

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

**Testování ekotoxicity chloracetanilidových pesticidů**

Bc. Adéla Zahradníčková

Diplomová práce

2022

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Zahradníčková**  
Osobní číslo: **C20465**  
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Testování ekotoxicity chloracetanilidových pesticidů**  
Téma práce anglicky: **Ecotoxicity Testing Of Chloroacetanilide Pesticides**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

Zpracujte rešerše na zadané téma, konkrétně na testování ekotoxicity chloracetanilidových pesticidů a jejich degradačních produktů. Déle zpracujte přehled metod a postupů jejich odstraňování z životního prostředí.

### Experimentální část:

1. U vybraných pesticidů proveďte alespoň 3 různé testy ekotoxicity (např. na *Chlorella kesleri*, *Lemna minor*, *Daphnia magna* aj.).
2. Otestujte ekotoxicitu vytipovaných pesticidů, které byly podrobeny fotokatalytické degradaci.
3. Data vyhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jiří Palarčík, Ph.D.**  
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultanti diplomové práce: **Ing. Kateřina Hrdá, Ph.D.**  
Ústav environmentálního a chemického inženýrství  
**Ing. Nikola Roulová**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.** v.r.  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Testování ekotoxicity chloracetanilidových pesticidů jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6.5.2022

Adéla Zahradníčková v.r.

#### Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Nikole Roulové a Ing. Kateřině Hrdé, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc, ochotu a čas, který mi věnovaly v průběhu mé diplomové práce. Rovněž za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost děkuji Ing. Jířímu Palarčíkovi, Ph.D. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině, příteli a přátelům za podporu v průběhu studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá hodnocením akutní toxicity chloracetanilidových pesticidů alachloru, metolachloru a acetochloru pomocí biologických zkoušek toxicity s využitím zelené řasy *Chlorella kessleri*, korýše *Daphnia magna*, jednoděložné rostliny *Lemna minor* a kroužkovce *Lumbriculus variegatus* jako zkušebních organismů. Současně byla hodnocena akutní toxicita směsí fotokatalytických degradačních produktů chloracetanilidových pesticidů na zelené řase *Chlorella kessleri*. Testy prokázaly, že nejvyšší toxicitu vykazuje acetochlor, naopak u metolachloru byla stanovena toxicita nejnižší.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

alachlor, acetochlor, metolachlor, akutní toxicita, *Chlorella kessleri*

## **TITLE**

Ecotoxicity testing of chloroacetanilide pesticides

## **ANNOTATION**

This diploma thesis deals with the evaluation of acute toxicity of chloroacetanilide pesticides alachlor, metolachlor, and acetochlor using bioassays with green alga *Chlorella kessleri*, crustacean *Daphnia magna*, plant *Lemna minor*, and annelid *Lumbriculus variegatus*. In addition, the acute toxicity of mixtures of photocatalysis degradation products formed during heterogeneous photocatalysis to green alga *Chlorella kessleri* was investigated. Tests have shown that acetochlor has the highest toxicity, while metolachlor has the lowest toxicity.

## **KEYWORDS**

alachlor, metolachlor, acetochlor, acute toxicity, *Chlorella kessleri*

# OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST .....	16
1.1	Ekotoxikologie.....	16
1.2	Ekotoxicita.....	16
1.2.1	Faktory nejistoty.....	17
1.3	Zkoušky ekotoxicity .....	17
1.3.1	Akutní toxicita.....	18
1.3.2	Chronická toxicita .....	19
1.3.3	Přehled standardních zkoušek toxicity.....	19
1.3.3.1	Zkouška toxicity na jednobuněčných řasách.....	20
1.3.3.2	Zkouška toxicity na okřehku menším (Lemna minor).....	22
1.3.3.3	Zkouška toxicity na semenech hořčice bílé (Sinapis alba).....	23
1.3.3.4	Zkouška toxicity na hrotnatce velké (Daphnia magna).....	24
1.3.3.5	Zkouška toxicity na bakterii Vibrio fischeri.....	25
1.3.4	Obecný postup ekotoxikologické zkoušky.....	26
1.4	Pesticidy.....	26
1.5	Chloracetanilidové pesticidy.....	29
1.5.1	Acetochlor .....	29
1.5.2	Alachlor.....	30
1.5.3	Metolachlor .....	31
1.6	Odstraňování pesticidů .....	32
1.6.1	Fotokatalýza .....	32
1.6.2	Mikrobiální degradace .....	33
1.6.3	Adsorpce .....	34
1.6.4	Hydrolyza.....	34
1.7	Biodegradační produkty.....	34
2	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	36

3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
3.1	Materiál.....	37
3.1.1	Zkušební organismy.....	37
3.1.2	Voda.....	37
3.1.3	Laboratorní pomůcky.....	37
3.1.4	Přístroje.....	37
3.1.5	Chemikálie a reagenty.....	38
3.1.6	Chloracetanilidové pesticidy.....	38
3.2	Podmínky laboratorního chovu.....	38
3.2.1	<i>Daphnia magna</i> .....	38
3.2.2	<i>Lumbriculus variegatus</i> .....	41
3.3	Zkouška akutní toxicity na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> .....	43
3.3.1	Pracovní postup.....	43
3.3.2	Vyhodnocení zkoušky.....	48
3.4	Zkouška akutní toxicity na korýši <i>Daphnia magna</i> .....	49
3.4.1	Pracovní postup.....	49
3.4.2	Vyhodnocení zkoušky.....	50
3.5	Zkouška akutní toxicity na jednoděložné rostlině <i>Lemna minor</i> .....	51
3.5.1	Pracovní postup.....	51
3.5.2	Vyhodnocení zkoušky.....	53
3.6	Zkouška akutní toxicity na kroužkovci <i>Lumbriculus variegatus</i> .....	54
3.6.1	Pracovní postup.....	55
3.6.2	Vyhodnocení zkoušky.....	57
3.7	Interpretace výsledků zkoušek toxicity.....	57
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	59
4.1	Zkoušky s referenčními látkami.....	59
4.2	Stanovení akutní toxicity chloracetanilidových pesticidů.....	66



4.2.1	<i>Chlorella kessleri</i> – zkouška akutní toxicity.....	66
4.2.1.1	Stanovení hodnoty EC <sub>50</sub> alachloru .....	66
4.2.1.2	Stanovení hodnoty EC <sub>50</sub> metolachloru .....	69
4.2.1.3	Stanovení hodnoty EC <sub>50</sub> acetochloru .....	70
4.2.2	<i>Daphnia magna</i> – předběžná zkouška akutní toxicity .....	72
4.2.3	<i>Lemna minor</i> – předběžná zkouška akutní toxicity.....	74
4.2.4	<i>Lumbriculus variegatus</i> – limitní zkouška akutní toxicity.....	77
4.3	Hodnocení akutní toxicity směsí fotokatalytických produktů chloracetanilidových pesticidů .....	79
4.3.1	Alachlor.....	79
4.3.2	Metolachlor .....	81
4.3.3	Acetochlor .....	82
5	ZÁVĚR .....	84
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	86

## SEZNAM ILUSTRACÍ

<b>Obrázek 1:</b> <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	20
<b>Obrázek 2:</b> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	21
<b>Obrázek 3:</b> <i>Chlorella vulgaris</i> .....	21
<b>Obrázek 4:</b> <i>Lemna minor</i> .....	22
<b>Obrázek 5:</b> Semena hořčice bílé v Petriho misce na filtračním papíru .....	23
<b>Obrázek 6:</b> <i>Daphnia magna</i> .....	24
<b>Obrázek 7:</b> Kolonie bioluminescenční bakterie <i>Vibrio fischeri</i> .....	25
<b>Obrázek 8:</b> Strukturní vzorec acetochloru .....	30
<b>Obrázek 9:</b> Strukturní vzorec alachloru .....	31
<b>Obrázek 10:</b> Strukturní vzorec metolachloru .....	32
<b>Obrázek 11:</b> Laboratorní chov korýše <i>Daphnia magna</i> .....	39
<b>Obrázek 12:</b> Laboratorní chov kroužkovce <i>Lumbriculus variegatus</i> .....	42
<b>Obrázek 13:</b> Schéma jamek mikrotitrační destičky pro zkoušku toxicity na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> .....	46
<b>Obrázek 14:</b> Průběh akutní zkoušky toxicity na korýši <i>Daphnia magna</i> v mikrotitračních destičkách.....	51
<b>Obrázek 15:</b> Průběh zkoušky akutní toxicity na jednoděložné rostlině <i>Lemna minor</i> ..	53
<b>Obrázek 16:</b> <i>Lumbriculus variegatus</i> .....	55
<b>Obrázek 17:</b> Průběh akutního testu toxicity pro alachlor na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v mikrotitrační destičce.....	68

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Příklady běžně používaných pesticidů .....	27
<b>Tabulka 2:</b> Zásobní roztok I a II pro médium M4 dle normy ČSN EN ISO 6341 .....	40
<b>Tabulka 3:</b> Složení M4 média dle normy ČSN EN ISO 6341 .....	41
<b>Tabulka 4:</b> Složení rekonstituované vody .....	42
<b>Tabulka 5:</b> Růstové médium pro zkoušky toxicity na zelených řasách.....	45
<b>Tabulka 6:</b> Složení Boldova bazálního média .....	47
<b>Tabulka 7:</b> Složení modifikovaného Steinbergova média pro zkoušku toxicity na <i>Lemna minor</i> .....	52
<b>Tabulka 8:</b> Hodnoty EC <sub>50</sub> pro referenční látky dichroman draselný a síran zinečnatý pro různé druhy zelených řas .....	63
<b>Tabulka 9:</b> Výsledky předběžné zkoušky akutní toxicity na jedincích <i>Daphnia magna</i> pro alachlor, metolachlor a acetochlor.....	72
<b>Tabulka 10:</b> Výsledky modifikované předběžné zkoušky akutní toxicity na jedincích <i>Daphnia magna</i> pro alachlor, metolachlor a acetochlor.....	73
<b>Tabulka 11:</b> Hodnoty 168hEC <sub>50</sub> pro alachlor, metolachlor a acetochlor získané při předběžné zkoušce akutní toxicity na <i>Lemna minor</i> .....	74
<b>Tabulka 12:</b> Inhibice růstové rychlosti (%) <i>Lemna minor</i> získané při předběžné zkoušce akutní toxicity pro alachlor, metolachlor a acetochlor .....	75

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Závislost probitové jednotky na logaritmu koncentrace dichromanu draselného, referenční zkouška na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v Erlenmeyerových baňkách .....	60
<b>Graf 2:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace dichromanu draselného, referenční zkouška na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v Erlenmeyerových baňkách .....	60
<b>Graf 3:</b> Závislost probitové jednotky na logaritmu koncentrace síranu zinečnatého heptahydrátu, referenční zkouška na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v Erlenmeyerových baňkách .....	62
<b>Graf 4:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace síranu zinečnatého heptahydrátu, referenční zkouška na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v Erlenmeyerových baňkách.....	62
<b>Graf 5:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace dichromanu draselného, referenční zkouška na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v mikrotitrační destičce .....	64
<b>Graf 6:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace dichromanu draselného, referenční zkouška na jednoděložné rostlině <i>Lemna minor</i> .....	65
<b>Graf 7:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na zkoušené koncentraci alachloru, zkouška na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v Erlenmeyerových baňkách.....	67
<b>Graf 8:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace alachloru, zkouška na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v mikrotitrační destičce.....	68
<b>Graf 9:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace metolachloru, zkouška na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v Erlenmeyerových baňkách.....	69
<b>Graf 10:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace metolachloru, zkouška na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v mikrotitrační destičce.....	70
<b>Graf 11:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na zkoušené koncentraci acetochloru, zkouška na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v Erlenmeyerových baňkách.....	71
<b>Graf 12:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace acetochloru, zkouška na zelené řase <i>Chlorella kessleri</i> v mikrotitrační destičce.....	71
<b>Graf 13:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace alachloru, předběžná zkouška akutní toxicity na jednoděložné rostlině <i>Lemna minor</i> .....	76
<b>Graf 14:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace metolachloru, předběžná zkouška akutní toxicity na jednoděložné rostlině <i>Lemna minor</i> .....	76

<b>Graf 15:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace acetochloru, předběžná zkouška akutní toxicity na jednoděložné rostlině <i>Lemna minor</i> .....	77
<b>Graf 16:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – alachlor, fotokatalyzátor P25 .....	80
<b>Graf 17:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – alachlor, fotokatalyzátor AV-01 .....	80
<b>Graf 18:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – metolachlor, fotokatalyzátor P25 .....	81
<b>Graf 19:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – metolachlor, fotokatalyzátor AV-01 .....	82
<b>Graf 20:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – acetochlor, fotokatalyzátor P25 .....	82
<b>Graf 21:</b> Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – acetochlor, fotokatalyzátor AV-01 .....	83

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

BBM	Boldovo bazální médium (Bold's Basal Medium)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
EC	efektivní koncentrace
EC <sub>50</sub>	střední efektivní koncentrace
ED <sub>50</sub>	střední efektivní dávka
ESA	ethansulfonová kyselina (Ethane Sulfonic Acid)
IC	inhibiční koncentrace
IC <sub>50</sub>	střední inhibiční koncentrace
LC	letální koncentrace
LC <sub>50</sub>	střední letální koncentrace
LD <sub>50</sub>	střední letální dávka
LOEC	nejnižší testovaná koncentrace látky, která způsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou (Lowest Observed Effect Concentration)
NOEL	nejvyšší testovaná koncentrace látky, která nezpůsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou (No Observed Effect Concentration)
OA	oxalová kyselina (Oxalic Acid)
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organization for Economic Co-operation and Development)
R-ME	R-metolachlor
S-ME	S-metolachlor
US-EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (U.S. Environmental Protection Agency)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

## ÚVOD

Následkem intenzivní zemědělské činnosti a s ní související rozsáhlou aplikací agrochemikálií dochází nejenom ke kontaminaci půdy, ale i vodních ekosystémů, do nichž používané látky pronikají zejména vlivem povrchového odtoku. Chloracetanilidové pesticidy patří celosvětově mezi nejvíce používanou skupinu herbicidů, přičemž alachlor, acetochlor a metolachlor jsou aplikovány nejčastěji. Tyto selektivní a systémové herbicidy slouží k hubení jednoletých trav a širokolistých plevelů při pěstování plodin, např. kukuřice, sóji nebo cukrové řepy. Vzhledem k relativně vysoké rozpustnosti ve vodě a nízké půdní sorpci mají chloracetanilidové pesticidy značný potenciál kontaminovat vodní ekosystémy. V oblastech ovlivněných zemědělskou činností jsou často detekovány v povrchových i podzemních vodách, nicméně jejich výskyt byl zaznamenán i ve vodách pitných. Přítomnost chloracetanilidových pesticidů ve vodních ekosystémech představuje riziko pro životní prostředí, ale i lidskou populaci. Přestože by chloracetanilidové pesticidy měly být toxické pouze pro určité druhy plevelů, bylo prokázáno, že negativně působí i na necílové skupiny organismů. Ve vodním prostředí jejich nespecifický účinek dopadá zejména na fotosyntetizující organismy, vzhledem k jejich podobnosti s rostlinami. Nicméně právě řasy nebo jednoděložné rostliny tvoří základ většiny vodních potravních řetězců a jakýkoliv negativní efekt vůči těmto organismům pak ovlivní i vyšší trofické úrovně. Odstranění chloracetanilidových pesticidů z vodního prostředí navíc vyžaduje využití inovativních technologií, neboť konvenční procesy čištění vody nejsou dostačující.

Cílem této diplomové práce bylo stanovit akutní toxicitu chloracetanilidových pesticidů alachloru, metolachloru a acetochloru vůči zelené řase *Chlorella kessleri*, korýši *Daphnia magna*, jednoděložné rostlině *Lemna minor* a kroužkovci *Lumbriculus variegatus*. Další část experimentální části je zaměřena na hodnocení akutní toxicity směsí fotokatalytických produktů chloracetanilidových pesticidů vznikajících při heterogenní fotokatalýze, která byla navržena jako technologie pro jejich efektivní odstranění z kontaminovaných vod. K tomuto toxikologickému hodnocení byla využita zelená řasa *Chlorella kessleri*.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Ekotoxikologie

Ekotoxikologie je vědní disciplína, která vznikla na základě událostí v polovině dvacátého století, při kterých došlo ke znečištění životního prostředí. Termín „ekotoxikologie“ poprvé zavedl a napsal Jean-Michel Jouany v roce 1971 ve svém článku „*Ecologie et nuisances*“ publikovaném ve francouzském časopise „*Actualités Pharmaceutiques*“, kde uvedl: „Studie vlivu narušení vztahu mezi jednotlivcem a jeho životním prostředím by se dalo jednoduše nazvat ekotoxikologie“, přičemž „nepříjemnosti“ jsou definovány jako „škodlivé a nepřátelské faktory vyvolané lidmi“ (Vasseur et al., 2020).

Cílem ekotoxikologie je porozumět a předvídat účinky chemických látek na přírodní společenstva za reálných podmínek expozice. K dosažení tohoto cíle jsou zapotřebí teoretické poznatky a metody čerpané z ekologie. Jedním z dalších cílů tohoto oboru je monitoring toxických látek v životním prostředí (Chapman, 2002). Ekotoxikologie stanovuje limity koncentrace nebo množství chemických látek přijatelných v životním prostředí studiem toxických účinků těchto látek na organismus a ekosystémy (Morales et al., 2013).

## 1.2 Ekotoxicita

Ekotoxicita je jedním z ukazatelů, který může charakterizovat potenciální nepříznivé účinky chemické látky na živé organismy, případně celý ekosystém (Mariaková et al., 2021). Je založena na toxikologických vlastnostech chemické látky a citlivosti organismu (Voutchkova, 2014). Povinnost hodnotit ekotoxicitu je v Evropské unii dáno Nařízením Evropského parlamentu. V české legislativě se ekotoxikologické testy a hodnocení toxicity vyskytují ve vyhlášce č. 257/2009 Sb. (Vyhláška o používání sedimentů na zemědělské půdě), ve vyhlášce 94/2016 Sb. (Vyhláška o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů), dále ve vyhlášce 294/2005 Sb. (Vyhláška o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady). Dále je ekotoxicita zahrnuta pod kódem H14 ve vyhlášce č. 8/2021 Sb. (vyhláška o Katalogu odpadů a posuzování vlastností odpadů).

Hodnocení toxických účinků lze provádět různými metodami. Mezi hodnocená kritéria patří např. mortalita nebo počet inhibovaných jedinců. Pokud není možné tyto faktory vyhodnotit, lze použít jiná data, která vycházejí ze specifických fyziologických



vlastností organismů, jako je růst jedince nebo testovací kolonie či populace (*Mariaková et al., 2021*).

### **1.2.1 Faktory nejistoty**

Faktory nejistoty slouží k odhadu pravděpodobnosti poškození životního prostředí a souvisejí s hodnocením chemických rizik. Kromě kvalitativního určení, tzn. jak daná látka působí na daný organismus, můžeme stanovit účinek kvantitativní, a to pomocí indexu toxicity. Index toxicity slouží k popisu míry toxického účinku a může být vyjádřen hodnotou efektivní koncentrace (EC), letální koncentrace (LC) či inhibiční koncentrace (IC) (*Chapman et al., 1998*).

Efektivní indexy vyjadřují efektivní dávku či koncentraci, která působí na daný počet jedinců. Střední účinná koncentrace (ED<sub>50</sub>) vyjadřuje množství látky, které vyvolá specifický účinek u 50 % sledované populace. Střední efektivní koncentrace (EC<sub>50</sub>) je koncentrace, při které je v testu toxicity ovlivněno 50 % konkrétní populace (*Dimmitt et al., 2017*).

Letální indexy jsou indexy akutní toxicity a vyjadřují smrtelnou dávku či koncentraci. Střední letální dávka (LD<sub>50</sub>) vyjadřuje množství podané látky testovaným jedincům, která způsobí úhyn 50 % testovaných živočichů do 24 hodin od expozice. Střední letální koncentrace (LC<sub>50</sub>) vyjadřuje koncentraci, při které se očekává 50% mortalita (*Liao et al., 2020*).

Určené indexy jsou takové koncentrace, které byly v experimentu testovány. Mezi ně patří NOEC a LOEC. NOEC (No Observed Effect Concentration) je nejvyšší testovaná koncentrace látky, která nezpůsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou. LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) je nejnižší koncentrace testované látky, která způsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou (*Dam et al., 2012*).

## **1.3 Zkoušky ekotoxicity**

Pro hodnocení ekotoxikologických vlastností látek se využívají ekotoxikologické testy, které se provádí za účelem odhadu rizik pro populaci, komunitu a celý ekosystém (*Walker, 2008*). Cílem testu ekotoxicity nebo biologického testu je předpovědět potenciální účinky biologicky dostupné frakce látky, směsi látek nebo celého environmentálního vzorku na živé necílové organismy po jejich vypuštění do složek životního prostředí. Standardní test typicky zahrnuje vystavení modelových testovacích

organismů různým koncentracím chemické sloučeniny nebo ředěním vzorku životního prostředí po definované časové období za standardních experimentálních podmínek. Získá se křivka koncentrace-odezva, která popisuje vztah mezi koncentrací chemické látky v roztoku nebo ve vzorku životního prostředí a velikostí biologických účinků vyskytujících se v exponované populaci testovacího druhu. Parametry této křivky lze odhadnout pro měření toxicity nebo velikosti nebezpečí. Příklady indexů toxicity jsou NOEC, EC<sub>50</sub> a LC<sub>50</sub> (Viegas, 2021).

Ekotoxikologické testy můžeme rozdělit podle několika hledisek například:

- podle doby expozice (akutní, subakutní, chronická toxicita)
- podle počtu zapojených druhů (jednodruhové, vícedruhové)
- podle prostředí (akvatické, terestrické testy)
- podle spektra testovacích organismů (producenti, konzumenti, destruenti)

V posledních letech je stále intenzivnějším výzkumným tématem miniaturizace některých ekotoxikologických testů. Metody založené na mikrodestičkách pro testování toxicity mají vysokou zpracovatelskou kapacitu, nižší náklady a stávají se tak žádanější pro rutinní testování (Tóth et al., 2019).

Testy ekotoxicity se běžně provádí v laboratořích, ale v současné době jsou k dispozici také online biosenzory. Příkladem je biokomerční senzor Eclox, microtox či ToxAlert k testování toxicity s *Daphnia magna*. Microtox test využívá jako indikátor *Vibrio fischeri* (Peyravi et al., 2020).

### **1.3.1 Akutní toxicita**

Akutní ekotoxikologické testování má dvě hlavní aplikace v hodnocení rizik pro životní prostředí. Jednou z aplikací je provádění screeningového testu, například za účelem zjištění, zda je toxická látka při testovacích dávkách pro použité indikátory biologicky aktivní. Druhým typem aplikace je stanovení akutní toxicity – měření funkce dávka-odpověď a stanovení LC<sub>50</sub> /LD<sub>50</sub> na předem stanovenou dobu.

Testy akutní toxicity jsou prvním krokem ke zjištění celkových toxických účinků způsobených toxikantem (Luybenova et al., 2016). Testy akutní toxicity jsou typicky krátkodobé testy (nejčastěji trvající 24, 48 nebo 96 hodin) (Theodorakis, 2005).

Mnoho studií bylo věnováno hledání nejcitlivějších druhů k provedení akutních testů. Praxe ukazuje, že neexistují žádné univerzální druhy, že výběr druhů závisí na typu

toxické látky a ovlivněných ekosystémech. Testy toxicity se běžně stanovují pomocí ryb, korýšů, hmyzu, ptáků, řas, vodních a suchozemských rostlin (*Theodorakis, 2005*). Jedny z nejpoužívanějších organismů jsou *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Vibrio fischeri* nebo *Lemna minor* (*Luybenova et al., 2016*).

### **1.3.2 Chronická toxicita**

Chronické ekotoxikologické testování zjišťuje, zda dlouhodobá expozice toxickým látkám, které se v životním prostředí vyskytují, může mít významný škodlivý dopad na ekosystémy (*Luybenova et al., 2016*). Testy chronické toxicity se mohou týkat celého životního cyklu organismu (tj. od zygoty do věku prvního rozmnožování). Tyto testy je však často obtížné provést kvůli jejich dlouhému trvání a vysoké ceně, což znemožňuje jejich rutinní použití. Z tohoto důvodu byly vyvinuty tři alternativy testů – testy částečného životního cyklu, testy v rané fázi života a krátkodobé chronické testy. Testy částečného životního cyklu byly vyvinuty pro organismy, které vyžadují více než 12 měsíců k dosažení reprodukční zralosti. Obvykle jsou dostatečně dlouhé na to, aby překlenuly období od dozrávání gonád až po první reprodukci. Krátkodobé chronické testy trvají od 4 do 7 dnů (*Theodorakis, 2005*).

Použité koncentrace toxických látek se pohybují od koncentrací způsobujících silný negativní dopad až po alespoň takovou, která nemá žádný vliv na studované ukazatele (ve srovnání s kontrolami). Nejčastěji se používají vodní organismy, které mohou dokončit svůj životní cyklus v laboratoři – řasy, bezobratlí a další (*Luybenova et al., 2016*). Výsledky chronických testů jsou obvykle vyjádřeny jako LOEC a NOEC (*Theodorakis, 2005*).

### **1.3.3 Přehled standardních zkoušek toxicity**

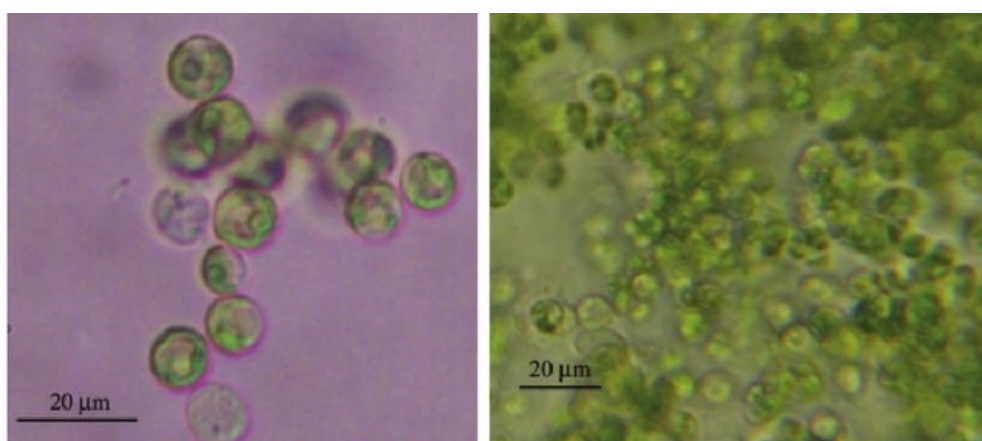
Standardizace ekotoxikologických testů je zavedení souboru důkladně definovaných postupů, metod a pokynů, které umožňují environmentálním toxikologům a dalším výzkumníkům provádět, analyzovat či interpretovat biologické testy. Standardizované zkušební metody umožňují opakovatelná, mezilaboratorní a vnitrolaboratorní srovnání stanovením a implementací postupů kontroly a zabezpečování kvality. Standardní testy v ekotoxikologii mají široké uplatnění pro hodnocení rizik, monitorování životního prostředí nebo při hodnocení nových látek. Standardizované testy usnadňují srovnání dat a výsledků, zvyšují přesnost, spolehlivost a jsou užitečné pro rutinní monitorování (*Taylor et al., 2013*).

