



**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**  
**Katedra geoenvironmentálních věd**

**Evoluční strategie v biomineralizaci schránek zástupců kmene  
Mollusca: Mikromechanické vlastnosti schránek a jejich vztah  
k prostředí**

Disertační práce

**Iva Hrabánková**

Obor: Aplikovaná a krajinná ekologie

Školitel: prof. RNDr. Jiří Frýda, Dr.

Praha 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci na téma „Evoluční strategie v biomineralizaci schránek zástupců kmene Mollusca: Mikromechanické vlastnosti schránek a jejich vztah k prostředí“ vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Jiřího Frýdy, Dr., a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Praze dne 25.7.2015

### **Poděkování:**

Tímto upřímně děkuji svému školiteli Jiřímu Frýdovi za čas, který mi věnoval, za poskytnutí vzorků schránek měkkýšů z jeho vlastní sbírky, děkuji mu za nápady, cenné rady, důležité připomínky a komentáře k textům a především za bezmeznou trpělivost, kterou se mnou měl po celou dobu studia. Děkuji mu také za jeho životní nadhled, který mi byl morální oporou především v závěrečné fázi disertační práce. Patří mu můj největší dík. Děkuji mu také za uvolnění finančních prostředků poskytnutých Grantovou agenturou České republiky, které pokryly náklady spojené s přípravou a měřením vzorků. Tímto děkuji i Grantové agentuře ČR.

Děkuji docentu Michalu Merglovi za poskytnutí vybraných vzorků mlžů a profesoru Takenori Sasakimu za poskytnutí vzorků patellogastropodů. Pověřeným pracovníkům České geologické služby děkuji za nezbytnou přípravu vzorků pro následnou studii jejich vnitřní struktury. Rovněž děkuji Ing. Josefu Šepitkovi z Laboratoře nanoindentčních technologií (ČVUT) za provedení požadovaných nanoindentčních měření.

Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu katedry geoenvironmentálních věd doc. RNDr. Michaelu Komárkovi, Ph.D., za jeho toleranci a poskytnutí podmínek pro dokončení disertační práce.

Ze srdce děkuji svým přátelům a kolegům za morální oporu a přesvědčení mých pochybností o smysluplnosti mého počínání.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mým nejbližším, manželovi Janovi za velkou oporu a toleranci a za jeho důvěru, svým dětem Helence, Anetce a Marušce za jejich bezprostřednost a radost, své sestře Šárce za rozmluvy a mým rodičům za veškerou podporu.

V Praze 25.7.2015

## **ABSTRAKT:**

Předložená disertační práce se zabývá studiem mikromechanických vlastností (mikrotvrdotí a elastickým modulem) vybraných mikrostruktur schránek měkkýšů a jejich vztahem ke krystalografické textuře schránek a k životnímu prostředí. Výsledky studie naznačily, že extrémní hydrostatický tlak má poměrně malý vliv na zkoumané vlastnosti kalcitových i aragonitových vrstev schránek měkkýšů. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi mikrotvrdotí a elastickým modulem perleti mlžů žijících v mořském a sladkovodním prostředí. Byla však zjištěna statisticky významná pozitivní korelace mezi těmito mikromechanickými vlastnostmi a tloušťkou aragonitových destiček tvořících perleť. Velmi neočekávaným zjištěním je skutečnost, že míra uspořádání aragonitových destiček negativně koreluje s hodnotami mikrotvrdotí a elastického modulu perleti a vysvětluje zhruba z 80 % variability těchto hodnot. Statisticky významná, ale slabší korelace, byla zjištěna i mezi mikromechanickými vlastnostmi a texturním typem perleti. Mlži s jednoosou texturou perleti mají tvrdší a pružnější perleť, než mlži s quasimonokrystalickou texturou. Tato data naznačují, že primitivnějším stavem perleti mlžů je její větší tvrdost a pružnost a v průběhu další evoluce mlžů se hodnoty těchto veličin snižovaly. Tento trend je však v rozporu s obecně přijímanou hypotézou o růstu predančního tlaku v mořském ekosystému v průběhu paleozoika a mesozoika.

**Klíčová slova:** Mollusca; mikrotvrdot a elastický modul; perleť; mikrostruktura; krystalografická textura; fylogeneze.

## **ABSTRACT:**

This thesis deals with the micromechanical properties (microhardness and elastic modulus) of selected molluscan shell microstructures and their relationship to crystallographic textures and environment. Results of the study suggest that extremely high hydrostatic pressure has a relatively weak influence on the mechanical properties of calcitic as well as aragonitic shell layers. No statistically significant difference was found in microhardness and elastic modulus of nacre between bivalvian species living in marine and freshwater environments. On the other hand, the study reveals a statistically significant positive correlation between the micromechanical properties and thickness of aragonitic platelets forming the nacre. Unexpected result is a negative correlation of the degree of ordering of aragonitic platelets with both elastic modulus as well as microhardness. Thus the degree of ordering explains about 80% of the variability of these micromechanical properties. Statistically significant but weaker correlation was also found between micromechanical properties and textural type of bivalvian nacre. The nacre with uniaxial texture is harder and more elastic than the nacre with quasimonocrystallic texture. The data suggests that higher hardness and elasticity corresponds to a primitive state of nacre and that during the subsequent evolution values of these micromechanical properties were decreasing. This trend contradicts with generally accepted hypothesis of increasing predation pressure in the marine ecosystem during the Paleozoic and Mesozoic.

**Keywords:** Mollusca; microhardness and reduced elastic modulus; nacre; microstructure; crystallographic texture; phylogeny.

## OBSAH

1	ÚVOD.....	9
1.1	Vnitřní stavba schránek.....	9
1.1.1	Mikrostruktura schránek měkkýšů.....	11
1.1.2	Textura schránek měkkýšů.....	12
1.1.3	Mikromechanické vlastnosti schránek.....	13
2	CÍLE PRÁCE .....	15
3	METODIKA.....	16
3.1	Charakteristika vybraných druhů.....	17
3.1.1	<i>Limalepeta lima</i> Dall, 1918.....	17
3.1.2	<i>Nipponacmea concinna</i> Lischke, 1870 .....	17
3.1.3	<i>Pectinodonta orientalis</i> Schepman, 1908 .....	18
3.1.4	<i>Amblyma plicata</i> Say, 1817 .....	18
3.1.5	<i>Brachidontes rostratus</i> Dunker, 1857 .....	19
3.1.6	<i>Leptodea fragilis</i> Rafinesque, 1820 .....	20
3.1.7	<i>Modiolus barbatus</i> Linnaeus, 1758 .....	20
3.1.8	<i>Mytilus californianus</i> Conrad, 1837 .....	21
3.1.9	<i>Mytilus edulis</i> Linnaeus, 1758 .....	22
3.1.10	<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819 .....	23
3.1.11	<i>Nucula nucleus</i> Linnaeus, 1758 .....	23
3.1.12	<i>Pinctada radiata</i> Leach, 1814.....	24
3.1.13	<i>Pinna nobilis</i> Linnaeus, 1758.....	25
3.1.14	<i>Quadrula apiculata</i> Say, 1829 .....	25
3.2	Metody studia mikrostruktury schránek kmene Mollusca .....	27
3.2.1	Výběr a příprava vzorků .....	27
3.2.2	SEM .....	28
3.2.3	EBSD .....	28
3.2.4	Metoda nanoindentace.....	30
3.3	Statistická analýza dat.....	34
4	VÝSLEDKY MĚŘENÍ.....	36
4.1	Studium vlivu prostředí na mikromechanické vlastnosti – výsledky měření .....	36
4.1.1	<i>Limalepeta lima</i> Dall, 1918.....	36
4.1.1.1	Nanoindentační zkouška vnitřní vrstvy M + 1 druhu <i>Limalepeta lima</i> .....	36

4.1.1.2	Nanoindentační zkouška vnitřní vrstvy M + 2 druhu <i>Limalepta lima</i> .....	37
4.1.2	<i>Nipponacmea concinna</i> Lischke, 1870 .....	39
4.1.2.1	Nanoindentační zkouška vnitřní vrstvy M + 1 druhu <i>Nipponacmea concinna</i> .....	39
4.1.3	<i>Pectinodonta orientalis</i> Schepman, 1908 .....	40
4.1.3.1	Nanoindentační zkouška vnitřní vrstvy M + 1 druhu <i>Pectinodonta orientalis</i> .....	41
4.1.3.2	Nanoindentační zkouška vnitřní vrstvy M + 2 druhu <i>Pectinodonta orientalis</i> .....	42
4.2	Mikromechanické vlastnosti perleti a aragonitu a vlivu anizotropie na měření – výsledky měření .....	44
4.2.1	Anorganický aragonit .....	44
4.2.1.1	Skenovací elektronová mikroskopie .....	44
4.2.1.2	Nanoindentační zkouška .....	44
4.2.2	<i>Nucula nucleus</i> Linnaeus, 1758 .....	47
4.2.2.1	Skenovací elektronová mikroskopie .....	47
4.2.2.2	Nanoindentační zkouška .....	48
4.2.3	<i>Pinctada radiata</i> Leach, 1814 .....	51
4.2.3.1	Skenovací elektronová mikroskopie .....	51
4.2.3.2	Nanoindentační zkouška .....	52
4.3	Elastický modul a mikrotvrдость perleti mlžů – výsledky měření .....	55
4.3.1	<i>Amblema plicata</i> Say, 1817 .....	55
4.3.1.1	Skenovací elektronová mikroskopie .....	55
4.3.1.2	Nanoindentační zkouška .....	56
4.3.2	<i>Brachidontes rostratus</i> Dunker, 1857 .....	57
4.3.2.1	Skenovací elektronová mikroskopie .....	57
4.3.2.2	Nanoindentační zkouška .....	57
4.3.3	<i>Leptodea fragilis</i> Rafinesque, 1820 .....	58
4.3.3.1	Skenovací elektronová mikroskopie .....	58
4.3.3.2	Nanoindentační zkouška .....	59
4.3.4	<i>Modiolus barbatus</i> Linnaeus, 1758 .....	60
4.3.4.1	Skenovací elektronová mikroskopie .....	60
4.3.4.2	Nanoindentační zkouška .....	60
4.3.5	<i>Mytilus californianus</i> Conrad, 1837 .....	61
4.3.5.1	Skenovací elektronová mikroskopie .....	61
4.3.5.2	Nanoindentační zkouška .....	62
4.3.6	<i>Mytilus edulis</i> Linaeus, 1758 .....	63
4.3.6.1	Skenovací elektronová mikroskopie u druhu <i>Mytilus edulis</i> – vzorek č. 103 .....	63

4.3.6.2	Nanoindentační zkouška u druhu <i>Mytilus edulis</i> – vzorek č. 103 .....	63
4.3.6.3	Skenovací elektronová mikroskopie u druhu <i>Mytilus edulis</i> – vzorek č. 106..	64
4.3.6.4	Nanoindentční zkouška u druhu <i>Mytilus edulis</i> – vzorek č. 106 .....	65
4.3.7	<i>Mytilus galloprovincialis</i> Lamarck, 1819 .....	66
4.3.7.1	Skenovací elektronová mikroskopie .....	66
4.3.7.2	Nanoindentační zkouška .....	66
4.3.8	<i>Pinna nobilis</i> Gmelin, 1791.....	67
4.3.8.1	Skenovací elektronová mikroskopie u druhu <i>Pinna nobilis</i> – vzorek č. 108 ...	67
4.3.8.2	Nanoindentační zkouška u druhu <i>Pinna nobilis</i> – vzorek č. 108.....	68
4.3.8.3	Skenovací elektronová mikroskopie u druhu <i>Pinna nobilis</i> – vzorek č. 109 ...	69
4.3.8.4	Nanoindentační zkouška u druhu <i>Pinna nobilis</i> – vzorek č. 109 .....	69
4.3.9	<i>Quadrula apiculata</i> Rafinesque, 1820.....	70
4.3.9.1	Skenovací elektronová mikroskopie .....	70
4.3.9.2	Nanoindentační zkouška .....	71
5	DISKUZE K VÝSLEDKŮM.....	73
5.1	Porovnání elastického modulu a mikrotvrdosti dvou odlišných mikrostruktur, kalcitové a aragonitové, u vybraných měkkýšů žijících ve výrazně odlišných fyzikálních podmínkách – <i>modelová studie</i> .....	73
5.1.1	Publikovaný výstup .....	81
5.2	Porovnání elastického modulu a mikrotvrdosti anorganického aragonitu a perleti mlžů s odlišnou krystalografickou texturou a analýza vlivu anizotropie na měřené mikromechanické veličiny .....	85
5.2.1	Test vlivu anizotropie aragonitu na měřené hodnoty elastického modulu a mikrotvrdosti .....	85
5.2.2	Diskuze výsledků analýzy vlivu orientace vzorku na měřené hodnoty .....	97
5.2.3	Porovnání hodnot elastického modulu a mikrotvrdosti perleti a aragonitu .....	99
5.2.4	Publikovaný výstup .....	102
5.3	Elastický modul a mikrotvrdost perleti mlžů z odlišných životních prostředí a analýza vztahu mikromechanických veličin k mikrostrukturním a texturním charakteristikám perleti .....	106
6	ZÁVĚR .....	122
7	CITOVANÁ LITERATURA.....	124
8	PUBLIKAČNÍ ČINNOST .....	133



## 1 ÚVOD

Kmen Mollusca patří k nejvíce diverzifikovaným skupinám živočichů, což platilo již na počátku jejich evoluce před více než 500 miliony lety a stejně tak i po celou dobu jejich existence až do současnosti. Měkkýši jsou druhým nejpočetnějším kmenem živočišné říše (Ruppert a kol. 2004; Bouchet a kol. 2005). V průběhu své dlouhé evoluce kolonizovali měkkýši všechna životní prostředí. Svým vývojem se přizpůsobili zcela rozdílným podmínkám akvatických i terestrických biotů. Výskyt měkkýšů byl zaznamenán od nížin po vysokohorské oblasti, běžně se vyskytují v humidních až aridních oblastech tropů až po subarktické biotopy. Počátek tohoto kmene sahá do kambria, kdy došlo ke vzniku většiny tříd a jejich rychlé radiaci v průběhu počátku ordoviku. Důsledkem dávné a rychlé fylogeneze ve starších prvohorách a následné dlouhé evoluce měkkýšů je zřejmá absence dostatečného fylogenetického signálu v genomu současných měkkýšů. Molekulární data žijících měkkýšů jsou tedy jen těžko použitelná pro studium vyšší fylogeneze kmene Mollusca (Ponder a Lindberg 1997, 2008; Passamaneck a kol. 2004; Giribet a kol. 2006; Giribet 2008; Dreyer a Steiner 2004; Boore a kol. 2004; McArthur a Harasewych 2003). Použití molekulárních dat recentních měkkýšů pro analýzu fylogeneze všech hlavních linií měkkýšů na úrovni řádu značně komplikuje i fakt, že většina těchto skupin je dnes vymřelá (Bouchet a kol. 2005).

Pochopit evoluci a fylogenetické vztahy měkkýšů není tedy možné bez studia fosilních druhů, jejichž schránky jsou cenným zdrojem fylogenetických informací. Schránka je často používána jako jediný zdroj charakteristických znaků pro stanovení jednotlivých taxonomických úrovní (viz *Treatise on Invertebrate Paleontology*, 1953–2015, University of Kansas, online). Řada morfologických znaků je však nesmírně konzervativních a může být použita i pro studium fylogeneze hlavních linií měkkýšů (viz *Treatise on Invertebrate Paleontology*). Jako příklad lze uvést morfologii larválních schránek měkkýšů, ze kterých je možné určit typ předmetamorfni ontogenetické strategie již dávno vymřelých skupin. Například u třídy Gastropoda lze doložit souvislou existenci jedinečných typů předmetamorfni ontogenetické strategie v různých liniích v trvání až 400 milionů let (Frýda 2012).

Morfologická data schránek však pro pochopení fylogeneze kmene Mollusca nestačí. Často se setkáváme s morfologickou konvergencí některých znaků na schránce (tj. podobné morfologické znaky se vyvinou v nepříbuzných skupinách měkkýšů). Pro pochopení fylogeneze fosilních a žijících měkkýšů je třeba hledat další znaky. Jedním z dosud málo využívaných informačních zdrojů o fylogenezi měkkýšů jsou data o vnitřní struktuře a textuře jejich schránek, přestože tato data poskytují množství cenných informací. Pro fylogenetické studie je důležitá především extrémní časová stabilita strukturních a texturních znaků schránek. Řada mikrostrukturních typů je doložena již od ordoviku a kambria (Vendrasco a kol. 2011; Runnegar 1985). Rovněž extrémní časová stabilita textury schránek je značná. Byla například doložena existence stejného mikrostrukturního a texturního typu perleti u řádu Vetigastropoda po dobu více než 200 milionů let (Frýda a kol. 2009).

### 1.1 Vnitřní stavba schránek

Schránky měkkýšů vypovídají o způsobu jejich života a jsou převážně tvořené silnější vnitřní vrstvou z uhličitanu vápenatého (ostrakum) a vnější organickou vrstvou (periostrakum). Periostrakum tvořené konchinem a vylučované okrajem pláště vytváří charakteristický povrch

schránky a určuje barvu a jemnou morfologii povrchu ve formě nerovností typu lamel a rýh, hrbolů či výrůstků, chloupků a podobně. V průběhu růstu se většinou periostrakum nezesiluje, ale naopak ztrácí se obušováním na starších částech schránky během života jedince (Harper 2005). Pigmentaci schránky určují geny a proteiny získávané z potravy – karotenoidy (žluté), melaniny (černé), porfyriny (modré), indigoidy (červené).

Jednotlivé vrstvy schránek měkkýšů lze mimo jiné charakterizovat mikrostrukturou a krystalografickou texturou. Mikrostruktura popisuje tvar mikrokrystallků, které tvoří jednotlivé vrstvy schránky. Krystalografická textura charakterizuje prostorové uspořádání jednotlivých mikrokrystallků (tj. orientaci jejich krystalografických os). Vznik určitého typu mikrostruktury a krystalografické textury, na kterém se podílí mikrokrystallky uhličitanu vápenatého (aragonitu nebo kalcitu) a další menší množství organických látek, je řízen genomem (Addadi a kol. 2006; Marin a kol. 2008). Mikrostruktura a krystalografická textura jsou vzájemně nezávislé znaky.

Jednou z nejstarších a zároveň velmi rozšířenou strukturou schránek kmene Mollusca je perleť, vyskytující se v několika typech pouze u této skupiny živočichů. Perleť se vyvinula u čtyř z osmi existujících tříd měkkýšů, a to u tříd Gastropoda, Bivalvia, Cephalopoda a Monoplacophora (Ponder a Lindberg 2008).

Nejběžnějším a zároveň také prastarým typem mikrostruktury schránek měkkýšů je lamelární mikrostruktura (označovaná jako cross-lamellar structure). Tento mikrostrukturní typ je doložen již od karbonu, stejně jako perleť, tedy zhruba 300 milionů let (Batten 1984; Bandel a kol. 2002). Podobně jako u perleti je i evoluce lamelární mikrostruktury velmi nedostatečně známa. Informace o vlastnostech a vývoji ostatních typů mikrostruktur jsou často téměř nulové.

Mikrostruktura a krystalografická textura nejsou jedinými vlastnostmi, které můžeme dnes studovat u měkkýších schránek. Nové instrumentální možnosti nabízí i studium mikromechanických vlastností měkkýších schránek, jako je určení mikrotvrdomosti či elastického modulu jednotlivých typů vrstev schránek měkkýšů. Přestože první data naznačují, že tyto mikromechanické vlastnosti jsou svázány s mikrostrukturou a krystalografickou texturou (Frýda a kol. 2013), znalosti o evoluci těchto vlastností schránek měkkýšů v podstatě neexistují.

Každá schránka měkkýšů je dokonale uspořádaným nanokompozitem složeným z mikrokrystallků uhličitanu vápenatého (často aragonitu a kalcitu současně) a menšího množství různých organických látek (Wada 1972; Marin a Luquet 2004; Addadi a kol. 2006; Marin a kol. 2008). Tyto organické látky se podílí na vzniku velmi složité mikrostruktury a krystalografické textury schránek měkkýšů. Výzkumy prokázaly, že organické látky ve schránkách určují, zda bude vylučován uhličitan vápenatý ve formě kalcitu či aragonitu nebo obě modifikace současně (Marin a Luquet 2004; Addadi a kol. 2006; Marin a kol. 2008). Množství organických látek však většinou nepřevyšuje 5 % hmotnostní kompozice (Barthelat a kol. 2009).

Mechanismus vzniku složité kompozitní struktury tvořící vnitřní vrstvy z uhličitanu vápenatého je předmětem mnoha studií založených na analýzách organických látek (Wada 1972; Marie a kol. 2008, 2009; Marin a Luquet 2004; Addadi a kol. 2006; Marin a kol. 2008; Mukai a kol. 2010), které určují formu vylučovaného uhličitanu vápenatého (aragonit, kalcit, kombinace obou forem) nebo na modelech růstu schránek a studiu faktorů ovlivňujících přednostní orientaci krystalografických os aragonitu nebo kalcitu (Checa a Rodriques-Navarro 2001, 2005; Checa a kol. 2006, 2008). Výsledky těchto studií jsou však často protikladné. Například nedávné studie (např. Jackson a kol. 2010) naznačují nezávislý vývoj perleti u jednotlivých tříd měkkýšů, což je

v protikladu se studii zaměřenými na enzymy řídící biomineralizaci schránek (např. Marie a kol. 2008, 2009; Marin a kol. 2008).

### 1.1.1 Mikrostruktura schránek měkkýšů

Vnitřní stavbu schránek měkkýšů můžeme zkoumat různými způsoby, ale v principu studujeme dvě nezávislé vlastnosti – mikrostrukturu a texturu schránek. Mikrostruktura popisuje tvar mikrokystalů, které tvoří jednotlivé vrstvy schránky. Mikrostruktura schránek měkkýšů je zkoumána již téměř sto let (Bøggild 1930), ale intenzivní výzkum je spojen až s použitím elektronové mikroskopie. Mezi měkkýši se mikrostrukturní vzory značně liší a pravděpodobně nejsložitější mikrostrukturní vzory jsou u řádu Patellogastropoda, což vedlo k tomu, že jsou snad nejlépe prozkoumanou skupinou měkkýšů.

Pro výskyt patellogastropodů jsou charakteristická skalnatá pobřeží přílivové zóny, kde tato skupina dosahuje velmi vysoké četnosti (Lindberg 1988, 1990, 2008; Harasewych a McArthur 2000). Velké procento zástupců Patellogastropoda se vyskytuje v tomto prostředí mělkých vod s vysokou energií, kde se žijí řasami a mořskými travami, avšak minoritně obývají některé druhy i hlubinná mořská prostředí (Lindberg a Hedegaard 1996; Lindberg 1988, 1990, 2008) také s výskytem v blízkosti hydrotermálních prúdů a sirných vývěrů černých komínů (McLean 1990; Lindberg 2008). O tom, zda právě život patellogastropodů ve vodách s vysokou energií vedl ke vzniku složitě stavby schránky patellogastropodů se dosud vedou spory (Frýda 2012).

První systematizaci mikrostruktury schránek patellogastropodů popsal MacClintock (1967) a následně ji generalizoval Lindberg (1988), který především zobecnil hlavní strukturní znaky schránek skupiny Patellogastropoda (Lindberg 1988; Lindberg a Hedegaard 1996). Stávající poznatky o struktuře schránek patellogastropodů do značné míry stále vycházejí z popisu MacClintocka (1967), založeném na užití optické mikroskopie, což bylo důvodem pro detailnější studium schránek patellogastropodů elektronovým mikroskopem (např. Fuchigami a Sasaki 2005). Na základě studie MacClintocka (1967) jsou vrstvy schránky patellogastropodů rozděleny na vnitřní a vnější vrstvy oddělené myostrakem. Pozice každé vrstvy schránky je označena dle uspořádání ve vztahu k myostraku (M), tzn. od vnitřní k vnější (tj. M + 1, M + 2, M + 3, atd.) a od vnější k vnitřní (tj. M - 1, M - 2, M - 3, atd.) (Fuchigami a Sasaki 2005; Gilman 2007). Jednotlivé vrstvy mohou mít nejen odlišnou mikrostrukturu, ale i mineralogické složení (tj. kalcit či aragonit). Morfologicky podobné mikrostruktury patellogastropodů mohou mít rozdílné textury a naopak (Chateigner a kol. 2000; Barthelat a kol. 2009; Frýda a Sasaki 2007; Sasaki a kol. 2010). U patellogastropodů mikrostruktura vnitřních vrstev schránky vymezuje taxonomické skupiny na úrovni rodu (Fuchigami a Sasaki 2005). Dnes existuje zhruba 25 mikrostrukturních typů schránek jen u řádu Patellogastropoda. Jednotlivé mikrostrukturní typy jsou charakteristické pro určité druhy, což lze využít při identifikaci fosilních taxonů (např. Bandel a Geldmacher 1996).

Výzkum patellogastropodů vyústil ve vznik řady termínů, které jsou dnes používány k popisu mikrostrukturních vzorů měkkýších schránek (např. MacClintocka 1967; Fuchigami a Sasaki 2005). Nezávisle na výzkumu mikrostruktur patellogastropodů probíhalo studium mikrostruktury zástupců třídy Bivalvia (mlži). Tento výzkum je spojen se skupinou kolem J. G. Cartera. Jejich výzkum vyústil ve velmi rozsáhlou monografii (Carter 1990a, b), která obsahuje data o mikrostruktuře mnoha set měkkýšů, především však mlžů. Toto jediné dílo dodnes obsahuje většinu současných poznatků o mikrostruktuře měkkýších schránek. Studium mikrostruktury mlžů vyústilo rovněž ve vlastní terminologii. Důsledkem toho je značná

nejednota v používání deskriptivního označení mikrostruktury schránek měkkýšů, kterou nalézáme téměř ve všech vědeckých publikacích.

Význam mikrostruktury schránek pro taxonomické a fylogenetické analýzy je dnes již nepochybný, což lze ilustrovat například na řadě studií (např. Gastropoda – např. Bandel 1990, 1997, 2002a, b; Bandel a Geldmacher 1996; Carter a Hall 1990, Bivalvia - např. Taylor a kol. 1969, 1973; Taylor 1973; Carter 1990a, b; Carter a Clark 1985).

### 1.1.2 Textura schránek měkkýšů

Jak již bylo řečeno, mikrostruktura popisuje tvar mikrokrystallků, které tvoří jednotlivé vrstvy schránky. Krystalografická textura charakterizuje prostorové uspořádání jednotlivých mikrokrystallků (tj. orientaci jejich krystalografických os). Mikrostruktura a krystalografická textura jsou vzájemně nezávislé znaky.

Na rozdíl od studia mikrostruktury, jsou poznatky o krystalografické textuře schránek velmi malé. Tento znak schránek byl dosud studován jen u několika málo desítek druhů žijících měkkýšů a jen u zhruba 20 druhů fosilních měkkýšů. Navíc většina těchto studií byla zaměřena na pochopení mechanismu růstu schránky nebo na využití těchto poznatků v medicíně či materiálovém inženýrství (např. Checa a Rodriques-Navarro 2001, 2005; Checa a kol. 2006, 2008). Počet publikovaných studií o krystalografické textuře měkkýších schránek, zaměřených na ekologii těchto organismů či na pochopení jejich evoluce, je menší než 20 (např. Chateigner a kol. 2000; Frýda a kol. 2010). Nejstudovanější vrstvou je perleť, které se věnuje většina publikací o krystalografické textuře měkkýších schránek.

Perleť (nacre) je aragonitová struktura, vyskytující se u čtyř z devíti tříd tohoto kmene: Gastropoda, Bivalvia, Cephalopoda a Monoplacophora. Perleť tvoří polygonální destičky aragonitu o tloušťce 200 – 500 nm oddělených 20 – 50 nm organické hmoty tvořené především proteiny a polysacharidy (Currey 1977; Jackson a kol. 1988). Vysoce organizovanou strukturu perleti utváří 95 hmot. % minerálních látek a 5 hmot. % organické hmoty. Mikrostrukturní typ perleti charakterizuje uspořádání jednotlivých destiček aragonitu. Krystalografická textura perleti je určena orientací krystalografických os ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) jednotlivých mikrokrystallků aragonitu (Chateigner a kol. 2000). Na základě mikroskopických studií byly popsány dva mikrostrukturní typy perleti charakteristické pro jednotlivé třídy měkkýšů (Carter 1990a; Chateigner a kol. 2000) - sloupcovitá perleť (columnar nacre) a vrstevnatá perleť (sheet nacre).

Sloupcovitá perleť má jednotlivé destičky perleti uspořádané ve sloupcích. Ve třídě Gastropoda se tento typ perleti vyskytuje pouze u fylogenetické linie Vetigastropoda (Currey a Taylor 1974; Frýda a kol. 2008, 2009). Na druhou stranu je tento mikrostrukturní typ dominantní u recentních i fosilních zástupců třídy Cephalopoda. Vrstevnatá perleť má jednotlivé destičky perleti formovány ve vrstvách víceméně neuspořádaně. Tento typ perleti je typický pro třídy Bivalvia (Barthelat a kol. 2007) a Monoplacophora (Chateigner a kol. 2000). Nedávné studie však potvrdily, že perleť monoplakoforů není stejného typu jako perleť u mlžů (Checa a kol. 2008), což otevírá možnost existence tří rozdílných struktur vzniklých nezávisle na sobě. Situaci ještě komplikuje fakt, že byl pravděpodobně potvrzen konvergentní vývoj perleti u hlavonožců, plžů, mlžů a monoplakoforů navzdory velmi podobným mikrostrukturním typům perleti (Vendrasco a kol. 2011).

Model mikrostrukturních typů perleti doplňuje krystalografická textura popisující prostorovou distribuci krystalografických os jednotlivých krystalů aragonitu (Hedegaard a Wenk

1998; Chateigner a kol. 2000). Studium orientace krystalografických os byly potvrzeny dvě základní krystalografické textury, které jsou charakteristické pro perleť jednotlivých tříd kmene Mollusca (Chateigner a kol. 2000; Frýda a kol. 2010; Frýda 2012). Těmito krystalografickými texturami perleti jsou – dokonale uspořádaná perleť (tzv. quasimonokrystalová textura) a neuspořádaná perleť (tzv. jednoosá textura).

Dokonale uspořádaná krystalografická textura je charakterizována stejnosměrnou orientací všech krystalografických os  $a$ ,  $b$  a  $c$  jednotlivých krystalků destiček perleti. Tímto způsobem jsou uspořádané krystalky aragonitu v perleti u třídy Bivalvia a Cephalopoda (Checa a Rodriques-Navarro 2001, 2005; Checa a kol. 2006; Frýda a kol. 2010). Jednoosá krystalografická textura je typická stejnou orientací krystalografické osy  $c$  u všech krystalků destiček perleti a náhodnou orientací dvou zbývajících krystalografických os  $a$  a  $b$ . Tato textura byla potvrzena u třídy Gastropoda a Monoplacophora (Chateigner a kol. 2000; Checa a kol. 2008; Frýda a kol. 2009). U obou typů krystalografických textur je shodná orientace osy  $c$  kolmo k povrchu schránky.

Hypotézy založené na jedinečnosti mikrostrukturního a krystalografického typu perleti pro jednotlivé třídy měkkýšů (Chateigner a kol. 2000) vyvrátily studie fosilních vzorků hlavonožců. Některé schránky fosilních hlavonožců mají perleť s jednoosou texturou, čímž byl předložen nový důkaz o tom, že v případě skupin Gastropoda a Cephalopoda se pravděpodobně jedná o sesterské skupiny (Frýda 2012).

Krom perleti existuje jen několik málo nesystematických publikací o krystalografické textuře měkkýších schránek. Jde především o výzkum aragonitové lamelární struktury a různých typů kalcitových struktur. Zaměření těchto publikací a omezené množství dat o krystalografické textuře dosud znemožňuje jakoukoliv jejich fylogenetickou interpretaci.

### 1.1.1 Mikromechanické vlastnosti schránek

S rozvojem instrumentálních technik došlo v posledních letech k možnosti využití nanoindentaci pro určení některých mechanických vlastností v nano až mikro měřítku (Oliver a Pharr 1992). Tato metoda označovaná také jako DSI (Depth Sensing Indentation) je nejrozšířenější metodou vhodnou ke zjišťování veličiny mikrotvrdosti a elastického modulu (Fischer-Cripps 2000).

Struktury některých přírodních materiálů vykazují pozoruhodné mechanické vlastnosti. Typickým případem těchto vlastností je perleť, která v posledních 10 letech poutá pozornost mnoha výzkumníků, kteří se snaží o pochopení vzniku a růstu perleti. Hlavním důvodem je možnost syntézy nových materiálů s podobnými mechanickými vlastnostmi. Mechanické vlastnosti schránek měkkýšů jsou také předmětem zájmu mnoha oborů od lékařů po materiálové inženýry. Stavba perleti vede k pozoruhodným mechanickým vlastnostem ve srovnání s monokrystalickým materiálem (Li a kol. 2004; Meyers a kol. 2008; Liang a kol. 2008). Studium perleti, jako modelového materiálu, byla věnována řada vědeckých prací, které analyzovaly vybrané mechanické vlastnosti u různých zástupců kmene Mollusca (např. Li a kol. 2004; Bruet a kol. 2005; Barthelat a kol. 2006). Mayers a kol. (2008) studovali strukturu a mechanické vlastnosti různých biologických materiálů, kde se zaměřili na strukturu a mechanické vlastnosti gastropodů. Heinemann a kol. (2011) ukázali, že periodickým uspořádáním biokrystalků a organické hmoty do specifické struktury vznikají pozoruhodné až dokonalé mechanické vlastnosti schránek měkkýšů. Velmi důležitým faktorem ovlivňujícím vznik vynikajících mechanických vlastností perleti je silné spojení mezi aragonitovými destičkami

perleti a organickou hmotou (viz také Meyers a kol. 2008). Spojení biokrystalků s organickým „tmelem“ u různých mikrostrukturních typů schránek zajišťuje tvrdost a značnou míru pružnosti. Hodnoty mikrotvrdomosti a elastického modulu jsou však u naprosté většiny mikrostruktur měkkýších schránek neznámé. První testy nanoindentační metody ukázaly, že hodnoty mikrotvrdomosti a elasticity jsou velmi ovlivněny jak mikro, tak nanostrukturou (tj. strukturou vlastních biokrystalků) schránek (Bruet a kol. 2005; Katti a kol. 2006). Navíc naše první data naznačila, že schránky s identickou mikrostrukturou, ale odlišnou krystalografickou texturou mají odlišné hodnoty mikrotvrdomosti a elastického modulu (Frýda a kol. 2013).

Pevnost lastur je ve skutečnosti vyšší než kosti obratlovců (Harper 2005). Testy, které provedl Currey a Taylor (1974) ukázaly modul pružnosti v rozmezí 40 až 70 GPa a pevnost v rozsahu 20 až 120 MPa, přičemž aragonitová struktura může dosáhnout pevnosti až 120 MPa (Li a Nardi 2004; Li a kol. 2004; Barthelat a kol. 2009). Hodnoty tvrdosti a elasticity vykazují nižší hodnoty při stoupající zátěži, přičemž nanoindentační měření (druhu *Haliotis rufescens*) vykazovalo v organické vrstvě pro parametr pružnosti nejnižší hodnotu 15 GPa (Katti a kol. 2006). Při měření modulu pružnosti jednotlivých destiček perleti u gastropoda druhu *Trochus niloticus* byla zjištěna hodnota až 92 GPa (Bruet a kol. 2005). U stejného druhu se pohybovala při zátěži 50 – 1 000  $\mu$ N hodnota elastického modulu mezi 114 – 143 GPa a hodnota tvrdosti 7 – 11,4 GPa.

Nanoindentační měření bylo provedeno také na anorganickém vzorku aragonitu. Například Kearney (2006) provedl měření mechanických vlastností na čistém aragonitu kolmo k ose *c* a uvádí hodnoty elastického modulu 102,8 GPa  $\pm$  2,4 GPa a mikrotvrdomost 6,2 GPa  $\pm$  0,3 GPa. Obdobnou studii provedli také Romana a kol. (2013), kteří došli k závěru, že hodnoty tvrdosti a elastického modulu organického aragonitu jsou velmi blízké hodnotám minerálního aragonitu. Hlavním problémem všech měření mikromechanických vlastností schránek měkkýšů je však absence stejného metodického postupu při měřeních. Tento fakt znemožňuje porovnat výsledky jednotlivých studií navzájem. K měření se používají různé tvary indenterů, odlišná časová i silová schemata, a tak dále. U porovnávaných měření není tedy zřejmé, jakou část rozdílu v měřených hodnotách lze přičíst rozdílnému metodickému přístupu, a jakou skutečnému rozdílu ve vlastnostech materiálů. Z tohoto důvodu není účelné analyzovat zde výsledky všech několika desítek publikovaných prací o mikromechanických vlastnostech biokompozitů včetně měkkýších schránek, neboť výsledky těchto prací nemají přímý vztah k cílům předložené disertační práce.

## 2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem disertační práce je určit dvě významné mikromechanické charakteristiky schránek, elastický modul a mikrotvrdost, pomocí nanoindentačních zkoušek u vybraných základních mikrostruktur schránek měkkýšů. Jako modelové mikrostruktury byly vybrány dvě nejrozšířenější a pravděpodobně také nejprimitivnější mikrostruktury tvořené aragonitem, perleť (nacre) a lamelární (crossed lamellar) mikrostruktura, a jedna kalcitová mikrostruktura označovaná v anglosaské literatuře jako „semifoliated mikrostructure“. Další cílem disertační práce je analyzovat vztah elastického modulu a mikrotvrdosti perleti k mikrostrukturním a texturním parametrům a k prostředí života studovaných měkkýšů. Cílem této analýzy je zjistit, které faktory determinují studované mikromechanické vlastnosti perleti.

Pro disertační práci byly stanoveny následující cíle:

- i. Určit a porovnat elastický modul a mikrotvrdost dvou odlišných mikrostruktur, kalcitové a aragonitové, u vybraných měkkýšů žijících ve výrazně odlišných fyzikálních podmínkách.
- ii. Určit a porovnat elastický modul a mikrotvrdost anorganického aragonitu a aragonitové perleti mlžů s odlišnou krystalografickou texturou a analyzovat vliv anizotropie aragonitu na měřené mikromechanické veličiny.
- iii. Určit elastický modul a mikrotvrdost perleti mlžů z odlišných životních prostředí a analyzovat vztah mikromechanických veličin k mikrostrukturním a texturním parametrům perleti.

### 3 METODIKA

Pro studium mikrostruktury byli vybráni zástupci kmene Bivalvia a Gastropoda.

Z kmene plžů byli vybráni tři zástupci fylogenetické linie Patellogastropoda: *Limalepeta lima*, *Nipponacmea concinna* a *Pectinodonta orientalis*.

Z kmene Bivalvia bylo vybráno jedenáct druhů, z nichž dva druhy (*Mytilus edulis* a *Pinna nobilis*) byly zastoupeny dvěma jedinci. Celkem tedy třináct zástupců následujících druhů: *Amblema plicata*, *Brachidontes rostratus*, *Leptodea fragilis*, *Modiolus barbatus*, *Mytilus californianus*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Nucula nucleus*, *Pinctada radiata*, *Pinna nobilis*, *Quadrula apiculata*.

Do této studie bylo zařazeno a studováno celkem 16 jedinců.

#### Zástupci kmene Mollusca vybraní pro studii:

zástupci	oblast	vzorek č.
<b>Gastropoda</b>		
<i>Limalepeta lima</i>	Tichý oceán, Japonsko	62
<i>Nipponacmea concinna</i>	Tichý oceán, Japonsko	55
<i>Pectinodonta orientalis</i>	Tichý oceán, Japonsko	63
<b>Bivalvia</b>		
<i>Amblema plicata</i>	Texas, USA	121
<i>Brachidontes rostratus</i>	Tichý oceán, Austrálie	115
<i>Leptodea fragilis</i>	Texas, USA	122
<i>Modiolus barbatus</i>	Jaderské moře, Slovinsko	104
<i>Mytilus californianus</i>	Tichý oceán, USA	116
<i>Mytilus edulis</i>	Severní moře, Norsko	103
<i>Mytilus edulis</i>	Kanál La Manche, Anglie	106
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Jaderské moře, Chorvatsko	105
<i>Nucula nucleus</i>	Středozevní moře, Španělsko	110
<i>Pinctada radiata</i>	Egejské moře, Řecko	101
<i>Pinna nobilis</i>	Středozevní moře, Španělsko	108
<i>Pinna nobilis</i>	Jaderské moře, Slovinsko	109
<i>Quadrula apiculata</i>	Texas, USA	123

Základní charakteristika a popis studovaných druhů je v abecedním pořadí uveden v kapitole 3.1 Charakteristika vybraných druhů.



### 3.1 Charakteristika vybraných druhů

#### 3.1.1 *Limalepeta lima* Dall, 1918

*Limalepeta lima* patří do nadřádu Eogastropoda, řádu Patellogastropoda, nadčeledi Lottioidea a čeledi Lepetidae Gray, 1850.



Foto 3.1 - Schránka druhu *Limalepeta lima*.

Oválný, kápoovitý tvar schránky dorůstá maximální velikosti 40 mm. Tenkostěnnou schránku charakterizují jemné drážky směřující radiálně od vrcholu k okraji. Barva schránky je světle hnědá s charakteristickým perleťovým leskem na vnitřní straně.

Přirozeným výskytem jsou skalnaté útesy, kameny či štěrky, často také schránky jiných druhů měkkýšů, obvykle mlžů. Hloubka výskytu je pro daný druh 4 až 120 m, častěji se však vyskytuje v rozmezí hloubky 10 – 40 m (Kolbin 2006).

Studovaný vzorek druhu *L. lima* (vzorek č. 62) byl odebrán na pobřeží Tichého oceánu v blízkosti města Kushiro, Hokkaido, Japonsko v hloubce 50 – 100 m (sběratel Takenori Sasaki, 1989).

#### 3.1.2 *Nipponacmea concinna* Lischke, 1870

*Nipponacmea concinna* patří do nadřádu Eogastropoda, řádu Patellogastropoda, nadčeledi Lottioidea a čeledi Lottidae Gray, 1840.

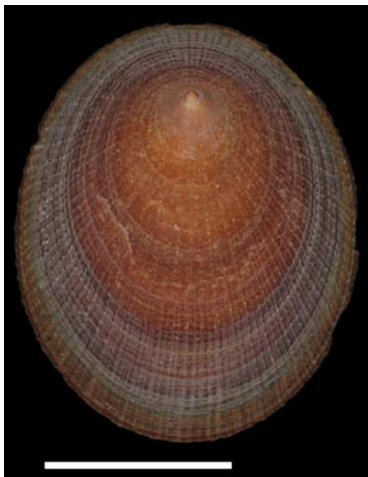


Foto 3.2 - Schránka druhu *Nipponacmea concinna*.

Schránky rodu *Nipponacmea* jsou oválného tvaru o velikosti do 35 mm. Barva schránky je na vnější straně nazelenalá až hnědá s charakteristickým povrchem jemných radiálních drážek. Vnitřní strana schránky je vysoce lesklá se zelenomodrým tónem. Tenký vnitřní okraj schránky vykazuje barvu a texturu substrátu, na který schránka přiléhá.

*Nipponacmea concinna* je velmi rozšířeným druhem v oblasti Japonska a přilehlých ostrovů. Přirozeným výskytem je litorální zóna, kde obývá kameny a balvany přílivového pásma do hloubky 25 metrů.

Studovaná schránka (vzorek č. 55) pochází z pobřeží Tichého oceánu v blízkosti města Kinzokan, Prefektura Miyagi, Japonsko (sběratel Takenori Sasaki, 2004).

### 3.1.3 *Pectinodonta orientalis* Schepman, 1908

*Pectinodonta orientalis* patří do nadřádu Eogastropoda, řádu Patelogastropoda, nadčeledi Acmaeidea a čeledi Acmaeidae Forbes, 1850.



Foto 3.3 - Schránka druhu *Pectinodonta orientalis*.

Schránky oválného tvaru dorůstají do průměrné velikosti 12 – 18 mm. Charakteristickým rysem schránek druhu *P. orientalis* je bělavé zbarvení, potvrzující hloubku jejich výskytu, jenž je pod hranicí fotické zóny. Vnější stranu schránky charakterizují jemné růstové linie, směřující v koncentrických kruzích od apexu k okraji.

Taxon *Pectinodonta* je z pohledu přirozeného výskytu výjimkou mezi zástupci čeledi Acmaeidae, pro kterou je obvyklé litorální pásmo. Přirozeným výskytem jedinců tohoto taxonu je batyální až abysální zóna (390 – 4 450 m) (Marshall 1985).

Studovaná schránka druhu *P. orientalis* (vzorek č. 63) pochází z pobřeží Tichého oceánu východní části Japonska, v blízkosti města Hyuga Basin, vylovená z hloubky 1 092 – 1 094 m (R/V *Tansei-maru* KT-86-16 station C) (sběratel Takenori Sasaki, 2002).

### 3.1.4 *Amblyma plicata* Say, 1817

*Amblyma plicata* patří do nadřádu Palaeoheterodonta, řádu Unionoida, nadčeledi Unionoidea a čeledi Unionidae Fleming, 1828.



Foto 3.4 - Schránka druhu *Amblyma plicata*.

Kulatá nebo protáhlá schránka je charakteristická paralelními hřebeny na zadní části lastury. Velikost *A. plicata* dosahuje délky přibližně 150 mm. Barevné variace korespondují se stářím jedince. Pro juvenilní stádia je typické žlutozelené až hnědé periostrakum, přičemž starší jedinci se vyznačují tmavězeleným, hnědým a černým zbarvením. Perleť má barvu bílou často s duhovými skvrnami.

*Amblyma plicata* je sladkovodní druh, jehož přirozeným výskytem jsou toky a vodní nádrže s bahnitým či písčitým dnem (Cummings et Mayer 1992; Watters 1995). Dle studií pochází

výrazně vypouklé schránky s menším počtem rýh z velkých toků a naopak. Tento druh se běžně vyskytuje v Mississippi, v Mexickém zálivu a centrální oblasti Texasu až po Floridu. Studovaná schránka (vzorek č. 121) pochází ze severozápadního Texasu (USA) (sběratel Jiří Frýda).

### 3.1.5 *Brachidontes rostratus* Dunker, 1857

*Brachidontes rostratus* patří do nadřádu Pteriomorphia, řádu Mytiloidea, nadčeledi Mytiloidea a čeledi Mytilidae Rafinesque, 1815.



**Foto 3.5** - Schránka druhu *Brachidontes rostratus*.

Lastura vějířovitého tvaru s výrazně zašpičatělým štítem dorůstá velikosti přibližně 40 mm. Vnější struktura schránky je jemně rýhovaná světlehnědé barvy a její vnitřní část charakterizuje typické perleťové zbarvení.

Přirozeným výskytem druhu *B. rostratus* je malakologická oblast australská, která pokrývá severní pobřeží (tropické pásmo), západní a východní pobřeží (subtropické pásmo) a jižní pobřeží Austrálie (mírné chladné pásmo). Nejčastěji obývá skalnaté břehy, kde vytváří shluky schránek pod přílivovou hranou nebo žije ve skulinách skalisek přichycená byssovými vlákny (Bruyne 2003).

Studovaná schránka (vzorek č. 115) pochází z Brouler Beach města Sydney (Austrálie) (sběratel Michal Mergl).

### 3.1.6 *Leptodea fragilis* Rafinesque, 1820

*Leptodea fragilis* patří do nadřádu Palaeoheterodonta, řádu Unionoida, nadčeledi Unionoidea a čeledi Unionidae Fleming, 1828.



Foto 3.6 - Schránka druhu *Leptodea fragilis*.

Oválné lastury dosahují velikosti 150 mm, jsou tenké a ploché. Stáří jedince odráží barvu periostraka, stejně jako letokruhy na vnější straně lastury. Žlutavé zbarvení je typické pro mladší jedince někdy se zřetelnými zelenými pásky oproti starším jedincům, kde je zbarvení žlutohnědé. Vnitřní strana lastury je modrobílá nebo nažloutlá perleť, v místě zubů může být růžová až purpurová.

*Leptodea fragilis* je sladkovodní druh, jehož biotem jsou řeky a potoky. Přirozeným výskytem jsou toky a vodní nádrže s bahnitým či štěrkovitým až písčitým dnem. Vyskytuje se v prostředí horských potoků až po řeky a jezera hojně v severovýchodní části USA (Cumings a Mayer 1992; Watters 1995).

Studovaná schránka (vzorek č. 122) pochází ze severozápadního Texasu (USA) (sběratel Jiří Frýda).

### 3.1.7 *Modiolus barbatus* Linnaeus, 1758

*Modiolus barbatus* patří do nadřádu Pteriomorphia, řádu Mytiloidea, nadčeledi Mytiloidea a čeledi Mytilidae Rafinesque, 1815.



Foto 3.7 – Schránka druhu *Modiolus barbatus*.

Lastury mají protáhle trojúhelníkovitý tvar, jejich barva je hnědočervená. Velikost schránky dorůstá do velikosti 65 mm. Na vnější straně lastury jsou u dospělých jedinců zřetelné hrubé růstové linie často porostlé dlouhými vlákny. Vnitřní strana, tzv. perleťové vrstvy má barvu nachovou.

Přirozeným výskytem druhu *M. barbatus* je litorální a sublitorální pásmo s hloubkou výskytu až několik desítek metrů (do 200 m) s hrubě písčitém až štěrkovitým substrátem, nejčastěji v místech se silným prouděním. Geografické rozšíření tohoto druhu sahá do malakologické oblasti arktické, kalifornské, keltské, japonské a lusitanické oblasti (Bruyne 2003).

Studovaná schránka (vzorek č. 104) pochází z pořeží Jaderského moře v blízkosti vesnice Izola (Slovinsko) (sběratel Michal Mergl).

### 3.1.8 *Mytilus californianus* Conrad, 1837

*Mytilus californianus* patří do nadřádu Pteriomorphia, řádu Mytiloidea, nadčeledi Mytiloidea a čeledi Mytilidae Rafinesque, 1815.



Foto 3.8 – Schránky druhu *Mytilus californianus*.

Mohutnou schránku charakterizují paprsčité vystouplá žebra s nepravidelnými růstovými liniemi. Povrch schránky je často erodovaný (Morris a kol. 1980). Vnitřní strana lastur má modrošedé zbarvení. Velikost schránky dosahuje přibližně 150 mm.

*Mytilus californianus* je rozšířeným druhem nižší až střední pobřežní zóny do hloubky 25 m. Jeho přirozeným výskytem jsou skalnaté útvary na otevřených pobřežích, kde je přichycen byssátními vlákny (Morris a kol. 1980). Díky vláknům, kterými je připevněn k substrátu je tento druh schopen vytvářet masivní vrstvy na nechráněných skalách a pilířích až do hloubky 24 m (Cowles 2002). Geograficky je tento druh rozšířen v malakologické oblasti kalifornské, aleotické a arktické (Bruyne 2003).

Studovaná schránka (vzorek č. 116) pochází z pobřeží Tichého oceánu u města Bookings (JZ Oregon, USA) (sběratel Jiří Frýda).

### 3.1.9 *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758

*Mytilus edulis* patří do nadřádu Pteriomorphia, řádu Mytiloidea, nadčeledi Mytiloidea a čeledi Mytilidae Rafinesque, 1815.



**Foto 3.9** – Schránka druhu *Mytilus edulis*.

Schránky jsou hladké s výraznými růstovými liniemi. Tenkostěnné lastury trojúhelníkovitého tvaru mají průměrnou délku 90 mm. Některé populace však dorůstají jen délky 30 mm a naopak největší exempláře mohou dosáhnout až 200 mm. Tvar a velikost schránek se mění v závislosti na podmínkách prostředí (Tyler-Walters 2008). Schránky druhu *M. edulis* jsou často zaměňovány za druh *Mytilus galloprovincialis*, které jsou však mírně větší (Tebble 1976; Tyler-Walters 2008). Na vnější straně schránek převažuje žlutohnědé barvivo, které od vrcholu přechází v tmavě fialové pásy. Vrchní vrstva schránky je často černá.

*Mytilus edulis* je celosvětově rozšířeným druhem mírných pásem. Jejich výskyt je vázán na malakologickou oblast arktickou, severoatlantskou boreální oblast, lusitánskou oblast (tj. oblast Středozevního moře s částí Atlantského oceánu) (Bruyne 2003). Jeho přirozeným výskytem je litorální až sublitorální pásmo, obvykle do hloubky 25 m. Schránky jsou připoutány byssovými vlákny k podkladu, kterým jsou skalnaté útvary či jiné lastury. Na kluzkých místech tvoří jakési „lavice“ (Bruyne 2003).

Studované schránky pochází ze Severního moře (Slemmestad, Oslo) (vzorek č. 103) a z pobřeží u města Brighton (kanál La Manche, Anglie) (vzorek č. 106) (sběratel Michal Mergl).

### 3.1.10 *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819

*Mytilus galloprovincialis* patří do nadřádu Pteriomorphia, řádu Mytiloidea, nadčeledi Mytiloidea a čeledi Mytilidae Rafinesque, 1815.



Foto 3.10 – Schránka druhu *Mytilus galloprovincialis*.

Lastury *Mytilus galloprovincialis* mají trojúhelníkovitý tvar dorůstající délky 100 mm. Jejich barva přechází ze zelenohnědé až do černé na vnější straně schránky. Vnitřní stranu schránky tvoří perleťová vrstva, která zcela nedorůstá k dolnímu okraji.

Přirozeným výskytem je litorální a sublitorální pásmo do hloubky 25 m. Schránky žijí obdobně jako druh *Mytilus edulis*, tj. přisedle na skalnatých útvarech či jiných lasturách. Z malakologických oblastí obývá keltskou oblast a lusitánskou oblast (Bruyne 2003). Jedná se o běžně rozšířený druh.

Studovaná schránka (vzorek č. 105) pochází z pobřeží Jaderského moře v blízkosti města Rabac (Istria, Chorvatsko) (sběratel Michal Mergl).

### 3.1.11 *Nucula nucleus* Linnaeus, 1758

*Nucula nucleus* patří do nadřádu Opponobranchia, řádu Nuculoida, nadčeledi Nuculoidea a čeledi Nuculidae Gray, 1824.



Foto 3.11 – Schránka druhu *Nucula nucleus*.

Průměrná délka schránky druhu *Nucula nucleus* dosahuje přibližné velikosti 14 mm. Pevné lastury oválného tvaru charakterizuje ohnutý vrchol a jemné rýhy rostoucí radiálně od vrcholu. Charakteristický je výrazně vroubkovaný okraj. Zbarvení schránky je na vnější straně v barvě

smetanové až šedobílé s hnědým až rudohnědým periostrakem. Vnitřní strana schránky má leskle perleťové zbarvení.

Přirozeným výskytem druhu *N. nucleus* je sublitorální pásmo až do hloubky 150 m. Jedná se o méně běžný druh (Bruyne 2004).

Studovaná schránka tohoto druhu (vzorek č. 110) pochází z pobřeží Středozemního moře u města Denia (Valencie, Španělsko) (sběratel Michal Mergl).

### 3.1.12 *Pinctada radiata* Leach, 1814

*Pinctada radiata* náleží do nadřádu Pteriomorphia, řádu Pterioda, nadčeledi Pteriodidea a čeledi Pteriidae Gray, 1847.

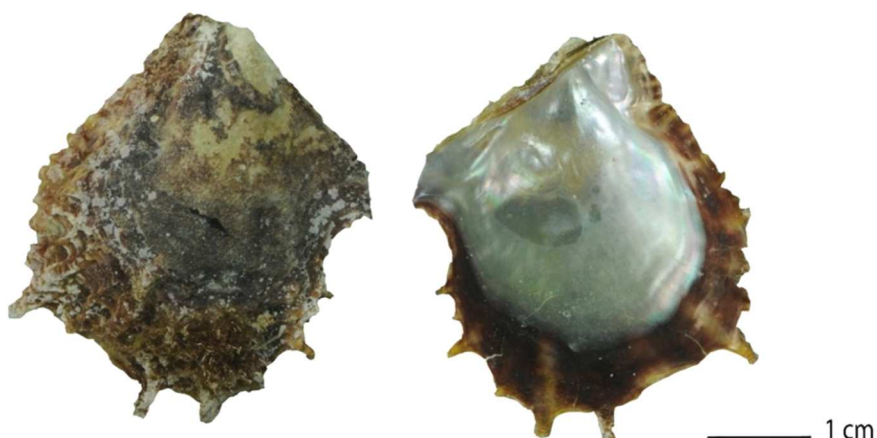


Foto 3.12 - Schránka druhu *Pinctada radiata*.

Tenká schránka čtvercovitého tvaru je charakteristická lupenitým povrchem s trnitým okrajem. Velikost schránky tohoto druhu dorůstá v průměru do velikosti 65 mm. Charakteristickým znakem vnější schránky jsou radiální paprsky tmavých odstínů barvy zelené, hnědé až černé. Vnitřní vrstva schránky je typická duhovým zbarvením perleti, která nedorůstá k samému okraji schránky.

Přirozeným výskytem druhu *P. radiata* je litorální až sublitorální pásmo do hloubky 150 m. Velmi často se však vyskytuje v hloubce do 25 m. *Pinctada radiata* je druh běžně rozšířený v západním Pacifiku, východní Africe, Rudém moři, Perském zálivu, Havaji a severním Japonsku (Carpenter et Niem 1998).

Studovaná schránka tohoto druhu (vzorek č. 101) pochází z pobřeží Egejského moře u vesnice Amoopi (Karpathos, Řecko) (sběratel Michal Mergl).



### 3.1.13 *Pinna nobilis* Linnaeus, 1758

*Pinna nobilis* patří do nadřádu Pteriomorphia, řádu Pinnoidea, nadčeledi Pinnoidea, 1819 a čeledi Pinnidae Leach, 1819.



Foto 3.13 – Schránka druhu *Pinna nobilis*.

Charakteristickým znakem *Pinna nobilis* je protáhlý, vějířovitý tvar lastur, které dosahují průměrné velikosti 40 cm. Jedná se o největší druh mlže ve Středomoří, jelikož ve své maximální délce může dosáhnout až 100 cm. Lastury jsou charakteristické žlábkovitými šupinami na vnější straně schránky a to především u mladších jedinců. Zbarvení vnější strany lastur je šedohnědé s přechodem do červenohnědé.

