

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



**Vliv nanočástic stříbra na aktivitu a přežívání
slávičky mnohotvárné
v experimentálních podmínkách**

Diplomová práce

Studijní obor: Biologie

Studijní obor: Hydrobiologie

Forma studia: Prezenční

Autor: Bc. Daniel Orlik

Vedoucí práce: RNDr. Vladimír Uvíra, Dr.

Olomouc 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 11. 11. 2021

.....

Podpis

Poděkování

Děkuji paní RNDr. Janě Soukupové, Ph.D. za obětavou pomoc, cenné rady a zajištění nanočástic stříbra společně s jejich aplikováním na experimentální nádoby. Velký dík patří také RNDr. Vladimíru Uvírovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce a rovněž za zapůjčení potápěčského vybavení a poskytnutí laboratorních prostor k provedení experimentů.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Daniel Orlík

Název práce: Vliv nanočástic stříbra na aktivitu a přežívání slávičky mnohotvárné v experimentálních podmínkách.

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: RNDr. Vladimír Uvíra, Ph.D.

Rok obhajoby: 2021

Počet stran: 43

Abstrakt:

Otázka toxicity a chování nanočástic stříbra v životním prostředí a jejich vliv na vyšší organismy nebyl doposud dostatečně prostudován. Slávičku mnohotvárnou (*Dreissena polymorpha*), která je jedním z organismů používaných v bioakumulačním biomonitoringu, byla za tímto účelem vybrána jako modelový organismus. Interakce tohoto organismu se stříbrem ve smyslu stanovení letální koncentrace (LC_{50}), stanovení místa bioakumulace nanočástic a také vliv nanočástic na přisedání sláviček na substrát představují parametry, které byly sledovány. Při stanovení letální koncentrace jsme slávičky vystavili různým koncentracím nanočástic stříbra ve formě suspenze. Následně jsme vytvořili křivku odpovědi sláviček na nanočástice stříbra a vypočítali střední letální koncentraci. Výsledná hodnota LC_{50} pro nanočástice stříbra vyšla 0,68 mg. Následně jsme pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS) stanovili množství a místo primární depozice nanočástic v měkkých tkáních. Nanočástice stříbra se v organismu slávičky usazují primárně na žábrech, odkud pak putují do svalnaté nohy. Nakonec jsme zkoumali rozdíl v přisedání sláviček k podkladu v závislosti na použitém způsobu interakce nanočástic stříbra – volné nanočástice stříbra ve formě disperze či imobilizované na povrchu substrátu. Experimenty poukázaly na fakt, že povrch pokrytý nanočásticemi nesnižuje míru přisednutí sláviček k podkladu nanočástic stříbra ve formě disperze ale prokazatelný vliv na míru přisedání daných jedinců sláviček mají.

Klíčová slova: slávička mnohotvárná, eradikace, nanočástice stříbra, LC_{50} , bioakumulace, přisedání

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Bc. Daniel Orлік

Title: Influence of the silver nanoparticles on the activity and survival of zebra mussel in the experimental conditions.

Type of thesis: Master thesis

Department: Department of Ecology and Environment

Supervisor: RNDr. Vladimír Uvíra, Dr.

The year of presentation: 2021

Number of pages: 43

Abstract:

There has not been published an appropriate study addressing toxicity and behavior of silver nanoparticles in the environment and their effect on higher organisms. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), which is one of the organisms being used in bioaccumulation biomonitoring, was selected as a model organism. The following parameters were monitored: the interaction of this organism with silver nanoparticles in the sense of determining lethal concentration (LC_{50}), a determination of the location of bioaccumulation of silver, and the effect of nanoparticles on the attachment of the organisms to the silver functionalized substrate. To determine the lethal concentration, zebra mussels were exposed to various concentrations of silver nanoparticles in the form of a suspension. Subsequently, a response curve of the zebra mussels to the silver nanoparticles was generated and the mean lethal concentration was calculated. The resulting LC_{50} value for silver in a form of free nanoparticles, was calculated to be 0.68 mg/L. Using atomic absorption spectroscopy (AAS), the amount and location of primary deposition of silver in soft tissues were defined. Silver accumulates primarily on gills in the zebra mussel's body. It reaches a saturation value and then it is deposited in the muscular leg. Finally, the difference in the attachment of zebra mussels to the substrate depend on the used method of interaction with silver nanoparticles – either free silver nanoparticles in a suspension or as silver nanoparticles immobilized to the surface. The experiments proved that the surface immobilized silver nanoparticles does not reduce the rate at which zebra mussels adhere to the layer. However, silver nanoparticles in the form of a suspension had a significant effect on the rate of attachment of the individual zebra mussels.

Key words: zebra mussel, eradication, silver nanoparticles, LC_{50} , bioaccumulation, attachment

Obsah

1 Úvod	2
2 Základní informace o zkoumaném jedinci	3
3 Dostupné eradikační metody	4
3.1 Chemické metody	4
3.2 Fyzikální metody	9
3.3 Biologické metody	12
4 Nanočástice	13
4.1 Vliv nanočástic na slávičku	13
4.2 Nanočástice stříbra	14
5 Materiál a metody	15
5.1 Lokalita a odběr vzorků sláviček mnohotvárných	15
5.2 Aklimatizace sláviček mnohotvárných v laboratoři	15
5.3 Nanočástice stříbra	16
5.4 Laboratorní experiment LC50	17
5.5 Akumulace nanočástic stříbra v měkkých tkáních	18
5.6 Reakce na plochy ošetřené nanočásticemi stříbra	18
5.7 Přichycování k podkladu v závislosti na použitém skupenství nanočástic Ag	19
5.8 Statistická analýza	20
6 Výsledky	21
6.1 Stanovení LC ₅₀	21
6.2 Akumulace v měkkých tkáních	23
6.3 Reakce na plochy ošetřené nanočásticemi Ag	23
6.4 Přichycování v závislosti na použitém skupenství nanočástic Ag	26
7 Diskuse	28
8 Závěr	29
Seznam použité literatury	31
Seznam příloh	40

1 Úvod

Slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) je druh našeho nepůvodního mlže. Díky svému rychlému množení, se velmi rychle stane dominantní na celé lokalitě, na které způsobuje značné problémy. Svou filtrační činností přemístí téměř veškerou potravu z vodního sloupce do výkalů. Negativní vliv nemají slávičky jen na biotu daného vodního tělesa, rovněž působí negativně na lidské stavby. Zde se zejména přichycuje v potrubí, které dokáže až úplně ucpat a způsobit tak značné nejen finanční problémy. Z těchto důvodů by nalezení levné a účinné metody, jak slávičku zpomalit anebo zastavit v tomto invazivním šíření, bylo velmi prospěšné.

První část práce je psaná formou literární rešerše a rozdělená do tří kapitol, přičemž v první kapitole jsou uvedené základní informace o zkoumaném jedinci. V další kapitole jsou shrnuta preventivní a reaktivní opatření, které slouží ke kontrole slávičky na daném území. V poslední kapitole jsou popsány nanočástice a dostupné studie, ve kterých byl testován vliv různých nanočástic na slávičku. Následně se již práce věnuje metodice a vyhodnocení našich experimentů.

Cíle práce:

1. Aktualizace literární rešerše z Bakalářské práce.
2. Laboratorní testování vlivu nanočástic Ag na aktivitu a přežívání slávičky.
3. Vyhodnocení výsledků, letální koncentrace, akumulace Ag v měkkých tkáních.
4. Návrh na využití výsledků k eradikaci slávičky v uzavřených systémech.

2 Základní informace o zkoumaném jedinci

Slávička mnohotvárná patří mezi 100 nejvíce invazivních druhů na naší planetě (Lowe et al. 2000). Svůj původ má v pontokaspické oblasti, odkud se rozšířila zejména díky lodní dopravě. Nyní ji nalezneme v Severní Americe a téměř celé Evropě (Hebert et al. 1989; Karatayev et al. 1997). V České republice byl první objev slávičky už koncem 19. století a to v Ústí nad Labem, kde se dostala z Německa díky lodní dopravě (Blažka 1893). Na střední Moravu se dostala roku 1991 záměrnou introdukcí rekreanty z pískovny u Čalova na jižním Slovensku. Jejím dalšímu šíření v povodí Moravy přispěla také povodeň v roce 1997 (Uvíra et al. 2009).

Slávička je druh filtrujícího sladkovodního mlže, který se dokáže přichytit byssovými vlákny k substrátu a zároveň má planktonní larvu zvanou veliger, která je typická zejména pro mořské druhy. Svým výskytem na lokalitě velmi ovlivňuje nejen fyzikální a chemické vlastnosti, ale také celá společenstva díky své rychlé reprodukci, přichycování na další organismy a vysoké rychlosti filtrace (litr vody za den) (Maguire and Sykes 2004; Haag et al. 1993; Karatayev et al. 1997).

Tělo slávičky tvoří lastura, pod kterou se nachází plášť. Ten pokrývá všechny orgány plášťové dutiny. V plášti lze nalézt 3 otvory: inhalační sifo kterým vniká do těla slávičky voda s potravou, exhalační sifo díky kterému je vypuzována voda s výkaly a třetí otvor v plášti je určen pro vysunovatelnou svalnatou nohu a byssova vlákna (Morton 1969).

Byssova žláza tvoří tuhnutí bílkovinný sekret zvaný byssova vlákna. Rychlost tvorby byssových vláken závisí na velikosti daného jedince, kvalitě a teplotě vody. Denně za normálních podmínek jedna slávička vyprodukuje kolem 22 mm byssových vláken a průměrně během týdne dokáže slávička vytvořit kolem 23 vláken (Clarke and McMahon 1996, Morton 1969).

Rychlost pohybu slávičky pomocí svalnaté nohy závisí na velikosti daného jedince, menší slávičky se dokáží pohybovat rychlostí kolem 20 cm/h, kdežto dospělé slávičky se pohybují rychlostí kolem 0,5 cm/h (Toomey et al. 2002). Pohyb sláviček i tvorba vláken je nižší v přítomnosti predátorů, kvůli kterým zpomalují fyziologické procesy. Aby předešli možnosti svého odhalení predátory, sníží množství produkovaných metabolitů. (Czarnoleski et al. 2010).

3 Dostupné eradikační metody

Metody eradikace slávičky můžeme shrnout do 3 základních kategorií na metody chemické, fyzikální a biologické. Těmto metodám se věnovala již má bakalářská práce (Orlík 2018). Tato kapitola obsahuje shrnutí metod z bakalářské práce a současně aktualizaci a rozšíření o další metody použitelné pro eradikaci slávičky mnohotvárné.

3.1 Chemické metody

Chemické metody jsou takové metody, kdy působíme chemickým činidlem na experimentální organismus. V našem případě na invazivní slávičku mnohotvárnou. Souhrn chemických metod použitelných k eradikaci uvádí tabulka 1. Bohužel kvůli různému způsobu stanovení toxicity jsou jednotlivé chemikálie špatně porovnatelné mezi sebou.

Chlorid draselný (KCl) je účinný k eradikaci při koncentraci 641,0 mg/l na všechna vývojová stádia slávičky. Tento chlorid způsobuje slávičkám nevratnou změnu na žábách. Zároveň je pro slávičku třikrát toxicitější než pro ryby (Odonnell et al. 1996; Waller et al. 1996). K dosažení LC₅₀ stačí na slávičku působit chloridem draselným o koncentraci 150 mg/l po dobu 48 h (Waller et al. 1993). Použití zmíněné látky se nicméně nedoporučuje kvůli toxicitě chloridu draselného k dalším organismům (Fisher et al. 1991).

Chlorid sodný (NaCl) neboli kuchyňská sůl, lze použít k eradikaci při koncentraci 10000 mg/l na larvy a přisedající jedince. Chlorid sodný se jeví jako ideální díky své nízké toxicitě k dalším organismům (Waller et al. 1996). Ovšem při vyšších koncentracích rovněž působí negativně i na ostatní jedince (Edwards et al. 2000).

Chlorid vápenatý (CaCl₂) je účinný k eradikaci při koncentraci 10000 mg/l na larvy a přisedající jedince. Při této koncentraci je však toxický například i pro pstruha obecného (*Salmo trutta*). Pokud dojde k navýšení dávky na 20000 mg/l, tak je tato dávka toxická i pro další druhy (Waller et al. 1996).

