

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Fakulta rybářství a ochrany vod**  
**Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

**Bakalářská práce**  
**Vliv chloridazonu na raná vývojová stádia raka**  
**mramorovaného**

**Autor:** Martin Řehořek

**Vedoucí bakalářské práce:** dr hab. Josef Velíšek, Ph.D.

**Konzultant bakalářské práce:** Ing. Alžběta Stará, Ph.D.

**Studijní program a obor:** Zootechnika, obor Ochrana vod

**Forma studia:** Prezenční

**Ročník:** 3

**České Budějovice, 2021**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské 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**

Tímto bych velice rád poděkoval především vedoucímu bakalářské práce dr. hab. Josefu Velíškovi Ph.D. a konzultantce Ing. Alžbětě Staré Ph.D. a dalším pracovníkům VÚRH ve Vodňanech za odborné vedení, pomoc a rady, které mi poskytovali během zpracování bakalářské práce.

# JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martin ŘEHOŘEK**  
Osobní číslo: **V18B031P**  
Studijní program: **B1601 Ekologie a ochrana prostředí**  
Studijní obor: **Ochrana vod**  
Téma práce: **Vliv chloridazonu na raná vývojová stádia raka mramorovaného**  
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický**

### Zásady pro vypracování

Růst spotřeby pesticidů v moderním světě budí stále větší obavy z vážného znečišťování prostředí, k němuž jejich používáním dochází. Pesticidy v minulosti zaujímaly významné místo v pořadí příčin havarijních úhynů ryb. V současné době přichází do úvahy skutečnost vlivu subletálních koncentrací pesticidů. V nižších koncentracích nemusí mít vždy bezprostřední dopad na rybní obsádku, ale mohou dlouhodobě negativně ovlivňovat nejranější vývojová stadia vodních organismů. Pro stanovení ekotoxikologického rizika pesticidů jsou základem údaje o toxicitě pro necílové organismy včetně bezobratlých. Cílem bakalářské práce je posouzení vlivu herbicidu chloridazonu na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). V rámci bakalářské práce bude proveden embryolární test toxicity na raku mramorovaném s chloridazonem. Během testu bude hodnocen vliv na mortalitu, růst, oxidativní stres a antioxidantní enzymy, ontogenetický vývoj a výskyt deformací raných vývojových stádií raka. Metodicky bude postupováno podle platných standardních metod a norem. Získané výsledky práce budou podkladem pro hodnocení rizika chloridazonu pro vodní bezobratlé organismy.

Rozsah pracovní zprávy: **30 – 50 stran**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

#### Seznam doporučené literatury:

- Bisewska, J., Sarnowska, E.I., Tukaj, Z.H., 2012. Phytotoxicity and antioxidative enzymes of green microalgae 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.
- 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.
- Vogt, G., 2011. Marmorkrebs: natural crayfish clone as emerging model for various biological disciplines. *Journal of Biosciences* 36: 377-382.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máčková, 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 rybníkáře. 2. upravené vydání, FROV JU, Vodňany, 658 s.
- Weber, G., Christmann, N., Thiery, A.C., Martens, D., Kubiniok, J., 2018. Pesticides in agricultural headwater streams in southwestern Germany and

effects on macroinvertebrate populations. Science of the Total Environment 619: 638-648.

Vedoucí bakalářské práce: dr. hab. Ing. Josef Velišek, Ph.D.  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

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

Datum zadání bakalářské práce: 7. ledna 2020

Termín odevzdání bakalářské práce: 3. května 2021

U. Z.   
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
děkan

L.S.

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

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Literární přehled</b> .....	<b>10</b>
2.1. Pesticidy .....	10
2.2. Herbicidy .....	13
2.3. Chloridazon .....	14
2.4. Raci .....	16
2.5. Morfologie a anatomie raků .....	17
2.6. Rak mramorovaný .....	18
2.7. Testy toxicity .....	21
2.8. Oxidativní stres.....	22
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	<b>24</b>
3.1. Embryolarvální testy toxicity .....	24
3.1.1. Princip a podmínky testu .....	24
3.1.2. Experimentální materiál .....	25
3.2. Průběh testu.....	26
3.3. Odběr vzorků.....	27
3.4. Chování raků .....	29
3.5. Biochemické metody stanovení biomarkerů.....	30
3.5.1. Stanovení enzymatické aktivity katalázy (CAT).....	31
3.5.2. Stanovení redukovaného glutathionu (GSH) .....	33
3.5.3. Stanovení enzymatické aktivity glutathion S – transferázy (GST).....	33
3.5.4. Stanovení aktivity glutathion reduktázy (GR) .....	34
3.5.5. Stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD).....	34
3.5.6. Stanovení lipidní prooxidace (TBARS) .....	35

3.5.7.	Metoda stanovení koncentrace proteinů (metoda BCA) .....	35
3.6.	Statistické vyhodnocení testu .....	36
<b>4.</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>37</b>
4.1.	Kumulativní mortalita .....	37
4.2.	Chování raků .....	37
4.3.	Makroskopické morfologické anomálie .....	39
4.4.	Růstové parametry .....	40
4.5.	Ontogenetický vývoj.....	42
4.6.	Biomarker oxidačního stresu .....	43
4.6.1.	Lipidní peroxiace (TBARS) .....	43
4.7.	Antioxidační biomarkery.....	44
4.7.1.	Superoxid dismutáza (SOD) .....	44
4.7.2.	Kataláza (CAT) .....	45
4.7.3.	Glutathion S-tranferáza (GST).....	46
4.7.4.	Glutathion reduktáza (GR) .....	47
4.7.5.	Redukovaný glutathion (GSH).....	48
<b>5.</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>Přehled použité literatury</b> .....	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>Abstrakt</b> .....	<b>62</b>
<b>9.</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>63</b>

# 1. Úvod

Pesticidy jakožto látky znečišťující životní prostředí jsou významným problémem především vodních ekosystémů, které velice často kontaminují v nemalém množství průmyslové, domácí nebo zemědělské chemické přípravky. Tyto přípravky se mohou šířit na regionální nebo globální úrovni (Worthing a Walker, 1983; Flynn a Spellman 2009). Pesticidní přípravky velice často ovlivňují i necílové organismy a mohou dramaticky zasáhnout do populací ryb a raků, což může vést až k ekologickým změnám ve vodním prostředí (Velíšek a kol., 2012, 2013; Stará a kol., 2012, 2013, 2014).

Rok 1939 je velice významným milníkem pro výrobu pesticidů. Jelikož doktor Paul Müller objevil u přípravku DDT (Dichlordifenyltrichlorethan) insekticidní účinky, DDT se stalo jedním z nejvyužívanějších pesticidů světa. Takto bylo DDT využíváno až do roku 1962, kdy byly popsány negativní vlivy přípravku DDT na ekosystémy (Carson, 1962).

V dnešní době registruje Americká chemická společnost (z angl. *American Chemical Society*) přes 62 milionů chemických látek, přičemž se přibližně 2 miliony komerčně využívají. Každoročně dochází k uvedení několika tisíc nových látek na trh (Velíšek a kol., 2014).

Vlivem navyšování produkce kukuřice a řepky dochází v posledních letech k výrazným změnám v rostlinné produkci, kde jsou tradiční plodiny, jako je obilí, nahrazovány energetickými plodinami. Díky těmto změnám v rostlinné produkci dochází i ke změnám ve využívání pesticidů, například herbicid acetochlor, u kterého se roční spotřeba pohybuje okolo 200 tun, což přispívá tomu, že je tento herbicid jedním z nejdetekovanějších v Severní Americe a Evropě (Foley a kol., 2008; ČHMÚ, 2019).

Již mnoho toxikologických výzkumů se věnovalo vlivu pesticidních přípravků na vodní organismy. Pokud bychom vyhledávali výsledky těchto výzkumů, tak bychom se většinou setkávali s výsledky krátkodobých studií, ve kterých se provádí například akutní testy toxicity. U těchto krátkodobých studií se vyhodnocuje vystavení jedinců vysokým koncentracím testovaných látek. Druhým typem jsou dlouhodobé testy toxicity, díky kterým získáváme mnohem přesnější informace o účincích pesticidních látek. V dlouhodobých testech vystavujeme organismy nižším koncentracím zkoumané látky. Při těchto dlouhodobých



studiích se provádí například embryolarvální testy, chronické testy a mnohé další. Díky těmto dlouhodobým studiím získáváme přesnější data o vlivu těchto látek na ekosystémy (Lahr a kol., 2000).

Bakalářská práce měla za cíl posoudit vliv chloridazonu na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Vliv chloridazonu jsme hodnotili podle řady faktorů, jako jsou biomarkery oxidačního stresu a antioxidační biomarkery, růst, mortalita, ontogenetický vývoj a chování raků. Získané výsledky z tohoto pokusu poslouží k rozšíření známých dat o působení chloridazonu na raky a vodní ekosystémy.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Pesticidy

Již v dřívějších dobách se lidé zajímali, jak vylepšit a ochránit před škůdci a chorobami své zásoby a zemědělské plodiny. K ochraně plodin a likvidaci hmyzu se již v Číně před 1000 lety před naším letopočtem používala síra v podobě plynné dezinfekce. Další pokrok nastal okolo roku 1400, a to když se začaly využívat k ochraně rostlin sloučeniny těžkých kovů, například olova, rtuti a arsenu. Další pokrok v používání insekticidů nastal v 15. století, kdy izolovali sloučeninu nikotinu z tabákových listů. A dále v 18. století zkoušeli využívat přírodních výtažků z kopretiny starčkolisté (*Chrysanthemum cinerariifolium*) (Cremlýn, 1978).

Celosvětové zemědělství prochází řadou změn a nových postupů v produkci, s čímž je spjatá intenzifikace zemědělství a tím se v posledních dvou desetiletích značně navýšila spotřeba pesticidů. S nadměrným využíváním pesticidů se ukázal významný problém, znečišťování životního prostředí. Tento problém je nejvíce pozorovatelný ve vodních ekosystémech, kde vede ke snížení produktivity a mnohdy až k mortalitě ryb. Pesticidy se objevují v potravinách nebo pitné vodě, kde se mohou nacházet ve zbytkovém množství, nebo ve formě metabolitů. Tyto látky mohou způsobovat velmi vážné zdravotní problémy pro lidské zdraví (Cerejeira a kol., 2003; Spalding a kol., 2003).

Výroba pesticidů a rozvoj syntetické chemie je spjat se začátkem 20. století. Konkrétně roku 1939 byly objeveny insekticidní účinky DDT (*Dichlordifenyltrichlorethan*) doktorem Paulem Müllerem. Tento insekticid se následně stal nejpoužívanějším pesticidem světa. Po více než dvou desetiletích v roce 1962 byl popsán negativní vliv DDT na ekosystém Rachel Carson v knize *Silent spring* (Carson, 1962). Vydání této knihy přispělo ke sledování vlivů pesticidů na živé organismy a monitoringu obsahu reziduí pesticidů v ekosystému. Po zjištění mnoha negativních vlivů došlo k sepsání Stokholmské úmluvy o perzistentních organických polutantech a zákazu používání těchto látek (Velíšek a kol., 2014).

Pesticidy jsou přípravky sloužící k likvidaci rostlinných a živočišných škůdců. Tyto přípravky používáme k ochraně rostlin, stromů, keřů, skladových zásob, technických produktů, zvířat a mnohých dalších (Zapletal a kol., 2001).

Pesticidy dělíme do několika skupin, a to s ohledem na jejich využití (Zapletal a kol., 2001):

- Rodenticidy-přípravky k hubení hlodavců.
- Akaricidy-přípravky k hubení roztočů.
- Fungicidy-prostředky k ochraně před houbovými chorobami.
- Avicidy-přípravky k hubení ptáků.
- Insekticidy-přípravky k hubení hmyzu.
- Piscicidy-přípravky k hubení ryb.
- Herbicidy-pesticidy k hubení rostlin.
- Moluskocidy-prostředky k hubení měkkýšů.
- Arboricidy-pesticidy k hubení stromů a keřů.

Pesticidy je možné dělit podle způsobu aplikace (Zapletal a kol., 2001):

- Mořidla.
- Pevné a tekuté nástrahy.
- Postřiky.
- Nátěry a impregnace.
- Aerosoly.
- Popraše.
- Fumiganty.

Dále se pesticidy mohou také dělit dle původu na (Zapletal a kol., 2001):

- Syntetické látky.
- Biopreparáty.
- Přírodní látky.

Po vstupu pesticidů do ekosystému dochází k jejich degradaci, jelikož jsou tyto látky ovlivňovány řadou fyzikálně chemických faktorů, mezi které řadíme: sluneční záření neboli fotolýzu, oxidaci vzdušným kyslíkem, jsou-li vystaveny vyšší teplotě, dochází k vypařování, ve vlhkém prostředí nastává hydrolýza, také může probíhat biotransformace. Během rozkladu

pesticidních přípravků vzniká řada metabolitů. Vzniklé metabolity mohou být mnohdy více toxičtější nebo u nich může nastat ztráta pesticidních účinků (Hajšlová a Kocourek, 2004). Během detoxikačního pochodu dochází u rostlin a živočichů k biotransformaci pesticidů. Enzymovými systémy, které dokáží velice účinně metabolizovat pesticidy, disponuje řada obratlovců, kterými jsou především ptáci a savci (Hudson a kol., 1984).

Během 20. století (mezi roky 1960–1980) tvořily pesticidy celkem 3–6 % případů otrav ryb z veškerých zkoumaných úhynů (Svobodová a kol., 1987). Koncem 20. století v 90. letech došlo k velkým změnám v zemědělství. Vzhledem k nástupu šetrného, ekologického zemědělství, nebo biozemědělství a vlivem ekonomických důvodů nastalo výrazné snížení spotřeby pesticidů. Začaly se využívat mnohem šetrnější přípravky k životnímu prostředí, čímž došlo ke snížení počtu otrav ryb pesticidy na pouhých 2 %. Během posledních let byly popsány jen ojedinělé případy úhynů ryb zapříčiněných únikem pesticidů do vodních recipientů (Svobodová a kol., 2011).

Po delší době v roce 2013 Česká inspekce životního prostředí zaregistrovala havárii práškovacího letadla do požární nádrže ve Žlunicích, kam uniklo přibližně 600 litrů organofosfátového insekticidu chlorpyrifos. Po této havárii byl zaznamenán úhyn mnoha kusů ryb v nádrži (ČIŽP, 2013). O rok později byl zaznamenán únik pesticidu NURELLE do levostranného přítoku řeky Doubravky. Při této havárii uhynulo více jak osm tisíc kusů raka říčního (*Astacus astacus*) a nespočet kusů střevle potoční (*Phoxinus phoxinus*) (ČIŽP, 2015).

Přesto jsou stále pesticidy ve vodách aktuálním tématem. Rozlišujeme dva druhy vstupů pesticidů do vodních ekosystémů, a to na přímé a nepřímé. Mezi nepřímé vstupy řadíme splachy pesticidů aplikovaných na okolní zemědělské kultury. A druhou skupinou jsou přímé vstupy, do kterých řadíme nesprávnou aplikaci, za niž může být považováno například nedodržování technologických postupů v rybářství, zasažení recipientu během leteckého ošetření přilehlých zemědělských ploch nebo únik látky při přečerpávání zředovací vody. Dále sem patří likvidace nevyužitých zbytků, do které řadíme neodbornou manipulaci s obaly, vyplachování cisteren do recipientu, čištění pomocných zařízení a aplikačních strojů. Mezi další velké přímé zdroje znečištění patří odpadní vody z průmyslové výroby pesticidů (Prousek, 2001; Svobodová a kol., 2008).

Musíme si uvědomovat, že během aplikace pesticidů dochází ke vstupu těchto látek do životního prostředí, kde se tyto látky mnohdy kumulují a ovlivňují vodní organismy.

V současnosti se klade důraz na využívání šetrnějších pesticidních přípravků k životnímu prostředí. Tyto přípravky nevytváří rezidua a dokážou se poměrně rychle rozkládat. A dále mají nižší negativní účinky na necílové organismy. V rybářství by se pesticidy měly aplikovat do vodního prostředí až v okamžiku, kdy selžou všechny jiné metody, jako je třeba mechanická likvidace porostu (Velíšek a kol., 2014).

Velice často nalézáme v povrchových vodách České republiky rezidua na bázi triazinů, chloracetalinidů, organofosfátů, karbamátů, derivátů močoviny a kyseliny fenoxycetové (Sehonová a kol., 2012).

## 2.2. Herbicidy

Herbicidy nazýváme přípravky, které se využívají k likvidaci nebo potlačování růstu plevelů (Zapletal a kol., 2001). Více než sto let se využívají chemikálie k hubení rostlin, které se vyskytovaly na železničních náspech, nedlážděných cestách nebo na plochách využívaných ke skladování dřeva. Na tato místa se aplikovaly poměrně vysoké dávky chemikálií (Whitten, 1966; Hartley a West, 1969).

Začátkem 20. století se začaly využívat v obilovinách rozpustné měďnaté soli a síran železnatý k potlačení růstu širokolistých plevelů. Selektivita je u těchto látek udána řadou fyzikálních faktorů. Aplikuje-li se postřik na plevely se širšími a hrubšími listy, má postřik mnohem větší účinky narozdíl od listů obilovin, které mají úzké a poměrně hladké listy, na kterých se pesticidy tím pádem hůře zachycují (Hartley a West, 1969).

