

Testy toxicity algicidních preparátů na organismy vodního prostředí

Toxicity tests of algicide preparations on aquatic organisms

E. Poštulková, R. Kopp

Summary: Acute toxicity tests are mandatory constituent in the basic testing sets for ecotoxicity requirements. Using of model organisms, the species Zebra fish (*Danio rerio*) and culture of common green alga species *Desmodesmus communis*, is recommended for testing the chemical substances in toxicology. Purpose of this study was to examine toxic effects of Guanacid preparation and Pelargonic acid on Zebra fish (*Danio rerio*) and green alga (*Desmodesmus communis*). Determination of acute toxicity on Zebra fish (*Danio rerio*) was realized according to ČSN EN ISO 7346-1 and test of growth inhibition of freshwater alga was realized according to ČSN ISO 8692. The concentrations of 0.001; 0.005 and 0.01 ml.l⁻¹ of Guanacid and 0.01; 0.05 and 0.1 ml.l⁻¹ of Pelargonic acid were chosen for inhibitory tests with green alga (*Desmodesmus communis*). The concentrations of 0.01; 0.05; 0.15; 0.20; 0.25 a 0.30 ml.l⁻¹ of Guanacid and 0.15; 0.20; 0.25; 0.30; 0.35 a 0.40 ml.l⁻¹ of Pelargonic acid were chosen for short-term test of acute toxicity on Zebra fish (*Danio rerio*). The values of LC₅₀ and IC₅₀ were evaluated using graphic probit analyze. For Zebra fish (*Danio rerio*) 48hLC₅₀ of Guanacid was 0.089 ml.l⁻¹ and 48hLC₅₀ of Pelargonic acid was 0.1623 ml.l⁻¹. For green alga (*Desmodesmus communis*) 48hIC₅₀ of Guanacid was 0.0004 ml.l⁻¹ and 48hIC₅₀ of Pelargonic acid was 0.0233 ml.l⁻¹.

Úvod

Zavádění chemických látek lidskou činností do životního prostředí může představovat vážné riziko pro životní prostředí a lidské zdraví. Proto současná legislativa Evropských a dalších průmyslových zemí vyžaduje náležité údaje o posuzování rizik pro registraci chemických látek, pesticidů, biocidů a léčiv. Tyto údaje zahrnují informace o toxicitě při různé trofické úrovni a vyžadují testování s obratlovci, zejména s rybami (Scholz et al., 2008). Pro jednotlivé látky existují rozsáhlé regulační požadavky na informace o akutní toxicitě tak, aby podporovala posouzení rizik pro životní prostředí a klasifikace nebezpečnosti. V základních zkouškách testování ekotoxicky pro vodní prostředí jsou ryby nepostradatelnou součástí (Lammer et al., 2009). Pro testování chemických látek se v toxikologii doporučuje požití modelového druhu *Danio pruhované* (*Danio rerio*) (ČSN EN ISO 7346-1). *Danio pruhované* jsou malé tropické ryby pocházející z řek Indie a jižní Asie. *Danio pruhované* se stalo jedním z nejoblíbenějších modelových organismů v toxikologii. Řada vlastností přispěla k jeho častému využívání, jako je rychlý rozvoj, velký počet potomků, průhledné embryo. *Danio pruhované* má velmi krátký reprodukční cyklus. Dospělosti dosahují zhruba ve věku 3 měsíců (Scholz et al., 2008). Doporučované použití *Dania pruhované* nevyklučuje použití jiných druhů ryb. Je možno použít ostatní druhy sladkovodních, mořských či brakických ryb za předpokladu, že jsou provedeny patřičné úpravy, například jakosti ředící vody a teplotních podmínek zkoušky (ČSN EN ISO 7346-1). Pro inhibiční testy lze požit zkušební organismy planktonních řas,

např. *Desmodesmus communis*, *Desmodesmus subcapitatus* nebo *Pseudokirchneriella subcapitata*. Tyto druhy jsou planktonní zelené řasy patřící do řádu *Chlorococcales* a v kultuře jsou obvykle jednobuněčné (ČSN EN ISO 8692). Řasy a sinice jsou běžné zkušební organismy citlivé na mnoho toxických látek, a díky tomu jsou široce používány v testech toxicity (Zhang et al. 2012).