Chlornan sodný (NaClO) je desinfekční činidlo, který při koncentraci 0,5 mg/l indikuje 50% mortalitu dospělců sláviček a to již během necelých sedmi dnů (Klerks and Fraleigh 1991). Při vyšších koncentracích působí chlornan sodný i na ostatní vodní organismy. Například při koncentraci 5,6 mg/l způsobuje 50% mortalitu u jelečka

velkohlavého (*Pimephales promelas*) nebo při několikanásobně vyšší koncentraci (56,4 mg/l) u bílých krevet (*Litopenaeus setiferus*) (Curtis et al. 1979).

Manganistan draselný (KMnO₄) je chemikálií, která běžně slouží k desinfekci. U sláviček způsobuje mortalitu 50% dospělců již po 7,2 dnech při koncentraci 2,5 mg/l (Klerks and Fraleigh 1991). Tato látka je rovněž toxická pro ryby. Například u sumečka tečkovaného (*Ictalurus punctatus*) působí 50% mortalitu po 4 dnech při koncentraci 0,75 mg/l (Marking and Bills 1975).

Dusičnan stříbrný (AgNO₃) je známý pro své využití v klasické fotografii. K dosažení mortality u 100% dospělců je zapotřebí použít koncentraci 1,5 mg/l. K mortalitě pak dochází většinou během 24 dnů (Berthet et al. 1992). K 50% mortalitě u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) dochází již při koncentraci 0,0065 mg/l (Davies et al. 1978).

Hydroxid draselný (KOH) je běžně používán k desinfekci nebo v potravinářském průmyslu. Zároveň je také účinný k eradikaci slávičky a to již při koncentraci 10,0 mg/l. V tomto množství způsobuje 100% mortalitu u všech životních stádií slávičky. Díky své vlastnosti zvyšovat pH vody a vlivu na další organismy se jeho použití příliš nedoporučuje (Wallen et al. 1957; U.S. Bureau of Reclamation 2008).

Síran měďnatý (CuSO₄), používaný jako přísada do algicidních a baktericidních přípravků, omezuje u sláviček funkci žaber (Watters et al. 2013). Nejúčinnější je vůči larválním stádiím, kdy dochází k mortalitě již během několika minut. K 50% mortalitě u dospělců dochází při koncentraci 20 mg/l, eradikace je v tomto případě časově náročnější, neboť se jedinci mohou uzavřít do svých lastur (Kennedy et al. 2006; Waller et al. 1993). Síran měďnatý je rovněž ve vyšších dávkách toxický pro další vodní organismy (Smith 1940).

Tributylcín (C₂₄H₅₄OSn₂) se používá k ošetření rybářských sítí a také se přidává do lodních nátěrů. Tato látka působí jako endokrinní disruptor, k 50% mortalitě u embryí sláviček dochází již při koncentraci 36·10⁻⁵ mg/l. Tato látka je nejen nebezpečná svou nízkou koncentrací, ale také svou perzistencí v sedimentech (Meador 1997; Faria et al. 2010).

Chlorothalonil (C₈Cl₄N₂) se využívá jako fungicid při ochraně užitkových rostlin, zejména banánů a sóji. Často se aplikuje formou postřiků, například na pole v letních měsících, čímž může dojít k zanesení do vodního prostředí. Zároveň však již při koncentraci 97·10⁻⁵ mg/l dochází k 50% mortalitě embryí sláviček. Tato látka nepůsobí

ve fauně pouze na slávičky, ale taky na pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), a to již při koncentraci 0,01 mg/l (Davies and White 1985; Faria et al. 2010).

Methylrtuť ($[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$), látka dříve využívaná jako fungicid, je tvořena také bakteriemi při methylovaní rtuti v sedimentech (Jensen and Jernelov 1969, Barrett 2010). Pro eradikaci embryí sláviček lze použít methylrtuť z CH_3HgCl . Při koncentraci $132 \cdot 10^{-5}$ mg/l nastane 50% mortalita embryí. Methylrtuť se však může akumulovat v potravním řetězci a způsobit tak mortalitu například u sivena amerického (*Salvelinus fontinalis*) (Christensen et al. 1977; Faria et al. 2010).

Oxid uhličitý (CO_2) může také přispět k eradikaci. Již při koncentraci 157,3 mg/l dochází během tří a půl dne k 50% mortalitě dospělých jedinců. U mlže *Lampsilis siliquoidea* z čeledi Unionidae, který se přirozeně vyskytuje v oblasti Great Lakes (Severní Amerika), je při mnohonásobně vyšší koncentraci (477,5 mg/l) po 96 hodinách inhibovaná tvorba byssových žláz (Waller and Bartsch 2018). Ukazuje se, že tato metoda působí mortalitu i u korbikuly asijské (*Corbicula fluminea*), která je rovněž nepůvodní na našem území (McMahon et al. 1995).

Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), který se využívá při tvorbě léčiv anebo kosmetiky, způsobuje 50% mortalitu sláviček při koncentraci 1000 mg/l během dvou dní. Fenol působí také na ryby, a to při mnohočetně nižší koncentraci. Například při koncentraci 34,5 mg/l způsobuje 50% mortalitu u gambusie (*Gambusia affinis*) a to také během dvou dní (Kamshilov and Flerov 1978; Angus 1983).

Formalin (CH_2O), sloužící v zemědělství jako insekticid a fungicid, se rovněž používá jako konzervační prostředek. U larev způsobuje mortalitu při 250,0 mg/l. U přisedajících jedinců však při stejné koncentraci nedojde ani k 50% mortalitě. Formalin je však toxický i pro ryby, již 50 mg/l způsobuje 50% mortalitu u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Waller et al. 1996; Tisler and ZagorčKoncan 1997).

Kadmium (Cd^{2+}) patří mezi toxické prvky. Využíval se k ochraně před korozi a v dnešní době jeho využití co nejvíce snižuje z důvodu jeho toxicity. Chlorid kademnatý je účinný k eradikaci dospělce při koncentraci 0,4 mg/l (Kraak et al., 1992). Působí také na reprodukci zástupců skupiny Arthropoda, a to již při 100krát nižší koncentraci (Bertram and Hart 1979).

Olovo (Pb^{2+}), používané nejen v průmyslu, patří mezi toxické látky. V poslední době je velká snaha jeho využití omezit. Olovo dokáže ovlivnit míru filtrace slávičky.

Pro dusičnan olovnatý, byla stanovena LC_{50} na koncentraci 0,35 mg/l (Kraak et al. 1994). Při daleko nižší koncentraci však již působí negativně i vůči dalším vodním organismům, jako je třeba pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) (Davies et al. 1976).

Zinek (Zn^{2+}) je používán k výrobě slitin nebo barev. Zinek použitý z chloridu zinečnatého ovlivňuje filtrační činnost slávičky. Při koncentraci 2,7 mg/l eradikuje dospělce (Kraak et al. 1994). Zinek rovněž působí negativně i na některé ryby a další vodní organismy (Vardy et al. 2014).

Nikl (Ni^{2+}) se používá stejně jako zinek k výrobě slitin a povrchové úpravě kovu před korozi. Pro svou toxicitu se však také od jeho použití postupně upouští. Při rozmíchání hexahydrátu chloridu nikelnatého o koncentraci 2,5 mg/l, dochází během 4 dnů k mortalitě poloviny jedinců (Potet et al. 2018). Plůdek kapra obecného (*Cyprinus carpio*) hyne již při třetinové koncentraci zinku (Eisler 1998).

Chlor (Cl_2), využívaný hojně k desinfekci, lze použít k eradikaci buď jako plyn Cl_2 nebo jako chlornan sodný $NaClO$ prodáváný pod obchodním názvem Savo. Koncentraci 0,5 mg/l lze použít k usmrcení jedinců slávičky mnohotvárné. K rychlejší eradikaci docílíme zvýšením teploty nebo koncentrace (Rajagopal et al. 2002). Ačkoliv je slávička citlivější k chloraci než některé další druhy mlžů, dochází při jejím používání ke vzniku karcinogenních látek (Martin et al. 1993b; Mackie and Claudi 2010).

Oxid chloričitý (ClO_2) se používá stejně jako chlor k desinfekci pitné vody. Působí rovněž na veligerové stádium slávičky, kdy při koncentraci 0,5 mg/l způsobuje během jednoho dne 100% mortalitu daných jedinců. Tato látka také působí na další vodní organismy (Svecevicus et al. 2005).

Chloramin (NH_2Cl), jež bývá součástí desinfekcí do bazénů, působí na veligerová stádia. Působí při koncentraci 1,2 mg/l 100% mortalitu a to již během jednoho dne (U.S. Bureau of Reclamation 2008). Chloramin způsobuje při větších koncentracích i mortalitu dalších vodních organismů (Bowker and Erdahl 1998).

Peroxid vodíku (H_2O_2) lze kromě eradikace, použít i jako desinfekční či oxidační činidlo. Při koncentraci 20,0 mg/l dochází ke 100% mortalitě. Rychlost eradikace pak závisí na teplotě vody, kdy například při 22 °C dojde k eradikaci již během dvou dnů, ale při teplotě 12 °C trvá eradikace o tři dny déle (Martin et al. 1993a). Současně je nevýhodou i smrtící vliv na další vodní organismy (U.S. Bureau of Reclamation 2008).

Ozon (O_3) se svými silnými oxidačními účinky působí na larvy sláviček, u kterých inhibuje filtraci, plavání a přichycení. Při koncentraci 0,5 mg/l pak způsobuje u larev 100% mortalitu (Vanbenschoten et al. 1993). Ozon působí toxicky například na larvy kapra a to již při koncentraci 0,045 mg/l (Leynen et al. 1998).

Tabulka 1: Přehled chemických metod eradikace slávičky mnohotvárné (* pouze 50% mortalita).

Chemická metoda	Účinná koncentr ace [mg/l]	Vliv na		Zdroj
		stádium slávičky	další organismy	
chlorid draselný (KCl)	641,0	všechna	ano	(Odonnell et al. 1996)
chlorid sodný (NaCl)	10 000,0	larva	ano	(Waller et al. 1996)
chlorid vápenatý ($CaCl_2$)	10 000,0	larva	ano	(Waller et al. 1996)
chloman sodný ($NaClO$)	0,5 *	dospělec	ano	(Klerks and Fraleigh 1991)
manganistan draselný ($KMnO_4$)	2,5 *	dospělec	ano	(Klerks and Fraleigh 1991)
dusičnan stříbrný ($AgNO_3$)	1,5	dospělec	ano	(Berthet et al. 1992)
hydroxid draselný (KOH)	10,0	všechna	ano	(U.S. Bureau of Reclamation 2008)
síran měďnatý ($CuSO_4$)	20,0	všechna	ano	(Waller et al. 1993)
tributylcín ($C_{24}H_{54}OSn_2$)	$36 \cdot 10^{-5}$ *	embryo	ano	(Faria et al. 2010)
chlorothalonil ($C_8Cl_4N_2$)	$97 \cdot 10^{-5}$ *	embryo	ano	(Faria et al. 2010)
methylrtuť ($[CH_3Hg]^+$)	$132 \cdot 10^{-5}$ *	embryo	ano	(Faria et al. 2010)
oxid uhličitý (CO_2)	157,3 *	dospělec	ano	(Waller and Bartsch 2018)
fenol (C_6H_5OH)	1 000,0 *	dospělec	ano	(Kamshilov and Flerov 1978)
formalin (CH_2O)	250,0	larva	ano	(Waller et al. 1996)
kadmium (Cd^{2+})	0,4	dospělec	ano	(Kraak et al. 1992)
olovo (Pb^{2+})	0,4 *	dospělec	ano	(Kraak et al. 1994)
nikl (Ni^{2+})	2,5 *	dospělec	ano	(Potet et al. 2018)
zinek (Zn^{2+})	2,1	dospělec	ano	(Kraak et al. 1994)
chlor (Cl_2)	0,5	všechna	ano	(Rajagopal et al. 2002)
oxid chloričitý (ClO_2)	0,5	larva	ano	(U.S. Bureau of Reclamation 2008)
chloramin (NH_2Cl)	1,2	larva	ano	(U.S. Bureau of Reclamation 2008)
peroxid vodíku (H_2O_2)	20,0	všechna	ano	(Martin et al. 1993a)
ozon (O_3)	0,5	larva	ano	(Vanbenschoten et al. 1993)

3.2 Fyzikální metody

Fyzikální metody jsou takové metody, kdy působíme fyzikálně na experimentální organismus. Mezi takové metody řadíme působení ultrafialového záření, vliv teploty, kavitace, vibrací, elektrického napětí atd. Souhrn všech doposud studovaných fyzikálních metod použitelných k eradikaci uvádí tabulka 2.

