

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

2024

Bc. Adéla Vonešová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Test toxicity vybraných fluorchinolonových antibiotik a reakčních směsí po
fotochemické degradaci těchto antibiotik na *Daphnia sp.***

Diplomová práce

Bc. Adéla Vonešová

Školitelka: doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

Školitel – specialista: Mgr. et Mgr. Martina Poncarová

České Budějovice 2024

Cíl práce

Cílem práce bylo provést na vodním koryši *Daphnia magna* následující testy toxicity:

- akutní test toxicity u tří zástupců fluorochinolonových antibiotik a to ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu
- akutní testy toxicity reakčních směsí ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu po ozáření
- chronický test toxicity pro ciprofloxacin a pro jeho reakční směs po ozáření

Vonešová A., 2024: **Test toxicity vybraných fluorochinolonových antibiotik a reakčních směsí po fotochemické degradaci těchto antibiotik na *Daphnia sp.*** [Toxicity test of selected fluoroquinolone antibiotics and their reaction mixtures after photochemical degradation on *Daphnia sp.* Mgr. Thesis, in Czech] – 52 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Annotation:

The Master's thesis is focused on the toxicity of selected fluoroquinolone antibiotics and their photoproducts on *Daphnia sp.* The theoretical part discusses the structure and usage of fluoroquinolone antibiotics, presents *Daphnia sp.* as a model organism for toxicity tests, and provides an overview of the occurrence of fluoroquinolone antibiotics in surface waters and the toxic effects of these compounds on aquatic organisms. The experimental part presents the results of acute toxicity tests of three selected representatives of fluoroquinolone antibiotics (ciprofloxacin, enrofloxacin, and norfloxacin), acute toxicity tests of the products of their photochemical degradation, and the chronic toxicity test for ciprofloxacin and its photoproduct mixture on *Daphnia sp.*

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích 25. 3. 2024

.....

Podpis

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala mé školitelce, doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc., za trpělivost, cenné rady a vstřícný přístup po celou dobu zpracování mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat mé školitelce-specialistce Mgr. et Mgr. Martině Poncarové, která mě zasvětila do práce s dafniemi a zaučila v plánování a organizaci testů toxicity. Její odborné znalosti a ochota přispěly k úspěšnému průběhu experimentů.

Také bych chtěla poděkovat RNDr. Michalu Šorfovi, Ph.D. za jeho pomoc při tvorbě grafů ze získaných hodnot a za poskytnutí dat z metody TOC stanovení uhlíku v řasách.

Na závěr bych ráda poděkovala svým nejbližším za jejich neustálou podporu a povzbuzení během celého procesu zpracování diplomové práce.

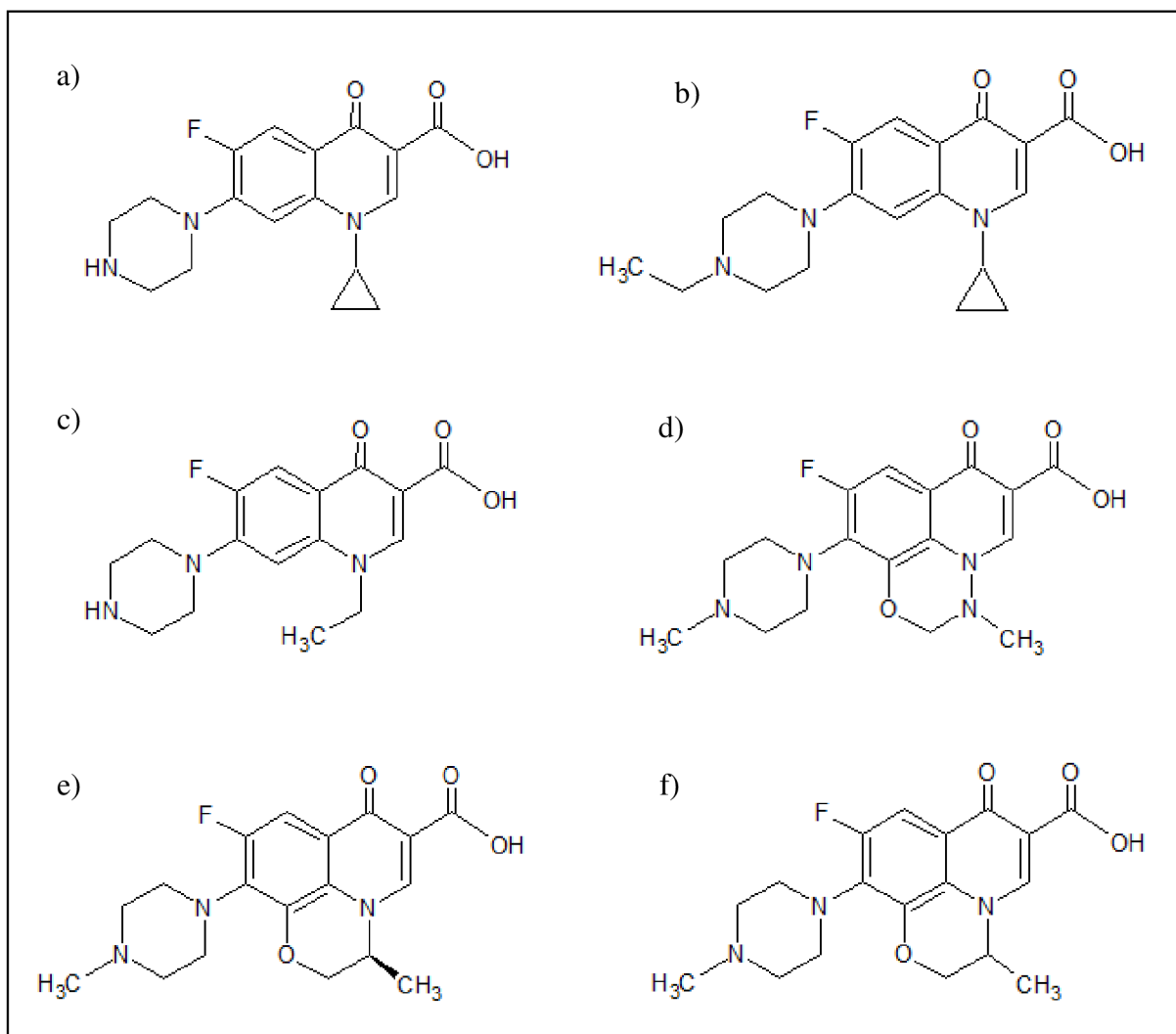
Obsah

Úvod	1
Fluorchinolonová antibiotika.....	1
Modelové organismy <i>Daphnia sp.</i>	2
Výskyt fluorchinolonových antibiotik v povrchových vodách a jejich toxické působení na vodní organismy	6
Materiál a metody	9
Výsledky a diskuze	12
Test kondice dafnií s použitím dichromanu draselného	12
Tvorba fotoproduktů	12
Test akutní toxicity	13
Test chronické toxicity	17
Využití výsledků práce ve výuce na střední škole.....	22
Závěr	23
Seznam použité literatury	24
Přílohy	27
Příloha 1: Test kondice dafnií s dichromanem draselným.....	27
Příloha 2: Akutní test toxicity - ciprofloxacin a jeho reakční směs po ozáření	30
Příloha 3: Akutní test toxicity - enrofloxacin a jeho reakční směs po ozáření	35
Příloha 4: Akutní test toxicity - norfloxacin a jeho reakční směs po ozáření	43
Příloha 5: Chronická toxicita ciprofloxacinu a jeho reakční směsi po ozáření	51

Úvod

Fluorchinolonová antibiotika

Fluorchinolony jsou širokospektrá antibiotika běžně předepisovaná v humánní i veterinární medicíně (Baggio & Ananda-Rajah, 2021). Jejich účinnosti je využíváno především u infekcí způsobených gramnegativními bakteriemi, např. u infekcí močových a dýchacích cest, kapavky a bakteriální gastroenteritidy. Při užívání těchto látek se mohou objevit vedlejší účinky jako bolesti hlavy, závratě či hypersenzitivní reakce, které jsou ale ve většině případech mírné a přechodné (Paton & Reeves, 2012). Strukturně jsou fluorchinolonová antibiotika molekuly s rozmanitými strukturami ale vždy obsahující v molekule na aromatickém jádře vázaný fluor a piperazinový kruh. K zástupcům této skupiny patří např. ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, marbofloxacin, levofloxacin a ofloxacin, jejichž vzorce jsou zakresleny v Obr. 1:



Obr. 1: Vzorec ciprofloxacinu (a), enrofloxacinu (b), norfloxacinu (c), marbofloxacinu (d), levofloxacinu (e), ofloxacinu (f).