V roce 1933 se ve Francii začal využívat jeden ze selektivních přípravků k hubení plevelů, nazýval se DNOK (2,4-dinitro-o-kresol(1;R=CH<sub>3</sub>)). Jednalo se o kontaktní herbicid aplikovaný postřikem na porosty obilovin, které významně nepoškodí, ale zároveň zničí mnoho jednoletých plevelů. U víceletých plevelů dojde ke zničení pouze nadzemní části a podzemní části dále přežívají, neboť tento přípravek není rostlinou rozváděn do kořenů. V dnešní době se tento herbicidní přípravek nepoužívá (Hartley a West, 1969).

Existuje řada herbicidů, které lze rozdělit do několika skupin podle různých specifikací. Vzhledem k jejich chemickému složení je můžeme rozdělit na organické a anorganické. Další skupina je dle rozsahu jejich účinků na rostliny. Dělíme je na totální herbicidy, které dokážou

zničit všechny druhy rostlin, jež jsou jimi zasaženy, a selektivní herbicidy, které mají vliv pouze na vybranou skupinu rostlin. Dle fyziologie působení dělíme herbicidy na systémové a kontaktní, které účinkují dotykem, srážejí bílkoviny a účinkují jako plazmatické jedy. Aplikovat se dají buďto preemergentní aplikací, která se uskutečňuje před vzejitím rostliny, nebo postemergentní aplikací jež je uskutečňována až po vzejití rostliny. Herbicidy mohou být aplikovány na půdu nebo povrch rostlin (Zapletal a kol., 2001).

Herbicidní přípravky mohou mít různé mechanismy účinků. Mohou způsobovat blokaci transportu elektronů během fotosyntézy a díky tomu inhibovat Hillovu reakci. Takto mohou účinkovat herbicidy na bázi triazinů a fenylmočoviny. Některé herbicidy jako nitroaniliny mohou ovlivňovat klíčivost semen plevelů. Fenoxalkanové kyseliny, nebo deriváty benzoových kyselin mohou ovlivňovat metabolismus nukleových kyselin, díky čemuž dochází k zastavení růstu u plevelných rostlin. Dalším účinkem může být katalýza tvorby hydroperoxidů mastných kyselin uvnitř buněčných membrán, přičemž nastává porušení procesu fotosyntézy. Toto může být způsobováno například desikanty (Hajšlová a Kocourek, 2004).

## 2.3. Chloridazon

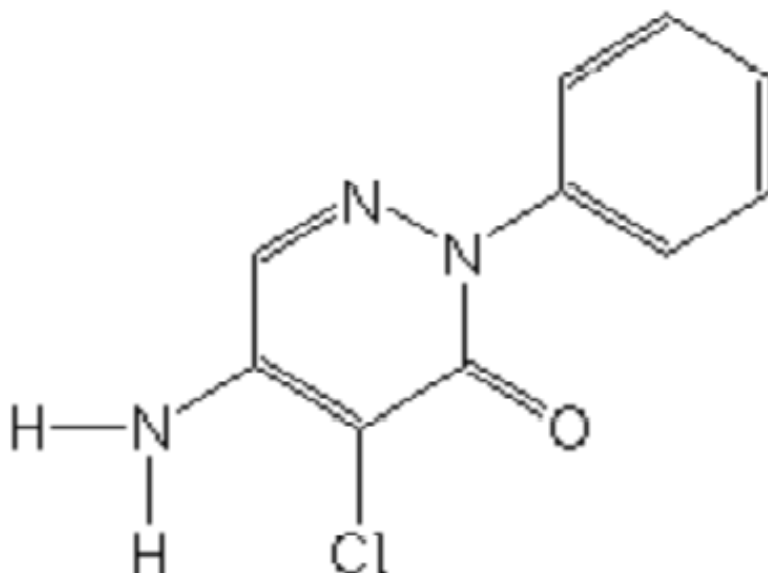
Chloridazon je herbicidní přípravek, chemicky ho lze vyjádřit jako 5-amino-4-chloro-2-phenyl-3(2H)-pyridazinone, nebo sumárním vzorcem  $C_{10}H_8ClN_3O$  (Obr. č. 1), jeho majoritní metabolity jsou chloridazon desphenyl a chloridazon methyl-desphenyl (ČHMÚ, 2020). V roce 1963 byl tento přípravek patentován americkou společností BASF. Tento herbicid řadíme do pyridazinonové třídy pesticidů. U zelených rostlin inhibuje fotosyntézu, jelikož blokuje transport elektronů uvnitř fotosystému II (PubChem, 2020).

Toxicita herbicidu chloridazonu (ČHMÚ, 2020):

- LC50 = 132 mg/l hrotnatka velká (*Daphnia magna*).
- LC50 = 39 mg/l pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*).
- LD50 = 2800 mg/l potkan (*Ratus ratus*).

Vlastnosti látky (ČHMÚ, 2020):

- Molekulová hmotnost: 221,6457 g/mol.
- Bod tání: 206 °C.
- Poločas rozpadu: 10 – 133,7 dne.
- Rozpustnost ve vodě: 340 – 422 mg/l.
- ADI (akceptovatelný denní příjem podle WHO): 0,16 mg/kg tělesné hmotnosti/den.



Obr. č. 1. Strukturní vzorec chloridazonu (ČHMÚ, 2020).

Tento herbicid se využívá především na polích k likvidaci plevelů, kde se pěstuje krmná řepa, červená řepa a cukrová řepa. Na trhu je k dostání jak ve formě kapaliny, tak smáčitelného prášku (PubChem, 2020).

Chloridazon je obsažen například v přípravcích Largo (s obsahem účinné látky 300 g/kg), Burex 430 DKV (430 g/kg), Betoxon 65 WDG (650 g/kg). V České republice bylo spotřebováno v roce 2016 celkem 26 709,3 kg této látky (ČHMÚ, 2020). Chloridazon aplikujeme buďto před

výsadbou, nebo před vzejitím, nebo těsně po vzejití semen. Většinou se aplikační dávka pohybuje mezi 1,6-3,3 kg/ha (Worthning a Walker, 1983).

Evropské předpisy povolují pro herbicidy maximální hodnoty, které se smějí vyskytovat ve vodách. Pro jednotlivé herbicidy, nebo metabolity, které z nich vznikají, je stanoven limit 0,1 µg/l a pro součet jednotlivých herbicidů a jejich metabolitů je stanovena limitní hodnota 0,5 µg/l (GWD, 2006). Chloridazon se vyskytuje v řadě evropských zemí, kde byly naměřeny koncentrace do 3,5 µg/l. Metabolity chloridazonu byly detekovány v hodnotách 24 µg/l (chloridazon desphenyl) a 6,1 µg/l (chloridazon methyl-desphenyl) (Schuhmann a kol., 2016). V České republice chloridazon nacházíme v povrchových vodách v hodnotách 0,1 – 4,34 µg/l a v podzemních vodách 0,67 µg/l (ČHMÚ, 2019).

## 2.4. Raci

Sladkovodní raky zařazujeme mezi korýše, do řádu Decapoda a infrařádu Astacida (mnohdy taktéž Astacoida). Infrařád je dělen do několika nadčeledí: Enoplometopoidea, Nephropoidea, Astacoidea, Parastacoidea. Do nadčeledi Enoplometopoidea a Nephroidea zařazujeme mořské humry, do nadčeledi Astacoidea a Aparastacoidea řadíme sladkovodní raky. Byl potvrzen monofyletický původ sladkovodních raků díky novodobým genetickým metodám, díky čemuž nemusí utvářet dvě samostatné nadčeledi, ale pouze jedinou, která je tvořena ze tří čeledí. Na jižní polokouli nacházíme čeleď Parastacidea, na severní polokouli se vyskytují čeledi Astacidea a Cambaridea. Tyto dva zeměpisně izolované rody, *Pasifastacus* ze severozápadu Severní Ameriky a *Cambaroides* z Dálného východu Asie, vytvářejí významný problém v dělení vyšších taxonů raků. Jelikož jsou odděleny od center diverzit svých čeledí, představují tak biogeografický problém. Dále není zcela znám ani fylogenetický vztah k rakům severní polokoule. V současnosti je známo více než 600 druhů raků, ale počet není konečný, jelikož stále nalézáme nové druhy (Kozák a kol., 2013).

Zástupci skupiny desetinožých korýšů mají poměrně velký areál rozšíření, ale i tak nalezneme území, kde se tato skupina korýšů nevyskytuje: kontinentální Afrika, Antarktida a větší část Jižní Ameriky a Asie (Hobbs, 1988).



V nearktické zoogeografické oblasti (hlavně v jihovýchodní části Severní Ameriky), žije převážná část račích druhů. Z čeledi Cambaridae je jich známo přes 400 druhů. Mezi další významné centrum výskytu řadíme australskou oblast, kde se nachází přes 150 druhů převážně z čeledi Parastacidae. V evropské části nalézáme pouze tři původní druhy raků, které řadíme do rodu *Astacus*, a dva druhy z rodu *Austropotamobius*. Také dochází k výskytu nepůvodních druhů raků, jež jsou často velice agresivní a také se invazivně šíří. V evropských vodách se v dnešní době vyskytuje více než deset nepůvodních druhů. Velice vážný problém představují severoamerické druhy raků, kteří přenášejí račí mor. Tato nemoc představuje vážný problém pro původní evropské druhy (Holdich a kol., 2009; Filipová a kol., 2011; Jaklič a Vrezec, 2011).

## 2.5. Morfologie a anatomie raků

Tělo raka je pokryto exoskeletem, který kryje tělní články. Exoskelet je tvořen jednotlivými články se 4 destičkami: břišní (sternit), hřbetní (tergit) a dva boční (pleurity). Spojuje je měkká membrána s jejíž pomocí se dokážou velmi dobře pohybovat. Račí tělo obsahuje i klouby jimiž jsou spojeny končetiny a zadečkové články (Zarenkov, 1982).

Krunýř raka se nenachází na povrchu těla, ale pod vrstvou kutikuly a je vylučován pokožkou nazývanou hypodermis (Zarenkov, 1982). Při svlékání starého krunýře dochází i ke svlékání části kutikuly. Jelikož starý krunýř obsahuje velké množství cenných látek vhodných k obnově nové kutikuly, je tedy rakem po svlečení požírán (Lowery, 1988; Reynolds, 2002). Typické zbarvení těla u jednotlivých druhů zajišťují pigmenty, které jsou obsaženy v krunýři (Kozák a kol., 2013).

Raky řadíme do řádu desetinožců (*Decapoda*), u kterých je typickým znakem přítomnost 5 párů kráčivých končetin. Mohutná klepeta nalezneme na prvním páru. Tento počet párů končetin není přesný, každý jedinec má párů končetin celkem 19, kam se započítávají tykadla, ústní a zadečkové končetiny. Tělo rozdělujeme na dvě části: zadeček (pleon, abdomen) a hlavohruď (cephalothorax) (Kozák a kol., 2013).

Hlavohruď se skládá ze 13 tělních článků, 5 hlavových a 8 hrudních. Karapax neboli hlavohrudní krunýř pokrývá boky hlavohrudi až po báze nohou (Kozák a kol., 2013). Mezi jedny

z hlavních rozlišovacích znaků račích druhů řadíme tvar rostra (čelního trnu), které vzniká vybíháním karapaxu mezi očima (Hobbs, 1987). Dalším znakem jsou dva páry postorbitálních lišt, které se nachází na hřbetní části karapaxu za očima raků (Souty-Grosset a kol., 2006; Kozák a kol., 2009; Štambergová a kol., 2009).

Zadeček je zřetelně článkovaný a je dělen na šest krátkých a širokých článků. Tyto články spojuje měkká membrána a pohyblivé klouby po stranách. Tělo raka zakončuje plochá ocasní destička (telson), která nenesou žádné končetiny, jelikož není pravým tělním článkem. Ocasní destička vznikla vychlípnutím předchozího článku zadečku. Na spodní straně tohoto článku se nachází řitní otvor (Kozák a kol., 2013).

Raci dýchají žábry, ty jsou pokryté velmi slabou a jemnou vrstvou kutikuly, která brání efektivnímu prostupu plynů, jelikož je tělo raků pokryto krunýřem, přes který nedochází k pronikání látek do těla a zpět, je přímá difuze kyslíku a výměna plynů umožněna pouze přes membrány kloubů a spodinu zadečku (Zarenkov, 1982).

Raci jsou gonochoristé, jejich pohlavní orgány jsou umístěny dorsálně v hlavohrudí mezi žaludkem a spodinou srdeční dutiny (Kozák a kol., 2013). Během růstu raků dochází k řadě svlékání a obdobím mezi svlékáním (Lowery, 1988). Rak rychle přibývá na hmotnosti a na délce těla v období po svlékání. Mezi svlékáními nedochází ke konstantnímu růstu. Dále se liší rychlost růstu u jednotlivých druhů raků, u pohlaví a také záleží na každém jedinci, jaké má růstové schopnosti. S věkem také dochází ke snížení četnosti svlékání a procentuálnímu přírůstku. V neposlední řadě také ovlivňuje svlékání řada faktorů, jež dělíme do dvou skupin: abiotické (fotoperioda, teplota, chemismus vody a jiné) a biotické (potrava, substrát, hustota populace, predace atd.) (Kozák a kol., 2013).

## 2.6. Rak mramorovaný

Rak mramorovaný (*Procambarus virginalis*, Obr. č. 2) dorůstá většinou do velikosti 10 cm, výjimečně až do 13 cm. Dožívá se poměrně krátkého věku. Laboratorně chovaní raci žijí přibližně 2 roky. Pouhá jedna desetina jedinců se dožije více jak 3 let. U tohoto druhu je znám také nejdéle žijící jedinec, který dosáhl věku 4,5 roku. Velice často dojde k úhynu během svlékání, pokud při něm nastanou komplikace (Pöckl a kol., 2006; Vogt, 2010).

Tělo zástupců tohoto druhu je zbarveno do typického mramorování buď na hnědavém, nebo zeleném podkladě. Nejviditelnější je na bocích hlavohrudi. Hlavohrud' raka mramorovaného je hladká, na ní se nachází za týlní brázdou a párem postorbitálních lišt několik trnů. Sbíhající okraje výrazného rostra utváří malý trojúhelníkový vrcholek. Klepeta jsou poměrně malá, na povrchu velice slabě zrnitá a na horní a spodní straně nemají viditelné mramorování. Dále na vnitřní straně zápěstí vyrůstá mohutný trn, který ojediněle přesahuje klepeta o 50 % délky hlavohrudi (Holdich a kol., 2006).



Obr. č. 2. Rak mramorovaný (*Procambarus virginalis*).

U tohoto druhu raka nejsou známi samci, protože se rozmnožuje prostřednictvím partenogeneze. Plodí pouze samice, díky čemuž je potomstvo geneticky identické (Scholtz a kol., 2003; Vogt a kol., 2004b; Martin a kol., 2007). Probíhaly i snahy o zvrát pohlaví, kde docházelo k exponování samčího pohlavního hormonu 17 – methyl testosteronu z vyvíjejících vajíček i ráčat, ale ani tato snaha nezaznamenala žádné samce (Vogt, 2007).

V 25.–35. týdnu dochází k dospívání samic. V tomto věku dosahuje délka těla přibližně 40 mm. Mají-li raci dobré podmínky, dokážou se v chovech rozmnožovat v průběhu roku i opakovaně, a to v intervalech 8-9 týdnů. U samic vzrůstá plodnost podle jejich velikosti. U malých samic se plodnost pohybuje mezi 50-150 vajíčky. Větší samice mohou plodit až 400 vajíček (Holdich a kol., 2006; Vogt, 2010). V přírodě můžeme nalézt i samice, které mají až 500-700 vajíček (Jones a kol., 2009; Chucholl a Pfeiffer, 2010). Průměrná velikost vajíček je mezi 1,5-1,9 mm s inkubační dobou 2-3 týdny (Seitz a kol., 2005; Holdich a kol., 2006). Ráčata jsou

přichycena na samičích pleopodech, poté co se dvakrát svléknou, začínají přijímat potravu a dochází k jejich osamostatňování (Vogt a Tolley, 2004a; Vogt, 2008a).

Díky výše uvedeným vlastnostem má rak mramorovaný velký potenciál stát se modelovým druhem organismu v mnoha studiích, například ve vývojových neurobiologických, cytologických, toxikologických a epigenetických studiích, jelikož rychle dospívá, dorůstá a má vysokou plodnost, krátkou dobu inkubace a geneticky uniformní potomstvo (Vogt, 2008b, 2010, 2011). A i díky těmto vlastnostem je tento druh raka velmi oblíbený mezi akvaristy. Ti ale musí v poměrně krátké době řešit problém s jeho potomstvem, proto většina z nich sahá po vypuštění raka do volné přírody než k přímé likvidaci, což vede k fatálním problémům, pokud vezmeme v potaz partenogenetické rozmnožování a rizikovost těchto raků jakožto přenašečů račího moru (Jimenez a Faulkes, 2011).