Přirozeným výskytem druhu *P. nobilis* jsou mělké pobřežní vody nebo porosty *Posidonia oceanica* vyskytující se do hloubky 30 m. Do písčitého či bahnitého substrátu jsou zanořeny téměř do jedné třetiny schránky. *Pinna nobilis* obývá celé Středomoří a pobřeží západní Afriky, pokrývá tedy celou lusitánskou malakologickou oblast (Bruyne 2003).

Studované schránky pochází z pořeží Středomořího moře v blízkosti města Denia (Valencie, Španělsko) (vzorek č. 108) a z pobřeží Jaderského moře u vesnice Izola (Slovinsko) (vzorek č. 109) (sběratel Michal Mergl).

### 3.1.14 *Quadrula apiculata* Say, 1829

*Quadrula apiculata* patří do nadřádu Palaeoheterodonta, řádu Unionoida, nadčeledi Unionoidea a čeledi Unionidae Fleming, 1828.



Foto 3.14 – Schránka druhu *Quadrula apiculata*.

Robustní lastury čtvercovitého tvaru se silnou perleťovou vrstvou mají na svém povrchu řadu výběžků. Velikost schránky může dosáhnout přibližně 70 mm. Zbarvení schránek je žlutozelené až světle hnědé.

Přirozeným výskytem druhu *Q. apiculata* jsou sladké vody, stojaté vodní plochy, ale i tekoucí řeky. Objevují se převážně ve středozápadní až jižní části USA. Schránky obývající větší vodní plochy se vyznačují nápadnější skulpturou oproti jedincům z menších toků (Gangloff 2004). Studovaná schránka (vzorek č. 123) pochází ze severozápadního Texasu (USA) (sběratel Jiří Frýda).

## 3.2 Metody studia mikrostruktury schránek kmene Mollusca

### 3.2.1 Výběr a příprava vzorků

Několik desítek vzorků schránek plžů a mlžů bylo připraveno v laboratoři České geologické služby, jejíž specializací je příprava mikroskopických preparátů – úprava různých materiálů do podoby preparátu, který je následně možné studovat optickým či elektronovým mikroskopem a vystavit zátěžovým testům v podobě nanoindentačních zkoušek.

Každý orientovaný vzorek schránky byl fixován do pryskyřice Epofix ve tvaru válce o průměru přibližně 30 mm (viz foto 3.15). Následně byl vzorek broušen postupně jemnějším karborundem, po té také diamantovými spreji o zrnitosti 3 až 0,25  $\mu\text{m}$ . V poslední fázi leštění byla použita zrnitost 0,05  $\mu\text{m}$ . Doba trvání jednotlivých fází se pohybuje v rozmezí několika minut, mezi něž je zařazeno omývání a čištění v ultrazvukové lázni. Celková doba přípravy a leštění vzorku je závislá na náročnosti a kvalitě materiálu. Průměrná doba přípravy jednoho vzorku je 3 dny, přičemž doba leštění jednotlivými brusivy odpovídá přibližně 15 minutám. Krom vlastní přípravy orientovaného vzorku bylo vlastní leštění vzorků provedeno pověřenými pracovníky ČGS, kteří jediní mohou s použitým zařízením pracovat.



Foto 3.15 – Vzorky fixované do Epofixu, připravené ke studii.

### 3.2.2 SEM

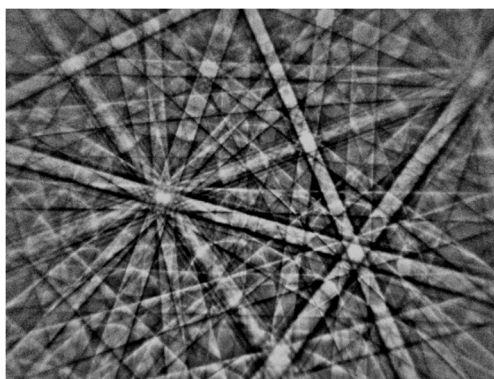
Metoda pozorování pomocí skenovacího elektronového mikroskopu je považována za nepřímou metodu. Skenovací elektronový mikroskop je přístroj, který pracuje na principu zobrazení odražených nebo sekundárních elektronů. Velká hloubka ostrosti dává možnost nalézt i u dvojrozměrných snímků ze SEM jistý trojrozměrný aspekt. Z tohoto důvodu byla uvedená metoda využita ke studiu mikrostruktury studovaných schránek.

Vzorky lastur byly rozlámány na drobné úlomky o velikosti přibližně 2 - 5 mm tak, aby byla odhalena studovaná vrstva perleti. Tyto části vzorků byly nalepeny uhlíkovou pastou na hliníkový terčík s uhlíkovou podložkou. U každého vzorku byla zaznamenána biologická orientace a označení vlastním číslem, aby při testování nedošlo k záměně vzorků. Lepení se provádí pod binokulární lupou s použitím pinzety tak, aby byly vzorky v neoptimálnější poloze při prohlížení SEM. Na jeden terčík lze nalepit dva až tři vzorky, v závislosti na jejich velikosti.

Před vlastním pozorováním v SEM je nezbytné potáhnout vzorek velmi tenkou vrstvičkou kovu s dobrou elektrickou a tepelnou vodivostí, která má za úkol odvést negativní elektrický náboj, zvýšit produkci sekundárních elektronů a minimalizovat poškození preparátu teplem uvolněným brzdícími se primárními elektrony. Tloušťka naprášené vrstvy by měla být přibližně 10 - 20 nm tak, aby byla dostatečná, ale nezakrývala povrchové detaily. Pokovování vzorků mlžů bylo provedeno zlatem nebo zlatem a paladiem v naprašovací aparatuře firmy JEOL JFC-1200. Pozorování studovaných vzorků ve skenovacím elektronovém mikroskopu bylo provedeno na SEM japonské firmy JEOL-6380LV na přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy. Při prohlížení preparátů bylo většinou použito urychlovací napětí 15 kV. Pozorované části schránky byly snímkovány a ukládány v digitální podobě.

### 3.2.3 EBSD

Elektronová difrakce zpětně odražených elektronů (EBSD), také známá jako Kikuchiho difrakce zpětně odražených elektronů (BKD), která se využívá ke studiu krystalografické orientace materiálů a objasnění textury krystalického či polykrystalického materiálu či k identifikaci těchto materiálů. Předností metody EBSD je spojení mezi texturou a krystalografií.

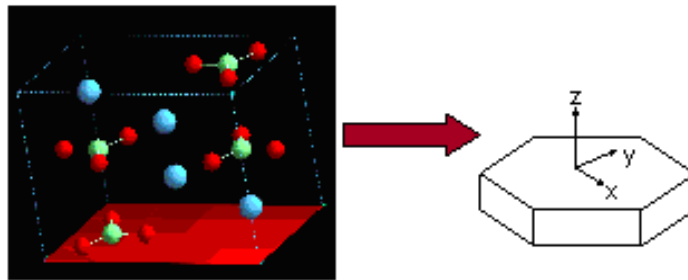


**Foto 3.16** - Difrakční vzor vygenerovaný metodou elektronové difrakce zpětně odražených elektronů.

Metoda EBSD se používá ve spojení se skenovacím elektronovým mikroskopem vybaveným kamerou snímající zpětnou difrakci elektronů. Princip této metody je založen na interakci

jednotlivých elektronů s krystalografickou mřížkou, vytvářející difrakční vzor na fluorescenční obrazovce, který je charakteristický pro každou krystalovou strukturu. Atomy krystalických materiálů jsou pravidelně uspořádané v trojrozměrné souřadnicové síti bodů nazývané krystalická mřížka. Shluky krystalů polykrystalických materiálů se formují do určité orientace - tzv. krystalografické textury.

V předložené práci byla metoda EBSD využita pro stanovení krystalografické textury perleti mlžů, kterou tvoří krystaly aragonitu. Každý krystal aragonitu je polygonální destička o tloušťce zhruba 0,5  $\mu\text{m}$  a šířce několika  $\mu\text{m}$ , uspořádaná do vrstevnaté struktury (Wojtal, 2000).



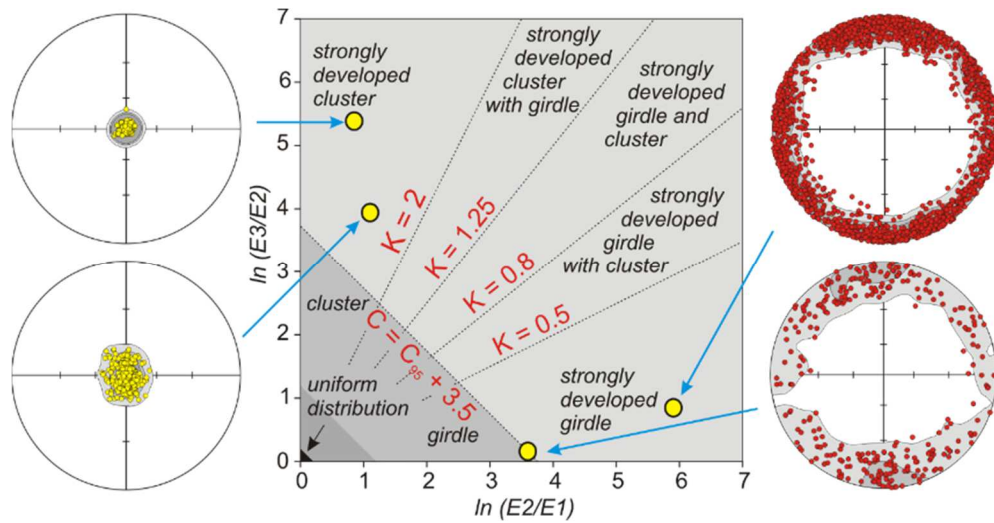
**Obrázek 3.1** - Elementární buňky uspořádané do destičky aragonitu (Wojtal 2000).

Analýzy EBSD byly provedeny v laboratořích České geologické služby za použití detektoru Nordlys připojeného ke skenovacímu elektronovému mikroskopu CamScan. Výsledky sérií EBSD Kikuchiho skupin byly odejmuty detektorem Nordlys a krystalografická orientace každého změřeného biokrystalu byla zhodnocená softwarem EBSD (HKL CHANNEL 5). Z důvodu přísných pravidel bezpečnosti práce musel provést měření školitel práce (Jiří Frýda) (přístroj generuje ionizující záření). Pro aragonit je možno vybrat více typů indexování krystalografické buňky. Zpracování měření EBSD aragonitu programem HKL Channel 5 používá následující indexování [001] = krystalografická osa **a**, [010] = krystalografická osa **b**, [100] = krystalografická osa **c**. Na každém vzorku perleti bylo provedeno 1 000 až 5 000 měření v souřadnicové síti s rozestupem 15  $\mu\text{m}$ . Vzhledem k velikosti perleťových destiček (přibližně 15  $\mu\text{m}$ ) odpovídá počet měření počtu změřených perleťových destiček v každém vzorku schránky. Měření byla provedena v režimu „Safe mode“, který v každém měřeném bodě provede tři záznamy difrakčních vzorů a pouze při naprosté shodě vyhodnocených orientací provede záznam měření.

Pro další analýzu krystalografické textury perleti byla vybrána pouze měření s nízkou hodnotou MAD (Mean Angular Deviation). Souborem programů HKL CHANNEL 5 byla vypočítána orientace každé změřené perleťové destičky a ta byla vyjádřena třemi Eulerovými úhly. Eulerovy úhly byly převedeny na krystalografické směry softwarovým balíčkem Škeble (viz Frýda a kol. 2009). Výsledky texturních analýz byly vyneseny ve stereografické projekci pro krystalografické směry [100], [010], [001] a [101].

Pro všechny projekce je rovina papíru rovnoběžná s rovinou leštěného nábrusu. Vzhledem ke skutečnosti, že cílem této dizertační práce je studium mikromechanických vlastností a nikoliv krystalografické textury, byly pro studium vybrány převážně takové vzorky, na nichž byla metoda EBSD již aplikována. Naměřená a částečně již publikovaná data (Frýda a kol. 2009) byla tedy zpracována pro potřeby této dizertační práce. Data o krystalografické orientaci jednotlivých krystalografických os perleti byla použita k výpočtu dvou parametrů *C* a *K* podle metody Woodcockových poměrů (Woodcock 1977; Woodcock a Naylor 1983). Parametr *C* určuje míru

uspořádání a parametr  $K$  charakteristický typ texturního vzorce. Tyto parametry byly využity k analýze vztahu krystalografické textury perleti a studovaných mikromechanických vlastností.



Obrázek 3.2 – Woodcockův poměr ( $C$  a  $K$ ).

### 3.2.4 Metoda nanoindentace

Pro určení elastického modulu a mikrotvrlosti byla použita metoda indentační zkoušky, používaná k mechanickým zkouškám materiálového inženýrství. K výpočtu tvrdosti a elastického modulu z těchto dat se v současnosti nejčastěji používá metoda navržená Oliverem a Pharrm (1992).

Princip nanoindentace spočívá ve vtlačování pyramidálního diamantového hrotu (Berkovichovy pyramidy) do materiálu na úrovni  $\text{nm} - \mu\text{m}$  (viz foto 3.17 a obrázek 3.3) při současném zaznamenávání aplikované síly ( $P$ ) a hloubky vpichu ( $h$ ) (obrázek 3.4).

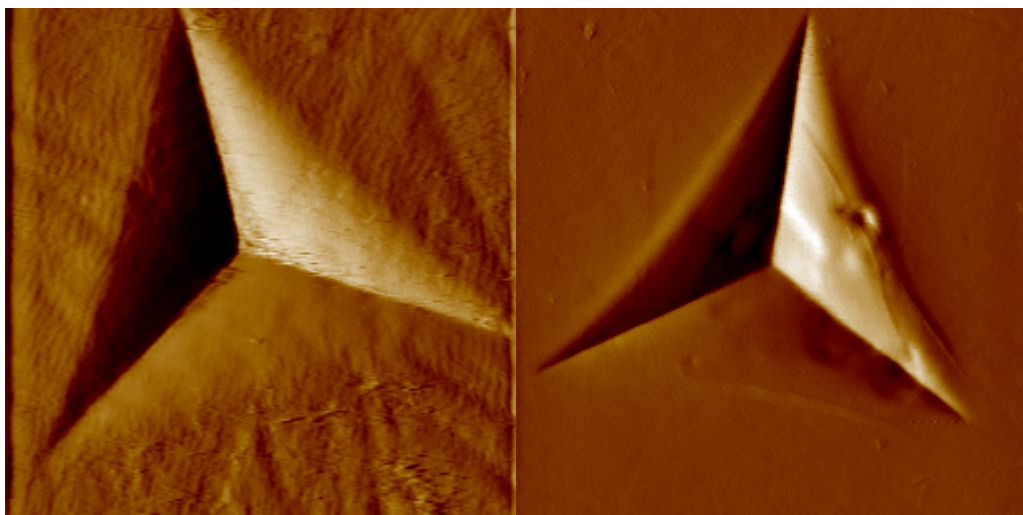
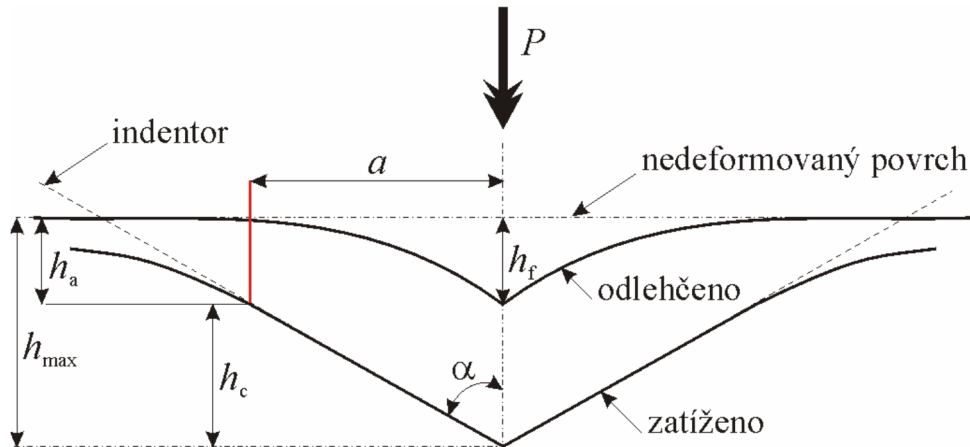


Foto 3.17 – Otisk indetoru v testovaném materiálu. Šířka obrazu zhruba  $0,5 \mu\text{m}$ .

Z naměřené indenační křivky, tj. síla vs. hloubka (obrázek 3.5), se standardně vypočítá elastický modul a mikrotvrdość testovaného materiálu.

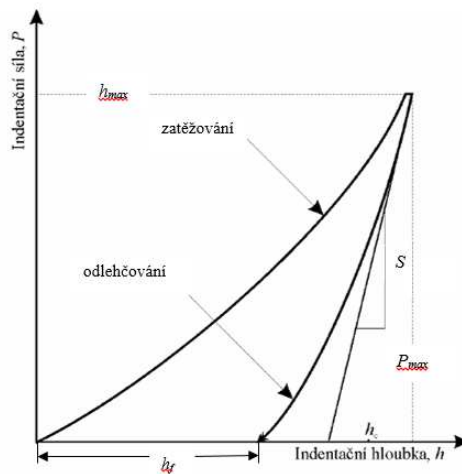


**Obrázek 3.3** - Schéma odlehčování indentoru (Oliver et Pharr 1992).

Kdykoliv v průběhu zatížení je celkové posunutí  $h$  vyjádřeno vztahem:

$$h = h_c + h_a$$

kde  $h_c$  určuje vertikální hloubku (kontaktní hloubku) a  $h_a$  je hloubkou posunu v obvodu kontaktu. Poloměr kruhu dotyku indentoru vyjařuje  $a$ . Uvolněním indentoru vzniká konečná hloubka zbytkové tvrdosti  $h_f$ .



**Obrázek 3.4** – Indenační křivka (Oliver a Pharr 1992).

Indenační křivka je grafickým znázorněním parametrů používaných při zjišťování elasticity materiálu. Vrchol křivky je průnikem maximální hloubky ( $h_{max}$ ) v závislosti na maximu vynaložené síly ( $P_{max}$ ). Parametr  $S$  vyjařuje tuhost materiálu.

Vlastní měření byla prováděna na zařízení Hysitron IT 950 TriboIndenter kvazi-statickou nanoindentací operátorem tohoto zařízení dle parametrů, které byly vybrány na základě studia literatury. Pro studium anizotropie byl naplánován experiment, který vyžaduje měření úhlů rotace vzorku podle osy kolmé k povrchu vzorku. K tomuto účelu byl zakoupen rotační stůl

(majetek ČZU) z prostředků poskytnutých grantovou agenturou ČR (P210-11-1891). Jednotlivé kroky měření byly naplánovány společně se školitelem a vlastní automatická měření byla prováděna za užití Berkovichova hrotu, mající tvar trojboké pyramidy.

V dílčí studii bylo nejprve testováno, zda použití Berkovichova hrotu majícího trojčetnou symetrii, neovlivňuje měření hodnot elastického modulu a mikrotvrdomi aragonitu (tj. perleti), který má ve směru osy *c* dvoučetnou symetrii. Jinými slovy, zda orientace Berkovichova hrotu neovlivňuje měřené hodnoty.

Měření studovaných vzorků bylo provedeno v laboratoři nanoindentačních technologií ČVUT Praha. K měření byly použity orientované nábrusy (viz foto 3.15), připravené dle metodiky popsané v části 3.2.1.

Topografie povrchu vzorků sledované oblasti o velikosti 20 x 20 μm byla naskenována pomocí *in-situ* SPM. Následně byla na naskenovaném snímku zvolena a označena místa pro indexaci pomocí tzv. „click skript“ a aplikována funkce piezo automatického módu, která umístí indenty s chybou < 10 nm. U všech experimentů byla tloušťka testované vrstvy 1 μm a maximální zatěžovací síla stanovena na 1 000 μN, která dle normy odpovídala hloubce vpichu ( $h_{\max} < 100$  nm). Zatěžovací funkce (zatěžování, konstantní síla a odlehčování) byly stanoveny na 5 x 2 x 5 sekund. V těchto časových intervalech byl zatěžován testovaný materiál. Při vytahování hrotu z materiálu se v důsledku elasticity vrací zpět, tím tlačí do hrotu silou, která je přístrojem zaznamenána. Elastický parametr – elastický modul *E* [GPa] se pak vyhodnocuje dle metody Olivera a Pharra (1992). Tento parametr je vyjádřený vztahem:

$$E = \frac{S\sqrt{\pi}}{2\sqrt{A}}$$

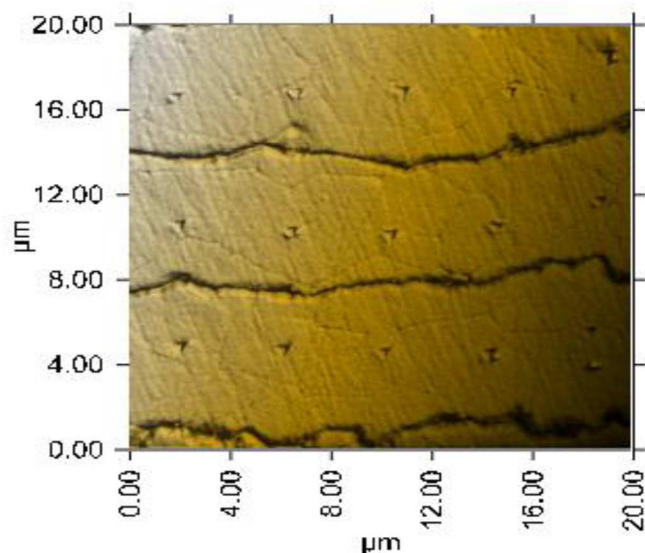
kde *S* je kontaktní tuhost a *A* vyjadřuje průmět kontaktní plochy.

Dalším výstupem je mikrotvrdomost *H* [GPa]:

$$H = \frac{P_{\max}}{A}$$

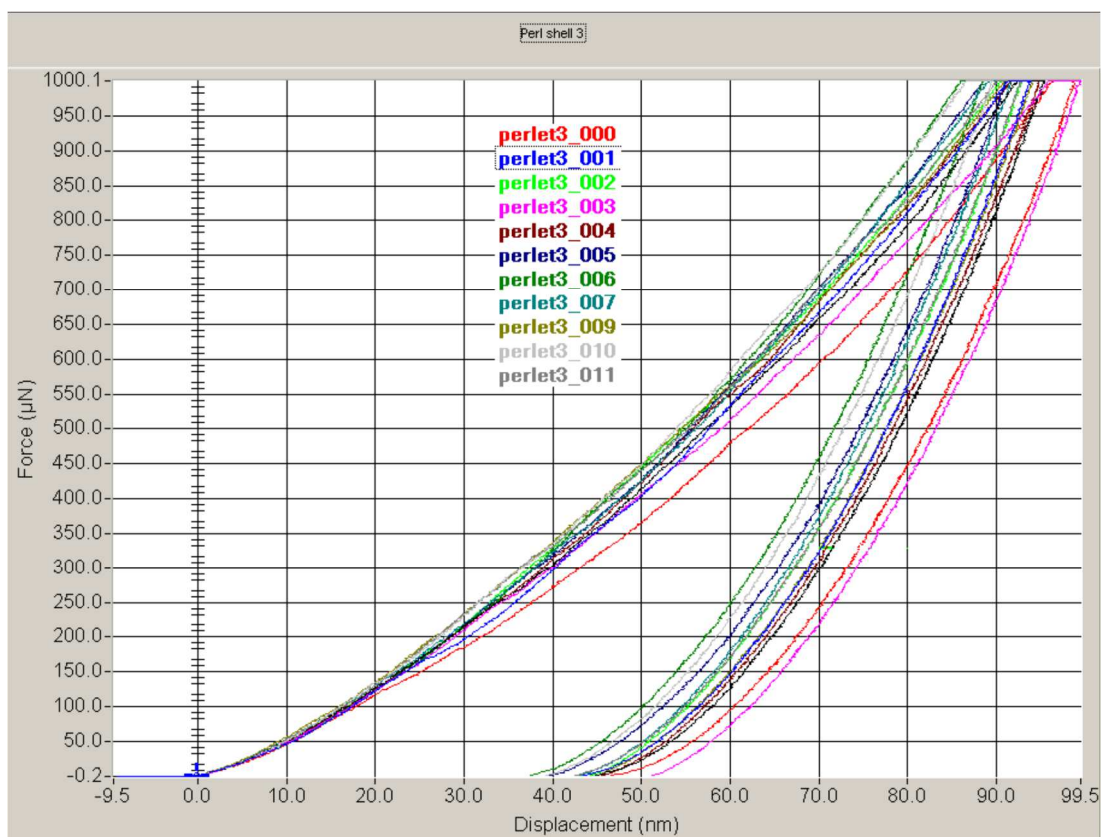
Po ukončení nanoindentace byla testovaná plocha opět naskenována pro kontrolu pozice indentů (foto 3.18).





**Foto 3.18** - Snímek topografie povrchu perleťi získané pomocí in-situ SPM po provedení nanoindentace.

Grafickým zobrazením nanoindentace je indentační křivka, znázorňující zatěžovací sílu v závislosti na hloubce vpichu (obrázek 3.5). Při měření se na některých křivkách vyskytl tzv. pop-in efekt, který může být způsoben křehkostí materiálu, tloušťkou testovaných vrstev perleťi, případně jejich překrýváním. Tato měření musí být vyloučena z dalších výpočtů.

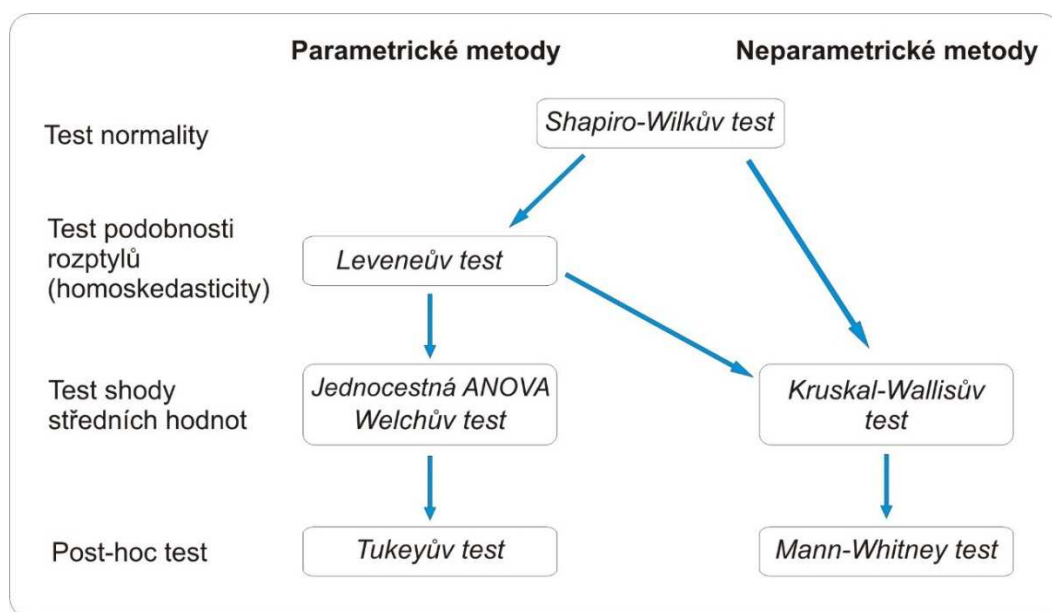


**Obrázek 3.5** - Graf křivek zatěžovací síly v závislosti na hloubce vpichu. Jednotlivá čísla na snímku skenu odpovídají jednotlivým indentům.

Jak již bylo uvedeno, perleť je nanokompozit tvořený převážně aragonitem. Publikovaná data o mikrotvrdomosti a elastickém modulu pružnosti anorganického aragonitu jsou rozporná. Z tohoto důvodu byly provedeny nanoindentační zkoušky i na monokrystalu aragonitu z lokality Bořetice, který byl naleštěn kolmo ke krystalografické ose *c*.

### 3.3 Statistická analýza dat

Hodnoty sledovaných mikromechanických vlastností, mikrotvrdomost a elastický modul, a jejich závislost, byly vyhodnoceny standardními statistickými metodami. Dříve než bylo provedeno statistické šetření, byly z měřených dat vyloučeny hodnoty ovlivněné „pop-in“ efektem či hodnoty měřené v místě s nevhodným povrchem (např. obrázek 4.20). Postup při zpracování dat a použité metody je možné popsat následujícím schématem:



#### **Shapiro-Wilkův test**

Shapiro-Wilkův test byl použit pro ověření normality měřených hodnot jako jedné z podmínek následného použití některé z parametrických statistických metod.

#### **Leveneův test**

Leveneův test byl použit na test homogenity rozptylů, což je jeden důležitých předpokladů ANOVY.

#### **Jednocestná ANOVA**

Jednou z vhodných parametrických statistických metod při studiu problémů, kdy existuje závislá proměnná spojitého typu a nezávislé proměnné jsou kategoriální (faktory), je analýza variance (Analysis of variance = ANOVA). V této práci byla ANOVA použita pro jeden kategoriální faktor (např. rotaci), je to tedy tzv. jednocestná ANOVA. Pro použití ANOVY musí být splněny následující předpoklady – nezávislost měření, normalita a podobnost rozptylů (homoskedasticita). Pro testování normality byl použit *Shapiro-Wilkův test* a pro testování homoskedasticity *Leveneův test*. *Shapiro-Wilkův test* je velmi silný a robustnost ANOVY k narušení normality stoupá s počtem pozorování ve skupině.

**Welchův test**

Welchův test byl použit jako alternativa ANOVy pro případ nestejného počtu měření v porovnávaných souborech.

**Tukeyův test**

Tukeyův post hoc test byl použit pro určení měření, mezi kterými je statisticky významný rozdíl ve středních hodnotách v případě, že ANOVA (či Welchův test) odmítly shodu jejich středních hodnot.

**Kruskal-Wallisův test**

Kruskal-Wallisův test, jako neparametrická metoda, byl použit v případě, že nebyly splněny předpoklady pro použití parametrických metod.

**Mann-Whitneyův test**

Mann-Whitneyův test byl použit jako post hoc test pro určení měření, mezi kterými je statisticky významný rozdíl ve středních hodnotách v případě, že Kruskal-Wallisův test odmítl shodu jejich středních hodnot.

**Analýza korelace**

Ke kvantifikaci míry korelace byl použit parametrický *Pearsonův korelační koeficient* v případě splnění nutných předpokladů, v opačném případě neparametrický *Spearmanův korelační koeficient*.

**Použitý software**

Pro grafickou prezentaci dat byl využit Adobe Photoshop (rastrová grafika) a CorelDraw (vektorová grafika). Veškerá měření byla formátována v Excelu a statisticky zpracována použitím funkcí v programech Excel a Past a open source softwaru R za použití rozhraní RStudio (viz [www.rstudio.com](http://www.rstudio.com)).

## 4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ

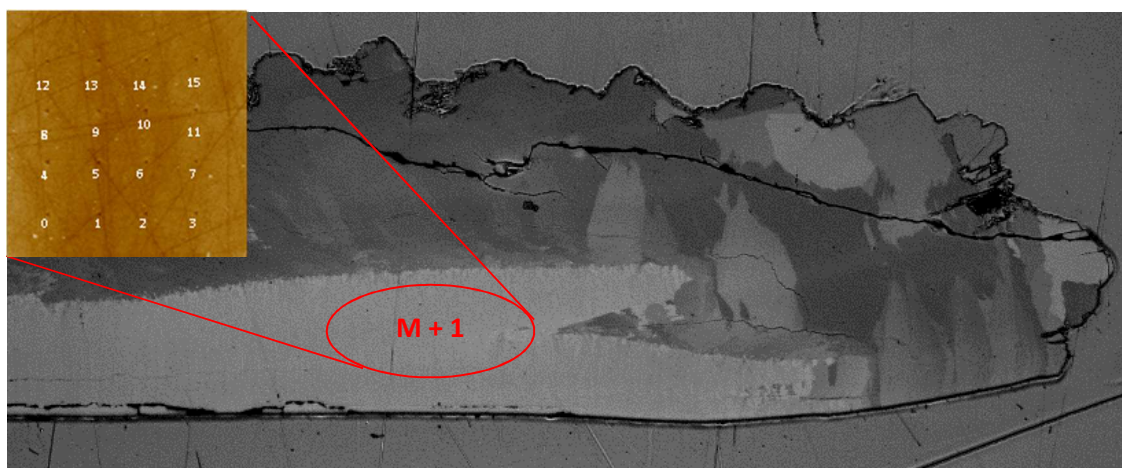
Výsledky uvedené formou grafického záznamu a změřených hodnot sledovaného parametru elastického modulu (E) a mikrotvrdosti (H), které byly vypočteny z dat získaných měření, jsou v kapitole 4 uvedeny bez vyloučení odlehlých hodnot.

### 4.1 Studium vlivu prostředí na mikromechanické vlastnosti – výsledky měření

#### 4.1.1 *Limalepeta lima* Dall, 1918

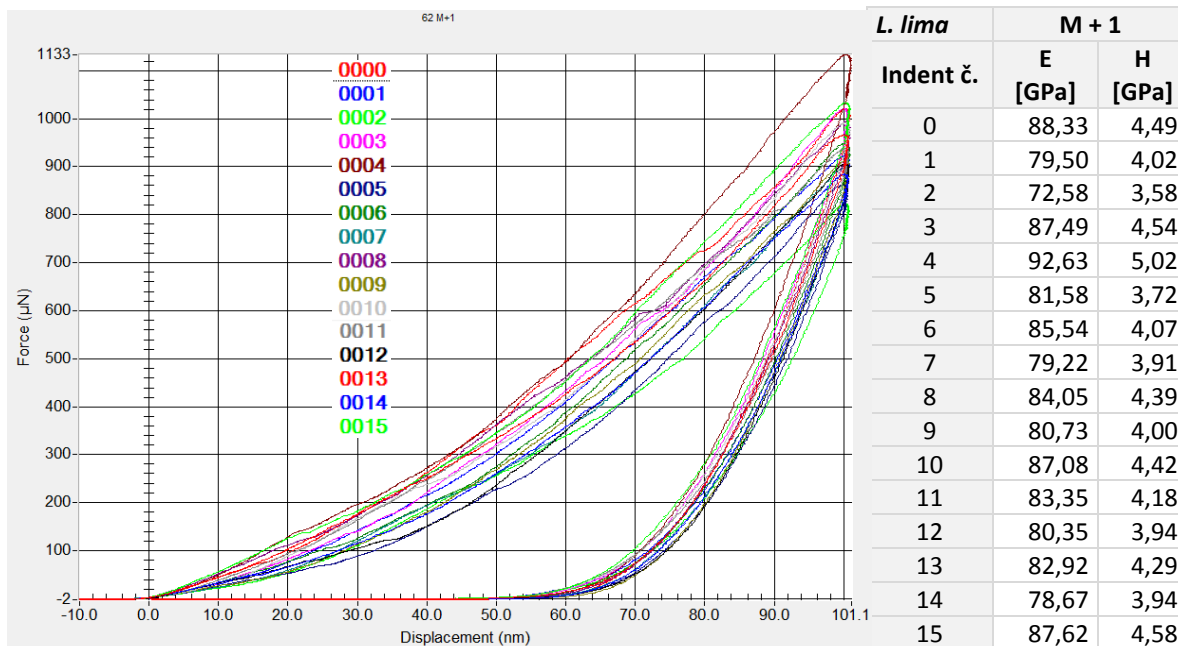
##### 4.1.1.1 Nanoindentační zkouška vnitřní vrstvy M + 1 druhu *Limalepeta lima*

Vnitřní struktura testované schránky druhu *Limalepeta lima* je tvořena čtyřmi mikrostrukturními vrstvami (tj. postavení vzhledem k myostraku: M – 1, M + 1, M + 2 a M + 3). Na tomto vzorku byly testovány dvě vybrané vrstvy: M + 1 a M + 2. Vrstvu M + 1 tvoří aragonitové krystaly, které jsou uspořádané do mikrostrukturního typu označovaného jako cCL (concentric Crossed Lamellar structure). Mikrostrukturní typ vrstvy M + 2 je tvořen kalcitem, jehož krystaly utváří strukturu značenou jako SF (Semifoliated structure). Obě studované vrstvy byly lokalizovány ve vzájemné blízkosti v periferní části schránky.



**Foto 4.1** - Výřez schránky testované plochy vnitřní vrstvy M + 1 druhu *Limalepeta lima* (vzorek č. 62) s detailním zobrazením testované plochy po ukončení DSI.

Testovaná vrstva M + 1 (foto 4.1) je tvořena krystalky aragonitu, jejichž uspořádání odpovídá strukturnímu typu cCL (concentric Crossed Lamellar structure). Na snímku vlevo nahoře je zobrazen detailní pohled na testovanou plochu po ukončení nanoindentace (DSI), kde jsou zřetelné jednotlivé indenty (vpichy), odpovídající jednotlivým křivkám na obrázku 4.1.

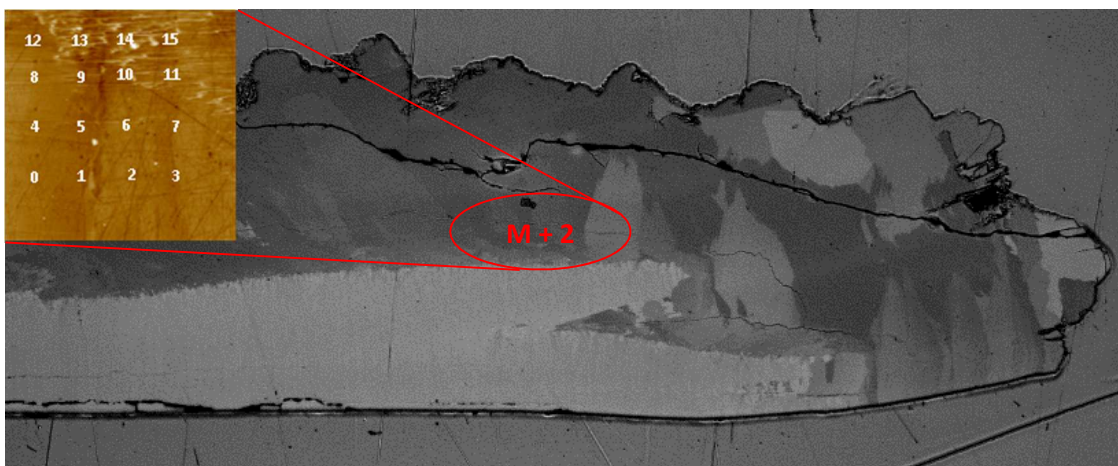


**Obrázek 4.1** - Graf indentačních křivek aragonitové vrstvy M + 1 druhu *Limalepta lima* (vzorek č. 62).

Na grafickém znázornění měření lze sledovat, že stanovené maximální hloubky ( $h_{\max} < 100$  nm) bylo pro jednotlivé indenty dosaženo v rozpětí hodnot aplikované síly od minimální 840  $\mu\text{N}$  (křivka č. 2) po maximální 1 133  $\mu\text{N}$  (křivka č. 4). Na křivkách 0, 2, 5, 12 a 14 byl pozorován tzv. pop-in jev či špatný počáteční kontakt. Tato měření je nutné vyřadit z analýzy z důvodu zkreslení statistických výsledků.

U veličiny redukovaného modulu (E) bylo vypočteno rozpětí hodnot mezi 78 až 92 GPa, přičemž maximální dosaženou hodnotou je  $E = 92,63$  GPa (indent č. 4). Nejnižší hodnotou tohoto parametru je  $E = 72,58$  GPa (indent č. 2). Okrajové hodnoty mikrotvrdomosti (H) jsou 3,58 GPa (indent č. 2 s minimální hodnotou E) a 5,02 GPa (indent č. 4 s maximální hodnotou E).

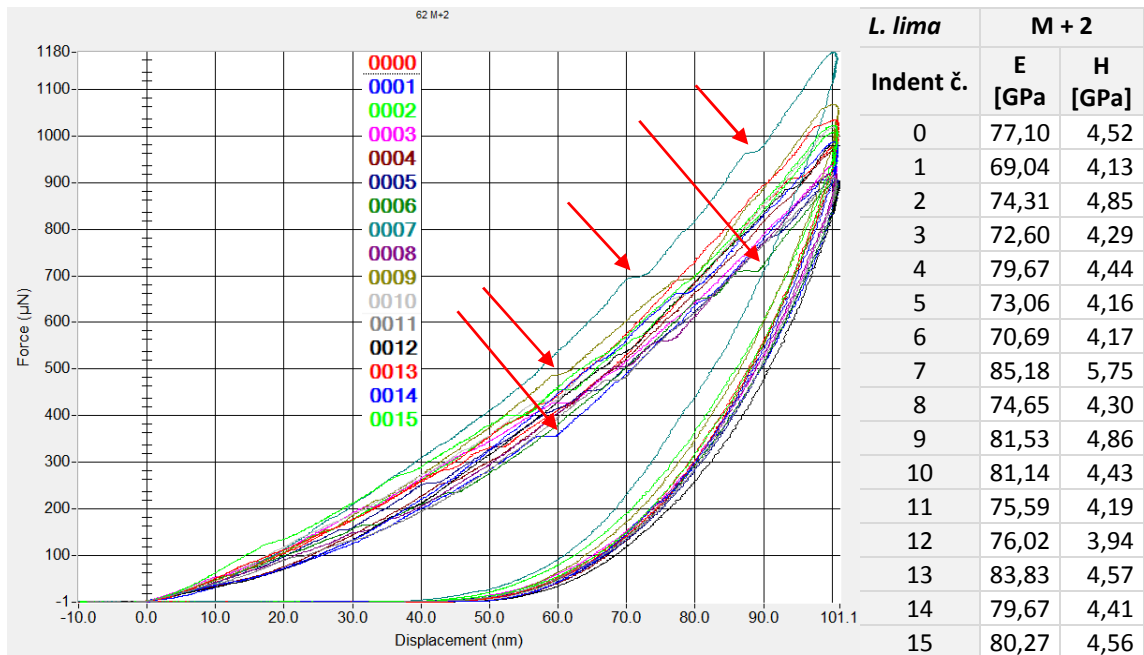
#### 4.1.1.2 Nanoindentační zkouška vnitřní vrstvy M + 2 druhu *Limalepta lima*



**Foto 4.2** - Výřez schránky testované plochy vnitřní vrstvy M + 2 druhu *Limalepta lima* (vzorek č. 62) s detailním zobrazením testované plochy po ukončení DSI.

Vrstvu M + 2 tvoří krystaly kalcitu, které svou charakteristickou strukturou a uspořádáním tvoří strukturální typ SF (Semifoliated structure). Testovaná plocha perleti je lokalizována v okrajové části

schránky v místě označení M + 2 na foto 4.2. Na snímku vlevo nahoře je zobrazen detailní pohled na testovanou plochu po ukončení nanoindentace, kde jsou méně zřetelné indety (vpichy), odpovídající jednotlivým křivkám na obrázku 4.2



**Obrázek 4.2** - Graf indentačních křivek kalcitu vrstvy M + 2 druhu *Limalepeta lima* (vzorek č. 62). Šipky označují výskyt pop-in efektu.

Při optickém zhodnocení jednotlivých křivek je patrné, že prakticky na všech křivkách je pozorován pop-in efekt (na obrázku 4.2 označeno šipkami), který se nejvýrazněji projevil na indentu 1, 3 a 6. Tato měření je nutné vyřadit z analýzy z důvodu zkreslení statistických výsledků. Indent č. 7 byl umístěn do rýhy, což vysvětluje vyšší hodnoty měřených parametrů. Z grafu je zřejmé, že stanovené maximální hloubky ( $h_{max} < 100$  nm) bylo pro jednotlivé indenty dosaženo v rozpětí hodnot aplikované síly od minimální 900  $\mu$ N po maximální 1 060  $\mu$ N (křivka č. 9). Hranici minimální hodnoty aplikované síly se přiblížilo více indentů. Po celkovém zhodnocení výsledků mechanických vlastností ponechaných křivek se zdají být vzhledem k hojnému výskytu pop-in jevu částečně podhodnocené.

Rozpětí hodnot naměřených mikromechanických vlastností pro druh *Limalepeta lima* reflektuje grafický záznam indentačních křivek. U veličiny elastického modulu je minimální hodnota 69,04 GPa (indent č. 1) a maximální dosažená hodnota 85,18 (indent č. 7). V případě veličiny mikrotvrlosti byly vypočteny hodnoty od 3,94 (indent č. 12) do 5,75 GPa (indent č. 7).

#### 4.1.2 *Nipponacmea concinna* Lischke, 1870

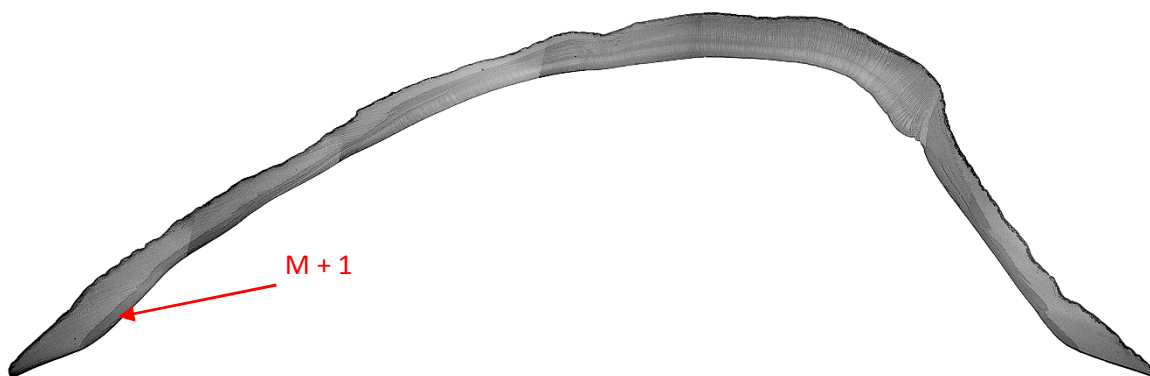


Foto 4.3 - Ventrální řez schránkou druhu *Nipponacmea concinna* (vzorek č. 55).

Na předozadním řezu schránkou druhu *N. concinna* (foto 4.3.) je označena lokalizace testované plochy perleti. Vnitřní struktura testované schránky tvoří čtyři mikrostrukturní vrstvy (tj. postavení vzhledem k myostraku:  $M - 1$ ,  $M + 1$ ,  $M + 2$  a  $M + 3$ ). Na tomto vzorku byla testována pouze jedna vrstva, tj.  $M + 1$  tvořená krystaly aragonitu, které odpovídají mikrostrukturnímu typu cCL (concentric Crossed Lamellar structure).

##### 4.1.2.1 Nanoindentační zkouška vnitřní vrstvy $M + 1$ druhu *Nipponacmea concinna*

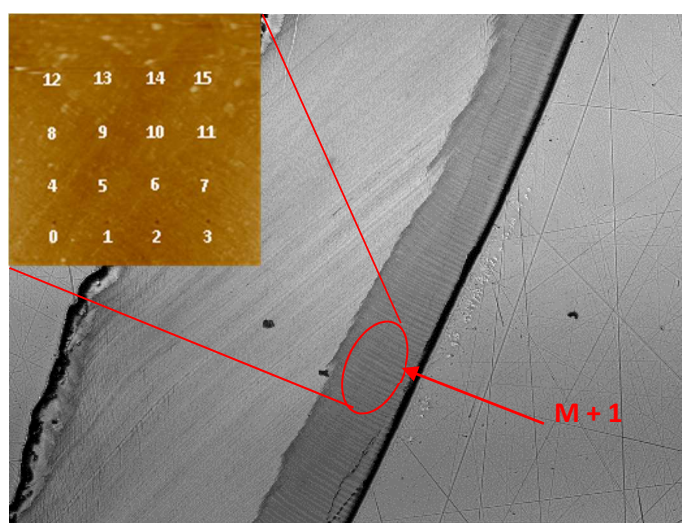
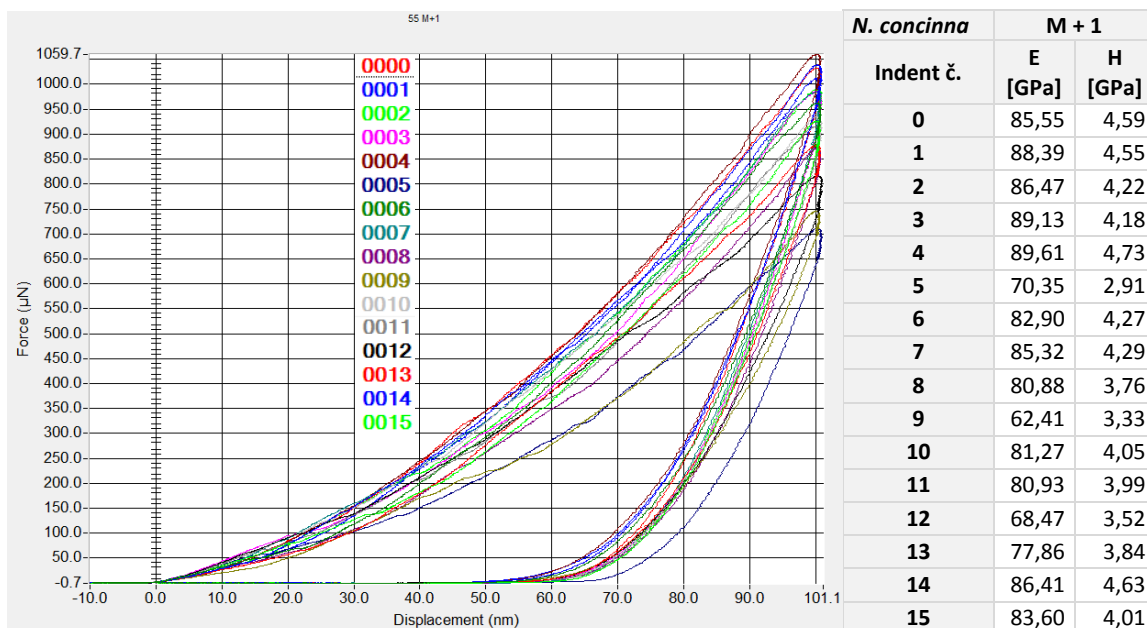


Foto 4.4 - Výřez schránky testované plochy vnitřní vrstvy  $M + 1$  druhu *Nipponacmea concinna* (vzorek č. 55) s detailním zobrazením testované plochy po ukončení DSI.

Vybraná část vrstvy  $M + 1$  se nachází v přední okrajové části vnitřní stěny schránky (foto 4.4). Tato vrstva tvořená krystaly aragonitu utváří charakteristickou strukturu označovanou cCL (concentric Crossed Lamellar structure). Na snímku vlevo nahoře je zobrazen detailní pohled na testovanou plochu po ukončení nanoindentace, kde jsou velmi dobře pozorovatelné indenty č. 0 – 3 (ostatní indenty jsou méně zřetelné), odpovídající jednotlivým křivkám na obrázku 4.3.



**Obrázek 4.3** - Graf indentačních křivek aragonitové vrstvy M + 1 druhu *Nipponacmea concinna* (vzorek č. 55).

Z grafu je zřejmé, že stanovené maximální hloubky ( $h_{max} < 100$  nm) bylo pro jednotlivé indenty dosaženo v rozpětí hodnot aplikované síly od minimální 720  $\mu$ N (křivka č. 5) po maximální 1 059,7  $\mu$ N (křivka č. 4). Na křivkách 5, 8, 9, 11, 12 a 13 byl pozorován tzv. pop-in jev či špatný počáteční kontakt, což je pozorovatelné jak na grafu indentačních křivek, tak v tabulce vypočtených hodnot mikromechanických vlastností (obrázek 4.3). Tato měření je nutné vyřadit z analýzy z důvodu zkreslení statistických výsledků.

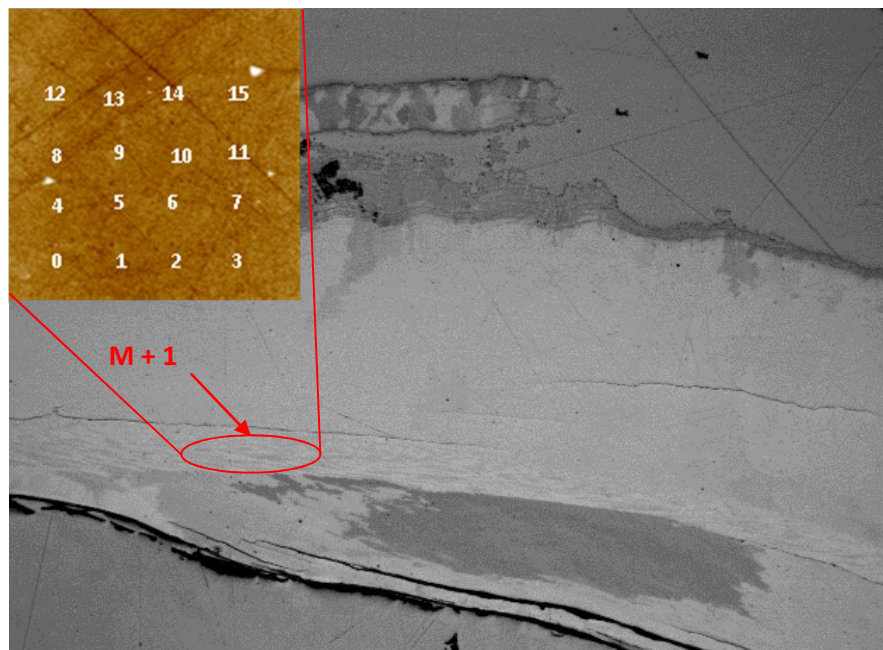
Pro veličinu elastického modulu se vypočtené hodnoty pohybují v rozpětí mezi 62 a 89 GPa, přičemž nejnižší hodnota tohoto parametru je 62,41 GPa (indent č. 9, kde byl pozorován pop-in efekt) a nejvyšší hodnota byla vypočtena pro indent č. 4 ( $E = 89,61$  GPa). Vypočtené hodnoty mikrotvrdomosti (H) se zdají být vyrovnané. Pohybují se v blízkosti střední hodnoty 4 GPa s výjimkou nejnižší dosažené hodnoty 2,91 GPa (indent č. 5), což odpovídá skutečnosti o pozorovaném pop-in efektu.

#### 4.1.3 *Pectinodonta orientalis* Schepman, 1908

U vzorku druhu *P. orientalis* tvoří vnitřní strukturu schránky, stejně jako u přechozích druhů, čtyři mikrostrukturální vrstvy (tj. postavení vzhledem k myostraku: M – 1, M + 1, M + 2 a M + 3). Na tomto vzorku byly pro testování vybrány dvě vrstvy M + 1 a M + 2, které svým vnitřním uspořádáním odpovídají mikrostrukturálnímu typu již uvedených zástupců skupiny Patellogastropoda. Vrstva M + 1 je utvářena aragonitem, jehož charakteristické uspořádání krystalů odpovídá struktuře cCL (concentric Crossed Lamellar structure). Mikrostrukturální typ vrstvy M + 2 je tvořen kalcitem uspořádaným do struktury ozačované jako SF (Semifoliated structure). Vrstva M + 1 byla testována v blízkosti vrcholové části schránky. Vrstva M + 2 byla lokalizována v okrajové části schránky ve vzájemné blízkosti vrstvy M + 1.

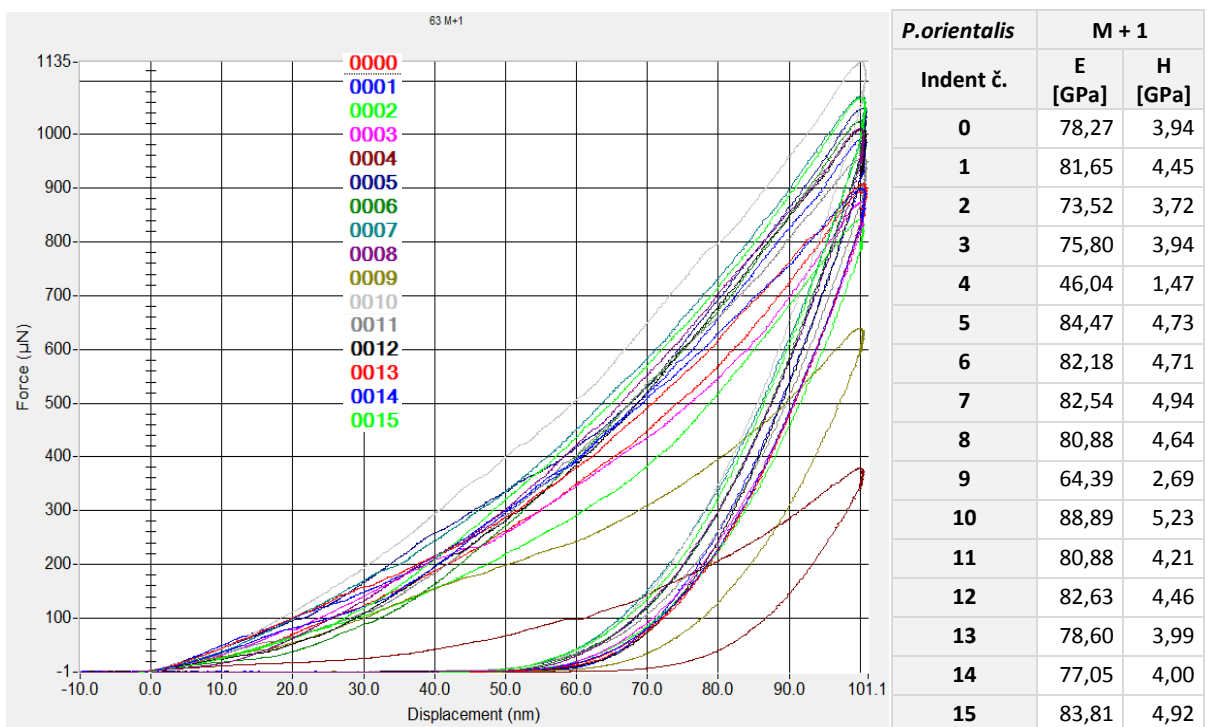


#### 4.1.3.1 Nanoindentační zkouška vnitřní vrstvy M + 1 druhu *Pectinodonta orientalis*



**Foto 4.5** - Výřez schránky testované plochy vnitřní vrstvy M + 1 druhu *Pectinodonta orientalis* (vzorek č. 63) s detailním zobrazením testované plochy po ukončení DSI.

