

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

Bakalářská práce

Neonikotinoidy ve vodních ekosystémech a jejich vliv na necílové organismy

Autor: Alžběta Strouhová

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Alžběta Stará, Ph.D.

Studijní program a obor: Ekologie a ochrana prostředí, obor Ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2018

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucí bakalářské práce Ing. Alžbětě Staré Ph.D. za metodické vedení, odbornou pomoc a cenné rady poskytnuté při vypracování této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala paní Iloně Prokopové a Ing. Antonínu Koubovi Ph.D. za pomoc při provedení testů toxicity. Můj dík patří také rodině a přátelům za podporu během celého studia.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Alžběta STROUHOVÁ
Osobní číslo: V15B029P
Studijní program: B1601 Ekologie a ochrana prostředí
Studijní obor: Ochrana vod
Název tématu: Neonikotinoidy ve vodních ekosystémech a jejich vliv na necílové organismy
Zadávací katedra: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

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

Cílem bakalářské práce bude sepsat dosavadní dostupné poznatky o výskytu neonikotinoidů ve vodních ekosystémech a jejich vlivu na necílové vodní organismy. Dílčím cílem bakalářské práce bude provedení a vyhodnocení akutních testů toxicity s neonikotinoidovým insekticidem na koryše.

Neonikotinoidy jsou uměle vyrobené insekticidy chemicky podobné přírodnímu nikotinu, které byly uvedeny na trh začátkem 90. let. Tato skupina látek je charakteristická svou nízkou toxicitou pro obratlovce, ale vyznačuje se velmi vysokou toxicitou pro bezobratlé organismy. Již v roce 2013 bylo komisí EU zakázáno používat několik účinných látek z této skupiny. Hlavními důvody byly především zjištěné vysoké koncentrace ve vodách, bioakumulace a škodlivé účinky na necílové bezobratlé organismy. Bakalářská práce shrne dosavadní poznatky o výskytu a dopadu neonikotinoidů na vodní ekosystémy a jejich vliv na necílové organismy vyskytující se v těchto ekosystémech. K vypracování bakalářské práce budou použity informace z dostupné literatury.

Raci jsou významnými zástupci bezobratlých organismů ve vodních ekosystémech a jsou i vhodnými indikátory používanými při sledování znečištění vodního prostředí. V rámci bakalářské práce budou provedeny akutní testy toxicity s neonikotinoidovým přípravkem na vybraných druzích raků. Během akutních testů se bude sledovat vliv na změnu chování a mortalita, po skončení testů bude vyhodnocena střední letální koncentrace (LC50) insekticidu pro vybrané druhy raků. Zkoušky akutní toxicity budou provedeny v souladu se směrnicí OECD pro testování chemických látek, OECD no. 203, s modifikací pro raky. Výsledky získané provedením a vyhodnocením akutních testů toxicity významně přispějí k rozšíření a doplnění informací o toxickém působení těchto látek na necílové vodní bezobratlé organismy a budou podkladem pro hodnocení rizik těchto látek pro životní prostředí (Environmental Risk Assessment).

Rozsah grafických prací: dle potřeby (do 10 stran)

Rozsah pracovní zprávy: 30 - 50 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Velíšek, J., a kol., 2014. Vodní toxikologie pro rybáře. FROV JU, Vodňany, 600 s.

Švobodová, Z., Beklová, M., Máchová, J., Dobšíková, R., Mácová, S., Modrá, H., Velíšek, J., 2010. Ekotoxikologie. Praktická cvičení, Testy toxicity na organismech vodního prostředí. VFU Brno, 84 s.

Paranjape, K., Gowariker, V., Krishnamurthy, V.N., Gowariker, S., 2015. The pesticide encyclopedia. CABI, London, 725 p.

Abou-Donia, M.B., 2015. Mammalian toxicology. John Wiley & Sons, United Kingdom, 720 p.

Morrissey, C.A, Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., Liber, K., 2015. Neonicotinoid contamination of global surfacewaters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International* 74: 291-303.

Velisek, J., Kouba, A., Stara, A., 2013. Acute toxicity of triazine pesticides to juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Neuroendocrinology Letters* 34: 31-36.

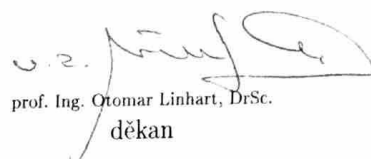
Kozák, P. a kol., 2013. Biologie a chov raků, FROV JU.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Alžběta Stará, Ph.D.

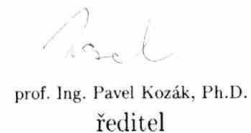
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: 11. prosince 2016

Termín odevzdání bakalářské práce: 4. května 2018


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

Ve Vodňanech dne 11. prosince 2016

OBSAH

OBSAH	6
1 ÚVOD	8
CÍL PRÁCE.....	10
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
2.1 Pesticidy	11
2.1.1 Insekticidy	13
2.1.2 Neonikotinoidy	14
2.1.2.1 Zákaz používání některých neonikotinoidů v EU	15
2.1.2.2 Mechanismus toxického účinku	16
2.1.2.3 Neonikotinoidy ve vodních ekosystémech	17
2.1.2.4 Vliv neonikotinoidů na necílové organismy.....	19
Terestrické organismy	20
Akvatické organismy.....	22
Dopad na úrovni druhů.....	22
Dopad na úrovni společenstev.....	24
Dopad na akvatické ekosystémy	26
2.2 Materiál použitý v testech toxicity.....	26
2.2.1 Thiacloprid	26
2.2.2 Raci.....	28
Rak červený (<i>Procambarus clarkii</i>).....	28
Rak mramorovaný (<i>Procambarus fallax f. virginalis</i>)	29
Rak ničivý (<i>Cherax destructor</i>).....	29
2.2.3 Perloočky (řád <i>Cladocera</i>)	30
3 MATERIÁL A METODIKA.....	31
3.1 Testovaná chemikálie.....	31
3.2 Akutní test toxicity na racích	32

3.2.1	Experimentální organismy	32
3.2.2	Princip a podmínky testu	33
3.2.3	Průběh testu	34
3.2.4	Vyhodnocení testů akutní toxicity	38
3.3	Akutní imobilizační test na <i>Daphnia magna</i>	39
3.3.1	Experimentální organismy	39
3.3.2	Princip a podmínky akutního imobilizačního testu na hrotnatkách	39
3.3.3	Průběh akutního imobilizačního testu na hrotnatkách	39
3.3.4	Vyhodnocení imobilizačního testu	41
4	VÝSLEDKY	42
4.1	Změny v chování raků v průběhu testu toxicity	42
4.2	Mortalita raků	42
4.3	Imobilizace perlooček	43
	DISKUSE	44
	ZÁVĚR	47
	SEZNAM LITERATURY	48
	PŘÍLOHY	56
	ABSTRAKT	58
	ABSTRACT	59

1 ÚVOD

Ochrana rostlin před škůdci je známa již ze starověku. V nejstarších dobách se k hubení škůdců a ochraně plodin využívaly zejména látky přírodního původu. Byly známy i chemické látky s pesticidními účinky – arsen, kryolit, síra, olovo a rtuť, plošné používání těchto přípravků však bylo velmi nákladné (Casida a Quistad, 1998). Od poloviny devatenáctého století se daří izolovat přírodní insekticidní sloučeniny jako nikotin, rotenoidy a pyretroidy, stejně tak se začínají využívat syntetické anorganické insekticidní látky, jejichž rozvoj pokračuje i v průběhu dvacátého století. Za největší objev mezi pesticidy je považován dichlordifenyltrichlorethan – DDT, za který byla v roce 1948 doktoru Müllerovi udělena Nobelova cena. Nežádoucí účinky DDT na ekosystémy po celém světě zajistily pesticidům pozornost z ekologického hlediska, od šedesátých let jsou sledovány vlivy pesticidních látek a jejich reziduí na všechny složky ekosystémů (Cremlyn, 1978).

Jednou z nejnovějších skupin insekticidních látek jsou neonikotinoidy, které působí jako neurotoxiny zejména na bezobratlé živočichy, vůči jejichž nikotinovým acetylcholinovým receptorům (nAChRs) mají vyšší selektivitu než vůči nAChRs obratlovců. Jsou tedy označovány za méně toxické pro obratlovce, včetně člověka, což bylo v době jejich uvedení na trh považováno za velikou výhodu oproti jiným, komerčně využívaným pesticidním látkám, jako jsou organofosfáty anebo karbamáty (Morrissey a kol., 2015).

Již z poloviny 90. let dvacátého století pocházejí zprávy o nežádoucích účincích neonikotinoidů, zejména imidaclopridu, clothianidinu a thiamethoxamu, na včely. Na základě několika studií, prokazujících negativní vliv neonikotinoidů na včelstva, Evropská komise v roce 2013 zakázala použití tří výše uvedených neonikotinoidních látek (Blacquiére a kol., 2012; Carreck, 2017).

Stejně jako mnoho dalších polutantů, se neonikotinoidy dostávají do vodních ekosystémů, a to zejména povrchovým odtokem, průsakem do podzemních vod či spadem ve formě prachu z ošetřených ploch (Morrissey a kol., 2015). Rezidua neonikotinoidů se nacházejí ve vodních recipientech po celém světě, průměrně v koncentracích mezi 0,08 a 0,73 $\mu\text{g.l}^{-1}$, maximální koncentrace však mohou dosahovat až hodnoty 320 $\mu\text{g.l}^{-1}$. V nejvyšších koncentracích se vyskytuje zejména imidacloprid a thiamethoxam (Sánchez-Bayo a kol., 2016).

Dosud provedené studie, věnující se vlivu neonikotinoidů na necílové organismy, se zaměřovaly zejména na včely a další opylovače. Přesto že jsou akvatické ekosystémy – sladkovodní i marinní, také široce zasaženy, ekologickým vlivům na ně se věnuje pouze několik autorů (Pisa a kol., 2014). Mimo toxických účinků na terestrické i akvatické organismy, jsou popsány také subletální efekty, zejména snížení růstové a reprodukční schopnosti jedinců, omezení příjmu potravy a omezení pohyblivosti (Alexander a kol., 2008; Ashauer a kol., 2011; Roessink a kol., 2013; Pisa a kol., 2014; Morrissey a kol., 2015). Při zvýšených koncentracích neonikotinoidů v ekosystému dochází ke snížení abundance citlivých druhů a s tím souvisí vznik volných nik pro druhy odolnější, případně dochází ke stěhování citlivějších organismů do nezasazených oblastí. Působením neonikotinoidů, i dalších polutantů, dochází ke změnám ve složení celých společenstev (Sánchez-Bayo a Goka, 2006; Beketov a Liess, 2008). Z pohledu celých ekosystémů dochází zejména ke dvěma nežádoucím jevům: omezení rozkladu organických látek, v důsledku snížení abundance rozkladačů a ke snížení abundance insektivorních organismů, jimž vymizela potravní základna (Sánchez-Bayo a kol., 2016).

Jedním z neonikotinoidů je thiacloprid – pesticidní látka ze skupiny chlorovaných neonikotinoidů, prodávaná německou společností Bayer CropScience AG (EPA, 2003). Toxicita thiaclopridu, účinné látky pesticidního přípravku CALYPSO® 480 SC, byla prokázána pomocí akutních testů toxicity na racích a dále pomocí akutního imobilizačního testu na hrotnatkách velkých (*Daphnia magna*). Provedení akutních testů toxicity a akutního imobilizačního testu je popsáno v praktické části práce. Testy toxicity na vodních organismech jsou rozšířenou metodou hodnocení působení látek na životní prostředí. Akutní testy toxicity jsou využívány při hodnocení nově vyvinutých i již dlouhodobě používaných chemických látek a přípravků. Pomocí těchto testů se často zjišťuje působení pesticidů na necílové vodní organismy, jako časté příjemce reziduí těchto látek vnášených do akvatických ekosystémů zejména splachy z polí. Druhy necílových organismů pro testy toxicity jsou vybírány tak aby vhodně reprezentovaly druhy, které testovaná látka může zasáhnout a případně ovlivnit. Vzhledem k širokému areálu rozšíření, širokému spektru druhů, významu v potravním řetězci i snadné dostupnosti jsou raci i hrotnatky vhodným testovacím organismem (Velíšek a kol., 2014).

CÍL PRÁCE

Cílem práce je sepsání dosavadních poznatků o výskytu neonikotinoidů ve vodních ekosystémech a jejich vlivu na necílové organismy. Dílčím cílem bakalářské práce je provedení a vyhodnocení akutních testů toxicity s neonikotinoidovým insekticidním přípravkem CALYPSO® 480 SC na:

- Raku červeném (*Procambarus clarkii*),
- Raku mramorovaném (*Procambarus fallax forma virginalis*),
- Raku ničivém (*Cherarax destructor*),
- Hrotnatce velké (*Daphnia magna*).

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Pesticidy

Pesticidy tvoří početnou skupinu biocidních látek, používaných v zemědělství, lesnictví i vodním hospodářství k prevenci, hubení, potlačení, odpuzení a kontrole škodlivých a nežádoucích organismů při produkci a hospodaření s potravinami, zemědělskými komoditami a krmivy. Mezi pesticidy mohou být řazeny také látky aplikované u zvířat, případně člověka, proti ektoparazitům, dále látky aplikované na plodiny před nebo po sklizni – regulátory či stimulátory růstu, inhibitory klíčení a desikanty (Pitter, 1999; Velíšek a kol., 2014).

Vzhledem k početnosti druhů, lze pesticidy rozdělit z několika hledisek. Základními skupinami používaných pesticidů podle biologické účinnosti jsou (Pitter, 1999):

- insekticidy – prostředky k hubení hmyzu,
- herbicidy – prostředky k hubení rostlin, zejména plevelů,
- fungicidy – prostředky proti škodlivým parazitickým houbám.

Tyto základní skupiny je možno rozšířit ještě o (Zapletal, 2001):

- akaricidy – prostředky k hubení roztočů,
- algicidy – prostředky k hubení řas,
- arboricidy – prostředky k hubení stromů a keřů,
- avicidy – prostředky k hubení ptáků,
- moluskocidy – prostředky k hubení měkkýšů,
- piscidy – prostředky k hubení ryb,
- rodenticidy – prostředky k hubení hlodavců.

Podle způsobu aplikace lze rozdělit pesticidy na: postřiky, aerosoly, fumiganty, popraše, pevné a tekuté nástrahy, mořidla, nátěry a impregnace. Podle původu pak rozlišujeme pesticidy na přírodní látky, syntetické látky a biopreparáty, účinné látky pesticidu pak mohou být organického či anorganického původu (Zapletal, 2001). Dále lze pesticidy rozdělit podle působení na organismus jako *systemově působící* a *kontaktně působící*. Systemově působící pesticidy pronikají do organismu a působí na vnitřní soustavy, kontaktně působící zůstávají na povrchu daného organismu a působí pouze v místě aplikace (Pitter, 1999).

Používání látek přírodního původu k hubení škůdců a ochraně plodin bylo známo již ve starověké Číně. V období středověku se k ochraně plodin a zásob používaly sloučeniny olova, rtuti a arsenu. Od 15. století se jako insekticid používala izolovaná sloučenina nikotinu – sulfát nikotin (Cremlýn, 1978). K rozvoji výroby pesticidů došlo ve 30. letech 20. století, kdy se rozvinula moderní syntetická chemie. Za objev insekticidních účinků dichlordifenyltrichlorethanu (DDT) v roce 1939, získal doktor Paul Müller v roce 1948 Nobelovu cenu. Dichlordifenyltrichlorethan se stal brzy jedním ze světově nejrozšířenějších a nejpoužívanějších pesticidů. S objevem žádoucích pesticidních účinků mnoha látek a masovou výrobou pesticidních přípravků se začaly projevovat také nežádoucí účinky těchto látek a sloučenin na životní prostředí (Velíšek a kol., 2014). V šedesátých letech popsala Rachel Carson negativní vliv DDT na ekosystém (Carson, 1962), od této doby dochází ke sledování reziduí pesticidních přípravků v potravinách, ekosystémech i jednotlivých organismech, zkoumá se také vliv na živé organismy. Současným problémem používání pesticidů je jejich kumulace v životním prostředí, případně jejich rozklad na často rizikovější sloučeniny, zejména ve vodních ekosystémech. Kumulace pesticidů a jejich sloučenin ve složkách životního prostředí může vést přímo i nepřímo ke zdravotním rizikům nejen u člověka, ale i u jiných – necílových organismů (Velíšek a kol., 2014).