Modelové organismy *Daphnia sp.*

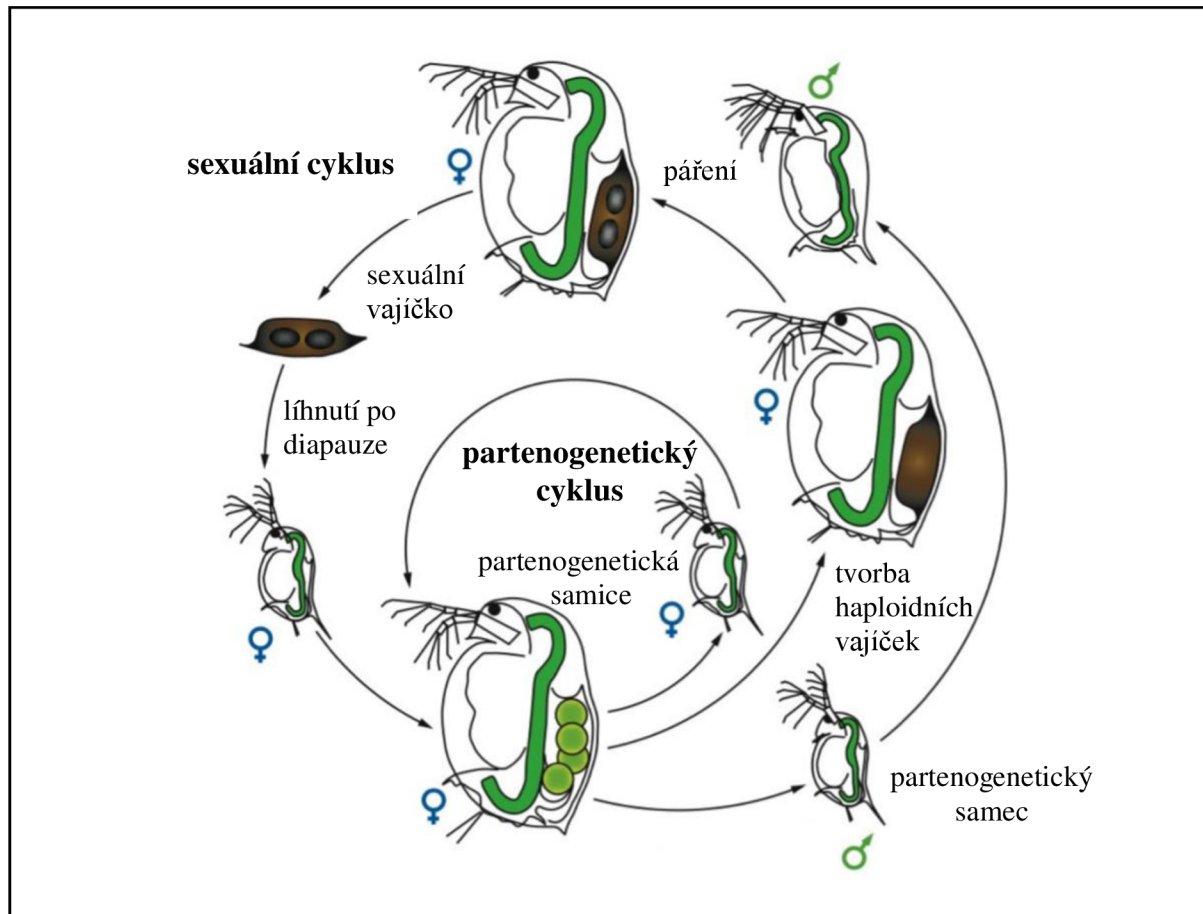
Daphnia sp. jsou sladkovodní korýši o velikosti 0,5 - 6 mm, řadí se mezi třídu *Branchiopoda*. Jsou součástí zooplanktonu, a tedy složkou potravního řetězce ve vodách. Obývají řadu vodních ploch, ale zejména stojaté vody, konkrétně menší rybníky a skalní jezírka z důvodu menší míry predace (Ebert, 2005). Fotografie zástupce *Daphnia sp.*, konkrétně *Daphnia magna*, pořízenou pod mikroskopem s měřítkem 500 μm ukazuje Obr. 2.



Obr. 2: Fotografie *Daphnia magna*.

Životní cyklus *Daphnia sp.* zahrnuje reprodukci jak sexuální, tak asexuální a je vázán na podmínky prostředí (Zhang et al., 2016). V optimálních životních podmínkách, jako jsou nízký predanční tlak a dostatečné množství potravy, se tyto organismy rozmnožují nepohlavní partenogenezí (La et al., 2014), kdy se z diploidních vajíček líhnou geneticky identické samice (Koláček, 2015). V případě zhoršení podmínek, kterými mohou být kromě zvýšeného predančního tlaku a snížení množství potravy i úbytek vody či pokles teploty, samice začnou produkovat haploidní vajíčka, ze kterých se později líhnou samci. Ti v dospělosti oplozují samice a ze vzniklé zygoty následně vznikají rezistentní vajíčka s ochranným obalem zvaným efiipium (Smrž, 2013). Vajíčka jsou velmi odolná nepříznivým podmínkám a jakmile nastane vhodné období, např. delší dny a příznivější teplota na jaře, líhnou se z nich samice (La et al., 2014).

Ze studií vyplývá, že sexuální rozmnožování podporuje genetickou diverzitu a schopnost přežití, zatímco nepohlavní rozmnožování vede k rychlé reprodukci během období s příznivými podmínkami (Zhang et al., 2016). Obr. 3 zobrazuje životní cyklus *Daphnia sp.*



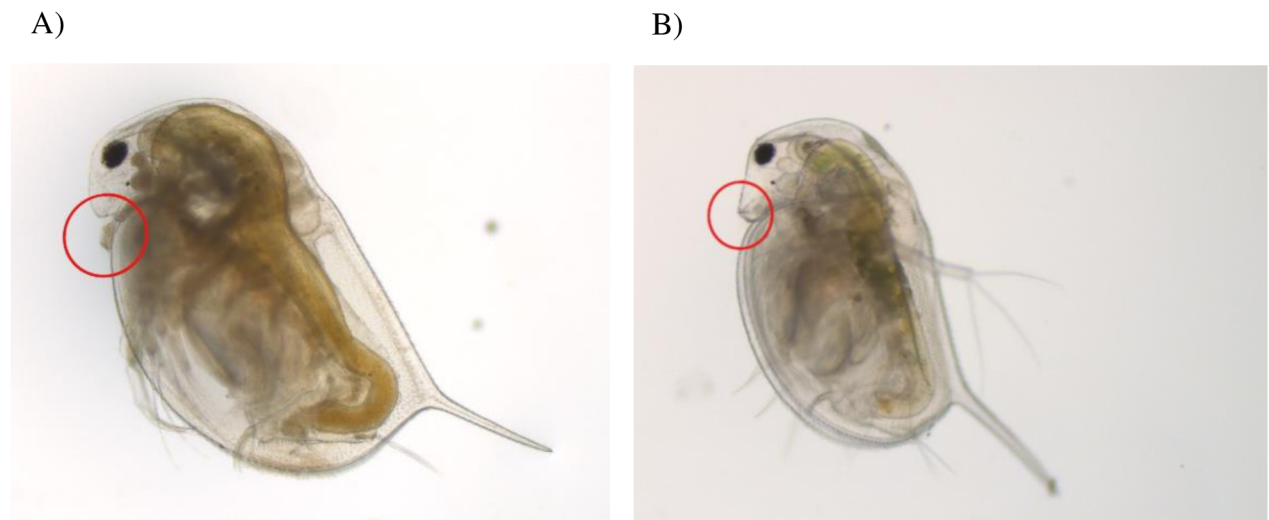
Obr. 3: Životní cyklus *Daphnia sp.* (upraveno dle Ebert, 2005).

Daphnia sp. jsou hojně využívány pro testování toxicity týkající se vodního prostředí. Vhodným modelovým organismem jsou tyto organismy díky vlastnostem, které umožňují relativně snadnou kultivaci v laboratoři – malá velikost jedinců, vysoká plodnost a krátký životní cyklus (Koivisto, 1995).

Nejfrekventovaněji užívaným testem ve studiích toxicity je test dle směrnice OECD 202: Akutní imobilizace *Daphnia sp.* (OECD, 2004). Testy akutní toxicity se provádí za účelem stanovení hodnoty střední účinné koncentrace (EC₅₀) pro imobilizaci. Hodnota EC₅₀ stanovuje koncentraci, která imobilizuje 50 % dafnií v testovací sérii během

nepřetržitého působení látky, které trvá 48 hodin (ChemSafetyPro, 2016). V tomto konkrétním případě je imobilizace jedinců ekvivalentem smrti.

Dalším hojně používaným testem je test č. 211: Test reprodukce *Daphnia magna* (OECD, 2012). Provedením reprodukčního testu lze pozorovat podrobnější parametry reprodukce, jako např. počet juvenilů na snůšku, počet snůšek, celkový počet juvenilů, počet nevyvinutých antenul, reprodukční rychlost, poměr pohlaví potomstva (Tkaczyk et al., 2021, Nguyen et al., 2021). Protože se jedná o reprodukční test, je potřeba do testu vybírat pouze samice. Rozdíl mezi samcem a samicí je v oblasti hlavy, jak je vidět z Obr. 4. U samce lze pozorovat delší pár antenul, u samice je tento pár velmi krátký.



Obr. 4: Samec (A) a samice (B) *Daphnia sp.*

Výskyt fluorchinolonových antibiotik v povrchových vodách a jejich toxické působení na vodní organismy

V posledních letech se zvyšuje pozornost léčivům jako nově identifikovaným kontaminantům, které mohou představovat potencionální hrozbu pro vodní ekosystémy i lidské zdraví (Bawa-Alláh & Ehimiyein, 2022). V důsledku toho, že jsou fluorchinolony z těla vylučovány až ze 70 % nemetabolizovány, dostávají se tak do životního prostředí (Yang et al., 2021), kde mohou setrvávat díky schopnostem sorpce a odolnosti vůči mikrobiální degradaci (Teglia et al., 2019). Do vodního prostředí se fluorchinolony dostávají prostřednictvím odpadních vod z domácností, nemocnic a průmyslu (Bawa-Alláh & Ehimiyein, 2022), a tím se mohou podílet na tvorbě rezistence u mikrobiálních populací (Doorslaer et al., 2014).

V povrchových vodách Evropy byla naměřena průměrná koncentrace ciprofloxacinu v jednotkách $\mu\text{g/l}$, oproti tomu v USA se koncentrace ciprofloxacinu pohybovala kolem desetin $\mu\text{g/l}$ (Frade et al., 2014). Nejvyšší koncentrace ciprofloxacinu byly detekovány v průmyslové oblasti Patancheru v Indii, a to až 14 mg/l (Kovalakov et al., 2020). Koncentrace enrofloxacinu v povrchových vodách v Portugalsku byla v rozmezí $0,067\text{--}0,102 \mu\text{g/l}$ (Ebert et al., 2011). Nižší koncentrace enrofloxacinu byly zaznamenány ve vodovodní vodě v Číně, a to v rozmezí od 2 do 4 ng/l (Dai et al., 2023). Norfloxacin byl v povrchových vodách v Číně zjištěn v koncentracích až 109 ng/l , v povrchových vodách v Austrálii byly získány koncentrace norfloxacinu až $1,15 \mu\text{g/l}$ (Feng et al., 2018).

V různých vodních organismech, jako jsou fytoplankton, zooplankton, krevety a ryby, byla zjištěna rezidua fluorchinolonů až po 342 ng/g suché hmotnosti (Shen et al., 2023).

Dionísio et al. (2020) zkoumali akutní toxicitu ciprofloxacinu na *Daphnia magna* dle metodiky OECD 202 (OECD, 2004). Hodnota EC_{50} po 48 hodinách činila $36,5 \text{ mg/l}$.

