

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

Chování vodních organismů a kontaminace vodních toků? nechtěná léčba deprese a nespavosti u raků

Autor: Josef Mareš

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Miloš Buřič, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: M.Sc. Md Shakhawate Hossain

Studijní program a obor: Zootechnika, rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: Třetí

České Budějovice, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 odevzdanému 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 dne 2.5.2019

Josef Mareš

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Miloši Buřičovi, Ph.D. a Ing. Janu Kubcovi za poskytnutí odborné pomoci při pokusech, při tvorbě písemné části bakalářské práce, za aktivní přístup a velmi ochotné a rychlé jednání. Dále bych chtěl poděkovat všem, kteří se jakoukoliv formou podíleli na mém pokusu a přispěli tak ke vzniku této práce.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Josef MAREŠ**

Osobní číslo: **V16B013P**

Studijní program: **B4103 Zootechnika**

Studijní obor: **Rybářství**

Název tématu: **Chování vodních organismů a kontaminace vodních toků ?
nechtěná léčba deprese a nespavosti u raků**

Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

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

Humánní farmaka jsou závažnou skupinou polutantů ohrožující vodní ekosystémy celého světa. Do vodních ekosystémů se dostávají vypouštěnou vodou z čistíren odpadních vod buď jako nezměněné účinné látky nebo jejich rezidua. Tyto látky sice nejsou akutní toxickou hrozbou 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 (např. vztahy potravních organismů a predátorů, útlum nebo zvýšení abundance některých zástupců apod.). Tato práce by měla experimentálně zjistit jaký vliv má environmentálně relevantní koncentrace 6 vybraných farmak (tramadol, citalopram, sertralin, metamfetamin, venlafaxin a oxazepam) na základní chování modelového organismu. Jako modelového organismu bude použito raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*), který bude minimálně týden exponován roztoku vybraných farmak a porovnán s kontrolní skupinou drženou ve srovnatelných podmínkách. Koncentrace látek bude kontrolována ze vzorků vody odebraných v průběhu výměn expoziční lázně. Po době expozice budou raci nasazeni do experimentálních arén s a bez dostupných úkrytů a bude nahráváno jejich chování v tomto pro ně novém prostředí. Souběžně bude nahráváno vždy 10 kontrolních a 10 exponovaných raků. Následně budou pořízené záznamy analyzované pomocí etologického software EthoVision[®]13 a statisticky vyhodnoceny.

Cílem práce je získat informace o účinku environmentálně relevantních koncentrací vybraných farmak na chování zástupce vodních bezobratlých. Předpokládaným cílem je detekce změny pohybové aktivity, rychlosti a úkrytového chování raků u exponovaných jedinců.

Práce bude podpořena projektem CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I).

Rozsah grafických prací: **dle potřeby (do 10 stran)**

Rozsah pracovní zprávy: **30-50 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Backhaus, T., 2014. Medicines, shaken and stirred: a critical review on the ecotoxicology of pharmaceutical mixtures. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369(1656), 20130585.

Boxall ABA, Rudd MA, Brooks BW, et al., 2012. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? *Environ. Health Perspec.* 120: 1221-1229.

Brodin T, Fick J, Jonsson M, et al., 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. and Jonsson, M., 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems-impacts through behavioural alterations. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369(1656), 20130580.

Gherardi F., 2002. Behaviour. In: Holdich D.M. (ed.): *Biology of Freshwater Crayfish*, Blackwell Science Ltd., London, UK, pp. 258-290.

Golovko O, Kumar V, Fedorova G, et al., 2014. Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant. *Chemosphere* 111: 418-426.

Manning, A. and Dawkins, M. S., 2012. *An introduction to animal behaviour*, Cambridge University Press, Cambridge; New York.

Nyström P., 2002. Ecology. In: Holdich D. M. (ed.): *Biology of Freshwater Crayfish*, Blackwell Science Ltd., London, UK, pp. 192-235.

Schoenfuss, H. L., Furlong, E. T., Phillips, P. J., Scott, T. M., Kolpin, D. W., Cetkovic-Cvrlje, M., Lesteborg, K. E. and Rearick, D. C., 2016. Complex mixtures, complex responses: Assessing pharmaceutical mixtures using field and laboratory approaches. *Environmental toxicology and chemistry* 35(4), 953-965.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Miloš Buřič, Ph.D.**

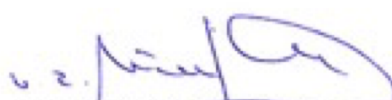
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Jan Kubec**

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: **5. ledna 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. května 2019**


prof. Ing. Pavel Kožík, Ph.D.
děkan

L.S.


doc. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 10. ledna 2018

Obsah

1. ÚVOD.....	8
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE	9
2.1 ZNEČIŠTĚNÍ POVRCHOVÝCH VOD	9
2.1.1. Šíření léčiv do životního prostředí.....	9
2.1.2. Čištění odpadních vod	10
2.1.2.1. Mechanické čištění	11
2.1.2.2. Biologické čištění	12
2.1.2.3. Kalové hospodářství	13
2.2 FARMACEUTICKY AKTIVNÍ SLOUČENINY	14
2.2.1 Tramadol.....	16
2.2.2 Citalopram	16
2.2.3 Metamfetamin.....	17
2.2.4 Venlafaxin.....	17
2.2.5 Sertralin.....	18
2.2.6 Oxazepam	18
2.3 RAK MRAMOROVANÝ.....	19
2.3.1 Rozmnožování	20
2.3.2 Biologie.....	20
2.3.3 Rozšíření	20
2.4 EKOTOXIKOLOGICKÉ TESTY	21
2.4.1 Ekotoxikologické testy na vodních organismech	22
2.4.2 Rak mramorovaný jako modelový organismus	22
2.5 PROGRAM ETHOVISION®	23
3. METODIKA.....	24
3.1 POUŽITÝ DRUH.....	24
3.2 EXPOZICE TESTOVANÝCH RAKŮ	24
3.3 MONITOROVÁNÍ CHOVÁNÍ	27
3.4 Vyhodnocení experimentu pomocí programu EthoVision®	29
3.5 Statistické vyhodnocení	29
4. VÝSLEDKY	30

4.1 SYSTÉM S ÚKRYTY	30
4.2 SYSTÉM BEZ ÚKRYTŮ	34
5. DISKUZE	37
6. ZÁVĚR	40
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
8. ABSTRAKT	48
9. ABSTRACT	49

1. Úvod

Tato bakalářská práce posuzuje vliv šesti farmaceuticky aktivních sloučenin (PhAC) na chování raků mramorovaných. Cíl práce je posoudit možný vliv těchto látek na necílové organismy.

PhAC představují velkou hrozbu pro vodní ekosystémy na celém světě. Různá léčiva mohou vstupovat do volných vod s nečištěnou odpadní vodou nebo přes čističky odpadních vod, které je dokážou vyčistit pouze částečně nebo vůbec, a tak zůstávají biochemicky aktivní ve vodních ekosystémech (Brodin a kol., 2013). Znečištění životního prostředí směsí PhAC podmiňuje neustále zvyšující se používání léčiv a výrobků pro osobní péči. Podle statistik Národního centra pro zdraví v USA vzrostla spotřeba antidepresiv v letech 1988 až 2008 o 400 % (Arnnok a kol., 2017). Zvýšení spotřeby farmak využívaných v humanitní a veterinární léčbě je důsledkem nejen zvyšující se hustota populace, ale také znatelné stárnutí populace. Navíc řada léků, jako jsou antidepresiva, léky na kardiovaskulární systém nebo krevní tlak, prášky na spaní a bolest, jsou často snadno dostupné a levné, čímž dochází ke zneužívání nebo nadměrnému užívání (Fent a kol., 2006).

PhAC jsou navrženy tak, že jsou účinné v nízkých koncentracích a jejich zbytky, které se dostávají do vodního prostředí přes odpadní vody, mohou ovlivnit necílové organismy. Dobře známé jsou toxické účinky PhAC na savce, ale informace o jejich ekotoxicitě a ekologických účincích jsou známé méně (Boxal a kol., 2012; Huerta a kol., 2012; Hugles a kol., 2012). Většina minulých studií byla zaměřena na hypertenzní léčiva, antibiotika a nejběžnější léčiva PhAC nacházející se v životním prostředí (Padhye a kol., 2014; Petrie a kol., 2016). Farmaceuticky aktivním látkám, které nemají zjevné toxické účinky, jako jsou antidepresiva, psycholeptika a opioidy, se nevěnovala tak velká pozornost (Brodin a kol., 2013).

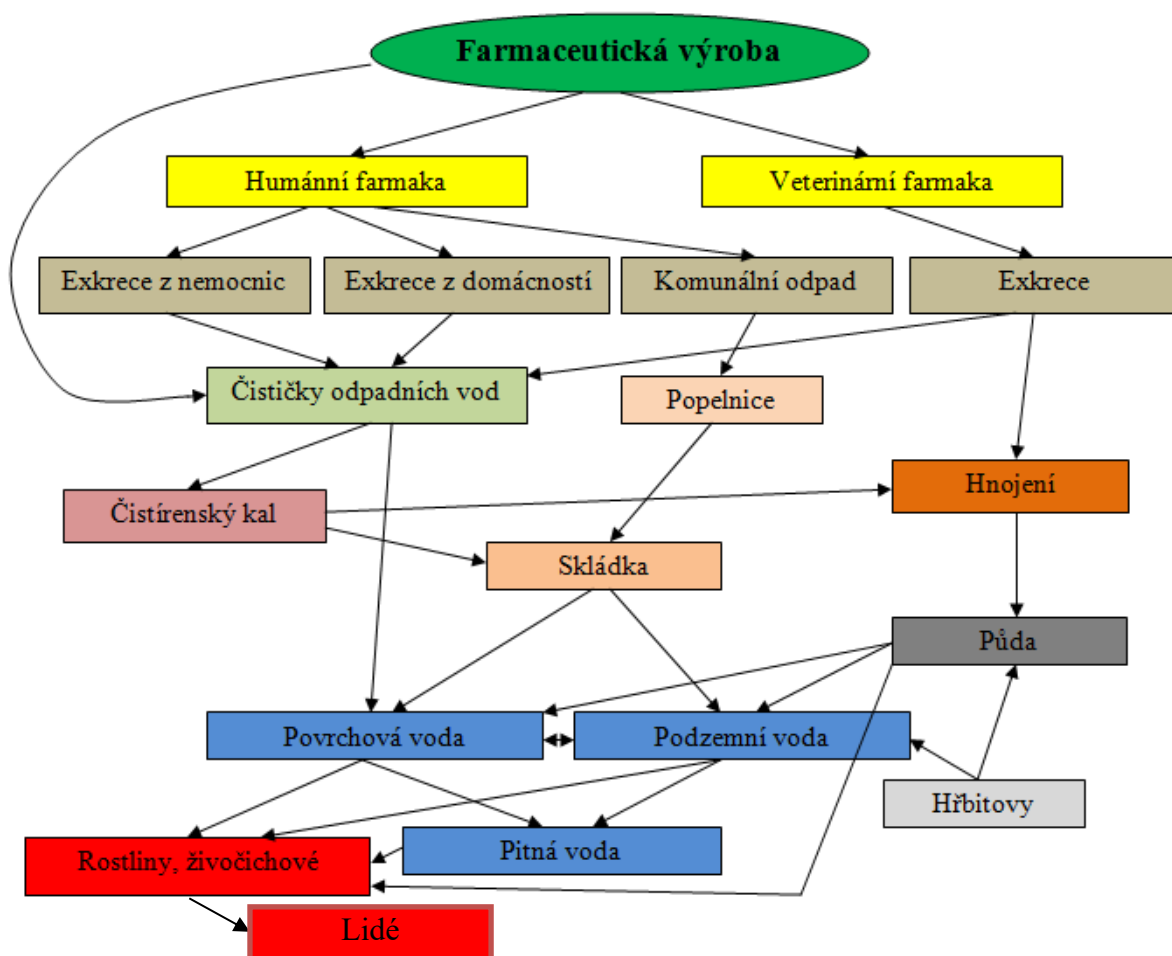
2. Literární rešerše

2.1 Znečištění povrchových vod

Co se týče celkového chemického znečištění povrchových vod v rozmezí let 2013–2015, tak dobrých výsledků nedosahuje 81,8 % útvarů stojatých vod a 90,6 % útvarů vod tekoucích. Mezi nejvíce problematické chemické polutanty patří prioritně látky ze skupiny polycyklických aromatických uhlovodíků (Tušil a Mičaník, 2018) a část specifických polutantů označovaných jako PPCP (Pharmaceuticals and Personal Care Products). Tyto látky se dostávají do odpadních vod až poté, co je použije populace. Obecně to jsou kosmetické přípravky, léčiva, hygienické a čisticí přípravky. Do skupiny těchto polutantů patří látky, které mají velice odlišnou chemickou strukturu, stejně jako fyzikální vlastnosti. Pro léčiva nelze v současné době použít legislativní podklady na ochranu životního prostředí, jelikož se obecně nemohou prohlásit za nebezpečné látky, a tudíž se jejich spotřeba a užívání musí respektovat, a naopak se zabývat problematikou jejich eliminace v čistírnách odpadních vod (ČOV) (Daughton a Ternes. 1999, Váňa a kol., 2010).

