

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

Vliv léčiv přítomných v recipientech ČOV na ryby

Autor: Bc. Michal Kubata

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Vladimír Žlábek, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: MSc. Pham Thai Giang

Studijní program a obor: Specializace v oboru rybářství / Rybářství a ochrana vod

Forma studia: kombinovaná

Ročník: 2.

České Budějovice 2017

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že, v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V rámci zpracování diplomové práce jsem se osobně podílel na odběru vzorků ryb, jejich zpracování a přípravě k analýze. V biochemické laboratoři jsem se účastnil analýzy biomarkerů. Samostatně jsem zpracoval veškerá získaná data včetně statistického vyhodnocení.

Datum:

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Vladimíru Žlábkovi Ph.D. a konzultantovi MSc. Pham Thai Giang za metodické vedení a odbornou pomoc. Dále také děkuji všem pracovníkům a doktorandům z Laboratoře environmentální chemie a biochemie a Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie ve VÚRH ve Vodňanech za pomoc a zodpovězení všech mých dotazů.

Diplomová práce vznikla při realizaci projektu podporovaného Grantovou agenturou: 15-04258S Osud a účinky antropogenních polutantů přítomných v recipientech “vyčištěných“ komunálních odpadních vod – komplexní environmentální studie (2015 – 2017, odpovědný řešitel: doc. Ing. Vladimír Žlábek, Ph.D.).

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michal KUBATA**
Osobní číslo: **V15N001K**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**
Název tématu: **Vliv léčiv přítomných v recipientech ČOV na ryby**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem DP je výzkum vlivu cizorodých látek přítomných ve výtocích čistíren komunálních odpadních vod (ČOV) na vodní organismy v reálných podmínkách. Sledovány budou biologické účinky na ryby. Kapr obecný (*Cyprinus carpio*), bude vystaven účinkům antropogenních sloučenin v biologickém rybníku. Pozornost bude zaměřena na dynamiku odezvy a selekci biomarkerů indikujících vliv znečištění na vodní organismy. Výsledky studie přinesou informace o osudu a účincích širokého spektra dosud minimálně sledovaných biologicky aktivních polutantů. Rybník Čezárka (2,6 ha) je biologický rybník určený pro retenci vyčištěné odpadní vody z čističky odpadních vod (ČOV) města Vodňany. Čištění odpadních vod v ČOV zahrnuje primární mechanickou filtraci, sedimentaci a následně technologii aktivovaného kalu. Město Vodňany (7 000 obyvatel) leží v těsné blízkosti řeky Blanice v Jihočeském kraji. Průmyslová činnost zahrnuje drůbeží jatka, výrobu zemědělských strojů, intenzivní zemědělství a zahradnictví. Označený roček kapra (K1 - cca 1000 kusů) pocházející z kontrolního rybníka bude nasazen do rybníka Čezárky na jaře. Exponované ryby (12 jedinců) budou odloveny a vzorkovány po 30, 90, 180 a 360 dnech expozice. Při odběru vzorků budou zaznamenány tělesné parametry a kondiční stav ryb. Vzorky tkání budou individuálně odebrány a skladovány při -80 °C až do analýzy. Účinky odpadních vod z ČOV na ryby budou studovány pomocí sady biochemických markerů, zahrnujících hematologické parametry a biochemický profil krve, parametry oxidativního stresu a antioxidační kapacity, parametry endokrinní rovnováhy a detoxikační enzymatické aktivity jater. Metodiky hodnocení jednotlivých parametrů jsou uvedeny v doporučené literatuře.

Rozsah grafických prací: **5 - 10 grafů, 5 - 10 tabulek**
Rozsah pracovní zprávy: **50 - 70 stran**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Vladimír Žlábek, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant diplomové práce: **MSc. Giang Thai Pham**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Datum zadání diplomové práce: **11. prosince 2015**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2017**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 16. února 2016

Příloha zadání diplomové práce

Seznam odborné literatury:

- Austin B., 2006. The Bacterial Microflora of Fish, Revised. *The Scientific World Journal* 6: 931-945.
- Besemer, K., Peter, H., Logue, J.B., Langenheder, S., Lindstrom, E.S., Tranvik, L.J., and Battin, T.J., 2012. Unraveling assembly of stream biofilm communities. *Isme Journal* 6: 1459-1468.
- Boryshpolets S., Cosson J., Bondarenko V., Gillies E., Rodina M., Dzyuba B., Linhart O. 2013. Different swimming behaviors of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa close to solid and free surfaces. *Theriogenology* 79: 81-86.
- Bricheux, G., Le Moal, G., Hennequin, C., Coffe, G., Donnadiou, F., Portelli, C., Bohatier, J., and Forestier, C., 2013. Characterization and evolution of natural aquatic biofilm communities exposed in vitro to herbicides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88: 126-134.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, J.M., Klaminder J. 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* 339, 814 (2013); DOI: 10.1126/science.1226850
- Corcoran, J., Winter, M.J., Tyler, C.R., 2010 Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology*. 40: 287-304.
- Fick, J., Lindberg, R.H., Parkkonen, J., Arvidsson B., Tysklind, M., Larsson, D.G.J., 2010. Therapeutic Levels of Levonorgestrel Detected in Blood Plasma of Fish: Results from Screening Rainbow Trout Exposed to Treated Sewage Effluents. *Environmental Science & Technology* 44:2661-2666
- Hegelund, T., K. Ottosson, et al. 2004. Effects of the antifungal imidazole ketoconazole on CYP1A and CYP3A in rainbow trout and killifish. *Environ. Tox. Chem.* 23(5): 1326-1334.
- Kroupova, H., Trubiroha, A., Wuertz, S., Kloas, W., 2011. Stage-dependent differences in RNA composition and content affect the outcome of expression profiling in roach (*Rutilus rutilus*) ovary. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 159(2):141-149.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Grabic, R., Li P., Machova, J., Velisek, J., Randak, T., 2010a. Effects of exposure to sublethal propiconazole on the antioxidant defense system and Na⁺-K⁺-ATPase activity in brain of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* 98: 297-303.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Randak, T., 2010b. Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 151: 137-141.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Turek, J., Velisek, J., Pulkrabova, J., Kolarova, J., Sudova, E., Berankova, P., Hradkova, P., Hajslova, J., Randak, T., 2011a. Evaluating environmental impact of STPs situated on streams in the Czech Republic: An integrated approach to biomonitoring the aquatic environment. *Water Research* 45: e1403-e1413
- Li, Z.H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P., Randak, T., 2011b. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 319-327
- Navinier, M., Giraud, E., Le Bris, H., Armand, F., Mangion, C., Ganière, J.-P., 2006. Seasonal variability of intestinal microbiota in rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*), with a particular attention to *Aeromonas* spp. As candidate indicator of antimicrobial resistance. *Revue Méd.Vét.*,157 (12): 599-604.

Ramirez, A.J., Brain, R.A., Usenko, S.,Mottaleb, M.A., O'Donnell, J.G., Stahl, L.L., Wathen, J.B., Snyder, B.D., Pitt, J.L., Perez-Hurtado, P., Dobbins, L.L., Brooks, B.W., Chambliss, C.K., 2009. Occurrence of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Fish: Results of A National Pilot Study in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28 (12):2587-2597.

Randak, T., Zlabek, V., Pulkrabova, J., Kolarova, J., Kroupova, H., Siroka, Z., Velisek, J., Svobodova, Z., Hajslova, J., 2

Obsah

1 ÚVOD	9
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED - VLIV LÉČIV PŘÍTOMNÝCH VE VODĚ NA RYBY	11
2.1 PŘÍMÉ PŮSOBENÍ FARMAK NA RYBY	11
2.1.1 <i>Hormonální přípravky – Endokrinní disruptory</i>	11
2.1.2 <i>Nesteroidní protizánětlivé léky (NSAIDs)</i>	13
2.1.3 <i>Antidepresiva</i>	15
2.1.4 <i>Antimykotika</i>	16
2.1.5 <i>Fibráty</i>	16
2.1.6 <i>Léky na srdeční onemocnění, β-blokátory</i>	17
2.1.7 <i>Antibiotika</i>	17
2.1.8 <i>Antiepileptika</i>	18
2.2 NEPŘÍMÝ VLIV KONTAMINANTŮ NA BÁZI LÉČIV NA RYBY	18
2.3 BIOMARKERY PŮSOBENÍ FARMAK NA RYBY	20
2.3.1 <i>LPO</i>	21
2.3.2 <i>SOD</i>	21
2.3.3 <i>GPx</i>	21
2.3.4 <i>GR</i>	21
2.3.5 <i>GST</i>	22
2.3.6 <i>CAT</i>	22
2.3.7 <i>VTG</i>	22
3 MATERIÁLY A METODY	23
3.1 LOKALITA ODBĚRU VZORKŮ	23
3.2 ODBĚR VZORKŮ	25
3.2.1 <i>Voda</i>	25
3.2.2 <i>Ryby</i>	25
3.3 CHEMIKÁLIE.....	26
3.4 ANALÝZA VZORKŮ VODY	27
3.4.1 <i>Analýza základních hydrochemických parametrů vody</i>	27
3.4.2 <i>Stanovení koncentrace farmak</i>	27
3.5 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA VZORKŮ PLAZMY A TKÁNÍ	28
3.5.1 <i>Stanovení hladiny vitellogeninu</i>	28
3.5.2 <i>Zjištění míry oxidativního stresu</i>	28
3.5.3 <i>Kvantifikace proteinu</i>	30
3.6 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT.....	30
4 VÝSLEDKY	31
4.1 ZÁKLADNÍ HYDROCHEMICKÉ PARAMETRY VODY	31
4.2 KONCENTRACE LÉČIV VE VODĚ	31
4.3 HLADINA VITELLOGENINU V KREVNÍ PLASMĚ.....	32
4.4 MÍRA OXIDATIVNÍHO STRESU	35
4.5 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA EMZYMŮ	36
4.5.1 <i>CAT</i>	37
4.5.2 <i>GST</i>	38
4.5.3 <i>GR</i>	39
4.5.4 <i>GPx</i>	40
4.5.5 <i>SOD</i>	41
5 DISKUSE	43
6 ZÁVĚR	50
7 LITERATURA	52
8 SEZNAM PŘÍLOH	58

8.1 OBRÁZKY	58
8.2 TABULKY	58
8.3 GRAFY	58
9 ABSTRAKT	97
10 ABSTRACT	98

1 Úvod

Se vzrůstající životní úrovní ve vyspělých zemích stoupá také množství používaných léčiv. Odhad hodnoty léčiv, které budou spotřebovány, v roce 2020 se predikuje na 1,3 triliónu USD (IMS Health, 2015). Užívaná léčiva jsou lidským organismem využita jen z části a zbytek je vyloučen buď v původní formě, nebo ve formě metabolitu. Velká část humánních léčiv je užívána orálně a poměr retence léčiva v těle se pohybuje v rozsahu 20 – 80 % (Holford, 2001). Zbytek léčiva, které nebylo využito tak končí v odpadních vodách (Kotyza a kol. 2009). V současnosti v Evropě převážná většina odpadních vod z lidských sídel končí v čistírnách odpadních vod (Li a kol., 2011a). Koncentrace farmak zaznamenané na odtocích z čistíren odpadních vod se pohybují v řádech jednotek $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ až $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Trudeau a kol., 2005). Konečná koncentrace léčiv ve vyčištěné odpadní vodě závisí na míře degradace dané látky v systému (Richardson a Bowron, 1985). Léčiva přítomná v odtocích z čistíren odpadních vod se tak dostávají přímou cestou do recipientu. Další možná cesta, jak se mohou tyto látky dostat do vodního prostředí, je splach ze zemědělských ploch, na které byl předtím aplikován čistírenský kal (Aga a kol., 2008). Při vstupu těchto látek do vodního prostředí hrozí reálné riziko ekologického ovlivnění společenství organismů obývajících dané prostředí. Přítomnost farmak v rybích tkáních prokázala studie provedená v USA, při které byly naměřeny koncentrace farmak ve svalovině a játrech v řádu jednotek až desítek $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$. Ještě vyšších hodnot dosahovaly koncentrace složek kosmetických produktů (parfémové vůně: galaxolid 300 - 2100 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$; tonalid 21 - 290 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$). V játrech byly naměřeny vždy vyšší hodnoty než ve svalovině (Ramirez a kol., 2009). Celá řada studií prokázala nepříznivý účinek reziduí farmak již v koncentracích běžně se vyskytujících v povrchových vodách (Jobling a kol., 1998; Lange a kol., 2009; Hoeger a kol. 2005). Cílem této práce bude shrnout poznatky o vlivu léčiv přítomných ve vodním prostředí na ryby a na základě výsledků z experimentální části diplomové práce rozhodnout, zda lze potvrdit či vyvrátit hypotézu:

Zařazení biologického rybníka jako terciální stupeň čistírny odpadních vod je vhodnou variantou zlepšení čištění městských odpadních vod.

Vhodnost tohoto kroku je posuzována ze dvou úhlů pohledu na danou problematiku.

- A. Vliv vyčištěných odpadních vod na ekologické podmínky života rybí obsádky.
- B. Bezpečnost konzumace ryb s přihlédnutím k faktické přítomnosti organických mikropolutantů.

2 Literární přehled - vliv léčiv přítomných ve vodě na ryby

Vzhledem k faktu, že ryby trvale obývají vodní prostředí, je pravděpodobné že na ně bude mít přítomnost léčiv v tomto prostředí určitý vliv. Příjem farmak může nastat povrchem kůže nebo žaber, orálně v potravě nebo maternální cestou či transferem kontaminantů přes tukové zásoby jiker (Corcoran a kol., 2010). Léčiva přítomná ve vodním prostředí mohou ryby ovlivňovat buď přímým působením na rybí organismus, nebo nepřímo vlivem na ekosystém, v němž ryby žijí.

2.1 Přímé působení farmak na ryby

2.1.1 Hormonální přípravky – Endokrinní disruptory

Látky ze skupiny endokrinních disruptorů (z angl. Endocrine Disrupting Chemicals – EDC) je skupina látek, které mají na svědomí narušení endokrinních drah. To v konečném důsledku vede k poruchám reprodukce. Již koncem devadesátých let dvacátého století byl prokázán vliv farmak na bázi hormonů na reprodukci populace plotice obecné (*Rutilus rutilus*) ve Velké Británii (Jobling a kol., 1998). Vyšetřování jedinci pocházeli z lokalit pod vyústěním vtoku odpadních vod do řeky, dále nad těmito místy proti proudu. Jedinci odlovení z řek, které nejsou zatěžovány odpadními vodami, sloužili jako kontrolní skupina k porovnání změn. Během histologického vyšetření gonád byla zjištěna závislost podílu intersexních jedinců v závislosti na druhu lokality. Pod místy vyústění odpadních vod se podíl intersexních jedinců pohyboval v intervalu 16 – 100 %. Nad těmito místy bylo zjištěno 11,7 – 44,4 % intersexních jedinců a v kontrolní skupině se podíl takovýchto jedinců pohyboval v rozsahu 4 – 18,1 %. Vliv **estrogenu** se prokázal i při kvantifikaci vitellogeninu v krevní plasmě, kde byly koncentrace u ryb pod vtokem splašek mnohem vyšší (Jobling a kol., 1998). V jiné studii z Velké Británie byla testovaná skupina plotice obecné vystavená účinkům syntetického hormonu **17 α -ethinylestradiolu (EE2)**. Během této dvouleté studie bylo prokázáno účinné působení této látky v takových koncentracích, které byly ekvivalentní naměřeným koncentracím v Evropských tocích. Expozice ryb v řízených podmínkách v koncentraci 4 ng · l⁻¹ EE2 po dobu 720 dní zapříčinila kompletní feminizaci celé populace (Lange a kol., 2009). Intersexní jedinci byli zjištěni i u vyšetřované samčí skupiny jeliců (*Squalius cephalus*) z Labe v lokalitě po proudu od Ústí nad Labem

(Randák a kol., 2009). Fick a kolektiv (2010) prováděli studii se zaměřením na biokoncentraci 25 vybraných farmak v krevní plazmě pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Po 14 denní expozici ryb v odtocích ze tří čistíren odpadních vod ve Švédsku bylo v krevní plazmě ryb zjištěno 16 cílových látek v koncentracích vyšších než 1/1000 terapeuticky účinné koncentrace v lidské plazmě. Progestin **levonorgestrel**, který je užíván jako antikoncepce, byl naměřen v krevní plazmě ryb v koncentraci pohybující se od 8,5 do 12 ng . ml⁻¹, což je koncentrace převyšující účinnou koncentraci v lidské krevní plazmě. V odtoku z čistírny odpadních vod byla naměřena koncentrace levonorgestrelu (1 ng . l⁻¹) převyšující koncentraci způsobující snížení fertility ryb (Fick a kol., 2010). 21 dnů trvající expozice jelečka velkohlavého ve **fadrazolu** o koncentraci 2513,85 µg . l⁻¹ způsobila též inhibici 17β-estradiolu (Villeneuve a kol., 2007). V studii prováděné autory Ankley a kolektiv (2002) bylo u jelečka velkohlavého prokázáno snížení plodnosti, inhibice aromatázy z mozku a u samic pokles počtu zralých oocytů po 21 denní expozici fadrazolu již při koncentracích pohybujících se v rozmezí 2 - 50 µg . l⁻¹. Stejně tak ve studii prováděné autory Panter a kolektiv (2004) byl po 21 dnech expozice samic jelečka velkohlavého (stáří 4,5 – 5 měsíců) fadrazolu o koncentrací 24,8 µg . l⁻¹ pokles růstu ovaríí, což se projevilo na sníženém gonado-somatickém indexu (GSI). U samců naopak fadrazol v koncentracích 51,7 a 95,5 µg . l⁻¹ po 21 dnech významně indukoval růst testes. Hladina vitellogeninu po 21 dnech expozice fadrazolu u samic významně klesla a u samců výrazně vzrostla. V rámci této studie byli ještě jedinci jelečka velkohlavého testováni na účinky působení **dihydrotestosteronu** (DHT) a **flutamidu**. V testu byly použity nominální koncentrace DHT 10; 32 a 100 µg . l⁻¹, které se však během přípravy experimentu vlivem ředění a degradace látky změnilly. Pro potřeby vyhodnocení byly použity střední hodnoty změřených koncentrací. Ty činily 6,0; 6,1 a 8,6 µg . l⁻¹. Expozice DHT po 14 dnech významně zvýšila množství třecí vyrážky (charakteristické pro samčí pohlaví), jak u samců (hojnější) tak i samic. Koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě významně vzrostla u samců (ve skupinách umístěných v koncentracích DHT 6,1 a 8,6 µg . l⁻¹), ale u samic (ve skupině umístěných v koncentraci DHT 6,0 µg . l⁻¹) byl vitellogenin inhibován. Flutamid byl použit v nominálních koncentracích (resp. o středních hodnotách změřených koncentrací) 100 (95,3); 320 (320,4) a 1000 (938,6) µg . l⁻¹. Flutamid v 938,6 µg . l⁻¹ po 21 dnech výrazně zredukoval třecí vyrážku u samců. Na syntézu vitellogeninu u samců flutamid žádný vliv neměl, ale u samic po 21 dnech expozice významně indukoval syntézu

vitellogeninu (Panter a kol. 2004). Na vliv odpadních vod na koncentrace vitellogeninu u kapra obecného (*Cyprinus carpio*) bylo provedeno hned několik studií. Ve studii prováděné na řece Ebro ve Španělsku (Lavado a kol., 2004) byla naměřena významně rozdílná (vyšší) koncentrace vitellogeninu u skupiny samců (n=6) kapra z lokality pod čistírnou odpadních vod města Zaragoza oproti lokalitám, které byly znečišťovány průmyslovými odpadními vodami, zemědělskou činností nebo byly bez znečištění. Průměrné koncentrace vitellogeninu naměřené v krevní plasmě samčích jedinců z lokality pod Zaragozou se pohybovaly v řádu desetin mg . ml⁻¹ s maximem 1,8 mg . ml⁻¹ (koncentrace okolo 2 mg . ml⁻¹ byly naměřeny u samic). Hranice stanovení byla VTG byla v této lokalitě dosažena u čtyř samčích jedinců ze šesti. Ve studii prováděné na divokých jedincích kapra obecného odlovených z odtokového kanálu čistírny odpadních vod v St. Paul (Minnesota, USA) mělo sedm z deseti samčích jedinců naměřeny stanovitelné hodnoty VTG (0,005 – 10 mg . ml⁻¹) v krevní plasmě, zatímco v případě samic byl VTG stanoven u všech jedinců v rozsahu 0,035 – 7, 5 mg . ml⁻¹ (Folmar a kol. 1996).

2.1.2 Nesteroidní protizánětlivé léky (NSAIDs)

Další skupinou farmak, která již byla zkoumána z hlediska přímého vlivu na ryby, byla skupina nesteroidních protizánětlivých léků (z angl. nonstereoidal anti-inflammatory drugs – NSAIDs). Konkrétně se jednalo o **diklofenak, naproxen, ibuprofen, ketoprofen a indometacin**. Tato léčiva rovněž negativním způsobem ovlivňují reprodukci ryb (Corcoran a kol., 2010). Terapeutická role těchto farmak je redukovat zánět a bolest. Princip spočívá v inhibici cyklooxygenáz (COXs), enzymů, které katalyzují syntézu prostaglandinů. Ty vznikají oxidací kyseliny arachidonové právě enzymovou aktivitou cyklooxygenáz. Existují dva isoenzymy: COX1 a COX2. Isoenzym COX1 je zodpovědný za základní hladinu prostaglandinů a COX2 produkuje prostaglandiny jako odpověď na stimulaci v místě zánětu. NSAIDs mohou být jak selektivní (působící jak na COX1 nebo na COX2), tak i neselektivní, působící na oba isoenzymy stejnoměrně (Corcoran a kol., 2010). U řady kostnatých ryb byly prostaglandiny identifikovány v gonádách, spermatu, ovariální tekutině, krvi a v *in vitro* ovariálních inkubátech. U kostnatých ryb se ukázalo, že jsou prostaglandiny zapojeny do ovulace (prasknutí folikulu), sexuálního chování samic, a možná do sekrece gonadotropinu (GtH). Zvýšení hladiny prostaglandinu F (PGF) asociovalo GtH

indukci a zapříčinilo ovulaci u piskoře dálnovýchodního (*Misgurnus anguillicaudatus*) a karasa stříbřitého (*Carassius auratus*). Indometacin, jako inhibitor PG u těchto druhů blokuje ovulaci. U karasa stříbřitého lze, injekčním podáním PG, opět reversivně tuto potlačenou ovulaci odblokovat (Stacey a Goetz., 1982). U diklofenaku byl mimo bránění syntéze prostaglandinu ještě zjištěn negativní vliv na žábry, játra a ledviny, které byly poškozeny u vyšetřovaných jedinců pstruha obecného (*Salmo trutta m. fario*). Zkoumaní jedinci pstruha obecného ve věku ~18 měsíců, byli exponováni koncentracím 0,5; 5,0; 50 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu 21 dní. Expozice diklofenaku po 21 dní způsobila mírné až střední poškození piliřových buněk sekundárních žaberních lamel (teleangiektázie) při všech koncentracích. Expozice 50 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ diklofenaku mimoto vedla k významně zvýšené degradaci sekundárních žaberních lamel. Navíc byla ještě příležitostně pozorována hyperplazie žaberních epitelárních buněk, rozšíření lamelárních konců a srůsty sekundárních lamel. Nejběžnějším zasažením tkáně ledvin byl (mírný) výskyt intersticiálních hyalinových kapének u všech skupin (dle koncentrací). U vyšších koncentrací byla po 21 denní expozici rovněž často pozorována výskyt intersticiální kapaliny bílkovinného původu (mírný až střední) a mírná nekróza tubulů. Histopatologické změny na játrech u testovaných pstruhů zahrnovaly infiltraci/akumulaci monocytů, která byla nejvíce patrná u ryb exponovaných ve skupině s koncentrací diklofenaku 5 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$; roztažení cévní pleteně (jaterní sinusoidy); difúze cytoplazmy a fokální nekróza (Hoeger a kol., 2005). Histologické změny na žábřácích a ledvinách byly pozorovány i u pstruha duhového při expozici koncentracím diklofenaku 5 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu 28 dní (Schwaiger a kol., 2004) a Triebkorn a kolektiv (2004) ve své studii označili jako nejnižší efektivní dávku (LOEC) pro diklofenak 1 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Při této dávce byly zaznamenány změny na játrech, ledvinách i žábřácích. Thibaut a kolektiv (2006) testovali vliv NSAIDs (ibuprofen, diklofenak, naproxen, ketoprofen,) na kapra obecného a zjistili významný vliv na CYP enzymy. Největší vliv na tyto enzymy měl ze skupiny NSAIDs diklofenak v o koncentraci 296,15 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Tato látka při výše uvedené koncentraci inhibovala enzym CYP2M. Další látky, ze skupiny NSAIDs, které inhibovaly enzym CYP2M u kapra byly ($c = 1 \text{ mM} \cdot \text{l}^{-1}$, s koncentrací v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ uvedenou v závorce): ibuprofen (206,28), naproxen (230,26) a ketoprofen (254,28) s tím, že uvedených koncentrací v přirozeném prostředí tyto látky nedosahovaly (Thibaut a kol., 2006).

2.1.3 Antidepresiva

Další látka, jejíž vliv na ryby byl zkoumán, je **fluoxetin**, patřící do skupiny antidepresiv. Brooks a kolektiv (2003) zkoumali vliv flouketinu v koncentracích 0 (kontrola); 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ na medaku japonskou (*Oryzias latipes*) po dobu 4 týdnů. U zkoumaných ryb se projevíly vývojové abnormality a zvýšená hladina estradiolu. Jiní autoři zase uvádějí klesající růst a konverzi krmiva u jelečka velkohlavého (*Pimephales promelas*) při koncentracích S-fluoxetinu vyšších než 51 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ a době expozice 7 dní (Stanley a kol., 2007). Thilbaut a kolektiv (2006) testovali vliv antidepresiv (fluoxetin, **fluvoxamin**, **paroxetin**) na kapra obecného a zjistili významný vliv na CYP enzymy. Studiu vlivu léčiv na chování ryb se věnovali Brodin a kolektiv (2013), když zkoumali vliv **oxazepamu** na chování okouna říčního (*Perca fluviatilis*). Oxazepam je látka patřící do skupiny benzodiazepinů. Užívá se k tlumení zvýšené činnosti některých částí nervového systému, která někdy vzniká jako reakce na stresovou situaci a snižuje, až odstraňuje tak psychické napětí a úzkost (Zentiva, 2008). Jedinci okouna byli vystaveni oxazepamu v koncentraci 1800 $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ a 910 000 $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu 7 dnů. Poté byla změřena koncentrace této látky ve svalovině exponovaných ryb. U jedinců exponovaných v nádrži s nižší koncentrací bylo naměřeno 6,6 až 36 ng oxazepamu v jednom gramu svaloviny (průměr činil 18 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$). Tyto hodnoty byly dost podobné těm, které byly zjištěny u ulovených ryb pocházejících z divoké populace okouna říčního ze středního toku řeky Fyris (Uppsala – Švédsko). U divokých okounů byla zjištěna koncentrace oxazepamu ve svalovině 0,39 až 13 $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ (v průměru 3,6 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$) a zároveň analýza odebraných vzorků vody (prostý odběr – ne POCIS) ukázala 580 $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$. Ryby exponované v nádrži s vodou o koncentraci oxazepamu 910 000 $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ měly v jednom gramu svaloviny 1 500 až 8 500 ng oxazepamu (v průměru 4 900 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$). Jako kontrola sloužila třetí skupina ryb, která nikdy nepřišla do kontaktu s vodou, v níž by byla zjištěna jakákoliv koncentrace oxazepamu. Ryby byly podrobeny důkladnému pozorování a chování jednotlivých skupin ryb bylo porovnáváno. Jednou ze změn v chování jedince ovlivněného oxazepamem byla ztráta přirozené plachosti (větší odvahy) a asocialita (stranění se hejna), což snižuje šanci na přežití jedince v přirozeném prostředí. Na druhou stranu se se zvyšující koncentrací oxazepamu zvyšovala i žravost a aktivita zvyšující šance na přežití zejména u raných stádií ryb (Brodin a kol., 2013).

2.1.4 Antimykotika

Studie prováděná autory Hegelund a kolektiv (2004) zkoumala účinky azolového antimykotika **ketokonazolu** na pstruha duhovém a fundulu (*Fundulus heteroclitus*). Při *in vitro* studii byla prokázána inhibice enzymové aktivity CYP1A a CYP3A u obou druhů. Expozice jelečka velkohlavého ketokonazolu v koncentraci $29,76 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu 21 dní způsobila inhibici hormonu 17β -estradiolu a už při koncentraci $3,19 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ inhibici testosteronu (Villeneuve a kol., 2007). Inhibice dvou isoform cytochromu P450 (CYP1A a CYP3A) při expozici ryb **klotrimazolu** byly prokázány při testech prováděných na juvenilních jedincích pstruha duhového v koncentracích 0,01; 1,0 a $10 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ po dobu expozice 21 a 42 dní (Burkina a kol., 2013). Při testování vlivu subletální expozice triazolového fungicidu **propikonazolu** na antioxidační obranný systém a aktivity $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPázy v mozku pstruha duhového se ukázala citlivost mozkových tkání na xenobiotika. Mozek ryb se tak ukázal jako lepší biomarker než například játra (Li a kol., 2010a).

2.1.5 Fibráty

Dále byly testovány účinky tří látek patřících do skupiny fibrátů. Konkrétně **klofibrát**, **fenofibrát** a **gemfibrozil**. Úkolem léků obsahující tyto látky je regulovat hladinu lipidů v krevní plasmě jejich oxidací (Corcoran a kol., 2010). Jeden ze zaznamenaných vedlejších účinků je zvýšená produkce peroxidu vodíku (H_2O_2) v buňkách, což může vést k oxidativnímu stresu a karcinogenezi jater (Gonzales a kol., 1998). Cytotoxicitu a oxidativní stres u pstruha duhového byl prokázán u klofibrátu a fenofibrátu (Laville a kol., 2004). Zároveň byly prokázány negativní účinky kyseliny klofibrové (což je persistentní metabolit klofibrátu) na vývoj spermatu u samců jelečka velkohlavého (Runnalls a kol., 2007). Negativní vliv gembrofizilu na reprodukční potenciál samců byl prokázán u karasa stříbřitého. Po 14 denní expozici ryb v koncentraci gembrofizilu $1,5 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ byla hladina testosteronu o 49 % nižší než u kontrolní skupiny. Ve skupině s koncentrací gembrofizilu $1500 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ byl pokles ještě významnější. Činil 72 % (Mimeault a kol., 2005). Thilbaut a kolektiv (2006) také testovali vliv fibrátů (klofibrát, fenofibrát, bezafibrát a gemfibrozil) na kapra obecného a u těchto látek také zjistili významný vliv na CYP enzymy.

2.1.6 Léky na srdeční onemocnění, β -blokátory

Další skupinou léčiv zjištěných ve vodním prostředí jsou β -blokátory. β -blokátory jsou léky k léčbě srdečních onemocnění, arytmií a bolesti na hrudi, které fungují na principu vazby na β -adrenergické receptory a tím blokují navazování katecholaminů, adrenalinu a noradrenalinu na tyto receptory (Reid a kol., 1998). Zástupci této skupiny jsou **propranolol**, **metoprolol**, **nadolol** a **atenolol**. Účinky propranololu spolu s metoprololem a nadololem byly testovány na medace japonské (*Oryzias latipes*). V testu akutní toxicity pro propranolol bylo 48-h LC_{50} stanoveno $24,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Expozice medaky v metoprololu a nadololu nezpůsobila nárůst mortality. Proto byly další experimenty prováděné autory Huggett a kolektiv (2002) prováděny pouze s látkou propranolol. Pukus 14 denní expozice v koncentraci propranololu $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ významně snížil růst, ale nesnížila produkci jiker či líhnivost. Významně se však změnil obsah steroidních hormonů v krevní plasmě ryb. U samců výrazně poklesla hladina testosteronu v krevní plasmě, zatímco hladina estradiolu výrazně vzrostla. U samic hladina estradiolu výrazně klesla při koncentracích vyšších než $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Množství vitellogeninu v játrech samic vystavených propranololu nebylo výrazně rozdílné od samic z kontrolní skupiny (Huggett a kol., 2002). U pstruha duhového se při testu, při kterém byli juvenilní ryby (6 g) exponováni po dobu 10 dní koncentrací propranololu $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ projeví nepříznivé účinky tohoto farmaka zhoršením růstu. V plazmě ryb byla zjištěna koncentrace propranololu $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Owen a kol., 2007). Expozice jelečků velkohlavých po dobu 28 dnů v koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ zapříčinila zhoršení rychlosti růstu (Winter a kol., 2006). Při testování atenololu na pstruhu duhovém (Steinbach a kol., 2014) se po 21 dnech expozice v koncentracích 10 a $1000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ výrazně snížila hodnota hematokritu. Dále se u ryb vystavených koncentracím 1; 10 a $1000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ zvýšila hladina laktátu v krevní plazmě. Koncentrace atenololu se však v odtocích ČOV pohybuje v řádu jednotek $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Během roční studie na čistírně odpadních vod v Českých Budějovicích dosáhly hodnoty koncentrací atenololu $0,39 - 1,69 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Golovko a kol., 2014).

2.1.7 Antibiotika

Velmi významnou skupinou léčiv vyskytujících se ve vodním prostředí jsou antibiotika. Přítomnost antibiotik byla prokázána jak v čistírnách odpadních vod (Yan a kol., 2013; Nikolaus a kol., 2007; Loos a kol., 2013), tak v povrchových vodách, které

jsou recipienty těchto čistíren (Kim a Carlson, 2007; Velicu a Suri, 2009; Yang a kol., 2011; Yan a kol., 2013; Grabicová a kol., 2014), či přijímají nečistěnou vodu přímo z kanalizace. Tyto látky se většinou vyskytují v koncentracích v řádu desítek až stovek $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$. Další cestou, kterou se mohou antibiotika dostat k vodním organismům, a to především k rybám, je aplikace veterinárních léčiv na bázi antibiotik v zemědělství a akvakultuře (Baquero a kol., 2008; Daniel, 2009). Ekotoxicita a genotoxicita některých látek patřících do skupiny antibiotik (**oxytetracyklin**) byla již popsána (Zounková a kol., 2011). Oxytetracyklin v koncentracích $0,1 - 50 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ způsobil zhoršení imunitního systému u pstruha duhového (Grondel a kol., 1985). Již zkoumanou skupinou antibiotik jsou sulfonamidy. Akutní toxicita **sulfamethoxazolu**, **sulfachlorpyridazinu**, **sulfathiazolu**, **sulfamethazinu**, **sulfadimethoxinu** a **trimethoprimu** testována na medace japonské ($l = 2,0 \text{ cm}, 1,0 \text{ cm}$). Po 96 hodinovém testu při teplotě $25^\circ\text{C} (\pm 1^\circ\text{C})$ se ukázala nízká akutní toxicita sulfonamidů pro medaku japonskou. LC_{50} u všech sulfonamidů byla při koncentracích $>100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Kim a kol., 2007).

