

TOXIKOLOGICKÁ RIZIKA HERBICIDŮ BROMOXYNILU A IOXYNILU

PAVLÍNA JANŮ a PETRA LOVECKÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
pavlina.janu@vscht.cz, petra.lovecka@vscht.cz

Došlo 8.10.12, přepracováno 12.5.13, přijato 20.6.13.

Klíčová slova: benzonitrilové herbicidy, ioxynil, bromoxynil, toxicita, genotoxicita, degradace, způsob účinku

Obsah

1. Úvod
2. Benzonitrilové herbicidy
 - 2.1. Způsob použití
 - 2.2. Degradace a fyzikálně-chemické vlastnosti
 - 2.2.1. Abiotická a biotická degradace
 - 2.2.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti
 - 2.2.3. Vlastnosti esterových forem herbicidů
 - 2.3. Způsob účinku
 - 2.4. Toxicita herbicidů
 - 2.4.1. Akutní, subakutní, chronická toxicita
 - 2.4.2. Genotoxicita
 - 2.4.3. Environmentální toxicita
 - 2.4.4. Toxicita pro člověka a denní příjem
3. Závěr

1. Úvod

Používání herbicidů patří již po několik desetiletí ke značně kontroverzním tématům. Přináší nám užitek v podobě zahubení nepohodlných plevelů a mnohonásobným zvýšení výnosů pěstovaných plodin. Zároveň však může mít přítomnost cizorodých látek v životním prostředí značné negativní důsledky. Obzvláště to platí u pesticidních látek, určených primárně k poškození a hubení škůdců.

Některé fyzikálně-chemické vlastnosti pesticidů, především rozpustnost ve vodě, lipofilita a tenze par, jsou spoluodpovědné za míru degradace, bioakumulace, hromadění v podzemních zdrojích vod, zvýšenou migraci anebo naopak sorpci. Následkem těchto procesů může docházet nejen k akutnímu, ale také chronickému působení látek na jedince, populace i celé ekosystémy, a to i ve velkých vzdálenostech od míst aplikace.

Odhadnout toxicitu a chování látek v prostředí není zatím možné ani s přispěním moderního softwaru a metod QSAR (analýza kvantitativních vztahů mezi chemickou

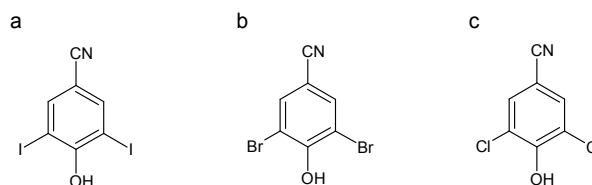
strukturou a biologickou účinností). Pro stanovení potenciální nebezpečnosti pro životní prostředí je tedy stále jedinou možností rozsáhlé testování na organismech, biologické testy *in vitro* a testy *in situ*. Aby co nejméně docházelo k nečekaným nepříjemným překvapením spojených s používáním pesticidů (jako tomu bylo např. v 60. letech minulého století u insekticidu 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethanu) dobře známého jako DDT), byla zavedena přísnější legislativa. Některé látky byly postupně zakázány celosvětově, u jiných byla spotřeba alespoň omezena. Pro každé nové schválení pesticidu je nyní v EU nutné látky testovat v doporučených testech OECD, zahrnujících například test akutní orální toxicity¹, test na dafniích² a sladkovodních řasách³. Některé negativní efekty se nám přes všechnu snahu nemusí podařit těmito testy postihnout.

Důkazem nám může být teprve nedávný zákaz používání herbicidů dichlobenilu⁴ a atrazinu⁵ v EU. Dichlobenil byl zakázán nejen kvůli vysoké toxicitě pro ptáky, ale především z důvodu velkého rizika kontaminace podzemních vod jedním z jeho degradačních produktů. U atrazinu bylo prokázáno poškozování endokrinního systému obojživelníků⁶. Atrazin působící jako inhibitor fotosyntézy musel být samozřejmě v místech použití nahrazen. Jednu z možných alternativ představují také herbicidy benzonitrilové řady, především bromoxynil a ioxynil.

2. Benzonitrilové herbicidy

Halogenové deriváty benzonitrilů a hydroxybenzonitrilů nejsou mezi herbicidy žádnými nováčky. Byly objeveny už v 60. letech minulého století při testování pesticidních vlastností řady látek metodou „pokus – omyl“. Účinnost hydroxybenzonitrilů je dána typem halogenu v molekule a klesá v řadě ioxynil, bromoxynil, chloroxynil (obr. 1), přičemž chloroxynil se vzhledem k svému nízkým herbicidním účinkům jako herbicid nepoužívá⁷.

