

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

Bakalářská práce

**Vliv metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy na raná vývojová stádia
raka mramorovaného**

Autor: Eliška Peřinová

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

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

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

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma “Vliv metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy na raná vývojová stádia raka mramorovaného“ jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby touto cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledcích obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucímu bakalářské práce dr hab. Josefu Velíškovi, Ph.D. a konzultantům Ing. Alžbětě Staré, Ph.D. a Ing. Antonínu Koubovi, Ph.D. za metodické vedení, odbornou pomoc a cenné rady poskytnuté při vypracování této bakalářské práce.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eliška PEŘINOVÁ**
Osobní číslo: **V13B021P**
Studijní program: **B1601 Ekologie a ochrana prostředí**
Studijní obor: **Ochrana vod**
Název tématu: **Vliv metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy na raná vývojová stádia raka mramorovaného**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Poslední desítky let je celosvětovým problémem vzrůstající výskyt xenobiotik v životním prostředí. Mezi nejčastěji monitorované pesticidy ve vodním prostředí patří triazinové herbicidy. V současnosti jsou triaziny považovány za nebezpečné pro životní prostředí a jsou zahrnuty na listině prioritních látek pro testování v EU a USA. Terbuthylazin-2-hydroxy je majoritní metabolit terbuthylazinu. Terbuthylazin se používá od roku 2006 jako náhrada za atrazin, k pre- a postemergentní kontrole plevelů, vodních řas a rostlin. Pro stanovení ekotoxikologického rizika pesticidů jsou základem údaje o toxicitě pro necílové organismy a předpokládané koncentraci v ekosystémech. Do skupiny necílových vodních organismů patří rovněž vodní bezobratlí.

Cílem bakalářské práce je posouzení vlivu terbuthylazinu-2-hydroxy na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambrus fallax f. virginalis*). Získané výsledky při testování budou podkladem pro hodnocení rizika terbuthylazinu-2-hydroxy pro životní prostředí (Environmental risk assessment).

V rámci bakalářské práce bude proveden embryolarvální test toxicity na raku mramorovaném s terbuthylazin-2-hydroxydem. Během testu se bude sledovat vliv na mortalitu, růst, biomarkery oxidativního stresu a antioxidantní enzymy, ontogenetický vývoj a výskyt deformací raných vývojových stádií raka. Metodicky bude postupováno podle platných standardních operačních postupů, které byly zpracovány akreditovanou laboratoří FROV JU. Tyto postupy vycházejí z norem OECD. Oxidativní stres a antioxidantní enzymy v tkáních raka signálního budou prováděny dle jednotlivých metod.

Rozsah grafických prací: **3 grafy**
Rozsah pracovní zprávy: **30-35 stran textu**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Abrantes, N., Pereira, R., Gonçalves, F., 2010. Occurrence of pesticides in water, sediments, and fish tissues in a lake Surrounded by agricultural lands: concerning risks to humans and ecological receptors, *Water Air & Soil Pollution* (212), 77 -88 s.

Rodrigo, R., 2009. Oxidative stress and antioxidants: their role in human disease, Nova Science Publishers, 358 s.

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*, 6 s.

Svobodová, Z., Beklová, M., Máchová, J., Dobšíková, R., Mácová, S., Modrá, H., Velíšek, J., 2010. Ekotoxikologie. Praktická cvičení, Testy toxicity na organismech vodního prostředí, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 84 s.

Velíšek, J., Svobodová, Z., Blahová, J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Široká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour-Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014. Vodní toxikologie pro rybáře, FROV JU Vodňany, 600 s.

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

Velíšek, J., Stará, A., Svobodová, Z., 2011. The effects of pyrethroid and triazine pesticides on fish physiology. In: *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*, Stoytcheva, M., (Ed.). Intech Open, 377-402 s.

Vedoucí bakalářské práce: **dr. hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Alžběta Stará, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: **12. prosince 2014**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2016**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zařízení 728/II
389 25 Vodňany (2)


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

dne

OBSAH:	
1. ÚVOD	8-9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1. Pesticidy	10-12
2.1.1. Triaziny	12-13
2.1.2. Terbutylazin	13-14
2.1.3. Terbutylazin-2-hydroxy	15
2.2. Raci	16
2.2.1. Obecná charakteristika raků	16
2.2.2. Rak mramorovaný	16-17
2.2.3. Použití raka v testech toxicity	17-18
2.3. Oxidativní stres	18-20
3. MATERIÁL A METODIKA	21
3.1. Embryolarvální test toxicity	21
3.1.1. Princip a podmínky testu	21-22
3.1.2. Experimentální materiál	22-24
3.2. Průběh testu	24-26
3.2.1. Odběr vzorků	26
3.3. Metody stanovení biomarkerů	27
3.3.1. Stanovení lipidní peroxidace	27
3.3.2. Stanovení aktivity superoxid dismutázy	27-28
3.3.3. Stanovení aktivity katalázy	28
3.3.4. Stanovení aktivity glutathion reduktázy	28
3.3.5. Stanovení koncentrace proteinů	29
3. 5. Statistické vyhodnocení testu	29
4. VÝSLEDKY	30
4.1. Chování raků	30
4.2. Kumulativní mortalita	30
4.3. Růstové parametry	31-32
4.5. Ontogenetický vývoj	33
4.6. Makroskopické morfologické anomálie	33
4.7. Biomarker oxidačního stresu	34
4.7.1. Lipidní peroxidace	34
4.8. Antioxidační biomarkery	35

4.8.1. Superoxid dismutáza	35
4.8.2. Kataláza	36
4.8.3. Glutathion reduktáza	37
5. DISKUSE	38-40
6. ZÁVĚR	41
7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	42-48
8. ABSTRAKT	49
9. ABSTRACT	50

1. ÚVOD

Snaha ochraňovat úrodu před živočišnými a rostlinnými škůdci, zvyšovat produkci plodin a chránit své životní podmínky, provází lidstvo od nepaměti. Použití síry k plynné dezinfekci plodin a k odpuzování hmyzu bylo známo již 1000 let př. n. l. v Číně. Kolem roku 1400 začali lidé k ochraně plodin a skladových zásob používat sloučeniny olova, rtuti a arsenu. V 15. století byla z tabákových listů izolována sloučenina sulfát nikotin, která sloužila jako insekticid. V 18. století byly objeveny insekticidní účinky pyrethra, přírodního výtažku z kopretiny starčkolisté (*Chrysanthemum cinerariifolium*), tyto látky jsou zvané jako pyrethrum (Cremllyn, 1978).

Nejvýznamnější rozvoj používání pesticidů a dalších chemických látek v zemědělství nastal teprve v minulém století, a to především po druhé světové válce. V tomto období se použití pesticidů rozšířilo téměř do celého světa. K největšímu rozvoji používání těchto látek došlo v Kanadě, v USA a ve Velké Británii. Ve 30. letech 20. století vzrostla spotřeba pesticidů v USA o 180 %, v Kanadě to bylo ještě třikrát více (Sotherton a Holland, 2003).

Zásadním milníkem v historii pesticidů byl rok 1939. V tomto roce došlo k objevení jednoho z nejznámějších insekticidů DDT (1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan). DDT je považováno za první moderní syntetický insekticid. Insekticidní účinky DDT byly objeveny doktorem Paulem Hermannem Müllerem, který za tento objev získal v roce 1948 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu (Cremllyn, 1978).

V současné době se zemědělské technologie stále zdokonalují s cílem zefektivnit výrobu a zvýšit výnosy, bez ohledu na vzrůstající výskyt a hromadění polutantů v ekosystému. Aplikace pesticidů představuje celosvětově jeden z nejvýznamnějších negativních faktorů intenzifikace zemědělské výroby. Jednou z nejvíce využívaných skupin pesticidů v zemědělství jsou herbicidy, tvořící 45 až 50 % objemu produkce všech pesticidů. Ve světě je v současnosti registrováno více než 1 200 účinných látek a 25 000 komerčních přípravků pesticidů, které se ročně prodají v hodnotě okolo 39 miliard dolarů (Velíšek a kol., 2014a). V České republice je také možné pozorovat stoupající trend v produkci a spotřebě pesticidů v zemědělské výrobě. V roce 1975 byl počet registrovaných přípravků pesticidů 362, v roce 2011 již 626 a je předpokládán jejich další nárůst. Některé marketingové studie uvádějí, že v roce 2019 dojde ke zvýšení celosvětového prodeje pesticidů, a to v hodnotě 52 miliard dolarů (Ceresena Research, 2013).

Cílem bakalářské práce bylo posouzení vlivu terbuthylazinu-2-hydroxy na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*). Vliv terbuthylazinu-2-hydroxy na raná vývojová stádia raka mramorovaného byl hodnocen na základě růstu, biomarkeru oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů, ontogenetického vývoje a výskytu deformací. Výsledky této práce přispějí k rozšíření podkladů pro hodnocení rizika majoritního metabolitu terbuthylazinu, a to terbuthylazinu-2-hydroxy pro vodní ekosystém a možnosti využití raných vývojových stádií raků k testování toxicity pesticidů.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Pesticidy

Pesticidy jsou organické či anorganické chemické sloučeniny, které se používají k hubení nebo tlumení nežádoucích organismů, škůdců z říše rostlin a živočichů. Pesticidy slouží k ochraně rostlin, skladových zásob, různých technických produktů, staveb, k ochraně před chorobami zvířat, ale i člověka. Pesticidy jsou od nepaměti spojeny se zemědělstvím, kde se také nejvíce uplatňují (Velíšek a kol., 2014a).

Vliv pesticidů na životní prostředí je většinou nežádoucí. V historii lze najít mnoho objevů a možností využití, ale i následných zjištění, že látka nejenom pomáhá, ale i škodí. Důležitým mezníkem v dějinách posuzování negativních vlivů pesticidních přípravků byl rok 1962, kdy Rachel Carson popsala ve své publikaci „Silent spring“ negativní vliv DDT na ekosystém (Carson, 1962). Na základě těchto informací došlo ke sledování reziduí pesticidů, ke zkoumání vlivu na živé organismy a začaly se rozvíjet analytické metody (Velíšek, kol., 2014a).

Dnes už víme, že sloučeniny pesticidů se kumulují v různých složkách životního prostředí a vedou přímo či nepřímo k různým zdravotním problémům u necílových organismů, včetně člověka (Abrantes a kol., 2010). Ve vodním prostředí, kam se pesticidy dostávají, se velmi snadno hromadí a mohou se rozkládat i na více toxické a rizikovější metabolity (Ceyhun a kol., 2010).

Pesticidy lze rozdělit podle několika hledisek. Na základě cílového organismu, který má být eliminován, rozdělujeme pesticidy na (Pitter, 1999):

- akaracidi - přípravky určené k hubení roztočů,
- algicidy - přípravky určené k hubení řas,
- piscicidy - přípravky určené k hubení ryb,
- insekticidy - přípravky určené k hubení hmyzu,
- rodenticidy - přípravky určené k deratizaci hlodavců,
- herbicidy, přípravky určené k hubení rostlin, hlavně plevelů,
- fungicidy - přípravky určené k hubení plísní a hub,
- moluskocidy - přípravky určené k hubení měkkýšů,
- avicidi - přípravky určené k hubení ptáků.

Pesticidy jsou aplikovány několika způsoby, například postřikem, aerosolem, poprašem, nátěrem či impregnací, můžeme je aplikovat jako nástrahu v tekuté nebo kapalné podobě. Původ pesticidů je buďto přírodní nebo syntetický, může se jednat i o biopreparáty (Pitter, 1999).

Prostředky na ochranu rostlin se používají především plošně v zemědělství a jejich registrace vyžaduje náročnější testování účinků těchto látek na ekosystém. Biocidy se využívají v malých dávkách, a to převážně v domácnostech, humánní a veterinární medicíně. Jejich povolení je jednodušší a nevyžaduje širší testování. Přesto jsou však tyto látky používány v nadbytku a jsou taktéž významným zdrojem pesticidů pro okolní prostředí (Velíšek a kol., 2014a).

Pesticidy degradují vlivem řady faktorů. Vlivem slunečního záření podléhají fotolýze, při zvýšené teplotě se vypařují, při určité vlhkosti hydrolyzují, na vzduchu mohou oxidovat a vlivem mikroorganismů podléhají biotransformaci. Při degradačních procesech vznikají metabolity, které mohou ztrácet původní účinky, ale mohou být i toxičtější než původní sloučenina. Například u triazinů dochází ve vodním prostředí vlivem působení UV záření k odštěpení postranních alkylových řetězců z triazinového kruhu. Jako hlavní degradační produkty triazinů vznikají toxické hydroxytriaziny a téměř netoxická kyselina kyanurová, (Hajšlová a Kocourek, 2004).

Za řadou biotransformací stojí působení mikroorganismů. Pesticidy vstupují do metabolických dějů probíhajících v mikrobiální buňce. V rostlinách a živočiších dochází k biotransformaci pesticidů během detoxikačních pochodů. Aktivní enzymové systémy schopné účinně metabolizovat pesticidy mají obratlovci, a to především teplotokrevní ptáci a savci. Biotransformace se skládá ze dvou fází. První z nich je detoxikační fáze asymetrická, kdy jsou molekuly pesticidů přeměněny na polárnější metabolit. Ten může být více či méně toxický než původní látka, zároveň je základem pro druhou tzv. symetrickou fázi. V druhé fázi se odehrávají konjugací reakce, při kterých vznikají neaktivní deriváty, snadno vylučitelné ven z těla (Hudson a kol., 1984).