Teplá voda, přesahující teplotu 39 °C, způsobuje mortalitu u slávičky mnohotvárné již během pár hodin (Spidle et al. 1995). Působením vody pod tlakem s teplotou 90 °C na slávičku z 10 cm působí v této populaci 100% mortalitu již během 15 vteřin. Teplá voda má však i negativní vliv například na rybí jikry nebo rostliny (Bradbeer et al. 2021).

Vysoušení, způsobené letněním rybníků anebo jiných vodních těles, působí eradikačně na slávičku. Teplota vzduchu velmi ovlivňuje rychlost eradikace. Při vysokých teplotách (36 °C) nebo teplotách pod bodem mrazu (− 12 °C) dochází k eradikaci během pár hodin. K účinnější eradikaci je zapotřebí nižší vzdušné vlhkosti (Ricciardi et al. 1995; U.S. Bureau of Reclamation 2008).

Ultrafialové záření, tedy elektromagnetické záření s kratší vlnovou délkou než má viditelné světlo, snižuje schopnost pohybu spermii. Zároveň také způsobuje zpoždění nebo také až úplné zastavení meiózy vajíček, což má za následek neoplození vajíčka (Seaver et al. 2009). Také další organismy jsou citlivé na ultrafialové záření, zejména na jejich ranná životní stádia (Tietge et al. 2001).

Ultrazvuk, tedy akustické vlnění vyšší než je horní hranice sluchu, navozuje 100% mortalitu larev již během pár vteřin. Dospělci hynou během jednoho dne při frekvenci 39–41 kHz (U.S. Bureau of Reclamation 2008). Zooplankton hyne při frekvenci 19 kHz již během pár vteřin, phytoplankton a bakterie během pár minut (Holm et al. 2008).

Vibrace, mechanické chvění těles, je zejména účinné v prevenci přisedání juvenilních či adultních jedinců k podkladu. Při frekvenci 8–10 kHz dochází k téměř 100% mortalitě u juvenilních forem. Nevýhodou této metody je její finanční náročnost a působení pouze na malou plochu (Donskoy 1996). Vibrace rovněž způsobují mortalitu u embryí ryb (Dunlap 2009).

Kavitace, tedy jev, při kterém dochází ke snížení tlaku a varu vody i při nízkých teplotách. Při 10–380 kHz usmrcuje již během pár sekund všechny veligery. U juvenilní

a adultní formy dochází k mortalitě až po několika hodinách. Kavitace působí mortalitu i u ryb. Další nevýhodou je snížení účinnosti této metody ve velkém toku (Cada 1990; U.S. Bureau of Reclamation 2008).

Elektrické napětí a jeho působení se využívá v praxi zejména jako preventivní opatření proti přisedání invazivní slávičky mnohotvárné. Využit k tomu lze jak střídavý proud, tak i proud stejnosměrný, který je k eradikaci účinnější. Působením napětí 30 V/cm^2 působí během dvou dnů 90% mortalitu u sláviček. Spotřebovaná energie pro ošetření 1 ha vodní plochy pak přibližně vychází kolem čtyř milionu českých korun. Elektrické napětí ve vodním tělese však působí i na další organismy (Luoma et al. 2017; Schneider 1992).

Filtry se dají použít zejména při nasávání vody do uzavřených systémů. Díky vysoké průtokové rychlosti přes mezery ve filtru o velikosti 0,2–0,4 mm, dochází k rotačnímu pohybu a larvy jsou rozemlety o hrany filtru a velké slávičky skrz filtr neprojdou (Matosovic 2003).

Mechanické odstranění, probíhající manuálně pomocí potápěčské výstroje, je také možné rovněž využít k eradikaci sláviček. Nejvhodnější období pro sběr jedinců je na začátku jara, sběr by měl proběhnout dříve, než dojde k uvolnění gamet, neboli pohlavních buněk, do vodního prostředí. Tato metoda je však velmi časově náročná. K ošetření plochy o rozloze 0,39 ha bylo na jezeře George (USA) potřeba strávit 276 hodin pod vodou k vylovení 90 % populace na zmíněném jezeře (Wimbush et al. 2009).

Odpuzující materiály se doporučují použít v prevenci proti přisedání zejména v uzavřených systémech. Mezi kovy, které slávičku odpuzují jsou měď, mosaz a zinek. Zároveň se doporučuje přidávat sloučeniny těchto kovů do laků a barev k zabránění přisedání sláviček (Boelman et al. 1997). Nežádoucí účinky, zejména mědi a zinku, jsou popsány v kapitole 3.1.

Tabulka 2: Přehled fyzikálních metod eradikace slávičky mnohotvárné.

Fyzikální metoda		Vliv na		Zdroj
		stádium slávičky	další organismy	
teplota	39 °C	dospělec	ano	(Spidle et al. 1995)
vysoušení		všechna	ano	(U.S. Bureau of Reclamation 2008)
UV	280-320 nm	gameta	ano	(Seaver et al. 2009)
ultrazvuk	39-41 kHz	všechna	ano	(U.S. Bureau of Reclamation 2008)
vibrace	8-10 kHz	juvenil	ano	(Donskoy 1996)
kavitace	10-380 kHz	všechna	ano	U.S. Bureau of Reclamation 2008)
elektrické napětí	30 V/cm ²	dospělec	ano	(Luoma et al. 2017)
filtry	0,2–0,4 mm	všechna		(Matosovic 2003)
odpuzující materiály		dospělec	ano	(Boelman 1997)
mechanické odstraňování		juvenil, dospělec		(Wimbush et al. 2009)

3.3 Biologické metody

Biologické metody jsou takové metody, kdy využíváme jiný živý organismus k eradikaci experimentálního organismu. Na slávičky mohou působit různé skupiny živočichů, které se dělí mezi predátory, parazity nebo kompetitory.

Přítomnost predátorů rovněž ovlivňuje sílu přichycení dospělců (Kobak et al. 2010). Z koryšů požívá planktonní larvy slávičky buchanka (Karabin 1978). Dospělé slávičky pak požívá krab modrý (*Callinectes sapidus*) (Molloy et al. 1994). Z ryb požívá larvy sláviček například plotice obecná (*Rutilus rutilus*) a několik dalších zástupců z čeledi Cyprinidae, Clupeidae, Osmeridae, Percidae a Percichtyidae. Mezi významné predátory dospělé slávičky patří například kapr obecný (*Cyprinus carpio*), slunečnice pestrá (*Lepomis gibbosus*) nebo hlaváč černoústý (*Neogobius melanostomus*). Z ptáků požívá slávičku například kachna divoká (*Anas platyrhynchos*), polák kaholka (*Aythya marila*), lyska černá (*Fulica atra*), zrzhlávka rudozobá (*Netta rufina*), hohol severní (*Bucephala clangula*), nebo také racek stříbřitý (*Larus argentatus*). Ze savců pak slávičky požívá například ondatra pižmová (*Ondatra zibethicus*) (Molloy et al. 1997).

Mezi kompetitory slávičky můžeme řadit houby ze skupiny Porifera. Například houba drsnojehlá (*Ephydatia muelleri*) a houba lomivá (*Eunapius fragilis*) dokáží porůstat slávičky. Takto pokryté slávičky vykazují několikanásobně vyšší mortalitu než slávičky na lokalitě bez této houby (Lauer and Spacie, 2000). Další organismy, se kterými slávička kompetuje, jsou jiní filtrátoři. Do nich se zařazují různonožci anebo mlži (Molloy et al. 1997).

Parazitě, kteří rovněž ovlivňují kondici a rozšíření slávičky na lokalitě, se nachází nejčastěji v dutině pláště slávičky. Mezi nejvýznamnější parazity sláviček se řadí nálevníky a motolice. Paraziti se nachází pouze u evropských populací sláviček, neboť do Ameriky došlo k zavlečení larválních stádií bez parazitů. Proto se mohou americké populace nekontrolovatelně množit (Lauer and Spacie, 2000; Molloy et al. 1997).

Inaktivovaná bakterie *Pseudomonas fluorescens* kmen CL145A způsobuje u sláviček nekrózu a destrukci trávicího traktu. Bakterie se prodává pod obchodním názvem Zequanox[®] s účinností přesahující 90 %. Použití této metody je však díky své účinnosti pouze na cílový druh velmi drahé (Molloy and Mayer 2007; Molloy et al. 2013).

4 Nanočástice

Nanomateriály jsou takové materiály, které splňují 3 základní podmínky, a to že je alespoň jeden z jejich rozměrů v oblasti od cca 1 do 100 nm; jsou to materiály, které vykazují inovativní vlastnosti právě s ohledem na jejich rozměr a můžeme s nimi manipulovat. Obecně tyto materiály, u kovů a jejich oxidů nejčastěji ve formě nanočástic, vykazují zřetelně odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti od konvenčních chemických látek (Filipová et al. 2012, Vert et al. 2012).

4.1 Vliv nanočástic na slávičku

Vliv nanočástic byl popsán pro nanočástice oxidu zinečnatého (ZnO), které se používají jako aditivum do biocidních barev. U sláviček tato látka zvyšuje oxidativní stres a snižuje jejich přežívání (Gagné et al. 2019).

Dále byl testován vliv nanočástic oxidu titaničitého (TiO₂). Ten se používá buď v průmyslu, jako aditivum do opalovacích krémů či do nátěrových hmot, kde je deklarován samočisticí efekt. V této studii s nanočásticemi oxidu titaničitého bylo zjištěno, že už při koncentraci 0,1 mg/l dochází u hemocytů k inhibici fagocytózy. Avšak není ještě úplně znám vliv na ostatní živočichy při této koncentraci (Couleau et al. 2012).

Mezi další zkoumané patří nanočástice ceria (nCeO₂). Tyto nanočástice se přidávají jak do paliv, tak i například do barev. Vystavení sláviček těmto nanočásticím vede k změně lysozomálního systému, účinnosti katalázy a dalším negativním vlivům. Dlouhodobé působení nanočástic ceria je podkladem pro další zkoumání, tedy ještě není jasné, jaký je jeho dopad na zkoumaný organismus v delším časovém období (Garaud et al. 2015).

Řada studií byla provedena i s nanočásticemi stříbra, ale s ohledem na fakt, že jsou to nanočástice, které jsou dále používány i v této předkládané práci, bude nanočásticím stříbra a jejich vlivu na organismus slávičky věnována samostatná kapitola.

4.2 Nanočástice stříbra

Nanočástice stříbra mají nepřeberné množství využití. Používají se například při výrobě elektroniky nebo oblečení, jsou součástí barev, kosmetiky nebo opalovacích krémů (Prashant et al. 2008). Své uplatnění našly nanočástice stříbra i v medicíně (Ahamed et al. 2010). Nanočástice stříbra působí antimikrobiálně, kdy působí inhibici růstu mikroorganismů (Kim et al. 2007). Z tohoto důvodu se nanočástice stříbra používají k zamezení vzniku infekce u popálenin anebo preventivně k ošetření medicinského náčiní (Ahamed et al. 2010). Zároveň se používá při léčbě řady nemocí, například u AIDS (Elechiguerra et al. 2005).

Při použití nanočástic stříbra na plůdek akvarijní ryby dánia pruhovaného (*Danio rerio*), dochází k usazování nanočástic stříbra v mozku, srdci, krvi a žloutku embrya. K dosažení LC_{50} pak stačí použít nanočástice o koncentraci mezi 25 a 50 mg/l (Asharani et al. 2008). Nanočástice stříbra působí i na další vodní organismy, u kterých způsobují mortalitu. LC_{50} pro hrotnatku velkou (*Daphnia magna*) byla vypočtena na 0,0007 mg/l (Allen et al. 2010). Pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) se LC_{50} pohybuje od 0,25 mg/l po 2,16 mg/l v závislosti na životním stádiu daného organismu, kdy embrya jsou citlivější k nanočásticím než dospělci (Johari et al. 2013). K mortalitě dochází i u populací například podoustve říční (*Vimba vimba*), karase stříbřitého (*Carassius auratus*) nebo tolstolobika bílého (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Hedayati et al. 2012).

Slávičky dokážou dobře bioakumulovat nanočástice stříbra. Nanočástice při koncentraci 0,5 mg/l filtruje z vody a ukládá do měkkých tkání. V důsledku toho se doporučuje použití sláviček jako efektivní akumulární indikátor při zkoumání životního prostředí (Zimmermann et al. 2017). Způsob bioakumulace nanočástic u mlžů popsal Canesi et al. (2012) na slávce jedlé (*Mytilus edulis*). Canesi et al. uvádí, že nejprve dochází

k zachycení nanočástic na žábrech, následně dochází k jejich přesunu do trávicí soustavy, tam probíhá jejich přesun do intracelulárního prostředí, kde způsobují oxidativní stres a lysozomální poruchy.

