

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

**Fakulta rybářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Bakalářská práce

**Vliv prometrynu na raná vývojová stádia
kapra obecného**

Autor: Jaroslava Lidová

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

Konzultant bakalářské práce: Ing. Alžběta Stará

Studijní program a obor: B4103 Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 2.

České Budějovice, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Vliv prometrynu na raná vývojová stádia kapra obecného 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, případně 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 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

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především vedoucímu bakalářské práce dr hab. Josefu Velíškovi Ph.D. a konzultantce Ing. Alžbětě Staré za metodické vedení, odbornou pomoc a cenné rady poskytnuté při vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům laboratoře Vodní toxikologie a ichthyopatologie, FROV JU Vodňany, kteří mi byli nápomocni při experimentální části této práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jaroslava LIDOVÁ**
Osobní číslo: **V11B032P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Vliv prometrynu na raná vývojová stadia kapra obecného**
Zadávající 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 :

Pro stanovení ekotoxikologického rizika pesticidů jsou základem údaje o toxicitě přípravků pro necílové organismy a předpokládaná koncentrace účinné látky v ekosystému. Do skupiny necílových vodních organismů patří rovněž ryby, vodní bezobratlí a řasy. Ryby představují největší a také nejvýznamnější skupinu obratlovců žijících ve vodním prostředí. Jsou zde konečným článkem potravního řetězce a současně hospodářsky významnými vodními organismy. Právě proto je prvořadá pozornost vodní toxikologie věnována rybám a jejich vývojovým stádiím.

Cílem bakalářské práce je posouzení vlivu prometrynu na raná vývojová stadia kapra obecného. Získané výsledky při testování budou podkladem pro hodnocení rizika terbutrynu pro životní prostředí (environmental risk assessment).

V rámci bakalářské práce bude proveden embryonarvální test toxicity na kapru obecném s prometrynem. Během testu se bude sledovat vliv na mortalitu, růst, ontogenetický vývoj a výskyt deformací raných vývojových stádií kapra. Metodicky bude postupováno podle platných standardních operačních postupů, které byly zpracovány akreditovanou laboratoří vodní toxikologie a ichthyopatologie FROV JU. Tyto postupy vycházejí z norem OECD pro testy toxicity na rybách.

Rozsah grafických prací: **3 grafy**

Rozsah pracovní zprávy: **30 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Rauscherová, Z., Chrudinová, B., Bártová, B. 1999: Hodnocení rizik pro životní prostředí u přípravků na ochranu rostlin v procesu registrace. Sborník referátů z 9. Konference Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, VÚRH, 34-40.

Svobodová, Z. a kolektiv., 2007. Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb. 4. vyd. Praha: Informatorium spol. s.r.o., Praha, 264 s.

Svobodová, Z., Gelnerová, J., Justýn, J., Krauper, V., Máchová, J., Šimanov, L., Valentová, V., Wohlgemuth, E. 1987: Toxikologie vodních živočichů. SZN Praha 231s

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.

Velisek, J., Stara, A., Svobodova, Z. 2011. The effects of pyrethroid and trazine pesticides on fish physiology. In: Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment, Stoytcheva, M., (Ed.). InTech Open. pp. 377-402.

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


Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Alžběta Stará**

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: **2. prosince 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2013**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 3. února 2012

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Literární přehled	9
2.1. Pesticidy	9
2.1.2. Dělení pesticidů.....	9
2.2. Herbicidy	11
2.2.1. Dělení herbicidů	12
2.2.2. Výskyt herbicidů ve vodách.....	13
2.3. Triaziny.....	16
2.3.1. Prometryn	17
2.3.2. Toxicita prometrynu.....	19
3. Materiál a metodika	21
3.1. Embryolarvální toxicity toxicity na rybách	21
3.1.1. Princip a podmínky testu.	21
3.1.2. Pracovní postup	22
3.1.3. Vyhodnocení testu.....	37
3.1.4. Platnost testu (validace)	38
4. Výsledky	39
4.1. Kulení.....	39
4.2. Kumulativní mortalita	39
4.3. Délkové hmotnostní růstové parametry	40
4.4. Ontogenetický vývoj	44
4.5. Makroskopické a morfologické anomálie	45
5. Diskuse.....	46
6. Závěr	49
7. Přehled použité literatury	50
8. Abstrakt.....	56
9. Abstract.....	57

1. ÚVOD

Lidé se od nepaměti snažili chránit své zemědělské produkty, aby si zajistili dostatečné zásoby potravy. S touto snahou šel ruku v ruce boj s různými škůdci, chorobami či plevele. Jejich metody byly ovšem založeny pouze na mechanickém principu, a proto byly málo efektivní.

Teprve v minulém století začaly být k těmto účelům používány chemické látky. Největší rozvoj zaznamenaly pesticidy po druhé světové válce a to především v USA, Kanadě a Velké Británii. Použití herbicidů vzrostlo od 30. let 20. století v USA o 180 %, v Kanadě dokonce trojnásobně (Sotherton and Holland, 2003).

Právě 30. léta 20. století jsou považována za skutečný počátek éry syntetických organických pesticidů. Roku 1939 objevil Dr. Paul Müller silné insekticidní vlastnosti DDT (1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorharfenyl)ethan), který se brzy po svém objevu stal nejrozšířenějším insekticidem na světě. V roce 1962 byla prokázána bioakumulace DDT v živočišných tkáních a v roce 1972 bylo v USA použití DDT zakázáno (Cremlyn, 1985).

V současnosti se ve světě používá 800 aktivních látek a 25 000 různých komerčních produktů pesticidů. Ročně jsou prodány pesticidy za 32 bilionů dolarů (Sotherton and Holland, 2003).

Na rozdíl od jiných chemických látek produkovaných člověkem, jsou pesticidy šířeny do životního prostředí záměrně. Pesticidy jsou vyráběny tak, aby byly škodlivé pro specifické cílové organismy nebo skupiny organismů. Vzhledem k jejich vlastnostem existuje zřejmé riziko, že těmito látkami budou postiženy i necílové organismy, a to jak v místě aplikace, tak i v důsledku neúmyslného šíření v blízkosti aplikace nebo dokonce i ve vzdálené oblasti (Kreuger et al., 1999).

V rámci studia vlivu pesticidů na vodní organismy již bylo realizováno mnoho toxikologických studií. K dispozici jsou převážně výsledky krátkodobých studií (např. testů akutní toxicity), které hodnotí vliv krátkodobé expozice vysokým koncentracím testovaných látek. Tyto typy testů jsou technicky, časově i finančně méně náročné v porovnání s dlouhodobými testy hodnotícími účinky nižších (subletálních) koncentrací pesticidů na exponované organismy (např. testy subchronické toxicity, chronické testy, embryolarvální testy, atp.). Právě však dlouhodobé testy poskytují objektivnější informace o účincích pesticidů z pohledu jejich reálného výskytu

v životním prostředí. Málo informací rovněž existuje o působení pesticidů na raná vývojová stádia ryb, která jsou obecně pokládána za nejcitlivější vůči působení negativních faktorů (Lahr et al., 2000).

Cílem bakalářské práce bylo posouzení vlivu prometrynu na raná vývojová stádia kapra obecného (*Cyprinus carpio L.*). Vliv prometrynu na raná vývojová stádia kapra byl hodnocen pomocí mortality, růstu, ontogenetického vývoje a výskytu deformací. Konečným cílem tohoto sledování bylo přispět k rozšíření podkladů pro hodnocení rizika prometrynu pro životní prostředí.

2. LIERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Pesticidy

Pesticidy jsou látky organického či anorganického původu, používané k hubení rostlinných a živočišných škůdců, parazitických hub, k ochraně rostlin, skladových zásob, technických produktů, domů, bytů, výrobních závodů, zvířat i člověka (Cremlyn, 1985).

Nejčastěji se pesticidy používají v zemědělství, jako přípravky k ochraně rostlin. Jejich účinky potlačují vliv rostlinných a živočišných škůdců. Pesticidy se v současné době používají na 95 % zemědělské půdy. Jejich účinkům jsou vystaveny všechny složky biosféry - vzduch, voda půda, rostliny i živočichové (Zapletal and Nepejchalová, 2001).

Příkladem je masový úhyn úhořů říčních (*Anguilla anguilla*) v letech 1991 a 1995 v jezeře Balaton v Maďarsku. I když názory na úhyn 7 tun úhořů v Balatonu byly protichůdné, zdá se, že hlavním důvodem byla intoxikace pyrethroidy. Tyto látky byly nalezeny ve tkáních ryb a kromě toho byla u úhoře a další druhů ryb prokázána silná inhibice acetylcholinesterázy, která je příznakem intoxikace pesticidy (Balint et al., 1995).

Je dokázáno, že pesticidy narušují přirozené podmínky ve vodních ekosystémech, což může vést k jeho dlouhodobým změnám. Nicméně stále existuje málo informací o společné toxicitě pesticidů. Pesticidy jsou v zemědělství často používány v kombinaci, takže existuje určité riziko synergických účinků těchto látek (Ecobichon, 1991; Belden and Lydy, 2000).

2.2.1 Dělení pesticidů

Nejčastější dělení pesticidů se provádí podle škůdců, které mají eliminovat (Pitter, 1999):

- Arkaricidy: přípravky určené k hubení roztočů.
- Algicidy: přípravky určené k hubení řas.
- Arborocidy: přípravky určené k hubení stromů a keřů.
- Avicidy: přípravky určené k hubení ptáků.

- Fungicidy: přípravky určené k ochraně před houbovými chorobami.
- Herbicidy: přípravky určené k hubení rostlin.
- Insekticidy: přípravky určené k hubení hmyzu.
- Moluskocidy: prostředky určené k hubení měkkýšů.
- Piscicidy: přípravky určené k hubení ryb.
- Rodenticidy: přípravky určené k hubení hlodavců.

Dělení pesticidů podle způsobu aplikace (Pitter, 1999):

- Postřiky: aerosoly: slouží k aplikaci tekutiny ve formě kapek.
- Fumiganty: slouží k aplikaci chemické látky ve formě par nebo plynů.
- Popraše: slouží k aplikaci práškových ochranných prostředků.
- Pevné a tekuté nástrahy: požerové nástrahy, především k hubení hlodavců.
- Mořidla: přípravky pro předseťovou ochranu semen.
- Nátěry a impregnace: Přípravky používané především k ochraně dřeva před dřevokaznými škůdci, plísněmi a houbami.

Dělení pesticidů podle působení na ošetřovaný organismus (Neuman et al., 1989; Pitter, 1999):

- Kontaktní (dotykové) – účinná látka zůstává na povrchu rostliny či škůdce, působí pouze v místě zasažení postřikem, jejich účinky úzce souvisí s povětrnostními podmínkami.
- Systémové – účinná látka proniká do buněk rostliny či škůdce, je rozváděna cévním systémem, a proto rostliny chrání bezpečněji. Jejich účinek není závislý na povětrnostních podmínkách.

Dělení pesticidů podle mechanismu působení (Mikulka and Kneifelová, 2005; Pitter, 1999):

- Inhibitory acetylcholinesterázy
- Inhibitory chitin syntázy
- Antagonista ekdysonu (hmyzí steroid ovlivňující larvální stádium vývoje)
- Inhibitory kyseliny gama-aminomáselné
- Analogy juvenilních hormonů (regulují růst hormonů)
- Antikoagulanty

- Inhibitory glutamin syntázy
- Inhibitory demethylace steroidů
- Inhibitory protoporfymogen oxidázy
- Inhibitory RNA polymerázy
- Inhibitory syntézy proteinů
- Inhibitory transportu elektronů při fotosyntéze
- Inhibitory mitochondriální respirace

Dělení pesticidů podle chemické povahy (Pitter, 1999):

- Organofosfáty: estery kyseliny fosforečné, jsou akutně toxické pro včely, volně žijící živočichy i člověka.
- Karbamáty: organické sloučeniny odvozené od kyseliny karbamové. Karbamátové insekticidy využívají funkční skupiny karbamátových esterů. Tyto insekticidy usmrkují hmyz pomocí reverzibilní inaktivace enzymu acetylcholinesterázy.
- Chlororganické sloučeniny: fyzikálně a chemicky velmi stabilní látky na bázi chloru, převážně insekticidy využívané hlavně v minulosti.
- Syntetické pyrethroidy: syntetické chemické sloučeniny podobné přírodním látkám pyrethrinům produkovanými květinami. Součást insekticidů a repelentů, toxické pro ryby a jiné vodní organismy.
- Fenoly: skupina hydroxyderivátů benzenu a jeho analogů, jsou hodnoceny jako toxické, některé formy i jako karcinogeny.
- Azoly: aromatické dusíkaté látky, inhibují enzymy plísní.
- Aniliny: aromatické aminy, toxické, nebezpečné pro životní prostředí.

2.2. Herbicidy

Nejvýznamnější skupinu pesticidů tvoří herbicidy. Jak již bylo zmíněno, herbicidy jsou látky hubící plevel v porostech kulturních rostlin, popřípadě invazní rostliny. Používají se převážně v zemědělství, ale i ve městech k údržbě parků, zahrad apod., nebo na údržbu železničních tratí (Neuman et al., 1989).

2.2.1 Dělení herbicidů

Herbicidy se dělí podle účinku, kdy dochází k blokaci některého ze životně důležitých biochemických pochodů v těle rostliny. Mezi tyto účinky patří například inhibice fotosyntézy, inhibice syntézy aminokyselin či buněčného dělení (Ecobichon, 1991).

Dalším dělením herbicidů je dělení na selektivní a neselektivní. Selektivními herbicidy jsou ničeny pouze určité druhy plevelů nebo jejich biologické skupiny, aniž by byla poškozena kulturní rostlina, v jejímž prostoru byl herbicid aplikován. Neselektivní herbicidy ničí veškerou vegetaci v prostoru jejich aplikace (Mikulka and Kneifelová, 2005; Pitter, 1999).

Dle účinku jsou herbicidy děleny na kontaktní (dotykové herbicidy) a systémové. Kontaktní herbicidy působí pouze na tu část rostliny, kde byly aplikovány. Ničí pouze nadzemní části rostlin a nejsou rozváděny cévním systémem po těle rostliny. Systémově působící herbicidy jsou rozváděny cévním systémem po těle rostliny a šíří se tak do všech jeho částí, od listů do podzemních částí rostliny nebo obráceně, od kořenů k nadzemním částem rostliny. Používají se k ničení vytrvalých plevelů. Následky působení systémových herbicidů jsou postupné zpomalení růstu a následné hynutí (Zapletal and Nepejchalová, 2001).

