

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Využití sladkovodních mlžů pro biosenzoring jakosti
vody - možnosti monitoringu reakce glochidií**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Anna Kejzlarová

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

©2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Využití sladkovodních mlžů pro biosenzoring jakosti vody - možnosti monitoringu reakce glochidií“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce, s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu odborné literatury na konci této práce.

Datum:

Podpis studenta:.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Karlu Doudovi, Ph.D., že mi umožnil práci na toto téma zpracovat. Velké díky patří též mé rodině za jejich podporu a v neposlední řadě Bc. Věře Plechingerové za pomoc při provádění pokusu.

Využití sladkovodních mlžů pro biosenzoring jakosti vody - možnosti monitoringu reakce glochidií

Souhrn:

První část práce shrnuje formou literární rešerše poznatky o biomonitoringu vodního prostředí a využití bezobratlých v této oblasti. Dále se literární přehled zabývá vlivem specifických polutantů a léčiv ve vodách na vodní organismy a zaměřuje se na informace o selektivních inhibitech zpětného vstřebávání serotoninu (SSRI), charakteristiku citalopramu a vliv SSRI na sladkovodní měkkýše.

Experimentální část této práce byla zaměřena na zjišťování reakcí při vystavení parazitického larválního stádia (glochidií) velevruba malířského (*Unio pictorum*) koncentracím citalopramu po dobu 24 hodin. Z předchozích pokusů je zřejmé, že antidepresiva ovlivňují reprodukční aktivitu plžů, narušují lokomoci a snižují plodnost u hlemýžďů. Citalopram patří do antidepresiv ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vstřebávání serotoninu (SSRI). V pokusu byly použity koncentrace citalopramu 1, 10, 100 a 1000 µg/l. Pro svůj pokus jsem použila směsný vzorek glochidií vypuštěný třemi velevrubami. Testovala jsem vždy šest opakování od každé koncentrace spolu se šesti kontrolními opakováními. Cílem bylo vyhodnotit změny přirozeného chování glochidií, změny jejich možnosti přichycení na ryby a poměr glochidií přichycených na žaberní oblouky vůči celkovému počtu přichycených na rybu. Hodnotila jsem změny ve frekvenci sklapávání (snapping activity), reakci po aplikaci roztoku NaCl, počet glochidií přichycených na rybí hostitele po 15 minutové expozici a procenta přichycených glochidií z počtu vyskytujících se v testovacích nádržích. Při pokusech vyšel signifikantní rozdíl u koncentrací citalopramu 100 a 1000 µg/l v poměru glochidií přichycených na žaberní oblouky vůči celkovému počtu nacházejících se na rybě.

Klíčová slova: biosenzoring, sladkovodní mlži, Unionidae, citalopram

The use of freshwater mussels for water quality biosensing - possibilities of glochidia reaction monitoring

Summary:

The first part of the dissertation summarises findings about the aquatic environment biomonitoring and the use of invertebrates in this field. Using further literature, this paper describes the effect of specific pollutants and pharmaceuticals on aquatic organisms. The focus is on selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRI), citalopram characteristics and the effect of SSRI on freshwater molluscs.

The practical part of the dissertation focuses on reactions of parasitic larval stage (glochidia) of Painter's Mussel (*Unio pictorum*) when exposed to Citalopram for 24 hours. Previous findings proved that antidepressants affect the reproductive activity of gastropods, disrupt locomotion and reduce fertility in snails. Citalopram belongs to a group of antidepressants based on selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs).

In this experiment, concentrations of 1, 10, 100 and 1000 µg/l of Citalopram were used. I worked with a mixed sample of glochidia extracted from three different mussels. Each concentration was measured six times and six control checks were also done. The aim was to evaluate changes in natural behaviour of glochidia, changes in the ability to attach to the fish and the ratio of glochidia attached to gills to the overall amount of glochidia attached to the fish.

I evaluated changes in the snapping activity frequency, reactions after application of the Sodium chloride, the amount of parasites attached to the fish host after being exposed for 15 minutes, and percentages of glochidia attached to the fish hosts out of all the parasites present in test tanks. There was a significant difference in results of the Citalopram concentration of 100 and 1000 µg/l in the ratio of glochidia attached to gills to the overall amount of glochidia attached to the fish.

Keywords: biosensing, freshwater mussels, Unionidae, citalopram, SSRI

Obsah

1. Úvod	7
2. Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3. Přehled literatury	9
3.1. Biosenzoring a využití bezobratlých	9
3.2. Vliv specifických polutantů a léčiv ve vodách	11
3.3. Selektivní inhibitor zpětného vstřebávání serotoninu (SSRI)	15
3.3.1. Citalopram	15
3.4. Vliv SSRI na sladkovodní měkkýše	16
3.4.1. Serotonin	16
3.4.2. Fluoxetin	17
4. Metodika	19
4.1. Studovaný organismus	19
4.2. Příprava hladin testovaných koncentrací	19
4.3. Expozice glochidií	19
4.4. Infikace ryb	21
4.5. Vyhodnocení aktivity glochidií	21
4.5.1. Statistické zhodnocení	23
5. Výsledky	24
5.1. Expozice glochidií	24
5.2. Infikace ryb	32
6. Diskuse	42
7. Závěr	45
8. Seznam literatury	46
9. Obrazová příloha	58

1. Úvod

O problémech, které způsobují rybám pod výpustí čistíren odpadních vod látky obsažené v hormonální antikoncepci vypuštěné do odpadních vod a posléze aktivované biologickými filtry čističek odpadních vod (Armstrong et al., 2016), má již povědomí většina široké veřejnosti. Další skupinou látek, jejichž spotřeba u lidské populace v posledních letech dramaticky roste, jsou antidepresiva (Ciuna et al., 2004). Ve svém experimentu jsem se zaměřila na antidepresivum ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vstřebávání serotoninu (SSRI). Konkrétně jsem použila citalopram, který se užívá k léčbě depresí, obsedantně-kompulzivních poruch a mnoha dalších psychických obtíží (Hedges et Woon, 2007). Na citalopram zatím nebyly zveřejněny žádné studie zkoumající jejich vliv na sladkovodní mlži. Vliv citalopramu jsem zkoumala na sladkovodním mlži velevrubu malířském (*Unio pictorum*).

Mlži jsou vhodnými druhy pro studium kvality sladkých vod. Důvodem je jejich přisedlý způsob života a také to, že pro uspokojení svých respiračních a nutričních potřeb přefiltrují velké množství vody a tím do sebe dostanou látky ve vodě obsažené (Brandão et al 2014; Chen et al., 2014). *Unio pictorum* je nejběžnější druh rodu *Unio* ve střední Evropě a byl v České republice vyhodnocen jako málo dotčený (Juříčková et al. 2001), přestože lokálně dochází k úbytkům početnosti, ve světě je ještě stále široce rozšířený a prokazuje stabilní celkovou populaci (Van Damme, 2011).

Z hlediska výskytu citalopramu v životním prostředí Loos et al. (2013) uvádí průměrnou koncentraci v evropských vodách 33, 8 ng/l. Nejvyšší zjištěnou koncentraci pak 189 ng /l. Metcalfe et al. (2010) uvádějí vyšší průměrné koncentrace citalopramu v kanadských odpadních vodách (přibližně 0,25 µg /l) a 10 m ve směru (přibližně 0,125 µg /l). V mé práci jsem použila celkem čtyři koncentrace citalopramu a to 1, 10, 100 a 1000 µg/l. Z toho vyplývá, že jsem pro svůj pokus použila koncentrace, které pokrývají škálu od environmentálně relevantních hodnot až po koncentrace, které jsou tisíckrát větší než ty naměřené ve volných vodách.

2. Vědecká hypotéza a cíle práce

Hlavními cíli bylo zjistit reakci parazitických larev mlžů (glochidií) velevruba malířského na koncentrace citalopramu 1, 10, 100 a 1000 $\mu\text{g/l}$, kterému byly vystaveny po dobu 24 hodin. Hodnotila jsem schopnost přichycení glochidií na rybu, jako jejich přirozeného hostitele, a také jejich možnou změnu přirozeného chování, sklapávání.

Vědecká hypotéza: Reakční schopnost parazitických larev mlžů (glochidií) je možné využívat jako indikátor přítomnosti kontaminantů ve vodním prostředí - konkrétně přítomnost citalopramu.

3. Přehled literatury

3.1. Biosenzoring a využití bezobratlých

Biosenzoring je metoda využívající biosenzory (Homola, 2009). Biosenzorem se obecně rozumí živý organismus, který při změně podmínek mimo jeho únosné hranice změní chování a tím poukáže na tyto změny (Oh et al., 2015). V přeneseném významu se dnes pojem biosenzor používá pro elektronový senzor měřící některé přírodní ukazatele (Sokolov et al., 2009). Dále při biosenzoringu mohou živé organismy sloužit jako rezervoár látek, kdy po jejich analýze lze získat informace o množství studované látky na daném stanovišti (Chen et al., 2014).

Živé organismy jsou pro detekování toxického znečištění využívány již dlouho (Gallo, 2001). Na rozdíl od genotoxických účinků, které se obvykle projeví až po delší době a mají významné biologické následky na celý organismus a většinu jeho buněčných struktur, toxikologické účinky se projeví poměrně brzy po expozici (Jha, 2008).

Metody biosenzoringu mají dlouhou historii. Do všeobecného povědomí se dostal např. biodetektor „kanárek v kleci“, jenž sloužil horníkům v dolech k detekci zamoření těžebních prostor škodlivými plyny (States et al., 2003). Pro detekci úniku nervově paralytických látek ve vojenských skladech bývaly ještě nedávno do těchto prostor rozmísťovány klece s králíky (States et al., 2003).

Využití organismů pro detekci toxického znečištění má své výhody i nevýhody. Při využití živého biodetektoru, pokud není jeho cílem monitorovat únik jedné konkrétní látky, je detekce znečištění nespecifická. To znamená, že zařízení ohlásí, že „něco je špatně“, ovšem neidentifikuje co (Lange et Lange, 1997).

V současné době je způsob sledování toxického znečištění pomocí živých organismů především využíván k monitorování toxického znečištění vody (Lange et Lange, 1997). Organismy, které se k těmto účelům využívají, jsou též často používány v ekotoxikologických testech. Tyto testy jsou jedním z pilířů akvatické ekotoxikologie. Jejich hlavními cíli je určit kritické množství toxické látky nebo jejich směsi pro vodní organismy a předpovědět jejich vliv na ekosystém. Mezi nejčastěji používané organismy patří ryby (např. akvarijní rybka Paví očko), bezobratlí (perloočky, žábronožky, vířníci), rostliny (okřehek, semena rostlin), jednobuněčné zelené řasy a bakterie (Farré et Barceló, 2003).

Pro detekci toxického znečištění v reálném čase byly vyvinuty takzvané „biologické systémy včasného varování“ (BEWS – biologically early warning systems) (Gregor et Maršálek, 2004). Jsou to zařízení, která jako detektor toxického znečištění využívají živý organismus, a skládají se z několika částí: zařízení na odběr testované vody, experimentálních prostor, elektronického či mechanického čidla (kamery), odkud jsou naměřená data přenášena do analyzátoru a alarmu, jenž upozorní na zjištěnou toxicitu. Monitorování toxického znečištění je prakticky kontinuální nebo probíhá opakovaně ve velice krátkých intervalech, čas nutný pro detekci je snížen na minimum. Nejčastěji se využívají, stejně jako v ekotoxikologických testech, ryby, perloočky, řasy a velice populární jsou také měkkýši (mlži) (Cairns et Van der Schalie, 1980). Přístroje BEWS byly vyvíjeny postupně. Nejprve byla sledována imobilita, popřípadě úmrtí testovaného organismu, postupem času se začalo využívat sledování změn v chování a fyziologických parametrech.

V současné době se prosazují BEWS, které jako detekční organismy využívají měkkýše, konkrétně mlže. Nejčastěji se jedná o druhy slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) a slávka jedlá (*Mytilus edulis*). Princip zařízení je jednoduchý. Určitý počet mlžů je umístěn do průtokové komory, kde jako indikátor toxického znečištění slouží pohyb lastur. Když se mlž dostane do styku s vodou obsahující toxikant, reaguje zavřením lastury. Pokud je kontaminace silná, mlži uhynou a jejich lastury se naopak úplně rozevřou. Pro potřeby BEWS je sledován podíl otevřených a uzavřených lastur v populaci umístěné v zařízení. Původní systémy byly jednoduché. Mlži byli přilepeni jednou lasturou k podkladu, na druhou lasturu byl umístěn magnet, který sloužil jako spínač alarmu. Současná zařízení umožňují sledovat pomocí elektromagnetického senzoru umístěného na obou lasturách i stupeň, jak jsou lastury otevřeny (Brosnan, 1999; Kamer et al., 1989; Lummer et al., 2016).

Dalším z organismů, které se poměrně často využívají, jsou sladkovodní korýši – perloočky. Perloočky jsou zooplanktonní živočichové o velikosti maximálně několika milimetrů, kteří se volně pohybují ve vodním sloupci (Veselá, 2004). Typický BEWS obsahuje několik perlooček, které plavou v uzavřené průtočné nádobě, jež je prosvětlována paprsky infračerveného světla. Přerušeni procházejícího paprsku organismem je detekováno čidlem umístěným na opačném konci nádoby, stupeň aktivity perlooček je dán hodnotou počtu přerušení infračervených impulzů. Toxikant ve vodě nejprve zvýší aktivitu perlooček, což se projeví zvýšením počtu impulzů. Znehybnění či úhyn perlooček následkem intoxikace se naopak projeví ostrým poklesem aktivity (Brosnan, 1999).

Novější BEWS je založen na přímém monitorování chování perlooček. Pomocí videokamery je v určitých intervalech snímán obraz nádoby, který je dál počítačovým programem vyhodnocován. Aktivita každé z perlooček je kontinuálně monitorována, je sledováno, zda nedochází ke změně jednoho či více definovaných parametrů. Tyto parametry jsou: průměrná rychlost pohybu, rozdělení perlooček do tříd podle rychlosti plavání, průměrná vzdálenost organismů od sebe, zakřivení dráhy pohybu, průměrná výška perlooček ve vodním sloupci, růst perlooček a počet přežívajících jedinců. Jednotlivým parametrům je přiřazen index důležitosti, změny jsou vyhodnocovány a následně je počítán index toxicity. Pokud dojde ke změně v chování perlooček, dojde i ke změně v hodnotě indexu toxicity. Po dosažení určité hodnoty indexu je vyhlášen alarm (Lechelt et al., 2000).

Využití BEWS pro on-line monitoring toxického znečištění je široké. Jsou používány k monitorování kvality vody a pro včasné zachycování ekologických havárií či úmyslného znečištění vodních toků. Z tohoto důvodu byly vytvořeny monitorovací sítě skládající se z jednotlivých monitorovacích stanic, kde je umístěno jedno nebo více zařízení BEWS. V případě ohlášení alarmu na některé stanici je vyhlášen poplach a jsou podniknuta následná opatření s cílem eliminovat či alespoň snížit následky znečištění dále po proudu (Van der Schalie et al., 2001).

Citlivost jednotlivých BEWS je různá. Důležitou roli hrají organismy, jež jsou v zařízení použity, typ sledovaných parametrů odezvy a jejich citlivost, způsob vyhodnocení a interpretace výsledků, spektrum toxických látek. Proto jsou v rámci monitorovacích sítí používány většinou minimálně dva různé typy BEWS s odlišným druhem organismů (Van der Schalie et al., 2001)

3.2. Vliv specifických polutantů a léčiv ve vodách

Daughton et Ternes, (1999) zavedli pro část specifických polutantů vypouštěných do toků pojem PPCP (Pharmaceuticals and Personal Care Products). Jsou to látky, které se do odpadních vod dostávají až po použití populací, obecně léčiva, kosmetické přípravky, čisticí a hygienické přípravky apod. Mezi PPCP zaujímají zvláštní místo léčiva, jejichž základní složkou jsou biologicky aktivní látky podávané především perorálně, parenterálně a dermatologicky. Je to skupina látek vymezená podle používání a zahrnující látky s velmi různou chemickou strukturou a fyzikálními vlastnostmi. Z pohledu systémů kontroly

znečištění je podstatné, že léčiva obecně nelze prohlásit za nebezpečné látky a použít tedy standardní nebo modifikované legislativní podklady pro ochranu vod nebo životního prostředí vůbec. Je nutno respektovat jejich užívání v současné (a rozvíjející se) míře a zkoumat možnosti jejich eliminace v systémech čištění komunálních odpadních vod (Váňa et al., 2010).