5 Materiál a metody

5.1 Lokalita a odběr vzorků sláviček mnohotvárných

Pro účely studia jsme zvolili pískovnu Poděbrady, kde je vysoké zastoupení tohoto invazivního mlže. Pískovna, s rozlohou 28 ha a maximální hloubkou 4 m, leží v katastrálním území obce Horka nad Moravou. Slávičky se na tuto pískovnu dostaly během povodní v roce 1997 z nedaleké pískovny Náklo (Uvíra et al. 2009).

Odběry sláviček probíhaly vždy v dopoledních hodinách za použití potápěčského vybavení z pískovny Poděbrady poblíž mola (49°37'24.9"N 17°13'37.0"E). Družky jsme odebrali společně s materiálem, na kterém byly slávičky přisedlé (kůra, kameny). Následně jsme slávičky transportovali do laboratoře společně s vodou z pískovny.

Odběr sláviček pro zjištění LC₅₀ proběhl dne 7. listopadu 2019, teplota vody byla 11,1 °C a měla pH 8,3. Odběr sláviček pro testování přisedání proběhl dne 14. prosince 2020. Teplota vody byla 5,5 °C a voda měla pH 8,9. Odběr sláviček pro testování rozdílných skupenství nanočástic proběhl dne 19. května s teplotou vody 14,5 °C. Voda měla pH 8,2.

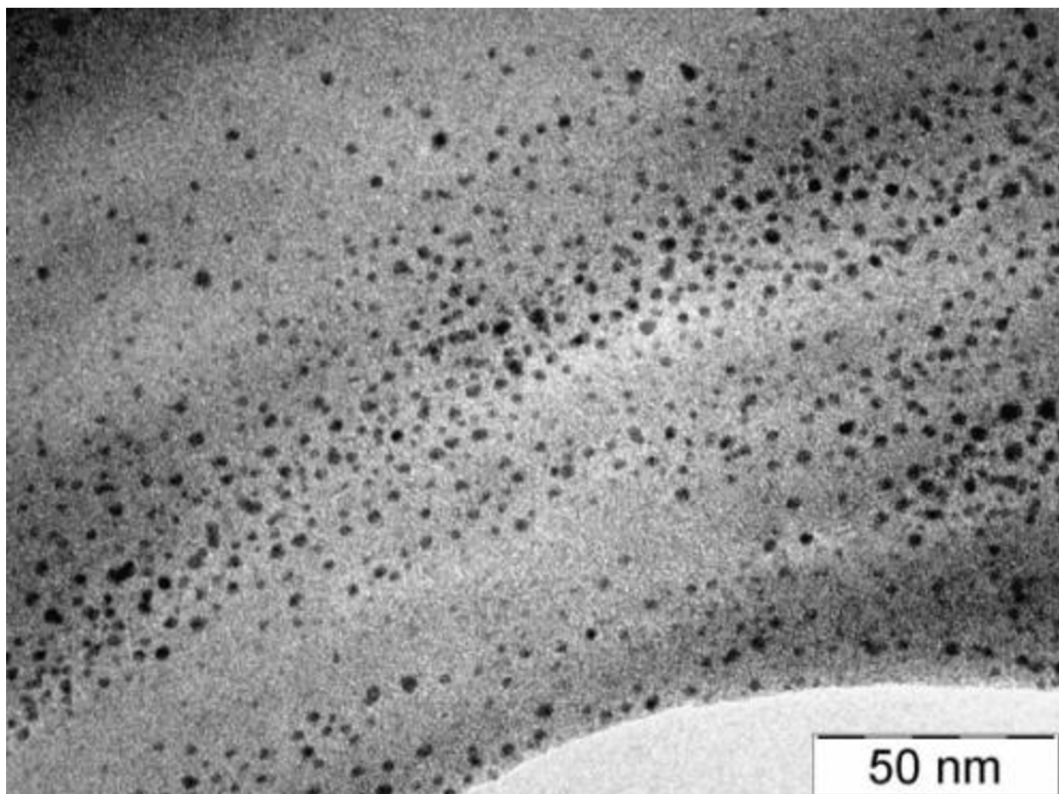
5.2 Aklimatizace sláviček mnohotvárných v laboratoři

V laboratoři jsme slávičky odstranili z materiálu, na kterém byly přisedlé a následně umístili rovnoměrně do dvou akvárií, každé o rozměrech 290 x 590 x 305 mm. V každém akváriu bylo 40 l vody, která byla prokysličována vzduchovým čerpadlem Sera Air 550 R Plus.

Na začátku aklimatizace jsme použili vodu přímo z pískovny, následně pak každé úterý a pátek jsme vodu v akváriu zvěřili, odebrali 5 l vody z akvária a tuto vodu nahradili 5 l odstáté prokysličené vody z vodovodu. Následně jsme experimentální jedince nakrmili suspenzí vláknité sinice *Spirulina* (dovozce DAJANA PET, s.r.o.; EAN: 8594000252061). Teplota vody v aklimatizačním akváriu se pohybovala od 12,3 do 15,4 °C. Hodnota vodíkového potenciálu se pohybovala kolem hodnoty pH 8,6. Světelný režim v laboratorní místnosti byl řízený zářivkami s automatickým časovačem, který byl nastaven na 10 hodin světla a 14 hodin tmy. Světelná intenzita nad akvárii byla během dne 284 lx.

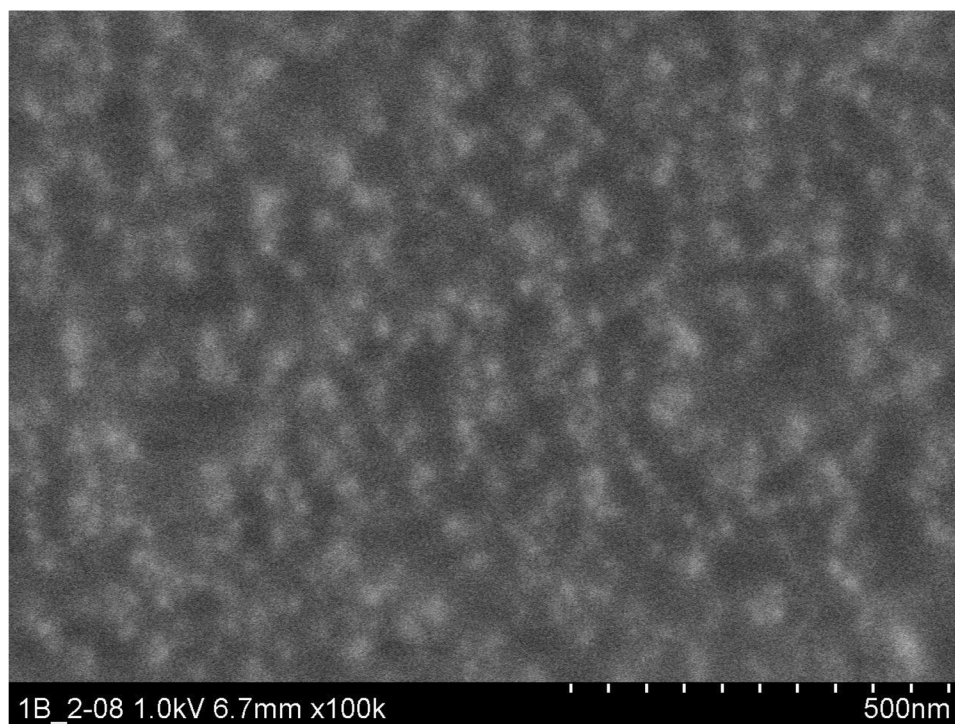
5.3 Nanočástice stříbra

Stříbro bylo dodáno z Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů v podobě buď volných a kotvených nanočástic. V případě volných nanočástic se jednalo o disperzi, v níž koncentrace stříbra byla 7 g/l. Disperze byla připravena pomocí patentovaného postupu přípravy vysoce koncentrované disperze nanočástic stříbra (PV 307919). Průměrná velikost nanočástic stříbra byla 5 ± 3 nm. Pro potřeby experimentu byla tato disperze ředěna do odpovídající koncentrace destilovanou vodou.



Obrázek 1: Nanočástice stříbra připravené patentovanou metodikou přípravy vysoce koncentrované disperze nanočástic stříbra (PV 307919) a používané v rámci předkládané studie.

Pro experimenty využívající kotvené nanočástice stříbra byly krabičky povrchově funkcionalizovány pomocí nanočástic stříbra za použití dvoukrokové imobilizace těchto nanočástic pomocí termálně indukované redukce (dle PV 303502). Tento proces umožňuje přípravu a depozici nanočástic stříbra na rozličné substráty za použití identických reakčních komponent jako v případě přípravy vysoce koncentrované disperze nanočástic stříbra (viz výše). Z tohoto důvodu jsou případné vlivy odlišných reakčních komponentů eliminovány a je možné tedy sledovat pouze vliv módu interakce – tj. zda jsou nanočástice volné či vázané.



Obrázek 2: Nanočástice stříbra kotvené na povrch polypropylenových krabiček. Bílé body představují ukotvené nanočástice stříbra. Tato povrchová funkcionalizace byla provedena pomocí patentovaného, dvoukrokového, termálně indukovaného procesu (PV 303502) a takto funkcionalizované krabičky byly použity v rámci předkládané studie.

5.4 Laboratorní experiment LC50

Laboratorní experiment probíhal od prosince do ledna. Všichni zkoumaní jedinci byli naposledy krmeni 72 hodin před začátkem experimentu. Do laboratorního experimentu jsme náhodně vybrali slávičky z aklimatizačního akvária. Velikost experimentálních jednotlivce se pohybovala od 14 do 25 mm s průměrem 19,9 mm a mediánem 21,0 mm. Vybrané experimentální jedince jsme vložili do nádoby s odstátou okysličenou vodou. Následně zkontrolovali, zda žijí, tedy že otevírají lastury a vysunují inhalační a exhalační sifo. Poté jsme živé experimentální jedince umístili do plastových experimentálních krabiček z polypropylenu o rozměrech 120 x 65 x 145 mm a přilili k nim 500 ml okysličené vody (15,1 °C, pH 8,7) s požadovanou koncentrací nanočástic stříbra. Každá experimentální nádoba obsahovala šest jedinců a každou koncentraci jsme testovali v pěti opakováních. Celkově jsme pak tedy ke každé koncentraci vystavili třicet jedinců.

Po třídní inkubaci jsme u experimentálních zvířat zkontrolovali, zda mají otevřené lastury a vysunují sifa. Dále pak, jestli jsou v experimentálních krabičkách přisedlé.

Všechny slávičky, které neměli vysunutá sifa, jsme následně přemístili do odstáté prokysličené vody z vodovodu a sledovali po dobu třiceti minut, jestli dojde k otevření lastur a vysunutí sif. Pokud ani po vrácení do čisté vody nedošlo k otevření lastur a vysunutí sif, byly tyto slávičky považovány za mrtvé.

Všechny experimentální skupiny jsme po ukončení experimentu umístili separátně do plastových uzavíratelných sáčků. Ty jsme následně uložili do mrazáku při teplotě $-12,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další analýzy.

5.5 Akumulace nanočástic stříbra v měkkých tkáních

Zmrazené slávičky, použité při testování LC_{50} , jsme po třech týdnech od provedení daného experimentu vložili pod binokulární lupu. Následně jsme lastury otevřeli a měkkou tkáň rozdělili na čtyři základní části: plášť, žábra, byssova vlákna a svalnatou nohu. Jednotlivé vzorky byly zhomogenizovány a jejich tzv. mineralizace, pro stanovení množství stříbra pomocí AAS byla provedena za použití kyseliny dusičné – HNO_3 ($\geq 65\%$, p. a. Sigma-Aldrich) a mikrovlnného rozkladu. Pro přípravu vzorků na AAS byla použita centrifuga Hettich Eba 20. Všechny vzorky byly ředěny destilovanou vodou.

Jednotlivé roztoky byly analyzovány pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS). Tato metoda tvoří spektrální analýzu vzorku, ve kterém dokáže měřit koncentraci až šedesáti druhů prvků z periodické soustavy. Atomy se nejprve ze vzorku převádí do plynné fáze během procesu atomizace. Samotná AAS je založena na absorpci fotonu (elektromagnetického záření) o určité vlnové délce a energii volnými atomy v plynném stavu (Komínková and Mestek 1997). Obsah stříbra ve vzorcích byl stanoven atomovým absorpčním spektrometrem (AAS) contrAA 300 (Analytik Jena, Německo).

