

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**In vitro metody chovu sladkovodních měkkýšů čeledi
Unionidae v průběhu larválního stádia vývoje**

Bakalářská práce

Autor práce: Kateřina Nosková

Obor studia: ABPS

Vedoucí práce: Ing. Karel Douda, Ph.D.

© 2017-2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "In vitro metody chovu sladkovodních měkkýšů čeledi Unionidae v průběhu larválního stádia vývoje" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 04. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Karlu Doudovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, vstřícnost, pomoc při získávání potřebných informací a podkladů, a především trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Mé poděkování patří též mému příteli, za morální podporu a pomoc během studia i při psaní bakalářské práce, které si velmi vážím. V neposlední řadě chci poděkovat i celé své rodině za umožnění studia a nepřetržitou podporu.

In vitro metody chovu sladkovodních měkkýšů čeledi Unionidae v průběhu larválního stádia vývoje

Souhrn

Tato bakalářská práce je rozdělena na dvě části. První částí je rešerše, druhá část sestává z pilotního experimentu s glochidii druhu *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758). Cílem rešeršní části bakalářské práce je objasnit problematiku rozmnožování mlžů čeledi Unionidae v laboratorních podmínkách. V práci je pojednáváno o komplikovaném rozmnožování těchto mlžů v přírodních podmínkách. Je zde rozebrána historie in vitro chovů mlžů v laboratorních podmínkách vedoucí k dosažení úspěšné transformace glochidií bez hostitelské ryby. V práci jsou zmíněny faktory ovlivňující kultivaci glochidií. Řešenými faktory jsou především teplota kultivace, pH hodnota kultivačního média, úprava atmosféry pomocí CO₂ inkubátoru nebo vhodná doba pro ukončení kultivace. Dalším řešeným tématem je složení kultivačního média. Pojednáváno je o jednotlivých komponentech potřebných pro sestavení celkového kultivačního média. Komponenty zahrnují živné médium, zdroj bílkovin v podobě séra či plasmy, antibiotika, antimykotika a zdroje lipidů. Hlavním cílem první části bylo shrnout in vitro metody chovu glochidií.

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo provést pilotní experiment zaměřený především na snadnou dostupnost a přípravu médií, která by prokázala transformaci glochidií druhu škeble říční *Anodonta anatina*. Dalším cílem bylo prokázat alespoň minimální hodnoty transformace bez použití CO₂ inkubátoru, tedy bez úpravy okolní atmosféry regulující pH kultivačního média. Testovanými faktory byla rozdílnost dvou médií, M199 a DMEM, přítomnost pufru HEPES a výměna média 5. den kultivace, která měla podpořit transformaci glochidií. Výsledků transformace ale nebylo dosaženo. Příliš vysoké hodnoty pH na konci kultivace pravděpodobně neumožnily glochidiím dokončit transformaci. Řešenou otázkou byla i hodnota použitých antibiotik, zda nemohla být pro glochidia dávkou smrtelnou. Z výsledků je patrné, že tímto způsobem transformace dosáhnout nelze, přesto experiment poskytuje důležité informace z hlediska nastavení budoucích experimentů. Vhodným řešením by bylo otestování antibiotik na životnost glochidií, ale také úprava pH kultivačního média před započítím kultivace.

Klíčová slova: in vitro, Unionidae, glochidium, mlži, chov

In vitro methods for the culture of freshwater mollusks of the family Unionidae during larval stage

Summary

This bachelor thesis is divided into two parts. The first part of this work is a review, the second part includes a pilot experiment with *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) glochidia. The target of the review section is a clarification of Unionidae mussels' propagation in laboratory conditions. Thesis describes the complicated reproduction of these mussels in nature, history of in vitro methods for glochidia culture leading to reach success in transformation of glochidia without host fish. It is discussed about factors influencing cultivation of glochidia like temperature of cultivation, pH value of culture medium, adjustment of CO₂ atmosphere with CO₂ incubator or suitable timing of the end of cultivation. Another solved topic is the composition of culture medium, which includes individual components for mixing of complete culture medium. Components like artificial medium, source of proteins – plasma/serum, antibiotics, antimycotics and source of lipids. Target of the first part of this work was to summarize the methods of glochidia in vitro culture.

The practical part of this work includes a pilot experiment focused on the availability and preparation of complete media to achieve successful transformation for *Anodonta anatina* without the use of CO₂ atmosphere to regulate pH. The tested factors were the difference between two mediums, M199 and DMEM, the presence of buffer HEPES and exchange of culture medium on the fifth day of cultivation. However, the results of the transformation were not achieved. Glochidia probably did not metamorphose due to high pH values. Question is also the amount of used antibiotics, as it is possible, that there were used too much antibiotics. The results show that it is not possible to reach transformation by this way, but the experiment provides important results in terms of future studies settings. It would be appropriate to test the value of antibiotics on glochidia viability, and also to modify pH before the start of cultivation.

Keywords: in vitro, Unionidae, glochidia, mussels, culture

Obsah

Úvod	1
Cíl práce.....	2
Přehled literatury	3
1.1 Reprodukční biologie mlžů řádu Unionida.....	3
1.2 Význam a historie in vitro chovů sladkovodních mlžů.....	5
1.3 Používané technologie.....	7
1.4 Složky média.....	11
1.4.1 Sérum/Plasma	12
1.4.2 Médium.....	14
1.4.3 Antibiotika, antimykotika	15
1.4.4 Lipidy.....	17
Materiál a metody	19
1.5 Studovaný druh.....	19
1.6 Odběr glochidií.....	20
1.7 Příprava variant média.....	21
1.7.1 Přehled použitých komponentů	22
1.7.2 Varianty médií	22
1.7.3 Metodika experimentu	24
1.7.4 Použitý materiál a technika.....	24
1.8 Průběh kultivace a kontrol.....	26
1.8.1 Harmonogram experimentu	26
1.9 Metodika statistického vyhodnocení	28
Výsledky.....	29
Diskuze	32
Závěr	35
Seznam použité literatury.....	37
Přílohy.....	40

Úvod

V dnešní době je velké množství druhů mlžů z čeledi velevrubovití Unionidae považováno za ohrožené, zranitelné nebo dokonce vyhynulé, a to zejména kvůli znečištěným vodám v důsledku antropogenních vlivů nebo stavbě přehrad ovlivňujících jak kvalitu vody, tak i její teplotu. Tito mlži mají na počátku svého života období, v němž parazitují na rybách. V tomto období prodělávají metamorfózu z larválního stádia do stádia juvenilů. Jejich larvy se nazývají glochidia a v životě mlžů představuje larvální stádium jedno z nejrizikovějších období (Lima et al., 2012). Glochidia se po uvolnění z marsupii samic musejí přichytit pomocí byssového vlákna a ozubených skořápek na kůži nebo žábry ryby. Některé druhy mlžů vyžadují určitý druh hostitele, jiné druhy jich mají více. Toto období přetrvává až do přeměny v juvenila, mladého jedince. Délka larválního stádia se liší dle druhu mlže. Glochidia jsou přichycená a zapouzdřená v rybí tkáni a čerpají živiny z rybí krve. Po dokončení metamorfózy se z glochidií stávají juvenilové, kteří opouští tkáň ryby a upadají na dno řek či rybníků (Barnhart et al., 2008). Tato fáze je dalším kritickým bodem v životě mlžů a velké množství jich v této fázi neuspěje. Po usednutí na dno se juvenilové začínají živit filtrací jako dospělci. Vzhledem k vysokým ztrátám při infestaci, tedy osídlení hostitele, v průběhu transformace a v důsledku znečištění toků toxickými látkami je třeba usilovat o zachování druhů těchto organismů. K nepříznivým vlivům patří také vytlačování nepůvodními druhy. Z těchto důvodů je chov mlžů v laboratorních podmínkách velmi důležitý z hlediska záchrany druhu, ale také pro ekotoxikologické testy, k nimž je třeba organismu dobře se množícího v laboratorních podmínkách. První experimenty zabývající se chovem mlžů simulovaly přírodní podmínky. I přes postupná vylepšování však tyto pokusy nebyly příliš efektivní, jelikož byla potřeba nádrž s dospělými jedinci a vhodným rybím hostitelem. Proto se objevovaly snahy o chov mlžů v laboratorních podmínkách bez potřeby hostitelské ryby se zaměřením pouze na transformaci glochidií, kterých šlo získat z jednoho dospělého jedince velké množství. Principem bylo navrhnout takové médium, v kterém by glochidia prodělala metamorfózu ve zdravé juvenily. Tato kultivace glochidií měla probíhat v kultivačním médiu v Petriho misce mimo tělo hostitelské ryby. Tento způsob je nazýván *in vitro* kultivace a o vhodném složení média a ovlivňujících faktorech je pojednáváno v této práci (Lima et al., 2012; Kern, 2017).

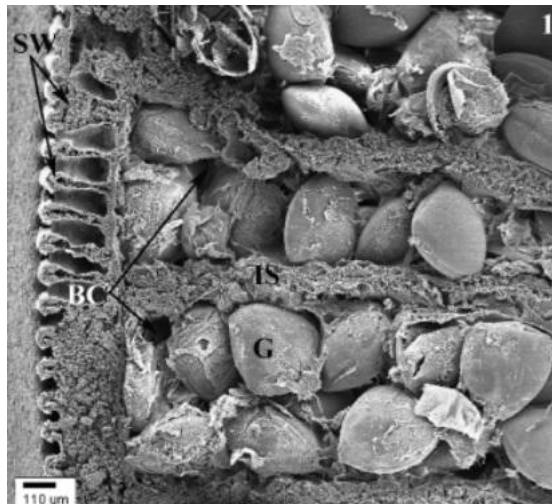
Cíl práce

Cílem práce je přiblížit problematiku chovu mlžů a shrnout dosud použité in vitro metody kultivace glochidií čeledi Unionidae. Zhodnotit nejlepší způsoby kultivace a použití látek k namíchání konečného kultivačního média. Součástí práce je i pilotní experiment, ve kterém je cílem použití nejsnáze komerčně dostupných látek, jednoduchost přípravy a průběhu celého experimentu a prokázání alespoň minimálních hodnot úspěšné transformace bez použití CO₂ inkubátoru.

Přehled literatury

1.1 Reprodukční biologie mlžů řádu Unionida

Většina sladkovodních mlžů jsou gonochoristé, tedy samčího a samičího pohlaví. Samice kladou neoplozená vajíčka do komor uvnitř žaberních listů, marsupií. Samci vypuzují spermie do otevřených vod, spermie putují vodou a samice je nasává svým sifonem. Uvnitř samice se vajíčka oplodní a vyvinou do larválního stádia (Barnhart, 2008). Vyvinutá glochidia poté setrvávají v komorách mezi žaberními listy do uvolnění z mateřského jedince (Obrázek 1). Glochidia jsou morfologicky jednoduchá, mají pouze jeden sval umožňující zavření lastury. Tento pohyb je potřebný k napadení neboli infestaci hostitelské ryby. K uzavření lastur glochidia podněcují mechanické a chemické podněty (Kern, 2017).



Obrázek 1 - Část marsupií s vyvinutými glochidii

Zdroj: Lima et al., 2006, s. 37

Některé druhy mlžů se snaží infestaci usnadnit, a tak ryby různými způsoby lákají do své blízkosti, a čekají na správný okamžik pro vypuzení glochidií. Druh vyskytující se vzácně i v ČR, velevrub tupý *Unio crassus* (Philipsson, 1788), nasaje vodu a proudem ji vypustí nad hladinu i s glochidii (Obrázek 2), čímž ji zčeří, naláká ryby a ty se náhle ocitnou ve vodě plné glochidií. Po vypuzení glochidií z mateřského jedince glochidia putují vodami a čekají na střet s vhodnou hostitelskou rybou (Vicentini, 2005).



Obrázek 2 - *Unio crassus* stříkající vodu s glochidii

Zdroj: Vicentini, 2005

Některé druhy mlžů vyžadují určitý druh hostitelské ryby, jiné druhy jich mají více. K primárnímu přichycení také pomáhá sekret a vlákna, tvořící se v tzv. Byssových žlázách. Barnhart a spol. (2008) se domnívají, že tento mechanismus by ale sám pravděpodobně pevné přichycení nezajistil. Glochidia se mohou přichytit na žábry nebo kůži ryb, přičemž připevnění ke kůži nebo ploutvím je typické spíše pro trojúhelníkovitá dorzoventrálně zploštělá glochidia z podčeledi Unioninae a čeledi Hyriidae, zatímco přichycení na žábry ryb je upřednostňováno u zástupců z čeledi Margaritiferidae a podčeledi Ambleminae. Glochidia parazitující žábry ryb jsou v porovnání s glochidii podčeledi Unioninae menší, ale dorzoventrálně vyšší. Často nemají ozubenou lasturku, ale pouze zahnutý okraj (Barnhart et al., 2008). Po přichycení se na hostitele nastává zapouzďení, které setrvává až do metamorfózy v juvenilní, dospělci podobnou formu. Zapouzďení nastává po mechanickém upevnění glochidii migrací keratocytů hostitelské ryby jako obranná funkce epitelu. Délka doby metamorfózy se odvíjí od teploty vody, čím je voda chladnější, tím déle trvá přeměna v juvenila (Roberts and Barnhart, 1999). Větší glochidia zapouzďená v tkáni ryby výrazně nerostou, avšak glochidia o velikosti $<100 \mu\text{m}$ zvětší svou délku v průměru dvakrát (Barnhart et al., 2008). Po metamorfóze v juvenila se jedinci proříznou z cysty a nastává druhé kritické období, a to uvolňování přeměněných jedinců

z cyst a osídlování dna toků nově metamorfozovanými juvenily. Ti se již živí řasami, bakteriemi nebo částičky organického materiálu. Tato fáze je kritická zejména proto, že pokud nejsou splněny požadavky jako správná teplota, vhodné složení substrátu, určitý obsah kyslíku ve vodě nebo dostatečně kvalitní potrava, mladí jedinci hynou i přes to, že invaze hostitelské ryby i přeměna z larválního stádia proběhly úspěšně. Vývoj této adaptace měl pravděpodobně usnadňovat rozptýlení mlžů do vyšších pásem vod, přičemž vztah těchto dvou organismů je nazýván foréza (Barnhart et al., 2008; Kern, 2017).