Kontinuální vypouštění PPCP do životního prostředí, v tomto případě z komunálních čistíren odpadních vod do toků, vede k chronické expozici vodních organismů těmito látkám a jejich metabolitům (De Lange a kol. 2006). Sledované látky jsou transportovány i do vodárenských nádrží a podzemních vod v nivě, kde jejich existence již byla prokázána (Fuksa et al., 2010).

Farmaceutické výrobky jsou jednou z hlavních skupin chemických sloučenin, které jsou průběžně uvolňovány do životního prostředí. Primární cesta léčiv do vodního prostředí je jejich vypouštění do odpadních vod (Bonnafé et al., 2014). Hlavním zdrojem farmaceutických látek nalezených v životním prostředí je lidská spotřeba a veterinární činnost (Jørgensen et Halling- Sørensen 2000).

Vzhledem k tomu, že se ve své práci věnuji problematice využití sladkovodních mlžů v biosenzingu, uvádím níže zjištěné poznatky z hlediska vlivu PPCP na měkkýše.

Chen et al. (2014) zkoumali účinky karbamazepinu na dospělé mlže *C. fluminea*. Mlži byli vystaveni koncentracím 0,5, 5 a 50 $\mu\text{g/l}$ karbamazepinu, který se používá především k léčbě epilepsie, bipolární poruchy, a neuralgie trojklanného nervu (García-Morales et al., 2007). Karbamazepin není snadné odstranit z odtoků odpadů konvenčními čistírnami odpadních vod. Jejich účinnost při odstranění je méně než 10 % (Zhang et al., 2008). Ve srovnání s kontrolní skupinou nebyl při koncentracích karbamazepinu 0,5 a 5 $\mu\text{l/l}$ pozorován žádný statisticky významný rozdíl v chování sifonu. Rychlost filtrace při 50 μg karbamazepinu na litr se ve srovnání s kontrolní skupinou významně snížila. U žaber byla superoxid dismutázová aktivita při koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$ karbamazepinu ve srovnání s kontrolní skupinou významně inhibována. Na rozdíl od měření aktivity superoxid dismutázy (enzym zneškodňující superoxidový radikál jeho přeměnou na molekulární kyslík a peroxid vodíku (Matoušková et al., 2014)), katalázová aktivita (kataláza je enzym rozkládající peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík (Matoušková et al., 2014)) byla vyšší v zažívacím traktu než v žábrách. Kromě toho byla aktivita katalázy významně zvýšena všemi koncentracemi karbamazepinu u žaber i v trávicím traktu. Aktivita glukokortikotropního receptoru byla u žaber významně

snížena u všech třech koncentrací karbamazepinu. Žádné významné změny v aktivitě glukokortikotropního receptoru nebyly pozorovány v trávicím ústrojí při koncentraci karbamazepinu 0,5 µg /l, zatímco významné snížení bylo pozorováno po expozici 5 a 50 µg karbamazepinu na litr. V souhrnu výsledky potvrzují, že karbamazepin může působit na molekulární úrovni namáhání *C. fluminea* tkání a že hladiny biomarkerů HSP jsou užiteční strážci stresu způsobeného látkami znečišťujícími životní prostředí (Chen et al., 2014).

Magni et al., (2014) si dali za úkol zjistit reakci sladkovodního mlže *Dreissena polymorpha* na expozici morfia v koncentracích 0,05 a 0,5 µg/l po dobu 14 dnů. Červený retenční test neutrality ukázal významnou destabilizaci lysosomálních membrán podle časového plánu a v závislosti na koncentraci. Obě koncentrace morfia výrazně zvýšily obecný buněčný stres mlžů, při 0,05 µg /l léčba způsobila významné snížení začínající 11 dnů po kontaktu, zatímco při 0,5 µg /l významná destabilizace lysosomálních membrán byla pozorována již 7 dní po expozici. Výsledky ukazují, že expozice morfia by mohla vyvolat mírné nežádoucí účinky u tohoto druhu sladkovodního mlže, je třeba zdůraznit jeho případné riziko pro sladkovodní komunitu. Dokonce i když současná úroveň morfia nezpůsobí žádné škodlivé účinky na životní prostředí, zvláště pak na mlže, 14-ti denní ošetření při koncentraci 0,5 µg /l již má vliv na oxidační stav mlžů a indukované mírné oxidační poškození buněčných makromolekul (Magni et al., 2014).

Na sladkovodní mlže má vliv i estrogen, hormon obsažený/ v antikoncepčních tabletách. Při koncentraci 1000 ng/l byla po 4 denní expozici významně zvýšena úmrtnost glochidií *Lampilis fasciola*. Při této koncentraci dále Leonard et al. (2014) pozorovali zvýšené vypouštění vajíček a nedovyvinutých glochidií samicemi vlivem předčasného tření.

Flippin et al. (2007) studovali vliv ibuprofenu, jako zástupce nesteroidních antiflogistik, na reprodukci sladkovodní ryby medaky japonské (*Oryzias latipes*) během šestitýdenní expozice. Se zvyšující se koncentrací (od 1 do 100 µg/l) se medaky třely méně často, ale produkovaly větší počet oplodněných vajíček na jedno tření. Největší počet vajíček na den byl produkován chovnými páry vystavenými nejvyšší koncentraci ibuprofenu 100 µg/l.

Výzkum Le et al. (2011) ukázal, že verapamil i tramadol má nepříznivý vliv na přežití, růst a rozmnožování sladkovodního korýše hrotnatky velké (*Daphnia magna*). Podstatné rozdíly v parametrech reprodukce (tj. doba prvního rozmnožování a počet mláďat na samici) byly pozorovány již při nízkých koncentracích verapamilu (2,1 mg /l) a tramadolu (8,5 mg/l).

Během 21 denní expozice se ukázalo, že při těchto koncentracích je dříve postižena reprodukce než samotné přežití jedinců (Le et al, 2011).

Obecně lze považovat citlivost měkkýšů na znečištění vody za velmi vysokou. U látek, které nepatří mezi PPCP, byl zdokumentován značný vliv například u pesticidů a těžkých kovů. Níže jsou uvedeny vybrané příklady.

Prosser et al. (2016) studovali vliv neonikotinoidních insekticidů na glochidie mlže *Lampisilis fasciola*. Koncentrace 500 µg/l způsobila po 48 hodinové expozici méně než 10% snížení její životaschopnosti. Výsledky této studie ukazují, že glochidie *L. Fasciola* jsou relativně necitlivé na akutní expozici neonikotinoidů ve srovnání například s vodním hmyzem (Morrissey et al., 2015).

U dospělých měkkýšů vyšší koncentrace herbicidu Atrazinu vyvolávají nekrózu vaječnicků u *Dreissena polymorpha* při 50 µg /l (Zupan a Kalafatic, 2003) Data dále ukazují, že v průběhu 1 až 2 h při koncentraci 15 µg/l mají sladkovodní mušle tendenci se shlukovat a přerušit tak uměle vyvolanou maximální vzdálenost mezi sebou (Flynn et Spellmann, 2009).

Koncentrace DDT nemá vliv na reprodukční cyklus *D. polymorpha* (Binelli et al., 2004). Avšak uhlovodíky jsou schopny indukovat degenerace oocytů (Moore, 1985; Lowe et Pipe, 1986).

Z těžkých kovů například kadmiové ionty jsou toxické a mohou první narušit příjem vápníku u sladkovodních mlžů, navázáním na epiteliální membrány do míst, která za normálních okolností váží vápník (Roesijadi et Unger 1993). Ionty kadmia také inhibují vychytávání bílkovin a narušují metabolismus vitamínu D3 (Brzo'ska et Moniuszko-Jakoniuk 1998). Kadmium také inhibuje transport Ca díky své vysoké afinitě k SH skupině vápník adenosin triphosphatases (CA-ATPas); (Verbost et al. 1988). Kadmium může mít také částečně negativní účinky na dýchání sladkovodních mlžů (Sparks et al, 1983)

Schoonover et al. (2016) zkoumali vliv kombinace zinku a kadmia (5 mg/l Zn a 20 µg/l Cd) na sladkovodní mlže. Kontrolní skupina dospělých *Corbicula fluminea* vyloučila během 28 dního testu větší množství glochidií než skupina vystavena kombinaci zinku a kadmia.

U několika druhů ryby (candát, okounek černý, pstruh duhový) došlo vlivem rtuti ke zvýšení příjmu potravy, změnám v jejich stravovacích návycích a také strategii získávání potravy (Sadraddini et al., 2011). Výsledky ukazují, že koncentrace Hg, Pb, Cu se v mnoha

sladkovodních ekosystémech v posledních letech snížily. Naopak množství niklu se zvýšilo (Fliedner et al., 2014).

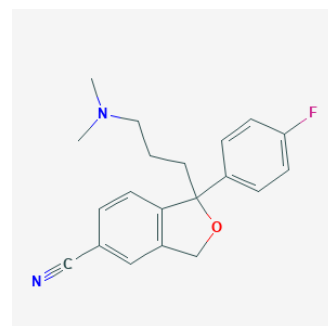
3.3. Selektivní inhibitor zpětného vstřebávání serotoninu (SSRI)

Selektivní inhibitory zpětného vstřebávání serotoninu (SSRI) patří mezi nejčastěji předepisované léky na světě. Tato skupina léků dosáhla takové fenomenální míry využití částečně proto, že mají příznivý profil bezpečnosti a snášenlivosti. Přestože se nežádoucí účinky SSRI vyskytují u malého procenta pacientů, spolu se vzrůstajícím počtem uživatelů vzrůstá i absolutní počet výskytů těchto problémů (Goldberg, 1998). Používání antidepresiv selektivní inhibitor zpětného vstřebávání serotoninu serotonin (5-HT) (SSRI) bylo zahájeno v roce 1980 a patří mezi nejúspěšnější léky na léčbu psychiatrických poruch a stále zůstávají na prvním místě při léčbě těžkých depresivních poruch. U lidí se terapeutická odpověď na SSRI projeví často se zpožděním, léčba tedy musí probíhat nejméně několik týdnů (Dale et al., 2015).

SSRI jsou relativně stabilní v životním prostředí odolné vůči hydrolýze a fotolýze. V laboratorních studiích (Kwon a Armbrust, 2006) bylo také zjištěno, že se akumulují v sedimentech a biotě (Brooks et al, 2005; Chu a Metcalfe, 2007; Bringolf et al, 2010; Schultz et al, 2010). U SSRI je známo, že ovlivňují reprodukci, příjem potravy, reakce na stres a pohyblivost ryb a bezobratlých (Brooks et al., 2003).

3.3.1. Citalopram

Jeho chemický vzorec je 1 - [3 -(dimethylamino)propyl] - 1 - (4 - fluorophenyl) - 3H - 2 -benzofuran - 5 - carbonitrile (Pubchem, n.d.).



Obr. 3.:2D struktura

Citalopramu (Pubchem, n. D.)

Citalopram je furancarbonitrile, který je jedním z inhibitorů zpětného vstřebávání používaných jako antidepresivum. Lék je také účinný při snižování příjmu ethanolu u alkoholiků a používá se u pacientů s depresí. Také se využívá k léčbě mírné demence, odvykání kouření, obsesivně-kompulzivní poruše u dětí a při diabetické neuropatii. (Hedges et Woon, 2007) Používá se také příležitostně v léčbě dysmorfické poruchy těla a úzkosti. Dysmorfická porucha těla je stav, kdy se člověk zcela iracionálně zaměří na určitou část svého těla jako na chybnou či nedokonalou (Phillips, n.d.). Citalopram je prodáván pod obchodní značkou jako Celexa (v USA), Cipramil, Seropram (v Evropě a Austrálii). V Austrálii je též prodáván pod názvem Ciazil (Human Metabolome Database, n.d.).

V evropských vodách je zjištěná průměrná koncentrace citalopramu 33,8 ng/l. Nejvyšší zjištěná koncentrace je pak 189 ng/l (Loos et al, 2013). Lajeunesse et al. (2008) uvádějí koncentraci 0,052 µg /l v kalových odpadních vodách, 0,057 µg /l odpadní vody a 0,011 µg /l u pitné vody. To jsou stejně vysoké hodnoty, jako byly naměřeny v amerických odtokových vodách, a to 0,07 µg /l (Schultz et al. 2010). Metcalfe et al. (2010) uvádějí vyšší průměrné koncentrace citalopramu v kanadských odpadních vodách (přibližně 0,25 µg /l) a 10 m ve směru (přibližně 0,125 µg /l).

3.4. Vliv SSRI na sladkovodní měkkýše

3.4.1. Serotonin

Biogenní monoamin serotoninu (5-hydroxytryptaminu, 5-HT) je nyní v široké míře testován pro své charakteristické neurohormonální účinky na fyziologické systémy mlžů (Uhler et al., 2000).

Serotonin ovládá pedální ciliární aktivitu u mořských plžů, jako je například *Tritonea Diomedea* (Audesirk et al., 1979), sladkovodních plžů, plovatky bahenní (Syed a Winlow, 1989) a *Planorbis corneus* (Deliagina a Orlovsky, 1990). Serotonin rovněž ovládá nožní svalové kontrakce a bylo prokázáno, že reguluje plavání u nahožábřých *Melibe leonine* (Lewis et al., 2011).

Serotonin omezuje u většiny mlžů pohyb. U mušlí a ústřic reguluje také ciliární aktivitu žaber (Aiello, 1970, Saimi et al, 1983) a zvyšuje ciliární aktivitu a průměr žaber u sláviček

mnohotvárných (Gardiner et al, 1991). V případě vystavení sláviček mnohotvárných vysokým koncentracím serotoninu (1 mM) jsou svaly na přilehlých tkáních sifonu (společný protažený vývod přijímacího a vyvrhovacího otvoru (geologie, n.d.)) ztuhlé a tudíž jsou slávičky otevřené, ale při nízkých koncentracích (1 μ M) se svaly uvolní (Ram et al., 1999). Naproti tomu, dopaminogenní neurony inhibují řasinky okolo žaber u veligeru mlže *Mytilus edulis* (Beiras a Widdows, 1995).

Serotonin reguluje také reprodukční procesy mlžů, jako je tření (Hirai et al, 1988, Ram et al., 1993.), reaktivace spermatu (Kadam et Koide, 1990), vypouštění larev (Fong et Warner, 1995) a zrání vajíček (Kadam et Koide, 1989, Krantic et al, 1991, Fong et al, 1994; Gobet et al, 1994). Serotonin také řídí řadu somatických procesů, jako jsou rektální svalové kontrakce u mořského plže *Aplysia* (Ajimal et Ram, 1991), jakož i ciliární aktivitu na nohou nahožábřích plžů (Audesirk et al., 1979) a žaber mlžů *Mytilus* (Saimi et al., 1983). Ve vývoji embrya sladkovodního plže *Helisoma trivolis*, serotonin indukuje ciliární defekt, který způsobuje rotační chování embryí ve vaječné kapsuli (Diefenbach et al, 1991; Goldberg et al, 1994).

3.4.2. Fluoxetin

Mezi známé účinky fluoxetinu na sladkovodní měkkýše patří uvolňování gamet a larev (Fong, 1998; Cunha et Machado, 2001; ga et al, 2004, Bringolf et al, 2010), změny v embryonálním nebo larválním rozvoji (Gust et al. 2009; Hazelton et al, 2013), a zjevná ztráta kontroly nad svalnatou nohou (Cunha a Machado, 2001; Fong a Molnar, 2013; Hazelton et al, 2013).

Při 67 dní trvající expozici 22,3 μ g fluoxetinu na litr bylo pozorováno zvýšení celkového pohybu. K největším změnám v množství pohybu pravděpodobně došlo již během prvních 10 hodin pokusu. Po 48 hodinách od vystavení fluoxetinu se všichni sledovaní živočichové přemístili ze svého výchozího místa. Z toho vyplývá, že dlouhodobé vystavení fluoxetinu může mít výrazný vliv na chování sladkovodních mlžů (Hazelton et al., 2014).