2.1.8 Antiepileptika

Karbamazepin je látka, která se užívá k léčbě epileptických záchvatů. U nás se prodává například pod obchodním názvem Biston (SÚKL ČR, 2012). Citlivost mozku na karbamazepin se ukázala i během 96 hodinového (96h LC_{50}) akutního testu toxicity na juvenilních jedincích pstruha duhového. Zároveň se neprojevila žádná výrazná fyziologická změna u ryb vystavených environmentálním koncentracím karbamazepinu ($1,0 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). To ukazuje, že pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) je dostatečně tolerantní ke změnám okolního prostředí vyvolaným karbamazepinem. Lze jen dodat, že by mělo být věnováno více pozornosti vlivu karbamazepinu na chování a neurologické změny u ryb (Li a kol., 2011b). Vliv karbamazepinu na antioxidační obranný systém mozku pstruha duhového se také prokázal indukci oxidativního stresu během 21 denního prolongovaného subletálního testu (Li a kol., 2010b).

2.2 Nepřímý vliv kontaminantů na bázi léčiv na ryby

Farmaka pocházející z antropogenní činnosti mají nezanedbatelný vliv na zdraví a prosperitu rybí obsádky skrz působení na vodní ekosystém v němž ryby žijí. Každý

organismus vyhledává určitou niku, tj. místo v životním prostředí, které mu nabízí vhodné životní podmínky. Tyto podmínky však může člověk svojí činností, ať už záměrně či nezáměrně měnit. Vypouštění odpadních vod do vod povrchových je jedním z těchto případů. Vedle narušení rovnováhy živin ve vodní prostředí je vnos toxických látek zahrnující těžké kovy, toxické organické sloučeniny a také léčiva a jejich metabolity. Rezidua léčiv svými účinky prokazatelně působí na mnohé necílové vodní organizmy a tím narušují přirozenou potravní základnu ryb nebo rovnováhu v prostředí, v němž ryby žijí. Jedním ze základních pilířů potravního řetězce je zvláště v menších tocích bakteriální a řasový nárost na površích ve vodním prostředí, tzv. perifyton. Perifyton je tvořen krátkověkými organizmy, a proto jsou jakékoliv změny prostředí následovány okamžitou odezvou ve formě změny abundance a fylogenetické skladby organismů tvořící daný biofilm. To je možné využít jako citlivý bioindikátor změn v kvalitě prostředí (Bricheux a kol., 2013). Složení komunity organismů tvořících biofilm řídí klíčové procesy ve vodním prostředí (Besemer a kol. 2012) Dále je přítomností léčiv ve vodách způsobena přítomnost rezistentních kmenů bakterií, které mohou být nebezpečnými patogeny jak pro ryby, tak i pro terestrické organismy včetně člověka. Navinier a kolektiv (2006) testovali rezistivitu bakterií rodu *Aeromonas*, přítomných v střevním systému pstruha duhového na oxolinovou kyselinu, flumequin, enrofloxacin, oxytetracyklin, chloramfenikol, florfenikol, ampicillin, gentamicin a streptomycin. Zjištěnou vyšší rezistivitu některých kmenů bakterií rodu *Aeromonas* ve střevech pstruhů spojují s používáním antibiotik na rybích farmách a/nebo kontaminací povrchových vod splachy ze zemědělských ploch nebo městskými odpadními vodami. Nepřímý vliv nebyl v této práci sledován.

2.3 Biomarkery působení farmak na ryby

Přímé působení na ryby způsobuje změny v organismu ryb jako takové. Proces je schématicky znázorněn na obrázku č. 1 v příloze.

Mimo změny ve skladbě hormonů ovlivňujících reprodukci, léčiva přítomná ve vodním prostředí ovlivňují další biochemické procesy, které lze využívat jako biomarkery účinků těchto cizorodých látek. Pro posouzení míry expozice či efektu environmentálních polutantů může být u ryb zkoumán níže uvedený výčet biomarkerů dle van der Oost a kolektiv (2003). V závorce jsou uvedeny zvýrazněné biomarkery použité v této studii.

- biotransformační enzymy I. fáze
- biotransformační enzymy II. fáze a profaktory (GSH, GSSG, **GST**)
- oxidativní stres (**LPO**) a antioxidační aktivita (**SOD, CAT, GPx, GR**)
- produkty biotransformace
- stresové proteiny, metalthionin a multixienobiotická rezistence
- hematologické parametry
- imunologické parametry
- reprodukční a endokrinní parametry (**VTG**)
- genotoxické parametry
- neuromuskulární parametry
- fyziologické, histologické a morfologické parametry

Toxický efekt xenobiotik a jejich metabolitů často závisí na jejich možnosti zvyšovat množství reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) v buňce, což může poškodit její klíčové součásti (Li a kol., 2009). Obrannou reakcí organismu je antioxidační aktivita enzymů. Pokud vzrůstá množství ROS vzniká oxidativní stres. Oxidativní stres se zjišťuje měřením peroxidace lipidů (LPO) a karbonylových proteinů

(CP) spolu s antioxidační aktivitou enzymů, jmenovitě to jsou: superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza (GPx) a glutathion reductáza (GR) (Li a kol., 2011a).

2.3.1 LPO

Lipoperoxidace (LPO) je destruktivní proces úzce spjatý s oxidativním stresem v biologických systémech. Oxidativní stres je výsledkem nerovnováhy produkce a eliminace volných radikálů ve prospěch jejich produkce (Kopřiva a kol., 2012). Tento stav může být zjištěn na základě kvantifikace jedné z látek, která je produktem LPO – malonaldehydu. Malonaldehyd (MDA) tvoří komplex s thiobarbiturovou kyselinou (TBA) v poměru 1:2, jenž se vyznačuje červenou barvou. V biologických materiálech TBA nereaguje pouze s MDA, ale i jinými látkami (např. bilirubin) za vzniku TBARS, proto se přesněji uvádí stanovení TBARS či TBARS ekvivalentů MDA, než přímého MDA. TBARS (z angl. thiobarbituric acid reactive substances = reaktivní sloučeniny kyseliny thiobarbiturové) (Kopřiva a kol., 2012).

2.3.2 SOD

SOD reguluje hladinu superoxidů tím, že katalyzuje dismutaci superoxidu na peroxid vodíku. Vyskytuje se ve třech formách: cytoplazmatická Cu,Zn-superoxid dismutáza (CuZnSOD), mitochondriální Mn-superoxid dismutáza (MnSOD) a extracelulární superoxid dismutáza (ECSOD) (Kopřiva a kol., 2012).

2.3.3 GPx

GPx katalyzuje přeměnu redukováného glutathionu (GSH) na oxidovaný glutathion (GSSG) a odstraňuje hydroxyperoxy, které vznikly v průběhu lipoperoxidace nenasycených mastných kyselin. Vyskytuje se v několika formách a všechny jsou selen-dependentní (v aktivním místě mají selenocystein): klasická GPx, plasmatická GPx, fosfolipid hydroperoxidová GPx a gastrointestinální GPx (Kopřiva a kol. 2012).

2.3.4 GR

GR katalyzuje přeměnu oxidovaného glutathionu (GSSG) na redukováný glutathion (GSH) za spotřeby $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Obsahuje dvě podjednotky s flavinem jako aktivní částí (Kopřiva a kol., 2012).

2.3.5 GST

GST hraje klíčovou roli při II. fázi enzymické detoxikace. Mimo svoji schopnost katalýzy konjugace elektrofilních substrátů glutathionu, má ještě řadu dalších funkcí. Má peroxidázové a isomerázové účinky, může inhibovat N-terminal kinázu (tedy chránit buňky proti buněčné smrti indukované H_2O_2) a je schopna nekatalyticky vázat širokou řadu endogenních a exogenních ligandů (Sheehan a kol., 2001).

2.3.6 CAT

Kataláza se skládá ze čtyř podjednotek s trojmocným železem a rozkládá peroxid vodíku tvořený v peroxisomech na vodu a molekulární kyslík. Strukturou je podobná hemoglobinu (Kopřiva a kol., 2012).

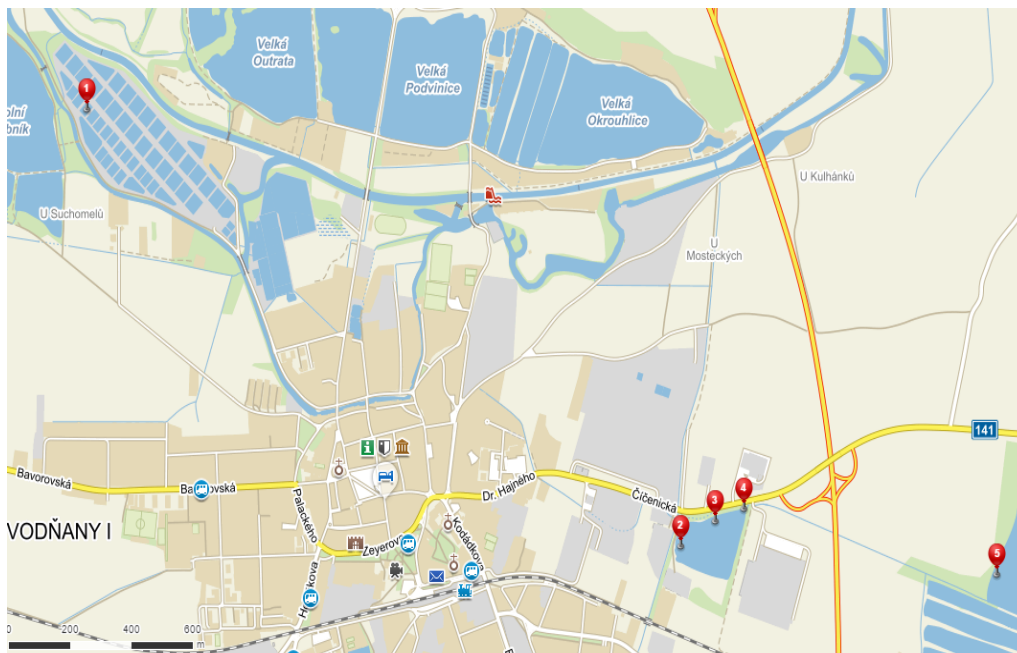
2.3.7 VTG

Vitellogenin (VTG) je fosfolipoglykoprotein. U obratlovců je VTG syntetizován mimo ovaria (u všech doposud zkoumaných druhů v játrech). VTG uvolněný z jater do krevního řečiště je potom přijímán rostoucími oocyty, ve kterých je potom enzymaticky štěpen na hlavní složky proteinů vaječných žloutků – fosvitiny a lipovitelliny. Spouštěčem syntézy VTG je 17β -estradiol, hormon řízen hypofýzou. (Polzonetti-Magni a kol., 2004). Toho lze proto využít při zkoumání činnosti látek na bázi estrogenů. Detekce VTG v krevních a tkáňových vzorcích juvenilních a samčích jedinců ryb je jednoduchým a citlivým biomarkerem pro nedokrinně působící chemické látky s estrogením efektem (Sumpter a Jobling, 1995).

3 Materiály a metody

3.1 Lokalita odběru vzorků

Pro účely studie byla využita lokalita rybníka Čežarka (2,6 ha) v katastrálním území města Vodňany, Jihočeský kraj, ČR, GPS: 49°08'46.4"N 14°11'28.3"E. Rybník Čežarka je biologická nádrž zadržující vyčištěnou odpadní vodu z městské čistírny odpadních vod (ČOV) města Vodňany (7 000 obyvatel). Vedle městských splaškových vod jsou dalšími možnými zdroji znečištění odpadní vody z průmyslu a zemědělství. V oblasti se nachází podniky lehkého strojírenského průmyslu (výroba zemědělských strojů, kovovýroba), výroba biopaliv z rostlinných olejů, drůbeží jatka, subjekty provozující intenzivní zemědělství a zahradnictví. Pro účely tohoto výzkumu bylo určeno 5 lokalit, kde byla sledována kvalita vody. Plánek s vyznačením lokalit je na obrázku č. 1. v textové části. V příloze jsou na obrázcích 3. – 4. vyfotografovány místa vtoku vyčištěných odpadních vod do rybníka. Odběrné místo č. 1 je rybník č. 50 v soustavě Experimentálního rybochovného pracoviště a pokusnictví FROV ve Vodňany. Tento rybník není zatěžován odpadními vodami a při studii sloužil jako kontrola. Odběrné místo č. 2 je jeden ze tří vtoků „vyčištěné“ odpadní vody přicházející z čistírny odpadních vod města Vodňany. Systém vtoku do rybníka Čežarka tvoří kanál vedoucí z ČOV, který vede podél západního břehu rybníka, kde se dělí do tří větví napájejících rybník. Odběrné místo č. 3 je situováno u severního břehu zhruba v polovině jeho délky. Odběrné místo č. 4 je prostor odtoku rybníka, který se nachází na rohu severního a východního břehu. Odběrné místo č. 5 se nachází v místě vtoku odpadní strouhy vedoucí z Čežárky do rybníka Dřemliny. Rybník Dřemliny je produkční kaprový rybník o výměře vodní plochy 60 hektarů obhospodařován subjektem Městské hospodářství Vodňany.



Obrázek č. 1. Situační plán s vyznačením lokalit odběru vzorků. Bod č. 1 Kontrolní rybník GPS: 49.1569672N, 14.1632242E, Bod č. 2 Čežárka V1 GPS: 49.1461747N, 14.1898317E, Bod č. 3 Čežárka V2 GPS: 49.1467922N, 14.1913767E, Bod č. 4 Čežárka V3 GPS: 49.1470869N, 14.1926642E, Bod č. 5 Dřemlinský rybník GPS: 49.1454728N, 14.2040153E

3.2 Odběr vzorků

3.2.1 Voda

Odběry vzorků na všech lokalitách byly provedeny v intervalech 30, 90, 180, 320 a 360 dnů od začátku studie. Z pěti lokalit byly odebrány vzorky vody k analýze základních hydrochemických parametrů a zároveň do těchto odběrných míst byly exponovány pasivní vzorkovače POCIS (Exposmeter AB, Švédsko). Doba expozice vzorkovačů byla 10 dnů. Odběry vzorků vody a pasivní vzorkování (POCIS) provedl konzultant diplomové práce MSc. Pham Thai Giang.

3.2.2 Ryby

Do rybníka byl nasazen označený roček kapra obecného ve stáří jednoho roku (K1) v počtu 1000 kusů původem z komorového rybníka. Termín nasazení 03/2016. Ze skupiny nasazovaných ryb bylo vybráno 20 jedinců, u kterých byl vyšetřen zdravotní stav. Po výše uvedené době expozice byla z hejna odlovena vždy skupina v počtu 12 jedinců. Stejný počet jedinců byl odloven i z rybníka, který sloužil jako kontrola. Při odběru vzorků z ryb byly zaznamenány tělesné parametry a kondiční stav zkoumaných jedinců. Tělesné parametry ryb jsou uvedeny v tabulce č. 1. Statisticky vyhodnocená data a datum odběru vzorků jsou uvedeny v tabulkách 1. – 6. v příloze. U odlovených ryb byly odebrány vzorky krve, svaloviny, jater, gonád a střev. Krevní vzorky byly odebrány napíchnutím kaudální žíly stříkačkou ošetřenou heparinem (Heparin inj., Léčiva, ČR) v koncentraci 5000 IU v 1 ml NaCl. Konečné naředění 0,01 ml roztoku v 1 ml krve zabezpečuje stabilizaci vzorků. Krevní plasma byla oddělena pomocí centrifugy (Centrifuga MPW 350R, MPW, Polsko) při $t=4^{\circ}\text{C}/837\text{g}$. Vzorky jater, gonád, svaloviny a střev byly odebrány co nejdříve po usmrcení ryby. Vzorky tkání byly odebrány do zkumavek (Eppendorf tubes 5 ml) a až do analýzy uchovány při teplotě -80°C .

Doba expozice (dny)	Skupina ryb (lokalita)	Hodnoty	Celková délka (cm)	Délka těla (cm)	Hmotnost -celk (g)	Hmotnost -bez vn. (g)	Hmotnost -játra (g)	Hmotnost -gonády (g)
0	Kontrola	průměr	17,1	13,6	65,8	57,9	2,8	0,0
		±SD	1,2	0,9	14,7	13,5	0,6	0,0
30	Kontrola	průměr	14,6	11,9	61,9	48,3	3,6	0,1
		±SD	1,7	1,3	19,2	15,5	1,1	0,1
	Čežárka	průměr	17,1	14,5	113,0	97,2	4,4	0,2
		±SD	2,2	1,8	48,2	43,4	1,6	0,2
90	Kontrola	průměr	46,8	18,7	311,9	265,9	8,1	0,4
		±SD	71,2	5,2	51,4	40,8	1,6	0,3
	Čežárka	průměr	31,9	26,6	817,3	711,5	33,4	8,9
		±SD	1,7	1,4	116,1	102,4	10,4	12,7
180	Kontrola	průměr	32,6	28,1	745,4	647,5	20,5	15,9
		±SD	1,3	1,1	147,1	124,0	4,2	13,1
	Čežárka	průměr	43,2	35,5	1755,8	1479,6	38,4	83,6
		±SD	1,7	1,4	235,9	215,2	10,0	76,6
320	Kontrola	průměr	33,1	27,2	725,4	639,4	29,0	14,3
		±SD	2,1	1,8	120,6	114,8	6,4	13,0
	Čežárka	průměr	44,5	36,6	2033,8	1717,9	89,9	89,3
		±SD	3,0	2,4	319,7	254,6	21,6	70,7
360	Kontrola	průměr	329,7	268,5	695,0	598,8	28,9	11,4
		±SD	19,3	19,1	116,1	101,4	7,2	9,6
	Čežárka	průměr	435,1	363,2	2011,7	1622,5	70,2	132,1
		±SD	15,7	17,1	137,6	91,6	18,7	86,5

Tabulka 1. Tělesné parametry vyšetřovaných jedinců kapra obecného (*Cyprinus carpio*) – průměr ±směrodatná odchylka (SD). Pro vzorek Kontrola 0: N=20; pro ostatní vzorky N=12.

3.3 Chemikálie

Pro stanovení koncentrací farmak pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií byla použita rozpouštědla acetonitril a metanol zakoupené od firmy Merck, Darmstadt, Německo a kyselina mravenčí (FA), která byla pořízena od firmy Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo. Izotopické standardy od firem Sigma Aldrich Co. LLC, St. Louis, Missouri, USA; Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, USA; Alsa Chim, Illkirch-Graffenstaden, Francie a Toronto Research Chemicals, North York, Kanada. Pro stanovení vitellogeninu byla použita souprava pro ELISA test: Carp Vitellogenin ELISA Kit Prod. No.: V01003402. Od výrobce Biosense Laboratories AS, Bergen, Norsko. K přípravě fosfátového pufru (PBS) byly použity K_2HPO_4 a KH_2PO_4 ,

NaOH, HCl a H₂SO₄ byly též použity produkty od výrobce Penty Chrudim. Tris byl použit od výrobce Appli-Chem-DE, Berlín, Německo. EDTA, NADPH, azid sodný (SA), kyselina trichloroctová (TCA), kyselina thiobarbiturová (TBA), kyselina pentetová (DTPA), glutathion disulfid (GSSG), nitrotetrazoliová modř (NBT), fenazin methosulfonát.

3.4 Analýza vzorků vody

3.4.1 Analýza základních hydrochemických parametrů vody

Chemický rozbor provedla Ing. Olga Valentová z Laboratoře vodní toxikologie a ichtyopatologie VÚRH Vodňany. Sledované parametry zahrnovaly pH, koncentrace amoniakálního dusíku (NH₄⁺ - N), dusičnanového dusíku (NO₃⁻ - N), dusitanového dusíku (NO₂⁻ - N), celkového dusíku (N-celk.), fosfátového fosforu (PO₄³⁺ - P) a celkového fosforu (P-celk.). Dále byla změřena biochemická spotřeba kyslíku za 5 dnů (BSK₅), chemická spotřeba kyslíku stanovena metodou s použitím dichromanu draselného (CHSK_{Cr}) a chemická spotřeba kyslíku stanovena metodou s použitím manganistanu draselného (CHSK_{Mn}).

3.4.2 Stanovení koncentrace farmak

Analýzu koncentrace farmak v sorbentu pasivních vzorkovačů POCIS provedly MSc. Ganna Fedorova, Ph.D. a MSc. Olga Koba z Laboratoře biochemie a environmentální chemie VÚRH Vodňany. Obsah mezimembránového prostoru pasivních vzorkovačů POCIS byl extrahován a analyzován metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) Metodika je popsána v literatuře (Fedorova a kol. 2014). Pro zpracování a analýzu vzorků byly použity tyto přístroje: Trojitý quadrupol MS/MS TSQ Quantum Ultra s LC pumpami Accela 1250 LC a Accela 600 LC (Thermo Fisher Scientific, USA) a Hybrid Quadrupole/Orbitrap MS Q-Exactive s pumpou Accela 1250 LC (Thermo Fisher Scientific, USA). Oba přístroje jsou vybaveny autosamplermem HTS XT-CTC (CTC Analytic, Švýcarsko).

3.5 Biochemická analýza vzorků plazmy a tkání

3.5.1 Stanovení hladiny vitellogeninu

Vzorky krevní plazmy, pocházející z krve odebrané z kaudální žíly odlovených ryb, byly testovány na obsah vitellogeninu (VTG) použitím sendvičovým ELISA testem určeným pro kvantifikaci VTG u kapra obecného. Princip tohoto testu spočívá v navázání přítomného VTG kovalentní vazbou na antigen (PAG) fixovaný na dně komůrek v mikrotitrační destičce (obrázek č. 2 v příloze). Do komůrek destičky byly pomocí pipety přidány vzorky krevní plazmy ředěné pufrům (PBS) o poměrech ředění 1:100; 1:3000; 1:90000 a 1:360000 pro vzorky samic a 1:20 a 1:500 pro vzorky samců a juvenilů. Dále byla přidána pro VTG specifická detekční protilátka, která se váže na komplex VTG-PAG. Ta je detekována sekundární detekční protilátkou, která změnou barvy celého komplexu slouží ke kvantifikaci VTG. Kvantifikace byla provedena Flourimetrem (Infinite 200, Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 492 nm.

3.5.2 Zjištění míry oxidativního stresu

3.5.2.1 TBARS

Zjištění míry oxidativního stresu bylo provedeno metodou stanovení úrovně peroxidace lipidů. Stanovení bylo provedeno dle Lushchaka a kolektiv (2005). Pro kvantifikaci TBARS byl použit fluorimetr Infinite 200 (Tecan, Švýcarsko), absorbance odečítána při vlnové délce 535 nm. Pro práci se vzorky byly použity mikrotitrační destičky (GAMA ČB, ČR). Homogenizace vzorků byla provedena ultrasonikem HD 2070 (Bandelin-Berlin, Německo). Pro analýzu byly použity tkáně jater, žaber, svaloviny a střev odlovených ryb.

3.5.2.2. Antioxidační enzymy

Kataláza (CAT)

Při analýze byla využita metoda dle Claiborna (1985) s užitím H_2O_2 jako substrátu. Adsorbance byla měřena při vlnové délce 240 nm. Jednotka katalázy $U \cdot ml^{-1}$ vyjadřuje množství proteinu potřebné k degradaci 1 $\mu mol H_2O_2$ za minutu při koncentraci proteinu ve vzorku 1 $mg \cdot ml^{-1}$. Pro analýzu byly použity tkáně jater, žaber, svaloviny a střev odlovených ryb.

Superoxid dismutáza (SOD)

Pro analýzu byly vzorky homogenizovány přístrojem Tissue Lyser II, Qiagen, USA). Chemikálie byly váženy na analytické váze AB 204-S (Mettler-Toledo, Švýcarsko. Pro analýzu byla zvolena metoda dle McCorda a Fridoviche (1959). Ta využívá reakci nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) s fenazin methosulfonátem (PMS) za vzniku superoxidů. Ty reagují s nitrobluetetrazoliem (NBT), ale SOD tuto reakci inhibuje tím, že sama reaguje se superoxydy. Barevný produkt vzniklý reakcí NADH, PMS a NBT je spektrofotometricky analyzován při vlnové délce 560 nm. Porovnávají se absorbance před reakcí a po reakci. Výsledek je vyjádřen jednotkou $\mu\text{mol NBT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{proteinu}}^{-1}$. Pro analýzu byly použity tkáně jater, žaber, svaloviny a střev odlovených ryb.

Glutathion peroxidáza (GPx)

K analýze byla použita metoda dle Mohandas a kol. (1984) s využitím kumenhydroperoxidu jako substrátu s měřením oxidace NADPH. Adsorbance byla měřena při vlnové délce 340 nm. Výsledek udávající úbytek enzymu v $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ pro 1 M substrát (při koncentraci proteinu ve vzorku $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) je vyjádřen v jednotkách $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Pro analýzu byly použity tkáně jater, žaber, svaloviny a střev odlovených ryb.

Glutathion reduktáza (GR)

K analýze byla zvolena metoda dle Carlberg a Mannervik (1975). Oxidace NADPH je spektrofotometricky měřena při vlnové délce 340 nm. Výsledek udávající úbytek enzymu v $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ pro 1 M substrát (při koncentraci proteinu $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) je vyjádřen v jednotkách $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$. Pro analýzu byly použity tkáně jater, žaber, svaloviny a střev odlovených ryb.

Glutathion S-transferáza (GST)

Pro analýzu enzymatické aktivity byla zvolena metoda dle Habig a kolektiv (1974) s použitím 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) jako substrátu. Adsorbance měřena při vlnové délce 340 nm. Výsledek znamenající spotřebu GST v μmol pro 1 M substrát za minutu (U) je vyjádřen v $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ (koncentrace proteinu ve vzorku $1 \text{ mg proteinu} \cdot \text{ml}^{-1}$). Pro analýzu byly použity tkáně jater, žaber, svaloviny a střev odlovených ryb.

3.5.3 Kvantifikace proteinu

Pro stanovení antioxidační aktivity enzymů je nejdříve nutné stanovit obsah proteinu ve vzorcích. Množství proteinu ve vzorcích bylo zjištěno spektrofotometricky metodou dle Bradforda (1976).

3.6 Statistická analýza dat

Při vyhodnocování dat byl použit statistický program Statistica 12 od společnosti Dell, USA. Výsledky analýz jsou prezentovány ve formě průměr \pm směrodatná odchylka. Při posuzování významnosti rozdílů byl vzhledem k nedodržení podmínky normální distribuce dat (velké variabilitě) použit neparametrický Mann-Whitneyův U-test ($p < 0,01$).

4 Výsledky

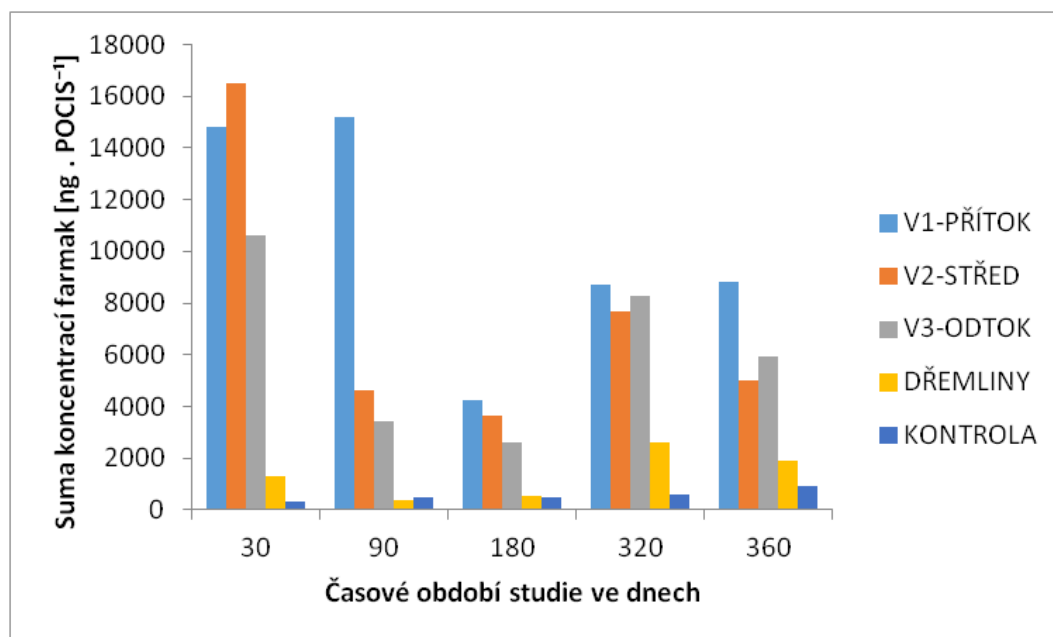
4.1 Základní hydrochemické parametry vody

Průměrné hodnoty pH se pohybovaly od 7,71 (V1-Přítok) do 8,75 (V3-Odtok). Průměrné koncentrace amoniakálního dusíku byly naměřeny od 0,3 mg · l⁻¹ (Kontrola) do 3,16 mg · l⁻¹ (V1-Přítok), dusičnanového dusíku od 0,36 mg · l⁻¹ (Dřemliny) do 7,03 mg · l⁻¹ (V1-Přítok), dusitanového dusíku od 0,05 mg · l⁻¹ (Kontrola) do 0,2 mg · l⁻¹ (V1-Přítok) a celkového dusíku od 5,15 mg · l⁻¹ (Kontrola) do 13,47 mg · l⁻¹ (V1-Přítok). Koncentrace fosforu naměřené ve vodních vzorcích se v průměru pohybovaly u PO₄³⁻-P od 0,05 mg · l⁻¹ (Kontrola) do 0,14 mg · l⁻¹ (V3-Odtok) a u celkového fosforu a od 0,17 mg · l⁻¹ (Kontrola) do 0,42 mg · l⁻¹ (Dřemliny) u celkového fosforu. CHSK_{Mn} se pohybovala od 9,82 mg · l⁻¹ (Kontrola) do 19,1 mg · l⁻¹ (Dřemliny), CHSK_{Cr} od 22,1 mg · l⁻¹ (Kontrola) do 49,87 mg · l⁻¹ (Dřemliny) a BSK₅ od 7,93 mg · l⁻¹ (Kontrola) do 16,95 mg · ml⁻¹ (Dřemliny). Obsah nerozpuštěných látek (NL) se pohyboval od 20,2 mg · l⁻¹ (V1-Přítok) do 61,57 mg · l⁻¹ (Dřemliny). Detailní výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č. 8 v příloze.

4.2 Koncentrace léčiv ve vodě

Při analýze obsahu pasivních vzorkovačů POCIS byly stanoveny koncentrace 62 farmak z celkových 79 farmak zahrnutých v analytické metodě. Koncentrace zbývajících 13 látek byla v pasivních vzorkovačích pod hranicí stanovitelnosti. V rybníce Čezárka (na alespoň jednom ze tří stanovených odběrných míst: V1-PŘÍTOK, V2-STŘED, V3-ODTOK) dosáhly maximální koncentrace deseti látek hodnoty přes 500 ng · POCIS⁻¹. Byly to látky: Irbesartan (300 – 4 500 ng · POCIS⁻¹), Telmisartan (450 – 2 900 ng · POCIS⁻¹), Diklofenak (110 – 1 800 ng · POCIS⁻¹), Tramadol (88 – 1 100 ng · POCIS⁻¹), trans-Dihydro-Dixydroxy-Karbamazepin (270 – 1 000 ng · POCIS⁻¹), Karbamazepin (240 – 990 ng · POCIS⁻¹), Valsartan (14 – 840 ng · POCIS⁻¹), kyselina Metoprololová (68 – 610 ng · POCIS⁻¹), O-Desmethylvenlafaxin (55 – 520 ng · POCIS⁻¹) a Metoprolol (32 – 510 ng · POCIS⁻¹). Nejvyšší sumární koncentrace léčiv 16 487 ng · POCIS⁻¹ byla naměřena u vzorků odebraných v čase 30 dní v lokalitě V2-Střed a nejnižší koncentrace 327 ng · POCIS⁻¹ byla naměřena ve stejném období v kontrolním rybníku.

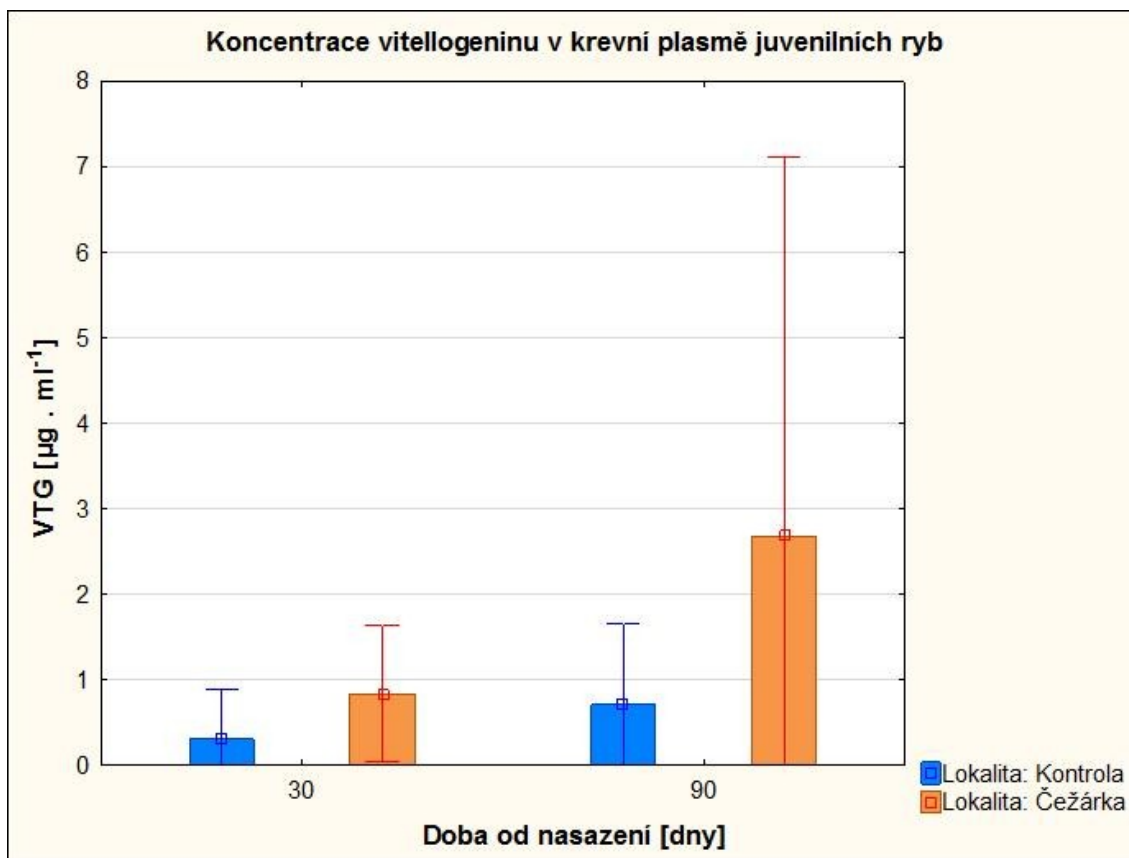
Sumy koncentrací všech farmak identifikovaných ve vzorcích exponovaných pasivních vzorkovačů POCIS jsou uvedeny v grafu č. 1. Přesné hodnoty jsou v tabulkách 9a – 13b v příloze.