Do vody se pesticidy dostávají přímo nebo nepřímo. V 60. až 80. letech 20. století byly pesticidy častou příčinou otrav ryb, tvořili až 6 % všech úhynů (Svobodová a kol., 1987). Od 90 let 20. století dochází ke snížení počtu úhynů, díky šetrnějšímu zacházení s pesticidy. Pesticidy v tomto období tvořily 2 % všech úhynů ryb (Svobodová a kol., 2011). V roce 2014 byl laboratorně potvrzen jeden případ úhynu střevle potoční (*Phoxinus phoxinus*) a raků říčních (*Astacus astacus*) způsobený přípravkem

NURELLE na řece Doubravce v úseku Vilémov až Zvěstovice. V roce 2015 nebyl zaznamenán žádný havarijný úhyn ryb způsobený pesticidy (Velíšek a Máchová, 2015).

Havarijní úhyny ryb dnes nejsou zaznamenávány, ale problematika pesticidů ve vodním prostředí je i nadále aktuální. V současné době se hlavně zkoumá vliv subletálních koncentrací těchto látek na vodní ekosystém. Tyto subletální koncentrace nezpůsobují akutní úhyny ryb, ale mohou nepříznivě ovlivňovat vodní organismy. Dále mohou nízké koncentrace pesticidů ovlivňovat i přirozenou potravní základnu ryb. Ta je obecně citlivější, hlavně na pesticidy na bázi organofosfátů, triazinů a kovů (Velíšek a kol., 2014a).

Při aplikaci pesticidů je potřeba dbát na to, že každé použití vnáší tyto látky do životního prostředí. Zde se mohou kumulovat a ovlivňovat tak vodní organismy. Dále je potřeba využívat šetrnější přípravky pesticidů, které se rychle rozkládají, nevytváří rezidua a nemají negativní účinky na necílové organismy (Velíšek a kol., 2014a).

Nejčastěji nalézanými rezidui pesticidů v povrchových vodách jsou rezidua triazinů (př. atrazin, simazin, terbuthylazin, terbutryn), karbamátů, organofosfátů, chloracetanilidů, derivátů močoviny a kyseliny fenoxycetové (Sehonová a kol., 2012).

2.1.1. Triaziny

Triaziny byly objeveny v roce 1952 švýcarskou společností J. R. Geigy Ltd. a patří mezi jedny z nejstarších a nejpoužívanějších herbicidů. Triaziny se vyznačují heterocyklickou strukturou, podobnou šestičlennému benzenovému kruhu, kde jsou však tři atomy uhlíku nahrazeny atomy dusíku (Kearney a Kaufmann, 1975).

Triaziny jsou inhibitory fotosyntézy, konkrétně tzv. Hillovy reakce ve fotosystému II. V této fázi je využíván chlorofyl k přeměně fotonů v energii pro buňky. Bez tohoto mechanismu nedokážou rostliny produkovat jakoukoli energii potřebnou k růstu, což se projeví jeho zpomalením a následným úhynem rostlin (Kearney a Kaufmann, 1975). Ne všechny rostliny jsou citlivé na tyto herbicidy, např. kukuřice nebo třtina dokážou pomocí enzymů poměrně rychle změnit herbicid na netoxickou formu (Vendlová, 2009).

Triaziny mají nízkou akutní toxicitu pro savce a nepatrně toxické jsou pro ptactvo. V případě ryb závisí jejich toxicita na druhu triazinu. Obecně se letální koncentrace (96hLC50) triazinů pohybuje v hodnotách jednotek až stovek miligramů na litr. Některé

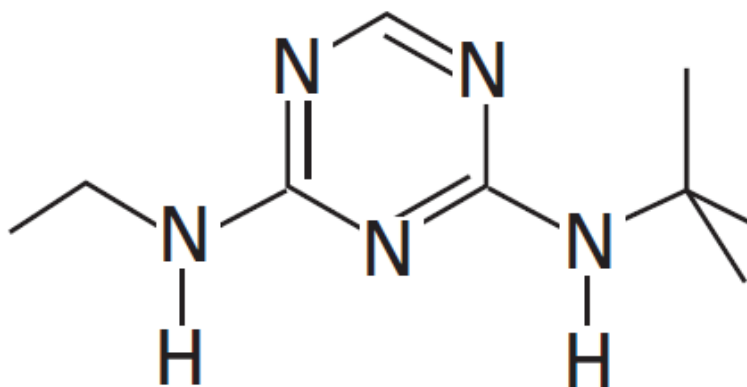
nižší organizmy, jako je např. hrotnatka velká (*Daphnia magna*) nebo buchanky jsou citlivější vůči působení triazinů než ryby a to až 5krát (Velíšek a kol., 2014a).

Degradace triazinů v půdách probíhá rychle a nedochází k adsorpci v půdních částicích. Triaziny se mohou z půdy vyluhovat a kontaminovat spodní vodu, a proto mohou být nalézány nejen v povrchové, ale i podzemí vodě (Vendlová, 2009). Triazinové herbicidy jsou relativně stabilní ve vodě (poločas rozpadu je až 300 dní) a v sedimentech (poločas rozpadu je několik let). Za nejvíce nebezpečné pro životní prostředí je pokládáno osm tzv. S- triazinů. Jsou jimi atrazin, cyanazin, prometryn, propazin, sebutylazin, simazin, terbuthylazin a terbutryn. Tyto látky byly zařazeny na seznam prioritních látek EU a USA (Velíšek a kol., 2014a).

V současné době je ve světě registrováno 14 komerčních přípravků na bázi triazinů, v ČR jsou registrovány 4 látky: metribuzin, metamitron, terbuthylazin, tebuconazol (Velíšek a kol., 2014a).

2.1.2. Terbuthylazin

Chemickou strukturou se terbuthylazin (6-chloro-N-(1,1-dimethylethyl)-N-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) (obr. č. 1), podobá atrazinu a simazinu.



Obr. č. 1. Chemická struktura terbuthylazinu (upraveno podle Breckenridge, 2010).

Terbuthylazin je v zemědělství používán jako selektivní a systémově působící herbicid, který slouží k regulaci plevelů. Jedná se o preemergentní, širokospektrální herbicid. Používá se před vyklíčením plodin, a to především v porostech čiroku, citrusů, kukuřice, vína, jablek, a také v lesnictví (Terbuthylazin, 2015).

Účinná látka terbuthylazin je přijímána kořeny a listy plevelů a je inhibitorem fotosyntézy. Pro dosažení odpovídajícího herbicidního účinku je žádoucí dostatečná půdní vlhkost. Terbuthylazin je obsažen v těchto komerčních přípravcích: Akris, Aspect Pro, Balaton, Bolton Duo, Bromoterb, Calaris, Gardoprim Plus Gold 500 Sc, Guardian Extra, Koban T, Lumax, Successor T, Successor Tx, Talos, Zeagran 350. Vzhledem k tomu, že se jedná o látky ohrožující vodní prostředí, je při jeho aplikaci za účelem ochrany nařízeno snížit úlet dodržením neošetřeného ochranného pásma v řádech metrů vzhledem k povrchovým vodám. S ohledem na ochranu vodních organismů je vyloučeno použití přípravků na pozemcích svažujících se k povrchovým vodám. Přípravky lze na těchto pozemcích aplikovat pouze při použití vegetačního pásu o specifické šířce v metrech pro daný herbicid (Agromanuál, 2016).

Metabolizace terbuthylazinu probíhá 1-2 měsíce prostřednictvím půdních organismů, ve vodě hydrolyzou, rychlost závisí na hodnotě pH vody. Při vyšším pH se rozpadá pomaleji (více jak 6 měsíců) než při nižším pH (cca 3 měsíce). Metabolity látky terbuthylazinu jsou atrazin desisopropyl, terbuthylazin desethyl, terbuthylazin-2-hydroxy atrazin desethyl desisopropyl, atrazin desethyl desisopropyl-2-hydroxy, terbuthylazin-desethyl-2-hydroxy (Dousset a kol., 1997).

Ve vodním prostředí se koncentrace terbuthylazinu pohybují v desetínách až jednotkách $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Carafa a kol., 2007; Pintoa a kol., 2012). Koncentrace v povrchových vodách na území ČR se pohybuje od 0,1 do 6,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Sehonová a kol., 2012; ČHMÚ, 2016).

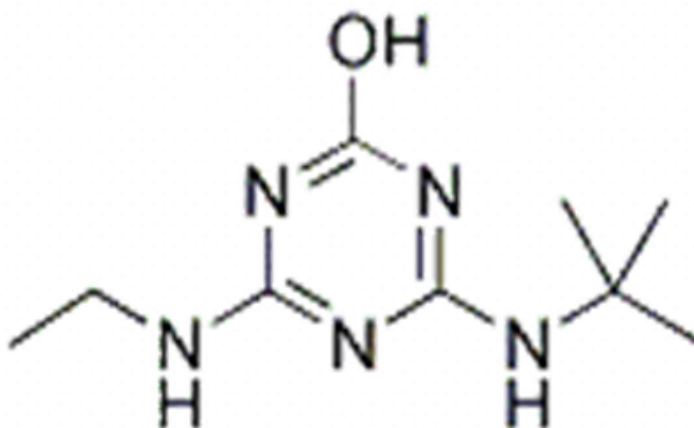
Terbuthylazin je prakticky netoxický pro ptáky. Byly provedeny dvě studie, s kachnou divokou (*Anas platyrhynchos*) a křepelkou viržinskou (*Colinus virginianus*), u těchto dvou druhů byla hodnota LD50 vyšší než 5620 mg.l^{-1} (TOXNET, 2016).

Terbuthylazin je mírně toxický pro sladkovodní ryby. Letální hodnota 96hLC50 pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) je 3,4 mg.l^{-1} , pro slunečnici obecnou (*Lepomis macrochirus*) je 7,5 mg.l^{-1} (Pesticide Ecotoxicity Database, 2000), pro sumečka černého (*Ameiurus melas*) je 7,0 mg.l^{-1} (Bathe a kol., 1975), pro živorodku duhovou (*Poecilia reticulata*) je 1,6 mg.l^{-1} (Bathe a kol., 1973).

Terbuthylazin je mírně toxický pro sladkovodní bezobratlé. Efektivní koncentrace (EC50) pro hrotnatku velkou za 96 hodin je 5,0 mg.l^{-1} a za 48h je 50,9 mg.l^{-1} ; a pro řasu *Scenedesmus subspicatus* je 48hEC50 0,59 mg.l^{-1} (Pesticide Ecotoxicity Database, 2000).

2.1.3. Terbutylazin-2-hydroxy

Terbutylazin-2-hydroxy (4-(tert-butylamino)-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-ol) (obr. č. 2), je hlavním metabolitem terbutylazinu (Huber a kol., 2000). Metabolismus terbutylazinu probíhá v půdě a ve vodě, kde podstupuje řadu biotických a abiotických mechanismů degradace, jako je fotodegradace, oxidace, hydrolýza, a biologický rozklad, které vedou k dealkylaci alkylovaných aminoskupin, deaminaci a hydroxylaci v poloze 2, jakož i štěpení triazinového kruhu. Hlavní degradační produkty terbutylazinu v podzemních a povrchových vodách jsou terbutylazin-2-hydroxy, terbutylazin-desethyl-hydroxy a terbutylazin-desethyl. Poločas rozpadu terbutylazinu-2-hydroxy se pohybuje mezi 112 a 120 dny při teplotě vody 20-25 °C. Při nižších teplotách tento proces trvá mnohem déle, při 10 °C až 456 dní (Nodler a kol., 2013).



Obr. č. 2. Chemická struktura metabolitu terbutylazinu-2-hydroxy
(upraveno podle Breckenridge, 2010).

Nejvyšší naměřená koncentrace terbutylazinu-2-hydroxy v povrchových vodách české republiky byla 0,75 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (ČHMÚ, 2016). Například v roce 2011 v povodí řeky Llobregat (Španělsko) byla naměřena nejvyšší koncentrace 9,24 $\mu\text{g.l}^{-1}$ této látky (Masia a kol., 2015).

Letální dávka (LD50) terbutylazinu-2-hydroxy pro savce je více než 2000 mg.kg^{-1} . Letální hodnota (LC50) pro pstruha duhového je 2,5 mg.l^{-1} . Hodnota 48hEC50 pro hrotnatku velkou je 2,8 mg.l^{-1} . Pro *Chironomus riparius* je hodnota NOEC 400 mg.kg^{-1} . Pro řasu *Pseudokirchneriella subcapitata* je efektivní koncentrace 72hEC50 3,8 mg.l^{-1} (PPDB, 2015).

2.2. Raci

Raci patří mezi korýše řádu Decapoda a infrařádu Astacida (někdy též Astacoidea). Infrařád je tvořen nadčeledi Enoplometopoidea, Nephropoidea, Astacoidea a Parastacoidea. První dvě nadčeledi zahrnují mořské humry, zbývající dvě nadčeledi zahrnují sladkovodní raky. V současnosti známe okolo 600 druhů raků (Kozák a kol, 2013).

2.2.1. Obecná charakteristika raků

Hlavními částmi těla raka jsou hlavohruď (cephalothorax s rostrem), členitý zadeček (abdomen s uropoddem a telstonem) a končetiny. Raci mají pět párů kráčivých nohou (pereopody), první pár je přeměněn na klepeta. Páry končetin vyrůstají z jednotlivých článků tvořících hlavohruď. Počet končetin je však vyšší, zahrnuje také tykadla, ústní a zadečkové končetiny. Hrudní oddíl kromě patrných kráčivých nohou nese ještě tři páry nenápadných zkrácených končetin. Tyto končetiny pomáhají čelistem v manipulaci s potravou. Zadečkové končetiny (pleopody) rak z počátku využívá k plavání, později zadečkové končetiny tuto schopnost ztrácí, nadále však fungují jako pomocné končetiny k pohybu, samičky je používají k přichycování vajíček. Krátká tykadla 1. páru jsou antény a nesou receptory, jimiž je rak schopný vnímat chuť a pach. Tykadla 2. páru se nazývají antenuly. Antény a antenuly slouží též jako hmatový orgán (Kozák a kol., 2013). Raci jsou vodní živočichové dýchající žábrami. Raci čeledi Cambaridae mají obvykle 17 funkčních žáber (Vogt, 2002).