Původně rak mramorovaný obýval ekosystémy na Floridě a Georgii (Taylor a kol., 2007; Dorn a Volin, 2009), kde není známá partenogeneticky se rozmnožující forma. Prvotně byla tato forma popsána až v Evropě ve druhé polovině 90. let 20. století, kde byla dostupná v rakouských a německých obchodech (Lukhaup, 2001). Nezodpovědnost chovatelů vedla ke vzniku životaschopných populací raka mramorovaného ve volných vodách Evropy. V Evropě se zatím vyskytuje v Nizozemí (Koese, 2008), Itálii (Marzano a kol., 2009), Německu (Marten a kol., 2004; Schulz a kol., 2009; Martin a kol., 2010) a Slovensku (Janský a Mutkovič, 2010). Řada modelů v dnešní době ukazuje na to, že jen malá část Evropy nabízí příznivé životní podmínky, které podporují další šíření (Feria a Faulkes, 2011). Dále byl tento druh raka zavlečen na Madagaskar (Jones a kol., 2007, 2009; Kawai a kol., 2009) a i do Japonska (Kozák a kol., 2013). V Severní Americe hrozí proniknutí tohoto druhu raka mimo původní areál výskytu, jelikož je ve velkém množství nabízen v internetových obchodech (Faulkes, 2010).

Nejlépe se mu daří při teplotách 18 – 25 °C. Několik týdnů dokáže přežít jak při nižších teplotách pod 8 °C, tak i nad 30 °C. Při těchto teplotách ovšem zastavuje svůj růst a reprodukci. V Evropě se vyskytuje i na lokalitách, které zamrzají, z čehož vyplývá, že se jedná o relativně tolerantní a velice adaptabilní druh (Holdich a kol., 2006; Kaldre a kol., 2012).

Raci jsou v ekosystému významným bentickým druhem bezobratlých a jsou vnímáni jako vhodné modelové organismy (Momot, 1995; Buřič a kol., 2013). Jelikož jsou v České republice původní druhy raků chráněny (Kozák a kol., 2011), proto se pro testy toxicity volí invazivní druhy, jako je rak mramorovaný (Kouba a kol., 2014). V dnešní době se preferují v testech

toxicity bezobratlí živočichové na rozdíl od obratlovců (Velíšek a kol., 2014). To už v roce 1959 popsali biologové William Russell a Rex Burch koncept **3R** (*Replace, Reduce, Refine*). Hlavním cílem je co nejvíce omezit využívání pokusných zvířat a pokusit se je nahradit alternativními metodami testování. Tato vize má tři části. První obsahuje nahrazování (*replacement*), kde se upřednostňuje náhrada alternativními metodami, pokud výsledky jsou stejné nebo lepší než na laboratorním zvířeti. Dále u tohoto bodu je požadavek na přednostní využívání nižších organismů v testech. Ve druhé části se zabývají snižováním (*reduction*) počtu zvířat, které se využívají v pokusech, a to formou na méně zvířat, ale více nebo stejně informací. A třetí část se zabývá zjemněním (*refinement*) a zmírněním utrpení a bolesti využívaných zvířat (Russell a Burch, 1959).

## 2.7. Testy toxicity

Testy toxicity na vodních organismech se využívají k hodnocení vlivu a dopadu látek na ekosystém, nově vyvinutých chemických látek a přípravků, klasifikaci odpadů nebo dále na hodnocení odpadních vod, případně i k určování původců havarijních znečištění vody. Rozlišujeme mnoho druhů testů toxicity, které lze rozdělit do několika skupin. Mezi nejčastěji využívané patří (Velíšek a kol., 2014):

- Testy na úrovni buněk a tkání.
- Testy na úrovni organismů.
- Testy na úrovni biocenóz.

Testy toxicity lze využít k hodnocení různých kritérií testovaných látek. Mohou se sledovat letální účinky (mortality, úhyn organismů), nebo subletální účinky (ovlivňování růstu, životních funkcí aj.). Specificky se můžeme zaměřit i na účinky, které působí na organismy například mutageně, imunotoxicky nebo genotoxicky. Látka nemusí mít jen jeden účinek, ale zároveň může mít i několik rozdílných účinků současně. Také se mohou lišit účinky látky podle délky působení. Například mutagenita, nebo genotoxicita se mnohdy projeví až po chronické expozici nebo u následujících generací (Maršálek, 2002).

Z dat, která jsme získali z testů toxicity, musíme vypočítat dané parametry, které lze následně porovnávat a hodnotit. Do hodnot, které získáváme přepočtem, řadíme například EC

(efektivní koncentraci). Při stanovení efektivní koncentrace testované látky může v organismu nastat například inhibici růstu, změna metabolické aktivity, změna chování atd. Hodnota LC (letální koncentrace) je hodnota, která zapříčiní úhyn testovaných organismů. Hodnota IC (inhibiční koncentrace) dokáže ovlivnit inhibici růstu, pohybu atd. Výslednou hodnotu nazýváme LD (letální dávka) nebo ED (efektivní dávka) (McNaught a Wilkinson, 1997; Landis a Yu, 2003).

Již zmíněné hodnoty se udávají jako hodnota EC50, LC50, IC50. Takto udávané hodnoty: letální, inhibiční a efektivní koncentrace toxikantu znamenají, že byla zachycena reakce u 50 % testovaných organismů. Tyto hodnoty lze určit několika způsoby, nejpoužívanější metodou je probitová analýza. Dalšími hodnotami používanými v toxikologii jsou NOEC a LOEC. NOEC (z angl. *No Observed Effect Concentration*) je nejvyšší testovaná koncentrace zkoumané látky, u níž nenastal statisticky významný vliv na sledovaný organismus. Významně je na tom podobně i hodnota NOEL (z angl. *No Observed Effect Level*) a též hodnota LID (z angl. *Lowest Ineffective Dilution*). Právým opakem hodnoty NOEC je hodnota LOEC (z angl. *Lowest Observed Effect Concentration*), která udává nejnižší koncentraci toxické látky, u které bylo možno pozorovat statisticky významný účinek. Velice podobným druhem jsou indexy NOAEL (z angl. *No Observed Adverse Effect Level*), u kterých nemusí být brány pozorované účinky za nežádoucí (McNaught a Wilkinson, 1997; Landis a Yu, 2003).

Výsledky z testů toxicity a hodnoty sledovaných látek v životním prostředí využíváme k posuzování enviromentálních rizik. Rizikovitost látky závisí na citlivosti organismů na tuto látku a koncentraci látky v ekosystému (Kočí, 2002).

## 2.8. Oxidativní stres

Oxidativní stres nastává, pokud dojde k porušení rovnováhy mezi volnými radikály a antioxidanty (Sies, 1991). Mohou ho způsobovat tři faktory. Prvním faktorem může být zvýšení reaktivních druhů kyslíku (ROS), druhým faktorem je zhoršení antioxidantních systémů a třetím nedostatečná kapacita, která by byla schopna napravit oxidační poškození. ROS mohou způsobovat řadu buněčných makromolekulárních změn například u membránových lipidů, proteinů, anebo DNA. Vlivem poškození může také dojít k přeměně funkcí některých buněk,

změnami intracelulárního vápníku nebo intracelulárního pH. V krajním případě může nastat i buněčná smrt (Kehrer a kol., 1990; Swann a kol., 1991).

Naopak antioxidační systémy zahrnují jak nápravu antioxidačního poškození, tak i odstraňování volných kyslíkových radikálů, čímž chrání organismus před oxidačním stresem. O redukci ROS se starají antioxidační enzymy, kterými jsou například superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza, nebo glutathion reductáza. Dále se na redukci volných radikálů podílejí další látky, kterými jsou například vitamíny C a E a glutathion (Di Giulio a kol., 1993).

Volnými radikály nazýváme atomy, molekuly, nebo ionty, které dokážou samostatně existovat. V jejich elektronovém obalu nalezneme jeden nebo více nepárových elektronů. Jsou velice reaktivní, jelikož se pokouší o získání dalších elektronů, aby byly schopny doplnit elektronový pár a byly tak schopny stabilní konfigurace. Další volné radikály vznikají z reakcí mezi volnými radikály a s intaktními molekulami. Na jejich vzniku se podílejí i enzymy, jako je například NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát) – oxidáza, která katalyzuje tvorbu volných radikálů uvnitř buněk. Mohou také vznikat neenzymovými ději, jako je například ionizující záření (Racek a Holeček, 1999).

K odstraňování volných radikálů, jako je superoxidový anion  $O_2^-$ , slouží superoxid dismutáza, která  $O_2^-$  přetváří na molekulární kyslík ( $O_2$ ) a peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) (Di Giulio a kol., 1993). Peroxid vodíku je dále rozkládán peroxizomální katalázou (CAT) na vodu a kyslík, nebo je redukován glutathion peroxidázou. Z peroxidu vodíku mohou vznikat volné hydroxylové radikály, ale to za podmínky, že se vyskytují v přímé blízkosti kovů, například Fe, Co, Cu atd. Tyto hydroxylové radikály se přemění na molekulu vody následkem napojení na další elektron (Racek a Holeček, 1999).

## 3. Materiál a metodika

Účinek expozice herbicidu chloridazonu na raná vývojová stadia raka mramorovaného byl hodnocen za využití embryolarvalního testu toxicity. Experiment byl prováděn v akvarijní místnosti laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie, která sídlí v budově Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech, ústav je součástí FROV JU.

### 3.1. Embryolarvalní testy toxicity

Vodní organismy řadíme k nejpoužívanějším druhům, které jsou využívány k testům toxicity. Velice často se k testům využívají ryby, korýši, měkkýši, vodní rostliny, řasy a bakterie. Způsob provedení většiny testů je velmi podobný. Testy toxicity mají významnou podmínku, kterou je rozpustnost látky ve vodě. Nebo je také možné pro testování použít výluhy vzorků z pevného skupenství (Velíšek a kol., 2014).

Ze skupiny necílových vodních organismů velice často volíme zástupce korýšů (*Crustacea*). Jelikož korýši se nacházejí téměř po celém světě, díky čemuž jsou velice významnou skupinou živočišné říše (Velíšek a kol., 2014). Jelikož jsou raci významným bentickým druhem, jsou vnímány jako vhodné modelové organismy (Momot, 1995, Buřič a kol., 2013). A dalším hlediskem, proč právě volíme raky, je snaha postupovat v testech toxicity v souladu s pravidly **3R** (*Replace, Reduce, Refine*) (Velíšek a kol., 2014).

#### 3.1.1. Princip a podmínky testu

Princip embryolarvalních testů na racích je velice podobný embryolarvalním testům, které jsou prováděny na rybách. Test je postaven na vystavení raných vývojových stádií raka mramorovaného koncentrační řadě zkoumané látky, v našem případě chloridazonu. Test je započat v momentě umístění oplozených vajíček do plastových makrodesek. Délka testu není jednotná, jelikož závisí na druhu raka a teplotě vody, v našem případě test trval 50 dní.



Během testu je nezbytné provádět krmení čerstvě vylíhnutými naupliemi žábřonožky solné (*Artemia salina*, Obr. č .3). Dále je nezbytné dodržet hodnoty chemických parametrů vody, jako je nasycení vody kyslíkem, pH a teplota vody. A také určené hodnoty koncentrací zkoumané látky. Již během testu zjišťujeme subletální a letální účinky. Ty je však nezbytné porovnávat s kontrolní skupinou. Dále během testu sledujeme mortalitu, růst a výskyt malformací.



Obr. č. 3. Nádoba s naupliemi žábřonožky solné (*Artemia salina*).

### 3.1.2. Experimentální materiál

V experimentu byl použit chloridazon od firmy Sigma – Aldrich Corporation (USA) o čistotě 99,8 %. Dále byly v testu využity vajíčka raka mramorovaného (*Procambarus viriginialis*) v X stádiu embryolarválního vývoje o průměrné hmotnosti 2,74 mg. Vajíčka byla získána od dvou samic raka mramorovaného, které měly délku karapaxu 37,84 mm a 36,55 mm a hmotnost 15,62 g a 14,98 g.

### 3.2. Průběh testu

K testu bylo využito 210 vajíček v desátém stádiu embryolarválního vývoje, které jsme získali od dvou samic. Vajíčka jsme rozdělili do pěti skupin. Ve čtyřech skupinách byl obsažen chloridazon a v páté skupině pro kontrolu čistá voda. Každá skupina obsahovala 42 jedinců, které jsme umístili jednotlivě do plastových makrodesek (Obr. č. 4).



*Obr. č. 4. Jedinci raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*), umístění v makrodeskách v laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie.*

První koncentrace E1 = 2,7  $\mu\text{g/l}$ , což je maximální reálná koncentrace naměřená v českých řekách (ČHMÚ, 2019), E2 = 27  $\mu\text{g/l}$ , E3 = 135  $\mu\text{g/l}$ , E4 = 270  $\mu\text{g/l}$ . Tři nejvyšší testované koncentrace odpovídaly 10, 50 a 100násobku reálné koncentrace. Z důvodu zajištění shody mezi nominálními a skutečnými koncentracemi chloridazonu ve vodě byly vzorky vody

podrobeny chemické analýze za použití kapalinové chromatografické tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS) a za dodržení metodiky Reemtsma a kol., (2013). Získané hodnoty nebyly odlišné od nominálních hodnot o více než o 9 %. Stanovení koncentrace chloridazonu nebylo součástí této práce a toto stanovení bylo provedeno formou zakázky.

Během testu docházelo v laboratoři k periodickému střídání světla a tmy v poměru 12:12 hodin a třikrát týdně (pondělí, středa a pátek) probíhala výměna roztoků, jelikož se jednalo o semistatický test. Fyzikálně chemické parametry vody v průběhu testu byly následující:

- Teplota:  $21,1 \pm 0,5$  °C.
- Rozpuštěný kyslík:  $> 5,25$  mg/l.
- pH: 7,7 – 8,0.
- $\text{KNK}_{4,5}$ : 0,71 mmol/l.
- $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$ : 0,92 mg/l.
- Celkový amoniak: 0,013 mg/l.
- Suma  $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ : 6,21 mg/l.

Teplota byla sledována pomocí Minikin loggerů (Environmental Measuring Systems, Brno, Česká republika). Dále probíhalo každý den měření nasycení kyslíkem, pH a sledování svlékání raků a mortality. Krmení raků bylo zajištěno jednou denně čerstvě vylíhlými naupliemi žábřonožky solné. Test byl ukončen 50. den expozice.

### 3.3. Odběr vzorků

Během experimentu jsme v pravidelných intervalech sledovali vývoj, mortalitu a tělesnou hmotnost, kterou jsme zjišťovali na analytických vahách (obr. č. 5), ale až dva dny poté, kdy se jedinec raka svlékl, z důvodu zajištění lepší odolnosti krunýře před poškozením. Růstové parametry jsme vyhodnotili na závěr testu. K tomuto vyhodnocení jsme použili ukazatele: specifickou rychlost růstu (SGR) a inhibici růstu (I).



Obr. č. 5. Vážení jedinců raka mramorovaného (*Procambarus viriginalis*) na analytických vahách.

Specifickou rychlost růstu lze definovat jakožto podíl rozdílu průměru přirozených logaritmů hmotností jedinců raků, které jsme poprvé zvážili 12. den testu a následně pak na konci testu 50. den. K výpočtu jsme využili vzorec:

$$SGR = \frac{\overline{\ln w_2} - \overline{\ln w_1}}{t_2 - t_1} \cdot 100$$

Kde:

SGR = průměrná specifická rychlost růstu ve skupině;

$W_1, W_2$  = hmotnosti jednoho raka v čase  $t_1$  a  $t_2$ , jednotlivě (g);

$t_1$  = čas (dny) – začátek expozice;

$t_2$  = čas – konec expozice.

Inhibice specifické rychlosti růstu vyjádříme jako podíl mezi rozdílem průměrné specifické rychlosti růstu kontrolní skupiny raků a experimentální skupiny raků a průměrné specifické rychlosti růstu u kontrolní skupiny. To vše po 50 dnech expozice chloridazonem, na závěr vynásobené stem. Výpočet lze provést za využití vzorce:

$$I_x[\%] = \frac{SGR_x(\text{control}) - SGR_x(\text{group})}{SGR_x(\text{control})} \cdot 100$$

Kde:

I = inhibice specifického růstu v experimentální skupině po 50 dnech expozice;

SRG (kontrola) = průměrná specifická rychlost růstu v kontrolní skupině raků;

SRG (skupina) = průměrná specifická rychlost růstu v experimentální skupině raků po 50 dnech expozice.

Po ukončení testu byla provedena analýza chování (viz kap. 3.4.), po této analýze byl proveden odběr vzorků pro biochemické analýzy. Odebrané vzorky jedinců byly zamrazeny v tubách (v tekutém dusíku) a následně byly využity ke stanovení hladiny oxidačního stresu a aktivity antioxidantních enzymů. Tyto ukazatele byly stanovovány z celotělních homogenátů raků.

