

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
Přírodovědecká fakulta  
**Katedra zoologie a ornitologická laboratoř**



Využití bioakumulačních vlastností  
slávičky mnohotvárné  
(*Dreissena polymorpha*)  
pro monitoring těžkých kovů ve vodách

Diplomová práce

**Kateřina Štachová**

Učitelství chemie a biologie pro SŠ, prezenční studium

Vedoucí práce: RNDr. Petr Hekera, Ph.D.

# Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Kateřina Štachová
Název práce:	Využití bioakumulačních vlastností slávičky mnohotvárné ( <i>Dreissena polymorpha</i> ) pro monitoring těžkých kovů ve vodách
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra zoologie a ornitologická laboratoř, PřF UP Olomouc
Vedoucí práce:	RNDr. Petr Hekera, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2015

## Abstrakt

Sladkovodní mlž slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) je kvůli svým bioakumulačním vlastnostem velmi dobrým bioindikátorem znečišťujících látek, včetně těžkých kovů. Cílem této práce bylo provést chemickou analýzu potvrzující bioakumulaci a dále pak histopatologickou analýzu zaměřenou na pozorování nežádoucích anatomických změn vybraných orgánů sláviček. V rámci práce byli jedinci všech velikostních skupin přeneseni do akvárií. Do každého z akvárií byla zvlášť přidána jedna ze solí těžkých kovů - kadmia, olova a niklu o koncentraci kovu 0,5 mg/l. V průběhu tří-týdenní expozice nebyly slávičky krmeny a nevyměňovala se voda. Dvakrát týdně bylo odebráno 50 ml vody k chemické analýze. Jednou týdně byla třetina mlžů z každého akvária vylovena a rozdělena na dvě poloviny, první k chemické analýze, druhá k analýze histopatologické. Koncentrace kovů ve vodě a ve tkáních *D. polymorpha* se stanovovala pomocí atomové absorpční spektroskopie (AAS). Výsledky potvrdily bioakumulaci, ale zcela nepotvrdily závislosti velikosti lastury na koncentraci kovu. Jistá závislost platila u nejmenších (1-1,9 cm) a největších (3-3,9 cm) skupin, kdy u nejmenších jedinců byla zjištěna nižší koncentrace kovů než u největších. Mikroskopické pozorování řezů tkání neodhalilo výrazné histologické změny, pouze výjimečně byly pozorovány nekrózy a hypertrofie.

## Klíčová slova

bioakumulace, *Dreissena polymorpha*, toxicita, kadmium, olovo, nikl, histopatologie

Počet stran:	65
Počet příloh:	4
Jazyk:	Čeština

# Bibliographical identification

Autor's name: Kateřina Štachová  
Title: Utilization of bioaccumulation zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) for monitoring heavy metals in waters  
Type of thesis: Msc. thesis  
Department: Department of Zoology and Laboratory of Ornithology, PřF  
UP Olomouc  
Supervisit: RNDr. Petr Hekera, Ph.D.  
The year of presentation: 2015

## Abstract

Freshwater zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) accumulates high amounts of heavy metals and is therefore considered as very suitable bioindicator of pollutants. The aim of the study was to perform chemical analysis confirming the bioaccumulation of zebra mussels and also histopathological analysis identifying adverse anatomic changes of selected mussels organs. Samples including all sizes of mussels were placed to aquariums. Into each aquarium was added one of the heavy metals salts separately - cadmium, lead and nickel with the same concentration 0,5 mg/l. During the three-week exposure zebra mussels weren't fed and the water was not replaced. Twice a week were collected 50 ml of water was collected for chemical analysis. Weekly, 1/3 of mussels has been removed from each aquarium and dividend into halves. One half was subjekt of the chemical analysis and the other hald of the histopathological analysis. The concentration of metals in water and tissues of *D.polymorpha* was determined by the atomc absorption spectroscopy (AAS). The results confirmed bioaccumulation trait, but did did not confirm dependency of the shell lenght on the concentration of any of the respektive metal. A certain dependency was observed in the smallest (1-1,9 cm) and largest (3-3,9 cm) samples, where the smallest samples always contained lower concentrations than the largest one. Microscopic observation of tissue sections did not reveal any significant histological changes. Rarely, necrosis and hypertrophy was observed among the samples.

## Keywords

bioaccumulation, *Dreissena polymorpha*, toxicity, cadmium, lead, nickel, histopathology

Number of pages: 65  
Number of appendices: 4  
Language: Czech

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Petra Hekery, Ph.D. a jen s použitím citovaných literárních a elektronických zdrojů.

V Olomouci, dne

Vlastnoruční podpis

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Petru Hekerovi, Ph.D. za odborné rady a konzultace, za poskytnutí všech materiálů a za celkovou spolupráci. Dále bych také ráda poděkovala Mgr. Aleně Vláčilové za odborné rady a doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za možnost zhotovování a pozorování mikroskopických řezů na katedře botaniky, za její pomoc a ochotu.

# Obsah

<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>7</b>
<b>Seznam obrázků .....</b>	<b>7</b>
<b>1 Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2 Cíle.....</b>	<b>11</b>
<b>3 Materiál a metody .....</b>	<b>12</b>
3.1 <i>Dreissena polymorpha</i> : bioindikátor znečištění .....	12
3.1.1 Morfologie a anatomie .....	14
3.2 Těžké kovy ve vodním prostředí .....	16
3.2.1 Kadmium (Cd).....	18
3.2.1.1 Cd ve vodním prostředí .....	18
3.2.1.2 Metabolismus a toxikologie.....	20
3.2.2 Olovo (Pb).....	21
3.2.2.1 Pb ve vodním prostředí.....	21
3.2.2.2 Metabolismus a toxikologie.....	22
3.2.3 Nikl (Ni) .....	23
3.2.3.1 Ni ve vodním prostředí .....	24
3.2.3.2 Metabolismus a toxikologie.....	24
3.3 Chemická analýza .....	26
3.3.1 Stanovení koncentrace kovů v modelovém organismu a ve vodě.....	26
3.3.1.1 Mikrovlnná mineralizace a Atomová absorpční spektroskopie (AAS) .....	26
3.4 Histopatologická analýza.....	29
3.4.1 Příprava řezových preparátů.....	29
<b>4 Výsledky .....</b>	<b>35</b>
4.1 Chemická analýza .....	35
4.1.1 Stanovení koncentrace kovů ve vodě .....	35
4.1.2 Stanovení koncentrace kovů v modelovém organismu .....	37
4.2 Histopatologická analýza.....	41
4.2.1 Tvar těla.....	41
4.2.2 Žábry .....	42
4.2.3 Trávicí trubice .....	45
4.2.4 Sifa .....	46
<b>5 Diskuze .....</b>	<b>48</b>
<b>6 Závěr .....</b>	<b>54</b>
<b>Seznam literatury .....</b>	<b>55</b>
<b>Seznam elektronických zdrojů.....</b>	<b>62</b>
<b>Přílohy.....</b>	<b>63</b>

# Seznam tabulek

Tabulka 1. Průměrné koncentrace Cd u různých skupin bezobratlých v průmyslových zónách USA (Moore & Ramamoorthy 1984), upraveno K. Štachová 2015 .....	20
Tabulka 2. Akutní toxicita vybraných druhů Intervetebrata (Moore & Ramamoorthy 1984), upraveno K.Štachová 2015 .....	23
Tabulka 3. Hmotnostní koncentrace kovů a jejich solí, K. Štachová 2015.....	26
Tabulka 4. Srovnání tvaru průřezu střední části těla sláviček po tří týdenní expozici Cd, Pb, Ni s blankem, K.Štachová 2015.....	41
Tabulka 5. Koncentrace kovů Ni, Pb a Cd ve vodě a úbytky v závislosti na době expozice, K.Štachová 2015.....	48
Tabulka 6. Koncetrace kovů Ni, Pb, Cd ve slávičkách u tří velikostních skupin, K.Štachová 2015.....	49
Tabulka 7. Srovnání celkových koncentrace kovů Cd, Pb a Ni naměřených v tkáních <i>Dreissena polymorpha</i> na vybraných místech severní Ameriky a Evropy, K. Štachová, 2015.....	51

# Seznam obrázků

Obrázek 1. Graf závislosti koncentrace Pb iontů ve vodě na době expozice, K.Štachová 2015 .....	35
Obrázek 2. Graf závislosti koncentrace Ni iontů ve vodě na době expozice, K.Štachová 2015.	36
Obrázek 3. Graf závislosti koncentrace Cd iontů ve vodě na době expozice, K. Štachová 2015	36
Obrázek 4. Graf srovnání koncentrace kovů ve vodě, K. Štachová 2015.....	37
Obrázek 5. Graf bioakumulace Pb slávičkou, srovnání tří velikostních skupin, K. Štachová 2015.....	37
Obrázek 6. Graf bioakumulace Ni slávičkou, srovnání tří velikostních skupin, K. Štachová 2015.....	38
Obrázek 7. Graf bioakumulace Cd slávičkou, srovnání tří velikostních skupin, K. Štachová 2015.....	38
Obrázek 8. Graf bioakumulace kovů slávičkou, bez srovnání velikostních skupin, K. Štachová 2015.....	38
Obrázek 9. Graf bioakumulace kovů slávičkou, srovnání velikostní skupiny 1-1,9 cm, K.Štachová 2015.....	39

Obrázek 10. Graf bioakumulace kovů slávičkou, srovnání velikostní skupiny 2-2,9 cm, K.Štachová 2015 .....	39
Obrázek 11. Graf bioakumulace kovů slávičkou, srovnání velikostní skupiny 3-3,9 cm, K.Štachová 2015 .....	40
Obrázek 12. Mikroskopický řez žaber <i>Dreissena polymorpha</i> , Pb2, zv.10, K. Štachová 2015 .	42
Obrázek 13. Mikroskopický řez žaber <i>Dreissena polymorpha</i> , Ni2, zv.10, K. Štachová 2015..	43
Obrázek 14. Mikroskopický řez žaber <i>Dreissena polymorpha</i> , Cd2, zv.10, K. Štachová 2015 .	43
Obrázek 15. Mikroskopický řez žaber <i>Dreissena polymorpha</i> , Cd1, zv.20, K. Štachová 2015 .	44
Obrázek 16. Mikroskopické řezy trávicí trubicí <i>D. polymorpha</i> , rektum (obr. A,C,E), střevo (obr. B,D,F), A : Cd2, zv.20, B : Pb2, zv.10, C : Cd1, zv.20, D : Pb2, zv.10, E : Ni2, zv.20, F : Pb2, zv.10, K. Štachová 2015 .....	45
Obrázek 17. Mikroskopický řez inhalačního sifa <i>D.polymorpha</i> , Ni1, zv.20, K.Štachová 2015	46
Obrázek 18. Mikroskopický řez exhalačního sifa <i>D.polymorpha</i> , Ni1, zv.10, K.Štachová 2015	46
Obrázek 19. Mikroskopický řez inhalačního (IN) a exhalačního (EX) sifa <i>D.polymorpha</i> , blank2, zv.4, K. Štachová 2015.....	47
Obrázek 20. Vnitřní anatomie dospělé <i>D. polymorpha</i> (Claudi & Mackie 1994), upraveno K.Štachová 2015 .....	63
Obrázek 21. Příčný řez tělem mlže (8), upraveno K. Štachová 2015 .....	63
Obrázek 22. Foto, A: živé D.P. v akváriích v době expozice;B: mrtvá D.P.; C: AAS Avanta. D: živé D.P. v drúzách; E: mineralizátor Speedwave 2; F: D.P. bez lastur v benzenu, K.Štachová 2015.....	64
Obrázek 23. Foto, vlevo: D.P. zalité v parafínu; mikroskopické řezy; sklíčka s řezy v kyvetách při barvení. Vpravo: mikrotom Microm; sklíčka s řezy v Eosinu a Hematoxylinu; nabarvené sklíčka, K. Štachová 2015.....	65



# 1 Úvod

V dnešní době se používají k detekci znečišťujících látek vod bioindikátory. Pojem bioindikátor (taktéž biologický indikátor) je organismus, který svou přítomností nebo nepřítomností ukazuje existenci určitého kritického faktoru pro životní prostředí. Speciální případ bioindikátoru může být bioakumulační biomonitor (od něj pak slovo biomonitoring, biomonitorování). Biomonitor je organismus, který dokáže hromadit nečistoty a škodlivé látky ve svých tkáních. Tyto látky pak mohou být z organismu analyzovány a identifikovány (Phillips & Rainbow 1993).

Více než 30 let se k bioakumulaci kontaminujících látek ve vodě používají mlži (Boeining 1999; Richman & Somers 2005). V Kanadě se často používá mlž *Elliptio complanata*, ale od konce 80. let, kdy došlo k masivnímu přemnožení *Dreissena polymorpha* a *Dreissena bugensis* ve Velkých jezerech, se právě tyto mlži stali častými bioindikátory vod (Richman & Somers 2005). Další mlži používané k biomonitorování jsou např. *Mytilus edulis*, *Mytilus californicus*, *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas* či *Ostrea edulis* (Boeining 1999). Důvodů, proč zrovna slávička je výborný bioindikátor a biomonitor, je spousta. Je to dáno vysokou schopností bioakumulace a invaze (Binelli et al. 2004) a dlouhodobým životem slávičky (až 19 let) (Karatayev et al. 2006). Má rychlý životní cyklus, brzo vstupuje do období reprodukce (Faria et al. 2010). Její velikost populace je obrovská a s časem se příliš nemění (stejně jako je to u řas a zooplanktonu). Do těla slávičky se toxické látky dostávají výhradně filtrací a žaberním dýcháním (Binelli & Provini 2003). Jako vhodný biomonitor je hlavně proto, že dokáže ve svém těle kumulovat množství škodlivin z vody, kdy okolní koncentrace ve vodě jsou natolik nízké, že by je dnešními analytickými metodami nebylo možné detekovat (Richman & Somers 2005).

Obecně platí, že koncentrace znečišťujících látek v tkáních sláviček je odrazem koncentrací v životním prostředí (Richman & Somers 2005). Množství kontaminujících látek v těle je ovlivňováno fyziologickými faktory např. reprodukčním stavem, pohlavím, věkem, velikostí lastury a obsahem tuků v měkké tkáni (obsah lipidů bývá nejvyšší po prvním rozmnožovacím období a poté začne klesat). Stejně jako environmentálními faktory, sezónností či teplotou vody (Richman & Somers 2005; Roe & MacIsaac 1998). Nicméně jiné výzkumy toto tvrzení vyvracejí. Gossiaux et al. (1996) v experimentu nenašel žádný důkaz, že by se příjem chemických látek slávičkou měnil v průběhu sezóny kvůli teplotě vody (pozorování bylo v rozmezí teplot od 4 do 24 °C).

Nicméně potvrdil, že v zimních měsících, kdy je teplota vody na dně 4 °C nebo 5 nižší, ztratily slávičky schopnost filtrování vody v důsledku snížení metabolismu, a proto v některých z nich byly nižší koncentrace polutantů.

Schopnost bioakumulace slávičky může být různá u různě velkých jedinců. Většinou ve větších slávičkách bývá naměřena vyšší koncentrace těžkých kovů než v menších, ale není to zcela potvrzeno (Richman & Somers 2005; Rutzke et al. 2000).

## 2 Cíle

1. Seznámit se s problematikou bioakumulace těžkých kovů v organismech
2. Sestavit laboratorní bioakumulační experiment s využitím slávičky mnohotvárné (*Dreissena polymorpha*)
3. Seznámit se s metodikou a technikou přípravy mikroskopických preparátů pro hodnocení anatomických změn
4. V pravidelných intervalech odebírat vzorky exponovaných organismů a vody a laboratorně analyzovat na obsah vybraných těžkých kovů
5. Vyhodnotit bioakumulační experiment
6. Provést řezy fixovaných vzorků mlžů a mikroskopicky vyhodnotit anatomické změny

## 3 Materiál a metody

### 3.1 *Dreissena polymorpha*: bioindikátor znečištění

Slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*, Pallas 1771) patří mezi sladkovodní invazivní mlže s oblastí původu v povodí Kaspického a Černého moře. Za posledních 200 let se odtud dostala do vodních nádrží, jezer a řek východní a západní Evropy díky ekologickým a ekonomickým vlivům i do USA a Kanady (Karatayev et al. 1997). Schopnost šířit se na větší vzdálenosti je u slávičky v prvních larválních stádiích ve formě planktonu (Anzano et al. 2011). Velkou pozornost se jí dostalo v roce 1980, kdy byly zjištěny negativní dopady její invaze na ekosystémy Velkých jezerech severní Ameriky. Svým šířením dochází k ekologickým ale i ekonomickým škodám, například snížení fytoplanktonu a zooplanktonu, změny v populacích ryb, úhyn původních mlžů, převážně z čeledi Unionidae, škody v provozu vodních elektráren a čističek odpadních vod (Sousa et al. 2011; Primack 2011). Celá invaze byla ovlivňována zejména lodní dopravou, komerčním rybolovem a budováním kanálů evropských řek (Karatayev et al. 1997).

Slávičky obývají hlavně sladkovodní jezera a řeky, ale hojně je nalezneme také v lomech, pískovnách a chladných rybnících (Mackie & Schloesser 1996). V České republice se vyskytují v povodí řek Vltavy a Labe, kde jejich distribuce sahala koncem 19. století až k Ústí nad Labem. Dále je nalezneme podél řeky Moravy, Dyje, ale i v nádrži Švihov na řece Želivce (Sedlák 2002; Horsák et al. 2013).

Bylo popsáno až sedm systémů klaiakace kmene měkkýšů. Druh *Dreissena polymorpha* se řadí do třídy Bivalvia, podtřída Heterodonta, řád Veneroida, nadčeď Dreissenoidea, čeď Dreissenidae, rod *Dreissena* (Mackie & Schloesser 1996). Tento rod není moc početný, podle Herein se zde řadí kromě *D. polymorpha*, *D. andrusovi*, *D. caspia*, *D. stankovici*, *D. rostriformis* a *D. bugensis* (Rosenberg 1994). Český název čeledi slávičkovití a rodu slávička vznikl, protože slávičky svým způsobem života připomínají slávku jedlou *Mytilus edulis* (Horsák et al. 2013).

Tento živočich je jedním z mála mlžů, který je dobře přizpůsobený k životu ve sladké i brakické vodě (Karatayev et al. 1998). Žije přisedle na jakémkoliv přirozeném či umělém pevném substrátu, který se vyskytuje ve vodní nádrži. Na něm drží pomocí byssových vláken. Při jeho oddělení od substrátu má tendenci se znovu byssovými vlákny připojit. Musí přitom prodloužit nohu a vystavit tak své měkké tělo vnějšímu

prostředí a toxickým sloučeninám, které se v něm nacházejí (Rajagopal et al. 2005). Často ohrožuje i jiné mlže, především zástupce z čeledi Unionidae, které využívá jako substrát. Slávička může na jejich lasturách vytvářet těžké kolonie (drúzy) a tím omezovat jejich pohyb, blokovat a a znemožňovat dýchání. K úmrtnosti těchto velkých mlžů dochází nejčastěji právě udušením (Sousa et al. 2011).