V prostředí se pesticidy po aplikaci, vlivem řady fyzikálně-chemických faktorů rozkládají – degradují. K degradaci může docházet vlivem slunečního záření, vyšší teploty či vlhkosti, oxidací vzdušným kyslíkem a biotransformací. K biotransformaci pesticidů dochází běžně v průběhu detoxikačních pochodů v rostlinách a živočiších, či je důsledkem působení mikroorganismů. Vlivem rozkladu vznikají metabolity pesticidů, které mohou pesticidní účinky ztrácet, anebo naopak mohou vznikat látky toxičtější, než jsou samotné účinné látky pesticidu (Hajšlová a Kocourek, 2004).

Do vodních recipientů se pesticidy dostávají buď přímo, nesprávnou aplikací anebo během nesprávné likvidace nepoužitých zbytků. Nepřímo se pesticidy do recipientu dostávají splachy z okolních ošetřených zemědělských kultur. V rybářství a vodním hospodářství jsou používány zejména látky určené k likvidaci vodních rostlin a léčbě parazitárních onemocnění ryb (Velíšek a kol., 2014). Ve vodách mohou být pesticidy přítomny v nerozpuštěné i rozpuštěné formě, mnohé jsou však ve vodě nerozpustné anebo málo rozpustné, musí se proto upravovat přidávkou rozpouštědel či jiných účinných látek, které společně s aktivní látkou pesticidu

kontaminují životní prostředí. Ve vyšších koncentracích pesticidy narušují biologickou rovnováhu v tocích, mohou ovlivnit samočistící procesy ve vodě, její organoleptické vlastnosti, případně ohrozit zdraví obyvatelstva (Pitter, 1999).

I přes nežádoucí účinky a vliv na životní prostředí, jsou pesticidy masivně používány. Při jejich aplikaci je třeba dbát na dodržení technologických postupů, aby se negativní vliv minimalizoval. Tento negativní vliv je také možno minimalizovat využitím šetrnějších pesticidních přípravků, které se rychleji rozkládají, nevytvářejí rezidua a na necílové organismy nemají negativní účinky (Velíšek a kol. 2014).

2.1.1 Insekticidy

Do poloviny devatenáctého století spočívala ochrana rostlin zejména ve sběru a odpuzování škůdců přírodními repelentními látkami. V tu dobu známé chemické látky s insekticidními účinky, jako anorganická síra, arsen, kryolit a kyselina boritá byly pro plošnou ochranu rostlin málo dostupné a drahé (Casida a Quistad, 1998). Již ve středověku se jako insekticidní přípravky používaly výluhy z některých rostlin jako je tabák (*Nicotiana sp.*) – alkaloid nikotin, kožnatec (*Derris elliptica*) – rotenoidy a kopretina starčkolistá (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) – pyrethrum. Aktivní látky těchto výluhů se však daří izolovat až od poloviny devatenáctého století (Cremlyn, 1978).

První anorganické syntetické insekticidní látky byly aplikovány v roce 1864 (směsný arsenitan a octan měďnatý) a 1892 (hydrogenarseničnan olovnatý) v USA. Na konci devatenáctého a počátku dvacátého století se začaly používat dinitrofenoly, thiokyanáty a jejich deriváty. Největším objevem však byl dichlordifenyltrichlorethan, známý jako DDT, sloučenina byla objevena již v roce 1874 Zeidlerem, avšak její insekticidní vlastnosti popsal až v roce 1939 doktor Müller. DDT bylo do šedesátých let dvacátého století celosvětově nejprodávanější insekticidní látkou, pro nepříznivé účinky na ekosystémy však bylo jeho použití ve většině zemí světa postupně omezováno a zcela zakázáno. Ve čtyřicátých letech byly syntetizovány další organochlorové sloučeniny – hexachlorcyklohexan a polycyklické chlorované insekticidy. Vedle organochlorových sloučenin probíhala také syntéza organofosforových a karbamátových sloučenin (Cremlyn, 1978).

Od sedmdesátých let se pro plošnou kontrolu škůdců začaly používat pyretroidy – syntetické sloučeniny odvozené od pyretrinů produkovaných květinami

Chrysanthemum cinerariaefolium a *Chrysanthemum coccineum* (Casida a Quistad, 1998).

V závislosti na metodě aplikace, určité koncentrace insekticidu vždy zasáhnou půdu, odkud se přesouvají do dalších složek ekosystémů. Rezidua insekticidů jsou absorbována rostlinami a vstupují tak do potravního řetězce, kde mohou být dále koncentrovány například v tukových buňkách živočichů. Další rezidua mohou být na dlouhé vzdálenosti přenášeny větrem ve formě prachu, povrchovým a podpovrchovým odtokem (Yu, 2008).

2.1.2 Neonikotinoidy

Pesticidy na bázi neonikotinoidů patří do skupiny systémově působících insekticidů (Morrissey a kol., 2015), jde o poměrně novou skupinu synteticky vytvářených pesticidů, odvozených od přírodního toxinu – nikotinu (Sánchez-Bayo a kol., 2016).

Již na konci 17. století byl výluh z tabákových listů použit k hubení škůdců na zahradních rostlinách. Aktivní látkou tabákového extraktu je alkaloid nikotin, který byl poprvé izolován v roce 1828 (Cremllyn, 1978).

Skupina synteticky vyráběných analogů nikotinu – neonikotinoidy, se jako insekticidy využívají až od 90. let 20. století. Prvním komerčně uvedeným neonikotinoidem byl v roce 1991 *imidacloprid*, který se rychle stal nejprodávanějším insekticidem na světě (Nauen a kol., 2008). Od roku 2000 bylo v návaznosti na úspěšné využití imidaclopridu syntetizováno šest dalších neonikotinoidních sloučenin – clothianidin, thiamethoxam, acetamiprid, dinotefuran, nitenpyram a thiacloprid (Morrissey a kol., 2015). Novou, osmou, sloučeninou je sulfoxaflor, uvedený na trh v Číně a USA v roce 2013. V Číně jsou syntetizovány a testovány další nové sloučeniny, zejména cis-neonikotinoidy – izomery neonikotinoidů lišící se od trans-neonikotinoidů orientací nitroskupiny a kyanoskupiny. Trans a cis izomery se mohou výrazně lišit v toxicitě. Cis-neonikotinoidních sloučenin bylo již syntetizováno více než 600, uvedení na Čínský trh se však blíží pouze dvě – paichongding a cycloxaprid. Cycloxaprid tvoří prostřednictvím hydrolyzy v rostlině imidacloprid, který se uvolňuje postupně, čímž prodlužuje ochranu rostliny. Paichongding i cycloxaprid jsou látky vysoce účinné proti stejnokřídlému hmyzu a motýlům (Zhu a kol., 2011; Shao a kol., 2013).

Pesticidy na bázi neonikotinoidů jsou pro ošetření semen anebo celých rostlin jako ochrana před bodavým i žvýkacím hmyzem registrovány a používány ve více než 120 zemích (Jeschke a kol., 2011; Morrissey a kol., 2015). Imidacloprid a nitenpyram jsou také používány jako účinné látky v přípravcích na ochranu psů a koček před blechami (Wang a kol., 2018). V roce 2010 byla roční celosvětová produkce přípravků, s účinnou látkou na bázi neonikotinoidu, odhadnuta na 20 000 tun. Úspěšnost neonikotinoidních přípravků na trhu je připisovaná jejich účinnosti na široké spektrum škůdců, variabilitě v jejich aplikaci a také v relativně nízké toxicitě pro savce a ptáky (Crossthwaite a kol., 2014; Morrissey a kol., 2015; Simon-Delso a kol., 2015). Na trhu s insekticidy neonikotinoidy zaujaly významný podíl, zejména na úkor organofosfátů a karbamátů (Jeschke a kol., 2011).

Neonikotinoidy jsou buď cyklické (imidacloprid, thiacloprid, thiamethoxam) anebo necyklické (nitenpyram, acetamiprid, clothianidin, dinotefuran) sloučeniny. Všechny neonikotinoidní sloučeniny vykazují vysokou rozpustnost a stabilitu ve vodě, kde jsou v anaerobních podmínkách a při neutrálním anebo mírně kyselém pH odolné vůči hydrolyze. Vysoce stabilní jsou také v půdě, za příznivých podmínek však mohou podléhat fotodegradaci. Vysoká rozpustnost a stálost ve vodě i v půdě (několik dnů až roky) podporují pohyb těchto insekticidů prostřednictvím povrchového a podpovrchového odtoku, a ve vhodných podmínkách vedou ke zvýšení perzistence v prostředí (Jeschke a kol., 2011; Bonmatin a kol., 2015; Morrissey a kol., 2015).

2.1.2.1 Zákaz používání některých neonikotinoidů v EU

První zprávy o ztrátách včel způsobených nově zavedenou třídou insekticidů, neonikotinoidů, zejména sloučeninou imidaclopridem pocházejí již z poloviny 90. let minulého století, z Francie. O nebezpečnosti prachu s obsahem clothianidinu, vznikajícího při seti osiva ošetřeného pesticidním přípravkem, varovali italští vědci v roce 2004 na Evropské konferenci o výzkumu včel. Nebezpečnost kontaminovaného prachu vznikajícího při seti ošetřeného osiva se potvrdila v roce 2008 otravou celých kolonií včel v Německu a ve Slovinsku (Carreck, 2017).

Evropská komise nařízením č 485/2013 od 1. prosince 2013 zakázala používání imidaclopridu, clothianidinu a thiamethoxamu pro ošetřování semen plodin atraktivních pro včely, jako je například řepka olejná. Použití dalších neonikotinoidů

ve formě postřiků – thiacloprid, acetamiprid, je stále povoleno, protože jsou pro včely považovány za méně toxické (Blacquiére a kol., 2012). Omezení používání tří neonikotinoidních látek byl podložen čtyřmi studii provedenými v roce 2012 ve Velké Británii, prokazujícími negativní vliv neonikotinoidů na včelstva (Carreck, 2017).

V současnosti jsou na úrovni Evropské unie patrné dvě tendence – přehodnocení zákazu moření osiva a přehodnocení podmínek použití přípravků na dosud povolené aplikace. Vlivem zákazu použití neonikotinoidů jako mořidel osiva stoupla potřeba ošetření rostlin v době vegetace. Opylovači jsou tedy chráněni před vlivem mořeného osiva, avšak přímo vystaveni insekticidům aplikovaným ve vegetačním období (Woodcock a kol., 2017).

2.1.2.2 Mechanismus toxického účinku

Neonikotinoidy patří mezi systémové insekticidy, působící na centrální nervovou soustavu organismů. Mezi neurotoxiny jsou zařazeny, protože fungují jako agonisté nikotinových acetylcholinových receptorů (nAChRs) bezobratlých i obratlovců (Wang a kol., 2018). Nikotinové acetylcholinové receptory jsou cholinergní receptory vytvářející iontové kanály v plazmatických membránách určitých neuronů a na postsynaptické straně neuromuskulárního spojení. Otevřeným receptorem prochází ionty sodíku, draslíku a vápníku, nikotin i jeho analogy působí na receptor agonisticky (Karlin, 2010). Po navázání nikotinu na vazebné místo nAChRs dojde k otevření kanálu pro ionty sodíku, draslíku i vápníku a vzniká elektrický potenciál. Nikotinové acetylcholinové receptory jsou zejména ve svalech, v mozku a v periferních vegetativních nervech, fungují jako chemicky závislé iontové kanály, složené z pěti podjednotek, vytvářejících v plazmatické membráně buněk vertikální pór (Yamamoto a kol., 1998).

Předpokládá se, že neonikotinoidy mohou mít vyšší selektivitu vůči nAChRs bezobratlých než obratlovců díky rozdílné struktuře receptorů, z tohoto důvodu mohou neonikotinoidy vykazovat nižší neurotoxicitu pro savce, ryby a ptáky (Tomizawa a Casida, 2005). Neonikotinoidní molekula zůstává vázána na nAChRs hmyzu, drží tak otevřený iontový kanál a účinně způsobuje kontinuální stimulaci nervového systému. Nízká afinita neonikotinoidů k nAChRs obratlovců souvisí s odlišnou konfigurací podjednotek, které tvoří tento receptor, takže vazba

insekticidu na receptor je slabá anebo netrvá tak dlouho jako u hmyzu (Yamamoto a kol., 1998).

Mimo neurotoxicity neonikotinoidů ukazují poslední studie další možné toxické účinky na bezobratlé i obratlovce, jako je imunotoxicita, hepatotoxicita, nefrotoxicita a cytotoxicita (Wang a kol., 2018).

Široké využívání a dostupnost přípravků s obsahem neonikotinoidních látek se také projevilo na množství akutních otrav lidí neonikotinoidy po záměrném požití přípravků, obsahujících účinnou látku thiacloprid, imidacloprid a acetamiprid (Wang a kol., 2018). Imamura a kol. (2010) například zmiňují dva případy otravy lidí po záměrném požití pesticidního přípravku, v prvním případě byl obsah 18 % acetamipridu, v druhém pouze 2 % stejné látky. V obou případech se otrava projevovala stejně – nevolnost, svalová slabost, křeče, tachykardie, hypotenze, dušnost a žízeň.

2.1.2.3 Neonikotinoidy ve vodních ekosystémech

Pesticidy, včetně neonikotinoidů se do vodních ekosystémů dostávají zejména povrchovým odtokem z ošetřených ploch, po silných deštích. Dále průsakem do podzemních vod s následným podpovrchovým odtokem. Pevná frakce se do recipientů dostává jako spad ve formě prachu, vznikajícího během setby osiva ošetřeného neonikotinoidními přípravky. Určité koncentrace se v akvatických ekosystémech objevují jako rezidua po ošetření rostlin v recipientu. Perzistence v půdě a s ní související transport neonikotinoidů do vodních ekosystémů závisí do značné míry na faktorech jako je pH, teplota, typ půdy, obsah organických látek, přítomnost hnojiva, ale také rychlost aplikace a rostlinný pokryv (Morrissey a kol., 2015).

Sánchez-Bayo a kol. (2016) shrnují výsledky studií uplynulého desetiletí, zabývajících se koncentracemi neonikotinoidů a jejich reziduí v povrchových vodách 11 zemí, sledovanými od roku 2005. Z výsledků vyplývá že:

- Rezidua sledovaných neonikotinoidů se nacházejí ve vodních recipientech po celém světě.
- Ve 13 % analyzovaných vod byl detekován acetamiprid, v 57 % dinotefuran a v některých oblastech byla detekována přítomnost všech sledovaných sloučenin.

- Průměrné koncentrace všech neonikotinoidních sloučenin byly v rozmezí od 0,08 $\mu\text{g.l}^{-1}$ do 0,73 $\mu\text{g.l}^{-1}$.
- Nejvyšší zjištěné koncentrace byly 320 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pro imidacloprid a 225 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pro thiamethoxam.
- Průměrné hladiny reziduí se za posledních deset let zvyšují, přičemž nejvyšší míra růstu je u clothianidinu a thiamethoxamu, v souvislosti s rostoucím trendem jejich používání.