Mezi nejpoužívanější standardní testy toxicity v praxi patří testy s producenty – testy na řasách, okřehek, semenech hořčice bílé. Dále to jsou testy s konzumenty – testy na perloočkách a rybách. Třetí skupina testů jsou testy s destruenty – například s *Vibrio fischeri*.

### 1.3.3.1 Zkouška toxicity na jednobuněčných řasách

Různé vzorky životního prostředí, jako jsou vzorky odpadních vod, výluhy, povrchové vody, stejně jako chemikálie a směsi, jsou ekotoxikologicky charakterizovány pomocí testů inhibice růstu řas. Planktonní řasy hrají zásadní roli ve vodním prostředí. Protože jsou základním článkem ve vodních potravních řetězcích a jsou klíčovou funkční skupinou organismů, mají zásadní význam pro správnou strukturu a funkci celého ekosystému. Narušení úrovně produkce by pravděpodobně způsobila účinky na vyšších trofických úrovních. Kromě toho jsou planktonní řasy citlivými indikátory pro testování různých účinků znečišťujících látek vypouštěných do vody (Paixao et al., 2008).

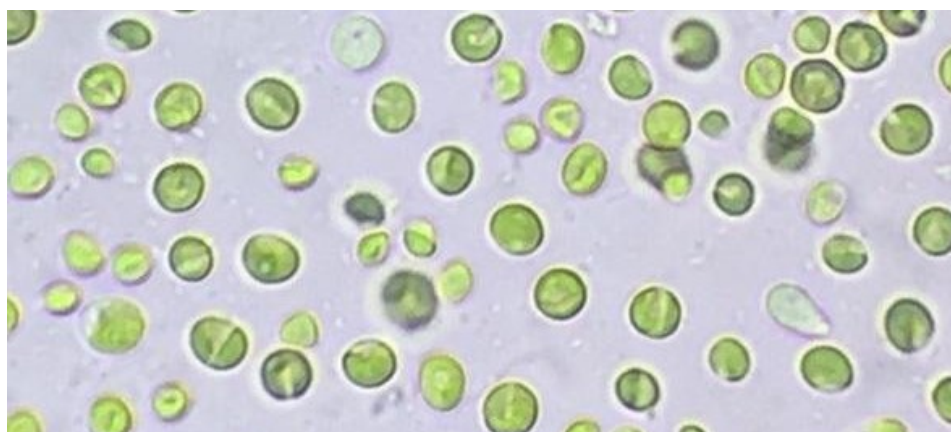
Testy růstu řas pomocí jednobuněčných zelených řas patřily mezi první biologické testy vytvořené pro stanovení fyto toxických účinků chemikálií, odpadních vod a dalších vzorků životního prostředí (Altenburger et al., 2008). Principem tohoto testu je stanovení inhibice růstu jednobuněčných zelených řas. Mezi nejčastěji využívané zkušební organismy patří řasy *Desmodesmus subspicatus* (Obrázek 1), *Pseudokirchneriella subcapitata* (Obrázek 2) nebo *Chlorella vulgaris* (Obrázek 3).



Obrázek 1: *Desmodesmus subspicatus* (převzato z Gönülol, 2012)



**Obrázek 2:** *Pseudokirchneriella subcapitata* (převzato z Krienitz et al., 2011)



**Obrázek 3:** *Chlorella vulgaris* (převzato z Ramaraj et al., 2016)

Délka expozice činí 72 či 96 hodin v definovaném médiu, které obsahuje různé koncentrace testované látky (ČSN EN ISO 8692). Pro výpočet inhibičních účinků kontaminantů je z ekotoxikologického hlediska vhodnější použít rychlost růstu než míru zisku biomasy (Altenburger et al., 2008). Inhibiční účinky se měří jako změna fluorescence chlorofylu v porovnání s kontrolní kulturou za stejně definovaných podmínek (ČSN EN ISO 8692).

Standardní test toxicity podle normy ČSN EN ISO 8692 – *Kvalita vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas* nebo OECD 201 má však v současnosti několik modifikací, a snaží se zlepšit některé nevýhody klasického postupu. Takovou nevýhodou může být problém s testováním sloučenin s vysokou těkavostí nebo rostoucí počet environmentálních vzorků, které vyžadují časovou a nákladově efektivní alternativu (Rojíčková et al., 1998). Mezi modifikace klasického postupu patří miniaturizace testů v kyvetách, mikrodestičkách nebo scintilačních zkumavkách. Řasy mohou být

kvantifikovány mikroskopicky počítáním buněk, fotometricky měřením absorpance či vizuálním pozorováním. Snížení objemů testované látky je výhodné, pokud testujeme velké množství vzorků. Další výhodou je, že příprava a vyhodnocení testu je méně časově náročné. Nízké objemy vzorků navíc minimalizují problémy s tvorbou odpadu a použití mikrodestiček na jedno použití eliminuje riziko kontaminace z opakovaně používaných testovacích nádob (Paixao et al., 2008).

### 1.3.3.2 Zkouška toxicity na okřehku menším (*Lemna minor*)

Test toxicity využívající *Lemna minor* (Obrázek 4), který vychází ze standardizované normy ČSN EN ISO 20079 – *Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek – Zkouška inhibice růstu okřehku* a OECD 221, je navržen pro testování ekotoxicity rozpuštěných látek ve vodě nebo ve výluhu. Kromě toho lze *Lemna minor* využít pro hodnocení toxicity sedimentů a půd (ČSN EN ISO 20079). Tato jednoděložná rostlina je považována za vhodný model pro ekotoxikologické studie díky své malé velikosti, rychlé rychlosti růstu, vegetativní reprodukci, snadné kultivaci a citlivosti na četné polutanty (Mitsou et al., 2006).



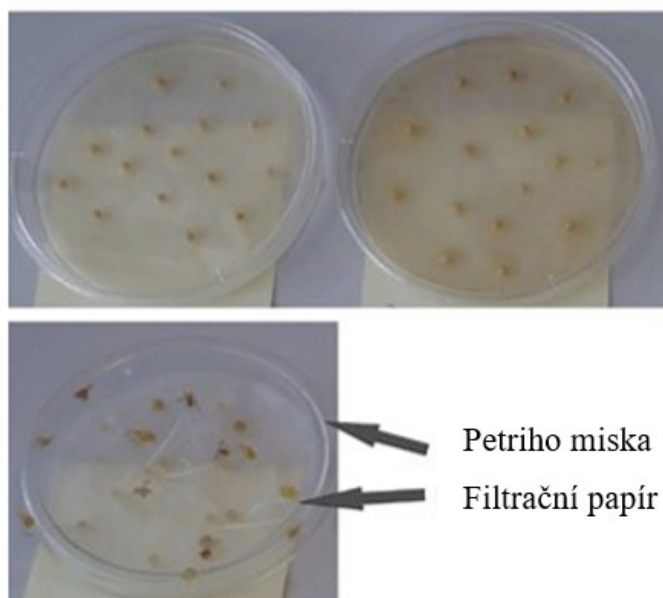
Obrázek 4: *Lemna minor* (převzato z Kutschera, 2014)

Cílem tohoto testu je stanovení toxického vlivu vzorku na růst jednoděložné rostliny, protože *Lemna minor*, stejně jako jiné vodní rostliny, může selektivně akumulovat určité

chemikálie a být využit pro biologický monitoring (Radić et al., 2011). Výslednou hodnotou je EC<sub>50</sub> a přístupů, jak vyhodnotit test je několik. Určovanými parametry mohou být: plocha listenů, počet listenů, množství chlorofylu a čerstvá nebo suchá hmotnost. Délka expozice je 168 hodin, tj. 7 dní (ČSN EN ISO 20079).

### 1.3.3.3 Zkouška toxicity na semenech hořčice bílé (*Sinapis alba*)

Dalším způsobem testování toxických vlastností odpadních vod a vodních výluhů odpadů je test prováděný na semenech hořčice bílé (*Sinapis alba*) (Obrázek 5). V tomto testu se využívá citlivosti klíčících semen a zjišťuje se vliv testované látky právě na klíčivost semen a růst kořenů v počátečním stádiu vývoje. Test spočívá v kultivaci semen v Petriho miskách na filtračních papírech nasycených roztokem testované látky. Test probíhá po dobu 72 hodin. Po uplynutí testované doby se změří délka kořene každé rostliny a stanoví se hmotnost sušiny. Poté se spočítá inhibice růstu v jednotlivých koncentracích a výsledné hodnoty se porovnají s nasazenou kontrolou (Ambrožová, 2003).



**Obrázek 5:** Semena hořčice bílé v Petriho misce na filtračním papíru (upraveno z Vaverková et al., 2018)

#### 1.3.3.4 Zkouška toxicity na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

Jedním z nejpoužívanějších a standardizovaných experimentálních biologických testů na necílových druzích pro testování toxicity kontaminovaných vod je krátkodobý test akutní toxicity s korýšem *Daphnia magna* (Obrázek 6) (Cappelli, 2020).



Obrázek 6: *Daphnia magna* (převzato z Ebert, 2005)

Mezinárodní norma ČSN EN ISO 6341 – *Kvalita vod – Zkouška inhibice pohyblivosti Daphnia magna Straus – Zkouška akutní toxicity* určuje metodu stanovení akutní toxicity na tomto korýšovi s expoziční dobou 24 nebo 48 hodin, jejíž cílem je zjištění vlivu látek na mortalitu a imobilizaci. Korýši jsou pro ekotoxikologické testování důležití, neboť se jedná o primární konzumenty a jsou hlavní složkou zooplanktonu ve vodních ekosystémech (ČSN EN ISO 6341). Navíc *Daphnia magna* lze snadno chovat a udržovat v laboratoři.

Testovací protokoly pro provádění testů akutní toxicity s *Daphnia magna* byly popsány ve vědecké literatuře od 60. let 20. století a standardní testovací postupy s tímto druhem byly od té doby schváleny několika národními a mezinárodními organizacemi zabývajícími se ochranou životního prostředí (Persoone, 2009).

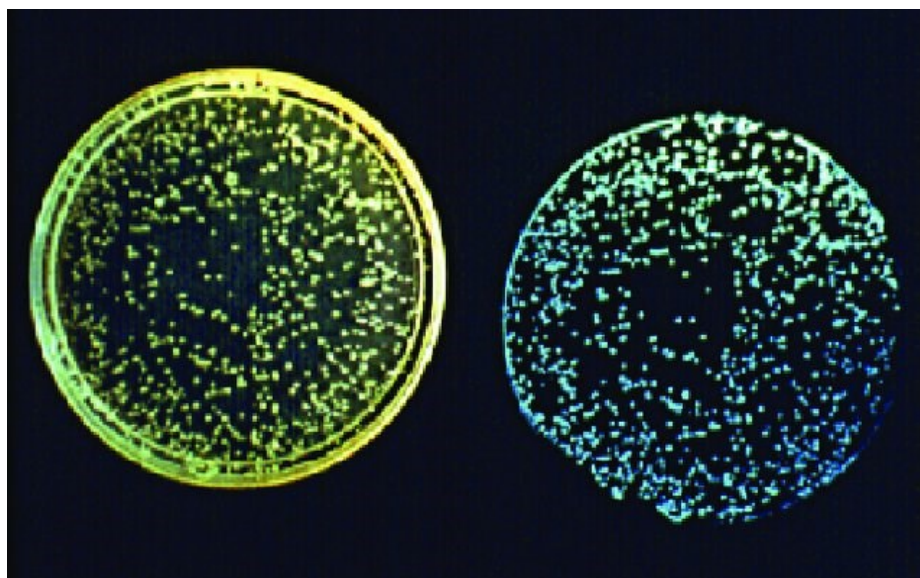
*Daphnia magna* je malá planktonní perloočka, která se běžně vyskytuje ve sladkých vodních útvarech včetně jezer, řek a tůňích (Lee et al., 2019). *Daphnia magna* má mnoho



výhod, jako je velikost těla (dospělý jedinec se pohybuje od 5 do 6 mm), krátký životní cyklus, vysoká plodnost a partenogenetické rozmnožování. Tento korýš jako modelový organismus má také mnoho praktických výhod včetně: jednoduchosti jejich kultivace v laboratorních podmínkách, krátkého životního cyklu, snadné manipulace a nízkých nákladů na údržbu (Tkaczyk, 2021). V ekotoxikologii je korýš *Daphnia magna* považován za dobrý modelový organismus, protože je citlivý na environmentální stresory a změny prostředí a je používán pro reprodukční test, studii akutní toxicity a testy chronické toxicity v pokynech OECD v reakci na různé chemikálie (Lee et al., 2019).

#### 1.3.3.5 Zkouška toxicity na bakterii *Vibrio fischeri*

Bakteriální testy se staly velmi populární, neboť jsou jednoduché, levné a rychlé. Jednou z metod pro rychlé a nákladově efektivní hodnocení toxicity ve všech druzích vzorků jako jsou vzorky povrchových a podzemních vod, odpadní vody a sedimenty, je bioluminescenční inhibiční test, který využívá testovací bakterie *Vibrio fischeri* (Obrázek 7) (Jarque et al., 2016). Produkce světla je přímo úměrná metabolické aktivitě bakteriální populace a jakákoliv inhibice enzymatické aktivity způsobí odpovídající pokles bioluminiscence. Test poskytuje míru subletální odpovědi (Parvez et al., 2006).



Obrázek 7: Kolonie bioluminescenční bakterie *Vibrio fischeri* (převzato ze Glöcker et al., 2012)

### 1.3.4 Obecný postup ekotoxikologické zkoušky

Při hodnocení ekotoxikologických vlastností je nutné nejprve provést úvodní test, po kterém následují testy předběžné a ověřovací.

Limitní test je sekvenční test, která se provádí při koncentraci 100 mg/l a primárně se používá v situacích, kdy má experimentátor informace naznačující, že testovaný materiál je pravděpodobně netoxický, tj. má toxicitu pod limitní dávky. Informace o toxicitě zkoušeného materiálu lze získat ze znalostí o podobných zkoušených sloučeninách nebo podobných zkoušených směsích nebo produktech, přičemž je třeba vzít v úvahu identitu a procento složek, o nichž je známo, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy je k dispozici jen málo nebo žádné informace o jeho toxicitě nebo kdy se očekává, že testovaný materiál bude toxický, by měla být provedena hlavní zkouška. Pokud dojde k úhynu alespoň jednoho organismu v průběhu limitního testu, zahájí se test předběžný (OECD 425).

Úvodní test v ekotoxikologii slouží k posouzení vnitřní toxicity produktu za standardních zkušebních podmínek. Test se provádí s nezředěným vodním výluhem posuzované látky. Počet organismů se nasazuje podle metodik pro předběžné testy pro jednotlivé testovací organismy.

Dojde-li v průběhu úvodního testu k projevení toxického účinku pro méně než 50 % testovacích organismů, provede se test předběžný. U tohoto testu je nutné zvolit vhodnou škálu testovaných koncentrací vodného výluhu. Za vhodně zvolenou koncentrační řadu se považují koncentrace, které měly toxický účinek pro 0–100 % testovaných organismů.

Test ověřovací slouží k ověření toho, že testovaný roztok nevykazuje žádné toxické účinky na dané testovací organismy. Počet organismů u tohoto testu je oproti počtům organismů v základních testech trojnásobný. Pro stanovení hodnot LC<sub>50</sub> (EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>) se provádí test základní. V každém testu se také nasazují kontroly, které mají počet organismů dán metodikou daného testu (Beneš, 2003).

## 1.4 Pesticidy

Pesticidem je označena látka nebo směs látek, které jsou kategorizovány na základě jejich pesticidních účinků, z nichž nejznámějšími a nejpoužívanějšími jsou herbicidy (proti plevelům), fungicidy (proti houbám) a insekticidy (proti hmyzu) (Tabulka 1). Dalším možným kritériem klasifikace je dělení na základě jejich obecné chemické povahy (např. organofosfáty) (McKnight et al., 2015).

Pesticidy jsou určeny k ochraně rostlin nebo rostlinných produktů před škůdci nebo chorobami, a to před nebo po sklizni. Slouží také k ovlivňování životních procesů nežádoucích rostlin (tj. k ničení nebo bránění jejich růstu) či ke konzervování pěstovaných rostlinných produktů. Široké využívání pesticidů přispělo k jejich distribuci v půdě, vzduchu a vodě. Používají se především v zemědělském sektoru, ale také v lesnictví nebo zahradnictví (Boivin et al., 2016). V závislosti na chemické podstatě a expozici však mohou pesticidy představovat zdravotní rizika a mohou vyvolat respirační problémy nebo chronická onemocnění jako je rakovina, cukrovka či například neurodegenerativní poruchy (Mostafalou et al., 2013). V současnosti jsou pesticidy označovány jako jedny z nejškodlivějších typů sloučenin ovlivňující povrchové vody. Některé pesticidy nejsou biologicky odbouratelné, a proto mohou v životním prostředí přetrvávat po dlouhou dobu (McKnight et al., 2015).

Pro uvedení na trh a používání pesticidů v zemědělských a nezemědělských oblastech je pro každou účinnou látku a přípravek na ochranu rostlin vyžadováno posouzení rizik a povolení používání. Tyto výrobky musí splňovat velký počet kritérií k zajištění ochrany pracovníků, spotřebitelů a životního prostředí. Tato kritéria jsou definována Evropským nařízením ES 1107/2009, které je přijato všemi zeměmi Evropské unie (Boivin et al., 2016).

*Tabulka 1: Příklady běžně používaných pesticidů (zpracováno z Mokarizadeh et al., 2015)*

<b>Druh pesticidu</b>	<b>Chemikálie</b>
Herbicid	Anilidy: acetochlor, alachlor, metolachlor Amidy: propanil Triaziny: atrazin, propazin
Fungicid	Dithiokarbamáty: mankozeb, maneb, zineb Aromatické fungicidy: bifenyl Anilidové fungicidy: isotianil, iprodion
Insekticid	Organochloridy: DDT, lindan Organofosfáty: chlorpyrifos

Vzhledem k širokému používání pesticidů v průběhu let došlo k akumulaci těchto sloučenin v životním prostředí, což způsobuje kontaminaci ekosystémů a poškození bioty. Herbicidy vykazují vysokou toxicitu pro cílové druhy (plevelé), ale mohou být toxické i pro necílové druhy, jako jsou lidé. Osud sloučeniny pak závisí na vlastnostech jak sloučeniny, tak i prostředí. Jakmile se herbicidy dostanou do půdy, může dojít ke změně jejich struktury a složení v důsledku působení fyzikálních, chemických a biologických procesů. Některé molekuly, když jsou zabudovány do půdy, jsou redukovány těkáním a fotolýzou pomocí světelného záření. Pokud nejsou absorbovány rostlinami, mohou se silně adsorbovat na organickou hmotu přítomnou v koloidní frakci půdy, být unášeny dešťovou vodou a/nebo zavlažováním, a dokonce mohou být vyluhovány, čímž se dostávají do povrchových nebo podzemních vod. Herbicidy mohou mít jak přímým, tak nepřímým způsobem škodlivé účinky na organismy a lidské zdraví. Stejně jako u jiných pesticidů závisí akumulace herbicidů v biotě kromě fyzikálně-chemických vlastností (chemická stabilita, rozpustnost, sorpce v půdě) na typu souvisejícího potravního řetězce. Mezi biologické účinky těchto chemikálií lze uvést genetická poškození, různé fyziologické změny, dokonce i smrt exponovaných organismů. Některé herbicidy, které jsou v nízkých koncentracích, nemusí vyvolat okamžité zjiřitelné účinky v organismech, ale z dlouhodobého hlediska mohou zkrátit jejich životnost (*Morales et al., 2013*).

## 1.5 Chloracetanilidové pesticidy

Chloracetanilidové pesticidy se využívají především k likvidaci jednoletých trav a širokolistých plevelů v kukuřici, rýži, sóji a mnoha dalších plodinách (*Saha et al., 2012*). Všechny pesticidy jsou alespoň mírně toxické. Pesticidy mohou způsobit kontaminaci půdy a vody, což má za následek např. kontaminaci zemědělských produktů. Tyto kontaminace mohou mít dále za následek zdravotní rizika a ekotoxicitu se škodlivými účinky na životní prostředí (*Pereira et al., 2021*). Vliv pesticidu na životní prostředí také závisí na způsobu rozptylu a jeho koncentraci. Mutagenní účinky chloracetanilidových pesticidů mohou vyplývat z mnoha reakcí s organismem jako je přímé působení sloučeniny na jadernou deoxyribonukleovou kyselinu (DNA), začlenění do DNA během replikace buněk, interference v činnosti mitotického nebo meiotického dělení, což má za následek nesprávné dělení buňky. U rostlin mohou některé pesticidy zasahovat do buněčného dělení a způsobit nesprávné fungování kořenů. U zvířat mohou herbicidy působit v různých tkáních nebo orgánech (*Morales et al., 2013*).

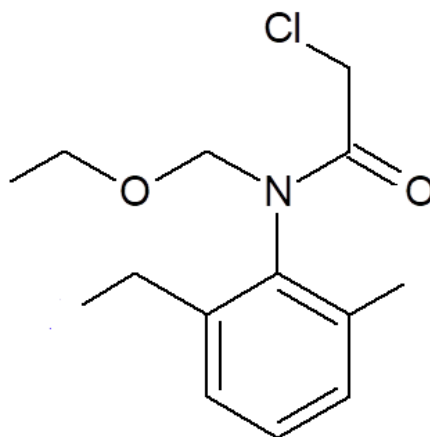
Mezi nejčastěji využívané pesticidy této skupiny patří acetochlor, alachlor a metolachlor. Chloracetanilidové pesticidy mají stejné molekulární jádro 2-chloracetanilidu a liší se pouze typem a uspořádáním substituentů (*Saha et al., 2012*).

### 1.5.1 Acetochlor

Acetochlor (2-chlor-N-[ethoxymethyl]-N-[2-ethyl-6-methylfenyl]acetamid) (Obrázek 8) je chloracetanilidový pesticid, který byl poprvé registrován v roce 1969 pro kontrolu trav a širokolistých plevelů při pěstování kukuřice, sóji, arašídů a fazolí (*Gadagbui et al., 2010*). Od roku 2012 nařídila Evropská komise zákaz používání acetochloru. Studie ukázaly, že dlouhodobá expozice acetochloru představuje riziko pro lidské zdraví.

Při hodnocení potenciální toxicity vůči necílovým organismům bylo zjištěno, že acetochlor má negativní dopad jak na vodní, tak na suchozemské ekosystémy (*Cheek et al., 1998; Tilson, 1998*). Je známo, že herbicid vykazuje toxické účinky vůči širokému spektru organismů od žížal až po člověka. Má inhibiční účinek na půdní mikrobiální společenství, což nepřímo ovlivňuje růst a reprodukci žížal. Je mutagenní i genotoxické povahy. Bylo popsáno, že acetochlor indukuje výměnu sesterských chromatid v lidských lymfocytech a mutuje zárodečné buňky u samců potkanů (*Mohanty et al., 2019*). Několik studií zjistilo, že acetochlor je endokrinní disruptor, který může interagovat s děložními

estrogenovými receptory a způsobit hormonální poruchy nebo dokonce ohrozit ženský reprodukční systém. Navíc se acetochlor snadno přenáší do vodních útvarů díky střední až vysoké rozpustnosti ve vodě a relativně nízké půdní adsorpci, což vede k časté detekci acetochloru v pitné vodě (An et al., 2021).



**Obrázek 8:** Strukturální vzorec acetochloru (zpracováno autorkou v programu ChemSketch)

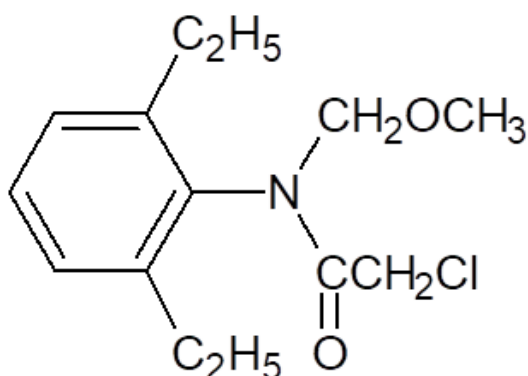
### 1.5.2 Alachlor

Alachlor (2-chlor-N-[2,6-diethylfenyl]-N-[methoxymethyl]acetamid) (Obrázek 9) je chloracetanilidový pesticid, který je registrován pro použití především na kukuřici a sóju. Od registrace v roce 1969 do poloviny devadesátých let patřil alachlor mezi nejpoužívanější zemědělské pesticidy (Lerro et al., 2018).

Chemické vlastnosti alachloru (tj. relativně vysoká mobilita v půdách) se ukazují jako vysoké riziko pro znečištění podzemních vod. V důsledku toho byl alachlor a jeho deriváty často detekovány ve vodním prostředí. Jejich koncentrace v podzemních a povrchových vodách je tak v mnoha zemích pravidelně sledována (Lauga et al., 2013).

Světová zdravotnická organizace (WHO) považuje tento pesticid za toxikologicky vysoce nebezpečný pro zdraví díky své karcinogenní aktivitě (Lerro et al., 2018). Akutní expozice alachloru způsobuje podráždění kůže a očí, dlouhodobá expozice může vést k selhání jater a ledvin, očním lézím a poškození endokrinního systému (Mohanty et al., 2019). V roce 1986 agentura pro ochranu životního prostředí (US-EPA) klasifikovala alachlor jako pravděpodobný lidský karcinogen. Klasifikace je založena především na důkazech nádorů u laboratorních zvířat. Toto zjištění v kombinaci s dalšími regulačními revizemi US-EPA vyústilo v nové požadavky na použití alachloru, včetně pokynů k použití navržených tak, aby se zabránilo kontaminaci podzemních vod,

a požadavků na osobní ochranné prostředky uvedené na etiketě výrobku za účelem minimalizace expozice na pracovišti (Lerro et al., 2018).

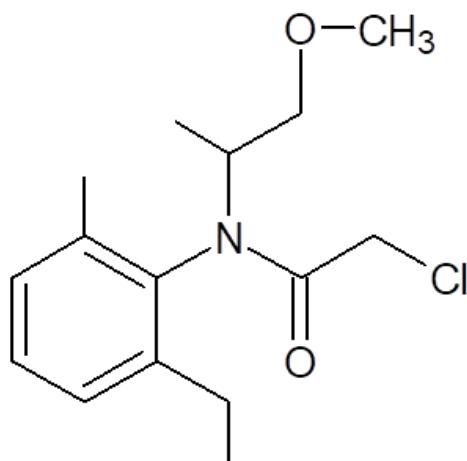


Obrázek 9: Strukturální vzorec alachloru (zpracováno autorkou v programu ChemSketch)

### 1.5.3 Metolachlor

Metolachlor (2-chlor-N-[2-ethyl-6-methylfenyl]-N-[1-methoxypropan-2-yl]acetamid) (Obrázek 10) je chirální pesticid sestávající se ze dvou sad enantiomerů. S-metolachlor (S-ME) vykazuje vyšší herbicidní aktivitu, zatímco R-metolachlor (R-ME) má výborné antifungální vlastnosti (Xie et al., 2016). Metolachlor funguje tak, že v cílových rostlinách inhibuje syntézu chlorofylu, bílkovin, mastných kyselin a lipidů. Expozice tohoto pesticidu vede ke škodlivým účinkům u několika necílových organismů, což ovlivní jejich růst a chování. Mechanismus účinku však není jasný (Lowry et al., 2013).

