

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

Bakalářská práce

**Vliv herbicidu s-metolachloru na raná vývojová stádia raka
mramorovaného**

Autor: Jan Materna

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

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

Studijní program a obor: Zootechnika, obor Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2019

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne

Podpis studenta

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především vedoucímu bakalářské práce dr. hab. Josefu Veliškovi, Ph.D., dále konzultantce Ing. Alžbětě Staré, Ph.D. a i dalším pracovníkům VÚRH ve Vodňanech za odbornou pomoc, cenné rady, metodické vedení a v neposlední řadě i trpělivost během tvorby této kvalifikační práce.

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

Jméno a příjmení: **Jan MATERNA**
Osobní číslo: **V16B016P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Vliv herbicidu s-metalochloru na raná vývojová stádia raka mramorovaného**
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 :

S rostoucí produkcí energetických plodin (zejména kukuřice a řepky) v Evropě, které nahrazují tradiční plodiny, jako jsou obiloviny, došlo v posledním desetiletí k výrazné změně způsobu využití pesticidů. Na základě negativních vlivů došlo v roce 2014 k zákazu používání herbicidu alachloru, který byl hojně používán v ČR. Tento herbicid byl nahrazen třemi herbicidy, a to chloridazonem, metazachlorem a s-metolachlorem. Rezidua těchto herbicidů a jejich metabolitů jsou velice často zjišťována v půdě a i povrchových vodách dlouho dobu po jejich aplikaci. Pro tuto bakalářskou práci byl k hodnocení vlivu vybrán s-metalochlor, jehož průměrná spotřeba v ČR je 55,3 tun ročně. Pro stanovení ekotoxikologického rizika pesticidů jsou základem údaje o toxicitě pro nečlověké organizmy a předpokládaná koncentrace v ekosystému. Do skupiny nečlověkých vodních organismů patří rovněž vodní bezobratlí. Cílem bakalářské práce je posouzení vlivu herbicidu s-metalochloru na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus fallax f. virginalis*). Získané výsledky při testování budou podkladem pro hodnocení rizika s-metalochloru pro vodní ekosystém. V rámci bakalářské práce bude proveden embryolarvální test toxicity na raku mramorovaném s s-metalochlorem. V průběhu testu bude hodnocen vliv na mortalitu, růst, biomarkery oxidativního stresu a antioxidantní enzymy, ontogenetický vývoj a výskyt deformací raných vývojových stádií raka. Metodicky bude postupováno podle platných standardních operačních postupů, které byly zpracovány akreditovanou laboratoří FROV JU. Tyto postupy vycházejí z norem OECD. Oxidativní stres a antioxidantní enzymy v tkáních raka signálního budou prováděny dle jednotlivých metod

Rozsah grafických prací: 2 grafy, 1 tabulka

Rozsah pracovní zprávy: 30 - 35 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Maazouzi, C., Coureau, C., Piscart, C., Saplaïroles, M., Baran, N., Marmonier, P., 2016. Individual and joint toxicity of the herbicide S-metolachlor and a metabolite, deethylatrazine on aquatic crustaceans: Difference between ecological groups. *Chemosphere* 165: 118-125.
- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budzinski, H., Cachot, J., Morin, B., 2014. Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquatic Toxicology* 147: 48-56.
- Mantzou, N., Hela, D., Karakitsou, A., Antonopoulou, M., Konstantinou, I., 2016. Dissipation and runoff transport of metazachlor herbicide in rapeseed cultivated and uncultivated plots in field conditions. *Environmental Sciences and Pollution Research International* 23: 20517-20527.
- Neves, M., Castro, B.B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J.C., Coutinho, J.A.P., Goncalves, F., Goncalves, A.M.M., 2015. Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra (R) Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecological Indicators* 53: 220-230.
- Velisek, J., Stara, A., Zuskova E., Kouba, A., 2017. Effects of three triazine metabolites and their mixture at environmentally relevant concentrations on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Chemosphere* 175: 440-445.
- Vogt, G., 2011. Marmorkrebs: natural crayfish clone as emerging model for various biological disciplines. *Journal of Biosciences* 36: 377-382.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šířoká, 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. FROV JU, Vodňany, 600 s.

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


Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

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

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: 5. ledna 2018

Termín odevzdání bakalářské práce: 3. května 2019


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

L.S.


doc. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 9. ledna 2018

OBSAH:

1. ÚVOD	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1. Pesticidy	10
2.1.1. Herbicidy	13
2.1.2 S-metolachlor	16
2.2. Raci	19
2.2.1. Obecná morfologie a anatomie raků.....	20
2.2.2. Rak mramorovaný	21
2.3. Testy toxicity	23
2.3.1. Využití raků v testech toxicity.....	25
2.4. Oxidativní stres	26
3. MATERIÁL A METODIKA	29
3.1. Embryolarvální test toxicity	29
3.1.1. Princip a podmínky testu	29
3.1.2. Experimentální materiál	30
3.2. Průběh testu	31
3.3. Odběr vzorků	32
3.3.1. Specifická rychlost růstu	33
3.3.2. Inhibice specifické rychlosti růstu.....	33
3.4. Chování raků	34
3.5. Biochemické metody stanovení biomarkerů	34
3.5.1. Příprava vzorků pro biochemické analýzy – homogenizace tkání	35
3.5.2. Stanovení enzymatické aktivity katalázy (CAT).....	35
3.5.3. Stanovení enzymatické aktivity glutathion S-transferázy (GST).....	36
3.5.4. Stanovení redukovaného glutathionu (GSH).....	37

3.5.5. Stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD).....	38
3.5.6. Stanovení lipidní peroxidace TBARS	39
3.5.7. Metoda stanovení koncentrace proteinů (metoda BCA)	39
3.6. Statistické vyhodnocení testu	40
4. VÝSLEDKY	41
4.1. Kumulativní mortalita	41
4.2. Růstové parametry	43
4.3. Ontogenetický vývoj.....	44
4.4. Makroskopické morfologické anomálie	44
4.5. Chování raků	45
4.6. Biomarker oxidativního stresu.....	47
4.6.1. Lipidní peroxidace	47
4.7. Antioxidační biomarkery.....	48
4.7.1. Kataláza (CAT)	48
4.7.2. Glutathion S-transferáza (GST).....	49
4.7.3. Redukovaný glutathion (GSH)	50
4.7.4. Superoxid dismutáza (SOD).....	51
5. DISKUSE.....	52
6. ZÁVĚR	56
7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	57
8. ABSTRAKT	65
9. ABSTRACT.....	66

1. ÚVOD

Snaha ochraňovat zemědělské plodiny a zásoby potravin před škůdci a chorobami je v lidech zakořeněna odjakživa. K tomuto účelu byly a jsou používány různé látky anorganického i organického původu, které jsou schopné choroby a škůdce svými vlastnostmi potlačovat a odpuzovat. Tyto látky nazýváme pesticidy. Pesticidy byly vždy spojovány především se zemědělstvím, kde se také nejvíce uplatňují (Velíšek a kol., 2014a).

Rostoucí produkce energetických plodin, zejména kukuřice a řepky, které nahradily tradiční plodiny jako je obilí, v posledních desetiletích výrazně změnila vzorce využívání pesticidů v Evropě. Herbicid acetochlor s roční spotřebou přes 200 tun byl používán hlavně na kukuřičných polích proti plevelům jako náhrada za atrazin používaný v minulosti. Je také nejčastěji nalézán herbicid ve vodním prostředí v Evropě a Americe (Foley a kol., 2008; ČHMU, 2018a). Acetochlor, spolu se svým isomerem alachlorem, byl ale označen jako pravděpodobný lidský karcinogen (Arregui a kol., 2010) a byl u nich prokázán negativní vliv na ontogenezi u vodních organismů. Na základě těchto potvrzených nežádoucích účinků byl acetochlor v ČR v roce 2014 zakázán. Nahrazen byl především herbicidy chloridazonem, metazachlorem a s-metolachlorem (MZe, 2018). Zbytkové množství těchto herbicidů a jejich metabolitů je nalézáno v půdě i povrchových vodách i dlouho po jejich aplikaci (Mantzos a kol., 2016).

Lze předpokládat, že tyto herbicidy a jejich hlavní metabolity mohou představovat potenciální riziko pro vodní organismy. Problémem je nedostatek údajů o účincích dlouhodobé expozice s-metolachloru a jejich metabolitů na raná vývojová stádia i dospělé vodní organismy v ekologicky relevantních koncentracích. Z tohoto důvodu se přistupuje k laboratorním pokusům zkoumání vlivu těchto herbicidů na vodní organismy. Zde se nově začaly jako pokusné organismy používat raci jakožto zástupci korýšů z řádu *Decapoda* (Velíšek a kol., 2018), kteří často hrají ekologicky a ekonomicky významné role a splňují kritéria pro bioindikátory, jak je popisuje Butler a kol. (1970) nebo Rainbow (1995). Použití bezobratlých pro takové účely, které mimo jiné splňuje i tzv. koncepci 3R (**R**eplace, **R**educe, **R**efine) (Russell a Burch, 1959), je krokem vpřed při hodnocení účinků herbicidů a jejich metabolitů na vodní organismy a také v bioindikaci vodního prostředí znečištěného xenobiotiky, resp. pesticidy (Velíšek a kol., 2014b, 2017, 2018).

Cílem bakalářské práce bylo posouzení vlivu herbicidu s-metolachloru na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginialis*). Získané výsledky při testování budou podkladem pro hodnocení rizik s-metolachloru pro vodní ekosystém.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Pesticidy

Už v 1. tisíciletí př. n. l. byla využívána v Číně síra k ochraně plodin a odpuzování hmyzu v podobě plynné dezinfekce. Postupem času docházelo k rozvoji, který spočíval v používání sloučenin olova, rtuti a arsenu k ochraně plodin a skladovaných zásob. To vše již kolem roku 1400. Následně je v 15. století datováno použití prvních insekticidů, které byly získávány izolací sloučeniny nikotinu z tabákových listů (Cremlyn, 1978).

K rozvoji výroby pesticidů došlo současně s rozvojem moderní syntetické chemie ve 30. letech 20. století, k masovému rozvoji došlo po druhé světové válce. Přelomový byl rok 1939. V tomto roce doktor Paul Müller objevil insekticidní účinky DDT (dichlordifenyltrichlorethan). Tento objev byl tak významný, že za něj obdržel Nobelovu cenu. Až do roku 1962 se stal DDT jedním z nejrozšířenějších a nejpoužívanějších pesticidních přípravků. V tomto roce ale poukázala Rachel Carson ve své knize *Silent Spring* na negativní vliv DDT na ekosystém (Carson, 1962). V reakci na toto zjištění začalo sledování obsahu reziduí pesticidů v potravinách a zkoumání jejich vlivu na živé organismy. To vše vyústilo až k zákazu používání těchto látek (Velíšek a kol., 2014a).

Největším problémem při použití pesticidů je jejich schopnost kumulace v živých i neživých složkách životního prostředí. Tyto kumulované látky pak mohou způsobovat zdravotní potíže i u necílových organismů, včetně člověka (Abrantes a kol., 2010). Jak doplňuje Ceyhun a kol. (2010), mimo to také dochází ke kontaminaci vodního prostředí těmito látkami, kde může docházet k dalšímu rozkladu i na často rizikovější sloučeniny.

Pesticidy se dají rozdělit do několika skupin, kdy každá skupina je zaměřená na hubení určitého druhu škůdce (Zapletal a kol., 2001):

- Akaricidy – přípravky určené k hubení roztočů,
- Algicidy – přípravky určené k hubení řas,
- Arboricidy – pesticidy určené k hubení stromů a keřů,
- Avicidy – přípravky určené k hubení ptáků,
- Fungicidy – prostředky určené k ochraně před houbovými chorobami,
- Herbicidy – pesticidy určené k hubení rostlin,
- Insekticidy – přípravky určené k hubení hmyzu (dezinsekce),

- Moluskocidy – prostředky určené k hubení měkkýšů,
- Piscicidy – přípravky určené k hubení ryb,
- Rodenticidy – přípravky určené k hubení hlodavců (deratizace).

Dále je možné rozdělit pesticidy podle způsobu aplikace (Zapletal a kol., 2001):

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

Mimo to také existuje dělení pesticidů podle původu, a to na látky přírodní (např. pyretriny), syntetické (např. pyretroidy) a biopreparáty (Zapletal a kol., 2001).

Každý druh pesticidu má svůj specifický způsob působení, určený především jeho cílovým organismem. **Insekticidní přípravky** působí na přenos signálu mezi nervovými centry. Tyto neurotoxické účinky vykazují i jiné látky, příkladem může být všem známé DDT. Kromě toho se v této skupině uplatňují i jiné mechanismy. Zde můžeme uvést látky nacházející se ve skupině benzoylmočovin (flufenoxuron, diflubenzuron, aj.), které fungují jako inhibitory syntézy chitinu, čímž znemožňují u hmyzu výstavbu kutikuly (Hajšlová a Kocourek, 2004). **Fungicidní** pesticidy působí na inhibici enzymů obsahujících v molekule sulfhydrové skupiny (např. ethylenbisdithiokarbamáty, nebo látky ze skupiny ftalimidů – captan, folpet) nebo dochází k narušení syntézy DNA pomocí velice často používaných sloučenin ze skupiny benzimidazolů (např. thiabendazol) (Hajšlová a Kocourek, 2004).

Po aplikaci pesticidů dochází v prostředí k jejich rozkladu (**degradaci**). Tento proces je závislý na řadě fyzikálně-chemických faktorů a jejich účinků. Ze skupiny **fyzikálních faktorů** je to teplota nebo sluneční záření (fotolýza) (Velíšek a kol., 2014a). **Fotolýza** je významný proces vedoucí k odbourávání pesticidů, jde o soubor reakcí iniciovaných slunečním zářením. Účinkem záření, resp. tepla, dochází k termickému rozkladu

karbamátových pesticidů (tzv. přímá fotolýza) nebo může jít o děje iniciované působením volných radikálů (např. hydroxylové, superoxidové), které vznikají v prostředí účinkem slunečního záření, reakce se singletovým kyslíkem apod. – tyto děje se označují jako nepřímá fotolýza. Je nutno dodat, že fotolýza může probíhat nejen v abiotických složkách životního prostředí (voda, atmosféra), ale může k ní docházet již po aplikaci pesticidu na povrchu ošetřených rostlin (Hajšlová a Kocourek, 2004). Z **chemických faktorů** jsou to oxidačně – redukční reakce a hydrolýza. **Hydrolýza** je neméně důležitá chemická reakce, která se podílí na eliminaci pesticidů z prostředí. K této reakci dochází především ve vodním prostředí, kde probíhá velmi rychle, ale setkat se s ní můžeme i v půdě. Mezi pesticidy, které snadno podléhají hydrolýze, se řadí například organofosfáty nebo pyrethroidy (Hajšlová a Kocourek, 2004). Mimo to se také uplatňují vlivy biologické (činnost mikroorganismů). Při degradaci pesticidů vznikají metabolity, které mohou ztrácet pesticidní účinky. Tyto metabolity však mohou být v některých případech toxičtější než samotné účinné látky (Velíšek a kol., 2014a).

U rostlin a živočichů v průběhu detoxikačních pochodů běžně dochází k biotransformaci pesticidů. Tento proces zahrnuje dvě fáze. První fáze detoxikace, tzv. asymetrická fáze (enzymatická katalýza – oxidace, redukce, hydrolýza), zahrnuje změny enzymově katalyzované hydrolázami a oxidázami, při kterých jsou molekuly pesticidů přeměněny na polárnější metabolit (X-OH). Takto vzniklý metabolit může být více nebo méně toxický než původní sloučenina a slouží jako substrát pro druhou fázi. Ta se nazývá symetrická a probíhají zde konjugační reakce za vzniku neaktivních derivátů, které lze snadno z organismu vyloučit (Velíšek a kol., 2014a).

Jak uvádí ve své publikaci Svobodová a kol. (1987), pesticidy působily velké problémy v ČR především v 60. až 80. letech 20. století. V tomto období tvořila otrava pesticidy 3-6 % ze všech sledovaných případů otrav ryb. Ke zlepšení situace došlo v 90. letech 20. století, kdy vlivem snížení spotřeby pesticidů (šetrné zemědělství, ekonomické důvody) a používáním přípravků šetrnějších k životnímu prostředí došlo k poklesu podílu otrav pesticidy. V současné době nejsou zaznamenávány žádné případy úhynů ryb způsobených únikem pesticidů do vodního prostředí. Výjimkou je případ z roku 2014, kdy došlo k úniku pesticidu NURELLE (účinná látka chlorpyrifos a cypermethrin) ze zemědělského areálu v Havlíčkově Brodě do řeky Doubravky a následnému úhynu několika tisíc jedinců raka říčního (*Astacus astacus*) a střevle potoční (*Phoxinus*

phoxinus). Zde byly překročeny maximální přípustné hodnoty téměř 190krát. Na vině byly porušené podmínky bezpečného uchování pesticidu (ČIŽP, 2018).

Zdroje pesticidů ve vodním prostředí jsou dvojího typu. První možností je přímý vstup. Tato možnost zahrnuje nesprávnou aplikaci pesticidu (zasažení nádrže nebo toku při leteckém ošetření, nedodržení technologických postupů) nebo likvidaci nepoužitých zbytků (proplachování cisteren u vody, nesprávná manipulace s obaly, čištění aplikačních strojů). Patří sem také odpadní vody z průmyslových závodů na výrobu pesticidů, z domácností aj. Druhou možností jsou nepřímé zdroje, kam patří především splachy pesticidů z přilehlých ošetřených zemědělských kultur (Svobodová a kol., 2008).