Fong (1998) zjistil, že nízké koncentrace fluvoxaminu i fluoxetinu podněcují samce mlžů (*Dreissena polymorpha*), aby se třeli, pokud jsou vystaveny koncentracím 1 nM fluvoxaminu a 50 nM fluoxetinu. Ve stejném roce, Fong et al. (1998) ukázali, že produkce juvenilních jedinců u sladkovodních okružanek (*Sphaerium striatinum*) byla indukována 10 nM

fluvoxaminu. Vzhledem k tomu, že slávičky jsou nebezpečnými invazními druhy, které se rozšířily po celé Evropě a jsou rychle se rozšiřující skupinou i v celé Severní Americe, a protože okružatky jsou důležitou součástí sladkovodního bentosu po celém světě, zjištění, že nízké koncentrace antidepresiv by mohlo vyvolat změny reprodukčních procesů, vyvolalo nárůst počtu následných studií o účincích různých antidepresiv na vodní živočichy (Fong et Ford, 2014).

4. Metodika

4.1. Studovaný organismus

Pokus byl prováděn na velevrubovi malířském (*Unio pictorum*, Linnaeus, 1758; obr. 1). Tento druh je rozšířen po celé Evropě a Rusku (Fauna Europaea, 2004). Je to nejběžnější druh rodu *Unio* ve střední Evropě a v České republice byl vyhodnocen jako málo dotčený (Juříčková et al. 2001). Tento druh byl dokumentován jako citlivý na organické znečištění (Mouthon, 1996), i když jeho rozšíření ve Velké Británii ukazuje vyšší úroveň tolerance, jak bylo zjištěno, jedná se o jediný velký druh mlže nalezený bezprostředně za kanalizačních výpustí (Killeen et al. 2004).

4.2. Příprava hladin testovaných koncentrací

Experiment proběhl ve spolupráci s Laboratoří environmentální chemie a biochemie Fakulty rybářství a ochrany vod (JČU), která zajistila přípravu zásobního roztoku citalopramu. Před startem pokusu jsem naředila zásobní roztok citalopramu z původní koncentrace 97,44 mg/l do potřebných koncentrací (1 (J), 10 (D), 100 (S) a 1000 (T) µg/l) a do poslední nádoby jsem umístila odstátou vodovodní vodu. Roztok jsem připravovala pomocí ředící řady. Od každé koncentrace jsem připravila 900 ml roztoku. Do každé ze šesti kádinek jsem nalila 150 ml roztoku v dané koncentraci.

4.3. Expozice glochidií

Do každé skleněné kádinky jsem dala určené množství látky a do ní jsem parazitické larvy (glochidia) vložila. Zdroj experimentálních glochidií velevruba malířského byl zajištěn v rámci projektu Psychoaktivní látky ve vodním prostředí a jejich vliv na exponované organismy (GAČR). Pro experiment jsem použila směsný vzorek glochidií vypuštěných třemi mateřskými mlži z lokality v povodí řeky Sázavy. Glochidia byla získána neinvazním odběrem vypuštěných parazitických larev, tak aby nedošlo k ovlivnění dospělců. První den experimentu jsem nejprve provedla test aktivity glochidií, abych zjistila, jestli jsou testovací glochidie vitální (Cook et al., 1991). Vodu pro ředění a kontrolu jsem používala odstátou prokysličenou kohoutkovou. V každé ze čtyř koncentrací jsem měla šest opakování a dále

bylo celkem devět opakování kontrolních kádinek (z toho tři zkušební). Poté co jsem založila pokus, jsem kádinky zakryla, z důvodu ochrany proti kontaminaci a nechala 24 hodin působit (Foto 1).



Foto 1: Založený pokus (vlastní foto)

Za 24 hodin jsem postupně z každé kádinky přesunula na Petriho misku jedno kapátko, které obsahovalo v průměru 120 glochidií, do 30 ml vody. Každá koncentrace měla své kapátko, aby nebyla narušena koncentrace v kádinkách. Za pomoci kamery na binokulární lupě jsem zaznamenávala bazální aktivitu glochidií a poté jejich aktivitu po podání koncentrovaného roztoku NaCl. Natáčela jsem minutu před aplikací roztoku NaCl a tři minuty po ní při zvětšení 15 x. Video jsem tvořila s frekvencí 30 snímků za sekundu. Abych eliminovala možné chyby, brala jsem vždy po jedné misce z každé koncentrace. Hodnoty konduktivity se během pokusu vyskytovaly v rozmezí $320,48 \pm 6,21 \mu\text{S}/\text{cm}$ (průměr \pm směrodatná odchylka), obsahu kyslíku $8,12 \pm 0,04 \text{ mg/l}$, hodnoty pH $8,04 \pm 0,03$ a teplota $23,33 \pm 0,15 \text{ }^\circ\text{C}$ a nelišily se mezi skupinami.

4.4. Infikace ryb

Vodu, která v kádinkách zůstala jsem přefiltrovala a glochidia dala k rybám v akváriu o objemu jeden litr a nechala je 15 minut infikovat. Infikace celé řady ryb (např. C1, J1, D1, S1 a T1) proběhla v jedné minutě a jejich vylovení taktéž. Po infikaci jsem ryby usmrtila předávkováním anestetikem a uschovala v mrazničce pro další pozorování počtu přisedlých glochidií. Pro pokus jsem používala jelce tloušťě (*Squalius cephalus*, Linnaeus, 1758) ve věku 1+ získané z chovatelského zařízení (Vodňany). Ryby měly délku $82,57 \pm 8,27$ mm (průměr \pm směrodatná odchylka) a hmotnost $5,28 \pm 1,71$ g.

4.5. Vyhodnocení aktivity glochidií

Z videí jsem vypočítala průměrný počet sklapnutí na jednu glochidii před podáním roztoku NaCl tak, že jsem počet sklapnutí v celé misce celkem vydělila celkovým počtem glochidií na misce (Foto 2). Dále jsem z videa zjišťovala počet sklapnutí před závěrečným zavřením po aplikaci koncentrovaného roztoku NaCl. Roztok NaCl je používán pro aktivaci glochidií (Cook et al., 1991). Vybrala jsem celkem šest glochidií způsobem, dvě z levé části obrazovky, dvě z prostřední části obrazovky a dvě z pravé části obrazovky a stanovila, kolikrát za 10 s od aplikace roztoku NaCl sklaply (Foto 3). Dále jsem zaznamenávala, v kolikáté sekundě se definitivně zavřely. Roztok byl aplikován po jedné minutě záznamu. Vyhodnoceny byly jak rozdíly v chování glochidií mezi kategoriemi vystavenými citalopramu a kontrolními, ale také rozdíly napříč koncentracemi citalopramu. V každé koncentraci včetně kohoutkové vody jsem provedla šest opakování v hodnocení aktivity glochidií.

U ryb jsem zaznamenávala pomocí binokulární lupy počet glochidií přichycených na ocasní, hřbetní, řitní ploutvi, obou břišních ploutvích, obou prsních ploutvích, nozdrách, skřelích, ústech, na všech čtyřech žaberních obloucích v oblasti vnitřních žaber a také počet volných glochidií na misce odpadlých vlivem manipulace s rybami. Z nich jsem pak vypočítala poměr glochidií přichycených na žaberních obloucích vůči celkovému počtu přichycených na rybu. Abychom znali procento přichycených glochidií na povrchu ryb, spočítala jsem opět za pomoci binokulární lupy i počet glochidií, které se za dobu patnáctiminutové expozice na rybu nepřichytily a zůstaly v akváriu. U nich jsem další den dále sledovala procento otevřených, a jejich sklapovací aktivitu.

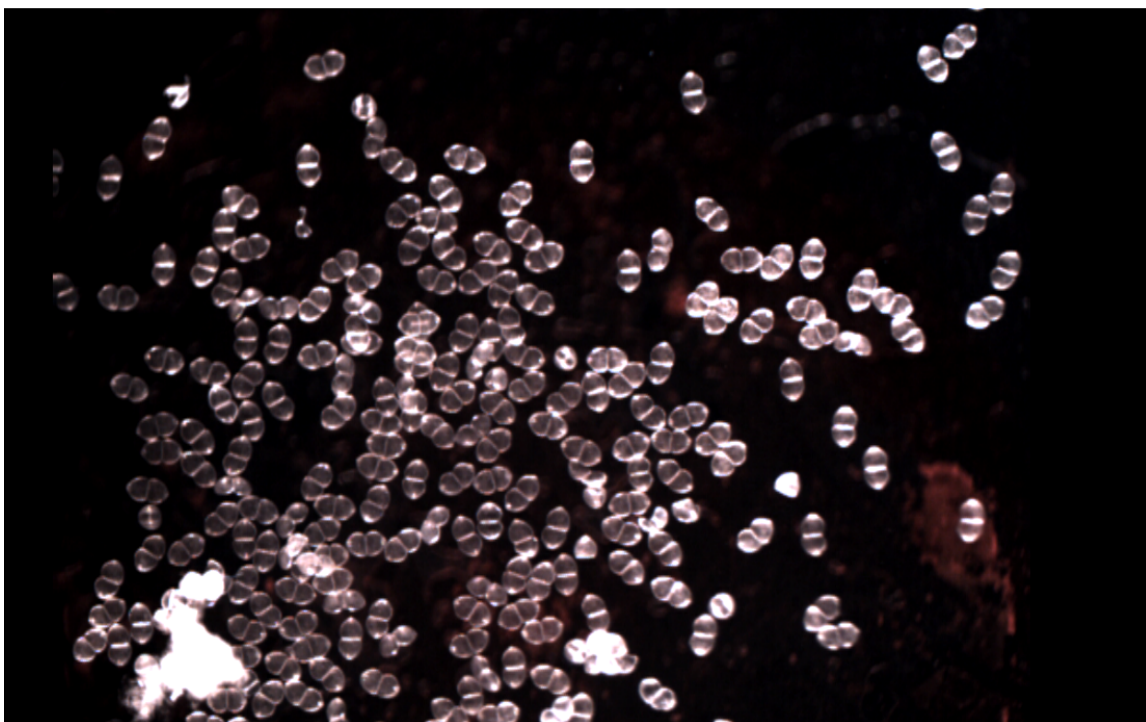


Foto 2: Glochidia ze vzorku J3 před aplikací roztoku NaCl. Osmá sekunda záznamu. Snímek z videa pořízeného kamerou na binokulární lupě během pokusu.

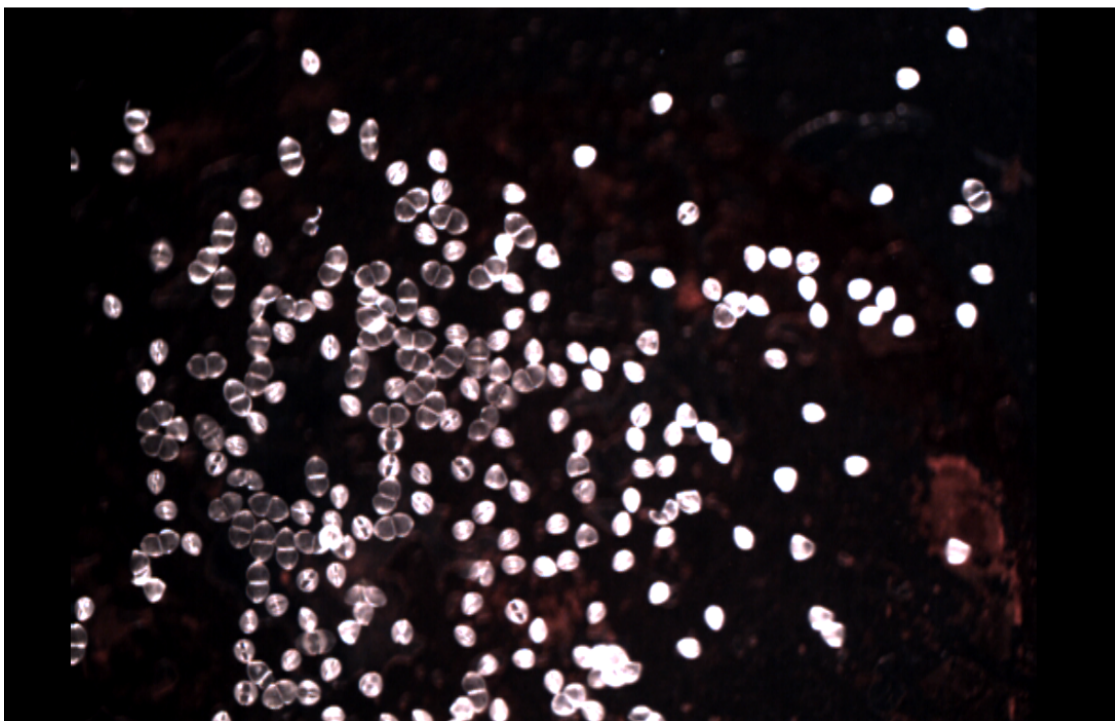


Foto 3: Glochidia J3 po aplikaci roztoku NaCl. 30. sekunda záznamu, tedy 5 sekund od aplikace roztoku. Snímek z videa pořízeného kamerou na binokulární lupě během pokusu.

4.5.1. Statistické zhodnocení

Statistické zhodnocení jsem prováděla pomocí neparametrického testu v softwaru STATISTICA Cz 12 Copyright© statsoft.

Byl použit Mann-Whitneyův U test, ve kterém byly zhodnoceny statisticky významné rozdíly zvláště pro hodnoty frekvence sklapávání před aplikací soli, sklapávání po aplikaci NaCl po 24 hodinové expozici citalopramem, množství glochidií vystavených citalopramu přichycených na ryby, poměr mezi glochidii přichycenými na žaberní oblouky vůči celkovému počtu přichycených na rybu a také procento přichycených glochidií na ryby z množství vyskytující se v testovacích nádržích. Vždy byly porovnávány hodnoty glochidií vystavených citalopramu bez ohledu na koncentraci s hodnotami pro glochidia v kontrolních kádinkách (šest vzorků).

Dále jsem pomocí Kruskal-Wallisova testu (neparametrická ANOVA) založené na pořadí pro více nezávislých hodnot hodnotila rozdíly mezi koncentracemi opět pro hodnoty sklapávání před aplikací NaCl, sklapávání po aplikaci NaCl po 24 hodinové expozici citalopramem, absolutní počet glochidií přichycených na ryby, poměr glochidií přichycených na žaberní oblouky vůči celkovému počtu glochidií přichycených na rybě a také procento přichycených z celkového počtu glochidií v testovacích nádržích. Proti sobě byly postaveny hodnoty pro koncentrace 1, 10, 100 a 1000 µg/l a kontrolní skupina s nulovou koncentrací.