Ve studiích z Kalifornie (Starner a Goh, 2012), Nizozemska (van Dijk a kol., 2013), Švédska (Kreuger a kol., 2010) a Vietnamu (Lamers a kol., 2011) byly analyzovány koncentrace neonikotinoidů v povrchových vodách. Maximální koncentrace imidaclopridu dosáhly hodnot mezi 0,22 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Vietnam) a 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Nizozemí). Typické hladiny reziduí jsou v povrchových vodách nižší než 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Sultana a kol. (2018) v roce 2015 sledovali výskyt thiamethoxamu, clothianidinu, thiaclopridu, imidaclopridu a acetamipridu v šesti povrchových zdrojích surové pitné vody v Kanadském Ontariu. Thiamethoxam, clothianidin a imidacloprid byli detekováni ve všech vzorcích, alespoň při jednom vzorkování. Maximální koncentrace thiamethoxamu byla stanovena na 0,28 $\mu\text{g.l}^{-1}$, clothianidinu na 0,14 $\mu\text{g.l}^{-1}$, imidaclopridu 0,014 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Thiacloprid byl přítomen pouze v jednom vzorku v koncentraci 0,002 $\mu\text{g.l}^{-1}$, acetamiprid nebyl v žádném vzorku detekován. Rezidua thiamethoxamu a imidaclopridu se objevovala i v upravené vodě, v koncentracích <0,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pro thiamethoxam a <0,005 $\mu\text{g.l}^{-1}$ u imidaclopridu.

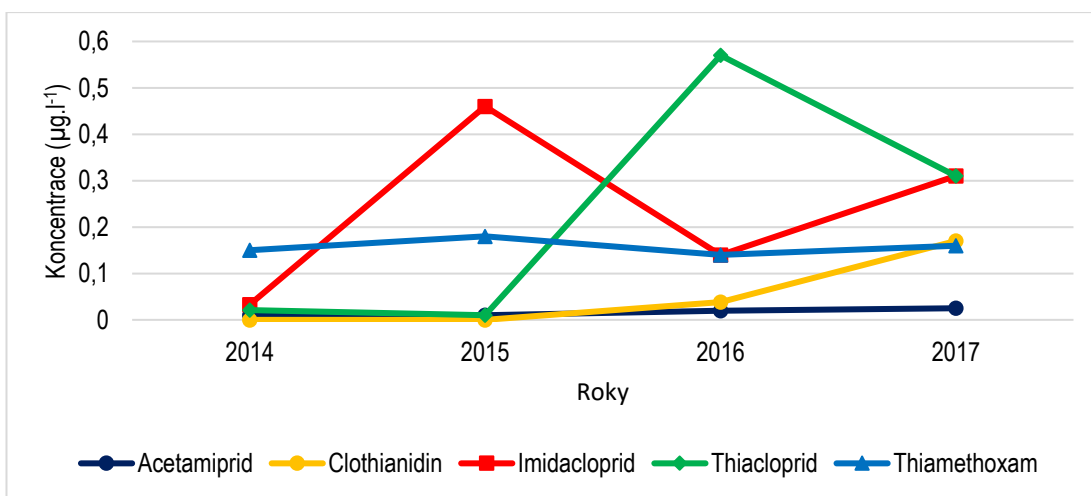
Hladik a kol. (2018) ve své studii uvádějí výsledky ročního sledování koncentrace imidaclopridu, thiamethoxamu a clothianidinu ve Velkých jezerech a jejich přítocích v USA, které probíhalo od října 2015 do září 2016. Ve studii uvádějí i dominantní krajinný pokryv v okolí místa vzorkování. Neonikotinoidy nebyly detekovány pouze tam, kde dominuje přirozený les. Průměrné koncentrace imidaclopridu v urbanizovaných a zemědělsky obhospodařovaných místech byly stanoveny mezi 0,002 – 0,01 $\mu\text{g.l}^{-1}$, thiamethoxamu 0,003 - 0,004 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a clothianidinu 0,002 – 0,027 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Maximální detekované koncentrace však byly na mnoha místech až desetkrát vyšší než roční průměr.

Maximální koncentrace neonikotinoidů v povrchových vodách České republiky, dle Českého hydrometeorologického ústavu (ČHMÚ) v roce 2017 jsou zaznamenány v tabulce č. 1. Graf č. 1 zobrazuje výskyt maximálních naměřených koncentrací neonikotinoidů v povrchových vodách ČR mezi roky 2013 a 2017. Databáze ČHMÚ

obsahuje dále údaj o výskytu imidaclopridu v podzemní vodě. Tato koncentrace mezi roky 2013 a 2017 klesla z 0,178 $\mu\text{g.l}^{-1}$ na 0,05 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (ČHMÚ, 2018). Ministerstvo zdravotnictví stanovuje v České republice vyhláškou č. 252/2004 nejvyšší mezní hodnotu výskytu pesticidů pro zdroje pitné vody na 0,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Tabulka č. 1. Maximální koncentrace vybraných neonikotinoidů v ČR v roce 2017 (ČHMÚ, 2018).

Látka	Maximální koncentrace ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Místo odběru
Acetamiprid	0,025	Klapský potok – Ústecký kraj
Clothianidin	0,17	Libočany – Ústecký kraj
Imidacloprid	0,31	Pikovice – Středočeský
Thiacloprid	0,31	Načetínský potok – Ústecký kraj
Thiamethoxam	0,16	Rotava – Karlovarský kraj



Graf č. 1. Změny maximálních naměřených koncentrací vybraných neonikotinoidů v povrchových vodách ČR mezi roky 2014 až 2017 (ČHMÚ, 2018)

2.1.2.4 Vliv neonicotinoidů na necílové organismy

Dosud provedené studie se zabývají zejména vlivem neonicotinoidů na včelu medonosnou (*Apis mellifera*), čmeláky (*Bombus sp.*) a další opylovače z čeledi Apoidea. Studie dále, jako zasažené necílové druhy zmiňují motýly (*Lepidoptera*) a žížaly (*Lumbricidae*). Méně studií se zabývá vlivem na akvatické organismy – sladkovodní i marinní, přestože tyto ekosystémy jsou neonicotinoidy široce zasaženy. U suchozemských i vodních bezobratlých jsou popsány toxické i behaviorální účinky na úrovni jednotlivých organismů i efekty na úrovni populací (Pisa a kol., 2014).

Terestrické organismy

Mnoho studií je zaměřeno na působení neonicotinoidů na populace včel, které jsou ceněny zejména jako významní opylovači většiny celosvětově významných plodin. Ztráty včel označované jako *zimní ztráty* jsou sledovány na vnitrostátních i regionálních úrovních. Měření *zimních ztrát* ukazují, že k degradaci populací včel dochází v mnoha částech světa. Vysoké ztráty nemají jedinou příčinu, ale jsou důsledkem kombinace mnoha faktorů, jako jsou ztráty biotopů, patogeny, parazité a v neposlední řadě pesticidy, a vzhledem k tomu, že neonicotinoidy patří mezi celosvětově nejpoužívanější pesticidní látky, je zkoumána jejich možná korelace se ztrátami včelstev (Pisa a kol., 2014).

Na včely působí negativně zejména látky imidacloprid, clothianidin a thiamethoxam, které se používaly ve formě postřiků celých rostlin v jejich vegetačním období. Ošetřována byla také semena plodin před vysetím a klíčící kořeny (Simon-Delso a kol., 2014). Včely požívají určité koncentrace neonicotinoidů obsažené v nektaru kvetoucích rostlin, dále přicházejí do styku s pylem ošetřených plodin. Koncentrace v nektaru a pylu jsou velmi proměnlivé, odvozené od způsobu aplikace. Rostliny ošetřené ve vegetačním období a rostliny s ošetřenými kořeny vykazují vyšší koncentrace neonicotinoidů v pylu i nektaru, než rostliny z ošetřených semen (Pisa a kol., 2014). Podle testů toxicity provedenými Nauenem a kol. (2001) a Schmuckem a kol. (2001) se smrtelná dávka imidaclopridu pro včely pohybuje mezi 3,7 a 400 ng.ks⁻¹. Odchylka pravděpodobně pramení od kombinací toxicity perorálně podávané a kontaktně používané látky. Toxicita imidaclopridu se také liší v závislosti na teplotě, stáří včel, testovaných poddruzích včel a předchozí expozici

pesticidům (Schmuck a kol., 2001; Belzunces 2012; Pisa a kol., 2014). Ačkoli se akutní toxicita neonikotinoidů v laboratorních a přírodních podmínkách v závislosti na biotických i abiotických faktorech liší, za předpokladu kombinace příznivých podmínek s obdobím aplikace insekticidu, může být tato aplikace pro včelstvo v okolí ošetřené plochy fatální (Pisa a kol., 2014).

Neonikotinoidy mají na včely také subletální efekt, projevující se zejména na aktivitě, pohybu, metabolismu a ontogenetickém vývoji. Imidacloprid, thiamethoxam a clothianidin podle Girolamiho a kol. (2009) vyvolávají paralýzu svalů křídel, což vede k zastavení pohybu křídel, imidacloprid dále narušuje pohyblivost svalstva nohou, znemožňuje chůzi a běh včel. Pesticidy mohou působit i na larvální vývoj – dospělci vylíhli z larev vystavených imidaclopridu vykazují poškození nervové i pohybové soustavy, vzniklé během vývoje (Yang a kol., 2012).

Vystavení včel subletálními dávkami ovlivňuje také sociální fungování včel, dochází k narušení paměti a orientace včel. Letální a subletální efekt neonikotinoidů může být posílen v případě působení dalších pesticidů, patogenů a parazitů (Pisa a kol., 2014).

Existující toxikologické studie naznačují, že dopady na další taxony včel (čmeláci, divoce žijící včely) jsou v podstatě stejné jako na včelu medonosnou, přičemž čmeláci mohou být v některých případech náchylnější než včely. Je zřejmé, že reálné dávky neonikotinoidů mohou mít škodlivé účinky na vývoj larev, plodnost dospělých, chování jedinců a výkonnost celých kolonií (Pisa a kol., 2014).

Bezobratlým, kteří nepůsobí jako opylovači kulturních plodin, studie nevěnují tolik pozornosti, jako opylovačům. Neonikotinoidy jsou však toxické pro téměř všechny skupiny hmyzu, včetně druhů, které predují škůdce (Van der Sluijs a kol., 2015). Mnoho bezobratlých také tvoří podstatnou část potravy mnoha druhů ptáků. Hallmann a kol. (2014) ve své studii uvádějí, že zvýšené koncentrace imidaclopridu mají v souvislosti se snižováním hmyzí populace mezi lety 2003–2010, na některých místech v Nizozemsku, negativní vliv na ptačí populace. Hallmann a kol. (2014) dále uvádějí, že v místech, kde byla koncentrace imidaclopridu v povrchové vodě vyšší než 20 ng.l^{-1} docházelo každoročně ke snížení populace hmyzožravého ptactva o 3,5 %. Tento trend se projevil až po zavedení imidaclopridu v Nizozemsku, v polovině 90. let 20. století.

Akvatické organismy

Dopad na úrovni druhů

Vodní bezobratlí jsou velmi důležitou složkou vodních ekosystémů. Mají významnou roli jako predátoři, parazité i dekompozitoři. Mnohé druhy bezobratlých se živí sedimenty, tvoří také významnou potravní základnu organismů z vyšších stupňů potravního řetězce. Vodní organismy jsou vůči pesticidům zvláště citliví, také vzhledem k tomu že se nemohou snadno vyhnout expozici přesunem do nekontaminovaného prostředí. Ve vodě rozpustné pesticidní látky představují pro bezobratlé vyšší riziko než látky usazené v sedimentech. K příjmu pesticidů do těla bezobratlých dochází během dýchání, pozřením během příjmu potravy a průchodem epidermis (Pisa a kol., 2014).

První neonikotinoidy uváděné na trh vykazovaly velmi nízkou toxicitu pro druhy, používané standardně pro testování toxicity. Letální koncentrace 48hLC50 pro perloočky (*Cladocera*) byla mezi 10 - 80 mg.l⁻¹, což je mnohem výše než u pyretroidů, organofosfátů a karbamátů (Song a kol., 1997). Stejně tak toxicita pro pstruha duhového (*Onchorhynchus mykiss*) a dánío pruhované (*Danio rerio*) byla nízká, testy vykazovaly hodnoty 96hLC50 mezi 83 - 281 mg.l⁻¹ (Ding a kol., 2004). Na základě těchto dat se usoudilo, že neonikotinoidy nemají velký vliv na vodní ekosystémy.

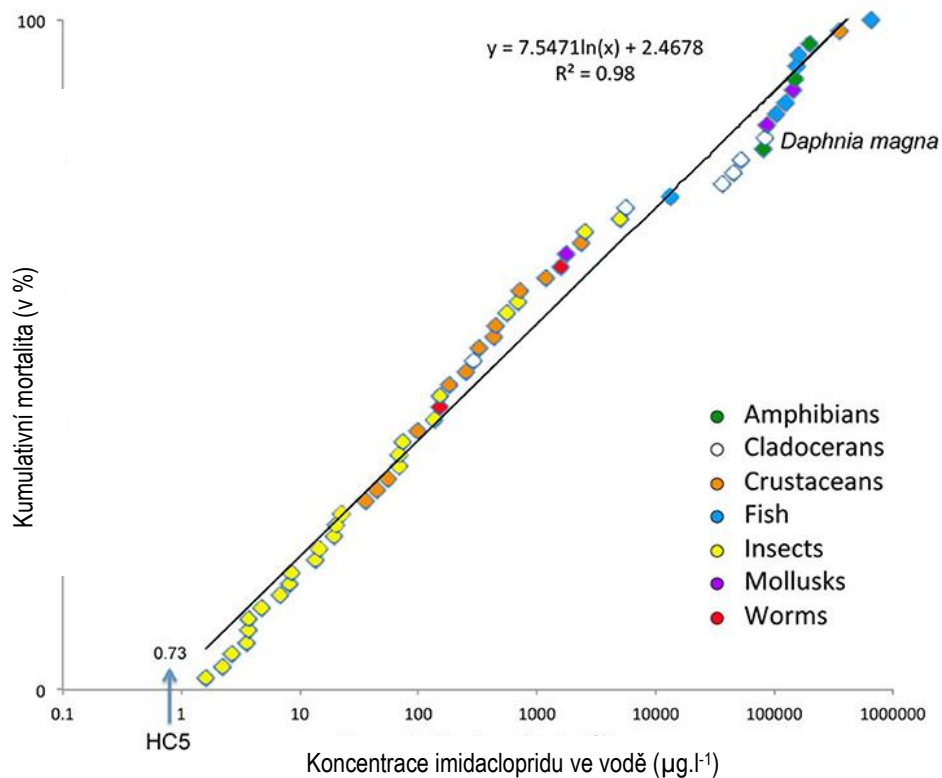
Sánchez-Bayo a Goka (2006) poukazují na to, že mnohé druhy vodních bezobratlých mohou být vůči neonikotinoidům citlivější než standardní testovací druhy, 48hLC50 pro sladkovodní lasturnatky (třída *Ostracoda*) je 185 - 719 µg.l⁻¹. Stoughton a kol. (2008) uvádí rozdílné střední letální koncentrace pro různonožce (*Hylella azteca*) při expozici 2 a 28 dnů – 115 a 7 µg.l⁻¹ a pro larvy pakomára (*Chironomus tentants*) při expozici 4 a 28 dnů – 5 a 0,9 µg.l⁻¹.