Vrstva M + 1, která je tvořena krystaly aragonitu, byla lokalizována v přední části schránky. Svým charakteristickým uspořádáním krystalů odpovídá mikrostrukturnímu typu cCL (concentric Crossed Lamellar structure). Na snímku vlevo nahoře je zobrazen detailní pohled na testovanou plochu po ukončení nanoindentace, kde jsou méně pozorovatelné indety, odpovídající jednotlivým křivkám na obrázku 4.4.



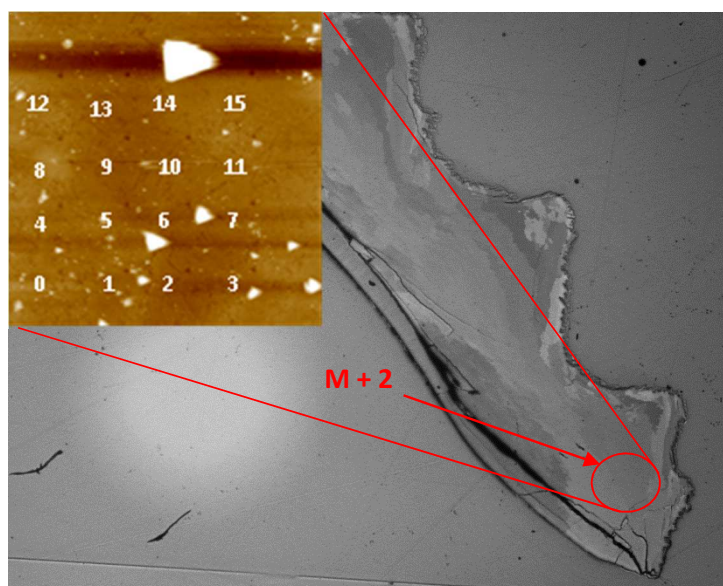
**Obrázek 4.4** - Graf indentačních křivek aragonitové vrstvy M + 1 druhu *Pectinodonta orientalis* (vzorek č. 63).

Při optickém zhodnocení indentačních křivek (Obrázek 4.4) je patrné široké rozpětí zaznamenaných a následně vypočtených hodnot mikromechanických vlastností. Graf křivek zaznamenal nejnižší hodnotu aplikované síly, tj. 380  $\mu\text{N}$  u křivky č. 4, což naznačuje zřejmou chybu v měření při tak výrazně nízké hodnotě. Obdobnou situaci lze vyčíst také u křivky č. 9. Maximální hodnota aplikované síly byla změřena u křivky č. 10, která dosáhla 1 135  $\mu\text{N}$ . Na křivkách 2, 4 a 9 došlo ke špatnému kontaktu mezi hrotem a povrchem vzorku. Na křivce č. 3 byl pozorován pop-in efekt. Tato měření je nutné vyřadit z analýzy z důvodu zkreslení statistických výsledků.

Vypočtené hodnoty mikromechanických vlastností jsou odrazem grafického záznamu měření, to znamená, že odlehlé křivky vykazují okrajové hodnoty sledovaných veličin. U veličiny elastického modulu náleží minimální hodnota indentu č. 4 ( $E = 46,04 \text{ GPa}$ ), což odpovídá našemu předpokladu. Maximální hodnotu zaznamenal indent č. 10 (tj.  $E = 88,89 \text{ GPa}$ ).

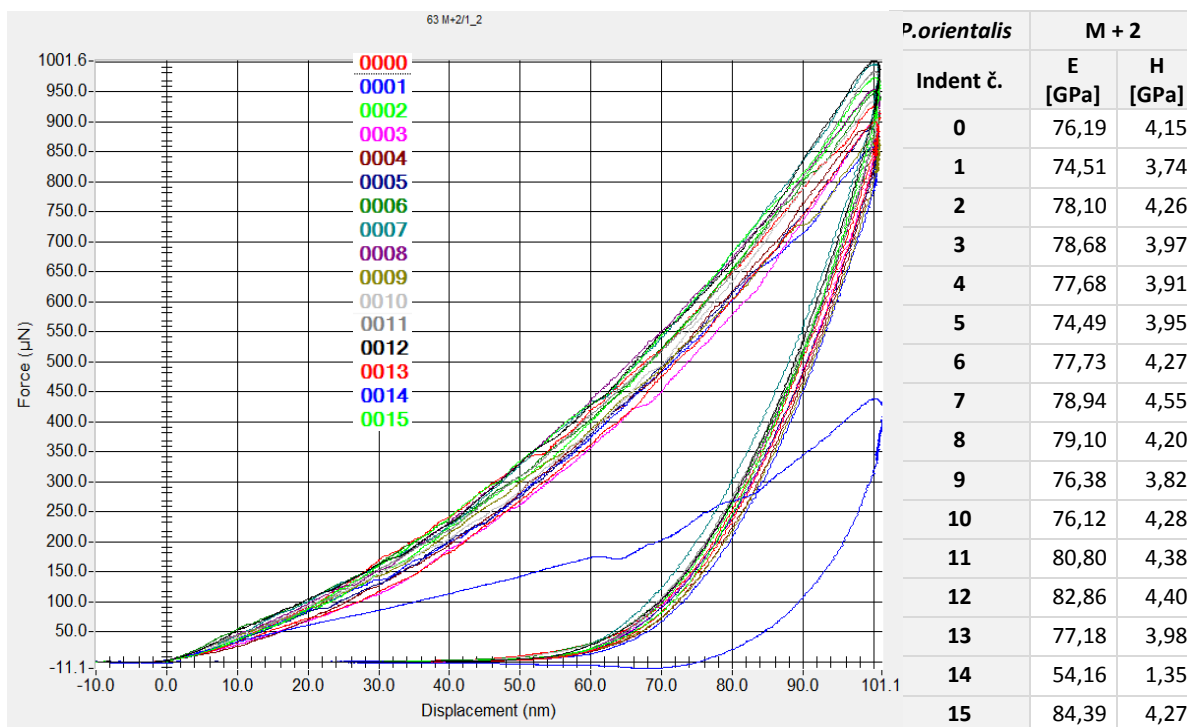
Veličina mikrotvrdomosti ( $H$ ) a její hodnoty reflektují výpočty pro elastický modul, jinými slovy okrajové hodnoty mikrotvrdomosti odpovídají stejným indentům jako v případě odlehlých hodnot u elastického modulu. Hodnota minima je 1,47 GPa (indent č. 4) a hodnota maxima je rovna 88,89 GPa (indent č. 10).

#### 4.1.3.2 Nanoindentační zkouška vnitřní vrstvy M + 2 druhu *Pectinodonta orientalis*



**Foto 4.6** – Výřez testované plochy vnitřní vrstvy M + 1 druhu *Pectinodonta orientalis* (vzorek č. 63) s detailním zobrazením testované plochy po ukončení DSI.

Testovaná plochy vnitřní vrstvy M + 2 u druhu *Pectinodonta orientalis* se nachází v okrajové části schránky (viz foto 4.6). Tuto vrstvu tvoří kalcit, který se v této schránce formuje do mikrostruktury označované SF (Semifoliated structure). Na snímku vlevo nahoře je zobrazen detailní pohled na testovanou plochu po ukončení nanoindentace (DSI), kde jsou dobře viditelné indenty, odpovídající jednotlivým křivkám na obrázku 4.5.



**Obrázek 4.5** - Graf indentačních křivek kalcitu vrstvy M + 2 druhu *Pectinodonta orientalis* (vzorek č. 63).

Z grafu je zřejmé, že stanovené maximální hloubky ( $h_{max} < 100$  nm) bylo pro jednotlivé indenty dosaženo v rozpětí hodnot aplikované síly od minimální 440 µN křivka č. 14, která se zcela vymyká ostatním měřením. Tato extrémní hodnota ukazuje na zřejmou chybu v měření. Maximální hodnotu veličiny síly (P) dosáhly křivky č. 7 a 12, které se dotýkají hodnoty 1 002 GPa.

Měření, na kterých byla pozorována chyba, se viditelně týkají zmíněné křivky č. 14, kde došlo ke špatnému kontaktu mezi hrotem a povrchem vzorku, což vysvětluje velmi nízké hodnoty u všech sledovaných veličin. Chyba byla rovněž zaznamenána na křivkách 0, 3 a 9, kde byl pozorován pop-in jev. Tato měření je nutné vyřadit z analýzy z důvodu zkreslení statistických výsledků.

V parametru elastického modulu (E) je rozpětí hodnot mezi 54 až 84 GPa, přičemž nejvyšší dosaženou hodnotu zaznamenal indent č. 15 (E = 84,39 GPa). Nejnižší hodnotou tohoto parametru je E = 54,16 GPa dosažená indentem č. 14, u kterého však došlo ke špatnému kontaktu v počátku měření a z tohoto důvodu musí být tato měření vyřazena z analýzy. Vypočtené hodnoty veličiny mikrotvrdosti dosahují limitní hranice 1,35 GPa u indentu č. 14 a 4,55 GPa u indentu č. 7.

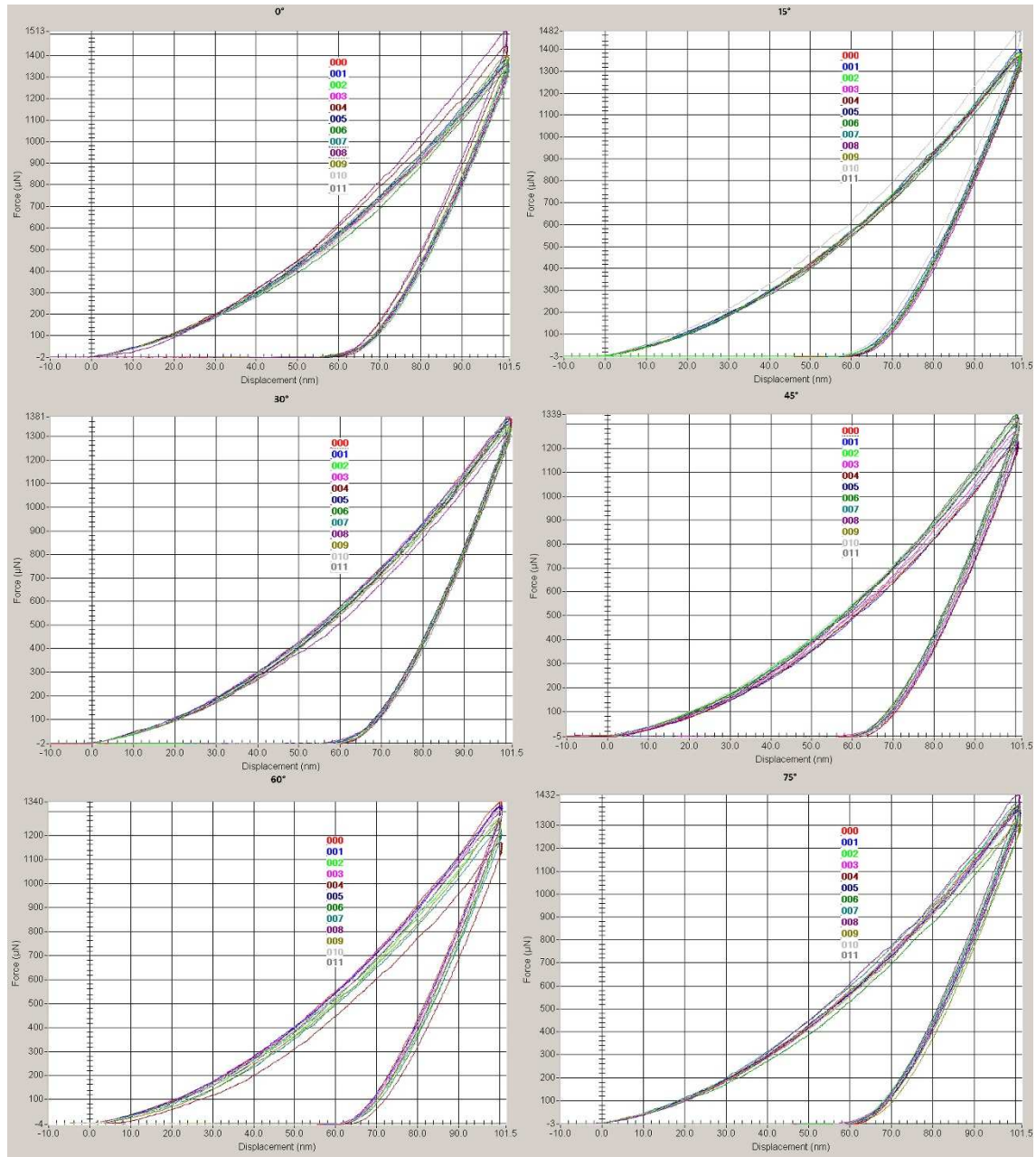
## 4.2 Mikromechanické vlastnosti perleti a aragonitu a vlivu anizotropie na měření – výsledky měření

### 4.2.1 Anorganický aragonit

#### 4.2.1.1 Skenovací elektronová mikroskopie

Pro analýzu byl použit leštěný řez monokrystalem aragonitu a z tohoto důvodu nebylo potřeba provádět pozorování elektronovým mikroskopem.

#### 4.2.1.2 Nanoidentační zkouška



**Obrázek 4.6** - Graf indentačních křivek anorganického aragonitu při rotaci vzorku 0°, 15°, 30°, 45°, 60° a 75°.

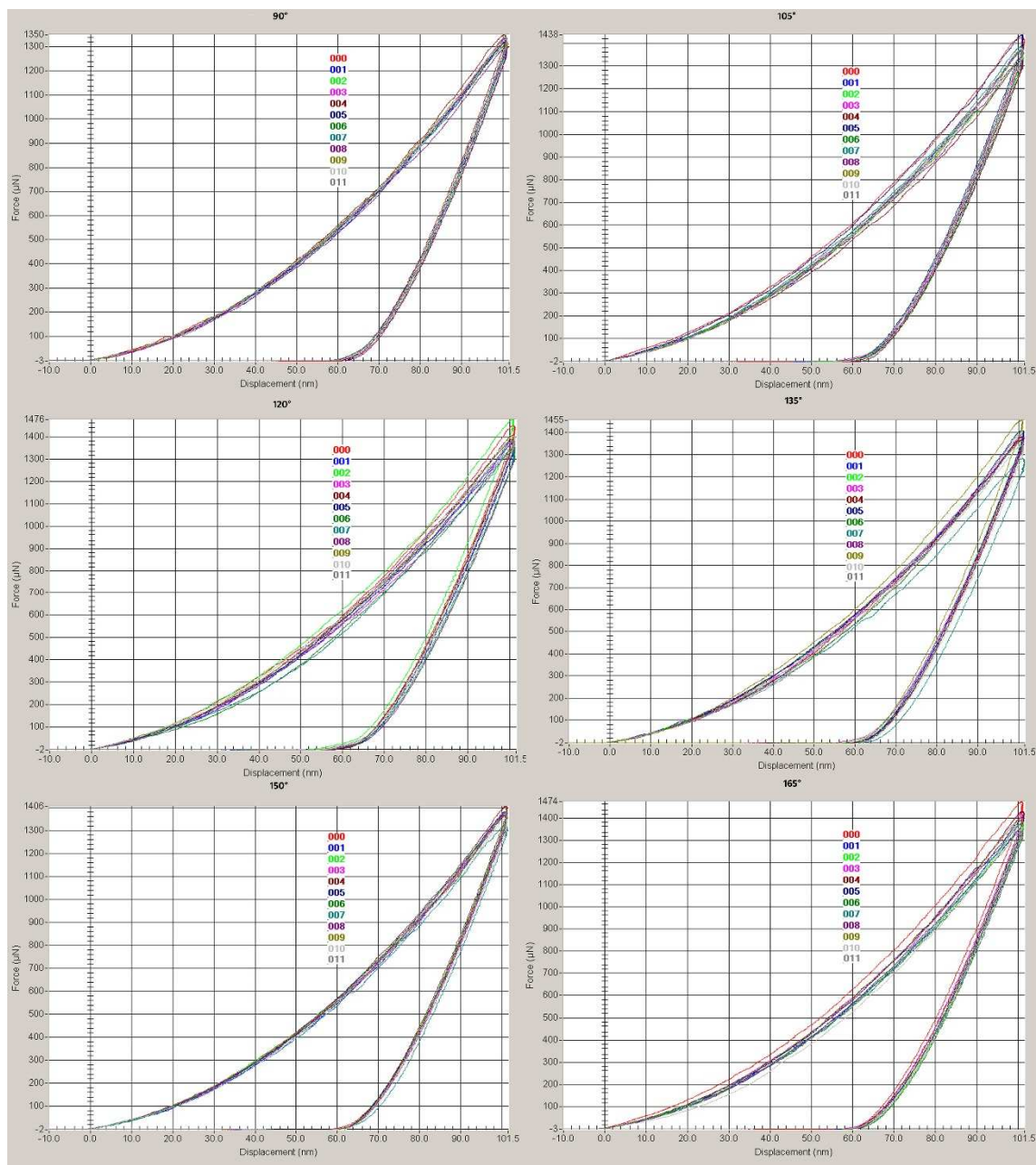
Měření zatěžovací síly v závislosti na hloubce vpichu jsou na obrázku 4.6 zobrazena pro 6 rotací vzorku (tj. 0°, 15°, 30°, 45°, 60° a 75°). Křivky uvedených měření jsou jen s malými rozdíly téměř identické a utváří kompaktní graf. Výjimkou jsou pouze křivky, na kterých byla zaznamenána chyba

měření v podobě tzv. pop-in efektu nebo špatného počátečního kontaktu. Pro vzorek s rotací 0° jsou to křivky č. 0, 1, 2 a 10, kde byl pozorován pop-in efekt a křivka č. 8 se špatným počátečním kontaktem. U vzorku s rotací 15° byl pozorován pop-in efekt na křivkách č. 7, 9, 10 a 11. Při měření s rotací vzorku 30° byly vyhodnoceny s chybným měřením křivky č. 1, 2, 3, 6 a 8, kde došlo k pop-in efektu, ke kterému došlo také u vzorku s rotací 45° na křivkách č. 0, 1, 3, 4, 5, 8, 10 a 11. U měření při rotaci 60° byla zaznamenána chyba měření u křivek č. 4, 6, 7, 9 a 11 a při rotaci 75° se chybné měření týká křivek č. 4 – 6 a 8 - 10. Výskyt výše uvedených chybných měření je pozorovatelný na vypočtených hodnotách mikromechanických veličin, které zde dosahují krajních hodnot (viz tabulka 4.1). U všech měření byla patrná křehkost a praskání testovaného materiálu, která však nedosahovala vysoké míry. Graf indentačních křivek anorganického aragonitu, vykazuje celistvost především ve fázi odlehčení indentoru, což je nejvíce zřetelné u rotace vzorku 15° a 30° (obrázek 4.6). Významným rozdílem výše uvedených měření je dosažená maximální hodnota síly ( $P_{\max} = 1\,513\ \mu\text{N}$ ) aplikované pro dosažení stanovené hloubky ( $h_{\max} < 100\ \text{nm}$ ), které dosáhla křivka č. 8 při rotaci vzorku 0°. Ostatní hodnoty aplikované síly se pohybují pod hranicí dosaženého maxima v řádech nižších o desítky až stovky jednotek (např. rotace vzorku 45°).

**Tabulka 4.1** - Hodnoty měření elastického modulu (E) a mikrotvrdosti (H) anorganického aragonitu při rotaci vzorku 0°, 15°, 30°, 45°, 60° a 75°.

Rotace [°]	0°		15°		30°		45°		60°		75°	
Indent č.	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]
0	97,85	6,79	96,05	6,97	98,92	6,77	92,34	6,01	98,45	6,75	99,04	6,79
1	99,20	6,90	100,70	7,00	96,42	6,83	95,57	6,03	98,50	6,61	100,92	6,83
2	98,91	6,93	98,66	6,93	96,98	6,67	96,83	6,64	96,97	6,31	99,98	7,04
3	98,44	6,78	98,72	6,67	100,08	6,86	96,85	6,18	98,17	6,58	98,78	6,73
4	101,84	7,31	97,95	6,86	97,28	6,77	92,69	5,98	89,91	5,66	100,74	6,81
5	96,74	6,69	97,44	6,83	97,87	6,87	97,54	6,50	97,65	6,64	98,91	6,71
6	96,63	6,57	94,76	6,76	100,21	6,87	98,46	6,69	96,66	6,15	95,64	6,53
7	96,60	6,75	97,81	6,98	99,93	6,67	95,37	6,47	91,93	6,08	99,81	7,00
8	105,17	7,58	99,32	6,61	95,17	6,60	99,18	6,60	95,89	6,41	101,39	7,25
9	100,63	7,03	97,26	6,79	99,61	6,66	97,51	6,39	94,81	6,23	99,14	6,39
10	97,15	6,52	103,71	7,53	99,81	6,78	96,48	6,48	98,02	6,58	98,22	6,78
11	97,47	6,69	97,67	6,73	97,94	6,48	95,37	6,24	96,13	6,31	100,01	7,00

Hodnoty jednotlivých měření sledovaných veličin jsou v tabulce 4.1 uvedeny bez vyloučení odlehlých hodnot. Jsou to hodnoty, ovlivněné výskytem chyby při měření, které dosahují hranice mezních hodnot. U veličiny elastického modulu (E) se hodnota uvedených měření pohybuje v rozpětí od 89,91 GPa (rotace 60°, indent č. 4) do 105,17 GPa (rotace 0°, indent č. 8). Veličina mikrotvrdosti (H) zaznamenala hodnoty v mezích od 5,66 GPa (rotace 60°, indnet č. 4) do 7,58 GPa (rotace 0°, indent č. 8). U zmíněných hodnot byl pozorován pop-in efekt, což může být vysvětlením okrajových hodnoty.



**Obrázek 4.7** - Graf indentačních křivek anorganického aragonitu při rotaci vzorku 90°, 105°, 120°, 135°, 150° a 165°.

Grafická znázornění indentačních křivek vzorku anorganického aragonitu pro rotace vzorku 90°, 105°, 120°, 135°, 150° a 165° jsou zachycena na obrázku 4.7. Dle tohoto záznamu je patrné, že křivky vykazují obdobné hodnoty, což může značit, že vlastnosti testovaného materiálu se významně neliší při rotaci vzorku. Výjimku mohou tvořit pouze křivky, kde byla pozorována chyba měření v podobě pop-in efektu, špatného počátečního kontaktu či nevhodný povrch. Avšak měření tohoto typu bylo dle charakteru indentačních křivek sledováno méně oproti měřením zobrazeným na obrázku 4.6. Chyby v měření jsou pozorovatelné na vzorku s rotací 135° a to u křivek č. 7 a 9. Tuto skutečnost podporují také hodnoty sledovaných veličin (viz tabulka 4.2), kde se tato měření projevila v podobě extrémních hodnot. Blízkou shodu v měření vykazují také hodnoty maximální síly ( $P_{max}$ ) aplikované pro dosažení maximální stanovené hloubky ( $h_{max} < 100$  nm). Tyto hodnoty se pohybují v blízkosti střední hodnoty 1 450 µN. Výjimkou ve výše uvedených měřeních je pouze vzorek s rotací 90°, kde je

pozorovatelný shluk indentačních křivek i ve fázi maximální aplikované síly, která se pohybuje v rozpětí 1 300 – 1 350  $\mu\text{N}$ .

**Tabulka 4.2** - Hodnoty měření elastického modulu (E) a mikrotvrdosti (H) anorganického aragonitu při rotaci vzorku 90°, 105°, 120°, 135°, 150° a 165°.

Rotace [°]	90°		105°		120°		135°		150°		165°	
Indent č.	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]
0	96,31	6,42	101,34	7,02	103,17	7,21	100,89	6,88	99,59	6,84	102,50	7,47
1	99,45	6,62	102,71	6,74	98,38	6,86	99,14	6,99	99,42	6,83	99,74	6,74
2	97,80	6,44	99,97	6,55	99,97	6,55	99,94	7,07	99,68	6,93	100,99	6,81
3	99,50	6,47	98,62	6,86	98,34	6,50	98,34	6,50	99,09	6,73	101,43	7,12
4	99,57	6,76	98,79	6,51	101,31	7,01	101,31	7,01	100,08	7,04	102,67	7,08
5	98,60	6,53	102,45	7,16	99,37	6,87	100,27	7,02	100,27	6,84	101,36	6,98
6	96,59	6,43	99,91	6,67	98,98	6,53	99,70	6,77	98,93	6,83	98,59	6,69
7	98,12	6,46	102,45	6,92	96,42	6,62	92,19	6,23	96,82	6,51	99,81	6,83
8	96,47	6,36	98,86	6,58	102,42	7,04	99,08	6,81	98,96	6,71	100,86	6,85
9	97,80	6,65	99,27	6,83	100,43	7,14	103,24	7,43	99,40	6,78	99,37	6,93
10	98,94	6,58	100,02	6,84	101,72	6,91	96,06	6,70	97,35	6,65	98,55	6,74
11	98,44	6,58	99,67	6,89	99,55	6,94	99,73	6,77	98,93	6,89	98,17	6,67

Tabulka 4.2 uvádí výpočet hodnot mikromechanických vlastností anorganického aragonitu pro rotace vzorku 90°, 105°, 120°, 135°, 150° a 165°. Vypočtené hodnoty daných veličin jsou zde uvedeny bez vyloučení odlehlých hodnot, tedy hodnot ovlivněných pop-in efektem či jinou chybou v měření. U veličiny elastického modulu (E) se hodnota uvedených měření pohybuje v rozpětí od 92,19 GPa (rotace vzorku 135°, indent č. 7) do 103,24 GPa (rotace vzorku 135°, indent č. 9). Veličina mikrotvrdosti (H) zaznamenala hodnoty v mezích od 6,23 GPa (rotace vzorku 135°, indent č. 7) do 7,47 GPa (rotace vzorku 165°, indent č. 0). Jak již bylo předesláno, odlehlé hodnoty obvykle reflektují chybu v měření, což v tomto případě platí zvláště pro rotaci vzorku 135°.

#### 4.2.2 *Nucula nucleus* Linnaeus, 1758

##### 4.2.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie

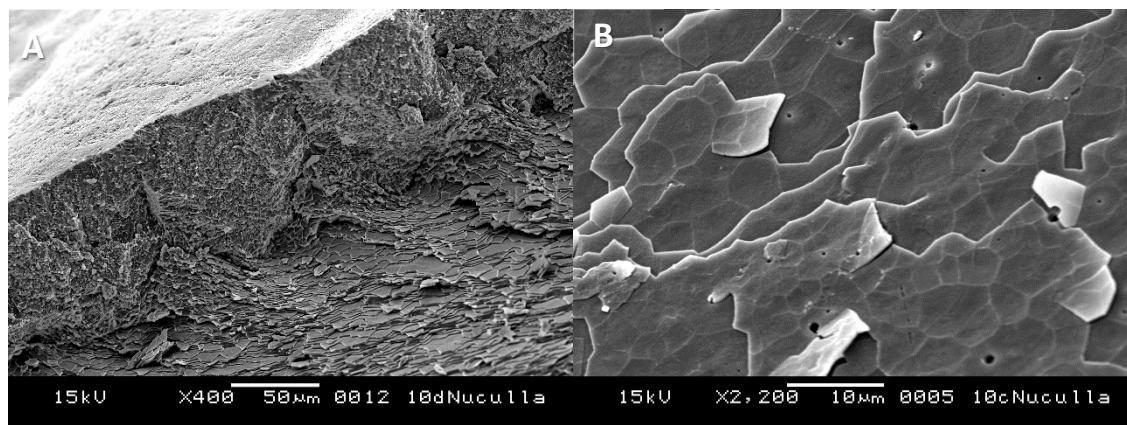
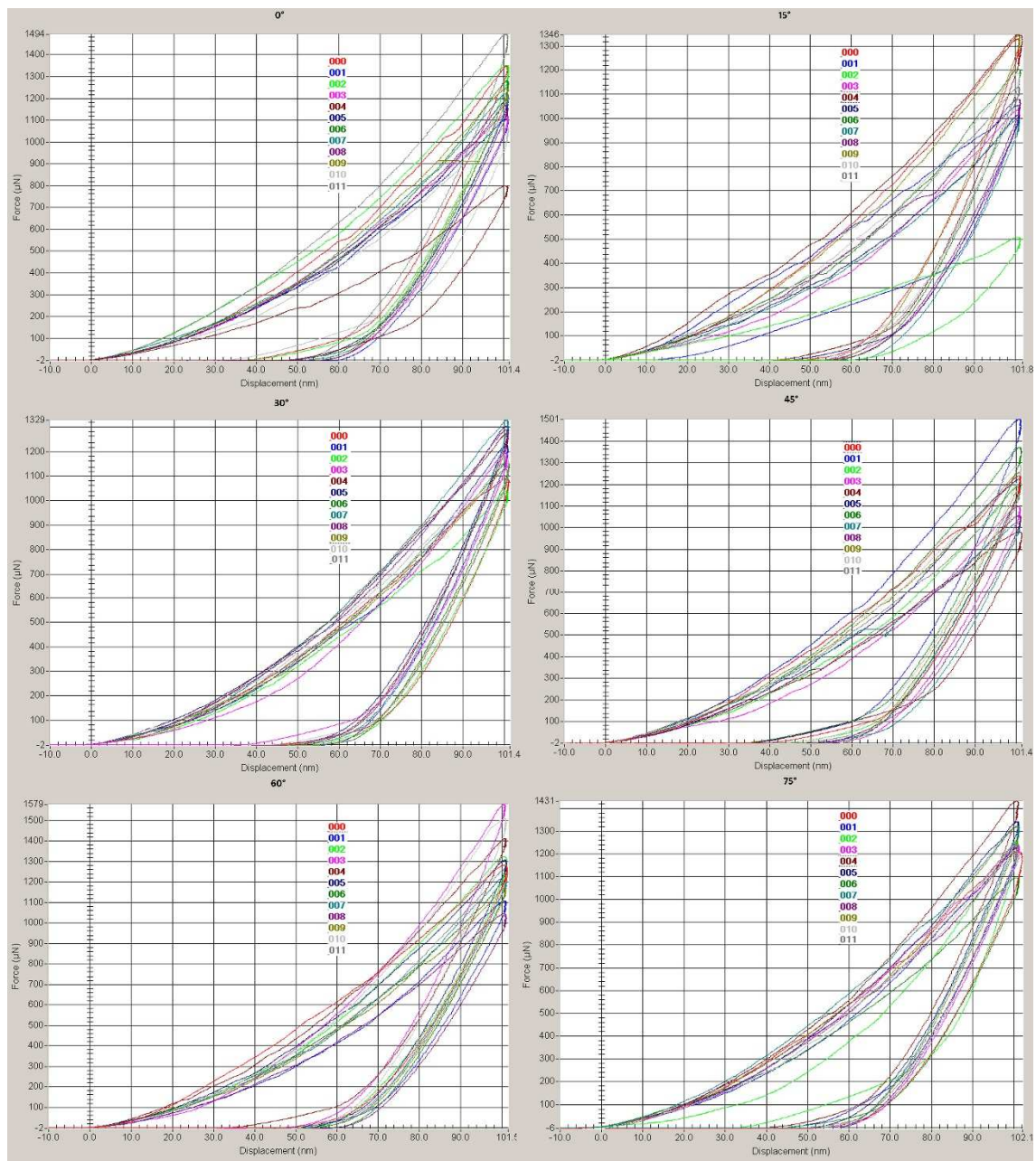


Foto 4.7 – *Nucula nucleus* (vzorek č. 110) – SEM.

Na fotografii 4.7 pořízené SEM je zobrazen pohled na destičky perleti v místě rozhraní s prizmatickou vrstvou na vnější straně schránky (snímek A). Snímek B dokumentuje nepravidelný tvar destiček perleti při pohledu shora.

#### 4.2.2.2 Nanoindentační zkouška

Výsledky uvedené formou grafického záznamu a hodnot sledovaných veličin parametru elastického modulu (E) a mikrotvrdomosti (H), které byly vypočteny z dat získaných měření, jsou v této kapitole uvedeny bez vyloučení odlehklých hodnot. Na testovaném materiálu byla patrná jeho křehkost a sklon k praskání, což může být ovlivněno rozdílnou tloušťkou testovaných buněk, ke kterým mohlo dojít při broušení nerovného materiálu.



**Obrázek 4.8** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Nucula nucleus* (vzorek č. 110) při rotaci vzorku 0°, 15°, 30°, 45°, 60° a 75°.



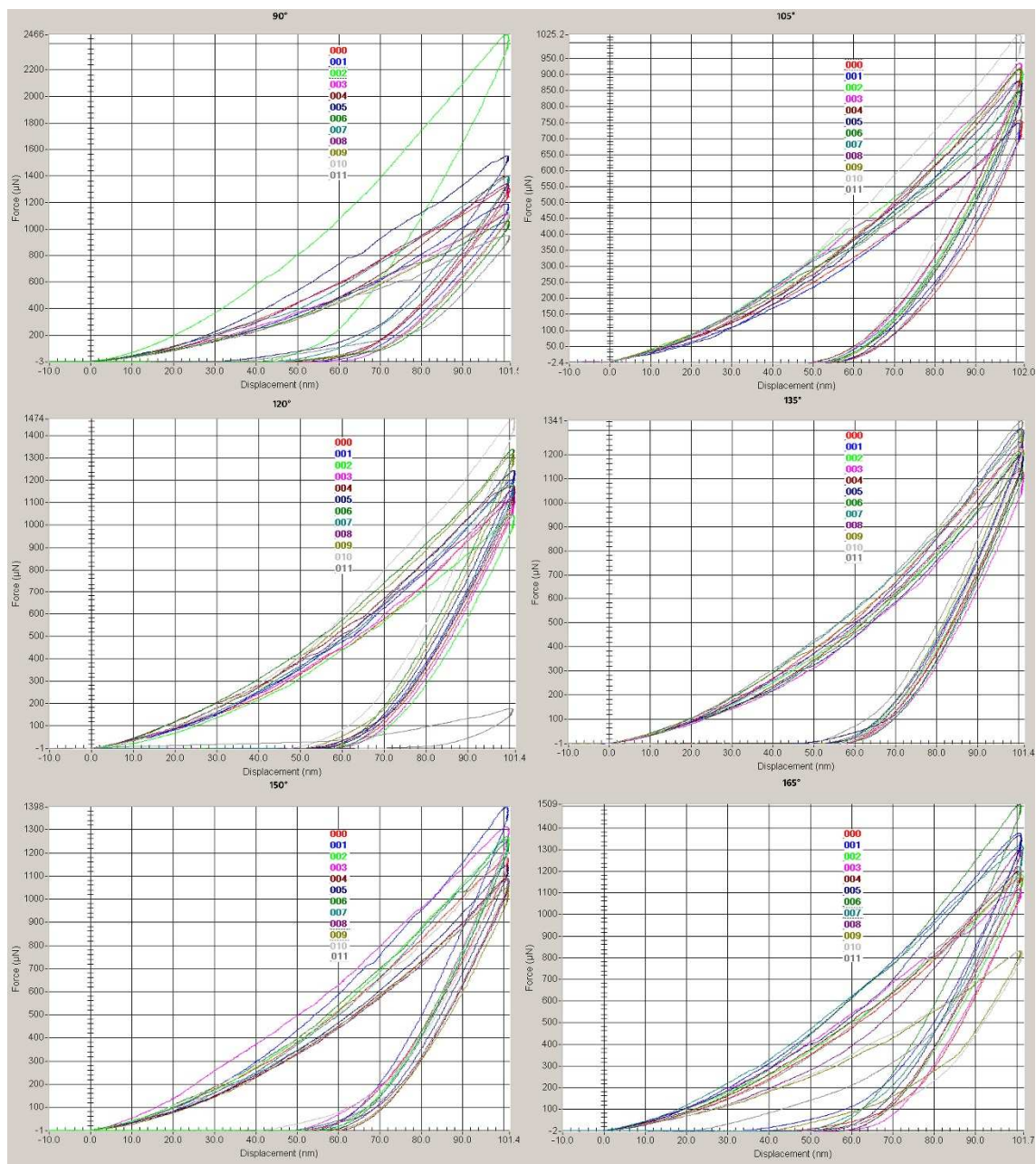
Měření mechanických vlastností perleti druhu *N. nucleus* a jejich grafický záznam jsou zobrazena na obrázku 4.8 pro rotace vzorku 0°, 15°, 30°, 45°, 60° a 75°. Na grafickém záznamu jsou pozorovatelné křivky, na kterých byla zaznamenána chyba měření. Tyto křivky se svým tvarem zcela liší od typického tvaru indentační křivky, případně je na jejich povrchu patrná nerovnost. Takových měření bylo v případě testování perleti druhu *N. nucleus* několik. Důvodem většího množství chyb měření byla zřejmě křehkost testovaného materiálu. Výše uvedená skutečnost se odrazila na zaznamenaných hodnotách sledovaných veličin, které dosahují významných rozdílů jak mezi jednotlivými rotacemi, tak v rámci rotace samotné.

Hodnota maximální aplikované síly se u daných měření pohybuje v rozpětí hodnot 510  $\mu\text{N}$  (rotace vzorku 15°, indent č. 2) až 1 579  $\mu\text{N}$  (rotace vzorku 60°, indent č. 3).

**Tabulka 4.3** - Hodnoty měření elastického modulu (E) a mikrotvrlosti (H) perleti druhu *Nucula nucleus* (vzorek č. 110) při rotaci vzorku 0°, 15°, 30°, 45°, 60° a 75°.

Rotace [°]	0°		15°		30°		45°		60°		75°	
Indent č.	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]
0	93,30	7,51	95,79	6,88	89,23	5,15	94,98	6,12	95,85	6,42	87,54	5,57
1	84,03	5,63	60,85	5,53	90,30	6,34	107,33	7,84	84,07	5,60	90,15	6,38
2	99,89	6,77	47,41	2,19	80,39	5,27	87,87	6,36	99,64	6,48	113,73	5,65
3	84,88	5,64	82,92	5,06	91,41	6,07	82,51	5,59	115,46	8,38	91,51	6,27
4	74,07	3,67	100,94	6,39	90,72	6,78	89,89	4,38	100,08	7,69	100,51	7,56
5	88,93	6,25	83,10	5,08	83,10	5,08	89,69	6,35	93,79	6,91	98,33	7,09
6	100,61	6,48	92,37	5,98	85,18	5,95	96,74	7,16	89,60	6,16	82,92	5,47
7	91,67	6,25	84,14	4,78	99,25	6,87	86,71	4,96	90,76	6,34	93,14	7,08
8	88,96	6,03	83,90	5,29	94,80	6,77	82,10	5,26	78,39	5,22	92,83	6,40
9	88,78	6,60	95,74	7,17	84,77	5,67	88,16	6,73	85,84	6,17	94,00	6,87
10	90,50	4,97	92,20	5,94	87,33	6,21	91,90	6,83	110,85	7,89	86,56	6,43
11	105,87	7,77	83,71	5,96	87,83	5,71	87,39	6,17	90,50	6,48	92,03	6,42

Numerická vyjádření sledovaných veličin mikromechanických vlastností (E a H) jsou zaznamenána v tabulce 4.3. Uvedené hodnoty a jejich difference potvrzují stav hodnot zaznamenaných při měření, především chybovost samotného měření. Tyto rozdíly jsou zřejmě z velké části způsobené skutečností, že se jedná o data bez vyloučení odlehlých hodnot, kterých je v daném případě několik. Chybná měření se obvykle ve vypočtených hodnotách projeví v podobě extrémních hodnot. V případě veličiny elastického modulu (E) se hodnota měření pohybuje v rozpětí od 47,41 GPa (rotace vzorku 15°, indent č. 2) do 115,46 GPa (rotace vzorku 60°, indent č. 3). Hodnota mikrotvrlosti (H) byla vypočtena v mezích od 2,19 GPa (rotace vzorku 15°, indent č. 2) do 7,84 GPa (rotace vzorku 45°, indent č. 1).



**Obrázek 4.9** – Graf indentačních křivek perleti druhu *Nucula nucleus* (vzorek č. 110) při rotaci vzorku 90°, 105°, 120°, 135°, 150° a 165°.

Měření zatěžovací síly v závislosti na hloubce vpichu jsou na obrázku 4.9 zobrazena pro 6 rotací vzorku druhu *Nucula nucleus* (tj. 90°, 105°, 120°, 135°, 150° a 165°). Křivky uvedených měření stejně jako u předchozích měření (obrázek 4.8) dosahují významných rozdílů jak pro jednotlivé rotace, stejně tak pro jednotlivé indenty. Indentačních křivek, kterých se týká chyba v měření, je s ohledem na již zmíněnou křehkost materiálu několik. Z tohoto pohledu je pozorováno nejméně chybných měření u rotaci 135°, což potvrzuje i celistvý charakter grafu (obrázek 4.9). Od uvedených měření se velmi významně liší měření s rotací vzorku 90°, kde maximální aplikovaná síla dosáhla hodnoty 2 466 GPa (indentační křivka č. 2) pro dosažení maximální hloubky ( $h_{\max} < 100$  nm). Ostatní indentační křivky dosáhly v řádech 100 nižší hodnoty maximální aplikované síly.

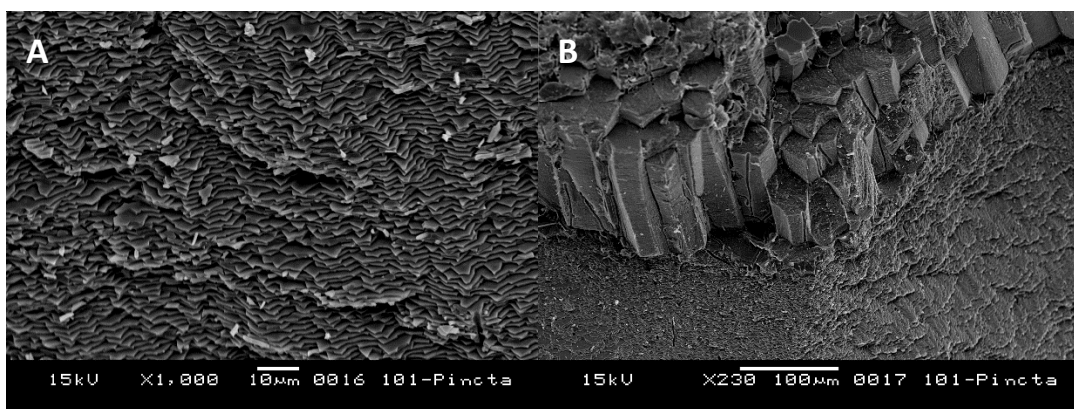
**Tabulka 4.4** - Hodnoty měření elastického modulu (E) a mikrotvrdosti (H) perleti druhu *Nucula nucleus* (vzorek č. 110) při rotaci vzorku 90°, 105°, 120°, 135°, 150° a 165°.

Rotace [°]	90°		105°		120°		135°		150°		165°	
Indent č.	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]
0	96,00	6,68	75,00	4,95	83,83	5,75	90,78	6,06	82,66	6,31	96,81	5,53
1	89,15	6,03	82,69	5,34	93,13	6,16	95,13	6,58	98,15	7,54	98,50	7,15
2	150,26	14,60	78,41	5,00	83,42	5,13	90,92	6,11	91,78	6,75	84,87	6,03
3	85,46	5,67	82,64	5,32	85,14	5,58	84,00	5,55	96,10	6,71	88,68	5,63
4	102,94	7,19	88,86	6,36	88,07	5,97	89,84	6,19	84,36	5,48	87,64	6,28
5	109,56	8,51	85,86	5,90	89,84	6,63	92,16	6,02	85,92	5,92	98,89	7,12
6	83,79	5,24	88,00	5,39	93,70	7,38	88,90	5,81	90,34	6,61	103,34	8,41
7	102,58	7,33	111,65	9,01	89,09	6,06	94,17	6,64	91,99	6,50	90,09	6,77
8	101,56	6,81	86,65	5,86	83,33	5,98	93,02	6,56	82,38	5,45	105,86	6,61
9	88,07	5,54	87,25	6,19	96,23	6,95	93,22	6,94	80,17	5,21	69,28	4,04
10	87,06	5,67	88,01	5,96	101,28	8,08	89,70	6,49	95,74	6,08	74,98	3,85
11	89,21	4,41	124,22	8,51	25,60	0,64	93,40	7,28	84,16	5,56	82,15	6,46

Tabulka 4.4 uvádí výpočet hodnot sledovaných veličin (elastický modul a mikrotvrdost). Z daných hodnot je možné posoudit výskyt chyb měření, které se obvykle projevují odlehlou hodnotou. Stejně jako v přechozím hodnocení výpočtu hodnot měření jsou i zde pozorovatelné rozdíly mezi jednotlivými rotacemi vzorku. Tyto rozdíly jsou způsobené skutečností, že se jedná o data bez vyloučení odlehlých hodnot. U veličiny elastického modulu (E) se hodnota uvedených měření pohybuje v rozpětí od 25,60 GPa (rotace 120°, indent č. 11) do 150,26 GPa (rotace 90°, indent č. 2). Veličina mikrotvrdosti (H) zaznamenala hodnoty v mezích od 0,64 GPa (rotace 120°, indent č. 11) do 14,60 GPa (rotace 90°, indent č. 2).

#### 4.2.3 *Pinctada radiata* Leach, 1814

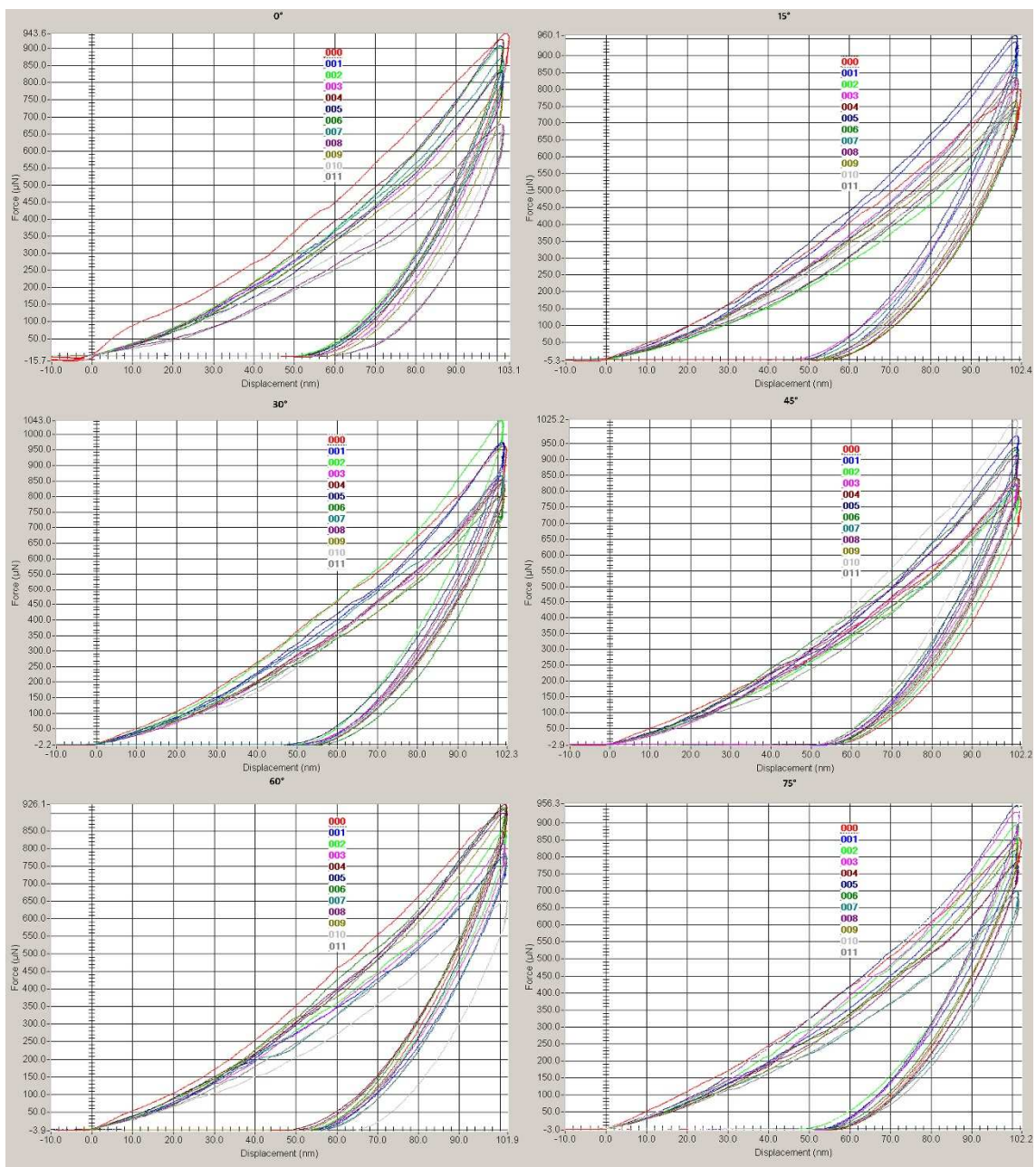
##### 4.2.3.1 Skenovací elektronová mikroskopie



**Foto 4.8** – *Pinctada radiata* (vzorek č. 101) – SEM.

Boční pohled na charakteristickou strukturu perleťové vrstvy dokumentuje snímek A (foto 4.8). Snímek B je detailním pohledem na hranoly prizmatické vrstvy na rozmezí s vrstvou perleti.

#### 4.2.3.2 Nanoindentační zkouška



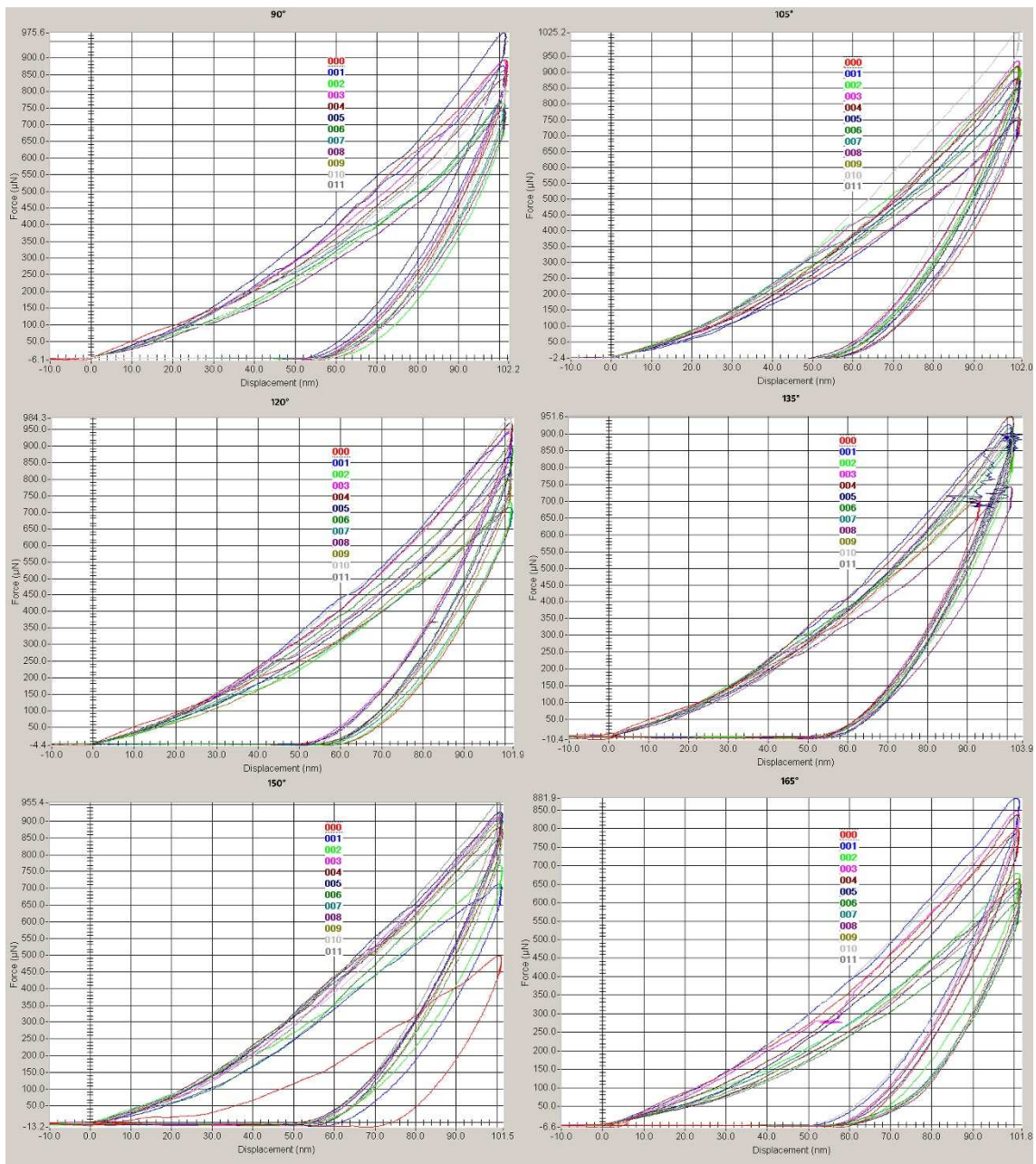
**Obrázek 4.10** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Pinctada radiata* (vzorek č. 101) při rotaci vzorku 0°, 15°, 30°, 45°, 60° a 75°.

Obrázek 4.10 je grafickým záznamem nanoindentačních měření perleti pro vzorky druhu *Pinctada radiata* s rotací 0°, 15°, 30°, 45°, 60° a 75°. Tvary indentačních křivek naznačují významné rozdíly jak pro jednotlivé rotace, tak jednotlivé indenty. Křivky liší se svým tvarem či nerovností naznačují možnou chybu měření (například pozorovaný pop-in efekt, či jiná zjevná chyba), která se ve výpočtu hodnot mikromechanických veličin projeví v podobě okrajové hodnoty. Hodnoty veličiny maximální aplikované síly ( $P_{max}$ ) se u daných měření pohybují v blízkosti hodnoty 1 000 GPa.

**Tabulka 4.5** - Hodnoty měření elastického modulu (E) a mikrotvrlosti (H) perleti druhu *Pinctada radiata* (vzorek č. 101) při rotaci vzorku 0°, 15°, 30°, 45°, 60° a 75°.

Rotace [°]	0°		15°		30°		45°		60°		75°	
Indent č.	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]
0	67,96	4,31	61,49	3,53	68,28	4,58	60,99	3,45	66,01	4,45	65,17	3,96
1	65,39	4,37	65,43	4,69	70,44	4,70	71,69	4,86	59,29	3,72	62,48	4,21
2	65,44	4,44	56,97	3,42	72,95	5,28	64,48	3,67	63,20	4,09	63,87	4,47
3	67,44	3,79	60,38	4,44	63,71	4,24	61,14	4,11	61,17	3,93	67,53	4,57
4	67,70	4,51	62,97	3,91	64,66	4,11	64,50	3,96	66,65	4,61	62,07	3,66
5	61,39	3,94	65,27	4,93	68,67	4,92	69,41	4,50	70,07	4,26	70,12	4,67
6	63,85	3,99	57,97	3,43	65,13	3,64	65,51	4,71	67,55	4,67	62,41	3,95
7	65,54	4,06	62,57	4,52	63,77	4,26	63,77	4,26	63,43	3,71	56,21	3,25
8	61,94	2,79	53,70	3,56	61,31	4,06	68,01	4,40	63,10	4,54	62,29	3,67
9	61,59	3,53	56,80	3,62	62,76	4,00	65,70	4,02	64,22	4,54	66,22	3,98
10	61,59	3,53	57,45	3,61	66,34	4,21	71,83	5,37	57,67	2,83	67,26	4,86
11	60,06	4,06	60,06	4,06	67,33	4,13	65,85	3,91	62,93	3,73	55,72	3,12

Vypočtené hodnoty sledovaných veličin (E a H) uvedené v tabulce 4.5 vykazují ve vzájemném porovnání rotací vzorku významné rozdíly, které mohou být způsobené skutečností, že se jedná o data bez vyloučení odlehlých hodnot. Chybná měření se obvykle ve výpočtu veličin projeví v podobě extrémních hodnot. U veličiny elastického modulu (E) se hodnota uvedených měření pohybuje v rozpětí od 53,70 GPa (rotace vzorku 15°, indent č. 8) do 72,95 GPa (rotace vzorku 30°, indent č. 2). Veličina mikrotvrlosti (H) zaznamenala hodnoty v mezích od 2,79 GPa (rotace vzorku 0°, indent č. 8) do 5,37 GPa (rotace vzorku 45°, indent č. 10).



**Obrázek 4.11** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Pinctada radiata* (vzorek č. 101) při rotaci vzorku 90°, 105°, 120°, 135°, 150° a 165°.

Měření zatěžovací síly v závislosti na hloubce vpichu je na obrázku 4.11 zobrazeno pro 6 rotací vzorku druhu *Pinctada radiata* (tj. 90°, 105°, 120°, 135°, 150° a 165°). Na grafickém záznamu měření s rotací 135° je pozorovatelné chybné měření způsobené pravděpodobně otřesy měřícího zařízení. Hodnota maximální aplikované síly se u daných měření pohybovala stejně jako v případě předchozích rotací vzorku (viz. Obrázek 4.10) v blízkosti hodnoty 1 000 GPa.

**Tabulka 4.6** - Hodnoty měření elastického modulu (E) a mikrotvrdosti (H) perleti druhu *Pinctada radiata* (vzorek č. 101) při rotaci vzorku 90°, 105°, 120°, 135°, 150° a 165°.