### 3.4. Chování raků

Po ukončení testu, který probíhal 50 dní, byl u jedinců raků proveden behaviorální test, ve kterém se sledují rozdíly chování mezi experimentálními skupinami a kontrolou. V tomto testu došlo k rozdělení ráčat do plastových misek s 50 ml roztoku odpovídající dané skupině. Následně proběhlo pozorování a zachycení chování raků po dobu jedné hodiny (obr. č. 6) za využití videokamery (Sony HDR-CX240E, Sony, Japan).

Získaný materiál byl analyzován softwarem EthoVision® XT 13 (Noldus Information Technology, Wageningen, Nizozemsko). Mezi sledované hodnoty řadíme čas, který raci strávili pohybem – aktivita (s), rychlost chůze (cm/s) a vzdálenost (cm).



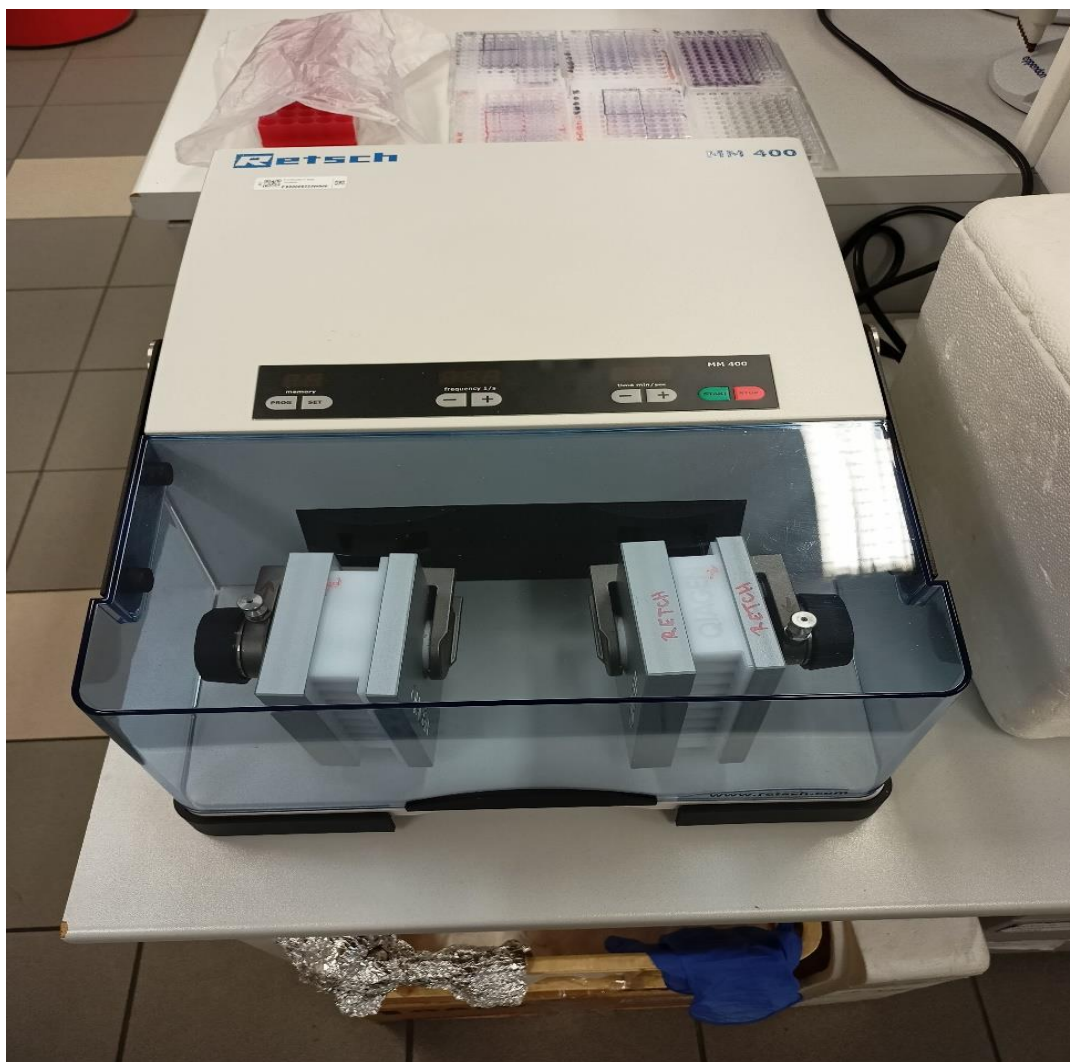
*Obr. č. 6. Pozorování a zaznamenávání chování jedinců raka mramorovaného (*Procambarus viriginalis*).*

### **3.5. Biochemické metody stanovení biomarkerů**

Před vlastními biochemickými analýzami bylo nejprve nutné provést homogenizaci těl, díky čemuž jsou vzorky z raků připraveny k vlastní analýze.

Před začátkem homogenizace jsme zamražené vzorky zvážili a poté jsme zahájili homogenizaci 1:10 w/v. S přidáním 50 mM fosfátového pufru (PBS) o neutrálním pH 7.2, který obsahoval: NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Homogenizaci jsme prováděli na homogenizátoru (Retsch MM 400, Německo) (obr. č. 7). Část vzniklého homogenátu jsme

použili pro měření lipidní peroxidace, druhou část jsme použili pro měření antioxidantních biomarkerů. Vzorky takto připravených homogenátů byly uchovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do samotného zpracování vybraných analýz.



*Obr. č. 7. Homogenizátor využívaný k přípravě vzorků.*

### **3.5.1. Stanovení enzymatické aktivity katalázy (CAT)**

Kataláza je významný enzym antioxidantní ochrany proti radikálům. Způsob stanovení je založen na účinku katalázy na rozložení peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Během této metody zaznamenáváme úbytek peroxidu vodíku za jednotku času. Měření aktivity katalázy provádíme metodou podle Aebi (1984). Vzorky byly po rozmrazení promíchány a centrifugovány po dobu

30 minut při 30 000 rpm a 4 °C. Měření jsme prováděli na spektrofotometrickém přístroji Tecan Infinite M200 (Švýcarsko) (obr. č. 8).

Vzorek jsme připravili napipetováním 50  $\mu$ l PP pufru, který jsme naředili 50  $\mu$ l supernatantu vzorku, a vše promíchali. Dále jsme smíchali v mikrotitrační destičce 50  $\mu$ l roztoku, ke kterému jsme přidali 0,09 %  $H_2O_2$  (250  $\mu$ l) mikropipetou. Takto připravený vzorek jsme umístili do spektrofotometru, kde jsme měřili absorbanč při 240 nm, 1 minutu v 5sekundových intervalech a získanou hodnotu katalázy zaznamenali jako  $\mu$ mol  $H_2O_2$  min/mg proteinů.



*Obr. č. 8. Spektrofotometr Tecan Infinite M200, s dalším laboratorním vybavením sloužící ke stanovování biomarkerů, v tomto případě katalázy.*



### 3.5.2. Stanovení redukovaného glutathionu (GSH)

Principem stanovení GSH je reakce thioselektivní Ellmanovy reagensie (DTNB; 2,2-dinitro-5,5-dithiobenzoová kyselina) s volnými -SH skupinami za tvorby barevného produktu. Stanovení proběhlo podle metodiky Ellman (1959).

Vzorek byl po rozmrznutí promícháván a umístěn v mikrozkušavkách do centrifugy po dobu 15 minut (10 000 rpm, 4 °C). Z každé zkumavky bylo odebráno 180 µl supernatantu vzorku a přidáno 18 µl 25 % kyseliny trichloroctové. Poté byl vzorek nechán 15 minut odstát při pokojové teplotě a následně byl umístěn opět do centrifugy na 10 minut (8 000 rpm, 4 °C). Poté proběhlo vlastní měření GSH. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 50 µl vzorku, 190 µl TRIS pufru a 10 µl 0,02 M DTNB. Absorbance byla měřena na spektrofotometru při 420 nm proti blanku a pozadí při 680 nm. Získanou hodnotu GSH zaznamenáváme jako nmol GSH/mg proteinů.

### 3.5.3. Stanovení enzymatické aktivity glutathion S – transferázy (GST)

Metoda spočívá v detekci konjugátu, jenž se nachází mezi redukovaným glutathionem a CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen), který je běžným substrátem pro běžné izoformy glutathion transferázy. Vyhodnocení se provádí spektrofotometricky podle metodiky Habig a kol. (1974).

Vzorek homogenátu byl po rozmražení 15 minut centrifugován (10 000 rpm, 4 °C) a vyředěn homogenizačním PBS pufrem v poměru 1:4 (60 µl PBS a 15 µl vzorku). Dále jsme přepipetovali 10 µl zředěného supernatantu na mikrotitrační destičku, poté jsme pipetou přidali k supernatantu 180 µl PBS a 10 µl 50 mM CDNB v ethanolu a vše důkladně promíchali. Po přidání 50 µl 10 mM redukovaného GSH substrátu došlo k rozběhnutí reakce. Poté jsme před umístěním vzorku do spektrofotometru museli provést třísekundové protřepání. Měření probíhalo po dobu 5 minut při 340 nm. Hodnotu GST jsme vyjádřili směrnicí křivky, od které jsme odečetli směrnici blanku a poté dosadili do rovnice a výslednou hodnotu zaznamenali v nmol/min/mg proteinu.

### **3.5.4. Stanovení aktivity glutathion reduktázy (GR)**

Glutathion reduktáza má velký význam při přeměně oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) a na spotřebu NADPH, kde působí jako katalyzátor. Aktivitu GR vyhodnocujeme podle úbytku množství NADPH v reakci za využití spektrofotometru podle metodiky Carlberg a Mannervik (1975).

Po rozmrznutí byl vzorek promícháván a centrifugován po dobu 15 minut (10 000 rpm, 4 °C). Pro stanovení aktivity GR musíme nejprve napipetovat 180 µl supernatantu vzorku a přidat 80 µl GR pufru, 20 µl GSSG, 20 µl NADPH a 30 µl destilované vody. Připravený vzorek jsme protřepávali po dobu 20 sekund a poté umístili vzorek do spektrofotometru, kde jsme 2 minuty měřili při 340 nm spotřebu NADPH. Mikrodestičku jsme znovu umístili do spektrofotometru a měřili 5 minut v intervalech 15 sekund při 340 nm. Výslednou hodnotu GR jsme vyjádřili v nmol NADPH/min/ml proteinů.

### **3.5.5. Stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD)**

Superoxid dismutázy řadíme do skupiny metaloenzymů jelikož obsahují ionty kovů (Zn, Mn, Cu, Ni). Tyto kovy jsou obsaženy ve struktuře a jsou zodpovědné za jejich aktivitu. Superoxid dismutázy nacházíme ve všech buňkách. Nejvíce jich nalézáme v játrech. Podstata jejich funkce je katalýza přeměny reaktivních superoxidových radikálů na peroxid vodíku a molekulový kyslík, díky čemuž zastávají podstatnou roli v kontrole hladiny superoxidů uvnitř buňky (Öztürk-Ürek a kol., 2001).

Podstatou metody je schopnost SOD inhibovat reakce, které jsou řízené superoxidy. K produkci superoxidů využíváme systémů NADH a phenazin methosulfonát (PMS). Superoxidy, které jsme takto získali, lze stanovit za využití NBT (nitrobluetetrazolium), u kterého dojde po reakci k přeměně na stabilní formazonový produkt, který již dokážeme spektrofotometricky měřit. Za využití této metody určíme pokles NBT. Vše provádíme podle metody Marklund a Marklund (1974).

Rozmrzlý vzorek homogenátu byl centrifugován po dobu 30 minut (30 000 rpm, 4 °C). Vzorek jsme připravili přepipetováním 25 µl supernatantu z celotělního homogenátu do mikrodestičky. Do tohoto vzorku byl dodán homogenizační pufr, NADH s NBT o objemu

200  $\mu$ l. Poté jsme provedli spektrofotometrické měření o celkové délce 2 minut s dvacetisekundovými intervaly při 560 nm. Následně vlivem po přidání 25  $\mu$ l PMS byla zahájena reakce a poté provedeno 5minutové měření kinetické reakce v intervalech 20 sekund při 560 nm. Výsledky byly vyjádřeny jako aktivita SOD v nmol NVT/min/mg proteinů.

### **3.5.6. Stanovení lipidní prooxidace (TBARS)**

Lipidní peroxidaci zjišťujeme za využití TBARS testu (thiobarbituric acid reactive substance = látky, které dokážou reagovat s kyselinou thiobarbiturovou – TBA). Tato metoda je založena na stanovení barevných aduktů, které měříme. Barevné adukty vznikají při reakcích produktů lipidní peroxidace a kyseliny barbiturové. Pro toto stanovení bylo vycházeno z metodiky Luschk a kol. (2005).

Lipidní peroxidace byla stanovena z necentrifugovaného vzorku homogenátu (250  $\mu$ l), ke kterému jsme přidali 12,5  $\mu$ l  $\text{FeSO}_4$  a ponechali 30 minut při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Následně ke vzorku byl přidán roztok TCA–BHT (kyselina trichloroctová – butylovaný hydrotoluen) v poměru 250  $\mu$ l : 75  $\mu$ l. Takto připravený vzorek byl po dobu 20 minut centrifugován při 4000 rpm a teplotě 4  $^{\circ}\text{C}$ . Po centrifugaci jsme přepipetovali 250  $\mu$ l vzorku do mikrozkuřavky, kam jsme dále přidali 200  $\mu$ l TRIS – TBA a 50  $\mu$ l HCl. Takto upravený vzorek jsme umístili do termobloku na 45 minut při teplotě 90  $^{\circ}\text{C}$ . Po uplynutí 45 minut jsme nechali vzorek vychladit a následně přepipetovali 250  $\mu$ l do mikrotitračních destiček a provedli měření na spektrofotometru, kde jsme měřili při 550 nm a při 590 nm vzniklé zbarvení. Zjištěné hodnoty jsme vyjádřili jako nmol TBARS/mg proteinů.

### **3.5.7. Metoda stanovení koncentrace proteinů (metoda BCA)**

Koncentrace proteinů byla stanovena podle metodiky Lowry a kol. (1951). Nejdříve bylo zředěno 30  $\mu$ l každého vzorku pomocí 0,1 M NaOH (1:20). Připravený vzorek byl po dobu 24 hodin ponechán při pokojové teplotě. Z každého vzorku bylo přepipetováno 10  $\mu$ l do mikrotitrační destičky a přidáno 200  $\mu$ l A (roztok sodné soli kyseliny bicinchoninové) + B ( $\text{CuSO}_4$ ) pufru (v poměru 26,54 ml A pufru ku 0,54 ml B pufru). Destička byla poté přetažena plastickou fólií a umístěna na 30 minut do termoboxu s teplotou 37  $^{\circ}\text{C}$ . Poté byla okamžitě

přemístěna do spektrofotometru a měřena při 562 nm oproti blanku. Z naměřených hodnot jsme z kalibračního grafu zjistili hodnotu trendu a z ní vypočítali hodnotu proteinu pro vzorek vyjádřenou v mg/ml.

### **3.6. Statistické vyhodnocení testu**

Rozdíl v kumulativní mortalitě jedinců zkoumaných skupin a kontrolních skupin jsme vyhodnotili za využití tzv. kontingenčních tabulek. Před zahájením analýzy bylo nezbytné provést u veškerých zjištěných proměnných kontrolu normality (Kolmogorovův – Smirnovův test) a homoscedasticitu rozptylu (Bartlettův test). Po splnění těchto podmínek byla využita jednosměrná ANOVA, díky které jsme vyhodnotili možnou existenci významných rozdílů analyzovaných proměnných mezi zkoumanými skupinami a kontrolní skupinou. Vyskytl-li se rozdíl, byl využit test Tukey Unequal N HSD. Pokud nebylo možné využít ANOVU, využilo se neparametrického testu (Kruskal – Wallis).