Je důležité uvědomit si, že při každé aplikaci pesticidů dochází ke vnikání těchto látek do životního prostředí, kde ovlivňují život všech organismů. Z tohoto důvodu by se mělo přistupovat k aplikaci těchto látek až v nejzazších případech, kdy všechny ostatní metody k potlačení škůdců selhaly. A pokud už bylo potřeba tyto látky použít, je důležité dbát na správné postupy aplikace a šetrné použití, které podléhá mnoha právním předpisům (Velíšek a kol., 2014a).

2.1.1. Herbicidy

Herbicidy jsou syntetické chemikálie používané v celosvětovém měřítku k potlačení nežádoucích rostlin (plevele) a zvýšení výnosů. Příkladem může být jeden z nejběžněji používaných herbicidů ve Spojených státech, atrazin (1-chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazin), který byl poprvé použit v 50. letech 20. století pro zvýšení produkce kukuřice, čiroku a cukrové třtiny (Belanger a kol., 2015). V Německu a Itálii je atrazin od roku 1991 zakázán a v Evropské unii začal platit zákaz používání od roku 2003 kvůli obavám ze zvýšených koncentrací v pitné vodě a nepříznivým výsledkům testů na zvířecích modelech. Naproti tomu v USA je atrazin stále běžně používán pro potlačení nežádoucích rostlin, především na středozápadě (Belanger a kol., 2015).

U herbicidů se setkáváme s různými mechanismy působení na cílové činitele. Jeden z těchto mechanismů je katalýza tvorby hydroperoxidů mastných kyselin v buněčných membránách, v důsledku toho dochází k narušení procesu fotosyntézy. Takto působí např. desikanty patřící mezi kvartérní amoniové sloučeniny – diquat, paraquat, které se aplikují za účelem likvidace nadzemních částí rostlin a k usnadnění sklizně plodin. Další

možností je aplikace látek ze skupiny již výše zmiňovaných triazinů (atrazin, prometryn) a fenylničovin (diuron, metoxuron). Tyto látky blokují transport elektronů při fotosyntéze a inhibují tzv. Hillovu reakci. Další účinky některých dalších herbicidních přípravků spočívají v zamezení klíčení semen plevelných rostlin (nitroaniliny) nebo narušování metabolismu nukleových kyselin, jehož výsledkem je zastavení růstu cílových plevelů (fenoxyalkanové kyseliny – dichlorpop, deriváty benzoové kyseliny – dicamba) (Hajšlová a Kocourek, 2004). Mimo výše vyjmenované se do skupiny herbicidů zařazují i defoliační prostředky, které slouží k řízenému přerušování vegetace. Zvláštní skupinou pak jsou arboricidy, které jsou určeny k ničení porostů keřů a stromů (Zapletal a kol., 2001).

Herbicidy lze rozdělit podle několika kritérií:

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

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

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

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

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

- Anorganické,
- Organické.

Herbicidy registrované v České republice jsou zařazené do jednotlivých skupin podle chemické struktury (Zapletal a kol., 2001):

- Deriváty fenoxymastných kyselin – selektivní herbicidy středně až málo toxické,
- Deriváty močoviny – chemicky stabilní, málo toxické,
- Triazinové herbicidy – selektivní herbicidy,
- Karbamáty a thiokarbamáty – mají methemoglobinizační účinek,
- Bipyridily – herbicidy s desifikačním a defoliačním účinkem,
- Amidy, aniliny, nitrily – málo toxické pro užitková zvířata,
- Anorganické herbicidy a ostatní skupiny – například síran amonný.

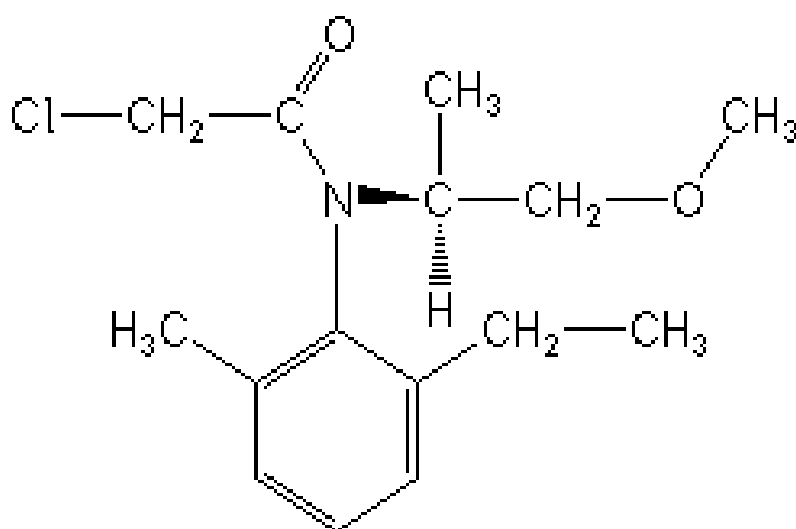
Herbicidy měly v minulém století ještě jiný význam, než jako prostředek k hubení nežádoucích rostlin v zemědělství. V letech 1962–1971 byly herbicidy použity Spojenými státy americkými k vojenským účelům během války ve Vietnamu. Šlo především o 2,4-dichlorfenoxycetovou kyselinu (2,4-D) a 2,4,5-trichlorfenoxycetovou kyselinu (2,4,5-T). Vedlejším produktem při jejich výrobě je dioxin. Tato používaná směs byla označována pod jménem Agent Orange. Cílem použití herbicidů ve vietnamské válce byla defoliace lesních porostů, které sloužily jako úkryty pro vojenskou techniku, a také ničení zemědělských kultur za účelem vyvolání nedostatečného zásobování vojska a místních obyvatel potravinami. Tato látka postihla ale i řadu necílových organismů, včetně teplokrevných živočichů, pro které jsou relativně hodně toxické. Odhaduje se, že bylo během války na jižní Vietnam aplikováno celkem 150 kg dioxinu obsaženého v herbicidech (Fusek a Měrka, 2003).

Jak už bylo řečeno, herbicidy mají negativní vliv na všechny úrovně života. Při vniknutí herbicidu 2,4-D do vodního prostředí dochází k usmrcení drobných vodních živočichů vířníků (*Rotifera*). Toto tvrzení bylo experimentálně potvrzeno na vířníku *Brachionus patulus* (Sarma a kol., 2001). Přítomnost atrazinu ovlivňuje u drápatky vodní (*Xenopus laevis*) jejich pohlaví, kdy mění u samečů tvorbu testosteronu na tvorbu estrogenu. Tím vznikají hermafroditi, kteří nejsou schopni se dále rozmnožovat (Hayes a

kol., 2002). O negativním vlivu herbicidů na člověka jakožto necílový organismus nemůže být pochyb. Jak uvádí Fusek a Měrka (2004), vliv herbicidů na tělo člověka se může projevovat mnoha způsoby. Mezi ty patří kancerogenní vlastnosti některých herbicidů, imunosupresivní vlastnosti, vliv na nervový systém, dermatologické vlastnosti a změny v souvislosti s cytogenetickou analýzou (změny v nukleoproteinovém komplexu lymfocytů a epitelioctů, zvýšený výskyt chromozomálních aberací a polyploidních lymfocytů). Mimo to také ovlivňují endokrinní systém a mají vliv na krvetvorbu.

2.1.2 S-metolachlor

S-metolachlor ($C_{15}H_{22}ClNO_2$, obr. č. 1) je preemergentní herbicid používaný pro potlačení růstu jednoletých trav a malosemenných širokolistých plevelů ve více než 70 zemědělských plodinách po celém světě (Zemolin a kol., 2014). Tato látka, a s tím spojený systematický název, je tvořena ze směsi (S)-2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl)acetamid a (R)-2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl)acetamid, a to v poměru 80-100% k 20-0%. S-metolachlor je herbicid na bázi chloracetanilidu inhibující biosyntézu zejména mastných kyselin, lipidů, proteinů, isoprenoidů a flavonoidů. Herbicidní účinek zahrnuje mimo jiné také konjugaci acetyl koenzymu A v rostlinách (Böger a kol., 2000). Metabolity s-metolachloru jsou metolachlor OA ($C_{15}H_{21}NO_4$) a metolachlor ESA ($C_{15}H_{23}NO_5S$) (ČHMU, 2018b).



Obr. č. 1: Strukturální vzorec látky s-metolachlor (ČHMU, 2018b).

Metolachlor byl poprvé syntetizován v roce 1972 ve městě Basel ve Švýcarsku, konkrétně v laboratořích firmy Ciba-Geigy Limited, a následně zaregistrován pod číslem U.S. patentu 3 937 730. Prvního komerčního využití se dočkal v roce 1977 jako přípravek na ochranu kukuřice. S-metolachlor byl poprvé zaregistrován v USA 14. března 1997. Číslo patentu je 5 002 606. Zkušební pokusy na s-metolachloru byly poprvé provedeny v letech 1995 a 1996. Na základě výsledků bylo dokázáno, že má biologické vlastnosti ekvivalentní metolachloru, včetně kontroly plevelu, selektivity a délky aktivity, ale vykazuje o 35 % vyšší toxicitu pro cílové organismy. Proto se jeví jako vhodnější přípravek (O'Connel a kol., 1998).

Vybrané vlastnosti a chování této látky (ČHMU, 2018b):

- Molekulová hmotnost: 283,7968 g/mol,
- Rozpustnost ve vodě: 480 mg/l,
- Bioakumulační potenciál: nízký,
- Biokoncentrační faktor: nízký potenciál (68,8),
- Poločas rozpadu v půdě: min. 11, max. 30 dnů,
- Bod tání: -61,1 °C,
- Bod varu: 334 °C.

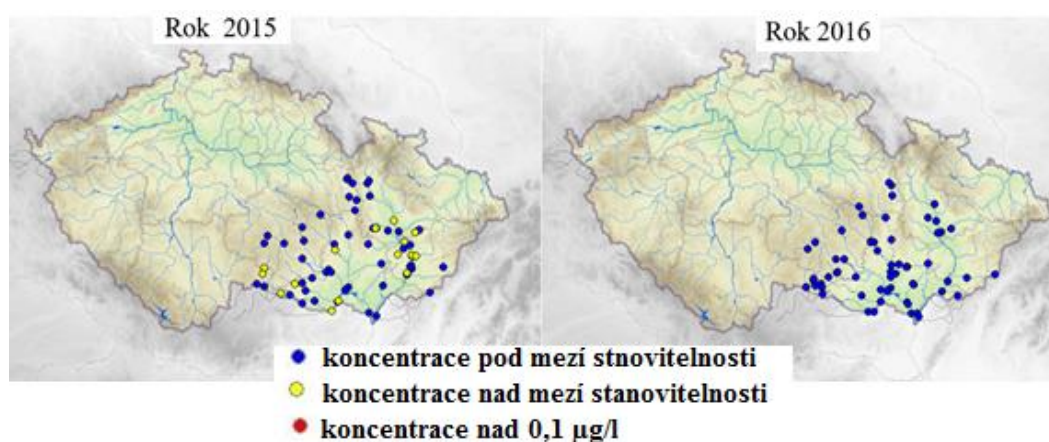
Toxicita s-metolachloru pro některé organismy (ČHMU, 2018b):

- LD50 potkan (*Ratus ratus*) – 2336 mg/l,
- 96hLC50 pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) – 1,23 mg/l,
- 48hLC50 hrotnatka velká (*Daphnia magna*) – 11,2 mg/l,
- 48hEC50 hrotnatka velká (*Daphnia magna*) – 26,5 mg/l,
- LC50 žížala obecná (*Lumbricus terrestris*) – 570 mg/kg.

Látka s-metolachlor je obsažena v přípravcích Dual Gold 960 EC (obsah látky 960 g/kg), dále Gardoprim Plus Gold 500 SC (312,5 g/kg) a v přípravku Lumax (375 g/kg). Tyto herbicidy se používají především pro ochranu kulturních plodin, jako jsou brambory pozdní i rané, hrách, kukuřice, řepa cukrovka a slunečnice. V převážné většině dochází

k aplikaci na jaře nebo během vegetační sezóny. Aplikované množství této látky v ČR za rok 2016 dosáhlo úrovně 51 607,4 kg. Z této sumy bylo téměř 96 % použito na ošetření kukuřice. Pro porovnání můžeme uvést dostupné údaje i z let dřívějších. V roce 2011 bylo množství aplikované látky na nejvyšší úrovni při hodnotě 94 302,2 kg. Naopak nejnižší hodnota je z roku 2001, kdy množství aplikované látky na našem území činilo 16 610,1 kg (ČHMU, 2018b).

Českým hydrometeorologickým ústavem je každoročně monitorován výskyt látky s-metolachlor v povrchových vodách na území ČR (obr. č. 2).



Obr. č. 2: Výskyt látky s-metolachloru v povrchových vodách ČR v roce 2015 a 2016 (ČHMU, 2018b).

Nebezpečnost herbicidu s-metolachloru je vyjádřena takzvanými H větami (Pubchem, 2018). V tomto případě se jedná konkrétně o věty H317 (Může vyvolat alergickou kožní reakci), H400 (Vysoce toxický pro vodní organismy) a H410 (Vysoce toxický pro vodní organismy s dlouhodobými účinky).

U s-metolachloru byl prokázán negativní vliv na některé vodní organismy. S-metolachlor již v koncentraci 4 mg/l způsobil významný pokles plodnosti u perloočky *Daphnia longispina*, přitom ale nebyly zjištěny žádné související změny ve složení mastných kyselin u matek perlooček (Neves a kol., 2015). Dále tato látka, spolu s produkty vznikajícími při její degradaci, může negativně ovlivnit vývoj larev *Crassostrea gigas* (Mai a kol., 2014). Vliv tohoto herbicidu na řasu *Botryococcus braunii* zkoumal ve své práci Deng a kol. (2012). V rámci testu došlo k ošetření řas herbicidem s-metolachlor

v koncentracích 0,1; 1 a 5 mg/l. Zde bylo v laboratorních pokusech potvrzeno, že tato látka, jakožto inhibitor mitózy, snižuje při své přítomnosti ve vodě růst těchto řas a také snižuje jejich obsah uhlovodíků (na 16,4; 14 a 5,5 % sušiny biomasy v závislosti na testované koncentraci). Dobšíková a kol. (2011), zjistili, že s-metolachlor ovlivňuje biochemické a hematologické parametry a tím dochází ke změně fungování jaterních buněk kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Během testu byly ryby vystaveny množství 13,0 mg/l herbicidního přípravku Gardoprim Plus Gold 500 SC (účinné látky: 187,5 g terbutylazinu a 312,5 g s-metolacholu). Následně byly u exponovaných kaprů pozorovány zjevné klinické příznaky ve změnách chování, respiračních nebo neurologických poruchách. Vliv tohoto herbicidu na raky rodu *Orconectes* (*O. rusticus*) prováděl Wolf a Moore (2002). Tito vědci při svém pokusu zjistili, že subletální expozice této látky změnila smyslové vnímání sledovaných jedinců, konkrétně schopnost najít potravu a reagovat na alarmující signály. Tyto výsledky doplnil Cook a Moore (2008). Ve svém pokusu prokázali, že vysoké koncentrace látky metolachlor ve vodním prostředí (80 µg/l) ovlivňují schopnost raků *Orconectes rusticus* reagovat na společenské signály a tím mohou ovlivňovat jejich určité agonistické chování.

2.2. Raci

Sladkovodní raci patří mezi korýše řádu Decapoda a infrařádu Astacida (někdy též nazývaný Astacoidea). Tento infrařád je následně rozdělován do 4 nadčeledí – Enoplometopoidea, Nephropoidea, Astacoidea a Parastacoidea. Do prvních dvou skupin jsou zařazováni mořští humři, sladkovodní raci náleží do skupin zbývajících (Astacoidea a Parastacoidea). Podle novodobých genetických metod byl ale nezvratně potvrzen monofyletický původ sladkovodních raků. Sladkovodní raci tedy nemusí náležet do dvou nadčeledí, ale představovat jedinou společnou, která by se následně skládala ze tří čeledí. Dvě čeledě původem na severní polokouli – Astacidae (zahrnující převážně raky evropské) a Cambaridae (převážně severoamerické druhy). A třetí čeleď s názvem Parastacidae, zahrnující raky žijící na jižní polokouli. Problémem v tomto členění jsou dva zeměpisně izolované druhy, *Cambaroides* z Dálného východu Asie a *Pacifastacus* ze severozápadu Severní Ameriky. U těchto druhů není zatím zcela vyjasněn jejich fylogenetický vztah k ostatním rakům severní polokoule. Nejasnosti jsou také

v biogeografii, protože jsou odděleny od center diverzity svých čeledí. V současné době je popsáno přes 600 druhů raků, toto číslo ale stále není konečné (Kozák a kol., 2013).

2.2.1. Obecná morfologie a anatomie raků

Celé tělo raka je kryto na svém povrchu pevným krunýřem vylučovaným pokožkou. Někdy je též nazývaný exoskelet. Tento exoskelet není kompaktní, ale je tvořen jednotlivými články navzájem propojenými tenkou membránou. Toto uspořádání umožňuje u raka velkou možnost pohybu. V krunýři se nachází mnoho druhů pigmentů, jejichž kombinace vytváří různé barevné varianty typické pro jednotlivé druhy raků. Krunýř neroste současně s tělem, ale dochází k jeho svlékání (Kozák a kol., 2013).

Pro raky, jakožto zástupce řádu desetinožců (Decapoda), je typická přítomnost deseti nápadných kráčivých končetin. Na prvním páru se nachází velká klepeta. Celkový počet končetin je ale mnohem vyšší, protože se zde započítávají i tykadla, ústní a zadečkové končetiny. Proto je výsledný počet 19 párů. Tělo raka je členěno na hlavohruď (cephalothorax) a zadeček (abdomen, pleon). Vrchní část hlavohrudi se nazývá karapax, jeho významná role je mimo jiné při správné determinaci. Mezi významné determinační znaky nacházející se na karapaxu patří postorbitální lišty, tzv. rostrum (čelní trn), nebo povrch a hrubost svrchní části hlavohrudi. Spodní část hlavohrudi slouží u samic našich raků jako místo, kam samci ukládají na podzim spermatofory. U některých druhů raků se zde nachází tzv. *annulus ventralis* (semenná schránka), kam samice ukrývají spermatofory. Na konci abdomenu se nachází tzv. *telson* (Kozák a kol., 2013).