Dle aplikace jsou herbicidy děleny na aplikaci před setím se zapravením do půdy, preemergentní aplikaci, a postemergentní aplikaci. Aplikace před setím se zapravením do půdy je poměrně málo rozšířený způsob. Je využíván především u herbicidů, které jsou nestabilní na světle nebo mají omezenou pohyblivost v půdě. Preemergentní aplikace se provádí v období po zasetí plodiny, avšak ještě před jejím vzejitím. Naproti tomu postemergentní aplikace je prováděna až po vzejití plodiny (Mikulka and Kneifelová, 2005).

Při aplikaci herbicidů je důležité brát v potaz i podmínky prostředí. Důležitým parametrem je teplota vzduchu. Čím teplejší vzduch, tím je účinek herbicidu vyšší. Silný vítr způsobuje nepravidelný účinek herbicidu, může dojít k poškození okolních rostlin. Dalšími faktory jsou vlhkost půdy a také druh půdy. S vyšší vlhkostí roste i účinnost přípravku. V suché půdě je účinnost téměř nulová. V lehkých půdách, jako jsou například půdy písčité, se herbicid velmi snadno pohybuje, hrozí tak jeho vyplavení do podzemních vod. V těžších jílovitých půdách je riziko kontaminace

podzemních vod mnohem nižší (Cremllyn, 1985).

Důležitou roli hrají též dešťové srážky. Pokud jsou srážky mírné, tak pomáhají lepšímu vstřebávání herbicidu. Při prudkých deštích jsou ovšem splavovány do hlubších vrstev půdy, kde již rostlinu nijak neovlivňují. Prudké deště mohou způsobit proniknutí herbicidů splachy jak do vod povrchových, tak i do podzemních vod. Intenzita světla ovlivňuje působení herbicidů inhibujících fotosyntézu (Cremllyn, 1985; Zapletal and Nepejchalová, 2001).

2.2.2. Výskyt herbicidů ve vodách

K plošnému znečištění vod herbicidy dochází zejména při splachu těchto látek ze zemědělských ploch při prudkých deštích. Herbicidní látky se dostávají nejen do povrchových vod, ale mohou kontaminovat i vody podzemní. Tyto látky, kontaminující vodní prostředí, se mohou v ekosystému hromadit (kumulovat) a rozkládat na mnohdy rizikovější sloučeniny (Svobodová et al., 1992).

Herbicidy ve vodách mohou ohrožovat vodní necílové organismy rostlinného i živočišného původu (mikroorganismy, vodní bezobratlé i vodní obratlovce) (Svobodová et al., 1992). Nejčastěji jsou ve vodním prostředí detekovány herbicidy ze skupiny triazinů (Claver et al., 2006; Shomar et al., 2006; Lapworth et al., 2006; Konstantinou et al., 2006; Padovani et al., 2006; Numabe and Nagahora, 2006).

Mezi triazinové herbicidy nejčastěji se vyskytující ve vodách patří:

- Atrazin
- Simazin
- Metribuzin
- Prometryn
- Terbutryn

Koncentrace atrazinu se v povrchových vodách ČR pohybuje řádově v desetinách $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Sehonová, 2012). V ostatních povrchových vodách světa se koncentrace atrazinu pohybuje řádově v desetinách až desítkách $\mu\text{g.l}^{-1}$ a nejvyšší koncentrace jsou zjišťovány v kanadských a amerických tocích (Pappas and Huang, 2008; Mosquin et al., 2012).

V České republice byla naměřena nejvyšší koncentrace simazinu v povrchových vodách $0,06 \mu\text{g.l}^{-1}$ (ČHMÚ 2012). V Evropě dosahují koncentrace simazinu až $5,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Beitz et al., 1994). V USA simazin dosahuje hodnot až $49,20 \mu\text{g.l}^{-1}$ (US EPA, 1994). Koncentrace simazinu nalezené ve světových povrchových a podzemních vodách jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1. Koncentrace simazinu naměřené ve vodách.

Země	Koncentrace ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Rok	Reference
Austrálie (Tasmanská řeka)	1,05	1989 - 1992	Davies et al. (1994)
Britská Kolumbie	max. 0,09	2003 - 2005	Woudneh et al. (2009)
Kanada (Greatské jezero)	0,0003 - 6,0	1977	Frank et al. (1979)
Kanada (řeka Ontario)	max. 23,0	1981 - 1985	Hiebsch (1988)
Dánsko (podzemní voda)	0,02 – 0,09	1992	Helweg 1994
Anglie (řeka Lee)	0,04 – 0,06	1991 - 2000	Snook and Whitehead (2004)
Anglie (řeka Thames)	0,04 – 0,17	1988 - 1997	Power et al. (1999)
Francie (řeka Vilaine)	0,003 - 0,033	1997 - 1998	Forgeta et al. (2003)
Francie (řeka Seina)	0,011 - 0,2	2000	Garmouna et al. (2001)
Itálie (podzemní vody)	max. 0,2	1992	Bagnati et al. (1994)

Portugalsko (řeka)	max. 2,30	1999	Tauler et al. (2001)
Španělsko (řeka Ebro)	0,10 - 0,54	2000 - 2001	Hildebrandt et al. (2008)
USA (Colorado)	0,02 - 49,2	1990 - 1993	U. S. EPA (1994)

Koncentrace metribuzinu v povrchových vodách ve světě se pohybuje v desetinách až desítkách mikrogramů na litr (Cerejeiral., 2000; Haarstad and Ludvigsen, 2007).

Nejvyšší naměřená koncentrace terbutrynu v povrchových vodách v České republice je 0,02 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (ČHMÚ, 2012). V Německu byl terbutryn zaznamenán v řece Weschnitz v maximální koncentraci 5,6 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Od září 2003 do září 2006 měly koncentrace terbutrynu v povrchových vodách vzestupnou tendenci (Quendnow and Puttmann, 2007). Terbutryn byl také zjištěn ve středomořských pobřežních vodách v koncentracích 5 – 184 ng.l^{-1} (Tolosa et al., 1996). Koncentrace terbutrynu zjištěné ve světových vodách jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. Koncentrace terbutrynu naměřené ve vodách.

Země	Koncentrace ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Rok	Reference
Německo (řeka Weschnitz)	5,60	2003-2006	Quendnow and Puttmann (2007)
Německo (řeka Labe)	0,02	1996-1997	Agre Elbe (1997)
Německo (řeka Brandbach)	0,12 - 0,48	1987-1997	LUA (1999)
Švýcarsko (Ženevské jezero)	0,0024	1988	Buser (1990)
Maďarsko (Balaton)	0,10 - 0,4	2003-2004	Maloschik et al. (2007)
Španělsko (řeka Ebro)	0,50	2006	Ormad et al. (2008)

Maximální koncentrace prometrynu v českých řekách je 0,51 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (ČHMÚ 2012). V Řecku byla zjištěna koncentrace prometrynu 0,190 až 4,40 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Vryzas et al., 2011)

2.3. Triaziny

Herbicidní vlastnosti triazinů byly objeveny švýcarskou společností J. R. Geigy Ltd. v roce 1952 (Kearney and Kaufmann, 1975).

Triaziny jsou jedny z nejstarších herbicidů na světě a jsou charakteristické heterocyklickou strukturou. Triaziny se dělí podle chemické struktury na dvě skupiny, a to asymetrické a symetrické triaziny. Do skupiny symetrických triazinů patří: simazin, atrazin, ametryn, propazin, terbutryn a prometryn. Ze skupiny asymetrických triazinů je nejpoužívanější metribuzin, který je v současnosti používán jako herbicid v porostech brambor (Giesy et al., 2001).

Triaziny jsou adsorbovány kořeny rostlin. Mechanismem účinku triazinů je inhibice fotosyntézy. Místem účinku je inhibice Hillovy reakce fotosyntetického elektronového přenosu v izolovaných chloroplastech, kdy je využíván chlorofyl na energii pro buňky rostlin. Zasažené rostliny nejsou schopné produkovat jakoukoliv energii, tím je zastaven jejich růst a postupně hynou (Corbett, 1974).

Triaziny jsou perzistentní půdní herbicidy, které při aplikaci ve vyšších koncentracích (5 - 20 kg.ha⁻¹) působí jako totální herbicidy. V nižších koncentracích (1 - 4 kg.ha⁻¹) se používají jako selektivní herbicidy na řadu klíčících plevelů např. ve fazolích, kukuřici, chřestu, jahodách a kolem ovocných keřů (Martin and Worthing, 1974).

Triazinové herbicidy jsou relativně stabilní a nebezpečné pro vodní živočichy a vodní ekosystém, a přestože bylo používání většiny z nich v nedávné době zakázáno, stále se tyto látky a jejich rezidua vyskytují v povrchových i podzemních vodách, potravinách a v různých složkách životního prostředí (ČHMÚ, 2012).

Toxicita triazinů pro ryby závisí na druhu triazinu. Většina triazinů spadá do kategorie mírně nebo nepatrně toxické, látky obsahující desmetryn jsou pro ryby toxické. Herbicidy na bázi triazinů dlouhodobě přetrvávají ve vodním prostředí, hlavně v podzemních vodách, a jsou jejich častými kontaminanty. V současnosti jsou triaziny považovány za nebezpečné pro životní prostředí a jsou zahrnuty na listině prioritních látek pro testování v EU (European Commission, 1999) a USA (U. S. EPA, 1994).

2.3.1. Prometryn (obr. č. 1)

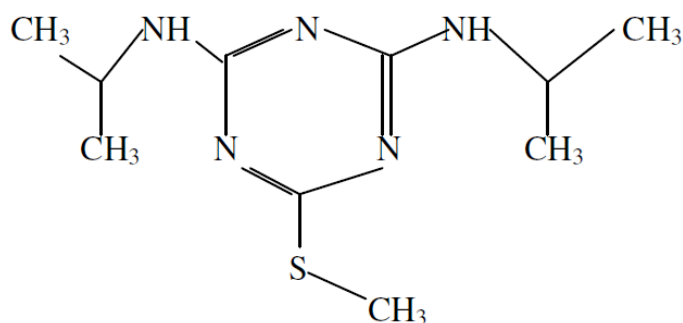
Systematický název:

N,N-bis(1-methylethyl)-6-(methylthio)-1,3,5-triazine-2,4-diamine

Chemický vzorec: C₁₀H₁₉N₅S

CAS-No : 7287-19-6

Molekulová hmotnost: 241,36 g/mol⁻¹



Obr. č. 1. Strukturální vzorec prometrynu (Meister, 1992).

Prometryn je bílá krystalická látka. Jeho bod tání je 118 – 120 °C, hustota je 1,157 g.cm⁻³. Prometryn je stabilní v neutrálním, mírně kyselém nebo mírně zásaditém prostředí, ale je hydrolyzován v silně kyselém prostředí. Je stabilní za běžných teplot a tlaku, nesnadno se vznítí, ale může hořet, pokud je vystaven teplu nebo ohni. Termickým rozkladem mohou vznikat toxické oxidy uhlíku, dusíku a síry (Meister, 1992).

Poprvé byl registrován v roce 1969 Agenturou EPA v USA, jeho registrační norma byla vydána v roce 1987. Prometryn můžeme najít i pod jinými názvy jako například: Prometryne, Caparol, Gesagard, Primatol Q a Prometex. V současné době ve světě existuje 17 registrovaných produktů obsahujících 8 – 97 procent prometrynu. Tyto produkty jsou vyráběny v kapalné formě, krystalické formě nebo jako prášek. V České republice není v současnosti registrován žádný přípravek obsahující prometryn. (Meister, 1992).

Prometryn je selektivní herbicid, který ničí jednoleté trávy a širokolisté plevele především v bavlně a celeru, dále také v kopru a hrášku. Je to inhibitor fotosyntézy, inhibuje přenos elektronů v cílových druzích plevelů a trav. Ke vstřebávání prometrynu dochází jak zelenými částmi rostlin, tak i kořeny. Z kořenů se rychle přesouvá do listů

a hromadí se ve výhoncích rostlin (U. S. EPA, 1994).

Prometryn je používán ve formě smáčivého prášku anebo jako kapalina. Aplikace se nesmí provádět přímo do vody, močálů nebo mokřadů. Ke kontaminaci vody může docházet při nevhodném čištění zařízení nebo likvidaci odpadů, které s tímto herbicidem souvisejí. Aplikace by měla být prováděna za příznivých povětrnostních podmínek, kdy nehrozí například jeho splach prudkými dešti nebo jeho šíření silným větrem, kdy především při aplikaci kapaliny hrozí jeho odnos z ošetřované plochy. Toto riziko též snižuje použití velkých kapek při postřiku, které nesou menší riziko odnosu (Bowmer et al., 1995).

Prometryn se snadno váže v půdách s vysokým obsahem jílu a organické hmoty. V takovýchto těžkých půdách se hůře vyplavuje do podzemních vod než z lehčích typů půd jako jsou písčité, alkalické a písčitohlinité půdy, které obsahují málo organické hmoty nebo jílu. Čím nižší je organické složení půdy, tím je prometryn více vyplavován. Prometryn přetrvává v půdě 1 – 3 měsíce. Při aplikaci několikrát ročně může přetrvávat v půdě 12 – 18 měsíců od poslední aplikace, při nepříznivých podmínkách, suchu a chladu může v půdě přetrvávat ještě déle (Bowmer et al., 1995).

Použití prometrynu v současné době není omezeno. Agentura EPA požaduje zákaz použití prometrynu na lehkých písčitých a hlinitopísčitých půdách, kde je vyšší riziko jeho vyplavení do podzemních vod. V tabulce č. 3 je uvedena spotřeba prometrynu v České republice.

Tabulka č. 3. Spotřeba prometrynu (kg.l⁻¹) v závislosti na plodině v letech 1994 – 2005 (ČHMÚ, 2012).