Výzkum Xu et al. (2020) ukázal, že koncentrace zbytkového S-ME v půdě mírně snížila množství rostlinné biomasy a měla malý vliv na peroxidaci lipidů, antioxidační enzymatický systém a obsah chlorofylu. Je zajímavé, že ačkoli testovaná koncentrace S-ME nevykazovala silné inhibiční účinky na fyziologické aktivity pšenice, snížila rozmanitost mikrobiálních společenstev fylosféry a změnila jejich strukturu. S-ME snížil kolonizaci některými prospěšnými bakteriemi souvisejícími s fixací rostlinného dusíku mezi mikroorganismy fylosféry, což ovlivnilo růst a výnos pšenice, protože tyto bakterie přispívají ke kondici rostlin. Kromě toho S-ME ovlivnil asociaci mezi hostitelem a složením mikrobiálních společenstev fylosféry za různých podmínek růstu (Xu et al., 2020).



Obrázek 10: Strukturální vzorec metolachloru (zpracováno autorkou v programu ChemSketch)

## 1.6 Odstraňování pesticidů

Mezi běžné metody, které se používají k odstranění pesticidů, patří například adsorpce, reverzní osmóza, membránová destilace či mikrobiální degradace. Některé z těchto uvedených metod však mohou přinášet několik nevýhod, mezi které se řadí možný výskyt toxických sekundárních produktů, delší doba degradace či vysoké výrobní náklady. Další využívanou metodou je v současné době fotokatalýza (*Saravanan et al., 2022*).

### 1.6.1 Fotokatalýza

Fotokatalýza je pokročilý oxidační proces, při kterém jsou pesticidy degradovány na meziprodukty s nižší molekulovou hmotností a následně mineralizovány na své anorganické složky (oxid uhličitý, vodu a anorganické minerální soli) (*Hadei et al., 2021*). Jako zdroj energie se využívá světelné záření. Zdrojem fotonů může být přirození sluneční světlo nebo UV záření jako jsou xenonové nebo rtuťové výbojky a UV LED diody. Fotokatalytická reakce nastane v případě, kdy se znečišťující látka dostane do kontaktu s povrchem fotokatalyzátoru (*Saravanan et al., 2022*).

Fotolytická degradace pesticidů má za cíl vyvolat chemickou změnu prostřednictvím absorpce záření přímými i nepřímými cestami. Při přímé fotolýze chromofor ve struktuře pesticidu absorbuje zářivou energii za vzniku aktivované molekuly pesticidu. Takto excitované molekuly pak mohou podléhat procesům jako homolýza, heterolýza nebo fotoionizace. Nepřímá fotolýza probíhá, když jiná chemická látka než pesticid, která nás zajímá, absorbuje sluneční světlo a iniciuje sérii reakcí, které mohou usnadnit transformaci pesticidu. Mezi tyto chemické látky patří rozpuštěné organické látky



(huminová a fulvová kyselina), dusičnany ve vodě, ozón a oxidy dusíku ve vzduchu a minerálech a přechodné kovy v jílech. Tyto chemické látky obsažené v roztoku pesticidu působí jako fotosenzibilizátory, mohou absorbovat světlo a poskytovat oxidanty (často radikály), které pesticidy degradují (Reddy et al., 2015).

Fotokatalyzátor je většinou polovodič, který katalyzuje degradaci tím, že absorbuje světelný tok a následně mohou proběhnout dvě reakce – oxidace z fotogenerovaných děr a redukce z fotogenerovaných elektronů. Nejvíce využívaným polovodičem pro proces fotokatalýzy je TiO<sub>2</sub> díky své vysoké katalytické aktivitě, nízké ceně a chemické stabilitě (Mermana et al., 2017). Mezi další běžně využívané polovodiče patří ZnO, WO<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Mezi modifikace, které v poslední době využívá mnoho výzkumníků, patří nanočástice, nanokompozity, nanotrubičky (Saravanan et al., 2022).

### 1.6.2 Mikrobiální degradace

Mikrobiální degradace je považována za jednu z nejdůležitějších cest pro odstranění chloracetanilidových pesticidů z prostředí. Je upřednostňována před ostatními konvenčními metodami díky své schopnosti úplně degradovat daný pesticid přírodní cestou, tj. pomocí mikroorganismů.

Mezi bakteriální kmeny schopné degradovat acetochlor patří například *Pseudomonas oleovorans*. Tento bakteriální kmen je schopný degradovat 98,03 % acetochloru během 7 dnů a má toleranci až 200 mg/l acetochloru (Xu et al., 2020). Mezi další bakteriální kmeny, které jsou schopny účinně degradovat acetochlor, patří *Achromobacter*, *Paracoccus* nebo *Catellibacterium caeni*. Účinnost biodegradace se zvyšuje s opakovanou expozicí se zvyšující se koncentrací acetochloru.

Degradace alachloru je převážně mikrobiální proces. Bakteriální kmeny schopné degradace jsou například *Streptomyces*, *Bacillus brevis* či *Pseudomonas putida*. Ve studii Tiedje a Hagedorn byly popsány dokonce půdní houby schopné účinné degradace alachloru. Jsou to například *Ceriporiopsis subvermispota*, *Phlebia tremelosa* nebo *Phanerochaete chrysosporium* (Mohanty et al., 2019).

Bakterie, které účinně degradují metolachlor, jsou například *Amycolatopsis*, *Sacharomonospora* či *Kribella* (Han et al., 2022).

### 1.6.3 Adsorpce

Mezi možnosti odstraňování pesticidů z vodného roztoku patří adsorpce na adsorpční materiály. Tato metoda je jednoduchá, levná a rychlá. Adsorpčním mechanismem může být fyzikální zachycení na adsorbent (= adsorpce) prostřednictvím slabých Van der Waalsových sil nebo chemisorpce pomocí chemických vazeb. Adsorbenty vykazující nejvyšší účinnost při odstraňování pesticidů s účinností odstranění téměř 100 % jsou aktivní uhlí, grafen, biouhel či nanočásticové adsorbenty. Mezi faktory ovlivňující adsorpci patří vlastnosti adsorbované látky jako je její rozpustnost, molekulová velikost a povaha substituentu. Za velmi zásadní faktor během adsorpce je považováno pH (*Mojiri et al., 2020*).

### 1.6.4 Hydrolýza

Mezi další důležité způsoby odstraňování pesticidů patří hydrolýza, která představuje důležitý proces při regulaci chloracetanilidových pesticidů v životním prostředí. Bylo zjištěno, že některé produkty hydrolýzy, jako je chloracetamid vzniklý N-dealkylací alachloru, jsou mutagenní a mohou se vázat na DNA. V případě metolachloru bylo zjištěno, že degradovaný metolachlor je méně cytotoxický, ale naopak více teratogenní než původní metolachlor. Částečně kvůli obavám ohledně toxicity zařadila US-EPA chloracetanilidové pesticidy včetně jejich produktů degradace na seznam kontaminujících látek, které by měly být v budoucnu regulovány (*Carlson et al., 2006*).

## 1.7 Biodegradační produkty

Obecně se zbytky a metabolity chloracetanilidových pesticidů vyskytují v povodích a podzemních vodách v zemědělských oblastech, kde se tyto pesticidy používaly. Prevalence těchto sloučenin vyskytujících se v životním prostředí podnítila výzkumy degradace nebezpečných látek ve vodě a kontaminované půdě (*Xu et al., 2008*).

Acetochlor je ve vodním ekosystému primárně degradován fotolyticky, oproti tomu v půdě je hlavní cesta degradace pomocí mikroorganismů. Mezi nejčastěji detekované meziproducty patří acetochlor ethansulfonová kyselina (ESA) a acetochlor oxalová kyselina (OA) (*Mohanty et al., 2019*). Následnými enzymatickými cestami dochází ke vzniku CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (*Singh et al., 2014*).

Degradace alachloru a jeho metabolitů z ekosystém probíhá na základě různých procesů jako je fotodegradace, mikrobiální degradace či těkání. Hlavním produktem degradace alachloru je alachlor-ESA, který byl detekován častěji než samotná mateřská sloučenina. Druhým hlavním metabolitem je alachlor-OA (*Mohanty et al., 2019*).

Metolachlor je v půdě degradován mikrobiálním rozkladem či fotodegradací. Rychlost mikrobiální degradace je ovlivněna hloubkou půdy, koncentrací organického uhlíku a rozpuštěného kyslíku, teplotou a velikostí mikrobiálních populací. K fotodegradaci dochází pouze tehdy, je-li metolachlor přítomen na povrchu půdy. Biodegradací metolachloru půdními mikroorganismy vzniká metolachlor-ESA a metolachlor-OA. Následnými enzymatickými cestami dochází opět ke vzniku CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O jako u acetochloru a alachloru (*Singh et al., 2014*).

## 2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zhodnotit akutní toxicitu vybraných zástupců chloracetanilidových pesticidů alachloru, metolachloru a acetochloru pomocí biologických zkoušek toxicity.

Úkolem bylo:

1. Stanovit akutní toxicitu alachloru, acetochloru a metolachloru vůči zelené řase *Chlorella kessleri*, korýši *Daphnia magna*, jednoděložné rostlině *Lemna minor* a kroužkovci *Lumbriculus variegatus*.

2. Zhodnotit akutní toxicitu směsí fotokatalytických produktů chloracetanilidových pesticidů vznikajících při heterogenní fotokatalýze vůči zelené řase *Chlorella kessleri*.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Zkušební organismy

- zelená řasa *Chlorella kessleri* FOTT et NOVÁK kmen LARG/1 vypěstovaná v laboratoři Ústavu environmentálního a chemického inženýrství
- novorozenci vodního korýše *Daphnia magna* z laboratorního chovu Ústavu environmentálního a chemického inženýrství
- jednoděložná rostlina *Lemna minor* vypěstovaná v laboratoři Ústavu environmentálního a chemického inženýrství
- kroužkovec *Lumbriculus variegatus* z laboratorního chovu Ústavu environmentálního a chemického inženýrství

#### 3.1.2 Voda

Pro přípravu zásobních roztoků solí, růstových médií a zásobních roztoků zkoušených látek byla využita redestilovaná voda s vodivostí nižší než  $0,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.1.3 Laboratorní pomůcky

Erlenmeyerovy baňky, odměrné baňky, odměrné válce, kádinky, skleněné láhve se šroubovacím uzávěrem, lžičky, váženky, 24jamkové a 96jamkové mikrotitrační destičky, krystalizační misky, jednokanálové a vícekanálové automatické manuální pipety, pipetovací špičky, plastové Pasteurovy pipety, injekční stříkačky, skleněné tyčinky, membránové filtry Sartorius PES porozity  $0,1 \mu\text{m}$ , kleště, pinzety, skalpel, podložní sklíčka, háček, sítko, gumičky, plastová víčka na mikrotitrační destičky, vata buničitá v přířezech, hliníková fólie

#### 3.1.4 Přístroje

- absorbanční reader Epoch (BioTek Instruments, USA)
- analytické předvážky KERN 440-49N (Kern & Sohn GmbH, Německo)
- analytické váhy ABJ (Kern & Sohn GmbH, Německo)
- digitální mikroskop Dino-Lite (AnMo Electronics Corporation, Taiwan)
- horkovzdušný sterilizátor 5104.2 (BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)

- chladnička (Electrolux s. r.o., Česká republika)
- inkubátor Heratherm Compact IMC18 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- inkubátor WTW TS 606 CZ/2 (WTW, Česká republika)
- kultivační box pro kultivaci zelené řasy *Chlorella kessleri* (vlastní výroba UPCE)
- pH metr CyberScan pH 510 (Eutech Instruments, USA)
- systém pro výrobu redestilované vody Milli-Q® Direct 8 (MilliporeSigma, USA)
- třepačky orbitální Heidolph Rotamax 120 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Německo)
- třepačky vibrační Heidolph Vibramax 100 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Německo)
- UV-VIS spektrofotometr DR6000 (Hach Lange s. r. o., Česká republika)
- vertikálně plněný autokláv VX-40 (Systec GmbH, Německo)

### 3.1.5 Chemikálie a reagenty

- Chemikálie pro přípravu M4 média pro laboratorní chov korýše *Daphnia magna* (Tabulka 2 a 3)
- Chemikálie pro přípravu rekonstituované vody (Tabulka 4)
- Chemikálie pro přípravu růstového média pro zkoušky toxicity na zelených řasách (Tabulka 5)
- Chemikálie pro přípravu Boldova bazálního média pro testy toxicity na zelených řasách (Tabulka 6)
- Chemikálie pro přípravu modifikovaného Steinbergova média pro testy toxicity na *Lemna minor* (Tabulka 7)

### 3.1.6 Chloracetanilidové pesticidy

- Acetochlor 98,6 %, CAS 34256-82-1 (HPC Standards GmbH, Německo)
- Alachlor 99,2 %, CAS 15972-60-8 (HPC Standards GmbH, Německo)
- Metolachlor 97,9 %, CAS 51218-45-2 (HPC Standards GmbH, Německo)

## 3.2 Podmínky laboratorního chovu

### 3.2.1 *Daphnia magna*

Chov korýše *Daphnia magna* probíhal v čirých skleněných nádobách naplněných médiem M4 (Obrázek 11). Médium M4 bylo připraveno ze zásobních roztoků solí dle

postupu uvedeného v normě ČSN EN ISO 6341 *Kvalita vod – Zkouška inhibice pohyblivosti Daphnia magna Straus – Zkouška akutní toxicity*. Zásobní roztoky pro přípravu média M4 jsou uvedeny v Tabulce 2. Konečné složení média M4 je uvedeno v Tabulce 3. Pro laboratorní chov *Daphnia magna* byly dodrženy podmínky definované normou ČSN EN ISO 6341, přičemž pH média M4 bylo upraveno na rozmezí hodnot 6 až 9. Laboratorní chov probíhal v místnosti s kontrolovanou teplotou v rozmezí  $20 \pm 2$  °C.



*Obrázek 11: Laboratorní chov korýše Daphnia magna (foto autor)*

Krmení korýše *Daphnia magna* bylo prováděno 3x týdně zelenou řasou *Chlorella kessleri*. Na 3 litry M4 média byly dávkovány 3 ml bohatě narostlé řasové kultury. Výměna M4 média byla prováděna 1x týdně, a to odlitím přibližně třetiny původního média a doplněním objemu chovné nádoby čerstvým médiem (SOP C04/21/LE).

Tabulka 2: Zásobní roztok I a II pro médium M4 dle normy ČSN EN ISO 6341

<i>Zásobní roztok</i>	<i>Chemikálie</i>	<i>Navážka</i>	<i>Objem jednotlivých zásobních roztoků</i>	<i>Objem zásobních roztoků I na 1000 ml zásobního roztoku II</i>		
<b>I</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28,60 g	500 ml	1 ml		
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3,61 g				
	LiCl	3,10 g				
	RbCl	0,71 g				
	SrCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,52 g				
	NaBr	0,16 g				
	MoNa <sub>2</sub> O <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,63 g				
	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,17 g				
	ZnCl <sub>2</sub>	0,13 g				
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,10 g				
	KI	0,065 g				
	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,044 g			1000 ml	1 ml
	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,012 g				
	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	2,26 g			500 ml	20 ml
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	0,99 g				

<sup>a</sup> Zásobní roztoky Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O a FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O se naváží do 500 ml a následně slijí do 1000 ml.



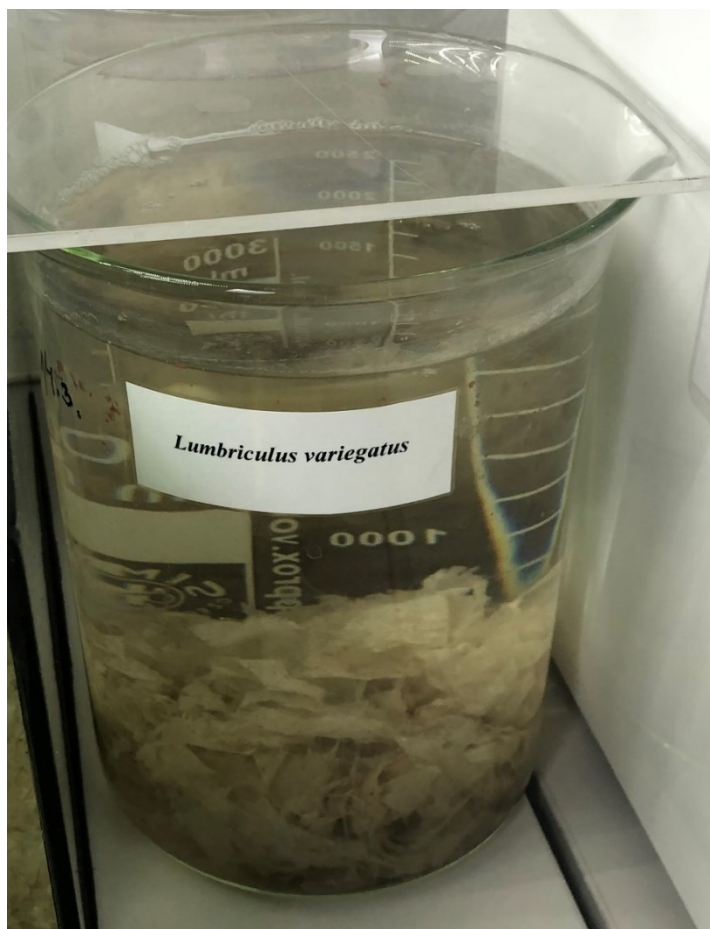
Tabulka 3: Složení M4 média dle normy ČSN EN ISO 6341

Zásobní roztoky	Chemikálie	Navážka	Objem jednotlivých zásobních roztoků	Objem zásobních roztoků do M4 média
II	Kombinované stopové prvky (Tabulka 2)	Tabulka 2	Tabulka 2	50 ml
Zásobní roztok makroživin	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	73,45 g	250 ml	1 ml
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	61,65 g		0,5 ml
	KCl	14,50 g		0,1 ml
	NaHCO <sub>3</sub>	16,20 g		1 ml
	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	9,33 g		0,2 ml
	NaNO <sub>3</sub>	0,685 g		0,1 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,358 g		0,1 ml
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,460 g		0,1 ml
Zásobní roztok vitamínů	Thiamin	750 mg	1000 ml	
	Kobalamin	10 mg		
	Biotin	7,50 mg		

### 3.2.2 *Lumbriculus variegatus*

Kroužkovci *Lumbriculus variegatus* se v laboratorních podmínkách chovají v systému sediment-voda. Sediment je tvořen natrhaným toaletním papírem nebo vrstvou písku (Obrázek 12). Vodnou fází je tzv. rekonstituovaná voda, která byla připravena spolu se sedimentem podle OECD 225 (OECD 225). Složení rekonstituované vody je uvedeno v Tabulce 4. pH rekonstituované vody by se mělo pohybovat v rozmezí hodnot 6 až 9, případná úprava pH byla provedena pomocí 1M roztoku HCl nebo 1M roztoku NaOH. Výměna rekonstituované vody nad sedimentem byla prováděna 1x za 2 týdny. Výměna sedimentu probíhala 1x za tři měsíce nebo dle potřeby. Chov probíhal v místnosti s kontrolovanou teplotou v rozmezí 20±2 °C Krmení kroužkovců *Lumbriculus variegatus*

bylo prováděno 1x týdně komerčně dostupným krmivem pro akvarijní rybky (*OECD* 225).



*Obrázek 12: Laboratorní chov kroužkovce Lumbriculus variegatus (foto autor)*

*Tabulka 4: Složení rekonstituované vody (převzato ze SOP C05/21/LE)*

<b>Chemikálie</b>	<b>Navážka/1000 ml</b>	<b>Objem zásobního roztoku na 1000 ml rekonstituované vody</b>
CaCl <sub>2</sub>	22,20 g	10 ml
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	25,20 g	5 ml
NaHCO <sub>3</sub>	8,60 g	7,7 ml
KCl	0,74 g	7,8 ml

### 3.3 Zkouška akutní toxicity na zelené řase *Chlorella kessleri*

#### 3.3.1 Pracovní postup

Standardizovanou metodiku pro zkoušku akutní toxicity na zelených řasách definuje norma ČSN EN ISO 8692 *Kvalita vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas*. Podstatou zkoušky je stanovení účinku zkoušené látky na inhibici růstu a rozmnožování sladkovodních druhů řas. Jako zkušební organismus byla využita zelená řasa *Chlorella kessleri* FOTT *et* NOVÁK kmen LARG/1. Přestože tento druh není normou ČSN EN ISO 8692 přímo doporučen jako zkušební organismus, využití zelené řasy *Chlorella kessleri* pro akutní zkoušky toxicity je možné, a to za podmínky splnění kritérií platnosti, které jsou definované v normě ČSN EN ISO 8692. Rozhodujícím faktorem je schopnost exponenciálního růstu řasového druhu po celou dobu zkoušky (tj. 72 hodin), který musí být ověřen. Metodika akutní zkoušky toxicity na zelené řase použitá v této práci vycházela primárně z metody popsané normou ČSN EN ISO 8692, nicméně byla modifikována s ohledem na použití druhu *Chlorella kessleri*.

Zkouška akutní toxicity na zelené řase byla provedena ve dvou odlišných experimentálních uspořádáních. První uspořádání bylo založeno na využití Erlenmeyerových baněk o objemu 50 ml jako zkušebních nádob, přičemž objem řasové kultury byl 30 ml. Zásobní kultury a předkultivace byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml. Pro zkoušku toxicity, kultivaci zásobních kultur i předkultur bylo využíváno růstové médium připravené dle normy ČSN EN ISO 8692, jehož složení je uvedeno v Tabulce 5. pH růstového média bylo upraveno na hodnotu  $8,1 \pm 0,2$  pomocí 1M roztoku HCl nebo 1M roztoku NaOH. Zásobní roztoky pro přípravu růstového média byly sterilizovány v autoklávu při  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 minut. Zásobní roztok  $\text{NaHCO}_3$  (IV) byl sterilizován membránovou filtrací (průměr pórů  $0,1\text{ }\mu\text{m}$ ). Zásobní roztoky byly uchovány při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  v chladničce a používány maximálně tři měsíce od přípravy.

Předkultivace byla započata 72 hodin před začátkem zkoušky a inkubována za podmínek totožných jako při zkoušce. Počáteční hustota předkultivace i řasového inokula na začátku zkoušky byla  $5 \cdot 10^4$  buněk/ml média, která zajistila exponenciální růst řasové kultury po dobu 72 hodin. Zásobní kultury, předkultivace i vlastní zkoušky toxicity byly kultivovány při teplotě  $28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu  $72 \pm 2$  hodin při světelné intenzitě 8000-9000 luxů ve světelném režimu 18 hodin světlo/6 hodin tma. Pro udržení řasových kultur v suspenzi byly Erlenmeyerovy baňky třepány na třepáčkách s orbitálním pohybem o frekvenci kmitů  $120\text{ min}^{-1}$ , a to v režimu 1 hodina třepání a dvě hodiny

bez třepání. Inkubace řasových kultur probíhala v kultivačním boxu. Pro zabránění vzdušné kontaminace a odpařování růstového média byly Erlenmeyerovy baňky překryty tenkou vrstvou buničiny. Pro snížení rizika kontaminace řasových kultur byly při práci dodržovány zásady aseptické práce, veškeré pomůcky přicházející do styku s řasovou kulturou byly sterilní, a to včetně růstového média.

Zásobní roztoky zkoušených látek byly připraveny rozpuštěním v redestilované vodě. Zkoušené sady byly připraveny smícháním vhodných objemů zásobního roztoku zkoušené látky, růstového média a řasového inokula v odměrných baňkách a následně rozpipetovány do zkušebních nádob. Pro každou koncentraci zkoušené látky byly připraveny tři replikáty. Kontrolní sady byly připraveny přidáním vhodného objemu řasového inokula do růstového média v odměrných baňkách a následně rozpipetovány do zkušebních nádob. Pro každou zkoušku bylo připraveno minimálně pět replikátů kontrolních vzorků. Jednotlivé replikáty stejného vzorku nebo kontrol byly během zkoušky rozmístěny náhodně tak, aby byl minimalizován vliv rozdílných podmínek způsobených různou světlenou intenzitou nebo teplotou na odlišných místech kultivačního boxu.

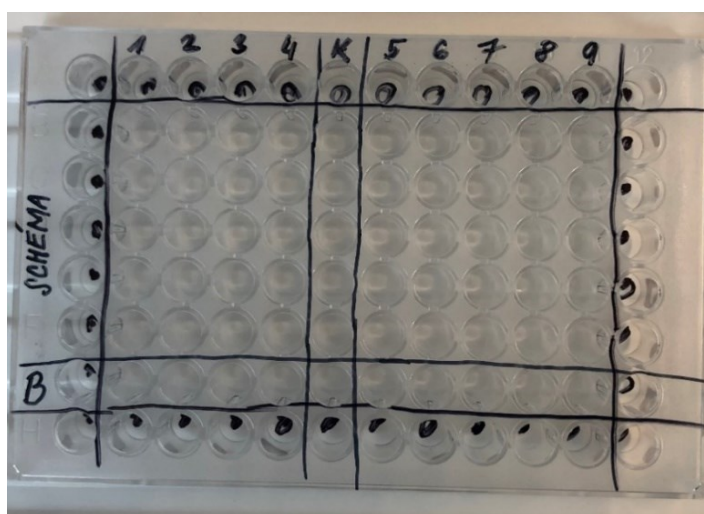
*Tabulka 5: Růstové médium pro zkoušky toxicity na zelených řasách dle ČSN EN ISO 8692*

<i>Zásobní roztok</i>	<i>Chemikálie</i>	<i>Navážka/1000 ml</i>	<i>Objem zásobního roztoku na 1000 ml růstového média</i>
<b>I</b>	NH <sub>4</sub> Cl	1,50 g	10 ml
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,20 g	
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,80 g	
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,50 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16 g	
<b>II</b>	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	64 mg	1 ml
	Na <sub>2</sub> EDTA	100 mg	
<b>III</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185 mg	1 ml
	MnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	415 mg	
	ZnCl <sub>2</sub>	3 mg	
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,5 mg	
	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,01 mg	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7 mg	
<b>IV</b>	NaHCO <sub>3</sub>	50 g	1 ml

Druhé experimentální uspořádání zkoušky toxicity na zelené řase *Chlorella kessleri* bylo založeno na využití jamek mikrotitračních destiček jako zkušebních nádob. Miniaturizace zkoušky toxicity na zelené řase umožnila zvýšit počet provedených opakování při současném snížení provozních nákladů. Pro zkoušky toxicity, kultivaci zásobních kultur i předkultur bylo využíváno Boldovo bazální médium (BBM médium), jehož složení je uvedeno v Tabulce 6. pH BBM média bylo upraveno na rozmezí hodnot 6,6±0,2 pomocí 1M roztoku HCl nebo 1M roztoku NaOH. Zásobní roztoky pro přípravu BBM média byly sterilizovány v autoklávu při 120 °C po dobu 15 minut. Zásobní roztok EDTA-KOH (IX) byl sterilizován membránovou filtrací (průměr pórů 0,1 μm). Zásobní roztoky byly uchovány v chladničce při teplotě 4 °C a používány maximálně tři měsíce od přípravy.