Raci dýchají pomocí žaber. Tento orgán je uložen po bocích hlavohrudi v žaberních komorách (Zarenkov, 1982). Počet žaber je druhově variabilní. Například u raka říčního můžeme pozorovat v jedné žaberní komoře celkem 18 plně funkčních žaber, plus 4 rudimentální. U raků z čeledi Cambaridae obvykle pozorujeme 17 funkčních žaber, u raků z jižní polokoule se nachází 12 až 21 žaber v jedné žaberní dutině (Vogt, 2002).

Raci jsou gonochoristé. Samčí i samičí pohlavní orgány se nachází dorzálně v hlavohrudi mezi spodinou srdeční dutiny a žaludkem. Vzhled a velikost varlat i vaječníků se odvíjí od věku jedince a jeho reprodukční kondice. Během páření dochází k znatelnému zvětšení gonád (Kozák a kol., 2013).

2.2.2. Rak mramorovaný

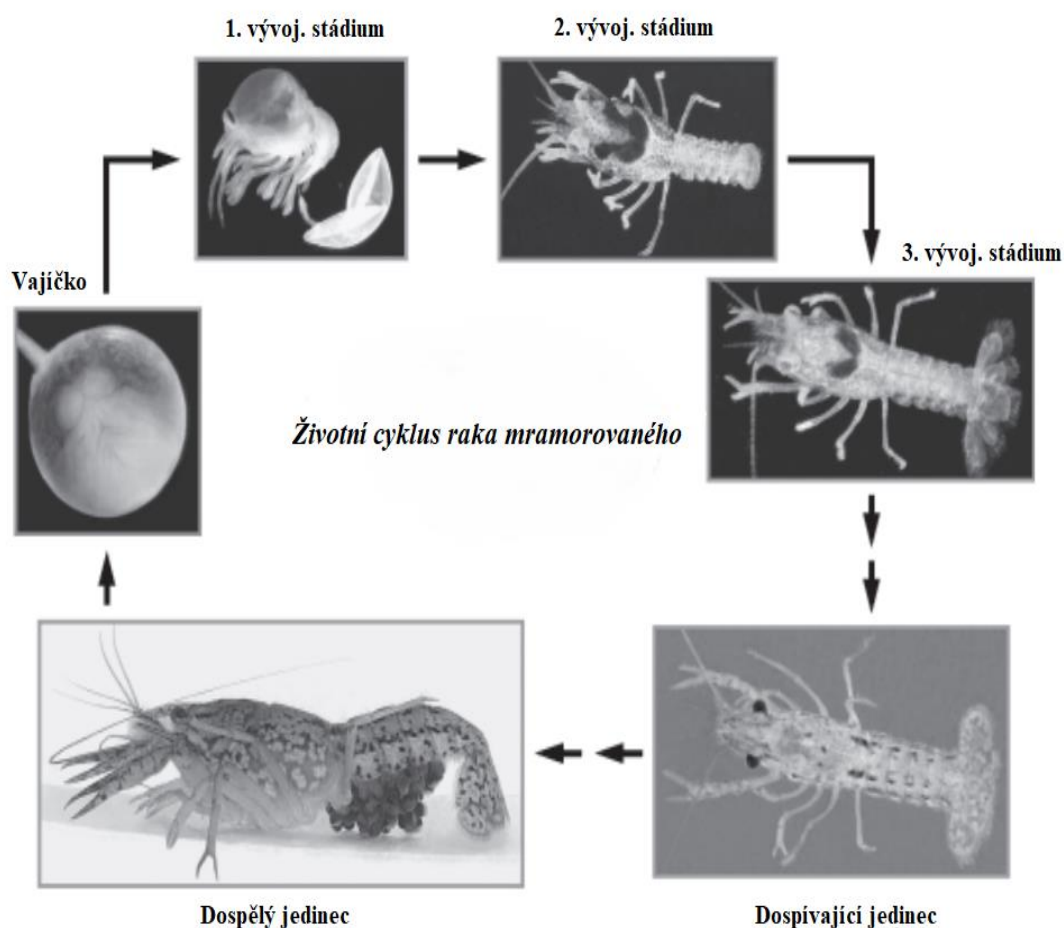
Rak mramorovaný, latinsky *Procambarus fallax* f. *virginalis*, patří mezi sladkovodní raky. Je zařazován do řádu Decapoda, infrařádu Astacida, nadčeledi Astacoidea, čeledi Cambaridae, podčeledi Cambarinae, rodu *Procambarus* (De Grave a kol., 2009).

Původem rak mramorovaný pochází z amerických států Florida a Georgia (Taylor a kol., 2007; Dorn a Volin, 2009), partenogeneticky se rozmnožující forma tohoto raka byla ale poprvé popsána až v Evropě. První kompletnější zmínka o druhu pochází z roku 2003, kdy Scholtz a kol. (2003) prohlásili, že došlo v akváriu v Německu k partenogenetické reprodukci u jednoho z druhů chovaných raků. Tento rak dostal jméno „Marmorkrebs“ (marbled crayfish) podle svého mramorovaného zbarvení. Na základě molekulárních důkazů, morfologických charakteristik a charakteristik postembryonálního vývoje bylo jasné, že tento rak patří do velké skupiny severoamerických raků Cambaridae. Nicméně zatím nebyla možná přesná determinace tohoto raka v rámci této konkrétní skupiny. Protože díky partenogenetickému rozmnožování byly pozorovány pouze samice, nebylo možné použít existující klíče této skupiny, které byly založeny na znacích mužských gonopodů (Hobbs, 1989). Vzhledem k velmi podobnému vzhledu a zbarvení začaly probíhat molekulární studie o fylogenetických vztazích mezi nově popsaným rakem a známým druhem *Procambarus fallax*. Tato analýza, založená na mitochondriálních datech, skutečně určila raka *Procambarus fallax* jako nejbližšího příbuzného. Přesto několik autorů považuje raka „Marmorkrebs“ příbuzného spíše raku *Procambarus alleni*. Mezitím se rak mramorovaný šířil a dále šíří po celém světě, především prostřednictvím neřízeného akvarijního obchodu. Exempláře byly nalezeny ve volné přírodě již v mnoha zemích, jako je Německo, Nizozemsko, Itálie, Japonsko nebo Madagaskar (Martin a kol., 2010). Rozšíření těchto zvířat je díky internetovému obchodu v dnešní době velmi snadné, následné vypuštění do volné přírody ale může ohrozit existenci původních druhů raků v dané lokalitě, mimo jiné také díky tomu, že je rak mramorovaný potencionálním přenašečem račího moru (Kozák a kol., 2013).

Svou velikostí je rak mramorovaný řazen mezi menší druhy. Jeho maximální velikost může dosahovat 13 cm, většinou ale nebývá větší než 10 cm. Rak mramorovaný je krátkověký druh (obr. č. 3). Jeho věk zpravidla nepřesahuje v laboratorních podmínkách 2 roky. Jen výjimečně se dožívá více než tři let. Nejdéle žijící exemplář dosáhl věku 4,5

let. Nejčastější příčinou úhynu jsou problémy spojené se svlékáním, které je u tohoto druhu raka poměrně časté (Pöckl a kol., 2006; Vogt, 2010).

Povrch těla je typicky mramorovaný na hnědavém nebo zeleném podkladu. Nejlépe toto zbarvení můžeme pozorovat na bocích hlavohruď. Ta má hladký povrch a nachází se zde několik trnů za týlní brázdou a jeden pár postorbitálních lišt. Rostrum je výrazné s hladkými okraji sbíhajícími se do malého trojúhelníkovitého vrcholku. Na rostru se nenachází střední rýha jako u jiných druhů. Rak mramorovaný disponuje malými klepety bez patrného mramorování, která jsou na povrchu jemně zrnitá a jen výjimečně přesahují 50 % délky hlavohruď. Na zápěstí obou klepet se nachází vyvinutý trn (Holdich a kol., 2006).



Obr. č. 3: Životní cyklus raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*)

(upraveno podle Vogt, 2008).

Jak už bylo řečeno výše, tento rak se rozmnožuje pomocí tzv. apomiktické partenogeneze. Tento pojem znamená, že potomstvo vzniká nepohlavním rozmnožováním samičky a všichni jedinci jsou opět pouze samičího pohlaví s identickou genetickou výbavou (Martin a kol., 2007). Tito geneticky identičtí jedinci jsou proto vhodné subjekty pro testovací účely. Dospělosti samice dosahují poměrně v brzkém věku, již při dosažení stáří 25 až 35 týdnů (což odpovídá velikosti těla přibližně 40 mm) jsou schopné reprodukce. Toto reprodukční období může následně probíhat, pokud jsou dodrženy správné chovatelské postupy, každých 8 až 9 týdnů v průběhu celého roku. Plodnost každé samice se v laboratorních podmínkách zpravidla pohybuje mezi 50 až 150 vajíčky o velikosti 1,7-1,9 mm. Doba inkubace se pohybuje mezi dvěma a třemi týdny (Seitz a kol., 2005; Holdich a kol., 2006; Gutkunst a kol., 2018).

2.3. Testy toxicity

Testy toxicity slouží k posouzení ekotoxicity různých chemických látek, chemických přípravků, pesticidů a odpadů pronikajících do vodního prostředí. Důležité je při provádění těchto testů dodržovat předepsané postupy, aby bylo možné porovnávat výsledky mezi jednotlivými laboratořemi. Tyto metodiky jsou standardizovány na mezinárodní úrovni podle mezinárodních organizací ISO (z angl. *International Organization for Standardization*) a OECD (z angl. *Organization for Economic Cooperation and Development*). ČR je členem této organizace od roku 1995 (Svobodová a kol., 2010a).

Principem biologických testů toxicity (biotestů) je sledování účinků látek na živé organismy za předem definovaných podmínek. Mezi sledované látky mohou patřit jak látky vytvořené člověkem, tak i látky přírodního původu. Vyhodnocení se provádí na základě negativního (ale i pozitivního) vlivu testované látky na živý organismus (Kočí a Mocová, 2009).

Testy toxicity můžeme rozdělovat podle různých kritérií. Podle doby expozice se dělí na akutní (expozice v řádu hodin), subchronické a chronické (expozice až v řádu měsíců). Další dělení je podle druhu testovaného organismu, koncentrace toxické látky aj. (Knejzlík a Ruml, 1999).

Toxicita dané testované látky může být ovlivněna mnoha faktory. Mezi hlavní faktory patří koncentrace dané sloučeniny a doba jejího působení. Dále může být testování ovlivněno faktory, které ovlivňují fyziologický stav testovaného organismu (teplota, osvětlení, přísun živin aj.) (Knejzlík a Ruml, 1999). Jak uvádí Svobodová a kol. (2010b), významným aspektem rozhodujícím o toxicitě dané látky jsou abiotické i biotické faktory prostředí. Jakožto zástupce fyzikálních parametrů je zde uváděna teplota prostředí, kdy vyšší teploty obecně urychlují chemické reakce. Tato vlastnost může být pozitivního i negativního charakteru. Mezi další faktory, které je nutné během testování sledovat, zmiňuje množství kyslíku nebo intenzitu osvětlení. To má, kromě již zmíněného vlivu na aktivitu organismů, také vliv na rozklad toxické látky.

Při provádění testů toxicity provádíme dva druhy experimentů. První možnost je testování přímo na pokusných zvířatech tzv. *in vivo* testy, druhou možností jsou tzv. *in vitro* testy. Tento pojem znamená, že využíváme pouze tkáňové kultury živočišných, popř. i lidských buněk v řízených laboratorních podmínkách. Význam a oblíbenost *in vitro* testů v poslední době stále roste s množstvím nových sloučenin a nutností jejich sledování. Jejich nespornou výhodou je rychlé vyhodnocení působení dané látky, nižší finanční náklady v porovnání s testy na pokusných zvířatech a možnost použití i lidských buněk. Nesporný argument hovořící ku prospěchu *in vitro* testů je i etické hledisko (Knejzlík a Ruml, 1999).

Pro vyhodnocení testu se používají hodnoty, které získáme výpočtem nebo určíme na základě pozorování v testu. Tyto parametry jsou přesně stanovené, aby je bylo možné vzájemně porovnávat a hodnotit. Jako nejčastější vypočítané hodnoty se uvádí tzv. efektivní koncentrace (z angl. *Effective Concentration* - EC), letální koncentrace (z angl. *Lethal Concentration* - LC) a inhibiční koncentrace (z angl. *Inhibitive Concentration* - IC), konkrétně pak zpravidla ve formě EC50, LC50 nebo IC50. Hodnota LC50 znamená úmrtí 50 % testovaných organismů, hodnota EC50 znamená reakci na látku u 50 % testovaných organismů v souboru a hodnota IC50 způsobuje inhibici růstu u 50 % organismů ze souboru za jednotku času (McNaught a Wilkinson, 1997). U dlouhodobých testů toxicity se dále můžeme setkat mimo jiné s tzv. hodnotami NOEC (z angl. *No Observed Effect Concentration*) označující maximální hodnoty testované látky nezpůsobující žádné významné změny a LOEC (z angl. *Lowest Observed Level Concentration*) označující nejnižší koncentraci testované látky způsobující změnu, ve srovnání s kontrolou (Velíšek a kol., 2014a).

2.3.1. Využití raků v testech toxicity

Raci, stejně jako i ryby a ostatní vodní organismy, se řadí mezi poikilotermní živočichy. To znamená, že tělesná teplota těchto živočichů a všechny ostatní fyziologické pochody závisí na teplotě okolního prostředí. Pokud porovnáme tyto vodní živočichy se savci, můžeme pozorovat řadu dalších odlišností. Kupříkladu na rozdíl od savců se vyskytují u raků některé další specifické cesty vstupu xenobiotik do organismu (branchiální, tj. přes žábry, transdermální, tj. přes kůži a perorální, tj. trávicím traktem). Dále můžeme pozorovat odlišnosti v tzv. toxikokinetice (osudu látky v organismu) a toxikodynamice (mechanismu působení látky v organismu; Velíšek a kol., 2014a).

S použitím raků a jiných živých organismů v laboratorních pokusech se úzce pojí tzv. koncept **3R** (**R**eplacement, **R**eduction a **R**efinement). Autorem jsou William Russel a Rex Burch, kteří ho publikovali v roce 1959 v knize *The Principles of Humane Experimental Technique*. Hlavní myšlenka tohoto konceptu je nahrazování pokusných zvířat nižšími organismy nebo úplné nahrazení pokusných zvířat alternativními metodami, dále je požadováno snižování počtu pokusných zvířat a v neposlední řadě je snaha autorů o co největší zmírnění utrpení a bolesti pokusných zvířat během experimentu (Russel a Burch, 1959; Flecknell, 2002).

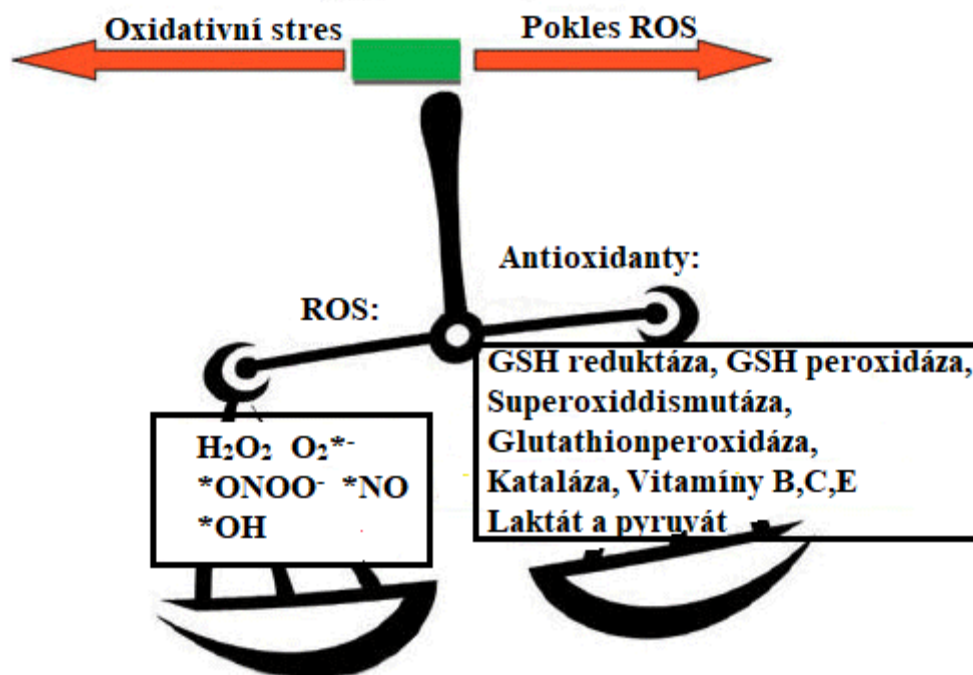
Jak uvádí Vogt (2008), v laboratorních pokusech sdílí rak mramorovaný některé charakteristiky s jinými pokusnými zvířaty, ale má i několik zvláštních vlastností, díky kterým se ukazuje jako výhodný testovací model. Stejně jako u ostatních modelů se i rak mramorovaný vyznačuje snadným chovem, poměrně malou velikostí, vysokou plodností, relativně krátkou generační dobou, možností rozmnožování po celý rok aj. Maximální průměrná doba života u raka mramorovaného v laboratorních podmínkách je kupříkladu delší než u hlístic a ovocných mušek, srovnatelná s dániem pruhovaným (*Danio rerio*), ale kratší než u drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Vajíčka s průměrem 1,7-1,9 mm, které se vyvíjejí mimo tělo, jsou u raka mramorovaného větší než u dánie i drápatky. Zvláštními rysy raka mramorovaného jsou přímý a krátkodobý vývoj, stereotypní buněčná linie během raného vývoje, četné a snadno identifikovatelné morfologické rysy, široký repertoár chování. Dle Vogta (2008) je ale nejdůležitější znak genetická identita všech potomků. Další výhodou je snížená agresivita ve společných kulturách díky složení pouze ze samičího pohlaví, které není tak agresivní jako samčí. Tyto vlastnosti a možnost kultivovat embrya a první post-embryonální životní stádia ve velmi jednoduchém

prostředí (mikrodestičky) umožňují vysoce standardizované laboratorní experimenty a přesné časové a etapové vzorkování.