2.1.1. Šíření léčiv do životního prostředí

Kontaminace vodního prostředí je primárně zatěžovaná odpadními vodami z domácností a nemocnic. PhAC nebo jejich metabolity po aplikaci konzument vyloučí z organismu společně s močí a výkaly. Poté jsou tyto látky nejčastěji odváděny do čistíren odpadních vod. V dalších případech mohou být na vině znečištění rovněž průsaky ze špatně zabezpečených komunálních skládek či exkrementy, které vyprodukují léčená hospodářská zvířata (Dobšíková a kol., 2015). V čističkách odpadních vod dochází k sorpci léčiva na aktivovaný kal (AK), jejich stabilizaci a skladování nebo jsou kaly s obsahem léčiv využity ke hnojení. Léčiva se poté snadno přes půdu dostávají do spodních i povrchových vod. V zemích třetího světa se léčiva sekundárně dostávají do životního prostředí při úniku z průmyslové výroby. Další možností kontaminace vodního prostředí léčivy je jejich nesprávná likvidace, případně vyhození do komunálního odpadu (Kotyza, 2009; Paíga a Delerue-Matos, 2016).



Obr. č. 1: Životní cyklus farmak v životním prostředí (převzato a upraveno, Kotyza, 2009; Paíga a Delerue-Matos, 2016)

2.1.2. Čištění odpadních vod

Základním nástrojem pro zlepšování kvality povrchových vod je čištění odpadních vod, které vede ke snížení množství vypouštěné nečištěné vody. Nejvýznamnější faktory, podle kterých se hodnotí kvalita odpadní vody, jsou CHSK, BSK₅, P_{celk.}, N_{celk.} a pH. Další sledovaným faktorem odpadní vody je její teplota, která ve velké míře ovlivňuje rychlost chemických reakcí. Roční průměrná teplota odpadních vod se v České republice nejčastěji pohybuje kolem 15 °C, v širším rozmezí od 10 °C do 25 °C.

Velmi problematické a zároveň dosti nákladné pro provoz čistíren odpadních vod (ČOV) je odstraňování ropných látek a tuků. Tyto látky je potřeba odstraňovat již u zdroje znečištění. Bez předčištění se odpadní vody s ropnými látkami nikdy nesmí mísit s ostatními vodami. Postupy pro čištění odpadních vod, které obsahují ropné látky, řeší norma ČSN 75 6551 (Groda a kol., 2007).

2.1.2.1. Mechanické čištění

Nejčastěji používané procesy při mechanickém čištění odpadních vod patří zahušťování suspenzí a usazování. Mezi základní zařízení patří hrubé lapáky šterku, česle, lapáky písku, a usazovací a zahušťovací nádrže.

Primárním stupněm čištění je hrubé předčištění, které můžeme označit za ochrannou část ČOV. Toto čištění se provozuje za účelem odstranění velkých nerozpuštěných látek, za které považujeme různé plovoucí nebo vodou nesené předměty, jež by mohly narušit chod provozu ČOV, popřípadě způsobit vážné poruchy na strojích pro čištění vody. Pro tyto účely se používají lapáky šterku a česle (Bindzar, 2009).

Lapák šterku je umístěn těsně před čistírnou nebo na začátku čistírny na přiváděči odpadní vody. Lapák je jímka, která slouží k zachycení těžkých a velkých částic, například kamenů, cihel, šterku, atd. Oproti přívodnímu kanálu je lapák prohlouben a rozšířen, čímž dochází ke snižování rychlosti vody a usazování předmětů. Lapák šterku se využívá zejména při přívalových deštích. Součástí lapáku je i kontejner, do kterého se ukládá přebytečný materiál.

Druhým stupněm hrubého předčištění jsou česle, pomocí nichž se odstraňují plovoucí a hrubé nečistoty. Česle fungují na principu cezení, kdy konstrukcí a velikostí průlin v česlích určujeme velikost zachytávaných předmětů. Nejčastěji se zachytávají větve, shluky trávy, papír, zbytky obalů apod. Často používanou a velmi jednoduchou konstrukcí česlí je mříž, která je tvořena česlicemi a rámem. Sklon česlí ve směru toku bývá většinou pod úhlem 30° - 60°. Na základě velikosti průlin mezi česlicemi dělíme česle na hrubé, se vzdáleností česlic od 5 cm, a jemné, u kterých bývá velikost průlin většinou 1-2 cm (Dohányos a kol., 2007; Slavíčková, Slavíček, 2013). Lapáky písku jsou posledním stupněm hrubého předčištění, zachycují se zde minerální částice, písek a další těžší anorganické látky, jako jsou úlomky skla, škvára apod. Tento lapák slouží k odstranění nerozpuštěných anorganických částic, které je třeba oddělit od částic organických, ty se odstraňují v sedimentačních nádržích (Henze a kol., 2002). Dále v lapácích písku dochází ke zpomalování proudění vody, a tudíž můžeme lapák využívat i k odstranění plovoucích látek (různé tuky). Odstranění tuků probíhá pomocí hladinových lišt, kdy lišty stírají plovoucí látky z hladiny do žlabu, a poté jsou odváděny do kalového hospodářství. Výhodnější je ovšem odstraňovat tuky přímo u

zdroje znečištění, kde se nachází ve větší koncentraci (Binzdar, 2009; Chudoba a kol., 1991).

Poslední fáze mechanického čištění odpadní vod probíhá v usazovacích a zahušťovacích nádržích, kdy se pomocí gravitačního zrychlení usazují tuhé částice. V závislosti na hustotě suspenzí a vzájemném ovlivnění různých částic mezi sebou při usazování, rozlišujeme prosté usazování a zahušťování suspenzí (Dohányos a kol., 2007).

2.1.2.2. Biologické čištění

Biologické čištění nebo také čištění sekundární tvoří druhou část čistícího procesu v ČOV. Sekundární čištění probíhá v anaerobních podmínkách v biologickém reaktoru, kde se uplatňují biochemické oxidačně-redukční reakce. Mikroorganismy v odpadní vodě rozkládají pomocí oxidace kyslíkem organické látky, tato činnost je podmiňující pro již zmiňované oxidačně-redukční reakce. Účelem těchto reakcí je odbourávat a koagulovat neusaditelné koloidní látky, dále pak stabilizovat látky organické (Hlavínek a Hlaváček, 1996). Významnou částí procesu biologického čištění je aktivace, tedy vytvoření aktivovaného kalu, což je směsná kultura mikroorganismů, kdy mikroorganismy rozdělujeme do dvou hlavních skupin, kterými jsou destruenti a konzumenti. Destruenti biochemicky rozkládají znečišťující látky v odpadní vodě. Tvoří podstatnou většinu mikroorganismů v aktivovaném kalu a patří mezi ně hlavně bakterie, dále pak bezbarvé sinice nebo mikroskopické houby. Konzumenti jsou zde jednobuněčné i mnohobuněčné organismy. Složení aktivovaného kalu, jak v kvantitativním, tak v kvalitativním ohledu, závisí hlavně na substrátu, kde byl kal pěstován, dále na hodnotách technologických parametrů během kultivace. Mezi nejdůležitější vlastnosti aktivovaného kalu patří dobrá flokulace a sedimentace vloček kalu. Základní druhy aktivovaného kalu jsou flokující aktivovaný kal, neflokující aktivovaný kal a zbytnělý aktivovaný kal (Binzdar, 2009). Proces aktivace se skládá z aktivační nádrže, tedy vlastní biologické jednotky a z dosazovací nádrže, tedy jednotky separační. Přitékající odpadní voda se v aktivační nádrži mísí s recirkulovaným kalem, poté je tato směs provzdušňována mechanickými aerátory nebo tlakovým vzduchem, dále prochází do dosazovací nádrže, kde je aktivovaný kal separovaný od vyčištěné vody. Voda poté odtéká k dalšímu stupni čištění, popřípadě do recipientu. Zahuštěný kal je veden zpátky na začátek do aktivační nádrže. Nová

biomasa, která se tvoří během aktivačního procesu, se musí odstraňovat jako přebytečný kal (Hlavínek a kol., 2000; Chudoba a kol., 1991).

Terciální stupeň čištění odpadní vody v ČOV je odstraňování dusíku a fosforu, protože v povrchových vodách způsobují eutrofizaci, navíc amoniak a dusitany působí toxicky na vodní organismy, atd. Dusík se odstraňuje nitrifikací a denitrifikací, tedy biologicky nebo fyzikálně chemickým způsobem, což je například chlorace, stripování vzduchem, membránové procesy, atd. Fosfor se odstraňuje též biologicky (defosfatací) a fyzikálně chemickou metodou (chemické srážení solemi kovů nebo vápnem, atd.) (Slavičková, Slaviček, 2013; Groda a kol., 2007).

2.1.2.3. Kalové hospodářství

Produktem ČOV je čistírenský kal, tedy směs vody a pevných látek z primárního, sekundárního i terciálního stupně čištění. Čistírenský kal bez dalších úprav zapáchá, obsahuje patogenní zárodky (viry, bakterie, atd.), toxické látky a další polutanty, tudíž je nutností každé čistírky řešit problematiku kalového hospodářství. Mezi hlavní cíle této problematiky patří redukce objemu kalu a obsahu vody, likvidace patogenních zárodků a zápachu z kalu. Dalšími požadavky je vyhovět požadavkům na kvalitu životního prostředí, minimalizovat náklady na skladování a transport kalu (Templeton a Butler, 2011). Proces odstraňování kalu začíná jeho zahuštěním, kdy je účelem odstranění části volné vody a snížit tím množství kalové suspenze. Dále je kal stabilizován, zde se biologicky lehce rozložitelné organické látky přeměňují na látky minerální nebo těžce biologicky rozložitelné látky. Za stabilizací následuje odvodnění kalu a postup končí konečným zpracováním kalu, tedy buď likvidací, nebo dalším využitím, což se odvíjí hlavně na vlastnostech kalu. Při absenci závadných látek, jako jsou těžké kovy nebo patogenní mikroorganismy je možné kal využít jako zemědělské hnojivo, pro kompostování nebo jako směs do stavebních materiálů. Likvidace probíhá většinou spalováním, což je považováno za nejúčinnější způsob, ale možnost je také kal skládkovat (Hlavínek a kol., 2000; Kutil a Dohányos, 2017).

2.2 Farmaceuticky aktivní sloučeniny

Farmaceuticky aktivní sloučeniny jsou v posledních letech považovány za významný zdroj znečištění povrchových vod (Wilga a kol., 2008). I když jejich malé množství nemá výrazný vliv na úmrtnost, u vodních organismů se může projevit chronická toxicita některých látek (Jjemba, 2006). Významným zdrojem farmaceutického znečištění povrchových vod jsou PhAC látky využívané v zemědělství jako veterinární léčiva při chovu hospodářských zvířat nebo v akvakultuře (Heberer, 2002). Pro zmírnění vlivů PhAC látek ve vodním prostředí je zapotřebí dobrá znalost farmakokinetických vlastností, stejně jako stanovení přesných dávek pro léčiva používané v akvakultuře (Ueno a kol., 2004; Fang a kol., 2008). Nejvýznamnější vstupní cestu léčiv do vodního prostředí jsou čističky odpadních vod, do kterých se tyto látky dostávají močí přes těla pacientů, kteří léčiva konzumují (Bound a Voulvoulis, 2004).

Psychofarmaka, jinak nazývané jako látky psychotropní, jsou látky, jejichž účinky mají vliv na duševní stav pacienta. Obvykle se využívají látky příznivě působící na psychickou integraci člověka, a látky, které ovlivňují úroveň afektivity, tedy například strach, smutek nebo hněv. Psychotropní látky se nevyžívají jen pro léčbu osob, ale také v řadě dalších lékařských oborů, kde se příznivě uplatňuje jejich zásah do funkce somatického a vegetativního nervstva. Psychofarmaka neléčí příčinu duševních chorob, ale pouze zmírňují některé chorobné projevy (Wenke, 1986).

Níže uvedená tabulka porovnává farmaceutické účinky různých farmak na chování řady druhů ryb. Uvedená koncentrace stanovuje hodnotu, při které byly pozorovány účinky na pozorovaném chování. Pokud nebyl pozorován žádný farmaceutický účinek na sledované chování, nejvyšší testovaná koncentrace látky je uvedena v závorce. Hodnoty uvedené s hvězdičkou značí nominální koncentraci. Uvedené koncentrace jsou v $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ nebo v $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tělesné hmotnosti (Brodin a kol., 2014).

