Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství

Vliv specifického znečištění povrchových vod na chování sladkovodních mlžů

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kristýna Božková

Obor studia: Zájmové chovy zvířat

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

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv specifického znečištění povrchových vod na chování sladkovodních mlžů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2017 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu diplomové práce, panu Ing. Karlu Doudovi, Ph.D., za odborné vedení, pomoc a nevídanou trpělivost při zpracování této práce. Poděkování patří také mojí rodině za podporu ve všem, co dělám.

Vliv specifického znečištění povrchových vod na chování sladkovodních mlžů

Souhrn

Práce sestává ze dvou částí, teoretické a praktické. V teoretické části byly shrnuty odborné poznatky týkající se vlivu znečišťujících látek na vodní bezobratlé se zaměřením na měkkýše. Vybrané práce uvádějí, že přirozené chování těchto živočichů je některými látkami ovlivněno. Těchto změn by mohlo být využito při detekci vybraných látek ve vodním prostředí. Vyvrácení či potvrzení této domněnky bylo náplní experimentální části práce.

Cílem experimentální části práce bylo potvrdit nebo vyvrátit hypotézu tvrdící, že monitoringu behaviorálních charakteristik mlžů lze využít jako efektivního nástroje identifikace vlivu specifických polutantů na vodní prostředí. K tomu bylo využito glochidií (larev) škeble říční (*Anodonta anatina*). Polovina získaných glochidií byla vystavena účinku tramadolu, druhá vystavena nebyla. Poté byla glochidia aplikována do kontaktu s rybím hostitelem, též rozděleného do dvou skupin - vystaveným a nevystaveným účinku tramadolu. Celkem tedy vzniklo 28 skupin - 7 s glochidii nevystavenými tramadolu na rybě nevystavené tramadolu (CGCR), 7 s glochidii nevystavenými tramadolu na rybě vystavené tramadolu (CGTR), 7 s glochidii vystavenými tramadolu na rybě nevystavené tramadolu (TGCR) a 7 s glochidii vystavenými tramadolu na rybě vystavené tramadolu (TGTR). Po uplynutí 24h byla spočítána glochidia přichycená na rybě i nepřichycená na dně nádrže. Tyto hodnoty byly statisticky vyhodnoceny.

Výsledky ukázaly, že mezi glochidii vystavenými a nevystavenými tramadolu neexistuje statisticky významný rozdíl v počtu přichycených glochidií, ale existuje v poměru přichycených glochidií z původně přichycených glochidií. Statisticky významný rozdíl mezi skupinami CGCR, CGTR, TGCR a TGTR v porovnání poměru přichycených glochidií z původně přichycených glochidií se neprokázal.

Závěrem lze tedy stanovit, že lze využít některých behaviorálních změn měkkýšů k detekci specifických látek ve vodním prostředí.

Klíčová slova: SSRI, antidepresiva, mlži, sladkovodní prostředí, znečištění vody.

Effects of specific contaminants in surface waters on behavior of freshwater bivalves

Summary

The thesis consists of two parts, theoretical and practical. In the theoretical part are summarized expertises regarding the impact of pollutants on aquatic invertebrates focused on molluscs. Some literature states that the natural behavior of the animals is influenced by certain substances. These changes could be used for the detection of selected substances in the aquatic environment. Denial or confirmation of this hypothesis was purpose the experimental part.

The goal of the experimental part was to confirm or deny the hypothesis claiming that monitoring the behavioral characteristics of bivalve molluscs can be used as an effective tool for identifying the influence of specific pollutants to aquatic environments. For that glochidia (larvae) of duck mussel (Anodonta anatina) were used. First half of the glochidia was exposed to tramadol and the second half was not exposed. Glochidias were then applied in contact with the host fish, also divided into two groups - the exposed and unexposed to tramadol. In total, 28 groups were formed - 7 glochidia unexposed to tramadol on fish unexposed to tramadol (CGCR), 7 glochidia unexposed to tramadol on fish exposed to tramadol (CGTR), 7 glochidia exposed to tramadol on fish unexposed to tramadol (TGCR) and 7 glochidia exposed to tramadol on fish exposed to tramadol (TGTR). After 24 hours glochidia attached to the fish and unattached at the bottom of the tank were counted. These values were statistically evaluated.

The results revealed that there is no statistically significant difference between glochidia exposed and unexposed to tramadol in the number of attached glochidia. However there is difference in the proportion of parasitizing glochidias out of originally attached glochidia. A statistically significant difference between groups CGCR, CGTR, TGCR TGTR and relative proportion of the attached glochidia was proved.

The conclusion is that some of the molluscs behavioral changes can be used to detect specific substances in the aquatic environment.

Keywords: SSRI, antidepressants, bivalves, fresh-water environment, water pollution.

Obsah

1. Úvod 1

2. Vědecká hypotéza a cíl práce 2

3. Literární analýza 3

3.1 Detekce antidepresiv ve vodě pomocí vodních bezobratlých 3

3.2 Definice významné bioindikační třídy - Bivalvia 4

3.2.1 Třída: Bivalvia 4

3.2.1.1 Stavba těla 4

3.2.1.2 Orgánové soustavy 4

3.2.1.3 Přijímání potravy 5

3.2.1.4 Rozmnožování 5

3.2.1.5 Etologie 6

3.2.1.6 Využití mlžů jako bioindikátorů 7

3.3. Antidepresiva 10

3.3.1 Rozdělení antidepresiv 11

3.3.2. Definice pěti nejčastěji užívaných psychicky aktivních látek 12

3.3.3 Selektivní inhibitory zpětného příjmu serotoninu 12

3.3.3.1 Citalopram 13

3.3.3.2 Sertraline 14

3.3.4 Inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (SNRI) 14

3.3.4.1 Venlafaxine 15

3.3.5 Benzodiazepimy 15

3.3.5.1 Oxazepam 16

3.3.6 Opioidní analgetika 16

3.3.6.1 Tramadol 16

4. Materiál a metody 18

4.1 Příprava skleněných nádob pro glochidia 19

4.2 Získání a umístění glochidií 20

4.3 Založení nádrží s rybami 21

4.4 Umístění ryb a glochidií do nádržek 22

4.5 Ukončení experimentu s rybami 23

5. Výsledky 25

5. 1 - Rozdíl v četnosti přichytávání mezi CG a TG 25

5. 2 - Rozdíl procenta přichycených glochidií 28

5.2.1 - Porovnání skupin CG a TG 28

5.2.2 - Porovnání skupin CGCR, CGTR, TGCR a TGTR 30

6. Diskuze 34

7. Závěr 38

8. Seznam literatury 39

9. Přílohy 47

1. Úvod

Sladká voda zabírá nemalou plochu na naší planetě, je životním prostředím milionů druhů živočichů a jsou na ní závislé všechny organismy bez rozdílu, včetně lidí. I přesto musí vodní prostředí čelit neustále se zvyšujícímu znečišťování a soustavnému vymírání mnoha druhů organismů (Dudegon, 2006). Se zdokonalující se civilizací stoupá mimo znečišťování vodního i terestrického prostředí také výskyt patologických změn lidské psychiky. Odpovědí na vzrůstající počet lidí s diagnostikovanou úzkostí byla zavedena léčiva tento stav regulující - antidepresiva (Farsimadan, 2016). S rostoucím výskytem depresí roste přirozeně i spotřeba těchto léčiv (Silva et al., 2015). Antidepresiva se v lidském těle metabolizují a tyto metabolity se dostávají do čistíren odpadních vod a odtud dále do vodního prostředí (Hubera et al., 2016). Tak se dostávají jednak zpět do pitné vody, jednak do přirozeného vodního prostředí, kde ovlivňují necílové organismy, které se v daném prostředí volně vyskytují (Fong and Ford, 2014; Van Donk et al., 2015; Vukovic-Gacic, 2014)). Je poměrně náročné detekovat ve vodě tyto látky, které se vyskytují ve velmi malých množstvích a jejich koncentrace může kolísat. Vedle klasického strojového měření lze využívat i vodní bezobratlé živočichy. Velmi vhodné pro toto využití se jeví různé druhy měkkýšů, kteří dokážou dané látky z vody odfiltrovat, ve svých tělech kumulovat a na rozdíl od strojů dokážou navíc i reflektovat dopad těchto látek na další vodní živočichy (Štambuk et al., 2009; Farris, J. L. et J. H. Van Hassel, 2010; Vukovic-Gacic, 2014). Stále je však třeba zodpovězení mnoha otázek o interakcích mezi těmito bioindikačními živočichy a metabolity psychicky aktivních látek i dalších znečišťujících látek vyskytujících se ve vodním prostředí vlivem lidské činnosti, než mohly být užívány rutinně. Stále neexistuje dostatečné množství informací o synergických, aditivních či antagonistických účincích komplexních směsí chemických látek, jejich distribuci v prostředí, ani o jejich dopadu na ekosystém (Hubera et al., 2016). I když je tato skutečnost známa poměrně dlouhou dobu, tak naléhavost probádání tohoto celosvětového problému neodpovídala množství zájmu odborníků. Zájem o toto téma však narůstá a prací s důležitými odpověďmi přibývá.

2. Vědecká hypotéza a cíl práce

Vědecká hypotéza: Monitoringu behaviorálních charakteristik mlžů lze využít jako efektivní nástroj identifikace vlivu specifických polutantů na vodní prostředí.

Cíl práce: zpracovat literární rešerši z hlediska vlivu specifického znečištění (např. antidepresiva) na etologii sladkovodních mlžů a provést krátkodobý laboratorní experiment s vybranou látkou pro ověření vlivu.

3. Literární analýza

3.1 Detekce antidepresiv ve vodě pomocí vodních bezobratlých

Na popředí zájmu detekce znečišťujících chemických látek ve vodním prostředí se nejvíce vyskytují konvenčně prioritní znečišťující látky, zejména akutně toxické či karcinogenní pesticidy a průmyslové meziprodukty a jejich perzistence v životním prostředí. Tato skupina chemikálií je však jen částí velké skupiny škodlivých látek vyskytujících se ve vodním prostředí vlivem lidské činnosti (Daughton et Ternes, 1999).

Další významnou a ve vodním prostředí hojně se vyskytující skupinou bioaktivních znečišťujících látek, jejichž přítomnost ve vodním prostředí by měla být též důvodem k obavám, jsou léčiva a doplňkové látky v produktech pro osobní péči lidí (Daughton et Ternes, 1999; Vieno et al., 2007; Azzouz a Ballesteros, 2013). Ač je přítomnost antidepresiv a jiných humánních či veterinárních léčiv i jejich škodlivý dopad na vodní bezobratlé i mnohé další živočichy znám z doby před více než 38 lety (Hignite et Azarnoff, 1977; Richardson et Bowron, 1985), tak se do většího zájmu odborníků dostaly až o téměř 20 let později. Mnohé z těchto látek mají nepříznivé ekologické účinky již při nízkých koncentracích (Halling-Sorensen et al., 1998; Jorgensen et Halling-Sorensen, 2000; Heberer, 2002). V současné době neexistuje dostatečné množství informací o synergických, aditivních či antagonistických účincích komplexních směsí chemických látek, jejich distribuci v prostředí, ani o jejich dopadu na ekosystém (Hubera et al., 2016). Aby se mohlo seriózně přistoupit k výzkumu dopadu takovýchto látek na vodní živočichy i životní prostředí vůbec, je potřeba umět nejen tyto látky ve vodním prostředí detekovat, ale i znát jejich přímý i nepřímý vliv na živočichy, jejich dopad na ekosytém a další skutečnosti, které se s pokračujícím výzkumem objevují a je potřeba je znát. Už nejzákladnější krok tohoto procesu - detekce daných látek ve vodě, je velmi obtížná a ukazuje se, že konvenční strojové měření (Liscio at al., 2009) je efektivní za určitých podmínek kombinovat s využitím bioindikačních živočichů. Velmi vhodnými se pro bioindikační využití jeví měkkýši díky vlastnostem, jako je přisedlý způsob života, získávání potravy pomocí filtrace vody, snížená citlivost k následkům akumulace látek v těle, nebo vysoká odolnost ke změnám kvality životního prostředí (Štambuk et al., 2009).

3.2 Definice významné bioindikační třídy - Bivalvia

3.2.1 Třída: Bivalvia

3.2.1.1 Stavba těla

Tělo mlžů je měkké, bilaterálně souměrné, tvoří ho trup a svalnatá noha, hlava je redukována. Zbytky hlavy se nacházejí kolem ústního otvoru jako tzv. přiústní plachetky. Tělo pokrývá plášť tvořený dvěma laloky, ze kterého je vylučována pravá a levá lastura (Lang et al., 1971). Okraje pláště jsou pevně přimknuté, někdy srostlé. V plášti se nacházejí tři otvory, jeden pro svalnatou nohu a dva pro přijímací (též inhalační) a vyvrhovací (exhalační) otvor. Přijímacím otvorem, umístěným v zadní části těla, proudí voda do plášťové dutiny, pokračuje do žaber a vyvrhovacím otvorem, většinou nacházejícím se nad otvorem přijímacím, ven z těla. Tato cirkulace je zajištěna kmitajícím řasinkovým epitelem, který vystýlá oba otvory, žábry i žaberní chodby (Papáček, 1994). Dýchací orgán mlžů, žábry, jsou tvořeny dvěma párovitými listy, vnějším a vnitřním. Svalnatá noha je volným pokračováním trupu na břišní straně. Svalnatá noha může mít různý tvar, od po stranách zploštělého klínu u velevrubovitých (*Unionidae*) po protáhle jazykovitý tvar nohy u okružankovitých (*Sphaeriidae*). Vkleslá ústa nacházející se při základně svalnaté nohy nemají radulu ani čelist (Pfleger, 1988).

3.2.1.2 Orgánové soustavy

Srdce je tvořeno jednou komorou a dvěma předsíněmi, proudí jím tělní tekutina hemolymfa. Pod srdcem ležící párový Bojanův orgán zastává funkci ledvin. Nervová soustava je jednoduchá, tvořená ganglii. Párová cerebropleurální ganglia nacházející se nad ústy a po jejich straně jsou spojena s párovými viscerálními ganglii nacházejícími se v zadní části těla, spojeny jsou i s párovými pedálními ganglii ve svalnaté noze (Beran, 1998). Smyslové orgány jsou vzhledem ke způsobu života a redukované hlavě vyvinuty nepatrně. Funkci čichového orgánu zastávají ofradia umístěná při bázi žaber. Rovnovážné vnímání je zajištěno párem statocyst, nacházejících se v blízkosti pedálních ganglií. Hlavová tykadla a oči mlžům chybí,

ovšem oči mohou být v některých případech vyvinuty na různých částech těla (Dogel, 1961). Tělní svalovina tvoří svalnatou nohu ve spodní části těla, svalnatá noha je tzv. erektilním ústrojím. Při lezení dochází k jejímu pohybu vlivem zpevnění v důsledku přítoku hemolymfy do lakun (Lang et al., 1971). U některých druhů je vyvinuta Byssova žláza, která produkuje rychle tuhnoucí sekret tvořící velmi pevná Byssova vlákna, která slouží k přichycení k podkladu. Vyskytuje se především u mořských mlžů, ale najdeme je i u sladkovodních forem, například u přisedle žijící slávičky mnohotvárné (*Dreissena polymorpha*), která má slabě vyvinutou svalnatou nohu a tato vlákna jí pomáhají udržet se na podkladu (Beran, 1998). Některé druhy mlžů tvoří perly, převážně se s tímto jevem setkáváme u mořských mlžů, výjimky najdeme však i u sladkovodních druhů, jakým je např. perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera*). Tvorba perly je způsobena sekrecí plášťového epitelu jako odpovědi na dráždící nečistotu, která pronikla mezi plášť a lasturu (Papáček, 1994).