Letální koncentrace neonikotinoidů jsou závislé také na délce expozice, pro sladkovodní lasturnatky je hodnota pětidenní LC50 třikrát nižší než dvoudenní (Sánchez-Bayo, 2009), pro jepici dvoukřídlou (*Cloeon dipterum*) je chronická toxicita (28 dnů) 800krát vyšší než akutní toxicita (2-4 dny) (Van den Brink a kol., 2016). Vyšší chronickou toxicitu oproti akutní toxicitě potvrdili Beketov a Liess (2008) a Roessink a kol. (2013), kteří provedli akutní a chronické testy třech neonikotinoidů (imidacloprid, thiamethoxam a thiacloprid) na několika dalších druzích, včetně hrotnatek (*Daphniidae*), blešivců (*Gammarus*), střechatek

(*Megaloptera*) a larvách jepic (*Ephemeroptera*) a vážek (*Odonata*). Při testech v kontrolovaných přírodních podmínkách bylo pozorováno, že organismy neumírají okamžitě po ošetření rostlin insekticidním přípravkem, ale zhruba týden po aplikaci, k vymření celé populace pak dochází během několika týdnů. Krátkodobé laboratorní studie navíc neodhalují fakt, že toxické účinky nižších koncentrací, mohou být zesíleny faktory prostředí, případně mohou být zpomaleny, což se může projevit v obnovování populace (Beketov a Liess, 2008).

Přítomnost neonikotinoidů v prostředí působí na organismy také subletálně, ovlivňuje růst, reprodukci, pohyblivost, příjem potravy a plavání. Již koncentrace imidaclopridu $0,1\mu\text{g.l}^{-1}$ způsobuje inhibici příjmu potravy a růstu jepic, podobně působí i na blešivce. Imobilita jepic a blešivců byla pozorována při koncentracích $0,1 - 0,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Alexander a kol., 2008; Ashauer a kol., 2011; Roessink a kol., 2013; Morrissey a kol., 2015).

Databáze Americké agentury pro ochranu životního prostředí (EPA), ECOTOX, obsahuje LC50 imidaclopridu pro 57 druhů vodních organismů, patřících do šesti řádů. Nejcitlivějšími organismy jsou podle databáze jepice a další vodní hmyz, následují korýši řádů Amphipoda, Ostracoda, dále krevety (*Caridae*), nitěnky (*Tubificidae*) a měkkýši (*Mollusca*). Nejdolnější jsou vůči neonikotinoidům ryby (Sánchez-Bayo a kol., 2016). Všechny testované druhy perlooček jsou velmi tolerantní, výjimku tvoří *Ceriodaphnia dubia*, která vykazuje stejnou citlivost jako třída Ostracoda. Perloočky proto nejsou vhodným indikačním druhem pro hodnocení vlivu neonikotinoidních sloučenin na další taxony bezobratlých (Beketov a Liess, 2008). Rozdělení citlivosti jednotlivých taxonomických skupin je znázorněno v grafu č. 2.



Graf č. 2. Distribuce citlivosti vybraných akvatických organismů vůči imidaclopridu (upraveno podle Sánchez-Bayo a kol., 2016).

Graf distribuce citlivosti druhů použily vládní agentury některých zemí ke stanovení maximálních koncentrací v povrchových vodách. V Nizozemsku a dalších evropských zemích je, například limitní koncentrace imidaclopridu stanovena na $0,2 \mu\text{g.l}^{-1}$ pro krátkodobé znečištění, při dlouhodobém zatížení je stanovena hranice $8,3 \text{ ng.l}^{-1}$. V USA je stanovena tzv. „Aquatic Life Benchmark“ imidaclopridu pro bezobratlé na $1,05 \mu\text{g.l}^{-1}$, v Kanadě je tato hranice $0,23 \mu\text{g.l}^{-1}$, ve Švédsku 13 ng.l^{-1} (Kreuger a kol., 2010; Anderson a kol., 2015; Smit a kol., 2015). Limitní koncentrace dalších látek ze skupiny neonikotinoidů jsou podobné. Mnoho dalších zemí však doposud nestanovilo limitní koncentrace, protože vychází z toxicity pro hroznatky a ryby. Na rozdíl od jiných pesticidů, jsou výše uvedené prahové hodnoty však spíše orientační, protože, jak již bylo uvedeno, toxicita neonikotinoidů pro bezobratlé roste s délkou expozice (Sánchez-Bayo a kol., 2016).

Dopad na úrovni společenstev

Experimenty sledující dopad neonikotinoidů na společenstva vodních organismů pracují zejména s kontrolovaným prostředím rýžových polí (Japonsko) a řek (Portugalsko, Kanada a Německo). Společným rysem těchto kontrolovaných

terénních experimentů je fakt, že subletální efekt mají na organismy koncentrace, které jsou hluboko pod hodnotami LC50 testovaných vodních druhů (Sánchez-Bayo a kol., 2016).

Ke snížení abundance vodního hmyzu může docházet již při koncentracích imidaclopridu 1 - 2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a thiaclopridu 3,2 $\mu\text{g.l}^{-1}$. V krátkodobém horizontu je snížení abundance způsobeno přímou toxicitou, z dlouhodobého hlediska však vymizením citlivějších druhů vzniká volná nika pro druhy tolerantnější (Sánchez-Bayo a Goka, 2006). K obnovení populací citlivých druhů dochází pouze, je-li koncentrace neonicotinoidních látek ve vodě anebo sedimentu nižší než 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Hayasaka a kol., 2012), samotné obnovení je velmi pomalé, navíc obsadil-li původní niku konkurenční druh, k návratu druhu prakticky nedochází (Liess a kol., 2013). Pokud nedojde k obnovení populace, nedojde ani k obnovení struktury společenstva vodních organismů (Hayasaka a kol., 2012). Dopady působení neonicotinoidů jsou v kontrastu s účinky jiných pesticidních látek. Mnoho pyretroidů a organofosforečnanů způsobuje vysokou okamžitou mortalitu cílových i necílových druhů, avšak nepůsobí kumulativně a umožňují obnovu postižených populací během několika týdnů (Brock a kol., 2010).

Změna složení společenstev v tekoucích vodách může být také způsobena migrací organismů ze zasažených oblastí níže po proudu. Tento jev byl pozorován například u larev muchniček *Simulium latigonium*, nymfy jepice předjarní (*Baetis rhodani*) a blešivce obecného (*Gammarus pulex*), když koncentrace různých neonicotinoidů dosahovala 1/10 LC50 jednotlivých druhů (Beketov a Liess, 2008).

Častým jevem je narušení trofických interakcí mezi dravcem a kořistí (Morrissey a kol., 2015). Změny v potravní strategii byly pozorovány například při interakci larev blešivce potočního (*Gammarus fosalum*) s nymfami jepice předjarní při koncentraci thiaclopridu 0,5 - 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$, tyto koncentrace zvyšovaly dravost blešivců vůči nymfám na úkor detritovorní činnosti (Englert a kol., 2012.) Kreutzweiser a kol. (2008) uvádějí i další příklady změny potravních strategií, zejména u detritovorních pošvatek a chrostíků. Změna chování byla pozorována u organismů rozkládajících opadané listy z javorových stromů, ošetřených imidaclopridem v reálných polních koncentracích (3 - 11 mg.l^{-1}). Depozice ošetřených listů nezpůsobila mortalitu vodních organismů, ale zajistila nepříznivé subletální účinky, zejména zpomalení a omezení rozkladu organické hmoty vodním hmyzem.

Dopad na akvatické ekosystémy

Dopad výše uvedených skutečností dosud nebyl analyzován komplexně, z pohledu celých ekosystémů. Dosud publikované studie se zaměřují maximálně na společenstva akvatických organismů. Problémem je získávání dlouhodobých experimentálních dat, která by ukazovala souvislosti mezi účinky neonikotinoidů na úrovni jednotlivých organismů s dopady na ekosystémy. Z dosud provedených pozorování mohou být identifikovány dvě hlavní oblasti dopadu působení neonikotinoidů. První je omezení rozkladu organických látek vodními organismy v důsledku snížení abundance rozkladačů. Druhým je pak snížení abundance bezobratlých i obratlovců, jejichž potravní základnu tvoří vodní bezobratlí (Sánchez-Bayo a kol., 2016).

Rozklad organické hmoty, vnášené do vodních recipientů, je jednou ze základních složek ekosystémů. Organická hmota je potravou mnoha vodních a bentických organismů, její rozklad také ovlivňuje kvalitu vody v recipientech (Sánchez-Bayo a kol., 2016). Mnoho rozkladačů organické hmoty je citlivých vůči výskytu polutantů, včetně neonikotinoidů, v prostředí. Mezi citlivé rozkladače, jejichž populace mohou být ohroženy právě neonikotinoidy patří larvy jepic, blešivců, pošvatek a dvoukřídlých, dále různonožci, lasturnatky a stejnonožci (Kreutzweiser a kol., 2007).

Vzhledem k provázanosti jednotlivých složek ekosystémů, se dá předpokládat, že snížení abundance druhů, živících se primárně bezobratlými může korelovat se snížením početnosti bezobratlých, způsobenou znečištěním prostředí neonikotinoidy. Tento fakt se však vzhledem k množství polutantů v prostředí nedá přisuzovat pouze neonikotinoidům (Sánchez-Bayo a kol., 2016).

2.2 Materiál použitý v testech toxicity

2.2.1 Thiacloprid

Thiacloprid ([3-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-2-thiazolidinylidene]cyanamid) je pesticidní látka ze skupiny chlorovaných neonikotinoidů, s insekticidními účinky. Na trhu je od roku 2003 prodáván pod několika obchodními názvy německou společností Bayer CropScience AG (Bayer CropScience, 2018).

Thiacloprid je nažloutlá krystalická látka bez zápachu, velmi dobře rozpustná ve vodě (EPA, 2003). Základní vlastnosti látky jsou zaznamenány v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. Základní fyzikálně-chemické parametry thiaclopridu (podle ČHMÚ, 2018).

Parametr	Molekulová hmotnost (g.mol ⁻¹)	Rozpustnost ve vodě (mg.l ⁻¹)	Poločas rozpadu v půdě (dny)
Thiacloprid	257,72	184 - 185	7 – 21

Účinná látka thiacloprid působí v pesticidních přípravcích zejména při ochraně jabloní, třešní, višní a slivoní proti žravým škůdcům, jádrovín a peckovin proti mšicím, brambor proti mandelince bramborové a proti škůdcům řepky olejky a hořčice bílé (Bayer CropScience, 2018). Toxicita thiaclopridu pro některé organismy je uvedena v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3. Toxicita thiaclopridu pro vybrané druhy

Druh	Ukazatel	Koncentrace (mg.l ⁻¹) 1)	Zdroj
Krysa obecná (<i>Rattus rattus</i>)	LD50	444	ČHMÚ, (2018)
Pstruh duhový (<i>Onchorhynchus mykiss</i>)	96hLC50	30,5	ČHMÚ, (2018)
Řasa (<i>Desmodesmus subspicatus</i>)	EC50	97	ČHMÚ, (2018)
Hrotnatka velká (<i>Daphnia magna</i>)	EC50	85,1	ČHMÚ, (2018)
Jepice předjarní (<i>Baetis rhodani</i>)	96hLC50	0,0046	PANNA, (2018)
Blešivec obecný (<i>Gammarus pulex</i>)	96hLC50	0,35	PANNA, (2018)
Křepel virginský (<i>Colinus virginianus</i>)	LD50	2716 mg.ks ⁻¹	TOXNET, (2018)
Včela medonosná (<i>Apis mellifera</i>)	Kontakt	24.2 µg.včela ⁻¹	TOXNET, (2018)

Dle údajů ČHMÚ (2018) bylo v České republice v roce 2016 aplikováno 25 972,2 kg (l) thiaclopridu, rozdělení tohoto množství mezi jednotlivé plodiny, je znázorněno v grafu v příloze č. 1. Celková spotřeba thiaclopridu, obsaženého v pesticidních přípravcích, v České republice mezi lety 2001-2016 je zobrazena v grafu v příloze č.

3. Maximální koncentrace thiaclopridu $0,57 \mu\text{g.l}^{-1}$, v České republice byla zjištěna v roce 2016 na Lučickém potoce na Havlíčkobrodsku (ČHMÚ, 2018).

2.2.2 Raci

Raci jsou všežraví bentičtí makrofágové, patřící mezi největší vodní bezobratlé živočichy, jejichž škála přijímané potravy je velmi široká a vzhledem k této skutečnosti, jsou ve vodním prostředí nezastupitelní, patří mezi korýše řádu Decapoda, infrařádu Astacida (Hobbs, 1989), v rámci evropských raků je v současnosti akceptováno pouze pět druhů, patřících do dvou rodů (Kozák a kol. 2013). Druhově bohatší je naopak Severní Amerika, kde se může vyskytovat i více než 400 druhů sladkovodních raků (Hobbs, 1989; Crandall a Buhay, 2008; De Grave, 2009).

Tělo raka je členěno na dvě části – hlavohruď (cephalotorax), kterou tvoří celkem 13 tělních článků a zadeček (abdomen), složený ze šesti zřetelných krátkých, širokých článků. Tělo raků je kryto krunýřem (exoskeletem), hlavohruď kryje z vrchní strany a boků celistvý karapax, který vpředu vybíhá mezi očima do rostra. Povrch karapaxu může být, v závislosti na druhu raka, hladký, granulovaný i pokrytý drobnými, ostrými trny. Tělo raka nese celkem osmnáct párů, různě pozměněných končetin, nejvýraznější je devátý pár, opatřen výraznými klepety. Raci dýchají pomocí žaber, uložených v žaberních komorách na bocích cephalotoraxu (Kozák a kol., 2013).

Rak červený (*Procambarus clarkii*)

Rak červený, dorůstající obvykle 10 až 12 výjimečně až 20 cm, patří mezi středně velké raky. V přírodě se díky rychlému životnímu cyklu dožívá obvykle maximálně 18 měsíců, na chladnějších lokalitách se však může dožít až pěti let (Holdich a kol., 2006; Crandall a Buhay, 2008).

Dospělí jedinci jsou obvykle červení nebo červeno až oranžovohnědí, juvenilní ráčata bývají méně výrazná, olivově zelená či hnědá (Pöckl a kol., 2006)

Hlavohruď raka červeného je poměrně úzká, na povrchu výrazně zrnitá, s výrazným rostrem, zakončeným krátkou špičkou. Změnami v anatomii hlavohrudi došlo k vytvoření prostoru pro větší rozvoj dýchacího aparátu v žaberní dutině, díky

tomu je rak červený, oproti jiným druhům, odolnější vůči nízké koncentraci rozpuštěného kyslíku ve vodě (Holdich a kol., 2006; Kozák a kol., 2013).

Životní cyklus raka červeného je odvozen od podmínek, ve kterých se daná populace nachází. Tento druh se vyznačuje vysokou plodností, samice mají 200 až 300 vajíček, ale výjimečně i 700 (Huner, 2002), ráčata velmi rychle rostou, pohlavní dospělosti mohou dosáhnout již ve věku pěti měsíců (Kozák a kol., 2013).

Rak červený má značné migrační schopnosti, dokáže se rychle šířit na nové lokality, je také přenašečem račího moru (Gherardi a kol., 2000). Tento druh je značně odolný vůči celé řadě parametrů vodního prostředí, při nedostatku rozpuštěného kyslíku ve vodě je schopný dobře využívat vzdušný kyslík, dokáže se také přizpůsobit nízkým teplotám, ačkoliv se jedná o teplomilný druh (Kozák a kol., 2013).

Rak mramorovaný (*Procambarus fallax f. virginalis*)

Rak mramorovaný patří mezi menší druhy raků, obvykle dorůstá méně než 10 cm, největší jedinci mohou mít až 13 cm. Průměrně se dožívá dvou let, jde tedy o značně krátkověký druh (Pöckl a kol., 2006; Vogt, 2010).

Charakteristické je pro tento druh mramorování na hnědém anebo zeleném podkladu. Malá a slabě zrnitá klepeta jsou naopak bez patrného mramorování (Holdich a kol., 2006).

