

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

Subletální účinky směsí pesticidů na raky

Autor: Anna Hovorková

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

Konzultant bakalářské práce: Ing. Nikola Třešňáková

Studijní program a obor: B1601 Ekologie a ochrana prostředí, Ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník studia: Třetí

České Budějovice, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. 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

Anna Hovorková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce Ing. Alžbětě Staré Ph.D. a konzultantce Ing. Nikole Třešňákové za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Marii Šandové a Ing. Alžbětě Strouhové za výpomoc při analýzách v laboratoři Vodní toxikologie a ichthyopatologie, FROV JU Vodňany.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Anna HOVORKOVÁ**
Osobní číslo: **V19B030P**
Studijní program: **B1601 Ekologie a ochrana prostředí**
Studijní obor: **Ochrana vod**
Téma práce: **Subletální účinky směsi pesticidů na raky**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Zásady pro vypracování

Pesticidy vstupují do vodních ekosystémů z různých zdrojů, například povrchovým odtokem, erozí, deštěm, infiltrací, atmosférickou depozicí. Proto se často ve vodních ekosystémech nacházejí v různých chemických směsích než jen jako samostatné sloučeniny. Avšak většina aktuálních studií hodnotí pouze toxické účinky jednotlivých látek na necelové organismy. Přičemž směsi pesticidů mohou vést k interakcím, které mohou změnit toxicitu směsi ve srovnání s toxicitou každé samotné sloučeniny. Cílem bakalářské práce bude posoudit subchronický vliv prometrynu a metazachloru a jejich směsi na raka mramorového (*Procambarus virginalis*). Metodicky bude postupováno podle platných standardních operačních postupů, které byly zpracovány Laboratoří vodní toxikologie a ichtyopatologie na FROV JU. Tyto postupy vycházejí z norem OECD a ISO pro testy toxicity na zástupcích vodních organismů. Biochemický profil hemolymfy, antioxidační biomarkery a oxidační stres v tkáních raka mramorovaného budou prováděny dle jednotlivých metod. Získané výsledky testování rozšíří dosavadní informace o nové poznatky o toxickém vlivu jednotlivých herbicidů, prometrynu, metazachloru, a jejich směsi na necelové vodní organismy, respektive raky, a budou podkladem pro hodnocení rizik pro životní prostředí (Environmental Risk Assessment).

Rozsah pracovní zprávy: **30-50 stran**
Rozsah grafických prací: **2 grafy, 2 tabulky**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A., Rakhshaninejad, M., 2020. Combined effects of exposure to sub-lethal concentration of the insecticide chlorpyrifos and the herbicide glyphosate on the biochemical changes in the freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Ecotoxicology* 29, 1500-1515.
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Gholamhosseini, A., Heidarieh, H., Fereidouni, M.S., 2019. Acute exposure to chlorpyrifos and glyphosate induces changes in hemolymph biochemical parameters in the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 222, 145-155.
- Chang, Y., Mao, L., Zhang, L., Zhang, Y., Jiang, H., 2020. Combined toxicity of imidacloprid, acetochlor, and tebuconazole to zebrafish (*Danio rerio*): acute toxicity and hepatotoxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 10286-10295.
- Stara, A., Kouba, A., Velisek, J., 2014. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 680131.
- Vehovszky, A., Farkas, A., Csikos, V., Szekacs, A., Mortl, M., Gyori, J., 2018. Neonicotinoid insecticides are potential substrates of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in the non-target invertebrate, *Dreissena sp.* *Aquatic Toxicology* 205, 148-155.
- Velíšek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšílková, R., Šíroková, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2018. Vodní toxikologie pro rybáře. 2. upravené vydání, FROV JU, Vodňany,

658 s.


Velisek, J., Stara, A., Kubec, J., Zuskova, E., Buric, M., Kouba, A., 2020. Effects of metazachlor and its major metabolite metazachlor OA on early life stages of marbled crayfish. *Scientific Reports* 10, 875.

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

Konzultant bakalářské práce: Ing. Nikola Třešňáková

Datum zadání bakalářské práce: 8. ledna 2021

Termín odevzdání bakalářské práce: 2. května 2022


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
389 25 Vodňany


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

V Českých Budějovicích dne 25. ledna 2021

Obsah

1	ÚVOD	9
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1	Pesticidy	11
2.2	Triaziny	13
2.2.1	Prometryn.....	15
2.2.1.1	Vlastnosti.....	16
2.2.1.2	Mechanismus účinku.....	17
2.3	Chloracetamidy	17
2.3.1	Metazachlor	18
2.3.1.1	Vlastnosti.....	18
2.3.1.2	Mechanismus účinku.....	19
2.4	Biochemický profil hemolymfy	19
2.5	Oxidační stres a antioxidanty	21
2.6	Testy toxicity na vodních organismech	22
2.7	Raci	23
2.7.1	Rak mramorovaný (<i>Procambarus virginalis</i>).....	24
3	MATERIÁL A METODIKA	25
3.1	Subchronický test toxicity	25
3.1.1	Princip a podmínky testu	25
3.1.2	Experimentální organismy	26
3.1.3	Průběh testu.....	26
3.2	Odběr vzorků	28
3.3	Biochemický profil hemolymfy	29

3.4	Stanovení oxidačního stresu a antioxidačních biomarkerů.....	29
3.4.1	Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA.....	30
3.4.2	Stanovení lipidní peroxidace (LPO) pomocí TBARS testu.....	32
3.4.3	Stanovení enzymatické aktivity katalázy (CAT).....	34
3.4.4	Stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD).....	35
3.5	Statistické vyhodnocení	37
4	VÝSLEDKY	38
4.1	Biochemický profil hemolymfy	38
4.1.1	Alanin aminotransferáza	38
4.1.2	Amoniak.....	39
4.1.3	Globuliny	40
4.1.4	Minerály (Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+}).....	41
4.2	Oxidační stres a antioxidanty.....	44
5	DISKUSE	46
5.1	Biochemický profil hemolymfy	46
5.1.1	Alanin aminotransferáza	46
5.1.2	Amoniak.....	47
5.1.3	Globuliny	47
5.1.4	Chloridy (Cl^-).....	48
5.1.5	Hořčík (Mg^{2+})	48
5.1.6	Vápník (Ca^{2+}).....	49
5.2	Antioxidační biomarkery	49
5.2.1	Kataláza	50
5.2.2	Superoxid dismutáza.....	51
5.3	Biomarker oxidačního stresu	52
6	ZÁVĚR.....	55

7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	56
8	ABSTRAKT.....	68
9	ABSTRACT.....	69

1 Úvod

Snaha lidstva o neustálé zlepšování svých životních podmínek je známa již od nepaměti a můžeme mezi ni zařadit také ochranu pěstovaných plodin před chorobami a škůdci. První zmínky o ochraně plodin nalézáme v Číně, kde k tomuto účelu sloužila síra. Rozvoj ochranných prostředků dále směřoval k využívání toxických kovů a dalších prvků i jejich sloučenin jako je olovo, rtuť a arzen. V neposlední řadě nalezly v minulosti místo mezi pesticidy také látky přírodního původu, lze mezi ně zařadit insekticidy na bázi sloučenin nikotinu získaných z tabáku (Cremllyn, 1978). Zmíněné prostředky však nebyly příliš účinné.

K rozvoji účinných pesticidních látek došlo až v 30. letech 20. století s rozvojem moderní syntetické chemie. Masová produkce syntetických pesticidních látek nastala po druhé světové válce. Ve 40. letech 20. století objevil Paul Müller insekticidní účinky DDT (dichlordifeniltrichlorethan). Jeho objev se stal zlomovým, právě na jeho základu se DDT stalo nejrozšířenějším a nejpoužívanějším pesticidním prostředkem. Tento objev měl však do budoucna velmi silný negativní až devastující vliv na ekosystémy a populace organismů díky nedostatečným informacím o účincích této sloučeniny. Významným bodem v historii pesticidních látek a jejich využívání bylo vydání knihy *Silent Spring* autorky Rachel Carlson poukazující na negativní dopad právě DDT na ekosystémy (Carson, 1962). Po vydání knihy započalo sledování obsahu pesticidních reziduí v potravinách, výzkumu vlivu pesticidů na živé organismy a v souvislosti s výzkumem také k rozvoji nových analytických metod sledování. Získané poznatky o negativních vlivech pesticidních látek vedly k sepsání Stockholmské úmluvy o perzistentních organických polutantech, která zakazuje jejich používání (Velíšek a kol., 2018).

Celosvětově rostoucí nadměrné užívání pesticidů na zemědělských plochách zvyšuje pravděpodobnost kontaminace dalších necílových ekosystémů (Schwarzenbach a kol., 2006). Nejzávažnější problém nastává v oblastech vodních ekosystémů, které mohou pesticidy, jejich směsi a metabolity, kontaminovat například vlivem splachů nebo vsaků z ošetřených ploch a výrazně tím narušit kvalitu vod povrchových i podzemních. K dalším závažným dopadům náleží také negativní dopad na necílové vodní organismy (Ongley, 1996; Harrison, 2001; Agarwal, 2005).

Neustále se rozvíjející výzkum chemického průmyslu poskytuje zejména zemědělství širokou škálu pesticidních látek na bázi mnoha chemických tříd. Výzkum v této práci byl zaměřen na dvě z nich, konkrétně na zástupce skupiny s-triazinů selektivní herbicid prometryn (US EPA, 1996; Kamrin, 1997). Druhým zkoumaným pesticidním prostředkem byl zástupce třídy chloracetamidů metazachlor využívaný zejména na ochranu olejnatých plodin (Böger, 2003).

Cílem bakalářské práce bylo posoudit subletální vliv dávky metazachloru, prometrynu a jejich směsí na raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) během subchronického testu toxicity. Vliv pesticidů a jejich směsí na raka mramorovaného byl vyhodnocen pomocí biochemického profilu hemolymfy, analýzy antioxidantů a biomarkeru oxidačního stresu ze vzorků svalstva, žaber a hepatopankreatu. Získané výsledky přispěly k rozšíření množství informací a poznatků o toxickém vlivu jednotlivých herbicidů a jejich směsí na necílové vodní organismy sloužící jako podklady pro hodnocení rizik pro životní prostředí.

2 Literární přehled

2.1 Pesticidy

Definice mezinárodního měřítka formulovaná komisí Codex Alimentarius Commission (CAC) uvedla pesticidy jako: „*Všechny sloučeniny nebo jejich směsi, určené pro prevenci, zničení, potlačení, odpuzení či kontrolu škodlivosti organismů během produkce, skladování, transportu, distribuci a zpracování potravin, zemědělských komodit a krmiv a dále látky aplikované u zvířat proti ektoparazitům*“ (CAC, 2013).

Pod pojmem pesticid si můžeme také představit sloučeniny používané jako desikanty, regulátory nebo stimulanty růstu a inhibitory klíčení, kterými jsou plodiny ošetřovány před nebo po sklizni. Z pohledu Evropské unie jsou v legislativě užívány termíny „*prostředky na ochranu rostlin a biocidy*“ (Velíšek a kol., 2018).

Sloučeniny na chemické či biologické bázi náleží k prostředkům pro ochranu rostlin, pokud splňují jednu ze zmíněných funkcí (Zapletal a kol., 2001):

- zajišťují ochranu rostlin nebo jejich produktů před škůdci (insekticidy, fungicidy),
- mají zásadní vliv na životní procesy rostlin jiným způsobem, než jakým působí nutrienty (stimulanty růstu, inhibitory klíčení),
- umožňují dlouhodobé skladování vypěstovaných plodin,
- potlačují růst nežádoucích rostlin, keřů nebo jejich částí (herbicidy, arborocidy).

Aplikace ochranných prostředků v zemědělství je prováděna obvykle plošně, je proto nutné používané látky vystavit rozsáhlejšímu testování negativních účinků na ekosystém před jejich registrací mezi schválené ochranné prostředky (Velíšek a kol., 2018).

Pesticidy lze dělit podle různých kritérií, například na základě způsobu aplikace prostředků, původu látky, období aplikace pesticidu, mechanismu účinku, druhu ošetřovaných skupin plodin a rychlosti degradace v prostředí. Nejvýznamnější rozdělení do skupin je podle organismů, na které mají pesticidy působit. Z tohoto rozdělení vyplývají nejznámější skupiny pesticidů herbicidy, látky sloužící k zneškodnění rostlin, insekticidy, látky potlačující hmyz, fungicidy, látky hubící plísně a další houbové choroby, algicidy sloužící k inhibici řasových nárostů a piscicidy využívané k devastaci rybích populací v ošetřovaném vodním díle (Zapletal a kol., 2001).

V prostředí podléhají pesticidy po aplikaci degradaci v důsledku působení mnoha fyzikálně-chemických faktorů. Jedná se o sluneční záření způsobující fotolýzu, při vyšší teplotě dochází k vypařování pesticidních látek a v důsledku vlhkosti k hydrolyze. Nelze opomenout také oxidaci vzdušným kyslíkem a biotransformace. Degradací vznikají metabolity, které mohou ztratit pesticidní účinky, v jiných případech však mohou být metabolity značně toxičtější než původní látky. Příkladem může být přeměna triazinů vystavených UV záření, ze kterých vznikají hydroxytriaziny a kyselina kyanurová. K biotransformacím dochází v důsledku působení mikroorganismů, pro které jsou součástí běžných metabolických dějů v buňce nebo jsou pro daný mikroorganismus substrátem (Hudson a kol., 1984; Hajšlová a Kocourek, 2004; Velíšek a kol., 2018).

Organismy vystavené pesticidům jsou schopné je biotransformovat v průběhu detoxikačních procesů. U savců a ptáků je nástrojem metabolizace pesticidů aktivní enzymový systém. Biotransformaci lze dělit na dvě fáze. V první asymetrické fázi dochází ke katalýze hydrolázami a oxidázami, které přeměňují pesticidy na polárnější metabolity. V druhé (symetrické) fázi vzniklé metabolity slouží jako substrát pro konjugační reakce za vzniku neaktivních derivátů snadno odstranitelných organismem. U teplotokrevných organismů probíhají konjugace metabolitu s kyselinou glukuronovou, v případě bezobratlých dominují produkty konjugace s glukózou (Hudson a kol., 1984).

Problematika pesticidů ve vodním prostředí není v posledních letech spojována s havarijními úhyny ryb, avšak i nadále je jejich výskyt aktuální. (Svobodová a kol., 2011; Velíšek a kol., 2018). V současnosti přichází do popředí vliv subletálních koncentrací ve vodním prostředí a jejich negativní vliv na přítomné organismy a celý ekosystém. Už subletální koncentrace pesticidů mohou způsobit snížení nebo až absolutní zničení organismů tvořících přirozenou potravní základnu, která je obecně mnohem citlivější v porovnání s ostatními konzumenty (Velíšek a kol., 2018).

Přítomnost pesticidů ve vodním prostředí je způsobena přímým nebo nepřímým vstupem. K přímým vstupům náleží nesprávná aplikace pesticidů, zneškodňování nepoužitých zbytků, odpady a odpadní vody z průmyslové výroby a objektů, kde jsou pesticidy využívány, nejčastěji zemědělských a dalších pěstitelských objektů. Nepřímý vstup zahrnuje zejména splachy z ošetřených zemědělských kultur do okolních vod (Prousek, 2001; Svobodová a kol., 2008).

Používáním pesticidů se každou aplikovanou dávkou zvyšuje jejich obsah v prostředí. Pesticidy se mohou kumulovat, degradovat a mít zásadní vliv na organismy. V oblasti aplikace pesticidů je v nynější době kladen důraz na používání pesticidů šetrnějších pro životní prostředí, které se vyznačují rychlejší dobou rozkladu, netvoří rezidua a nemají nepříznivý vliv na necílové organismy. Aplikace pesticidů ve vodním prostředí představuje krajní možnost, jak se vypořádat s nežádoucími organismy či rostlinami. V tomto případě je zapotřebí klást obzvlášť velký důraz na šetrnou aplikaci (Velíšek a kol., 2018).

2.2 Triaziny

Za objevením nejstarších selektivních herbicidů, které triaziny představují, stojí J. R. Geiry. Tento významný objev učinil v roce 1952 (Velíšek a kol., 2018). Triaziny se řadí mezi herbicidy, jejichž mechanismem účinku je inhibice fotosyntézy. Hlavním způsobem zamezení fotosyntézy je inhibice Hillovy reakční fáze přenosu elektronů. Absorpce herbicidů je zprostředkována primárně kořenovým systémem, dalším vstupem mohou být i listy. Herbicidní látky jsou poté transportovány xylémem vzhůru kde se hromadí ve vrcholových meristémech. Následně pronikají do zelených listových pletiv, které degradují. Listy poté žloutnou a odumírají. Triaziny nejsou příliš rozpustné ve vodě, a proto neprostupují v půdě do přílišných hloubek. Tato skutečnost omezuje jejich použití na hluboko kořenicí rostliny (Roberts a kol., 1998; Waxman, 1998; Das a kol., 2000; Appleby a kol., 2005; Simoneaux a Gould, 2008; Trebs, 2008;).

Triazinové sloučeniny lze rozdělit do dvou skupin podle jejich chemické struktury. Skupinami jsou symetrické triaziny (1, 3, 5 – triaziny) a asymetrické triazinony (1, 2, 4- triazinony). Symetrické triaziny (s-triaziny) se řadí mezi jedny z komerčně využívaných skupin herbicidů, které jsou dále děleny na chloro-s-triaziny, thiomethyl-s-triaziny, fluoroalkyl-s-triaziny a andmethoxy-s-triaziny (Roberts a kol., 1998; Stevens a kol., 2001; Appleby a kol., 2005; Breckenridge a kol., 2010). Strukturu triazinů představuje heterocyklický kruh podobný benzenovému jádru, ve kterém jsou tři atomy uhlíku nahrazeny dusíkem (Stevens a kol., 2001; Appleby a kol., 2005; LeBaron a kol., 2008).