3.2.1.3 Přijímání potravy

Mlži jsou mikrofágové a filtrátoři, malé části potravy jsou přinášeny pohybem řasinkového epitelu přes přijímací otvor do plášťové dutiny, kde se zachytí na žábrách, jsou slepeny slizem produkovaným řasinkovým epitelem a transportovány směrem ke svalnaté noze a dále k ústnímu otvoru. Trávicí trakt je tvořen ústy, hltanem, žaludkem a střevem, ústí do vyvrhovacího otvoru. K žaludku je připojen hepatopankreat. Střevo prochází ve svém posledním úseku perikardem a srdeční předsíní. Tento způsob příjmu potravy je typický pro sladkovodní mlže, u ostatních může být modifikován, vždy je však zásadní příjem potravy s přicházejícím vodním proudem přes přijímací otvor pomocí pohybu řasinkového epitelu (Papáček, 1994).

3.2.1.4 Rozmnožování

U měkkýšů se vyskytuje oplození vnitřní i vnější. V případě vnějšího oplození jsou samčí a samičí pohlavní buňky vypuštěny do vody, dojde k oplození a vznikne volně plovoucí larva, trochofora. Ta se poté vyvíjí ve veliger, následuje přisednutí k podkladu a přeměna na malého dospělého jedince. Z našich měkkýšů se takto rozmnožuje např. slávička

mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) (Beran, 1998). V případě vnitřního oplození vypouští samčí jedinec spermie do vody, poté jsou nasáty samičím jedincem a k oplození dochází v plášťové dutině. Vzniká larva zvaná glochidium. Za vhodných podmínek (jako je například dostupnost kyslíku, příznivá teplota a přítomnost vhodného hostitele) vypouští samičí jedinec slizovitá vlákna, která mohou dosáhnout až 15cm a obsahovat až 500 glochidií. Glochidia většiny velkých mlžů (čel. Unioidae) jsou obligátní parazité na rybích hostitelích. Glochidia se po vyhledání hostitele encystují v jeho tkáních, následuje metamorfóza a excystace. To zaručuje jednak ochranu glochidií, jednak i jejich distribuci ve vodním prostředí, která by jinak pro takto málo pohyblivé živočichy byla velmi těžce dosažitelná. Následuje vývoj zakončený odpadnutím z rybího hostitele a přeměnou v juvenilního jedince. Glochidia jsou dle druhu vybavena různými adaptacemi, usnadňujícími přichycení k hostiteli, jako jsou různé háčky či ostny, které umožní přichycení nejen k žábrám, ale u některých druhů i k ploutvím, očím či jiným částem těla (Reynolds et al., 1997; Beran, 1998).

Svou významnou roli v ekosystému zastávají i ve vztahu opačném, kdy se stávají hostiteli. Některé druhy mlžů jsou hostiteli ryb z rodu *Rhodeus*. Tyto ryby využívají mlže ve svém rozmnožovacím cyklu tak, že samičky kladou jikry sifonem do žaber mlžů, sameček následně vypouští mlíčí v blízkosti dýchacího otvoru a k oplození dochází uvnitř mlže. To poskytuje plůdku dočasnou ochranu, než ho mlž vyvrhne ven. Tímto napomáhají například hořavkám k rychlému šíření do nových lokalit, kde mohou být považovány za invazivní druh (Vrtílek et Reichard, 2012, Reynolds et al., 1997).

3.2.1.5 Etologie

I když mlži tvoří velké množství biomasy vodního prostředí a dosahují vysoké hustoty ve většině sladkovodních stanovišť, tak je známo jen velmi málo z jejich etologie (Zając et al., 2016). Obecně jsou sladkovodní mlži výkonnými filtrátory. Odfiltrovávají jemný detrit, plankton, bakterie i organický materiál z vodního sloupce (Beran 1998; Vaughn et Hakenkamp, 2001; Ravera et Sprocati, 1997). Některé druhy, například velevrubi a škeble, se zavrtávají do dna i do několikacentimetrové hloubky. Substrát, ve kterém mlži žijí zahrabaní, jeho typ a stabilita, jsou důležité faktory, které ovlivňují jejich hustotu a druhovou bohatost (Allen et Vaughn, 2009). Rozmístění mlžů v přírodních podmínkách není náhodné, nejvíce obsazované stanoviště je podél břehu v přibližně půlmetrové hloubce (Zając et al., 2016).

Mlži plní významnou roli ve vodním ekosystému, protože díky svým specifickým schopnostem významně ovlivňují vodní prostředí. Mimo již zmíněného čištění vody se uplatňují v ovlivňování množství živin ve vodním prostředí, nebo jako hostitel či potrava pro jiné živočichy (Zając et al., 2016). Obzvláště schopnost odstraňovat organické znečištění je klíčová u vodních ploch s mnohostranným využitím. Nejvíce jsou zatíženy mělké vodní nádrže s pitnou vodou využívané zároveň jako rekreační. Rušení mlžů přejezdy lodí, obzvláště motorových, může snížit denní filtrační rychlost populace mlžů až o 6,9%. Druhy žijící na dně jsou k tomuto typu stresu náchylnější než druhy žijící v sedimentu (Lorenz et al., 2013).

3.2.1.6 Využití mlžů jako bioindikátorů

Antropogenní zatížení, zemědělské využívání krajiny i průmyslová činnost - to vše přispívá k soustavnému snižování kvality vody sladkovodních stanovišť (Guidi et al., 2010). Sladká voda sice tvoří jen 0,01% světové vody, přesto je však životním prostředím pro více než 100 000 druhů živočichů, což je přibližně 6% všech dosud popsaných druhů (Dudgeon et al., 2006). Mimo to plní vodní plochy také úlohu ekonomickou, kulturní, rekreační, estetickou, či dopravní, nemluvě o tom, že je na vodě životně závislá většina organismů na Zemi. Zachování kvality sladkovodních ploch je rozhodující pro všechny lidi bez rozdílu, i přesto však mnohé vodní plochy zažívají pokles biodiverzity, který je mnohem větší, než je u nejvíce postižených suchozemských ekosystémů (Dudegon, 2006). Pro úspěšnou ochranu zbývajícího vodního prostředí je třeba vhodná detekce stavu a změn kvality vody. Jako velmi vhodná cesta se jeví využívání vodních bezobratlých jako organismů schopných z vody zachytávat a ve svých tělech akumulovat různé ve vodě přítomné látky, velmi vhodnými pro tuto úlohu se jeví vodní mlži. Mezi nejužitečnější a pro biomonitoring významné vlastnosti mlžů patří přisedlý způsob života, získávání potravy pomocí filtrace vody, snížená citlivost k následkům akumulace látek v těle, nebo vysoká odolnost ke změnám kvality životního prostředí (Štambuk et al., 2009). Mlži řádu Unioida se v poslední době stávají hlavním studijním cílem v oblasti toxikologie (Farris, J. L. et J. H. Van Hassel, 2010). Pro potřeby biomonitoringu se využívají jedinci z umělého chovu, nepříbuzní jedincům vyskytujícím se v měřené lokalitě. To zaručuje eliminaci rušivých efektů, například adaptaci organismu měřené látce (Vukovic-Gacic, 2014).

Kromě standardně sledovaných znečišťujících látek se poměrně novým problémem stává přítomnost estrogenních či androgenních látek ve vodě, které mohou způsobovat endokrinní poruchy u volně žijících zvířat i lidí. (Hill et al, 2002; Madsen et al., 2004). Estrogeny syntetické, tvořící aktivní složku perorální hormonální antikoncepce, i přírodní, se dostávají do vodního prostředí z výměšků hospodářských zvířat či lidí. Tyto sloučeniny se v odpadních vodách velmi rychle ředí a proto je velmi náročné je detekovat. Strojové měření však zaznamenává pouze okamžité koncentrace daných látek a je tak zatíženo chybou krátkodobého i dlouhodobého kolísání koncentrací těchto látek (Liscio et al., 2009).

To je jeden z důvodů, proč v posledních deseti letech získává na oblibě aktivní biomonitoring využívající k detekci látek živé organismy. Využití těchto organismů je vedle samotné detekce látek i mocným nástrojem k hodnocení ekologických rizik pro vodní prostředí. Množství druhů živočišných i rostlinných organismů používaných pro tento typ monitoringu se rozšiřuje. Mimo detekci organických znečišťujících látek mohou být využity i k detekci anorganických znečišťujících látek, například výskytu těžkých kovů (Vukovic-Gacic, 2014).

Navzdory těmto kladům však Liscio at al. (2009) při detekci organických látek, konkrétně estrogenních sloučenin, ve vodě upřednostňuje přístroje oproti bioindikačním živočichům. Konkrétně porovnával strojové měření s měřením za pomoci mlžů z hlediska nákladové efektivity a schopnosti spolehlivě monitorovat estrogenní látky v čističkách odpadních vod. Jeho výsledky ukázaly, že pro měření těchto látek ve vodě vykazují mlži horší výsledky ve srovnání s přístroji. Důvodem může být zatím nedokonalá znalost endokrinního systému mlžů a s tím spojená chybná interpretace některých faktů, například do jaké míry jsou nahromaděné estrogeny v těle metabolizovány, nebo kolik naakumulovaných estrogenů ve tkáních pochází z metabolizmu živočicha. Dále zpracování vzorků mlžů je komplikovanější ve srovnání s přístroji. I přes daná fakta však uznává významnou roli mlžů jako bioindikátorů ve smyslu studia možných účinků estrogenních sloučenin ve vodním prostředí.

Další skupinou látek, k jejichž detekci lze úspěšně využít mlžů jako detekčních organismů, jsou antidepresiva. Antidepresiva patří mezi nejčastěji detekovatelná humánní léčiva ve vodním prostředí. Mlži mají k těmto látkám velmi citlivé receptory. Ve vyšších koncentracích dokonce dochází k ovlivňování pohybového a reprodukčního systému (Fong

and Ford, 2014). Vodní živočichy může dále ovlivnit i přítomnost látek, které jsou běžně lidmi využívány a dostávají se tak do odpadních vod. Jsou jimi například různé vůně, opalovací mléka (Daughton et Ternes, 1999), antibiotika, analgetika a protizánětlivé léky, steroidní hormony a antihypertenziva (Puckowski et al., 2016) a další běžně používané látky. Nedostatečně ošetřená odpadní voda vypouštěná do přírodních toků s sebou přináší i tyto škodlivé látky. Čističky odpadních vod nebyly původně navrženy tak, aby byly schopny tyto látky z vody odstranit. Jejich hlavním úkolem je především odstraňování organických látek pevných i rozpuštěných, zejména tuků a živin. V důsledku toho se léky, jejich rezidua, hormony i látky běžné lidské spotřeby dostávají do přijímacího ekosystému, nejčastěji řeky, moře, oceánu, nebo vodní nádrže (Hubera et al., 2016).

Pro vodní bezobratlé je to obzvláště nebezpečné, vzhledem ke skutečnosti, že se po většinu života zdržují výlučně ve vodě, ve které se i rozmnožují. Fyziologické změny způsobené pomalým hromaděním těchto látek v jejich tělech nejsou většinou patrné, dokud kumulativní úroveň těchto účinků nezpůsobí kaskádu nevratných změn. Tyto změny můžou být natolik rychlé, že organismy ani prostředí, ve kterém žijí, nebudou mít šanci se jim přizpůsobit (Daughton et Ternes, 1999). Reakce mlžů na stres vlivem prostředí se může projevovat jako fyziologické, histologické a molekulární reakce organismu, včetně abnormální morfologie, změny DNA (Vukovic-Gacic, 2014), narušení interdruhové chemické komunikace (Van Donk et al., 2015) a další.

Faktem zůstává, že v některých čističkách odpadních vod s různými způsoby čištění byla pozorována částečná eliminace těchto látek. Mezi faktory ovlivňující odstraňování patří typ čisticího procesu, stupeň ředění surové odpadní vody, či teplota. Význam má i geografické umístění a sezónní výkyvy teploty. Degradace probíhá pomaleji při nízkých teplotách, v Arktických oblastech je eliminace nejnižší. Neřešeným paradoxem zůstává, že zrovna v těchto oblastech dochází k intenzivnímu rybolovu, z něhož vytěžené maso putuje do celého světa (Hubera et al., 2016).

3.3. Antidepresiva

S neustále se zdokonalujícími technologiemi, náročnějšími procesy výroby a celkově se zvyšující spotřebou souvisí znečišťování životního prostředí následované vymíráním některých živočišných druhů. Vedle znečišťujících anorganických látek se v přírodě vyskytují i znečišťující látky, které se do vodního prostředí dostaly jako rezidua léků či jiných látek pro osobní péči lidí. Mezi stále častěji detekovatelné látky patří antidepresiva, jejichž zvyšující se výskyt reflektuje nárůst psychiatrických onemocnění (Daughton et Ternes, 1999; Puckowski et al., 2016). Úzkost je nejčastějším typem psychiatrického onemocnění, které bylo v minulém století široce rozšířeno po celém světě. Odpovědí na to byla zavedena léčiva pro kontrolu tohoto typu onemocnění i souvisejících psychiatrických nemocí (Farsimadan, 2016).

Neuroaktivní látky - antidepresiva, patří mezi skupinu léků, které jsou pacientům předepisovány velmi často. Používají se k léčbě depresí různého původu, poruchy příjmu potravy, poruchám osobnosti (Brooks et al., 2003) i množství dalších psychických pathos. Účinek se vyvíjí s latencí několika týdnů, a to pouze u psychicky nemocných. Od antidepresivního účinku je třeba oddělit akutní účinky, které se vyvinou i u psychicky zdravých osob - celkový útlum a vegetativně nežádoucí účinky (Lüllmann, 2004). Většina antidepresiv je silným inhibitorem REM spánku, ať už se podávají akutně, subchronicky, nebo chronicky (McCarthy et al., 2016).