1.2 Význam a historie in vitro chovů sladkovodních mlžů

V dnešní době počet sladkovodních mlžů čeledi Unionidae neustále klesá. Někteří zástupci jsou dokonce kriticky ohroženi nebo už vyhynuli. To je způsobeno především znečištěním vod kanalizací, toxickými odpady, ale také stavbou přehrad i komerčním sběrem mlžů mezi lety 1800 - 1940 pro průmysl vyrábějící z jejich lastur knoflíky, tedy celkovým narušováním jejich původního prostředí antropogenními vlivy (Keller and Zam, 1990). Tyto faktory ovlivňují nejen mlže samotné, ale i jejich hostitele, kteří jsou pro jejich zachování nezbytní. V neposlední řadě se také na vytlačování původních druhů podílí druhy nepůvodní, tedy invazivní. Význam rozvoje chovu mlžů v laboratorních podmínkách je proto velmi důležitý nejenom z hlediska záchrany druhů, ale také např. pro ekotoxikologické testy, k nimž je třeba organismu dobře se množícího v laboratorních podmínkách (Lima et al., 2012).

První pokusy o rozmnožení sladkovodních mlžů se zaměřovaly spíše na napodobení infestace ryby, s kterým se lze setkat v potocích, řekách a jezerech. To zahrnovalo akvárium, ve kterém byly společně umístěny ryby a gravidní samice. Tento způsob byl ovšem časově náročný a kontrola byla takřka nemožná. Dalším krokem byla umělá infestace ryby, kdy se z gravidní samice odebrala glochidia. To nabízelo dvě metody infestace, a to buď přímou infestaci, prováděnou pipetou, nebo infestaci suspenzační. U přímé infestace se pipetou, která obsahovala glochidia, mířilo na ústa a žábry ryby, zatímco u infestace suspenzační se ryba umístila do provzdušněné nádrže, ve které volně plavala glochidia. Bylo zjištěno, že suspenzační metoda infestace byla účinnější, protože průměrně bylo větší množství glochidií přichyceno na rybách zamořených pomocí metody suspenzační nežli přímé (Lima et al., 2012). V dnešní době stále převládá v reprodukci mlžů v laboratorních podmínkách metoda chovu in vivo. Moderní techniky se zaměřují na efektivní využití hostitelských ryb a na úspěšnost transformace glochidií. Ryby

zamořené glochidii jsou umístěny ve speciálních akvariijních systémech s recirkulací zaměřené na sběr juvenilů. Přičemž metamorfóza druhů mlžů využívající jako svého hostitele větší druhy ryb je snazší. Zatímco v případě metamorfózy na menších druzích ryb nebo ryb ohrožených či vysoce teritoriálních je chov mlžů náročnější (Kern, 2017). Doposud byla zmiňována metoda chovu in vivo. V překladu z latiny znamená pojem in vivo - v živém, tedy kultivace glochidií in vivo znamená na rybím hostiteli. Z latiny pochází i pojem in vitro – ve skle. Kultivaci glochidií in vitro si tedy lze představit jako transformaci mimo hostitele nebo živou tkáň v Petriho misce obsahující kultivační médium. Výhodou in vitro kultivace je především získání juvenilů stejné věkové kategorie, k transformaci není potřeba hostitelská ryba a následným mikroskopováním dna není třeba hledat vyvinuté jedince mezi detritem a jedinci odpadlými před dokončenou metamorfózou. Celý proces lze takto mikroskopicky pozorovat po celou dobu kultivace, což umožňuje přesnější načasování navazujících experimentů, např. testování brzkých fází juvenilů na znečištění vod, toxické látky nebo změny biotopů (Keller and Zam, 1990).

Na počátku dvacátého století, byl zveřejněný experiment od Ellis & Ellis (1926), který spočíval ve vyříznutí glochidia druhu *Lampsilis fallaciosa* (Smith, 1899) z cysty na hostitelské rybě *Lepisosteus platostomus* (Rafinesque, 1820) a následně umístění glochidia do kultivačního média (Ellis and Ellis, 1926). Což mohlo pravděpodobně narušit transformaci. Avšak detaily použitého média nebyly nikdy publikovány (Lima, 2012). Tento experiment byl zásadním bodem v rozvoji in vitro metod reprodukce mlžů. V dalších letech bylo provedeno množství experimentů, které se zaměřovaly na in vitro kultivaci glochidií samotného druhu, což bylo zaměřeno především na zvolení vhodného kultivačního média, nebo také na obecné působení vlivů jako je pH, CO₂ a teplota na samotnou transformaci. První in vitro experimenty navazující na experimenty od Ellis & Ellis (1926) realizované Isomem a Hudsonem (1982) založené pro transformaci glochidií v kultivačním médiu byly realizovány v médiu s velkým podílem rybí plasmy. Kultivační médium obsahovalo aminokyseliny, dextrózu, antibiotika (carbecillin, gentamycin sulfate, rifampin), antimykotika (amphotericin B) a rybí plasmu ve fyziologickém roztoku. I přes to, že úspěchy na sebe nedaly dlouho čekat, v dalších experimentech byly stanoveny vyšší nároky, a to úspěch transformace bez nutnosti rybí plasmy. V dalších letech se tedy směr výzkumu ubíral nalezením jiného bílkovinného zdroje, než nabízí rybí plasma, ale také co nejvyšší hodnotou transformace a v neposlední řadě i vyšší kvalitou transformovaných juvenilů (Isom and Hudson, 1982; Keller and Zam, 1990)

1.3 Používané technologie

In vitro chov glochidií umožňuje glochidiím podstoupit metamorfózu do juvenilního stádia bez přítomnosti rybího hostitele. Do roku 2012 se takto podařilo odchovat glochidia 42 druhů, mezi kterými byly i druhy ohrožených mlžů USA jako např. *Cyprogenia stegaria* (Rafinesque, 1820), *Epioblasma capsaeformis* (Lea, 1834), *Epioblasma brevidens* (I. Lea, 1831), *Lampsilis abrupto* (Say, 1831). Metamorfózu glochidia podstupují v Petriho miskách obsahujících kultivační médium se všemi potřebnými složkami. Metody in vitro chovů glochidií do juvenilního stádia mají oproti transformaci in vivo spousty výhod, a to především:

- Produkce velkého množství juvenilů
- Není nutná znalost přirozeného hostitele
- Nižší cena v přepočtu na jednoho transformovaného juvenila
- Minimální počáteční ztráty a ztráty během kultivace
- Bez nutnosti zařízení potřebných pro život hostitele

Přes všechny výhody sebou nesou in vitro chovy i určité požadavky a rizika, jako např.:

- Zdravotní stav juvenilů může být zhoršený
- Nutnost požadovaných látek a techniky
- Obtížné udržení plísňové a bakteriální infekce na minimum (Lima et al., 2012)

Na samém počátku experimentu je nutno nějakým způsobem získat glochidia, a to buď samovolným uvolněním z mateřského jedince, nebo průplachem žaberních dutin mateřského jedince sterilizovanou vodou. Glochidia uvolněna přirozeně bývají ale rychle kontaminována oproti glochidiím odebraným přímo z marsupíí (Barnhart and Roberts, 1999). Odběr probíhá tak, že vyjmeme celé žábry, které propláchneme v deionizované vodě (Isom and Hudson, 1982), anebo tak, že lasturu opatrně otevřeme a naříznutím marsupíí a jejich následným propláchnutím získáme glochidia šetrněji (Barnhart and Roberts, 1999). K tomu se používá sterilizovaná injekční stříkačka vhodné velikosti, např. 0,3mm průměr, 13mm délka. Druhá metoda se dnes používá běžně ve většině experimentů (Barnhart and Roberts, 1999; Lima et al., 2006; Taskinen et al., 2011).

Před umístěním glochidií do kultivačních misek s médiem je dobré prověřit jejich životnost. Tu lze zjistit zkontrolováním glochidií pod mikroskopem (x100) zda periodicky zavírají lasturky (Lima et al., 2006). Dalším testem na viabilitu glochidií může být test

s NaCl, při kterém se glochidia vystaví roztoku s NaCl. Po rozptýlení látky po celém objemu tekutiny s glochidii začnou glochidia reagovat na jiný chemický potenciál, přičemž živá glochidia uzavřou lasturky. Ostatní glochidia, která na chemický potenciál nezareagovala a zůstala otevřená, jsou považována za mrtvá, protože pružnost zámku s vazy otevře lastury po uvolnění svalů, který je zavírá (Barnhart and Roberts, 1999). Odebraná glochidia by měla být umístěna do kultivačního média nejpozději 5 hodin od odebrání z marsupii samice, později se již snižuje jejich životnost (Uthaiwan et al., 2001).

V prvotních úspěšných experimentech in vitro kultivace stanovili Isom a Hudson (1982) teplotu vhodnou pro kultivaci na 23°C. Zjistili, že při vyšších teplotách klesají počty metamorfovaných juvenilů. V kultivaci při 28 °C klesly výnosy ze 48,8 % na 18,8 % (Isom and Hudson, 1982). V roce 1999 provedli Roberts a Barnhart sérii pokusů založených na vlivech teploty na transformaci glochidií. Testovali, zda nízká teplota pomáhá glochidiím k zacystění a následné transformaci na rybím hostiteli. Vycházeli z toho, že nízká teplota potlačuje imunitní funkce u exotermních organismů, do kterých se řadí i ryby. V laboratorních podmínkách při experimentech na rybím hostiteli nastavili teplotu na 10, 15 a 21°C. Transformační úspěch byl největší při 10°C. Při pokusech provedených in vitro za stejných teplotních podmínek byl ale výsledek opačný, tedy při 21°C bylo množství transformovaných juvenilů významně vyšší nežli při 10°C. Tyto výsledky podporují hypotézu, že imunitní funkce ryby za nízké teploty umožňují větší transformační úspěch, ale určitá teplota není pro glochidia rozhodujícím prvkem. Potvrdilo se tedy tvrzení Isoma a Hudsona, kteří stanovili teplotu na 23°C, že při této teplotě je udržen bakteriální a plísňový rozvoj na minimu, což je pro transformaci důležitější skutečnost než samotná teplota (Roberts and Barnhart, 1999). V roce 2013 provedl experimenty Taeubert a spol. (2013) s mlžem velevrub tupý *Unio crassus* a hostitelem, kterého představoval druh střevle potoční *Phoxinus phoxinus* (Linnaeus, 1758). Experimenty byly založené na testování čtyř různých teplot (12 °C, 17 °C, 20 °C a 23 °C) v průběhu metamorfózy glochidií, zda odlišné teploty ovlivní vývoj glochidií na rybím hostiteli. V průběhu prvních 9 dnů probíhala transformace úspěšně, zlom však nastal 10. den. V dalších dnech se objevila mortalita hostitelských ryb a to v takovém rozsahu, že po ukončení testování dosahovala mortalita až 71 % u skupiny držené v 20 °C. Smrt hostitele ale vždy znamená i smrt glochidií i přes předešlý úspěch při přichycení, zacystění i započetí transformace. Toto období je tedy rizikové nejen pro glochidia, ale i pro hostitelské ryby. Při testování vhodné teploty u in vitro kultivací ale není třeba znát vhodné

teplotní rozmezí pro hostitelské ryby a v porovnání s teplotou vhodnou pro glochidia není nutné hledat kompromis. U in vitro kultivace se lze zaměřovat pouze na teplotu vhodnou pro dosažení nejlepších výsledků transformace glochidií určitého druhu, a tím obejít větší znalost hostitele (Taeubert et al., 2013).

V prvotních experimentech Isoma a Hudsona (1982) založených na kultivaci glochidií byl používán CO₂ inkubátor k udržení vyššího obsahu oxidu uhličitého v umělé atmosféře napomáhající udržení pH. CO₂ inkubátor byl dále běžně používán v in vitro kultivacích glochidií (Keller and Zam, 1990; Kovitvadhi et al., 2006; Lima et al., 2006; Taskinen et al., 2011). Byly testovány hodnoty CO₂ v umělém atmosférickém vzduchu, a to v hodnotách atmosférického vzduchu, vzduchu s 2 % CO₂ a 5 % CO₂, ve vztahu k přeměně glochidií. Bylo zjištěno, že čím vyšší byl obsah CO₂ v okolním vzduchu, tím vyšší byly hodnoty metamorfozovaných jedinců (Barnhart and Roberts, 1999). Alternativou za CO₂ inkubátor jsou hermeticky uzavřené nádoby, do kterých se v intervalech pouští plyn určité koncentrace. Tento plyn lze získat např. z komerčně dostupných mixtur s 5 % zastoupením CO₂ (Barnhart and Roberts, 1999). Experimenty s hermeticky uzavřenými nádobami byly provedeny také na ohroženém evropském druhu velevrub tupý *Unio crassus*, hodnota CO₂ v nádobách byla měřena každé dva až tři dny a při nedostatku CO₂ byla nádoba doplněna pro udržení hodnoty CO₂ na 5 % objemu oxidu uhličitého ve vzduchu (Gąsienica-Staszeczek et al., 2017).

Dalším faktorem ovlivňujícím hodnoty transformace je pH média po celou dobu kultivace. Hodnota pH je úzce spjata s množstvím CO₂ ve vzduchu. Experimenty zaměřené na vliv hodnoty pH a CO₂ na transformační úspěch glochidií provedli Barnhart a Roberts v roce 1999. Celý experiment byl proveden v nádobách plněných plynem CO₂ při teplotě 15 °C. Součástí byl i test organického pufru HEPES a také provedení bez pufru HEPES. Pufry jsou látky schopné udržet v určité míře konstantní pH. Média byla upravena na hodnoty pH 7,6; 7,9 a 8,2. Varianty hodnot CO₂ ve vzduchu byly 0,04 % (atmosférický vzduch), 2 % a 5 %. Jako nejlepší možnou variantou se ukázala nejnižší zvolená hodnota pH s nejvyšším obsahem CO₂ v okolní atmosféře, systém HEPES neprokázal stabilizaci pH. Přičemž médium s HEPES bez úpravy CO₂ v okolní atmosféře neprokázalo transformaci ve všech testovaných hodnotách (Barnhart and Roberts, 1999).

K úspěšné přeměně glochidia v juvenila je zapotřebí znát jeho optimální délku transformace zejména proto, že v toto období je zapotřebí přemístit glochidia do jejich přirozeného prostředí, vody. V roce 2017 byl uskutečněn experiment hledající optimální délku metamorfózy ohroženého druhu *Unio crassus*. Experiment byl rozdělen na tři části.