Vznik a vývoj nových algicidních přípravků je zapříčiněn stále se více rozvíjející výstavbou zahradních jezírek a také užíváním těchto přípravků v rybářském sektoru zejména pro likvidaci sinic a řas. Masový rozvoj sinic není problémem jen v České republice, ale jedná se o problém celosvětový. Neexistuje přitom žádné jednoduché opatření, které by bylo proti rozvoji sinic účinné, aplikovatelné na různé typy vodních nádrží a zároveň by nepoškodilo vodní ekosystém (Drábková & Maršálek, 2004). Mezi nejčastější možnosti v boji proti sinicím a řasám patří aplikace algicidních látek (Jančula, Slováčková & Maršálek, 2008). Rozšířeným algicidem u nás je modrá skalice. Výhodou tohoto algicidu je nízká cena a rychlý účinek. Její nevýhodou je však měď v ní obsažená. Účinnost mědi je totiž silně ovlivňována složením vody, do které je modrá skalice dávkována (Jančula, Maršálek & Drábková, 2006). Mezi další a nově se vyvíjející algicidy patří například Guanacid a kyselina pelargonová. Látka Guanacid je desinfekční prostředek pro ošetření vody v plaveckých bazénech. Je to modrá kapalina bez zápachu s bodem varu 100°C. Guanacid je směs amonných sloučenin (kvartérní amoniová sůl a derivát iminomočoviny). Strukturálně obsahuje méně jak 0,2% n-alkyl(C12-C16)(benzyl) dimetrylamoniumchlorid a méně jak 0,9% polyhexamethylu guanidinu chloridu (Bezpečnostní list, 2009). Kyselina pelargonová je čirá až nažloutlá olejovitá kapalina s bodem tání 11°C a bodem varu 253°C. Je nerozpustná ve vodě, ale rozpustná v etheru, alkoholu a organických rozpouštědlech. Kyselina pelargonová je přirozeně se vyskytující mastná kyselina v rostlinách, používá se jako herbicid, aby se zabránilo růstu plevelů. Kyselina pelargonová je chemická látka, obsahující devět atomů uhlíků, která se rovněž nazývá kyselina nonanová (C₉H₁₈O₂) (Kegley, Conlisk & Moses, 2010).

Materiál a metodika

Pro test akutní toxicity na rybách a inhibiční test na řasách byly vybrány algicidní látky Guanacid a kyselina pelargonová. Sledovali jsme střední letální koncentraci (LC₅₀) testovaných algicidních preparátů pro ryby (*Danio rerio*). Testované ryby jsme vystavili po dobu 96 hodin různým koncentracím testovaných látek rozpuštěné ve standardně připravené ředící vodě. Pro krátkodobé testy akutní toxicity jsme zvolili šest různých koncentrací Guanacidu: 0,010; 0,050; 0,150; 0,200; 0,250 a 0,300 ml.l⁻¹ a šest koncentrací kyseliny pelargonové: 0,010; 0,025; 0,050; 0,075; 0,100 a 0,125 ml.l⁻¹. V jednom akváriu byly ryby pouze v ředící vodě bez přípravku, jako kontrolní akvárium. V průběhu každých 24 hodin testu jsme sledovali mortalitu ryb, měřili jsme hodnoty pH, teplotu a obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě přístrojem HACH HQ40d a vodivost přístrojem Hanna combo.

Ryby (*Danio rerio*) byli ve stáří 4 měsíců s celkovou délkou těla 15-20 mm. Jednotlivé ryby byly do testu vybrány náhodně ze zásobního akvária a nebyly během testu krmeny. V každém testovaném akváriu bylo 10 ks ryb ve 3000 ml testovaného roztoku bez aerace. Ředící voda byla připravena podle normy ISO 6341 ze zásobních roztoků v množství 11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,59 g NaHCO_3 a 0,23 g KCl (Svobodová et al., 2000). Takto připravená ředící voda se 24 hodin sytila vzdušným kyslíkem (aerace).

