

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

Kdo je boss teď? aneb dopad farmaka sertralinu na hierarchii raků

Autor: Bc. Josef Mareš

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jan Kubec, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Ing. Martin Musil

Studijní program a obor: N4106 Zemědělská specializace, Rybářství a ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2022

Prohlášení

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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. 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 odevzdávanému textu do 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 na Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích

Josef Mareš

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Janu Kubcovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Martinovi Musilovi za poskytnutí odborné pomoci při experimentální části a tvorbě písemné části diplomové práce, dále za aktivní přístup a ochotné a rychlé jednání. Dále bych chtěl poděkovat všem, kteří se jakoukoliv formou podíleli na mém pokusu a přispěli tak ke vzniku této závěrečné práce.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybnářství a ochrany vod

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Josef MAREŠ**
Osobní číslo: **V19N004P**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Rybnářství a ochrana vod**
Téma práce: **„Kdo je boss teď?“ aneb dopad farmaka sertralinu na hierarchii raků**
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický**

Zásady pro vypracování

Humánní farmaka jsou závažnou skupinou polutantů ohrožující vodní ekosystémy celého světa. Do vodních ekosystémů se dostávají vypouštěnou vodou z čistíren odpadních vod a to nezměněné účinné látky nebo jejich rezidua. Tyto látky sice nemají akutně toxický potenciál v daných environmentálních koncentracích, ale mohou mít významnou chronickou toxicitu, mohou snižovat obranyschopnost, narušovat reprodukci nebo měnit chování vodních organismů. V důsledku pak mohou způsobit změny ekologických vazeb a vztahů a způsobit tak nerovnováhu v ekosystému.

Tato práce by měla experimentálně zajistit jaký vliv má environmentálně relativní koncentrace jednoho vybraného farmaka (sertralin) na intraspecifické chování hierarchického statusu modelového organismu. Jako modelového organismu bude použito raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*), který bude minimálně týden exponován roztoku vybraného farmaka, shodným podmínkám bude vystavena i kontrolní skupina bez přítomnosti farmaka. Exponování raci budou následně dle velikosti a příslušnosti k experimentální skupině rozříděny do dyád, které budou interagovat v předem připravených arénách. Interakce raků budou zaznamenávány na videozáznam a následně analyzovány.

Cílem práce je získat informace o účinku environmentálně relevantních koncentrací vybraného farmaka na chování zástupce vodních bezobratlých. Předpokládaným cílem je narušení ustanovení hierarchie, snížení či zvýšení agresivity jedinců a změny v interakcích běžných pro dané jedince.

Rozsah pracovní zprávy: **50-70 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- Breithaupt, T., Thiel, M., 2011. Chemical Communication in Crustaceans. Springer, New York.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* 339, 814-815.
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Jonsson, M., 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems-impacts through behavioural alterations. *Philos. Trans. R. Soc. B* 369, 20130580.
- Buřič, M., Grabicová, K., Kubec, J., Kouba, A., Kuklina, I., Kozák, P., Grabic, R., Randák, T., 2018. Environmentally relevant concentrations of tramadol and citalopram alter behaviour of an aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 200, 226-232.
- Fedorova, G., Golovko, O., Randak, T., Grabic, R., 2014. Storage effect on the analysis of pharmaceuticals and personal care products in wastewater. *Chemosphere* 111, 55-60.
- Fong, P.P., Bury, T.B., Dworkin-Brodsky, A.D., Jasion, C.M., Kell, R.C., 2015. The antidepressants venlafaxine („Effexor“) and fluoxetine („Prozac“) produce different effects on locomotion in two species of marine snail, the oyster drill (*Urosalpinx cinerea*) and the starsnail (*Lithopoma americanum*).

Mar Environ Res 103: 89-94.

Fong, P.P., Molnar, N., 2013. Antidepressants cause foot detachment from substrate in five species of marine snail. Mar Environ Res 84: 24-30.

Grabicová, K., Grabic, R., Bláha, M., Kumar, V., Červený, D., Fedorova, G., Randák, T., 2015. Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. Water Res. 72, 145-153.

Grabicová, K., Grabic, R., Fedorova, G., Fick, J., Červený, D., Kolářová, J., Turek, J., Žlábek, V., Randák, T., 2017. Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream. Water Res. 124, 654-662.

Hossain, M.S., Kubec, J., Grabicová, K., Grabic, R., Randák, T., Guo, W., Kouba, A., Buřič, M., 2019. Environmentally relevant concentrations of methamphetamine and sertraline modify the behavior and life history traits of an aquatic invertebrate. Aquatic Toxicology 213: 105222.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jan Kubec, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: **Ing. Martin Musil**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: **23. ledna 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **3. května 2021**



prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

L.S.



prof. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

Obsah

1. ÚVOD.....	8
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	10
2.1. ZNEČIŠTĚNÍ POVRCHOVÝCH VOD LÉČIVY	10
2.1.1. Cesta polutantů do životního prostředí	11
2.1.2. Akumulace PPCP ve vodních organismech.....	11
2.1.3. Opatření proti šíření PhAC	11
2.1.4. Metody sledování polutantů.....	12
2.1.5. Samočistící schopnost volných vod	12
2.1.6. Čištění odpadních vod	13
2.1.6.1. Primární čištění	13
2.1.6.2. Sekundární čištění	14
2.1.6.3. Terciální čištění.....	14
2.2. ANTIDEPRESIVA	17
2.2.1. Sertralin.....	19
2.3. KOMUNIKACE A SOCIÁLNÍ CHOVÁNÍ U RAKŮ	21
2.3.1. Sensorický systém	21
2.3.2. Komunikace	22
2.3.3. Sociální chování.....	23
2.4. RAK MRAMOROVANÝ.....	25
2.5. TESTY TOXICITY	27
2.5.1. Toxicita PPCPs	28
2.5.2. Využití raků jako modelových organismů	29
3. METODIKA	30
3.1. PŘÍPRAVA EXPOZICE	30
3.2. ROZDĚLENÍ RAKŮ	31
3.3. MONITOROVÁNÍ CHOVÁNÍ	31
3.4. VYHODNOCENÍ INTERAKCÍ.....	33
3.5. STATISTICKÁ ANALÝZA	35
4. VÝSLEDKY	36
5. DISKUSE.....	40

6. ZÁVĚR	44
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	45
8. ABSTRAKT	61
9. ABSTRACT.....	62

1. Úvod

Neustálý růst lidské populace, farmaceutický rozvoj a s ním spojená snadná dostupnost léčiv vede k vysoké spotřebě farmaceutických výrobků. Zrychlující se životní styl má rovněž za důsledek psychické problémy, se kterými se pojí užívání psychoaktivních látek. Důležitým faktorem zvyšující se spotřeby léčiv je také stárnutí populace, což zvyšuje potřebu zdravotnické péče a farmak.

Enormní výroba a konzumace léčiv vede k zatěžování vodních ekosystémů. Léčivé látky totiž v drtivě většině případů není schopen konzument plně vstřebat, a tak se s exkrecí dostává léčivo přes čističky odpadních vod do povrchových a podzemních vod. Ačkoliv jsou již dostupné čisticí metody pro odbourávání mikropolutantů z vody, používají se tyto způsoby výlučně pro čištění vody pitné. V čističkách vod odpadních nejsou nejnovější technologie čištění dostupné především pro svou vysokou finanční náročnost. Nejzatíženější oblasti farmaceutickými produkty jsou pod většími obcemi či městskými aglomeracemi, kde nejsou dostatečné průtoky vody pro adekvátní naředění polutantů. Populace vodních živočichů v místech zatížení znečištěnou odpadní vodou, mohou vykazovat změny v chování, problémy s reprodukcí nebo být jinak negativně vystaveny vlivu polutantů (Kvarnryd a kol., 2011; Parezanovič a kol., 2019). Farmaceuticky aktivní sloučeniny mohou mít také vliv na růst či fyziologii vodních organismů i při koncentracích relevantních danému životnímu prostředí (Arnold a kol., 2014; Saaristo a kol., 2018). Tyto látky jsou totiž navrženy tak, aby měly účinek již při nízkých koncentracích (Kaushik a kol., 2016).

Problémem nejsou pouze samotná léčiva, ale též jejich rezidua nebo metabolity. Ačkoliv nemusí mít jednotlivé sloučeniny příliš vysokou toxicitu, jejich kombinace v koktejlu chemických látek ve vodě může toxicitu výrazně zvyšovat (Backhaus, 2016).

Mezi selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu, látky proti depresi a úzkosti označované jako SSRI, se vedle dalších antidepressiv řadí také sertralin (Pages a kol., 1988). Díky běžnému užívání SSRI, anxiolytik nebo nelegálních drog jsou tyto látky hrozbou pro životní prostředí, jelikož mohou negativně ovlivňovat vodní organismy.

V současnosti existují studie zabývající se přítomností až 160 druhů léčiv ve volných nebo podzemních vodách a v půdě (Luo a kol., 2014). Některé záznamy rovněž hovoří o přítomnosti farmaceutických produktů ve vodě pitné (Mompelat a kol., 2009).

Cílem práce je zjistit možné účinky environmentálně relevantních koncentrací antidepresiva sertralinu na sociální chování sladkovodních bezobratlých, zastoupených evropsky nepůvodním druhem korýše, rakem mramorovaným (*Procambarus virginalis*) jako modelovým organismem.

2. Literární rešerše

2.1. Znečištění povrchových vod léčivy

Kvalita povrchových vod je velmi důležitá pro zachování biodiverzity a funkčnosti ekosystému (Bakker, 2012). Pokles globální biologické rozmanitosti může být zapříčiněn snižováním kvality vody a celkovým znečištěním vodních ekosystémů (Dudgeon a kol., 2006; Sehonova a kol., 2018). Mezi hlavní studované látky zodpovědné za rozsáhlé znečišťování ekosystémů patří především farmaka, pesticidy, chemická hnojiva, detergenty, petrochemikálie a plasty (Amoatey a Baawain, 2019; Yang a kol., 2017), které se staly velkým problémem posledních několika desetiletí (Luo a kol., 2014). Odbouráváním organických sloučenin mohou často vznikat mikropolutanty, což vede ke vzniku perzistentních metabolitů (Sorensen a kol., 2007).

Vážnou hrozbou pro ekosystémy na celém světě jsou farmaceuticky aktivní látky PhAC (Pharmaceutically active compounds) (Boxall a kol., 2012), stejně jako podobná skupina polutantů, léčiv a výrobků pro osobní péči PPCP (Pharmaceutical and personal care products) (Daughton a Ternes, 1999). Mezi zmiňované skupiny polutantů řadíme především látky z farmacie, jako například antidepresiva, antibiotika, antidiabetika, antihypertenziva, antiepileptika a jiné. Do PPCPs rovněž patří výrobky pro osobní péči, kam můžeme řadit například syntetické vonné látky, baktericidy nebo UV filtry (Kolpin a kol., 2002). Tyto látky pocházejí především z komunálních odpadních vod, ze kterých jdou vyčistit pouze částečně nebo velmi problematicky (Golovko a kol., 2014; Petković a kol., 2003), jelikož se postupy čištění mohou lišit v závislosti na druhu léčiva a s tím spojenými náklady na čistící proces (Luo a kol., 2014). Sladkovodní ekosystémy jsou často vystaveny různým mixům PhAC nebo jejich reziduí (Azuma a kol., 2017; Li a kol., 2011). Ekologická rizika představují vedle aktivních složek léčiv i pomocné látky, které jsou součástí farmaceutických výrobků (Silva a kol., 2014). Farmaka vstupující prostřednictvím odpadních vod do vodního prostředí mohou mít na necílové organismy vliv i při nízkých koncentracích (Huerta a kol., 2012; Santos a kol., 2010). Přítomné koncentrace znečišťujících látek ve vodním prostředí jsou často v rozmezí několika ng.l^{-1} , až do jednotek $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Luo a kol., 2014).

Stoupající trend používání léčiv a výrobků pro osobní péči může být zapříčiněn jak pokrokem ve zdravotní péči a neustálým zlepšováním v léčbě chorob, tak rovněž stárnutím populace. Vyšší užívání léčiv vede přímo ke zvyšování jejich koncentrací ve

vodním prostředí (Liu a Wong, 2013). Každý rok je odhadem vyrobeno a spotřebováno přes 100 tisíc tun léčiv a látek pro osobní péči (Corcoran a kol., 2010).

2.1.1. Cesta polutantů do životního prostředí

Nejběžnější cesta léčiv do životního prostředí probíhá po aplikaci léčivého přípravku konzumentem. Ten následně vyloučí z těla ven zbytky aktivních látek nebo jejich metabolitů spolu s močí nebo exkrementy. Ve většině případů jsou dále odváděny do čističek odpadních vod (ČOV) (Dobšíková a kol., 2015; Gomes a kol., 2017). Do vodního prostředí vstupuje prostřednictvím výtoků z ČOV kolem 80 % PPCPs. Ostatní látky mohou do vodního prostředí vstupovat prostřednictvím odpadů z živočišné výroby, průmyslu nebo díky nezákonnému odstraňování nevyužitých léčiv (Fent a kol., 2006). Vinu znečištění mohou nést v dalších případech i průsaky ze špatně zabezpečených skládek komunálního odpadu nebo exkrece produkovaná léčenými hospodářskými zvířaty (Dobšíková a kol., 2015).

2.1.2. Akumulace PPCP ve vodních organismech

Přítomnost farmaceutických látek ze znečištěné vody nebo kontaminované potravy může vést k bioakumulaci těchto látek ve vodních organismech (Zenker a kol., 2014). Distribuce léčiv v rámci rybích orgánů závisí především na faktoru biokoncentrace a bioakumulace, který je nejvyšší u orgánů s vyšším obsahem lipidů. Tím jsou především játra, jakožto primární metabolický orgán, a mozek, jako cílový orgán pro působení některých léčiv (Grabicová a kol., 2014). V rámci sledování kontaminantů v tělech ryb je důležitým faktorem cesta léčiva v rámci jejich potravy. Významným aspektem je přítomnost polutantů v nižších člancích potravního řetězce, například v bentosu (Hellmann a kol., 2013). Právě bentické organismy se často používají jako bioindikátory pro hodnocení znečištění vodního prostředí z důvodu jejich snadného odběru a omezené pohyblivosti (Clews a kol., 2014). Mezi hojně užívané indikátory kvality volných vod patří například larvy chrostíků rodu *Hydropsyche* nebo pijavice rodu *Erpobdella* (Azrina a kol., 2006; Sola a Prat, 2006).

2.1.3. Opatření proti šíření PhAC

Na základě požadavků od Evropské agentury pro léčiva se musí nové farmaceutické výrobky podrobit posouzení rizik spjatých s dopady na životní prostředí. Hodnocená expozice nového léčiva se provádí výpočtem odhadované koncentrace v životním

prostředí (tato hodnota se označuje jako PEC – predicted environmental concentration). Když hodnota PEC překročí koncentraci $0,01 \mu\text{g.l}^{-1}$, je nutné další sledování hodnoceného farmaka. Při vyšší koncentraci se vypočítává poměr mezi PEC a předpokládanou koncentrací bez účinku (PNEC – predicted no-effect concentration). Pokud je PEC / PNEC menší než 1, tak dle předpokladu nepředstavuje látka velké environmentální riziko. Když je hodnota vyšší než 1, pak je u látky předpoklad zvýšeného rizika pro životní prostředí (Parezanović a kol., 2019).

Stávající národní vodohospodářská legislativa neobsahuje limitní koncentrace pro léčiva nebo hormony. Zahrnuje pouze 45 tradičních mikropolutantů, ale ostatní látky nejsou významněji řešeny (Benáková a Wanner, 2017). Ve vyhlášce č. 437/2016 Sb. stanovující možnosti ukládání čistírenských kalů na zemědělskou půdu, nejsou hodnoty PPCPs vůbec uvedeny (Vyhláška č. 437/2016 Sb.).