Mlži včetně sláviček jsou převážně odděleného pohlaví (gonochoristé), hermafrodité jen výjimečně. Slávičky mají vysokou fertilitu a schopnost se rozšiřovat. Z hlediska času je životní cyklus sláviček poměrně krátký, ale rychlý. Než se z embrya stane dospělý jedinec, musí projít několika larválními stádii (Faria et al. 2010; Sedlák 2002). První larvální stádium, označované jako trochophora, je velmi krátké. Velikostně se pohybuje mezi 57–121  $\mu\text{m}$ . S rostoucím pláštěm se z larvy trochophora stává veliger, která má D-tvar a velikost asi 70–160  $\mu\text{m}$ . Poslední volně plovoucí larvální fázi je veliconcha. S dalším růstem, rozvojem nohy a vznikem byssových vláken vzniká larva pediveliger, která je zhruba 167–300  $\mu\text{m}$  velká. Dokáže se už pomocí nohy přemístit na vhodné místo a byssovými vlákny se k substrátu připevnit. Po připevnění se mění na stádium plantigrade a z něho na dospělého mlže. Zvýšený růst a vývoj vede u sláviček k pohlavní dospělosti, která může nastat už při velikosti lastury 5 mm. Tento fakt byl potvrzen v červenci v roce 1990 Ackermanem, který si všiml bělavého sekretu spermií u takto malých jedinců (Ackerman 1995). Obvyklá délka lastury pohlavně dospělého jedince bývá spíše kolem 8 až 10 mm a nastává asi v druhém roce života (Mackie & Schloesser 1996). Maximální zjištěná velikost dospělého mlže byla kolem 5 cm (Ackerman 1995).

Obecně platí, čím je slávička mladší, tím je méně odolná vůči toxickým látkám. Nejvíce citlivá je tedy embryonální fáze. Druhé larvální stádium veliger (s největší přirozenou úmrtností) bývá o dost citlivější na toxické látky než dospělí jedinci. Larva pediveliger už má byssova vlákna a může se jimi připevnit k pevnému podkladu, aby ji proud vody neodnesl. Nevýhodou ale je, že ještě nemá vytvořenou pevnou schránku (lasturu) a tak se do něj dostávají biocidy více než do dospělců. Toto stádium se může jevit jako nejlepší bioindikátor znečišťujících látek, protože zůstává připevněné k podkladu téměř na jednom místě, už moc daleko necestuje a kvůli tomu, že ještě nemá schránku, se do něj snadno dostávají škodliviny (Faria et al. 2010). U sladkovodních mlžů existuje krátké larvální stádium nazvané glochidium, které parazituje na rybách a je méně citlivé než embryonální fáze slávičky a to až 50krát (Verween et al. 2009).

Slávička se často používá jako bioindikátor perzistentních organických polutantů, těžkých kovů a radionuklidů ve vodních ekosystémech (Anzano et al. 2011).

### 3.1.1 Morfologie a anatomie

Tělo sláviček je bilaterálně souměrné, s redukovanou hlavou a kýlovitou nohou, chráněné dvěma lasturami (Sedlák 2002). Velikost lastur dospělých jedinců *D. polymorpha* se pohybuje nejčastěji kolem 1-4 cm, jen výjimečně je velikost větší (Ackerman 1995). Tvar a velikost schránek je dobře přizpůsobená životnímu stylu sláviček. Slávičky žijí v koloniích tzv. drúzách, připevněné na pevném podkladu nad sedimenty byssovými vlákny. Povrch lastury je plochý, na konci kuželovitě zúžený. Slávičky jsou umístěny těsně k podkladu, aby je dravci nebo silné proudy neodnesli (Alexander et al. 1997). Na příčném řezu má lastura ventrální okraj vyrovnaný, klenutý nebo konkávní, s černohnědými a světlými, rovnými i klikatými proužky (Mackie & Schloesser 1996). Díky této variabilitě, nosí v angličtině jméno zebra mussel protože se svými nepravidelnými proužky podobá zebře (Nalepa et al. 1993, Claudi & Mackie 1994).

Lastury se otvírají pomocí elastických závěsných vazů. Proti nim působí přední (anterior) a zadní (posterior) sval zavírající lasturu. Když slávička zemře, svaly nejsou v kontrakci a lastury se otevrou (1).

Na povrchu je tělo obalené tenkým pláštěm, který je vylučován schránkou. Vnitřní prostor mezi pláštěm a tělem se nazývá plášťová dutina. V zadní části těla tvoří plášť dva otvory, inhalační a exhalační sifa. Inhalační otvor je větší a je obklopen 80-100 malými chapadly, které pomáhají při filtraci vody s částicemi potravy (Claudi & Mackie 1994). Inhalačním sifem proudí voda až do žaber, kde odevzdá kyslík a poté vytéká zpátky exhalačním otvorem (Sedlák 2002).

V dalším otvoru pláště je umístěna byssová žláza s vlákny, která produkuje sekret jehož pomocí se přichycuje slávička k podkladu (Sedlák 2002). Jedná se o mimotělní sekreci nohy a přidružených žláz. Byssovy vlákna se skládají z několika částí. Z kořene, který je ukotven v plášti pomocí svalu, stopky, vláknů a disku (tzv. plaque), který se připojuje k substrátu. (Bonner & Rockhill 1994). Dospělí jedinci vylučují asi 23 byssových vláken týdně, nicméně rychlost jejich tvorby se liší v závislosti na jejich velikosti, teplotě a kvalitě vody (Mackie & Schloesser 1996). Kořen, stopka a disk

obsahují kolagen, zatímco vlákna obsahují elastin. V byssových vláknech se nachází 3 třídy proteinů. Dva z nich jsou bohaté na tyrosin a dihydroxyfenylalanin (DOPA), třetí protein obsahuje cystein (Bonner & Rockhill 1994).

Po obou stranách těla, mezi pláštěm a nohou se nachází žábry. Žábry sláviček (Lamellibranchiata) se skládají ze dvou lupenitých vláken na každé straně, spojené příčnými spojkami (Sedlák 2002). Každé lupenité vlákno se skládá z řady příčně orientovaných vláken s řasinkami, uprostřed vlákna je systém vodních kanálků. Příčně orientované vlákna jsou občas odděleny ostiemi, vnější a vnitřní mohou být spojeny spojkami (septum). Vnější žábry se nikterak neliší od vnitřních (McElwain & Bullard 2014). Základní funkcí žaber je transport vody s částicemi potravy a kyslíkem. Proudění vody v žábrách je zajištěno řasinkami. Jejich pohybem je voda poháněna z inhalačního a do dutiny pláště, odtud ostiemi do žaber přes vodní kanály do centrálního kanálu. Nakonec voda opouští tělo exhalačním otvorem. Průtok vody řídí integrální žaberní svaly, které regulují rozměry ostií a interfilament a tím i tlak vody (Medler & Silverman 1997).

Ústní otvor ústí do krátkého jícnu, který vede potravu do žaludku, do hepatopankreas (trávicí žláza; slinivkojaterní žláza), do střev, rekta a nakonec do exhalačního sifa (Claudi & Mackie 1994).

V posledních oddílech střeva prochází perikardiem (Sedlák 2002).

Cévní soustava sláviček je otevřená, srdce je tvořeno dvěma předsíněmi, uzavřené v perikardiu. Vylučování je prostřednictvím metanefridií, které ústí do exhalačního otvoru (Sedlák 2002).

Nervový systém je méně centralizovaný než u jiných měkkýšů. Je tvořen dvojicí ganglií (viscerální a pedální), ležící v blízkosti jícnu. Viscerální ganglia inervují zadní sval (posterior adductor) a pedální inervují nohu. Smyslové orgány se nacházejí v blízkosti vnějšího prostředí, na okraji pláště a v blízkosti sif (1).

## 3.2 Těžké kovy ve vodním prostředí

Za těžké kovy považujeme kovy, jejichž hustota je vyšší než  $5 \text{ g/cm}^3$  a jejich soli reagují se sulfidem sodným za vzniku málo rozpustných sulfidů (Pitter 1999). Jedná se asi o 40 prvků periodické soustavy, většinou se jedná o kovy, ale kvůli toxickému působení zde zařazujeme i polokovy selen a arsen (Adámek et al. 2010).

Do živých organismů se v průběhu jejich života dostávají jednak látky pro životní pochody velmi důležité, ale i látky neužitečné a škodlivé. Prvky v biologických systémech dělíme podle minimální koncentrace, která je pro organismus nezbytná, na makrobiogenní a mikrobiogenní též stopové prvky. Stopové prvky se ještě dále dělí na esenciální, neesenciální a toxické (Bencko 1984). Železo, měď, zinek a mangan patří mezi základními kovy, neboť hrají důležitou roli v biologických systémech. Naproti tomu rtuť, olovo a kadmium jsou toxické, dokonce i ve stopách (Tüzen 2003; Kress 1998).

Do jaké míry bude určitá látka toxická závisí na její koncentraci, teplotě, pH, složení vody (Pitter 1999) a na vztahu mezi dávkou látky, účinku a dobou expozice. Za toxické látky považujeme téměř všechny prvky, které přijímá organismus ve vysoké dávce po dostatečně dlouhou dobu. Této závislosti se říká Bertrandův zákon (Bencko 1984). Toxicita těžkých kovů se může projevovat různými způsoby, především poškozováním buněk, ovlivňováním propustnosti biomembrán a inhibicí enzymatických reakcí (Adámek et al. 2010). Inhibice spočívá v navázání kovu na aktivní místo enzymu, nejčastěji se jedná o sulfanylovou ( $-\text{SH}$ ) nebo hydroxylovou ( $-\text{OH}$ ) skupinu. Látkám, které tuto inhibici způsobují, se obecně říká katalytické jedy (Rychlíková 1994). Vysoké koncentrace kovů v tkáních mohou ovlivnit biochemii a fyziologii mlžů vyvoláním syntézy metalothioneinu (Geng et al. 2015). Tento protein detoxikuje organismus vazbou s kovem (Cd, Zn, Hg) a následně jej imobilizuje v granulích. Nakonec ho vyloučí trusem nebo exocytózou. Tato reakce závisí na biologických faktorech jako je aktuální fyziologický stav, genetika či velikost organismu. U neesenciálních prvků bývá tato reakce velmi pomalá nebo nemusí vůbec probíhat (Voets et al. 2009).

V živých organismech dochází často ke vzájemnému ovlivňování škodlivých látek. Například kombinace kovů Cd či Ni se Zn nebo Hg s Cu jsou více toxické než kovy samotné. Jedná se o tzv. synergický efekt (Pitter 1999). Uvnitř organismu dochází



také k přeměnám sloučenin kovů. Touto biotransformací mohou vznikat produkty méně nebo naopak více toxické (Rychlíková 1994).

Pro těžké kovy jsou v organismech typické alkylační reakce, převážně methylace kovů, které spočívají v navázání kovu na uhlík organické sloučeniny. Takových reakcích se využívá v chemickém průmyslu, v organických syntézách, kde organokovové sloučeniny fungují jako katalyzátory. Methylace v buňkách organismu je základní biochemický proces a probíhá pomocí tří enzymů: S-adenosylmethionin, methylcobalamin nebo N-methyltetrahydrofolát (Mason 2012).

Do životního prostředí se těžké kovy dostávají hlavně díky průmyslu, těžbě, dopravě, a zemědělství. V malém množství se přirozeně vyskytují v zemské kůře, nejčastěji ve formě sloučenin a z ní se pak dostávají do podzemních a povrchových vod (Adámek et al. 2010). Narozdíl od terestrického prostředí, kde mají toxické látky pouze lokální vliv, ve vodním prostředí se dostávají až do velkých vzdáleností od zdroje znečištění (Primack et al. 2011).

Do potravinového řetězce se dostávají škodliviny z vodního prostředí a ze sedimentů a kvůli jejich lipofilních vlastnostech se hromadí v tucích (Jones & Voogt 1999). Tato bioakumulace je závislá na velikosti, hmotnosti, věku, fyziologickém stavu organismu, ale i na sezónnosti a nutričním stavu stanoviště (Gundacker 1999; Zhong et al. 2013). I v malých koncentracích mohou být pro vodní organismy toxické díky biozesilování neboli biomagnifikaci (Primack et al. 2011). Biomagnifikací se rozumí zvyšování koncentrace polutantů se zvyšující se úrovní trofického řetězce (Gobas et al. 1999). Drobní živočichové jako jsou například mlži či plankton, mají schopnost filtrovat znečištěnou vodu a tím se do jejich těla dostanou škodliviny, které se hromadí v tkáních. Těmito živočichy se živí drobní predátoři a ti jsou zase potravou pro větší predátory, a proto nalezneme nejvyšší koncentrace polutantů v druzích, stojících nejvýše v potravním řetězci (Primack et al. 2011).

Schopnost bioakumulace udává akumulární koeficient, který vyjadřuje poměr obsahu kovu v daném organismu ku jeho obsahu v okolní vodě (Pitter 1999). Nejvyšší akumulární koeficient z těžkých kovů mají rtuť, kadmium a olovo (Adámek et al. 2010).

U mlžů, včetně slávičky mnohotvárné, snižují těžké kovy jejich výkonnost. Při zvýšené koncentraci kovu slávičky dokáží udržet své ulity po delší dobu uzavřené, produkují menší množství Byssových vláken, mají sníženou srdeční frekvenci a filtrační rychlost (Kraak et al. 1994). Některé orgány mají vyšší či nižší schopnost kumulovat

těžké kovy, a proto se ve všech orgánech nenachází stejné množství daného kovu. Ve Vídni byly určité orgány sláviček vypreparovány a podrobeny chemické analýze. Experiment dokázal, že kadmium bylo nejvíce nahromaděno v měkkých částí těla, ve viscerální hmotě, poté v žlázech. Nejvyšší koncentrace olova, zinku a mědi byla v byssových vláknech a poté v noze. Nejmenší množství všech kovů obsahovaly schránky sláviček (Gundacker 1999).

### **3.2.1 Kadmium (Cd)**

Kadmium se řadí se zinkem a rtutí do II.B skupiny periodické soustavy prvků. Jedná se o bílý, lesklý a tažný kov, na vzduchu stálý, pokrývá se vrstvičkou svého oxidu. Vyskytuje se společně se zinkem v jeho rudách, samostatně se vyskytuje v minerálu greenockit. Za vlhka ztrácí svůj lesk a za vyšší teploty hoří na oxid kademnatý. Reaguje dobře s kyslíkem, sírou a fosforem, za vyšší teploty i s halogeny. Oproti zinku nereaguje s hydroxidy, pouze s kyselinami. Jeho maximální oxidační stupeň ve sloučeninách je II (Kameníček et al. 2009).

Je velmi toxické, kvůli svým lipofilním vlastnostem se nejčastěji hromadí v játrech a ledvinách. Zde se společně se zinkem váže silnou vazbou na protein metalothionein (Moore & Ramamoorthy 1984).

Do odpadních vod se dostává při jeho zpracování. Při elektrolytické výrobě zinku vzniká jako odpadní produkt, je součástí čistírenských kalů. Používá se k výrobě fosforečnanových hnojiv, pigmentů (CdS jako kadmiová žluť se používá jako nátěrová hmota a k barvení skla), stabilizátor např. při výrobě PVC (polyvinylchlorid) společně s niklem při výrobě galvanických článků. Významné je i jeho užití v jaderné energetice jako regulátor neutronů (Kameníček et al. 2009, Pitter 1999).

#### **3.2.1.1 Cd ve vodním prostředí**

Ve vodním prostředí všechny prvky II.B skupiny snadno podléhají hydrolyze za vzniku hydroxokomplexů. Reagují však také s dalšími anionty vyskytující se ve vodě za tvorby např. sulfatokomplexů  $[\text{Cd}(\text{SO}_4)(\text{aq})]$ , karbonatokomplexů  $[\text{Cd}(\text{CO}_3)(\text{aq})]$ , chloridokomplexů  $[\text{CdCl}]^+$ . V mořské vodě se běžně vyskytuje i  $[\text{Cd}(\text{Cl})_2(\text{aq})]$  (Pitter 1999).

Nejčastější dvoumocné kadmium Cd se vyskytuje ve vodě až do pH 8, pod podmínkou, že se zde společně s ním nevyskytují fosfáty, sulfidy či jiné anionty, s kterými by kadmium tvořilo různě rozpustné sraženiny. Při pH vyšší než 9 hydrolyzuje a tvoří sloučeniny  $[\text{Cd}(\text{OH})]^+$ . Naproti tomu rtuťnatý kation pouze hydrolyzuje v rozmezí pH 2-6 za vzniku  $\text{Hg}(\text{OH})_2$ . Vyšší hodnoty pH se přirozeně ve vodě nevyskytují, proto ani vyšší hydroxylové (popř. chloridové) sloučeniny s kadmiem nenajdeme (Moore & Ramamoorthy 1984).

Chloridy jsou více selektivní v interakci s některými těžkými kovy např. s kadmiem, rtuť, olovem. Kovalentnost vazby se liší v závislosti na daném kovu. Oproti jiným komplexotvorným činidlům jsou chloridy dobře rozpustné ve vodě, jsou mobilní a perzistentní (stálé a těžko odbouratelné z životního prostředí) (Moore & Ramamoorthy 1984).

Také s organickými činidly tvoří kadmium stabilní komplexní sloučeniny. Podle Pearsonovy hard-soft teorie (1963) se Cd s oxidačním číslem II řadí k měkkým kyselinám, které budou přednostně reagovat s měkkými bázemi (ligandy) za tvorby komplexů. K měkkým zásadám patří např.  $\text{CO}$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{R}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{R}_2\text{S}$  (Březina & Pastorek 1991). Z organických látek se ve vodě běžně vyskytují aminokyseliny, aminosacharidy, polysacharidy, alifatické i aromatické karboxylové kyseliny. V mořské i sladké vodě reaguje Cd s huminovými kyselinami (Moore & Ramamoorthy 1984). Jedná se o makromolekuly s aromatickým charakterem a spoustou funkčních skupin, především karboxylových a fenolických, amino a sulfydrylových. Kadmium se dokáže vázat na všechny tyto funkční skupiny (Voets et al. 2004).

Stabilita huminových chelátů roste v Irving-Williamse řadě (Moore & Ramamoorthy 1984):



Voets et al. (2004) studovali pomocí iontově selektivních elektrod vliv huminových kyselin na bioakumulaci kadmia slávičkou mnohotvárnou a došli k závěru, v přítomnosti huminové kyseliny došlo k výraznému poklesu aktivity  $\text{Cd}^{2+}$  iontů ve vodě z 51,6 % na 21,8 % a 19,9 %. V experimentu bez přítomnosti huminových kyselin byly naměřeny vyšší hodnoty kadmia ve slávičkách.

Nejvyšší mezní hodnota Cd pro pitnou vodu je v České republice 5 µg/l (vyhláška č. 252/2004 Sb.), pro balené přírodní minerální vody je 0,003 mg/l, pro povrchové vody 1 µg/l a podzemní vody 1,5 µg/l (2).