Dále jsme stanovovali inhibiční účinky (IC_{50}) Guanacidu a kyseliny pelargonové na růst zelené řasy (*Desmodesmus communis*). Před zahájením testu jsme připravili růstové médium pro zkušební organismy. Růstové médium bylo připraveno podle normy ČSN EN ISO 8692. Testy probíhaly 168 hodin v laboratorních podmínkách v Erlenmayerových baňkách se zelenou řasou (*Desmodesmus communis*). Pro inhibiční test s Guanacidem byly zvoleny koncentrace 0,001; 0,005 a 0,01 ml.l^{-1} a pro test s kyselinou pelargonovou byly zvoleny koncentrace 0,01; 0,05 a 0,1 ml.l^{-1} . V dalších Erlenmayerových baňkách se inkubovaly zelené řasy bez přídavku jakékoli látky, jako kontrolní vzorek. Všechny varianty byly ve třech opakováních. V každé testované Erlenmayerově baňce bylo 50 ml testovaného roztoku. Zkušební nádoby byly uzavřeny buničitou vatou, aby se zabránilo vzdušné kontaminaci a snížilo se odpařování vody, ale aby byla zachována výměna plynů (ČSN EN ISO 8692). Pro zjištění inhibičních nebo stimulačních účinků testované látky jsme zvolili kvantitativní metodu počítání buněk v Bürkerově komůrce za použití mikroskopu s fluorescencí. Toto počítání probíhalo každých 24 hodin po dobu 72 hodin. Počet buněk napočítaných v Bürkerově komůrce se přepočítal pomocí vzorce na množství buněk v 1 ml. Dále po 168 hodinách jsme stanovovali chlorofyl-a. Podstatou stanovení chlorofylu-a je extrakce chlorofylu horkým etanolem a změření na spektrofotometru při vlnových délkách 665 a 750 nm. Ke stanovení chlorofylu-a jsme použili kyselinu chlorovodíkovou (HCl) a čistý etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (ČSN ISO 10260).

Testy akutní toxicity na rybách a inhibiční testy na řasách byly prováděny při umělém osvětlení s intervalem 13 hodin světlo a 11 hodin tma.

Výsledky a diskuze

V průběhu testu akutní toxicity na rybách s kyselinou pelargonovou i Guanacidem byla průměrná teplota ve všech akváriích 23,5°C. Nikde nebyly zaznamenány teplotní výkyvy. V akváriích s kyselinou pelargonovou byla hladina kyslíku v rozmezí 4,20 do 92,20 % (0,36-7,69 mg.l^{-1}). Nejnižší hladina kyslíku byla při koncentraci 0,20 ml.l^{-1} ve 48 hodinách. V akváriích s Guanacidem se hladina kyslíku pohybovala v rozmezí od 55,90 do 87,80 % (4,63-5,01 mg.l^{-1}). Hodnoty pH ve všech akváriích s kyselinou pelargonovou i Guanacidem vykazovaly mírně zásadité prostředí. Vodivost vody se pohybovala v akváriích s kyselinou pelargoniovou v rozmezí 41,3 do 46,8 mS a v akváriích s Guanacidem se hodnoty pohybovaly od 41,8 mS do 51,4 mS. Mortalita byla u kyseliny pelargonové s koncentrací od 0,30 do 0,40 ml.l^{-1} 100% do deseti minut od zahájení testu. Při koncentraci 0,25 ml.l^{-1} byla mortalita 100% do

24 hodin, s koncentrací 0,20 ml.l⁻¹ byla mortalita do 24 hodin 90% a u koncentrace 0,15 ml.l⁻¹ uhynula po 24 hodinách 1 ryba a k žádnému dalšímu úhynu do 96 hodin nedošlo. Mortalita v akváriích s Guanidem u koncentrací od 0,20 do 0,30 ml.l⁻¹ byla do 24 hodin 100%. U koncentrace 0,15 ml.l⁻¹ byla mortalita 100% po 72 hodinách a u koncentrací 0,01 a 0,05 ml.l⁻¹ nedošlo k žádnému úhynu. Střední letální koncentrace (48hLC₅₀) byla spočítaná pomocí probitové analýzy na 0,1623 ml.l⁻¹ u kyseliny pelargonové a 0,089 ml.l⁻¹ u Guanididu.

V tabulce 1 a 2 jsou uvedeny průměrné počty buněk zelené řasy *Desmodesmus communis* a množství chlorofylu-a stanového po 168 hodinách.