Eluk et al. (2021) provedli akutní testy toxicity šesti vybraných fluorchinolonových antibiotik na *Daphnia magna*. Testy akutní toxicity byly provedeny dle metodiky OECD 202 (OECD, 2004). Jak je patrné z Tab. I, hodnoty EC_{50} se v této studii pohybují od jednotek do nižších desítek mg/l .

Tab. I: Hodnoty EC₅₀ po 48 hodinách působení na *Daphnia sp.* pro jednotlivé vybrané fluorchinolony (dle Eluk et al., 2021).

chemická látka	48 h EC ₅₀ [mg/l]
ciprofloxacin	7,2
enrofloxacin	7,9
levofloxacin	19,5
marbofloxacin	5,4
norfloxacin	8,7
ofloxacin	36,0

Ve stejné studii (Eluk et al., 2021) provedli autoři též test chronické toxicity dle protokolu OECD 211 (OECD, 2012). Autoři zjistili, že chronická expozice vůči fluorchinolonovým antibiotikům ovlivňuje růst i mortalitu v koncentracích 50 až 140 µg/l, což znamená, že v povrchových vodách řek a jezer představují tato antibiotika mírné riziko, ovšem v odpadních vodách (zejména nemocnic) může být riziko velké (Eluk et al., 2021).

Akutní a chronické testy toxicity pro ciprofloxacin na *Daphnia magna* byly součástí i studie vykonané autory Martins et al. (2012). Akutní testy byly provedeny dle metodiky OECD 202 (OECD, 2004) a chronické účinky ciprofloxacinu na velikost a plodnost byly zjišťovány podle protokolu OECD 211 (OECD, 2012). Po 48 hodinách byla zjištěna hodnota akutní toxicity EC₅₀ = 65,3 mg/l. V rámci chronického testu toxicity měl ciprofloxacin významný vliv na velikost juvenilů z prvního potomstva a míru plodnosti.

See et al. (2016) uskutečnili čtyřgenerační reprodukční test enrofloxacinu na *Daphnia magna*, upravený podle OECD 211 (OECD, 2012). Hodnoceny byly účinky enrofloxacinu na přežití, růst a reprodukci. Test prokázal zvýšení úmrtnosti a snížení reprodukce s dalšími generacemi. Inhibice růstu byla zjištěna pouze u jedné skupiny čtvrté generace.

Fotochemické degradaci fluorchinolonů a následným testům toxicity na *Daphnia sp.* se zatím nevěnovala žádná studie. Existují ale studie fotochemického odbourávání a následných testů toxicity na jiných organismech.

Fotochemické degradaci pod slunečním světlem a následnému testu toxicity na *Vibrio fischeri* se věnovali ve své práci Sturini et al. (2015). Testováno bylo pět fluorchinolonových antibiotik – ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, levofloxacin a marbofloxacin. Z výsledků této studie vyplývá, že fotochemická degradace za daných podmínek je významnou metodou odstraňování těchto látek v povrchových vodách a toxický účinek, zaznamenaný na *Vibrio fischeri*, byl způsoben produkty fotochemické degradace.

Práce Klementové et al. (2021) se zabývala studiem fotochemické degradace ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu při vystavení záření o vlnových délkách 300 – 350 nm jednak v neutrálním a jednak v mírně alkalickém pH a následným testem antibakteriální aktivity na dvou typech bakterií, *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis*. V případě obou bakterií byl pozorován signifikantní nárůst antibakteriální aktivity u směsi fotoproduktů ciprofloxacinu a enrofloxacinu oproti původnímu léčivu, u norfloxacinu se zvýšená antibakteriální aktivita neukázala.

Materiál a metody

Ciprofloxacin, enrofloxacin a norfloxacin byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich v čistotě $\geq 98,0\%$. Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním antibiotika ve 4 ml 0,1 M HCl, pak bylo přidáno 96 ml ultračisté vody (Smart2Pure, Thermo Scientific) a pH upraveno na hodnotu 6,9 - 7,2. Pro akutní testy toxicity byly připraveny zásobní roztoky v koncentracích 400 mg/l pro ciprofloxacin, 200 mg/l pro enrofloxacin a 300 mg/l pro norfloxacin. Pro chronický test toxicity byla u ciprofloxacinu pro zásobní roztok použita koncentrace 50 mg/l. Všechny zásobní a ozářené roztoky byly následně ředěny na definovanou koncentraci médiem *Achener Daphnien Medium*.

Mořská sůl byla zakoupena v prodejně Akvaristika (České Budějovice, CZ) a před použitím vysušena v sušárně po dobu 2 hodin při teplotě 105°C.

Ozařování vzorků bylo prováděno v reaktoru Rayonet RPR 100 osazeném lampami RPR 3000Å, které emitují záření o vlnových délkách v rozmezí 250 – 350 nm. Vzorky byly ozařovány ve skleněných kyvetách s víčkem, aby bylo odfiltrováno záření o vlnových délkách kratších než 300 nm.

Daphnia sp. byly kultivovány v médiu *Achener Daphnien Medium* (ADaM), které se na objem 10 l připravovalo z destilované vody a několika chemických látek, jejichž složení udává Tab. II.

Tab. II.: Složení *Achener Daphnien Medium*.

chemická látka	koncentrace látky [g/l]	množství látky v médiu na objem 10 l
SeO ₂	0,014	1 ml
NaHCO ₃	25,2	22 ml
CaCl ₂ ·2 H ₂ O,	117,6	23 ml
mořská sůl	—	3,33 g

Daphnia sp. byly krmeny zelenými řasami *Desmodesmus subspicatus* (kultura získána z CCALA Třeboň, Česká republika) 3× během týdne vždy v pondělí, středu a pátek tak, aby výsledná koncentrace uhlíku v médiu byla 3 mg C/l. Pro tento účel byla před začátkem

pokusů sestrojena kalibrační křivka absorbance roztoků řas o různé koncentraci při vlnové délce 684 nm a stanoven obsah uhlíku v řasách metodou TOC. Stanovení TOC bylo provedeno na Ústavu chemie a biochemie Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně pomocí analyzátoru FLASH 2000 (ThermoFisher Scientific Inc., USA) spálením vzorků v proudu kyslíku při 950 °C a v přítomnosti katalyzátoru.

Kultivované *Daphnia sp.* byly otestovány na ověření kondice referenčním testem s dichromanem draselným. Pro test byla připravena koncentrační řada dichromanu draselného s koncentracemi v rozmezí 0,1 - 3,2 mg/l.

Akutní toxicita ciprofloxacinu, enrofloxacinu, norfloxacinu a jejich fotoproduktů byla testována na *Daphnia sp.* podle metodiky OECD Guideline 202 (OECD, 2004).

Před započítáním testu byly *Daphnia sp.* chovány v médium ADaM ve vinotéce Wine cooler SW-66 při teplotě 20°C. Den před samotným testem byly dospělé samice odchyceny a separovány, aby následující den byli nasazeni juvenilové mladší než 24 hodin.

Test akutní toxicity probíhal v 100 ml kádinkách a trval celkem 48 hodin, přičemž byly provedeny dvě kontroly, a to po 24 a 48 hodinách od začátku testu. Důvodem kontroly bylo pozorovat úhyn jedinců, či případnou změnu chování v daných koncentracích. Každá koncentrace se testovala v 10 paralelních stanoveních se dvěma jedinci na jedno stanovení. Kontrola obsahovala pouze samotné médium ADaM. Do každé kádinky byl nakonec přidán cetylalkohol, zakoupený od firmy Sigma Aldrich, kvůli snížení povrchového napětí a eliminaci možného přichycení juvenilů na hladině. Po nasazení testu a po jeho ukončení byly změřeny hodnoty pH roztoků.

Data získaná z akutního testu toxicity byla vyhodnocena metodou nelineární regrese pomocí softwaru GraphPad Prism 7.05 za použití SEM odchylky (střední chyby průměru).

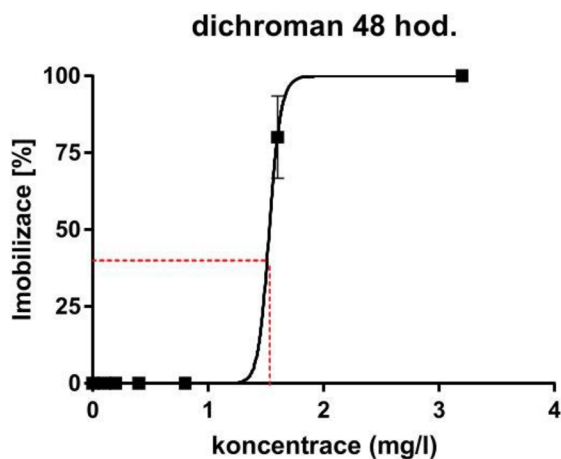
Chronická toxicita ciprofloxacinu a jeho fotoproduktů byla testována na *Daphnia sp.* dle metodiky OECD Guideline 211 (OECD, 2012). Pro úspěšnost testu bylo zásadní testovat látky výhradně na samicích, tudíž před jeho počátkem je bylo nutné pomocí binolupy Olympus SZ 51 identifikovat a separovat. Test probíhal po dobu 21 dní v 15 opakováních se dvěma jedinci pro testovanou koncentraci. Pozorován byl účinek látek na reprodukční schopnost a růst *Daphnia sp.* Na výsledky z chronického testu toxicity byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test v softwaru Statistica 14.

Pro měření rozměrů jedinců použitých v testech byla nejprve provedena jejich lyofilizace v Labconco FreeZone 2.5 po dobu 48 hodin. K měření byl použit mikroskop Olympus CX41 se zvětšením 4krát.

Výsledky a diskuze

Test kondice dafnií s použitím dichromanu draselného

Kondice dafnií byla testována s použitím roztoku dichromanu draselného v rozmezí koncentrací 0,1 - 3,2 mg/l. Výsledky testu s dichromanem draselným ukazuje Obr. 5.



Obr. 5: Test kondice s dichromanem draselným.

Z výnosu na Obr. 5 byla získána hodnota EC_{50} pro dichroman 1,5 mg/l. Tato hodnota spadá do intervalu 0,6 - 1,7, který je brán jako měřítko dobré kondice dafní (ČSN, 2013). Podrobná data stanovení kondice dafní jsou uvedena v Příloze 1.