Tento druh raka se rozmnožuje partenogeneticky – jsou známy pouze samice, samci nebyli pozorováni (Martin a kol., 2007). Pohlavní dospělosti dosahují samice ve 25 až 35 týdnech věku, v závislosti na podmínkách prostředí (Holdich a kol., 2006). Vzhledem k nenáročnosti na životní podmínky, rychlému růstu, dospívání a vysoké plodnosti je jeho odchov jednoduchý a chovatelé se často zbavují nadbytečných jedinců vypuštěním do volné přírody, kde je schopen přežít a dále se rozmnožovat. Rak mramorovaný je potenciálním přenašečem račího moru (Jimenez a Faulknes, 2011).

Rak ničivý (*Cherax destructor*)

Rak ničivý je jedním z poměrně velkých druhů raků, dorůstajících až 15 cm. Dožívá se obvykle tří, maximálně šesti let. Zbarvení krunýře je variabilní, od béžové po téměř černou, jedinci v zajetí bývají modrošedí, modří, červení i žlutí. Výrazně

vyvinutá klepeta jsou hladká a nesou identické zbarvení jako hlavohrud', spodní strana je zpravidla bílá až šedá (Holdich a kol., 2006).

Rak ničivý se nespécializuje na jeden typ habitatů, obývá široké spektrum – od pramenišť, horských úseků řek až po subtropické potoky, jezera a bažiny, častěji se ale vyskytuje ve stojatých vodách. Původní habitaty jsou periodicky vysychající, s tím souvisejí kyslíkové deficity, které vedly k rozvoji schopnosti využívat v případě potřeby i vzdušný kyslík. Pohlavní dospělosti rak ničivý dosahuje i dříve než ve věku jednoho roku, samice jsou velmi plodné a za vhodných podmínek jsou schopny rozmnožovat se až pětkrát za rok. Tento druh je vysoce přizpůsobivý, vyznačující se agresivitou a teritorialitou (Kozák a kol., 2013).

2.2.3 Perloočky (řád *Cladocera*)

Perloočky tvoří monofyletickou skupinu drobných vodních korýšů, vyskytujících především ve stojatých vodách jako součást planktonu. Tvoří potravní základnu mnoha druhů ryb a dalších vodních živočichů, samy se živí fytoplanktonem, existují však i dravé druhy živící se zooplanktonem (Ruppert a kol., 2004).

Perloočky mají laterálně zploštělé tělo, opatřené dvouchlopňovou skořápkou, na břišní straně rozevřenou. Na hlavě mají jedno složené oko a naupliové očko. Pohybují se pomocí antén, potravu filtrují pomocí hrudních nožek, které mají také dýchací epipodity. Cévní soustava je redukována na srdce s párem ostií (Sedlák, 2005).

Pro perloočky je typická heterogonie, za optimálních podmínek převládají v populaci samičky, rozmnožují se partenogeneticky, při nástupu nepříznivých podmínek dojde u samic k tvorbě haploidních vajíček, ze kterých se líhnou samci. Za nepříznivých podmínek kladou samice po oplození samcem ephippia, ve kterých jsou vajíčka schopna přežít nepříznivé podmínky. Nejznámějšími zástupci jsou hrotnatky (*Daphniidae*), nosatičky (*Bosminidae*) a ramenatky (*Leptodoridae*) (Sedlák, 2005).

Z toxikologického hlediska jsou perloočky významné jako citlivé indikační druhy. Zejména zástupci hrotnatek jsou využívány jako testovací organismus k biologickým zkouškám toxicity (Velíšek a kol., 2014).

3 MATERIÁL A METODIKA

Vliv pesticidů na bázi neonikotinoidů na necílové organismy byl hodnocen pomocí akutního testu toxicity na racích a akutního imobilizačního testu na hrotnatkách velkých (*Daphnia magna*). Experimenty probíhaly v akvarijní místnosti Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie a v prostorách Laboratoře etologie ryb a raků Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech, Fakulty rybářství a ochrany vod, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

3.1 Testovaná chemikálie

Pro experiment nebyl použit chemicky čistý neonikotinoid, ale insekticidní přípravek CALYPSO® 480 SC (obr. č. 1), obsahující neonikotinoid thiacloprid ((Z)-[3-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-2-thiazolidinylidene]cyanamid) o koncentraci 480 g.l⁻¹ (40,4% hm). Insekticidní přípravek Calypso byl zakoupen od německé společnosti Bayer CropScience AG.



Obrázek č. 1. Insekticidní přípravek CALYPSO® 480 SC (Foto: A. Strouhová).

3.2 Akutní test toxicity na racích

3.2.1 Experimentální organismy

Vzhledem k tomu, že původní druhy raků, vyskytující se na území České republiky patří mezi ohrožené druhy a jsou chráněny vnitrostátními i evropskými předpisy, byly pro účely akutního testu toxicity použity druhy invazní, dva severoamerické - rak mramorovaný (obr. č. 2) a rak červený (obr. č. 3) a jeden australský - rak ničivý (obr. č. 4).



Obrázek č. 2. Rak mramorovaný (*Procambarus fallax f. virginalis*) (Foto: A. Strouhová).



Obrázek č. 3. Rak červený (*Procambarus clarkii*) (Foto: A. Strouhová).



Obrázek č. 4. Rak ničivý (*Cherax destructor*) (Foto: A. Strouhová).

Jedinci všech použitých druhů byli získáni z chovu Fakulty rybářství a ochrany vod, Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech. Od každého druhu byla použita dvě různá vývojová stádia, která se testovala odděleně, celkem tedy bylo provedeno šest testů.

Průměrné délky těl (měří se od začátku rostra po konec telsonu) a průměrné hmotnosti raků použitých v testech akutní toxicity jsou zaznamenány v tabulce č. 4. Všichni jedinci byli v dobré zdravotní kondici.

Tabulka č. 4. Průměrné míry raků použitých v testech toxicity.

Druh raka	Průměrná délka těla (mm) ± SD	Průměrná hmotnost (mg) ± SD
Rak mramorovaný (mladší jedinci)	22,74 ± 2,75	224,64 ± 84,45
Rak mramorovaný (starší jedinci)	45,02 ± 7,87	2364,87 ± 1499,11
Rak červený (mladší jedinci)	13,55 ± 1,67	49,00 ± 13,00
Rak červený (starší jedinci)	23,03 ± 5,29	311,13 ± 220,24
Rak ničivý (mladší jedinci)	20,90 ± 3,20	214,5 ± 136,28
Rak ničivý (starší jedinci)	49,27 ± 9,88	3780,00 ± 3183,00

3.2.2 Princip a podmínky testu

Test byl proveden s modifikacemi podle metodiky OECD č. 203 pro testování akutní toxicity na rybách.

Testované organismy byly po dobu 96 hodin vystaveny účinku různých koncentrací testované látky rozpuštěné ve vodě, testovací organismy byly nasazeny také do vody bez testované látky, vznikla tak kontrolní skupina. Po každých 24 hodinách byla lázeň vyměňována a zaznamenávala se mortalita testovacích organismů. Z hodnot mortality se pomocí probitové analýzy stanovila LC50 – koncentrace testovaného vzorku, která vyvolala úhyn 50 % testovacích organismů. LC50 se stanovovala po 24, 48, 72 a 96 hodinách.

3.2.3 Průběh testu

Test akutní toxicity byl proveden na třech druzích raků, kdy od každého druhu byla použita dvě různá vývojová stádia (pro účely této práce označováni jako starší – obr. č. 5 a mladší – obr. č. 6 jedinci), celkem bylo provedeno šest testů, každý test byl prováděn ve dvou stejných koncentračních řadách.



Obrázek č. 5. Starší jedinec raka ničivého (Foto: A. Strouhová).



Obrázek č. 6. Mladší jedinci raka červeného (Foto: A. Strouhová).

Před zahájením testů byly raci vždy zkontrolováni a rozděleni do akvárií po 7 až 10 kusech, tedy 14 až 20 kusů pro každou koncentraci (při testování starších jedinců bylo použito vždy méně kusů než při testování mladších jedinců). Pro znemožnění kanibalismu při testování větších jedinců byli raci v akváriích odděleni pomocí speciálních plastových boxů (obr. č. 7.).

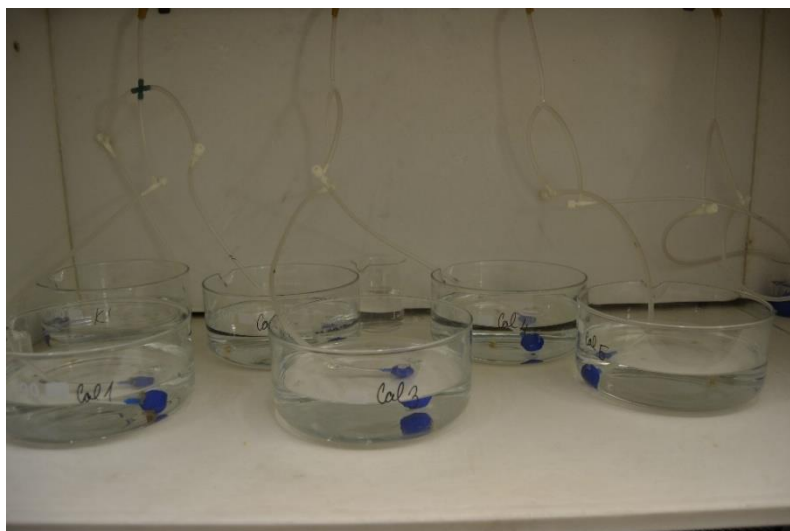


Obrázek č. 7. Speciální plastový box pro oddělení starších raků (Foto: A. Strouhová).

Pro testování starších raků byla použita akvária o objemu 20 l s 10 litry vody (obr. č. 8), menší raci byli testováni v 0,5 a 1 l vody (obr. č. 9). Po rozdělení do akvárií byli raci 7 dní před expozicí pesticidu aklimatizováni v čisté vodě.



Obrázek č. 8. Akvária o objemu 20 l pro testování starších raků (Foto: A. Strouhová).



Obrázek č. 9. Kádinky o objemu 1 l pro testování mladších raků (Foto: A. Strouhová).

Voda použita pro testy měla kyselinovou neutralizační kapacitu ($\text{KNK}_{4,5}$) $1,0 \text{ mmol.l}^{-1}$, koncentraci celkového amoniaku ($\text{NH}_3+\text{NH}_4^+$) $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$, koncentraci dusičnanů (NO_3^-) $2,92 \text{ mg.l}^{-1}$, koncentraci dusitanů (NO_2^-) $0,0001 \text{ mg.l}^{-1}$, koncentraci fosforečnanů (PO_4^{3-}) $0,003 \text{ mg.l}^{-1}$, koncentraci vápenatých a hořečnatých iontů ($\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$) $7,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a chemickou spotřebu kyslíku (CHSK_{Mn}) $0,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Další fyzikálně chemické parametry vody v akváriích (teplota, pH a nasycení vody kyslíkem) byly měřeny před zahájením testů, dále po 24, 48, 72 a 96 hodinách, vždy před výměnou lázně, všechny hodnoty byly pravidelně kontrolovány a zaznamenávány. Teplota se pohybovala mezi $17,7$ až $22,5$ ° C, pH vody bylo v rozmezí $7,21$ až $8,12$, nasycení vody kyslíkem dosahovalo 84 – 106 %.

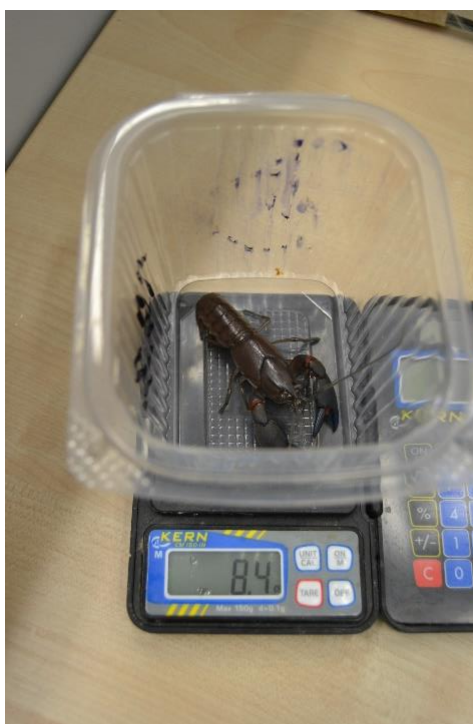
Výsledky testů lze považovat za platné, jelikož v jednotlivých testech: v kontrolních skupinách nebyly zaznamenány úhyny (povolené maximum je do 10 %); teplota vody se nezměnila o více než 1 stupeň Celsia; pH se nezměnilo o jednotku; nasycení vody kyslíkem nekleslo pod 60 % a koncentrace testované látky neklesla pod 80 % nominální koncentrace. Během testů byla analyticky stanovena koncentrace thiaclopridu ve vodě pomocí metody kapalinové chromatografie (HPLC-MS/MS). Koncentrace thiaclopridu ve vodě během testů neklesla pod 95 % nominální koncentrace. Stanovení koncentrace nebylo součástí bakalářské práce a toto stanovení bylo provedeno formou služby. Byla tedy splněna validace pro akutní testy toxicity.

Celková doba expozice při testu akutní toxicity byla 96 h. Po každých 24 hodinách byli raci kontrolováni a byla jim vyměňována lázeň, plastové boxy byly

z akvárií opatrně vyjmuty, raci byli zkontrolováni (pozorovaly se změny v chování, pohybová aktivita, úhyny aj.), uhynulí jedinci byli odstraněni, změřeni (obr. č. 10) a zváženi (obr. č. 11), byla zaznamenána mortalita a další pozorované změny v jednotlivých koncentracích.



Obrázek č. 10. Měření uhynulého jedince (Foto: A. Strouhová).



Obrázek č. 11. Vážení uhynulého jedince (Foto: A. Strouhová).

V průběhu testů raci nebyli krmeni, z důvodu zamezení případného uvolnění dalších toxinů a ovlivnění toxicity testované látky. Koncentrace testované látky

Calypso byly stanoveny na základě předběžných testů, testovaných koncentrací bylo 8–10, vždy bylo použito také kontrolní akvárium s nulovou koncentrací testované látky. V tabulce č. 5 jsou zaznamenány počty koncentrací, počty jedinců v koncentraci, objemy lázní, nejvyšší a nejnižší koncentrace Calypsa v jednotlivých testech.

Tabulka č. 5 Základní parametry jednotlivých testů toxicity.

Druh raka	Počet koncentrací	Počet jedinců v koncentraci	Objem lázně (l)	Nejnižší koncentrace (mg.l ⁻¹)	Nejvyšší koncentrace (mg.l ⁻¹)
Rak mramorovaný (mladší jedinci)	10	20	0,5	0,1	80
Rak mramorovaný (starší jedinci)	8	14	10,0	0,1	80
Rak červený (mladší jedinci)	8	16	1,0	0,1	80
Rak červený (starší jedinci)	9	14	10,0	0,1	50
Rak ničivý (mladší jedinci)	9	15	10,0	0,1	50
Rak ničivý (starší jedinci)	7	14	10,0	0,1	50

3.2.4 Vyhodnocení testů akutní toxicity

Hodnoty mortality získané z jednotlivých akutních testů toxicity na racích byly použity pro výpočty letálních koncentrací (LC) pro jednotlivé druhy testovaných organismů. Letální koncentrace byly určeny lineární regresí a probitovou analýzou s intervalem spolehlivosti 95 % pomocí programu EKO-TOX (verze 5.2, INGEO Liberec). Po 24, 48, 72 a 96 hodinách byly určovány:

- LC0 (koncentrace testované látky v mg.l⁻¹ která nezpůsobí úhyn žádného testovacího organismu),
- LC50 (koncentrace testované látky v mg.l⁻¹ která způsobí úhyn 50 % testovacích organismů) a
- LC100 (koncentrace testované látky v mg.l⁻¹ která způsobí úhyn 100 % testovacích organismů).

