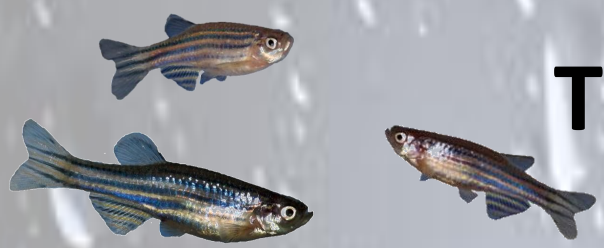
Mendelova univerzita v Brně

Oddělení rybářství a hydrobiologie

Agronomická fakulta

Toxický účinek kyseliny pelargonové na organismy vodního prostředí



The toxic effect of a pelargonic acid on aquatic organisms

Eva POŠTULKOVÁ[1] & Radovan KOPP[1]

[1]Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno ČR; e-mail: e.postulkova@seznam.cz

Úvod

Vznik a vývoj nových algicidních přípravků je zapříčiněn stále více se rozvíjející výstavbou zahradních jezírek a také užíváním těchto přípravků v rybářském sektoru zejména pro likvidaci sinic a řas. Mezi nejčastější možnosti v boji proti sinicím a řasám patří aplikace algicidních látek. Mezi nově se vyvíjející algicidy patří kyselina pelargonová, známá také jako kyselina nonanová obsahující devět atomů uhlíku ($C_9H_{18}O_2$). Kyselina pelargonová se přirozeně vyskytuje v různých rostlinách. Její aplikace se zaměřuje především na její herbicidní, fungicidní a desinfekční vlastnosti (TOXNET, 2008). O potenciálním riziku pro vodní organismy je známo velmi málo (Techer at al., 2015). Kyselina pelargonová je čirá až nažloutlá olejovitá kapalina s bodem tání 11°C a bodem varu 253°C. Je nerozpustná ve vodě, rozpustná v etheru, alkoholu a organických rozpouštědlech (Kegley et al., 2010).

Pro testování chemických látek se v toxikologii doporučuje požití modelového druhu Danio pruhované (*Danio rerio*) (ČSN EN ISO 7346-1) . Danio pruhované je malá tropická ryba pocházející z řek Indie a jižní Asie. Stalo se jedním z nejoblíbenějších modelových organismů v toxikologii. Řada vlastností, jako je rychlý vývoj, velký počet potomků nebo průhledné embryo, přispěla k jeho častému využívání. Danio pruhované má velmi krátký reprodukční cyklus. Dospělosti dosahují zhruba ve veku 3 měsíců (Scholz et at., 2008).

Pro inhibiční testy lze použít zkušební organismy planktonních řas, např. *Desmodesmus communis, Desmodesmus subcapitatus* nebo *Pseudokirchneriela subcapitata*. Tyto druhy jsou planktonní zelené řasy patřící do řádu *Chlorococcales* a v kultuře jsou obvykle jednobuněčné (ČSN EN ISO 8692).

Materiál a metodika

Na test akutní toxicity na rybách a zkoušku inhibice růstu sladkovodních řas byla použita 21,17% kyselina pelargonová.

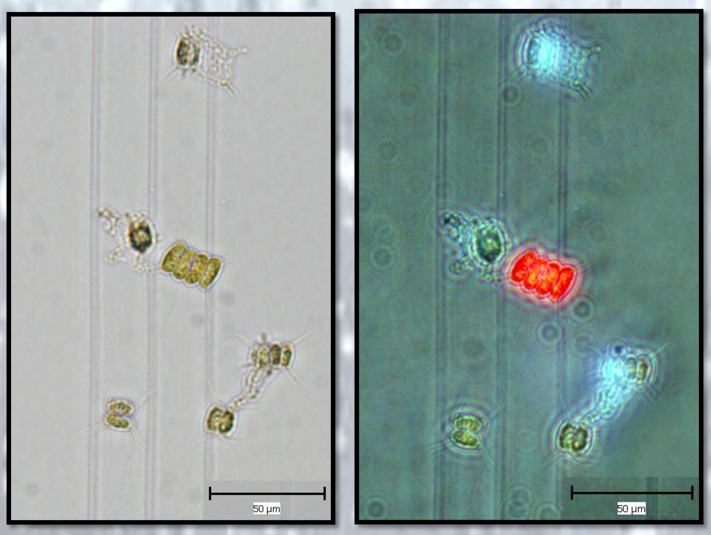
Test akutní toxicity na rybách

Zkoušky akutní toxicity byly provedeny na akvarijních rybách *Danio rerio* (ve věku 4 měsíce, celková délka těla 20±5 mm). Test byl proveden podle ČSN EN ISO 7346-1 statickou metodou a ČSN EN ISO 7346-2 semistatickou metodou – každých 24 hodin výměna testovacího roztoku. Ryby byly vystaveny po 96 hodin různým koncentracím kyseliny pelargonové. Pro krátkodobé testy akutní toxicity na rybách statickou metodou byly zvoleny koncentrace kyseliny pelargonové 5,58; 7,44; 9,30; 11,17; 13,03 a 14,89 mg.l^{-1} a pro semistatickou metodu byly zvoleny koncentrace 3,72; 9,30; 18,61 a 37,22 mg.l^{-1}. Test byl proveden v nádržích bez aerace s objemem ředící vody 3000 ml s 10 rybami pro každou koncentraci a pro kontrolní skupinu. Ryby nebyly během testu krmeny. V průběhu každých 24 hodin testu byla sledována mortalita ryb. Hodnoty pH, teplota a obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě byly měřeny přístrojem HACH HQ40d a vodivost přístrojem Hanna combo.

Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas

Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas byla provedena na *Desmodesmus communis*. Zkouška byla provedena podle ČSN EN ISO 8692. Pro inhibiční zkoušku s kyselinou pelargonovou byly zvoleny koncentrace 0,37; 1,86 a 3,72 mg.l^{-1}. Zkoušky probíhaly 168 hodin v laboratorních podmínkách v Erlenmayerových baňkách ve třech opakováních pro každou koncentraci a pro kontrolní vzorek. V každé testované Erlenmayerově baňce bylo 50 ml testovaného roztoku. 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 podle ČSN ISO 10260.

Data z akutního testu pro *Danio rerio* byla zpracována probitovou analýzou pro výpočet 48h LC50 kyseliny pelargonové. Srovnávání účinků koncentrací kyseliny pelargonové na počet buněk řas v 1 ml byla použita jednofaktorová ANOVA - Schefféův test v programu STATISTICA 12.



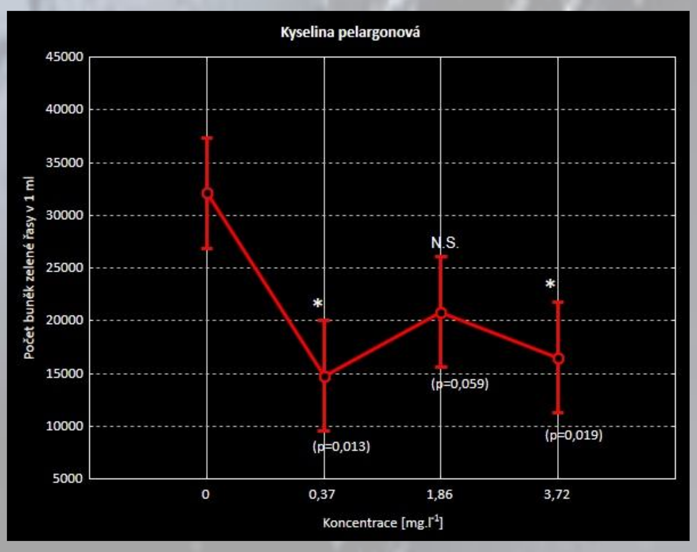
Obr. 1: *Desmodesmus communis* pod mikroskopem bez použití fluorescence (vlevo) a s použitím fluorescence (vpravo).

Kyselina pelargonová [mg.l^{-1}]	Chlorofyl-a [µg.l^{-1}]	
0	70,25	± 11,33
0,37	85,45	± 6,60
1,86	86,53	± 17,00
3,72	76,76	± 6,12

Tab. 1: Hodnota chlorofylu – a ve zkoušce inhibice růstu zelené řasy (*Desmodesmus communis*) po 168 hodinách

Výsledky

V průběhu statické a semistatické metody testu akutní toxicity na rybách s kyselinou pelargonovou byly teplota a vodivost po celou dobu stabilní bez výrazného výkyvu. Hodnoty pH vykazovaly mírně zásadité prostředí v obou variantách testu. Hodnota procentuálního nasycení kyslíkem u statické metody klesla po 48 hodinách pod 50%, z tohoto důvodu došlo k opakování testu semistatickou metodou a během testu neklesla hladina procentuálního nasycení kyslíku pod 60%. U semistatické metody u koncentrace 18,61 a 37,22 mg.l^{-1} byla mortalita do hodiny od zahájení testu 100%. U statické metody u koncentrací 11,17 až 14,84 mg.l-1 byla mortalita 100% do 24 hodin. Střední letální koncentrace ve 48 hodinách jsme spočítali probitovou analýzou (Graf 1, Graf 2). Kegley et al. 2010 uvádí LC50 pro pstruha duhového 9,19 mg.l^{-1}.



