

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv znečištění vody léčivy na filtrační aktivitu vodních  
organismů: modelový případ karbamazepin**

**Bakalářská práce**

**Aneta Zbořilová**

**Ochrana krajiny a využívání přírodních zdrojů**

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

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv znečištění vody na filtrační aktivitu vodních organismů: modelový případ karbamazepin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.4.2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Karlu Doudovi, Ph.D. za možnost podílet se na zajímavém experimentu a za velké množství zajímavých poznatků v tomto oboru. Dále bych ráda poděkovala Ing. Vojtěchu Barákovi za jeho profesionální přístup během průběhu experimentu. Za jeho cenné rady po čas psaní této práce, taktéž jeho ochotu, vstřícnost a lidský přístup. V neposlední řadě také za poskytnutí nezbytných dat a neuvěřitelnou trpělivost. Mé poděkování patří i Ing. Filipu Merclovi, Ph.D. za provedení analýz vzorků v laboratoři katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin FAPPZ ČZU.

# Vliv znečištění vody léčivý na filtrační aktivitu vodních organismů: modelový případ karbamazepin

## Souhrn

Sladkovodní prostředí náleží mezi nejohroženější ekosystémy na světě kvůli znečištění. Výzkum se nyní zaměřuje na skupinu nově se objevujících organických kontaminantů, kam patří i léčiva. Tyto látky vstupují nekontrolovatelně do prostředí a mají toxické účinky na vodní organismy. Jedněmi z nejvíce ohrožených organismů jsou obecně mlži. Dosud málo poznatků máme o vlivu léčiv, jako je běžně se vyskytující karbamazepin (CBZ), na chování sladkovodních mlžů, hlavně na jejich filtrační aktivitu, kterou dokáží ovlivnit celý ekosystém.

Tato práce byla zaměřena na provedení rešerše literatury za účelem popisu vlivu CBZ na filtrující vodní organismy. Na něj navázal vlastní experiment, kdy byli mlži vystaveni účinkům léčiva, a bylo sledováno jeho působení na široce rozšířené invazní druhy *Sinanodonta woodiana* a *Corbicula fluminea*.

Mlži byli umístěni v experimentálním PFT systému s automatickým pulsním dodáváním vody a potravy. V kádinkách s vodou a sedimentem se nacházeli dva jedinci *S. woodiana*, resp. deset jedinců *C. fluminea*. Před provedením testu CBZ byly použity dva pre-testy (NaCl, NaNO<sub>3</sub>) pro stanovení frekvence odběru vzorků vody a zjištění chování mlžů (jejich filtrační aktivity) vystavených působení daných kontaminantů. Pro hodnocení změny míry filtrace v závislosti na čase od aplikace kontaminantů do kádinek byla využita přímá (pozorovací; P) a nepřímá (založena na měření turbidity; N) metoda.

Bylo doloženo, že koncentrace použitých látek se v průběhu času (48 hodin) dle předpokladů snižovaly v důsledku ředění přitékající vodou. V rámci experimentu nebyl zaznamenán statisticky významný vliv studovaných látek na aktivitu experimentálních mlžů, ale přesto bylo možné pozorovat určité trendy v ovlivnění filtrační aktivity, které jsou v práci diskutovány. Při testu s CBZ nebylo zaznamenáno ovlivnění filtrace ani *C. fluminea*, neboť se její aktivita v průběhu expozice výrazně změnila. Zkoumané léčivo mělo podobný vliv na mlže a jejich filtrační účinnost jako v případě obou pre-testů.

Environmentálně blízké koncentrace kontaminantů nebyly schopny významně ovlivnit filtrační aktivitu vybraných invazních druhů mlžů. Výsledky této práce lze využít při procesech čištění odpadních vod, kdy by mohli být mlži využiti při nízkých pořizovacích nákladech jako „lapače“ znečištění. Inovativní podmínky provádění experimentů simulující reálné situace v terénu mohou najít uplatnění při dalším výzkumu pro bližší poznání vlivu kontaminantů (např. směsi různých sloučenin) na filtrující vodní organismy (např. původní druhy mlžů).

**Klíčová slova:** karbamazepin, toxicita, mlži, voda, prostředí, koncentrace, živočichové, expozice



# Effects of water pollution by pharmaceuticals on filtration activity of aquatic organisms: model case carbamazepine

## Summary

Freshwater environments may be the most endangered ecosystems in the world for their pollution. Research efforts are being focused on emerging organic contaminants (including pharmaceuticals). These non-regulated contaminants are introduced into the environment, and they have toxic effects on aquatic organisms. In general, bivalves belong to the most endangered animals. We have a lack of knowledge on effects of pharmaceuticals (e.g. carbamazepine (CBZ) commonly presented in the environment) on behavior of freshwater bivalves, especially their filtration activity with impact on whole ecosystem.

This thesis was focused on literature review to describe effects of CBZ on aquatic filter-feeders. Then, lab experiment was performed: common invasive bivalve species (*Sinanodonta woodiana* and *Corbicula fluminea*) were exposed to CBZ and its effects on experimental animals monitored.

Bivalves were kept in the experimental PFT (pulsed flow-through auto-feeding) system. In each beaker with water and sediment, there were two (*S. woodiana*) or ten individuals (*C. fluminea*). Before CBZ experiment, pre-tests (NaCl, NaNO<sub>3</sub>) were performed for determination of water sampling frequency and assessment of bivalve behavior (filtration activity) during exposure to contaminants. Filtration rates of bivalves depending on time from contaminant application to the beakers were assessed using two methods (direct “P” – visual, indirect “N” – based on turbidity measurements).

It was found that concentration of contaminants used decreased during 48 hours as a result of dilution by water inflow to the PFT system (as expected). During experiment, no significant effect of studied substances on activity of experimental bivalves was recorded. Nevertheless, it was possible to observe some trends in filtration activity changes, and this is discussed in this thesis. During CBZ test, no effect of substance on filtration of *C. fluminea* was also recorded because species activity distinctly changed during exposure. Pharmaceutical investigated had similar effect on filtration efficiency of bivalves like substances used for both pre-tests.

Environmentally relevant concentrations of contaminants were too low to have significant effects on filtration activity of invasive bivalve species tested. Results of this thesis can be applied during wastewater treatment processes: bivalves could be used as (low-cost) „traps“ for pollution. Performing experiments in terms of innovative approach simulating real field conditions could be used in the future research to get rich knowledge on effects of contaminants (e.g. mixture of compounds) on aquatic filter-feeders (e.g. native bivalve species).