Triazinů jsou používány tisíce tun na plochy zemědělské půdy po celém světě, to má za následek kontaminace povrchových a podzemních vod triaziny nebo jejich metabolity. Koncentrace v prostředí kolísá v průběhu roku v závislosti na ročním období a zemědělské produkci. Triazinové pesticidy v půdě jsou značně perzistentní a společně s jejich rozsáhlou aplikací byly ustanoveny jako zvláště problematické ve zdrojích pitné vody a mimo jiné i v potravinách (Muir a Baker, 1976; Muir, 1980; Konstantinou a kol., 2006; Granby a kol., 2008; Tillitt a kol., 2010; Hostovský a kol., 2014). Na základě mnoha interagujících faktorů jsou triazinové herbicidy ovlivňovány v oblasti jejich aktivity, pohybu a perzistence v prostředí. Jedná se zejména o texturu a fyzikální parametry půdy, klima, chemické a biologické degradační mechanismy. Triazinový kruh je poměrně odolný vůči mikrobiálnímu rozkladu, což má ve výsledku jen malý dopad na životní prostředí (Pelizzetti a kol., 1990; Appleby a kol., 2005; Manahan, 2005; Solomon a kol., 2008).

Významné množství triazinových pesticidů bylo zaznamenáno ve vodním prostředí v kontextu s jejich nadměrným používáním. Hlavním mechanismem vstupu triazinů do prostředí se staly splachy z polí s ošetřenými zemědělskými plodinami. Ve vodním prostředí se mají prokazatelně schopnost pohybovat, vyluhovat a zanechávat rezidua. Triaziny a jejich metabolity byly potvrzeny v podzemních vodách i vodních útvarech povrchových vod mnoha regionů po celém světě (US EPA, 1994; Steinberg a kol., 1995; Solomon a kol., 1996; Oropesa a kol., 2008; Caquet a kol., 2013; Nödler a kol., 2013).

Pokud se triaziny ocitnou ve vodním prostředí, jsou ohroženy organismy napříč všemi trofickými úrovněmi vzhledem ke složitě provázaným potravním sítím. Významnou složkou akvatického potravního řetězce jsou bezobratlí tvořící základní zdroj potravy pro většinu vyšších organismů (Turner, 2003; Di Giulio a Hinton, 2008). Pokud vlivem přítomných pesticidů dojde ke snížení početnosti druhů bezobratlých, nastává změna celého ekosystému na základě tzv. bottom-up efektu. Citlivost bezobratlých vůči triazinům je různá, může to naznačovat široké rozpětí toxického účinku zmiňovaných pesticidů (Fitzmaier a kol., 1982; Wan a kol., 2006). Jako dobré indikátory kontaminace triazinovými pesticidy se ukázali vodní korýši, u kterých se již v malých koncentracích projevovaly znaky akutní toxicity (Johnson a Finley, 1980). Z raků, největších zástupců sladkovodních korýšů, byla u raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) zjištěna vyšší citlivost na atrazin ($12,1 \text{ mg.l}^{-1}$), hexazin ($19,5 \text{ mg.l}^{-1}$) a metribuzin ($30,6 \text{ mg.l}^{-1}$) po

96hodinovém testu toxicity (96hLC50) (Velíšek a kol., 2013). Na druhé straně některé triazinové sloučeniny jsou představovány jako prakticky netoxické pro některé skupiny bezobratlých, přičemž např. simazin je toxický pro krevety ($3,7 \text{ mg.l}^{-1}$) (Mayer a kol., 1986; Turner, 2003).

U ryb se toxicita triazinů projevuje mnohými morfologickými, fyziologickými a biochemickými změnami (Velíšek a kol., 2018). Vystavení ryb triazinovým herbicidům vyvolává biologické reakce, jako jsou biochemické a hematologické změny. Právě tyto změny patří mezi první zjiřitelné a kvantifikovatelné reakce, které jsou u organismů po vystavení triazinům možné pozorovat. Potvrzení vystavení organismů pesticidům je prováděno na základě analýzy potenciálních biomarkerů kontaminace, kterými jsou specifické enzymy nebo metabolické produkty účastnící se fyziologických reakcí v těle ryb (Van der Oost a kol., 2003; Amiard-Triquet a kol., 2012). Biochemický profil je zjiřován z odebrané rybí plazmy. Ze získaných výsledků je sledován významný pokles nebo vzrůst u analyzovaných parametrů, které jednotlivě představují konkrétní místa a reakce, které byly ovlivněny přítomností triazinů ve vodě (Hostovský a kol., 2014).

Nejen změny biochemického profilu plazmy naznačují negativní účinky triazinů. Dalším projevem toxického účinku triazinů obecně je narůstající oxidační stres v buňkách organismu (Di Giulio a Hinton, 2008; Slaninová a kol., 2009; Haluzová a kol., 2010). Jako biomarkery oxidačního stresu jsou využívány enzymy antioxidační obrany a produkty poškození volnými radikály (Van der Oost a kol., 2003). Nejběžněji sledovanými enzymy jsou superoxid dismutáza (SOD), a kataláza (CAT), jejich aktivita se v přítomnosti látek způsobujících oxidační stres významně mění (Di Giulio a Hilton, 2008; Slaninová a kol., 2009).

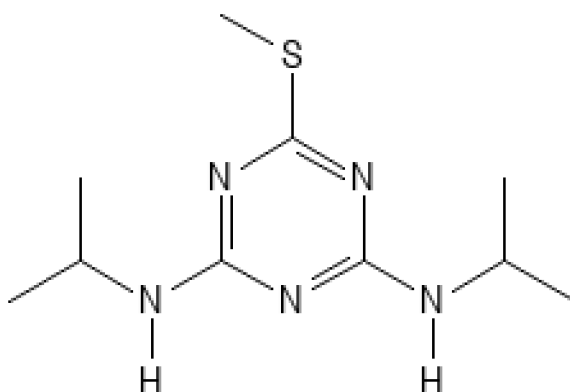
2.2.1 Prometryn

Prometryn patří mezi selektivní herbicidy ze skupiny triazinů. Na ošetřované plochy je aplikován před vyklíčením ale i po vyklíčení jednoletých trav a širokolistých plevelů v různých plodinách (US EPA, 1996; Kamrin, 1997). V půdě je prometryn špatně absorbován, v rostlinných tělech dochází k jeho snadnému rozkladu na metabolity, které mohou snadno kontaminovat podzemní vody (Jiang a kol., 2011). Poločas rozpadu v anaerobních podmínkách půdy přesahuje 270 dní (US EPA, 1996). V Evropě bylo jeho

používání zakázáno v roce 2004 (Zhou a kol., 2012), ale stále se vyskytuje v určitém množství ($0,51 \mu\text{l.l}^{-1}$) v podzemních i povrchových vodách v České republice (Stará a kol., 2014). Prometryn se stále používá například v Číně, Austrálii, Kanadě, Novém Zélandu, Jihoafrické republice a Spojených státech (Kegley a kol., 2010; Zhou a kol., 2012). Ve vodním prostředí představuje prometryn akutní riziko pro necílové vodní organismy. Z výsledků akutních testů toxicity ho lze charakterizovat jako mírně až středně toxický pro vodní rostliny, zooplankton a ryby. Pro řasu *Selenastrum capricirnutum* představuje 5dEC_{50} $23 \mu\text{g.l}^{-1}$, k inhibici okřehku menšího (*Lemna minor*) docházelo při hodnotách $0,083 \mu\text{l.l}^{-1}$ (24hEC_{50}). Akutní test (96hLC_{50}) stanovil akutní hodnoty prometrynu pro hrotnatku obecnou (*Daphnia pulex*) na $40 \mu\text{l.l}^{-1}$, pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) je hodnota $2,9 \text{mg.l}^{-1}$ a kapra obecného (*Cyprinus carpio*) 8mg.l^{-1} (Popova, 1976; US EPA, 1996; Küster a Alterburger, 2007; Stará a kol., 2014).

2.2.1.1 Vlastnosti

Prometryn, 6-methylsulfanyl-2-*N*,4-*N*-di(isopropyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamin (Obr. č. 1), sumárním vzorcem $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{S}$, je bílá nebo bezbarvá krystalická látka bez zápachu. Molekulární hmotnost činí $246,36 \text{g.mol}^{-1}$, bod tání byl stanoven při 119°C . Jedná se o velmi stabilní látku mírně citlivou na přirozené světlo. Je stabilní v neutrálním, mírně zásaditém a kyselém prostředí. Při tepelném rozkladu unikají toxické výpary dusíku a sulfoxidů. K rozpadu napomáhá UV záření (PubChem, 2004).



Obrázek č. 1: Struktura prometrynu (Vytvořeno v PubChem Sketcher V2.4).

2.2.1.2 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku prometrynu je schopnost inhibice přenosu elektronů v buňkách zasažených rostlin a travin, je tím celkově omezena schopnost fotosyntézy (Erickson a Turner, 2002). Prometryn, řadící se do skupiny s-triazinů, stejně tak jako ostatní sloučeniny triazinů, také ovlivňuje metabolismus sacharidů. Zapřičiňuje blokaci akumulace škrobů potlačením produkce cukrů, to vše v souvislosti s inhibicí fotosyntézy (ACGIH, 1986). Dále také způsobuje inhibici oxidativní fosforylace (Hartley a Kidd, 1987).

2.3 Chloracetamidy

Herbicidní látky v podobě chloracetamidů byly představeny v 50. a 60. letech minulého století. Mezi první sloučeniny z této skupiny patřily illidochlor a propachlor (LeBaron a kol., 1988). V současnosti zahrnuje skupina chloracetamidů 31 sloučenin. Jedná se o stále velmi hojně využívané druhy pesticidů k regulaci plevelů. Využívají se zejména k ochraně kukuřice, čiroku, sóji a bavlny před travami a dvouděložnými plevely (Böger a kol., 2000).

K příjmu rostlinou dochází skrze kořenový systém, výhonky nebo listeny. Následně jsou přenášeny xylémem akropetálním pohybem. Dochází k inhibici náchylných plevelů s rychlým vývojem, semena zasažena herbicidem obvykle vyklíčí, ale růst a semenáčky zůstávají zakrnělé a dále nerostou (Böger a kol., 2000). Chloracetamidy disponují rozsáhlou řadou fyziologických účinků, mezi které lze zařadit například imobilizaci škrobu a zvýšení osmotického potenciálu kořene (Ebert, 1980; Vavrina a Ahley, 1983).

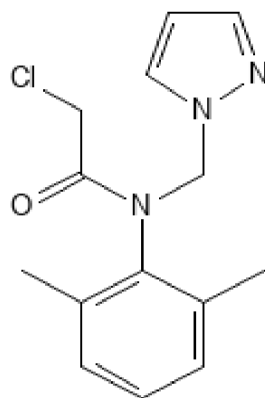
Chloracetamidy inhibují elongaci C-16 a C-18 mastných kyselin na mastné kyseliny s velmi dlouhými řetězci. Nízká hladina mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem působí fyto toxicky. Tyto potřebné mastné kyseliny jsou přítomny v intracelulárních membránách i plazmatické membráně. V případě snížení hladiny mastných kyselin s velmi dlouhými řetězci ztrácí membrány svou tuhost a propustnost spojenou s nedokonalým uvolňováním a dělením buněk (Böger, 2003). K dalším pozorovaným změnám buněk u některých řas a rostlin náleží zvětšení objemu buňky, nabobtnání a snížení pevnosti buňky po aplikaci pesticidu (Weisshaar a Böger, 1987).

2.3.1 Metazachlor

Metazachlor, patří do skupiny chloracetamidů, jde o herbicid využívaný k ošetřování zejména olejnatých plodin a kukuřice. Aplikace metazachloru je používána při preemergentní a časně postemergentní regulaci širokolistých plevelů a jednoletých trav (Roberts a kol., 1998; PubChem, 2005). V letech 1997 byl metazachlor společně s alachlorem zařazen na seznam endokrinních disruptorů (EDC, z angl. endocrine-disrupting chemicals). Předpokládá se, že tyto herbicidy mají nepříznivý vliv na necílové organismy právě v podobě narušování endokrinního systému (Keith, 1997).

2.3.1.1 Vlastnosti

Metazachlor, 2 - chloro -*N*- (2,6 - dimethylphenyl) -*N*- (pyrazol -1- ylmethyl) acetamid (Obr. č. 2), sumárním vzorcem $C_{14}H_{16}ClN_3O$, je organochlorová sloučenina s molekulovou hmotností $277,75 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Teplota tání představuje $85 \text{ }^\circ\text{C}$ (PubChem, 2005). Světový harmonizační systém označuje metazachlor za dráždivý, zdraví škodlivý a toxický pro životní prostředí, dále je podezřelý z karcinogenity (ECHA, 2022). Poločas rozpadu v půdě pro metazachlor představuje 5 až 30 dní, zde se rozkládá na kyselinu oxanilovou, kyselinu etansulfonovou a její deriváty (Lewis a kol., 2016; Hvězdová a kol., 2018). Ve vodním prostředí je herbicid stabilní vůči hydrolýze za normálních teplot a hodnot pH. Výsledné produkty přeměn vykazují minimální schopnost adsorpce do půdy, což způsobuje jejich vysokou mobilitu v prostředí. Metabolity z přeměny metazachloru představují běžně identifikovatelné znečišťující látky v prostředí (Baran a Gourcy, 2013; Lewis a kol., 2016; Chen a kol., 2017). Toxicita metazachloru vůči vodním organismům byla stanovena na střední úrovni, jedná se zejména o účinky na perlorodkách *Daphnia magna* ($48\text{hEC}_{50} = 22,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), slunečnici pestré *Lepomis macrochirus* ($96\text{hLC}_{50} = 15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a kapru obecném ($96\text{hLC}_{50} = 15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Citlivější reakce byly pozorovány u pstruhů ($96\text{hLC}_{50} = 4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), kde vystavení herbicidu může způsobit poškození jater a ledvin (FAO, 1999; Králová a kol., 2015).



Obrázek č. 2: Struktura metazachloru (Vytvořeno v PubChem Sketcher V2.4).

2.3.1.2 Mechanismus účinku

Mechanismem účinku je inhibice tvorby mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem ($C > 18$), které jsou součástí buněčných membrán, slouží k ochraně buňky a podílejí na procesech dělení buňky (Böger, 2003). Přítomnost mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem naznačuje v rostlinných pletivech přítomnost epikutikulárních vosků v epidermis rostlin, dále jsou součástí buněčných membrán, zejména plazmatické membrány (obsahuje až 10 % mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem) (Moureau a kol., 1998). Mechanismus účinku zaměřený právě na inhibici mastných kyselin způsobuje vysokou toxicitu metazachloru pro rostliny již v nízkých koncentracích (Zwenger a Pestemer, 2000; Böger a Matthes, 2002). Čím vyšší koncentrací mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem rostlina disponuje, tím citlivější vůči působení metazachloru je (Mohr a kol, 2007).

2.4 Biochemický profil hemolymfy

Posouzení akutního vnitřního stavu vodních organismů z veterinárního hlediska je nejspolehlivěji zajišťováno biochemickým vyšetřením oběhových tekutin. Pomocí zmíněného vyšetření lze jednoduše získat informace o metabolických funkcích, které mohou být při poruše důvodem většiny chorob (Kolářová a Velíšek, 2012). Mimo jiné lze biochemického vyšetření využít v experimentálních pokusech při vyhodnocování výsledků akutních a chronických testů toxicity (Gallardo a kol., 2003; Ballarin a kol., 2004).

Biochemický profil ryb je stanovován z krve. Odběry se liší podle požadovaného cílového vzorku, který je zapotřebí získat. V případě požadavku získání krevního séra, se odběrové materiály zásadně neproplachují protisrážecími přípravky např. vodným roztokem sodné soli heparinu. Pokud je výsledným cílem konečný rozbor krevní plazmy, odběrové materiály jsou před odběrem ošetřeny protisrážecím přípravkem. Biochemický profil oběhových tekutin lze stanovit i u raků (Kolářová a Velíšek, 2012). Na rozdíl od ryb mají raci v oběhové soustavě hemolymfu (Kozák a kol., 2013). Při odběru (Obr. č. 3) hemolymfy je zapotřebí ošetření odběrových pomůcek protisrážecím přípravkem (Kolářová a Velíšek, 2012).



Obrázek č. 3: Odběr hemolymfy (Foto A. Hovorková).

K hlavním stanovovaným parametrům náleží glukóza (GLU), proteiny krevní plazmy ((např. albuminy (ALB), globuliny (GLOB)), amoniak (NH_3^-), cytoplazmatické a mitochondriální enzymy (alanin aminotransferáza (ALT)) a minerály (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-). Glukóza představuje hlavní zdroj energie. Albumin je součástí jaterní syntézy společně s tkáňovým katabolismem, udržuje koloidní osmotický tlak a dále plní transportní funkci. Globulin při zvýšené koncentraci odráží probíhající zánětlivé procesy. Amoniak je produktem metabolismu a trávení bílkovin u ryb a je toxický. Zvýšené hodnoty značí selhání funkce jater nebo metabolické poruchy v Krebsově cyklu. Cytoplazmatický enzym alanin aminotransferáza zvýšenou aktivitou indikuje toxické poškození hepatopankreatu. V případě minerálů, esenciální prvek vápník a jeho obsah v krvi ovlivňuje enzymatickou aktivitu, kvalitu skeletu, svalový metabolismus, krevní srážlivost a osmoregulaci. Další nezastupitelnou složkou je hořčík důležitý při aktivaci enzymů anabolických a katabolických procesů. Podílí se i na syntéze a destrukci acetylcholinu. Ionty Cl^- se společně s Na^+ ionty nacházejí v buněčné cytoplazmě, zde mají hlavní funkci v podobě udržování osmotického tlaku a acidobazické rovnováhy (Müllerová, 2003; Velíšek a Hajšlová, 2009; Kolářová a Velíšek, 2012).

2.5 Oxidační stres a antioxidanty

Oxidační stres nastává v případě přebytku reaktivních forem kyslíku (ROS), kdy antioxidantní obranné mechanismy již nejsou schopné udržet redoxní rovnováhu (Alavanja a kol., 2013). Negativní působení oxidačního stresu se projevuje modifikací proteinů a lipidů, změnou struktury DNA, aktivací indukovaných transkripčních faktorů a produkcí zánětlivých cytokinů (Alavanja a kol., 2013; D'Souza, 2017).