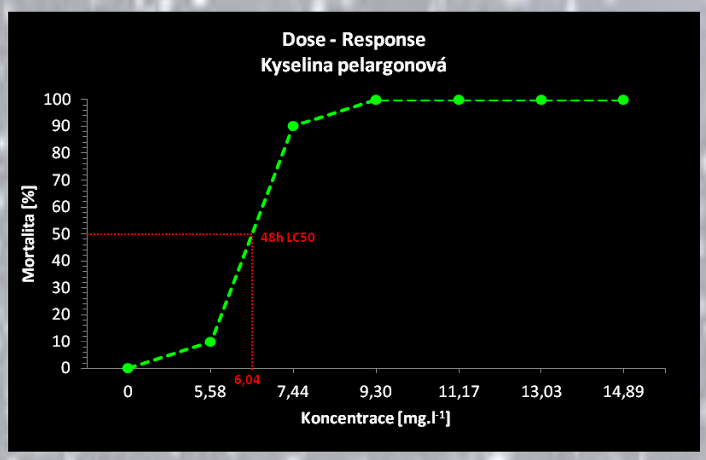
Graf 3: Srovnání účinku jednotlivých koncentrací kyseliny pelargonové na počet buněk zelené řasy (*Desmodesmus communis*) v 1 ml po 48 hodinách (N.S. not significant, * p<0,05)

Obr. 2: Danio pruhované (*Danio rerio*)

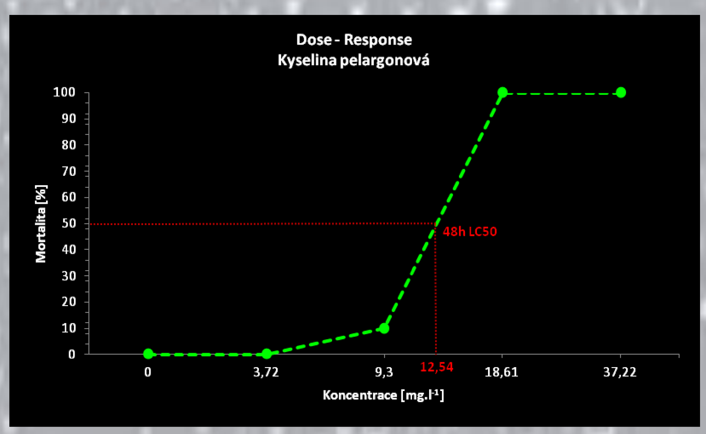
Graf 3 znázorňuje účinek jednotlivých koncentrací na počet buněk zelené řasy (*Desmodesmus communis*) ve 48 hodinách. Z grafu je patrný statisticky průkazný rozdíl u koncentrace 0,37 a 3,72 mg.l^{-1} oproti kontrole. V tabulce 1 je uvedeno průměrné množství chlorofylu-a po 168 hodinách délky trvání testů.

Závěr

S kyselinou pelargonovou jsme provedli testy akutní toxicity na rybách statickou a semistatickou metodou a testy inhibice s kulturou zelené řasy *Desmodesmus communis.* Kontrolovali jsme účinnost přípravku pomocí měření hustoty v Bürkerově komůrce pod mikroskopem s fluorescencí (Obr. 1). U inhibičních testů na zelené řase *Desmodesmus communis* po 48 hodinách byl statisticky významný pokles počtu buněk zelené řasy u koncentrace 0,37 a 3,72 mg.l^{-1}. Po této době látka přestala působit inhibičně a projevovala se stimulačním účinkem. Na konci testu jsme sledovali obsah chlorofylu – a zelené řasy a bylo zjištěno že zelená řasa *Desmodesmus communis* byla po 168 hodinách ve všech koncentracích fotosynteticky aktivní.



Graf 1: Mortalita Dania pruhovaného (*Danio rerio*) v různých koncentracích kyseliny pelargonové při testu akutní toxicity statickou metodou (znázornění LC50 ve 48 hodinách – 6,04 mg.l^{-1})



Graf 2: Mortalita Dania pruhovaného (*Danio rerio*) v různých koncentracích kyseliny pelargonové při testu akutní toxicity semistatickou metodou (znázornění LC50 ve 48 hodinách – 12,54 mg.l^{-1})

Použitá literatura

•TECHER, D., MILLA, S., FONTAINE, P., VIOT, S., & THOMAS, M. (2015). Acute toxicity and sublethal effects of gallic and pelargonic acids on the zebrafish Danio rerio. *Environmental Science and Pollution Research.* 22, 5020-5029

•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

•TOXNET (2008). *Nonanoic acid*. [Online] TOXNET - Toxicology Data Network US National Library of Medicine, National Institutes of Health, Health & Human Services; [Citace: 18.6.2015] http://www.toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+5554

•SCHOLZ S, FISCHER S, GÜNDEL U, KÜSTER E, LUCKENBACH T, & VOELKER D. (2008). The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research International.* 15, 394-404.

•ČSN EN ISO 8692 (2005): Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas. Praha: Český normalizační institut, 24 str.

•ĆSN 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.

•ĆSN EN ISO 7346-2 (1999): Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [Branchydanio rerio Hamilton – Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] Část 2: Semistatická metoda. Praha: Český normalizační institut.

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

Poděkování

Tato publikace je spolufinancována z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky.

Byla vydána za podpory projektu OP VK **CZ.1.07/2.2.00/28.0302** Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace

evropský sociální fond v ČR · EVROPSKÁ UNIE · MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY · OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost · Mendelova univerzita v Brně · CZ.1.07/2.2.00/28.0302

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