2.1.4. Metody sledování polutantů

Díky rozvoji automatizovaných a citlivých analytických přístrojů na konci dvacátého století máme možnost detekovat velké množství látek. Velmi nízké koncentrace sloučenin v řádech ng.l^{-1} zjišťujeme pomocí analytického vybavení, čímž je tandemová hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie kombinovaná se spektrometrií hmotnostní nebo plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Grabic a kol., 2012).

2.1.5. Samočistící schopnost volných vod

Povrchové vody mají schopnost některé polutanty transformovat a degradovat pomocí abiotických a biotických procesů. Abiotické procesy často probíhají jako fotodegradace nebo hydrolýza, naopak procesy biotické probíhají při účasti mikroorganismů (Tixier a kol., 2003). Látky nepodléhající hydrolýze nebo látky rezistentní vůči mikrobiálnímu rozkladu mohou být transformovány účinkem světla (Fatta-Kassinos a kol., 2011). Na účinnosti fotodegradace léčiv závisí mnoho faktorů, v první řadě vlnová délka a intenzita slunečního záření, dále povětrnostní podmínky, zeměpisná šířka nebo chemické vlastnosti vody. Některé produkty vzniklé fotochemickou degradací mohou mít vyšší toxicitu než jejich původní forma (DellaGreca a kol., 2004; Miao a kol., 2015).

Důvody, proč se určité sloučeniny ve vodním prostředí rozkládají velmi pomalu nebo vůbec shrnuje Fott a kol., (1978). Jednou z možností je neexistence mikroorganismů,

kteřé by byly schopny daný polymer štěpit. V dalším případě mohou mít látky zamezen přístup k bakteriální buňce nebo mohou být navázány na makromolekulární komplexy. V případě nízkomolekulárních látek, obsahujících zanedbatelné množství energie, nemusí energetický zdroj stačit k růstu bakterií. U sloučenin strukturálně podobným enzymatickým jedům může vlivem toxicity docházet k blokaci enzymů.

2.1.6. Čištění odpadních vod

Znečištěná odpadní voda vstupuje do čističek odpadních vod (ČOV), kde prochází procesem čištění, tak aby co nejméně zatěžovala volné vody. Tato voda pochází především z domácností a průmyslu, kdy se za odpadní vodu považuje jakákoliv voda, u které se změnilo složení nebo teplota (Kalač a kol., 2010). Mezi nejčastěji hodnocené parametry odpadních vod patří $CHSK_{Cr}$ – chemická spotřeba kyslíku, BSK_5 – biochemická spotřeba kyslíku, N_{celk} – celkový dusík, $N-NH_4^+$ – amoniakální dusík, P_{celk} – celkový fosfor a NL – nerozpuštěné látky (Groda a kol., 2007). Tyto hodnoty musí při vypouštění do recipientu splňovat emisní hodnoty, dle nařízení vlády č. 401/2015 Sb., které udává emisní standardy pro vody vytékající z komunálních ČOV. Výše uvedené standardy se dělí do pěti kategorií v závislosti na sumě ekvivalentních obyvatel (EO), kdy se 1 EO rovná produkci 60 g BSK_5 za den. Pro kategorie ČOV do 500 EO a 2000 EO nejsou relevantní hodnoty P_{celk} a N_{celk} (NV 401/2015 Sb.). Konvenční ČOV mají obvykle 2 nebo 3 části čištění, mezi které patří mechanické neboli primární čištění, biologické sekundární čištění a případně terciální čištění (Kalač a kol., 2010).

2.1.6.1. Primární čištění

Odpadní voda vstupující do ČOV nejprve prochází hrubým předčištěním, kde se za pomoci jednoduchých procesů, jako je sedimentace nebo filtrace, odstraňují z vody hrubé nečistoty. Pomocí lapáku šterku nebo česlí se zachycují velké předměty, jako jsou cihly nebo velké větve (Bindzar, 2009). Voda dále putuje do usazovací nádrže s lapačem tuků, kde principem gravitace dochází k oddělení nečistot. Lehčí látky (tuky o oleje) jsou odebírány z hladiny za pomoci speciálních lapačů, přičemž lze ke zdokonalení tohoto procesu využít princip flotace neboli intenzivního probublávání vodního sloupce, kdy se na vytvořené vzduchové bubliny naváží znečišťující látky. Těžší látky klesají na dno do šterbinových nádrží, kde se usazují, a následně putují do kalového hospodářství (Černecký a kol., 2006; Dohányos a kol., 2007).

2.1.6.2. Sekundární čištění

Druhou částí čistícího procesu je biologické čištění. Zde se stabilizují organické látky a odbourávají neusaditelné koloidní látky. Celý proces má dvě části, jednotku biologickou (aktivační nádrž) a jednotku separační (dosazovací nádrž) (Hlavínek a Hlaváček, 1996). Odpadní voda vstupuje do aktivační nádrže, kde se mísí se zahuštěným aktivačním kalem, nazývaným též startovací nebo očkovací struktura, a dochází k tvorbě aktivovaného kalu (Adámek a kol., 2010). Aktivovaný kal je struktura mikroorganismu kultivující se v biologické části ČOV. Tito destruenti a konzumenti odbourávají znečišťující biologické látky v odpadní vodě. Pro zajištění dostatečného kontaktu mikroorganismů s kyslíkem a odpadní vodou jsou v aktivační nádrži instalovány provzdušňovací systémy. (Binzdar, 2009; Ismail a Yuliwati, 2010).

Dále kal spolu s odpadní vodou přitéká do dosazovací nádrže, kde dochází ke spojení biomasy do větších vloček, které následně sedimentují. Tento proces nazýváme jako bioflokulace. Dochází tedy k separaci aktivovaného kalu od vyčištěné vody. Akumulovaný kal se částečně vrací zpět do aktivační nádrže. Mezi aktivační a akumulační nádrži dochází k recirkulaci aktivovaného kalu pro udržení jeho správné koncentrace v aktivační nádrži. Přebytný kal, nazývaný též jako kal redundantní, se dále zpracovává v kalovém hospodářství (Binzdar, 2009; Groda a kol., 2007).

V kalovém hospodářství nejprve dochází ke gravitačnímu nebo strojnímu zahuštění kalu. Následně se kal anaerobně stabilizuje ve stabilizační nádrži, kde se biologicky rozkládá za vzniku metanu a oxidu uhličitého. Vzniklý bioplyn (metan) se může použít jako palivo, případně je bez dalšího využití spalován. Stabilizovaný kal se dále odvodňuje a sterilizuje nehašeným vápnem, aerobní nebo anaerobní termofilní stabilizací nebo dávkováním kyslíku. Následně lze kal využít v zemědělství při průmyslovém kompostování (Groda a kol., 2007), skládkování, hnojení nebo je spalován (Kalač a kol., 2010).

2.1.6.3. Terciální čištění

Ve třetím stupni čištění odpadních vod se odstraňuje hlavně anorganický fosfor a dusík. Fosfor se odstraňuje chemickým srážením fosforečnanů, a přidáváním železitých, hlinitých a vápenatých iontů. Druhou možností je eliminace pomocí poly-P bakterií nebo kombinace obou způsobů. Dusík se eliminuje principem autotrofní nitrifikace a denitrifikace (Kalač a kol., 2010). Pokročilé metody terciálního čištění odstraňují některé

biologicky neodbouratelné a vysoce persistentní mikropolutanty pomocí UV záření, ozonizace, membránové filtrace nebo filtrace přes aktivní uhlí. Tyto způsoby čištění lze mezi sebou kombinovat. Běžně se však v čistírenských provozech pro svou vysokou nákladovost nevyužívají (Luo a kol., 2014). Ternes a kol. (2002) prokázal, že pokročilé metody čištění v úpravárnách vody odstraňují farmaka pod detekční limity.

Ozonizace

Ozonizace může být efektivním způsobem odstraňování polutantů z vodního prostředí. Hlavními výhodami jsou neselektivita a vysoká míra degradace (Hernández-Leal a kol. 2011). Čištění probíhá buď přímo reakcí kontaminantu s O_3 nebo prostřednictvím tvorby méně selektivního a silnějšího oxidačního činidla (Gerrity a kol. 2011). Ozonizace redukuje mikropolutanty již při velmi nízkých dávkách kolem 5 mg.l^{-1} ozonu. Ne vždy však ozon redukuje sledované látky spolehlivě (Sui a kol., 2010).

UV záření a Fentonova reakce

UV záření se pro komplexní eliminaci kontaminantů často používá v kombinaci s peroxidem vodíku (H_2O_2), což obvykle zvyšuje míru eliminace polutantů (Kim a kol., 2009). Na podobném principu funguje i Fentonova reakce, která k degradaci polutantů využívá reakce peroxidu vodíku s železitými ionty za vzniku hydroxylových radikálů s vysokou oxidační schopností (Wang, 2008). Hydroxylový radikál ($OH\cdot$) reaguje s organickými látkami, zahrnující léčiva (Suárez a kol., 2008).

Chlorace

Chlorace eliminuje mikroby a oxiduje organické látky. Také může štěpit fenolické sloučeniny a tvořit vedlejší produkty z PPCPs látek a pesticidů (Westerhoff a kol., 2005). Při nižších dávkách kolem 2 mg.l^{-1} je chlorace z hlediska odstranění mikropolutantů neúčinná (Sim a kol., 2010). Naopak vyšší dávky chloru v kombinaci s nižším pH pod hodnotou 7 úspěšně eliminují větší množství sledovaných polutantů (Westerhoff a kol., 2005).

Membránové procesy

Nanofiltrace a reverzní osmóza mohou do určité míry eliminovat mikropolutanty pomocí zadržení látek bariérou. Tyto procesy čištění poháněné tlakem mají v odstraňování mikropolutantů vyšší účinnost než mikrofiltrace a ultrafiltrace, jelikož

disponují mnohem těsnějšími strukturami. Nicméně jsou i tyto membrány v určité míře propustné pro menší mikropolutanty (Steinle – Darling a kol., 2010).

Aktivované uhlí

Aktivované uhlí je využíváno v úpravách pitné vody, přičemž se jeho uplatnění rozšiřuje i pro adsorpci PPCPs látek z odpadních vod. Využívá se ve dvou formách, jako práškové aktivní uhlí a granulované aktivní uhlí (Liu a kol., 2009). Obě formy dokážou z vody úspěšně eliminovat mikropolutanty, nýbrž při použití granulovaného aktivního uhlí je zapotřebí větší dávka pro zachování účinného odstranění PPCPs (Meinel a kol., 2015).

Iontové procesy

Iontové procesy jsou založené na výměně kationtů a aniontů v kapalném prostředí za kationty a anionty v pevném sorbentu (Choi a kol., 2007). Jako iontoměničové membrány jsou nejčastěji využívány polymerní akrylové a styrenové pryskyřice (Dickert, 2007).

2.2. Antidepressiva

Antidepressiva jsou léky používané především pro léčbu příznaků deprese. Další indikace antidepresiv mohou být například úzkostné poruchy, mezi které patří sociální fobie, panická porucha, agorafobie, obsedantně kompulzivní porucha (OCD) , posttraumatická stresová porucha (PTSD) a generalizovaná úzkostná porucha (GAD). Antidepressiva se mohou rovněž užívat při chronických bolestech, nespavosti nebo u poruch příjmu potravy (Fujáková a Kopeček 2012).

Mechanismus působení je u převážné většiny antidepresiv účinek na serotoninergní neurotransmitterové systémy a dysfunkční noradrenergické systémy. Propojenost systémů potvrzuje studie Heningera a kol. (1996), kdy se pacienti při léčbě selektivními inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) obvykle horšili po experimentálním deficitu serotoninu, přičemž u pacientů odpovídajících na inhibitory zpětného vychytávání noradrenalinu se stav po depleci katecholaminů náhle zhoršil. Principem monoaminové teorie deprese je, že depresivní příznaky vznikají na základě centrálního nedostatku jednoho nebo obou neurotransmiterů serotoninu a noradrenalinu (Doogan a Caillard, 1988).

Tab. č. 1.: Spotřeba antidepresiv v roce 2015 ve vybraných zemích Evropské unie.

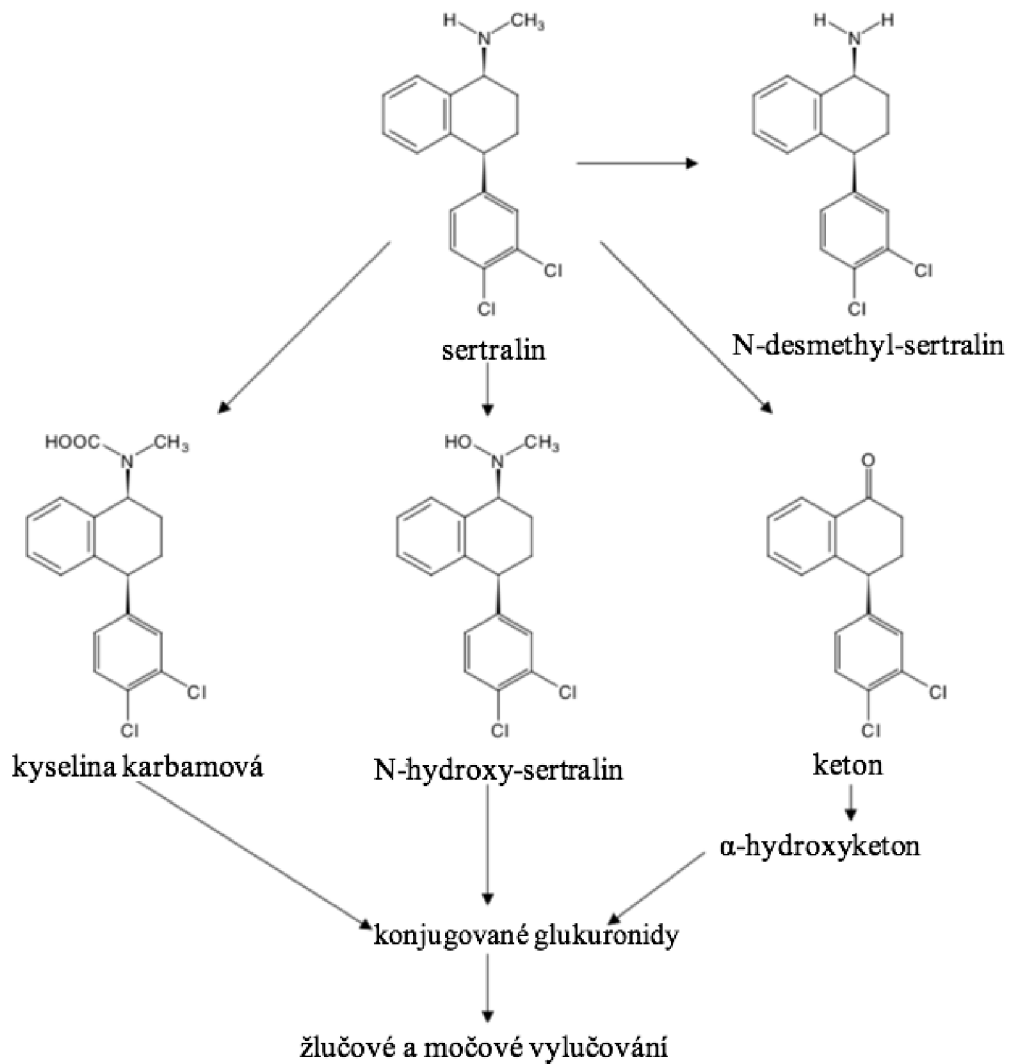
Počet obyvatel (OSN, 2015), počet dávek antidepresiv na 1 000 obyvatel (OECD, 2017), denní spotřeba antidepresiv na 1000 obyvatel v mg, jedna dávka stanovena na 50 mg (Clinicians ultimate guide, 2018). PO (mil) – počet obyvatel v milionech; DA (n) – počet dávek antidepresiv na 1 000 obyvatel; SA (mg) – denní spotřeba antidepresiv na 1 000 obyvatel v miligramech; SSA (kg) – množství spotřebovaných antidepresiv na 1 000 obyvatel k kilogramech; TSA (t) – celkové množství spotřebovaných antidepresiv v tunách.

