

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE



/rigorózní práce/

EKOTOXIKOLOGICKÝ SCREENING ANTIBIOTIKA AUGMENTIN[®] 625 MG

ECOTOXICOLOGICAL SCREENING OF THE ANTIBIOTIC AUGMENTIN[®] 625 MG

Vedoucí rigorózní práce: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Konzultant: Mgr. Jitka Vytlačilová

Hradec Králové 2009

Mgr. Zuzana Psohlavcová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Zuzana Psohlavcová

Děkuji Mgr. Jitce Vytlačilové za odborné vedení, pomoc se zpracováním výsledků, poskytnutí materiálů a všechny cenné rady a připomínky při psaní mé rigorózní práce.

Obsah	4
1. ÚVOD	6
1.1. Cíl práce	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Amoxicillin	10
2.1.1. Lécivo Augmentin® 625 mg	10
2.1.1.1. <i>Farmakodynamické vlastnosti</i>	10
2.1.1.2. <i>Farmakokinetika</i>	11
2.1.2. Spotřeba antibakteriálních léčiv a amoxicillinu v České republice	13
2.1.2.1. <i>Spotřeba za rok 2007</i>	13
2.1.2.2. <i>Spotřeba za rok 2008</i>	15
2.1.2.3. <i>Spotřeba za roky 2005 – 2008</i>	16
2.1.3. Spotřeba antibakteriálních léčiv a amoxicillinu v nemocnicích Karlovy Vary a Cheb za rok 2007 a 2008	17
2.2. Zkušební organismy	19
2.2.1. <i>Selenastrum capricornutum</i>	19
2.2.2. <i>Tetrahymena pyriformis</i>	23
2.2.3. <i>Thamnocephalus platyurus</i>	26
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1. Testovací organismy	31
3.2. Chemikálie, pomůcky a zařízení	32
3.2.1. Použité chemické látky	32
3.2.2. Pomůcky a přístroje	33
3.3. Provedení experimentu	35
3.3.1. Příprava a provedení experimentu pomocí <i>Selenastrum capricornutum</i> – stanovení akutní inhibice růstu	35
3.3.2. Příprava a provedení experimentu akutní toxicity s <i>Tetrahymena pyriformis</i>	37
3.3.3. Příprava a provedení experimentu pomocí <i>Thamnocephalus platyurus</i> – stanovení inhibice příjmu potravy	39
4. VÝSLEDKY	42
4.1. <i>Selenastrum capricornutum</i>	43
4.1.1. Lécivo Augmentin® 625 mg	43

4.1.2. Standard účinné látky (amoxicillin)	44
4.2. <i>Tetrahymena pyriformis</i>	46
4.2.1. Léčivo Augmentin® 625 mg	46
4.2.2. Standard účinné látky (amoxicillin)	48
4.3. <i>Thamnocephalus platyurus</i> (RAPIDTOXKIT)	50
4.3.1. Léčivo Augmentin® 625 mg	50
4.3.2. Standard účinné látky (amoxicillin)	51
5. DISKUZE	53
6. ZÁVĚR	63
Abstrakt	66
Abstract	67
Použitá literatura	68

1. Úvod

V posledních letech začíná mít odborná veřejnost strach o rovnováhu ve sladkovodním i mořském ekosystému, zejména díky znečišťování chemickými látkami, ke kterým léčiva bezpochyby patří. Tyto chemikálie pak působí jak na živočichy, tak i rostliny. Čistírny odpadních vod nedokážou tyto látky úplně vyfiltrovat, tak je zde na místě, aby se zkoumal jejich efekt na všechny složky potravního řetězce. Obavy vyjadřuje i mnoho autorů:

Sladké vody mohou být ovlivňovány různými nebezpečnými látkami, které se tam dostávají pomocí průmyslových a zemědělských aktivit, výtokem ze skládek odpadů, louhováním a odtokem vody. Odhad kvality vody je velmi důležitý pro provedení monitoringu a programy minimalizace rizik způsobených nebezpečnými látkami ve vodním ekosystému. (Palma, P.; 2009)

Léčiva jsou důležitou a nepostradatelnou součástí moderního života. Nejsou aplikovány pouze v humánní a veterinární medicíně, ale také v zemědělství a akvakultuře a jejich produkce a užívání převyšuje stovky metrických tun ročně. (Nalecz-Jawecki, G.; 2006)

Léčiva a produkty osobní péče (PPCP) jsou skupinou objevujících se nečistot, která v posledních letech přitahuje značnou pozornost. Tyto produkty, stejně jako jejich metabolity a konjugáty, jsou uvolňovány do vodního prostředí buď exkrecí a vylouhováním lidského a zvířecího odpadu, nebo oplachováním našich těl a odtokem špinavé vody. PPCP jsou pak detekovatelné jak v povrchových, pitných a podzemních vodách, čistírnách odpadních vod, stejně tak i v půdách a sedimentech. Potencionální ekologický vliv spojený s PPCP je specifickým problémem vzhledem k jejich kontinuálnímu vstupu do vodního prostředí. (Kim, J. W.; 2009)

Doklad o spotřebě vybrané skupině léčiv, tj. antibiotik, podává kupříkladu Halling-Sørensen (1998), který zjistil jejich užívání v dánské humánní i veterinární medicíně více jak 200 tun ročně. Podle Parka (2008) přibližně 23 tisíc tun antibiotik je vyrobeno každý rok a okolo 40 % se jich užívá jen v zemědělství. Celkové množství veterinárních antibiotik užívaných k terapeutickým účelům a jako přísady do krmiv v Koreji za rok 2005 bylo okolo 1,5 tisíce tun. V České republice bylo za rok 2008 dle MV-AISLP (2009.3) spotřebováno 12,7 milionů balení.

Tato množství udávají pouze jejich spotřebu. Bohužel není možné určit, kolik tun se dostane ve formě parentní látky či jejich metabolitů do volné přírody.

1.1. Cíl práce

Cílem rigorózní práce bylo navázat na moji diplomovou práci (Ekotoxikologický screening vybraného antibiotika), dále provádět ekotoxikologický screening antibiotika (ve formě léčivého přípravku Augmentin® 625 mg a standardu amoxicillinu) a tím rozšířit spektrum testujících organismů.

Jelikož užívání antibakteriálních léčiv pro systémovou terapii v průběhu let neklesá a širokospektrální antibiotikum amoxicillin tvoří nezanedbatelnou část této spotřeby, existuje zde možnost, že dochází ke kumulaci v jednotlivých člancích potravního řetězce. Proto jsem se rozhodla k dalšímu ekotoxikologickému testování dalších organismů trofického řetězce.

Studovala jsem inhibici růstu na vodním producentovi, jednobuněčné zelené řase *Selenastrum capricornutum*, akutní toxicitu na destruentovi, nálevníkově *Tetrahymena pyriformis* a současně jsem provedla rychlý orientační test Rapidtoxkit na konzumentovi, korýši *Thamnocephalus platyurus* pro zjištění potenciální nebezpečnosti látky v životním prostředí.

2. Teoretická část

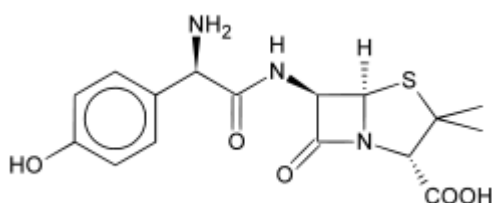
2.1. Amoxicillin

2.1.1. Léčivo Augmentin® 625 mg

2.1.1.1. Farmakodynamické vlastnosti

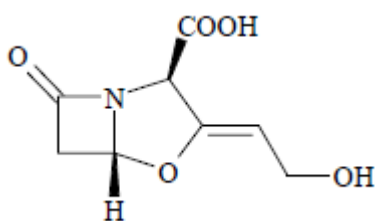
Mikrobiologie

Amoxicillin je polosyntetické antibiotikum s širokou antibakteriální aktivitou proti řadě gram pozitivních i gram negativních mikroorganismů. Amoxicillin však není odolný vůči beta-laktamázám, a proto spektrum samotného amoxicillinu nezahrnuje mikroorganismy, které produkují tyto enzymy. (SPC)



Amoxicillin (dle mezinárodního názvosloví IUPAC: 7-[2-amino-2-(4-hydroxyphenyl)-acetyl]amino-3,3-dimethyl-6-oxo-2-thia-5-azabicyclo[3.2.0]heptane-4-carboxylic acid)
(www.drugbank.ca)

Kyselina klavulanová má beta-laktamovou strukturu podobnou penicilinům. Má schopnost inaktivovat celou řadu beta-laktamáz přítomných v mikroorganismech resistantních vůči penicilinům a cefalosporinům. Působí dobře zejména proti klinicky významným beta-laktamázám produkovaným plasmidy, které jsou často zodpovědné za přenos rezistence proti lékům. Méně účinná je proti beta-laktamáze typu 1 produkované na chromozomech. (SPC)



Kyselina klavulanová (dle mezinárodního názvosloví IUPAC: (2R,5R,Z)-3-(2-hydroxyethylidene)-7-oxo-4-oxa-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid)
(www.drugbank.ca)

Kyselina klavulanová obsažená v Augmentinu chrání amoxicillin před rozkladem beta-laktamázi a významně rozšiřuje antibakteriální spektrum amoxicillinu o mikroorganismy, které jsou normálně vůči amoxicillinu, jiným penicilinům a cefalosporinům resistantní. Augmentin má typické vlastnosti širokospektrého

antibiotika a inhibitoru beta-laktamáz. Augmentin působí baktericidně na celou řadu mikroorganismů:

Gram pozitivní aerobní: *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium* sp., *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia asteroides*, *Staphylococcus aureus*, koaguláza negativní stafylokoky (včetně *Staphylococcus epidermidis*), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* sp., *Streptococcus viridans*.

Gram pozitivní anaerobní: *Clostridium* sp., *Peptococcus* sp., *Peptostreptococcus* sp..

Gram negativní aerobní: *Bordetella pertussis*, *Brucella* sp., *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella* sp., *Legionella* sp., *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*.

Gram negativní anaerobní: *Bacteroides* sp. (včetně *Bacteroides fragilis*), *Fusobacterium* sp..

Ostatní: *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydiae*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Treponema pallidum*. (SPC)

2.1.1.2. Farmakokinetika

Absorpce

Obě složky Augmentinu, amoxicillin i kyselina klavulanová, jsou při fyziologickém pH dobře rozpustné ve vodě. Po perorálním podání se obě složky dobře a rychle vstřebávají. Optimální absorpce je dosaženo, podá-li se Augmentin těsně před jídlem.

Farmakokinetické údaje

Výsledky dvou farmakokinetických studií, kdy byly zdravým dobrovolníkům nalačno podávány tablety 1x denně (a srovnání s podáním každé složky zvlášť), jsou shrnuty v následující tabulce:

Střední hodnoty farmakokinetických parametrů						
	Podaný lék	Dávka (mg)	C _{max} (mg/l)	T _{max} (hodiny)	AUC (mg.hod/l)	T _½ (hodiny)
Amoxicillin	Augmentin 625 mg [®]	500	6,5	1,5	23,2	1,3
	Amoxicillin	500	6,5	1,3	19,5	1,1
Kyselina klavulanová	Augmentin 625 mg [®]	125	2,8	1,3	7,3	0,8
	Kyselina klavulanová	125	3,4	0,9	7,8	0,7

Sérové koncentrace amoxicillinu dosažené po podání Augmentinu jsou srovnatelné s koncentracemi, které nacházíme po perorálním podání ekvivalentního množství samotného amoxicillinu. (SPC)

Distribuce

Po nitrožilním podání se dají terapeutické koncentrace amoxicillinu i kyseliny klavulanové detekovat ve tkáních a intersticiální tekutině. Terapeutické koncentrace přípravku byly nalezeny ve žlučníku, břišní tkáni, kůži, tukové a svalové tkáni a v synoviální a peritoneální tekutině, ve žluči a hnisu.

Amoxicillin i kyselina klavulanová se váží slabě na plasmatické bílkoviny. Studie ukazují, že asi 25 % kyseliny klavulanové a 18 % amoxicillinu z celkového množství v plasmě se váže na bílkoviny. Studie prováděné na zvířatech neprokázaly kumulaci ani jedné složky v orgánech.

Amoxicillin se dá jako většina penicilinů detekovat v mateřském mléce. Stejně tak se v mateřském mléce dají detekovat stopová množství kyseliny klavulanové. Užívání Augmentinu při kojení nevyvolává u kojence žádné nežádoucí účinky kromě rizika sensibilisace spojeného s uvedeným vylučováním antibiotik do mateřského mléka. Reprodukční studie prováděné na zvířatech prokázaly, že amoxicillin i kyselina klavulanová procházejí placentární bariérou. Nebyl však zjištěn žádný případ poruchy plodnosti nebo poškození plodu. (SPC)

V maďarské studii zahrnující 6 935 kojenců nebyla zjištěna žádná souvislost mezi užíváním Augmentinu v druhém a třetím měsíci těhotenství s vrozenými vadami. (Czeizel, A. E.; 2001) V jiné randomizované studii s 4 826 těhotnými ženami byla pozorována souvislost mezi užíváním amoxicillinu s kyselinou klavulanovou ve třetím trimestru a výskytem nekrotizující enterokolitidy u novorozenců. (Kenyon, S.; 2001, 2002)

Vylučování

Amoxicillin se vylučuje, stejně jako ostatní peniciliny, převážně ledvinami, zatímco klavulanát se vylučuje ledvinami i mimoledvinovou cestou. Asi 60 – 70 % amoxicillinu a asi 40 – 65 % kyseliny klavulanové se vyloučí v nezměněné formě močí během prvních 6 hodin po podání jedné tablety 625 mg.

10 – 25 % podaného amoxicillinu se vyloučí močí ve formě inaktivní kyseliny penicilové. Kyselina klavulanová se u člověka intenzivně metabolizuje na 2,5-dihydro-4-(2-hydroxyethyl)-5-oxo-1H-pyrol-3-karboxylovou kyselinu, 1-amino-4-hydroxybutan-2-on a oxid uhličitý, které se vylučují močí, stolicí a plicní ventilací. (SPC)

2.1.2. Spotřeba antibakteriálních léčiv a amoxicillinu v České republice

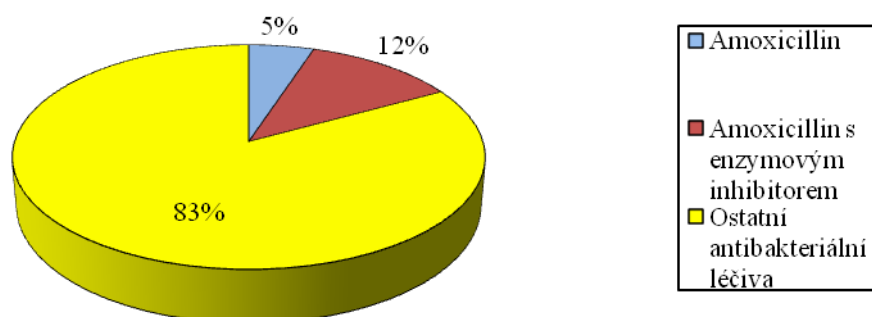
2.1.2.1. Spotřeba za rok 2007

Spotřeba antibakteriálních léčiv pro systémovou terapii v roce 2007 byla 12 021 610 balení za průměrnou cenu 2 547 724 141 Kč, což odpovídalo 72 635 122 spotřebovaných definovaných denních dávek (DDD), tj. 19,3445 spotřebovaných definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den (DDD/t.o./d).

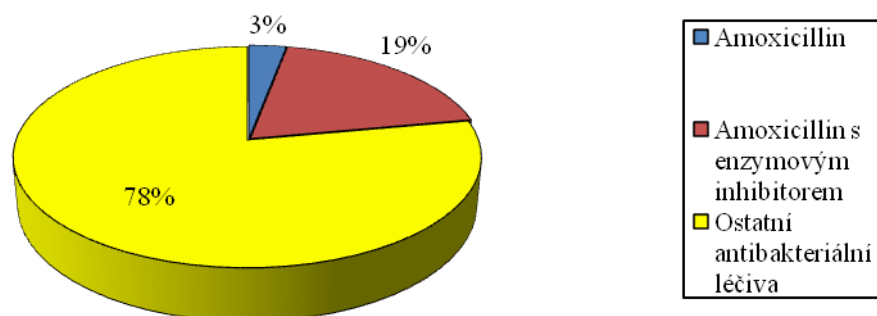
Na amoxicillin z toho připadalo 612 248 balení za průměrnou cenu 76 219 572 Kč, což odpovídalo 7 594 300 DDD, tj. 2,0225 DDD/t.o./d.