	2005	2004	2003	2002	2001	2000	1999	1998	1997	1996	1995	1994
Brambory	0	387,8	344,9	262	488,8	689	803	1250	1536	2103	2260	1819
Chmel	0	24	70,1	14	0	0	12	19	0	38	0	0
Kukuřice	0	122,3	450	779	792	1532	1041	1781	1786	1948	2912	3172
Luskoviny	0	288,1	641,1	599	969,4	1433	1398	1120	1347	2307	2672	4246
Pícniny	0	0	11,5	193	203	92	113	58	88	743	112	179
Vinná réva	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	82
Sady	0	0	0	0	61	0	0	0	0	0	77	26
Zelenina	30,4	979,4	784,3	1109	907,6	691	1166	1722	1844	2277	3119	3542
Ostatní	59,4	3429,9	7951,1	4783	5615,2	5679	3599	4620	4746	5586	7575	4603

2.3.2. Toxicita prometrynu

Aplikace prometrynu na zemědělské plodiny představuje riziko pro necílové organismy v ekosystému, a to při jeho odtoku z ošetřené plochy díky nepříznivým povětrnostním podmínkám, neodborné aplikaci a likvidaci zbytků (Plhalová et al., 2011).

Akutní toxicita

Pometryn je mírně toxický, až prakticky netoxický při požití. Hodnoty LD50 se pohybují u potkanů mezi 3750 až 5235 mg.kg⁻¹, 3750 mg.kg⁻¹ u myší a více než 2020 mg.kg⁻¹ u králíků. Při dermálních testech se prometryn ukázal jako mírně toxický, hodnota LD50 u králíků je vyšší než 2000 mg.kg⁻¹. Technický prometryn způsobuje u králíků podráždění kůže a očí, u krys způsobuje útlum, poruchy koordinace svalů, potíže s dýcháním, průjem, nadměrné močení a křeče (Hayes and Laws, 1991).

Prometryn je prakticky netoxický pro ptáky, hodnoty LD50 z akutního orálního testu pro křepelky viržinské (*Colinus virginianus*) a kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) jsou 2150 mg.kg⁻¹ a 4640 mg.kg⁻¹ (Hayes and Laws, 1991).

Pro ryby je prometryn mírně toxický, hodnota 96hLC50 pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) se pohybuje v rozmezí 2,5 – 2,9 mg.l⁻¹ (U.S. EPA, 1996), pro slunečnici velkoploutvou (*Lepomis macrochirus*) 7,9 mg.l⁻¹, halančíka diamantového (*Cyprinodon variegatus*) 5,1 mg.l⁻¹, kapra obecného (*Cyprinus carpio*) 5,2 mg.l⁻¹. Hodnota 48hLC50 u karase stříbřitého (*Carassius auratus auratus*) je 4 mg.l⁻¹ (Kegley et al., 2010). Průměrná letální toxicita prometrynu (96hLC50) pro kaprovité ryby je 8 mg.l⁻¹ (Hayes and Laws, 1991).

Prometryn je mírně toxický pro vodní bezobratlé. Pro včely a žížaly není toxický (Hayes and Laws, 1991).

Chronická toxicita

Na základě výsledků dlouhodobých krmných studií prometrynu u potkanů s dávkou 37,5 mg.kg.den⁻¹ a u psů 4 mg.kg.den⁻¹ prometrynu po dobu dvou let nebyly prokázány známky toxicity. Při vyšších dávkách této látky byly pozorovány histopatologické

změny v ledvinách a játrech (Hayes and Laws, 1991).

Údaje o chronické toxicitě prometrynu pro sladkovodní ryby nejsou doposud příliš známy. Nežádoucí účinky na růst ryb byly zjištěny při koncentracích od 1 do 2 mg.l⁻¹ prometrynu u jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*) vystaveného prometrynu po dobu 32 dnů (Erickson and Turner, 2002).

Reprodukční toxicita

Poruchy reprodukce krys nebyly zaznamenány u dávky 5 mg.kg.den⁻¹ prometrynu. U potkanů krmených dávkou 75 mg.kg.den⁻¹ byla pozorována snížená váha těla u potomstva (Hayes and Laws, 1991).

Prometrynu při testované dávce 250 mg.kg.den⁻¹ u potkanů, 50 mg.kg.den⁻¹ u krys, 72 mg.kg.den⁻¹ u králíků nezpůsobil žádné teratogenní změny. U prometrynu zatím nebyly prokázány mutagenní účinky (Hayes and Laws, 1991)

3. Materiál a metodika

Pro stanovení vlivu prometrynu [N,N-bis(1-methylethyl)-6-(methylthio)-1,3,5-triazine-2,4-diamine] na raná vývojová stádia kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) byla použita metoda embryolarválního testu toxicity pro ryby (OECD test č. 210).

Pokusy byly prováděny v akvaristické místnosti laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie na Fakultě rybářství a ochrany vod, Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém JU ve Vodňanech.

3.1. Embryolarvální test toxicity

Testy toxicity na organizmech vodního prostředí mají nezastupitelnou úlohu při hodnocení rizik chemických látek a přípravků včetně pesticidů pro vodní ekosystém (risk assessment). Snahou ekotoxikologie a vodní toxikologie je hodnotit potencionální nebezpečí pro vodní ekosystém jako celek. Prakticky to znamená čtyři úrovně studovaného ekosystému, a to bakterie, řasy, bezobratlí a ryby. K hodnocení ekotoxikologického rizika látek včetně pesticidů jsou vyžadovány výsledky testů toxicity na řasách, dafniích a rybách (Svobodová et al., 2010).

Při provádění testů toxicity na rybách je nutné dodržovat zásady zákona č.246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a podle § 11 vyhlášky Mze ČR č. 207/2004 Sb. o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

3.1.1. Princip a podmínky testu

Testy s ranými vývojovými stádii ryb jsou určeny k definování letálních, subletálních a chronických účinků chemických látek. Raná stádia ryb jsou vystavena určité koncentraci testované látky rozpuštěné ve vodě nebo rozpouštědle. Cílem testu je posouzení vlivu testované látky na raná vývojová stádia ryb. Test začíná umístěním oplodněných jiker do krystalizačních misek a končí přechodem ryb na juvenilní stádium (přibližně 30 až 35 dní, podle teploty vody). Test toxicity spočívá ve sledování chování, mortality, růstu a vzniku morfologických anomálií ryb v odstupňovaných koncentracích testované látky (OECD, 1992).

Ke sledovaným parametrům v průběhu testu patří kulení, přežívání embryí, rozdíly

v chování, pohyblivost, délka, hmotnost, výskyt anomálií ve vývinu ryb. Dále je v průběhu testu zaznamenávána teplota, množství kyslíku, pH a koncentrace látky. Výsledkem testu na základě získaných hodnot je stanovení hodnot LOEC (Lowest Observed Effect Concentration – nejnižší koncentrace testované látky, při které jsou už pozorovány účinky), NOEC (No Observed Effect Concentration – nejvyšší koncentrace testované látky, která nevyvolá žádné pozorované účinky) a 35dLC50 (OECD, 1992).

3.1.2. Pracovní postup

Jako experimentální materiál byly použity oplodněné jikry kapra, které byly získány z líhně Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech, Fakulty rybářství a ochrany vod, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Výtěr ryb proběhl 10. 5. 2012, jikry použité v testu byly vybrány náhodně z důvodu minimalizování vlivu genetických změn na výsledky testu. Jikry kapra obecného byly druhý den po výtěru převezeny do laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie.

Nasazení testu proběhlo 11. 5. 2012, oplozené jikry byly rozděleny po 100 ks do 18 skleněných misek o objemu lázně 0,75 l obsahující prometryn a dvě kontroly. Jedna kontrola obsahovala jen ředící vodu a druhá kontrola obsahovala dimethyl sulfoxid (DMSO) použitý k rozpouštění prometrynu. DMSO je polární rozpouštědlo, které se používá při chemických reakcích a je využíváno jako pomocná látka (rozpouštědlo) v testech toxicity na vodních organismech. Je potvrzeno, že použití DMSO v koncentracích 0,2 až 0,5 ml.l⁻¹ nevyvolá u raných vývojových stadií kapra žádné poškození a neovlivňuje výsledky testů toxicity (Máchová et al., 2009).

Celkem byly testovány čtyři koncentrace prometrynu rozpuštěné v DMSO a každá koncentrace byla vždy ve třech opakováních. Tři opakování obsahovala též kontrola a kontrola DMSO.

Testovaný prometryn byl použit od firmy Sigma Aldrich s chemickou čistotou 99,3 %). Testované koncentrace prometrynu pro kapra byly následující: 0,51 µg.l⁻¹ (reálná koncentrace v českých řekách, skupina 1 - E1), 80 µg.l⁻¹ (1 % 96hLC50, skupina 2 - E2), 1 200 µg.l⁻¹ (15 % 96hLC50, skupina 3 - E3), a 4 000 µg.l⁻¹ (50 % 96hLC50, skupina 4 - E4). Ředící voda používána pro přípravu testovacích roztoků měla následující parametry: obsah kyslíku >93 %, teplota 19,3 - 20,1 °C, pH 7,56,

KNK_{4,5} 3,3 mmol.l⁻¹, CHSK_{Mn} 1,1 mg.l⁻¹, celkový amoniak < 0,02 mg.l⁻¹, NO₃⁻ 5,55 mg.l⁻¹, NO₂⁻ < 0,01 mg.l⁻¹, PO₄ 0,228 mg.l⁻¹, Ca₂⁺ 49,10 mg.l⁻¹, Mg₂⁺ 13,60 mg.l⁻¹. Příprava testovacích roztoků proběhala podle schématu uvedeného v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4. Příprava testovacích roztoků.

Skupina č.		Koncentrace prometrynu	Dávka do 1 l	Objem příslušných roztoků			Roztok č.
				do 1 litru	do 2 litrů	do 3 litrů	
Kontrola		0	0	0	0	0	
Kontrola DMSO		0	0,5 ml	0,5 ml	1 ml	1,5 ml	DMSO
1	Reálná konc.	0,51 µg.l ⁻¹	0,51 µg.l ⁻¹	0,5 ml	1 ml	1,5 ml	I
2	1 % LC50	80 µg.l ⁻¹	80 µg.l ⁻¹	0,5 ml	1 ml	1,5 ml	II
3	15 % LC50	1 200 µg.l ⁻¹	1 200 µg.l ⁻¹	0,5 ml	1 ml	1,5 ml	III
4	50 % LC50	4 000 µg.l ⁻¹	4 000 µg.l ⁻¹	0,5 ml	1 ml	1,5 ml	IV

Poznámka: Roztok IV: 0,4 g prometrynu do 50 ml DMSO

Roztok III: 15 ml roztoku IV do 50 ml DMSO

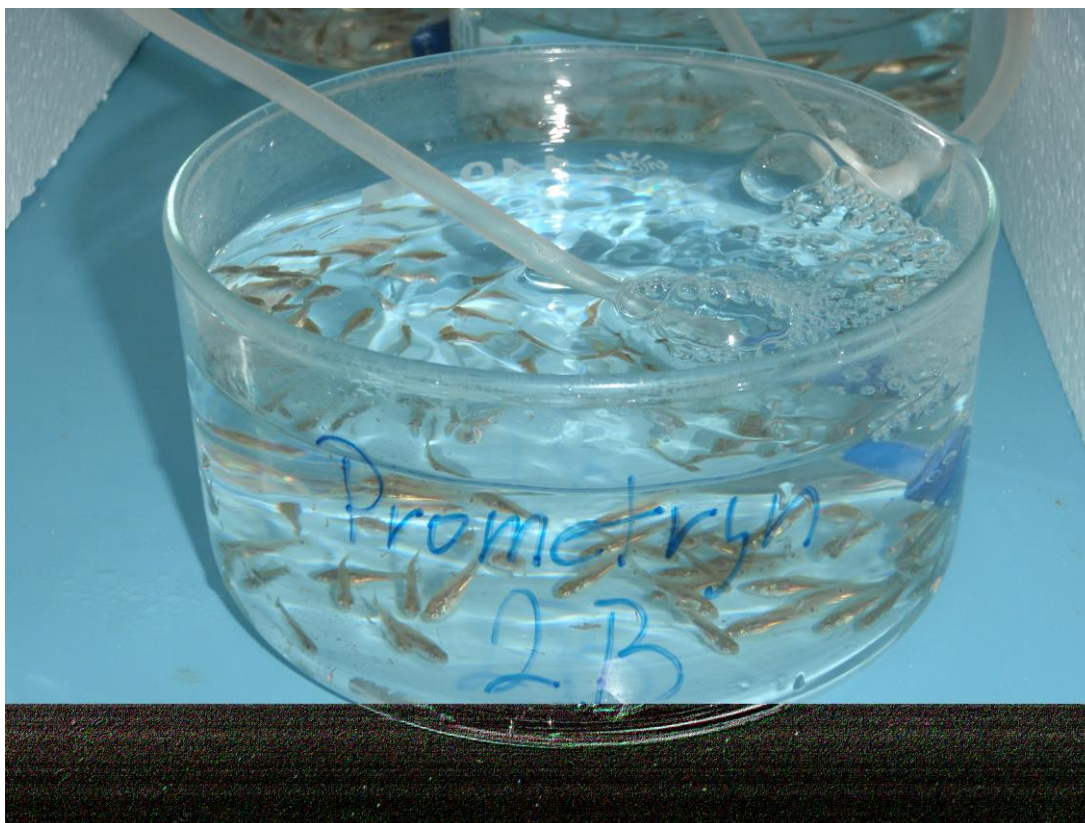
Roztok II: 1 ml roztoku IV do 50 ml DMSO

Roztok I: 0,320 ml roztoku II do 50 ml DMSO

Misky byly umístěny do boxu v laboratoři, uspořádání misek jedné skupiny bylo náhodné (obr. č. 2, 4, 5). Do misek byly vloženy vzduchovací kamínky pro zajištění aerace (obr. č. 3). Světelný režim v testu byl přirozený (16 hodin světla a 8 hodin tmy). Test byl proveden v semistatickém systému, testovací roztoky byly vyměňovány každých 24 hodin. Výměna roztoků byla prováděna velice opatrně, aby nedošlo k poškození testovaných jedinců (obr. č. 6, 7, 8, 9). Během výměny lázně byli vyloveni uhynulí jedinci a jejich počet byl každý den zaznamenán. Dále byla každý den měřena teplota vody, nasycení kyslíkem a pH.



Obrázek č. 2. Uspořádání embryolarválního testu.