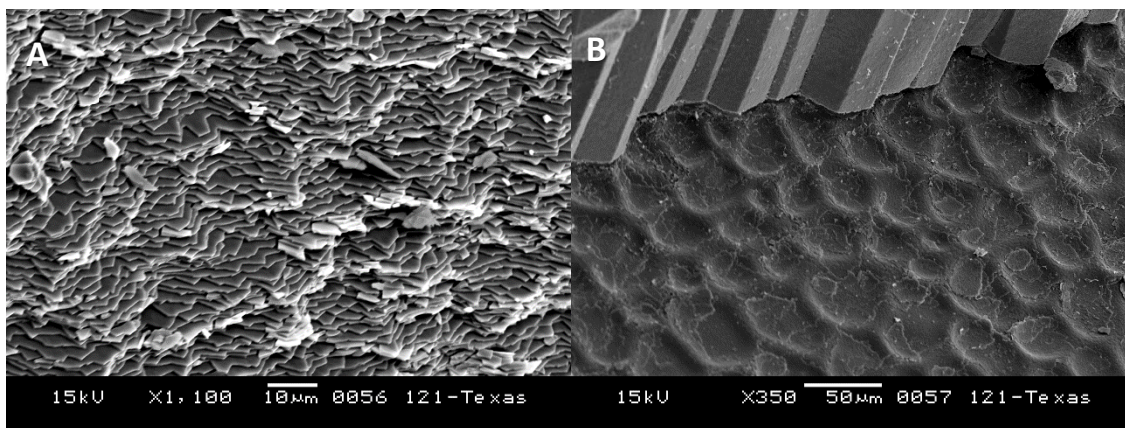
Rotace [°]	90°		105°		120°		135°		150°		165°	
Indent č.	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]	E [GPa]	H [GPa]
0	69,08	4,11	62,39	3,52	57,78	3,31	64,03	3,86	55,42	2,01	60,60	3,81
1	62,82	4,33	56,40	3,67	65,34	4,75	65,68	4,66	58,17	3,25	63,93	4,33
2	62,89	3,27	64,97	4,62	58,01	3,39	63,36	4,08	60,29	3,55	54,91	3,12
3	67,28	4,22	67,36	4,80	65,17	4,86	68,31	4,28	64,31	4,57	64,56	4,13
4	63,42	3,99	64,65	4,76	68,43	4,94	66,91	4,63	61,50	4,35	63,94	4,05
5	70,12	4,90	65,77	4,37	66,38	4,24	64,42	4,48	65,78	4,68	61,29	3,73
6	61,27	3,57	62,40	4,30	68,53	4,33	68,96	4,46	62,79	4,11	54,41	2,61
7	62,56	3,64	60,61	4,36	53,77	3,42	63,25	4,26	64,51	4,53	56,13	2,80
8	59,68	3,44	69,29	4,08	61,15	3,95	55,41	3,56	66,58	4,64	58,04	2,77
9	65,87	3,82	69,37	4,55	60,62	3,79	62,04	4,22	66,82	4,39	61,36	2,90
10	63,96	3,86	69,96	5,42	69,13	5,12	64,43	4,43	63,50	4,12	60,71	4,18
11	64,74	4,18	62,38	3,77	64,93	3,96	65,41	4,55	68,06	4,92	56,23	2,71

Tabulka 4.6 uvádí výpočet hodnot pro sledované veličiny mikromechanických vlastností (E a H). Tyto hodnoty naznačují významné rozdíly ve vzájemném porovnání s rotací vzorku. Zjevné rozdíly vypočtených hodnot mohou být způsobené skutečností, že se jedná o data bez vyloučení odlehklých hodnot. U veličiny elastického modulu (E) se hodnota měření pohybuje v rozpětí od 53,77 GPa (rotace vzorku 120°, indent č. 7) do 70,12 GPa (rotace vzorku 90°, indent č. 5). Veličina mikrotvrdosti (H) zaznamenala hodnoty v mezích od 2,01 GPa (rotace vzorku 150°, indent č. 0) do 5,42 GPa (rotace vzorku 105°, indent č. 10).

### 4.3 Elastický modul a mikrotvrdost perleti mlžů – výsledky měření

#### 4.3.1 *Amblema plicata* Say, 1817

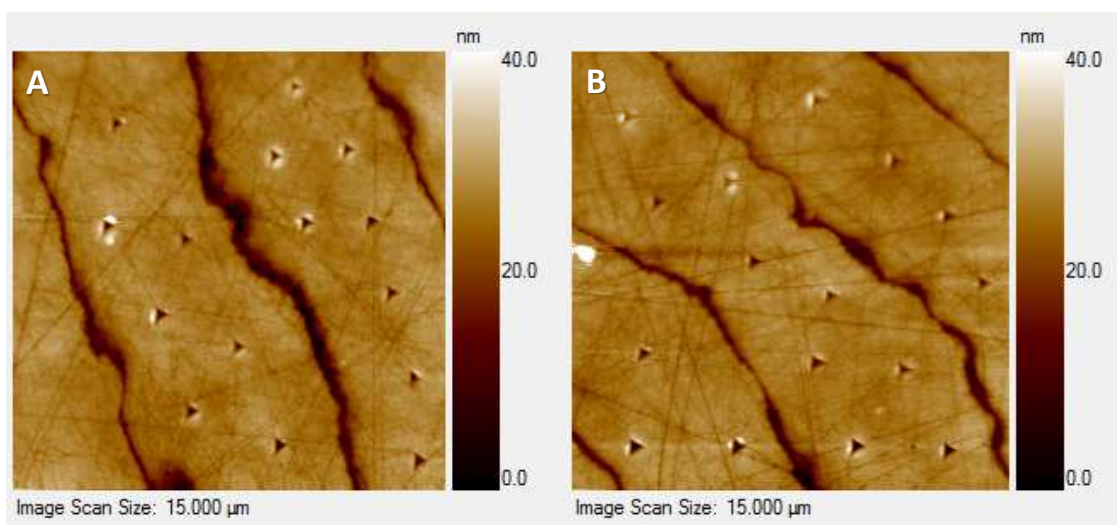
##### 4.3.1.1 Skenovací elektronová mikroskopie



**Foto 4.9** – *Amblema plicata* (vzorek č. 121) – SEM.

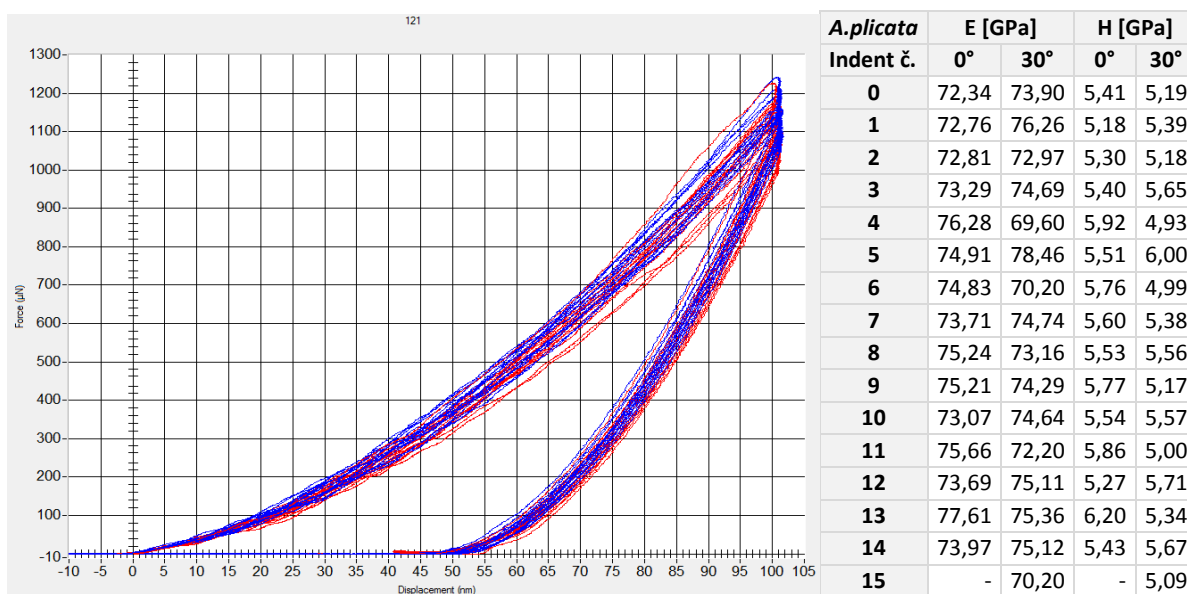
Boční pohled na charakteristickou strukturu perleťové vrstvy dokumentuje snímek A na fotografii 4.9. Snímek B zobrazuje detailní pohled na hranoly prizmatické vrstvy na hranici s vrstvou perleti.

### 4.3.1.2 Nanoindentační zkouška



**Foto 4.10** – Sken povrchu perleti druhu *Amblema plicata* (vzorek č. 121). Vzorek otočený o 0° (A). Vzorek otočený o 30° (B).

Na skenované ploše vzorku č. 121 (foto 4.10) jsou viditelné jednotlivé vrstvy perleti se zřetelným rozhraním. Indenty v jednotlivých vrstvách jsou přesně umístěné tak, aby nedošlo k posunu měřených hodnot v případě chybného umístění do rozhraní vrstev perleti.



**Obrázek 4.12** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Amblema plicata* (vzorek č. 121). Modré křivky – 0°, červené křivky 30°.

Při měření vzorku č. 121 bylo dosaženo v parametru síly (P) nevyšší hodnoty 1 240 µN na vzorku s rotací 0° (obrázek 4.12). Druhou nejvyšší hodnotu ( $P_{\max} = 1\,220\ \mu\text{N}$ ) zaznamenal vzorek s rotací 30°. Grafické znázornění indentačních křivek ukazuje, že mezi měřeními jednotlivých indentů se nevyskytují výrazné rozdíly, což potvrzuje celistvý vzhled grafu. Výjimkou jsou pouze tři indentační křivky s rotací vzorku 30°, které zaznamenaly podprůměrnou hodnotu.



Toto je zřejmé z vypočtených hodnot E a H pro rotaci vzorku 0° a 30°, které nevykazují rozdílné hodnoty v porovnání s rotací testovaného vzorku. Tomuto výsledku odpovídá i celistvost grafu indentačních křivek na obrázku 4.12.

### 4.3.2 *Brachidontes rostratus* Dunker, 1857

#### 4.3.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie

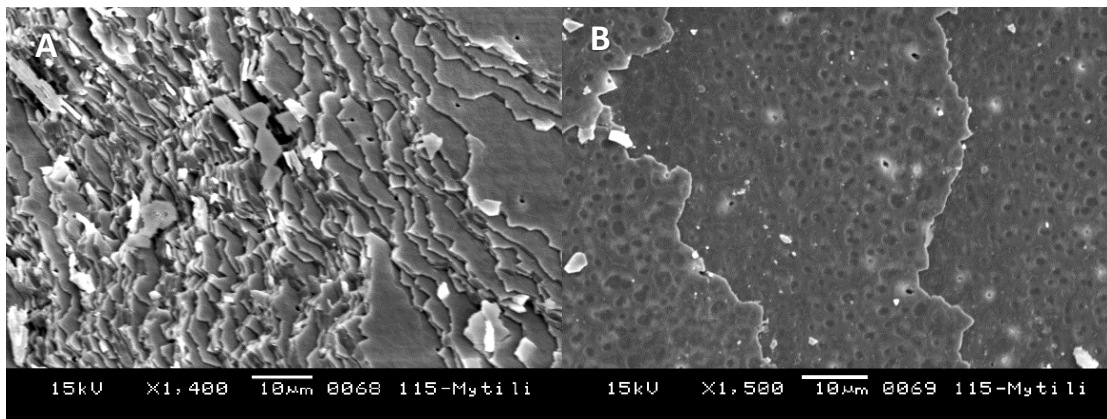


Foto 4.11 – *Brachidontes rostratus* (vzorek č. 115) – SEM.

Fotografie pořízené pomocí SEM (foto 4.11) dokumentují detailní pohled na uspořádání destiček perleti tvořící jednotlivé vrstvy (snímek A). Snímek B je detailním pohledem na destičky perleti ve středu perleťové vrstvy při kolmém pohledu k povrchu schránky.

#### 4.3.2.2 Nanoindentační zkouška

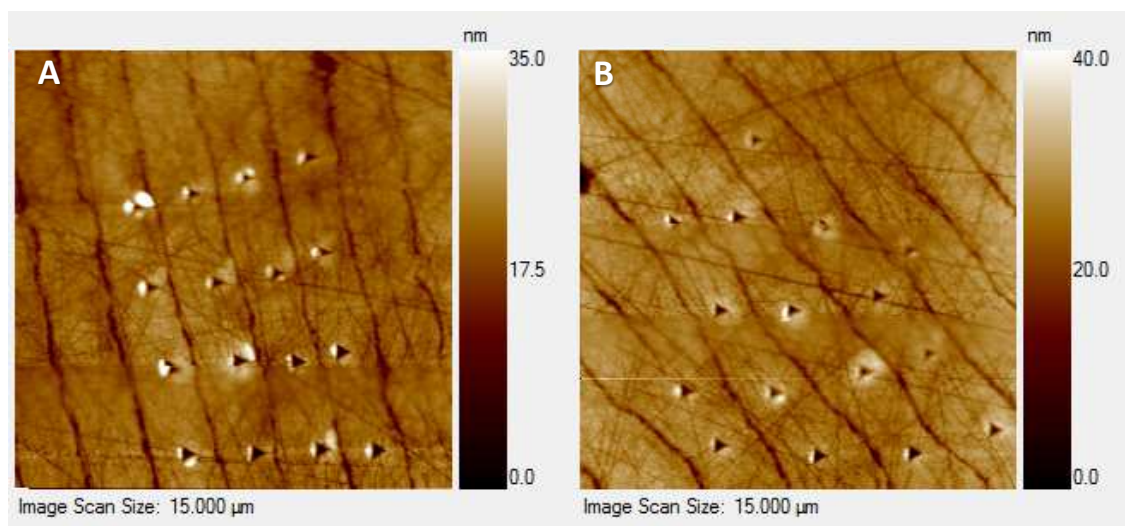
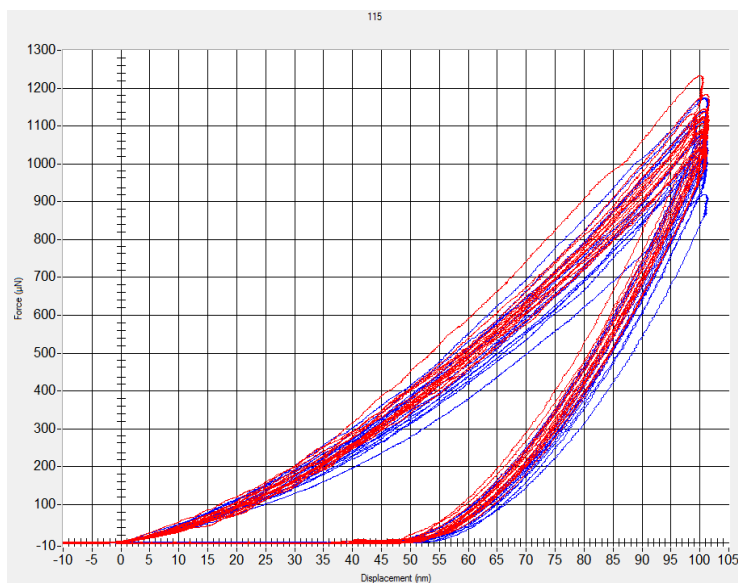


Foto 4.12 - Sken povrchu perleti druhu *Brachidontes rostratus* (vzorek č. 115) Vzorek otočený o 0° (A). Vzorek otočený o 30° (B).

Snímky na fotografii 4.12 byly pořízeny bezprostředně po měření vzorku č. 115 (*B. rostratus*). Na skenovaném povrchu vzorku jsou zřetelné jednotlivé téměř pravidelné vrstvy perleti. Tyto snímky dokumentují umístění indentů do vrstev perleti. Jednotlivé indenty odpovídají naměřeným hodnotám na obrázku 4.13.



<i>B.rostratus</i>	E [GPa]		H[GPa]	
	0°	30°	0°	30°
0	73,19	70,06	5,28	5,45
1	72,44	68,89	5,73	5,28
2	71,35	69,48	5,38	5,58
3	68,22	71,48	4,68	5,35
4	72,52	66,23	5,00	4,88
5	68,76	73,75	5,19	5,71
6	69,34	72,64	4,93	5,73
7	71,14	69,85	5,63	5,59
8	68,18	69,15	4,90	5,28
9	73,60	69,77	5,62	5,24
10	69,14	75,54	4,88	6,27
11	67,03	68,11	4,97	5,00
12	72,63	69,13	5,53	5,79
13	72,90	67,99	4,99	4,98
14	67,31	67,59	4,64	5,00
15	-	69,39	-	5,43

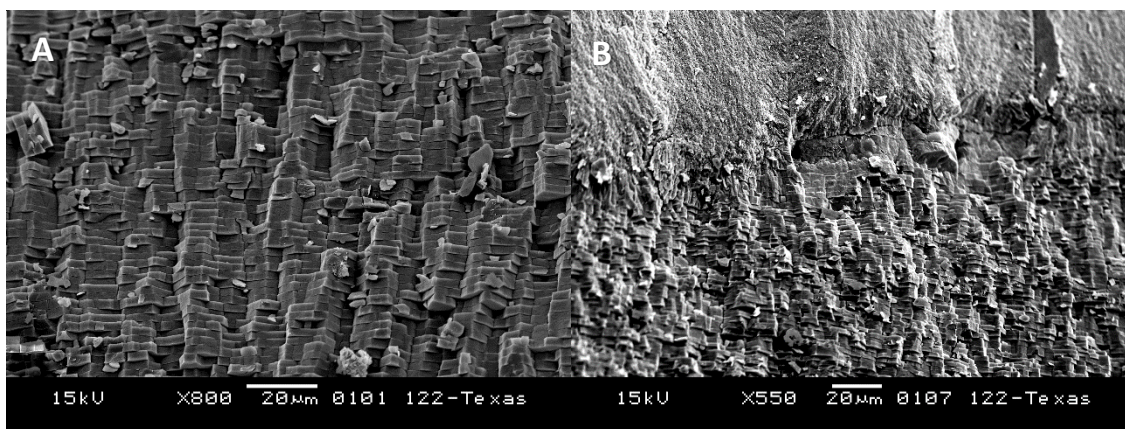
**Obrázek 4.13** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Brachiodontes rostratus* (vzorek č. 115). Modré křivky – 0°, červené křivky 30°.

Při měření vzorku č. 115 bylo dosaženo v parametru síly (P) nevyšší hodnoty 1 240  $\mu\text{N}$  (vzorek s rotací 30°) a nejnižší hodnoty 920  $\mu\text{N}$  (vzorek s rotací 0°). Při celkovém pohledu na graf indentačních křivek je viditelné, že několik modrých křivek (tj. rotace 0°) zaznamenalo několik nejnižších hodnot měření u veličiny aplikované síly. Jednotlivé křivky v grafu jsou kompaktní.

Vypočtené hodnoty elastického modulu a mikrotvrdomosti pro rotaci 0° a 30° odpovídají grafickému znáznamu měření. Zdá se tedy, že rotace vzorku vykazuje minimální rozdíly.

### 4.3.3 *Leptodea fragilis* Rafinesque, 1820

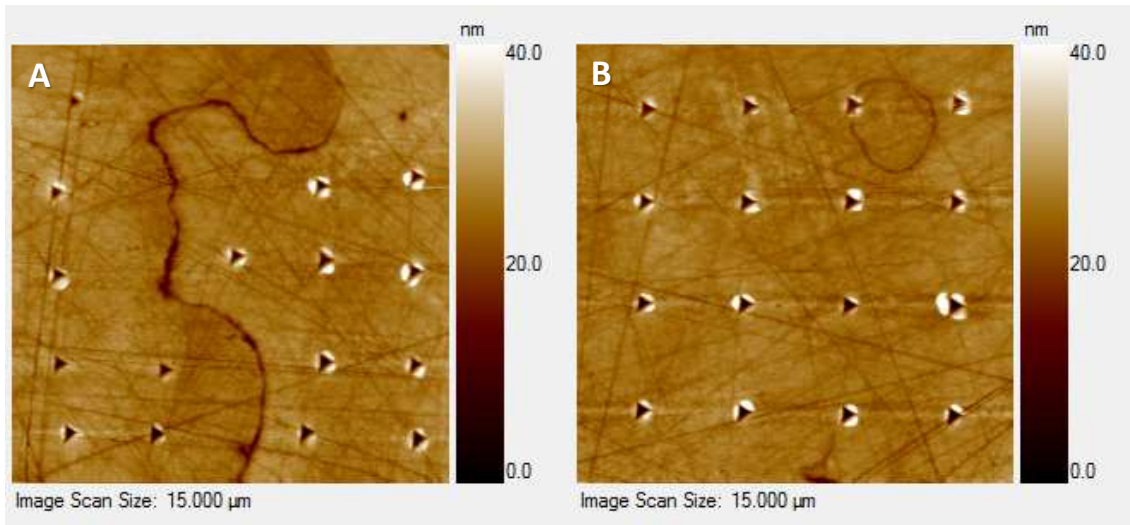
#### 4.3.3.1 Skenovací elektronová mikroskopie



**Foto 4.13** – *Leptodea fragilis* (vzorek č. 122) – SEM.

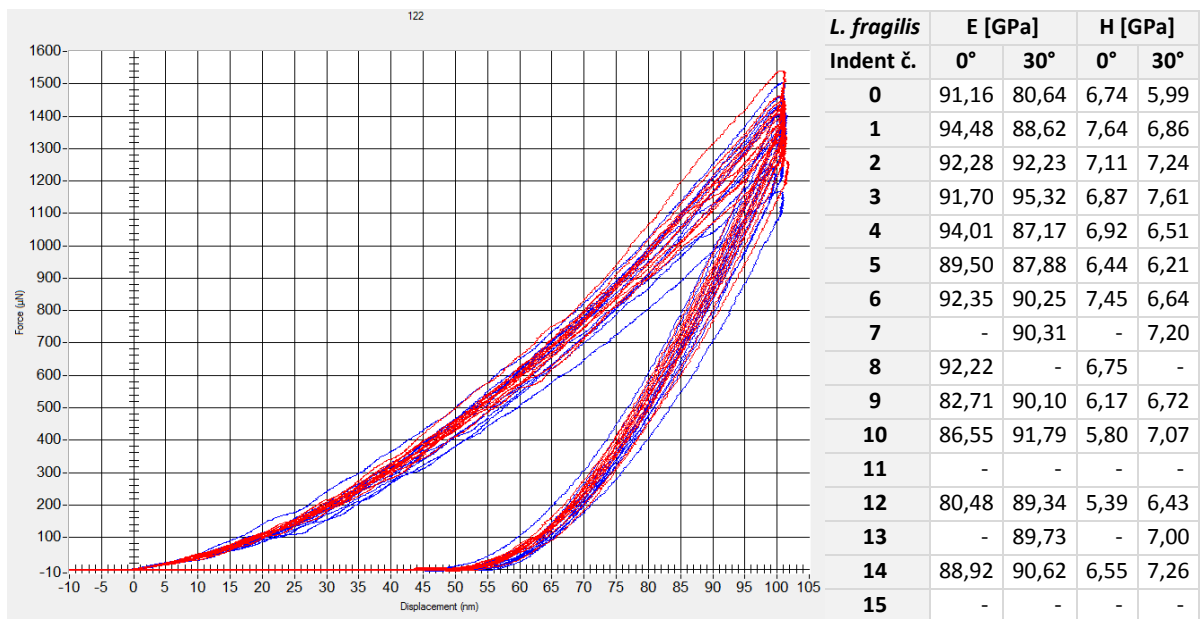
Snímky na fotografii 4.13 ukazují vnitřní strukturu perleťové vrstvy. Boční pohled na jednotlivé destičky perleti o tloušťce okolo 2  $\mu\text{m}$  (snímek A) a rozmezí perleťové a prizmatické vrstvy (snímek B).

#### 4.3.3.2 Nanoindentační zkouška



**Foto 4.14** - Sken povrchu perleti druhu *Leptodea fragilis* (vzorek č. 122). Vzorek otočený o 0° (A). Vzorek otočený o 30° (B).

Na skenovaném povrchu (foto 4.14) jsou zřetelné indenty v pravidelné matici 5 x 5  $\mu\text{m}$ . Tyto indenty odpovídají jednotlivým indentačním křivkám pro danou rotaci vzorku.



**Obrázek 4.14** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Leptodea fragilis* (vzorek č. 122). Modré křivky – 0°, červené křivky 30°.

Graf indentačních křivek (obrázek 4.14) zobrazuje velmi široké rozpětí naměřených hodnot v parametru síly (P) aplikované pro dosažení stanovené maximální hloubky ( $h_{\text{max}} < 100 \text{ nm}$ ). Zaznamenané rozpětí hodnot se pohybuje od nejnižší hodnoty 160  $\mu\text{N}$  (rotace vzorku 0°) po nejvyšší zaznamenanou hodnotu u vzorku s rotací 30°, tj.  $P_{\text{max}} = 1540 \mu\text{N}$ . Z pohledu rotace vzorku se zdají být jednotlivé indentační křivky v rozpětí naměřených hodnot rozloženy takřka rovnoměrně, čemuž odpovídají i vypočtené hodnoty mikromechanických veličin, které velmi podobnými hodnotami.

#### 4.3.4 *Modiolus barbatus* Linnaeus, 1758

##### 4.3.4.1 Skenovací elektronová mikroskopie

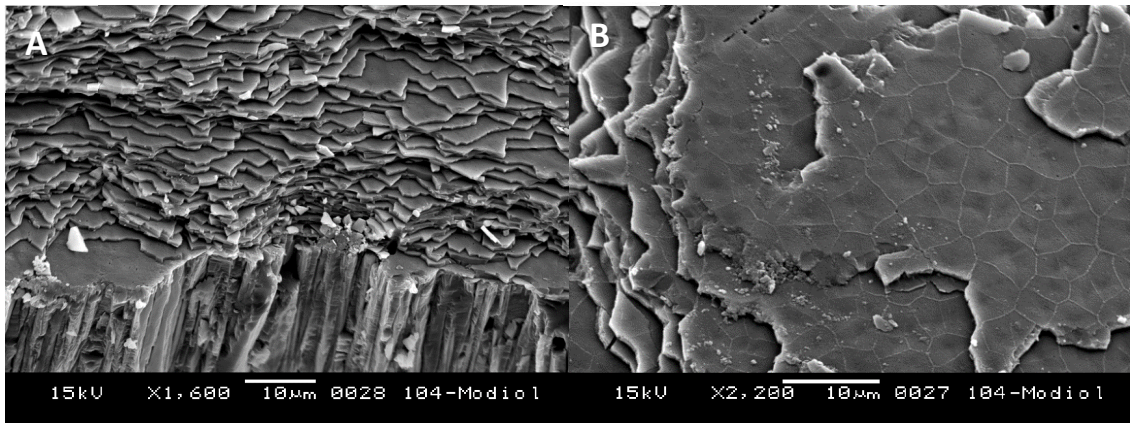


Foto 4.15 – *Modiolus barbatus* (vzorek č. 104) – SEM.

Snímky z elektronového mikroskopu (foto 4.15) dokumentují přechod mezi perleťovou vrstvou a prizmatickou vrstvou, která je tvořena aragonitovými hranoly (snímek A). Na snímku B je zachycen pohled shora na vrstvu perleti, kde jsou patrné jednotlivé destičky nepravidelných tvarů zřetelně spojené organickými látkami.

##### 4.3.4.2 Nanoindentační zkouška

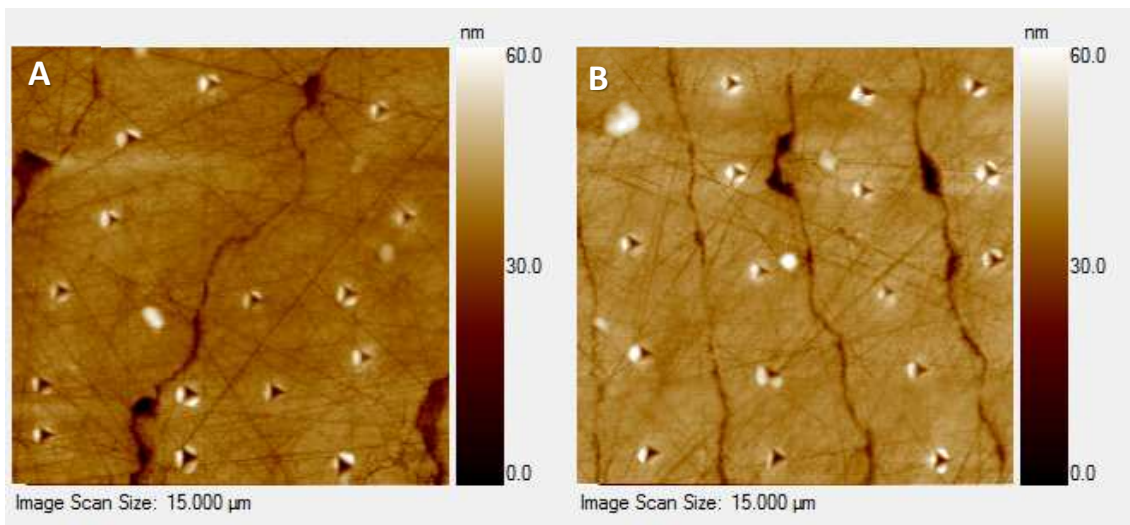
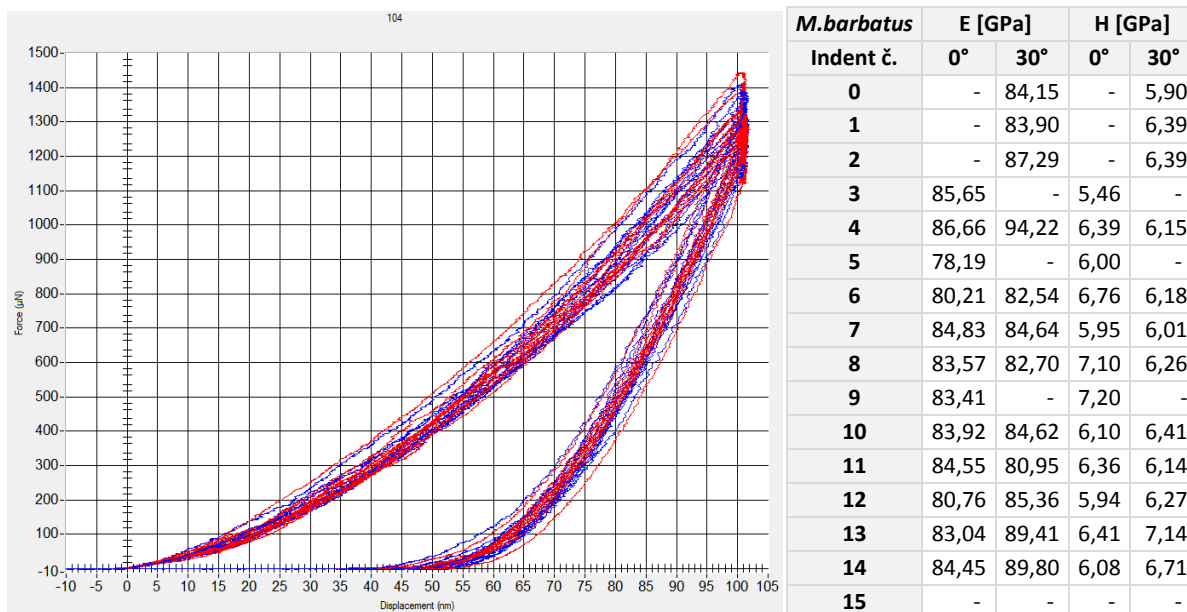


Foto 4.16 - Sken povrchu perleti druhu *Modiolus barbatus* (vzorek č. 104). Vzorek otočený o 0° (A). Vzorek otočený o 30° (B).

Skenovaná plocha vzorku č. 104 (foto 4.16) zobrazuje jednotlivé indenty, které jsou přesně umístěné do vybraných vrstev perleti. V případě umístění indentu do místa rozmezí jednotlivých vrstev by došlo k odchylce měření.



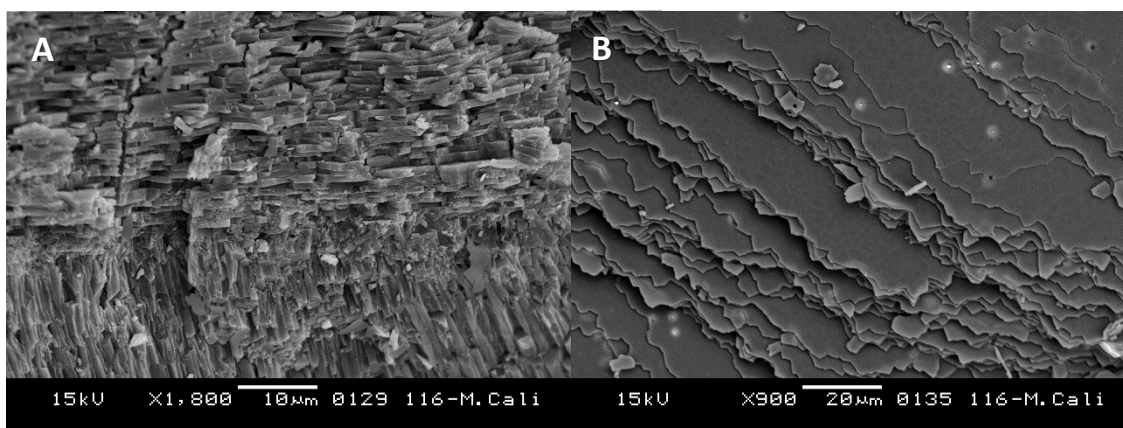
**Obrázek 4.15** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Modiolus barbatus* (vzorek č. 104). Modré křivky – 0°, červené křivky 30°.

Při stanovené hloubce ( $h_{\max} < 100$  nm) se hodnota aplikované síly pohybovala v rozpětí od 1 180  $\mu\text{N}$  do 1 450  $\mu\text{N}$ , přičemž daného maxima dosáhl vzorek s rotací 30°. Celkově je graf indentačních křivek kompaktnější a rozložení jednotlivých křivek se zdá rovnoměrné, čemuž odpovídají průměrné hodnoty měření uvedené na obrázku 4.15.

Vypočítané hodnoty sledovaných veličin (elastický modul a mikrotvrdost) u vzorku č. 104 (*M. barbatus*) naznačují, že rotace testovaného vzorku nemá vliv na vybrané mikromechanické vlastnosti testovaného materiálu.

#### 4.3.5 *Mytilus californianus* Conrad, 1837

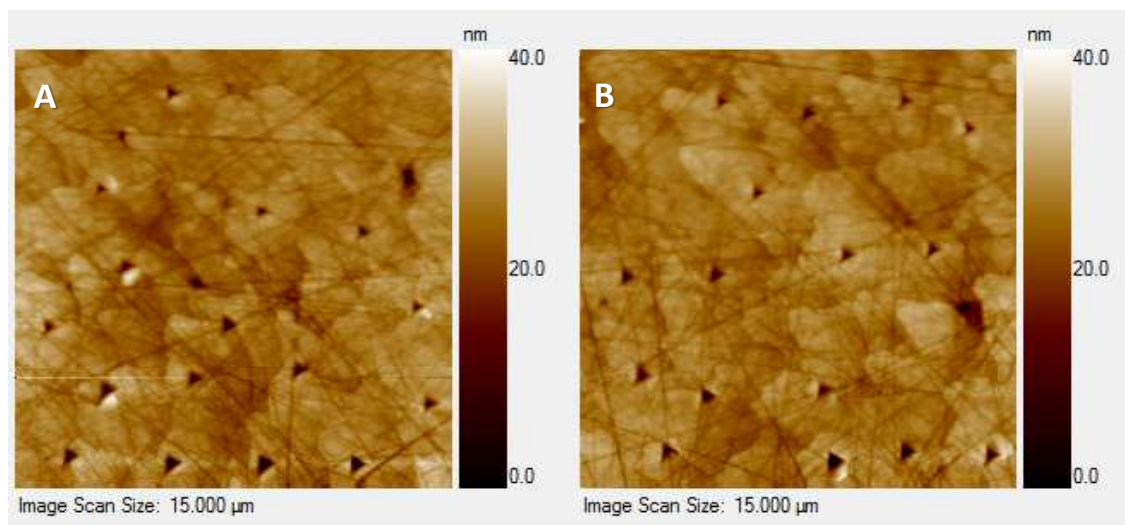
##### 4.3.5.1 Skenovací elektronová mikroskopie



**Foto 4.17** – *Mytilus californianus* (vzorek č. 116) – SEM.

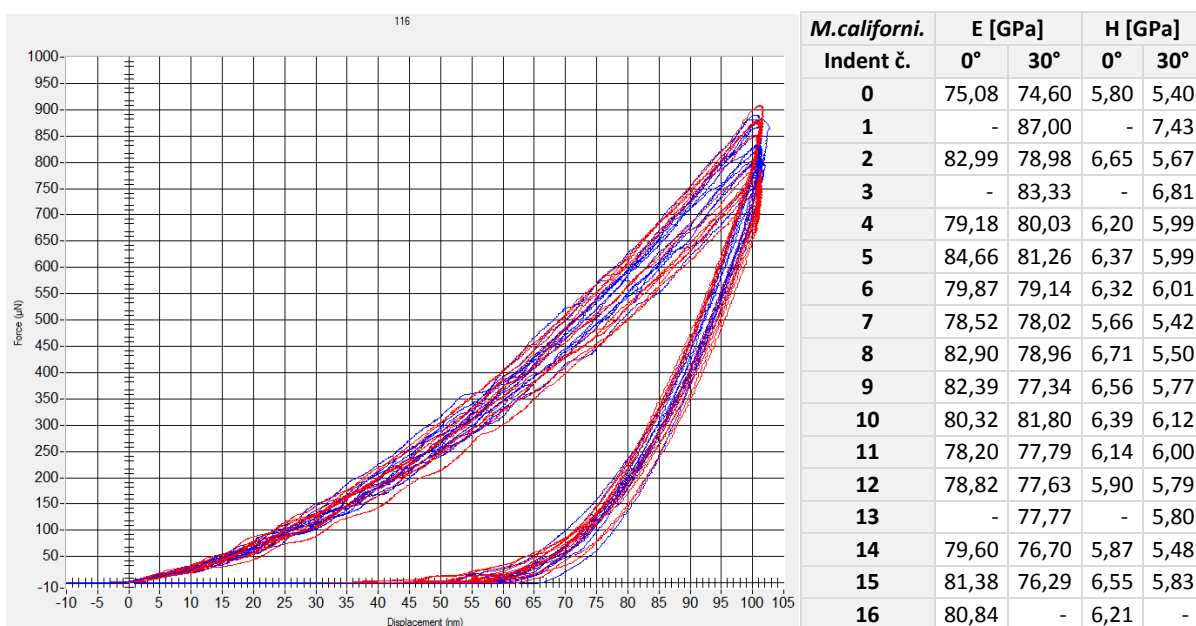
Snímky na fotografii 4.17 pořízené pomocí SEM dávají pohled na vnitřní vrstvy schránky. Rozmezí mezi perleťovou vrstvou a prizmatickou vrstvou (snímek A). Perleťovou vrstvu utváří destičky aragonitu o průměrné tloušťce 0,8  $\mu\text{m}$ . Kolmý pohled shora na uspořádání vrstev perleti, kde jsou zřetelné jednotlivé destičky perleti, dokumentuje snímek B.

#### 4.3.5.2 Nanoindentační zkouška



**Foto 4.18** - Sken povrchu perleti druhu *Mytilus californianus* (vzorek č. 116). Vzorek otočený o 0° (A). Vzorek otočený o 30° (B).

Na skenovaných plochách vzorku č. 116 jsou viditelné růstové perleťové vrstvy s indenty, které odpovídají jednotlivým indentačním křivkám na obrázku 4.16.



**Obrázek 4.16** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Mytilus californianus* (vzorek č. 116). Modré křivky – 0°, červené křivky 30°.

Při měření vybraných mikromechanických vlastností vzorku č. 116 (*M. californianus*) bylo ve sledovaných veličinách naměřeno rozpětí hodnot 740 – 920 μN aplikované síly (P). Z grafického záznamu je zřejmé, že křivky ve fázi odlehčení indentoru vykazují nižší rozptýl hodnot než ve fázi aplikované síly, tedy při zatížení testovaného materiálu. Jednotlivé indentační křivky jsou v grafu rozloženy rovnoměrně a patrně žádná z nich nevykazuje výraznou odchylku od průměru daného měření.

Vypočtené hodnoty veličin E a H u vzorku č. 116 vykazují ve sledovaných parametrech shodné hodnoty, čemuž odpovídá i graf indentačních křivek, který má kompaktní podobu.

#### 4.3.6 *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758

##### 4.3.6.1 Skenovací elektronová mikroskopie u druhu *Mytilus edulis* – vzorek č. 103

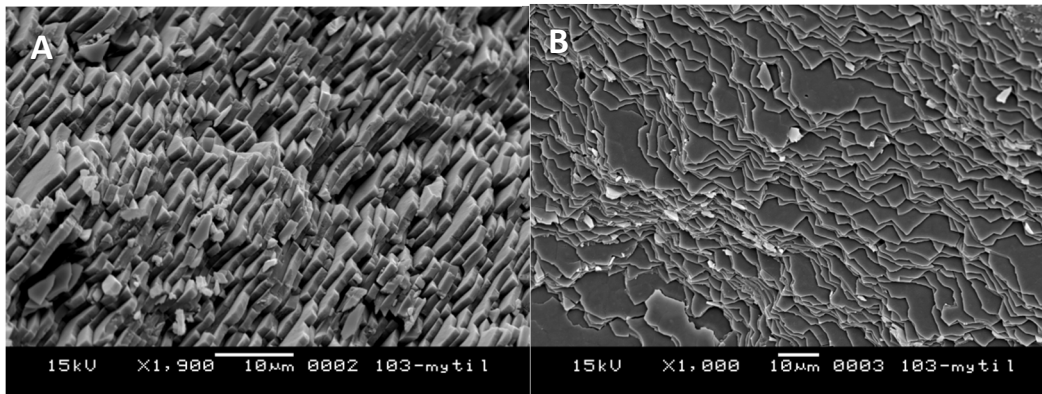


Foto 4.19 – *Mytilus edulis* (vzorek č. 103) – SEM.

Detailní pohled na vnitřní vrstvu perleti zachycuje SEM na fotografii 4.19. Charakteristické uspořádání destiček perleti o tloušťce přibližně 0,85  $\mu\text{m}$  uvnitř perletové vrstvy je dobře pozorovatelné při bočním pohledu (snímek A). Snímek B podává obraz kolmého pohledu shora na svrchní vrstvu perleti.

##### 4.3.6.2 Nanoindentační zkouška u druhu *Mytilus edulis* – vzorek č. 103

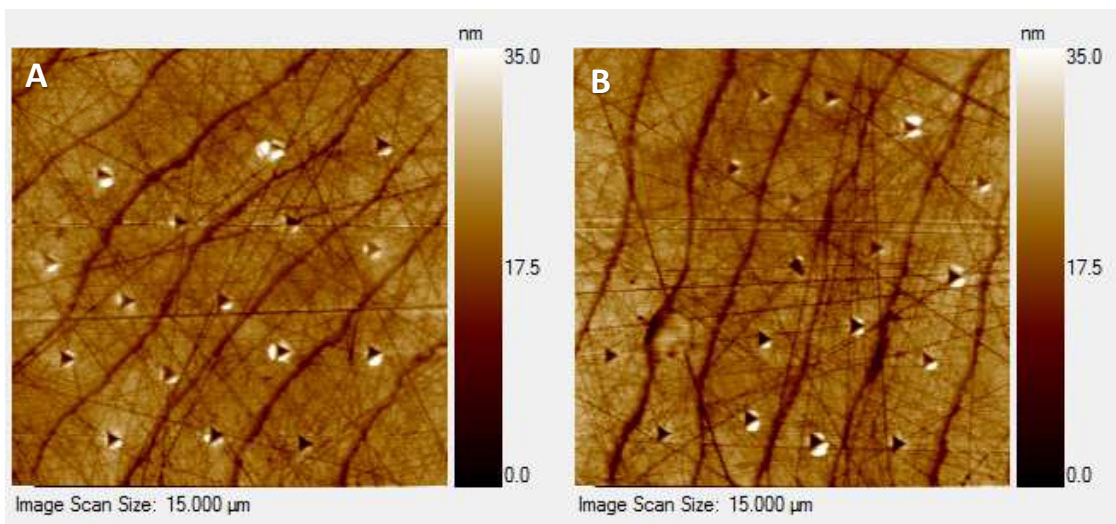
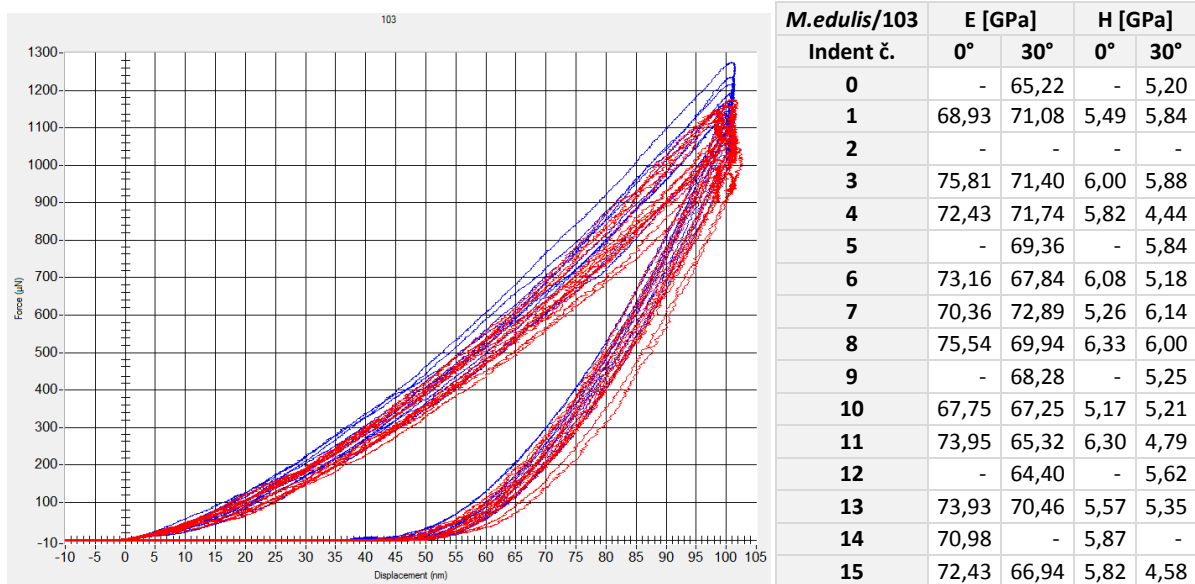


Foto 4.20 - Sken povrchu perleti druhu *Mytilus edulis* (vzorek č. 103). Vzorek otočený o 0° (A). Vzorek otočený o 30° (B).

Výše zobrazené snímky A, B (foto 4.20) ukazují plochy vzorku č. 103 skenované bezprostředně po testování daného vzorku. Jsou zde zřetelné jednotlivé vrstvy perleti, na kterých bylo provedeno testování a současně i jednotlivé indenty, které odpovídají jednotlivým indentačním křivkám znázorněným na obrázku 4.17.

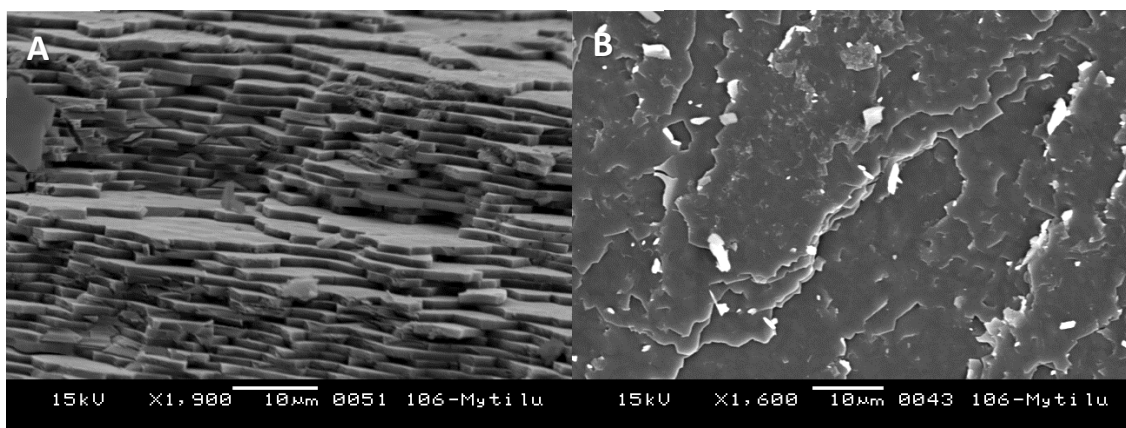


**Obrázek 4.17** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Mytilus edulis* (vzorek č. 103). Modré křivky – 0°, červené křivky 30°.

Graf křivek na obrázku 4.17 představuje indentační křivky zatěžovací síly v závislosti na hloubce vpichu. Modré křivky zaznamenávají hodnotu při rotaci vzorku 0°, červené jsou hodnotou síly při rotaci testovaného vzorku 30°. Z grafu křivek je viditelný jen nepatrný posun modře označených křivek směrem k vyšším hodnotám zatěžovací síly (P) s nejvyšší naměřenou hodnotou 1 280 µN. Naopak červené křivky dosahují pod průměr naměřených hodnot aplikované síly, včetně nejnižší zaznamenané hodnoty (980 µN).

Dle vypočtených hodnot sledovaných veličin se na první pohled zdá, že hodnoty v jednotlivých parametrech se liší minimálně, přičemž nepatrný rozdíl byl zaznamenan pouze u elastického modulu (E).

#### 4.3.6.3 Skenovací elektronová mikroskopie u druhu *Mytilus edulis* – vzorek č. 106

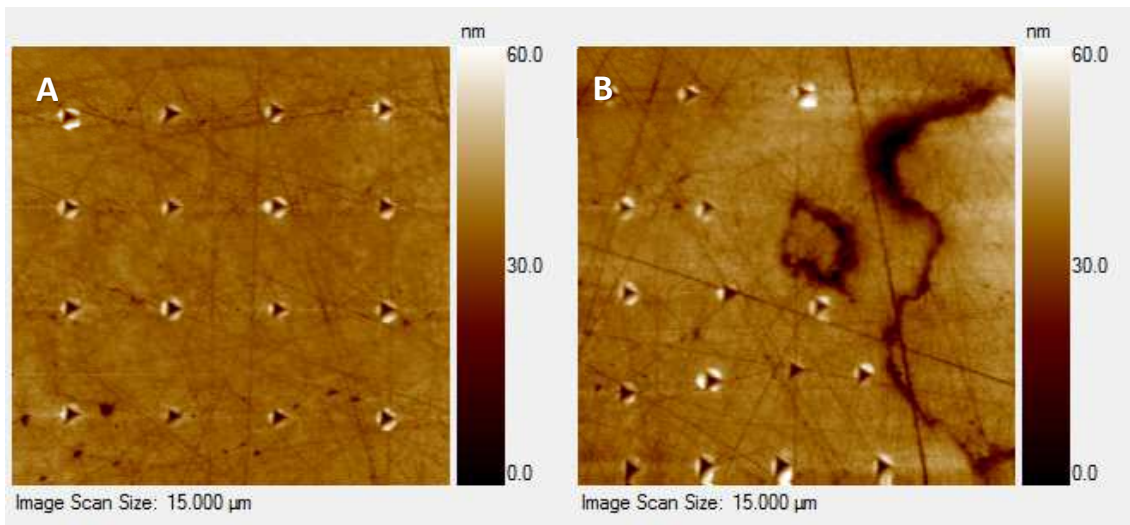


**Foto 4.21** – *Mytilus edulis* (vzorek č. 106) – SEM.

Snímky na fotografii 4.21 pořízené pomocí SEM dokládají obraz typického vrstvení destiček perleti druhu *M. edulis* (vzorek č. 106). Boční pohled detailně zobrazuje jednotlivé vrstvy perleti se zřetelnými destičkami, které mají přibližnou tloušťku 1,00 µm (snímek A). Kolmý pohled shora dokumentuje snímek B.

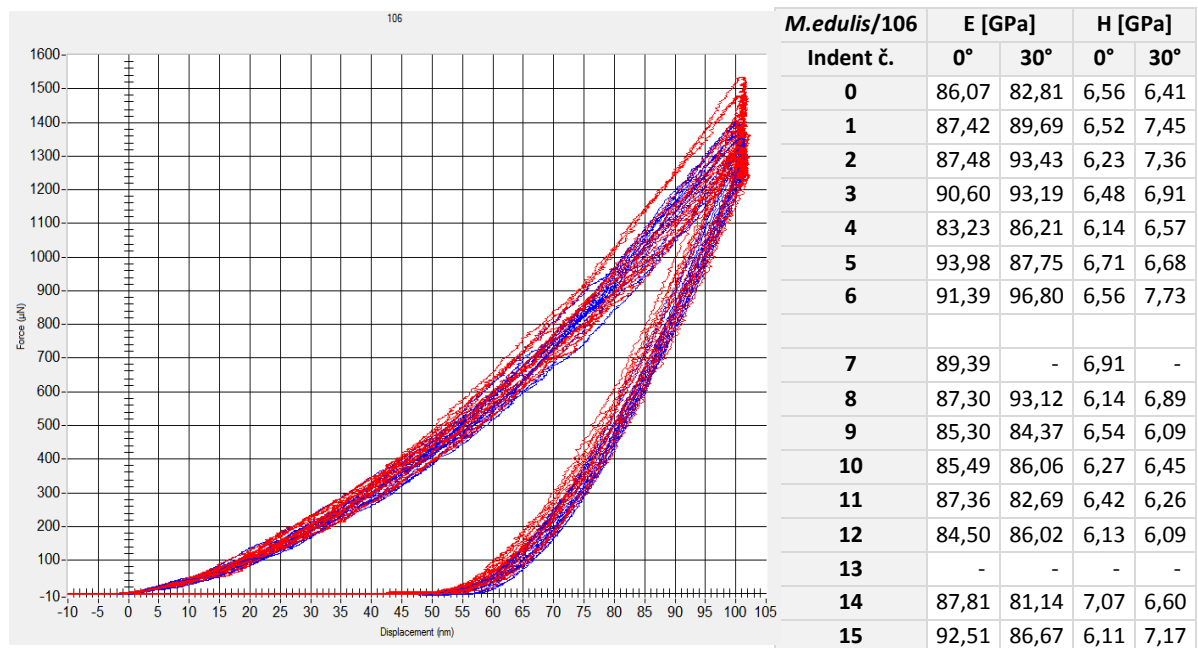


#### 4.3.6.4 Nanoindentční zkouška u druhu *Mytilus edulis* – vzorek č. 106



**Foto 4.22** - Sken povrchu perleti druhu *Mytilus edulis* (vzorek č. 106). Vzorek otočený o 0° (A). Vzorek otočený o 30° (B).

Na skenovaných plochách vzorku č. 106 (foto 4.22) nejsou pozorovatelné jednotlivé vrstvy perleti, tak jako je tomu například u fotografie 4.20. Snímek A (foto 4.22) zobrazuje přesné rozmístění indetnů na testované ploše v matici 5 x 5  $\mu\text{m}$ . Jednotlivým indentům odpovídají indentační křivky znázorněné na obrázku 4.18.



**Obrázek 4.18** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Mytilus edulis* (vzorek č. 106). Modré křivky – 0°, červené křivky 30°.

Graf indentačních křivek (obrázek 4.18) ukazuje, že pro dosažení maximální stanovené hloubky ( $h_{\text{max}} < 100 \text{ nm}$ ) byla při testování vzorku č. 106 (*M. edulis*) aplikovaná síla v rozmezí hodnot 1 240 – 1 540  $\mu\text{N}$ . Nejvyšší hodnoty zatěžovací síly dosáhl vzorek s rotací 30° (tj. červená křivka). Celkově je graf indentačních křivek kompaktnější, což může být zdůvodněno například minimálním výskytem odchylek.

Vypočítané hodnoty sledovaných veličin (E a H) u vzorku č. 106 naznačují, že rotace testovaného vzorku nemá vliv na vybrané mikromechanické vlastnosti testovaného materiálu, který vykazuje téměř stejné hodnoty.

#### 4.3.7 *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819

##### 4.3.7.1 Skenovací elektronová mikroskopie

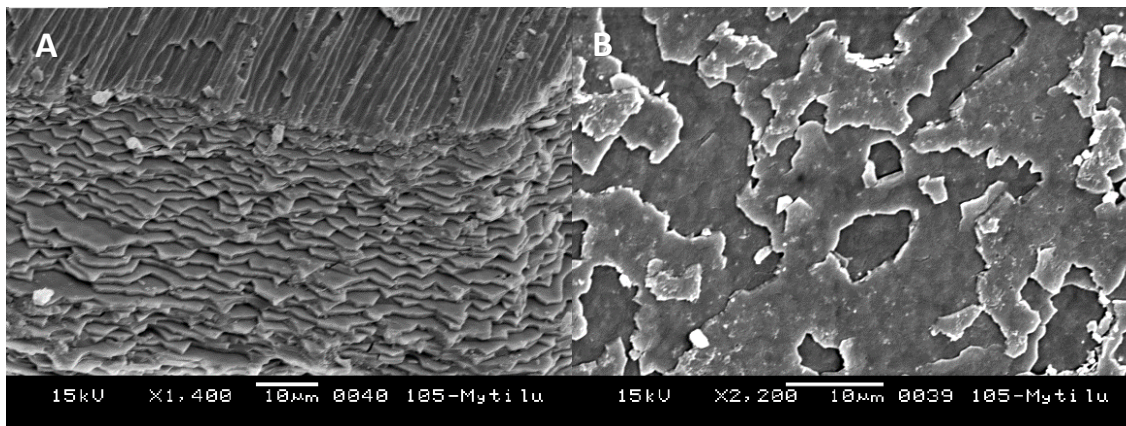


Foto 4.23 – *Mytilus galloprovincialis* (vzorek č. 105) – SEM.

Vnitřní strukturu perleti druhu *M. galloprovincialis* zobrazuje snímek A a B (foto 4.23). Snímek A dokumentuje rozhraní perleti bezprostředně pod prizmatickou vrstvou při pohledu shora. Perleťová vrstva je tvořena množstvím těsně na sebe doléhajících aragonitových destiček s průměrnou tloušťkou 1,25 µm. Snímek B je pohledem na perleťovou vrstvu v pohledu kolmém k povrchu schránky.