Tabulka 1 Průměrný počet buněk, ± SD *Desmodesmus communis* v 1 ml a množství chlorofylu-a v µg.l⁻¹

Hodiny	Kontrola		Kyselina pelargonová [ml.l ⁻¹]					
	0	±SD	0,01	±SD	0,05	±SD	0,1	±SD
0	11 574	4 331						
24	14 468	2 165	25 463	17 724	10 995	4 978	6 944	4 253
48	28 935	10 449	23 727	2 951	26 620	10 826	10 996	1 637
72	27 199	6 993	20 833	8 622	37 616	23 903	21 991	7 807
Chlorofyl-a								
168	70,25	11,33	85,45	6,60	86,53	17,00	76,76	6,12

Tabulka 2 Průměrný počet buněk, ± SD *Desmodesmus communis* v 1 ml a množství chlorofylu-a v µg.l⁻¹

Hodiny	Kontrola		Guanicid [ml.l ⁻¹]					
	0	±SD	0,001	±SD	0,005	±SD	0,01	±SD
0	11 574	4 331						
24	14 468	2 165	18 518	11 370	8 681	4 911	1 157	818
48	28 935	10 449	9 259	6 547	16 782	4 978	2 315	818
72	27 199	6 993	21 991	10 826	13 310	818	0	0
Chlorofyl-a								
168	70,25	11,33	57,41	7,18	42,47	2,97	0,00	0,00

Svobodová et al. (1985) uvádí, že hojně využívaný algicidní prostředek na omezování masového rozvoje sinic a řas byl požívaný Kuprikol 50 obsahující nejméně 47,5% mědi ve formě oxychloridu mědi. Při stanovení akutní toxicity přípravku Kuprikol 50 pro vodní organismy zjistili hodnotu 48hLC₅₀, která činila pro ryby *Poecilia reticulata* 129 mg.l⁻¹. V porovnání s námi prováděnými testy byla u kyseliny pelargonové stanovena 48hLC₅₀ na 0,16 ml.l⁻¹ a 0,089 ml.l⁻¹ u Guanididu. V porovnání s Kuprikolem 50 jsou u nově zkoumaných látek nižší letální koncentrace. Výsledky se dají porovnat s Vaněk (2012), který testoval stejné látky a měl obdobné výsledky u Guanididu, ale u kyseliny pelargonové jsme došli odlišným výsledkům. V testech nám vyšla 100% inhibice s přípravkem Guanidid při koncentraci 0,01 ml.l⁻¹ po

72 hodinách. Při této koncentraci nedošlo k žádnému úhynu ryb v akutním testu toxicity. Vaněk (2012) udává, že u přípravku Guanacid dojde při koncentraci $0,1 \text{ ml.l}^{-1}$ k 100% mortalitě po 48 hodinách. K obdobným výsledkům jsme došli také v námi prováděných testech, kdy u koncentrace $0,15 \text{ ml.l}^{-1}$ došlo k 100% mortalitě za 72 hodin. U kyseliny pelargonové Vaněk (2012) udává, že při koncentraci $0,5 \text{ ml.l}^{-1}$ dojde k mortalitě 40% do 48 hodin. Při námi provedených testech vychází, že při koncentraci $0,25 \text{ ml.l}^{-1}$ dojde k 100% mortalitě do 24 hodin. U inhibičního testu ve všech třech zvolených koncentracích docházelo ke stimulačním účinkům.

Závěr

S kyselinou pelargonovou a Guanacidem jsme prováděli testy akutní toxicity na rybách (*Danio rerio*) a testy inhibice s kulturou zelené řasy *Desmodesmus communis*. Zjišťovali jsme účinné inhibiční koncentrace pro likvidaci řas a střední letální koncentraci (LC_{50}) pro ryby. Kontrolovali jsme účinnost přípravku pomocí měření hustoty v Bürkerově komůrce pod mikroskopem s fluorescencí. Při porovnání $48LC_{50}$ u Guanacidu, která je $0,089 \text{ ml.l}^{-1}$ a inhibiční koncentrací, kdy nám vyšlo, že při $0,01 \text{ ml.l}^{-1}$ došlo k 100% inhibici, by se dalo říct, že se jedná o dostatečně bezpečnou látku, která by neměla mít negativní vliv na testované ryby *Danio rerio* a naopak by měla být dostatečně účinná pro omezování zelené řasy. Toto nemůžeme tvrdit v případě kyseliny pelargonové, kdy u koncentrace $0,20 \text{ ml.l}^{-1}$ došlo do 24 hodin k 90% mortalitě ryb a u zelené řasy (*Desmodesmus communis*) měla spíše stimulační účinky při koncentraci $0,1 \text{ ml.l}^{-1}$. U algicidních látek je velmi důležité, aby nedošlo k masivnímu úhynu biomasy, a aby se nevyžil buněčný obsah do okolí. Cílem je omezit fotosyntetickou asimilaci. Proto jsme na konci testu stanovovali obsah chlorofylu-a zelené řasy, kde bylo možné vidět, ve kterých variantách testu s různou koncentrací algicidu byly stále fotosynteticky aktivní a u kterých došlo k zastavení fotosyntetických pochodů.