Raci jako všežravci, využívají pro ně všechny dostupné zdroje potravy. Hrají významnou roli jako konzumenti a predátoři, představují však i potravu pro jiné, vyšší živočichy (Reynolds, 2011).

2.2.2. Rak mramorovaný

Rak mramorovaný je sladkovodním rakiem řazeným podle De Grave a kol. (2009) do řádu Decapoda, infrařádu Astacida, nadčeledi Astacoidea, čeledi Cambaridae, podčeledi Cambarinae, rodu *Procambarus*: druh *Procambarus fallax f. virginalis*.

Podle Hobbse (1989) je rod *Procambarus* druhově nejbohatším rodem amerických raků. Původem je rak mramorovaný z Floridy a Georgie (Taylor a kol, 2007; Dorn a Volin, 2009). Ve své domovině obývá nevysychající lokality a stojaté i tekoucí vody, ve kterých si buduje jednoduché nory (Hobbs, 1981; Hendrix a Loftus, 2000; Dorn

a Trexler, 2007). Do dalších zemí byl zavlečen. V Evropě se již vyskytuje v Nizozemí (Koese, 2008), Německu (Marten a kol., 2004; Schulz a kol., 2009; Martin a kol., 2010), Itálii (Marzano a kol., 2009) a také na Slovensku (Jánský a Mutkovič, 2010) a šíří se dál. Dále byl například nalezen na Madagaskaru, kde ohrožuje původní endemické druhy raků (Jones a kol., 2007, 2009; Kawai a kol., 2009). Výskyt byl potvrzen i v Japonsku. Šíření přispívá i oblíbenost u akvaristů. Díky internetovému obchodu se s raky neomezeně obchoduje, rozšíření těchto zvířat do různých částí světa je tak velmi snadné (Kozák a kol., 2013).

Jak napovídá název, zbarvení tohoto raka je mramorované, na hnědém až zelenavém podkladě. Tělo je ze spodní části a z boků světlejší, hnědavé. Rostrum těchto raků je nápadné, hladké, bez střední rýhy, s výraznou špičkou. Klepeta jsou malá, kratší. Jejich povrch je slabě zrnitý a není zde patrné mramorování (Holdich a kol., 2006).

Rak mramorovaný svým vzrůstem patří mezi menší raky. Dorůstá výjimečně až do velikosti 13 cm. Jde o krátkověký druh. V průměru se dožívá 2 let (Pöckl a kol., 2006; Vogt, 2010). Samičky poměrně rychle dospívají, už kolem 25. až 35. týdne života. Ve vhodných podmínkách se rak množí několikrát do roka. Čím je samička starší, tím produkuje více vajíček. V laboratorních podmínkách u mladých samiček je to něco mezi 50 - 150 vajíčky, starší samičky mohou mít až 400 vajíček (Holdich a kol., 2006; Vogt, 2010).

Tento rak je potenciálním přenašečem račího moru. Původcem onemocnění račího moru je parazit *Aphanomyces astaci* (Söderhäll a Ceresius, 1999). Severoameričtí raci nákaze odolávají, zatímco ostatní raci toto nedokážou a na následky onemocnění hynou (Unestam, 1969). Neuvážené introdukce chovatelů vedou ke vzniku odolných jedinců, kteří se dokážou podmínkám přizpůsobit a posléze se i množit. Faktem také zůstává, že tento druh raka se rozmnožuje tzv. apomiktickou partenogenezí. To znamená, že se takovýto rak rozmnožuje nepohlavně, u tohoto druhu jsou známy pouze samičky, jejichž potomstvo je geneticky identické (Martin a kol., 2007). Proto je také odchov tohoto raka velice snadný.

2.2.3. Použití raka v testech toxicity

Důležitým preventivním opatřením ke snížení rizik dopadu pesticidů na životní prostředí je znalost jejich účinků a jejich chování v ekosystému. V Evropě v současné době podléhá užívání pesticidů složitému testování. Testování toxicity je známé již po

staletí, a přestože byly testy prováděny na různých organizmech, cílem bylo hlavně zjištění účinků na člověka. V druhé polovině 20. století byly vyvíjeny metody popisující toxické účinky látek antropogenního původu, které měly vliv na ostatní organizmy a životní prostředí (Kočí a Mocová, 2009).

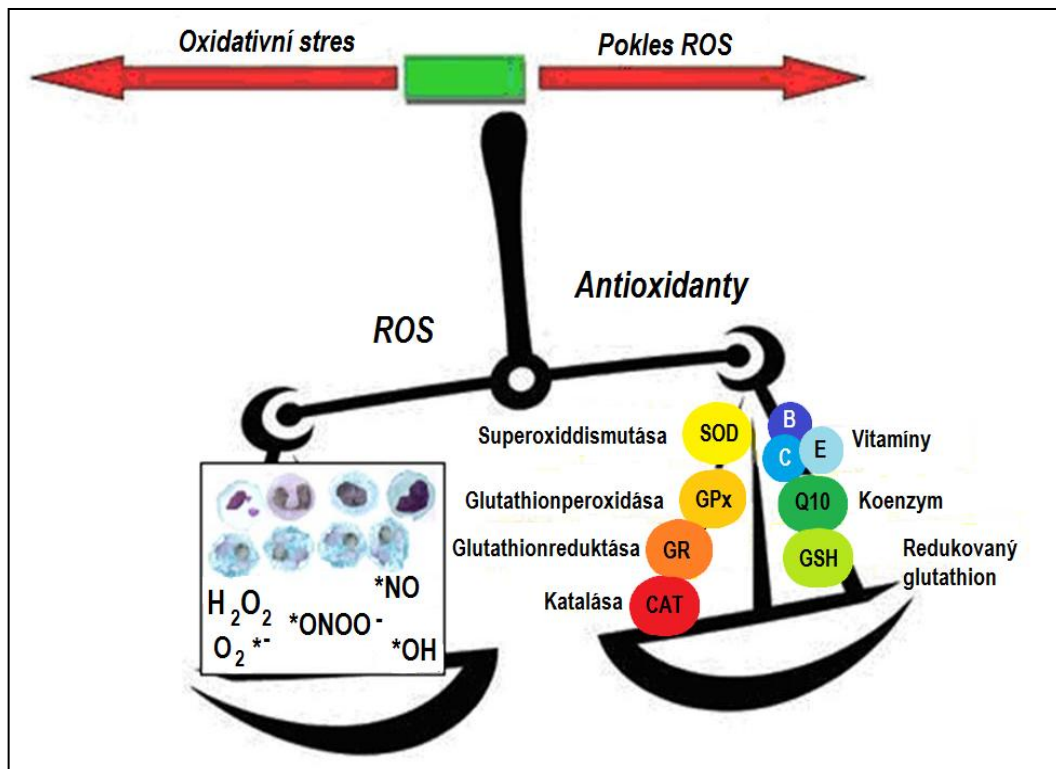
V 50. letech 20. století se ve Velké Británii zrodil koncept tzv. 3R (Replace, Reduce, Refine). Hlavní myšlenkou tohoto konceptu je humánní přístup k experimentům na zvířatech. Koncept 3R upřednostňuje využití nižších živočichů k testům toxicity či úplným nahrazením alternativními metodami, např. matematickými modely. Preferuje snižování počtu organismů využívaných k pokusům, slučitelných s vhodnými metodami, tak aby bylo množství získaných informací srovnatelné nebo vyšší. V neposlední řadě se snaží o zmírnění bolesti a utrpení použitých zvířat během experimentů (Russel a Burch, 1959).

Dnešním trendem je tedy náhrada obratlovců v testech toxicity za bezobratlé. Rak mramorovaný patří mezi bezobratlé živočichy, je odolný, přizpůsobivý a není ohroženým nebo chráněným druhem. Kombinace jeho vlastností, a to rychlého růstu a dospívání, typu rozmnožování, vysoké plodnosti a krátkodobé inkubace, z něj dělá vysoce adaptabilní druh a kandidáta na modelový organizmus pro testy toxicity. Tento druh se využívá i v toxikologických studiích například v embryolarválních testech (Velíšek, 2014b,c); v chronických testech (Stará, 2014), tak i cytologických, neurobiologických, vývojových a dalších studiích (Vogt, 2010, 2011).

2.3. Oxidativní stres

Oxidační stres můžeme charakterizovat jako převahu volných radikálů nad antioxidanty (obr. č. 3). Radikál je vysoce reaktivní částice, která má jeden nebo více nepárových elektronů. Chemický radikál nebo volný chemický radikál zvyšuje oxidativní charakter a posiluje redoxní reakce vnitřního prostředí organismu (krve, tkání, orgánů, buňky), snižuje hladinu antioxidantů (antioxidační rezistenci) vnitřního prostředí organismu a stává se tak radikálem biologickým. Radikály vznikající při patologických stavech, v energetickém metabolismu, v důsledku fyzikálních faktorů, chemickou cestou (některé poškozené biomolekuly mohou mít samy charakter radikálů a tím iniciovat vznik dalších radikálů). Nejznámější jsou v tomto ohledu proteiny, na které se enzymaticky navázala glukóza, tzv. AGE's (z ang. *Advanced Glycation End-product*), zevního prostředí (dusitany, chlór, kyslíkové radikály, kyslík, ozón, peroxidy,

oxidy a jejich reaktivní sloučeniny, těžké kovy, železo a měď zejména v některých sloučeninách, některé herbicidy a pesticidy, tuky přepálené a vlivem tepla, světla a času za přístupu vzduchu zoxidované) (Halliwell a Gutteridge, 2000).



Obr. č. 3. Rovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty
(upraveno podle Amira a Adly, 2010).

Volné radikály exogenního i endogenního původu, jsou charakterizovány nepárovými elektrony. Je-li v přítomnosti kyslík, na místo nepárového elektronu se okamžitě naváže molekula kyslíku a vzniká peroxidový radikál, který se snaží získat z jiné sloučeniny chybějící elektron, čímž vytváří jiný volný radikál. Tato řetězová reakce je přerušena buď vazbou dvou radikálů na sebe, nebo reakcí s antioxidantem. Nejznámější vznik volných radikálů probíhá v dýchacím řetězci. Oxidací vzdušným O_2 vzniká energie a jako vedlejší produkty volné radikály superoxid (O_2^*) a volný hydroxylový radikál (OH) (Holeček, 2005).

Superoxid dismutáza (SOD) vytváří superoxid, který je zpracováván na peroxid vodíku, ten, přestože není volným radikálem, je také neméně škodlivý. Peroxid vodíku proniká membránami buněk a sám může působit oxidační poškození buňky nebo dát vzniknout hydroxylovému radikálu. Má delší poločas trvání než volné radikály, které

mají poločas většinou v rozmezí 10^{-5} - 10^{-9} sekundy. Tyto metabolické produkty volných radikálů se označují jako reaktivní formy kyslíku (ROS z angl. *Reactive Oxygen Species*) (Šípek a kol., 2000).

Odstranění peroxidu vodíku se děje pomocí katalázy a peroxidáz. V lidském organismu je peroxid vodíku odstraňován hlavně glutathion peroxidázou (GPx), méně katalázou (CAT). Při nedostatku těchto enzymů a v přítomnosti kovů (Fe, Ni, Co, Cd, Cu) vznikají z peroxidu vodíku dva volné hydroxylové radikály. Ty až po spojení s dalším elektronem vytváří molekulu vody (Fentonova reakce). Cílem organismu je zabránit vzniku volného hydroxylového radikálu (Ráček a Holeček, 1999).

Proti působení volných radikálů jsou obranou antioxidanty. Odstraňování volných radikálů pak probíhá často ve vzájemné souhře různých reakcí. Např. vitamin E odbourává superoxid na kyslík, přitom však vzniká radikál vitaminu E, dále vitamin C regeneruje vitamin E za vzniku radikálu vitaminu C a ten je teprve odstraňován redukováním glutathionem. Ten je zpětně redukován glutathion reductázou za účasti NADPH (Lushchak, 2011).

Antioxidant je látka, jejíž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů – snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů (Lushchak, 2011). Antioxidanty rozlišujeme na hydrofilní, lipofilní a amfifilní. Podle způsobu účinku rozlišujeme enzymatické antioxidanty (SOD, GPx aj.) a neenzymatické (kyselina močová, vitaminy C, E, b-karoten, bílkoviny, flavonoidy, selen, zinek, některé léky aj.) (Šípek a kol., 2000).

Superoxid dismutáza je důležitý přirozený, tělu vlastní enzymatický antioxidant. Účinně působí na superoxidový radikál a přeměňuje ho na méně toxický peroxid vodíku (Šípek a kol., 2000). Glutathion peroxidáza je enzym, který v těle mění toxický a karcinogenně působící peroxid vodíku na neškodnou vodu a molekulární kyslík (Šípek a kol., 2000). Kataláza je běžný enzym vyskytující se téměř ve všech živých organismech vystavených kyslíku. Funguje jako katalyzátor rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík (Leopold a Loscalzo, 2000).