ROS velmi dobře reagují s lipidy, proteiny, sacharidy a nukleovými kyselinami, následkem reakce je změna struktury a funkce buněčných molekul. Reakce ROS s nenasycenými mastnými kyselinami v membránách, které obsahují lipidy, způsobuje lipidní peroxidaci. Jedná se o řetězovou reakci, pokud dojde ke ztrátě kontroly nad reakcí, mohou být postižené buňky pozměněny nebo dochází až k buněčné smrti (Pamplona, 2011). Pro stanovení lipidní peroxidace se jako nejběžnější činidlo využívá malondialdehyd (MDA), produkt reakce často testovaný s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) (de Zwart a kol., 1999). MDA je také známý mutagen (Niedernhofer a kol., 2003).

Organismus se před oxidačním stresem chrání systémem antioxidační obrany složené z enzymatické i neenzymatické složky. Hlavní antioxidační enzymy jsou SOD, CAT a glutathionperoxidáza (GPx) (Valko a kol., 2007). V obraně před oxidativním stresem nastupuje nejprve SOD, která katalyzuje dismutaci dvou superoxidových radikálů (O_2^-) na molekulární kyslík (O_2) a peroxid vodíku (H_2O_2). Produkty reakce SOD s ROS jsou nadále neutralizovány kombinací CAT a GPx. Tyto enzymy mají koordinovaný účinek, avšak v případě vychýlení hladiny jednoho ze zmíněných enzymů může nastat posun redoxní rovnováhy, což má za následek vyvolání oxidativního stresu (Matés, 2000; Semren a kol., 2018).

2.6 Testy toxicity na vodních organismech

Využívání vodních organismů pro testy toxicity patří k nejrozšířenějším způsobům hodnocení dopadu látek na životní prostředí, k hodnocení nově vyvinutých chemických látek, zařazení a klasifikaci odpadů či odpadních vod i v případě určování původců vzniklých havarijních znečištění podzemních a povrchových vod. Využívaných metod testů toxicity je nepřehledná řada, od využití matematických modelů, vedení testů na úrovni buněk a tkání, přes testy na úrovni organismů až sledování toxicity na úrovni celých biocenóz (Velíšek a kol., 2018).

Pro testy toxicity jsou nejčastěji v metodikách využívány vodní organismy. Jedná se nejčastěji o testy na rybách, koryšcích, měkkýších a vodních rostlinách, bakteriích a řasách (Kočí a Mocová, 2009). Obecný princip testů spočívá ve vystavení testovaných organismů po daný čas různým koncentracím testovaných látek, společně s nasazenými koncentracemi jsou také organismy umístěny do kontrolní skupiny, ředící vody bez testované látky. Testované látky musí být dobře rozpustné ve vodě, v testech je možné také využít vodné výluhy látek pevného skupenství. Sledují se příznivé i nepříznivé účinky testovaných látek na organismy (Kočí a Mocová, 2009; Svobodová a kol., 2007).

Většina využívaných testů je řazena mezi tzv. standartní. Výhodou takto zařazených testů je jejich standardizace mezinárodními metodikami a uznání mezinárodní legislativou. Průběh testů je prováděn dle platných metodik v přísně kontrolovaných podmínkách. To zaručuje možnost porovnávání získaných výsledků mezi laboratořemi (Landis a Yu, 2003; Maršálek, 2004). Kromě schválených metodik musí být testy toxicity

na vodních obratlovcích, dle naší legislativy, také provedeny pouze na základě schváleného projektu pokusu za dodržení všech zásad podle zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání v platném znění a vyhlášky č. 419/2012 Sb. o ochraně pokusných zvířat v platném znění.

Jedním z možných členění standartních testů toxicity je podle délky trvání samotného testu. Na základě tohoto kritéria se testy dělí na akutní (krátkodobé), subchronické a chronické (dlouhodobé) (Velíšek a kol., 2018). Akutní vystavení toxické látky je definováno jako doba, po kterou je dotčeno pouze jedno vývojové stádium organismu. V akutních testech je sledováno převážně působení látek na přežívání organismu. V případě chronické expozice je definice vysvětlena jako doba zasahující více vývojových stádií nebo životních cyklů. Mimo sledování přežití organismu je zaznamenáván dále nepříznivý účinek na růst, rozmnožování genetické změny atd. V posledních letech přešly do popředí testy prolongované, chronické, subchronické a hodnocení subletálních účinků (OECD, 1992; Williams a kol., 2003).

2.7 Raci

Sladkovodní druhy raků řadíme systematicky mezi korýše řádu Decapoda a infrařádu Astacida (Hobbs, 1989). Jedná se o jedny z největších vodních bezobratlých, kteří svou velikostí představují modelové formy tělesné stavby pro tělní typ organizace členovců (Kozák a kol., 2013). Jedná se o bentické druhy organismů.

Tělo raka je chráněno vnějším krunýřem (exoskeletem), který je vylučován pokožkou uloženou pod silnou vrstvou kutikuly (Zarenkov, 1982). Tělo raka je děleno na dvě hlavní části, hlavodrud' a zadeček. (Kozák a kol., 2013).

Svalovina raků je příčně pruhovaná jak u kosterního svalstva, tak i u svalů srdečních a útrobních (Fomičev, 1986). Dýchací soustavu raků tvoří žábra, která jsou uložena v žaberních komorách na bocích hlavohrudi. Jedním z důležitých orgánů je hepatopankreas, součást trávicí soustavy. Zásadní funkcí hepatopankreatu je tvorba a sekrece trávicích enzymů, metabolismus sacharidů, produkce emulgátorů a zajištění zásob vápníku. K dalším funkcím náleží depozice některých těžkých kovů, hepatopankreas se tím stává hlavním detoxikačním orgánem raků (Kozák a kol., 2013).

2.7.1 Rak mramorovaný (*Procambarus virginalis*)

Rak mramorovaný je řazen mezi druhy raků dorůstajících malých rozměrů. Jedná se o spíše krátkověký druh, průměrný věk se pohybuje okolo dvou let. (Pöckl a kol., 2006; Vogt, 2010).

Pro druh je typické mramorování na podkladě, které má hnědavé, tmavě hnědé nebo zelené zbarvení. Nejvíce patrné je na bocích hlavohruď. Hladká hlavohruď je pokryta několika trny za týlní brázdou a jedním párem postorbitálních lišt. Klepeta raka mramorovaného jsou velmi malá se slabou zrnitostí na povrchu. Zápěstí obou klepet jsou opatřena na vnitřní straně silným trnem (Holdich a kol., 2006).

Rak mramorovaný je původní pro jihovýchodní části USA (Taylor a kol., 2007; Dorn a Volin, 2009). V původním areálu se vyskytuje na lokalitách stojatých i tekoucích vod, znám je též tvorbou jednoduchých nor (Hobbs, 1981; Hendrix a Loftus, 2000; Dorn a Trexler, 2007). Jedná se o druh významně adaptabilní a tolerantní vůči podmínkám prostředí i teplotám (Holdich a kol., 2006; Kaldre a kol., 2012). Zmíněné vlastnosti a jejich snadná dostupnost a šíření díky oblíbenosti mezi akvaristy zapříčinila rozšíření tohoto druhu, a tvorbu schopných populací, nejen po Evropě, ostatních státech USA, ale i na ostrovní státy, kde se jedná o významnou hrozbu pro místní endemické druhy raků. Jedná se o invazivní druh řadící se k potenciálním druhům přenášející račí mor, tato skutečnost dělá z raka mramorovaného jeden z nejnebezpečnějších invazivních druhů (Lukhaup, 2001; Jones a kol., 2007; Kawai a kol., 2009; Faulkes, 2010; Kozák a kol., 2013).

Reprodukce druhu na území Evropy probíhá prostřednictvím apomiktické partenogeneze, tzn. že samice produkují potomstvo pouze se samičí genetickou informací, to zapříčiňuje že potomstvo je geneticky identické. Samci raka mramorovaného na Evropském území nejsou doposud známi (Scholz a kol., 2003; Vogt a kol., 2004; Martin a kol., 2007).

Rak mramorovaný má jako druh dobrý předpoklad stát se jedním z modelových organismů pro řadu biochemických, toxikologických a dalších studií. Pro toto využití je druh zajímavý z hlediska jeho rychlého růstu a dospívání, vysoké plodnosti, krátké době inkubace a produkci uniformně genetického potomstva. (Vogt, 2008, 2010, 2011; Jimenez a Faulkes, 2010).

3 Materiál a metodika

Zvolenou metodou pro zjištění subletálních účinků směsí pesticidů na raky, konkrétně účinku prometrynu, metazachloru a jejich směsí, byl subchronický test toxicity. Testování proběhlo v akvarijské místnosti Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického, Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

3.1 Subchronický test toxicity

3.1.1 Princip a podmínky testu

Subchronický test toxicity na racích byl proveden formou modifikace podmínek pro chronický test toxicity na racích. Vybraní jedinci testovaného organismu byli vystaveni po dobu 8 dnů účinkům různých koncentrací vybraných pesticidů a jejich směsí. Koncentrace byly zvoleny tak, aby jejich přítomnost ve vodě nebyla pro raky letální. Testování obou vybraných látek a jejich směsí probíhalo současně společně s opakováním pro každou vybranou skupinu.

Kontrola testu spočívala v nasazení jedinců do čisté vody bez obsahu testovaných pesticidů, s jejím opakováním. Kontrola byla společná pro obě látky a jejich směsí.

Výměna lázně proběhla každý třetí den od započetí testu. Před výměnou a po výměně lázně byly měřeny hodnoty vody: pH, obsahu O₂ a teploty. Světelný režim během testu byl 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Raci byli krmeni každý den suchým peletovým krmivem (Sera crabs natural, Německo) ad libitum. V průběhu testu byla zaznamenána mortalita a změny v chování testovaných jedinců. Odběr vzorků proběhl po 4 a 8 dnech expozice.

3.1.2 Experimentální organismy

Jako modelový organismus pro subchronický test toxicity byl vybrán rak mramorovaný, který je na našem území považován za druh nepůvodní až invazivní. Testované organismy pocházely z chovu Laboratoře sladkovodních ekosystémů Fakulty rybářství a ochrany vod, Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech.

Průměrná délka, měřená testovaných organismů od špičky rostra po konec hlavohruď, dosahovala $18,6 \pm 2,79$ mm. Hmotnost v průměru dosahovala $1,87 \pm 0,45$ g. Při nasazení do testu byli jedinci v dobrém zdravotním stavu.

3.1.3 Průběh testu

Při subchronickém testu toxicity byli raci po dobu 8 dnů vystaveni vybraným koncentracím zvolených testovaných látek rozpuštěných ve vodě (viz tabulka č. 1). Společně s nimi byla nasazena i kontrola v podobě čisté vody, kontrola byla společná pro oba pesticidy i jejich směsi. Testování všech látek, směsí i kontrol probíhalo současně. Všechny experimentální skupiny byly testovány ve dvou opakováních.

Raci byli nasazeni do akvárií o objemu lázně 10 litrů. Akvária byla vybavena vzduchováním a speciálními boxy s přepážkami pro oddělení prostorů, do kterých byly raci uloženi (Obr. č. 4). Přepážky v boxech bránily kanibalismu mezi nasazenými raky. Do každého boxu bylo nasazeno 13 jedinců, s opakováním bylo v každé testované koncentraci nasazeno 26 raků.



Obrázek č. 4: Akvária s boxy (Foto A. Stará).

Pro test byly použity analytické standardy látek prometrynu (o čistotě 99,5%) a metazachloru (o čistotě 99,7%) od firmy Sigma Aldich Cz. Testované látky prometryn a metazachlor byly sledovány ve třech různých koncentracích. Dále byly vytvořeny směsi obou pesticidů, které vznikly smísením vždy stejné koncentrace obou testovaných látek. Koncentrace testovaných látek a směsí jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Koncentrace testovaných látek a směsí.

Testovaná látka	Označení	Koncentrace (mg.l ⁻¹)
Kontrola – K	K/K'	0
Prometryn – P1	P1/P1'	0,01
Prometryn – P2	P2/P2'	0,1
Prometryn – P3	P3/P3'	1
Metazachlor – M1	M1/M1'	0,01
Metazachlor – M2	M2/M2'	0,1
Metazachlor – M3	M3/M3'	1
Směs – S1	P1/P1' + M1/M1'	0,01+0,01
Směs – S2	P2/P2' + M2/M2'	0,1+0,1
Směs – S3	P3/P3' + M3/M3'	1+1

Průměrná teplota v akváriích byla $19,67 \pm 1,72$ °C, hodnoty pH se pohybovaly okolo $7,54 \pm 0,14$ a obsah kyslíku byl naměřen s hodnotami $86,34 \pm 2,09$ %.

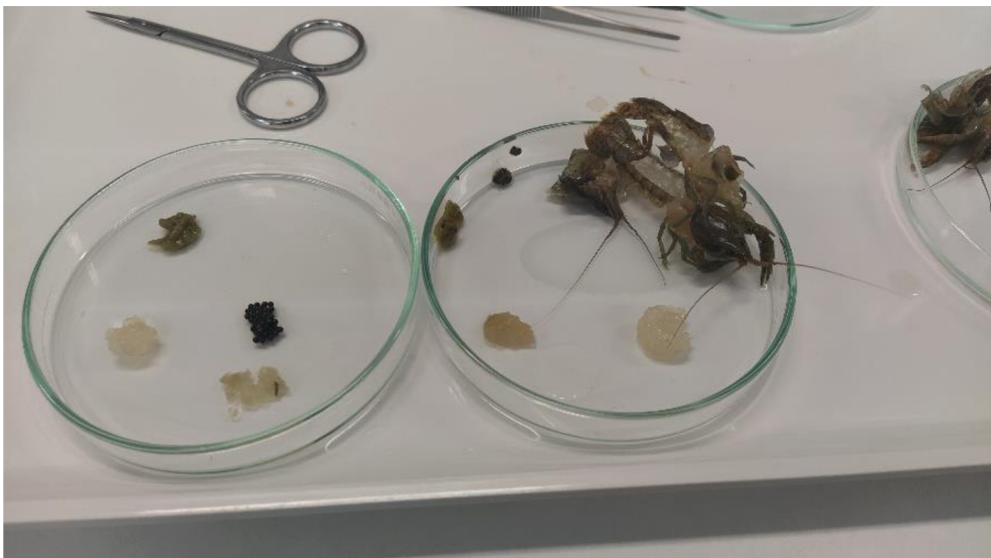
Výsledky testu lze považovat za validní, jelikož byla dodržena kritéria podmiňující správnost získaných výsledků. V průběhu testu koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod hranici 60 %, teplota se pohybovala v přijatelném rozmezí, dále v kontrolním akváriu mortalita nepřesáhla 10 % a koncentrace testovaných látek v akváriích neklesly pod 80 %.

3.2 Odběr vzorků

Vzorky tkání a hemolymfy byly odebrány po 4 a 8 dnech expozice testovaných látek a jejich směsí. Vždy bylo odebráno 6 jedinců z každé testované skupiny, kteří byli změřeni a zváženi. Následně byly raci přemístěni do šupinkového ledu (Obr. č. 5), který způsobil jejich anestezii. Poté proběhl odběr vzorků hemolymfy a tkání hepatopankreatu, svalu a žaber (Obr. č. 6).



Obrázek č. 5: Uložení raků na ledu (Foto A. Hovorková).



Obrázek č. 6: Odběr vzorků tkání (Foto A. Hovorková).

Každý odebraný vzorek byl vložen do předem nadepsané mikrozkušavky, následně byly mikrozkušavky umístěny do kryoboxů a uschovány v hlubokomrazícím zařízení při teplotě -80 °C do doby jejich analyzování.

3.3 Biochemický profil hemolymfy

Pro stanovení biochemického profilu hemolymfy byla od raků při odběru vzorků tkání odebrána hemolymfa z břišní strany pomocí injekční stříkačky obsahující 0,01 ml heparinu sodného na ml hemolymfy, která byla zavedena skrze schránku v části předělu mezi hlavohrudí a zadečkem směrem k bázi klepety. Odebrané vzorky byly promíchány a uloženy na ledu. Po dokončení odběru proběhla centrifugace všech vzorků po dobu 10 minut při 10 000 rpm. Odstředěná hemolymfa byla uložena v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C do samotného provedení analýzy. Zjištění biochemického profilu hemolymfy bylo provedeno na chemickém analyzátoru VETTEST 8008 (IDEXX Laboratories Inc., Maine, USA) podle metodiky Kolářová a Velíšek (2012). Ze vzorků byly stanoveny následující parametry:

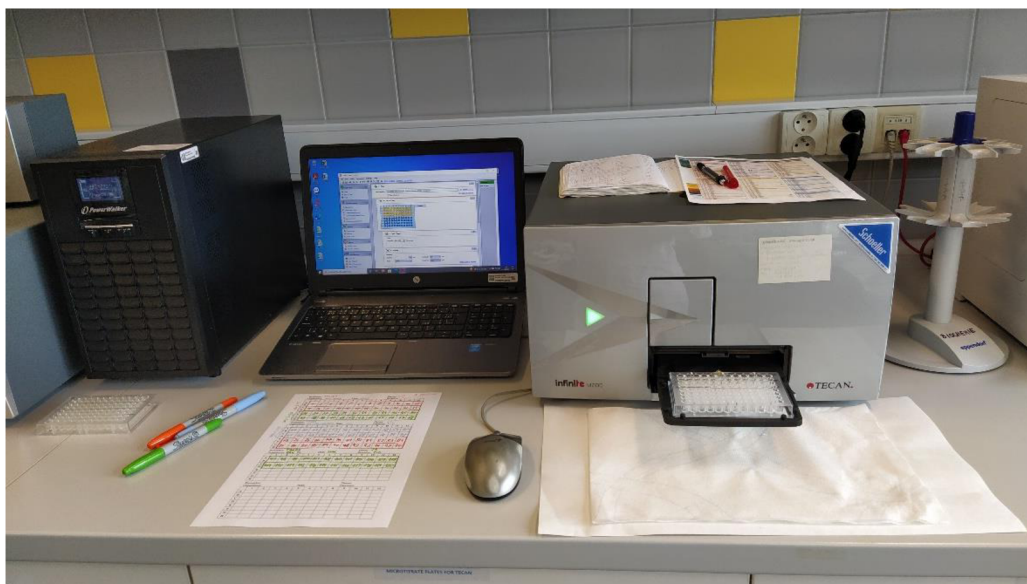
- alanin aminotransferáza (ALT),
- amoniak (NH₃),
- proteiny plazmy:
 - globuliny (GLOB),
- minerály:
 - chloridy (Cl⁻), hořčík (Mg²⁺), vápník (Ca²⁺).