Oblíbenost raka mramorovaného v laboratorních pokusech stále stoupá a důkazem je množství pokusů, kde byl právě rak mramorovaný použit jako testovací organismus. Například Vogt (2007) testoval sensitivitu embryí raka mramorovaného na chemikálie s přítomností testosteronu. Vliv prometrynu na raná vývojová stádia raka mramorovaného zkoumal ve své práci Velíšek a kol., (2014b). Působení látky terbuthylazine-2-hydroxy na raná vývojová stádia raka mramorovaného zjišťoval Koutník a kol. (2017). Ve všech vyjmenovaných pokusech bylo dosaženo zajímavých výsledků, stejně tak jako v mnoho dalších, které zde nejsou vyjmenované.

2.4. Oxidativní stres

Jak uvádí Halliwell (2007), termín oxidativní stres (angl. *oxidative stress*) můžeme definovat jako vážnou nerovnováhu mezi produkcí volných radikálů a antioxidantů (obr. č. 4). Tuto definici potvrzuje i Sies (1997). Jak říká, oxidační stres je narušení rovnováhy mezi prooxidanty (volnými radikály) a antioxidanty ve prospěch prvního, což může vést k potencionálním škodám či poškozením. Tyto škody se nejčastěji nazývají **oxidační poškození** (angl. *oxidative damage*).



Obr. č. 4: Rovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty

(upraveno podle Amira a Adly, 2010)

Volnými radikály jsou označovány vysoce reaktivní částice s jedním nebo více nepárovými elektrony, které způsobují zvýšení oxidativního charakteru a posilují redoxní reakce uvnitř organismu. Snižují také hladinu antioxidantů. Vznik radikálů může být důsledek fyzikálních faktorů, chemickou cestou, při patologických stavech aj. Mezi radikály řadíme proteiny, dusitany, chlor, kyslíkové radikály, kyslík, ozon, peroxidy a další. Patří sem i těžké kovy a některé herbicidy a pesticidy (Halliwell a Guteridge, 2000). Základní volné radikály kyslíku jsou často označovány jako tzv. ROS (z angl. *Reactive Oxygen Species*), což jsou v podstatě meziprodukty redukce kyslíku na vodu. Známý kyslíkový radikál je superoxid $O_2^{\cdot-}$, který spontánně nebo působením antioxidačního enzymu superoxid dismutázy (SOD) přechází na peroxid vodíku (H_2O_2). Ten je sice sám o sobě stabilní, ale pokud zreaguje s redukovanými redoxně aktivními přechodnými kovy (typicky železo a měď), vzniká nesmírně reaktivní hydroxylový radikál ($\cdot OH$), který se považuje za vlastního původce startujícího oxidačního poškození biomolekul organismu (Pláteník, 2009).

Jako obrana před volnými radikály slouží antioxidanty. Tento termín pochází ze 40. let, kdy byl poměrně úzce definován jako látka schopná zastavit řetězové radikálové reakce typu peroxidace lipidů (Pláteník, 2009). Dle Halliwella a Gutteridge (2000) je ale antioxidační ochrana těla mnohem komplexnější pojem, která zahrnuje mnoho bodů. Nejdůležitější z nich jsou antioxidační enzymy. Zde je na prvním místě superoxid dismutáza, která katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. Následně je peroxid odstraňován pomocí dalších mechanismů (kataláza, glutathion peroxidáza). Zajímavý bod je adaptace buněk na oxidační stres pomocí stresových reakcí (ischemie a teplotní šok). Do antioxidační ochrany patří také antioxidační substráty (thioly, kyselina močová, bilirubin, vitamin C a E, karotenoidy, flavonoidy) a v širším slova smyslu i systémy, které se podílejí na reparaci oxidačního poškození DNA, proteinů a lipidů.

Halliwell a Gutteridge (2000) ale doplňují, že zvýšené úrovně oxidačního poškození nemusejí být výhradně důsledkem oxidativního stresu. Za těmito poruchami může stát i selhání látkové výměny nebo systému oprav v organismu. Proto zvýšení hladin „biomarkerů“ oxidativního poškození nemusí nutně znamenat vyšší hladinu oxidativního stresu.

Oxidativní stres může způsobovat mnoho nepříjemných událostí uvnitř živého organismu. Například může přímo poškozovat Na⁺/K⁺-ATPázu a modulovat působení kanálů K⁺ chemickou reakcí s aminokyselinovými zbytky. Jeden z nejpozoruhodnějších účinků oxidativního stresu je na buněčném metabolismu Ca²⁺, kde jsou pozorovány tendence ke zvýšení hladiny intracelulárního „volného“ Ca²⁺. Následkem toho je zvýšení buněčné proteolýzy aktivací kalpainem. Zde je ale sporné, zda výsledná proteolýza je opravdu přímé oxidační poškození (McConkey a Orrenius, 1997; Halliwell, 2007).

„Oxidační poškození“ je termín často používaný k označení náhodného a nerozlišujícího poškození široké škály biomolekul, avšak cílové poškození je až překvapivě specifické. Pokud vezmeme jako příklad člověka, tak u Parkinsonovy choroby se zdá, že zvýšené oxidativní poškození DNA ovlivňuje pouze guanin. V buňkách vystavených oxidativnímu stresu proteomické techniky odhalují, že je často poškozen jen malý počet proteinů, ačkoli mechanismy této selektivity zůstávají ve většině případů neobjasněny (Alam a kol., 1997).

3. MATERIÁL A METODIKA

Vliv herbicidu s-metolachloru na raná vývojová stádia raka mramorovaného byl zkoumán za pomoci embryolarválního testu toxicity. Tento experiment probíhal v akvarijní místnosti Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie, která se nachází v budově Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech. Tento ústav je součástí Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

3.1. Embryolarvální test toxicity

Testy toxicity na vodních organismech patří v současné době mezi nejrozšířenější metody hodnotící negativní vliv látek na životní prostředí. Jsou také častým nástrojem pro zjišťování potenciačních rizik nově vyvinutých chemických látek a přípravků, při určování původců havarijního znečištění povrchových a podzemních vod nebo hodnocení odpadních vod (Velíšek a kol., 2014a,b).

Všeobecným principem všech těchto testů je vystavení testovacích organismů různým koncentracím testované látky po určitou dobu. Současně se organismy umístí do ředící vody bez testované látky (kontrolní skupina) a je sledován vliv testované látky v průběhu testu a po ukončení testu (Svobodová a kol., 2010b).

3.1.1. Princip a podmínky testu

Postup při provádění embryolarválních testů na racích je takřka totožný s embryolarválními testy na rybách. Základním principem u tohoto typu pokusu je vystavení raných vývojových stádií testovaných jedinců koncentrační řadě testované látky. Ve většině případů je uspořádání testu v průtočném systému, v některých případech se ale přistupuje k systému semistatickému. Délka testu je odlišná v závislosti na jednotlivých faktorech, jako je druh raka, teplota vody aj. V průběhu testu jsou sledovány subletální a letální účinky testované látky v jednotlivých koncentracích v porovnání s kontrolní skupinou. Během testu jsou testovaní jedinci krmeni *ad libitum* (dle libosti) čerstvě vylíhnutými naupliemi žábřonožky solné (*Artemia salina*). Mimo letálních účinků

je sledován růst jedinců a výskyt malformací. Také je důležité udržovat v potřebných hodnotách chemické parametry vody (např. teplota vody, nasycení vody kyslíkem, hodnota pH) a odpovídající koncentraci testované látky.

3.1.2. Experimentální materiál

V tomto testu byli použiti juvenilní jedinci raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*), kteří byli získáni od jediné samice (obr. č. 5) tohoto druhu (délka karapaxu 31,2 mm, délka postorbitalu 26,3 mm) o hmotnosti 8,2 g. Tato samice byla získána z odchovny Výzkumného ústavu rybářství a hydrobiologie ve Vodňanech, Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Čerstvě narození jedinci byli až do III. vývojového stádia inkubováni spolu s matkou (přechod na exogenní výživu). Průměrná hmotnost raků mramorovaných před začátkem testu byla $5,41 \pm 0,48$ mg.



Obr. č. 5: Samice raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) použita pro test z odchovny VÚRH ve Vodňanech.

Test byl proveden v semistatickém systému, kdy byla měněna voda každých 48 hodin. Makrodesky byly umístěny v laboratoři VÚRH se světelným režimem 12 hodin světlo a 12 hodin tma. Bylo také nezbytné dodržení stanovených přesných podmínek testu:

- Teplota: **22,7 ± 0,6 °C**,
- Rozpuštěný kyslík > **6,65 mg/l**,
- pH: **7,6-8,1**,
- KNK_{4,5}: **0,73 mmol/l**,
- CHSK_{Mn}: **0,96 mg/l**,
- Celkový amoniak: **0,018 mg/l**,
- Suma Ca²⁺ + Mg²⁺: **6,73 mg/l**.

Teplota vody byla sledována v hodinových intervalech za použití Minikin loggerů (Systémy měření prostředí, Brno). Nasycení vody kyslíkem, pH a ostatní parametry byly sledovány denně. Krmení raků probíhalo jednou denně *ad libitum* čerstvě vylíhnutými naupliemi žábřonožky solné (*Artemia salina*).

3.3. Odběr vzorků

V průběhu celého testu v denních intervalech probíhala kontrola za účelem sledování mortality, vývoje, výskytu morfologických anomálií a zjištění tělesné hmotnosti na analytických vahách Mettler-Toledo s přesností na 0,1 mg (vždy druhý den po svlékání, aby byla zajištěna již částečná „odolnost“ kalcifikováním krunýře). Vývojová stádia byla stanovena dle Vogt a kol. (2004).

Na konci testu bylo provedeno vyhodnocení růstových parametrů raků. Za účelem tohoto vyhodnocení byly zvoleny dva ukazatele, konkrétně specifická rychlost růstu (SGR) a inhibice růstu (I).

3.3.1. Specifická rychlost růstu

Tento ukazatel je vyhodnocován na základě podílu rozdílu průměru přirozených logaritmů hmotností raků při prvním vážení (5. den testu) a na konci testu (45. den testu). Výpočet byl proveden podle vzorce:

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

kde:

SGR = průměrná specifická rychlost růstu ve skupině;

w1, w2 = hmotnosti jednoho raka v čase t1 a t2, jednotlivě (g);

t1 = čas (dny) – začátek expozice;

t2 = čas – konec expozice.

3.3.2. Inhibice specifické rychlosti růstu

Jde o podíl mezi rozdílem průměrné specifické rychlosti růstu kontrolní skupiny raků a experimentální skupiny raků a průměrné specifické rychlosti růstu v kontrolní skupině raků po 45 dnech expozice, násobený stem. Výpočet byl proveden podle vzorce:

$$I_x [\%] = \frac{\text{SGR}_x(\text{kontrola}) - \text{SGR}_x(\text{skupina})}{\text{SGR}_x(\text{kontrola})} \cdot 100$$

kde:

I = inhibice specifického růstu v experimentální skupině po 40 dnech expozice;

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

SRG (skupina) = průměrná specifická rychlost růstu v experimentální skupině raků po 40 dnech expozice.

3.4. Chování raků

Po ukončení testu (45. den) bylo u přeživších jedinců provedeno testování vzorců chování. Princip tohoto testu zahrnoval sledování jedinců během jejich chování v reálném čase. Každý jedinec ve skupině byl umístěn do bílé kruhové misky s 50 ml vodního roztoku a sledován pomocí videokamery (Sony HDR-CX240E, Sony, Japan) po dobu jedné hodiny. Naměřené hodnoty byly následně analyzovány softwarem EthoVision® XT 13 (Noldus Information Technology, Wageningen, Nizozemsko). V případě tohoto testu byly hodnoceny speciální parametry jako celková pohybová vzdálenost (cm), rychlost chůze (cm/s) a aktivita raků (%).

3.5. Biochemické metody stanovení biomarkerů

Jednotliví raci byli po ukončení testování vzorců chování zváženi na analytické váze, umístěni do mikrozkušavek a vloženi do tekutého dusíku (obr. č. 7). Takto zmrazení raci byli uchováni při -80 °C pro následující biochemické analýzy oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů.



Obr. č. 7: Vážení testovaných jedinců na analytické váze a následné umístění do mikrozkušavky Eppendorf pro zmrazení v tekutém dusíku.

3.5.1. Příprava vzorků pro biochemické analýzy – homogenizace tkání

Prvním krokem před vlastním stanovením jednotlivých biochemických analýz oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů byla příprava vzorků, konkrétně homogenizace zamražených vzorků tkání. Ta se provádí ve fosfátovém PBS pufru (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,29% Na₂HPO₄*12H₂O, 0,02% KH₂PO₄ v deionizované při pH 7,2) a rotačního homogenizátoru.

Vzorky mražených tkání byly na ledu krájeny skalpelem a váženy v mikrozkušavkách Eppendorf na analytických vahách (0,140 – 0,169 mg zmrzlé tkáně do jedné zkumavky). Do každé zkumavky byl poté přidán PBS pufr v množství 1ml pufru/100 mg tkáně. Tkáně byly následně homogenizovány na rotačním homogenizátoru po dobu přibližně 2 minut. Po celou dobu přípravy a homogenizace bylo potřeba vzorky udržovat na ledu. Takto připravené vzorky byly uloženy do mrazáku.

Před samotným stanovením jednotlivých biochemických analýz byly jednotlivé vzorky pomalu rozmrazeny na ledu a dále bylo postupováno dle jednotlivých metod.

3.5.2. Stanovení enzymatické aktivity katalázy (CAT)

Metoda je založena na schopnosti katalázy rozložit peroxid vodíku na vodu a kyslík. Tento proces se nazývá katalýza a sledujeme ho pomocí měření poklesu absorbance směsi ve vzorku s H₂O₂ za jednotku času. Měření probíhá v mikrodestičkách při 240 nm. Stanovení aktivity katalázy bylo provedeno dle metodiky Aebi (1984), spektrofotometricky v laboratoři na přístroji Infinite M200 (TECAN) (obr. č. 8), na tomto přístroji byly měřeny i ostatní biochemické parametry.

Vzorek byl po rozmražení centrifugován po dobu 30 minut. Poté byl supernatant vzorku vyředěn pomocí homogenizačního PP pufru do mikrozkušavek Eppendorf (poměr 50 µl supernatantu vzorku : 450 µl PP pufr). Následně byl od každého vzorku odebráno pomocí mikropipety 50µl do mikrotitrační destičky. K tomu bylo ihned přidáno multikanálovou pipetou do každé jamky 250 µl 0,09% H₂O₂ a byla měřena absorbance reakční směsi. Měření probíhalo po dobu 1 minuty s 5 sec intervaly při 240 nm oproti kontrole. Každý vzorek byl měřen ve třech opakováních. Výsledná hodnota aktivity

katalázy byla vyjádřena jako směrnice křivky, od které byla odečtena směrnice blanku a došlo k přepočtení pomocí stanovené rovnice na $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min/mg proteinů}$.

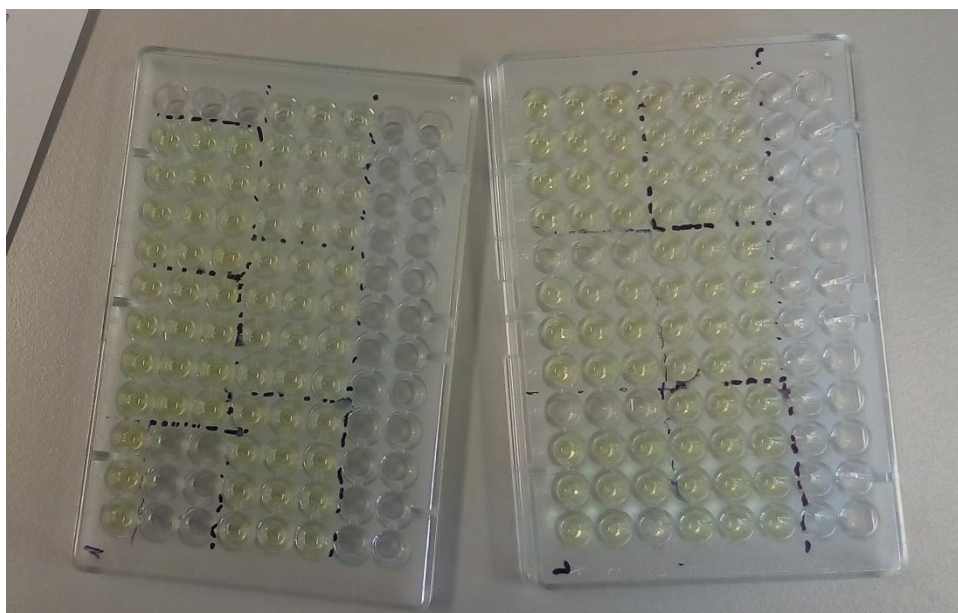


Obr. č. 8: Spektrofotometrický přístroj Infinite M200 (Tecan) a další laboratorní vybavení použité při měření enzymatické aktivity katalázy (CAT) a ostatních biomarkerů.