5.6 Reakce na plochy ošetřené nanočásticemi stříbra

Laboratorní experiment zaměřený na přisedání probíhal druhý týden v lednu roku 2020. Všichni zkoumaní jedinci byli naposledy krmeni 72 hodin před začátkem experimentu. Do laboratorního experimentu jsme náhodně vybrali slávičky ze zásobního akvária. Velikost experimentálních jedinců se pohybovala od 16 do 25 mm s průměrem 20,3 mm a mediánem 20,0 mm. Vybrané experimentální jedince jsme vložili do nádoby s odstátou okysličenou vodou. Následně jsme zkontrolovali, zda žijí, tedy jestli otevírají lastury

a vysunují inhalační a exhalační sifa. Použili jsme experimentální polypropylenové krabičky o rozměrech 133 x 66 x 180 mm. Do nich jsme přidali 500 ml odstáté okysličené vody (13,5 °C, pH 8,3).

Pro experiment byly použity tři druhy modifikovaných krabiček. Vždy polovina povrchu krabiček byla ošetřena nanočásticemi stříbra (ve dvou diametrálně odlišných koncentracích, ať to 0,02986 mg/cm² a 0,3989 mg/cm²) a v posledním případě byl použit pouze polymerní linker na bázi ethyleniminu (PEI). Tento polymer byl zároveň použit i pro imobilizaci nanočástic stříbra k pevnému substrátu a jako modifikující látka a redukční činidlo v případě přípravy vysoce koncentrované disperze nanočástic stříbra. Přestože je tato látka používána v obou případech v nízké koncentraci, bylo nutné otestovat její toxicitu, abychom následně mohli hovořit pouze o toxickém účinku ve spojení s nanočásticemi stříbra jako takovými. Do poloviny krabiček byly ihned po napuštění vody umístěny slávičky. U druhé poloviny došlo ke dvaceti čtyř hodinové prodlevě mezi napuštěním vody a umístěním sláviček. Důvod, proč jsme zvolili tyto dva systémy, byl zcela pragmatický. Toxický účinek nanočástic stříbra na biologické systémy je někdy spojován s částečnou rozpustností nanočástic, kdy je iontové stříbro uvolňováno z povrchu nanočástic. Dvaceti čtyřhodinová prodleva mezi nalitím vody do plastové nádoby a začátkem experimentu měla poskytnout dostatečně dlouhou dobu na generaci iontového stříbra do vody, ve které experiment se slávičkami probíhal.

Do každé krabičky jsme umístili deset jedinců na startovací čáru, která se nacházela buď uprostřed modifikované části, nebo uprostřed nemodifikované části. Umístění sláviček na každou polovinu probíhalo ve třech opakováních ve stejný čas. Následně jsme sledovali, zda se slávičky budou snažit dostat na modifikovanou část nebo z modifikované části a jestli se přichytí na modifikovanou část nebo mimo ni. A v neposlední řadě zda přežijí.

Po třech dnech jsme experiment vyhodnotili a experimentální jedince jsme separátně umístili po skupinách do průhledných plastových sáčků a následně vložili do mrazáku při teplotě -12,7 °C.

5.7 Přichycování k podkladu v závislosti na použitém skupenství nanočástic Ag

Laboratorní experiment porovnávající účinnost suspenze nanočástic stříbra s nanočásticemi stříbra imobilizovanými na povrchu substrátu probíhal v červnu. Všechny zkoumané jedince

jsme naposledy nakrmili 72 hodin před experimentem. Do laboratorního experimentu jsme náhodně vybrali slávičky ze zásobního akvária. Velikost experimentálních jedinců se pohybovala od 14 do 25 mm s průměrem 20,1 mm a mediánem 21,0 mm. Použili jsme experimentální polypropylenové krabičky o rozměrech 133 x 66 x 180 mm. Vybrané experimentální jedince jsme vložili do nádoby s odstátou okysličenou vodou. Dalším krokem byla kontrola, jestli žijí. To jsme určili podle otevírání lastur a vysunutí inhalačního a exhalačního sifa. Při testování nanosených nanočástic byly použity řádově odlišné koncentrace stříbra, a to 0,02986 mg/cm² a 0,3989 mg/cm². Při testování suspenze jsme aplikovali koncentraci 2 mg/l a 0,09 mg/l. Do každé krabičky jsme přidali 500 ml odstáté okysličené vody z vodovodu. Následně jsme vložili deset jedinců do experimentální krabičky. Každá koncentrace byla testována ve třech opakováních.

Po 3 dnech jsme experiment ukončili a spočítali jsme počet byssových vláken, která byla přichycena k experimentální krabičce. Následně jsme experimentální živočichy separátně umístili po skupinách do průhledných plastových sáčků a uložili do mrazáku při teplotě -12,7°C.

5.8 Statistická analýza

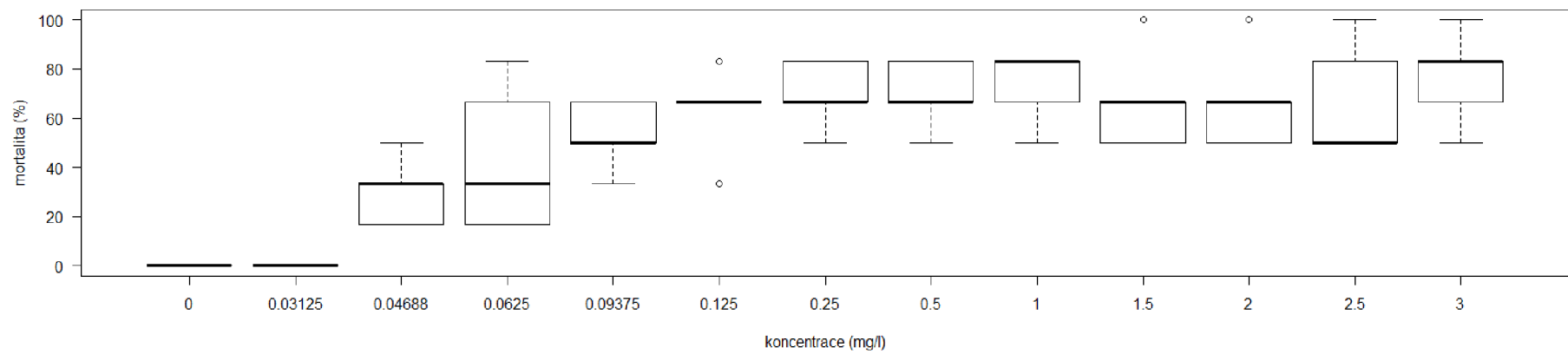
Data jsme zpracovali pomocí programu R studio 3.4.0. (R Core Team 2017). Hodnota LC₅₀ byla stanovena pomocí balíčku 'ecotoxicology' (Jose Gama 2015). Ostatní výpočty probíhaly metodou ANOVA v balíčku 'stats' (R Core Team 2017). Pro lepší znázornění byly vytvořeny krabicové grafy z balíčku 'graphics' (R Core Team 2017),

6 Výsledky

6.1 Stanovení LC₅₀

V rámci experimentu stanovení LC₅₀ jsme vložili do experimentálních krabiček celkem 384 jedinců. Při testování jsme zjistili rozdílnou reakci na měnící se koncentraci nanočástic stříbra (viz graf 1). Hodnota LC₅₀ byla pomocí programu R studio vypočtena na 0,68 mg nanočástic stříbra na jeden litr vody. Hodnota-p je výpočtem stanovena na $4,443393 \cdot 10^{-9}$. V kontrolní skupině nebyla pozorována žádná mortalita, z čehož můžeme vyvodit, že slávičky uhynuly kvůli přítomnosti nanočástic stříbra a jejich toxického efektu. Úhyn tedy nebyl způsoben hladověním nebo jinými laboratorními podmínkami, které jsou odlišné od přirozeného prostředí, ve kterém se slávička obvykle vyskytuje.

U sláviček, umístěných do suspenze nanočástic stříbra o koncentraci 0,125 mg/l a vyšší, nebylo v průběhu experimentu pozorováno otevření lastur a vytažení síť. K přichycení k podkladu, pomocí byssových vláken, došlo pouze při koncentraci 0,03125 mg/l. Při této koncentraci bylo přichyceno k podkladu pouze 20 % ze zkoumaných jedinců. V kontrolním experimentu docházelo k přichycení kolem 66 % jedinců z daného vzorku.



Graf 1: Mortalita slávičky mnohotvárné v závislosti na použité koncentraci nanočástic stříbra.

6.2 Akumulace v měkkých tkáních

V tomto experimentu jsme pomocí atomové absorpční spektrometrie analyzovali jednotlivé vzorky separované slávičky. Vzhledem k velmi nízkým koncentracím stříbra obsaženým v měkkých tkáních sláviček, byla k analýze použita pouze skupina vystavena koncentraci 3 mg/l.

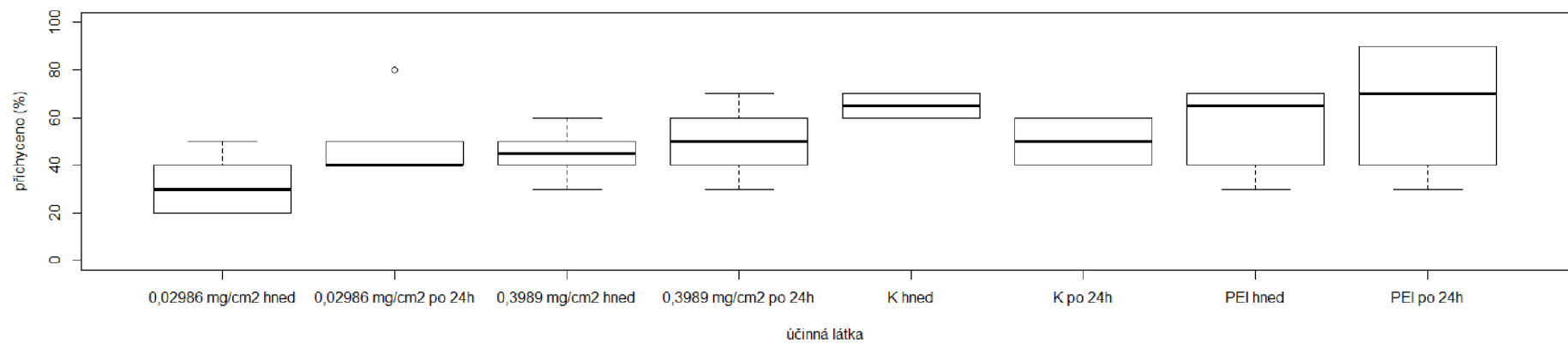
V žábrech živých sláviček byla hodnota koncentrace naakumulovaného stříbra rovna 4,34 $\mu\text{g/g}$. V noze živých sláviček pak byla koncentrace stříbra 1,36 $\mu\text{g/g}$. Tato hodnota je pod mezí detekce použité metodiky a především použitého přístroje. Na rozdíl od toho, byla v žábrech mrtvých sláviček analyzována koncentrace 4,38 $\mu\text{g/g}$ stříbra. V noze mrtvých sláviček byla koncentrace nanočástic 3,98 $\mu\text{g/g}$. S ohledem na velmi podobné hodnoty u živých a mrtvých jedinců stanovených v žábrech je evidentní, že pro dané jedince je hodnota okolo 4,3 $\mu\text{g/g}$ mezní. Bohužel jsme neměli k dispozici dostatečné množství jedinců, abychom provedli časově distribuční studii. Ta by bývala mohla prokázat, zda dochází k simultánní distribuci mezi žábry a nohou slávičky od jisté míry intoxikace či zda jde o primární naplnění kapacity žaber a následnou akumulaci v noze. Koncentrační rozdíly mezi žábry a nohou u živých a mrtvých jedinců by nasvědčovaly tomu, že existuje jistá saturační mez žaber, která dále nemohou pojmout další kumulativní jed a ten pak odchází do další části organismu – do nohy. To by vysvětlovalo rozdíly v koncentraci stříbra v noze u živých a mrtvých jedinců.