K benzonitrilovým herbicidům se také řadí zakázaný dichlobenil, u něhož však především nepřítomnost fenolo-



Obr. 1. **Struktura benzonitrilových fenolů:** a) ioxynil (3,5-dijod-4-hydroxybenzonitril), b) bromoxynil (3,5-dibrom-4-hydroxybenzonitril) a c) chloroxynil (3,5-dichlor-4-hydroxybenzonitril)

vé skupiny na benzenovém jádře stojí za jeho výrazně odlišnými vlastnostmi, způsobem účinku a tedy i odlišným způsobem použití⁸.

2.1. Způsob použití

Halogenované hydroxybenzonnitrily patří do skupiny kontaktních herbicidů. Jedná se o látky určené především k hubení širokolístých plevelů v obilných a cibulových polích, ale použití našly i v průmyslových zónách, v parcích, na loukách, na okrasných trávnících, chodnících a dvorcích.

Bývají používány jako postemergentní (aplikované po vzejití) nejlépe do objevení druhého děložního listu. Mezi cílové plevely patří především zeměděm, starček, mák, opletka, hořčice, rdesno, maceška, ptačinec, hluchavka, kokoška, rozrazil, rmen a konopice. Po aplikaci dochází během 36 hodin k tvorbě nekrotických skvrn na listech v místě aplikace a odtud se tato chloróza šíří i do nezasažených listů.

Jejich selektivita je nejspíše dána rozdílnou schopností absorpce a metabolizace látky citlivými a rezistentními druhy. Dobrá selektivita pro obilniny platí od rozvinutí druhého listu až do vzniku druhého kolénka, včetně^{9,10}.

Bromoxynil i ioxynil nalezneme v komerčních přípravcích většinou ve formě fenolu nebo oktanoátu v koncentracích 80–280 g l⁻¹ samostatně nebo ve směsi s jinými účinnými látkami. Na bázi bromoxynilu jsou v ČR dostupné především postřikové přípravky Bromotril 25 SC a Pardner 22,5 EC. Ioxynil bývá v přípravcích přítomen většinou ve směsi s dalšími herbicidy, především bromoxynilem, 2,4-D (kyselinou dichlorfenoxyoctovou), MCP-P (kyselinou (R)-2-(4-chlor-2-methylfenoxy)propánovou) a dalšími.

Roční spotřeba komerčních herbicidů na bázi bromoxynilu v USA je odhadována na 1100–1300 tun (cit.^{9,10}). Běžně používané dávky bromoxynilu i ioxynilu v zemědělství jsou v rozmezí 0,4–1,1 kg/ha (cit.^{10,11}), přestože výrobci bývá většinou udávána nižší doporučená dávka. Velkou výhodou představuje používání směsných přípravků, jež dovoluje použití nižších dávek a rozšíření spektra citlivých plevelů. Bromoxynil je na některé druhy plevelů trochu méně účinný než ioxynil, ale je levnější¹⁰.

2.2. Degradace a fyzikálně-chemické vlastnosti

2.2.1. Abiotická a biotická degradace herbicidů

Po aplikaci dochází k abiotické a biotické degradaci herbicidů s rozdílnou rychlostí dle povahy prostředí, přičemž abiotická degradace, jako je fotolýza nebo alkalická hydrolyza, není tak důležitá. Nejúčinnější a tudíž klíčová je jejich mikrobiální degradace. Hlavními mikrobiálními degradačními produkty jsou příslušné benzoové kyseliny a benzamidy, vzniklé přeměnou nitrilové skupiny. Kyseliny mohou vznikat buď přímou hydrolyzou katalyzovanou mikrobiální nitrilasou (EC 3.5.5.1) nebo za spoluúčasti dvou mikrobiálních enzymů: nitrilhydratasy (EC 4.2.1.84), která umožňuje přeměnu nitrilů na příslušné benzamidy,

a amidasy (EC 3.5.1.4), která hydrolyzuje vzniklé benzamidy na benzoové kyseliny^{11,12}. Následná degradace zahrnuje redukční dehalogenaci, rozštěpení kruhu a mineralizaci. Benzamidy jsou k degradaci odolnější. Kompletní mineralizace proto bývá až následkem mikrobiální adaptace po opakované expozici herbicidu¹¹.

Produkty částečné mikrobiální degradace benzonitrilů (příslušné kyseliny a amidy) vykazují několikanásobně nižší herbicidní vlastnosti. Na hydrolyze bromoxynilu za vzniku méně účinné kyseliny 3,5-dibrom-4-hydroxybenzoové je založena i odolnost geneticky upravené bavlny rezistentní k působení bromoxynilu⁹. Při testování vlivu herbicidů a jejich metabolitů na klíčící semena bylo prokázáno, že metabolity inhibují klíčení méně účinně než příslušné mateřské sloučeniny¹².