3.5.3. Stanovení enzymatické aktivity glutathion S-transferázy (GST)

Principem metody je detekce konjugátu mezi redukováným glutathionem a CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzen), substrátem běžným pro všechny izofomy glutathion S-transferázy. Tato metoda byla modifikována na mikrodoskové provedení a využívá spektrofotometrické koncovky při 340 nm. Postupováno bylo podle metodiky Habig a kol. (1974).

Vzorek byl po rozmražení na 15 minut umístěn do centrifugy a centrifugován. Po uplynutí této doby byl supernatant vzorku vyředěn pomocí PBS pufru (0,8% NaCl; 0,02% KCl; 0,29% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 0,02% KH_2PO_4 v deionizované vodě, pH 7,2) v mikrozkuhavce Eppendorf, a to v poměru 200 μl vzorku : 200 μl PBS pufru. Následně bylo pipetováno na mikrotitrační destičku postupně 70 μl zředěného supernatantu vzorku, 120 μl PBS pufru a 10 μl 50 mM CDNB v ethanolu. Reakce byla zahájena přidáním 50 μl 10 mM redukovaného GSH a ihned měřena v přístroji Infinite M200 po dobu 5 minut při 340 nm (obr. č. 9). Stejný postup platil i pro použitý blank. Každý vzorek (blank) byl měřen ve 3 opakováních. Výsledná hodnota aktivity GSH byla vyjádřena směrnicí křivky, od které se odečetla směrnice blanku a následně byla přepočtena dle stanovené rovnice na nmol/min/mg proteinů.



Obr. č. 9: Barevné zabarvení vzorku na mikrotitrační destičce při měření glutathion S-transferázy spektrofotometrickou metodou.

3.5.4. Stanovení redukovaného glutathionu (GSH)

U této metody je hlavním principem reakce thioselektivní Ellmanovy reagentie (DTNB; 2,2-dinitro-5,5-dithiobenzoová kyselina) s volnými -SH skupinami za tvorby barevného produktu, který je stanovován. Tyto volné -SH skupiny jsou ve vzorku zbaveného proteinů zejména v molekule redukovaného glutathionu. Při měření bylo postupováno dle metodiky Ellman (1959).

Nejdříve bylo nutné odstranit ze vzorku proteiny. Proto byl vzorek po rozmrazení promícháván na vortexu a umístěn v mikrokumavkách Eppendorf do centrifugy po dobu 15 minut (10 000 rpm, 4 °C). Po vyndání z centrifugy bylo odebráno z každé mikrokumavky 180 µl supernatantu vzorku a přidáno 18 ml TCA (25% kyselina trichloroctová). Takto upravený vzorek byl nechán 15 minut odstát při pokojové teplotě a následně umístěn opět do centrifugy na 10 minut (8 000 rpm, 4 °C). Po tomto procesu už bylo možné přejít k vlastnímu měření. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno postupně 50 µl vzorku, 190 µl TRIS pufru a 10 µl 0,02 M DTNB, každý vzorek ve třech opakováních. Absorbance byla měřena na spektrofotometru při 420 nm proti blanku a pozadí při 680 nm. Vlastnímu měření předcházela inkubace 5 minut při pokojové teplotě. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny na základě kalibrační křivky v nmol GSH/mg proteinů.

3.5.5. Stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD)

Superoxid dismutázy patří do skupiny metaloenzymů, které obsahují ve své struktuře iont kovu (Cu, Zn, Mn, Ni). Tento iont je zodpovědný za jejich aktivitu. Nejvíce se SOD vyskytuje v jaterních buňkách, jakožto hlavním detoxikačním orgánem, v různé míře jsou ale přítomny po celém těle. Jejich hlavní funkcí je katalýza přeměny reaktivních superoxidových radikálů na molekulový kyslík a peroxid vodíku (Öztürk-Ürek a kol., 2001). Tato metoda tedy primárně spočívá ve schopnosti SOD inhibovat reakce řízené superoxidy.

Pro produkci superoxidů je použit systém NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) a phenazin methosulfonát (PMS). Následně jsou vzniklé superoxidy stanovovány pomocí NBT (nitrobluetetrazolim). Ty se po reakci se superoxidy mění na stabilní formazanový produkt. Ten je následně spektrofotometricky měřen jako pokles přeměny NBT po reakci vzniklých superoxidů se SOD. Aktivita SOD byla stanovena dle metodiky Ewing a Janero (1995).

Vzorky byly nejdříve centrifugovány 30 minut. Poté bylo z každého vzorku odebráno 25 µl supernatantu do mikrotitrační destičky, stejný objem platil i pro blank (PP pufr). Do vzorku bylo následně přidáno 200 µl NADH+NBT pufru a celá destička byla umístěna do spektrofotometru na 1. měření při 560 nm po dobu 2 minut s 20 sec intervaly ke stanovení interní přeměny NBT vzorkem. Ihned poté došlo k odstartování reakce

přidáním 25 µl 35 µM PMS a opět bylo měřeno ve spektrofotometru při 560 nm po dobu 5 minut s 20 sec intervaly. Každý vzorek byl měřen ve třech opakováních. Výsledná SOD aktivita byla vyjádřena v nmol NBT/min/mg proteinů.

3.5.6. Stanovení lipidní peroxidace TBARS

Stanovování lipidní peroxidace je založeno na tzv. TBARS testu (z angl. *Thiobarbituricacid Reactive Substances* = látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou – TBS). Metoda vychází ze stanovení barevných aduktů, které vznikají při reakci produktů lipidní peroxidace a kyseliny barbiturové (TBA). Při měření vzorků touto metodou bylo vycházeno z metodiky Lushchak a kol. (2005).

Do každého necentrifugovaného homogenátu vzorku o objemu 250 µl bylo přidáno 12,5 µl 2mM FeSO₄ a došlo k preinkubování při 37 °C po dobu 30 minut. Následně bylo z každé mikrozkušavky odebráno 12,5µl vzorku pro dosažení požadovaného objemu (250 µl) a poté bylo přidáno 75 µl roztoku TCA-BHT. Takto upravený vzorek byl centrifugován 20 minut (4000 rpm, 4 °C). Po centrifugaci bylo do mikrozkušavek Eppendorf odpipetováno 250 µl vzorku a přidáno 50 µl HCl a 200 µl TRIS TBA. Vzorek byl umístěn do termobloku s teplotou 90 °C na dobu 45 minut. Poté bylo z každé mikrozkušavky odpipetováno ve třech opakováních 250 µl vzorku na miktotitrační destičku. Destička byla vložena do spektrofotometru a proběhlo měření vzniklého zbarvení při 550 a 590 nm po dobu 10-15 minut. Naměřené hodnoty jsou dle výpočtu přes kalibrační křivku vyjádřeny v nmol TBARS/mg proteinů.

3.5.7. Metoda stanovení koncentrace proteinů (metoda BCA)

Při stanovení koncentrace proteinů bylo postupováno podle metodiky Lowry a kol. (1951) spektrofotometricky na mikrodestičkách.

V prvním kroku bylo zředěno 30 µl každého rozmraženého vzorku pomocí 0,1 M NaOH v poměru 1:20. Takto naředěný vzorek byl ponechán při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Následující den bylo z každého vzorku odebráno 10 µl do mikrotitrační destičky, každý vzorek ve dvou opakováních, včetně blanku. K tomu bylo do každé jamky přidáno 200 µl **A** (roztok sodné soli kyseliny bicinchoninové) + **B** (CuSO₄) **pufro**

(vytvořen v den stanovení v poměru 26,54 ml A pufru ku 0,54 ml B pufru). Celá destička byla po naplnění přetažena plastickou fólií a umístěna na 30 minut do termoboxu při teplotě 37 °C. Po 30 minutách byla destička ihned přemístěna do spektrofotometru a proběhlo měření při 562 nm oproti blanku. Z naměřených hodnot jsme díky kalibračnímu grafu zjistili hodnotu trendu a přes ní vypočítali výslednou hodnotu proteinu pro každý vzorek (mg/ml).

3.6. Statistické vyhodnocení testu

Rozdíly v kumulativní mortalitě mezi experimentálními skupinami a kontrolní skupinou byly vyhodnoceny pomocí tzv. kontingenčních tabulek (z angl. *contingency tables*). Pro vyhodnocení růstu, chování, oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů byl použit tzv. Kolmogorův – Smirnovův test. Homogenita byla testována za použití Barlettova testu. Rozdíly v růstu, celkové pohybové vzdálenosti, rychlosti chůze, oxidativním stresu a antioxidačních biomarkerech mezi testovanými skupinami byly testovány pomocí jednocestné analýzy ANOVA s post-hoc srovnáním pomocí metody Unequal N HSD, která vychází z Tuckey HSD testu. Rozdíly v aktivitě raků mezi experimentálními skupinami byly hodnoceny pomocí Kruskal – Wallisova testu.

4. VÝSLEDKY

4.1. Kumulativní mortalita

Během experimentu byly zjištěny statisticky významné rozdíly ($P < 0,01$) v celkové kumulativní mortalitě u raků mezi skupinami vystavenými působení sledované látky s-metolachlor ve srovnání s kontrolou. Tyto údaje jsou uvedeny v tabulce č. 1. Kumulativní mortalita u raků vystavených s-metolachloru v koncentracích 1,1 $\mu\text{g/l}$ (E1), 11 $\mu\text{g/l}$ (E2) a 110 $\mu\text{g/l}$ (E3) byla 22,5; 25,0 a 42,5 % respektive a v kontrolní skupině byla mortalita pouze 2,5 %.

Tabulka č. 1. Růstové ukazatele a kumulativní mortalita raných vývojových stádiích raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) po expozici s-metolachloru:

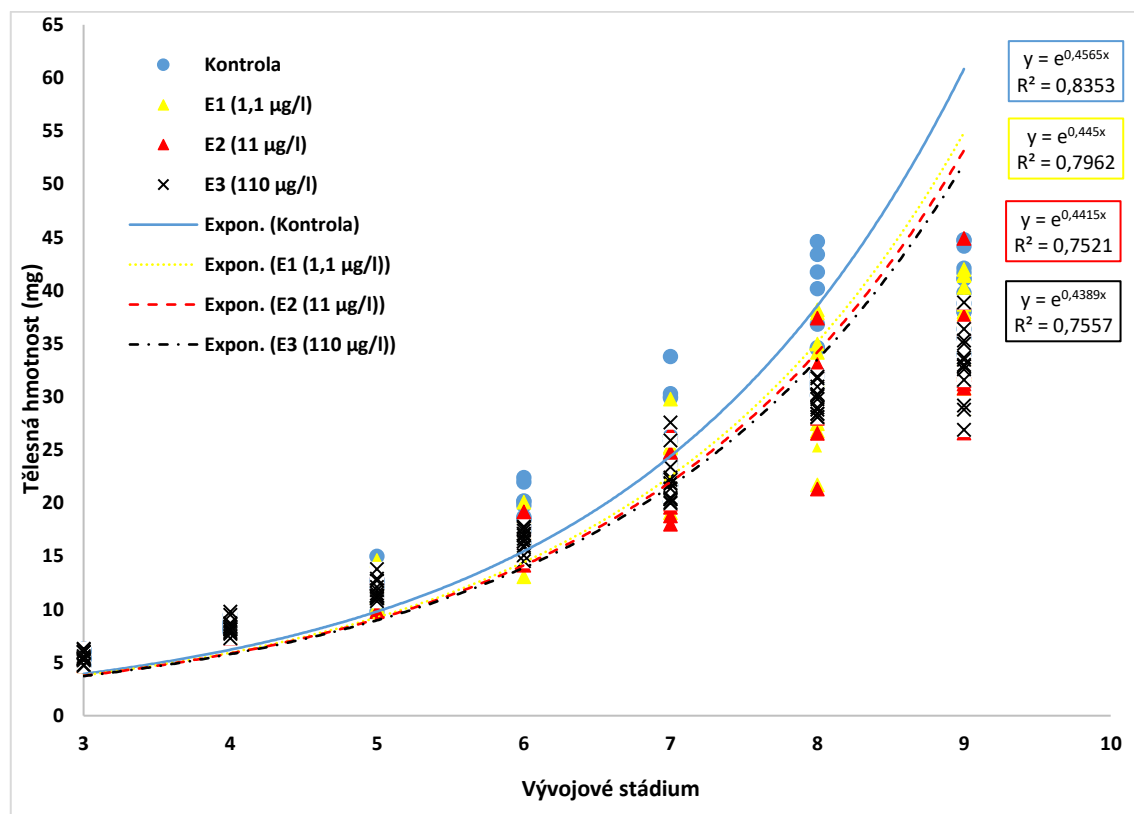
Skupina	Kontrola	E1	E2	E3
S-metolachlor (µg/l)	0	1,1	11	110
M₅ (X ± SD, mg)	8,52 ± 0,56 ^a	8,44 ± 0,66 ^a	8,40 ± 0,57 ^a	8,32 ± 0,64 ^a
M₄₅ (X ± SD, mg)	42,71 ± 5,45 ^a	36,52 ± 4,11 ^b	33,89 ± 4,63 ^b	31,90 ± 4,81 ^b
SGR	4,03 ± 0,11	3,63 ± 0,15	3,45 ± 0,18	3,33 ± 0,19
I (%)	-	9,94 ± 0,10	14,29 ± 1,01	17,39 ± 0,99
Celková mortalita (%)	2,50 ^a	22,50 ^b	25,00 ^b	42,50 ^c

Poznámka: M₅, M₄₅ = průměrná hmotnost raků vybrané skupiny 5. a 45. den expozice; SGR = specifická rychlost růstu vybrané skupiny po 40 dnech expozice; I = inhibice specifické rychlosti růstu vybrané skupiny po 40 dnech expozice; X = průměr; SD = směrodatná odchylka. Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami (P < 0,05).

4.2. Růstové parametry

Tělesná hmotnost raných vývojových stádií raka mramorovaného v experimentálních skupinách (E1, E2 a E3) a v kontrole v průběhu testu je znázorněna v grafu č. 1. V testované skupině E3 (koncentrace 110 µg/l) došlo od VI. vývojového stupně ke statisticky významnému ($P < 0,01$) snížení růstu ve srovnání s kontrolou. V exponované skupině E2 (koncentrace 11 µg/l) došlo ke statisticky významnému snížení růstu ($P < 0,01$) od VIII. vývojového stupně. U raků vystavených koncentraci látky 1,1 µg/l (skupina E1) došlo ke statisticky významnému snížení růstu ($P < 0,05$) až od IX. vývojového stupně.

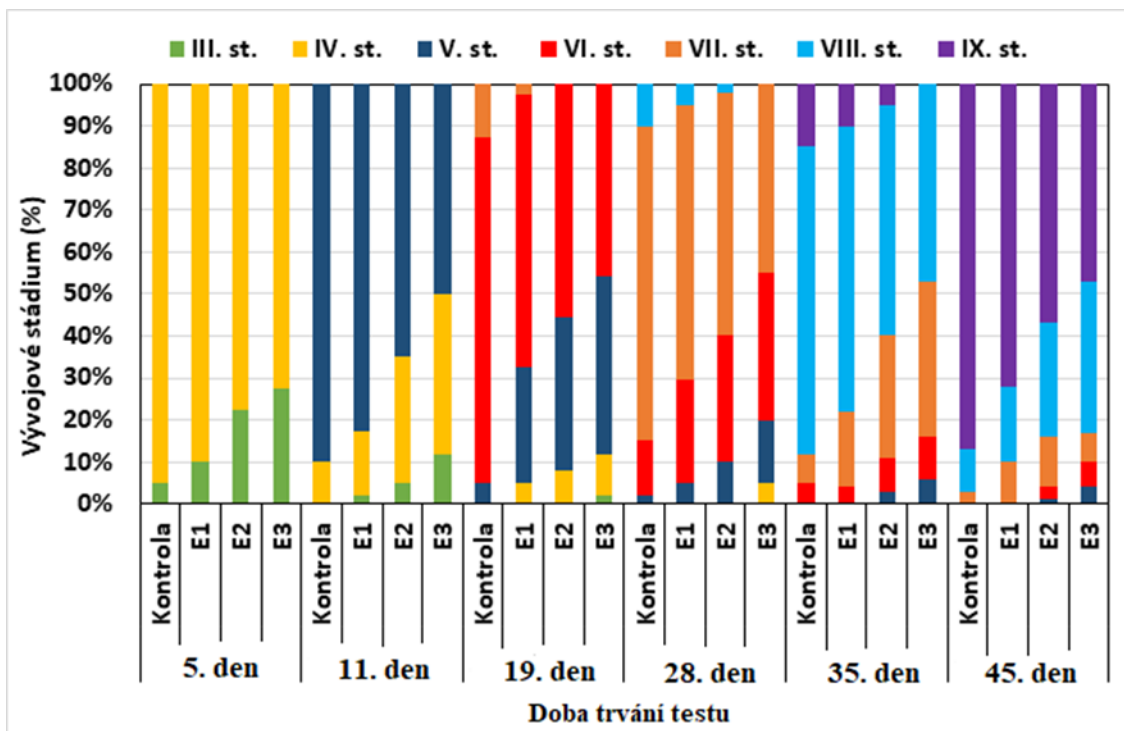
Specifická rychlost růstu (SGR) a inhibice růstu (I) v jednotlivých experimentálních skupinách je uvedena v tabulce č. 1. Inhibice růstu u raků v experimentálních skupinách vystavených s-metolachloru E1, E2 a E3 byla 9,94, 14,29 a 17,39% respektive v porovnání s kontrolní skupinou raků.



Graf č. 1: Porovnání tělesné hmotnosti v závislosti na dosažených vývojových stádiích u raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) vystaveného 45denní expozici s-metolachloru (E1 – 1,1 µg/l, E2 – 11 µg/l, E3 – 110 µg/l).