3.4 Stanovení oxidačního stresu a antioxidačních biomarkerů

Pro vybrané analýzy bylo nutné zmražené vzorky zvážit, na základě jejich hmotnosti došlo k přidání homogenizačního média – PBS pufru (0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,29 % Na₂HPO₄*12H₂O, 0,02 % KH₂PO₄ v deionizované vodě, pH = 7,2). Na 100 mg tkáně byl použit 1 ml pufru. Takto připravené vzorky byly umístěny po dobu 6 minut do oscilačního mlýnu (Retsch, Oscilační mlýn MM400), kde došlo k jejich homogenizaci. V průběhu homogenizace tkání byly vzorky neustále uchovávány na ledu, aby nedošlo k jejich poškození. Zhomogenizované vzorky byly následně rozpipetovány do mikrozkušavek

v potřebných objemech pro jednotlivé analýzy. Napipetované vzorky homogenátů byly dále uloženy v kryoboxech do hlubokomrazícího zařízení při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Stanovení všech níže zmíněných biomarkerů bylo provedeno spektrofotometricky prostřednictvím přístroje TECAN Infinite M200 (TECAN Austria GmbH) v mikrodestičkovém provedení (Obr. č. 7).



Obrázek č. 7: TECAN Infinite M200 (Foto A. Hovorková).

3.4.1 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Princip metody

Metoda BCA využívá schopnosti komplexace iontů Cu^{I} pomocí sodných solí kyseliny bicinchoninové při reakci peptidové vazby s ionty Cu^{II} . Činidlo se připravuje smísením roztoků sodné soli kyseliny bicinchoninové v alkalickém prostředí a CuCO_4 v poměru 100:1. Výsledný komplex je měřen spektrofotometricky při 562 nm (Bradford, 1976).

Materiál a reagensie

- BSA standard, 0,1 M roztok NaOH (Sigma Aldrich, P-0914),
- činidlo A: roztok kyseliny bicinchoninové – BCA (Sigma Aldrich, B-9643),
- činidlo B: roztok síranu měďnatého – CuSO_4 (Sigma Aldrich, C-2284).

Postup metody

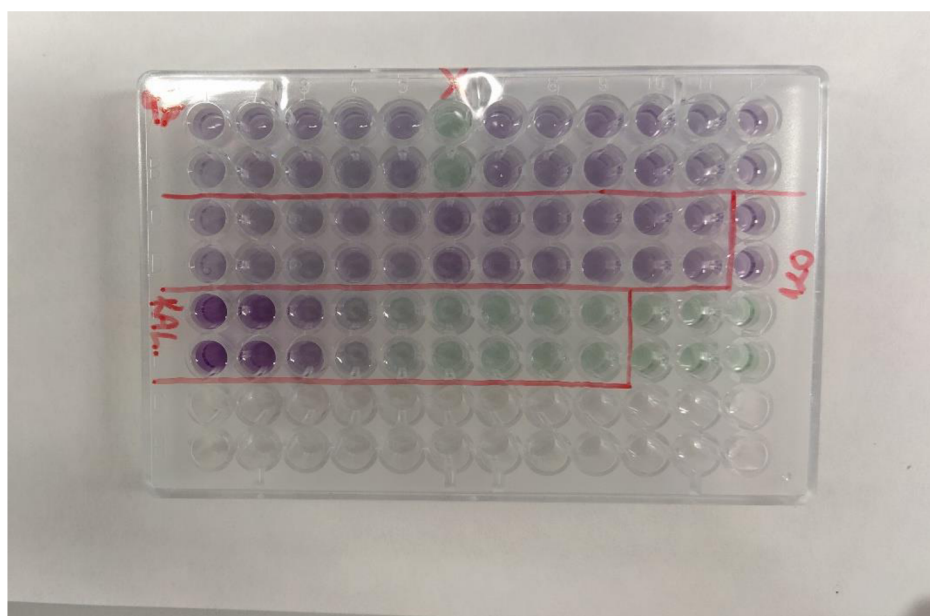
Nejprve bylo k rozmraženému homogenátu vzorku o objemu 30 μl přidáno 570 μl 0,1 M roztoku NaOH, takto připravený vzorek byl ponechán do druhého dne při pokojové teplotě.

Na mikrotitrační destičku byl pipetován objem 10 μl vzorku společně s 200 μl roztoku kyseliny bicinchoninové a síranu měďnatého, který vznikl smísením 19,6 ml kyseliny a 0,4 ml síranu.

Napipetovaná destička byla překryta fólií a ponechána po dobu 30 minut v termoboxu při 37 °C. Následně byly inkubované vzorky změřeny spektrofotometricky při 562 nm.

Kalibrace

Pro kalibraci byl použit standard BSA (1 mg BSA/0,1 M NaOH). Jako blank byl využit 0,1 M roztok NaOH. Rozsah kalibrační řady byl stanoven od 12,5 – 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Obr. č. 8).



Obrázek č. 8: Měřené vzorky a kalibrační řada (Foto A. Hovorková).

Vyhodnocení

Výsledná koncentrace proteinů byla vypočítána s pomocí vytvořené kalibrační křivky se standardem BSA. Hodnoty výsledků byly vyjádřeny v $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.4.2 Stanovení lipidní peroxidace (LPO) pomocí TBARS testu

Princip metody

Pro stanovení lipidní peroxidace (LPO) byl využit TBARS test (thiobarbituric acid reactive substances = látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou - TBA), který využívá látky s ní reagující. Metoda je založená na stanovení barevných produktů, které vznikají reakcí produktů lipidní peroxidace s TBA. Malondialdehyd (MDA-) je produktem LPO jakožto sekundární lipidický oxidační produkt vznikající reakcí ROS s nenasycenými mastnými kyselinami. MDA je schopna s TBA reagovat za vzniku barevného komplexu, který je měřen spektrofotometricky při 532 nm (Uchiyama a Mihara, 1978; Livingstone a kol., 1989; Surai a kol., 1996).

Cílem metody stimulované LPO je zhodnotit potenciál homogenátu podstoupit proces LPO.

Chemikálie a reagensie

- TCA-BHT (20 % kyselina trichloroctová (w/v), 2 % butylovaný hydrotoluén (w/v), v poměru 200:1 TCA:BHT),
- 0,6 M HCl,
- TRIS-TBA (25 mM TRIS, 100 mM TBA v destilované vodě, pH 7,4),
- Standard MDA (22 % 1,1,3,3-tetraethoxypropan (w/v) v 1 % H₂SO₄),
- 2 mM FeSO₄ v PBS.

Postup metody

Pro stanovení LPO byly využity necentrifugované homogenáty vzorků. Pro stimulovanou LPO byl vzorek o objemu 250 µl s 2 mM roztokem FeSO₄ o objemu 12,5 µl preinkubován na termodesce při 37 °C po dobu 30 minut. K homogenátu stimulovaného vzorku byl po preinkubaci přidán roztoku TCA-BHT o objemu 75 µl, promíchán na vortexu a poté centrifugován při 4000 rpm a 4 °C. Takto připravené vzorky byly pipetovány na mikrolesku společně s 50 µl HCl a 200 µl TRIS TBA. Následně se vzorky vařily na termobloku po dobu 45 minut při teplotě 90 °C. Po ochlazení byl od každého ze vzorků přenesen objem 250 µl na mikrotitrační destičku. Vzniklé zabarvení bylo měřeno spektrofotometricky 10 až 15 minut při 550 až 590 nm.

Kalibrace MDA

Rozpětí kalibrační řady bylo stanoveno na 0,5 až 8 nmol MDA. Standard MDA představoval 10 mM roztok MDA (11,02 mg tetraethoxypropanu rozpuštěného v 5ml 1 % H₂SO₄) naředěný na 100 μM roztok MDA. Dále byla připravena koncentrační řada vyobrazená v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Kalibrace MDA.

nmol.reakci ⁻¹	100μM roztok MDA (μl)	PBS (μl)
0	0	750
0,5	15	735
1	30	720
2	60	690
3	90	660
4	120	630
5	150	600
6	180	570
7	210	540
8	240	510

Vyhodnocení

Vyhodnocení lipidní peroxidace bylo provedeno na základě výpočtu podle kalibrační křivky se standardem MDA. Hodnoty byly vyjádřeny jako nmol TBARS.mg proteinů⁻¹.

3.4.3 Stanovení enzymatické aktivity katalázy (CAT)

Princip metody

Vybraná metoda pro stanovení enzymatické aktivity CAT, využívá schopnosti kataláz rozkládat peroxid vodíku na vodu a kyslík. Zmíněný rozklad je sledován spektrofotometrickým měřením snižující se absorbance směsi vzorku s H₂O₂ při 240 nm (Aebi, 1984).

Chemikálie a reagensie

- Homogenizační pufr 50 mM PP,
- TRIS EDTA pufr (50 mM TRIS pufr s 0,1 mM EDTA),
- 0,09 % H₂O₂ v 50 mM TRIS EDTA pufru.

Postup metody

Homogenáty tkání byly centrifugovány po dobu 30 minut při 15000 rpm a 4 °C, následně bylo stanoveno ředění pro jednotlivé tkáně. Nejprve bylo jednotlivé ředění vyzkoušeno a následně aplikováno na vzorky.

V případě hepatopankreatu bylo zvoleno ředění 10:490, tedy k 10 µl centrifugovaného homogenitu bylo přidáno 490 µl 50 mM homogenizačního pufru. Pro tkáň žaber bylo zvoleno ředění 60:440 a pro sval ředění 50:450. Doplnění vzorků na objem 500 µl proběhlo stejným způsobem jako u vzorků hepatopankreatu s ohledem na příslušné ředění.

Vyředěné a protřepané vzorky byly pipetovány v objemu 50 µl na mikrodestičku společně s 250 µl 0,09 % H₂O₂ v 50 mM TRIS EDTA pufru. Vzorky byly ihned spektrofotometricky měřeny, byla sledována kinetická reakce s pětisekundovými intervaly při 240 nm. Vzorky byly měřeny po třech v triplikátu.

Vyhodnocení

Výsledky vyhodnocování jednotlivých vzorků byly vyjádřeny jako směrnice křivky/minutu, dále je nutné pro konečný výpočet enzymatické aktivity CAT znát molární extinkční koeficient H_2O_2 , který je při 240 nm $39,4 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$. Výsledná hodnota aktivity CAT byla vyjádřena jako směrnice křivky vzorku, od které byla odečtena směrnice křivky blanku a přepočtena dle znázorněné rovnice na $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinů.

$$\text{CAT aktivita} = \frac{\text{směrnice křivky}}{39,4 * (\text{mg}\cdot\text{m}^{-1} \text{protein}) * 10^3}$$

3.4.4 Stanovení enzymatické aktivity superoxid dismutázy (SOD)

Princip metody

Superoxid dismutázy (SOD) řadíme do skupiny metaloenzymů s iontem kovu (Cu, Zn, Mn, Ni) ve své struktuře, ten je zodpovědný za jejich aktivitu. SOD nalézáme ve všech buňkách, nejvíce v játrech jakožto hlavním detoxikačním orgánu. Jejich funkcí je katalýza přeměny reaktivních superoxidových radikálů na molekulový kyslík a peroxid vodíku. S touto funkcí hrají důležitou roli v kontrole hladiny superoxidů v buňce (Ozturk-Urek a Tarhan, 2001).

Zvolená metoda je založena na schopnosti SOD inhibovat reakce řízené superoxidy. Pro produkci superoxidů je využit systém NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) a phenazin methosulfonát (PMS). Produkované superoxidy jsou stanovovány pomocí NBT (nitrobluetetrazolium), který se po reakci se superoxidy mění na stabilní formazanový produkt. Výsledný produkt je poté spektrofotometricky měřen. V rámci této metody stanovujeme pokles přeměny NBT, jelikož reagující SOD se vzniklými superoxidy způsobuje inhibici přeměny NBT na barevný produkt. Metoda je modifikována na mikrodiskové provedení a využívá spektrofotometrické koncovky při 560nm (Ewing a Janero, 1995).

Chemikálie a reagensie

- Homogenizační pufr 50 mM PP (pufr KH_2PO_4 s 1 mM EDTA v destilované vodě, pH 7,4),
- PP pufr (50 mM PP pufr s 0,1 mM EDTA),
- 60 μM NBT v PP pufru,
- 100 μM NADH v 60 μM NBT TMA,
- 35 μM PMS.

Postup metody

Homogenáty tkání byly nejprve centrifugovány po dobu 30 minut při 15000 rpm a 4 °C. Následně bylo do mikrodestičky pipetováno 25 μl zcentrifugovaného homogenátu (25 μl PP pufru), a bylo přidáno 200 μl PP pufru s NADH a NBT. Takto připravené vzorky byly promíchány a následně spektrofotometricky měřeny při 560 nm po dobu 2 minut s dvaceti sekundovými intervaly pro stanovení NBT interní přeměny NBT vzorkem. V dalším cyklu měření bylo ke vzorkům přidáno 25 μl 35 μM PMS pro nastartování reakce. Ihned proběhlo měření reakce při 560 nm po dobu 5 minut s dvaceti sekundovými intervaly. Vzorky byly měřeny po čtyřech v triplikátu.

Vyhodnocení

Molární extinkční koeficient NBT při 560 nm byl 15 000 $\text{M}\cdot\text{c}^{-1}$. V rámci analýzy byla sledována inhibice tetrazolinové soli na formazan. Výsledná hodnota aktivity SOD byla vypočtena dle následujícího vzorce a výsledky byly vyjádřeny v $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinů.

$$SOD \text{ aktivita} = \frac{(\text{směrnice křivky blanku} + \text{směrnice křivky směsi se vzorkem} \cdot \text{min}^{-1}) - \text{směrnice křivky s PMS se vzorkem} \cdot \text{min}^{-1}}{0,6791 * 15000 * (\text{mg} \cdot \text{m}^{-1}) * 10^6}$$

3.5 Statistické vyhodnocení

Data byla vyhodnocena Bartlettovým testem na homogenitu rozptylu. Rozdíly v parametrech ve dnech pozorování během expozice jsme analyzovali pomocí Kruskal-Wallisova testu pro neparametrické posthoc srovnání pro všechny parametry, protože se nepředpokládalo normální rozdělení. Rozdíly mezi testovanými skupinami byly vyhodnoceny pomocí programu Statistica v. 12.0 pro Windows (StatSoft).

4 Výsledky

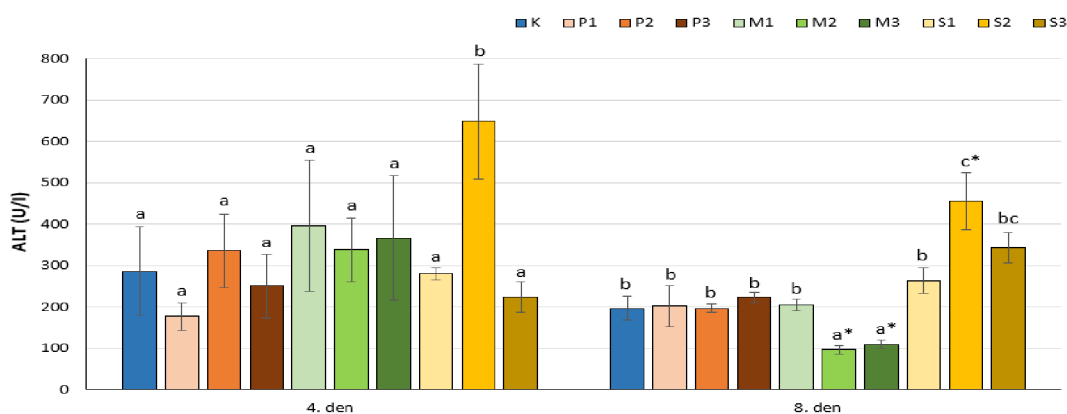
Označení výsledků jednotlivých koncentrací testovaných pesticidů a jejich směsí jsou znázorněny v tabulce č. 1 v této práci (3 Metodika, str. 27). Označení testovaných skupin je u všech grafů shodné.

4.1 Biochemický profil hemolymfy

4.1.1 Alanin aminotransferáza

Výsledky subchronické expozice prometrynu, metazachloru a jejich směsí na aktivitu alanin aminotransferázy (ALT) v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 1.

Během 4denní expozice došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení aktivity ALT pouze u skupiny S2 v porovnání s ostatními testovanými skupinami. Po 8denní expozici došlo ke statisticky významnému ($P < 0,01$) zvýšení aktivity ALT ve skupině S2 v porovnání s ostatními skupinami, kromě skupiny S3. Zvýšené hodnoty aktivity ALT byly pozorovány dále u všech testovaných koncentrací v porovnání se skupinami M2 a M3 po 8denní expozici. V průběhu experimentu byla statisticky významně ($P < 0,01$) snižena aktivita ALT ve skupině M2 a M3 po 8 dnech s porovnáním aktivity v těchto skupinách po 4 dnech expozice.