2.2.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Bromoxynil a ioxynil jsou středně rozpustné ve vodě (s rozpustností 130 mg l⁻¹ pro bromoxynil a 50 mg l⁻¹ pro ioxynil při teplotě 20 °C) a díky přítomnosti fenolové skupiny v molekule patří mezi slabé kyseliny (pKa bromoxynilu je 3,86 a ioxynilu 3,96). V prostředí jsou středně mobilní se sorpčním koeficientem K_{OC} pro bromoxynil v intervalu 87–140 l kg⁻¹ a pro ioxynil 155–540 l kg⁻¹. Patří mezi málo těkavé látky, tlak nasycených par bromoxynilu je pouze 0,0063 mPa, pro ioxynil je stanoven jako menší než 1 mPa při 20 °C (Henryho konstanta K_H pro bromoxynil je $1,92 \cdot 10^{-8}$ atm m³ mol⁻¹ a pro ioxynil $5,99 \cdot 10^{-9}$ atm m³ mol⁻¹).

Výše uvedené metabolity jsou díky svým karboxylovým nebo amidovým skupinám rozpustnější ve vodě a mobilnější než původní herbicidy. To však ve výsledku znamená, že mohou snadněji přecházet do spodních vod a dalších zdrojů pitné vody¹¹.

2.2.3. Vlastnosti esterových forem herbicidů

Do prostředí se kromě fenolů dostávají i esterové formy těchto herbicidů. Oktanoáty jsou mobilní a nejsou perzistentní. V prostředí se rozkládají abiotickou hydrolyzou, fotolyticky a dále podléhají mikrobiálnímu rozkladu za aerobních i anaerobních podmínek. Poločas rozpadu závisí na okolních podmínkách a vlastnostech půdy a pro bromoxyniloktanoát se pohybuje od 1 do 34 dnů (cit.^{9,10}).

Je nutné si uvědomit, že fyzikálně-chemické vlastnosti látek nejsou pouze parametry určujícími distribuci látek v prostředí, což ovlivní např. způsob a podmínky aplikace herbicidů. Jsou rovněž neopomenutelnými faktory pro způsob účinku v organismu a s tím spojené riziko nežádoucí toxicity.

2.3. Způsob účinku

Biochemický účinek benzonitrilů s fenolovou skupinou spočívá zřejmě především v odprášení oxidativní fosforylace v mitochondriích a zřejmě i fotofosforylace v chloroplastech^{13–17}.

Pod pojmem odpřažení dýchacího řetězce je myšleno narušení protonového elektro-chemického gradientu na mitochondriální membráně, a tím zamezení produkce energie ve formě vznikajícího ATP. Tento proces byl pozorován i u jiných slabých kyselin^{18,19}.

Hlavní úlohu zde hraje přítomnost disociovatelné skupiny v molekule aktivní látky, tedy např. fenolové skupiny bromoxynilu nebo ioxynilu. Ta je po vstupu do buňky v neutrálním prostředí cytoplasmy převážně disociovaná. Celá molekula však přesto díky své lipofilitě snadno prochází přes vnější mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru. Tam vlivem nižšího pH vzniklého přebytkem H^+ iontů přenášených dýchacím řetězcem z mitochondriální matrix přijme proton a jako neutrální molekula prostupuje vnitřní mitochondriální membránou do matrix, kde v neutrálním prostředí opět protony uvolňuje. Takto jsou vodíkové protony přenášeny zpět do matrix na molekule aktivní látky, bez zapojení mitochondriální ATPasy, tedy aniž by mohlo dojít k ukládání chemické energie do molekul ATP.

Obdobný proces zajišťovaný odpřahujícími proteiny probíhá fyziologicky např. u hibernujících zvířat nebo novorozenců, kde slouží k produkci tepla. Objev přenosu protonů bez produkce energie samozřejmě nezůstal bez povšimnutí farmaceutických firem a vedl k vývoji nových léčiv proti obezitě na bázi dinitrofenolů. Vzhledem k významným vedlejším účinkům však byl další výzkum zastaven²⁰.

Dalším velmi významným efektem těchto herbicidů je inhibice elektronového transportu ve fotosystému II vyšších rostlin, kde působí jako kompetitivní inhibitory. Herbicidy brání přenosu elektronu na sekundární akceptor Q_B (plastochinonový sekundární akceptor ve fotosystému II), který nahrazují v jeho vazebném místě na proteinu D1 (protein spoluvytvářející reakční centrum fotosystému II). Touto vazbou ovlivňují produkci singletového kyslíku a také míru fotoinhibice, což může přispět k jejich negativnímu působení^{21–23}. Především u ioxynilu, který více inhibuje degradaci proteinu D1, je fytotoxické působení zesíleno vystavení světlu²⁴.