Na amoxicillin s enzymovým inhibitorem připadalo 1 432 516 balení za průměrnou cenu 486 770 242 Kč, což odpovídalo 14 496 698 DDD, tj. 3,8608 DDD/t.o./d. (MV AISLP; 2008.3)

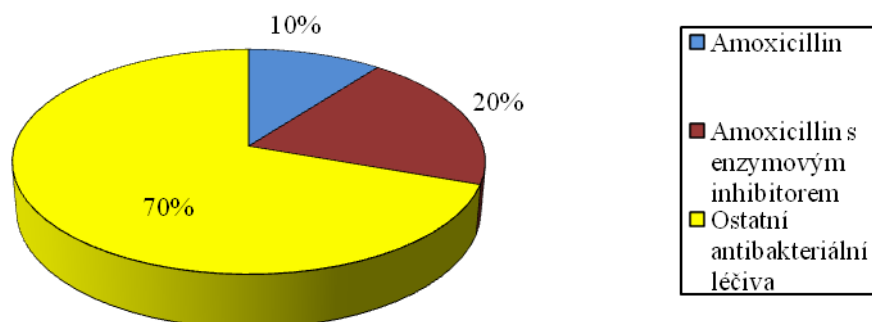
Podíl spotřebovaných balení za rok 2007



Podíl z průměrných cen za rok 2007 (v Kč)



Podíl spotřebovaných DDD za rok 2007

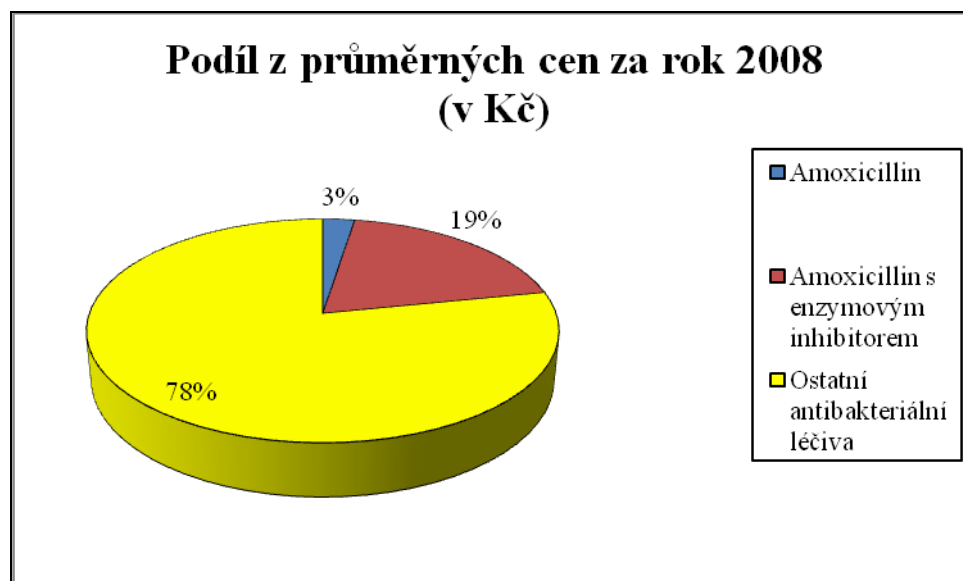
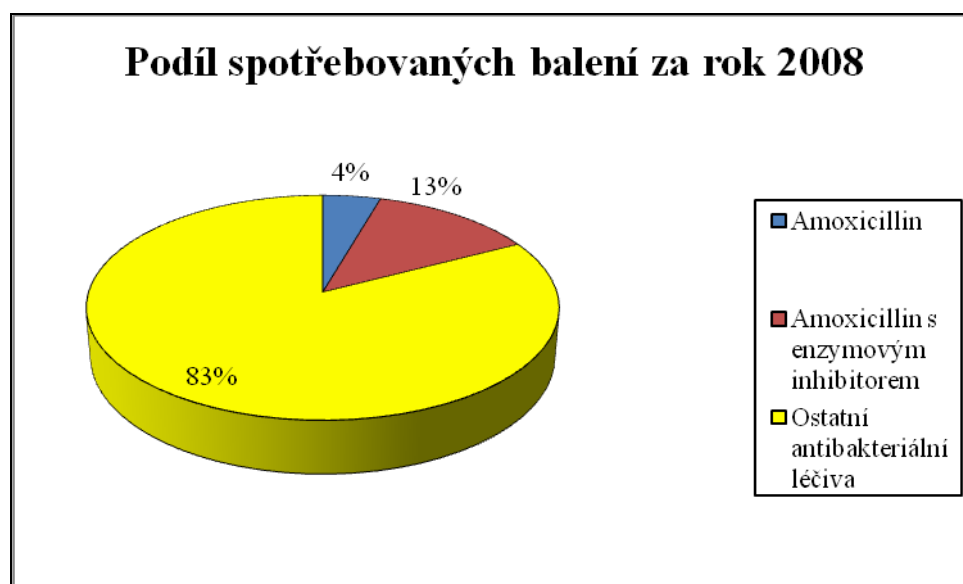


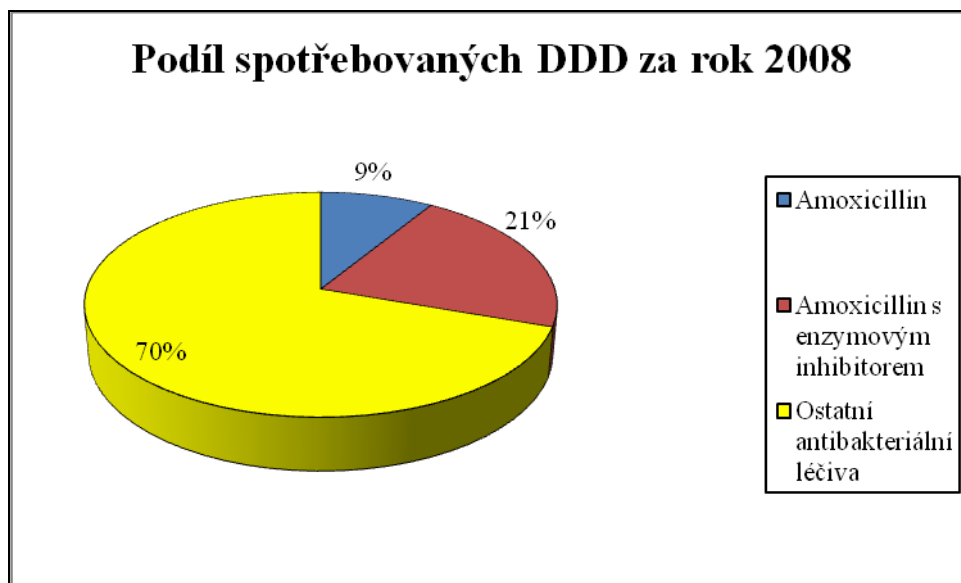
2.1.2.2. Spotřeba za rok 2008

Spotřeba antibakteriálních léčiv pro systémovou terapii v roce 2008 byla 12 050 226 balení za průměrnou cenu 2 749 755 966 Kč, což odpovídalo 74 012 422 spotřebovaných definovaných denních dávek (DDD), tj. 19,5329 spotřebovaných definovaných denních dávek na tisíc obyvatel a den (DDD/t.o./d).

Na amoxicillin z toho připadalo 544 166 balení za průměrnou cenu 69 515 169 Kč, což odpovídalo 6 532 861 DDD, tj. 1,7241 DDD/t.o./d.

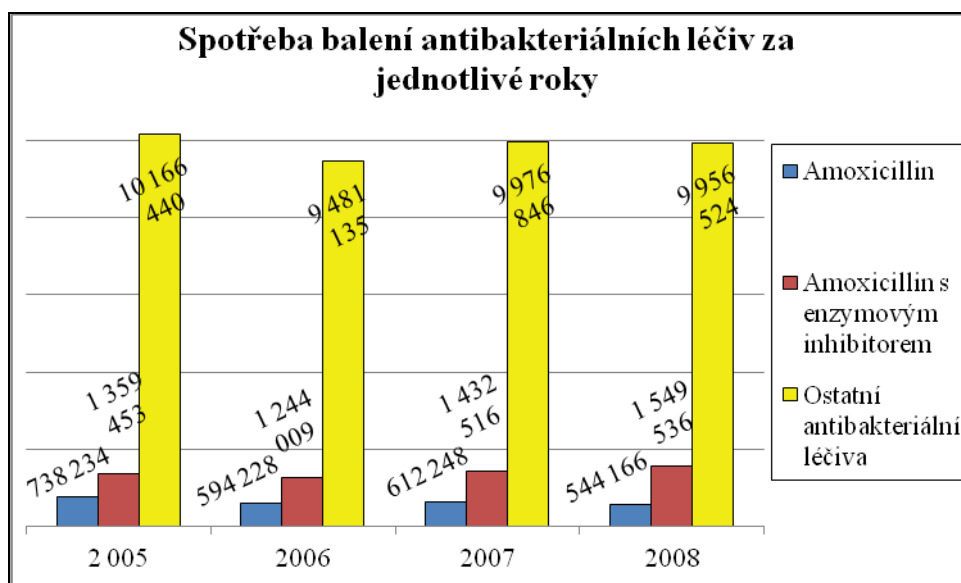
Na amoxicillin s enzymovým inhibítorem připadalo 1 549 536 balení za průměrnou cenu 530 817 992 Kč, což odpovídalo 15 913 048 DDD, tj. 4,1996 DDD/t.o./d. (MV AISLP; 2009.2)





2.1.2.3. Spotřeba za roky 2005 - 2008

Na základě dat získaných z diplomové práce (DP; 2008) a MV-AISLP (verze 2008.3 a 2009.2) mohlo dojít k porovnání hodnot:

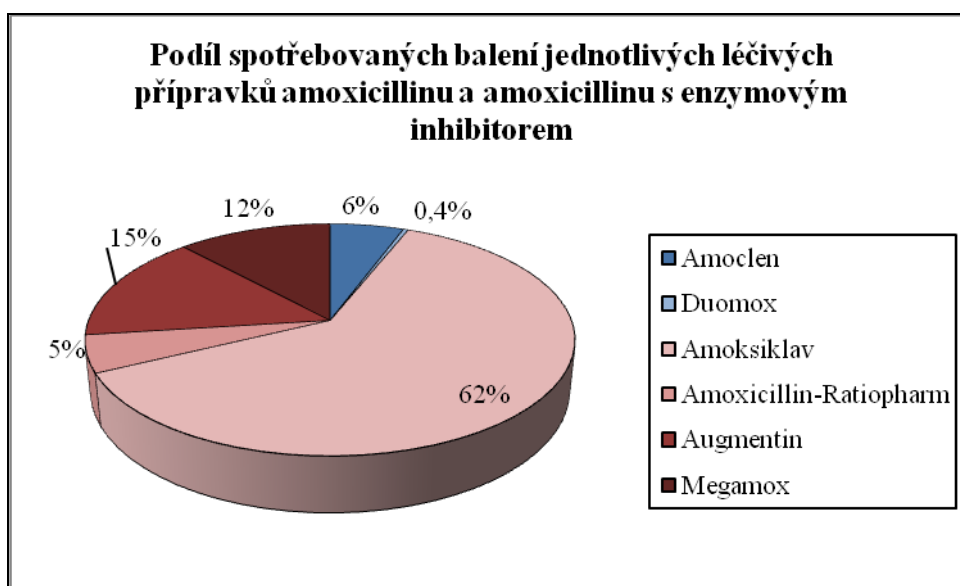
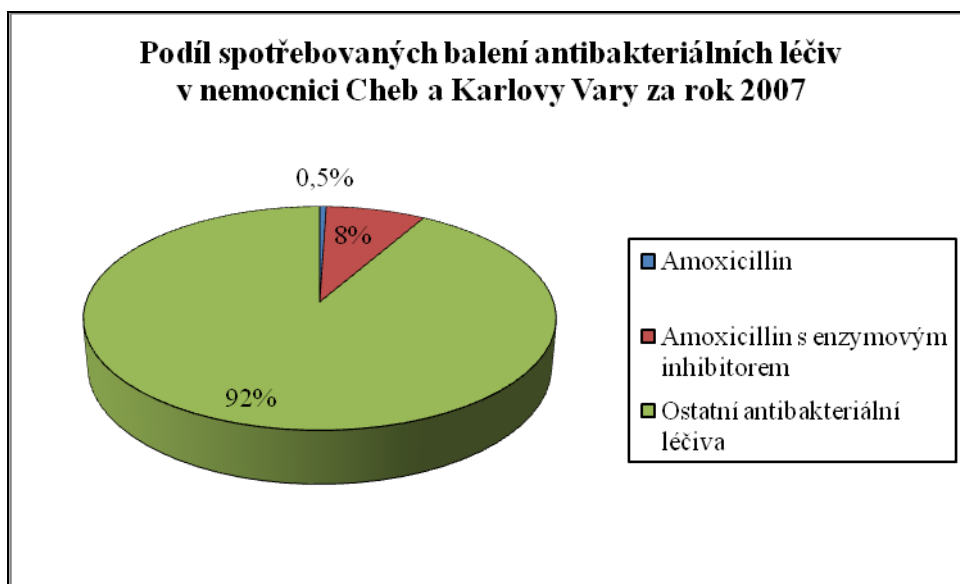


Pozn.: Data uvádějí počet spotřebovaných balení.

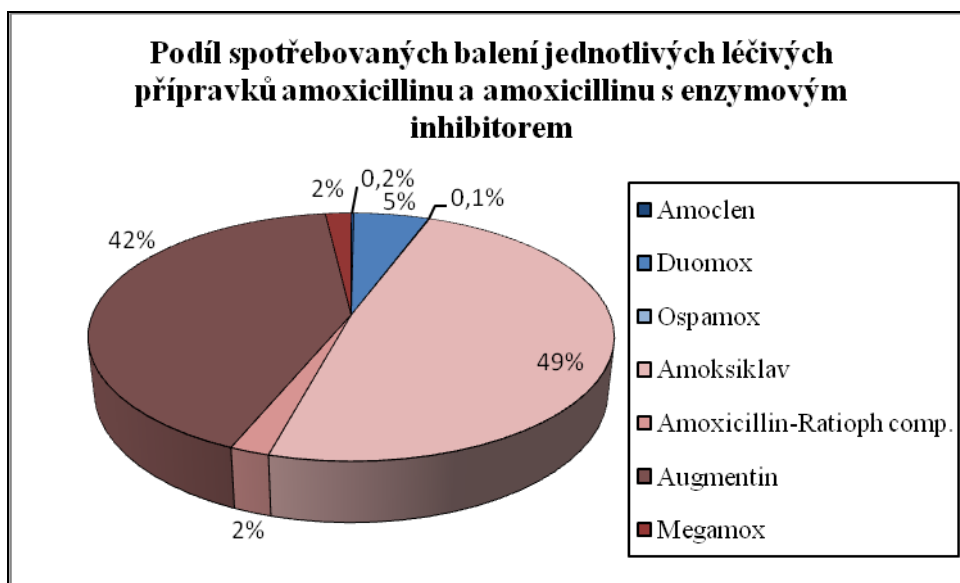
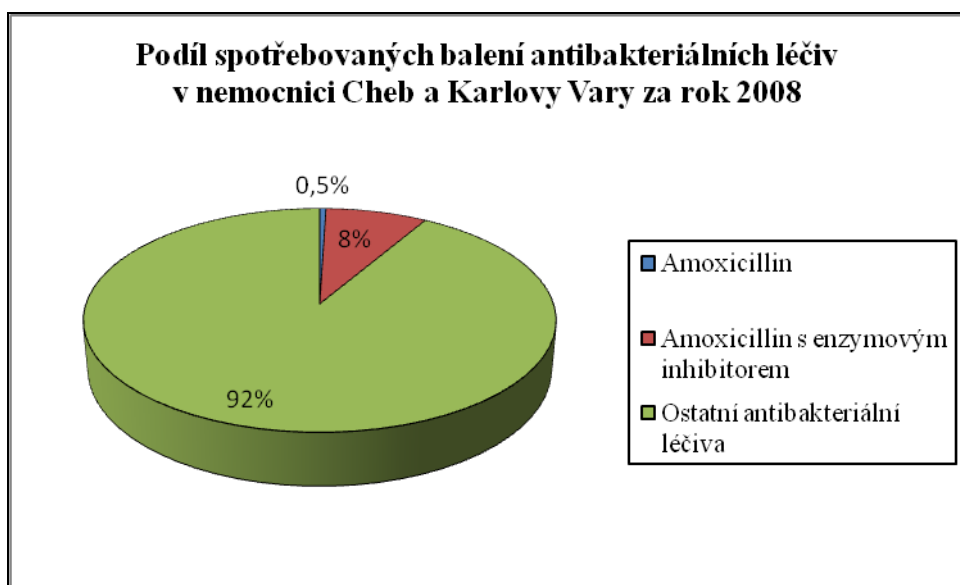
2.1.3. Spotřeba antibakteriálních léčiv a amoxicillinu v nemocnicích Karlovy Vary a Cheb za rok 2007 a 2008

Nemocnice v Karlových Varech a Chebu, které patří pod Karlovarskou krajskou nemocnici a.s., jsou důležitými centry pro poskytování zdravotnické péče v Karlovarském kraji. Se svými 600 a 340 lůžky jsou velkými spotřebiteli nejen v oblasti antibakteriálních léčiv.

Spotřeba antibakteriálních léčiv pro systémovou terapii za rok 2007 v těchto nemocnicích činila 35 145,4 balení, z toho na amoxicillin připadlo 179 balení a na amoxicillin s enzymovým inhibitorem 2 758 balení. (Mediox – verze 1.9.0)



Spotřeba antibakteriálních léčiv pro systémovou terapii za rok 2008 pak byla 42 483,9 balení, z toho na amoxicillin připadlo 208 balení a na amoxicillin s enzymovým inhibitorem 3 403 balení. (Mediox)



2.2. Zkušební organismy

2.2.1. Selenastrum capricornutum

Taxonomické zařazení

Algae (Řasy)

Řasy jsou většinou mikroskopicky pozorovatelné nižší rostliny, které řadíme z hlediska charakteru buňky mezi organismy eukaryotické (jádro s jadernou membránou). Jejich tělo tvoří stélka. Řasy žijí převážně ve vodním prostředí, kde tvoří autotrofní složku společenstva. Jejich výskyt je dán charakterem biotopu a ročního období (sezónní dynamika druhů). Z hlediska obývaného biotopu stojatých a tekoucích vod lze rozlišit řasy fytoplanktonní (osidlují volnou vodu, vznášejí se pasivně nebo se pohybují pomocí bičíků a brv), perifytonní (tvoří nárosty na ponořených rostlinách, kamenech a jiných substrátech) a bentické (obývající dno). (Říhová Ambrožová, J.; 2008)

Zástupci jednotlivých oddělení se liší submikroskopickou stavbou buněk, složením fotosyntetických barviv a typem zásobních látek. Paralelní vývoj stélek v průběhu evoluce způsobuje jejich typové prolínání ve všech odděleních. (Hrdina, V.; 2004)

Kmen: *Chlorophyta (Zelené řasy)*

Základním charakteristickým znakem celé skupiny je výrazné zelené zbarvení, způsobené přítomností asimilačních pigmentů ve skladbě: chlorofyl a a b, α a β -karoteny a xantofyly (lutein, neoxantin, violaxantin a zeaxantin, u *Ulvophyceae* navíc sifonein a sifonoxantin). (Říhová Ambrožová, J.; 2008) Poměr chlorofylů a i b a α - a β -karotenů je stejný jako u vyšších rostlin. Karotenoidy občas překryjí ostatní barviva jako sluneční filtr. (www.sinicearasy.cz)

Chloroplast má dvě obalné membrány a 2 - 6 thylakoidů v jedné lamele. Je bez spojení s buněčným jádrem. Ve většině případů je vyvinut pyrenoid – bílkovinné tělíčko obsahující RUBISCO - 1,5-ribulózobifosfát karboxylázy (funkce tohoto enzymu je vázat oxid uhličitý v temnostní fázi fotosyntézy). Na povrchu pyrenoidu je většinou škrob. V chloroplastu se nevyskytují grana, jaká známe u vyšších rostlin. Zásobní látkou je především škrob, který se shromažďuje v chloroplastech nebo na pyrenoidu. Jako

doplňkové zásobní látky se vyskytují mono- a disacharidy a jejich deriváty (alkoholy aj.) a polyfosfátová zrna (volutin). Některé skupiny mají ještě nějaké další specifické zásobní látky (např. *Ulvophyceae* mannan a xylan). (www.sinicearasy.cz)

Rozdělení zelených řas do jednotlivých taxonomických tříd je dáno postavením bičíků, průběhem mitózy a charakterem buněčné stěny. (Říhová Ambrožová, J.; 2008)

Zelené řasy jsou velice široká skupina. Její příslušníci mají všechny druhy stélek, jen rhizopodiální typ se vyskytuje pouze jako gameta u Zygnematales. Odvozenější skupiny zelených řas mají většinou i komplikovanější typ stélky.