Předkultivace byla započata 72 hodin před začátkem zkoušky a inkubována za podmínek totožných jako při zkoušce. Počáteční hustota buněk v předkultivaci byla  $2,2 \cdot 10^5$  buněk/ml, hustota buněk na začátku zkoušky toxicity byla  $4 \cdot 10^5$  buněk/ml. Zásobní kultury, předkultivace i vlastní zkoušky toxicity byly kultivovány při teplotě  $22 \pm 2$  °C, po dobu  $72 \pm 2$  hodin při kontinuálním osvětlení o intenzitě 6000-10 000 luxů za neustálého třepání na třepáčkách s vibračním pohybem o frekvenci kmitů  $150 \text{ min}^{-1}$ . Inkubace řasových kultur probíhala v termoluminostatu.

Zásobní roztoky zkoušených látek byly připraveny rozpuštěním v redestilované vodě. Zkoušené sady byly připraveny smícháním vhodných objemů zásobního roztoku zkoušené látky, BBM média a řasového inokula v jamkách mikrotitrační destičky. Kontrolní sady byly připraveny přidáním vhodného objemu řasového inokula do BBM média v jamkách mikrotitrační destičky. Pro každou koncentraci zkoušené látky bylo připraveno pět replikátů. Pro každou zkoušku bylo připraveno pět replikátů kontrolních vzorků. Jamky mikrotitrační destičky byly plněny podle schématu na Obrázku 13. Okrajové jamky mikrotitrační destičky byly naplněny 250  $\mu\text{l}$  BBM média. Do jamek označených 1 až 9 byla připravena koncentrační řada zkoušené látky, a to smícháním 200  $\mu\text{l}$  řasového inokula a 50  $\mu\text{l}$  příslušného ředění zásobního roztoku zkoušené látky. Do jamek označených jako K byly připraveny kontrolní sady, a to smícháním 200  $\mu\text{l}$  řasového inokula a 50  $\mu\text{l}$  BBM média. Do jamek označených jako B bylo napipetováno 200  $\mu\text{l}$  BBM média a 50  $\mu\text{l}$  zkoušené látky. Tyto jamky sloužily jako blank a neobsahovaly řasovou kulturu. Do jamky označené jako BK bylo napipetováno 250  $\mu\text{l}$  BBM média. Pro zabránění vzdušné kontaminace a odpařování BBM média byly mikrotitrační destičky překryty plastovým víčkem.



**Obrázek 13:** Schéma jamek mikrotitrační destičky pro zkoušku toxicity na zelené řase *Chlorella kessleri* (B – blank; K – kontrolní sada) (foto autor)

Tabulka 6: Složení Boldova bazálního média (převzato ze SOP R02/21/LE)

<i>Zásobní roztok</i>	<i>Chemikálie</i>	<i>Navážka/ 1000 ml</i>	<i>Objem zásobního roztoku na 1000 ml BBM média</i>
<b>I</b>	NaNO <sub>3</sub>	25 g	10 ml
<b>II</b>	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	7,50 g	10 ml
<b>III</b>	NaCl	2,50 g	10 ml
<b>IV</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,50 g	10 ml
<b>V</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,50 g	10 ml
<b>VI</b>	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	3,76 g	10 ml
<b>VII</b>	EDTA	50 g	1 ml
	KOH	31 g	
<b>VIII</b>	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4,98 g	1 ml
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 ml	
<b>IX</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42 g	1 ml
<b>X stopové prvky</b>	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	8,82 g	1 ml
	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1,44 g	
	MoO <sub>3</sub>	7,10 g	
	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	1,57 g	
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,49 g	

### 3.3.2 Vyhodnocení zkoušky

Hlavní sledovanou veličinou při zkoušce toxicity na zelené řase *Chlorella kessleri* byla hustota buněk, která byla měřena na začátku a na konci zkoušky. V obou experimentálních uspořádáních bylo ke kvantifikaci řasové biomasy využito spektrofotometrické stanovení při vlnové délce 684 nm. Pro uspořádání v mikrotitračních destičkách byla koncentrace buněk současně proměřována při vlnové délce 750 nm, která odpovídala zákalu. Před měřením absorbance bylo nutné řasové kultury homogenizovat, v případě Erlenmeyerových baněk manuálním promícháním, v případě mikrotitračních destiček opakovaným nasátím a vypuštěním obsahu jamky pomocí automatické pipety. Případně vzniklé bubliny byly potřeba odstranit, neboť mohly výrazně ovlivnit výsledky spektrofotometrického měření.

Z naměřených hodnot absorbance byla vypočítána hustota buněk v 1 ml řasové kultury pomocí rovnice lineární regrese korelační křivky, která vyjadřovala závislost mezi počtem buněk řasové suspenze a hodnotou absorbance, a to tak že, za hodnotu  $y$  v rovnice byla dosazena hodnota naměřené absorbance a z rovnice byla vypočítána hustota řasové kultury  $x$ . Stanovení korelační křivky nebylo součástí této diplomové práce a byla použita křivka na pracovišti již používána.

Ze zjištěných hodnot hustoty buněk na začátku a na konci zkoušky byly nejprve vypočítány specifické růstové rychlosti  $\mu$  pro každý replikát zkoušené a kontrolní sady podle Rovnice 1 (ČSN EN ISO 8692):

$$\mu = \frac{\ln n_L - \ln n_0}{t_L - t_0} \quad (1)$$

kde

$n_0$	počáteční hustota buněk
$n_L$	hustota buněk měřená v době $t_L$
$t_0$	doba začátku zkoušky
$t_L$	doba ukončení zkoušky

Následně byla vypočítána střední růstová rychlost  $\mu_c$  pro kontrolní sadu replikátů. Poté byla vypočítána inhibice růstové rychlosti v procentech  $I_{\mu i}$  pro každou zkoušenou sadu replikátů podle Rovnice 2 (ČSN EN ISO 8692):

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100 \quad (2)$$

kde

$\mu_i$	růstová rychlost pro zkoušenou koncentraci
$\mu_c$	střední růstová rychlost u kontrolního vzorku



Pro každou předkultivaci byly sestrojeny růstové křivky, a to jako závislost přirozeného logaritmu střední hustoty řasových buněk na čase. Pomocí růstových křivek bylo kontrolováno udržení exponenciální růstu řasové kultury v časovém intervalu 0-72 hodin. Za účelem sestrojení růstových křivek byla měřena hustota řasové předkultivace minimálně jednou za 24 hodin. Exponenciální růst byl vyjádřen lineární růstovou křivkou, zatímco vyrovnaní růstové křivky signalizovalo přechod řasové kultury do stacionární fáze. V takovém případě nemohla být předkultivace použita jako inokulum pro zkoušku. Současně bylo pomocí růstových křivek kontrolováno, zda řasové kultury rostou očekávanou specifickou růstovou rychlostí.

Zkouška na zelených řasách byla považována za platnou, pokud byly splněny dvě kritéria platnosti. První podmínkou byla minimální specifická růstová rychlost kontrolních replikátů  $1,4 \text{ d}^{-1}$  a druhou nepřekročení 5% variačního koeficientu specifické růstové rychlosti v kontrolních replikátech (ČSN EN ISO 8692).

### **3.4 Zkouška akutní toxicity na korýši *Daphnia magna***

#### **3.4.1 Pracovní postup**

Metodu stanovení akutní toxicity pro vodního korýše *Daphnia magna* určuje norma ČSN EN ISO 6341 *Kvalita vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus – Zkouška akutní toxicity*. Jako zkušební organismy byli využiti novorozenci *Daphnia magna* z laboratorního chovu Ústavu environmentálního a chemického inženýrství. Zkouška je založena na určení počáteční koncentrace zkoušené látky, která za 24 nebo 48 hodin imobilizuje 50 % jedinců *Daphnia magna*. Den před zahájením zkoušky byly gravidní samice přeneseny do samostatných nádob s rekonstituovanou vodou, jejíž složení je uvedeno v Tabulce 4. Během následujících 24 hodin byly odebrány nově narození jedinci, kteří byli použiti jako zkušební organismy pro zkoušku akutní toxicity provedené podle metodiky definované normou ČSN EN ISO 6341.

Zkouška probíhala při teplotě  $20 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$  po dobu 48 hodin, bez aerace, osvětlení a bez krmení zkušebních organismů. Jako zkušební nádoby byly využity 24-jamkové mikrotitrační destičky. Mikrotitrační destičky byly umístěny do termoluminostatu s vypnutým světelným zdrojem.

Zásobní roztoky zkoušených látek byly připraveny rozpuštěním v redestilované vodě. Zkoušené sady byly připraveny smícháním vhodných objemů zásobního roztoku zkoušené látky s rekonstituovanou vodou a přidáním jednoho novorozence *Daphnia*

*magna*. Kontrolní sady byly připraveny umístěním jednoho novorozence *Daphnia magna* do rekonstituované vody v jamce mikrotitrační destičky (Obrázek 14). Pro každou zkoušenou a kontrolní sadu bylo použito celkem 20 jedinců rozdělených po jednom do jamek mikrotitrační destičky. Na každého jedince byly použity 2 ml zkoušeného roztoku.

Zkouška akutní toxicity zahrnovala předběžnou zkoušku. Předběžná zkouška sloužila k určení intervalu koncentrací pro základní zkoušku akutní toxicity a byla provedena ve dvou koncentračních hladinách (0,5 mg/l a 5 mg/l) totožných pro všechny tři zkoušené chloracetanilidové pesticidy.

### 3.4.2 Vyhodnocení zkoušky

Na konci zkušební doby byli spočítáni pohybliví jedinci *Daphnia magna* ve zkušebních i kontrolních sadách. Jedinci, kteří nebyli schopni se rozplavat během 15 sekund po mírném promíchání roztoku v jamce mikrotitrační destičky, byli považováni za imobilizované, a to i v případě že doposud pohybovali tykadly. Následně bylo vypočteno procento imobilizace  $I_i$  pro každou zkoušenou sadu ve vztahu k celkovému počtu použitých jedinců *Daphnia magna* (ČSN EN ISO 6341). Výpočet procenta imobilizace  $I_i$  byl proveden dle Rovnice 3:

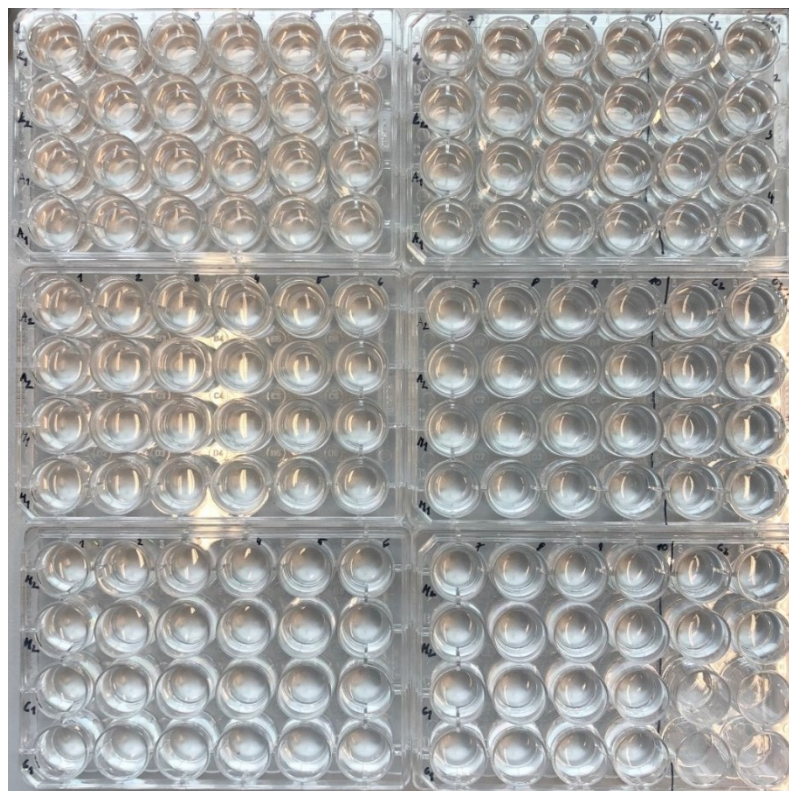
$$I_i = \frac{n_i}{n_c} \cdot 100 \quad (3)$$

kde

$n_i$  počet imobilizovaných jedinců *Daphnia magna* na konci zkoušky

$n_c$  celkový počet jedinců *Daphnia magna* nasazených pro danou zkušební sadu

Zkouška na vodním korýši *Daphnia magna* byla považována za platnou, pokud procento imobilizace v kontrolních sadách bylo menší nebo rovno 10 % a hodnota 24hEC<sub>50</sub> pro dichroman draselný se pohybovala v intervalu hodnot od 0,6 mg/l do 2,1 mg/l (ČSN EN ISO 6341).



Obrázek 14: Průběh akutní zkoušky toxicity na koryši *Daphnia magna* v mikrotitračních destičkách (foto autor)

### 3.5 Zkouška akutní toxicity na jednoděložné rostlině *Lemna minor*

#### 3.5.1 Pracovní postup

Standardizovanou metodiku pro zkoušku akutní toxicity na jednoděložné rostlině *Lemna minor* definuje norma ČSN EN ISO 20079 *Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (Lemna minor) – Zkouška inhibice růstu okřehek*. Podstatou zkoušky je kvantifikovat účinek zkoušené látky na vegetační růst jednoděložné rostliny *Lemna minor*. Jako zkušební organismus byl použit druh *Lemna minor* (Okřehek menší). Kultura používaná pro vlastní zkoušku toxicity se musela skládat z mladých, rychle rostoucích kolonií světle zelené barvy bez viditelného poškození. V rozmezí 7 až 10 dní před začátkem zkoušky toxicity bylo nutné zahájit předkultivaci kultury *Lemna minor*. Předkultivace probíhala za podmínek totožných s vlastní zkouškou toxicity. Pro zkoušky toxicity, kultivaci zásobních kultur i předkultivaci bylo používáno modifikované Steinbergovo médium připravené dle normy ČSN EN ISO 20079, jehož pH bylo upraveno na hodnotu  $5,5 \pm 0,2$  pomocí 1M roztoku HCl nebo 1M roztoku NaOH. Zásobní roztoky pro přípravu modifikovaného Steinbergova média byly sterilizovány v autoklávu při 120 °C po dobu 15 minut. Zásobní roztok  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (VIII) byl

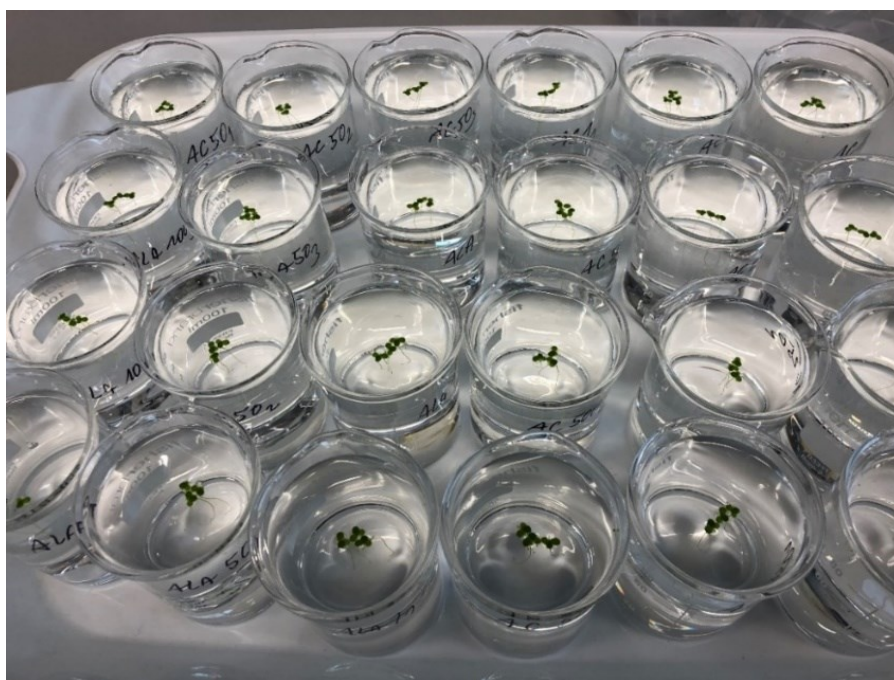
sterilizován membránovou filtrací (průměr pórů 0,1 μm). Složení modifikovaného Steinbergova média je uvedeno v Tabulce 7.

Zkouška toxicity probíhala při teplotě  $24 \pm 2$  °C po dobu 7 dní při kontinuálním osvětlení o světelné intenzitě 6500-10000 luxů. Jako zkušební nádoby byly použity skleněné kádinky o objemu 100 ml. Pro zabránění vzdušné kontaminace a odpařování růstového média byly kádinky překryty plastovým víčkem a umístěny do termoluminostatu. Jednotlivé replikáty stejného vzorku nebo kontrol byly během zkoušky rozmístěny náhodně tak, aby byl minimalizován vliv rozdílných podmínek způsobených různou světlenou intenzitou nebo teplotou na odlišných místech termoluminostatu.

*Tabulka 7: Složení modifikovaného Steinbergova média pro zkoušku toxicity na Lemna minor dle normy ČSN EN ISO 20079*

<i>Zásobní roztok</i>	<i>Chemikálie</i>	<i>Navážka/1000 ml</i>	<i>Objem zásobního roztoku na 1000 ml Steinbergerova média</i>
<b>I</b>	KNO <sub>3</sub>	17,5 g	20 ml
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,63 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5 g	
<b>II</b>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5 g	20 ml
<b>III</b>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	14,75 g	20 ml
<b>IV</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,12 g	1 ml
<b>V</b>	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,18 g	1 ml
<b>VI</b>	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,044 g	1 ml
<b>VII</b>	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,18 g	1 ml
<b>VIII</b>	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,76 g	1 ml
	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	1,50 g	

Zásobní roztoky zkoušených látek byly připraveny rozpuštěním v redestilované vodě. Zkoušené sady byly připraveny smícháním vhodných objemů zásobního roztoku zkoušené látky s modifikovaným Steinbergovým médiem. Celkový objem zkoušeného roztoku v jedné zkušební nádobě byl 100 ml. Kontrolní roztoky byly připraveny pouze z modifikovaného Steinbergova média. Do každé kontrolní i zkušební sady byly pomocí pinzety přeneseny tři kolonie *Lemna minor* se třemi stélkami (celkem 9 stélek), které splňovaly podmínky předkultivace, přičemž bylo dbáno na to, aby velikost použitých kolonií byla co nejhomogennější (Obrázek 15). Pro každou koncentraci zkoušené látky i kontrolních vzorků byly připraveny tři replikáty.



Obrázek 15: Průběh zkoušky akutní toxicity na jednoděložné rostlině *Lemna minor* (foto autor)

### 3.5.2 Vyhodnocení zkoušky

Hlavním měřeným parametrem u zkoušky akutní toxicity na jednoděložné rostlině *Lemna minor* byl počet stélek. Jako druhý měřený parametr byla pro tuto práci zvolena plocha porostlá stélkami hodnocená pomocí fotografického záznamu digitálního mikroskopu. Oba parametry byly kvantifikovány na začátku a na konci zkoušky.

Ze sledovaných parametrů zjištěných na začátku a na konci zkoušky byly nejprve vypočítány specifické růstové rychlosti  $r$  pro každý replikát zkoušené a kontrolní sady podle Rovnice 4 (ČSN EN ISO 20079):

$$r = \frac{\ln x_{t_2} - \ln x_{t_1}}{t_2 - t_1} \quad (4)$$

kde

$x_{t_1}$  hodnota sledovaného parametru v  $t_1$  dnech

$x_{t_2}$  hodnota sledovaného parametru v  $t_2$  dnech

$t_2 - t_1$  doba mezi  $x_{t_1}$  a  $x_{t_2}$  ve dnech

Poté byla vypočítána inhibice růstové rychlosti v procentech  $i_r$  pro každou zkoušenou koncentraci podle Rovnice 5 (ČSN EN ISO 20079):

$$i_r = \frac{r_c - r_t}{r_c} \cdot 100 \quad (5)$$

kde

$r_c$  průměrná specifická růstová rychlost kontroly v  $d^{-1}$

$r_t$  průměrná specifická růstová rychlost vzorků nebo jejich ředění v  $d^{-1}$

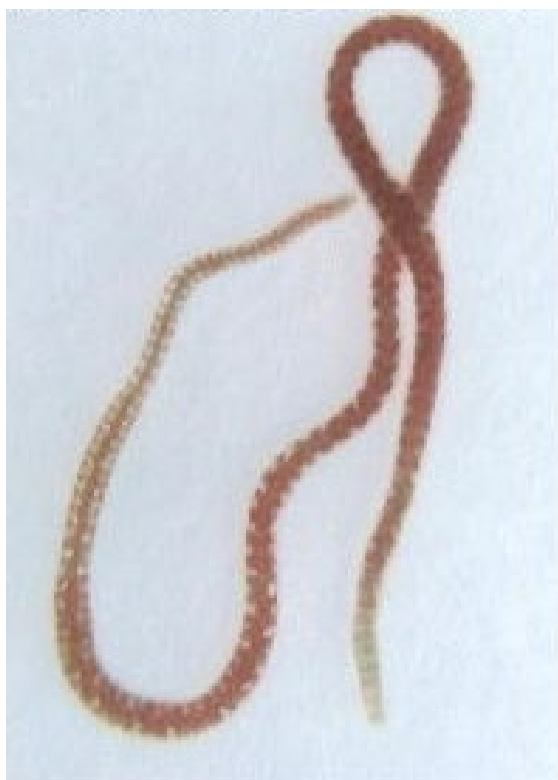
Zkouška na jednoděložné rostlině *Lemna minor* byla považována za platnou, pokud se počet stélek v kontrolních sadách za dobu 7 dní zvýšil minimálně sedmkrát.

### 3.6 Zkouška akutní toxicity na kroužkovci *Lumbriculus variegatus*

Sedimenty jsou stanovištěm a zdrojem potravy pro různé bentické organismy, a proto hrají důležitou roli ve vodních ekosystémech. Bentické organismy jsou základem potravního řetězce, takže kontaminace sedimentů může ovlivnit další trofické úrovně. Znečišťující látky vázané na sediment tak mohou po příjmu těmito druhy vstoupit do lidského potravního řetězce.

Kroužkovec *Lumbriculus variegatus* byl vybrán jako zástupce bentických organismů pro zkoušky akutní toxicity látek, které se mohou nacházet v sedimentech. *Lumbriculus variegatus* byl vybrán pro svoji snadnou dostupnost, laboratorní chov a širokou distribuci v životním prostředí (Galluba et al., 2012).

*Lumbriculus variegatus* (Obrázek 16) je malý sladkovodní mnohoštětinatcovitý červ (řád *Lumbriculida*, čeleď *Lumbriculidae*), který žije v mělčinách sladkovodních rybníků, jezer a bažin. Tento organismus je široce rozšířen jak v Evropě, tak Severní Americe. Vodní máloštětinatci jsou důležitými členy sladkovodních společenstev, kde pomáhají při rozkladu organických materiálů v sedimentu, a také slouží jako zdroj potravy pro vyšší trofické úrovně (Gara et al., 2004).



Obrázek 16: *Lumbriculus variegatus* (převzato z Garcia et al., 2021)

### 3.6.1 Pracovní postup

Zkouška akutní toxicity na kroužkovci *Lumbriculus variegatus* není definována žádnou normovanou metodou. Směrnice OECD 225 definuje pouze metodiku pro zkoušku chronické toxicity trvající 28 dní. Podstatou zkoušky na kroužkovci *Lumbriculus variegatus* je vystavení zkušebních organismů účinku zkoušené látky aplikovaných do sedimentu v systému sediment-voda (OECD 225). Při zkoušce akutní toxicity na kroužkovci *Lumbriculus variegatus* bylo vycházeno z principů popsaných v OECD 225 (OECD 225). Jako zkušební organismy byli použiti kroužkovci *Lumbriculus variegatus* podobného fyziologického stavu z laboratorního chovu Ústavu environmentálního a chemického inženýrství. Před zahájením zkoušky bylo nezbytné provést synchronizaci jedinců, aby se minimalizovala nekontrolovaná reprodukce a regenerace. Reprodukce je u *Lumbriculus variegatus* nepohlavní, kdy dochází ke vzniku dvou fragmentů, které se neživí do té doby, dokud nedojde k regeneraci hlavy. Z tohoto důvodu nedochází k působení látky na zkušební organismus nepřetržitě po celou trvání expozice. Dva týdny před zahájením zkoušky akutní toxicity byly jedinci *Lumbriculus variegatus* uměle fragmentováni, aby došlo k jejich synchronizaci. K tomuto účelu byli vybráni dospělí jedinci, kteří byli umístěni na podložní skličko

a skalpelem rozdělení. Přední a zadní konec jednoho jedince byl oddělen a obě části ponechány v kádince s rekonstituovanou vodou. Regenerace nových hlav byla indikována v případě zavrtávání synchronizovaných jedinců do substrátu. V takovém případě bylo přepokládáno, že se zkušební organismy nacházejí v podobném fyziologickém stavu. To znamená, že pokud během zkoušky dojde u synchronizovaných červů k regeneraci prostřednictvím morfalaxe, předpokládá se, že většina zkušebních organismů bude rovnoměrně vystavena účinku obohaceného sedimentu (*OECD 225*).

Zkouška probíhala při teplotě  $20 \pm 2$  °C po dobu 96 hodin, bez osvětlení. V případě neprospívání zkušebních organismů byl zaveden světelný režim 16 hodin světlo/8 hodin tma o světelné intenzitě 100-1000 luxů. Jako zkušební nádoby byly použity kádinky o objemu 250 ml, které byly umístěny v termoluminostatu. Zkouška probíhala pouze ve vodné fázi, která byla tvořena rekonstituovanou vodou, jejíž složení je uvedeno v Tabulce 4.

Zkušební sady byly připraveny smícháním vhodných objemů zásobních roztoků zkoušené látky s rekonstituovanou vodou nebo se zásobními roztoky solí pro přípravu rekonstituované vody a přidáním deseti jedinců *Lumbriculus variegatus*. Kontrolní sady byly připraveny umístěním deseti jedinců *Lumbriculus variegatus* do vhodného objemu rekonstituované vody ve zkušební nádobě. Na každého jedince bylo použito 10 ml rekonstituované vody (tj. celkový objem 100 ml na 10 jedinců v jedné zkušební nádobě). Pro každou zkoušenou i kontrolní sadu byly připraveny dva replikáty, tedy 20 jedinců rozdělených po deseti do dvou zkušebních nádob.