Kromě ovlivnění funkce chloroplastů a mitochondrií bylo zjištěno, že bromoxynil a ioxynil zabraňují inkorporaci fosfátů do nukleových kyselin v listech¹⁹. Rovněž je inhibována inkorporace CO_2 do acetyl-CoA nezbytná pro syntézu mastných kyselin²⁵. Všechny výše zmíněné procesy mohou následně vést k smrti zasažených buněk a ovlivnění životaschopnosti celého organismu. Při konfokálním snímkování buněk *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že buněčné smrti předchází agregace GFP-značené nitrilasy 1 (tj. nitrilasy 1 značené zeleným fluorescenčním proteinem), stejně jako je tomu po fyzikálním poškození buněk²⁶.

S rozšiřujícími se znalostmi biochemických účinků těchto látek se začíná stále více pochybovat o tom, zda vliv na energetický metabolismus rostlinné buňky je primární a jedinou příčinou buněčné smrti.

Nezanedbatelné jsou i další účinky na homeostázu rostlinné buňky. Vesměs jsou závislé na nižší hodnotě

extracelulárního pH a klíčovou roli v nich hraje právě fenolová skupina, schopná disociace a přenosu H^+ iontů přes membránu. V neutrálním nebo lehce zásaditém extracelulárním prostředí nebyly tyto děje pozorovány. Je však dobré si uvědomit, že právě prostředí rostlinného apoplastu, sloužícího k mezibuněčnému transportu látek, je slabě kyselé.

V nízkém pH docházelo u buněk řas *Chara corallina* k inhibici proudění cytoplasmy a u pylových zrn lilie k acidifikaci cytosolu, což jsou procesy samy o sobě pro buňku smrtící. Okyselení cytoplasmy totiž postupně vede k inhibici proudění cytoplasmy, ovlivnění buněčných procesů závislých na pH, narušení semipermeability buněčné membrány, poklesu viability a smrti buněk²⁷. Vzhledem k rychlosti, s jakou dochází k inhibici proudění cytoplasmy (do 60 min od přidání aktivní látky, přičemž během prvních 10 min poklesne rychlost proudění na polovinu) i okyselení cytoplasmy (do 15 min), je jen málo pravděpodobné, že by šlo o následek inhibice syntézy ATP během fotosyntézy nebo buněčného dýchání.

Analogy benzonitrilů bez fenolové skupiny (např. 3,5-dichlorbenzonitril) nezpůsobují okyselení cytosolu ani neinhibují proudění cytoplasmy, a to ani při nízkém extracelulárním pH. Je tedy potvrzeno, že acidifikace je umožněna především přítomností disociovatelné fenolové skupiny v molekule aktivní látky²⁷.

Dalším zajímavým efektem pozorovaným pouze v kyselém pH byla depolarizace cytoplasmatické membrány²⁸. Lze však předpokládat, že je to jen následek předchozích dějů. Vztah mezi depolarizací membrány a acidifikací cytosolu byl prokázán už v roce 1988 na rhizoidních buňkách²⁹.

Průběh depolarizace membrány po působení hydroxybenzonitrilů u *Chara corallina* byl obdobný jako po inhibici elektrogenních protonových pump³⁰. Protože tyto látky zprostředkovávají tok H^+ membránou, mohou rovněž ovlivňovat funkci tohoto přenosu. Přímá inhibice protonových pump byla vyloučena³¹. S největší pravděpodobností dochází k inhibici vlivem změny vnitrobuněčného pH, případně vlivem inhibice funkce chloroplastů nebo mitochondrií. Práce membránových elektrogenních protonových pump je závislá také na extracelulárním pH (cit.³²).

Herbicidy z jiných tříd ani analogy benzonitrilů bez fenolové skupiny, tj. bez možnosti přenášet H^+ přes membránu na své molekule, neměly žádný významný vliv na depolarizaci membrány²⁸. Zřejmě tedy, ač jde i o blízké analogy, představuje fenolová skupina v molekule významný rozdíl pro způsob účinku těchto látek.

2.4. Toxicita herbicidů

Rychlá přeměna esterových forem herbicidů na formu fenolovou *in vivo* po orální aplikaci umožňuje hodnocení toxicity pomocí dat pro fenoly.