**Keywords:** carbamazepine, toxicity, bivalves, water, environment, concentration, animals, exposure

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Kontaminace vodního prostředí</b>	<b>10</b>
3.1.1	Farmaceuticky aktivní sloučeniny	10
3.1.2	Karbamazepin (CBZ)	10
<b>3.2</b>	<b>Mlži</b>	<b>12</b>
3.2.1	Invazní druhy	12
3.2.2	Mlži a kontaminace prostředí	13
<b>3.3</b>	<b>Vliv polutantů na vodní organismy</b>	<b>14</b>
3.3.1	Léčiva a vodní organismy	14
3.3.2	CBZ a přímý vliv na mlže	15
3.3.3	CBZ a nepřímý vliv na mlže	16
3.3.4	CBZ a filtrační aktivita vodních organismů	17
3.3.5	Přenos CBZ v potravním řetězci	18
3.3.6	Metody vyhodnocení filtrační aktivity mlžů	18
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Popis experimentu</b>	<b>20</b>
4.1.1	Mlži a uspořádání experimentu	21
4.1.2	Konfigurace systému	21
4.1.3	Pre-test NaCl	22
4.1.4	Pre-test NaNO <sub>3</sub>	22
4.1.5	Test CBZ	23
<b>4.2</b>	<b>Zpracování dat</b>	<b>23</b>
4.2.1	Analýza filtrační aktivity mlžů	23
4.2.2	Statistické vyhodnocení	24
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Pre-test NaCl</b>	<b>25</b>
5.1.1	Chování NaCl ve volné vodě	25
5.1.2	Reakce mlžů na působení NaCl – přímá metoda	25
5.1.3	Reakce mlžů na působení NaCl – nepřímá metoda	27
<b>5.2</b>	<b>Pre-test NaNO<sub>3</sub></b>	<b>29</b>
5.2.1	Chování NaNO <sub>3</sub> ve volné vodě	29
5.2.2	Reakce mlžů na působení NaNO <sub>3</sub> – přímá metoda	29
5.2.3	Reakce mlžů na působení NaNO <sub>3</sub> – nepřímá metoda	31

<b>5.3</b>	<b>Test CBZ .....</b>	<b>33</b>
5.3.1	Chování CBZ ve volné vodě.....	33
5.3.2	Reakce mlžů na působení CBZ – přímá metoda .....	33
5.3.3	Reakce mlžů na působení CBZ – nepřímá metoda .....	34
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>37</b>
<b>6.1</b>	<b>MIŽI a CBZ .....</b>	<b>37</b>
<b>6.2</b>	<b>MIŽI a léčiva .....</b>	<b>38</b>
<b>6.3</b>	<b>MIŽI a kontaminanty.....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>41</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>42</b>

# 1 Úvod

V současné době stále narůstá množství látek vytvářených člověkem, jež se následně objevují i ve vodních útvech. Jsou to většinou syntetické látky, které jsou pro lidskou společnost „nezbytné“. Patří sem léčiva, přípravky pro osobní péči nebo pesticidy (Khan et al. 2022), souhrnně náležící do skupiny nově se objevujících organických kontaminantů (tzv. „emerging organic contaminants“ neboli EOC; Pal et al. 2010). Tyto látky vstupují do prostředí zejména při nesprávné a/nebo nedostatečné likvidaci odpadů (především odpadních vod), resp. nadměrném využití pesticidů a hnojiv (Mukhopadhyay et al. 2022).

Vodní ekosystémy, zejména prostředí sladkých tekoucích a stojatých vod, náleží mezi nejohroženější ekosystémy na světě (Dudgeon et al. 2006). Mezi hlavní příčiny patří znečištění vody kontaminanty, jako jsou právě např. farmaceuticky aktivní sloučeniny (Couto et al. 2019; Fontes et al. 2020; Wilkinson et al. 2022). V současnosti se výzkum podrobněji zaměřuje na tyto mikropolutanty. Není totiž zřejmé, kolik z nich se neregulovaně uvolňuje do prostředí a z jak velké části v prostředí přetrvávají (Batucan et al. 2022).

Tyto látky v prostředí způsobují toxické (akutní letální či chronické subletální) účinky, a tak mohou ovlivnit druhy citlivé na znečištění, čímž dochází k ekologické změně. V prostředí mohou nastat změny dynamiky živin a kyslíku a následně je narušen celý ekosystém. Navíc jsou tyto látky schopny ovlivňovat celá společenstva organismů (Fleeger et al. 2003).

Mlži jsou vlivem své filtrační a dýchací aktivity jedněmi z organismů nejvíce ohrožených přítomností kontaminantů ve vodním sloupci (Almeida et al. 2015). Mohou svou biomasou dominovat bentickým společenstvům: kromě filtrace ovlivňují prostředí kolem sebe také díky schopnosti prohrabávat a přepracovávat sediment, a tak spojují toky energie a živin mezi volnou a pórovou vodou (tzn. mezi pelagickým a bentickým prostředím; Vaughn & Hakenkamp 2001). Mlži patří mezi ekosystémové inženýry (Gutiérrez et al. 2003), což znamená, že jsou schopni přímo i nepřímo ovlivňovat dostupnost zdrojů pro jiné druhy. Tyto zdroje ovlivňují různými mechanismy, díky kterým jsou schopni modifikovat, udržovat nebo přetvářet stanoviště, kde žijí. Mezi tyto přeměny patří změny v chemismu sedimentu, velikosti zrn v sedimentu či obsahu organické hmoty prostřednictvím bioturbace a v neposlední řadě také zvýšené pronikání světla do vodního sloupce díky filtraci (Sousa et al. 2009).

Jedním z běžně se vyskytujících kontaminantů ze skupiny látek EOC ve vodním prostředí je léčivo karbamazepin (CBZ; Almeida et al. 2014). Většina prací se zaměřuje na zkoumání jeho nepříznivých účinků na mořské vodní organismy včetně mlžů (např. Almeida et al. 2015; Franzellitti et al. 2019), zejména na molekulární úrovni. Bylo zjištěno, že u mlžů vystavených účinku CBZ dochází k oxidačnímu stresu (Almeida et al. 2014). Nicméně mnohem méně znalostí máme o mlžích ze sladkovodního prostředí, zejména invazních druhů, které obecně negativně působí na společenstva organismů stojatých a tekoucích vod (Sousa et al. 2009). Navíc se autoři již méně zajímají o ovlivnění filtrační aktivity mlžů, přestože právě touto činností mají dopad na celý ekosystém (Chen et al. 2014).

## **2 Cíle práce**

Hlavním cílem práce bylo sledování vlivu karbamazepinu na vodní organismy. Byla provedena rešerše literatury a vlastní experiment, kdy organismy (v tomto případě mlži) byly vystaveny koncentracím karbamazepinu ve vodním prostředí. Probíhalo sledování chování (filtrační aktivity) těchto organismů po vystavení CBZ ve vodním prostředí. Dále byla sepsána praktická část BP dle získaných výsledků.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Kontaminace vodního prostředí

#### 3.1.1 Farmaceuticky aktivní sloučeniny

Farmaceuticky aktivní sloučeniny jsou látky, jejichž cílem je zkvalitnit nebo prodloužit život jak lidem, tak zvířatům po celém světě. Patří sem např. analgetika, beta-blokátory, regulátory lipidů, endokrinní disruptory či rentgenové kontrastní látky, uvolňované do prostředí s potenciálními škodlivými účinky na zdraví lidí a ekosystémů (Couto et al. 2018; Couto et al. 2019; Wilkinson et al. 2022). V povrchových a podzemních vodách bylo pozorováno přes 200 různých sloučenin, které jsou stále častěji zaznamenány ve všech typech vod na celém světě. Nejvyšší koncentrace látek v řekách byly zjištěny v subsaharské Africe, Jižní Americe a jižní Asii: většinou jde o oblasti, kde není kvalitní infrastruktura odpadového hospodářství. Nejčastěji detekovanými látkami jsou karbamazepin, metformin a kofein (Wilkinson et al. 2022). S ohledem na různé vlastnosti farmaceuticky aktivních sloučenin (jako např. složitost struktury, rozdílná těkavost a hydrofobicita nebo interakce s jinými rozpuštěnými látkami) je problém zejména s jejich odstraněním v konvenčních čistírnách odpadních vod (Couto et al. 2018). Vzhledem k tomu, že jsou navrženy tak, aby měly biologický účinek už při nízkých koncentracích, mohou mít nepříznivé účinky na zdraví člověka a jiné organismy (dos Santos et al. 2021; Cravo et al. 2022). Měření koncentrací těchto látek ve vodních ekosystémech je však stále poměrně málo rozvinuté (Almeida et al. 2021), a proto je velmi obtížné sestavit seznam látek obsažených ve vodách dle důležitosti. Významnou roli mohou hrát také interakce mezi polutanty farmaceutického původu a abiotickými faktory prostředí (Almeida et al. 2022).