##### 4.3.7.2 Nanoindentační zkouška

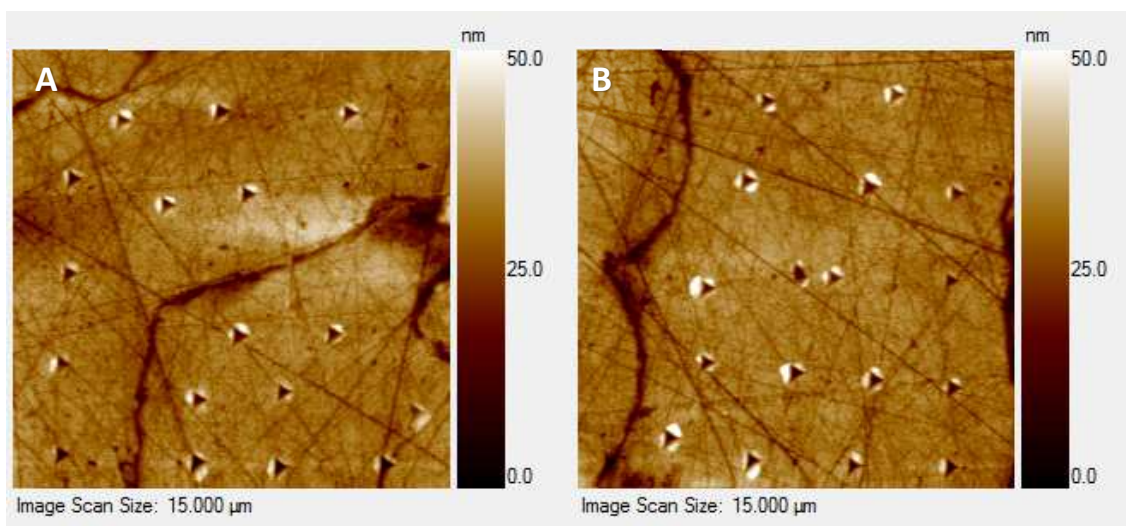
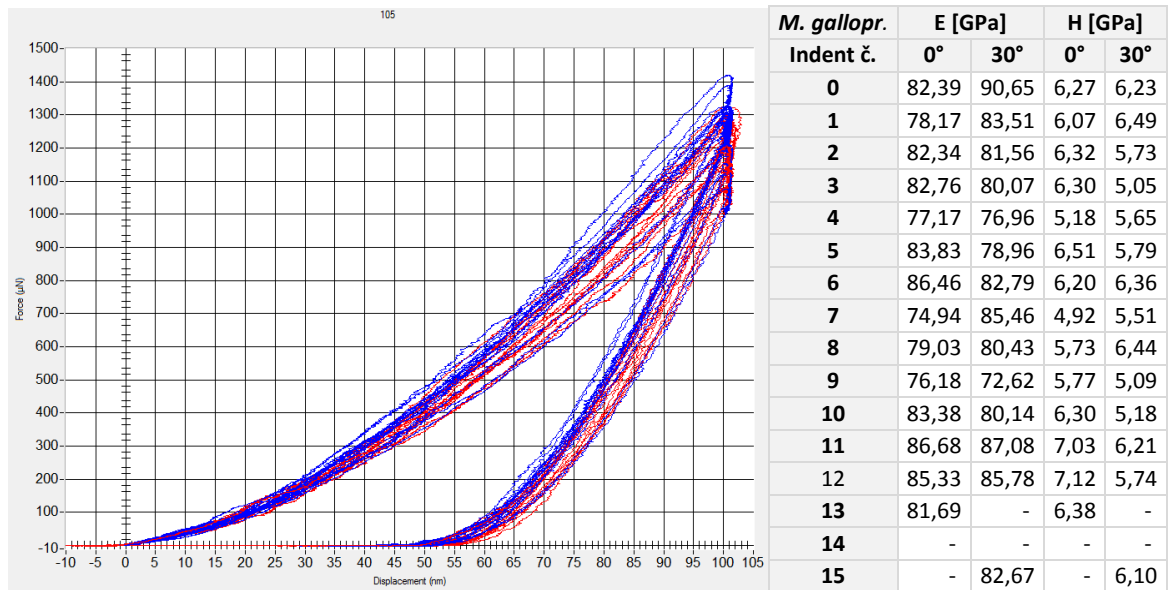


Foto 4.24 - Sken povrchu perleti druhu *Mytilus galloprovincialis* (vzorek č. 105). Vzorek otočený o 0° (A). Vzorek otočený o 30° (B).

Ze snímků pořízených po nanoindentačním měření (foto 4.24) je patrná nepravidelnost a nerovnost v rozhraní lamel, což muselo být zohledněno při umísťování indetoru. Tomu také odpovídá

nepravidelné rozmístění indentů, které korespondují s jednotlivými indentačními křivkami na obrázku 4.19.



**Obrázek 4.19** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Mytilus galloprovincialis* (vzorek č. 105). Modré křivky – 0°, červené křivky 30°.

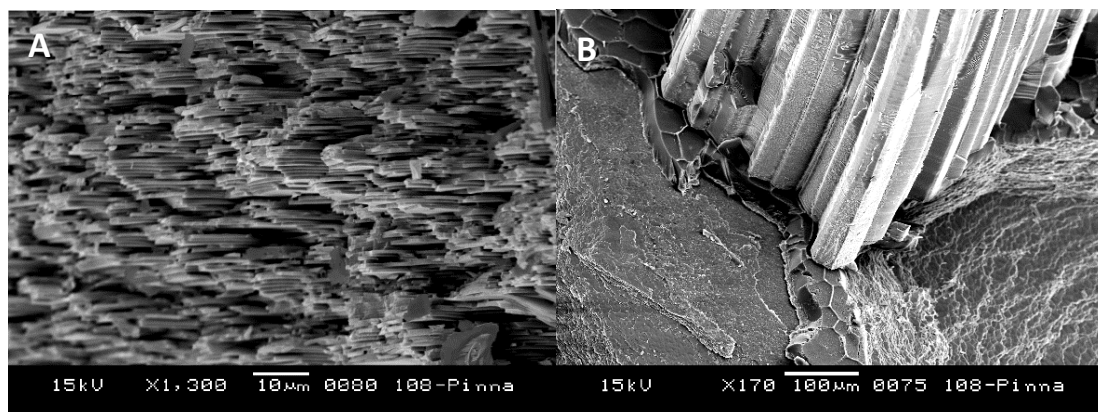
Z grafického zobrazení zatěžovací síly v závislosti na hloubce vpichu (obrázek 4.19) je čitelný poměrně velký rozptyl hodnot zatěžovací síly ( $P$ ), které dosáhly minimální hodnoty 1 080  $\mu\text{N}$  a maximální hodnoty 1 420  $\mu\text{N}$  (vzorek s rotací 0°). Minimální hodnoty byly zaznamenány u vzorků s oběma rotacemi. Při stanovené fixní hloubce ( $h_{\text{max}}$ ) 100 nm se hodnota aplikované síly pohybovala v rozpětí od 1 080  $\mu\text{N}$  do 1 420  $\mu\text{N}$ .

Celkový pohled na jednotlivé křivky naznačuje jejich rovnoměrné rozložení, avšak vykazuje širší rozpětí naměřených hodnot, především u parametru aplikované síly ( $P$ ).

Graf indentačních křivek a numerický výpočet mikromechanických veličin nenaznačuje významné rozdíly z pohledu rotace testovaného materiálu. Rozdíl u sledovaných parametrů z pohledu rotace materiálu se pohybuje u každého sledovaného parametru v řádu desetin až jednotek dané hodnoty.

#### 4.3.8 *Pinna nobilis* Gmelin, 1791

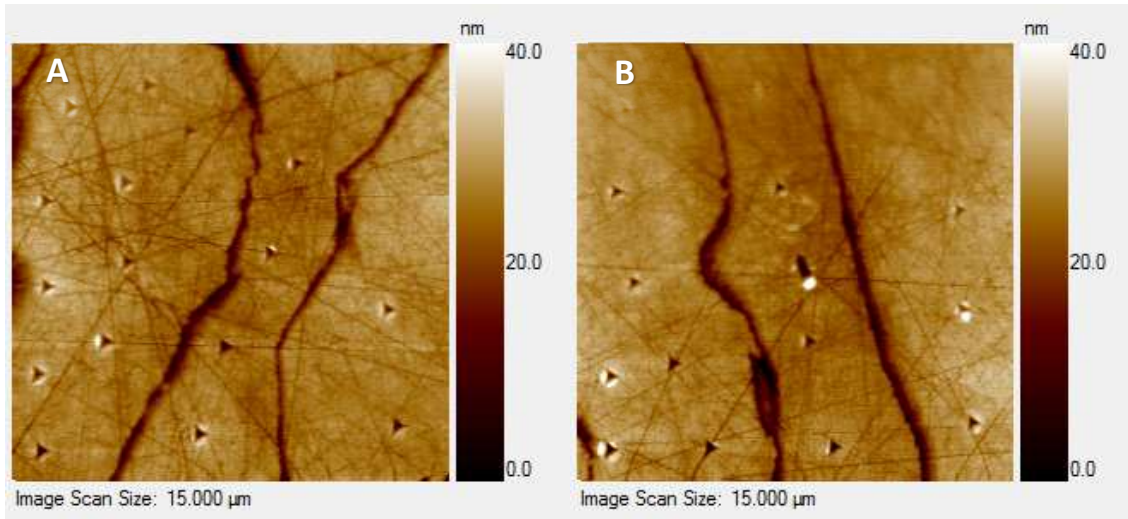
##### 4.3.8.1 Skenovací elektronová mikroskopie u druhu *Pinna nobilis* – vzorek č. 108



**Foto 4.25** – *Pinna nobilis* (vzorek č. 108) – SEM.

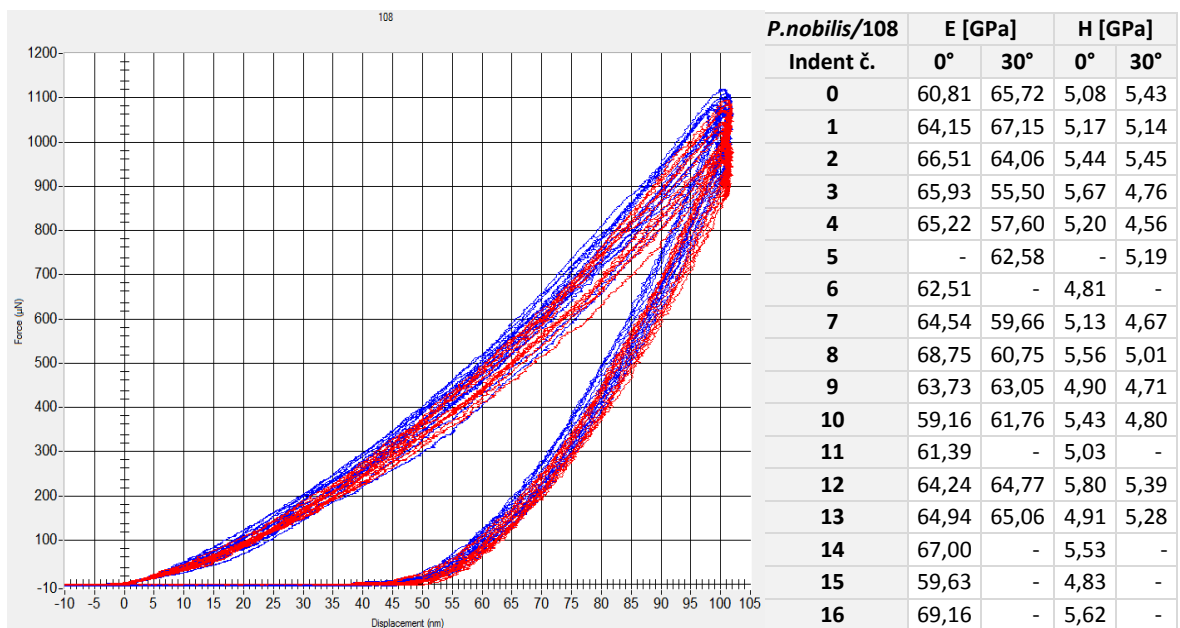
Snímky na fotografii 4.25 zobrazují detailní pohled na vrstvy destiček perleti druhu *P. nobilis* vzorku č. 108. Charakteristická struktura perleťové vrstvy, jejíž jednotlivé destičky jsou oproti předchozím druhům tenčí s průměrnou tloušťkou 0,5  $\mu\text{m}$ , je zachycena v bočním pohledu (snímek A). Snímek B zachycuje pohled shora na uspořádání všech vrstev se zřetelným rozhraním mezi jednotlivými vrstvami.

#### 4.3.8.2 Nanoindentační zkouška u druhu *Pinna nobilis* – vzorek č. 108



**Foto 4.26** – Sken povrchu perleti druhu *Pinna nobilis* (vzorek č. 108). Vzorek otočený o 0° (A). Vzorek otočený o 30° (B).

Skenovaná plocha perleti druhu *P. nobilis* u vzorku č. 108 dokumentuje jednotlivé indenty cíleně umístěné do jednotlivých vrstev perleti, tak aby se eliminovala možnost umístění indentu do rozhraní mezi lamelami, což by mohlo zkreslit výsledek měření. Na snímcích jsou zřetelné perleťové vrstvy s indenty, kterým odpovídají jednotlivé indentační křivky na obrázku 4.20.



**Obrázek 4.20** – Graf indentačních křivek perleti druhu *Pinna nobilis* (vzorek č. 108). Modré křivky – 0°, červené křivky 30°.

Při stanovené maximální hloubce ( $h_{\max} < 100 \text{ nm}$ ) bylo při měření perleti vzorku č. 108 u veličiny síly dosaženo maximální hodnoty  $1\,120 \mu\text{N}$  a minimální hodnoty  $900 \mu\text{N}$ . Těto hodnoty dosáhl indent základního postavení (tj. při rotaci  $0^\circ$ ). Graf indentačních křivek nasvědčuje, že jednotlivá měření jsou v daném rozpětí hodnot z pohledu rotace, rozloženy téměř rovnoměrně s užším rozptylem hodnot.

Vypočítané hodnoty elastického modulu a mikrotvrdosti perleti pro daný druh se zdají být téměř shodné při porovnání s rotací vzorku.

#### 4.3.8.3 Skenovací elektronová mikroskopie u druhu *Pinna nobilis* – vzorek č. 109

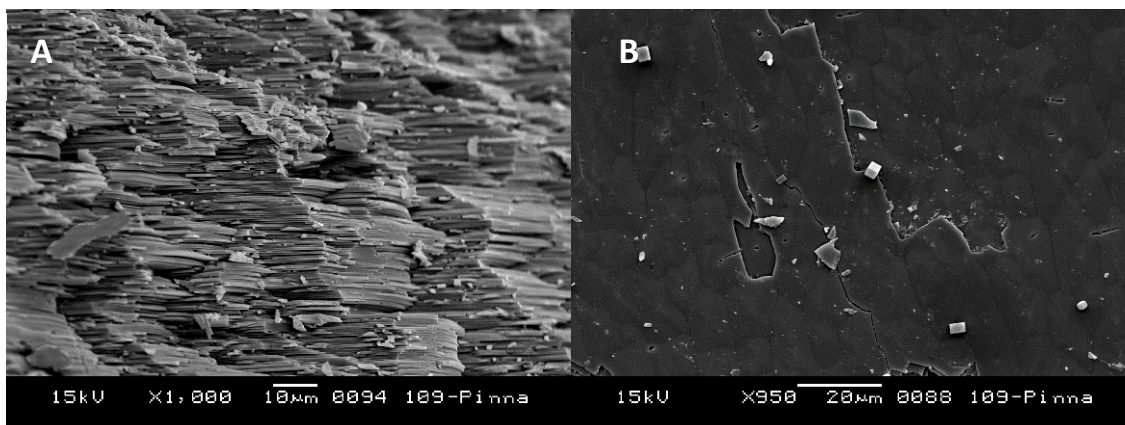


Foto 4.27 – *Pinna nobilis* (vzorek č. 109) – SEM.

Fotografie 4.27 dokumentuje dva pohledy na vnitřní vrstvy perleti. Boční pohled na vrstvu perleti tvořenou velmi tenkými destičkami (přibližně  $0,5 \mu\text{m}$ ) (snímek A). Pohled kolmo k povrchu schránky ukazuje na nepravidelné destičky perleti v blízkosti prizmatické vrstvy (snímek B).

#### 4.3.8.4 Nanoindentační zkouška u druhu *Pinna nobilis* – vzorek č. 109

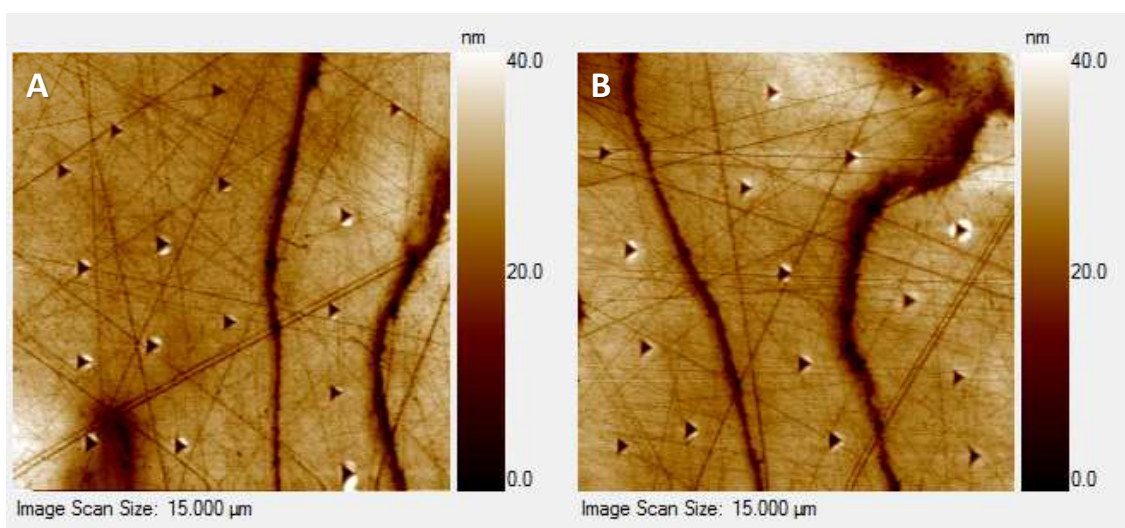
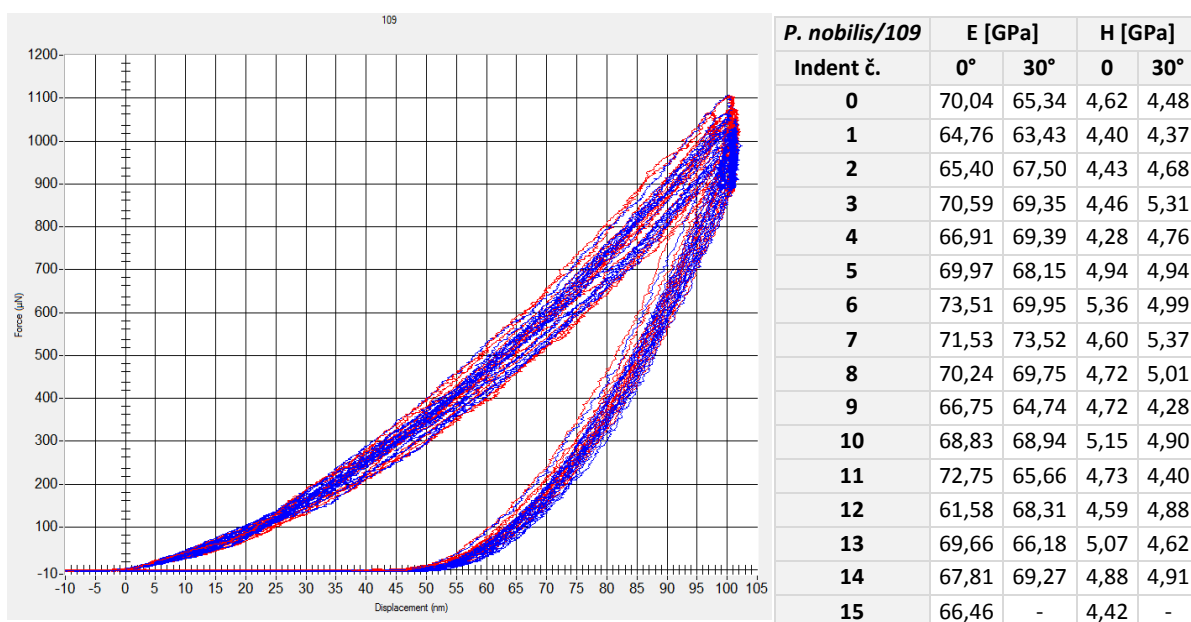


Foto 4.28 – Sken povrchu perleti druhu *Pinna nobilis* (vzorek č. 109). Vzorek otočený o  $0^\circ$  (A). Vzorek otočený o  $30^\circ$  (B).

Snímky pořízené po testování perleti vzorku č. 109 (druh *P. nobilis*) podávají jasný pohled na umístění jednotlivých indentů pro rotaci 0° a 30° (foto 4.28). Na snímcích jsou zřetelná rozhraní vrstev, která bylo nutné zohlednit při umísťování indentu do testovaných ploch.

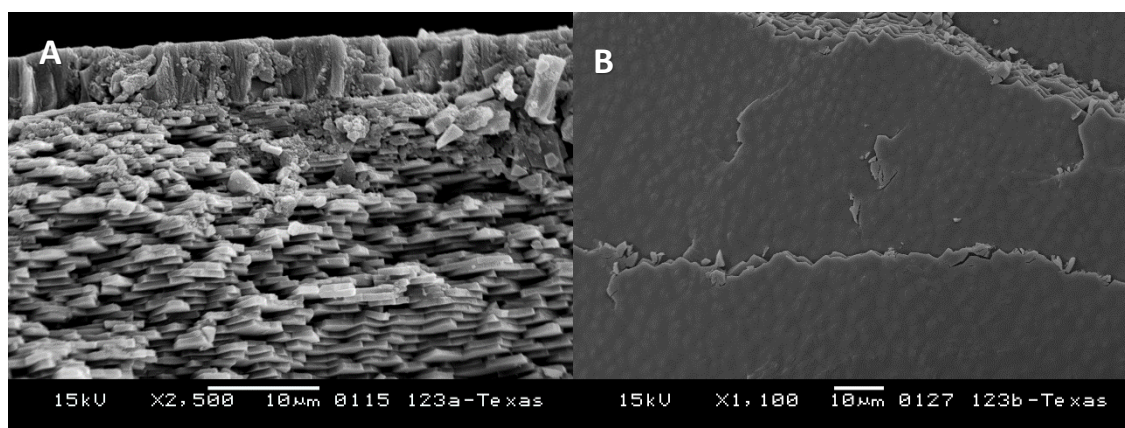


**Obrázek 4.21** – Graf indentačních křivek perleti druhu *Pinna nobilis* (vzorek č. 109). Modré křivky – 0°, červené křivky 30°.

Grafické zhodnocení měření perleti na vzorku č. 109 naznačuje, že jednotlivá měření jsou v daném rozptylu hodnot z pohledu rotace, rozloženy téměř rovnoměrně a to jak ve fázi zatížení materiálu, tak ve fázi odlehčení (obrázek 4.21). Žádná z křivek se svými hodnotami výrazně nevychyluje z daného rozpětí. Při stanovené maximální hloubce ( $h_{max} < 100$  nm) bylo při nanoindentačním měření dosaženo u veličiny síly maxima ve výši 1 100  $\mu$ N, což je o 100  $\mu$ N aplikované síly více než u vzorku č. 108. Této maximální hodnoty síly dosáhly shodně dva indenty s rozdílnou rotací. Nejnižší hodnotou síly aplikované pro dosažení maximální hloubky je 900  $\mu$ N. Hodnoty vypočítané pro veličinu elastického modulu a mikrotvrdosti vzorku č. 109, které odpovídají naměřeným hodnotám pro rotaci 0° a 30°, vykazují téměř shodné hodnoty pro obě rotace.

### 4.3.9 *Quadrula apiculata* Rafinesque, 1820

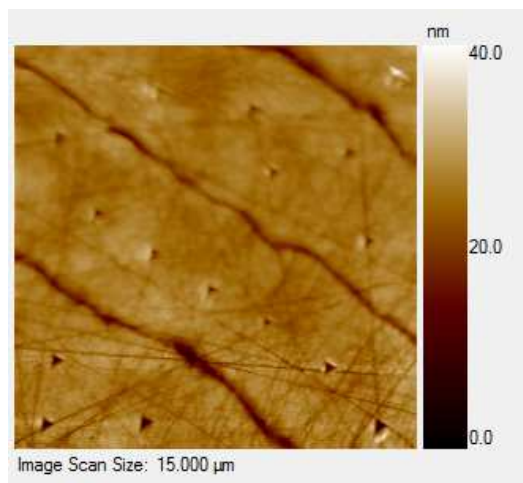
#### 4.3.9.1 Skenovací elektronová mikroskopie



**Foto 4.29** – *Quadrula apiculata* (vzorek č. 123) – SEM.

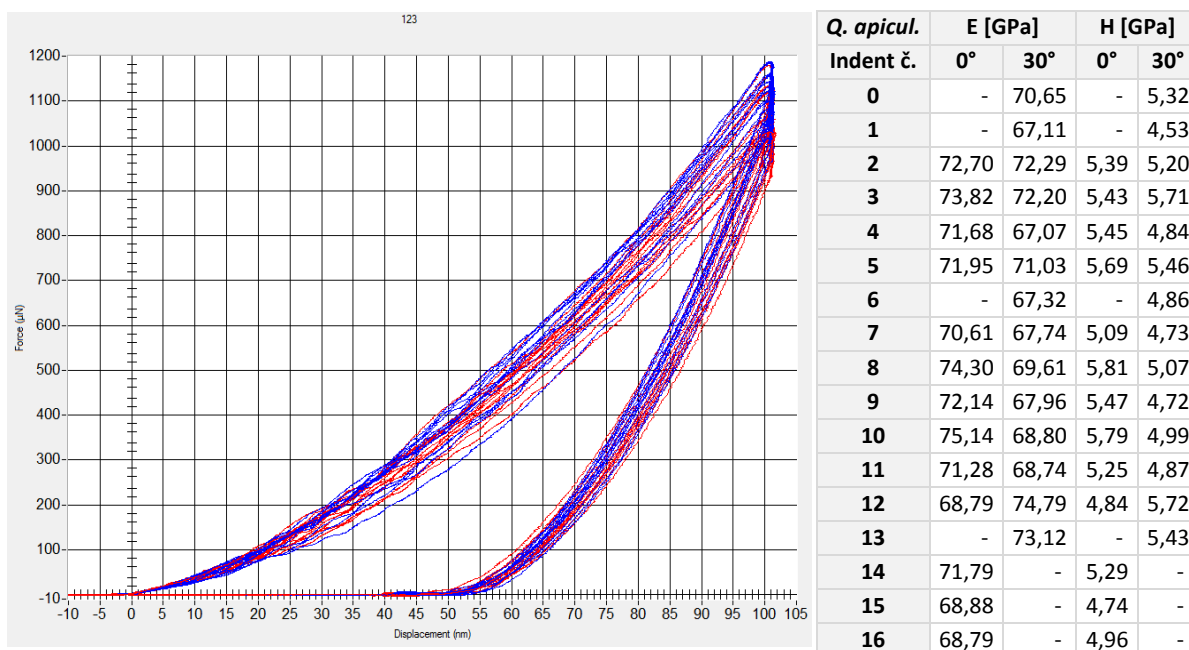
Snímky pořízené pomocí SEM (foto 4.29) zobrazují charakteristické uspořádání perleťové vrstvy (jednotlivých aragonitových destiček) u vnějšího okraje perleťové vrstvy (snímek A) a pohled na vrstvu perleti kolmo k povrchu schránky (snímek B).

#### 4.3.9.2 Nanoindentační zkuška



**Foto 4.30** - Sken povrchu perleti druhu *Quadrula apiculata* (vzorek č. 123). Vzorek otočený o 30°.

Na skenované ploše testovaného vzorku jsou viditelné jednotlivé lamely perleti s přesně a pravidelně rozmístěnými indenty. Vzorek s rotací 0° nebyl při měření uložen.



**Obrázek 4.22** - Graf indentačních křivek perleti druhu *Quadrula apiculata* (vzorek č. 123). Modré křivky – 0°, červené křivky 30°.

Grafickým záznamem nanoindentačního měření je síť křivek zobrazená na obrázku 4.22. Tvar těchto křivek vypovídá o malém rozdílu zaznamenaných hodnot veličiny síly v závislosti na hloubce vpichu. Zdá se, že po odlehčení indentoru, kdy se povrch zatěžovaného materiálu vrací zpět, jsou graficky znázorněné křivky kompaktnější a nevykazují tak široké rozpětí hodnot. Celkově má graf celistvý charakter. Maximální hodnota aplikované síly dosáhla 1 180 μN (rotace vzorku 0° a 30°).

Z měřených dat byly vypočteny hodnoty mikromechanických veličin ( $E$  a  $H$ ), které se zdají být téměř shodné z pohledu rotace testovaného vzorku, což podporuje i grafické znázornění indentačních křivek.



## 5 DISKUZE K VÝSLEDKŮM

### 5.1 Porovnání elastického modulu a mikrotvrlosti dvou odlišných mikrostruktur, kalcitové a aragonitové, u vybraných měkkýšů žijících ve výrazně odlišných fyzikálních podmínkách – *modelová studie*

Výsledky modelové studie vlivu prostředí na mikromechanické vlastnosti schránek měkkýšů již byly publikovány (Hrabánková a kol. 2013) ve formě krátké publikace (short paper) v impaktovaném časopise (*Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, IF pro rok 2013: 1.793) u příležitosti mezinárodního kongresu (Congres de la Societe de Biomecanique, viz [http://dircom.univ-amu.fr/sites/dircom.univ-amu.fr/files/cp\\_congres\\_biomecanique\\_040913.pdf](http://dircom.univ-amu.fr/sites/dircom.univ-amu.fr/files/cp_congres_biomecanique_040913.pdf)). Rozsah publikovaných prací v oboru materiálového inženýrství je obvykle malý a publikace jsou úzce zaměřeny na řešení konkrétní otázky bez rozsáhlých diskuzí, což je dáno především vysokým počtem publikací v daném oboru (např. jen v oboru biomechaniky bylo v roce 2014 publikováno 2 379 článků s IF – viz heslo „Biomechanics“ na webových stránkách Web of Science). Tato skutečnost a obvyklý charakter publikací (short paper) neumožnily zahrnout do dané publikace širší diskusi, objasňující zdůvodnění výběru zkoumaných druhů, detailní metodický postup a některé další rozvinutější výsledky či poznatky. Z tohoto důvodu uvádím v následující části stručný komentář k výběru zkoumaných druhů a k výsledkům modelového experimentu.

#### ***Komentář k článku Hrabánková a kol. (2013)***

Měkkýši v průběhu své dlouhé evoluce obsadili téměř všechna prostředí. Z původního mořského prostředí se přes brakické vody dostali do sladkovodního prostředí a následně již v období prvohor došlo k adaptaci na terestrické prostředí, kde měkkýši obsadili téměř všechna prostředí od aridních oblastí až do tropických deštných pralesů, od nížin do vysokých hor. Tato fakta ukazují, že existují desítky či stovky různých biotických i abiotických faktorů, které svým působením mohou ovlivňovat mikromechanické vlastnosti schránek měkkýšů. Studium vlivu prostředí na mikromechanické vlastnosti schránek měkkýšů omezuje jak časová, tak finanční náročnost nanoindentčních zkoušek pouze na výběr jednoho vhodného modelového experimentu.

Při výběru modelové studie bylo vhodnější zaměřit se na abiotické parametry a mořské prostředí, neboť abiotické faktory mořského prostředí jsou z hlediska změn podstatně konzervativnější, než podmínky prostředí terestrického.

**Z analýzy možných abiotických parametrů charakterizujících mořské prostředí byl vybrán hydrostatický tlak a to z následujících důvodů:**

- i. hydrostatický tlak je veličina stálá v čase, kterou lze z lokalizace prostředí výskytu druhu snadno určit a dosahuje v mořském prostředí extrémního rozsahu hodnot;
- ii. obě modifikace uhličitanu vápenatého (kalcit a aragonit), vyskytující se ve schránkách měkkýšů, jsou odlišně závislé na tlaku. Kalcit je za normálních podmínek v mořském prostředí stabilní fází oproti aragonitu, který je metastabilní. To znamená, že se zvyšujícím se tlakem by mohl být aragonit stabilnější. Pole stability aragonitu však nemůže být v moři dosaženo, neboť hydrostatický tlak nemůže dosáhnout tak vysokých hodnot.

Studium vlivu hydrostatického tlaku na mikromechanické vlastnosti umožňuje analyzovat projev tlaku na kalcitové i aragonitové struktury, které by se mohly z termodynamických důvodů chovat odlišně.

### Výběr modelové skupiny pro studium vlivu hydrostatického tlaku na mikromechanické vlastnosti

Vhodná modelová skupina měkkýšů pro tento experiment by měla splňovat následující kritéria:

- i. druhy modelové skupiny by měli patřit do jedné fylogenetické linie;
- ii. druhy modelové skupiny musí žít od intertidální zóny do velmi hlubokého moře;
- iii. druhy modelové skupiny musí ve svých schránkách současně produkovat kalcit i aragonit.

Při výběru modelové skupiny je nejvíce limitujícím faktorem kritérium zóny výskytu druhu, neboť z řady mnoha mořských měkkýšů se jen malá část druhů jedné fylogenetické linie vyskytuje v širokém rozpětí hloubky. Vezmeme-li v úvahu i kritérium přítomnosti kalcitu a aragonitu ve schránce, je skupina Patellogastropoda jedinou vhodnou skupinou.

### Patellogastropoda

Všichni žijící patellogastropodi jsou přílipky se schránkou kápoitého tvaru dosahující velikosti od několika milimetrů do přibližně 20 cm. Tento tvar schránky se však vyvinul nezávisle téměř ve všech hlavních liniích plžů. Z tohoto důvodu je tvar schránky jen těžko použitelný pro taxonomické členění patellogastropodů. Zástupci této skupiny jsou výhradně mořští plži, vyskytující se jen velmi vzácně v brakických vodách (Lindberg 1990) a v blízkosti hydrotermálních průduchů a sirných vývěrů černých komínů (McLean 1990).

Patellogastropodi jsou vývojově velmi starou skupinou (Frýda 2012) s nejsložitější strukturou schránek ze všech měkkýšů (MacClintock 1967; Fuchigami a Sasaki 2005). Otázka, zda je složitá struktura schránek patellogastropodů reakcí na podmínky života v přílivoodlivové zóně, či je to původní znak této starobylé skupiny, je stále nezodpovězena.

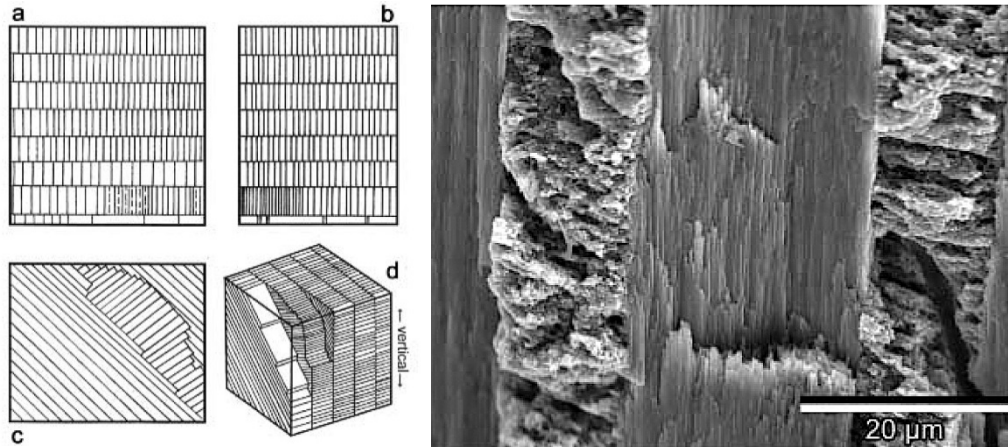
Patellogastropodi mají poměrně velké a silné schránky (průměrná velikost všech schránek plžů je jen několik milimetrů), což značně ulehčuje přípravu vzorků ke studiu mikromechanických vlastností. Pro tuto studii byla limitujícím faktorem dostupnost vzorků schránek hlubokomořských druhů. Pro studii byly získány díky laskavosti japonského zoologa Takenori Sasakiho dva hlubokovodní druhy. Tímto byl zpětně ovlivněn i výběr mělkovodních patellogastropodů z intertidální zóny.

Cílem modelové studie bylo použít takové druhy, které mají stejnou mikrostrukturu studovaných kalcitových či aragonitových vrstev tvořících jejich schránku. Struktura vzácných (tj. těžko dostupných) hlubokovodních druhů tedy omezila výběr možných druhů z mělkovodního prostředí. Do experimentu byly zařazeny následující druhy podle výše uvedených kritérií (detailní charakteristika druhů je uvedena v kapitole 3.1):

**Tabulka 5.1** – Vybraní zástupci skupiny Patellogastropoda.

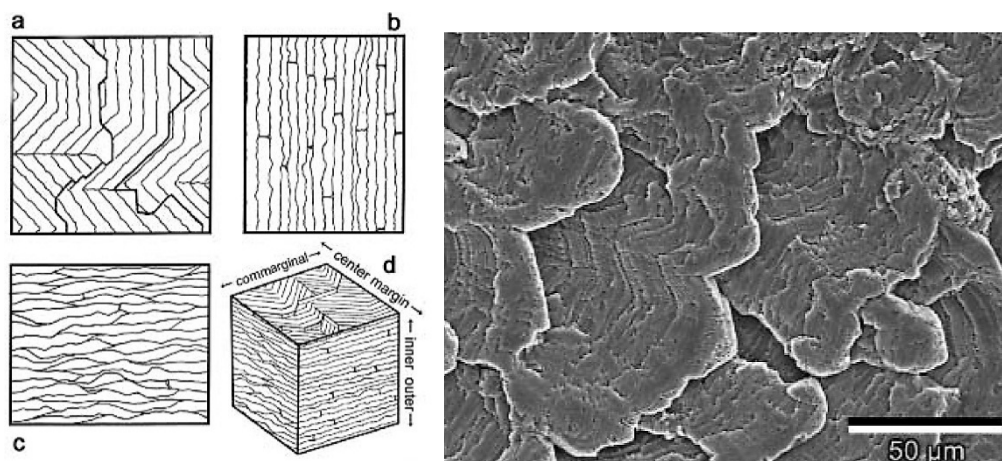
Studovaný druh	Hloubka	Studovaná vrstva
<i>Nipponacmea concinna</i> (Lischke, 1870)	5 m	aragonitová cCL
<i>Limalepeta lima</i> (Dall, 1918)	50 - 100 m	aragonitová cCL
<i>Limalepeta lima</i> (Dall, 1918)	50 - 100 m	kalcitová SF
<i>Pectinodonta orientalis</i> Schepman, 1908	1 092 - 1 094 m	kalcitová SF
<i>Pectinodonta orientalis</i> Schepman, 1908	1 092 - 1 094 m	aragonitová cCL

Nanoindentační zkoušky byly podrobeny tři vzorky schránek druhů *Nipponacmea concinna*, *Limalepeta lima* a *Pectinodonta orientalis* s identickou aragonitovou cCL strukturou – označovanou v anglicky psaných publikacích jako “concentric Crossed Lamellar structure” (obrázek 5.1), která je první vrstvou nad myostrakem (Fuchigami a Sasaki 2005).



**Obrázek 5.1** - Aragonitová cCL mikrostruktura (“concentric Crossed Lamellar structure”). Vlevo je tato struktura schématicky znázorněna v různých řezech: a) řez paralelní s vnitřním povrchem, b) řez paralelní s okrajem schránky, c) radiální řez a d) šikmý 3D pohled. Vpravo je snímek z elektronového mikroskopu této struktury (Fuchigami a Sasaki 2005).

K výzkumu kalcitové vrstvy mohly být použity pouze dva vzorky, *Limalepeta lima* a *Pectinodonta orientalis*, s kalcitovou SF mikrostrukturou – označovanou v anglicky psaných publikacích jako “semifoliated structure;” (obrázek 5.2), která se nachází v pozici druhé vrstvy nad myostrakem (Fuchigami a Sasaki 2005). U třetího zkoumaného druhu, *Nipponacmea concinna*, se tato vrstva nevyskytuje.



**Obrázek 5.2** - Kalcitová SF mikrostruktura (“Semifoliated structure”). Vlevo je tato struktura schématicky znázorněna v různých řezech: a) řez paralelní s vnitřním povrchem, b) řez paralelní s okrajem schránky, c) radiální řez a d) šikmý 3D pohled. Vpravo je snímek z elektronového mikroskopu této struktury (Fuchigami a Sasaki 2005).

Nanoindentační zkoušky byly provedeny u všech druhů kolmo k sagitální rovině (tedy kolmo na řez c) (obrázek 5.1 a obrázek 5.2). Detaily přípravy vzorků, metodika nanoindentační zkoušky a měřená data jsou uvedena v kapitolách (3.2 Metody studia mikrostruktury schránek kmene Mollusca, str. 27;

4.1 Studium vlivu prostředí na mikromechanické vlastnosti, str. 36). V následující části je stručně uvedeno vyhodnocení měření a diskuze.

Na základě předchozí analýzy měření (viz popis měřených křivek v kapitole 4 Výsledky měření) byly pro následující statistickou analýzu vynechány hodnoty výrazně ovlivněné „pop-in“ efektem či měřené v místě s nevhodným povrchem. V následujících tabulkách jsou uvedeny základní statistické parametry dat použitých k další analýze.

### STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ MĚŘENÝCH HODNOT

V této kapitole jsou uvedeny výsledky statistického vyhodnocení nanoindentačních zkoušek pro oba typy testovaných vrstev, tj. aragonitovou a kalcitovou. Prvním provedeným statistickým testem je test normality pro ověření jedné z nutných podmínek následného použití některé z parametrických statistických metod.

**Tabulka 5.2** - Základní statistické parametry jednotlivých měření pro indentační zkoušky aragonitových vrstev.

ARAGONIT	Elastický modul - cCL mikrostruktura			Mikrotvrđost - cCL mikrostruktura		
	<i>Nipponacmea concinna</i>	<i>Limalepeta lima</i>	<i>Pectinodonta orientalis</i>	<i>Nipponacmea concinna</i>	<i>Limalepeta lima</i>	<i>Pectinodonta orientalis</i>
N	12	14	12	12	14	13
Min	80,88	78,67	75,80	3,76	3,72	3,72
Max	89,61	88,33	84,47	4,73	4,58	4,94
Mean	85,04	83,32	80,73	4,27	4,18	4,36
Median	85,44	83,14	81,27	4,25	4,13	4,45
25 prcnil	81,68	80,14	78,35	4,02	3,94	3,97
75 prcnil	87,91	87,18	82,61	4,58	4,44	4,72

**Tabulka 5.3** - Základní statistické parametry jednotlivých měření pro indentační zkoušky kalcitových vrstev.

KALCIT	Elastický modul - SF mikrostruktura		Mikrotvrđost - SF mikrostruktura	
	<i>Limalepeta lima</i>	<i>Pectinodonta orientalis</i>	<i>Limalepeta lima</i>	<i>Pectinodonta orientalis</i>
N	15	12	14	14
Min	69,04	74,49	3,94	3,74
Max	83,83	79,10	4,86	4,55
Mean	76,61	77,09	4,40	4,15
Median	76,02	77,43	4,42	4,23
25 prcnil	73,06	76,14	4,17	3,94
75 prcnil	80,27	78,54	4,56	4,31

### Shapiro-Wilkův test

Výsledky Shapiro-Wilkova testu jsou uvedeny v následujících tabulkách:

**Tabulka 5.4** – Výsledky Shapiro-Wilkova testu pro aragonitovou vrstvu.

ARAGONIT	Elastický modul - cCL mikrostruktura			Mikrotvrđost - cCL mikrostruktura		
	<i>Nipponacmea concinna</i>	<i>Limalepeta lima</i>	<i>Pectinodonta orientalis</i>	<i>Nipponacmea concinna</i>	<i>Limalepeta lima</i>	<i>Pectinodonta orientalis</i>
N	12	14	12	12	14	13
Shapiro-Wilk	0,93	0,92	0,94	0,95	0,94	0,92
p (normal)	0,34	0,20	0,55	0,71	0,38	0,26

**Tabulka 5.5** - Výsledky Shapiro-Wilkova testu pro kalcitovou vrstvu.

KALCIT	Elastický modul - SF mikrostruktura		Mikrotvrđost - SF mikrostruktura	
	<i>Limalepeta lima</i>	<i>Pectinodonta orientalis</i>	<i>Limalepeta lima</i>	<i>Pectinodonta orientalis</i>
N	15	12	14	14
Shapiro-Wilk	0,97	0,93	0,96	0,95
p (normal)	0,88	0,34	0,64	0,57

Výsledky Shapiro-Wilkova testu ukázaly, že v žádném z provedených měření nemůžeme odmítnout nulovou hypotézu o normálním rozdělení měřených hodnot ( $p > 0,05$ ), a mohou být tedy použity statistické metody vyžadující normální rozdělení hodnocené proměnné.

V experimentu posuzujeme současně několik nezávislých měření a testujeme vliv jednoho faktoru. Vhodnou statistickou metodou je analýza variace (Analysis of variance = ANOVA), která hodnotí shodu středních hodnot jednotlivých souborů měření (v tomto případě shodu průměrů). Je tedy možno použít analýzu variance, a to pro jeden kategoriální faktor (pro tento případ hloubku), tzv. jednocestnou ANOVu. Pro použití této metody musí být splněny následující předpoklady – nezávislost měření, normalita a podobnost rozptylů (homoskedasticita). První dva předpoklady jsou splněny. Shapiro-Wilkův test je velmi silný a robustnost ANOVy k narušení normality stoupá s počtem pozorování ve skupině. Významným předpokladem ANOVy je podobnost rozptylů (tj. ověření homoskedasticity), kterou ověříme použitím Leveneova testu. Leveneův test lze použít k testování, že každá skupina nezávislé proměnné má podobný rozptyl. Je-li Leveneova statistika významná na úrovni 0,05 (tedy  $p < 0,05$ ), zamítáme nulovou hypotézu, že skupiny mají podobné hodnoty rozptylů a ANOVu nemůžeme použít. V takovém případě podobnost středních hodnot (např. mediánů) testujeme Welchovým testem nebo neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem.

## ANOVA

### a) Elastický modul – aragonitová cCL mikrostruktura

**Tabulka 5.6** – Výsledky Leveneova a Welchova testu a ANOVy pro elastický modul aragonitové cCL mikrostruktury

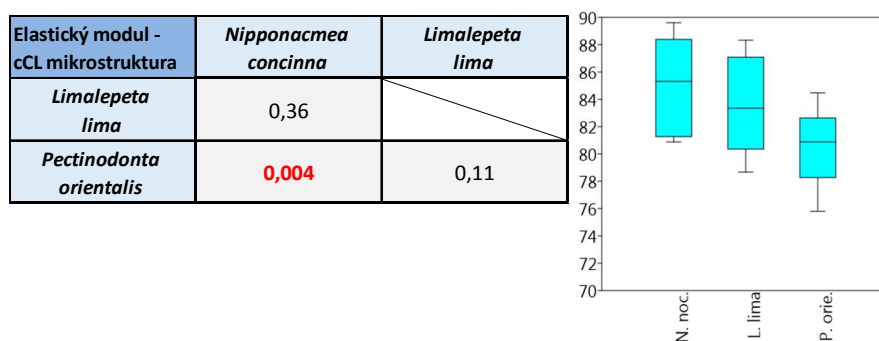
Elastický modul - cCL mikrostruktura					
Source of Variation:	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	113,023	2	56,511	5,779	0,0068
Within groups:	342,269	35	9,779		
<b>Total:</b>	<b>455,292</b>	37			
Levene's test for homogeneity of variance, from means:	p (same):	0,54			
<b>Welch F test in the case of unequal variances:</b>	<b>F = 6,49; df = 23,21; p = 0,0058</b>				

Uvedené p-hodnoty Leveneova testu jsou výrazně nad úrovní 0,05 a nemůžeme tedy zamítnout nulovou hypotézu, že testované proměnné mají stejný rozptyl. Na druhou stranu p-hodnota ANOVy je výrazně nižší než 0,05 a musíme tedy zamítnout nulovou hypotézu, že skupiny mají stejnou střední hodnotu (průměr). Stejně tak i Welchův test. Test ANOVA však nehodnotí, které skupiny se liší od ostatních, nýbrž pouze potvrzuje, že zde existuje statisticky významný rozdíl. Pro zjištění rozdílu

musíme provést *post hoc* test. Pro toto statistické šetření použijeme Tukeyův test („Tukey’s pairwise post-hoc test“), který srovnává vždy dva páry proměnných a je obdobou t-testu. Tento test patří k nejpoužívanějším a je považován za jeden z nejlepších testů z hlediska vhodného kompromisu síly testu a možnosti výskytu chyby prvního druhu (Dytham 2011).

### Tukeyův test

**Tabulka 5.7** - Výsledky Tukeyova testu (p-hodnoty) a box plot pro hodnoty elastického modulu aragonitové cCL mikrostruktury u druhů *Nipponacmea concinna* (N. noc.), *Limalepeta lima* (L. lima) a *Pectinodonta orientalis* (P. orie.).



Závěrem lze říci, že výsledky ANOVy a Tukeyova testu prokázaly, že existuje statisticky významný rozdíl mezi průměrnými hodnotami elastického modulu aragonitové cCL mikrostruktury mezi druhy *Nipponacmea concinna* a *Pectinodonta orientalis*.

### **b) Mikrotvrdomost – aragonitová cCL mikrostruktura**

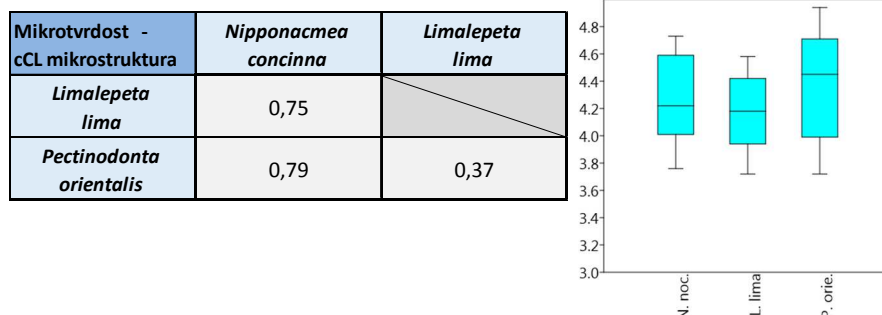
**Tabulka 5.8** - Výsledky Leveneova a Welchova testu a ANOVy pro mikrotvrdomost aragonitové cCL mikrostruktury

Mikrotvrdomost - cCL mikrostruktura					
Source of Variation:	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	0,219	2	0,109	0,980	0,385
Within groups:	4,014	36	0,111		
<b>Total:</b>	<b>4,232</b>	<b>38</b>			
Levene’s test for homogeneity of variance, from means	p (same):	0,075			
<b>Welch F test in the case of unequal variances:</b>	<b>F = 0,93; df = 22,99; p = 0,096</b>				

Uvedené p-hodnoty Leveneova testu jsou nad úrovní 0,05 a nemůžeme tedy odmítnout nulovou hypotézu, že testované proměnné mají různý rozptyl. Rovněž p-hodnota ANOVy je výrazně vyšší než 0,05 a nemůžeme tedy ani zde odmítnout nulovou hypotézu, že skupiny mají stejnou střední hodnotu (průměr) mikrotvrdomosti. Test ANOVy potvrzuje i *post hoc* Tukeyův test (viz tabulka 5.9).

## Tukeyův test

**Tabulka 5.9** - Výsledky Tukeyova testu (p-hodnoty) a box plot pro hodnoty mikrotvrlosti aragonitové cCL mikrostruktury u druhů *Nipponacmea concinna* (N. noc.), *Limalepeta lima* (L. lima) a *Pectinodonta orientalis* (P. orie.).



Závěrem lze říci, že výsledky ANOVy a Tukeyova testu prokázaly, že neexistuje statisticky významný rozdíl v mikrotvrlosti aragonitové cCL mikrostruktury u druhů *Nipponacmea concinna*, *Limalepeta lima* a *Pectinodonta orientalis*.

### **c) Elastický modul – kalcitová SF mikrostruktura**

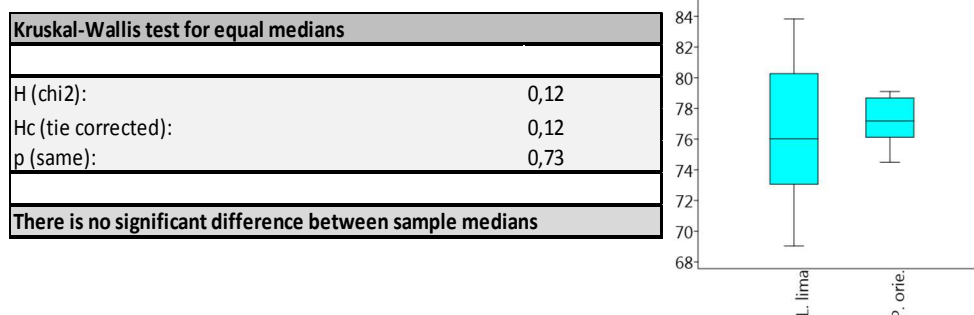
**Tabulka 5.10** - Výsledky Leveneova a Welchova testu a ANOVy pro elastický modul kalcitové SF mikrostruktury

Elastický modul - SF mikrostruktura					
Source of Variation:	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	1,54	1	1,54	0,13	0,72
Within groups:	288,22	25	1237749		
<b>Total:</b>	<b>289,76</b>	<b>26</b>			
Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	<b>0,0021</b>			
Welch F test in the case of unequal variances:	F = 0,16; df = 18,42; p = 0,69				

Výsledné p-hodnoty Leveneova testu jsou výrazně pod úrovní 0,05 a musíme tedy odmítnout nulovou hypotézu, že testované proměnné mají podobný rozptyl. Tímto výsledkem dochází k situaci, že analyzovaná měření nesplňují předpoklady ANOVy – podobnost rozptylů (homoskedasticita). Z tohoto důvodu nelze výsledky ANOVy použít a test provedeme neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem (viz Tabulka 5.11).

## Kruskal-Wallisův test

**Tabulka 5.11** - Výsledky Kruskal-Wallisova testu a box plot pro hodnoty elastického modulu kalcitové SF mikrostruktury u druhů *Limalepeta lima* (L. lima) a *Pectinodonta orientalis* (P. orie.).



Závěrem lze říci, že výsledky Kruskal-Wallisova testu prokázaly, že neexistuje statisticky významný rozdíl v elastickém modulu kalcitové SF mikrostruktury u druhů *Limalepeta lima* a *Pectinodonta orientalis*.

## d) Mikrotvrdomost – kalcitová SF mikrostruktura

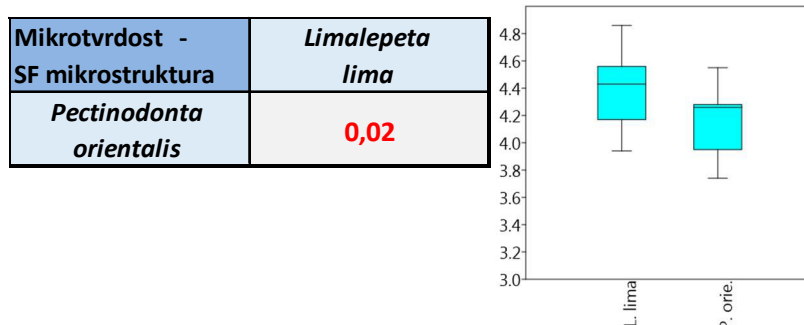
**Tabulka 5.12** - Výsledky Leveneova a Welchova testu a ANOVy pro mikrotvrdomost kalcitové SF mikrostruktury

Mikrotvrdomost - SF mikrostruktura					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	0,408	1	0,408	6,326	<b>0,018</b>
Within groups:	1,677	26	0,064		
<b>Total:</b>	<b>2,085</b>	<b>27</b>			
Levene's test for homogeneity of variance, from means	p (same):	0,792			
<b>Welch F test in the case of unequal variances:</b>	<b>F = 6,33; df = 25,66; p = 0,019</b>				

Dosažené p-hodnoty Leveneova testu jsou nad úrovní 0,05 a nemůžeme tedy odmítnout nulovou hypotézu, že testované proměnné mají různý rozptyl (tím splníme předpoklad ANOVy). P-hodnota ANOVy je výrazně nižší než 0,05 a můžeme odmítnout nulovou hypotézu, že skupiny mají stejnou střední hodnotu (průměr). Tento závěr ANOVy potvrzuje i *post hoc* Tukeyův test (viz tabulka 5.13), který je však pro dva vzorky nadbytečný a uvádím ho zde jako ilustraci podobnosti p-hodnot ANOVy a Tukeyova testu.

## Tukeyův test

**Tabulka 5.13** - Výsledky Tukeyova testu a box plot pro hodnoty mikrotvrdomosti kalcitové SF mikrostruktury u druhů *Limalepeta lima* (L. lima) a *Pectinodonta orientalis* (P. orie.).





Závěrem lze říci, že výsledky ANOVY a Tukeyova testu prokázaly existenci statisticky významného rozdílu v mikrotvrdosti kalcitové SF mikrostruktury u druhů *Limalepeta lima* a *Pectinodonta orientalis*.

Cílem této studie bylo (i) určení mikrotvrdosti (H) a elastického modulu (E) u homologních vrstev vybraných schránek patellogastropdů a (ii) analyzovat vztah hloubky vody na hodnoty mikrotvrdosti (H) a redukovaného elastického modulu (E).

Na základě provedených měření a následné analýzy výsledků studie bylo zjištěno, že aragonitové vrstvy schránek vybraných druhů mají významně nižší hodnoty tvrdosti (H) a elasticity (E), než jsou naměřené hodnoty anorganického aragonitu. Naopak v porovnání s mikromechanickými vlastnostmi anorganického kalcitu, vykazují kalcitové vrstvy biogenního materiálu zřetelně vyšší hodnoty elasticity (E) a téměř dvojnásobné hodnoty tvrdosti (H). Obdobná pozorování již byla publikována (viz Merkel a kol. 2009).

