

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

**VLIV KOMUNÁLNÍHO ZNEČIŠTĚNÍ NA
RYBY ŽIJÍCÍ V MALÉM TOKU**

Autor: Vojtěch Hora

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Kateřina Grabicová a Viktoriia Burkina, MSc.

Studijní program a obor: Zootechnika B4103, Rybářství

Forma studia: kombinovaná forma

Ročník: 3. ročník

České Budějovice, 2014

Prohlašuji, že svou 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, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Vojtěch Hora

V Českých Budějovicích dne 2. 5. 2014

Poděkování

Děkuji panu doc. Ing. Tomáši Randákovi, Ph.D., za velmi užitečnou a profesionální odbornou pomoc, metodické vedení a poskytnuté rady při vypracování této bakalářské práce.

Také bych rád poděkoval Ing. Kateřině Grabicové a MSc. Viktorii Burkině za poskytnuté rady a pomoc při laboratorních analýzách.

Rovněž chci poděkovat manželce za podporu a trpělivost, kterých bylo zapotřebí při zpracování mé bakalářské práce.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vojtěch HORA**
Osobní číslo: **V11B026K**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Vliv komunálního znečištění na ryby žijící v malém toku**
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 :

Živný potok je pravostranným přítokem Blanice vodňanské. Délka Živného potoka je přibližně 15 km. Horní tok se nachází v řídce obydlené oblasti. Přibližně 6 km nad jeho vtokem do Blanice se nachází okresní město Prachatice s 12 000 obyvateli. Komunální odpadní vody z Prachatic a okolí jsou svedeny do čistírny odpadních vod (ČOV) a vyčištěné odpadní vody vtékají do Živného potoka. Podíl vyčištěných odpadních vod tvoří přibližně 20% celkového průtoku v tomto toku. V Živném potoce se vyskytuje pstruh obecný, přičemž v části nad ČOV se úspěšně rozmnožuje, pod ČOV je výskyt plůdku zaznamenáván pouze ojediněle. Je známo, že vyčištěná voda vypouštěná z ČOV do recipientů obsahuje široké spektrum cizorodých sloučenin (zejména farmak), které se nepodaří odbourat ve stávajících čistírenských technologiích.

Cílem práce je posoudit vliv znečištění pocházejícího z ČOV Prachatice na ryby žijící v Živném potoce, a to pomocí stanovení vybraných biomarkerů a chemických analýz.

Nejprve bude vytvořena literární rešerše zaměřená na negativní faktory ovlivňující rybí populace v pstruhových vodách. V průběhu zpracování práce bude pomocí elektrického agregátu odloven reprezentativní počet ryb nad a pod zdrojem znečištění. Samci a samice budou vzorkovány odděleně. Následně budou realizovány biochemické a chemické analýzy v Laboratoři environmentální chemie a biochemie FROV JU. Z biomarkerů bude sledován obsah vitellogeninu v krevní plazmě (indikátor přítomnosti látek s estrogením účinkem ve vodním prostředí) a aktivita jaterních detoxifikačních enzymů (EROD). Dále budou pomocí kapalinové chromatografie sledovány koncentrace vybraných cizorodých látek (zejména farmak) v rybách a ve vodě. Závěrem bude provedena syntéza získaných informací a posouzeno ovlivnění ryb cizorodými sloučeninami vstupujícími do vodního prostředí přes ČOV Prachatice.

Rozsah grafických prací: 4 - 7 tabulek a grafů
Rozsah pracovní zprávy: 20 - 30 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

Randák, T., Slavík, O., Kubečka, J., Adámek, Z., Horký, P., Turek, J., Vostradovský, J., Hladík, M., Peterka, J., Musil, J., Prchalová, M., Jůza, T., Kratochvíl, M., Boukal, D., Vašek, M., Andreji, J., Dvořák, P., 2013. Rybářství ve volných vodách. FROV JU, Vodňany, 434 s.
Hill, M.K., 2004. Understanding Environmental Pollution. Cambridge University Press, 468 s., ISBN 0 521 527260
Kalač, P., Tříška, J., Kolář, L., Jírovcová, E., 2010. Chemie životního prostředí. JU v Českých Budějovicích, ZF, 171 s. ISBN 978-80-7394-232-8
McMaster, M.C., 2007. HPLC a practical user's guide - 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 238 s. ISBN 978-0-471-75401-5

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Bc. Kateřina Grabicová**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Ostatní konzultanti: **MSc. Viktoriia Burkina**
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Datum zadání bakalářské práce: **7. prosince 2012**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2014**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
389 25 Vodňany (2)


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2013

Obsah

1	ÚVOD.....	7
2	CÍLE PRÁCE.....	8
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
3.1	Charakteristika horních toků.....	9
3.2	Negativní faktory ovlivňující rybí populace v malých tocích	10
3.2.1	Hydrologické poměry povodí toků	10
3.2.2	Úpravy vodních toků.....	12
3.2.3	Rybožraví predátoři.....	15
3.2.4	Sportovní rybolov	17
3.2.5	Rybářské hospodaření	17
3.2.6	Znečištění vod a vliv znečištění na ryby	18
3.2.7	Metody zjišťování vlivu cizorodých látek na vodní prostředí.....	27
4	MATERIÁL A METODIKA.....	31
4.1	Lokalita.....	31
4.2	Indikátorový organismus	32
4.3	Odlov ryb a odběr vzorků.....	33
4.4	Analýza vzorků	34
4.4.1	Stanovení obsahu vitellogeninu v krevní plazmě	34
4.4.2	Stanovení enzymové aktivity pomocí cytochromu P450 (CYP1A) ..	36
4.4.3	Stanovení vybraných cizorodých látek ve vodě	37
4.4.4	Stanovení cizorodých látek v těle ryb (játra).....	37
4.5	Statistická analýza.....	39
5	VÝSLEDKY	40
5.1	Obsah vitellogeninu v krevní plazmě.....	40
5.2	Enzymová aktivita jaterních detoxikačních enzymů (EROD).....	41

5.3	Koncentrace vybraných cizorodých látek v játrech ryb	42
5.4	Koncentrace vybraných cizorodých látek ve vodě	43
6	DISKUZE	45
7	ZÁVĚR.....	48
8	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	49
9	SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ.....	60
10	SEZNAM PŘÍLOH.....	61

1 ÚVOD

Horní úseky jsou z ekologického hlediska nejcennějšími částmi našich toků. Z hlediska jejich osídlení rybami a dalšími vodními organismy se jedná obvykle o pstruhové vody. Ekosystémy horních, obvykle malých, toků jsou však velmi citlivé na různé vlivy, které je ve většině případů negativně ovlivňují. V posledním desetiletí dochází k významnému poklesu stavu původních druhů ryb v pstruhových vodách, zejména pstruha obecného a lipana podhorního. Jako nejpravděpodobnější příčina tohoto stavu je soubor negativních vlivů na rybí společenstva. Většina těchto vlivů negativně ovlivňuje přirozenou reprodukci rybích druhů v toku, která je nezbytná k zachování genetické variability dané rybí populace. Právě snížená nebo zcela chybějící přirozená reprodukce je jedna z hlavních příčin současného nepříznivého stavu rybích populací v pstruhových vodách (Randák a kol., 2013). Jedním z těchto vlivů je i antropogenní znečištění. V současné době představuje právě na malých vodních tocích velmi významný problém znečištění pocházející z komunálních odpadních vod. Přestože tyto vody jsou již v dnešní době z velké části čištěny v čistírnách odpadních vod (ČOV), dostává se široké spektrum cizorodých látek do vodního prostředí právě prostřednictvím „vyčištěných“ odpadních vod, tzn. přímo z výtoků čistíren odpadních vod. Stávající čistírenské technologie totiž mají v případě mnoha chemických látek omezenou účinnost z hlediska jejich odstranění. Vliv těchto cizorodých látek, které se dostanou do vodního prostředí, na vodní organismy závisí na jejich výsledné koncentraci v recipientech „vyčištěných“ odpadních vod, tzn. na výši nařazení vod vytékajících z ČOV v recipientu. K nejnižšímu nařazení těchto vod dochází právě v malých tocích, a proto zde tedy můžeme očekávat i největší vliv těchto látek na přítomné organismy.

Tato práce je zaměřena na zpracování teoretického přehledu možných negativních antropogenních faktorů ovlivňujících populace ryb v tocích a dále na experimentální rozpracování jednoho z těchto faktorů – znečištění vodního prostředí, konkrétně na zjišťování negativního vlivu komunálního znečištění na ryby žijící v malém toku, ve kterém dochází k nízkému nařazení vod vytékajících z ČOV.

2 CÍLE PRÁCE

- Zpracování literární rešerše věnující se negativním antropogenním vlivům na populace ryb žijících v malých tocích
- Posouzení ovlivnění ryb cizorodými látkami vstupujícími do malého toku přes ČOV Prachatice pomocí:
 - 1) analýz vzorků krve a tkání odlovených ryb na vybrané biomarkery
 - 2) analýz vzorků vody a tkání ryb na přítomnost vybraných cizorodých látek

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakteristika horních toků

Charakteristická pro horní toky je chladná a dobře prokysličená voda. Teplota vody v nejteplejších částech roku jen zřídka překročí 15 až 18 °C a nasycení vody kyslíkem se vlivem neustálé mechanické aerace pohybuje kolem 100 %. Dno těchto toků je velmi členité, kamenité, místy může být štěrkové nebo pískové a převládá zde turbulentní (vířivé) proudění. Šířka těchto toků je většinou do 15 metrů a spád toku bývá od 2 ‰ až do 20 ‰ (Adámek a kol., 1997).

Osídlení horních toků rostlinami a živočichy je rozdílné v závislosti na úseku vodního toku. Obecně se zde vyskytují chladnomilné druhy, které jsou náročné na čistou vodu. V nejvýše položených částech toku jsou v nárostech na kamenech především rozsivky (*Bacillariophyceae*), dále také ruduchy (*Rhodophyta*) a vodní mech pramenička obecná (*Fontinalis antipyretica*). Ze zoobentosu zde najdeme blešivce (*Gammarus fossarum*), larvy jepic (*Ephemeroptera*), pošvatek (*Plecoptera*) a chrostíků (*Trichoptera*). Ze živočichů je zde zastoupen rak říční (*Astacus fluviatilis*) a mlži, především perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera*). Charakteristickou rybou těchto částí toku je pstruh obecný (*Salmo trutta m. fario*). Z menších ryb se zde vyskytuje vranka obecná (*Cottus gobio*) i vranka pruhoploutvá (*Cottus poecilopus*), střevle potoční (*Phoxinus phoxinus*), mřenka mramorovaná (*Barbatula barbatula*) a mihule potoční (*Lampetra planeri*). Abundance v těchto částech toku je nízká a dosahuje maximálně několik stovek kusů na hektar. Rovněž biomasa je nízká a dosahuje desítky kilogramů na hektar (Adámek a kol., 1997). U níže položených částí toku jsou nárosty fytozobentosu podobné jako u výše položených částí, avšak v několikanásobném množství. V klidnějších částech toku může být i porost vodních makrofyt (lakušník, hvězdoš). Také zástupci zoobentosu jsou zde v početnějším množství. Vyskytují se zde larvy jepic (*Ephemeroptera*), pošvatek (*Plecoptera*), chrostíků (*Trichoptera*), dále červi, larvy motýlic (*Calopteryx virgo*) a pakomárů (*Chironomidae*). Ze živočichů je zde zastoupen rak říční (*Astacus fluviatilis*), mlži a plži. Z ryb se zde vyskytuje pstruh obecný (*Salmo trutta m. fario*), dále také lipan podhorní (*Thymallus thymallus*), mník jednovousý (*Lota lota*), jelec tloušť (*Squalius cephalus*) a nepůvodní pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*)

a siven americký (*Sasivelinus fontinalis*). Z menších ryb se zde vyskytuje střevle potoční (*Phoxinus phoxinus*), hrouzek obecný (*Gobio gobio*), mřenka mramorovaná (*Barbatula barbatula*), ouklejka pruhovaná (*Alburnoides bipunctatus*) a jelec proudník (*Leuciscus leuciscus*). Abundance je zde několikanásobně vyšší a dosahuje tisíce kusů na hektar, biomasa dosahuje až 500 kilogramů na hektar (Adámek a kol., 1997).

3.2 Negativní faktory ovlivňující rybí populace v malých tocích

3.2.1 Hydrologické poměry povodí toků

Průtokové poměry v malých tocích jsou nejvíce závislé na povrchových odtokových poměrech v krajině daného úseku toku. Pro úspěšné přežívání rybích populací a přirozené rozmnožování, které je u většiny druhů závislé na migraci, je nejvhodnější udržovat co nejpřirozenější průtokové poměry (Lusk a kol., 2011).

Postupnou změnou zemědělského hospodaření v těchto oblastech, zemědělskou meliorací a odlesňováním, krajina ztrácí retenční kapacitu a převládá povrchový odtok nad infiltrací (Adámek a kol., 2010). Při častém povrchovém odtoku zároveň dochází k vodní erozi, která zhoršuje jakost vody v toku. Snížením retenční kapacity se hůře zadržuje voda v krajině, nedochází k postupnému předávání zadržené vody tokům a důsledkem je vznik nevyrovnaných průtoků během roku. Velmi častý je výskyt dlouhých období s minimálním průtokem (Slavík a kol., 2004; Rogers a kol., 2005). Tímto se značně snižuje kapacita toku pro rybí společenstva, protože většina rybích druhů těchto úseků je teritoriální a při minimálním průtoku nemají dostatek úkrytů (Harsányi a Aschenbrenner, 2002). Zároveň při minimálním průtoku dochází k poklesu hladiny nebo úplnému vyschnutí klidových okrajových částí toku s minimálním prouděním nebo slepých ramen, které jsou nezbytné pro vývoj raných stádií rybích druhů (Cowx a Wlecome 1998). Jako příklad bych uvedl Černý potok v okrese Prachatice, který byl dříve využíván pro chov generačních ryb a násad pstruha obecného (Obr. 1).

Na zvýšený průtok jsou rybí společenstva pstruhových vod lépe adaptovaná (Randák a kol., 2013). Problém ovšem nastává tím, že tato průtoková maxima jsou často

i několikrát do roka, prakticky po každé větší srážce vyskytující se na povodí daného toku. Tímto jsou zejména juvenilní jedinci často vystavováni zátěži maximálního průtoku a jsou oslabováni nebo odplaveni do nevhodného prostředí (Adámek a kol., 2010; Randák a kol., 2013). Na špatné hydrologické poměry povodí toků nemá vliv jen zemědělská činnost, ale také stále větší zastavěná plocha krajiny, různá vodní díla budovaná na horních úsecích toků a v současné době také budování malých vodních elektráren (MVE), kdy je přímo ovlivněn tok v délce až několika stovek metrů (Cox a Wlecome 1998; Turek a kol., 2009) (Obr. 2, Obr. 3). Vliv členitosti toku a průtokových poměrů na populaci pstruha obecného a vranky obecné dokumentují výsledky terénní studie realizované Turkem a kol. (2009) na malém toku v západních Čechách, kde je na tomto toku vybudována malá vodní elektrárna. Ze studie vyplývá, že abundance a biomasa ryb v úsecích ovlivněných zásahem člověka je několikanásobně nižší než v úsecích přírodního charakteru.



Obr. 1: Minimální průtok na Černém potoce
(foto: V. Hora)



Obr. 2: Odběr vody z řeky Blanice pro MVE Husinec (vpravo náhon pro MVE, vlevo původní tok řeky)

(foto: V. Hora)



Obr. 3: Průtok vody v korytě Blanice před odběrem vody pro MVE Husinec (vlevo) a po odběru (vpravo)

(foto: V. Hora)

3.2.2 *Úpravy vodních toků*

Vodní tok má svojí morfologií zcela zásadní vliv na rybí společenstva obývající pstruhové vody. Jako ideální je tok s přirozeně velkým prostorovým rozsahem, přirozeně velkou tvarovou členitostí koryta a přirozenou hydraulickou členitostí. To znamená, že ideální tok by měl vytvářet meandry, měla by u něj být plocha pro rozliv povodní, dostatečná břehová vegetace, členitost tvaru a materiálu dna a dostatečná členitost hloubek a rychlosti proudění (Adámek a kol., 2010) (Obr. 4). Takovéto toky se nacházejí nejčastěji v místech, kde je minimální nebo žádná antropogenní činnost.

Stále častěji však dochází k úpravě přirozené morfologie toků, takzvaným regulacím. Důvodem pro regulaci toku nejčastěji bývá protipovodňové opatření. Při regulaci dochází k odstraňování břehové vegetace, odstranění překážek v toku, prohloubení koryta, zpevnění břehů, stavba protipovodňových valů a napřimování toku (Randák a kol., 2013). Někdy dochází ke stavbě jezů a hrází, které zabraňují rybám v migraci, hlavně za účelem reprodukce (Vannote a kol., 1980) (Obr. 5). Všechny tyto úpravy mají za následek, že z toku výrazně ubydou nebo zcela vymizí přirozené úkryty pro ryby i jiné živočichy. Dochází tím k výraznému snížení biodiverzity v toku. Zároveň jsou zničena vhodná místa pro výtěr a klidové části toku pro vývoj raných stádií ryb (Randák a kol., 2013). Další podstatný vliv regulace je ten, že dochází k nadměrnému odvodňování krajiny a ke zrychlení běžných a povodňových odtoků. To jenom prohlubuje rozdíl mezi průtokovým maximem a minimem a zvyšuje období, kdy je v toku průtokové minimum. Odstraněním břehové vegetace rovněž dochází k přehřívání toku (Randák a kol., 2013).