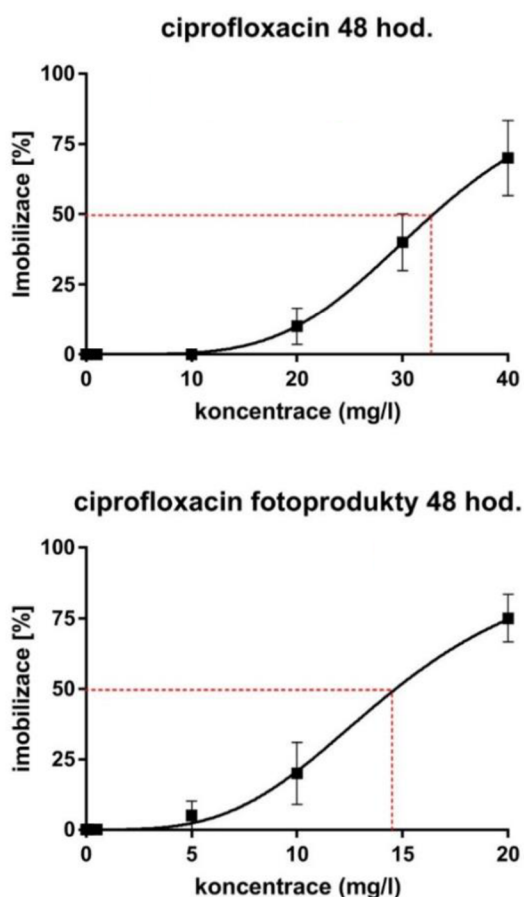
Tvorba fotoproduktů

Doby ozařování ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu pro testy toxicity byly stanoveny na základě kinetických profilů odbourávání (Poncarová, 2020). Doby ozařování byly vybírány tak, aby v reakční směsi bylo přítomno původní antibiotikum v koncentraci cca 20 % a bylo tedy možno stanovit, kolikrát víc směsi fotoproduktů je třeba přidat do testu toxicity, aby byla zachována stejná koncentrace nerozloženého antibiotika a v testu se mohl projevit jen vliv směsi fotoproduktů.

Testy akutní toxicity

Koncentrace byly pro každou látku zvoleny dle orientační hodnoty EC_{50} z literatury tak, aby se následně mohla co nejpřesněji určit hodnota EC_{50} . V rámci akutního testu toxicity bylo vždy na začátku a po 48 hodinách změřeno pH v kontrolní skupině, nejnižší koncentraci testované látky a nejvyšší koncentraci testované látky. Hodnota pH se musela pohybovat v rozmezí 6 – 9, optimální hodnoty pH pro dafnie (OECD, 2004). Naměřené hodnoty pH se pohybovaly v rozmezí 6,97 - 7,87, což odpovídá požadovanému intervalu.

Vyhodnocení akutního testu toxicity ciprofloxacinu, enrofloxacinu, norfloxacinu a jejich směsí fotoproduktů bylo provedeno součtem uhynulých jedinců za dobu 48 hodin a převedením součtu na procentuální hodnotu. Z těchto zjištěných hodnot byly poté vyhotoveny grafy, z nichž byla získána hodnota EC_{50} . Obr. 6 shrnuje výsledek akutního testu pro ciprofloxacin a směs ciprofloxacinu a produktů jeho degradace po ozáření.

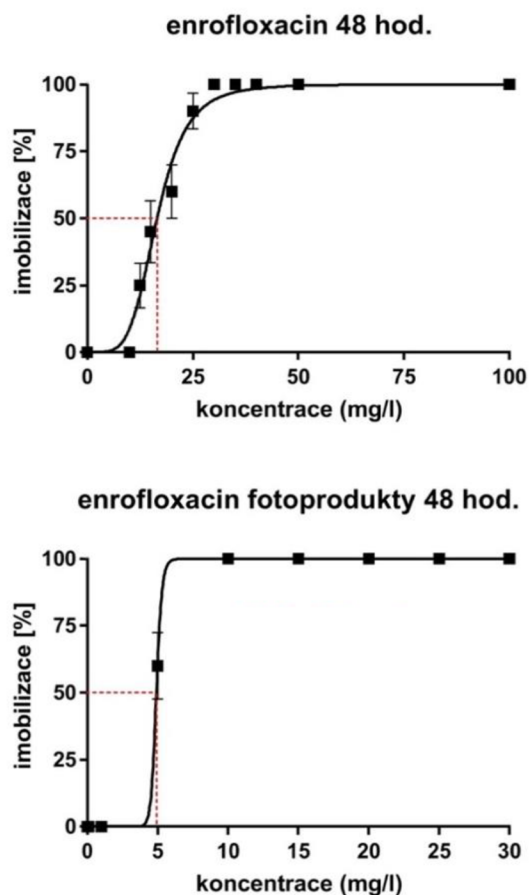


Obr. 6: Akutní toxicita pro ciprofloxacin a jeho fotoprodukty.

Pro ciprofloxacin byla z Obr. 6 získána hodnota $EC_{50} = 33$ mg/l, pro fotoprodukty $EC_{50} = 14,7$ mg/l. Z těchto výsledků je patrné, že fotoprodukty vykazují v akutním testu více než dvakrát vyšší toxicitu oproti původní látce. Podrobná data akutního testu toxicity pro ciprofloxacin jsou uvedena v Příloze 2. Hodnoty EC_{50} uváděné v literatuře se poněkud liší. Nejblíže hodnotě stanovené v této práci je hodnota 36,5 mg uvedená v práci autorů Dionísio et al. (2020). Násobně nižší hodnotu získali během své studie Eluk et al. (2021), a to 7,2 mg/l. Naopak Martins et al. (2012) uvádějí hodnotu 65,3 mg/l, tedy dvojnásobnou oproti zde

uvedené hodnotě. V literatuře nejsou údaje o toxicitě fotoproduktů získaných za světelných podmínek relevantních povrchovým vodám

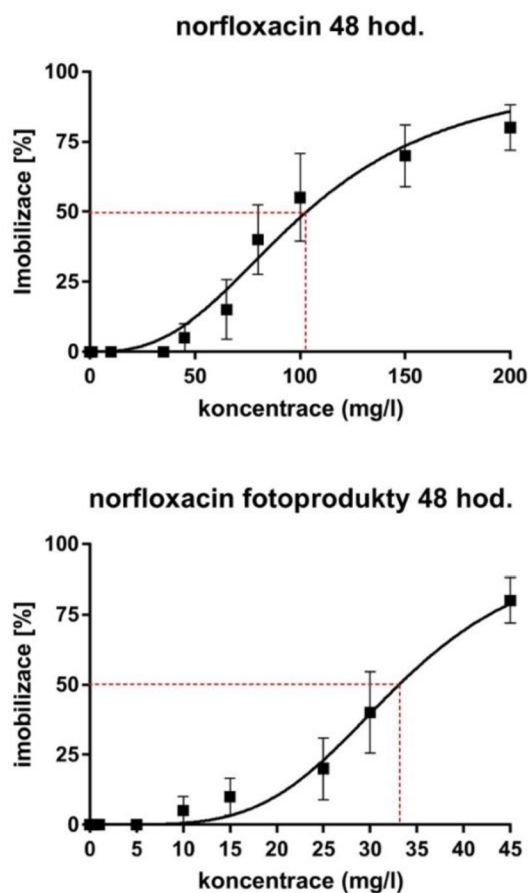
Obr. 7 uvádí výsledek akutního testu toxicity pro enrofloxacin a jeho reakční směs po ozáření.



Obr. 7: Akutní toxicita pro enrofloxacin a jeho fotoprodukty.

Na základě grafů v Obr. 7 byly získány hodnoty EC₅₀, přičemž pro enrofloxacin EC₅₀ = 17 mg/l a pro fotoprodukty enrofloxacinu EC₅₀ = 5 mg/l. Z výsledků je zřejmé, že i v tomto případě byly fotoprodukty toxicitější než samotný enrofloxacin, a to více než třikrát. Podrobná data akutního testu toxicity pro enrofloxacin jsou uvedena v Příloze 3. Srovnatelná hodnota EC₅₀ vyplývá ze studie Bona et al. (2014), kde EC₅₀ = 16,3 mg/l. Eluk et al. (2021) i v tomto případě uvádějí nižší hodnotu, než byla získána v této práci, a to 7,9 mg/l.

Výsledek akutního testu toxicity pro norfloxacin a jeho fotoprodukty znázorňuje Obr. 8.



Obr. 8: Akutní toxicita pro norfloxacin a jeho fotoprodukty.

Z Obr. 8 byly vyhodnoceny hodnoty EC_{50} , přičemž pro norfloxacin byla získána hodnota $EC_{50} = 103$ mg/l a pro fotoprodukty norfloxacinu $EC_{50} = 33$ mg/l. Z hodnot EC_{50} vyplývá, že pro fotoprodukty byla získána třikrát nižší hodnota než pro samotný norfloxacin, tudíž i v tomto případě jsou fotoprodukty toxičtější. Podrobná data akutního testu toxicity pro norfloxacin jsou uvedena v Příloze 4. Hodnota EC_{50} pro norfloxacin je uvedena pouze v práci autorů Eluk et al. (2021), jimi stanovená hodnota 8,7 mg/l je opět výrazně nižší podobně jako u ostatních fluorchinolonových antibiotik.