3. MATERIÁL A METODIKA

Vliv metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy na raná vývojová stádia raka mramorovaného byl hodnocen pomocí dlouhodobého embryolarválního testu toxicity. Experiment probíhal v akvarijní místnosti laboratoře vodní toxikologie a ichthyopatologie na Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém ve Vodňanech, Fakultě rybářství a ochrany vod, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

3.1. Embryolarvální test toxicity

Testy toxicity s vodními organizmy patří mezi nejrozšířenější metody hodnocení dopadu látek na životní prostředí a jsou využívány při hodnocení nově vyvinutých chemických látek a přípravků, při klasifikaci odpadů či hodnocení odpadních vod i při určování původců havarijních znečištění povrchových a podzemních vod. Testy toxicity na racích jsou založeny na stejném principu jako testy s rybami (Velíšek a kol., 2014a,b,c).

Z necílových organismů byl vybrán rak mramorovaný jako zástupce korýšů. Korýši, jsou rozšířeni téměř do celého světa a tvoří jednu z velice významných skupin živočišné říše. Dalším důvodem, díky kterému byli vybráni právě raci, je snaha koncipovat testy toxicity v souladu s pravidly 3R (Replace, Reduce, Refine). V zemích EU je stále více dbáno na dodržování tohoto konceptu (Velíšek a kol., 2014a).

Mezi cíle 3R patří ochrana obratlovců, jejich co možná nejnížší použití v rámci toxikologických studií a i celkové snížení potřeby jakýchkoli pokusných zvířat. Dle tohoto konceptu jsou upřednostňovány nové, alternativní experimentální metody, které využívají nižší živočichy (např. mikroorganismy a bezobratlé) (Velíšek a kol., 2014a). Proto byla pro náš experiment zvolena skupina bezobratlých organismů - raci, kteří by v budoucnu mohli hrát klíčovou roli při posuzování vlivu pesticidů a jejich metabolitů na vodní organizmy a současně by raci mohli být využíváni jako významný bioindikátor znečištění vodních ekosystémů xenobiotiky, respektive pesticidy.

3.1.1. Princip a podmínky testu

Dlouhodobé embryolarvální testy toxicity posuzují chronický vliv testovaných látek na vodní organizmy. Během těchto studií jsou posuzovány nízké koncentrace testovaných látek. Experimentální organizmy jsou vystaveny určitým koncentracím testované látky rozpuštěné ve vodě nebo bývají používána různá rozpouštědla (např. dimethylsulfoxid - DMSO).

V průběhu testu jsou v pravidelných intervalech sledovány základní fyzikálně chemické parametry vody (teplota vody, nasycení vody kyslíkem, hodnoty pH), koncentrace testované látky, mortalita a chování organismů. Cílem embryolarválního testu je posouzení vlivu terbuthylazinu-2-hydroxy na raná vývojová stádia raků.

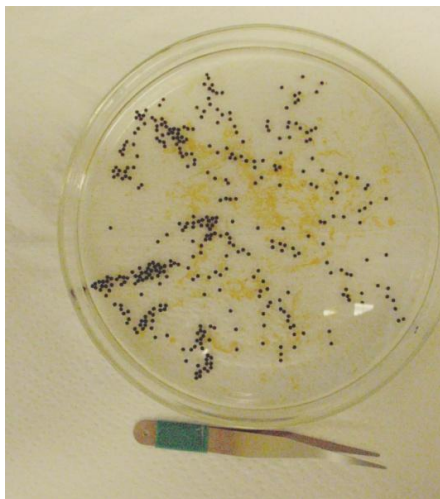
3.1.2. Experimentální materiál

Jako experimentální materiál byla použita oplodněná vajíčka, která byla odebrána pinzetou z pleopod samičky (obr. č. 4) raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *Virginalis*). Oplodněná samička byla získaná z odchovny Výzkumného ústavu rybářství a hydrobiologie ve Vodňanech, Fakulty rybářství a ochrany vod, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Hmotnost této samičky byla 6,68 g, délka hlavohruďi 28,94 mm (měřeno od špičky rostra ke konci karapaxu) a postorbitální délka hlavohruďi byla 22,69 mm (měřeno od oční jamky po konec karapaxu). K testu bylo použito celkem 210 vajíček s průměrnou hmotností 2.18 mg v X. fázi embryonálního vývoje.



Obr. č. 4. Samička raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *Virginalis*) z odchovny FROV JU použita pro test.

Vajíčka byla rozdělena do 5 skupin po 42 kusech (obr. č. 5-7) a individuálně umístěna do mikrodestiček o objemu 10 ml. Vajíčka byla rozdělena do čtyř experimentálních skupin s různou koncentrací terbuthylazinu-2-hydroxy (Sigma Aldrich, Česká republika, s chemickou čistotou 99,5 %) a jedné kontrolní skupiny (která obsahovala jen ředící vodu bez testované látky).



Obr. 5. Třídění vajíček.



Obr. 6. Umístění vajíček do mikrodestiček.



Obr. 7. Rozdělení do 5 skupin (čtyři experimentální skupiny s různou koncentrací terbuthylazinu-2-hydroxy a kontrola).

Koncentrace terbuthylazinu-2-hydroxy použité v testu byly následující:

- 1) 0,75 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (skupina č. 1 - E1), skutečná koncentrace nalezená v českých řekách (ČHMÚ, 2016),
- 2) 75 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (skupina č. 2 - E2),
- 3) 375 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (skupina č. 3 - E3),
- 4) 750 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (skupina č. 4 - E4),
- 5) kontrola – bez testované látky.

Parametry ředící vody pro přípravu testovacích roztoků byly následující:

- obsah kyslíku > 95 %,
- teplota 19,8 - 20,1 °C,
- pH 7,4 - 7,9,
- CHSK_{Mn} 1,18 mg.l^{-1} ,
- celkový amoniak < 0,01 mg.l^{-1} ,
- NO_3^- 4,20 mg.l^{-1} , NO_2^- < 0,01 mg.l^{-1} .

Koncentrace terbuthylazinu-2-hydroxy v testovacích roztocích v průběhu experimentu byla stanovena metodou tandemové hmotnostní spektrometrie (LC/MS/MS). Zjištěná koncentrace terbuthylazinu-2-hydroxy během testu nepoklesla pod hodnotu nominální koncentrace o více než 8 procent. Stanovení koncentrace terbuthylazinu-2-hydroxy nebylo součástí bakalářské práce a bylo provedeno formou služby.

3.2. Průběh testu

Vajíčka, a později raná vývojová stádia raků, byla vystavena terbuthylazinu-2-hydroxy po dobu šedesáti dvou dnů. Mikrodestičky byly umístěny do boxu v laboratoři, uspořádání mikrodestiček jedné skupiny bylo náhodné. Světelný režim v testu byl přirozený (12 hodin světla a 12 hodin tmy).

Test byl proveden v semistatickém systému, testovací roztoky byly vyměňovány každé dva dny. Výměna roztoků byla prováděna velice opatrně, aby nedošlo k poškození testovaných jedinců, voda byla odsávána šetrně pipetou, mikrodestičky byly propláchnuty a nový roztok (10 ml) byl pomalu pipetován zpět. Denně bylo

sledováno přežití a stupeň vývojového stádia. Mrtvá vajíčka nebo jedinci byli odstraňováni.

Vývojová stádia byla stanovena podle Vogt et al. (2004). Juvenilní vývojová stádia se dělí na tři etapy. První stádium zahrnuje období těsně po vylíhnutí až do prvního svlékání. Z počátku jsou ráčata přichycena pomocí háčků na telstonu za telstonové vlákno přes vaječný obal. Takto jsou uchyceny na pleopodech samičky až do doby, než toto vlákno zmizí a ráčata začnou být aktivní a přichytí se na samici pomocí háčků na klepetech. Po prvním postembryonálním svlékání rozlišujeme druhé juvenilní stádium. Mláďata raka mramorovaného začínají být plně samostatná až ve třetím stádiu.

Od třetího vývojového stádia byli juvenilní jedinci krmeni *ad libitum* jednou denně čerstvě vylíhlými, v čisté vodě opláchnutými, naupliemi žábřonožky solné (*Artemia salina*). Každý druhý den, po dosažení vývojového stupně, byli jedinci váženi na analytických vahách značky Mettler-Toledo.

Na konci testu bylo provedeno vyhodnocení růstových parametrů raků. Pro toto vyhodnocení byly použity dva ukazatele, a to specifická rychlost růstu (SGR) a inhibice růstu (I).

Specifická rychlost růstu je podíl rozdílu průměru přirozených logaritmů hmotností raků při prvním vážení (9. den testu) a na konci testu (62. den testu). Výpočet byl proveden podle vzorce:

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

kde:

SGR = průměrná specifická rychlost růstu ve skupině;

w_1, w_2 = hmotnosti jednoho raka v čase t_1 a t_2 , jednotlivě (g);

t_1 = čas (dny) – začátek expozice;

t_2 = čas – konec expozice.

Inhibice specifické rychlosti růstu je podíl mezi rozdílem průměrné specifické rychlosti růstu kontrolní skupiny raků a experimentální skupiny raků a průměrné specifické rychlosti růstu v kontrolní skupině raků po 62 dnech expozice, násobený stem. Výpočet byl proveden podle vzorce:

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

kde:

I = inhibice specifického růstu v experimentální skupině po 53 dnech expozice;

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

SRG (skupina) = průměrná specifická rychlost růstu v experimentální skupině raků po 53 dnech expozice.

3.2.1. Odběr vzorků

Na konci testu (62. den) byl proveden odběr vzorků pro stanovení hladiny oxidativního stresu a aktivity antioxidantních enzymů. Biomarkery oxidativního stresu a antioxidantních enzymů byly měřeny v celotělním homogenátu raků mramorovaných.

Odebrané vzorky byly okamžitě zmrazeny a skladovány při -80 °C pro následné analýzy. Před rozmrazením byly vzorky opět zváženy a následně proběhla jejich homogenizace (1:10, w/v) v přístroji Ultra Turrax homogenizér (IKA, Německo). Pro homogenizaci byl použit fosfátový pufr s obsahem EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) s neutrálním pH. Vzniklý homogenát byl následně rozdělen do dvou částí. První část homogenátu byla použita pro analýzu lipidní peroxidace pomocí reaktivních látek s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS). Další část homogenátu byla použita pro stanovení aktivity antioxidantních biomarkerů superoxid dismutázy (SOD), katalázy (CAT) a glutathion reductázy (GR).

3.3. Metody stanovení biomarkerů

3.3.1. Metoda stanovení lipidní peroxidace

Lipidní peroxidace je měřena jako TBARS (látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou). Principem této metody je stanovení barevných aduktů, vznikajících během reakcí produktů lipidní peroxidace a kyseliny barbiturové (TBA). Vzniklý barevný adukt je měřen spektrofotometricky za pomoci destičkového spektrofotometru Infinite M200PRO (TECAN).

Při stanovení TBARS bylo postupováno podle metodiky Luschak (2005). Vzorek celotělního homogenátu (250 μ l) byl 30 minut preinkubován s 12,5 μ l FeSO_4 při 37 $^\circ\text{C}$. Dále byl k homogenátu v poměru 250 μ l:75 μ l přidán roztok TCA - BHT, tato směs byla následně promíchána na vortexu a dvacet minut centrifugována při 4000 rpm a teplotě 4 $^\circ\text{C}$. Po centrifugaci bylo do mikrozkušavek přepipetováno 250 μ l vzorku a následně přidáno 50 μ l HCl a 200 μ l TRIS - TBA. Takto připravený vzorek byl umístěn do termobloku, kde se vařil po dobu 45 minut při teplotě 90 $^\circ\text{C}$. Po uplynutí 45 minut byly vzorky přepipetovány do mikrotitračních destiček a spektrofotometricky bylo změřeno vzniklé zbarvení při 550 nm a následně při 590 nm. Hodnoty byly vyjádřeny jako nmol TBARS. mg^{-1} proteinů.

3.3.2. Stanovení aktivity superoxid dismutázy (SOD)

Superoxid dismutázy patří mezi metaloenzymy. Součástí struktury těchto enzymů je iont kovu, a to konkrétně mědi, zinku, manganu a niklu. SOD jsou součástí všech buněk, nejčastěji se však nacházejí v játrech. Hlavní funkcí tohoto enzymu je kontrola množství superoxidových radikálů v buňce. V případě jejich nadbytku, jsou tyto radikály katalyzovány na molekulový kyslík a peroxid vodíku (Ozturk-Urek a Tarhan, 2001). Principem tohoto stanovení je schopnost SOD inhibovat reakce řízené superoxidy.

K produkci superoxidů je použit NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) a phenazin methosulfonát (PMS). Produkce superoxidů je stanovena za pomoci NBT (nitrobluetetrazolium), které je po průběhu reakce měněno na barevný stabilní formazanový produkt, který je v mikrotitračních destičkách následně spektrofotometricky měřen za pomoci přístroje Infinite M200PRO (TECAN) dle metodiky Marklund a Marklund (1974).

Vzorek celotělního homogenátu (25 μl) byl přepipetován do mikrodestičky a bylo přidáno 200 μl homogenizačního pufru s NADH a NBT. Objem byl důkladně promíchán a následně měřen při 560 nm 2 minuty s 20 sekundovými intervaly. Poté se reakce odstartuje přidáním 25 μl PMS a ihned je měřena kinetika reakce opět při 560 nm ve dvaceti sekundových intervalech po dobu pěti minut. Hodnota aktivity SOD byla vyjádřena v $\text{nmol NBT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů.

3.3.3. Stanovení aktivity katalázy (CAT)

Kataláza je hlavní funkcí kataláz. Použitá metoda je založena na schopnosti tohoto enzymu přeměnit peroxid vodíku na vodu a kyslík. Během měření se sleduje pokles peroxidu vodíku za jednotku času. Aktivita katalázy byla měřena na přístroji Infinite M200PRO (TECAN). Stanovení aktivity CAT bylo provedeno podle metodiky Aebi (1984).