### 3.2.1.2 Metabolismus a toxikologie

Při kontaktu toxické látky s živým organismem dochází k jejich vzájemné interakci a látka se tak dostává do jeho metabolismu. Pohyb škodliviny začíná vstupem do organismu, následuje proces vstřebávání, transport, distribuce a vylučování (Picka & Matoušek 1996). Důležité je poznamenat, že pouze malá část kadmia je v organismu zadržována a kumulována, zbytek bývá vyloučen. Do jaké míry je vylučován a do jaké kumulován závisí na živočišném druhu, například u krys je zadržováno v těle 0,3 % Cd, u drůbeže 7 %, u člověka až 25 % (Bencko 1984).

Proniknutí škodlivé látky do organismu může být enterální (vstup trávicím ústrojím) nebo parentální (všechny cesty kromě trávicí, tj. dýchací, kůží apod.) (Picka & Matoušek 1996). Po parentálním vstupu je téměř 95 % kadmia zadržováno v krevní plazmě, kde je vázáno na proteiny, převážně na  $\alpha$ -2-makroglobulin. Z krve je transportován do jater, ledvin, střevní sliznice a dalších tkání. Tato distribuce je však závislá na dávce a době expozice. Při dlouhodobé expozici se kadmium hromadí nejvíce v ledvinách, po jednorázové dávce ve střevní sliznici (Bencko 1984).

Do bezobratlých živočichů (Intervetebrata) se kadmium dostává potravou a vodou. Hodnoty BCF (biokoncentrační faktor – poměr dvou koncentrací v různých fázích, např. biota/voda; ukazuje do jaké míry se znečišťující látka koncentruje z vody do vodního organismu) kademnatých anorganických sloučenin jsou nízké oproti organokademnatým sloučeninám. Průměrné koncentrace kadmia v některých skupinách bezobratlých v průmyslových zónách v USA jsou shrnuty v tabulce.

**Tabulka 1. Průměrné koncentrace Cd u různých skupin bezobratlých v průmyslových zónách USA (Moore & Ramamoorthy 1984), upraveno K.Štachová 2015**

Trichoptera	Ephemeroptera,	Crustaceae	Diptera	Mollusca	Hirudinea
1,5 mg/kg	5,9 mg/kg	2,3 mg/kg	2,2 mg/kg	2,1 mg/kg	3,8 mg/kg

Maximální koncentrace nahromaděného kadmia v orgánech bezobratlých je specifická pro daný druh. Koncentrace Cd v konkrétních orgánech se může zvyšovat či

snižovat v závislosti na teplotě a reprodukční činnosti daného druhu. Transport Cd do různých tkání a orgánů bezobratlých je prostřednictvím hemolymfy. Přítomnost zinku může vést ke zvýšení koncentrace Cd ve vnitřních orgánech a zároveň jeho snížení ve svalech (Moore & Ramamoorthy 1984).

Kadmium patří mezi látky karcinogenní (způsobuje rakovinu), teratogenní (poškozuje plod) a reprotoxické (snižuje reprodukční schopnost). Akutní otravy způsobují zvýšení krevního tlaku, selhávání ledvin a rozklad erytrocytů. U člověka se příjem kadmia pohybuje okolo 50  $\mu\text{g}$  (2). U mlžů (konkrétně *Mytilus edulis*) se prováděl experiment, kdy se do vody přidalo  $\text{CdCl}_2$  a zjišťovaly se negativní účinky na tkáně a orgány. Kadmium se nahromadilo nejvíce v trávicí žláze (hepatopankreas), ale zde žádné negativní účinky nebyly pozorovány. Až po snížení expozice Cd se objevily nekrózy, léze, záněty a neoplazie (Sheir et al. 2013).

### 3.2.2 Olovo (Pb)

Tento stříbrolesklý kov patří do IV.A skupiny periodické soustavy prvků. S rostoucím protonovým číslem roste ve skupině elektropozitivita a tím i ochota vytvářet sloučeniny s oxidačním číslem II, proto jsou sloučeniny olova v oxidačním čísle II velmi běžné a stálé. Ve vyšším oxidačním čísle tj. IV se projevuje kyselinotvornost sloučenin, zatímco v II amfoterita až zásaditost. Z triády Ge, Sn, Pb je olovo nejreaktivnější (Kameníček et al. 2009).

Nejrozšířenější rudou olova je galenit  $\text{PbS}$ , z které se také získává její oxidací (Kameníček et al. 2009). Další rudy jsou cerrusit  $\text{PbCO}_3$  a anglesit  $\text{PbSO}_4$ . Do životního prostředí se dostává jako organická látka tetraethylolovo, které byla dříve součástí výfukových plynů motorových vozidel. Dalšími antropogenními zdroji jsou pájené spoje měděného potrubí, výroba akumulátorů, slitin, chemikálií a pigmentů (Pitter 1999; Moore & Ramamoorthy 1984)

Všechny rozpustné sloučeniny olova jsou jedovaté (Kameníček et al. 2009).

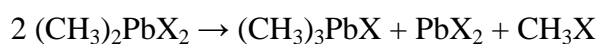
#### 3.2.2.1 Pb ve vodním prostředí

Pod pH 6 se vyskytuje olovo ve vodě ve formě  $\text{Pb}^{2+}$  popř. jako karbonatokomplex  $[\text{Pb}(\text{CO}_3)(\text{aq})]$  (Pitter 1999). Nad touto hodnotou hydrolyzuje olovo na nerozpustný  $\text{Pb}(\text{OH})_2$ ,  $[\text{Pb}(\text{OH})_2(\text{aq})]$  a  $[\text{Pb}(\text{OH})]^+$ , který při pH 8,5 převažuje. V bazické oblasti pH

nalezneme také  $[\text{Pb}(\text{CO}_3)_2]$  a při vyšším množství oxidu uhličitého i  $[\text{Pb}(\text{CO}_3)(\text{aq})]$ . V mořské vodě je oproti sladké častější tvorba chloridokomplexů, které při pH 8,1-8,2 převažují nad hydroxylovými (Pitter 1999; Moore & Ramamoorthy 1984).

S organickými ligandy obsahující atom síry, dusíku či kyslíku vytváří středně silné cheláty. Olovo se také dobře váže na růstová média mikroorganismů a buněk (Moore & Ramamoorthy 1984).

Organokovové sloučeniny olova jsou méně stabilní kvůli slabé vazbě mezi Pb a C. Obecně jsou aryl sloučeniny stabilnější než alkylové a jejich stabilita roste s rostoucím počtem organických skupin. Alkylolovo může podléhat disproportionaci:



Kde X může být acetát, perchlorát, nitrát, chlorid, bromid, jodid, dusitan...

Biomethylace olovnatých solí (např. octanu olovnatého) u mikroorganismů vede za anaerobních podmínek až ke konečnému produktu tetramethylolovo (Moore & Ramamoorthy 1984).

### 3.2.2.2 Metabolismus a toxikologie

Olovo je méně toxické než kadmium, měď, zinek a rtuť, ale toxicitější než nikl, kobalt nebo mangan (Moore & Ramamoorthy 1984). Z vnějšího prostředí se dostává do organismu dýchacím či trávicím ústrojím. Toto vstřebávání nezávisí pouze na množství kovu v místě vstupu, ale také na fyziologickém stavu organismu, stáří, velikosti, pohlaví a na fyzikálních a chemických vlastnostech olovnatých sloučenin. Sloučeniny dobře rozpustné ve vodě jsou i dobře vstřebávány. Naproti tomu nerozpustné mají schopnost se rozpustit v plicích (Bencko 1984).

Vstup částic olova dýchacím ústrojím závisí na jejich velikosti a na frekvenci dechů za minutu. Při frekvenci 30 dechů/minutu se jedná o 6-16 %, při frekvenci 10 dechů 40-50 %. V trávicím systému se vstřebává 5-10 %, u dětí však může být o dost vyšší. Vstřebávání olova zvyšují diety, např. nízký obsah vápníku, vitamínu D, železa či hladovění. Průměrný příjem Pb u člověka se odhaduje na 28-38  $\mu\text{g}$  (Bencko 1984).

Akutní otravy olovem v dnešní době nejsou časté. Ve výjimečných případech se mohou projevit poruchami CNS, krvetvorby, zažívacího ústrojí, ledvin apod. Olovo prochází placentou, je teratogenní (Picka & Matoušek 1996). Je karcinogenní pro některé živočichy např. pro krysy, u lidí je zatím v sekci potenciální karcinogen. Pro vodní organismy je toxické a reprotoxické. Společně s kadmiiem se řadí k perzistentním biakumulujícím látkám (3). Zvláště nebezpečné jedy jsou organické látky tetraethylolovo, tetramethylolovo a trialkylolovičité soli (Picka & Matoušek 1996).

U bezobratlých se akutní otrava může objevit v širokém rozmezí 0,002-670 mg/l. Někteří bezobratlí, včetně stejnonožců a mnohoštětinatců, jsou však vůči intoxikaci odolní. Chronické účinky se mohou objevit při koncentracích pod LC<sub>50</sub> daného druhu. V přirozených podmínkách se mohou následky vypouštění olova do vod objevit zcela náhle přítomností či spíše nepřítomností bezobratlých. Se zvyšujícím pH se snižuje koncentrace Pb<sup>2+</sup> ve vodě a tím dochází ke snižování toxicity pro bezobratlé živočichy. Ke snížení toxicity vede také tvorba chalátů s Pb<sup>2+</sup> (Moore & Ramamoorthy 1984). Některé letální koncentrace bezobratlých (akutní toxicita) jsou shrnuty v tabulce.

**Tabulka 2. Akutní toxicita vybraných druhů Intervetebrata, (Moore & Ramamoorthy 1984), upraveno K.Štachová 2015**

	<b>Akutní toxicita [mg/l]</b>
<i>Asselus aquaticus</i>	670 (48h LC50)
<i>Daphnia hyalina</i>	0,055 (48 h LC50)
<i>Cyclops abyssorum</i>	3,8 (48 h LC50)
<i>Tanytarsus dissimilis</i>	0,258 (96 h LC50)
<i>Lymnea palustris</i>	0,036 (50 % snížení produkce)

### 3.2.3 Nikl (Ni)

Jedná se o stříbrolesklý, tažný a kujný kov řadící se do VIII. vedlejší podskupiny periodického systému. Společně s železem (Fe) a kobaltem (Co) patří do tzv. Triády železa. Ve sloučeninách se vyskytuje v oxidačním stavu II, méně často v III. Vzácně může existovat i v -I, I, IV (Kameníček et al. 2009).

V přírodě se nikl vyskytuje nejčastěji vázaný v rudách se sírou, arsenem a antimonem. Jedná se o minerály nikelin NiAs, chloantit NiAs<sub>2</sub>, millerit NiS, breithauptit NiSb, ullmanit NiSbS. Pro těžbu a výrobu má důležitý význam křemičitan garnierit (Ni,

$\text{Mg}_6\text{SiO}_{10}(\text{OH})_8$  a pentlandit  $(\text{Ni}, \text{Fe})_9\text{S}_8$ ). Z rud se získává tavením sírou, následným pražením a redukcí koksem. Velmi častá je rafinace Mondovým procesem, což je tavení karbonylniklu při teplotě kolem 200 °C (Kameníček et al. 2009).

Je dobrý vodič elektrického proudu a nepodléhá korozi (4). Práškový nikl se používá jako katalyzátor v organických syntézách. Do odpadních vod se dostává díky chemickému a sklářskému průmyslu, při povrchových úpravách kovů (Pitter 1999). Až 40-65 % produkce niklu se využívá k legování oceli a pro výrobu slitin. Jeho hydroxid se používá s kadmíem v bateriích (Bencko 1984).

### 3.2.3.1 Ni ve vodním prostředí

Ve vodě nikl tvoří stabilní komplexní sloučeniny s anorganickými i organickými ligandy. Z anorganických ligandů jsou to sírany, halogenidy, fosforečnany, uhličitany a karbonyly (CO). S huminovými kyselinami tvoří středně silné komplexy (Moore & Ramamoorthy 1984). Obdobně jako u předchozích kovů v kyselé oblasti pH se vyskytuje jako iont  $\text{Ni}^{2+}$ . V bazickém tvoří hydroxokomplexy  $[\text{Ni}(\text{OH})]^+$  až  $[\text{Ni}(\text{OH})_4]^{2-}$ , karbonato i sulfatokomplexy. V odpadních vodách z povrchových úpravách kovů se vyskytují i kyanokomplexy  $[\text{NiCN}]^+$  až  $[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{2-}$  i aminokomplexy  $[\text{NiNH}_3]^{2+}$  až  $[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$  (Pitter 1999).

### 3.2.3.2 Metabolismus a toxikologie

Absorpce niklu úzce souvisí s příjmem kadmia a zinku. Synergistické nebo antagonistické účinky látek se však mohou projevit až po určité době, protože organismy ve vodním prostředí jsou obvykle vystaveny směsí chemických látek (Bourgeault et al. 2012). Worms et al. (2007) došli k závěru, že v případě zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* pětinašobný nárůst koncentrace zinku snížil příjem niklu o 60 %, zatímco u kadmia to bylo jen o 10 %.

Vstřebávání niklu se děje prostřednictvím kůže, trávicího a dýchacího ústrojí. Jedna z nejjedovatějších látek niklu tetrakarbonylnikl se nejlépe vstřebává plicemi, kde je oxidován na oxid uhelnatý, který se váže na hemoglobin. Postiženy jsou nejvíce alveoly (plicní sklípky). U krys se vstřebalo asi 50 % inhalované dávky, zatímco trávicím ústrojím pouze 10 %. Vstřebávání kůží bylo pozorováno u morčat, králíků a



krys (Bencko 1984). U *dreissena polymorpha* Bourgeault et al. (2012) zjistili, že při nižších koncentracích přírodních organických látek byl příjem niklu vyšší. Vysvětlovali to filtrační činností sláviček. Při vyšší koncentracích přírodních organických látek došlo ke změně propustnosti membrány, a proto se méně niklu dostalo do těla sláviček.

Nejvyšší koncentrace niklu u obratlovců králíků a krys byly nalezeny převážně v ledvinách, hypofýze, játrech a plicích (Bencko 1984). U sladkovodního mlže *Lamellidans marginalis* bylo nejvíce niklu nahromaděno v dýchacím orgánu (ctenidium) a hepatopankreas (4). Až 90 % niklu vyloučí živočichové močí (Bencko 1984).

Pro mnohé rostliny, živočichy a člověka je nikl biogenní, esenciální prvek (Bencko 1984). Střední příjem dospělého člověka je cca 200-300 µg denně. Lidské tělo dokáže až 10 mg niklu skladovat a využít ho, když je potřeba. V krevní plazmě se váže na α-globulin, je důležitý pro účinné vstřebávání železa a krvevorbou. Jeho nedostatek ovlivňuje aktivitu mnohých enzymů. Pokud je podáván v nadbytku dochází v játrech ke změnám hladin glutatationu a k syntéze a zároveň degradaci hemu (Moore & Ramamoorthy 1984). Při kontaktu s kůží může u lidí vyvolat alergickou reakci. Ve větším množství je toxický, poškozují játra, ledviny, plíce či CNS. Jedná se o potenciální lidský karcinogen. Pro vodní organismy vykazují jeho sloučeniny akutní i chronickou toxicitu, která je závislá na tvrdosti vody. Čím měkčí je voda, tím je větší riziko kontaminace niklem (5).

### 3.3 Chemická analýza

Na konci října 2014 bylo odebráno asi 800 sláviček z bývalé stěrkořískovny, z jezera Kvasice, nacházející se mezi obcemi Kvasice a Tlumačov.

Po aklimatizaci byly slávičky v drúzách přibližně stejného počtu jedinců jednotlivých velikostních kategorií rozděleny do čtyř akvárií o objemu 20 l. V prvních třech akváriích bylo rozpuštěno tolik soli daného kovu, aby koncentrace kovu byla 0,5 mg/l. Do posledního akvária se žádný kov nepřidával, bylo ponecháno jako kontrola.

**Tabulka 3. Hmotnostní koncentrace kovů a jejich solí, K. Štachová 2015**

Sůl	Hmotnostní koncentrace soli [mg/l]	Hmotnostní koncentrace kovu [mg/l]
$\text{CdCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,976	0,5
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0,799	0,5
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2,024	0,5

Doba expozice trvala tři týdny. Vždy po týdnu byly odstraněni mrtví jedinci a 1/3 z živých sláviček byla odebrána a rozdělena na polovinu. První polovina byla ponechána v mrazícím boxu pro chemickou analýzu a druhá polovina byla vložena do 4-10% formaldehydu k histopatologické analýze. Dvakrát týdně bylo také odebráno 50 ml vody ze všech akvárií pro stanovení koncentrace kovů ve vodě, pro zjištění úbytku kovů díky bioakumulaci sláviček. První odebraná voda byla v ten samý den, kdy se do akvárií přidávaly soli kovu, proto první naměřená koncentrace (v den 0) je brána jako 100 %.

#### 3.3.1 Stanovení koncentrace kovů v modelovém organismu a ve vodě

##### 3.3.1.1 Mikrovlnná mineralizace a Atomová absorpční spektroskopie (AAS)

Při použití vysoce citlivých metod jako je AAS, ICP-OES (kombinace indukčně vázané plazmy s optickou emisní spektroskopií), ICP-MS (kombinace indukčně vázané plazmy s hmotnostní spektrometrií) nebo voltarimetrie se pracuje se vzorky ve vodném roztoku

(Knapp 1991). K rozložení vzorku a následnému převedení do roztoku slouží tzv. mineralizace za působení mikrovlnného záření. Jejím principem je převést organickou látku na jednoduché anorganické sloučeniny působením kyselin nebo jejich směsí za zvýšené teploty a tlaku. Mineralizace se provádí ve speciálních uzavřených tlakových nádobkách, které jsou umístěny v mineralizátoru (Opekar et al. 2003). Pokud jsou tlakové nádoby vyrobené z PTFE či PFA, teplota uvnitř mineralizátoru by neměla překročit 240 °C. Křemenné nádoby se mohou používat i při vyšších teplotách. Tlak v nádobě závisí na použitém systému, buď nízkotlaký systém do 1,6 MPa nebo vysokotlaký do 15 MPa. Pro biologické materiály se používá mineralizace kyselinou dusičnou (65-69%) v kombinaci s kyselinou sírovou, chloristou (hrozí exploze), chlorečnou nebo peroxidem vodíku, protože samotná kyselina dusičná nemá tak silné oxidační vlastnosti, aby některé organické vzorky rozložila (Knapp 1991).

Před chemickou analýzou byly slávičky rozmrazeny a rozděleny do tří velikostních skupin. V první skupině byli dospělí jedinci s délkou lastury 1-1,9 cm, v druhé 2-2,9 cm a v poslední >2,9 cm. Po odstranění lastur byly vzorky sušeny v sušárně při teplotě 105 °C po několik hodin a poté byly přeneseny do exsikátoru ke zchladnutí.