Obrázek č. 3. Areace testovací lázně během testu.



Obrázek č. 4 a. 5 Uspořádání embyolarválního testu.



Obrázek č. 6. Larvy kapra během přelovování.



Obrázek č. 7. Příprava výměny testovací lázně.



Obrázek č. 8. Výměna lázně.



Obrázek č. 9. Přelovení a výměna lázně.

S krměním ryb se započalo dva dny po kulení jiker (13. 5. 2012). Jako potrava byla použita čerstvě vylíhlá naupliová stádia žábřonožky solné (*Artemia salina*). Žábřonožky se líhnou v solném roztoku (90 g mořské soli na 3 litry vody), do kterého se přidá na toto množství 6 g žábřonožky. Pro líhnutí žábřonožek je velice důležitá vhodná nádoba a intenzita vzduchování. Vajíčka musí být stále v pohybu. Ve chvíli, kdy se usadí na dně nebo zůstanou viset na hladině, se jejich vývoj zastaví. Dalším důležitým parametrem pro líhnutí žábřonožek je teplota. Při teplotě 28 °C dochází k líhnutí vajíček do 18 hodin, při teplotě 25 °C do 24 hodin (čím je teplota nižší, tím delší je doba líhnutí). Nevylíhnutá vajíčka obvykle leží na dně, prázdné skořápky plavou na hladině (Kouba et al., 2009). Krmění ryb žábřonožkou solnou probíhalo dvakrát denně *ad libitum* (obr. č. 10, 11).



Obrázek č. 10 a 11. Líhnutí žábřonožky solné.

V průběhu testu byly odebírány vzorky embryí a larev ryb, které byly přechovány v 4 % roztoku formalínu (obr. č. 12). Odebíráno bylo vždy 5 jedinců z každé misky (tj. 15 jedinců ze skupiny). První odběr zkušebních vzorků proběhl 17. 5. 2012 po 5 jedincích z každé misky. Druhý odběr proběhl 24. 5. 2012 (5 ks z každé misky). Odběr číslo 3 proběhl 31. 5. 2012, odebráno bylo 5 ks z každé misky kromě misek 4B, kde byly odebráni pouze 3 jedinci a z misky 4A byly odebráni pouze 2 poslední jedinci. Misky 4A a 4B byly po tomto odběru zrušeny. Odběr číslo 4 proběhl 7. 6. 2012, odebráno bylo opět 5 jedinců z každé misky kromě misky 4C, kde nebyli odebráni žádní jedinci. Poslední odběr zkušebních vzorků, odběr číslo 5, proběhl 14. 6. 2012. Odebráno bylo po 5 jedincích z každé misky. Takto odebraní jedinci byli použiti pro účely sledování ontogenetického vývoje, výskyt morfologických anomálií a růstových ukazatelů.

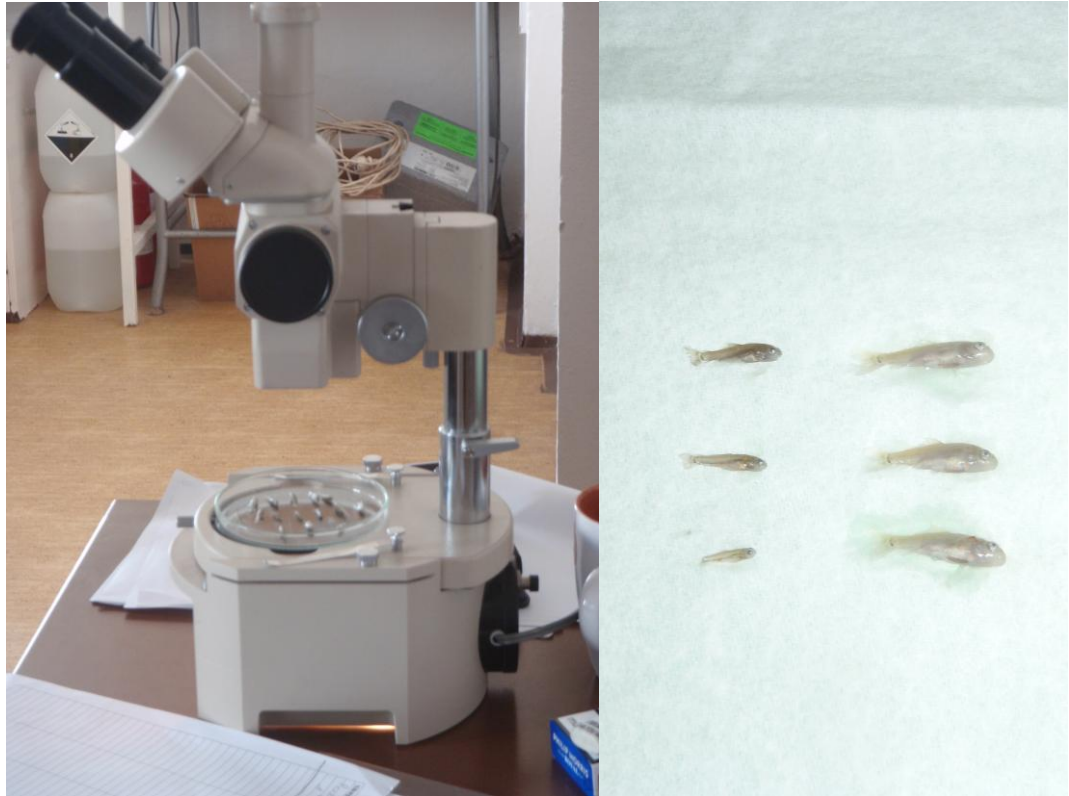


Obrázek č. 12. Přechování vzorků ryb v polyetylenových láhvích s formalínem.

U odebraných vzorků ryb bylo provedeno stanovení periody ontogenetického vývoje podle Peňáze et al. (1983) (obr. č. 13, 14, 15), který popsal devět embryonálních (E1 - E9), šest larválních (L1 - L6) a dvě juvenilní stádia (J1 - J2).



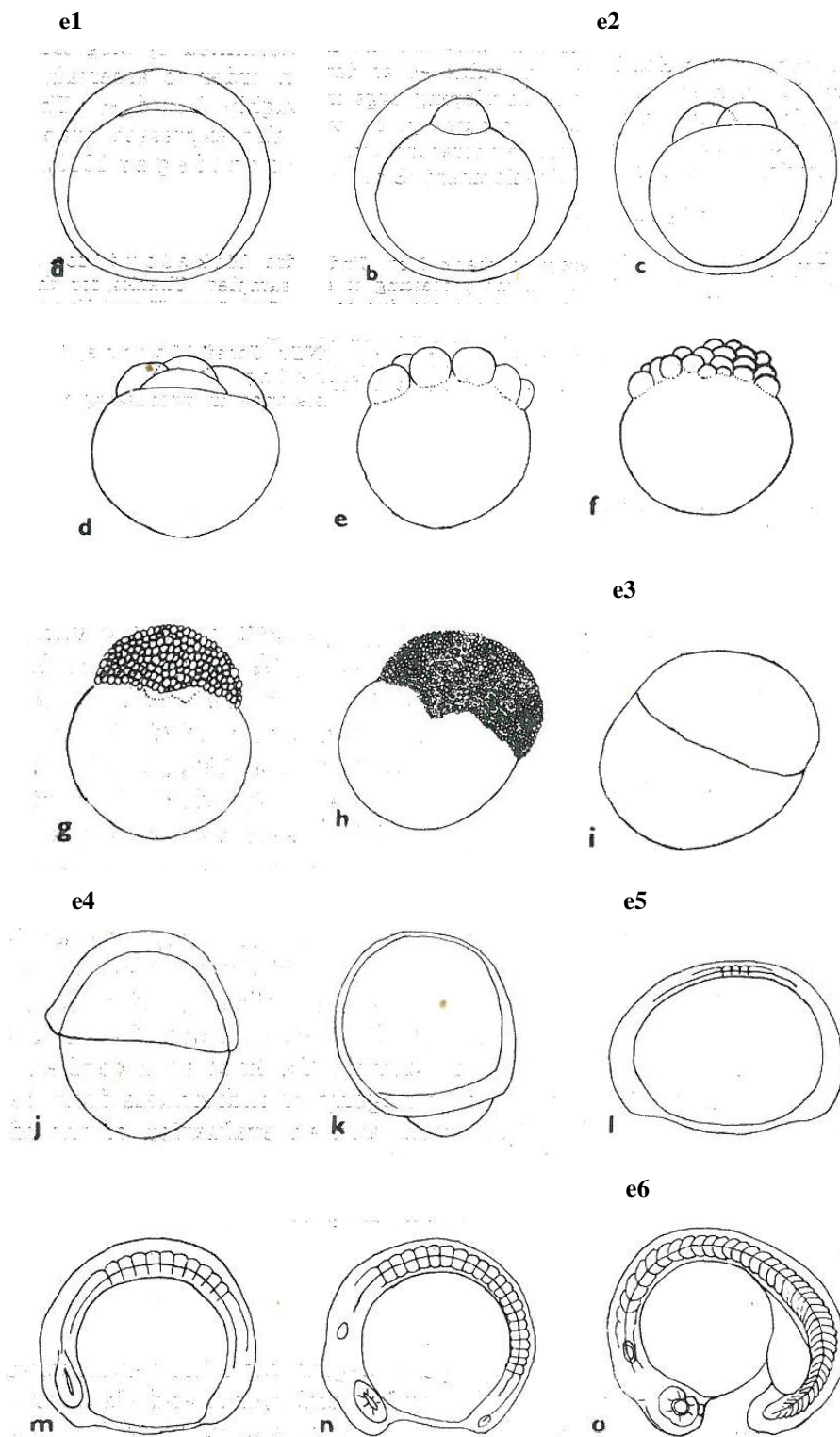
Obrázek č. 13. Hodnocení ontogenetického vývoje kaprů.



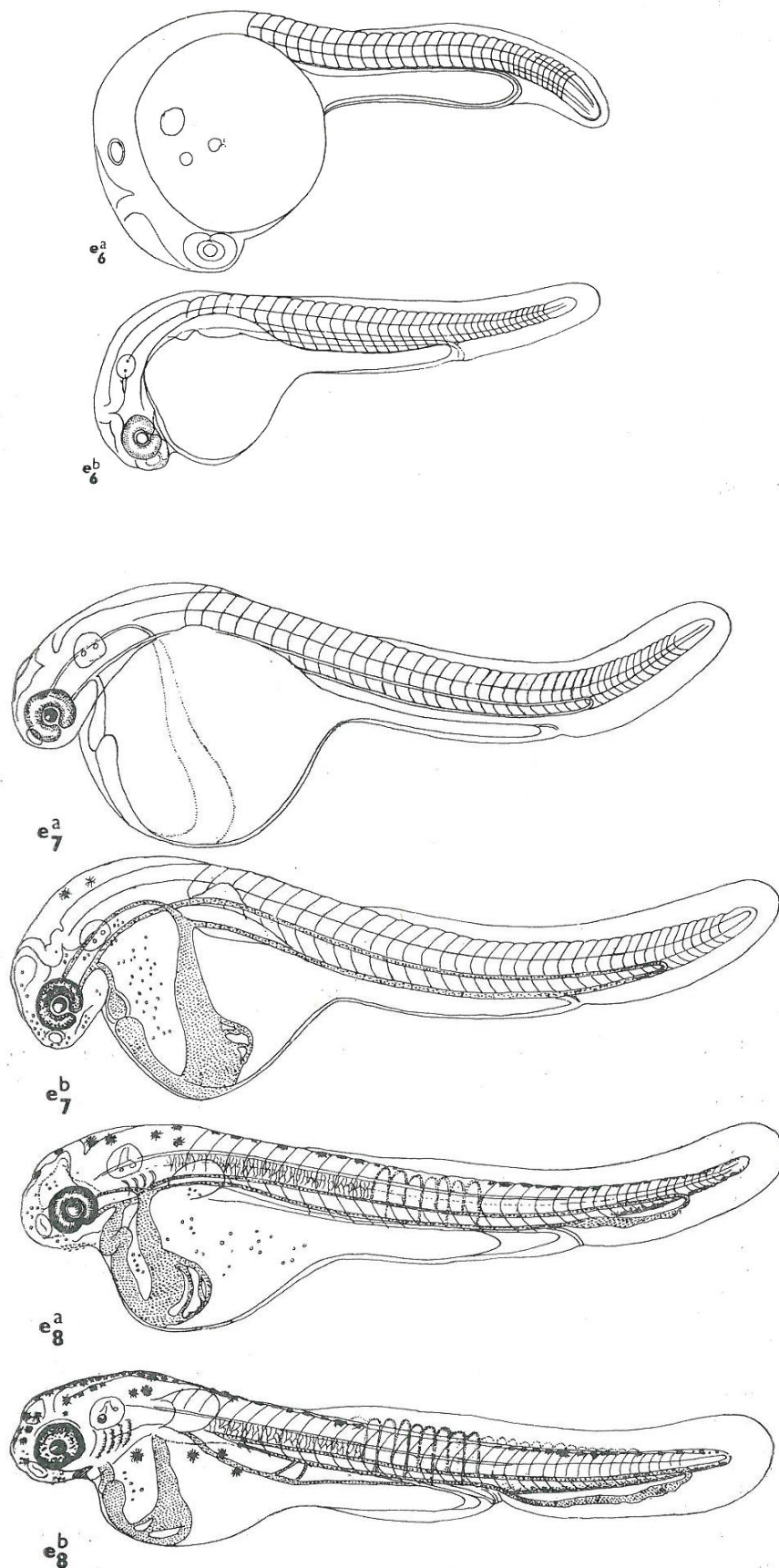
Obrázek č. 14 a 15. Hodnocení ontogenetického vývoje ryb

Embryonální perioda (stádia E1 - E9)