Nejhorší způsob provedení regulace je zatrubnění toku. Tímto je tok veden pod povrchem a ztrácí kontakt s povrchovými a podzemními vodami. Zároveň zde chybí světlo a tok je minimálně provzdušňován. V takto regulovaném toku vodní organismy pouze přežívají nebo zcela hynou (Randák a kol., 2013). Dalším typem regulace je opevnění dna a břehů. Při této úpravě jsou břehy a dno vyloženy kameny nebo betonovými prvky. Těsným spojením těchto prvků dochází k utvoření koryta toku, které je zcela odlišné od přírodního. Dochází k zániku turbulentního proudění a převažuje laminární. Zároveň se snižuje hydraulická drsnost dna, chybí rozdíly v proudění u hladiny a dna a zcela chybí přirozené úkryty. Tyto toky bývají často budované za účelem rychlého odtoku vody. Důsledkem toho je velmi malá hloubka, voda se v letním období snadno přehřívá a naopak v zimním období často promrzá až ke dnu (Randák a kol., 2013). Takto regulované toky mívají také velmi sníženou samočisticí schopnost (Zelinka a Kubíček, 1985) (Obr. 6). Jako přijatelnější se jeví regulace provedená opevněním břehů kamenným záhozem při zachování původního dna. Dochází však k odstranění břehové vegetace, přírodních tůní, štěrkových lavic a členitých břehů. Nevýhodou je přehřívání vody z důvodu odstranění břehové vegetace, ztráta klidných úseků a snížení hloubky toku. Z tohoto důvodu dochází někdy ke stavbě jízků, které částečně zlepšují proudové a hloubkové poměry (Randák a kol., 2013). Regulace, při které dochází pouze k místnímu kamennému záhozu z důvodu zabránění eroze, je

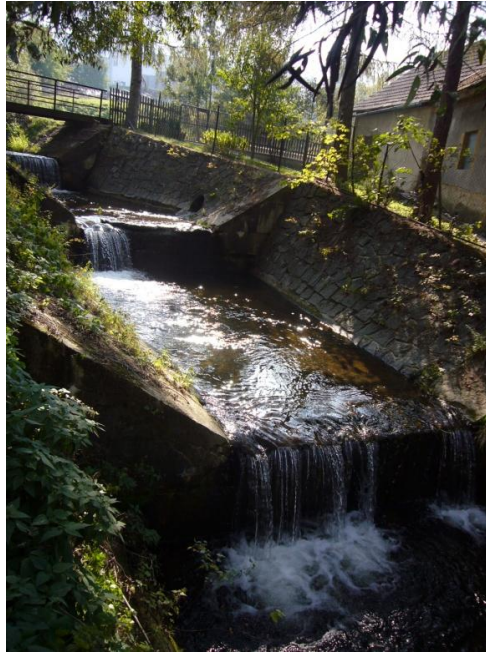
přírodě nejbližší. Při zachování břehové vegetace téměř nedochází k ovlivnění rybích společenstev nebo jen na velmi malém úseku toku (Randák a kol., 2013).

Pokud je regulace provedena citlivě, většinou má za následek pouze úbytek přirozených úkrytů, zejména prodloužením doby průtokového minima, a tím je snížena kapacita toku pro rybí společenstva. Ve většině případů však dochází ke kompletní regulaci, která má za následek snížení nebo zánik vhodných podmínek pro úspěšné přežívání a přirozenou reprodukci rybích společenstev (Randák a kol., 2013).

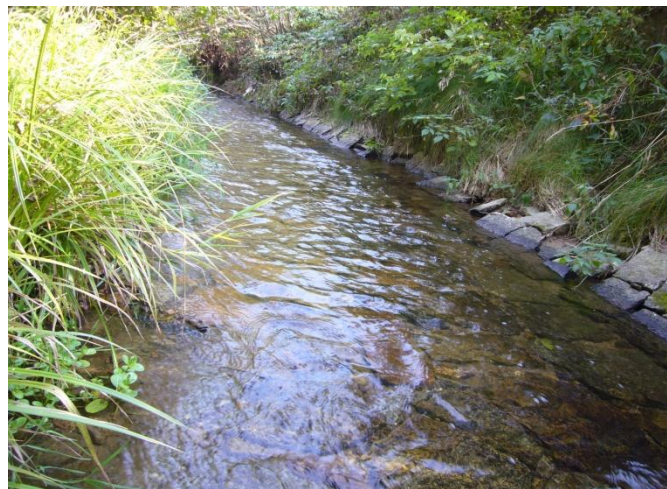


Obr. 4: Přirozený tok řeky Blanice

(foto: V. Hora)



Obr. 5: Regulace Živného potoka u Prachatic
(foto: V. Hora)



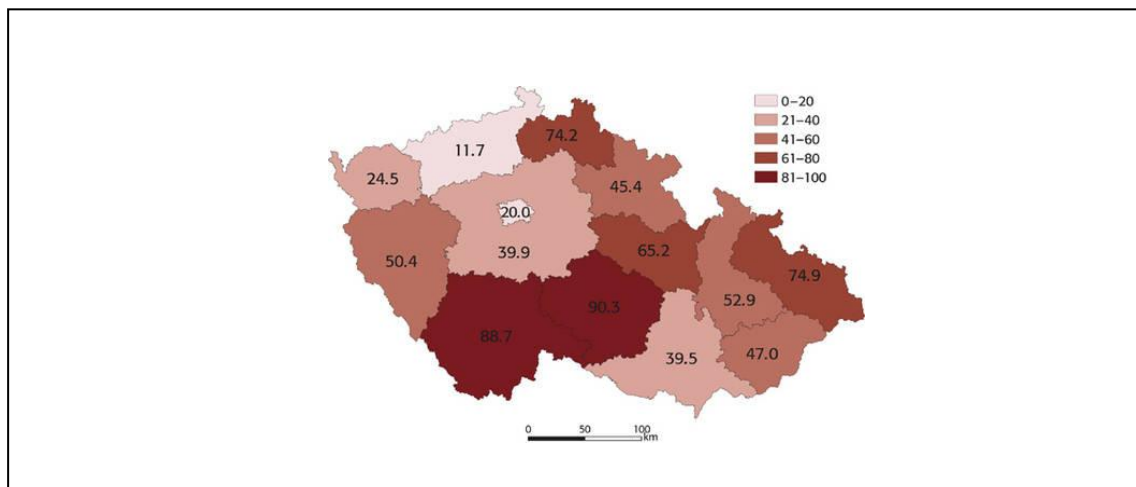
Obr. 6: Regulace Živného potoka u Prachatic
(foto: V. Hora)

3.2.3 *Rybožraví predátoři*

Jako další negativní faktor působící na rybí společenstva pstruhových vod je rostoucí predační tlak řady rybožravých druhů obratlovců. Mezi nejvýznamnější rybožravé predátory, kteří ovlivňují naše pstruhové vody, patří vydra říční (*Lutra lutra*),

kormorán velký (*Phalacrocorax carbo*), volavka popelavá (*Ardea cinerea*), v poslední době také norek americký (*Mustela vison*) a čáp černý (*Ciconia nigra*) (Randák a kol., 2013).

Výskyt predátorů je závislý na složení a hustotě rybích populací. Pokud se např. vydra vyskytuje na tocích, které jsou rybářsky obhospodařované a obsádka ryb je pravidelně doplňována, dochází k navýšení stavů těchto predátorů, protože nejsou potravně limitovány (Kruuk, 1995; Roche 2001) (Obr. 7). K nárůstu populací predátorů samozřejmě přispívají prakticky neomezené potravní zdroje v chovných rybnících.



Obr. 7: Výskyt vydry říční v jednotlivých krajích (plocha krajů s potvrzeným výskytem vydry, vyjádřeno v procentech)

Zdroje geografických dat: AOPK ČR, VÚV Praha

Pstruhové vody jsou většinou úseky toků, které v zimě nezamrzají, a tudíž zde mohou významně škodit kolonie zimujících kormoránů, které se přemísťují ze zamrzlých chovných rybníků a větších toků. V těchto vodách může i mírný predáční tlak kormoránů vážně narušit vyváženost rybího společenstva (Suter, 1991). Spurný (2003) považuje úseky pstruhových vod za nejzranitelnější predací zimujících kolonií kormoránů. Vhodná velikost kořisti, průhledná voda a nízký vodní sloupec lov kormoránům velice usnadňuje. V takových podmínkách mohou kormoráni rybí společenstvo za dva roky zredukovat až o 90 %. Nejvíce postiženým druhem je lipan podhorní, pro kterého je typické hejnové chování a po vyrušení nevyhledává úkryty (Randák a kol., 2013). Dále díky nevhodným hydrologickým poměrům a úpravám

vodních toků ztrácí ryby přirozené úkryty a jsou tak snáze ulovitelné (Čech a Čech, 2000; 2008).

Většina těchto rybožravých predátorů patří do skupiny živočichů, která je chráněna zákonem. Proto je proti nim velice obtížná obrana. V roce 2012 byla vyčíslena Rybářským sdružením ČR škoda způsobená rybožravými predátory na 148 milionu korun (Rybníkářství č. 10/2012).

3.2.4 Sportovní rybolov

Populace ryb v tocích, které jsou využívány jako pstruhové rybářské revíry, negativně ovlivňuje sportovní rybolov. Tyto revíry jsou velmi často vystavené silnému rybářskému tlaku. Díky tomuto rybářskému tlaku, případně ponecháváním ulovených ryb, je značně redukována populace ryb v daném rybářském revíru (Randák a kol., 2013). I při metodě lovu, při které jsou ulovené ryby vráceny zpět do vody, dochází k jejich poškození a v důsledku toho i k úhynu některých ulovených ryb (Risley a Zydlewski, 2010). V posledním období dochází k vývoji rybářského náčiní a technik lovu, které jsou tak stále účinnější (Meka, 2004). Z tohoto důvodu při sportovním rybolovu dochází k ulovení všech věkových kategorií ryb. Pokud jsou opakovaně loveny nejnižší věkové kategorie ryb, výrazně tím klesá jejich šance na přežití a dosažení pohlavní dospělosti. Při silném rybářském tlaku se výrazně snižuje schopnost přirozené reprodukce u dané populace ryb, protože pohlavně dospělí jedinci jsou po dosažení minimální lovné délky často odloveni (Randák a kol., 2013). Vliv sportovního rybolovu na pstruhové vody je úzce spjat s nastavenými pravidly lovu, především počtem ponechaných kusů, minimální lovnou délkou, dobou hájení, atd. (Randák a kol., 2013)

3.2.5 Rybářské hospodaření

Další z činností, která významně ovlivňuje populace ryb v malých tocích, je rybářské hospodaření. Jako problematické se jeví intenzivní využívání volně žijících generačních ryb k umělé reprodukci (Randák a kol., 2013). Generační ryby pro umělou

reprodukcí jsou odlovovány pomocí elektrického agregátu před přirozeným výtěrem. Tím dochází v daném úseku prakticky k úplné likvidaci přirozeného výtěru.

Vzhledem k úbytku generačních ryb se snižuje umělá reprodukce a klesá i produkce násadového materiálu pro hospodaření na pstruhových vodách. Jelikož jsou hospodařící rybářské subjekty vázány zarybňovacími plány, dochází v důsledku nedostatku vhodných násad k jejich nákupu a transportu z jiných částí republiky nebo ze zahraničí. Dále narůstá počet násad, které jsou až do vysazení odchovávány v umělých chovech (Randák a kol., 2013). Vysazování nepůvodních nebo uměle odchovaných násad představuje velké riziko pro původní populace. Zarybňovací programy, při nichž se využívají geneticky odlišné linie (např. Kolowrat) nebo uměle odchované druhy, jsou často kritizovány především z důvodu nízkého přežití a špatné reprodukce takto vysazených ryb (L'Abée-Lund, 1991; Fleming, 2001) a také z důvodu negativního vlivu vysazených ryb na původní populace (Saunders, 1991; Waples, 1991).

Nejčastějším důvodem vysazování nepůvodních druhů ryb je jejich ekonomická dostupnost oproti násadám původních druhů ryb. Jedná se převážně o pstruha duhového a sivena amerického. Vliv těchto nepůvodních druhů není doposud podrobně prozkoumán. Na druhou stranu jsou vysazené ryby v lovné velikosti pod velkým rybářským tlakem a během krátké doby dochází k jejich vychytání z revíru (Randák a kol., 2013). Větší negativní vliv má přerybňování násadami původních druhů ryb. Tyto násady bývají často vysazeny i do toků, kde úspěšně probíhá přirozená reprodukce a úkrytová i potravní kapacita toku je naplněna (Randák a kol., 2013). Vysazením starších násad dochází k soupeření o teritoria a potravu, což má za následek oslabení původních i nasazených jedinců. Dochází tak k nepřirozeným migracím ryb, vytváří se prostor pro rybí predátory nebo dochází k úhynu z důvodu zhoršení zdravotního stavu (Randák a kol., 2013).

3.2.6 Znečištění vod a vliv znečištění na ryby

V poslední době je věnována velká pozornost sledování kvality povrchových a podzemních vod. Znečištění může být přírodního charakteru nebo vlivem antropogenní činnosti. Pro povrchové vody představuje riziko především znečištění antropogenního původu, protože dochází k nárůstu objemu odpadních vod. Odpadní

vody se obvykle rozdělují na komunální (splaškové), průmyslové, zemědělské a srážkové (Hlavínek, 2004). Přestože je odpadní voda často čištěna s využitím i nejmodernějších technologií, často dochází k úniku látek ve větší či menší míře ovlivňující kvalitu vody a tím dochází i k ovlivnění vodních organismů (Heberer, 2002).

Míru znečištění a jeho následky ovlivňuje způsob kontaminace vodního prostředí. Rozdělujeme znečištění bodové, plošné a difúzní (rozptýlené). Bodové znečištění je do vodního toku přiváděno v úzce lokalizovaném prostoru a je možné měřit jeho kvantitu a kvalitu (např. vyústění z ČOV). Při plošném znečištění dochází ke splachům z velkého území v důsledku odtoku atmosférických srážek. Difúzní znečištění způsobují rozptýlené bodové zdroje na delším úseku toku (Pitter, 1999).

Dle časového průběhu rozdělujeme havarijní, trvalé nebo dlouhodobé znečištění. Havarijní znečištění bývá nepředvídatelné a krátkodobé zhoršení kvality vody. Často má za následek významný úhyn vodních organismů během krátkého časového období. Po odeznění vlivu havarijního znečištění obvykle dochází k rychlé regeneraci toku a přirozenou cestou nebo se zásahem člověka je tok znovu obsazen vodními organismy (Vučka a kol., 1984). Trvalé nebo dlouhodobé znečištění mění trvale kvalitu zasažených vod. Nedochází k masovému úhynu vodních organismů, ale má veliký vliv na složení populací těchto organismů. Přežívající populace jsou pod neustálým vlivem znečištění, dochází ke změnám druhového složení, velikostí jedinců, zdravotního stavu, kvality reprodukce a někdy toto znečištění neumožňuje populacím vodních organismů v zasaženém toku dlouhodobě přežít (Blažek a kol., 2006). Obnovení příznivých podmínek pro vodní organismy takto zasažených toků bývá často možné až po ukončení zdroje znečištění. Takováto obnova bývá finančně i technologicky velmi nákladná (Lusk, 1990).

Dále můžeme znečištění vod rozdělit dle původu na přírodní a vlivem antropogenní činnosti (Svobodová a kol., 2008). Znečištění přírodního charakteru mívá krátkodobý vliv na zasažený tok. Znečištění antropogenního charakteru dodává do vod často velmi škodlivé, těžko odbouratelné látky a mívá zásadní vliv na vodní organismy v zasaženém toku (Šuta, 2008).

3.2.6.1 Znečištění přírodního charakteru

Mezi znečištění přírodního charakteru v horních tocích můžeme zařadit znečištění suspendovanými látkami a znečištění organickými hmotami (Adámek a kol., 2010). Jako suspendované látky označujeme anorganické a organické látky nacházející se ve vodním sloupci. Nejčastěji to bývají půdní a jílové částice způsobující především zákal vody. Ve vodním prostředí se vyskytují v důsledku vodní eroze, především v době zvýšených průtoků nebo stavebních úprav na toku (Pokorný, 2009). Dalším zdrojem těchto částic může být hospodaření na nádržích napojených na pstruhové toky, zejména jejich vypouštěním a vyplavováním sedimentů. Zvýšená koncentrace suspendovaných látek má za následek změnu fyzikálních, chemických a biologických vlastností vodního toku (Adámek a kol., 2010). Při větším zasažení toku může docházet k sedimentaci unášených částic a tím ke snížení úkrytové kapacity toku pro ryby (Randák a kol., 2013). Nebezpečná je sedimentace suspendovaných částic zejména pro jikry v období vývoje po přirozeném výtěru a pro potěr ryb. Sedimentovaný materiál ucpává mezery mezi substrátem dna a brání tak dostatečné výměně rozpuštěného kyslíku a oxidu uhličitého mezi respirujícími jikrami a okolní vodou. Rovněž mohou unášené částice mechanicky poškozovat jikry a způsobovat jejich úhyn. Sedimentace suspendovaných částic v období vývoje jiker bývá označována jako jedna z možných příčin redukováného přirozeného vývoje jiker a potěru lososovitých ryb (Billota a Brazier, 2008).

3.2.6.2 Znečištění antropogenního charakteru

Mezi znečištění antropogenního charakteru v horních tocích můžeme zařadit znečištění organickými látkami, znečištění vlivem stavebních prací poblíž nebo přímo v toku, zemědělskými odpadními vodami a zemědělskou činností a komunálními odpadními vodami (Svobodová a kol., 2008).

Ke znečištění horních toků organickými látkami antropogenního původu dochází při zasažení toku odpadní vodou nebo smyvem z povodí. Tyto organické látky můžeme rozdělit na lehce nebo obtížně rozložitelné a na organické látky nerozložitelné (Hyánek a kol., 1991). Vlivem neustálého přísunu rozložitelných organických látek může docházet ke zvýšenému nárůstu kolonií bakterií, vláknitých řas a vodních rostlin. Tento

nárůst může negativně ovlivňovat výšku vodního sloupce v toku nebo světelné podmínky, ale zároveň může pozitivně ovlivnit rozvoj bentosu a drobných organismů nebo může zvyšovat úkrytovou kapacitu toku. Nerozložitelné organické látky se kumulují v prostředí, zapojují se do potravního řetězce a mohou mít toxické, karcinogenní, mutagenní nebo teratogenní (embryotoxické) účinky (Kalač a kol., 2010).

Na horní toky může mít vysoký krátkodobý vliv provádění stavebních prací poblíž těchto toků nebo přímo v tocích, pokud dojde k úniku nebo smyvu stavebních směsí do vodního prostředí. Tím dojde k velmi rychlému zvýšení pH až na 10 a více (Svobodová a kol., 2008). Lososovité ryby obývající pstruhové vody jsou citlivější vůči vysokému pH. Jako hraniční hodnota se udává pH 9 (Dubský a kol., 2003). Pokud stavební práce probíhají delší dobu a dochází k častým nebo nepřetržitým únikům stavebních směsí, může docházet k poškození lososovitých ryb vlivem vysokého pH a nebo k migraci do nezasazených částí toků nebo přítoků (Svobodová a kol., 2008).

Ke znečištění zemědělskými odpadními vodami a zemědělskou činností dochází při vypouštění odpadních vod ze zemědělských objektů nebo splachy z území, která jsou intenzivně zemědělsky obhospodařována a používají se chemické přípravky nebo hnojiva. V malé míře se může jednat o ropné látky nebo různé dezinfekční prostředky. Jednou ze skupin nebezpečných chemických přípravků užívaných při zemědělském hospodaření jsou pesticidy. Pesticidy jsou obecně chemické látky, které se používají na ochranu rostlin a živočichů v zemědělství a lesnictví a zároveň tyto látky našly uplatnění i ve vodním hospodářství jako přípravky k likvidaci vodních rostlin, omezení rozvoje zooplanktonu nebo k antiparazitárnímu ošetření ryb (Pitter, 1999). Pesticidy obecně ovlivňují biologické pochody v živých organismech (Táborský a Šedivý, 1997). Ovlivňování jsou nejen cílové organismy, na které je pesticid přímo určen, ale i ostatní necílové organismy. Dle cílového organismu pesticidy dělíme na insekticidy, používané proti hmyzím škůdcům a herbicidy, používané k hubení rostlin, zejména plevelů (Kalač a kol., 2010; Adámek a kol., 2010). Vážné nebezpečí způsobuje bioakumulační schopnost pesticidů nebo reziduí, které jsou přítomny v životním prostředí (Drápal a kol., 2005; Niimi a Oliver, 1989). U ryb většinou dochází ke kumulaci těchto látek v organismu a mohou se projevit až po delším časovém úseku nebo při vývoji následující generace. Dále tyto látky ovlivňují výrazně potravní základnu pro ryby (Hartman a kol., 2005).