Existuje několik typů antidepresiv, ale mezi nejoblíbenější patří selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (Lajeunesse et al., 2011). Tyto látky způsobují koncentraci serotoninu v nervových synapsích (Burkina et al., 2015). Podle zprávy OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) z roku 2011 se spotřeba těchto drog ve všech zemích v posledním desetiletí zvýšila o 60% (Silva et al., 2015). Spotřeba antidepresiv (amitriptylin) v nemocnicích byla jen v roce 2007 závratných 34 836 t (Jean et al., 2012). Proto není divu, že antidepresiva jsou látky detekovatelné ve vodě ve stále větším množství. Kromě léčby nemocných dochází i ke zneužívání sedativních účinků těchto léčiv, takže může být v budoucnu vyžadováno zjišťování jejich přítomnosti v odpadních vodách (Farsimadan, 2016).

Farmaceutická rezidua se sice v přírodě vyskytují jen v nízkých koncentracích, ovšem přicházejí do vodního prostředí rychleji, než dochází k jejich degradaci. Tak dochází k

dlouhodobé expozici vodních živočichů těmto látkám, což může způsobit nežádoucí účinky na tyto necílové organismy. To je jeden z důvodů, proč jsou tyto látky považovány za nebezpečné kontaminanty. Farmaceutická rezidua se vyskytují nejen ve vodním prostředí, ale i v sedimentech a půdě (Puckowski et al., 2016).

Pro lepší orientaci je uveden stručný seznam skupin, do kterých se antidepresiva dělí.

3.3.1 Rozdělení antidepresiv

Antidepresiva se dají dělit dle různých aspektů (Češková, E., 2016):

- podle generací na antidepresiva I., II., III. a IV. generace
- na klasická a novější
- podle chemické struktury na tricyklická, tetracyklická a heterocyklická
- podle mechanismu účinku na inhibitory zpětného vychytávání monoaminů a inhibitory biodegradace

Inhibitory zpětného vychytávání monoaminů jsou děleny do čtyř generací:

- I. generace
  - tricyklika a tetracyklika, účinné látky: imipramin, amitriptilin, nortriptilin, klomipramin a dosulepin
- II. generace
  - heterocyklika, účinná látka: maprotilin
- III. generace
  - specifické inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), účinné látky: fluoxetin, fluvoxamin, citalopram, paroxetin, sertralin, escitalopram
  - serotoninoví antagonisté a inhibitory zpětného vychytávání (SARI), účinné látka: trazodon
  - alosterická inhibice zpětného vychytávání serotoninu (ASRI), účinná látka: escitalopram
  - inhibitory zpětného vychytávání noradrenalinu (NARI), účinné látky: reboxetin, atomoxetin

- IV. generace
  - inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (SNRI), účinné látky: venlafaxin, milnacipran, duloxetin
  - noradrenergní a specificky serotonergní antidepresiva (NaSSa), účinné látky: mianserin, mirtazapin
  - inhibitory zpětného vychytávání dopaminu a noradrenalinu (DNRI), účinná látka: bupropion

Inhibitory biodegradace

- I. generace (neselektivní)
  - Ireverzibilní, účinná látka: tranylcypromin
- II.generace (selektivní)
  - Inhibitory MAO
    - I-MAO-A, účinná látka: moklobemid
    - I-MAO-B, účinná látka: selegilin

Antidepresivní léčiva jsou velkou skupinou léků, obsahující množství účinných látek a ještě větší množství chráněných názvů léků. Proto budou dále uvedeny a rozebrány pouze tři účinné látky ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného příjmu serotoninu - citalopram, sertalin a venlafaxin, dále za skupinu benzodiazepimů oxazepam a tramadol za opioidní analgetika. U každé účinné látky bude uveden účinek na pacienty, kvůli kterému je látka užívána, a popsaný účinek na vodní bezobratlé.

3.3.2. Definice pěti nejčastěji užívaných psychicky aktivních látek

3.3.3 Selektivní inhibitory zpětného příjmu serotoninu

Značí se SSRI z anglického selective serotonin reputake inhibitors. Vedoucí látkou je fluoxetin. Tyto látky inhibují v CNS zpětný příjem uvolněného serotoninu do nervových buněk a tím zvyšují extracelulární koncentraci serotoninu v synaptické štěrbině. Účinkem jsou srovnatelná s tricyklickými antidepresivy, jejich spekrtum nežádoucích účinků je však zcela

odlišné. Typické nežádoucí účinky jsou nauzea, nechutenství, poruchy spánku, může se stupňovat agresivní chování. Metabolizují se s poločasem 50-70 hodin. (Lüllmann, 2004). Při pokusech s mlži rodu *Ilyanassa obsoleta* byly pozorovány poruchy lokomoce a problémy související s funkčností svalnaté nohy, zejména vyrovnávací schopnost, a to po vystavení látkám z této skupiny antidepresiv. Nejnápadnější účinek byl pozorován při expozici měkkýšů fluoxetinu, kdy se negativní změny oproti kontrolní skupině projevily při koncentraci 3,45 µg/l, což je cca 3,71 krát vyšší koncentrace oproti životnímu prostředí, při expoziční době 2 hodiny (Moreno-González et al., 2016). Vliv fluoxetinu na měkkýše potvrdil i Fong et al. (2014), konkrétně zjistil snížení rychlosti i četnosti pohybů směrem k rozhraní vody a vzduchu u měkkýšů druhu *Urosalpinx cinerea* a *Lithopoma americanum*.

3.3.3.1 Citalopram

Citalopram (CIT) je mimo svého čistého stereoizomeru escitalopramu nejselektivnějším inhibitorem zpětného vychytávání serotoninu. Je vhodný k léčbě starších nemocných nebo u pacientů, u kterých nepřevažuje útlum a neklid (Glassman et al., 2002). Hlavní indikací je deprese, dále se používá k léčbě panické poruchy, dysthymie, premenstruační dysforické poruchy, tělesné dysmorfické poruchy a obsedantně kompulzivní poruchy (Farsimadan, 2016). Fong et Hoy (2012) provedli pozorování účinku citalopramu a venlafaxinu na vodní měkkýše, konkrétně na druhy *Leptoxis carinata* a *Stagnicola elodes*. Laboratorní testy ukázaly, že vystavení měkkýšů přítomnosti citalopramu i venlafaxinu způsobuje významné narušení přilnavosti k podkladu. Jedinci, kteří se od podkladu oddělili, nebyli již schopni se znovu přichytit. K těmto výsledkům docházelo při nižších koncentracích daných látek, než jaké jsou hlášeny z čistíren odpadních vod v Severní Americe i Evropě. Jedná se o nejnižší hlášenou koncentraci antidepresiv, která měla škodlivý vliv na vodní živočichy. Fong et Molnar (2012) provedli pozorování ovlivnění přilnavosti vodních měkkýšů, tentokrát druhů žijících ve slané vodě, konkrétně druhů *Chlorostoma funebralis*, *Nucella ostrina*, *Urosalpinx cinerea*, *Tegula fasciatus* a *Lithopoma americanum*, látkami obsaženými v antidepresivních léčivech - fluoxetin, fluvoxamin, venlafaxin a citalopram. Výsledky ukázaly, stejně jako u sladkovodních plžů, že tyto látky, běžně se vyskytující v odpadních vodách vypouštěných do sladkých i slaných vod, ovlivňují přilnavost plžů k

podkladu. V těchto experimentech byli mořští plži méně citliví k účinkům látek obsažených v antidepresivech, než jejich sladkovodní příbuzní.

3.3.3.2 Sertraline

Sertraline (SRT) je bezpečné a účinné léčivo pro léčbu depresí, stavů po infarktu myokardu, nebo v souvislosti s nestabilní anginou pectoris (Glassman et al., 2002). Často se používá k léčbě deprese, panické poruchy, dysthymie, premenstruační dysforické poruchy, či obsedantně kompulzivní poruchy (Farsimadan, 2016). Na pacienty nepůsobí sedativně a po překonání možných prvotních nežádoucích účinků při jeho užívání neplyne pro pacienty žádné omezení v běžném životě (Glassma et al., 2002). Vliv na vodní bezobratlé byl zkoumán na třech různých druzích vodních živočichů - *Amphibalanus amphitrite*, *Brachionus plicatilis* a *Mytilus galloprovincialis*, jež byly vystaveny stejným koncenrtacím sertralinu, jaké se vyskytují v životním prostředí. U jedinců *Amphibalanus amphitrite* a *Brachionus plicatilis* vyvolaly již nízké koncentrace sertralinu významné behaviorální změny plavání, vyšší koncentrace vedly k imobilizaci či úmrtí. U druhu *Brachionus plicatilis* byla pozorována embryotoxicita (Estévez-Calvar et al., 2016). Moreno-González et al. (2016) pozorovali u mořského měkkýše *Ilyanassa obsoleta* poruchy lokomoce a problémy související s funkčností svalnaté nohy, zejména omezení její vyrovnávací funkce. Kromě měkkýšů byl prozkoumán i vliv na jiné vodní bezobratlé, konkrétně u druhu *Daphnia magna*. Sertraline zvýšil plodnost F0 generace, ale snížil počet potomků F1 generace. Mimo tuto skutečnost lze sertraline považovat za hrozbu pro životní prostředí i kvůli jeho kumulaci ve vodních řasách a kvůli fyziologické slabosti zkoumaných živočichů pozorované po celé generace (Minguez et al., 2015).

3.3.4 Inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (SNRI)

Látky této skupiny inhibují zpětné vychytávání serotoninu a noradrenalinu, ve vysokých dávkách ovlivňují i vychytávání dopaminu. Mají široké spektrum antidepresivního působení díky duálnímu účinku, nemají afinitu k muskarinovým, histaminovým, ani adrenergním receptorům. Vyznačují se krátkým poločasem rozpadu, málo se váží na

plazmatické bílkoviny, mají lineární farmakokinetiku a nízké riziko farmakokinetických reakcí. Snášenlivost těchto látek je u různých pacientů rozdílná, oproti SSRI jsou zatíženy serotoninovými a noradrenalinovými nežádoucími účinky. Noradrenalinové nežádoucí účinky jsou například anxieta, agitovanost, tachykardie a zvýšení krevního tlaku, mezi serotoninové nežádoucí účinky patří nauzea, vomitus, průjem, insomnie, tenze, sexuální dysfunkce (Dušek et al., 2010).

3.3.4.1 Venlafaxine

Využívá se k léčbě všech druhů depresí a úzkosti, účinný je i při léčbě chronických bolestivých stavů. Poměrně rychle zlepšuje utlumenou psychomotoriku. (Janů et Racková, 2006; Bouček et al., 2005). Venlafaxine je účinný i u pacientů, u kterých selhaly jiné terapeutické postupy, včetně inhibitorů monoaminooxidázy (IMAO) a elektrokonvulzí (Raboch et al., 2005). Na mlže má velafaxine podobné účinky jako citalopram, narušuje schopnost přichytit se k podkladu a to již při nízkých koncentracích. Jednou oddělení jedinci již nebyli schopni se znovu přichytit (Fong et Hoy, 2012). Rychlost pohybu je taky venlafaxinem ovlivněna. Pozorování proběhlo na měkkýších druhu *Urosalpinx cinerea* a *Lithopoma americanum*. Venlafaxin působil na měkkýše tak, že se pohybovali rychleji a častěji směrem k hladině (Fong et al., 2014). Byl potvrzen i vliv na další vodní bezobratlé, konkrétně na hrotnatku velkou - *Daphnia magna*. Venlafaxine snížil množství potomků u F0 generace a způsobil drogovou toleranci u F1 generace (Minguez et al., 2015).

3.3.5 Benzodiazepimy

Látky této skupiny působí poměrně specificky proti stavům strachu a anxiózní náladě. Jejich terapeutická šíře je velká. Ve vyšších dávkách působí tlumivě, myorelaxačně, při chronickém podávání mohou vyvolat závislost a nutkavé zneužívání. Účinek na organismus je vyvolán zesílením inhibičního účinku transmiteru GABA na jeho receptory. Vedoucí látkou je diazepam. Benzodiazepiny nemají antipsychotický účinek, ale snižují elektrickou aktivitu retikulární formace a limbického systému a tím snižují vliv zevních i vnitřních stimulů, čímž se vědomí distancuje od vnitřních i vnějších prožitků (Lüllman, 2004).

3.3.5.1 Oxazepam

Oxazepam je jednou z mnoha účinných látek skupiny benzodiazepimů. Patří do skupiny benzodiazepimů se slabším účinkem a krátkým poločasem eliminace v organismu, v průměru 12 hodin (Lincová et Farghali, 2005). Patří mezi velmi často předepisované látky. Mackuľak et al. (2015) provedl měření odpadních vod nemocnic na území České a Slovenské republiky a jeho výsledky prokázaly oxazepam spolu s dalšími látkami (kotinin, tramadol, venlafaxin, kodein, oxykodon) jako nejvíce koncentrované látky v těchto vodách (Mackuľak et al., 2016). U sladkovodních mlžů vyskytujících se v řekách kontaminovaných oxazepamovými rezidui pocházejícími z čističek odpadních vod bylo popsáno poškození DNA (Kolarević et al., 2016).

3.3.6 Opioidní analgetika

Opioidy jsou nejúčinnější analgetika, můžeme rozdělit na slabé a silné opioidy podle míry aktivace opioidních receptorů a afinity k nim. Podle blokace či stimulace těchto receptorů dělíme opioidy na agonisty, agonisty-antagonisty a antagonisty. Mezi nežádoucí účinky patří zácpa, nauzea, sedace, únava, ospalost, zvracení, pruritus, retence moči, pocení, závratě. Nutno je počítat i s fyzickou či psychickou závislostí při neuváženém užívání (Rokyta et al., 2005).

3.3.6.1 Tramadol

Tramadol je středně silné opioidní analgetikum. Používá se k tlumení akutní i chronické středně silné až silné bolesti. Na rozdíl od jiných opioidních analgetik u tramadolu hrozí jen velmi malé riziko vzniku závislosti. Všeobecně je velmi dobře snášen, ve vyšších dávkách se může objevit depresivní efekt na kardiovaskulární a respirační systém, nauzea a zvracení (Mirossay et al., 2006). Patří mezi často předepisované analgetikum, na území ČR a SR patří mezi nejčastěji detekované látky v odpadních vodách nemocnic (Mackuľak et al., 2016). Vliv na vodní bezobratlé byl zkoumán na druhu hrotnatka velká (*Daphnia magna*).

Zkoumán byl vliv tramadolu na procento přežití, délku těla F1 generace a počet mláďat na samici, všechny aspekty byly tramadolem ovlivněny negativně (Le et al., 2011).