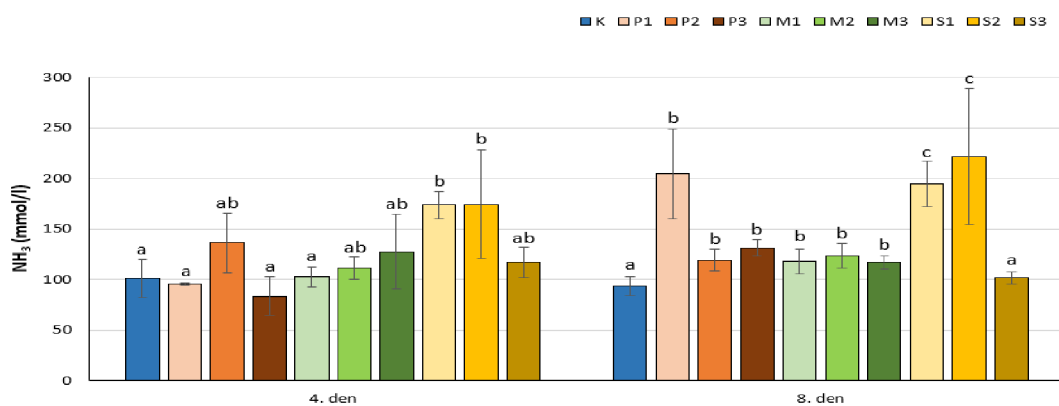


Graf č. 1: Aktivita alanin aminotransferázy (ALT) v hemolymfě raka mramorovaného po subchronické expozici prometrynu, metazachloru a jejich směsí. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, $n=6$; a, b, c = statisticky významné rozdíly mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). * = statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$).

4.1.2 Amoniak

Účinky subchronické expozice prometrynu, metazachloru a jejich směsí na hladinu amoniaku (NH_3) v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 2.

Zatímco v porovnání s kontrolní skupinou byla po 4 dnech expozice pozorována statisticky zvýšená ($P < 0,01$) hladina NH_3 ve skupinách S1 a S2. Po 8 dnech došlo ke zvýšení ($P < 0,01$) hladiny NH_3 u všech skupin kromě kontrolní skupiny a skupiny S3. Přestože lze v grafu č. 2 pozorovat nepatrné rozdíly v hladině NH_3 u skupin P1, P2 a S2 mezi 4denní a 8denní expozicí, nebyly tyto rozdíly statisticky potvrzeny.

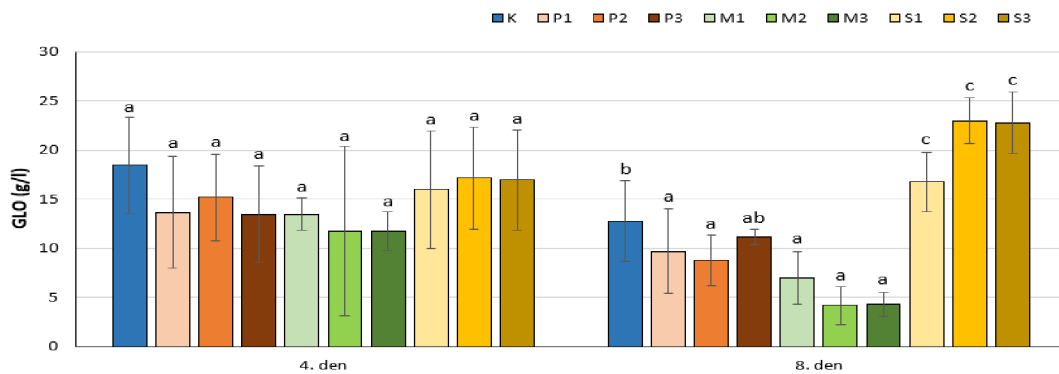


Graf č. 2: Hladina amoniaku (NH_3) v hemolymfě raka mramorovaného po subchronické expozici prometrynu, metazachloru a jejich směsí. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, $n=6$; a, b, c = statisticky významné rozdíly mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$).

4.1.3 Globuliny

Účinky subchronické expozice prometrynu, metazachloru a jejich směsí na hladinu globulinů (GLO) v hemolyfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 3.

Čtyřdenní expozice prometrynu, metazachloru a jejich směsí neměla vliv na hladinu globulinů. Statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení hladiny GLO bylo pozorováno až 8. den expozice u skupiny S1, S2 a S3 oproti ostatním skupinám. Ve skupinách P1, P2 a skupinách koncentrací metazachloru byly zjištěny nejnižší hodnoty hladiny GLO po 8denní expozici. Statisticky významné změny pro skupiny v průběhu času nebyly pozorovány.

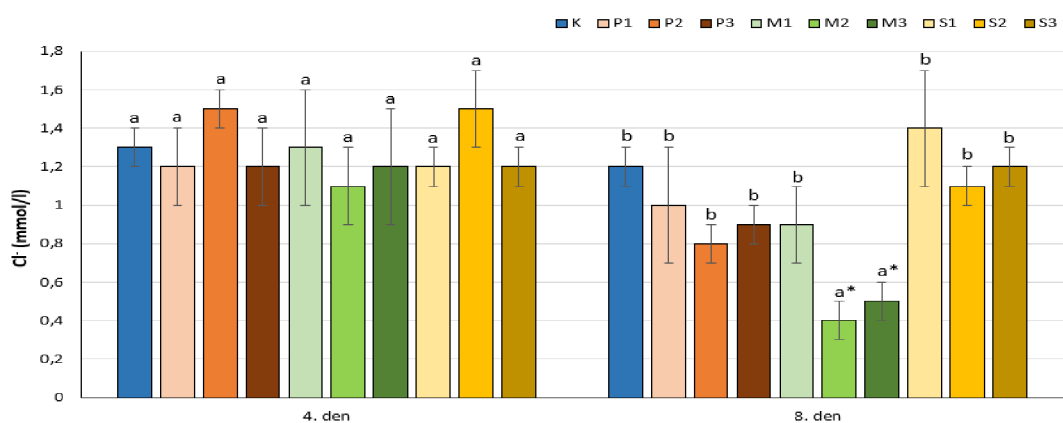


Graf č. 3: Hladina globulinů (GLO) v hemolymfě raka mramorovaného po subchronické expozici prometrynu, metazachloru a jejich směsí. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, $n=6$; a, b, c = statisticky významné rozdíly mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$).

4.1.4 Minerály (Cl⁻, Mg²⁺, Ca²⁺)

Účinky subchronické expozice prometrynu, metazachloru a jejich směsí na hladinu chloridů (Cl⁻) v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 4.

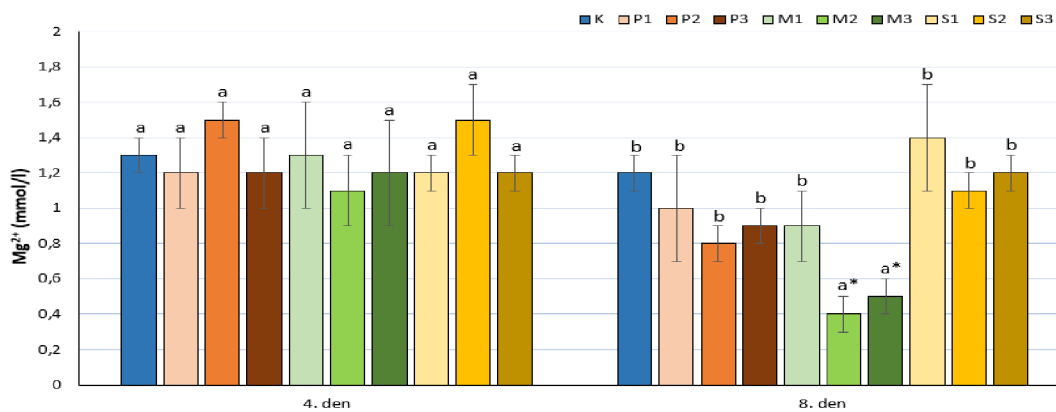
Čtyřdenní expozice prometrynu, metazachloru a jejich směsí neměla vliv na hladinu chloridů. Statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hladiny Cl⁻ bylo zaznamenáno ve skupinách M2 a M3 po 8denní expozici v porovnání s ostatními skupinami a hodnotami zjištěnými po 4denní expozici v těchto skupinách.



Graf č. 4: Hladina chloridů (Cl⁻) v hemolymfě raka mramorovaného po subchronické expozici prometrynu, metazachloru a jejich směsí. Hodnoty uvádějí průměr ± SD, n=6; a, b, c = statisticky významné rozdíly mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). * = statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$).

Hodnoty hladiny hořčíku (Mg^{2+}) po subchronické expozici prometrynu, metazachloru a jejich směsí v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 5.

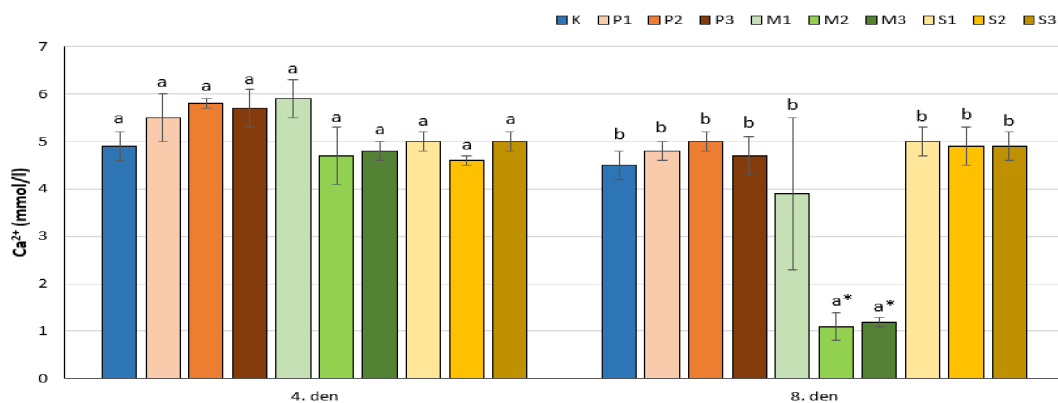
Statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hladiny Mg^{2+} bylo pozorováno pouze u skupin M2 a M3 po 8 dnech expozice v porovnání s ostatními skupinami a hodnotami zjištěnými v těchto skupinách i po 4 dnech expozice.



Graf č. 5: Hladina hořčíku (Mg^{2+}) v hemolymfě raka mramorovaného po subchronické expozici prometrynu, metazachloru a jejich směsí. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, n=6; a, b, c = statisticky významné rozdíly mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). * = statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$).

Hodnoty hladiny vápníku (Ca^{2+}) po subchronické expozici prometrynu, metazachloru a jejich směsí v hemolymfě raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 6.

Hladina Ca^{2+} naměřena u všech testovaných skupin se po 4denní expozici nelišila. Po 8denní expozici byly pozorovány statisticky významně ($P < 0,01$) snížené hladiny Ca^{2+} pouze u skupin M2 a M3 v porovnání s ostatními skupinami. V průběhu testu bylo zaznamenáno statisticky průkazné ($P < 0,01$) snížení hladiny Ca^{2+} ve skupinách M2 a M3 po 8 dnech expozice v porovnání se 4denní expozicí. U ostatních skupin nebyly v průběhu expozice pozorovány statisticky významné změny.



Graf č. 6: Hladina vápníku (Ca^{2+}) v hemolymfě raka mramorovaného po subchronické expozici prometrynu, metazachloru a jejich směsí. Hodnoty uvádějí průměr \pm SD, $n=6$; a, b, c = statisticky významné rozdíly mezi skupinami ve stejném čase ($P < 0,01$). * = statisticky významné rozdíly mezi hodnotami jedné skupiny v průběhu času ($P < 0,01$).

4.2 Oxidační stres a antioxidanty

Účinky subchronické expozice prometrynu, metazachloru a jejich směsí na hladinu lipidní peroxidace (LPO) a aktivitu katalázy (CAT) a superoxid dismutázy (SOD) jsou uvedeny v tabulce č. 3. Jedná se o výsledky analýz z hepatopankreatu, svalu a žaber raka mramorovaného.

Statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hladiny LPO bylo pozorováno v tkáni hepatopankreatu ve skupině M1 ($0,01 \text{ mg.l}^{-1}$) po 8 dnech expozice v porovnání s hodnotami získanými po 4 dnech expozice pro tuto skupinu. U tkáni svalu a žaber nebyly pozorovány statisticky významné změny mezi hodnotami jednotlivých skupin v závislosti na koncentracích, druhu pesticidu i času expozice.

Výsledné hodnoty CAT vykazují statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení aktivity CAT v hepatopankreatu ve skupině M1 po 8 dnech expozice v porovnání s výslednými hodnotami po 4 denní expozici. Statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení aktivity CAT bylo ve skupině P1 ($0,01 \text{ mg.l}^{-1}$) 4. den po expozici v porovnání s ostatními skupinami v tkáni žaber. Statisticky významné ($P < 0,01$) zvýšení aktivity CAT tkáně žaber bylo také ve skupině M3 8. den expozice v porovnání s výsledky po 4 dnech expozice. Analýza vzorků svalstva nepotvrdila statisticky významné změny v aktivitě CAT.

V aktivitě SOD v tkáních hepatopankreatu, svalu a žaber nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny.

Tabulka č. 3: Výsledky lipidní peroxidace (LPO), aktivity katalázy (CAT) a superoxid dismutázy (SOD) v tkáních raka mramorovaného.

	Tkáň	Čas (dny)	Testovaná skupina									
			K	P1	P2	P3	M1	M2	M3	S1	S2	S3
LPO (nmol/mg protein)	Hep.	4	0,014±0,005 ^a	0,014±0,007 ^a	0,012±0,002 ^a	0,015±0,006 ^a	0,017±0,050^a	0,013±0,004 ^a	0,014±0,003 ^a	0,016±0,004 ^a	0,011±0,003 ^a	0,012±0,003 ^a
		8	0,011±0,002 ^a	0,013±0,003 ^a	0,011±0,002 ^a	0,010±0,001 ^a	0,009±0,001^a	0,009±0,001 ^a	0,010±0,001 ^a	0,012±0,004 ^a	0,013±0,004 ^a	0,010±0,001 ^a
	Sval	4	0,006±0,001 ^a	0,007±0,001 ^a	0,007±0,002 ^a	0,007±0,002 ^a	0,007±0,001 ^a	0,007±0,002 ^a	0,007±0,002 ^a	0,006±0,001 ^a	0,007±0,002 ^a	0,006±0,001 ^a
		8	0,006±0,001 ^a	0,007±0,001 ^a	0,007±0,002 ^a	0,006±0,001 ^a	0,006±0,002 ^a	0,008±0,001 ^a	0,007±0,001 ^a	0,007±0,001 ^a	0,006±0,001 ^a	0,007±0,002 ^a
	Žábra	4	0,008±0,001 ^a	0,008±0,001 ^a	0,008±0,002 ^a	0,009±0,001 ^a	0,009±0,001 ^a	0,008±0,001 ^a	0,010±0,002 ^a	0,010±0,001 ^a	0,008±0,001 ^a	0,009±0,001 ^a
		8	0,009±0,001 ^a	0,010±0,001 ^a	0,009±0,001 ^a	0,011±0,002 ^a	0,008±0,002 ^a	0,008±0,001 ^a	0,008±0,001 ^a	0,008±0,001 ^a	0,011±0,004 ^a	0,008±0,001 ^a
CAT (μmol H ₂ O ₂ /min/mg protein)	Hep.	4	0,123±0,09 ^a	0,304±0,224 ^a	0,155±0,221 ^a	0,064±0,071 ^a	0,054±0,035 ^a	0,046±0,011 ^a	0,075±0,094 ^a	0,129±0,132 ^a	0,167±0,140 ^a	0,376±0,146 ^a
		8	0,132±0,167 ^a	0,299±0,208 ^a	0,254±0,194 ^a	0,300±0,224 ^a	0,420±0,271^{ak}	0,231±0,209 ^a	0,100±0,119 ^a	0,281±0,228 ^a	0,133±0,191 ^a	0,145±0,087 ^a
	Sval	4	0,145±0,047 ^a	0,194±0,085 ^a	0,185±0,098 ^a	0,156±0,079 ^a	0,171±0,077 ^a	0,166±0,078 ^a	0,110±0,041 ^a	0,100±0,036 ^a	0,120±0,064 ^a	0,078±0,028 ^a
		8	0,082±0,024 ^a	0,094±0,024 ^a	0,112±0,032 ^a	0,113±0,029 ^a	0,159±0,051 ^a	0,141±0,069 ^a	0,123±0,027 ^a	0,129±0,047 ^a	0,101±0,027 ^a	0,170±0,096 ^a
	Žábra	4	0,484±0,098 ^{ab}	0,535±0,111^b	0,406±0,090 ^{ab}	0,398±0,048 ^{ab}	0,324±0,100 ^{ab}	0,331±0,044 ^{ab}	0,255±0,166^a	0,374±0,065 ^{ab}	0,493±0,143 ^{ab}	0,401±0,183 ^{ab}
		8	0,484±0,121 ^a	0,464±0,097 ^a	0,449±0,151 ^a	0,374±0,151 ^a	0,441±0,166 ^a	0,558±0,167 ^a	0,574±0,110^{ak}	0,517±0,179 ^a	0,421±0,205 ^a	0,319±0,115 ^a
SOD (nmol NBT/min/mg protein)	Hep.	4	0,126±0,074 ^a	0,196±0,066 ^a	0,150±0,036 ^a	0,182±0,050 ^a	0,309±0,132 ^a	0,184±0,064 ^a	0,194±0,070 ^a	0,166±0,109 ^a	0,165±0,113 ^a	0,156±0,031 ^a
		8	0,230±0,067 ^a	0,281±0,091 ^a	0,213±0,057 ^a	0,170±0,089 ^a	0,234±0,029 ^a	0,345±0,463 ^a	0,126±0,039 ^a	0,136±0,051 ^a	0,174±0,067 ^a	0,170±0,047 ^a
	Sval	4	0,601±0,826 ^a	0,283±0,421 ^a	0,125±0,097 ^a	0,222±0,295 ^a	0,739±0,872 ^a	0,223±0,256 ^a	0,115±0,100 ^a	0,092±0,059 ^a	0,096±0,060 ^a	0,074±0,045 ^a
		8	0,087±0,028 ^a	0,102±0,052 ^a	0,079±0,07 ^a	0,295±0,209 ^a	0,233±0,208 ^a	0,294±0,201 ^a	0,120±0,064 ^a	0,304±0,384 ^a	0,381±0,253 ^a	0,475±0,460 ^a
	Žábra	4	0,139±0,210 ^a	0,087±0,083 ^a	0,092±0,078 ^a	0,071±0,037 ^a	0,051±0,050 ^a	0,119±0,110 ^a	0,314±0,584 ^a	0,065±0,069 ^a	0,049±0,065 ^a	0,049±0,054 ^a
		8	0,041±0,042 ^a	0,083±0,043 ^a	0,150±0,134 ^a	0,070±0,063 ^a	0,082±0,035 ^a	0,064±0,069 ^a	0,028±0,037 ^a	0,248±0,456 ^a	0,117±0,123 ^a	0,155±0,192 ^a

5 Diskuse

Cílem bakalářské práce bylo posouzení subletálního vlivu metazachloru, prometrynu a jejich směsí na raky. Modelovým organismem byl rak mramorovaný. Projevy subchronické expozice byly vyhodnocovány na základě biochemického profilu hemolymfy a analýzy antioxidantních biomarkerů společně s biomarkerem oxidačního stresu v hepatopankreatu, svalu a žábrech. Výsledky analýz vzorků přispěly k rozšíření informací o toxických účincích vybraných pesticidů, a především jejich směsí na necílové vodní organismy.