Tab. č. 1: Účinky různých koncentrací farmak na chování ryb

Léčivo	Druh ryby	Pozorované chování	Koncentrace testované látky
neostigmin	<i>Lepomis gibbosus</i>	Odvážnost	(100 000)
pyridostigmin	<i>Lepomis gibbosus</i>	Odvážnost	(100 000)
citalopram	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Agresivita	(100 000)
bupropion	<i>Pimephales promelas</i>	odlišné chování při reprodukci	(0,057)
fluoxetin	<i>Aphanius dispar</i>	agresivita, aktivita a sociální chování	0,3
fluoxetin	<i>Betta splendens</i>	agresivita a aktivita	350
fluoxetin	<i>Betta splendens</i>	Agresivita	0,5-0,008*
fluoxetin	<i>Carassius auratus</i>	zvýšení příjmu potravy	54 000
fluoxetin	<i>Morone saxatilis, Morene chrysops</i>	zvýšení příjmu potravy	23 000
fluoxetin	<i>Pimephales promelas</i>	zvýšení příjmu potravy	3,7
fluoxetin	<i>Pimephales promelas</i>	odlišné chování při reprodukci	(0,028)
sertralin	<i>Pimephales promelas</i>	odlišné chování při reprodukci	(0,0052)
sertralin	<i>Pimephales promelas</i>	Odvážnost	3
sertralin	<i>Perca fluviatilis</i>	rychlost přijímání potravy	89*
venlafaxin	<i>Pimephales promelas</i>	chování při reprodukci	(1,1)
venlafaxin	<i>Morone saxatilis, Morene chrysops</i>	zvýšení příjmu potravy	36
carbamazepin	<i>Oryzias latipes</i>	aktivita, rychlost přijímání potravy	6 100
difenhydramin	<i>Pimephales promelas</i>	zvýšení příjmu potravy	5,6
propranolol	<i>Pimephales promelas</i>	odlišné chování při reprodukci	(4)
propranolol	<i>Danio rerio</i>	Aktivita	3 000
diclofenac	<i>Oryzias latipes</i>	zvýšení příjmu potravy	1 000
bromzepam	<i>Danio rerio</i>	Aktivita	1 500
buspiron	<i>Danio rerio</i>	Aktivita	3 000
clonazepam	<i>Danio rerio</i>	Aktivita	300
diazepam	<i>Danio rerio</i>	Aktivita	160
diazepam	<i>Lepomis gibbosus</i>	Aktivita	266
diazepam	<i>Danio rerio</i>	Odvážnost	5 000
haloperidol	<i>Pimephales promelas</i>	Agresivita	50
oxazepam	<i>Perca fluviatilis</i>	aktivita, sociální chování, zvýšení příjmu potravy	1,8

2.2.1 Tramadol

Vznik opioidních analgetik umožnil v řadě indikací terapeuticky zvládat různé bolesti. Avšak i tyto medikamenty mají nedostatky, patří mezi ně možnost vzniku závislosti na těchto látkách, vznik tolerance vůči jejich účinkům, útlum dýchání nebo zácpa. Výsledkem snahy o nalezení analgetika, které působí centrálně a nevyvolává nežádoucí závislost, je tramadol (Hampl a kol, 2015).

Působení tramadolu není úplně jednoduché, neboť je jen v malé míře opatřen opioidními μ -receptory, které zodpovídají za vznik závislosti. Udává se, že tramadol má 6000x nižší vazbu na μ -receptory než morfin. Mezi pozorované biointerakce tramadolu patří interakce s některými subtypy serotoninových receptorů, acetylcholinových muskarinových a nikotinových receptorů, ale také inhibice zpětného vychytávání noradrenalinu a serotoninu (SSRI). Tramadol působí synergicky, je používán jako cis-racemát, což je racemická směs dvou enantiomerů (R,R a S,S), přičemž k synergetickému působení enantiomerů je přikládán příznivý terapeutický profil tramadolu (Rádl, 2016).

Při testování vlivu tramadolu na chování raka mramorovaného (*Procambarus virginalis*) v koncentraci látky $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ čisté sloučeniny, což je z hlediska životního prostředí považováno za relevantní úroveň, byla zjištěna snížená aktivita u exponovaných zvířat. Raci vystavení působení tramadolu ve srovnání s kontrolou nachodili výrazně kratší vzdálenosti, což bylo spojeno s jejich sníženou rychlostí (Buřič a kol., 2018).

2.2.2 Citalopram

Citalopram je typický zástupce selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu. Poločas rozpadu této látky je zhruba 36 hodin. Metabolizace látky probíhá v játrech. Citalopram je používán pro léčbu deprese jako prostředek první volby. Což platí pro unipolární deprese, tak i pro různé depresivní epizody v bipolárních poruchách. Kromě toho se citalopram předepisuje pro terapii panické poruchy bez agorafobie i s agorafobií. Mezi nežádoucí účinky citalopramu v závislosti na podávaných dávkách mohou patřit nebezpečné poruchy srdečního rytmu. V ojedinělých případech může nastat porucha krvetvorby v kostní dřeni (Dreher, 2017). Při sledování účinků citalopramu na raku mramorovaném v koncentraci látky $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ čisté sloučeniny, což je z hlediska životního prostředí považováno za relevantní úroveň, byla zjištěna snížená

aktivita u exponovaných zvířat. Raci vystavení působení citalopramu ve srovnání s kontrolou nachodili výrazně kratší vzdálenosti, což bylo spojeno s jejich sníženou rychlostí (Buřič a kol., 2018).

2.2.3 Metamfetamin

Metamfetamin se řadí mezi medikamenty se slabou lipofilitou a za pomoci difúze přestupuje snadno přes plazmatickou membránu buněk. Chemická struktura se podobá struktuře efedrinu a amfetaminu, má také téměř stejné biologické stimulační vlastnosti (Anglin a kol., 2000). Metamfetamin je nejspíše nejrozšířenějším syntetickým stimulantem. V mnoha zemích po celém světě je spolu s kokainem, marihuanou a opioidy považován za jednu z nejužívanějších nezákonných drog. Původně byl metamfetamin pokusnou látkou, která se používala jako lék, později byl používán jako látka pro zvýšení výkonu vojáků. Koncem sedmdesátých let se stává výroba a užívání metamfetaminu nelegální, ale od začátku devadesátých let jeho spotřeba, díky oblibě užívání, prudce narůstá po celém světě. V České republice představuje metamfetamin druhou nejoblíbeněji užívanou drogu hned po konopí (Mravčík a kol., 2007). Může být užíván různými způsoby, perorálně, inhalací, análně, intravenózně, přičemž největší (100%) biologickou dostupnost metamfetaminu představuje podání drogy injekčně a v těchto případech dochází nejčastěji k problémům s předávkováním nebo vyvoláváním závislosti. Pro své složení je rezistentní vůči působení degradačního enzymu monoaminoxidázy v játrech a poločas eliminace trvá 12 až 34 hodin (Cho a kol., 2001).

Nežádoucí účinky metamfetaminu závisí především na dávce a způsobu podání. Při aplikaci intravenózně nebo inhalačně dochází ve velkém množství k uvolnění neurotransmiteru, kdežto po perorální aplikaci dochází k pomalejšímu uvolnění nízkých hladin dopaminu (Volkov a kol., 2001).

2.2.4 Venlafaxin

Venlafaxin je duálním antidepresivem SNRI (serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor), jedná se o bicycklý phenylethylamin. Antidepresivní účinky venlafaxinu byly prokázány na humánních i animálních modelech, aniž by se prokázala větší afinita k muskarinovým nebo anticholinergním receptorům (Einarson a kol., 1999). Venlafaxin má výraznou down-regulaci beta-adrenergních receptorů, což znamená řidší osazení membrán receptorem. Účinek na zpětné vychytávání noradrenalinu závisí převážně na

dávce, je však nižší než vychytávání serotoninu. Při vyšších dávkách je venlafaxin duálním antidepresivem s lineární kinetikou, které má minimální vazbu na plazmatický albumin a vykazuje poměrně rychlou absorpci a dostatečně stabilní plazmatickou koncentraci dostává během několika dní (3-4 dny) (Kent a kol., 2000). Venlafaxin se používá pro léčbu deprese a to i pro depresi, která je provázená úzkostí, dále je indikován k prevenci recidiv depresivních epizod, stejně jako pro prevenci relapsu depresivní epizody (Kašparová, Novotná, 2005). Účinnost této látky pro léčbu deprese bez úzkosti nebo s ní byla podložena velkým množstvím placebem kontrolovaných studií u ambulantních i hospitalizovaných pacientů (Rudolph a kol., 1998).

2.2.5 Sertralin

Sertralin patří stejně jako citalopram do skupiny látek selektivních inhibitorů zpětného příjmu serotoninu (SSRI), které také můžeme označit jako antidepresiva 3. generace. Tato skupina látek postrádá anticholinergní a sedativní účinky, taktéž nezesilují účinek alkoholu a nejsou kardiotoxické (Hynie, 2001). SSRI látky mají dobré vstřebávací vlastnosti z gastrointestinálního systému (GIT), na krevní bílkoviny se mohou vázat až v 90 procentech. Biotransformace probíhá v játrech, kde jsou přítomny izoenzymy cytochromu 450. Mezi riziko setralinu patří vyvolávání serotoninového syndromu a aktivace 5-HT-receptorů v mozku i GIT (Martínková, 2007), kdy se mohou vyskytnout centrální nežádoucí účinky, jako jsou bolesti hlavy, břicha, nespavost, nervozita, zmatenost, apod. Sertralin je podáván při lehkých až středně těžkých depresích (Hynie, 2001).

2.2.6 Oxazepam

Lék oxazepam se od 60. let minulého století používá hlavně pro léčbu nespavosti a úzkosti, ale také při odvykání závislosti na alkoholu. Oxazepam řadíme mezi léčiva ze skupiny benzodiazepinů, tedy psychoaktivních látek, které zesilují působení neurotransmiteru GABA a vyvolávají antikonvulzivní, myorelaxační, sedativní, anxiolytický, amnestický a hypnotický účinek (Page a kol., 2002), a proto se benzodiazepiny využívají při léčbě nespavosti, úzkosti, křečí, agitace nebo abstinenčních příznaků (Olkkola a Ahonen, 2008). Benzodiazepiny mají velmi dobrou biologickou dostupnost, která se při perorálním podání blíží 100 %. Účinek těchto látek nastupuje již v průběhu první hodiny, ale u oxazepamu obvykle později (Lincová a Farghali, 2007). Poločas rozpadu oxazepamu se pohybuje kolem 8 hodin. Oxazepam

konjuguje přes hydroxylovou skupinu s kyselinou glukuronovou a jeho eliminace je renální (Lüllmann a kol., 1994). Kumulaci v tukové tkáni a snadnou prostupnost přes hematoencefalickou bariéru zajišťuje benzodiazepinům poměrně vysoká lipofilita. Vyšší je také vazebnost na plasmatické bílkoviny, ta se pohybuje od 60 do 95 %. Do vody se tyto látky dostávají vyloučením ve formě sloučenin rozpustných ve vodě. Mezi nežádoucí účinky patří poruchy koordinace, anterográdní amnézie, zmatenost nebo ospalost, tyto jevy se mohou projevit při běžném dávkování. Při předávkování může docházet k prohloubení a prodloužení spánku. Tlumivý účinek na centrální nervovou soustavu může vyvolat kombinace s jinými látkami, hlavně konzumace alkoholu (Lincová a Farghali, 2007).

2.3 Rak mramorovaný

Rak mramorovaný, v odborné literatuře znám jako *Procambarus virginalis*, Lyko 2017 a v zahraničí označován jako „*marbled crayfish*“ nebo „*Marmorkrebs*“. Jedná se o partenogeneticky rozmnožujícího se korýše řádu Decapoda, který patří k akvaristicky nejchovanějším druhům. Rovněž je silně invazivním druhem pro evropské sladkovodní ekosystémy. Tento rak je triploidním potomkem druhu raka *Procambarus fallax*, který se rozmnožuje sexuálně, tudíž od něj existují samci i samice, na rozdíl od druhu *Procambarus virginalis*, od kterého existují pouze samice (Vogt a kol., 2015). Ještě donedávna byl rak mramorovaný označován jako *Procambarus fallax f. virginalis*, tedy poddruh výše zmíněného raka *Procambarus fallax*, avšak Lyko (2017) povýšil raka mramorovaného na samostatný druh.



Obr. č. 2: Rak mramorovaný (foto autor)

2.3.1 Rozmnožování

Jak již bylo napsáno, rak mramorovaný se rozmnožuje pomocí tzv. apomiktické partenogeneze (Vogt, 2007), což je jeden z nejjednodušších partenogenetických procesů, při kterém dochází k potlačení meiózy a produkují se neoplozená diploidní vajíčka pomocí mitózy, tudíž můžeme potomky apomiktické matky označit jako její klony. Apomiktické rozmnožování je běžné například u živorodé ryby *Poecilia formosa*, řady vírníků, členovců, měkkýšů a dalších živočichů (Stenberg a Saura, 2009).

2.3.2 Biologie

Rak mramorovaný je řazen mezi menší druhy raků, může dorůst do velikosti 13 cm, ale obvyklá velikost je maximálně kolem 10 cm. Tento druh je značně krátkověký, v laboratorních podmínkách se průměrně dožívá dvou let a jen 10 % jedinců se dožije více než tří let. Ke smrti dochází většinou při neúspěšném svlékání (Vogt a kol., 2004). Rak mramorovaný má již podle názvu typické mramorování, které je patrné hlavně na bocích hlavohruď. Hlavohruď je hladká, několik trnů se nachází za týlní brázdou a je přítomen jeden pár postorbitálních lišt. Rostrum je výrazné a jeho střední rýha chybí. Hladké okraje rostra se sbíhají a vytváří malý trojúhelníkový vrcholek. Klepeta jsou na svrchní straně výrazněji mramorovaná, na povrchu jsou slabě zrnitá a v poměru s tělem mají malou velikost, jen v ojedinělých případech jsou delší než polovina délky hlavohruď. Zápěstí obou klepet mají silně vyvinutý trn na jejich vnitřní straně (Kozák a kol., 2015).