Do mikrokyvet bylo pipetováno 50 μl celotělního homogenátu raků a přidáno 250 μl 0,09% H_2O_2 . Vše bylo promícháno a ihned byla měřena absorbance reakční směsi. Měření probíhalo v jednotlivých intervalech, vždy po pěti sekundách po dobu jedné minuty při 240 nm. Naměřená hodnota CAT aktivity byla vyjádřena jako $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů.

3.3.4. Stanovení aktivity glutathion reduktázy (GR)

Hlavním úkolem enzymu glutathion reduktázy je katalýza oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukovaný glutathion (GSH) za spotřeby nikotinamid adenin dinukleotid fosfátu (NADPH). Aktivita GR byla stanovena spektrofotometricky na základě měření koncentrace NADPH během reakce na destičkovém spektrofotometru Infinite M200PRO (TECAN), měřením oxidace NADPH dle metodiky Carlberg a Mannervik (1975).

Do mikrodestiček bylo postupně pipetováno 80 μl GR pufru, 20 μl NADPH, 20 μl GSSG a 30 μl destilované vody. Takto vzniklý roztok byl při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$ dvacet sekund promícháván na vortexu a poté byla měřena spotřeba NADPH, při 340 nm bez vzorku po dobu 2 minut. Následně bylo přidáno 50 μl vzorku a bylo provedeno měření při 340 nm v jednotlivých intervalech vždy po 15 sekundách. Celková doba měření byla 5 minut. Aktivita glutathion reduktázy byla vyjádřena jako počet jednotek na $\text{nmol NADPH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteinů.

3.3.5. Metoda stanovení koncentrace proteinů

Principem stanovení koncentrace proteinů je využití Folin-Ciocalteu fenolové reagencie, při vzniku modře zbarveného komplexu podle Lowryho a kol. (1951). Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno spektrofotometricky na destičkovém spektrofotometru Infinite M200PRO (TECAN).

Do připravených mikrodestiček bylo postupně napipetováno 40 μl BSA standardu nebo desetkrát naředěného vzorku. Následně bylo přidáno 35 μl NaOH + 105 μl CuSO₄ a 70 μl Folin reagentu a promícháno na vortexu. Inkubace mikrodestiček probíhala po dobu třiceti minut ve tmě při teplotě 37°C. Po uplynutí této doby následovalo měření při 680 nm proti blanku. Koncentrace proteinů v celotělním homogenátu raků byla vypočítána podle kalibrační křivky pro BSA - v rozsahu 0,1 - 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.5. Statistické vyhodnocení testu

Stanovení statistického rozdílu mezi experimentálními skupinami a kontrolu bylo vyhodnoceno pomocí statistického programu Statistika 12.0 analýzou variance (ANOVA - Tuckey test).

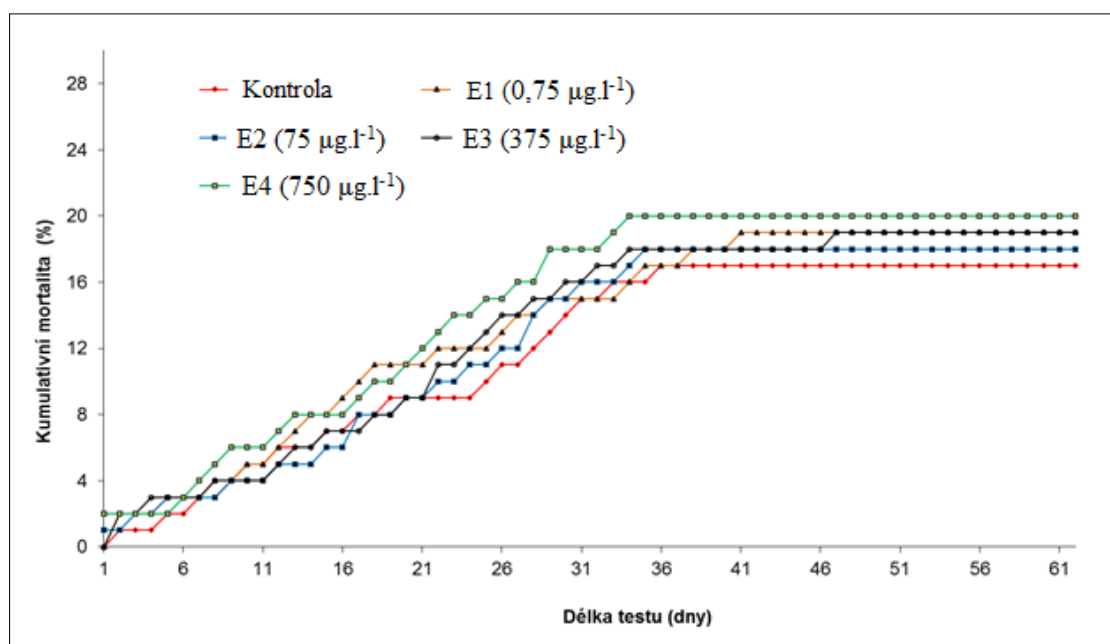
4. VÝSLEDKY

4.1. Chování raků

Během experimentu bylo sledováno chování (příjem krmiva a pohybová aktivita) raných vývojových stádií raka mramorovaného v jednotlivých experimentálních skupinách, vystavených terbuthylazinu-2-hydroxy a kontrole. Tato raná vývojová stadia raka mramorovaného, vystavena terbuthylazinu-2-hydroxy v koncentracích (0,75; 75; 375 a 750 $\mu\text{g.l}^{-1}$) po dobu 62 dnů, nejevila žádné změny chování a v příjmu krmiva v porovnání s kontrolou.

4.2. Kumulativní mortalita

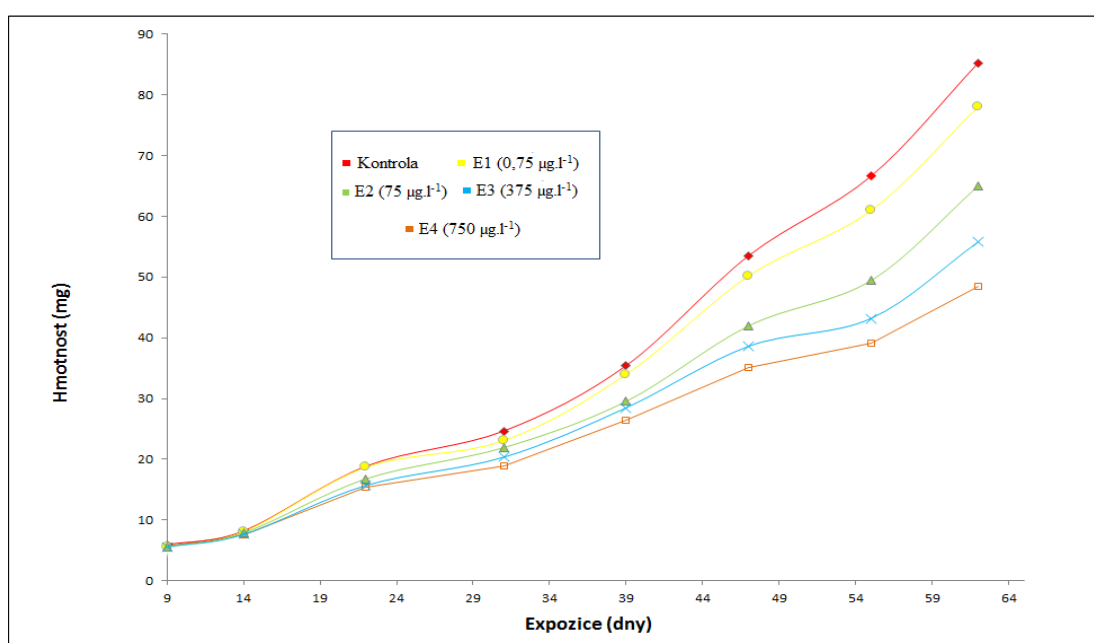
Mezi skupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v kumulativní mortalitě raků vystavených terbuthylazinu-2-hydroxy v porovnání s kontrolní skupinou. Kumulativní mortalita v experimentálních skupinách a kontrolní skupině se pohybovala mezi 17 až 20 % (graf č. 1).



Graf č. 1. Kumulativní mortalita raka mramorovaného vystaveného metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy během embryolarválního testu toxicity.

4.3. Růstové parametry

Od dvacátého druhého dne experimentu bylo zjištěno statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hmotnosti raků, vystavených nejvyšší testované koncentraci terbuthylazinu-2-hydroxy ($750 \mu\text{g.l}^{-1}$, čtvrtá skupina - E4), ve srovnání s kontrolou (graf č. 2). Od 47 dne bylo také pozorováno statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hmotnosti raků, vystavených testované koncentraci $375 \mu\text{g.l}^{-1}$ terbuthylazinu-2-hydroxy (E3), ve srovnání s kontrolní skupinou. U raků v experimentální skupině E2 ($75 \mu\text{g.l}^{-1}$ terbuthylazinu-2-hydroxy) bylo zjištěno statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hmotnosti až od 55. dne expozice. U první experimentální skupiny vystavené reálné koncentraci terbuthylazinu-2-hydroxy ($0,75 \mu\text{g.l}^{-1}$) nebyl zjištěn vliv na růst raků mramorovaných.



Graf č. 2. Hmotnost raných vývojových stádií raka mramorovaného vystavených 62 denní expozici metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy.

Specifická rychlost růstu (SRG) a inhibice růstu (I) raných vývojových stádií raka mramorovaného, vystavených 62 denní expozici terbuthylazinu-2-hydroxy, je uvedena v tabulce č. 1. Inhibice růstu raků vystavených nejvyšší koncentraci terbuthylazinu-2-hydroxy ($750 \mu\text{g.l}^{-1}$) byla 19,80 % ve srovnání s kontrolní skupinou, u raků vystavených koncentrací $375 \mu\text{g.l}^{-1}$ terbuthylazinu-2-hydroxy byla inhibice růstu 13,40 % a u skupiny vystavené koncentrací $75 \mu\text{g.l}^{-1}$ terbuthylazinu-2-hydroxy byla inhibice růstu 8,40 %.

Tabulka č. 1. Specifická rychlost růstu a inhibice růstu raka mramorovaného po expozici metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy.

Skupina	Kontrola	E1	E2	E3	E4
Terbuthylazine-2-hydroxy ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	-	0,75	75	375	750
M₉ (Mean \pm SD, mg)	5,93 \pm 0,19	5,57 \pm 0,39	5,61 \pm 0,40	5,57 \pm 0,45	5,70 \pm 0,42
M₆₂ (Mean \pm SD, mg)	85,27 \pm 14,48	78,06 \pm 11,49	65,00 \pm 12,32*	55,79 \pm 9,11*	48,39 \pm 6,97*
SGR	5,00	41,98	4,58	4,33	4,01
I (%)	-	0,40	8,40	13,40	19,80

*Experimentální skupiny statisticky ($P < 0,01$) významně se lišící od kontrolní skupiny.

Poznámka: m_9 , m_{62} = průměrná hmotnost raků vybrané skupiny 9. a 62. den expozice;

SGR = specifická rychlost růstu vybrané skupiny po 53 dnech expozice;

I = inhibice specifické rychlosti růstu vybrané skupiny po 52 dnech expozice;

SD = směrodatná odchylka.

4. 5. Ontogenetický vývoj

U raků vystavených nejvyšší koncentraci $750 \mu\text{g.l}^{-1}$ terbuthylazinu-2-hydroxy došlo po 62 denní expozici ke zpoždění ontogenetického vývoje. Raci v této koncentraci dosáhli pouze vývoje VIII. fáze juvenilního stádia. V kontrolní skupině a ostatních třech experimentálních skupinách, vystavených terbuthylazinu-2-hydroxy v koncentracích ($0,75$, 75 a $375 \mu\text{g.l}^{-1}$), raci na konci testu (62. den) dosáhli X. fáze juvenilního stádia.

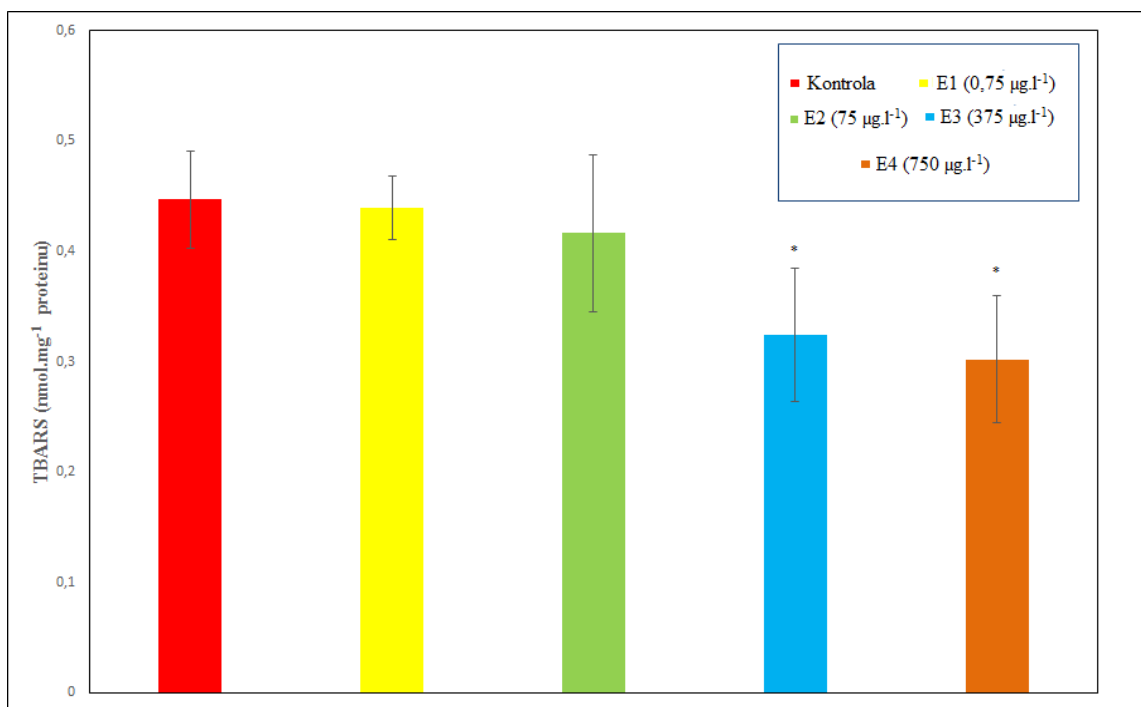
4.6. Makroskopické morfologické anomálie

V průběhu testu nebyly zjištěny v žádné experimentální ani kontrolní skupině makroskopicky pozorovatelné morfologické anomálie.