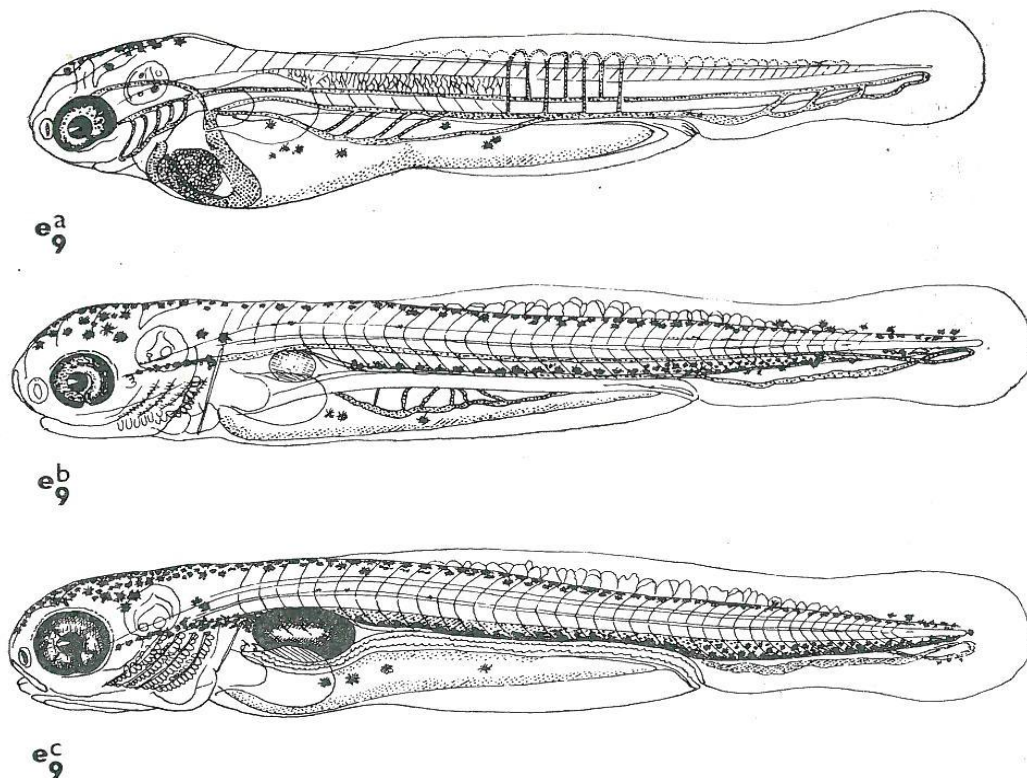
Embryonální perioda začíná aktivací vývoje vajíčka a končí zahájením exogenní výživy. V této fázi vývoje se začínají diferencovat jednotlivé orgány, začíná pulsovat srdce, tvoří se oči, trávicí soustava, vytváří se pigmentové buňky (obr. č. 16 - 18) (Peňáz et al., 1983).



Obrázek č. 16. Embryonální vývojová stádia kapra (E1 - E6) (Peňáz et al., 1983).



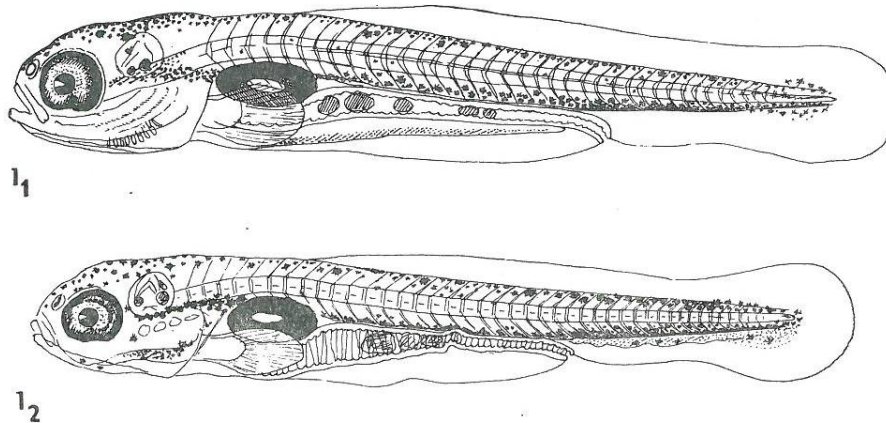
Obrázek č. 17. Embryonální stádia E6 - E8 (Peňáz et al., 1983)



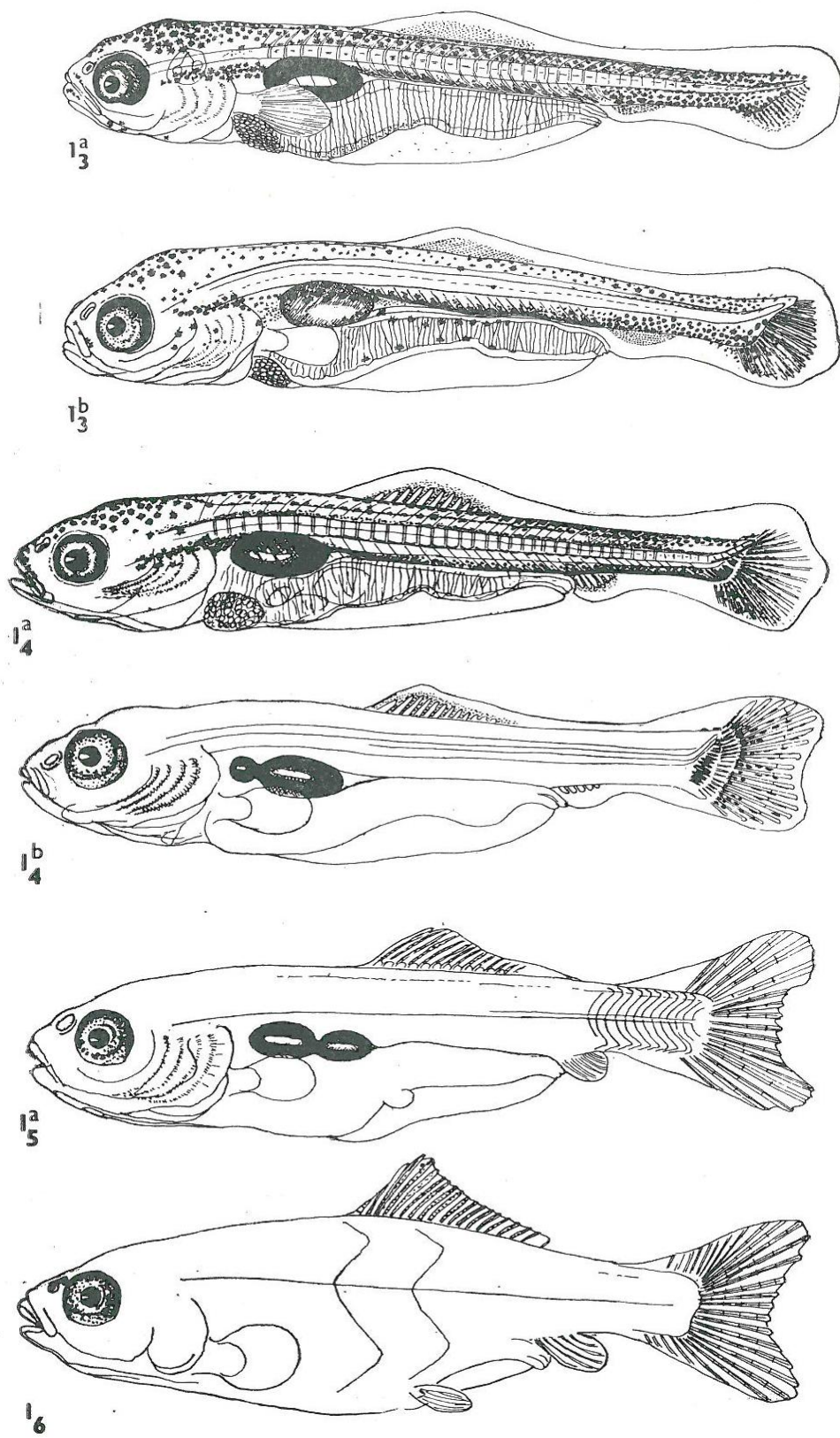
Obrázek č. 18. Embryonální stádium E9 (Peňáz et al., 1983).

Larvální perioda (stádia L1 - L6)

Larvální perioda začíná zahájením exogenní výživy, končí metamorfózou a nahrazením embryonálních a larválních orgánů definitivními. V této fázi vývoje je již plně zformované tělo a je podobné tělu dospělých jedinců. Larvy se stávají odolnějšími, svou činnost zahajuje i trávicí soustava a získávání potravy je plně zajištěno přijímáním vnější potravy, stoupá spotřeba kyslíku (obr. č. 19, 20) (Peňáz et al., 1983).



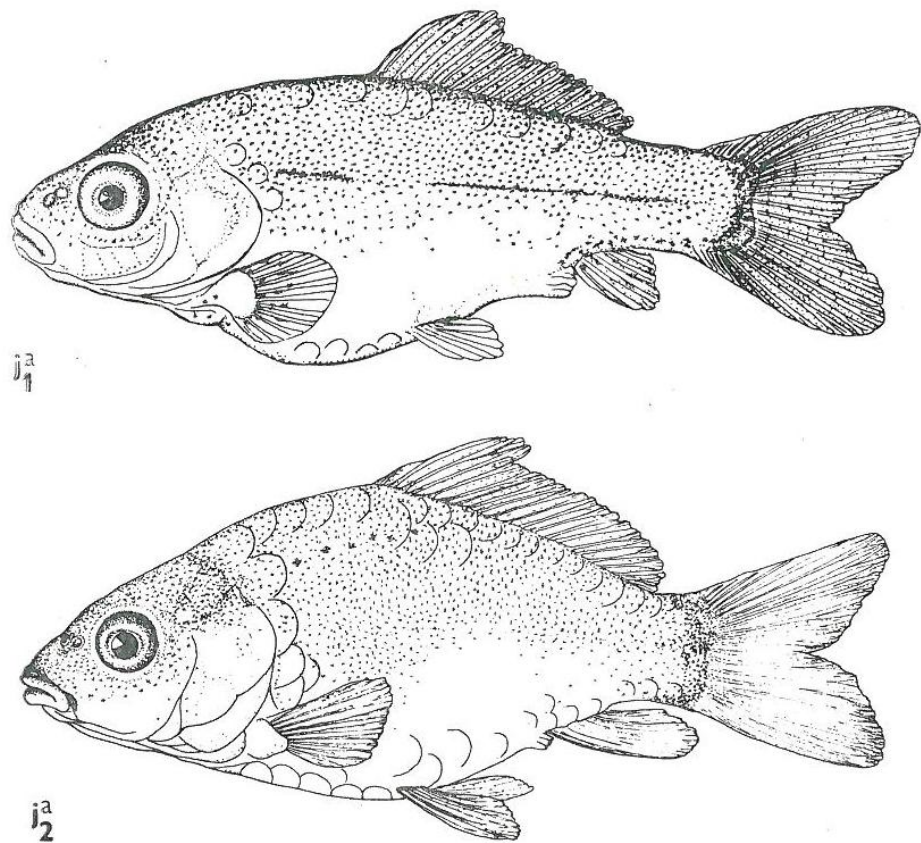
Obrázek č. 19. Larvální stádia L1 - L2 (Peňáz et al., 1983)



Obrázek č. 20. Larvální stádia L3 - L6 (Peňáz et al., 1983).

Juvenilní perioda (stádia J1 a J2)

Juvenilní perioda začíná dokončením metamorfózy (tělo podobné dospělým jedincům). U kaprovitých ryb se vytváří šupinový pokryv těla. Juvenilní perioda končí zahájením pohlavní dospělosti. V této fázi vývoje nastupuje intenzivní růst, stoupá odolnost ryb vůči vnějším faktorům a hladovění (obr č. 21) (Peňáz et al., 1983)

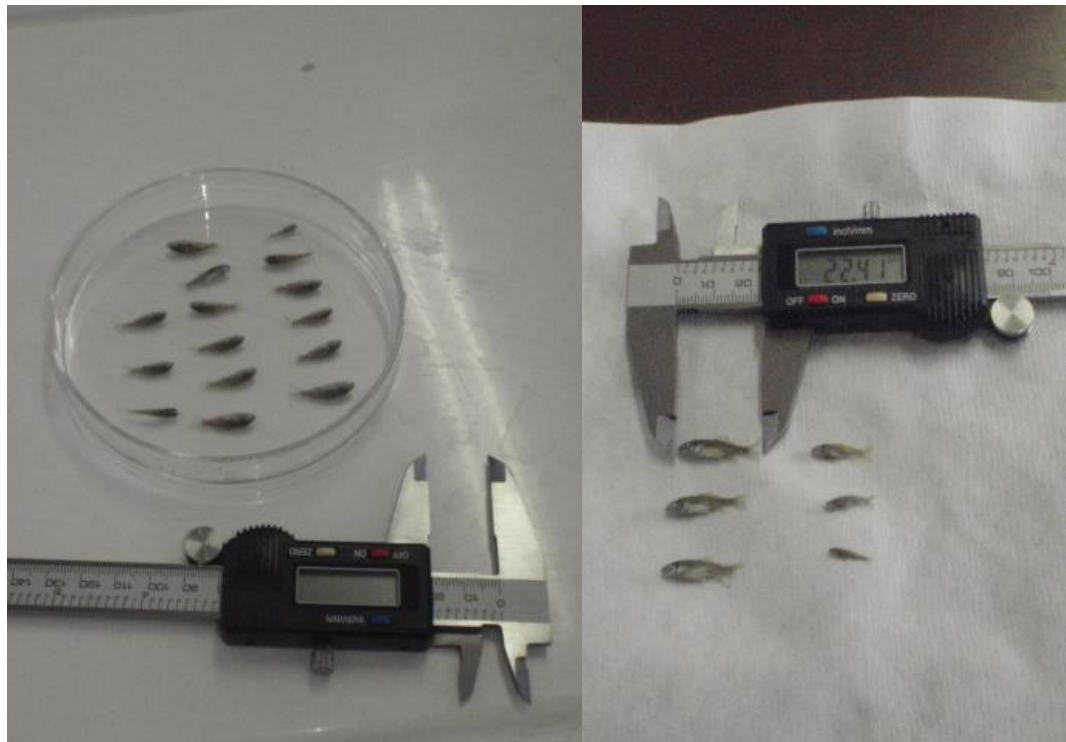


Obrázek č. 21. Juvenilní stádia J1 - J2 (Peňáz et al., 1983).

V rámci embryolarválního testu byly ryby dále zváženy na analytických vahách (Mettler-Toledo) (obr. č 21). Dále byla změřena celková délka těla digitálním posuvným měřítkem (obr. č. 22, 23). Všechny tyto údaje byly zaznamenány.