První částí byla kultivace glochidií v umělém médiu v CO₂ atmosféře, která odpovídá fázi probíhající v přírodních podmínkách na rybím hostiteli. Druhou částí je fáze postupného ředění média vodou, tento krok odpovídá situaci odpojení jedince od hostitelské ryby. Třetí částí je období mladých jedinců vyvíjejících se ve vodním prostředí. Testování spočívalo v hledání správné doby vývoje glochidií pro počátek postupného ředění kultivačního média k ukončení transformace. K ředění byla použita neionizovaná voda nebo minerální voda v lahvi značky Kropla Beskidu, která má podobné složení jako voda, z které pocházeli dospělí jedinci *Unio crassus*. Na kultivaci nemělo složení vody téměř žádný vliv, jediným pozorovaným jevem byl pomalejší rozklad těl odumřelých glochidií v médiu s minerální vodou. Ředění probíhalo 10., 13., 15., 17., 20., 22., a 24. den po zahájení kultivace na 50 % zastoupení původního média. Druhé přidání vody následovalo 4 – 5 dní po prvním a původní médium se tak redukovalo na 25 %. Reakce na ředění média naznačuje, že glochidia reagují na přítomnost vody a snaží se přizpůsobit novým podmínkám otevřením lastur. Po uplynutí následujících 7 – 8 dní bylo médium kompletně vyměněno za minerální vodu. Médium naředěné již 10. den po začátku kultivace způsobilo, že glochidia i přes nedokončení transformace otevřela lasturky, a v důsledku nezralosti hynula. To by v přírodních podmínkách nebylo možné, protože glochidia při správné transformaci nejsou v kontaktu s vodou do dosažení fáze, v které se začínají pohybovat a jsou již schopná ve vodě přežít. Při ředění 13. a 17. den bylo dosaženo 36 % a 25 % transformace. Kultivace ředěná 15. den byla infikována a v důsledku toho žádný jedinec nepřežil. Transformace neproběhla ani u jednoho jedince z kultivací v médiu ukončených dříve než 13. den nebo déle než 17. den. Glochidia, která přežila první ředění vodou, byla kompletně transformovaná za 24 – 27 dní po zahájení experimentu. To ukazuje obtížnost kultivace i přes zdárně zvolené kultivační médium především proto, že doba transformace se u každého druhu mlže liší a její délka je ovlivňována i teplotou (Gašienica-Staszeczek et al., 2017).

Po úspěšné transformaci glochidií v juvenilny nastává období, kdy již jedinci nečerpají živiny z média. Toto období lze poznat tak, že pod mikroskopem je možné pozorovat pohyblivou nohu vyčnívající z lastur, lastury již nemají ozubenou skořápku, ale hladký okraj a jedinci jsou aktivní, později lze pozorovat nárůst vnějších vrstev lastury. V přírodě je tato fáze velmi kritickým bodem, kdy se juvenilové prořezávají z cysty na hostiteli a usedají na dno toků. V tuto chvíli se tedy musejí vyživovat jiným způsobem než je čerpání živin z kultivačního média v případě *in vitro* kultivace nebo z hostitelské ryby v přírodních podmínkách. V *in vitro* chovech jsou v této fázi přemísťováni z kultivačního

média do provzdušněných nádrží s vodou zbavenou chlóru. V experimentech Uthaiwan a spol. (2001) bylo do jedné provzdušněné nádrže umístěno 200-300 ml nechlórované vody. Juvenilové byly před umístěním do nádrží propláchnuty sterilizovanou vodou s médiem M199. Mladí jedinci druhu *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856) byli krmeni směsí 3 druhů fytoplanktonu (*Chlamydomonas sp.*, *Monoraphidium sp.*, *Chlorella sp.*) po dobu 2 měsíců. Fytoplankton byl do vody přidáván v takovém množství, aby měla voda lehce nazelenalou barvu. Údržba probíhala denně výměnou poloviny objemu nádrže. V tomto období se mladí jedinci živí již jako dospělci mikroskopickou potravou, kterou přijímají filtrací z vody (Uthaiwan et al., 2001).

1.4 Složky média

V roce 1982 publikovali Isom a Hudson transformační úspěch u několika druhů sladkovodních mlžů řádu Unionoida bez potřeby hostitelské ryby. Metamorfózy docílili tím, že namixovali roztok aminokyselin, vitamínů, glukózy a solí modifikovaný z roztoku “Unionid Ringers“ odvíjející se od poznatků Ellis a Ellis (1926). Modifikace spočívala v nahrazení K_2HPO_4 . Použili $NaHCO_3$ pro možnost regulace pH pomocí změny CO_2 koncentrace vzduchu (Isom a Hudson, 1982). Do tohoto roztoku přidali vakuově sterilizovanou rybí plasmu jako zdroj bílkovin, růstových faktorů, hormonů atd. (Farris and Hassel, 2006). Celkové médium obsahovalo sterilizovanou rybí plasmu, roztok obsahující směs aminokyselin, solí, glukózu a vitamíny, pro snížení bakteriální kontaminace na minimum byla přidána také antibiotika (carbenicillin, rifampin, gentamycin), antimykotika (Amphotericin B) proti rozvoji plísní a fenolovou červeň detekující pH (Keller a Zam, 1990). Ačkoli dřívější testy ukázaly, že čím vyšší je procento rybí plasmy v celkovém médiu, tím vyšší je hodnota transformovaných glochidií, jako poměr v nejlepším vztahu - úspěch transformace/cena stanovili Isom a Hudson (1982) 1 díl rybí plasmy na 2 díly média. Tento poměr mezi bílkovinným zdrojem a médiem se dále používal v mnoha dalších experimentech zaměřených na in vitro kultivaci glochidií různých druhů mlžů, počínaje experimenty provedené Kellerem a Zamem (1990). Výsledky metamorfózy v médiu od Isoma a Hudsona s použitím rybí plasmy byly v pokusech provedených Kellerem a Zamem vysoké, ale vyústily v transformované juvenilů, kteří byli neaktivní a letargičtí. Naopak komerčně dostupné médium (M199, DME) za použití koňského séra produkovalo významně nižší hodnoty transformovaných juvenilů, ale mladí jedinci byli zdravější. Uthaiwan a spol. (2001) ve svých experimentech

dokazují, že za použití média M199 a rybí plazmy může dojít k podpoře a zvýšení kvality transformace a zároveň jsou výsledkem aktivní a zdraví, čerstvě transformovaní juvenilové, kteří se dožívali věku 3 měsíců. Z těchto faktů vycházeli Lima a spol. (2006), kteří zkonstruovali médium o stejných komponentech jako Uthaiwan a spol. (2001). Výsledkem jejich kultivace byli také zdraví a aktivní juvenilové. Ačkoli použité látky i postup byl stejný jako u dříve provedených experimentů, jejich kultivace trvala namísto očekávaných 3 měsíců pouhých 15 dní. To ukazuje, že je ještě další množství jiných faktorů ovlivňujících jak transformaci, tak i fázi rozvoje juvenilů (Lima et al., 2006).

1.4.1 Sérum/Plasma

Původní médium od Isoma a Hudsona obsahovalo jako zdroj bílkovin rybí plasmu, která se zdála být nezbytnou součástí pro zdárný vývoj glochidií. Detekovali, že čím vyšší je obsah plazmy v celkovém médiu, tím větší je procento úspěšné transformace (Isom and Hudson, 1982). Plasmu získávaly z rybí krve, která byla odebírána přímo ze srdce ryby pomocí sterilní heparinizované injekční stříkačky. Tedy injekční stříkačky s jehlou ošetřené heparinem, což je antikoagulant, látka snižující srážlivost krve. Krev byla dále zchlazená a centrifugována rychlostí 1000 ot./min. po dobu deseti minut, následně pak centrifugována rychlostí 3000ot./min. po dobu dalších deseti minut. Poté byla oddělena plasma, ta byla centrifugována po dalších deset minut. Následně proběhl další odběr plazmy aspirační pipetou od celku a dále byla plasma zmrazena, poté filtrována, čímž došlo k získání čisté plazmy bez krevních složek (Isom and Hudson, 1982).

V dalších experimentech byla snaha o nalezení jiného proteinového zdroje, než nabízí rybí plasma. Důvodem byly hlavně složité přípravy před použitím rybí plazmy týkající se hlavně odběru rybí krve a následně separace plazmy z krve, která je zdlouhavá a nezaručuje takovou sterilitu jako komerčně dostupné proteinové zdroje. Jako proteinové zdroje byly testovány séra různých obratlovců, jako např. koňské, telecí, králičí, prasečí nebo kuřecí sérum. Plasma a sérum se ale v některých složkách liší. Plasma obsahuje stejně jako sérum hormony, glukózu, elektrolyty, protilátky, antigeny, živiny a navíc oproti séru faktory účastnící se srážení krve. Lze tedy říci, že sérum je plasma bez srážecích faktorů (Hayat, 2012).

Další pokrok učinil Keller a Zam (1990), kteří interpretovali výsledky úspěšné in vitro kultivace glochidií druhu *Anodonta imbecilis* (Say, 1829) bez přítomnosti rybí plazmy v kultivačním médiu. Ve svém experimentu nahrazovali rybí plasmu různými

proteinovými zdroji nebo séry jiných obratlovců např. koňským sérem, telecím sérem, bílkovinnými sraženinami z jater lososa a tresky, kaseinem z kravského mléka a rybí plasmou pro porovnání. Zatímco rozdíly v počtu metamorfovaných juvenilů nebyly významné, jedinci vyvinutí v telecím a koňském séru byly více vitální a pohybliví. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s telecím a následně poté s koňským sérem. I přes to, že telecí sérum indikovalo mírně lepší výsledky než koňské, bylo z důvodu nižší ceny preferováno koňské sérum (Keller and Zam, 1990). Další experimenty rozvíjející použití jiné než rybí plasmy prováděli Hudson a Shelbourne v roce 1990. Porovnávali výnosy transformace za použití rybí plasmy a sér obratlovců nebo jiných proteinových náhrad. Testovali sérum králičí, prasečí, koňské, jehněčí, telecí a kuřecí. Další série pokusů byly založeny na kombinaci dvou proteinových zdrojů – rybí plasma/králičí sérum, rybí plasma/prasečí sérum, rybí plasma/telecí sérum, rybí plasma/koňské sérum, králičí sérum/prasečí sérum, dále použití různých umělých proteinových zdrojů – TCM, TCH, CPSR, Serumac, LPSR, TM-235. A následně kombinace vždy rybí plasmy a jednoho umělého proteinového zdroje. Komponenty jako TCM, TCH a CPSR produkovaly v kombinaci s rybí plasmou větší výsledné hodnoty než rybí plasma sama. Následně byly proteinové náhrady testovány s vybranými séry. Při vytvoření kombinace nejúspěšnějšího séra se dvěma proteinovými zdroji dosáhli toho, oč usilovali. Detekovali nejlepší transformační hodnoty při použití králičího séra společně s TCH a TCM náhražkami séra u druhu *Elliptio lanceolata* (Lea, 1828) v poměru 1:1:1. Tyto hodnoty byly dokonce vyšší než při použití rybí plasmy a navíc bylo sérum omezeno na 1/9 namísto 1/3 (Hudson and Shelbourne, 1990).

V roce 2002 byly prováděny experimenty s mlžem *Hyriopsis myersiana* porovnávající transformaci při použití koňské plasmy, plasmy kapra obecného *Cyprinus Carpio* (Linnaeus, 1758), tilápie nilské *Oreochromis Niloticus* (Linnaeus, 1758), *Pangasius Pangasius* (Hamilton, 1822) a hybrida keříčkovce velkohlavého *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864) X *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Výsledky s použitím koňské plasmy nebyly ani zdaleka tak úspěšné jako u druhu *Anodonta imbecilis* v experimentech Kellera a Zama z roku 1990. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s plasmou kapra obecného, kde se procento přeživších pohybovalo okolo 94 %, z čehož 100 % úspěšně dokončilo transformaci, tito metamorfozovaní juvenilové také přežili nejdéle ze všech ostatních testovaných skupin (Uthaiwan et al., 2002). Pro úspěšný výběr proteinového zdroje není možné vycházet z předešlých experimentů, pokud se zaměřovaly na nalezení proteinového zdroje u jiného druhu mlže. Pro dosažení největších

transformačních hodnot je vždy důležité zkoumat vhodnost finálního média v rámci jednoho druhu mlže. Porovnáním míry transformace v médiu s koňským sérem a v médiích se sérem několika druhů ryb bylo zjištěno, že u druhu *Hyriopsis myersiana* bylo dosaženo největší míry transformace se sérem kapra obecného *Cyprinus Carpio*. To může souviset s vysokou koncentrací některých aminokyselin v séru tohoto druhu ryby. Nicméně, složitost získání rybího séra mohou převážit v porovnání s menší produkcí snadno dostupná savčí séra. Rybí sérum ale obsahuje látky působící také jako antibiotika (Meyer, 2007).

Ma a spol. (2017) testovali účinky plasmy druhu hostitelské ryby a dvou druhů ryb nehostitelských na transformační hodnoty glochidií druhu *Cristaria plicata* (Leach, 1815). Výsledné hodnoty transformace ukázaly, že hodnoty dvou druhů nehostitelských ryb byly nepatrně vyšší. Po biochemické analýze plasmy těchto tří druhů ryb bylo zjištěno, že plasma nehostitelských druhů ryb obsahovala více LDL a HDL. To naznačuje, že tyto lipoproteiny mohou být důležité pro metamorfózu glochidií (Ma et al., 2017). Ačkoli bylo prokázáno, že je možná transformace glochidií i se sérem savců (Keller and Zam, 1990; Barnhart and Roberts, 1999), zůstane pravděpodobně rybí sérum nejúspěšnějším zdrojem bílkovin potřebných pro správný fyziologický vývoj, kontrolu kontaminace a celkově velmi potřebná složka při kultivaci glochidií ve zdravé juvenilí (Kern, 2017).

1.4.2 Médium

V prvním experimentu Isoma a Hudsona (1982) bylo používáno médium nazývané “Unionid Ringer’s“, které bylo modifikované z média vytvořeného od Ellis a Ellis (1926) obsahující aminokyseliny, vitamíny, glukózu a soli. Vzhledem k náročnosti příprav bylo ale v následujících experimentech od tohoto média upuštěno a pro snadnost použití a lehkou dostupnost se začala používat komerčně dostupná média. Např. Isom a Hudson již v roce 1982 také dosáhli metamorfózy s použitím předpřipravených komerčně dostupných médií jako M199 a Eagles essential and non-essential amino acids, která obsahovala stejné nebo větší množství takových aminokyselin, nacházejících se v rybí plasmě, což bylo hlavním kritériem při sestavování média “Unionid Ringers“ (Isom and Hudson, 1982). V dalším experimentu, navazujícím na předchozí při použití koňského séra, byla testována dvě komerčně dostupná média, a to M199 a DME. Tato média obsahovala mnoho stejných komponentů jako médium od Isoma a Hudsona, avšak byla předem připravená ve formě prášku, který stačilo hydratovat a následně upravit hodnotu pH na 7,3-7,4. Ukázalo se, že

procento transformace u předem připravených médií bylo znatelně vyšší nežli u média navrženého Isomem a Hudsonem (Keller and Zam, 1990). V dalších experimentech se pro snadnost přípravy, dostupnost a transformační úspěch používala zejména média M199 a DME, která sloučením s bílkovinným zdrojem, antibiotiky a antimykotiky dala vznik konečnému kultivačnímu médiu používaného pro kultivaci glochidií ve vitální juvenilně (Roberts and Barnhart, 1999; Uthaiwan et al., 2001; Uthaiwan et al., 2002; Lima et al., 2006; Taskinen et al., 2011).