Vysušené vzorky byly homogenizovány pomocí třecí misky s tloučkem a zváženy na digitálních vahách. Vzorky s hmotností  $\geq 300$  mg byly nasypány do teflonových nádob a zality 7 ml 65%  $\text{HNO}_3$  a 1 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Při šumění krouživým pohybem a střeptáváním nádob se zabránilo jejímu vypěnění. Vzorky s hmotností  $\pm 200$  mg byly zality menším množstvím kyseliny a peroxidu, ale ve stejném poměru (4,9 ml 65%  $\text{HNO}_3$  a 0,7 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Nádoby byly uzavřeny teflonovými víčky a šroubovacími hlavicemi a vloženy do mineralizačního zařízení Speedwave 2, firmy BERGHOF, byl nastaven příslušný mineralizační program. Teplota nepřesáhla 180 °C, mineralizace trvala 54 minut včetně chlazení. Celkem se jednalo o 36 vzorků.

Po vychladnutí se opatrně odšroubovaly hlavice, pojistným otvorem od těla a obsah nádob se nalil do odměrných baněk. Vzorky s vyšší hmotností byly nality do 50 ml odměrných baněk a ty s nižší do 15 ml baněk. Poté byly doplněny destilovanou vodou po rysku, promíchány a zfiltrány přes skládaný filtr.

Pro stanovení těžkých kovů Cd, Pb a Ni ve vodě a mineralizovaných vzorcích se použil atomový absorpční spektrometr AVANTA, firmy GBC.

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je spektrometrická metoda, založená na měření absorpce elektromagnetického záření (veličina absorbance) volnými atomy v plynném stavu. Velikost absorbance je podle Lambert-Beerova zákona přímo úměrná koncentraci  $c$  stanovovaného prvku (Klouda 2003 ):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A... absorbance

$\varepsilon$ ... molární absorpční koeficient [l/mol·cm]

l... délka absorbující vrstvy [cm]

Zdrojem záření je výbojka s křemenným okénkem a s dutou katodou z čistého stanovovaného kovu. Anoda je z těžkotavitelného kovu. Prostor kolem elektrod je vyplněn vzácným plynem (argonem nebo neonem) (Opekar et al. 2003). Pro každý prvek je potřeba použít jinou výbojku.

V plamenovém atomizátoru se převedou stanovované prvky z roztoku na atomy v plynném stavu. Jako palivo se použil acetylen a oxidovadlo vzduch. Nakonec detektory (fotonásobiče) detekují záření a z absorbance vyhodnotí koncentraci stanovovaného prvku ve vzorku (Klouda 2003).

### **3.4 Histopatologická analýza**

Histopatologická analýza se používá ke zjištění nežádoucích účinků chemických látek na živý organismus.

Slávičky byly vystaveny účinkům těžkých kovů kadmia, niklu a olova po 3 týdny. Vždy po týdnu byla odebrána 1/3 živých vzorků, která byla následně rozdělena na půl. Tato polovina se přichystala k histopatologické analýze, zatímco druhá polovina byla ponechána v mrazícím boxu pro chemickou analýzu.

Základem této analýzy je zhotovení trvalých řezových preparátů pro pozorování předních, středních a zadních částí těl sláviček. Řezové preparáty se na rozdíl od totálních používají k pozorování vnitřní stavby větších objektů, které se musí nařezat na tenké plátky. Řezy se mohou zhotovovat ručně pomocí žiletky nebo ručních mikrotomů. Velmi tenké řezy se připravují na rotačních či sáňkových mikrotomech.

Celý postup spočívá v několika krocích:

**Fixace**

**Vyprání fixáže**

**Odvodnění**

**Projasňování**

**Prosycení**

**Vlastní zalití**

**Řezání na mikrotomu**

**Barvení**

**Pozorování pod mikroskopem**

#### **3.4.1 Příprava řezových preparátů**

**Fixace**

Po odebrání vzorku tkáně dochází k různým fyziologickým a morfologickým změnám až k autolýze buněk, což by vedlo k jeho znehodnocení. Aby se těmto nežádoucím

změnám zabránilo, musí se tkáň fixovat. Při fixaci dochází k rychlému usmrcení buněk, které spočívá v denaturaci bílkovin včetně enzymů (5).

Fixační tekutina musí mít schopnost rychle pronikat do tkání, ale přitom nesmí změnit strukturu buňky (Habrová 1979). Navíc má rychle usmrtit živý organismus a má upevnit struktury, aby se při pozdějším zpracování dobře barvily (Lelláková 1992). Jejich množství by mělo být asi 50 krát více než je objem fixovaného objektu (Habrová 1979, Lelláková 1992).

Fixační prostředky mohou být fyzikální nebo chemické. Mezi fyzikální metody patří zejména fixace teplem, vyschnutím za mrazu či rychlým zmrazením. Žádná z těchto metod nemá však v histologii široké uplatnění, používá se zejména pro krevní nátěry (Habrová 1979) nebo v mikrobiologii (odkaz). Větší uplatnění má použití chemických fixačních prostředků. Jedná se o anorganické i organické sloučeniny, které se mohou použít samostatně i ve směsích. Mezi nejznámější patří Bouinova tekutina, Zenkerova, Carnoyova, formaldehyd, ethanol či kyselina octová (sublimát) (Habrová 1979).

Živé vzorky sláviček i s lasturou byly ponechány ve fixační tekutině 4-10% formaldehydu (tzv. 10-25% formol), kde došlo k jejich usmrcení. Formaldehyd se prodává 35-40% a ředí se v poměru 1:4 až 1:10, přitom pro jemné objekty se používá nižší koncentrace (Lelláková 1992). Vzorky byly po několik týdnů uzavřeny v tmavých láhvích, protože se formaldehyd světlem oxiduje a vzniklá kyselina mravenčí by poškodila živočišnou tkáň (6).

### **Vyprání fixáže**

Vypírání fixačních tekutin je velice důležité, protože přítomnost fixační tekutiny v tkáních by byla překážkou pro další zpracování preparátů zejména při zalévání do parafínu a barvení (Habrová 1979).

Vybrané vzorky o velikosti lastury 2-2,9 cm byly nejdříve zbaveny schránek. Poté byly tkáň uzavřeny v gázovém sáčku 7,5 x 7,5 cm a na 6-8 h zavěšeny do nádoby s vodou, která se dvakrát vyměnila.

### **Odvodnění**

Pro přípravu mikroskopických řezů živočišných tkání se jako montovací médium používá parafín. Parafín je látka ve vodě nerozpustná, a proto je třeba objekty před vlastním zalitím odvodnit. Odvodnění se provádí vzestupnou alkoholickou řadou, která zaručí co nejmenší smrštění tkáně (Habrová 1979).

Objekt byl přenesen do ethanolu nejdříve do 70%, 80% a nakonec do 96%. V každé lázni byl ponechán asi 6 hodin, podle velikosti objektu. Důležitou roli při odvodňování hraje množství alkoholu, které by mělo být spíše větší a lázeň by se měla alespoň jednou vyměnit (Jírovec 1958).

### **Projasňování**

Dalším krokem je tkáň projasnit benzenem. Parafín je v benzenu při zahřátí dobře rozpustný, navíc se benzen dobře mísí i s ethanolem. Objekt je ponechán ve třech benzenových lázních, v každé po dobu 10-15 min. Po poslední lázni by měla být tkáň průsvitná. Pokud tomu tak není a tkáň je mléčně zbarvená, měla by se znovu vrátit do 96% ethanolu na 6 hodin (Habrová 1979).

### **Prosycení**

K prosycení objektu se používá speciální parafín pro histologii tzv. paraplant. Paraplant je čistý parafín s přídavkem polyisobutylenu, má podobu bílých voskových peciček, které tají v rozmezí 55-57 °C. Je vhodný pro řezy tenké až 5 μm (7).

Do benzenu bylo nasypáno takové množství parafínu, aby vznikl nasycený roztok (poměr cca 1:2 parafín:benzen). Termostat byl nastaven na teplotu 35-40 °C a po rozpuštění parafínu byly do něj vloženy objekty. Po půl hodině byly tkáně přeneseny do rozpuštěného čistého parafínu a byly ponechány v termostatu o teplotě 55-60 °C. Po 2-3 hodinách byla lázeň vyměněna, v druhé lázni byl objekt ponechán asi 3-4 h a v třetí lázni byl ponechán přes noc, asi 12 h (Habrová 1979).

### **Vlastní zalití**

Po poslední lázni následuje vlastní zalití do parafínu a zhotovení tak parafínových bločků. Z papíru byly zhotoveny malé krabičky, které byly následně popsány značkou kovu. Nový rozpuštěný parafín byl nalit do krabičky, rychle nahřátou pinzetou byly do

něj umístěny tkáně a krabička byla ponořena do vody o teplotě 10-15 °C. Dbalo se na to, aby se voda nedostala dovnitř krabičky, došlo by tak k znehodnocení bločku. Až vznikla na povrchu bločku parafínová ztuhlá vrstva, krabička se potopila celá (Habrová 1979).

## **Řezání na mikrotomu**

K řezání tenkých řezů pro mikroskopování se používají speciální přístroje zvané mikrotomy. Podle způsobu ovládání rozlišujeme mikrotomy sáňkové a rotační. Mikrotomy, které pracují se zmraženými bločky se nazývají zmrazovací (Habrová 1979).

Dnešní mikrotomy mohou být manuální, poloautomatické či automatické. Parafínové bločky s tkáněmi sláviček byly krájeny na rotačním mikrotomu Microm Ergostar HM 200, firmy Zeiss. Každý rotační mikrotom se skládá ze základny, na kterou se upevňuje držák s nožem, s kterým se dá pohybovat. Do držáku se připevní nůž pomocí svorek a pomocí bočních šroubů se nastaví sklon. Parafínový bloček je pevně umístěn v malém držáku nad nožem a bočními rukojetmi se posouvá bloček ve svorce nahoru a dolů a tím vzniká souvislá tenká páska. Na mikrotomu jsou tlačítka pro posun svorky s bločkem dopředu a dozadu a nastavení velikosti řezů.

Nejprve byly bločky zahřátým parafínem přilepeny k dřevěnému špalíčku. Po jeho ztuhnutí se špalíček s bločkem upevnil do svorky (držáku) mikrotomu, nastavila se požadovaná tloušťka řezů (7 a 12 μm) a sklon nože 10-15° k rovině řezu. Pomocí tenkého štětečku byly řezy přenášeny a lepeny na podložní sklíčko natřené směsí glycerol-bílek s kapkou destilované vody navrchu. Sklíčko se poté položilo na ploténku o teplotě 40-45 °C, aby se řezy natáhly.

## **Barvení**

Některé buněčné a tkáňové struktury nejdou bez barvení dobře pozorovat ve světelném poli klasického mikroskopu (nebarvené se dají pozorovat pouze ve speciálních mikroskopech).

V histologii se rozlišují barviva podle acido-bazických vlastností na kyselé, zásadité a neutrální. Kyselé barví dobře cytoplazmu, patří zde např. eosin, erythroeosin, kyselý fuchsin či oranž G. Zásadité barví jádra, ale i jiné cytoplazmatické struktury jako



jsou třeba mitochondrie. K těmto barvivům řadíme hematoxylin, methylovou zeleň, azokarmín G, toluidinovou modř a bazický fuchsin (Habrová 1979).

Sklička s parafínovými řezy se barví ve speciálních skleněných nádobách, tzv. Hellendahlových kyvetách, aby se urychlil proces barvení a zabránilo se slepení sklíček. Nejprve se řezy zbavují parafínu ponořením sklíček do dvou xylenových lázní v každé na 5 minut. Poté následuje sestupná alkoholová řada (96%, 80%, 70%) končící destilovanou vodou. Jednotlivá sklíčka byla přenášena pomocí pinzety vždy z jedné kyvety s roztokem do druhé. Je třeba dbát na to, aby sklíčka nezaschly, ale zároveň se hrany sklíček otírají filtračním papírem, aby nedošlo ke smíchání roztoků. Po odparafínování se sklíčka přenesou na 5 min do hematoxylinu, následuje opláchnutí ve vodě, diferenciaci v okyseleném 96% alkoholu (na 100 ml alkoholu 3-5 kapek HCl) a praní v tekoucí vodě. Poté se ponořily sklíčka do druhého barviva, do kyselého eosinu. Následuje znovu opláchnutí vodou z vodovou a destilovanou vodou, poté odvodnění vzestupnou alkoholovou řadou (70%, 80%, 96%) a opět 2 lázně xyleny. Pokud bychom chtěli zhotovit trvalý preparát, nabarvené řezy se fixují pomocí kanadského balzámu a přikryjí krycím sklíčkem.

Pro přehlednost je zde uvedeno schéma kroků při barvení:

Odparafínování, zavodnění:

Xylen I	5 min
Xylen II	5 min
Ethanol 96%	5 min
Ethanol 80%	5 min
Ethanol 70%	5 min
Destilovaná voda	5 min

Barvení hematoxylin-eosin:

Hematoxylin	5 min
Opláchnutí ve vodě (dokud nepřestane téct modrofialová voda)	
Diferenciace okyseleným ethanolem	2 min
Praní v tekoucí vodě	
Eosin	5 min
Opláchnutí ve vodě	

Odvodnění, prosycení xylenem:

Ethanol 70%	5 min
Ethanol 80%	5 min
Ethanol 96%	5 min
Xylen I	5 min
Xylen II	5 min

### **Pozorování pod mikroskopem**

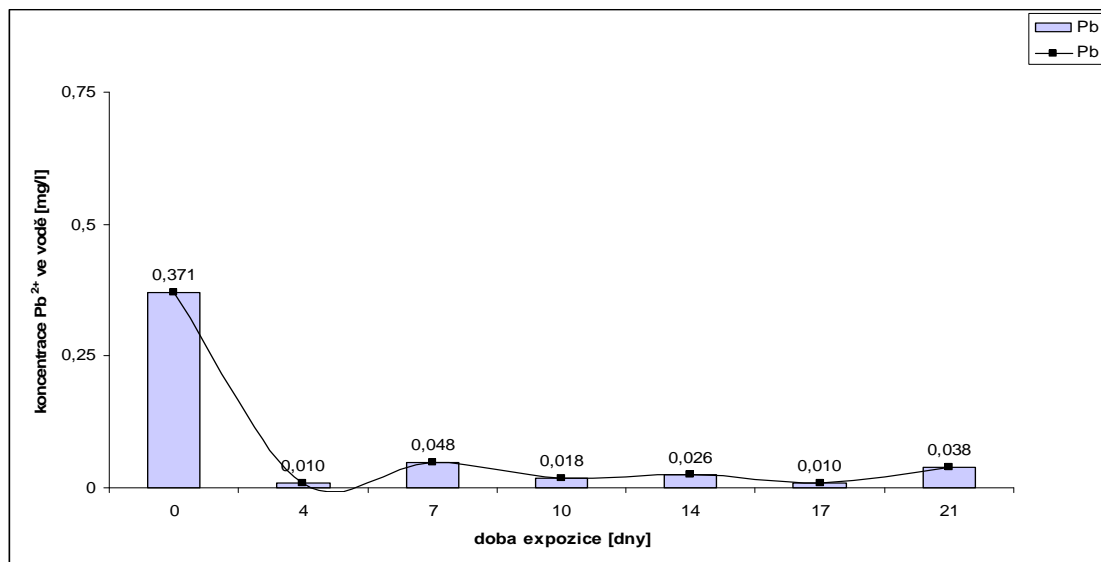
Nabarvené řezové preparáty byly opatřeny popisky a několik dní sušeny. Poté byly pozorovány pod světelným mikroskopem Olympus BX60 pod objektivem 4x, 10x nebo 20x a foceny digitální kamerou Olympus DP70.

## 4 Výsledky

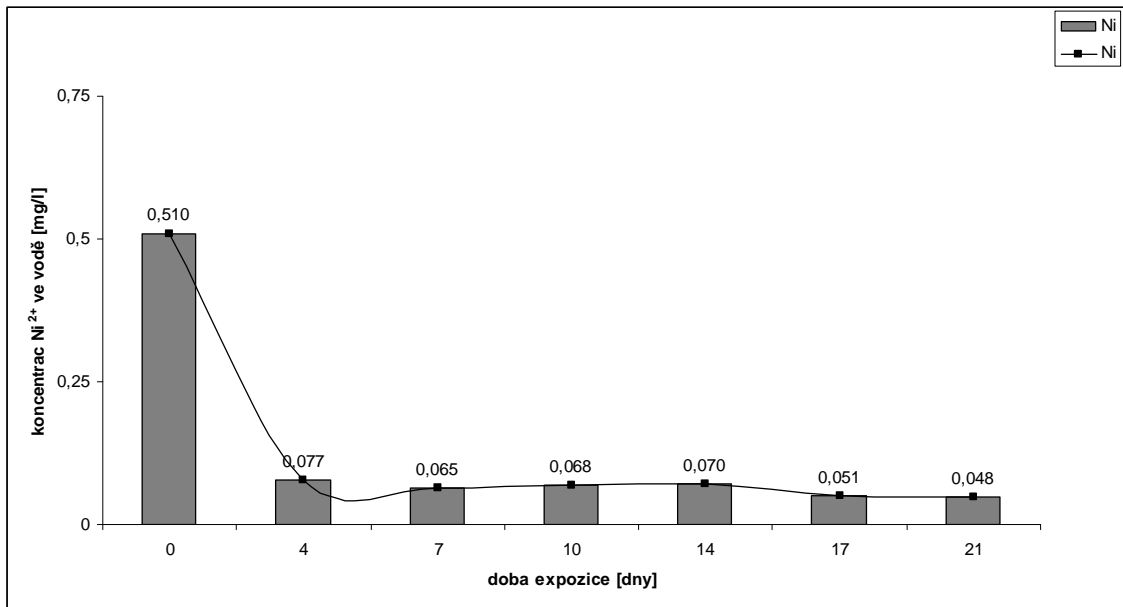
### 4.1 Chemická analýza

#### 4.1.1 Stanovení koncentrace kovů ve vodě

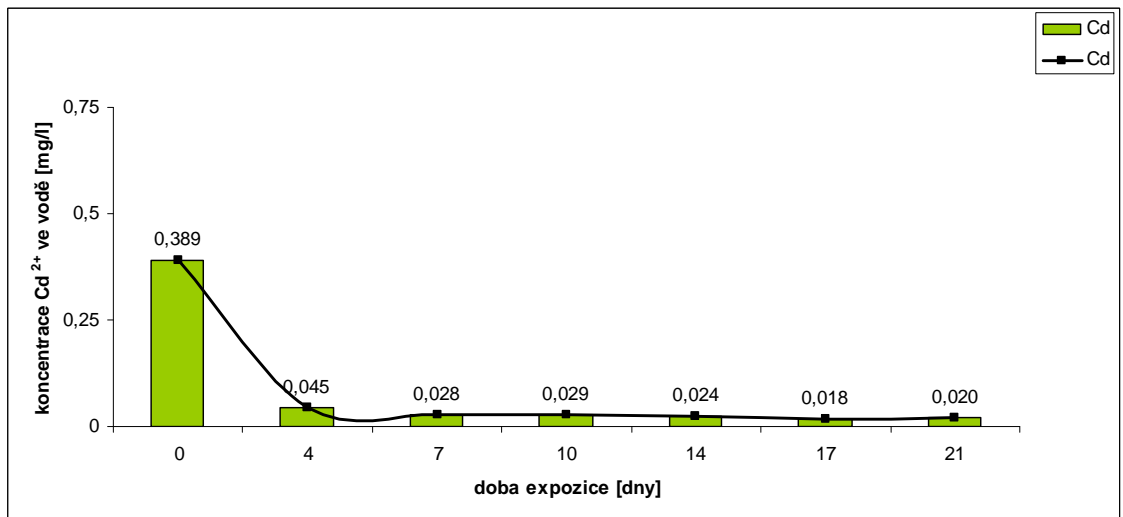
Pomocí AAS byla stanovena hmotnostní koncentrace těžkých kovů Pb, Ni a Cd ve vodě pro důkaz bioakumulační schopnosti sláviček. Již po čtyřech dnech pozorujeme u olova, kadmia a niklu výrazný pokles jejich množství ve vodě. U olova klesne koncentrace až na 0,010 mg/l (2,7 % z původní hodnoty, ze dne 0), u kadmia na 0,045 mg/l (11,6 %) a u niklu 0,077 mg/l (15,1 %). V dalších dnech už tak výrazný pokles nepozorujeme. Koncentrace každého kovu ve vodě je oproti výchozí hodnotě nízká, téměř lineární, pozorujeme malé výkyvy koncentrace z důvodu vylučování odpadních látek slávičkami a jejich opětovnou filtrací. Nejnižší koncentrace u olova byla 0,01 mg/l což odpovídá 2,7 % původních hodnoty, u niklu byla 0,048 mg/l (9,4 %) a u kadmia 0,018 mg/l (4,6 %). Z grafů lze také vyčíst, že nejnižší hodnota u niklu byla až po 21 dnech, 4. až 14. den byly hodnoty ještě o dost vyšší. Zatímco u olova byla nejnižší koncentrace hned po prvním týdnu, u kadmia v 17. den.