Při metabolických studiích na laboratorních krysách byly nalezeny tyto látky nebo jejich metabolity převážně v krvi, a to především v plasmě (vázaný na plasmatické proteiny), a dále v játrech, ledvinách, ale také ve štítné

Tabulka I

Shrnutí některých toxikologických údajů bromoxynilu a ioxynilu. Hodnoty LD₅₀ a NOEL jsou uváděny pro orální aplikaci

Pokusný organismus	Toxikologický index [jednotka] nebo typ testu ^a	Výsledek testu (v indexu citace)	
		bromoxynil	ioxynil
Akutní toxicita			
krysa	LD ₅₀ [mg/kg]	81 ³³	114 ³⁴
bezobratlí <i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ [mg/l]	12,5 ³³	3,14 ³⁴
řasy <i>Navicula pelliculosa</i>	EC ₅₀ [mg/l]	0,12 ³³	0,15 ³⁴
Subchronická toxicita			
pes	NOEL [mg/kg/den]	méně než 1 ⁹	méně než 1 ¹⁰
myš	NOEL [mg/kg/den]	3,9 ⁹	neznámá
krysa	NOEL [mg/kg/den]	28 ⁹	1 ¹⁰
Chronická toxicita			
krysa	NOEL [mg/kg/den]	5 ⁹	0,5 ³⁴
rostliny <i>Lemna gibba</i>	EC ₅₀ [mg/l]	0,033 ³³	0,027 ³⁴
bezobratlí <i>Daphnia magna</i>	NOEC [mg/l]	3,1 ³³	0,013 ³⁴
Vývojová toxicita			
králík	NOEL [mg/kg/den]	méně než 15 ⁹	neznámá
myš	NOEL [mg/kg/den]	32 ⁹	neznámá
krysa	NOEL [mg/kg/den]	5 ⁹	4 ¹⁰
Mutagenita			
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	Amesův test	negativní ⁹	pozitivní ¹⁰
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	Amesův test	negativní ⁹	negativní ¹⁰
<i>Escherichia coli</i>	DNA reparační test	negativní ⁹	negativní ¹⁰
Karcinogenita			
myš	<i>per os</i> 13 mg/kg/den	adenomy a karcinomy jater ⁹	nádory jater, štítné žlázy, dělohy ¹⁰

^a LD₅₀ – letální dávka testované látky, způsobující úhyn 50 % pokusných organismů; EC₅₀ – efektivní koncentrace, způsobující ovlivnění 50 % pokusných organismů; NOEL [NOEC] – dávka [koncentrace] látky nezpůsobující žádné účinky na pokusných organismech

žláze, kde se jód pocházející z ioxynilu zabudovává do jejích přirozených produktů. Množství nalezená ve tkáních samic krys často několikanásobně převyšovala hodnoty zjištěné u samců. K vylučování z těla dochází převážně močí a je u samic výrazně pomalejší než u samců. Nezměněné látky bývají vylučovány většinou samostatně bez konjugace, metabolity především ve formě konjugátů. Hlavními zjištěnými metabolity byly 3-halogen-4-hydroxybenzonitrily, 4-hydroxybenzonitrily, 3,5-dihalogen-4-hydroxybenzoové kyseliny a 2,6-dihalogenfenoly^{9,10}.

Toxikologická data o obou látkách jsou dostupná např. ve zprávách EC^{33,34}, U.S. EPA⁹ nebo britského PSD¹⁰ a část z nich je shrnuta v tab. I.

2.4.1. Akutní, subchronická a chronická toxicita

Toxicita byla klasicky testována především na krysách, myších, králících a psech. Bromoxynil i ioxynil jsou pro savce poměrně málo akutně toxické. Při orálním podání byla určena letální dávka LD₅₀ pro krysu 81, resp. 114 mg kg⁻¹ váhy zvířete. Mezi zjevné příznaky patří prohloubené dýchání, útlum a křeče^{9,34}.

Po subchronickém a chronickém působení však byla pozorována řada orgánových, systémových, reprodukčních i vývojových změn. Typický je především váhový úbytek a změny na játrech a v množství jaterních enzymů u pokusných zvířat.

Dávky herbicidů NOEL, tj. takové dávky, po kterých nebyly pozorovány žádné prokazatelné efekty (no observed effect level), jsou shrnuty v tab. I. Subchronické orální podávání bromoxynilu krysám v množství od 58 mg/kg/

den po dobu 13 týdnů vedlo ke snížení váhy u pokusných jedinců a změnám v hladinách některých enzymů (alanintransaminasy, aspartáttransaminasy a alkalické fosfatasy). Množství od 13 mg/kg/den po dobu 12 týdnů způsobilo u myši hypertrofii jater. U psů bylo po 12 týdenní orální aplikaci bromoxynilu pozorováno zvýšené slinění, zrychlený dech, průjmy, snížení počtu erytrocytů a množství hemoglobinu v krvi u dávek vyšších než 5 mg/kg/den, přičemž dávky nad 16 mg/kg/den působily vysoce toxicky až letálně⁹.