#### 3.1.2 Karbamazepin (CBZ)

Karbamazepin patří do skupiny léčiv zvané antikonvulziva, ty jsou používána pro léčbu a prevenci epileptických záchvatů. Předepisuje se také ke stabilizaci poruch nálady u pacientů s bipolární poruchou (Hai et al. 2018). Poprvé syntetizován byl v roce 1960 (Batucan et al. 2022). Jeho hlavní fyziologickou funkcí je stabilizace inaktivovaného stavu tzv. sodíkových kanálů, což má za následek menší excitabilitu (vzrušivost) mozkových buněk (Contardo-Jara et al. 2011; Kovacevic et al. 2016). Hlavní metabolickou cestu CBZ u savců zprostředkovává cytochrom P450 (patří mezi enzymy monooxygenázy), vedoucí k tvorbě karbamazepin-10,11-epoxidu. Poté následuje hydratace na trans-10,11-dihydroxy-10,11-dihydro-karbamazepin a konjugace s kyselinou glukuronovou (Mezzelani et al. 2021). Zhang et al. (2008) uvádí, že se celosvětově spotřebuje až 1014 tun karbamazepinu ročně.

Až 90 % léčiv, jež člověk pozře, je tělem později vyloučeno do odpadní vody jako mateřská sloučenina nebo metabolit daného léku (Mohan et al. 2021). Problém u metabolitů nastává obzvláště v případech, kdy jsou některé toxičtější než samotná mateřská sloučenina: v případě karbamazepinu lze uvést akridin, který je karcinogenní a mutagenní (Kosjek et al. 2009). Karbamazepinu se po konzumaci z lidského těla vyloučí 10 % a následně putuje do čistíren odpadních vod, kde jsou jeho koncentrace několik desítek až tisíc ng/l. V komunálních čistírnách se odstraní méně než 10 % CBZ (Hai et al. 2018). Během tří běžných technologií

úprav vody (oxidace oxidem chloričitým, biologické čištění a UV záření) může vzniknout až sedm transformačních produktů CBZ (Kosjek et al. 2009).

Nejčastějším způsobem odstranění kontaminantů z vody je využití mikroorganismů, které mineralizují látky, jež vodu znečišťují. V procesu čištění odpadních vod hraje hlavní roli aktivovaný kal. Produktem mineralizace jsou  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  a látky, které jsou schopny snáze degradovat (Zhang et al. 2008). Karbamazepin však biologickému rozkladu podléhá obtížně, a to především proto, že musí být metabolicky stabilní, aby v organismu působil s dostatečnou účinností (Jos et al. 2003). Přírozená fotodegradace CBZ je poměrně pomalým procesem, protože jeho plná likvidace slunečním zářením může trvat 4,5 až 25 slunečních letních dní (Calisto et al. 2011). Jedním z důvodů, proč je často tak složité jej odstranit během čištění odpadních vod, je jeho symetrická aromatická heterocyklická struktura obsahující dusík (Meng et al. 2022).

CBZ se běžně vyskytuje spolu s ostatními léčivými ve všech typech vod. Nalezneme jej v odpadních vodách z domácností i ve vodách průmyslových, a dále jak v povrchových, tak i podzemních vodách (Chander et al. 2016). CBZ se používá jako ukazatel městského znečištění (Almeida et al. 2014). Frekvence detekce karbamazepinu v povrchových vodách na různých kontinentech se významně neliší (Wilkinson et al. 2022). Vlivem člověka je jeho vstup do prostředí nepřetržitý (Vernouillet et al. 2010). Koncentrace CBZ ve sladkovodním prostředí mohou ovlivňovat sušší období v některých regionech, kdy může karbamazepin dosahovat až dvojnásobných koncentrací oproti vlhkým obdobím, protože jsou vody méně ředěny (Hai et al. 2018). Karbamazepin se navíc dokáže absorbovat na povrch polymeru mikro- či nanoplastů, čímž je usnadněna asimilace pro přenos kontaminantu vodou (tím se i zvyšuje jeho integrace vodními organismy; Brandts et al. 2018). Může dokonce kontaminovat i zdroje pitné vody (Chander et al. 2016).

Na účinnosti odstraňování kontaminantů z vodního prostředí se podílí řada faktorů prostředí, do něhož se tyto látky dostanou. Mezi základní faktory patří technika čištění odpadních vod na dané ČOV, retenční doba při procesu čištění, teplota vody a pH (Fontes et al. 2020). Koncentrace různých látek v prostředí se liší i v závislosti na platových poměrech daných oblastí. Wilkinson et al. (2022) ve své práci poukazují na fakt, že největší rozdíly jsou mezi střední platovou třídou a všemi ostatními třídami. V zemích, kde lidé mají střední příjmy, totiž mají obvykle nižší připojení na infrastrukturu odpadních vod, ale poměrně dobrý přístup k většímu počtu léků.

Léčiva nakonec vstupují do mořského prostředí: největší koncentrace jsou zaznamenány při pobřeží v blízkosti ústí řek. Dále od pobřeží se kontaminovaná voda smíchá s vodou, která obsahuje méně toxických látek, a tak dochází ke snížení koncentrace těchto látek. Úrovně kontaminace CBZ v mořských ekosystémech jsou všeobecně nižší, než je tomu právě v ústích řek nebo řekách samotných (Almeida et al. 2021). Nkoom et al. (2019) uvádí, že koncentrace v mořských vodách dosahuje úrovně 2 ng/l. CBZ byl detekován i 19 námořních mil od pobřeží, ale koncentrace byly téměř trojnásobně nižší, než je tomu u ústí řek. CBZ se tedy i v brakických vodách rozkládá velmi obtížně (Almeida et al. 2021).

## 3.2 Mlži

### 3.2.1 Invazní druhy

Mlži (Mollusca: Bivalvia) jsou organismy žijící většinou na dně vodních útvarů, kteří se živí planktonem a suspendovanými látkami ve vodě. Získávání potravy jsou mlži schopni uskutečňovat pomocí filtrace skrze žábry. Proces filtrace začíná přes brvy (cilie), které zajišťují přítok vody a suspendovaných částic, které se poté zadrží v žaberních vláknech a následně jsou transportovány do úst. Ovšem ne všechny částice jsou takhle zadrženy: některé jsou totiž vyselektovány na základě velikosti nebo hustoty a jsou vyloučeny jako tzv. pseudopelety (na sekret vázané částice; Castro et al. 2018).

Invazní mlži (jako např. *Corbicula fluminea*, *Sinanodonta woodiana* a *Dreissena polymorpha*) mají velké ekologické, ekonomické a evoluční dopady na sladkovodní ekosystémy, a tak představují hrozbu pro životní prostředí z hlediska zachování biologické rozmanitosti. Mezi nejdůležitější znaky, kterými disponují, patří schopnost kolonizovat širokou škálu biotopů, fyziologická tolerance ke změnám prostředí, rychlý růst a vysoká genetická variabilita (Sousa et al. 2014). Negativní dopad na původní druhy se projevuje nedostatkem prostoru a potravy (omezují dostupnost planktonu). Invazní mlži tvoří hlavní část biomasy společenstev bentických makrobezobratlých živočichů ve vodních ekosystémech (nejčastěji tam, kde jsou mělká dna; Linares et al. 2017). Vzhledem k jejich časté toleranci k abiotickým změnám jsou schopni poměrně snadno snášet různé typy znečišťujících látek v prostředí (Gomes et al. 2018).

*Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia: Venerida: Cyrenidae) neboli korbikula asijská je považována za jeden z nejvýznamnějších invazních druhů vodních organismů (Sousa et al. 2008). Má svůj původ v jihovýchodní Asii a běžně se vyskytuje v evropských vodách, ale najdeme ji i jinde na světě (na všech kontinentech mimo Antarktidu; Crespo et al. 2015). Dosahuje velikosti až 50 mm. Jejimi nespornými výhodami jsou filtrace, schopnost rychlého šíření (v podobě volně plovoucích larev) a vysoká míra reprodukce (početné populace jsou dostupné i ve znečištěných oblastech), stejně tak jako zvýšená odolnost vůči stresorům prostředí ve srovnání s jinými druhy (Castro et al. 2018).

*Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionida: Unionidae) neboli škeble asijská také pochází z Asie a jedná se o jednoho z největších sladkovodních mlžů, když dosahuje velikosti více než 20 cm (Dobler et al. 2022). Pro vývoj svých larev potřebuje rybiho hostitele (je to hostitelský generalista, který svůj vývoj dokončuje na mnoha druzích ryb) (Douda et al. 2012; Bolotov et al. 2016). Je to hojně rozšířený filtrátor, schopný denně vyfiltrovat velké objemy vody a zadržet poměrně širokou škálu velikostí částic: tím zlepšuje kvalitu vody a odstraňuje biomasu fytoplanktonu z vodního sloupce (Zhou et al. 2018). V ekosystémech je také nepostradatelná kvůli schopnosti uvolňování živin a promíchání sedimentů (Xia et al. 2016). Má též zvýšenou odolnost vůči znečištění, tudíž může žít i ve vodách nacházejících se v silně zalidněných oblastech (Monaco et al. 2016).

*Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) (Bivalvia: Myida: Dreissenidae) neboli slávička mnohotvárná je druh, který je značně rozšířený především v evropských vodách, ale s lodní dopravou (volně plovoucí larvy v balastní vodě) se dostala až do Severní Ameriky. Původně jde o tzv. ponticko-kaspický druh, jenž se vyskytoval především v deltách a spodních úsecích



řek ústících do Černého a Kaspického moře (Beran 2018). Je známa vysokou hustotou populací ve vodách, vysokou filtrační aktivitou a širokou geografickou distribucí (Louis et al. 2020). Tento menší mlž o velikosti kolem 3 cm žije přisedle na různých předmětech ve vodě (pomocí tzv. byssových vláken; Gilbert & Sone 2010) a filtruje částice o rozsahu velikostí 1-1200  $\mu\text{m}$  rychlostí 5 až 400 ml za hodinu. Díky filtraci a redistribuci živin jsou v některých jezerech jedinci schopni snižovat eutrofizaci vod. Jsou tolerantní, co se týká chemické kontaminace i fyzikálně chemických podmínek prostředí (Géba et al. 2021).

### 3.2.2 Mlži a kontaminace prostředí

Mlži svou filtrační činností a dýcháním přijímají kontaminanty vstupující do vodního prostředí (Almeida et al. 2015). Přímý kontakt mlžů se znečištěnou vodou a sedimenty má za následek hromadění kontaminantů v jejich měkkých tkáních (Arumugam et al. 2020). S jejich pomocí se sleduje znečištění vodního prostředí (vč. kovů, polycyklických aromatických uhlovodíků a léčiv): můžou to být jak sladké vody, tak ekosystémy v ústích řek nebo mořích (Castro et al. 2018). V případě, že jsou mlži ohroženi znečištěním, je vyvoláno omezení metabolických funkcí a snížení filtrační aktivity, čímž tyto organismy předcházejí kumulaci kontaminantů v organismu (Castro et al. 2018; Almeida et al. 2022). Tím se však zároveň omezuje i možnost příjmu potravy a rozpuštěného  $\text{O}_2$ , což vede ke zvýšení stresu těchto organismů (viz kap. 3.3.4). V potravním řetězci jsou příkladem primárních konzumentů, a proto jsou považovány za ideální organismy pro kvantifikaci znečištění a poškození vodního prostředí (Arumugam et al. 2020).

Pro sledování znečištění prostředí se v současnosti využívá zejména mořský mlž *Mytilus galloprovincialis* (Brandts et al. 2018). Rozpuštěný i na částice vázaný karbamazepin je schopen se vstřebávat a metabolizovat přes trávicí žlázu a žábry, a tím dochází k jeho akumulaci v těle organismu, kde je schopen negativně ovlivnit fyziologické a reprodukční procesy (Nardi et al. 2022). *Ruditapes philippinarum* je dalším druhem mořského mlže, který je navrhovaným bioindikátorem pro hodnocení kvality mořského prostředí, protože již byl využíván v některých studiích v laboratorních podmínkách pro hodnocení toxicity karbamazepinu i dalších farmaceutických přípravků, organického znečištění a kovů (Almeida et al. 2015).

Početné populace sladkovodních invazních druhů s vysokou filtrační aktivitou a odolností mohou být využity pro bioakumulaci těžkých kovů, resp. obecně k odstraňování kontaminantů z vod (Gomes et al. 2018). *Corbicula fluminea* se běžně používá v terénních a laboratorních studiích k měření environmentálních perturbací (narušení) nebo kontaminace prostředí (Chen et al. 2014). Má velmi vysokou schopnost bioakumulace chemických látek rozpuštěných ve vodě nebo látek vázaných na suspendované částice. Rychlý vývoj histologických analýz a molekulární biologie v posledních letech pomáhá lepšímu morfologickému pozorování a změnám biochemických parametrů druhu. Žije na rozhraní vody a sedimentu, a proto se používá nejen k hodnocení toxicity volné vody, ale i prostředí sedimentů (Guo & Feng 2018). *Sinanodonta woodiana* (také pocházející z Asie) je schopna akumulace stopových prvků i pesticidů, z čehož vyplývá i schopnost detekce genotoxicity látky (Kolarević et al. 2013). *Dreissena polymorpha* má vysokou odolnost proti xenobiotikům (cizorodým látkám) vzhledem k dobrým obranným oxidačním, biotransformačním a vylučovacím mechanismům. Některé látky jsou však schopny v jejím těle vyvolat stresový stav, během něhož dochází k poškození

proteinů v žábkách (Contardo-Jara et al. 2011). Díky odolnosti vůči podmínkám prostředí a biofiltrační kapacitě je tento druh vhodný pro vývoj nového postupu čištění odpadních vod. Takovéto čištění by bylo poměrně levným řešením pro zlepšování kvality vody a snižovalo by také zdravotní rizika spojená s výskytem mikropolutantů. Tento druh je schopen extrahovat a odbourávat jak organické, tak anorganické látky v prostředí. Příkladem může být nedávný experiment v Miláně (Itálie), kde tento mlž významně snížil obsah chromu ve vodách (Géba et al. 2021).

### 3.3 Vliv polutantů na vodní organismy

#### 3.3.1 Léčiva a vodní organismy

Protože většina nových farmaceuticky účinných látek znamená potenciální riziko pro životní prostředí, je v Evropě vyžadováno provést ekotoxikologické testy jako součást procesu registrace látky (dos Santos et al. 2021; Wilkinson et al. 2022). Testy, které jsou prováděny, sledují účinky látky na růst řas a sinic i reprodukci a růst bezobratlých a ryb. Nasbíraná data pak pomáhají určit předpokládané koncentrace bez významného nepříznivého účinku (Wilkinson et al. 2022). Detekce látek v prostředí totiž poskytuje pouze informace o jejich přítomnosti v prostředí, ale neříká nám nic o jejich interakci nebo biologických účincích na organismy. Pro hodnocení účinků se používají biomarkery nebo fyziologické, behaviorální a strukturální endpointy (jako např. míra respirace či filtrace) (Kolarević et al. 2013; Batucan et al. 2022).