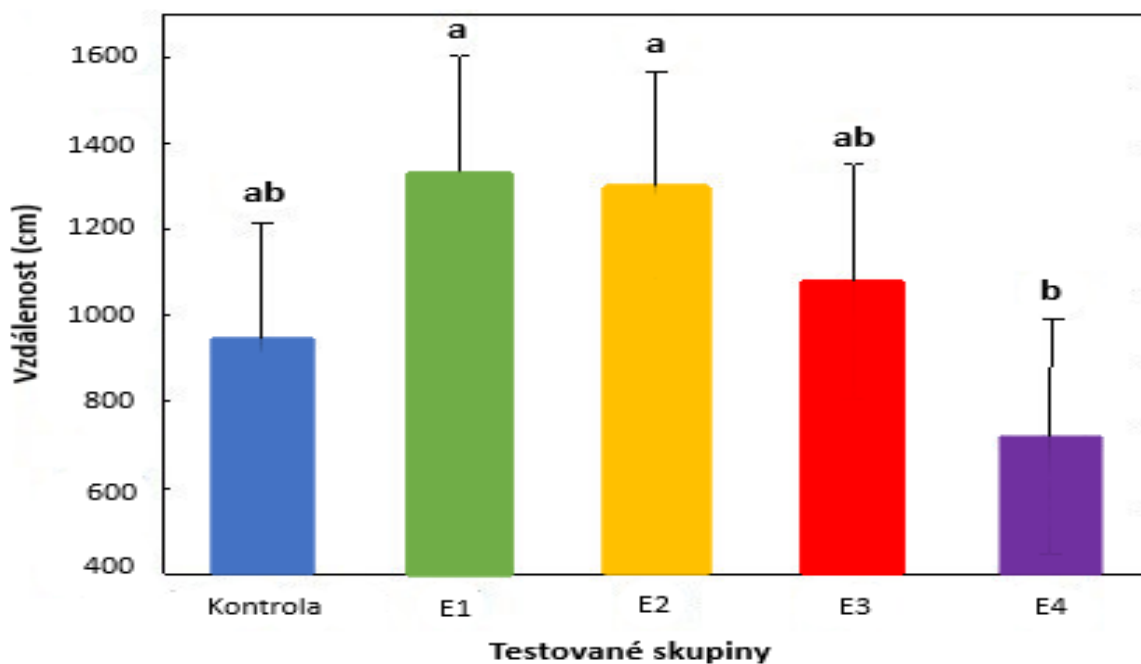
## 4. Výsledky

### 4.1. Kumulativní mortalita

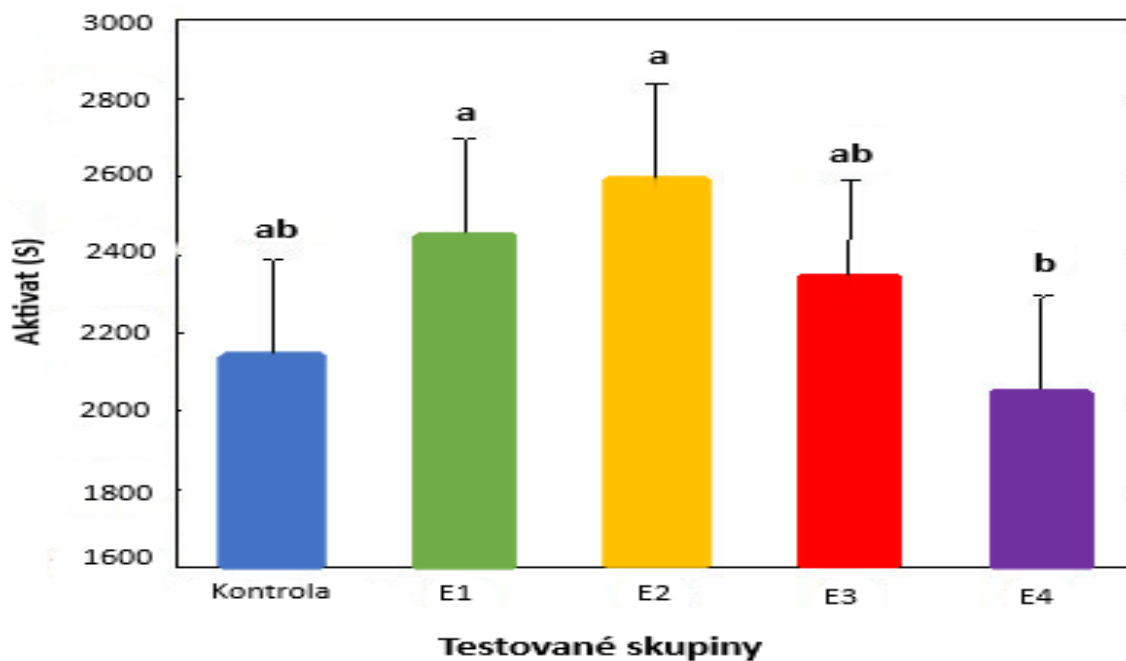
Kumulativní mortalita zjišťovaná mezi skupinami nevykazovala žádné statisticky významné rozdíly. U skupin raků, které byly vystaveny chloridazonu, byla zaznamenána úmrtnost při koncentracích: E1 = 2,7 µg/l (16,5 %), E2 = 27 µg/l (13,5 %), E3 = 135 µg/l (12 %), E4 = 270 µg/l (13 %) a v kontrolní skupině činila 14 %.

### 4.2. Chování raků

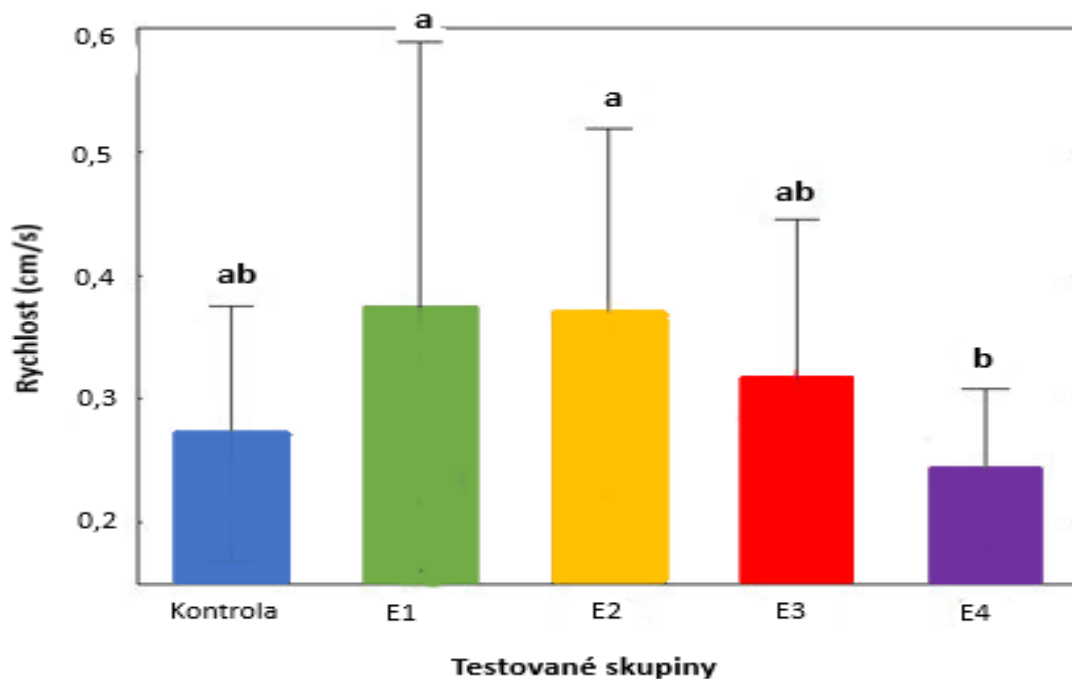
Na konci testu (50. den expozice) byla sledována pohybová aktivita, rychlost chůze a celkově ušlá vzdálenost raných vývojových stádií raka mramorovaného v jednotlivých experimentálních skupinách exponovaných čtyřem koncentracím chloridazonu (E1 = 2,7 µg/l, E2 = 27 µg/l, E3 = 135 µg/l, E4 = 270 µg/l) ve srovnání s kontrolou. U raků vystavených chloridazonu nebyly zjištěny žádné signifikantně významné změny v chování ve srovnání s kontrolou. Statisticky významný ( $P < 0,05$ ) rozdíl byl zaznamenán pouze u skupiny E4, kde došlo ke snížení celkové pohybové vzdálenosti (graf č. 1), aktivitě (graf č. 2) a rychlosti chůze (graf č. 3) oproti skupinám E1 a E2 .



Graf č. 1. Celková pohybová vzdálenost (cm) raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*), který byl vystaven padesátidenní expozici chloridazonu (2,7  $\mu\text{g/l}$ , 27  $\mu\text{g/l}$ , 135  $\mu\text{g/l}$  a 270  $\mu\text{g/l}$ ). Indexy a, b popisují shodu, nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami.



Graf č. 2. Aktivita (%) raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*), který byl vystaven padesátidenní expozici chloridazonu (2,7  $\mu\text{g/l}$ , 27  $\mu\text{g/l}$ , 135  $\mu\text{g/l}$  a 270  $\mu\text{g/l}$ ). Indexy a, b popisují shodu, nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami.



Graf č. 3. Změna rychlosti pohybu v (cm/s) raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*), který byl vystaven padesátidenní expozici chloridazonu (2,7 µg/l, 27 µg/l, 135 µg/l a 270 µg/l). Indexy a, b popisují shodu, nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami.

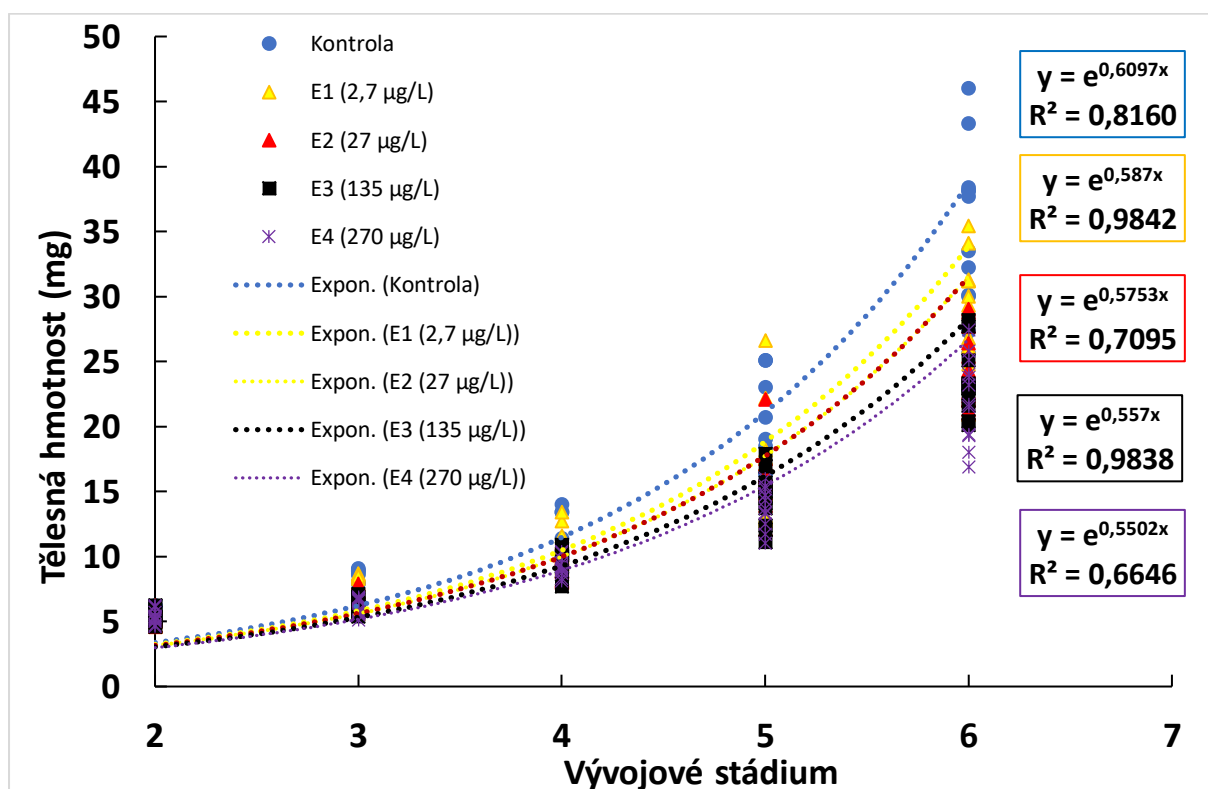
### 4.3. Makroskopické morfologické anomálie

V průběhu padesátidenního testu jsme nezaznamenali žádné makroskopicky viditelné morfologické anomálie u ranných vývojových stádií raků mramorovaných vystavených chloridazonu.

## 4.4. Růstové parametry

Porovnání tělesné hmotnosti těl raných vývojových stádiích raků během expozice chloridazonu je popsána v grafu č. 4. Reálná koncentrace chloridazonu E1 = 2,7 µg/l neměla statisticky významný ( $P < 0,05$ ) vliv na růst raků mramorovaných. U zbylých tří sledovaných koncentrací nastalo od 4. stadia vývoje významné snížení hmotnosti ( $P < 0,01$ ) oproti kontrole (100 %). U koncentrace E2 byly zjištěny snížené hodnoty na 75 %, u E3 na 68 % a u E4 na 63 %.

Specifická rychlost růstu (SRG) a inhibice růstu (I) u sledovaných skupin, které byly vystaveny padesátidennímu působení chloridazonu, je zaznamenáno v tabulce č 1. Inhibice růstu raků oproti kontrole byly u E1 = 9,03 %, E2 = 12,85 %, E3 = 14,07 % a u E4 = 19,28 %.



Graf č. 4. Srovnání tělesných hmotností raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) vystaveného chloridazonu (2,7 µg/l, 27 µg/l, 135 µg/l, 270 µg/l) po dobu 50 dnů.



Tabulka č. 1. Specifická rychlost růstu a inhibice růstu raných vývojových stadií raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) po expozici chloridazonem.

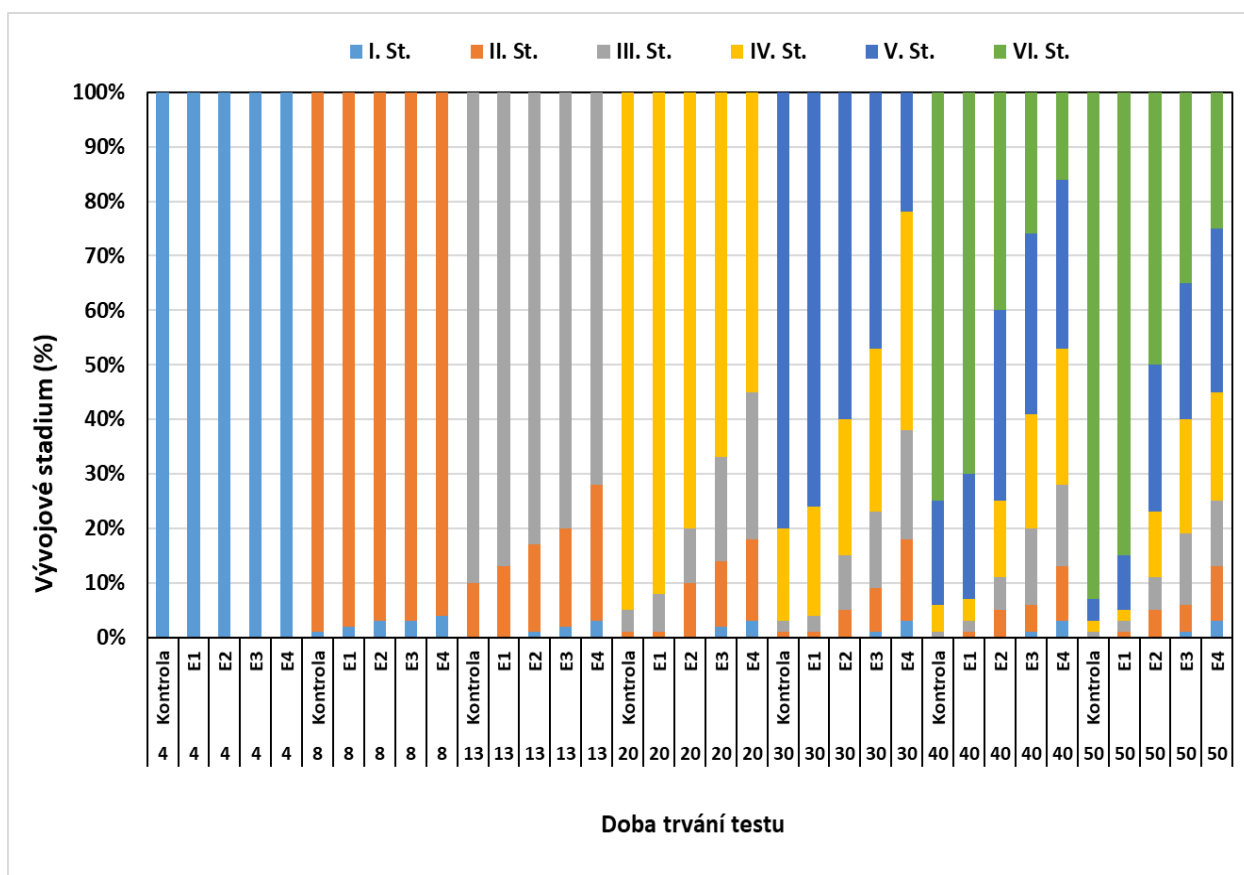
Skupina	Kontrola	E1	E2	E3	E4
Chloridazon ( $\mu\text{g/L}$ )	0	2.7	27	135	270
$M_{12}$ ( $X \pm SD$ , mg)	$7,04 \pm 1,09^a$	$6,97 \pm 0,85^a$	$6,82 \pm 0,61^a$	$6,25 \pm 0,52^a$	$6,10 \pm 0,55^a$
$M_{50}$ ( $X \pm SD$ , mg)	$45,40 \pm 7,82^a$	$38,68 \pm 3,92^{ab}$	$36,61 \pm 7,96^b$	$32,37 \pm 5,91^b$	$29,01 \pm 7,37^c$
SGR	$4,98 \pm 0,23^a$	$4,53 \pm 0,31^{ab}$	$4,34 \pm 0,2^b$	$4,28 \pm 0,41^b$	$4,02 \pm 0,38^b$
I (%)	$0,0^a$	$9,03 \pm 0,42^{ab}$	$12,85 \pm 0,39^b$	$14,06 \pm 0,58^b$	$19,28 \pm 0,71^b$

Poznámka:  $M_{12}$ ,  $m_{50}$  = průměrná hmotnost raků vybrané skupiny 12 a 50 den expozice; SGR = specifická rychlost růstu vybrané skupiny po 50 dnech expozice;

I = inhibice specifické rychlosti růstu vybrané skupiny po 50 dnech expozice; SD = směrodatná odchylka. Horní indexy a,b vyznačují rozdíl, nebo shodu u hodnot mezi jednotlivými skupinami ( $P < 0,05$ ).