Stát	PO (mil)	DA (n)	SA (mg)	SSA (kg)	TSA (t)
Litva	2,897	12,3	615	0,224	0,65
Estonsko	1,314	24,8	1240	0,453	0,60
Maďarsko	9,872	28,3	1415	0,517	5,10
Slovensko	5,424	40	2000	0,730	3,96
Nizozemsko	16,896	45,1	2255	0,823	13,91
Itálie	59,793	46,5	2325	0,849	50,76
Řecko	10,977	48,1	2405	0,878	9,64
Francie	64,259	49,8	2490	0,909	58,41
Lucembursko	0,562	53,7	2685	0,980	0,55
Česko	10,542	55	2750	1,004	10,58
Německo	80,667	56,4	2820	1,029	83,01
Slovinsko	2,066	56,8	2840	1,037	2,14
Rakousko	8,530	60,3	3015	1,100	9,38
Finsko	5,491	68,2	3410	1,245	6,84
Španělsko	46,189	73,1	3655	1,334	61,62
Dánsko	5,658	77	3850	1,405	7,95
Belgie	11,263	78,3	3915	1,429	16,10
Švédsko	9,741	92,5	4625	1,688	16,44
Velká Británie	64,525	94,2	4710	1,719	110
Portugalsko	10,375	95,1	4755	1,736	18,01
Celkem	427,041	1 155,5	57 775	21,089	485,65

2.2.1. Sertralin

Sertralin je derivátem naftylaminu, který selektivně inhibuje zpětné vychytávání centrálního serotoninu. Poločas rozpadu je přibližně 25 až 26 hodin. Léčivo je tedy ideální podávat jednou denně (Doogan a Caillard, 1988). Vrcholové plazmatické koncentrace dosahuje u lidí po 4 až 8 hodinách (Pages a kol., 1988).

Po absorpci prochází sertralin rozsáhlým metabolismem v játrech (obr. č. 1.), nejprve prostřednictvím demetylace na demethyl-sertralin. Ten se následně oxidativně deaminuje na demethyl-sertralin keton, který se podrobuje hydroxylaci na α -hydroxy keton a alkohol (Doogan a Caillard, 1988). Původně byl sertralin určen pro léčbu závažné depresivní poruchy, nyní se jím léčí i panická porucha, posttraumatické stresové poruchy nebo obsedantně-kompulzivní poruchy (De Vane a kol., 2002). Výhody sertralinu a dalších SSRI přípravků je dobrá snášenlivost a relativní bezpečnost při předávkování (Grimsley a Jann, 1992).



Obr. č. 1: Metabolické dráhy sertralinu (převzato a upraveno, De Vane, 2002; Tremaine a kol., 1989; Warrington, 1992).

Sertralín má tendenci akumulace v těle necílových organismů. Při použití BAF (bioaccumulation factor) ≥ 500 lze sertralín označit jako bioakumulativní sloučeninu. Vedle orgánů s největší tendencí akumulace, v játrech a ledvinách, by sertralín detekován i v mozku necílových živočichů (Grabicová a kol., 2017).

2.3. Komunikace a sociální chování u raků

Pro pochopení chování organismů je velmi důležité znát jejich komunikaci a příjem signálů (Moller a Milinski, 1998). Komunikace mezi zvířaty hraje velmi důležitou roli například při výběru partnera a reprodukci. Pro vzájemnou komunikaci používají mnoho signálů ohledně jejich stavu, identity, nálady, polohy apod. (Bradbury a Vehrencamp, 1998). Živočichové vnímají prostředí pomocí vyvinutých smyslů, které z prostředí získávají speciální informace (Atema 1988). Korýši, a především raci jsou využíváni jako modelové organismy z důvodu jejich celosvětového rozšíření (Briffa, 2013). Sladkovodní druhy raků mají vysokou úroveň sociální interakce v laboratoři i v terénu (Gherardi, 2002), což je v experimentálních podmínkách značnou výhodou. Raci se vyskytují v mnoha typech stanovišť a vykazují široké spektrum vzorců chování. Jsou to ekologicky, fyziologicky i behaviorálně zajímavé organismy, u kterých je známá přirozená distribuce a rozšíření do nových oblastí (Souty-Grosset a kol., 2006). Vysokou schopnost adaptace na nové prostředí dokazuje dlouhodobé přežití raků čeledi *Astacidae* v brakických vodách (Holdich a kol., 1997) nebo přezimování teplomilných druhů raků ve studených vodách chladných lokalit (Veselý a kol., 2015). I díky těmto schopnostem jsou některé druhy raků řazeny mezi invazivní a představují značnou hrozbu pro sladkovodní biotopy (Crandall a Buhay 2008). Raky můžeme nalézat vedle tradičních vodních stanovišť i v podzemí. Jejich schopností je rovněž vytvářet nory, sloužící především jako úkryt (McMahon a kol., 2005).

2.3.1. Senzorický systém

Prostřednictvím svých smyslů udržují zvířata s prostředím nepřetržitou interakci. Jejich smyslové orgány se dokážou adaptovat na příjem určitých informací, které jsou charakteristické pro jejich životní prostředí. Smyslové orgány zvířat mají schopnost rozlišovat podněty pocházející z jejich habitatu (Atema, 1988). Korýši disponují senzorickým systémem interoreceptorů a exteroceptorů, pomocí jichž přenášejí důležité informace z vnějšího i vnitřního prostředí do centrálního nervového systému. Interoreceptory předávají informace o poloze a pohybu těla. Chemoreceptory a baroreceptory zajišťují dohled nad chemickým stavem tělesných tekutin a krevního tlaku. Exteroceptory zachycují vnější podmínky dopadající na povrch těla z dálky, jako například zvuky, světla, vůně nebo hydrodynamické poměry (Brusca a Brusca, 2003).

2.3.2. Komunikace

Vzájemné interakce organismů se odvíjí od vhodného sociálního, sexuálního a obranného chování. Tato komunikace je důležitá pro sociální soužití, výběr partnera nebo včasné varování před nebezpečím (Gherardi, 2002). V tomto procesu přenosu informací odesílatel (organismus) vytvoří signál pro jednoho nebo skupinu příjemců. Signál se dle schopností odesílatele či smyslovým vybavením příjemce přenáší pomocí akustických, optických, čichových nebo hmatových kanálů (Bradbury a Vehrencamp, 1998). Příjemce pomocí smyslových orgánů zachycuje a dekoduje signál. Následně se informace odesílají do nervového systému, kde se dále zpracovávají (Vogt, 2002). Vysílaný signál v biologické komunikaci obecně připravuje účastníky přenosu informací na nové okolnosti, kterými mohou být výzvy ke spolupráci nebo naopak interakce (Schaller, 1978). Příjem signálu se jak mezidruhově, tak v rámci jednoho druhů může lišit. Současně mohou komunikační signály přijímat i necílové organismy, například predátoři, paraziti, kořist nebo potencionální rivalové (Brandley a kol., 2013). Předpokladem v biologické komunikaci je, že by z výměny informací měl těžit jak příjemce, tak odesílatel. Ten však může nastávající situaci špatně vyhodnotit a nesprávně kódovat signál (Bradbury a Vehrencamp, 1998).

K vizuální komunikaci používají raci dobře vyvinutý systém zahrnující složené oči umístěné na dvou očních stopkách (Vogt, 2002). Výhodou vizuálního systému je správné určení polohy nebo detekce pohybu (Veselovský, 2005). Přenos vizuálních signálů závisí na vzdálenosti, možných nerovnostech terénu, intenzitě světla nebo na dalších vizuálních podmínkách daného prostředí, jako je například zákal vody (Bradbury a Vehrencamp, 1998). Někteří živočichové si na těle vytvořili barevné ornamenty a vzory pro rozpoznání partnerů a známých jedinců v rámci jednoho druhu. Toto je velmi podrobně popsáno u krabů (Cummins a kol., 2008) nebo krevet (Schein 1977). U raků bylo zaznamenáno rozpoznání „obličejů“ u jejich předchozích oponentů (Van der Velden a kol., 2008).

Akustické signály a vibrace zachytávají raci pomocí speciálních chloupků na klepetech nebo jsou snímány dalšími mechanoreceptory. Pomocí mechanoreceptorů může být raky vnímáno i proudění vody, její vibrace nebo gravitace (Vogt, 2002). Přenos akustického signálu ve vodním prostředí záleží na výšce frekvence, intenzitě okolního hluku nebo na jak velkou vzdálenost je signál přenášen. Při produkci zvuku záleží především na tvorbě vibrací nesoucích specificky kódovanou informaci, modifikaci

vibrace pro její zachycení mechanoreceptory a spojení vibrací s prostředím, kde je zvuk šířen (Bradbury a Vehrencamp, 1998).

Velký význam má rovněž komunikace hmatová, kterou bezobratlí používají pro orientaci, rozlišení objektů nebo v rámci vzájemných doteků při sociální interakci (Alcock, 2001). Zprostředkovateli hmatových vjemů jsou antenuly a antény, které disponují mechanosenzory a chemosenzory (Vogt, 2002).

Komunikace na chemické bázi je u vodních živočichů hojně používaná a zároveň dobře vyvinutá (Wyatt, 2011). Díky podmínkám zachycených čichovými receptory se organismy ve vodním prostředí mohou specificky rozhodovat, například pro útěk, boj nebo páření. Současně specifické signály ovlivňují dominanci v hierarchii. Pachy vnímané chemickými receptory využívají korýši při hledání potravy (Hay, 2011). Chemická komunikace pomocí feromonů je druhově specifická a může mít teritoriální, poplašnou nebo sexuální funkci (Bradbury a Vehrencamp, 1998). V období rozmnožování vylučují samice raků specifické chemické pachy v moči, které následně rozpoznávají samci a zahajují tak námluvy (Berry a Breithaupt, 2010).

2.3.3. Sociální chování

Za důležitý aspekt v rámci sociálního chování považuje Manning a Dawkins (2012) snahu jednotlivce manipulovat s dalšími organismy pro získání určité konkurenční výhody.

Sociální chování u raků může být odlišné dle pohlaví zejména v aktivitách, jako je péče o potomstvo nebo reprodukční chování (Bradbury a Vehrencamp, 1998). Samice raků mají juvenilní ráčata přichycena na pleopodách a stálými pohyby je očišťují a zajišťují dostatek kyslíku (Vogt, 2013). Samci se naopak vůči mláďatům chovají agresivně a mohou je i cíleně lovit (Mathews, 2011). Agresivní chování je nýbrž běžné u všech věkových kategorií raků: Charakteristické je u konfliktů o potravu, úkryt, stanoviště nebo v období páření (Gherardi, 2002). Před přímou konfrontací korýši často používají vizuální nebo chemické signály pro zastrašení rivala, čímž se snaží vyhnout možným rizikům z případného souboje (Breithaupt a Thiel, 2011), jako je ztráta energie, poranění, smrt, ale také vystavení riziku predace během přímého konfliktu (Payne, 1998). V rámci určité populace živočichů je důležitá dobře fungující hierarchie, která obecně předchází možným konfliktům a zajišťuje bezpečnost jednotlivců (Manning a Dawkins, 2012). Založena je především na dominanci. Tu určuje síla jedince, velikost, pohlaví, ale

také sociální schopnosti jedince, například manipulace s ostatními nebo rozpoznání ostatních členů skupiny (Fero a Moore 2014).

Raci jsou ve volné přírodě především samotáři a teritoriální zvířata (Vogt, 2013). Hierarchie funguje v rámci teritorií, kdy dominantnější jedinci zaujímají teritoria u potravních zdrojů a vhodných partnerů (Fero a Moore, 2014). Se vzrůstající konkurencí o podstatné zdroje roste i predáční riziko a kanibalismus (Figler a kol., 1999). Souboje o dominanci a partnera se vyskytují rovněž u samičího pohlaví, nicméně nejsou tak časté jako u opačného pohlaví (Jennions a Petrie 1997). Sociální interakce probíhají i mezidruhově, a to především v rámci původních a nepůvodních druhů, kdy nepůvodní druhy často vykazují vyšší agresivitu a dominanci. To jim umožňuje ovládat prostředí na úkor původních méně agresivních druhů. V Evropě takto často dominuje rak signální, který se vyznačuje vyšším odhodláním a intenzitou při soubojích o stanoviště (Hudina a Hock, 2012).

2.4. Rak mramorovaný

Před výskytem raka mramorovaného *Procambarus virginalis* v přírodních biotopech byl tento rak známý pouze jako dekorativní rak v zájmových akvaristických chovech (Souty-Grosset a kol., 2006). Pro jeho snadný chov, atraktivní zbarvení, minimální nároky na prostředí se stal pro akvaristy velmi oblíbeným korýšem (Martin a kol., 2007). Původní areál rozšíření raka mramorovaného není znám. Vogt a kol., (2015) uvádí, že rak mramorovaný je triploidním potomkem sexuálně se rozmnožujícího raka klamavého *Procambarus fallax* (Hagen, 1870) původem z amerických států Georgia a Florida. Lyko, 2017 označil raka mramorovaného *Procambarus virginalis* za samostatný druh.

Raci mramorovaní jsou jedineční svým způsobem rozmnožování, kdy samotná samice dokáže založit fungující populaci. Tento druh reprodukce nazýváme jako apomiktická partenogeneze (Martin a kol., 2007). Při tomto velmi jednoduchém procesu partenogeneze dojde k potlačení meiózy, a pomocí mitózy se produkují diploidní neoplozená vajíčka. Potomci jsou tedy geneticky identické klony jejich matky (Stenberg a Saura, 2009), a tím pádem celé populace tohoto druhu. S ohledem na životní strategii tohoto druhu, samci v rámci druhu neexistují (Seitz a kol., 2005).

Velikost raka mramorovaného je obvykle kolem 10 cm, v ojedinělých případech více. Rak mramorovaný (obr. č. 2) je oproti ostatním druhům raků krátkověký. V řízených podmínkách se obvykle nedožívá více než 2 až 3 let, přičemž smrt nastává většinou při nezdařilém svlékání (Vogt a kol., 2004; Vogt, 2010). Už podle názvu můžeme odvodit jasné mramorované zbarvení, které je znatelné především na bocích hlavohrudí. Hlavohruď s jedním párem postorbitálních lišt má hladký povrch. Za týlní brázdou je malé množství trnů. U raka mramorovaného je výrazné rostrum bez střední rýhy, která je běžná u jiných druhů raků. Klepeta jsou malá, slabě zrnitá a na svrchní straně mramorovaná. Zápěstí obou klepet disponuje vyvinutým trnem, který se nachází na jejich vnitřní straně (Holdich a kol., 2006). Již po půl roce života dosahuje pohlavní dospělosti (Seitz a kol., 2005). Za příznivých podmínek se může rozmnožovat v průběhu celého roku v intervalu přibližně 8 až 9 týdnů. Inkubační doba je u raka mramorovaného asi 21 dní při ideální teplotě vody 21 °C. V laboratorních podmínkách se plodnost pohybuje v rozmezí 50 až 150 vajíček o velikosti cca 1,7 až 1,9 mm. Tento druh raka je vysoce přizpůsobivý a nenáročný na prostředí. Snáší nízké teploty pod 8 °C a vysoké teploty nad 30 °C i po dobu několika týdnů až měsíců (Holdich a kol., 2006, Gutekunst a kol., 2018). Kaldre a kol. (2012) uvádí, že někteří jedinci dokážou přežít zimní období i v nádržích,

kteře částečně zamrzají. V takovém případě však dojde k zastavení reprodukce a zvýšení mortality.