Ve studii Batucan et al. (2022) byly hodnoceny 3 různé polutanty (karbamazepin, diklofenak a ibuprofen) a práce týkající se jich za posledních deset let. Je zde uvedeno, že dvacet šest studií se zabývalo krátkodobou expozicí vůči karbamazepinu: většina těchto experimentů zahrnovala ryby, řasy a drobné filtrující korýše (jako např. *Daphnia magna*). Tyto organismy vykazovaly nepříznivé účinky CBZ při environmentálně relevantních koncentracích. Pět nejčastěji využívaných druhů projevilo jednoznačnou reakci na polutanty v méně než polovině experimentů. Jediným druhem, který vždy 100 % reagoval, byla *Corbicula fluminea*.

Díky tomu, že do vody často vstupuje karbamazepin téměř nezměněn, může ovlivňovat i necílové organismy (Almeida et al. 2017). V případě jeho výskytu ve vodě lze pravděpodobně vyloučit akutní toxické účinky na organismy, protože jeho koncentrace jsou relativně nízké. Nicméně může mít chronické účinky, které se projevují v delším časovém horizontu (Jos et al. 2003; Almeida et al. 2015). CBZ i jeho rezidua mohou zasahovat trávicí systém, endokrinní systém i centrální nervovou soustavu organismů (Meng et al. 2022). Dle práce Chen et al. (2014) může CBZ výraznými negativními účinky významně ovlivnit četné biochemické a oxidační procesy u mlžů, avšak i přes tento fakt dosud nebyly mechanismy ani behaviorální účinky léčiva na vodní organismy dostatečně prozkoumány. Prozkoumány jsou zatím jen účinky při vysokých koncentracích způsobujících akutní toxicitu, ovšem chronické účinky při dlouhodobých nízkých koncentracích nejsou příliš známy. Z tohoto důvodu je většina experimentů z hlediska toxicity irelevantních vzhledem k environmentálnímu významu CBZ.

Nyní je zapotřebí především detailní poznání a popis buněčné a molekulární toxicity karbamazepinu – teprve poté budeme schopni pochopit a předvídat účinky léku v prostředí (Baali & Cosio 2022). Navíc také zatím neprobíhá podrobnější stanovení koncentrace léčiv

v tělech mlžů, a proto není možné určit bioakumulační faktor těchto látek (Almeida et al. 2021). Cravo et al. (2022) hodnotili 24 farmaceuticky aktivních látek v měkkých tkáních mlžů, kteří byli exponováni po dobu jednoho měsíce pod městskou čistírnou odpadních vod (ČOV) v Ria Formosa (Portugalsko). Vzorky z těchto mlžů byly porovnávány se vzorky odebranými ve výtocích z ČOV. Kvantifikace probíhala metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrofotometrií. Autoři zjistili, že v přečištěných odpadních vodách a prostředí, do něhož tyto vody přitékají, je nejvíce zastoupen diklofenak, karbamazepin a kofein. V mlžích se naopak nejvíce akumulují kofein a acetaminofen, vždy však záleží na biotických faktorech, jako např. délka lastury a hmotnost jedince.

### 3.3.2 CBZ a přímý vliv na mlže

Vodní ekosystémy jsou vystaveny nejen přímému vypouštění přečištěných odpadních vod z ČOV, ale také do nich ústí kontaminovaná voda z přítoků (Dumas et al. 2022). Kromě toho se kontaminanty dostávají do vody i splachem z přilehlých ploch, např. po vydatné srážce. Karbamazepin je ve vodním prostředí široce rozšířený perzistentní mikropolutant (Baratange et al. 2022). Jelikož není snadno absorbován sedimenty nebo pevnými částicemi, zůstává převážně ve vodné fázi (Dumas et al. 2022). Koncentrace ve vodním prostředí dosahuje hodnot od ng/l až po µg/l s tím, že v některých mořských organismech byly zjištěny hodnoty až 14 ng/l jejich suché hmotnosti (Navon et al. 2021). Karbamazepin má tedy potenciál akumulovat se i ve vodní biotě (Almeida et al. 2014).

CBZ ve vodné fázi se stává snadno biologicky dostupným pro filtrátory, jako jsou mlži. Jelikož dýchají i získávají potravu filtrací vody, jsou velmi citliví na různá xenobiotika. Jsou přitom schopni akumulovat mnoho organických kontaminantů ve vysokých koncentracích (Almeida et al. 2014). Bioakumulace toxických látek mlži je založena na výsledku dynamické rovnováhy mezi expozicí vůči vnějšímu prostředí a absorpcí, vylučováním, ukládáním a degradací těchto látek mlžem. Látka se může hromadit v různých orgánech mlžů, jako jsou například žábry, plášť nebo svalnatá noha (Guo & Feng 2018). Bioakumulaci ovlivňuje mnoho faktorů, jakými jsou hydrodynamika prostředí, biologická dostupnost látky, délka expozice a také velikost organismu, pohlaví a jeho reprodukční cyklus (Arumugam et al. 2020).

Nejběžnějším negativním účinkem na mořské mlže je vyvolání oxidačního stresu – mezi další účinky patří cytotoxicita či imunotoxicita, genotoxicita a embryotoxicita (Almeida et al. 2022; Dumas et al. 2022). U mlže *M. galloprovincialis*, vystavenému environmentálně relevantním koncentracím CBZ, látka způsobila poškození embryonálního vývoje a změny genové exprese (Franzellitti et al. 2019). Změny v mořských ekosystémech spojené se změnou klimatu mohou změnit biologickou dostupnost a účinky kovů, polycyklických aromatických uhlovodíků i léčiv, jako je CBZ (Nardi et al. 2022). Studie Mezzelani et al. (2021) nepotvrdila žádné významné rozdíly v absorpci CBZ u mlžů, kteří byli vystaveni běžné či snížené úrovni zatížení. Nicméně kombinace CBZ a sníženého pH může zvýšit buněčný stres u mlže druhu *Mytilus galloprovincialis* (ve srovnání se situací, kdy každý z těchto stresorů působí zvlášť; Almeida et al. 2022). Práce Nardi et al. (2022), zaměřená na mlže *M. galloprovincialis*, se zabývala kombinací účinku CBZ a MHW („marine heatwave“ neboli mořská vlna veder) a autoři zjistili, že hodnoty CBZ v organismu byly téměř dvojnásobné na vrcholu MHW. To ukazuje, že vliv CBZ na organismus nemusí souviset pouze s účinkem léčiva, ale také

s aktuálním stavem prostředí, ve kterém tyto vlivy sledujeme. Vícenásobné environmentální stresory mohou vyvolat synergické, aditivní nebo antagonistické účinky, které závisí na jejich kombinaci, zkoumaném endpointu a úrovni biologické organizace (tzn. od molekuly přes organismus, společenstvo a ekosystém až po biosféru), podobně jako směsi kontaminantů. V důsledku interakcí směsí farmaceuticky aktivních látek tedy mohou být ekotoxikologická rizika vyšší, než se původně předpokládalo (Wilkinson et al. 2022).

Mořské vody jsou znečištěny také plasty rozloženými na drobné mikro- či nanočástice, díky čemuž mohou být organismům více dostupné. Tyto plasty se hojně využívají jako obalový materiál na produkty spojené se skladováním potravin, jednorázové přístroje a průmyslové obaly a jejich hlavním problémem je, že se málokdy znovu využijí. Velikost těchto částic je často menší než 100 nm a Brandts et al. (2018) uvádí, že nanočástice polystyrenu spolu s karbamazepinem snižují integritu DNA mlže druhu *M. galloprovincialis*.