Výsledky studie vlivu prostředí na mikromechanické vlastnosti schránek měkkýšů ukázaly, že hloubka vody nemá žádný nebo má jen minimální vliv na mechanické vlastnosti biogenních karbonátů hlubokomořského druhu *Pectinodonta orientalis*. Toto zjištění potvrzuje hypotézu o raném osídlení hlubokomořského prostředí tímto druhem (Nakano a Ozawa 2004).

Výsledky modelové studie vlivu prostředí na mikromechanické vlastnosti schránek měkkýšů byly již publikovány v časopise (*Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* (IF pro rok 2013: 1.793), který následuje:

#### **5.1.1 Publikovaný výstup**

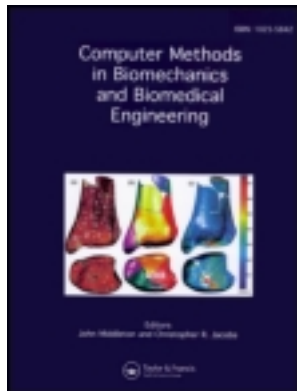
**HRABÁNKOVÁ, I.; FRÝDA, J.; ŠEPITKA, J.; SASAKI, T.; FRÝDOVÁ, B.; LUKEŠ, J. (2013).** Mechanical properties of deep-sea molluscan shell. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, Vol. 16, No. S1: pp 287 - 289.

This article was downloaded by: [Jiri Fryda]

On: 05 March 2014, At: 00:49

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gcmb20>

### Mechanical properties of deep-sea molluscan shell

I. Hrabánková<sup>a</sup>, J. Frýda<sup>ab</sup>, J. Šepitka<sup>c</sup>, T. Sasaki<sup>d</sup>, B. Frýdová<sup>be</sup> & J. Lukeš<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, Praha, Czech Republic

<sup>b</sup> Czech Geological Survey, P.O.B. 85, 118 21, Prague 1, Czech Republic

<sup>c</sup> Czech Technical University, Faculty of Mechanical Engineering, Biomechanics and Mechatronics, Prague, Czech Republic

<sup>d</sup> The University Museum, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

<sup>e</sup> VÚRV v.v.i., Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06, Prague - Ruzyně, Czech Republic

Published online: 07 Aug 2013.

To cite this article: I. Hrabánková, J. Frýda, J. Šepitka, T. Sasaki, B. Frýdová & J. Lukeš (2013) Mechanical properties of deep-sea molluscan shell, *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 16:sup1, 287-289, DOI: [10.1080/10255842.2013.815873](https://doi.org/10.1080/10255842.2013.815873)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10255842.2013.815873>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

## Mechanical properties of deep-sea molluscan shell

I. Hrabánková<sup>a\*</sup>, J. Frýda<sup>a,b</sup>, J. Šepitka<sup>c</sup>, T. Sasaki<sup>d</sup>, B. Frýdová<sup>b,e</sup> and J. Lukeš<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, Praha, Czech Republic; <sup>b</sup>Czech Geological Survey, P.O.B. 85, 118 21 Prague 1, Czech Republic; <sup>c</sup>Czech Technical University, Faculty of Mechanical Engineering, Biomechanics and Mechatronics, Prague, Czech Republic; <sup>d</sup>The University Museum, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; <sup>e</sup>VÚRV v.v.i., Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06 Prague – Ruzyně, Czech Republic

**Keywords:** Patellogastropoda; deep-sea; hardness and reduced elastic modulus

### 1. Introduction

The Patellogastropoda have been considered to represent a sister group of all other living gastropods, and thus are also considered the oldest gastropod group. All living patellogastropods are limpets with cap-shaped shells, typically occurring on intertidal rock substrates, except for a few living in the deep sea. The crucial question is whether the cap-shaped shells originated as a result of their adaptation to intertidal environments, or whether this shape represents a primitive feature. The patellogastropods also have the most complex shell microstructures of all gastropods (Fuchigami and Sasaki 2005). This shell complexity has often been used as evidence for their shallow water origin. Comparisons of the mechanical properties of homologous shell layers (i.e. layers having an identical microstructure, crystallographic texture and mineralogy) in patellogastropods living in shallow and deep water environments can shed light not only on the influence of water depth on the mechanical properties of biogenic carbonates, but also on patellogastropod phylogeny.

Here, we use a combination of nanoindentation and electron backscatter diffraction (EBSD) to test whether there is a difference in the mechanical properties of biogenic carbonates growing both in deep sea and in shallow water environments. The aims of the study are (1) to determine the hardness ( $H$ ) and reduced elastic modulus ( $E_r$ ) in homologous layers of patellogastropod shells and (2) to analyse the influence of water depth on the values of  $H$  and  $E_r$ .

### 2. Methods

Three different patellogastropod species from Japan were selected for this study: (1) the deep-sea limpet *Pectinodonta orientalis* from the Hyuga Basin, captured from 1092–1094 m, (2) *Nipponacmea concinna* from the

coast near Kinkazan, Miyagi Prefecture, and (3) *Limalepeta lima* from the continental shelf near Kushiro, Hokkaido, captured from 50–100 m. The aragonitic concentric crossed lamellar (cCL) structure, forming the  $M + 1$  layer in all of the above-mentioned species, and the calcitic semi-foliated (SF) structure, forming the  $M + 2$  layer in *P. orientalis* and *L. lima*, were studied (see data in Fuchigami and Sasaki 2005).

Patellogastropod shells were separately embedded in epoxy resin. Subsequently, the samples were cut along the sagittal plane across the shell apex, and then polished using progressively finer polishing media (SiC, diamond and 0.05  $\mu\text{m}$  colloidal silica).

The EBSD analysis was carried out using a Nordlys detector connected to a CamScan scanning electron microscope. Measurements of each of the shell layers were carried out in a regular grid with 15  $\mu\text{m}$  spacing. The crystallographic orientations were evaluated by Channel 5 software (HKL Technology) and were plotted on a stereographic projection (Figure 1). For measurements of the mechanical properties in homologous layers only, areas having identical crystallographic textures were selected.

A Hysitron TI 950 TriboIndenter<sup>®</sup> nanomechanical test instrument was used to carry out quasi-static indents with a Berkovich probe on selected shell layers. The displacement-controlled indents at maximum indentation depth of 100 nm followed a trapezoidal loading function of  $5 \times 2 \times 5$  s. Reduced elastic modulus  $E_r = S/2 \cdot (\pi/A)^{1/2}$ , where  $S$  is the contact stiffness and  $A$  is the contact area, was determined from indentation curves according to Oliver and Pharr method using the TriboScan software.

### 3. Results and discussion

The EBSD analysis revealed identical textural patterns and a similar orientation of the crystallographic axes in

\*Corresponding author. Email: [hrabankovai@fzp.czu.cz](mailto:hrabankovai@fzp.czu.cz)

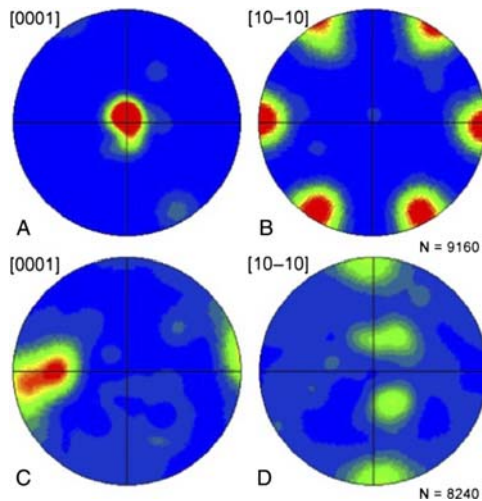


Figure 1. Results of the EBSD analysis of the M + 2 layer in the deep-sea *P. orientalis*.

the aragonitic cCL structure of the M + 1 layer in all three patellogastropods. In contrast, the M + 2 layer with calcitic SF structure is rather variable. This layer is developed only in the deep-sea *P. orientalis* and shallow water *L. lima*. In both species, the M + 2 layer has the same textural pattern, but the [0001] axes are oriented differently in different parts of their shells, varying from a direction perpendicular to the sagittal plane (Figure 1(A), (B)) to a direction parallel with it (Figure 1(C), (D)).

The hardness of the calcitic SF structure only measured in areas with [0001] axes of calcite parallel to the sagittal plane is about 4.4(2) GPa in *L. lima*, and about 4.1(3) GPa in the deep-sea *P. orientalis*. The reduced elastic modulus is identical in both species, at about 76 (4) GPa (Figure 2). The hardness of the aragonitic cCL structures is similar (4.3(3) GPa in *N. concinna*, 4.2 (3) GPa in *L. lima* and 4.4(4) GPa in *P. orientalis*). Values of the reduced elastic modulus are slightly more variable

(85(3) GPa in *N. concinna*, 83(3) GPa in *L. lima* and 81 (3) GPa in *P. orientalis*).

The calcitic and aragonitic shell layers have a very similar hardness, but their reduced elastic modulus differs significantly (Figure 2). It is noteworthy that both the measured  $H$  and  $E_r$  values differ significantly from the mechanical properties of inorganic aragonite and calcite. The aragonitic cCL structure has significantly lower hardness values, as well as a reduced elastic modulus, than inorganic aragonite (Figure 2). On the other hand, the calcitic SF structure has slightly, but significantly, higher values of its reduced elastic modulus. However, values of its hardness are almost double those in inorganic calcite (Figure 2). Similar observations on brachiopod biocalcite were published by Merkel et al. (2009).

The analysis of the effect of water depth on  $H$  and  $E_r$  values in biocarbonates revealed the lack of a close relationship. A statistically significant difference was found only between the reduced elastic modulus in the aragonitic cCL layer of *N. concinna* and deep-sea *P. orientalis*, and between the hardness of the calcitic SF layer of *L. lima* and deep-sea *P. orientalis*. On the other hand, there was no difference between the reduced elastic modulus in the aragonitic cCL layer of *L. lima* and deep-sea *P. orientalis*.

#### 4. Conclusions

1. Our analyses revealed that bioaragonitic layers have significantly lower  $H$  and  $E_r$  values than inorganic aragonite; however, compared with inorganic calcite, the biocalcitic layers have distinctly higher  $H$  values, and similar  $E_r$  values.
2. The water depth has no or only a weak influence on the mechanical properties of the biogenic carbonates of the deep-sea limpet *P. orientalis*. This finding may support the hypothesis of an early settlement in the deep-sea environment by the patellogastropods (Nakano and Ozawa 2004).

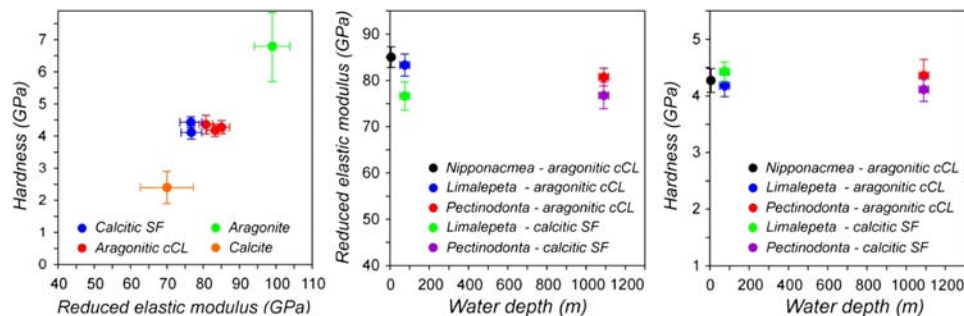


Figure 2. Results of the nanoindentation analysis, showing a relationship between the mechanical properties of biogenic aragonite and calcite (i.e. hardness and reduced elastic modulus; average of 15 measurements for each sample); as well as the relationship between the mechanical properties of those carbonates and water depth of their formation.

### Acknowledgements

This study was supported by Grant No. 334600 from the CGS; project VZ 0002700604 (Section 010) and also by Grant No. TA01010185 of the Technology Agency from the Czech Republic.

### References

Fuchigami T, Sasaki T. 2005. The shell structure of the Recent Patellogastropoda (Mollusca: Gastropoda). *Palaeontol Res.* 9:143–168.

Merkel C, Deuschle J, Griesshaber E, Enders S, Steinhauser E, Hochleitner R, Brand U, Schmahl WW. 2009. Mechanical properties of modern calcite- (*Mergerlia truncata*) and phosphate-shelled brachiopods (*Discradis castella* and *Lingula anatina*) determined by nanoindentation. *J Struct Biol.* 168:396–408.

Nakano T, Ozawa T. 2004. Phylogeny and historical biogeography of limpets of the order Patellogastropoda based on mitochondrial DNA sequences. *J Mollus Stud.* 70:31–41.

## 5.2 Porovnání elastického modulu a mikrotvrdosti anorganického aragonitu a perleti mlžů s odlišnou krystalografickou texturou a analýza vlivu anizotropie na měřené mikromechanické veličiny

Většina z plánovaných experimentů je zaměřena na studium elastického modulu a mikrotvrdosti perleti a vlivu prostředí na tyto mikromechanické vlastnosti. Pro toto studium byla perleť vybrána jako modelová mikrostruktura z následujících důvodů:

- i. perleť je pravděpodobně nejstarším typem mikrostruktury u měkkýšů (Carter 1990a, b) a vyskytuje se u čtyř z šesti žijících tříd měkkýšů, a to v třídě Gastropoda, Cephalopoda, Bivalvia a Monoplacophora;
- ii. mikrostruktura a krystalografická textura perleti se zdají být velice konzervativními znaky. Bylo prokázáno, že se tyto znaky se u perleti gastropodů nezměnily nejméně od počátku druhohor (Frýda a kol. 209);
- iii. perleť má nejjednodušší mikrostrukturu a krystalografickou texturu ze všech typů vrstev měkkýších schránek.

Mlži (Bivalvia) byli vybráni jako modelová skupina pro plánovaný výzkum, protože jsou jedinou skupinou s perletí se zástupci ze dvou odlišných prostředích, v moři a ve sladkých vodách. Cephalopoda a Monoplacophora jsou výhradně mořskými skupinami. Žádný sladkovodní ani suchozemský gastropod nemá vyvinutou perleť.

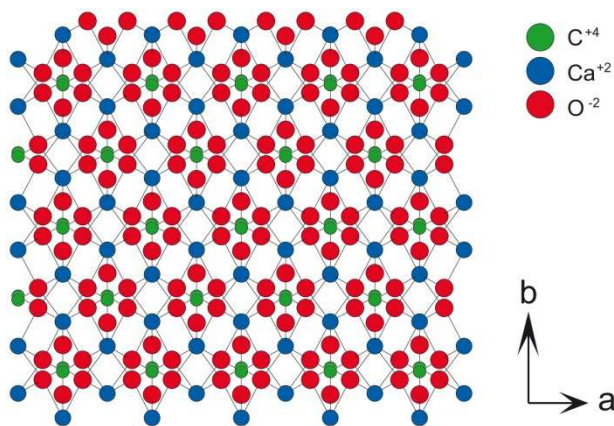
Před měřením hodnot elastického modulu a mikrotvrdosti perleti u různých měkkýšů bylo třeba testovat, jak je měření těchto mikromechanických hodnot ovlivněno anizotropií aragonitu a krystalografickým uspořádáním (tj. texturou) perleti. Byly stanoveny dva dílčí cíle:

- A. testovat vliv anizotropie aragonitu vzorku na měřené hodnoty elastického modulu a mikrotvrdosti;
- B. porovnat hodnoty elastického modulu a mikrotvrdosti perleti a aragonitu.

### 5.2.1 Test vlivu anizotropie aragonitu na měřené hodnoty elastického modulu a mikrotvrdosti

Perleť je tvořena malými destičkami aragonitu o rozměrech okolo 0,01 mm a tloušťce 0,001 mm. Aragonit je orthorombická modifikace  $\text{CaCO}_3$ , jehož krystalografická mřížka se dá popsat třemi osami (**a**, **b** a **c**), které jsou na sebe kolmé. Tyto osy mají různou délku ( $a = 4,95 \cdot 10^{-10}$  m,  $b = 7,96 \cdot 10^{-10}$  m,  $c = 5,74 \cdot 10^{-10}$  m; viz <http://www.mindat.org/>). Poměr těchto os je tedy značně odlišný ( $a : b : c = 0,622 : 1 : 0,721$ ). Aragonit tedy patří mezi výrazně anizotropní látky. Perleť je složena z destiček aragonitu orientovaných tak, že krystalografická osa **c** aragonitové mřížky je kolmá k povrchu schránky měkkýšů, což bylo opakovaně ověřeno u řady druhů mlžů, plžů a hlavonožců (např. Chateigner a kol. 2000; Frýda a kol. 2010). Na základě této skutečnosti, byly všechny zkoumané vzorky perleti připraveny tak, že orientované schránky byly naleštěny rovnoběžně s povrchem schránky (detailní popis viz kapitola 3.2.1 Výběr a příprava vzorků). Znamená to tedy, že mikromechanické vlastnosti (elastický modul a mikrotvrdost) byly zkoumány ve směru krystalografické osy **c** aragonitu a v tomto směru (tedy kolmo k leštěnému povrchu vzorku) byl vtačován pyramidální diamantový hrot Berkovichovy pyramidy do vzorku.

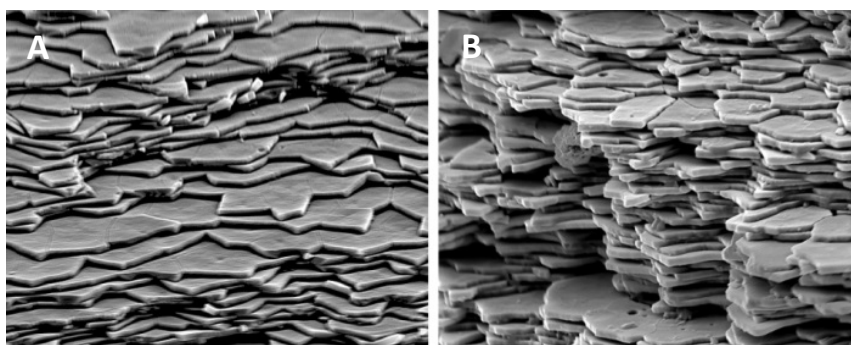
Krystalografická mřížka aragonitu v pohledu podél krystalografické osy  $c$  má sice pseudohehexagonální symetrii (viz obr. 5.3), ale její skutečná symetrie je dvoučetná (tedy pouze otočení krystalografické mřížky o  $180^\circ$  podle osy  $c$  (tj. osy kolmé k povrchu stránky na obrázku 5.3) a vede k identické pozici mřížky. Dá se tedy očekávat, že orientace vtačovaného trojčetného diamantového hrotu (Berkovichova pyramida) bude mít vliv na hodnoty měřených fyzikálních veličin, tj. elastického modulu a mikrotvrdosti.



**Obrázek 5.3** - Pohled na krystalografickou mřížku aragonitu podél osy  $c$  (obrázek vytvořený v programu Diamond).

K testování vlivu orientace Berkovichovy pyramidy na měřené hodnoty byly vybrány tři vzorky, krystal přírodního aragonitu a perleť druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata* (viz charakteristika vzorků 3.1.11 a 3.1.12). Důvody pro tento výběr jsou následující:

Monokrystal aragonitu poskytuje možnost studovat pouze interakci čistého anorganického materiálu (aragonitu) s Berkovichovou pyramidou bez vlivu organického materiálu, který je vždy, byť v malé míře obsažen v perleti (např. Jackson a kol. 1988; Wang a kol. 2001; Li a kol. 2004; Lin a kol. 2006, 2008; Barthelat a kol. 2007; Chen a kol. 2008; Meyers a kol. 2008; Yang a kol. 2011; Ji a Li 2014). Orientace krystalové mřížky lze u monokrystalu aragonitu snadno určit a tak mohl být připraven orientovaný leštěný vzorek, který byl ekvivalentní vzorkům perleti (tj. leštěný povrch je kolmý ke krystalografické ose  $c$ ).

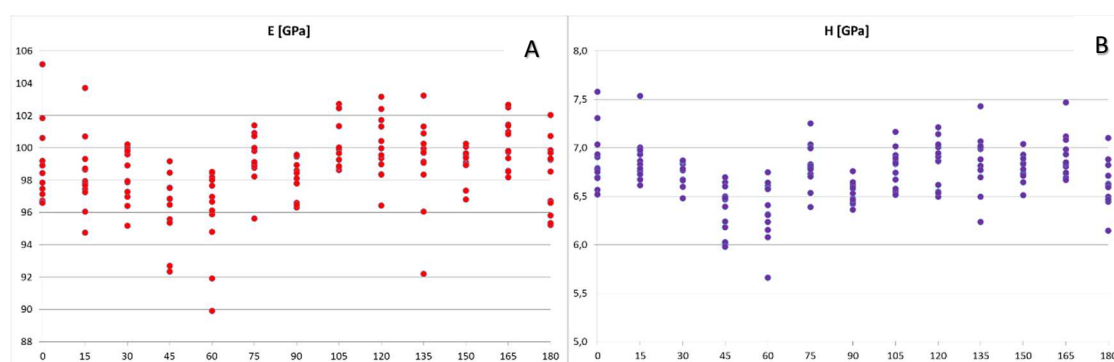


**Foto 5.1** - Pohled na perleť druhů (A) *Nucula nucleus* a (B) *Pinctada radiata* elektronovým mikroskopem.

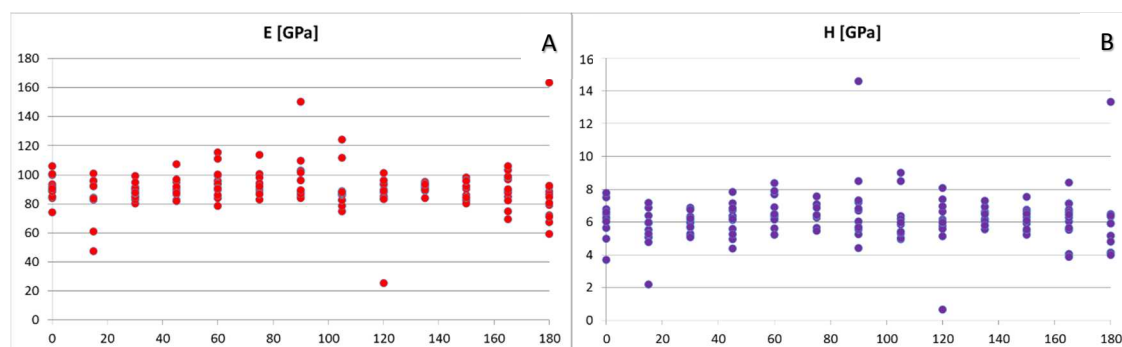
Perleť druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata* má stejnou mikrostrukturu (tj. tvar krystalků aragonitu (viz foto 5.1). Na druhou stranu, jak ukázalo předchozí studium metodou difrakce zpět odražených elektronů (EBSD), je perleť druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata* velice odlišná

v krystalografické orientaci jednotlivých destiček (krystalků) aragonitu v perleti (Frýda a kol. 2010). U druhu *Nucula nucleus* jsou jednotlivé krystalky aragonitu v perleti orientovány tak, že jejich krystalografické osy *c* jsou kolmé k povrchu schránky a krystalografické osy *a* a *b* jsou orientovány náhodně. Naopak u druhu *Pinctada radiata* jsou jednotlivé krystalky aragonitu v perleti orientovány tak, že jejich krystalografické osy *c* jsou kolmé k povrchu schránky, ale všechny jejich krystalografické osy *a* a *b* jsou rovněž uspořádány.

Vybrané tři vzorky (krystal přírodního aragonitu, perleť druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata*) k testování vlivu orientace Berkovichovy pyramidy na měřené hodnoty elastického modulu a mikrotvrdomosti představují tři krajní texturní typy. Všechny měřené vzorky perleti mají krystalografickou texturu mezi těmito krajními případy (viz strana 36, v kapitole 4 Výsledky). Test vlivu orientace Berkovichovy pyramidy na měřené hodnoty elastického modulu a mikrotvrdomosti byl navržen tak, že měřený vzorek byl po každé provedené nanoindentační zkoušce otočen o 15° podle osy kolmé k povrchu vzorku pomocí goniometrického stolku. Tyto kroky byly provedeny v rozmezí 0° až 180°. Tím bylo provedeno 13 nanoindentačních zkoušek na každém vzorku. Naměřené hodnoty elastického modulu a mikrotvrdomosti, tvary indentačních křivek a jejich popisy jsou uvedeny v kapitole 4 Výsledky na stranách 44 až 55. Výsledky měření vykazují značný rozptyl hodnot elastického modulu a mikrotvrdomosti u všech měřených vzorků (viz obrázky 5.4, 5.5 a 5.6). Na těchto grafech jsou zobrazena všechna měření.

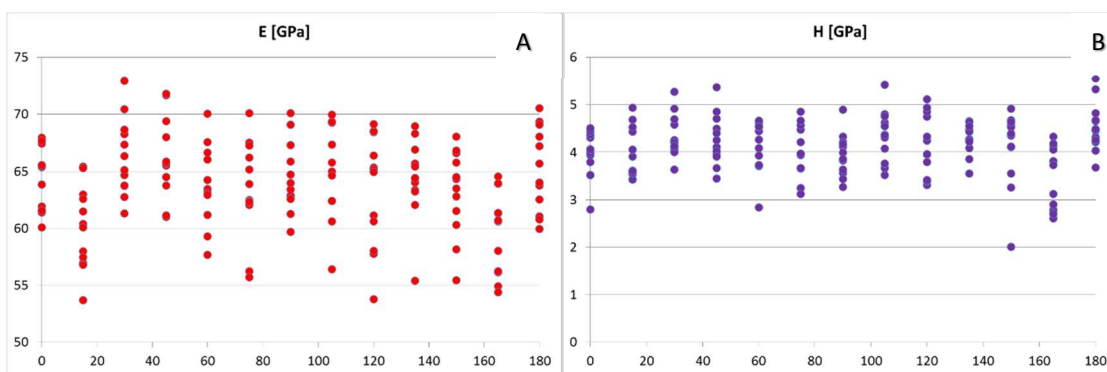


**Obrázek 5.4** - Grafy ilustrující závislost měřených hodnot elastického modulu (A) a mikrotvrdomosti (B) krystalu aragonitu na orientaci Berkovichovy pyramidy.



**Obrázek 5.5** - Grafy ilustrující závislost měřených hodnot elastického modulu (A) a mikrotvrdomosti (B) perleti u druhu *Nucula nucleus* na orientaci Berkovichovy pyramidy.





**Obrázek 5.6** - Grafy ilustrující závislost měřených hodnot elastického modulu (A) a mikrotvrdosti (B) perleti u druhu *Pinctada radiata* na orientaci Berkovichovy pyramidy.

### STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ MĚŘENÝCH HODNOT

Na základě předchozí analýzy (viz popis měřených křivek v kapitole 4 Výsledky) byly pro následující statistickou analýzu vynechány hodnoty, které byly silně ovlivněny „pop-in“ efektem či byly měřeny v místě s nevhodným povrchem (např. obrázek 4.20). V následujících tabulkách jsou uvedeny základní statistické parametry dat použitých k další analýze.

**Tabulka 5.14** - Základní statistické parametry jednotlivých měření pro indentační zkoušky aragonitu.

ARAGONIT - Elastický modul - E [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	11	10	12	12	12	11	12	12	12	11	12	12	12
Min	96,60	96,05	95,17	92,34	89,91	98,22	96,31	98,62	96,42	96,06	96,82	98,17	95,23
Max	101,84	100,70	100,21	99,18	98,50	101,39	99,57	102,71	103,17	101,31	100,27	102,67	102,03
Mean	98,31	98,16	98,35	96,18	96,09	99,72	98,13	100,34	100,01	99,47	99,04	100,34	98,26
Median	97,85	97,88	98,43	96,66	96,82	99,81	98,28	99,94	99,76	99,73	99,25	100,34	98,90
25 prcnil	96,74	97,40	97,06	95,37	95,08	98,91	96,89	98,96	98,53	99,08	98,93	98,79	96,01
75 prcnil	99,20	98,87	99,90	97,53	98,13	100,74	99,32	102,17	101,62	100,27	99,66	101,41	99,81
ARAGONIT - Mikrotvrdost - H [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	11	10	12	12	12	11	12	12	12	10	12	12	12
Min	6,52	6,61	6,48	5,98	5,66	6,39	6,36	6,51	6,50	6,50	6,51	6,67	6,14
Max	7,31	7,00	6,87	6,69	6,75	7,25	6,76	7,16	7,21	7,07	7,04	7,47	7,10
Mean	6,81	6,84	6,74	6,35	6,36	6,85	6,53	6,80	6,85	6,85	6,80	6,91	6,62
Median	6,78	6,85	6,77	6,43	6,36	6,81	6,50	6,84	6,89	6,85	6,83	6,84	6,61
25 prcnil	6,69	6,72	6,66	6,07	6,17	6,73	6,43	6,60	6,57	6,75	6,72	6,74	6,48
75 prcnil	6,93	6,97	6,85	6,58	6,60	7,00	6,61	6,91	7,03	7,01	6,88	7,06	6,79

**Tabulka 5.15** - Základní statistické parametry jednotlivých měření pro indentační zkoušky perleti u druhu *Nucula nukleus*.

Nucula nukleus - Elastický modul - E [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	10	10	12	12	12	12	11	10	11	11	12	12	11
Min	84,03	82,92	80,39	82,10	78,39	82,92	83,79	75,00	83,33	88,90	80,17	69,28	59,22
Max	100,61	100,94	99,25	107,33	115,46	113,73	109,56	88,86	101,28	95,13	98,15	105,86	92,34
Mean	91,15	89,48	88,69	90,44	94,57	93,60	94,13	84,34	89,73	91,93	88,65	90,09	79,38
Median	89,73	88,17	88,53	88,92	92,27	92,43	89,21	86,26	89,09	92,16	88,13	89,39	80,66
25 prcnil	87,80	83,56	84,88	86,88	86,78	88,19	87,06	81,58	83,83	89,84	83,04	82,83	70,98
75 prcnil	94,95	95,75	91,24	94,21	99,97	97,24	102,58	88,00	93,70	93,40	94,81	98,79	88,34

Nucula nucleus - Mikrotvrđost - H [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	10	10	12	12	12	12	11	10	11	11	12	12	11
Min	5,63	4,78	5,08	4,38	5,22	5,47	4,41	4,95	5,13	5,81	5,21	3,85	3,98
Max	7,77	7,17	6,87	7,84	8,38	7,56	8,51	6,36	8,08	7,28	7,54	8,41	6,49
Mean	6,49	5,85	5,99	6,15	6,64	6,43	6,28	5,63	6,33	6,43	6,18	6,16	5,31
Median	6,36	5,95	6,01	6,26	6,45	6,41	6,03	5,63	6,06	6,49	6,20	6,37	5,17
25 prcnil	5,93	5,07	5,37	5,34	6,16	5,80	5,54	5,24	5,75	6,06	5,50	5,55	4,13
75 prcnil	6,96	6,51	6,66	6,81	7,50	7,02	7,19	6,02	6,95	6,64	6,69	7,03	6,33

**Tabulka 5.16** - Základní statistické parametry jednotlivých měření pro indentační zkoušky perleti u druhu *Pinctada radiata*.

Pinctada radiata - Elastický modul - E [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12
Min	60,06	53,70	61,31	60,99	57,67	55,72	59,68	56,40	53,77	62,04	55,42	54,41	59,96
Max	67,96	65,43	72,95	71,83	70,07	70,12	70,12	69,96	69,13	68,96	68,06	64,56	70,52
Mean	64,16	60,09	66,28	66,07	63,77	63,45	64,47	64,63	63,27	65,16	63,15	59,67	65,17
Median	64,62	60,22	65,74	65,60	63,31	63,17	63,69	64,81	65,05	64,43	63,90	60,65	64,84
25 prcnil	61,59	57,09	63,73	63,95	61,61	62,12	62,62	62,39	58,67	63,36	60,59	56,15	61,42
75 prcnil	66,97	62,87	68,57	69,06	66,49	67,00	66,93	68,81	67,92	66,91	66,38	63,29	68,82

Pinctada radiata - Mikrotvrđost - H [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	12	12
Min	2,79	3,42	3,64	3,45	2,83	3,12	3,27	3,52	3,31	3,86	3,25	2,61	3,68
Max	4,51	4,93	5,28	5,37	4,67	4,86	4,90	5,42	5,12	4,66	4,92	4,33	5,56
Mean	3,94	3,98	4,34	4,25	4,09	4,03	3,94	4,35	4,17	4,36	4,28	3,43	4,54
Median	4,02	3,77	4,22	4,06	4,18	3,97	3,93	4,37	4,10	4,43	4,39	3,43	4,47
25 prcnil	3,59	3,54	4,07	3,92	3,72	3,66	3,58	3,84	3,51	4,22	4,11	2,78	4,23
75 prcnil	4,35	4,50	4,67	4,65	4,54	4,55	4,21	4,72	4,83	4,55	4,64	4,11	4,78

Prvním provedeným statistickým testem je test normality pro ověření jedné z nutných podmínek následného použití některé z parametrických statistických metod.

### Shapiro-Wilkův test

Výsledky Shapiro-Wilkova testu jsou uvedeny v následujících tabulkách:

**Tabulka 5.17** - Výsledky Shapiro-Wilkova testu.

ARAGONIT - Elastický modul - E [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	11	10	12	12	12	11	12	12	12	11	12	12	12
Shapiro-Wilk	0,895	0,965	0,915	0,931	0,828	0,957	0,907	0,866	0,983	0,887	0,859	0,942	0,931
p (normal)	0,159	0,842	0,246	0,388	0,020	0,731	0,195	0,058	0,992	0,127	0,048	0,517	0,387

ARAGONIT - Mikrotvrđost - H [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	11	10	12	12	12	11	12	12	12	10	12	12	12
Shapiro-Wilk	0,938	0,937	0,914	0,914	0,925	0,948	0,953	0,965	0,921	0,933	0,969	0,877	0,969
p (normal)	0,494	0,519	0,238	0,237	0,328	0,613	0,681	0,855	0,297	0,475	0,901	0,080	0,897

<i>Nucula nucleus</i> - Elastický modul - E [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	10	10	12	12	12	12	11	10	11	11	12	12	11
Shapiro-Wilk	0,905	0,846	0,981	0,890	0,954	0,886	0,895	0,863	0,924	0,955	0,924	0,964	0,942
p (normal)	0,247	0,052	0,986	0,119	0,695	0,105	0,161	0,082	0,354	0,705	0,324	0,840	0,541
<i>Nucula nucleus</i> - Mikrotvrđost - H [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	10	10	12	12	12	12	11	10	11	11	12	12	11
Shapiro-Wilk	0,925	0,940	0,933	0,985	0,936	0,940	0,974	0,935	0,942	0,954	0,954	0,945	0,893
p (normal)	0,401	0,549	0,408	0,996	0,451	0,504	0,925	0,494	0,538	0,701	0,691	0,570	0,151
<i>Pinctada radiata</i> - Elastický modul - E [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12	12
Shapiro-Wilk	0,904	0,961	0,972	0,934	0,980	0,932	0,956	0,947	0,922	0,949	0,949	0,913	0,936
p (normal)	0,179	0,801	0,929	0,421	0,983	0,404	0,726	0,588	0,306	0,634	0,624	0,232	0,446
<i>Pinctada radiata</i> - Mikrotvrđost - H [GPa]													
Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180
N	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	11	12	12
Shapiro-Wilk	0,907	0,874	0,935	0,958	0,885	0,960	0,972	0,967	0,927	0,943	0,906	0,862	0,959
p (normal)	0,193	0,073	0,439	0,752	0,101	0,787	0,927	0,874	0,351	0,562	0,218	0,051	0,774

Výsledky Shapiro-Wilkova testu ukázaly, že ze všech provedených měření můžeme odmítnout nulovou hypotézu o normálním rozdělení měřených hodnot na hladině významnosti  $p < 0,05$  jen v případě měření elastického modulu aragonitu pro orientaci 60° a 150°. Kritické hodnoty  $p = 0,05$  bylo téměř dosaženo ve třech dalších případech, a to v případě měření elastického modulu aragonitu pro orientaci 105°, měření elastického modulu u druhu *Nucula nucleus* pro orientaci 15° a měření mikrotvrđosti pro orientaci 165°. Tyto výsledky tedy dokládají pouze slabé narušení předpokladu, že měřené hodnoty jsou pro každý vzorek (orientaci) výběrem z populace s normálním rozdělením.

### **Test shody středních hodnot – Aragonit**

#### **a) Elastický modul – aragonit**

**Tabulka 5.18** - Výsledky Leveneova a Welchova testu a ANOVy pro elastický modul aragonitu.

Test for equal means					
Source of Variation:	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	273,726	12	22,811	7,764	6,635E-11
Within groups:	405,444	138	2,938		
<b>Total:</b>	<b>679,170</b>	<b>150</b>			
Levene's test for homogeneity of variance, from means:	p (same):	0,027			
<b>Welch F test in the case of unequal variances:</b>	F = 5,897; df = 53,42; p =	2,175E-06			

P-hodnoty Leveneova testu jsou mírně pod úrovní 0,05, musíme tedy odmítnout nulovou hypotézu, že testované proměnné mají stejný rozptyl. Pro mírné nesplnění předpokladů ANOVy (Levenův test) je p-hodnota ANOVy extrémně nízká, což naznačuje zamítnutí nulové hypotézy, že porovnávané soubory měření elastického modulu pro různé orientace mají stejné průměry. Welchův test (korigující analýzu pro soubory s nesterjným rozptylem) dokládá totéž ( $p < 0,05$ ).

Pro porovnání shodnosti průměrů ANOVou nebyl splněn předpoklad ANOVy o podobnosti rozptylů (Leveneův test  $p < 0,05$ ). Z tohoto důvodu byla provedena analýza i neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem (viz tabulka 5.19).

### Kruskal-Wallisův test

**Tabulka 5.19** - Výsledky Kruskal-Wallisova testu pro hodnoty elastického modulu aragonitu pro různé orientace.

Kruskal-Wallis test for equal medians	
H (chi2):	59,49
Hc (tie corrected):	59,49
p (same):	2,80E-08
There is a significant difference between sample medians	

Test ANOVA a Kruskal-Wallisův test odmítly nulovou hypotézu o shodě středních hodnot (průměrů a mediánů) pro měření elastického modulu aragonitu při různých rotacích vzorku. Post hoc testy – Tukeyův a Mann-Whitneyův test byly použity k determinaci, které z rotací se liší od ostatních (tab. 5.20 a 5.21). Porovnáním obou tabulek (Tukeyova a Mann-Whitneyova testu) je zřejmá rozdílná síla těchto testů.

**Tabulka 5.20** - Výsledky Tukeyova testu.

Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165
15	1,000											
30	1,000	1,000										
45	0,125	0,215	0,109									
60	0,088	0,158	0,076	1,000								
75	0,749	0,595	0,782	0,000	0,000							
90	1,000	1,000	1,000	0,233	0,173	0,568						
105	0,183	0,105	0,207	0,000	0,000	1,000	0,095					
120	0,463	0,315	0,501	0,000	0,000	1,000	0,293	1,000				
135	0,923	0,827	0,939	0,000	0,000	1,000	0,807	0,992	1,000			
150	0,999	0,991	0,999	0,004	0,002	0,999	0,988	0,841	0,981	1,000		
165	0,185	0,105	0,208	0,000	0,000	1,000	0,095	1,000	1,000	0,992	0,842	
180	1,000	1,000	1,000	0,154	0,110	0,696	1,000	0,151	0,407	0,894	0,997	0,152

**Tabulka 5.21** - Výsledky Mann-Whitneyova testu.

Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165
15	0,916											
30	0,735	0,668										
45	0,034	0,016	0,017									
60	0,069	0,052	0,030	0,795								
75	0,033	0,005	0,065	0,000	0,000							
90	0,951	0,817	0,470	0,017	0,030	0,005						
105	0,009	0,003	0,030	0,000	0,000	0,479	0,001					
120	0,053	0,016	0,065	0,001	0,000	0,735	0,017	0,644				
135	0,088	0,022	0,132	0,001	0,001	0,870	0,011	0,372	0,601			
150	0,103	0,060	0,453	0,001	0,000	0,310	0,053	0,126	0,237	0,175		
165	0,009	0,003	0,018	0,000	0,000	0,424	0,002	0,931	0,686	0,230	0,069	
180	0,976	0,869	0,840	0,069	0,069	0,132	0,729	0,030	0,100	0,166	0,419	0,026

**Závěr:** Výsledky statistického šetření prokázaly statisticky významný rozdíl mezi středními hodnotami elastického modulu aragonitu pro různé rotace vzorku.

**b) Mikrotvrđost – aragonit**

**Tabulka 5.22** - Výsledky Leveneova a Welchova testu a ANOVy pro mikrotvrđost aragonitu.

Test for equal means					
Source of Variation:	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	5,116	12	0,426	9,729	1,612E-13
Within groups:	6,004	137	0,044		
<b>Total:</b>	<b>11,120</b>	<b>149</b>			
Levene's test for homogeneity of variance, from means:	p (same):	0,083			
<b>Welch F test in the case of unequal variances:</b>	F = 8,331; df = 52,82; p = 1,584E-08				

P-hodnoty Leveneova testu jsou nad úrovní 0,05, proto nemůžeme odmítnout nulovou hypotézu o stejných rozptylech, čímž jsou splněny všechny předpoklady ANOVy. Výsledky ANOVy zamítají nulovou hypotézu, že porovnávané soubory měření mikrotvrđosti pro různé orientace mají stejné průměry. Welchův test (pro soubory s neshodnou variací) dokládá totéž (p < 0,05).

Post hoc Tukeyův test byl použit k determinaci, které z rotací se liší od ostatních (tab. 5.23).

**Tabulka 5.23** - Výsledky Tukeyova post hoc testu měření mikrotvrđosti aragonitu.

Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165
15	1,000											
30	1,000	0,995										
45	0,000	0,000	0,001									
60	0,000	0,000	0,001	1,000								
75	1,000	1,000	0,987	0,000	0,000							
90	0,050	0,021	0,434	0,737	0,797	0,014						
105	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,089					
120	1,000	1,000	0,987	0,000	0,000	1,000	0,013	1,000				
135	1,000	1,000	0,983	0,000	0,000	1,000	0,012	1,000	1,000			
150	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,086	1,000	1,000	1,000		
165	0,997	1,000	0,744	0,000	0,000	1,000	0,001	0,988	1,000	1,000	0,989	
180	0,607	0,418	0,988	0,086	0,113	0,332	0,996	0,744	0,331	0,305	0,737	0,058

**Závěr:** Výsledky statistického šetření prokázaly statisticky významný rozdíl mezi průměrnými hodnotami mikrotvrđosti aragonitu pro různé rotace vzorku. Je zřejmé, že se liší jen rotace 45° a 60°.

## Test shodnosti středních hodnot – Nucula nucleus

### a) Elastický modul – Nucula nucleus

**Tabulka 5.24** - Výsledky Leveneova a Welchova testu a ANOVy pro elastický modul druhu *Nucula nucleus*.

Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	2250,610	12	187,550	3,228	4,2920E-04
Within groups:	7727,080	133	58,098		
<b>Total:</b>	<b>9977,680</b>	<b>145</b>			
Levene's test for homogeneity of variance, from means:	p (same):	0,002			
Welch F test in the case of unequal variances:	F = 3,182; df = 50,7; p =	0,001914			

P-hodnoty Leveneova testu jsou pod úrovní 0,05, proto musíme odmítnout nulovou hypotézu, že testované proměnné mají stejný rozptyl. Nebyl zde splněn předpoklad ANOVy o podobnosti rozptylů. Welchův test, nevyžadující tento předpoklad, dokládá ( $p < 0,05$ ) nerovnost průměrů. Z tohoto důvodu byla rovněž provedena analýza neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem (viz tabulka 5.25).

### Kruskal-Wallisův test

**Tabulka 5.25** - Výsledky Kruskal-Wallisova testu pro hodnoty elastického modulu perleti u druhu *Nucula nucleus* pro různé orientace.

Kruskal-Wallis test for equal medians	
H (chi2):	27,4
Hc (tie correctec	27,4
p (same):	0,0068
There is a significant difference between sample medians	

Kruskal-Wallisův test odmítl nulovou hypotézu o shodě mediánů pro měření elastického modulu perleti u druhu *Nucula nucleus* pro různé orientace vzorku. Mann-Whitneyův test byl použit k determinaci, které z rotací se liší od ostatních (tab. 5.26).

**Tabulka 5.26** - Výsledky Man-Whitneyova testu pro elastický modul perleti druhu *Nucula nucleus*.

Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165
15	0,521											
30	0,339	0,869										
45	0,575	0,974	0,624									
60	0,410	0,249	0,126	0,286								
75	0,489	0,373	0,089	0,215	0,977							
90	0,550	0,130	0,207	0,442	0,878	0,976						
105	0,006	0,141	0,070	0,032	0,011	0,003	0,008					
120	0,597	0,751	0,782	0,976	0,207	0,282	0,212	0,038				
135	0,307	0,504	0,045	0,132	0,782	0,926	0,844	0,000	0,212			
150	0,410	0,818	0,977	0,708	0,194	0,112	0,148	0,199	0,689	0,230		
165	0,717	0,668	0,708	0,840	0,403	0,544	0,518	0,156	0,782	0,644	0,544	
180	0,012	0,045	0,053	0,018	0,007	0,002	0,007	0,379	0,026	0,001	0,053	0,039

**Závěr:** Výsledky statistického šetření prokázaly statisticky významný rozdíl mezi středními hodnotami elastického modulu perleti u druhu *Nucula nucleus* pro dvě orientace 105° a 180°.

**b) Mikrotvrdost – *Nucula nucleus***

**Tabulka 5.27** - Výsledky Leveneova a Welchova testu a ANOVy pro mikrotvrdost druhu *Nucula nucleus*.

Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	18,198	12	1,516	2,088	0,022
Within groups:	96,594	133	0,726		
<b>Total:</b>	<b>114,791</b>	<b>145</b>			
Levene's test for homogeneity of variance, from means:	p (same): 0,086				
Welch F test in the case of unequal variances:	F = 2,544; df = 51,33; p = 0,01021				

P-hodnoty Leveneova testu jsou nad úrovní 0,05, nemůžeme tedy odmítnout nulovou hypotézu o stejných rozptylech a tím jsou splněny všechny předpoklady ANOVy. Výsledky ANOVy zamítají nulovou hypotézu, že porovnávané soubory měření mikrotvrdosti perleti druhu *Nucula nucleus* pro různé orientace mají stejné průměry. Welchův test (pro soubory s neshodnou variací) dokládá totéž ( $p < 0,05$ ).

Post hoc Tukeyův test byl použit k determinaci, které z rotací se liší od ostatních (tab. 5.28).

**Tabulka 5.28** - Výsledky Tukeyova post hoc testu měření mikrotvrdosti perleti druhu *Nucula nucleus*.

Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165
15	0,866											
30	0,975	1,000										
45	0,999	1,000	1,000									
60	1,000	0,596	0,839	0,977								
75	1,000	0,929	0,991	1,000	1,000							
90	1,000	0,994	1,000	1,000	0,999	1,000						
105	0,446	1,000	0,999	0,968	0,191	0,566	0,843					
120	1,000	0,983	0,999	1,000	1,000	1,000	1,000	0,759				
135	1,000	0,935	0,993	1,000	1,000	1,000	1,000	0,581	1,000			
150	1,000	1,000	1,000	1,000	0,987	1,000	1,000	0,950	1,000	1,000		
165	0,999	1,000	1,000	1,000	0,981	1,000	1,000	0,963	1,000	1,000	1,000	
180	0,055	0,953	0,803	0,498	0,013	0,089	0,252	1,000	0,181	0,094	0,435	0,476

**Závěr:** Výsledky statistického šetření prokázaly statisticky významný rozdíl mezi průměrnými hodnotami mikrotvrdosti perleti u druhu *Nucula nucleus*, ale pouze pro jednu kombinaci, a to 60° a 180°.

### Test shodnosti středních hodnot – *Pinctada radiata*

#### a) Elastický modul – *Pinctada radiata*

**Tabulka 5.29** - Výsledky Leveneova a Welchova testu a ANOVy pro elastický modul perleti druhu *Pinctada radiata*.

Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	573,388	12	47,782	3,602	0,000104
Within groups:	1883,900	142	13,267		
<b>Total:</b>	<b>2457,280</b>	<b>154</b>			
Levene's test for homogeneity of variance, from means:	p (same):	0,483			
Welch F test in the case of unequal variances:	F = 3,426; df = 55,2; p =	0,0009			

P-hodnoty Leveneova testu jsou nad úrovní 0,05, nemůžeme tedy odmítnout nulovou hypotézu o stejných rozptylech, čímž jsou splněny všechny předpoklady ANOVy. Výsledky ANOVy zamítají nulovou hypotézu, že porovnávané soubory měření elastického modulu u druhu *Pinctada radiata* pro různé orientace mají stejné průměry. Welchův test (pro soubory s neshodnou variací) dokládá totéž ( $p < 0.05$ ).

Post hoc Tukeyův test byl použit k determinaci, které z rotací se liší od ostatních (tab. 5.30).

**Tabulka 5.30** - Výsledky Tukeyova post hoc testu měření elastického modulu u druhu *Pinctada radiata*.

Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165
15	0,238											
30	0,971	0,002										
45	0,988	0,004	1,000									
60	1,000	0,395	0,903	0,947								
75	1,000	0,554	0,796	0,869	1,000							
90	1,000	0,144	0,993	0,998	1,000	1,000						
105	1,000	0,109	0,997	0,999	1,000	1,000	1,000					
120	1,000	0,640	0,722	0,809	1,000	1,000	1,000	1,000				
135	1,000	0,038	1,000	1,000	0,999	0,995	1,000	1,000	0,989			
150	1,000	0,700	0,664	0,758	1,000	1,000	1,000	0,999	1,000	0,981		
165	0,122	1,000	0,001	0,001	0,228	0,356	0,067	0,049	0,437	0,015	0,498	
180	1,000	0,038	1,000	1,000	0,999	0,995	1,000	1,000	0,989	1,000	0,981	0,015

**Závěr:** Výsledky statistického šetření prokázaly statisticky významný rozdíl pouze mezi několika hodnotami elastického modulu perleti u druhu *Pinctada radiata*.



**b) Mikrotvrđost – *Pinctada radiata***

**Tabulka 5.31** - Výsledky Leveneova a Welchova testu a ANOVy pro mikrotvrđost perleti druhu *Pinctada radiata*.

Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	11,319	12	0,943	3,444	0,000186
Within groups:	38,613	141	0,274		
<b>Total:</b>	<b>49,932</b>	<b>153</b>			
Levene's test for homogeneity of variance, from means:	p (same):	0,159			
Welch F test in the case of unequal variances:	F = 2,881; df = 54,71; p = 0,0038				

P-hodnoty Leveneova testu jsou nad úrovní 0,05 a tedy nemůžeme odmítnout nulovou hypotézu o stejných rozptylech, čímž jsou splněny všechny předpoklady ANOVy. Výsledky ANOVy zamítají nulovou hypotézu, že porovnávané soubory měření mikrotvrđosti u druhu *Pinctada radiata* pro různé orientace mají stejné průměry. Welchův test (pro soubory s neshodnou variací) dokládá totéž ( $p < 0,05$ ).

Post hoc Tukeyův test byl použit k determinaci, které z rotací se liší od ostatních (tab. 5.32).

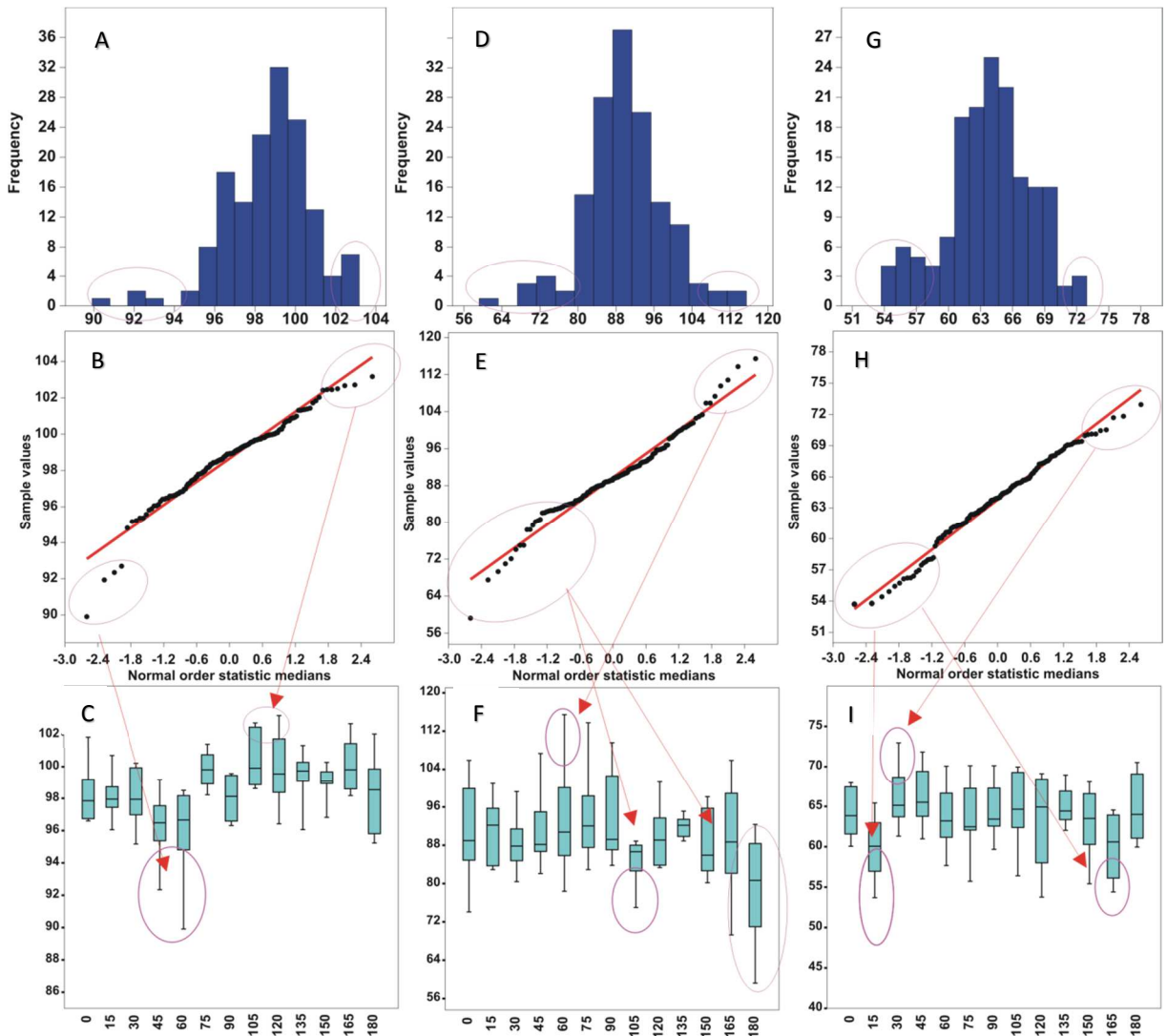
**Tabulka 5.32** - Výsledky Tukeyova post hoc testu měření mikrotvrđosti u druhu *Pinctada radiata*

Rotace [°]	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165
15	1,000											
30	0,818	0,894										
45	0,973	0,990	1,000									
60	1,000	1,000	0,994	1,000								
75	1,000	1,000	0,965	0,999	1,000							
90	1,000	1,000	0,819	0,973	1,000	1,000						
105	0,793	0,876	1,000	1,000	0,992	0,956	0,794					
120	0,998	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,998	1,000				
135	0,781	0,867	1,000	1,000	0,991	0,952	0,782	1,000	1,000			
150	0,938	0,972	1,000	1,000	1,000	0,995	0,938	1,000	1,000	1,000		
165	0,453	0,344	0,002	0,009	0,102	0,206	0,451	0,001	0,032	0,001	0,005	
180	0,213	0,298	1,000	0,979	0,668	0,463	0,214	1,000	0,891	1,000	0,993	0,000

**Závěr:** Výsledky statistického šetření prokázaly statisticky významný rozdíl mezi průměrnými hodnotami mikrotvrđosti perleti u druhu *Pinctada radiata* pouze pro rotaci 165°.

### 5.2.2 Diskuze výsledků analýzy vlivu orientace vzorku na měřené hodnoty

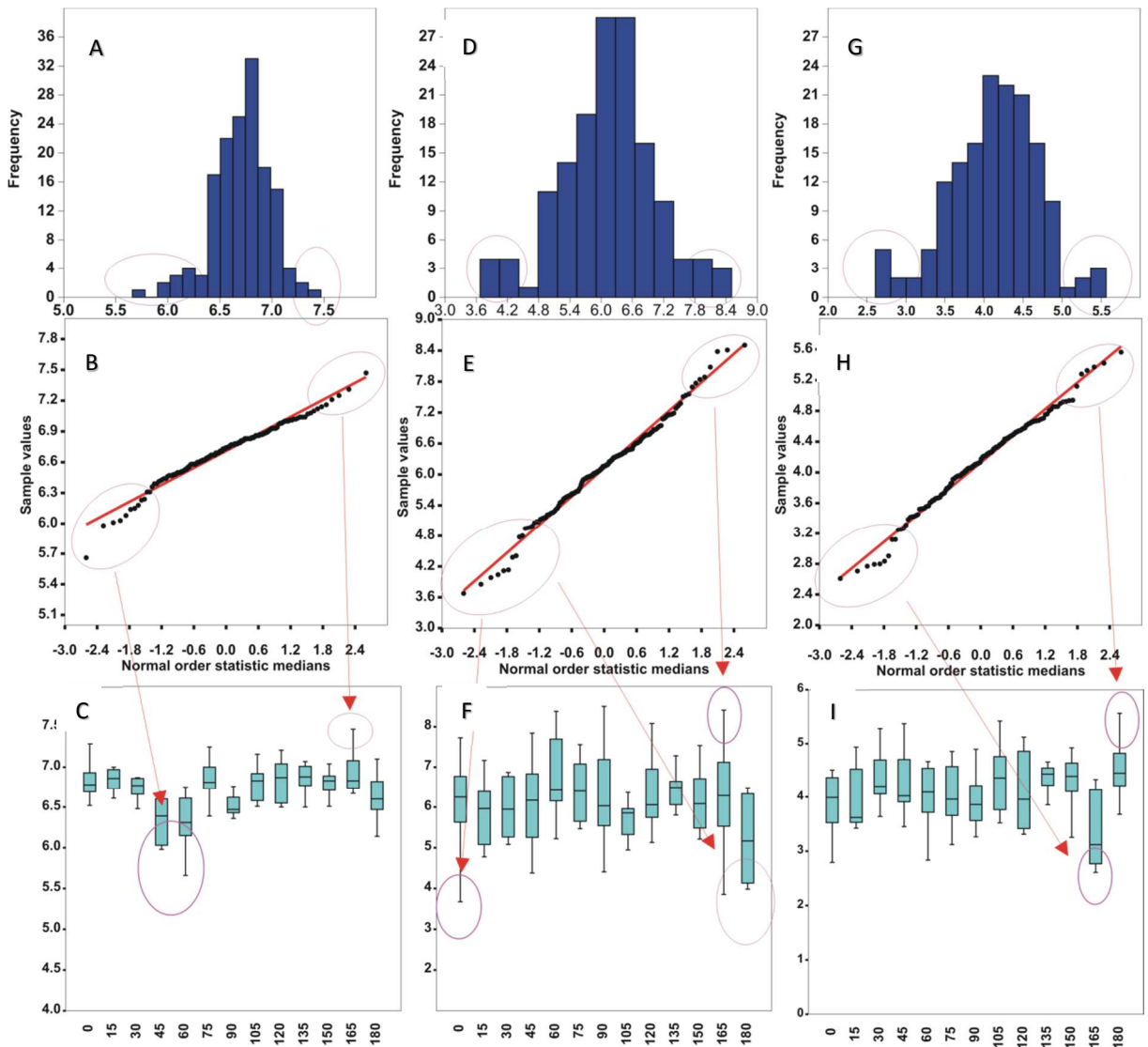
Předchozí statistická analýza vlivu orientace vzorku na měřené hodnoty elastického modulu a mikrotvrdosti aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata* byla založena na souboru měření, ze kterých byly vyloučeny pouze hodnoty silně ovlivněné „pop-in“ efektem, nebo které byly měřeny v místě s nevhodným povrchem.