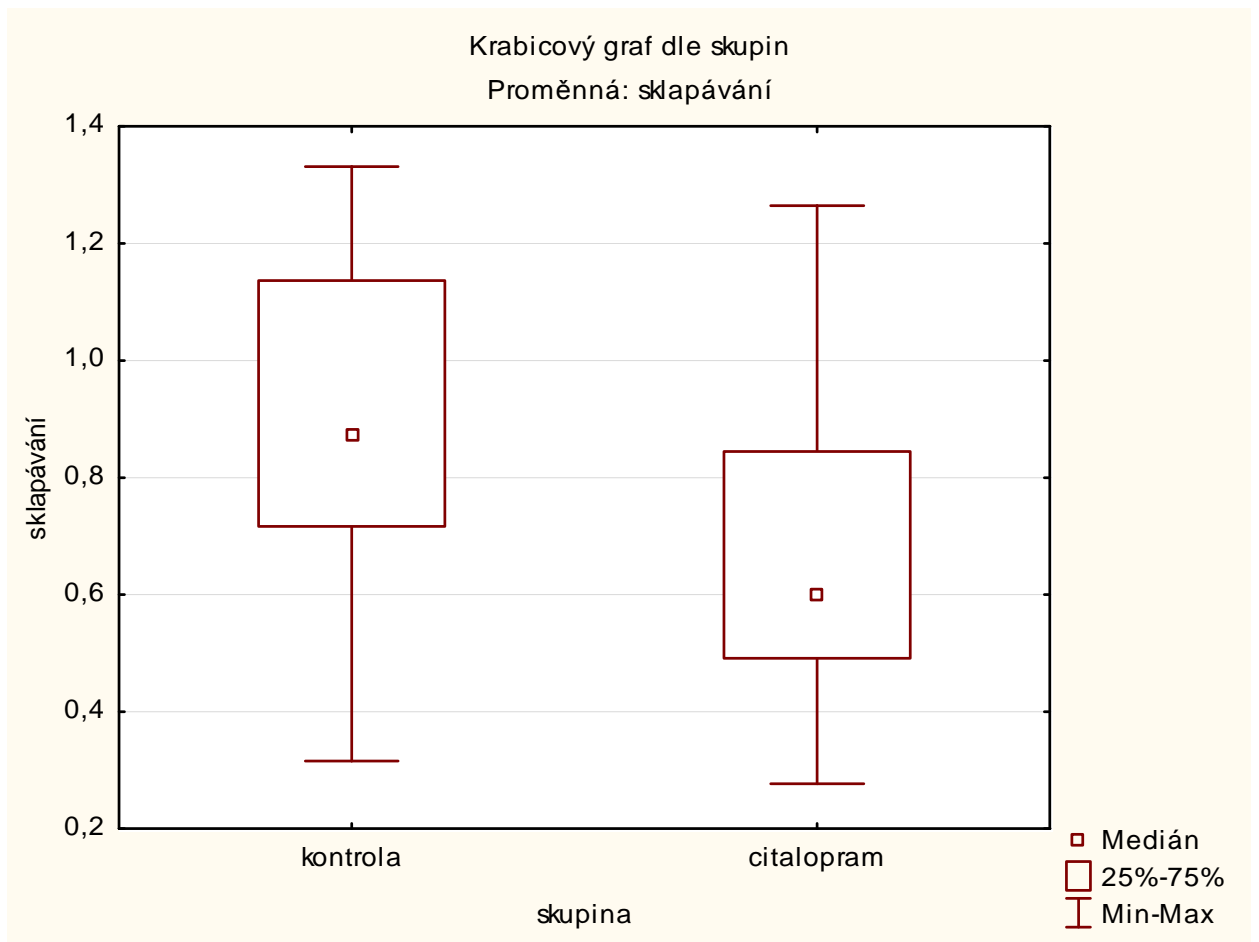
5. Výsledky

5.1. Expozice glochidí

Hodnota parametru p ($p = 0,15$) vyšla větší než hladina významnosti ($\alpha = 0,05$). Znamená to tedy, že v průměru sklapnutí při porovnání infikovaných a kontrolních vzorků na jednu glochidii před podáním roztoku NaCl jsem nezjistila žádný statisticky významný rozdíl (Tab. 1).

Mann-Whitneyův U test					
Dle proměnné skupiny					
Označené testy jsou významné na hladině $p < 0,05000$					
	Součet pořadí kontrola	Součet pořadí citalopram	U	Z	P-hodnota
Sklopávání	121	344	44	1,45	0,15
Proměnná	Z upravené	P-hodnota	N platných kontrola	N platných citalopram	2*1 str. Přesné p.
Sklopávání	1,45	0,15	6	24	0,16

Tab. 1.: Statistické zhodnocení rozdílu průměrné frekvence sklopávání glochidí mezi jedinci infikovanými citalopramem a jedinci z kontrolní skupiny



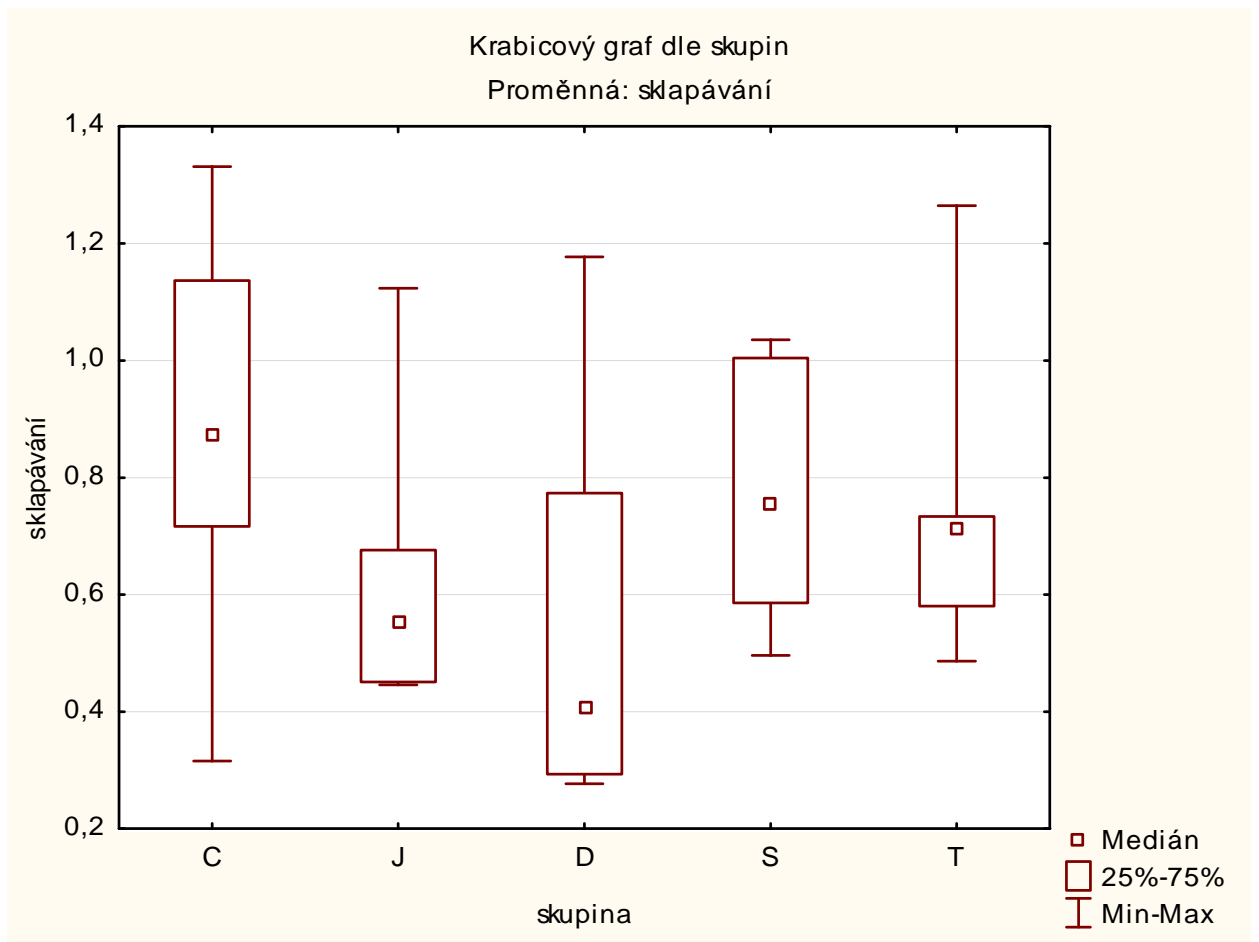
Graf 1: Průměr sklapávání na jednu glochidii. Rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou exponovanou citalopramem.

Hodnota parametru p ($p = 0,33$) vyšla větší než hladina významnosti ($\alpha = 0,05$). Znamená to tedy, že v průměru sklapnutí při porovnání jednotlivých koncentrací citalopramu (1, 10, 100 a 1000 $\mu\text{g/l}$) a kontrolních vzorků na jednu glochidii před podáním roztoku NaCl jsem nezjistila žádný statisticky významný rozdíl (Tab. 2). Celkem 15 hodnot je menších nebo rovno a 15 hodnot je větších než společný medián skupin (celkový medián = 0,69), to znamená, že žádná hodnota se společnému mediánu nerovná.

Kruskal-Wallisova ANOVA založeno na pořadí				
Nezávislá (grupovací) proměnná: skupiny				
Kruskal-Wallisův test: $H(4, N=30) = 4,606452, p=0,3301$				
	Kód	Počet platných	Součet pořadí	Průměr pořadí
C	101	6	121	20,17
J	102	6	75	12,50
D	103	6	64	10,67
S	104	6	105	17,50
T	105	6	100	16,67

Mediánový test, celk. Medián = 0,691939; sklapávání						
Nezávislá (grupovací) proměnná: skupiny						
Chi-Kvadrát = 6,666667, sv = 4, p = 0,1546						
	C	J	D	S	T	Celkem
\leq Medián: pozorování	1	5	4	3	2	15
Očekávání	3	3	3	3	3	
Pozorování - očekávání	-2	2	1	0	-1	
$>$ Medián: pozorování	5	1	2	3	4	15
Očekávání	3	3	3	3	3	
Pozorování - očekávání	2	-2	-1	0	1	
Celkem: očekávání	6	6	6	6	6	30

Tab. 2: Statistické zhodnocení rozdílu průměrné frekvence sklapávání glochidií mezi jedinci infikovanými citalopramem z jednotlivých skupin koncentrací a jedinci z kontrolní skupiny.

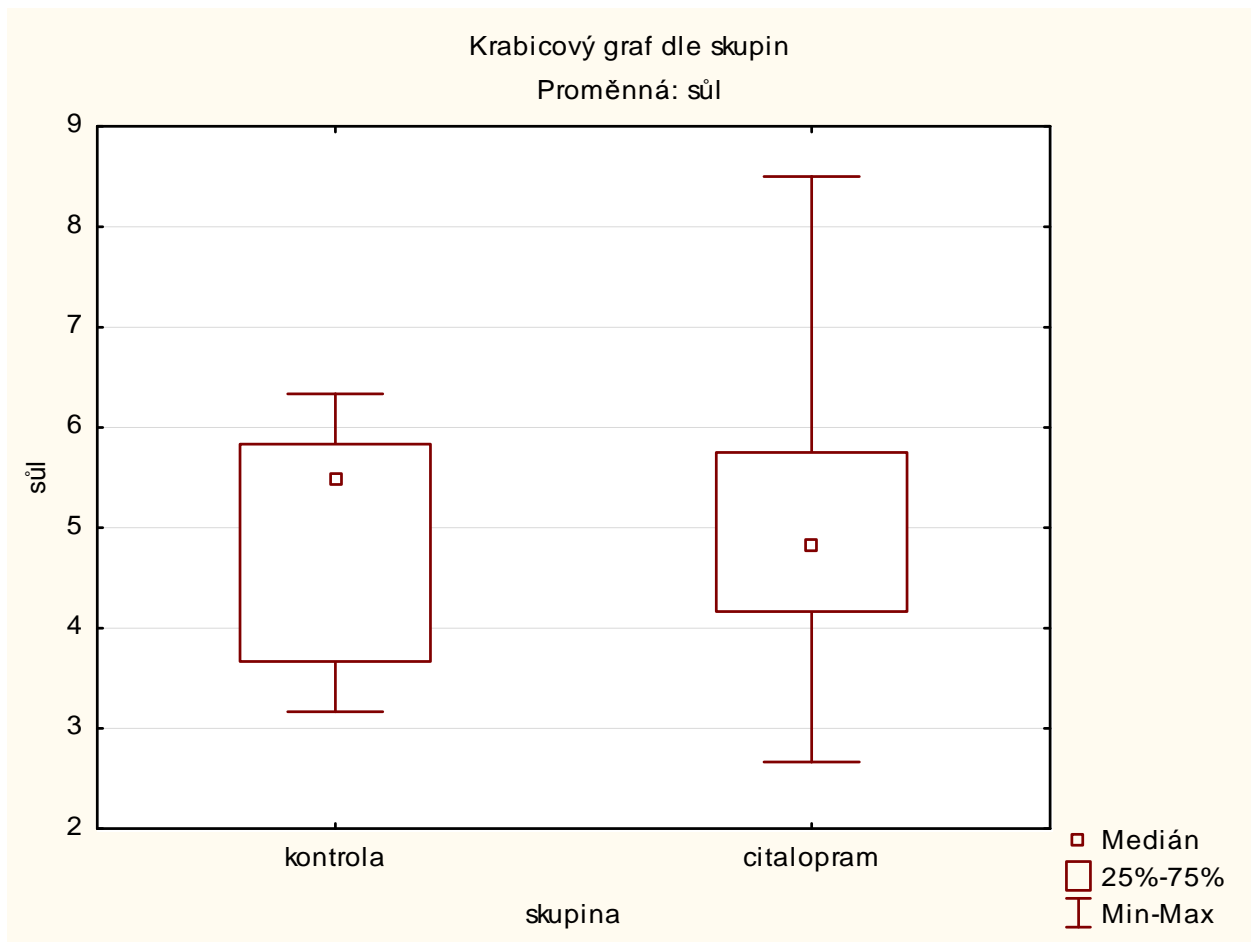


Graf 2: Průměr sklapávání na jednu glochidii. Porovnání kontrolní skupiny a skupin jednotlivých koncentrací citalopramu.

Mezi kontrolní skupinou a skupinou ošetřenou citalopramem neexistují statisticky významné rozdíly (Tab. 3.) Ve sklapávání po aplikaci roztoku NaCl, protože hodnota parametru p ($p = 0,44$) je větší než mnou zvolená hladina významnosti ($\alpha=0,05$).

Mann-Whitneyův U test					
Dle proměnné skupiny					
Označené testy jsou významné na hladině $p < 0,05000$					
	Součet pořadí kontrola	Součet pořadí citalopram	U	Z	P-hodnota
NaCl	100,50	364,50	64,50	0,39	0,70
Proměnná	Z upravené	P-hodnota	N platných kontrola	N platných citalopram	2*1str. Přesné p.
NaCl	-0,76938	0,441668	6	24	0,7

Tab. 3: Statistické zhodnocení rozdílu sklapávání glochidíí po aplikaci roztoku NaCl mezi jedinci infikovanými citalopramem a jedinci z kontrolní skupiny



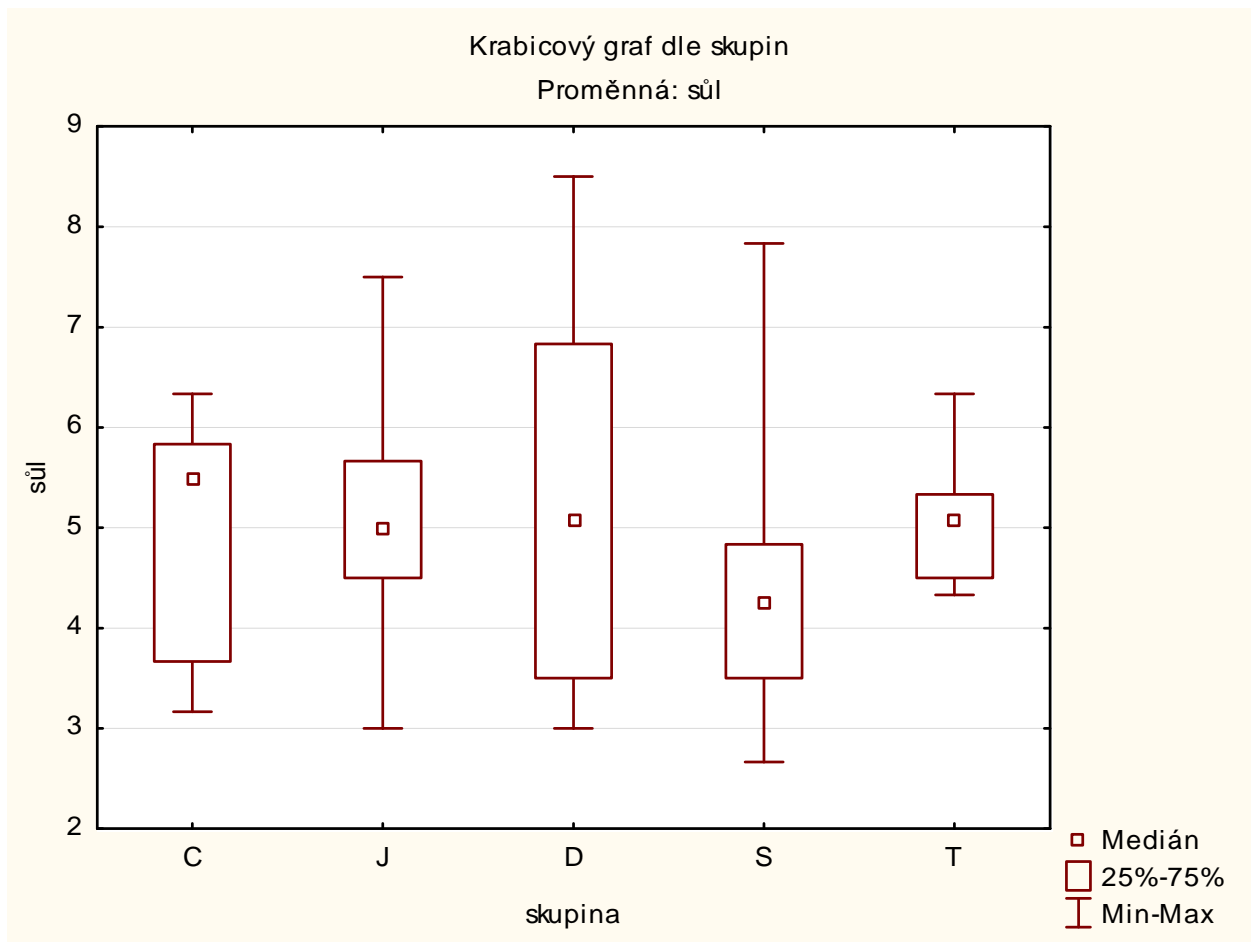
Graf 3: Počet sklapnutí glochidií po aplikaci roztoku NaCl. Rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou exponovanou citalopramem.