Již méně jsou známy účinky karbamazepinu na sladkovodní mlže. Chen et al. (2014) zkoumali chronické účinky CBZ na druh *Corbicula fluminea* během 30denního experimentu. Úmrtnost mlžů byla velice nízká (< 3 %), ale environmentálně relevantní koncentrace hrály roli při změně biomarkerů a úrovní mRNA a proteinů v žábách a trávicích žlázách organismů. Vliv CBZ přitom souvisel s oxidačním stresem. Aguirre-Martínez et al. (2015) provedli podobný experiment trvající 21 dní a potvrdili, že působením CBZ dochází jak k vyvolání stresu, tak ke změnám ve sledovaných biomarkerech.

### 3.3.3 CBZ a nepřímý vliv na mlže

Karbamazepin má toxické účinky také na jednobuněčné živé řasy, jež mohou tvořit podstatnou část potravy mlžů. Ovlivňuje jejich fosfolipidovou dvojrůstvou: naruší ji tak, že zapůsobí na specifické proteiny a ty pak naruší funkci buněčné membrány (Xin et al. 2017). Negativní účinek kontaminantů se obvykle hodnotí pomocí testů fyto toxicity, které jsou založeny na inhibici růstu řas (Zhang et al. 2012). Když ve vodním útvaru dojde k poklesu koncentrace řas, mlž sníží rychlost otevírání sifonu: pokud se koncentrace řas nezvýší, dojde k úplnému uzavření, a tím se zastaví i filtrační aktivita. Tento stav trvá do té doby, dokud se koncentrace řas nezvýší na hodnotu, kterou je mlž schopen detekovat (Riisgård et al. 2003).

Xin et al. (2017) vystavovali řasy různým koncentracím CBZ a zjistili, že buňky vystavené nejnižší dávce vykazovaly mírně zvýšenou koncentraci chlorofylu-a. To znamená, že nízká dávka léčiva může zvýšit rychlost fotosyntézy, dýchání a metabolickou aktivitu řas, ovšem pouze v kratším časovém horizontu. S delší expozicí nejsou tyto účinky nadále patrné. Chlorofyl a endogenní ochranné mechanismy (zahrnující enzymy CAT a SOD) jsou spolehlivými ukazateli toxického účinku CBZ (Zhang et al. 2012).

Diniz et al. (2020) popsali pozitivní vliv přítomnosti kofeinu na působení karbamazepinu ve vodním prostředí. Kofein totiž snižuje toxicitu CBZ a má antioxidační účinky, což se pozitivně projevilo na rychlosti růstu mikrořas, produkci chlorofylu-a a maximální hustotě řasových buněk. Kofein tedy může ovlivňovat testy vzhledem k tomu, že je stejně jako CBZ hojně rozšířený ve vodních útvech (Xin et al. 2017). Pozitivní vliv mohou mít i jiné látky: Bai a Acharya (2017) ve svém výzkumu zjistili, že 14 dní po aplikaci dávky karbamazepinu spolu s trimethoprimem do kultivačního média není řasami vychytáno téměř žádné množství (ve směsi se stále nachází 90-100 % původní koncentrace léčiv).

Dle práce Diniz et al. (2020) byly účinky karbamazepinu na rychlost růstu u sledované mikrořasy *Raphidocelis subcapitata* významné až při koncentraci 10 µg/l a vyšší. To lze vysvětlit schopností CBZ indukovat rychlou reakci enzymů katalázy a superoxid dismutázy, kterými se organismus jako první brání před toxicitou ROS (reaktivních forem kyslíku) v buňce (Zhang et al. 2012).

### 3.3.4 CBZ a filtrační aktivita vodních organismů

Organismy využívající filtraci k získávání potravy často akumulují vysoké koncentrace organických kontaminantů, a právě proto se používají pro zjišťování znečištění vodního prostředí (Pruell et al. 1986). Dalším z důvodů tohoto využití jsou početné populace nejen v mořských vodách, u mlžů také jejich přisedlý způsob života. Proces filtrace je citlivý na vnější podmínky. Během filtrování mlži mohou využívat regulaci otevírání/zavírání sifonů, např. v závislosti na přítomnosti kontaminantu (Castro et al. 2018). Sifony jsou funkčně důležité z hlediska reprodukce nebo jejich role při fyziologii výživy, proto jsou hlavním ukazatelem celkového zdraví nebo stresu mlže (Chen et al. 2014).

Ve studii, jež provedli Chen et al. (2014), bylo zjištěno, že CBZ při nízkých koncentracích 0,5-5 µg/l nemá žádné účinky na filtrační aktivitu mlže druhu *Corbicula fluminea*, avšak při koncentraci 50 µg/l byla filtrační aktivita značně nižší, než tomu bylo u kontrolní skupiny. V nejnovějším experimentu (Baali & Cosio 2022) byl stejný druh mlže vystaven koncentracím karbamazepinu až 50 µg/l po dobu 30 dní. Takové koncentrace měly vliv na rychlost filtrace a dýchání, kdy byla intenzita daných procesů snížena až o 80 % (počáteční rychlost filtrace činila 19 ml/hod., zatímco po vystavení karbamazepinu již pouze 4 ml/hod.). Castro et al. (2018) ve svém experimentu hodnotili účinky různých kontaminantů pro odhalení omezení filtrační aktivity mlže *Corbicula fluminea*. Tyto testy prokázaly, že mlž má snahu se před kontaminanty chránit prostřednictvím přerušovaného nebo prodlouženého uzavírání sifonů, což využívá jako ochranu před kontaminanty. Tato ochrana není stoprocentní, protože mlž má stále omezenou potřebu se krmit: v případě, že nefiltruje, je snížena schopnost příjmu potravy a správného fungování metabolismu. Měření indexu fitness (CI) ukázalo, že akumulace CBZ v tkáních mlžů má za následek snížení CI. Při vyšších koncentracích dochází vzhledem k uzavření schránky i ke snížení spotřeby kyslíku, což vede k tomu, že mlž vynakládá méně energie na krmení a dýchání. To následně vede ke snížení glykogenu jako zásobní látky v těle organismů (Almeida et al. 2014).

Filtraci však nevyužívají jen mlži, ale i drobní korýši, jako jsou např. perloočky. Nkoom et al. (2019) vystavili druh *Daphnia magna* koncentracím CBZ 5-100 µg/l a zjistili, že u korýšů došlo s nárůstem zatížení k omezení příjmu potravy, což snižuje jejich fitness (zdatnost) jak z hlediska růstu, tak reprodukce (Lu et al. 2017). Zástupci třídy Ascidiacea (sumky), kam patří mořské organismy, jako např. *Herdmania momus*, mají účinné filtrační schopnosti, přičemž filtrují částice menší než 1 µm. Některé druhy jsou schopny žít jak v čistých, tak i znečištěných místech, jakými jsou např. přístavy a průmyslové oblasti. Tito živočichové mají schopnost akumulovat mikroplasty nebo těžké kovy přítomné v okolním vodě i při nízkých koncentracích. Experiment využívající jedince druhu *Herdmania momus* na izraelském pobřeží Rudého moře prokázal při působení CBZ významné změny v souboru proteinů sumek (Navon et al. 2021).