Celá skupina je natolik rozsáhlá a rozmanitá, že sice existují některé typy rozmnožování, které se dají označit jako obecné, ale skoro každá ze skupin má výrazná specifika.

- Nepohlavní rozmnožování: - bičíkovci se nepohlavně rozmnožují schizotomií, jednobuněční se rozmnožují sporulací, tzv. cytogonií. Typy žijící v coenobiích se rozmnožují dceřinými coenobii, vláknité typy se vegetativně dělí tzv. cytotomií.
- Pohlavní rozmnožování: – obecně izo-, anizo- i oogamie, s řadou různých variant a specifik.

Mají několik typů průběhu mitózy: Nejprimitivnější je uzavřená vnitrojaderná pleuromitóza. Většina zelených řas má ortomitózu. (www.sinicearasy.cz)

Třída: *Chlorophyceae* (*Zelenivky*)

Zelenivky jsou řasy s jednobuněčnou nebo mnohobuněčnou stélkou. Žijí jednotlivě nebo v koloniích nebo cenobiích. Vegetativní buňky zelenivek jsou jednojaderné, zpravidla s jedním chloroplastem. (Leifertová, I.; 1990)

Druhově bohatá třída zelenivek obsahuje volně žijící bičíkovce, jednobuněčné kapsální (gleomorfní) a kokální řasy.

Značnou část buňky zelenivek zaujímá chloroplast. Obsahuje tylakoidy sdružené v lamely. U většiny druhů je pouze jeden chloroplast, který často obsahuje jeden nebo několik pyrenoidů. Vlastní tělísko (matrix) pyrenoidu je kulovité nebo oválné. Na povrchu pyrenoidu bývají uložena zrna škrobu a další pak jsou uložena porůznu v chloroplastu. Další strukturou chloroplastu bývá červené stigma. Obsahuje beta-

karoten a větší množství proteinů. Barva chloroplastů je zelená, při nedostatku živin (zejména dusíkatých) buňky zastavují dělení a žloutnou.

Buněčné stěny velké skupiny kokálních zelených řas jsou polysacharidové s chemicky rezistentní povrchovou vrstvou, zpravidla nazývanou sporoloprotein. Volně žijící bičíkovci rodu *Dunaliella* nemají pevnou buněčnou stěnu, jejich povrch pokrývá pouze plasmatická membrána. U řádů Chlamydomonadales a Volvocales se buněčná stěna nazývá chlamys. Je pevná a pružná, u plně vyvinutých buněk může být vícevrstevnatá. Její důležitou složkou je aminokyselina hydroxyprolin, na rozdíl od dalších řádů je tato stěna glykoproteinová.

Jádro je kulovité, s jadérkem, obklopené diktyozomy a mitochondriemi. V buňce bývá jediné jádro. (Kalina, T.; 2005)

Dělení je uzavřená nebo částečně otevřená ortomitóza, při níž se vytváří fykoplást. Z endoplazmatického retikula vzniká tzv. septum, které odděluje dceřiné protoplasty.

Nepohlavní rozmnožování probíhá pomocí nahých zoospor s CW a DO pozicí bázi bičíků, některá typy se rozmnožují rovněž autosporami. Pohlavní rozmnožování - izogamie a anizogamie, vzácně oogamie (řád *Oedogoniales*). (www.sinicearasy.cz)

Nepříznivé podmínky přetrvávají zelenivky v podobě akinet (tlustostěnné nepohyblivé buňky). (Leifertová, I.; 1990)

Třída obsahuje asi 500 rodů a 3 000 druhů. (Kalina, T.; 2005) Vzhledem k obrovské šíři skupiny nemají *Chlorophyceae* společnou ekologii, snad jen to, že velká většina zástupců jsou sladkovodní typy, ale zahrnuje také značné množství zástupců půdních, aerických a extrémofilních. (www.sinicearasy.cz)

Řád: ***Chlorococcales***

Heterogenní skupina převážně sladkovodních řas, obsahující velký počet rodů. Klasifikace a taxonomie jednotlivých rodů je neustálená. (Kalina, T.; 2005)

Tento řád obsahuje mononukleární druhy s kokální stélkou. Dle rozmnožování se dají rozdělit na zoosporinní, autosporinní a coenobiální typy. (www.sinicearasy.cz)

Tyto řasy bývají dominující složkou mikrobioty našich vod a půdy. Chlorokokální řasy se snadno pěstují v kulturách jako předpokládaný zdroj bílkovin pro výživu a izolaci účinných látek. (Leifertová, I.; 1990)

Rod: *Selenastrum*

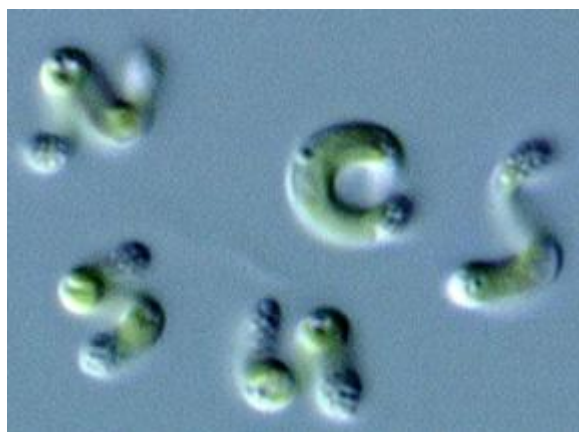
Rod *Selenastrum* má měsíčkovitě nebo srpovitě buňky, které jsou delší než širší a silně zakřivené nebo zamotané. Může tvořit nemucilagenní kolonie z klastrů, skládající se ze 4, 8 a 16 buněk, které nejsou propleteny a místo toho se dotýkají vypouklými stranami. (silicasecchidisk.conncoll.edu)

Dominuje v letním a podzimním fytoplanktonu stojatých vod, kde je často s jinými druhy hlavním primárním producentem. (Kalina, T.; 2005) Patří mezi autosporinní typy. Buňky jsou rohlíčkovité, bez pyrenoidu, uložené ve slizu. (www.sinicearasy.cz)

Druh: *Selenastrum capricornutum* **Prinz** (syn. *Ankistrodesmus subcapitata*, *Kirchneriella subcapitata*, *Pseudokirchneriella subcapitata*) (www.fritschalgae.info/index.html)

Selenastrum capricornutum je nejčastěji užívaný biomonitor ke zhodnocení různých úrovní živin a toxinů ve sladkovodním prostředí. (silicasecchidisk.conncoll.edu)

Selenastrum capricornutum je běžně užívaná ve standardních řasových testech toxicity (ISO 1989) jako modelový organismus pro sladkovodní řasy. (Holten Lützhøft, H. H.; 1999)



Selenastrum capricornutum (foto: silicasecchidisk.conncoll.edu)

2.2.2. Tetrahymena pyriformis

Říše: *Chromalveolata*

Říše obsahuje čtyři hlavní skupiny s mixotrofní výživou.

Druhy, které obsahují chloroplasty, vznikly sekundární endosymbiózou, kdy eukaryotní buňka pohltila jinou eukaryotní buňku, která již obsahovala plastid získaný primární endosymbiózou. Jejich chloroplasty vždy obsahují chlorofyly c. Nefotosyntetické skupiny řazené mezi Stramenopila ztratily chloroplasty až druhotně. Další skupina zahrnuje původce toxoplasmózy, kryptosporidiózy, kokcidiózy a malárie. (Kalina, T.; 2005)

Podříše: *Alveolata*

Mají pod svou cytoplazmatickou membránou ploché vakuoly, zvané kortikální alveoly. Tyto struktury, tvořené celulózou nebo jinými látkami, jsou ohraničené jednou membránou a společně tvoří tzv. pelikulu, zajišťující buňce tuhost a pružnost. (Volf, P.; 2007)

Jsou zde zařazeny jednobuněčné organismy s nejsložitější stavbou buňky: obrněnky (*Dinozoa*, *Dinoflagellata*, *Dinophyta*), výtrusovci (*Sporozoa*) a nálevníci (*Ciliophora*). Uvedené skupiny mají vývojové vztahy s říší hub a říší živočichů. Fotoautotrofní druhy jsou pouze mezi obrněnkami. (Kalina, T.; 2005)

Kmen: *Ciliophora*

Ciliophora získali své jméno na základě metody lokomoce: plavou pomocí cilií. Cilie jsou krátké, vlasům podobné výběžky cytoplazmy složené z mikrotubulů obklopených buněčnou membránou. Cilie mohou přivádět potravu.

Jsou to mnohjaderné organismy.

Mohou se rozmnožovat pohlavně i nepohlavně. Nejčastějším způsobem asexuální reprodukce je dělení. Do genetické výměny během sexuální reprodukce se zapojuje mikronukleus, přičemž po konjugaci a následném dělení vzniknou čtyři identické organismy.

Ciliophora jsou převážně sladkovodní organismy a mají často vztah k bakteriím, které pro ně mohou i nemusí být škodlivé. (microbewiki.kenyon.edu/index.php/Ciliophora)

Třída: *Ciliata (Nálevníci)*

Nálevníci jsou vývojově nejpokročilejší skupinou prvoků. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 10 µm až 4 500 µm. Tvar těla je většinou oválný. Brvy jsou rozmístěny po celém povrchu těla nebo jen na některých částech v pravidelných řadách. K příjmu potravy slouží cytostoma, které je umístěno na povrchu těla, v prohlubni (atrium), v dutině (vestibulum) či v ústní dutině vybavené vysoce specializovanými skupinami brv. Existuje i předústní prohlubeň. U některých druhů je ústní dutina na předním konci rozevřena v tzv. příústní pole, tj. peristom. Kromě peristomu se vyskytuje nálevkovitý útvar, tj. infundibulum. Cytostoma je umístěno terminálně, tj. na konci těla anebo na břišní, tj. ventrální straně.

Povrchová vrstva buňky, tzv. cortex, má složitou stavbu. Svrchní vrstva kortexu, pelikula, má různý povrchový reliéf, popř. je změněna v tuhý krunýř. Hlubší vrstvou kortexu je infraciliatura, která obsahuje kinetosomy, tj. bazální tělíška řasinek a systém fibril a mikrotubulů (kinetosomy bez řasinek - buňky jsou neobrvené).

Řada kinetosomů a jejich řasinek tvoří tzv. kinetu. Kinety jsou významnou složkou ústního ústrojí, obrvení úst je hlavním vodičkem pro determinaci. Podélné tělní kinety vedoucí od předního pólu buňky k zadnímu se nazývají meridiány (taxonomický znak). Řasinky se vyskytují nejen v řadách, ale i jednotlivě jako tzv. skákací pružné štětiny. Speciálním případem je vznik cir, které vznikly spojením řasinek (skupina *Hypotrichida*). Dle umístění cir na těle nálevníka se rozlišují ciry frontální - na předním konci; ventrální - na břišní straně; marginální - dvě řady po stranách; transverzální - příčně uložená skupina silných cir v zadní části těla; ocasní - na konci těla.

Typickým znakem nálevníků je přítomnost dvou typů jader. Mikronukleus je diploidní a má prvořadou úlohu při pohlavním rozmnožování. Je malý, kulovitý a zaživa nepozorovatelný. Makronukleus (u primitivních druhů diploidní) bývá spíše zmnožený a řídí procesy v buňce. Je větší a různého tvaru.

Nálevníci tvoří důležitou složku potravních řetězců, jsou indikátory znečištění vody, podílejí se na samočisticích pochodech ve vodním prostředí. (Říhová Ambrožová, J.; 2008)

Nadřád: *Oligohymenophorea (Chudoblanní)*

Zástupci nadřádu nálevníků *Oligohymenophora* mají skutečnou ústní dutinu, která může být druhotně otevřena a tvoří peristom či se zužuje v infundibulum. K obrvení

ústního ústrojí patří řada bočně spojených řasinek tvořící blanitý útvar, tzv. parorální membránu, která přesahuje obrys těla. (Infraciliárním základem parorální membrány je haplokineta, tj. řada střídavě vpravo a vlevo postavených kinetosomů, pouze vnější jsou obrvené. V ústní dutině jsou další útvary, např. adorální zóna membranel, jejichž základem je polykineta, tj. více souběžně probíhajících řad hustě sestavených kinetosomů.) Potravu si přivířují. U řádu *Peritrichida* se vyskytuje žláznaté zařízení, produkující stvol, kterým nálevníci přisedávají k podkladu. U některých rodů může obsahovat stažitelné svalové vlákno, tj. myonema, umožňující rychlé stažení. Zástupci této skupiny mohou žít i v koloniích, jedinci v kolonii se označují jako zoidy. (Říhová Ambrožová, J.; 2008)

Řád: *Hymenostomatida*

Střední až velké formy, 50 až 250 μm , bez ocasních štětín, nápadné ústní ústrojí. Lokomoční pás chybí a tělo mají pokryté meridiány. (Říhová Ambrožová, J.; 2008)

Rod: *Tetrahymena* (*Hruštička*)

Tělo mají hruškovité až vejčité, vpředu zašpičatělé. Před ústní dutinou jsou tělní kinety odděleny předústním švem. V ústní dutině jsou tři membranely, na břišní straně 1 – 2 postorální kinety. (Říhová Ambrožová, J.; 2008)

Druh: *Tetrahymena pyriformis* Ehrenberg

Tělo má ovoidní a uniformně obrvené, ústa přibližně trojúhelníková. Kulatý makronukleus je situován uprostřed a je obvykle doprovázen 1 mikronukleem a kontraktilní vakuola je blízko zadní části. (www.nies.go.jp) Makronukelus prvoka *Tetrahymena pyriformis* obsahuje 12–14krát více DNA než mikronukleus a prakticky reprezentuje kompletní obsah DNA buňky. Makro- a mikronukleus dávají silně pozitivní fytochemickou reakci DNA. (Stefanidou, M. a kol.; 2001)

Tetrahymena je členem heterotrofní volně žijící mikrofauny vodního ekosystému, která zaobírá první trofickou úroveň. S ostatními nálevníky hraje klíčovou roli v přenosu energie uvnitř mikrobiální smyčky a je indikátorem včasného varování při znečištění.

Je to pravá eukaryotická buňka, která může být snadno kultivovaná s krátkým generickým časem v definovaném médiu. V mnoha studiích se tento organismus použil

jako alternativní buněčný model pro *in vitro* toxikologické testování různých chemikálií včetně pesticidů, těžkých kovů, léčiv a organických sloučenin. (Bonnet, J. - L., a kol.; 2007)

Prvok *Tetrahymena pyriformis* je vhodným experimentálním modelem pro funkční, farmakologické, toxikologické nebo imunotoxické studie. (Stefanidou, M. a kol.; 2001)

Tetrahymena pyriformis je jeden z nejběžněji používaných obrvených prvoků pro laboratorní výzkumy. (Sauvant, M. P. a kol.; 1999)



Tetrahymena pyriformis (foto: www.nies.go.jp)

2.2.3. *Thamnocephalus platyurus*

Kmen: *Arthropoda* (**Členovci**)

Kmen členovci je nejpočetnější skupina organismů s vysokým stupněm tělesné organizace. Tělo je složeno z několika segmentů, článkované jsou rovněž končetiny, kryté chitinem. (Říhová Ambrožová, J.; 2008)

Podkmen: *Crustacea* (**Korýši**)

Zahrnují milimetrové až několik desítek centimetrů velké, převážně vodní členovce. Tělo i končetiny mají článkované. Počet článků je proměnlivý (10 – 50).

Jsou to převážně vodní členovci, velmi málo druhů je suchozemských, ale i tyto preferují vysokou vzdušnou vlhkost. Článkované tělo je členěno na oddíly (tagmata): hlava, hrud' a zadeček. Často dochází ke srůstu několika hrudních článků s hlavovým oddílem za vzniku hlavohrudí. U starobylých forem je členění těla na hlavu a trup

(truncus). Tělo je kryté kutikulou, která může být silně inkrustována uhličitánem vápenatým a vytvářet tak krunýř.

Končetiny jsou buď jednovětevné a slouží pak obvykle k lezení nebo jsou rozeklané, dvouvětevné (birámní) – ty slouží většinou k plavání, přihánění a filtraci potravy, dýchání aj.

Hlava je zakončena akronem (první tělní článek, který je bez končetin) a dalšími pěti články nesoucí orgány končetinového původu: antenuly a anteny (tykadla prvního a druhého páru), mandibuly (kusadla) a dva páry maxil (čelistí). Hrud' je z různého počtu článků, končetiny na prvních třech článcích jsou často modifikovány v maxilipedy (čelistní nožky). Ostatní hrudní končetiny mají běžně pohybovou funkci, mohou také sloužit k dýchání, filtraci potravy nebo k rozmnožování. Poslední tělní článek je bez končetin a bývá v něm řitní otvor.