Ke znečištění komunálními odpadními vodami dochází většinou v blízkosti obcí a měst, kde do toku vyústí sběrná kanalizace nebo čistírna odpadních vod (ČOV). V poslední době je kladen důraz na kvalitu povrchových vod, proto dochází ke stavbám a modernizacím ČOV. Tyto čistírny mají prakticky všechny větší obce a města. I přes to, že se v ČOV využívá moderní technologie, odpadní voda vypouštěná z těchto čistíren obsahuje značné množství látek, které v menší či větší míře ovlivňují vodní organismy v recipientu (Veselý, 1994; Tyler a kol., 1998). V minulosti byl kladen důraz na sledování a výzkum látek, které jsou klasifikovány jako významné polutanty. Jedná se zejména o karcinogenní a toxické pesticidy, látky bioakumulativní nebo perzistentní (Daughton a Ternes, 1999).

3.2.6.3 PPCP látky

V posledních letech se začala pozornost obracet na další skupinu látek, u kterých je pravděpodobný významný vliv na vodní organismy. Celkově tuto skupinu látek označujeme jako PPCPs (Pharmaceuticals and personal care products) (Christian a kol., 2003). Jedná se o látky, které jsou dobře rozpustné ve vodě a ve vodním prostředí jsou přítomny ve stopové koncentraci ($\text{ng}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). I v takto nízkých koncentracích však mají vliv na vodní organismy v recipientu (Corcoran a kol., 2010; Kolpin, 2002). Jako hlavní zdroj těchto látek ve vodě můžeme označit komunální odpadní vody a to i po procesu čištění v ČOV (Keith, 1997). Do odpadní vody se tyto látky dostávají močí nebo výkaly lidí či zvířat a odpadní vodou z domácností. V případě farmak můžeme také jako další zdroj označit odpadní vody z nemocnic či likvidaci prošlých nebo nespotřebovaných léčiv (Zuccato a kol., 2000). Zatímco se neustále zlepšuje technologie čištění odpadních vod, zejména odstranění organického zatížení a minerálních živin (fosfor, dusík), nejsou čistírny odpadních vod schopny zcela eliminovat široké spektrum specifických polutantů ve stopových koncentracích. Většina látek ze skupiny PPCPs není zcela odstraněna stávajícími čistírenskými technologiemi a jako původní látky či jejich degradační produkty kontaminují vodní prostředí (Giokas a kol., 2007).

Skupina PPCPs zahrnuje velký počet převážně syntetických organických sloučenin, např. humánní nebo veterinární léčiva, širokou škálu látek pro osobní potřebu lidí, tj. zejména parfémy, deodoranty, pižma, šampony, desinfekce, čistící a prací prostředky,

barvy na vlasy, ústní hygienu, laky na vlasy, make up, lak na nehty, UV filtry, tělová mléka, rtěnky a krémy, atd. Dále do této skupiny patří pomocné látky při výrobě výše zmíněných produktů (Ellis, 2006). Tyto látky jsou vyráběny a používány ve velkých objemech a jejich množství a rozmanitost stále roste (Lambropoulou a kol., 2002). Část PPCPs látek zařazujeme do skupiny perzistentních látek (Sedlák a kol., 2004). U některých látek jsou prokázány jejich bioakumulační a bioaktivní schopnosti. Dalším významným vlivem těchto látek je ovlivňování endokrinních systémů v organismech (Caliman a Gavrilescu, 2009).

Lze předpokládat, že vliv PPCPs je závislý na jejich výsledné koncentraci, tedy v podstatě na průtočných poměrech toku, do kterého je vypouštěna odpadní voda s obsahem těchto látek. Horní toky mívají menší průtoky, kde i odpadní vody z menších obcí tvoří značnou část průtoku pod zaústěním odpadních vod. Tímto dochází k menšímu naředění odpadních vod a zvyšuje se vliv PPCPs na vodní organismy (Li a kol., 2011). Skupinu PPCPs látek můžeme rozdělit na dvě hlavní kategorie. Jedná se o skupinu produktů denní potřeby (PCP) a farmaka (Hill, 2004).

PCP látky

Jako významné a nejvíce používané látky patřící do skupiny produktů denní potřeby (PCP) jsou tenzidy, antimikrobiální látky a UV filtry (Ellis, 2006).

Tenzidy jsou syntetické látky, které již v nízkých koncentracích snižují povrchovou energii. Řadíme je tedy mezi povrchově aktivní látky. Používají se hlavně při výrobě pracích a čistících prostředků a dále také jako přísady různých kosmetických přípravků, zejména díky schopnosti rozpouštět a odstraňovat nečistoty a antibakteriálním vlastnostem. Hlavním zdrojem tenzidů v povrchové vodě jsou komunální odpadní vody, přestože je při čistírenských procesech odstraněno přibližně 95 – 99 % těchto látek (Lara-Martin a kol., 2008). Dle ionicity dělíme tenzidy do dvou hlavních skupin na ionické a neionické. Nejrozšířenější jsou ionické tenzidy, které dále dělíme na anionické, kationické a amfoterní tenzidy. Přibližně 90 % tenzidů z evropské produkce patří do skupin kationických a anionických (Ivankovic a Hrenovic, 2010). Jako nejpoužívanější anionické tenzidy jsou uváděny alkybenzen sulfonáty (LAS), které jsou složkou pracích a čistících prostředků. Dále jsou velmi používané alkyly

sulfáty (AS) a alkyl ethoxysulfáty (AES), které se přidávají zejména do šampónů (Lara-Martin a kol., 2008). Z kationických tenzidů se nejvíce používají kvartérní amonné sloučeniny (QAC), jako součást čistících prostředků, či vlasových kondicionérů a jsou také přidávány do desinfekčních prostředků (Ivankovic a Hrenovic, 2010). Nejznámější amfoterní tenzidy jsou amin oxidy (AO), které se přidávají do deodorantů (Singh a kol., 2006). Nebezpečí tenzidů pro vodní organismy spočívá v tom, že díky povrchové aktivitě dokáží ovlivňovat či inhibovat buněčné procesy. Může docházet ke změně povrchového náboje (anionické tenzidy), rozpadu cytoplazmatických membrán (kationické tenzidy), či dochází ke zvyšování propustnosti membrán a následnému úniku důležitých iontů a aminokyselin z buňky (neionické tenzidy) (Cserhati a kol., 2002; McDonnel a Russel, 1999; Cserhati, 1995). Dále mohou tenzidy při vysoké koncentraci inhibovat mikroorganismy v ČOV a snižovat tím účinnost čištění odpadních vod (Ivankovic a Hrenovic, 2010). Nejtoxičtější jsou kationické tenzidy, méně toxické jsou anionické a nejméně toxické jsou neionické tenzidy (Singh a kol., 2002).

Další významnou skupinou látek ze skupiny PCPs jsou antimikrobiální látky. Obecně lze říci, že to jsou chemické látky s biocidním účinkem, které se využívají k ochraně výrobků, přípravků či léčiv, před mikrobiálním znehodnocením (Sasseville, 2004). Do vodního prostředí se antimikrobiální látky nejčastěji dostávají z komunálních odpadních vod. Tyto látky mohou být při procesu čištění odpadních vod odstraněny v závislosti na jejich schopnosti biologické přeměny a vazby na různé částice, užívané v čistírenských technologiích (Ternes a Joss, 2007). Pokud ovšem tyto schopnosti nemají, jsou prakticky beze změn vypouštěny do vodního prostředí (Roberts a Thomas, 2006). Toto platí zejména pro podskupinu látek, kterou nazýváme antiseptika. Jsou to látky s antimikrobiálním účinkem, které zamezují růstu mikroorganismům v PCP a slouží ke konzervaci potravin, léčiv a PCP. Nejčastěji se antiseptika přidávají do mýdel, antiperspirantů a deodorantů, čistících pleťových přípravků a stomatologických výrobků. Přestože mají podobné účinky jako antibiotika a jsou používány již dlouhou dobu, je jim věnována daleko menší pozornost než antibiotikům. Antiseptika ale mají obecně širší spektrum účinnosti než antibiotika (McDonnel a Russel, 1999).

Vliv na vodní prostředí mají i UV filtry, které rovněž patří do skupiny PCPs látek. Tyto látky se vykazují schopností eliminovat škodlivé účinky ultrafialového záření na

lidskou pokožku. K eliminaci může docházet absorpcí UV záření (chemické UV filtry) nebo odrážením UV záření (fyzikální UV filtry) (Schlumpf a kol., 2008). Díky těmto vlastnostem jsou významnou složkou opalovacích krémů, rtěnek a přípravků na ošetřování vlasů. Do vodního prostředí vstupují UV filtry buď přímo v důsledku smyvu z povrchu těla (např. při koupání) nebo nepřímo přes komunální odpadní vody. V komunálních odpadních vodách mohou být tyto látky obsaženy v důsledku smyvu kosmetických přípravků z pokožky nebo prostřednictvím vyloučených zbytků po vstřebání těchto látek do organismu (Balmer a kol., 2004). Při studiu vlivu těchto látek bylo zjištěno, že některé UV filtry vykazují estrogení a androgení účinky či ovlivňují jaterní funkce (Schlumpf a kol., 2008; Grabicová a kol., 2013). Dále bylo zjištěno, že některé UV filtry vykazují zvýšenou aktivitu, pokud se nachází ve směsi s jinými UV filtry (Kunz a Fent, 2006).

Farmaka

Farmaka (léčiva) se dostávají do odpadních vod po jejich použití lidmi či hospodářskými zvířaty nebo při nevhodné likvidaci nepotřebných léčiv. Základní složkou farmak jsou biologicky aktivní (tzv. účinné) látky, které se podávají nejčastěji perorálně, parenterálně nebo dermatologicky. Tato skupina látek zahrnuje látky s velmi různorodou chemickou strukturou a fyzikálními vlastnostmi (Pal a kol., 2012). Díky pozitivním účinkům farmak na lidské zdraví, nelze předpokládat jejich omezování pomocí legislativy nebo jejich prohlášení za nebezpečné látky pro vodní prostředí. Naopak je třeba počítat se stále rostoucí spotřebou. Díky rozvoji farmaceutického průmyslu bude také stále stoupat počet nových a v dnešní době neznámých látek. Je proto nutné respektovat jejich stále se rozvíjející užívání a pozornost věnovat možnostem jejich eliminace v technologiích čistíren odpadních vod (Salgado a kol., 2009). Odhaduje se, že spotřeba těchto látek ve světě je více než 100 000 tun za rok a je využíváno více než 3 000 druhů těchto látek (Kümmerer, 2004).

Množství spotřebovaných farmak a jejich sortiment prakticky nelze regulovat. Z tohoto důvodu lze předpokládat jejich stálý nárůst v komunálních odpadních vodách. Jelikož se jedná o specifické látky, s ohromným množstvím různých modifikací, nelze je stanovit běžnými ukazateli pro hodnocení odpadních vod (Jjemba, 2006). Použitá

farmaka jsou z těla vylučována jako původní látky, včetně doprovodných látek obsažených v preparátech, ale zároveň také jako metabolity. Z původního farmaka se tím pádem v odpadních vodách před vstupem do čistírny odpadních vod stává směs látek, které se značně odlišují jak chemicky, tak i fyzikálně od původního farmaka (Ellis, 2006). Pokud v odpadní vodě po čistírenském procesu určitá farmaka nejsou detekována, neznamená to, že tyto látky byly z odpadní vody odstraněny, ale mohlo dojít ke vzniku dalších sloučenin, které mívají mnohdy značné biologické nebo toxické účinky. Proto je pro sledování těchto látek nutno využít více paralelních analytických metod a zároveň sledovat více koncentrací a větší rozsah vzorků (Svoboda a kol., 2009). Jelikož tyto látky vykazují vysokou biologickou aktivitu, lze jejich vliv ve vodním prostředí sledovat i ve významně nižších koncentracích, než jsou koncentrace v těle člověka během užívání farmak.

V České republice byla provedena studie a na jejím základě byl vypracován seznam pěti nejvýznamnějších látek ze skupiny farmak, která obsahují odpadní vody (Svoboda a kol., 2009). Jedná se o tyto látky:

- Kyselina salicylová – je základním metabolitem kyseliny acetylsalicylové, kterou obsahuje lék Aspirin. Udává se, že spotřeba léku Aspirin může v České Republice být až 600 tun za rok. Přímé využití této látky je pouze v nepatrných množstvích.
- Ibuprofen – jedná se o protizánětlivé, nesteroidní léčivo, které se většinou užívá perorálně. Spotřeba v České Republice je udávána v množství kolem 200 tun za rok.
- Kyselina klofibrová – je základním metabolitem fibrátů, které se používají ke kontrole hladiny lipoproteinů v krvi. Spotřeba v České Republice je udávána v množství kolem 10 tun za rok.
- Diklofenak – jedná se o nesteroidní protizánětlivé léčivo a analgetikum. Převážně se užívá ve formě mastí. Spotřeba v České Republice je udávána v množství kolem 20 tun za rok.
- Karbamazepin – jedná se převážně o antidepresivum a antiepileptikum, užívá se výhradně perorálně a pouze na lékařský předpis. Spotřeba v České Republice je udávána v množství kolem 7,5 tun za rok.

Vlivu těchto látek na ryby ve vodním prostředí byla věnována řada studií (např. Sumpter 1998; Li a kol., 2010) a stále jsou předmětem řady výzkumů. Na rybí populace mají značný vliv aktivní látky z orální antikoncepce (např. 17 α -ethynylestradiol). Tyto látky obecně ovlivňují reprodukční funkce a jsou sledovány od konce 20. století (Jobling a kol., 1998; Kidd a kol., 2007). Kidd a kol. (2007) prokázali vymizení krátkodobé rybí populace ve vodním prostředí, v důsledku ovlivnění estrálního cyklu. Do tohoto vodního prostředí byl při experimentu přidáván 17 α -ethynylestradiol v koncentracích, které se dnes běžně nacházejí v povrchových vodách. Vlivem těchto látek nejčastěji dochází k poklesu množství spermatu či feminizaci samců u volně žijících populací (Žlábek a kol., 2004). U některých látek je feminizace pozorována již při koncentracích nižších než 1 ng.l⁻¹ (Dorabawilla a Gupta, 2005). Feminizace samců způsobuje výrazné zhoršení nebo omezení reprodukce, zejména u pstruha obecného (Kolářová a kol., 2005) a to jak u přírodních populací těchto ryb, tak i u generačních ryb pro umělý výtěr, které bývají z takto zasažených toků odlovovány.

Standardní čistírenské procesy odpadních vod dokážou eliminovat 90% a více ze sledovaných farmak. I přes velkou účinnost čistírenských procesů musíme počítat s tím, že do toků odchází s vyčištěnou odpadní vodou stále značné koncentrace reziduí farmak, které vykazují vysokou biologickou aktivitu a mají vliv na vodní společenstva (Hill, 2004). Dále je nutno brát v úvahu, že dnes používané čistírenské procesy odpadních vod nefungují na všechna významná farmaka stejně a některé látky jsou prakticky rezistentní (např. karbamazepin, diklofenak) nebo s nejistým výsledkem čištění (Kümmerer, 2008).

3.2.7 *Metody zjišťování vlivu cizorodých látek na vodní prostředí*

Znečištění životního prostředí, včetně vodního, je v dnešní době věnována velká pozornost. K určení stupně znečištění je potřeba provádět rychlé a přesné stanovení škodlivých látek. Při sledování škodlivých látek je důležité určit jejich vztah mezi zdrojem znečištění a ekologickými účinky těchto látek na organismy (Suter, 1993). U volně žijících organismů je sledování poměrně náročné, protože se mnoho škodlivých účinků projevuje až po delší době (Calabrese, 1991). Při posuzování vlivu látek na vodní ekosystémy se s úspěchem využívají různé druhy ryb. Ryby totiž lze nalézt

prakticky v každém vodním ekosystému a většinou stojí na vrcholu potravních řetězců ve vodním prostředí (Beyer, 1996). Nevýhodou mohou být značné rozdíly ve fyziologických funkcích u jednotlivých druhů ryb a relativně vysoká mobilita ryb. I přes tyto nevýhody jsou ryby obecně považovány za nejvhodnější organismy pro monitorování znečištění vodního prostředí (Stegeman a kol., 1992).

Při sledování vodního prostředí se převážně využívají monitorovací metody. Monitoring je opakující se pozorování a měření na určeném místě, dle stanoveného časového harmonogramu, za využití standardizovaných a srovnatelných metod. Pokud při monitorování pravidelně využíváme živé organismy (tzv. bioindikátory), nazýváme ho biologickým monitorováním neboli biomonitoringem (De Zwart, 1995). Při posuzování vlivu sledovaných látek na vodní organismy a vodní prostředí se nejčastěji využívají tyto metody biomonitoringu:

chemický monitoring – měření hladiny vybraných skupin kontaminujících látek v biotických složkách životního prostředí (např. pomocí kapalinové chromatografie, spektrofotometrie).

monitorování biomarkerů – biomarker můžeme definovat jako biologickou reakci, která je vyvolaná toxickým účinkem látky nebo expozicí organismu v kontaminovaném prostředí. Tyto reakce mohou probíhat na molekulární, buněčné či fyziologické úrovni. Biomarkery jsou měřeny přímo v organismu nebo v produktech organismů (výkaly, moč, sliz, atd.). Biomarkery můžeme sledovat na různých úrovních organismu. Na molekulární či buněčné úrovni probíhá biologická reakce mezi sledovanou látkou (včetně jejích metabolitů) a cílovou molekulou nebo buňkou uvnitř organismu. Dále může sledovaná látka vyvolávat měřitelné biochemické či fyziologické změny ve tkáních nebo tělních tekutinách (McCarthy a Shugart, 1990). Organismy mohou také vlivem sledované látky změnit své schopnosti (i včetně genetických změn) a přizpůsobovat se prostředí exponovanému touto látkou. Tyto změny lze rovněž sledovat (Peakall, 1994). Biomarkery by měli být neinvazivní a nedestruktivní, aby bylo možné sledovat vliv znečištění u chráněných nebo ohrožených druhů (Fossi a Marsili, 1997). Jako biomarker může být využito i množství kumulované látky v organismu (bioakumulace). U ryb se obvykle využívají následující biomarkery:

- sledování enzymů, které se podílejí na detoxikaci cizorodých látek nebo jejich metabolitů (Vermeulen, 1996). K této detoxikaci dochází převážně v játrech. Nejčastěji sledujeme biotransformační enzymy (Bucheli a Fent, 1995) a antioxidační enzymy (Winston a Di Giulio, 1991).
- sledování produktů biotransformace, nejčastěji hladiny metabolitů v tělních tekutinách (Melancon a kol., 1992).
- sledování stresových proteinů, které chrání buňky proti stresu a škodlivým vlivům (Sanders, 1993).
- sledování hematologických parametrů, jako je hematokrit, hemoglobin, proteiny, obsah glukózy, specifické hormony a specifické buněčné enzymy, vyskytující se v krvi při narušení buněčných membrán (Moss a kol., 1986).
- sledování imunologických parametrů (Wester a kol., 1994).
- sledování reprodukčních a endokrinních parametrů (Spies a kol., 1990).
- sledování genotoxických parametrů, zejména změny ve struktuře DNA a následný vznik mutací (Shugart a kol., 1992).
- sledování fyziologických a morfologických parametrů.