Obr. č. 2: Rak mramorovaný (*Procambarus virginalis*), foto autor

Od roku 2015 je podle nařízení Evropského parlamentu a Rady EU č. 1143/2014 o prevenci a regulaci zavlékání, vysazování a šíření invazivních nepůvodních omezen prodej a manipulace s rakem mramorovaným. Tato omezení však nemusí být dostatečná, jelikož jsou raci stále chováni mezi akvaristy. Chovatelé ve většině případů neznají důvody zákazu vlastnictví některých druhů živočichů, stejně jako neznají možné důsledky a rizika biologických invazí (Patoka a kol., 2018). Největším problémem spjatým s rozmachem nepůvodních druhů raků v Evropě je zavlečení račieho moru, což zapříčiňuje úbytek původních druhů raků (Holdich a kol., 2009). Vedle v Evropě již etablovaných druhů, raka pruhovaného a raka signálního (Chucholl a kol., 2008), je do budoucna potencionálně nejnebezpečnější právě rak mramorovaný, především díky svému snadnému a rychlému rozmnožování (Hossain a kol., 2018).

První záznamy o výskytu raka mramorovaného v Evropě jsou z roku 2003, konkrétně z Německa (Marten a kol., 2004), o rok déle v Nizozemí (Soes a van Eekelen, 2006). Při monitoringu etablované populace invazivního raka červeného *Procambarus clarkii* v Itálii, byli objeveni i jedinci raka mramorovaného (Marzano a kol., 2009). Záznamy hovoří o nálezích dokonce i na izolovaném Madagaskaru (Jones a kol., 2009). Již plně

prosperující populace byly nalezeny v roce 2010 na Slovensku (Jánský a Mutkovič, 2010), v Německu (Martin a kol., 2010) nebo v Japonsku (Kawai a Takahata, 2010). Bohman a kol. (2013) objevil raky mramorované i v chladném prostředí švédské řeky. Další nálezy populací jsou v Chorvatsku (Samardžić a kol., 2014) nebo Maďarsku, kde prosperující populaci zaznamenali v termálním jezeře Hévíz (Lökkös a kol., 2016). V České republice o nálezech dvou populací píše Patoka a kol. (2016). V prvním případě byli raci mramorovaní pozorováni v soustavě parkových jezírek v Praze. Další populace byla nalezena v umělé nádrži poblíž severočeského města Bíliny. V obou případech raky do nádrží s největší pravděpodobností vypustili nezodpovědní akvaristé.

2.5. Testy toxicity

Toxikologické testy jsou významné pro snížení dopadů rizik spjatých s vypouštěním odpadních vod do vodních recipientů nebo dalšího vstupu chemických a jiných cizorodých látek do životního prostředí. Znalost účinků kontaminujících látek na vodní organismy se jeví jako důležitý indikátor pro posouzení stavu sledovaného prostředí (Hon, 2013). Většina chemických látek používaných v Evropě podléhá testům toxicity. Pomocí těchto testů sledujeme, zda není riziko vstupu látky do životního prostředí větší než samotný kladný přínos pro lidstvo. Environmentální rizika posuzují testy zaměřené především na změny chování vodních organismů, odlišnosti v běžném chování nebo procentuální úmrtnost sledovaných organismů. Živočiškové jsou vystaveni určité látce nebo koktejlů látek nejčastěji v environmentálně relevantní koncentraci, tedy odpovídající koncentraci polutantu běžně naměřené ve vodním prostředí. Pro možnost porovnání výsledků je důležité zachování jednotného postupu napříč laboratořemi. K tomu slouží standardizované metodiky na úrovni mezinárodních organizací, např. Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) a Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) (Svobodová a kol., 2010a).

Testy toxicity dělíme většinou podle doby expozice na testy akutní, kdy jsou organismy exponované v řádu několika minut až hodin. Dále na testy subchronické a chronické, u kterých může trvat expozice až několik měsíců. Testy mohou být děleny rovněž podle koncentrace sledované látky nebo druhu testovaných zvířat (Knejzlík a Ruml, 1999). Většina biotestů je zaměřena na přímé studování účinků látek. Používají se však i testy zaměřené na jiné projevy organismu, například testy trofie nebo enzymatické aktivity (Kočič a Mocová, 2009).

Toxicitu látek může ovlivňovat mnoho faktorů. Důležitá je především koncentrace sledované sloučeniny nebo doba po kterou působí. Mezi další faktory patří děje ovlivňující fyziologický stav modelového organismu, jako například přísun živin, teplota nebo osvětlení (Knejzlík a Ruml, 1999). Významný efekt na toxicitu látky mají rovněž biotické a abiotické faktory prostředí. Vyšší teplota prostředí obecně zrychluje chemickou reakci, naopak nižší teploty je mohou zpomalit. Tento efekt může mít pozitivní i negativní dopady. Další faktory, na které je třeba brát během testování zřetel, jsou množství kyslíku ve vodě nebo intenzita osvětlení, což má vedle vlivu na aktivitu organismů také dopad na rozkladné procesy toxických látek (Svobodová a kol., 2010b).

V rámci provádění ekotoxikologických testů se používají dva druhy testování. Testování přímo na modelových zvířatech nazýváme *in vivo* testy, naopak pokusy na buňkách či živočišných tkáňových kulturách nazýváme pojmem *in vitro*. Výhodou *in vitro* testů jsou zvláště nízké finanční náklady, rychlost vyhodnocení působení látky, možnost použití lidských buněk nebo etické hledisko. V mnoha případech se však bez *in vivo* testů na živých organismech neobjedeme (Knejzlík a Ruml, 1999).

2.5.1. Toxicita PPCPs

Převážně se u léčiv a drogistických výrobků nepředpokládá akutní toxicita, nýbrž toxicita chronická (Petrović a Barceló, 2007). Velké množství těchto látek se vyznačuje vysokou biologickou aktivitou, což může mít vliv na necílové vodní organismy i při nízkých koncentracích (Gunnarsson a kol., 2008). Důležitá je z hlediska toxického účinku interakce PPCPs s jinými sloučeninami, synergismus metabolitů PPCPs nebo produkty rozkladu (Kumar a Xagorarakí, 2010).

Pro výzkum efektů léčiv a chemikálií pro osobní péči se nejčastěji používají akutní nebo chronické testy toxicity. Různé účinky a chemické vlastnosti PPCPs mohou vykazovat odlišné následky na vodní organismy. Nejčastěji se pro tyto testy využívají vodní živočichové, například pstruh duhový *Oncorhynchus mykiss* nebo hrotnatka velká *Daphnia magna*. Za limitující faktory považujeme hlavně koncentraci látky, dobu expozice, odezvu organismu či přítomnost jiné chemické sloučeniny (Petrović a Barceló, 2007).

2.5.2. Využití raků jako modelových organismů

Raci i ryby se podobně jako další vodní organismy řadí mezi poikilotermní živočichy, tedy organismy, u kterých tělesná teplota a další fyziologické procesy závisí na teplotě prostředí. Rozdíl poikilotermních živočichů od endotermních živočichů, například savců, není jen odlišná schopnost udržovat tělesnou teplotu. U raků pozorujeme rozdílné vstupy xenobiotik do organismu – branchiální (přes žábry), transdermální (přes kůži) a perorální (trávicím traktem). Specifická je u raků rovněž toxikodynamika, tedy mechanismus působení látky v organismu, nebo toxikokinetika, tedy osud látky v těle organismu (Velíšek a kol., 2014).

Myšlenkou nahrazení pokusných zvířat nižšími organismy v ekotoxikologických testech se pojí projekt autora Williama Russela zvaný 3R, z anglického replacement, reduction, refinement (v překladu výměna, zmenšení a upřesnění). V praxi to znamená, co nejméně využívat vyšší organismy a nahrazovat je nižšími, nebo jinými alternativními metodami. Dále je brán zřetel na snižování počtu testovaných zvířat, případně zmírnění bolesti, stresu a utrpení pokusných organismů během experimentu (Russel a Burch, 1959; Flecknell, 2002).

Nejen díky genetické uniformitě celosvětové populace se stal rak mramorovaný velmi oblíbeným modelovým organismem (Martin a kol., 2007). Jeho předností v laboratorním prostředí je především partenogenetický způsob rozmnožování, který má vedle absence partnera při rozmnožování výhody i v unisexuality, tedy eliminaci odlišného chování samců a samic (Vogt a kol., 2004). Rak mramorovaný je rovněž vhodný pro chov, což potvrzuje rychlá reprodukční schopnost, možnost rozmnožování po celý rok, snadná kultivace, nenáročnost při manipulaci nebo snadné přizpůsobení v rámci různých životních prostředí. Vyniká i svou menší velikostí, vyšší plodností nebo délkou života srovnatelnou s dalším běžně užívaným laboratorním organismem dániem pruhovaným (*Danio rerio*). (Vogt, 2008; Martin a kol., 2007; Kawai a kol., 2015). Navzdory jeho genetické uniformitě vykazují jedinci prvky variability v růstu, reprodukci, zbarvení nebo délce života i ve stejných podmínkách chovu (Vogt, 2008).

3. Metodika

Experiment probíhal v průběhu července až srpna 2020 v laboratoři Experimentálního rybochovného pracoviště (Model), který je součástí Fakulty rybářství a ochrany vod při Jihočeské univerzitě. Zde proběhla vnitrodruhová interakce testovaných raků v kontrolovaném prostředí. Vyhodnocení pozorovaného chování bylo provedeno sledováním a zaznamenáváním změn dle natočených videozáznamů. Hlavním cílem experimentu bylo pozorování změn v chování kontrolních a exponovaných raků na přítomnost antidepresiva sertralin. Zásobní roztok zmiňovaného antidepresiva byl odborně připraven pracovníky Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického (VÚRH), tak aby odpovídal po naředění stařenou vodou environmentální koncentraci sertralinu ($1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) zaznamenané v tekoucích vodách zemí střední Evropy (Fedorová a kol. 2014, Grabicová a kol., 2015).

3.1. Příprava expozice

Pro účel experimentu byli použiti jedinci raka mramorovaného, kultivovaní v laboratorních podmínkách v akvaristické odchovně na Modelu. Testovaní jedinci byli pro experiment selektováni dle fyzických parametrů. Všichni raci byli váženi, byla měřena délka hlavohrudi a kontrolována tělesná znevýhodnění (ztráta klepet, kráčivých nohou či jiného viditelného poškození), které by umožnilo v následných interakcích zlepšení situace pro kontrolního nebo exponovaného jedince.

Raci byli po selekci uloženi do plastového boxu (190x140x75 mm) s krytem o objemu 1,25 l, opatřeného specifickým kódem. Tyto kódy byly nápomocné k dohledání konkrétních jedinců v průběhu expozice a párování raků pro vzájemné interakce. Celkem bylo vybráno na 300 jedinců, kteří byli rovnoměrně rozděleni do dvou skupin. Jedna skupina byla v plastových boxech exponována v 0,5 l odstáté pitné vodě s environmentální koncentrací ($1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) sertralinu. Druhá skupina měla poskytnutou vodu bez příměsí zkoumaného farmaka, tedy stařenou pitnou vodu. Teplotní a světelné podmínky byly pro obě skupiny stanovené v poměru 12D:12N hodin, zatímco teplota v místnosti měla konstantních 21 °C. Expozice testovaných raků probíhala celkem po dobu 21 dní, a to z důvodu delšího mechanismu účinku sertralinu. V průběhu expozice docházelo k výměně vody u obou testovaných skupin každých 24 hodin, včetně výměny čerstvé environmentální dávky zásobního roztoku do vody určené pro expoziční skupinu.

Všichni testovaní raci byli v průběhu experimentu krmeni *ad libitum* frakcí Sera Granugreen, Sera, Heinsberg, Německo.

Během expozice experimentálních zvířat byly rovněž pravidelně odebírány vzorky vody, a to v nepravidelných termínech, z důvodu výpomoci více zainteresovaných osob v průběhu experimentu. Vzorky vody byly následně poslány na rozbor do laboratoře VÚRH pro vyhodnocení koncentrace rozpuštěného farmaka ve vodě čerstvě namíchané (SerT₀; KonT₀) a ve vodě po 24 hodinách (SerT₂₄; KonT₂₄).

3.2. Rozdělení raků

Na konci expoziční doby (21 dní) byli raci roztríděni dle jejich parametrů do tzv. dyád, přičemž se jednalo o dvojici raků, kteří spolu interagují v rámci jedné arény. Třídění raků proběhlo pomocí výše specifických kódů na plastových boxem, pro schopnost etablovat raky dyád dle velikosti a skupiny.

Pravidlo parametrů dyád činilo – do 5 % rozdílu váhy mezi jedinci považované za stejně velké a – od 10 % do 20 % rozdílu váhy mezi jedinci považované za většího a menšího oponenta. V úmyslu dosáhnout co nejpřínosnějších výsledků z našeho experimentu jsme utvořili celkem 7 různých skupin dyád:

- dva stejně velcí kontrolní jedinci
- dva stejně velcí exponovaní jedinci
- stejně velký kontrolní jedinec vs. stejně velký exponovaný jedinec
- větší kontrolní jedinec vs. menší kontrolní jedinec
- větší exponovaný jedinec vs. menší exponovaný jedinec
- větší kontrolní jedinec vs. menší exponovaný jedinec
- větší exponovaný jedinec vs. menší kontrolní jedinec

3.3. Monitorování chování

Pro etologickou část experimentu byl použit modifikovaný aparát dle Kubec a kol. (2019), který prezentuje oválná plastová aréna (600 x 400 mm, vodní hladina 100 mm) s dvojicí odstranitelných úkrytů a vrstvou jemného písku pro efektivnější pohyb v plastové aréně. Aréna byla napuštěna stařenou pitnou vodou (stejná jako u kontrolní skupiny) bez příměsí testovaného farmaka. Spárování raci byli vloženi do předem připravených úkrytů z průhledných potravinových plastových krabiček. Pro zklidnění a

aklimatizaci před spuštěním experimentu byli raci těmito krabičkami překryti po dobu 5-ti minut před interakčním experimentem. Po uplynutí zmíněné periody byly úkryty odstraněny a bylo spuštěno nahrávání pohybu raků po aréně. Každá dyáda byla pozorována po dobu 15-ti minut, pak došlo k ukončení nahrávání, uložení raků do jejich boxů a výměně vody v aréně. Kontrolní i exponovaní raci byli použiti pro účely experimentu pouze jednou, aby nedocházelo k pseudo-replikacím. Konstantní teplotu vody během monitorování interakcí, která byla stanovena na stejnou hodnotu jako během expozice, zajišťovalo klimatizační zařízení. Monitorování experimentu proběhlo pomocí videokamery Sony HDR-CX240, Sony, Japonsko.

3.4. Vyhodnocení interakcí

Tab. č. 2: Značení etologických interakcí sledovaného druhu raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) v kontrolní a exponované skupině včetně značení pro vyhodnocení diplomové práce. Modifikace dle (Karavanich a Atema 1998). RE – únik/útěk raka; 0 – volně se pohybující rak; NOFYC – interakce bez fyzického kontaktu; INIT – iniciace souboje; AGG – agresivní chování.