V roce 2011 použil Taskinen a spol. (2011) pro kultivaci mlžů *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) a *Pseudanodonta complanata* (Rossmöessler, 1835) médium L-15 od Leibowitze navržené pro inkubaci bez použití CO₂ inkubátoru. Ačkoli se glochidia vyvíjela správně a jejich orgány byly viditelné, jejich transformace se nezdařila (Taskinen et al., 2011). Ačkoli Wen a spol. (2011) kultivovali s úspěchem druh *Hyriopsis cumingii* (Lea, 1852) v běžném inkubátoru s použitím média L-15, pro kultivaci mnoha druhů glochidií bylo stále nezbytné použití atmosféry s 5 % CO₂ za použití média M199 (Ma et al., 2017). Další experimenty porovnávající médium L-15 s médii M199 a MEM prokázaly, že médium L-15 umožnilo glochidiím druhu *Potamilus alatus* (Say, 1817) lepší podmínky pro rozvoj při teplotě 24 ± 0,5 °C bez úpravy atmosféry pomocí CO₂. V tomto experimentu bylo prokázáno, že metody s využitím L-15 jako základního média prokazatelně zjednodušily proces in vitro kultivace glochidií a zlepšily její úspěšnost v porovnání s dosud využívanými způsoby in vitro kultivace (Wen et al., 2018).

1.4.3 Antibiotika, antimykotika

Glochidia získaná ze samice je velice obtížné izolovat od mikroorganismů. Proto je nutné přidávat do finálního kultivačního média antibiotickou a antimykotickou složku, která minimalizuje bakteriální kontaminaci kultivace glochidií. Pro ochranu glochidií před nepříznivým působením a namnožením bakterií dělali Isom a Hudson (1982) pokusy s různými druhy antibiotik. Jako nejlepší antibiotikum se ukázaly carbecillin, gentamycin sulfát a rifampin. Každé z těchto antibiotik bylo přidáváno v množství 100µg na mililitr finálního média. Tato antibiotika byla použita v mnoha dalších kultivacích glochidií. Testování antibiotik ve směsi PSN obsahující penicillin, streptomycin a neomycin v celkovém kultivačním médiu v hodnotách 30 µl, 60 µl a 120 µl na 3 ml v porovnání s původně navrženými antibiotiky od Isoma a Hudsona (1982) ukázalo, že tato antibiotika nevykazují lepší výkony než antibiotika carbecillin, gentamycin sulfát a rifampin.

Výsledků stejných jako kultivace s původní variantou antibiotik nedosáhla žádná z testovaných hodnot směsi PSN. Nejlepší výsledky prokázala nejvyšší hodnota antibiotik PSN v množství 120 µl na 3 ml média (Freshwater bivalve ecotoxicology, 2006). Taskinen (2011) použil také antibiotika ve směsi PSN obsahující penicillin, streptomycin a neomycin u druhu *Anodonta anatina*, *Anodonta cygnea* (Linnaeus, 1758), *Pseudanodonta complata* a *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758). Dosáhl transformace u všech testovaných druhů kromě *M. margaritifera*. Antibiotika byla použita v množství 100 miligramů na mililitr média a u druhu *Anodonta anatina* dosáhly transformační hodnoty 100 % v kultivaci provedené na jaře (Taskinen et al., 2011).

Další nepříznivý vliv na kultivaci měl rozvoj plísní, který Isom a Hudson (1982) odstranili použitím antimykotik ve formě Amphotericinu B v dávce 5 µg/ml. Použitá antibiotika a antimykotika fungovala úspěšně s počátečním propláchnutím glochidií a umístěním do čisté nádoby s novým médiem. Starší glochidia čelila kontaminaci lépe než glochidia mladší (Isom and Hudson, 1982). Tuto kombinaci antibiotik a antimykotik použili s úspěchem ve svých experimentech např. Keller and Zam (1990), Kovitvadhi et al. (2006), Owen et al. (2010) a další. V roce 2010 byly provedeny experimenty pro porovnání několika antimykotik na mlži *Lampsilis teres* (Rafinesque, 1820). Mezi testovaná antimykotika byly zařazeny: Dichloran, Hygromycin B, Enomyl, Thiabendazol, Econozol, Ketaconazole, Amphotericin B a Nystatin. Kromě Hygromycinu B a Nystatinu přidané v množství 50 µg/ml byly ostatní látky přidány v množství 1 µg/ml. Sestupně dle úspěchu transformace byly seřazeny látky Thiabendazol, Dichloran, Benomyl a Amphotericin B, ostatní transformaci neprokázaly. Není ale zřejmé, jestli ostatní léčiva působila na glochidia cytotoxicky nebo zda je zahubily látky produkované plísněmi. Možná by byla i kombinace těchto dvou faktorů. Jedinci metamorfozovaní s antimykotiky Thiabendazol a Benomyl byli letargičtí a do dvou dnů uhynuli (Owen et al., 2010). Testování těchto látek bylo uskutečněno v kultivacích se zdrojem bílkovin v podobě rybího séra, které obsahuje látky působící jako antibiotika (Meyer et al., 2007). Rybí sérum by tedy mohlo být v ochraně proti kontaminaci účinnější než komerčně dostupná séra savců (Owen et al., 2010). Ačkoli bylo prokázáno, že je možná transformace glochidií i se sérem savců (Keller and Zam, 1990; Barnhart and Robets, 1999), zůstane pravděpodobně rybí sérum nejúspěšnějším zdrojem bílkovin nutných pro správný fyziologický vývoj, kontrolu kontaminace a celkově velmi potřebná složka při kultivaci glochidií ve zdravé juvenily. V roce 2011 provedl Taskinen sérii pokusů s mlžem *Anodonta cygnea*, kde bylo cílem otestovat účinek antimykotik v různých koncentracích na transformaci glochidií.

Testovaným antimykotikem byl Amphotericin B a v experimentu byl použit v množství 6, 7 a 8 mikrogramů na mililitr konečného média. Konečné hodnoty transformace byly seřazeny vzestupně dle přidaného množství antimykotik $31,9 \pm 3,5$; $39,9 \pm 2,6$ a $57,7 \pm 3,9$ %. Antimykotika u tohoto druhu mlže významně zvýšila konečné transformační hodnoty (Taskinen et al., 2011). Ačkoli u druhu *Anodonta cygnea* zvýšená dávka antimykotik umožnila dosažení větších transformačních hodnot, u druhu *Villosa iris* (Wright, 1898), *Villosa taeniata* (Conrad, 1834) a *Alasmidonta marginata* (Say, 1818) působila toxicky již dávka 5 mikrogramů na mililitr média doporučená Isomem a Hudsonem (1982). Antimykotikum Amphotericin B má jen malé rozmezí mezi koncentrací účinnou k potlačení plísňové kontaminace a koncentrací již toxickou. Proto je v dnešní době často hodnota redukována na koncentraci 1 mikrogram na mililitr konečného kultivačního média. Avšak tato koncentrace neudrží plísňovou kontaminaci na minimu v průběhu celé kultivace, tudíž je nutná každodenní výměna média. Častá výměna média ale může vyústit ve stres kultivovaných glochidií (Patterson et al., 2018).

1.4.4 Lipidy

Při porovnání glochidií vyvíjejících se na rybě nebo v kultivačním médiu se zdálo, že zásoby lipidů u glochidií vyvíjejících se na rybím hostiteli byly vyšší nežli u těch v kultivačním médiu. Tankersley (2000) uvedl, že počáteční hladina lipidů u glochidií a juvenilů závisí na mateřském jedinci. A navíc je možné ovlivnit zásoby lipidů glochidií a tedy i juvenilů složením kultivačního média, ze kterého rozvíjející se glochidium dokáže lipidy čerpat. Fisher (2002) prokázal, že glochidia vyvíjející se v kultivačním médiu obsahující králičí sérum měla menší lipidové zásoby než glochidia transformovaná na hostitelské rybě. Tudíž Hudson porovnal výsledky transformace u kultivačních médií obsahující olej z olivní (squid oil) a olej z tresčích jater (cod liver oil). Do kultivační misky přidal 50 μ l jednoho z vybraných olejů. Výsledné hodnoty se lišily, olej z tresčích jater prokázal lepší výsledky než olej z olivní a navíc snížil výskyt plísňové infekce (Farris and Van Hassel, 2006). Faktem je, že přidáním zdroje lipidů (oleje z tresčích jater apod.) se zvýší zásoby lipidů u juvenilů, což naznačuje, že přídavek lipidů může významně zvýšit kvalitu transformovaných juvenilů (Lima et al., 2012). Množství zásob lipidů u juvenilů se odvíjí nejen od druhu hostitelské ryby, na které proběhla transformace, ale výsledné hodnoty lipidů se liší i v rámci hostitelských jedinců stejného druhu. Experimenty zjišťující lipidové zásoby na druhu *A. anatina* a *U. crassus* provedl Douđa (2015). Zhodnocení

lipidových zásob probíhalo na jedincích, kteří byli nejprve fixováni ve formaldehydu. Lipidový obsah u juvenilů byl posuzován metodou, kterou vyvinul Tankersley (2000). Metoda spočívala v obarvení juvenilů pomocí nilské červeně. Roztok byl připraven přidáním 5 mg nilské červeně do 50 ml acetonu s následným uchováním ve tmě při 5 °C. Barvicí roztok byl připraven bezprostředně před barvením juvenilů přidáním 2,5 ml připraveného roztoku do 50 ml vodovodní vody zbavené chlóru k dosažení barvicího roztoku o koncentraci 5 µg/ml. Juvenilové byli následně umístěni do Petriho misky se 4 ml barvicího roztoku po dobu 30 minut. Obsah lipidů se poté zjišťuje dle intenzity fluorescence, přičemž jedinci *A. anatina* a *U. crassus* fluoreskovali jasně zelenožlutou barvou. Bylo zjištěno, že nejvíce lipidových zásob měli jedinci *A. anatina* transformované na druhu *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) a mlži druhu *U. crassus* transformovaní na druhu hostitelské ryby *P. phoxinus*, přičemž hodnoty lipidů po transformaci na různých jedincích v rámci tohoto druhu se lišily (Douda, 2015). V dnešní době se u většiny experimentů přidává 50 µl rybího oleje na kultivační misku. S úspěchem se používají především komerčně dostupné lipidové mixtury vyrobené z oleje z tresčích jater namísto špatně rozpustného oleje z tresčích jater (Lima et al., 2012).

Materiál a metody

1.5 Studovaný druh

Pro pilotní experiment byli vybráni jedinci druhu škeble říční *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758). Tento druh se vyskytuje téměř v celé Evropě a v části Asie. Mlži řádu Unionoida, mezi které patří i škeble říční *Anodonta anatina*, jsou typičtí svým životním cyklem, na jehož začátku je krátká životní fáze ve formě ektoparazitické larvy a poté až nastává fáze volně žijících jedinců na dně vod. Ektoparazitická glochidia jsou uvolněna z marsupii samice a plují volnou vodou a hledají vhodného hostitele. Poté se volně plující larvy přichytí na žábry, ploutve nebo kůži ryb. Následuje vytvoření cysty, ve které larvy prodělávají metamorfózu. Po metamorfóze již nastává období, kdy transformovaní juvenilové přisednou na dno vodních toků (Barnhart et al., 2008; Lopes-Lima, 2014).

U druhu *Anodonta anatina* probíhá uvolňování spermií a následné oplození od května do června, následuje vývoj glochidií od července do září a uvolnění larev mateřským jedincem od září do března, přičemž největší množství larev je uvolněno během 2 – 3 týdnů v průběhu března. Ve stojatých vodách byli také nalezeni hermafroditi, samooplození u hermafroditických jedinců však nebylo prokázáno. (Hinzmann et al., 2013).

Lastura škeble říční je tlustší, pevná, uvnitř obvykle bělošedé barvy perleťového nádechu s vejčítým až kosočtverečným tvarem. Štít obvykle silně vyniká, vrcholové lišty jsou spíše přímé, k vrcholům obvykle prohnuté a na koncích prudce stoupají, vnější zbarvení lastur je šedavě zelené až hnědé a přirůstající části tvoří tmavší prstence. Škeble říční se dožívá poměrně vysokého věku, a to okolo 5-15 let. Je to velký druh mlže dorůstající na délku jeho lastury mezi 75-120mm a na šířku 45-64mm (Machač, 2009).

Patří mezi sladkovodní mlže obývající tekoucí vody jako např. vodní toky od potoků až po velké řeky, kanály, tak i vody stojaté jako odstavná ramena a tůň a jiné vodní plochy jako rybníky nebo plochy vzniklé v souvislosti s těžbou. Nejčastěji vyhledává místa s měkkým bahnitým dnem, do kterého se částečně zahrabává. Vzhledem k četnému rozšíření je tento druh řazen v seznamu ohrožených druhů IUCN do stupně ohrožení – Least concern (LC), tedy není řazen mezi obecně ohrožené živočichy. Ačkoliv je druh *Anodonta anatina* klasifikován jako málo dotčený, na mnoha místech Evropy je pozorovaný pokles v populacích, a to například v Itálii a Maďarsku. V tomto případě se pravděpodobně jedná o pokles způsobený vytlačováním nepůvodním druhem škeblí

asijskou *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834). Šíření tohoto druhu mlže z východu je pro populace evropských mlžů nebezpečné zejména proto, že narušují vztah původních druhů živočichů. Faktem je, že úspěšnost šíření tohoto druhu mlže je dán zejména jeho nenáročností larev na hostitele. Dalším vlivem, který přispívá ke snižování počtů škeble říční *Anodonta anatina* např. v Německu jsou zejména zásahy člověka do ekosystému. Je možná záměna se škeblí rybničnou *Anodonta cygnea*. Tento druh ale dorůstá větších rozměrů a jeho lastura je více oválná. K rozpoznání těchto dvou druhů pomůže i fakt, že škeble rybničná *Anodonta cygnea* je vázána na větší stojaté vody (Lopes-Lima, 2014).