Trávicí soustava je trubicovitá, různě diferencovaná. Dýchacími orgány jsou žábry ve formě epipoditových přívěsků na končetinách. Cévní soustava je otevřená s dominující dorzální cévou. Vylučovacími orgány jsou modifikovaná metanefridia buď u báze druhého páru čelistí – maxilární žlázy, nebo u druhého páru tykadel – antenální žlázy. Nervová soustava je u nižších tříd korýšů tvořena párovitými ganglii v jednotlivých tělních článcích těla, přičemž první je největší. U rakovců dochází ke splývání ganglií v hlavě s vytvořením mozkového ganglia děleného na tři části. Jako smyslové orgány mohou být vytvořeny různé mechanoreceptory umístěné nejčastěji na tykadlech. (Sedlák, E.; 2003) Dýchají žábrami. (Říhová Ambrožová, J.; 2008)

Korýši jsou většinou gonochoristi, někdy je přítomna parthenogenese. Pohlavní žlázy jsou párovité a mají párovité vývody. U nižších tříd je výrazný pohlavní dimorfismus – samci bývají menší. Vývoj je přímý nebo přes larvální stádium. Typů larev je mnoho, ale základními typy jsou nauplius a zoea. (Sedlák, E.; 2003)

Korýši jsou vázáni na vodu nebo alespoň na vlhké prostředí. Většina z nich žije v mořích. Objevují se ve všech hloubkách. Většinou žijí benticky, někteří se přizpůsobili planktonickému nebo nektonnímu způsobu života. Mnozí korýši jsou filtrátoři, někteří jsou dravci nebo paraziti.

Třída: ***Brachiopoda (Lupenonožci)***

Tato třída se skládá z čtyř žijících skupin: *Anostraca*, *Notostraca*, *Cladocera* a *Conchostraca* a dvou fosilních.

S více jak 800 popsánymi druhy, je obtížné zevšeobecňovat tuto skupinu. Většina jich žije v sladkých či brakických vodách a jen málo jich je mořských. Vajíčka jsou schopna po dlouhou dobu přežívat v období sucha a při styku s vodou se líhnou, čehož se využívá v baleních dodávaných do zverimexů jako krmivo pro akvariijní zvířata.

Hruď a břicho jsou u většiny spojené nebo nerozeznatelné. Jejich přívěsky jsou obvykle lupenonožky, přičemž některé skupiny mají těchto přívěsků více než ostatní. Mají kombinaci párových složených oček a/nebo jednoduchého středového oka.

Mnozí jsou schopni partenogeneze, ale někteří používají jiné strategie rozmnožování.

Tito živočichové přijímají potravu mnoha cestami. Jedni se krmí suspenzí, tvořenou buď pohyblivými organickými částicemi, nebo jimi rozvířeným sedimentem. Další seškrabují organický povlak ze zrněk písku a skal. Malá část loví menší živočichy. (www.ucmp.berkeley.edu)

Řád: *Anostraca* (**Žábronožky**)

Anostraca mají tělo dlouze protáhlé a ze stran smáčknuté. Tělo je tvořeno hlavou, 11 hrudními články a 9 zadečkovými články s furkou (ploutvovité lupínky). Hrudní končetiny nesou po 1 páru listovitých nožek, antenuly jsou bičíkovité. (Říhová Ambrožová, J.; 2008)

Čeleď: *Thamnocephalidae*

Tato čeleď obsahuje šest rodů: *Branchinella*, *Branchinellites*, *Dendrocephalus*, *Gurneya*, *Simplicephalus* a *Thamnocephalus*. Některé druhy jsou běžné, ale většina má zřejmě omezené rozšíření (Timms, B. V.; 2004)

Od ostatních žábronožek se liší telsonem redukovaným a nejasným od koncového abdominálního segmentu. Samcům chybí frontální přívěsky, mají penes s rigidní bází a apikálními trny. Samičky mají trny na labru. (Williams, W. D.; 1980)

Rod: *Thamnocephalus*

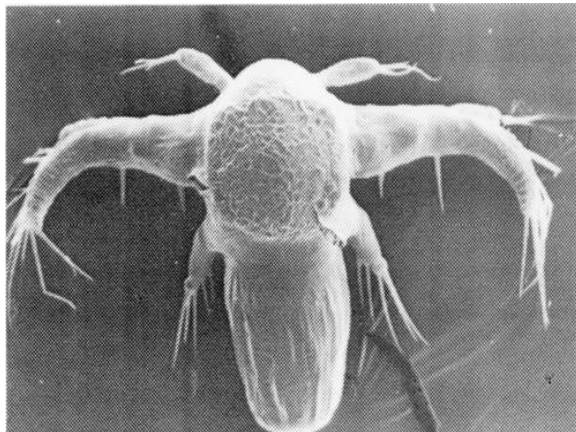
Druh: *Thamnocephalus platyurus* Packard, 1877

Barva fylopodií je silně variabilní, liší se od místa k místu a od jednoho životního stádia k jinému. Jejich barva sahá od průsvitné k šedé, modré, zelené, oranžové až k načervenalé, pravděpodobně řízené typem strávené potravy. (Maeda-Martínez, A. M.; 1995)

Thamnocephalus platyurus se více než 10 let používá v různých ekotoxikologických studiích jako ekonomičtější varianta k jiným testům s koryši. (Nalecz- Jawecki, G.; 2006)

T. platyurus by měl být vedle *Vibrio fisheri* užíván v akutních testech pro ekotoxikologický monitorovací program vodních nádrží. (Palma, P.; 2009)

Tento organismus obsadil různé úrovně vodního ekosystému a je dobrým modelem pro předpověď toxicity polutantů v ekosystémech. V porovnání s *Daphnia magna* je značně citlivější k mnoha chemikáliím. (Kim, J. W.; 2009)



Thamnocephalus platyurus (foto: www.microbiotests.be)

3. Experimentální část

3.1. Testovací organismy

Řasa *Selenastrum capricornutum*

Imobilizované řasy ve formě kuliček jsou součástí balení Algaltoxkitu F, které dodává firma MicroBioTests Inc.

Centrifugační zkumavky s kuličkami řas *Selenastrum capricornutum* včetně média jsou skladovány v temnu při $5 \pm 2^\circ\text{C}$.

Nálevník *Tetrahymena pyriformis*

T. pyriformis byl získán jako zásobní kultura z katedry parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Zkumavky jsou uchovávány při teplotě 20°C za dostatečného přístupu kyslíku.

Larvální stadium korýše *Thamnocephalus platyurus*

Cysty jsou součástí balení Rapidtoxkitu, které dodává firma MicroBioTests Inc.

Plastové zkumavky s cystami *Thamnocephalus platyurus* jsou uchovávány v chladu při 4°C . Z cyst jsem nechala vylíhnout larvy, pro pokus stáří 30 – 45 hodin.

3.2. Chemikálie, pomůcky a zařízení

3.2.1. Použité chemické látky

Použité léčivo

Augmentin[®] 625 mg

- držitel rozhodnutí o registraci: Smithkline Beecham Pharmaceuticals, Brentford, Velká Británie

- balení: POR TBL FLM 21X625MG+SÁČEK

- ATC skupina: J01CR02

- účinná látka: Amoxicillinum trihydricum 574 mg (což odpovídá 500 mg amoxicillinu) a Kalii clavulanas 149 mg (což odpovídá 125 mg kyseliny klavulanové) v jedné tabletě

- pomocné látky: Magnesium-stearát, sodná sůl karboxymethylškrobu, koloidní oxid křemičitý, mikrokrytalická celulóza, oxid titaničitý, hypromelosa 2910/5, hypromelosa 2910/15, makrogol 4000, makrogol 6000, dimetikon

- léková forma: Potahovaná tableta

- kód SÚKL: 86148

- registrační číslo: 15/141/84-C

Standard účinné látky

Amoxicillin SIGMA[®] 1 g

- vzorec: $C_{16}H_{19}N_3O_5S$

- molární hmotnost: $365,40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

- výrobce: Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

Ostatní chemikálie

Voda získaná reverzní osmózou

Kyselina chlorovodíkové (HCl)

Hydroxid sodný (NaOH)

Dichroman draselný ($K_2Cr_2O_7$)

3.2.2. Pomůcky a přístroje

Pomůcky

Plastové testovací destičky s 96 jamkami

ALGALTOXKIT F

PROTOXKIT FTM

RAPIDTOXKITTM

Petriho misky skleněné (o průměru 10, 5 cm)

Skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem

Zábrusové zkumavky skleněné s uzávěry

Zkumavky centrifugační

Automatické mikropipety a špičky firmy Braun (100 – 1 000 μ l, 20 – 200 μ l, 0,5 – 5 ml)

Stojany na zkumavky

Pipety plastové malé

Erlenmayerovy baňky

Laboratorní lžičky

Váženky

Skleněné tyčinky

Kádinky

Odměrné baňky

Teflonové míchadlo

Ochranné rukavice

Parafilm

Exsikátor

Roušky

Lihové fixy na popisování

Černé papíry

Přístroje

Předvážky Kern 440-47N

Analytické váhy Kern Abj

pHmetr pH/Cond 340

Oxymetr Oxi340i

Míchačka MM2A (Laboratorní přístroje Praha)

Termostat VTB Binder

Termostat MicroBioTest Inc.

Ultrazvuková lázeň Bandeln

Stereomikroskop

Přístroj na reverzní osmózu Water Purification System

Lednice

Počítač s readerem Anthos 2010

3.3. Provedení experimentu

3.3.1. Příprava a provedení experimentu pomocí *Selenastrum capricornutum* – stanovení akutní inhibice růstu

Při vlastním testování se vycházelo z Algaltoxkitu F, který byl upraven dle možností laboratoře na uspořádání ve zkumavkách. Test se používá ke stanovení toxicity chemikálií a odpadních vod. Jeho výhodou je vysoká citlivost a nízká cena.

Principem je inhibice růstu řas po 72 hodinách působení testované látky.

Příprava kultivačního média pro řasy

Do odměrné baňky o objemu 1000 ml se nalije 800 ml deionizované vody a přidá 10 ml výživného roztoku (Nutrient Stock) z lahvičky A a 1 ml z nádobek B, C a D. Dále se přidá po rysku deionizovaná voda a zhomogenizuje se obsah. Dle potřeby se upraví pH na $8 \pm 0,2$ s použitím 0,01 M kyseliny chlorovodíkové nebo hydroxidu sodného.

De-imobilizace řas

Z centrifugační zkumavky obsahující řasové kuličky se vylije tekutina a přidá 5 ml rozpouštěcího média (Matrix dissolving medium). Uzavřená zkumavka se pak rázně protřepává každé 2 minuty, aby se matrix úplně rozpustil. Poté se zkumavka centrifuguje 10 minut při otáčkách 3 000 rpm, vylije supernatant a přidá se 10 ml deionizované vody a resuspenduje obsah. Opět se centrifuguje 10 minut při otáčkách 3 000 rpm a slije se supernatant. Přidá se 10 ml kultivačního média pro řasy a opět se protřepe pro resuspendaci řas.

Příprava koncentrovaného řasového inokula

Obsah centrifugační zkumavky se nalije do 100 ml kalibrované baňky a přidá se řasové kultivační médium po rysku. Baňka se zazátkuje a protřepe do homogenizace řas. Ze suspenze se odebere několik kapek, které se kápnou do Bürkerovy počítací komůrky. Zjistí se koncentrace řasové kultury (počet buněk v komůrce se násobí 5 000)

a dle vzorce se vypočte potřebný objem inokula tak, aby koncentrace ve zkušebních zkumavkách byla $1 \cdot 10^4$ buněk/1 ml:

$$x = \frac{V \cdot c}{a}$$

- x potřebný objem inokula v ml
c požadovaná hustota řasové kultury na začátku testu (počet buněk v 1 ml)
V množství testovaného roztoku v ml
a hustota inokulační kultury (počet buněk v 1 ml)

Potřebný objem inokula se pak doplní kultivačním médiem pro řasy.

Příprava testované látky

Testovaná látka včetně standardní toxické látky (dichroman draselný, $K_2Cr_2O_7$) se testuje v molárních koncentracích. Množství látky, které odpovídá nejvyšší koncentraci, se naváží a rozpustí v zábrusové zkumavce. Jako rozpouštědlo se použije připravené řasové kultivační médium. Pro dokonalé rozpuštění se může použít ultrazvuková lázeň.

Koncentrační řada se připraví naředěním vzorku s nejvyšší koncentrací. Faktor ředění je 0,5.

Vlastní provedení pokusu

Pokusy se provádí ve skleněných zábrusových zkumavkách. Pro každou testovanou látku se použije 6 zkumavek a pro kontrolu pokusu 2 zkumavky.

Do každé zkumavky se vloží 5 ml suspenze řas a 1 ml roztoku testované látky z koncentrační řady a lehce se protřepe. Výsledná řasová koncentrace ve zkumavce je $1 \cdot 10^4$ buněk/1 ml.

Zkumavky, umístěné ve stojánku v náhodném pořadí, se inkubují 72 hodin a po celou dobu kultivace se udržuje konstantní boční osvětlení 10 000 lux při teplotě 21 – 25 °C. Během umístění v termostatu se zkumavky pravidelně lehce protřepávají.

Pomocí Bürkerovy komůrky se po 24, 48 a 72 hodinách inkubace, vždy po protřepání, spočítá hustota řasové suspenze.

3.3.2. Příprava a provedení experimentu akutní toxicity s *Tetrahymena pyriformis*

Při vlastním testování se vycházelo ze základní metodiky Protoxkitu F modifikovaného skupinou okolo Diase (1999) na mikrotitrační destičky s vyhodnocením na readeru.

Test je založen na opakujících se měření optické hustoty suspenze prvoka *Tetrahymena pyriformis*. Inhibice růstu je pozorována po 24 hodinách expozice kultury testovanou látkou. Jedná se o vícegenerační test toxicity, kdy během této doby vznikne 5 – 6 generací prvoka. Principem testu je přeměna substrátu v buněčnou biomasu.

Příprava inokula

Jako tekuté médium pro růst organismů se použije PPY – „Proteose Pepton Yeast Extract Medium“ - obsahující 1,5 % peptonu a s přidavkem kvasnicového extraktu (0,5 %).

Suspenzi organismů *Tetrahymena pyriformis* se zředí PPY médiem na koncentraci 10^4 - 10^5 buněk/ml.

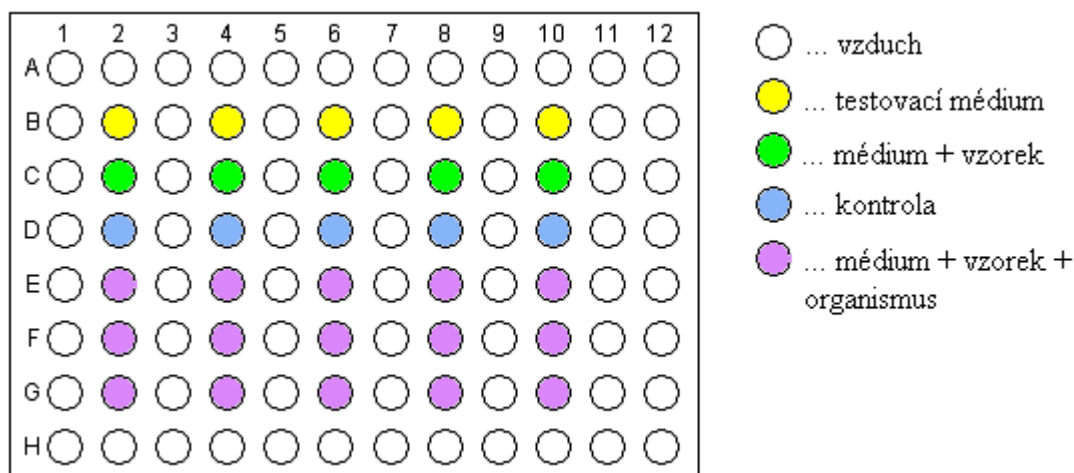
Příprava testované látky

Testovaná látka včetně standardní toxické látky (dichroman draselný, $K_2Cr_2O_7$), se testuje v molárních koncentracích. Množství látky, které odpovídá nejvyšší koncentraci, se naváží a rozpustí v zábrusové zkumavce. Jako rozpouštědlo se použije deionizovaná voda. Pro dokonalé rozpuštění se použije ultrazvukovou lázeň.

Koncentrační řada se připraví naředěním vzorku s nejvyšší koncentrací. Faktor ředění je 0,25.

Vlastní provedení experimentu

Pokusy se provádí v plastových 96jamkových testovacích destičkách. Každá destička má 8 řad (A-H) a 12 sloupců (1-12). Mikrotitrační destička se plní dle následujícího schématu:



1., 3., 5., 7., 9., 11., 12. sloupec se nechá prázdný kvůli dostatku vzduchu pro zkušební organismus.

Řada B se naplní 120 µl peptonu a 60 µl vody, řada C 120 µl peptonu a 60 µl jednotlivými koncentracemi vzorku, řada D pak 120 µl peptonu a 60 µl suspenzí obsahující *Tetrahymena pyriformis*. Do řad E, F a G se pak dá 60 µl peptonu, 60 µl vzorku a 60 µl suspenze organismů. Tyto pak slouží jako 3 paralelní stanovení, přičemž nejvyšší koncentrace je ve sloupci č. 2 a nejnižší ve sloupci č. 10.

Při každém pokusu se provede referenční test toxicity s dichromanem draselným ($K_2Cr_2O_7$).

Měření optické hustoty probíhá při 492 nm na readru Anthos 2010. První měření se uskuteční hned po naočkování kultury (čas 0) a pak po 1, 2, 4, 6, 22, 24 a 48 hodinách. V průběhu tohoto testování se mikrotitrační destičky uchovávají v inkubátoru při 25 °C bez přístupu světla.