3.3 Akutní imobilizační test na *Daphnia magna*

3.3.1 Experimentální organismy

Hrotnatky použité v akutním imobilizačním testu byly kultivovány v Laboratoři vodní toxikologie a ichtyopatologie. Jedinci použítí v testu pocházeli z jednoho chovu a nebyli starší než 24 hodin.

3.3.2 Princip a podmínky akutního imobilizačního testu na hrotnatkách

Test byl proveden podle metodiky OECD č. 202 akutní imobilizační test na hrotnatkách.

Po dobu 48 hodin byly testovací organismy vystaveny účinku různých koncentrací testovaného přípravku Calypso, rozpuštěné ve standardní ředící vodě (ISO). Současně byly nasazeny organismy do ředící vody bez testované látky – kontrola.

Po 24 a 48 hodinách byly organismy zkontrolovány, zaznamenávala se imobilizace a mortalita testovaných jedinců, z hodnot byla pomocí probitové analýzy stanovena EC50 – koncentrace která způsobila imobilizaci 50 % testovacích organismů.

3.3.3 Průběh akutního imobilizačního testu na hrotnatkách

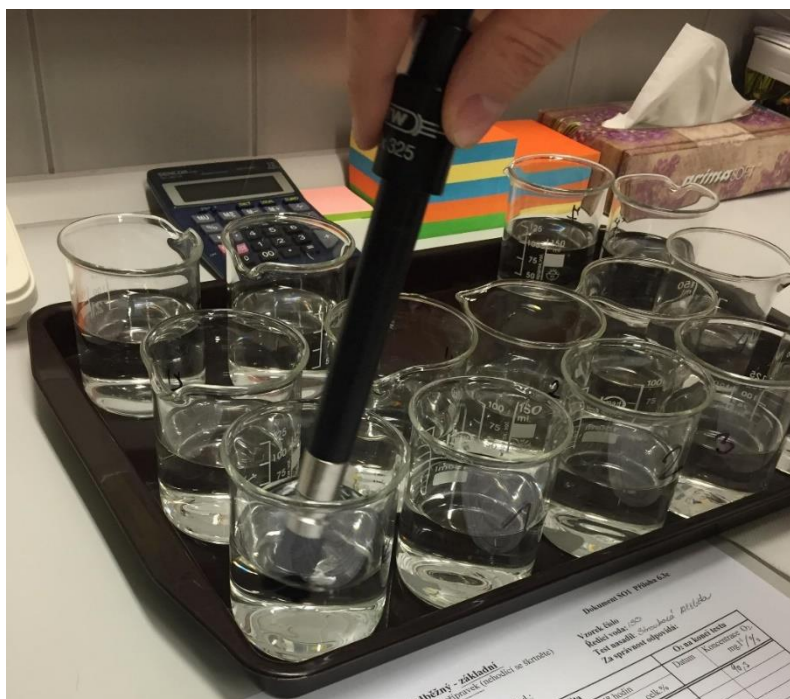
Akutní imobilizační test na hrotnatkách byl proveden na 24 hodin starých jedincích *Daphnia magna*. Test byl proveden ve dvou stejných koncentračních řadách.

Před zahájením testu byly hrotnatky rozděleny po 10 kusech do kádinek se 100 ml standardní ředící vody připravené podle ISO 6341 pro testy toxicity na hrotnatkách. Do kádinek byla dále dávkována testovaná látka podle koncentrační řady sestavené na základě předběžného testu. Koncentrační řada zahrnovala 7 různých koncentrací (0,5; 1; 10; 20; 40; 60; 100 mg.l⁻¹), dále byla použita kontrolní kádinka s nulovou koncentrací pesticidního přípravku. Každá testovaná a kontrolní skupina byla provedena ve dvou paralelních opakováních (obr. č. 12).



Obrázek č. 12 Koncentrační řada ve dvou paralelních opakováních (Foto: A. Strouhová).

Teplota během testu byla $21,0 \pm 0,2$ °C); koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích na konci testu byla větší než 2 mg.l^{-1} ; koncentrace testované látky během testu neklesla pod 80 % nominální koncentrace a imobilizace organismů v kontrolní skupině byla menší než 10 %. Měření pH, teploty a koncentrace rozpuštěného kyslíku probíhalo po 24 h (obr. č. 13). Byla tedy splněna validace pro akutní imobilizační test na hrotnatkách.



Obrázek č. 13. Měření pH, teploty a koncentrace rozpuštěného kyslíku (Foto: A. Strouhová).

Celková expozice při testu byla 48 h; po 24 hodinách byly hrotnatky zkontrolovány, imobilizovaní a uhynulí jedinci byli spočítáni a odstraněni, jejich počty byly zaznamenávány podle jednotlivých koncentrací.

3.3.4 Vyhodnocení imobilizačního testu

Hodnoty imobilizace a mortality z akutního imobilizačního testu byly použity pro výpočet EC50 - koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50 % testovacích organismů. Hodnota EC50 byla určena lineární regresí s probitovou analýzou s intervalem spolehlivosti 95 % pomocí programu EKO-TOX (verze 5.2, INGEO Liberec).

4 VÝSLEDKY

4.1 Změny v chování raků v průběhu testu toxicity

V průběhu testů byly pozorovány změny v chování raků. Nejpatrnější byla klesající aktivita raků se stoupající koncentrací testované látky. Raci v akváriích s nulovou anebo velmi nízkou koncentrací Calypsa byli při kontrolách velmi pohybliví, v případě větších jedinců je možné popsat i obranné agresivní chování (štípání klepety).

Značné změny v chování bylo možno pozorovat zhruba od koncentrace 5 mg.l⁻¹ testované látky, od této koncentrace se raci přetáčeli na záda, klesala frekvence i rychlost pohybů a vzrůstala celková apatie organismů. Mimo zpomalení pohybů končetin docházelo také ke zpomalení pohybů žaber, zpomalení dýchání a následnému úhynu organismů. U jedinců z vyšších koncentrací již nebylo zaznamenáno žádné obranné chování.

4.2 Mortalita raků

Hodnoty letálních koncentrací pesticidu Calypso u pro jednotlivé druhy a věkové kategorie raků jsou zaznamenány v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6. Letální koncentrace pesticidu Calypso pro raky.

Druh raka	24 h (mg.l ⁻¹)			48 h (mg.l ⁻¹)			72 h (mg.l ⁻¹)			96 h (mg.l ⁻¹)		
	LC0	LC50	LC100	LC0	LC50	LC100	LC0	LC50	LC100	LC0	LC50	LC100
Rak mramorovaný (mladší jedinci)	0,00	67,60	>1000	0,10	10,30	>1000	0,03	3,06	329,93	0,02	1,60	148,95
Rak mramorovaný (starší jedinci)	8,90	65,00	472,00	9,30	54,90	323,70	1,70	54,40	>1000	1,00	27,30	727,60
Rak červený (mladší jedinci)	0,36	6,72	125,29	0,05	4,47	410,43	0,05	2,33	116,05	0,08	1,13	15,82
Rak červený (starší jedinci)	6,40	20,00	62,20	2,30	10,60	48,30	0,02	7,96	>1000	0,09	1,94	43,35
Rak ničivý (mladší jedinci)	0,02	2,63	310,92	0,01	0,96	145,26	0,01	0,69	42,91	0,01	0,52	27,46
Rak ničivý (starší jedinci)	3,40	44,80	587,30	3,50	27,50	216,40	1,40	11,10	91,40	1,41	7,65	41,42

Přípravek Calypso je toxičtější pro mladší jedince. Výjimku tvoří pouze rak mramorovaný, u kterého je hodnota 24hLC50 vyšší pro mladší jedince než pro starší, avšak již po 48 hodinách jsou hodnoty letální koncentrace nižší pro mladší jedince.

Z porovnání 96hLC50 starších jedinců všech druhů vyplývá, že nejodolnějším druhem vůči testovanému pesticidnímu přípravku je rak mramorovaný. Ke stejnému závěru dojdeme i při porovnání 96hLC50 mladších jedinců všech druhů.

Dle snižování hodnoty LC50 s narůstající dobou expozice lze odvodit nárůst toxicity v čase. Sestupná tendence hodnoty LC50 je také patrná z grafu v příloze č. 2.

4.3 Imobilizace perlooček

Imobilizací (EC) *Daphnia magna* se rozumí makroskopicky pozorovatelná neschopnost samostatného prostorového pohybu do 15 s po krouživém zamíchání lázně, za imobilizované považujeme i jedince, kteří pohybují pouze tykadly druhého páru, ale nejsou schopny samostatného pohybu.

Probitovou analýzou byly získány následující hodnoty: 24hEC50 = 292,7 mg.l⁻¹, 48hEC50 = 32,7 mg.l⁻¹. Hrotnatky velké jsou vůči pesticidnímu přípravku Calypso SC480 odolnější než raci, dá se však předpokládat, že s prodlužující se dobou expozice by toxicita pro hrotnatky stoupala.

DISKUSE

Cílem této práce bylo shrnutí dosavadních poznatků o neonikotinoidech, jejich výskytu ve vodních ekosystémech a vlivu na necílové, zejména akvatické organismy. Dílčím cílem bylo také provedení a vyhodnocení akutních testů toxicity na racích a akutního imobilizačního testu na hrotnatkách, s neonikotinoidovým insekticidním přípravkem CALYPSO® 480 SC, obsahujícího 48 % thiaclopridu.

Využití raků v testech toxicity odpovídá konceptu 3R (Replace, Reduce, Refine), který upřednostňuje využití bezobratlých živočichů v testech toxicity před obratlovcí (Russel a Burch, 1959). Rak červený, mramorovaný ani ničivý nepatří mezi ohrožené anebo chráněné druhy, jsou rychle rostoucí, vysoce plodní a dosahují brzy pohlavní dospělosti (Kozák a kol., 2013). Vzhledem k těmto charakteristikám jsou vhodnými kandidáty na modelové organismy pro testy toxicity. Mimo raků byla v této studii využita hrotnatka velká pro imobilizační test toxicity. Hrotnatka je jedním, ze standardních testovacích druhů pro hodnocení toxicity nově uváděných i dlouhodobě používaných látek. Výhoda použití perlooček pro testy toxicity spočívá zejména v její snadné kultivovatelnosti, rychlému růstu a vysoké citlivosti vůči širokému spektru polutantů (Guilhermino a kol., 2000).

Během experimentu byla zjištěna toxicita pesticidního přípravku Calypso pro tři druhy raků ve dvou věkových kategoriích. Sledována byla zejména mortalita, ale byly zaznamenány i změny v chování jedinců, velmi dobře pozorované zejména u starších, a tedy i větších raků. Se stoupající koncentrací testovaného přípravku se rapidně snižovala celková aktivita raků, zatímco v koncentracích nižších než 1 mg.l^{-1} byli raci velmi pohybliví a bylo u nich pozorováno i obranné agresivní chování jako štípaní klepety, v koncentracích nad 5 mg.l^{-1} aktivita raků značně klesala, raci se přetáčeli na záda, klesala rychlost i frekvence jejich pohybů a zvyšovala se celková apatie organismů. Podobné změny chování při akutním testu toxicity směsi pesticidních látek bensulfuron-methylu a acetochloru (MBA) na raku červeném, uvádějí Yu a kol. (2017), raci trhavě pohybovali končetinami a tělem, ztráceli rovnováhu, byli letargičtí, zpomaloval se pohyb žaber a dýchání a postupně umírali. Naopak Koutník a kol. (2014) nezaznamenali u raka mramorovaného, při chronickém vystavení (30 dnů), koncentracím $0,52 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ a $3,06 \text{ mg.l}^{-1}$ metribuzinu, žádné změny v chování oproti kontrolní skupině.

Přípravek se, dle našich předpokladů, projevil toxičtější pro juvenilní jedince. V závislosti na druhu 96hLC50 juvenilních jedinců byla 0,52 mg.l⁻¹ (rak ničivý), 1,13 mg.l⁻¹ (rak červený) a 1,6 mg.l⁻¹ (rak mramorovaný). Pro starší raky byla hodnota 96hLC50 1,94 mg.l⁻¹ (rak červený), 7,65 mg.l⁻¹ (rak ničivý) a 27,3 mg.l⁻¹ (rak mramorovaný). Nejodolnějším se v obou kategoriích ukázal rak mramorovaný. Jeho hodnota LC50 v průběhu celého testu vysoce převyšovala hodnoty LC50 ostatních dvou druhů. Budeme-li vycházet z těchto výsledků, můžeme raka mramorovaného považovat za druh odolnější vůči pesticidům, což zvyšuje jeho šanci na úspěšnou introdukci a případné vytlačení méně odolných druhů. Toxicitě neonikotinoidů pro raky se věnuje pouze málo studií, například Barbee a Stout (2009) uvádějí 96hLC50 pro juvenilního raka červeného pro clothianidin 0,059 mg.l⁻¹ a pro thiamethoxam 0,967 mg.l⁻¹. Finnegan a kol. (2017) uvádějí průměrnou hodnotu 96hLC50 thiamethoxamu pro dospělé raka červeného 10 mg.l⁻¹. V porovnání s dalšími pesticidy, například metribuzinem, pyretroidy (cypermethrin, cyfluthrin, deltamethrin), karbamáty (carbofuran, carbaryl) a organofosfáty (malathion, fenitrothion), jsou neonikotinoidy pro raka červeného méně toxické. Hodnota 96hLC50 metribuzinu pro raka červeného je, dle Velíška a kol. (2013) 3,06 mg.l⁻¹, u pyretroidů se 96hLC50 pohybuje mezi 0,14 a 0,22 µg.l⁻¹ (Morolli a kol., 2006). Hodnota 96hLC50 carbofuranu a carbarylu je 0,5 mg.l⁻¹, malathionu a fenitrothionu je 50 a 3,5 mg.l⁻¹ (Andreu-Moliner a kol., 2008).

Toxicita pesticidního přípravku Calypso byla dále hodnocena pomocí akutního imobilizačního testu na hrotnatce velké. Hodnota 48hEC50 získaná z testu byla 32,7 mg.l⁻¹. Takács a kol. (2017) uvádí 48hEC50 pesticidu Calypso pro hrotnatku velkou 27 mg.l⁻¹ a hodnotu 48hEC50 čistého thiaclopridu uvádějí 10,1 mg.l⁻¹. Databáze ČHMÚ (2018) uvádí hodnotu 48hEC50 čistého thiaclopridu pro hrotnatku 85,1 mg.l⁻¹, pro ostatní neonikotinoidy se tato hodnota pohybuje mezi 49,8 mg.l⁻¹ (acetamiprid) a 100 mg.l⁻¹ (thiamethoxam). Hayasaka a kol. (2013) uvádějí toxicitu imidaclopridu a clothianidinu pro pět druhů perlooček, dle této studie je nejcitlivějším druhem *Ceriodaphnia dubia*, jejíž 48hEC50 pro thiacloprid je 0,57 mg.l⁻¹ a pro clothianidin 1,69 mg.l⁻¹. Vůči imidaclopridu je naopak nejodolnější kaluženka klínohlavá (*Moina macrocopa*), 48hEC50 je 45,271 mg.l⁻¹ a vůči clothianidinu hrotnatka velká, 48hEC50 je 67,56 mg.l⁻¹. Oproti neonikotinoidům jsou pro hrotnatku velkou toxičtější například pyretroidy, 48hEC50 cypermethrinu je 0,275 µg.l⁻¹ (ČHMÚ, 2018).

Přesto že akutní testy toxicity nemají takovou vypovídací hodnotu jako například chronické testy, jedná se o významný způsob hodnocení látek nově uváděných i dlouhodobě používaných. Výsledky akutních testů toxicity lze využít pro zařazení látek do skupin podle jejich toxicity. Raci mohou být, vůči některým látkám, citlivější než hrotnatky a mohlo by být přínosné, zařadit je mezi standardní testovací organismy.