## 4.5. Ontogenetický vývoj

Reálná koncentrace chloridazonu vyskytující se v životním prostředí E1 = 2,7 µg/l neměla vliv na ontogenetický vývoj raků. Počínaje 13. dnem jsme zaznamenali signifikantně významné ( $P < 0,01$ ) opoždění ontogenetického vývoje raků vystavených třem nejvyšším koncentracím (E2 = 27 µg/l, E3 = 135 µg/l, E4 = 270 µg/l) chloridazonu oproti kontrole. Na konci testu bylo 93 % jedinců v kontrolní skupině a 85 % jedinců ve skupině E1 v šestém stupni vývoje. U skupiny E2 se nacházelo 27 % jedinců v pátém stupni vývoje a 50 % v šestém stupni vývoje, u E3 bylo 25 % jedinců v pátém stupni a 32 % jedinců v šestém stupni vývoje. U skupiny E4 bylo 30 % jedinců v pátém stupni a 25 % v šestém stupni vývoje. Ontogenetický vývoj raků během testu je znázorněn v grafu č. 5.

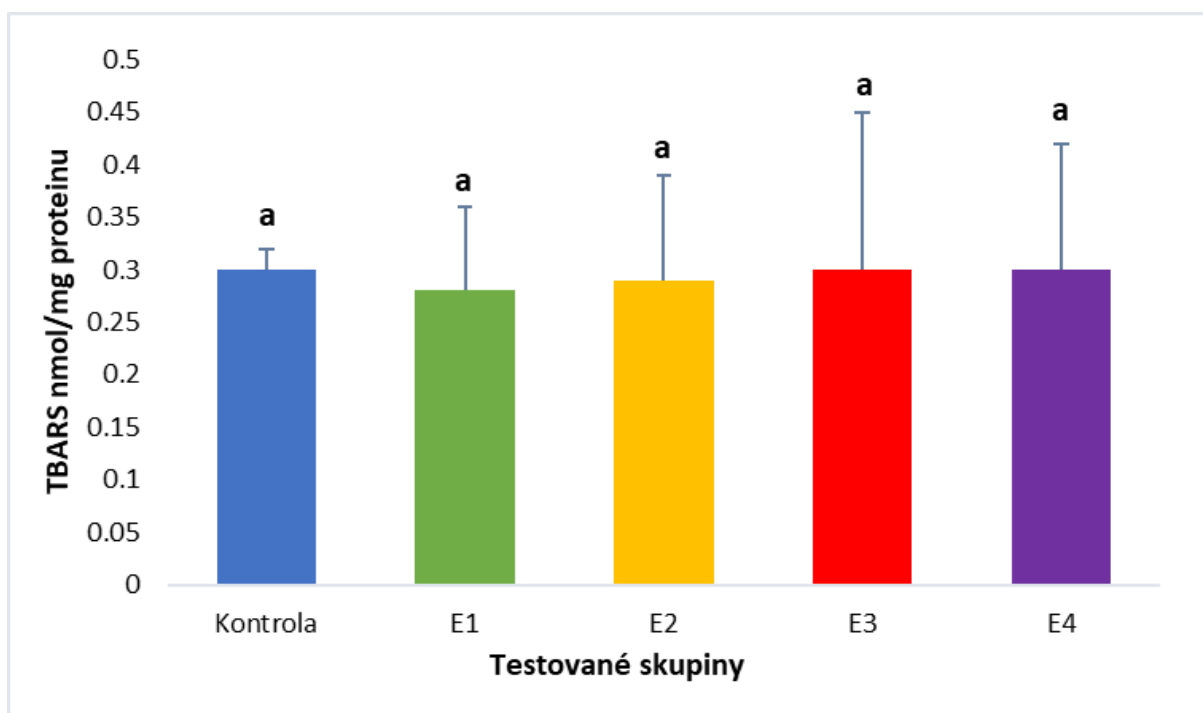


Graf č. 5. Vliv chloridazonu na ontogenický vývoj raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*).

## 4.6. Biomarker oxidačního stresu

### 4.6.1. Lipidní peroxiace (TBARS)

Vliv chronického působení chloridazonu na hladinu TBARS v celotělním homogenátu raka mramorovaného je zaznamenán v grafu č. 6. Expozice chloridazonu neměla statisticky významný ( $P < 0,05$ ) vliv na hladinu TBARS v celotělním homogenátu raků mramorovaných.

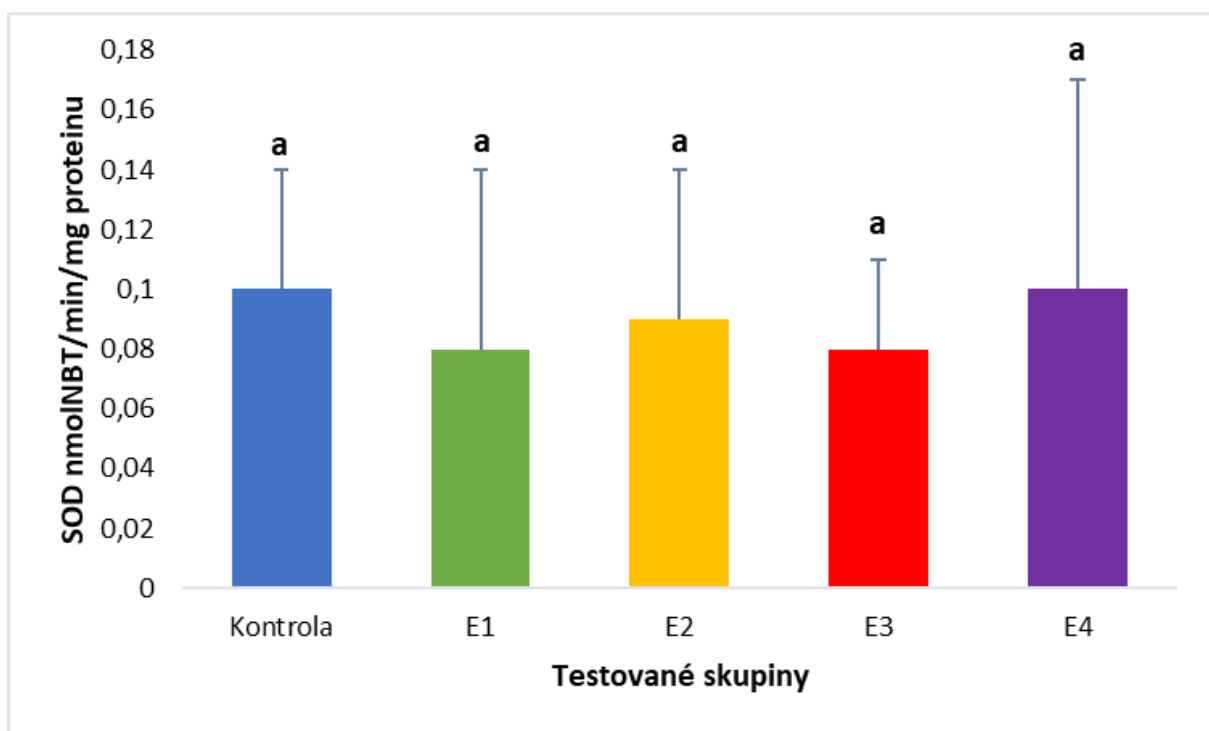


Graf č. 6. Vliv padesátidenního působení chloridazonu v koncentracích: 2,7  $\mu\text{g/l}$ , 27  $\mu\text{g/l}$ , 135  $\mu\text{g/l}$  a 270  $\mu\text{g/l}$ , na hladinu lipidní peroxidace v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Indexy a, b popisují shodu, nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ( $P < 0,05$ ).

## 4.7. Antioxidační biomarkery

### 4.7.1. Superoxid dismutáza (SOD)

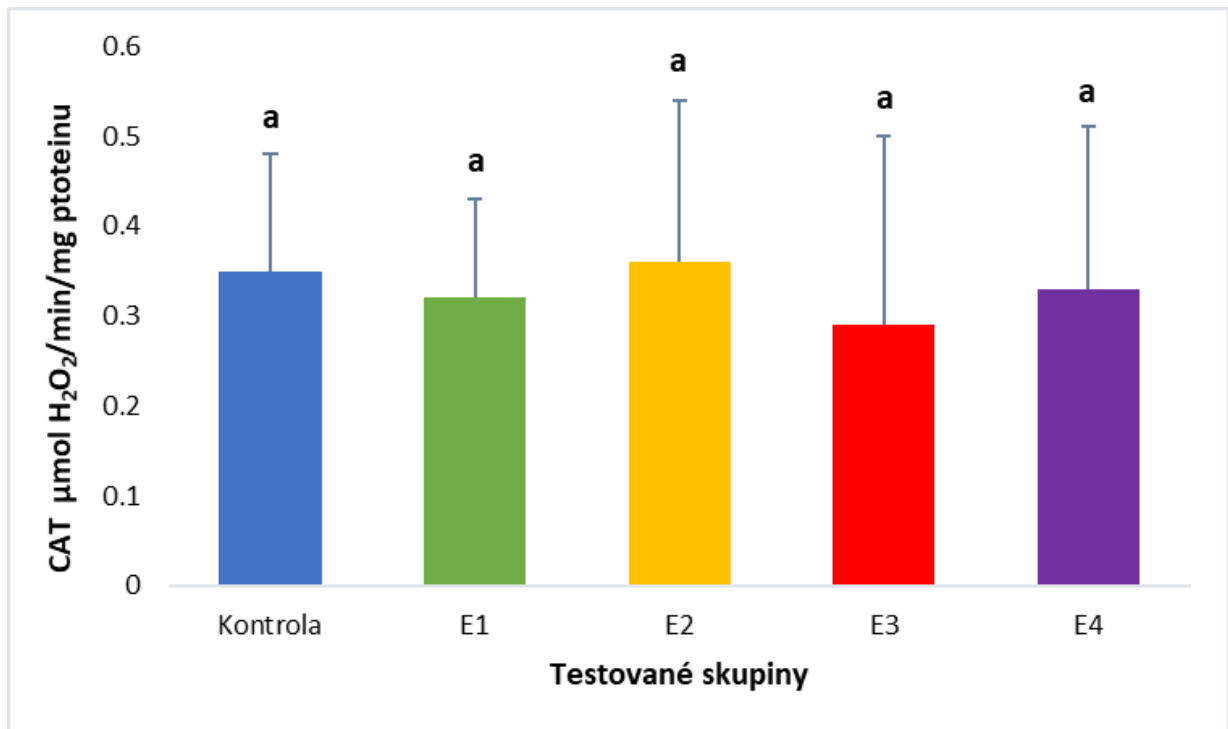
Vliv chronického působení chloridazonu na aktivitu superoxid dismutázy je zaznamenán v grafu č. 7. Expozice chloridazonu neměla statisticky významný ( $P < 0,05$ ) vliv na aktivitu SOD v celotělním homogenátu raků mramorovaných.



Graf č. 7. Vliv padesátidenního působení chloridazonu v koncentracích: 2,7  $\mu\text{g/l}$ , 27  $\mu\text{g/l}$ , 135  $\mu\text{g/l}$  a 270  $\mu\text{g/l}$ , na aktivitu superoxid dismutázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Indexy a, b popisují shodu, nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ( $P < 0,01$ ).

#### 4.7.2. Kataláza (CAT)

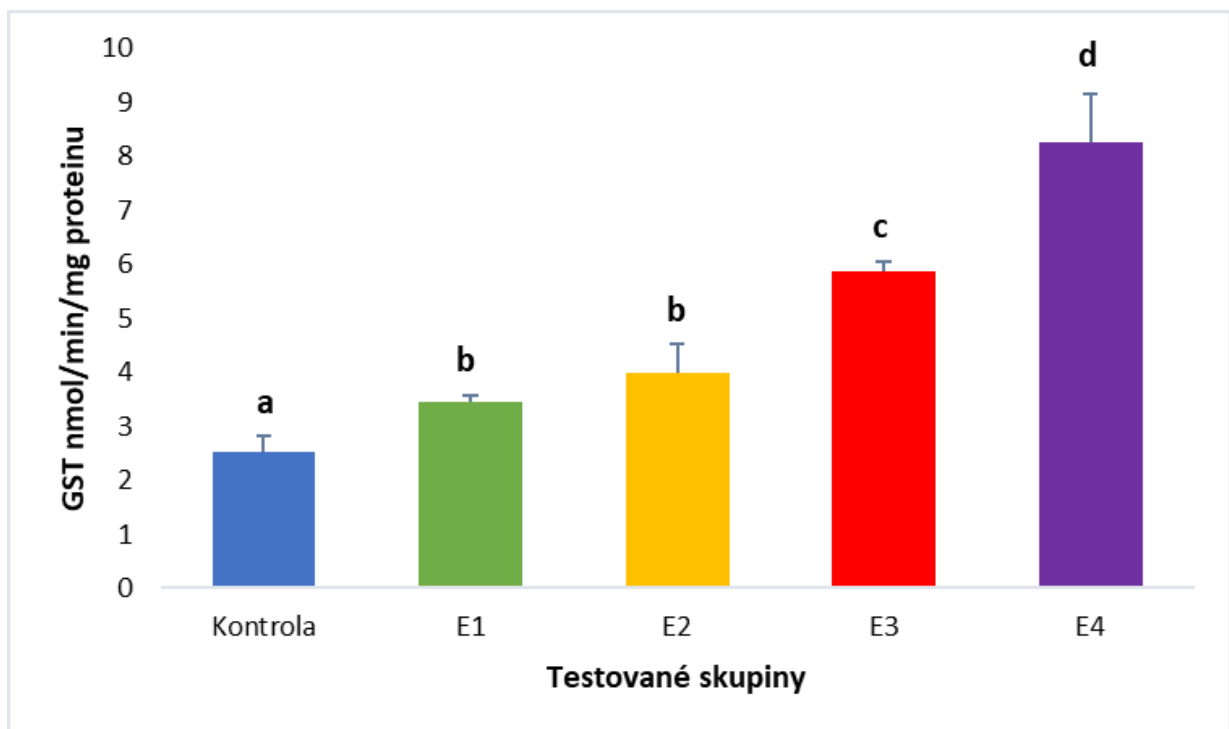
Vliv chronického působení chloridazonu na aktivitu CAT v celotělním homogenátu raka mramorovaného je zaznamenán v grafu č. 8. Expozice chloridazonu neměla statisticky významný ( $P < 0,05$ ) vliv na aktivitu CAT v celotělním homogenátu raků mramorovaných.



Graf č. 8. Vliv padesátidenního působení chloridazonu v koncentracích: 2,7  $\mu\text{g}/\text{l}$ , 27  $\mu\text{g}/\text{l}$ , 135  $\mu\text{g}/\text{l}$  a 270  $\mu\text{g}/\text{l}$ , na aktivitu katalázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Indexy a, b popisují shodu, nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ( $P < 0,05$ ).

### 4.7.3. Glutathion S-transferáza (GST)

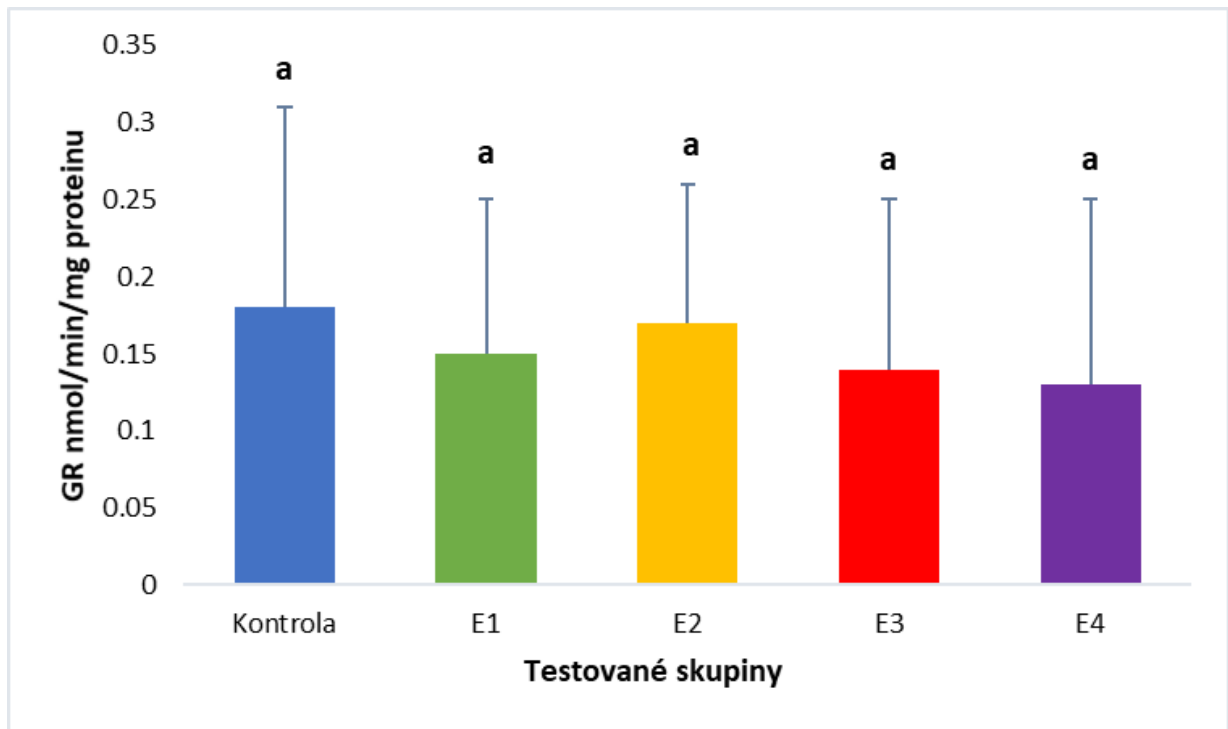
Vliv expozice chloridazonu na aktivitu GST je zaznamenán v grafu č. 9. U jedinců, které jsme vystavili působení chloridazonu, po padesátidenní expozici ve všech testovaných koncentracích došlo v celotělním homogenátu raků k signifikantnímu ( $P < 0,01$ ) zvýšení aktivity GST oproti kontrolní skupině.