4. Materiál a metody

Experimentální část práce byla provedena v průběhu prosince 2016 v prostorách České zemědělské univerzity v Praze. Samotnému experimentu předcházela příprava a po zakončení experimentu následovalo zpracování získaných vzorků a zpracování dat. V rámci přípravy byly nachystány nezbytné pomůcky, vybavení, přístroje a stanoven postup práce v přehledných bodech:

Seznam pomůcek a přístrojů:

- 14 skleněných nádob o objemu 50ml
- 14 kusů Al fólie o rozměrech 15 x 15 cm
- filtrační papír o rozměru 50 x 30 cm
- dva plastové kanystry o objemu 20 l
- plastové pipety o objemu 5 ml
- 32 ks injekčních stříkaček o objemu 5 ml
- 32 ks biologických filtrů na stříkačky
- 32 ks skleněných vrorkovacích lahviček
- roztok tramadolu o koncentraci 1µg/l
- odstátá kohoutková voda
- 5 dospělých jedinců škeble říční (*Anodonta anatina*)
- zdravotnická jehla - růžová
- injekční stříkačka o objemu 10 ml
- plastová nádoba o objemu 350 ml
- svorka na otevírání lastur
- sonda na měření konduktivity, teploty, pH a tvrdosti vody
- mikroskop s možností nahrávání videí + PC + HDD
- pipeta + násada
- NaCl
- 56 ks petriho misek
- 56 ks filtračních víček

- trychtýřovitá láhev
- 35 ks plastových nádrží o objemu 5 l, s víčkem a vzduchováním
- 14 ks juvenilních jedinců ryby druhu jelec tloušť (*Leuciscus cephalus*) dlouhodobě vystavených tramadolu
- 14 ks juvenilních jedinců ryby druhu jelec tloušť (*Leuciscus cephalus*) nevystavených tramadolu
- stopky
- 2 ks nádob na vodu o objemu 50 l
- počítací Petriho miska
- střička
- anestetikum pro ryby
- sáčky
- popisovací fixa

4.1 Příprava skleněných nádob pro glochidia

Prvním krokem experimentu bylo namíchání roztoku tramadolu o koncentraci 1µg/l. K tomu bylo využito 190 ml roztkoku tramadolu o koncentraci 10,7 mg/l přidaného do plastového kanystru s 2000 ml odstáté kohoutkové vody. Tento kanystr byl označen popisovací fixou symbolem T (T = tramadol). Druhý plastový kanystr byl označen symbolem C (C = control) a naplněn 2000 ml odstáté kohoutkové vody. Poté byly na filtrační papír rozmístěny skleněné nádoby o objemu 50 ml tak, aby vytvořily dvě skupiny po 7 kusech. Každá nádoba byla označena popisovacím fixem kódem CG1 - CG7 pro skupinu nádob s kontrolními glochidii, nebo TG1 - TG7 pro skupinu nádob s glochidii vystavenými tramadolu. Poté byly nádoby skupiny CG naplněny 30 ml odstáté kohoutkové vody a nádoby skupiny TG byly naplněny 30 ml roztoku tramadolu o koncentraci 1µg/l. Bezprostředně po naplnění byly nádoby uzavřeny alobalovou fólií. Pak byly odebrány kontrolní vzorky z obsahů čtyř nádob ze skupiny CG a čtyř nádob ze skupiny TG. Pomocí 5 ml injekčních stříkaček byl odebrán vzorek a přes biologický filtr aplikován do skleněných vzorkovacích lahviček, označených dle odebíraných nádob CG1 - CG4 S (S = start), nebo TG1 - TG4 S (S = start). Lahvičky byly uzavřeny víčkem, uloženy do sáčku a poté do mrazáku přítomného v laboratoři, před

doručením na rozbor specializovanou laboratoří. Průběžně byla měřena a zaznamenávána konduktivita, teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě pomocí speciální sondy.

4.2 Získání a umístění glochidií

Glochidia potřebná pro daný experiment byla získána z pěti mateřských jedinců vodního mlže škeble říční (*Anodonta anatina*). Mlži byli manuálně očištěni a jednomu po druhém byly pootevřeny jejich lastury pomocí svorky na otevírání lastur. Po otevření schránky mlže bylo nalezeno, odkryto a manuálně pomocí jehly perforováno marsupium. Poté byl proveden výplach marsupia pomocí jehly a 10 ml stříkačky naplněné odstátou kohoutkovou vodou. Proud vycházející z mlže obsahoval množství glochidií a byl zachycen do plastové nádoby.

Obr. č. 1 - svorka na otevírání lastur

Postup byl zopakován u všech jedinců stejným způsobem. Získaná glochidia byla otestována testem vitality: z každého odběru bylo 5 ml plastovou pipetou odděleno cca 20 ks glochidií. Ta byla umístěna na Petriho misku s malým množstvím vody a vložena pod

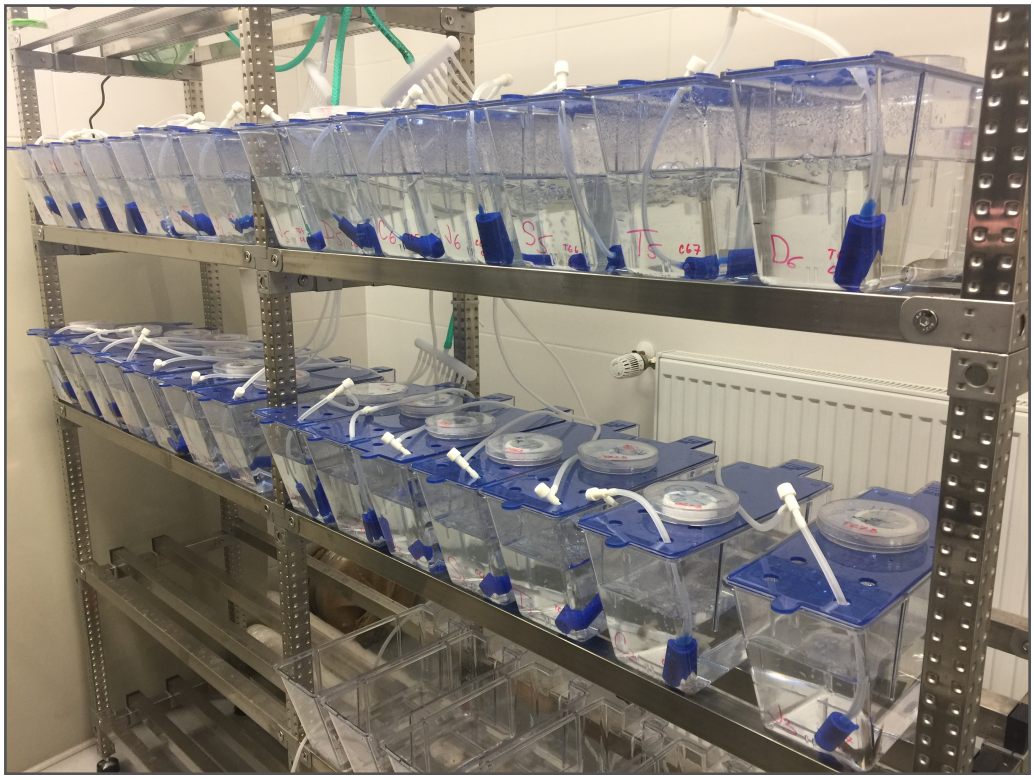
mikroskop. Do vody byly přidány 3-4 zrnka NaCl, který simuluje přítomnost hostitele. Glochidia by po kontaktu s NaCl měla sklapnout. V námi testovaných pěti skupinách o celkovém počtu 192 jedinců byl počet reagujících glochidií 191 ku 1 glochidiu, které se nezavřelo. Test prokázal velmi dobrou reaktivnost u všech pěti odebraných skupin. Glochidia od všech pěti dospělců byla smíchána do jedné skupiny, která byla aplikována do připravených skleněných nádrží pomocí plastové pipety. Dvě dávky o přibližně stejném množství jedinců do každé nádoby. Následovala 24 hodinová expozice.

Obr. č. 2 - otevřený jedinec s proděravěným marsupiem

4.3 Založení nádrží s rybami

Během trvání expozice glochidií tramadolu byly založeny nádrže pro ryby. Celkem 24 plastových nádrží o objemu 5 litrů bylo umyto, rozděleno do dvou skupin, aplikováno víčko a vzduchovací kamínek. Následovalo přidání 2 litrů odstáté kohoutkové vody, zprovoznění

vzduchotechniky a označení popisovací fixou dle skupin, symbol CG1CR - CG7CR pro nádrže s glochidii nevystavenými tramadolu a pro rybu nevystavenou tramadolu, CG1TR - CG7TR pro nádrže s glochidii nevystavenými tramadolu a pro rybu vystavenou tramadolu, TG1TR - TG7TR pro nádrže s glochidii vystavenými po dobu 24 hodin tramadolu a pro rybu vystavenou tramadolu a TG1CR - TG7CR pro nádrže s glochidii vystavenými po dobu 24 hodin tramadolu a pro rybu nevystavenou tramadolu. Nádrže byly umístěny na nerezovém stojanu ve dvou řadách po 14 nádržích. Pro minimalizování možného vlivu teploty na výsledek experimentu byly nádrže různých skupin mezi sebou na stojanech promíchány.



Obr. č. 3 - nádrže s rybami

4.4 Umístění ryb a glochidií do nádržek

Glochidia byla plastovou pipetou vyjmuta ze skleněných nádržek a přenesena na jemné sítko, to bylo vloženo do uzavíratelné Petriho misky označené stejným kódem jako původní skleněná nádržka. Opět byla speciální sondou změřena konduktivita, teplota, pH a saturace O2. Naměřená průměrná konduktivita byla 406,5 µS, průměrná teplota 22 °C,

průměrné pH 8,01 a průměrná saturace 8,26 mg/l. Naměřené hodnoty se nelišily mezi skupinami.

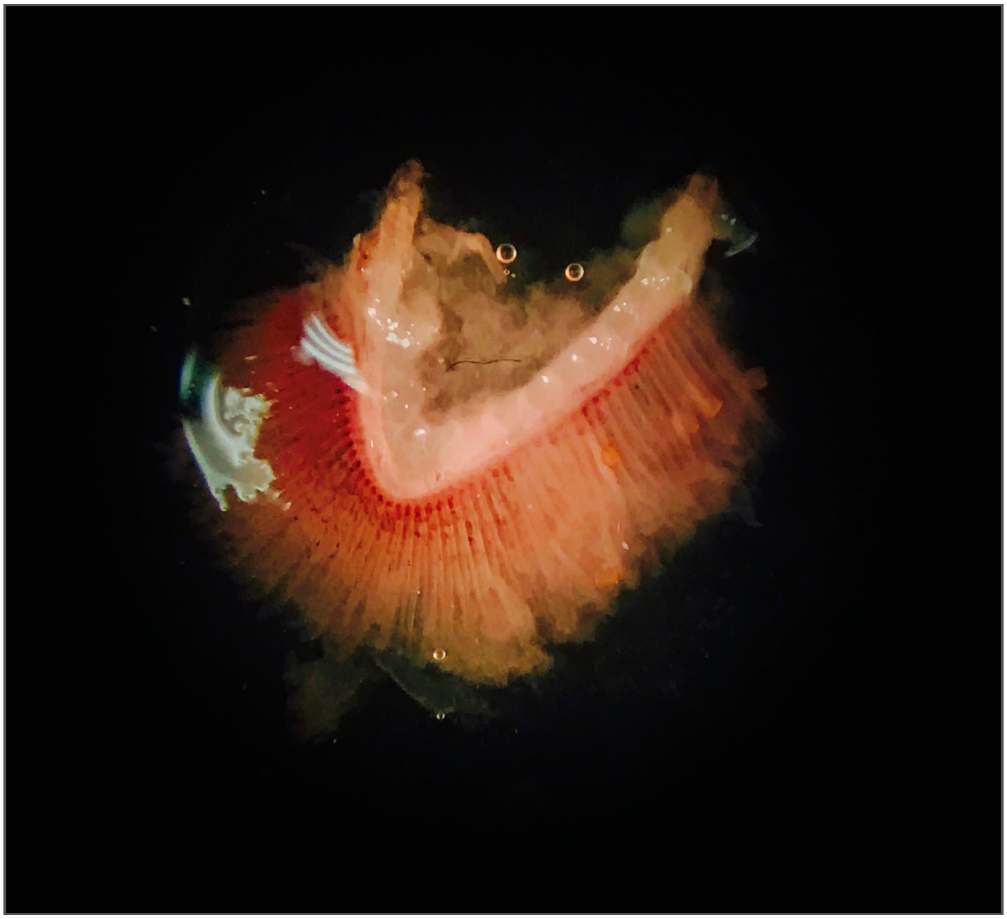
V dalším kroku byli do každé předem připravené plastové nádrže aplikováni juvenilní jedinci ryby druhu jelec tloušť (*Leuciscus cephalus*) dle skupin s rybou vystavenou či nevystavenou tramadolu. Průměrná hmotnost ryb byla 8,6 g (směrodatná odchylka 1,7) a průměrná délka byla 8,98 cm (směrodatná odchylka 0,77). Poté byla dle skupin přidána vystavená či nevystavená glochidia. Následně byla po dobu 15 minut manuálně vířena voda vytvářením proudu pomocí plastové pipety. Potom byly ryby přemístěny do jiné nádržky, voda z původní nádržky byla přefiltrována přes jemné sítko, které zachytilo nepřichycené glochidie k pozdějšímu spočítání. Nádržky byly opět naplněny vodou a ryby do nich byly vráceny. Následovala 24 hodinová expoziční doba během níž byla spočítána předčasně odpadlá glochidia, výsledky jsou uvedeny v tab. č. 1 (viz. kapitola 8. - Přílohy).

4.5 Ukončení experimentu s rybami

Po uplynutí 24 hodin byla každá ryba vylovena z nádržky, vložena do nádoby se směsí vody a anestetika, jehož vysoká koncentrace rybu usmrtila. Po usmrcení byla ryba vložena do plastového sáčku se stejným označením jako nádržka (CG1CR-CG7CR, TG1CR-TG7CR, CG1TR-CG7TR, TG1TR-TG7TR) a uskladněna v mrazáku k pozdějšímu vyhodnocení. Pomocí speciální sondy byla změřena průměrná teplota v nádržkách 18,7 °C, která se mezi skupinami nelišila. Voda z nádržky byla přelita přes jemné sítko a i se zachycenou hmotou uložena do uzavíratelné Petriho misky označené stejně jako nádržka k pozdějšímu vyhodnocení. Po dokončení všech nádržek následovalo vyhodnocení hmoty zachycené na sítcích. Vyhodnocoval se počet glochidií přítomných na víčku, u glochidií přichycených, ale odpadlých během 24 hodinové expozice včetně záznamu, zda byla zavřená, či otevřená. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2 (viz. kapitola 8 - Přílohy).

Následně bylo přikročeno k počítání glochidií zachycených na tělech ryb. Ryby byly prohlédnuty pod mikroskopem, nejprve ploutve v pořadí ocasní, hřbetní, řitní, břišní a hrudní, následovaly skřele z vnější i vnitřní strany, ústa a ústní okolí a závěrem zbylý povrch těla.
Po prohlédnutí povrchu těla byly odstraněny skřele, vypreparovány žaberní oblouky,

separovány na jednotlivé oblouky a též prohlédnuty. Výsledky počítání jsou uvedeny v tabulce 3a, 3b, 3c a 3d (viz. kapitola 8 - Přílohy).