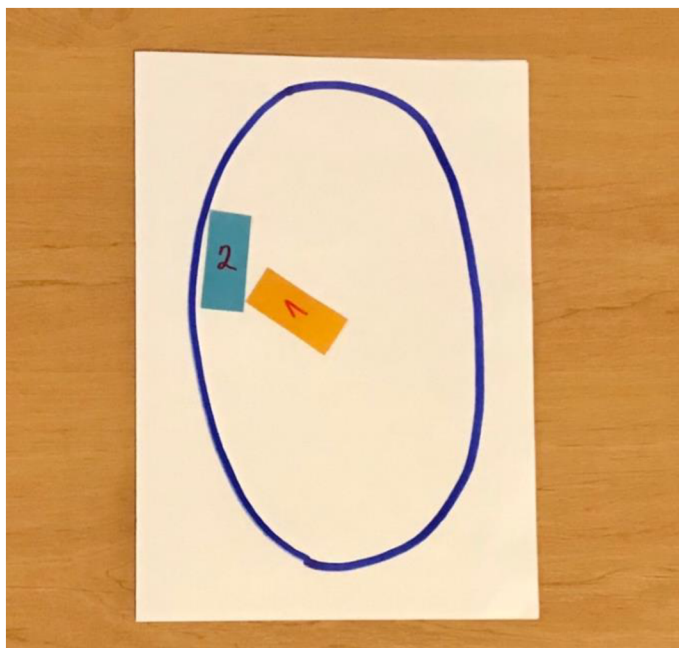
Označení	Interakce	Popis interakce	DP
-2	Únik	Rychlá chůze dozadu/pryč, úskok/únik kmitáním ocasu.	RE
-1	Vyhýbání se	Pomalá chůze dozadu/pryč, odvrácení od protivníka.	RE
0 -	Bez aktivity	Raci oddělení bez aktivního pohybu.	0
0 +	Aktivita	Aktivní pohyb bez interakcí.	0
1	Aktivita do vzdálenosti jedné délky těla raka (bez fyzického kontaktu)	Otočení směrem k soupeři. Pomalé přibližování k soupeři. Pronásledování soupeře. Tváří v tvář soupeři.	NOFYC
2	Výhružné chování (bez fyzického kontaktu)	Zvednutí přední části těla. Tleskání klepety. Zvednutí klepet nahoru.	NOFYC
3	Fyzický kontakt (klepeta nebyla použita k uchopení soupeře)	Dotek anténami. Dotek/tlačení klepety. Boxování klepety Cvakání/stříhání klepety.	INIT
4	Fyzický kontakt (klepeta použita k uchopení soupeře)	Uchopení soupeře klepety.	AGG
5	Neomezené použití klepet	Nejvyšší stupeň agresivity. Neomezené agresivní chování, zatímco se soupeř nebrání.	AGG

Vyhodnocení získaných videozáznamů proběhlo dle vizuálního posouzení interakcí sledovaných párů raků. Interakce byly posuzovány na základě výše uvedené tabulky, kdy bylo zaznamenáváno 9 odlišných interakcí. Vždy se vyhodnocovala každá aréna zvlášť. Sledované hodnoty byly zapisovány do tabulky v MS Excel. Pro každé video se uvedl název, číslo vyhodnocované arény a čas začátku sledování interakcí. Dále se postupně zaznamenávalo časové rozmezí interakce spolu s jejím označením, a to pro každého raka individuálně.



Obr. č. 3: Dvojice raků v arénách, foto autor

Odlišení raků v rámci arény zajišťovala černá tečka na okraji arény v blízkosti startovací pozice raka (obr. č. 3). Toto označení ukazovalo primárně na raka exponovaného případně sekundárně na většího raka ze sledované dyády. Pro posuzování interakcí raků stejně velkých byla autorem vytvořena pomocná aréna (obr. č. 4), která sloužila především jako opěrný bod rozlišení raků při soubojích, kdy bylo video velmi často stopováno pro důkladné zapsání sledovaných interakcí.



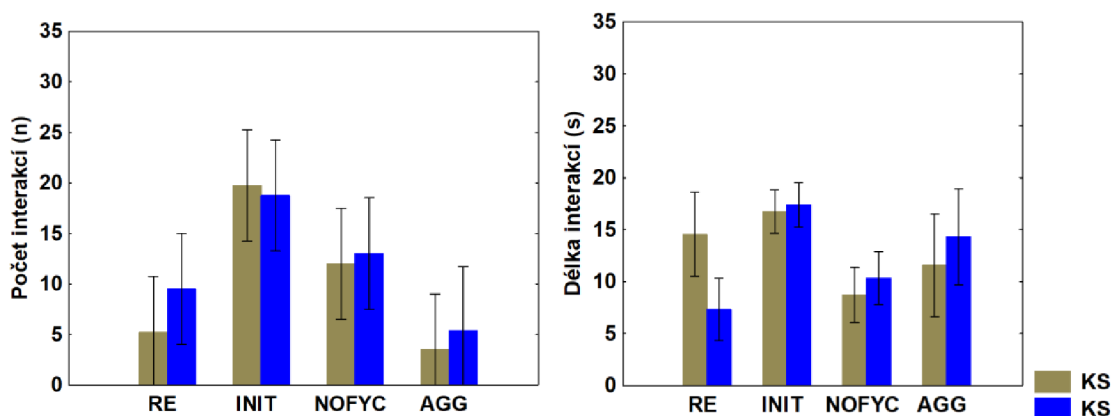
Obr. č. 4: Pomůcka k zaznamenávání interakcí mezi stejně velkými raký, foto autor.

3.5. Statistická analýza

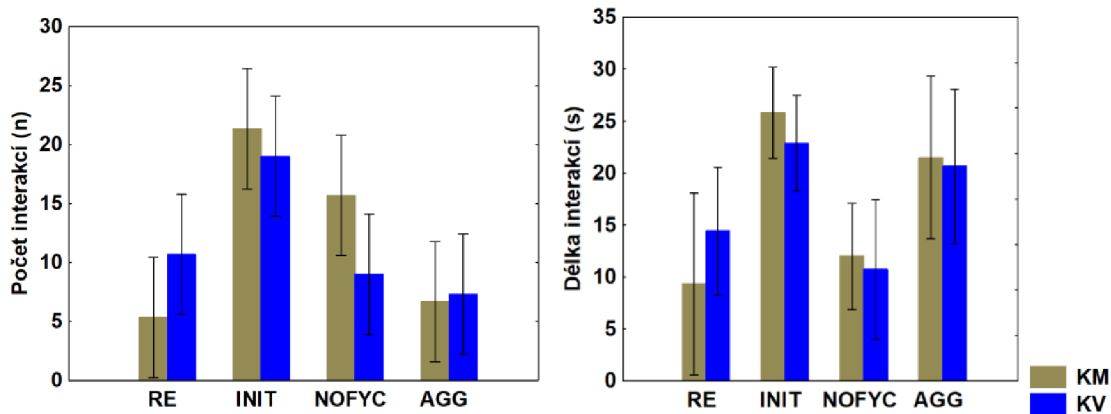
Statistická analýza získaných dat pozorováním chování raků byla provedena pomocí softwaru Statistica 13.2 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Data byla nejprve podrobena Bartlettově testu pro homogenitu variancí. Po jejím potvrzení byla provedena hierarchická ANOVA (GLM) pro vyhodnocení případných změn v chování na základě počtu jednotlivých typů interakcí: „útek“ (-2, -1) – RE; bez fyzického kontaktu (1, 2) – NOFYC; iniciace boje (3) – INIT; agresivní chování (4, 5) – AGG. Podobným způsobem byla vyhodnocena i délka interakcí, která byla měřena v sekundách. Po potvrzení signifikance ve skupině raků byl pokaždé proveden test pro mnohonásobné porovnání (post-hoc test) pro identifikaci významně se lišící skupiny či chování. Výsledky byly analyzovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4. Výsledky

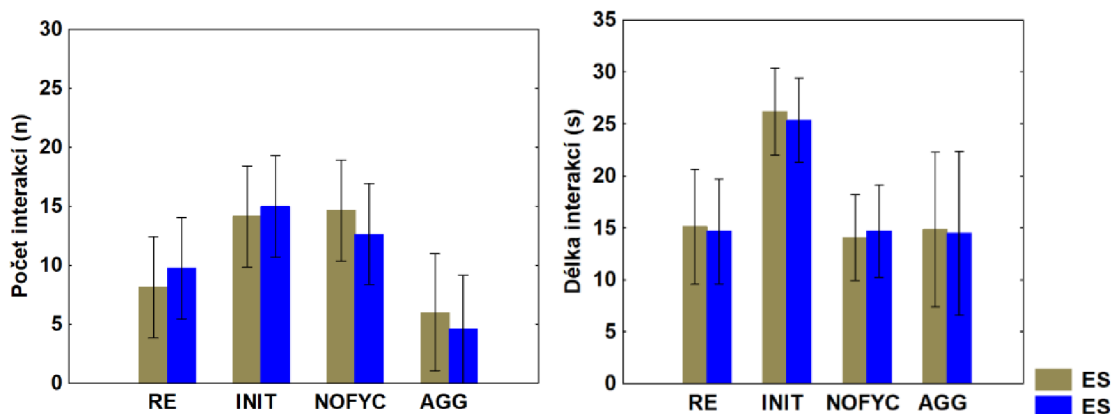
Během vnitroskupinových interakcí kontrolních jedinců stejné velikosti nebyl pozorován ($P > 0,05$) rozdíl mezi časem stráveným v přímých interakcích ani v počtu jejich započítání (Obr. č. 5). Podobně tomu bylo v případě porovnání chování mezi kontrolními jedinci s rozdílnou velikostí (Obr. č. 6). Expoziční skupina raků vystavená srovnatelným podmínkám jako kontrola neprojevovala žádné alternace v chování či ve stupních interakcí. Tento jev byl pozorován mezi expozičními raky jak stejné velikosti (Obr. č. 7), tak u dyád raků s odlišnou velikostí (Obr. č. 8). Při porovnání změn v chování testovaných raků na expoziční v sertralinu a jejich kontrolních protějšků nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl. Velikostně větší exponovaní raci (Obr. č. 9) nevykazovali vyšší či nižší míru agresivity proti menším kontrolním rakům, podobně se u menších exponovaných jedinců neprokázalo (Obr. č. 10), že by více či méně utíkali ze soubojů. Rovněž interakce podobně velkých raků (Obr. č. 11) nebyly vyhodnoceny jako statisticky rozdílné, a to v počtu interakcí i jejich délce.



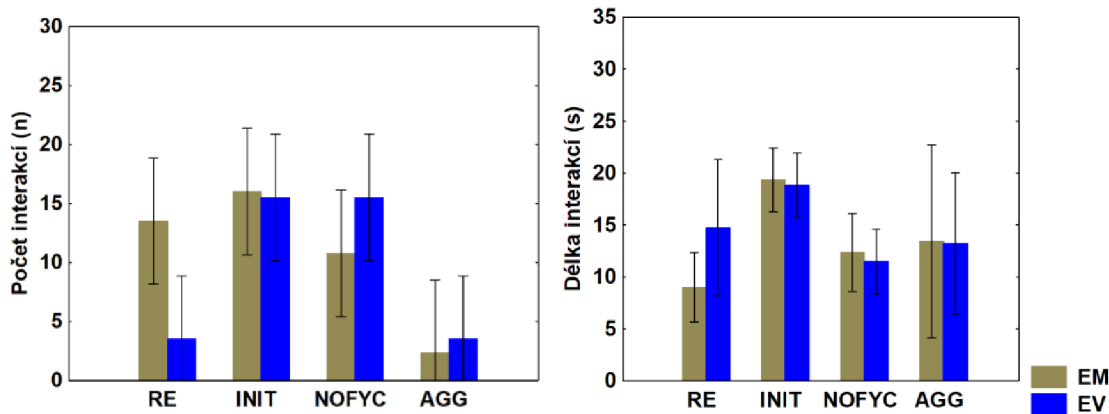
Obr. č. 5: Grafická analýza počtu interakcí a doby setrvání v přímých interakcích kontrolních velikostně shodných jedinců raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). RE – útek ze souboje; INIT – iniciace souboje; NOFYC – přímá interakce bez fyzického útoku; AGG – přímá fyzická agresivní interakce; KS – kontrolní skupina stejné velikosti. Průměr ± SD.



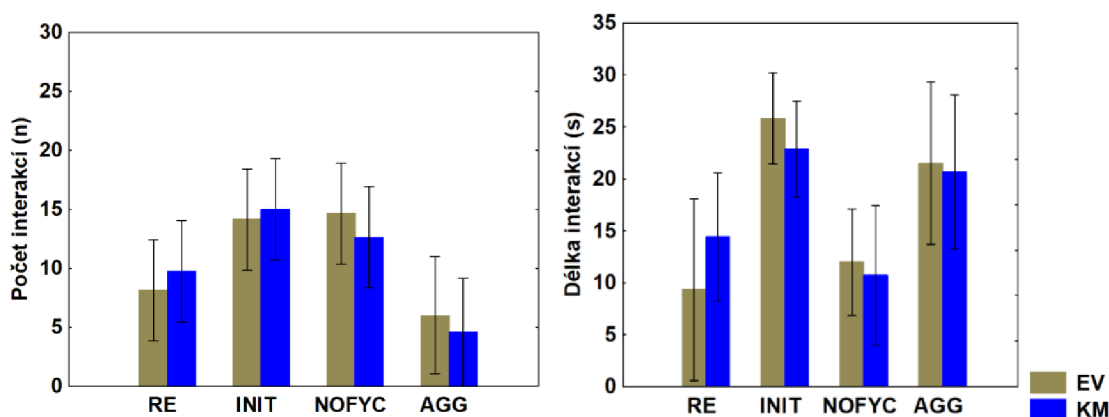
Obr. č. 6: Grafická analýza počtu interakcí a doby setrvání v přímých interakcích kontrolních velikostně odlišných jedinců raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). RE – útěk ze souboje; INIT – iniciace souboje; NOFYC – přímá interakce bez fyzického útoku; AGG – přímá fyzická agresivní interakce; KM – kontrolní skupina menší velikosti; KV – kontrolní skupina větší velikosti. Průměr ± SD.



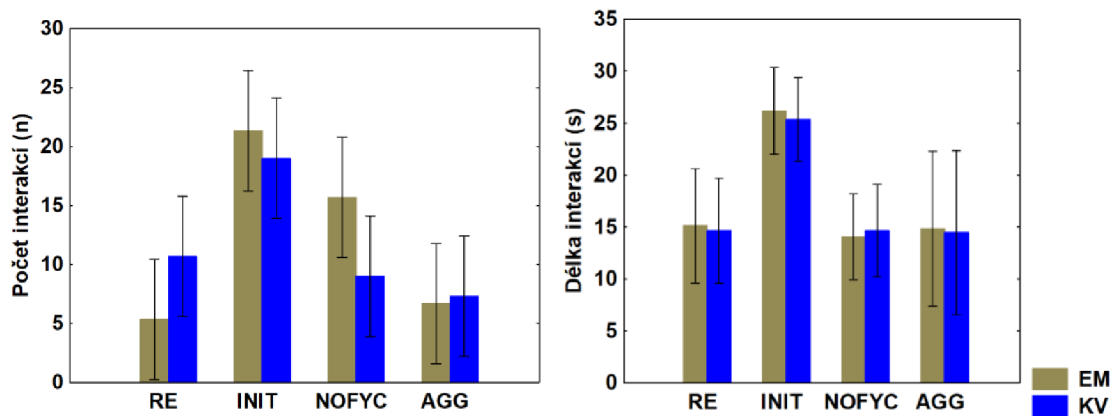
Obr. č. 7: Grafická analýza počtu interakcí a doby setrvání v přímých interakcích exponovaných velikostně shodných jedinců raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). RE – útěk ze souboje; INIT – iniciace souboje; NOFYC – přímá interakce bez fyzického útoku; AGG – přímá fyzická agresivní interakce; ES – exponovaná skupina stejné velikosti. Průměr ± SD.