4.7. Biomarker oxidativního stresu

4.7.1. Lipidní peroxidace

Účinky chronické expozice terbuthylazinu-2-hydroxy na hladinu TBARS v celotělním homogenátu raka mramorovaného jsou uvedeny v grafu č. 3. Statisticky významné ($P < 0,01$) snížení hladiny TBARS v celotělním homogenátu raků bylo zjištěno po 62 denní expozici v experimentálních skupinách vystavených terbuthylazinu-2-hydroxy v koncentracích $375 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $750 \mu\text{g.l}^{-1}$ v porovnání s kontrolní skupinou. Ve skupinách raků vystavených terbuthylazinu-2-hydroxy v koncentracích $0,75 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $75 \mu\text{g.l}^{-1}$ nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v hladině TBARS v porovnání s kontrolou.



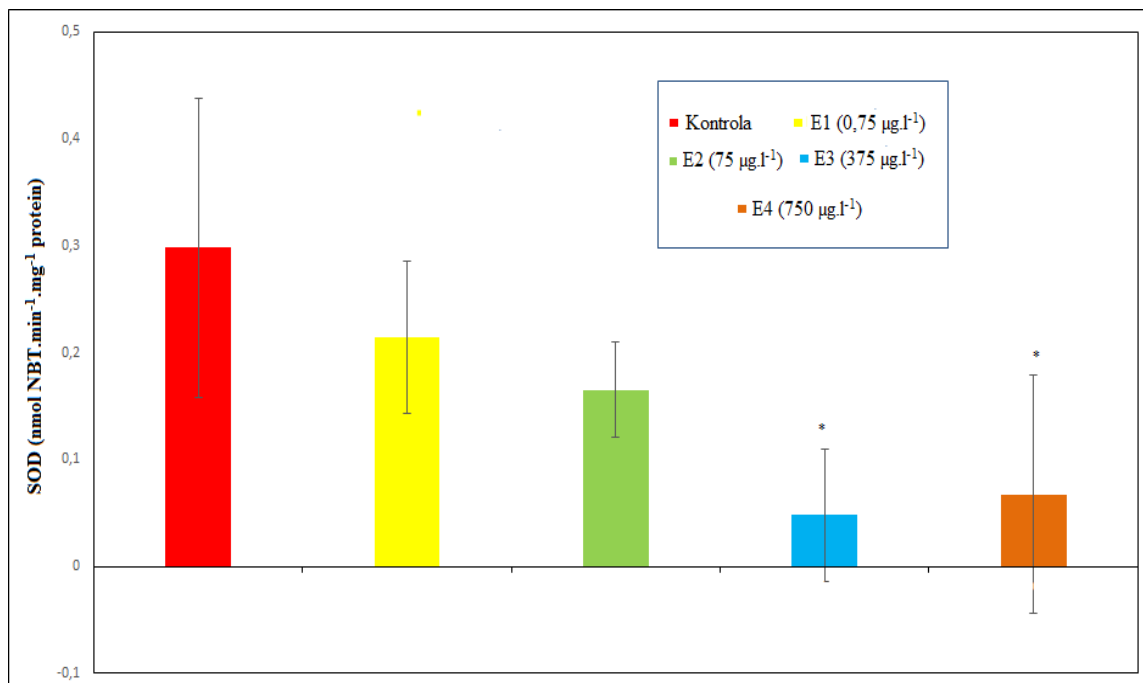
Graf č. 3. Hladina TBARS v celotělním homogenátu raka mramorovaného po 62 denní expozici terbuthylazinu-2-hydroxy. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm S. D., $N = 20$.

* $P < 0.01$ statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolou.

4.8. Antioxidační biomarkery

4.8.1. Superoxid dismutáza

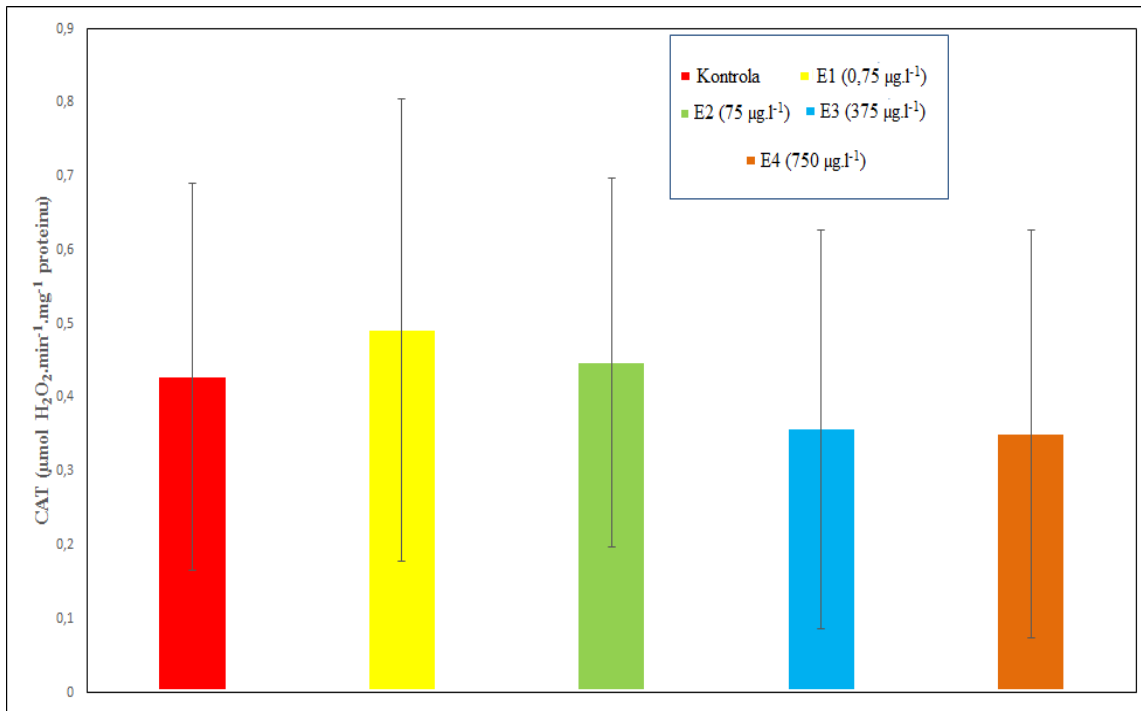
Účinky expozice terbuthylazinu-2-hydroxy na aktivitu superoxid dismutázy, v celotělním homogenátu raka mramorovaného, jsou uvedeny v grafu č. 4. Ve skupinách raků vystavených terbuthylazinu-2-hydroxy v koncentracích $0,75 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $75 \mu\text{g.l}^{-1}$ nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v aktivitě SOD v porovnání s kontrolní skupinou. U raků vystavených terbuthylazinu-2-hydroxy v koncentracích $375 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $750 \mu\text{g.l}^{-1}$ bylo zjištěno statisticky významné ($P < 0,01$) snížení aktivity SOD v celotělním homogenátu po 62 denní expozici.



Graf č. 4. Aktivita superoxid dismutázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného po 62 denní expozici terbuthylazinu-2-hydroxy. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm S. D., $N = 20$. * $P < 0.01$ statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolou.

4.7.2. Kataláza

Účinky expozice terbuthylazinu-2-hydroxy na aktivitu katalázy, v celotělním homogenátu raka mramorovaného, jsou uvedeny v grafu č. 5. Šedesáti dvou denní expozice terbuthylazinu-2-hydroxy, v testovaných koncentracích (0,75, 75, 350 a 750 $\mu\text{g.l}^{-1}$), neměla vliv na aktivitu katalázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného.

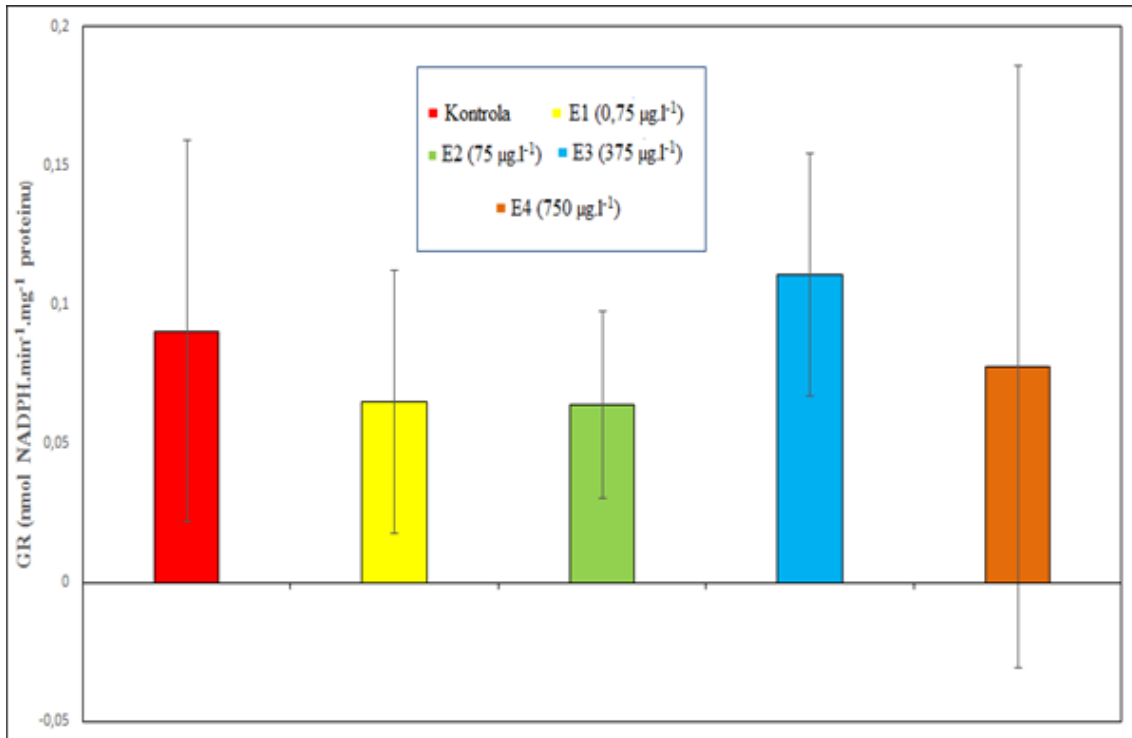


Graf č. 5. Aktivita katalázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného po 62 denní expozici terbuthylazinu-2-hydroxy. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm S.D., $N=20$.

* $P < 0.05$ statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolou.

4. 7. 3. Glutathion reduktáza

Účinky expozice terbuthylazinu-2-hydroxy na aktivitu glutathion reduktázy, v celotělním homogenátu raka mramorovaného, jsou uvedeny v grafu č. 6. Šedesáti dvou denní expozice terbuthylazinu-2-hydroxy, v testovaných koncentracích ($0,75$, 75 , 350 a $750 \mu\text{g.l}^{-1}$), neměla vliv na aktivitu glutathion reduktázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného.



*Graf č. 6. Aktivita glutathion reduktázy v celotělním homogenátu raka mramorovaného po 62 denní expozici terbuthylazinu-2-hydroxy. Hodnoty v grafu uvádějí průměr \pm S. D., $N = 20$. * $P < 0.05$ statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolou.*

5. DISKUSE

Cílem této studie bylo posouzení vlivu metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy na raná vývojová stádia raka mramorovaného (*Procambarus fallax* f. *virginalis*). Dalším cílem této práce bylo rozšířit podklady o možném vlivu tohoto metabolitu na vodní ekosystém a organizmy v něm žijící. Pro posouzení vlivu byl použit embryolarvální test toxicity.

Triaziny jsou velice dobře popsány ve vědecké literatuře, na Web of Science je možné nalézt přibližně 17 500 vědeckých článků. Nicméně jen malá část těchto publikací popisuje vliv těchto látek na vodní organizmy. Vliv triazinů na ryby byl doposud popsán ve 143 vědeckých publikacích, vliv triazinů na raky je však popsán pouze v šesti vědeckých pracích. Stále ovšem existuje jen velmi málo údajů o vlivu metabolitů triazinů pro raky a ostatní vodní organizmy.

Raci patří k největším sladkovodním bezobratlým, jsou klíčovým druhem a v ekosystému hrají významnou úlohu jako všežraví živočichové se širokým jídelníčkem. Jako velcí bentičtí makrofágové jsou dobře pozorovatelní a odlišitelní od jiných živočichů. Také splňují kritéria 3R principu a jsou indikátorem kvality životního prostředí (Kozák a kol., 2013).