Vzhledem k chybějícím informacím o akutní toxicitě chloracetanilidových pesticidů na *Lumbriculus variegatus* byla nejprve provedena limitní zkouška sloužící pro odhad toxicity. Koncentrace pesticidů v limitní zkoušce byla 97 mg/l. Zkušební sady byly připraveny obohacením zásobního roztoku zkoušeného pesticidu v redestilované vodě zásobními roztoky solí používaných k přípravě rekonstituované vody. K 96,95 ml zásobního roztoku pesticidu byl přidán 1 ml zásobního roztoku  $\text{CaCl}_2$ , 0,78 ml zásobního roztoku  $\text{KCl}$ , 0,77 ml zásobního roztoku  $\text{NaHCO}_3$  a 0,5 ml zásobního roztoku  $\text{MgSO}_4$ . Ve druhé limitní zkoušce byla koncentrace pesticidů 1 mg/l, připravena smícháním 10 ml zásobního roztoku příslušného pesticidu o koncentraci 10 mg/l s 90 ml rekonstituované vody.



### 3.6.2 Vyhodnocení zkoušky

Na konci zkušební doby byli spočítáni živí a uhynulí jedinci *Lumbriculus variegatus* ve zkušebních i kontrolních sadách. Následně bylo vypočteno procento úmrtnosti  $I_u$  pro každou zkoušenou sadu ve vztahu k celkovému počtu použitých jedinců *Lumbriculus variegatus*. Výpočet procenta úmrtnosti  $I_l$  byl proveden dle Rovnice 7:

$$I_u = \frac{n_l}{n_c} \cdot 100 \quad (7)$$

kde

$n_l$  počet uhynulých jedinců *Lumbriculus variegatus* na konci zkoušky

$n_c$  celkový počet jedinců *Lumbriculus variegatus* nasazených pro danou zkušební sadu

### 3.7 Interpretace výsledků zkoušek toxicity

Podstatou zkoušek akutní toxicity je stanovení střední účinné koncentrace  $EC_{50}$ , která představuje koncentraci zkoušené látky způsobující 50% snížení sledovaného parametru ve vztahu ke kontrolním vzorkům (Ambrožová, 2003). Hodnoty  $EC_{50}$  představují toxikologická data odvozená z laboratorní zkoušky provedené za definovaných podmínek. Mohou určit potenciální riziko zkoušené látky, nicméně nemohou přímo předpovídat účinek dané látky v přirozeném prostředí (ČSN EN ISO 8692).

Pro určení intervalu koncentrací zkoušené látky pro provedení základního testu toxicity byly provedeny předběžné testy. Základní test pro stanovení parametru  $EC_{50}$  byl poté naplánován na základě výsledků předběžného testu. Při základním testu byly zkušební organismy vystaveny koncentracím zkoušené látky v geometrických řadách, které zahrnovaly minimálně pět koncentračních úrovní, aby bylo získáno dostatečné množství dat pro regresní analýzu.

Vyhodnocení zkoušek toxicity a zjištění hodnot  $EC_{50}$  bylo založeno na probitové analýze. Procentuální inhibice stanovené ze sledovaných parametrů u jednotlivých zkoušek akutní toxicity byly převedeny na pravděpodobností probitové jednotky. Následně byl pomocí programu Excel sestrojen graf, kde na ose  $x$  byly vyneseny přirozené logaritmy zkoušené koncentrace, a na osu  $y$  odpovídající probitové jednotky. Pomocí lineární regrese byla vyjádřena rovnice závislosti, ze které byla vypočtena hodnota efektivní koncentrace  $EC_{50}$ , a to tak, že za  $y$  byla dosazena hodnota odpovídající probitu 50% inhibice a vypočtena hodnota  $x$ , která odpovídala logaritmu zkoušené koncentrace. Po odlogaritmování byla získána koncentrace látky odpovídající parametru  $EC_{50}$  (Ambrožová, 2003).

Další způsob vyhodnocení zkoušek toxicity je pomocí vhodného statistického programu, přičemž v této práci byl využíván program *GraphPad Prism*. Importovanými daty byly logaritmy zkoušených koncentrací, které byly dosazeny za hodnoty  $x$ , a hodnoty procentuálních inhibic odpovídající jednotlivým zkušebními sadám, které byly dosazeny za hodnoty  $y$ . Data se analyzují metodou Nonlinear Regression – Dose-Response Stimulation, a to za využití čtyř modelů rovnic nelineární regrese. Jednotlivé výstupy analýz jsou mezi sebou porovnány a zvoleny ty rovnice regrese, které nejlépe prokládají data a poskytují přijatelnou hodnotu  $EC_{50}$  (*SOP R02/21/LE*).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Zkoušky s referenčními látkami

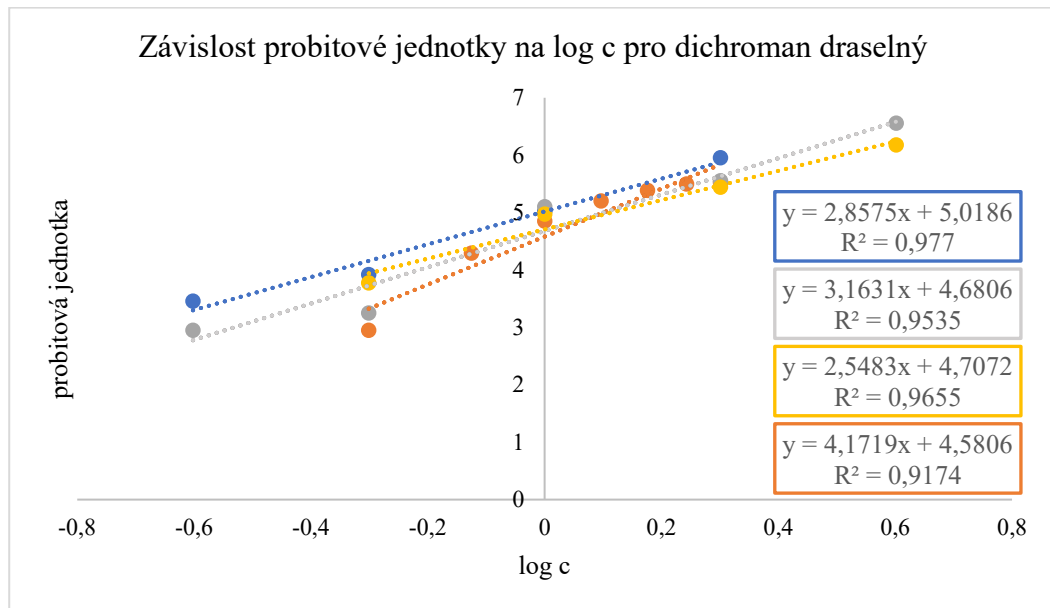
Účelem zkoušky s referenčními látkami je ověření správného postupu zkoušky a kontrola citlivosti zkušebních organismů. Při zkouškách toxicity je mimořádně důležité udržovat zdravé kultury zkušebních organismů, aby se předešlo změnám jejich citlivosti. K ověření platnosti zkušebního systému se doporučuje použít minimálně jednu referenční látku. Zkouška s referenční látkou by měla být provedena minimálně 2x ročně. Nejčastěji používanou referenční látkou při ekotoxikologickém testování je dichroman draselný (*Kikuchi et al., 2017*).

Referenční zkouška pro zelenou řasu *Chlorella kessleri* pro uspořádání v Erlenmeyerových baňkách byla provedena s referenčními látkami dichromanem draselným a síranem zinečnatým heptahydrátem. Pro obě referenční látky byly provedeny čtyři nezávislé zkoušky v různých časových intervalech.

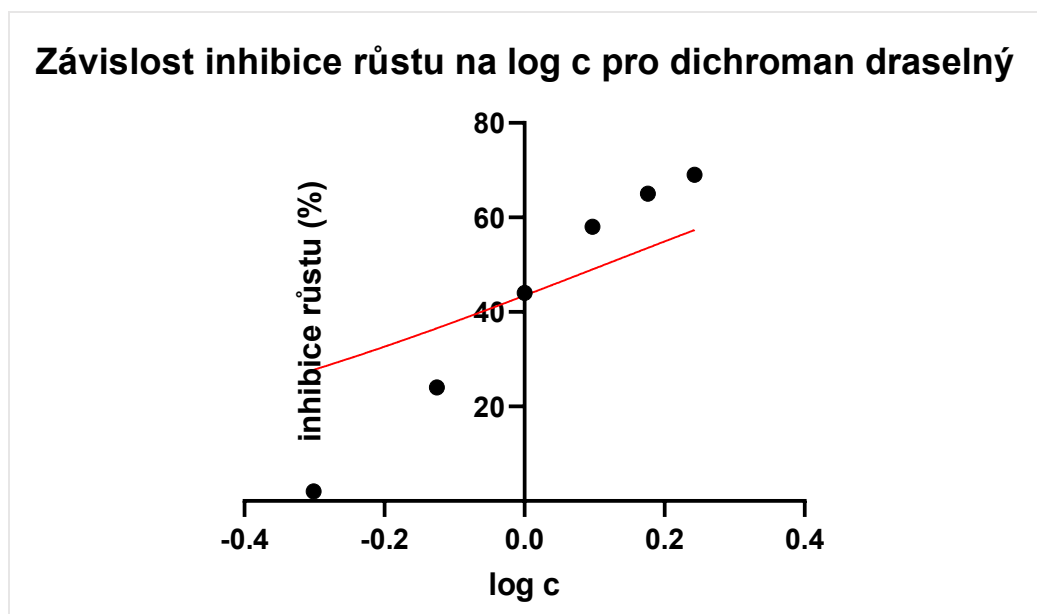
U dichromanu draselného byly zkoušky provedeny v časovém rozmezí dvou měsíců. Pro všechny zkoušky byl použit totožný zásobní roztok dichromanu draselného připravený v redestilované vodě o koncentraci 1000 mg/l. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že stáří roztoku dichromanu draselného nemá vliv na toxicitu, neboť výsledky jednotlivých zkoušek poskytly srovnatelné výsledky.

V každé zkoušce byly testovány minimálně čtyři koncentrační úrovně, nejméně jednou byly ve zkoušce zahrnuty následující koncentrace 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75; 2 a 4 mg/l (Graf 1). Jako nejvhodnější se ukázalo použití geometrické koncentrační řady s koeficientem 2. Při menších rozdílech ve zkoušených koncentracích jednotlivé hodnoty procentuálních inhibic růstové rychlosti splývaly, čímž bylo prokázáno, že zelená řasa *Chlorella kessleri* není natolik citlivý organismus, aby bylo možné zkouškou zaznamenat rozdíly v toxicitě blízkých koncentrací zkoušené látky. Nicméně i přes tuto skutečnost byla u všech provedených zkoušek zachována lineární závislost mezi zkoušenou koncentrací a procentuální inhibicí růstové rychlosti. Parament 72hEC<sub>50</sub> pro dichroman draselný byl probitovou analýzou stanoven na hodnotu 1,21±0,11 mg/l. Vyhodnocením výsledků prostřednictvím statistického programu *GraphPad Prism* s využitím nelineární regrese byla hodnota parametru 72hEC<sub>50</sub> pro dichroman draselný stanovena na 1,30 mg/l (Graf 2). *Rojíčková-Padrťová and Maršálek (1999)* ve studii zaměřené na porovnání selektivity a citlivosti jednotlivých řasových druhů vhodných pro

testy toxicity stanovili parametr  $72hEC_{50}$  pro dichroman draselný na zelené řase *Chlorella kessleri* na hodnotu 0,575 mg/l.



**Graf 1:** Závislost probitové jednotky na logaritmu koncentrace dichromanu draselného, referenční zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v Erlenmeyerových baňkách (zpracováno pomocí programu Excel)



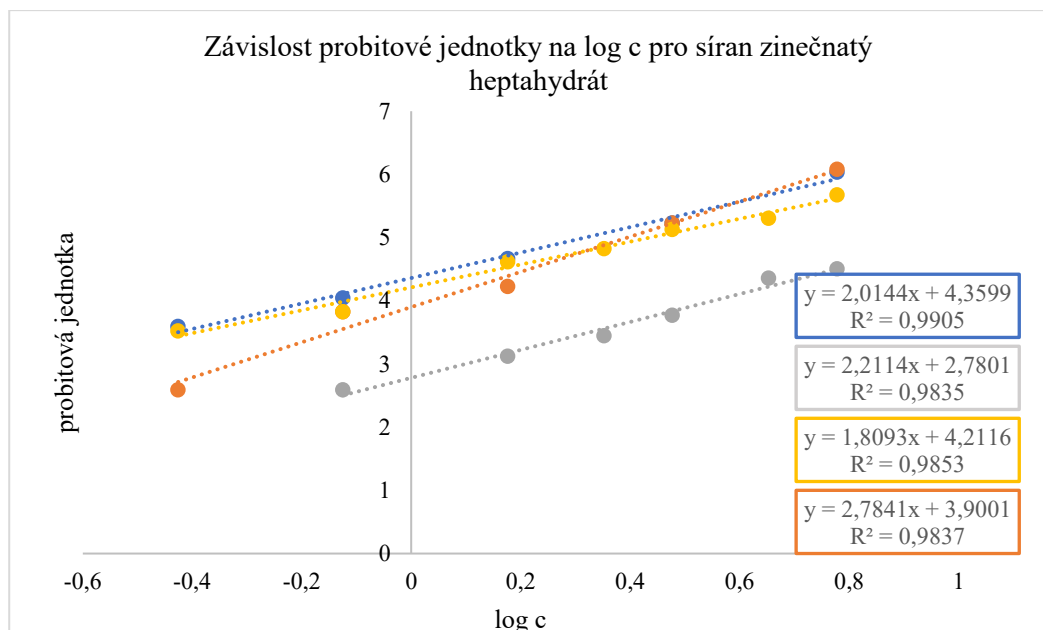
**Graf 2:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace dichromanu draselného, referenční zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v Erlenmeyerových baňkách (zpracováno pomocí programu GraphPad Prism)

U síranu železnatého heptahydrátu byly zkoušky provedeny v časovém rozmezí deseti měsíců. Pro tři zkoušky byl připraven vždy nový zásobní roztok, a to v den zahájení zkoušky. Pro zkoušku zahájenou 1. 4. 2022 byl však použit zásobní roztok připravený 30. 11. 2021, tedy přibližně 4 měsíce starý, který byl po celou dobu skladován při teplotě 4 °C v chladničce. Koncentrace zásobního roztoku byla vždy 1000 mg/l.

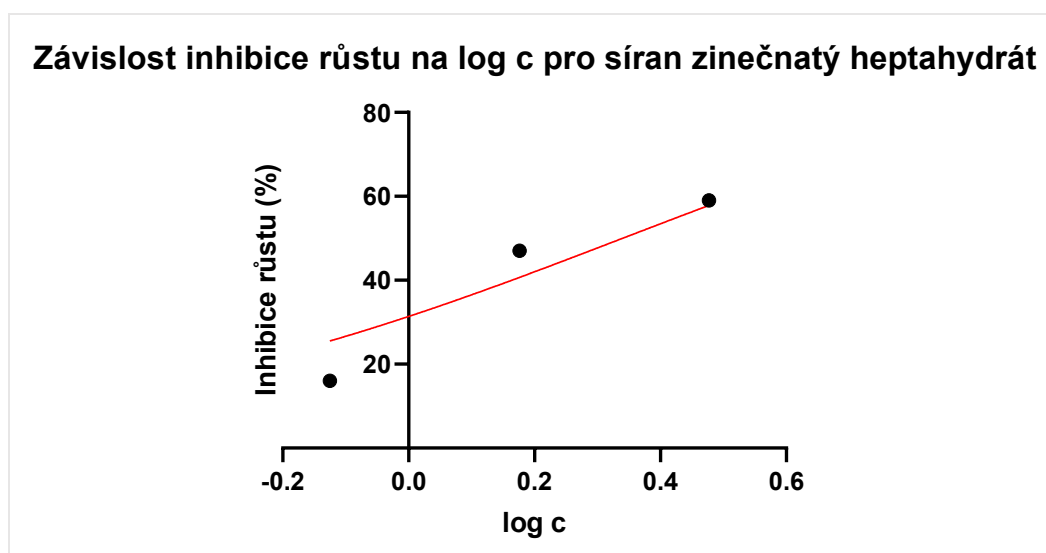
V každé zkoušce bylo testováno minimálně pět koncentračních úrovní, nejméně jednou byly ve zkoušce zahrnuty následující koncentrace 0,375; 0,75; 1,5; 2,25; 3; 4,5 a 6 mg/l (Graf 3). Na rozdíl od zkoušek s dichromanem draselným mohl být v geometrické koncentrační řadě použit i nižší koeficient než 2, aniž by získané hodnoty procentuálních inhibic růstové rychlosti splývaly. Parament 72hEC<sub>50</sub> pro síran železnatý heptahydrát byl probitovou analýzou stanoven na hodnotu 2,43±0,27 mg/l, a to při vyloučení výsledku ze zkoušky provedené dne 1. 4. 2022. Podobně hodnota 72hEC<sub>50</sub> pro síran zinečnatý heptahydrát byla pomocí statistického programu stanovena na 2,19 mg/l (Graf 4), při vyloučení odlehlé hodnoty. Také *Rojíčková-Padrťová and Maršálek (1999)* získali podobnou hodnotu 72hEC<sub>50</sub> pro síran zinečnatý na zelené řase *Chlorella kessleri*, a to 2,31 mg/l.

Při výše zmíněné zkoušce ze dne 1. 4. 2022 vedlo stáří zásobního roztoku k významnému zvýšení paramentu 72hEC<sub>50</sub>, a to na hodnotu 10,06 mg/l. Na rozdíl od dichromanu draselného mělo dlouhodobé skladování zásobního roztoku síranu zinečnatého heptahydrátu vliv na toxicitu. Tento výrazný nárůst paramentu 72hEC<sub>50</sub> mohl být způsoben rozkladem či případnou adsorpcí látky na stěnách nádoby, čímž se koncentrace síranu zinečnatého heptahydrátu v roztoku během skladování snížila. To vedlo ke zvýšení parametru 72hEC<sub>50</sub>, indikující nižší toxicitu zkoušené látky. Nicméně i přesto byla u všech provedených testů zachována lineární závislost mezi zkoušenou koncentrací a procentuální inhibicí růstové rychlosti, podobně jako u zkoušek s dichromanem draselným.

Na základě výsledků získaných při zkouškách s referenčními látkami na zelené řase *Chlorella kessleri* byla potvrzena správnost postupu navrženého pro provedení zkoušky toxicity v Erlenmeyerových baňkách. Vzhledem k tomu, že se hodnoty EC<sub>50</sub> vyhodnocené probitovou analýzou a nelineární regresí pomocí statistického programu *GraphPad Prism* mezi sebou příliš nelišily, bylo v dalších experimentech přistoupeno k vyhodnocení parametru EC<sub>50</sub> pouze pomocí statistického programu.



**Graf 3:** Závislost probitové jednotky na logaritmu koncentrace síranu zinečnatého heptahydrátu, referenční zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v Erlenmeyerových baňkách (zpracováno pomocí programu Excel)



**Graf 4:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace síranu zinečnatého heptahydrátu, referenční zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v Erlenmeyerových baňkách (zpracováno pomocí programu GraphPad Prism)

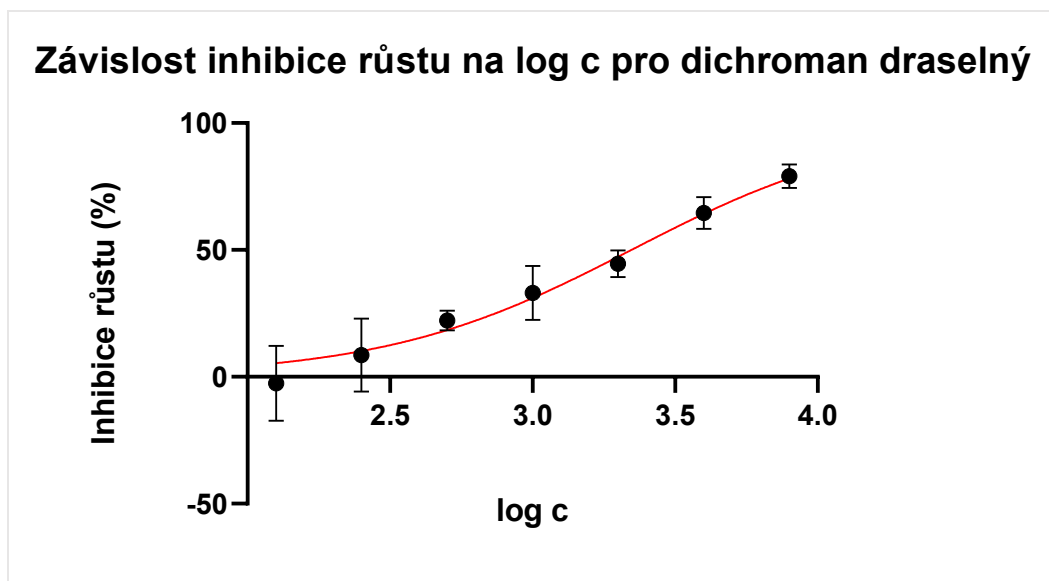
K testování akutní toxicity je možné využít různé druhy zelených řas. Nicméně hodnoty  $EC_{50}$  pro jednu referenční látku zjištěné na různých zkušebních organismech se výrazně liší. V Tabulce 8 jsou uvedeny hodnoty  $EC_{50}$  pro dvě referenční látky, dichroman draselný a síran zinečnatý, získané na třech různých druzích zelených řas (Rojíčková-Padrťová and Maršálek, 1999).

**Tabulka 8:** Hodnoty  $EC_{50}$  pro referenční látky dichroman draselný a síran zinečnatý pro různé druhy zelených řas (zpracováno z Rojíčková-Padrťová and Maršálek, 1999)

<i>Zkušební organismus</i>	<i>EC<sub>50</sub> (mg/l)</i>	
	<i>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></i>	<i>ZnSO<sub>4</sub></i>
<i>Chlorella kessleri</i>	0,58	2,30
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	0,40	0,80
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	2,53	0,81

Rozdílná citlivost různých druhů zelených řas vůči jedné referenční látce může být způsobena odlišným složením buněčné stěny, ale také rozdíly v aktivaci obranných mechanismů. Z toho vyplývá, že hodnoty  $EC_{50}$  publikované v odborné literatuře, které byly získány na různých druzích zelených řas, nelze zobecnit pro celý rod (Machado and Soares, 2020).

Referenční zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v miniaturizovaném uspořádání v mikrotitračních destičkách byla provedena s referenční látkou dichromanem draselným. Rozsah testovaných koncentrací byl obdobný těm, které byly využity u zkoušky provedené v Erlenmeyerových baňkách, konkrétně se jednalo o koncentrace 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 a 8 mg/l (Graf 5). Parament  $72hEC_{50}$  pro dichroman draselný byl stanoven na hodnotu 2,22 mg/l. Odlišná hodnota zjištěná pro dichroman draselný na zelené řase *Chlorella kessleri* při zkouškách provedených v odlišných uspořádáních není překvapující a může být přičtena právě lišícím se podmínkám v průběhu zkoušky. Jak uvádí Machado and Soares (2019) výkyvy v zjištěných hodnotách  $EC_{50}$  lze přičítat konkrétním použitým podmínkám při vlastním zkoušce toxicity, kterými jsou zejména počáteční hustota buněk, doba expozice vůči zkoušeným látkám, použité růstové médium, teplota, způsob míchání kultury nebo intenzita světelného záření.



**Graf 5:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace dichromanu draselného, referenční zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v mikrotitrační destičce (zpracováno pomocí programu GraphPad Prism)

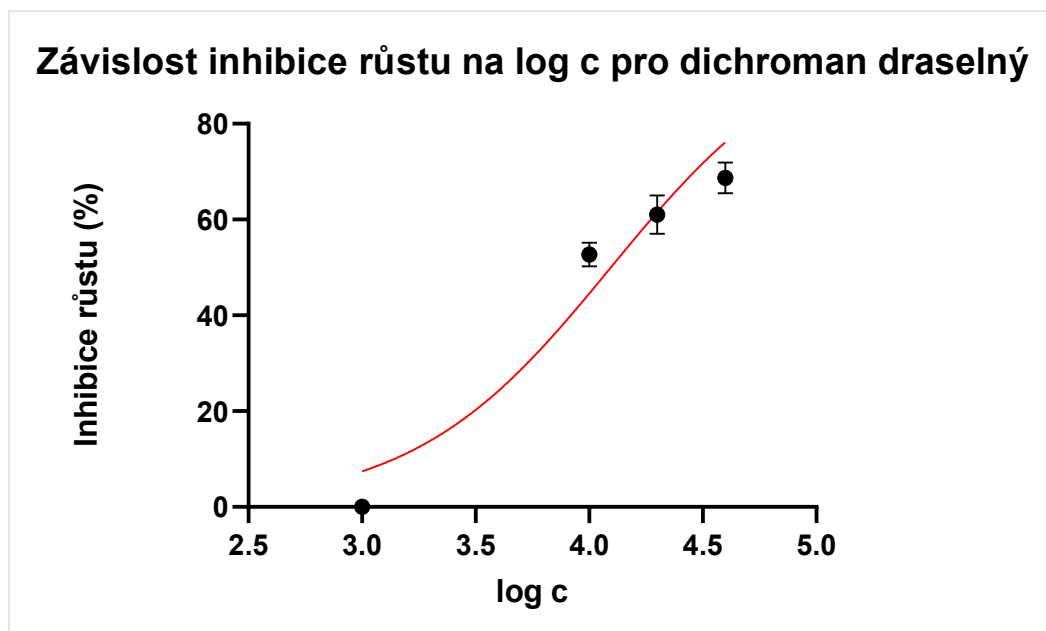
Hodnoty 72hEC<sub>50</sub> pro dichroman draselný při referenční zkoušce se musí pohybovat v rozmezí koncentrací 0,5-3 mg/l (*SOP R02/21/LE*). Tato podmínka byla i přes získání odlišných hodnot splněna jak pro zkoušku v Erlenmeyerových baňkách, tak i pro miniaturizované uspořádání zkoušky v mikrotitračních destičkách.

Předepsanou referenční látkou pro ověření citlivosti *Daphnia magna* je dichroman draselný, přičemž zkouška pro stanovení 24EC<sub>50</sub> má být provedena jednou měsíčně. Taktéž je nutné brát v úvahu, že na základě získané hodnoty pro dichroman draselný nelze posuzovat citlivost *Daphnia magna* na ostatní látky. Hodnota 24EC<sub>50</sub> pro dichroman draselný se má pohybovat v rozmezí koncentrací 0,6-2,1 mg/l (*ČSN EN ISO 6341*). Referenční zkouška s dichromanem draselným byla provedena ve třech nezávislých opakováních. Byly testovány následující koncentrace 0,1; 0,68; 1; 1,76 a 2 mg/l. Nicméně žádný z referenčních testů na *Daphnia magna* nesplnil jednu z podmínek kritérií platnosti definované normou ČSN EN ISO 6341, a to, že procento imobilizace kontrolních vzorků je menší nebo se rovná 10 % (*ČSN EN ISO 6341*). Vzhledem k tomu, že se ani v jednom případě nepodařilo udržet jednice v kontrolních sadách v životaschopném stavu, zkoušku nebylo možné vyhodnotit.