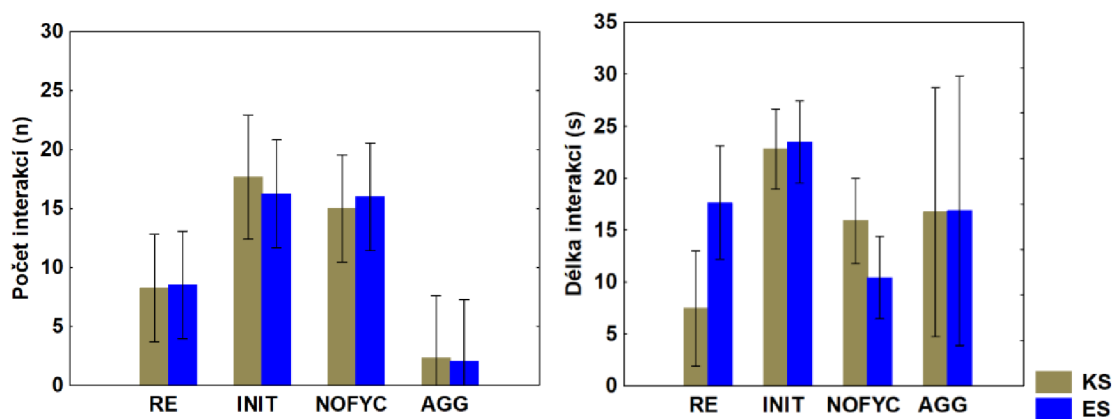
Obr. č. 8: Grafická analýza počtu interakcí a doby setrvání v přímých interakcích exponovaných velikostně odlišných jedinců raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). RE – útěk ze souboje; INIT – iniciace souboje; NOFYC – přímá interakce bez fyzického útoku; AGG – přímá fyzická agresivní interakce; EM – exponovaná skupina menší velikosti; EV – exponovaná skupina větší velikosti. Průměr ± SD.



Obr. č. 9: Grafická analýza počtu interakcí a doby setrvání v přímých interakcích exponovaných velikostně větších jedinců a kontrolních velikostně menších jedinců raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). RE – útěk ze souboje; INIT – iniciace souboje; NOFYC – přímá interakce bez fyzického útoku; AGG – přímá fyzická agresivní interakce; EV – exponovaná skupina větší velikosti; KM – kontrolní skupina menší velikosti. Průměr ± SD.



Obr. č. 10: Grafická analýza počtu interakcí a doby setrvání v přímých interakcích exponovaných velikostně menších jedinců a kontrolních velikostně větších jedinců raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). RE – útek ze souboje; INIT – iniciace souboje; NOFYC – přímá interakce bez fyzického útoku; AGG – přímá fyzická agresivní interakce; EM – exponovaná skupina menší velikosti; KV – kontrolní skupina větší velikosti. Průměr ± SD.



Obr. č. 11: Grafická analýza počtu interakcí a doby setrvání v přímých interakcích velikostně shodných exponovaných a kontrolních jedinců raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*). RE – útek ze souboje; INIT – iniciace souboje; NOFYC – přímá interakce bez fyzického útoku; AGG – přímá fyzická agresivní interakce; ES – exponovaná skupina stejné velikosti; KS – kontrolní skupina stejné velikosti. Průměr ± SD.

5. Diskuse

Výše uvedené výsledky neznají signifikantní rozdíly v chování u sledovaných organismů. U žádného z vyhodnocovaných parametrů chování se od sebe skupiny kontrolních a exponovaných raků různých či stejných velikostí nelišily tak, aby bylo možné pozorovat statisticky významný rozdíl. Jelikož je studie zcela závislá na živých organismech, u kterých nemůžeme předem s jistotou předpokládat jejich chování, jsou i výsledky s nesignifikantními hodnotami v praxi zcela běžné. Ačkoliv experiment probíhal na modelových organismech, čímž raci mramorovaní zajisté jsou, nemůžeme dokonale eliminovat ostatní vlivy a faktory. Dle Vogta a kol. (2008) vykazují jedinci raka mramorovaného mnoho odlišností i při stejných podmínkách chovu (výskyt individuality).

Důležitou skutečností při vyhodnocování výsledků je rovněž lidský faktor. Moderní počítačové programy vyhodnocující výsledky u podobných studií detailně zaznamenají každý sledovaný parametr a jejich chybovost je velmi malá. Oproti tomu vizuální hodnocení sledovaných interakcí se díky lidskému faktoru nemusí obejít bez chyb a dosažené výsledky se tak nemohou rovnat přesnosti vyhodnocení u počítačových systémů. V případech dříve realizovaných experimentů shledáváme odlišné nebo úplně opačné výsledky účinků podobných sloučenin (Brodin a kol., 2013). Příčinou této skutečnosti mohou být odlišné podmínky experimentu, jiný způsob aplikace látek, různá délka trvání pokusu nebo rozdílné hladiny koncentrací u sledovaných polutantů. Důležitou roli hraje taktéž druh a způsob provedení experimentu. Pro zjištění skutečných účinků cizorodých látek na vodní organismy je třeba důkladné studium jak působení látek samotných, tak působení různých látek současně (Di Lorenzo a kol., 2019).

Dosaženými výsledky zcela jistě nemůžeme vyloučit negativní vliv sertralinu na necílové vodní organismy. Díky prvotní fázi studií tohoto typu, kdy pozorujeme vzájemné interakce raků vizuálně, nelze dosažené výsledky plnohodnotně porovnat s adekvátními studii podobného charakteru. V současnosti jsou dostupné studie porovnávací vlivy antidepresiv na různých vodních modelových organismech.

Agresivitu raků druhu *Orconectes virilis* vystavených environmentální koncentraci sertralinu sledoval Woodman a kol. (2016). Ve své studii porovnával chování stejných velikostních skupin raků v systému podobném bludišti. V experimentu vykazovaly sledované skupiny kontrolních i exponovaných zvířat stejnou agresivitu při interakcím

v rámci stejné skupiny raků, kdy se tedy agresivita kontrolní vs. kontrolní rak rovnala agresivitě exponovaný vs. exponovaný rak. Signifikantní rozdíl v agresivitě byl zaznamenán při interakci exponovaný vs. kontrolní rak. V tomto případě vykazovala exponovaná skupina raků výrazně vyšší agresivitu.

Vliv antidepressiva sertralinu na chování raků mramorovaných prokázal Hossain a kol. (2019), který zaznamenal významně zvýšenou aktivitu u exponovaných organismů. Studie porovnávala chování zvířat umístěných jednotlivě do arén s úkryty, a v druhé fázi pozorování také arén bez úkrytů. V obou případech vykazovali exponovaní raci signifikantně vyšší aktivitu než raci kontrolní. Významný byl rovněž parametr přítomnosti raků v úkrytu, kdy kontrolní raci trávili podstatně více času v úkrytu než raci exponovaní. V systému bez možnosti úkrytu nachodila exponovaná skupina zvířat signifikantně větší vzdálenost než skupina kontrolní.

Účinky sertralinu podávaného v potravě pstruhům duhovým sledoval Václavík a kol. (2020). Výsledky 28denního testu toxicity o koncentracích sledované látky v krmivu $4,4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $42 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a $400 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ prokázaly vliv sertralinu na chování ryb ve všech sledovaných koncentracích. U exponovaných ryb byl potlačen únikový reflex a zároveň tyto pstruzi vykazovali vyšší odolnost vůči stresu. Tento jev může mít za následek zhoršení imunity rybí populace.

Neuparth a kol. (2019) pozoroval vliv environmentálně relevantní koncentrace sertralinu na blešivci druhu *Gammarus locusta*. V této studii byli juvenilní jedinci blešivců vystaveni různým koncentracím sertralinu v hodnotách od 8 do 1 000 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ po dobu 48 dní. Chronický test posuzoval změny životního cyklu blešivců a účinku na jejich reprodukci. Při nízkých koncentracích sertralinu v hodnotách 8, 40 a 200 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ nebyly zaznamenány žádné významné změny v růstu, přežití, reprodukci ani v chování sledovaných organismů. Změna nastala při koncentraci antidepressiva 1 000 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, kdy bylo zaznamenáno významné zvýšení pohybu u exponovaných samic oproti samicím kontrolním. Samci blešivců nevykazovali signifikantní změny ani při nejvyšší sledované koncentraci. Autor studie poukazuje na větší náchylnost samic *Gammarus locusta* k chronickým účinkům sertralinu, zároveň však nepředpokládá, že by mohl mít sertralin ve sledovaných koncentracích významným ekologickým rizikem pro testovaný druh blešivce.

Výše uvedené studie účinků sertralinu ukazují významný vliv tohoto antidepresiva na necílové modelové organismy. V řadě případů nízké koncentrace studovaného léčiva nevykazují významné efekty. V porovnání s výsledky naší studie tak můžeme usuzovat, že sertralin je hrozbou pro vodní ekosystémy zatížené vyššími koncentracemi této látky. Zároveň nemůžeme pro nedostatek relevantních zdrojů vyvrátit negativní vliv sertralinu v nízkých koncentracích. Pro zjištění co nejvíce informací o možných efektech sledovaného antidepresiva je rovněž důležité pozorovat účinky sertralinu v koktejlu s dalšími farmaceutickými produkty. Při přítomnosti více látek se totiž mohou jejich efekty násobit (Riva a kol., 2019) nebo naopak tlumit (Rede a kol., 2019).

Hossain a kol. (2021) studoval vliv mixu šesti psychoaktivních léčiv v environmentálně relevantních koncentracích. Testovaným organismem byl obdobně jako v této diplomové práci rak mramorovaný *Procambarus virginalis*. Látky použité pro tuto studii byly o koncentracích $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Raci byli vystaveni sertralinu, oxazepamu, tramadolu, metamfetaminu, venlafaxinu a citalopramu. Experiment, který porovnával kontrolní a exponované skupiny raků umístěných jednotlivě do arén s úkryty či do arén bez úkrytů, prokázal signifikantní rozdíly. V boxech bez úkrytů nachodili exponovaní jedinci výrazně kratší vzdálenost nižší rychlostí a zároveň vykazovali menší aktivitu než raci kontrolní. V arénách s úkryty trávili exponovaní raci významně déle času mimo úkryt, s čímž byla spjata i jejich celková vyšší aktivita v podobě nachození delší vzdálenosti. Totožný jev v obdobné, již výše zmíněné studii, zaznamenal Hossain a kol. (2019) při experimentu s raky exponovanými pouze v sertralinu. Můžeme tedy předpokládat, že sertralin ovlivňuje chování vodních organismů jak samostatně, tak i v rámci koktejlu s dalšími psychoaktivními látkami.

Testování psychoaktivních látek na vzájemné interakce korýšů jsou metodou prozatím málo používanou, leč velmi důmyslnou. Hierarchie hraje nejen u bezobratlých velkou roli při příjmu potravy, hledání vhodného teritoria či rozmnožování (Herberholz a kol. (2007). Huber a Delago (1998) stejně jako Sneddon a kol. (2000) prokázali závislost serotoninu na formování hierarchie. Jedinci korýšů vykazují po vítězné interakci zvýšenou hladinu serotoninu v nerovném systému. Vyšší hladina serotoninu následně vede k tzv. „vítěznému efektu,“ díky kterému má jedinec větší šanci uspět v následujících interakcích (Bergman a kol., 2003). Právě sertralin je zástupcem antidepresiv SSRI – selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (Doogan a Caillard, 1988). Změna hladiny serotoninu může mít negativní vliv na formování dominance a tvorbu

hierarchie. Tento jev může rovněž ovlivnit stravovací a rozmnožovací návyky nebo mít vliv na únikové reflexy. V těchto případech může být rovněž snížena ostražitost jedince, což vede k následnému snazšímu ulovení korýše predátorem (Hazlett, 1999). Změny v chování u raků mohou mít velký vliv na fungování ekosystému jako celku. Díky ovlivnění ekosystémových procesů může dojít k narušení funkcí ekosystému (Ludington a Moore, 2017). Manning a Dawkins (2012) zmiňují také ztrátu biodiverzity nebo možnost rozpadu potravního řetězce.

6. Závěr

Cílem diplomové práce bylo posoudit účinek sertralinu na vzájemné chování raků mramorovaných. Koncentrace antidepresiva odpovídala relevantním koncentracím vyskytujících se ve volných vodách v České republice. Díky tomu bylo možné pozorovat objektivní výsledky. Ačkoliv nebyly v této studii pozorovány žádné významné změny chování u sledovaných parametrů, nemůžeme vyvrátit negativní vliv sertralinu pro vodní prostředí. Další studie chování vodních organismů na přítomnost farmaceutických látek mohou v budoucnu rozšířit znalost o účincích léčiv na necílové vodní organismy. Výsledné hodnoty z této diplomové práce mohou dále sloužit k porovnání výsledků s podobnými studiemi nebo jako metodický pokyn pro provedení obdobného experimentu.

7. Seznam použité literatury

- Adámek, Z., Helešic, J., Maršálek, B., Rulík, M., 2010. Aplikovaná hydrobiologie (Applied Hydrobiology). FROV JU, Vodňany, 350.
- Alcock, J., 2001. The triumph of sociobiology. Oxford University Press.
- Amoatey P, Baawain MS., 2019. Effects of pollution on freshwater aquatic organisms. *Water Environ Res* 91(10):1272–1287.
- Arnold, K. E., Brown, A. R., Ankley, G. T., Sumpter, J. P., 2014. Medicating the environment: assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656).
- Atema, J., 1988. Distribution of chemical stimuli. In *Sensory biology of aquatic animals*. Springer, New York, NY, 29-56.
- Azrina, M.Z., Yap, C.K., Ismail, A.R., Ismail, A., Tan, S.G., 2006. Anthropogenic impacts on the distribution and biodiversity of benthic macroinvertebrates and water quality of the Langat River, Peninsular Malaysia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64 (3), 337-347.
- Azuma, T., Arima, N., Tsukada, A., Hiramí, S., Matsuoka, R., Moriwake, R., Ishiuchi, H., Inoyama, T., Teranishi, Y., Yamaoka, M., 2017. Distribution of six anticancer drugs and a variety of other pharmaceuticals, and their sorption onto sediments, in an urban Japanese river. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.
- Backhaus, T., 2016. Environmental risk assessment of pharmaceutical mixtures: demands, gaps, and possible bridges. *The AAPS journal*, 18(4), 804-813.
- Bakker K. 2012. Water security: research challenges and opportunities. *Science* 337(6097): 914-915.
- Benáková, A., Wanner, J., 2017. Problematika mikropolutantů ve vodním prostředí: Možné přístupy a zkušenosti z ČOV v zahraničí. In: *Seminář: Problematika mikropolutantů při čištění odpadních vod a při úpravě vody na vodu pitnou*. *Sovak* 4, 12-112.
- Bergman, D.A., Kozłowski, C.P., McIntyre, J.C., Huber, R., Daws, A.G., Moore, P.A., 2003. Temporal dynamics and communication of winner-effects in the crayfish *Orconectes rusticus*. *Behaviour* 140 (6), 805–825.

- Berry, F.C., Breithaupt, T., 2010. To signal or not to signal? Chemical communication by urine-borne signals mirrors sexual conflict in crayfish. *BMC Biol.* 8, 25.
- Bindzar, J., 2009. *Základy úpravy a čištění vod*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 251.
- Bohman, P., Edsman, L., Martin, P., Scholtz, G., 2013. The first Marmorkrebs (*Decapoda: Astacida: Cambaridae*) in Scandinavia.
- Boxall, A.B., Rudd, M.A., Brooks, B.W., Caldwell, D.J., Choi, K., Hickmann, S., Innes, E., Ostapyk, K., Staveley, J.P., Verslycke, T., 2012. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environmental health perspectives* 120, 1221.
- Bradbury, J.W., Vehrencamp, S.L., 1998. *Principles of Animal Communication*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Brandley, N.C., Speiser, D.I., Johnsen, S., 2013. Eavesdropping on visual secrets. *Evol. Ecol.* 27(6), 1045-1068.
- Breithaupt, T., Thiel, M., 2011. *Chemical Communication in Crustaceans*. Springer, New York.
- Briffa, M., 2013. Contests in crustaceans: assessments, decisions and their underlying mechanisms. *Animal Contests* 86-112.
- Brodin, T.; Fick, J.; Jonsson, M.; Klaminder, J., 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science*, 339, 814–815.
- Brusca, R. C., Brusca, G. J., 2003. *Invertebrates second edition* Sinauer Associates. Inc. Sunderland, Massachusetts, 936.
- Clews, E., Low, E.W., Belle, C.C., Todd, P.A., Eikaas, H.S., Ng, P.K.L., 2014. A pilot macroinvertebrate index of the water quality of Singapore's reservoirs. *Ecol. Indic.* 38, 90-103.
- Clinicians ultimate guide, 2018, <https://globalrph.com/drugs/anti-depressants/>
- 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(4), 287-304.