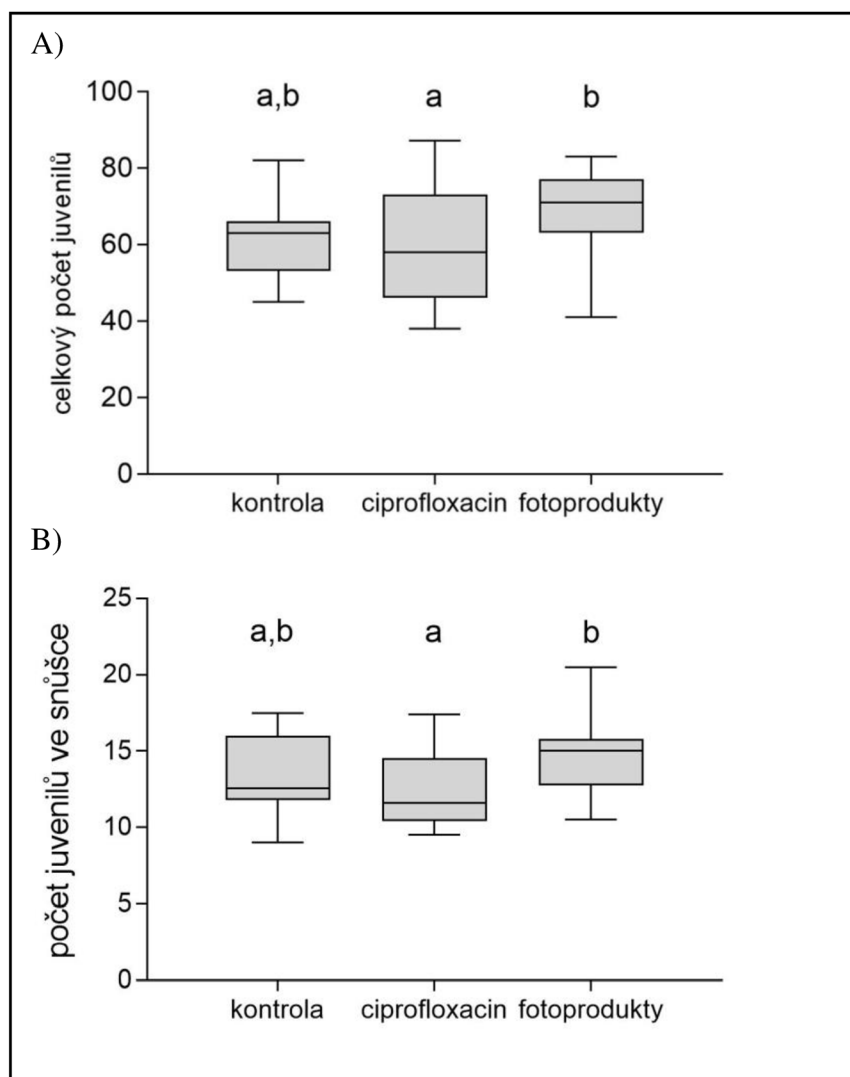
V literatuře nejsou údaje o toxicitě fotoproduktů získaných za světelných podmínek relevantních povrchovým vodám, ale například při testu antibakteriální aktivity ciprofloxacinu a jeho fotoproduktů bylo také zjištěno, že směs fotoproduktů je výrazně efektivnější než mateřská látka. Stejně výsledky byly zaznamenány i pro enrofloxacin a jeho

reakční směs po ozáření. V případě norfloxacinu práce uvádí, že fotoproducty norfloxacinu antibakteriální aktivitu nevykazovaly (Klementová et al., 2021).

Test chronické toxicity

Pro chronický test toxicity byla pro ciprofloxacin vybrána koncentrace natolik nízká, že nevykazovala žádný efekt v akutním testu toxicity (OECD, 2012).

V chronickém testu toxicity na *Daphnia sp.* byly sledovány následující parametry: celkový počet juvenilů za dobu testu, počet juvenilů v jednotlivých snůškách, čas mezi snůškami, počet snůšek a velikost těla dafnií na konci pokusu (OECD, 2012). Obr. 9 znázorňuje celkové počty juvenilů a počty juvenilů ve snůšce v kontrole, v roztoku s ciprofloxacinem o koncentraci 0,1 mg/l a v roztoku se směsí fotoproductů, v němž hodnota koncentrace ciprofloxacinu byla stejná jako v roztoku se samotným ciprofloxacinem.



Obr. 9: Závislost celkového počtu juvenilů v kontrole, ciprofloxacinu (0,1 mg/l) a směsi fotoproduktů ciprofloxacinu a závislost počtu juvenilů ve snůšce v kontrole, ciprofloxacinu (0,1 mg/l) a směsi fotoproduktů ciprofloxacinu. Písmena a, b symbolizují v obou částech grafu prokázaný statisticky významný rozdíl.

Z Obr. 9 vyplývá, že v médiu s obsahem ciprofloxacinu 0,1 mg/l nebyl statisticky významný rozdíl v celkovém počtu juvenilů a počtu juvenilů ve snůšce oproti kontrole. Průměrný celkový počet juvenilů a jejich průměrný počet ve snůšce byl ve směsi s fotoprodukty ciprofloxacinu statisticky významně vyšší než v kontrole a ciprofloxacinu samotném.

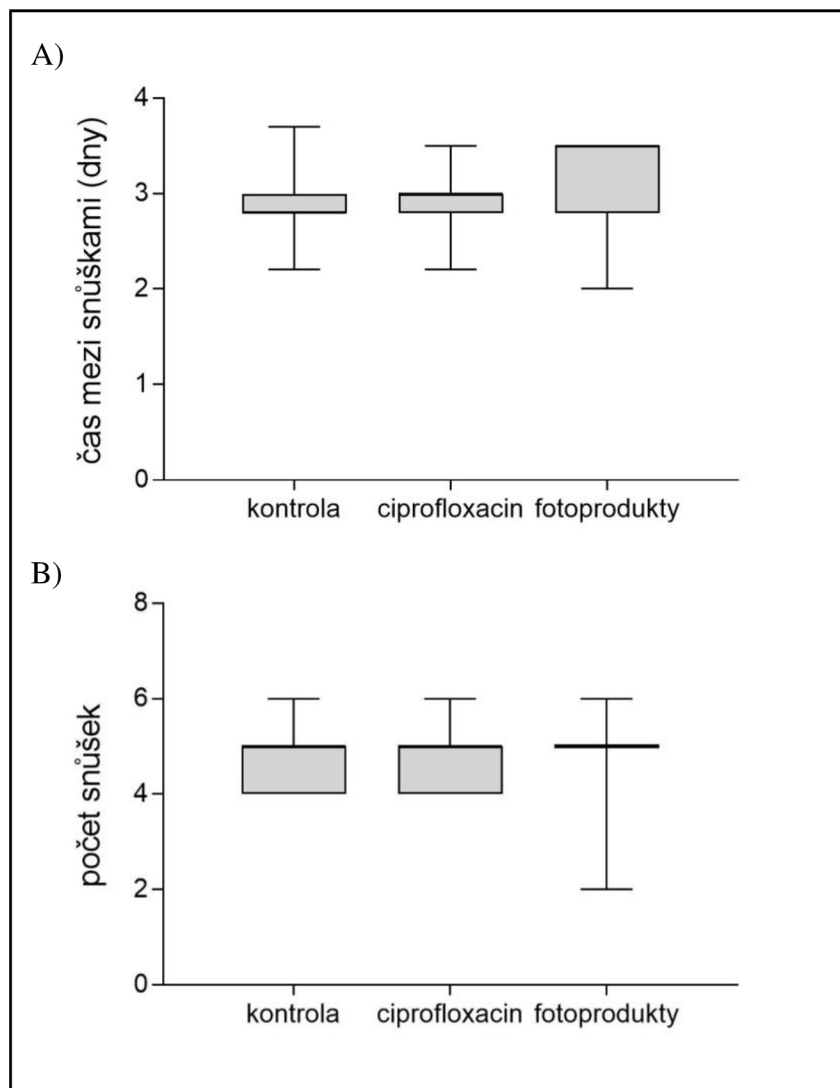
Motiei et al. (2020) ve své práci uvádějí zvyšující se rychlost růstu populace *Daphnia sp.* v nízkých koncentracích ciprofloxacinu ve srovnání s kontrolou. Testované koncentrace ciprofloxacinu s procentuálním zvýšením rychlosti růstu populace *Daphnia sp.* vzhledem ke kontrole ukazuje Tab. III.

Tab. III: Zvýšení rychlosti růstu populace *Daphnia sp.* v daných koncentracích ciprofloxacinu vzhledem ke kontrole (dle Motiei et al., 2020).

koncentrace ciprofloxacinu [mg/l]	nárůst rychlosti růstu populace [%]
0,01	17
0,1	19
1	15

Získané výsledky z chronického testu toxicity pro celkový počet juvenilů v ciprofloxacinu o koncentraci 0,1 mg/l se liší od studie Motiei et al. (2020), kde byl zaznamenán konkrétně 19% nárůst rychlosti růstu populace oproti kontrole. V této práci nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v ciprofloxacinu oproti kontrole, za to ve směsi s fotoproducty ciprofloxacinu, kde byl ciprofloxacín rovněž v koncentraci 0,1 mg/l, byl zaznamenán nárůst populace vzhledem ke kontrole a ciprofloxacinu samotnému.

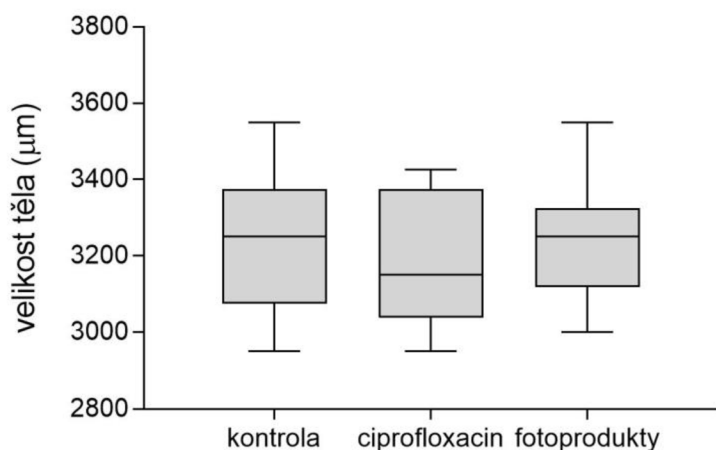
Obr. 10 znázorňuje vyhodnocení času mezi snůškami a počty snůšek v testovaných roztocích kontroly, ciprofloxacinu a směsi fotoproduktů ciprofloxacinu.



Obr. 10: Závislost času mezi snůškami (A) a počtu snůšek (B) při chronickém testu ciprofloxacinu a jeho fotoproduktů.

Z Obr. 10 je patrné, že čas mezi jednotlivými snůškami a počet snůšek v kontrole, ciprofloxacinu a ve směsi fotoproduktů ciprofloxacinu nebyl vyhodnocen jako statisticky významně rozdílný, proto v něm nejsou označení pro statisticky významné rozdíly (a, b).

Obr. 11 znázorňuje velikost těla dafnií na konci pokusu v kontrole, ciprofloxacinu (0,1 mg/l) a směsi fotoproduktů ciprofloxacinu.



Obr. 11: Závislost velikosti těla při chronickém testu s ciprofloxacinem a jeho fotoproducty.