1.6 Odběr glochidií

K experimentu byla použita glochidia tří jedinců *Anodonta anatina*. Lastury dosahovaly délky: 120 mm, 108 mm a 86 mm. Jedinci pocházeli z jižních Čech z oblasti Košínského potoka, který se nachází v okrese Tábor. Potok je v nejširších místech široký až 2 metry a ústí do vodní nádrže Jordán. Dno potoka je kamenité, v pomalejších úsecích bahnitě (Rybářské revíry, 2014). Z domovského stanoviště byli mlži odebráni pět dní před zahájením pokusu. Drženi byli v neustále cirkulovaných nádržích chlazených na 5 °C. Před samotným odběrem glochidií se tři vybraní jedinci vytemperovali na 20 °C. Odběr probíhal tak, že se opatrně otevřely lastury pomocí speciálních kleštíček a zafixovaly se při rozevření na 1cm, poté se několika průplachy marsupii injekční jehlou získávala glochidia. Ta byla poté několikrát propláchnuta sterilizovanou vodou. K pokusu byla použita glochidia všech tří jedinců dohromady.

Následovalo posouzení glochidií od všech jedinců před a po průplachu a umístění glochidií do kultivačních misek. Posouzení spočívalo především v kontrole glochidií pod optickým mikroskopem značky Motic typ mlc 150c. Bylo pozorováno, že po odběru glochidií 100 % glochidií periodicky zavírá a otevírá lasturky, což značí životaschopnost glochidií. Po promytí glochidií sterilizovanou vodou bylo ověřeno, že si glochidia zachovala životaschopnost. V zásobní nádrži bylo 95 % glochidií otevřeno. Následně byl proveden test se solí na jedné misce o 200 larvách, tento krok má ověřit, zda jsou glochidia schopná reagovat na chemický potenciál, tedy zda by byla schopná zareagovat v blízkosti ryby a následně měla šanci uskutečnit infestaci (Roberts and Barnhart, 1999). Po přidání NaCl do testovací misky reagovalo 99 % glochidií sklapnutím. Během dalších 2 - 5 minut se opět cca 80 % glochidií otevřelo.

Do každé Petriho misky s 3 ml média bylo umístěno zhruba 200 jedinců pro kultivaci. S glochidii bylo manipulováno pomocí Pasterovy pipety. Dále byla přemístěna do kultivačních misek bezprostředně po odebrání ze samic a nutném promytí od nečistot, jelikož po 5 hodinách rapidně klesá životnost glochidií (Uthaiwan et al., 2001). V jedné misce bylo tedy: 1 ml koňského séra, 2 ml jednoho ze čtyř vybraných médií (M199, M199 s HEPES, DMEM, DMEM s HEPES), mixtura antibiotik PSN obsahující penicillin, streptomycin, neomycin a jako opatření proti plísňovému napadení byl zvolen Amphotericin B. V tomto roztoku byla držena glochidia při teplotě 22 ± 2 °C bez úpravy CO₂ v okolní atmosféře.

1.7 Příprava variant média

Při výběru komponentů pro pilotní experiment bylo vycházeno zejména z pokusů od Isoma a Hudsona (1982), Hudsona a Shelbournea (1990), Kellera a Zama (1990) a Taskinena a spol. (2011). Pro pokus byla vybrána čtyři různá média, a to M199 with Earle's salts, M199 with Earle's salts – HEPES modification, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Dulbecco's Modified Eagle's Medium – HEPES modification. Médium M199 bylo převzato z pokusů Isoma a Hudsona (1982), kteří po zveřejnění úspěchů s jejich médiem nazvaným Unionid Ringer's měli snahu pokus zjednodušit. Použili tedy médium s podobným složením jako Unionid Ringer's, ale bez nutnosti příprav, jelikož je toto médium komerčně dostupné ve formě prášku, který stačí pouze hydratovat nebo také v cílové podobě ve formě roztoku, který byl zvolen pro tento experiment. Dalším zvoleným komponentem byl roztok komerčně dostupného média s obchodním názvem Dulbecco's Modified Eagle's Medium, ve zkratce DMEM. S tímto médiem pracoval Keller a Zam (1990), kteří se již odvíjeli od experimentů Isoma a Hudsona (1982). Nutnou složkou v konečném médiu je také sérum, jako zdroj bílkovin. Sérum bylo zvoleno stejné, jako použili ve svých experimentech Keller a Zam (1990), a to koňské sérum, u kterého v jejich experimentech týkajících se nalezení vhodného séra kromě séra rybího, zaujalo druhé místo. Na prvním místě se umístilo sérum telecí, které bylo ale nákladnější, proto za vhodnější zvolili sérum koňské, které se nejvíc osvědčilo v poměru – úspěch transformace/cena. Pro potlačení bakteriální kontaminace bylo nutné použít antibiotika. Byla vybrána směs antibiotik PSN, která obsahovala penicillin, streptomycin a neomycin. Tuto směs antibiotik použil úspěšně ve svých experimentech s *Anodonta anatina*, *Anodonta cygnea* a *Pseudanodonta complata* Taskinen a spol. (2011). Kvůli dostupnosti

směsi PSN ve formě roztoku bylo použité množství směsi PSN převzato z publikace s názvem Freshwater bivalve ecotoxicology. Byly testovány tři hodnoty antibiotik, přičemž nejvyšší hodnota prokázala největší hodnoty transformace (Farris and Van Hassel, 2006). Proto byla v tomto experimentu použita. Posledním komponentem bylo antimykotikum proti rozvoji plísní. Bylo vybráno antimykotikum Amphotericin B, které bylo převzato z pokusů od Isoma a Hudsona (1982), ale běžně používané takřka ve všech dalších experimentech týkajících se kultivace glochidií.

1.7.1 Přehled použitých komponentů

1) Médium

- a. M199 with Earle's salts – HEPES modification
- b. M199 with Earle's salts
- c. DMEM – HEPES modification
- d. DMEM

2) Plasma/Sérum

- a. Koňské sérum

3) Antibiotikum

- a. Směs PSN (penicilin, streptomycin, neomycin)

4) Antimykotikum

- a. Amphotericin B

Všechny komponenty byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich.

1.7.2 Varianty médií

Z výše uvedených komponentů byly vytvořeny 4 odlišné skupiny finálních médií. Každá varianta obsahovala jiný typ média.

I. Varianta

- 2 ml na kultivační miskou média M199
- 1 ml na kultivační miskou koňského séra
- 40 µl směsi antibiotik PSN na 1 ml konečného média
- 5 µg Amphotericinu B na 1 ml konečného média

II. Varianta

- 2 ml na kultivační miskou média M199 s HEPES modifikací
- 1 ml na kultivační miskou koňského séra
- 40 µl směsi antibiotik PSN na 1 ml konečného média
- 5 µg Amphotericinu B na 1 ml konečného média

III. Varianta

- 2 ml na kultivační miskou média DMEM
- 1 ml na kultivační miskou koňského séra
- 40 µl směsi antibiotik PSN na 1 ml konečného média
- 5 µg Amphotericinu B na 1 ml konečného média

IV. Varianta

- 2 ml na kultivační miskou média DMEM s HEPES modifikací
- 1 ml na kultivační miskou koňského séra
- 40 µl směsi antibiotik PSN na 1 ml konečného média
- 5 µg Amphotericinu B na 1 ml konečného média

V experimentu bylo použito celkem 56 Petriho misek. Každá výše uvedená varianta konečného média měla 14 replik. Přičemž 7 kultivačních misek z těchto čtrnácti replik s označením X bylo určeno k dalšímu testování. To spočívalo ve výměně média 5. den kultivace, což mělo podpořit transformaci glochidií (Uthaiwan, 2002). Při přípravě roztoků tedy bylo počítáno i s tímto objemem, který byl po 3 dny uchován v chladničce a až před umístěním do kultivačních misek vytemperován na 22 °C. Pro případné nehody bylo počítáno s větším množstvím látek.

1.7.3 Metodika experimentu

Metodika experimentu byla následující:

- ❖ Odměření 96 ml koňského séra
- ❖ Odměření antibiotik - 1152 μ l směsi PSN a umístění do séra
- ❖ Odvážení antimykotik - 1440 μ g Amphotericinu B a umístění do séra
- ❖ Důkladné promíchání antibiotik PSN a Amphotericinu B v koňském séru
- ❖ Odměření 48 ml každého média – M199/M199 s HEPES/DMEM/DMEM s HEPES
- ❖ Do každého média 24 ml séra obsahující směs PSN a Amphotericin B
- ❖ Na jednu Petriho misku připadá 3 ml celkového roztoku skládající se z jednoho ze čtyř médií (M199, M199 s HEPES, DMEM, DMEM s HEPES), koňského séra, směsi antibiotik PSN (penicilin, streptomycin, neomycin) a antimykotikum Amphotericin B
- ❖ Umístění kultivačních misek do inkubátoru s nastavenou teplotou na 22 °C
- ❖ Pro dosažení vyšší vlhkosti v inkubátoru umístění nádoby na odpar
- ❖ Následnou kontrolou pod mikroskopem zjištění případného zaplísnění nebo bakteriálního rozvoje či rozkladu
- ❖ Zjišťování procenta transformovaných glochidií či glochidií, které započaly/nezapočaly vývoj

Proces přípravy konečných médií byl uskutečněn v den zahájení pokusu. Po naplnění misek (56 ks) kultivačním médiem (3 ml/miska) bylo zbylé médium uchováno v chladničce do plánované výměny média 5. den kultivace, která měla podpořit transformaci (Uthaiwan et al., 2002).

1.7.4 Použitý materiál a technika

Během experimentu bylo použito množství materiálu a techniky:

- Petriho miska \varnothing 60 mm – 56 ks
- Automatická pipeta
- Plastové laboratorní nádoby – 80 ml

- Laboratorní sklo
- Inkubátor značky Q-Cell
- Nádrž na dospělé mlže o objemu 320 litrů s cirkulací a chlazením
- Optický mikroskop značky Motic typu mlc 150c
- Materiál na odběr glochidií (injekční jehla, nádrž na odebraná glochidia)
- Přístroj na měření pH, váha
- Ostatní spotřební materiál (plastová pipeta, injekční stříkačka, injekční jehla)

Všechny vybrané komponenty byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Po obdržení komponentů k namíchání celkového média byly do zahájení experimentu látky uchovány v chladničce. Během příprav probíhala manipulace s roztoky pomocí automatické pipety pro maximální přesnost. Média byla míchána do laboratorního skla a konečná média byla namixována a uchována v plastových nádobkách o objemu 80 ml. K odvážení 1,44 mg antimykotik byla použita váha umožňující měření takto malých hodnot.

Dospělí jedinci druhu škeble říční *Anodonta anatina* byli drženi v cirkulované nádrži o objemu 320 litrů. Nádrž byla pomocí chladicího zařízení chlazena na teplotu 5 °C. Pro průplach marsupíí byla použita injekční stříkačka s jehlou, která umožnila vypudit glochidia z marsupíí do předem připravené nádrže. Po poklesu odebraných glochidií na dno nádrže bylo možné odebrat glochidia k posouzení jejich viability. To probíhalo pod mikroskopem značky Motic typ mlc 150c. S glochidiem bylo manipulováno pomocí jednorázových plastových pipet. Po zhodnocení glochidií mikroskopováním nastala doba pro umístění kultivačního média z plastových nádobek do Petriho misek, což probíhalo pomocí injekční stříkačky, která umožňovala odměřit roztok o objemu 3 ml. Následovalo umístění glochidií do předpřipravených Petriho misek s médiem. To bylo uskutečněno opět pomocí jednorázových plastových pipet, s kterými byla nyní snaha o odebrání vždy 150 – 200 glochidií ke kultivaci v jedné Petriho misce. Kultivační misky byly v průběhu experimentu umístěny v inkubátoru značky Q-Cell. Po ukončení experimentu byla změřena hodnota pH jednotlivých médií, což bylo provedeno pomocí pH metru.

1.8 Průběh kultivace a kontrol

Kompletní transformace v juvenilny u druhu *Anodonta anatina* v in vitro kultivaci proběhla v experimentu od Taskinena a kol. (2011) za 9 dní. Délka pokusu byla nastavena na 15 dní, ale po dvanácti dnech byl již patrný silný bakteriální rozklad. Z tohoto důvodu byl pokus dvanáctý den ukončen. Vzhledem k dřívějšímu ukončení pokusu z důvodu bakteriální kontaminace bylo za tuto dobu provedeno 6 kontrol za 12 dní, nepočítaje den zahájení experimentu. Každá kontrola spočívala ve fotodokumentaci vybrané série misek, která sloužila ke kontrole pH a intenzitě vysychání, a pod mikroskopem bylo zkoumáno možné zaplísnění, bakteriální kontaminace nebo možná transformace v juvenilny. Kultivace probíhala mimo CO₂ inkubátor, tedy bez úpravy okolního CO₂ na 5%, ale v atmosférickém složení vzduchu, tedy s CO₂ v hodnotě 0,04 %. Velké množství úspěšných experimentů mělo nastaveno na hodnotu CO₂ v okolní atmosféře na 5 %. Bylo zjištěno, že s vyšší teplotou, vyšší hodnotou CO₂ v umělé atmosféře a nízkým pH je transformační úspěch největší (Barnhart and Roberts, 1999).

Misky byly umístěny v inkubátoru značky Q-Cell. Teplota byla nastavena na 22 ± 2 °C. Pro dosažení vyšší vlhkosti byla na dno inkubátoru umístěna nádoba s vodou k evaporaci. U série s označením X proběhla 5. den výměna celého média, což by mohlo zkvalitnit transformaci (Uthaiwan, 2002).