Vyhodnocení výsledků

Ze získaných dat se spočítá 24hodinová inhibice v procentech dle vzorce:

$$\% \text{ inhibice}_{(24h)} = \left(1 - \frac{\Delta OD}{\Delta OD_{C0}} \right) \times 100$$

ΔOD rozdíl optických hustot v čase 0 a 24 hodin

ΔOD_{C0} rozdíl optických hustot v kontrolách v čase 0 a 24 hodin

Z těchto dat se dále získá hodnota 24h LC_{50} .

3.3.3. Příprava a provedení experimentu pomocí *Thamnocephalus platyurus* – stanovení inhibice příjmu potravy

Screeningový test Rapidtoxkit s larválním stádiem korýše *Thamnocephalus platyurus* je určen k rychlé detekci toxinů ve vodním prostředí.

T. platyurus přijímá potravu filtrací vody. Pokud je vystaven stresu, který může být způsoben přítomností toxinů, rychlost filtrace klesá a při dlouhodobém působení stresového faktoru se zastavuje. V tomto případě se pozoruje rozdíl zbarvení larev v kontrolách a ve vzorcích.

Líhnutí cyst

Po otevření zkumavky s cystami se přidá 1 ml standardní vody (lahvička s nápisem „standard freshwater“) a po jejím zazátkování opatrně protřepe. Cysty se nechají 1 hodinu smáčet.

Smáčené cysty se pak přelijí ze zkumavky do líhnoucí nádoby (pro lepší manipulaci se mohou použít skleněné Petriho misky). Zkumavka se vypláchne 1 ml standardní vody, která se vlije do líhnoucí nádoby a přidá se ještě 8 ml standardní vody. Nádoba se uzavře, opatrně promíchá tak, aby se zabránilo přichycení cyst na stěny, a pak se vloží do inkubátoru.

Podmínky líhnutí: 25 °C, souvislé osvětlení (3 000 – 4 000 lux), doba líhnutí: 30 – 45 hodin.

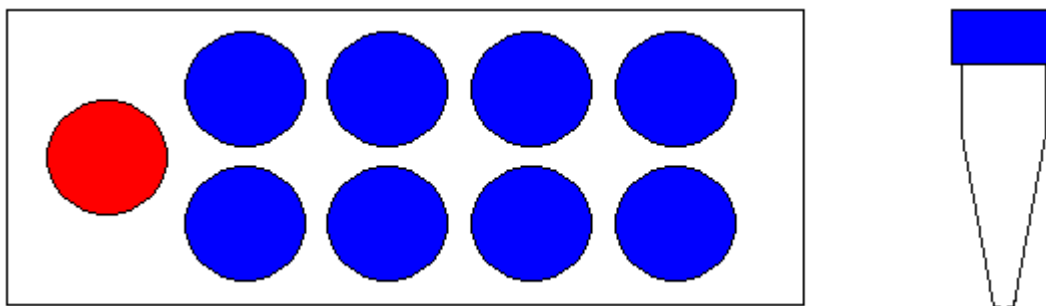
Příprava testované látky

Testovaná látka se testuje v molárních koncentracích. Množství látky, které odpovídá nejvyšší koncentraci, se naváží a rozpustí v zábrusové zkumavce. Jako rozpouštědlo se použije připravená standardizovaná voda. Pro dokonalé rozpuštění se použije ultrazvukovou lázeň.

Koncentrační řada se připraví naředěním vzorku s nejvyšší koncentrací. Faktor ředění je 0,5.

Vlastní provedení pokusu

Připravené plastové zkumavky ve dvou papírových stojáncích (viz nákres) se naplní tak, aby první dvě zkumavky v prvním stojánku obsahovaly 4,5 ml standardní vody, ty pak slouží jako kontroly. Do dalších zkumavek se přidá 4,5 ml různých koncentrací roztoku testované látky. Jedná se o 7 různých koncentrací ve dvou paralelních stanoveních.



Nádoba s vylíhnutými larvami se jemně protřepe a její obsah se přelije do připravené zkumavky s červeným víčkem. Pomocí mikropipety se opatrně promíchá obsah zkumavky tak, aby byly larvy rovnoměrně rozmístěny ve zkumavce. Z takto připravené suspenze se odebere 0,5 ml a přidá se do každé z testovaných zkumavek včetně kontrol.

Uzavřené zkumavky se umístí na 1 hodinu do inkubátoru při teplotě 25 °C.

Vezme se lahvička, která obsahuje červené mikrosféry, a promíchá se až do vzniku homogenní suspenze. Do každé zkumavky s testovaným organismem se přidá pomocí insulinové stříkačky 0,2 ml této suspenze. Opět se opatrně promíchá.

Zkumavky se dají do inkubátoru na 15 – 30 minut.

Po uplynutí této doby se přidají do každé zkumavky 3 kapky fixačního roztoku a opatrně se promíchají. V případě, že organismy nezahynou, může se použít 0,1 M kyselina chlorovodíková.

Po cca 5 minutách by se měly uhynulé larvy usadit ve spodní části zkumavky.

Pomocí mikropipety se odebere 0,3 ml roztoku s mrtvými larvami z každé zkumavky a přemístí se do plastové 8 jamkové destičky.

Pod mikroskopem na tmavém podkladě se spočítají všechny larvy v jamce a potom ty, které nemají zabarvený zažívací trakt (mortalita způsobená toxinem).

Vyhodnocení výsledků

Pro vlastní testování se musí použít larvy uvedeného stáří (30 – 45 hodin), protože mladší nemají zcela vyvinut trávicí trakt a naopak starší slábnou hladem.

Pomocí následujícího vzorce se určí míra inhibice příjmu barviva (IPU):

$$\text{IPU} = \frac{A - B}{A} \cdot 100$$

A procentuální příjem mikrosfér v kontrole

B procentuální příjem mikrosfér ve vzorku

Již 30% IPU signalizuje přítomnost toxinu v testované vodě.

I slabě zbarvené larvy se hodnotí jako pozitivní.

V kontrolní vodě by mělo být nejméně 50% jedinců pozitivních.

4. Výsledky

4.1. *Selenastrum capricornutum*

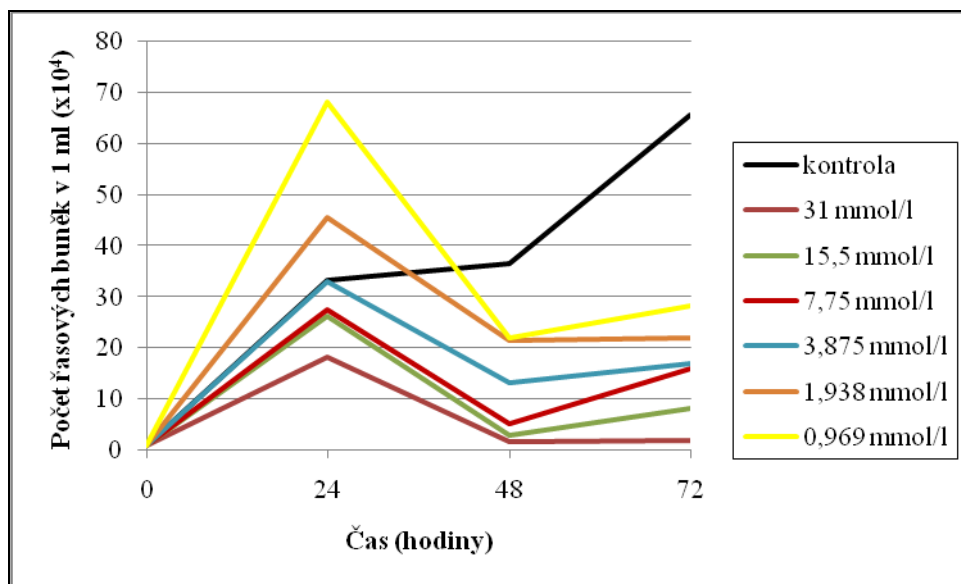
4.1.1. Léčivo Augmentin® 625 mg

- délka testu: 72 hodin
- podmínky experimentu: konstantní boční osvětlení 10 000 lux, teplota 25 °C
- vzorek ve formě suspenze

Tabulka výsledků č. 1: *Tabulka zobrazuje průměry ze dvou experimentů.*

Počet řasových buněk v 1 ml (x10 ⁴)	Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Čas (hodiny)			
		0	24	48	72
kontrola		1	33,33	36,66	65,6
c1	31	1	18,2	1,8	2,1
c2	15,5	1	26,3	3,1	8,3
c3	7,75	1	27,5	5,2	16
c4	3,875	1	33,1	13,4	17,17
c5	1,938	1	45,5	21,6	22
c6	0,969	1	68,3	22,1	28,3

Graf č. 1: *Selenastrum capricornutum* a Augmentin® 625 mg



Z grafu vyplývá, že v celém spektru zvolených koncentrací dochází k silné inhibici růstu řasy a tím je pro *S. capricornutum* léčivo značně toxické.

V tomto případě nemohu stanovit IC_{50} , jelikož tato hodnota by neodpovídala realitě. Z důvodu velkého množství vzorků trvalo počítání v Bürkerově komůrce okolo osmi hodin, přičemž po tuto dobu se stále buněčná masa rozrůstala a výsledky tak byly značně zkreslené.

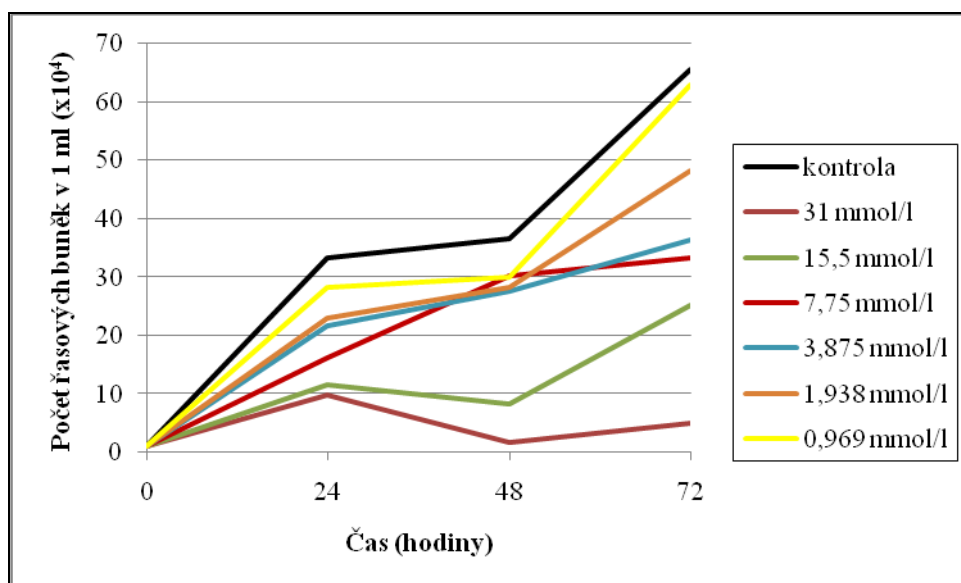
4.1.2. Standard účinné látky (amoxicillin)

- délka testu: 72 hodin
- podmínky experimentu: konstantní boční osvětlení 10 000 lux, teplota 25 °C
- vzorek ve formě suspenze

Tabulka výsledků č. 2: *Tabulka zobrazuje průměry ze dvou experimentů.*

Počet řasových buněk v 1 ml ($\times 10^4$)	Koncentrace účinné látky (mol/l)	Čas (hodiny)			
		0	24	48	72
kontrola		1	33,33	36,66	65,6
c1	31	1	9,8	1,6	5
c2	15,5	1	11,6	8,3	25,1
c3	7,75	1	16,1	30,2	33,3
c4	3,875	1	21,6	27,5	36,4
c5	1,938	1	23	28,3	48,3
c6	0,969	1	28,3	30	63

Graf č. 2: *Selenastrum capricornutum a standard účinné látky (amoxicillin)*



Z grafu vyplývá, že koncentrace 31; 15,5 a 7,75 mmol/l způsobují silnou inhibici růstu řasy a tím jsou pro *S. capricornutum* léčivo značně toxické

V tomto případě také nelze stanovit IC_{50} z důvodu velké časové náročnosti při odečítání velkého množství vzorků, během kterého docházelo k stálému nárůstu buněk.

4.2. *Tetrahymena pyriformis*

4.2.1. Léčivo Augmentin® 625 mg

- délka testu: 48 hodin
- podmínky experimentu: bez přístupu světla, teplota 25 °C
- vzorek ve formě suspenze

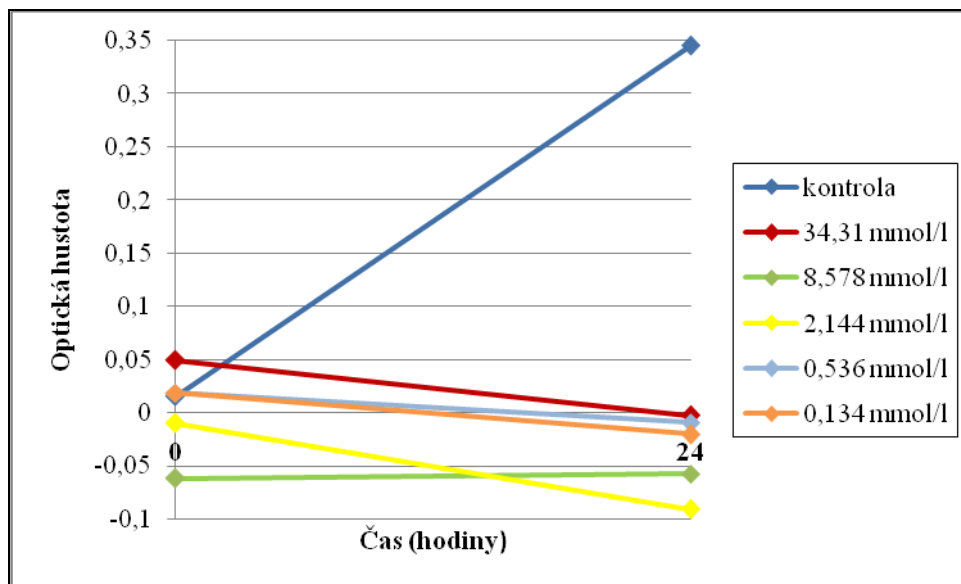
Tabulka výsledků č. 3: *Tabulka zobrazuje naměřené hodnoty optických hustot získaných pomocí readeru v čase 0 – tj. po naočkování kultury a přidání testovaných látek.*

	1.	2.	3.	4.	5.
Koncentrace účinné látky (mmol/l)	34,31	8,578	2,144	0,536	0,134
Testovací médium	0,126	0,127	0,134	0,125	0,129
Médium + vzorek	2,685	1,25	0,43	0,184	0,121
Kontrola	0,14	0,14	0,142	0,143	0,154
Médium + vzorek + organismus	2,756	1,132	0,423	0,197	0,142
	2,767	1,188	0,436	0,21	0,142
	2,68	1,244	0,401	0,201	0,135
Průměr hodnot	2,734	1,188	0,420	0,203	0,140

Tabulka výsledků č. 4: *Tabulka zobrazuje naměřené hodnoty optických hustot získaných pomocí readeru po 24 hodinách kultivace.*

	1.	2.	3.	4.	5.
Koncentrace účinné látky (mmol/l)	34,31	8,578	2,144	0,536	0,134
Testovací médium	0,127	0,127	0,132	0,126	0,127
Médium + vzorek	2,27	1,183	0,455	0,191	0,121
Kontrola	0,135	0,515	0,563	0,549	0,604
Médium + vzorek + organismus	2,262	1,042	0,351	0,191	0,101
	2,271	1,108	0,371	0,183	0,102
	2,27	1,226	0,37	0,171	0,099
Průměr hodnot	2,268	1,125	0,364	0,182	0,101

Graf č. 3: Graf závislosti hustoty suspenze *Tetrahymena pyriformis* na čase u jednotlivých koncentrací Augmentinu® 625 mg.



Tabulka výsledků č. 5: Tabulka znázorňuje hodnoty 24hodinové inhibice *Tetrahymena pyriformis* v Augmentinu® 625 mg získané výpočtem (viz vzorec strana 38) z tabulek č. 3 a 4.

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	24hodinová inhibice (%)
34,31	116
8,858	99
2,144	125
0,536	108
0,134	112

Z těchto výsledků jsem nemohla určit hodnoty EC_{50} , látka v daném rozpětí koncentrací byla pro organismy vysoce toxická.

Hodnota EC_{50} pro standardní toxickou látku (dichroman draselný) byla 1,335 mg/l.