Biotesty – při biotestech monitorujeme přežití, růst a rozmnožování vybraných jedinců. Většinou probíhají v laboratorních podmínkách. Z toho plyne jejich nevýhoda, protože mají malou vypovídající hodnotu pro účinek dané látky v životním prostředí, kde dochází k interakcím s jinými látkami, kumulaci, ovlivnění potravního řetězce, atd. (McCarthy a Shugart, 1990). Biotesty lze úspěšně využít jako systém včasného varování, např. ve vodárenských procesech (Randák a kol., 2011).

Ekologické indikátory – sledují vliv látek na úrovni celých ekosystémů, zejména změny v druhovém složení, složení ekosystémů a množství populací v ekosystému.

Jelikož vodní prostředí můžeme označit za dynamický komplex, doporučuje se při sledování a hodnocení vlivů určité látky využívat více monitorovacích metod najednou. Van Gestel a Van Brummelen (1996) navrhli integrovaný monitoring sledované látky, za využití biomarkerů, biotestů, bioindikátorů a ekologických indikátorů.

V rámci této práce byly pro podchycení vlivu komunálního znečištění na ryby v prostředí malého toku ovlivněného přítokem „vyčištěných“ odpadních vod z ČOV zvoleny a sledovány biomarkery vilellogenin (VTG) a EROD.

Vitellogenin je lipofosfoprotein, který je syntetizován v játrech ryb samičího pohlaví. Jeho syntézu řídí převážně steroidní hormon estradiol. Z jater je vitellogenin vylučován do krve a z té je endocytózou absorbován do zrajících folikulů ve vaječnicích. Tam je následně vitellogenin převeden na lipovitellin a fosvitin (Kunkel, 1996). Vitellogenin představuje významný zdroj výživy pro jikru a larvu. Jeho další funkcí je transport iontů a je významným zdrojem minerálních látek pro oocyty. Pokud jsou ve vodě přítomny látky s estrogením účinkem, dochází k navázání těchto estrogeních látek na estrogení receptory v buňkách a syntéza vitellogeninu v játrech probíhá i u samčího pohlaví. Tento jev lze sledovat v krevní plazmě. Aktivací estrogeního komplexu u samců dochází k „feminizaci samců“. Tyto změny postupně vedou k degenerativním změnám pohlavního ústrojí u samců a tím i k poruchám reprodukce zasažených ryb (Arcand-Hoy a Benson, 1998).

Pro stanovení zatížení vodního prostředí cizorodými látkami byla jako biochemický marker zvolena aktivita cytochromu P450 (CYP1A), tzv. EROD. Cytochromy se řadí mezi oxidační enzymy a podílí se na zneškodňování cizorodých látek v organismu. Tyto cytochromy se vyskytují ve velké koncentraci v játrech (tvoří až 20% hmotnosti hepatocytů), která jsou hlavním orgánem biotransformace cizorodých látek. Pokud je organismus exponován cizorodými látkami (PCB, PAH, PPCP), zvyšuje se hladina cytochromu P450, jeho isoformy CYP1A a aktivity EROD. Proto se EROD využívá jako biochemický marker při znečištění vod PPCPs látkami (Široká a kol., 2005).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Lokalita

Jako sledovaný malý tok byl vybrán Živný potok. Živný potok je pravostranný přítok řeky Blanice. Délka toku měří 11,4 km a povodí se rozkládá na ploše 45 km². U obce Těšovice ústí zprava do řeky Blanice. Největší přítoky Živného potoka jsou Feferský potok ústící v Prachaticích a Žernovický potok, přitékající krátce před ústím Živného potoka do řeky Blanice. Z ryb se v Živném potoce vyskytuje zejména pstruh obecný, který se v horní části toku úspěšně přirozeně rozmnožuje. Největším sídlem na Živném potoce je město Prachatice. V Prachaticích žije 11 172 obyvatel (k 31. 12. 2012) a odpadní vody jsou svedeny kanalizací do čistírny odpadních vod na severním okraji města. Objem vyčištěných odpadních vod z této čistírny tvoří přibližně 25 % průtoku v Živném potoce pod městem Prachatice (Randák a kol., 2013) (Obr. 8). Tato čistírna prošla v minulosti několikrát modernizací, přesto je vyčištěná voda z této čistírny zdrojem řady cizorodých látek (zejména farmak), které nedokáže současná technologie čistíren odpadních vod dostatečně odbourávat.



Obr. 8: Vyústění vyčištěných odpadních vod z ČOV Prachatice do Živného potoka (foto: V. Hora)

Nejprve byly určeny tři lokality, kde následně proběhly odlovy ryb (Obr. 9). Tyto lokality byly zvoleny tak, aby mezi jednotlivými úseky byly překážky v toku, které ztěžují migraci ryb proti nebo po proudu a umožňují tak oddělit ryby exponované

odpadními vodami a ryby, které nepřišly se sledovanými odpadními vodami do styku (Obr. 9).



Obr. 9: Sledované lokality a překážky v toku mezi lokalitou C a E (vpravo)

zdroj: www.mapy.cz, foto: V. Hora

První je lokalita C (control) umístěná nad městem Prachatice, kde se nepředpokládá žádné nebo pouze minimální znečištění vodního prostředí. Druhá je lokalita E (effluent) umístěná pod zaústěním čistírny odpadních vod z města Prachatice. Třetí je lokalita R (river) umístěná 3 kilometry po proudu od lokality E (v obci Těšovice), přibližně 0,5 kilometru před zaústěním Živného potoka do řeky Blanice.

4.2 Indikátorový organismus

Pro biologický monitoring byl jako nejvhodnější organismus vybrán pstruh obecný. Pstruh obecný je v České republice původním druhem. Vyhovují mu čisté proudivé toky s tvrdým, písčítokamenitým dnem a dostatkem úkrytů. Je náročný zejména na obsah kyslíku ve vodě a teplotu vody. Dobře přežívá ve vodě s obsahem kyslíku 9 až 11 mg.l⁻¹ a teplotou 10 až 15 °C. Snese i krátkodobé oteplení na 20 °C za předpokladu, že je ve vodě dostatek kyslíku. Pstruh je typicky stanovištní ryba. Svě teritorium, které bývá do značné míry vymezeno zrakovým dosahem, obývá většinou celý svůj život, opouští ho pouze v době výtěru nebo vlivem nepříznivých podmínek, zejména při kolísání vodního stavu a nedostatku potravy. Výtěr probíhá v závislosti na teplotě nejčastěji od poloviny října do prosince. Pstruh obecný je dominantním druhem horních úseků toků, za

přítomnosti několika dalších menších druhů, mající stejné nároky na životní prostředí. Pstruh může sloužit jako bioindikátor znečištění toku, protože vyžaduje minimálně znečištěnou vodu. Ovlivněním životních podmínek v pstruhovém pásmu dochází k úbytku nebo úplnému vymizení tohoto druhu (Dubský a kol., 2003).

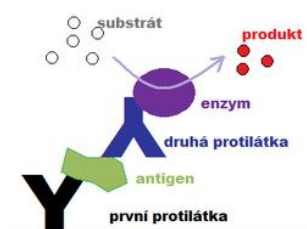
4.3 Odlov ryb a odběr vzorků

Odlov ryb byl proveden pomocí elektrického agregátu dne 2. 10. 2012. Odlovené ryby byly rozděleny dle pohlaví a z každé lokality bylo vybráno šest samic a šest samců přibližně stejné věkové kategorie. Vybrané ryby byly změřeny (celková délka, délka těla) a zváženy (Příloha 1). Následně byl u odlovených ryb proveden odběr krve (z *vena caudalis*). Při odběru krve bylo postupováno dle metodiky „Metody hematologického vyšetřování ryb“ (Svobodová a kol., 2012). Odebraná krev byla následně odstředěna a vzorky krevní plazmy pro stanovení obsahu vitellogeninu byly umístěny do tekutého dusíku. Po odběru krve byly odlovené ryby šetrným způsobem usmrceny. Po usmrcení byly zváženy pohlavní orgány, játra a ryby bez vnitřních orgánů, byly sledovány případné anomálie vnitřních orgánů a byly odebrány šupiny na určení věku. Dále byl proveden u každé ryby odběr vzorků z jater na stanovení jaterních markerů (EROD). Tyto vzorky byly rovněž uloženy do tekutého dusíku. Následně byla odebrána svalovina a játra na stanovení obsahu vybraných PPCPs. Vzorky tkání na chemické analýzy byly uloženy do termoboxů se šupinkovým ledem a později zamraženy při – 18 °C. Dále byl ve sledovaných lokalitách prováděn opakovaný bodový odběr vzorků vody pro stanovení koncentrací vybraných PPCPs. Vliv znečištění na ryby ve vybraných lokalitách byl hodnocen pomocí biochemických markerů, které dle výsledků předchozích studií mají nejlepší vypovídající schopnost. Dále byl vliv znečištění stanoven sledováním vybraných cizorodých látek (zejména farmak) v těle ryb a ve vodním prostředí. Laboratorní rozbory probíhaly v Laboratoři environmentální chemie a biochemie Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech.

4.4 Analýza vzorků

4.4.1 Stanovení obsahu vitellogeninu v krevní plazmě

Pro indikaci výskytu látek s estrogenním účinkem ve vodním prostředí byl jako biochemický marker zvolen obsah vitellogeninu v krevní plazmě. Obsah vitellogeninu v krevní plazmě byl stanoven pomocí testu ELISA. ELISA (enzyme - linked immunosorbent assay) test je imunochemická stanovovací metoda, která je založena na použití specifických protilátek jako detektoru sledované látky. Při testu dochází k posloupnosti různých biochemických reakcí, jejichž výsledkem je stanovení přítomnosti a množství sledované látky. Ke stanovení byl využit sendvičový ELISA test, který je dostatečně citlivý. Při tomto druhu testu po přidání vzorku a inkubaci dochází ke vzniku vazby antigen – protilátka. Poté je přidána druhá protilátka, která se váže na stejný antigen. Na tuto protilátku je kovalentně připojen enzym acetylcholinesteráza. Následně je přidán substrát a proběhne katalyzovaná reakce řízená připojeným enzymem. Produktem této reakce je měřitelná změna (změna zbarvení). Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci vitellogeninu ve vzorku (Obr. 10).



Obr. 10: Schéma sendvičového ELISA testu

zdroj: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/ELISA>

Pro stanovení obsahu vitellogeninu byl používán Rainbow trout vitellogenin ELISA kit od Biosense Laboratories AS, Norway. Dávkování roztoků bylo prováděno multikanalovými pipetami Eppendorf. Při samotném testu bylo postupováno dle návodu od výrobce ELISA kitu (Biosense Laboratories AS). Prvotně byl připraven promývací pufr rozpuštěním jedné tablety (bag C) v 1000 ml destilované vody. Pufr byl skladován při 2-8 °C. Následně byl připraven ředící pufr zředěním 25 ml koncentrátu (lahvička D) s 225 ml destilované vody. Dále byl připraven zásobní roztok ze standardu VTG,

přidáním 1 ml ředícího pufru do lahvičky VTG standardu (lahvička G) a byla vypočtena koncentrace vitellogeninu dle údajů na lahvičce G. Zásobní roztok byl nadále ředěn ředícím pufrům pro dosažení koncentrace 200 ng.ml⁻¹. Následně byla připravena řada deseti standardních roztoků o koncentraci vitellogeninu od 200 ng.ml⁻¹ až do 0,391 ng.ml⁻¹ (každý standard byl dále ředěn na polovinu předchozí koncentrace). Z uvedených standardů byla stanovena kalibrační křivka. Poté byly připravovány vzorky krevní plazmy. Při přípravě je bylo nutné udržovat na ledu, protože molekuly vitellogeninu jsou značně nestabilní. Vzhledem k širokému rozpětí koncentrací vitellogeninu v plazmě bylo nutné vzorky plazmy naředit, aby bylo možné následně výsledky odečíst z kalibrační křivky. Pro samce bylo zvoleno ředění 1:20 (10 µl vzorku a 190 µl ředícího pufru) a 1:500 (10 µl vzorku 1:20 a 240 µl ředícího pufru). Pro samice bylo zvoleno ředění 1:100 (10 µl vzorku a 990 µl ředícího pufru), 1:3000 (10 µl vzorku 1:100 a 290 µl ředícího pufru) a 1:90000 (10 µl vzorku 1:3000 a 290 µl ředícího roztoku).

Vlastní stanovení bylo prováděno na 96 - jamkových mikrotitračních destičkách z polystyrénu s navázanou protilátkou (imunoglobulin). Na každé mikrotitrační destičce byly první dvě jamky určeny pro zjištění nespecifických vazeb (označeny NSB). Do jamek NSB bylo pomocí mikropipety odměřeno 100 µl ředícího pufru. Do dalších jamek bylo odměřeno 100 µl zásobního roztoku (pro standardy) nebo 100 µl vzorků krevní plazmy. Takto připravené mikrotitrační destičky se nechaly inkubovat přes noc při teplotě 2-8 °C (v lednici). Po inkubaci se připravil pro každou mikrotitrační destičku, užitou v testu, roztok pro detekci protilátek (lahvička E). Detekční roztok byl naředěn 1:100 přidáním 110 µl tohoto roztoku do 1 ml ředícího pufru. Každá jamka v mikrotitrační destičce se po inkubaci propláchla třikrát 300 µl promývacího pufru. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 µl roztoku pro detekci protilátek a destičky se nechaly inkubovat na orbitální třepačce po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Každá jamka v mikrotitrační destičce se po této inkubaci propláchla pětkrát 300 µl promývacího pufru. Následně byl připraven roztok substrátu (Ellmanovo činidlo) rozpuštěním jedné lahvičky F v 50 ml destilované vody. Do každé jamky bylo přidáno 300 µl tohoto roztoku substrátu a destičky se inkubovaly ve tmě na orbitální třepačce po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Po této inkubaci došlo u vzorků s obsahem vitellogeninu k optickým změnám. Poté byla změřena absorbance u destiček (při 405 nm) pomocí čtečky mikrotitračních destiček (Infinite M200, Tecan, Switzerland). Od

absorbancí na destičce byl odečten průměr absorbancí jamek NSB. Následně byla z řady standardních roztoků sestavena kalibrační křivka a určena rovnice regrese. Poté byla pomocí rovnice regrese vypočtena koncentrace vitellogeninu ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Tato koncentrace byla následně vynásobena ředěním pro zjištění skutečné koncentrace v původním vzorku krevní plazmy.

4.4.2 Stanovení enzymové aktivity pomocí cytochromu P450 (CYP1A)

Pro stanovení enzymové aktivity cytochromu CYP1A byla použita metoda EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylasa). Tato enzymová aktivita koreluje s účinky xenobiotik, jako jsou aromatické uhlovodíky, PCB či PPCP (Nilsen a kol., 1998; Šířoká a kol., 2005; Monod a Vindimian, 1991). Prvotně byla připravena preparace jaterních mikrozomů (fragmety endoplazmatického retikula) pomocí diferenciální centrifugace (Li a kol., 2011). Asi 0,5 g jaterní tkáň bylo nasekáno v pufru Tris - sacharózy (10 mM Tris-HCl, 250 mM sacharózy, pH 7,4) a homogenizováno pomocí homogenizátoru (Schuett Homogen, Germany). Poté byly vzorky odstředěny na centrifuze při 10 000 $\text{ot}\cdot\text{s}^{-1}$ (Beckman Coulter OptimaTM L-90 K ultracentrifuge) po dobu 15 minut a při teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant s obsahem mikrozomů byl oddělen od odstředěné tkáňe a byl dále odstředěn při 36 000 $\text{ot}\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 60 minut, při teplotě 4 °C. Po tomto odstředění jsme získali jaterní mikrozomy ve formě malých peletek. Upravené vzorky byly do konečného zpracování uchovány při -80 °C. Celá příprava probíhala za nízké teploty (na ledu) (Burkina, 2013).

Celková koncentrace proteinu byla stanovena spektrofotometricky. Jako standard byl použit hovězí albumin (Smith a kol., 1985). Stanovení bylo provedeno na 96 - jamkových mikrotitračních destičkách. Do každé jamky byla přidána směs mikrozomů, draselný pufr (50 mM, pH 7,8) a substrát (8 μM 7-ethoxyresorufin). Reakce byla zahájena přidáním NADPH (1,2 mM). Aktivita EROD byla stanovena fluorimetrickou detekcí resorufinu, který vznikl přeměnou 7-ethoxyresorufinu na resorufin (Kennedy a Jones, 1994). Intenzita fluorescence byla měřena opakovaně každou minutu (po dobu 12 minut) pomocí čtečky mikrotitračních destiček (Infinite M200, Tecan, Switzerland) při 544/590 nm (excitation/emission). Úroveň enzymové aktivity byla vyjádřena jako rozdíl fluorescence posledního měření a fluorescence

prvního měření. Z tohoto rozdílu byla pomocí rovnice regrese vypočtena enzymová aktivita a byla vyjádřena v $\text{pmol resorufin} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein (Grabicová a kol., 2013).

4.4.3 Stanovení vybraných cizorodých látek ve vodě

Pro sledování koncentrace vybraných cizorodých látek (zejména farmak) ve vodě byla použita metoda kapalinové chromatografie. Seznam jednotlivých sledovaných farmak je uveden v Příloze 2. Sledované skupiny farmak jsou uvedeny v Tabulce 1. Pro odběry vzorků byla použita injekční stříkačka a odebrané vzorky byly přefiltrovány přes celulókové filtry $0,45 \mu\text{m}$ (Labicom, Olomouc). Přefiltrované vzorky byly pipetovány do chromatografických vialek v množství $100 \mu\text{l}$ vzorku na jednu vialku. Poté byly vzorky zmrazeny při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Před stanovením bylo do vzorků ve vialkách přidáno $10 \mu\text{l}$ vnitřního standardu (IS – farmaka isotopicky značené). Následně byly vzorky analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie LC, ve spojení s hmotnostním spektrometrem, který pracuje na principu trojitého kvadrupólu MS/MS TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA), vybaveného čerpadly Accela 1250 LC a Accela 600 LC (Thermo Fisher Scientific) a autosamplerem HTS XT-CTC (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). Systém byl vybaven pro separaci cílových látek kolonou Hypersil GOLD Phenyl column ($50 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm i.d.}$, $3 \mu\text{m}$ částice) a předkolonou Hypersil GOLD Phenyl guard column ($10 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm i.d.}$, $3 \mu\text{m}$ částice) od Thermo Fisher Scientific. Extrakce pevných částic probíhala na koloně Hypersil GOLD column ($20 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm i.d.}$, $12 \mu\text{m}$ částice) od Thermo Fisher Scientific (Grabicová a kol., 2013). Poté byly stanoveny cizorodé látky dle výsledků kapalinové chromatografie a byla vypočtena jejich koncentrace ve vzorku ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$).