U velikosti těla je vidět z Obr. 11 velmi výrazný rozdíl mezi jedinci v jednotlivých paralelních pokusech za stejných podmínek. V průměrné velikosti nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi kontrolou, ciprofloxacinem a směsí fotoproductů. Velikost těla je tedy zjevně ovlivněna mnohem významněji jinými faktory než prostředím.

Gabsi et al. (2014) se zabývali studiem mateřských vlastností a faktory prostředí, které mají vliv na velikost potomků u populací *Daphnia magna*. Výsledky se shodují s publikací Eberta (1993), kde je velikost potomků významně ovlivněna úrovní potravy, velikosti těla matky a velikosti plodu. Oproti tomu Sakwinska (2004) uvádí odlišné výsledky. Studie byla prováděna na *Daphnia galeata*, u kterých byla zaznamenána velikost potomků v závislosti na věku matky. Variabilita faktorů mezi jednotlivými studii může být způsobena mezidruhovými rozdíly.

V rámci této práce byly všechny testované mateřské dafnie v době nasazení do pokusu stáří mladší než 24 hodin a krmeny stejným množstvím potravy. Z výše uvedených studií lze tedy usuzovat, že v tomto případě mohly mít vliv na variabilitu velikost těla juvenilů velikost těla matky či velikost plodu.

Klementová et al. (2020) srovnávali toxikologické účinky verapamilu a jeho fotoproductů na *Daphnia magna*. Výsledky ukázaly, že samotný verapamil neovlivnil ani jeden ze stanovovaných parametrů, zatímco jeho fotoproducty vykazovaly významný negativní účinek na počet juvenilů, počet snůšek i na velikost těla *Daphnia magna*.

Podrobná data ke všem parametrům, sledovaných v chronickém testu toxicity, jsou uvedena v Příloze 5.

Využití výsledků práce ve výuce na střední škole

Téma diplomové práce by mohlo být na střední škole využito např. v maturitním semináři chemie s důrazem na vliv člověka na životní prostředí. Výuka by mohla být zaměřena zejména na problematiku polutantů, mezi které se řadí i fluorochinolonová antibiotika a léčiva obecně. Téma je vhodné na propojení mezipředmětových vztahů biologie a chemie.

V chemii lze z hlediska toxikologie žáky seznámit se základními parametry hodnocení toxicity látek, jako jsou např. IC_{50} , EC_{20} , EC_{50} nebo LC_{50} . Za cíl výuky by bylo stanoveno, aby studenti pochopili, jak se tyto parametry používají k posouzení účinků látek na organismy. Zároveň je možné do výuky zařadit i moderní instrumentální možnosti stanovování těchto látek, které se v přírodě vyskytují v malých koncentracích, a propojit teoretické poznatky s praktickým využitím. Další související témata, o které by mohla být výuka obohacena, jsou dopady znečištění na životní prostředí a možnosti ochrany přírody.

Závěr

- Stanovené hodnoty EC_{50} při testu akutní toxicity činily pro ciprofloxacin 33 mg/l, pro enrofloxacin 17 mg/l a pro norfloxacin 103 mg/l. Stanovené hodnoty EC_{50} při testu akutní toxicity pro směs fotoproduktů činily pro ciprofloxacin 14,7 mg/l, pro enrofloxacin 5 mg/l a pro norfloxacin 33 mg/l. Ve všech případech byly tedy hodnoty EC_{50} násobně menší u směsi produktů fotochemické degradace daného léčiva oproti mateřské látce, což prokazuje vyšší toxicitu směsi degradačních produktů u všech tří testovaných látek.
- Z chronického testu toxicity vyplývá, že ciprofloxacin samotný nemá vliv na celkový počet juvenilů, počet juvenilů ve snůšce, počet snůšek, čas mezi snůškami, ani na velikost těla.
- Směs fotoproduktů se ukázala jako příznivě ovlivňující celkový počet juvenilů a počet juvenilů ve snůšce, neměla vliv na počet snůšek, čas mezi snůškami a na velikost těla.

Seznam použité literatury

Baggio D., Ananda-Rajah M. R. (2021): Fluoroquinolone antibiotics and side effects.

Australian Prescriber, 44, 161-4.

<https://doi.org/10.18773/austprescr.2021.035>

Bawa-Alláh K. A., Ehimiyein A. O. (2022): Ecotoxicological effects of human and veterinary antibiotics on water flea (*Daphnia magna*). Environmental Toxicology and Pharmacology, 94, 103932.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103932>

Bona M. D., Leva V. D., Liguoro M. D. (2014): The sensitivity of *Daphnia magna* and *Daphnia curvirostris* to 10 veterinary antibacterials and to some of their binary mixtures. Chemosphere, 115, 67-74.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.003>

ČSN EN ISO 6341 (757751). Kvalita vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Zkouška akutní toxicity. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2013, 28.

Dai Y., Peng J. J., Zhang T. Y., Xie X. P., Luo S. S., Liu W. Ch., Ma Y. (2023): Effects of antibiotics (enrofloxacin) on microbial community of water and sediment in an aquatic ecological model. Frontiers in Veterinary Science, 10, 1151988.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1151988>

Dionísio R., Daniel D., Dias de Alkimin G., Nunes B. (2020): Multi-parametric analysis of ciprofloxacin toxicity at ecologically relevant levels: Short- and long-term effects on *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 74, 103295.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103295>

Doorslaer X. V., Dewulf J., Van Langenhove H., Demeestere K. (2014): Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. Science of The Total Environment, 500-501, 250-269.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.075>

Ebert D. (1993): The trade-off between offspring size and number in *Daphnia magna*: the influence of genetic, environmental and maternal effects. Arch. Hydrobiologia, 90, 453–473.
https://www.evolution.unibas.ch/ebert/publications/papers/01_papers/1993_Ebert_ArchHydrobiol.PDF

Ebert D. (2005): Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda: National Center for biotechnology Information. ISBN-10: 1-932811-06-0

Ebert I., Bachmann J., Kühnen U., Küster A., Kussatz C., Maletzki D., Schlüter Ch. (2011): Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry, 30 (12), 2786-2792.
<https://doi.org/10.1002/etc.678>

Eluk D., Nagel O., Gagnetten A., Reno U., Althaus R. (2021): Toxicity of fluoroquinolones on the cladoceran *Daphnia magna*. Water Environment Research, 93 (12), 2914-2930.
<https://doi.org/10.1002/wer.1631>

Feng M., Wang Z., Dionysiou D. D. Sharma V. K. (2018): Metal-mediated oxidation of fluoroquinolone antibiotics in water: A review on kinetics, transformation products, and toxicity assessment. Journal of Hazardous Materials, 344 (15), 1136-1154.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.067>

Frade V. M. F., Dias M., Teixeira A. C. S. C., Palma M. S. A. (2014): Environmental contamination by fluoroquinolones. Brazilian journal of farmaceutics sciences, 50 (1), 41-54.
<https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100004>

Gabsi F., Glazier D. S., Hammers-Wirtz M., Ratte H. T., Preuss T. G. (2014): How do interactive maternal traits and environmental factors determine offspring size in *Daphnia magna*? Annales De Limnologie-International Journal of Limnology, 50, 9-18.
<https://doi.org/10.1051/limn/2013067>

ChemSafetyPro (2016): Aquatic Toxicity ChemSafetyPro Publishing.
https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/ecotox_aquatic_toxicity.html

Klementová Š., Poncarová M., Langhansová H., Lieskovská J., Kahoun D., Fojtíková P. (2021): Photodegradation of fluoroquinolones in aqueous solution under light conditions relevant to surface waters, toxicity assessment of photoproduct mixtures. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 13941–13962.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-16182-6>

Klementová Š., Poncarová M., Kahoun D., Šorf M., Dokoupilová E., Fojtíková P. (2020): Toxicity assessment of verapamil and its photodegradation products. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 35650-35660.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-020-09830-w>

Koivisto S. (1995): Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? *Environmental Pollution*, 90 (2), 263-267.
[https://doi.org/10.1016/0269-7491\(95\)00029-Q](https://doi.org/10.1016/0269-7491(95)00029-Q)

Koláček T. (2015): Využití hrotnatky *Daphnia magna* v ekotoxikologických biotestech. *Živa*, 6.
<https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/vyuziti-hrotnatky-daphnia-magna-v-ekotoxikologicky.pdf>

Kovalakov P., Cizmas L., McDonald T. J., Maršálek B., Feng M., Sharma V. K. (2020): Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere*, 251, 126351.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>

La G. H., Choi J. Y., Chang K. H., Jang M. H., Joo G. J., Kim H. W. (2014): Mating Behavior of *Daphnia*: Impacts of Predation Risk, Food Quantity, and Reproductive Phase of Females. *Plos One*, 9(8), 104545.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104545>

Martins N., Pereira R., Abrantes N., Pereira J., Gonçalves F., Marques C. R. (2012): Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology*, 21, 1167–1176.
<https://doi.org/10.1007/s10646-012-0871-x>

Motiei A., Brindefalk B., Ogonowski M., El-Shehawy R., Pastuszek P., Ek K., Liewenborg B., Udekwu K., Gorokhova E. (2020): Disparate effects of antibiotic-induced microbiome change and enhanced fitness in *Daphnia magna*. Plos One, 15(1), 1-22.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214833>

Nguyen T. D., Itayama T., Ramaraj R., Iwami N., Shimizu K., Dao T. S., Pham T. L., Maseda H. (2021): Chronic ecotoxicology and statistical investigation of ciprofloxacin and ofloxacin to *Daphnia magna* under extendedly long-term exposure. Environmental Pollution. 291, 118095.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118095>

OECD (2012): OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Guideline 211. *Daphnia magna* Reproduction Test. OECD Publishing, Paris.

<https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>

OECD (2004): OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Guideline 202. *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test. OECD Publishing, Paris.

<https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>

Paton J. H., Reeves D. S. (2012): Fluoroquinolone Antibiotics. Drugs, 36, 193–228.

<https://doi.org/10.2165/00003495-198836020-00004>

Poncarová, M. (2020): Identifikace produktů fotochemické degradace antibiotik ze skupiny fluorochinolonů. Magisterská práce, PřF JU, České Budějovice, ČR.

<https://theses.cz/id/v0zc75/?info>

Sakwinska O. (2004): Persistent maternal identity effects on life history traits in *Daphnia*. Oecologia, 138, 379–386.