2.3.3 Rozšíření

Původní rozšíření raka mramorovaného je neznámé. Jistý je původ druhu *Procambarus fallax*, kdy jeho originální výskyt nalezneme v oblasti Severní Ameriky, konkrétně ve státech Florida a Georgia. Rak mramorovaný byl popsán poprvé až na Evropském kontinentu, kde se od poloviny devadesátých let začal rozšiřovat akvaristickým obchodem v Německu a Rakousku. Ve volné přírodě v Evropě byl poprvé zaznamenán výskyt raka mramorovaného v roce 2003 v Německu (Vogt a kol., 2004; Kozák a kol., 2015). Hossain a kol. 2018 shrnuje dosavadní rozšíření raka mramorovaného. Jeho výskyt byl od roku 2003 prokázán v 11 evropských státech, v Japonsku a na Madagaskaru, přičemž ve většině případů se jedná o etablované populace. Na území České republiky byly zjištěny dva nálezy tohoto raka, přičemž minimálně jedné populaci se podařilo úspěšně přezimovat, u obou byla zjištěna známka

reprodukce, a tudíž je lze považovat za etablované. Tuto lokalitu tvoří soustava parkových vodotečí a jezírek, která se nachází v Praze. V druhém případě se jedná o umělou nádrž poblíž města Bílina (Patoka a kol., 2016).

2.4 Ekotoxikologické testy

Ekotoxikologické testy slouží jako významné preventivní opatření pro snížení nebezpečí dopadu odpadních vod nebo různých chemických přípravků a látek na životní prostředí, proto je důležitá znalost účinků určitých látek, na chování testovaných organismů (Hon, 2013). V dnešní době většina chemikálií, které se užívají v Evropě, podléhá toxikologickému testování. Sledováním účinků látek stanovujeme, jestli je pozitivní přínos látky důležitější než možná rizika pro životní prostředí a pro člověka. K posouzení rizik slouží testy zaměřené na změny chování vodních organismů vystavených určité aktivní látce či látkám, případně na odchylky v běžném chování, ne pouze na procentuální přežití organismů. Nejčastěji jsou požívány již tzv. environmentálně relevantní koncentrace látek, které se určují na základě koncentrace polutantů již obsažených ve vodním prostředí. (Svobodová a kol., 2010a).

Před samotným ekotoxikologickým testem je třeba zvážit určité faktory, které by mohly výši účinnosti ovlivňovat. Konečný efekt je závislý na prostředí, organismu a vlastnostech látky. Dostupnost pro organismus, působení v organismu, a také rozsah a způsob vylučování ovlivňují chemicko-fyzikální vlastnosti polutantů. Důležitou rolí v působení testovaných látek na organismy hraje stabilita a koncentrace dané látky, dále také délka expozice nebo perzistence polutantu v prostředí. Nízké koncentrace látek, často organismus přežívá bez viditelných následků na rozdíl od vysokých koncentrací stejné látky, které mohou vést ke smrtelnému poškození. Velký význam hraje i délka trvání testu, tedy jak dlouho je organismus vystaven toxické látce, v těchto případech může docházet k závažným problémům i při nízkých koncentracích (Williams a kol., 2003). Abiotické a biotické faktory také významným způsobem ovlivňují toxické působení látky. Hlavním faktorem z fyzikálních parametrů je teplota prostředí, především u ryb je zásadní pro rychlost jejich metabolismu. Teplota všeobecně ovlivňuje rychlost chemických reakcí, ať už pozitivním nebo negativním způsobem. Mezi další důležité parametry patří intenzita osvětlení a množství kyslíku (Svobodová a kol., 2010b).

Způsoby provádění testů závisí na použité metodice, kterou je třeba dodržovat. Testy toxicity rozdělujeme podle různých kritérií. Podle délky testu rozdělujeme testy

na akutní, subchronické a chronické (Williams a kol., 2003). Testy akutní toxicity zjišťují dávkovou závislost pro akutní účinek testované látky, získávají se od nich hlavně kvantitativní údaje o toxických účincích. Nejčastěji se sleduje mortalita (Linhart, 2012). Od testů subchronických získáváme údaje o dávkové závislosti opakované expozice na škodlivých látkách. Subchronické testy trvají nejčastěji 14 až 90 dní, a proto nejsou plnohodnotné pro posouzení rizik dlouhodobých expozic genotoxických látek. Hrají však velmi důležitou roli pro posuzování bezpečnosti léčiv, potravinových aditiv, pesticidů a dalších chemických látek (Wilson a kol., 2008). U chronických testů sledujeme dlouhodobé účinky toxikantů na testovaných organismech po dobu několika měsíců, let i po celou dobu dospělého života (Williams a kol., 2008).

2.4.1 Ekotoxikologické testy na vodních organismech

V metodikách testů toxicity jsou nejčastěji používány vodní organismy. Nejběžněji jsou v testech zastoupeny ryby, měkkýši, korýši, vodní rostliny, dále potom řasy a bakterie. Hlavním požadavkem pro provádění testů toxicity je rozpustnost sledované látky ve vodě (Kočí a Mocová, 2009). Základním principem testů je vystavit testované organismy po určitý čas určité koncentraci testované látky. Zároveň se provádí kontrolní test (skupina), kdy se organismy za stejných podmínek umístí pouze do ředící vody bez toxikantu. Po skončení testu se porovnají výsledky obou skupin a zaznamenají se toxické účinky, popřípadě příznivé účinky vlivu sledované látky na testované organismy (Svobodová a kol., 2010a).

2.4.2 Rak mramorovaný jako modelový organismus

Pro laboratorní objekty jsou velice žádaná geneticky identická zvířata, která umožňují získávat závěry o environmentálních a epigenetických účincích na vývoj, strukturu a chování. Tyto zvířata jsou však velice vzácná, zvláště organismy, které mají vysokou míru reprodukce. Na základě partenogenetického rozmnožování je rak mramorovaný ideální kandidát pro laboratorní objekty. Studie dokazuje genetickou jednotnost potomstva, kdy rak produkuje geneticky identické potomky (Vogt a kol., 2004; Martin a kol., 2007). Vogt, 2008 poukazuje na to, že geneticky totožní jedinci vykazují překvapivě široké rozmezí variací v růstu, délce života, reprodukci, zbarvení, a to i při chovu ve stejných podmínkách. Největší odchylka byla pozorována u mramorovaného zbarvení, kdy byl každý ze stovek testovaných jedinců unikátní.

Výhod využití raka mramorovaného pro výzkumné účely je hned několik, vedle již zmíněné genetické uniformity tohoto druhu, kdy se eliminuje genotypová variabilita (Martin a kol., 2007), je rak mramorovaný velmi vhodný pro chov, což dokazuje jeho snadná kultivace, rychlá reprodukční schopnost a vysoká tolerance k manipulaci. Dále se tento druh raka snadno přizpůsobí různým životním podmínkám. Jako velkou výhodou můžeme také považovat eliminaci druhého pohlaví, jelikož chování samců a samic je většinou značně odlišné, můžeme při absenci samců očekávat větší jednotvárnost (Kawai a kol., 2015; Vogt, 2008)

2.5 Program EthoVision®

Program EthoVision® byl vyvinut pro konzistentní a spolehlivé sledování chování testovaných organismů po delší dobu, než při manuálním nahrávání, kdy změny chování u sledovaných zvířat zaznamenává pověřená osoba. Výhoda počítačového algoritmu je, že pracuje vždy stejným způsobem a výsledky tak nezkrusuje únava zapisovatele. Software zaznamenává aktivitu, pohyb a chování zvířat, a to i při sledování více objektů najednou. Integrovaný systém EthoVision® XT se skládá z různých softwarových a hardwarových částí. Videokamera zaznamenává oblast, kde se sledované objekty (zvířata) nachází. Analogový videosignál je digitalizován snímacím zařízením a následně přenesen do paměti počítače. Software na základě šedé stupnice jasu nebo odstínů sytosti barvy odliší sledovaný objekt od pozadí. Výpočty se provádí na základě naměřených hodnot dle chování sledovaných zvířat (Noldus a kol., 2001).

3. Metodika

Celý pokus probíhal na experimentálním rybochovném pracovišti a pokusnictví, které je součástí Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického (VÚRH) ve Vodňanech. Experiment se sestavoval z expoziční fáze následovanou vlastním experimentálním pozorováním testovaných jedinců a poslední částí zaměřenou na samotné vyhodnocení chování pomocí speciálního softwaru. Hlavní účel tohoto experimentu byl vystavit testované jedince koktejlu šesti sledovaných látek – Tramadol, Citalopram, Metamfetamin, Venlafaxin, Oxazepam a Sertralin. Výsledný mix sledovaných látek (zásobní roztok) byl vytvořen ve specializované laboratoři VÚRH o celkové koncentraci $6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ tak, aby sledované látky v expozičním roztoku určeném pro testované raky odpovídal koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pro jednotlivé látky.

3.1 Použitý druh

Pro testování byli použiti jedinci raka mramorovaného. Raci byli odchováni v akvarijní místnosti vybavenou stálou recirkulací vody a trvalým světelným režimem. Teplota vody odchovu byla nastavena na optimální teplotu pro tento druh raka. K pokusu se vybírali raci z náhodně vybraných odchovných nádrží. Věk pokusných raků byl přibližně stejný. Velikost raků se pohybovala v rozmezí 16 – 23 mm délky hlavohruď. Byla změřena pomocí posuvného měřítka s přesností na 0,1 mm. Hmotnost raků byla zjištěna na elektronické váze (Kern a Sohn, Balingen, Německo) s přesností na 0,1 g.

3.2 Expozice testovaných raků

V první fázi experimentu byla provedena expozice, neboli vystavení raků koktejlu sledovaných látek po dobu tří týdnů. Tato doba byla určena na základě delšího mechanismu účinku určitých látek, tj. antidepresantů citalopramu, sertralinu a venlafaxinu. Raci byli umístěni v krabičkách o délce 19 cm, šířce 14 cm a hloubce 7 cm, do kterých se přidal vždy 500 ml vody u kontroly) nebo 500 ml připraveného roztoku látek o celkové koncentraci $6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pokus byl proveden v laboratoři s denním režimem a konstantní teplotou vody $20 \text{ }^\circ\text{C}$, bez pohybu osob. V průběhu expozice byla zaznamenávána mortalita a svlékání raků a kladení vajíček.



Obr. č. 3: Umístění krabiček s raky v průběhu expozice (foto autor)

Krabičky s raky byly umístěny na stojanech ve dvou částech laboratoře. V jedné se sledovala exponovaná skupina, kdy byl do každého boxu přidán expoziční roztok připravený z odstáté a temperované pitné vody s mixem sledovaných látek. Jelikož všechny látky podléhaly biodegradaci, tedy poměrně rychlému rozkladu, musela se lázeň obnovovat každých 24 hodin. V druhé části laboratoře byla sledována kontrolní skupina o stejném počtu vzorků, tedy 100 kusů krabiček s raky mramorovanými, v tomto případě se k rakům přidávala pouze odstátá a temperovaná pitná voda. Podmínky okolního prostředí byly optimalizovány pro obě skupiny stejně z důvodu eliminace jakéhokoliv vlivu na jednu ze skupin.

Výměna vody probíhala u exponované i kontrolní skupiny jednou za 24 hodin a pro zamezení jakékoliv kontaminace byly pro výměnu použity gumové rukavice. V první řadě se voda měnila u kontrolní skupiny. Vedle stojanů se vzorky byly umístěné dvě nádrže, každá o objemu 80 litrů. V jedné nádrži s nápisem “zdrojová voda“ byla odstátá voda z předešlého dne, která sloužila jako zdroj čerstvé vody do plastových boxů s raky. Voda byla natočena den předem pro vyprchání nežádoucího chloru a z důvodu srovnání její teploty s teplotou laboratoře. Do druhé nádrže se vylévala den stará voda z krabic, tato nádrž byla popsána nápisem “použitá voda“. Před vylitím vody do nádrže s nápisem “použitá voda“ se z krabičky vyjmul rak, na kterém se provedla kontrola

přítomnosti vajíček. Dále se zkontroloval plastový box pro přítomnost svlečku. Při zjištění nálezu vajíček či svlečku se lihovým fixem nález spolu s datem nálezu na daný box zaznamenal. Poté byl tento nález společně s datem a typem události zapsán do protokolu. Při úmrtí raka se krabička vyřadila a událost se také zaznamenala do protokolu.

Při nálezu vajíček se ze samic raků vajíčka odstraňovali pomocí entomologické pinzety, poté byl rak umístěn zpět do krabičky. Svlečky se též z krabiček odstraňovali. Před nalitím čisté vody bylo přidáno 5 granulí Granugreen od značky Sera, které rakům sloužily jako potrava.