Během experimentu nebyl zjištěn vliv terbuthylazinu-2-hydroxy na chování (příjem krmiva a pohybovou aktivitu) vývojových stádií raka mramorovaného. Změna chování je jedním z mnoha sledovaných parametrů během toxikologických studií. Změna chování vodních organismů může být i indikátorem znečištění vodního prostředí (Hayes, 2007). Změny chování raků se vyskytují pouze při vyšších koncentracích triazinů (řádově desítky miligramů), jedná se hlavně o nekoordinované pohyby a snahu uniknout z kontaminovaného prostředí (Velíšek a kol., 2013). Výsledky této studie jsou v souladu s dalšími studiemi, při kterých byli raci vystaveni subletálními dávkami triazinů. V těchto studiích také nebyly pozorovány žádné změny chování (Stará a kol., 2014; Koutník a kol., 2014).

Kumulativní mortalita v experimentálních skupinách a kontrolní skupině byla na konci testu 17 až 20 %. Mezi skupinami nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v kumulativní mortalitě raků. Mortalita během testu byla nízká z důvodu použití nízkých koncentrací terbuthylazinu-2-hydroxy. Všeobecně se uvádí, že letální koncentrace triazinů pro vodní organizmy, hlavně ryby, se pohybují v rozsahu jednotek až stovek miligramů na litr (Velíšek a kol., 2014a). Letální hodnota (96hLC50) pro raka signálního (*Pacifastacus leniusculus*) pro atrazin je 12,1 mg.l⁻¹, pro terbutryn je 13,9 mg.l⁻¹, pro prometryn je 14,4 mg.l⁻¹, pro hexazinon je 19,5 mg.l⁻¹, pro metribuzin je 30,6

mg.l⁻¹ a pro simazin je 77,9 mg.l⁻¹ (Velíšek a kol., 2013). V povrchových vodách se koncentrace triazinů pohybuje řádově od desetin až do desítek mikrogramů na litr (Sehonová a kol., 2012). Lze tedy předpokládat, že triaziny a jejich metabolity nebudou v prostředí způsobovat akutní úhyny vodních organismů, ale mohou mít chronické vlivy na tyto organizmy.

V embryolarválních testech toxicity se běžně sleduje vývoj testovaných organismů, tento parametr je relativně citlivý při hodnocení toxicity pesticidů (Hayes, 2007). U raků, vystavených nejvyšší koncentraci 750 µg.l⁻¹ terbuthylazinu-2-hydroxy, došlo po 62 denní expozici ke zpoždění ontogenetického vývoje. Raci v této koncentraci dosáhli pouze vývoje VIII. fáze juvenilního stádia oproti ostatním experimentálním skupinám a kontrole, kde raci dosáhli X. fáze juvenilního stádia. Tyto výsledky jsou v souladu s ostatními studii na racích a rybách, kde došlo ke zpoždění ontogenetického vývoje pouze u vyšších koncentrací triazinů (jednotky miligramů na litr) (Velíšek a kol., 2014b,c; Koutník a kol., 2015; Velíšek a kol., 2016).

Po expozici terbuthylazinu-2-hydroxy v koncentracích (0,75; 75; 375; 750 µg.l⁻¹) nebyly pozorovány žádné makroskopicky pozorovatelné morfologické anomálie v experimentálních skupinách, ani ve skupině kontrolní. Tyto výsledky jsou v souladu s dalšími studii. Ve studiích Velíšek a kol. (2014b,c, 2016) také nebyly pozorovány žádné morfologické anomálie u vývojových stádií raků a ryb vystavených triazinům.

Růst je jeden z parametrů, který je rutině měřen během embryolarválních testů toxicity. Růst představuje integraci různých fyziologických a environmentálních faktorů (Sprague, 1971). V testu byl zjištěn statisticky významný pokles tělesné hmotnosti raků vystavených koncentracím vyšším než 75 µg.l⁻¹ terbuthylazinu-2-hydroxy. U raků exponovaných nejvyšší koncentraci terbuthylazinu-2-hydroxy (750 µg.l⁻¹) došlo k inhibici růstu o 19,80 % ve srovnání s kontrolní skupinou. Snížení hmotnosti raků po expozici terbuthylazinu-2-hydroxy může zpozdit reprodukci a zvýšit citlivost mladých raků k predaci a onemocněním. Výsledky této studie jsou v souladu se studii provedenými na rybách vystavených triazinům, kde také došlo k inhibici růstu (Velíšek a kol., 2015a,b, 2016).

Triaziny způsobují oxidativní stres a ovlivňují aktivitu antioxidantních enzymů ryb, intenzita těchto změn je závislá na koncentraci a délce expozice (Koutník a kol., 2015). Terbuthylazin-2-hydroxy ve dvou nejvyšších testovaných koncentracích (375 a 750 µg.l⁻¹) způsobil snížení hladiny TBARS a aktivity SOD v celotělním homogenátu raků mramorovaných. Superoxid dismutáza je jedním z antioxidantních enzymů první linie

obranu proti oxidativnímu stresu. Snížení aktivity SOD bylo vyvolané adaptační reakcí raků neutralizovat reaktivní formy kyslíku, které vznikly expozicí terbuthylazinu-2-hydroxy. Stejně změny v aktivitě SOD byly popsány i ve studii Koutník a kol. (2014), kde byl rak signální vystaven reálné koncentraci metribuzinu ($0,52 \mu\text{g.l}^{-1}$). Změny aktivity antioxidantních enzymů jsou popsány i u ryb vystavených triazinům, včetně terbuthylazinu, jehož hlavním metabolitem je terbuthylazin-2-hydroxy (Hostovský a kol., 2014).

Maximální koncentrace metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy, která byla naměřena v roce 2014 v českých řekách, je $0,75 \mu\text{g.l}^{-1}$ (ČHMÚ, 2016), odpovídá koncentraci, která byla použita v našem testu v experimentální skupině č. 1. Tato koncentrace terbuthylazinu-2-hydroxy nezpůsobila, v námi sledovaných ukazatelích, žádnou změnu. Lze tedy předpokládat, že při současném stavu metabolit terbuthylazin-2-hydroxy není rizikový pro raná vývojová stadia raků. Vodní prostředí však obsahuje velké množství látek, které mohou ovlivňovat i toxicitu terbuthylazinu-2-hydroxy.

6. ZÁVĚR

V této práci byl posouzen vliv majoritního metabolitu terbuthylazinu, a to terbuthylazinu-2-hydroxy, na raná vývojová stádia raka mramorovaného. Vliv terbuthylazinu-2-hydroxy byl hodnocen na základě růstu, biomarkeru oxidativního stresu a antioxidačních biomarkerů, ontogenetického vývoje a výskytu deformací raných vývojových stádií. K posouzení vlivu tohoto metabolitu byl použit embryolarvální test toxicity na racích. Toxický vliv terbuthylazinu-2-hydroxy byl hodnocen ve čtyřech koncentracích ($0,75 \mu\text{g.l}^{-1}$, $75 \mu\text{g.l}^{-1}$, $375 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $750 \mu\text{g.l}^{-1}$) po dobu 62 dnů.

Výsledky této studie prokázaly vliv terbuthylazinu-2-hydroxy na růst, ontogenetický vývoj a hladinu lipidní peroxidace a zároveň narušení antioxidačních systémů raka mramorovaného. Tyto změny byly prokázány jen ve vyšších testovaných koncentracích, a to $75 \mu\text{g.l}^{-1}$, $375 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $750 \mu\text{g.l}^{-1}$ terbuthylazinu-2-hydroxy. V nejnižší testované koncentraci, která odpovídala reálně se vyskytující koncentraci v podmínkách životního prostředí, nebyl prokázán vliv tohoto metabolitu na sledované ukazatele. Lze tedy předpokládat, že při současném výskytu v přírodě, metabolit terbuthylazin-2-hydroxy není rizikový pro raná vývojová stádia raků. Ale vodní prostředí může být znečištěno dalšími různými látkami, které mohou při současné expozici zesilovat negativní efekt této látky.

Tato studie doplňuje informace o vlivu metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy na raky a tím i na vodní ekosystém jako celek. Dále poukazuje na velkou citlivost vývojových stádií raků vůči metabolitům triazinů a nabízí možnost využití raných vývojových stádií raků k jejich hojnějšímu využívání při toxikologických testech a biomonitoringu zatížení vodního prostředí triaziny a jejich metabolity.

7. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Abrantes N., Pereira, R., Gonçalves, F., 2010. Occurrence of pesticides in water, sediments, and fish tissues in a lake Surrounded by agricultural lands: concerning risks to humus and ecological receptors. *Water and Air Pollution* 212: 77-88.
- Aebi, H., 1984. Catalase *In vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Agromanul, 2016. Dostupné z: <http://www.agromanual.cz/cz/pripravky/ucinne-latky/ucinna-latka/terbuthylazine>, (navštívené online 14. 4. 2016).
- Amira, A., Adly, M., 2010. Oxidative stress and Disease: An Updated Review. *Research Journal of Immunology* 3: 129-145.
- Bathe, R., Ullmann, L., Sachsse, K., 1973. Determination of pesticide toxicity to fish. *Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg Berlin - Dahlem* 37: 241-256.
- Bathe, R., Sachsse, K., Ullmann, L., Hormann, W.D., Zak, F., Hess, R., 1975. The Evaluation of fish toxicity in the laboratory. *Proceedings of the European Society of Toxicology* 16: 113-124.
- Breckenridge, C.B., Eldringe, J.C., Stevens, J.T., Simpkins, J.W., 2010. Symmetrical triazine herbicides: A Review of regulatory toxicity endpoints. In: Kriger, R. (Ed.), *Hayes` Handbook of pesticides toxicology*. Volume 2, Elsevier, Amsterdam, pp. 1711-1723.
- Carafa, R., Wollgast, J., Canuti, E., Ligthart, J., Dueri, S., Hanke, G., 2007. Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). *Chemosphere* 69: 1625-1637.
- Carson, R., 1962. *Silent Spring*. Houghton Mifflin Co., Boston, USA, 378 pp.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione. *Journal of Biological Chemistry* 25: 5475-5480.
- Ceresena Research, 2013. *Market Study: Crop Protection*. Ceresana, Konstanz, Germany, 800 pp.
- Ceyhun, S.B., Sentur, M., Erdogan, O., Kufrevioglu, O.I., 2010. *In vitro* and *in vivo* effect of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 97: 177-181.
- Cremlyn, R.J.W., 1978. *Pesticides: Preparation and mode of action*. Wiley, Chichester, 240 pp.

- ČHMÚ (Český hydrometeorologický ústav) 2016. Pasport látky. Dostupné z: <http://hydro.chmi.cz/oj/>, (navštívené online 1. 1. 2016).
- De Grave, S., Pentcheff, N.D., Ah Yong, S.T., Chan, T.Y., Crandall, K.A., Dworschak, P.C., Felder, D.L., Feldmann, R.M., Franssen, Ch.H.J.M., Goulding, L.Y.D., Lemaitre, R., Low, M.E.Y., Martin, J.W., Ng, P.K.L., Schweitzer, C.E., Tan, S.H., Tshudy, D., Wetzer, R., 2009. A classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology* 21: 1-109.
- Dorn, N., Trexler, J.C., 2007. Crayfish assemblage Shift in a large drought-prone wetland: the role 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.
- Dousset, S., Mouvet, C., Schiavon, M., 1997. Degradation of [14C]terbutylazine and [14C] atrazine in laboratory soil microcosms. *Pesticide Science* 49: 9-16.
- Hajšlová, J., Kocourek, V., 2004. Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka. *Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha*, 35 s.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, 888 pp.
- Hayes, A.W., 2007. *Principles and methods of toxicology*. CRC Press, Boca Raton, USA, 2296 pp.
- Hendrix, A.N., Lotus, W.F., 2000. Distribution and relative abundance of the crayfishes *Procambarus alleni* (Faxon) and *P. fallax* (Hagen) in southern Florida. *Wetlands* 20: 194-199.
- Hobbs, H.H., Jr., 1981. The crayfishes of Georgia, *Smithsonian Contributions to Zoology* 549 pp.
- Hobbs, H.H., Jr., 1989. An illustrated checklist of the American crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 236 pp.
- Holeček, V., 2005. Volné radikály a antioxidanty. Dostupné na: <http://www.celostnimediceina.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecek-csc.htm>, (navštívené online 14. 4. 2016).
- Holdich, D.M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Füderer, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckl, M., Šmietana, P., Taugbol, T., Vigneux, E., 2006. Species files.