1.8.1 Harmonogram experimentu

Harmonogram byl následující:

- (-5). den
 - dovezení mlžů *Anodonta Anatina* (Příloha 1)
- (-1). den
 - umístění mražených komponentů do chladničky
 - nastavení inkubátoru na 22 ± 2 °C
 - umístění nádoby s vodou do inkubátoru pro zvýšení vzdušné vlhkosti
- 1. den
 - příprava všech komponentů (4x médium, 1x sérum, antibiotika, antimykotika)
 - namíchání kultivačních médií (Příloha 2)
 - odběr glochidií (Příloha 3)

- umístění finálního média a glochidií do kultivačních misek a následně do inkubátoru
- fotodokumentace (Příloha 4)
- 3. den
 - fotodokumentace, detailně u 4. série (Příloha 5)
 - kontrola pH dle barvy
 - kontrola vysychání, zaplísnění
- 4. den
 - fotodokumentace, detailně u 4. série (Příloha 6)
 - kontrola pH dle barvy
 - kontrola vysychání, zaplísnění
- 5. den
 - fotodokumentace, detailně u 4. série (Příloha 7)
 - kontrola pH dle barvy
 - kontrola vysychání, zaplísnění
 - u série s označením X výměna média (Příloha 8)
- 8. Den
 - fotodokumentace a kontrola pH dle barvy (Příloha 9)
 - kontrola vysychání, zaplísnění
 - kontrola možné transformace
- 11. Den
 - fotodokumentace a kontrola pH dle barvy (Příloha 10)
 - kontrola vysychání, zaplísnění
 - kontrola možné transformace
- 12. den
 - změření finálních hodnot pH
 - předčasné ukončení pokusu z důvodu bakteriální kontaminace

Po zahájení experimentu byly všechny Petriho misky v inkubátoru téměř stejné barvy, což značí shodnost hodnoty pH. Plánovaná výměna média 5. den kultivace ukázala, že média určená pro výměnu umístěná nejprve v chladničce a poté v pokojové teplotě pro vytemperování na 22 °C měla velmi odlišnou barvu (Příloha 11). Barva médií určená

k výměně byla oproti médiím umístěným v inkubátoru s teplotou okolního vzduchu 22 °C více do oranžového odstínu, zatímco média umístěná již delší dobu v inkubátoru byla spíše do červené až fialové barvy.

V důsledku nižší vlhkosti vzduchu byla do inkubátoru umístěna nádoba k evaporaci. I přes zvýšenou vlhkost docházelo již druhý den kultivace ke značnému vypařování média, a to nejvíce ve spodních policích inkubátoru. Z tohoto důvodu bylo médium u 7. série umístěné v nejnižší polici inkubátoru doplněno o 1 ml destilované vody a na dno inkubátoru vložen zvlhčený filtrační papír, který pojme velké množství vody. I 3. den kultivace bylo nutné přidat do Petriho misek 1 ml destilované vody, a to už u všech sedmi sérií. Další dny se již vlhkost v inkubátoru ustálila a k odparu nedocházelo v takovém množství jako první tři dny kultivace.

Každá kontrola spočívala i v posouzení bakteriální či plísňové kontaminace. V prvních dnech nebyla pozorována žádná houbová vlákna ani kolonizace bakteriemi. Změna nastala 4. den, kdy se mezi lasturkami glochidií začaly objevovat nepravidelné útvary. V následujících dnech se tyto útvary rapidně zvětšovaly a začaly tvořit tvary připomínající chomáčky vaty. Houbová vlákna pozorována nebyla po celou dobu kultivace.

Od prvního dne experimentu byla mimo inkubátor umístěna testovací miska s glochidii. Tato miska obsahovala namísto kultivačního média pouze vodu, v které byli drženi dospělí jedinci, z kterých byla glochidia odebrána. Voda v misce umístěná mimo inkubátor měla teplotu jako okolní vzduch, tedy okolo 18 °C. Čtvrtý den kultivace byla testována životnost glochidií umístěných ve vodě pomocí NaCl. Tato glochidia reagovala sevřením lasturek, což značilo, že glochidia ve vodě jsou po dobu 4 dnů stále naživu. Stejný test s NaCl byl proveden i na otevřených glochidiích odebraných z kultivačního média z inkubátoru. Bylo zjištěno, že glochidia z kultivačního média nereagovala na NaCl.

1.9 Metodika statistického vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo provedeno trojcestnou analýzou ANOVA v softwaru R. Ovlivňující faktory byly – rozdílnost médií (M199/DMEM), přítomnost HEPES (s HEPES/bez HEPES) a výměna média 5. den kultivace (s výměnou/bez výměny). Byl testován možný vliv těchto faktorů na zavřená glochidia 12. den kultivace. Další testování porovnávalo vliv faktorů na rozsah infekce 12. den kultivace. Zdroje dat k nahlédnutí v příloze (Příloha 12).

Výsledky

Po dvanácti dnech kultivace metamorfóza neproběhla. Již 4. den od zahájení pokusu se po detailním pohledu mikroskopem objevily nepravidelné tvary vyčnívající z přivřených lasturek glochidií. Již takto brzy tyto útvary pravděpodobně naznačovaly bakteriální rozklad. V den ukončení experimentu byla detailně zkoumána glochidia s uzavřenými lasturami a bylo zjištěno, že i přes uzavřené lastury těchto glochidií žádný z jedinců nezapočal metamorfózu. Po větším přiblížení viditelných útvarů vyčnívajících z lasturek byl pozorován shluk bakterií (Příloha 13).

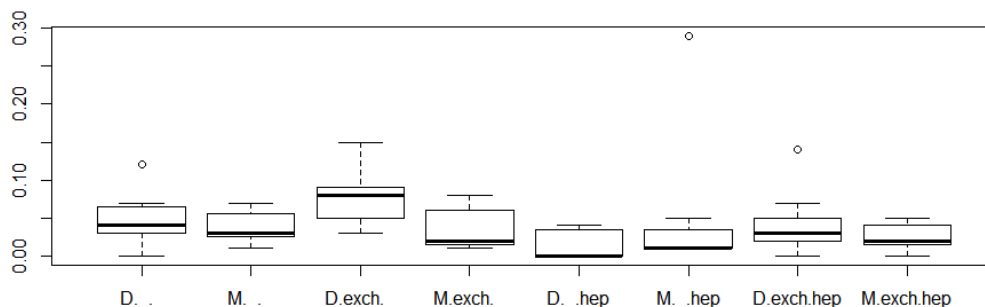
Glochidia umístěná v misce s vodou mimo inkubátor reagovala 4 dny po zahájení experimentu na přítomnost NaCl sevřením lasturek, naopak glochidia odebraná z kultivačního média za účelem testu viability s NaCl reakci neprokázala. To naznačuje již v tuto dobu smrt glochidií umístěných v inkubátoru.

Třetí den kultivace bylo v rámci vybrané série misek počítáno procento částečně a úplně uzavřených schránek glochidií k otevřeným glochidiím. Hodnoty byly seřazeny vzestupně:

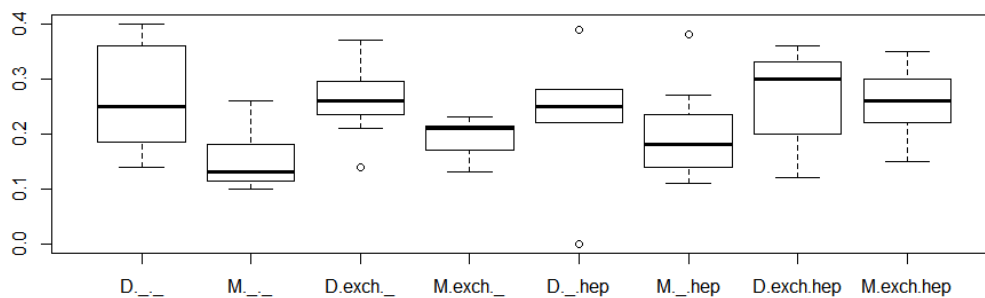
- M199 bez HEPES $21,5 \pm 5,5$ %
- DMEM bez HEPES $32,25 \pm 3,25$ %
- M199 s HEPES $36,6 \pm 6,8$ %
- DMEM s HEPES $39,15 \pm 1,85$ %

Z výsledků je patrné, že glochidia reagovala lépe na média obsahující HEPES. Ostatní otevřená glochidia byla považována za mrtvá, protože pružnost zámku s vazy otevře lastury po uvolnění svalů, který je zavírá (Barnhart and Roberts, 1999). Výsledky statistické analýzy ukazují, že mezi variantami médií (Graf 1) se nevyskytuje významný rozdíl ($P > 0,05$). Při zhodnocení rozsahu infekce (Graf 2) prokázalo ale médium M199 menší bakteriální rozklad než médium DMEM ($P < 0,05$). I přes to, že některá glochidia zůstala po celou dobu experimentu zcela uzavřená, po rozlomení lasturek několika jedinců nebyl pozorován žádný náznak počátečního vývoje glochidia v juvenila.

Graf 1 - Podíl zavřených glochidií 12. den kultivace



Graf 2 - Podíl infikovaných glochidií 12. den kultivace



Po zahájení pokusu byly všechny Petriho misky v inkubátoru téměř stejné barvy, což značí shodnost hodnoty pH. Plánovaná výměna média 5. den kultivace ukázala, že média určená pro výměnu umístěná nejprve v chladničce a poté při pokojové teplotě měla velmi odlišnou barvu. Barva médií určená k výměně byla oproti médiím umístěným v inkubátoru s teplotou okolního vzduchu 22 °C více do oranžového odstínu, zatímco média umístěná již delší dobu v inkubátoru byla spíše do červené až fialové barvy. Původní domněnkou bylo, že vzhledem k působení glochidií došlo ke zvýšení hodnoty pH, což bylo ale další kontrolní den vyvráceno, neboť všechny Petriho misky ze série s označením X prokazovaly stejnou barvu jako misky bez vyměněného média i přes to, že v tuto dobu byla glochidia pravděpodobně již mrtvá a tudíž nemohla ovlivnit hodnotu pH svými metabolickými pochody, při nichž by se navíc uvolňoval CO₂, který by snížil pH, tedy by došlo k opačnému účinku. Po ukončení experimentu bylo změřeno pH u každé z variant, byly nalezeny tyto hodnoty:

	BEZ VÝMĚNY	SÉRIE X
▪ M199	8,98	9,071
▪ M199 s HEPES	8,727	8,808
▪ DMEM	9,112	9,203
▪ DMEM s HEPES	9,002	9,045

Nevysvětlené zůstává, proč se na konci experimentu u vyměněného média vyskytuje vyšší hodnota pH než u média nezměněného po celou dobu experimentu.

Diskuze

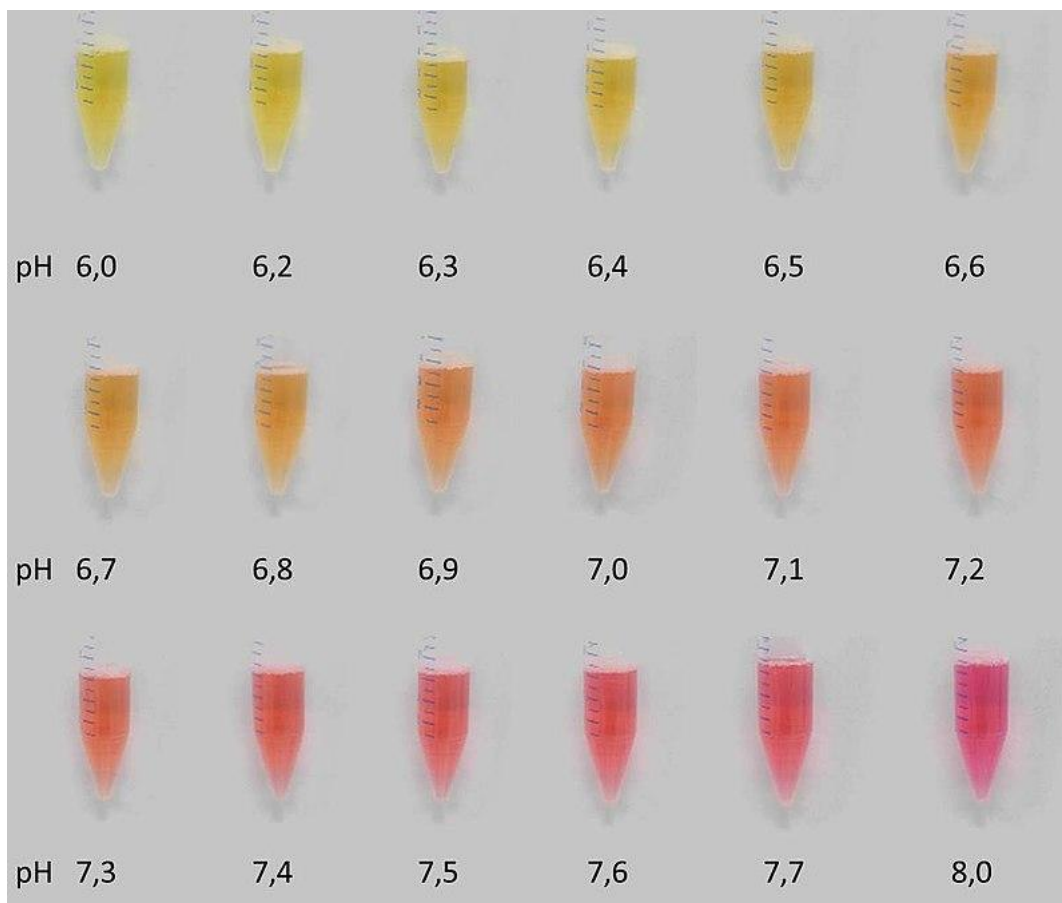
I přes to, že stav glochidií byl velmi dobrý, což potvrzoval i fakt, že glochidia byla schopná provést infestaci dvou druhů ryb - okoun říční *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758) a krunýřovec sp. gold *Ancistrus sp. gold* (Příloha 14), na základě výsledků experimentu je zřejmé, že tímto způsobem nelze dosáhnout transformace v juvenilny. Potvrzením životaschopnosti glochidií je úspěšná transformace v juvenilny na druhu krunýřovec sp. gold *Ancistrus sp. gold*, která proběhla ve stejnou dobu jako samotný experiment mimo laboratorní podmínky (Příloha 15).