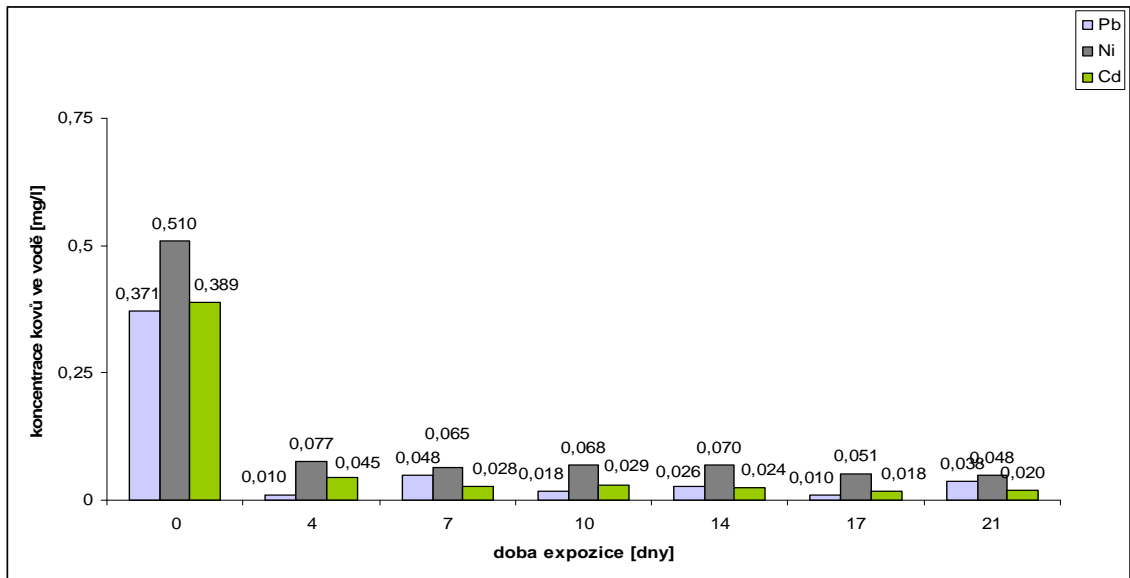
Obrázek 1. Graf závislosti koncentrace Pb iontů ve vodě na době expozice, K.Štachová 2015



Obrázek 2. Graf závislosti koncentrace Ni iontů ve vodě na době expozice, K.Štachová 2015



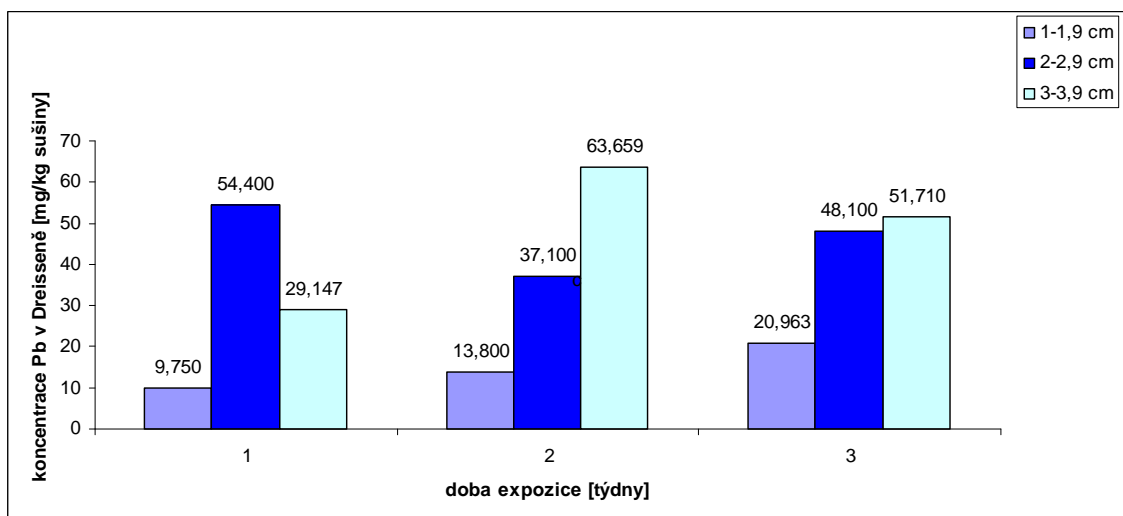
Obrázek 3. Graf závislosti koncentrace Cd iontů ve vodě na době expozice, K. Štachová 2015



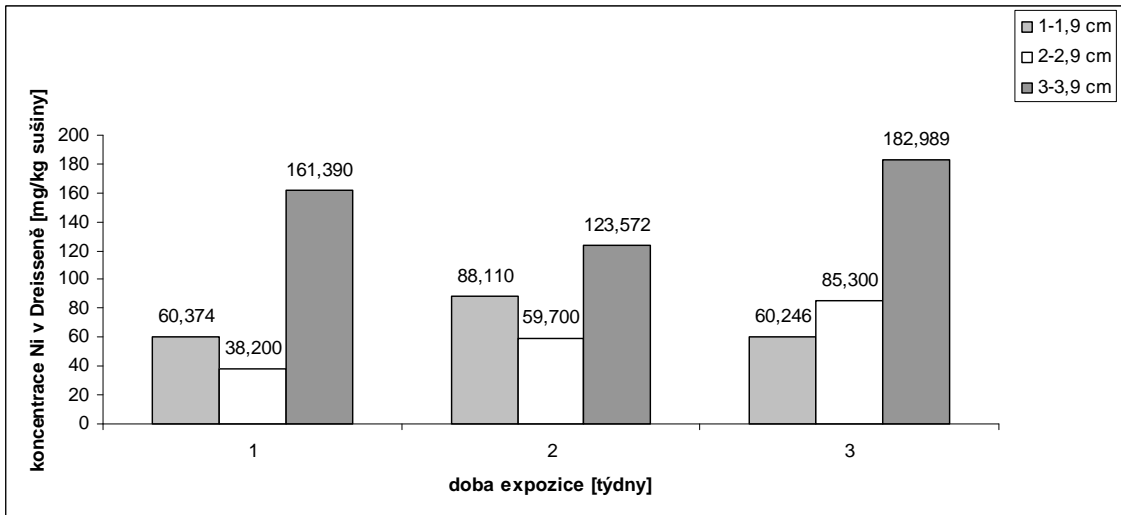
Obrázek 4. Graf srovnání koncentrace kovů ve vodě, K. Štachová 2015

#### 4.1.2 Stanovení koncentrace kovů v modelovém organismu

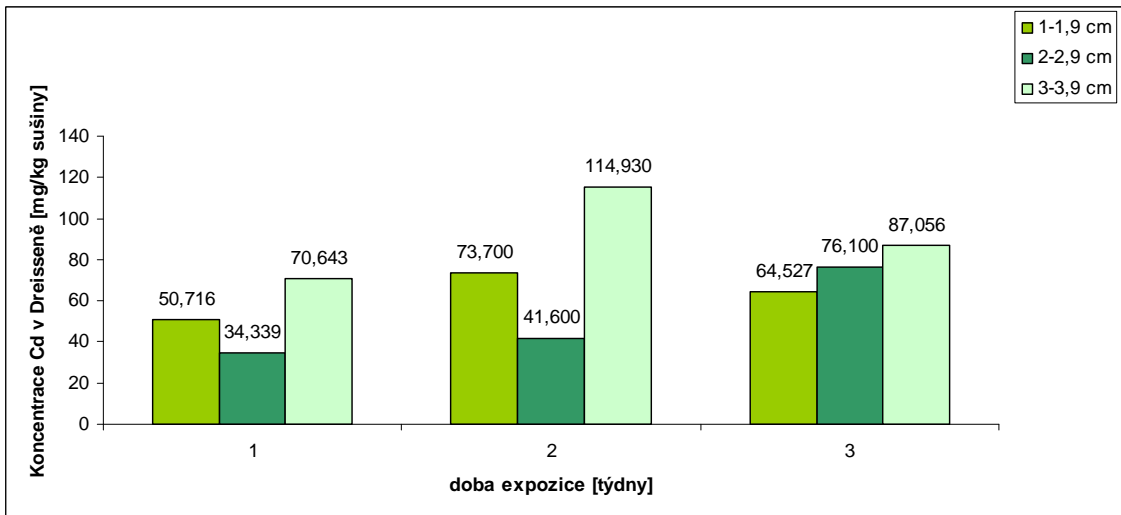
Mikrovlnou mineralizací a AAS byla stanovena hmotnostní koncentrace těžkých kovů Cd, Pb a Ni ve tkáních dospělých jedinců slávičky mnohotvárné (*Dreissena polymorpha*). V každém akváriu s kovem byly jedinci různé velikosti, kteří byli před mineralizací rozděleni do tří skupin podle délky lastury. Spektrometr vyhodnotil koncentraci kovu v roztoku (v mg/l), a proto se musela koncentrace přepočítat na hmotnost kovu (mg) v jednom kg sušiny.



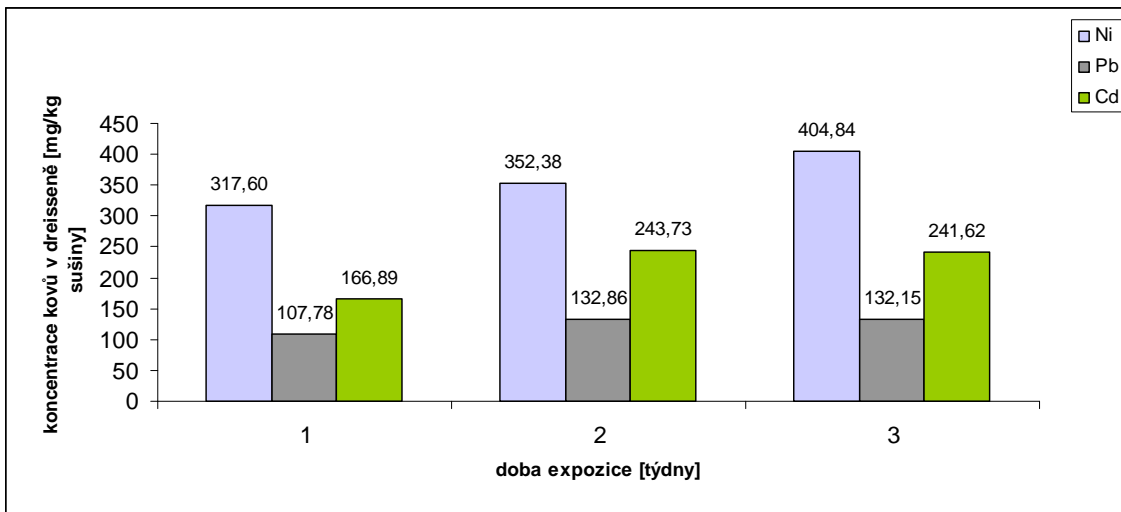
Obrázek 5. Graf bioakumulace Pb slávičkou, srovnání tří velikostních skupin, K. Štachová 2015



Obrázek 6. Graf bioakumulace Ni slávičkou, srovnání tří velikostních skupin, K. Štachová 2015



Obrázek 7. Graf bioakumulace Cd slávičkou, srovnání tří velikostních skupin, K. Štachová 2015

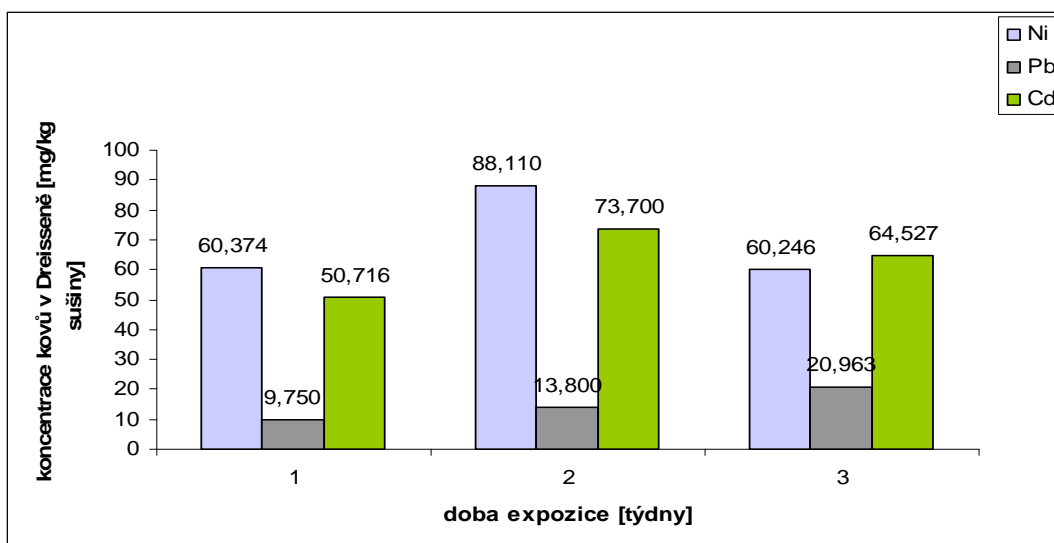


Obrázek 8. Graf bioakumulace kovů slávičkou, bez srovnání velikostních skupin, K. Štachová 2015

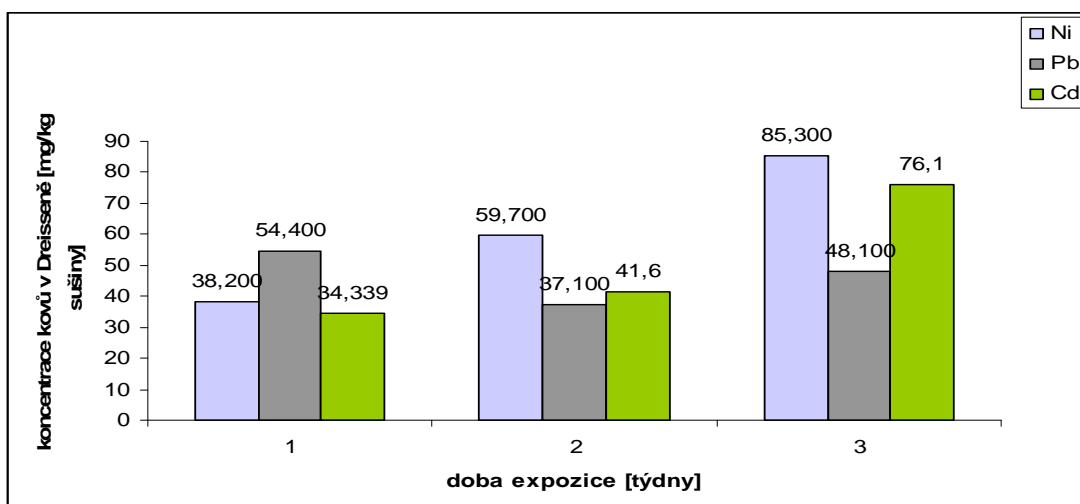
Všechny stanovované kovy se porovnávaly s blankem, do kterého žádný kov nebyl přidáván. Nicméně i v blanku byly pomocí AAS naměřeny nízké koncentrace každého ze tří stanovovaných kovů, a proto se jejich hodnoty odečetly.

Pokud porovnáváme jednu velikost sláviček v závislosti na době expozice, výsledky nevykazují stejnou závislost. Lineárně roste u olova pouze u malých jedinců, u niklu a kadmia u středních velikostí.

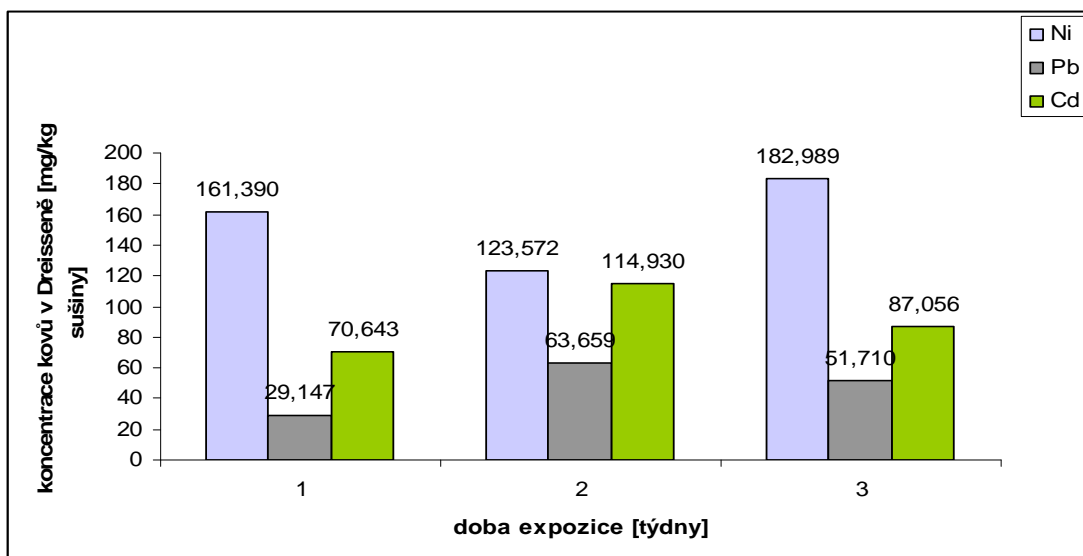
Z grafů můžeme vyčíst, že nejvyšší koncentrace kovů byla u jedinců s největší velikostí (až na jedinou výjimku 1. týden u Pb, kdy byla nejvyšší koncentrace u střední velikosti), nejmenší byla naopak u nejmenších velikostních kategorií.