4.2.2. Standard účinné látky (amoxicillin)

- délka testu: 48 hodin
- podmínky experimentu: bez přístupu světla, teplota 25 °C
- vzorek ve formě suspenze

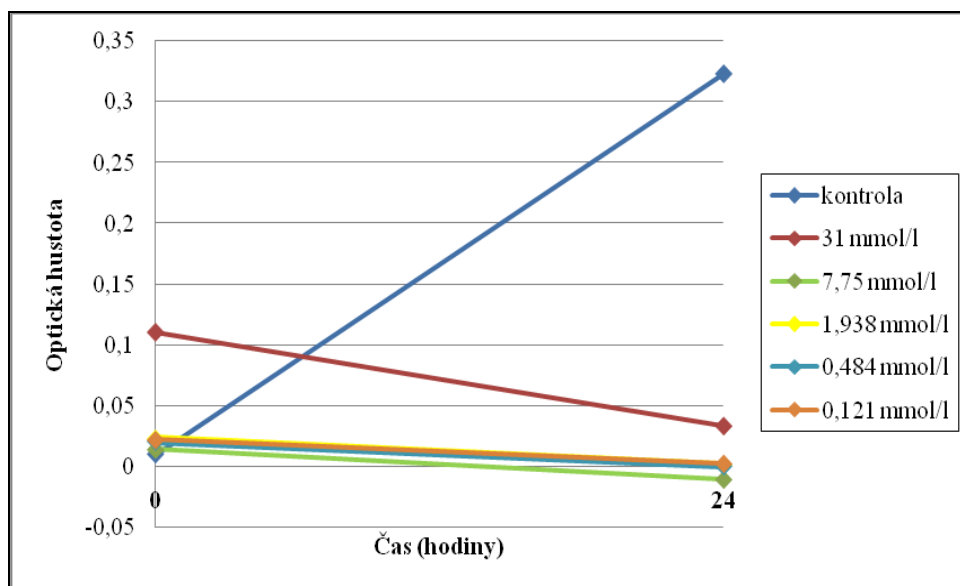
Tabulka výsledků č. 6: *Tabulka zobrazuje naměřené hodnoty optických hustot získaných pomocí readeru v čase 0 – tj. po naočkování kultury a přidání testovaných látek.*

	1.	2.	3.	4.	5.
Koncentrace účinné látky (mmol/l)	31	7,75	1,938	0,484	0,121
Testovací médium	0,119	0,126	0,123	0,128	0,129
Médium + vzorek	1,928	0,119	0,095	0,095	0,096
Kontrola	0,131	0,133	0,135	0,134	0,141
Médium + vzorek + organismus	2,058	0,126	0,12	0,118	0,121
	1,972	0,145	0,112	0,115	0,118
	2,084	0,128	0,122	0,113	0,115
Průměr hodnot	2,038	0,133	0,118	0,115	0,118

Tabulka výsledků č. 7: *Tabulka zobrazuje naměřené hodnoty optických hustot získaných pomocí readeru po 24 hodinách kultivace.*

	1.	2.	3.	4.	5.
Koncentrace účinné látky (mmol/l)	31	7,75	1,938	0,484	0,121
Testovací médium	0,12	0,126	0,128	0,127	0,124
Médium + vzorek	1,849	0,107	0,094	0,095	0,094
Kontrola	0,125	0,519	0,505	0,526	0,564
Médium + vzorek + organismus	1,886	0,097	0,096	0,097	0,097
	1,858	0,094	0,094	0,094	0,095
	1,902	0,097	0,096	0,094	0,097
Průměr hodnot	1,882	0,096	0,095	0,095	0,096

Graf č. 4: Graf závislosti hustoty suspenze *Tetrahymena pyriformis* na čase u jednotlivých koncentrací standardu účinné látky (amoxicillin).



Tabulka výsledků č. 8: Tabulka znázorňuje hodnoty 24hodinové inhibice *Tetrahymena pyriformis* ve standardu účinné látky (amoxicillin) získané výpočtem (viz vzorec strana 38) z tabulek č. 6 a 7.

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	24hodinová inhibice (%)
31	125
7,75	108
1,938	107
0,484	106
0,121	106

Z těchto výsledků jsme také nemohli určit hodnoty EC_{50} , látka v daném rozpětí koncentrací byla pro organismy vysoce toxická.

Hodnota EC_{50} pro standardní toxickou látku (dichroman draselný) byla 1,335 mg/l.

4.3. *Thamnocephalus platyurus* (RAPIDTOXKIT)

4.3.1. Léčivo Augmentin® 625 mg

- délka testu: 60 minut
- podmínky experimentu: teplota 25 °C
- vzorek ve formě suspenze

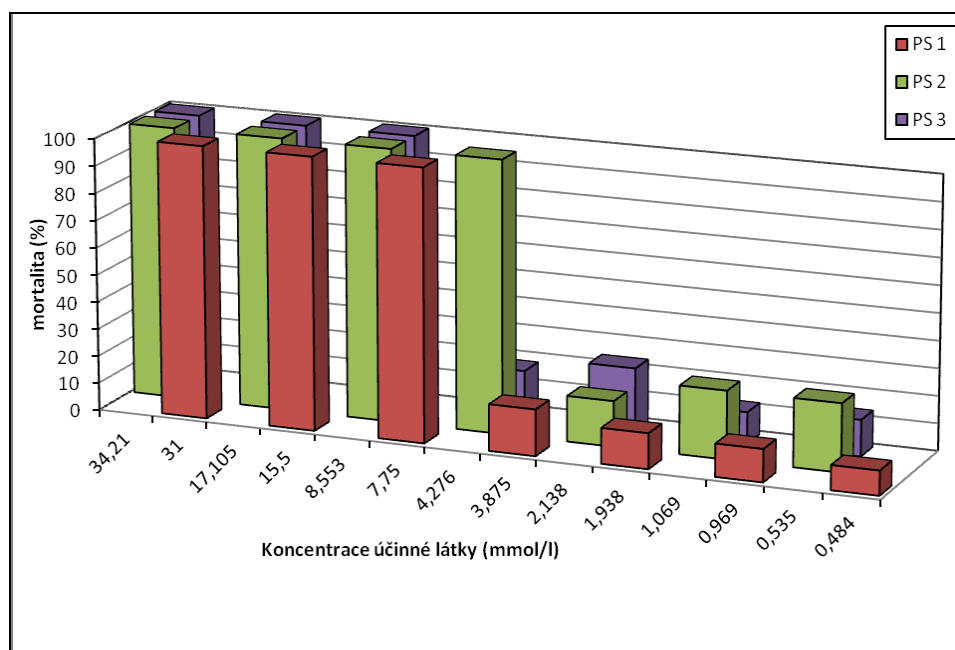
Tabulka výsledků č. 9:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Inhibice příjmu barviva (%)
	PS 1
31	100
15,5	100
7,75	100
3,875	17
1,938	13
0,969	12
0,484	9

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Inhibice příjmu barviva (%)		
	PS 2	PS 3	Průměr
34,21	100	100	100
17,105	100	100	100
8,553	100	100	100
4,276	100	18	59
2,138	17	23	20
1,069	25	12	19
0,535	25	13	19

PS 1, 2, 3 paralelní stanovení č. 1, 2, 3

Graf č. 5: *Thamnocephalus platyurus* (RAPIDTOXKIT) a Augmentin® 625 mg



Tento test slouží pouze k orientačnímu určení toxicity látek rozpuštěných ve vodě a signálem přítomnosti nežádoucí sloučeniny je 30% inhibice příjmu barviva (IPU).

Tato hranice byla překročena již v koncentraci 4,276 mmol/l (1,562 g/l). Látka v uvedené koncentraci a ve vyšších testovaných koncentracích vykazuje potenciální nebezpečnost pro vodní prostředí.

4.3.2. Standard účinné látky (amoxicillin)

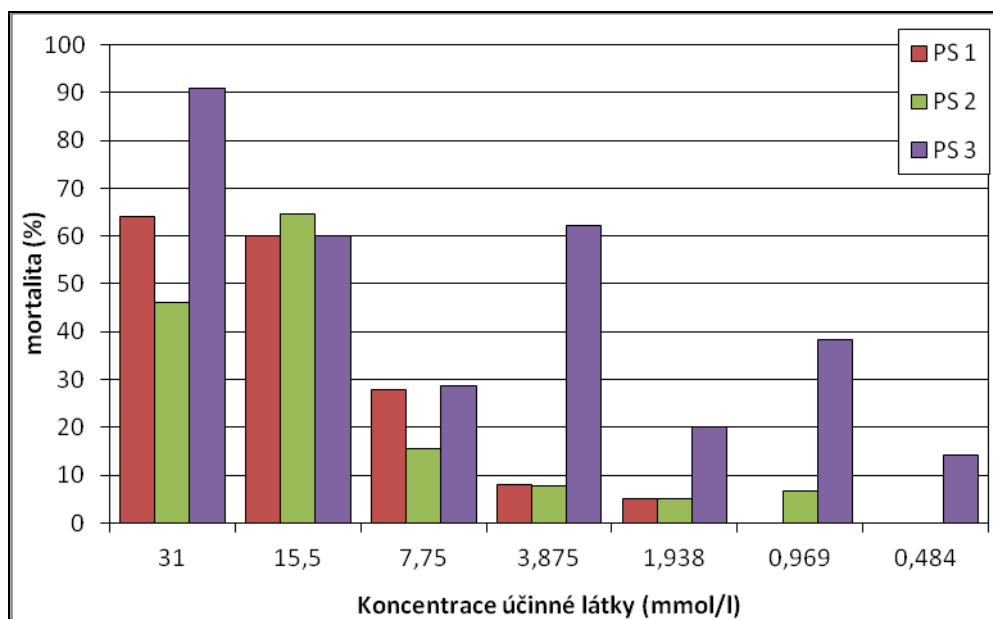
- délka testu: 60 minut
- podmínky experimentu: teplota 25 °C
- vzorek ve formě suspenze

Tabulka výsledků č. 10:

Koncentrace účinné látky (mmol/l)	Inhibice příjmu barviva (%)			
	PS 1	PS 2	PS 3	Průměr
31	64	46	91	67
15,5	60	65	60	62
7,75	28	16	29	24
3,875	8	8	62	26
1,938	5	5	20	10
0,969	0	7	38	15
0,484	0	0	14	5

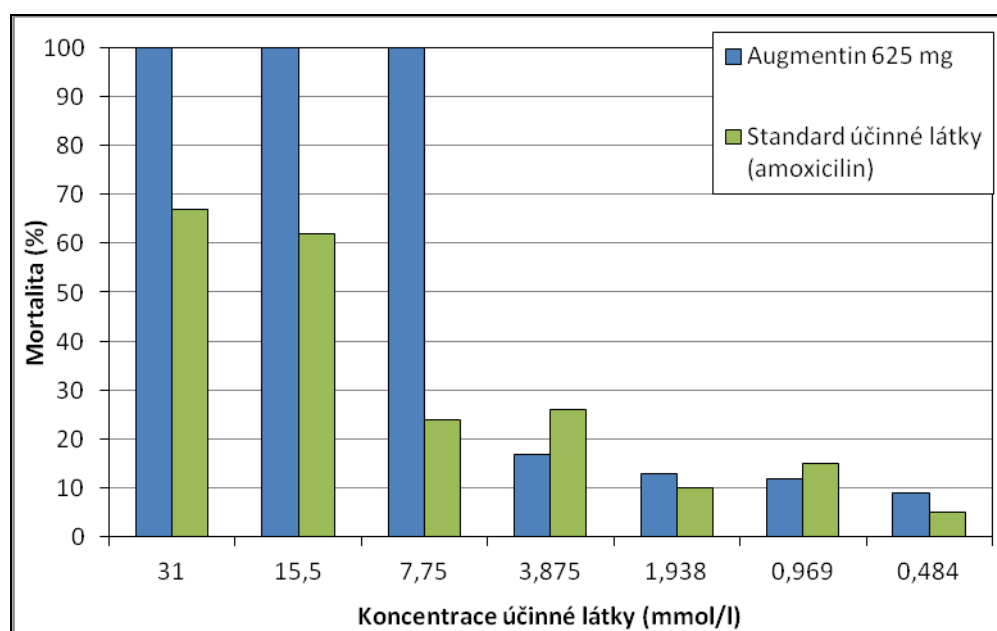
PS 1, 2, 3 paralelní stanovení č. 1, 2, 3

Graf č. 7: *Thamnocephalus platyurus* (RAPIDTOXKIT) a standard účinné látky (amoxicillin)



Tento test slouží pouze k orientačnímu určení toxicity látek rozpuštěných ve vodě a signálem přítomnosti nežádoucí sloučeniny je 30% inhibice příjmu barviva (IPU). Pro standard účinné látky byla tato hodnota 8,974 mmol/l – tj. 3,279 g/l (data získána extrapolací výsledků). Pouze dvě nejvyšší (31 mmol/l a 15,5 mmol/l) testované koncentrace vykazovaly nebezpečnost pro vodní prostředí.

Graf č. 8: Porovnání průměrných hodnot mortality *Thamnocephalus platyurus*



Z vizuálního zhodnocení grafu jsme dospěli k závěru, že léčivý přípravek v daných koncentracích je toxičtější pro *Thamnocephalus platyurus* než standard účinné látky.

5. Diskuze

Při ekotoxikologickému screeningu léčiva Augmentin[®] 625 mg jsem vybrala za zkušební organismy zelenou řasu *Selenastrum capricornutum* jako zástupce z řady producentů a nižších rostlin, korýše a konzumenta *Thamnocephalus platyurus* a nálevníka *Tetrahymena pyriformis*, řazeného k destruentům.

Při hodnocení tohoto léčiva jsem zvolila počáteční koncentraci léčivého přípravku tak, že jsem vycházela z mé diplomové práce (DP; 2008), konkrétně z experimentů na bělohořčici *Sinapis alba*. Tuto koncentraci (34 mmol/l) jsem vybrala z předpokladu, že jak bělohořčice, tak i *Selenastrum capricornutum* patří do říše rostlin a tudíž by mohly mít stejné nebo obdobné reakce na tuto látku. Skupina okolo Fairchilda (1997) totiž zjistila, že jak *S. capricornutum*, tak vodní rostlina *Lemna minor* (okřehek menší) jsou obdobně citlivé k triazinovým (atrazin, metribuzin, simazin, cyanazin), sulfonmočovinovým (metsulfuron, chlorsulfuron), pyridinovým (diquat, paraquat), dinitroanilinovým (trifluralin) a acetanilidovým (alachlor, metolachlor) herbicidům, avšak tato řasa je citlivější než *L. minor* k jednomu ze dvou thiokarbamátů (triallate) a k jednomu z triazinů (cyanazine). Výzkum Blinové (2004) zabývající se toxicitou vod různého původu a chemikálií (Cr^{3+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , pyreny) naopak poukázal na to, že citlivost korýšů a rostlinných druhů k jednotlivým kontaminantům či směsím je nepředvídatelná. *Lemna minor* je citlivější než *Selenastrum capricornutum*.

I když užívání amoxicillinu v posledních letech spíše stagnuje, stále tvoří nezanedbatelnou část celkové spotřeby antibakteriálních léčiv (dle databáze MV-AISLP v České republice přibližně 17 % všech balení v letech 2005 – 2008). Podle Pascoea (2003) ve Velké Británii patří amoxicillin dokonce mezi 10 nejčastěji předepisovaných léčiv. Přesto je zde stále málo autorů, kteří se zabývají dopadem tohoto antimikrobiálního léčiva na ekosystém. Dle USP DI[®] je navíc amoxicillin eliminován ledvinami z 60 – 75 % nezměněný, a i když Adler dle Sörena (2003) říká, že beta-laktámy, ke kterým toto antibiotikum patří, se v přírodě nacházejí zřídka patrně kvůli degradaci nestabilního laktámového kruhu, je však zde velká pravděpodobnost, že dochází k ovlivnění organismů. Eguchi (2004) tvrdí, že zvířatům bývá podáváno současně více antimikrobiálních agens a tím se dostává do ekosystému jejich kombinace. Přesto se podle něj ve většině případů užívají pro testy toxicity pouze jednotlivé chemické látky.

Jako jeden z mála autorů se Park (2008) zabýval studiem běžně užívaných veterinárních antibiotik (mezi které zařadil i amoxicillin) a jejich dopadem na vodní

ekosystém. K experimentům akutní a chronické toxicity si vybral standardní zkušební organismy: *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Moina macrocopa* a *Oryzias latipes*. Při testování akutní toxicity neviděl významné rozdíly mezi jednotlivými organismy a různými skupinami antimikrobních léčiv (sulfonamidy, tetracyklíny, aminoglykosidy, fluorochinolony) s výjimkou beta-laktámů (ampicilin a amoxicilin), které byly nejméně toxické.

Skupina okolo Pascoea (2003) si vybrala za zkušební organismus žahavce nezmara obecného (*Hydra vulgaris*), přičemž studovala akutní a chronickou toxicitu. Žádný efekt nepozorovali až do koncentrace 1,0 mg/l a po 17 dnech expozice nebyl ovlivněn příjem potravy a ani tvorba pupenů.

Obecně lze tvrdit, že řasové testy toxicity na *Selenastrum capricornutum* jsou populárnější než experimenty s ostatními organismy, které jsem testovala. Tuto domněnku potvrzuje Holten Lützhøft (1999) a Halling-Sørensen (2000), kteří ve svých pracích uvádějí, že je běžně užívaná ve standardních řasových testech toxicity (ISO 8692, 1989) jako modelový organismus pro sladkovodní řasy.

Holten Lützhøft (1999) se dokonce ve své práci zabýval studiem kromě jiných antibiotik též amoxicillinem, který se v Dánsku používá v rybím farmarění, a jeho efektem na mořskou řasu *Mycrocystis aeruginosa*, sladkovodní řasu *Selenastrum capricornutum* a skrytěnku *Rhodomonas salina*. Při testování *S. capricornutum* použil modifikaci testu dle standardního protokolu ISO 8692 (1989). Algaltokit FTM, ze kterého jsem vycházela, také vychází z této ISO normy spolu s předpisy OECD – Guideline 201: Řasa, růstový inhibiční test. Pro možnosti laboratoře byl tento test upraven na uspořádání ve zkumavkách. Počáteční koncentrace buněk u Holten Lützhøfta byla $1 \cdot 10^4$ buněk/ml (tuto hodnotu zjistil díky automatickému počítací částic), přičemž buňky rostly na nářasném stole (93 rpm) pod světlem o intenzitě $6,8 \pm 0,4$ klux při teplotě 23 ± 1 °C. Tuto počáteční koncentraci buněk jsem si určila také s tím rozdílem, že jsem buňky spočítala manuálně pomocí Bürkerovy komůrky. Jak jsem posléze zjistila, tato metoda není vhodná pro větší počet vzorků, protože počítání zabralo okolo 8 hodin a za tu dobu došlo k expanzi buněčné masy a tyto výsledky byly proto zkreslené. Zkumavky, které jsem pravidelně manuálně protřepávala, jsem nechala ve stojánku v termostatu při 25°C, kde na ně působilo konstantní boční osvětlení 10 klux.

Nárůst buněčné hmoty pak zjišťoval pomocí spektrofotometru, který určoval hladinu chlorofylu po extrakci buněk řas 67% etanolem. Pro amoxicillin získal hodnotu NOEC vyšší než 250 mg/l. Inhibice růstu řas v našem experimentu se projevila podle grafu č. 2 až od koncentrace 2,83 g/l. Metodiku extrakce buněk etanolem použil i Halling-Sørensen (2000). Vzhledem k tomu, že se má metodika odečítání výsledků ukázala jako nesprávná, nebyla jsem schopna získat relevantní hodnoty IC_{50} , i když Sano a kol. (2005) je manuálně spočítala pomocí hemacytometru a Dellamatrice (2005) pomocí Neubauerovy komůrky.