Při srovnání výsledků jednotlivých koncentrací citalopramu (1, 10, 100 a 1000 µg/l) a kontrolní skupiny neexistují statisticky významné rozdíly ve sklapávání po aplikaci roztoku NaCl, protože hodnota parametru p ($p = 0,84$) je větší než mnou zvolená hladina významnosti ($\alpha=0,05$) (Tab. 3.). Celkem 18 hodnot je menších nebo rovno a 15 hodnot je větších než společný medián skupin (celkový medián = 4,92), to znamená, že žádná hodnota se celkovému mediánu nerovná.

Kruskal-Wallisova ANOVA založena na pořadí: NaCl				
Nezávislá (grupovací) proměnná: skupiny				
Kruskal-Wallisův test: $H(4, N=30) = 1,442770, p = 0,8367$				
	Kód	Počet platných	Součet pořadí	Průměr Pořadí
C	103	6	100,50	16,75
J	104	6	97,00	16,17
D	105	6	98,00	16,33
S	106	6	70,00	11,67
T	107	6	99,50	16,58

Mediánový test, celkový medián = 4,91666						
Nezávislá (grupovací) proměnná: skupiny						
Chi-Kvadrát = 4, sv = 4 p = 0,4060						
	C	J	D	S	T	Celkem
<= Medián: pozorování	2	2	3	5	3	15
Očekávání	3	3	3	3	3	
Pozorování -očekávání	-1	-1	0	2	0	
> Medián: pozorování	4	4	3	1	3	15
Očekávání	3	3	3	3	3	
Pozorování -očekávání	1	1	0	-2	0	
Celkem: očekávání	6	6	6	6	6	30

Tab. 4. Statistické zhodnocení rozdílu sklapávání glochidí po aplikaci roztoku NaCl mezi jedinci infikovanými citalopramem z jednotlivých skupin koncentrací a jedinci z kontrolní skupiny.



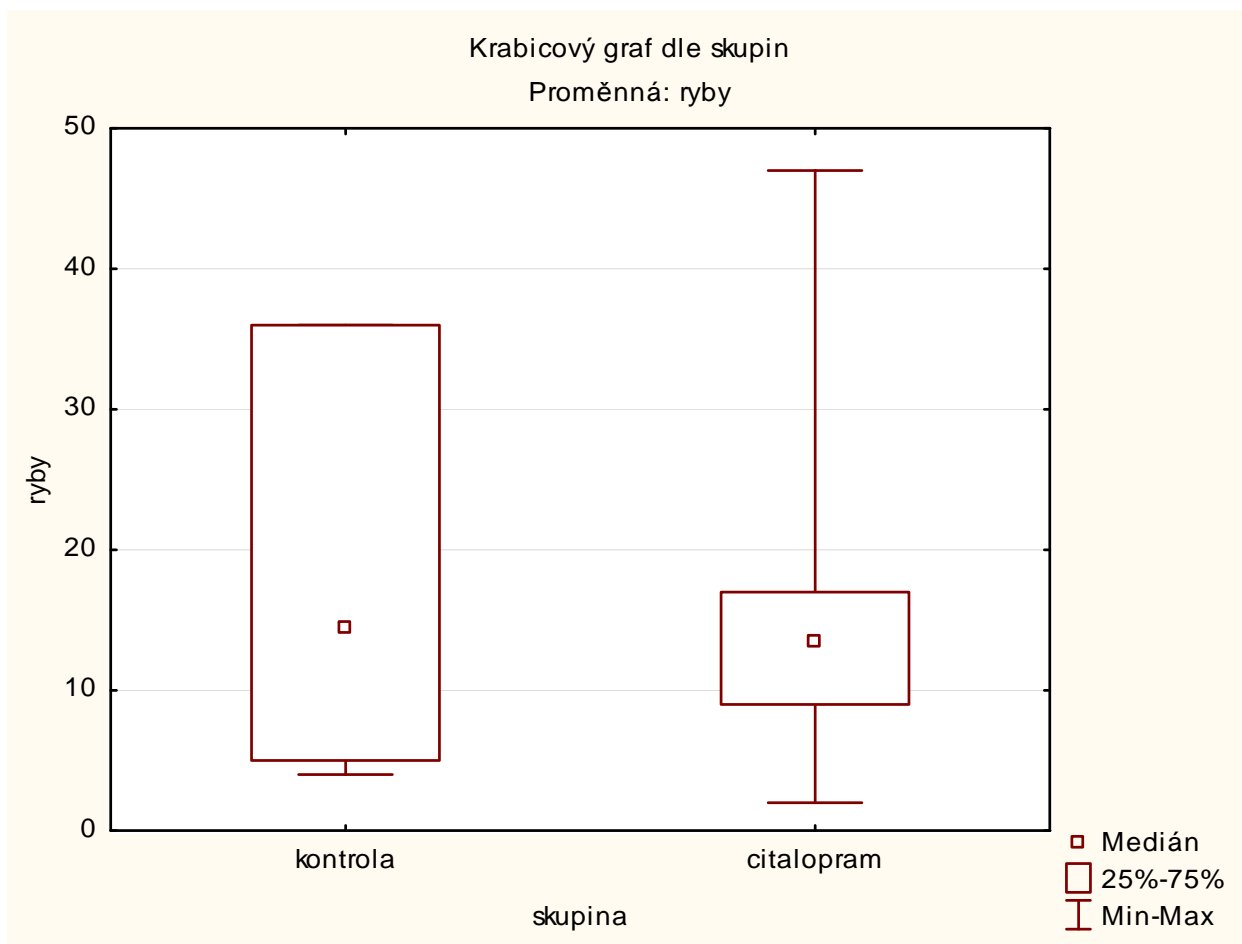
Graf 4: Počet sklapnutí glochidií po aplikaci roztoku NaCl. Porovnání kontrolní skupiny a skupin jednotlivých koncentrací citalopramu.

5.2. Infikace ryb

Při porovnání kontrolní skupiny a skupiny ošetřené citalopramem jsem nenalezla statisticky významné rozdíly, hodnota parametru p ($p = 1$) je mnohem větší než hladina významnosti ($\alpha = 0,05$) (Tab. 5.). Sledovala jsem přichycení na ocasní, hřbetní, řitní ploutev, obě břišní ploutve, obě prsní ploutve, nozdry, skřele, ústa, na všechny čtyři žaberní oblouky v oblasti vnitřních žaber a také jsem sledovala počet volných glochidií na misce odpadlých vlivem manipulace s rybami.

Mann-Whitneyův U test					
Dle proměnné skupiny					
Označené testy jsou významné na hladině $p < 0,05000$					
Proměnná	Součet pořadí kontrola	Součet pořadí citalopram	U	Z	P-hodnota
ryby	93,00	372,00	72,00	0,00	1,00
Proměnná	Z upravené	P-hodnota	N platných kontrola	N platných citalopram	2*1str. Přesné p.
ryby	0,00	1,00	6	24	1,00

Tab. 5.: Statistické zhodnocení rozdílů infikace ryb mezi glochidii infikovanými citalopramem a jedinci z kontrolní skupiny.



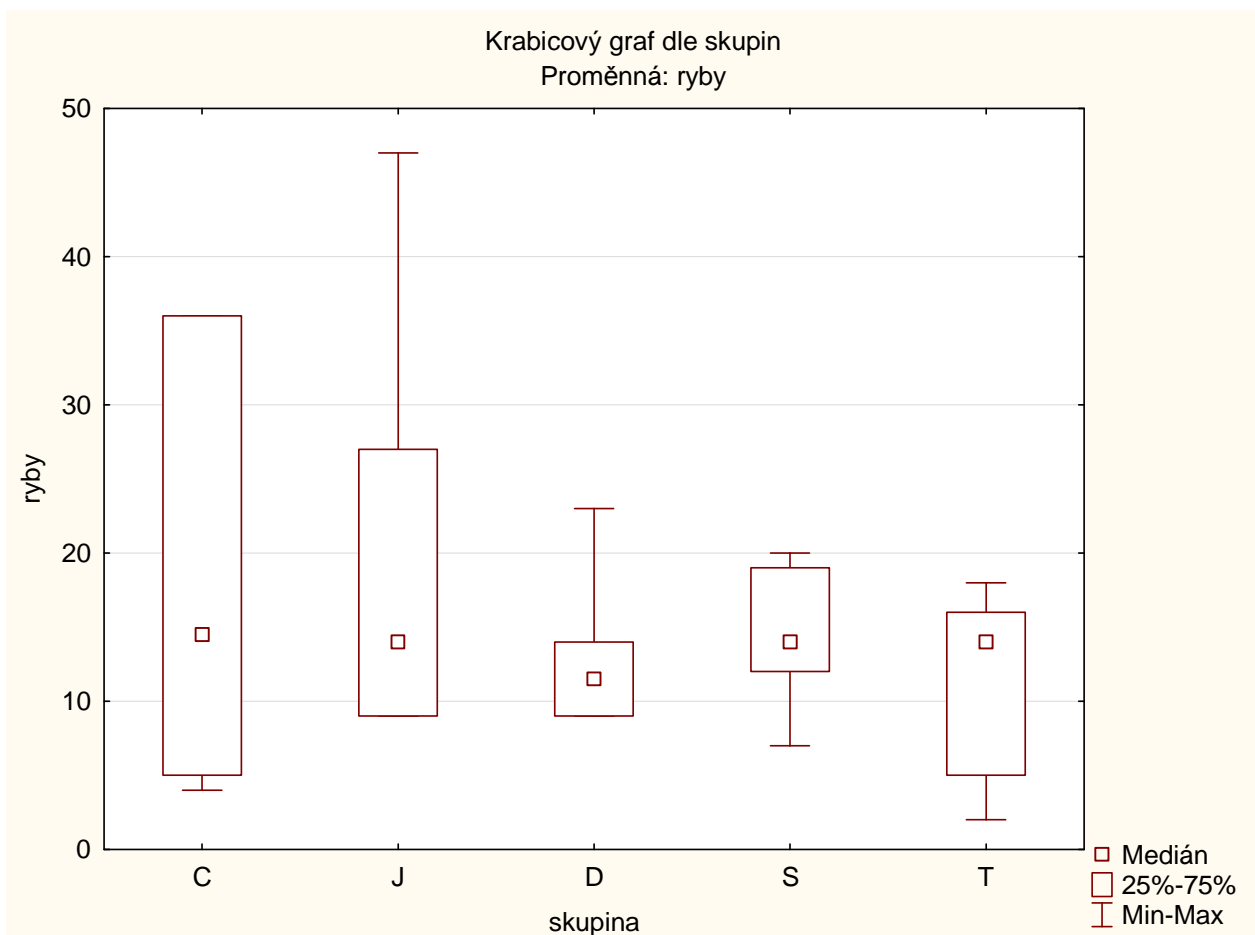
Graf 5: Počet přichycených glochidií na ryby po 15 minutové infekci. Rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou léčenou citalopramem.

Neexistuje statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými koncentracemi citalopramu (1, 10, 100 a 1000 µg/l a kontrolní skupinou z hlediska počtu přichycených glochidií po 15 minutové infekci (Tab. 6.). Hodnota parametru p je větší (p= 0,91) než hladina významnosti ($\alpha= 0,05$). Celkem 15 hodnot je menších nebo rovno a 15 hodnot je větších než společný medián skupin (celkový medián = 13,5), to znamená, že žádná hodnota se společnému mediánu nerovná.

Kruskal-Wallisova ANOVA založena na pořadí; ryby				
Nezávislá (grupovací) proměnná: skupiny				
Kruskal-Wallisův test: H (4, N= 30) =0,99951556 P =0,9099				
	Kód	Počet platných	Součet pořadí	Průměrné pořadí
C	103	6	93,0	15,50
J	104	6	107,5	17,92
D	105	6	84,5	14,08
S	106	6	99,0	16,50
T	107	6	81,0	13,50

Mediánový test, celk. Medián = 13,5; ryby						
Nezávislá (grupovací) proměnná: skupiny						
Chi-Kvadrát = 1,333333, sv = 4 p = 0, 8557						
	C	J	D	S	T	Celkem
<= Medián: pozorování	3	3	4	2	3	15
Očekávání	3	3	3	3	3	
Pozorování -očekávání	0	0	1	-1	0	
> Medián: pozorování	3	3	2	4	3	15
Očekávání	3	3	3	3	3	
Pozorování- očekávání	0	0	-1	1	0	
Celkem: očekávání	6	6	6	6	6	30

Tab. 6: statistické zhodnocení počtu přichycených glochidií na ryby po 15 minutové infekci. Rozdíl mezi jedinci infikovanými citalopramem z jednotlivých skupin koncentrací a jedinci z kontrolní skupiny.

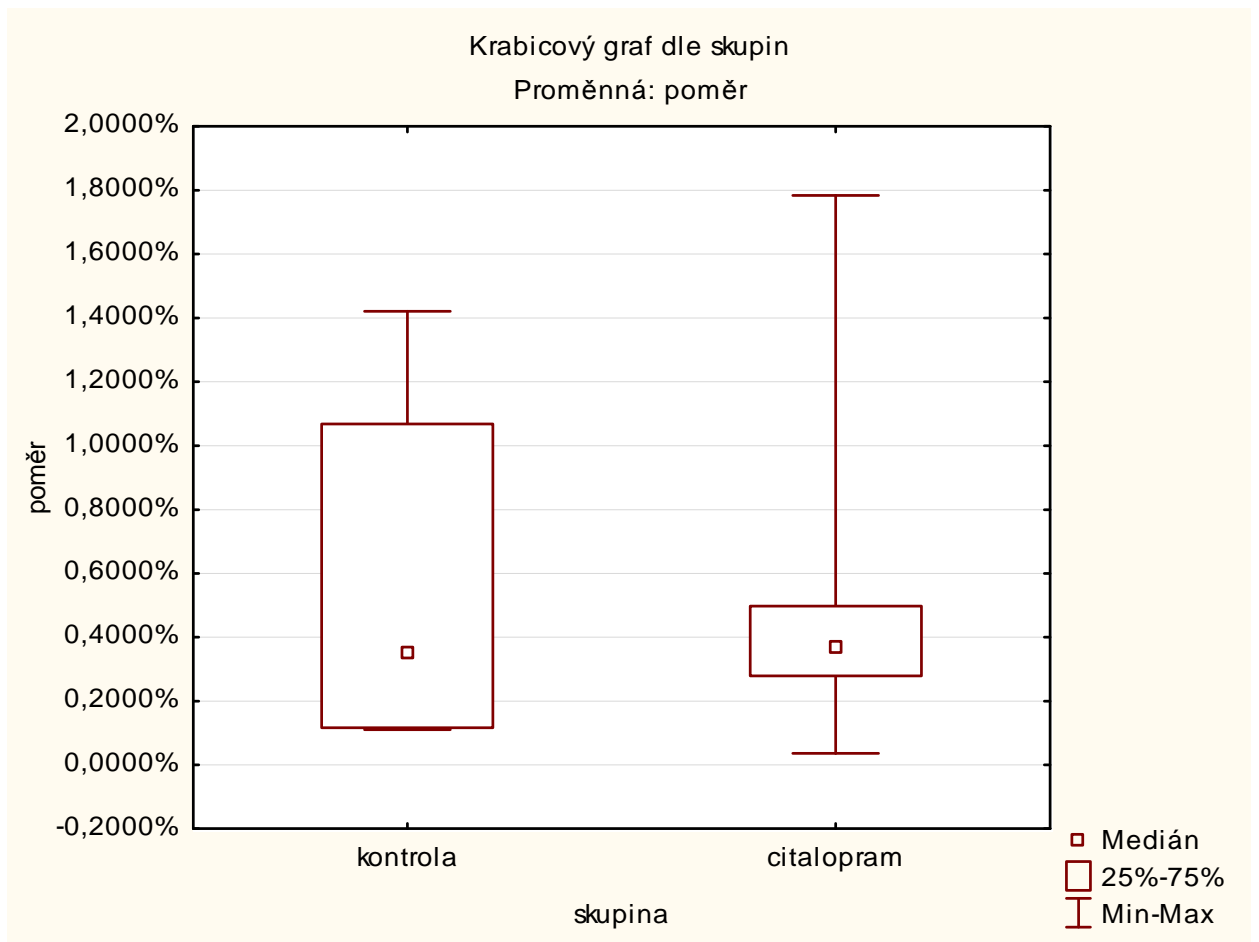


Graf 6: Počet přichycených glochidií na ryby po 15 minutové infekci. Porovnání kontrolní skupiny a skupin jednotlivých koncentrací citalopramu.

Nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v procentu úspěšnosti přichytávání na ryby při porovnání kontrolní skupiny se skupinou vystavenou citalopramu (Tab. 7). Hodnota parametru p ($p= 0,96$) vyšla větší než hladina významnosti ($\alpha= 0,05$).

Mann-Whitneyův U test					
Dle proměnné skupiny					
Označené testy jsou významné na hladině $p < 0,05000$					
Proměnná	Součet pořadí kontrola	Součet pořadí citalopram	U	Z	P-hodnota
Poměr	92,00	373,00	71,00	-0,05	0,96
Proměnná	Z upravené	P-hodnota	N platných kontrola	N platných citalopram	2*1str. Přesné p.
poměr	-0,05	0,96	6	24	0,98

Tab. 7.: Statistické zhodnocení rozdílu v procentu úspěšnosti přichycení glochidií na rybu mezi kontrolní skupinou a skupinou vystavenou citalopramu.



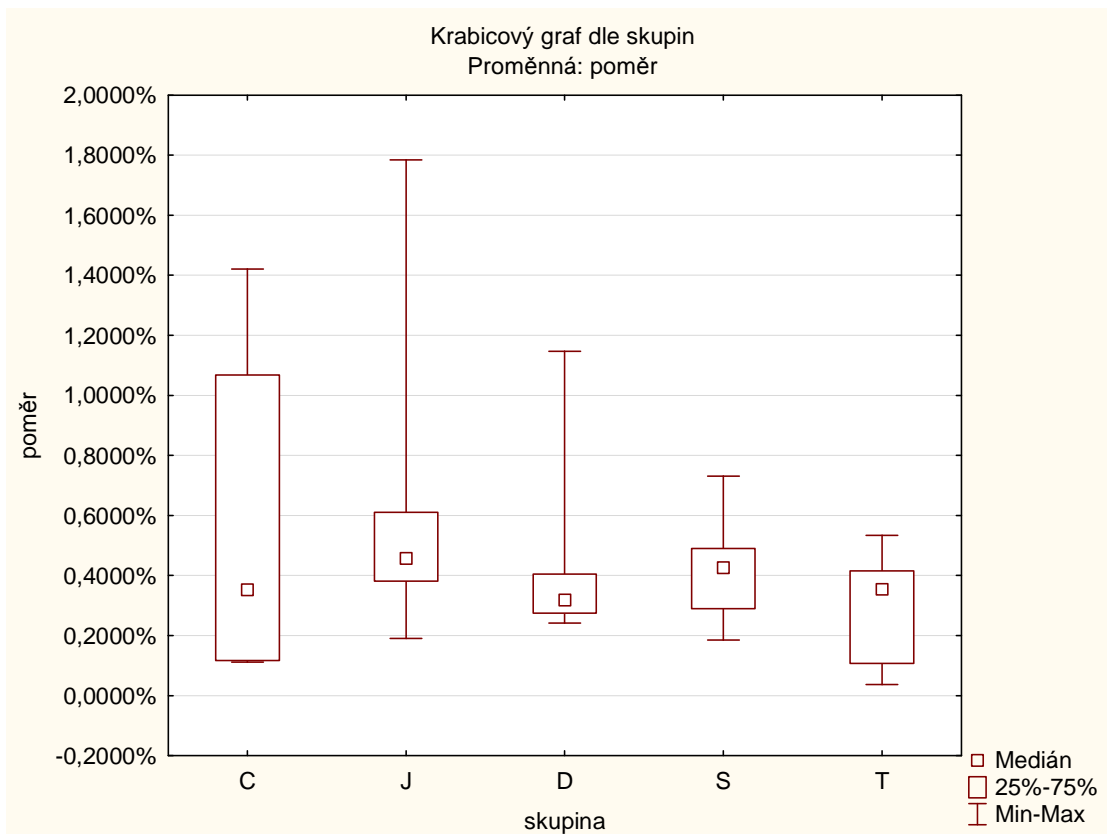
Graf 7: Procenta úspěšnosti přichycení glochidií na rybu z jedinců v pokusné misce. Porovnání kontrolní skupiny a skupiny vystavené citalopramem.

Nezjistila jsem statisticky významný rozdíl mezi procentem přichycených glochidií na ryby v porovnání jednotlivých koncentrací spolu s kontrolní skupinou (Tab. 8). Hodnota parametru p je totiž větší ($p = 0,62$) než hladina významnosti ($\alpha = 0,05$). Celkem 15 hodnot je menších nebo rovno a 15 hodnot je větších než společný medián skupin (celkový medián $= 0,04$), to znamená, že žádná hodnota se celkovému mediánu nerovná.

Kruskal-Wallisova ANOVA založená na pořadí; poměr				
Nezávislá (grupovací) proměnná: skupina				
Kruskal-Wallisův test: $H(4, N=30) = 2,602151$, $P = 0,6264$				
	Kód	Počet platných	Součet pořadí	Průměr pořadí
C	103	6	92	15,33
J	104	6	118	19,67
D	105	6	85	14,17
S	106	6	99	16,50
T	107	6	71	11,83

Mediánový test, celkový medián = 0,03737						
Nezávislá (grupovací) proměnná: skupina						
Chi-Kvadrát = 4,00 sv = 4 p = 0,4060						
	C	J	D	S	T	Celkem
<= Medián: pozorování	3	1	4	3	4	15
Očekávání	3	3	3	3	3	
Pozorování - očekávání	0	-2	1	0	1	
> Medián: pozorování	3	5	2	3	2	15
Očekávání	3	3	3	3	3	
Pozorování - očekávání	0	2	-1	0	-1	
Celkem: očekávání	6	6	6	6	6	30

Tab. 8: Statistické zhodnocení rozdílů mezi koncentracemi citalopramu spolu s kontrolními vzorky v procentech přichycených glochidií na ryby z počtu přítomných testovacích nádrží.



Graf 8: Procenta úspěšnosti přichycení glochidií na rybu z jedinců z počtu vyskytujících se v testovacích nádržích. Rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi spolu s kontrolní skupinou.

Při porovnání poměru glochidií přichycených na žaberních obloucích vůči celkovému počtu přichycených na rybu při porovnání kontrolní skupiny a skupiny vystavené citalopramem vyšel statisticky významný rozdíl, protože hodnota proměnné p ($p=0,04$) je menší než hladina významnosti ($\alpha=0,05$) (Tab. 9.).

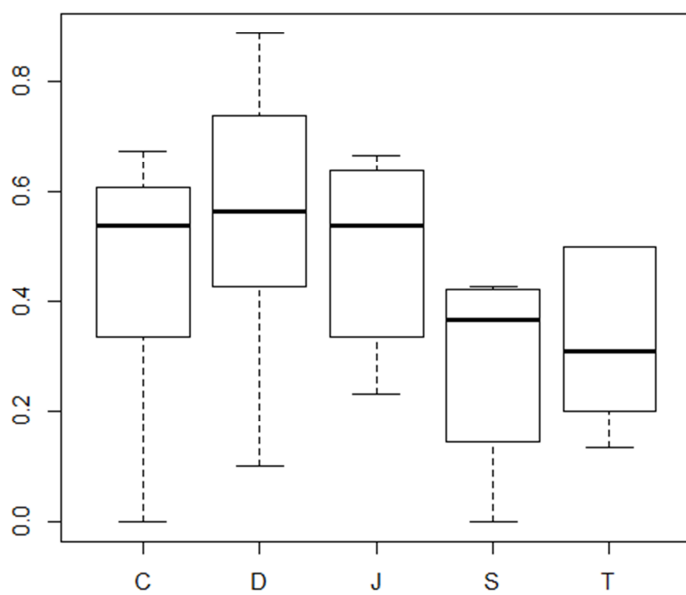
	Df	Deviance Resid.	Df Resid. Dev	F	Pr(>F)
null		29	82,116		
groups 4	23,948	25	58,168	2,89	0,04291

Tab. 9.: Statistické rozdíly v poměr glochidií přichycených na žaberních obloucích vůči celkovému počtu přichycených na rybu mezi kontrolní skupinou a skupinou vystavenou citalopramem.

Při vyhodnocování poměru mezi glochidiiemi přichycenými na žaberních obloucích vůči celkovému počtu přichycených na rybu jsem našla statisticky významné rozdíly u skupin S ($p=0,02$) a T ($0,03$). Zjistila jsem to tak, že jsem hodnotu proměnné p porovnála s hladinou významnosti ($\alpha=0,05$). Naopak u skupin C ($p=0,28$), J ($p=0,92$) a D ($p=0,72$) statisticky významný rozdíl při porovnání s hladinou významnosti nevyšel (Tab. 10).

Coefficients:				
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0,30319	0,27401	1,106	0,2791
groups D	-0,04536	0,42798	-0,106	0,9164
groups J	-0,13613	0,38035	-0,358	0,7234
groups S	-1,03142	0,42996	-2,399	0,0242
groups T	-1,06229	0,46197	-2,299	0,0301

Tab. 10.: Statistické rozdíly v poměru glochidií přichycených na žaberních obloucích vůči celkovému počtu přichycených na rybu v jednotlivých koncentracích.



Graf 9.: Poměr glochidií přichycených na žaberních obloucích vůči celkovému počtu přichycených na rybu v jednotlivých koncentracích.

6. Diskuse

Znečištění vody je jednou z hlavních příčin ohrožení sladkovodních mlžů (Unionoida), kteří patří mezi nejohroženější taxony uvedené na seznamu Mezinárodní unie pro ochranu přírody (IUCN) "červený seznam" přírody (Bogan, 1993; Lopes-Lima et al. 2017; IUCN, 2014).

Mé výsledky ukazují, že vystavení glochidií velevruba malířského (*Unio pictorum*) citalopramu po dobu 24 hodin mělo jen určitý vliv na změnu jejich chování. Nezměnila se frekvence jejich sklapávání ani počet sklapnutí po aplikaci koncentrovaného roztoku NaCl, kde nelze identifikovat žádné prokazatelné rozdíly v porovnání s kontrolními vzorky. Statisticky významné rozdíly nevyšly ani v případě množství přichycených glochidií na ryby během 15 minutové expozice ani v procentu přichycených glochidií z celkového počtu vyskytujícího se v pokusné nádobě. Statisticky významný rozdíl jsem ovšem zaznamenala u poměru glochidií přichycených na žaberní oblouky vůči celkovému počtu přichycených na rybu.

V druhém kroku jsem statisticky zhodnotila rozdíly mezi každou mnou použitou koncentrací citalopramu (1, 10 100 a 1000 $\mu\text{g/l}$) včetně kontrolních vzorků. Ani zde nevyšly žádné statisticky významné rozdíly v případě aktivity před aplikací roztoku NaCl, po její aplikaci, v počtu přichycených glochidií na ryby a ani v procentu přichycených vzhledem k množství v kontrolní nádobě. Statisticky významné rozdíly vyšly pouze u skupin S a T u poměru glochidií přichycených na žaberní oblouky vůči celkovému počtu přichycených na rybě.

Pro statistickou analýzu jsem nemohla použít obvyklý Spearman- Karberův test pro zjištění LC 50 (letální koncentrace pro 50 % jedinců) z toho důvodu, že u mlžů nebyla pozorována žádná konzistentní reakce. Nezaznamenala jsem ani úhyn u žádné z koncentrací citalopramu kterým jsem je během pokusu vystavovala. Pravděpodobně se hodnoty LC 50 nacházejí až v hodnotách vysoko přesahující mnou použité. Pro srovnání hodnota LC 50 citalopramu pro *Ceriodaphnia dubia* je 3,90 mg/l (Henry et al., 2004), což je ovšem zcela mimo rozsah environmentálně relevantních hodnot.

Kellner et al. (2016) ve své studii na Koljuškách tříostných ukazují na výrazný anxiolytický účinek citalopramu při přenesení ryb do testovacích nádrží. Ukazují také, že expozice citalopramem zvyšuje pohybovou aktivitu při použitých koncentracích 0,15, 1,5 a 15

$\mu\text{g/l}$. Výsledky testů v nových nádržích odhalily, že s výskytem citalopramu ve vodě se snížil čas trávený rybami ve spodní části akvária (Levin et al., 2007), a také doba při které byly ryby ve stavu strnulosti (Egan et al., 2009), což jsou chování úzce spojená s úzkostí. Pohybová aktivita je přitom potenciálně ekologicky důležitá, protože vyšší pohybová aktivita by mohla zvýšit i látkovou výměnu a riziko predace. Sackerman et al. (2010) zjistili, že i *Danio rufozonatus* strávil více času v horní části své nádrže 3 min po akutní expozici až 100 mg/l citalopramu. Kromě anxiolytických účinků prokázaných ve studii Kellnera et al. (2016) bylo také možné pozorovat snížení krmné aktivity ryb vystavené $1,5 \mu\text{g/l}$, ale také její odpovídající snížení vzhledem ke koncentraci $0,15 \mu\text{g/l}$, což podporuje teorii, že množství citalopramu ve vodě má schopnost významně ovlivnit ekologicky důležité proměnné vodních organismů (Kellner et al., 2015).

Na citalopram zatím nebyly prováděny žádné pokusy na sladkovodních mlžích. Proto mohou své výsledky porovnávat pouze s pokusy s jinými látkami ze skupiny inhibitorů zpětného vstřebávání serotoninu, do kterých citalopram patří.

V mé práci nebyla zjištěna žádná změna ve sklapování glochidií velevruba malířského po 24 hodinové expozici citalopramem. Oproti tomu Hazelton et al. (2014) pozorovali signifikantní zvýšení míry celkového pohybu dospělců velevrubů druhu *Lampsilis Fasciola* se zvýšením koncentrace fluoxetinu, kde průměrný celkový pohyb ve skupině léčené $22,3 \mu\text{g/l}$ byl více než dvakrát vyšší než v kontrolní skupině. Živočichové ošetřené koncentrací fluoxetinu $22,3 \mu\text{g/l}$ se pohybovala do výrazně větších vzdáleností než živočichové z kontrolní skupiny. Dřívější práce (Bringolf et al, 2010; Hazelton et al, 2013; Cunha a Machado, 2001) vykazaly výrazný otok a vysunutí nohy u mlžů exponovaných fluoxetinem. Toto bylo přičítáno možnému zvýšení absorpce vody u žaber a ztrátě kontroly nad hydrostatickým skeletem, což by pravděpodobně snížilo pohyblivost postižených mlžů (Cope et al, 2008; Hazelton et al, 2013).

Také Prieto et al. (2012) zkoumali účinky koncentrace $1,5 \text{ mg}$ fluoxetinu na litr vody na pohyb larvy *Dania rufozonatus* (*Danio rerio*) exponované po dobu 24 hodin. Larvy vykazovaly snížení pohybu u kontrolních živočichů 2 dny po expozici a pohyb byl značně nevyrovnaný oproti živočichům z kontrolní skupiny. I tento výsledek je rozdílný s mým. V mé práci mezi výsledky kontrolní skupiny a skupiny vystavené citalopramu nebyl ve sklapávání zjištěn statisticky významný rozdíl.