Rovněž pro ověření citlivosti a současně kontrolu postupu zkoušky na jednoděložné rostlině *Lemna minor* byl jako referenční látka použit dichroman draselný. Hodnota paramentu 168EC<sub>50</sub> musí být v rozmezí koncentrací 10-60 mg/l (*SOP T03/21/LE*). Referenční zkouška s dichromanem draselným byla provedena v jednom opakování.



Byly testovány následující koncentrace 1; 10; 20; 40 a 80 mg/l (Graf 6). Parametr  $168hEC_{50}$  pro dichroman draselný byl stanoven na hodnotu 12,45 mg/l, který leží v rozmezí určených koncentrací.



**Graf 6:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace dichromanu draselného, referenční zkouška na jednoděložné rostlině *Lemna minor* (zpracováno pomocí programu GraphPad Prism)

Referenční test na kroužkovci *Lumbirculus variegatus* nebyl proveden, neboť metodika akutního testu toxicity není standardizována, čímž chybí i informace o vhodné referenční látce i koncentračním rozmezí, které by určilo případná kritéria platnosti zkoušky akutní toxicity.

## 4.2 Stanovení akutní toxicity chloracetanilidových pesticidů

Následující podkapitoly shrnují výsledky zkoušek akutní toxicity chloracetanilidových pesticidů na jednotlivých zkušebních organismech. Koncentrační rozsah pro zkoušky toxicity byl navržen na základě již publikovaných hodnot  $EC_{50}$  a případně upravován dle získaných výsledků.

Hodnoty  $EC_{50}$ , které byly získány pro jednotlivé pesticidy, naznačují jejich relativní toxicitu vůči jednotlivým testovacím organismům. Nicméně, chloracetanilidové pesticidy, podobně jako ostatní kontaminanty, se v životním prostředí vyskytují zřídka samostatně. Mnohem častěji se totiž vyskytují v prostředí jako více či méně složité směsi. Z tohoto důvodu může následně docházet k aditivním nebo interaktivním toxickým účinkům takové směsi (Sigurnjak et al., 2020).

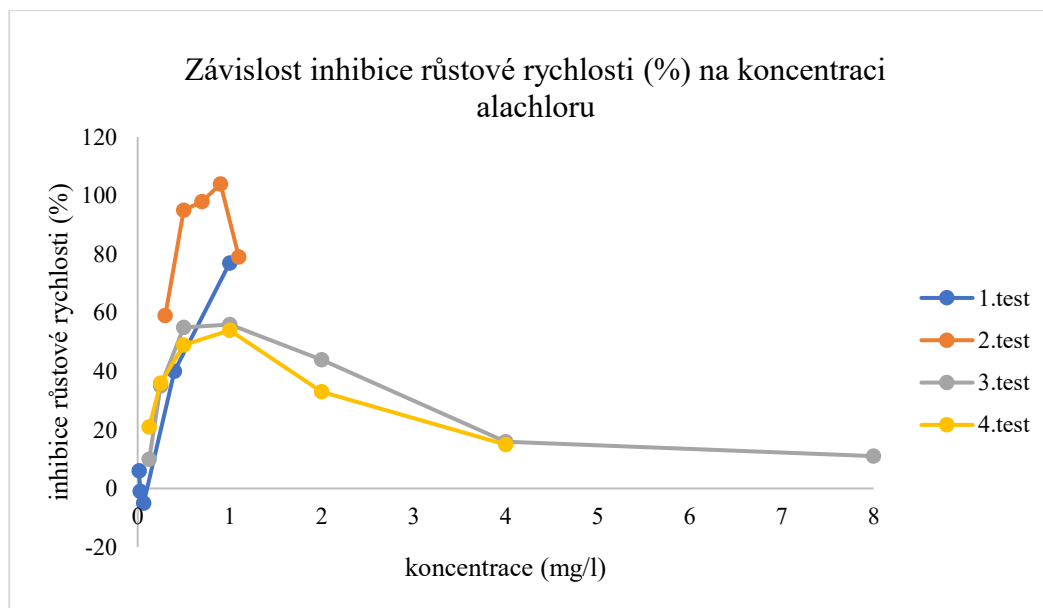
### 4.2.1 *Chlorella kessleri* – zkouška akutní toxicity

Stanovení hodnoty  $EC_{50}$  chloracetanilidových pesticidů na zelené řase *Chlorella kessleri* bylo provedeno jak v Erlenmeyerových baňkách, tak v miniaturizovaném uspořádání v mikrotitračních destičkách.

#### 4.2.1.1 Stanovení hodnoty $EC_{50}$ alachloru

##### Provedení v Erlenmeyerových baňkách

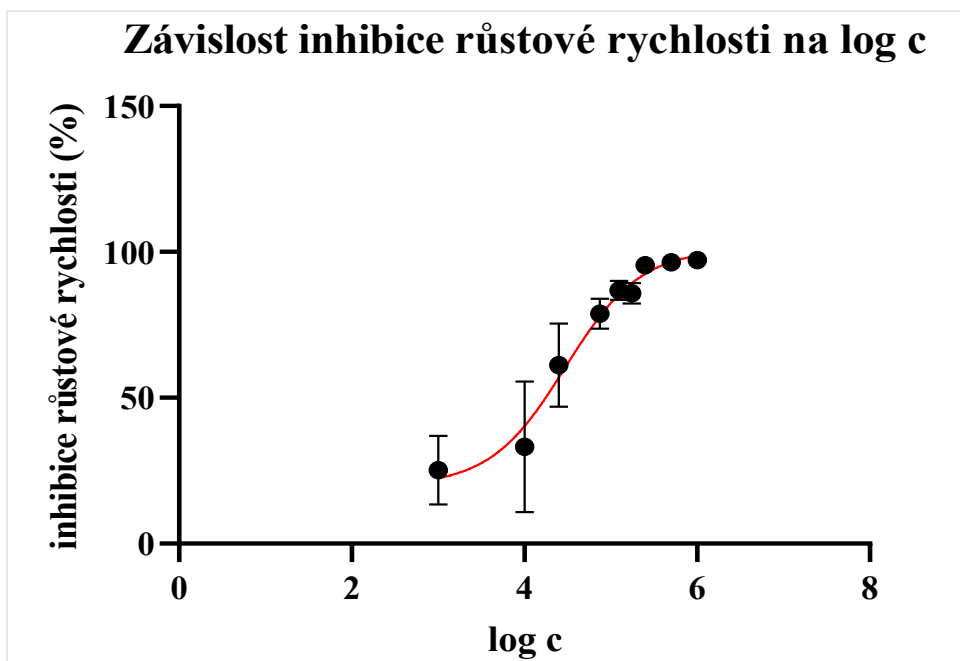
Ze zkoušek akutní toxicity alachloru na zelené řase *Chlorella kessleri* v Erlenmeyerových baňkách nebylo možné stanovit hodnotu  $EC_{50}$ . Graf 7 vyjadřuje závislost procentuální inhibice růstové rychlosti na zkoušené koncentraci alachloru ve čtyřech provedených opakováních zkoušky. U tohoto typu závislosti by měla být křivka lineární, tj. čím vyšší koncentrace alachloru, tím vyšší procento inhibice růstové rychlosti. Tuto závislost bylo ale možné částečně pozorovat pouze u zkoušky označené jako test 1. U dalších provedených zkoušek (označených jako test 2-4) byla sice u nižších koncentrací pozorována požadovaná závislost, nicméně se vzrůstající koncentrací alachloru byl pozorován opačný efekt, projevující se snížením procentuální inhibice růstové rychlosti se zvyšující se koncentrací alachloru. Tyto výsledky indikují, že pro zkoušku měly být použity nižší koncentrační úrovně odpovídající oblastem, u kterých bylo možné pozorovat požadovanou závislost s procentuální inhibicí růstové rychlosti. Přestože bylo zkoušeno použití různých koncentračních rozmezí, nepodařilo se odhadnout správný koncentrační rozsah, který by zajistil stanovení hodnoty  $EC_{50}$ .



**Graf 7:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na zkoušené koncentraci alachloru, zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v Erlenmeyerových baňkách (zpracováno pomocí programu Excel)

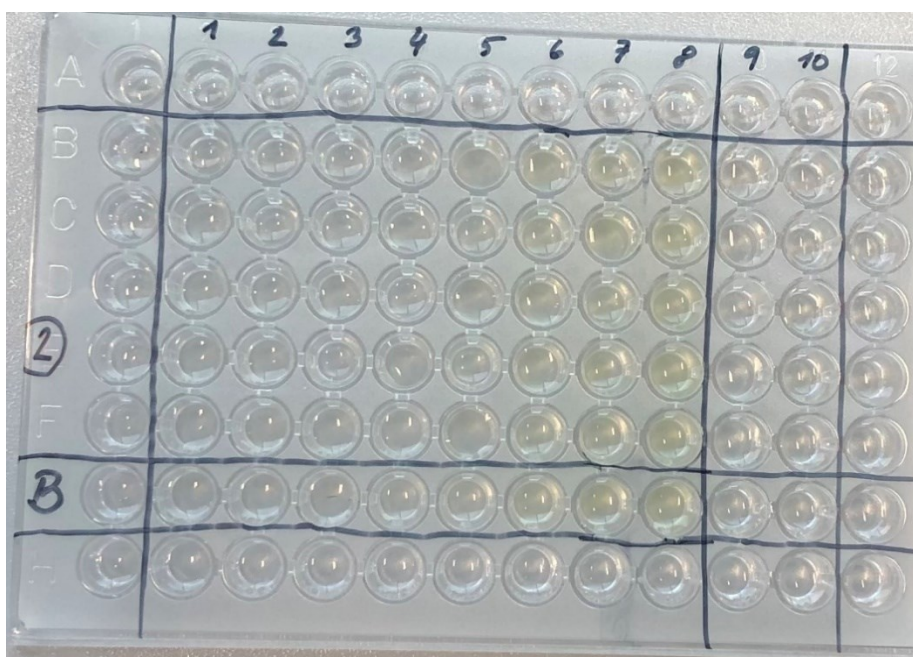
### Provedení v mikrotitračních destičkách

Zkouška akutní toxicity alachloru na zelené řase *Chlorella kessleri* v mikrotitračních destičkách byla provedena ve dvou opakováních. Zkoušené koncentrace v prvním experimentu byly v rozmezí od 0,125 do 32 mg/l s koeficientem 2. Jelikož toto koncentrační rozmezí nebylo dostatečně rozsáhlé ke stanovení hodnoty  $EC_{50}$ , bylo ve druhém experimentu testováno širší koncentrační rozmezí, zahrnující tyto koncentrace: 1; 0,5; 0,25; 0,175; 0,125; 0,075; 0,025 a 0,01 mg/l (Graf 8). Hodnota  $72hEC_{50}$  byla pro alachlor stanovena na hodnotu 29,75  $\mu\text{g/l}$ . Ve studii Fairchild *et al.* (1998) byla hodnota  $96hEC_{50}$  pro alachlor na zelené řase *Chlorella vulgaris* stanovena na hodnotu 26  $\mu\text{g/l}$ . Přičemž *Chlorella vulgaris* byla vůči alachloru druhým nejcitlivějším druhem zelené řasy z celkem šesti, které byly ve studii využity.



**Graf 8:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace alachloru, zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v mikrotitrační destičce (zpracováno pomocí programu GraphPad Prism)

Provedení zkoušky pro alachlor je znázorněno na Obrázku 17. Roztok alachloru byl pipetován do jamek 1-8, přičemž nejvyšší zkoušená koncentrace byla v jamkách označených číslem 1, zatímco nejnižší v jamkách označených číslem 8. Z Obrázku 17 je patrné, že čím nižší je koncentrace alachloru, tím vyšší je nárůst řasové kultury, což se vizuálně projevuje výrazně zelenějším zbarvením.

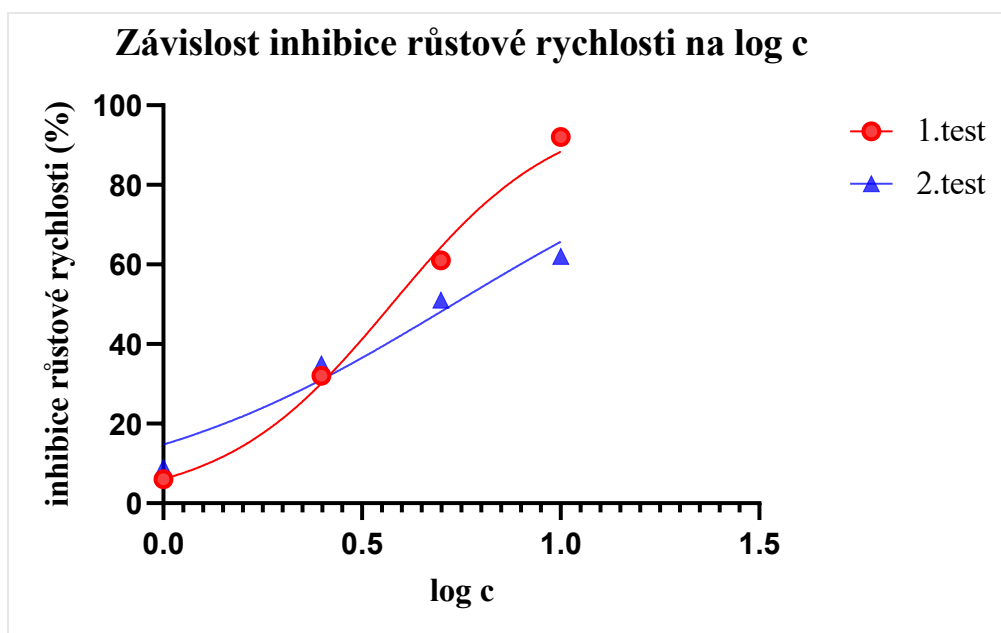


**Obrázek 17:** Průběh akutního testu toxicity pro alachlor na zelené řase *Chlorella kessleri* v mikrotitrační destičce (foto autor)

#### 4.2.1.2 Stanovení hodnoty $EC_{50}$ metolachloru

##### Provedení v Erlenmeyerových baňkách

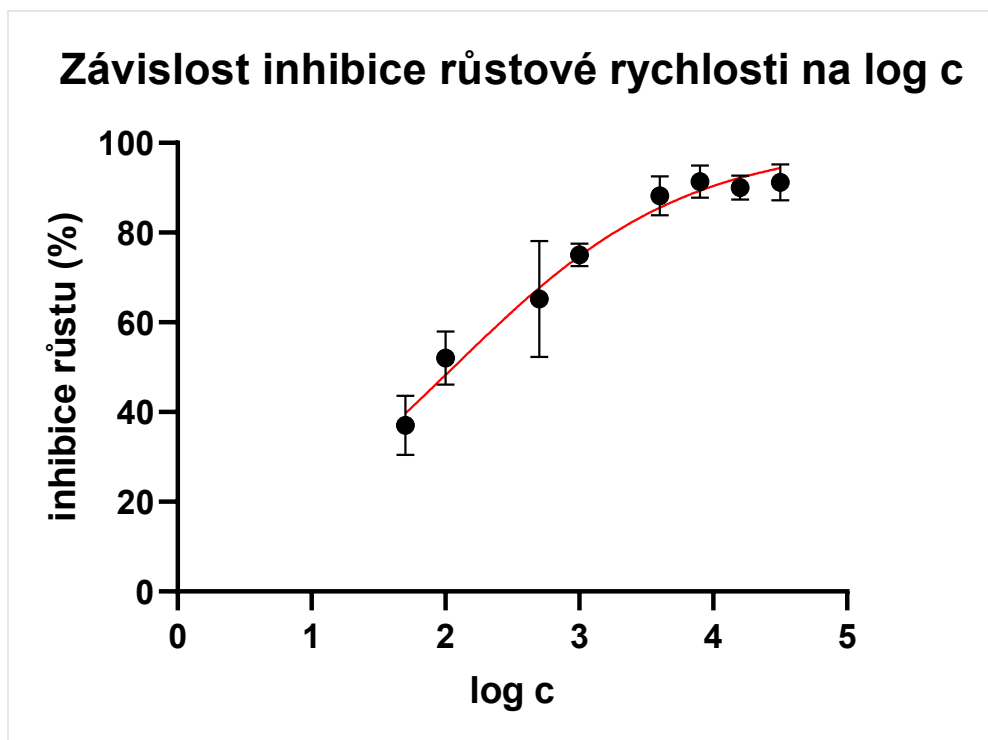
Zkouška akutní toxicity metolachloru na zelené řase *Chlorella kessleri* v Erlenmeyerových baňkách poskytla ve dvou opakováních odlišné hodnoty 72h $EC_{50}$ . V prvním experimentu byla tato hodnota stanovena na 3,76 mg/l, ve druhém experimentu na 5,43 mg/l (Graf 9). V obou zkouškách byly testovány následující koncentrace: 1; 2,5; 5 a 10 mg/l.



Graf 9: Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace metolachloru, zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v Erlenmeyerových baňkách (zpracováno pomocí programu GraphPad Prism)

##### Provedení v mikrotitračních destičkách

Zkouška byla provedena ve třech opakováních s geometrickou koncentrační řadou 32; 16; 8; 4; 1; 0,5; 0,1 a 0,05 mg/l (Graf 10). Hodnota 72h $EC_{50}$  pro metolachlor na zelené řase *Chlorella kessleri* byla miniaturizovaným testem v mikrotitračních destičkách stanovena na hodnotu 115,10  $\mu$ g/l. Přestože hodnota  $EC_{50}$  pro metolachlor indikuje vysokou toxicitu vůči zelené řase *Chlorella kessleri*, byl metolachlor ve srovnání s alachlorem a acetochlorem nejméně toxický. Podobně i Fairchild *et al.* (1998) zaznamenal u metolachloru nižší toxicitu vůči zelené řase *Chlorella vulgaris* ve srovnání s alachlorem. Hodnota 96h $EC_{50}$  byla pro metolachlor v této studii stanovena na 203  $\mu$ g/l.

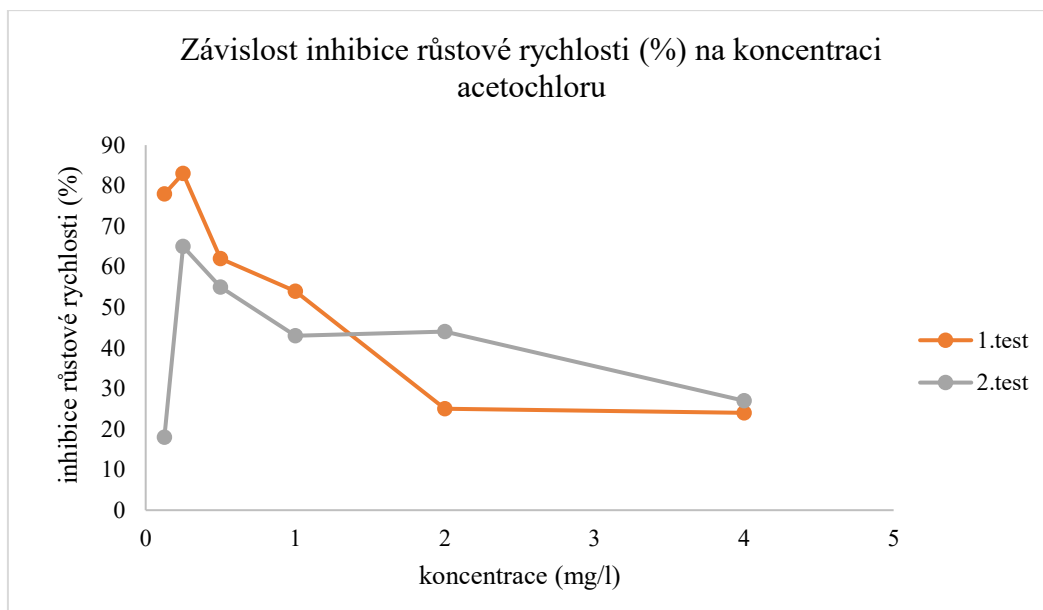


**Graf 10:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace metolachloru, zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v mikrotitrační destičce (zpracováno pomocí programu GraphPad Prism)

#### 4.2.1.3 Stanovení hodnoty $EC_{50}$ acetochloru

##### Provedení v Erlenmeyerových baňkách

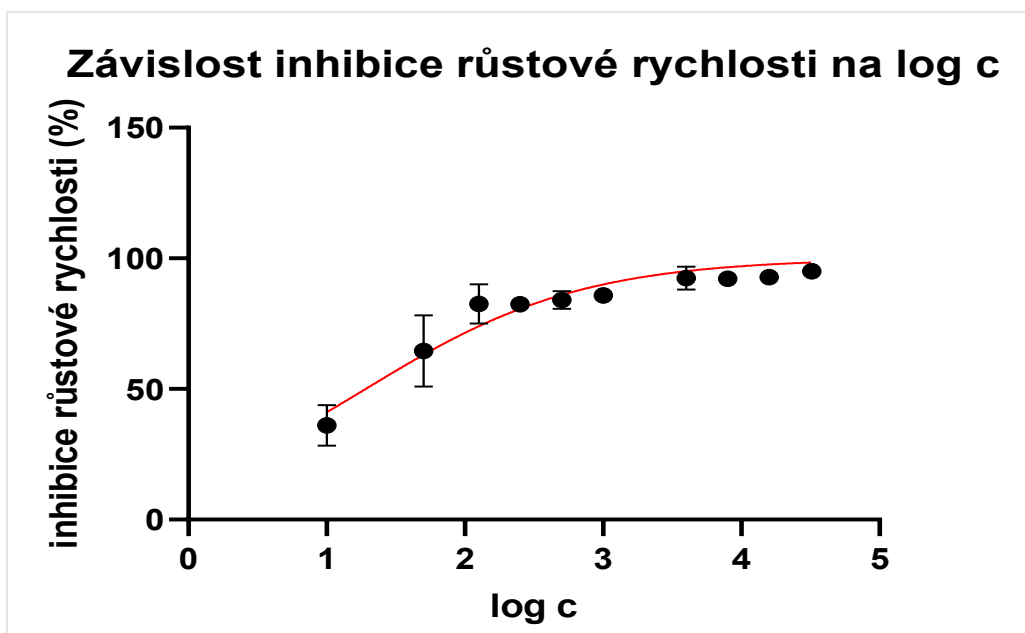
Při testování akutní toxicity acetochloru na zelené řase *Chlorella kessleri* v Erlenmeyerových baňkách byla u provedených zkoušek pozorována zcela opačná závislost mezi procentuální inhibicí růstové rychlosti a zkoušenou koncentrací. Jak je patrné z Grafu 11, se zvyšující se koncentrací acetochloru se snižovala procentuální inhibice růstové rychlosti. Zkouška byla provedena ve dvou opakováních v koncentračních rozmezích 0,5-4 mg/l a 0,125-4 mg/l, v obou případech s koeficientem 2.



**Graf 11:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na zkoušené koncentraci acetochloru, zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v Erlenmeyerových baňkách (zpracováno pomocí programu Excel)

#### Provedení v mikrotitračních destičkách

Hodnota  $72hEC_{50}$  pro acetochlor na zelené řase *Chlorella kessleri* byla miniaturizovaným testem v mikrotitračních destičkách stanovena na hodnotu  $19,13 \mu\text{g/l}$ . Test byl proveden ve třech opakováních s geometrickou řadou koncentrací 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,05 a 0,01 mg/l (Graf 12).



**Graf 12:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace acetochloru, zkouška na zelené řase *Chlorella kessleri* v mikrotitrační destičce (zpracováno pomocí programu GraphPad Prism)

#### 4.2.2 *Daphnia magna* – předběžná zkouška akutní toxicity

Předběžná zkouška akutní toxicity na jedincích *Daphnia magna* byla nejprve provedena ve třech opakováních ve 24-jamkových mikrotitračních destičkách. Zkoušeny byly dvě koncentrace, a to 0,5 mg/l a 5 mg/l, přičemž pro každou koncentraci bylo nasazeno pět replikátů, což odpovídalo použití celkem pěti jedinců *Daphnia magna*. Průběh testu odpovídal požadavkům normy ČSN EN ISO 6341.

Bohužel předběžná zkouška, podobně jako zkouška s referenční látkou dichromanem draselným, nemohla být považována za platnou, neboť procento imobilizace jedinců v kontrolních sadách bylo ve všech třech provedených předběžných zkouškách vyšší než 10 %. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí od 30 % do 40 %. V Tabulce 9 jsou uvedeny procenta imobilizace jedinců ve zkušebních sadách pro tři provedené předběžné zkoušky akutní toxicity pro alachlor, metolachlor a acetochlor na *Daphnia magna*.

*Tabulka 9: Výsledky předběžné zkoušky akutní toxicity na jedincích Daphnia magna pro alachlor, metolachlor a acetochlor*

<b>Pesticid</b>	<b>Zkoušená koncentrace (mg/l)</b>	<b>Imobilizace (%) ve zkušebních sadách</b>		
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Alachlor</b>	0,5	35	55	100
	5	45	65	95
<b>Metolachlor</b>	0,5	40	80	95
	5	35	60	100
<b>Acetochlor</b>	0,5	25	75	100
	5	50	75	85

Ve snaze zjistit příčinu a předejít vysokým hodnotám procenta imobilizace v kontrolních sadách, byla zkouška modifikována. Jedna z možných příčin, proč provedené předběžné zkoušky akutní toxicity neposkytly požadované výsledky, mohlo být použití mikrotitračních destiček jako zkušebních nádob. Z tohoto důvodu byly v další předběžné zkoušce použity kádinky o objemu 25 ml. Dále byl změněn ředící roztok. Přestože norma ČSN EN ISO 6341 předepisuje pro zkoušku toxicity použití rekonstituované vody, v následující zkoušce bylo využito M4 médium, běžně používané pouze pro laboratorní chov. Bylo předpokládáno, že procento imobilizace v kontrolních



sadách by mohlo být při použití M4 média nižší, v porovnání s rekonstituovanou vodou, neboť M4 médium je živinově bohatší. Nicméně tato domněnka nebyla potvrzena, jak naznačují výsledky uvedené v Tabulce 10. Provedení předběžného testu v kádinkách s M4 médiem nemělo žádný vliv na snížení procenta imobilizace jedinců v kontrolních sadách. Ani modifikace zkoušky tak nevedla k získání hodnot  $EC_{50}$  pro jednotlivé chloracetanilidové pesticidy. Důvodem vysoké imobilizace *Daphnia magna* v kontrolních sadách může být i sezónnost jedinců. Tato hypotéza však nemohla být ověřena, a proto by bylo vhodné experiment znovu zopakovat v jiném ročním období a zjistit tak jeho možný vliv.

Přestože se v této diplomové práci nepodařilo stanovit hodnotu  $EC_{50}$  pro testované chloracetanilidové pesticidy na jedincích *Daphnia magna*, lze hodnoty  $EC_{50}$  dohledat v odborné literatuře. Dle studie *Kashian and Dodson (2002)* reagovali jedinci *Daphnia magna* nejcitlivěji na alachlor, přičemž hodnota  $48hEC_{50}$  byla stanovena na 1 mg/l. Pro acetochlor byla hodnota  $48hEC_{50}$  stanovena na 1,6 mg/l. Naopak metolachlor byl vůči *Daphnia magna* nejméně toxický, s hodnotou  $48hEC_{50}$  2,5 mg/l. Také ve studii *Souissi et al. (2013)* byl metolachlor vůči *Daphnia magna* nejméně toxický, přičemž hodnota  $48hEC_{50}$  byla stanovena na 22,3 mg/l. Hodnota  $48hEC_{50}$  pro alachlor byla stanovena na 7,5 mg/l. Nejvíce citlivý byly jedinci *Daphnia magna* v této studii k acetochloru, s hodnotou  $48hEC_{50}$  6,29 mg/l.