Obrázek 9. Graf bioakumulace kovů slávičkou, srovnání velikostní skupiny 1-1,9 cm, K.Štachová 2015



Obrázek 10. Graf bioakumulace kovů slávičkou, srovnání velikostní skupiny 2-2,9 cm, K.Štachová 2015



Obrázek 11. Graf bioakumulace kovů slávičkou, srovnání velikostní skupiny 3-3,9 cm, K.Štachová 2015



## 4.2 Histopatologická analýza

Pro tuto analýzu bylo náhodně vybráno asi 120 jedinců střední velikosti *Dreissena polymorpha*. Při krájení na mikrotomu se na sklíčka lepily řezy tenké 7-12  $\mu\text{m}$  z přední, střední (tvar průřezu těla) a zadní (inhalační a exhalační ony) části těla. Bylo zhotoveno 96 sklíček s řezovými preparáty, které byly pozorovány pod mikroskopem.

### 4.2.1 Tvar těla

Cílem bylo zjistit, jestli se měnil tvar průřezu střední části těla sláviček po přidání daného kovu oproti blanku po 3 týdny expozice. K tomu bylo náhodně vybráno 7 mikroskopických řezů střední části těla z každého ze tří kovů a blanku, z každého týdne (dohromady tedy 84 řezů). Tvar se určil pomocí poměrů výška a šířka, kdy oválný tvar měl poměr mezi hodnotami 1-2,5, podlouhlý 2,5-4. Široký tvar by se neměl moc brát v úvahu, neboť se nejspíš jednalo o oválný či podlouhlý tvar, ve kterém chybí kousek těla či nohy. Výsledky shrnuje následující tabulka.

**Tabulka 4. Srovnání tvaru průřezu střední části těla sláviček po tří týdenní expozici Cd, Pb, Ni s blankem, K.Štachová 2015**

		1	2	3	4	5	6	7	O/P/Š
1. týden	blank	oválný	oválný	oválný	oválný	oválný	široký	široký	5,0,2
	kadmium	podlouhlý	podlouhlý	podlouhlý	podlouhlý	oválný	oválný	oválný	3,4,0
	olovo	oválný	podlouhlý	oválný	podlouhlý	podlouhlý	podlouhlý	široký	2,4,1
	nikl	široký	široký	široký	široký	podlouhlý	podlouhlý	oválný	1,2,4
2. týden	blank	podlouhlý	oválný	podlouhlý	oválný	podlouhlý	podlouhlý	podlouhlý	2,5,0
	kadmium	oválný	oválný	podlouhlý	podlouhlý	podlouhlý	oválný	oválný	4,3,0
	olovo	oválný	široký	široký	oválný	podlouhlý	oválný	podlouhlý	3,2,2
	nikl	oválný	oválný	podlouhlý	oválný	oválný	podlouhlý	oválný	5,2,0
3. týden	blank	podlouhlý	oválný	oválný	oválný	podlouhlý	podlouhlý	podlouhlý	3,4,0
	kadmium	oválný	oválný	oválný	oválný	podlouhlý	oválný	oválný	6,1,0
	olovo	oválný	široký	oválný	oválný	oválný	podlouhlý	podlouhlý	4,2,1
	nikl	oválný	oválný	oválný	oválný	podlouhlý	podlouhlý	oválný	5,2,0

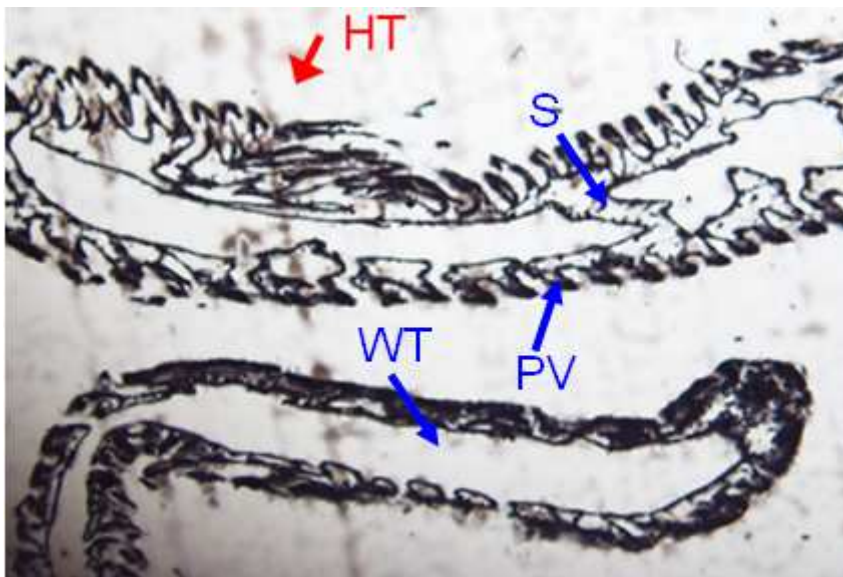
Nebyly zjištěny žádné závislosti tvaru průřezu těla na přidání určitého kovu v rámci expozice. Byly nalezeny oválné i podlouhlé tvary průřezu, žádný kov nevykazoval jenom oválné nebo naopak jenom podlouhlé, nebyl nalezen žádný shodný poměr oválných a podlouhlých u stejného kovu v rámci doby expozice. Jen u niklu byl

v druhém a třetím týdnu shodný poměr 5:2 oválný: podlouhlý. V prvním týdnu byl často tvar průřezu u Ni široký, proto nemůžeme vyloučit, jestli by se poměr také neshodoval s poměrem 5:2.

#### 4.2.2 Žábry

Žábry mlžů včetně slávičky mnohotvárné se nachází ve dvou řadách pod pláštěm podél těla. Většinu z nich šlo dobře pozorovat ve střední a přední části těla. Žábry ze střední části se anatomicky nijak nelišily od těch ze přední. Jejich distální konce byly vždy zaoblené, příčně orientovaná vlákna (PV), vodní kanál (WT) a septa (S) dobře pozorovatelné.

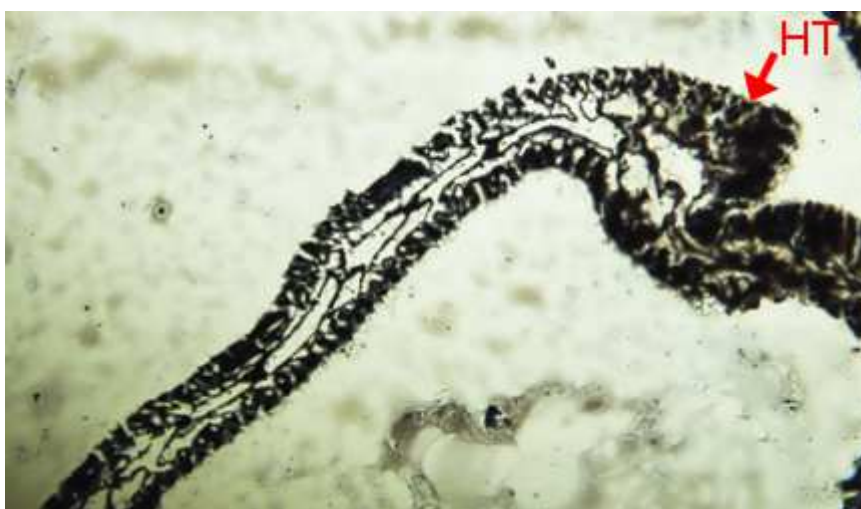
Ve většině případů nebyly pozorovány žádné změny. Jen ojediněle byly nalezeny nekrózy (N) tkání a v druhém týdnu expozice zvětšené (HT) příčně orientovaná vlákna žaber.



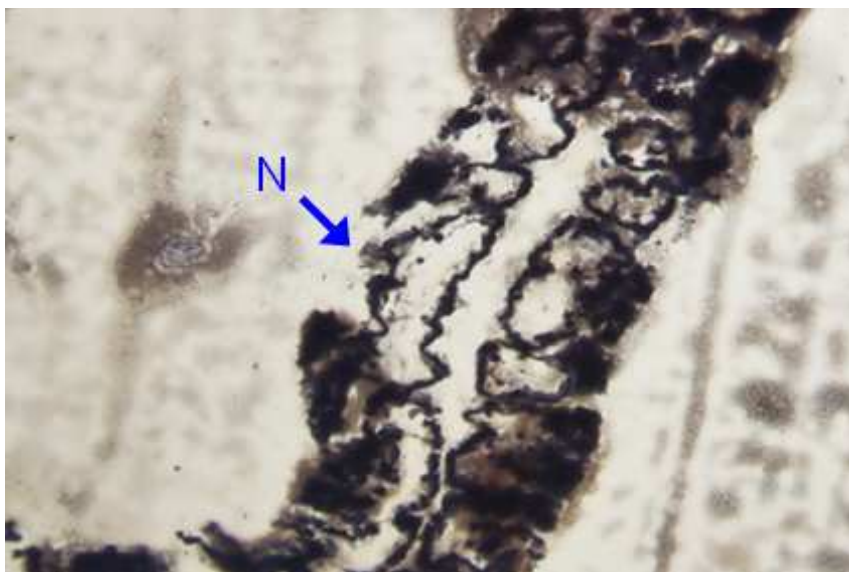
Obrázek 12. Mikroskopický řez žaber *Dreissena polymorpha*, Pb2, zv.10, K. Štachová 2015



Obrázek 13. Mikroskopický řez žaber *Dreissena polymorpha*, Ni2, zv.10, K. Štachová 2015



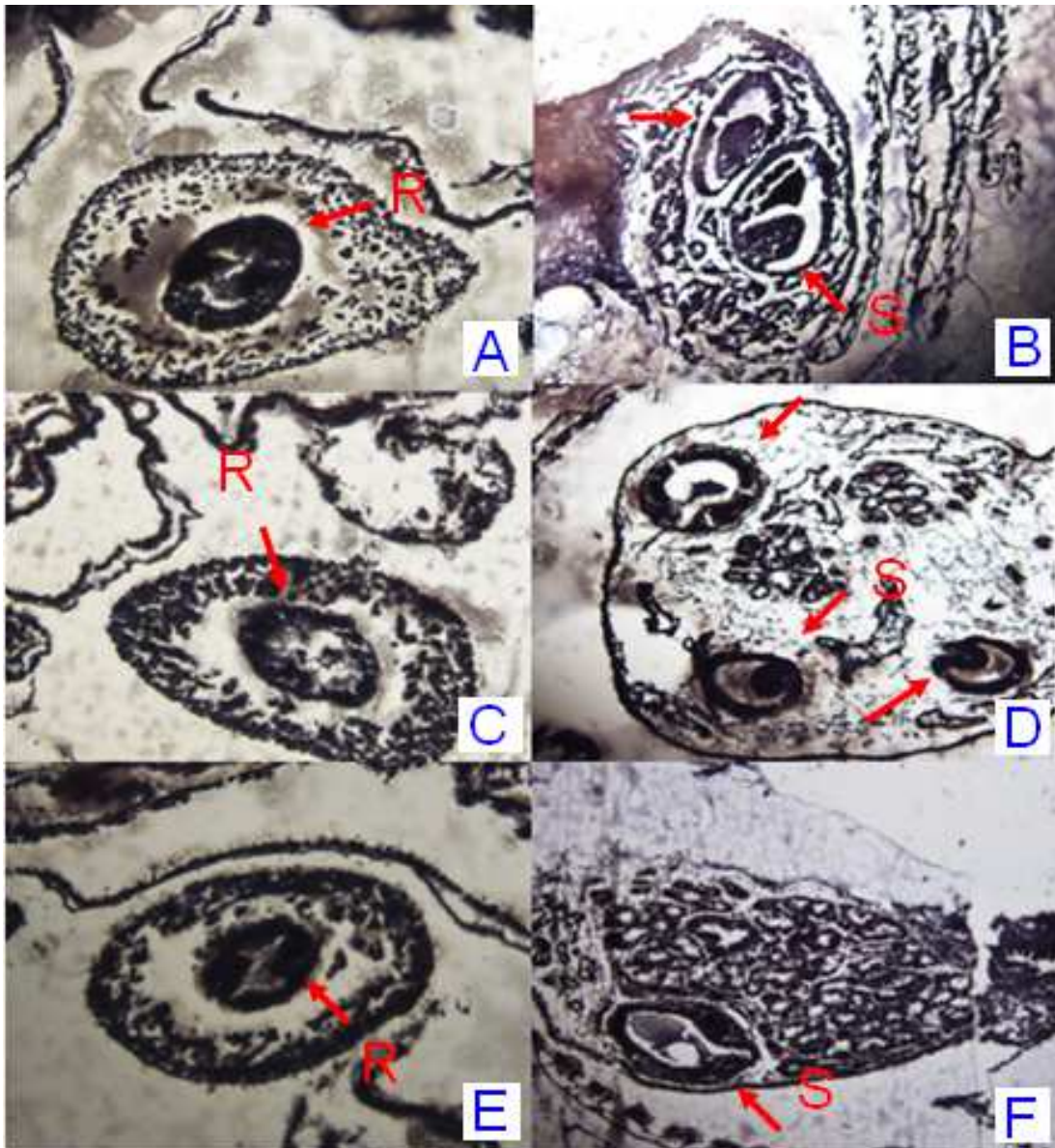
Obrázek 14. Mikroskopický řez žaber *Dreissena polymorpha*, Cd2, zv.10, K. Štachová 2015



Obrázek 15. Mikroskopický řez žaber *Dreissena polymorpha*, Cd1, zv.20, K. Štachová 2015

### 4.2.3 Trávicí trubice

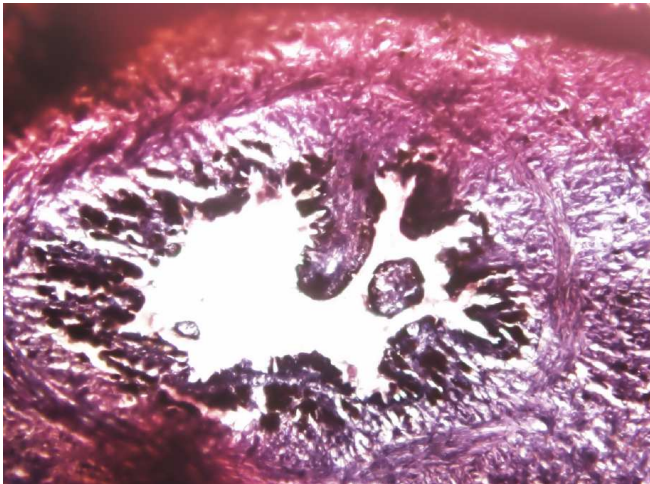
Na příčném řezu ve střední a přední části těla lze pozorovat trávicí ústrojí (střevo, žaludek, rektum). Průřez trubic byl oválný až kulatý, nebyli zde viděni žádní paraziti, nekrózy ani jiné morfologické změny. Časté bylo jedině zvětšení lumenu.



Obrázek 16. Mikroskopické řezy trávicí trubicí *D. polymorpha*, rektum (obr. A,C,E), střevo (obr. B,D,F), A : Cd2, zv.20, B : Pb2, zv.10, C : Cd1, zv.20, D : Pb2, zv.10, E : Ni2, zv.20, F : Pb2, zv.10, K. Štachová 2015

#### 4.2.4 Sifa

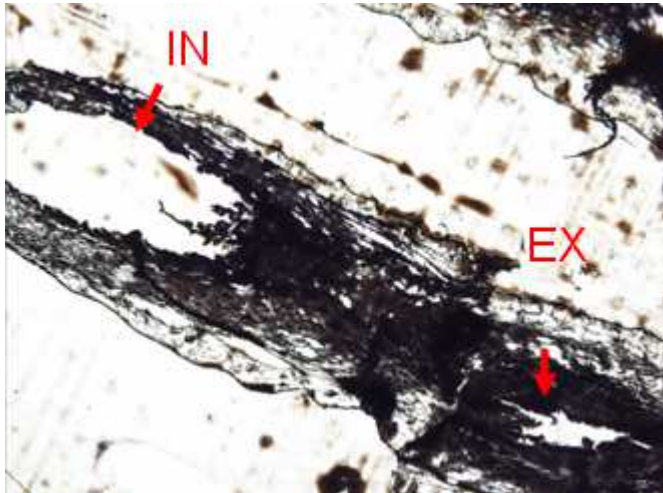
Inhalační a exhalační sifa hrají důležitou roli ve fyziologii, reprodukci a obraně mlžů (Ram et al. 1999). Nachází se blízko sebe v zadní části těla, nicméně při řezání se mi pouze občas podařilo zhotovit průřez obou sif najednou. Inhalační sifo bylo vždy větší, ale oba měly různé tvary průřezu, od oválných, zploštělých až po kulaté. Bohužel někdy docházelo k jejich potrhání a tím i k znehodnocení řezů.



Obrázek 17. Mikroskopický řez inhalačního sifa *D.polymorpha*, Ni1, zv.20, K.Štachová 2015



Obrázek 18. Mikroskopický řez exhalačního sifa *D.polymorpha*, Ni1, zv.10, K.Štachová 2015



Obrázek 19. Mikroskopický řez inhalačního (IN) a exhalačního (EX) sifa *D.polymorpha*, blank2, zv.4, K. Štachová 2015

## 5 Diskuze

Z experimentu vyplývá, že *Dreissena polymorpha* je dobrý bioindikátor sladkých vod, vhodný pro biomonitorování těžkých kovů kadmia, niklu a olova. Má schopnost filtrovat vodu a dostat tak do svého těla nižší i vyšší koncentrace kovů. Z grafů můžeme vyčíst zřetelně viditelný úbytek každého ze tří kovů Cd, Ni, Pb ve vodě již 4. den expozice (obrázek 1,2,3,4). Z analýzy vody můžeme říci, že největší úbytek koncentrace kovu zaznamenalo olovo, které mělo minimální koncentraci v 1. týdnu, konkrétně 0,010 mg/l (2,7 % původní hodnoty). Poté následovalo kadmium, v 17. den 0,018 mg/l (4,6 %) a nakonec nikl, v poslední den experimentu 0,048 mg/l (9,6 %). Všechny úbytky koncentrace kovů ve vodě a procentuální úbytky jsou shrnuty v následující tabulce.