Obr. č. 4 - žaberní oblouk s přichycenými glochidii

Tímto skončila praktická část experimentu a bylo přikročeno ke zpracování nasbíraných dat. Statistické hodnocení dat bylo provedeno pomocí programu Statistica for Windows 7.1 (Statistica 7.1, 2006).

5. Výsledky

5. 1 - Rozdíl v četnosti přichytávání mezi CG a TG

Vlastnost potenciálně ovlivnitelná tramadolem je schopnost larev přichytit se k rybímu hostiteli. V praktické části experimentu byla tato schopnost experimentálně prověřena (viz. kapitola 5. Materiál a metody, podkapitola 4. 5 - Ukončení experimentu s rybami) a výsledné množství přichycených jedinců je uvedeno v tabulkách 3a, 3b, 3c a 3d (viz. kapitola 8 - Přílohy).

Takto získaná data byla testována v programu Statistica (Statistica 7.1, 2006). Jako nulová a alternativní hypotéza bylo stanoveno:

H0: Rozdíl v četnosti přichycení mezi larvami vystavenými a nevystavenými tramadolu neexistuje.

HA: Rozdíl v četnosti přichycení mezi larvami vystavenými a nevystavenými tramadolu existuje.

Hypotéza byla ověřena analýzou rozptylu. Test byl proveden s 5% hladinou významnosti. Předpokladem pro provedení analýzy rozptylu je test pro normální rozložení dat ve skupinách a shoda rozptylů. Ověření předpokladu normality bylo provedeno Shapiro-Wilkovým testem s následujícími výsledky:

Glochidia: CG/CR Počet larev: SW-W = 0,8833; **p = 0,2414**
Glochidia: CG/TR Počet larev: SW-W = 0,8919; **p = 0,2849**
Glochidia: TG/CR Počet larev: SW-W = 0,9095; **p = 0,3925**
Glochidia: TG/TR Počet larev: SW-W = 0,9566; **p = 0,7893**

P-hodnoty testů normality byly pro všechny výběry vyšší než zvolená hladina významnosti 0,05, výběr tedy pochází z normálního rozložení. Ověření předpokladu shody rozptylů bylo provedeno Levenovým testem.

	Leveneův test homogenity rozpylů Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000							
Proměnná	SČ efekt	SV efekt	PČ efekt	SČ chyba	SV chyba	PČ chyba	F	p
Počet larev	778,89	3	259,63	3828,28	24	159,51	1,628	**0,209**

Obr. č. 5 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - Levenův test

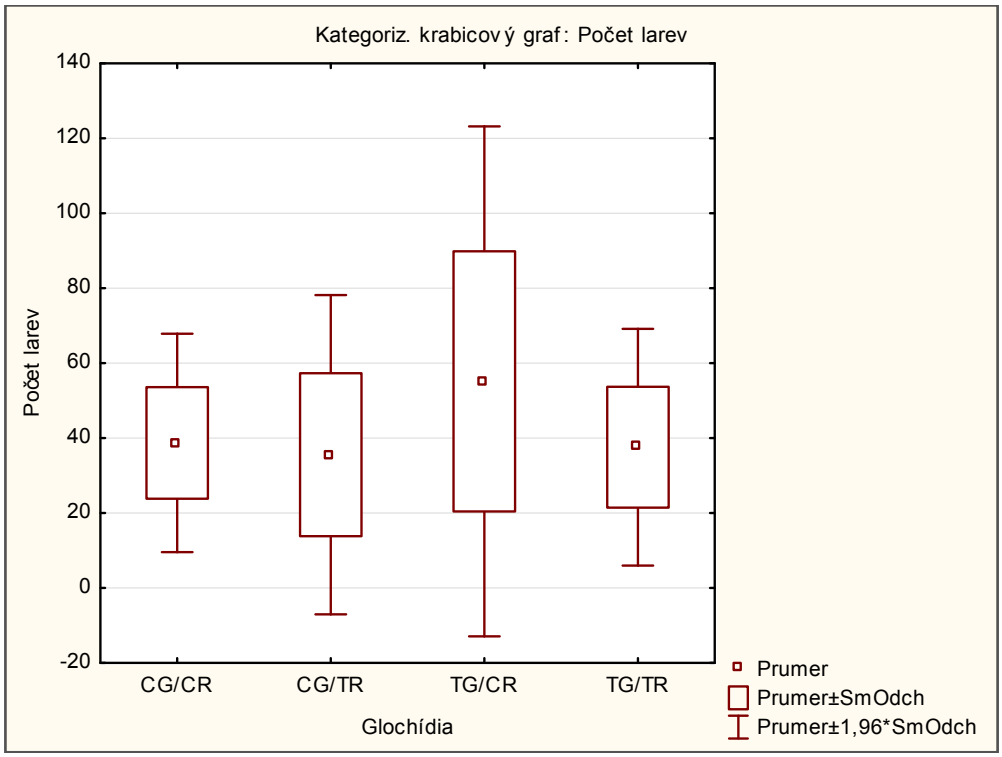
P-hodnota Levenova testu byla vyšší, než zvolená hladina významnosti 0,05, předpoklad shody rozptylů byl tedy splněn. Konečně mohlo být přikročeno k samotné analýze rozptylů.

	Analýza rozptylu Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000							
Proměnná	SČ efekt	SV efekt	PČ efekt	SČ chyba	SV chyba	PČ chyba	F	p
Počet larev	1709,54	3	569,85	12953,71	24	539,74	1,056	**0,386**

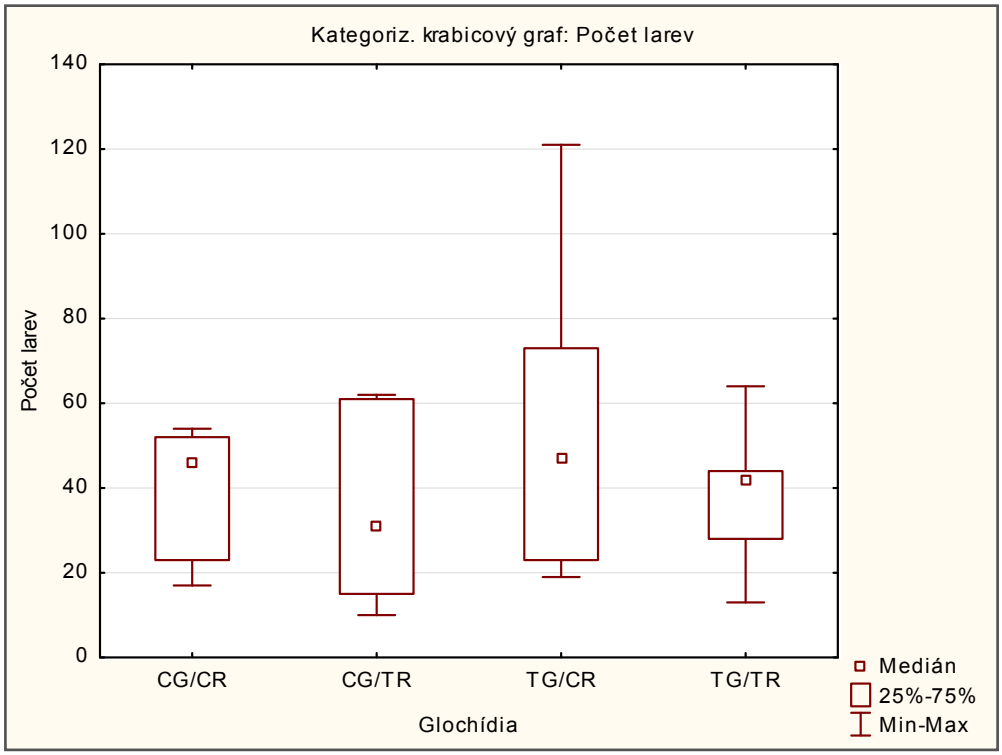
Obr. č. 6 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - analýza rozptylu

P-hodnota analýzy rozptylu byla vyšší než zvolená hladina významnosti 0,05. Nulovou hypotézu o nerozdílu četnosti přichycení mezi larvami vystavenými a nevystavenými tramadolu nezamítáme. Nepodařilo se nám prokázat, že vystavení tromadolu nemá vliv na četnost přichycení.

Četnosti přichycených glochidií lze pro větší obraznost znázornit i graficky. Obr. č. 7 a 8 znázorňují všechny čtyři skupiny (tedy glochidia nevystavená tramadolu na rybách nevystavených tramadolu - CG/CR, glochidia nevystavená tramadolu na rybách vystavených tramadolu - CR/TR, glochidia vystavená tramadolu na rybách nevystavených tramadolu - TG/CR a glochidia vystavená tramadolu na rybách vystavených tramadolu - TG/TR) a graficky znázorněné počty přichycených glochidií těchto skupin.



Obr. č. 7 - krabicový graf zobrazující grafické znázornění četností přichycených glochidií mezi skupinami CGCR, CGTR, TGCR a TGTR



Obr. č. 8 - rabicový graf zobrazující grafické znázornění četností přichycených glochidií mezi skupinami CGCR, CGTR, TGCR a TGTR

5. 2 - Rozdíl procenta přichycených glochidií

Jako další bylo statisticky testováno množství přichycených glochidií, která se na rybím hodstiteli udržela během 24 hodinové expozice, ku glochidiím celkově přichyceným, ale odpadlým během 24 hodinové expozice, vyjádřené v procentech. Pro výpočet těchto hodnot byly použity výsledky počítání přichycených a odpadlých glochidií získané při praktické části experimentu, ze kterých byl vypočten procentuální podíl přichycených glochidií po 24 hodinové expozici z celkem přichycených. Přehled počtu přichycených, odpadlých a původně přichycených glochidií a procento přichycených z původně přichycených a procento odpadlých z celkem aplikovaných je uveden v tabulce 4 (viz. kapitola 8 - Přílohy).

Takto získaná data byla testována v programu Statistica (Statistica 7.1, 2006). Nejprve byly porovnány dvě základní skupiny glochidií vystavených a nevystavených tramadolu (CG, TG), potom čtyři dílčí skupiny glochidií nevystavených tramadolu na rybách nevystavených tramadolu (CGCR), glochidií nevystavených tramadolu na rybách vystavených tramadolu (CGTR), glochidií vystavených tramadolu na rybách nevystavených tramadolu (TGCR) a glochidií vystavených tramadolu na rybách vystavených tramadolu (TGTR).

5.2.1 - Porovnání skupin CG a TG

Nejprve byly testovány dvě základní skupiny, tedy CG - glochidia vystavená tramadolu a TG - glochidia nevystavená tramadolu. Jako nulová a alternativní hypotéza bylo stanoveno:

H0 = rozdíl mezi procentem přichycených z původně přichycených glochidií mezi glochidii vystavenými a nevystavenými tramadolu neexistuje.

HA = rozdíl mezi procentem přichycených z původně přichycených glochidií mezi glochidii vystavenými a nevystavenými tramadolu existuje.

Test byl proveden s 5% hladinou významnosti. Hypotéza byla ověřena T-testem s následujícími výsledky:

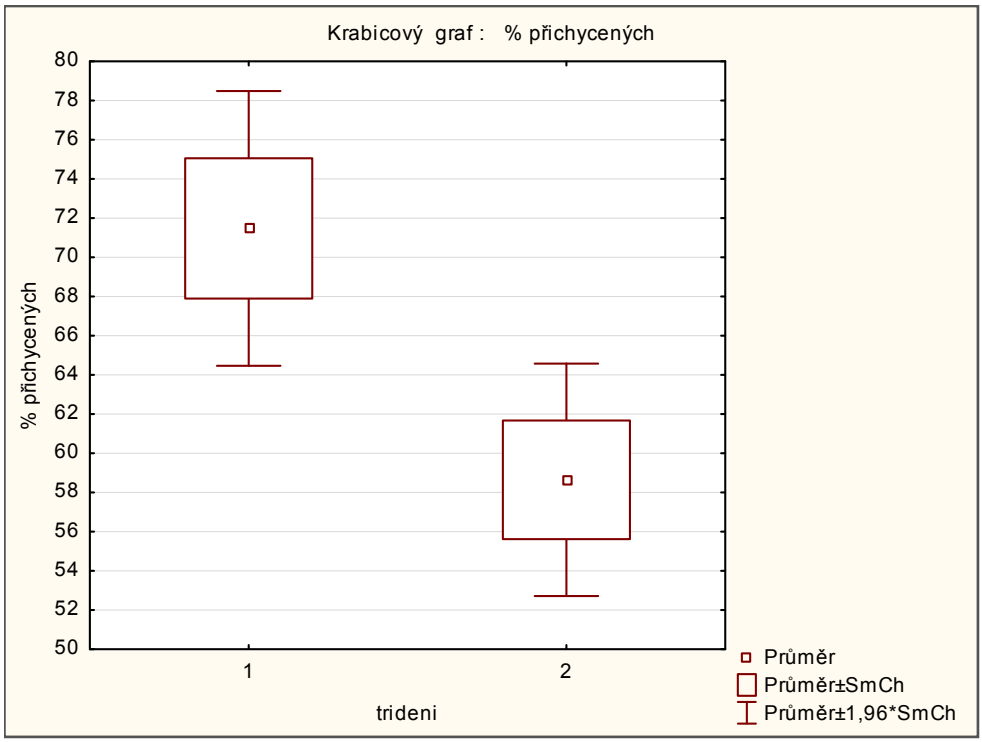
t-testy; grupováno: trideni (Tabulky pro print screenEXCEL)
Skup. 1: 1
Skup. 2: 2

Proměnná	Průměr 1	Průměr 2	t	sv	p	Poč.plat 1	Poč.plat. 2	Sm.odch. 1	Sm.odch. 2	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
% přichycených	71,47608	58,64606	2,738120	26	0,011003	14	14	13,38653	11,32176	1,398003	0,554408

Obr. č. 9 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - T-test

P-hodnota pro rozptyly je větší, než zvolená hladina významnosti 0,05, předpoklad shody rozptylů je tedy splněn.

P-hodnota T-testu je nižší, než zvolená hladina významnosti 0,05, nulovou hypotézu o nerozdílu mezi procentem přichycených z původně přichycených glochidií mezi glochidii vystavenými a nevystavenými tramadolu zamítáme. Nezamítáme tedy alternativní hypotézu, která říká, že existuje statisticky významný rozdíl mezi procentem přichycených glochidií z původně přichycených mezi skupinami vystavenými a nevystavenými tramadolu.