4.4.4 Stanovení cizorodých látek v těle ryb (játra)

Pro stanovení přítomnosti cizorodých látek (farmak) v těle ryb byly využity vzorky jater. Seznam jednotlivých sledovaných farmak je uveden v Příloze 2. Sledované skupiny farmak jsou uvedeny v Tabulce 1. Zmražené odebrané vzorky se nechaly při pokojové teplotě rozmrazit a nakrájely se na malé kousky. Poté se na analytických

vahách odvážilo do mikrozkušavek typu Eppendorf přibližně 0,5 g od každého vzorku. Ke každému vzorku se přidal 1 ml acetonitrilu (extrakční rozpouštědlo) obsahující 0,1 % kyseliny mravenčí a 10 µl vnitřního standardu (IS – farmaka isotopicky značené). Vzorky byly homogenizovány v homogenizátoru (TissueLyser II, Quiagen) při 30 000 úderech za minutu po dobu 10 minut. Proces homogenizace zvýšilo přidání kovové kuličky ke každému vzorku. Po homogenizaci se vzorky odstředily při 10 000 ot.s⁻¹ po dobu 10 minut na centrifuze (Micro 200R centrifuge, Hettich Zentrifugen). Z odstředěných vzorků byl odebrán pomocí injekční stříkačky extrakt bez sedimentu. Extrakt byl přefiltrován přes celulózové filtry 0,45 µm (Labicom, Olomouc). Přefiltrované vzorky se umístily přes noc do – 18 °C. Po rozmrazení byly vzorky znovu odstředěny při 10 000 ot.s⁻¹ po dobu 10 minut a poté bylo od každého vzorku převedeno 100 µl do chromatografické vialky a následně analyzováno pomocí kapalinové chromatografie LC, ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením HRMS. Přístroj pracuje na principu trojitého kvadrupólu MS/MS TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA), vybaveného čerpadlem Accela 1250 (Thermo Fisher Scientific) a autosamplerem HTS XT-CTC (CTC Analyticals AG, Zwingen, Switzerland). Systém byl vybaven pro separaci cílových látek kolonou Cogent bidentate (50 mm x 2,1 mm i.d., 3 µm částice) (Grabicová a kol., 2013). Z každé lokality se dva vzorky opakovaly pro kontrolu analytické metody (duplicitní vzorek). U vzorků z lokality C byl u třech vzorků připraven opakující se vzorek, do kterého bylo navíc přidáno 5 µl nativního standardu (Fortifikované vzorky). Nativní standard NS obsahoval známé stanovované látky – F1 (farmaka), F2 (farmaka), A (antibiotika). Dále byl připraven matricový standard (MS), který se připravoval jako jiné vzorky, pouze IS a NS se přidal těsně před analýzou. Matricový standard se používal ke korekci faktoru odezvy kalibrační křivky (McMaster, 2007). Poté byly stanoveny cizorodé látky dle výsledků kapalinové chromatografie a byla vypočtena jejich koncentrace ve vzorku (ng.g⁻¹).

Tabulka 1: Sledované skupiny farmak ve vodě a v tkáních ryb

Antibiotika
Regulátory cholesterolu
Antidepresiva
Antimykotika
Nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID)
Psycholeptika
Antihistaminika
Analgetika
Léčba cukrovky
Léčba vysokého tlaku

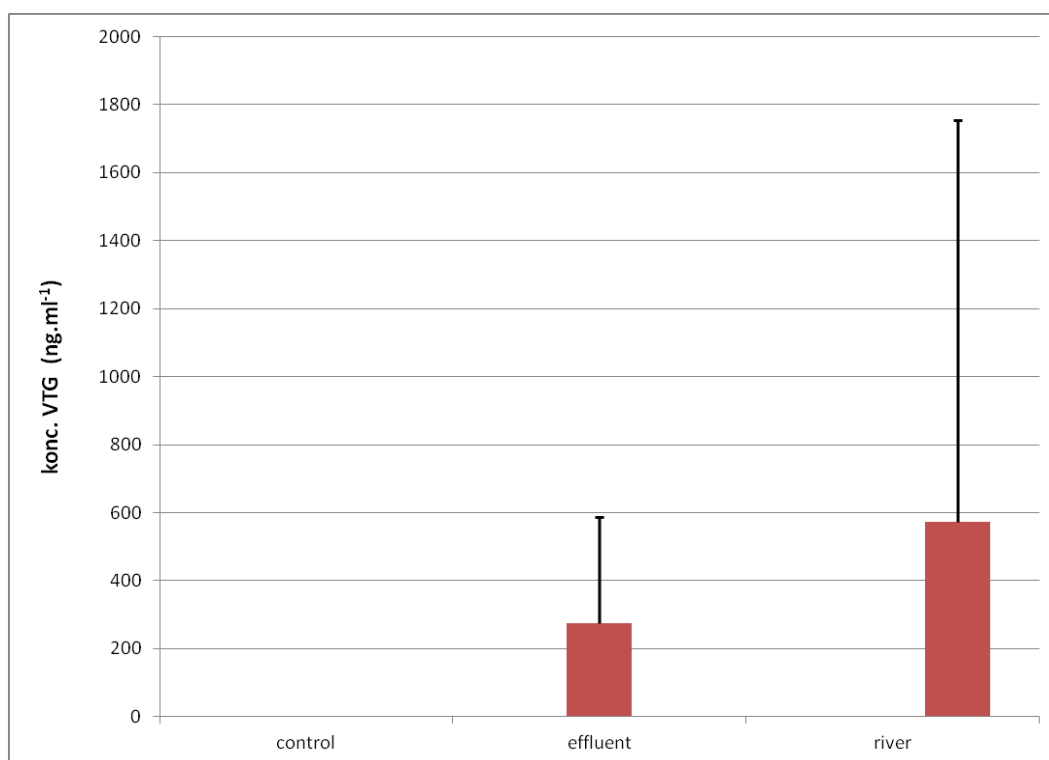
4.5 Statistická analýza

U všech získaných dat proběhlo statistické vyhodnocení pomocí analýzy variance (jednofaktorová anova – Tukeyův HSD test) z důvodu určení statistické významnosti zjištěných rozdílů mezi jednotlivými lokalitami. Statistické výpočty byly provedeny za použití programu Statistika 10.1

5 VÝSLEDKY

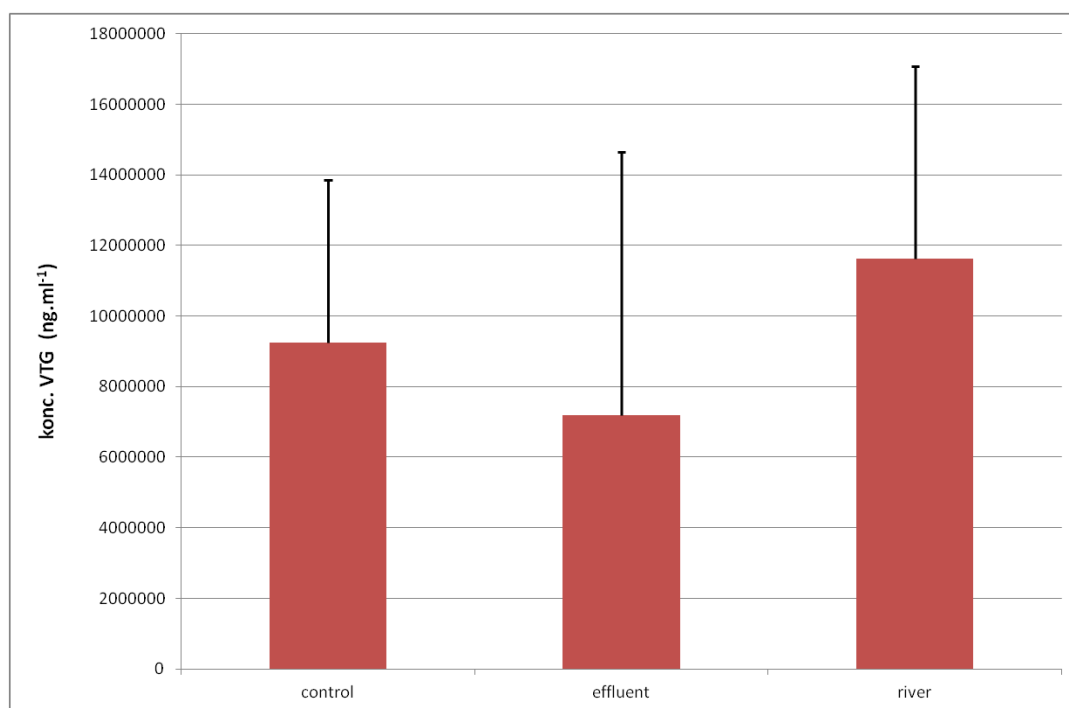
5.1 Obsah vitellogeninu v krevní plazmě

U všech vzorků samců z lokality C byly hodnoty koncentrací vitellogeninu v krevní plazmě pod mezí detekce analytické metody. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny v lokalitě R, kde byl vitellogenin zjištěn u třech samců ze šesti analyzovaných. Průměrná koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě v této lokalitě byla 573 ng.ml^{-1} . V lokalitě E byl vitellogenin zjištěn u třech samců ze šesti analyzovaných. Průměrná koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě v této lokalitě byla 275 ng.ml^{-1} . Mezi jednotlivými lokalitami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl zjištěných koncentrací vitellogeninu v krevní plazmě. Naměřené hodnoty jsou znázorněny v Grafu č. 1.



Graf č. 1: Průměrný obsah vitellogeninu v krevní plazmě samců analyzovaných ryb

U samic byla zjištěna nejvyšší koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě v lokalitě R. Zjištěná průměrná koncentrace byla 11 614 177 ng.ml⁻¹. V lokalitě C byla průměrná zjištěná koncentrace 9 250 302 ng.ml⁻¹. V lokalitě E byla průměrná zjištěná koncentrace 7 185 823 ng.ml⁻¹. Mezi jednotlivými lokalitami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl koncentrací vitellogeninu v krevní plazmě. Naměřené hodnoty jsou znázorněny v Grafu č. 2.

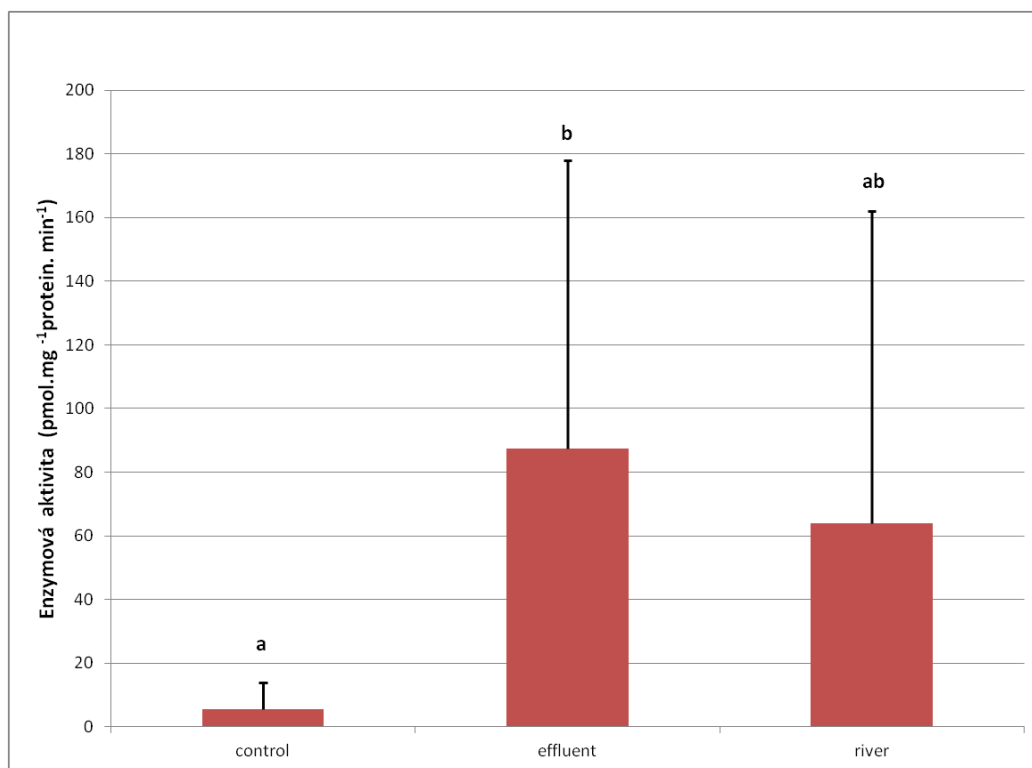


Graf č. 2: Průměrný obsah vitellogeninu v krevní plazmě samic analyzovaných ryb

5.2 Enzymová aktivita jaterních detoxikačních enzymů (EROD)

Nejnižší aktivita jaterních detoxikačních enzymů byla naměřena v lokalitě C. Průměrná naměřená hodnota v této lokalitě byla 5,4 pmol.mg⁻¹protein.min⁻¹. U všech samic z této lokality byla aktivita tak nízká, že byla pod mezí detekce analytické metody. Nejvyšší naměřená enzymová aktivita byla v lokalitě E. Průměrná naměřená hodnota v této lokalitě byla 87,4 pmol.mg⁻¹protein.min⁻¹. V lokalitě R byla naměřena průměrná hodnota aktivity jaterních enzymů 63,9 pmol.mg⁻¹protein.min⁻¹. Mezi skupinami analyzovaných jedinců z lokalit C a E byl zjištěn statisticky významný rozdíl

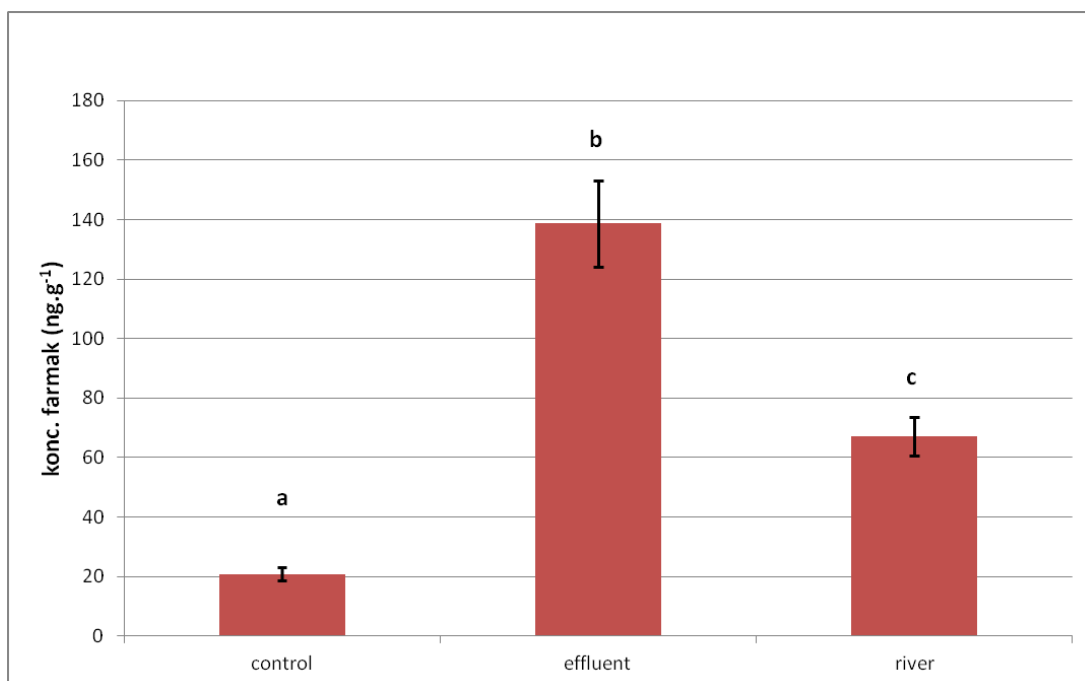
naměřených hodnot EROD ($p < 0,05$). Naměřené hodnoty aktivity EROD jsou znázorněny v Grafu č. 3.



Graf č. 3: Průměrné hodnoty EROD u analyzovaných ryb

5.3 Koncentrace vybraných cizorodých látek v játrech ryb

Výsledkem stanovení cizorodých látek v játrech ryb je celková suma všech detekovaných farmak. Nejnižší hodnoty obsahu farmak v játrech byly zjištěny v lokalitě C. Průměrná hodnota sumy detekovaných farmak byla $20,8 \text{ ng.g}^{-1}$. Celkem bylo v této lokalitě zachyceno 5 farmak z 97 měření. Nejvyšší hodnoty obsahu farmak v játrech byly zjištěny v lokalitě E. Průměrná hodnota sumy všech detekovaných farmak byla v této lokalitě $138,8 \text{ ng.g}^{-1}$. Zde bylo zachyceno celkem 17 farmak z 97 měření. V lokalitě R byla zjištěna průměrná suma všech detekovaných farmak $67,1 \text{ ng.g}^{-1}$ a v této lokalitě bylo zachyceno celkem 16 farmak z 97 měření. Mezi jednotlivými lokalitami byl zjištěn statisticky významný rozdíl u detekovaných farmak ($p < 0,001$) (Graf č. 4). Sumy všech detekovaných farmak v játrech ryb jsou znázorněny v Grafu č. 4.