Z výsledků této studie vyplývá, že raci jsou vůči pesticidnímu přípravku s obsahem thiaclopridu mnohem citlivější než hrotnatky. Vzhledem ke vzrůstající spotřebě thiaclopridu v České republice (viz graf v příloze č. 3) i po celém světě, je nutné zabývat se jeho možným vlivem na organismy i ekosystémy. Thiacloprid by mohl mít vliv zejména na akvatické ekosystémy v zemědělsky intenzivně využívaných lokalitách a díky povrchovému i podpovrchovému odtoku také v dolních úsecích řek. Thiacloprid je ve vodě stabilní, může docházet k jeho kumulaci a zvyšování jeho koncentrací, a lze předpokládat, že zvýšené koncentrace mohou mít vliv na funkci celého ekosystému.

ZÁVĚR

V této práci byly posouzen výskyt neonikotinoidů ve vodních ekosystémech a jejich vliv na necílové, zejména akvatické organismy. Toxicita neonikotinoidů pro bezobratlé organismy byla hodnocena pomocí testů akutní toxicity neonikotinoidového pesticidu na třech druzích raků a akutním imobilizačním testem na hrotnatkách.

Tato studie prokázala toxicitu pesticidního přípravku CALYPSO® 480 SC pro raky a hrotnatky. Nejtoxičtější byl tento přípravek pro juvenilní jedince raka ničivého, 96hLC50 pro tyto organismy byla 0,52 mg.l⁻¹. Nejdolnějším byl naopak rak mramorovaný, v obou věkových kategoriích, 96hLC50 pro něj byla 1,6 mg.l⁻¹ (juvenilové) a 27,3 mg.l⁻¹ (dospělci). Z výsledků této studie, i ze studií dalších autorů vyplývá, že neonikotinoidy jsou toxičtější pro raky než pro hrotnatky. Během akutních testů toxicity na racích byla pozorována nejen mortalita raků, ale také změny jejich chování. Mezi nejčastější změny patřilo snížení agresivity, zpomalení pohybů končetin, snížení dýchání, otáčení raků na záda, apatie organismů a následné úhyny.

Studie shrnuje a doplňuje informace o neonikotinoidech v povrchových vodách České republiky, dále poukazuje na vyšší citlivost raků oproti hrotnatkám vůči neonikotinoidům. Vysoká citlivost raků vůči neonikotinoidům i dalším polutantům ve vodním prostředí nabízí možnost využití těchto organismů při toxikologických testech a studiích.

V této práci bylo prokázáno že pesticidní přípravek s obsahem thiaclopridu (Calypso) negativně ovlivňuje necílové vodní organismy a vzhledem k jeho stále rostoucí spotřebě lze u něj předpokládat negativní dopad na funkčnost celého ekosystému. Tato studie přispívá k rozšíření informací o toxicitě neonikotinoidních látek pro necílové vodní organismy a jejich působení na životní prostředí.

SEZNAM LITERATURY

- Alexander, A.C., Heard, K.S., Culp, J.M., 2008. Emergent body size of mayfly survivors. *Freshw. Biol.* 53, 171-180.
- Anderson, J.C., Dubetz, C., Palace, V.P., 2015. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Sci. Total Environ.* 505, 409-422.
- Andreu-Moliner, E.S., Almar, M.M., Legarra, I., Núñez, A., 2008. Toxicity of some ricefield pesticides to the crayfish *P. Clarkii* under laboratory and field conditions in lake Albufera (Spain). *J. Environ. Scie. Health, Part B.* 21, 529-537.
- Ashauer, R., Hintermeister, A., Potthoff, E., Escher, B.E., 2011. Acute toxicity of organic chemicals to *Gammarus pulex* correlates with sensitivity of *Daphnia magna* across most modes of action. *Aqua. Toxicol.* 103, 38-45.
- Barbee, G.C., Stout, M.J., 2009. Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. *Pest Manag. Sci.* 65, 1250-1256.
- Bayer CropScience, 2018. Přípravky na ochranu rostlin osiva a prostředky pro DDD činnost. Praha: Bayer, s. r. o., 272 s.
- Beketov, M.A., Liess, M., 2008. Potential of 11 pesticides to initiate downstream drift of stream macroinvertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 247-253.
- Belzunces, L.P., Tchamitchian, S., Brunet, J.L., 2012. Neural effects of insecticides in honey bee. *Apidolog.* 43, 348-370.
- Blacquiere, T., Smaghe, G., Gestel, C.A.M., Mommaerts, V., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicol.* 21, 973-992.
- Bonmatin, J.M., Giorio, C., Girolami, C., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., Noome, D.A., Simon-Delso, N., Tapparo, A., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 35-67.
- Brock, T.C.M., Belgers, J.D.M., Roessink, I., Cuppen, J.G.M., Maund, S.J., 2010. Macroinvertebrate responses to insecticide application between sprayed and adjacent nonsprayed ditch sections of different sizes. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1994-2008.
- Carreck, N.L., 2017. A beekeeper's perspective on the neonicotinoid ban. *Pest. Manag. Sci.* 7, 1295-1298.
- Carson, R., 1962. *Silent Spring*. Houghton Mifflin Co., Boston, USA, 378 pp.

- Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden age of isecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1-16.
- Crandall, K.A, Buhay, J.E., 2008. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae – Decapoda) in freshwater. *Hydrobiol.* 595, 295-301.
- Cremlyn, R.J.W., 1978. Pesticides: preparation and mode of action. Wiley, Chichester, 240 pp.
- Crossthwaite, A.J., Rendine, S., Stenta, M., Slater, R., 2014. Target-site resistance to neonicotinoids. *J. Chem. Biol.* 7, 125-128.
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2018. Pasportizace pesticidů. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/pasporty/>, (navštíveno online 10. 4. 2018).
- De Grave, S., Pentcheff, N.D., Ahyong, S.T., Chan, T.Y. Crandall, K.A., Dworschak, P.C., Felder, D.L., Feldman, R.M., Franssen, Ch.H.J.M., Goulding, L.Y.D., Lemaitre, R., Low, M.E.Y., Martin, J.W., Ng, P.K.L., Schweitzer, C.E., Tan, S.H., Tshudy, D., Wetzer, R., 2009. A classificaion of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bull. Zool.* 21, 1-109.
- Ding, Z., Yang, Y., Jin, H., Yu, H., Feng, J., Zhang, X., Zhou, J., 2004. Acute toxicity and bioconcentration factor of three pesticides on *Brachydanio rerio*. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 15, 888-890.
- Englert, D., Bundschuh, M., Schulz, R., 2012. Thiacloprid affects trophic interaction between gammarids and mayflies. *Environ. Pollut.* 167, 41-46.
- EPA (United States Environmental Protection Agency), 2003. Thiacloprid in/on pome fruits and cotton. Health effects division risk assessment. Dostupné z: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-014019_23-Jul-03_a.pdf, (navštíveno online 10. 4. 2018).
- Finnegan, M.C., Baxter, L.R., Maul, J.D., Hanson, M.L., Hoekstra, P.F., 2017. Comprehensive characterization of the acute and chronic toxicity of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam to a suite of Aquatic primary producers, invertebrates and fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 2838-2848.
- Gherardi, F., Barbaresi, S., Salvi, G., 2000. Spatial and temporal patterns in the movement of *Procambarus clarkii*, an invasive crayfish. *Aquat. Sci.* 62, 179-193.
- Girolami, V., Mazzon, L., Squartini, A., Mori, N., Marzaro, M., Di Bernardo, A., Greatti, M., Giorio, C., Tapparo, T., 2009. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: A novel way of intoxication for bees. *J. Econ. Entomol.* 102, 1808-1815.

- Guilhermino, L., Diamantino, T., Silvia, M.C., Soares, A.M.V.M., 2000. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 46, 357-362.
- Hajšlová, J., Kocourek, V., 2004. Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 35 s.
- Hallmann, C.A., Foppen, R.P.B., Van Turnhout, C.A.M., de Kroon, H., Jongejans, E., 2014. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature* 511, 341-343.
- Hayasaka, D., Korenaga, T., Suzuki, K., Saito, F., Sánchez-Bayo, F., Goka, K., 2012. Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80, 355-362.
- Hayasaka, D., Suzuki, K., Nomura, T., Nishiyama, M., Nagai, T., Sánchez-Bayo, F., Goka, K., 2013. Comparison of acute toxicity of two neonicotinoid insecticides, imidacloprid and clothianidin, to five cladoceran species. *J. Pest. Sci.* 38, 44-47.
- Hladik, M.L., Corsi, S.R., Kolpin, D.W., Baldwin, A.K., Blackwell, B.R., Cavallin, J.E., 2018. Year-round presence of neonicotinoid insecticides in tributaries to the Great Lakes, USA. *Environ. Pollut.* 235, 1022-1029.
- Hobbs, H.H., Jr., 1989. An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae and Parastacidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 480, 236 pp.
- Holdich, D.M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Füderer, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckl, M., Šmietana, P., Taugbol, T., Vigneux, E., 2006. Species files. In: Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P. (Eds), *Atlas of crayfish in Europe*. Paris: Muséum national d'Histoire naturelle, pp 49-129.
- Huner, J.V., 2002. *Procambarus*. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science Ltd., Oxford, pp. 541-584.
- Imamura, T., Yanagawa, Y., Nishikawa, K., Matsumoto, N., Sakamoto, T., 2010. Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans. *Clin. Toxicol.* 48, 851-853.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 897-908.
- Jimenez, S.A., Faulkes, Z., 2011. Can the parthenogenetic marbled crayfish *Marmorkrebs* compete with other crayfish species in fight? *J. Ethol.* 29, 115-120.

- Karlin, A., 2010. Nicotinic acetylcholine receptors. In: Bradshaw, R.A. and Dennis, E.A., Handbook of cell signaling (second edition). Amsterdam: Elsevier, pp 221-224.
- Koutník, D., Stara, A., Zuskova, E., Kouba, A., Velisek, J., 2014. The effect of subchronic metribuzin exposure to signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana 1852). Neuroendocrinol. Lett. 35, 51-56.
- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková, E., Polícar, T., 2013. Biologie a chov raků, 1. vyd. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 418 s.
- Kreuger, J., Graaf, S., Patring, J., Adielsson, S., 2010. Pesticides in surface water in areas with open ground and greenhouse horticultural crops in Sweden 2008. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Kreutzweiser, D.P., Good, K.P., Chartrand, D.T., Scarr, T.A., Thompson, D.G., 2008. Toxicity of the systemic insecticide, imidacloprid, to forest stream insects and microbial communities. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 80, 211-214.
- Kreutzweiser, D.P., Good, K.P., Chartrand, D.T., Scarr, T.A., Thompson, D.G., 2007. Non-target effects on aquatic decomposer organisms of imidacloprid as a systemic insecticide to control emerald ash borer in riparian trees. Ecotoxicol. Environ. Safe. 68, 315-325.
- Lamers, M., Anyusheva, M., La, N., Nguyen, V.V., Streck, T., 2011. Pesticide pollution in surface and groundwater by paddy rice cultivation: A case study from northern Vietnam. CLEAN – Soil, Air, Water 39, 356-361.
- Liess, M., Foit, K., Becker, A., Hassold, E., Dolciotti, I., Kattwinkel, M., Duquesne, S., 2013. Culmination of low-dose pesticide effects. Environ. Sci. Technol. 47, 8862-8868.
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic Marmorkrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. Naturwissenschaften 94, 843-846.
- Morolli, C., Quaglio, F., Rocca, G.D., Malvisi, J., Di Salvo, A., 2006. Evaluation of the toxicity of synthetic pyrethroids to red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard 1852) and common carp (*Cyprinus carpio*, L. 1758). Bull. Fr. Peche Piscic. 380-381, 1381-1394.
- Morrissey, C.A., Mineau, P., Devries, J.H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M.C., Liber, K., 2015. Neonicotinoid Contamination of Global Surface Waters and Associated Risk to Aquatic Invertebrates: A Review. Environ. Int. 74, 291-303.

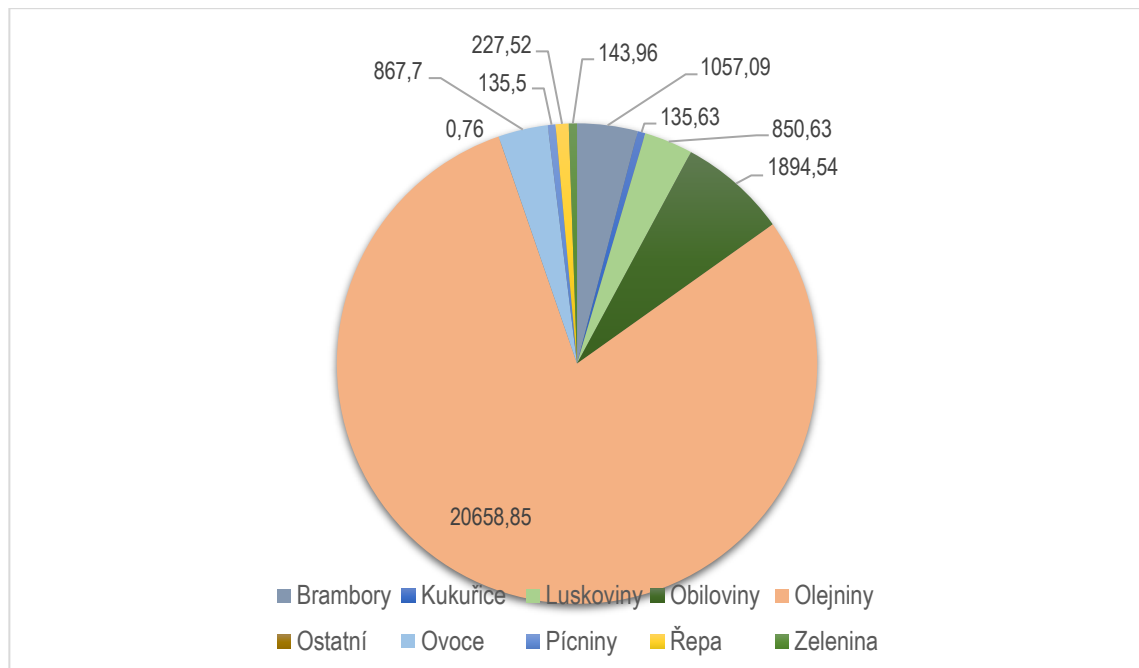
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Elbert, A., Jeschke, P., Tietjen, K., 2001. Acetylcholine receptors as sites for developing neonicotinoid insecticides. In: Ishaaya, I. (eds) Biochemical sites of insecticide action and resistance. Berlin, Heidelberg: Springer. pp77-105.
- Nauen, R., Jeschke, P., Copping, L., 2008. In Focus: Neonicotinoid insecticides Editorial. *Pest. Manag. Sci.* 64, 1081.
- PANNA (Pesticide Action Network North America), 2018. PAN Pesticides Database – Chemical. Dostupné z: http://pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp, (navštíveno online 10. 4. 2018).
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van der Sluijs, J.P., Van Dyck, H., Wiemers, M., 2014. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 68-102.
- Pitter, P., 1999. *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, Praha, 568 s.
- Pöckl, M., Holdich, D.M., Pennerstorfer, J., 2006. Identifying native and alien crayfish species in Europe. European Project CRAYNET, 47 pp.
- Roessink, I., Merga, L.B., Zweers, H.J., van den Brink, P.J., 2013. The neonicotinoid imidacloprid shows high chronic toxicity to mayfly nymphs. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1096-1100.
- Ruppert, E.E., Fox, R.S., Barnes, R.D., 2004. *Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach*. 7th ed. Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole, 963 pp.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The principles of humane experimental technique*. Methuen, London, UK, 238 pp.
- Sánchez-Bayo, F., 2009. From simple toxicological models to prediction of toxic effects in time. *Ecotoxicol.* 18, 343-354.
- Sánchez-Bayo, F., Goka, K., 2006. Influence of light in acute toxicity bioassays of imidacloprid and zinc pyrethrin to zooplankton crustaceans. *Aquat. Toxicol.* 78, 262-271.
- Sánchez-Bayo, F., Goka, K., Hayasaka, D., 2016. Contamination of the aquatic environment with neonicotinoids and its implication for ecosystems. *Front. Environ. Sci.* 4,71-54.
- Sedlák, E., 2005. *Zoologie bezobratlých*. 2. přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 337s.