6.3 Reakce na plochy ošetřené nanočásticemi Ag

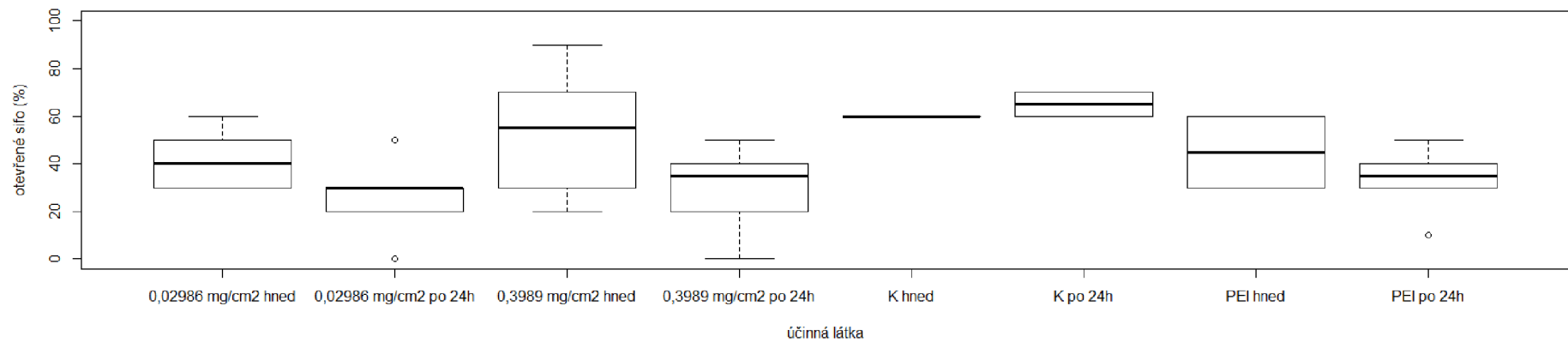
Tento experiment si kladl za cíl odhalení vlivu nanočástic stříbra imobilizovaných na povrchu krabiček na přisedání (viz graf 2) a filtrování, respektive otevření sifa (graf 3). Hodnoceny byly dvě koncentrace, PEI a kontrolní skupina (K). Pomocí ANOVY a Tukey HSD testu bylo zjištěno, že ani samotný polymerní linker, ani nanočástice stříbra nemají vliv na přisedání ani na filtraci. Zkoumané skupiny se nelišily od kontrolní skupiny. K přisedání nedocházelo, ani když byly slávičky umístěny do experimentální nádoby po 24 hodinovém ustálení vody, ani když byly umístěny do experimentálních nádob okamžitě. Rozdíl byl pozorován pouze u přisedání dvou skupin, které se od sebe se liší. Dle Tukey HSD se jedná o skupinu PEI po 24h a vzorek obsahující imobilizované nanočástice stříbra o plošné koncentraci rovné 0,02986 mg/cm^2 (pozn. celkové množství stříbra na $\frac{1}{2}$ polovině

experimentální nádoby bylo 4,509 mg) a vzorek obsahující imobilizované nanočástice stříbra o plošné koncentraci rovné 0,3989 mg/cm² (pozn. celkové množství stříbra na ½ polovině experimentální nádoby bylo 4,509 mg), kam byly slávičky umístěny ihned po napuštění vody (viz Příloha 1 a 2).

Během experimentu docházelo k pohybu jednotlivých organismů po experimentální nádobce. Avšak k překročení z jedné poloviny na druhou (z modifikované na nemodifikovanou anebo naopak) docházelo pouze v ojedinělých případech.



Graf 2: Vliv nanosených nanočástic stříbra na přichycení slávičky mnohotvrnné.

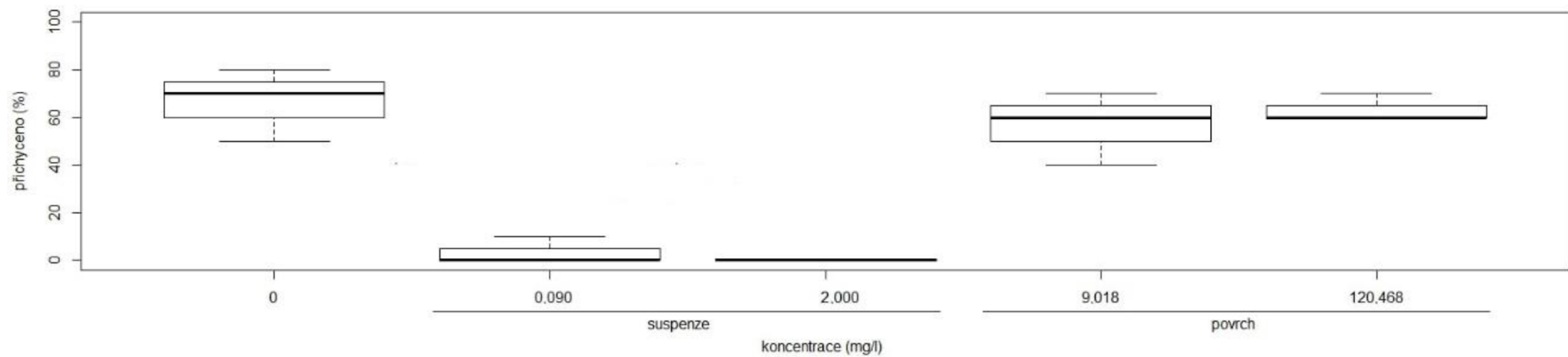


Graf 3: Vliv nanosených nanočástic stříbra na filtraci slávičky mnohotvrnné.

6.4 Přichycování v závislosti na použitém skupenství nanočástic Ag

V tomto experimentu byla pozornost věnována vlivu nanočástic stříbra v různých módech interakce – interakce s volnými nanočásticemi stříbra v disperzi a s nanočásticemi stříbra imobilizovanými na povrchu experimentálních nádob a dopadu jejich chování na míru přisedání testovaných organismů slávičky. Množství stříbra naneseného na povrchu experimentálních nádob bylo 4,509 mg a 60,234 mg na krabičku. Vzhledem k tomu, že by kapalné médium, které bylo nalito do experimentální nádoby mělo objem 500 ml, je možné množství stříbra přepočítat na koncentraci stříbra imobilizovaného na povrchu nádoby na hodnotu 9,018 mg/l a 120,468 mg/l. V podobě suspenze nanočástic stříbra, tedy ve formě volných nanočástic stříbra, byly pak testovány koncentrace 2,000 mg/l a 0,090 mg/l. Systém bez obsahu stříbra byl poté použit jako kontrolní.

Z výsledku Tukey HSD testu vyplývá, že se signifikantně liší procento přichycení v závislosti na tom, jaký mód interakce nanočástic byl zvolen. (viz Příloha 3). Z výsledku vyplývá, že nanočástice stříbra použité v podobě suspenze, tj. volné nanočástice, jsou vysoce účinné v otázce přisedání organismů k povrchu substrátu. (viz graf 4). Použití nanočástic na ošetření povrchů proti přisedání sláviček, se v míře přisedání neliší od kontrolní skupiny.



Graf 4: Přichycení slávičky mnohotvárné v závislosti na použité koncentraci a skupenství nanočástic stříbra.

7 Diskuse

Na základě provedených experimentů s disperzí nanočástic byla stanovena hodnota LC_{50} způsobena nanočásticemi. LC_{50} v naší studii pro slávičku byla stanovena na 0,68 mg/l stříbra ve formě volných nanočástic. Při porovnání této hodnoty s hodnotou LC_{50} , kterou stanovil Asharani et al. (2008) u ryby dánia pruhovaného (*Danio rerio*) je námi naměřená hodnota LC_{50} pro slávičku několikanásobně nižší. Na rozdíl od toho použití v tocích, které obývá naše původní ryba, pstruh duhovým (*Oncorhynchus mykiss*), je hodnota LC_{50} pro larvy pstruha jen o 0,03 mg/l vyšší (Johari et al. 2013).

Berthet et al. odečítali mortalitu po 24 dnech a LC_{50} pro dusičnan stříbrný stanovili na 1,5 mg/l. Na našem případě byla hodnota LC_{50} vyhodnocena po 72 hodinách. Hodnotu získaná v našem experimentu není tedy možné jednoduše porovnat s již publikovanými výsledky pro elementární stříbro.

Z námi získaných experimentálních výsledků vyplývá, že se nanočástice stříbra nejprve zachycují na žábrech slávičky. A z žaber pak putují do intracelulárního prostředí, stejně jak popsal u slávky jedlé (*Mytilus edulis*) Canesi et al. (2012). Odtud jsou pak nanočástice deponovány do svalnaté nohy. Zjištění způsobu, jakým nanočástice stříbra účinkují v těle slávičky, by mohlo být přínosné pro další studie, jelikož účinek nanočástic v těle zatím ještě není znám.

Použití nanočástic stříbra na ochranu povrchů se jeví v testovaných koncentracích jako neúčinné. A to i přes to, že se během 24h uvolní z ošetřené plochy do vody Ag^+ z nanočástic stříbra, tedy iontové stříbro. Experimentální krabičky jsme naplnily 500 ml vody a provedli experiment s uvolňování stříbra do obsahu média. Následně jsme vzorky zcentrifugovali a nechali charakterizovat pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Tímto způsobem jsme potvrdili, že v kapalném mediu nejsou přítomné nanočástice stříbra a veškeré stříbro, ve vzorcích obsažené, musí být iontové. U koncentrace 0,02986 mg/l se uvolnilo $<0,5 \mu\text{g/l } Ag^+$ a u koncentrace 0,3989 mg/l se uvolnilo $10,01 \mu\text{g/l } Ag^+$. Ačkoliv je iontové stříbro nejtoxičtější forma stříbra, je tato koncentrace velmi nízká, a proto tyto koncentrace iontového stříbra nepůsobí na slávičky negativně.

8 Závěr

Použití nanočástic stříbra v otevřených ekosystémech se jeví jako problematické díky svému vlivu i na další organismy, od planktonních až po ryby. V uzavřených systémech lze použít suspenzi k eradikaci sláviček. Již při nízkých koncentracích způsobují mortalitu a tím i zabraňují přisedání.

Nanočástice stříbra se vstřebávají pomocí žaber slávičky a z žaber pak putují do intracelulárního prostředí. Množství stříbra v žábrech je obdobné u sláviček, které byly na konci experimentu mrtvé. Stejně tak s těmi, které daný experiment přežily. Množství stříbra ve svalnaté noze se však již liší. U sláviček, které zůstaly na konci experimentu živé, byla naměřena velmi nízká koncentrace stříbra ležící prakticky na/pod hranici detekce použité metodiky. Zato u sláviček, které experiment nepřežily, je množství stříbra v noze jedince téměř tak vysoké jako v žábrech. To významným způsobem indikuje postupnou distribuci stříbra v organismu slávičky a kaskádovou akumulaci stříbra v jednotlivých tělesných strukturách.

Použití nanočástic stříbra k úpravě povrchu při zvolené koncentraci 0,02986 g/cm² a 0,3989 g/cm² nemělo vliv ani na přisedání a ani na filtrování sláviček. Z povrchu se totiž evidentně neuvolnilo dostatečné množství iontového stříbra (a to ani, když byly organismy vloženy do systému s 24 hodinovou prodlevou, která měla zajistit částečné rozpuštění nanočástic stříbra a zvýšení množství iontového stříbra v systému), které by slávička ve svém těle dostatečně rychle naakumulovala a které by zabránilo tvorbě byssových vláken, která jsou nezbytná pro přichycení těchto organismů k pevnému substrátu.

S ohledem na cíle práce a výsledky vyvozují následující závěry:

1. Aktualizace literární rešerše z Bakalářské práce.
Rešerše z Bakalářské práce byla aktualizována a doplněna o další metody účinné k eradikaci slávičky mnohotvárné.
2. Laboratorní testování vlivu nanočástic stříbra na aktivitu a přežívání slávičky.
K testování vlivu nanočástic stříbra bylo použito 384 jedinců. Slávičky vystavené koncentraci nanočástic vyšší než 0,125 mg/l se nikdy k podkladu nepřichytily. K přichycení k podkladu došlo pouze při koncentraci suspenze nanočástic stříbra 0,03125 mg/l. Mortalita byla pozorována až u koncentrace 0,04688 mg/l a vyšší.
3. Vyhodnocení výsledků, letální koncentrace, akumulace stříbra v měkkých tkáních.
Hodnota LC₅₀ byla spočtena na 0,68 mg/l nanočástic stříbra. Stříbro se primárně akumuluje v žábrech slávičky a následně dochází k akumulaci i v noze.

4. Návrh na využití výsledků k eradikaci slávičky v uzavřených systémech.

Pouze volné nanočástice stříbra, které byly použité ve formě suspenze, jsou účinné k invazivní slávičce mnohotvárné. V uzavřených systémech, kde nehrozí kontaminace životního prostředí, lze nanočástice použít k eradikaci a tudíž i zabránění přisedání.