**Tabulka 10:** Výsledky modifikované předběžné zkoušky akutní toxicity na jedincích *Daphnia magna* pro alachlor, metolachlor a acetochlor

<b><i>Pesticid</i></b>	<b><i>Zkoušená koncentrace (mg/l)</i></b>	<b><i>Imobilizace ve zkušebních sadách (%)</i></b>
<b><i>Alachlor</i></b>	0,5	40
	5	65
<b><i>Metolachlor</i></b>	0,5	45
	5	40
<b><i>Acetochlor</i></b>	0,5	45
	5	65

### 4.2.3 *Lemna minor* – předběžná zkouška akutní toxicity

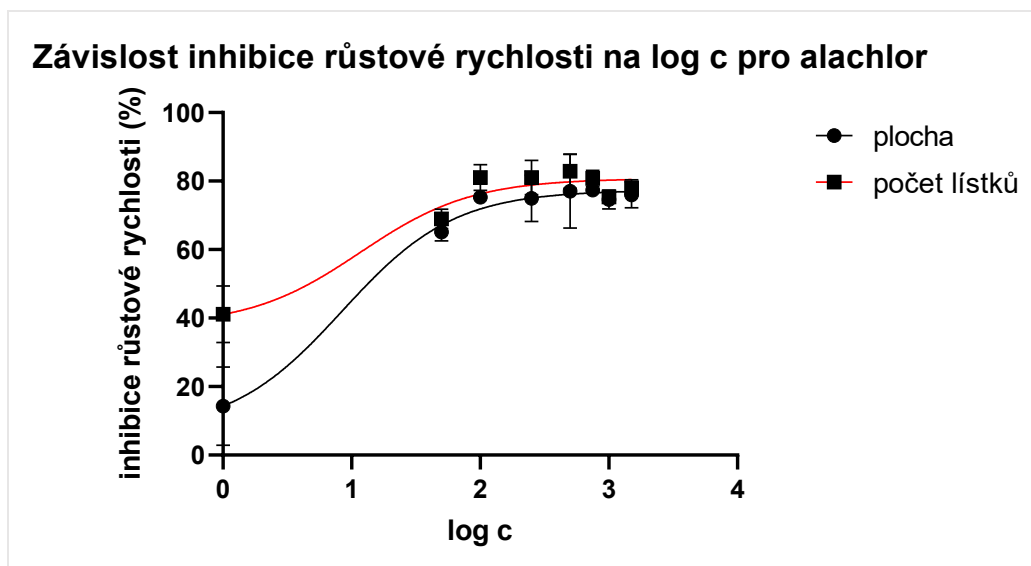
Předběžná zkouška akutní toxicity na jednoděložné rostlině *Lemna minor* byla provedena pro všechny chloracetanilidové pesticidy v jednom opakování. Testovány byly následující koncentrace: 1; 50; 100; 250; 500; 750; 1000 a 1500 µg/l. Tyto hodnoty byly zvoleny na základě hodnot EC<sub>50</sub> publikovaných v odborné literatuře. Ve studii *Fairchild et al. (1997)* byl měřeným parametrem počet stélek a hodnota 96hEC<sub>50</sub> pro alachlor byla stanovena na 198 µg/l. Metolachlor vykazoval nižší toxicitu vůči *Lemna minor*, přičemž hodnota 96hEC<sub>50</sub> byla stanovena na 343 µg/l. Měřenými parametry v této diplomové práci byly počet stélek a plocha porostlá stélkami. Výsledné hodnoty 168hEC<sub>50</sub> jsou uvedeny v Tabulce 11, procentuální inhibice růstu *Lemna minor* stanovené na základě měření počtů stélek a plochy porostlé stélkami jsou uvedené v Tabulce 12. Závislosti procentuální inhibice růstové rychlosti na logaritmu zkoušené koncentrace alachloru, metolachloru a acetochloru jsou zobrazeny v Grafech 13, 14 a 15.

**Tabulka 11:** Hodnoty 168hEC<sub>50</sub> pro alachlor, metolachlor a acetochlor získané při předběžné zkoušce akutní toxicity na *Lemna minor*

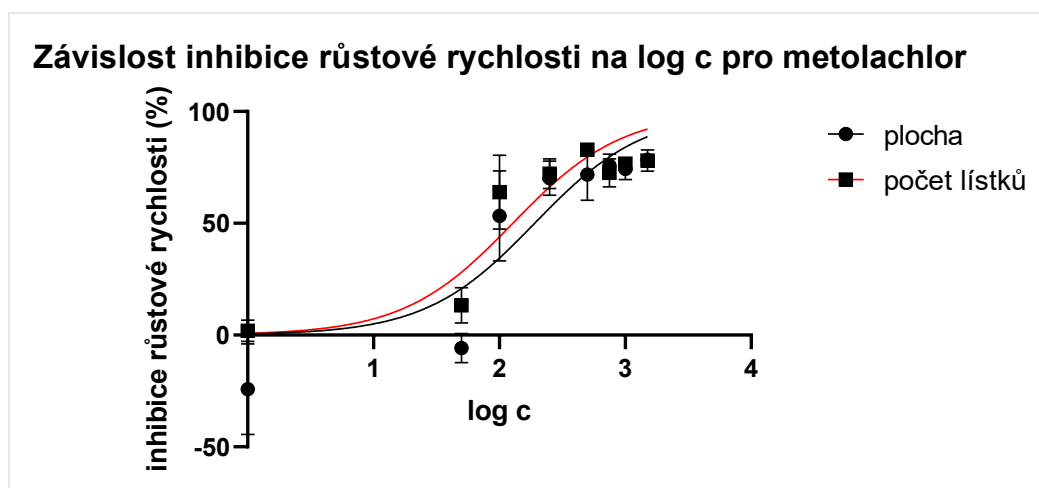
<i>Pesticid</i>	<i>měřený parametr</i>	
	<i>plocha porostlá stélkami</i>	<i>počet stélek</i>
	<i>168hEC<sub>50</sub> (µg/l)</i>	
<i>Alachlor</i>	70,49	43,10
<i>Metolachlor</i>	190,50	127,80
<i>Acetochlor</i>	22,91	14,16

**Tabulka 12:** Inhibice růstové rychlosti (%) *Lemna minor* získané při předběžné zkoušce akutní toxicity pro alachlor, metolachlor a acetochlor

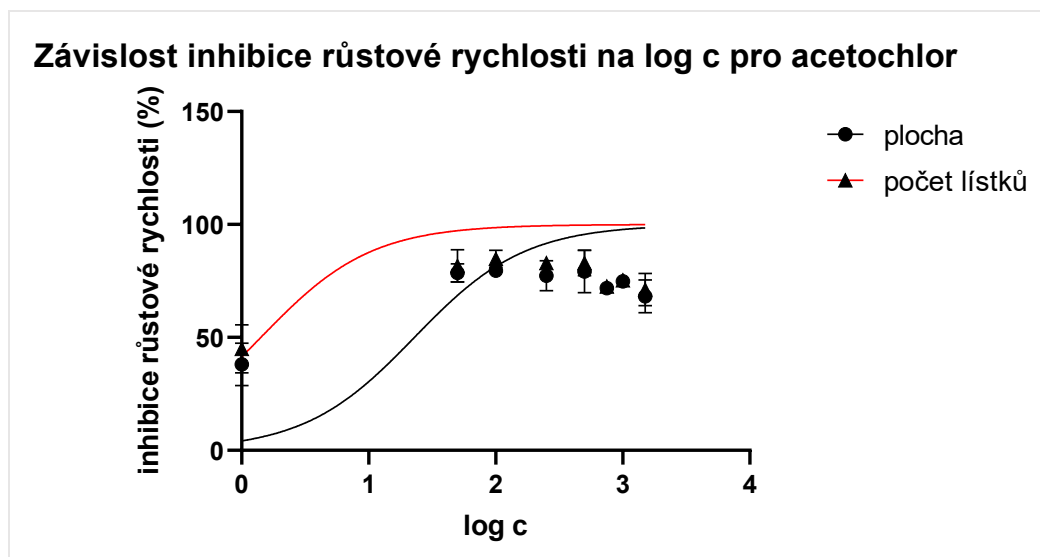
<b>Zkoušená koncentrace (<math>\mu\text{g/l}</math>)</b>	<b>Pesticid</b>					
	<b>Alachlor</b>		<b>Metolachlor</b>		<b>Acetochlor</b>	
	<b>měřený parametr</b>					
	<i>plocha porostlá stélkami</i>	<i>počet stélek</i>	<i>plocha porostlá stélkami</i>	<i>počet stélek</i>	<i>plocha porostlá stélkami</i>	<i>počet stélek</i>
<b>inhibice růstové rychlosti (%)</b>						
<b>1</b>	14	41	-24	2	38	45
<b>50</b>	65	69	-6	13	79	82
<b>100</b>	75	81	53	64	80	85
<b>250</b>	75	81	70	72	77	83
<b>500</b>	77	83	72	83	76	83
<b>750</b>	77	81	76	73	72	73
<b>1000</b>	75	75	74	77	75	75
<b>1500</b>	76	78	78	78	68	71



**Graf 13:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace alachloru, předběžná zkouška akutní toxicity na jednoděložné rostlině *Lemna minor* (zpracováno pomocí statistického programu GraphPad Prism)



**Graf 14:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace metolachloru, předběžná zkouška akutní toxicity na jednoděložné rostlině *Lemna minor* (zpracováno pomocí statistického programu GraphPad Prism)



**Graf 15:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na logaritmu koncentrace acetochloru, předběžná zkouška akutní toxicity na jednoděložné rostlině *Lemna minor* (zpracováno pomocí statistického programu GraphPad Prism)

Vzhledem k tomu, že se nepodařilo zabránit kontaminaci kultury *Lemna minor* zelenou řasou *Chlorella kessleri*, bylo vyhodnocení zkoušek toxicity komplikované. Na druhou stranu bylo pozorováno působení chloracetanilidových pesticidů na dva organismy zároveň. Z experimentu bylo patrné, že růst zelené řasy *Chlorella kessleri* nebyl významně ovlivněn až do koncentrací chloracetanilidových pesticidů 100 µg/l, zatímco jednoděložná rostlina *Lemna minor* při této koncentrační hladině tolik neprosplávala.

Za účelem zisku axenické kultury *Lemna minor* byla provedena dezinfekce kontaminovaných kultur pomocí 100% roztoku SAVA po dobu 90 sekund. Zhruba po třech týdnech došlo k obnově růstu *Lemna minor*, zatímco řasa byla z kultury odstraněna. Tato aseptická kultura však již nebyla využita pro další experimenty v rámci této diplomové práce, neboť neobsahovala dostatečný počet stélek potřebný ke zkouškám toxicity.

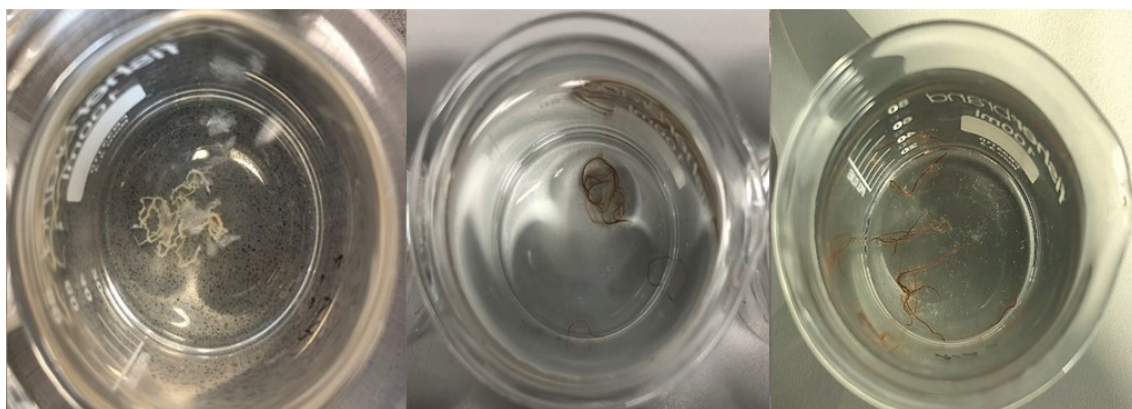
#### 4.2.4 *Lumbriculus variegatus* – limitní zkouška akutní toxicity

Vzhledem k tomu, že pro chloracetanilidové pesticidy nejsou v odborné literatuře dostupné hodnoty EC<sub>50</sub> stanovené na kroužkovci *Lumbriculus variegatus*, byla nejprve provedena limitní zkouška sloužící pro odhad toxicity zkoušených látek vůči zkušebnímu organismu. Nicméně pro orientační odhad koncentračního rozmezí bylo možné vycházet z hodnot EC<sub>50</sub> stanovených na kroužkovci *Eisenia fetida*, neboť tento druh je fyziologicky velmi podobný jedincům *Lumbriculus variegatus*. Ve studii *Yanhua et al. (2012)* byl

určen parament 48hEC<sub>50</sub> pro alachlor na jedincích *Eisenia fetida* na hodnotu 251,28 µg/cm<sup>2</sup>, pro metolachlor a acetochlor se parametr 48hEC<sub>50</sub> pohyboval v rozmezí hodnot 10,32-34,69 µg/cm<sup>2</sup>.

Koncentrace chloracetanilidových pesticidů v prvním experimentu byla 97 mg/l. Nicméně při této koncentraci zkoušených látek došlo ihned po vložení jedinců *Lumbriculus variegatus* do roztoku k viditelným záškubům. Přestože měl test probíhat 96 hodin, již po pouhých 24 hodinách došlo ve všech testovaných roztocích k usmrcení jedinců a k jejich následnému rozkladu (Obrázek 18A). Po 96 hodinách byl zhodnocen stav kontrolní skupiny, kde všichni použítí jedinci přežili a nebyli u nich pozorovány žádné viditelné morfologické změny (Obrázek 18B).

V druhém experimentu byla koncentrace zkoušených látek snížena na 1 mg/l. Při této koncentraci chloracetanilidových pesticidů nebyla po 96 hodinách expozice pozorována žádná viditelná morfologická změna, ani úmrtí jedinců (Obrázek 18C). Vzhledem k časové náročnosti přípravy jedinců k testu nebyly zkoušeny další koncentrace pesticidů. Hodnota 96hEC<sub>50</sub> pro alachlor, metolachlor i acetochlor se nachází v rozmezí 1-100 mg/l.



(a)

(b)

(c)

**Obrázek 18:** A) *Lumbriculus variegatus* – limitní test s alachlorem (97 mg/l), stav jedinců po 24 hodinách expozice, B) *Lumbriculus variegatus* – kontrolní skupina, stav jedinců po 96 hodinách, C) *Lumbriculus variegatus* – limitní test s alachlorem (1 mg/l), stav jedinců po 96 hodinách expozice

### 4.3 Hodnocení akutní toxicity směsí fotokatalytických produktů chloracetanilidových pesticidů

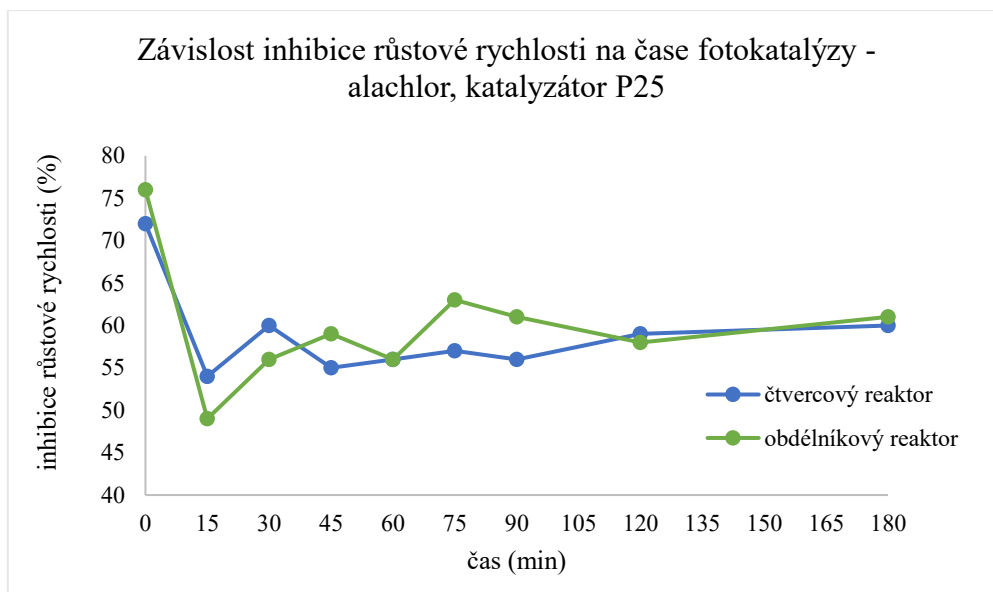
V následujících podkapitolách jsou shrnuty výsledky hodnocení akutní toxicity směsí fotokatalytických produktů chloracetanilidových pesticidů. Jako zkušební organismus byla využita zelená řasa *Chlorella kessleri*, přičemž experimenty byly provedeny v Erlenmeyerových baňkách.

Roztoky alachloru, acetochloru a metolachloru o koncentraci 10 mg/l byly podrobeny fotokatalytické degradaci. Jako fotokatalyzátory byly využity dva komerčně dostupné TiO<sub>2</sub> – Aeroxide® P25 a Pretiox AV-01, jejichž koncentrace v reakčním roztoku byla 1 g/l. Fotokatalýza probíhala ve vsádkovém uspořádání, přičemž byly využity dva rozdílné nerezové reaktory, lišící se v objemu, rozměrech a velikosti ozařované plochy, nad reaktory byl umístěn zdroj UV-A záření. Testovaným vodným prostředím byla redestilovaná voda.

V průběhu fotokatalytické degradace byly v pravidelných 15minutových intervalech odebírány vzorky reakční směsi. Fotokatalyzátor byl z reakční směsi odstraněn centrifugací. Kromě vzorků, které byly podrobeny fotokatalytické degradaci, byly do toxikologického hodnocení zahrnuty i počáteční roztoky pesticidů a roztoky pesticidů s přidavkem fotokatalyzátoru. Za účelem hodnocení akutní toxicity byly odebrané vzorky 10x zředěny sterilní redestilovanou vodou, tj. na počáteční koncentraci pesticidů odpovídající 1 mg/l.

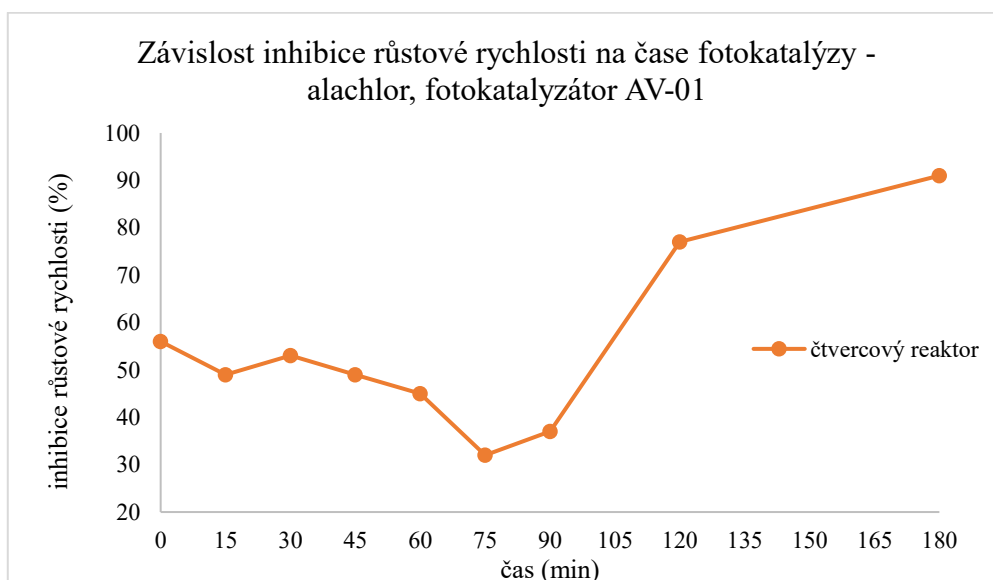
#### 4.3.1 Alachlor

Hodnocení akutní toxicity roztoků alachloru podrobených fotokatalytické degradaci bylo provedeno pro oba typy fotokatalyzátorů. Pro fotokatalyzátor P25 byly vzorky testovány jak ze čtvercového, tak i obdélníkového reaktoru. Pro počáteční roztoky alachloru byla zjištěna podobná inhibice růstové rychlosti, a to 72 % a 76 %. V prvních 15 minutách fotokatalýzy došlo k prudkému poklesu inhibice růstové rychlosti, kdy nejnižší hodnoty byly zaznamenány u vzorků odebraných v 15. minutě pro oba typy reaktorů. Mezi 30. a 180. minutou se hodnoty inhibic růstové rychlosti pohybovaly okolo 60 %. Konečné roztoky vykazovaly shodně 60% inhibici růstové rychlosti (Graf 16).



**Graf 16:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – alachlor, fotokatalyzátor P25 (zpracováno pomocí programu Excel)

Pro fotokatalyzátor AV-01 byly testovány pouze vzorky z obdélníkového reaktoru. Počáteční roztok alachloru vykazoval 56% inhibici růstové rychlosti. Odlišná hodnota inhibice růstové rychlosti počátečních roztoků pesticidů může být odvozena od variací koncentrace okolo teoretické hodnoty. Toxicita vzorků postupně klesala, až dosáhla minima v 75. minutě, kdy inhibice růstové rychlosti byla na hodnotě 32 %. Nicméně následně došlo k prudkému nárůstu toxicity. Konečný roztok vykazoval 91% inhibici růstové rychlosti a byl významně toxicitější, než počáteční roztok (Graf 17).

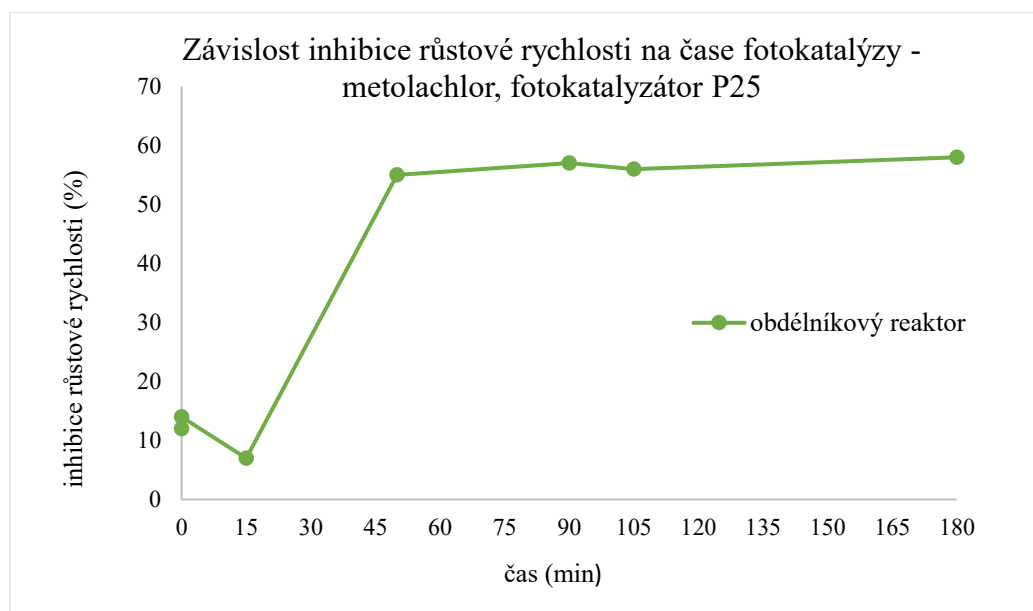


**Graf 17:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – alachlor, fotokatalyzátor AV-01 (zpracováno pomocí programu Excel)



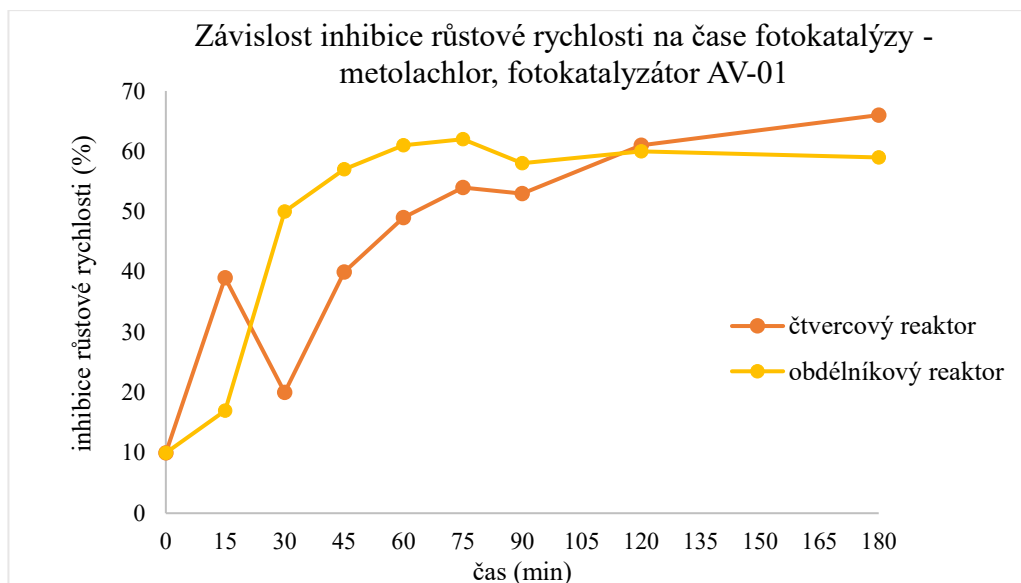
### 4.3.2 Metolachlor

Pro metolachlor byly testovány vzorky podrobené fotokatalytické degradaci za použití fotokatalyzátoru P25 a obdélníkového reaktoru. Toxicita počátečního roztoku metolachloru byla ve všech provedených experimentech významně nižší než u alachloru a acetochloru, což koreluje s hodnotami  $EC_{50}$  získanými pro zelenou řasu *Chlorella kessleri*, neboť metolachlor je ze všech tří testovaných chloracetanilidových pesticidů vůči této zelené řase nejméně toxický. Hodnota inhibice růstové rychlosti byla pro počáteční roztok 12 %. Přestože během prvních 15 minut došlo k mírnému poklesu toxicity, mezi 15. a 45. minutou došlo ke skokovému zvýšení toxicity na inhibici růstové rychlosti 55 %. Konečný roztok vykazoval 58% inhibici růstové rychlosti a byl významně toxičtější, než počáteční roztok (Graf 18).