Velmi podobné příznaky byly pozorovány i po subchronickém podávání ioxynilu, pouze v nižších dávkách. Ke změnám v množství jaterních enzymů, krevního hemoglobinu a počtu erytrocytů stačily u krys dávky nad 1 mg/kg/den. Také u psů odhalila hematologická analýza snížení počtu erytrocytů a hemoglobinu už při dávkách 1 mg/kg/den (cit.¹⁰). U krys docházelo ke snížení hmotnosti při dávkách 16 mg/kg/den a navíc bylo pozorováno zvětšení štítné žlázy, především u samic¹⁰. Rostoucí podezření o účinku na endokrinní funkci štítné žlázy bylo potvrzeno *in vitro*. Ioxynil se sice neváže přímo na thyroïdní receptor β (cit.³⁵), zato zřejmě ovlivňuje jeho hormonálně řízenou expresi³⁶. Navíc vykazuje zvýšenou afinitu k transthyretinu, což je protein sloužící k transportu hormonů štítné žlázy^{37,38}.

Po chronickém působení trvajícím 120 týdnů byla pro krysy stanovena hodnota NOEL pro bromoxynil 5 mg/kg/den a hodnota NOAEL (dávka, při které nebyl pozorován žádný škodlivý účinek, z angl. no observed adverse effect level) pro ioxynil 0,5 mg/kg/den při podávání po dobu dvou let. Projevy dlouhodobého orálního podávání ve stravě byly obdobné jako u subchronické expozice^{9,10}.

Přestože se nepředpokládá, že by měl bromoxynil přijímaný ve stravě negativní vliv na vývoj dětí⁹, Rogerse a spol. prokázali vývojovou toxicitu bromoxynilu u krys a myši³⁹. Po působení bromoxynilu na březí samice od 6. do 15. dne gestace docházelo ke snížení váhy plodu a vyšší četnosti výskytu kosterních abnormalit jako je nadměrný počet žeber nebo nedostatečná osifikace obratlů, a to u myši při dávkách 96 mg/kg/den a u krys už při dávkách 15 mg/kg/den. Podobné příznaky byly pozorovány⁹ i u mláďat králíků při dávkování od 15 mg/kg/den.

Při studiu reprodukční toxicity ve 2 a 3 generačních testech nebyly prokázány při zkoumaném dávkování žádné významné efekty. Při nejvyšší testované dávce 21 mg/kg/den se objevily pouze systémové změny jako zvětšení jater a nižší nárůst hmotnosti a u mláďat krys byla pozorována nižší váha během laktace a opožděné otevírání očí⁹.

Ioxynil si v teratogenních studiích vedl obdobně. Po orálním podávání březím samicím krys v dávkách nad 4 mg/kg/den vyvolával snížení váhy plodů, poruchy v osifikaci žeber, výskyt nadbytečného páru žeber nebo také abnormality vývoje očí jako je například anoftalmie¹⁰.

2.4.2. Genotoxicita

Předpokládá se, že tyto látky inhibují syntézu DNA. Schopnost obou látek způsobovat mutace byla zkoumána

desítkou genotoxických testů prováděných *in vitro*, ale také několika testy *in vivo*. Při testech *in vivo* nebylo pozorováno mutagenní působení, *in vitro* byl u bromoxynilu i ioxynilu pozitivní pouze výsledek testu na myších lymfoidních buňkách po metabolické aktivaci, u bromoxynilu bakteriálního DNA reparačního testu na *Escherichia coli* a u ioxynilu Amesův test na některých kmenech *Salmonella typhimurium* a také byl pozorován nárůst aberací při testu na vaječnickových buňkách křečička čínského^{9,10}.

Bromoxynil zvyšoval výskyt adenomů i karcinomů jater u myši (při dávkách 13 mg/kg/den *per os* po dobu 18 měsíců). Na základě extrapolace těchto dat na člověka byl klasifikován do skupiny C, jako potenciální lidský karcinogen⁹. Po orálním podávání ioxynilu vyšším než 1,5 mg/kg/den byl pozorován zvýšený výskyt adenomů a karcinomů jater a folikulárních i C-buněk štítné žlázy u krys a myši, přičemž vliv na štítnou žlázu byl patrnější u samic. U myši byly navíc nalezeny nádory dělohy¹⁰. Mechanismus zapříčínující tuto zvýšenou tumorigenezi je prozatím neznámý, ale při pokusech na buněčných kulturách bylo zjištěno, že ioxynil může působit jako inhibitor mezibuněčné komunikace, přesněji vodivých spojů (angl. gap-junction), spoluodpovědných za normální růst a diferenciaci buněk⁴⁰.