Obr. č. 10 - krabicový graf znázorňující počty přichycených glochidií z původně přichycených pro skupiny CG a TG

5.2.2 - Porovnání skupin CGCR, CGTR, TGCR a TGTR

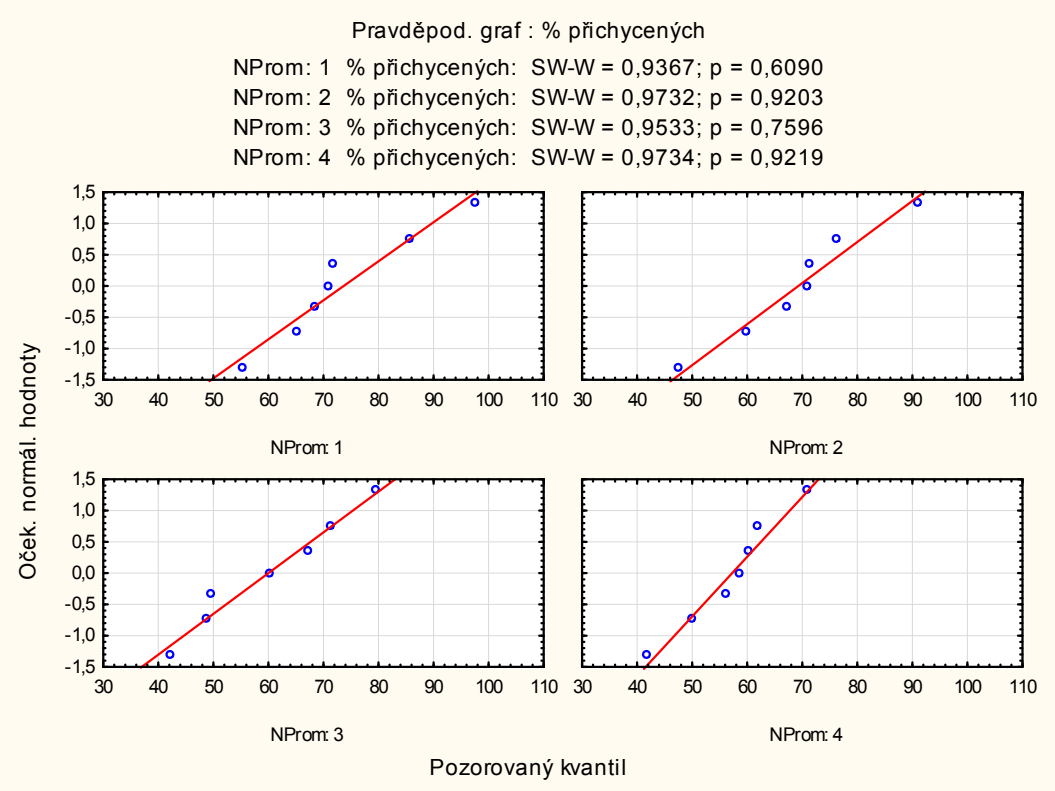
Jako další byl statisticky vyhodnocen procentuální zastoupení přichycených glochidií z původně přichycených u skupin glochidií nevystavených tramadolu s rybami nevystavenými tramadolu (CGCR), glochidií nevystavených tramadolu s rybami vystavenými tramadolu (CGTR), glochidií vystavených tramadolu s rybami nevystavenými tramadolu (TGCR) a glochidií vystavených tramadolu s rybami vystavenými tramadolu (TGTR). Jako nulová a alternativní hypotéza bylo stanoveno:

H0: Rozdíl mezi procentem přichycených z původně přichycených glochidií mezi glochidii nevystavenými tramadolu na rybách nevystavených tramadolu (CGCR), glochidii nevystavenými tramadolu na rybách vystavených tramadolu (CGTR), glochidii vystavenými tramadolu na rybách nevystavených tramadolu (TGCR) a glochidii vystavenými tramadolu na rybách vystavených tramadolu (TGTR) neexistuje.

HA: Rozdíl mezi procentem přichycených z původně přichycených glochidií mezi glochidii nevystavenými tramadolu na rybách nevystavených tramadolu (CGCR), glochidii nevystavenými tramadolu na rybách vystavených tramadolu (CGTR), glochidii vystavenými tramadolu na rybách nevystavených tramadolu (TGCR) a glochidii vystavenými tramadolu na rybách vystavených tramadolu (TGTR) existuje.

Hypotézu ověříme analýzou rozptylu. Test provedeme na 5% hladině významnosti. Předpokladem pro test je normální rozložení dat ve skupinách a shoda rozptylů.

Ověření předpokladu normality Shapiro-Wilkovým testem:



Obr.č. 11 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - Shapiro-Wilkův test

P-hodnoty testů normality jsou pro všechny výběry vyšší než zvolená hladina významnosti 0,05. Nulovou hypotézu o normalitě dat nezamítáme. Výběry pochází z normálního rozložení.

Ověření předpokladu shody rozptylů Levenovým testem:

Leveneův test homogenity rozpylů (Tabulky pro print screenEXCEL)
Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000

Proměnná	SČ efekt	SV efekt	PČ efekt	SČ chyba	SV chyba	PČ chyba	F	p
% přichycených	79,57019	3	26,52340	1345,451	24	56,06044	0,473121	0,703876

Obr. č. 12 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - Levenův test

P-hodnota Levenova testu je vyšší než zvolená hladina významnosti 0,05. Nulovou hypotézu o shodě rozptylů nezamítáme. Předpoklad shody rozptylů je splněn. Může být přikročeno k analýze rozptylu.

Analýza rozptylu:

Proměnná	Analýza rozptylu (Tabulky pro print screenEXCEL) Označ. efekty jsou význ. na hlad. p < ,05000 **SČ efekt**	SV efekt	PČ efekt	SČ chyba	SV chyba	PČ chyba	F	p
% přichycených	1245,506	3	415,1688	3902,718	24	162,6133	2,553106	0,079235

Obr. č. 13 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - analýza rozptylu

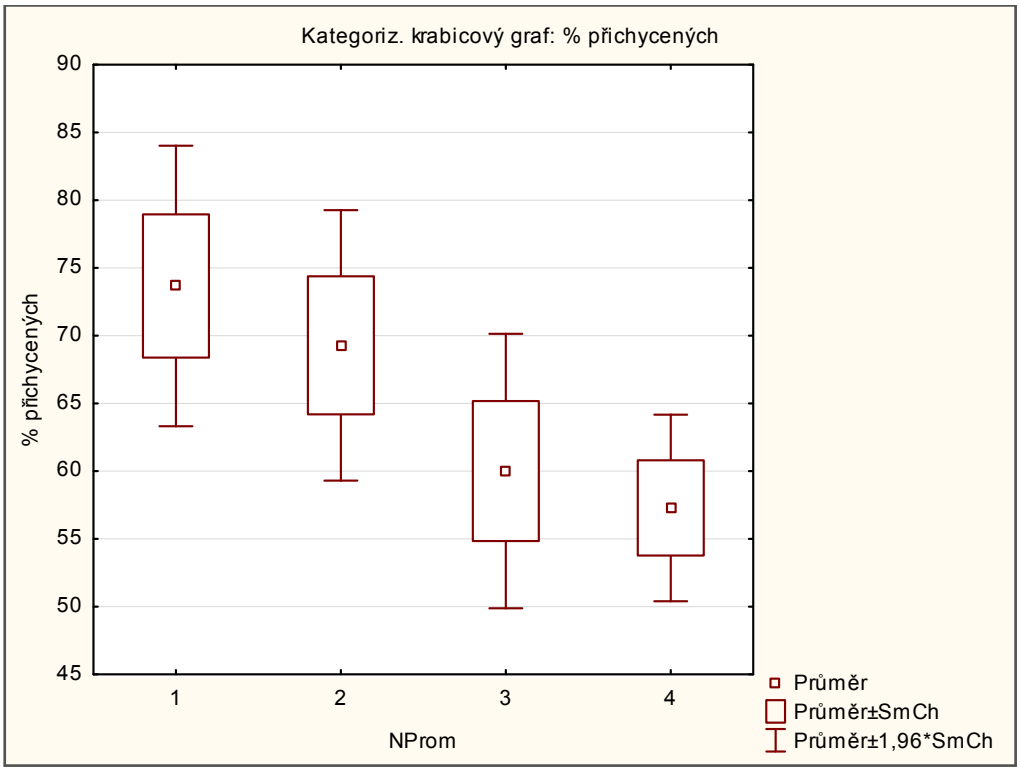
P-hodnota analýzy rozptylu je vyšší než zvolená hladina významnosti 0,05. Nulovou hypotézu o nerozdílu mezi procentem přichycených z celkem aplikovaných glochidií mezi glochidii nevystavenými tramadolu na rybách nevystavených tramadolu, glochidii nevystavenými tramadolu na rybách vystavených tramadolu, glochidii vystavenými tramadolu na rybách nevystavených tramadolu a glochidii vystavenými tramadolu na rybách vystavených tramadolu nezamítáme.

Porovnání skupin CGCR, CGTR, TGCR a TGTR bylo provedeno i pomocí Scheffeho testu, který porovná skupiny mezi sebou po dvojicích a určí, mezi kterými skupinami existuje statisticky významný rozdíl. Test ukázal následující výsledky:

NProm		Scheffeho test; proměn.:% přichycených (Tabulky pro print screenEXCEL) Označ. rozdíly jsou významné na hlad. p < ,05000 **{1} M=73,668**	{2} M=69,284	{3} M=60,008	{4} M=57,284
1	**{1}**		0,936383	0,285213	0,152339
2	{2}	0,936383		0,610528	0,395652
3	{3}	0,285213	0,610528		0,983415
4	{4}	0,152339	0,395652	0,983415	

Obr. č. 14 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - Scheffeho test

Byla stanovena následující označení: proměnná (1) pro CGCR, proměnná (2) pro CGTR, proměnná (3) pro TGCR a proměnná (4) pro TGTR. P-hodnoty všech skupin jsou vyšší, než zvolená hladina významnosti 0,05, Scheffeho test tedy neprokázal statisticky významný rozdíl mezi žádnými dvěma skupinami.



Obr. č. 15 - krabicový graf znázorňující poměr přichycených glochidií z původně přichycených mezi danými skupinami. Proměnná (1) pro CGCR, proměnná (2) pro CGTR, proměnná (3) pro TGCR a proměnná (4) pro TGTR

6. Diskuze

Smyslem práce bylo dokázat nebo vyvrátit možnost využití behaviorálních charakteristik mlžů jako efektivního nástroje identifikace vlivu specifických polutantů na vodní prostředí. Literární analýza ukázala, že vodní bezobratlí reagují různými způsoby na přítomnost znečišťujících látek ve vodním prostředí a teoreticky by tedy mohla být tato hypotéza experimentálně potvrzena a později i využita v praxi. Mezi pozorované behaviorální změny po vystavení antidepresivům patří změny lokomočního chování po vystavení vlivu fluoxetinu (Moreno-González et al., 2016; Fong et al. 2014), narušení schopnosti přilnout k povrchu po vystavení citalopramu (Fong et Hoy, 2012), nebo imobilizace, úmrtí a embryotoxicita při vystavení setralinu (Estévez-Calvar et al., 2016).

Pro experiment provedený pro tuto práci byly jako modelové organismy vybrány paraziticky žijící larvy vodního mlže škeble říční (*Anodonta anatina*), jako modelový rybí hostitel juvenilní jedinci ryby jelec tloušť (*Leuciscus cephalus*) a jako modelová látka tramadol ze skupiny opioidních analgetik o koncentraci 1 μg/l.

První testovanou vlastností byl počet glochidií schopných přichytit a udržet se na rybím hostiteli po 24 hodinové expozici. Přichycená i odpadlá gloochidia se po uplynutí dané expoziční doby spočítala pod mikroskopem a výsledné počty byly statisticky vyhodnoceny.

Nejprve bylo zjištěno, zda existuje statisticky významný rozdíl v celkovém počtu přichycených glochidií k rybímu hostiteli po 24 hodin po infikaci ve standardizovaných laboratorních podmínkách mezi skupinami glochidií vystavených a nevystavených tramadolu. Použit byl test analýzy rozptylu. Statisticky významný rozdíl se zde neprokázal. Zkreslujícím faktorem mohly být nestejné počty glochidií mezi skupinami. Vliv antidepresiv na larvy, tentokrát mořského plže *Ilyanassa obsoleta,* zkoumal i Couper, J. M. et Leise, E. M. (1996). Vystavili larvy účinku serotoninu, který u vystavených larev spouštěl metamorfózu. Jako účinným spouštěčem metamorfózy se ukázal i fluoxetin.

Dalšímu testování byly podrobeny opět počty glochidií přichycených k rybímu hostiteli, ovšem aby byl eliminován možný negativní vliv nestejného množství glochidií v jednotlivých skupinách, bylo určeno, kolik procent tvoří úspěšně parazitující glochidia z původně přichycených glochidií. Nejprve bylo hodnoceno, zda existuje rozdíl v procentu

přichycených glochidií z původně přichycených glochidií mezi skupinami glochidií vystavenými a nevystavenými tramadolu. Použit byl T-test, který potvrdil, že existuje statisticky významný rozdíl v procentu přichycených glochidií z počtu původně přichycených glochidií mezi skupinami glochidií vystavených a nevystavených tramadolu. Podobný závěr lze vyvodit i z vystavěného krabicového grafu. Dalším potvrzeným vlivem antidepresiv na mlže je regulace ciliární aktivity žaber vlivem serotoninu, pozorovaná u některých druhů měkkýšů (Aiello, 1970; Saimi et al, 1983). U larev (veliger) *Mytilus edulis* byla pozorována inhibice ciliárního pohybu žaber a snížené projevy potravního chování po vystavení dopaminu (Beiras et Widdows, 1995).

Dále bylo testováno, zda existuje statisticky významný rozdíl mezi procentem přichycených glochidií z celkem aplikovaných glochidií mezi skupinami CGCR (glochidia nevystavená tramadolu na rybě nevystavené tramadolu), CGTR (glochidia nevystavená tramadolu na rybě vystavené tramadolu), TGCR (glochidia vystavená tramadolu na rybě nevystavené tramadolu) a TGTR (glochidia vystavená tramadolu na rybě vystavené tramadolu). Hodnoty byly testovány pomocí analýzy rozptylu. Statisticky významný rozdíl mezi testovanými skupinami nebyl zjištěn. Za předpokladu, že tramadol negativně ovlivňuje vitální funkce jemu vystaveným živočichům (Le et al., 2011) se dá předpokládat, že naruší schopnost glochidií přichytávat se k rybímu hostiteli a naruší schopnost rybího hostitele se parazitům bránit. Proto bylo předpokládáno, že největší možný rozdíl v procentu přichycených glochidií z celkem aplikovaných bude mezi skupinami s glochidii nevystavenými tramadolu na rybách vystavených tramadolu (CGTR, nevystavené glochidie se budou lépe přichytávat a vystavený rybí hostitel se bude hůře bránit) a glochidii vystavenými tramadolu na rybách nevystavených tramadolu (TGCR, vystavené glochidie se budou hůře přichytávat a nevystavený rybí hostitel se bude lépe bránit). Teoreticky by se tedy jednalo o porovnání skupiny s nejvyšším procentem přichycených larev z původně přichycených se skupinou s nejnižším procentem přichycených larev z původně přichycených. Pro vyhodnocení byl použit Scheffeho test, který porovná všechny zadané skupiny po dvojicích. Nebyl však nalezen statisticky významný rozdíl mezi danými skupinami. Grafické znázornění pomocí krabicového grafu ovšem ukazuje bodové rozdíly mezi skupinami, absence signifikantních rozdílů mohla být způsobena nedostatečnou sílou testu v důsledku menšího množství vzorků. U obou testů porovnávajících čtyři různé

kategorie, analýzy rozptylu i Scheffeho testu, se tedy neprokázalo, že existuje statisticky významný rozdíl mezi schopností glochidia přichytit se k rybímu hostiteli, bez ohledu na to, zda bylo glochidium nebo rybí hostitel vystaveno účinku tramadolu. Pro analýzu datového souboru by však bylo vhodné využít i další, více citlivé statistické metody (např. zobecněný lineární model), které by zohlednily konkrétní vliv obou faktorů a jejich interakce. Takové vyhodnocení však nebylo předmětem této diplomové práce.