**Tabulka 5. Koncentrace kovů Ni, Pb a Cd ve vodě a úbytky v závislosti na době expozice, K.Štachová 2015**

	<b>hmotnostní koncentrace kovu ve vodě [mg/l]</b>	<b>procentuální úbytek [%]</b>	<b>doba expozice [dny]</b>
<b>Ni</b>	0,077	15,1	4
	0,065	12,8	7
	0,068	13,3	10
	0,070	13,7	14
	0,051	10,0	17
	<b>0,048</b>	<b>9,6</b>	<b>21</b>
<b>Pb</b>	<b>0,010</b>	<b>2,7</b>	<b>4</b>
	0,048	12,9	7
	0,018	4,9	10
	0,026	7,0	14
	<b>0,010</b>	<b>2,7</b>	<b>17</b>
	0,038	10,2	21
<b>Cd</b>	0,045	11,6	4
	0,028	7,2	7
	0,029	7,5	10
	0,024	6,2	14
	<b>0,018</b>	<b>4,6</b>	<b>17</b>
	0,020	5,1	21



Slávička má velmi dobrou bioakumulační schopnost, což dokazují grafy bioakumulace kovů slávičkou (obrázek 5,6,7,8). U všech tří kovů platilo, že v nejmenších jedincích (1-1,9 cm) byla nižší koncentrace kovů než v největších (3-3,9 cm). Nicméně u středních velikostí (2-2,9 cm) nebyl pozorován žádný vliv koncentrace kovu na velikosti. V nejmenších slávičkách pozorujeme u Pb s rostoucí dobou expozice lineární nárůst koncentrace. V prvních dvou týdnech byly u Ni a Cd nižší hodnoty ve středních velikostech než v malých, jinak byly vyšší. Pouze v prvním týdnu u Pb byly nejvyšší koncentrace ve středních velikostech, jinak byly vždy nejvyšší v největších slávičkách.

Tabulka 6. Koncentrace kovů Ni, Pb, Cd ve slávičkách u tří velikostních skupin, K.Štachová 2015

		koncentrace kovu [mg/kg sušiny]		
		1-1,9 cm	2-2,9 cm	3-3,9 cm
1. týden	Ni	60,4	38,2	161,4
	Pb	9,75	<b>54,4</b>	29,1
	Cd	50,7	34,3	70,6
2. týden	Ni	88,1	59,7	123,6
	Pb	13,8	37,1	63,6
	Cd	73,7	41,6	114,9
3. týden	Ni	60,2	85,3	182,9
	Pb	20,9	48,1	51,7
	Cd	64,5	76,1	87,1

K podobným závěrům došla i studie Richman & Somers (2005), která zkoumala vliv velikosti *D. polymorpha* a *D. bugensis* na koncentraci 7 těžkých kovů (Cd, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn). Pouze u Cd, Cu a Mn byly na jednom místě řeky Niagara rozdílné koncentrace u různě velkých jedinců, větší jedinci (1,6-2,5 cm) měly vyšší koncentrace kovů v tkáních než ti menší (<1,5 cm). V závislosti na druzích se koncentrace lišily. *D. polymorpha* měla ve tkáních vyšší koncentrace než *D. bugensis*. Jiná studie Kwan et al. (2003) zjišťovala závislost koncentrací kovů v tkáních a obsah kovu tkáně na velikosti těla sláviček pomocí regresivních modelů a korelačních matic. Výsledky ukázaly, že kovy As, Pb, Mn, Se a Hg nevykazovaly žádnou pozitivní korelaci, naproti tomu pozitivní závislost byla nalezena u Cd, Ni, Cr, Ca, Zn a Cu. Studie Rutzke et al. (2000) došla také k podobným závěrům. V jezeru Ontario se měřila koncentrace několika těžkých kovů v závislosti na velikosti *D. polymorpha* a *D. bugensis* a konkrétně u Cd a Pb byly nalezeny vyšší koncentrace kovu ve větších jedincích (2-

2,5 cm) než v menších (1,5-2 cm). U Ni byly hodnoty stejné. Stejně jako u Richman & Somers (2005), byly koncentrace u stejně velkých jedinců u *D. polymorpha* vyšší než u *D. bugensis*, proto můžeme říci, že *D. polymorpha* má lepší akumulaci schopnost.

Je zajímavé, že k opačným výsledkům došly studie, zaměřené na bioakumulaci perzistentních organických polutantů slávičkou. Například studie prováděny na pesticidu Lindanu (Berny et al. 2002) nebo na organokovové sloučenině tributylcínů (Fent & Hunnt 1991) obě dokazují, že nejvyšší koncentrace těchto látek byla nalezena právě naopak v nejmenších jedincích.

Řada prací se zabývala stanovováním koncentrací těžkých kovů v určitém vodním systému (v řece, jezeře, nádrži apod.) s využitím bioakumulačních schopností slávičky mnohotvárné. Tento experiment zjišťoval bioakumulaci slávičky za laboratorních podmínek, nicméně, protože malé množství kadmia, olova i niklu bylo nalezeno v kontrolních vzorcích (bez přidání kovů) můžeme tyto výsledky porovnat s vybranými studii (tabulka 7).

**Tabulka 7. Srovnání celkových koncentrací kovů Cd, Pb a Ni naměřených v tkáních *Dreissena polymorpha* na vybraných místech severní Ameriky a Evropy, K. Štachová, 2015**

lokace	Cd [μg/g sušiny]	Pb [μg/g sušiny]	Ni [μg/g sušiny]	rok sběru	studie
jezero Kvasice (ČR)	3,14-5,00	0,55-8,2	13,23-34,70	2014	tato studie
jezero Ontario (USA, Kan.)	6,76	-	-	2003	Johns 2010
	1,53	-	-	2002	
	3,35	-	-	2001	
	4,17	-	-	2000	
	3,46	-	-	1999	
	4,78	-	-	1998	
	5,25	-	-	1997	
	6,86	-	-	1995	
	12,04	-	-	1994	
řeka St.Lawrence,1(USA,Kanada)	3,08	1,51	52,5	1996	Kwan et al. 2003
řeka St.Lawrence,2	3,01	1,27	40,4		
řeka Niagara,1 (USA)	2,2-7,3	0,55-8,9	31-45	1995	Richman & Somers 2005
řeka Niagara,2	4-7,9	2,3-10	37-51		
řeka Dunaj,Vídeň,1(Rak.)	0,37-0,69	0,11-0,25	-	1993-94	Gundacker et al.1998
řeka Dunaj,Vídeň,2	0,33-1,75	0,27-0,73	-		
nádrž,Antverpy,1(Belgie)	3,9	0,45	4,3	2002	Bervoets et al. 2004
nádrž,Antverpy,2	0,4	0,42	2,35		
nádrž,Antverpy,3	17	7,94	4,52		
jezero Ženeva,1(Švýc.)	0,9	3,1	-	1996	Berny et al. 2003
jezero Ontario	8,9-10	1-1,5	16	1997	Rutzke et al. 2000
jezero Erie (USA)	3,5	5	17	1997	Rutzke et al. 2000
jezero Erie,1	8,27	40	17,9	1993-94	Lowe & Day 2002
jezero Erie,2	10	113,7	41,9		
jezero Ontario,1	2,04	26	24,4		
jezero Ontario,2	1,36	2,78	57,9		

V této práci se nezjišťovala akumulace kovů slávičkou v různých částech těla, ale zhotovovaly se mikroskopické řezy napříč celého těla k pozorování anatomických změn některých orgánů. Podle výsledků Gundacker (1999) se kadmium nejvíce akumuluje v měkkých částech těla (plášť, noha) a ve vnitřních orgánech. Důvodem je nejspíše vysoká afinita k metalothioneinu, který se zde nachází. Vysoké množství tohoto proteinu můžeme také nalézt v žábřácích, kde se Cd také dost hromadilo. Kvůli vazbě s metalothioneinem nemůže *D.polymorpha* hladinu kadmia regulovat, jeho vylučování je velice pomalé. Velice malé množství Cd bylo nalezeno ve schránkách

neboť bylo zjištěno, že se zde váže na aragonit lastury a během rozpouštění uhličitanu vápenatého se z něj uvolňuje.

V byssových vláknech, byssové žláze a v noze byly nejvíce nahromaděny kovy olovo, měď a zinek (Gundacker 1999).

Nenalezla jsem žádnou histopatologickou studii vlivu těžkých kovů přímo na *D. polymorpha*. Většinou jsem vycházela ze studií, které se zabývaly vlivem těžkých kovů na určité orgány jiných mlžů nebo histopatologické analýzy sláviček po expozici perzistentními organickými polutanty např. PCB (polychlorované bifenyly), DDT (dichlordifenyltrichlorethan), atrazín, tributylcín a trifenylycín.

Základem histopatologické analýzy bylo zhotovit sérii mikroskopických řezů z přední, střední a zadní části těl sláviček střední velikostní kategorie. Naučit se zhotovit parafínové bločky, nařezat je pomocí mikrotomu, nabarvit a pozorovat pod mikroskopem.

Nenašla se žádná závislost tvaru průřezu těla na přidání určitého kovu v rámci expozice. Při pozorování žaber *D. polymorpha* byly výjimečně nalezeny nekrózy tkání (2/150) a hypertrofie (zvětšení) příčně orientovaných vláken (4/150). Cilie nebylo možné pozorovat. Studie Sheir et al (2013) prováděná na *Mytilus edulis* porovnávala anatomické změny žaber, hepatopankreas (trávicí žláza) a gonád po přidání 20 µg/l CdCl<sub>2</sub> s kontrolními vzorky, které pocházely ze znečištěných míst v jihozápadní Anglii. Po expozici Cd došlo ke snížení koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů v žábrách, trávicí žláze a hemolymfě. U slávek ze znečištěných míst byly občas pozorovány léze, nekrózy, záněty a neoplazie, ale kupodivu se jejich četnost naopak snížila až po expozici Cd. U žaber docházelo výjimečně k nekrotickým a ciliární erozi, u hepatopankreas ke zvětšení lumenu a nekrotickým. U pohlavních orgánů to byly degenerace a záněty spermií a oocytů, nekrózy. Obdobné výsledky nalezneme u Regoli et al. (2001), kteří zkoumali vliv tributyl a trifenylycínu na gonádách sláviček z vysoce kontaminovaných oblastí nebo u Binelli et al. (2004), zkoumací vliv DDT. Výsledky ukázaly velmi nízké úrovně rozvoje spermií a oocytů, jejich ztrátu a degeneraci. Zvětšení lumenu trávicích žláz bylo pozorováno na sladkovodním mlži *Lamellidens marginalis* po kontaminaci insekticidem dimethoátem (Kumar et al. 2011) nebo na *D. polymorpha* po kontaminaci atrazinem (Zupan & Kalafatic 2003). Jiná studia zjistila histologické změny u mlže *Anadara sp.* v důsledku kontaminace vody kadmíem. V hemolymfě došlo k poklesu hemocytů a v pojivové tkáni obklopující epitel trávicí žlázy ke zvýšení počtu hnědých buněk s lipofuscinem (hnědý pigment) (Kolyuchkina & Miljutin 2013).

Žádné histopatologické studie na inhalační a exhalační sifa nebyly nalezeny. U sif se většinou autoři zabývali morfologií např. Smith (1999) morfologicky srovnával sifa *D. polymorpha* s *D. bugensis*. Ram et al. (1999) přišli s tím, že sifa s okolní tkání hrají důležitou roli v nervosvalové kontrole mlžů. Koncentrace  $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  M serotoninu 5-HT, který je součástí mnoha tkání mlžů, včetně sif a přilehlé tkáně pláště, způsobuje relax a koncentrace  $10^{-3}$  –  $10^{-4}$  M naopak kontrakci pláště a sif. V mé práci jsem pod mikroskopem pozorovala tvar inhalačních a exhalačních sif, nicméně žádné zvláštní změny jsem nezaznamenala.

## 6 Závěr

V současnosti se často řeší problém výskytu toxických látek ve vodách a jejich kumulace v sedimentech. Těžké kovy patří mezi více či méně škodlivé látky, s hustotou vyšší než  $5 \text{ g/cm}^3$ . K velmi toxickým těžkým kovům řadíme rtuť, kadmium a olovo. Nikl patří mezi biogenní, esenciální prvky. Pro člověka a některé živočichy je nezbytný pro účinné vstřebávání železa a krvetvorbu, v nadměrném množství je však toxický. Pro vodní organismy je toxický už v nižších koncentracích.

Pomocí AAS byly stanoveny koncentrace kadmia, olova a niklu ve vodě i v modelovém organismu *D. polymorpha*. Už z analýzy vody můžeme říci, že slávička má schopnost filtrovat vodu s rozpuštěnými kovy, které dokáže po určitou dobu skladovat v tkáních. Již po čtyřech dnech pozorujeme u všech kovů pokles koncentrace. Nikl měl procentuální úbytky ze zmiňovaných kovů nejvyšší, což odpovídá skutečnosti, že nikl má nejnižší bioakumulační koeficient (nejméně se kumuluje).

Ve slávičkách většinou roste s rostoucí dobou expozice v rámci velikostní skupiny koncentrace kovu. Bylo potvrzeno, že v nejmenších kategoriích (1-1,9 cm) byla naměřena vždy nižší koncentrace kovů než v největších (3-3,9 cm). Nicméně u středních velikostí to nevykazovalo žádnou pravidelnost. U olova zde byla vyšší koncentrace než u nejmenších, u niklu a kadmia byla v prvních dvou týdnech naopak nižší.

Histopatologická analýza byla dosti náročná kvůli vlastní přípravě řezových preparátů. Žábry i trávicí trubice byly v mikroskopu většinou dobře pozorovatelné, ale pouze výjimečně se zde objevily nekrózy a hypertrofie. Tvar průřezu těla nevykazoval žádnou závislost na přidaném kovu v rámci doby expozice, stejně tak nebyly zaznamenány žádné anatomické změny inhalačních a exhalačních sif. Doba expozice trvala pouze tři týdny. Je možné, že po delší době expozice by bylo viditelných více anatomických změn.

Slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) se potvrdila jako vhodný modelový organismus pro biomonitorování těžkých kovů ve vodách, ale toxické účinky vybraných kovů nebylo možné zaznamenat. Myslím si, že v budoucnosti by se její akumulační vlastnosti mohly využít, třeba pro čištění odpadních vod.

# Seznam literatury

Ackerman, J.D. (1995): Zebra mussel Life History. Proceedings of The Fifth International Zebra Mussel and Other Aquatic Nuisance Organisms Conference, Toronto, Canada. 1-8.

Adámek, Z., Helešic, J., Maršálek, B., Rulík, M. (2010): Aplikovaná hydrobiologie. Vyd. 2. České Budějovice: Jihočeská univerzita, fakulta rybářství a ochrany vod. 350 s. ISBN 978-80-87437-09-4.

Alexander, J.E., Thorp, J.H., Smith, J.C. (1997) Biology and potential impacts of zebra mussels in large rivers. Denver: AWWA, research foundation and American Water Works Association. 104 s. ISBN 0-89867-930-3.

Anzano, J., Lasheras, R., Bonilla, B., et al. (2011): Determination of trace metals by voltamperometry in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) employed as environmental bio-indicator. Green chemistry letters and reviews 4: 261-267.

Bencko, V., Cikrt, M., Lener, J. (1984): Toxické kovy v pracovním a životním prostředí člověka. Vyd. 1. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství. 264 s. 08-052-84.

Berny, P., Lachaux, O., Buronfosse, T., Mazallon, M., Gillet, C. (2002): Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as indicators of freshwater contamination with Lindane. Environmental Research Section A 90: 142-151.

Berny, P.J., Veniat, A., Mazallon, M. (2003): Bioaccumulation of lead, cadmium, and lindane in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and associated risk for bioconcentration in tufted duck (*Aythya fuligula*). Environ. Contam. toxicol. 71: 90-97.

Bervoets, L., Voets, J., Chu, S., Covaci, A., Schepens, P. (2004): Comparison of accumulation of micropollutants between indigenous and transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Environmental toxicology and chemistry 23: 1973-1983.

Binelli, A. & Provini, A. (2003): The PCB pollution of Lake Iseo (N.Italy) and the role of biomagnification in the pelagic food web. Chemosphere 53: 143-151.

Binelli, A., Ricciardi, F., Provini, A. (2004): Present status of POP contamination in Lake Maggiore (Italy). *Chemosphere* 57: 27-34.

Boening, D.W. (1999): An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. *Environmental monitoring and assessment* 55: 459-470.

Bourgeault, A., Gourlay-France, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.-H.(2012): Bioaccumulation of waterborne Ni in *Dreissena polymorpha*: A stable isotope experiment to assess the effect of zinc, calcium, and dissolved organic matter. *Environmental toxicology and chemistry* 31: 819-827.

Bonner, T.P. & Rockhill, R.L. (1994): Ultrastructure of the byssus of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*, Mollusca: Bivalvia). *Transaction of the American Microscopical Society* 113: 302-315.

Březina, F., Pastorek, R. (1991): *Koordinační chemie*. Vyd. 1. Olomouc: UP Olomouc, 176 s. ISBN 80-7067-040-1.

Claudi, R. & Mackie, G.L. (1994): *Practical manual for zebra mussel monitoring and control*. Vyd. 2. Boca Raton: Lewis Publisher, 227 s. ISBN 0-87371-985-9.

Faria, M., López, M.A., Fernández-Sanjuan, M., Lacorte, S., Barata, C. (2010): Comparative to 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.

Fent, K. & Hunt, J. (1991): Phenyltins in water, sediment, and biota of freshwater marinas. *Environmental Science Technology*. 25: 956-963.

Geng, N., Wang, Ch., Wang, P., Ning, Q., Ling, R. (2015): Cadmium accumulation and metallothionein response in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* under hydrodynamic conditions. *Biol. Trace. Elem. Res.* 165: 222-232.

Gobas, F.A.P.C., Wilcockson, J.B., Russel, R.W., Haffner, G.D. (1999): Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. *Environmental Science Technology* 33: 133-141.



- Gossiaux, D.C., Landrum, P.F., Fischer, S.W. (1996): Effect of Temperature on the Accumulation Kinetics of PAHs and PCBs in the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. Journal of Great Lakes Research. 22(2): 379-388.
- Gundacker, C. (1999): Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha Pallas*. Chemosphere 38: 3339-3356.
- Habrová, V. (1979): Biologická technika. Vyd. 1. Praha: UK v Praze, SPN. 191 s. ISBN 17-131-79.
- Horsák, M., Juříčková, L., Pícka, J. (2013): Měkkýši České a Slovenské republiky. Vyd. 1. Zlín: nakladatelství Kaňourek, s.r.o. 264 s. ISBN 978-80-86447-15-5.
- Jírovec, O., et al. (1958): Zoologická technika. Vyd. 3. Praha: SPN. 314 s.
- Johns, C. (2012): Trend of total cadmium, copper, and zinc in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) along the upper reach of the St. Lawrence river: 1994-2005. Environ.monit.assess. 184: 5371-5385.
- Jones, K.C. & Voogt, de P. (1999): Persistent organic pollutants (POPs): State of the science. Environmental Pollution 100: 209-221.
- Kameníček, J., Šindelář, Z., Pastorek, R., Kašpárek, F. (2009): Anorganická chemie. Vyd. 4. Olomouc: UP v Olomouci. 315 s. ISBN 978-80-244-2387-6.
- Karatayev, A.Y., Burlakova L.E., Padilla D.K. (1997): The effects of *Dreissena polymorpha* (Pallas) invasion on aquatic communities in Eastern Europe. Shellfish Research. 16: 187-203.
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K. (1998): Physical factors that limit the distribution and abundance of *Dreissena polymorpha* (Pall.). Journal of Shellfish research 17.
- Karatayev, A.Y., Burlakova, L.E., Padilla, D.K. (2006): Growth rate and longevity of *Dreissena polymorpha* (Pallas): A review and recommendations for future study. Journal of Shellfish research 25: 23-32.
- Klouda, P. (2003): Moderní analytické metody. Vyd. 2. Ostrava: nakladatelství Pavel Klouda. 132 s. ISBN 978-80-86369-07-5.