Z výsledků je zřejmé, že při koncentracích citalopramu 100 a 1000 $\mu\text{g/l}$ se významně zvětšil podíl přichycených glochidií vzhledem k jejich celkovému počtu vyskytujícímu se na rybě. Využití živin parazity může mít za následek snížení fitness ryb (Pegg et al., 2015; Britton et al., 2011; Thomas et al., 2014), zahrnující zpomalený růst (Britton et al., 2011; Arnott et al., 2000), menší tělesnou velikost (Pegg et al., 2015; Arnott et al., 2000; Crane et al., 2011), a je také často spojeno se snížením přežití hostitele (Crane et al., 2011; Poulin, 1998; Knopf et al., 2007; Francová et Ondráčková, 2013). I když rybí hostitelé mohou získat rezistenci k opakovaným infekcím způsobeným glochidiemi, vysoké počty mohou být pro hostitele potenciálně letální (Howerth et Keller, 2006). Například pstruh na kterém parazitují glochidie perlorodky říční měl zvětšenou slezinu a vlivem encystace zesílené a prodloužené žaberní lamely (Thomas et al., 2014). Slavík et al. (2017) zjistili, že pokud je kapr napaden glochidiemi, spotřebuje na stejný pohyb více energie na stejné množství pohybu. Množství pohybu se vlivem množství přichycených glochidií statisticky významně nezměnil (Slavík et al., 2017). Dopad parazitismu může být pozorována nepřímo poklesem imunitních funkcí ryb (Liljedal et al., 1999). Naštěstí však tak velké koncentrace citalopramu (100 a 1000 $\mu\text{g/l}$) u kterých byly zjištěny zvýšené podíly glochidií na žaberních obloucích se běžně ve vodách nevyskytují a tedy se neprojevuje ani zvětšený výskyt výše uvedených potíží.

Otázkou dále zůstává, jaké reakce je možné sledovat u dospělých jedinců velevrubů malířských na koncentrace citalopramu. Toto pozorování by však bylo třeba provádět po delší dobu. Jejich reakce by pak mohly být sledovány pomocí Hallova senzoru (Lummer et al., 2016). Bylo by též možné sledovat, zda by se nějak změnila schopnost vypouštění glochidií s ohledem na měnící se koncentrace citalopramu. Citalopram se však ve vodách nevyskytuje sám, proto by podnětem pro další studie mohla být výzkum reakcí sladkovodních mlžů na kombinace kontaminantů sladkých vod. Je totiž možné, že citalopram v kombinaci s dalšími látkami u mlžů reakci způsobí.

Laboratorně by bylo možné určit koncentraci citalopramu LC 50 pro sladkovodní mlže a jejich glochidie. Ale vzhledem k tomu že jsem ke svému pokusu použila koncentraci citalopramu zhruba tisíckrát přesahující množství této látky běžně se vyskytující v odpadních vodách nebylo by efektivní stanovovat přesnou hodnotu LC 50 protože není téměř možné, aby se mlži s takovou koncentrací setkali mimo laboratorní podmínky. Více pozornosti si ovšem zaslouží ověření vlivu citalopramu na prostorové přichycení glochidií na rybiho hostitele, kde se ukázal významný vliv již od koncentrace 100 $\mu\text{g/l}$.

7. Závěr

Hlavním cílem této práce bylo vyhodnotit vliv citalopramu, antidepressiva ze skupiny inhibitorů zpětného vstřebávání serotoninu na glochidie sladkovodního mlže velevruba malířského. Hodnocení se provádělo 24 hodinovou infikací jedinců v laboratorních podmínkách.

1) Testovalo se šest kádinek od každé koncentrace citalopramu (1, 10, 100 a 1000 $\mu\text{g/l}$) a také šest kádinek s kohoutkovou vodou jako kontrolní vzorky. V každé kádince bylo přibližně 120 jedinců parazitických larev.

2) Další částí pokusu byla infikace ryb glochidii vystavenými citalopramu z předchozí části pokusu po dobu 15 minut.

3) Testování jedinci neprojevovali žádný statisticky významný rozdíl v chování vzhledem ke koncentraci citalopramu, to ani po aplikaci NaCl pro jejich aktivaci.

4) Na rybách nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi jedinci vystavenými citalopramu a těmi kontrolními z hlediska absolutního počtu jedinců přichycených na rybu, ani v procentuálním zastoupení přichycených jedinců vzhledem k počtu v testovacích nádržích.

5) Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány u poměru glochidií přichycených žaberní oblouky vůči celkovému počtu přichycených na rybu u skupin exponovaných 100 a 1000 $\mu\text{g/l}$.

Celkové výsledky ukazují, že citalopram při krátkodobé 24 hodinové expozici nezpůsobuje výraznou změnu chování (sklapávání) u glochidií velevruba malířského, avšak jeho vysoké koncentrace ovlivňují prostorové umístění glochidií přichycených na žaberní oblouky ryb.

8. Seznam literatury

- Aiello, E., 1970. Nervous and chemical stimulation of gill cilia in bivalve molluscs. *Physiological Zoology* 43, p. 60–70.
- Ajimal, G. S. et Ram, J. L. 1981. *Aplysia californica* gastrointestinal tract motility: spontaneous activity and pharmacological sensitivity. *Comp Biochem Physiol* 68 C: p. 133–144.
- Armstrong, B. M., Lazorchak, J. M., Jensend, K. M., Haring, H. J. , Smith, M. E., Flick, R. W., Bencic, D. C. et Biales, A. D. 2016. Reproductive effects in fathead minnows (*Pimphales promelas*) following a 21 d exposure to 17 α - ethinylestradiol. *Chemosphere* 144. p. 366–373
- Arnott, S. A., Barber, I., Huntingford, F. A. 2000. Parasite-associated growth enhancement in a fish-cestode system, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 267. p. 657–663.
- Audesirk, G., Mc Caman, R. E. et Willows, A. O. D., 1979. The role of serotonin in the control of pedal ciliary activity by identified neurons in *Tritonia diomedea*. *Comparative Biochemistry Physiology C* 62, p. 87–91.
- Beiras, R. et Widdows, J., 1995. Effect of the neurotransmitters dopamine, serotonin and norepinephrine on the ciliary activity of mussel (*Mytilus edulis*) larvae. *Marine Biology* 122, p. 597–603.
- Binelli, A., Bacchetta, R., Mantecca, P., Ricciardi, F., Provini, A. et Vailati, G. 2004. DDT in zebra mussels from Lake Maggiore (N. Italy): level of contamination and endocrine disruptions. *Aquat Toxicol.* 69 (2). p. 175-188.
- Bogan, A. E. 1993. Freshwater bivalve extinctions (*Mollusca, Unionoidea*) – a search for causes. *Am. Zool.* 33, p. 599–609.
- Bonnafé, E., Sroda, S., Budzinski, H., Valière, A., Pedelluc, J., Marty, P. et Geret, F. 2014. Responses of cytochrome P 450, GST, and MXR in the mollusc *Corbicula fluminea* to the exposure to hospital wastewater effluents. *Environ Sci Pollut Res* 22: p. 11033–11046
- Brandão, F. P., Pereira, J. L., Gonçalves, F. et Nunes, B. 2014 The impact of paracetamol on selected biomarkers of the mollusc species *Corbicula fluminea*. *Environ Toxicol* 29: p. 74–83.

Bringolf, R. B., Heltsley, R. M., Newton, T. J., Eads, C. B., Fraley, S. J., Shea, D. et Cope, W. G. 2010. Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (6), p. 1311–1318.

Britton, J. R., Pegg, J. et Williams, C. F. 2011. Pathological and ecological host consequences of infection by an introduced fish parasite, *PLoS One* 6

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

Brooks, B. W., Chambliss, C. K., Stanley, J. K., Ramirez, A. J., Banks, K. E., Johnson R. D. et Lewis, R. J., 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, p. 464–469.

Brosnan T. M. 1999. Early warning monitoring to detect hazardous events in water supplies. An ILSI Risk Science Institute Workshop Report: ILSI. p. 37.

Brzóška, M., et Moniuszko-Jakoniuk, J. 1998. The influence of calcium content in diet on cumulation and toxicity of cadmium in the organism. *Archives of Toxicology* 72. p. 63–73.

Cairns, J. et Van Der Schalie, W. H. 1980. Biological monitoring Part I – Early warning systems. *Water Research*. Vol. 14. p. 1179-1196.

Ciuna, A., Andretta, M., Corbari, L., Levi, D., Mirandola, M., Sorio, A. et Barbui, C. 2004. Are we going to increase the use of antidepressants up to that of benzodiazepines? *European Journal of Clinical Pharmacology*, Volume 60. p 629–634

Cook, C. M., Lanaras, T., Wood, A. P., Codd, G. A. et Kelly, D. P. 1991. Kinetic properties of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase from *Thiobacillus thyasiris*, the putative symbiont of *Thyasira flexuosa* (Montagu), a bivalve musel. *Microbiology* 137. p. 1491-1496

Cope, W. G., Bringolf, R. B., Buchwalter, D. B., Newton, T. J., Ingersoll, C. G. et Wang, N. 2008. Differential exposure, duration, and sensitivity of *Unionoidean bivalve* life stages to environmental contaminants. *J N Am Benthol Soc*; 27: p. 451–62.

Crane, A. L., Fritts, K. A., Mathis, A., Lisek, C. J. et Barnhart, M. C. 2011. Do gill parasites influences the foraging and antipredator behavior of rainbow darters, *Etheostoma caruleum*? *Anim. Behav.* 82. p. 817–823.

Cunha, E. M. et Machado, J., 2001. Parturition in *Anodonta cygnea* induced by selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Canadian Journal of Zoology* 79 (1), p. 95–100.

Dale, E., Bang-Andersen, B. et Sanchez, C. 2015. Emerging mechanisms and treatments for depression beyond SSRIs and SNRIs. *Biochemical Pharmacology* 95. p. 81–97

Daughton, C. G. et Ternes, T. A. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environ. Health Perspectives*, 107, Suppl. 6, p. 907–938.

De Lange, H. J., Noordoven, W., Murkc, A. J., Lurling, M. et Peeters, E. T. H. M. 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (*Crustacea, Amphipoda*) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 78, p. 209–216

Deliagina, T. G. et Orlovsky, G. N., 1990. Control of locomotion in the freshwater snail *Planorbis corneus*. II. Differential control of various zones of the ciliated epithelium. *Journal Experimental Biology* 152, p. 405–423.

Diefenbach, T. J., Koehncke, N. K. et Goldberg, J. I. 1991. Characterization and development of rotational behavior in *Helisoma embryos*: role of endogenous serotonin. *J Neurobiol* 22: p. 922–934.

Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., Elkhayat, S. I., Bartels, B. K., Tien, A. K., Tien, D. H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z. et Kalueff, A. V. 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, p. 38–44

Farré, M. et Barceló, D. 2003 Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 22, p. 299–310.

Fauna Europaea. 2004. Fauna [cit. 2017-03-04]. Europaea version 1.1. Dostupné z <http://www.faunaeur.org/full_results.php?Id=338030>.

Fliedner, A., Rudel, H., Knopf, B., Weinfurtner, K., Paulus, M., Ricking, M. et Koschorreck, J. 2014. Spatial and temporal trends of metals and arsenic in German freshwater compartments. *Environmental Science And Pollution Research*. p. 5521–5536

Flippin, J. L., Huggett, D. et Foran, Ch. M. 2007. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology* 81. p. 73–78

Flynn, K. et Spellmann, T. 2009. Environmental levels of atrazine decrease spatial aggregation in the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 72, p. 1228–1233

Fong, P.P., 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *Biological Bulletin* 194, p. 143–149.

Fong, P. P., Huminski, P. T. et D'Urso, L. M., 1998. Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatinum*) by selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Journal Experimental Zoology* 280, p. 260–264.

Fong, P. P. et Ford, A. T.. 2014 The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review. *Aquatic Toxicology* 151. p. 4–13

Fong P. P, Kyojuka K., Abdelghani H., Hardege J. D. et Ram J. L. 1994. In vivo and in vitro induction of germinal vesicle breakdown in a freshwater bivalve, the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J Exp Zool* 269: p. 467–474.

Fong, P. P. et Molnar, N. 2013. Antidepressants cause foot detachment from substrate in five species of marine snail. *Marine Environmental Research* 84, p. 24–30.

Fong, P. P. et Warner, M. 1995. Serotonin induced parturition in the fingernail clam *Sphaerium* (Musculium) transversum (Say). *J Exp Zool* 272:p. 163–166.

Francová, K. et Ondračková, M. 2013. Overwinter body condition, mortality a parasite infection in two size of 0+year juvenile European bitterling *Rhodeus amarus*, *J. Fish Biol.* 82. p. 555–568.

Fuksa, J. K., Váňa, M. et Wanner, F. 2010: Znečištění povrchových vod farmaky a možnosti jejich nálezu ve zdrojích pitné vody. *Vodárenská biologie*, p. 186-190

Gallo, M. A. 2001. History and scope of toxicology. In: Klaassen, C.D. (ed), Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. New York: Mc graw-Hill, Medical Publishing Division. p. 3-10.

García - Morales, I., Rieger, J. S., Gil - Nagel, A. et Fernández, J. L. H., 2007. Antiepileptic drugs: from scientific evidence to clinical practice. *Neurologist* 13, p. 20 – 28.

Gardiner, D. B., Silverman, H. et Dietz, T. H. 1991. Musculature associated with the water canals in freshwater mussels and response to monoamines in vitro. *Bio-logical Bulletin* 180 (3), p. 453–465.

Geist, J., 2011. Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. *Ecol. Indic.* 11, p. 1507–1516

Geologie. Třída Bivalvia. Citováno [2017-04-11]. Dostupné z <
<http://geologie.vsb.cz/paleontologie/paleontologie/zoopaleontologie/Mekkysi/T%C5%99%C3%ADDa%20Bivalvia.htm>>

Gobet, I., Durocher, Y., Le Clerc, C., Moreau, M. et Guerrier, P. 1994. Reception and transduction of the serotonin signal responsible for meiosis reinitiation in oocytes of the Japanese clam *Ruditapes philippinarum*. *Dev Biol* 164: p. 540–549.

Goldberg, R. J. 1998. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. In frequent medical adverse effects. From the departments of medicine and psychiatry, Brown university; and Rhode island hospital, Providence, RI.

Goldberg, J. I., Koehncke, N. K., Christopher, K. J., Neumann, C. et Diefenbach, T. J. 1994. Pharmacological characterization of a serotonin receptor involved in an early embryonic behavior of *Helisoma trivolis*. *J Neurobiol* 25: p. 1545–1557.

Gust, M., Buronfosse, T., Giamberini, L., Ramil, M., Mons, R. et Garric, J., 2009. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *Environmental Pollution* 157 (2), p. 423–429.

Gregor, J. et Maršálek, B. 2004 Biologické systémy včasného varování – on-line detekce přítomnosti toxických látek ve vodě. In: Kočí, V., Maršálek, B. Et Tlustá, P. (eds.), *Ekotoxikologické biotesty IV*, p. 106 - 112.

Hazelton, P. D., Duc, B., Haddadd, S. P., Fritts, A. K., C. Chambliss, K., Brooksc, B. W. et Bringolf, R. B. 2014. Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. *Aquat. Toxicol.*

Hazelton, P. D., Cope, W. G., Mosher, S., Pandolfo, T. J., Belden, J. B., Barnhart, M. C. et Bringolf, R. B., 2013. Fluoxetine alters adult freshwater mussel behavior and larval metamorphosis. *Science of the Total Environment* 445–446, p. 94–100.

Hedges, D. W. et Woon, F. L. M. 2007. An emerging role for escitalopram in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat.* p. 455–461.

Henry, T. B., Kwon, J. W., Armbrust, K. L. et Black, M. C. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23. p. 2229– 2233

Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A. L., Kanatani, H. et Koide, S. S. 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5- hydroxytryptamine in the surf clam. *J Exp Zool* 245: p. 318–321.