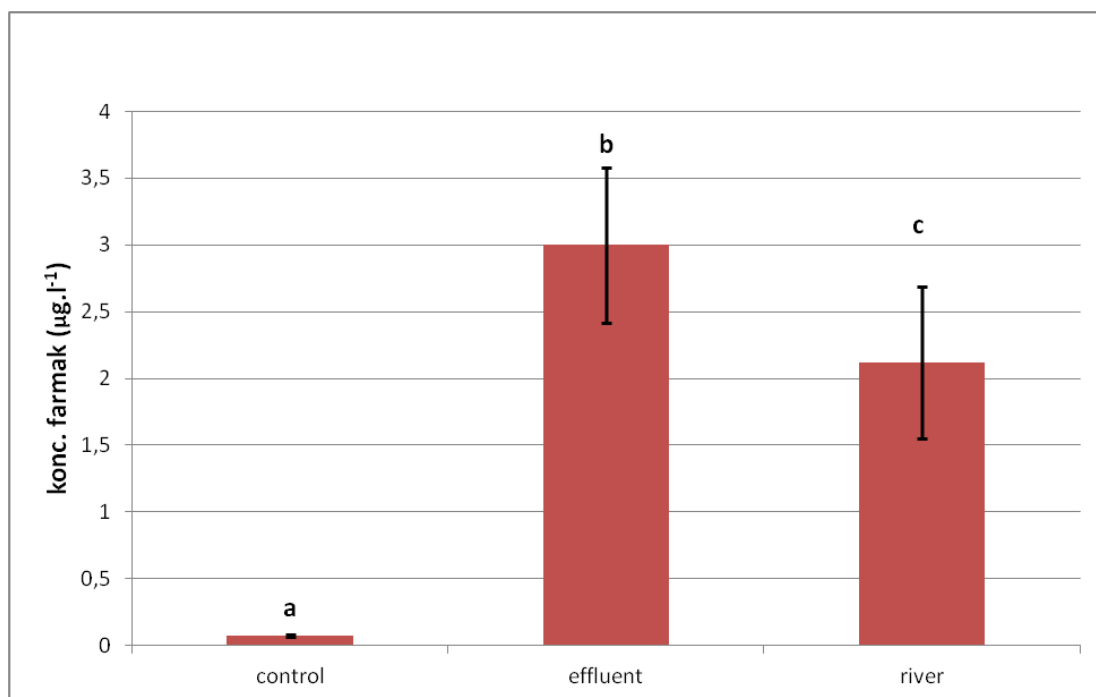
Graf č. 4: Průměrné hodnoty sumy všech detekovaných farmak v játrech analyzovaných ryb

Z jednotlivých skupin farmak byla v rybách z lokality C zjištěna pouze antimykotika ($9,4 \text{ ng.g}^{-1}$) a léky na vysoký krevní tlak ($11,4 \text{ ng.g}^{-1}$). V lokalitě E byla v rybách zjištěna největší koncentrace u léků na vysoký krevní tlak ($70,1 \text{ ng.g}^{-1}$), antidepresiv ($41,4 \text{ ng.g}^{-1}$), antihistaminik ($9,1 \text{ ng.g}^{-1}$), antimykotik ($7,3 \text{ ng.g}^{-1}$), psycholeptik ($5,7 \text{ ng.g}^{-1}$) a antibiotik ($3,9 \text{ ng.g}^{-1}$). V lokalitě R byla v rybách zjištěna největší koncentrace u antidepresiv ($39,7 \text{ ng.g}^{-1}$), léků na vysoký krevní tlak ($7,3 \text{ ng.g}^{-1}$), antihistaminik ($5,5 \text{ ng.g}^{-1}$), antimykotik ($4,9 \text{ ng.g}^{-1}$), psycholeptik ($4,0 \text{ ng.g}^{-1}$), antibiotik ($2,7 \text{ ng.g}^{-1}$) a analgetik ($2,0 \text{ ng.g}^{-1}$). Detekované skupiny farmak v játrech ryb jsou znázorněny v Příloze 3.

5.4 Koncentrace vybraných cizorodých látek ve vodě

Výsledkem stanovení cizorodých látek ve vodě je celková suma všech detekovaných farmak. Nejnížší hodnoty obsahu farmak ve vodě byly zjištěny v lokalitě C. Suma všech detekovaných farmak byla $0,07 \mu\text{g.l}^{-1}$. Celkem bylo v této lokalitě zachyceno 21 farmak ze 74 měření. Nejvyšší hodnoty obsahu farmak ve vodě byly zjištěny v lokalitě E. Suma všech detekovaných farmak byla $3,00 \mu\text{g.l}^{-1}$. V této lokalitě

bylo zachyceno celkem 42 farmak ze 74 měřených. V lokalitě R byla zjištěna suma všech detekovaných farmak $2,12 \mu\text{g.l}^{-1}$ a v této lokalitě bylo zachyceno celkem 37 farmak ze 74 měřených. Mezi jednotlivými lokalitami byl zjištěn statisticky významný rozdíl u detekovaných farmak ($p < 0,001$) (Graf č. 5). Sumy všech detekovaných farmak ve vodě jsou znázorněny v Grafu č. 5.



Graf č. 5: Průměrné hodnoty sumy všech detekovaných farmak ve vodě sledovaných lokalit

Z jednotlivých skupin farmak byla ve vodě v lokalitě C zjištěna v největší koncentraci nesteroidní protizánětlivá léčiva ($0,04 \mu\text{g.l}^{-1}$), antibiotika ($0,03 \mu\text{g.l}^{-1}$) a léky na vysoký krevní tlak ($0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$). V lokalitě E byla zjištěna největší koncentrace u antibiotik ($0,91 \mu\text{g.l}^{-1}$), léků na vysoký krevní tlak ($0,79 \mu\text{g.l}^{-1}$), analgetik ($0,56 \mu\text{g.l}^{-1}$), antidepresiv ($0,51 \mu\text{g.l}^{-1}$), psycholeptik ($0,26 \mu\text{g.l}^{-1}$) a nesteroidních protizánětlivých léčiv ($0,23 \mu\text{g.l}^{-1}$). V lokalitě R byla zjištěna největší koncentrace u antibiotik ($0,75 \mu\text{g.l}^{-1}$), léků na vysoký krevní tlak ($0,50 \mu\text{g.l}^{-1}$), antidepresiv ($0,45 \mu\text{g.l}^{-1}$), analgetik ($0,39 \mu\text{g.l}^{-1}$), psycholeptik ($0,19 \mu\text{g.l}^{-1}$) a nesteroidních protizánětlivých léčiv ($0,17 \mu\text{g.l}^{-1}$). Detekované skupiny farmak ve vodě jsou znázorněny v Příloze 4.

6 DISKUZE

Ze získaných výsledků je zřejmé, že znečištění malých toků, které slouží jako recipienty „vyčištěných“ komunálních odpadních vod, může významně ovlivňovat vodní organismy, které v nich žijí. V případě Živného potoka byl prokázán vliv tohoto znečištění na sledované biochemické ukazatele u pstruha obecného a řada sledovaných sloučenin byla detekována i v játrech tohoto indikátorového organismu. Zjištěné hodnoty biomarkerů však vykazovaly vysokou variabilitu, která mohla být ovlivněna např. migrací ryb, tzn. že výskyt některých jedinců ve znečištěných lokalitách mohl být krátkodobý z hlediska vyvolání negativních měřitelných účinků na jejich organismus nebo naopak dlouhodobý s adaptací na znečištění vodního prostředí. Argumentem pro tuto skutečnost může být porovnání koncentrací vitellogeninu a EROD u jednotlivých jedinců. Jak vyplývá z tabulky v Příloze 5, u samců, kteří vykazovali zvýšenou koncentraci vitellogeninu v krevní plazmě, byla zároveň zvýšena i aktivita jaterních detoxikačních enzymů. Výjimkou byl samec č. R_5 z lokality R, který vykazoval vysokou koncentraci vitellogeninu, ale aktivita jaterních detoxikačních enzymů byla nízká. Lze se domnívat, že jde o samce, který je již adaptován na znečištění vodního prostředí a proces feminizace je u něj pokročilejší v důsledku dlouhodobé expozice estrogenním látkám. Zároveň samice, u kterých byla zjištěna výrazně snížená koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě, vykazovaly zvýšenou aktivitu jaterních detoxikačních enzymů. Výjimkou byla samice č. C_12 z lokality C, u které byla zjištěna nízká koncentrace vitellogeninu a minimální aktivita jaterních detoxikačních enzymů. Při somatickém vyšetření byly u této samice zjištěny patologické změny na ledvinách. Z výsledků je zřejmé, že znečištěním jsou negativně ovlivňováni jak samci z důvodu přítomnosti látek s estrogenním účinkem, tak i samice z důvodu přítomnosti látek, které mají účinek opačný. Je nutno i zmínit, že do spektra sledovaných cizorodých sloučenin nebyla z důvodu obtížnosti jejich stanovení zahrnuta steroidní léčiva („hormony“), což jsou látky s nejvyšší biologickou účinností týkající se vlivu na endokrinní systém exponovaných organismů. Lze předpokládat přítomnost těchto látek i v tomto toku.

Na základě výsledků obsahu vitellogeninu v krevní plazmě analyzovaných ryb je možno konstatovat, že v důsledku znečištění lokalit pod ČOV Prachatice cizorodými látkami s endokrinním účinkem může docházet k narušení přirozené reprodukce u organismů žijících v tomto toku. Této skutečnosti nasvědčuje i nepřítomnost plůdku

pstruha obecného v lokalitách pod ČOV Prachatice a naopak jeho vysoké zastoupení v populaci v kontrolní lokalitě, což bylo zjištěno v průběhu odlovů ryb pomocí elektrického agregátu.

Koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě ryb byla sledována i na jiných lokalitách. Kolářová a kol. (2005) a Havelková a kol. (2008) prováděli stanovení koncentrace vitellogeninu u samců v řece Tiché Orlici a na jejím přítoku Kralickém potoku. Kralický potok je zatížen odpadními vodami z města Králíky a tyto vyčištěné odpadní vody mají přibližně stejné naředění jako odpadní vody v Živném potoce. V obou výzkumech byl zjištěn výrazný nárůst koncentrace vitellogeninu u samců v Kralickém potoce v porovnání se samci z řeky Tichá Orlice. Rovněž Randák a kol. (2008) sledoval koncentraci vitellogeninu u samců v malých tocích v povodí Labe, kde porovnával lokality nad a pod ČOV. Ve všech lokalitách nad zdroji znečištění byly naměřeny nulové hodnoty. Naopak zvýšené koncentrace vitellogeninu u samců byly zjištěny pod zdroji znečištění, nejvíce pak pod městy Volary a Vimperk. Žlábek a kol. (2004a) prováděl monitoring zatížení řeky Blanice látkami s xenoestrogenním účinkem. Nejvyšší koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě samců byla zjištěna v lokalitě Živný potok, kde průměrná hodnota činila 4923 ng.ml^{-1} . To je více, než nejvyšší naměřená koncentrace vitellogeninu v této práci. Při porovnání s těmito výzkumy lze konstatovat, že výsledky této práce odpovídají výsledkům předchozích studií na podobných lokalitách.

Aktivitu jaterních detoxikačních enzymů u ryb metodou EROD sledovala Havelková a kol. (2008) na lokalitách Tiché Orlice a Kralického potoka. Nejvyšší hodnoty aktivity EROD byly naměřeny v Kralickém potoce, kde průměrná hodnota činila $114 \text{ pmol.mg}^{-1}\text{protein.min}^{-1}$. Randák a kol. (2008) sledoval také aktivitu EROD v malých tocích v povodí Labe. Zvýšené hodnoty aktivity EROD byly zjištěny pod zdroji znečištění, nejvíce pak pod městy Volary a Vimperk. Li a kol. (2011a) prováděl výzkum na malých tocích (Prachatice, Brloh, Pacov), kde sledoval také aktivitu jaterních detoxikačních enzymů v lokalitách nad a pod ČOV. Největší rozdíl byl zjištěn na Živném potoce, kde aktivita v lokalitě pod zdrojem znečištění byla o 39,77 % větší než nad znečištěním. Zároveň v této práci bylo poukázáno na souvislost mezi naředěním vypouštěných „vyčištěných“ vod z ČOV a intenzitou vlivu znečištění na organismy. Při porovnání s těmito výzkumy lze konstatovat, že výsledky aktivity EROD v této práci

vykazovaly větší rozdíl nad a pod zdrojem znečištění (93,8 %), než předchozí studie na stejné lokalitě. Největší naměřená aktivita EROD v této práci byla menší než největší naměřená aktivita EROD na podobné lokalitě (Kralický potok). Zároveň lze konstatovat, že výsledky této práce odpovídají výsledkům předchozích studií na podobných lokalitách. Na základě zjištěných hodnot parametru EROD lze konstatovat, že ryby žijící v lokalitách pod Prachaticemi jsou vystaveny chemickému stresu.

Koncentraci cizorodých látek v játrech ryb sledoval Li a kol. (2011a) na malých tocích (Prachatice, Brloh, Pacov). V lokalitách pod zdroji znečištění byl zjištěn nárůst sledovaných cizorodých látek v játrech ryb. Ramirez a kol. (2009) prováděl výzkum na řekách v USA, kde porovnával koncentraci cizorodých látek (PPCP) v játrech ryb z lokalit nad a pod zdrojem znečištění. Ve všech lokalitách pod zdroji znečištění zjistil nárůst sledovaných cizorodých látek. Při porovnání s těmito výzkumy lze konstatovat, že výsledky této práce odpovídají předchozím výsledkům na stejné lokalitě, ale i výsledkům zjištěných v USA.

Koncentraci vybraných cizorodých látek ve vodě na podobných lokalitách sledovala Jarošová a kol. (2012). Ve většině sledovaných lokalit byl zjištěn nárůst sledovaných cizorodých látek (včetně farmak) pod zdroji znečištění. Na lokalitě Živný potok byl zjištěn největší nárůst sledovaných farmak u skupin antibiotik, psycholeptik a nesteroidních protizánětlivých léčiv. Randák a kol. (2008) sledoval koncentraci cizorodých látek v malých tocích v povodí Labe. Zvýšené koncentrace cizorodých látek včetně farmak ve vodě byly zjištěny pod zdroji znečištění, nejvyšší pak pod městem Volary ($291 \mu\text{g.l}^{-1}$) a Vimperk ($108,4 \mu\text{g.l}^{-1}$). Schultz a kol. (2010) rovněž sledoval koncentraci vybraných farmak ve vodě vybraných řek v USA. Z výsledků vyplývá, že lokality pod zdroji znečištění vykazovaly významně zvýšené koncentrace farmak ve vodě. Grabic a kol. (2013) sledoval výskyt kontaminantů včetně farmak na vybraných tocích v Krušných horách. Z výsledků vyplývá, že největší koncentrace farmak ve vodě byly naměřeny pod zdroji znečištění v lokalitách, které mají hodně obyvatel (Vejprty) nebo kde dochází k malému naředění vypouštěných odpadních vod (Černá pod Božím Darem). Ze skupiny farmak byly ve sledovaných lokalitách zjištěny největší koncentrace u léků na vysoký krevní tlak, antibiotik a antihistaminik. Při porovnání s těmito výzkumy lze konstatovat, že výsledky této práce odpovídají předchozím výzkumům na podobných lokalitách, ale i ve světě.

7 ZÁVĚR

Z výsledků provedených analýz vyplývá, že v Živném potoce pod Prachaticemi přítomné koncentrace cizorodých látek negativně ovlivňují přítomné organismy. V rámci naší studie byl prokázán vliv na pohlavní soustavu a na jaterní funkce pstruha obecného. Dále byla prokázána kumulace některých farmak v játrech tohoto druhu. Na základě výsledků této studie lze usuzovat, že znečištění Živného potoka je významným faktorem ovlivňujícím přirozenou reprodukci ryb žijících ve znečištěném úseku tohoto toku. Zároveň z provedených analýz vyplývá, že Živný potok pod Prachaticemi je zatížen širokým spektrem farmak. Významnými skupinami těchto sloučenin, které jsou přítomny ve vodním prostředí sledovaného recipientu „vyčištěných“ odpadních vod, jsou psycholeptika, analgetika a antidepresiva, tzn. látky, které ovlivňují chování léčených osob. Lze předpokládat, že tyto látky mohou ovlivňovat i chování organismů necíleně exponovaných v životním prostředí.

Z výsledků této i předchozích studií zaměřených na recipienty „vyčištěných“ komunálních odpadních vod vyplývá, že kontaminace vodních ekosystémů sloučeninami PPCP představuje vysoce aktuální problém a to zejména v malých tocích, ve kterých dochází k nízkému naředění vod vypouštěných z ČOV. Do budoucna bude nutné nejen objektivně vyhodnotit ekologická rizika plynoucí z tohoto druhu znečištění, ale zároveň nalézt efektivní a ekonomicky přijatelné metody eliminace nejvíce nebezpečných látek a to jak v čistírenských technologiích, tak i v samotných recipientech odpadních vod prostřednictvím podpory samočisticích procesů.

8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Adámek, Z., Helešic, J., Maršálek, B., Rulík, M., 2010. Aplikovaná hydrobiologie, Fakulta rybářství a ochrany vod, 2. vydání, s. 47-137, ISBN 978-80-87437-09-4.
- Adámek, Z., Vostradovský, J., Dubský, K., Nováček, J., Hartvich, P., 1997. Rybářství ve volných vodách, East Publishing, 204 s., ISBN 80-7187008-0.
- Agentura ochrany přírody a krajiny ČR (AOPK ČR) [online], [cit. 2013-10-12], dostupné na: <http://portal.nature.cz>.
- Arcand-Hoy, L. D., Benson, W. H., 1998. Fish reproduction: An ecologiccally relevant indicator of endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 49-57.
- Balmer, M. E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P. A., Müller, M. D., Buser, H. R., 2004. Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. *Environmental science & technology* 38(2), 390-395.
- Beyer, J., 1996. Fish biomarkers in marine pollution monitoring; evaluation and validation in laboratory and field studies. Academic thesis, University of Bergen, Norway.
- Bilotta, G. S., Brazier, R. E., 2008. Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research* 42, 2849-2861.
- Biosense Laboratories AS, Rainbow trout Vitellogenin ELISA Kit [online], [cit. 2014-03-12], dostupné na: http://www.biosense.com/docs/Rtrout%282005_1%29.pdf.
- Blažek, V., Cílek, V., Ehrlich, P., Frank, D., Gergel, J., Hladný, J., Hofmeister, T., Jánský, B., Kakos, V., Kender, J., Kopp, J., Král, M., Krátká, M., Krátký, M., Kvítek, T., Lídlová, D., Langhammer, J., Maníček, J., Matoušek, V., Matoušková, M., Nesměrák, I., Němec, J., Nietscheová, J., Plesník, J., Pokorný, D., Punčochář, P., Řádek, T., Satrapa, L., Šamalová, Z., Šťastný, B., Vrabc, M., Vylita, T., Zeman, O., 2006. Voda v České republice. Consult Praha, s. 25- 108, ISBN 80-903-4821-1.
- Bucheli, T. D., Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25, 201-268.
- Burkina, V., Zlabek, V., Zamaratskaia, G., 2013. Clotrimazole, but not dexamethasone, is a potent *in vitro* inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP1A and CYP3A in rainbow trout. *Chemosphere* 92, 1099-1104.