Knapp, G. (1991): Mechanized Techniques for Hample decomposition and element preconcentration. *Mikrochimica. Acta II*, 445-455.

Kolyuchkina, G.A. & Miljutin, D.M.(2013): Application of the morpho-functional analysis of hydrobionts (*Anadara* sp. cf. *Anadara inaequalvis* Bivalvia) to environmental monitoring. *Oceanology* 53: 169-175.

Kraak, M.H.S., Toussaint, M., Lavy, D., Davids, C. (1994): Short-term effects of metals on the filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution* 84: 139-143.

Kress, N., Horniny, H. and Herut, B. (1998): Concentration of Hg, Cd, Cu, Zn, Fe and Mn in Deep sea benthic fauna from the southeastern Mediterranean sea: A comparison study between fauna collected at a pristine area and at two waste disposal sites. *Marine pollution bulletin* 36: 991-921.

Kumar, S., Pandey, R.K., Das, S., Das, V.K. (2011): Pathological changes in hepatopancreas of freshwater mussel (*Lamellidens marginalis* Lamarck) exposed to sub-lethal concentration of dimethoate. *GERF Bulletin of biosciences* 2: 18-23.

Kwan, K.H.M., Chan, H.M., LaFontaine, Y. (2003): Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) slony the st.Lawrence river. *Environmental monitoring and assessment* 88: 193-219.

Lelláková, F., et al. (1992): *Zoologická technika. Vyd. 2. Praha: UK v Praze, nakladatelství DIALOG. 120 s. ISBN 80-7066-669-2.*

Lowe, T.P. & Day, D.D. (2002): Metal concentrations in zebra mussels and sediments from embayments and riverine environments of eastern lake Erie, southern lake Ontario, and the Niagara river. *Environ. Contam.Toxicol.* 43: 301-308.

Mackie, G.L. & Schloesser, D.W. (1996): Comparative biology of zebra mussels in Europe and North America: An overview. *American zoology* 36: 244-258.

Mason, R.P. (2012). *The Methylation of Metals and Metalloids in Aquatic Systems, Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment*, Prof. Anica Dricu (Ed.), ISBN: 978-953-51-0881-8, InTech, DOI: 10.5772/51774. Available from:

<http://www.intechopen.com/books/methylation-from-dna-rna-and-histones-to-diseases-and-treatment/the-methylation-of-metals-and-metalloids-in-aquatic-systems>

McElwain, A. & Bullard, S.A.(2014): Histological atlas of freshwater mussels (Bivalvia, Unionidae): *Villosa nebulosa* (Ambleminae: Lampsilini), *Fusconaia cerina* (Ambleminae: Pleurobemini) and *Strophitus connasaugaensis* (Unioninae: Anodontini). *Malacologia* 57: 99-239.

Medler, S. & Silverman, H. (1997): Functional organization of intrinsic gill muscles in zebra mussels, *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalve), and response to transmitters in vitro. *Intervetebate biology* 116: 200-212.

Moore, J., W., Ramamoorthy, S. (1984): Heavy metals in natural waters: Applied monitoring and impact assessment. New York: Springer-Verlag. ISBN 0-387-90885-4.

Nalepa, T.F., Schloesser, D.W., Morton, B. et. al. (1993): Zebra mussels: biology, impacts, and control. Boca Raton: Lewis publishers. 810 s. ISBN 0-87371-696-5.

Opekar, F., Jelínek, I., Rychnovský, P. Plzák, Z. (2003): Základní analytická chemie. Praha: nakladatelství Karolinum, Univerzita Karlova v Praze. 201 s. ISBN 80-246-0553-8.

Phillips, D.J.H., Rainbow, P.S.(1993): Environmental series management: biomonitoring of trace aquatic contaminants. Elsevier science Publisher.

Picka, K. & Matoušek, J. (1996): Základy obecné a speciální toxikologie. Brno: VUT v Brně. ISBN 80-85 368-91-9.

Pitter, P. (1999): Hydrochemie. Vyd. 3. Praha: vydavatelství VŠCHT. 568 s. ISBN 80-03-00525-62.

Primack, R.B., Kindlmann, P., Jersáková, J. (2011): Úvod do biologie ochrany přírody. Vyd. 1. Praha: Portál, s.r.o. 472 s. ISBN 978-80-7367-595-0.

Rajagopal, S., Velde, G., Gaag, M., Jenner, H.A. (2005): Byssal detachment underestimates tolerance of mussels to toxic compounds. *Marine Pollution Bulletin* 50: 20-29.

- Ram, J.L., Moore, D., Putschakayala, S., Paredes, A.A., Ma, D., Croll, R.P. (1999): Serotonergic responses of the sifons and adjacent mantle tissue of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. Comparative biochemistry and physiology part C 124: 211-220.
- Regoli, L., Chan, H.M., Lafontaine, Y., Mikaelian, I. (2001): Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and sediments of the Quebec city harbour area of the St. Lawrence river. Aquatic toxicology 53: 115-126.
- Richman, L. & Somers, K. (2005): Can we use zebra and quagga mussels for biomonitoring contaminants in the Niagara river? Water, air, and soil pollution 167: 155-178.
- Roe, S.L. & MacIsaac, H. (1998): Temporal variation of organochlorine contaminants in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in Lake Erie. Aquatic Toxicology 41: 125-140.
- Rosenberg, G. (1994): A nomenclatural review of *Dreissena* (Bivalvia: Dreissenidae), with identification of the Quagga mussel as *Dreissena bugensis*. Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences 51: 1474-1484.
- Rutzke, M.A., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., Mills, E.L. (2000): Toxic and nutrient element concentrations in soft tissues of zebra and quagga mussels from lakes Erie and Ontario. Chemosphere 40: 1353-1356.
- Rychlíková, B. (1994): Průmysl a životní prostředí. Vyd. 1. Ostrava: ediční oddělení PdF OU. ISBN 80-7042-076-6.
- Sedlák, E. (2002): Zoologie bezobratlých. Vyd. 2. Brno: MU v Brně. ISBN 80-210-2892-0.
- Sheir, S.K., Handy, R.D., Henry, T.B. (2013): Effect of pollution history on immunological response and organ histology in the marine mussel *Mytilus edulis* exposed to Cadmium. Environ. contam. toxicol. 64: 701-716.
- Smith, D. G. (1999): Differences in sifonal anatomy between *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* (Mollusca: Dreissenidae) in lake Ontario. The American Midland Naturalist 141: 402-405.

Sousa, R., Pilotto, F. & Aldrige, D.C. (2011): Fouling of European freshwater bivalves (Unionidae) by the invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Freshwater biology* 56: 867-876.

Tüzen, M. (2003): Determination of heavy metals in fish simplex of the model Black sea (Turkey) by graphite turbidimetric atomic absorption spectrometry. *Food chemistry* 80: 119-123.

Verween, A., Vincx, M., Degraer, S. (2009): Comparative toxicity of chlorine and peracetic acid in the biofouling control of *Mytilopsis leucophaeata* and *Dreissena polymorpha* embryo (Mollusca, Bivalvia). *International biodeterioration & biodegradation* 63: 523-528.

Voets, J., Bervoets, L., Blust, R. (2004): Cadmium bioavailability and accumulation in the presence of humic acid to the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Environmental science & technology* 38: 1003-1008.

Voets, J., Redeker, E.S., Blust, R., Bervoets, L. (2009): Differences in metal sequestration between zebra mussel from lean and polluted field locations. *Aquatic Toxicology* 93: 53-60.

Worms, I.A.M., Parthasarathy, N., Wilkinson, K.J. (2007): Ni uptake by a green alga. 1. Validation of equilibrium models for complexation effects. *Environmental science & technology* 41: 4258-4263.

Zupan, I. & Kalafatic, M. (2003): Histological effects of low Atrazine concentration on zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 688-695.

# Seznam elektronických zdrojů

(1) NICHOLS, Jerrine. Zebra mussel information system [online]. U.S. Army Engineer Research and Development Center (ERDC) [cit. 2015-07-20] Dostupné z <<http://el.erd.c.usace.army.mil/ansrp/ANSIS/ansishelp.htm>>

(2) PETRLÍK, Jindřich, VÁLEK, Petr. Kadmium [online]. Arnika.org [cit. 2015-06-29]. Dostupné z <<http://arnika.org/kadmium>>

(3) HAVEL, Milan, GAŽÁKOVÁ, Lucie, VÁLEK, Petr. Olovo [online]. Arnika.org [cit. 2015-06-30]. Dostupné z <<http://arnika.org/olovo>>

(4) Bioaccumulation summary, nickel [online]. EPA United States Environmental Protection Agency [water.epa.gov](http://water.epa.gov) [cit. 2015-07-05]. Dostupné z <<http://water.epa.gov/polwaste/sediments/cs/upload/Chem-5.pdf>>

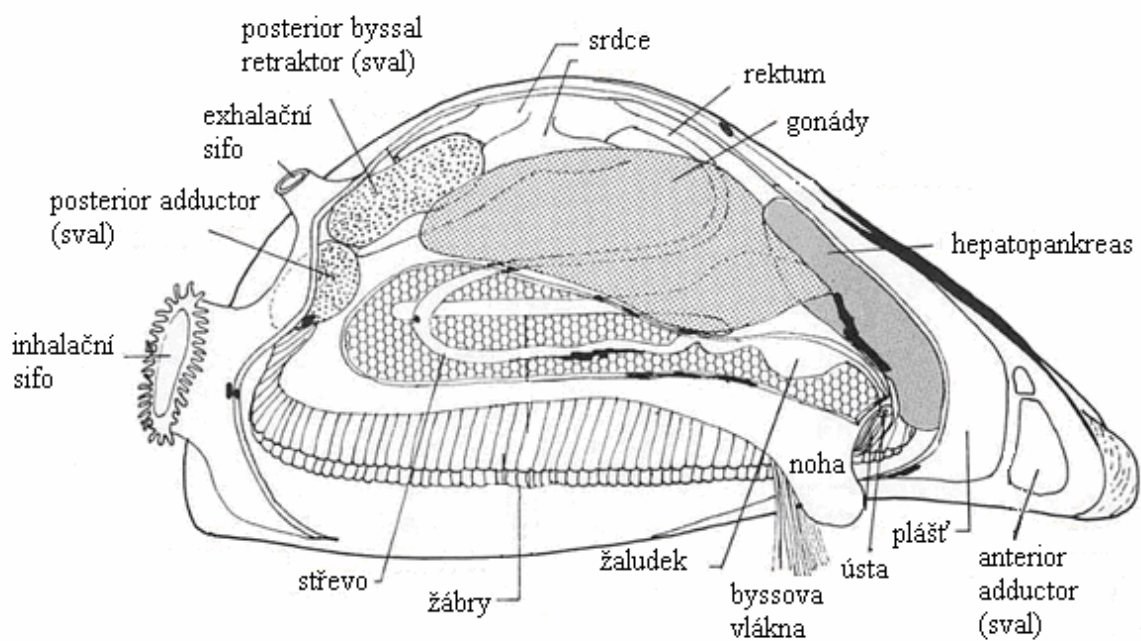
(5) KLEGER, Ladislav, VÁLEK, Petr. Nikl [online]. Arnika.org [cit. 2015-07-02]. Dostupné z <<http://arnika.org/nikl>>

(6) Zpracování vzorků pro histologické vyšetření [online]. WikiSkripta.eu [cit. 2015-01-10]. Dostupné z <[http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Zpracování\\_vzorků\\_pro\\_histologické\\_vyšetření&oldid=286886](http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Zpracování_vzorků_pro_histologické_vyšetření&oldid=286886)>

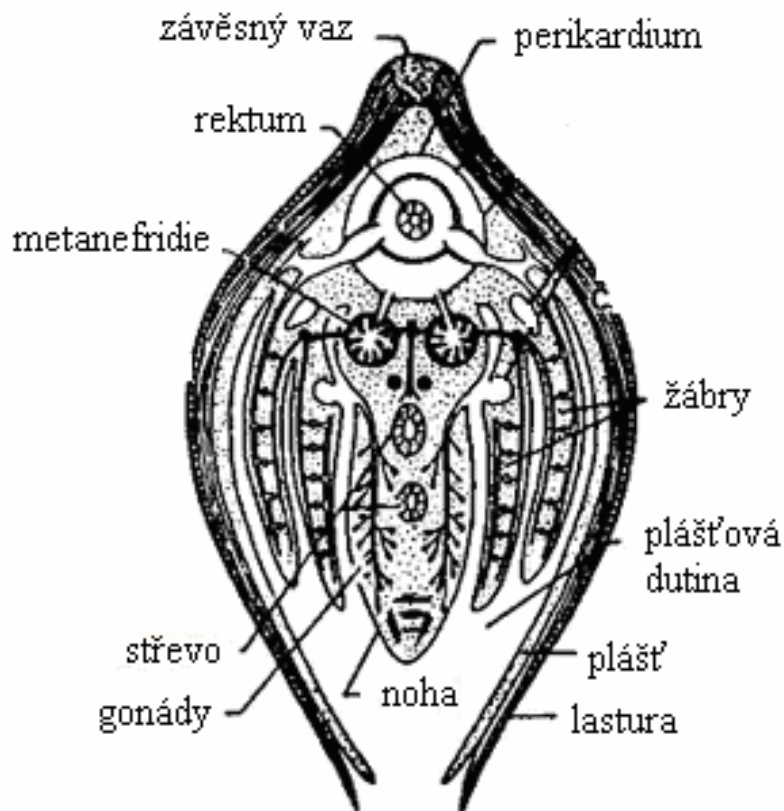
(7) Paraplast [online]. Potřeby pro laboratoř p-lab.cz [cit. 2015-01-18]. Dostupné z <<http://www.p-lab.cz/katalog.pl?akce=polozka&id=3162&sekce=169&from=obsah>>

(8) JANVRIN, Jeff. Mussel anatomy – interior [online]. US Fish & wildlife service [cit. 2015-07-10]. Dostupné z <[http://www.fws.gov/midwest/mussel/images/mussel\\_anatomy\\_interior.html](http://www.fws.gov/midwest/mussel/images/mussel_anatomy_interior.html)>

# Přílohy



Obrázek 20. Vnitřní anatomie dospělé *D. polymorpha* (Claudi & Mackie 1994), upraveno K.Štachová 2015

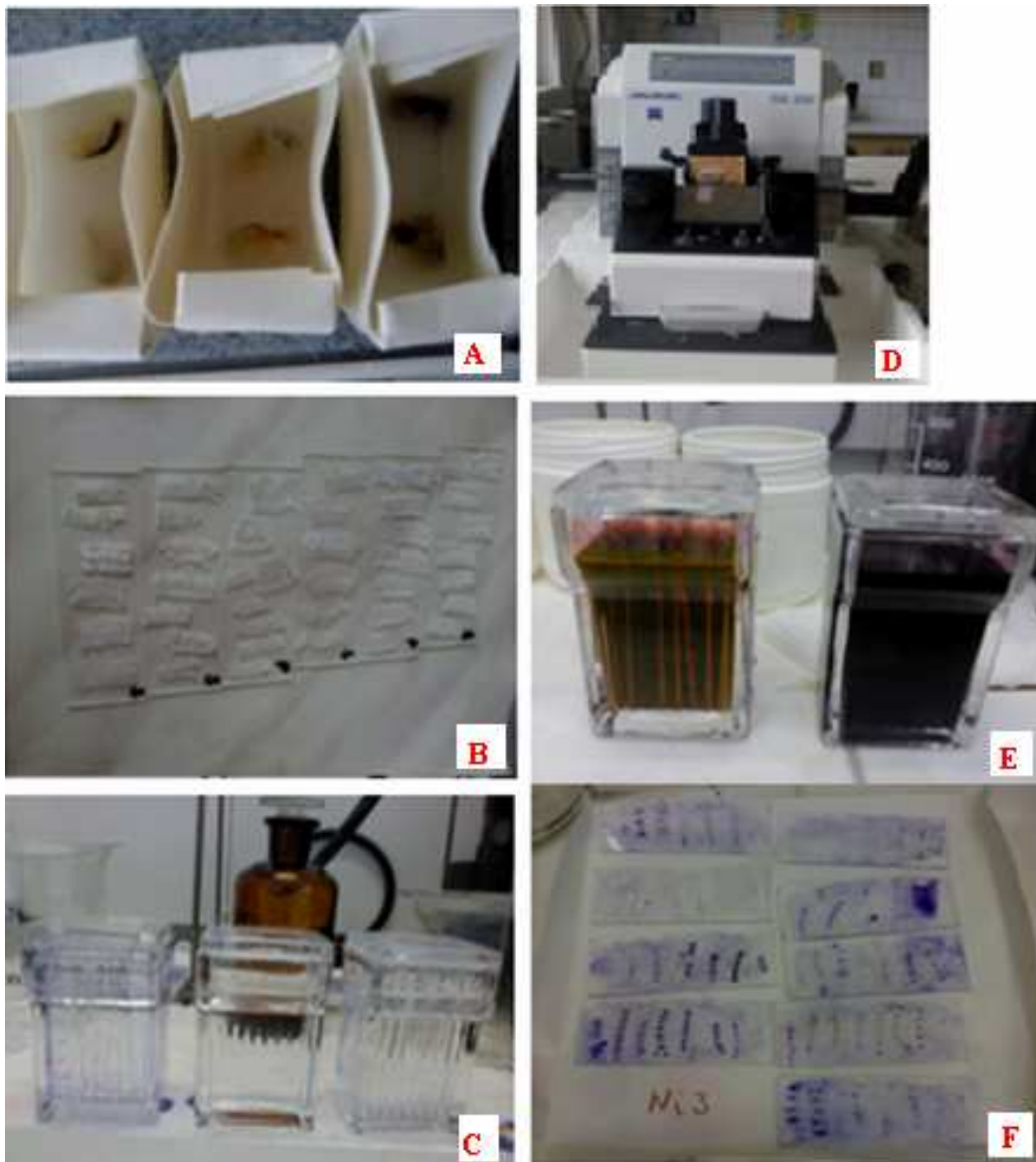


Obrázek 21. Příčný řez tělem mlže (8), upraveno K. Štachová 2015



Obrázek 22. Foto, A: živé D.P. v akváriích v době expozice; B: mrtvá D.P.; C: AAS Avanta. D: živé D.P. v drúzách; E: mineralizátor Speedwave 2; F: D.P. bez lastur v benzenu, K.Štachová 2015





Obrázek 23. Foto, vlevo: D.P. zalité v parafínu; mikroskopické řezy; sklíčka s řezy v květech při barvení. Vpravo: mikrotom Microm; sklíčka s řezy v Eosinu a Hematoxylinu; nabarvené sklíčka, K. Štachová 2015