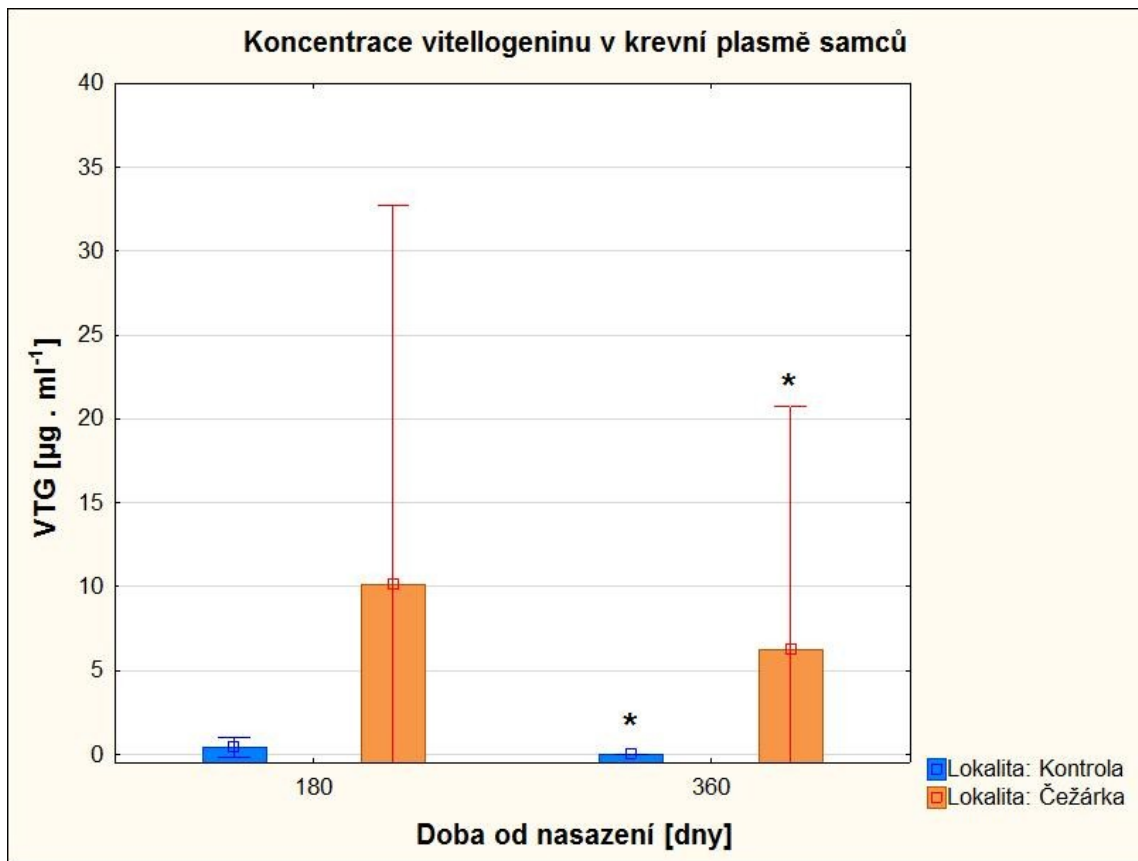
Graf č. 1. Hodnoty koncentrací farmak v měřených lokalitách v závislosti na době odběru.

4.3 Hladina vitellogeninu v krevní plasmě

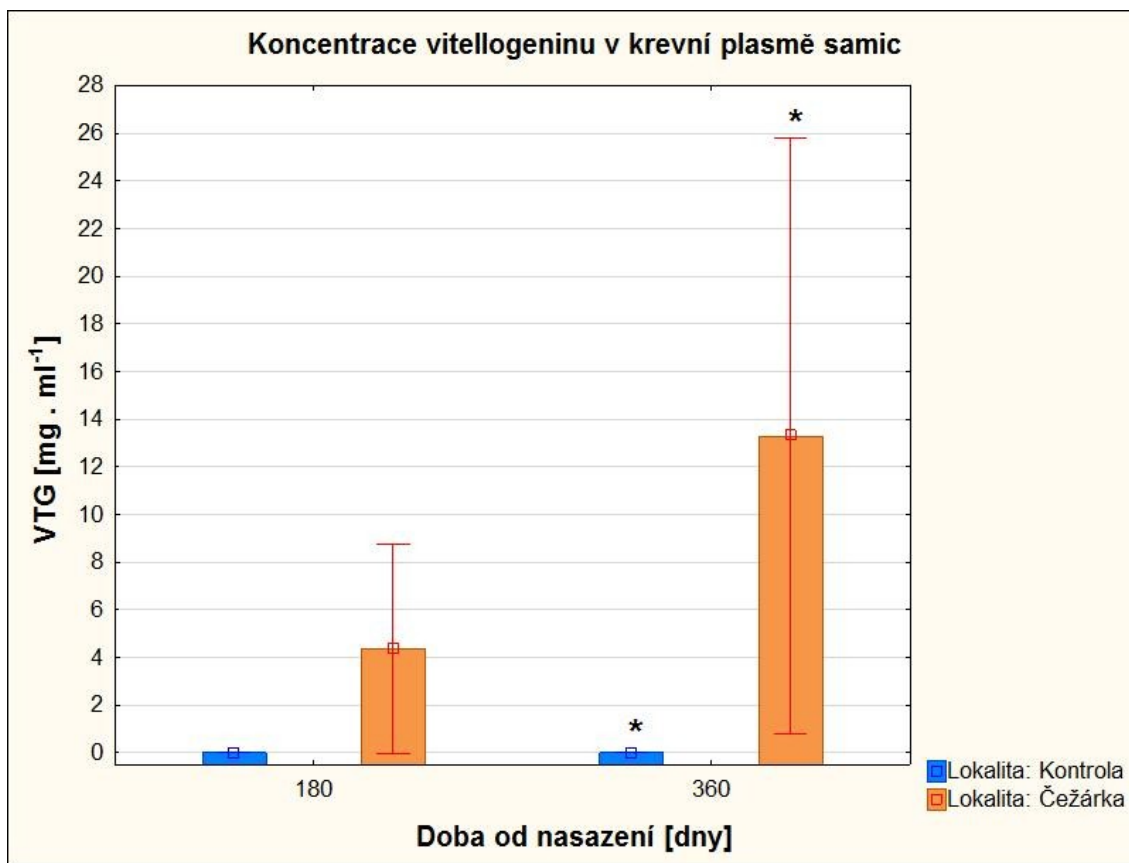
Průměrné hodnoty hladiny vitellogeninu v krevní plasmě ryb z lokality Čezárka činily u juvenilních jedinců kapra v čase 30 dnů $836 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a v čase 90 dnů $2\,680 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. U samců kapra byly hodnoty koncentrace vitellogeninu v krevní plasmě po 180 dnech v průměru $10,14 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a po 360 dnech $6,27 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. U samic $4,36 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a po 180 dnech a $13,29 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ po 360 dnech. V kontrolním rybníku dosáhly koncentrace vitellogeninu v krevní plasmě u juvenilů po 30 dnech $304 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a po 90 dnech $703 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. Hladiny vitellogeninu v krevní plasmě samců v kontrolním rybníku dosahovaly v průměru po 180 dnech $434 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a po 360 dnech nebyl v krevní plasmě žádný vitellogenin zjištěn. V krevní plasmě samic z kontrolního rybníka byl po 180 dnech naměřen vitellogenin v koncentraci $4,84 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Po 360 dnech v kontrolním rybníku nebyl u samic žádný vitellogenin zjištěn. Porovnání koncentrace vitellogeninu u jednotlivých skupin ryb je uvedeno v grafech č. 2 – 4.



Graf č. 2. Koncentrace vitellogeninu (VTG) v krevní plasmě juvenilních kaprů po 30 a 90 dnech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD), N=12.



Graf č. 3. Koncentrace VTG v krevní plasmě samců kapra po 180 a 360 dnech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, N=12. Sloupce označené znakem * jsou v daném časovém období od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).

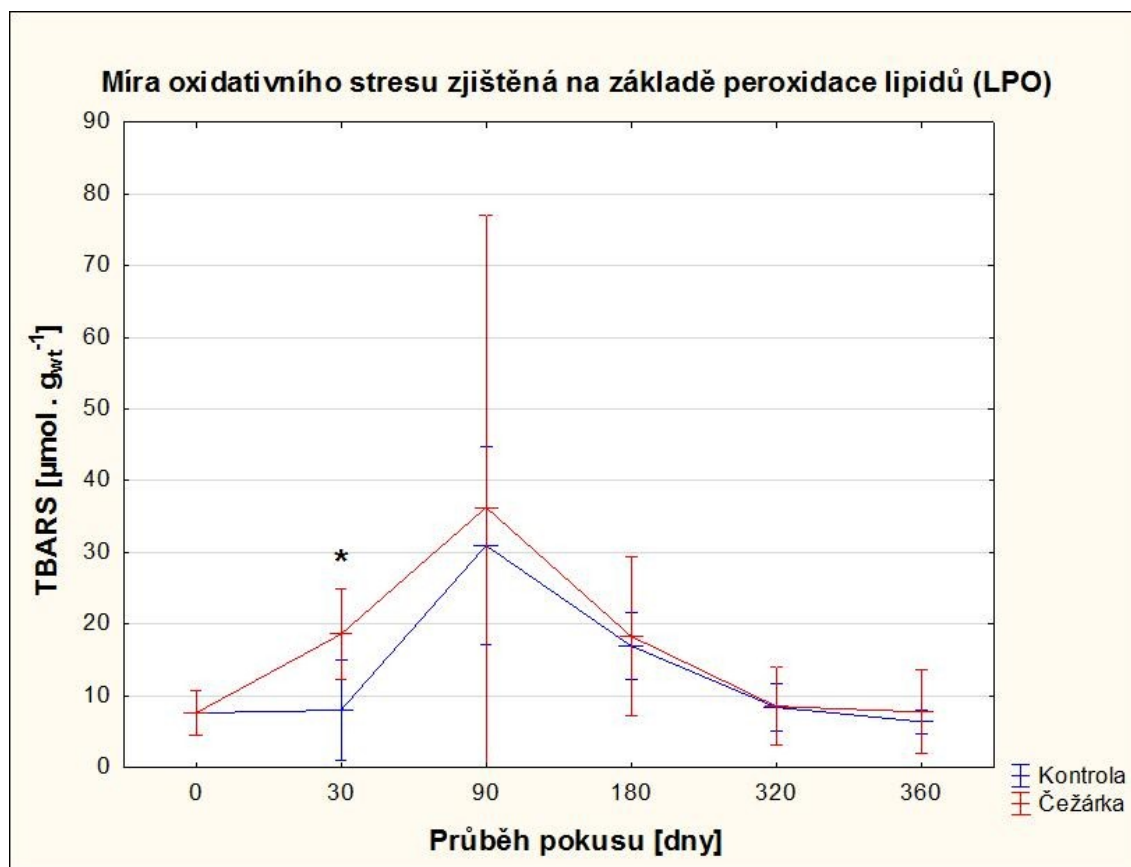


Graf č. 4. Koncentrace VTG v krevní plasmě samic kapra ze dvou odlišných lokalit po 180 a 360 dnech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, N=12. Sloupce označené znakem * jsou v daném časovém období od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).

4.4 Míra oxidativního stresu

Největší míra procesu peroxidace lipidů byla zazmanenaná v jaterní tkáni u obou skupin ryb (v Čežárce i v kontrolním rybníku) a to zejména v letním období. U těchto vzorků dosáhly hodnoty TBARS řádu desítek mikromolů na gram homogenizované tkáně v nevysušeném stavu [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{wt}}^{-1}$] (z angl. micromoles per gram wet tissue). Významný rozdíl těchto hodnot v jaterní tkáni byl mezi dvěma skupinami ryb zjištěn v čase 30 dnů od začátku experimentu, v průměru o 233 %. V případě výsledku homogenizované tkáně střev byl významný rozdíl mezi skupinami v časovém období 90 dnů od začátku experimentu. Průměr u ryb z Čežárky byl v případě těchto vzorků střev o 314 % vyšší. U vzorků tkání žaber se významný rozdíl mezi skupinami ryb projevil ve vzorcích odebraných 360 dnů od začátku expozice. Průměr u vzorků z Čežárky byl vyšší o 273 % oproti kontrolní skupině. Trend míry oxidativního stresu v jaterní tkáni je

patrný z grafu č. 5. Ostatní grafy pro vzorky tkání svaloviny, střev a žaber jsou v grafech č. 3.- 8. v příloze.



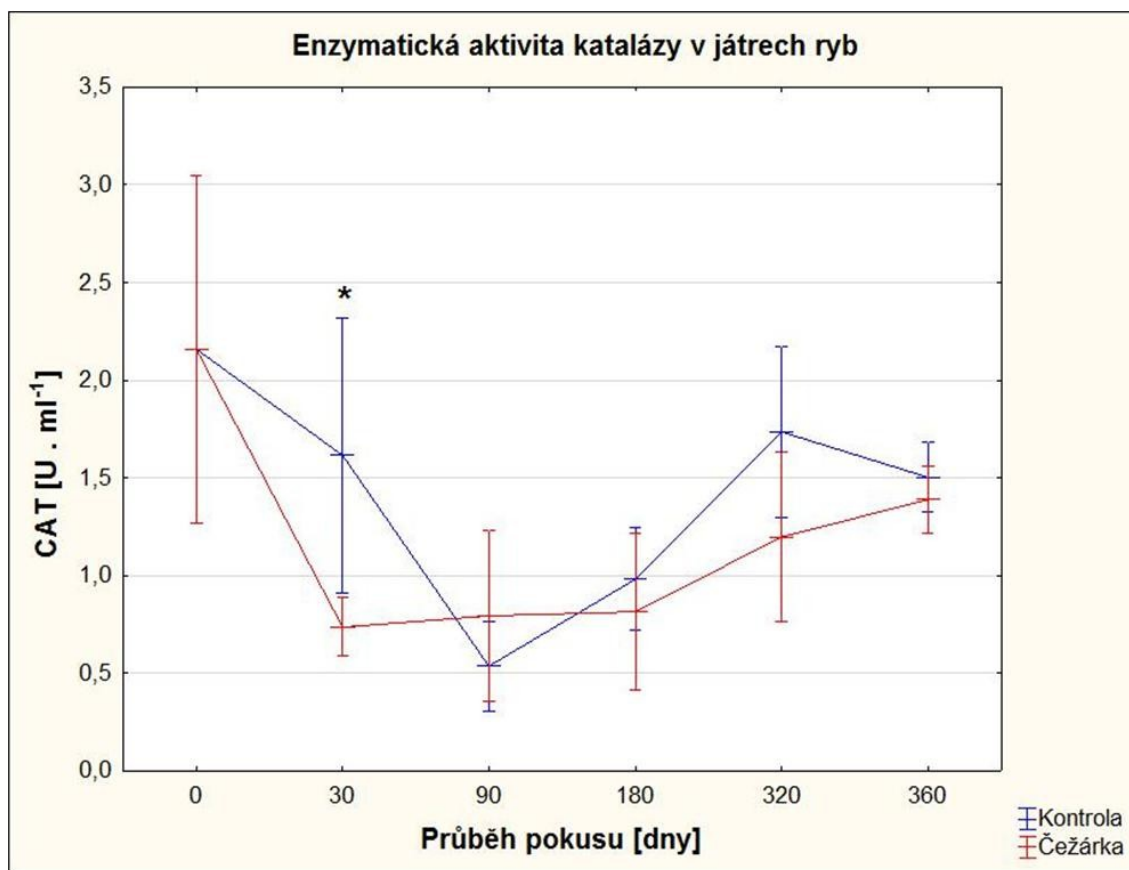
Graf č. 5. Oxidativní stres v jaterní tkáni kaprů pocházejících ze dvou odlišných lokalit. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, v čase 0 dní jen jedna skupina ryb před expozicí, N=20. V ostatních obdobích je pro každou skupinu N=12. Sloupce označené znakem * jsou v daném časovém období od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).

4.5 Antioxidační aktivita enzymů

Vzorky jaterních tkání odebraných rybám, které byly uloveny po 30 dnech po nasazení do nádrží, se významně lišily. U enzymů CAT, GST, GR a GPx byla u skupiny ryb exponovaných v zatíženém prostředí rybníka Čezárka nižší než u kontrolní skupiny. U enzymu SOD byla antioxidační aktivita v jaterním vzorku vyšší. U vzorků svaloviny, žaber a střev nebyly rozdíly v tomto období pozorovány. Obecně lze říci, že u dalších období byly míry antioxidační aktivity enzymů u obou skupin stejné, nebo byly vyšší u skupiny ryb z lokality Čezárka.

4.5.1 CAT

Enzymatická aktivita katalázy se u jaterních vzorků pohybovala na úrovni řádu jednotek $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). V případě vzorků svaloviny, žaber a střev byly průměrné hodnoty vyjadřující aktivitu tohoto enzymu vždy nižší nebo na stejné úrovni. Významných rozdílů mezi skupinami bylo zjištěno v případě jaterních vzorků pocházejících z ryb, které byly odloveny 30 dnů po začátku expozice, kdy byl průměr hodnot vyjadřujících enzymatickou aktivitu katalázy u vzorků z Čezárky o 54 % nižší oproti vzorkům z kontrolního rybníka. Nižších průměrných hodnot v případě vzorků z Čezárky oproti kontrole dosáhly také vzorky z období 180 dnů (u žaber o 30 %) a 360 dnů (u střev o 35 %). Naopak v období 30 dnů od nasazení ryb byla průměrná hodnota vyjadřující aktivitu katalázy u vzorků střev pocházejících z ryb z Čezárky o 52 % vyšší než u vzorků střev z ryb ulovených v kontrolním rybníku ve stejném období. Vývoj hodnot vyjadřujících míru enzymatické aktivity lze pozorovat na grafu č. 6. Podrobné znázornění vztahující se k enzymatické aktivitě katalázy vyjadřují grafy č. 9 - 14 v příloze.

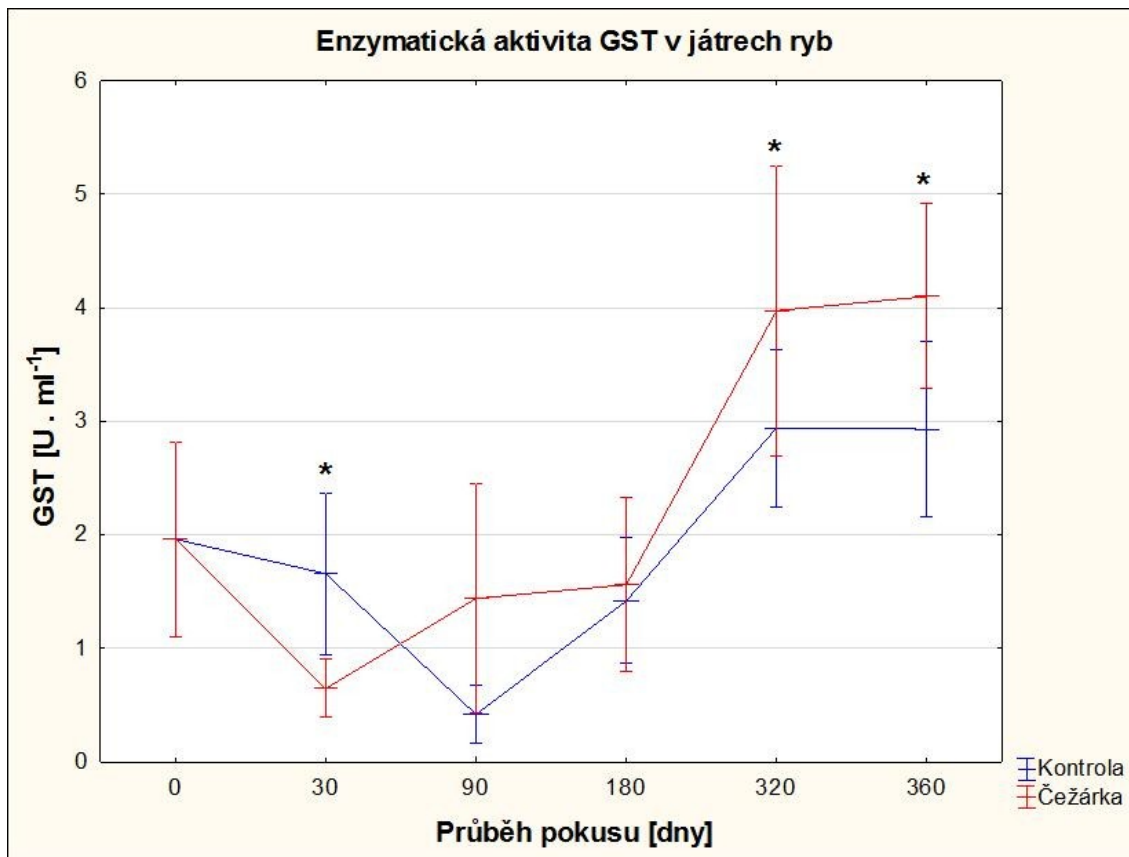


Graf č. 6. Enzymatická aktivita katalázy v jaterní tkáni kaprů pocházejících ze dvou odlišných lokalit. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, v čase 0 dní jen jedna skupina ryb před expozicí, N=20. V ostatních obdobích je pro každou skupinu N=12. Sloupce označené znakem * jsou v daném časovém období od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).

4.5.2 GST

Enzymatická aktivita GST je vyjádřena jednotkami $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). V případě hodnot vyjadřujících enzymatickou aktivitu vzorků jaterní tkáně byl významný rozdíl mezi skupinami ryb v časovém období 30 dnů od vysazení (skupina z Čezárky o 61 % nižší než u kontroly), 320 dnů (skupina z Čezárky o 56 % vyšší než kontrola) a 360 dnů (skupina z Čezárky o 35 % vyšší než kontrola). V případě svaloviny byla významně odlišná aktivita GST v období 360 dnů od vysazení (u skupiny z Čezárky o 156 % vyšší než u kontroly) Hodnoty u vzorků žaber se lišily v období 90 dnů (skupina z Čezárky o 42 % vyšší u kontroly) a u vzorků tkáně střev v období 320 dnů (u skupiny z Čezárky o 67 % vyšší než u kontroly). Vývoj hodnot vyjadřujících míru enzymatické aktivity GST v žaberní tkáni lze pozorovat na grafu č. 7. Podrobné

znázornění vztahující se k enzymatické aktivitě GST vyjadřují grafy č. 15 – 20 v příloze.

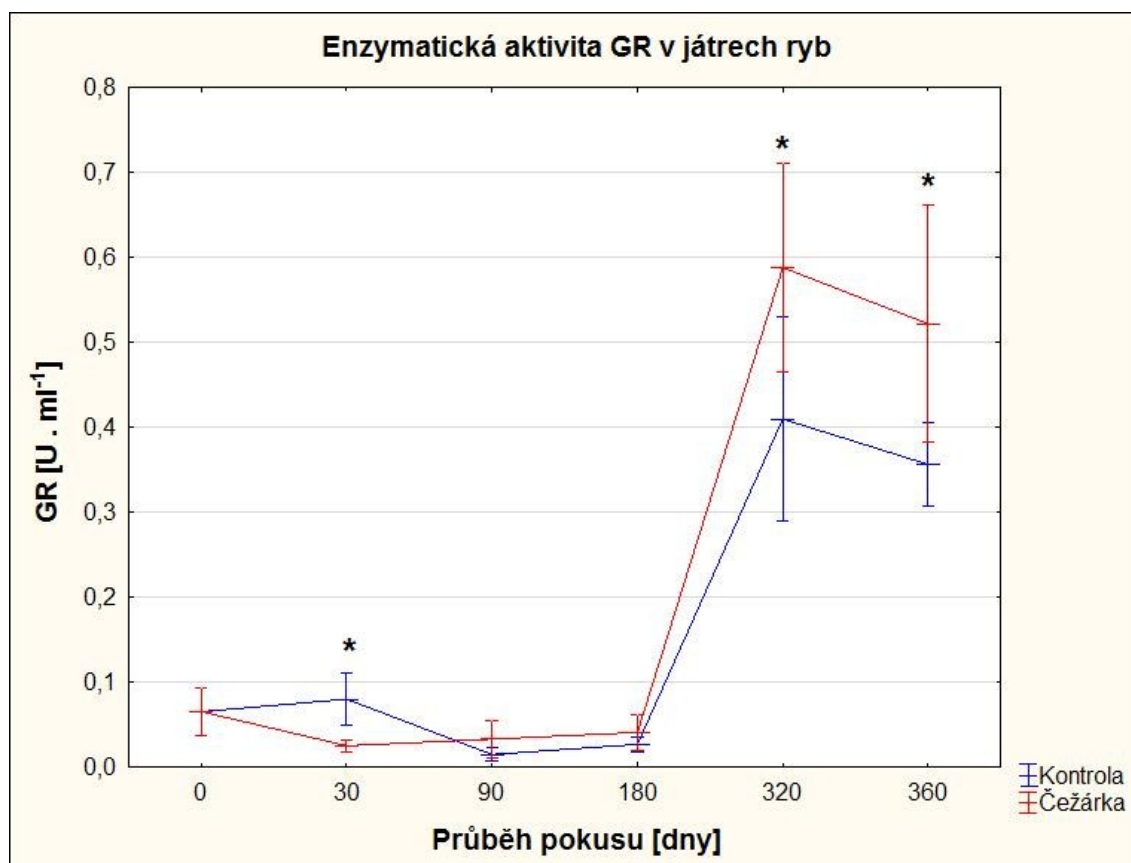


Graf č. 7. Enzymatická aktivita GST v jaterní tkáni kaprů pocházejících ze dvou odlišných lokalit. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, v čase 0 dní jen jedna skupina ryb před expozicí, N=20. V ostatních obdobích je pro každou skupinu N=12. Sloupce označené znakem * jsou v daném časovém období od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).

4.5.3 GR

Enzymatická aktivita GR je vyjádřena jednotkami $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Aktivita tohoto enzymu byla na začátku této studie velmi nízká. Aktivita GR v jaterní tkáni je na rozdíl od aktivity ostatních enzymů ve srovnání nižší. Naopak je tento enzym aktivnější ve vzorcích žaber. V případě hodnot vyjadřujících enzymatickou aktivitu vzorků jaterní tkáně byl významný rozdíl mezi skupinami ryb v časovém období 30 dnů od vysazení (skupina z Čezárky o 69 % nižší než u kontroly), 320 dnů (skupina z Čezárky o 43 % vyšší než kontrola) a 360 dnů (skupina z Čezárky o 46 % vyšší než

kontrola). Rozdíly mezi skupinami nejsou u ostatních vzorků v daných časových intervalech významné. Vývoj hodnot vyjadřujících míru enzymatické aktivity GR v žaberní tkáni lze pozorovat na grafu č. 8. Podrobné znázornění vztahující se k enzymatické aktivitě GR vyjadřují grafy č. 21- 26 v příloze.

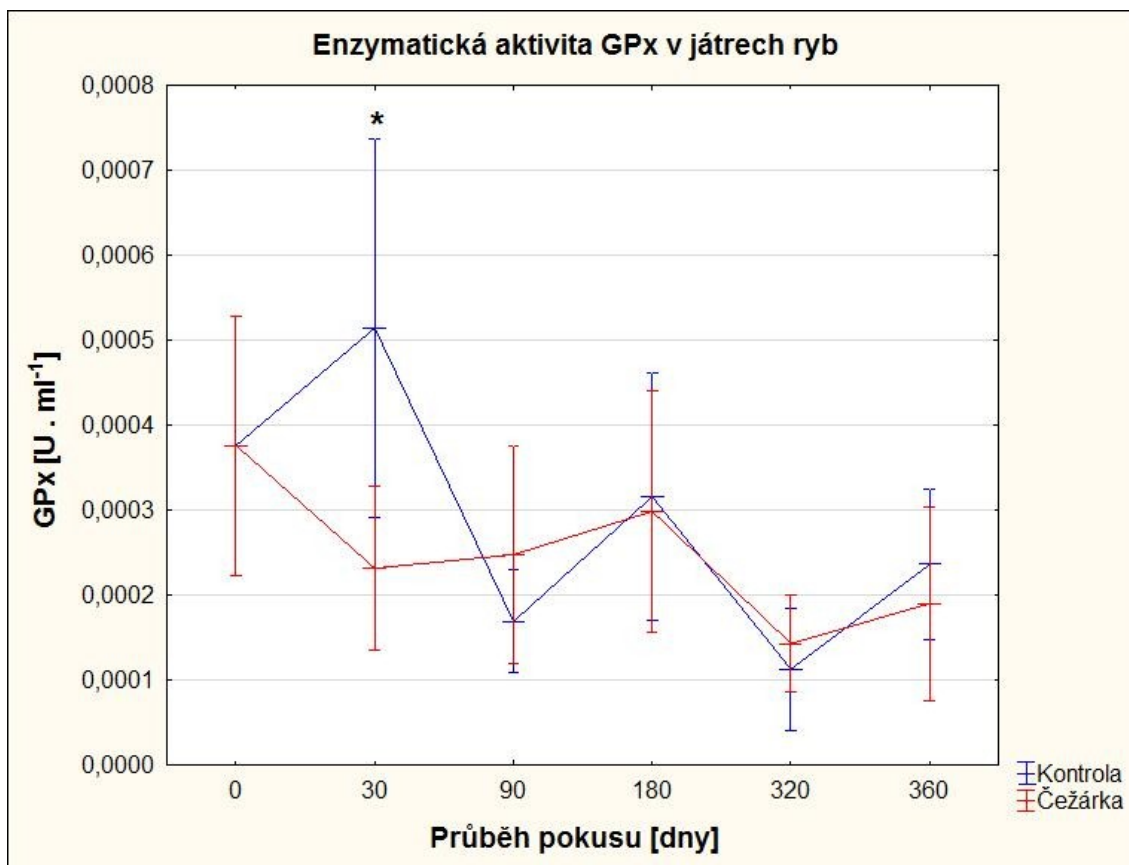


Graf č. 8. Enzymatická aktivita GR v jaterní tkáni kaprů pocházejících ze dvou odlišných lokalit. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, v čase 0 dní jen jedna skupina ryb před expozicí, N=20. V ostatních obdobích je pro každou skupinu N=12. Sloupce označené znakem * jsou v daném časovém období od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).

4.5.4 GPx

Enzymatická aktivita GPx dosahuje hodnot do jednoho $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. V případě hodnot vyjadřujících enzymatickou aktivitu vzorků jaterní tkáně byl významný rozdíl mezi skupinami ryb v časovém období 30 dnů od vysazení (skupina z Čezárky o 55 % nižší než u kontroly). V případě žaber byla významně odlišná aktivita GPx v období 90 dnů od vysazení (u skupiny z Čezárky o 22 % nižší než u kontroly) a

180 dnů od vysazení (skupina z Čežárky o 23 % vyšší u kontroly). Kolísání hodnot vyjadřujících enzymatickou aktivitu GPx v čase je patrné na grafu č. 9. Podrobné znázornění vztahující se k enzymatické aktivitě GPx vyjadřují grafy č. 27 - 32 v příloze.

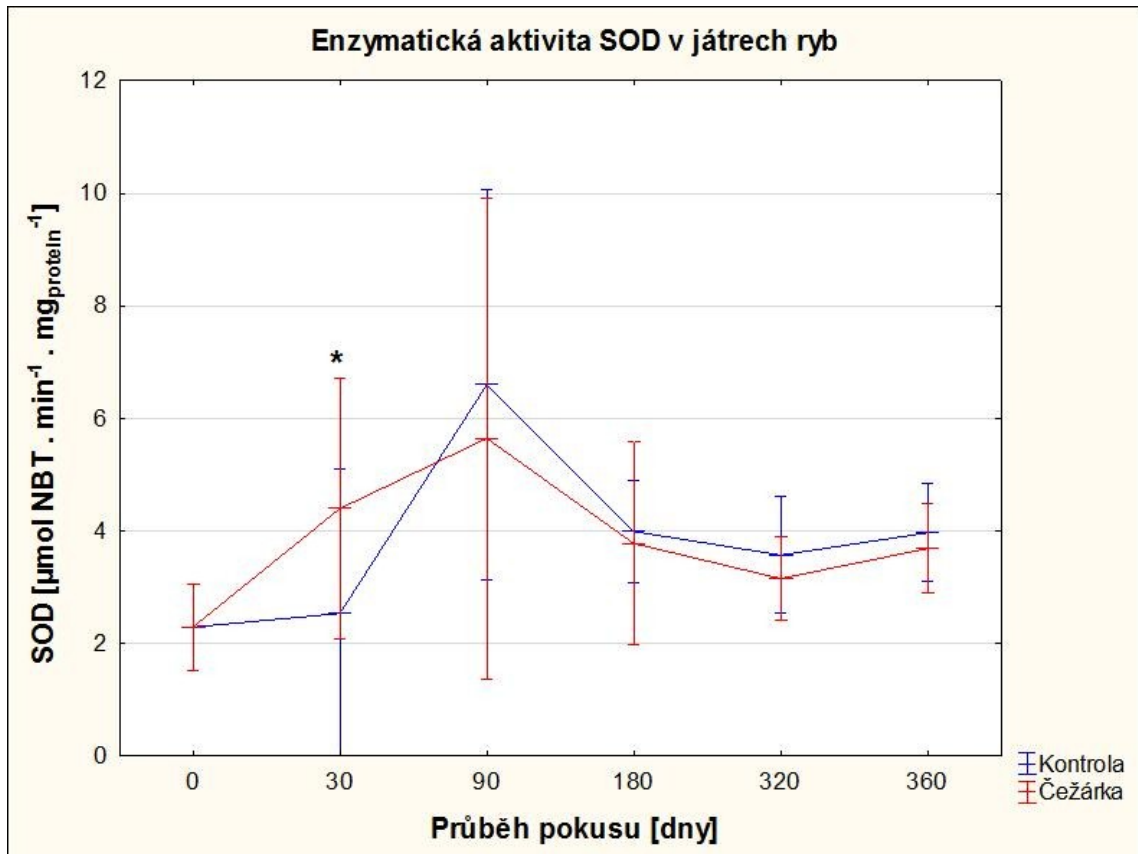


Graf č. 9. Enzymatická aktivita GPx v jaterní tkáni kaprů pocházejících ze dvou odlišných lokalit. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD, v čase 0 dní jen jedna skupina ryb před expozicí, N=20. V ostatních obdobích je pro každou skupinu N=12. Sloupce označené znakem * jsou v daném časovém období od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).