<https://www.jstor.org/stable/40005844>

See M. D., Lizzi F., Borgato A., Liguoro R. (2016): Increasing toxicity of enrofloxacin over four generations of *Daphnia magna*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 132, 397-402.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.032>

Shen M., Hu Y., Zhao K., Li Ch., Liu B., Li M., Lyu Ch., Sun L., Zhong S. (2023): Occurrence, Bioaccumulation, Metabolism and Ecotoxicity of Fluoroquinolones in the Aquatic Environment: A Review. *Toxics*, 11 (12), 966.
<https://doi.org/10.3390/toxics11120966>

Smrž, J. (2013): *Základy biologie, ekologie a systému bezobratlých živočichů*. První vydání. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum. ISBN 978-80-246-2258-3.

Sturini M., Speltini A., Maraschi F., Pretali L., Ferri E.N., Profumo A. (2015): Sunlight-induced degradation of fluoroquinolones in wastewater effluent: Photoproducts identification and toxicity. *Chemosphere* 134, 313-318.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.081>

Teglia C. M., Perez F. A., Michlig N., Repetti M. R., Goicoechea H. C., Culzoni M. J. (2019): Occurrence, Distribution, and Ecological Risk of Fluoroquinolones in Rivers and Wastewaters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(10), 2305-2313.
<https://doi.org/10.1002/etc.4532>

Tkaczyk A., Bownik A., Dudka J., Kowal K., Ślaska B. (2021): *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of The Total Environment*, 763, 143038.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143038>

Yang Q., Gao Y., Ke J., Show P. L., Ge Y., Liu Y., Guo R., Chen J. (2021): Antibiotics: An overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods. *Bioengineered*, 12 (1), 7376-7416.
<https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1974657>

Zhang Y. N., Zhu X. Y., Wang W. P., Wang Y., Wang L., Xu X. X., Zhang K., Deng D. G. (2016): Reproductive switching analysis of *Daphnia similoides* between sexual female and parthenogenetic female by transcriptome comparison. *Scientific Reports*, 6, 34241.
<https://doi.org/10.1038/srep34241>

Přílohy

Příloha 1: Test kondice dafnií s dichromanem draselným.

treatment	koncentrace (mg/l)	opakování	počet nasazených juvenilů	počet imobilizovaných juvenilů po 24 h	počet imobilizovaných juvenilů po 48 h	imobilizace po 24 h (%)	imobilizace po 48 h (%)	průměrná imobilizace po 24 h (%)	průměrná imobilizace po 48 h (%)	SD 48 h (%)	SEM 48 h (%)
kontrola	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
dichroman draselný	0,1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				

	0,2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	0,4	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	0,8	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				

	10	2	0	0	0	0				
1,6	1	2	0	2	0	100	15	80	40	13
	2	2	1	2	50	100				
	3	2	0	0	0	0				
	4	2	0	2	0	100				
	5	2	0	2	0	100				
	6	2	1	2	50	100				
	7	2	0	2	0	100				
	8	2	0	2	0	100				
	9	2	1	2	50	100				
	10	2	0	0	0	0				
3,2	1	2	2	2	100	100	100	100	0	0
	2	2	2	2	100	100				
	3	2	2	2	100	100				
	4	2	2	2	100	100				
	5	2	2	2	100	100				
	6	2	2	2	100	100				
	7	2	2	2	100	100				
	8	2	2	2	100	100				
	9	2	2	2	100	100				
	10	2	2	2	100	100				

Příloha 2: Akutní test toxicity - ciprofloxacin a jeho reakční směs po ozáření.

treatment	koncentrace (mg/l)	opakování	počet nasazených juvenilů	počet imobilizovaných juvenilů po 24 h	počet imobilizovaných juvenilů po 48 h	imobilizace po 24 h (%)	imobilizace po 48 h (%)	průměrná imobilizace po 24 h (%)	průměrná imobilizace po 48 h (%)	SD 48 h (%)	SEM 48 h (%)
kontrola	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
ciprofloxacin	0,1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				

		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	10	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	20	1	2	0	0	0	0	10	10	20	6
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	1	1	50	50				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	1	1	50	50				
	30	1	2	0	0	0	0	40	40	30	9

		2	2	1	1	50	50				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	1	1	50	50				
		5	2	1	1	50	50				
		6	2	2	2	100	100				
		7	2	1	1	50	50				
		8	2	1	1	50	50				
		9	2	1	1	50	50				
		10	2	0	0	0	0				
		40	1	2	1	2	50				
2	2		0	2	0	100					
3	2		1	2	50	100					
4	2		0	2	0	100					
5	2		1	2	50	100					
6	2		0	0	0	0					
7	2		1	1	50	50					
8	2		2	2	100	100					
9	2		1	1	50	50					
10	2		0	0	0	0					
foto- pro- dukty	0,1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				

	0,5	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	5	1	2	0	0	0	0	5	5	15	5
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	1	1	50	50				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	10	1	2	0	2	0	100	0	20	33	10
		2	2	0	1	0	50				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	1	0	50				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				

		10	2	0	0	0	0				
	20	1	2	2	2	100	100	20	75	25	8
		2	2	0	2	0	100				
		3	2	0	2	0	100				
		4	2	0	1	0	50				
		5	2	0	2	0	100				
		6	2	0	1	0	50				
		7	2	1	1	50	50				
		8	2	1	2	50	100				
		9	2	0	1	0	50				
		10	2	0	1	0	50				

Příloha 3: Akutní test toxicity - enrofloxacin a jeho reakční směs po ozáření.

treatment	koncentrace (mg/l)	opakování	počet nasazených juvenilů	počet imobilizovaných juvenilů po 24 h	počet imobilizovaných juvenilů po 48 h	imobilizace po 24 h (%)	imobilizace po 48 h (%)	průměrná imobilizace po 24 h (%)	průměrná imobilizace po 48 h (%)	SD 48 h (%)	SEM 48 h (%)
kontrola	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
enrofloxacin	0,1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	10	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				

		3	2	0	0	0	0					
		4	2	0	0	0	0					
		5	2	0	0	0	0					
		6	2	0	0	0	0					
		7	2	0	0	0	0					
		8	2	0	0	0	0					
		9	2	0	0	0	0					
		10	2	0	0	0	0					
	12,5	1	2	0	0	0	0	0	25	25	8	
		2	2	0	1	0	50					
		3	2	0	1	0	50					
		4	2	0	1	0	50					
		5	2	0	1	0	50					
		6	2	0	0	0	0					
		7	2	0	1	0	50					
		8	2	0	0	0	0					
		9	2	0	0	0	0					
		10	2	0	0	0	0					
	15	1	2	1	2	50	100	15	45	35	11	
		2	2	0	1	0	50					
		3	2	0	0	0	0					
		4	2	0	1	0	50					
		5	2	0	1	0	50					
		6	2	0	1	0	50					
		7	2	0	0	0	0					
		8	2	0	0	0	0					
		9	2	0	1	0	50					
		10	2	2	2	100	100					
20		1	2	1	2	50	100	30	60	30	9	

		2	2	1	2	50	100				
		3	2	1	1	50	50				
		4	2	1	1	50	50				
		5	2	0	1	0	50				
		6	2	1	2	50	100				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	1	1	50	50				
		9	2	0	1	0	50				
		10	2	0	1	0	50				
	25	1	2	0	2	0	100	10	90	20	6
		2	2	0	2	0	100				
		3	2	0	2	0	100				
		4	2	0	2	0	100				
		5	2	1	2	50	100				
		6	2	0	2	0	100				
		7	2	1	1	50	50				
		8	2	0	1	0	50				
		9	2	0	2	0	100				
		10	2	0	2	0	100				
	30	1	2	0	2	0	100	40	100	0	0
		2	2	1	2	50	100				
		3	2	1	2	50	100				
		4	2	1	2	50	100				
		5	2	2	2	100	100				
		6	2	0	2	0	100				
		7	2	1	2	50	100				
		8	2	0	2	0	100				
		9	2	2	2	100	100				
		10	2	0	2	0	100				

	35	1	2	1	2	50	100	25	100	0	0
		2	2	1	2	50	100				
		3	2	0	2	0	100				
		4	2	0	2	0	100				
		5	2	0	2	0	100				
		6	2	1	2	50	100				
		7	2	1	2	50	100				
		8	2	1	2	50	100				
		9	2	0	2	0	100				
		10	2	0	2	0	100				
	40	1	2	1	2	50	100	55	100	0	0
		2	2	1	2	50	100				
		3	2	0	2	0	100				
		4	2	2	2	100	100				
		5	2	2	2	100	100				
		6	2	0	2	0	100				
		7	2	1	2	50	100				
		8	2	1	2	50	100				
		9	2	1	2	50	100				
		10	2	2	2	100	100				
	50	1	2	2	2	100	100	55	100	0	0
		2	2	1	2	50	100				
		3	2	0	2	0	100				
		4	2	2	2	100	100				
		5	2	1	2	50	100				
		6	2	1	2	50	100				
		7	2	1	2	50	100				
		8	2	1	2	50	100				
		9	2	1	2	50	100				

		10	2	1	2	50	100				
	100	1	2	0	2	0	100	40	100	0	0
		2	2	2	2	100	100				
		3	2	1	2	50	100				
		4	2	2	2	100	100				
		5	2	1	2	50	100				
		6	2	0	2	0	100				
		7	2	1	2	50	100				
		8	2	0	2	0	100				
		9	2	0	2	0	100				
		10	2	1	2	50	100				
fotoprodukty	0,1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				

	9	2	0	0	0	0				
	10	2	0	0	0	0				
5	1	2	1	1	50	50	20	60	37	12
	2	2	0	1	0	50				
	3	2	1	2	50	100				
	4	2	0	2	0	100				
	5	2	0	1	0	50				
	6	2	1	2	50	100				
	7	2	1	2	50	100				
	8	2	0	1	0	50				
	9	2	0	0	0	0				
	10	2	0	0	0	0				
	10	1	2	2	2	100				
2		2	2	2	100	100				
3		2	2	2	100	100				
4		2	2	2	100	100				
5		2	2	2	100	100				
6		2	1	2	50	100				
7		2	2	2	100	100				
8		2	2	2	100	100				
9		2	2	2	100	100				
10		2	2	2	100	100				
15	1	2	1	2	50	100	60	100	0	0
	2	2	0	2	0	100				
	3	2	1	2	50	100				
	4	2	0	2	0	100				
	5	2	2	2	100	100				
	6	2	2	2	100	100				
	7	2	1	2	50	100				