Bez ohledu na výsledky statistického testování musí být v každé práci provádějící experiment s biologickými systémy přihlédnuto k možnosti mnoha vlivů, které mohou ovlivňovat chování pokusných organismů. Mezi možné faktory, které mohly ovlivnit projevy hostitelsko-parazitického vztahu v této práci zkoumaných živočichů, mohlo být umělé získání glochidií z mateřských jedinců bez možnosti nechat mateřského jedince vypustit glochidia ve vhodný okamžik. Tento postup je však využíván již po celá desetiletí a je považován za standardní způsob získávání glochidií (Dodd et al., 2006). Dále vystavení rybích hostitelů stresu mohlo změnit jejich odpověď na napadení parazitem a mohlo dojít k ovlivnění výsledků vlivu tramadolu na tuto schopnost, ovšem napadení ryby parazitem přirozeně doprovází stresová reakce (Douda et al., 2016), která může vést až k úhynu, zvláště u mladého plůdku (Cusack a Cone, 1986). Vystavení glochidií tramadolu po dobu 24 hodin mohlo být nedostatečné, v případě výskytu tramadolu v ekosystému může docházet k delší expozici a tím i pozměněným reakcím živočichů. Glochidia vypuzená z mateřského jedince jsou však životná 48-72 hodin (Araujo et al., 2015), proto by museli být v případě nutnosti delší expozice být exponováni již mateřští jedinci. Navíc v přírodě látky rozpuštěné ve vodě značně kolísají (Liscio et al., 2009). I výběr experimentálního rybího hostitele může ovlivnit výsledky přichytávání glochidií. Dle Bauera a Vogela (1987) se glochidia můžou přichytit i na netradičního hostitele, z něhož ovšem odpadávají před dokončením metamorfózy. Jelec tloušť je ovšem dobrý hostitel pro durh *A. anatina* (Douda et al. 2013).

Na všechny tyto biologické faktory je třeba brát při podobných experimentech zřetel a při případném opakování tohoto či podobného experimentu se je snažit zohlednit. V případě opakování podobného experimentu je na základě poznatků této práce doporučeno větší množství pokusných živočichů a provést více opakování experimentu. Pro praktické využití zjištěných faktů je třeba zjistit mnoho dalších údajů, například na jakou minimální a maximální koncentraci tramadolu larvy reagují, jaký rybí hostitel je vhodný, larvy jakých

dalších vodních mlžů lze využít, jak dlouhá je vhodná expoziční doba, jak měření ovlivní roční doba a teplota a další.

Výsledkem této práce je tedy poznání, že za určitých okolností lze využít behaviorálních změn larválního stádia škeble říční (*Anodonta anatina*) pro detekci tramadolu ve vodním prostředí.

7. Závěr

Teoretická část práce sesbírala poznatky o využitelnosti vodních bezobratlých, zejména vodních měkkýšů, jako bioindikátorů psychicky aktivních látek ve vodním prostředí. Uvedené práce uvádějí, že přirozené chování těchto živočichů je výskytem daných látek ovlivněno. Těchto změn by mohlo být využito jako ukazatelů na přítomnost daných látek ve vodním prostředí. Vyvrácení či potvrzení této domněnky bylo náplní experimentální části práce.

Experimentální část práce prokázala rozdíl v poměru procenta přichycených glochidií na rybím hostiteli z celkového počtu aplikovaných glochidií mezi glochidii vystavenými a nevystavenými tramadolu. Rozdíl v přichytávání na rybího hostitele vystaveného či nevystaveného tramadolu se neprokázal.

Získaných poznatků lze za určitých okolností využít pro praktické detekování tramadolu, popřípadě i dalších látek, ve vodním prostředí. Popřípadě je brát jako varování o ovlivňování necílových organismů ve vodním prostředí. Experiment prokázal možnost využitelnosti behaviorálních změn měkkýšů jako indikačních ukazatelů pro detekci určitých látek ve vodě, před použitím v praxi je však třeba ještě dalšího, rozšiřujícího výzkumu.

8. Seznam literatury

Aiello, E. 1970. Nervous and chemical stimulation of gill cilia in bivalve mollusks. Physiological Zoology. 43. 60-70.

Allen, D. C., Vaughn, C. C. 2009. Burrowing behavior of freshwater mussels in experimentally manipulated communities. Journal of the North American Benthological Society. 28. 93-100.

Araujo, R., Feo, C., Pou, Q., Campos, M. 2015. Conservation of two endangered European freshwater mussels (Bivalvia, Unionidae): A three-year, semi-natural breeding experiment. Nautilus. 129 (3). 126-135.

Azzouz, A., Ballesteros, E. 2013. Influence of seasonal climate differences on the pharmaceutical, hormone and personal care product removal efficiency of a drinking water treatment plant. Chemosphere. 93 (9). 2046-2054.

Bauer G., Vogel C. 1987. The parasitic stage of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) I. Host response to Glochidiosis. *Archiv für Hydrobiologi*e. 76 (4). 393–402.

Beiras, R., Widdows, J. 1995. Effect of the neurotransmitters dopamine, serotonin and norepinephrine on the ciliary activity of mussel (*Mytilus edulis*) larvae. Marine Biology. 122. 597–603.

Beran, L. 1998. Vodní měkkýši ČR. Metodika ČSOP. Vlašim. p. 113. ISBN: 80-902469-69-4-X.

Bouček, J., Pidrman, V. 2005. Psychofarmaka v medicíně. Grada. Praha. p. 286. ISBN: 80-247-1136-2.

Brooks, B. W., Foran, C. M., Richards, S. M., Weston, J., Turner, P. K., Stanley, J. K., Solomon, K. R., Slattery, M., La Point, T. W. 2003. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. Toxicology letters. 142 (3). 169-183.

Burkina, V., Zlabek, V., Zamaratskaia, G. 2015. Effects of pharmaceuticals present in aquatic environment on Phase I metabolism in fish. Environmental toxicology and pharmacology. 40 (2). 430-444.

Češková, E. 2006. Možnosti farmakoterapie deprese. Praktické lékárenství. 6. 261-264.

Couper, J. M., Leise, E. M. 1996. Serotonin Injections Induce Metamorphosis in Larvae of the Gastropod Mollusc Ilyanassa obsoleta. The Biological Bulletin. 191 (2). 178-186.

Cusack R., Cone D. K. 1986. Gyrodactylus salmonis (Yin and Sproston, 1948) parasitizing fry of Salvelinus fontinalis (Mitchill). Journal of Wildlife Diseases. 22 (2). 209-213.

Daughton, C. G., Ternes, T. A. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? Environmental health perspectives. 107 (6). 907-938.

Dodd, B. J., Barnhart, M. Ch., Rogers-Lowery, C. L., Fobian, T. B., Dimock Jr., R. V. 2006. Persistence of host response against glochidia larvae in Micropterus salmoides. Fish & Shellfish immunology. 21 (5). 473-484.

Dogel, V. A. 1961. Zoologie bezobratlých. SPN. Praha. p. 597.

Douda, K., Lopes−Lima, M., Hinzmann, M., Machado, J., Varandas, S., Teixeira, A.,, Sousa, R. 2013. Biotic homogenization as a threat to native affiliate species: fish introductions dilute freshwater mussel's host resources. Diversity and Distributions. 19 (8). 933-942.

Douda, K., Martin, M., Glidewell, E., Barnhart, Ch. 2016. Stress-induced variation in host susceptibility to parasitic freshwater mussel larvae. Freshwater bivalves. 1-8.

Dušek, K., Večeřová-Procházková, A. 2015. Diagnostika a terapie duševních poruch. Grada. Praha. p. 648. ISBN: 978-80-247-4826-9.

Estévez-Calvar, N., Canesi, L., Montagna, M., Faimali, M., Piazza, V., Garaventa, F. 2016. Adverse effects of the SSRI antidepressant sertraline on early life stages of marine invertebrates. Marine Environmental Research. Non. Non.

Farris, J. L., Van Hassel, J. H. 2006. Freshwater Bivalve Ecotoxicology. CRC Press. Boca Raton. p. 408. ISBN: 1-4200-4284-X.

Farsimadan, S., Goudarzi, N. , Chamjangali, M. A., Bagherian, G. 2016. Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets by experimental design methodologies for determination of three anti-anxiety drugs in human serum and urine samples by high performance liquid chromatography. Microchemical journal. 128. 47-54.

Fong, P. P., Bury, T. B., Dworkin-Brodsky, A. D., Jasion, Ch. M., Kell, R. C. 2014. The antidepressants venlafaxine ("Effexor") and fluoxetine ("Prozac") produce different effects on locomotion in two species of marine snail, the oyster drill (*Urosalpinx cinerea*) and the starsnail (*Lithopoma americanum*). Marine Environmental Research. 103. 89–94.

Fong, P. P., Hoy, C. M. 2012. Antidepressants (venlafaxine and citalopram) cause foot detachment from the substrate in freshwater snails at environmentally relevant concentrations. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology. 45 (2). 145-153.

Fong, P. P., Molnar, N. 2012. Antidepressants cause foot detachment from substrate in five species of marine snail. Marine Environmental Research. 84. 24-30.

Glassman, A., Swenson, J. R., Van Zyl, L. T., Forman, L., Barton, D., Clary, C., Harrison, W. 2002. Sertraline treatment of major depression in patients with acute MI or unstable angina. The Journal of the American Medical Association. 288 (6). 701-709.

Guidi P., Frenzilli, G., Benedetti, M., Bernardeschi, M., Falleni, A., Fattorini, D., Regoli, F., Scarcelli, V., Nigro, M. 2010. Antioxidant, genotoxic and lysosomal biomarkers in the freshwater bivalve (Unio pictorum) transplanted in a metal polluted river basin. Aquatic toxicology. 100 (1). 75-83.

Halling-Sorensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Lutzhoft, H. CH., Jorgensen, S. E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review. Chemosphere. 36 (2). 357-394.

Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. Toxicology letters. 131 (1-2). 5-17.

Hignite, C., Azarnoff, D. L. 1977. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. Life Sciences. 20. 337–342.

Hill, M., Stabile, C., Steffen, K., Hill, A. 2002. Toxic effects of endocrine disrupters on freshwater sponges: common developmental abnormalities. Environmental Pollution. 117 (2). 295–300.

Hubera, S., Rembergerc, M., Kajc, L., Schlabachd, M., Jörundsdóttire, H. Ó., Vesterf, J., Arnórssong, M., Mortensenh, I., Schwartsoni, R., Damj, M. 2016. A first screening and risk assessment of pharmaceuticals and additives in personal care products in waste water, sludge, recipient water and sediment from Faroe Islands, Iceland and Greenland. Science of The Total Environment. 562. 13–25.

Janů, L., Racková, S. 2006. Nežádoucí a vedlejší účinky psychofarmak. Psychiatrie pro praxi. 6 (2). 64-65.

Jean, J., Perrodin, Y., Pivot, C., Trepo, D., Perraud, M., Droguet, J., Tissot-Guerraz, F.,

Locher, F. 2012. Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents. Journal of environmental management. 103. 113-121.

Jorgensen, S. E., Halling-Sorensen, B. 2000. Drugs in the environment. Chemosphere. 40 (7). 691-699.

Kolarević, S., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Slobodnik, J., Liška, I., Gačić, Z., Paunović, M., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. 2016. Assessment of the genotoxic potential along the Danube River by application of the comet assay on haemocytes of freshwater mussels: The Joint Danube Survey 3. Science of The Total Environment. 540. 377–385.

Lajeunesse, A., Gagnon, Ch., Gagne, F., Louis, S., Cejka, P., Sauve, S. 2011. Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment - Evidence of biological effects. Chemosphere. 83 (4). 564-571.

Lang, J., Pravda, O., Doskočil, J., Hůrka, K. 1971. Zoologie pro pedagogické fakulty: I. díl. SPN. Praha. p. 381.

Le, T. H., Lim, E. S., Lee, S. K., Park, J. S., Kim, Y. H., Min, J. 2011. Toxicity evaluation of verapamil and tramadol based on toxicity assay and expression patterns of Dhb, Vtg, Arnt, CYP4, and CYP314 in *Daphnia magna.* Environmental Toxicology. 26 (5). 515-523.

Lincová, D., Farghali, H. 2007. Základní a aplikovaná farmakologie. Galén. Praha. p. 672. ISBN: 8072621688.

Liscio, C., Magi, E., Di Carro, M., Suter, M. J. F., Vermeirssen, E. L. M. 2009. Combining passive samplers and biomonitors to evaluate endocrine disrupting compounds in a wastewater treatment plant by LC/MS/MS and bioassay analyses. Enviromental Pollution. 157 (10). 2716-2721.

Lorenz, S., Gabel, F., Dobra, N., Pusch, M. T. 2013. Modelling the effects of recreational boating on self-purification activity provided by bivalve mollusks in a lowland river. Freshwater Science. 32 (1). 82-93.

Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. 2004. Farmakologie a toxikologie. Grada. p. 725. ISBN: 80-247-0836-1

Mackuľak, T., Vojs, M., Grabic, R., Golovko, O., Vojs Staňová, A., Birošová, L., Medveďová, A., Híveš, J., Gál, M., Kromka, A., Hanusová, A. 2016. Occurrence of pharmaceuticals, illicit drugs, and resistant types of bacteria in hospital effluent and their effective degradation by boron-doped diamond electrodes. Monatshefte für Chemie. 147. 97-103.

Madsen, S. S., Skovbolling, S., Nielsen, C., Korsgaard, B. 2004. 17-b estradiol and 4-nonylphenol delay smolt development and downstream migration in Atlantic salmon, Salmo salar. Aquatic Toxicology. 68. 109–120.