**Obrázek 5.7** - Měřené hodnoty elastického modulu aragonitu (A-C) a perleti druhů *Nucula nucleus* (D-F) a *Pinctada radiata* (G-I) zobrazené v histogramu (A, D a G), v pravděpodobnostním diagramu (Q - Q plot) pro normální rozdělení (B, E a H) a v krabicovém diagramu (C, F a I).

Provedená analýza vlivu orientace vzorku na měřené hodnoty ukázala, že soubory měření pro některé rotace se statisticky významně liší od hodnot ostatních rotací (viz strany 85 - 102). Analýza byla provedena jednocestnou ANOVou a Welchovým testem (k určení zda je mezi 13 rotacemi statisticky významný rozdíl ve střední hodnotě) a následně byl použit Tukeyův post hoc test (k určení mezi kterými z 13 rotací je statisticky významný rozdíl ve střední hodnotě). Pokud Leveneův test vyvrátil podobnost rozptylů jednotlivých souborů, a nebyl tak splněn základní předpoklad ANOVy, pak byl použit Welchův test a neparametrický Kruskal-Wallisův test (k určení mezi kterými z 13 rotací je statisticky významný rozdíl ve střední hodnotě). Následně byl použit Mann-Whitneyův test (k určení mezi kterými z 13 rotací je statisticky významný rozdíl ve střední

hodnotě). Je třeba zmínit, že posledně zmíněný test (Dynam 2011) je náchylnější ke vzniku statistické chyby I. řádu (tj. vzniku falešných rozdílů).



**Obrázek 5.8** - Měřené hodnoty mikrotvrdoosti aragonitu (A - C) a perleti druhů *Nucula nucleus* (D - F) a *Pinctada radiata* (G - I) zobrazené v histogramu (A, D a G), v pravděpodobnostním diagramu (Q - Q plot) pro normální rozdělení (B, E a H) a v krabicovém diagramu (C, F a I).

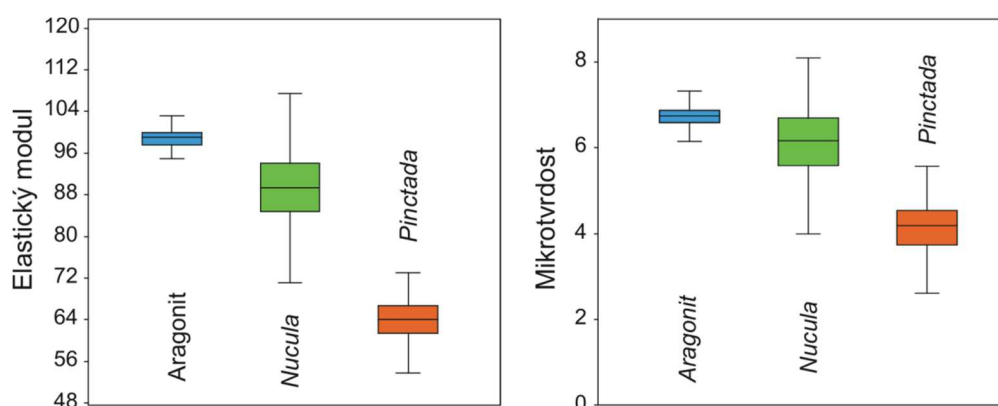
Detailní rozbor důvodů těchto rozdílů ve středních hodnotách (průměru či mediánu) ukázal, že důvodem jsou extrémní hodnoty, pro které nebyl nalezen jednoznačný důvod pro jejich vyloučení při popisu nanoindentačních křivek (viz strany 44 - 55), například z důvodů silného pop-in efektu. Například pro měření mikrotvrdoosti aragonitu (obrázek 5.8) je z histogramu zřejmá (Obrázek 5.8 A) poměrně početná skupina měření s hodnotami okolo 6 GPa. Tyto hodnoty se zřetelně odchylojí v pravděpodobnostním diagramu (Q - Q plotu) od očekávaného normálního rozdělení (obrázek 5.8 B). Z krabicového diagramu (obrázek 5.8 C) je vidět, že tyto hodnoty jsou ze souborů pro rotaci 45° a 60°. ANOVA a následná aplikace Tukeyova testu (viz tabulka 5.22 a 5.23) ukázaly, že právě některé hodnoty ze souborů pro rotaci 45° a 60° způsobily odmítnutí nulové hypotézy o shodě průměrů ANOVou. Podobně i v ostatních případech lze doložit, že příčiny neshody ve středních hodnotách mezi měřenými soubory mají na svědomí extrémní hodnoty, které jsou i z hlediska teoretického normálního rozdělení anomální (viz

obrázky 5.7 B, E a H a 5.8 B, E a H). Jak už bylo zmíněno výše, pro vyloučení těchto hodnot nebyly na indentačních křivkách často nalezeny jednoznačné důvody. Vyloučíme-li však tyto extrémní hodnoty, pak opakováním testů shody středních hodnot elastického modulu či mikrotvrlosti u aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata* pro jednotlivé rotace se dostaneme do situace, že nelze vyvrátit nulovou hypotézu o shodě středních hodnot. Tedy jinými slovy, neexistuje statisticky významné ovlivnění měřených hodnot rotací vzorku (tj. anizotropii). Všechny vyloučené extrémní hodnoty (tj. hodnoty ovlivněné pop-in efektem či extrémní hodnoty ležící mimo přímkou v Q-Q diagramu) reprezentují méně než 5 % všech měřených hodnot. Je zajímavé, že použitý test normality (Shapiro-Wilkův test) neodmítl nulovou hypotézu o normálním rozdělení hodnot pro jednotlivé rotace. Důvodem je patrně nízký počet měření pro jednotlivé rotace (tj. 10 - 12 měření).

**Závěr:** Po vyloučení všech extrémních hodnot elastického modulu či mikrotvrlosti u aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata* prokázala následná analýza neexistenci závislosti hodnoty měření na rotaci vzorku vůči Berkovichově pyramidě. Důvody pro vznik extrémních hodnot nejsou dosud objasněny a společně s pracovníky nanoindentační laboratoře plánují publikaci metodické práce zaměřené na toto téma. Je třeba si uvědomit, že nanoindentační zkouška je časově i finančně náročná a z tohoto důvodu je obvykle prováděno jen několik málo indentů pro charakteristiku různých materiálů. Provedený experiment na aragonitu a perleti dvou druhů (celkově reprezentující 156 indentů na vzorek) je naprosto anomální vysokým počtem měření. Tento výsledek ovlivnil i další plánovaná měření perleti. Každý vzorek byl pro jistotu měřen 2 x 16 indenty a ve dvou orientacích 0° a 30°.

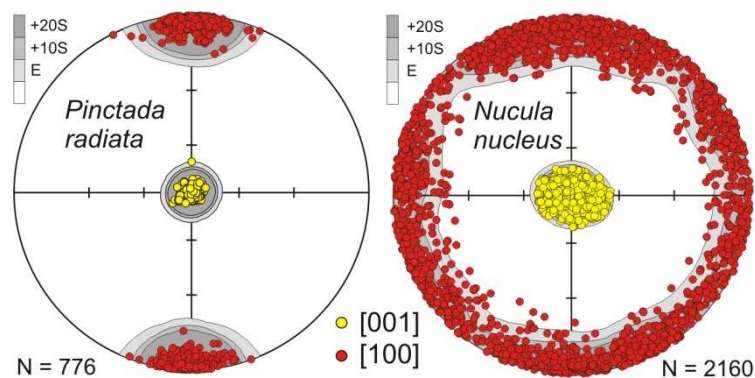
### 5.2.3 Porovnání hodnot elastického modulu a mikrotvrlosti perleti a aragonitu

Výše popsaný experiment poskytl rovněž data pro porovnání hodnot elastického modulu a mikrotvrlosti perleti a aragonitu (obrázek 5.9).



**Obrázek 5.9** - Měřené hodnoty elastického modulu a mikrotvrlosti aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata* zobrazené v krabicovém diagramu.

Perleť druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata* má stejnou mikrostrukturu (tj. tvar krystalků aragonitu). Jak ale ukázalo předchozí studium metodou difrakce zpět odražených elektronů (EBSD), perleť druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata* je velice odlišná v krystalografické orientaci jednotlivých destiček (krystalků) aragonitu v perleti (viz obrázek 5.10).



**Obrázek 5.10** - Orientace jednotlivých destiček (krystalků) aragonitu v perleti u druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata* promítnutá ve sférické projekci (upraveno z Frýda a kol. 2010).

U druhu *Nucula nucleus* jsou jednotlivé krystalky aragonitu v perleti orientovány tak, že jejich krystalografické osy *c* (tj. směr [001]) jsou rovnoběžné a kolmé k povrchu schránky (žluté body v obrázku 5.10) a krystalografické osy *a* (tj. směr [100]) červené body v obrázku 5.10) a *b* jsou orientovány náhodně. Krystalografická textura perleti u druhu *Nucula nucleus* může být označena jako jednoosá textura. U druhu *Pinctada radiata* jsou jednotlivé krystalky aragonitu v perleti orientovány rovněž tak, že jejich krystalografické osy *c* (tj. směr [001]) jsou rovnoběžné a kolmé k povrchu schránky (žluté body v obrázku 5.10), avšak i orientace krystalografických os *a* (tj. směr [100]) červené body v obrázku 5.10) a *b* je uspořádána (viz obrázek 5.10). Všechny osy jednotlivých krystalků aragonitu v perleti druhu *Pinctada radiata* jsou rovnoběžné a krystalografická textura této perleti může být označena jako „quasimonokrystal“. Tato textura je tedy nejbližší monokrystalu aragonitu, který je jako každý přírodní krystal tvořen malými doménami s identickou orientací krystalografických os.

Uskutečněná měření hodnot elastického modulu a mikrotvrdosti aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata* (obr. 5.7 a 5.8), naznačila, že aragonit má vyšší elastický modul a mikrotvrdost než perleť.

### **Shapiro-Wilkův test**

Výsledky Shapiro-Wilkova testu jsou uvedeny v následující tabulce:

**Tabulka 5.33** - Výsledky Shapiro-Wilkova testu

	Elastický modul			Mikrotvrdost		
	Aragonit	<i>Nucula nucleus</i>	<i>Pinctada radiata</i>	Aragonit	<i>Nucula nucleus</i>	<i>Pinctada radiata</i>
N	141	137	141	141	137	141
Shapiro-Wilk	0,987	0,980	0,988	0,993	0,987	0,983
p (normal)	0,208	0,084	0,254	0,679	0,201	0,084

Výsledky Shapiro-Wilkova testu ukázaly, že v žádném z provedených měření nemůžeme odmítnout nulovou hypotézu o normální rozdělení měřených hodnot na hladině významnosti  $p < 0,05$ . Na druhou stranu p-hodnoty Leveneova testu pro elastický modul a mikrotvrdost odmítly nulovou hypotézu o podobnosti rozptylu. Z tohoto důvodu byl pro vyhodnocení použit neparametrický Kruskal-Wallisův test.

## Kruskal-Wallisův test

### a) Elastický modul

**Tabulka 5.34** - Výsledky Kruskal-Wallisova testu pro hodnoty elastického modulu aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata*.

Kruskal-Wallis test for equal medians	
H (chi2):	351,90
Hc (tie corrected):	351,90
p (same):	3,95E-77
There is a significant difference between sample medians	

Kruskal-Wallisův test odmítl nulovou hypotézu o shodě mediánů pro měření elastického modulu aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata*. Mann-Whitneyův test byl použit k determinaci, které dvojice se liší od ostatních (tabulka 5.35).

**Tabulka 5.35** – Výsledky Mann-Whitneyova testu pro hodnoty elastického modulu aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata*.

	Aragonit	<i>Nucula nucleus</i>
<i>Nucula nucleus</i>	4,37E-43	
<i>Pinctada radiata</i>	6,96E-48	4,78E-43

### b) Mikrotvrdoost

**Tabulka 5.36** - Výsledky Kruskal-Wallisova testu pro hodnoty mikrotvrdoosti aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata*.

Kruskal-Wallis test for equal medians	
H (chi2):	307,40
Hc (tie corrected):	307,40
p (same):	1,75E-67
There is a significant difference between sample medians	

Kruskal-Wallisův test odmítl nulovou hypotézu o shodě mediánů pro měření mikrotvrdoosti aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata*. Mann-Whitneyův test byl použit k determinaci, které dvojice se liší od ostatních (tabulka 5.37).

**Tabulka 5.37** - Výsledky Mann-Whitneyova testu pro hodnoty elastického modulu aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata*.

	Aragonit	<i>Nucula nucleus</i>
<i>Nucula nucleus</i>	1,41E-15	
<i>Pinctada radiata</i>	9,45E-48	8,20E-47

**Závěr:** Výsledky statistického šetření prokázaly statisticky významný rozdíl mezi středními hodnotami elastického modulu i mikrotvrdosti aragonitu a perleti druhů *Nucula nucleus* a *Pinctada radiata*. Významným výsledkem je zjištění velkého rozdílu v hodnotách elastického modulu i mikrotvrdosti perleti s odlišnou krystalografickou texturou.

Výsledky tohoto dílčího experimentu byly již publikovány v časopise (*Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* (IF pro rok 2013: 1.793), který následuje:

#### **5.2.4 Publikovaný výstup**

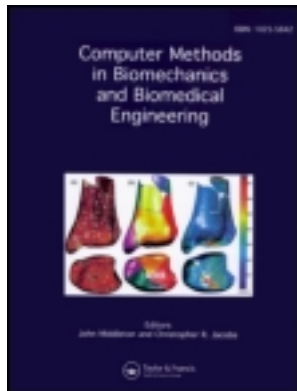
FRÝDA, J.; ŠEPITKA, J.; FRÝDOVÁ, B.; HRABÁNKOVÁ, I.; LUKEŠ, J.; KLICNAROVÁ, M. (2013). Crystallographic texture determines mechanical properties of molluscan nacre. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 16: pp. 292 - 293.

This article was downloaded by: [Jiri Fryda]

On: 05 March 2014, At: 00:49

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gcmb20>

### Crystallographic texture determines mechanical properties of molluscan nacre

J. Frýda<sup>ab</sup>, J. Šepitka<sup>c</sup>, B. Frýdová<sup>bd</sup>, I. Hrabánková<sup>a</sup>, J. Lukeš<sup>c</sup> & M. Klicnarová<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýká 129, 165 00, Praha 6, Czech Republic

<sup>b</sup> Czech Geological Survey, P.O.B. 85, 118 21, Prague 1, Czech Republic

<sup>c</sup> Czech Technical University, Faculty of Mechanical Engineering, Biomechanics and Mechatronics, 166 07, Prague 6, Czech Republic

<sup>d</sup> VÚRV v.v.i., Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06, Prague - Ruzyně, Czech Republic

Published online: 07 Aug 2013.

To cite this article: J. Frýda, J. Šepitka, B. Frýdová, I. Hrabánková, J. Lukeš & M. Klicnarová (2013) Crystallographic texture determines mechanical properties of molluscan nacre, *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 16:sup1, 292-293, DOI: [10.1080/10255842.2013.815875](https://doi.org/10.1080/10255842.2013.815875)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10255842.2013.815875>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>



## Crystallographic texture determines mechanical properties of molluscan nacre

J. Frýda<sup>a,b\*</sup>, J. Šepitka<sup>c</sup>, B. Frýdová<sup>b,d</sup>, I. Hrabánková<sup>a</sup>, J. Lukeš<sup>c</sup> and M. Klicnarová<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Environmental Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýká 129, 165 00 Praha 6, Czech Republic;

<sup>b</sup>Czech Geological Survey, P.O.B. 85, 118 21 Prague 1, Czech Republic; <sup>c</sup>Czech Technical University, Faculty of Mechanical Engineering, Biomechanics and Mechatronics, 166 07 Prague 6, Czech Republic; <sup>d</sup>VÚRV v.v.i., Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06 Prague – Ruzyně, Czech Republic

**Keywords:** nacre; crystallographic texture; hardness and reduced elastic modulus; anisotropy

### 1. Introduction

The study of biologically controlled mineralisation represents an essential issue of modern science. Molluscan nacre (mother-of-pearl) is one of the most studied nanocomposite materials. Nacre is found in the inner layer of some seashells, and it is composed of an aragonite phase (about 95 vol.%) arranged in microscopic polygonal flat tablets, bonded together by a biopolymer thin film (Figure 1). Published data on the mechanical properties of molluscan nacre show a rather high variability (Barthelat et al. 2007). The reasons for such a high variability are still a matter of scientific discussion. Different textural arrangements of the aragonitic platelets are one of the possible parameters influencing the mechanical properties of the nacre. Two basic textural types of bivalve nacre (unordered and ordered nacre) have been documented, differing by their arrangements of the *a*- and *b*-axis of aragonite (Figure 1).

Here, we use a combination of nanoindentation and electron backscatter diffraction (EBSD) to test whether the crystallographic texture of nacre controls its mechanical properties. The aims of this study are as follows: (1) to determinate the hardness (*H*) and reduced elastic modulus (*E<sub>r</sub>*) in both textural types of bivalve nacre and (2) to test whether the shape of a diamond Berkovich probe influences the measured *H* and *E<sub>r</sub>* values, in the case of a strongly anisotropic material (see Kearney et al. 2006).

### 2. Methods

Three different aragonitic materials were selected for this study: (1) natural single crystals of inorganic aragonite, (2) unordered bivalve nacre (*Nucula nucleus* from the Mediterranean Sea coast, about 80 km SE of Valencia, Spain) and (3) ordered bivalve nacre (*Pinctada radiata* from the Mediterranean Sea, Karpathos, Greece).

Bivalve shells as well as single crystal of aragonite selected for the intended analyses were separately

embedded in epoxy resin. Subsequently, the samples were polished using progressively finer polishing media [SiC followed by diamond of thickness from 3 μm to 0.25 μm, and 0.05 μm colloidal silica]. The shell fragments were polished parallel to the inner shell surface. The single crystal of aragonite was polished in a plane perpendicular to its *c*-axis. The samples for the EBSD analysis were cleaned and then carbon coated. The EBSD analysis was carried out using a Nordlys detector connected to a CamScan scanning electron microscope. Measurements were carried out in a regular grid with spacings of 15 μm. The crystallographic orientations of several thousand measurements, evaluated by Channel 5 software (HKL Technology), were plotted on a stereographic projection (Figure 1).

A Hysitron TI 950 TriboIndenter<sup>®</sup> nanomechanical test instrument was used to carry out quasi-static indents on the nacre. Load-controlled quasi-static tests were carried out on the samples using a diamond Berkovich

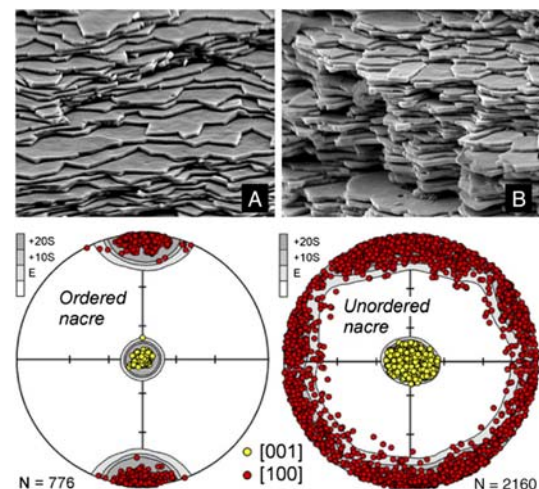


Figure 1. Scanning electron microscope images and results of the texture analysis of the nacre in *P. radiata* (A, ordered nacre) and in *N. nucleus* (B, unordered nacre).

\*Corresponding author. Email: [bellerophon@seznam.cz](mailto:bellerophon@seznam.cz)

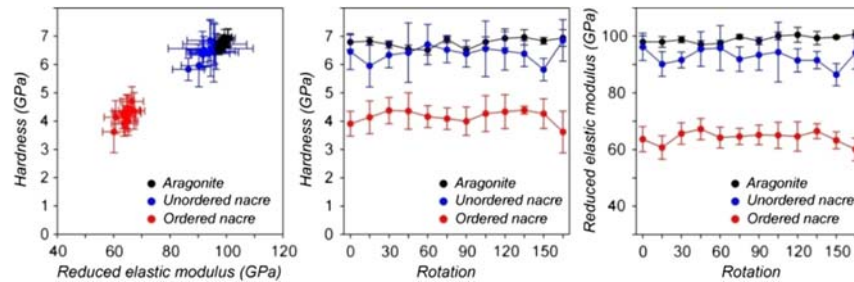


Figure 2. Results of the nanoindentation analysis showing the relationship between hardness and reduced elastic modulus, as well as the effect of rotation of a diamond Berkovich probe on the measured mechanical properties.

probe. A jig for mounting the embedded sample was attached to a rotational stage (model RSP-T), which was bolted down to TriboIndenter stage.

*In situ* scanning probe microscopy images of  $15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$  in size were taken at a contact force of  $2\ \mu\text{N}$ . A displacement load controlled indents to a maximum indentation depth of 100 nm, followed by a trapezoidal loading function of  $5 \times 2 \times 5\ \text{s}$ . The recorded indentation curves were analysed according to the Oliver and Pharr method, implemented within the TriboScan software.

The anisotropy of nacre was examined by rotating the sample by  $15^\circ$  within the range of  $0\text{--}180^\circ$ . Indents were individually placed via the ‘click script’ method on the acquired topography image.

### 3. Results and discussion

All living and fossil bivalves developing a nacreous layer have had an identical microstructural type, the so-called sheet nacre. However, the nacre may differ by its crystallographic texture. Two basic textural patterns (i.e. unordered and ordered) of the bivalve nacre have been documented (Frýda et al. 2009, 2010). The diagnostic character of the unordered nacre is a perfect preferred arrangement of  $[001]$  axis of individual platelets, and a random arrangement of their  $[100]$  and  $[010]$  axes. The second textural type of the nacre has a perfect preferred arrangement of their  $[100]$ ,  $[010]$  and  $[001]$  axes.

The EBSD analysis revealed a uniform orientation of the  $[001]$  direction of the aragonite platelets in both bivalve species, but a variable arrangement of  $[100]$  and  $[010]$  axes (Figure 1). The girdle arrangement for the  $[100]$  direction was documented in *N. nucleus* (unordered nacre), in contrast to *P. radiata* in which the cluster arrangement of the  $[100]$  direction was found (ordered nacre). Each of the two different samples of bivalve nacre thus represents a different textural type.

Nanoindentation analysis revealed that both textural types of the sheet nacre differ by their hardness values and reduced elastic modulus. The hardness of the ordered nacre is about 4.2 (3) GPa, and its reduced elastic modulus is about 64(2) GPa. In contrast, the unordered nacre is characterised by much higher values. Its hardness is about 6.3(5) GPa, and its reduced

elastic modulus is about 92(4) GPa.  $H$  and  $E_r$  values of the unordered nacre are similar to those obtained for an inorganic single crystal of aragonite (Figure 2). The values of the hardness and reduced elastic modulus for aragonite, measured in a direction parallel to its  $[001]$  axis (thus, as in the nacreous samples), are about 6.8(2) GPa and about 99(1) GPa, respectively. Nevertheless,  $F$  and  $t$  tests revealed statistically significant differences for both values measured ( $H$  and  $E_r$ ) of the inorganic aragonite as well as the unordered nacre.

Both the measured  $H$  and  $E_r$  values show very small variations for all rotated positions of the diamond Berkovich probe (Figure 2). None of the rotations influenced the measured values in a statistically significant manner.

### 4. Conclusion

1. The analyses suggest that both the hardness and reduced elastic modulus of the sheet nacre are controlled by its crystallographic texture. The ordered nacre is characterised by significantly lower values of  $H$  and  $E_r$  than are the unordered nacre.
2. The shape of the Berkovich probe has no significant influence on the measured  $H$  and  $E_r$  values in a strongly anisotropic aragonite.

### Acknowledgements

This study was supported by Grant No. 334600 from the CGS; project VZ 0002700604 (Section 010) and also by Grant No. TA01010185 of the Technology Agency from the Czech Republic.

### References

- Barthelat F, Tang H, Zavattieri PD, Li CM, Espinosa HD. 2007. On the mechanics of mother-of-pearl: a key feature in the material hierarchical structure. *J Mech Phys Solids*. 55(2):306–337.
- Frýda J, Bandel K, Frýdová B. 2009. Crystallographic texture of Late Triassic gastropod nacre: evidence of long-term stability of the mechanism controlling its formation. *Bull Geosci*. 84(4):745–754.
- Frýda J, Klicnarová M, Frýdová B, Mergl M. 2010. Variability in the crystallographic texture of bivalve nacre. *Bull Geosci*. 85:645–662.
- Kearney C, Zhao Z, Bruet BJF, Radovitzky R, Boyce MC, Ortiz C. 2006. Nanoscale anisotropic plastic deformation in single crystal aragonite. *Phys Rev Lett*. 96(25):255505.

### **5.3 Elastický modul a mikrotvrдость perleti mlžů z odlišných životních prostředí a analýza vztahu mikromechanických veličin k mikrostrukturním a texturním charakteristikám perleti**

Splnění třetího dílčího cíle disertační práce je doloženo rukopisem, který po přeložení do anglického jazyka a úpravě formátu podle instrukcí vybraného periodika, bude předložen do některého z odborných časopisů s IF zaměřených na problematiku biomineralizací. Detailní charakteristika vybraných vzorků a použitá metodika jsou uvedeny v kapitole 3.2 Metody studia mikrostruktury schránek kmene Mollusca. Výsledky měření hodnot elastického modulu a mikrotvrdsti jsou uvedeny v kapitole 4 Výsledky měření. Měření mikromechanických vlastností perleti mlžů bylo prováděno na stejných vzorcích, u kterých proběhlo již určení krystalografické textury perleti metodou elektronové difrakce zpětně odražených elektronů (EBSD) (Frýda a kol. 2010). Pro účely této studie bylo provedeno několik dalších ověřovacích měření metodou EBSD, následně byla všechna měření nově zpracována (vyloučení všech odlehlých hodnot a hodnot odpovídajících dvojčatění aragonitu podle {110}) a byly výpočteny Woodcockovy parametry. Výsledky měření hodnot elastického modulu a mikrotvrdsti byly zpracovány stejnou metodikou statistického šetření, která byla použita v kapitolách 5.1 a 5.2. Míra korelace mezi mikromechanickými vlastnostmi a Woodcockovými parametry byla charakterizována Pearsonovým korelačním koeficientem nebo v případě zamítnutí normálního rozdělení (Shapiro-Wilkův test) neparametrickým Spearmanovým korelačním koeficientem. Další detaily použité metodiky jsou uvedeny přímo v manuskriptu.

## Co určuje elastický modul pružnosti a mikrotvrdotost perleti mlžů?

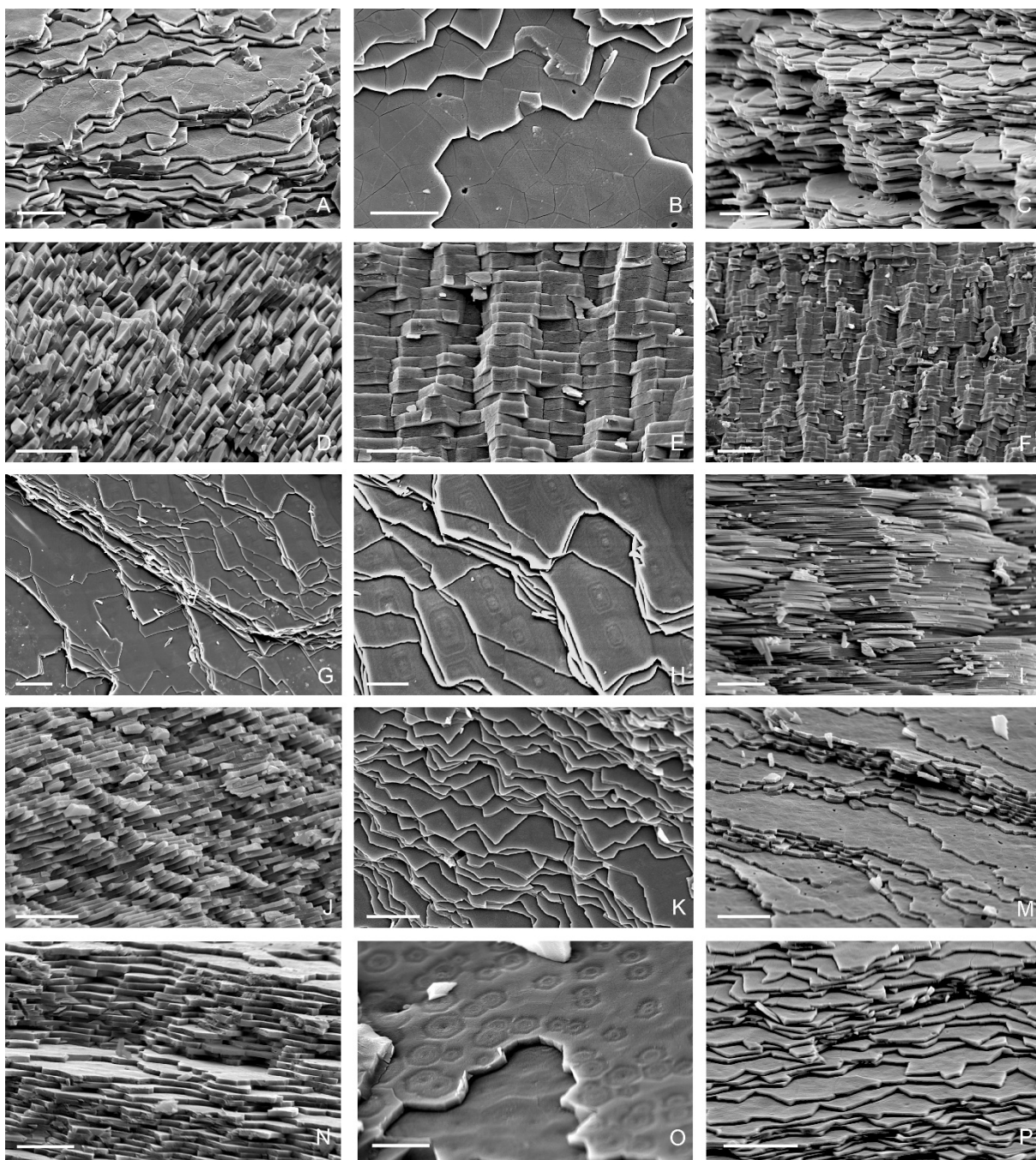
Abstrakt. - Studium mikrotvrdotosti a elastického modulu perleti mlžů patřících k 11 druhům (5 čeledím a 4 řádům) odhalilo, že mikrotvrdotost a elastický modul perleti je u všech zkoumaných mlžů nižší než u anorganického monokrystalu aragonitu. Získaná data neprokázala rozdíl mezi vlastnostmi perleti mořských a sladkovodních mlžů. U všech studovaných skupin mlžů roste s poklesem míry uspořádání aragonitových destiček, tvrdost a pružnost perleti. Mlži s jednoosou texturou perleti mají rovněž tvrdší a pružnější perleť, než mlži s quazimonokrystalickou texturou perleti. Výsledky studia naznačují možnost využít parametry krystalografické textury k odhadu tvrdosti a pružnosti perleti u fosilních měkkýšů, u kterých již tyto vlastnosti nemohou být přímo měřeny z důvodu absence organické složky schránek.

Měkkýši jsou nejvíce diversifikovanou skupinou mořských organismů, která má rovněž velmi dlouhý fosilní záznam. Během evoluce se jejich těla značně změnila a mnohé, často velmi početné skupiny měkkýšů vyhynuly. Fylogenetické vztahy většiny fosilních měkkýšů nejsou známy. Druhou nejpočetnější třídou měkkýšů jsou mlži, kteří jsou známy již od kambria a tvoří významnou součást mořského ekosystému po více než 500 milionů let (Runnegar 1985; Bieler a Mikkesen 2006; Bieler a kol. 2010). Diversita fosilních mlžů je však mnohem vyšší než diverzita žijících mlžů, avšak úroveň znalosti jejich fylogenetických vztahů klesá s jejich geologickým stářím (Waller 1998; Giribet 2008; Bouchet a Rocroi 2010). Na druhou stranu fosilní záznam mlžů je neobvykle kompletní, což je dáno hlavně velkou rezistencí jejich schránek v průběhu fosilizace. Mlži jsou tedy ideální skupinou pro evoluční, ekologické a biogeografické výzkumy. Poznání fylogenetických vztahů fosilních i žijících mlžů má tedy zásadní význam pro správné hodnocení těchto výzkumů. Tradiční systém mlžů byl odvozen z morfologie jejich schránek a tento zdroj dat je již značně vyčerpán (Bouchet a Rocroi 2010; Kříž 2007). Na rozdíl od tohoto poskytuje studium vnitřní stavby schránek fosilních i žijících mlžů významný a dosud nevyužitý zdroj fylogenetických údajů. Většina těchto studií se zaměřovala na hodnocení mikrostruktury (tj. tvaru krystalků; viz souhrn v Carter a kol. 1990a, b) nebo analýzu biochemických reakcí řídících tvorbu schránky (viz souhrn v Marin a Luquet 2004). Pouze několik značně izolovaných studií bylo zaměřeno na studium textury mlžích schránek či její mechanických vlastností (Wise 1970; Barthelat a kol. 2007; Checa a kol. 2008; Checa a Rodrigues-Navarro 2001, 2005; Lin a kol. 2008; Meyers a kol. 2008; a literatura v těchto publikacích).

Cílem této práce je určit, jaká je variabilita hodnot mikrotvrdotosti a elastického modulu pružnosti perleti mlžů, jak tyto mikromechanické vlastnosti souvisí s mikrostrukturou a krystalografickou texturou perleti, a zda životní prostředí či fylogenetická pozice mlžů ovlivňují hodnoty mikrotvrdotosti a elastického modulu pružnosti jejich perleti.

## Metodika

Pro studium mikromechanických vlastností perleti bylo vybráno jedenáct druhů mlžů, z nichž dva druhy (*Mytilus edulis* a *Pinna nobilis*) byly zastoupeny dvěma jedinci z rozdílných lokalit (tab. 1).



**Obrázek 1.** Aragonitové destičky perleti zkoumaných mlžů. •A-C – *Nucula nucleus*, Středozevní moře, Španělsko; •D, K – *Mytilus edulis*, Severní moře, Švédsko; •E-F – *Leptodea fragilis*, a •J, O – *Quadrula apiculata* ze SZ Texasu; •G-I – *Pinna nobilis* a •M – *Modiolus barbatus* z Jaderského moře, Slovinsko. •N – *Mytilus edulis*, La Manche, Anglie; •P – *Pinctada radiata*, Středozevní moře, Řecko. Velikost úsečky: A, B, C, D, E, H, I, J, K, M, N, P – 10  $\mu\text{m}$ ; F, G – 20  $\mu\text{m}$ ; O – 5  $\mu\text{m}$ .

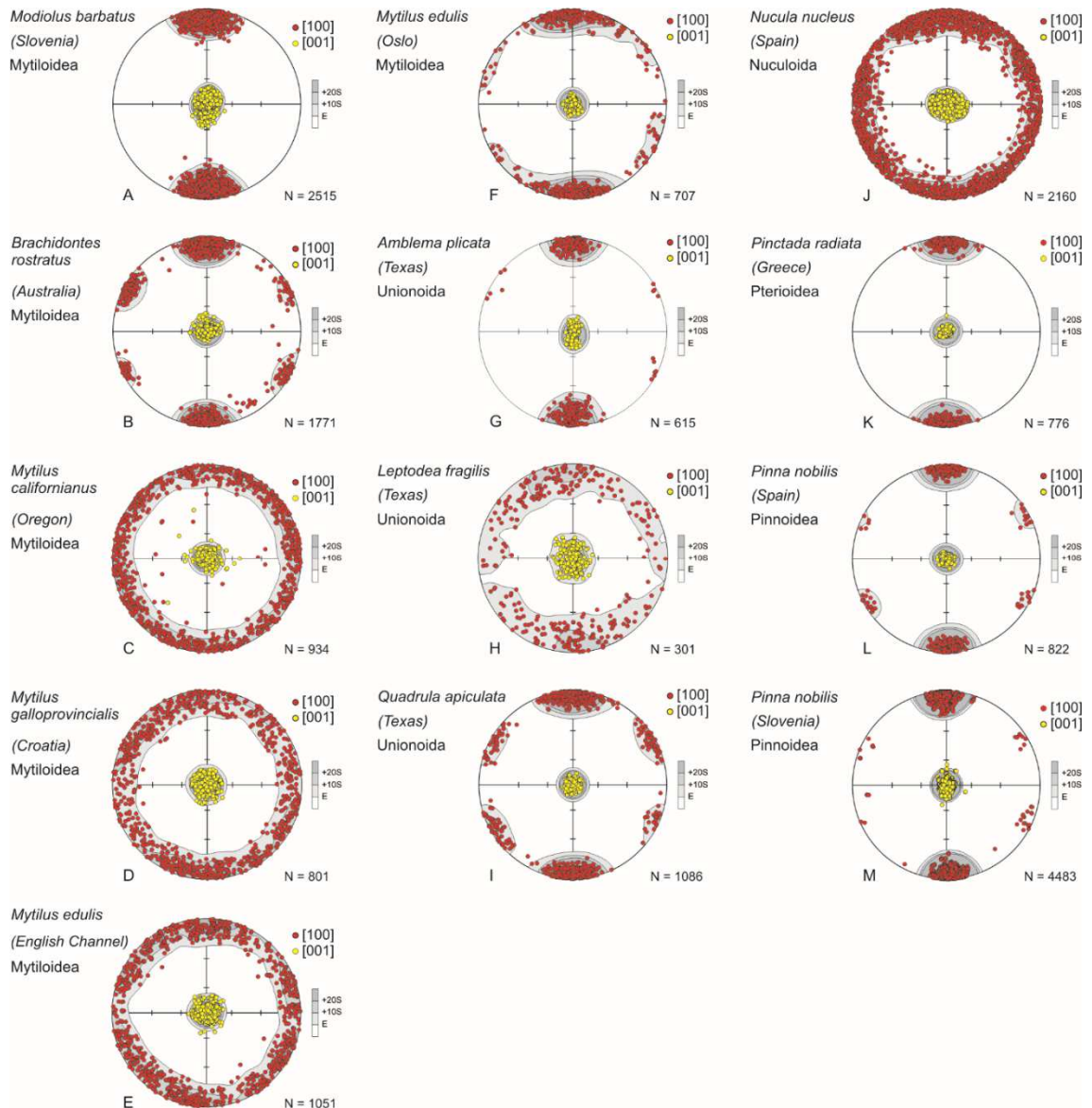
Vzorky lastur mlžů byly rozlámány na drobné úlomky tak, aby byla odhalena studovaná vrstva perleti a zachována informace o biologické orientaci úlomků. Část vzorků byla použita pro studium mikrostruktury elektronovým mikroskopem a jiné úlomky pro analýzu mikromechanických vlastností a krystalografické textury. Úlomky schránek pro studium mikrostruktury byly nalepeny uhlíkovou pastou na hliníkový terčík s uhlíkovou podložkou. U každého vzorku byla zaznamenána biologická orientace. Před vlastním pozorováním

elektronovým mikroskopem byly vzorky naprášeny vrstvou slitiny zlata a paladia o tloušťce přibližně 10 - 20 nm v naprašovací aparatuře firmy JEOL JFC-1200. Studium mikrostruktury schránek bylo provedeno na skenovacím elektronovém mikroskopu firmy JEOL-6380LV za urychlovacího napětí 15 kV. Pozorované části schránky byly snímkovány pro pozdější určení průměrné tloušťky destiček perleti a tloušťky perleťové vrstvy. Průměrná tloušťka destiček perleti byla vypočítána jako průměr z měření tloušťky 20 destiček perleti na třech různých příčných řezech schránkou.

**Tabulka 1. Seznam studovaných druhů**

Druh	Čeď	oblast	vzorek č.
<i>Nucula nucleus</i>	Nuculidae	Středozevní moře, Španělsko	110
<i>Pinctada radiata</i>	Pteridae	Egejské moře, Řecko	101
<i>Modiolus barbatus</i>	Mytilidae	Jaderské moře, Slovinsko	104
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mytilidae	Jaderské moře, Chorvatsko	105
<i>Mytilus edulis</i>	Mytilidae	Kanál La Manche, Anglie	106
<i>Mytilus edulis</i>	Mytilidae	Severní moře, Norsko	103
<i>Mytilus californianus</i>	Mytilidae	Tichý oceán, USA	116
<i>Brachidontes rostratus</i>	Mytilidae	Tichý oceán, Austrálie	115
<i>Pinna nobilis</i>	Pinnidae	Středozevní moře, Španělsko	108
<i>Pinna nobilis</i>	Pinnidae	Jaderské moře, Slovinsko	109
<i>Amblema plicata</i>	Unionidae	Texas, USA	121
<i>Leptodea fragilis</i>	Unionidae	Texas, USA	122
<i>Quadrula apiculata</i>	Unionidae	Texas, USA	123

Pro analýzu mikromechanických vlastností a krystalografické textury perleti byl každý orientovaný vzorek schránky mlže fixováním do pryskyřice Epofix ve tvaru válce o průměru přibližně 30 mm. Každý vzorek byl broušen nejprve několikrát postupně jemnějším karborundem, následně diamanty o zrnitosti 3 až 0,25  $\mu\text{m}$ . V poslední fázi leštění byla použita zrnitost diamantů 0,05  $\mu\text{m}$ . Mezi každou fází leštění byly vzorky omývány a čištěny v ultrazvukové lázni. Identické vzorky byly použity pro analýzu mikromechanických vlastností a krystalografické textury.



**Obrázek 2.** Orientace aragonitových destiček perleti zkoumaných mlžů zobrazená ve sférické projekci.

Měření mikromechanických vlastností perleti mlžů bylo prováděno na stejných vzorcích, u kterých proběhlo již určení krystalografické textury perleti metodou elektronové difrakce zpětně odražených elektronů (EBSD) (Frýda a kol. 2010). Pro účely této studie bylo provedeno několik dalších ověřovacích měření metodou EBSD, následně byla všechna měření nově zpracována (vyloučení všech odlehlých hodnot a hodnot odpovídajících dvojčatění aragonitu podle {110}) a byly vypočteny Woodcockovy parametry (Woodcock 1977; Woodcock a Naylor 1983). Analýzy EBSD byly provedeny za použití detektoru Nordlys připojeného ke skenovacímu elektronovému mikroskopu CamScan. Na každém vzorku perleti bylo provedeno 1 000 až 8 000 v souřadnicové síti s rozstupem 10 - 15  $\mu\text{m}$ . Vzhledem k velikosti perleťových destiček (přibližně 15  $\mu\text{m}$ ) odpovídá počet měření zhruba počtu změřených perleťových destiček v každém vzorku schránky. Měření byla provedena v režimu „Safe mode“, který v každém měřeném bodě provede tři záznamy difrakčních vzorů a pouze při naprosté shodě vyhodnocených orientací provede záznam měření. Pro další analýzu krystalografické textury perleti byla vybrána pouze měření

s nízkou hodnotou MAD (Mean Angular Deviation). Souborem programů HKL CHANNEL 5 byla vypočítána orientace každé změřené perleťové destičky a ta byla vyjádřena třemi Eulerovými úhly. Eulerovy úhly byly převedeny na krystalografické směry softwarovým balíčkem Škeble (viz Frýda a kol. 2009). Výsledky texturních analýz byly vyneseny ve stereografické projekci pro krystalografické směry [100] a [001] (Obr. 2). Data o orientaci jednotlivých krystalografických os aragonitových destiček perleti byla použita k výpočtu dvou parametrů C a K podle metody Woodcocka (1977) a zobrazena v Flinnově grafu (Flinn 1962). Parametr C určuje míru uspořádání a parametr K charakteristický typ texturního vzorce. Tyto parametry byly využity k analýze vztahu krystalografické textury perleti a studovaných mikromechanických vlastností.

Pro určení mikromechanických vlastností perleti, přesněji elastického modulu a mikrotvrdosti, byla použita metoda nanoindentační zkoušky. Měření byla prováděna za použití Berkovichova diamantového hrotu na zařízení Hysitron IT 950 TriboIndenter kvazi-statickou nanoindentací. Topografie povrchu vzorků sledované oblasti o velikosti 20 x 20  $\mu\text{m}$  byla nejprve naskenována pomocí *in-situ* SPM. Následně byla na naskenovaném snímku zvolena a označena místa pro indexaci pomocí tzv. „click skript“ a aplikována funkce piezo automatického módu, která umístí indenty s chybou < 10 nm. U všech experimentů byla tloušťka testované vrstvy 1  $\mu\text{m}$  a maximální zatěžovací síla stanovena na 1 000  $\mu\text{N}$ , která dle normy odpovídala hloubce vpichu ( $h_{\text{max}} < 100 \text{ nm}$ ). Zatěžovací funkce (zatěžování, konstantní síla a odlehčování) byly stanoveny na 5 x 2 x 5 sekund. Na každém vzorku byly provedeny dvě série měření, vždy 4 x 4 indenty, celkem tedy 32 indentů. Mezi oběma sériemi byl stolek se vzorkem otočen o 30°, aby byl vyloučen případný vliv anizotropie (Hrabánková a kol., v přípravě). K výpočtu mikrotvrdosti a elastického modulu byla použita metoda navržená Oliverem a Pharrm (1992).

## Výsledky

Tloušťka jednotlivých destiček perleti je poměrně málo variabilní u jednotlivých studovaných jedinců a pohybuje se mezi 5 – 10 % (Tab. 2). Na druhou stranu tloušťka destiček perleti je velice rozdílná mezi studovanými druhy.

**Tabulka 2.** Průměrná tloušťka destiček perleti v  $\mu\text{m}$  (pro každý vzorek je n=60).

Vzorek	Druh	Průměrná tloušťka destiček ( $\mu\text{m}$ )	Směrodatná odchylka ( $\mu\text{m}$ )
vz110	<i>Nucula nucleus</i>	0,80	0,06
vz101	<i>Pinctada radiata</i>	0,50	0,04
vz104	<i>Modiolus barbatus</i>	0,91	0,06
vz105	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	1,25	0,09
vz106	<i>Mytilus edulis</i>	1,00	0,07
vz103	<i>Mytilus edulis</i>	0,83	0,06
vz116	<i>Mytilus californianus</i>	0,65	0,05
vz115	<i>Brachidontes rostratus</i>	0,67	0,05
vz108	<i>Pinna nobilis</i>	0,56	0,04
vz109	<i>Pinna nobilis</i>	0,43	0,03
vz121	<i>Amblema plicata</i>	0,59	0,04
vz122	<i>Leptodea fragilis</i>	2,22	0,16
vz123	<i>Quadrula apiculata</i>	1,36	0,10



Z 32 nanoindentačních měření pro každý vzorek perleti bylo vždy vyloučeno několik měření (1 - 4) z důvodu výskytu „pop-in“ efektu na měřených křivkách. Jednotlivé série měření elastického modulu a mikrotvrlosti po vyloučení odlehlých hodnot splňovaly kritérium normality (Shapiro-Wilkův test,  $p > 0.05$ ). Výsledky nanoindentačních měření u žádného druhu mlže neprokázaly statisticky významný rozdíl (t-test,  $p > 0.05$ ) mezi oběma sériemi měření (2x  $n=16$ ) otočenými o 30°, což je v souladu s předchozími výsledky o nevýznamnosti vlivu anizotropie při měření mikromechanických vlastností perleti použitím Berkovichova diamantového hrotu (Hrabánková a kol., v přípravě). Vzhledem k těmto skutečnostem byly mikromechanické vlastnosti perleti u každého druhu charakterizovány hodnotami vypočtenými ze sloučených dat obou serií (Tab. 3 a Obr. 3)

**Tabulka 3.** Výsledky měření elastického modulu a mikrotvrlosti.

Vzorek	Druh	Mikrotvrlost (GPa)	Směr odchylka mikrotvrlosti (GPa)	Elastický modul (GPa)	Směr odchylka el. modulu (GPa)
vz110	<i>Nucula nucleus</i>	6,25	0,16	89,17	1,23
vz101	<i>Pinctada radiata</i>	4,19	0,11	64,04	0,84
vz104	<i>Modiolus barbatus</i>	6,32	0,09	84,53	0,68
vz105	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	5,99	0,11	81,75	0,77
vz106	<i>Mytilus edulis</i>	6,60	0,08	87,92	0,72
vz103	<i>Mytilus edulis</i>	5,56	0,10	70,30	0,63
vz116	<i>Mytilus californianus</i>	6,08	0,08	79,71	0,51
vz115	<i>Brachidontes rostratus</i>	5,30	0,07	70,22	0,42
vz108	<i>Pinna nobilis</i>	5,16	0,06	63,40	0,62
vz109	<i>Pinna nobilis</i>	4,75	0,06	68,27	0,51
vz121	<i>Amblema plicata</i>	5,47	0,06	74,07	0,35
vz122	<i>Leptodea fragilis</i>	6,74	0,11	89,61	0,76
vz123	<i>Quadrula apiculata</i>	5,21	0,07	70,75	0,47

Hodnoty nově přepočtených Woodcockových parametrů pro série měření orientace jednotlivých aragonitových destiček perleti (Obr. 2) se ve všech případech statisticky významně neliší (t-test,  $p > 0.05$ ) od předchozího zpracování (Frýda a kol. 2010). Určením orientace libovolných dvou os aragonitu je sice určena pozice osy třetí, ale jednotlivá měření (tj. jednotlivé destičky aragonitu) jsou orientovány nezávisle. Z tohoto důvodu byly vypočteny Woodcockovy parametry K a C pro všechny tři kolmé krystalografické osy aragonitu (**a**, **b** a **c**), tj. pro krystalografické směry [100], [010], a [001] (Tab. 4).

**Tabulka 4.** Woodcockovy parametry C a K pro hlavní krystalografické osy aragonitu

<b>Woodcockův parameter C</b>							
Vzorek	Druh	C [100]	std. d.	C [010]	std. d.	C [001]	std. d.
vz110	<i>Nucula nucleus</i>	3,921	0,015	4,057	0,017	4,885	0,001
vz101	<i>Pinctada radiata</i>	5,830	0,008	5,884	0,007	6,368	0,002
vz104	<i>Modiolus barbatus</i>	4,331	0,001	4,876	0,001	5,062	0,002
vz105	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	3,512	0,025	4,198	0,05	4,329	0,002
vz106	<i>Mytilus edulis</i>	3,696	0,025	4,329	0,047	4,694	0,002
vz103	<i>Mytilus edulis</i>	5,290	0,072	5,764	0,116	5,831	0,003
vz116	<i>Mytilus californianus</i>	4,131	0,080	4,79	0,128	4,950	0,002
vz115	<i>Brachidontes rostratus</i>	5,229	0,002	6,207	0,004	5,743	0,002
vz108	<i>Pinna nobilis</i>	5,599	0,004	5,817	0,004	5,924	0,002
vz109	<i>Pinna nobilis</i>	5,366	0,001	5,798	0,001	5,773	0,001
vz121	<i>Amblema plicata</i>	4,963	0,004	6,432	0,016	6,223	0,003
vz122	<i>Leptodea fragilis</i>	2,964	0,030	3,418	0,047	3,833	0,005
vz123	<i>Quadrula apiculata</i>	5,379	0,002	5,729	0,010	5,670	0,158

<b>Woodcockův parameter K</b>							
Vzorek	Druh	K [100]	std. d.	K [010]	std. d.	K [001]	std. d.
vz110	<i>Nucula nucleus</i>	0,098	0,000	0,093	0,000	6,311	0,011
vz101	<i>Pinctada radiata</i>	4,096	0,031	4,005	0,032	11,3	0,064
vz104	<i>Modiolus barbatus</i>	34,202	0,300	8,239	0,020	4,462	0,007
vz105	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	0,093	0,001	0,075	0,001	75,531	3,454
vz106	<i>Mytilus edulis</i>	0,055	0,000	0,048	0,001	15,231	0,120
vz103	<i>Mytilus edulis</i>	0,627	0,014	0,548	0,017	7,945	0,041
vz116	<i>Mytilus californianus</i>	0,109	0,004	0,096	0,004	15,064	0,130
vz115	<i>Brachidontes rostratus</i>	9,403	0,040	3,282	0,011	8,407	0,028
vz108	<i>Pinna nobilis</i>	7,033	0,041	5,403	0,026	11,889	0,072
vz109	<i>Pinna nobilis</i>	26,781	0,910	8,325	0,011	11,541	0,017
vz121	<i>Amblema plicata</i>	29,465	0,905	3,249	0,034	3,338	0,012
vz122	<i>Leptodea fragilis</i>	0,380	0,006	0,328	0,006	5,504	0,061
vz123	<i>Quadrula apiculata</i>	2,993	0,006	2,377	0,014	5,670	0,002

## Diskuze

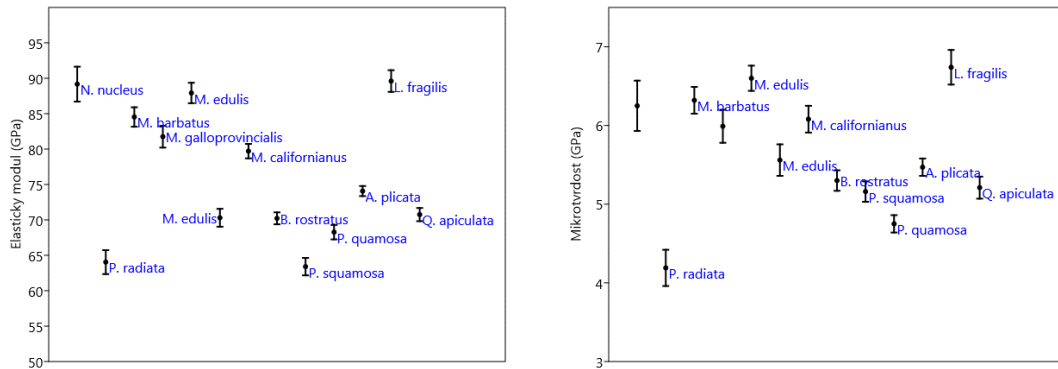
### Variabilita elastického modulu a mikrotvrlosti

Vypočtené hodnoty elastického modulu a mikrotvrlosti perleti mlžů jsou značně variabilní mezi jednotlivými druhy (Obr. 3) a dokonce jsou statisticky významně odlišné mezi jedinci stejného druhu z odlišných geografických populací *Mytilus edulis*: Severního moře (Oslo) x pobřeží u města Brighton (Anglie); *Pinna nobilis*: Středozevního moře (Valencie, Španělsko) x pobřeží Jaderského moře (Slovinsko). V obou případech se studovaní jedinci mírně liší v tloušťce destiček perleti (Tab. 2) a významně v krystalografické textuře perleti (Tab. 4). Nicméně toto zjištění je založeno pouze na porovnání velmi omezených dat (tj. dva druhy a každý jen ze dvou odlišných populací), proto je třeba ho brát jako velmi předběžné. Dosud nebyla provedena žádná studie, která by analyzovala variabilitu mikrostrukturních a texturních parametrů perleti v jedné populaci nebo v průběhu ontogeneze u jedné schránky. Existující modely růstu perleti u mlžů (Checa a kol. 2006, 2008), jakož i aktivita shodných enzymů řídících růst perleti (Marin a Luquet 2004; Marin a kol. 2008; Marie a kol. 2008, 2009), naznačují uniformní mikrostrukturní a texturní parametry perleti. Data této studie však naznačují, že skutečnost je patrně mnohem komplikovanější.

Taxonomická variabilita elastického modulu a mikrotvrlosti perleti je rovněž značná (Obr. 3). Například variabilita hodnot elastického modulu a mikrotvrlosti perleti u zástupců čeledi Mytilidae, zastoupené druhy rodů *Modiolus*, *Mytilus* a *Brachidontes*, se pohybuje v rozmezí 70 - 88 GPa pro elastický modul a 5.3 - 6.6 GPa pro mikrotvrlost. Podobně je tomu i u čeledi Unionidae, zastoupené 3 druhy rodů *Amblema*, *Leptodea* a *Quadrula* (Obr. 3). Přestože bylo studováno jen omezené množství mlžů (11 druhů z 5 čeledí), provedená studie naznačuje, že mikromechanické vlastnosti perleti nejsou determinovány fylogenetickou pozicí mlžů.