Obr. č. 4: Výměna vody u kontrolní skupiny (foto autor)

Do každé krabičky se nalil půllitr zdrojové vody a boxy se uzavřely a umístily zpět do stojanů. Použitá voda se z nádrže vylila do odpadu přes síto, které zachytilo račí svlečky, vajíčka a nezkonsumované granule. Výměna vody u exponované skupiny probíhala úplně stejně jako u kontrolní skupiny, pouze se místo zdrojové pitné vody použil zásobní roztok s mixem sledovaných látek. Pravidelná výměna vody byla zajištěna z důvodu udržení sledovaných zvířat ve standardizovaných podmínkách testu a rovněž pro udržení stálé koncentrace látek v expoziční vodě. Testované látky, jak je již známo, degradují a pro účely testu bylo potřeba udržet stejnou hladinu koncentrace po celou dobu expozice. Pro ověření obsahu sledovaných látek v průběhu expozice, byly odebírány vzorky vody, které byly dále analyzovány ve specializované laboratoři VÚRH.

3.3 Monitorování chování

Druhá fáze experimentu byla založena na monitoringu chování testovaných zvířat (raků mramorovaných) po období expozice v mixu šesti sledovaných látek. Natáčení bylo prováděno ve stejné místnosti jako první část pokusu, tedy za stejných konstantních podmínek. V místnosti byl po dobu monitorování absolutní klid, i proto byl během pokusu zamezen vstup všem osobám. Pro jedno opakování bylo použito 20 raků (10 ks z expozice, 10 ks z kontroly) ve stejný čas, kteří byli umístěni do 20 arén, vždy po jednom kuse. Jako arény pro raky jsme použili bílé kruhové plastové misky o průměru 28 cm a výšce 10 cm, do kterých jsme na dno přidali jemný písek. Ten sloužil jako vhodný povrch pro pohyb raků, jelikož dno plastové misky klouže. Každá experimentální aréna obsahovala 2 litry vody. Voda se odebírala z podobných kádí jako v průběhu expozice, byla načerpána předchozí den, tudíž byla odstátá, neobsahovala chlor a měla stejnou teplotu jako prostředí laboratoře. Část experimentálních arén s pískem a vodou byla vybavena úkryty pro raky pro lepší charakterizaci změny v chování. Jako úkryty sloužili půlené keramické květináče (viz obrázek č. 5). Do každé misky jsme přidali po jednom úkrytu.



Obr. č. 5: Rak mramorovaný v úkrytu (foto autor)

Arény byly umístěny na podlahu v zadní části laboratoře, nad ně se umístila kamera, která nahrávala všechny arény v opakování, dále se do záběru přidala bílá tabulka s nápisem run 1 až 6, pro pozdější lepší orientaci ve videích značila pořadí monitorování. Doba jednoho natáčení trvala celkem čtyři hodiny čistého času. Pro video záznam byla použita video kamera Sony HDR CX240.

Celkem byly takto provedeny tři opakování bez úkrytu a tři s úkrytem, přičemž někteří raci nebyli pro konečné vyhodnocení použiti, například při převrácení na záda je software nedokázal rozpoznat od povrchu dna. Sledovaný počet raků v arénách s úkryty byl 56 kusů a v arénách bez úkrytů 50 kusů. Po skončení nahrávání jednotlivých opakování byli vyjmutí raci z arén změřeni, zváženi a vysazeni do čistého akvária k depuraci. Voda v experimentálních arénách mezi jednotlivými opakováními byla po skončení nahrávání vyměněna a každá miska důkladně propláchnuta, aniž by došlo ke kontaminaci jiných.



Obr. č. 6: Začátek monitorování chování zvířat – raci v arénách (foto autor)

3.4 Vyhodnocení experimentu pomocí programu EthoVision®

Pro vyhodnocení experimentu bylo zapotřebí nejprve nahrát pořízená videa z monitorování do softwaru EthoVision® XT, kde se videa následně dále zpracovávala. Po nahrání videa se nastavil tvar arén, tedy určitý prostor, kde se sledovaný rak mohl pohybovat. Jelikož kamera zabírala každou arénu z trochu jiného úhlu, tvar a nastavení každé arény byl trochu jiný. Při pořízeném záznamu, kdy byly přítomny i úkryty v podobě rozpuštěných keramických květináčů, se tyto úkryty označily, aby software dokázal detekovat raka vně i mimo úkryt. Po označení sledovaného území se dále označily rozměry arén, průměr všech misek byl 28 centimetrů. Následně byl nastaven přesný čas začátku a konce videa, tedy od jaké vteřiny záznamu má program začít video vyhodnocovat. Videa byla účelně natáčena o trochu déle, než byl stanovený čas 4 hodiny, jelikož jsme chtěli zachovat čistě konstantní podmínky, tedy klidnou hladinu, eliminaci nárazů, hluku apod. Jako třetí krok se označili sledovaní raci, aby je byl software schopen rozpoznat od pozadí. Rozpoznání sledovaných zvířat se provádělo na základě detekce barevného spektra, kdy byli raci tmavší než pozadí s pískem. Nakonec se všechna takto nastavená videa dala vyhodnocovat a statisticky se dále zpracovala.

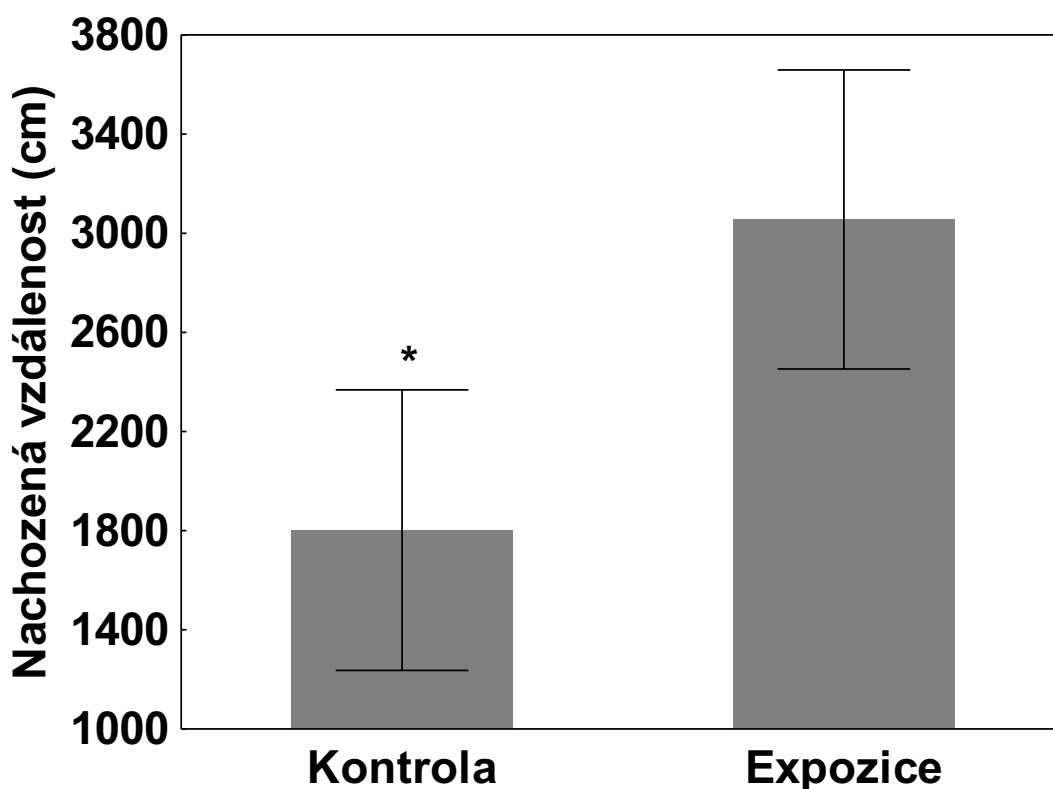
3.5 Statistické vyhodnocení

Data byla testována na normální rozdělení použitím Kolmogorov – Smirnov testu. Homogenita variancí byla testována pomocí Levenova testu. Sledované proměnné v opakováních bez úkrytu byly: nachozená vzdálenost – cm; aktivita - %; rychlost – $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. V případě sledování chování s přítomným úkrytem v aréně byly analyzovány tyto parametry: nachozená vzdálenost – cm; aktivita - %; rychlost – $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$; čas mimo úkryt - %. Získané hodnoty proměnných byly analyzovány pomocí faktoriální ANOVY. Statistická analýza byla provedena ve statistickém softwaru Statistica, verze 13.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Hladina významnosti (signifikance) byla stanovena na $\alpha = 0,05$. Data jsou prezentována jako průměr a střední chyba průměru.

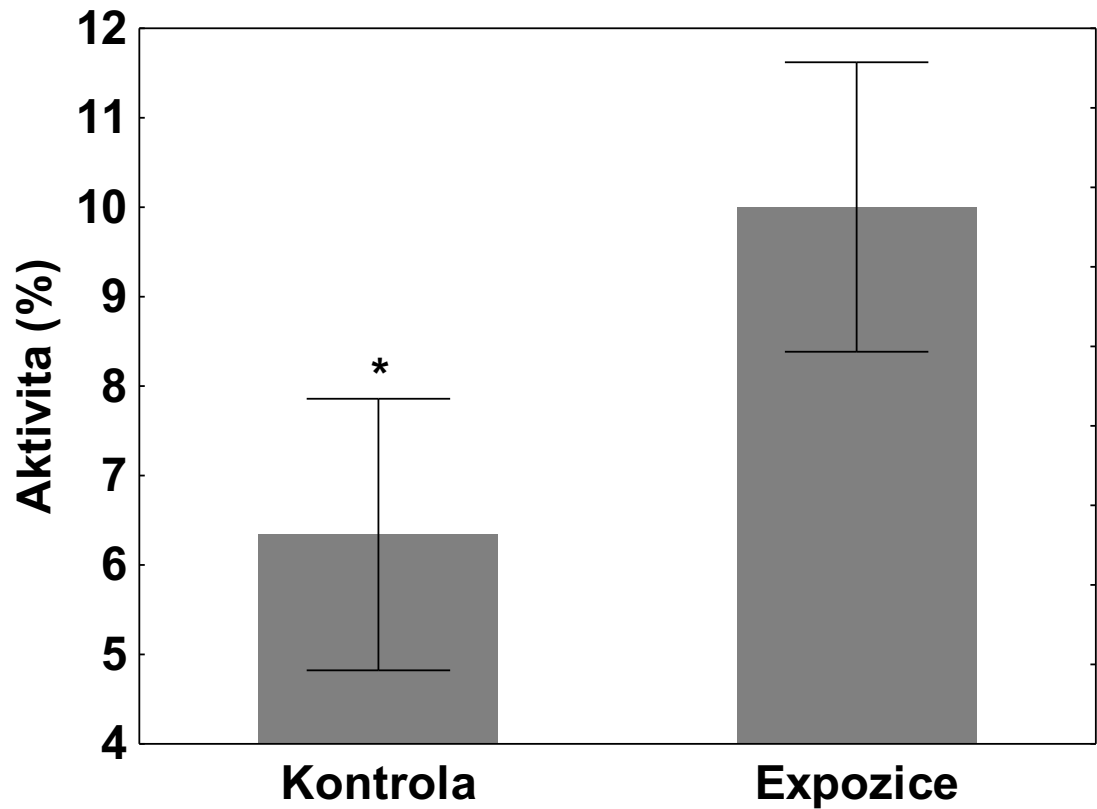
4. Výsledky

4.1 Systém s úkryty

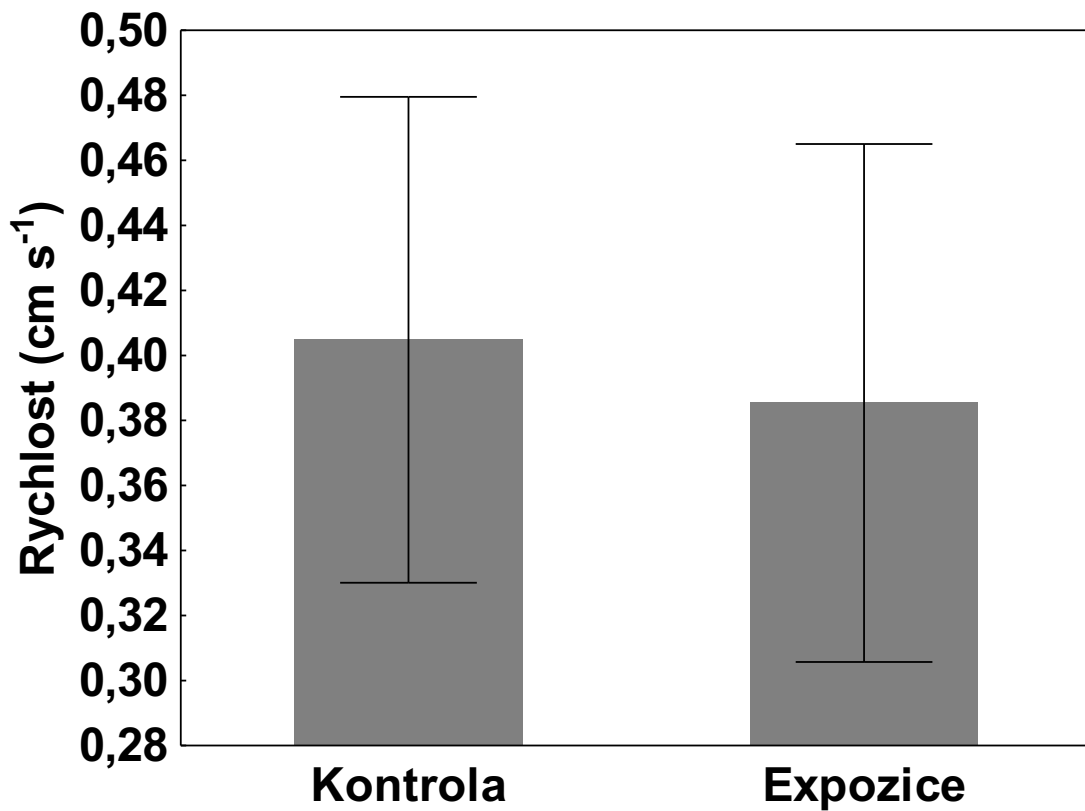
V arénách s možností využití úkrytu, nachodili exponovaní raci signifikantně delší vzdálenost než raci v kontrole ($F_{1,56} = 9,218$; $P < 0,05$). Podobné výsledky byly i u parametru aktivity, kdy exponovaná skupina raků mramorovaných byla signifikantně aktivnější, než kontrolní skupina ($F_{1,56} = 10,927$; $P < 0,05$). Významného rozdílu nebylo dosaženo pouze u parametru rychlosti, kdy byla kontrolní skupina zvířat rychlejší, ale ne signifikantně ($F_{1,56} = 0,127$; $P > 0,05$). Tyto výsledky byly výrazně ovlivněny tím, že raci v kontrolní skupině trávili většinu času v úkrytu, což dokazuje poslední parametr, čas strávený mimo úkryt, kdy exponovaní raci trávili signifikantně delší čas mimo úkryt ($F_{1,56} = 24,171$; $P < 0,05$).