Nabízejí se nám možnosti, proč neproběhla transformace. První možností je, že glochidia byla napadena bakteriemi a napadení způsobilo úhyn všech glochidií. Což by značilo špatně zvolená antibiotika. Ta byla převzata z pokusů od Taskinena a spol. (2011), který dosáhl 100 % transformace u jarní kultivace u druhu *Anodonta anatina*. Taskinen (2011) ale použil směs antibiotik PSN v množství 100 mikrogramů na mililitr finálního média. Pro použitý antibiotický roztok byla zvolena hodnota 40 $\mu\text{l/ml}$ výsledného média, která byla převzata z publikace s názvem Freshwater bivalve ecotoxicology. S touto hodnotou antibiotik PSN bylo dosaženo největších transformačních hodnot. Možností by mohla být příliš vysoká koncentrace antibiotik zejména proto, že s hodnotou 40 $\mu\text{l/ml}$ nebyla ještě transformace u druhu *Anodonta anatina* prokázána (Farris and Van Hassel, 2006; Taskinen et al., 2011). Další možností je, že pH v médiu se po krátké době změnilo z fyziologické hodnoty okolo pH 7 na hodnotu blížící se hodnotě pH 9, jak tomu bylo po ukončení experimentu. Vysoká hodnota pH mohla zahubit glochidia, a následně se objevil bakteriální rozklad. V tomto případě by nedošlo k udržení pH systémem HEPES a NaHCO_3 , který média již obsahovala. Další podstatnou částí, která v tomto experimentu selhala, byla tedy hodnota pH, která se na konci experimentu vyšplhala u všech variant médií na hodnotu okolo 9. Přičemž Barnhart a spol. (1999) za použití koňského séra, média DME (s HEPES i bez HEPES), Amphotericinu B a antibiotik (gentamycin sulfate, carbecillin, rifampin) používaných Isomem a Hudsonem (1982) prokázal, že se zvyšujícím se pH hodnoty transformace klesají. Při upravení pH finálního média obsahující médium s HEPES na hodnotu 7,6; 7,9; 8,2 nebyla prokázána transformace u žádné nastavené hodnoty pH. Otázkou tedy zůstává, proč se pH změnilo i u médií, která obsahovala HEPES, tedy složku využívanou pro stabilizaci pH. Bylo zjištěno, že s vyšší teplotou, vyšší hodnotou CO_2 v umělé atmosféře a nízkým pH je transformační úspěch největší (Barnhart and Roberts, 1999). Možností tedy také je, že za použití CO_2 inkubátoru s 5 %

CO₂ v okolní atmosféře by problém se zvýšením pH nenastal. Lima a spol. (2012) uvádí, že k regulaci pH pomocí NaHCO₃ je třeba jiné koncentrace CO₂, přičemž 5 % koncentrace CO₂ bylo stanoveno jako optimum (Lima et al., 2012).

Další variantou ale je, že i přes to, že hodnota pH zakoupených médií byla uvedena mezi 7 - 7,6 (Sigma-Aldrich), tedy fyziologické pH, tuto hodnotu při teplotě 22 °C v atmosférickém vzduchu neměla média od prvopočátku. Všechna média obsahovala fenolovou červeň k detekci hodnoty pH dle barevného odstínu. Vzhledem k ilustraci se znázorněnou škálou barev (Obr. 3) dle hodnoty pH mělo pH médií ještě před přípravou finálního média hodnotu >7,6. Při pohledu na barvu médií doplňovaných do série X uchovávaných v chladničce byla barva o několik odstínů světlejší, spíše do oranžova. To nám ale ukazuje, že v nižších teplotách má médium i nižší hodnotu pH, protože po určité době v inkubátoru s 22 °C se vyměněné médium barevně vyrovnalo médiu neměněnému. Na základě těchto poznatků se nabízí myšlenka, zda by nebylo možné dosáhnout transformace bez CO₂ inkubátoru a bez úpravy média pomocí NaOH nebo HCl v nižších teplotách za předpokladu, že pokud by se pH udrželo v nižších hodnotách, transformace by pouze trvala déle. Tato úvaha navazuje na tvrzení, že délka doby metamorfózy se odvíjí od teploty vody, čím je voda chladnější, tím déle trvá přeměna v juvenila (Roberts and Barnhart, 1999). Nižší teplota by glochidiím vadit neměla, protože v přírodních podmínkách probíhá transformace v zimních a jarních měsících, kdy je teplota vody velmi nízká. Předěšlo by se tak nutnosti použití CO₂ inkubátoru a navíc by se v nižších teplotách lépe udržoval bakteriální rozvoj na minimu (Isom a Hudson, 1982).

Pokud byly nesplněné parametry nutné k transformaci glochidií v juvenily příliš vysoká hodnota pH a nevhodná dávka antibiotik, pak by po přidání vhodného množství antibiotik, tedy např. 100 µg/ml a za předpokladu úpravy pH na počátku experimentu pomocí NaOH nebo HCl mohlo dojít k cílené transformaci glochidií (Lima and Avelar, 2010; Taskinen et al., 2011). Experimenty provedené Kellerem a Zamem (1990) s druhem *Anodonta imbecilis* byly sestaveny s médiem upraveným pomocí NaOH na hodnotu pH 7,3 – 7,4, kultivace probíhala v atmosférickém vzduchu a pro porovnání i v CO₂ inkubátoru. Zatímco výsledky kultivace z CO₂ inkubátoru byly výrazně vyšší, podařilo se dosáhnout transformace i v atmosférickém vzduchu (Keller and Zam, 1990).



Obrázek 3 - Barevná škála pH indikátoru (fenolová červeň)

Zdroj:

https://www.researchgate.net/post/Why_does_my_1640_cell_culture_medium_change_color_with_time

Dalším faktem nasvědčujícím nevhodnost hodnoty pH nebo antibiotik bylo i to, že miska s vodou umístěná mimo inkubátor, tedy v nižší teplotě, obsahovala živá glochidia déle i přes to, že byla dříve napadena bakteriemi v důsledku absence antibiotik. Nicméně, to naznačuje problém v hodnotě pH nebo také ve vysoké koncentraci antibiotik. Jednou z možností je již výše zmíněná nevhodná použitá hodnota antibiotické směsi PSN ve vztahu k druhu *Anodonta anatina*, ale protože glochidia umístěná ve vodě nebyla vystavena také směsi PSN pro porovnání, působení těchto dvou faktorů nelze jednoznačně posoudit. Vhodným řešením by byl test viability glochidií druhu *Anodonta anatina* na použitou hodnotu antibiotik PSN provedený ve vodě v průběhu 3 – 4 dní, kdy už glochidia neprokazovala známky života.

Ostatní použité komponenty jako média M199 a DMEM, koňské sérum a antimykotikum Amphotericin B prokázaly v použitém množství úspěšnost v jiných experimentech. Taskinen (2011) prokázal transformaci u druhu *Anodonta anatina*

s použitím média DMEM a Amphotericinem B v množství 5 µg/ml, stejném množství jako bylo použito v této práci. Médium M199 bylo v kombinaci s koňským sérem ve finálním médiu úspěšné při transformaci glochidií druhu *Anodonta imbecilis* v experimentech Kellera a Zama (1990). Navíc médium M199 ve finálním médiu s rybí plasmou nebo jiným zvířecím sérem prokázalo transformační úspěch v kultivaci 42 druhů mlžů (Ma et al., 2017).

Výsledky měření pH hodnot po ukončení experimentu ukázaly, že vyšší pH prokazovala vždy skupina s vyměněným médiem 5. den kultivace. To by mohlo být způsobeno menším rozvojem bakterií u vyměněných médií, přičemž větší množství bakterií a vyšší stupeň rozkladu v neměněném médiu mohl produkcí CO₂ pH nepatrně snížit (Fondriest Environmental, Inc., 2013).

Během experimentu také docházelo k vysychání kultivačního média. Tento problém byl řešen pomocí zvýšení vlhkosti evaporací z nádoby umístěné v inkubátoru. V dalších experimentech by bylo dobré umístit nádobu pro odpar dříve než 1 den před zahájením pokusu, nejlépe 4-5 dní před umístěním kultivačních misek do inkubátoru. Po této době se již odpar téměř nevyskytoval a vlhkost tedy musela být ustálena.

V dalších experimentech s cílem prokázat transformaci bez CO₂ inkubátoru je tedy nutné věnovat pozornost hodnotě pH, která by měla být ideálně okolo 7,3 – 7,4, protože tato hodnota umožňuje nejlepší transformační výsledky (Keller and Zam, 1990). Úpravy pH do této hodnoty lze docílit za pomoci NaOH, v případě, že chceme pH roztoku zvýšit, naopak nižšího pH docílíme pomocí HCl (Lima and Avelar, 2010). Také je vhodné zjistit, zda jsou antibiotika přijatelná, tedy znát správnou hodnotu jejich použití ve vztahu k druhu glochidií.

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosud použité in vitro metody kultivace glochidií mlžů čeledi Unionidae a na jejich základě provést experiment, který by šel zkonstruovat i v méně vybavených laboratořích, tedy bez úprav médií nebo plasmy a bez nutnosti použití CO₂ inkubátoru. Na základě pilotního experimentu bylo zjištěno, že za použití komerčně dostupných médií (M199, M199 s HEPES, DMEM, DMEM s HEPES) bez následné úpravy pH na hodnotu mezi 7 – 7,6 při 22 °C kultivace není možné dosáhnout transformace glochidií v juvenilily u druhu *Anodonta anatina*. Vzhledem k této situaci není možné určit, které z testovaných médií by bylo pro transformaci glochidií nejvhodnější. Dalším testovaným parametrem byla výměna média 5. den kultivace. Tento bod měl podpořit metamorfózu glochidií. Kvůli nedostatečným výsledkům není možné tento bod zhodnotit. V souvislosti s výměnou média bylo ale zjištěno, že pH finálního média se velmi mění ve vztahu s okolní teplotou. V dalším experimentu založeném na podobných principech je nutné věnovat se více hodnotám pH, což je pro glochidia velmi klíčový parametr, ale také otestovat vhodnost použitých antibiotik a jejich množství ve vztahu k druhu glochidií.

Seznam použité literatury

- ANON. Košínský potok 1 – 423 061[online]. Rybářské revíry. 13. července 2014. [cit. 2018-03-05]. Dostupné z <<http://www.rybarskereviry.eu/reviry/kosinsky-potok-1-423-061/>>
- Barnhart, M. Ch., Haag, W. R., Roston, W. N. 2008. Adaptations to host infection and larval parasitism in Unionoida. J. N. Am. Benthol. Soc.. 27. 370-394.
- Douda, K. 2015. Host-dependent vitality of juvenile freshwater mussels: Implications for breeding programs and host evaluation. Aquaculture. 445. 5-10.
- Ellis, M. M., Ellis, M. D. 1926. Growth and transformation of parasitic glochidia in physiological nutrient solutions. Science. 54. 579-580.
- Farris, J. L., Van Hassel, J. H. 2006. Freshwater bivalve ecotoxicology. CRC Press. Pensacola. 369. ISBN: 1-4200-4284-X
- Fondriest Environmental, Inc. pH of Water [online]. Fundamentals of Environmental Measurements. 19. listopadu 2013. [cit. 2018-04-03]. Dostupné z <<http://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/ph/>>
- Gašienica-Staszczek, M. Zając, K. Zając, T. Olejniczak, P. 2017. In vitro culture of glochidia of the threatened freshwater mussel *Unio crassus* Philipsson 1788 – the dilution problem. Invertebrate Reproduction & Development. 2017. 1-9.
- Graf, D.L., Cummings, K.S. 2007. Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). Journal of Molluscan Studies. 73. 291-314.
- Hayat, K. Difference Between Plasma And Serum [online]. MEDIMOON. 3. července 2012. [cit. 2018-03-15]. Dostupné z <<http://medimoon.com/2012/07/difference-between-plasma-and-serum/>>
- Hinzmann, M. Lopes-Lima, M. Teixeira, A. Varandas, S. Sousa, R. Lopes, A. Froufe, E. Machado, J. 2013. Reproductive Cycle and Strategy of Anodonta anatina (L., 1758): Notes on Hermaphroditism. Journal of experimental zoology. Ecological genetics and physiology. 319. 378-390.

- Hudson, R.G., Shelbourne, C.W. 1990. Improved in vitro culture of parasitic freshwater mussel glochidia. Report to the Tennessee Valley Authority. 25.
- Isom, B.G., Hudson, R.G. 1982. In vitro culture of parasitic freshwater mussel glochidia. *The Nautilus*. 96. 147-151.
- Keller, A. E., Zam, S. G. 1990. Simplification of in vitro culture techniques for freshwater mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 9. 1291-1296.
- Kern, M. A. 2017. Simplifying Methods for in Vitro Metamorphosis of Glochidia. MSU Graduate Theses. 3132.
- Lima, P., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Machado, J. 2006. In vitro culture of glochidia from the freshwater mussels *Anodonta cygnea*. *Invertebrate Biology*. 125(1). 34-44.
- Lima, P., Lima, M. L., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Owen, Ch., Machado, J. 2012. A review on the „in vitro“ culture of freshwater mussels (Unionoida). *Hydrobiologia*. 691. 21-33.
- Lima, R.C., Avelar, W.E.P. 2010. A new additive to the artificial culture medium for freshwater bivalve culture *in vitro*. *Invertebrate Reproduction and Development*. 54. 89-94.
- Lopes-Lima, M. *Anodonta anatina* [online]. The IUCN Red List of Threatened Species. 2014. [cit. 2018-03-27]. Dostupné z <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T155667A21400363.en>>
- Ma, X. Y. Wen, H. B. Zou, J. Jin, W. Hua, D. Gu, R. B. Xu, P. 2017. An improved method for in vitro culture of glochidia in freshwater mussel *Cristaria plicata* (Mollusca, Bivalvia). *Hydrobiologia*. 810. 133-144.
- Machač, O. *Anodonta anatina* – škeble říční [online]. *Natura Bohemica příroda České republiky*. 27. února 2009. [cit. 2018-02-27]. Dostupné z <<http://www.naturabohemica.cz/anodonta-anatina/>>
- Owen, Ch., Alexander, J.E. JR.,McGregor, M. 2010. Control of microbial contamination during in vitro culture of larval unionid mussels. *Invertebrate Reproduction & Development*. 54. 187-193.