- Calabrese, E. J., 1991. Multiple chemical interactions. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 704 pp., ISBN 08-737-1146-7.
- Caliman, F. A., Gavrilesco, M., 2009. Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment - A Review. *Clean-Soil Air Water* 37, 277-303.
- Christian, T., Schneider, R. J., Farber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T., Goldbach, H. E., 2003. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* 31, 36-44.
- Corcoran, J., Winter, M. J., Tyler, C. R., 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit. Rev. Toxicol.* 40 (4), 287–304.
- Cowx, I. G., Welcome, R. L., 1998. Rehabilitation of rivers for fish. Food and Agricultural Organization of the United Nations by Fishing News Books, Oxford, UK, 304 pp., ISBN 92-510-4018-4.
- Cserhati, T., Forgacs, E., Oros, G., 2002. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International* 28, 337-348.
- Cserhati, T., 1995 Alkyl ethoxylated and alkylphenol ethoxylated nonionic surfactants - interaction with bioactive compounds and biological effects. *Environmental Health Perspectives* 103, 358-364.
- Čech, M., Čech, P., 2000. Potrava vydry říční na Chotýšance v zimním období 2000/2001. Sborník vlastivěd. prací z Podblanicka 40, 81-91.
- Čech, M., Čech, P., 2008. Potrava vydry říční (*Lutra lutra*) a norka amerického (*Neovison vison*) na Křešickém potoce (střední Čechy). Sborník vlastivěd. prací z Podblanicka 48, 106-121.
- Český rybářský svaz [online], [cit. 2013-11-15], dostupné na: <http://www.rybsvaz.cz>.
- Daughton, C. G., Ternes, T. A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107, 907-938.
- De Zwart, D., 1995. Monitoring water quality in the future, Volume 3: Biomonitoring. National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), Bilthoven, The Netherlands.
- Dorabawila, N., Gupta, G., 2005. Endocrine disrupter – estradiol – in Chesapeake Bay tributaries. *Journal of Hazardous Materials* 120 (1-3), 67-71.

- Drápal, J., Ettlerová, K., Hajšlová, J., Hlúbik, P., Jechová, M., Kozáková, M., Malíř, F., Ostrý, V., Ruprich, J., Sosnovcová, J., Špelina, V., Winklerová, D., 2005. Rezidua pesticidů v potravinách. VŠCHT Praha, 29 s.
- Dubský, K., Kouřil, J., Šrámek, V., 2003. Obecné rybářství, Informatorium, spol. s r.o., s. 149-151, ISBN 80-7333-019-9.
- Ellis, J. B., 2006. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environmental Pollution* 144, 184-189.
- Fleming, I. A., Peterson, E., 2001. The ability of released, hatchery salmonids to breed and contribute to the natural productivity of wild populations. *Nordic Journal of Freshwater Research* 75, 71-98.
- Fossi, M. C., Marsili, L., 1997. The use of non-destructive biomarkers in the study of marine mammals. *Biomarkers* 2, 205-216.
- Giokas, D. L., Salvador, A., Chisvert, A., 2007. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26, 360-374.
- Grabic, R., Randák, T., Žlábek, V., Turek, J., Fedorova, G., 2013. Sledování výskytu polárních kontaminantů ve vybraných profilech vodotečí v Krušných horách [online], [cit. 2014-04-02], dostupné na: http://www.ochranavody.cz/upload/out/Sledovani_vyskytu_polarnich_kontaminantu_CZ_WWW.pdf.
- Grabicová, K., Fedorová, G., Burkina, V., Steinbach, Ch., Schmidt-Posthaus, H., Žlábek, V., Kocour Kroupová, H., Grabic, R., Randák, T., 2013. Presence of UV filters in surface water and the effects of phenylbenzimidazole sulfonic acid on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following a chronic toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 96, 41-47.
- Hartman, P., Příklad I., Štědranský, E., 2005. Hydrobiologie, Informatorium, třetí vydání, 359 s., ISBN 80-7333-046-6.
- Harsányi, A., Aschenbrenner, P., 2002. Vývoj obsádky a rozmnožování lipana (*Thymallus thymallus*) v dolním Bavorsku. *Bulletin VÚRH Vodňany* 38 (3), 99-127.
- Havelková, M., Svobodová, Z., Kolářová, J., Krijt, J., Némethová, D., Jarkovský, J., Pospíšil, R., 2008. Organic pollutant contamination of the river Ticha Orlice as assessed by biochemical markers. *Acta Veterinaria Brno* 77(1), 133-141.

- 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.
- Hill, M. K., 2004. *Understanding Environmental Pollution*. Cambridge University Press, 468 pp., ISBN 05-2152-726-0.
- Hlavínek, P., 2004. *Jakost vody v povodí*. Akademické nakladatelství CERM Brno, 209 s., ISBN 978-80-214-2815-5.
- Hyánek, L. a kol., 1991. *Čistota vod*. Alfa Bratislava, 262 s., ISBN 80-05-00700-0.
- Ivankovic, T., Hrenovic, J., 2010. Surfactants in the environment. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* 61, 95-110.
- Jarošová, B., Bláha, L., Vrána, B., Randák, T., Grabic, R., Giesy, J. P., Hilscherová, K., 2012. Changes in concentrations of hydrophilic organic contaminants and of endocrine-disrupting potential downstream of small communities located adjacent to headwaters. *Environment international* 45, 22-31.
- Jjemba, P. K., 2006. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63 (1), 113–130.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science & Technology* 32, 2498 – 2506.
- Kalač, P., Tříška, J., Kolář, L., Jírovcová, E., 2010. *Chemie životního prostředí. JU v Českých Budějovicích*, ZF, 171 s., ISBN 978-80-7394-232-8.
- Keith, L. H., 1997. *Environmental endocrine disruptors*. John Wiley and Sons Inc, New York, USA, p. 1232.
- Kennedy, S. W., Jones, S. P., 1994. Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein-concentration with a fluorescence plate reader. *Anal.Biochem.* 222, 217–223.
- Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., Flick, R. W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (21), 8897–8901.

- Kolářová, J., Svobodová, Z., Žlábek, V., Randák, T., Hajšlová, J., Suchan, P., 2005. Organochlorine and PAHs in brown trout (*Salmo trutta fario*) population from Tichá Orlice River due to chemical plant with possible effects to vitellogenin expression. *Fresenius Environmental Bulletin* 14 (12), 1091-1096.
- Kolpin, D. W., 2002. Pharmaceuticals, Hormones and other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36, 1202-1211.
- Kruuk, H., 1995. *Wild otters: Predation and Populations*, Oxford university Press, Oxford, UK, 290 pp., ISBN 978-01-9158-907-2.
- Kümmerer, K., 2004. *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 505 pp., ISBN 978-35-4074-664-5.
- Kümmerer, K., Schuster, A., 2008. Substance flows associated with medical care – significance of different sources. *Pharmaceuticals in the environment*, Springer, 43–59.
- Kunkel, J. G., 1996. Serum and egg vitellogenin measurement in the Atlantic cod *Gadus morhua* and its relationship to ovarian development. Proposal response to CMER NOAA/NMFS RESEARCH TOPICS – 1996.
- Kunz, P. Y., Fent, K., 2006. Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217, 86-99.
- Lambropoulou, D. A., Giokas, D. L., Sakkas, V. A., Albanis, T. A., Karayannis, M. I., 2002. Gas chromatographic determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyldimethyl-p-aminobenzoic acid sunscreen agents in swimming pool and bathing waters by solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* 967, 243-253.
- L'Abée-Lund, J. H., 1991. Stocking of hatchery-reared fish an enhancement method? *Fauna* 44, 173-180.
- Lara-Martin, P. A., Gomez-Parra, A., Gonzalez-Mazo, E., 2008. Reactivity and fate of synthetic surfactants in aquatic environments. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 27, 684-695.
- Li, Z. H., Velíšek, J., Žlábek, V., Grabic, R., Máchova, J., Kolářova, J., Randák, T., 2010. Hepatic antioxidant status and haematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. *Chemico-Biological Interactions* 138, 98-104.

- Li, Z. H., Žlábek, V., Turek, J., Velíšek, J., Pulkrábová, J., Kolářová, J., Sudová, E., Beránková, P., Hrádková, P., Hajšlová, J., Randák, T., 2011a. Evaluating environmental impact of STPs situated on streams in the Czech Republic: An integrated approach to biomonitoring the aquatic environment. *Water Research* 45 (3), 1403-1413.
- Li, Z. H., Žlábek, V., Velíšek, J., Grabic, R., Máchová, J., Kolářová, J., Li, P., Randák, T., 2011. Acute toxicity of carbamazepine to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on antioxidant responses, hematological parameters and hepatic EROD. *Ecotoxcol. Environ. Saf.* 74, 319–327.
- Lusk, S., 1990. *Rybářství a úpravy vodních toků*. Hydroprojekt Brno, s. 3-103, ISBN 80-900-0673-6.
- Lusk, S., Hartvich, P., Lojkásek, B., Lusková, V., 2011. Migrace ryb a migrační prostupnost vodních toků. *Biodiverzita ichtyofauny ČR (VII)*, 5-67.
- Mapy.cz, [online], [cit. 2014-04-05], dostupné na: <http://www.mapy.cz/#!x=14.068962&y=49.013229&z=11>.
- McCarthy, J. F., Shugart, L. R., 1990. *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 457 pp., ISBN 08-737-1284-6.
- McDonnell, G., Russell, A. D., 1999. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 147.
- McMaster, M. C., 2007. *HPLC a practical user's guide – 2nd ed.*, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 238 pp. ISBN 978-0-471-75401-5.
- Meka, J. M., 2004. The influence of hook type, angler experience and fish size on injury rates and the duration of capture in an Alaskan catch-and-release rainbow trout fishery. *North American Journal of Fisheries Management* 24 (4), 1309-1321.
- Melancon, M. J., Alscher, R., Benson, W., Kruzynski, G., Lee, R. F., Sikka, H. C., Spies, R. B., 1992. *Metabolic products as biomarkers*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 87-124.
- Monod, G., Vindimian, E., 1991. Effect of storage conditions and subcellular fractionation of fish liver on cytochrome P-450-dependent enzymatic activities used for the monitoring of water pollution. *Wat. Res.* 25(2), 173-177.
- Moss, D. W., Henderson, A. R., Kochmar, J. F., 1986. *Enzymes; principles of diagnostic enzymology and the aminotransferases*. Saunders, Philadelphia, PA, 663-678.

- Niimi, J., Oliver, B. G., 1989. Distribution of polychlorinated biphenyl congeners and other halocarbons in whole fish and muscle from Lake Ontario salmonids. *Environmental Science and Technology* 23, 83-88.
- Nilsen, B. M., Berg, K., Goksoyr, A., 1998. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 423-438.
- Pal, R., Megharaj, M., Kirkbride, K. P., Naidu, R., 2012. Illicit drugs and the environment – A review. *Sci. Total Environ.* (In press).
- Peakall, D. W., 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1, 55-60.
- Pitter P., 1999. *Hydrochemie, VŠCHT Praha*, 592 s., ISBN 978-80-7080-701-9.
- Pokorný, J., 2009. *VODNÍ HOSPODÁŘSTVÍ, Stavby v rybářství*, Informatorium Praha, s. 246-290, ISBN 978-80-7333-071-2.
- Ramirez, A. J., Brain, R. A., Usenko, S., Mottaleb, M. A., O'Donnell, J. G., Stahl, L. L., Wathen, J. B., Snyder, B. D., Pitt, J. L., Dobbins, L., Brooks B. W., Chambliss, C. K., 2009. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: results of a national pilot study in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2587-2597.
- Randák, T., Slavík, O., Kubečka, J., Adámek, Z., Horký, P., Turek, J., Vostradovský, J., Hladík, M., Peterka, J., Musil, J., Prchalová, M., Jůza, T., Kratochvíl, M., Boukal, D., Vašek, M., Andreji, J., Dvořák, P., 2013. *Rybářství ve volných vodách. FROV JU, Vodňany*, 434 s., ISBN 80-874-3749-7.
- Randák, T., Velíšek, J., Žlábek, V., Kolářová, J., Kroupová, H., Grabic, R., Valentová, O., Máchová, J., Svobodová, Z., Piačková, V., Faina, R., Sudová, E., Beránková, P., Turek, J., Hanák, R., 2008. Antropogenní tlaky na stav půd, vodní zdroje a vodní ekosystémy v české části mezinárodního povodí Labe, B7 Výzkum vlivu polutantů přítomných ve vodním prostředí na ryby, Zpráva za rok 2008, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany, 20 s.
- Randák, T., Žlábek, V., Turek, J., Velíšek, J., Kolářová, J., 2011. Využití pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) pro účely ekotoxikologického monitoringu kvality vody. *Metodika, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*, 23 s.

- Risley, C. A. L., Zydlewski, J., 2010. Assessing the Effects of Catch and Release Regulations on a Brook Trout Population Using an Age-Structured Model. *North American Journal of Fisheries Management* 30 (6), 1434-1444.
- Roberts, P.H., Thomas, K.V., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of The Total Environment* 356, 143-153.
- Rogers, M. H., Allen, M. S., Jones, D., 2005. Relationship between river surface level and fish assemblage in the Ocklawaha River, Florida. *River Research and Applications* 21, 501-511.
- Roche, K., 2001. Sprainting behaviour, diet and foraging strategy of otters (*Lutra lutra L.*) in the Třeboň Biosphere Reserve (Czech Republic) PhD Thesis. Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Vertebrate Biology in Brno, 135 pp.
- Rybníkářství číslo 10, vydáno červen 2012 Rybářským sdružením České Republiky, Typ § Z-Media, 8 s.
- Salgado, R., Marques, R., Noronha, J. P., Oehmen, A., Carvalho, G., Reis, M., 2009. Assessing the Dynamics of Pharmaceutical Compounds in a Full-Scale Activated Sludge Plant. XENOWAC 2009 – International Conference on Xenobiotics in the Urban Water Cycle, 11–13th March 2009, Cyprus.
- Sanders, B. M., 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23, 49-75.
- Sasseville, D., 2004. Hypersensitivity to preservatives. *Dermatologic Therapy* 17, 251-263.
- Saunders, R. L., 1991. Potential interaction between cultured and wild Atlantic salmon. *Aquaculture* 98, 51-60.
- Sedlák, D. L., Huang, C. H., Pinkston, K., 2004. Strategies for selecting pharmaceuticals to assess attenuation during indirect potable water reuse. *Berlin Springer*, 107–120.
- Schlumpf, M., Durrer, S., Faass, O., Ehnes, C., Fuetsch, M., Gaille, C., Henseler, M., Hofkamp, L., Maerkel, K., Reolon, S., Timms, B., Tresguerres, J. A. F., Lichtensteiger, W., 2008. Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review. *International Journal of Andrology* 31, 144-150.

- Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L. B., Blazer, V. S., Norris, D. O., Vajda, A. M., 2010. Antidepressant pharmaceuticals in two US effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environmental science & technology* 44(6), 1918-1925.
- Shugart, L. R., Bickham, J., Jackim, G., McMahon, G., Ridley, W., Stein, J., Steinert, S., 1992. DNA alterations. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 155-210.
- Singh, S. K., Bajpai, M., Tyagi, V. K., 2006. Amine Oxides: A Review, *Journal Oleo Science* 55, 99-119.
- Singh, R. P., Gupta, N., Singh, S., Singh, A., Suman, R., Annie, K., 2002. Toxicity of ionic and nonionic surfactants to six macrobes found in Agra, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69, 265-270.
- Slavík, O., Mašek, P., Balvín, P., Kolářová, J., Randák, T., 2004. Migrace pstruhů obecných a variabilita průtoků v pramenných oblastech řeky Vydry a Vltavy. Sborník z konference Aktuality šumavského výzkumu II. CHKO Šumava, s. 230-232.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Spies, R. B., Stegeman, J. J., Rice, D. W., Woodlin, B., Thomas, P., Hose, J. E., Cross, J. N., Prieto, M., 1990. Sublethal responses of *Platichthys stellatus* to organic contamination in San Francisco Bay with emphasis on reproduction. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 87-122.
- Spurný, P., 2003. Deterioration of the fish community of the salmonid Dyje river caused by overwintering cormorant (*Phalacrocorax carbo*). *Acta scientiarum polonorum, Piscaria* 2 (1), 247-254.
- Stegeman, J. J., Brouwer, M., Richard, T. D. G., Forlin, L., Fowler, B. A., Sanders, B. M., Van Veld, P. A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, 235 - 335.
- Sumpter, J. P., 1998. Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. *Toxicology Letters*, 102-103, 337-342.
- Suter, W., 1991. Der Einfluss fishfressender Vogelarten auf Süßwasserfisch-Bestände-eine Übersicht. *J. Ornithol.* 132, 29-45.

- Suter, W., 1993. Ecological Risk Assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 538 pp., ISBN 08-737-1875-5.
- Svobodová, Z., a kol., 2008. Veterinární toxikologie v klinické praxi, Profí Press Praha, s. 201-219, ISBN 978-80-86726-27-4.
- Svobodová, Z., Pravda, D., Modrá, H., 2012. Metody hematologického vyšetřování ryb. Metodika, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 36 s.
- Svoboda, J., Fuksa, J. K., Matoušová, L., Schönbauerová, L., Svobodová, A., Váňa, M., Šťastný, V., 2009. Léčiva a čistírny odpadních vod – možnosti odstraňování a reálná data. Vodní hospodářství 59 (4), 9–12.
- Široká Z., Krijt J., Randák T., Svobodová Z., Pešková G., Fuksa J., Hajšlová J., Jarkovský J., Jánková M., 2005. Organic Pollutant Contamination of the River Elbe as Assessed by Biochemical Markers. Acta Vet. Brno 74, 293 – 303.
- Šuta, M., 2008. Chemické látky v životním prostředí a zdraví. ZO ČSOP Veronica, Brno, 61 s., ISBN 978-80-87308-00-4.
- Táborský, V., Šedivý, J., 1997. Rostlinolékařství, Credit Praha, 347 s., ISBN 80-902295-2-2.
- Ternes, T. A., Joss, A., Siegrist, H., 2007. Peer Reviewed: Scrutinizing Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wastewater Treatment. Environmental Science & Technology 38, 392A-399A.
- Turek, J., Randák, T., Velíšek, J., Hanák, R., Sudová, E., 2009. Porovnání abundace a biomasy rybí obsádky v morfologicky a průtokově odlišných úsecích malého toku. Bulletin VÚRH Vodňany 45 (1), 18-25.
- Tyler, C. R., Jobling, S., Sumpter, J. P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. Critical Review in Toxicology 28 (4), 319-361.
- Van Gestel, C. A. M., Van Brummelen, T. C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. Ecotoxicology 5, 217-225.
- Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedell, J. R., Cushing, C. E., 1980. The River Continuum Concept. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 37, 130-137.
- Vermeulen, N. P. E., 1996. Role of metabolism in chemical toxicity. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 29-53, ISBN 08-493-9224-1.

- Veselý, J., 1994. Kontaminace českých řek stopovými prvky. *Vesmír* 73, 558-561.
- Vučka, V., 1984. Havarijní stavy v čistotě vod. SZN Praha, 207 s.
- Waples, R. S., 1991. Genetic interactions between hatchery and wild salmonids: lessons from the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48 (1), 124-133.
- Wester, P. W., Vethaak, D., Van Muiswinkel, W. B., 1994. Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology* 86, 213-232.
- Wikiskripta, metoda ELISA, [online], [cit. 2013-03-26], dostupné na: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/ELISA>.
- Winston, G. W., Di Giulio, R. T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137-161.
- Zelinka M., Kubiček F., 1985. Základy aplikované hydrobiologie, SNP Praha, 333 s.
- Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M., Fanelli, R., 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355 (9217), 1789–1790.
- Žlábek, V., Kolářová, J., Randák, T., Svobodová, Z., 2004a. Monitoring zatížení řeky Blanice látkami s xenoestrogenním účinkem. Sborník z konference Aktuality šumavského výzkumu II. CHKO Šumava, 186-191.
- Žlábek V, Randák T, Kolářova J, Svobodová Z, Hajslová J, Suchan P., 2004. Monitoring of endocrine disruption in chub (*Leuciscus cephalus* L.) population from the Vltava river. *Toxicology and Applied Pharmacology* 197, 256 s.