Obrázek č. 21. Vážení larev kapra na analytických vahách.



Obrázek č. 22 a 23. Měření kaprů digitálním posuvným měřítkem.

Po změření ryb bylo provedeno vyhodnocení růstových parametrů ryb. Pro toto vyhodnocení byly použity tři ukazatele, a to: specifická rychlost růstu (SRG), inhibice růstu (I) a Fultonův koeficient (FK).

Průměrná specifická rychlost růstu pro jednotlivé skupiny ryb byla stanovena jako podíl rozdílu průměru přirozených logaritmů hmotností ryb při prvním odběru (7. den testu) a na konci testu (35. den testu). Výpočet byl proveden podle vzorce:

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

kde: SGR = průměrná specifická rychlost růstu ve skupině; w_1 , w_2 = hmotnosti jedné ryby v čase t_1 a t_2 jednotlivé (g); t_1 = čas (dny) – začátek expozice a t_2 = čas - konec expozice.

Inhibice specifické rychlosti růstu je podíl mezi rozdílem průměrné specifické rychlosti růstu kontroly a experimentální skupiny a průměrné specifické rychlosti růstu v kontrole po 35 dnech expozice, násobený stem a byla vypočtena podle vzorce:

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

kde: I = inhibice specifického růstu ve vybrané experimentální skupině po x dnech expozice, $SGR_{(kontrola)}$ = průměrná specifická rychlost růstu v kontrolní skupině, $SGR_{(skupina)}$ = průměrná specifická rychlost růstu ve vybrané experimentální skupině.

3.1.3. Vyhodnocení testu

V průběhu testu byla sledována a zaznamenávána mortalita ryb a výsledky byly vyhodnoceny probitovou analýzou s využitím programu Eko-Tox 5.1. Na základě mortality byly vypočteny hodnoty 35dLC50 a hodnoty LOEC a NOEC.

Růstové ukazatele ryb byly vyhodnoceny pomocí statistického programu Statistika 8.1 analýzou variance (ANOVA - Tuckey test)

3.1.4. Platnost testu (validace) podle OECD (1992)

Výsledky se považují za platné, jestliže jsou splněna následující kritéria:

- koncentrace testované látky během testu neklesla pod 80 % nominální koncentrace,
- teplota vody se neliší o více jak 1,5 °C v průběhu testu a musí být v rozmezí pro daný testovaný druh,
- koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovaných roztocích a v kontrole se během celého testu pohybovala v rozmezí 60 – 100 % nasycení,
- mortalita v kontrole nesmí přesáhnout 25%,
- líhnutí v kontrole musí být minimálně 80%.

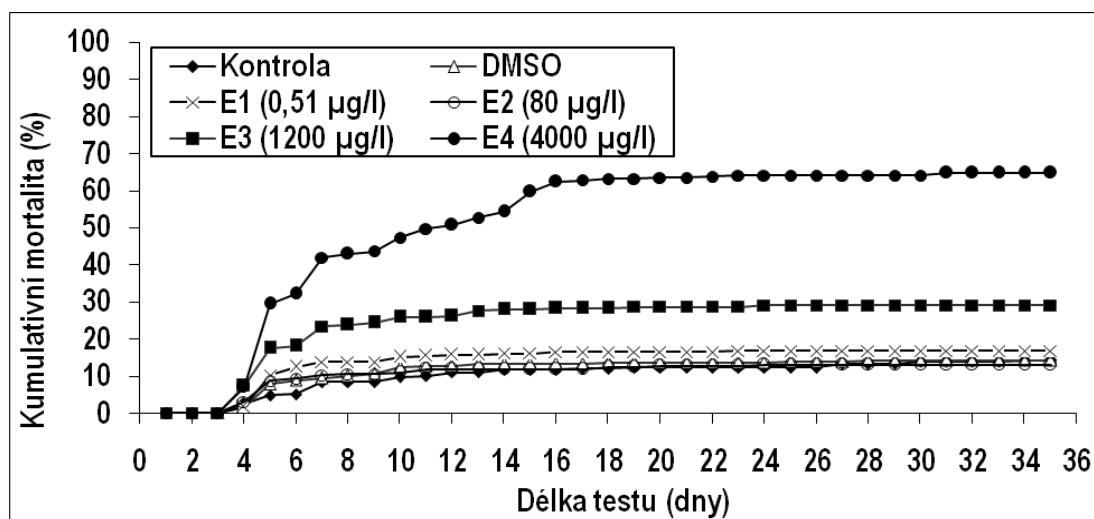
4. Výsledky

4.1. Kulení

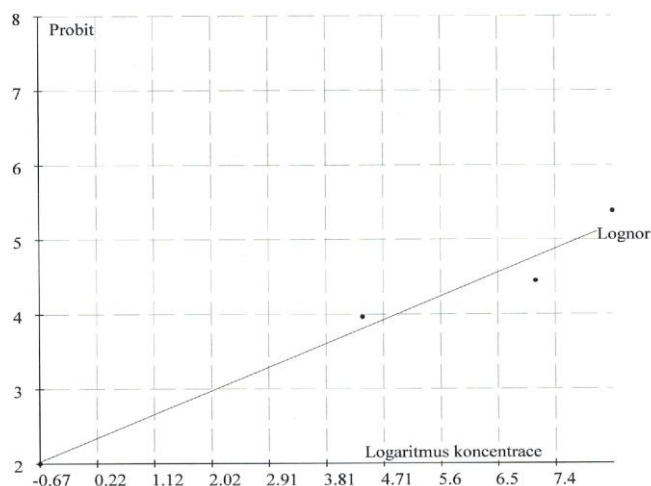
Kulení ryb začalo 4. den po nasazení testu, většina jiker ve všech pokusných skupinách se vykulila do 6. dne. Během testu nebyl zjištěn vliv prometrynu na kulení kapra obecného (*Cyprinus carpio L.*).

4.2. Kumulativní mortalita

Statisticky významný ($p < 0,01$) rozdíl v celkové kumulativní mortalitě byl zjištěn u ryb exponovaných nejvyšší koncentraci 4 mg.l^{-1} prometrynu ($50\% \text{ 96hLC50}$), ve srovnání s kontrolní skupinou (graf č. 1) v této skupině došlo k 65 % mortalitě. Masivní mortalita v této skupině nastala během 6. až 16. dne. V ostatních testovaných koncentracích se kumulativní mortalita pohybovala v rozmezí 13 až 29 %, v těchto skupinách nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl oproti kontrolním skupinám, kde byla mortalita 14%. Na základě výsledků byla stanovena 35 denní $\text{LC50} = 2\,314,0 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ prometrynu (graf č. 2). Na základě mortality byla stanovena hodnota $\text{LOEC} = 1\,100,0 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ a $\text{NOEC} = 850,0 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$.



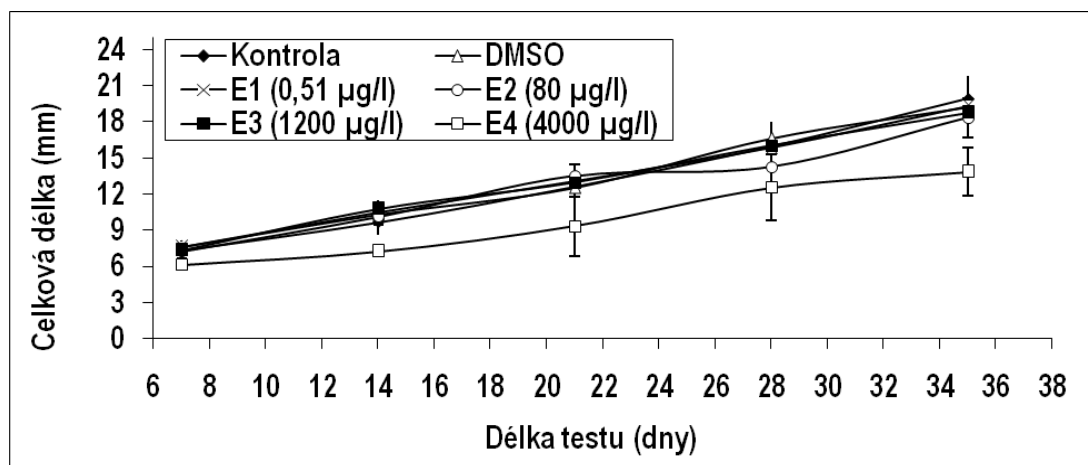
Graf č. 1. Kumulativní mortalita kapra obecného během embryolarválního testu s prometrynem.



Graf č. 2. Test akutní toxicity prometrynu za 35 dní – vyhodnocení 35dLC50.

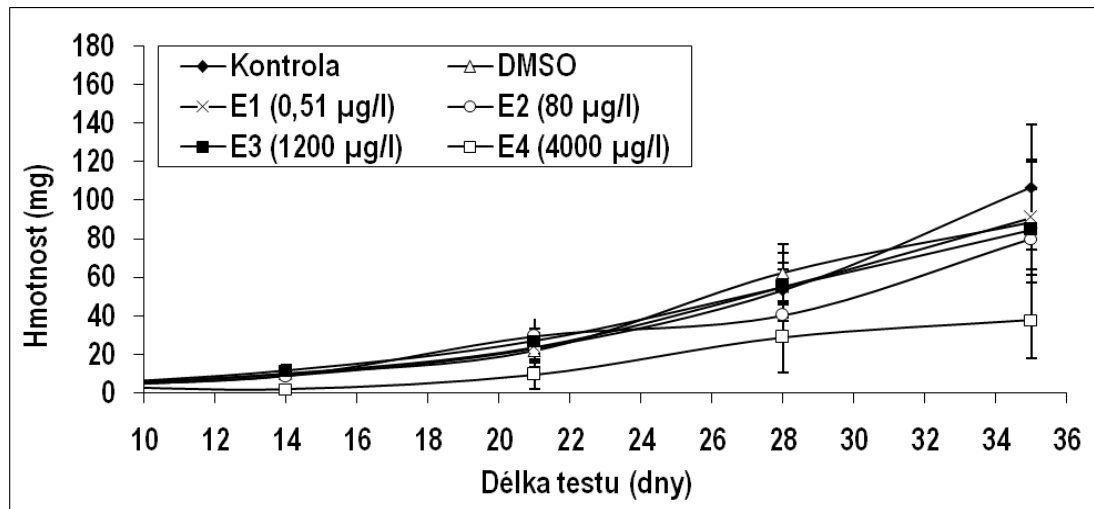
4.3. Délkové hmotnostní růstové parametry

Od sedmého dne experimentu bylo zjištěno statisticky významné ($p < 0,01$) snížení délky ryb vystavených nejvyšší testované koncentraci prometrynu 4 mg.l^{-1} (čtvrtá skupina - E4) (graf č. 3). U ostatních experimentálních skupin nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v celkové délce těla oproti kontrolním skupinám.



Graf č. 3. Celková délka larev a juvenilních kaprů obecných vystavených prometrynu.

Počínaje čtrnáctým dnem měly ryby ve čtvrté pokusné skupině (E4 - 4 mg.l⁻¹ prometrynu) statisticky ($p < 0,01$) nižší hmotnost v porovnání s kontrolní skupinou (graf č. 4). Mezi ostatními experimentálními skupinami a kontrolními skupinami nebyly zjištěny rozdíly v hmotnosti ryb.



Graf č. 4. Hmotnost larev a juvenilních kaprů obecných vystavených prometrynu.

Hodnoty Fultonova koeficientu experimentálních a pokusných skupin jsou uvedeny v tabulce č. 5. Hodnoty Fultonova koeficientu byly signifikantně ($p < 0,01$) nižší u ryb vystavených nejvyšší koncentraci prometrynu (E4 - 4 mg.l⁻¹) od 7. do 21. dne ve srovnání s kontrolami. Mezi ostatními experimentálními skupinami a kontrolními skupinami nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.

Tabulka č. 5. Hodnoty Fultonova koeficientu u larev a juvenilních kaprů obecných vystavených prometrynu.

Skupina	Kontrola	DMSO	E1	E2	E3	E4
Prometryn (µg.l ⁻¹)	-	-	0.51	80	1200	4000
Čas (dny)	x ± SD	x ± SD	x ± SD	x ± SD	x ± SD	x ± SD
7	0,72 ± 0,20	0,80 ± 0,18	0,78 ± 0,22	0,94 ± 0,26	0,88 ± 0,21	0,52 ± 0,61*
14	1,11 ± 0,69	0,89 ± 0,15	0,86 ± 0,15	0,86 ± 0,27	0,91 ± 0,14	0,49 ± 0,13*
21	1,10 ± 0,12	1,05 ± 0,16	1,04 ± 0,13	1,18 ± 0,25	1,22 ± 0,17	0,84 ± 0,23*
28	1,29 ± 0,20	1,33 ± 0,13	1,33 ± 0,15	1,41 ± 0,64	1,32 ± 0,14	1,23 ± 0,14
35	1,30 ± 0,10	1,22 ± 0,30	1,21 ± 0,35	1,27 ± 0,09	1,26 ± 0,09	1,26 ± 0,21

*Experimentální skupiny statisticky ($p < 0,01$) významně se lišící od kontrolních skupin.

Specifická rychlost růstu (SRG) a inhibice růstu (I) kaprů vystavených prometrynu jsou uvedeny v tabulce 6. Inhibice růstu ryb vystavených nejvyšší koncentraci prometrynu (4 mg.l^{-1}) byla 41,68 % ve srovnání s kontrolní skupinou, v ostatních skupinách se inhibice pohybovala v rozmezí 9,67 % do 13,53 %.

Tabulka č. 6. Rychlost a inhibice růstu kaprů obecných po expozici prometrynu

Skupina	Kontrola	DMSO	E1	E2	E3	E4
Prometryn ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	-	-	0,51	80	1200	4000
m_7 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, mg)	2,76 \pm 0,45	3,46 \pm 0,47	3,27 \pm 0,47	3,44 \pm 0,50	3,39 \pm 0,64	4,05 \pm 1,16
m_{35} ($\bar{x} \pm \text{SD}$, mg)	106,73 \pm 32,52	88,45 \pm 31,25	90,98 \pm 29,88	80,01 \pm 19,83	84,77 \pm 20,79	37,63 \pm 19,53*
SGR	12,93	11,25	11,68	11,18	11,46	7,54
I (%)	-	12,99	9,67	13,53	11,37	41,68

*Experimentální skupiny statisticky ($p < 0,01$) významně se lišící od kontrolních skupin.