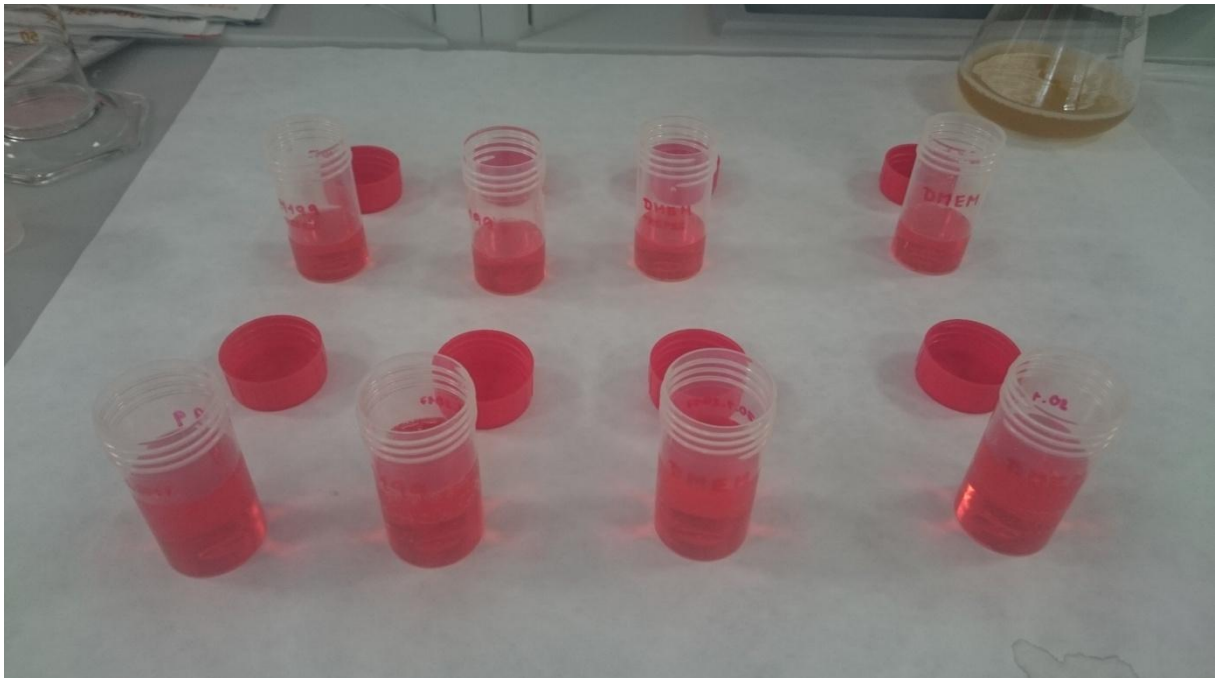
- Patterson, M. A. Mair, R. A. Eckert, N. L. 2018. Freshwater Mussel Propagation for restoration. Cambridge University Press. 2018.
- Roberts, A. D., Barnhart, M. Ch. 1999. Effects of temperature, pH, and CO₂ on Transformation of the Glochidia of *Anodonta suborbiculata* on Fish Hosts and in vitro. Journal of the North American Benthological Society. 18(4). 477-487.
- Taeubert, J. El-Nobi, G. Geist, J. 2013. Effects of water temperature on the larval parasitic stage of the thick-shelled river mussel (*Unio crassus*). AQUATIC CONSERVATION: Marine and Freshwater ecosystems. 24. 231-237.
- Taskinen, J., Mäenpää, E., Valovirta, I. 2011. In vitro culture of parasitic glochidia of four unionacean mussels. Ferrantia. 64. 38-47.
- Uthaiwan, K., Noparatnaraporn, N., Machado, J. 2001. Culture of glochidia of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856) in artificial media. Aquaculture. 195. 61-69.
- Uthaiwan, K., Pakkong, P., Noparatnaraporn, N., Vilarinho, L., Machado, J. 2001. Study of suitable fish plasma for in vitro culture of glochidia *Hyriopsis myersiana*. Aquaculture. 209. 197-208.
- Vicentini, H. 2005. Unusual spurting behaviour of the freshwater mussel *Unio crassus*. Journal of Molluscan Studies. 71. 409-410.
- Wen, H. B. Jin, W. Ma, X. Y. Zheng, B. Q. Xu, P. Xu, L. Hua, D. Yuan, X. H. Gu, R. B. 2018. Vitro culture o faxe-head glochidia in pink heelsplitter *Potamilus alatus* and mechanism of its high host specialists. PLoS ONE. 13. 1-19.

Přílohy

Příloha 1 – Mlži druhu *Anodonta anatina*



Příloha 2 – Příprava kultivačních médií



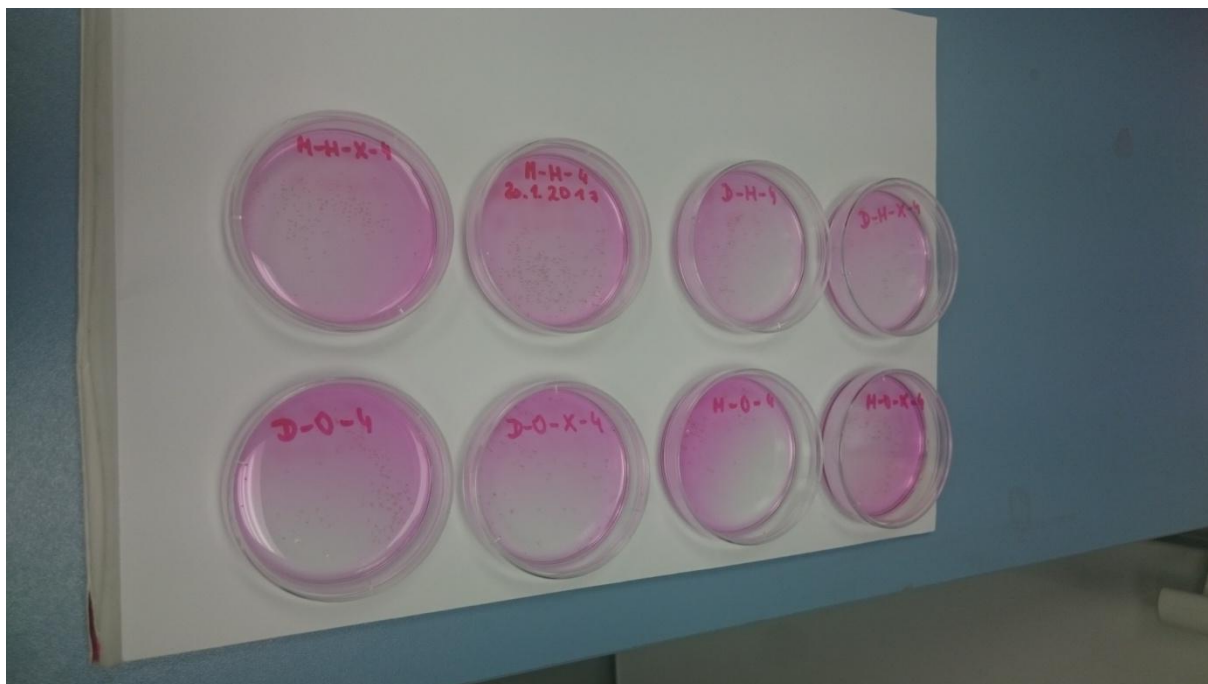
Příloha 3 – Odebraná glochidia



Příloha 4 – Kultivační misky v inkubátoru 1. den kultivace



Příloha 5 – Misky 4. série 3. den kultivace



Příloha 6 - Misky 4. série 4. den kultivace



Příloha 7 - Misky 4. série 5. den kultivace



Příloha 8 – Všechny misky po výměně média 5. den kultivace u série s označením X



Příloha 9 – Všechny misky 8. den kultivace



Příloha 10 – Všechny misky 11. den kultivace



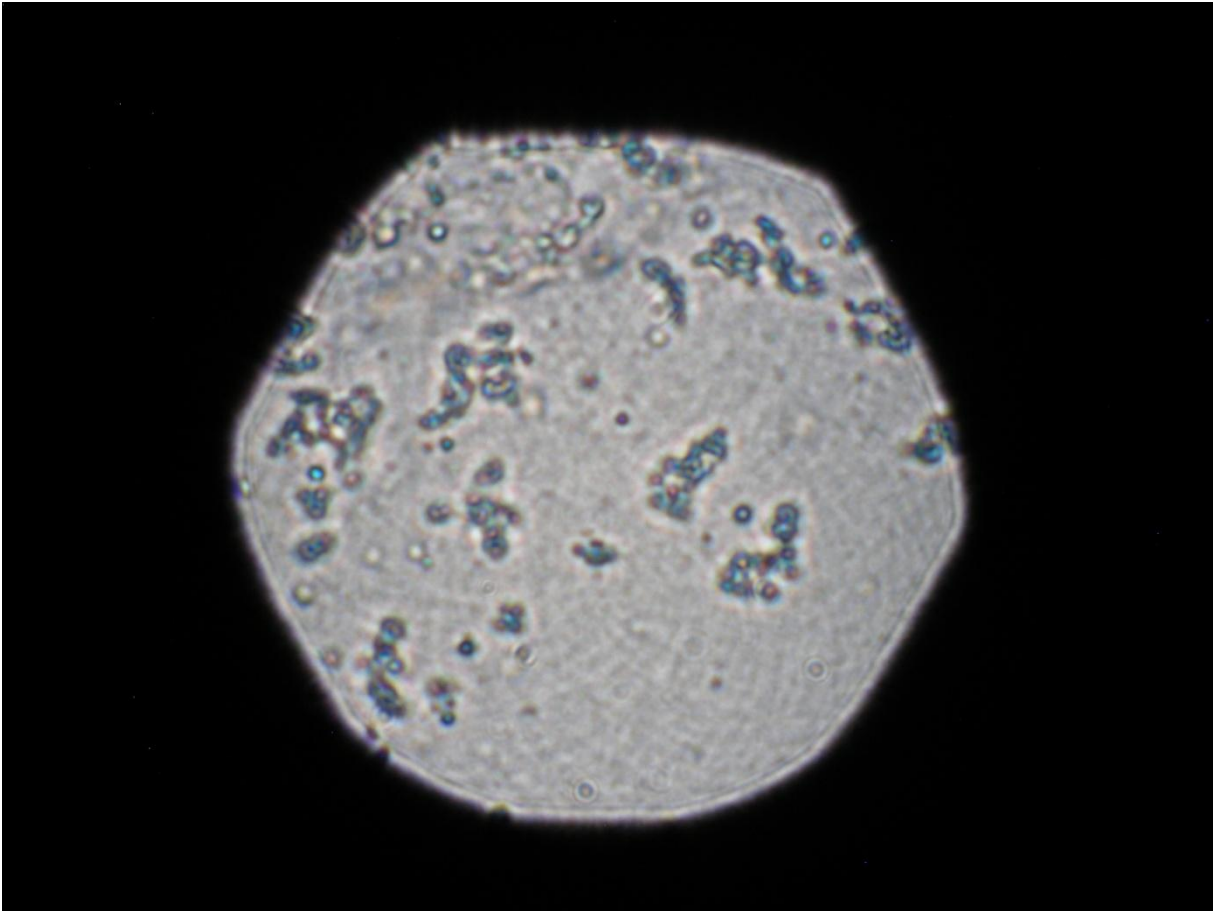
Příloha 11 – Média určená na výměnu 5. den kultivace u série s označením X



Příloha 12 – Výchozí data

ID misky	Medium	Výměna	HEPES	Podíl zavřených 12. den	Podíl zaplísněných 12. den	Celkový počet glochidií	Počet zavřených glochidií	Počet zaplísněných glochidií
	D/M	ANO/NE	ANO/NE	%	%	n	n	n
M-0-X-1	M	ANO	NE	8%	21%	149	12	32
M-0-1	M	NE	NE	1%	12%	197	2	23
M-0-X-2	M	ANO	NE	1%	23%	185	2	42
M-0-2	M	NE	NE	3%	10%	164	5	17
M-0-X-3	M	ANO	NE	2%	15%	176	3	26
M-0-3	M	NE	NE	4%	21%	128	5	27
M-0-X-4	M	ANO	NE	1%	19%	148	2	28
M-0-4	M	NE	NE	7%	13%	95	7	12
M-0-X-5	M	ANO	NE	7%	22%	219	15	49
M-0-5	M	NE	NE	3%	11%	181	5	20
M-0-X-6	M	ANO	NE	2%	13%	203	5	26
M-0-6	M	NE	NE	2%	15%	100	2	15
M-0-X-7	M	ANO	NE	5%	21%	227	11	47
M-0-7	M	NE	NE	7%	26%	242	17	62
M-H-X-1	M	ANO	ANO	2%	26%	94	2	24
M-H-1	M	NE	ANO	1%	14%	133	1	18
M-H-X-2	M	ANO	ANO	1%	21%	114	1	24
M-H-2	M	NE	ANO	1%	14%	139	1	19
M-H-X-3	M	ANO	ANO	5%	33%	149	8	49
M-H-3	M	NE	ANO	1%	20%	75	1	15
M-H-X-4	M	ANO	ANO	2%	23%	123	2	28
M-H-4	M	NE	ANO	2%	18%	173	3	32
M-H-X-5	M	ANO	ANO	3%	15%	188	5	28
M-H-5	M	NE	ANO	5%	27%	125	6	34
M-H-X-6	M	ANO	ANO	0%	27%	237	1	64
M-H-6	M	NE	ANO	1%	11%	135	2	15
M-H-X-7	M	ANO	ANO	5%	35%	187	10	65
M-H-7	M	NE	ANO	29%	38%	226	66	86
D-0-X-1	D	ANO	NE	3%	14%	116	3	16
D-0-1	D	NE	NE	2%	14%	174	4	24
D-0-X-2	D	ANO	NE	15%	32%	206	30	66
D-0-2	D	NE	NE	0%	23%	104	0	24
D-0-X-3	D	ANO	NE	6%	37%	135	8	50
D-0-3	D	NE	NE	7%	40%	133	9	53
D-0-X-4	D	ANO	NE	10%	26%	136	14	36
D-0-4	D	NE	NE	6%	25%	107	6	27
D-0-X-5	D	ANO	NE	4%	21%	178	8	37
D-0-5	D	NE	NE	4%	14%	76	3	11
D-0-X-6	D	ANO	NE	8%	26%	115	9	30
D-0-6	D	NE	NE	12%	35%	131	16	46
D-0-X-7	D	ANO	NE	8%	27%	153	13	42
D-0-7	D	NE	NE	4%	37%	139	6	52
D-H-X-1	D	ANO	ANO	0%	12%	148	0	18
D-H-1	D	NE	ANO	0%	28%	167	0	47
D-H-X-2	D	ANO	ANO	1%	13%	229	2	29
D-H-2	D	NE	ANO	0%	22%	193	0	43
D-H-X-3	D	ANO	ANO	14%	36%	110	15	40
D-H-3	D	NE	ANO	4%	39%	99	4	39
D-H-X-4	D	ANO	ANO	3%	30%	105	3	31
D-H-4	D	NE	ANO	4%	22%	103	4	23
D-H-X-5	D	ANO	ANO	3%	32%	146	4	46
D-H-5	D	NE	ANO	0%	0%	150	0	0
D-H-X-6	D	ANO	ANO	3%	34%	137	4	47
D-H-6	D	NE	ANO	0%	25%	87	0	22
D-H-X-7	D	ANO	ANO	7%	27%	263	18	70
D-H-7	D	NE	ANO	3%	28%	125	4	35

Příloha 13 – Shluk bakterii pozorovaný v blízkosti glochidií



Příloha 14 – Glochidia na druhu *Ancistrus sp. gold*



Příloha 15 – Juvenil transformovaný na rybě *Ancistrus sp. gold*