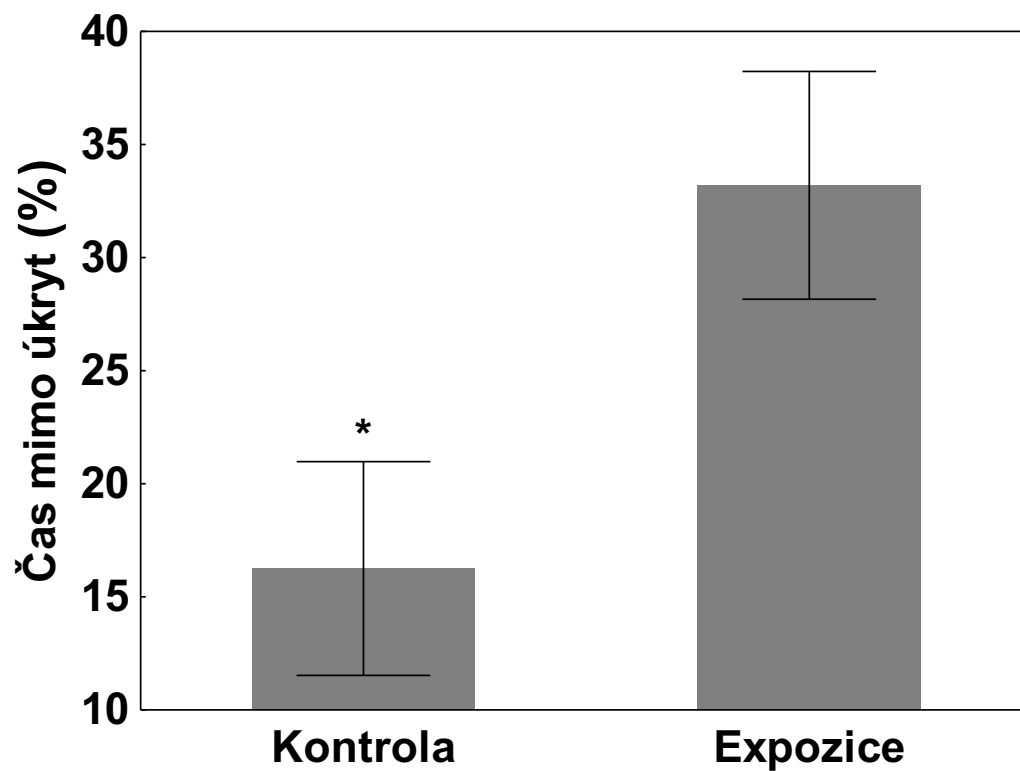
Graf č. 1: Celková nachozená vzdálenost raků mramorovaných (*Procambarus virginalis* – Lyko 2017) vystavených koktejlu šesti sledovaných látek a kontroly v systému s dostupnými úkryty. Data jsou vyjádřena průměrem \pm SE. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl mezi skupinami.



Graf č. 2: Aktivita raků mramorovaných (*Procambarus virginalis* – Lyko 2017) vystavených koktejlu šesti sledovaných látek a kontroly v systému s dostupnými úkryty. Data jsou vyjádřena průměrem \pm SE. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl mezi skupinami.



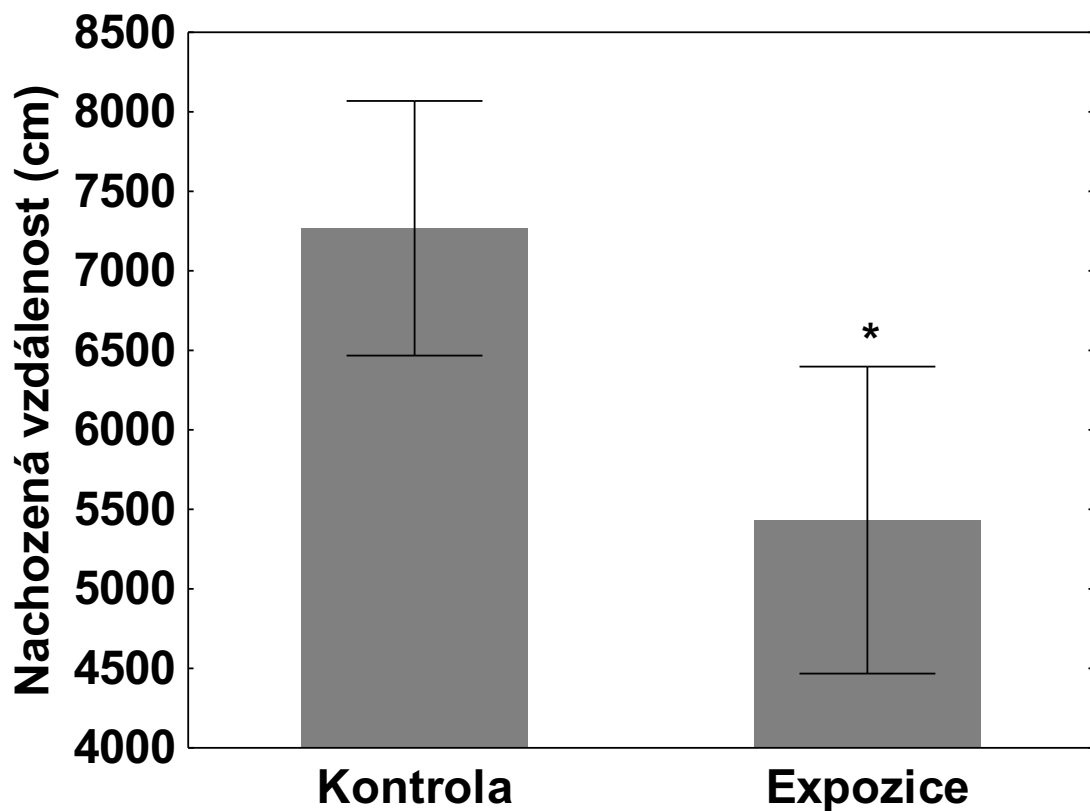
Graf č. 3: Průměrná rychlost raků mramorovaných (*Procambarus virginalis* – Lyko 2017) vystavených koktejlu šesti sledovaných látek a kontrole v systému s dostupnými úkryty. Data jsou vyjádřena průměrem \pm SE.



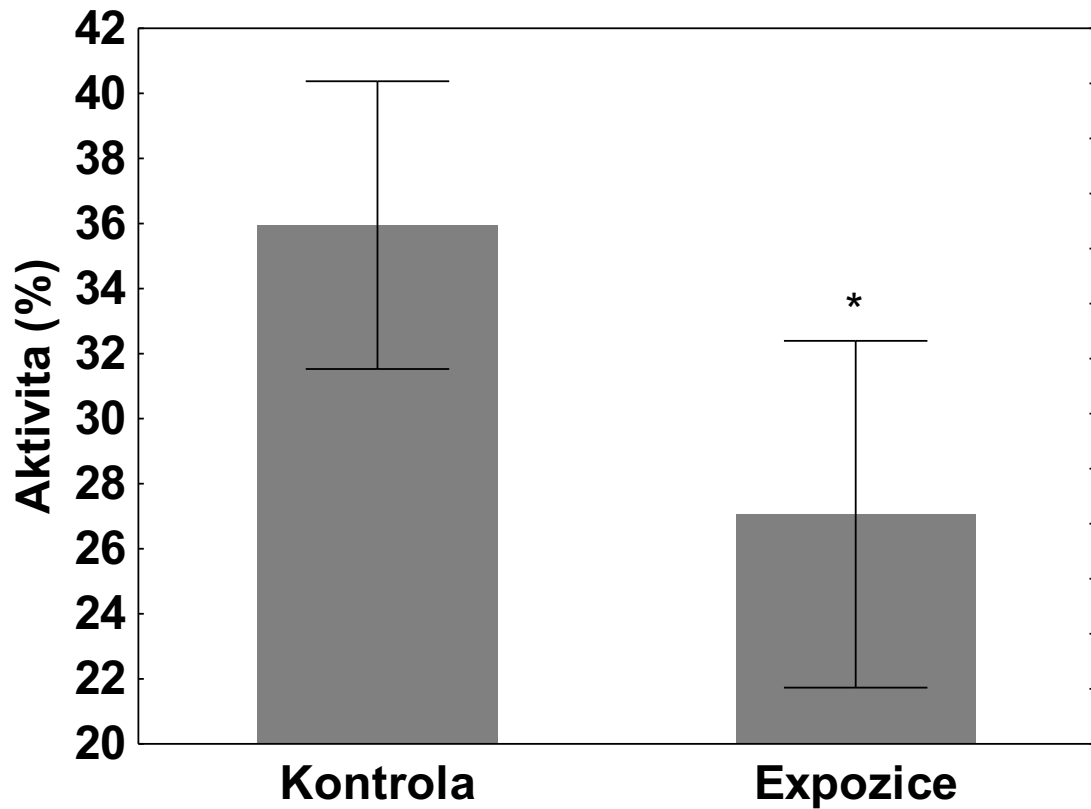
Graf č. 4: Čas, který strávili raci mramorovaní (*Procambarus virginalis* – Lyko 2017) mimo úkryt. Porovnání expozice – kdy byli raci vystaveni koktejlu šesti sledovaných látek a kontroly. Data jsou vyjádřena průměrem \pm SE. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl mezi skupinami.

4.2 Systém bez úkrytů

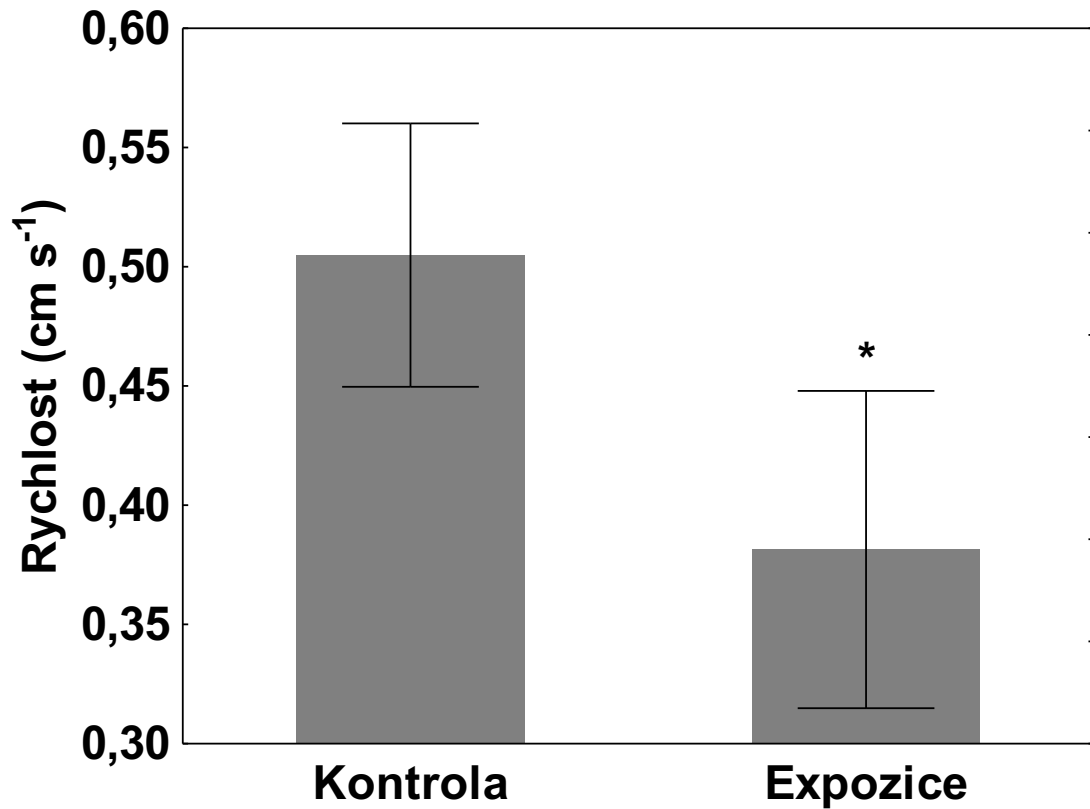
V arénách bez možnosti využití úkrytů nastala téměř opačná situace než v předchozím systému, kde se raci mohli schovat v úkrytu. V prvním měřeném parametru nachodili exponovaní raci signifikantně kratší vzdálenost než v kontrole ($F_{1,50} = 8,637$; $P < 0,05$). Při měření aktivity raků byla exponovaná skupiny signifikantně méně aktivní než skupina kontrolní ($F_{1,50} = 6,641$; $P < 0,05$). Při posledním měřeném parametru v systému bez dostupného úkrytu, tedy rychlosti raků, byly výsledky obdobné jako v parametrech předchozích. Exponovaní raci byli signifikantně pomalejší než kontrolní raci ($F_{1,50} = 8,229$; $P < 0,05$).