Poznámka: m_7 , m_{35} = průměrná hmotnost ryby vybrané skupiny 7. a 35. den expozice; SGR = střední specifická rychlost růstu vybrané skupiny po 28 dnech expozice; I = inhibice specifické rychlosti růstu vybrané skupiny po 28 dnech expozice; SD = směrodatná odchylka.

4.4. Ontogenetický vývoj

Periody ontogenetického vývoje kaprů vystavených prometrynu jsou uvedeny v tabulce č. 7. Významné rozdíly v ontogenetickém vývoji byly zjištěny ve dvou nejvyšších testovaných skupinách (1,2 a 4 mg.l⁻¹). U ryb v těchto skupinách došlo ke zpoždění vývoje v porovnání s kontrolními skupinami. V těchto skupinách byli na konci testu jedinci v larválním stádiu (L4b nebo L5), se zvyšující se koncentrací prometrynu převládali jedinci ve stádiu L4b. V ostatních experimentálních skupinách a kontrolách dosahovaly ryby na konci testu juvenilního stádia (J1).

Tabulka č. 7. Periody ontogenetického vývoje kaprů v průběhu 35 denní expozice prometrynem.

Skupina	Kontrola	DMSO	E1	E2	E3	E4
Prometryn ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	-	-	0.51	80	1200	4000
Čas (dny)	DSP	DSP	DSP	DSP	DSP	DSP
7	ec9 - L1	ec9 - L1	ec9 - L1	ec9 - L1	ec9 - L1	ec9
14	L2 - L3b	L2 - L3b	L2 - L3b	L2 - L3b	L2 - L3a	L1 - L2
21	L4a - L5	L4a - L5	L4a - L5	L4a - L5	L4a - L4b	L3 - L4a
28	L5 - L6	L5 - L6	L5 - L6	L5 - L6	L4a - L5	L4a - L4b
35	L6 - J1	L6 - J1	L6 - J1	L6 - J1	L5 - L6	L4b - L5

4.5. Makroskopické morfologické anomálie

V průběhu testu byly zjištěny ve všech skupinách včetně kontrolních morfologické anomálie. Výskyt těchto anomálií byl v průměru do 1%, jednalo se převážně o zakřivení páteře (lordózy, skoliózy) a deformity váčkového žloutku. Vzhledem k nízkému procentu morfologických anomálií a výskytu i v kontrolních skupinách lze považovat tyto anomálie za spontánní a nemající souvislost s expozicí prometrynu.

5. Diskuse

Cílem této studie bylo posouzení vlivu prometrynu na raná vývojová stádia kapra obecného (*Cyprinus carpio L.*) a zároveň rozšíření podkladů a informací o možném vlivu na vodní organismy a životní prostředí. Pro posouzení vlivu prometrynu na raná vývojová stádia kapra obecného byla použita metoda embryolarválního testu toxicity pro ryby (OECD test č. 210).

Raná vývojová stádia ryb jsou obecně považována za nejcitlivější vůči znečištění a působení negativních vnějších vlivů na ekosystém, ve kterém žijí (Lahr et al., 2000).

V současné době existuje několik informací o toxicitě prometrynu pro dospělé ryby, ovšem o působení prometrynu, a to i pesticidů obecně, na raná vývojová stádia ryb, je doposud známo jen velmi málo. Přitom embryolarvální testy toxicity jsou jednou z nejcitlivějších metod posouzení vlivu chemických látek, protože testovaný organismus je vystaven působení chemické látky ve všech kritických obdobích raného vývoje, jako jsou: líhnutí jiker, rozplavání, začátek exogenní výživy, vývoj orgánů a žaber a metamorfóza (McKim, 1995). Zvláště citlivou skupinu tvoří čerstvě vylíhlé larvy, protože ztrácí ochrannou membránu a jsou tak plně vystaveny potenciální toxicitě testované látky (Arufe et al., 2004)

Výsledky této studie poskytují další údaje o působení prometrynu a jeho vlivu na raná vývojová stádia ryb a přispívají k lepšímu poznání této látky. Během embryolarválního testu toxicity nebyl prokázán vliv prometrynu na kulení jiker kapra. Do 6. dne od nasazení testu se vykulila většina jiker ve všech pokusných skupinách. Mezi 6. a 16. dnem testu se statisticky významně odlišovala skupina číslo 4 s nejvyšší koncentrací prometrynu 4 mg.l^{-1} . V této skupině došlo k 65% kumulativní mortalitě ve srovnání s kontrolou. Ostatní skupiny nevykazovaly žádný statisticky významný rozdíl v kumulativní mortalitě ve srovnání s kontrolou. Skupina číslo 4 se významně odlišovala od ostatních skupin s nižšími koncentracemi prometrynu ve všech sledovaných faktorech.

Od 7. dne expozice ryb prometrynu bylo zjištěno snížení délky těla ryb ve 4. skupině. Ostatní experimentální skupiny nevykazovaly žádnou statisticky významnou odchylku oproti kontrole. Hmotnost ryb vystavených prometrynu o koncentraci 4 mg.l^{-1} se začala snižovat oproti ostatním pokusným skupinám od 14. dne testu. Inhibice růstu ryb vystavených nejvyšší koncentraci prometrynu (4 mg.l^{-1}) byla 41,68 % ve srovnání

s kontrolní skupinou, v ostatních skupinách se inhibice pohybovala v rozmezí 9,67

do 13,53 %. Rychlost růstu je jedním z limitujících faktorů pro posouzení úspěšnosti ryb v jejich životním prostředí (Bengtsson, 1974). Zpomalení růstu jedince může způsobit jeho nižší konkurenceschopnost v boji o potravu či vhodné stanoviště. Tito jedinci se častěji stávají kořistí predátorů, mohou být náchylnější k onemocnění a mohou být ovlivněny i jejich rozmnožovací schopnosti (Rosenthal and Alderdica, 1976; Woltering, 1984). Velíšek et al. (2012) zaznamenal významný pokles růstu po expozici triazinovému herbicidu terbutrynu u kapra. Ontogenetický vývoj je důležitým ukazatelem mnoha typů znečištění vody. Významné rozdíly v ontogenetickém vývoji se projevily ve dvou experimentálních skupinách s nejvyššími koncentracemi prometrynu (1,2 a 4 mg.l⁻¹). U ryb v těchto dvou skupinách došlo k opoždění ve vývoji v porovnání se všemi skupinami. Ve skupinách 3 a 4 s nejvyššími koncentracemi prometrynu byli na konci testu jedinci v larválním vývojovém stádiu (L4b nebo L5), se zvyšující se koncentrací převládali jedinci ve stádiu L4b. V ostatních experimentálních skupinách a kontrolách ryby na konci testu dosáhly juvenilního stádia (J1). Změny v ontogenetickém vývoji byly pozorovány u kapra obecného po expozici terbutrynu o koncentracích 0,2 a 2 mg.l⁻¹ (Velíšek et al., 2012). McCarthy et al. (2008) a DeMicco et al. (2010) ve svých studiích embryolaroválního vývoje ryb po expozici pesticidů pozorovali řadu morfologických anomálií. Jednalo se především o malformace myoskeletárního vývoje, zakřivení páteře, otoky v perikardiální oblasti nebo deformace žloutkového váčku.

Po expozici prometrynu byly pozorovány morfologické anomálie ve všech skupinách včetně kontrolních, ovšem výskyt těchto anomálií nepřesáhl jedno procento, proto je lze považovat za spontánní. Nepředpokládá se, že by tyto morfologické anomálie měly souvislost s expozicí ryb prometrynu.

Je prokázáno, že triazinové herbicidy obecně mají u sladkovodních ryb vliv na funkci orgánů, a to především ledvin a jater. Játra jsou primárním orgánem pro metabolismus a vylučování škodlivin. Zvýšená koncentrace toxických látek v játrech může mít negativní vliv na jejich stavbu. Degenerace epitelových buněk kaudální části ledvin byla pozorována u pstruha duhového a kapra po expozici metribuzinu (Velíšek et al., 2008).

Triazinové herbicidy obecně jsou pro ryby středně až silně toxické. Klinické příznaky intoxikace ryb těmito látkami se projevují převážně útlumovými fázemi.

Jedním z charakteristických příznaků intoxikace ryb triaziny je tvorba transudátu v dutině tělní. Toto se projevuje především jejím zvětšením (Svobodová et al., 2007).

Změny chování ryb byly pozorovány po expozici terbutrynu o koncentraci 32 mg.l^{-1} (Velíšek et al., 2012). Při expozici metribuzinu o koncentraci $175,1 \text{ mg.l}^{-1}$ byla pozorována zvýšená frekvence dýchání, ztráta schopnosti pohybu a koordinace, křeče a pohyb v kruzích (Velíšek et al., 2008).

Maximální koncentrace prometrynu, která byla naměřena v roce 2012 v českých řekách, je $0,51 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ (ČHMÚ 2012). Tato koncentrace odpovídá koncentraci v experimentální skupině č. 1, kde nebyly pozorovány žádné významné odchylky oproti kontrole ve všech sledovaných faktorech. Lze tedy předpokládat, že při současném stavu prometryn není rizikový pro raná vývojová stádia ryb v přírodě.

6. Závěr

V této práci byl posuzován vliv triazinového herbicidu prometrynu na raná vývojová stádia kapra obecného (*Cyprinus carpio L.*). K posouzení toxicity této látky byla použita metoda embryolarválního testu toxicity pro ryby (OECD test č. 210). Testované organismy byly vystaveny čtyřem různým koncentracím prometrynu po dobu 35 dnů.

Experimentální skupina číslo 1 byla vystavena koncentraci $0,51 \mu\text{g.l}^{-1}$ prometrynu. Tato koncentrace odpovídala reálné maximální koncentraci prometrynu naměřené v českých řekách v roce 2012 (ČHMÚ 2012). Skupina číslo 1 nevykazovala žádné statisticky významné odchylky oproti kontrole, a proto při této koncentraci nebyla prokázána toxicita prometrynu pro raná vývojová stádia kapra. Lze tedy předpokládat, že při současném stavu prometryn není rizikový pro raná vývojová stádia ryb v přírodě.

Statisticky významné rozdíly nebyly pozorovány ani v experimentálních skupinách číslo 2 a 3 o koncentracích $80 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $1,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Pouze ve skupině číslo 3 bylo zaznamenáno opoždění v ontogenetickém vývoji ve srovnání s kontrolou.

Skupina s nejvyšší koncentrací testované látky 4 mg.l^{-1} se významně odlišovala od kontroly i od ostatních pokusných skupin ve všech sledovaných faktorech (kumulativní mortalita, hmotnost ryb, růst, ontogenetický vývoj). Vliv prometrynu na vznik morfologických anomálií nebyl prokázán v žádné z experimentálních skupin.

Tato studie přispěla k rozšíření informací o toxicitě pesticidních látek pro raná vývojová stádia ryb a jejich vlivu na životní prostředí.

7. Přehled použité literatury

- ARGE ELBE, (Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe), 1997: Wassergutedater der Elbe – Zahlentafel 1996: Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe. Wassergutestelle Elbe, Germany.
- ARUFE, M.I., ARELLANO, J., MORENO, M.J., SARASETEC, C., 2004: Toxicity of a commercial herbicide containing terbutryn and triasulfuron to seabream (*Sparus aurata* L.) larvae: a comparison with the Microtox test. *Ecotoxicol Environ Saf*, 59, 209 - 216.
- BAGNATI, R., BENFENATI, E., DAVOLI, E., FANELLI, R., 1988: Screening of 21 pesticides in waters by single extraction with C18 silica bonded phase column and HRGC-MS. *Chemosphere*, 17, 59 - 65.
- BEITZ, H., SCHMIDT, F., HERZEL, F., 1994: Occurrence, toxicological and ecotoxicological significance of pesticides in groundwater and surface water. In Borner H., (ed). *Pesticides in ground and surface water. Chemistry of Plant Protection*, 9, 3 - 56.
- BELDEN, JB., LYDY, MJ., 2000: Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. *Environmental Toxicology nad Chemistry*, 19, 2266 - 2274.
- BALINT, T., SZEGLETES, T., SZEGLETES, Z., HALASY, K., NEMCSOK, J., 1995: Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin. *Aquatic Toxicology*, 33, 279 - 295.
- BENGTSSON, BE., 1974: Effect of zinc on growth of the minnow *Phoxinus phoxinus*. *Oikos*, 25, 370 - 373.
- BOWMER, KH., JACOBS, SWL., SAINTY, GR., 1995: Identification, Biology and Management of *Elodea canadensis*, Hydrocharitaceae. *Journal of Aquatic Plant Management*, 33, 13- 19.
- BUSER, HR., 1990: Atrazine and other s-Triazine herbicides in Lakes and in rain in Switzerland. *Environmental Science and Technology*, 24, 1049 - 1058.
- CEREJEIRA, M.J., SILVA, E., BATISTA, S., TRANCOSO, A., CENTENO, M.S.L., SILVA-FERNANDES, A., 2000: Simazine, metribuzine and nitrates in ground water of agricultural areas of Portugal. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 75, 245 - 253.
- CLAVER, A., ORMAD, P., RODRÍGUEZ, L., OVELLEIRO, J.L., 2006: Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere*, 64, 1437- 1443.
- CORBETT, JR., 1974: *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*. Academic Press, London, New York, 236 pp.
- CREMLYN, R., 1985: *Pesticidy*. STNL - Nakladatelství technické literatury. Praha, 244 s.