Homola, J. 2009. Biosenzory s povrchovými plasmony pro bezpečné potraviny a medicínální diagnostiku. Citováno [2017-03-28]. Dostupné z <http://www.ufe.cz/cs/biosenzory-s-povrchovymi-plasmony-pro-bezpecne-potraviny-medicinalni-diagnostiku>

Howerth, E. W. et Keller, E. A. 2006. Experimentally induced glochidiosis in smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*), *Vet. Pathol.* 43. p. 1004–1007.

Human Metabolome Database. Citalopram. [cit. 2017-03-04]. Dostupné z <<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB05038> >

Chen, H., Zha, J. et Liang, X. 2014 Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Aquat Toxicol* 155. p. 1–8.

Chu, S. et Metcalfe, C. D. 2007. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1163 (1–2), p. 112–118.

IUCN, 2014. The IUCN Red List for Threatened Species, 2014. 1st ed. Internationalunion for Conservation of Nature and Natural Resources.

Jha, A. N., 2008. Ecotoxicological application and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, p. 207–221.

Jørgensen, S. et Halling - Sørensen, B. (2000) Drugs in the environment. *Chemosphere* 40: p. 691–699

Juříčková, L., Horsák, M., et Beran, L. (2001). Check-list of the molluscs (*Mollusca*) of the Czech Republic. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 65(1), p. 25-40.

Kadam, A. L. et Koide, S. S. 1989. Serotonin analogs and *Spisula* oocyte maturation. *Invert Rep Dev* 15: p. 225–227.

Kantor, Y. I., Schileyko, A. A., Vinarski, M. V. et Sysoev, A. V. 2009. Catalogue of the continental mollusks of Russia and adjacent territories. Institute of Ecology and Evolution of Russian Academy of Sciences. p. 1- 4

Kamer, K. J. M., Jenner, H. A. et De Zwart, D. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia*, 1989. Vol. 188/189, p. 433 - 443.

Kellner, M., Porseryd, T., Porsch- Hällström, I., Hansen, S. H. et Olsén, K. H. 2015. Environmentally relevant concentrations of citalopram partially inhibit feeding in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquat. Toxicol.* 158, p. 165–170

Kellner, M., Porseryd, T., Hallgren, S., Porsch- Hällströma, I., Hansenb, S. H. et Olsén, K. H. 2016. Waterborne citalopram has anxiolytic effects and increases locomotor activity in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology* 173. p 19–28

Killeen, I., Aldridge, D. et Oliver, G. 2004. Freshwater Bivalves of Britain and Ireland. FSC. AIDGAP Occasional Publication 82, p. 114

Knopf, K., Krieger, A. et Hoelker, F. 2007. Parasite community and mortality of young-of-the-year roach, (*Rutilus rutilus*), *J. Parasitol.* 93. p. 985–991.

Krantic S., Guerrier P. et Dube F. 1993. Meiosis reinitiation in surf clam oocytes is mediated via a 5-hydroxytryptamine-5 serotonin membrane receptor and a vitelline envelope-associated high affinity binding site. *J Biol Chem* 268: p. 7983 – 7989.

Kwon, J. W. et Armbrust, K. L., 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, p. 2561–2568.

Lajeunesse, A., Gagnon, C. et Sauve, S. 2008. Determination of basic antidepressants and their N- desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 80, p. 5325–5333.

Lange, C. R. et Lange, S. R.: *Biomonitoring. Water Environment Research.* Vol. 69, p. 900-915.

Le, T. H., Lim, E. S., Lee, S. K., Park, J. S., Kim, Y. H. et Min, J. 2011. Toxicity Evaluation of Verapamil and Tramadol Based on Toxicity Assay and Expression Patterns of Dhb, Vtg, Arnt, CYP4, and CYP314 in *Daphnia magna*. Wiley Periodicals, Inc. p. 515- 523

Lechelt, M., Blohm, W., Kirschneit, B., Pfeiffer, M., Gresens, E., Liley, J., Holz, R., Luring, C. et Moldaenke, C. 2000. Monitoring of surface water by ultrasensitive daphnia toximeter. *Environmental toxicology*, 1997. Vol. 15, p. 390-400.

Leise, E. M., Thavaradhara, K., Durham, N. R. et Turner, B. E. 2001. Serotonin and nitric oxide regulate metamorphosis in the marine snail *Ilyanassa obsoleta*. *Am Zool*; 41: p. 258–267.

Leonard, J. A., Cope, W. G., Barnhart, M. Ch. et Bringolf, R. B. 2014. Metabolomic, behavioral, and reproductive effects of the syntheticestrogen 17 α -ethinylestradiol on the unionid musel *Lampsilis fasciola*. *Aquatic Toxicology* 150. p. 103–116

Levin, E. D., Bencan, Z. et Cerutti, D. T., 2007. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol. Behav.* 90, p. 54–58

Lewis, S. L., Lyons, D. E., Meekins, T. L. et Newcomb, J. M., 2011. Serotonin influences locomotion in the nudibranch mollusc *Melibe leonine*. *Biological Bulletin* 220(3), p. 155–160.

Liljedal, S., Folstad, I. et Skarstein, F. 1999. Secondary sex traits, parasites, immunity and ejaculate quality in the Arctic charr, *Proc. Biol. Sci.* 266. p. 1893–1898.

Loos, R., Carvalho, R., Antó'nio, D. C., Comero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettieri, T., Blaha, L., Jarosova, B., Voorspoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R. H., Schwesig, D. et Gawlik, B. M. 2013 EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water research* 47. p. 6475 - 6487

Lopes-Lima, M., Sousa, R., Geist, J., Aldridge, D. C., Araujo, R., Bergengren, J., Bernal, Y., Bódis, E., Burlakova, L., Van Damme, D., Douda, K., Froufe, E., Georgiev, D., Gumpinger, C., Karatayev, A., Kebapçı, Ü., Killeen, I., Lajtner, J., Larsen, B. M., Lauceri, R., Legakis, A., Lois, S., Lundberg, S., Moorkens, E., Motte, G., Nagel, K. O., Ondina, P., Outeiro, A., Paunovic, M., Prié, V., von Proschwitz, T., Riccardi, N., Rudzīte, M., Rudzītis, M., Scheder, Ch., Seddon, M., Şereflişan, H., Simić, V., Sokolova, S., Stoeckl, K., Taskinen, J., Teixeira, A., Thielen, F., Trichkova, T., Varandas, S., Vicentini, H., Zajac, K., Zajac, T. et Zogaris, S. 2017. Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. *Biological Reviews* 92.1. p. 572-607.

Lowe, V. L. et Pipe, R. K. 1986. Hydrocarbon exposure in mussels: a quantitative study of the responses in the reproductive and nutrient storage cell systems. *Aquat. Toxicol.*, 8. p. 265–272

Lummer, E. M., Auerswald, K. et Geist J. 2016. Fine sediment as environmental stressor affecting freshwater mussel behavior and ecosystem services. *Science of the Total Environment* 571. p. 1340–1348

Magni, S., Parolini, M. et Binelli, A. 2014. Sublethal Effects Induced by Morphine to the Freshwater Biological Model *Dreissena polymorpha* Department of Biosciences, environmental toxicology. p. 58- 67

Metcalf, C. D., Chu, S., Judt, C., Li, H., Oakes, K. D., Servos, M. R. et Andrews, D. M., 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and down-stream exposure in an urban watershed. *Environmental Toxicology Chemistry* 29 (1), p. 79–89.

Matoušková, M., Rutkay- Nedecký, B., Kizeka, R. 2014. Antioxidační enzymy - biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 3, p. 53—56

Moore, M. N. 1985. Cellular responses to pollutants. *Mar. Pollut. Bull.*, 4. p. 134–139

Morrissey, C., Mineau, P., Devries, J., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. et Liber, K. 2015. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environ. Int.* 74, p. 291- 303.

Mouthon, J. 1996. Molluscs and biodegradable pollution in rivers: proposal for a scale of sensitivity of species. *Hydrobiologia* 317: p. 221-229.

Oh, Y., Lee, Y., Heath, J. et Kim, M. 2015 Applications of Animal Biosensors: A Review. *IEEE Sensors Journal*. Volume: 15. p. 637 -645

Pegg, J., Andreou, D., Williams, F. C. et Britton, J. R. 2015. Temporal changes in growth, condition and trophic niche in juvenile *Cyprinus carpio* infected with a non-native parasite, *Parasitology* 143. p. 1–9.

Phillips, K., What is BDD (Body Dysmorphic Disorder)? [cit. 2017-03-28]. Dostupné z <https://bdd.iocdf.org/about-bdd/>

Poulin, R. 1998. *Evolutionary Ecology of Parasites: From Individuals to Communities*, Chapman and Hall, London

Prieto, M. J., Gutierrez, H. C., Arévalo, R. A., Chiaramoni, N. S. et del Valle Alonso, S., 2012. Effect of risperidone and fluoxetine on the movement and neurochemical changes of zebra fish. *Open Journal of Medicinal Chemistry* 2, p. 129–138.

Prosser, R. S., De Solla, S. R., Holman, E. A. M., Osborne, R., Robinson, S. A., Bartlett, A. J., Maisonneuve, F. J. et P. L. Gillis. 2016. Sensitivity of the early-life stages of freshwater mollusks to neonicotinoid and butenolide insecticides. *Environmental Pollution* 218. p. 428-435

Pubchem. Open Chemistry database. [cit. 2017-03-06]. Dostupné z < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/infozdroje.czu.cz/compound/2771#section=Top> >

Ram, J. L., Crawford, G. W., Walker, J. U., Mojares, J. J., Patel, N., Fong, P. P. et Kyojuka, K. 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. *J Exp Zool* 265: p. 587–598.

Ram, J. L., Moore, D., Putschakayala, S., Paredes, A. A., Ma, D. et Croll R. P., 1999. Serotonergic responses of the siphons and adjacent mantle tissue of the zebra mussel, *Dreissna polymorpha*. *Comparative Biochemistry Physiology (C)* 124, p. 211–220.

Roesijadi, G., et Unger, M. E. 1993. Cadmium uptake in gills of the mollusc *Crassostrea virginica* and inhibition by calcium channel blockers. *Aquatic Toxicology* 24: 195–206.

Sackerman, J., Donegan, J. J., Cunningham, C. S., Nguyen, N. N., Lawless, K., Long, A., Benno, R. H. et Gould, G. G., 2010. Zebrafish behavior in novel environments; effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line. *Int. J. Comp. Psychol.* 23, p. 43–61.

Sadraddini, S., Azim, M. E., Shimoda, Y., Mahmood, M., Bhavsar, S. P., Backus, S. M. et Arhonditsis, G. B. 2011. Temporal PCB and mercury trends in Lake Erie fish communities: A dynamic linear modeling analysis *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74. p. 2203–2214

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

Schoonover, C. M., Wieker, J., Pope, R., Brown, C., Cooper, E., DeWitt, J., Gunselman, S., Jensen C, Stevens, W., Yri, J., Nezat, C. et Joyner-Matos, J. 2016. Development of functional trait biomarkers for trace metal exposure in freshwater clams (*Musculium spp.*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* p. 21-34

Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L. B., Blazer, V. S., Norris, D. O. et Vajda, A. M., 2010. Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environmental Science Technology* 44, p. 1918–1925.

Sparks, R. E., Sandusky, M. J. et Paparo, A. A. 1983. In: Center, W.R. (Ed.), Identification of the water quality factors which prevent fingernail clams from recolonizing the Illinois River — Phase III. University of Illinois at Urbana-Champaign, p. 55.

States, S., Scheuring, M., Kuchta, J., Newberry, J. et Casson, L. 2003. Utility based analytical methods to ensure public water supply security. *American water works association journal* 95. p. 103- 115.

Sokolov, A. N., Roberts, M. E. et Bao, Z. 2009. Fabrication of low-cost electronic biosensors Volume 12, Issue 9, September 2009, p. 12–20

Syed, N. I. et Winlow, W. 1989. Morphology and electrophysiology of neurons innervating the ciliated locomotor epithelium in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comparative Biochemistry Physiology (A)* 93 (3), p. 633–644.

Thomas, R. G., Taylor, J. et Garcia de Leaniz, C. 2014. Does the parasitic freshwater pearl mussel *M. margaritifera* harm its host? *Hydrobiologia* 735. p. 191–201.

Uhler, G. C., Huminski, P. T., Les, F. T., et Fong, P. P. 2000 Cilia Driven Rotational Behavior in Gastropod (*Physa elliptica*) Embryos Induced by Serotonin and Putative Serotonin Reuptake Inhibitors (ssris). Department of biology, Gettysburg College, Gettysburg, Pennsylvania 17325. *CJ. Ouuhrlenra le to fal experimental zoology* 286: p. 414–421 (2000)

Váňa, M., Wanner, F., Matoušková, L. et Fuksa, J. K. 2010. Možnosti odstraňování vybraných specifických polutantů v ČOV. *Vodohospodářské technicko - ekonomické informace*. Ročník 52. Únor 2010.

Van der Schalie, W. H., Shedd, T. R., Knechtges, P. L. et Widder, M. W. 2001 Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. *Biosensors Bioelectronics*, 2001. Vol. 16, p. 457-465.

Veselá, Š.: Co víme (a nevíme) o perloočkách. Perloočky v ekotoxikologii. In: Kočí, V., Maršálek, B., Tlustá, P. (eds.), *Ekotoxikologické biotesty IV*. p. 18-25

Verbost, P. M., Flik, G., Lock, R. A. C. et Wendelaar Bonga. S. E. 1988. Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. *Journal of Membrane Biology* 102: p. 97–104.

Zhang, Y., Geissen, S. U. et Gal, C., 2008. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, p. 1151–1161.

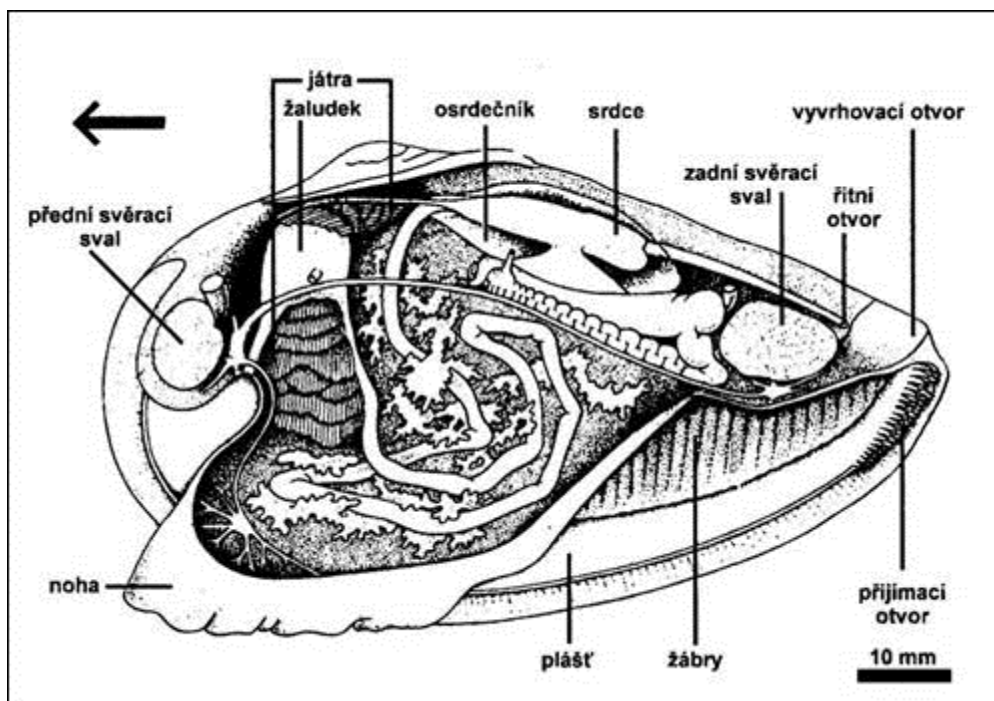
Zupan, I. et Kalafatic', M. 2003. Histological effects of low atrazine concentration on zebra mussels (*Dreissens polymorpha pallas*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, p. 688 –695.

9. Obrazová příloha



Obr. 1.: Schránka velevruba malířského, autor Luboš R. Kolouch.

<http://www.biolib.cz/en/taxonimage/id1751/?Taxonid=2994>



Obr. 2.: Schéma anatomie mlže (Lang et al., 1971 in Kvaček et al., 2000).