4.3. Ontogenetický vývoj

Na konci experimentu dosáhla většina raků v kontrolní skupině a experimentální skupině E1 a E2 9. stupně ontogenetického vývoje. Naproti tomu u raků vystavených s-metolachloru v koncentraci 110 $\mu\text{g/l}$ (E3) došlo ke zpoždění ontogenetického vývoje, pouze 46 % raků v této skupině dosáhlo 9. stupně ontogenetického vývoje (graf č. 2).



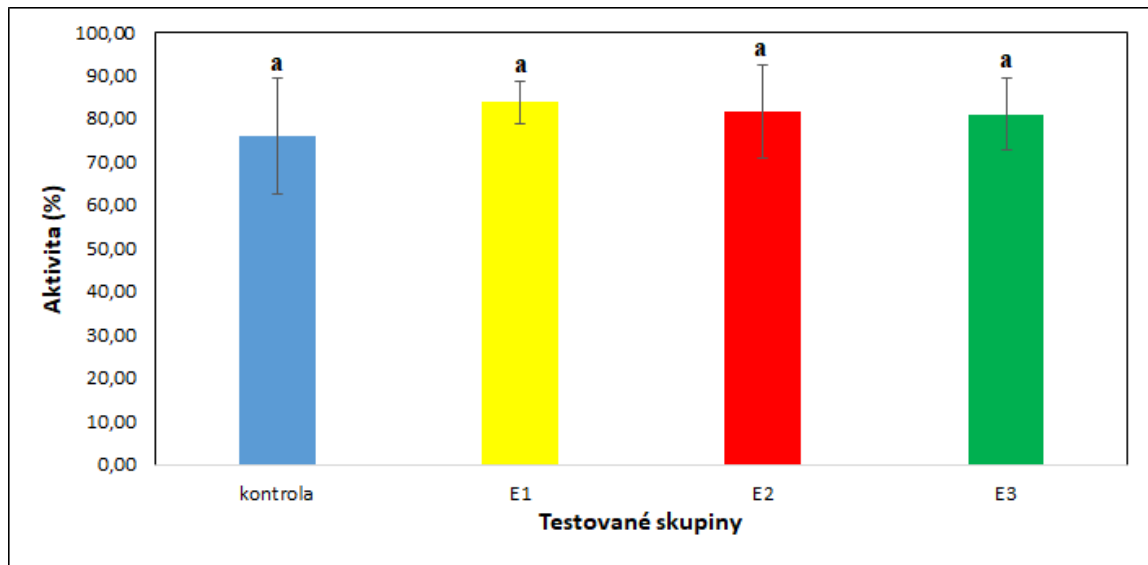
Graf č. 2: Vliv s-metolachloru (E1 – 1,1 $\mu\text{g/l}$, E2 – 11 $\mu\text{g/l}$, E3 – 110 $\mu\text{g/l}$) na raný ontogenetický vývoj raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginialis*).

4.4. Makroskopické morfologické anomálie

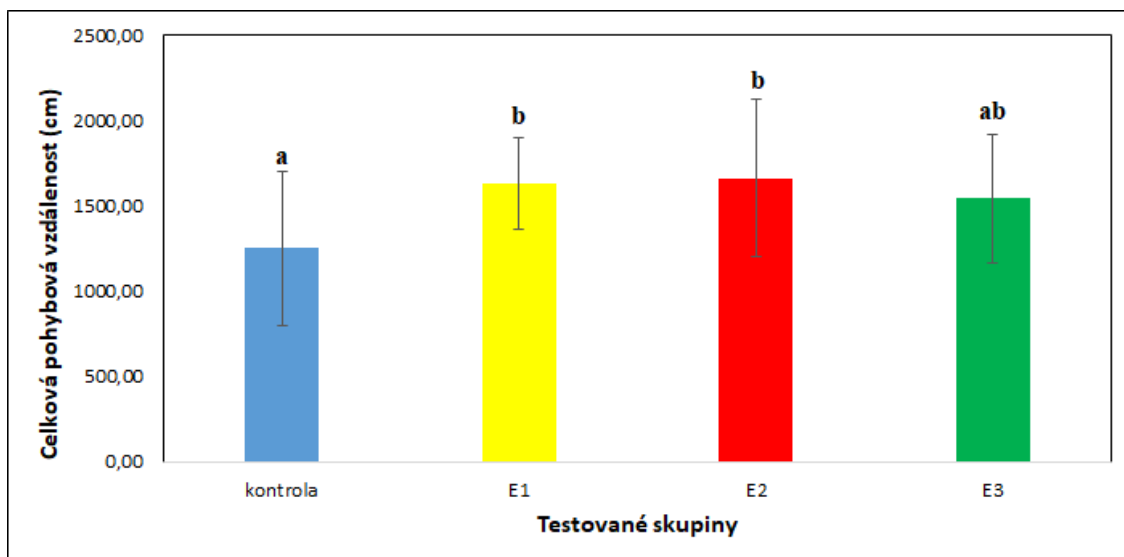
Během testu nebyly napříč skupinami pozorovány žádné makroskopicky pozorovatelné morfologické anomálie.

4.5. Chování raků

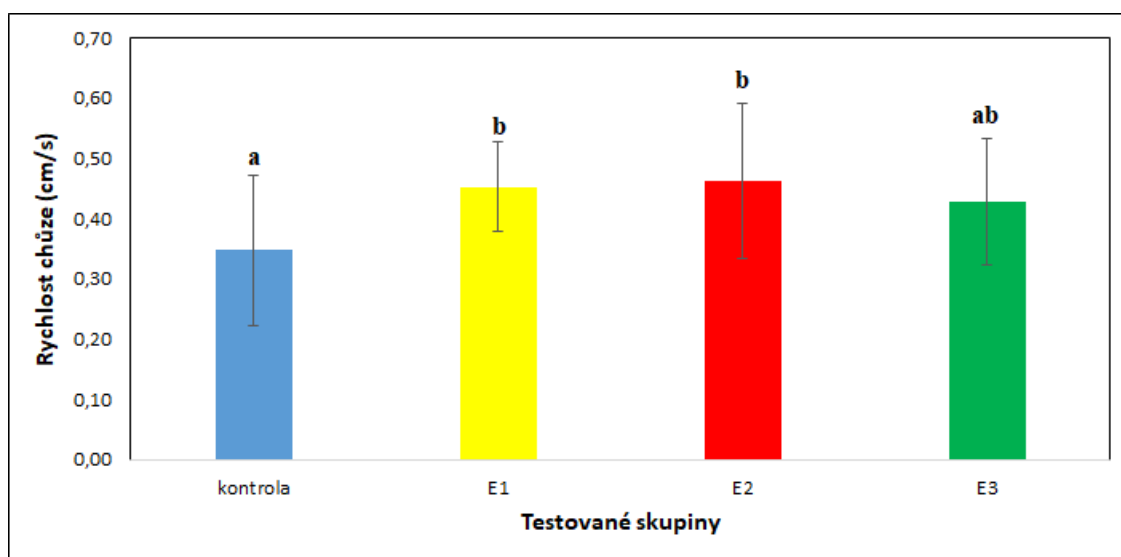
V průběhu experimentu byl sledován příjem krmiva a pohybová aktivita raných vývojových stádií raka mramorovaného v jednotlivých experimentálních skupinách ve srovnání s kontrolou. Po ukončení testu nevykazovali raci v exponovaných skupinách (E1, E2, E3) žádné signifikantně významné změny ($P = 0,055$) v aktivitě ve srovnání s kontrolou (graf č. 3). Na druhou stranu, ale došlo ke změnám v celkové pohybové vzdálenosti (graf č. 4) a rychlosti chůze (graf č. 5). Raci, kteří byli vystaveni s-metolachloru v koncentraci odpovídající reálné koncentraci v prostředí (skupina E1 – 1,1 µg/l) signifikantně významně ($P < 0,05$) zvýšili svou celkovou pohybovou vzdálenost a rychlost chůze v porovnání s kontrolní skupinou. Také u raků v exponované skupině E2 došlo k signifikantně významnému ($P < 0,01$) nárůstu těchto parametrů v porovnání s kontrolou. Experimentální skupina E3 neprokázala žádné statisticky významné změny ani v jednom ze sledovaných parametrů chování ve srovnání s kontrolou ($P = 0,055$ a $0,055$), ale trend účinků byl velice podobný jako v exponované skupině E1 a E2.



Graf č. 3: Aktivita (%) raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) po 45 denní expozici s-metolachloru (E1 – 1,1 µg/l, E2 – 11 µg/l, E3 – 110 µg/l). Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).



Graf č. 4: Celkové pohybové vzdálenosti (cm) raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) po 45denní expozici s-metolachloru (E1 – 1,1 µg/l, E2 – 11 µg/l, E3 – 110 µg/l). Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).

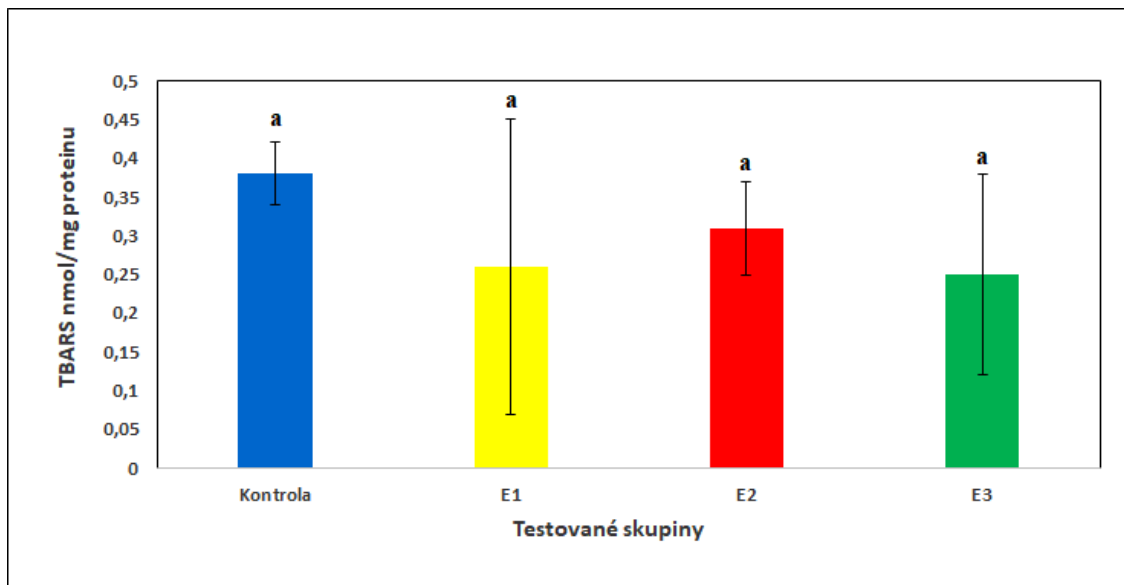


Graf č. 5: Změny v rychlosti chůze (cm/s) raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) po 45denní expozici s-metolachloru (E1 – 1,1 µg/l, E2 – 11 µg/l, E3 – 110 µg/l). Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).

4.6. Biomarker oxidativního stresu

4.6.1. Lipidní peroxidace

Účinky chronické expozice s-metolachloru na hladinu TBARS v homogenátu raných vývojových stádií raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 6. U žádné z testovaných skupin raků nedošlo k statisticky významnému rozdílu ($P < 0,05$) v hladině TBARS ve srovnání s kontrolou.

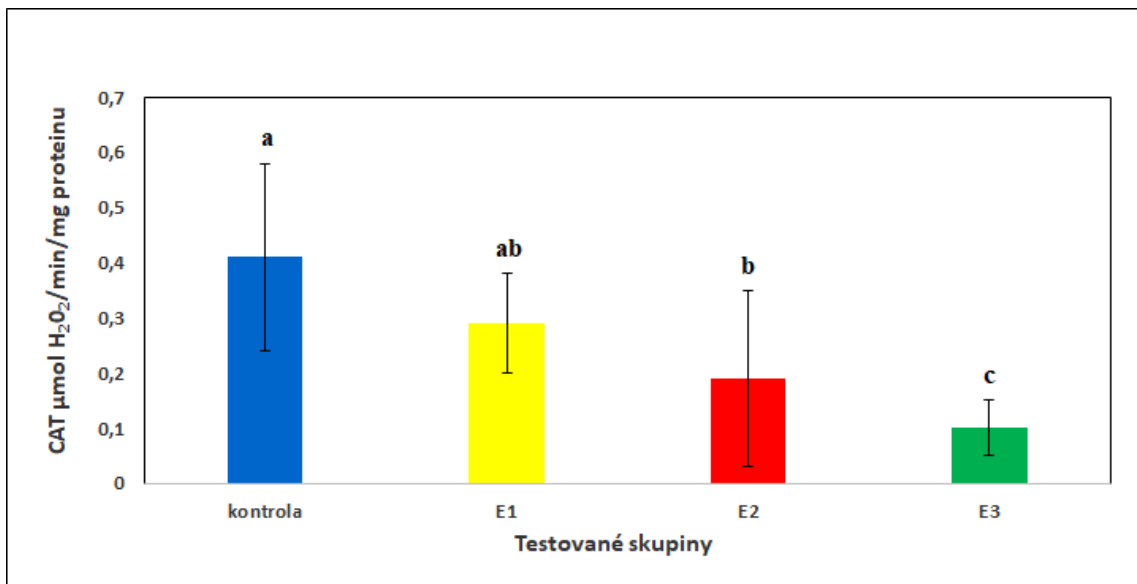


Graf č. 6: Vliv s-metolachloru (E1 – 1,1 $\mu\text{g/l}$, E2 – 11 $\mu\text{g/l}$, E3 – 110 $\mu\text{g/l}$) na hladinu TBARS v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginialis*) po 45denní expozici. Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$). Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=20$.

4.7. Antioxidační biomarkery

4.7.1. Kataláza (CAT)

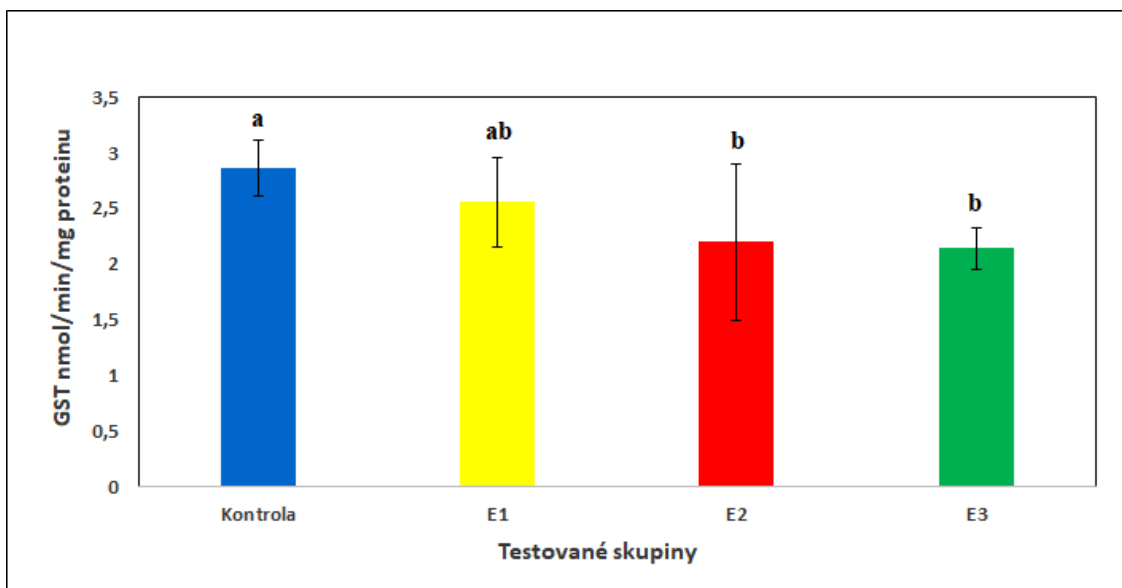
Vliv expozice s-metolachloru na aktivitu CAT v celotělním homogenátu raka mramorovaného je uveden v grafu č. 7. U raků v experimentální skupině E1 (1,1 µg/l) nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl v aktivitě katalázy ve srovnání s kontrolou. Statisticky významné ($P < 0,01$) snížení enzymatické aktivity katalázy bylo zjištěno u experimentálních skupin E2 (11 µg/l) a E3 (110 µg/l) v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf č. 7: Vliv s-metolachloru (E1 – 1,1 µg/l, E2 – 11 µg/l, E3 – 110 µg/l) na aktivitu katalázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) po 45denní expozici. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, N=20. Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$).