- ČHMÚ (Český hydrometeorologický institut), 2012: On-line database kvality vody. Dostupné z: <<http://hydro.chmi.cz/oj/>>, Navštíveno dne 25/07/2012.
- DAVIES, P.E., COOK, L.S.J., BARTON, J.L., 1994: Triazine herbicide contamination of Tasmanian streams: Sources, concentrations and effects on biota. *Australian Journal of Marine Freshwater Research* 45, 209 - 226.
- DEMICCO A., COOPER K.R., RICHARDSON J.R., WHITE L.A., 2010: Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides in zebrafish embryos, *Toxicol. Sci.* 113: 177 - 186.
- ECOBICHON, D.J. 1991: Toxic effects of pesticides. In: Casarett and Doull's. *Toxicology: The basic science of poisons*, 4th ed., M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen, (eds.) McGraw-Hill, New York.
- ERICKSON, W., TURNER, L., 2002: Prometryn analysis of risks to endangered and threatened Salmon and Steelhead. Environmental Field Branch, Office of Pesticide Programs, 71 pp.
- EUROPEAN COMMISSION, 1999: Study on the prioritisation of substances dangerous to the aquatic environment. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 120 pp.
- FORGETA, J., BELIAEFF, B., BOCQUENEC, G., 2003: Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology*, 62, 195 - 204.
- FRANK, R., SIRONS, G.J., THOMAS, R.L., MCMILLAN, K., 1979: Triazine residues in suspended solids (1974 - 1976) and water (1977) from the mouths of Canadian streams flowing into the Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research*, 5, 131 - 138.
- GARMOUMA, M., BLANCHOUD, H., TEIL, M.J., BLANCHARD, M., CHEVREUIL, M., 2001: Triazines in the Marne and the Seine Rivers (France): Longitudinal Evolution and Flows. *Water, Air and Soil Pollution*, 132, 1 - 17.
- GIESY, J.P., HENEWEER, M.; LETCHER, R.J., SANDERSON, J.T., VAN DEN BERG, M., 2001: Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environmental Health Perspection*, 109, 1027 - 1031.
- HAARSTAD, K., LUDVIGSEN, G.H., 2007: Ten years of pesticide monitoring in Norwegian ground water. *Water Monitoring and Remediation*, 27, 75 - 89.
- HAYES, W.J., LAWS, E.R., 1991: *Handbook of Pesticide Toxicology. Classes of Pesticides.* New York, NY: Academic Press, 1451 pp.
- HELWEG, A., 1994: Threats to water quality from pesticides-case histories from Denmark. *Pesticides Outlook*, 5, 12 - 18.

- HIEBSCH, S.C., 1988: The occurrence of thirty-five pesticides in Canadian drinking water and surface water. Report prepared for the Environmental Health Directorate. Department of National Health and Welfare, January (1988).
- HILDEBRANDT, A., GUILLAMON, M., LACORTE, S., TAULER, R., BARCELO, D., 2008: Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Resarch*, 42, 3315 - 3326.
- KEARNEY, P.C., KAUFMAN, D.D., 1975: *Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 345 pp.
- KEGLEY, S.E., HILL, B.R., ORME, S., CHOI, A.H., 2010: PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA, 2010), Pesticide Action Network, North America.
- KOUBA, A., HAMÁČKOVÁ, J., KOZÁK, P., 2009: Dekapsulace, líhnutí a odkrm žábřonůžek rodu *Artemia*. *Edice Metodik (technologická řada)*, VÚRH JU Vodňany, č. 94, 35 s.
- KONSTANTINOOU, I.K., HELA, D.G., ALBANIS, T.A., 2006: The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece, Part I Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution*, 14, 555 - 570.
- KREUGER J., PETERSON M. AND LUNDGREN E. 1999: Agricultural inputs of pesticide residues to stream and pond sediments in a small catchment in southern Sweden. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 55 - 62.
- LAHR, J., DIALLO, A.O., GADJI, B., DIOUF, P.S., BEDAUX, J.J.M., BADJI, A. 2000: Ecological effects of experimental insecticide applications on invertebrates in sahelian temporary ponds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 1278 - 1289.
- LAPWORTH, D.J., GOODDY, D.C., STUART, M.E., CHILTON, P.J., CACHANDT, G., KNAPP, M., BISHOP, S., 2006: Pesticides in groundwater: some observations on temporal and spatial trends. *Water Environmental Journal*, 20, 55 - 64.
- LUA, (Landesumweltamt), 1999: Gewässergutebericht NWR 1997. Pflanzenbehandlungs und Schadlingsbekämpfungsmittel in Oberflächengewässern Berichtzeitraum 1987 - 1997 Landesumweltamt. Essen, Germany.
- MÁCHOVÁ, J., PROKEŠ, M., KROUPOVÁ, H., SVOBODOVÁ, Z., MÁCOVÁ, S., DOLEŽELOVÁ, P., VELÍŠEK, J., 2009: Early ontogeny, growth and mortality of common carp (*Cyprinus carpio*) at low concentrations of dimethyl sulfoxide. *Acta Veterinaria Brno*, 78, 505 - 512.
- MALOSCHIK, E., ERNST, A., HEGEDUS, G., DARVAS, B., SZEKACS, A., 2007: Monitoring water-polluting pesticides in Hungary. *Microchemical Journal*, 85, 88 - 97.
- MARTIN, H., WORTHING, C. R., 1974: *Pesticide Manual*, 4th edition. British Crop Protection Council. Droitwich, 565 pp.

- MCCARTHY I.D., FUIMAN L.A., 2008: Growth and protein metabolism in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae exposed to environmental levels of atrazine and malathion. *Aquat. Toxicol.*, 88, 220 - 229.
- MCKIM, J.M., 1995: Early life stage toxicity tests. In Rand, G.M., (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. Washington, DC.
- MEISTER, R.T., 1992: *Farm Chemicals Handbook 1992*. Meister Publishing Company. Willoughby, OH.
- MIKULKA, J., KNEIFELOVÁ, M. a kolektiv, 2005: *Plevelné rostliny*. Nakladatelství odborného tisku Profi Press s.r.o., Praha 148 s.
- MOSQUIN, P., WHITMORE, R.W., CHEN, W., 2012: Estimation of upper centile concentrations using historical atrazine monitoring data from community water systems. *Journal of Environmental Quality*, 41, 834 - 44.
- NEUMAN, J., LOPUCHOVSKÝ, J., ZAPLETAL, O., 1989: *Chemizace zemědělství, farmakologie a toxikologie*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha. 303 s.
- NUMABE, A., NAGAHORA, S., 2006: Estimation of pesticide runoff from paddy fields to rural rivers. *Water Science and Technology*, 53, 139 - 146.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 1992: *Guideline for testing of chemicals 210: Fish, early-life stage toxicity test*. Paris, France, 19 pp.
- ORMAD, M.P., MIGUEL, N., CLAVER, A., MATESANZ, J.M., OVELLEIRO, J.L., 2008: Pesticides removal in the process of drinking water production. *Chemosphere*, 71, 97 - 106.
- PADOVANI, L., CAPRI, E., PADOVANI, C., PUGLISI, E., TREVISAN, M., 2006: Monitoring tricyclazole residues in rice paddy watersheds. *Chemosphere*, 62, 303 - 314.
- PAPPAS, E.A., HUANG, C., 2008: Predicting atrazine levels in water utility intake water for MCL compliance. *Environmental Science and Technology*, 42, 7064 - 7068.
- PENAZ, M., PROKES, M., KOURIL, J., HAMACKOVA, J., 1983: Early development of the carp, *Cyprinus carpio*. *Acta Science, Natural Brno*, 17, 1 -39.
- PITTER, P., 1999: *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT Praha, 568 p.
- PLHALOVA, L., HALUZOVA, I., MACOVA, S., DOLEZELOVA, P., PRASKOVA, E., MARSALEK, P., SKORIC, M., SVOBODOVA, Z., PISTEKOVA, V., BEDANOVA, I., 2011: Effects of subchronic exposure to simazine on zebrafish (*Danio rerio*). *Neuroendocrinology Letter*, 32, 89 - 94.
- POWER, M., ATTRILL, M.J., THOMAS, R.M., 1999: Trends in agricultural pesticide (atrazine, lindane, simazine) concentrations in the Thames Estuary. *Environmental Pollution*, 104, 31 - 39.
- QUEDNOW, K., PUTTMANN, W., 2007: Monitoring terbutryn pollution in small rivers of Hesse, Germany. *Journal of Environmental Monitoring*, 12, 1337 - 1343.

- ROSENTHAL H, ALDERDICE DF., 1976: Sub-lethal effects of environmental stressors, natural and pollutional, on marine fish eggs and larvae. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33, 2047 - 2065.
- SEHONOVÁ, P., KODEŠ, V., LEONTOVIČOVÁ, D., SVOBODOVÁ, Z., 2012: Zhodnocení výskytu reziduí pesticidů v povrchových vodách České republiky. *Bulletin VÚRH Vodňany*, 48, 25 - 30.
- SHOMER, B., YAHYA, A., MULLER, G., 2006: Occurrence of pesticides in groundwater and the topsoil of Gaza strip. *Water, Air and Soil Pollution*, 171, 237 - 251.
- SNOOK, D L., WHITEHEAD, P.G., 2004: Water quality and ecology of the River Lee: mass balance and review of temporal and spatial data. *Hydrology Earth Systema Science*, 8, 636 - 650.
- SOTHERTON, N., HOLLAND, J., 2003: Indirect effects of pesticides on farmland wildlife. In D. J. Hoffman, (ed.) *Handbook of ecotoxicology*, 2nd ed. CRC Press. Boca Raton, USA, pp. 1173 - 1195.
- SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., VYKUSOVÁ, B., 1992: Havarijní a dlouhodobé znečištění povrchových vod, VURH Vodňany, 180 s.
- SVOBODOVÁ, Z. a kolektiv., 2007. *Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb*. 4. vyd. Informatorium spol. s.r.o., Praha, 264 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, Brno, 84 s.
- TAULER, R., DE ALMEIDA AZEVEDO, D., LACORTE, S., CESPEDES, R., VIANA, P., BARCELO, D., 2001: Organic pollutants in surface waters from Portugal using chemometric interpretation. *Environmental Technology*, 22, 1043 - 1054.
- TOLOSA, I., READMAN, J.W., BLAEVOET, A., GHILINI, S., BARTOCCI, J., HORVAT, M., 1996: Contamination of Mediterranean (Costed'Azur) coastal waters by organotins and Irgarol 1051 used in antifouling paints. *Marine Pollution Bulletin*, 22, 335 - 341.
- U.S. EPA (Environmental protection agency), 1994: Atrazine, simazine and cyanazine: notice of initiation of special review. 59, 30 - 60.
- U.S. EPA (Environmental protection agency), 1996: R.E.D. Fact Prometryn, 11 pp.
- VELISEK, J., SVOBODOVA, Z., PIACKOVA, V., 2008: Effect of metribuzin on some biochemical, haematological and histopathological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology Letters*, 180, 176 - 176.
- VELISEK, J., SUDOVA, E., MACHOVA, J., SVOBODOVA, Z., 2010: Effects of sub chronic exposure to terbutryn in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safe*, 73, 384 - 390.

- VELISEK, J., STARA, A., MACHOVA, J., DVORAK, P., ZUSKOVA, E., PROKES, M., SVOBODOVA, Z., 2012: Effect of terbutryn at environmental concentrations on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102, 102 - 108.
- VRYZAS, Z., ALEXOUDISA, C., VASSILIOUA, G., GALANISA, K., PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E., 2011: Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotoxicology and Environmental Safe*, 74, 174 - 181.
- WOUNDNEH, M.B., OU, Z.Q., SEKELA, M., TUOMINEN, T., GLEDHILL, M., 2009: Pesticide Multiresidues in Waters of the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. Part II. Groundwater. *Journal of Environmental Quality*, 38, 948 - 954.
- WOLTERING D.M., 1984: The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests: a critical review. *Aquatic Toxicology*, 5, 1 - 21.
- ZAPLETAL, O., NEPEJHALOVÁ, L., 2001: Speciální veterinární toxikologie. Editační středisko VFU, Brno, 148 s.

Abstrakt

Vliv prometrynu na raná vývojová stádia kapra obecného

Prometryn patří do skupiny triazinových herbicidů používaných v zemědělství. Cílem této studie bylo posoudit vliv prometrynu na mortalitu, růst, výskyt deformací a vývoj raných vývojových stádií kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.). Pro posouzení toxicity prometrynu pro raná vývojová stádia kapra byl použit embryolarvální test toxicity na rybách (OECD test č. 210). Toxické účinky prometrynu byly zkoumány ve čtyřech koncentracích ($0,51 \mu\text{g.l}^{-1}$, $80 \mu\text{g.l}^{-1}$, $1,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a 4 mg.l^{-1}) po dobu 35 dnů. Negativní vliv na mortalitu a rychlost růstu byl pozorován ve skupině číslo čtyři s nejvyšší koncentrací prometrynu (4 mg.l^{-1}). Opoždění v ontogenetickém vývoji kaprů bylo pozorováno v experimentálních skupinách číslo tři a čtyři (koncentrace $1,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a 4 mg.l^{-1}). Na základě výsledků testu byla stanovena 35 denní hodnota $\text{LC}_{50} = 2314,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ prometrynu. Na základě mortality v experimentálních skupinách byla stanovena hodnota $\text{LOEC} = 1100,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $\text{NOEC} = 850,0 \mu\text{g.l}^{-1}$.

Klíčová slova: triaziny, ryby, embryolarvální test toxicity, raná vývojová stádia, *Cyprinus carpio*

Abstract

The effects of prometryne on early life stages of common carp

Prometryne belongs to the triazine group of herbicides, which are used in agriculture. The aim of this study was to assess the impact of prometryne on mortality, occurrence of deformation, growth and development of early life stages of common carp (*Cyprinus carpio L.*). For assessing the impact of prometryne on the early developmental stages of carp was used the method of embryo-larval toxicity test for fish (OECD test n. 210). Toxic effect of prometryne at four concentrations (0.51 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 80 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 1.2 mg.l^{-1} and 4 mg.l^{-1}) was investigated during 35 days. Negative effects on mortality and growth were observed in the experimental group number four with the highest concentration of prometryne (4 mg.l^{-1}). Retardation of ontogeny development of carp was observed in the experimental groups number three and four (concentrations 1.2 mg.l^{-1} and 4 mg.l^{-1}). On the basis of test results was estimated at 36 day $\text{LC}_{50} = 2314.0 \mu\text{g.l}^{-1}$ prometryne. Based on mortality in experimental group was estimated $\text{LOEC} = 1100.0 \mu\text{g.l}^{-1}$ and $\text{NOEC} = 850.0 \mu\text{g.l}^{-1}$ prometryne.

Keywords: triazine, fish, embryo-larval toxicity test, early developmental stages, *Cyprinus carpio*