5.1 Biochemický profil hemolymfy

5.1.1 Alanin aminotransferáza

ALT se podílí na přenosu aminoskupin L-alaninu a α -ketoglutarátu. ALT také katalyzuje přeměnu alaninu na pyruvát, který je nezbytný pro tvorbu ATP v mitochondriích (Richard a kol., 2010). Zvýšení hladiny ALT indikuje toxické poškození jater testovaných organismů (Kolářová a Velišek, 2012).

V této studii byla pozorována zvýšená aktivita ALT indikující poškození hepatopankreatu vlivem toxického poškození způsobeného vystavenými pesticidy. Testované směsi pesticidů vykazují synergický účinek na zvýšení hladiny ALT, v případě tohoto biomarkeru směs vykazuje toxičtější účinky nežli pesticidy působící samostatně. Snížení aktivity ALT u skupin M2 a M3 může značit změny v transaminaci aminokyselin v hepatopankreatu.

Banaee a kol. (2019) pozoroval změny aktivity ALT v hemolymfě raků bahenních (*Pontastacus leptodactylus*), kteří byli vystaveni pesticidu glyfosátu (2 a 4 mg.l⁻¹) a chlorpyrifosu (12,5 a 25 μ g.l⁻¹) při 7denní expozici. V této studii bylo zjištěno snížení aktivity ALT po expozici glyfosátu a chlorpyriforu ve všech testovaných koncentracích v porovnání s kontrolou. Studie Bacchetta a kol. (2014) sledovala aktivitu ALT a její změny při subletálním testu toxicity na juvenilech ryb *Piaractus mesopotamicus* vystavených po dobu 96 hodin koncentraci endosulfanu (1,1 μ g.l⁻¹), lambda-cyhalothrinu (0,7 μ g.l⁻¹) a jejich směsí (1,1 + 0,7 μ g.l⁻¹). Zvýšení aktivity ALT bylo pozorováno

v ledvinách ryb po vystavení oběma pesticidům jednotlivě, naopak významné snížení aktivity ALT bylo zaznamenáno v rybích játrech po expozici směsi pesticidů. Synergický účinek testovaných směsí pesticidů na aktivitu ALT byl pozorován na racích bahenních ve studii Banaeeho a kol. (2020). Expozice různých kombinací směsí pesticidů glyfosátu (2,5 a 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$) s chlorpyrifosem (0,4 a 0,8 mg.l^{-1}) způsobily snížení aktivity ALT v hemolymfě raků po 21 dnech.

5.1.2 Amoniak

Amoniak představuje produkt metabolického trávení a metabolismu bílkovin. U raků je z hemolymfy vylučován žábry. Zvýšené hodnoty NH_3 indikují metabolické poruchy Krebsova cyklu nebo selhání funkce jater. (Kolářová a Velíšek, 2012; Kozák a kol., 2013).

Zvýšení hladiny NH_3 v této studii může indikovat poškození funkce hepatopankreatu u testovaných organismů spojeného s nadprodukcí a jeho neefektivním vylučováním z organismu. Směs pesticidů v koncentraci 0,01 a 0,1 mg.l^{-1} prokázaly synergický účinek na zvýšení hladiny NH_3 již po 4denní a následně i po 8denní expozici, to může značit jejich efektivnější negativní vliv na organismus.

Stará a kol. (2021) pozorovala zvýšení hladiny NH_3 v hemolymfě slávky středomořské (*Mytilus galloprovincialis*) po vystavení koncentraci thiaclopridu detekované v životním prostředí (4,5 $\mu\text{l.l}^{-1}$) a jeho 100násobku (450 $\mu\text{l.l}^{-1}$) po expozici 20 dnů.

5.1.3 Globuliny

Zvýšená koncentrace globulinů naznačuje probíhající zánětlivé procesy (Kaplan a Pesce, 1989). Synergický účinek testovaných směsí na zvýšení hladiny globulinů indikuje zánětlivé procesy zapříčiněné toxickým účinkem vybraných pesticidů. V případě globulinů vykazovaly směsi pesticidů toxičtější působení nežli pesticidy testované individuálně. Snížení hladiny GLO může naznačovat poruchy syntézy proteinů v důsledku nesprávné funkce hepatopankreatu (Kolářová a Velíšek, 2012).

Strouhová (2020) pozorovala snížení hladiny GLO v hemolymfě raka mramorovaného. Snížení bylo pozorováno u raků vystavených 10 a 20denní expozici

Mospilanu (2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a 20denní expozici acetamipridu (0,8 a 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$) oproti kontrole, 10denní depurace prokázala nízkou hladinu GLO u Mospilanu (27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$).

5.1.4 Chloridy (Cl^-)

Bylo pozorováno snížení hladiny Cl^- ve skupině M2 a M3 po 8 dnech expozice, jednalo se o významnou změnu v porovnání s ostatními testovanými skupinami i skupinami porovnanými napříč časy expozice.

Chloridy se společně se sodíkovými ionty nacházejí v buněčné cytoplazmě, dále se vyskytují v extracelulárních tekutinách, zde mají chloridy hlavní funkci udržování osmotického tlaku a objemu tekutin. Další funkcí je udržování acidobazické rovnováhy a iontové bilance, nedostatek Cl^- způsobuje poruchy funkcí metabolických procesů (Müllerová, 2003; Velíšek a Hajšlová, 2009; Stránský a Kohout, 2011).

5.1.5 Hořčík (Mg^{2+})

V organismu zastává Mg^{2+} funkci při aktivaci enzymů katabolických i anabolických procesů. Hořčík je dále součástí syntézy a destrukce acetylcholinu regulujícího přenos elektrických impulsů na neuromuskulární spojení, při jeho nedostatku je negativně postížen energetický metabolismus celého organismu (Brody, 1999; Kolářová a Velíšek, 2012). Negativní účinek metazachloru (0,1 a 1 mg.l^{-1}) mohl mít negativní vliv na metabolické poruchy a poruchy homeostázy testovaných organismů.

Studie Staré a kol. (2021) zaznamenala zvýšení hladiny Mg^{2+} u testovaných jedinců slávky středomořské vystavených koncentracím thiaclopridu 450 $\mu\text{g.l}^{-1}$ po 10denní expozici. Snížení hladiny Mg^{2+} v hemolymfě raka mramorovaného pozorovala Strouhová (2020). Raci byly vystaveny koncentracím Mospilanu (2,71 a 27,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a acetamipridu (0,8 a 8,0 $\mu\text{g.l}^{-1}$), ke snížení hladiny Mg^{2+} došlo u koncentrací Mospilanu po 10denní expozici v porovnání s kontrolou, 20denní expozice prokázala snížení hladiny Mg^{2+} u koncentrací obou testovaných látek v porovnání s kontrolou.

5.1.6 Vápník (Ca²⁺)

Vápník je esenciální prvek nacházející se v mnoha tělních systémech. Nalezneme ho ve složení skeletu, k dalším systémům náleží enzymatická aktivita, krevní srážlivost, svalová aktivita a osmoregulace. Snížení hladiny Ca²⁺ indikuje defekty metabolismu Ca, onemocnění ledvin až onemocnění kosterní soustavy (Kolářová a Velíšek, 2012). Koncentrace metazachloru (0,1 a 1 mg.l⁻¹) mohly mít v organismu negativní efekt na metabolismus a funkce Ca²⁺ výše jmenované.

Stará a kol. (2021) sledovali zvýšení hladiny Ca²⁺ v hemolymfě slávky středomořské v testovaných koncentracích thiaclopridu 0,45 a 450 µg.l⁻¹ po 10 dnech expozice v porovnání s kontrolou. Riaz -ul-Haq a kol. (2018) pozorovali změny hladiny Ca²⁺ na labeu avanském (*Labeo rohita*) po vystavení subletální koncentraci diafenthiuronu (7,5 µg.l⁻¹) při krátkodobé (2, 4 a 8 dnů) a dlouhodobé experimentální fázi (16, 32 a 64 dnů). Zvýšení hladiny Ca²⁺ bylo pozorováno po 2denní a 16denní expozici v porovnání s kontrolou.

Z biochemického profilu hemolymfy raka mramorovaného byl zjištěn synergický účinek směsí pesticidů v případě stanovení ALT, GLO a NH₃. V těchto analýzách se prokázal toxičtější vliv vytvořených směsí v porovnání s účinky koncentrací pesticidů testovaných individuálně. Výsledky analýz poukázaly na probíhající toxické působení pesticidů na biomarkery hemolymfy poukazující zejména na poškození hepatopankreatu, se kterým je spojena široká škála dalších negativních důsledků. Při zaměření na vliv jednotlivých pesticidů byly změny nejvíce sledovány u koncentrací metazachloru (0,1 a 1 mg.l⁻¹).

5.2 Antioxidační biomarkery

Pro analýzu antioxidačních biomarkerů byly vybrány antioxidační obranné enzymy kataláza (CAT) a superoxid dismutáza (SOD).

5.2.1 Kataláza

Přestože v této práci byl vliv na aktivitu CAT pozorován pouze u prometrynu v nejnižších koncentracích ($0,01 \text{ mg.l}^{-1}$) v tkáni žaber, Stará a kol. (2014) pozorovali změny aktivity CAT v hepatopankreatu a svalu u raka červeného (*Procambarus clarkii*), který byl vystaven koncentracím prometrynu ($0,51 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$, $0,144$ a $1,44 \text{ mg.l}^{-1}$) po dobu 25 dnů. Snížení aktivity CAT bylo prokázáno po 11 dnech u koncentrací $0,144$ a $1,44 \text{ mg.l}^{-1}$, po 25 dnech došlo ke snížení aktivity CAT u všech testovaných koncentrací. Stará a kol. (2013) v chronickém testu na plůdku kapra obecného pozorovali snížení aktivity CAT v játrech a zvýšení aktivity CAT ve střevě v koncentraci prometrynu $80 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ po 60 dnech expozice. Vliv prometrynu na aktivitu CAT ve vzorcích coelomové tekutiny mořské okurky (*Apostichopus japonicus*) byl prokázán ve studii Zenga a kol. (2021) u střední (100 mg. kg^{-1}) a vysoké koncentrace (2000 mg.kg^{-1}) prometrynu, které byly podávány po dobu 30 dnů v peletovém krmivu. Testované organismy, které byly krmeny peletami se zmíněnými koncentracemi, vykazovaly významné snížení aktivity CAT.

Oproti zmíněným studiím výsledky této studie vykazují v indikovaných změnách zvýšení aktivity CAT, což naznačuje aktivní antioxidační obranu proti volným radikálům, které stojí za vznikem oxidačního stresu. I přesto, že v této práci byly použity koncentrace podobné některým ze zmíněných prací, hlavním rozdílem je volený modelový organismus a doba expozice, po kterou byly testované organismy prometrynu vystaveny. Po dlouhodobém vystavení látkám produkujícím volné radikály přestává být antioxidační obrana organismu (zde CAT) dostačující, tento jev lze v analýzách sledovat jejich sníženou aktivitou. Jedná se o možné důvody absolutně odlišných výsledků mezi touto studií a studii zmíněnými.

U raků vystavených koncentracím metazachloru byly pozorované změny v aktivitě CAT potvrzeny pouze u skupin M1 v hepatopankreatu a M3 v žábrech. Tkáň svaloviny nedisponovala žádnými změnami u testovaných skupin, důvodem může být krátká doba expozice. Velíšek a kol. (2020) pozoroval snížení aktivity CAT u koncentrace metazachloru $22 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ a metazachloru OA v koncentraci $3,2$ a $22 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ po 40 dnech expozice v homogenátu juvenilů raka mramorovaného. Zásadní roly v rozdílech mezi touto a předloženou studií mohou být odlišné koncentrace a doba expozice pesticidu.

Tato studie neprokázala vliv testovaných skupin pesticidů na aktivitu CAT v synergistickém nebo antagonistickém směru. Synergistický účinek na aktivitu CAT byl potvrzen ve studii Banaeeho a kol. (2020), který studoval vliv různých směsí pesticidů glyfosát ($2,5$ a $5 \mu\text{g.l}^{-1}$) a chlorpyrifos ($0,4$ a $0,8 \mu\text{g.l}^{-1}$) na raka bahenního v expozici 21 dnů. V této studii došlo vlivem směsí pesticidů ke snížení aktivity CAT. Shukla a kol. (2017) pozoroval synergické zvýšení aktivity CAT směsí pesticidů imidaclopridu ($13,75 \text{ mg.l}^{-1}$), dichlorvosu ($7,5 \text{ mg.l}^{-1}$) a atrazinu ($1,5 \text{ mg.l}^{-1}$) po 24hodinové expozici na daniu pruhovaném (*Danio rerio*) v játrech, ledvinách a mozku v porovnání s kontrolou a jednotlivě testovanými pesticidy. Změny aktivity CAT byly také pozorovány v práci Changa a kol. (2020) pro směsí pesticidů o koncentracích imidaclopridu ($0,213$, $0,426$ a $2,13 \text{ mg.l}^{-1}$), acetochloru ($0,005$, $0,009$ a $0,047 \text{ mg.l}^{-1}$) a teboconazolu ($0,025$, $0,050$ a $0,251 \text{ mg.l}^{-1}$) ve všech vytvořených směsích z různých koncentrací v porovnání s individuálně testovanými pesticidy po 14 a 21denní expozici na daniu pruhovaném v játrech.

5.2.2 Superoxid dismutáza

V této studii nebyly zaznamenány žádné významné změny v aktivitě SOD u všech testovaných látek a tkání. Za důvod lze pokládat dobu expozice, která byla výrazně kratší než u zmiňovaných testů a zároveň i nižší dávky testovaných pesticidů.

Studie Staré a kol. (2014) zjistila snížení aktivity SOD po expozici prometrynu ($0,144$ a $1,44 \text{ mg.l}^{-1}$) v hepatopankreatu a svalu raka červeného po 11 i 25 dnech expozice. Snížení aktivity SOD, v porovnání s kontrolou, bylo také pozorováno ve studii Zenga a kol. (2021) při vystavení mořské okurky krmivu s nízkým obsahem prometrynu ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$) po dobu 30 dnů. Studie Staré a kol. (2013) prokázala změny aktivity SOD u plůdku kapra obecného vystavenému koncentracím prometrynu $0,51$, 8 a $80 \mu\text{g.l}^{-1}$ v mozku, žábrech, játrech, svalu a střevě v průběhu 60denního testu. Studie Mosiichuka a kol. (2015) o vlivu expozice Gesagardu v koncentracích $0,2$, 1 a 5 mg.l^{-1} (odpovídá $0,1$, $0,5$ a $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ prometrynu) na karasy zlaté (*Carassius auratus*) po zjistila zvýšení aktivity SOD v játrech o 28% (5 mg.l^{-1}) a ledvinách o 36% ($0,2 \text{ mg.l}^{-1}$) a 47% (1 mg.l^{-1}) po 96 hodinové expozici.

Studie Velíška a kol. (2020) zaznamenala snížení aktivity SOD v homogenátu juvenilů raka mramorovaného u testované koncentrace metazachloru $22 \mu\text{g.l}^{-1}$ a testovaných koncentrací metazachloru OA $3,2$ a $22 \mu\text{g.l}^{-1}$ v porovnání s kontrolou po 40 dnech expozice. Z práce vyplývá že na antioxidační biomarkery nají mnohem větší vliv vzniklé metabolity pesticidu než pesticid samotný.

Výzkum Changa a kol. (2020) zaměřený na vliv směsi pesticidu imidaclopridu ($0,213$, $0,426$ a $2,13 \text{ mg.l}^{-1}$), acetochloru ($0,005$, $0,009$ a $0,047 \text{ mg.l}^{-1}$) a teboconazolu ($0,025$, $0,050$ a $0,251 \text{ mg.l}^{-1}$) na danio pruhované pozoroval v játrech změny aktivity SOD v porovnání s výsledky analýz pesticidů testovaných individuálně po 21 a 28 dnech expozice. Zvýšení aktivity SOD bylo zjištěno ve studii Shukla a kol. (2017) pro směs pesticidů imidaclopridu ($13,75 \text{ mg.l}^{-1}$), dichlorvosu ($7,5 \text{ mg.l}^{-1}$) a atrazinu ($1,5 \text{ mg.l}^{-1}$) po 24hodinové expozici na daníu pruhovaném v játrech v porovnání s kontrolou. V mozku bylo po 24hodinové expozici pozorováno zvýšení aktivity SOD v porovnání s kontrolou a pesticidy testovanými individuálně.

5.3 Biomarker oxidačního stresu

Snížení hladiny LPO bylo pozorováno pouze ve skupině M1 ($0,01 \text{ mg.l}^{-1}$) v tkáni hepatopankreatu po 8 dnech expozice v porovnání s výsledky analýzy po 4 dnech expozice u této skupiny. Tkáň svalů a žaber neprokázaly významné změny v hladině LPO v závislosti na koncentracích, testovaném pesticidu i době expozice.