4.5.5 SOD

Enzymatická aktivita SOD je vyjádřena hodnotami $\mu\text{mol NBT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}$. Aktivita enzymů dosahovala v průběhu pokusu řádů jednotek a desítek těchto hodnot. V první polovině pokusu v časech 30, 90 a 180 dnů byla nevyšší aktivita SOD v jaterní tkáni ryb obou skupin. V období 30 dnů od začátku pokusu byl zjištěn významný rozdíl mezi skupinami u jaterního vzorku (ve skupině z Čežárky byl průměr hodnot vyjadřující

enzymatickou aktivitu o 74 % vyšší než u kontrolní skupiny). Ostatní hodnoty aktivity SOD v jaterní tkáni byly bez významného rozdílu mezi těmito skupinami. Hodnoty u vzorků žaber se lišily v období 90 dnů (skupina z Čežárky o 61 % vyšší u kontroly). Vývoj hodnot vyjadřujících míru enzymatické aktivity SOD v žaberní tkáni lze pozorovat na grafu č. 7. Podrobné znázornění vztahující se k enzymatické aktivitě SOD vyjadřují grafy č. 33 – 38 příloze.



Graf č. 10. Enzymatická aktivita SOD v jaterní tkáni kaprů pocházejících ze dvou odlišných lokalit. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, v čase 0 dní jen jedna skupina ryb před expozicí, N=20. V ostatních obdobích je pro každou skupinu N=12. Sloupce označené znakem * jsou v daném časovém období od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).

5 Diskuse

„Vyčištěná“ odpadní voda vytékající z čistíren odpadních vod musí vyhovovat parametřům stanoveným v Nařízení vlády č. 401/2015 Sb. Stanovené hodnoty byly dodrženy ve všech sledovaných parametrech. Pro komunální odpadní vody jsou stanoveny mezní limity těchto sledovaných parametrů: CHSK_{Cr} , BSK_5 , NL, N-NH_4^+ , N-celk. a P-celk. Koncentrace nerozpuštěných látek se sice v některých odběrných místech blíží k mezním limitům, ale ne v důsledku přítomnosti velkého množství nerozpuštěných látek v odpadní vodě z ČOV. Množství nerozpuštěných látek ve vzorcích odebraných v Čezárce a rybníce Dřemliny je způsobeno vyšší biomasou přítomnou v obou nádržích. Z výsledků hydrochemického rozboru je patrné, že na vtoku do nádrže Čezárka jsou hodnoty nerozpuštěných látek nejnižší a postupně se v nádrži mírně zvyšují. Nejvyšší jsou v rybníku Dřemliny. Tento stav je způsoben vegetačním zákalem a sedimenty uvolněnými (zvířenými) dnovou aktivitou husté rybí obsádky s dominancí kapra. Primárním producentům se dostává velké množství živin v dostupné formě, což má za následek již zmíněnou vysokou biomasu v nádrži. V rybníku Čezárka je však nižší obsádka planktonofágních ryb a proto je v této nádrži dostatek hrubého zooplanktonu. Dostatečné množství hrubého zooplanktonu zaručuje účinnou filtraci fytoplanktonu a tím plné využití živin proudících do rybníka. Právě v odpadních vodách jsou rozpuštěny látky, které jsou cenné pro další hospodářské využití jako živiny. Jedná se zejména o dusík a fosfor v různých formách a dále o organický uhlík. Tyto živiny jsou nezbytné pro primární produkci v rybníční akvakultuře. Takto můžeme ovšem využít pouze odpadní vodu, v níž nejsou tyto látky v takové koncentraci, ve které by ovlivnily rybníční systém natolik, že by se stal z hlediska hydrochemického nevhodný pro život vodních organismů. V souvislosti se splaškovými odpadními vodami jsou stále diskutovanějším problémem polární organické mikropolutanty – léčiva a jejich metabolity. Analýzou obsahu pasivních vzorkovačů POCIS byly prokázány tyto nejvýznamnější skupiny látek: nesteroidní protizánětlivé léky (diklofenak); antidepresiva (O-desmethylvenlafaxin); analgetika (tramadol); antiepileptika (karbamazepin a trans-dihydro-dihydroxykarbamazepin); antihypertenzika (irbesartan, telmisartan, valsartan) a beta-blokátory (metoprolol a metoprololová kyselina). Tyto uvedené látky byly naměřeny alespoň v jednom případě v koncentraci $500 \text{ ng} \cdot \text{POCIS}^{-1}$, což ukazuje současný trend užívání léčiv. Antibiotika byla zastoupena těmito látkami:

klarithromycin, klindamycin sulfoxid, klindamycin, erythromycin, N4 acetylsufamethoxazol, roxithromycin, sulfamerazin, sulfamethazin, sulfamethoxazol, sulfapyridin. Sumární koncentrace antibiotik vykazovaly napříč lokalitami sestupnou tendenci. Průměry sumárních koncentrací antibiotik v průběhu experimentu byly: 573 ng . POCIS⁻¹ v odběrném místě V-1 na přítoku do Čežárky, 442 ng . POCIS⁻¹ v odběrném místě V-2 na v Čežárce, 402 ng . POCIS⁻¹ v odběrném místě V-3 na odtoku z Čežárky, 112 ng . POCIS⁻¹ v odběrném místě rybníka Dřemliny a 46 ng . POCIS⁻¹ v kontrolním rybníce. Pro koncentrace těchto látek ve vypouštěných komunálních odpadních vodách však nejsou žádné limity stanoveny. Tento výzkum je na rozdíl od laboratorních pokusů, kdy byly testované ryby nebo nižší organizmy v řízených podmínkách, pojat spíše jako dlouhodobá observační studie v reálném prostředí. Při současných možnostech není možnost nastavit design experimentu tak aby byla dodrženy všechny podmínky. Jde zejména o počet opakování. Je složité triplikovat pokus a navíc pokaždé dodržet stejné podmínky v živém systému, který ovlivňují stále se měnící vnější podmínky. Nehledě na dobu trvání studijního programu a výzkumného projektu. Stejně diskutabilní je i porovnávání s kontrolní lokalitou, která je úplně na jiné rybníční soustavě. Jsou zde jiné teplotní i hydrochemické i trofické poměry. Na výsledcích analýzy fyzikálně chemických vlastnosti vody a LC-MS analýzy vzorků z POCIS je možné vidět, že se parametry vody a koncentrace látek v daném rybníčním ekosystému neustále mění v čase a zároveň dochází k nerovnoměrné distribuci těchto látek v samotném biologickém rybníce. Zde je nutno též zdůraznit, že u splaškových vod dochází k sezónnímu kolísání koncentrací farmak v průběhu ročních období. Každá sezóna však má v našich podmínkách jiný průběh. Sezónní kolísání koncentrací farmak v lokalitách ovlivněných vypouštěním splašek z ČOV již byly popsány i v jiných studiích (Qi a kol. 2014; Yan a kol. 2013; Kim a Carlson 2007; Jiang a kol. 2011; Yang a kol 2011), ale v těchto studiích byly vždy koncentrace léčiv (zejména antibiotik) nejvyšší v zimním období, což je v těchto pracích vysvětlováno nižší účinností technologií používaných v ČOV. V těchto případech se jednalo o výzkum prováděný na větších řekách s rozdílným průtokem v průběhu roku. Ale s faktem rozdílné účinnosti čistírenských technologií v závislosti na teplotě je nutné počítat. A stejně tak s mírou biodegradace organických polutantů v biologickém rybníce. V případě Čežárky jsou vidět výrazně nižší koncentrace na dalších odběrných místech v létě a na podzim. To může být právě proto vysvětleno vyšší mírou degradace farmak v rybníčním prostředí

během vegetační sezóny. Vyšší hodnoty těchto látek v jarním období nám mohou naopak potvrdit, že během vegetačního klidu v zimním období probíhá rozklad těchto mikropolutantů pomaleji. Při porovnání výsledků analýzy je patrné, že k degradaci farmak v prostředí biologického rybníka dochází ve značné míře. Pokud počítáme sumu farmak na přítoku do rybníka jako 100 %, můžeme si vyjádřit zbytkové koncentrace na odtoku z rybníka 23 – 95 % a v ústí do rybníka Dřemliny 2 - 30 % v závislosti na podmínkách v různých ročních obdobích. Vedle procesů biodegradace, zde hrají obrovskou roli i další cesty rozkladu těchto látek. Jde zejména o fotodegradaci. Tento fakt může být jedním ze spolufaktorů zapříčiňujícím lepší výsledky odbourávání farmak ve vegetačním období. Předpokládaný vliv endokrinních disruptorů přinášených odpadní vodou, jež prošla městskou ČOV na ryby byl potvrzen. Z výsledků analýzy vzorků je patrný projev narušení endokrinních procesů prostřednictvím zvýšení hladiny vitellogeninu v krevní plasmě ryb. Při kvantifikaci koncentrace vitellogeninu v krevní plasmě ryb byly hodnoty této látky vždy vyšší u ryb exponovaných v biologickém rybníku. Ve vzorcích krevní plasmy ryb odlovených po 30, 90 a 180 dnech pokusu však ještě nebyly rozdíly mezi výsledky měření koncentrací VTG v krevní plasmě ryb z Čezárky a kontrolního rybníka významné. Ve skupině ryb odlovených po 180 dnech expozice již byly patrné rozdíly v hodnotách koncentrací VTG naměřených u samců i samic. Avšak vzhledem vysokým rozptylům nebyly rozdíly mezi průměrnými hodnotami koncentrací VTG naměřené v krevní plasmě ryb po 180 dnech expozice z hlediska příslušnosti k lokalitám statisticky významné (při použití výše uvedeného testu). U vzorků krevní plasmy ryb odlovených po 360 dnech pokusu byly rozdíly v koncentraci VTG mezi skupinou pocházející z Čezárky a skupinou z kontrolního rybníka významné jak v případě samic, tak i samců. Ryby z kontrolního rybníka v tomto období vykazovaly v krevní plasmě nulové hodnoty VTG, zatímco ryby z Čezárky měly v krevní plasmě hladinu VTG v průměru okolo 6 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (samci) a 13 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (samice).

Samotná přítomnost VTG v krevní plasmě samic je biomarkerem přítomnosti a účinků xenoestrogenních látek, tzn. látek napodobujících účinky přirozených estrogenních hormonů, které se v nezátíženém prostředí tvoří pouze u pohlavně dospělých samic. V případě samic může být změna v hladině VTG, nebo její výrazná časová a individuální rozkolísanost známkou narušení vnitřní hormonální rovnováhy projevující se poruchami řízení reprodukčních procesů.

Výsledky obsahu VTG vykazovaly značný rozptyl. Ve skupině sedmi samců po 360 dnech expozice v biologickém rybníku byl jeden jedinec, u kterého bylo zjištěno $39 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ VTG v krevní plasmě, u dvou jedinců do $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, u dvou jedinců do $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a u dvou jedinců nebyl v krevní plasmě zjištěn žádný VTG. Z pěti samic z Čežárky bylo zjištěno 34; 17; 9; 4 a 3 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Takovéto kolísání může být způsobeno právě narušením endokrinního systému v důsledku působení reziduí farmak na bázi hormonů, což je možné podložit faktem, že u kontroly nebyl žádný vitellogenin zjištěn, jak již bylo výše zmíněno. Hodnoty vitellogeninu v krevní plasmě jedinců kapra obecného z Čežárky však nebyly tak vysoké jako hodnoty naměřené v krevní plasmě samců kapra obecného odlovených na španělské řece Ebro pod ČOV města Zaragoza ve stejném ročním období. V krevní plasmě ryb z Ebra se koncentrace VTG pohybovaly okolo $300 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v případě samců a $2000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v případě samic. Ryby z lokality Zaragoza vážily v průměru 1196 ± 89 gramů (samci) a 1579 ± 130 gramů a gonády byly ve stádiu dozrávání (Lavado a kol., 2004). Ryby srovnatelných tělesných parametrů a ve stejném stádiu vývoje gonád byly i v lokalitě Čežárka. V případě studie provedené v podzimním období se hodnoty koncentrací pohybovaly od 5 do $10\,000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v případě samců a od 35 do $7\,500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v případě samic (Folmar a kol. 1996).

Z analýzy TBARS ve vzorcích tkání byla patrná odezva na působení volných kyslíkových radikálů (ROS) na lipidy. Sekundární produkt oxidace těchto lipidů je malondialdehyd (MDA), který se projevil ve zvýšené úrovni naměřených TBARS ve skupině ryb odlovených po 30 dnech expozice v biologické nádrži Čežárce. Cílem studie bylo sledování změn v čase a zhodnocení rozdílů mezi skupinami. Jak je vidět z grafů, nejprve se působení ROS projevilo v jaterní tkáni. U jaterních vzorků kaprů vylovených po 30 dnech byl analýzou prokázán pokles enzymatické aktivity u CAT, GR, GPx a GST. Pouze enzymatická aktivita SOD vykazovala v tomto období nárůst. V dalším období pokračoval nárůst TBARS, který dosáhl v čase 90 dnů od začátku experimentu maxima, ale bez významného rozdílu mezi skupinami. Je tedy pravděpodobné, že za tímto nárůstem oxidativního stresu v čase 90 dnů mohou stát jiné faktory, než přítomnost farmak v lokalitě Čežárka. V následujících období už v případě jaterní tkáně docházelo k nárůstu antioxidační aktivity enzymů a následným poklesem úrovně TBARS. V případě svaloviny na začátku pozorování (vegetační období) k žádnému výraznému nárůstu úrovně TBARS nedošlo. Znamky oxidativního stresu se projeví až v období 320 a 360 dnů od začátku experimentu, tzn. v zimě a časném jaru.

Tento vzrůst úrovně TBARS však proběhl stejně u obou skupin. Mezi průměrnými hodnotami nebyl významný rozdíl. V tomto případě lze hledat příčinu jinde než v přítomnosti farmak jak již bylo výše zmíněno. V případě enzymů došlo ke zvýšení aktivity katalázy u skupiny ryb z Čežárky v období 30 dnů od začátku pokusu a zároveň k mírnému poklesu u skupiny v kontrolním rybníku. Tento rozdíl však nebyl statisticky signifikantní. K významnému rozdílu mezi skupinami ryb v antioxidantní aktivitě enzymu ve svalovině došlo v případě GST v období 360 dnů od začátku pokusu. Tento významný rozdíl může být vysvětlen přítomností farmak, které mohou prohloubit přirozené kolísání míry oxidativního stresu v čase. Zde byla aktivita vyšší u skupiny ryb z Čežárky. V případě svaloviny je tedy vidět, že k nárůstu oxidativního stresu docházelo v průběhu zimy, která byla na přelomu let 2015/2016 provázena výrazně vyššími teplotami, než je pro dané období obvyklé. Průměrné teploty v prosinci 2015 překročily normál o 5°C, v lednu 2016 o 1,6°C, v únoru 2016 o 4°C a v březnu 2016 o 0,7 stupňů. Dlouhodobý normál jsou průměrné teploty z daných období mezi lety 1961 – 1990 (ČHMÚ, 2017). Průměrná teplota za měsíc leden 2017 v místě České Budějovice činila -4,7°C (ČHMÚ, 2017). Lze předpokládat, že kapři byli značnou část zimy aktivní a po spotřebování tukových zásob se dostavil oxidativní stres z důvodu horší kondice. Nárůst úrovně TBARS ve svalové tkáni byl pozorován u obou skupin ryb. Zároveň v tomto období došlo k poklesu aktivity CAT a GST, kde u aktivity GST došlo k významnému rozdílu mezi kontrolní skupinou a skupinou ryb z Čežárky. U ryb z Čežárky byla aktivita GST vyšší. U ostatních antioxidantů byl v období konce zimy a časného jara pozorován nárůst aktivity. U vzorků žaberních tkání byl zaznamenán nárůst úrovně TBARS v průběhu vegetační sezóny s maximem na podzim v čase 180 dnů expozice ryb (datum odlovu 8. 10. 2015). Během zimy úroveň oxidativního stresu klesla a na jaře byl zaznamenán nárůst hodnot TBARS u vzorků z Čežárky. Po 360 dnech expozice byla ve vzorcích žaberní tkáně ryb z Čežárky zjištěna významně vyšší úroveň TBARS než u kontroly. Při analýze enzymatické aktivity antioxidantů v žaberní tkáni vykazovaly enzymy GR a GST v období vegetační sezóny pokles, SOD setrvalý stav, GPx zprvu nárůst a pozěji pokles a kataláza prudký nárůst na začátku (období 30 dnů od nasazení) následovaný poklesem na původní úroveň. Významné rozdíly mezi skupinami byly ve vzorcích odebraných 20. 8. 2105 (90 dnů expozice), kdy byla aktivita GST a SOD u vzorku z Čežárky vyšší než v kontrole, zatímco aktivita GPx byla naopak vyšší v kontrole. V zimním období byl zaznamenán nárůst u GST a

GR a pokles u GPx. U katalázy a SOD byl setrvalý stav. U vzorků odebaných v zimě a na jaře (320 a 360 dnů od nasazení) nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi skupinami. Úroveň TBARS u vzorků střev vykazovala setrvalý stav s mírným poklesem u vzorků z kontrolního rybníka, kde byla úroveň TBARS ve vzorcích z 20. 8. 2015 významně nižší než u vzorků z Čezárky. Enzymy CAT, GST a GR ve střevním vzorku vykazovaly pozvolný pokles aktivity v průběhu celého pokusu. GPx a SOD vykazovaly setrvalý stav se vzestupem na konci pokusu (360 dnů od nasazení). Významný rozdíl byl zaznamenán pouze u enzymatické aktivity GST mezi vzorky odebranými 11. 3. 2016 (320 dnů expozice), kdy byla aktivita tohoto enzymu výrazně vyšší u vzorků z Čezárky. Z výše uvedené analýzy vyplývá, že rezidua farmak mají prokazatelný vliv na rybí obsádku jak z hlediska narušení endokrinní činnosti žláz, tak na odezvu ve formě oxidativního stresu. Na druhou stranu ryby vykazují značnou schopnost adaptace zvýšením antioxidantní enzymatické aktivity jako odpověď na přítomnost reaktivních forem kyslíku (ROS). Při vhodně zvolené obsádce jsou ryby schopné prosperovat i v lokalitě, která je značně zatěžována komunálními odpadními vodami. Je ovšem důležité, aby tyto odpadní vody prošly čistícím procesem technologií ČOV. Pokud nebude z vody odstraněna značná část biologicky rozložitelných látek, bude při rozkladu těchto látek docházet k vyčerpání rozpuštěného kyslíku ve vodě a taková voda se stane nevhodnou pro rybí obsádku. Rybník, který je příjemcem vyčištěných odpadních vod, ale s vyváženými hydrochemickými poměry umožňuje vhodně zvolené rybí obsádky značné přírůstky. Porovnání hmotností ryb z lokalit Čezárka a kontrolního rybníka je v grafu č. 1 pro kapra a v grafu č. 2 pro candáta. Z těchto grafů je zřejmé, že jsou přírůstky ryb v tomto rybníce v porovnání s kontrolou vynikající. Nabízí se zde otázka, jestli by ryby z lokalit zatěžovaných komunálními odpadními vodami byly vhodné pro konzumaci. Ve studii Brodím a kol. (2013) byla zmíněna bioakumulace oxazepamu v okounech ze švédské řeky Fyris, která je zatěžována komunálními odpadními vodami z města Uppsala. Biokoncentrační faktor u okouna byl stanoven v případě svaloviny více než šestinásobný oproti okolnímu vodnímu prostředí. Při koncentracích oxazepamu v okouním mase $3,6 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ dle Brodina a kol. (2013) bude v běžné porci o 150 gramech svaloviny okouna cca $0,72 \mu\text{g}$ oxazepamu. Účinná dávka v jedné tabletě je 10 mg (Zentiva, 2008). Švédská studie publikovaná Brodinem a kolektiv v roce 2013 je však pouze demonstrací vlivu a bioakumulace jedné látky ze směsi reziduí mnoha běžně používaných farmak a jejich metabolitů. Zhodnotit riziko současné přítomnosti celé

řady xenobiotik v prostředí, v němž se ryby mohou nacházet, je velmi obtížné. Vzájemné interakce v působení těchto látek na vodní organizmy také není možné předvídat. Je třeba si uvědomit, že tržní ryby stráví v zatíženém prostředí zpravidla několik let. Není tedy reálné kalkulovat s možností příjmu účinných dávek farmak v rybím mase ze zatížených lokalit. Další možné riziko by mohla představovat přítomnost velkého množství fekálních bakterií. Jako potenciální zdroj bakteriálních patogenů pro člověka posuzuje ve své práci Novotný a kol. (2004). Riziko autoři vidí v nedokonalých hygienických podmínkách zpracování a nedostatečnou tepelnou úpravu (pod 65°C). Přítomnost různých bakteriálních taxonů ve střevní mikrofloře, mikrofloře povrchu rybího těla, žaberního aparátu, tkáni ledvin a jater uvádí v přehledové studii Austin a kolektiv (2006). Ryby jsou nosiči bezpočtu druhů bakterií, často reflektující skladbu mikroflory okolního vodního prostředí. Přítomnost bakterií v rybí svalovině je však sporná. Apun a kolektiv (1999) považují rybí svalovinu za sterilní, zatímco Evelyn a McDermott (1961) přítomnost bakterií uvádějí. Jedná se však pouze o spekulaci, protože vodní díla, které jsou při vodoprávním řízení v oblasti nakládání s vodami povolovány jako biologické nádrže nejsou určeny k chovu ryb pro konzumní využití. Konzumace takových ryb není povolena. Takovýto případ je i rybník Čezárka, která byla asanována v režii Agentury ochrany přírody a krajiny (AOPK) s využitím dotací. V dotačních pravidlech je zakotveno omezení chovu ryb. Dočasný uživatel rybníka Fakulta rybářství a ochrany vod má udělenou výjimku k nasazení ryb pro experimentální účely.

6 Závěr

Zařazení biologického rybníka za technologii městské čistírny odpadních vod je vhodným a přírodě blízkým řešením. Hydrochemické rozbory prováděné Laboratoří vodní toxikologie a ichthyopatologie VÚRH Vodňany prokázaly pokles emisních parametrů v biologickém rybníce. Dochází zde k dokončení rozkladu biologicky rozložitelných látek, k nitrifikaci amoniakálního dusíku a k retenci fosforu a dusíku. Jak je patrné z výsledků měření farmak, dochází i k postupné degradaci těchto látek v ekosystému. Navázáním do biomasy také dochází k distribuci těchto látek mezi různými složkami prostředí ve kterých mohou být různými cestami odbourávány. To vše zvyšuje efektivitu rozkladu těchto látek. Biologické rybníky nejsou v souvislosti s odpadními vodami žádnou novinkou. Při dodržení emisních limitů a respektování objemu a plochy rybníka ve vztahu k množství vypouštěné odpadní vody je možno při vhodné volbě obsádky dosáhnout výtečných přírůstků. Zdrojem potravy pro ryby je výlučně přirozená potrava. V rybníce Čezárka dosáhly dvouleté ryby (kapr – K2) kusové hmotnosti okolo 2 kilogramů. K úhynům ryb nedocházelo, přestože v některých obdobích byly naměřeny velmi nízké koncentrace rozpuštěného kyslíku. Ryby se pravděpodobně uchýlily k silnému přítoku vyčištěné odpadní vody (obrázky 3 a 4), která obsahovala rozpuštěného kyslíku dostatek k tomu, aby přežili nejen kapři, ale i candáti. Ve skupině ryb exponovaných v Čezárce se projevil vliv endokrinních disruptorů zvýšenou hladinou vitellogeninu u samců i samic. Vliv působení endokrinně působících látek na schopnost reprodukce zatím nelze posoudit. Pro lepší zhodnocení vlivu endokrinně působících látek bude nutné pokračovat v další expozici starších ročníků ryb v biologických rybnících a provádění dalších experimentů zaměřených na sledování reprodukčních parametrů u pohlavně zralých ryb. Působení oxidativního stresu na ryby indukovalo odpověď jejich organismu v období adaptace (30 – 90 dnů expozice) ve zvýšení antioxidační aktivity sledovaných enzymů. Zatím nejsou dostupná data o koncentracích farmak v tkáních exponovaných ryb, které by bylo možné porovnat s výsledky měření koncentrací farmak z pasivních vzorkovačů exponovaných ve sledovaných lokalitách. Ryby prokázaly schopnost aklimatizovat se životním podmínkám v prostředí a plně využít možnosti nového prostředí. To se projevilo v lepším růstu ryb v úživnějším biologickém rybníce. Vyhodnocení hygienické nezávadnosti rybí svaloviny z hlediska obsahu farmak není možné kvůli chybějícím

limitům. K dosažení objektivnějších výsledků by bylo do budoucna vhodné provést opakování experimentu, ale v současné době je překážkou nedostupnost optimální kontrolní lokality.

7 Literatura

- Aga, D.S., 2008. Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, ISBN 978-1-4200-5232-9, 391s.
- Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E.A., Leino, R.L., 2002. Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a reproduction assay with fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol Sci* 67:121–130.
- Apun, K., Yusof, A.M., and Jugang, K. (1999) Distribution of bacteria in tropical freshwater fish and ponds. *Int. J. Environ. Health Res.* 9, 285–292.
- Austin B., 2006. The Bacterial Microflora of Fish, Revised. *The Scientific World Journal* 6: 931–945.
- Baquero, F., Martinez, J.L., Canton, R., 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 19:260–265.
- Besemer, K., Peter, H., Logue, J.B., Langenheder, S., Lindstrom, E.S., Tranvik, L.J., and Battin, T.J., 2012. Unraveling assembly of stream biofilm communities. *Isme Journal* 6: 1459-1468.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Bricheux, G., Le Moal, G., Hennequin, C., Coffe, G., Donnadieu, F., Portelli, C., Bohatier, J., and Forestier, C., 2013. Characterization and evolution of natural aquatic biofilm communities exposed *in vitro* to herbicides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 88: 126-134.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, J.M., Klaminder J. 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* 339, 814 (2013); DOI: 10.1126/science.1226850
- Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M., La Point, T.W., 2003. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol Lett* 142:169–183.
- Burkina, V., Žlábek, V., Zamaratskaia, G., 2013. Clotrimazole, but not dexamethasone, is a potent *in vitro* inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP1A and CYP3A in rainbow trout. *Chemosphere* 92, 1099-1104.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 250, 5475–5480.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity. In Greewald, R.A., *CRC Handbook of Methods in Oxygen Radical Research*, CRC Press, Boca Raton, USA, 283-284.
- Corcoran, J., Winter, M.J., Tyler, C.R., 2010 Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit. Rev. Toxicol.* 40: 287-304.
- ČHMÚ, 2017 - <http://portal.chmi.cz/historicka-data/pocasi/uzemni-teploty#> - navštíveno 4. 3. 2017

- Daniel, P., 2009. Drugs and Chemicals in Aquafeeds: The problems and solutions. In *The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture*, edited by Basurco Rogers C.J., B. Zaragoza: CIHEAM - IAMZ.
- Evelyn, T.P.T., McDermott, L.A. (1961) Bacteriological studies of freshwater fish. 1. Isolation of aerobic bacteria from several species of Ontario fish. *Can. J. Microbiol.* 7, 357–382.
- Fedorova, G., Randak, T., Golovko, O., Kodes, V., Grabicova, K., Grabic, R., 2014. A passive sampling method for detecting analgesic, psycholeptic, antidepressants and illicit drugs in aquatic environment in the Czech Republic. *Sci. Total Environ.* 487: 681 – 687.
- Fick, J., Lindberg, R.H., Parkkonen, J., Arvidsson B., Tysklind, M., Larsson, D.G.J., 2010. Therapeutic Levels of Levonorgestrel Detected in Blood Plasma of Fish: Results from Screening Rainbow Trout Exposed to Treated Sewage Effluents. *Environ Sci Technol.* 44:2661-2666
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Guillet, J.R., 2006. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. (R824760). *Environmental Health Perspectives.* Oxford Journals, 104:1096-1101.
- Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randák, T., Grabic, R., 2014. Removal and seasonal variability of selected analgesic/anti-inflammatory, anti-hypertensive/cardiovascular pharmaceuticals and UV filters in wastewater treatment plant. *Environ Sci Pollut Res.* 21: 7578-7585.
- Gonzalez, F.J., Peters, J.M., Cattley, R.C., 1998. Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators; role of the peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Natl Cancer Inst* 90:1702–1709.
- Grabicová, K., Grabic, R., Bláha, M., Kumar, V., Červený, D., Fedorova, G., Randák, T., 2014. Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water Research* XXX: 1-9.
- Grondel, J.L., Gloudemans, A.G., Van Muiswinkel, W.B., 1985. The influence of antibiotics on the immune system II. Modulation of fish leukocyte responses in culture. *Vet Immunol Immunopathol* 9:251–260.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130 – 7139.
- Hegelund, T., K. Ottosson, et al. 2004. Effects of the antifungal imidazole ketoconazole on CYP1A and CYP3A in rainbow trout and killifish. *Environ. Tox. Chem.* 23(5): 1326-1334.
- Hoeger, B.A., Köllner, B., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B., 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquat Toxicol* 75:53–64.
- Holford, N.H.G., 2001. Pharmacokinetics and pharmacodynamics: Rational dosing and the time course of drug action. In: Katzung BG, ed. *Basic and Clinical Pharmacology* New York: McGraw-Hill Professional, Chapter 3: 24–50.
- Huggett, D.B., Brooks, B.W., Peterson, B., Foran, C.W., Schlenk, D., 2002. Toxicity of select beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals (β blockers) on aquatic organisms. *Arch Environ Contam Toxicol* 43:229–235.

- IMS Health 2015. Web: <http://www.imshealth.com/en/about-us/news/ims-health-forecasts-global-drug-spending-to-increase-30-percent-by-2020> , navštíveno 12.8. 10:33
- Jiang, L., Hu, X. L., Yin, D. Q., Zhang, H. C., Yu, Z. Y., 2011. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huanghu River, Shanghai, China, *Chemosphere* 82, 822-828.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol* 32:2498–2506.
- Kim, S.C., Carlson, K., 2007. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environ Sci Technol.* 41: 50-57.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.G., Park, J., 2007. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem, and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environ Int* 33: 370 – 375.
- Kopřiva, V., Hostovský, M., Nekvapil, T., Boudný, V., Malota, L., 2012. Vybrané instrumentální metody v biochemických cvičeních – inovované úlohy. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ISBN 978-80-7305-627-8, 47 s.
- Kotzya, J., Soudek, P., Kafka, Z., Vaněk, T., 2009. Léčiva – „nový“ environmentální polutant. *Chemické listy* 103: 540-547.
- Lange, A., Paull, G.C., Coe, T.S., Katsu, Y., Urushitani, H., Iguchi, T., Tyler, C.R., 2009. Sexual reprogramming and estrogenic sensitisation in wild fish exposed to ethinylestradiol. *Environ Sci Technol* 43:1219–1225.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldúa, D., Martín, R., Porte, C., 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196: 247–257.
- Laville, N., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196:41–55.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Grabic, R., Li P., Machova, J., Velisek, J., Randak, T., 2010a. Effects of exposure to sublethal propiconazole on the antioxidant defense system and Na⁺-K⁺-ATPase activity in brain of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 98: 297-303.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Turek, J., Velisek, J., Pulkrabova, J., Kolarova, J., Sudova, E., Berankova, P., Hradkova, P., Hajslova, J., Randak, T., 2011a. Evaluating environmental impact of STPs situated on streams in the Czech Republic: An integrated approach to biomonitoring the aquatic environment. *Water Research* 45: e1403-e1413
- Li, Z.H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P., Randak, T., 2011b. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 319–327
- Li, Z.H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Randak, T., 2009. Responses of antioxidant status and Na⁺-K⁺-ATPase activity in gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, chronically treated with carbamazepine. *Chemosphere* 77, 1476e1481.

- Li, Z.H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Randak, T., 2010b. Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment. *Comp. Biochem. Physiol. C* 151: 137-141.
- Loos, R., Carvalho, R., António D.C., Comero S., Locoro, G., Tavazzi, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettieri T., Bláha, L., Jarošová, B., Voorspoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R.H., Schwesig, D., Gawlik, B.M., 2013. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Research* 47: 6475-6487.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Husak, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., Storey, K.B., 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37: 1670 - 1680.
- McCord, J. M., Fridovich, I., 1969. *J. Biol. Chem.* 244: 6049 – 6055.
- Mimeault, C., Woodhouse, A.J., Miao, X.-S., Metcalfe, C.D., Moon, T.W., Trudeau, V.L., 2005. The human lipid regulator, gemfibrozil, bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish *Carassius auratus*. *Aquat Toxicol* 73:44–54.
- Mohandas, J., Marshall, J.J., Duggins, G.G., Horvath, J.S., Tiller, D., 1984. Differential distribution of glutathione and glutathione related enzymes in rabbit kidney. Possible implications in analgesic neuropathy. *Cancer Res.* 44: 5086 – 5091.
- Navinier, M., Giraud, E., Le Bris, H., Armand, F., Mangion, C., Ganière, J.-P., 2006. Seasonal variability of intestinal microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), with a particular attention to *Aeromonas* spp. As candidate indicator of antimicrobial resistance. *Revue Méd.Vét.*,157 (12): 599-604.
- Nikolaus, A., MERIC, S., Fatta, D., 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 1225–1234.
- Novotný, L., Dvorská, L., Lorencová, A., Beran, V., Pavlík, I., 2004. Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. *Vet. Med. – Czech*, 49, 2004 (9): 343 – 358.
- Owen, S.F., Giltrow, E., Huggett, D.B., Hutchinson, T.H., Saye, J., Winter, M.J., Sumpter, J.P., 2007. Comparative physiology, pharmacology and toxicology of β -blockers: Mammals versus fish. *Aquat Toxicol* 82:145–162.
- Panter, G.H., Hutchinson, T.H., Hurd, K.S., Sherren, A., Stanley, R.D., Tyler, C.R., 2004. Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured end points of sexual development. *Aquat Toxicol* 70:11–21.
- Polzonetti-magni, A.M., Mosconi, G., Soverchia, L., Kikuyama, S. and Carnevali, O., 2004. Multihormonal control of vitellogenesis in lower vertebrates. *Int Rev Cytol* 239: 1-46.
- Qi, W., Müller, B., Pernet-Coudrier, B., Singer, H., Liu, H., Qu, J., Berg, M., 2014. Organic micropollutants in the Yangtze River: Seasonal occurrence and annual loads. *Sci Total Environ.* 472, 789-799.
- Ramirez, A.J., Brain, R.A., Usenko, S., Mottaleb, M.A., O'Donnell, J.G., Stahl, L.L., Wathen, J.B., Snyder, B.D., Pitt, J.L., Perez-Hurtado, P., Dobbins, L.L., Brooks, B.W., Chambliss, C.K., 2009. Occurrence of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Fish: Results of A National Pilot Study in the United States. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (12):2587-2597.