- Crandall, K.A., Buhay, J.E., 2008. Global diversity of crayfish (*Astacidae*, *Cambaridae*, and *Parastacidae-Decapoda*) in freshwater. *Hydrobiologia* 595, 295-301.
- Cummings, M.E., Jordao, J.M., Cronin, T.W., Oliveira, R.F., 2008. Visual ecology of the fiddler crab, *Uca tangeri*: effects of sex, viewer and background on conspicu- ousness. *Anim. Behav.* 75, 175-188.
- Černecký, J., Kvasnová, P., Dočkal, J., 2006. Technika úpravy vôd a ich čistenia. Technická univerzita vo Zvolene, Fakulta environmentálnej a výrobnjej techniky, Katedra environmentálnej techniky, 1. vydání, Vydavateľstvo TU vo Zvolene, 132.
- Daughton, C.G., Ternes, T. A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environmental health perspectives* 107(6), 907-938.
- DellaGreca, M., Fiorentino, A., Isidori, M., Lavorgna, M., Previtiera, L., Rubino, M., & Temussi, F., 2004. Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organisms. *Chemosphere*, 54(5), 629-637.
- De Vane, C. L., Liston, H. L., & Markowitz, J. S., 2002. Clinical pharmacokinetics of sertraline. *Clinical pharmacokinetics*, 41(15), 1247-1266.
- Dickert, C., 2007. Ion exchange. In: Kirk, E.R., Othmer, D.F., Kroschwitz, J.I., HoweGrant, M. (Eds.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley and Sons, New York, 1084.
- Di Lorenzo, T., Castaño-Sánchez, A., Di Marzio, W.D., García-Doncel, P., Martínez, L.N., Galassi, D.M.P. Iepure, S., 2019. The role of freshwater copepods in the environmental risk assessment of caffeine and propranolol mixtures in the surface water bodies of Spain. *Chemosphere*, 220, 227–236.
- Dobšíková, R., Blahová, J., Bartošková, M., Stancová, V., 2015. Farmakologicky aktivní látky ve vodím prostředí. *Ochrana zvířat a welfare* 2015, 41-46.
- Dohányos, M., Koller, J., Strnadová, N., 2007. Čištění odpadních vod. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 177.
- Doogan, D. P., Caillard, V., 1988. Sertraline: a new antidepressant. *The Journal of clinical psychiatry*.

- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, Kawabata Z-I, Knowler DJ, Lévêque C, Naiman RJ, Prieur-Richard A-H, Soto D, Stiassny ML. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81(2):163–182.
- Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M. I., Kümmerer, K., 2011. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes – degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere*, 85(5), 693-709.
- Fedorova, G., Nebesky, V., Randak, T., Grabic, R., 2014. Simultaneous determination of 32 antibiotics in aquaculture products using LC-MS/MS. *Chemical Papers*, 68(1), 29-36.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology* 76(2), 122-159.
- Fero, K. C., Moore, P. A., 2014. Shelter availability influences social behavior and habitat choice in crayfish, *Orconectes virilis*. *Behaviour*, 151(1), 103-123.
- Figler, M.H., Cheverton, H.M., Blank, G.S., 1999. Shelter competition in juvenile red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*): the influences of sex differences, relative size, and prior residence. *Aquaculture* 178, 63-75.
- Flecknell, P., 2002. Replacement, reduction, refinement. ALTEX-alternatives to Animal Experimentation, 19(2), 73-78.
- Fott, J., Kořínek, V., Lellák, J., Straškrabová, V., 1978. Hydrobiologie pro postgraduální studium – textová část. Učební texty PřK UK v Praze, 93.
- Fujáková, M., Kopeček, M., 2012. Antidepressiva–od teorie ke klinické praxi. *Klinická farmakologie a farmacie*, 26(1), 29-37.
- Gerrity, D., Gamage, S., Holady, J.C., Mawhinney, D.B., Quiñones, O., Trenholm, R.A., Snyder, S.A., 2011. Pilot-scale evaluation of ozone and biological activated carbon for trace organic contaminant mitigation and disinfection. *Water research* 45(5), 2155-2165.
- Gherardi, F., 2002. Behaviour. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, USA and Canada. Iowa State University Press, Oxford, England; Ames, Iowa, pp. 258-290.

- Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randak, T., Grabic, R., 2014. Removal and seasonal variability of selected analgesics/anti-inflammatory, anti-hypertensive/cardiovascular pharmaceuticals and UV filters in wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 7578-7585.
- Gomes, A. R., Justino, C., Rocha-Santos, T., Freitas, A. C., Duarte, A. C., Pereira, R., 2017. Review of the ecotoxicological effects of emerging contaminants to soil biota. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52(10), 992-1007.
- Grabic, R., Fick, J., Lindberg, R.H., Fedorova, G., Tysklind, M., 2012. Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta* 100, 183-195.
- Grabicova, K., Lindberg, R.H., Östman, M., Grabic, R., Randak, T., Joakim Larsson, D.G. and Fick, J., 2014. Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant. *Sci. Total Environ.* 488–489(0), 46-50.
- Grabicova, K., Grabic, R., Blaha, M., Kumar, V., Cervený, D., Fedorova, G., Randak, T., 2015. Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water research*, 72, 145-153.
- Grabicova, K., Grabic, R., Fedorova, G., Fick, J., Cervený, D., Kolarova, J., Randak, T., 2017. Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream. *Water research*, 124, 654-662.
- Grimsley SR, Jann MW, 1992. Paroxetine, sertraline, and fluvoxamine: new selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Pharm*; 11 (11): 930-57.
- Groda, B., Vítěz, T., Machala, M., Foller, J., Surýnek D., Musil, J., 2007. Čištění odpadních vod jako nástroj k ochraně životního prostředí v zemědělské praxi a na venkově. Brno: Ministerstvo zemědělství České republiky, 56.
- Gutekunst, J., Andriantsoa, R., Falckenhayn, C., Hanna, K., Stein, W., Rasamy, J., Lyko, F., 2018. Clonal genome evolution and rapid invasive spread of the marbled crayfish. *Nat. Ecol. Evolut.* 2, 567-573.
- Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D.J., 2008. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environmental science & technology* 42(15), 5807-5813.

- Hay, M.E., 2011. Crustaceans as powerful models in aquatic chemical ecology. In: Breithaupt, T., Thiel, M. (Eds.), *Chemical Communication in Crustaceans*. Springer, 41-62.
- Hazlett, B., 1999. Responses to multiple chemical cues by the crayfish *Orconectes virilis*. *Behaviour*, 136(2), 161-177.
- Hellmann, C., Wissel, B., Winkelmann, C., 2013. Omnivores as seasonally important predators in a stream food web. *Freshw. Sci.* 32 (2), 548-562.
- Heninger GR, Delgado PL, Charney DS., 1996. The revised mono-amine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry*. 29(1): 2–11.
- Herberholz, J., McCurdy, C., Edwards, D. H., 2007. Direct benefits of social dominance in juvenile crayfish. *The Biological Bulletin*, 213(1), 21-27.
- Hernández-Leal, L., Temmink, H., Zeeman, G., Buisman, C.J.N., 2011. Removal of micropollutants from aerobically treated grey water via ozone and activated carbon. *Water Research* 45(9), 2887-2896.
- Hlavínek, P., Hlaváček, J., 1996. Čištění odpadních vod: praktické příklady výpočtů. Brno: NOEL 2000, 196.
- Holdich, D.M., Haffner, P., Noël, P., Carral, J., Föderer, L., Gherardi, F., Machino, Y., Madec, J., Pöckl, M., Šmietana, P., Taugbol, T., Vigneux, E., 2006. Species files. In: Souty-Grosset, C., Holdich, D.M., Noël, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P. (Eds), *Atlas of crayfish in Europe*. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, 49-130.
- Holdich, D.M., Harlioglu, M.M., Firkins, I., 1997. Salinity adaptations of crayfish in British waters with particular reference to *Austropotamobius pallipes*, *Astacus leptodactylus* and *Pacifastacus leniusculus*. *Estuar. Coast Shelf Sci.* 44, 147-154.
- Holdich, D. M., Reynolds, J. D., Souty-Grosset, C., Sibley, P. J., 2009. A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 11, 394-395.
- Hossain, M. S., Kubec, J., Grabicová, K., Grabic, R., Randák, T., Guo, W., Buřič, M., 2019. Environmentally relevant concentrations of methamphetamine and sertraline modify the behavior and life history traits of an aquatic invertebrate. *Aquatic Toxicology*, 213, 105222.

- Hossain, M. S., Kubic, J., Guo, W., Roje, S., Ložek, F., Grabicová, K., Buřič, M., 2021. A combination of six psychoactive pharmaceuticals at environmental concentrations alter the locomotory behavior of clonal marbled crayfish. *Science of the Total Environment*, 751, 141383.
- Hossain, M. S., Patoka, J., Kouba, A., Buřič, M., 2018. Clonal crayfish as biological model: a review on marbled crayfish. *Biologia*, 1-15.
- Hon, Z., 2013. *Základy toxikologie pro obor vodního hospodářství*. Vysoká škola evropských a regionálních studií, 136.
- Hudina, S., Hock, K., 2012. Behavioural determinants of agonistic success in invasive crayfish. *Behav. Process.* 91, 77-81.
- Huber, R., Delago, A., 1998. Serotonin alters decisions to withdraw in fighting crayfish, *Astacus astacus*: the motivational concept revisited. *Journal of Comparative Physiology A*, 182(5), 573-583.
- Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. *Analytical and bioanalytical chemistry* 404, 2611-2624.
- Choi, K.J., Son, H.J., Kim, S.H., 2007. Ionic treatment for removal of sulfonamide and tetracycline classes of antibiotic. *Science of the total environment* 387(1-3), 247-256.
- Chucholl, C., Stich, H. B., Maier, G., 2008. Aggressive interactions and competition for shelter between a recently introduced and an established invasive crayfish: *Orconectes immunis* vs. *O. limosus*. *Fundamental and applied limnology*, 172(1), 27.
- Ismail, A.F., Yuliwati, E., 2010. *Membrane Science and Technology for wastewater reclamation*. Sciences and Engineering, Oxford, 62.
- Janský, V., Mutkovič, A., 2010. Marbled crayfish—*Procambarus sp.*(*Crustacea: decapoda: cambaridae*)—first find in Slovakia. *Acta Rerum Naturalium Musei Natuionalis Slovenici*, 56, 64-67.
- Jennions, M.D., Petrie, M., 1997. Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biol. Rev.* 72, 283-327.

- Jones, J. P., Rasamy, J. R., Harvey, A., Toon, A., Oidtmann, B., Randrianarison, M. H., Raminosoa, N., Ravoahangimalala, O. R., 2009. The perfect invader: a parthenogenic crayfish poses a new threat to Madagascar's freshwater biodiversity. *Biological Invasions*, 11, 1475-1482.
- Kalač, P., Třiska, J., Kolář, L., Jírovcová, E., 2010. *Chemie životního prostředí*. Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 171.
- Kaldre, K., Meženin, A., Paaver, T., 2012. Marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*) resistance and survival rates at low (under 5 °C) temperatures during winter period. In: *Book of Abstracts, International Association of Astacology*, 19, Innsbruck, Rakousko, 75.
- Karavanich, Ch., Atema, J., 1998. Individual recognition and memory in lobster dominance. *Animal Behaviour*, 56, 1553-1560.
- Kaushik, G., Xia, Y., Yang, L., Thomas, M. A., 2016. Psychoactive pharmaceuticals at environmental concentrations induce in vitro gene expression associated with neurological disorders. *BMC genomics*, 17(3), 277-285.
- Kawai, T., Faulkes, Z., Scholtz, G., 2015. *Freshwater Crayfish: A Global Overview*. CRC Press, 679.
- Kawai, T., Takahata, M., 2010. *Biology of crayfish*. Sapporo, Japan: Hokkaido University Press, Japan.
- Kim, I., Yamashita, N., Tanaka, H., 2009. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. *Journal of Hazardous Materials* 166(2-3), 1134-1140.
- Knejzlík, Z., Ruml, T., 1999. Nepříznivý vliv xenobiotik na lidský organismus a metody jeho testování. Ústav chemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 6. *Chem. List*. 93, 607-615.
- Kočí, V., Mocová, K., 2009. *Ekotoxikologie pro chemiky*. VŠCHT, Praha, 199.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999– 2000: A national reconnaissance. *Environmental science & technology* 36(6).

- Kubec, J., Hossain, M. S., Grabicová, K., Randák, T., Kouba, A., Grabic, R., Buřič, M. 2019. Oxazepam alters the behavior of crayfish at diluted concentrations, venlafaxine does not. *Water*, 11(2), 196.
- Kumar, A., Xagorarakis, I., 2010. Human health risk assessment of pharmaceuticals in water: an uncertainty analysis for meprobamate, carbamazepine, and phenytoin. *Regulatory toxicology and pharmacology* 57(2-3), 146-156.
- Kvarnryd, M., Grabic, R., Brandt, I., Berg, C., 2011. Early life progestin exposure causes arrested oocyte development, oviductal agenesis and sterility in adult *Xenopus tropicalis* frogs. *Aquat. Toxicol.* 103, 18–24.
- Liu, J. L., Wong, M. H., 2013. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. *Environment international* 59, 208-224.
- Liu, Z.H., Kanjo, Y., Mizutani, S., 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment—physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. *Science of the total environment* 407(2), 731-748.
- Li, Z.-H., Zlabek, V., Turek, J., Velisek, J., Pulkrabova, J., Kolarova, J., Sudova, E., Berankova, P., Hradkova, P., Hajslova, J., 2011. Evaluating environmental impact of STPs situated on streams in the Czech Republic: An integrated approach to biomonitoring the aquatic environment. *Water Research* 45, 1403-1413.
- Lókkös, A., Müller, T., Kovács, K., Várkonyi, L., Specziár, A., Martin, P., 2016. The alien, parthenogenetic marbled crayfish (*Decapoda: Cambaridae*) is entering Kis-Balaton (Hungary), one of Europe's most important wetland biotopes. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 417, 16.
- Ludington, T.S., Moore, P.A., 2017. The degree of impairment of foraging in crayfish (*Orconectes virilis*) due to insecticide exposure is dependent upon turbulence dispersion. *Arch Environ Con Tox* 72 (2), 281–293.
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X. C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the total environment* 473, 619-641.
- Lyko, F., 2017. The marbled crayfish (*Decapoda: Cambaridae*) represents an independent new species. *Zootaxa*, 4363, 544-552.