4.7.2. Glutathion S-transferáza (GST)

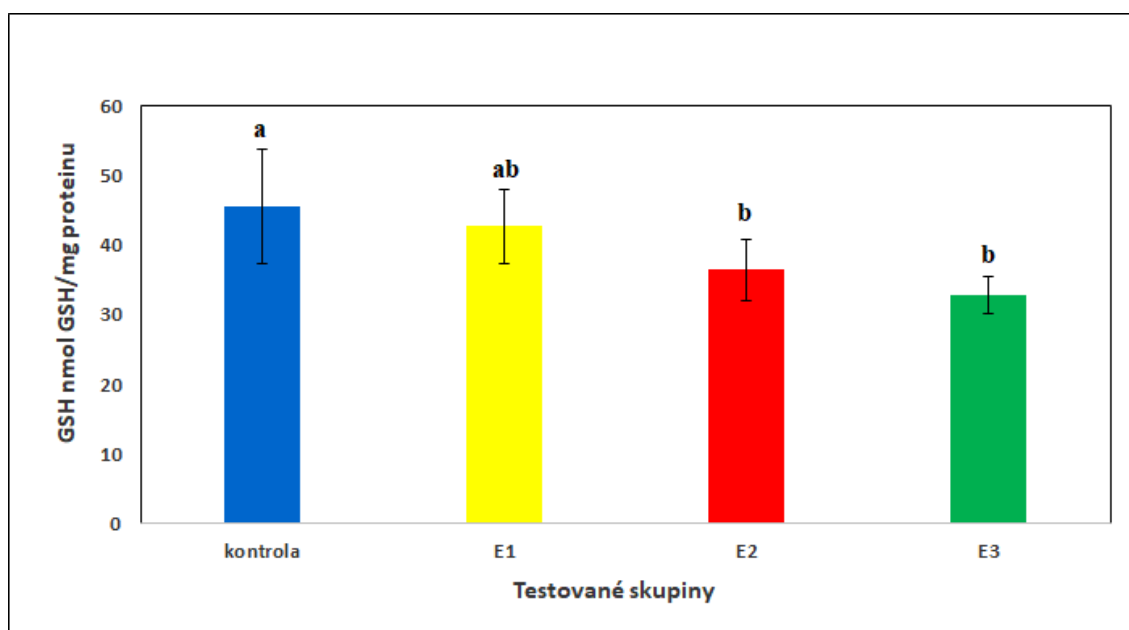
Vliv expozice s-metolachloru na hladinu GST v celotělním homogenátu raka mramorovaného je uveden v grafu č. 8. U experimentální skupiny E1 (1,1 µg/l) nebyla pozorována žádná statisticky významná změna hladiny GST v porovnání s kontrolní skupinou. Ale v experimentálních skupinách E2 (11 µg/l) a E3 (110 µg/l) došlo ke statisticky významnému ($P < 0,05$) snížení hladiny GST v porovnání s kontrolní skupinou.



Graf č. 8: Vliv s-metolachloru (E1 – 1,1 µg/l, E2 – 11 µg/l, E3 – 110 µg/l) na aktivitu glutathion S-transferázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) po 45denní expozici. Hodnoty v grafu uvádějí průměr ± SD, N=20. Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,05$).

4.7.3. Redukovaný glutathion (GSH)

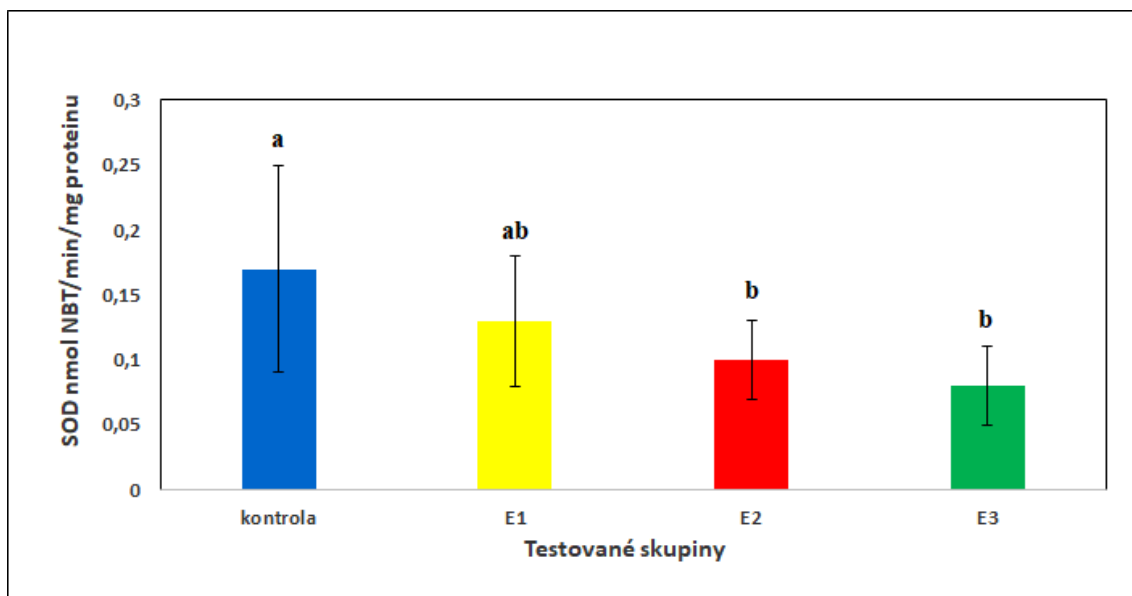
Vliv expozice s-metolachloru na hladinu GSH v celotělním homogenátu raka mramorovaného je uveden v grafu č. 9. Expozice s-metolachloru v environmentální koncentraci 1,1 $\mu\text{g/l}$ (E1) nezpůsobila statisticky významnou změnu hladiny GSH v celotělním homogenátu raků v porovnání s kontrolní skupinou. Naproti tomu u skupin E2 (11 $\mu\text{g/l}$) a E3 (110 $\mu\text{g/l}$) bylo zjištěno statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hladiny redukovaného glutathionu ve srovnání s kontrolou.



Graf č. 9: Vliv s-metolachloru (E1 – 1,1 $\mu\text{g/l}$, E2 – 11 $\mu\text{g/l}$, E3 – 110 $\mu\text{g/l}$) na hladinu redukovaného glutathionu v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) po 45denní expozici. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, N=20. Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$).

4.7.4. Superoxid dismutáza (SOD)

U raků mramorovaných vystavených testované látce s-metolachlor v koncentraci 11 $\mu\text{g/l}$ (E2) a 110 $\mu\text{g/l}$ (E3) po dobu 45 dnů bylo zjištěno statisticky významné ($P < 0,01$) snížení aktivity superoxid dismutázy ve srovnání s kontrolou. U raků mramorovaných exponovaných koncentraci 0,11 $\mu\text{g/l}$ s-metolachloru (E1) nedošlo k žádné statisticky významné změně v aktivitě SOD oproti kontrole. Vliv s-metolachloru na aktivitu SOD je uveden v grafu č. 10.



Graf č. 10: Vliv s-metolachloru (E1 – 1,1 $\mu\text{g/l}$, E2 – 11 $\mu\text{g/l}$, E3 – 110 $\mu\text{g/l}$) na aktivitu superoxid dismutázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginialis*) po 45denní expozici. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm SD, $N=20$. Indexy a, b, charakterizují shodu nebo rozdílnost hodnot mezi skupinami ($P < 0,01$).

5. DISKUSE

Cílem této práce bylo posouzení vlivu herbicidu s-metolachloru na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*). Tato studie je jedním z prvních příspěvků hodnotících vliv s-metolachloru u sladkovodních raků, zejména v raných stádiích jejich života. Pro posouzení vlivu herbicidu s-metolachloru byl v této studii použit embryolarvální test toxicity.

Pro pokus byl vybrán jako testovací organismus rak mramorovaný. Raci, jakožto zástupci bezobratlých, patří mezi tzv. klíčové druhy hrající významnou roli ve vodním ekosystému. Se svojí velikostí jsou dobře pozorovatelní a snadno se odlišují od jiných živočichů. Z hlediska potravy je řadíme mezi bentické makrofágy se širokým jídelníčkem (Kozák a kol., 2003). Výhodou použití raka mramorovaného v testech toxicity je jeho způsob rozmnožování, kdy pomocí tzv. apomiktické partenogeneze jsou všichni nově narození jedinci z genetického hlediska identičtí. Společně s tím splňují také kritéria principu 3R a patří mezi indikátory kvality životního prostředí (Kozák a kol., 2003; Gutekunst a kol., 2018).

Raná vývojová stádia raka mramorovaného byla vystavena dlouhodobému působení s-metolachloru v subletálních koncentracích a koncentraci odpovídající reálnému výskytu této látky v přírodě. Takové znečištění vody nezpůsobuje přímo úmrtnost, ale má potenciál vyvolat negativní fyziologické změny ve vodních organismech. I tak byly v této studii zjištěny zřetelné rozdíly v mortalitě. Úroveň kumulativní mortality v jednotlivých skupinách vystavených působení s-metolachloru odpovídala koncentraci látky v každé konkrétní skupině (tabulka č. 1).

S-metolachlor patří k pesticidům působící primárně na rostliny (herbicid). Pro ryby je tato látka toxická, akutní toxicita 96hLC50 pro slunečnici velkoploutvou (*Lepomis macrochirus*) je 3,2 mg/l a pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) 11,9 mg/l (PED, 2000). Mortalitu vodních živočichů způsobuje s-metolachlor ve vyšších koncentracích, v řádu jednotek až desítek miligramů na litr (PED, 2000). Oproti tomu v našich povrchových vodách dosahuje tento herbicid maximálních koncentrací v řádech jednotek mikrogramů na litr (ČHMÚ, 2018a). V experimentu se ale ukázalo, že i tyto nízké koncentrace mohou být letální pro raky. Ve skupině E1 s koncentrací testované látky odpovídající koncentraci vyskytující se v českých řekách (1,1 µg/l) byla zaznamenána 22,5 % úmrtnost.

Raci, kteří byli vystaveni působení s-metolachloru během experimentu, vykazovali ve všech testovaných skupinách nižší intenzitu růstu ve srovnání s kontrolou. Tato inhibice růstu představovala 9,94; 14,29 a 17,39 % ve skupinách E1, E2 a E3 (tabulka č. 1). Snížení růstu lze vysvětlit vyčerpáním energetických rezerv v jedné nebo ve více tkáních. Toto snížení poté následné může zpomalit reprodukci a zvýšit náchylnost raných vývojových fází raků k predátorství a nemocem. Růst je proto často označován za citlivější parametr než mortalita (Bengtsson, 1974). Jak ale doplňuje Woltering (1984), rozdíl v citlivosti na xenobiotika je pro každý druh specifický. V dalších studiích bylo zjištěno snížení růstu u raků mramorovaných po expozici herbicidů a jejich metabolitů jako jsou prometryn (Velíšek a kol., 2014b), terbuthylazin-2-hydroxy (Koutník a kol., 2017) nebo atrazin-2-hydroxy (Velíšek a kol., 2017).

Opoždění ve vývoji vodních organismů je běžný jev při vystavení testovaných jedinců různým druhům herbicidů v embryolarválních testech toxicity (Velíšek a kol., 2014b, 2017, 2018; Koutník a kol., 2017). Údaje z literatury uvádějí časný ontogenetický vývoj jako důležitý parametr při hodnocení vlivu pesticidů na necílové vodní organismy. V této práci nebyl prokázán negativní vliv s-metolachloru v koncentraci 1,1 µg/l, která odpovídá reálně koncentraci v českých tocích na raný ontogenetický vývoj raků mramorovaných. Naproti tomu ve vyšších koncentracích u skupin E2 (konc. 11 µg/l) a E3 (konc. 110 µg/l) s-metolachlor způsobil opoždění v ontogenetickém vývoji u testovaných jedinců (graf č. 5).

Raci se silně spoléhají na získávání prostorových sensorických informací pro vyhýbání se nebezpečí a rozpoznávání jiných jedinců (Hazlett, 1990; Keller a Moore, 1999; Giri a Dunham, 2000; Belanger a Moore, 2006), vyhledávání potravy (Moore a kol., 1991), reagování na popluchy (Wolf a Moore, 2002) a určení společenského postavení (Zulandt Schneider a kol., 2001). Předešlé studie Wolf a Moore (2002), Cook a Moore (2008) nebo Browne a Moore (2014) prokázaly vliv metolachloru (v koncentracích 25 až 80 µg/l) na chemoreceptci potravinových pachů, poplachových pachů a společenských pachů dospělých raků. Ztráta schopnosti detekovat tyto pachy a reagovat na ně by mohla mít negativní vliv na životaschopnost raků. V našem pokusu byla pozorována stimulace chemoreceptorů způsobená nižšími koncentracemi (E1 a E2) s-metolachloru. Výsledkem toho bylo zvýšení celkové pohybové vzdálenosti (graf č. 2) a rychlosti pohybu (graf č. 3) u exponovaných raků v těchto skupinách. Účinky s-metolachloru pravděpodobně narušují sensorické schopnosti raků a způsobují u

exponovaných jedinců zmatenost a dezorientovanost. Kromě toho může s-metolachlor způsobovat narušení společenských hierarchií a stabilitu trofických úrovní, které raky ovlivňují (Lodge a kol., 1994; Usio, 2000).

U všech živých organismů můžeme pozorovat komplikovaný víceúrovňový antioxidační systém, jehož hlavním cílem je eliminovat nebo alespoň minimalizovat negativní účinky reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou v buňkách přirozeně obsaženy. Díky tomuto systému jsou buňky udržovány v rovnovážném stavu a nedochází k intracelulárnímu poškození (Lushchak, 2014). Jak ale uvádí Liberato a kol. (2003), rovnováha tohoto systému může být snadno narušena působením xenobiotik, jako jsou například pesticidy. V této práci bylo zjištěno u raků vystavených vyšším koncentracím s-metolachloru ve skupině E2 (11 µg/l) a E3 (110 µg/l) významné snížení antioxidačních biomarkerů CAT (graf č. 7), GST (graf č. 8), GSH (graf č. 9) a SOD (graf č. 10). Díky těmto změnám byly buňky udržovány v rovnovážném stavu před tvorbou ROS, protože nebylo pozorováno oxidační poškození (lipidní peroxidace). Tento výsledek není neobvyklý, i u jiných studií na sladkovodních organismech z řádu Decapoda vystavených působení pesticidů byly také pozorovány změny antioxidačních biomarkerů (CAT, GST, SOD apod.), a současně nebyla pozorována žádná statisticky významná změna u lipidní peroxidace, která byla také měřena pomocí metody TBARS testu (Griboff a kol., 2014; Stará a kol., 2014; Velíšek a kol., 2017).

Enzymy SOD a CAT patří spolu s nejméně jedním biomarkerem souvisejícím s GSH k nejdůležitějším biomarkerům a jsou považovány za vhodné biomarkery při hodnocení toxických účinků znečišťujících látek, které stojí za tvorbou ROS v organismech (Lushchak, 2014). Enzym SOD pomáhá dismutovat přebytek superoxidového radikálu O_2^- na peroxid vodíku (H_2O_2) a CAT je zodpovědná za detoxikaci H_2O_2 na vodu a kyslík (Nwani a kol., 2010). Jak doplňuje Ighodaro a Akinloye (2017), tyto dva biomarkery mají funkci prvních obranných antioxidantů. Pro správné fyziologické fungování buněk je zásadní rovnováha mezi ROS a detoxikačními antioxidanty. Pokud je tato rovnováha narušena, dochází k oxidačnímu poškození, které jsme mohli pozorovat i v této práci.

Maximální reálná koncentrace herbicidu s-metolachloru, naměřená v českých řekách, byla 1,1 µg/l (ČHMÚ, 2018b). Tato koncentrace odpovídala koncentraci s-metolachloru v testované skupině E1. I u této nejnižší koncentrace došlo u několika sledovaných parametrů k statisticky významným negativním změnám. V závislosti na výsledcích je

možné předpokládat potencionální riziko při výskytu této látky v přírodě jak pro raná vývojová stádia raků, tak i pro jiné necílové vodní organismy.

6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo posouzení vlivu herbicidu s-metolachloru na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*). Vliv s-metolachloru byl hodnocen na základě vybraných parametrů. Konkrétně šlo o vyhodnocení chování raků na základě aktivity, celkové pohybové vzdálenosti a změny v rychlosti chůze. Mezi další parametry patřilo sledování kumulativní mortality, měření růstových parametrů, ontogenetický vývoj a pozorování makroskopických morfologických anomálií v průběhu testu. V neposlední řadě šlo o sledování biomarkeru oxidačního stresu a antioxidačních biomarkerů. K posouzení vlivu tohoto herbicidu byl použit embryolarvální test toxicity na racích. Hodnocení probíhalo ve sledování třech koncentrací s-metolachloru (1,1 µg/l, 11 µg/l a 110 µg/l) společně s kontrolní skupinou po dobu 45 dnů v laboratoři za přesně definovaných podmínek. V každé skupině bylo testováno 40 jedinců.

Výsledky studie ukázaly, že s-metolachlor u vyšších expozičních (11 µg/l a 110 µg/l; sk. E2 a E3) způsobuje negativní změny ve všech sledovaných parametrech. U skupiny E1 (1,1 µg/l), jejíž koncentrace odpovídá maximální reálné koncentraci s-metolachloru zjištěné v českých vodách, byly zjištěny statisticky významné změny v chování (celkové pohybové vzdálenosti a rychlosti chůze), celkové mortalitě a rychlosti růstu. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že i maximální koncentrace s-metolachloru vyskytující se v českých vodách může mít negativní vliv na raná vývojová stádia raků jakožto modelový organismus.

Výsledky této studie, především v závislosti na výsledcích parametrů růstu, ontogenetického vývoje a chování, by mohly poskytnout užitečné informace pro vyhodnocení fyziologických účinků xenobiotik na raná vývojová stádia raků mramorovaných, kteří zde představují modelový organismus i pro jiné necílové vodní organismy.