**Graf 18:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – metolachlor, fotokatalyzátor P25 (zpracováno pomocí programu Excel)

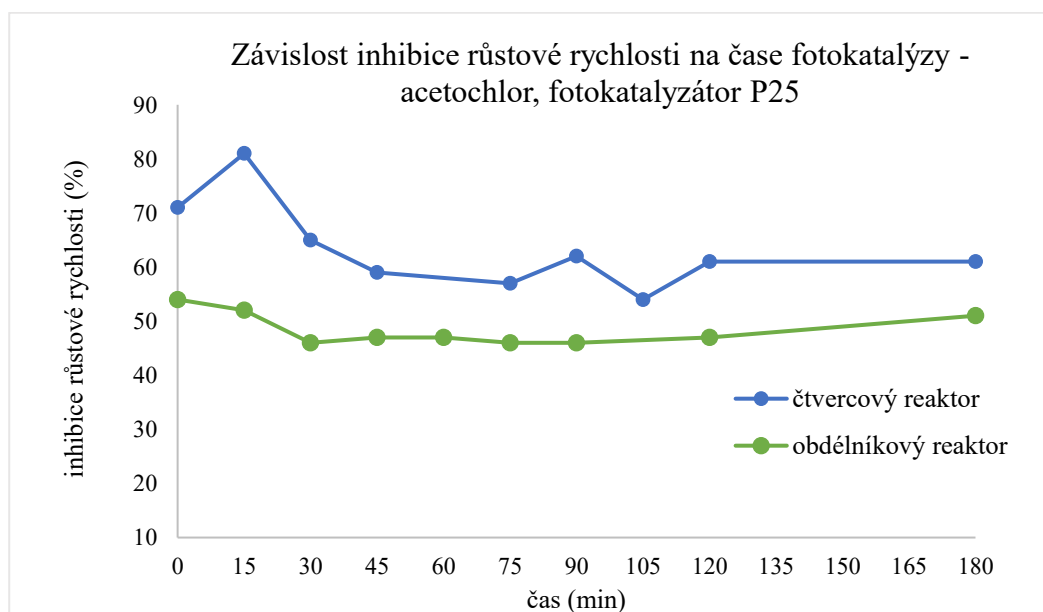
Pro fotokatalyzátor AV-01 byly testovány vzorky jak ze čtvercového, tak obdélníkového reaktoru. Hodnota inhibice růstové rychlosti byla pro počáteční roztoky shodně stanovena na 10 %, což odpovídá hodnotě získané při experimentu s katalyzátorem P25. Podobně jako u předcházejícího experimentu však došlo k následnému prudkému nárůstu toxicity. Konečné roztoky vykazovaly 66% (čtvercový reaktor) a 59% (obdélníkový reaktor) inhibici růstové rychlosti a byly významně toxičtější, než počáteční roztok (Graf 19).



**Graf 19:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – metolachlor, fotokatalyzátor AV-01 (zpracováno pomocí programu Excel)

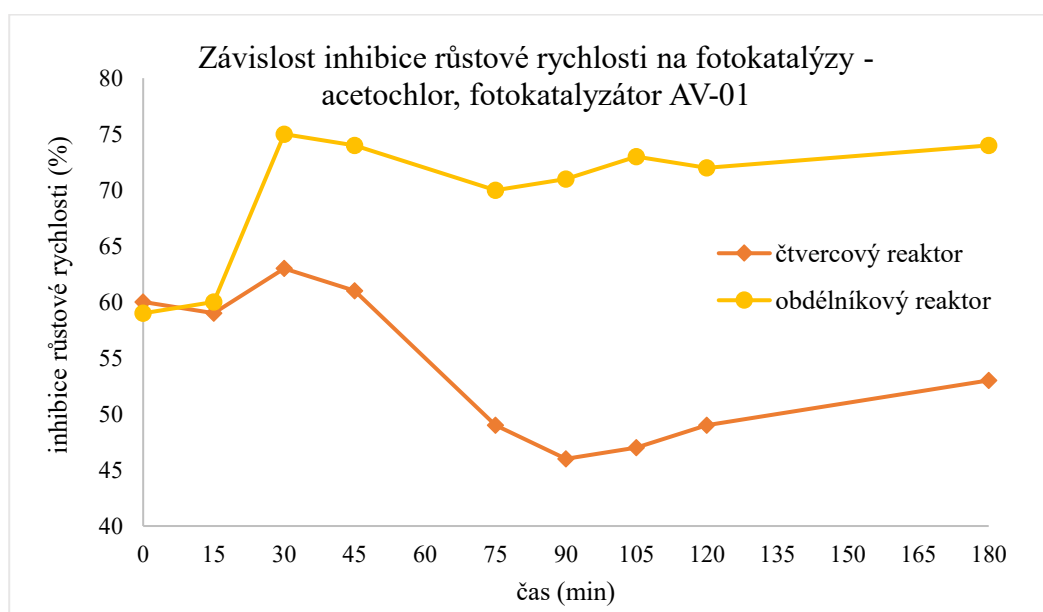
### 4.3.3 Acetochlor

Profily toxicity získané pro vzorky acetochloru po fotokatalytické degradaci za použití fotokatalyzátoru P25 vykazují téměř rovnoběžný profil s časovou osou, což indikuje minimální změnu toxicity během fotokatalytického procesu. Rozdíl v odlišné toxicitě počátečního roztoku acetochloru (71 % a 54 %) lze vysvětlit rozdíly ve skutečné koncentraci alachloru na počátku experimentu (Graf 20).



**Graf 20:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – acetochlor, fotokatalyzátor P25 (zpracováno pomocí programu Excel)

V experimentech s fotokatalyzátorem AV-01 byla toxicita počátečního roztoku acetochloru u čtvercového a obdélníkového reaktoru téměř totožná, a to 60 % a 59 %. Zatímco u experimentu provedeného v čtvercovém reaktoru toxicita roztoku postupně klesala, až dosáhla minima v 90. minutě (inhibice růstové rychlosti 46 %), u obdélníkového reaktoru naopak došlo ke skokovému růstu toxicity na maximální hodnotu procentuální inhibice růstové rychlosti 75 % ve 30. minutě. Na této hladině se pak toxicita držela až do konce experimentu. Konečný roztok v obdélníkovém reaktoru vykazoval 74% inhibici růstové rychlosti a byl významně toxičtější než počáteční roztok. Přestože toxicita roztoku u čtvercového reaktoru od 90. minuty začala postupně stoupat, konečný roztok vykazoval 53% inhibici růstové rychlosti a byl méně toxický než počáteční roztok (Graf 21).



**Graf 21:** Závislost inhibice růstové rychlosti (%) na čase fotokatalýzy – acetochlor, fotokatalyzátor AV-01 (zpracováno pomocí programu Excel)

## 5 ZÁVĚR

Akutní toxicita chloracetanilidových pesticidů alachloru, metolachloru a acetochloru byla zkoušena na zelené řase *Chlorella kessleri*, korýši *Daphnia magna*, jednoděložné rostlině *Lemna minor* a kroužkovci *Lumbriculus variegatus*.

Zkouška akutní toxicity na zelené řase *Chlorella kessleri* byla prováděna ve dvou experimentálních uspořádáních, které zahrnovaly standardní provedení v Erlenmeyerových baňkách a miniaturizované provedení v mikrotitračních destičkách, jehož použití v toxikologických laboratořích postupně převažuje. Výhodou miniaturizace zkoušky toxicity je zejména snížení provozních nákladů a zjednodušení provedení testování i u rozsáhlých souborů vzorků. Současně se snižují nároky na množství vzorku, které je nutné poskytnout k toxikologickému testování.

Nejvyšší toxicita vůči zelené řase *Chlorella kessleri* byla zaznamenána pro acetochlor, s hodnotou  $72\text{hEC}_{50}$  19,13  $\mu\text{g/l}$ . Pro alachlor byla hodnota  $72\text{hEC}_{50}$  stanovena na 29,75  $\mu\text{g/l}$ . Metolachlor byl vůči zelené řase *Chlorella kessleri* nejméně toxický, hodnota  $72\text{hEC}_{50}$  byla stanovena na 115,10  $\mu\text{g/l}$ . Hodnoty  $72\text{hEC}_{50}$  pro jednotlivé chloracetanilidové pesticidy stanovené na zelené řase *Chlorella kessleri* byly zjištěny miniaturizovaným testem v mikrotitračních destičkách, zatímco při standardním provedení v Erlenmeyerových baňkách se hodnoty  $72\text{hEC}_{50}$  stanovit nepodařilo.

Zkouška akutní toxicity na korýši *Daphnia magna* nevedla k získání hodnot  $\text{EC}_{50}$  pro jednotlivé chloracetanilidové pesticidy, a to z důvodu vysoké imobilizace jedinců v kontrolních sadách, což představovalo nesplnění kritérií platnosti zkoušky.

Při zkoušce akutní toxicity na jednoděložné rostlině *Lemna minor* byly sledovanými parametry počet stélek a plocha porostlá stélkami. Stanovení hodnot  $\text{EC}_{50}$  bylo komplikováno kontaminací kultury *Lemna minor* zelenou řasou *Chlorella kessleri*. Nejvyšší toxicitu vykazoval acetochlor, jehož hodnota  $168\text{hEC}_{50}$  byla v rozmezí 14,16-22,91  $\mu\text{g/l}$ . U alachloru byla zaznamenána nižší toxicita. Hodnota  $168\text{hEC}_{50}$  byla v rozmezí 43,10-70,49  $\mu\text{g/l}$ . Nejnižší toxicitu vůči *Lemna minor* vykazoval metolachlor, jehož hodnota  $168\text{hEC}_{50}$  byla v rozmezí 127,80-190,50  $\mu\text{g/l}$ .

Při zkouškách na kroužkovci *Lumbriculus variegatus* bylo stanoveno pouze rozmezí hodnot  $96\text{hEC}_{50}$ , které bylo pro alachlor, acetochlor i metolachlor mezi koncentracemi 1 a 100  $\text{mg/l}$ .

Pro hodnocení akutní toxicity směsí fotokatalytických produktů chloracetanilidových pesticidů byla jako zkušební organismus využita zelená řasa *Chlorella kessleri*

a experimenty byly provedeny v Erlenmeyerových baňkách. Ze získaných profilů toxicity vyplývá, že ve většině případů byla toxicita konečného reakčního roztoku stejná, nebo dokonce vyšší, než toxicita počátečního roztoku jednotlivých chloracetanilidových pesticidů. Tyto výsledky indikují, že v průběhu fotokatalýzy docházelo k tvorbě toxických degradačních produktů.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALTENBURGER R., SCHMITT M., RIEDL J.: Bioassays with Unicellular Algae: Deviations from Exponential Growth and Its Implications for Toxicity Test Results. *Journal of Environmental Quality* **2008**, 37(1), 16-21.
2. AMBROŽOVÁ J.: *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze **2003**. ISBN 80-7080-521-8.
3. AN W., SANG CH., JENSEN K. M., SORENSEN P. B. et al.: Application of the health risk assessment of acetochlor in the development of water quality criteria. *Journal of Environmental Sciences* **2021**, 110, 48-54.
4. BENEŠ B.: *Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů*. **2003**. Praha: Ministerstvo životního prostředí České republiky – Odbor odpadů.
5. BOIVIN A., POULSEN V.: Environmental risk assessment of pesticides: state of the art and prospective improvement from science. *Environmental Science and Pollution Research* **2016**, 24, 6889-6894.
6. CAPPELLI C., TOROPOV A. A., TOROPOVA A. P.: Ecosystem ecology: Models for acute toxicity of pesticides towards *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2020**, 80.
7. CARLSON D. L., THAN K. D., ROBERTS A. L.: Acid- and Base-catalyzed Hydrolysis of Chloroacetamide Herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54(13), 4740-4750.
8. ČSN EN ISO 6341: Kvalita vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity. **2013**. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
9. ČSN EN ISO 8692: Kvalita vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. **2012**. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
10. ČSN EN ISO 20079: Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřehek. **2007**. Praha: Český normalizační institut.
11. DAM R., HARFORD A. J., WARNE M.: Time to get off the fence: the need for definitive international guidance on statistical analysis of ecotoxicity data. *Integrated Environmental Assessment and Management* **2012**, 8(2), 242-245.

12. DIMMITT S., STAMPFER H., MARTIN J. H.: When less is more – efficacy with less toxicity at the ED<sub>50</sub>. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2017**, 83(7), 1365-1368.
13. EBERT D.: *Ecology, Epidemiology and Evolution of Parasitism in Daphnia*. Bethesda: National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, **2005**. ISBN 1-932811-06-0.
14. FAIRCHILD J. F., RUESSLER D. S., HAVERLAND P.S., CARLSON A. R.: Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1997**, 32, 353-357.
15. FAIRCHILD J. F., RUESSLER D. S., CARLSON A. R.: Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1998**, 17(9), 1830–1834.
16. GADAGBUI B., MAIER A., DOURSON M., PARKER A. et al.: Derived Reference Doses for the environmental degradates of the herbicides alachlor and acetochlor: Results of an independent expert panel deliberation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2010**, 57, 220-234.
17. GALLUBA S., OETKEN M., OEHLMANN J.: Comprehensive sediment toxicity assessment of Hessian surface waters using *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **2012**, 47(4), 507-521.
18. GANGDHAR D., BABU P. V., PAMANJI R., SRIKANTH K.: The Pursuit of Alachlor Herbicide Toxicity on *Eisenia fetida* and Its Biochemical Responses. *Water, Air, & Soil Pollution* **2021**, 232, 1-10.
19. GARA B. A., BOHANNON V. K., TEAGUE M., SMEATON M. B.: Copper-induced changes in locomotor behaviors and neuronal physiology of the freshwater oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Aquatic Toxicology* **2004**, 69(1), 51-66.
20. GARCUA A. A. T., MARTÍNEZ R. A., MARTÍNEZ J. M., CARBAJAL F. A.: Transcriptome analysis during early regeneration of *Lumbriculus variegatus*. *Gene Reports* **2021**, 23.
21. GLÖCKNER F. O., STAL L. J., SANDAA R.-A., GASOL J. M. et al.: *Marine Microbial Diversity and its role in Ecosystem Functioning and Environmental Change. Marine Board Position Paper 17*. Marine Board-ESF, Ostend, Belgium, **2012**. ISBN: 978-2-918428-71-8

22. GÖNÜLO A.: Morphological and 18S rRNA analysis of coccoid green algae isolated from lakes of Kizilirmak Delta. *Turkish Journal of Biology* **2012**, 36(3), 247-254.
23. HADEI M., MESDAGHINIA A., NABIZADEH R., MAHVI A. H. et al.: A comprehensive systematic review of photocatalytic degradation of pesticides using nano TiO<sub>2</sub>. *Environmental Science and Pollution Research* **2021**, 28, 13055-13071.
24. HAN L., LIU T., FANG K., LI X. et al.: Indigenous functional microbial communities for the preferential degradation of chloracetamide herbicide S-enantiomers in soil. *Journal of Hazardous Materials* **2022**, 423.
25. CHAPMAN P. M., FAIRBROTHER A., BROWN D.: A critical evaluation of safety factors for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1998**, 17(1), 99-108.
26. CHAPMAN P. M.: Integrating toxicology and ecology: putting the „eco“ into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin* **2002**, 44(1), 7-15.
27. CHEEK A. O., VONIER P. M., OBERDORSTER E., BUROW B. C. et al.: Environmental signaling: a biological context for endocrine disruption. *Environmental Health Perspectives* **1998**, 106.
28. JARQUE S., MASNER P., KLÁNOVÁ J., PROKEŠ R. et al.: Bioluminescent *Vibrio fischeri* Assays in the Assessment of Seasonal and Spatial Patterns in Toxicity of Contaminated Rived Sediments. *Frontiers in Microbiology* **2016**, 7.
29. KASHIAN D. R., DODSON S. I.: Effects of common-use pesticides on developmental and reproductive processes in *Daphnia*. *Toxicology and Industrial Health* **2002**, 18, 225-235.
30. KIKUCHI M., SYUDO A., HUKUMORI M., NAITO CH. et al.: Changes in aquatic toxicity of potassium dichromate as a function of water quality parameters. *Chemosphere* **2017**, 170, 113-117.
31. KRIENITZ L., BOCK CH., NOZAKI H., WOLF M.: SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga “*Selenastrum capricornutum*” recovered the polyphyletic origin of crecent-shaped *Chlorophyta*. *Journal of Phycology* **2011**, 47(4), 880-893.
32. LAUGA B., GIRARDIN N., KARAMA S., MÉNACH K. et al.: Removal of alachlor in anoxic soil slurries and related alternation of the active communities. *Environmental Science and Pollution Research* **2013**, 20, 1089-1105.



33. LEE B.-Y., CHOI B. S., KIM M. S., PARK J. CH. et al.: The genome of the freshwater water flea *Daphnia magna*: A potential use for freshwater molecular ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* **2019**, *210*, 69-84.
34. LERRO C. C., ANDREOTTI G., KOUTROS S., LEE J. W. et al.: Alachlor Use and Cancer Incidence in the agricultural Health Study: An Updated Analysis. *Journal of the National Cancer Institute* **2018**, *110(9)*, 950-958.
35. LIAO J.-Y., FAN CH., HUANG Y. Z., PEI K.J.CH.: Distribution of residual agricultural pesticides and their impact assessment on the survival of an endangered species. *Journal of Hazardous Materials* **2020**, *389*.
36. LOWRY D. M., GREINER D., FRETHEIM M., UBBEN M. et al.: Mechanism of metolachlor action due to alterations in cell cycle progression. *Cell Biology and Toxicology* **2013**, *29*, 283-91.
37. LUYBENOVA M., BOTEVA S.: Biotests in Ecotoxicology: Current Practice and Problems. In *Toxicology - New Aspects to this Scientific Conundrum* **2016**. InTech Publisher, 147-179. ISBN: 978-953-51-7319-9.
38. MACHADO M. D., SOARES E. V.: Sensitivity of freshwater and marine green algae to three compounds of emerging concern. *Journal of Applied Phycology* **2019**, *31(1)*, 399–408.
39. MACHADO M. D., SOARES E. V.: Reproductive cycle progression arrest and modification of cell morphology (shape and biovolume) in the alga *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to metolachlor. *Aquatic Toxicology* **2020**, *222*.
40. MARIÁKOVÁ D., MOCO VÁ K. A., FOŘTOVÁ K., RYPAROVÁ P. et al.: Ecotoxicity and Essential Properties of Fine-Recycled Aggregate. *Materials* **2021**, *14(2)*.
41. MCKNIGHT U. S., RASMUSSEN J. J., KRONVAN B., BINNING P. J. et al.: Sources, occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. *Environmental Pollution* **2015**, *200*, 64-67.
42. MERMANA J., SUTTHIVAIYAKIT P., BLAISE C., GAGNÉ F. et al.: Photocatalysis of S-metolachlor in aqueous suspension of magnetic cerium-doped mTiO<sub>2</sub> core-shell under simulated solar light. *Environmental Science and Pollution Research* **2017**, *24*, 4077-4092.

43. MITSOU K., KOULIANOU A., LAMBROPOULOU D., PAPPAS P. et al.: Growth rate effects, responses of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanil in the aquatic plant *Lemna minor*. *Chemosphere* **2006**, 62(2), 275-284.
44. MOHANTY S. S., JENA H. M.: A systemic assessment of the environmental impacts and remediation strategies for chloracetanilide herbicides. *Journal of Water Process Engineering* **2019**, 31.
45. MOJIRI A., ZHOU J. L., ROBINSON B., OHASHI A et al.: Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. *Chemosphere* **2020**, 253.
46. MOKARIZADEH A., FARYABI M. R., REZVANFAR M. A., ABDOLLAHI M.: A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. *Toxicology Mechanisms and Methods* **2015**, 1-21.
47. MORALES M. A., VENTURA-CAMARGO B.C., MIYUKI M.: Toxicity of Herbicides: Impact on Aquatic and Soil Biota and Human Health. In *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use* **2013**. InTech Publisher, 399-445. ISBN 978-9535111122
48. MOSTAFALOU S., ABDOLLAHI M.: Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2013**, 268(2), 157-177.
49. OECD Test No. 201: *Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. **2011**. Paris: OECD Publishing. Dostupné z: <https://doi.org/10.1787/9789264069923-en>
50. OECD Test No. 221: *Lemna sp. Growth Inhibition Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. **2006**. Paris: OECD Publishing. Dostupné z: <https://doi.org/10.1787/9789264016194-en>
51. OECD Test No. 225: *Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment. Effects on Biotic Systems*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. **2007**. Paris: OECD Publishing. Dostupné z: <https://doi.org/10.1787/9789264067356-en>
52. OECD Test No. 425: *Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. **2008**. Paris: OECD Publishing. Dostupné z: <https://doi.org/10.1787/9789264071049-en>
53. PAIXAO S. M., FERNANDES A., ROURKE K. O., MENDONCA E. et al.: Performance of a miniaturized algal bioassay in phytotoxicity screening. *Ecotoxicology* **2008**, 17(3), 165-71.

54. PARVEZ S., VENKATARAMAN CH., MUKHERJI S.: A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International* **2006**, 32(2), 265-268.
55. PEREIRA S. P., SANTOS S. M. A., FERNANDES M. A. S., DEUS C. M. et al.: Improving pollutants environmental risk assessment using a multi model toxicity determination with in vitro, bacterial, animal and plant model systems: The case of the herbicide alachlor. *Environmental Pollution* **2021**, 286.
56. PERSOONE G., BAUDO R., COTMAN M., BLAISE C. et al.: Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **2009**, 393, 2-29.
57. PEYRAVI M., JAHANSHAHI M., TOURANI H.: Analytical methods of water pollutants detection. In *Inorganic Pollutants in Water* **2020**. Elsevier, 97-113. ISBN 9780128189658.
58. RADIĆ S., STIPANIČEVD., CVJETKO P., RAJČIĆ M. M et al.: Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2011**, 74(2), 182-187.
59. RAMARAJ R., UNPAPROM Y., DUSSADEE N.: Cultivation of Green microalga, *Chlorella vulgaris* for Biogas Purification. *International Journal of Scientific and Technology Research* **2016**, 2(3), 117-122.
60. REDDY P. V. L., KIM K. H.: A review of photochemical approaches for the treatment of a wide range of pesticides. *Journal of Hazardous Materials* **2015**, 285, 325-335.
61. ROJÍČKOVÁ R., DVOŘÁKOVÁ D., MARŠÁLEK B.: The use of miniaturized algal bioassays in comparison to the standard flask assay. *Environmental Toxicology and Water Quality* **1998**, 13(3), 235–241.
62. ROJÍČKOVÁ-PADRTOVÁ R., MARŠÁLEK B.: Selection and sensitivity comparisons of algal species for toxicity testing. *Chemosphere* **1999**, 38(14), 3329–3338.
63. SAHA S., DUTTA D., KARMAKAR R., RAY D. P.: Structure – toxicity relationship of chloracetanilide herbicides: Relative impact on soil microorganisms. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2012**, 34(2), 307-314.

64. SARAVANAN A., KUMAR S. P., JEEVANANTHAM S., ANUBHA M. et al.: Degradation of toxic agrochemicals and pharmaceutical pollutants: Effective and alternative approaches toward photocatalysis. *Environmental Pollution* **2022**, 298.
65. SIGURNJAK M., UKIĆ Š., CVETMOĆ M., MARKIĆ M. et al.: Combined toxicities of Binary mixtures of alachlor, chlorfenvinphos, diuron and isoproturon. *Chemosphere* **2020**, 240.
66. SINGH B., SINGH K: Microbial degradation of herbicides. *Critical Reviews in Microbiology* **2014**, 245-261.
67. SOP C04/21/LE Standardní pracovní postup: *Hrotnatka velká*. **2021**. Pardubice: Laboratoř ekotoxikologie, FCHT, UPCE
68. SOP C05/21/LE Standardní pracovní postup: *Žížallice pestrá*. **2021**. Pardubice: Laboratoř ekotoxikologie, FCHT, UPCE
69. SOP R02/21/LE Standardní pracovní postup: *Řasový test toxicity na miktoritrační destičce*. **2021**. Pardubice: Laboratoř ekotoxikologie, FCHT, UPCE
70. SOP T03/21/LE Standardní pracovní postup: *Test semichronické toxicity na okřehku*. **2021**. Pardubice: Laboratoř ekotoxikologie, FCHT, UPCE
71. SOUISSI, Y., BOUCHONNET, S., BOURCIER, S., KUSK, K. et al.: Identification and ecotoxicity of degradation products of chloroacetamide herbicides from UV-treatment of water. *Science of the Total Environment* **2013**, 458–460, 527–534.
72. TAYLOR L. N., SCROGGINS R. P.: Standardization of Ecotoxicological Tests: The Process. In *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology* **2013**. Springer. ISBN 978-94-007-5704-2.
73. THEODORAKIS CH.: Environmental Toxicology. In *Encyclopedia of Toxicology* **2005**. Academic Press, 210-212. ISBN 978-0-12-369400-3.
74. TILSON H. A.: Developmental neurotoxicology of endocrine disruptors and pesticides: identification of information gaps and research needs. *Environmental Health Perspectives* **1998**, 106, 807-811.
75. TKACZYK A., BOWNIKK A., DUDKA J., KOWAL K. et al.: *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of The Total Environment* **2021**, 763.
76. TÓTH G., HAHN J., KRISZT B., SZOBOSZLAY S.: Acute and chronic toxicity of herbicides and their mixtures measured by *Aliivibrio fischeri* ecotoxicological assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2019**, 185(15).

77. VASSEUR P., MASFARAUD J. F., BLAISE CH.: Ecotoxicology, revisiting its pioneers. *Environmental Science and Pollution Research* **2020**, *28*, 3852-3857.
78. VAVERKOVÁ M. D., ADAMCOVÁ D., RADZIEMSKA M., ZLOCH J. et al.: Assessment and Evaluation of Heavy Metals Removal from Landfill Leachate by *Pleurotus ostreatus*. *Waste and Biomass Valorization* **2018**, *9*, 503-511.
79. VIEGAS C. A.: Microbial bioassays in environmental toxicity testing. *Advances in Applied Microbiology* **2021**, *115*, 115-158.
80. VOUTCHKOVA A.: *A Framework to Guide Selection of Chemical Alternatives*. National Research Council, **2014**. ISBN: 978-0-309-31013-0.
81. WALKER C. H.: Ecotoxicity testing: Science, politics and ethics. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* **2008**, *36*(1), 103-112.
82. XIE J., ZHANG L., ZHAO L., TANG Q et al.: Metolachlor stereoisomers: Enantioseparation, identification and chiral stability. *Journal of Chromatography A* **2016**, 42-48.
83. XU J., YANG M., DAI J., CAO H. et al.: Degradation of acetochlor by four microbial communities. *Bioresource Technology* **2008**, *99*(16), 7797-7802.
84. XUN N., QU Q., ZHANG Z., YUAN W. et al.: Effects of residual S-metolachlor in soil on the phyllosphere microbial communities of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Science of The Total Environment* **2020**, 748.
85. YANHUA W., WEIHUA Y., LIZHI Y., TAO C. et al.: Acute Toxicity of Twenty-Two Commonly Used Herbicides to Earthworm (*Eisenia Fetida*). *Asian Journal of Ecotoxicology* **2011**, *3*, 317-325.