Poděkování

Tato studie byla podpořena projekty Interní grantové agentury Agronomické fakulty MENDELU v Brně č. IP 6/2014 a TP 7/2014.

Literatura

Bezpečnostní list. [Online] 6. 5 2009. [Citace: 29. 10 2014.] http://obchod.bazenovachemie.cz/files/Bezpecnostni_list_Guanacid.pdf.
ČSN EN ISO 7346-1 (1999): Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [Branchydanio rerio Hamilton – Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]
Část 1: Statická metoda. Praha: Český normalizační institut, 16 str.
ČSN EN ISO 8692 (2005): Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas. Praha: Český normalizační institut, 24 str.

ČSN ISO 10206 (1999): Jakost vod – Měření biochemických ukazatelů, Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a. Praha: Český normalizační institut, 12 str.

DRÁBKOVÁ, M., MARŠÁLEK, B. (2004): Přehled možností principů omezování masového rozvoje sinic. *Cyanobakterie: Biologie, toxikologie a možnosti nápravných opatření*. Brno: Vodní zdroje EKOMONITOR spol., 1. vyd., 113-142

JANČULA, D., MARŠÁLEK, B., DRÁBKOVÁ, M. (2006): Přípravky pro redukci masového rozvoje sinic. *Cyanobakterie: biologie, toxikologie a management*. Brno : Botanický ústav AV ČR, 1. vyd., 156-160.

JANČULA, D., SLOVÁČKOVÁ, H. A MARŠÁLEK, B. (2008): Možnosti ošetření vodního sloupce nádrží chemickými prostředky. *Cyanobakterie: invazivní sinice, nové cyanotoxiny a trendy v technologiích*. Botanický ústav AV ČR Brno, 78-83

KEGLEY, S., CONLISK, E., MOSES, M. Marian Municipal Water District. *Herbicide Risk Assessment*. [Online] 1. 1 2010. [Citace: 30. 10 2014.] <http://www.marinwater.org/DocumentCenter/View/252>.

LAMMER, E., CARR, G. J., WENDLER, K., RAWLINGS, J. M., BELANGER, S. E, BRAUNBECK, Th. (2009): Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a petential alternativ efor the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology C-toxicology a Pharmacology*. 149 (2): 196 209

SCHOLZ, S., FISCHER, S., GÜNDEL, U., KÜSTER, E., LUCKENBACH, T., VOLKER, D. (2008): The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing. *Environmental science and pollution research*. 15(5): 394-404

SVOBODOVÁ, Z., FAINA, R. A VYKUSOVÁ, B. (1985): Použití přípravku Kuprikol 50 v rybářství. Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický Vodňany, č. 19, 10 str.

SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., BEKLOVÁ, M., CUPÁKOVÁ, Š., MINKS, J. (2000): Ekotoxikologie praktická cvičení část I. Brno: VFU Brno, 1. vyd, 72 str.

VANĚK, P. (2012): Likvidace sinic a řas ekologicky šetrným algicidem. *Diplomová práce*. Brno : Mendelova univerzita, 68 str.

ZHANG, L. J., YING, G. G., CHEN, F., ZHAO, J. L., WANG, L., FANG, Y. X. (2012): Development and application of whole sediment toxicity est using immobilized freshwater microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 13 (2): 377-386

Ing. Eva Poštulková, doc. Ing. Radovan Kopp, Ph.D., Mendelova univerzita v Brně, Oddělení rybářství a hydrobiologie, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, e.postulkova@seznam.cz, fcela@seznam.cz