7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Abrantes, N., Pereira, R., Gonçalves, F., 2010. Occurrence of pesticides in water, sediments, and fish tissues in a lake surrounded by agricultural lands: Concerning risks to humans and ecological receptors. *Water, Air, Soil Pollut.* 212, 77-88.
- Aebi, H., 1984. Catalase *In vitro*. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Alam, Z.I., Jenner, A., Daniel, S.E., Lees, A.J., Cairns, N., Marsden, C.D., Halliwell, B., 1997. Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J. Neurochem.* 69, 1196-1203.
- Amira, A., Adly, M., 2010. Oxidative stress and disease: An updated review. *Res. J. Immunol.* 3, 129-145.
- Arregui, M., Sanchez, D., Althaus, R., Scotta, R., Bertolaccini, I., 2010. Assessing the risk of pesticide environmental impact in several Argentinian cropping systems with a fuzzy expert indicator. *Pest. Manag. Sci.* 66, 736-740.
- Belanger, R.M., Moore, P.A., 2006. The use of the major chelae by reproductive male crayfish (*Orconectes rusticus*) for discrimination of female odours. *Behaviour* 143, 713-731.
- Belanger, R.M., Peters, T.J., Sabhapathy, G.S., Khan, S., Katta, J., Abraham, N.K., 2015. Atrazine exposure affects the ability of crayfish (*Orconectes rusticus*) to localize a food odor source. *Archiv. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 636-645.
- Bengtsson, B.E., 1974. Effect of zinc on growth of the minnow *Phoxinus phoxinus*. *Oikos* 25, 370-373.
- Böger, P., Matthes, B., Schmalfuß, J., 2000. Towards the primary target of chloroacetamides—new findings pave the way. *Pest Manag. Sci.* 56, 497-508.
- Browne, A.M., Moore, P.A., 2014. The effects of sublethal levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide (2,4-D) on feeding behaviors of the crayfish *O. rusticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 234-244.
- Butler, P.A., Andren, L., Bonde, G.J., Jernelov, A., Reisch, D.J., 1970. Monitoring organisms. In M. Ruivo (Ed.), *FAO Technical Conference on Marine Pollution*. London, Fishing News, p. 101-112.
- Carson, R., 1962. *Silent Spring*. Houghton Mifflin Co., Boston, 378 pp.

- Ceyhun, S.B., Şentürk, M., Erdoğan, O., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2010. In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pest. Biochem. Physiol.* 97, 177-181.
- Cook, M.E., Moore, P.A., 2008. The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Archiv. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 94-102.
- Cremllyn, R.J.W., 1978. *Pesticides: Preparation and mode of action*. Wiley, Chichester, 240 pp.
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2018a. On-line Water Quality Database. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/>, (navštívené online 4. 9. 2018)
- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav), 2018b. Pasport látky s-metolachlor. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/pasporty/>, (navštívené online 18. 7. 2018).
- ČIŽP (Česká inspekce životního prostředí), 2018. Za únik pesticidu do řeky Doubravky padla první pokuta 500 tisíc korun. Dostupné z: <http://www.cizp.cz/Za-unik-pesticidu-do-reky-Doubravky-padla-prvni-pokuta-500-tisic-korun.html>, (navštívené online 25.7.2018).
- de Oliveira Arias, J.L., Schneider, A., Batista-Andrade, J.A., Vieira, A.A., Gehrke, V.R., Camargo, E.R., Caldas, S.S., Primel, E.G., 2017. Evaluation of dilute-and-shoot and solid-phase extraction methods for the determination of S-metolachlor and metolachlor-OA in runoff water samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* 9, 5777-5783.
- De Grave, S., Pentcheff, N.D., Ahyong, S.T., Chan, T.Y., Crandall, K.A., Dworschak, P.C., Felder, D.L., Feldmann, R.M., Franssen, Ch.H.J.M., Goulding, L.Y.D., Lemaitre, R., Low, M.E.Y., Martin, J.W., Ng, P.K.L., Schweitzer, C.E., Tan, S.H., Tshudy, D., Wetzer, R., 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bull. Zool.* 21, 1-109.
- Deng, L., Senseman, S.A., Gentry, T.J., Zuberer, D.A., Weiss, T.L., Devarenne, T.P., Camargo, E.R., 2012. Effect of selected herbicides on growth and hydrocarbon content of *Botryococcus braunii* (Race B). *Ind. Crop. Prod.* 39, 154-161.
- Dobšíková, R., Blahová, J., Modrá, H., Škorič, M., Svobodová, Z., 2011. The effect of acute exposure to herbicide Gardoprim Plus Gold 500 SC on haematological and biochemical indicators and histopathological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Vet. Brno* 80, 359-363.
- Dorn, N.J., Volin, J.C., 2009. Resistance of crayfish (*Procambarus* spp.) populations to wetland drying depends on species and substrate. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 28, 766-777.

- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Ewing, J.F., Janero, D.R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal. Biochem.* 232, 243-248.
- Flecknell, P., 2002. Replacement, reduction and refinement. *Altex* 19, 73-78.
- Foley, M., Sigler, V., Gruden, C., 2008. A multiphasic characterization of the impact of the herbicide acetochlor on freshwater bacterial communities. *ISME J.* 2, 56-66.
- Fusek, J., Měrka, V., 2003. Nebezpečné herbicidy. *V.Z.L.* 6, 262-272.
- Giri, T., Dunham, D.W., 2000. Female crayfish (*Procambarus clarkii* (Girard, 1852)) use both antennular rami in the localization of male odour. *Crustaceana* 73, 447-458
- Griboff, J., Morales, D., Bertrand, L., Bonansea, R.I., Monferran, M.V., Asis, R., Wunderlin, D.A., Ame, M.V., 2014. Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes argentinus*: The protective effect of vitamin E. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 108, 1-8.
- Gutekunst, J., Andriantsoa, R., Falckenhayn, C., Hanna, K., Stein, W., Rasamy, J., Lyko, F., 2018. Clonal genome evolution and rapid invasive spread of the marbled crayfish. *Nat. Ecol. Evolut.* 2, 567-573.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Hajšlová, J., Kocourek, V., 2004. Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 35 s.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, 888 pp.
- Halliwell, B., 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Transact.* 35, 1147-1150.
- Hayes, T.B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A., 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 5476-5480.
- Hazlett, B.A., 1990. Source and nature of disturbance-chemical system in crayfish. *J. Chem. Ecol.* 16, 2263-2275.
- Hobbs, H.H., Jr., 1989. An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 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. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, pp. 49-130.
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A., 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex. J. Med.* 54, 287-293.
- Keller, T.A., Moore, P.A., 1999. Effects of ontogeny and odors on behavior: the influence of crayfish size and fish odors on crayfish movement. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 33, 35-50.
- Knejzlík, Z., Ruml, T., 1999. Nepříznivý vliv xenobiotik na lidský organismus a metody jeho testování. Ústav chemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 6. *Chem. List.* 93, 607-615.
- Kočí, V., Mocová, K., 2009. Ekotoxikologie pro chemiky. VŠCHT, Praha, 199 s.
- Koutník, D., Stará, A., Zusková, E., Kouba, A., Velíšek, J., 2017. The chronic effects of terbuthylazine-2-hydroxy on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Pest. Biochem. Physiol.* 136, 29-33.
- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrušek, 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.
- Liberato, C., Di Cristo, C., De Luise, G., Di Cosmo, A., Paolucci, M., 2003. Preliminary evidence of an oxidative stress system in freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes Italicus*. *Bull. Fr. Pêche. Piscic.* 370/371, 151-156.
- Lodge, D.M., Kershner, M.W., Aloi, J.E., 1994. Effects of an omnivorous crayfish (*Orconectes rusticus*) on a freshwater littoral food web. *Ecology* 75, 1265-1281.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lushchak, V.I., Bgnyukova, T.V., Husak, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., Storey, K.B., 2005. Hapertoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in gill tissues. *Int. J. Bioch. Cell Biol.* 37, 1670-1680.
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164-175.

- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic Marmorkrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform off spring. *Naturwissenschaften* 94, 843-846.
- Martin, P., Dorn, N. J., Kawai, T., van der Heiden, C., Scholtz, G., 2010. The enigmatic Marmorkrebs (marbled crayfish) is the parthenogenetic form of *Procambarus fallax* (Hagen, 1870). *Contribut. Zool.* 79, 107-118.
- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budzinski, H., Cachot, J., Morin, B., 2014. Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquat. Toxicol.* 147, 48-56.
- Mantzou, N., Hela, D., Karakitsou, A., Antonopoulou, M., Konstantinou, I., 2016. Dissipation and runoff transport of metazachlor herbicide in rapeseed cultivated and uncultivated plots in field conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 20517-20527.
- McConkey, D.J., Orrenius, S., 1997. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 357-366.
- McNaught, A.D., Wilkinson, A., 1997. *Compendium of chemical terminology*. Blackwell Science Inc., Oxford, UK, 464 pp.
- Moore, P.A., Scholz, N., Atema, J., 1991. Chemical orientation of lobsters, *Homarus americanus*, in turbulent odor plumes. *J. Chem. Ecol.* 17, 1293-1307.
- MZe (Ministerstvo zemědělství), 2018. Registr přípravků na ochranu rostlin. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/>, (navštívené online 4. 9. 2018).
- Neves, M., Castro, B.B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J.C., Coutinho, J.A.P., Gonçalves, A.M.M., 2015. Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecolog. Indic.* 53, 220-230.
- Nwani, C.D., Lakra, W.S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Srivastava, S.K., 2010. Toxicity of the herbicide atrazine: Effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Int. J. Environ. Res. Pub. Health* 7, 3298-3312.
- O'Connell, P.J., Harms, C.T., Allen, J.R., 1998. Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Protect.* 17, 207-212.
- Öztürk-Ürek, R., Bozkaya, L.A., Tarhan, L., 2001. The effects of some antioxidant vitamin-and trace element-supplemented diets on activities of SOD, CAT, GSH-Px and LPO levels in chicken tissues. *Cell Biochem. Funct.* 19, 125-132.

- PED, (Pesticide Ecotoxicity Database) 2000. Office of pesticide programs, environmental fat and effects division. U.S. Environmental Protection Agency, Washington.
- Pláteník, J., 2009. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Int. Med. Prax.* 11, 30-33.
- PubChem Project, 2018. S-metolachlor, safety and hazards. Dostupné na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11140605#section=Safety-and-Hazards>, (navštíveno online 18.7.2018).
- Rainbow, P.S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 183-192.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. The principles of humane experimental technique. Methuen, London, UK, 238 pp.
- Sarma, S.S.S., Ramírez-Pérez, T., Nandini, S., Peñalosa-Castro, I., 2001. Combined effects of food concentration and the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on the population dynamics of *Brachionus patulus* (Rotifera). *Ecotoxicol.* 10, 91-99.
- Seitz, R., Vilpoux, K., Hopp, U., Harzsch, S., Maier, G., 2005. Ontogeny of the Marmorkrebs (marbled crayfish): A parthenogenetic crayfish with unknown origin and phylogenetic position. *J. Exp. Zool.* 303, 393-405.
- Scholtz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Steuerwald, F., Vogt, G., 2003. Parthenogenesis in an outsider crayfish. *Nature* 421, 806.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.: Translat. Integrat.* 82, 291-295.
- Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Biomed Res. Int.* 2014, ID 680131.
- Svobodová, Z., Gelnerová, J., Justýn, J., Krupauer, V., Máchová, J., Simanov, L., Valentová, V., Wohlgemuth, E., 1987. *Toxikologie vodních živočichů*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 231 s.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otravy ryb. *Veterinární toxikologie v klinické praxi*. Profi Press, Praha, s. 201-217.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2010a. *Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb*. Informatorium, Praha, 264 s.

- Svobodová, Z., Beklová, M., Máchová, J., Dobšíková, R., Mácová, S., Modrá, H., Velíšek, J., 2010b. Ekotoxikologie – praktická cvičení: Testy toxicity na organismech vodního prostředí. VFU Brno, Brno, 84 s.
- Taylor, C.A., Schuster, G.A., Cooper, J.E., DiStefano, R.J., Eversole, A.G., Hamr, P., Hobbs, H.H., Robison, H.W., Skelton, C.E., Thoma, R.F., 2007. A reassessment of the conservation status of crayfishes of the United States and Canada after 10+ years of increased awareness. *Fisheries* 32, 372-389.
- Usio, N., 2000. Effects of crayfish on leaf processing and invertebrate colonisation of leaves in a headwater stream: decoupling of a trophic cascade. *Oecologia* 124, 608-614.
- Velíšek, J., Svobodová Z., Bláhová J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroková, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014a. Vodní toxikologie pro rybáře. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, 600 s.
- Velíšek, J., Stará, A., Koutník, D., Zusková, E., Kouba, A., 2014b. Effect of prometryne on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Neuroendocrinol. Lett.* 35, 93-98.
- Velíšek, J., Stará, A., Zusková E., Kouba, A., 2017. Effects of three triazine metabolites and their mixture at environmentally relevant concentrations on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Chemosphere* 175, 440-445.
- Velíšek, J., Stará, A., Zusková, E., Kubec, J., Buřič, M., Kouba, A., 2018. Chronic toxicity of metolachlor OA on growth, ontogenetic development, antioxidant biomarkers and histopathology of early life stages of marbled crayfish. *Sci. Total Environ.* 643, 1456-1463.
- Vogt, G., 2002. Functional anatomy. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of freshwater crayfish*. Backwell Science Ltd., Oxford, pp. 53-151.
- Vogt, G., Tolley, L., Scholtz, G., 2004. Life stages and reproductive components of the Marmorecra, the first pathogenetic decapod crustacean. *J. Morphol.* 261, 286-311.
- Vogt, G., 2007. Exposure of the eggs to 17 α -methyl testosterone reduced hatching success and growth and elicited teratogenic effects in postembryonic life stages of crayfish. *Aquat. Toxicol.* 85, 291-296.
- Vogt, G., 2008. The marbled crayfish: A new model organism for research on development, epigenetics and evolutionary biology. *J. Zool.* 276, 1-13.

- Vogt, G., 2010. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological research: A review and perspective, with remarks on some further crustaceans. *Biogerontol.* 11, 643-669.
- Wolf, M.C., Moore, P.A., 2002. Effects of the herbicide metolachlor on the perception of chemical stimuli by *Orconectes rusticus*. *J. North Am. Benthol. Soc.* 21, 457-467.
- Woltering, D., 1984. The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: A critical review. *Aquat. Toxicol.* 5, 1-21.
- Zapletal, O., Ruprich, J., Dvořáková, D., Nepejchalová, L., Vranová, E. 2001. Speciální veterinární toxikologie., 1.vyd., Editační středisko VFU Brno, Brno, 132 s.
- Zarenkov, N.A., 1982. Členistonogie. Rakoobraznye, Čast' 1. Izd. MGU, Moskva.
- Zemolin, C.R., Avila, L.A., Cassol, G.V., Massey, J.H., Camargo, E.R., 2014. Environmental fate of S-metolachlor: A review. *Planta Daninha* 32, 655-664.
- Zulandt Schneider, R.A., Huber, R., Moore, P.A., 2001. Individual and status recognition in the crayfish, *Orconectes rusticus*: The effects of urine release on fight dynamics. *Behaviour* 138, 137-153.

8. ABSTRAKT

Vliv herbicidu s-metolachloru na raná vývojová stádia raka mramorovaného

S-metolachlor je látka patřící do skupiny herbicidů, které jsou v současné době používány k ochraně zemědělských plodin. Konkrétně je tato látka s chemickým názvem $C_{15}H_{22}ClNO_2$ řazena mezi preemergentní herbicidy používané k potlačení nežádoucích plevelných rostlin.

Cílem této práce bylo posouzení vlivu s-metolachloru na mortalitu, chování, růst, ontogenetický vývoj, hladinu oxidativního stresu a aktivitu antioxidantních enzymů raných vývojových stádií raka mramorovaného (*Procambarus fallax f. virginalis*). Vliv tohoto herbicidu byl hodnocen na základě embryolarválního testu toxicity na racích. Raná vývojová stádia raků byla vystavena třem koncentracím s-metolachloru a to 1,1 $\mu\text{g/l}$, 11 $\mu\text{g/l}$ a 110 $\mu\text{g/l}$ po dobu 45 dnů.

U všech testovaných koncentrací byla prokázána vyšší mortalita, zpoždění ontogenetického vývoje s doprovodným pomalejším růstem a změny v chování (celková pohybová vzdálenost a rychlost chůze). Navíc bylo pozorováno významné snížení koncentrace katalázy, glutathion S-transferázy, superoxid dismutázy a snížení hladiny redukovaného glutathionu ve dvou vyšších testovaných koncentracích (11 $\mu\text{g/l}$ a 110 $\mu\text{g/l}$) s-metolachloru ve srovnání s kontrolou. U žádné z testovaných skupin nebyly pozorovány statisticky významné změny v oxidačním poškození (hladině TBARS).

Na základě výsledků této studie lze doporučit raná vývojová stádia raků jako vhodné organismy pro testy toxicity a jejich využití pro biomonitoring zatížení vodního prostředí herbicidy.

Klíčová slova: herbicidy, rak mramorovaný, embryolarvální test toxicity, chování, ontogenetický vývoj, antioxidantní enzymy

9. ABSTRACT

The effect of herbicide s-metolachlor on early life stages of marbled crayfish

S-metolachlor is a substance belonging to the group of herbicides, widely used in agriculture to protect crops. This substance with the chemical composition $C_{15}H_{22}ClNO_2$ and is used as the pre-emergent herbicides to control unwanted weeds.

The aim of this work was to evaluate the influence of s-metolachlor on mortality, behavior, growth, ontogenetic development, oxidative stress level and activity of antioxidant enzymes of early developmental stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). The effect of s-metolachlor was evaluated on the basis of embryo-larval toxicity test. Early developmental stages of crayfish were exposed to three concentrations of s-metolachlor, 1.1 $\mu\text{g/l}$, 11 $\mu\text{g/l}$ and 110 $\mu\text{g/l}$ for 45 days.

All tested concentrations significant showed higher mortality, delay of ontogenetic development, lower growth and changes in behavior (total movement distance and movement speed). Moreover, significant decrease in catalase, glutathione-s-transferase, superoxide dismutase concentration, and reduced glutathione levels at the two higher test concentrations (11 $\mu\text{g/l}$ and 110 $\mu\text{g/l}$) of s-metolachlor were observed. No significant changes in oxidative damage (TBARS levels) were observed in all the tested groups.

Based on the results of this study, early developmental stages of marbled crayfish can be recommended as suitable organisms for toxicity test and their use for biomonitoring of the aquatic environment by herbicides.

Keywords: herbicides, marbled crayfish, embryo-larval toxicity test, behavior, ontogenetic development, antioxidant enzymes