- Shao, X., Liu, Z., Xu, X., Li, Z., Qian, X., 2013. Overall status of neonicotinoid insecticides in China: Production, application and innovation. *J. Pest. Sci.* 38, 1-9.
- Schmuck, R., Schöning, R., Stork, A., Schramel, O., 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag. Sci.* 57, 225-238.
- Simon-Delso, N, Amaral-Rogers, V., Belzunces, LP., Bonmatin, JM., Chagnon, M., et al. 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 5-34.
- Simon-Delso, N., Martin, G.S., Bruneau, E., Minsart, L.A., Mouret, C., Hautier, L., 2014. Honeybee colony disorder in crop areas: The role of pesticides and viruses. *PLoS ONE* 9, e103073.
- Smit, C.E., Posthuma-Doodeman, C.J.A.M., van Vlaardingen, P.L.A., de Jong, F.M.W., 2015. Ecotoxicity of imidacloprid to aquatic organisms: derivation of water quality standards for peak and long-term exposure. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 21, 1608-1630.
- Song, M.Y., Stark, J.D., Brown, J.J., 1997. Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2494-2500.
- Starner, K., Goh, K.S., 2012. Detections of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in surface waters of three agricultural regions of California, USA, 2010-2011. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 316-321.
- Stoughton, S.J., Liber, K., Culp, J., Cessna, A., 2008. Acute and chronic toxicity of imidacloprid to the aquatic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyaella azteca* under constant- and pulse-exposure conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 662–673.
- Sultana, T., Murray, C., Kleywegt, S., Metcalfe, C.D., 2018. Neonicotinoid pesticides in drinking water in agricultural regions of southern Ontario, Canada. *Chemosphere* 202, 506-513.
- Takács, E., Klátyik, S., Mörtl, M., Rácz, G., Kovács, K., Darvas, B., Székács, A., 2017. Effects of neonicotinoid insecticide formulations and their components on *Daphnia magna* – the role of active ingredients and co-formulants. *Int. J. Environ. Analyt. Chem.* 97, 885-900.
- Tomizawa, M., Casida, JE., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanism of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247-268.

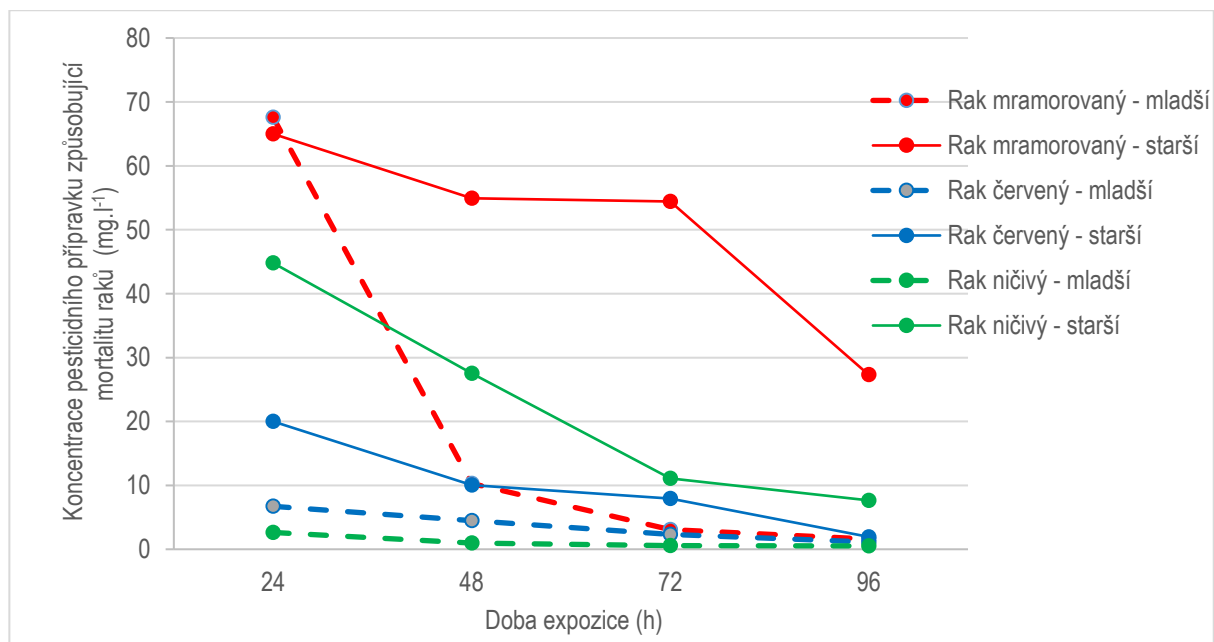
- TOXNET (Toxicology Data Network), 2018. Hazardous Substances Data Bank. Dostupné z: <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm>, (navštíveno online 10. 4. 2018).
- Van den Brink, P. J., Van Smeden, J.M., Bekele, R. S., Dierick, W., De Gelder, D.M., Noteboom, M., Roessink, I., 2016. Acute and chronic toxicity of neonicotinoids to nymphs of a mayfly species and some notes on seasonal differences. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 128-133
- Van der Sluijs, J.P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bijleveld van Lexmond, M.F.I.J., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C.A., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 148-154.
- Van Dijk, T.C., Van Staaldouin, M.A., Van der Sluijs, J.P., 2013. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PLoS ONE* 8, e62374.
- Velisek, J., Kouba, A., Stara, A., 2013. Acute toxicity of triazine pesticides to juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Neuroendocrinol. Lett.* 34, 31-36.
- Velíšek, J., Svobodová Z., Bláhová J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014. Vodní toxikologie pro rybáře. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, 600 s.
- Vogt, G., 2010. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological reaches: a review and perspective, with remarks on some further crustaceans. *Biogerontol.* 11, 643-669.
- Vyhláška č. 252/2004 Sb., Vyhláška, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.
- Wang, X., Anadón, A., Qinghua, W., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larranaga, M., Yuan, Z., Martínez, M., 2018. Mechanism of neonicotinoid toxicity: Impact on oxidative stress and metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 58, 18.1-18.37.
- Woodcock, B.A., Bullock, J.M., Shore, R.F., Heard, M.S., Pereira, M.G., Redhead, J., Ridding, L., Dean, H., Sleep, D., Henrys, P., Peyton, J., Hulmes, S., Sárospataki, M., Saure, C., Edwards, M., Genersch, E., Knäbe, S., Pywell, R.F., 2017. Country-specific

- effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science* 356, 1393-1395.
- Yamamoto, I., Tomizawa, M., Saito, T., Miyamoto, T., Walcott, E. C., Sumikawa, K., 1998. Structural factors contributing to insecticidal and selective actions of neonicotinoids. *Insect Biochem. Physiol.* 37, 24-32.
- Yang, E.C., Chang, H.C., Wu, W.Y., Chen, Y.W., 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS ONE* 7, e49472.
- Yu, J., Xu, E.G., Ren, Y., Jin, S., Zhang, T., Liu, J., Li, Z., 2017. Mixture toxicity of bensulfuron-methyl and acetochlor to Red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*): Behavioral, morphological and histological effects. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 1466.
- Yu, S.J., 2008. *The toxicology and biochemistry of insecticides*. Second Edition. CRC Press, Boca Raton.
- Zapletal, O., 2001. *Speciální veterinární toxikologie*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, 148 s.
- Zhu, Y., Loso, M.R., Watson, G.B., Sparks, T.C., Rogers, R.B. et al 2011. Discovery and characterization of sulfoxaflo, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2950-2957.

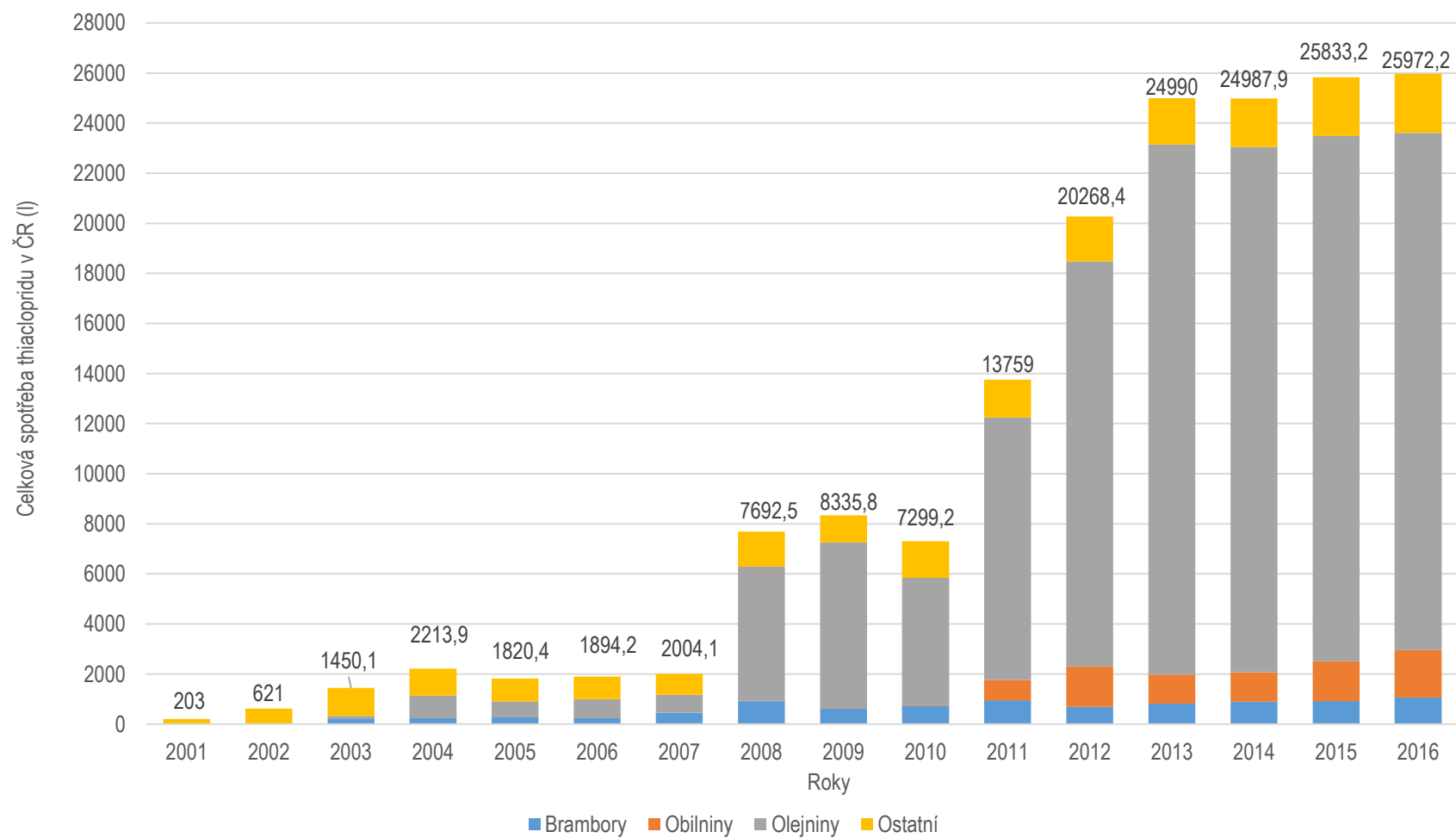
PŘÍLOHY



Příloha č. 1. Graf spotřeby thiaclopridu v roce 2016 dle jednotlivých plodin (v l) (ČHMÚ, 2018).



Příloha č. 2. Graf LC50 pro jednotlivé druhy a věkové kategorie raků v závislosti na době expozice.



Příloha č. 3 Spotřeba thiaclopridu v ČR od roku 2001, s rozdělením mezi nejčastěji ošetřené druhy plodin (ČHMÚ, 2018).

ABSTRAKT

Neonikotinoidy ve vodních ekosystémech a jejich vliv na necílové organismy

Neonikotinoidy jsou jednou z nejnovějších tříd pesticidních látek, používaných v zemědělství jako insekticidy. První neonikotinoidy byly používány od začátku devadesátých let, pro svou nízkou toxicitu pro obratlovce se staly velmi oblíbenými a široce používanými po celém světě. Vzhledem k nízké toxicitě pro standardní testovací organismy hrotnatku velkou (*Daphnia magna*) a pstruha duhového (*Onchorhynchus mykiss*) byly také považovány za málo toxické pro vodní organismy, studie z poslední doby však ukazují opak této domněnky.

Dílčím cílem této studie byl, mimo shrnutí dosavadních poznatků o neonikotinoidech ve vodních ekosystémech a jejich vlivu na necílové, zejména akvatické organismy, také důkaz toxicity neonikotinoidového přípravku CALYPSO[®] 480 SC, který obsahuje 48 % thiaclopridu. Pro dokázání toxicity byly použity tři druhy raků – rak červený (*Procambarus clarkii*), rak mramorovaný (*Procambarus fallax f. virginalis*) a rak ničivý (*Cherax destructor*) a hrotnatka velká. K posouzení toxicity Calypsa byly použity akutní testy toxicity na racích a akutní imobilizační test na hrotnatkách. Doba expozice organismů v testech byla 96 a 48 hodin. Nejcitlivějšími se ukázali juvenilní jedinci raků, jejichž 96hLC50 se pohybovala mezi 0,52 a 1,6 mg.l⁻¹, 96hLC50 pro starší raky byla v rozmezí 1,94 a 27,3 mg.l⁻¹. Hodnota 48hEC50 pro hrotnatky byla 32,7 mg.l⁻¹.

U raků byly mimo mortality pozorovány také změny v chování organismů, mezi nejčastější změny patřilo snížení agresivity, zpomalení pohybů končetin a žaber a následně i dýchání, otáčení raků na záda, apatie organismů a následné úhyny.

Klíčová slova: neonikotinoidy, thiacloprid, akutní test toxicity, akutní imobilizační test, korýši

ABSTRACT

Neonicotinoids in Aquatic Ecosystems and Their Impact on Non-target Organisms

Neonicotinoids are one of the newest class of pesticides, used in agriculture like insecticides. The first neonicotinoids has been used since the early 1990s, they become very popular and widely used worldwide for their low toxicity for vertebrates. Neonicotinoids were considered to be less toxic to aquatic organisms due to their low toxicity to standard test organisms *Daphnia magna* and Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*), but recent studies have shown the opposite of this assumption.

Partial aim of this study was, among summary of existing knowledges of the neonicotinoids in aquatic ecosystem and their impact on non-target organisms, also evidence toxicity of neonicotinoid preparation CALYPSO® 480 SC, which contains 48 % of thiacloprid. Three species of crayfish were used to provide the toxicity – Red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*), Marbled crayfish (*Procambarus fallax*) and Yabby (*Cherax destructor*). To asses the toxicity of Calypso, the acute toxicity tests on crayfish and acute immobilisation test on daphnia were used. The exposure time of tests were 96 and 48 hours. Juvenile crayfish were the most sensitive, their 96hLC50 ranged between 0.52 and 1.6 mg.l⁻¹, 96hLC50 for older crayfish were between 1.94 and 27.3 mg.l⁻¹. The 48hEC50 value for daphnia was 32.7 mg.l⁻¹.

During the acute toxicity test on crayfish, out of the mortality, changes in behavior of orgaisms were observed, the most frequent changes were the reduction of aggressiveness, slowing of motion of limbs, gills and breathing. Crayfish turned on their back, individuals were apathetic and died.

Key words: neonicotinoids, thiacloprid, acute toxicity test, acute immobilisation test, *Crustacea*