Graf č. 9. Vliv padesátidenního působení chloridazonu v koncentracích: 2,7  $\mu\text{g/l}$ , 27  $\mu\text{g/l}$ , 135  $\mu\text{g/l}$  a 270  $\mu\text{g/l}$ , na aktivitu glutathion S-transferázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Indexy a, b, c, d popisují shodu, nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ( $P < 0,01$ ).

#### 4.7.4. Glutathion reduktáza (GR)

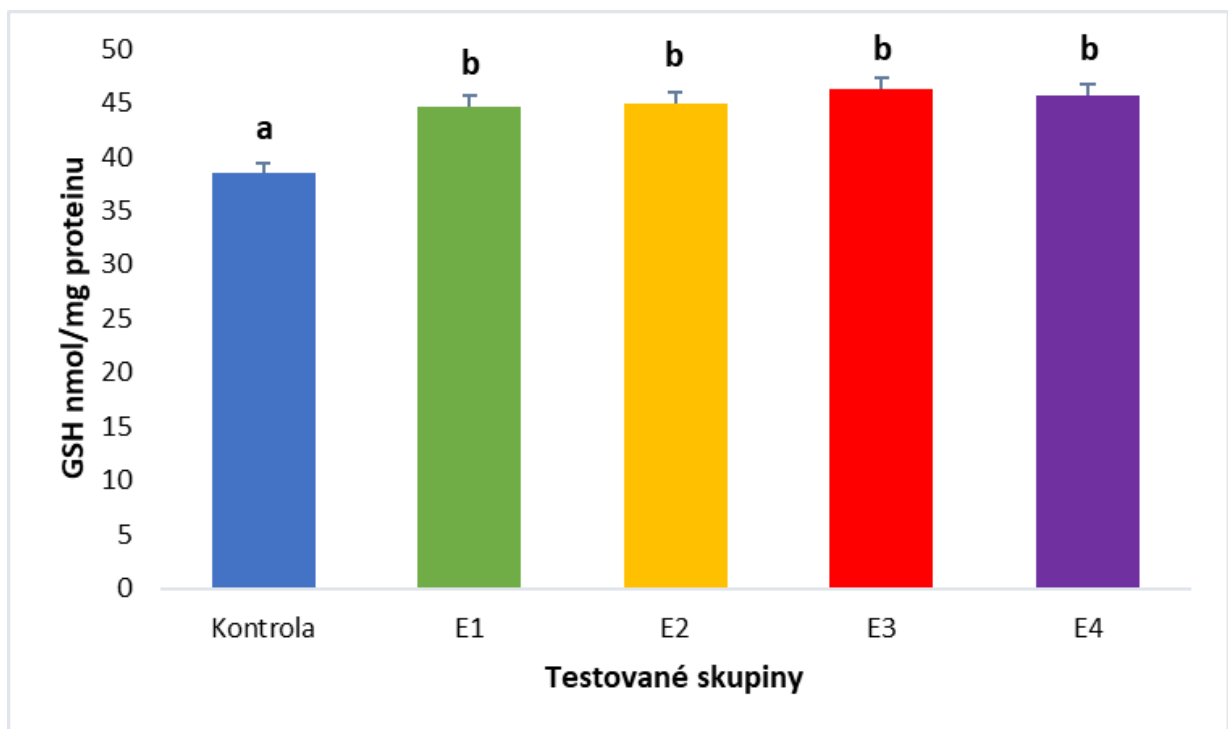
Vliv chloridazonu na hladinu glutathion reduktázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného je zaznamenán v grafu č. 10. Expozice chloridazonu neměla statisticky významný ( $P < 0,05$ ) vliv na hladinu GR v celotělním homogenátu raků mramorovaných.



Graf č. 10. Vliv padesátidenního působení chloridazonu v koncentracích: 2,7  $\mu\text{g/l}$ , 27  $\mu\text{g/l}$ , 135  $\mu\text{g/l}$  a 270  $\mu\text{g/l}$ , na aktivitu glutathion reduktázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Indexy a, b popisují shodu, nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ( $P < 0,05$ ).

#### 4.7.5. Redukovaný glutathion (GSH)

Vliv chloridazonu na hladinu GSH v celotělním homogenátu raka mramorovaného je znázorněn v grafu č. 11. Po padesátidenní expozici chloridazonu ve všech testovaných koncentracích došlo v celotělním homogenátu raků k signifikantnímu ( $P < 0,01$ ) zvýšení hladiny GSH oproti kontrolní skupině.



Graf č. 11. Vliv padesátidenního působení herbicidu chloridazonu v koncentracích: 2,7  $\mu\text{g/l}$ , 27  $\mu\text{g/l}$ , 135  $\mu\text{g/l}$  a 270  $\mu\text{g/l}$ , na hladinu redukovaného glutathionu v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Indexy a, b popisují shodu, nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ( $P < 0,01$ ).



## 5. Diskuze

Tato bakalářská práce měla za cíl posouzení vlivu herbicidu chloridazonu na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Díky tomuto výzkumu se nám podařilo rozšířit data o vlivu chloridazonu na vodní ekosystémy, především na raky jakožto zástupce vodních korýšů a jejich vývojová stádia. Vliv herbicidu chloridazonu jsme stanovovali za využití embryolarválních testů toxicity, které jsme prováděli v laboratoři toxikologie a ichtyopatologie VÚRH Vodňany.

Pro embryolarvální test jsme zvolili raka mramorovaného, jelikož raky řadíme do skupiny bezobratlých živočichů vyskytujících se ve stojatých, ale i v tekoucích vodách. Jsou velkými bentickými makrofágy se širokým spektrem přijímání potravy a jsou velice dobře pozorovatelní a snadno se odlišují od jiných živočichů. To je řadí do skupiny organismů indikující kvalitu vod. Rak mramorovaný se velice často využívá v testech toxicity, jakožto druh korýše splňující kritéria principu 3R (Kozák a kol., 2013). Partenogenetické rozmnožování samic zajišťuje geneticky identické jedince, které můžeme následně využívat v pokusech (Scholz a kol., 2003; Vogt a kol., 2004b; Martin a kol., 2007).

Dalším hodnoceným parametrem, který se u exponovaných organismů sleduje, je vývoj jedinců, který velice dobře reaguje na pesticidní přípravky (Hayes, 2007). Jedinci, kteří byli vystaveni koncentraci vyskytující se reálně v životním prostředí (2,7 µg/l), nijak chloridazon významně neovlivnil, naopak u zbylých třech koncentrací (27 µg/l, 135 µg/l a 270 µg/l) jsme zaznamenávali od 13. dne signifikantně výrazné opoždění ve vývoji. Na závěr testu po 50 dnech expozice se do šestého stupně vývoje dostalo v koncentracích 27 µg/l 50 % jedinců, u koncentrace 135 µg/l 32 % jedinců a u nejvyšší koncentrace 270 µg/l se vyvinulo pouze 26 % jedinců.

Primárně je herbicid chloridazon určen k likvidaci plevelů na řepných polích, předchozí studie ukázaly, že chloridazon vykazuje mírnou toxicitu pro vodní organismy. Velice citlivým druhem byly vodní řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* 72 hEC 50 0,6 mg/l a pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) 96hLC50 41,3 mg/l (PED, 2000). U raků je prokázané, že juvenilní

jedinci nejsou tak odolní oproti dospělým stádiím (Vogt, 2008a). Kumulativní úmrtnost v exponovaných skupinách se pohybovala v rozmezí 13 – 16 %.

Dalším významným faktorem je chování, jehož změny mohou být způsobeny přítomností znečišťujících látek. U jedinců, které jsme vystavili expozici během embryonarválního testu působení chloridazonu, jsme došli k závěrům, že vysoké koncentrace (137 µg/l a 270 µg/l) působí na raky útlumovými účinky, naopak nízké koncentrace mají snahu navýšovat pohybovou aktivitu. Vlivem dlouhodobého poločasu rozpadu chloridazonu (Schuhmann a kol., 2016, Chiaia-Hernandez a kol., 2017), se dá předpokládat, že se mohou projevit změny v chování způsobené dlouhodobější expozicí herbicidu (Roberts a Croucher, 2007), v našem případě chloridazonu.

Inhibice rychlosti růstu může vést k řadě problémů. U jedinců může dojít k opoždění schopnosti reprodukce a v krajním případě může dojít i v brzkých fázích života raků k predaci (Bengtsson, 1974). V našem případě skupina raků, kterou jsme vystavili působení koncentraci chloridazonu 2,7 µg/l, což je koncentrace vyskytující se v životním prostředí, nezpůsobila v našem experimentu žádné prokazatelně negativní účinky, které by ovlivnily růst jedinců raků. Naopak jedinci raka mramorovaného, kteří byli vystaveni působení vyšších koncentrací chloridazonu (27 µg/l, 135 µg/l a 270 µg/l), ovlivnila expozice snížením schopnosti růstu od 25 do 30 %. Ke snížení růstu dochází vlivem toho, že organismus raka vynakládá větší množství energie do antioxidantního systému a díky tomu se nedostává energie k vývoji jedince. I podle dalších studií je známo, že pesticidy ovlivňují rychlost růstu juvenilních jedinců raků (Velíšek a kol., 2014, 2019).

Pesticidní přípravky velice výrazně navyšují hladinu reaktivních forem kyslíku ROS, díky čemuž může docházet k poškození buněčného systému, následně až k oxidačnímu stresu a oxidačním poškozením (Lushchak, 2011; Yan a kol., 2016, Narra a kol., 2017). ROS se vyskytují v buňkách organismů přirozeně a na jejich rovnováhu dohlížejí antioxidantní systémy, které působí na principu volných lapačů ROS. Mezi antioxidantní systémy patří například SOD, CAT, GR, GST, GSH, vitamíny a mnoho dalších (Lushchak a kol., 2010; Lushchak, 2011). Výsledkem naší práce je zjištění, že nedošlo k ovlivnění aktivity SOD, CAT a GR biomarkerů.

Došlo však ke zvýšení hladiny GSH a aktivity GST u všech koncentrací chloridazonu, které jsme testovali, ale toto zvýšení hodnot nevedlo k dalším změnám. Změny jako poškození nebo vyčerpání antioxidantního systému mnohdy způsobují nadprodukcí ROS (Lushchak, 2011; Stará

a kol., 2014), která je indikována peroxidací lipidů (Stará a kol., 2012; Poley a kol., 2016; Yuan a kol., 2019). V našem případě nedošlo ke statisticky významným změnám v lipidní peroxidaci, díky čemuž nebyla zaznamenána žádná oxidační poškození u jedinců raků. Dá se tedy předpokládat, že zvýšená hladina GSH a aktivita GST způsobila, že se stali hlavními detoxikačními antioxidanty herbicidu chloridazonu v organismech raků mramorovaných, což vedlo k dostatečné oxidační rovnováze. Již je známá řada studií, kde byl zaznamenán velice identický rozdíl v biomarkerech antioxidantních systémů, ale zároveň nebyla narušena buněčná rovnováha peroxidace lipidů v raných fázích života raků (Stará a kol., 2013; Velíšek a kol., 2017, 2019, 2020).

## 6. Závěr

Cílem práce bylo vyhodnotit vliv herbicidu chloridazonu na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Ke zjištění vlivu chloridazonu jsme využili embryolarválního testu toxicity. Pro test bylo využito 210 vajíček, které jsme rozdělili do 4 skupin po 42 kusech. Čtyři skupiny jsme vystavili expozici chloridazonu a pátá skupina sloužila jako kontrola. Chloridazon jsme použili ve 4 koncentracích: 2,7 µg/l, 27 µg/l, 135 µg/l a 270 µg/l. Test probíhal po dobu 50 dnů a poté jsme ze zjištěných dat vyhodnocovali vliv této látky na mortalitu, rychlost růstu, ontogenetický vývoj, chování a oxidační a antioxidační biomarkery.

Chloridazon ve všech testovaných koncentracích způsobil signifikantní zvýšení ( $P < 0,05$ ) aktivity glutathion S-transferázy a hladiny redukovaného glutathionu v celotělním homogenátu raků. U raků vystavených vyšším koncentracím chloridazonu (27 µg/l, 135 µg/l a 270 µg/l) došlo ke zpomalení ontogenetického vývoje a rychlosti růstu.

Získané výsledky práce poslouží k rozšíření informací o vlivech tohoto přípravku na vodní organismy. Na základě této práce lze říct, že rak mramorovaný je vhodný modelový organismus pro testy toxicity.

## 7. Přehled použité literatury

- Aebi, H., 1984. Catalase In vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Bengtsson, B.E., 1974. Effect of zinc on growth of the minnow *Phoxinus phoxinus*. *Oikos* 25: 370-373.
- 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.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione. *Journal of Biological Chemistry* 25: 5475-5480.
- Carson, R., 1962. *Silent spring*. Houghton Mifflin Co., Boston, USA, 16 pp.
- Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valerio, M.J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A.M., 2003. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research* 37: 1055-1063.
- Cremllyn, R.J.W., 1978. *Pesticides: Preparation and mode of action*. Wiley, Chichester, UK, 240 pp.
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2019. Online databáze kvality vody. Dostupné na: <http://hydro.chmi.cz/>, (navštíveno online dne 29.12.2019).
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2020. Pasport látky chloridazon. Dostupné na: <http://hydro.chmi.cz/pasporty/>, (navštíveno online dne 20.11.2020).
- ČIŽP (Česká inspekce životního prostředí), 2013. Z havarovaného práškovacího letadla unikly do požární nádrže v obci Žlunice. Dostupné na: <http://www.cizp.cz/Z-havarovaneho-praskovaciho-letadla-unikly-do-pozarni-nadrze-v-obci-Zlunice-zavadne-latky.html>, (navštíveno inline dne 10.11.2020).
- ČIŽP (Česká inspekce životního prostředí), 2015. Za únik pesticidu do řeky Doubravky padla první pokuta. Dostupné na: <http://www.cizp.cz/Za-unik-pesticidu-do-reky-Doubravky-padla-prvni-pokuta-500-tisic-korun.html>, (navštíveno online dne 10.11.2020).
- Di Giulio, R.T., Habig, C., Gallagher, E.P., 1993. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology* 26: 1-22.