McCarthy, A., Wafford, K., Shanks, E., Ligocki, M., Edgar, D. M., Dijk, D. J. 2016. REM sleep homeostasis in the absence of REM sleep: Effects of antidepressants. Neuropharmacology. 108. 415-425.

Minguez, L., Ballandonne, C., Rakotomalala, Ch., Dubreule, Ch., Kientz-Bouchart, V., Halm-Lemeille, M. P. 2015. Transgenerational Effects of Two Antidepressants (Sertraline and Venlafaxine) on *Daphnia magna* Life History Traits. Environmental Science & Technology. 49 (2). 1148–1155.

Mirossay, L., Mojžiš, J. 2009. Základná farmalológia a farmakoterapia. Equilibra. Košice. p. 533. ISBN: 978-80-89284-43-6.

Moreno-González, R., Rodríguez-Mozaz, S., Huerta, B., Barceló, D., León, V. M. 2016. Do pharmaceuticals bioaccumulate in marine molluscs and fish from a coastal lagoon? Environmental Research. 146. 282–298.

Papáček, M., Matěnová, V., Matěna, J., Soldán, T. 1994. Zoologie. Scientia. Praha. p. 286.

Pfleger, V. 1988. Měkkýši. Artia. Praha. p. 191.

Puckowski, A., Mioduszewska, K., Lukaszewicz, P., Borecka, M., Caban, M., Maszkowska, J., Stepnowski, P. 2016. Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 127. 232-255.

Raboch, J., Jirák, R., Paclt, I. 2007. Psychofarmakologie pro praxi. Triton. Praha. p. 172. ISBN: 978-80-7387-041-6

Ravera, O., Sprocati, A. R. 1997. Population dynamics, production, assimilation and respiration of two fresh water mussels: Unio mancus, Zhadin and Anodonta cygnea. Memoire dell´Istituto di Idrobiologia. 56. 113-130.

Reynolds, J. D., Debuse, V. J., Aldridge, D. C. 1997. Host Specialisation in an Unusual Symbiosis: European Bitterlings Spawning in Freshwater. Oikos. 78 (3). 539-545.

Richardson, M. L., Bowron, J. M. 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. Journal Pharmacy Pharmacology. 37. 1–12.

Rokyta, R. 2006. Bolest. Tigis. Praha. p. 684. ISBN 80-903750-0-6.

Saimi, Y., Murakami, A., Takahashi, K. 1983. Electrophysiological correlates of nervous control of ciliary arrest response in the gill epithelial cells of *Mytilus*. Comparative Biochemistry Physiology. 74 (A). 499–506.

Silva, L. J. G., Pereira, A. M. P. T., Meisel, L. M., Lino, C. M., Pena, A. 2015. Reviewing the serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. Environmental pollution. 197. 127-143.

Statistica version 7.1 (2006). Data analysis software system STATISTICA, StatSoft, Inc., <http://www.statsoft.com>.

Van Donk, E., Peacor, S., Grosser, K., De Senerpont Domis, L. N., Lürling, M. 2015. Pharmaceuticals May Disrupt Natural Chemical Information Flows and Species Interactions in Aquatic Systems: Ideas and Perspectives on a Hidden Global Change. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 238. 91-105.

Vaughn, C. C., Hakenkamp, C. C., 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. Freshwater Biology. 46. 1431–1446.

Vieno, N. M., Tuhkanen, T., Kronberg, L. 2005. Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. Environmental science & technology. 39 (21). 8220-8226.

Vukovic-Gacic, B., Kolarevic, V., Sunjog, K., Tomovic, J., Knezevic-Vukcevic, J., Paunovic, M., Gacic, Z. 2014. Comparative study of the genotoxic response of freshwater mussels Unio tumidus and Unio pictorum to environmental stress. Hydrobiologia. 735 (1). 221-231.

Zając, K., Zając T., Ćmiel, A. 2016. Spatial distribution and abundance of Unionidae mussels in a eutrophic floodplain lake. Limnologica. 58. 41-48.

9. Přílohy

	Počet nepřichycených		Počet nepřichycených
CG1CR	1002	**TG1CR**	828
CG2CR	337	**TG2CR**	1546
CG3CR	950	**TG3CR**	1058
CG4CR	722	**TG4CR**	1003
CG5CR	830	**TG5CR**	1014
CG6CR	576	**TG6CR**	954
CG7CR	1156	**TG7CR**	1180
CG1TR	1188	**TG1TR**	1068
CG2TR	860	**TG2TR**	904
CG3TR	604	**TG3TR**	1348
CG4TR	658	**TG4TR**	1216
CG5TR	804	**TG5TR**	732
CG6TR	808	**TG6TR**	972
CG7TR	590	**TG7TR**	1196

Tab. č. 1 - Počty glochidií, která se nedokázala zachytit na rybím hostiteli během 15 min expozice, během níž docházelo k víření vody

	Počet otevřených glochidií	Počet zavřených glochidií	Odpadených celkem
CG1CR	15	7	22
CG2CR	1	0	1
CG3CR	16	9	25
CG4CR	4	5	9
CG5CR	4	4	8
CG6CR	4	5	9
CG7CR	7	17	24
CG1TR	4	11	15
CG2TR	0	6	6
CG3TR	7	16	23
CG4TR	3	17	20
CG5TR	1	3	4
CG6TR	4	15	19
CG7TR	2	8	10
TG1CR	16	10	26
TG2CR	49	25	74
TG3CR	8	4	12
TG4CR	13	16	29
TG5CR	17	7	24
TG6CR	12	16	28
TG7CR	20	28	48
TG1TR	19	15	34
TG2TR	21	18	39
TG3TR	5	12	17
TG4TR	8	11	19
TG5TR	15	13	28
TG6TR	5	13	18
TG7TR	12	18	30

Tab. č. 2 - Počty glochidií zachycených během 15 min expozice a odpadených během následujících 24 hodin, včetně záznamu, zda byla nalezena otevřená či zavřená

	Váha	Délka	Ocasní ploutev	Hřbetní ploutev	Řitní ploutev	Pánevní ploutev levá	Pánevní ploutev pravá	Hrudní ploutev levá	Hrudní ploutev pravá	Nozdra levá
CG1CR	9,2	9,8	3	0	1	3	3	16	20	0
CG2CR	5	8,4	5	0	3	10	5	9	3	0
CG3CR	7,5	9,5	1	1	4	4	1	5	4	0
CG4CR	9,5	10,5	1	0	2	4	2	0	1	0
CG5CR	4,1	7,5	1	2	4	5	8	12	6	0
CG6CR	6,6	9	1	0	2	3	4	2	0	0
CG7CR	7,1	9,1	0	0	8	5	3	12	6	0
CG1TR	8,2	9,6	0	0	3	2	1	8	1	0
CG2TR	7,3	9	1	0	2	3	8	10	8	0
CG3TR	7,5	9,7	0	0	3	0	0	2	1	0
CG4TR	6,4	8,8	8	1	8	6	0	5	4	0
CG5TR	6,7	9	0	0	1	0	1	1	1	0
CG6TR	6,5	8,6	0	0	8	5	3	5	9	0
CG7TR	6,9	8,8	1	0	2	1	2	1	2	0

Tab. č. 3a - Počty glochidií nevystavených tramadolu úspěšně zachycených na rybách, včetně záznamu, na kterých částech těla byla nalezena a v jakém počtu

	Nozdra pravá	Skřele levá	Skřele pravá	Ústa	1. žaberní oblouk	2. žaberní oblouk	3. žaberní oblouk	4. žaberní oblouk	Žaberní dutina	Kůže
CG1CR	1	0	3	1	6	10	4	2	0	0
CG2CR	0	0	1	0	6	2	2	0	0	0
CG3CR	0	0	2	0	0	3	4	1	1	0
CG4CR	0	3	2	0	0	2	0	0	0	0
CG5CR	0	2	0	0	0	6	0	2	0	0
CG6CR	0	1	0	0	6	2	2	0	0	0
CG7CR	0	1	0	0	6	0	8	0	3	0
CG1TR	0	0	0	0	8	4	4	0	0	0
CG2TR	0	0	0	0	4	6	8	4	0	8
CG3TR	0	0	0	1	2	6	2	0	0	4
CG4TR	0	3	0	0	4	6	4	0	0	0
CG5TR	0	0	0	0	2	0	2	2	0	0
CG6TR	1	1	1	1	18	8	0	0	0	1
CG7TR	0	0	0	0	2	0	2	0	0	2

Tab. č. 3b - Počty glochidií nevystavených tramadolu úspěšně zachycených na rybách, včetně záznamu, na kterých částech těla byla nalezena a v jakém počtu

	Váha	Délka	Ocasní ploutev	Hřbetní ploutev	Řitní ploutev	Pánevní ploutev levá	Pánevní ploutev pravá	Hrudní ploutev levá	Hrudní ploutev pravá	Nozdra levá
TG1CR	5,6	8,3	0	0	5	1	1	3	2	0
TG2CR	9,5	9,9	0	2	1	4	8	5	6	0
TG3CR	5,5	8,5	4	3	4	5	6	6	3	0
TG4CR	12,1	11,2	2	3	0	3	1	5	9	0
TG5CR	6	8,6	4	1	2	1	0	4	3	0
TG6CR	6,5	8,7	2	1	3	3	3	10	4	0
TG7CR	5,9	8,6	7	3	10	22	14	30	14	0
TG1TR	4,7	8,4	3	3	6	9	4	6	9	0
TG2TR	6,5	8,7	6	2	1	6	6	10	14	0
TG3TR	5,5	9	0	2	2	4	5	12	13	0
TG4TR	6,4	8,7	1	0	2	4	3	6	0	0
TG5TR	7,3	9,5	1	0	2	3	2	6	5	0
TG6TR	5,1	7,9	0	0	1	3	1	3	2	0
TG7TR	5,3	8,2	1	1	4	4	4	16	3	2

Tab. č. 3c - Počty glochidií vystavených tramadolu úspěšně zachycených na rybách, včetně záznamu, na kterých částech těla byla nalezena a v jakém počtu

	Nozdra pravá	Skřele levá	Skřele pravá	Ústa	1. žaberní oblouk	2. žaberní oblouk	3. žaberní oblouk	4. žaberní oblouk	Žaberní dutina	Kůže
TG1CR	1	2	0	0	0	0	0	4	0	0
TG2CR	0	3	0	1	14	12	10	2	0	5
TG3CR	0	1	1	0	4	8	2	0	0	0
TG4CR	0	0	0	0	8	10	10	6	1	2
TG5CR	0	0	0	0	6	0	0	2	0	0
TG6CR	0	2	3	0	2	2	2	2	0	4
TG7CR	0	0	0	0	2	6	6	6	0	1
TG1TR	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0
TG2TR	0	0	1	0	6	2	6	4	0	0
TG3TR	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0
TG4TR	0	0	0	1	2	0	6	4	0	0
TG5TR	0	0	3	0	2	4	0	0	0	0
TG6TR	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0
TG7TR	3	0	0	1	4	0	0	0	0	0

Tab. č. 3d - Počty glochidií vystavených tramadolu úspěšně zachycených na rybách, včetně záznamu, na kterých částech těla byla nalezena a v jakém počtu

	Celkem přichycených	% přichycených po 24 hodinách	% odpadlých po 24 hodinách
CG1CR	76	71	29
CG2CR	47	98	2
CG3CR	56	55	45
CG4CR	26	65	35
CG5CR	56	86	14
CG6CR	32	72	28
CG7CR	76	68	32
CG1TR	46	67	33
CG2TR	68	91	9
CG3TR	44	48	52
CG4TR	69	71	29
CG5TR	14	71	29
CG6TR	80	76	24
CG7TR	25	60	40
TG1CR	45	42	58
TG2CR	147	50	50
TG3CR	59	80	20
TG4CR	89	67	33
TG5CR	47	49	51
TG6CR	71	61	39
TG7CR	169	72	28
TG1TR	78	56	44
TG2TR	103	62	38
TG3TR	59	71	29
TG4TR	48	60	40
TG5TR	56	50	50
TG6TR	31	42	58
TG7TR	73	59	41

Tab. č. 4 - Počty glochidií celkem přichycených po 15 min expozici, procento glochidií úspěšně přichycených i po 24 hodinách, procento glochidií odpadlých během 24 hodin

Seznam příloh:

Obrázky:

Obr. č. 1 - svorka na otevírání lastur

Obr. č. 2 - otevřený jedinec s proděravěným marsupiem

Obr. č. 3 - nádrže s rybami

Obr. č. 4 - žaberní oblouk s přichycenými glochidii

Obr. č. 5 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - Levenův test

Obr. č. 6 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - analýza rozptylu

Obr. č. 7 - krabicový graf zobrazující grafické znázornění četností přichycených glochidií mezi skupinami CGCR, CGTR, TGCR a TGTR

Obr. č. 8 - rabicový graf zobrazující grafické znázornění četností přichycených glochidií mezi skupinami CGCR, CGTR, TGCR a TGTR

Obr. č. 9 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - T-test

Obr. č. 10 - krabicový graf znázorňující počty přichycených glochidií z původně přichycených pro skupiny CG a TG

Obr.č. 11 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - Shapiro-Wilkův tes

Obr. č. 12 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - Levenův test

Obr. č. 13 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - analýza rozptylu

Obr. č. 14 - výstup z programu Statistica (Statistica 7.1, 2006) - Scheffeho test

Obr. č. 15 - krabicový graf znázorňující poměr přichycených glochidií z původně přichycených mezi danými skupinami. Proměnná (1) pro CGCR, proměnná (2) pro CGTR, proměnná (3) pro TGCR a proměnná (4) pro TGTR

Tabulky:

Tab. č. 1 - Počty glochidií, která se nedokázala zachytit na rybím hostiteli během 15 min expozice, behem níž docházelo k víření vody

Tab. č. 2 - Počty glochidií zachycených během 15 min expozice a odpadených během následujících 24 hodin, včetně záznamu, zda byla nalezena otevřená či zavřená

Tab. č. 3a - Počty glochidií nevystavených tramadolu úspěšně zachycených na rybách, včetně záznamu, na kterých částech těla byla nalezena a v jakém počtu

Tab. č. 3b - Počty glochidií nevystavených tramadolu úspěšně zachycených na rybách, včetně záznamu, na kterých částech těla byla nalezena a v jakém počtu

Tab. č. 3c - Počty glochidií vystavených tramadolu úspěšně zachycených na rybách, včetně záznamu, na kterých částech těla byla nalezena a v jakém počtu

Tab. č. 3d - Počty glochidií vystavených tramadolu úspěšně zachycených na rybách, včetně záznamu, na kterých částech těla byla nalezena a v jakém počtu

Tab. č. 4 - Počty glochidií celkem přichycených po 15 min expozici, procento glochidií úspěšně přichycených i po 24 hodinách, procento glochidií odpadlých během 24 hodin