2.4.3. Toxicita pro člověka a denní příjem

Na základě chronických studií na pokusných zvířatech bývají ze zjištěných hodnot NOEL nebo NOAEL určeny bezpečné referenční dávky (RfD) pro chronický orální příjem nebo také akceptovatelný denní příjem (ADI, acceptable daily intake) ze všech zdrojů pro člověka, přičemž je zahrnut faktor mezidruhové interpolace (10 \times) a vnitrodruhové variability (10 \times). Tak byla z 18 měsíční studie³³ na myších vypočtena ADI bromoxynilu na 0,01 mg/kg/den. Pro ioxynil byla stanovena ADI 0,005 mg/kg/den na základě dvouleté studie na krysách³⁴. Při extrapolaci dat na ženy a dívky starší 13 let je nutné k předchozímu bezpečnostnímu faktoru (100 \times) zahrnout ještě bezpečnostní faktor (10 \times) pro možnost vývojové toxicity a tedy pro ochranu případných plodů.

Vzhledem k fyzikálně-chemické povaze látek není riziko kontaminace povrchových ani podzemních vodních zdrojů příliš vysoké. Výjimky mohou nastat pouze lokálně, v místech aplikace. Také množství herbicidů zjištěných v potravě bývá nízké, neboť sklizeň probíhá s dlouhým časovým odstupem od aplikace. Člověkem běžně přijímané dávky v potravě a vodě bývají 100 \times menší než doporučené ADI, tedy 10 000 \times než hodnoty NOEL, případné NOAEL, zjištěné pro pokusná zvířata^{9,10}.

Akutní expozice pracovníků se projevuje zvýšeným pocením, závratěmi a bolestmi hlavy^{33,34}.

2.4.4. Environmentální toxicita

Bromoxynil i ioxynil jsou prakticky netoxické pro včely a pouze slabě toxické pro ptáky. Při chronickém působení bromoxynil oktanoátu však u ptáků dochází k ovlivnění reprodukce. Ioxynil jako fenol je pro ptáky výrazněji toxický než oktanoát. Na rozdíl od savců, kde se

toxicita fenolu a příslušného oktanoátu příliš neliší, jsou oktanoáty vysoce toxické, zatímco fenoly jen lehce až středně toxické, pro sladkovodní ryby a bezobratlé. Oktanoáty jsou rovněž vysoce toxické pro mořské živočichy^{9,10}.

3. Závěr

Rychle se rozšiřující poznání v oblasti biologie a chemie nám umožňuje efektivnější a pro životní prostředí únosnější používání pesticidů. Rozsáhlejší, dobře definované testy toxicity a genotoxicity, podrobné prozkoumání biochemického účinku, přesné a vysoce citlivé analytické metody, stanovení fyzikálně-chemických vlastností pesticidů i jejich metabolitů spolu s umírněnou spotřebou snad jednou povedou k tomu, že nebude docházet k opožděnému objevování negativních vlastností pesticidů a s tím souvisejícímu ohrožení lidského zdraví, životaschopnosti některých druhů, a zdraví ekosystémů všeobecně.

Hydroxybenzonnitrily se dosud jeví jako jedny z relativně bezpečných herbicidů. Jsou pro většinu testovaných druhů pouze slabě toxické. Mají vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti, nejsou příliš mobilní, těkavé, ale ani se významně nesorbují na zeminu. Jsou vcelku lehce degradovatelné a při degradaci nevznikají toxičtější nebo výrazně rezistentní produkty. Doufejme jen, že s těmito herbicidy nás žádná nepříjemná překvapení nečeká.