Jinou formu zjišťování růstu buněk řas použil Eguchi (2004) - automatický hematologický analyzátor.

Další, který se zabýval vlivem amoxicillinu na řasu *S. capricornutum* byl Andreozzi (2004). Jeho řasové testy toxicity ukázaly, že v rozsahu koncentrací od 50 ng/l do 50 mg/l není toto léčivo vůči ní toxické, což potvrzuje výzkum Holten Lützhøfta (1999). V tomto rozmezí neovlivňuje ani jiné eukaryotické organismy: *Closterium ehrenbergi*, *Cyclotella meneghiniana*, ale ukázala se značná toxicita vůči sinici *Synechococcus leopolensis*.

Test se *Selenastrum capricornutum* patřil k akutním a trval 72 hodin. Stejnou dobu trval i test kolektivu okolo Lanzkyho (1997). Ten studoval akutní toxicitu jiného antibiotika, metronidazolu, s výsledkem EC_{50} 40,4 mg/l. Dalším pak byl např. již zmíněný Eguchi (2004), který zkoumal vliv antimikrobních látek schválených v Japonsku jako veterinární léčiva pomocí testu vycházejícího ze směrnice OECD č. 201 s drobnými modifikacemi. Erythromycin měl hodnoty EC_{50} 0,037 mg/l, sulfomethoxazol 1,5 mg/l, sulfadiazin 2,2 mg/l, sulfadimethoxin 2,3 mg/l, ale ampicilin (strukturně podobný amoxicillinu) a cefazolin neinhibovaly růst ($EC_{50} > 1000$ mg/l). Kamava a kol. se zabývali akutní toxicitou jiných látek, mastných kyselin (s počtem uhlíků C14 – C18) běžně se nacházejících ve dřevě. Toxicita závisela na počtu uhlíků a násobných vazeb. Z testovaných kyselin olejová (cis-9-oktadekanová) vykazovala nejvyšší toxicitu (72h $IC_{50} = 0,47$ mg/l) a její triglycerid už nevykazoval žádnou.

Minimální doba expozice testu toxicity je dle normy ISO 8692 (1989) a OECD Guideline No. 201 určena na 72 hodin. Dle skupiny okolo Kočího (2002) je však vhodnější použití doby expozice alespoň 96 hodin do doby, kdy jsou již relativní odchylky nižší a tak se vyhnout nepřesnostem způsobeným vyššími relativními

odchylkami ve druhém a třetím dni. Doporučují však, že nejlépe je provádět experiment až do doby, kdy jsou z kultivačního média vyčerpány živiny. Toto potvrzuje i Diamond a kol. (2008), který ve svém výzkumu stokových vod zjistil, že řasové testy často byly náchylné k falešné pozitivitě a vysoké variabilitě v rámci různých laboratoří.

Někteří autoři se proto spíše zabývali chronickými 96hodinovými testy. Příkladem může být Sano a kol. (2005), která zjišťovala toxicitu biocidu široko užívaného v lékařských aplikacích, glutaraldehydu. Test byl veden na základě standardů uvedených v ASTM (American Society for Testing and Materials z roku 1998 - Standard guide for conducting static 96h toxicity tests with microalgae) a USEPA (Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Water to Freshwater Organisms z roku 2002). Hodnota IC_{50} pak pro glutaraldehyd byla 1,0 mg/l (95% interval spolehlivosti 0,44 – 1,29 mg/l). Avšak Choova skupina (2008) zjistila, že pouhé dvě hodiny stačí k předpovězení hodnoty EC_{50} v porovnání s konvenčními 96hodinovými testy zakládající se na růstové rychlosti. Vyvinutý test s *S. capricornutum* se prokázal být užitečnou jednoduchou testovací metodou v určování environmentální toxicity.

Podle Tsaie (2007) *Selenastrum capricornutum* ukázala značně vyšší citlivost při testování 90 organických látek v porovnání s ostatními organismy: nálevníkem *Tetrahymena pyriformis*, korýšem *Daphnia magna*, rybou *Pimephales promelas* a luminiscenční bakterií *Photobacterium phosphoreum*.

Pro akutní testy s *T. pyriformis* jsem použila metodiku vyvinutou skupinou okolo Diase (1999), která hodnotí populační růst a využívá plastové 96jamkové destičky. Ty jsem inkubovala 48 hodin v temnu při 25°C a optická hustota byla měřena na readeru při 492 nm. Bonnet (2007) používal pro své experimenty stejné destičky s tím rozdílem, že nechal pouze 36 buněk na její periferii prázdných. Pro test jsem kromě okrajů nevyplňovala ještě 1., 3., 5., 7., 9., 11. a 12. sloupec kvůli dostatku vzduchu pro zkušební organismus a každou jamku jsme naplnila 180 μ l roztoku oproti jeho 200 μ l. Bonnet destičky nechal inkubovat při teplotě 28 °C a optickou hustotu měřil každou hodinu po dobu 12 hodin při vlnové délce 490 nm. Hodnota EC_{50} pro standardní toxickou látku (dichroman draselný) mi pak vyšla 1,335 mg/l. Testované léčivo bohužel ve zvoleném rozpětí koncentrací vzhledem k vysoké toxicitě tuto hodnotu nedalo.

Kromě těchto mikrodestiček zkoumal toxicitu herbicidů a jejich degradačních produktů ještě v baňkách a zkumavkách, a výsledky pak porovnal:

Tabulka č. 11: (převzata od Bonnet (2007))

IC ₅₀ (mg/l)	Baňky (9 hod)	Zkumavky (9 hod)	Mikrodestičky (12 hod)
alachlor	12,96 ± 0,64	11,61 ± 0,38	8,89 ± 1,28
diuron	8,18 ± 0,96	7,84 ± 0,66	6,33 ± 1,11

Dle Sauvanta a kol. (1995) je technika testování používající mikrotitrační destičky rychlá, jednoduchá na ovládání, levná a statisticky relevantní, což jsem potvrdila, protože vyhodnocením na readeru vyloučím lidskou chybu při manuálním odečítání výsledků.

Mimo populačního růstu jsem se v některých publikacích setkávala také s hodnocením esterázové aktivity. Skupina okolo Bogaertse (2001) zjistila při srovnání 13 anorganických a 21 organických sloučenin, že FDA test esterázové aktivity má ve většině případů vyšší citlivost oproti testům zahrnujících populační růst. Při porovnání těchto dvou endpointů u cisplatiny a doxorubicinu Bonnet (2003) toto potvrdil – tj. IC₅₀ 124,37 ± 7,47 a 74,62 ± 6,12 μmol/l pro populační růst a z hlediska nespecifické esterázové aktivity pak 88,32 ± 8,35 a 44,61 ± 3,33 μmol/l. Ve své další práci (2007) v testech salachlorem a diuronem naopak zjistil, že růst je citlivější (IC₅₀ 8,89 ± 1,28 mg/l a 6,33 ± 1,11 mg/l) než esterázová aktivita (IC₅₀ 14,92 ± 1,13 mg/l a >100mg/l).

Někteří autoři se zabývali vlivem na motilitu tohoto nálevníka. Skupina okolo Wu (1996) získala u testovaného organismu s antibiotikem chloramfenikolem hodnotu IC₅₀ pro motilitu 2,95 ± 0,25 mmol/l, zatímco pro jeho sukcinát byla tato hodnota 28,2 ± 1,93 mmol/l. V jiné své práci (1994) zkoumali vliv etanolu a opioidů na motilitu. EC₅₀ pro ethanol byla 522 ± 36,7 mmol/l, dextropropoxyfen 0,59 ± 0,08 mmol/l, metadon 0,40 ± 0,09 mmol/l a petidin 4,57 ± 0,36 mmol/l. Tým Darcyho (2002) zjistil, že IC₅₀ amitriptilinu, desipraminu, lofepraminu a lidokainu odpovídá rozdělovacímu koeficientu *n*-oktanol – voda.

Pět evropských skupin okolo Girlinga (2000) zkoumalo několik různých organismů: řasy (*Chlamydomonas reinhardi*, *Scenedesmus subspicatus* a *Euglena gracilis*), prvoky (*Tetrahymena pyriformis*), vířníky (*Brachionus calyciflorus*), koryše

(*Gammarus pulex*) a dvoukřídlé (*Chironomus riparius*). Přičemž zjistili, že nejnižší získané hodnoty NOEC, EC_x nebo LC_x pro lindan, azatrin a měď jsou srovnatelné s nejnižšími hodnotami získanými v mezokosmu. Nejnižší chronická hodnota NOEC v laboratorních testech zahrnující 3,4-dichloranilin byla přibližně 200x vyšší než hodnota získaná v mezokosmu.

Porovnáním citlivosti různých testů Bonnet (2007) ukázal, že testy využívající eukaryotické buňky (*T. pyriformis*) jsou obecně citlivější než testy s prokaryotickými buňkami (*Vibrio fischeri*)

Prakticky nejméně zmínka v literatuře je o ekotoxikologických testech na korýši *Thamnocephalus platyurus*. Rapidtoxkit, jehož je součástí, slouží k rychlé detekci toxinů ve vodních vzorcích, a je kratší verzí 24hodinového Thamnotoxkitu F, přičemž měří subletální toxický efekt po hodinové expozici larev korýšů. Je to pouze orientační test, signálem přítomnosti nežádoucí sloučeniny v testované vodě je 30% inhibice příjmu barviva (IPU), která by pak měla vést k další pozornosti a boji s touto látkou. Tato hranice byla překročena v koncentraci 1,56 g/l pro léčivo Augmentin[®] 625 mg a pro standard účinné látky byla tato hodnota 3,28 g/l.

Törökne a kol. (2007) porovnávala Rapidtoxkit (s malými úpravami standardního operačního postupu z roku 2004) a Thamnotoxkit na vzorcích přírodní biomasy sinic. Korelační koeficient mezi EC₅₀ a LC₅₀ získaných z obou mikrobiotestů ($r = 0,82$) ukázal velmi dobrou shodu mezi subletálními a letálními efekty a tak je jednohodinový Rapidtoxkit atraktivní rychlou alternativou k Thamnotoxkitu. Nalecz-Jawecki (2006) toto srovnání prováděl u 28 vybraných léčiv ze skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv, biocidů, léčiv ovlivňujících kardiovaskulární a nervový systém a purinových alkaloidů. Velmi vysoká korelace ($r = 0,967$) mezi oběma testy byla u tří nejtoxičtějších sloučenin (amitriptilin, thioridazin a chlorpromazin). Pokud se tato léčiva vynechala z porovnání, byl tento korelační koeficient nižší ($r = 0,822$), ale stále signifikantní.

Při testování toxicity 42 vzorků různých typů domácích a průmyslových vykládek použila skupina okolo Muna (1995) standardní test s *Daphnia magna* a mikrobiotest Thamnotoxkit F. Korýš *T. platyurus* byl u 75 % případů citlivější než *D. magna*, což by mohlo zvýšit popularitu tohoto levnějšího alternativního mikrobiotestu oproti konvenčnímu. *Thamnocephalus platyurus* se podle Nalecz-Jawecki (2006) více než

10 let používá v různých ekotoxikologických studiích jako ekonomičtější varianta k jiným testům s korýši.

Holoubek a kol. (1998) v sérii experimentů označil naopak *T. platyurus* méně citlivým organismem v porovnání s řasami (*Selenastrum capricornutum*), korýšem *Ceriodaphnia dubia* a prvokem *Spirostomum ambiguum*. Při testování akutní toxicity (24h LC₅₀) permetrinu, resmetrinu a cypermetrinu Barahona a kol. (2005) zjistil, že *T. platyurus* je méně sensitivní k těmto látkám než *Daphnia* a *Brachionus plicatilis*.

Pro akutní test toxicity použila DellaGreca a kol. (2007) také cysty získané od firmy MicroBioTest. Organismy stáří 0-2 hodiny byly vystaveny různým koncentracím tamoxifenu, nesteroidního antiestrogenu, a jeho fototransformačním produktům, přičemž byla získána hodnota 24h LC₅₀ 0,40 (0,32 – 0,50) mg/l. Pro experiment jsem použila 38 hodin staré organismy.

Nalecz-Jawecki (2008) zkoumal dále ekotoxicitu antidepresiv amitritilinu, imipraminu a jejich metabolitů (desmetyl-, didesmethyl-, N-oxid). Testovaná léčiva byla velmi toxická (LC₅₀ okolo 1 mg/l) jak ke korýši *Thamnocephalus platyurus*, tak k prvoku *Spirostomum ambiguum*. Ukázalo se, že toxicita směsi metabolitů v Spirotoxu a Thamnotoxkitu F je vyšší, než předpovězená hodnota vypočtená na základě koncentrací léčiv a jejich metabolitů ve vzorcích. Obdobné bylo i mé zjištění, kdy jsem shledala, že léčivo Augmentin[®] 625 mg, které v tabletách kromě amoxicillinu obsahuje i enzymový inhibitor a pomocné látky, je toxicitější než standard účinné látky (amoxicillin).

Vzhledem k tomu, že jsem v experimentech navazovala na diplomovou práci Ekotoxikologický screening vybraného antibiotika (DP; 2008), můžu tak provést srovnání s organismy, které jsem testovala v rigorózní práci.

I když jak *Thamnocephalus platyurus*, tak *Artemia salina* patří do řádu *Anostraca* (žábřonožky), v testech vykazovali odlišné vlastnosti. S *T. platyurus* byla práce a vyhodnocování výsledků jednodušší, protože jsem nemusela odečítat 96jamkovou destičku, ale destičku pouze s osmi jamkami. *A. salina* reagovala v léčivu atypicky, kdy se zvyšovala toxicita s klesající koncentrací. (DP; 2008) V tomto případě reagoval *T. platyurus* ukázkově bez problémů (viz graf č. 8). U standardu účinné látky byly v případě *A. salina* výsledky už jasnější a zjistili jsme hodnotu EC₅₀ 0,6637 mmol/l (95% interval spolehlivosti 0,5794 – 0,7602 mmol/l). (DP; 2008) U *T. platyurus* jsem

zjišťovala 30% inhibici příjmu barviva, která byla v koncentracích 4,276 mmol/l pro léčivo a 8,974 mmol/l pro čistý amoxicillin.

Jak *T. platyurus*, tak *Brachionus calyciflorus* jsou zástupci konzumentů. *B. calyciflorus* jsem také testovala pomocí kitů a to: Rotoxkit F a Rotoxkit F Chronic, přičemž jsem sledovala v prvním případě 24hodinovou akutní toxicitu a v druhém chronickou toxicitu po 48 hodinách. (DP; 2008) Bohužel jsem neměla tu možnost provést toto srovnání i u *Thamnocephalus platyurus*, kde jsem užila pouze rychlý Rapidtoxkit. U vířníků jsem v nejvyšší testované koncentraci (1,089 mmol/l) v žádném z testů nezískala relevantní data. Byl u nich i problém špatné líhnivosti a vysoké úmrtnosti v kontrole. (DP; 2008) Tentokrát *T. platyurus* tyto problémy nebyly a testování proběhlo v pořádku.

Když srovnám výsledky dvou rostlinných druhů, které jsem v našich experimentech použila, tj. *Selenastrum capricornutum* a *Sinapis alba*, mohu říci, že metodika odečítání výsledků je u bělohořčice jednodušší. Zde jsem měřila velikost kořínků (inhibici růstu kořene), které vyrostli na filtračním papíře nasyceným roztokem léčiva (DP; 2008), zatímco u řasy jsem počítala buňky v Bürkerově komůrce. Počet řasových buněk se během odečítání v jednotlivých zkumavkách rozrůstal, a proto jsem pro tyto organismy nezískala žádné hodnoty inhibice. V celém rozsahu koncentrací bylo léčivo pro *S. capricornutum* toxičtější než standard, který měl srovnatelnou reakci od koncentrace 7,5 mmol/l (viz graf č. 2). Hodnota IC_{50} pro *S. alba* a léčivo byla 0,4999 mmol/l, zatímco standard účinné látky ani v koncentraci 2,70 mmol/l nevykazoval toxické účinky. (DP; 2008)

Jak *Tetrahymena pyriformis*, tak nítěnka *Tubifex tubifex*, zástupci destruentů, v akutních testech toxicity dávali jasné výsledky. Také testování bylo jednodušší. Nítěnky jsem testovala 30 minut v 24jamkových plastových destičkách při teplotě 20 °C a dala nám pro Augmentin® 625 mg hodnotu EC_{50} 4,567 mmol/l (95% interval spolehlivosti 0,1860 – 112,1 mmol/l) a pro standard účinné látky 110,9 mmol/l (95% interval spolehlivosti 85,71 – 143,4 mmol/l). (DP; 2008) Tato data jsem ale pro nálevníka nezískala z toho důvodu, že látka v daném rozpětí koncentrací byla pro organismy vysoce toxická (viz tabulky č. 5 a 8).

V porovnání s ostatními autory – např. Pascoe (2003), Holten Lützhøft (1999), Andreozzi (2004) – jsem pro amoxicillin získala konkrétnější výsledky u jednotlivých

organismů, protože jsem se nebála testovat ve vyšších koncentracích (g/l oproti jejich mg/l).

6. Závěr

V rigorózní práci jsem si dala za cíl pokračovat v získávání ekotoxikologických dat o léčivu Augmentin[®] 625 mg v porovnání se standardem. Touto prací jsem navázala na diplomovou práci Ekotoxikologický screening vybraného antibiotika (DP; 2008). Jako zkušební organismy jsem použila organismy: zelenou řasu *Selenastrum capricornutum*, zástupce z řady producentů a nižších rostlin, koryše a konzumenta *Thamnocephalus platyurus* a nálevníka *Tetrahymena pyriformis*, řazeného k destruentům.