- In: Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P. (Eds), Atlas of Crayfish in Europe. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, pp. 49-130.
- Hostovský, M., Blahová, J., Plhalová, L., Kopřiva, V., Svobodová, Z., 2014. Effects of the exposure of fish to triazine herbicides. *Neuroendocrinology Letters* 35: 3-25.
- Huber, A., Bach, M., Frede, H.G., 2000. Pollution of surface waters with pesticides in Germany: modeling non-point source inputs. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 80: 191-204.
- Hudson, R.H., Tucker, R.K., Haegele, M.A., 1984. Handbook of toxicity of pesticides to wildlife. USDI Fish and Wildlife Service Resource, Washington, USA, 136 pp.
- Jánský, V., Mutkovič, A., 2010. Rak *Procambarus fallax* sp. (Crustacea: decapoda: Cambaridae) - prvý nález na Slovensku. *Acta Rerum Naturalium Musei Nationalis Slovaci* 56: 64-67.
- Jimenez, S.A., Faulkes, Z., 2011. Can the parthenogenetic marbled crayfish *Marmorkrebs* compete with other crayfish species in fight? *Journal of Ethology* 29: 115-120.
- Jones, J.P.G., Andriahajaina, F.B., Hockley, N.J., Crandall, K.A., Ravoahangimalala, O.R., 2007. The ecology and conservation status of Madagascar's endemic freshwater crayfish (Parastacidae; Astacoides). *Freshwater Biology* 52: 1820-1833.
- Jones, J.P.G., Rasamy, J.R., Harvey, A., Toon, A., Oidtmann, B., Randrianarison, M.H., Raminosoa, N., Ravoahangimalala, O.R., 2009. The perfect invader: a parthenogenic crayfish poses a new threat to Madagascar's biodiversity. *Biological Invasions* 11: 1475-1482.
- 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.
- Kearney, P.C., Kaufman, D.D., 1975. *Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action*. Marcel Dekker, New York, 345 pp.
- Kočí, V., Mocová, K., 2009. *Ekotoxikologie pro chemiky*. VŠCHT, Praha, 199 s.
- Koese, B., 2008. *Rivierkreeften proeftabel*. Naturalis, Leiden, 17 pp.
- Koutník, D., Stará, A., Velíšek, J., 2015. The effect of selected triazines on fish: A review, *Slovenian Veterinary Research* 52: 107-131.

- Koutník, D., Stará, A., Zusková, E., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. The effect of subchronic metribuzine exposure to signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana 1852), *Neuroendocrinology Letters* 35: 51-56.
- Kozák, P., Ďuriš, Z., Petrusek, A., Buřič, M., Horká, I., Kouba, A., Kozubíková, E., Polícar, T., 2013. *Biologie a chov raků*, 1. vyd. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 418 s.
- Leopold, J.A., Loscalzo, J., 2000. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *American Journal of Physiology* 279: 2477-2485.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lushchak, V.I., Bgnyukova, T.V., Husák, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., Storey, K.B., 2005. Hapertoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in god tissues. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37: 1670-1680.
- Lushchak, V.I., 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 153: 175-190.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of superoxide anion radiál in autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 47: 469-474.
- Marten, M., Werth, C., Marten, D., 2004. Der Marmorkrebs (Cambaridae, Decapoda) in Deutschlandein weiteres Neozoon im Einzugsgebiet des Rheins. *Lauterbornia* 50: 17-23.
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic Marmorkrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. *Naturwissenschaften* 94: 843-846.
- Martin, P., Shen, H., Füllner, G., Scholtz, G., 2010. The first rekord of the parthenogeneitc Marmorkrebs (Decapoda, Astacia, Cambaridae) in the wild in saxony (Germany) raises the question of its achal Great to European freshwater ecosystems. *Aquatic Invasion* 5: 397-403.
- Marzano, F.N., Scalici, M., Chiesa, S., Gherardi, F., Piccinini, A., Gibertini, G., 2009. The first rekord of the marbled crayfish aids further treats to fresh waters in Italy. *Aquatic Invasion* 4: 401-404.

- Masia, A., Campo, J., Navarro-Ortega, A., Barcelo, D., Pivo, Y., 2015. Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data, *Science of the Total Environment* 503/504: 58-68.
- Nodler, K., Licha, T., Voutsas, D.T., 2013. Twenty years later atrazine concentrations in selected coastal waters of the Mediterranean and the Baltic sea. *Marine Pollution Bulletin* 70: 112-118.
- Ozturk-Urek, R., Tarhan, L., 2001. The purification and characterization of superoxidizedismutase from chicken liver. *Comparative Biochemistry and Physiology* 128: 205-212.
- Pesticide Ecotoxicity Database, 2000. Office of Pesticide Programs, Environmental Fate and Effects Division. US EPA, Washington, DC, USA.
- Pintoa, A.P., Serranoa, C., Piresa, T., Mestrinhoo, E., Diasa, L., Teixeiraa, D.M., Caldeira, A.T., 2012. Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. *Science of The Total Environment* 435/436: 402-410.
- Pitter, P., 1999. *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, Praha, 568 s.
- Pöckl, M., Holdich, D.M., Pennerstorfer, J., 2006. Identifying native and alien crayfish species in Europe. European Project CRAYNET, 47 pp.
- PPDB (Pesticide Properties DataBase), 2015. Hydroxy-terbuthylazine. Dostupné na: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1495.htm>, (navštívené 20. 4. 2016).
- Racek, J., Holeček, V., 1999. Enzymy a volné radikály. *Chemické Listy* 93: 774-780.
- Reynolds, J.D., 2011. A review of ecological interactions between crayfish and fish, indigenous and introduced. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystem* no. 401.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, UK, 238 pp.
- Schulz, H., Gross, H., Dümpelmann, C., Schulz, R., 2009. Flusskrebse Deutschlands. In: Füreder, L. (Ed.), *Flusskrebse, Biologie – Ökologie – Gefährdung*. Veröffentlichungen des Naturmuseums Südtirol 6, pp. 71-81.
- Sehonová, P., Kodeš, V., Leontovyčová, D., Svobodová, Z., 2012. Zhodnocení výskytu reziduí pesticidů v povrchových vodách České republiky. *Bulletin VÚHR Vodňany* 48: 5-19.
- Söderhäll, K., Ceresius, L., 1999. The crayfish plague fungus: History and recent advances. *Freshwater Crayfish* 12: 11-35.

- Sotherton, N., Holland, J., 2003. Indirect effects of pesticides on farmland wildlife. In: Hoffman, D.J. (Ed.), Handbook of ecotoxicology. CRC Press, Boca Raton, 1173-1195.
- Sprague, J.B., 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish. III. Sub-lethal effects and "safe" concentrations, Water Research 5: 245-266.
- Stará, A., Kouba, A., Velíšek, J., 2014. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). BioMed Research International, 2014: Article ID 680131.
- Svobodová, Z., Gelnerová, J., Justýn, J., Krupauer, V., Máchová, J., Simanov, L., Valentová, V., Wohlgemuth, E., 1987. Toxikologie vodních živočichů. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 231 s.
- Svobodová, Z., 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 VÚHR Vodňany 47: 47-56.
- Šípek, S., a kol., 2000. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Grada Publishing, Praha, 320 s.
- Taylor, C.A., Schuster, G.A., Cooper, J.E., DiStefani, R.J., Eversole, A.G., Hamr, P., Hobbs, H.H., Robison, H.W., Skelton, C.E., Thoma, R.F., 2007. A reassessment of the conservation status of crayfishes of the United States and Canada after 10+ years of increased awareness. Fisheries 32: 372-389.
- Terbuthylazin (2015). In: Wikipedia, The Free Encyclopedia. Dostupné na: <https://de.wikipedia.org/wiki/Terbuthylazin>, (navštívené 20. 4. 2016).
- TOXNET (Toxicology Data Network), 2016. Dostupné z: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6148>, (navštívené 14. 4. 2016).
- Unestam, T., 1969. Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. Report of the Institute of the Freshwater Research Drottningholm 49: 202-209.
- Velíšek, J., Máchová, J., 2015. Monitoring otrav vodních organismů přípravky na ochranu rostlin v roce 2015 – zpráva pro MZe. FROV JU, 12 s.
- Velíšek, J., Kouba, A., Stará, A., 2013. Acute toxicity of triazine pesticides to juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). Neuroendocrinology Letters 34: 31-36.
- Velíšek, J., Svobodová Z., Bláhová J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šíroková, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H.,

- Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014a. Vodní toxikologie pro rybáře. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, 600 s.
- Velíšek, J., Stará, A., Koutník, D., Zusková, E., Kouba, A., 2014b. Effect of prometryne on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *Neuroendocrinology Letters* 35: 106-10.
- Velíšek, J., Stará, A., Koutník, D., Máchová, J., 2014c. Effect of terbuthylazine-2-hydroxy at environmental concentrations on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *BioMed Research International* 2014: Article ID 621304.
- Velíšek, J., Stará, A., Koutník, D., Máchová, J., 2015a. Effect of prometryne on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 118: 58-63.
- Velíšek, J., Stará, A., Koutník, D., Zusková, E., 2015b. Effects of terbuthylazine on early life stages of common carp. *Neuroendocrinology Letters* 36: 120-125.
- Velíšek, J., Koutník, D., Zusková, E., Stará, A., 2016. Effects of the terbuthylazine metabolite terbuthylazine-desethyl on common carp embryos and larvae. *Science of the Total Environment* 539: 214-220.
- Vendlová, J., 2009. Stanovení triazinových herbicidů ve vodách. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta Chemicko – Technologická, Ústav Ochrany Životního Prostředí. Dostupné na: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/35001/VendlovaJ_Stanoveni%20triaziniovych_JCh_2009.pdf?sequence=1&isAllowed=y, (navštívené 30. 3. 2016).
- Vogt, G., 2002. Functional anatomy. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Backwell Science Ltd., Oxford, pp. 53-151.
- Vogt, G., 2010. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological reaches: a review and perspective, with remarks on some further crustaceans. *Biogerontology* 11: 643-669.
- Vogt, G., 2011. Marmorcrebs: natural crayfish clone as emerging model for various biological disciplines. *Journal of Biosciences* 36: 377-382.
- Vogt, G., Tolley, L., 2004. Brood care in freshwater crayfish and relationship with the offspring's sensory deficiencies. *Journal of Morphology* 262: 566-582.
- Zarenkov, N.A., 1982. Členistonogie. Rakoobraznye, Čast' 1. Izd. MGU, Moskva.

8. ABSTRAKT

Vliv metabolitu terbuthylazinu-2-hydroxy na raná vývojová stádia raka mramorovaného

Terbuthylazin patří do skupiny pesticidů na bázi triazinů, používaných v zemědělství jako herbicidy. Jeho majoritním metabolitem je terbuthylazin-2-hydroxy. Cílem této studie bylo posoudit vliv terbuthylazinu-2-hydroxy na mortalitu, růst, výskyt deformací a vývoj raných vývojových stádií a hladinu oxidativního stresu a aktivitu antioxidantních enzymů raka mramorovaného (*Procambarus fallax f. virginalis*) a zároveň také rozšířit podklady pro posouzení vlivu tohoto metabolitu na životní prostředí.

K posouzení vlivu tohoto metabolitu byl použit embryolarvální test toxicity na racích. Toxický vliv terbuthylazinu-2-hydroxy byl hodnocen ve čtyřech koncentracích ($0,75 \mu\text{g.l}^{-1}$, $75 \mu\text{g.l}^{-1}$, $375 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $750 \mu\text{g.l}^{-1}$) po dobu 62 dnů.

Expozice terbuthylazinu-2-hydroxy v koncentracích $375 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $750 \mu\text{g.l}^{-1}$ způsobila snížení aktivity superoxid dismutázy (SOD) a hladiny lipidní peroxidace (měřené jako TBARS) a zpomalení růstu. Zpomalení růstu bylo zjištěno i u skupiny vystavené koncentraci $75 \mu\text{g.l}^{-1}$ terbuthylazinu-2-hydroxy. Navíc u raků vystavených koncentraci $750 \mu\text{g.l}^{-1}$ došlo ke zpomalení ontogenetického vývoje raků. Testovaná reálná koncentrace $0,75 \mu\text{g.l}^{-1}$ terbuthylazinu-2-hydroxy neměla vliv na sledované ukazatele raných vývojových stádií raka mramorovaného.

Terbuthylazin-2-hydroxy způsobil snížení růstu, zpomalení ontogenetického vývoje, oxidativní poškození buněčných lipidů a proteinů a také změny v antioxidantní aktivitě raných vývojových stádií raka mramorovaného.

Klíčová slova: triaziny, metabolity, raci, embryolarvální test toxicity, raná vývojová stádia

9. ABSTRACT

The effect of metabolite terbuthylazine-2-hydroxy on early life stages of marbled crayfish

Terbuthylazine belongs to the group of pesticides on triazine-based for use in agriculture as herbicides. Terbuthylazine-2-hydroxy is the main metabolite of terbuthylazine. The aim of this study was evaluate the effect of terbuthylazine-2-hydroxy on mortality, growth, occurrence the deformations and the development of early life stages, and levels of oxidative stress, assess the activity of antioxidant enzymes of marbled crayfish (*Procambarus fallax* f. *virginalis*) and also augment data for assessing the impact of this metabolite on the environment.

For assess of effect of this metabolite was used embryo larval toxicity test with crayfish. The effect of terbuthylazine-2-hydroxy was evaluated in four concentrations ($0.75 \mu\text{g.l}^{-1}$, $75 \mu\text{g.l}^{-1}$, $375 \mu\text{g.l}^{-1}$ and $750 \mu\text{g.l}^{-1}$) for 62 days.

Terbuthylazine-2-hydroxy in concentrations $375 \mu\text{g.l}^{-1}$ and $750 \mu\text{g.l}^{-1}$ caused decrease of activity superoxide dismutase (SOD) and the levels lipid peroxidation (measured as TBARS) and inhibition of growth. Inhibition of growth was also observed in the group exposed to $75 \mu\text{g.l}^{-1}$ of terbuthylazine-2-hydroxy. Additionally, there was delay in ontogenetic development of crayfish exposed to concentration $750 \mu\text{g.l}^{-1}$. The real tested concentration of $75 \mu\text{g.l}^{-1}$ terbuthylazine-2-hydroxy had no effect to monitored indices in the early life stages of marbled crayfish.

Terbuthylazine-2-hydroxy caused oxidative damage of cellular lipids and proteins, changes in antioxidant activity, reduction of growth, delay in ontogenetic development of marbled crayfish.

Keywords: triazine, metabolites, crayfish, embryo-larval toxicity test, early life stages