- Randák, T., Žlábek, V., Pulkrábová, J., Kolářová, J., Kroupová, H., Šíroká, Z., Velíšek, J., Svobodová, Z., Hajšlová, J., 2009. Effects of pollution on chub in the River Elbe, Czech Republic. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 737-746.
- Reid, S.G., Bernier, N.J., Perry, S.F., 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. C* 120: 1–27.
- Richardson, M.L., Bowron, J.M., 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol* 37:1–12.
- Runnalls, T.J., Hala, D.N., Sumpter, J.P., 2007. Preliminary studies into the effects of the human pharmaceutical clofibrilic acid on sperm parameters in adult fathead minnow. *Aquat Toxicol* 84:111–118.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360: 1–16.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R.D., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I. Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 68:141–150.
- Stacey, W.E., Goetz, F.W., 1982. Role of prostaglandins in fish reproduction. *Can J Fish Aquat Sci* 39:92–98.
- Stanley, J.K., Ramirez, A.J., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., 2007. Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine on a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere* 69:9–16.
- Steinbach, C., Burkina, V., Fedorova, G., Grabicová, K., Stará, A., Velíšek, J., Žlábek, V., Schmidt-Posthaus, H., Grabic, R., Kocour Kroupová, H., 2014. The sub-lethal effects and bioconcentration of the human pharmaceutical atenolol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.* 497-498: 209-218.
- SÚKL ČR 2009. Web: www.sukl.cz/download/spc/SPC100421.doc , navštíveno 12. 8. 2016 v 12:52.
- SÚKL ČR 2012. Web: www.sukl.cz/download/spc/SPC32579.pdf , navštíveno 12. 8. 2016 v 12:55.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health. Persp.* 103 (supl. 7), 173–178.
- Thibaut, R., Schnell, S., Porte, C., 2006. The interference of pharmaceuticals with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp liver: An in vitro study. *Environ Sci Technol* 40:5154–5160.
- Triebkorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.R., Schwaiger, J., 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II. Cytological effects in liver kidney gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 68:151–166.
- Trudeau, V.L., Metcalfe, C.D., Mimeault, C., Moon, T.W., 2005. Pharmaceuticals in the environment: Drugged fish? In: Mommsen TP, Moon TW, eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Vol. 6*. Amsterdam: Elsevier, 475–493.

- van der Oost, R., J. Beyer and P. E. Vermeulen (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assesment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(3): 57-149.
- Velicu, M., Suri, R., 2009. Presence of steroid hormones and antibiotics in surface waters of agricultural suburban and mixed use areas. *Environ Monitor Assess* 154:349-59.
- Villeneuve, D.L., Ankley, G.T., Makynen, E.A., Blake, L.S., Greene, K.J., Higley, E.B., Newsted, J.L., Giesy, J.P., Hecker, M., 2007. Comparison of fathead minnow ovary explant and H295R cell-based steroidogenesis assays for identifying endocrine-active chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf* 68:20–32.
- Winter, M.J., Caunter, J.E., Glennon, Y., Hutchinson, T.H., 2006. Atenolol: 28 day assessment of survival and growth in fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryo-larvae. AstraZeneca Brixham Environmental Laboratory, Report Number BL8269A.
- Yan, C., Yang, Y., Zhou, J., Liu, M., Nie, M., Shi, H., Gu, L., 2013. Antibiotics in surface water of the Yangtze Estuary: Occurrence, distribution and risk assessment. *Environ Pollut.* 175, 22-29.
- Yang, J.F., Ying, G.G., Zhao, J.L., Tao, R., Sua, H.C., Liu, Y.S., 2011. Spatial and seasonal distribution of selected antibiotics in surface waters of the Pearl Rivers, China. *J Environ Sci Health B* 46, 272-280.
- Zentiva, 2008. Oxazepam Léčiva, příbalový leták léku, Zentiva a. s. Praha.
- Zounková, R., Klimešová, Z., Nepejchalová, L., Hilscherová, K., Bláha, L., 2011. Complex evaluation of ecotoxicity and genotoxicity of antimicrobials oxytetracycline and flumequine used in aquaculture. *Environ Toxicol Chem.* 30 (5):1184-9.

8 Seznam příloh

8.1 Obrázky

Obrázek č. 1 ilustrační schéma přítomnosti kontaminantů ve vodě

Obrázek č. 2 detail mikrotitračních destiček ELISA testu

Obrázek č. 3 přítok do Čežárky 1

Obrázek č. 4 přítok do Čežárky 2

8.2 Tabulky

Tabulka č. 1 tělesné parametry jedinců ze skupiny nasazovaných ryb

Tabulka č. 2 tělesné parametry ryb ulovených po 30 dnech expozice

Tabulka č. 3 tělesné parametry ryb ulovených po 90 dnech expozice

Tabulka č. 4 tělesné parametry ryb ulovených po 180 dnech expozice

Tabulka č. 5 tělesné parametry ryb ulovených po 360 dnech expozice

Tabulka č. 7 hydrochemická analýza vzorků vody

Tabulka č. 8 emisní standardy dle NV 401/2015 Sb.

Tabulky 9a a 9b koncentrace farmak v období 30 dnů od začátku pokusu

Tabulky 10a a 10b koncentrace farmak v období 90 dnů od začátku pokusu

Tabulky 11a a 11b koncentrace farmak v období 180 dnů od začátku pokusu

Tabulky 12a a 12b koncentrace farmak v období 320 dnů od začátku pokusu

Tabulky 13a a 13b koncentrace farmak v období 360 dnů od začátku pokusu

8.3 Grafy

Graf č. 1 porovnání růstu kaprů z Čežárky s kontrolní skupinou

Graf č. 2 porovnání hmotností candátů z Čežárky s kontrolní skupinou

Graf č. 3 koncentrace TBARS v tkáních nasazovaných ryb

Graf č. 4 koncentrace TBARS v tkáních ryb po 30 dnech

Graf č. 5 koncentrace TBARS v tkáních ryb po 90 dnech

Graf č. 6 koncentrace TBARS v tkáních ryb po 180 dnech

Graf č. 7 koncentrace TBARS v tkáních ryb po 320 dnech

Graf č. 8 koncentrace TBARS v tkáních ryb po 360 dnech

Graf č. 9 antioxidační aktivita CAT v tkáních nasazovaných ryb

Graf č. 10 antioxidační aktivita CAT v tkáních ryb po 30 dnech

Graf č. 11 antioxidační aktivita CAT v tkáních ryb po 90 dnech

Graf č. 12 antioxidační aktivita CAT v tkáních ryb po 180 dnech

Graf č. 13 antioxidační aktivita CAT v tkáních ryb po 320 dnech

Graf č. 14 antioxidační aktivita CAT v tkáních ryb po 360 dnech

Graf č. 15 antioxidační aktivita GST v tkáních nasazovaných ryb

Graf č. 16 antioxidační aktivita GST v tkáních ryb po 30 dnech

Graf č. 17 antioxidační aktivita GST v tkáních ryb po 90 dnech

Graf č. 18 antioxidační aktivita GST v tkáních ryb po 180 dnech

Graf č. 19 antioxidační aktivita GST v tkáních ryb po 320 dnech

Graf č. 20 antioxidační aktivita GST v tkáních ryb po 360 dnech

Graf č. 21 antioxidační aktivita GR v tkáních nasazovaných ryb

Graf č. 22 antioxidační aktivita GR v tkáních ryb po 30 dnech

Graf č. 23 antioxidační aktivita GR v tkáních ryb po 90 dnech

Graf č. 24 antioxidační aktivita GR v tkáních ryb po 180 dnech

Graf č. 25 antioxidační aktivita GR v tkáních ryb po 320 dnech

Graf č. 26 antioxidační aktivita GR v tkáních ryb po 360 dnech

Graf č. 27 antioxidační aktivita GPx v tkáních nasazovaných ryb

Graf č. 28 antioxidační aktivita GPx v tkáních ryb po 30 dnech

Graf č. 29 antioxidační aktivita GPx v tkáních ryb po 90 dnech

Graf č. 30 antioxidační aktivita GPx v tkáních ryb po 180 dnech

Graf č. 31 antioxidační aktivita GPx v tkáních ryb po 320 dnech

Graf č. 32 antioxidační aktivita GPx v tkáních ryb po 360 dnech

Graf č. 33 antioxidační aktivita SOD v tkáních nasazovaných ryb

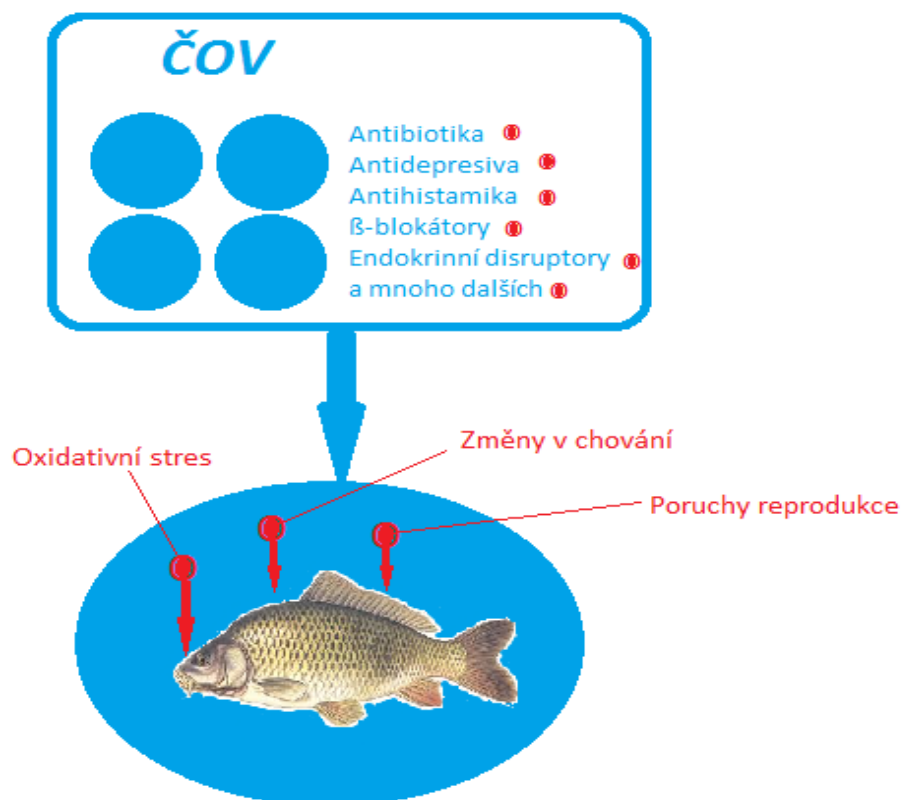
Graf č. 34 antioxidační aktivita SOD v tkáních ryb po 30 dnech

Graf č. 35 antioxidační aktivita SOD v tkáních ryb po 90 dnech

Graf č. 36 antioxidační aktivita SOD v tkáních ryb po 180 dnech

Graf č. 37 antioxidační aktivita SOD v tkáních ryb po 320 dnech

Graf č. 38 antioxidační aktivita SOD v tkáních ryb po 360 dnech



Obrázek č. 1. Ilustrační schéma



Obrázek č. 2. Detail mikrotitracních destiček se vzorky



Obrázek č. 3. Přítok 1



Obrázek č. 4. Přítok 2

	Popisné statistiky (Násada - Kontrola 0)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
TL (cm)	20	17,05	15,00	19,50	1,24
BL (cm)	20	13,60	12,00	15,50	0,93
m-celk (g)	20	65,80	46,60	100,40	15,12
m-bez vn. (g)	20	57,93	40,46	89,84	13,86
m-játra (g)	20	2,78	1,83	3,79	0,58
m-gonády (g)	20	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabulka 1. Tělesné parametry 20 jedinců vybraných ze skupiny nasazovaných ryb.
Datum nasazování 12. 4. 2015

	Popisné statistiky (Kontrolní rybník 30 dnů)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
TL (cm)	12	14,61	12,10	17,50	1,76
BL (cm)	12	11,89	9,60	14,00	1,39
m-celk (g)	12	61,92	28,06	98,58	20,09
m-bez vn. (g)	12	48,29	21,93	79,14	16,14
m-játra (g)	12	3,65	1,78	5,63	1,15
m-gonády (g)	12	0,08	0,00	0,23	0,08
	Popisné statistiky (Čežárka 30 dnů)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
TL (cm)	12	17,07	14,20	22,50	2,30
BL (cm)	12	14,53	11,50	18,70	1,84
m-celk (g)	12	113,03	67,75	255,15	50,33
m-bez vn. (g)	12	97,19	57,71	226,86	45,38
m-játra (g)	12	4,37	2,79	9,27	1,70
m-gonády (g)	12	0,22	0,00	0,51	0,16

Tabulka 2. Tělesné parametry ryb ulovených po 30 dnech expozice.
Datum odlovu 12. 5. 2015

	Popisné statistiky (Kontrolní rybník 90 dnů)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
TL (cm)	12	44,70	21,50	272,00	71,59
BL (cm)	12	18,69	2,00	22,50	5,39
m-celk (g)	12	311,92	216,50	425,30	53,73
m-bez vn. (g)	12	265,92	188,30	371,50	42,61
m-játra (g)	12	8,07	5,82	11,47	1,64
m-gonády (g)	12	0,40	0,18	1,42	0,35
	Popisné statistiky (Čežárka 90 dnů)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
TL (cm)	12	31,91	28,70	34,30	1,82
BL (cm)	12	26,63	23,90	29,00	1,46
m-celk (g)	12	817,34	609,70	1025,00	121,26
m-bez vn. (g)	12	711,53	542,00	908,70	106,97
m-játra (g)	12	33,43	23,64	61,81	10,85
m-gonády (g)	12	10,17	0,33	37,82	13,46

Tabulka 3. Tělesné parametry ryb ulovených po 90 dnech expozice.
Datum odlovu 20. 8. 2015

	Popisné statistiky (Kontrolní rybník 180 dnů)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
TL (cm)	12	32,58	30,50	36,00	1,38
BL (cm)	12	28,13	26,50	30,00	1,15
m-celk (g)	12	745,42	595,00	1170,00	153,61
m-bez vn. (g)	12	647,50	525,00	1015,00	129,50
m-játra (g)	12	20,54	15,09	31,58	4,43
m-gonády (g)	12	14,60	0,00	38,76	13,84
	Popisné statistiky (Čežárka 180 dnů)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
TL (cm)	12	43,17	40,50	46,00	1,76
BL (cm)	12	35,50	33,00	38,00	1,48
m-celk (g)	12	1755,83	1350,00	2095,00	246,37
m-bez vn. (g)	12	1479,58	1035,00	1700,00	224,79
m-játra (g)	12	38,40	23,32	55,91	10,47
m-gonády (g)	12	83,60	7,66	243,00	79,96

Tabulka 4. Tělesné parametry ryb ulovených po 180 dnech expozice.
Datum odlovu 8. 10. 2015

	Popisné statistiky (Kontrolní rybník 320 dnů)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
TL (cm)	12	33,14	29,20	36,50	2,17
BL (cm)	12	27,21	23,50	30,50	1,92
m-celk (g)	12	725,42	515,00	960,00	126,01
m-bez vn. (g)	12	639,42	450,00	825,00	119,90
m-játra (g)	12	28,96	13,53	41,28	6,73
m-gonády (g)	12	14,32	0,00	41,19	13,53
	Popisné statistiky (Čežárka 320 dnů)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
TL (cm)	12	44,46	40,00	49,10	3,10
BL (cm)	12	36,63	33,20	40,50	2,51
m-celk (g)	12	2033,75	1555,00	2495,00	333,87
m-bez vn. (g)	12	1717,92	1310,00	2135,00	265,94
m-játra (g)	12	89,86	65,03	150,96	22,52
m-gonády (g)	12	89,33	13,24	239,55	73,85

Tabulka 5. Tělesné parametry ryb ulovených po 320 dnech expozice.
Datum odlovu 11. 3. 2016

	Popisné statistiky (Kontrolní rybník 360 dnů)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
TL (cm)	12	329,67	298,00	364,00	20,13
BL (cm)	12	268,50	225,00	297,00	19,93
m-celk (g)	12	695,00	500,00	875,00	121,26
m-bez vn. (g)	12	598,75	435,00	770,00	105,92
m-játra (g)	12	28,86	14,06	41,97	7,51
m-gonády (g)	12	11,37	0,00	27,01	10,04
	Popisné statistiky (Čežárka 360 dnů)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
TL (cm)	12	329,67	298,00	364,00	20,13
BL (cm)	12	268,50	225,00	297,00	19,93
m-celk (g)	12	695,00	500,00	875,00	121,26
m-bez vn. (g)	12	598,75	435,00	770,00	105,92
m-játra (g)	12	28,86	14,06	41,97	7,51
m-gonády (g)	12	11,37	0,00	27,01	10,04

Tabulka 6. Tělesné parametry ryb ulovených po 360 dnech expozice.
Datum odlovu 18. 4. 2016

Lokalita	Kontrola	V1 Příklad	V2 Střed	V3 Odtok	Dřemliny
pH	8,05	7,71	8,65	8,75	8,61
± SD	0,75	0,80	0,89	0,70	0,64
NH ₄ ⁺ -N [mg · l ⁻¹]	0,30	3,16	2,39	2,60	0,75
± SD	0,19	1,43	3,01	3,73	0,73
NO ₃ ⁻ -N [mg · l ⁻¹]	2,06	7,03	5,90	4,98	1,36
± SD	1,87	1,92	1,16	1,84	2,40
NO ₂ ⁻ -N [mg · l ⁻¹]	0,05	0,20	0,18	0,17	0,06
± SD	0,06	0,05	0,03	0,03	0,06
N (celk.) [mg · l ⁻¹]	5,15	13,47	12,30	11,62	6,15
± SD	3,35	1,86	1,60	2,94	3,09
PO ₄ ³⁻ -P [mg · l ⁻¹]	0,05	0,13	0,12	0,14	0,07
± SD	0,02	0,13	0,14	0,14	0,04
P _{celk} [mg · l ⁻¹]	0,17	0,34	0,30	0,32	0,42
± SD	0,08	0,07	0,08	0,07	0,23
CHSK _{Mn} [mg · l ⁻¹]	9,82	13,22	13,23	13,57	19,10
± SD	2,40	2,00	2,64	2,72	5,36
CHSK _{Cr} [mg · l ⁻¹]	22,10	30,40	34,48	34,25	49,87
± SD	5,78	9,58	11,47	12,10	14,49
BSK ₅ [mg · l ⁻¹]	7,93	16,08	14,12	13,63	16,95
± SD	4,74	4,97	7,39	5,43	3,55
NL [mg · l ⁻¹]	39,22	20,20	23,78	22,80	61,57
± SD	34,02	9,11	12,00	12,50	25,56

Tabulka 7. Hydrochemické parametry vody v jednotlivých lokalitách. Hodnoty jsou uvedeny ve formě průměr ± směrodatná odchylka. U hodnot pH v lokalitě Dřemliny nN=5, u ostatních hodnot pH: N=4. U výsledků všech ostatních hodnot ve všech lokalitách: N=6.

Kategorie ČOV (EO) ¹⁾⁷⁾ nebo velikost aglomerace	CHSK _{Cr}		BSK ₅		NL		N-NH ₄ ⁺ *		N _{celk} ^{2),8)} *		P _{celk}	
	p ³⁾	m ⁴⁾	p ³⁾	m ⁴⁾	p ³⁾	m ⁴⁾	průměr ⁵⁾ _l	m ⁴⁾ ₆₎	průměr ⁵⁾ _l	m ⁴⁾ ₆₎	průměr ⁵⁾ _l	m ⁴⁾
<500	150	220	40	80	50	80	-	-	-	-	-	-
500 – 2000	125	180	30	60	40	70	20	40	-	-	-	-
2001 -10000	120	170	25	50	30	60	15	30	-	-	3	8
10001 -100000	90	130	20	40	25	50	-	-	15	30	2	6
> 100000	75	125	15	30	20	40	-	-	10	20	1	3

Tabulka 8. Emisní standardy: přípustné hodnoty (p)³⁾, maximální hodnoty (m)⁴⁾ a hodnoty průměru⁵⁾ koncentrace ukazatelů znečištění vypouštěných odpadních vod v mg/l

* Neexistence konkrétního emisního standardu nevyklučuje možnost stanovení emisního limitu pro daný ukazatel při postupu podle § 5 odst. 2 a 3.

1) Rozumí se kategorie čistírny odpadních vod vyjádřená v počtu ekvivalentních obyvatel. Ekvivalentní obyvatel (EO) je definovaný produkcí znečištění 60 g BSK5 za den. Počet ekvivalentních obyvatel se pro účel zařazení čistírny odpadních vod do velikostní kategorie vypočítává z maximálního průměrného týdenního zatížení na přítoku do čistírny odpadních vod během roku s výjimkou neobvyklých situací, přívalových dešťů a povodní. Pro určení velikosti aglomerace se použije stejný postup pro všechny odpadní vody odváděné kanalizací pro veřejnou potřebu. Pro účely stanovení limitů se použije vyšší z obou hodnot.

U kategorií COV pod 2000 EO lze použít pro účel zařazení čistírny do velikostní kategorie (v tabulce 1a nebo 1b v příloze č. 1 a v tabulce 1 v příloze č. 4 k tomuto nařízení) výpočet z bilance v ukazateli BSK5 v kg za kalendářní rok na přítoku do čistírny vydělený koeficientem 18,7. U nových ČOV se pro zařazení do velikostní kategorie v prvním roce po výstavbě (zkušební provoz) použije návrhový parametr v zatížení BSK5. Po prvotním provedení kategorizace je v případě změny zatížení další kategorizace prováděna až s ukončením platnosti povolení k vypouštění odpadních vod.

2) Celkový dusík je ukazatel, který zahrnuje všechny formy dusíku.

3) Uváděné přípustné koncentrace „p“ nejsou aritmetické průměry za kalendářní rok a mohou být překročeny v povolené míře podle hodnot uvedených v příloze č. 5 k tomuto nařízení. Vodoprávní úřad stanoví typ vzorku A nebo B nebo C podle poznámky 3) k tabulce 1 v příloze č. 4 k tomuto nařízení.

4) Uváděné maximální koncentrace „m“ jsou nepřekročitelné. Vodoprávní úřad stanoví typ vzorku uvedený v tabulce 1 přílohy č. 4 k tomuto nařízení v souladu se stanovením hodnoty „p“.

5) Uváděné hodnoty jsou aritmetické průměry koncentrací za kalendářní rok a nesmí být překročeny. Počet vzorků odpovídá ročnímu počtu vzorků stanovenému vodoprávním úřadem. Vodoprávní úřad stanoví typ vzorku A nebo B nebo C podle poznámky 3) k tabulce 1 v příloze č. 4 k tomuto nařízení.

6) Hodnota platí pro období, ve kterém je teplota odpadní vody na odtoku z biologického stupně vyšší než 12°C. Teplota odpadní vody se pro tento účel považuje za vyšší než 12°C, pokud z pěti měření provedených v průběhu dne byla tři měření vyšší než 12°C. V případě odběru vzorku A nebo prostého vzorku se stanovení teploty provedou v době odběru vzorku.

7) Rozbory odtoků z biologických dočišťovacích nádrží zkolaudovaných do 3. 3. 2011 se provádějí ve filtrovaných vzorcích, koncentrace celkových nerozpuštěných látek však nesmí přesáhnout hodnotu 100 mg/l.

8) Požadavky na dusík je možno kontrolovat pomocí denních průměrů, jestliže se prokáže, že je takto zajištěna stejná úroveň ochrany vod. V tomto případě denní průměr nesmí přesáhnout 20 mg/l celkového dusíku pro všechny vzorky, jestliže teplota na odtoku biologického stupně čistírny odpadních vod je vyšší nebo rovná 12°C. Zohlednění požadavků na funkci biologického odstranění dusíku a plnění limitů při teplotách na odtoku nižších než 12°C může být nahrazeno zohledněním pro časově určené zimní období podle oblastních klimatických podmínek, které stanoví vodoprávní úřad u tohoto ukazatele znečištění (NV 401/2015 Sb.)

Lokalita	V1-PŘÍTOK	V2-STŘED	V3-ODTOK	DŘEMLINY	KONTROLA
Datum odběru	12.5.2015	12.5.2015	12.5.2015	12.5.2015	12.5.2015
Doba expozice [dny]	30	30	30	30	30
Amitriptylin	1,1	0,84	0,54	<0.066	<0.045
Atenolol	210	200	130	<0.23	0,84
Atorvastatin	3,5	3,4	1,6	<0.37	<0.18
Azithromycin	6,9	1,9	1,5	<0.11	<0.066
Bezafibrát	61	85	53	1,3	<0.15
Bisoprolol	130	130	91	0,32	0,23
Kofein	170	200	140	80	100
Karbamazepin	830	990	670	170	14
Cetirizin	270	350	220	20	2,2
Cilazapril	<0.31	0,34	<0.28	<0.25	<0.12
Citalopram	69	55	28	<0.25	0,24
Klarithromycin	110	84	60	2,2	8,6
Klindamycin sulfoxid	79	90	59	4,9	2,2
Klindamycin	68	83	56	11	1,5
Klomipramin	<0.5	<0.49	<0.46	<0.4	<0.2
Kodein	27	30	20	<0.32	0,29
Diclofenak	1200	1200	670	7,3	7,3
Dihydro KBZ	4,9	5,2	3,9	1,4	<0.53
Diltiazem	2,1	1,7	0,9	<0.43	<0.21
Diphenhydramin	0,44	<0.13	<0.12	<0.11	<0.053
Disopyramid	<0.17	<0.17	<0.16	<0.077	<0.047
Donepezil	<0.048	0,32	<0.046	<0.022	<0.013
Epoxy KBZ	67	79	51	20	1,5
Erythromycin	21	19	14	0,51	0,51
Fexofenadin	210	290	190	11	0,66
Glimepirid	0,94	1,8	1,9	0,96	<0.11
Iopromide	<4	7	<3.7	22	36
Irbesartan	4000	4300	2700	150	22
Loperamid	0,23	0,28	0,12	<0.093	<0.046
Memantin	26	33	17	1,5	0,27
Metamfetamin	93	130	72	2,9	1

Tabulka č. 9a. Koncentrace farmak [ng . POCIS⁻¹] naměřené v jednotlivých lokalitách. Doba expozice ryb: 30 dnů. Doba expozice vzorkovačů POCIS: 10 dnů. Hodnoty uvedené ve tvaru <R znamenají, že koncentrace byla pod limitem stanovitelnosti (LOQ), kde R=LOQ.

Lokalita	V1-PŘÍTOK	V2-STŘED	V3-ODTOK	DŘEMLINY	KONTROLA
Datum odběru	12.5.2015	12.5.2015	12.5.2015	12.5.2015	12.5.2015
Doba expozice [dny]	30	30	30	30	30
Metoprolol	480	510	350	3	2,6
Metoprololová kys.	380	520	340	27	18
Mianserin	<0.86	<0.85	<0.79	<0.69	<0.34
Miconazol	<0.03	<0.029	<0.027	<0.024	<0.012
Mirtazapin	11	8,1	5	<0.38	<0.23
N4 Acetylsufamethoxazol	19	18	12	15	6
N-Des methylcitalopram	34	36	20	<0.77	<0.38
Norsertaline	<0.2	<0.2	<0.18	0,67	<0.079
O-Des methylvenlafaxin	500	500	280	16	9,7
Orphenadrin	0,41	0,79	0,41	<0.1	<0.049
Oseltamivir carboxylát	2,6	<0.97	1,7	<0.73	<0.43
Oxazepam	58	65	43	4,9	0,74
Oxkarbazepin	31	27	15	0,98	<0.12
Propranolol	0,27	0,32	0,16	<0.098	<0.059
Ropinirol	0,64	0,64	<0.32	<0.21	<0.13
Rosuvastatin	17	8,5	2,2	<0.27	<0.13
Roxithromycin	1,5	0,85	0,58	<0.065	<0.039
Sertralin	5,2	7,7	2,6	<0.64	<0.32
Sotalol	55	60	38	<0.48	1,4
Sulfamerazine	<0.5	<0.48	<0.46	<0.36	<0.21
Sulfamethazin	16	20	13	2	0,52
Sulfamethoxazol	300	360	250	110	5,4
Sulfapyridin	120	140	87	3,7	2
Telmisartan	2000	2400	1800	300	34
Terbinafin	<0.14	<0.14	<0.13	<0.11	<0.056
Tramadol	1000	1100	670	36	11
trans-Dihydro-Dihydroxy KBZ	880	1000	640	270	18
Trimethoprim	230	270	170	3,2	1,9
Valsartan	760	840	510	25	14
Venlafaxin	240	220	130	1,4	2,8
Verapamil	3,8	2,9	1,1	<0.44	<0.22

Tabulka č. 9b. Koncentrace farmak [ng . POCIS⁻¹] naměřené v jednotlivých lokalitách. Doba expozice ryb: 30 dnů. Doba expozice vzorkovačů POCIS: 10 dnů. Hodnoty uvedené ve tvaru <R znamenají, že koncentrace byla pod limitem stanovitelnosti (LOQ), kde R=LOQ.

Lokalita	V1-PŘÍTOK	V2-STŘED	V3-ODTOK	DŘEMLINY	KONTROLA
Datum odběru	20.8.2015	20.8.2015	20.8.2015	20.8.2015	20.8.2015
Doba expozice [dny]	90	90	90	90	90
Amitriptylin	0,96	0,1	<0.061	<0.06	0,25
Atenolol	100	14	2,5	<0.2	0,64
Atorvastatin	<0.34	<0.23	<0.27	<0.3	<0.23
Azithromycin	19	<0.082	<0.097	<0.093	<0.088
Bezafibrát	<0.27	<0.19	<0.22	<0.24	<0.19
Bisoprolol	44	7,9	4,4	0,27	0,41
Kofein	65	44	70	15	75
Karbamazepin	720	430	450	75	41
Cetirizin	240	66	67	4,1	5,6
Cilazapril	<0.22	<0.15	<0.18	<0.2	<0.15
Citalopram	110	6,6	3,7	0,24	0,28
Klarithromycin	47	5,2	1,4	0,7	4,1
Klindamycin sulfoxid	330	110	64	0,44	2,6
Klindamycin	110	46	45	3,5	2,1
Klomipramin	0,41	<0.25	<0.29	<0.32	<0.25
Kodein	19	3,9	1,3	<0.28	0,44
Diclofenak	1800	310	110	<1.4	8,4
Dihydro KBZ	3,9	2,4	2,4	<0.86	<0.68
Diltiazem	2,1	<0.27	<0.31	<0.34	<0.27
Diphenhydramin	2,2	<0.067	<0.078	<0.086	<0.067
Disopyramid	<0.094	<0.068	<0.074	<0.063	<0.066
Donepezil	0,17	<0.019	0,059	<0.018	0,045
Epoxy KBZ	65	41	46	2,9	4,2
Erythromycin	11	2,8	1	<0.094	<0.089
Fexofenadin	150	48	36	1,5	1,5
Glimepirid	0,93	<0.14	<0.17	<0.18	<0.14
Iopromide	260	85	57	2,7	16
Irbesartan	4500	960	300	7,6	55
Loperamid	0,26	<0.058	<0.068	<0.074	<0.058
Memantin	9,7	<0.13	<0.14	<0.12	0,61
Metamfetamin	17	5,7	7,5	10	1

Tabulka č. 10a. Koncentrace farmak [ng . POCIS⁻¹] naměřené v jednotlivých lokalitách. Doba expozice ryb: 90 dnů. Doba expozice vzorkovačů POCIS: 10 dnů. Hodnoty uvedené ve tvaru <R znamenají, že koncentrace byla pod limitem stanovitelnosti (LOQ), kde R=LOQ.

Lokalita	V1-PŘÍTOK	V2-STŘED	V3-ODTOK	DŘEMLINY	KONTROLA
Datum odběru	20.8.2015	20.8.2015	20.8.2015	20.8.2015	20.8.2015
Doba expozice [dny]	90	90	90	90	90
Metoprolol	340	64	32	3,3	6,4
Metoprololová kys.	300	68	120	5,7	25
Mianserin	<0.63	<0.43	<0.5	<0.55	<0.43
Miconazol	<0.022	<0.015	<0.017	<0.019	<0.015
Mirtazapin	25	3,7	2,4	<0.31	<0.32
N4 Acetylsufamethoxazol	5,9	2,1	2,1	<1	3,2
N-Des methylcitalopram	29	3,4	2	<0.62	<0.48
Norsertaline	<0.15	<0.1	<0.12	<0.13	<0.1
O-Des methylvenlafaxin	520	91	55	5,7	26
Orphenadrin	0,8	<0.062	<0.073	1,6	<0.063
Oseltamivir carboxylát	<0.74	<0.54	0,9	<0.89	<0.57
Oxazepam	60	26	17	<0.056	3,2
Oxkarbazepin	46	7,1	<0.17	<0.19	1,1
Propranolol	0,49	<0.077	<0.091	<0.084	<0.078
Ropinirol	0,9	<0.17	<0.2	<0.18	<0.17
Rosuvastatin	4,3	<0.17	<0.2	<0.21	<0.17
Roxithromycin	0,58	0,27	<0.057	<0.054	<0.051
Sertralin	23	<0.4	<0.47	<0.52	<0.4
Sotalol	58	13	8,8	2,5	4,1
Sulfamerazine	<0.37	<0.27	<0.34	0,86	<0.28
Sulfamethazin	2,5	1,7	3,4	0,26	0,6
Sulfamethoxazol	100	41	51	3,6	8
Sulfapyridin	61	22	22	<0.33	5,7
Telmisartan	2900	1400	1200	110	97
Terbinafin	<0.1	<0.071	<0.083	<0.091	<0.071
Tramadol	750	130	88	15	45
trans-Dihydro-Dixydroxy KBZ	830	460	490	97	40
Trimethoprim	46	17	18	<0.84	1,2
Valsartan	42	36	40	3,5	8,2
Venlafaxin	390	44	19	0,21	6,3
Verapamil	5,9	<0.27	<0.32	<0.35	<0.28

Tabulka č. 10b. Koncentrace farmak [ng . POCIS⁻¹] naměřené v jednotlivých lokalitách. Doba expozice ryb: 90 dnů. Doba expozice vzorkovačů POCIS: 10 dnů. Hodnoty uvedené ve tvaru <R znamenají, že koncentrace byla pod limitem stanovitelnosti (LOQ), kde R=LOQ.