Výzkum Mosiichuka a kol. (2015) studoval expozici Gesagardu v koncentracích $0,2$, 1 a 5 mg.l^{-1} (odpovídá $0,1$, $0,5$ a $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ prometrynu) u karasů zlatých při 96hodinové expozici. Studie prokázala snížení hladiny LPO v játrech u koncentrací Gesagardu $0,2$ a 5 mg.l^{-1} o 27 a 29 %. Nejvýznamnější změny v hladině LPO byly pozorovány v ledvinách, kde došlo k poklesu o 35 a 43 % u koncentrací Gesagardu 1 a 5 mg.l^{-1} . Oxidačním stresem po expozici prometrynu u vodních organismů se zabývaly i další studie (Stará a kol., 2012, 2013, 2014), v těchto studiích však nebyl prokázán vliv prometrynu na LPO.

Vliv metazachloru na oxidační stres u necílových vodních organismů popisuje pouze studie Velíška a kol., (2020). Studie byla zaměřena na vliv metazachloru v koncentracích $3,2$ a $22 \mu\text{g.l}^{-1}$ na ranná vývojová stádia raka mramorovaného. V této studii na konci

experimentu po 40 dnech expozice, nebyly zjištěny změny v hladině LPO v testovaných koncentracích.

Synergický účinek směsi pesticidů na oxidační stres byl pozorován ve studii Banaeeho a kol. (2020) u raků bahenních. Kombinace různých koncentrací pesticidu glyfosátu (2,5 a 5 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a chlorpyrifosu (0,4 a 0,8 mg.l^{-1}) způsobily zvýšení LPO v hemolymfě raků po 21 dnech expozice oproti kontrolním rakům. Chang a kol. (2020) sledoval projevy oxidačního stresu pomocí hladiny MDA v játrech dania pruhovaného vystaveného směsi pesticidů. Kombinace nízkých koncentrací pesticidů imidaclopridu (0,213 mg.l^{-1}), acetochloru (0,005 mg.l^{-1}) a tebuconazolu (0,025 mg.l^{-1}) způsobila zvýšení hladiny MDA v porovnání s jednotlivými expozicemi testovaných pesticidů po 7 a 14 dnech. Shukla a kol. (2017) ve své studii pozoroval synergický účinek u testované směsi pesticidů (imidacloprid 13,75 mg.l^{-1} + dichlorvos 7,5 mg.l^{-1} + atrazin 1,5 mg.l^{-1}), kdy došlo ke zvýšení hladiny LPO v játrech, ledvinách a mozku dania pruhovaného po 24hodinové expozici v porovnání s kontrolou a jednotlivými pesticidy. Samotné koncentrace testovaných pesticidů imidaclopridu a dichlorvosu vedly ke zvýšení LPO v játrech, a u dichlorvosu v ledvinách oproti kontrole. Bacchetta a kol. (2014) ve své studii popisuje vliv pesticidů endosulfanu (1,1 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a lambda-cyhalothrinu (0,7 $\mu\text{g.l}^{-1}$) a jejich směsí na hladinu LPO v tkáních ryb *Piaractus mesopotamicus* po akutní 96h expozici. Kombinace těchto pesticidů způsobila synergický účinek a vedla tak k významnému zvýšení hladiny LPO v játrech a ledvinách v porovnání s kontrolou a samotnými pesticidy. V tkáni mozku ryb bylo zjištěno zvýšení hladiny LPO ve směsi pesticidů i jednotlivých pesticidech.

Ačkoliv existují studie, které popisují synergické účinky různých kombinací pesticidů na necílové vodní organismy, v této studii nebylo prokázáno, že testované směsi pesticidů v daných koncentracích vedou k narušení antioxidační rovnováhy a ke zvýšení hladiny volných radikálů majících vliv na projev oxidačního stresu u testovaných organismů. Výsledky testované koncentrace metazachloru (0,01 mg.l^{-1}) naznačují vyšší negativní dopad na projev oxidačního stresu u koncentrací pesticidů testovaných samostatně, nežli je tomu u vzniklých testovaných směsí. Zaznamenané snížení bylo pozorováno u tkáně hepatopankreatu, který představuje hlavní detoxikační orgán. Změny byly předpokládány také u žaber, jakožto prvotního orgánu reagujícího na chemismus vnějšího prostředí. Za příčinu lze považovat dobu expozice testu, která představovala pouze 8 dnů. Tkáně

svaloviny obecně nevykazují přílišné změny, a ani zde nebyly pozorovány. Lze i říci, že v této studii antioxidační obranné mechanismy byly schopné udržet redoxní rovnováhu v tvorbě ROS a předešlo se tak negativnímu působení pesticidů a jejich směsí před oxidačním poškozením.

6 Závěr

V práci byl posuzován subchronický vliv triazinového herbicidu prometrynu, zástupce chloracetamidu metazachloru a směsí těchto dvou pesticidů na raka mramorovaného. K posouzení vlivu testovaných látek byl zvolen subchronický test toxicity. Test celkově trval 8 dní, raci byli vystaveni třem koncentracím prometrynu i metazachloru (0,01, 0,1, 1 mg.l⁻¹). Směsi testovaných látek byly vytvořeny smísením zmíněných pesticidů v testovaných koncentracích, smíseny byly vždy shodné koncentrace.

Z raků byly po 4 a 8 dnech odebrány tkáně hepatopankreatu, žaber a svaloviny, dále byla odebrána hemolymfa. Ze vzorků tkání byly stanoveny aktivity antioxidantních biomarkerů a biomarker oxidačního stresu. Hemolymfa byla použita pro analýzu biochemického profilu, z výsledků byly v práci zmíněny látky důležité pro metabolismus raka vykazující nejvýznamnější rozdíly.

Studie ve svých výsledcích prokázala výraznější změny v biochemickém profilu hemolymfy po vystavení raka koncentracím metazachloru. Změny po působení směsí pesticidů byly nejvíce pozorovány při analýze hladiny GLO, ALT a NH₃, kdy byl pozorován synergický účinek. Při analýze antioxidantních biomarkerů byly zjištěny změny v aktivitě CAT u testovaných koncentrací metazachloru v hepatopankreatu a žábrech a koncentrací prometrynu v tkáni žaber. Analýza aktivity SOD neprokázala významné změny u žádné z testovaných skupin. Analýza hladiny LPO prokázala změny pouze v hepatopankreatu vystavenému metazachloru.

Tato práce poukazuje na toxický účinek individuálně testovaných koncentrací prometrynu, metazachloru a jejich směsí na raka mramorovaného. Ze studie vyplývá, že testované směsi pesticidů neprojeví synergické nebo antagonistické ovlivnění aktivity antioxidantních biomarkerů a biomarkeru oxidačního stresu. Projevy vlivu směsí byly zaznamenány pouze v biochemickém profilu hemolymfy. Z této a dalších zmíněných studií jsou patrné významné rozdíly v působení vybraných pesticidů v závislosti na zvolené koncentraci a době expozice. Vyšší toxicita byla v této studii prokázána v případě metazachloru v individuální expozici. Získané výsledky bakalářské práce poslouží k rozšíření informací o výsledných vlivech jednotlivých pesticidů a jejich směsí na necílové vodní organismy.

7 Přehled použité literatury

- ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists), 1986. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indecs. Cincinnati, 44 pp.
- Aebi, S. K., 2005. Catalase Invitro. *Methods in Enzymology* 105, pp. 121-126.
- Agarwal, S. K., 2005. Water Pollution. APH Publishing Corporation, New Dehli, pp. 1-2. ISBN 81-7648-832-1.
- Alavanja, M. C., Ross, M. K., Bonner, M. R., 2013. increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA: Cancer Journal for Clinicians* 63, 120-142.
- Amiard-Triquet, C., Amiard J. C., Rainbow, P. S., 2012. Ecological biomarkers: Indicators of ecotoxicological effect. Taylor and Francis Group, CRC Press, Boca Raton.
- Appleby, A. P., Muller, F., Carpy, S., 2005. Weed Control. In: Bailey, J. E., Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Willey-VCH, Weinheim.
- Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M. J., Cazenave, J., 2014. Combined toxicological effect of pesticides: A fish multi-biomarker approach. *Ecological Indicators* 36, 532-538.
- Ballarin, L., Dalloro, M., Bertotto, D., Libertini, A., Francescon, A., Barbaro, A., 2004. Haematological parameters in *Umbra cirrosa* (Teleostei, Sciaenidae): a comparison between diploid and triploid specimens. *Comparative Biochemistry and Physiology* 138, 45-51.
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Gholamhosseini, A., Heidarieh, H., Fereidouni, M. S., 2019. Acute axposure to chlorpyrifos and glyphosate induces changes in hemolymph biochemical parameters in the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Comparative Biochemistry and Physiology (C 222)*, 145-155.
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A., Rakhshaninejad, M., 2020. Combined effect of exposure to sub-lethal concentration of the insecticide chlorpyrifos and the herbicide glyphosate on the biochemical changes in the freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Ecotoxicology* 29, 1500-1515.
- Baran, N., Gourcy, L., 2013. Sorption and mineralization of S-metolachlor and its ionic metabolites in soils and vadose zone solids: consequences on groundwater quality in an alluvial aquifer (Ain Plain, France). *Journal of Contaminant Hydrology* 154, 20-28.

- Böger, P., Matthes, B., Schmalfuß, J., 2000. Review: Towards the primary target of chloracetamides – new findings pave the way. *Pest Management Science* 56, 497-508.
- Böger, P., Matthes, B., 2002. Inhibitors of biosynthesis of very-long-chain fatty acids. In: Böger, P., Wakabayashi, K., Hirai, K. (Eds.), *Herbicide classes in development*. Springer, Berlin, pp. 117-137.
- Böger, P., 2003. Mode of action for chloracetamides and functionally related compounds. *Journal of Pesticide Science*. 24, 324-329.
- Bradford, M. M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Breckenridge, C. B., Eldridge, J. C., Stevens, J. T., Simpkins, J., 2010. Symmetrical triazine herbicides: A review of regulatory toxicity endpoints. In: Krieger, R. (Eds.), *Haye's handbook of pesticide toxicology*. Academic Press Inc., San Diego, pp. 1711-1723.
- Brody, T., 1999. *Nutritional biochemistry*, 2 edice, Berkeley: Academic Press, Kalifornie, 1006 pp.
- CAC (Codex Alimentarius Commission), 2013. [online]. [cit. 25.2.2022]. Dostupné na WWW: <http://www.codexalimentarius.org/about-codex/en/>.
- Caquet, T., Roucaute, M., Mazzella, N., Delmas, F., Madigou, C., Farcy, E., 2013. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environmental Science and Pollution Research* 20, 651-666.
- Carson, R., 1962. *Silent Spring*. Houghton Mifflin Co., Boston, USA, 16 pp.
- Chang, Y., Mao, L., Zhang, L., Zhang, Y., Jiang, H., 2020. Combined toxicity of imidacloprid, acetochlor, and tebuconazole to zebrafish (*Danio rerio*): acute toxicity and hepatotoxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 1026-10295.
- Chen, Z., Chen, Y., Vymazal, J., Kule, L., Koželuh, M., 2017. *Science of the Total Environment* 557, 386-394.
- Cremlyn, R. J. W., 1978. *Pesticides: preparation and mode of action*. Wiley, Chichester, UK.
- D'Souza U. J. A., 2017. Pesticide toxicity and oxidative stress: a review. *Borneo Journal of Medical Sciences* 11, 9-19.
- Das, P. C., McElroy, W. K., Cooper, R. L., 2000. Differential modulation of catecholamines by chlorotriazine herbicides in pheochromocytoma (PC12) cells in vitro. *Toxicological Sciences* 56, 324-331.

- de Zwart, L. L., Meerman, J. H., Commandeur, J. N., Vermeulen, N. P., 1999. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine* 26, 202-226.
- Di Giulio, R. T., Hinton, D. E., 2008. *The toxicology of fishes*. Taylor and Francis Group, CRC Press, Boca Raton.
- Dorn, N., Trexler, J. C., 2007. Crayfish assemblage shifts in a large drought-prone wetland: the roles of hydrology and competition. *Freshwater Biology* 52, 2399-2411.
- Dorn, N. J., Volin, J. C., 2009. Resistance of crayfish (*Procambarus* spp.) populations to wetland drying depends on species and substrate. *Journal of the North American Benthological Society* 28, 766-777.
- Ebert, E., 1980. Herbicidal effect of metolachlor 2-chloro-N-[2-ethyl-6-methylphenyl]-N-[2-methoxy-1-methylethyl] acetamide) at the cellular level of sorghum. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 13, 227-236.
- ECHA (European Chemicals Agency), 2022. Substance Infocard – metazachlor [online]. European Chemical Agency [cit. 28.2.2022]. Dostupné na WWW: <https://echa.europa.eu/cs/substance-information/-/substanceinfo/100.060.511>.
- Erickson, W., Turner, L., 2002. Prometryn analysis of risk to endangered and threatened Salomon and Steelhead. Environmental Field Branch, Office of Pesticide Programs.
- Ewing, J. F., Janero, D. R., 1995. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Analytical Biochemistry* 232, 243-248.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 1999. FAO specification and evaluations for plant protection products: Metazachlor [online]. [cit. 9. 3. 2022], Dostupné na WWW: https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/metazach.pdf.
- Faulkes, Z., 2010. The spread of the parthenogenetic marbled crayfish, Marmorkrebs (*Procambarus* sp.), in the North American pet trade. *Aquatic Invasions* 5, 447-450.
- Fitzmaier, K. M., Geiger, J. G., Van Den Avyle, M. J., 1982. Effect of chronic exposure to simazine on the cladoceran (*Daphnia pulex*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11, 603-609.
- Fomičev, N. I., 1986. Rečnoj rak. Metody issledovania. Izd, Nauka, Leningrad.

- Gallardo, M. A., Sala-Rabanal, M., Ibarz, A., Padros, F., Blasco, J., Fernandez-Borra, J., Sanchez, J., 2003. Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 223, 15-27.
- Granby, K., Petersen, A., Herrmann, S. S., Poulsen, M. E., 2008. Levels of pesticides in food and food safety aspects. In: Tadeo, J. L. (Eds.), *Analysis of pesticides in food and environmental samples*. Taylor and Francis Group, CRC Press, Boca Raton, pp. 287-318.
- Hajšlová, J., Kocourek, V., 2004. *Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka*. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha, 35 s.
- Haluzová, I., Modrá, H., Bláhová, J., Maršálek, P., Šíroká, Z., Groch, L., 2010. Effect of subchronic exposure to Spartakus (prochloraz) on common carp *Cyprinus carpio*. *Neuroendocrinology Letters* 31, 105-113.
- Harrison, R. M., 2001. *Pollution: Causes, Effects and Control*. Royal Society of Chemistry.
- Hartley, D., Kidd, H., 1987. *The agrochemicals handbook*. The Royal Society of Chemistry, Lechworth, pp. 340A.
- Hendrix, A. N., Loftus, W. F., 2000. Distribution and relative abundance of the clayfishes *Procambarus alleni* (Faxon) and *P. Fallax* (Hagen) in southern Florida. *Wetlands* 20, 194-199.
- Hobbs, H. H., Jr., 1981. The clayfishes of Georgia. *Smithsonian Contributions to Zoology* 318, VII + pp. 549.
- Hobbs, H. H., Jr., 1989. An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 166, III + pp. 236.
- 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 Clayfish in Europe*, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, pp. 49-130.
- Hostovský, M., Bláhová, J., Plhalová, L., Kopřiva, V., Svobodová, Z., 2014. Effect of the exposure on fish to triazine herbicides. *Neuroendocrinology Letters* 35, 4-9.
- Hudson, R. H., Tucker, R. K., Haegele, M. A., 1984. *Handbook of toxicity of pesticides n wildlife*. USDI Fish and Wildlife Service Resource, Washington, USA, 136 pp.

- Hvězdová, M., Kobusová, P., Košíková, M., Scherr, K. E., Šimek, Z., Brodský, L., Škulcová, L., Sánka, M., Svobodová, Z., Krkošková, L., Vašíčková, J., Neuwirthová, N., Bielská, L., Hofman, J., 2018. Currently and recently used pesticides in Central European arabe soils. *Science of the Total Environment* 613, 361-370.
- Jiang, L., Ma, L., Sui, Y., Han, S. Q., Yang, H., 2011. Mobilization and plant accumulation of prometryne in soil by two different sources of organic matter. *Journal of Environmental Monitoring* 13, 1935-1943.
- Jimenez, S. A., Faulkes, Z., 2010. Establishment and care of a laboratory colony of parthenogenetic marbled crayfish, Marmorkrebs. *Invertebrate Rearing* 1, 1-18.
- Johnson, W. W., Finley, M. T., 1980. Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Fish and Wildlife Service 137, Washington: U. S. Government Printing Office.
- Jones, J. P. G., Andriahajaina, F. B., Hockley, N. J., Crandall, K. A., Ravoahangimalala, O. R., 2007. The ecology and conservation status of Madagascar's endemic freshwater crayfish (Parastacidae, Astacoides). *Freshwater Biology* 52, 1820-1833.
- Kaldre, K., Maženin, A., Paaver, T., 2012. Marbled crayfish (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) resistance and survival rates and low (under 5°C) temperatures during winter period. Book of abstracts, International Association of Astacology 19, Innsbruck, Rakousko, 75 pp.
- Kamrin, M. A., 1997. Pesticide Profiles. Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- Kaplan, L. A., Pesce, A. J., 1989. Clinical Chemistry. CV Mosby Company, St. Louis, 186 s.
- Kawai, T., Scholtz, G., Morioka, S., Ramanamandimby, F., Lukhaup, C., Hanamura, Y., 2009. Parthenogenetic alien crayfish (Decapoda: Cambaridae) spreading in Madagascar. *Journal of Crustacean Biology* 29, 562-567.
- Kegley, S. E., Hill, B. R., Orme, S., Choi, A. H., 2010. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America. Pesticide Action Network, Oakland.
- Keith, I. H., 1997. Environmental endocrine disruptors. John Wiley and Sons, New York, 1232 pp.
- Kočí, V., Mocová, K., 2009. Ekotoxikologie pro chemiky. VŠCHT, Praha, 64 s.
- Kolářová, J., Velíšek, J., 2012. Stanovení a vyhodnocení biochemického profilu krve ryb. Metodika č. 135. Edice Metodik (Technologická řada). FROV JU, Vodňany, s. 7-42.
- Konstantinou, I. K., Hela, D. G., Albanis, T. A., 2006. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part 1. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution* 141, 555-570.

- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková, E., Polícar, T., 2013. Biologie a chov raků. FROV JU, Vodňany, s 111, 173, 176.
- Králová, M., Levchuc, I., Kašpárek, V., Sillanpaa, M., Cihrář, J., 2015. Influence of synthesis conditions on physical properties of land-doped titania for photocatalytic decomposition of metazachlor. *Chinese Journal of Catalysis* 36, 1679-1684.
- Küster, A., Altenburger, 2007. Development and validation of a new fluorescence-based bioassay for aquatic macrophyte species. *Chemosphere* 67, 194-201.
- Landis, W. G., Yu, M. H., 2003. Introduction to environmental toxicology impacts of chemicals upon ecological ecosystems. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton.
- LeBaron, H. M., McFarland, J. E., Simoneaux, B. J., Ebert, E., 1988. Metolachlor. In: *Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action* (Kearney, P. C., Kaufman, D. D., eds.). Marcel, Dekker, New York, pp. 335-382.
- LeBaron, H. M., McFarland, J., Burnside, O. C., 2008. The triazine herbicides. 50 years revolutionizing agriculture. Elsevier Science, Amsterdam, 600 pp.
- Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J., Green, A., 2016. An international database for pesticide risk assessment and management. *Human and Ecological Risk Assessment* 22, 1050-1064.
- Livingstone, D. R., Martinez, P. G., Winston, G. W., 1989. Menadione-stimulated oxyradical formation in digestive gland musomes of the common mussel, *Mytilus edulis L.* *Aquatic Toxicology* 15, 213-236.
- Lukhaup, C., 2001. *Procambarus* sp. – Der Marmor krebs. *Aquaristik aktuell* 7-8, 48-51.
- Manahan, S. E., 2005. Environmental chemistry. Taylor and Francis Group, CRC Press, Boca Raton.
- Maršálek, B., 2004. Aktuální trendy v ekotoxikologii vodních ekosystémů. In: Kočí, V., Maršálek, B., Halousková, O. (Eds.), *Ekotoxikologické biotesty* 4. 2004, Chrudim, s. 65-67.
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic Marmorcrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. *Naturwissenschaften* 94, 843-846.
- Matés, J. M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83-104.
- Mayer, F. L., Mayer K. S., Ellersieck, M. R., 1986. Relation of survival to other endpoints in chronic toxicity tests with fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 5, 737-748.

- Mohr, S., Berghahn, R., Feibicke, M., Meinecke, S., Ottenströer, T., Schmiedling, I., Schmiediche, R., Schmidt, R., 2007. Effect of the herbicide metazachlor on macrophytes and ekosystem function in freshwater pond and stream mesocosms. *Aquatic Toxicology* 82, 73-84.
- Mosiichuk, N. M., Husak, V. V., Maksymiv, I. V., Hlodan, O. Y., Storey, J. M., Storey, K. B., Lushchak, V. I., 2015. Toxicity of environmental Gesagard to goldfish may be connected with induction of low intensity oxidative stress in concentration- and tissue-related manners. *Aquatic Toxicology* 165, 249-258.
- Moureau, P., Bessoule, S., Mongrand, S., Testet, P., Cassagne, C., 1998. Lipid trafficking in plant cells. *Progress in Lipid Research* 37, 371-391.
- Muir, D. C. G., Baker, B. E., 1976. Detection of triazine herbicides and their degrsdation products in tiledrain water from fields under intensive corn (maize) production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24, 122-125.
- Muir, D. C. G., 1980. Determination of terbutryn and its degradation products in water sediments, aquatic plants, and fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28, 714-719.
- Müllerová, D., 2003. Zdravá výživa a prevence civilizačních onemocnění ve schématech. Triton, Praha, ISBN 80-7254-421-7.
- Niedernhofel, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E., Marnett, L. J., 2003. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 31426-31433.
- Nödler, K., Licha, T., Voutsas, D., 2013. Twenty years later – Atrazine concentrations in selected coastal waters of the Mediterranean and the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 70, 112-118.
- OECD, 1992. Guidelines for testing of chemicals 203. Fish, acute toxicity test, 24 pp.
- Ongley, E. D., 1996. Control of water pollution from agriculture. Food and Agriculture Organization.
- Oropesa, A. L., García Cambero, J. P., Soler, F., 2008. Effect of long-term exposure to simazine on brain and muscle acetylcholinesterase activity of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology* 23, 285-293.
- Ozturk-Urek, R., Tarhan, L., 2001. Purification and characterization of superoxide dismutase from chicken liver. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 128, 205-212.

- Pamplona, R., 2011. Advanced lipoxidation end-products. *Chemico-Biological Interactions* 192, 14-20.
- Pelizzetti, E., Maurino, V., Minero, C., Carlin, V., Pramauro, E., Zebrinat O., 1990. Photocatalytic degradation of atrazine and other s-triazine herbicides. *Environmental Science and Technology* 24, 1559-1565.
- Pöckl, M., Holdich, D. M., Pennerstorfer, J., 2006. Identifying native and alien crayfish species in Europe. European Project CRAYNET, 47 pp.
- Popova, G. V., 1976. Characteristics of the effect of the herbicide prometryn on fish. *Nauchnye Osnovy Okhrany Prirody* 4, 118-125.
- Prousek, J., 2001. Rizikové vlastnosti látok. Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Bratislava, Slovenská republika, s. 60-93.
- PubChem, 2004. Prometryn – compound summary [online]. National Centre for Biotechnology Information [cit. 26.2.2022], Dostupné na WWW: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Prometryn#section=Information-Sources>.
- PubChem, 2005. Metazachor – compound summary [online]. National Centre for Biotechnology Information [cit. 28.2.2022], Dostupné na WWW: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/metazachlor>.
- Riaz-ul-Haq, M., Javeed, R., Iram, S., Rasheed, M. A., Amjad, M., Iqbal, F., 2018. Effect of Diafenthiuron exposure under short and long term experimental conditions on hematology, serum biochemical profile and elemental composition of a non-target organism, *Labeo rohita*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 62, 45-45.
- Richard, L., Vachot, C., Brèque, J., Blanc, P. P., Rigolet, V., Kaushik, S., Geurden, I., 2010. The effect of protein and methionine intake on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase activities in juvenile black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 391, 153-160.
- Roberts, T. R., Hutson, D. H., Lee, P. W., Nicholls, P. H., Plimmer, J. R., 1998. *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Scholz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Steuerwald, F., Vogt, G., 2003. Parthenogenesis in an outsider crayfish. *Nature* 421, 806.
- Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., Von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*. 313, 1072-1077.

- Semren, T. Ž., Žunec, S., Pizent, A., 2018. Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings. Institution for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, pp. 109-110.
- Shukla, S., Jhamtani, R. C., Dahiya, M. S., Agarwal, R., 2017. Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. *Toxicology Reports* 4, 240-244.
- Simoneaux, B. J., Gould, t. J., 2008. Plant uptake and metabolism of triazine herbicides (chapter 7). In: LeBaron, H. M., McFarland, J. E., Burnside, O. C., *The triazine herbicides. 50 years revolutionizing agriculture*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 73-99.
- Slaninová, A., Smutná, M., Modrá, H., Svobodová, Z., 2009. A review: Oxidative stress in fish induces by pesticides. *Neuroendocrinology Letters* 30, 2-12.
- Solomon, K. R., Baker, D. B., Richards, R. P., Dixon, K. R., Klaine, S. J., La Point, T. W., 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 31-76.
- Solomon, K. R., Carr, J. A., Du Preez, L. H., Giesy, J. P., Kendall, R. J., Smith, E. E., 2008. Effect of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: A critical review. *Critical Reviews in Toxicology* 38, 721-772.
- Stránský, M., Kohout, P., 2011. Referenční hodnoty pro příjem živin. Praha, ISBN 978-80-254-6987-3, 192 s.
- Stará, A., Machová, J., Velíšek, J., 2012. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in early life stages of common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Neuroendocrinology Letters* 33, 130-135.
- Stará, A., Kristián, J., Zusková, E., Velíšek, J., 2013. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 105, 18-23.
- Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *BioMed Research International* 2014, 680131.
- Stará, A., Pagano, M., Albano, M., Savoca, S., Di Bella, G., Albergamo, A., Koutová, Z., Šandová, M., Velíšek, J., Fabrello, J., Matozzo, V., Faggio, C., 2021. Effect of long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to thiacloprid: A multibiomarker approach. *Environmental Pollution* 289, 117892.

- Steinberg, C. E. W., Lorenz, R., Spieser, O. H., 1995. Effect of atrazine a swimming behavior on zebra fish (*Branchio rerio*). Water Research 29, 981-985.
- Stevens, J. T., Breckenridge, C. B., Simpkins, J., Eldridge, J. C., 2001. Symmetrical and asymmetrical triazine herbicides. In: Krieger, R. (Eds.), Haye's handbook of pesticide toxicology. Academic Press Inc., San Diego, pp. 1511-1519.
- Strouhová, A., 2020. Akutní a chronické působení neonikotinoidových látek na vodní organismy [online]. Diplomová práce, Vedoucí práce Ing. Alžběta Stará, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. České Budějovice, [cit. 7. 4. 2022]. Dostupné na WWW: <https://theses.cz/id/bwp3hx/>, s. 50, 54.
- Surai, P. F., Noble, R. C., Speake, B. K., 1996. Tissue-specific differences in antioxidant distribution and susceptibility to lipid peroxidation during development of the chick embryo. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism 1304, 1-10.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb. Informatorium, Praha, s. 78.
- Svobodová, Z., Máchová, J., Kroupová, H., 2008. Otravy ryb. In: Svobodová, Z. (Ed.), Veterinární toxikologie v klinické praxi. Profi Press, Praha, s. 201-217.
- Svobodová, Z., Sehonová, P., Kaut, J., Pauzorová, M., 2011. Analýza příčin havarijního znečištění povrchových vod a následných úhynů ryb v České republice v období 1989-2010. Bulletin VÚRH Vodňany 47, s. 47-56.
- 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 clayfishes of the United States and Canada after 10+ years of increased awareness. Fisheries 32, 372-389.
- Tillitt, D. E., Papoulias, D. M., Whyte, J. J., Richter, C. A., 2010. Atrazine reduces reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquatic Toxicology 99, 149-159.
- Trebs, A., 2008. The mode of action of triazine herbicides in plants (chapter 8). In: LeBaron, H. M., McFarland, J. E., Burnside, O. C., The triazine herbicides. 50 years revolutionizing agriculture. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 101-110.
- Turner, L., 2003. Simazine analysis of risk to endangered and threatened Salomon and Steelhead. U. S. Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs, Field Branch.
- Uchiyama, M., Mihara, M., 1978. Determination, of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Analytical Biochemistry 86, 271-278.

- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 1994. Atrazine, simazine and cyanazine: notice of initiation of special review.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), 1996. R. E. D. – Prometryn.
- Valko, M., Liebfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Vavrina, C. S., Ahley, R. A., 1983. Effect of alachlor on PEG6000 uptake, root osmotic potential, and root leakage. *Weed Science* 31, 600-603.
- Velišek, J., Hajšlová, J., 2009. *Chemie potravin*. 1. rozšířené 3. vydání, OSSIS, Tábor, ISBN 978-80-244-86659-15-2, s. 466.
- Velišek, J., Kouba, A., Stará, A., 2013. Acute toxicity of atrazine pesticides to juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). *Neuroendocrinology Letters* 34, 31-36.
- Velišek, J., Svobodová, Z., Bláhová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šírká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2018. *Vodní toxikologie pro rybáře*. FROV JU, Vodňany, 658 s.
- Velišek, J., Stará, A., Kubec, J., Zusková, E., Buřič, M., Kouba, A., 2020. Effect of metazachlor and its major metabolite metazachlor OA on early life stages of marbled crayfish. *Scientific Reports* 10, 875.
- Vogt, G., Tolley, L., Scholtz, G., 2004. Life stages and reproductive components of the Marmorkrebs (marbled crayfish), the first parthenogenetic decapod crustacean. *Journal of Morphology* 261, 286-311.
- Vogt, G., 2008. The marbled crayfish: a new model organism for research on development, epigenetics and evolutionary biology. *Journal of Zoology* 276, 1-13.
- Vogt, G., 2010. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological research: a review and perspective, with remarks on some further crustaceans. *Biogerontology* 11, 643-669.
- Vogt, G., 2011. Marmorkrebs: natural crayfish clone as emerging model for various biological disciplines. *Journal of Biosciences* 36, 377-382.

- Wan, M. T., Buday, C., Schroeder, G., Kuo, J., Pasternak, J., 2006. Toxicity to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus tshawytscha*, and *Rana catesbeiana* of atrazine, metolachlor, simazine, and their formulated products. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76, 52-58.
- Waxman, M. F., 1998. *The agrochemical and pesticides safety handbook*. Taylor and Francis Group, CRC Press, Boca Ranton.
- Weisshaar, H., Böger, P., 1987. Primary effect of chloracetamides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 28, 286-293.
- Williams, P. L., James, R. C., Roberts, S. M., 2003. *Principes of toxicology: Environmental and industrial applications*. John Wiley and Sons Inc., Hoboken.
- Zapletal, O., Ruprich, J., Dvořáková, D., Nepejchalová, L., Vránová, E., 2001. *Speciální veterinární toxikologie*. VFU Brno, Brno, ISBN 80-7305-403-5, 148 s.
- Zarenkov, N. A., 1982. *Členistonogie. Rakoobraznye, Čast' 1. Izd.* MGU, Moskva.
- Zeng, F., Wu, L., Ren, X., Xu, B., Cui, S., Li, M., Chen, W., Han, Y., Ren, T., 2021. Effect of chronic prometryn exposure on antioxidative status, intestinal morphology, and microbiota in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 250, 109187.
- Zhou, J., Hu, F., Jiao, J., Liu, M., li, H., 2012. Effect of bacterial-feeding nematodes and prometryne-degrading bacteria on the dissipation of prometryne in contaminated soil. *Journal of Soils and Sediments* 12, 576-585.
- Zwerger, P., Pestemer, W., 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life cycle test. *Journal of Plant Diseases and Protection* 107, 711-718.

8 Abstrakt

Subletální účinky směsí pesticidů na raky

Prometryn, řadící se do skupiny triazinových herbicidů, byl v Evropě zakázán v roce 2004. Metazachlor, chloracetamid využívaný k ošetření převážně olejnatých plodin, je stále používaným herbicidem. Ve vodním prostředí mohou negativně působit individuálně používané pesticidy či jejich metabolity, další otázku z hlediska negativního působení v prostředí představují vznikající směsi pesticidů, které se v životním prostředí mohou vytvořit.

Cílem této studie bylo posoudit vliv směsí pesticidů smíšených ze zvolených koncentrací (0,01 mg.l⁻¹, 0,1 mg.l⁻¹, 1 mg.l⁻¹) na raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). Testované byly také pesticidy individuálně ve zvolených koncentracích. Byl hodnocen vliv na biochemický profil hemolymfy a antioxidační biomarkery a biomarker oxidačního stresu v tkáních hepatopankreatu, svalů a žaber raka mramorovaného. Toxicita byla posouzena pomocí subchronického testu toxicity, který probíhal po dobu 8 dnů.

Na hladiny biomarkerů biochemického profilu hemolymfy působily nejvíce koncentrace metazachloru (0,1 a 1 mg.l⁻¹), které způsobily statisticky významné snížení hladiny ALT, Cl⁻, Mg²⁺ a Ca²⁺ a zvýšení hladiny NH₃. Vliv všech testovaných směsí byl pozorován na zvýšení hladiny GLO, ALT a NH₃, zde se projevil synergický účinek směsí. Aktivita antioxidačních biomarkerů byla ovlivněna pouze u CAT u prometrynu (0,01 mg.l⁻¹) a metazachloru (0,01 a 1 mg.l⁻¹). Hladina LPO byla ovlivněna metazachlorem (0,01 mg.l⁻¹). Nebyl prokázán vliv směsí pesticidů na hladinu LPO a aktivity antioxidačních enzymů.

Klíčová slova: prometryn, metazachlor, směsi, oxidační stres, hemolymfa, antioxidační enzymy

9 Abstract

Sublethal effects of pesticide mixtures on crayfish

Prometryn, a triazine herbicide, was banned in Europe in 2004. Metazachlor, a chloracetamide used to treat mainly oilseed crops, is one of the herbicides still in use. Individual pesticides or their metabolites can cause adverse effects in the aquatic environment, and the resulting mixtures of pesticides that can form in the environment are another issue in terms of adverse effects in the environment.

The aim of this study was to assess the effect of mixtures of pesticides mixed from selected concentrations (0.01 mg.l⁻¹, 0.1 mg.l⁻¹, 1 mg.l⁻¹). Pesticides were also tested individually at selected concentrations. The biochemical profile of hemolymph and antioxidant biomarkers and oxidative stress biomarker in hepatopancreatic, muscle and gill tissues of marbled crayfish were determined. Toxicity was assessed using a subchronic toxicity test performed over a period of 8 days.

Metazachlor concentrations (0.1 and 1 mg.l⁻¹) caused decreasing ALT, Cl⁻, Mg²⁺ and Ca²⁺ levels and increasing NH₃ levels in hemolymph. The effect of all tested mixtures was observed on the increase of GLO, ALT and NH₃ levels, here a synergistic effect of the mixtures was observed. The activity of antioxidant biomarkers was affected only in CAT for prometryn (0.01 mg.l⁻¹) and metazachlor (0.01 and 1 mg.l⁻¹). LPO levels were affected by metazachlor (0.01 mg.l⁻¹). There was no effect of pesticide mixtures on LPO levels and antioxidant enzyme activities.

Keywords: prometryn, metazachlor, mixtures, oxidative stress, hemolymph, antioxidant enzymes