Možnost studovat vliv životního prostředí na hodnoty elastického modulu a mikrotvrlosti perleti u takto nepočteného výběru je značně omezena. Některé hypotézy však mohou být testovány. Lze vyloučit hypotézu, že existuje významný rozdíl v hodnotách elastického modulu a mikrotvrlosti perleti u mořských a sladkovodních mlžů. Hodnoty elastického modulu a mikrotvrlosti perleti u čeledi Unionidae, zastoupené sladkovodními druhy rodů *Amblema*,

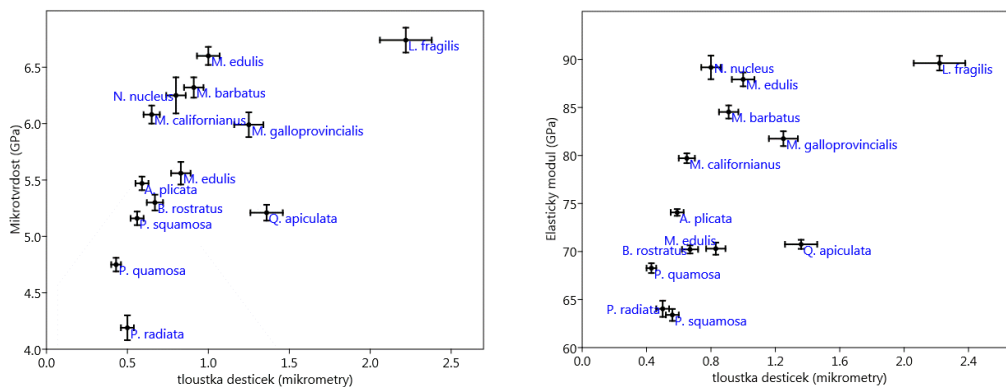
*Leptodea* a *Quadrula*, se pohybují v rozmezí 70 - 90 GPa pro elastický modul a 5.2 - 6.7 GPa pro mikrotvrdot. Rozsah hodnot elastického modulu i mikrotvrdoti perleti těchto sladkovodních druhů je téměř identický s hodnotami zjištěnými u mořských zástupců čeledi Mytilidae (Obr. 3).



Obrázek 3. Taxonomická variabilita hodnot elastického modulu a mikrotvrdoti perleti mlžů.

### Vztah mikromechanických vlastností a mikrostruktury perleti

Studium perleti elektronovým mikroskopem (Obr. 1) potvrdilo, že perleť všech zkoumaných druhů patří ke stejnému mikrostrukturnímu typu, tzv. vrstevnaté perleti (sheet nacre), což je dosud jediný mikrostrukturní typ perleti známý u mlžů (Hedegaard a Wenk 1998; Chateigner a kol. 2000; Frýda a kol. 2010). Je třeba si ale uvědomit, že z mnoha tisíců žijících mlžů byla perleť zkoumána jen u několika málo desítek druhů. Jediným výrazným parametrem, kterým se liší mikrostruktura perleti u studovaných druhů, je tloušťka jednotlivých destiček perleti (Tab. 2 a Obr. 4).



Obrázek 4. Závislost hodnot elastického modulu a mikrotvrdoti na tloušťce destiček perleti.

Analýza odhalila statisticky významnou korelaci mezi tloušťkou aragonitových destiček perleti a hodnotami jak elastického modulu, tak i mikrotvrdoti (Spearmanův koeficient  $r = 0.71$ ,  $p < 0.05$ , pro elastický modul,  $r = 0.68$ ,  $p < 0.05$ , pro mikrotvrdot). Přestože tato korelace není velmi těsná, je zřejmé, že perleť mlžů, kteří mají silnější destičky perleti, má větší mikrotvrdot i elastický modul. Nicméně, hodnotami tloušťky destiček perleti můžeme vysvětlit jen zhruba polovinu variability hodnot elastického modulu a mikrotvrdoti.

### Vztah mikromechanických vlastností a krystalografické textury perleti

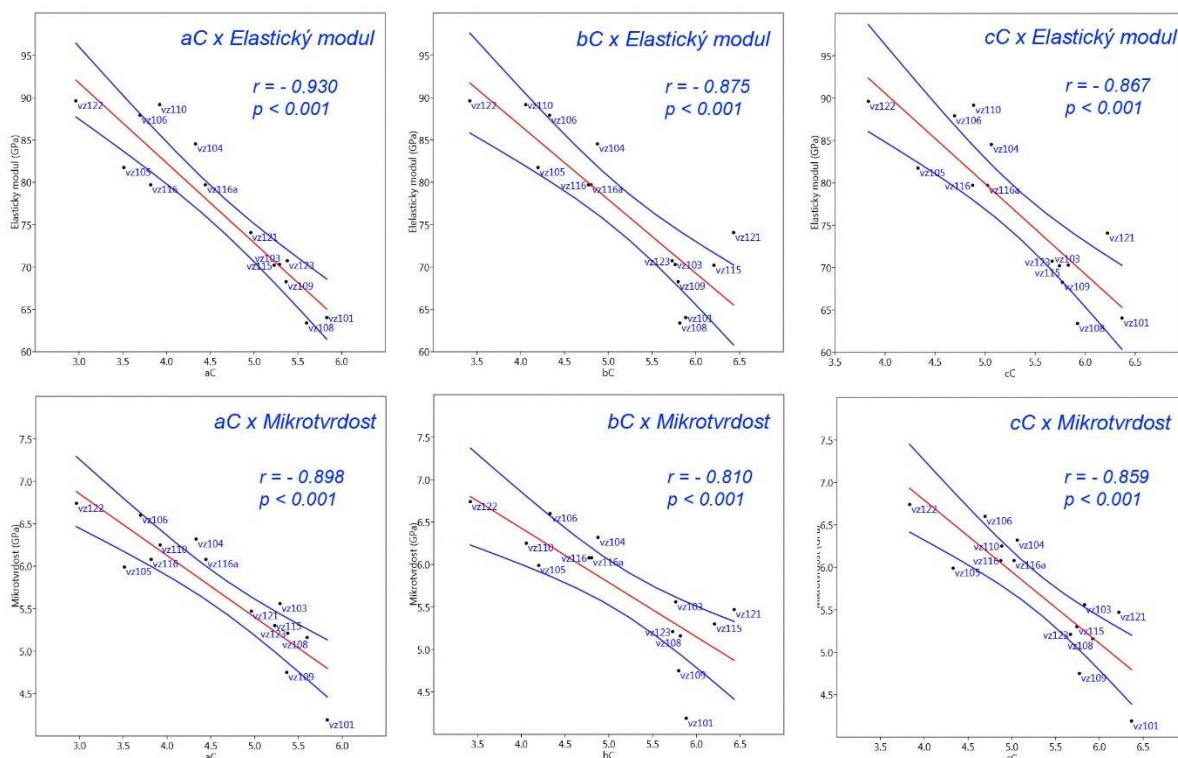
Tvar, velikost a uspořádání jednotlivých aragonitových destiček perleti (tj. mikrostruktura) nejsou jedinými vlastnostmi, kterými můžeme charakterizovat stavbu perleti. Protože destičky perleti jsou tvořeny krystalky aragonitu, lze analyzovat rovněž vzájemnou orientaci krystalografických mřížek těchto krystalků (tj. krystalografickou texturu). Zvážíme-li orientaci vždy jen jedné krystalografické osy u analyzovaných aragonitových destiček, lze teoreticky prostor možných orientací vymezit třema krajními stavy, mezi kterými se nachází všechny ostatní možnosti. První možností je naprosto náhodná orientace os, druhou možností je naprosto identická orientace os a třetí možností je náhodná orientace os v jedné rovině. Z měřených dat promítnutých ve sferické projekci (Obr. 2) je zřejmé, že orientace krystalografických os aragonitu u zkoumaných vzorků perleti je blízká druhé a třetí možnosti. U všech zkoumaných vzorků jsou *c* osy aragonitových destiček (tj. krystalografický směr [001]) téměř paralelní a vždy kolmo k povrchu schránky. Na druhou stranu u *a* osy aragonitových destiček (tj. krystalografický směr [100]) se vyskytují dvě krajní možnosti a přechody mezi nimi. Osy *a* aragonitových destiček jsou buď orientovány shodně (tedy podobně jako osy *c*) a vytvářejí jeden shluk (Obr. 2A), nebo jsou náhodně orientovány v jedné rovině a vytváří prstenec (Obr. 2 C). V prvním případě, kdy všechny krystalografické osy aragonitových destiček (tj. osy *a*, *b* a *c*) jsou zhruba rovnoběžné, můžeme krystalografickou texturu perleti označit jako "quazimonokrystalickou" (perleť je jakýmsi monokrystalem aragonitu složeným ze stejně orientovaných destiček). V druhém případě, kdy krystalografické osy *c* (tj. krystalografický směr [001]) všech aragonitových destiček jsou zhruba rovnoběžné, ale osy *a* (tedy i osy *b*) jsou náhodně orientovány v jedné rovině a vytváří prstenec, označujeme krystalografickou texturu perleti jako "jednoosou".

Pro potřeby této studie byly výše zmíněné kvalitativní texturní vlastnosti perleti kvantifikovány pomocí Woodcockových parametrů *K* a *C* a zobrazeny v Flinnově diagramu (Flinn 1962). Parametry *K* a *C* nabývají hodnot z intervalu  $< 0, \infty$ ), přičemž parametr *K* kvantitativně charakterizuje přechod mezi stavem, kdy osy jsou uspořádány do „prstence“ ( $K = 0$ ), a stavem, kdy osy jsou naprosto rovnoběžné ( $K = \infty$ ). Naproti tomu parametr *C* kvantitativně charakterizuje míru uspořádání, od nahodilého uspořádání os ( $C = 0$ ) po naprosto dokonalé uspořádání ( $C = \infty$ ). U každé aragonitové destičky je určením orientace libovolných dvou os aragonitu sice určena pozice osy třetí, ale jednotlivá měření (tj. jednotlivé destičky aragonitu) jsou orientovány nezávisle. Z tohoto důvodu byly vypočteny hodnoty Woodcockových parametrů *K* a *C* pro všechny hlavní krystalografické osy, tj. osu *a*, *b* a *c* (Tab. 4).

**Tabulka 5.** Korelace mezi elastickým modulem (*A*) a mikrotvrdostí (*B*) a Woodcockovými parametry.

<b>A</b>	<i>El. modul</i>	<i>aC</i>	<i>cC</i>	<i>bC</i>	<i>aK</i>	<i>bK</i>	<i>cK</i>
<i>El. Modul</i>		0,000	0,000	0,000	0,068	0,017	0,396
<i>aC</i>	-0,902	<i>Spearmanův korelační koeficient (rs\p)</i>					
<i>cC</i>	-0,838						
<i>bC</i>	-0,840						
<i>aK</i>	-0,502						
<i>bK</i>	-0,623						
<i>cK</i>	-0,246						
		aC - parametr C osy <i>a</i>		aK - parametr K osy <i>a</i>			
		bC - parametr C osy <i>b</i>		bK - parametr K osy <i>b</i>			
		cC - parametr C osy <i>c</i>		cK - parametr K osy <i>c</i>			





**Obrázek 5.** Korelace mezi mikrotvrdostí a elastickým modulem a Woodcockovými parametry

Porovnání variability hodnot mikrotvrdosti a elastického modulu perleti mlžů s hodnotami anorganického aragonitu (Frýda a kol. 2010, Hrabánková, v přípravě), který byl měřen v identickém směru (tj. paralelně s osou *c*) a stejnou metodikou, ukazuje na neobvyklou skutečnost. Mlži, kteří mají méně uspořádané aragonitové destičky perleti (tj. nižší Woodcockův parametr C), mají tvrdší a pružnější perleť. Hodnoty mikrotvrdosti a elastického modulu perleti u této skupiny mlžů se blíží hodnotám anorganického aragonitu [mikrotvrdość (6,7 GPa) a elastický modul (98 GPa), Hrabánková, v přípravě]. Je zajímavé, že existující data pro kalcitové vrstvy měkkých schránek dokazují opačný trend. Například Hrabánková a kol. (2013) doložila, že kalcitová vrstva patellogastropodů má vyšší tvrdost a téměř dvojnásobný elastický modul, než anorganický kalcit.

Mlži, kteří mají jednoosou krystalografickou texturu (tj. aragonitové destičky perleti jsou uspořádané do prstence - mají nižší Woodcockův parametr K), mají tvrdší a pružnější perleť, než mlži s quazimonokrystalickou texturou perleti. Tato vazba je však podstatně volnější, než vazba mezi hodnotami mikrotvrdosti a elastického modulu a Woodcockova parametru C.

Přechozí analýza mikrotvrdosti a elastického modulu perleti mlžů (Frýda a kol. 2013) naznačila silnou vazbu mezi mikromechanickými vlastnostmi perleti a její krystalografickou texturou. Do studie však byly zahrnuty jen dva druhy mlžů, a tak nebylo možno rozhodnout, který z Woodcockových parametrů má rozhodující vliv. Skutečnost, že tvrdší a pružnější perleť se vyskytuje u mlžů s jednoosou texturou perleti, je velice zajímavá i z hlediska fylogenetického.

Tento texturní typ perleti se vyskytuje u všech tříd měkkých s perleťovou vrstvou, tj. u tříd Monoplacophora, Gastropoda, Cephalopoda a Bivalvia (Hedegaard a Wenk 1998; Chateigner a kol. 2000; Frýda a kol. 2010; Frýda 2012) a je považován za primitivní stav. Je to rovněž jediný texturní typ perleti, který se vyskytuje ve třídách Monoplacophora a Gastropoda. Přestože dosud

neexistuje mnoho dat o krystalografické textuře perleti fosilních měkkýšů, existující data naznačují extrémní časovou stabilitu texturních parametrů perleti. Byla například prokázána existence perleti s jednoosou texturou u triasového vetigastropoda, což doložilo, že perleť gastropodů se nezměnila po více než 220 milionů let (Frýda a kol. 2009). Přijmeme-li fylogenetickou hypotézu, že jednoosá textura perleti je primitivní a quazimonokrystalová odvozená, pak ale data této studie naznačují, že primitivnějším stavem perleti mlžů je její větší tvrdost a pružnost, než u perleti fylogeneticky mladší. Toto je však opačný trend, než by logicky vyplýval ze skutečnosti vzrůstajícího predančního tlaku v mořském ekosystému v průběhu paleozoika a mesozoika (např. Vermeij 1977; Klug a kol. 2010). Nicméně, statisticky významná negativní korelace (viz Tab. 5) Woodcockova parametru C pro osu **b** a mikrostrukturními vlastnostmi perleti je skutečností a vyžaduje další zkoumání.

Důvody neočekávaně silné negativní korelace mezi mikromechanickými vlastnostmi a Woodcockovým parametrem C (viz Tab. 5 a Obr. 5), která dokáže vysvětlit 75 – 86 % variability elastického modulu a 65 - 81 % variability mikrotvrdosti, jsou zatím neznámé. Jedním z možných důvodů by mohlo být množství organické hmoty v perleti. Dá se očekávat, že při vzrůstu obsahu organické hmoty v perleti by se uspořádání aragonitových destiček méně řídilo krystalografickými zákony (viz model růstu perleti – Checa a kol. 2006, 2008), a Woodcockův parametr C by rostl a hodnoty mikrotvrdosti a elastického modulu by klesaly. Tuto a některé další pracovní hypotézy však bude nutno podrobit dalším testům.

## Shrnutí

Studium mikrotvrdosti a elastického modulu perleti mlžů přineslo několik nových a zásadních zjištění, které jsou sumarizovány v následujících bodech:

- 1) Mikrotvrdost a elastický modul perleti u všech zkoumaných mlžů (11 druhů z 5 čeledí a 4 řádů) je nižší než u anorganického monokrystalu aragonitu.
- 2) Neexistuje statisticky významný rozdíl hodnot elastického modulu a mikrotvrdosti perleti mořských a sladkovodních mlžů.
- 3) Mikromechanické vlastnosti perleti nejsou pravděpodobně determinovány fylogenetickou pozicí mlžů.
- 4) Existuje statisticky významná pozitivní korelace mezi tloušťkou aragonitových destiček a mikromechanickými vlastnostmi perleti.
- 5) Existuje silná negativní korelace mezi hodnotami mikrotvrdosti a elastického modulu na jedné straně a mírou uspořádání aragonitových destiček. Statisticky významná, ale slabší korelace existuje mezi mikromechanickými vlastnostmi a texturním typem perleti. Mlži s jednoosou texturou perleti mají tvrdší a pružnější perleť, než mlži s quazimonokrystalickou texturou perleti.

Pokud se dalšími studiemi tyto závěry potvrdí, pak bude možno poměrně přesně odhadovat mikrotvrdost a elastický modul perleti fosilních měkkýšů. Vlastní měření mikromechanických vlastností perleti fosilních měkkýšů může být zkresleno absencí organické hmoty v perleti či její částečnou rekrytalizací na stabilnější kalcit. Krystalografická textura aragonitových destiček, pokud se zachovají (nejstarší aragonitová perleť je cca 350 milionů let stará), se těmito procesy nezmění. Získali bychom tedy nástroj, jak zpětně poměrně přesně kvantifikovat tvrdost a pružnost perleti měkkýšů žijících před stovkami milionů let.

## Poděkování

Tato práce je založena na doktoradském projektu první autorky, který byl částečně financován projektem Grantové agentury ČR (15-133105).

## Literatura

- Barthelat, F., Tang, H., Zavattieri, P. D., Li, C. M., Espinosa, H.D. 2007. On the mechanics of mother-of-pearl: A key feature in the material hierarchical structure, *J Mech Phys Solid* 55, 306–337.
- Bieler, R., Mikkesen, P. 2006. Bivalvia – a look at the branches. *Zoological Journal of the Linnean Society* 148(3), 223–235.
- Bieler, R., Carter R, J.G., Coan, E.V. 2010. Classification of bivalve families, 113–133. In Bouchet, P., Rocroi, J.-P. Nomenclator of bivalve families. *Malacologia* 52(2), 1–184.
- Bouchet, P., Rocroi, J.-P. 2010. Nomenclator of bivalve families with a classification of bivalve families by R. Bieler, J.G. Carter & E.V. Coan. *Malacologia* 52(2), 1–184.
- Carter, J.G. (ed.) 1990a. Skeletal Biomineralisation: Patterns, Processes and evolutionary trends. Vol. I. New York: *Van Nostrand Reinhold*, 832pp.
- Carter, J.G. (ed.) 1990b. Skeletal Biomineralisation: Patterns, Processes and evolutionary trends. Vol. II. Atlas and Index. New York: *Van Nostrand Reinhold*, 250pp.
- Carter J.G, Clark, GR. 1985. Classification and phylogenetic significance of Molluscan shell microstructure. In: Broadbent TW, ed. Mollusks, notes for a short course. *University of Tennessee Department of Geological Sciences Studies in Geology* 13, 50–71.
- Chateigner, D., Hedegaard, C., Wenk, H. R. 2000. Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *Journal of Structural Geology* 22, 1723–1735.
- Checa, A. G., Okamoto, T. & Ramírez, J. 2006. Organization pattern of nacre in Pteriidae (Bivalvia: Mollusca) explained by crystal competition. *Proceedings of the Royal Society B* 273, 1329–1337.
- Checa, A. G.; Ramírez, J.; González-Segura, A.; Sáncheznavas, A. (2008). Nacre and false nacre (foliated aragonite) in extant monoplacophorans (=Tryblidiida: Mollusca). *Naturwissenschaften* 96 (1): pp. 111 - 122.
- Checa, A. G. & Rodrigues-Navarro, A. B. 2001. Geometrical and crystallographic constraints determine the self-organization of shell microstructures in Unionidae (Bivalvia: Mollusca). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* 268, 771–8.
- Checa, A. G. & Rodrigues-Navarro, A. B. 2005. Self-organisation of nacre in the shells of Pterioida (Bivalvia: Mollusca). *Biomaterials* 26, 1071–1079.
- Flinn D. 1962. On folding during three-dimensional progressive deformation. *Quarterly Journal of the Geological Society*, London 118, 385-433.
- Frýda, J. 2012. Phylogeny of Paleozoic gastropods inferred from their ontogeny, 395-435. In: *Earth and Life – Global Biodiversity, Extinction Intervals and Biogeographic Perturbations Through Time*, John A. Talent (Ed.), Series: International Year of Planet Earth, Springer, 1100.
- Frýda, J., Bandel, K., Frýdová, B. 2009. Crystallographic texture of Late Triassic gastropod nacre: evidence of long-term stability of the mechanism controlling its formation. *Bulletin of Geosciences* 84(4), 747–756.



- Frýda, J., Klicnarová, M., Frýdová, B., Mergl, M. 2010. Variability in the crystallographic texture of bivalve nacre. - *Bulletin of Geosciences* 85(4), 645–662.
- Frýda, J.; Šepitka, J.; Frýdová, B.; Hrabánková, I.; Lukeš, J.; Klicnarová, M. (2013). Crystallographic texture determines mechanical properties of molluscan nacre. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 16: pp. 292 - 293.
- Giribet, G. 2008. Bivalvia. In: Ponder, W. F., Lindberg, D. R. (Eds.), *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. University of California Press, Berkeley, 105–141.
- Hedegaard, C. & Wenk, H. R. 1998. Microstructure and texture patterns of mollusc shells. *Journal of Molluscan Studies* 64, 133–136.
- Hrabánková, I., Frýda, J., Šepitka, J., Sasaki, T., Frýdová, B., Lukeš, J. 2013. Mechanical properties of deep-sea molluscan shell. – *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 16, Supplement 1, 287-289.
- Klug, C., Kröger, B., Kiessling, W., Mullins, G. L., Servais, T., Frýda, J., Korn, D. & Turner, S. 2010. The Devonian Nekton Revolution. *Lethaia*, 43, 465–477.
- Kříž, J. 2007. Origin, evolution and classification of the new superorder Nepiomorphia (Mollusca, Bivalvia, Lower Paleozoic). *Palaeontology* 50(6), 1341–1365
- Lin A. Y. M., Chen, P.Y., Meyers, M.A. 2008. Biological materials: structure and mechanical. *Prog. Mater Sci.* 53, 1–206.
- Marie, B., Luquet, G., Bedouet, L., Milet, C., Guichard, N., Medakovic, D. & Marin, F. 2008. Nacre Calcification in the Freshwater Mussel *Unio pictorum*: Carbonic Anhydrase Activity and Purification of a 95 kDa Calcium-Binding Glycoprotein. *ChemBioChem* 9, 15, 2515–2523.
- Marie, B., Marin, F., Marie, A., Bedouet, L., Dubost, L., Alcaraz, G., Milet, C. & Luquet, G. 2009. Evolution of nacre: Biochemistry and proteomics of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. *ChemBioChem* 10, 9, 1495–1506.
- Marin, F. & Luquet, G. 2004. Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus, Palevol* 3, 469–492.
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B. & Medakovic, D. 2008. Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution. *Current Topics in Developmental Biology* 80, 210–277.
- Meyers M.A., Chen P.Y., Lin A.Y.M., Seki Y. 2008. Biological materials: Structure and mechanical properties, *Prog Mater Sci* 53, 1–206.
- Runnegar B. 1985. Shell microstructures of Cambrian molluscs replicated by phosphate. *Alcheringa*, 9, 3–4, 245–257.
- Vermeij, G.J., 1977. The Mesozoic marine revolution: Evidence from snails, predators, and grazers: *Paleobiology*, 3, 245–258.
- Waller, T. R. 1998. Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups. In *Bivalves: An Eon of Evolution*. Edited by P. A. Johnston and J. W. Haggard. Calgary: University of Calgary Press, pp. 1–45.
- Wise S.W. 1970. Microarchitecture and mode of formation of nacre (mother of pearl) in pelecypods, gastropods and cephalopods. *Eclogae Geologicae Helvetiae* 63, 775–97.
- Woodcock, N. H. 1977. Specification of fabric shape using an eigenvalue method, *Geological Society of America Bulletin*, 88, 1231–1236.

Woodcock, N. H. & M. A. Naylor, 1983. Randomness testing in three-dimensional orientation data, *Journal of Structural Geology* 5, 539–548.

## 6 ZÁVĚR

Disertační práce má stanoveny tři dílčí cíle:

- i. Určit a porovnat elastický modul a mikrotvrdotost dvou odlišných mikrostruktur, kalcitové a aragonitové, u vybraných měkkýšů žijících ve výrazně odlišných fyzikálních podmínkách.
- ii. Určit a porovnat elastický modul a mikrotvrdotost anorganického aragonitu a aragonitové perleti mlžů s odlišnou krystalografickou texturou a analyzovat vliv anizotropie aragonitu na měřené mikromechanické veličiny.
- iii. Určit elastický modul a mikrotvrdotost perleti mlžů z odlišných životních prostředí a analyzovat vztah mikromechanických veličin k mikrostrukturním a texturním parametrům perleti.

Dosažení těchto cílů je doloženo textem kapitol 5.1, 5.2 a 5.3 a dvěma publikovanými pracemi a jedním dosud nepředloženým manuskriptem, který je součástí dizertační práce. V následující části jsou shrnuty nejdůležitější výsledky a nové poznatky předložené dizertační práce:

A) V případě řádu Patellogastropoda bylo doloženo, že nejrozšířenější aragonitová mikrostruktura (crossed lamellar microstructure) má statisticky významně nižší mikrotvrdotost a elastický modul než anorganický aragonit (viz kapitola 5.1). Ke stejnému závěru vedla i analýza mikrotvrdotosti a elastického modulu aragonitové perleti mlžů (viz kapitola 5.3). Lamelární mikrostruktura a perleť jsou dvě nejrozšířenější a pravděpodobně také nejprimitivnější mikrostruktury tvořené aragonitem. Naopak v případě kalcitu bylo doloženo, že studovaná mikrostruktura (semifoliated microstructure) má statisticky významně vyšší mikrotvrdotost a elastický modul než anorganický kalcit (viz kapitola 5.1). Dosud publikovaná data o mikrotvrdotosti a elastickém modulu mikrostruktur měkkýších schránek jsou značně omezená, nejsou však v rozporu s tímto závěrem. Předložená studie o perleti mlžů reprezentuje nejucelenější soubor dat, který byl dosud vytvořen. Pokud se dalšími studii mikrostruktur schránek měkkýšů různých tříd potvrdí, že biokompozity (tj. mikrostruktury schránek) tvořené aragonitem mají nižší mikrotvrdotost a elastický modul než anorganický aragonit, a obráceně v případě kalcitu, pak bude třeba hlouběji analyzovat příčiny tohoto makroevolučního trendu v biomineralizaci schránek. Tyto skutečnosti mohou být příčinou vzniku složitého biochemického mechanismu, který vedl ke schopnosti vytvářet kalcitové i aragonitové mikrostruktury současně v jedné schránce, tak, jak to je doloženo u řady specializovaných skupin mlžů (např. u řádu Patellogastropoda, který se adaptoval na život ve vodách s vysokou energií, tj. v přílivoodlivové zóně). Předložená dizertační práce tedy přinesla nejen nové informace o mikrotvrdotosti a elastickém modulu nejběžnějších mikrostruktur měkkýších schránek, ale umožnila vytvořit základ testovatelné hypotézy o příčinách vzniku složitého biomineralizačního mechanismu kmene měkkýšů, do kterého patří zhruba 20 % všech žijících mnohobuněčných druhů v mořském ekosystému.

B) Bylo doloženo, že extrémní hydrostatický tlak má poměrně malý vliv na mikrotvrdotost a elastický modul zkoumaných kalcitových i aragonitových mikrostruktur měkkýších schránek.

Tento předběžný závěr je však třeba potvrdit studiem i jiných mikrostruktur a vzorků měkkýšů z jiných tříd. V případě perleti mlžů nebyl zjištěn jednoduchý vztah mezi mikrotvrdostí a elastickým modulem perleti mlžů žijících v mořském a sladkovodním prostředí. Rozsah hodnot mikrotvrdosti a elastického modulu perleti sladkovodních mlžů je uvnitř intervalu hodnot pro mořské mlže. Podobný závěr lze vyslovit pro vztah taxonomické pozice mlžů a hodnot mikrotvrdosti a elastického modulu perleti. Oba předchozí závěry je však nutno ověřit na vzorcích měkkýšů z jiných tříd. Byla zjištěna statisticky významná pozitivní korelace mezi hodnotami mikrotvrdosti i elastického modulu perleti a tloušťkou aragonitových destiček tvořících perleť.

C) Hodnoty mikrotvrdosti a elastického modulu perleti mlžů jsou značně variabilní mezi různými druhy (zjištěné hodnoty se odlišují v řádu desítek procent). Byla zjištěna silná negativní korelace mezi hodnotami mikrotvrdosti a elastického modulu na jedné straně, a mírou uspořádání aragonitových destiček perleti mlžů. Pokud se dalšími studii tyto závěry potvrdí, pak bude možno poměrně přesně odhadovat hodnoty mikrotvrdosti a elastického modulu perleti fosilních měkkýšů, které z důvodu absence organické hmoty schránek není možno přesně rekonstruovat z přímých měření. Statisticky významná, ale slabší korelace byla zjištěna i mezi mikromechanickými vlastnostmi a texturním typem perleti. Mlži s jednoosou texturou perleti mají tvrdší a pružnější perleť, než mlži s quasimonokrystalickou texturou perleti. Přijmeme-li fylogenetickou hypotézu, že jednoosá textura perleti je primitivní a quasimonokrystalová odvozená (pro což svědčí dosud veškerá známá data – viz např. Hedegaard a Wenk 1998; Chateigner a kol. 2000; Frýda a kol. 2010; Frýda 2012), pak ale data této studie naznačují, že primitivnějším stavem perleti mlžů je její větší tvrdost a pružnost a v průběhu další evoluce mlžů se hodnoty těchto veličin snižovaly. Toto je však opačný trend, než by logicky vyplýval ze skutečnosti vzrůstajícího predančního tlaku v mořském ekosystému v průběhu paleozoika a mesozoika (např. Vermeij 1977; Klug a kol. 2010).

D) Metodický postup pro účely studia mikromechanických vlastností měkkýších schránek vytvořený a prověřený touto dizertační prací lze použít pro testování nových výše zmíněných hypotéz, ale i pro studium biomineralizace jiných skupin organismů, např. brachiopodů, korálů a členovců. Dodržování stejného metodického protokolu (tj. stejných podmínek měření) umožní porovnání mikromechanických vlastností schránek mezi různými skupinami organismů. Absence standardizovaného protokolu měření (tj. použití různých tvarů indentorů, odlišných časových i silových schémat, etc.) je hlavním důvodem, proč nelze použít již publikovaná data k vzájemnému porovnání hodnot různých taxonů.

## 7 CITOVANÁ LITERATURA

- ADDADI, L.; JOESTER, D.; NUDELMAN, F.; WEINER, S. (2006). Mollusk Shell Formations: A Source of New Concepts for Understanding Biomineralization Processes. *Chemistry - A European Journal*, 12: pp. 980 - 987.
- BANDEL, K. (1990). Shell structure of the Gastropoda excluding Archaeogastropoda. In: Carter J.G. ed., *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*. Van Nostrand Reinhold, New York 1, pp. 117 - 134.
- BANDEL, K. (1997). Higher classification and pattern of evolution of the Gastropoda. *Courier Forschungsinstitut Senckenberg*, 201: pp. 57 - 81.
- BANDEL, K. (2002a). About the Heterostropha (Gastropoda) from the Carboniferous and Permian. . *Mitteilungen Geologie-Paläontologie Institut der Universität Hamburg*, 86: pp. 45 - 80.
- BANDEL, K. (2002b). Reevaluation and classification of Carboniferous and Permian Gastropoda belonging to the Caenogastropoda and their relation. *Mitteilungen Geologie-Paläontologie Institut der Universität Hamburg*, 86: pp. 81 - 188.
- BANDEL, K.; GELDMACHER, W. (1996). The structure of the shell of *Paatella crenata* connected with suggestions to the classification and evolution of Archaeogastropoda. *Freiberger Forschungsheft*. No. C464: pp. 1 - 71.
- BANDEL, K.; NÜTZEL, A.; YANCEY, T. E. (2002). Larval Shells and Shell Microstructures of exceptionally well - preserved Late Carboniferous Gastropods from the Buckhorn Asphalt Deposit (USA). *Senckenbergiana lathaea*, 82(2): pp. 639 - 689.
- BARTHELAT, F., TANG, H., ZAVATTIERI, P., LI, C., ESPINOSA, H. (2007). On the mechanics of mother-of-pearl: a key feature in the material hierarchical structure. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 55(2): pp. 306 - 337.
- BARTHELAT, F.; LI, C. M.; COMI, C.; ESPINOSA, H. D. (2006). Mechanical properties of nacre constituents and their impact on mechanical performance. *Journal of Materials Research*, 21(08): pp. 1977- 1986.
- BARTHELAT, F.; RIM, J. E.; ESPINOSA, H. D. (2009). A Review on the Structure and Mechanical Properties of Mollusk Shells - Perspectives on Synthetic Biomimetic Material. *Applied Scanning Probe Methods XIII*. Springer Berlin Heidelberg, 2009: pp. 17 - 44.
- BARTHELAT, F.; TANG, H.; ZAVATTIERI, P. D.; LI, C. M.; ESPINOSA, H. D. (2007). On the mechanics of mother-of-pearl: A key feature in the material hierarchical structure. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 56: pp. 306 - 337.
- BATTEN, R. L. (1984). The calcitic wall in the Paleozoic families Euomphalidae and Platyceratidae (Archeogastropoda). *Journal of Paleontology*, 58 (5): pp. 1186 - 1192.

- BIELER, R.; CARTER, J. G.; COAN, E. V. (2010). Classification of bivalve families, 113–133. In BOUCHET, P. & ROCROI, J.-P. Nomenclator of bivalve families. *Malacologia*, 52 (2): pp. 1 – 184.
- BIELER, R.; MIKKESEN, P. (2006). Bivalvia – a look at the branches. *Zoological Journal of the Linnean Society* 148(3), 223–235. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 148 (3): pp. 223 – 235.
- BØGGILD, O. B. (1930). The shell structure of the mollusks. *Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Skrifter, Naturvidenskabelige og Matematiske Afdeling*, 9 (II.2): pp. 231 – 325.
- BOORE, J. L.; MEDINA, M.; ROSENBERG, L. A. (2004). Complete sequences of the highly rearranged molluscan mitochondrial genomes of the scaphopod *Graptacme eborea* and the bivalve *Mytilus edulis*. *Molecular Biology and Evolution*, 21: pp. 1492 – 1503.
- BOUCHET, P.; ROCROI, J. P. (2010). Nomenclator of bivalve families with a classification of bivalve families by R. Bieler, J.G. Carter & E.V. Coan. *Malacologia* 52 (2): pp. 1 – 184.
- BOUCHET, P.; ROCROI, J. P.; FRÝDA, J.; HAUSDORF, B.; PONDER, W.; VALDES, A.; WARÉN, A. (2005). Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia*, 47, 1-2: pp. 1 - 368.
- BRUET, B. J.; PANAS, R.; TAI, K.; ORITZ, C.; QI, H. H.; BOYCE, M. C. (2005). Nanoscale morphology and indentation of individual nacre tablets from the gastropod mollusc *Trochus niloticus*. *Journal of Materials Research*, 20 (9): pp. 2400 - 2419.
- BRUYNE, R. H. (2003). *Geïllustreerde schelpen encyclopedie*. Rebo Production.
- CARPENTER, K. E.; NIEM, V. H. (1998). FAO species identification guide for fishery purposes. *The living marine resources of the Western Central Pacific*. Volume 1. Seaweeds, corals, bivalves and gastropods. Rome: Food and Agriculture Organization of The United Nations.
- CARTER, J. G. (1990a). *Skeletal Biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends*. Vol. I. New York: Van Nostrand Reinhold: pp. 832.
- CARTER, J. G. (ed.). (1990b). *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*. Vol. II. Atlas and Index. New York: Van Nostrand Reinhold: pp. 250.
- CARTER, J. G.; CLARK, G. R. (1985). Classification and phylogenetic significance of Molluscan shell microstructure. In: Broadbent TW, ed. *Mollusks, notes for a short course*. University of Tennessee Department of Geological Sciences Studies in Geology, 13: pp. 50 – 71.
- CARTER, J. G.; HALL, R. M. (1990). Polyplacophora, Scaphopoda, Archaeogastropoda and Paragastropoda (Mollusca). In, Carter J.G. ed., *Skeletal Biomineralization: Patterns Processes and Evolutionary Trends*, 1990. Van Nostrand RReinhold, New York, 2: pp. 29 - 51.

- COWLES, D. (2002). *Mytilus californianus*. *Walla Walla Univeristy*. Online: [http://www.wallawalla.edu/academics/departments/biology/rosario/inverts/Mollusca/Bivalvia/Mytiloidea/Mytilidae/Mytilus\\_californianus.html](http://www.wallawalla.edu/academics/departments/biology/rosario/inverts/Mollusca/Bivalvia/Mytiloidea/Mytilidae/Mytilus_californianus.html); [cit. 1.6.2015]
- CUMMINGS, K. S.; MAYER, CH. A. (1992). Field guide to freshwater mussels of the Midwest. Champaign, Illinois: Illinois Natural History Survey, 1992: pp. 194.
- CURREY, J. D. (1977). Mechanical properties of mother of pearl in tension. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 196(1125): pp. 443 - 463.
- CURREY, J. D.; TAYLOR, J. D. (1974). The mechanical behaviour of some molluscan hard tissues. *Journal of Zoology*, 173 ( 3): pp. 395 - 406.
- DREYER, H.; STEINER, G. (2004). The complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the gadilid scaphopod *Siphonodontalium lobatum* (Mollusca). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: pp. 605 – 617.
- DYTHAM, C. (2011). Choosing and using statistics: a biologist's guide. John Wiley & Sons.
- FISCHER-CRIPPS, A. (2000). A review of analysis methods for sub-micron indentation testing. *Vacuum*, 58 (4): pp. 569 - 585.
- FLINN, D. (1962). On folding during three-dimensional progressive deformation." *Quarterly Journal of the Geological Society*, 118(1-4): pp. 385 - 428.
- FORBES, E. (1850). On the genera of British Patellacea. In Report of the 19th meeting of the British Association for the Advancement of Science (Birmingham, 1849). *Notices and Abstracts of Communication*: pp. 75-76.
- FRÝDA, J. (2012). Phylogeny of Paleozoic gastropods inferred from their ontogeny. *Earth and Life - Global Biodiversity, Extinction Intervals and Biogeographic Perturbations Through Time, John A. Talent (Ed.), Series: International Year of Planet Earth, Springer*: pp. 395 - 435.
- FRÝDA, J.; BANDEL, K.; FRÝDOVÁ, B. (2009). Crystallographic texture of Late Triassic gastropod nacre: evidence of long-term stability of the mechanism controlling its formation. *Bulletin of Geosciences*, 84 ( 4): pp. 747 - 756.
- FRÝDA, J.; KLICNAROVÁ, M.; FRÝDOVÁ, B.; MERGL, M. (2010). Variability in the crystallographic texture of bivalve nacre. *Bulletin of Geosciences*, 85: pp. 645 - 662.
- FRÝDA, J.; NÜTZEL, A.; WAGNER, P. (2008). Paleozoic gastropoda. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca, University of California Press, Berkeley and Los Angeles*: pp. 239 - 270.
- FRÝDA, J.; SASAKI, T. (2007). Crystallographic textures of shell layers in Patellogastropoda: a new tool unraveling their phylogeny. *World Congress of Malacology, Antwerp, Belgium, K. Jordaens, N. Van Houtte, J. Van Goethem & T. Backeljau (Eds)*: 65, ISBN 978-90-9022078-9.

- FRÝDA, J.; ŠEPITKA, J.; FRÝDOVÁ, B.; HRABÁNKOVÁ, I.; LUKEŠ, J.; KLICNAROVÁ, M. (2013). Crystallographic texture determines mechanical properties of molluscan nacre. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 16: pp. 292 - 293.
- FRÝDA, J.; WEITSCHAT, W.; TÝCOVÁ, P.; HALODA, J.; MAPES, R. H. (2007). Crystallographic textures of cephalopod nacre: its evolution, time stability, and phylogenetic significance. *In Seventh International Symposium: Cephalopods—Present & Past 2007 Abstracts*, 33. Sapporo, Japan.
- FUCHIGAMI, T.; SASAKI, T. (2005). The shell structure of the recent Patellogastropoda (Mollusca: Gastropoda). *Paleontological Research*, 9 (2): pp. 143 - 168.
- GANGLOFF, M. (2004). *Quadrula apiculata*. Načteno z Collega of science and mathematics, Auburn university, Alabama.:  
[http://www.auburn.edu/academic/science\\_math/cosam/collections/invertebrates/collections/species/unionoida/quadrula\\_apiculata/index.htm](http://www.auburn.edu/academic/science_math/cosam/collections/invertebrates/collections/species/unionoida/quadrula_apiculata/index.htm); [cit.: 27.11.2014]
- GILMAN, S. E. (2007). Shell microstructure of the patellid gastropod *Collisella scabra* (Gould): ecological and phylogenetic implications. *Veliger*, 48(4): pp. 235-242.
- GIRIBET, G. (2008). Bivalvia. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*, 6: pp. 105 - 141.
- GIRIBET, G.; OKUSU, A.; LINDGREN, A.; HUFF, S.; SCHRÖDL, M.; NISHIGUCHI, M. (2006). Evidence for a clade composed of molluscs with serially repeated structures: Monoplacophorans are related to chitons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 103: pp. 7723 – 7728.
- GRAY, J. E. (1840). Shells of molluscos animals. In: *Synopsis of the contents of the British Museum*, 42: pp. 105 - 152.
- GRAY, J. E. (1850). *Figures of molluscos animals selected from various authors. Etched for the use of students by M. E. Gray, Vol 4.* London, Longman, Brown, Green and Longmans. IV +215 pp.
- HARASEWYCH, M. G.; MCARTHUR, A. G. (2000). A molecular phylogeny of the Patellogastropoda (Mollusca: Gastropoda). *Marine Biology*, 137 (2): pp. 183 - 194.
- HARPER, E. M. (2005). Fossil invertebrates/Bivalvia. *University of Cambridge, Cambridge, UK*: pp. 369 - 378.
- HEDEGAARD, C.; WENK, H. R. (1998). Microstructure and texture patterns of molluse shells. *Journal of Molluscan Studies*, 64 (1): pp. 133 - 136.
- HEINEMANN, F.; LAUNSPACH, M.; GRIES, K.; FRITZ, M. (2011). Gastropod nacre: Structure, properties and growth - Biological, chemical and physical basic. *Biophysical Chemistry*, 153: pp. 126 - 153.
- HRABÁNKOVÁ, I.; FRÝDA, J.; ŠEPITKA, J.; SASAKI, T.; FRÝDOVÁ, B.; LUKEŠ, J. (2013). Mechanical properties of deep-sea molluscan shell. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 16 (S1): pp 287 - 289.



- CHATEIGNER, D.; HEDEGAARD, C.; WENK, H. R. (2000). Mollusc shell microstructures and crystallographic textures . *Chateigner, D., Hedegaard, C. & Wenk, H.-R. 2000. MolluscJournal of Structural Geology*, 22: pp. 1723 - 1735.
- CHATEIGNER, D.; HEDEGAARD, C.; WENK, H. R. (2000). Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *Journal of Structural Geology*, 22: pp. 1723 - 1735.
- CHECA , A. G.; RODRIGUES-NAVARRO, A. B. (2001). Geometrical and crystallographic constraints determine the self - organization of shell microstructures in Unionidae (Bivalvia: Mollusca). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268 (1468): pp. 771 - 778.
- CHECA, A. G.; OKAMOTO , T.; RAMÍREZ, J. (2006). Organization pattern of nacre in Pteriidae (Bivalvia: Mollusca) explained by crystal competition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273 (1592): pp. 1329 - 1337.
- CHECA, A. G.; RAMÍREZ, J.; GONZÁLEZ-SEGURA, A.; SÁNCHEZNAVAS, A. (2008). Nacre and false nacre (foliated aragonite) in extant monoplacophorans (=Tryblidiida: Mollusca). *Naturwissenschaften*, 96 (1): pp. 111 - 122.
- CHECA, A. G.; RODRIGUES-NAVARRO , A. B. (2005). Self - organisation of nacre in the shells of Pterioda (Bivalvia: Mollusca). *Biomaterials*, 26 (9): pp. 1071 - 1079.
- CHEN, P. Y., LIN, A. Y., LIN, Y. S., SEKI, Y., STOKES, A. G., PEYRAS, J., OLEVSKY, E. A.; MEYERS, M. A.; MCKITTRICK, J. (2008). Structure and mechanical properties of selected biological materials. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1 (3): pp. 208 - 226.
- JACKSON , D. J.; MCDUGALL, C.; WOODCROFT, B.; MOASE, P.; ROSE , T. A.; KUBE, M.; REINHARDT, R.; ROKHSAR, D.. S.; MONTAGNANI, C.; JOUBERT, C.; PIQUEMAL, D.; DEGNAN, B. M. (2010). Parallel Evolution of Nacre Building Gene Sets in Molluscs. *Molecular Biology and Evolution*, 27 (5): pp. 1237 - 1242.
- JACKSON, A. P.; VINCENT, J.F.V; TURNER, R. M. (1988). The mechanical design of nacre. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 234 (1277).
- Jl, H. M.; LI, X. W. (2014). Microstructural Characteristic and its Relation to Mechanical Properties of Clinocardium californiense Shell. *Journal of the American Ceramic Society*, 97 (12): pp. 3991 - 3998.
- KATTI, K. S.; MOHANTY, B.; KATTI, D. R. (2006). Nanomechanical properties of nacre. *Journal of Materials Research*, 21 (05): pp. 1237 - 1242.
- KEARNEY, C.; ZHAO, Z.; BRUET, B. J.; RADOVITZKY, R.; BOYCE, M. C.; ORTIZ, C. (2006). Nanoscale Anisotropic Plastic Deformation in Single Crystal Aragonite. *Physical Review Letters. The American Physical Society*: pp. 96 - 99.
- KLUG, C.; KROEGER, B.; KIESSLING, W.; MULLINS, G. L.; SERVAIS, T.; FRÝDA, J.; KORN, D.; TURNER, S. (2010). The Devonian Nekton Revolution. *Lethaia*, 43 (4): pp. 465 - 477.

- KOLBIN, K. G. (2006). Reproduction and Development of the Limpet *Limalepeta lima* (Dall, 1918) (Gastropoda: Lepetidae) from Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of marine Biology*, 32 (4): pp. 265-267.
- KŘÍŽ, J. (2007). Origin, evolution and classification of the new superorder Nepiomorpha (Mollusca, Bivalvia, Lower Paleozoic). *Palaeontology*, 50 (6): pp. 1341 – 1365.
- LI, X.; CHANG, W.; CHAO, Y.J.; WANG, R.; CHANG, M. (2004). Nanoscale structural and mechanical characterization of a natural nanocomposite material: the shell of red abalone. *Nano Letters*, 4 (4): pp. 613 - 617.
- LI, X.; NARDI, P. (2004). Micro/nanomechanical characterization of a natural nanocomposite material—the shell of Pectinidae. *Nanotechnology*, 15 (1): pp. 2011.
- LIANG, Y.; ZHAO, J.; WANG, L.; LI, F.M. (2008). The relationship between mechanical properties and crossed-lamellar structure of mollusk shells. *Materials Science and Engineering: A* 483: pp. 309 - 312.
- LIN, A. Y. M.; CHEN, P. Y.; MEYERS, M. A. (2008). Lin Albert, Y.M. Biological materials: structure and mechanical. *Prog. Mater. Sciences*, 53: pp. 1 - 206.
- LIN, A. Y. M.; MEYERS, M. A.; VECCHIO, K. S. (2006). Mechanical Properties and Structure of *Strombus gigas*, *Tridacna gigas*, and *Haliotis rufescens* sea Shells: A Comparative Study. *Mater. Sci. Eng., C* 26 (8): pp. 1380 - 1389.
- LINDBERG, D. R. (1990). The systematics of *Potamacmaea fl uvatilis* Blandford: a brackishwater patellogastropod (Patelloidinae: Lottiidae). *Journal of Molluscan Studies*, 56: pp. 309 - 316.
- LINDBERG, D. R. (2008). Patellogastropoda, Neritimorpha, and Cocculinoidea. 271-296. In: *Ponder, W. and Lindberg, D. L. (eds), Phylogeny and Evolution of the Mollusca, University of California Press, 488 pp., Berkeley and Los Angeles, California.*
- LINDBERG, D. R. (1988). The patellogastropoda. Prosobranch Phylogeny: proceedings of the 9th international malacological congress. *Malacol Rev.*, 4: pp. 35 - 63.
- LINDBERG, R. D.; HEDEGAARD, C. (1996). A deep water patellogastropod from Oligocene water-logged wood of Washington State, USA (Acmaeoidea: Pectinodonta). *Journal of Molluscan Studies*, 62 (3): pp. 299 - 314.
- MacCLINTOCK, C. (1967). Shell structure of paterloid and bellerophonoid gastropods (Mollusca). *Peabody Museum of Natural History, Yale University, Bulletin*, 22. pp. 1 - 140.
- MARIE, B.; LUQUET, G.; BEDOUET, L.; MILET, C.; GUICHARD, N.; MEDAKOVIC, D.; MARIN, F. (2008). Nacre Calcification in the Freshwater Mussel *Unio pictorum*: Carbonic Anhydrase Activity and Purification of a 95 kDa Calcium-Binding Glycoprotein. *ChemBioChem*, 9 (15): pp. 2515 - 2523.

- MARIE, B.; MARIN, F.; MARIE, A.; BEDEOUE, L.; DUBOST, L.; ALCARAZ, G.; MILET, C.; LUQUET, G. (2009). Evolution of nacre: Biochemistry and proteomics of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. *ChemBioChem*, 10 (9): pp. 1495 – 1506.
- MARIN, F.; LUQUET, G. (2004). Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus, Pale* 3: pp. 469 - 492.
- MARIN, F.; LUQUET, G.; MARIE, B.; MEDAKOVIC, D. (2008). Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current topics in developmental biology*, 80: pp. 209-276.
- MARSHALL, B. A. (1985). Recent and tertiary deep-sea limpets of the genus *Pectinodonta* Dall (Mollusca: Gastropoda) from New Zealand and New South Wales. *New Zealand Journal of Zoology*, 12(2): pp. 273 - 282.
- MARTHUR, A. G.; HARASEWYCH, M. G. (2003). Molecular systematics of the major lineages of the Gastropoda. *Molecular Systematics and Phylogeny of Mollusks*. pp. 140 - 160.
- MCLEAN, J. H. (1990). Neolepetopsidae, a new docoglossate limpet family from hydrothermal vents and its relevance to patellogastropod evolution. *Journal of Zoology*, 222 (3): pp. 485 - 528.
- MERKEL, C.; DEUSCHLE, J.; GRIESSHABER, E.; ENDERS, S.; STEINHAUSER, E.; HOCHLEITNER, R.; BRAND, U.; SCHMAHL, W. (2009). Mechanical properties of modern calcite-(*Mergerlia truncata*) and phosphate-shelled brachiopods (*Discradisca stella* and *Lingula anatina*) determined by nanoindentation. *Journal of structural biology*, 168(3): pp. 396 - 408.
- MEYERS M.A., CHEN P.Y., LIN A.Y.M., SEKI Y. 2008. Biological materials: Structure and mechanical properties, *Prog Mater Sci* 53, 1–206
- MORRIS, R. H.; ABBOTT, D. P.; HADERLIE, E. C. (1980). Intertidal invertebrates of California. Redwood City, CA: Stanford University Press: pp. 690.
- MUKAI, H.; SARUWATARI, K.; NAGASAWA, H.; KOGURE, T. (2010). Aragonite twinning in gastropod nacre. *Journal of Crystal Growth*, 312 (20): pp. 3014 - 3019.
- OLIVER, W. C.; PHARR, G. M. (1992). An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of materials research*, 7 (6): pp. 1564 - 1583.
- PASSAMANECK, Y. J.; SCHANDER, C.; HALANYCH, K. M. (2004). Passamaneck, Y. J., Schander, C., & Halanych, K. M. (2004). Investigation of molluscan phylogeny using large-subunit and small-subunit nuclear rRNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 32 (1): pp. 25 - 38.
- PONDER, W. F.; LINDBERG, D. R. (1997). Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 119 (2): pp. 83 - 265.

- PONDER, W.; LINDBERG, D. R. (2008). A phylogeny of gastropod molluscs; an analysis using morphological characters. *Zoological journal of the Linnean Society*, 119; pp. 86 - 265.
- ROMANA, L.; THOMAS, P.; BILAS, P.; MANSOT, J. L.; MERRIFIELS, M.; BERCOIN, Y.; ARANDA, D. A. (2013). Use of nanoindentation technique for a better understanding of the fracture toughness of *Strombus gigas* conch shell. *Materials characterization*, 76: pp. 55 - 68.
- RUNNEGAR, B. (1985). Shell microstructures of Cambrian molluscs replicated by phosphate. *Alcheringa*, 9 (4), pp. 245 - 257.
- RUPPERT, S. D.; PETERS, W. S. (2004). Autotomy of the posterior foot in *Agaronia* (Caenogastropoda: Olividae) occurs in animals that are fully withdrawn into their shells. *Journal of Molluscan Studies*, 2011, eyr019.
- SASAKI, T.; FRÝDA, J.; NAKANO, T. (2010). Comparative anatomy, shell microstructure and higher systematics of Patellogastropoda. *Abstract, 17th World Congress of Malacology, Phuket, Thailand, Tropical Natural History, Supplement 3*, 64, ISSN 1513-9700.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. pp. 591 - 611.
- TAYLOR, J. D. (1973). The structural evolution of the bivalve shell. *Paleontology*, 6: pp. 519 - 534.
- TAYLOR, J. D.; KENNEDY, J. W.; HALL, A. (1969). The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction. Nuculacea-Trigonacea. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology, Supplement*, 3: pp. 1 - 125.
- TAYLOR, J. D.; KENNEDY, J. W.; HALL, A. (1973). The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. II. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Zoology*, 22. pp. 253 - 294.
- TEBBLE, N. (1976). British bivalve shells. *Royal Scottish Museum. Edinburgh*.
- TYLER-WALTERS, H. (2008). *Mytilus edulis. Common mussel. Marine Life Information Network*.
- VENDRASCO, M. J.; CHECA, A. G.; KOCHINSKY, A. V. (2011). Shell microstructure of the early bivalve *Pojetaia* and the independent origin of nacre within the Mollusca. *Palaeontology*, 54 (4): pp. 825 - 850.
- VERMEIJ, G. J. (1977). The Mesozoic marine revolution: evidence from snails, predators and grazers. *Paleobiology*, 3: pp. 245 - 258.
- WADA, K. (1972). Nucleation and growth of aragonite crystals in the nacre of some bivalve molluscs. *Biomineralization*, 4: pp. 141 - 159.
- WALLER, T. R. (1998). Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups. *In Bivalves: An Eon of Evolution. Edited by P. A. Johnston and J. W. Haggard. Calgary: University of Calgary Press: pp. 1-45.*

- WANG, R. Z.; SUO, Z.; EVANS, A. G.; YAO, N.; AKSAY, I. A. (2001). Deformation mechanisms in nacre. *Journal of Mater. Res.*, 16: pp. 2485.
- WATTERS, G. T. (1995). A guide to the freshwater mussels of Ohio. *Columbus, Ohio: Division of Wildlife, Ohio Department of Natural Resources.*
- WISE, S. (1970). Microarchitecture and mode of formation of nacre (mother of pearl) in pelecypods, gastropods and cephalopods. *Eclogae Geologicae Helvetiae*, 63: pp. 775 – 797.
- WOJTAL, E. (2000). Charakterization of the Orientation of Abalone Shell Structure. Princeton University.: online:<http://www.princeton.edu/pccm/outreach/reuarchive/REU/presentations/wojcek/sld001.html>. /cit. 10.6.2014/
- WOODCOCK, N. H. (1977). Specification of fabric shape using an eigenvalue method. *Geological Society of America Bulletin*, 88: pp. 1231 – 1236.
- WOODCOCK, N. H.; NAYLOR, M. A. (1983). Randomness testing in three-dimensional orientation data . *Journal of Structural Geology*, 5: pp. 539 – 548.
- YANG, W.; KASHANI, N.; LI, X. W.; ZHANG, G. P.; MEYERS, M. A. (2011). Structural characterization and mechanical behavior of a bivalve shell (*Saxidomus purpuratus*). *Materials Science and Engineering: C*, 31 (4): pp. 724 - 729.

## 8 PUBLIKAČNÍ ČINNOST

### *Příspěvky v databázi Web of Science*

**HRABÁNKOVÁ, I.**; FRÝDA, J.; ŠEPITKA, J.; FRÝDOVÁ, B.; LUKEŠ, J.; 2013: Mechanical properties of deep-sea molluscan shell. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, Vol. 16, No. 1: 287-289. ISSN: 1025-5842. (IF pro rok 2013: 1,793).

FRÝDA, J.; ŠEPITKA, J.; FRÝDOVÁ, B.; **HRABÁNKOVÁ, I.**; LUKEŠ, J.; KLICNAROVÁ, M.; 2013. Crystallographic texture determines mechanical properties of molluscan nacre. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, Vol. 16, No. 1: 292-293. ISSN: 1025-5842. (IF pro rok 2013: 1,793).

### *Příspěvky ve sbornících*

**HRABÁNKOVÁ, I.**; 2011: Evoluční strategie v biomineralizaci schránek u recentních a fosilních zástupců třídy Gastropoda: Vztah mechanických vlastností schránek a životní strategie. In *Konference environmentálního inženýrství a geoenvironmentálních věd 2011*. vyd. Praha ČZU: 18 s. ISBN 978-80-213-2223-3.

**HRABÁNKOVÁ, I.**; 2012: Mikrostruktura a mechanické vlastnosti schránek u vybraných zástupců třídy Gastropoda. In *Konference environmentálního inženýrství a geoenvironmentálních věd 2012*. vyd. Praha ČZU: 16 s. ISBN 978-80-213-2333-9.

**HRABÁNKOVÁ, I.**; 2013: Mechanické vlastnosti schránek populací hlubinných měkkýšů. In *Konference environmentálního inženýrství a geoenvironmentálních věd 2013*. vyd. Praha ČZU: 21 s. ISBN 978-80-213-2407-7.