Lokalita	V1-PŘÍTOK	V2-STŘED	V3-ODTOK	DŘEMLINY	KONTROLA
Datum odběru	8.10.2015	8.10.2015	8.10.2015	8.10.2015	8.10.2015
Doba expozice [dny]	180	180	180	180	180
Amitryptilin	0,33	<0.05	<0.052	<0.053	<0.047
Atenolol	36	30	19	<0.19	0,73
Atorvastatin	0,66	0,33	<0.21	<0.3	<0.17
Azithromycin	1,5	0,51	<0.098	<0.084	<0.069
Bezafibrát	1,2	1,3	1,2	<0.24	<0.14
Bisoprolol	24	11	8,4	0,12	0,55
Kofein	18	15	15	27	49
Karbamazepin	240	240	240	87	39
Cetirizin	41	35	26	5	3,8
Cilazapril	<0.16	<0.14	<0.14	<0.2	<0.11
Citalopram	17	4,1	1,9	0,47	0,46
Klarithromycin	18	7,9	3,1	0,69	6,8
Klindamycin sulfoxid	31	26	20	0,43	5,9
Klindamycin	29	26	27	4,4	3,1
Klomipramin	<0.26	<0.24	<0.23	<0.32	<0.19
Kodein	7,1	5,1	3,5	<0.26	0,46
Diclofenak	380	280	140	<1.4	14
Dihydro KBZ	1,3	1,4	1,4	<0.87	<0.5
Diltiazem	<0.28	<0.25	<0.25	<0.34	<0.2
Diphenhydramin	<0.07	<0.063	<0.062	<0.086	<0.05
Disopyramid	<0.079	<0.068	<0.068	0,49	<0.051
Donepezil	0,058	<0.019	<0.019	<0.016	<0.014
Epoxy KBZ	24	25	26	5,7	3,5
Erythromycin	2,6	1,5	0,99	<0.086	0,49
Fexofenadin	25	26	18	2,5	1,7
Glimepirid	<0.15	<0.13	<0.13	<0.18	<0.11
Iopromide	<3.1	<2.7	<2.9	<2.5	38
Irbesartan	1100	980	660	50	53
Loperamid	<0.061	<0.054	<0.053	<0.074	<0.043
Memantin	3,4	2,3	1,7	1,1	0,38
Metamfetamin	7,3	4	5,3	<0.95	<0.67

Tabulka č. 11a. Koncentrace farmak [ng . POCIS⁻¹] naměřené v jednotlivých lokalitách. Doba expozice ryb: 180 dnů. Doba expozice vzorkovačů POCIS: 10 dnů. Hodnoty uvedené ve tvaru <R znamenají, že koncentrace byla pod limitem stanovitelnosti (LOQ), kde R=LOQ.

Lokalita	V1-PŘÍTOK	V2-STŘED	V3-ODTOK	DŘEMLINY	KONTROLA
Datum odběru	8.10.2015	8.10.2015	8.10.2015	8.10.2015	8.10.2015
Doba expozice [dny]	180	180	180	180	180
Metoprolol	180	93	67	2,2	10
Metoprololová kys.	140	150	110	25	21
Mianserin	<0.45	3,2	1,7	<0.56	3
Miconazol	<0.016	<0.014	<0.014	<0.019	<0.011
Mirtazapin	4	2,4	1,6	<0.27	<0.25
N4 Acetylsufamethoxazol	2,8	3,7	2	5,4	5,3
N-Des methylcitalopram	7,4	2,4	1,3	<0.62	<0.36
Norsertaline	<0.1	<0.094	<0.092	<0.13	<0.075
O-Des methylvenlafaxin	260	180	130	8,3	33
Orphenadrin	<0.065	<0.059	<0.057	2	<0.047
Oseltamivir carboxylát	<0.73	<0.64	<0.7	<0.57	<0.46
Oxazepam	23	24	20	2,1	2,2
Oxkarbazepin	11	<0.14	<0.14	0,94	0,93
Propranolol	0,33	0,17	0,11	<0.077	<0.061
Ropinirol	<0.22	<0.19	<0.19	<0.17	<0.13
Rosuvastatin	1,1	<0.16	<0.15	<0.21	<0.12
Roxithromycin	<0.062	<0.053	<0.058	<0.049	<0.04
Sertralin	2,7	<0.38	<0.37	<0.52	<0.3
Sotalol	23	20	16	<0.39	4,4
Sulfamerazine	<0.36	<0.32	<0.35	<0.28	<0.23
Sulfamethazin	1,3	1,7	1,5	0,25	1,2
Sulfamethoxazol	130	130	84	12	27
Sulfapyridin	27	26	22	0,64	6,3
Telmisartan	730	690	450	110	85
Terbinafin	<0.074	<0.067	<0.065	<0.091	<0.053
Tramadol	320	230	170	14	44
trans-Dihydro-Dixydroxy KBZ	270	300	270	160	33
Trimethoprim	34	28	20	<0.54	2,6
Valsartan	29	22	14	3,4	3,4
Venlafaxin	65	29	18	0,1	8,9
Verapamil	<0.29	<0.26	<0.25	<0.35	<0.21

Tabulka č. 11b. Koncentrace farmak [ng . POCIS⁻¹] naměřené v jednotlivých lokalitách. Doba expozice ryb: 180 dnů. Doba expozice vzorkovačů POCIS: 10 dnů. Hodnoty uvedené ve tvaru <R znamenají, že koncentrace byla pod limitem stanovitelnosti (LOQ), kde R=LOQ.

Lokalita	V1-PŘÍTOK	V2-STŘED	V3-ODTOK	DŘEMLINY	KONTROLA
Datum odběru	11.3.2016	11.3.2016	11.3.2016	11.3.2016	11.3.2016
Doba expozice [dny]	320	320	320	320	320
Amitryptilin	0,11	<0.069	<0.077	<0.058	<0.049
Atenolol	180	210	190	5,9	2,7
Atorvastatin	18	13	11	0,32	0,32
Azithromycin	0,5	0,51	0,5	<0.09	<0.067
Bezafibrát	27	21	24	4,9	<0.15
Bisoprolol	19	18	14	0,14	1,1
Kofein	250	180	170	400	130
Karbamazepin	350	360	360	160	18
Cetirizin	81	68	95	27	2,5
Cilazapril	0,24	<0.19	0,24	<0.18	<0.13
Citalopram	13	12	10	1,2	1,4
Klarithromycin	64	67	67	2,1	14
Klindamycin sulfoxid	98	97	110	25	2,2
Klindamycin	63	63	71	14	1,9
Klomipramin	<0.31	<0.32	<0.36	<0.3	<0.21
Kodein	25	26	29	1,9	0,85
Diclofenak	1300	920	1100	51	14
Dihydro KBZ	2	2	1,9	0,97	<0.55
Diltiazem	0,61	0,62	0,43	<0.32	<0.22
Diphenhydramin	<0.084	<0.085	<0.097	<0.079	<0.055
Disopyramid	<0.085	<0.083	<0.1	<0.067	<0.05
Donepezil	<0.024	<0.024	<0.028	0,077	<0.014
Epoxy KBZ	37	36	37	20	2,2
Erythromycin	13	12	11	0,51	0,51
Fexofenadin	46	43	50	19	0,87
Glimepirid	<0.18	<0.18	0,95	<0.17	<0.12
Iopromide	41	45	69	45	110
Irbesartan	1900	1700	1800	550	37
Loperamid	0,089	0,12	<0.083	<0.068	<0.048
Memantin	3,2	2,5	2,8	0,52	0,52
Metamfetamin	16	14	14	<1	3,2

Tabulka č. 12a. Koncentrace farmak [ng . POCIS⁻¹] naměřené v jednotlivých lokalitách. Doba expozice ryb: 320 dnů. Doba expozice vzorkovačů POCIS: 10 dnů. Hodnoty uvedené ve tvaru <R znamenají, že koncentrace byla pod limitem stanovitelnosti (LOQ), kde R=LOQ.

Lokalita	V1-PŘÍTOK	V2-STŘED	V3-ODTOK	DŘEMLINY	KONTROLA
Datum odběru	11.3.2016	11.3.2016	11.3.2016	11.3.2016	11.3.2016
Doba expozice [dny]	320	320	320	320	320
Metoprolol	120	110	94	1	10
Metoprololová kys.	610	400	540	160	43
Mianserin	<0.54	<0.55	<0.62	<0.51	<0.36
Miconazol	<0.019	<0.019	<0.021	<0.018	<0.012
Mirtazapin	5,4	5,8	5,1	<0.33	<0.25
N4 Acetylsufamethoxazol	33	30	37	28	9,4
N-Des methylcitalopram	8,4	7,1	8,1	<0.57	<0.4
Norsertaline	<0.13	<0.13	<0.14	<0.12	<0.082
O-Des methylvenlafaxin	410	360	410	17	21
Orphenadrin	<0.078	<0.079	<0.09	<0.074	<0.051
Oseltamivir carboxylát	<0.72	<0.78	<0.93	<0.66	<0.46
Oxazepam	31	30	35	8,1	0,9
Oxkarbazepin	13	9,9	11	<0.17	0,96
Propranolol	0,56	0,68	0,56	<0.082	<0.061
Ropinirol	<0.21	<0.22	<0.26	0,18	0,15
Rosuvastatin	15	6,7	7,8	<0.2	1,1
Roxithromycin	<0.058	<0.063	<0.076	<0.053	<0.039
Sertralin	<0.5	<0.51	<0.58	<0.47	<0.33
Sotalol	<0.49	1,9	<0.64	<0.42	3,6
Sulfamerazine	<0.36	<0.39	<0.46	<0.32	<0.23
Sulfamethazin	2,3	2	2,1	2,7	0,52
Sulfamethoxazol	340	270	360	73	13
Sulfapyridin	40	38	39	11	3,6
Telmisartan	910	1000	920	330	56
Terbinafin	<0.089	<0.089	<0.1	<0.084	<0.058
Tramadol	280	280	300	23	24
trans-Dihydro-Dixydroxy KBZ	510	490	520	300	23
Trimethoprim	280	330	290	39	4,6
Valsartan	480	360	390	270	25
Venlafaxin	50	43	48	0,85	6,4
Verapamil	0,37	0,45	0,45	<0.33	<0.23

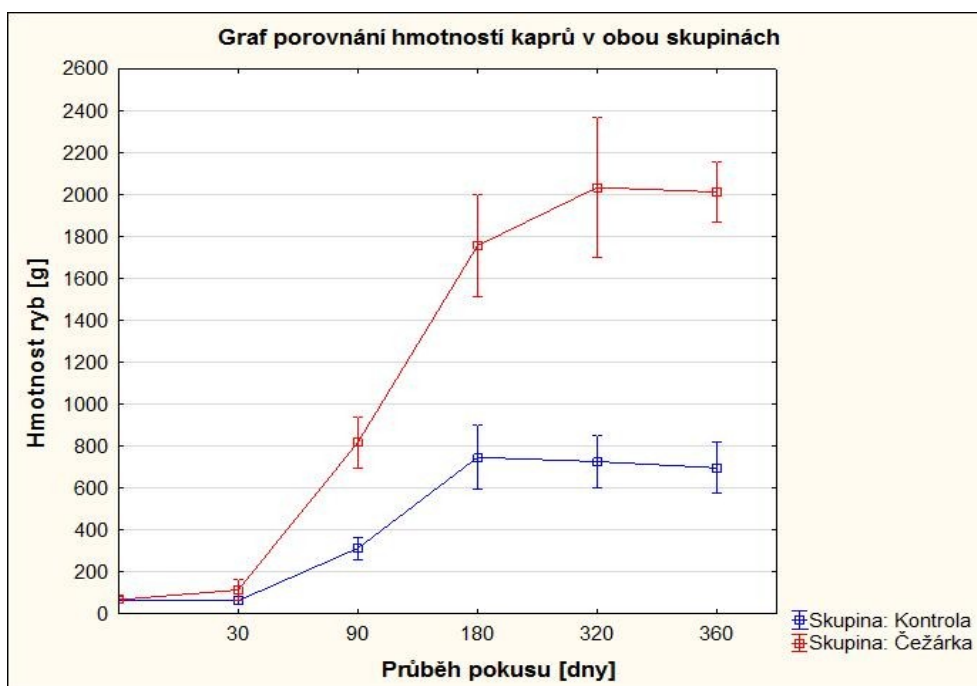
Tabulka č. 12b. Koncentrace farmak [ng . POCIS⁻¹] naměřené v jednotlivých lokalitách. Doba expozice ryb: 320 dnů. Doba expozice vzorkovačů POCIS: 10 dnů. Hodnoty uvedené ve tvaru <R znamenají, že koncentrace byla pod limitem stanovitelnosti (LOQ), kde R=LOQ.

Lokalita	V1-PŘÍTOK	V2-STŘED	V3-ODTOK	DŘEMLINY	KONTROLA
Datum odběru	18.4.2016	18.4.2016	18.4.2016	18.4.2016	19.4.2016
Doba expozice [dny]	360	360	360	360	360
Amitryptilin	0,14	0,14	<0.08	<0.067	<0.057
Atenolol	160	83	85	0,97	21
Atorvastatin	3,3	2	2,1	<0.35	<0.25
Azithromycin	2,5	0,62	0,66	<0.1	<0.076
Bezafibrát	3,1	1,5	1,6	2,7	4,3
Bisoprolol	13	5,2	6,2	<0.098	1,5
Kofein	150	96	120	180	220
Karbamazepin	590	360	390	180	38
Cetirizin	130	65	85	18	5,5
Cilazapril	<0.25	<0.2	<0.2	<0.23	<0.17
Citalopram	17	6,2	5,7	1,6	0,83
Klarithromycin	80	40	36	0,77	19
Klindamycin sulfoxid	68	42	45	9,6	3,1
Klindamycin	87	52	58	12	2,4
Klomipramin	<0.41	<0.33	<0.33	<0.37	<0.28
Kodein	30	17	19	0,62	1,1
Diclofenak	680	360	420	16	42
Dihydro KBZ	3,3	2	2	<1	<0.74
Diltiazem	<0.44	<0.35	<0.35	<0.4	<0.29
Diphenhydramin	<0.11	<0.088	<0.088	<0.1	<0.074
Disopyramid	0,25	0,14	0,72	<0.071	0,97
Donepezil	<0.034	<0.026	<0.027	<0.02	<0.017
Epoxy KBZ	61	35	37	22	3,4
Erythromycin	10	5,7	6	<0.11	1,2
Fexofenadin	49	28	35	7,8	1,8
Glimepirid	<0.24	<0.19	<0.19	<0.21	<0.16
Iopromide	88	36	60	26	98
Irbesartan	2000	1100	1300	240	59
Loperamid	0,15	<0.076	0,077	<0.086	<0.063
Memantin	1	0,97	1	0,43	0,45
Metamfetamin	5,6	6,6	6,3	<0.99	1,7

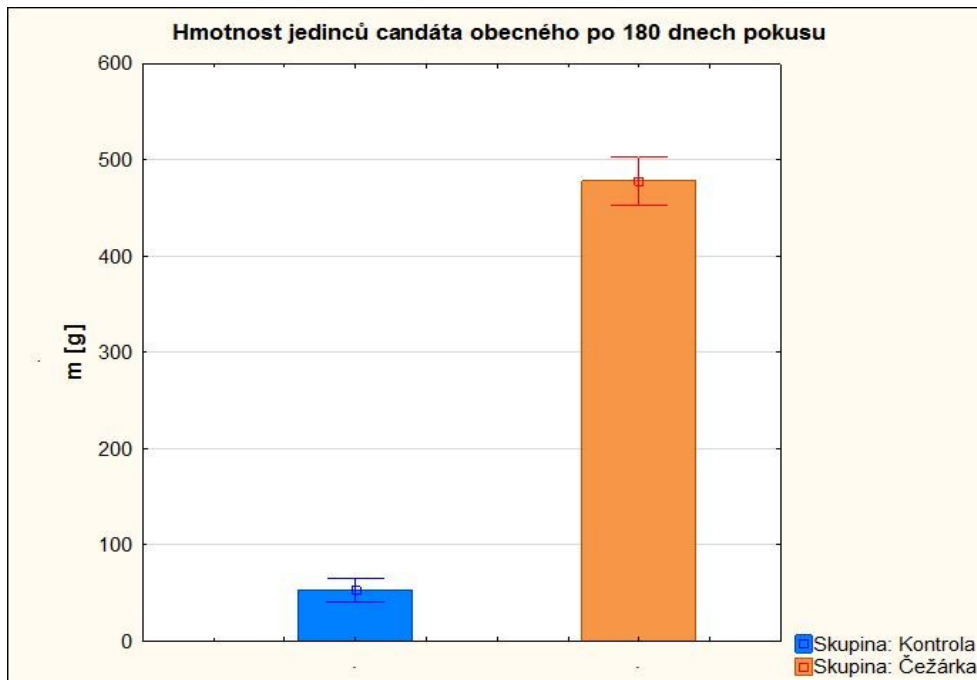
Tabulka č. 13a. Koncentrace farmak [ng . POCIS⁻¹] naměřené v jednotlivých lokalitách. Doba expozice ryb: 360 dnů. Doba expozice vzorkovačů POCIS: 10 dnů. Hodnoty uvedené ve tvaru <R znamenají, že koncentrace byla pod limitem stanovitelnosti (LOQ), kde R=LOQ.

Lokalita	V1-PŘÍTOK	V2-STŘED	V3-ODTOK	DŘEMLINY	KONTROLA
Datum odběru	18.4.2016	18.4.2016	18.4.2016	18.4.2016	19.4.2016
Doba expozice [dny]	360	360	360	360	360
Metoprolol	73	37	48	1,6	17
Metoprololová kys.	380	220	280	51	35
Mianserin	<0.71	2,8	0,59	<0.64	4,7
Miconazol	0,12	<0.02	<0.019	<0.022	0,11
Mirtazapin	8,1	4,5	4,8	<0.35	<0.29
N4 Acetylsufamethoxazol	24	17	16	34	12
N-Desmethylcitalopram	9,7	4,5	4,4	<0.72	<0.53
Norsertaline	<0.17	<0.13	<0.13	<0.15	<0.11
O-Desmethylvenlafaxin	330	250	260	11	34
Orphenadrin	<0.1	<0.082	<0.082	<0.093	<0.068
Oseltamivir carboxylát	<0.99	<0.85	<0.85	<0.68	<0.53
Oxazepam	61	34	39	6,8	3,1
Oxkarbazepin	11	6	6,4	1	1,1
Propranolol	0,42	0,27	0,29	<0.093	<0.073
Ropinirol	<0.29	<0.24	<0.25	<0.2	<0.16
Rosuvastatin	5,6	1,4	1,4	<0.25	<0.18
Roxithromycin	<0.082	<0.074	<0.07	<0.061	<0.045
Sertralin	<0.66	<0.53	<0.53	<0.6	<0.44
Sotalol	3,2	1,7	1,8	<0.44	3,6
Sulfamerazine	<0.49	<0.42	<0.42	<0.33	<0.26
Sulfamethazin	7,7	4,2	4,4	2,1	0,45
Sulfamethoxazol	230	170	210	150	29
Sulfapyridin	61	31	34	15	6,1
Telmisartan	1600	910	1200	330	100
Terbinafin	0,12	<0.093	<0.093	<0.11	<0.078
Tramadol	250	170	200	20	51
trans-Dihydro-Dixydroxy KBZ	810	430	460	330	40
Trimethoprim	370	210	230	8,4	9,2
Valsartan	320	160	190	240	25
Venlafaxin	35	24	26	0,35	5,9
Verapamil	1,3	0,46	0,49	<0.41	<0.3

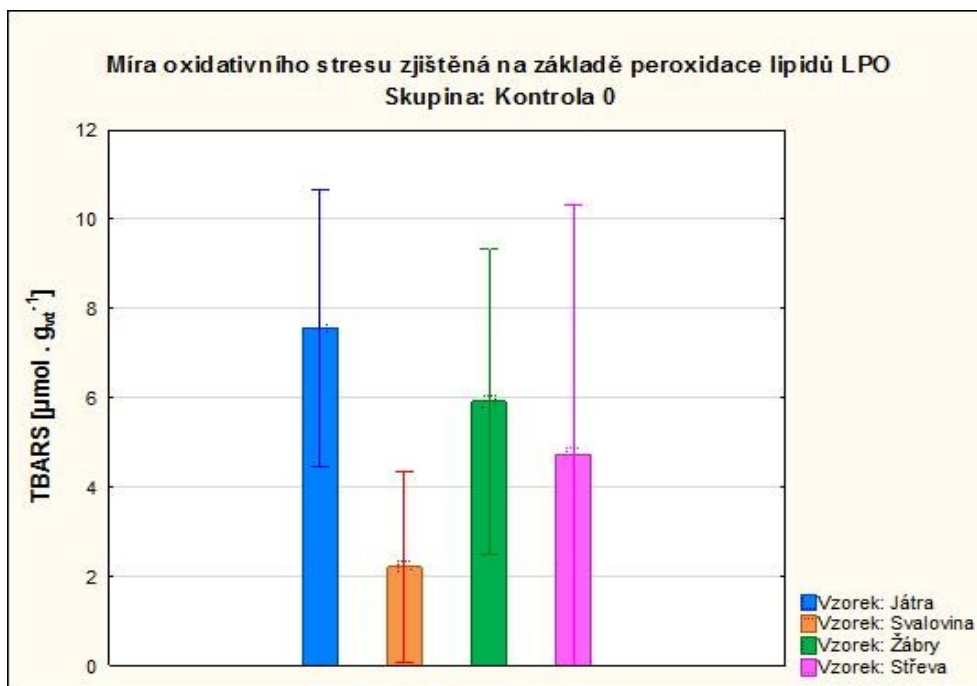
Tabulka č. 13b. Koncentrace farmak [ng . POCIS⁻¹] naměřené v jednotlivých lokalitách. Doba expozice ryb: 360 dnů. Doba expozice vzorkovačů POCIS: 10 dnů. Hodnoty uvedené ve tvaru <R znamenají, že koncentrace byla pod limitem stanovitelnosti (LOQ), kde R=LOQ.



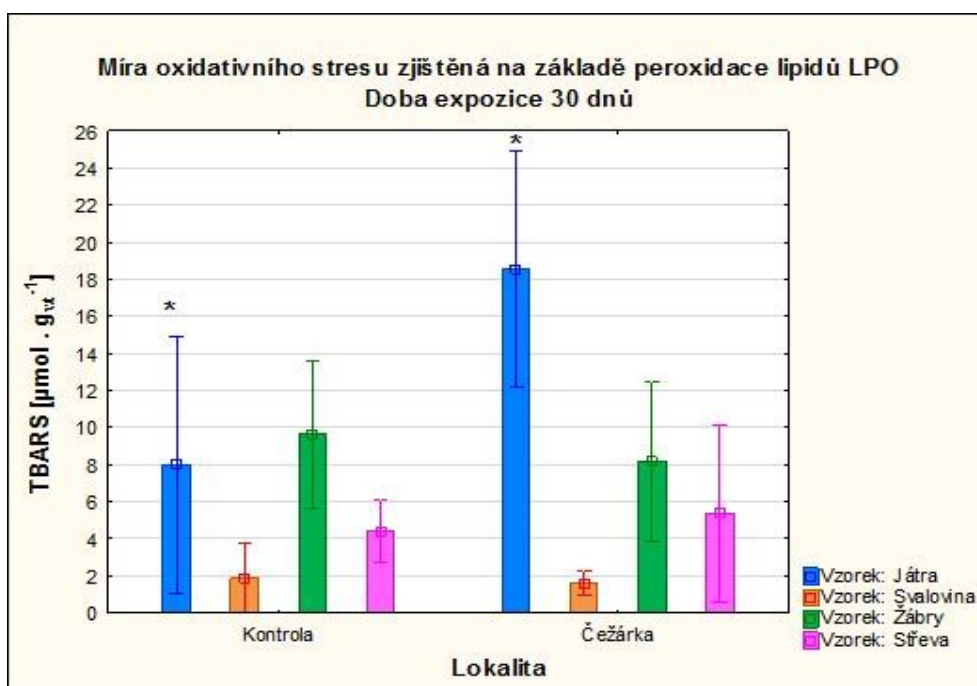
Graf č. 1. Hmotnosti odlovených kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Hmotnost je vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka. V čase 0 dní vážena jedna skupina ryb (násada) N=20. V ostatních případech pro každou skupinu N=12.



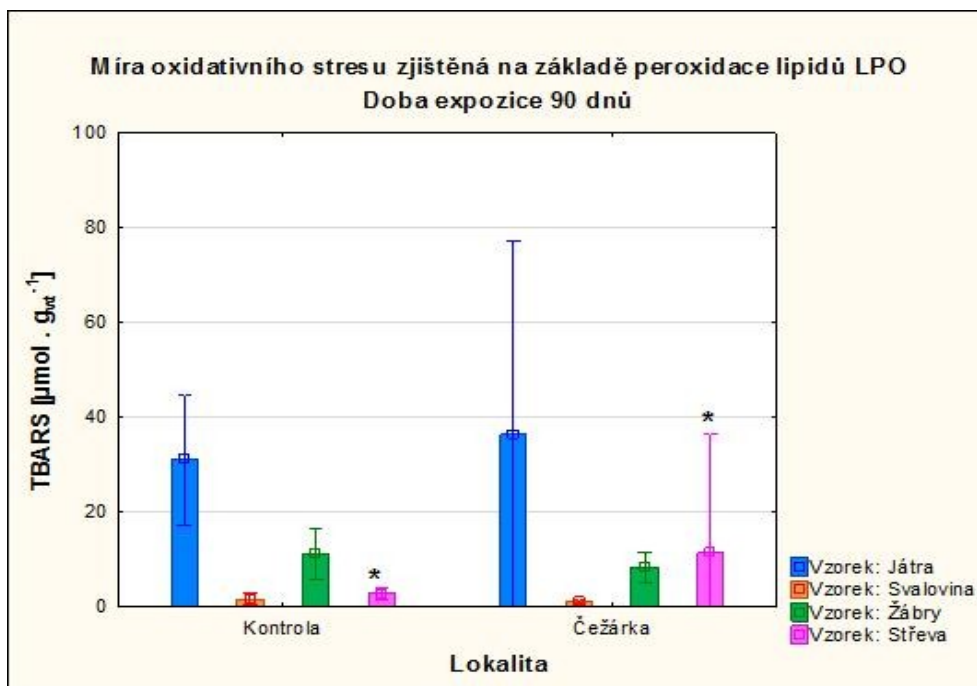
Graf č. 2 Hmotnosti odlovených candátů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Hmotnost je vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka. Pro každou skupinu N=12.



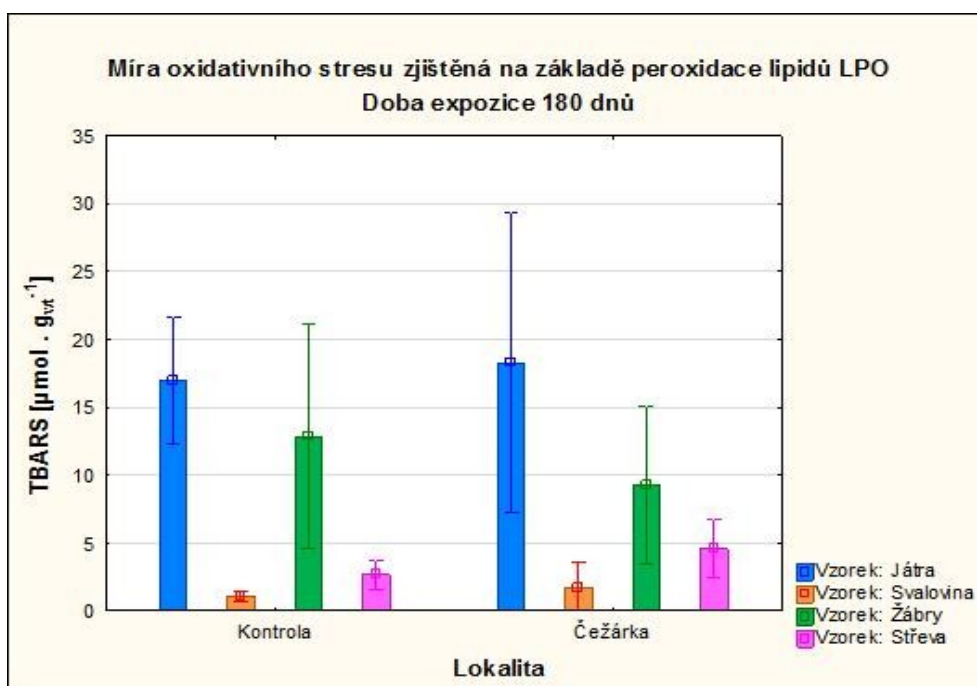
Graf č. 3. Míra oxidativního stresu násady kaprů. Míra LPO je vyjádřena v μmol TBARS na g nevysušené tkáně [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{wt}}^{-1}$] jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=20.



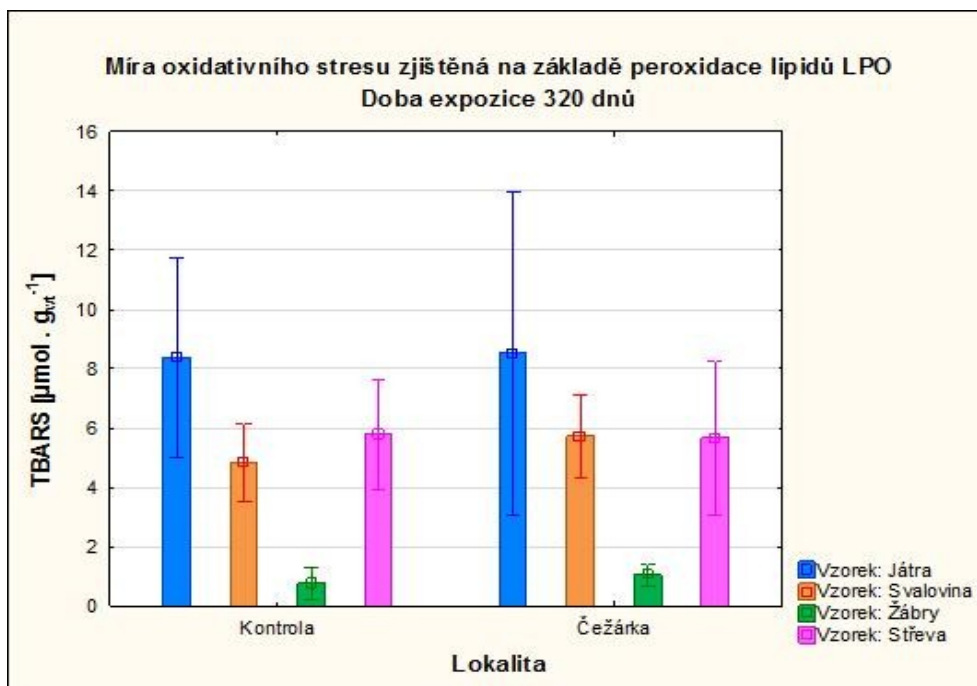
Graf č. 4. Míra oxidativního stresu kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čezárka. Míra LPO je vyjádřena v μmol TBARS na g nevysušené tkáně [$\mu\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{wt}}^{-1}$] jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



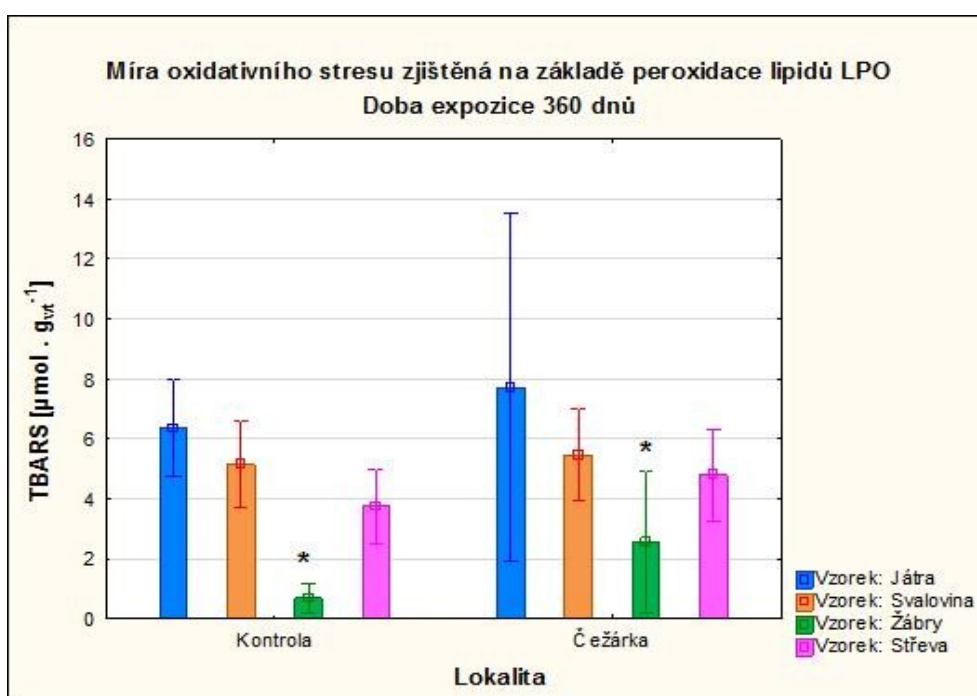
Graf č. 5. Míra oxidativního stresu kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čezárka. Míra LPO je vyjádřena v $\mu\text{mol TBARS na g nevysušené tkáně } [\mu\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{wt}}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



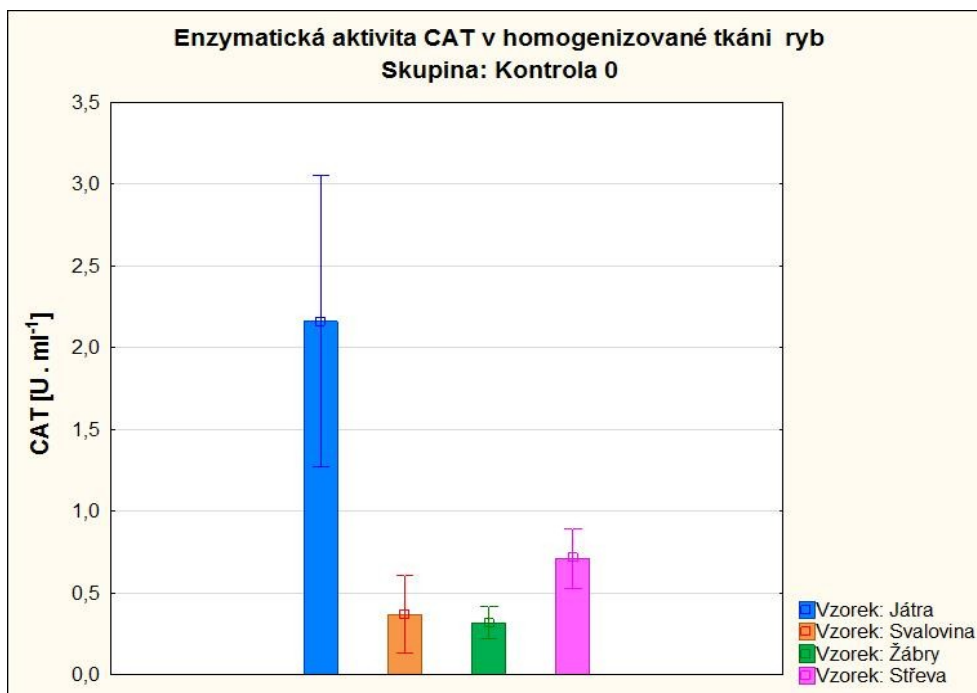
Graf č. 6. Míra oxidativního stresu kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čezárka. Míra LPO je vyjádřena v $\mu\text{mol TBARS na g nevysušené tkáně } [\mu\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{wt}}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$.