Seznam použité literatury

- Ahamed, M., AlSalhi, M. S. and Siddiqui, M. K. J. (2010): Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta* 411:1841-1848.
- Allen, H. J., Impellitteri, C. A., Macke, D. A., Heckman, J. L., Poynton, H. C., Lazorchak, J. M., Govindaswamy, S., Roose, D. L. and Nadagouda, M. N. (2010): Effects from filtration, capping agents and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:2742-2750.
- Angus, R. A. (1983): Phenol tolerance in populations of mosquitofish from polluted and nonpolluted waters. *Transactions of the American Fisheries Society* 112:794-799.
- Asharani, P. V., Wu, Y. L., Gong, Z. Y. and Valiyaveetil, S. (2008): Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology* 19.
- Barrett, J. R. (2010): An uneven path forward the history of methylmercury toxicity research. *Environmental Health Perspectives* 118:A352-A352.
- Berthet, B., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Martoja, M. and Jeantet, A.Y. (1992): Bioaccumulation, toxicity and physico-chemical speciation of silver in bivalve molluscs: ecotoxicological and health consequences. *Science of the Total Environment*, 125, pp.97-122.
- Bertram, P. and Hart, B. (1979): Longevity and reproduction of *Daphnia pulex* (de Geer) exposed to cadmium-contaminated food or water. *Environmental Pollution*, 19(4): 295- 305.
- Boelman, S.F. (1997): Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) control handbook for facility operators. US Army Engineer Waterways Experiment Station, 93pp.
- Bowker, J. and Erdahl, D. (1998): Observations on the efficacy of chloramine-T treatment to control mortality in a variety of salmonids. *Progressive Fish-Culturist* 60:63-66.
- Bradbeer, S. J., Renals, T., Quinn, C., Warren, D. A., Pile, B., Hills, K. and Dunn, A. M. (2021): The effectiveness of hot water pressurized spray in field conditions to slow the spread of invasive alien species. *Management of Biological Invasions* 12:125-147.

- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G. and Gallo, G. (2012): Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine environmental research*, 76, 16-21.
- Clarke, M. and McMahon, R. F. (1996): Effects of hypoxia and low-frequency agitation on byssogenesis in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Biological Bulletin* 191:413-420.
- Christensen, G., Hunt, E. and Fiandt, J. (1977): Effect of methylmercuric chloride, cadmium chloride, and lead nitrate on 6 biochemical factors of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 42:523-530.
- Couleau, N., Techer, D., Pagnout, C., Jomini, S., Foucaud, L., Laval-Gilly, P. and Bennasroune, A. (2012): Hemocyte responses of *Dreissena polymorpha* following a short-term in vivo exposure to titanium dioxide nanoparticles: preliminary investigations. *Science of the total environment*, 438, 490-497.
- Curtis, M. W., Copeland, T. L. and Ward, C. H. (1979): Acute toxicity of 12 industrial chemicals to freshwater and saltwater organisms. *Water Research* 13:137-141.
- Czarnoleski, M., Muller, T., Adamus, K., Ogorzelska, G. and Sog, M. 2010. Injured conspecifics alter mobility and byssus production in zebra mussels *Dreissena polymorpha*. *Fundamental and Applied Limnology* 176:269-278.
- Davies, P.H., Goettl Jr, J.P. and Sinley, J.R. (1978): Toxicity of silver to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Research*, 12(2), pp.113-117.
- Davies, P.H., Goettl, J.P., Sinley, J.R. and Smith, N.F. (1976): Acute and chronic toxicity of lead to rainbow trout *Salmo gairdneri*, in hard and soft water. *Water Research*, 10(3): 199-206.
- Davies, P. E. and White, R. W. G. (1985): The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. I. Lethal levels for *Salmo gairdneri*, *Galaxias maculatus*, *G. truttaceus* and *G. auratus* and the fate of ¹⁴C-TCIN in *S. gairdneri*. *Aquatic toxicology*, 7(1-2), 93-105.
- Dunlap, K. N. (2009): Blasting bridges and culverts: water overpressure and vibration effects on fish and habitat. University of Alaska Fairbanks, 187pp.

- Edwards, W.J., Babcock-Jackson, L. and Culver, D.A. (2000): Prevention of the spread of zebra mussels during fish hatchery and aquaculture activities. *North American Journal of Aquaculture*, 62(3): 229-236.
- Eisler, R. (1998): Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. *Biological Science Report*. Geological survey Washington DC, 76 pp.
- Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H. and Yacaman, M. J. (2005): Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of nanobiotechnology*, 3(1), 1-10.
- Faria, M., Angel Lopez, M., Fernandez-Sanjuan, M., Lacorte, S. and Barata, C. (2010): Comparative toxicity of single and combined mixtures of selected pollutants among larval stages of the native freshwater mussels (*Unio elongatulus*) and the invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Science of the Total Environment* 408:2452-2458.
- Filipová, Z., Kukutschová, J. and Mašláň, M. (2012): Rizika nanomateriálů. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., Peyrot, C. and Wilkinson, K. (2019): The influence of surface waters on the bioavailability and toxicity of zinc oxide nanoparticles in freshwater mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 219, 1-11.
- Garaud, M., Trapp, J., Devin, S., Cossu-Leguille, C., Pain-Devin, S., Felten, V. and Giamberini, L. (2015): Multibiomarker assessment of cerium dioxide nanoparticle (nCeO₂) sublethal effects on two freshwater invertebrates, *Dreissena polymorpha* and *Gammarus roeseli*. *Aquatic Toxicology*, 158, 63-74.
- Haag, W. R., Berg, D. J., Garton, D. W. and Farris, J. L. (1993): Reduced survival and fitness in native bivalves in response to fouling by the introduced zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in Western Lake Erie. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50:13-19.
- Hedayati, A., Kolangi, H., Jahanbakhshi, A. and Shalvei, F. (2012): Evaluation of silver nanoparticles ecotoxicity in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Bulg. J. Vet. Med*, 15(3), p.172.

- Holm, E.R., Stamper, D.M., Brizzolara, R.A., Barnes, L., Deamer, N. and Burkholder, J.M. (2008): Sonication of bacteria, phytoplankton and zooplankton: application to treatment of ballast water. *Marine Pollution Bulletin*, 56(6): 1201-1208.
- Jensen, S. and Jernelov, A. (1969): Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature*, 223(5207), 753-754.
- Johari, S. A., Kalbassi, M. R., Soltani, M. and Yu, I. J. (2013): Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 12:76-V.
- Kamshilov, M. M. and Flerov, B. A. (1978): Experimental research on phenol intoxication of aquatic organisms and destruction of phenol in model communities. In *Proceedings of the First and Second USA-USSR Symposia on the Effects of Pollutants Upon Aquatic Ecosystems* 1.
- Karabin, A. (1978): The pressure of pelagic predators of the genus *Mesocyclops* (Copepoda, Crustacea) on small zooplankton. *Ekol. pol*, 26(2), 241-257.
- Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E. and Padilla, D. K. (1997): The effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communities in eastern Europe. *Journal of Shellfish Research* 16:187-203.
- Kennedy, A.J., Millward, R.N., Steevens, J.A., Lynn, J.W. and Perry, K.D. (2006): Relative sensitivity of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) life-stages to two copper sources. *Journal of Great Lakes Research*, 32(3): 596-606.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C. Y., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Jeong, D. H. and Cho, M. H. (2007): Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 3:95-101.
- Klerks, P. L. and Fraleigh, P. C. (1991): Controlling adult Zebra mussels with oxidants. *Journal American Water Works Association* 83:92-100.
- Kobak, J., Kakareko, T. and Poznanska, M. (2010): Changes in attachment strength and aggregation of zebra mussel, *Dreissena polymorpha* in the presence of potential fish predators of various species and size. *Hydrobiologia*, 644(1): 195-206.

- Kobak, J., Klosowska-Mikulan, E. and Wisniewski, R., 2002. Impact of copper substrate on survival, mobility and attachment strength of adult *Dreissena polymorpha* (Pall.). *Folia Malacologica*, 10(2).
- Komínková, J. and Mestek, O. (1997): Atomová absorpční spektrometrie. Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II., Praha, VŠCHT Praha.
- Kraak, M. H. S., Lavy, D., Peeters, W. H. M. and Davids, C. (1992): Chronic ecotoxicity of copper and cadmium to the Zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23:363-369.
- Kraak, M. H. S., Wink, Y. A., Stuijzand, S. C., Jong, M., Degroot, C. J. and Admiraal, W. (1994): Chronic ecotoxicity of Zn and Pb to the Zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* 30:77-89.
- Lauer, T.E. and Spacie, A. (2000): The effects of sponge (Porifera) biofouling on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) fitness: Reduction of glycogen, tissue loss, and mortality. *Journal of Freshwater Ecology*, 15(1): 83-92.
- Leynen, M., Duvivier, L., Girboux, P. and Ollevier, F. (1998): Toxicity of ozone to fish larvae and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41:176-179.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S. and Poorter, M. De (2000): 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. Invasive Species Specialist Group Auckland.
- Luoma, J.A., Dean, J.C., Severson, T.J., Wise, J.K. and Barbour, M.T. (2017): Use of alternating and pulsed direct current electrified fields for zebra mussel control. *Management of Biological Invasions*, 8(3): 311-324.
- Mackie, G.L. and Claudi, R. (2010): Monitoring and control of macrofouling mollusks in fresh water systems. Second revised edition. CRC Press, 508 pp.
- Maguire, C.M. and Sykes, L.M. (2004): Zebra mussel management strategy. Queen's University Belfast, 57 pp.
- Matosovic, A. (2003): Muschelprobleme in Waermetauschern gelöst. *Chemie, Anlagen, Verfahren (CAV)*, 4.

- Marking, L. L. and Bills T. D. (1975): Toxicity of potassium permanganate to fish and its effectiveness for detoxifying antimycin. Transactions of the American Fisheries Society 104:579-583.
- Martin, I.D., Mackie, G.L. and Baker, M.A. (1993a): Acute toxicity tests and pulsed-dose delay mortality at 12 and 22°C in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 24(3): 389-398.
- Martin, I.D., Mackie, G.L. and Baker, M.A. (1993b): Control of the biofouling mollusk, *Dreissena polymorpha* (Bivalvia, Dreissenidae), with sodium-hypochlorite and with polyquaternary ammonia and benzothiazole compounds. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 24(3): 381-388.
- McMahon, R. F., Matthews, M., Shaffer, L. R. and Johnson, P. D. (1995): Effects of elevated carbon dioxide concentrations on survivorship in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian clams (*Corbicula fluminea*). Electric Power Research Inst., Palo Alto, CA (United States).
- Meador, J. P. (1997): Comparative toxicokinetics of tributyltin in five marine species and its utility in predicting bioaccumulation and acute toxicity. Aquatic Toxicology 37:307-326.
- Molloy, D.P., Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Kurandina, D.P. and Laruelle, F. (1997): Natural enemies of zebra mussels: predators, parasites, and ecological competitors. Reviews in Fisheries Science, 5(1): 27-97.
- Molloy, D.P., Powell, J. and Ambrose, P. (1994): Short-term reduction of adult zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the Hudson River near Catskill, New York – an effect of juvenile blue-crab (*Callinectes sapidus*) predation. Journal of Shellfish Research, 13(2): 367-371.
- Molloy, D.P. and Mayer, D.A. (2007): Overview of a novel green technology: biological control of zebra and quagga mussels with *Pseudomonas fluorescens*. Bacterial Project Overview, 6: 1-9.
- Molloy, D.P., Mayer, D.A., Gaylo, M.J., Morse, J.T., Presti, K.T., Sawyko, P.M., Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Laruelle, F., Nishikawa, K.C. and Griffin, B.H. (2013): *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A-A biopesticide for the control of zebra and

- quagga mussels (Bivalvia: Dreissenidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(1): 104-114.
- Morton, B. (1969): Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall: general anatomy and morphology. *Journal of Molluscan Studies*, 38(4): 301-321.
- Odonnell, J. M., Durand, M. E., Robitaille, P. M. L., Fisher, S. W. and Stromberg, P. C. (1996): P-31-NMR analysis of lethal and sublethal lesions produced by KCl-intoxication in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Experimental Zoology* 276:53-62.
- Orlík, D. (2018). Metody kontroly a eradikace invazivní slávičky mnohotvárné. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
- Pepin, P. (1991): Effect of Temperature and Size on Development, Mortality and Survival Rates of the Pelagic Early Life Stages of Marine Fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(3): 503-518.
- Potet, M., Giambérini, L., Pain-Devin, S., Louis, F., Bertrand, C. and Devin, S. (2018): Differential tolerance to nickel between *Dreissena polymorpha* and *Dreissena rostriformis bugensis* populations. *Scientific reports* 8:700.
- Prashant K. J., Huang, X., El-Sayed, I. H. and El-Sayed, M. A. (2008): Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine, *Accounts of Chemical Research*, 41 (12): 1578–86.
- Rajagopal, S., Velde, G. and Jenner, H. A. (2002): Effects of low-level chlorination on zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Water Research* 36:3029-3034.
- Seaver, R.W., Ferguson, G.W., Gehrman, W.H. and Misamore, M.J. (2009): Effects of Ultraviolet Radiation on Gametic Function During Fertilization in Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*). *Journal of Shellfish Research*, 28(3): 625-633.
- Schneider, J.C. (1992): Field Evaluations of 230-V AC Electrofishing on Mortality and Growth of Warmwater and Coolwater Fish. *North American Journal of Fisheries Management*, 12(1): 253-256.
- Smith, M. (1940): Copper sulphate and rotenone as fish poisons. *Transactions of the American Fisheries Society*, 69(1): 141-157.