### 3.3.5 Přenos CBZ v potravním řetězci

Tím, jak roste industrializace, urbanizace a další antropogenní aktivity, roste i úroveň znečištění životního prostředí. Toto znečištění dále vede k poškození vodních organismů a akumulaci toxických látek v jejich tkáních, a tím i přenosu těchto látek napříč trofickými úrovněmi (Arumugam et al. 2020). O akumulaci farmaceutických látek pomocí potravního řetězce v zoobentosu, tzn. i mlžích, existují pouze velmi omezené informace, přestože jsou mlži vystaveni často vysokým koncentracím těchto látek s výskytem jak ve vodě, tak v sedimentu (Xie et al. 2017). Invazní mlži, jako jsou *Corbicula fluminea* a *Sinanodonta woodiana*, přitom mají potenciál akumulovat kontaminanty a dále je bioamplifikovat v potravním řetězci. Tato schopnost může mít dále významný negativní dopad na vyšší trofické úrovně živočichů (Sousa et al. 2014).

CBZ patří mezi léčiva, u nichž Xie et al. (2017) zjistili vyšší koncentrace v zooplanktonu než ve fytoplanktonu, což je způsobeno odlišnými expozičními cestami. Fytoplankton přijímá CBZ pouze povrchovou adsorpcí do buňky – na rozdíl od toho zooplankton je schopen jak adsorpce, tak i příjmu skrze fytoplankton, kterým se živí.

Jelikož léčiva jsou schopna se dostávat z vody do tkání nebo plazmy organismů, mohou mít potenciální negativní vliv na necílové organismy. Tím může docházet k biomagnifikaci těchto látek v potravní síti a po delší době je zde možnost ohrožení lidského zdraví (Contardo-Jara et al. 2011). Vernouillet et al. (2010) ve své studii upozorňují na přenos CBZ napříč trofickými úrovněmi ve vodních organismech (zelená řasa *Pseudokirchneriella subcapitata*, korýš *Thamnocephalus platyurus*, nezmar *Hydra attenuata*). Při koncentraci 150 mg/l, která byla v experimentu použita, byla prokázána schopnost CBZ bioakumulovat se v organismech prostřednictvím kontaminace potravy (i když se nepředpokládá, že by se takto vysoká úroveň zatížení reálně vyskytovala v prostředí). Dále bylo prokázáno, že pro hodnocení potenciální toxicity přenosu CBZ v potravní síti je důležité použít experimentální trofický řetězec a multiparametrické biomarkery.

### 3.3.6 Metody vyhodnocení filtrační aktivity mlžů

Stanovení filtrační aktivity organismů, využívajících jako potravu rozptýlené částice ve vodním sloupci, se obvykle provádí prostřednictvím měření „clearance rate“ (CR neboli objem vody zbavený částic za jednotku času) s využitím znalosti o koncentraci částic. Přitom je důležité rozlišovat mezi CR a pojmem „pumping rate“ (PR neboli objem vody pumpovaný skrz plášťovou dutinu (v případě mlžů) za jednotku času). Hodnoty CR jsou shodné s PR pouze tehdy, když jsou částice zadrženy se 100% účinností. Přímé měření PR má své praktické překážky, proto se spíše využívají různé nepřímé metody a stanovují se hodnoty CR. Měření mohou probíhat jak v uzavřených (statických), tak otevřených (průtočných) experimentálních systémech (Iglesias et al. 1998).

Běžně se dnes využívá metoda stanovení CR dle práce Coughlan (1969), jak uvádí např. Marescaux et al. (2016), Mistry a Ackerman (2018) či Pouil et al. (2021). Kromě objemu vody a počáteční/konečné koncentrace chlorofylu-*a* během experimentu probíhajícího v čase „t“ se zohledňuje také počet filtrujících mlžů. Koncentrace chlorofylu-*a* je přitom třeba znát jak pro zařízení s mlži, tak pro kontrolu bez mlžů (v tomto případě by se do zařízení měly ideálně umístit prázdné schránky podobné svou velikostí a tvarem živým jedincům). Jiný přístup

nabízejí Horgan a Mills (1997), když místo počtu jedinců zohledňují jejich biomasu a pro zjednodušení uvažují koncentrace řasových buněk (ve formě chlorofylu-a) pouze v zařízeních s přítomností organismů.

Kromě výpočetních metod lze použít také jednoduché pozorování filtrační aktivity mlžů. Beggel et al. (2017) se zabývali chováním mlže *Unio pictorum* při působení amoniakálního dusíku, kdy sledovali aktivitu ve třech časech (24 h. před zahájením experimentu, na začátku experimentu a nakonec po 96 h. trvání experimentu). Aktivitu přitom rozlišovali na základě otevřené/zavřené schránky mlžů s viditelnými/bez viditelných sifonů. Dzierzyńska-Białończyk et al. (2019) ke sledování a hodnocení míry otevírání schránky mlžů *Dreissena polymorpha* v důsledku chemické či mechanické stimulace využili videozáznamů. Escobar-Calderón et al. (2022) vyvinuli a otestovali modifikovanou metodu využívající videoanalýzu při monitoringu reakce mlžů *Anodonta anatina* na přítomnost dusičnanového dusíku. Podobné metody budou postupně vylepšovány, tudíž lze předpokládat zvýšení spolehlivosti těchto studií zaměřených na chování mlžů.

## 4 Metodika

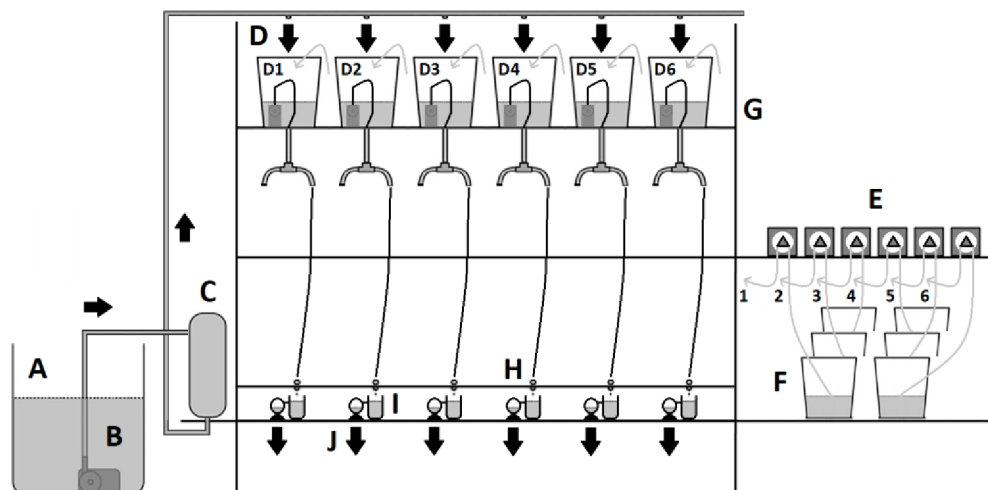
### 4.1 Popis experimentu

Pro experiment byl využit PFT systém („pulsed flow-through auto-feeding beaker systém“ neboli systém kádinek s pulsním průtokem a automatickým krmením). Systém vymysleli a zkonstruovali Kunz et al. (2020) za účelem usnadnění manipulace a sledování mlžů chovaných v laboratorních podmínkách. Tento systém se sestává z kádinek (beakerů) s vodou a sedimentem: voda v nich je statická kromě dodávání směsi vody a potravy v pulsech v předem stanovených cyklech.