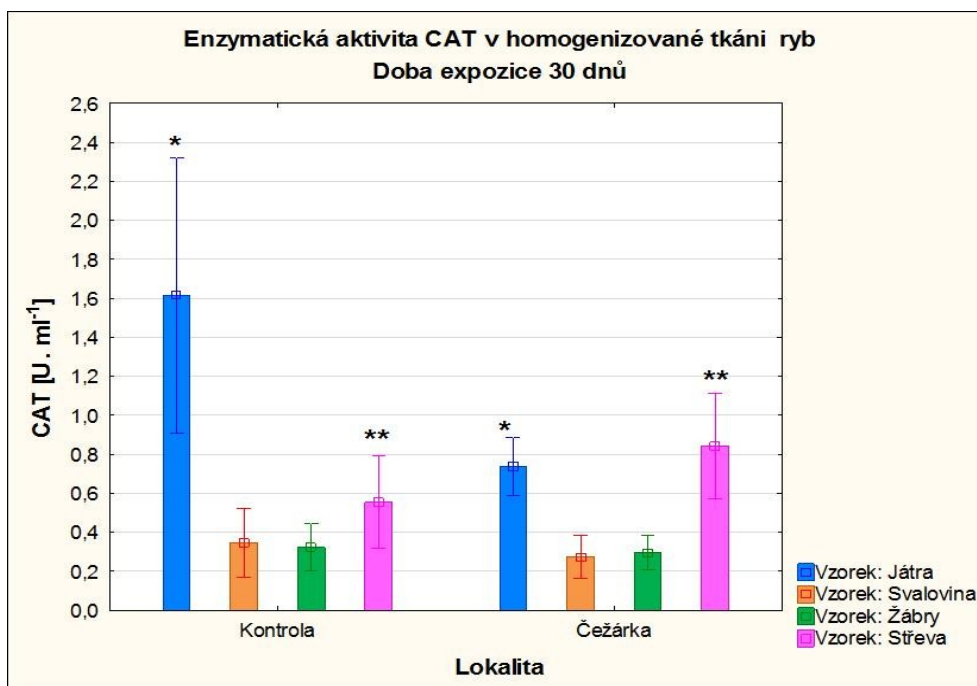
Graf č. 7. Míra oxidativního stresu kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra LPO je vyjádřena v $\mu\text{mol TBARS na g nevysušené tkáně } [\mu\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{wt}}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12.



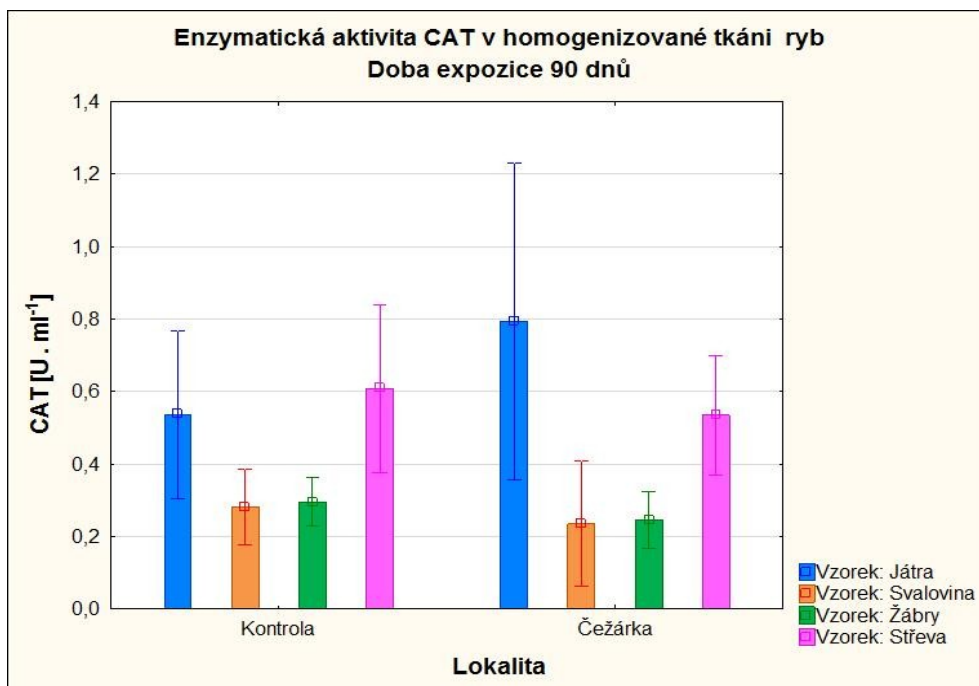
Graf č. 8. Míra oxidativního stresu kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra LPO je vyjádřena v $\mu\text{mol TBARS na g nevysušené tkáně } [\mu\text{mol} \cdot \text{g}_{\text{wt}}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



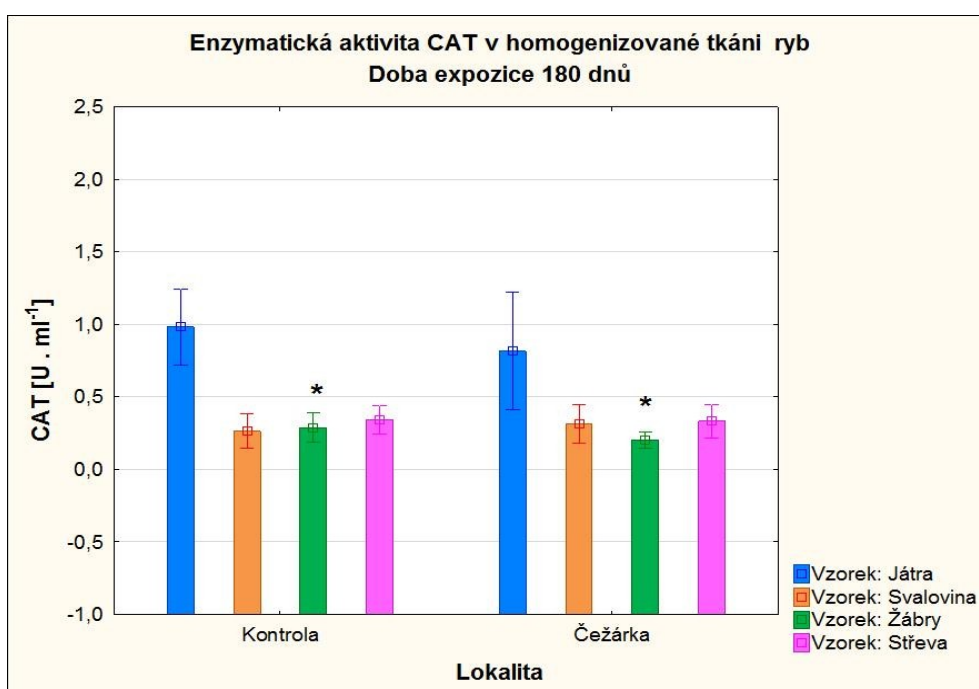
Graf č. 9. Enzymatická aktivita katalázy ve vzorcích tkání z kapří násady. Míra enzymatické aktivity CAT je vyjádřena v [U . ml⁻¹] jako průměr ± směrodatná odchylka. N=20.



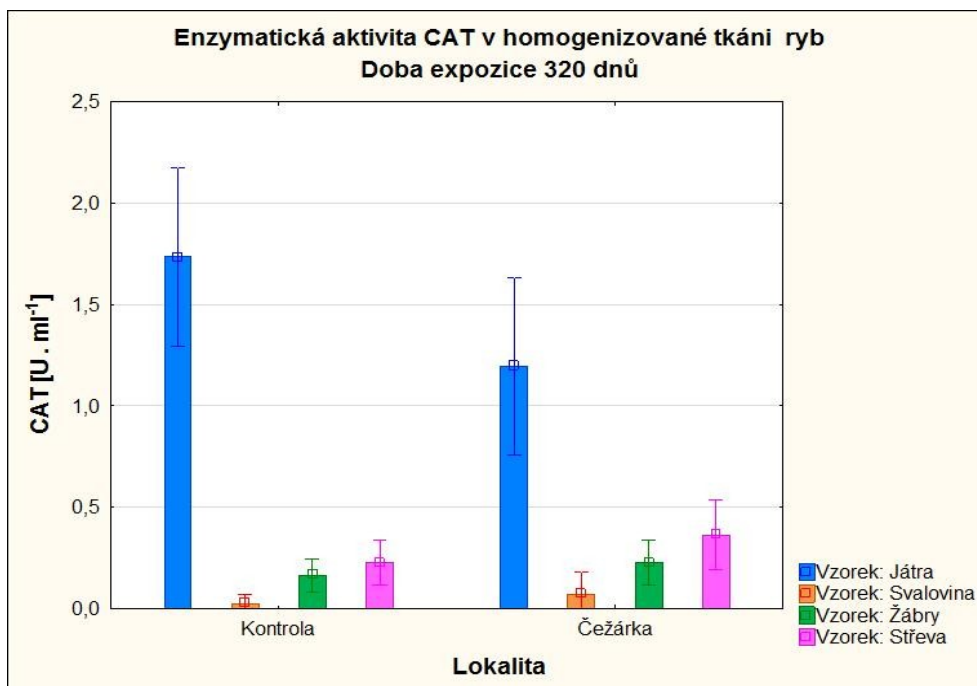
Graf č. 10. Enzymatická aktivita katalázy ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čezárka. Míra enzymatické aktivity CAT je vyjádřena v [U . ml⁻¹] jako průměr ± směrodatná odchylka. N=12. Sloupce označené znakem * a ** jsou od sebe pro daný vzorek významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



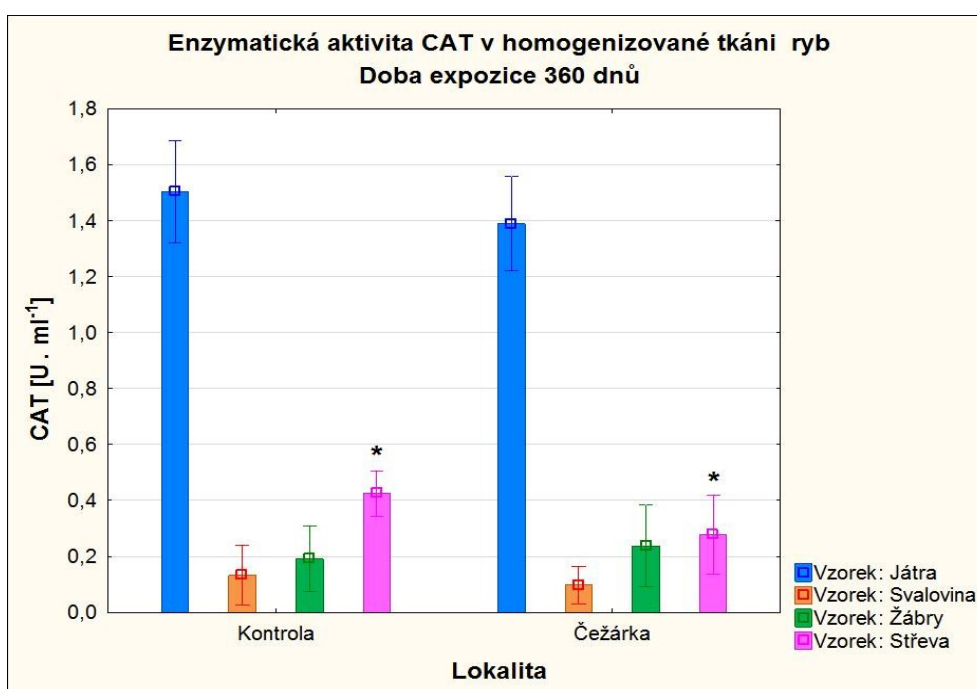
Graf č. 11. Enzymatická aktivita katalázy ve vzorcích tkáni kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity CAT je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$.



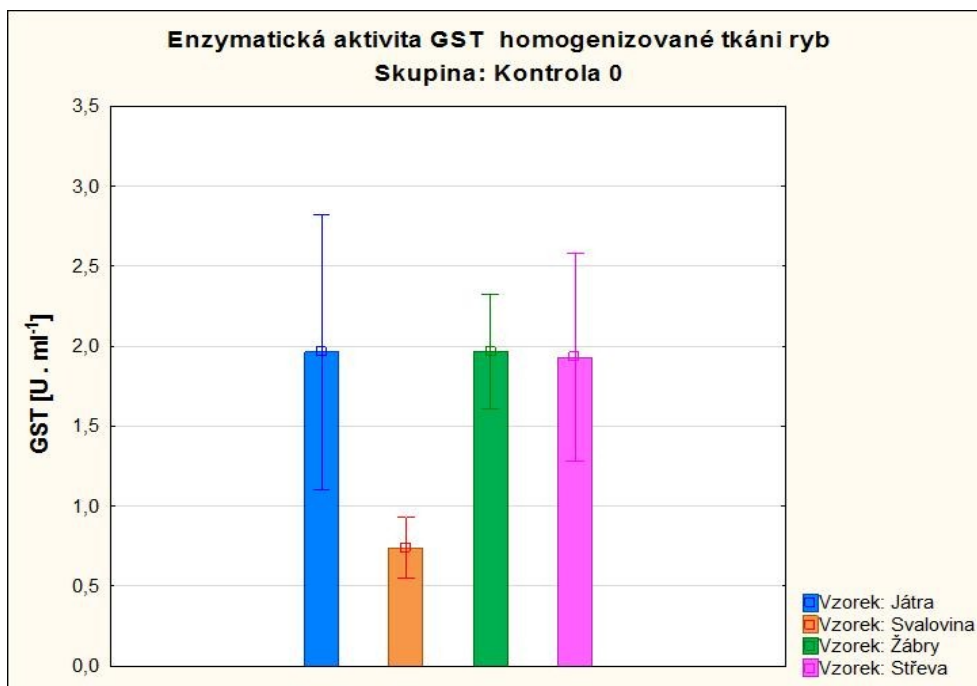
Graf č. 12. Enzymatická aktivita katalázy ve vzorcích tkáni kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity CAT je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



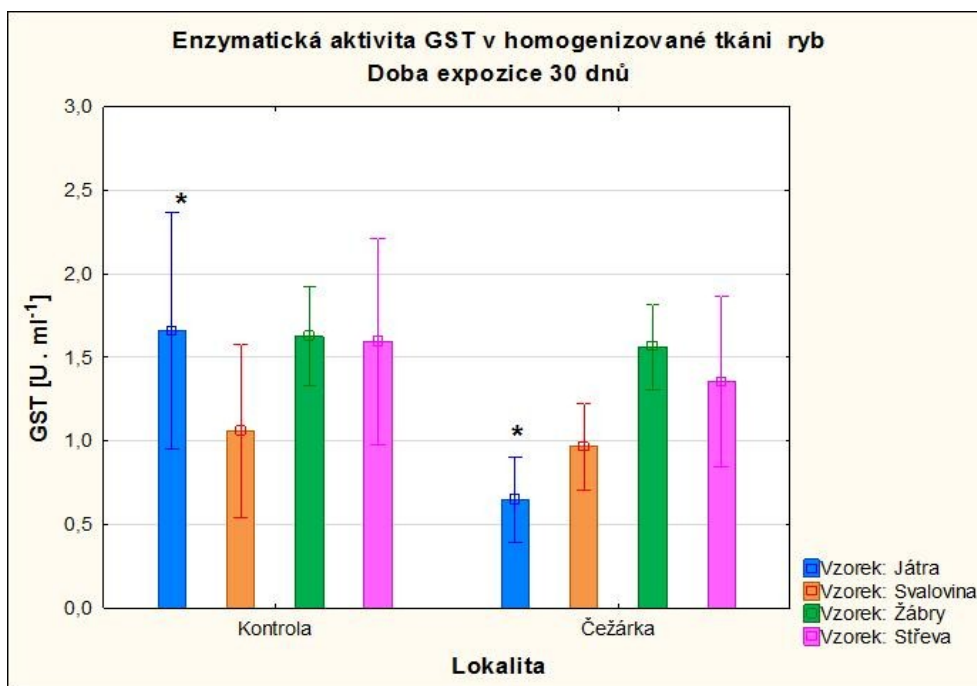
Graf č. 13. Enzymatická aktivita katalázy ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity CAT je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12.



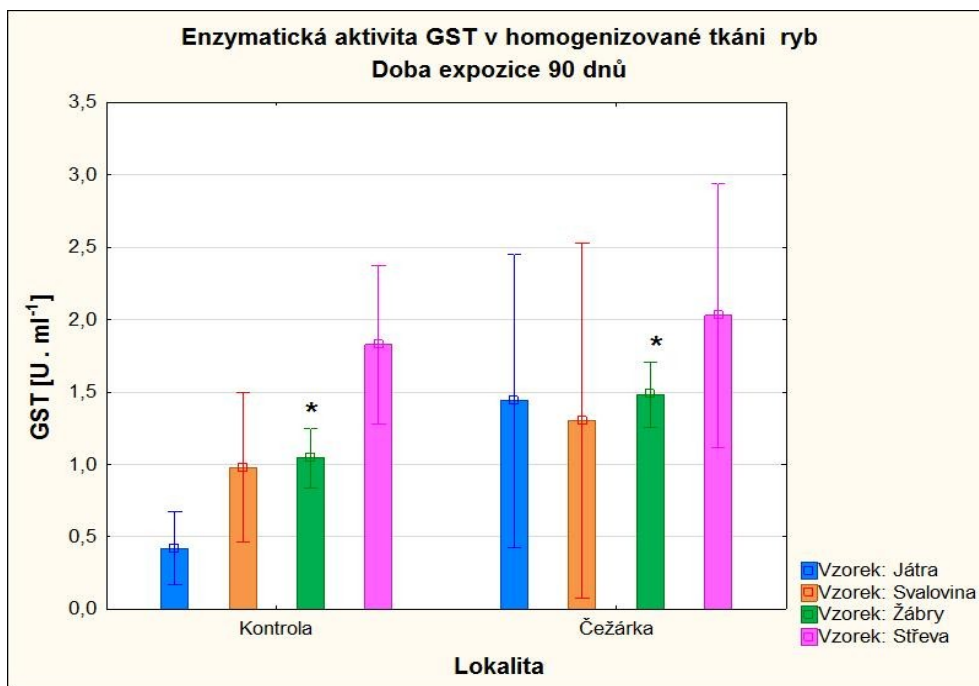
Graf č. 14. Enzymatická aktivita katalázy ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity CAT je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



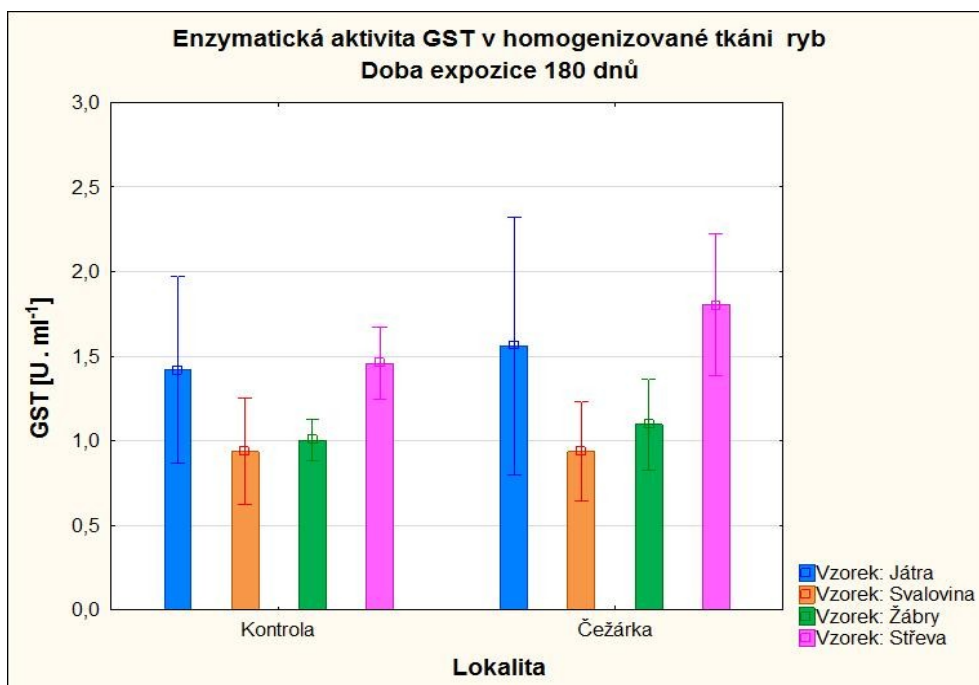
Graf č. 15. Enzymatická aktivita GST ve vzorcích tkání z kapří násady. Míra enzymatické aktivity GST je vyjádřena v [U · ml⁻¹] jako průměr ± směrodatná odchylka. N=20



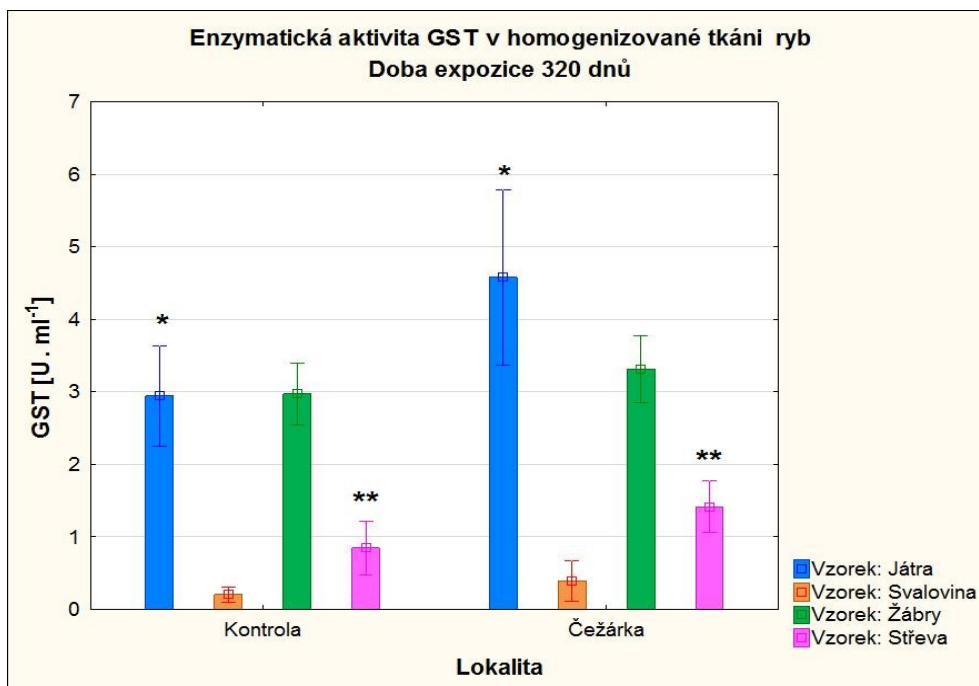
Graf č. 16. Enzymatická aktivita GST ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GST je vyjádřena v [U · ml⁻¹] jako průměr ± směrodatná odchylka. N=12. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu (p<0,01).



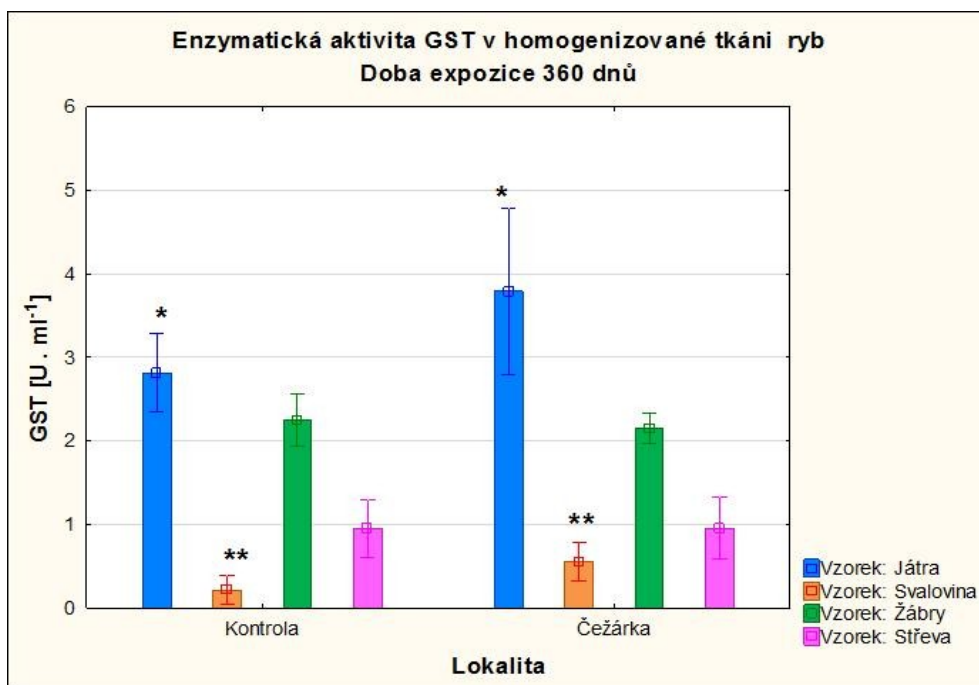
Graf č. 17. Enzymatická aktivita GST ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GST je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



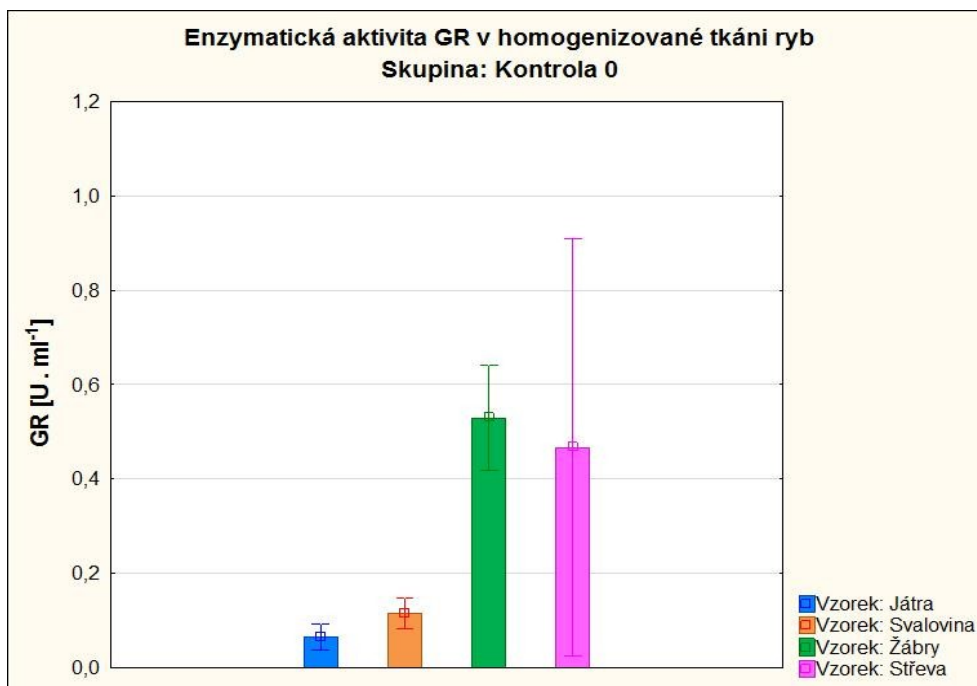
Graf č. 18. Enzymatická aktivita GST ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GST je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$.



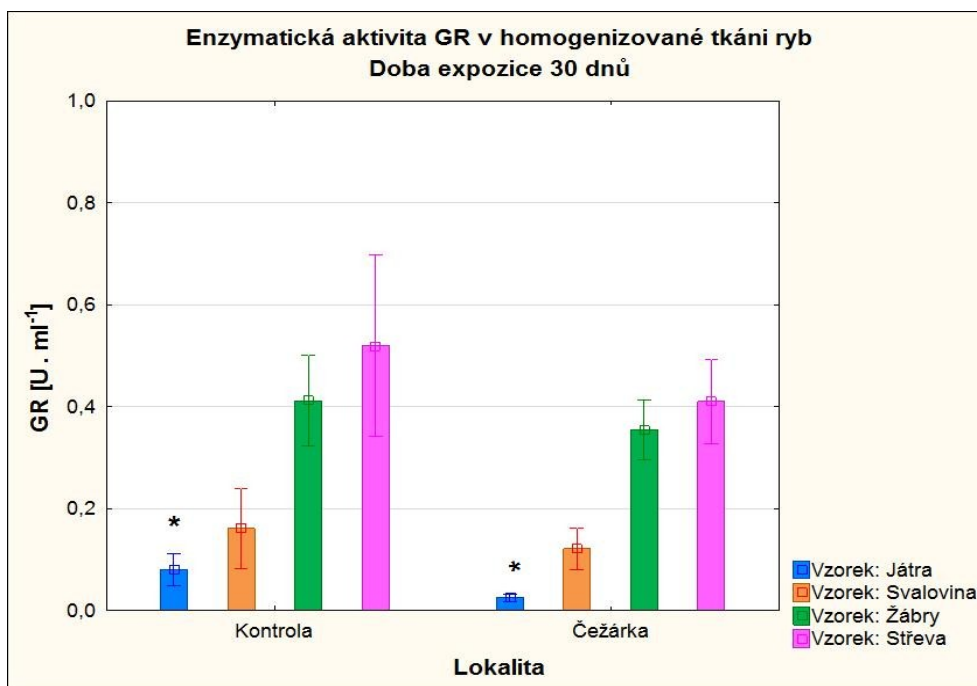
Graf č. 19. Enzymatická aktivita GST ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GST je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$. Sloupce označené znakem * a ** jsou od sebe pro daný vzorek významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



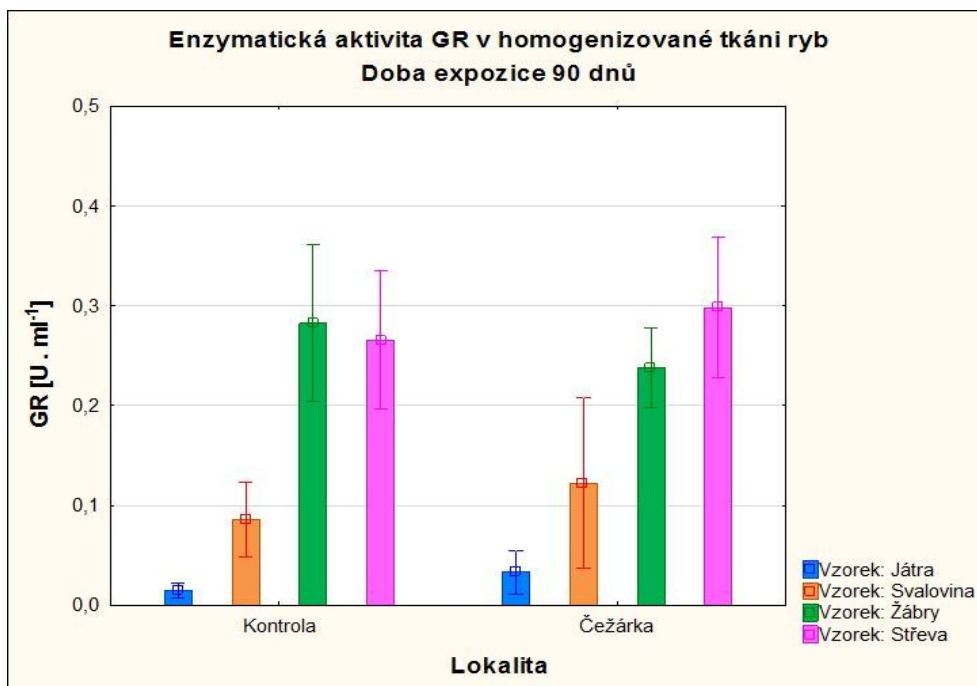
Graf č. 20. Enzymatická aktivita GST ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GST je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$. Sloupce označené znakem * a ** jsou od sebe pro daný vzorek významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



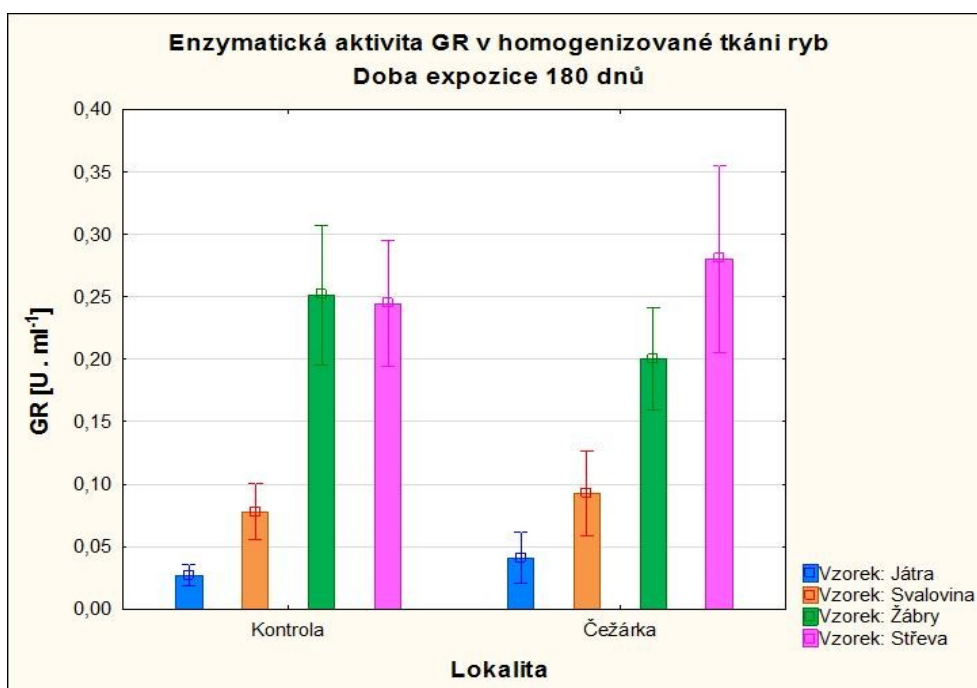
Graf č. 21. Enzymatická aktivita GR ve vzorcích tkání z kapří násady. Míra enzymatické aktivity GR je vyjádřena v [U · ml⁻¹] jako průměr ± směrodatná odchylka. N=20



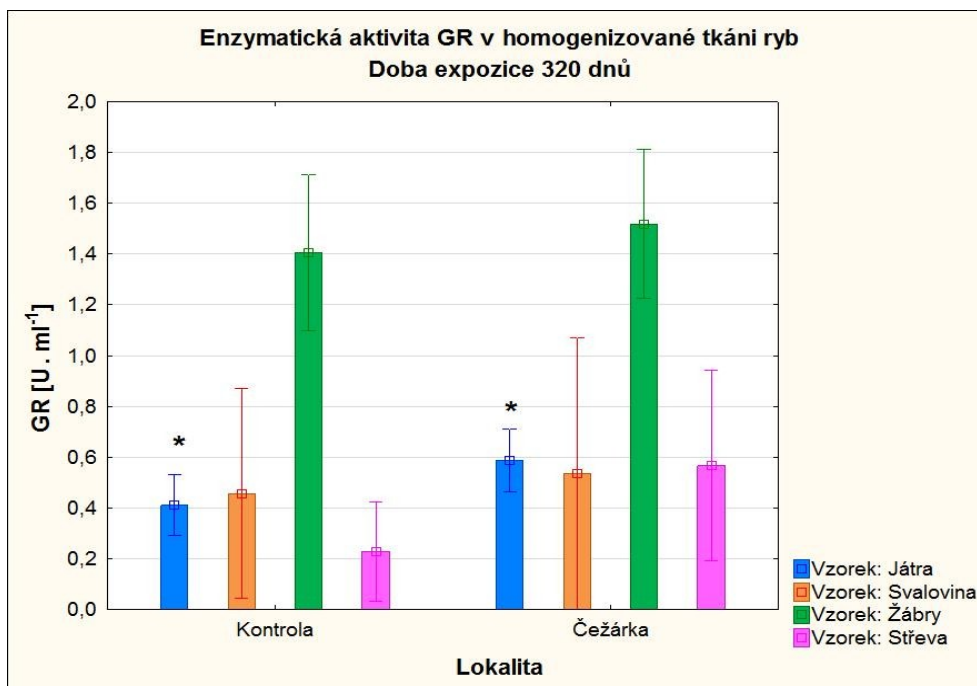
Graf č. 22. Enzymatická aktivita GR ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čezárka. Míra enzymatické aktivity GR je vyjádřena v [U · ml⁻¹] jako průměr ± směrodatná odchylka. N=12. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu (p<0,01).