- Dorn, N.J., Volin, J.C., 2009. Resistance of crayfish (*Procambarus spp.*) populations to wetland drying depends on species and substrate. *Journal of the North American Benthological Society* 28: 766-777.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82: 70-77.
- Faulkes, Z., 2010. The spread of the parthenogenetic marbled crayfish, Marmorkrebs (*Procambarus sp.*), in the North American pet trade. *Aquatic Invasions* 5: 447-450.
- Feria, T.P., Faulkes, Z., 2011. Forecasting the distribution of Marmorkrebs, a parthenogenetic crayfish with high invasive potential, in Madagascar, Europe, and North America. *Aquatic Invasions* 6: 55-67.
- Filipová, L., Grandjean, F., Chucholl, C., Soes, M., Petrusek, A., 2011. Identification of exotic North American crayfish in Europe by DNA barcoding. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401: 11.
- Flynn, K., Spellman, T., 2009. Environmental levels of atrazine decrease spatial aggregation in the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Ecotoxicol Environ Safe* 72: 1228-1233.
- Foley, M., Sigler, V., Gruden, C., 2008. A multiphasic characterization of the impact of the herbicide acetochlor on freshwater bacterial communities. *ISME Journal* 2: 56-66.
- GWD, EU. Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on protection of groundwater against pollution and deterioration. O. J. L, 2006, vol. 372, pp. 19-31.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.
- Hajšlová, J., Kocourek, V., 2004. Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 35 s.
- Hartley, G.S., West, T.F., 1969, *Chemicals for Pest Control*. Pergamon Press, Oxford.
- Hayes, A.W., 2007. *Principles and methods of toxicology*. CRC Press, Boca Raton, USA, 2296 pp.
- Hobbs, H.H., Jr., 1987. A Review of the crayfish genus *Astacoides* (Decapoda: *Parastacidae*). *Smithsonian Contributions to Zoology* 443: 1-50.
- Hobbs, H.H., Jr., 1988, Crayfish distribution, adaptive radiation and evolution. In: Holdich D.M., Lowery, R.S. (Eds), *Freshwater Crayfish, Biology, Management and Expolitation*. Croom Helm Ltd., London, pp. 52-82.
- Holdich, D.M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Föderer, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckl, M., Śmietana, 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.
- Holdich, D.M., Reynolds, J.D., Souty-Grosset, C., Sibley, P.J., 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 394/395: 11.
- Hudson, R.H., Tucker, R.K., Haeghele, M.A., 1984. Handbook of toxicity of pesticides to wildlife. USDI Fish and Wildlife Service Resource, Washington, USA, 136 pp.
- 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 & Technology* 51: 10642-10651.
- Chucholl, C., Pfeiffer, M., 2010. First evidence for an established Marmorkrebs (Decapoda, Astacida, Cambaridae) population in Southwestern Germany, in syntopic occurrence with *Orconectes limosus* (Rafinesque, 1817). *Aquatic Invasions* 5: 405-412.
- Jaklič, M., Vrezec, A., 2011. The first tropical alien crayfish species in European waters: the redclaw *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana* 84: 651-665.
- Janský, V., Mutkovič, A., 2010. Rak *Procambarus* sp. (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) – prvý nález na Slovensku. *Acta Rerum Naturalium Musei Slovaci* 56: 64-67.
- Jimenez, S.A., Faulkes, Z., 2011. Can the parthenogenetic marbled crayfish Marmorkrebs compete with other crayfish species in fights? *Journal of Ethology* 29: 115-120.
- Jones, J.P.G., Andriahajaina, F.B., Hockley, N.J., Crandall, K.A., Ravoahangimalala, O.R., 2007. The ecology and conservation status of Madagascar's endemic freshwater crayfish (Parastacidae; Astacoides). *Freshwater Biology* 52: 1820-1833.
- Jones, J.P.G., Rasamy, J.R., Harvey, A., Toon, A., Oidtmann, B., Randrianarison, M.H., Raminosoa, N., Ravoahangimalala, O.R., 2009. The perfect invader: a parthenogenic crayfish poses a new threat to Madagascar's freshwater biodiversity. *Biological Invasions* 11: 1475-1482.
- Kaldre, K., Meženin, A., Paaver, T., 2012. Marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*) resistance and survival rates at low (under 5 °C) temperatures during winter period. In: Book of abstracts, International Association of Astacology 19, Innsbruck, Rakousko, pp. 75.
- Kawai, T., Scholtz, G., Morioka, S., Ramanamandimby, F., Lukhaup, C., Hanamura, Y., 2009. Parthenogenetic alien crayfish (Decapoda: Cambaridae) spreading in Madagascar. *Journal of Crustacean Biology* 29: 562-567.

- Kehrer, J.P., Jones, D.P., Lemasters, J.J., Farber, L., Jaeschke, H., 1990. Summary of the symposium presented at the 1990 Annual Meeting of the Society of Toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 106: 165-178.
- Kočí, V., 2002. Postavení testů toxicity v monitoringu životního prostředí. In: Kočí, V., Maršálek, B., Halousková, O. (Eds), *Ekotoxikologické biotesty 1*. Seč, s. 1-4.
- Koese, B., 2008. *Rivierkreeften proeftabel*. Naturalis, Leiden, 17 pp.
- Kouba, A., Petrussek, A., Kozák, P., 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 413: 5.
- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrussek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková, E., Policar, T., 2013. *Biologie a chov raků*. 1. vyd. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 418 s.
- Kozák, P., Fureder, L., Kouba, A., Reynolds, J., Souty-Grosset, C., 2011. Current conservation strategies for European crayfish. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. 401: 1.
- Kozák, P., Policar, T., Buřič, M., Kouba, A., 2009. Základní morfologické znaky k rozlišení raků v ČR (2. přepracované vydání). *Edice Metodik, FROV JU, Vodňany*, č. 92: 27 s.
- Lahr, J., Diallo, A.O., Gadj, B., Diouf, P.S., Bedaux, J.J.M., Badji, A. 2000: Ecological effects of experimental insecticide applications on invertebrates in sahelian temporary ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1278-1289.
- 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.
- Lowery, R.S., 1988. Growth, moulting and reproduction. In: Holdich, D.M., Lowery, R.S. (Eds), *Freshwater Crayfish, Biology, Management and Exploitation*. Croom Helm Ltd., London, pp. 83-113.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lukhaup, C., 2001. *Procambarus sp.* – Der Marmorkrebs. *Aquaristik aktuell* 7/8: 48-51.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 10: 13-30.
- Lushchak, V.I., Bgnyukova, T.V., Husák, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., Storey, K.B., 2005. Hapertoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in gill tissues. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37: 1670-1680.



- Lushchak, V.I., Yu, O., Kubrak, V.O.I., Storey, K.B., 2010. Cytoxicity of chromium ions may be connected with induction of oxidative stress. *Chemosphere* 80: 1044-1049.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 47: 469-474.
- Maršálek, B., 2002. Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití. In: Kočí, V., Maršálek, B., Halousková, O. (Eds), *Ekotoxikologické biotesty 1*. Seč, s. 1-4.
- Marten, M., Werth, C., Marten, D., 2004. Der Marmorkrebs (Cambaridae, Decapoda) in Deutschland – ein weiteres Neozoon im Einzugsgebiet des Rheins. *Lauterbornia* 50: 17–23.
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic Marmorkrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform off spring. *Naturwissenschaften* 94: 843-846.
- Martin, P., Shen, H., Füllner, G., Scholtz, G., 2010. The first record of the parthenogenetic Marmorkrebs (Decapoda, Astacida, Cambaridae) in the wild in Saxony (Germany) raises the question of its actual threat to European freshwater ecosystems. *Aquatic Invasions* 5: 397-403.
- Marzano, F.N., Scalici, M., Chiesa, S., Gherardi, F., Piccinini, A., Gibertini, G., 2009. The first record of the marbled crayfish adds further threats to fresh waters in Italy. *Aquatic Invasions* 4: 401-404.
- McNaught, A.D., Wilkinson, A., 1997. *Compendium of chemical terminology*. Blackwell Science Inc., Oxford, UK, 464 pp.
- Momot, W.T., 1995. Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in Fisheries Science* 3: 33-63.
- Narra, M.R., Rajender, K., Reddy, R.R., Murty, U.S., Begum, G., 2017. Insecticides induced stress response and recuperation in fish: Biomarkers in blood and tissues related to oxidative damage. *Chemosphere* 168: 350-357.
- Öztürk-Ürek, R., Bozkaya, L.A., Tarhan, L., 2001. The effects of some antioxidant vitamin-and trace element-supplemented diets on activities of SOD, CAT, GSH-Px and LPO levels in chicken tissues. *Cell Biochemistry and Function* 19: 125-132.
- PED, (Databáze ekotoxicity pesticidů), 2000. Úřad pro programy pesticidů, divize osudu a účinků na životní prostředí.
- Pöckl, M., Holdich, D.M., Pennerstorfer, J., 2006. Identifying native and alien crayfish species in Europe. *European Project CRAYNET*, 47 pp
- Poley, J.D., Braden, L.M., Messmer, A.M., Whyte, S.K., Koop, B.F., Fast, M.D., 2016. Cypermethrin exposure induces metabolic and stress-related gene expression in copepodid salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 20: 74-84.

- Prousek, J., 2001. Rizikové vlastnosti látok. Slovenská technická univerzita v Bratislave, Bratislava, Slovensko, pp. 60-93.
- Pubchem, 2020. Open chemistry database at the National Institutes of Health (NIH). Dostupné na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chloridazon>, (navštíveno dne 20.11.2020).
- Racek, J., Holeček, V., 1999. Enzymy a volné radikály. *Chemické Listy* 93: 774-780.
- 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.
- Reynolds, J.D., 2002. Growth and reproduction. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science Ltd., Oxford, pp. 151-191.
- Roberts, M.C., Croucher, L., 2007. Metabolic pathways of agrochemicals: part 1: herbicides and plant growth regulators. Royal Society of Chemistry, pp. 847.
- 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.
- Seitz, R., Vilpoux, K., Hopp, U., Harzsch, S., Maier, G., 2005. Ontogeny of the Marmorkrebs (marbled crayfish): a parthenogenetic crayfish with unknown origin and phylogenetic position. *Journal of Experimental Zoology* 303A: 393-405.
- Scholtz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Steuerwald, F., Vogt, G., 2003. Parthenogenesis in an outsider crayfish. *Nature* 421: 806.
- 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 Sediments* 16: 1032-1045.
- Schulz, H., Gross, H., Dümpelmann, C., Schulz, R., 2009. Flusskrebse Deutschlands. In: Füreder, L., (Ed.), *Flusskrebse, Biologie – Ökologie – Gefährdung*. Veröffentlichungen des Naturmuseums Südtirol 6: 71-81.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: Introduction. In Sies, H. (Eds), *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, Vol 23. Academic, San Diego, CA, USA, pp. 21-48.
- Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noel, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P., (Eds) 2006. *Atlas of Crayfish in Europe*. Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, 187 pp.

- Spalding, R.F., Exner, M.E., Snow, D.D., Cassada, D.A., Burbach, M.E., Monson, S.J., 2003. Herbicides in ground water beneath Nebraska's management systems evaluation area. *Journal of Environmental Quality* 32: 92-98.
- Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *BioMed Research International* 2014: Article ID 680131.
- Stará, A., Máchová, J., Velíšek, J., 2012. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Neuroendocrinology Letters* 33: 130-135.
- Stará, A., Steinbach, Ch, Wlasow, T., Gomulka, P., Ziemok, E., Máchová, J., Velíšek, J., 2013. Effect of zeta-cypermethrin on common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Neuroendocrinology Letters* 34: 37-42.
- Svobodová, Z., Gelnarová, J., Justýn, J., Krupauer, V., Máchová, J., Simanov, 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: *Veterinární toxikologie v klinické praxi*. Profi Press, Praha, s. 201-217.
- Svobodová, Z., Sehonová, P., Kaut, J., Pauzorová, M., 2011. Analýza příčin havarijního znečištění povrchových vod a následných úhynů ryb v České republice v období 1989–2010. *Bulletin VÚRH Vodňany* 47: 47-56.
- Swann, J.D., Smith, M.W., Phelps, P.C., Maki, A., Berezsky, I.K., Trump, B.F., 1991. Oxidative injury induces influx-dependent changes in intracellular calcium homeostasis. *Toxicology Pathology* 19: 128-137.
- 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.
- Velíšek, J., Kouba, A., Stará, A., 2013. Acute toxicity of triazine pesticides to juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Neuroendocrinology Letters* 34: 31-36.

- Velíšek, J., Stará, A., Kubec, J., Zusková, E., Buřič, M., Kouba, A., 2020. Effects of metazachlor and its major metabolite metazachlor OA on early life stages of marbled crayfish. *Scientific Reports* 10, Article number: 875.
- Velíšek, J., Stará, A., Máchova, J., Dvořák, P., Zusková, E., Svobodová, Z., 2012. Simazin toxicity in environmental concentration on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Neuroendocrinology Letters* 33: 90-95.
- Velíšek, J., Stará, A., Zusková, E., Kouba, A., 2017. Effects of three triazine metabolites and their mixture at environmentally relevant concentrations on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax* f. *virginalis*). *Chemosphere* 175: 440-445.
- Velíšek, J., Stará, A., Zusková, E., Kubec, J., Burič, M., Kouba, A., 2019. Effects of s-metolachlor on early life stages of marbled crayfish. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 153: 87-94.
- Velíšek, J., Svobodová Z., Bláhová J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014. *Vodní toxikologie pro rybáře*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, Vodňany, 600 s.
- Vogt, G., 2007. Exposure of the eggs to 17 $\alpha$ -methyl testosterone reduced hatching success and growth and elicited teratogenic effects in postembryonic life stages of crayfish. *Aquatic Toxicology* 85: 291-296.
- Vogt, G., 2008a. Investigation of hatching and early post-embryonic life of freshwater crayfish by in vitro culture, behavioural analysis, and light and electron microscopy. *Journal of Morphology* 269: 790-811.
- Vogt, G., 2008b. The marbled crayfish: a new model organism for research on development, epigenetics and evolutionary biology. *Journal of Zoology* 276: 1-13.
- Vogt, G., 2010. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological research: a review and perspective, with remarks on some further crustaceans. *Biogerontology* 11: 643-669.
- Vogt, G., 2011. Marmorkrebs: natural crayfish clone as emerging model for various biological disciplines. *Journal of Biosciences* 36: 377-382.
- Vogt, G., Tolley, L., Scholtz, G., 2004a. Brood care in freshwater crayfish and relationship with the offspring's sensory deficiencies. *Journal of Morphology* 262: 566-582.
- Vogt, G., Tolley, L., Scholtz, G., 2004b. Life stages and reproductive components of the Marmorkrebs (marbled crayfish), the first parthenogenetic decapod crustacean. *Journal of Morphology* 261: 286-311.

- Whitten, J.L., 1966. That We May Live. Van Nostrand, Princeton.
- Worthing, C.R., Walker, S.B. (Eds), 1983. Pesticide Manual – World Compendium. Levenham, Suffolk, Velká Británie: The Levenham Press Limited, 109 pp.
- Yan, S.H., Wang, J.H., Zhu, L.S., Chen, A.M., Wang, J., 2016. Thiamethoxam induces oxidative stress and antioxidant response in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Environmental Toxicology* 31: 2006-2015.
- Yuan, J., Guo, J., Wang, H., Guo, A., Lian, Q., Gu, Z., 2019. Acute toxicity of cypermethrin on the juvenile of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Chemosphere* 237: 124468.
- Zapletal, O., a kol., 2001. Speciální veterinární toxikologie. VFU Brno, Brno, 148 s.
- Zarenkov, N.A., 1982. Členistonogie. Rakoobraznye, Časť 1. Izd. MGU, Moskva.

## 8. Abstrakt

### Vliv chloridazonu na raná vývojová stádia raka mramorovaného

Chloridazon ( $C_{10}H_8ClN_3O$ ) řadíme mezi herbicidy využívané v zemědělství především k likvidaci plevelů. Chloridazon patří do pyridazinonové třídy pesticidů.

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jaké účinky může mít přípravek chloridazon na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus viriginalis*). K vyhodnocení vlivu chloridazonu na raná vývojová stádia jsme využili embryolarválního testu toxicity, ve kterém jsme vystavili raky po dobu 50 dnů 4 koncentracím (2,7  $\mu\text{g/l}$ , 27  $\mu\text{g/l}$ , 135  $\mu\text{g/l}$ , 270  $\mu\text{g/l}$ ) chloridazonu.

Chloridazon ve všech testovaných koncentracích způsobil signifikantní zvýšení ( $P < 0,05$ ) aktivity glutathion S-transferázy a hladiny redukovaného glutathionu v celotělním homogenátu raků. U raků vystavených vyšším koncentracím chloridazonu (27  $\mu\text{g/l}$ , 135  $\mu\text{g/l}$ , a 270  $\mu\text{g/l}$ ) došlo ke zpomalení ontogenetického vývoje a rychlosti růstu.

Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že chloridazon v reálných koncentracích vyskytující se v českých vodách může mít negativní vliv na raná vývojová stádia raků mramorovaných.

**Klíčová slova:** embryolarvalní test toxicity, chloridazonu, ontogenetický vývoj, oxidativní stres, rak mramorovaný.

## 9. Abstract

### **The effect of chloridazon on the early developmental stages of the marbled crayfish**

Chloridazon (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O) is a herbicide used in agriculture, primarily for weed control. Chloridazon belongs to the pyridazinone class of pesticides.

The aim of this bachelor's thesis was to determine the effects of chloridazon on the early developmental stages of the marbled crayfish (*Procambarus viriginalis*). To evaluate the effect of chloridazon on early developmental stages, we used embryolarval toxicity test in which we exposed crayfish for 50 days to 4 concentrations (2.7 µg/l, 27 µg/l, 135 µg/l, 270 µg/l) of chloridazon.

Chloridazon at all concentrations tested caused a significant increase ( $P < 0.05$ ) in glutathione S-transferase activity and reduced glutathione levels in whole-body crayfish homogenate. Crayfish exposed to higher concentrations of chloridazon (27 µg/l, 135 µg/l and 270 µg/l) displayed a retarded ontogenetic development and growth rate.

Based on the results of this work, it can be assumed that chloradazon in concentrations known to occur in Czech waters may have a negative effect on the early developmental stages of the marbled crayfish.

**Key words:** embryo-larval toxicity test, chloridazonu, marbled crayfish, ntogenetic development, oxidative stress.