Graf č. 5: Celková nachozená vzdálenost raků mramorovaných (*Procambarus virginalis* – Lyko 2017) vystavených koktejlu šesti sledovaných látek a kontroly v systému bez dostupných úkrytů. Data jsou vyjádřena průměrem \pm SE. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl mezi skupinami.



Graf č. 6: Aktivita raků mramorovaných (*Procambarus virginalis* – Lyko 2017) vystavených koktejlu šesti sledovaných látek a kontroly v systému bez dostupných úkrytů vyjádřena v procentech. Data jsou vyjádřena průměrem \pm SE. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl mezi skupinami.



Graf č. 7: Průměrná rychlost raků mramorovaných (*Procambarus virginalis* – Lyko 2017) vystavených koktejlu šesti sledovaných látek a kontrole v systému bez dostupných úkrytů. Data jsou vyjádřena průměrem \pm SE. Hvězdička značí statisticky významný rozdíl mezi skupinami.

5. Diskuze

Z výše uvedených výsledků je patrné, že sledované látky mají i v nízkých koncentracích vliv na chování exponovaných raků. Téměř u všech vyhodnocovaných parametrů se kontrolní a exponovaná skupina výrazně lišila. Velmi významnou roli hrály ve výsledcích úkryty. U určitých parametrů byly výsledky ve skupinách s úkryty a bez úkrytů téměř opačné. Jakmile byl v aréně dostupný úkryt, mnoho kontrolních raků rychle úkryt vyhledalo a většinu času během sledované doby trávil v úkrytu. Toto chování je pro raky při světle přirozené, kdy vyhledávají bezpečné místo před napadením denními predátory. Naopak exponovaní raci, kteří měli v arénách dostupné úkryty, většinu času trávili mimo úkryt. Můžeme tedy usuzovat, že u exponované skupiny raků byly ochromeny buď smyslové receptory, nebo více pravděpodobně, raci nepocíťovali nutnost se skrývat – bylo omezeno vnímání a vyhodnocení stresové situace. Ve volné přírodě by tento jev (špatné vyhodnocení situace a absence pobytu v úkrytu) mohl u vodních organismů znamenat větší ztrátu energie, dále také snadnější kořist pro predátory, což může znamenat hrozbu pro jednotlivé druhy, narušení potravních zdrojů (Holdich, 2002; Craddock a Jones, 1999) a následně změnu fungování celého ekosystému (Manning a Dawkins 2012).

Pokud se podíváme na systém arén bez úkrytů, pak můžeme ze všech sledovaných parametrů vyvodit jasný výsledek, jelikož všechny parametry se jednostranně signifikantně lišily. Koktejl šesti sledovaných látek působil na exponovanou skupinu stejným tlumivým účinkem. Zatímco kontrolní skupina byla aktivní, rychle a více se pohybující (snaha uniknout ze stresujících podmínek), exponovaná skupina byla utlumena a jevila chování, jako by se nacházela v bezpečné situaci. Ve vodních habitatech by se podle Manninga a Dawkinse (2012) tento jev, jako snížená aktivita a pomalejší reakce, mohl u vodních organismů projevit jako handicap v hledání potravy, dále by se organismy mohly stát snadnější kořistí pro predátory a v neposlední řadě může být ovlivněná přirozená reprodukce. Tyto změny chování mohou hlavně u všežravých a dravých organismů ovlivnit fungování celých ekosystémů. Pokud by navíc takto sledované organismy reagovaly v habitatech s nedostatkem úkrytů, vedlo by to ke stejnému efektu, jaký byl popsán výše – větší vystavení predaci.

Velké rozdíly vykazovali kontrolní i exponovaní raci také v individualitě, i když se jedná o geneticky téměř totožné jedince, projev chování se mezi jednotlivými zvířaty výrazně lišil v aktivitě, nachozené vzdálenosti, rychlosti i času stráveného mimo úkryt.

Tím můžeme sledovat obecný vzor osobnosti – personality, který se projevuje v určitých situacích různým chováním jednotlivců, jako je například tendence k průzkumu nového prostředí nebo úroveň aktivity a odvážnosti v jiném prostoru (Réale a kol., 2007).

Sledované látky – Tramadol, Citalopram, Metamfetamin, Venlafaxin, Oxazepam a Sertralin výrazně ovlivnily chování sledovaných raků mramorovaných, jednoznačný projev každé sledované látky však ze zjištěných poznatků vyvodit nemůžeme, jelikož se účinky látek mohou v některých případech vzájemně tlumit nebo naopak násobit. Konkrétní účinky jednotlivých látek však známy jsou.

Raci mramorovaní, kteří byli vystaveni pouze tramadolu nebo citalopramu (o koncentraci vždy $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) v obou případech, v systému bez možnosti ukrytí, nachodili signifikantně kratší vzdálenost oproti kontrole. Podobně na tom byli exponovaní raci i s vykazovanou rychlostí, ta byla oproti kontrole výrazně nižší. V systému s dostupnými úkryty nebyly u žádného sledovaného parametru pozorovány významné rozdíly mezi expozicí a kontrolou, to platilo u obou testovaných látek (Buřič a kol., 2018). Můžeme tedy usuzovat, že tramadol i citalopram mají na testované organismy tlumivé účinky, jak v koktejlů s dalšími farmaky, tak i jako látky samotné.

Kubec a kol. (2018) porovnával chování raků mramorovaných za přítomnosti látek venlafaxinu nebo oxazepamu ve stejných koncentracích ($1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). U oxazepamu výsledky znovu potvrdily, že i nízké koncentrace mohou mít vliv na chování vodních organismů, kdy exponovaná skupina raků vykazovala výrazně vyšší aktivitu, stejně tak byl měřený parametr nachozené vzdálenosti výrazně vyšší u skupiny raků vystavené oxazepamu. Při testování raků na venlafaxinu se možná rizika tohoto antidepresiva na životní prostředí nepotvrdila, jelikož nebyly pozorovány žádné změny chování exponovaných a kontrolních zvířat. Účinky venlafaxinu na chování testovaných zvířat ale zaznamenal Fong a kol. (2015), ale pouze při výrazně vyšších koncentracích.

Překvapivých výsledků bylo dosaženo při testování raků mramorovaných, kteří byli vystaveni koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ metamfetaminu. Exponovaní raci v porovnání s kontrolními nevykazovali významné rozdíly u parametrů nachozené vzdálenosti, rychlosti ani aktivity, což platilo za situace, kdy byl v aréně přítomný úkryt i za situace bez úkrytu. Jediným signifikantně odlišným parametrem byla doba strávená mimo úkryt, kdy exponovaní raci trávili výrazně více času mimo úkryt (Hossain a kol., 2019). Toto zjištění je v porovnání s předchozími výzkumy poměrně očekávané, jelikož různé expozice raků v metamfetaminu, kokainu nebo morfinu vyvolávaly zvýšenou aktivitu

raků. Je však nutné podotknout, že modelová zvířata byla v těchto pokusech vystavena výrazně vyšším koncentracím (Imeh-Nathaniel a kol. 2016; Imeh-Nathaniel a kol., 2017).

Při experimentu, kdy byli raci mramorovaní vystaveni sertralinu o koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, se prokázal významný vliv tohoto antidepresiva na chování sledovaných zvířat. Signifikantní rozdíly byly pozorovány u zvýšené aktivity exponovaných raků, a to v případě systému s dostupnými úkryty i v systému bez nich. Exponovaná skupina za přítomnosti úkrytu nachodila významně větší vzdálenost než skupina kontrolní. Jako signifikantně významný parametr se také ukázal čas strávený mimo úkryt, kdy exponovaní raci trávili podstatně déle času mimo úkryt (Hossain a kol., 2019).

Zajímavé je porovnání tří samostatně testovaných antidepresiv (citalopram, venlafaxin, sertralin), jelikož každé antidepresivum se při stejné koncentraci projevovalo odlišně. Zatímco venlafaxin neměl na chování raků významný vliv (Kubec a kol., 2018), tak citalopram působil na raky tlumivým účinkem (Buřič a kol. 2018), a naopak v případě sertralinu byli raci aktivnější a projev tohoto antidepresiva byl pro raky značně povzbuzující (Hossain a kol., 2019). Dle porovnání jednotlivých látek použitých v našem experimentu se zdá být hlavním hybatelem změn v chování sertralin, jelikož jeho samostatné působení se samo o sobě velmi podobá účinku celého mixu látek.

Jelikož je kvalita povrchových vod zásadní pro lidské použití, zemědělství i pro funkci ekosystému (National Intelligence Council, 2012), je třeba této problematice věnovat zvýšenou pozornost, abychom rozšířili poznatky o možném vlivu znečišťujících látek na vodní prostředí. Již víme, že léčiva mají vliv na změnu chování u ryb a bezobratlých (Brodin a kol., 2013; Buřič a kol., 2018). Je však důležité dále porovnávat jak účinky samostatných léčiv, tak účinky léčiv ve směsích, které se běžně vyskytují v povrchových vodách, a to při koncentracích blízkým skutečným hodnotám ve volných vodách (Di Lorenzo a kol., 2019).

6. Závěr

Bakalářská práce měla za cíl porovnání účinků farmaceuticky aktivních látek na chování vodních organismů, které v tomto experimentu zastupovali raci mramorovaní, kteří jsou pro svou genetickou uniformitu ideálním modelovým organismem. Raci byli vystaveni koktejlu šesti látek, jež tvořili antidepresiva, analgetikum, benzodiazepin a syntetický stimulant. V této práci byly prokázány odlišné výsledky u skupin raků, kteří měli k dispozici úkryty, a bez možnosti využití úkrytu. V obou případech ale můžeme konstatovat, že sledované změny chování mohou vést ke zvýšenému vystavení predaci a můžou tak vést k dalším změnám v potravním řetězci. Většina naměřených hodnot byla významně odlišná, a proto lze z této práce vyvodit možné nebezpečí psychoaktivních látek pro vodní prostředí. Jelikož jsou v této době studie o vlivu léčiv na necílové organismy málo početné, můžou výsledky této práce přispět k větší informovanosti o reálných účincích farmaceuticky aktivních látek na vodní organismy. Výsledky této bakalářské práce poslouží k porovnání účinků léčiv v koktejlu a jejich porovnání s účinky léčiv samotných.

7. Seznam použité literatury

- Arnnok, P., Singh, R. R., Burakham, R., Pérez-Fuentetaja, A., Aga, D. S., 2017. Selective uptake and bioaccumulation of antidepressants in fish from effluent-impacted Niagara River. *Environmental Science and Technology* 51 (18), 10652-10662.
- Anglin, M., Burke, C., Perrochet, B., Stamper, E., Dawud-Noursi, S., 2000. History of the methamphetamine problem. *Journal of Psychoactive Drugs* 32 (2), 137-141.
- Bindzar, J., 2009. *Základy úpravy a čištění vod*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 251 s.
- 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 (9), 1221-1229.
- Bound J.P., Voulvoulis N., 2004. Pharmaceuticals in the aquatic environment – a comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere* 56, 1143–1155.
- 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. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369, 1656.
- Buřič, M., Grabicová, K., Kubec, J., Kouba, A., Kuklina, I., Kozák, P., Randák, T., 2018. Environmentally relevant concentrations of tramadol and citalopram alter behaviour of an aquatic invertebrate. *Aquatic Toxicology* 200, 226-232.
- Craddock, N., Jones, I., 1999. Genetics of bipolar disorder. *Journal of Medical Genetics* 36 (8), 585-594.
- 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.
- 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 s. ISBN 9788070806197.

Dreher, J., 2017. *Psychfarmakoterapie*. 2. vydání, Grada Publishing, 216 s.

Einarson, T.R., Arikian, S.R., Casciano, J., Doyle, J.J., 1999. Comparison of extended-release venlafaxine, selective serotonin reuptake inhibitors, and tricyclic antidepressants in the treatment of depression: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Therapeutics* 21 (2), 296–308.

Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76, 122-159.

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*). *Marine Environmental Research* 103, 89–94.

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 s.

Hampl, F., Rádl, S., Paleček, J., 2015. *Farmakochemie*. Praha: VŠCHT, 640 s.

Heberer T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 131, 5–17.

Henze, M., Harremoës, P., la Cour Jansen, J., Arvin, E., 2002. *Wastewater treatment: biological and chemical processes*. 3rd ed. Berlin: Springer, 430 pp.

Hlavínek, P., Mičín, J., Prax, P., 2001. *Příručka stokování a čištění*. Brno: NOEL 2000, 283 s. ISBN 8086020304.

Hlavínek, P., Hlaváček, J., 1996. Čištění odpadních vod: praktické příklady výpočtů. Brno: NOEL 2000, 196 s.

- Hon, Z., 2013. Základy toxikologie pro obor vodního hospodářství. Vysoká škola evropských a regionálních studií, 136 s.
- Hossain, M. S., Patoka, J., Kouba, A., Buřič, M., 2018. Clonal crayfish as biological model: a review on marbled crayfish. *Biologia*, 1-15.
- Hossain, M.S., Kubec, J., Grabicova, K., Grabic, R., Randak, 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. *Science Total Environmental*, under review.
- Holdich, D. M., 2002. *Biology of freshwater crayfish*. Oxford: Blackwell Science, 702 pp.
- 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.
- Hughes, S.R., Kay, P., Brown, L.E., 2012. Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems. *Environmental Science and Technology* 47, 661-677.
- Hynie, S., 2001. *Farmakologie v kostce*. Triton, 520 s.
- Cho, A.K., Melega, W.P., Kuczynski, R., Segal, D.D., 2001. Relevance of pharmacokinetic parameters in animal models of methamphetamine abuse. *Synapse* 39 (2), 161-166.
- Chudoba, J., Dohányos, M., Wenner, J., 1991. *Biologické čištění odpadních vod*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 465 s. ISBN 8003006112.
- Imeh-Nathaniel, A., Adedeji, A., Huber, R., Nathaniel, T.I., 2016. The rewarding properties of methamphetamine in an invertebrate model of drug addiction. *Physiology and Behavior* 153, 40-46.
- Imeh-Nathaniel, A., Rincon, N., Orfanakos, V.B., Brechtel, L., Wormack, L., Richardson, E., 2017. Effects of chronic cocaine, morphine and methamphetamine on the mobility, immobility and stereotyped behaviors in crayfish. *Behavioural Brain Research* 332, 120-125.
- Jjemba, P.K., 2006. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63, 113–130.

- Jones, J.P.G., 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 (6), 1475-1482.
- Kašparová, L., Novotná, H., 2005. *Pharmindex Breviř*. Praha: MediMedia Information spol. s r.o., 1134 s.
- Kawai, T., Faulkes, Z., Scholtz, G., 2015. *Freshwater Crayfish: A Global Overview*. CRC Press, 679 pp.
- Kent, J.M., 2000. SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs: new agents for the treatment of depression. *The Lancet* 355 (9207), 911-918.
- Kočí, V., Mocová, K., 2009. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Praha: VŠCHT, 199 s.
- Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., Vaněk, T., 2009. Léčiva-nový environmentální polutant. *Chemické listy* 103, 540-547.
- 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.
- Kutil, J., Dohányos, M., 2007. Efektivní využití a likvidace čistírenských kalů [online]. [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/efektivni-vyuziti-a-likvidace-cistirenskych-kalu-2>.
- Lincová D., Farghali H., 2007. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 672 s.
- Linhart, I., 2014. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. Praha: VŠCHT, 376 s.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A., Rašková, H., 1994. *Atlas farmakologie*. Grada, 392 s.
- Lyko, F. 2017. The marbled crayfish (Decapoda: Cambaridae) represents an independent new species. *Zootaxa* 4363 (4), 544-552.
- Manning, A., Dawkins, M.S., 2012. *An Introduction to Animal Behaviour* (6th ed.), Cambridge University Press, Cambridge; New York, USA. 458 pp.
- Martin, P., Kohlmann, K., Scholtz, G., 2007. The parthenogenetic Marmorcrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring. *Naturwissenschaften* 94 (10), 843-846.

- Martínková, J., 2007. Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. Grada Publishing as., 380 s.
- Mravčík, V., Vorel, F., Zábanský, T., 2007. Drugs and fatal traffic accidents in the Czech Republic. *Central European Journal of Public Health* 15 (4), 158-162.
- National Intelligence Council, 2012. *Global Trends 2030: Alternative worlds*. Office of the Director of National Intelligence Washington, 160 pp.
- Noldus, L. P., Spink, A. J., Tegelenbosch, R. A., 2001. EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behavior Research Methods, Instruments and Computers* 33 (3), 398-414.
- Olkkola, K.T., Ahonen, J., 2008. Midazolam and other benzodiazepines. *Modern Anesthetics*. Berlin: Springer, 335–360 pp.
- Padhye, L.P., Yao, H., Kung'u, F.T., Huang, C.-H., 2014. Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. *Water Research* 51, 266-276.
- Page, C., Michael, C., Sutter, M., Walker, M., Hoffman, B.B., 2002. *Integrated Pharmacology*. 2 nd. Mosby International Ltd, 303 pp.
- Paíga, P., Delerue-Matos C., 2016. Determination of pharmaceuticals in groundwater collected in five cemeteries' areas (Portugal). *Science of The Total Environment*. 569-570, 16-22.
- Patoka, J., Buřič, M., Kolář, V., Bláha, M., Petrtyl, M., Franta, P., Tropek, R., Kalous, L., Petrussek, A., Kouba, A., 2016. Predictions of marbled crayfish establishment in conurbations fulfilled: Evidences from the Czech Republic. *Biologia* 71, 1380-1385.
- Petrie, B., Youdan, J., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2016. Multi-residue analysis of 90 emerging contaminants in liquid and solid environmental matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1431, 64-78.
- Rádl, S., 2016. Tramadol opět ve středu zájmu. *Chemické listy* 110 (10), 662-665.
- Réale, D., Reader, S.M., Sol, D., McDougall, P.T., Dingemanse, N.J., 2007. Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews* 82, 291-318.

- Rudolph, R.L., Entsuah, R., Chitra, R., 1998. A meta-analysis of the effects of venlafaxine on anxiety associated with depression. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 18 (2), 136–144.
- Slavičková, K., Slaviček, M., 2013. *Vodní hospodářství obcí 1: úprava a čištění vody*. 2. vyd. Praha: ČVUT, 199 s. ISBN 9788001053904.
- Stenberg, P., Saura, A., 2009. Cytology of asexual animals. *Lost Sex: The Evolutionary Biology of Parthenogenesis* 1, 63-74.
- Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2010a. *Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb*. Praha: Informatorium, 264 s.
- Svobodová, Z., Beklová, M., Máchová, J., Dobšíková, R., Mácová, S., Modrá, H., Velíšek, J., 2010b. *Ekotoxikologie- praktická cvičení. testy toxicity na organismech vodního prostředí*. Brno: VFU, 84 s.
- Templeton, M., Butler, D., 2011. *An Introduction to Wastewater Treatment* [online]. bookboon.com, [cit. 2017-04-05]. ISBN 978-87-7681-843-2. Dostupné z: <https://bookboon.com/cs/introduction-to-wastewater-treatment-ebook>
- Tušil, P., Mičaník, T., 2018. Odborný seminář Vyhodnocení stavu povrchových vod za období 2013–2015. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace* 60 (3), 43–44. ISSN 0322-8916.
- Ueno, R., Kinoshita, A., Wakabayashi, J., 2004. Comparative pharmacokinetics of oxytetracycline in eel and its fate in a closed aquatic environment. *Aquaculture* 235 (1-4), 53–63.
- Váňa, M., Wanner, F., Matoušková, L., Fuksa, K.F., 2010. Možnosti odstraňování vybraných specifických polutantů v ČOV. *Vodohospodářské technologicko-ekonomické informace* 52, 1-16.
- Vogt, G., Tolley, L., Scholtz, G., 2004. Life stages and reproductive components of the Marmorcrebs (marbled crayfish), the first parthenogenetic decapod crustacean. *Journal of Morphology* 261 (3), 286-311.
- Vogt, G., 2007. Exposure of the eggs to 17alpha-methyl testosterone reduced hatching success and growth and elicited teratogenic effects in postembryonic life stages of crayfish. *Aquatic Toxicology* 85 (4), 291–296.

- Vogt, G., 2008. The marbled crayfish: a new model organism for research on development, epigenetics and evolutionary biology. *Journal of Zoology* 276, 1-13.
- 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., 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.
- Volkov, N., Wang, G., Fowler, J., Thanos P., 2001. Role of dopamine in drug abuse and addiction in human subjects: results from imaging studies. *Molecular Psychiatry* 6, 3-4.
- Wenke, M., 1986. *Farmakologie: Učebnice pro lékařské fakulty*. 1. vyd., Praha: Avicentrum, 580 s. ISBN 08-027-86.
- Wilga, J., Kot-Wasik, A., Namiesnik, J., 2008. Studies of human and veterinary drugs' fate in environmental solid samples – analytical problems. *Journal of Chromatographic Science* 46, 601-608.
- Williams, P. L., James, R. C., Roberts, S. M., 2003. *Principles of toxicology: Environmental of industrial application*. John Wiley a Sons, Inc., Hoboken, USA, 603 pp.
- Williams, G. M., Iatropoulos, M. J., Enzmann, H. G., 2008. Principles of Testing for Carcinogenic Activity. In *Principles and Methods of Toxicology*, 5th ed.. Informa Healthcare USA. New York. 1265-1316 pp.
- Wilson, N. H., Hardisty, J. F., Hayes, J. R., 2008. Short-term, Subchronic and Chronic Toxicology Studies. In *Principles and Methods of Toxicology*, 5th ed.. Informa Healthcare USA. New York. 1223-1264 pp.

8. Abstrakt

Tato bakalářská práce posuzuje možné účinky farmaceuticky aktivních sloučenin na necílové vodní organismy, a s tím spojená možná rizika. Test probíhal na partenogeneticky se rozmnožujících nepůvodních racích mramorovaných, kteří byli vystaveni koktejlu pěti běžně užívaných farmak a jedné nezákonné droze – tramadolu, citalopramu, sertralínu, venlafaxinu, oxazepamu a metamfetaminu. Koncentrace odpovídala $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pro každou z testovaných látek. Hlavní část experimentu byla založena na monitoringu chování skupin exponovaných a kontrolních raků v arénách s úkryty nebo bez úkrytů. Této části předcházela třítydenní expozice raků v koktejlu sledovaných látek. Výsledky byly vyhodnoceny v programu EthoVision[®]XT a následně statisticky vyhodnoceny. V systému s dostupnými úkryty vykazovaly sledované parametry (nachozená vzdálenost a aktivita) významné rozdíly mezi exponovanou a kontrolní skupinou. Exponovaná skupina nachodila signifikantně větší vzdálenost a byla výrazně aktivnější než skupina kontrolní. Zároveň strávila statisticky významně vyšší dobu mimo úkryt než kontrolní raci. V systému bez možnosti ukrytí byly výsledky z důvodu absence úkrytů téměř opačné. Nachozená vzdálenost, rychlost i aktivita se signifikantně lišila. Exponovaní raci vykazovali výrazně nižší aktivitu, rychlost, a nachodili značně kratší vzdálenost. Výsledky tohoto experimentu dokazují, že koktejl sledovaných látek může významný vliv na chování necílových vodních organismů. Na exponované raky působily látky tlumivým účinkem a ochromením smyslových receptorů, což může mít výrazný vliv na populace ve volných vodách.

Klíčová slova: aktivita, bezobratlí, chování, environmentální koncentrace, farmaceuticky aktivní sloučeniny, rak mramorovaný

9. Abstract

This bachelor thesis evaluates the possible effects of pharmaceutically active compounds on non-target fresh water organisms and the risks connected with them. As model organism was used parthenogenetically reproducing non-native marbled crayfish, which were exposed to a mix of five commonly used drugs and one illicit drug – tramadol, citalopram, sertraline, venlafaxine, oxazepam and methamphetamine. The concentration was $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ for each of the tested compounds. The main part of the experiment was based on monitoring the behaviour of the exposed and control group of crayfish in arenas with or without shelter. Prior experiment crayfish were exposed for three-weeks to the mixture of compounds mentioned above. The results were analysed in the programme EthoVision®XT and later also statistically evaluated. In the system with available shelters the observed parameters (distance moved and activity) showed significant differences, where the exposed group walked significantly larger distances and was considerably more active than the control group. Exposed group also spent significantly more time outside the shelter. The results in the system without shelter were almost the opposite. The distance moved, velocity and activity were significantly different. The exposed crayfish showed considerably lower activity, velocity and moved shorter distances. The results of this experiment prove that the mixture of monitored compounds can have a significant impact on the behaviour of non-target fresh water organisms. The compounds had a softening effect and can affect sensory receptors of the exposed crayfish, which can have a significant impact on the populations in open waters.

Key words: activity, behaviour, environmental concentration, pharmaceutically active compounds, invertebrates, marbled crayfish