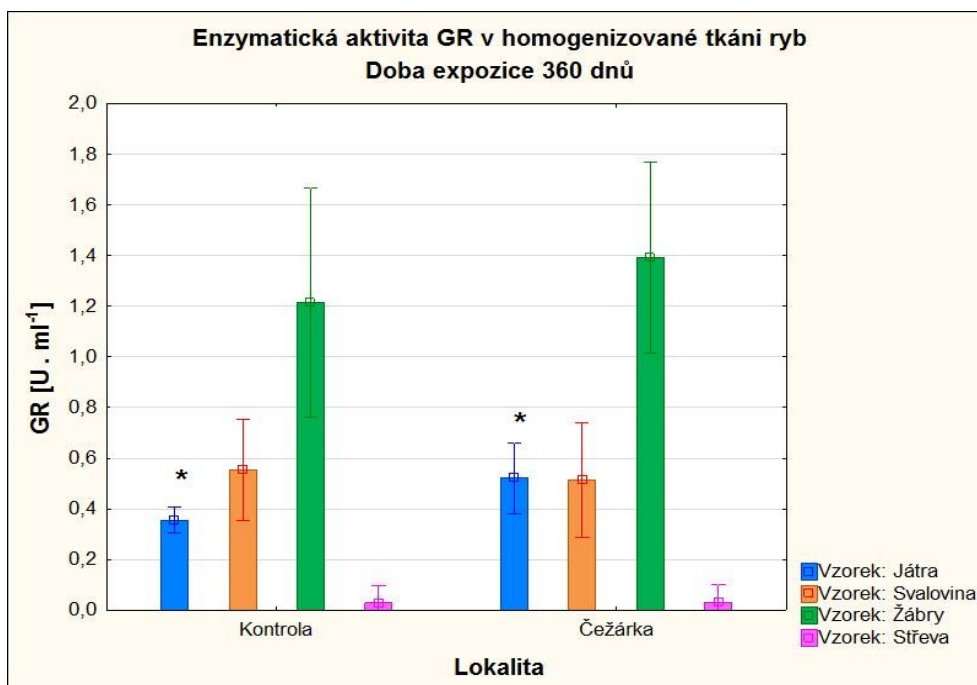
Graf č. 23. Enzymatická aktivita GR ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GR je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12



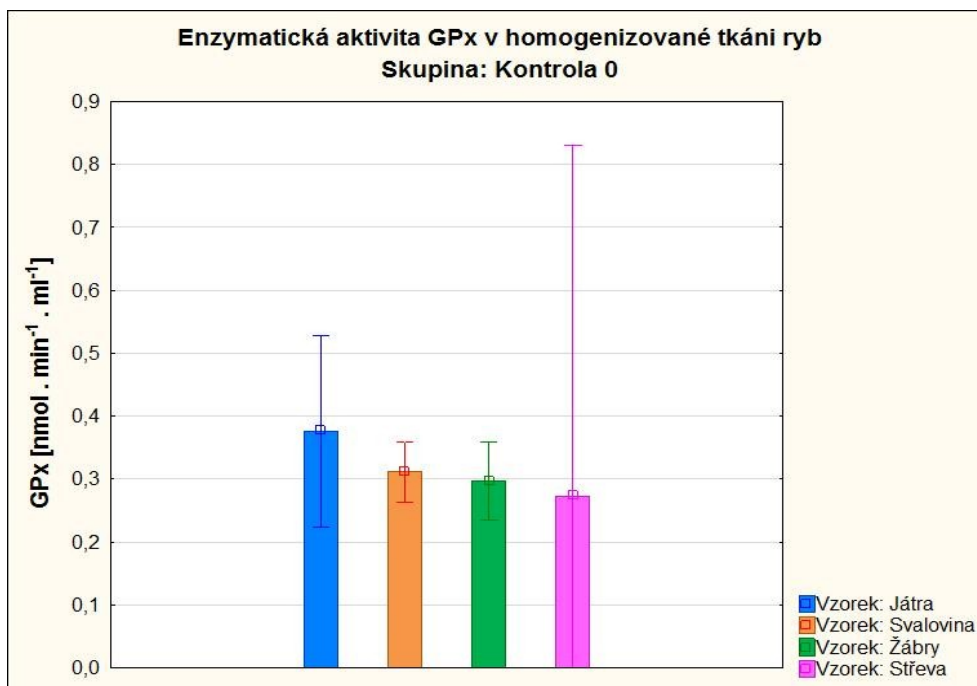
Graf č. 24. Enzymatická aktivita GR ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GR je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12



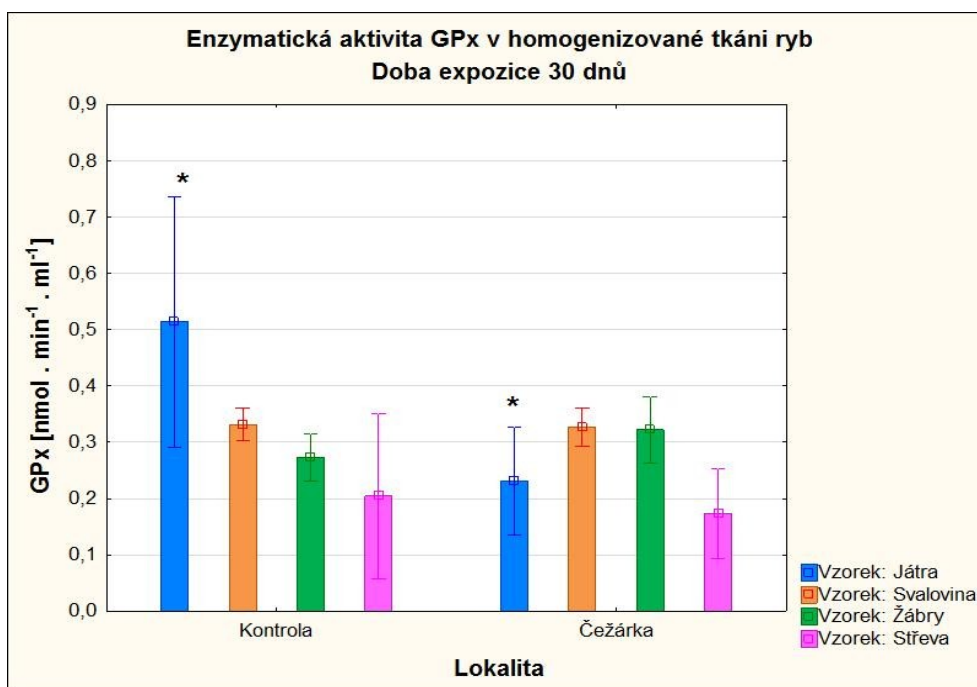
Graf č. 25. Enzymatická aktivita GR ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GR je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12. . Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



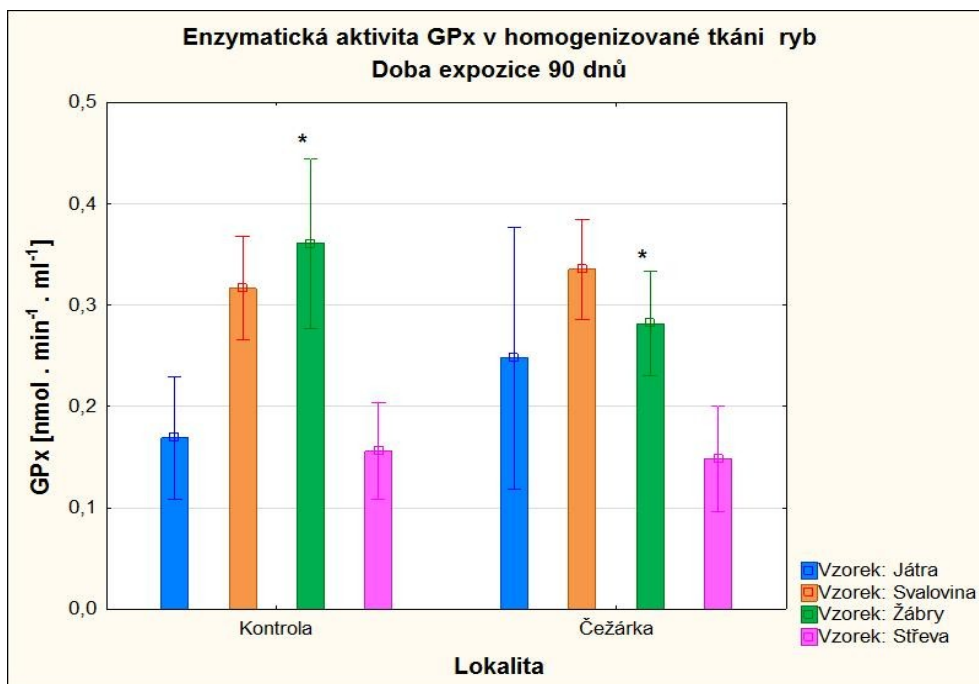
Graf č. 26. Enzymatická aktivita GR ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GR je vyjádřena v $[U \cdot ml^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12. . Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



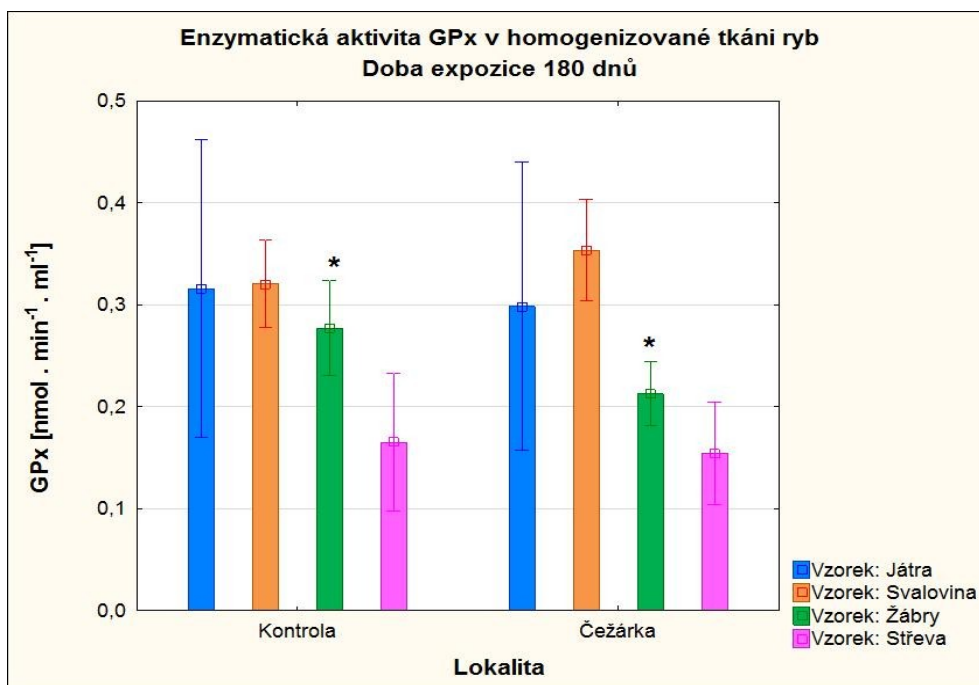
Graf č. 27 Enzymatická aktivita GPx ve vzorcích tkání z kapří násady. Míra enzymatické aktivity GPx je vyjádřena v [nmol · min⁻¹ · ml⁻¹] jako průměr ± směrodatná odchylka. N=20



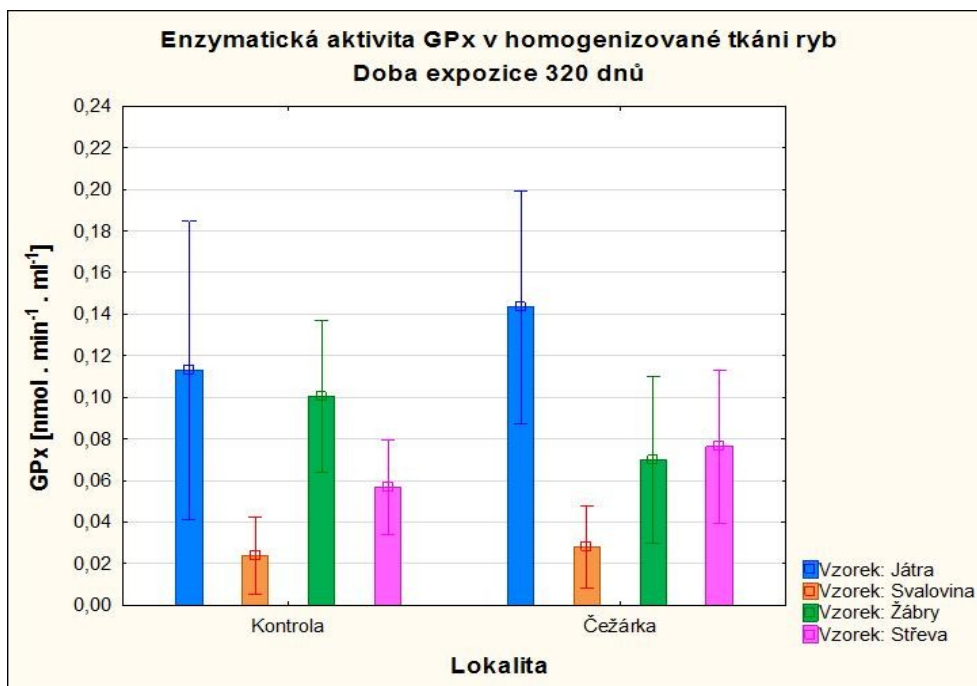
Graf č. 28. Enzymatická aktivita GPx ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GPx je vyjádřena v [nmol · min⁻¹ · ml⁻¹] jako průměr ± směrodatná odchylka. N=12. . Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu (p<0,01).



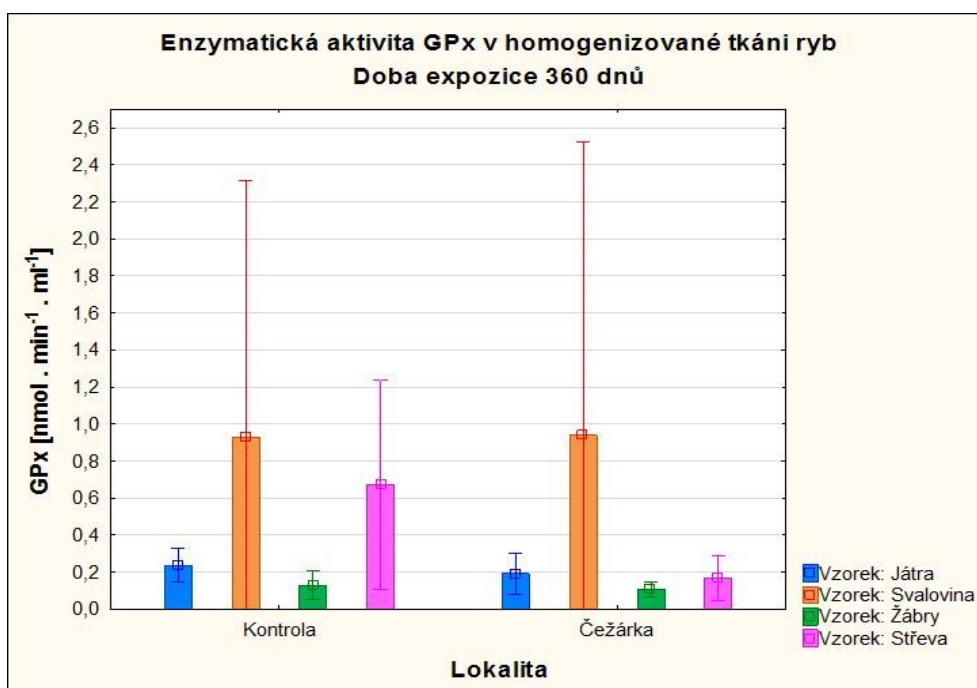
Graf č. 29. Enzymatická aktivita GPx ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GPx je vyjádřena v $[\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p<0,01$).



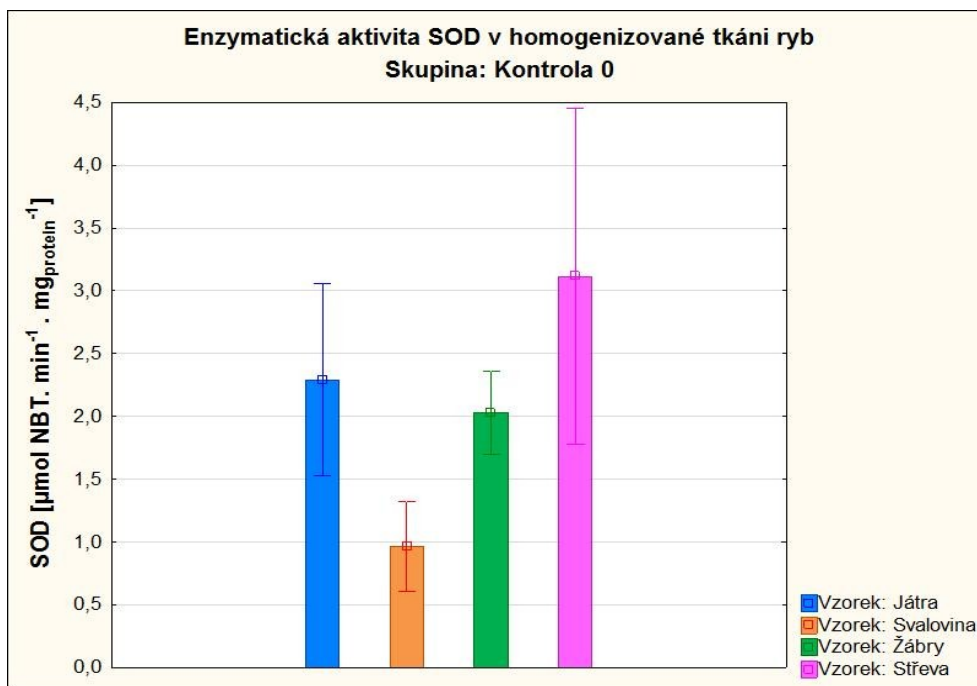
Graf č. 30. Enzymatická aktivita GPx ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GPx je vyjádřena v $[\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p<0,01$).



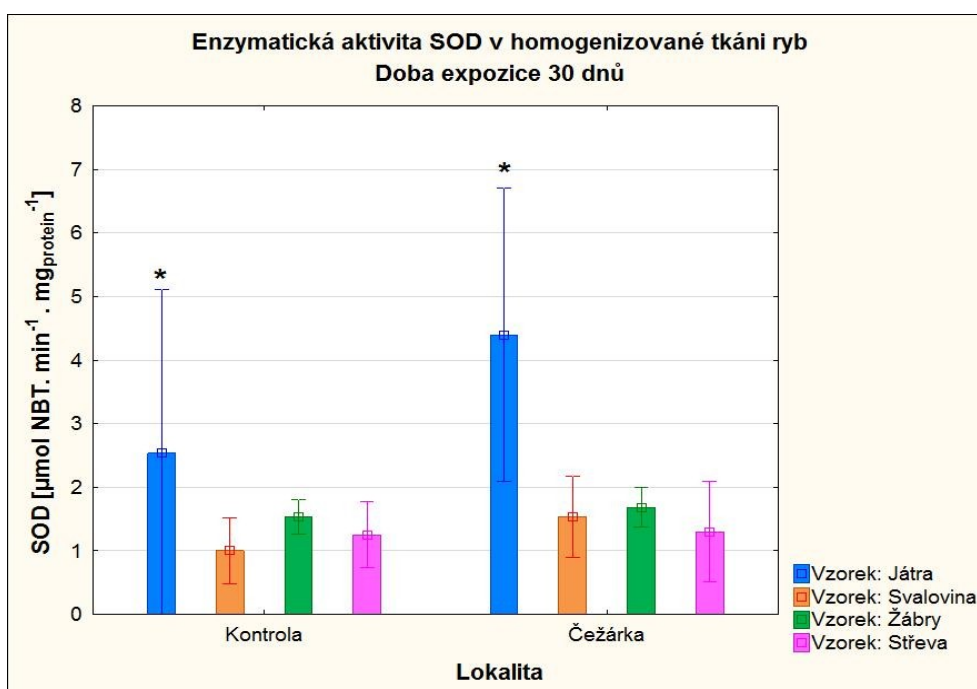
Graf č. 31. Enzymatická aktivita GPx ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GPx je vyjádřena v $[\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12



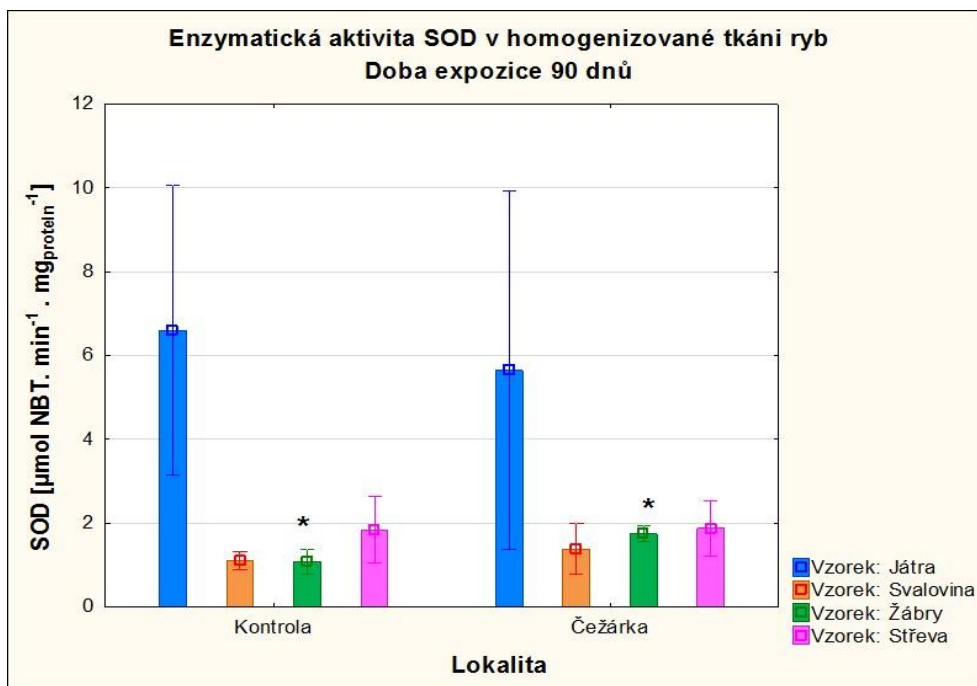
Graf č. 32. Enzymatická aktivita GPx ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity GPx je vyjádřena v $[\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12



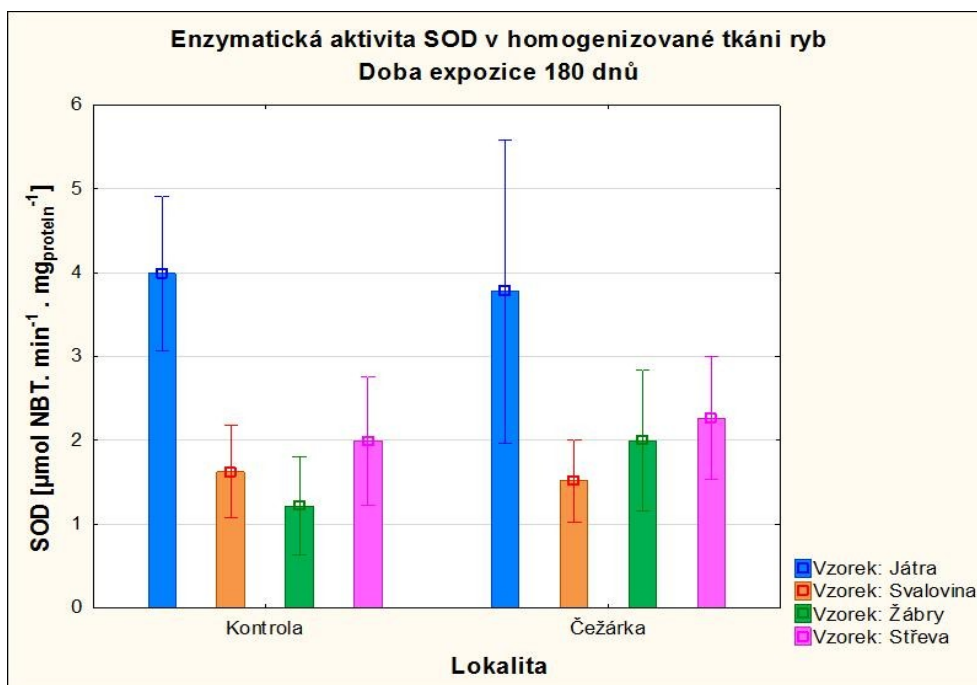
Graf č. 33. Enzymatická aktivita SOD ve vzorcích tkáních kapří násady. Míra enzymatické aktivity SOD je vyjádřena v [$\mu\text{mol NBT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}$] jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12



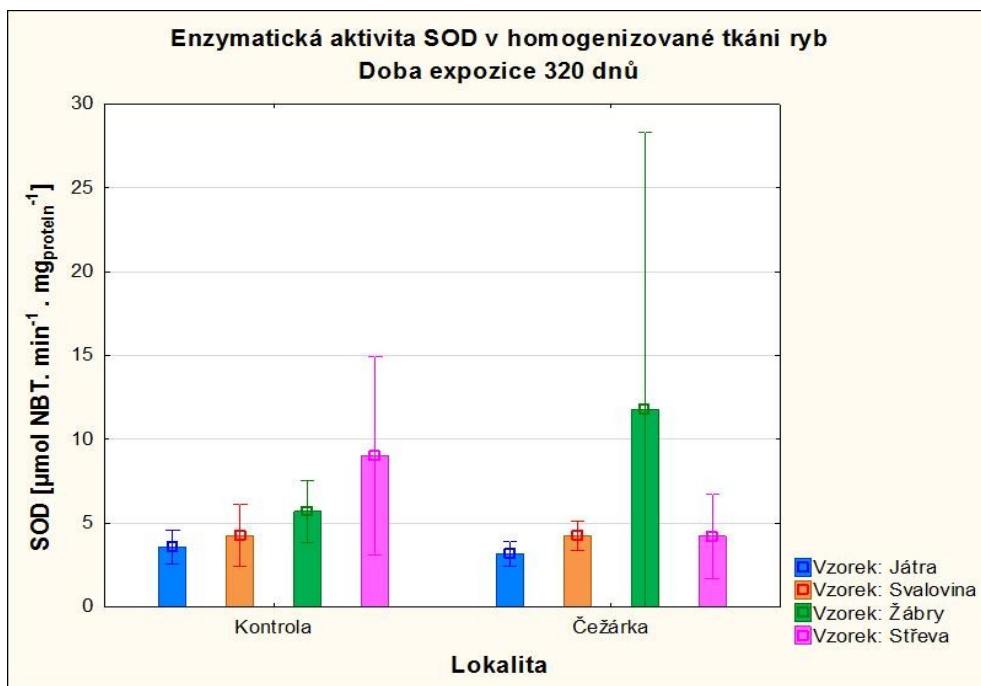
Graf č. 34. Enzymatická aktivita SOD ve vzorcích tkání kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čezárka. Míra enzymatické aktivity SOD je vyjádřena v [$\mu\text{mol NBT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}$] jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



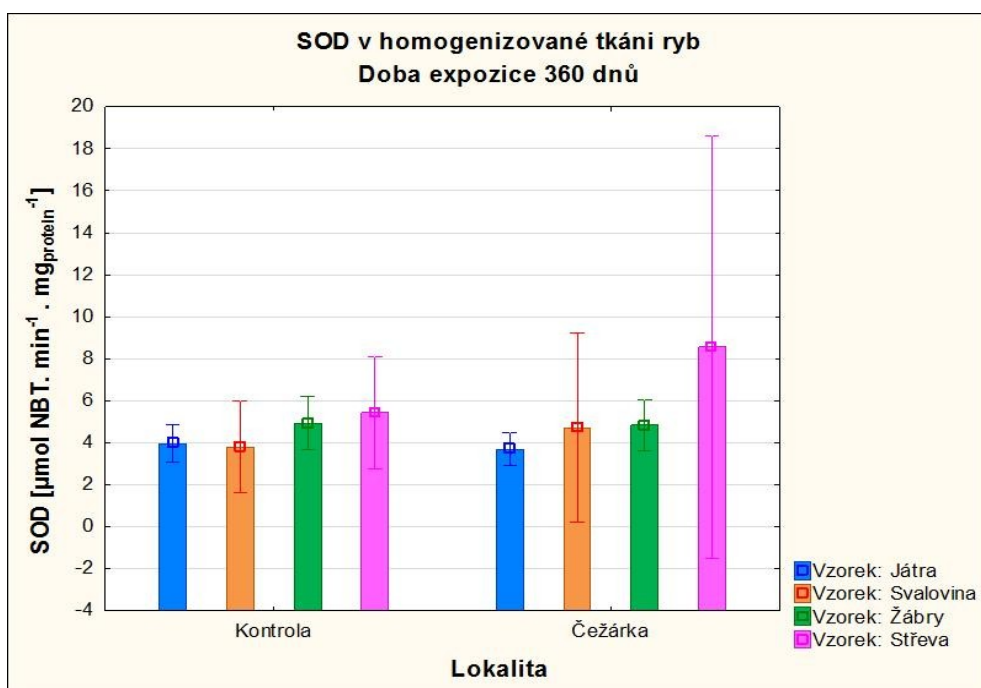
Graf č. 35. Enzymatická aktivita SOD ve vzorcích tkáni kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity SOD je vyjádřena v $[\mu\text{mol NBT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$. Sloupce označené znakem * jsou od sebe významně rozdílné dle Mann-Whitneyova testu ($p < 0,01$).



Graf č. 36. Enzymatická aktivita SOD ve vzorcích tkáni kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity SOD je vyjádřena v $[\mu\text{mol NBT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. $N=12$



Graf č. 37. Enzymatická aktivita SOD ve vzorcích tkáni kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity SOD je vyjádřena v $[\mu\text{mol NBT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12



Graf č. 38. Enzymatická aktivita SOD ve vzorcích tkáni kaprů z lokalit Kontrolní rybník a Čežárka. Míra enzymatické aktivity SOD je vyjádřena v $[\mu\text{mol NBT} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}]$ jako průměr \pm směrodatná odchylka. N=12

9 Abstrakt

Za několik posledních dekád ve vyspělých zemích výrazně vzrostlo množství spotřebovávaných léčiv. Tyto látky jsou v menší nebo větší míře z lidského těla vyloučeny a končí v kanalizaci. Splaškové vody z kanalizace končí v lepším případě v čistírnách odpadních vod, kde jsou částečně vyčištěny a poté vypuštěny do povrchových vod. Rezidua léčiv unikající do životního prostředí ovlivňují zde přítomné organismy. V rámci této studie byl posouzen vliv reziduí léčiv na ryby v biologickém rybníku Čežárka (2,6 ha). Čežárka je recipientem vyčištěných odpadních vod z ČOV města Vodňany, jehož populace čítá 7 000 obyvatel. Biologické rybníky jsou vhodným řešením zajišťujícím dočištění odpadní vody z ČOV, kde se živiny v těchto vodách zapojují do potravního řetězce v ekosystému rybníka. Ve vodě v rybníku bylo identifikováno 62 farmak. Fyziologický stav ryby exponované v biologickém rybníku po dobu 30, 90, 180, 320 a 360 dnů byl porovnáván s rybami z kontrolního rybníka nezatíženého odpadními vodami. Mezi sledované parametry byl zařazen přírůstek, kondice ryb a biomarkery zahrnující koncentraci vitellogeninu, míru peroxidace lipidů, antioxidační aktivita katalázy, glutathion peroxidázy, glutathion reduktázy, glutathion S-transferázy a superoxid dismutázy. Výsledky analýz sady biomarkerů prokázaly vliv vyčištěných odpadních vod obsahujících rezidua léčiv na ryby. Získané výsledky dokládají značnou schopnost adaptace ryb na prostředí biologického rybníka po 90 dnech expozice.

Klíčová slova: Farmaka, Odpadní vody, Oxidativní stres, Biomarkery

10 Abstract

Volume of consumed antibiotics in developed countries have increased eminently in past few decades. These substances are excreted from human body in various abundance and end up in the sewage. Sewage water flows to sewage treatment plants to be partly cleaned and finally discharged to surface waters. Pharmaceutical residuals leaking to water environment of recipients affect local biota. Impact of pharmaceutical residuals present in biological pond Čežárka was assessed in this study. Čežárka biological pond (2,6 ha) is a recipient of discharged waters of sewage treatment plant in Vodňany, the town with 7 000 inhabitants. Biological ponds are good solution for final treatment of wastewater discharged from sewage treatment plant effluents. The nutrients from wastewater may enter the food chain of pond ecosystem. In total 62 pharmaceuticals were identified in water of sewage pond. Fish exposed in the pond for 30, 90, 180, 320 and 360 days were compared with fish of control group. Growth, condition of fish and biomarkers including level of vitellogenine in blood plasma, lipid peroxidation rate, antioxidative activity of catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase and superoxide dismutase were compared. The study proved the environmental impact of STP discharge containing pharmaceutical residuals in fish. Significant adaptation of fish to environment of biological pond was observed after 90 days of exposure.

Keywords: Pharmaceuticals, Sewage water, Oxidative stress, Biomarkers