Experimenty se *S. capricornutum* vycházely z Algaltoxkitu vyráběného firmou MicroBioTests, s tím rozdílem, že jsem je prováděla dle možností laboratoře v zábrusových zkumavkách, přičemž pro každou testovanou látku jsem použila 6 zkumavek (koncentrace léčiva a standardu amoxicillinu v rozmezí 31 – 0,969 mmol/l) a 2 zkumavky pro kontrolu pokusu. Ty jsme nechala za občasného protřepávání inkubovat 72 hodin při konstantním bočním osvětlení 10 000 lux při teplotě 25 °C. Pomocí Bürkerovy komůrky jsem po 24, 48 a 72 hodinách inkubace, vždy po protřepání, spočítala hustotu řasové suspenze. Jak jsem posléze zjistila, tato metoda odečítání výsledků není vhodná, protože počítání velkého množství vzorků zabralo okolo 8 hodin a za tu dobu došlo k expanzi buněčné masy a výsledky inhibiční koncentrace (IC₅₀) byly proto zkreslené. Z grafů č. 1 a 2 nicméně vyplývá, že Augmentin[®] 625 mg je toxicitější než standard, protože způsobuje silnou inhibici v celém rozmezí koncentrací. Tato inhibice je srovnatelná u amoxicillinu od koncentrace 7,5 mmol/l (2,83 g/l).

Pomocí mikrotitračních destiček jsem zkoušela akutní toxicitu na nálevníkovi *Tetrahymena pyriformis*. Test byl převzat od Diase (1999), trval 48 hodin, přičemž jsem plastové 96jamkové destičky s organismy uchovávala v inkubátoru při 25 °C bez přístupu světla. Pomocí readru Anthos 2010 jsem při 492 nm měřila optické hustoty v čase 0 (tj. hned po naočkování kultury), 1, 2, 4, 6, 22, 24 a 48 hodin. V rozsahu koncentrací 34,31 – 0,121 mmol/l jsem jak pro léčivo (Augmentin[®] 625 mg), tak pro standard účinné látky (amoxicillin) zjistila vysokou toxicitu (inhibice v rozmezí 125 – 99 % pro léčivo a 125 – 106 % pro standard). Z těchto hodnot jsem nemohla získat hodnotu EC₅₀, která pro standardní toxickou látky (dichroman draselný) byla 1,335 mg/l.

38 hodin staré larvy *Thamnocephalus platyurus* jsem testovala pomocí dalšího průmyslově vyráběného kitu – Rapidtoxkitu. Pokusy probíhaly 60 minut v 7 plastových

zkumavkách ve dvou paralelních stanoveních se zkumavkou pro kontrolu při 25°C. Po uplynutí této doby jsem do testovacího média přidala červené mikrosféry a za dalších 15 – 30 minut jsem mohla po usmrcení organismů odečítat výsledky. Tento test měří pouze subletální toxický efekt, je pouze orientační a signálem přítomnosti nežádoucí sloučeniny v testované vodě je 30% inhibice příjmu barviva (IPU), která by pak měla vést k další pozornosti a boji s touto látkou. Tato hranice byla překročena v koncentraci 4,276 mmol/l (1,56 g/l) pro léčivo Augmentin[®] 625 mg a pro standard účinné látky byla tato hodnota 8,974 mmol/l (3,28 g/l). Z grafu č. 8 také vyplývá, že léčivo je toxičtější než amoxicillin samotný.

Z porovnání hodnot a grafů získaných v diplomové práci (DP; 2008) a nynějších experimentů jsme zjistili, že Augmentin[®] 625 mg je toxičtější než standard.

Metodika testů s *Tetrahymena pyriformis* a *Selenastrum capricornutum* je naším pracovištěm dále propracovávána a určitě jsou zde závažné důvody (např. velká spotřeba a vysoká exkrece nezměněné látky do volné přírody) u experimentů rozšířit testovací řady, které by umožnily výpočet hodnot EC₅₀.

Abstrakt

Psohlavcová Zuzana, Ekotoxikologický screening antibiotika Augmentin® 625 mg, rigorózní práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra Farmaceutické botaniky a ekologie

V letech 2005 – 2008 amoxicillin tvořil 17 % spotřebovaných antibakteriálních léčiv pro systémovou terapii. Užívání tohoto antibiotika v průběhu let neklesá a dochází k stálému zamořování ekosystémů. Při hodnocení ekotoxikologického efektu amoxicillinu jsem využila Algaltokit (tj. 72hodinový test inhibice růstu zelené řasy *Selenastrum capricornutum*) a Rapidtoxkit (rychlý screeningový test na korýši *Thamnocephalus platyurus*) Dále jsem použila 48hodinový test akutní toxicity s nálevníkem *Tetrahymena pyriformis*. Tyto organismy jsem testovala v koncentracích 12,5 – 0,044 g/l účinné látky. Řasa s léčivem reagovala silně toxicky, zatímco se standardem až od koncentrace 2,83 g/l. Pro *T. platyurus* byly hodnoty 30% inhibice příjmu barviva pro amoxicillin 3,28 g/l a testovaný léčivý přípravek 1,56 g/l. Nálevník reagoval v testech s oběma látkami silně toxicky. Léčivo Augmentin® 625 mg se ukázalo toxičtější než standard.

Klíčová slova: ekotoxicita, Augmentin® 625 mg, amoxicillin, *Tetrahymena pyriformis*, *Selenastrum capricornutum*, *Thamnocephalus platyurus*

Abstract

Psohlavcová Zuzana, Ecotoxicological screening of the antibiotic Augmentin[®] 625 mg, rigorous thesis

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Department of Pharmaceutical Botany and Ecology**

In the years 2005 – 2008 amoxicillin accounted 17% of all consumed antibacterial drugs used in systematic therapy. Usage of this antibiotic has not been reduced over the years and therefore the ecosystems are permanently contaminated. To evaluate the ecotoxicological effect of amoxicillin I used Algaltokit (ie. 72hour growth inhibition test of the green algae *Selenastrum capricornutum*) and Rapidtoxkit (rapid screening test for the crustacean *Thamnocephalus platyurus*). Next I used a 48hour test of acute toxicity with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. I tested these organisms in concentrations ranging from 12,5 – 0,044 g/l of the active substance. Green algae reacted with the drug strongly toxic, while the standard from a concentration of 2.83 g/l. For *T. platyurus* were 30% inhibition of particle uptake for amoxicillin 3,28 g/l and test medicine 1,56 g/l. Ciliate reacted in tests with both substances strongly toxic. The drug Augmentin[®] 625 mg has been shown more toxic than the standard.

Key words: ecotoxicity, Augmentin[®] 625 mg, amoxicillin, *Tetrahymena pyriformis*, *Selenastrum capricornutum*, *Thamnocephalus platyurus*

Použitá literatura:

- Andreozzi, R.; Caprio, V.; Ciniglia, C.; de Champdore, M.; Lo Giudice, R.; Marotta, R.; Zuccato, E.: Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(24), s. 6832 – 6838.
- Barahona, M. V.; Sánchez-Fortún, S.: Comparative study on the environmental risk induced by several pyrethroids in estuarine and freshwater invertebrate organisms. *Chemosphere*, 2005, 59(4), s. 553 – 559.
- Blinova, I.: Use of freshwater algae and duckweeds for phytotoxicity testing. *Environmental Toxicology*, 2004, 19(4), s. 425 – 428.
- Bogaerts, P.; Bohatier, J.; Bonnemoy, F.: Use of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis* for the assessment of toxicity and quantitative structure--activity relationships of xenobiotics: comparison with the Microtox test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, 49(3), s. 293 – 301.
- Bonnet, J. - L.; Dusser, M.; Bohatier, J.; Laffosse, J.: Cytotoxicity assessment of three therapeutic agents, cyclosporin-A, cisplatin and doxorubicin, with the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Research in Microbiology*, 2003, 154(5), s. 375 – 385.
- Bonnet, J. - L.; Bonnemoy, F.; Dusser, M.; Bohatier, J.: Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental Toxicology*, 2007, 22, s. 78 – 91.
- DellaGreca, M.; Iesce, M. R.; Isidori, M.; Nardelli, A.; Previtiera, L.; Rubino, M.: Phototransformation products of tamoxifen by sunlight in water. Toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms. *Chemosphere*, 2007, 67, s. 1933 – 1939.

- Cho, C. W.; Pham, T. P.; Jeon, Y. C.; Min, J.; Jung, H. Y.; Lee, D. S.; Yun, Y. S.: Microalgal photosynthetic activity measurement system for rapid toxicity assessment. *Ecotoxicology*, 2008, 17(6), s. 455 – 463.
- Czeizel, A. E.; Rockenbauer, M.; Sorensen, H. T.; Olsen, J.: Augmentin treatment during pregnancy and the prevalence of congenital abnormalities. A population based case-control teratologic study. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2001, 97(2), s. 188 – 192.
- Darcy, P.; Kelly, J. P.; Leonard, B. E.; Henry, J. A.: The effect of lofepramine and other related agents on the motility of *Tetrahymena pyriformis*. *Toxicology Letters*, 2002, 128(1-3), s. 207 – 214.
- Dellamatrice, P. M.; Monteiro, R. T. R.; Kamida, H. M.; Nogueira, N. L.; Rossi, M. L.; Blaise, Ch.: Decolourization of municipal effluent and sludge by *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2005, 21, s. 1363 – 1369.
- Diamond, J. M.; Stribling, S.; Bowersox, M.; Latimer, H.: Evaluation of Effluent Toxicity as an Indicator of Aquatic Life Condition in Effluent-Dominated Streams: A Pilot study. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2008, 4(4), s. 456 – 470.
- Dias, N.; Nicolau, A.; Carvalho, G. S.; Mota, M.; Lima, N.: Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants. *Journal of Basic Microbiology*, 1999, 39(2), s. 103 – 108.
- DP; 2008 - Psohlavcová, Z.: Ekotoxikologický screening vybraného antibiotika. Diplomová práce. 2008, s. 142.
- Eguchi, K.; Nagase, H.; Ozawa, M.; Endoh, Y. S.; Goto, K.; Hirata, K.; Miyamoto, K.; Yoshimura, H.: Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*, 2004, 57(11), s. 1733 – 1738.
- Fairchild, J. F.; Ruessler, D. S.; Haverland, P. S.; Carlson, A. R.: Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides.

- Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1997, 32(4), s. 353 – 357.
- Halling-Sørensen, B.; Nors Nielsen, S.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Lützhøft, H. C.; Jørgensen, S. E.: Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere*, 1998, 36, s. 357 – 393.
- Halling-Sørensen, B.: Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere*, 2000, 40, s. 731 – 739.
- Holoubek, I.; Maršálek, B.; Rojíčková-Padrťová, R.: Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: Selection of an optimal test battery. *Chemosphere*, 1998, 37(3), s. 495 – 507.
- Holten Lützhøft, H. H.; Halling-Sørensen, B.; Jørgensen, S. E.: Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 36(1), s. 1 – 6.
- Hrdina, V.; Hrdina, R.; Jahodář, L.; Martinec, Z.; Měrka, V.: Přírodní toxiny a jedy. Galén, Nakladatelství Karolinum, Praha, 2004, s. 302.
- Girling, A. E.; Pascoe, D.; Janssen C. R.; Peither, A.; Wenzel, A.; Schäfer, H.; Neumeier, B.; Mitchell, G. C.; Taylor, E. J.; Maund, S. J.; Lay, J. P.; Jüttner, I.; Crossland, N. O.; Stephenson, R. R.; Persoone, G.: Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 45(2), s. 148 – 176.
- Kalina, T.; Váňa, J.: Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství v Praze, 2005, s. 606.
- Kenyon, S. L.; Taylor, D. J.; Tarnow-Mordi, W.: Broad-spectrum antibiotics for preterm, prelabour rupture of fetal membranes: the ORACLE I randomised trial. *Lancet*, 2001, 357(9261), s. 979 – 988.
- Kenyon, S. L.; Taylor, D. J.; Tarnow-Mordi, W.: ORACLE – antibiotics for preterm prelabour rupture of the membranes: short-term and long-term outcomes. *Acta paediatrica*, 2002, 437, s. 12 – 15.

- Kim, J. W.; Ishibashi, H.; Yamauchi, R.; Ichikawa, N.; Takao, Y.; Hirano, M.; Koga, M.; Arizono, K.: Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). The Journal of Toxicological Sciences, 2009, 34(2), s. 227 – 232.
- Kočí, V.; Mlejnek, M.; Burkhard, J.: Statistické vyhodnocování řasových biotestů. Czech Phycology, Olomouc, 2002, 2, s. 139 – 142.
- Lanzky, P. F.; Halling-Sørensen, B.: The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. Chemosphere, 1997, 35(11), s. 2553 – 2561.
- Leifertová, I.; Baloun, J.: Farmaceutická botanika. Systematika. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1990, s. 173.
- Maeda-Martínez, A. M.; Obregón, H.; Dumont, H. J.: Food-dependent color patterns in *Thamnocephalus platyurus* Packard (Brachiopoda: Anostraca); a laboratory study. Hydrobiologia, 1995, 298, s. 133 – 139.
- Muna, L.; Guido, P.; Colin, J.; Wim, D. C.; Karl, S.: Toxicity Evaluations of Wastewaters in Austria with Conventional and Cost-Effective Bioassays. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1995, 32(2), s. 139 – 146.
- Nałecz-Jawecki, G.: In vitro biotransformation of amitriptyline and imipramine with rat hepatic S9 fraction: evaluation of the toxicity with Spirotox and Thamnotoxkit F Tests. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2008, 54(2), s. 266 – 273.
- Nałecz-Jawecki, G.; Persoone, G.: Toxicity of Selected Pharmaceuticals to the Anostracan Crustacean *Thamnocephalus platyurus*. Comparison of Sublethal and Lethal Effect Levels with the 1h Rapidtoxkit and the 24h Thamnotoxkit Microbiotests. Environmental Science & Pollution Research, 2006, 13(1), s. 22 – 27.
- Palma, P.; Alvarenga, P.; Palma, V.; Matos, C.; Fernandes, R. M.; Soares, A.; Barbosa, I. R.: Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: a case

- study of the Alqueva Reservoir (Portugal). *Environmental Science & Pollution Research*, 2009.
- Park, S.; Choi, K.: Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystem. *Ecotoxicology*, 2008, 17, s. 526 – 538.
- Pascoe D.; Karntanut W.; Müller C. T.: Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, 2003, 51(6), s. 521 – 528.
- Říhová Ambrožová, J.: Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník [on-line]. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, [16. 6. 2008] – dostupné z adresy: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.copyright.htm
- Sano, L. L.; Krueger, A. M.; Landrum, P. F.: Chronic toxicity of glutaraldehyde: differential sensitivity of three freshwater organisms. *Aquatic Toxicology*, 2005, 71(3), s. 283 – 296.
- Sauvant, M. P.; Pepin, D.; Bohatier, J.; Groliere, C. A.: Microplate technique for screening and assessing cytotoxicity of xenobiotics with *Tetrahymena pyriformis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, 32(2), s. 159 – 165.
- Sauvant, M. P.; Pepin, D.; Piccinni, E.: *Tetrahymena pyriformis*: a tool for toxicological studies. A review. *Chemosphere*, 1999, 38, s. 1631 – 1669.
- Sedlák, E.: Zoologie bezobratlých. Masarykova univerzita v Brně, Brno – Kraví hora, 2003, s. 337.
- Sören, T. - B.: Pharmaceutical antibiotic compounds in soil – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2003, 166(2), s. 145 – 167.
- Stefanidou, M.; Chatziioannou, A.; Livaditou, A.; Rellaki, A.; Aleviopoulos, G.; Spiliopoulou, H.; Koutselinis, A.: DNA toxicity of cocaine hydrochloride and cocaine freebase by means of DNA image analysis on *Tetrahymena pyriformis*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 25(3), s. 332 – 334.

- Timms, B. V.: An identification guide to the fairy shrimps (Crustacea: anostraca) of Australia. Identification Guide No. 47. Co-operative Research Centre for Freshwater Ecology (Australia), 2004, s. 76.
- Törökné, A.; Vasdinnyei, R.; Asztalos, B. M.: A rapid microbiotest for the detection of cyanobacterial toxins. *Environmental Toxicology*, 2007, 22(1), s. 64 – 68.
- Tsai, K. P.; Chen, C. Y.: An algal toxicity database of organic toxicants derived by a closed-system technique. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007, 26(9), s. 1931 – 1939.
- Volf, P.; Horák, P.: Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha, 2007, s. 318.
- Williams, W. D.: Australian Freshwater Life: The Invertebrates of Australian Inland Waters. The Macmillan Company of Australia, Melbourne, 1980, s. 321.
- Wu, C.; Clift, P.; Fry, C. H.; Henry, J. A.: Membrane action of chloramphenicol measured by protozoan motility inhibition. *Archives of Toxicology*, 1996, 70(12), s. 850 – 853.
- Wu, C.; Henry, J. A.: Interaction between ethanol and opioids in a protozoan assay. *Human & Experimental Toxicology*, 1994, 13(3), s. 145 – 148.

- elektronické zdroje:

Mediox – lékárenský systém - majetek Karlovarské krajské nemocnice, a.s.

Mikro-verze AISLP - ČR 2008.3 pro MS Windows

Mikro-verze AISLP - ČR 2009.2 pro MS Windows

SPC – Souhrn údajů o přípravku Augmentin® 625 mg [20. 7. 2008] - dostupné z adresy:
<http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>

USP DI[®] Drug Information for the Health Care Profesional

www.BioLib.cz [20. 7. 2008]

www.drugbank.ca – autor: Wishart, D., University of Alberta, Departments of Computing Science & Biological Sciences [12. 7. 2008]

www.fritschalgae.info/index.html [29. 6. 2008]

www.kkn.cz – Karlovarská krajská nemocnice, a.s. [30. 8. 2008]

<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Ciliophora> - [16. 11. 2008]

www.microbiotests.be – MicroBioTests Inc. [2. 8. 2008]

www.nies.go.jp - National Institute for Environmental Studies [12. 7. 2008]

http://silicasecchidisk.conncoll.edu/LucidKeys/Carolina_Key/html/Selenastrum_Main.html - Connecticut College, Freshwater Ecology Laboratory [29. 6. 2008]

www.sinicearasy.cz - autoři: Kaštovský, J.; Hauer, T.; Lukavský, J. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích [29. 6. 2008]

<http://www.ucmp.berkeley.edu/arthropoda/crustacea/branchiopoda.html> [20. 7. 2008] - University of California, Museum of Paleontology