LITERATURA

1. *OECD guidelines for the testing of chemicals: Acute oral toxicity – up-and-down-procedure*, str. 425, Paris 2006.
2. *OECD guideline for testing of chemicals: Daphnia sp., acute immobilisation test*, str. 202, Paris 2004.
3. *OECD guidelines for testing of chemicals: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test*, str. 201, Paris 2006.
4. European Commission: Commission Decision concerning the non-inclusion of dichlobenil in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing that substance (2008/754/EC).
5. European Commission: Commission Decision concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance (2004/248/EC).
6. Hayes T. B., Collins A., Lee M., Mendoza M., Noriega N., Stuart A. A., Vonk, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5476 (2002).
7. Wain R. L.: *Nature* 200, 28 (1963).
8. U.S. Environmental Protection Agency: Reregistration eligibility decision (RED), dichlobenil, EPA-738-R-98-003 (U.S. EPA 1998).
9. U.S. Environmental Protection Agency: Reregistration eligibility decision (RED), bromoxynil, EPA738-R-98-013 (U.S. EPA 1998).
10. Pesticides Safety Directorate, U.K.: Review of the agricultural and horticultural uses of ioxynil (PSD, 1995).
11. Holtze M. S., Sørensen S. R., Sørensen J., Aamand J.: *Environ. Pollut.* 154, 155 (2008).
12. Veselá A. B., Franc M., Pelantová H., Kubáč D., Vejvoda V., Šulc M., Bhalla T. C., Macková M., Lovecká P., Janů P., Demnerová K., Martínková L.: *Biodegradation* 21, 761 (2010).
13. Kerr M. W., Wain R. L.: *Ann. Appl. Biol.* 54, 441 (1964).
14. Ferrari T. E., Moreland D. E.: *Plant Physiol.* 44, 429 (1969).
15. Zottini M., Scoccianti V., Zannoni D.: *Plant Physiol.* 106, 1483 (1994).
16. Argese E., Bettiol C., Marchetto D., De Vettori S., Zambon A., Miana P., Ghetti P. F.: *Toxicol. In Vitro* 19, 1035 (2005).
17. Guan X. F., Zhao G. J., Cai Q. Q., Wang Z. Y., Lu Z. Q., Qiu Q. M., Hong G. L., Liang H.: *Zhonghua Laodong Weisheng Zhiyebing Zazhi* 27, 472 (2009).
18. Reid R. J., Smith F. A., Whittington J.: *J. Exp. Bot.* 40, 883 (1989).
19. Berüter J.: *Vierteljahrsschr. Naturforsch. Ges. Zuerich* 116, 213 (1971).
20. Boelsterli U. A.: *Mechanistic toxicology. The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets*, kap. 17.2. CRC Press, Boca Raton 2007.
21. Janssen M. A. K., Depka B., Trebst A., Edelman M.: *J. Biol. Chem.* 268, 21246 (1993).
22. Kyle D. J., Ohad I., Arntzen C. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 4070 (1984).
23. Krieger-Liszka A.: *J. Exp. Bot.* 56, 337 (2005).
24. Zaki M. A., Taylor H. F., Wain R. L.: *Ann. Appl. Biol.* 59, 481 (1967).
25. Hassal K. A.: *The chemismy of pesticides: Their metabolism, mode of action and uses in crop protection*. Macmillan Press Ltd., London 1982.
26. Cutler S. R., Somerville Ch. R.: *BMC Plant Biol.* 5, 1 (2005).
27. Morimoto H., Shimmen T.: *J. Plant Res.* 121, 227 (2008).
28. Shimmen T.: *J. Plant Res.* 123, 715 (2010).
29. Frachisse J. M., Johannes E., Felle H.: *Biochim. Biophys. Acta* 938, 199 (1988).
30. Shimmen T.: *J. Plant Res.* 117, 291 (2004).
31. Shimmen T.: *J. Plant Res.* 125, 749 (2012).
32. Kawamura G., Shimmen T., Tazawa M.: *Planta* 149, 213 (1980).
33. A European Commission: Review report for the active substance bromoxynil. Bromoxynil SANCO/4347/2000 – final (EC 2004).
34. B European Commission: Review report for the active substance ioxynil. Ioxynil SANCO/4349/2000 final (EC 2004).
35. Ishihara A., Nishiyama N., Sugiyama S. I., Yamauchi K.: *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 36 (2003).

36. Sugiyama S. I., Shimada N., Miyoshi H., Yamauchi K.: *Toxicol. Sci.* 88, 367 (2005).
37. Yamauchi K., Eguchi R., Shimada N., Ishihara A.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, 1250 (2002).
38. Morgado I., Hamers T., Van der Ven L., Power D. M.: *Chemosphere* 69, 155 (2007).
39. Rogers J. M., Francis B. M., Barbee B. D., Chernoff N.: *Toxicol. Sci.* 17, 442 (1991).
40. Leithe E., Kjenseth A., Bruun J., Sirnes S., Rivedal E.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 247, 10 (2010).

P. Janů and P. Lovecká (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Toxicological Hazards of Herbicides Bromoxynil and Ioxynil**

The title herbicides are selective post-emergent contact herbicides currently widely used in the EU and USA to control broad-leaved weeds especially in crops. They are typical inhibitors of photosynthesis acting simultaneously as uncouplers of oxidative phosphorylation. The review briefly discusses their physical and chemical properties, mode of action, degradation and toxicity. Bromoxynil and Ioxynil are of low-to-moderate toxicity for all the tested species, with no *in vivo* genotoxicity. Their main metabolites in microbial degradation are the corresponding acids and amides, which are supposedly less toxic.