9 SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ

Obr. 1: Minimální průtok na Černém potoce.....	11
Obr. 2: Odběr vody z řeky Blanice pro MVE Husinec (vpravo náhon pro MVE, vlevo původní tok řeky)	12
Obr. 3: Průtok vody v korytě Blanice před odběrem vody pro MVE Husinec (vlevo) a po odběru (vpravo)	12
Obr. 4: Přirozený tok řeky Blanice.....	14
Obr. 5: Regulace Živného potoka u Prachatic	15
Obr. 6: Regulace Živného potoka u Prachatic	15
Obr. 7: Výskyt vydry říční v jednotlivých krajích (plocha krajů s potvrzeným výskytem vydry, vyjádřeno v procentech)	16
Obr. 8: Vyústění vyčištěných odpadních vod z ČOV Prachatice do Živného potoka	31
Obr. 9: Sledované lokality a překážky v toku mezi lokalitou C a E (vpravo)	32
Obr. 10: Schéma sendvičového ELISA testu.....	34
Graf č. 1: Průměrný obsah vitellogeninu v krevní plazmě samců analyzovaných ryb ...	40
Graf č. 2: Průměrný obsah vitellogeninu v krevní plazmě samic analyzovaných ryb	41
Graf č. 3: Průměrné hodnoty EROD u analyzovaných ryb	42
Graf č. 4: Průměrné hodnoty sumy všech detekovaných farmak v játrech analyzovaných ryb.....	43
Graf č. 5: Průměrné hodnoty sumy všech detekovaných farmak ve vodě sledovaných lokalit	44

10 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Odběrové tabulky ryb z jednotlivých lokalit	62
Příloha 2: Seznam jednotlivých sledovaných farmak ve vodě a tkáních ryb	63
Příloha 3: Jednotlivé skupiny farmak detekované v játrech sledovaných ryb	64
Příloha 4: Jednotlivé skupiny farmak detekované ve vodě sledovaných lokalit	64
Příloha 5: Koncentrace vitellogeninu a aktivity EROD u jednotlivých analyzovaných jedinců	65

Příloha 1: Odběrové tabulky ryb z jednotlivých lokalit

Lokalita C (nad Prachaticemi)

číslo ryby	kód	Délka (cm)		Hmotnost (g)	
		celková	délka těla	celková	pohlaví
1	ZP_C_1	25,5	22,0	155	M
2	ZP_C_2	19,5	16,5	70	M
3	ZP_C_3	23,5	21,0	110	M
4	ZP_C_4	21,5	19,5	100	M
5	ZP_C_5	19,7	18,5	70	M
6	ZP_C_6	24,2	21,3	125	M
7	ZP_C_7	21,3	19,5	70	F
8	ZP_C_8	20,0	18,2	75	F
9	ZP_C_9	22,2	20,5	105	F
10	ZP_C_10	19,0	17,5	60	F
11	ZP_C_11	21,2	20,0	95	F
12	ZP_C_12	26,5	24,5	155	F, nezdravé ledviny

Lokalita E (pod výtokem ČOV)

číslo ryby	kód	Délka (cm)		Hmotnost (g)	
		celková	délka těla	celková	pohlaví
13	ZP_E_1	27,5	25,0	220	M
14	ZP_E_2	24,3	22,3	155	M
15	ZP_E_3	31,0	28,3	300	M
16	ZP_E_4	25,8	23,5	180	M
17	ZP_E_5	25,4	23,0	175	M
18	ZP_E_6	25,3	23,5	205	M
19	ZP_E_7	27,0	24,6	225	F
20	ZP_E_8	21,2	19,5	100	F, nezdravé ledviny
21	ZP_E_9	21,7	20,1	130	F
22	ZP_E_10	22,3	20,2	130	F, ledviny velké, možná parazit
23	ZP_E_11	22,6	20,7	120	F, ledviny velké, možná parazit
24	ZP_E_12	19,4	17,8	90	F, ledviny velké, možná parazit

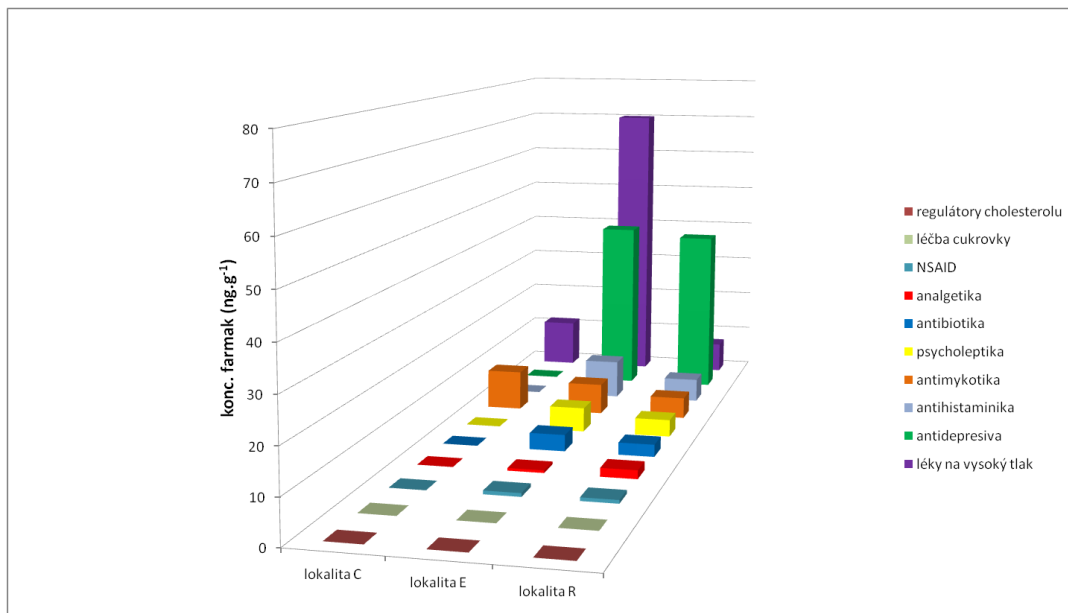
Lokalita R (před soutokem s Blaníci)

číslo ryby	kód	Délka (cm)		Hmotnost (g)	
		celková	délka těla	celková	pohlaví
25	ZP_R_1	21,0	19,0	110	M
26	ZP_R_2	22,5	20,9	125	M, nezdravé ledviny
27	ZP_R_3	22,5	20,0	100	F, nezdravé ledviny
28	ZP_R_4	23,0	21,5	125	F, nezdravé ledviny
29	ZP_R_5	27,0	24,0	175	M
30	ZP_R_6	21,5	18,8	95	M, zduřelé ledviny
31	ZP_R_7	21,0	18,5	85	F, zduřelé ledviny
32	ZP_R_8	26,0	23,5	155	M
33	ZP_R_9	23,5	21,0	125	M, zduřelé ledviny
34	ZP_R_10	29,0	25,5	230	F
35	ZP_R_11	25,5	22,5	185	F, velké ledviny
36	ZP_R_12	28,2	25,5	225	F

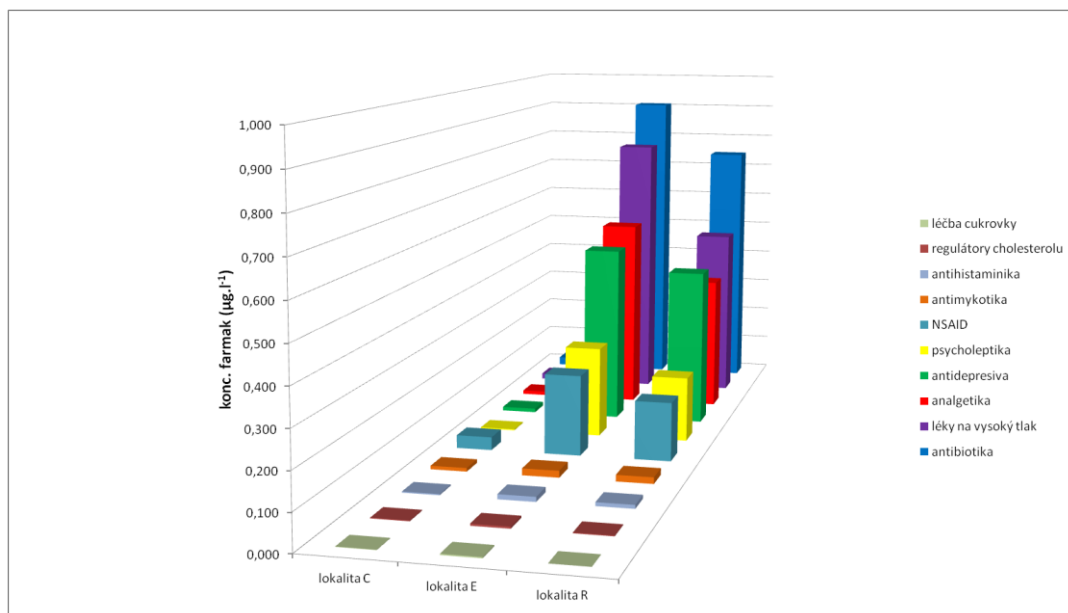
Příloha 2: Seznam jednotlivých sledovaných farmak ve vodě a v tkáních ryb

Farmaka sledovaná ve vodě		Farmaka sledovaná v tkáních ryb (játra)	
Alfuzosin	Glimepiride	Alfuzosin	Isradipine
Amitriptyline	Haloperidol	Amiodiarone	Levomepromazine
Atenolol	Hydroxyzine	Amitriptyline	Loperamide
Atorvastatin	Irbesartan	Atenolol	Maprotiline
Atracurium	Isradipine	Atorvastatin	Memantine
Azithromycin	Levofloxacin	Atracurium	Metoprolol
Bezafibrate	Levomepromazine	Azelastine	Mianserin
Biperiden	Lomefloxacin	Azithromycin	Miconazole
Bisoprolol	Loperamide	Bezafibrate	Mirtazapin
Bupropion	Maprotiline	Biperiden	Mirtazapine
Carbamazepine	Meclozine	Bisoprolol	Naloxone
Cilazapril	Memantine	Bromocriptin	Nefazodone
Ciprofloxacin	Metoprolol	Bupropion	Oxazepam
Citalopram	Mianserin	Carbamazepine	Oxolinic acid
Clarithromycin	Mirtazapine	Cilazapril	Paroxetine
Clemastine	Norfloxacin	Citalopram	Perphenazine
Clindamycine	Orphenadrine	Clarithromycin	Pizotifen
Clonazepam	Oxazepam	Clemastine	Promethazine
Clotrimazole	Paroxetine	Clindamycine	Repaglinide
Cyproheptadine	Ropinirole	Clomipramine	Risperidone
Desloratadine	Roxithromycin	Clonazepam	Ropinirole
Diclofenac	Sertaline	Clotrimazole	Roxithromycin
Difloxacin	Sotalol	Codeine	Sertraline
Dihydroergotamine	Sulfamerazine	Cyproheptadine	Sotalol
Diltiazem	Sulfamethazine	Desloratadine	Sulfadiazine
Diphenhydramine	Sulfamethizole	Diclofenac	Sulfadimethoxine
Disopyramide	Sulfamethoxazole	Dicycloverine	Sulfamerazine
Enoxacin	Sulfamethoxyipyridazine	Dihydroergotamine	Sulfamethazine
Enrofloxacin	Sulfamoxol	Diltiazem	Sulfamethizole
Erythromycin	Sulfaphenazole	Diphenhydramine	Sulfamethoxazole
Fexofenadine	Sulfasalazine	Dipyridamole	Sulfamethoxyipyridazine
Flecainide	Tramadol	Econazole	Sulfamoxol
Fluconazole	Trimethoprim	Eprosartan	Sulfaphenazole
Flumequine	Valsartan	Erythromycin	Sulfapyridine
Flupentixol	Venlafaxine	Fenofibrate	Sulfaquinoxaline
Fulvestrant	Verapamil	Fexofenadine	Sulfasalazine
Glibenclamide	Zuclopenthixol	Finasteride	Sulfathiazole
		Flecainide	Tamoxifen
		Flumequine	Telmisartan
		Flupentixol	Terbinafine
		Fluphenazine	Terbutaline
		Fulvestrant	Tramadol
		Glibenclamide	Trihexyphenidyl
		Glimepiride	Trimethoprim
		Haloperidol	Valsartan
		Hydroxyzine	Venlafaxine
		Chlorpromazine	Verapamil
		Chlorprothixene	Zuclopenthixol
		Irbesartan	

Příloha 3: Jednotlivé skupiny farmak detekované v játrech sledovaných ryb



Příloha 4: Jednotlivé skupiny farmak detekované ve vodě sledovaných lokalit



Příloha 5: Koncentrace vitellogeninu a aktivity EROD u jednotlivých analyzovaných jedinců

	lokality	ryba	VTG ng.ml ⁻¹	EROD (pmol.mg ⁻¹ .min ⁻¹)
MALE	control	C_1	0	0,8
MALE		C_2	0	2,7
MALE		C_3	0	3,0
MALE		C_4	0	22,9
MALE		C_5	0	23,7
MALE		C_6	0	11,3
MALE	effluent	E_1	0	19,7
MALE		E_2	0	55,7
MALE		E_3	323	79,8
MALE		E_4	832	148,1
MALE		E_5	495	121,3
MALE		E_6	0	66,9
MALE	river	R_1	15	48,6
MALE		R_2	0	31,3
MALE		R_5	3208	55,0
MALE		R_6	0	40,2
MALE		R_8	218	78,4
MALE		R_9	0	56,0
FEMALE	control	C_7	10125000	0,0
FEMALE		C_8	16100625	0,0
FEMALE		C_9	10430625	0,0
FEMALE		C_10	10166250	0,0
FEMALE		C_11	8152500	0,0
FEMALE		C_12	526813	0,0
FEMALE	effluent	E_7	12630000	0,8
FEMALE		E_8	472813	46,6
FEMALE		E_9	19432500	2,9
FEMALE		E_10	10346250	1,6
FEMALE		E_11	13125	320,7
FEMALE		E_12	220250	184,9
FEMALE	river	R_3	9646875	2,1
FEMALE		R_4	13310625	72,3
FEMALE		R_7	371938	377,1
FEMALE		R_10	14490000	0,0
FEMALE		R_11	16410000	4,4
FEMALE		R_12	15455625	1,1

Abstrakt:

VLIV KOMUNÁLNÍHO ZNEČIŠTĚNÍ NA RYBY ŽIJÍCÍ V MALÉM TOKU

Hlavním cílem této práce bylo posouzení ovlivnění ryb žijících v Živném potoce cizorodými látkami vstupujícími do toku přes ČOV Prachatice. Jako indikátorový organismus byl zvolen pstruh obecný (*Salmo trutta m. fario*). Odlov ryb byl proveden v roce 2012 pomocí elektrického agregátu ze tří lokalit. Celkem bylo odloveno 36 ryb. Následně byla u odlovených ryb provedena analýza vzorků krve a tkání pomocí vybraných biomarkerů (vitellogenin a EROD). Dále byla provedena analýza tkání ryb a analýza vzorků vody na přítomnost vybraných cizorodých látek. Koncentrace vitellogeninu v krevní plazmě samců ryb byla v kontrolní lokalitě nulová, ve znečištěných lokalitách se průměrná koncentrace pohybovala od 275 do 573 ng.ml⁻¹. V krevní plazmě samic byla koncentrace vitellogeninu nejnižší v lokalitě pod ČOV (7 185 823 ng.ml⁻¹). V ostatních lokalitách byla průměrná koncentrace v rozmezí 9 250 302 – 11 614 177 ng.ml⁻¹. Aktivita jaterních detoxikačních enzymů (EROD) byla nejvyšší ve znečištěných lokalitách, v rozmezí 63,9 – 87,4 pmol.mg⁻¹protein.min⁻¹. V kontrolní lokalitě byla aktivita minimální (5,4 pmol.mg⁻¹protein.min⁻¹). Výsledkem stanovení vybraných cizorodých látek v tkáních ryb (játra) a ve vodě je suma všech detekovaných farmak. V tkáních ryb byla suma všech detekovaných farmak v rozmezí 20,8 – 138,8 ng.g⁻¹. Ve vodě byla suma všech detekovaných farmak v rozmezí 0,07 – 3,00 µg.l⁻¹. Nejvyšší hodnoty byly opět naměřeny ve znečištěných lokalitách. Z výsledků provedených analýz vyplývá, že v Živném potoce pod Prachaticemi přítomné koncentrace cizorodých látek negativně ovlivňují přítomné organismy.

Klíčová slova: *Salmo trutta m. fario*, Živný potok, ČOV, vitellogenin, EROD, farmaka

Abstract:

IMPACT OF MUNICIPAL POLLUTION ON FISH LIVING IN A SMALL STREAM

Main objective of this thesis is evaluation of the impact of extraneous substances that enter Živný stream through the WWTP Prachatice onto the stream's fish population. Brown trout (*Salmo trutta m. fario*) was selected as a sampling organism. Sampling was conducted in 2012 using an electrical aggregate at three locations. The sample counted a total of 36 fish. Subsequently there was conducted blood sample and tissue analysis using selected biomarkers (vitellogenin and EROD). Furthermore, an analysis of fish tissue and water samples was made to identify presence of selected extraneous substances. Concentration of vitellogenin in blood plasma of male fish in the controlled location was zero, in polluted location the average concentration varied between 275 and 573 ng.ml⁻¹. Concentration of vitellogenin in blood plasma of female fish was the lowest at a location directly downstream the WWTP (7 185 823 ng.ml⁻¹). At other locations, the average concentration ranged between 9 250 302 – 11 614 177 ng.ml⁻¹. The activity of liver detoxifying enzymes (EROD) was the highest at polluted locations, between 63,9 – 87,4 pmol.mg⁻¹protein.min⁻¹. In the controlled location was the lowest activity EROD (5,4 pmol.mg⁻¹protein.min⁻¹). The result of identification of selected extraneous substances in fish tissues (liver) and in the water is a sum of all detected pharmaceuticals. In fish tissues was the sum of all detected pharmaceuticals in the range from 20,8 to 138,8 ng.g⁻¹, while in water it varied between 0,07 – 3,00 µg.l⁻¹. The highest values were again measured in polluted areas. The results of the analyses conducted imply, that the present concentrations of extraneous substances in Živný stream downstream from Prachatice have a negative impact onto live organisms.

Keywords: *Salmo trutta m. fario*, Živný stream, WWTP, vitellogenin, EROD, pharmaceuticals