	8	2	2	2	100	100				
	9	2	2	2	100	100				
	10	2	1	2	50	100				
20	1	2	2	2	100	100	65	100	0	0
	2	2	2	2	100	100				
	3	2	0	2	0	100				
	4	2	1	2	50	100				
	5	2	1	2	50	100				
	6	2	1	2	50	100				
	7	2	1	2	50	100				
	8	2	2	2	100	100				
	9	2	2	2	100	100				
	10	2	1	2	50	100				
25	1	2	2	2	100	100	95	100	0	0
	2	2	2	2	100	100				
	3	2	2	2	100	100				
	4	2	2	2	100	100				
	5	2	2	2	100	100				
	6	2	2	2	100	100				
	7	2	2	2	100	100				
	8	2	2	2	100	100				
	9	2	2	2	100	100				
	10	2	1	2	50	100				
30	1	2	2	2	100	100	100	100	0	0
	2	2	2	2	100	100				
	3	2	2	2	100	100				
	4	2	2	2	100	100				
	5	2	2	2	100	100				
	6	2	2	2	100	100				

		7	2	2	2	100	100				
		8	2	2	2	100	100				
		9	2	2	2	100	100				
		10	2	2	2	100	100				

Příloha 4: Akutní test toxicity - norfloxacín a jeho reakční směs po ozáření.

treat- ment	koncen- trace (mg/l)	opako- vání	počet nasaze- ných juveni- lů	počet imobilizo- vaných juvenilů po 24 h	počet imobilizo- vaných juvenilů po 48 h	imobili- zace po 24 h (%)	imobili- zace po 48 h (%)	průměr- ná imobiliza- ce po 24 h (%)	průměrná imobiliza- ce po 48 h (%)	SD 48 h (%)	SEM 48 h (%)	
kontro- la	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	2	0	0	0	0					
		3	2	0	0	0	0					
		4	2	0	0	0	0					
		5	2	0	0	0	0					
		6	2	0	0	0	0					
		7	2	0	0	0	0					
		8	2	0	0	0	0					
		9	2	0	0	0	0					
		10	2	0	0	0	0					
norflo- xacin	0,1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2	2	0	0	0	0					
		3	2	0	0	0	0					
		4	2	0	0	0	0					
		5	2	0	0	0	0					
		6	2	0	0	0	0					
		7	2	0	0	0	0					
		8	2	0	0	0	0					
		9	2	0	0	0	0					
		10	2	0	0	0	0					
	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
			2	2	0	0	0	0				

		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	10	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	35	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	45	1	2	0	0	0	0	0	5	15	5

		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	1	0	50				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	65	1	2	0	1	0	50	0	15	32	10
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	2	0	100				
	80	1	2	2	2	100	100	20	40	37	12
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	1	0	50				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	1	0	50				
		7	2	1	1	50	50				
		8	2	0	1	0	50				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	1	2	50	100				

100	1	2	1	2	50	100	30	55	47	15
	2	2	0	0	0	0				
	3	2	0	0	0	0				
	4	2	2	2	100	100				
	5	2	1	2	50	100				
	6	2	1	2	50	100				
	7	2	1	2	50	100				
	8	2	0	1	0	50				
	9	2	0	0	0	0				
	10	2	0	0	0	0				
150	1	2	2	2	100	100	45	70	33	10
	2	2	1	1	50	50				
	3	2	1	2	50	100				
	4	2	2	2	100	100				
	5	2	0	1	0	50				
	6	2	0	0	0	0				
	7	2	2	2	100	100				
	8	2	1	1	50	50				
	9	2	0	1	0	50				
	10	2	0	2	0	100				
200	1	2	0	2	0	100	25	80	24	8
	2	2	0	2	0	100				
	3	2	2	2	100	100				
	4	2	0	1	0	50				
	5	2	0	1	0	50				
	6	2	1	2	50	100				
	7	2	1	2	50	100				
	8	2	1	1	50	50				
	9	2	0	1	0	50				

		10	2	0	2	0	100				
foto- pro- dukty	0,1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	0,5	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				
		9	2	0	0	0	0				
		10	2	0	0	0	0				
	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	2	0	0	0	0				
		3	2	0	0	0	0				
		4	2	0	0	0	0				
		5	2	0	0	0	0				
		6	2	0	0	0	0				
		7	2	0	0	0	0				
		8	2	0	0	0	0				

	9	2	0	0	0	0				
	10	2	0	0	0	0				
5	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	2	0	0	0	0				
	3	2	0	0	0	0				
	4	2	0	0	0	0				
	5	2	0	0	0	0				
	6	2	0	0	0	0				
	7	2	0	0	0	0				
	8	2	0	0	0	0				
	9	2	0	0	0	0				
	10	2	0	0	0	0				
10	1	2	0	0	0	0	5	5	15	5
	2	2	0	0	0	0				
	3	2	0	0	0	0				
	4	2	0	0	0	0				
	5	2	0	0	0	0				
	6	2	0	0	0	0				
	7	2	1	1	50	50				
	8	2	0	0	0	0				
	9	2	0	0	0	0				
	10	2	0	0	0	0				
15	1	2	0	0	0	0	5	10	20	6
	2	2	0	0	0	0				
	3	2	0	0	0	0				
	4	2	0	0	0	0				
	5	2	0	0	0	0				
	6	2	0	1	0	50				
	7	2	0	0	0	0				

	8	2	0	0	0	0				
	9	2	0	0	0	0				
	10	2	1	1	50	50				
25	1	2	0	0	0	0	5	20	33	10
	2	2	0	0	0	0				
	3	2	0	0	0	0				
	4	2	0	0	0	0				
	5	2	0	1	0	50				
	6	2	1	2	50	100				
	7	2	0	0	0	0				
	8	2	0	0	0	0				
	9	2	0	1	0	50				
	10	2	0	0	0	0				
30	1	2	1	2	50	100	20	40	44	14
	2	2	0	0	0	0				
	3	2	1	2	50	100				
	4	2	0	0	0	0				
	5	2	0	1	0	50				
	6	2	0	1	0	50				
	7	2	0	0	0	0				
	8	2	0	0	0	0				
	9	2	0	0	0	0				
	10	2	2	2	100	100				
45	1	2	0	2	0	100	20	80	24	8
	2	2	1	2	50	100				
	3	2	0	2	0	100				
	4	2	0	1	0	50				
	5	2	0	1	0	50				
	6	2	1	2	50	100				

		7	2	0	2	0	100				
		8	2	1	1	50	50				
		9	2	0	1	0	50				
		10	2	1	2	50	100				

Příloha 5: Chronická toxicita ciprofloxacinu a jeho reakční směsi po ozáření.

pokus	opakování	počet juvenilů v daný den od počátku pokusu							počet juvenilů na samici	počet snůšek	počet juvenilů na snůšku	počet dílků pod mikroskopem (22. den)	velikost těla (μm)
		8	11	13	15	18	20	22					
kontrola	1	13	27	0	11	16	0	15	82	5	16	128	3200
	2	0	12	21	3	0	7	6	49	5	10	120	3000
	3	0	20	16	0	10	18	0	64	4	16	142	3550
	4	0	19	11	0	9	10	0	49	4	12	123	3075
	5	0	23	15	0	12	16	0	66	4	17	136	3400
	6	0	33	0	12	10	0	15	70	4	18	136	3400
	7	0	14	21	7	0	7	12	61	5	12	130	3250
	8	0	10	22	11	10	0	12	65	5	13	128	3200
	9	0	13	18	9	1	18	13	72	6	12	135	3375
	10	0	13	21	11	8	1	10	64	6	11	130	3250
	11	0	23	11	0	8	11	0	53	4	13	133	3325
	12	0	11	18	0	3	11	2	45	5	9	118	2950
	13	0	12	17	7	0	12	11	59	5	12	125	3125
	14	0	14	21	5	0	12	11	63	5	13	119	2975
	15	0	22	11	0	10	13	0	56	4	14	131	3275
ciprofloxacin 100 μg/l	1	0	18	22	6	9	0	19	74	5	15	135	3375
	2	0	18	20	0	2	8	10	58	5	12	118	2950
	3	0	17	16	4	0	5	10	52	5	10	125	3125
	4	0	13	15	9	0	6	14	57	5	11	122	3050
	5	0	23	0	6	21	8	1	59	5	12	134	3350
	6	17	25	0	6	16	0	9	73	5	15	135	3375
	7	0	18	22	3	0	3	0	46	4	12	127	3175

	8	0	14	18	1	8	12	6	59	6	10	124	3100
	9	0	12	15	0	8	9	0	44	4	11	120	3000
	10	0	11	16	0	6	5	0	38	4	10	samice uhynula 20. den	
	11	18	20	0	23	15	0	11	87	5	17	137	3425
	12	13	18	0	24	15	0	6	76	5	15	135	3375
	13	0	12	17	0	9	12	0	50	4	13	118	2950
	14	0	15	15	0	4	7	0	41	4	10	123	3075
	15	0	10	21	10	0	6	12	59	5	12	128	3200
fotoprodukty	1	17	23	0	21	14	0	8	83	5	17	122	3050
	2	17	23	0	4	17	0	14	75	5	15	130	3250
	3	18	23	0	6	18	0	14	79	5	16	125	3125
	4	16	21	0	8	18	0	14	77	5	15	141	3525
	5	16	24	0	11	12	0	13	76	5	15	133	3325
	6	0	18	18	6	2	6	13	63	6	11	130	3250
	7	15	20	0	6	16	0	14	71	5	14	142	3550
	8	16	21	0	7	14	0	12	70	5	14	124	3100
	9	16	22	0	0	4	4	10	56	5	11	125	3125
	10	0	22	9	0	0	0	0	31	2	16	samice uhynula 15. den	
	11	0	20	15	7	0	9	13	64	5	13	120	3000
	12	14	22	0	12	15	0	13	76	5	15	132	3300
	13	19	24	0	12	15	0	11	81	5	16	132	3300
	14	15	21	0	9	9	0	13	67	5	13	133	3325
	15	0	22	19	0	1	6	12	60	5	12	130	3250