- Spidle, A.P., Mills, E.L. and May, B. (1995): Limits to tolerance of temperature and salinity in the quagga mussel (*Dreissena bugensis*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(10): 2108-2119.
- Tietge, J.E., Diamond, S.A., Ankley, G.T., DeFoe, D.L., Holcombe, G.W., Jensen, K.M., Degitz, S.J., Elonen, G.E. and Hammer, E. (2001): Ambient solar UV radiation causes mortality in larvae of three species of *Rana* under controlled exposure conditions. *Photochemistry and Photobiology*, 74(2): 261-268.
- Tisler, T. and ZagorcKoncan, J. (1997): Comparative assessment of toxicity of phenol, formaldehyde, and industrial wastewater to aquatic organisms. *Water Air and Soil Pollution* 97:315-322.
- Toomey, M. B., McCabe, D. and Marsden, J. E. (2002): Factors affecting the movement of adult zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Journal of the North American Benthological Society* 21:468-475.
- U.S. Bureau of Reclamation (2008): Draft Upper Colorado Region Prevention and Rapid Response Plan for Dreissenid Mussels. U.S. Bureau of Reclamation, 52 pp.
- Uvíra, V., et al. (2009): Slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) v zatopených pískovných a lomech na Moravě. *Limnologické noviny* 2: 1-5.
- Vanbenschoten, J.E., Jensen, J.N., Brady, T.J., Lewis, D.P., Sferrazza, J. and Neuhauser, E.F. (1993): Response of zebra mussel veligers to chemical oxidants. *Water Research*, 27(4): 575-582.
- Vardy, D.W., Santore, R., Ryan, A., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2014): Acute toxicity of copper, lead, cadmium, and zinc to early life stages of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) in laboratory and Columbia River water. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(13): 8176-8187.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M. and Schue F. (2012): Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* 84:377-408.
- Wallen, I.E., Greer, W.C. and Lasater, R. (1957): Toxicity to *Gambusia affinis* of certain pure chemicals in turbid waters. *Sewage and Industrial Wastes*, 29(6): 695-711.

- Waller, D. L., and Bartsch, M. R. (2018): Use of carbon dioxide in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) control and safety to a native freshwater mussel (Fatmucket, *Lampsilis siliquoidea*). *Management of Biological Invasions* 9:439-450.
- Waller, D. L., Fisher, S. W. and Dabrowska, H. (1996): Prevention of zebra mussel infestation and dispersal during aquaculture operations. *Progressive Fish-Culturist* 58:77-84.
- Waller, D.L., Rach, J.J., Cope, W.G., Marking, L.L., Fisher, S.W., and Dabrowska, H. (1993): Toxicity of Candidate Molluscicides to Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) and Selected Nontarget Organisms. *Journal of Great Lakes Research*, 19(4): 695-702.
- Watters, A., Gerstenberger, S.L. and Wong, W.H. (2013): Effectiveness of EarthTec(®) for killing invasive quagga mussels (*Dreissena rostriformis bugensis*) and preventing their colonization in the Western United States. *Biofouling*, 29(1): 21-28.
- Wimbush, J., Frischer, M.E., Zarzynski, J.W. and Nierzwicki-Bauer, S.A. (2009): Eradication of colonizing populations of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) by early detection and SCUBA removal: Lake George, NY. *Aquatic Conservation*, 19(6): 703-713.
- Zimmermann, S., Ruchter, N., Loza, K., Epple, M. and Sures, B. (2017): Nanoparticulate versus ionic silver: Behavior in the tank water, bioaccumulation, elimination and subcellular distribution in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution* 222:251-260.

Seznam příloh

Příloha 1: Tukey HSD test zkoumající přisedání sláviček na ošetřené povrchy.

Příloha 2: Tukey HSD test zkoumající otevřené sifo u sláviček na ošetřených površích.

Příloha 3: Tukey HSD test zkoumající přisedání v závislosti na použitém skupenství nanočástic stříbra.

Příloha 1: Tukey HSD test zkoumající přidání sláviček na ošetřené povrchy. Tučně jsou zvýrazněny všechny hodnoty $p < 0,05$.

	diff	lwr	upr	p adj
0,02986 mg/cm ² po 24h–0,02986 mg/cm ² hned	18,33333	–12,62179	49,28846	0,54898
0,3989 mg/cm ² hned–0,02986 mg/cm ² hned	15,00000	–15,95513	45,95513	0,76404
0,3989 mg/cm ² po 24h–0,02986 mg/cm ² hned	20,00000	–10,95513	50,95513	0,44049
K hned–0,02986 mg/cm ² hned	35,00000	–8,77716	78,77716	0,19668
K po 24h–0,02986 mg/cm ² hned	20,00000	–23,77716	63,77716	0,81211
PEI hned–0,02986 mg/cm ² hned	26,66666	–4,28846	57,62179	0,13311
PEI po 24h–0,02986 mg/cm ² hned	35,00000	4,04487	65,95513	0,01788
0,3989 mg/cm ² hned–0,02986 mg/cm ² po 24h	–3,33333	–34,28846	27,62179	0,99996
0,3989 mg/cm ² po 24h–0,02986 mg/cm ² po 24h	1,66667	–29,28846	32,62179	0,99999
K hned–0,02986 mg/cm ² po 24h	16,66667	–27,11049	60,44383	0,91564
K po 24h–0,02986 mg/cm ² po 24h	1,66667	–42,11049	45,44383	1,00000
PEI hned–0,02986 mg/cm ² po 24h	8,33333	–22,62179	39,28846	0,98659
PEI po 24h–0,02986 mg/cm ² po 24h	16,66667	–14,28846	47,62179	0,65983
0,3989 mg/cm ² po 24h–0,3989 mg/cm ² hned	5,00000	–25,95513	35,95513	0,99944
K hned–0,3989 mg/cm ² hned	20,00000	–23,77716	63,77716	0,81211
K po 24h–0,3989 mg/cm ² hned	5,00000	–38,77716	48,77716	0,99994
PEI hned–0,3989 mg/cm ² hned	11,66667	–19,28846	42,62179	0,91961
PEI po 24h–0,3989 mg/cm ² hned	20,00000	–10,95513	50,95513	0,44049
K hned–0,3989 mg/cm ² po 24h	15,00000	–28,77716	58,77716	0,94988
K po 24h–0,3989 mg/cm ² po 24h	0,00000	–43,77716	43,77716	1,00000
PEI hned–0,3989 mg/cm ² po 24h	6,66667	–24,28846	37,62179	0,99648
PEI po 24h–0,3989 mg/cm ² po 24h	15,00000	–15,95513	45,95513	0,76404
K po 24h–K hned	–15,00000	–68,61585	38,61585	0,98382
PEI hned–K hned	–8,33333	–52,11049	35,44383	0,99838
PEI po 24h–K hned	0,00000	–43,77716	43,77716	1,00000
PEI hned–K po 24h	6,66667	–37,11049	50,44383	0,99962

PEI po 24h–K po 24h	15,00000	–28,77716	58,77716	0,94988
PEI po 24h–PEI hned	8,33333	–22,33333	39,28846	0,98659

Příloha 2: Tukey HSD test zkoumající otevřené sífo u sláviček na ošetřených površích. Tučně jsou zvýrazněny všechny hodnoty $p < 0,05$.

	diff	lwr	upr	p adj
0,02986 mg/cm ² po 24h–0,02986 mg/cm ² hned	–16,66667	–47,91466	14,58133	0,67003
0,3989 mg/cm ² hned–0,02986 mg/cm ² hned	10,00000	–21,24799	41,24799	0,96493
0,3989 mg/cm ² po 24h–0,02986 mg/cm ² hned	–13,33333	–44,58133	17,91466	0,85854
K hned–0,02986 mg/cm ² hned	16,66667	–27,52467	60,85800	0,91935
K po 24h–0,02986 mg/cm ² hned	21,66667	–22,52467	65,85800	0,75356
PEI hned–0,02986 mg/cm ² hned	1,66667	–29,58133	32,91466	0,99999
PEI po 24h–0,02986 mg/cm ² hned	–10,00000	–41,24799	21,24799	0,96493
0,3989 mg/cm ² hned–0,02986 mg/cm ² po 24h	26,66667	–4,58133	57,91466	0,14932
0,3989 mg/cm ² po 24h–0,02986 mg/cm ² po 24h	3,33333	–27,91466	34,58133	0,99996
K hned–0,02986 mg/cm ² po 24h	33,33333	–10,85800	77,52467	0,25582
K po 24h–0,02986 mg/cm ² po 24h	38,33333	–5,85800	82,52467	0,12797
PEI hned–0,02986 mg/cm ² po 24h	18,33333	–12,91465	49,58133	0,56044
PEI po 24h–0,02986 mg/cm ² po 24h	6,66667	–24,58133	37,91466	0,99668
0,3989 mg/cm ² po 24h–0,3989 mg/cm ² hned	–23,33333	–54,58133	7,91466	0,26683
K hned–0,3989 mg/cm ² hned	6,66667	–37,52467	50,85800	0,99668
K po 24h–0,3989 mg/cm ² hned	11,66667	–32,52467	55,85800	0,98023
PEI hned–0,3989 mg/cm ² hned	–8,33333	–39,58133	22,91466	0,98730
PEI po 24h–0,3989 mg/cm ² hned	–20,00000	–51,24799	11,24799	0,45233
K hned–0,3989 mg/cm ² po 24h	30,00000	–14,19134	74,19133	0,37879
K po 24h–0,3989 mg/cm ² po 24h	35,00000	–9,19133	79,18133	0,20571
PEI hned–0,3989 mg/cm ² po 24h	15,00000	–16,24799	46,24799	0,77223
PEI po 24h–0,3989 mg/cm ² po 24h	3,33333	–27,91466	34,58133	0,99996

K po 24h–K hned	5,00000	–49,12311	59,12311	0,99999
PEI hned–K hned	–15,00000	–59,19133	29,19133	0,95225
PEI po 24h–K hned	–26,66667	–70,85800	17,52467	0,52598
PEI hned–K po 24h	–20,00000	–64,19133	24,19133	0,81910
PEI po 24h–K po 24h	–31,66667	–75,85800	12,52467	0,31366
PEI po 24h–PEI hned	–11,66667	–42,91466	19,58133	0,92317

Příloha 3: Tukey HSD test zkoumající přisedání v závislosti na použitém skupenství nanočástic stříbra. Tučně jsou zvýrazněny všechny hodnoty $p < 0,05$.

	diff	lwr	upr	p adj
120,468 mg/l–0,09 mg/l	60,00000	32,24716	0,87753	0,00024
9,018 mg/l–0,09 mg/l	53,33333	25,58049	0,81086	0,00063
2 mg/l–0,09 mg/l	–3,33333	–31,08618	0,24420	0,99400
0 mg/l–0,09 mg/l	63,33333	35,58049	0,91086	0,00015
9,018 mg/l–120,468 mg/l	–6,66667	–34,41951	0,21086	0,92762
2 mg/l–120,468 mg/l	–63,33333	–91,08618	–0,35580	0,00015
0 mg/l–120,468 mg/l	3,33333	–24,41951	0,31086	0,92762
2 mg/l–9,018 mg/l	–56,66667	–84,41951	–0,17753	0,00039
0 mg/l–9,018 mg/l	10,00000	–17,75284	0,37753	0,75920
0 mg/l–2 mg/l	66,66667	38,91382	0,94420	0,00010