- Manning, A.; Dawkins, M.S., 2012. An Introduction to Animal Behaviour, 6th ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK; New York, NY, USA, 458.
- Marten, M., Werth, C., Marten, D., 2004. Der Marmorkrebs (*Cambaridae*, *Decapoda*) in Deutschland—ein weiteres Neozoon im Einzugsgebiet des Rheins. *Lauterbornia*, 50, 17-23.
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic Marmorkrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. *Naturwissenschaften*, 94, 843-846.
- Martin, P., Shen, H., Füllner, G., Scholtz, G., 2010. The first record of the parthenogenetic Marmorkrebs (*Decapoda*, *Astacida*, *Cambaridae*) in the wild in Saxony (Germany) raises the question of its actual threat to European freshwater ecosystems. *Aquatic Invasions*, 5, 397-403.
- Marzano, F. N., Scalici, M., Chiesa, S., Gherardi, F., Piccinini, A., Gibertini, G., 2009. The first record of the marbled crayfish adds further threats to fresh waters in Italy. *Aquatic Invasions*, 4, 401-404.
- McMahon, A., Patullo, B.W., Macmillan, D.L., 2005. Exploration in a T-maze by the crayfish *Cherax destructor* suggests bilateral comparison of antennal tactile information. *Biol. Bull.* 208, 183-188.
- Meinel, F., Ruhl, A.S., Sperlich, A., Zietzschmann, F., Jekel, M., 2015. Pilot-scale investigation of micropollutant removal with granular and powdered activated carbon. *Water, Air, & Soil Pollution* 226(1), 2260.
- Miao, H. F., Cao, M., Xu, D. Y., Ren, H. Y., Zhao, M. X., Huang, Z. X., Ruan, W. Q., 2015. Degradation of phenazone in aqueous solution with ozone: influencing factors and degradation pathways. *Chemosphere*, 119, 326-333.
- Moller, A.P., Milinski, M., 1998. The concept of stress and its relevance for animal behavior - Introduction. *Adv. Stud. Behav.* 27.
- Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment international*, 35(5), 803-814.
- Nařízení vlády č. 401/2015 Sb., Nařízení vlády o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech.

- Neuparth, T., Lopes, A. I., Alves, N., Oliveira, J. M., Santos, M. M., 2019. Does the antidepressant sertraline show chronic effects on aquatic invertebrates at environmentally relevant concentrations? A case study with the keystone amphipod, *Gammarus locusta*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 183, 109486.
- OECD, 2017. Health at a Glance 2017: OECD indicators [online]. Dostupné z: http://www.keepeek.com/Digital-Asset-Management/oecd/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-2017/antidepressant-drugs-consumption-2000-and-2015-or-nearest-year_health_glance-2017-graph181-en
- Organizace spojených národů, Ekonomická a sociální rada, Populační divize, 2015. Perspektivy světové populace: Revize z r. 2015. Data pochází z odhadů a předpokladů dle varianty střední plodnosti. Znovu využito se souhlasem Organizace spojených národů. Zdroj: 2015-11-15.
- Pages, L. J., Garg, D. C., Martibez, J. J., Jallad, N. S., Fouda, H. G., Shaw, G. L., Weidler, D. J., 1988. Safety and pharmacokinetics of sertraline in healthy young males. *J Clin Pharmacol*, 28, 920.
- Parezanović, G. Š., Lalic-Popovic, M., Golocorbin-Kon, S., Vasovic, V., Milijašević, B., Al-Salami, H., Mikov, M., 2019. Environmental Transformation of Pharmaceutical Formulations: A Scientific Review. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 77(2), 155-161.
- Patoka, J., Buřič, M., Kolář, V., Bláha, M., Petrtýl, M., Franta, P., Tropek, R., Kalous, L., Petrusek, A., Kouba, A., 2016. Predictions of marbled crayfish establishment in conurbations fulfilled: evidences from the Czech Republic. *Biologia*, 71, 1380-1385.
- Patoka, J., Magalhães, A. L. B., Kouba, A., Faulkes, Z., Jerikho, R., Vitule, J. R. S., 2018. Invasive aquatic pets: failed policies increase risks of harmful invasions. *Biodiversity and Conservation*, 27, 3037-3046.
- Payne, R.J.H., 1998. Gradually escalating fights and displays: the cumulative assessment model. *Anim. Behav.* 56, 651-662.
- Petrović, M., Barceló, D., 2007. *Comprehensive analytical chemistry, Analysis, Fate and Removal of pharmaceuticals in the water cycle.* (Vol. 50). Elsevier Science, Oxford, 564.
- Petrović, M., Gonzalez, S., Barceló, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22, 685-696.

- Rede, D., Santos, L.H., Ramos, S., Oliva-Teles, F., Antão, C., Sousa, S.R., Delerue-Matos, C., 2019. Individual and mixture toxicity evaluation of three pharmaceuticals to the germination and growth of *Lactuca sativa* seeds. *Sci. Total Environ.* 673, 102–109.
- Riva, F., Zuccato, E., Davoli, E., Fattore, E., Castiglioni, S., 2019. Risk assessment of a mixture of emerging contaminants in surface water in a highly urbanized area in Italy. *J Hazard Mat* 361, 103–110.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The principles of humane experimental technique*. Methuen, London, UK, 238.
- Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M. G., Brooks, B. W., Ehlman, S. M., Arnold, K. E., 2018. Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife. *Proceedings of the Royal Society B*, 285(1885), 20181297.
- Samardžić, M., Lucić, A., Maguire, I., Hudina, S., 2014. The first record of the marbled crayfish (*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) *f. virginalis*) in Croatia. *Crayfish News*, 36, 4-4.
- Santos, L.H., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials* 175, 45-95.
- Sehonova, P., Svobodova, Z., Dolezelova, P., Vosmerova, P., Faggio, C., 2018. Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment* 631:789–794.
- Seitz, R., Vilpoux, K., Hopp, U., Harzsch, S., Maier, G., 2005. Ontogeny of the Marmorkrebs (marbled crayfish): a parthenogenetic crayfish with unknown origin and phylogenetic position. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 303, 393-405.
- Schaller, D., 1978. Antennal sensory system of *Periplaneta americana* L. *Cell Tissue Res.* 191, 121-139.
- Schein, H., 1977. Role of snapping in *Alpheus heterochaelis* Say, 1818, big-clawed snapping shrimp. *Crustaceana* 33, 182-188.
- Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L. B., Vajda, A. M., 2010. Antidepressant pharmaceuticals in two US effluent-impacted streams:

occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environmental science & technology*, 44(6), 1918-1925.

Silva, A., Santos, L. H., Delerue-Matos, C., Figueiredo, S. A., 2014. Impact of excipients in the chronic toxicity of fluoxetine on the alga *Chlorella vulgaris*. *Environmental technology*, 35(24), 3124-3129.

Sim, W.J., Lee, J.W., Oh, J.E., 2010. Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea. *Environmental pollution* 158(5), 1938-1947.

Sneddon, L. U., Taylor, A. C., Huntingford, F. A., Watson, D. G., 2000. Agonistic behaviour and biogenic amines in shore crabs *Carcinus maenas*. *Journal of Experimental Biology*, 203(3), 537-545.

Soes, D. M., van Eekelen, R., 2006. Rivierkreeften, een oprukkend probleem?. *De Levende Natuur*, 107, 56-59.

Sola, C., Prat, N., 2006. Monitoring metal and metalloid bioaccumulation in *Hydropsyche* (Trichoptera, Hydropsychidae) to evaluate metal pollution in a mining river. Whole body versus tissue content. *Sci. Total Environ.* 359 (1-3), 221-231.

Sørensen, S.R., Holtze, M.S., Simonsen, A., Aamand, J., 2007. Degradation and mineralization of nanomolar concentrations of the herbicide dichlobenil and its persistent metabolite 2, 6-dichlorobenzamide by *Aminobacter* spp. isolated from dichlobenil-treated soils. *Applied Environmental Microbiology* 73(2), 399-406.

Souty-Grosset, C., Holdich, D., Noel, P., Reynolds, J. D., Haffner, P., 2006. Atlas of Crayfish in Europe (p. 188). *Muséum national d'Histoire naturelle*.

Steinle-Darling, E., Litwiller, E., Reinhard, M., 2010. Effects of sorption on the rejection of trace organic contaminants during nanofiltration. *Environmental science & technology* 44(7), 2592-2598.

Stenberg, P., Saura, A., 2009. Cytology of asexual animals. *Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis* 1, 63-74.

Suárez, S., Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2008. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters?. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 7(2), 125-138.

- Sui, Q., Huang, J., Deng, S., Yu, G., Fan, Q. 2010. Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. *Water research* 44(2), 417-426.
- Svobodová, Z., Beklová, M., Máchová, J., Dobšíková, R., Mácová, S., Modrá, H., Velišek, J., 2010b. Ekotoxikologie – praktická cvičení: Testy toxicity na organismech vodního prostředí. VFU Brno, Brno, 84.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2010a. Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb. Praha: Informatorium, 264.
- Ternes, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H. J., Haist-Gulde, B., Preuss, G., Wilme, U., Zulei-Seibert, N., 2002. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental science & technology* 36(17), 3855-3863.
- Tixier, N., Guibaud, G., Baudu, M., 2003. Effect of pH and ionic environment changes on interparticle interactions affecting activated sludge flocs: a rheological approach. *Environmental technology*, 24(8), 971-978.
- Tremaine, L. M., Welch, W. M., Ronfeld, R. A., 1989. Metabolism and disposition of the 5-hydroxytryptamine uptake blocker sertraline in the rat and dog. *Drug metabolism and disposition*, 17(5), 542-550.
- Vaclavik, J., Sehonova, P., Hodkovicova, N., Vecerkova, L., Blahova, J., Franc, A., Faggio, C., 2020. The effect of foodborne sertraline on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Science of the Total Environment*, 708, 135082.
- Van der Velden, J., Zheng, Y., Patullo, B.W., Macmillan, D.L., 2008. Crayfish recognize the faces of fight opponents. *PloS One* 3(2), 1695.
- Velišek, J., Svobodová Z., Bláhová J., Máchová, J., Stará, A., Dobšíková, R., Šířoká, Z., Modrá, H., Valentová, O., Randák, T., Štěpánová, S., Kocour Kroupová, H., Maršálek, P., Grabic, R., Zusková, E., Bartošková, M., Stancová, V., 2014. Vodní toxikologie pro rybáře. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, FROV, 600.
- Veselý, L., Buřič, M., Kouba, A., 2015. Hardy exotics species in temperate zone: can “warm water” crayfish invaders establish regardless of low temperatures?. *Scientific reports*, 5(1), 1-7.

- Veselovský, Z. 2005. Etologie: biologie chování zvířat. Vyd. 1. Praha: Academia, 407.
- Vogt, G., 2002. Functional anatomy. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, USA and Canada. Iowa State University Press, Oxford England; Ames, Iowa, pp. 53-151.
- Vogt, G., 2010. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological research: a review and perspective, with remarks on some further crustaceans. *Biogerontology*, 11, 643-669.
- Vogt, G., 2013. Abbreviation of larval development and extension of brood care as key features of the evolution of freshwater Decapoda. *Biol. Rev.* 88, 81-116.
- Vogt, G., Falckenhayn, C., Schrimpf, A., Schmid, K., Hanna, K., Panteleit, J., Helm, M., Schulz, R., Lyko, F., 2015. The marbled crayfish as a paradigm for saltational speciation by autopolyploidy and parthenogenesis in animals. *Biology Open*, 4 (11), 1583-1594.
- Vogt, G., Huber, M., Thiemann, M., van den Boogaart, G., Schmitz, O.J., Schubart, C.D., 2008. Production of different phenotypes from the same genotype in the same environment by developmental variation. *Journal of Experimental Biology* 211, 510–523.
- Vogt, G., Tolley, L., Scholtz, G., 2004. Life stages and reproductive components of the Marmorokrebs (marbled crayfish), the first parthenogenetic decapod crustacean. *Journal of Morphology* 261 (3), 286-311.
- Vyhláška č. 437/2016 Sb., Vyhláška o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady a změně vyhlášky č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady a o změně vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady (vyhláška o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady).
- Wang, S., 2008. A comparative study of Fenton and Fenton-like reaction kinetics in decolourisation of wastewater. *Dyes and Pigments* 76(3), 714-720.
- Warrington, S.J., 1992. Clinical implications of the pharmacology of sertraline. *Int Clin Psychopharmacol*; 6 Suppl. 2: 11-21.

- Westerhoff, P., Yoon, Y., Snyder, S., Wert, E., 2005. Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environmental science & technology* 39(17), 6649-6663.
- Woodman, S. G., Steinkey, D., Dew, W. A., Burket, S. R., Brooks, B. W., Pyle, G. G., 2016. Effects of sertraline on behavioral indices of crayfish *Orconectes virilis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 134, 31-37.
- Wyatt, T.D., 2011. Pheromones and behavior. In: Breithaupt, T., Thiel, M. (Eds.), *Chemical Communication in Crustaceans*. Springer, pp. 23-38.
- Yang, Y., Ok, Y.S., Kim, K-H., Kwon, E.E., Tsang, Y.F., 2017. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment* 596:303–320.
- Zenker, A., Cicero, M.R., Prestinaci, F., Bottoni, P. and Carere, M., 2014. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J. Environ. Manage.* 133, 378-387.

8. Abstrakt

Znečištění volných vod farmaceutickými látkami je aktuální hrozbou pro vodní organismy. Rozvoj farmacie a zvýšená konzumace léčiv vede k zatížení vodního prostředí nebezpečnými polutanty. Díky rychlému a stresujícímu životnímu stylu u většiny lidské populace výrazně stoupá konzumace antidepresiv. Antidepresiva a ostatní léčiva se po konzumaci a exkreci dostávají přes čističky odpadních vod do vod podzemních a povrchových, kde mohou sekundárně ovlivňovat necílové organismy. Tato diplomová práce posuzuje možný vliv běžně užívaného antidepresiva sertralinu na vzájemné sociální chování u raků mramorovaných (*Procambarus virginalis*). Experiment byl založen na monitorování chování různých velikostně odlišných dvojic raků. V rámci vytvořených dvojic byli posuzovány vzájemné interakce mezi raky kontrolními, raky exponovanými v sertralinu a recipročně také mezi oběma skupinami raků. Tři týdny před monitorováním byli exponovaní raci vystaveni environmentálně relevantní koncentraci sertralinu $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledky byly vyhodnoceny sensorickým posouzením dle dostupné metodiky a následně se statisticky vyhodnotily. Žádná sledovaná skupina raků nevykazovala signifikantní rozdíl v chování. Díky prvotní fázi experimentů tohoto typu nemůžeme ze zjištěných výsledků s jistotou určit, že sertralin nemá vliv na sociální chování raků mramorovaných. Společně s dalšími antidepresivy je však sertralin, jako selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu, zajisté možnou hrozbou pro životní prostředí.

Klíčová slova: bezobratlí, sociální chování, farmaceutické polutanty, sertralin, rak mramorovaný

9. Abstract

Pharmaceuticals' pollution of open waters is a current threat to aquatic organisms. The development of pharmacies and increased consumption of drugs leads to a burden on the aquatic environment with dangerous pollutants. Due to the fast and stressful lifestyle, the consumption of antidepressants increases significantly in the majority of the human population. After consumption and excretion, antidepressants and other drugs enter groundwater and surface water through wastewater treatment plants, which can have a secondary effect on non-target organisms. This master thesis assesses the possible impact of the commonly used antidepressant sertraline on the mutual social behavior of marbled crayfish (*Procambarus virginalis*). The experiment was based on monitoring the behavior of different pairs of different crayfish. The created dyads assessed mutual interactions between control crayfish, crayfish exposed to sertraline, and reciprocally between both crayfish groups. Three weeks before monitoring, crayfish were exposed to an environmentally relevant sertraline concentration of $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The results were evaluated by sensory assessment according to available methods, and subsequently, the statistics were assessed. No group of crayfish observed showed a significant difference in behavior. Thanks to the initial phase of experiments of this type, we cannot determine with certainty from the results that sertraline does not affect the social behavior of marbled crayfish. However, along with other antidepressants, sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, is undoubtedly a potential threat to the environment.

Keywords: invertebrates, social behavior, pharmaceutical pollutants, sertraline, marbled crayfish