Výše uvedený systém byl modifikován pro potřeby využití v několika experimentech v malakologické laboratoři na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU (Mohammadi et al. 2022). Modifikovaný systém se skládal ze 36 kádinek, opatřených třemi hadičkami. První z nich měla průměr 0,8 cm a sloužila pro odtok vody ze systému. Zbývající dvě hadičky o průměru 0,2 cm sloužily pro odběr volné vody z vodního sloupce, resp. odběr pórové vody ze sedimentu. Na dně se nacházelo 30 ml štěrku o zrnitosti 3-5 mm a na něm byl umístěn Uhelon o velikosti oka 500  $\mu\text{m}$ . Tato síťovina vyrobená z polyamidu sloužila jako bariéra proti vstupu křemičitého písku o velikosti zrna 0,8-1,2 mm do hadičky pro odběr pórové vody a zároveň také zabraňovala promíchání písku společně se štěrkem. Objem písčité vrstvy byl 420 ml a vodní sloupec nad ním tvořil 450 ml objemu kádinky. Tyto plastové kádinky byly vyrobeny z polypropylenu a jejich celkový objem byl 1000 ml.

Na obr. 1 (viz str. 21) můžeme vidět základní schéma našeho systému. Sud o objemu 200 l sloužil jako zásobní nádrž pro vodu (A). Plovák na hladině snímal výšku vodního sloupce: pokaždé, když byla voda odčerpána, automaticky se opět doplnila z vodovodní sítě. Nádrž byla naplněna s několikadenním předstihem tak, aby většinu jejího objemu tvořila odstátá voda (nikoli čerstvá nachlorovaná). Standardní fyzikálně-chemické parametry vody (konduktivita 334  $\mu\text{S/cm}$ , pH 7,78, obsah amoniakálního dusíku < 0,02 mg/l, obsah dusičnanového dusíku 5 mg/l a tvrdost 150 mg/l  $\text{CaCO}_3$ ) již byly dříve popsány (Mohammadi et al. 2022) a lze předpokládat, že se ani během tohoto experimentu příliš nelišily. Ponorné čerpadlo (B) s připojeným časovačem zajistilo každou hodinu vedení vody přes filtr (C) směrem nahoru do potrubí (D), z něhož se plnily směšovací nádrže s objemem 1,25 l (D1-D6). Za dvě minuty se spustila peristaltická čerpadla (E), která čerpala řasovou směs (50 ml; složení: 80 % *Ettlia oleoabundans* + 20 % *Easyroti*) ze zásobníků se suspenzí (F; zásobníky umístěny v chladicím boxu, kde byla udržována teplota cca 4 °C) do směšovacích nádrží D1-D6. Tyto nádrže byly provzdušňovány pomocí kompresoru a sítě hadiček, aby docházelo k promíchání suspenze s vodou. Za dalších pět minut se spustila malá čerpadla (G) připojená k časovači, umístěná uvnitř nádrží D1-D6, a obsah těchto nádrží byl sveden směrem dolů do rozdělovacího potrubí se šesti větvemi (H). Na každé větvi bylo v otvorech opatřených silikonovými zátkami instalováno celkem šest jehel. Z těchto jehel voda se suspenzí vytékala přímo do kádinek (I). Každou hodinu přibližně 200 ml vody v kádinkách bylo vyměněno a tato „odpadní“ voda se odváděla sběrným potrubím (J) do kanalizace.





Obr. 1. Experimentální PFT systém (autor: Vojtěch Barák; upraveno)

#### 4.1.1 Mlži a uspořádání experimentu

Zástupci druhu *Corbicula fluminea* byli nasbíráni v řece Ohři poblíž Radovesic mezi jezem a silničním mostem. Zástupci druhu *Sinanodonta woodiana* byli získáni z experimentálního chovu katedry zoologie a rybářství FAPPZ ČZU. Velikosti mlžů byly následující: *C. fluminea* měla délku schránky 2-3 cm, zatímco větší mlži *S. woodiana* dosahovali délky 5,5-6,5 cm. Mlži byli umístěni v 18 kádinkách: do 9 kádinek jsme dali dva jedince *S. woodiana* (označeno jako „W“), v dalších 9 kádinkách bylo 10 jedinců *C. fluminea* (označeno jako „C“). Zbývajících 18 kádinek tvořilo kontrolní sadu bez jakéhokoliv mlže (označeno jako „O“). Schéma experimentu přibližuje tab. 1.

Tab. 1. Schéma experimentu (S. woodiana = W, C. fluminea = C, kontrola = O)

36-C	30-O	24-C	18-O	12-C	6-O
35-O	29-W	23-O	17-W	11-O	5-W
34-O	28-C	22-O	16-C	10-O	4-C
33-W	27-O	21-W	15-O	9-W	3-O
32-C	26-O	20-C	14-O	8-C	2-O
31-O	25-W	19-O	13-W	7-O	1-W

#### 4.1.2 Konfigurace systému

V systému bylo použito hned několik testů včetně tzv. pre-testů, které sloužily pro odvození účinku na zkoumané organismy. S pomocí pre-testů s referenčními látkami bylo možné stanovit optimální frekvenci odběru vzorků a jejich výsledky dále zohlednit při finálním testu s cílovou látkou CBZ.

Předtím, než bylo možné testy zahájit, byla nutná aklimatizace mlžů. Aklimatizace mlžů probíhala v kompletně dokončeném systému a mlži v jejím průběhu nebyli vystavováni žádným kontaminantům. Tento proces trval celkem šest dní, během nichž byla průběžně sledována pozice mlžů v kádinkách. Kontrolní odběr volné i pórové vody byl proveden dvakrát během aklimatizace: měření pomocí multimetru bylo zaměřeno na odhalení případného deficitu O<sub>2</sub>.

Po ukončení aklimatizace následovalo vyjmutí a vážení mlžů, kdy se jedinci *S. woodiana* individuálně vážili, zatímco jedinci *C. fluminea* byli váženi ve dvou skupinách dle výskytu těchto mlžů v sedimentu (v mělké podpovrchové, resp. hlubší vrstvě písčitého substrátu). Voda v kádinkách byla vypuštěna pomocí hadičky pro odběr pórové vody a následovalo vyjmutí a propírání písčitého substrátu pod tekoucí kohoutkovou vodou. Vnitřek kádinek byl důkladně vyčištěn pomocí houbičky. Poté se do kádinek vložil propraný písek a doplnila se voda ze zásobní nádrže. Dalším krokem bylo navrácení mlžů do kádinek (předtím byli mlži očištěni čistou houbičkou). V případě úhynu zjištěného již při vážení byli příslušní mlži (*C. fluminea*) nahrazeni novými jedinci. Posledním úkonem bylo navrácení kádinek zpět do PFT systému, pak následovalo plné spuštění celého systému.

#### 4.1.3 Pre-test NaCl

Pro tento test byl připraven roztok NaCl, kdy bylo smícháno 16 g NaCl se 700 ml destilované vody. Koncentrace chloridů ve volné vodě v kádinkách po aplikaci 15 ml roztoku měla na základě směšovací rovnice dosahovat 435 mg/l, což je environmentálně relevantní hodnota typická pro zatížení vodních toků odtokem ze solí posypaných silnic ve Velké Británii (Rivett et al. 2016).

Před zahájením pre-testu (2 h. před aplikací roztoku soli) se provádělo 18 kontrolních odběrů volné vody (6x W, 6x C, 6x O) pro měření konduktivity (náhradní veličiny pro sledování chování NaCl) pomocí multimetru a turbidity (veličiny pro výpočet filtrační aktivity) pomocí turbidimetru. Stejný počet odběrů a následných měření proběhl těsně po přidání NaCl do všech kádinek, a později ještě třikrát (tj. 8, 24 a 48 h. po aplikaci roztoku soli). V čase aplikace látky byli mlži v kádinkách cca 24 hodin. Rozsah odběrů vzorků (vč. pórové vody) a měření byl ve skutečnosti daleko větší, než je zde uváděno. Veškerá data v ucelené podobě budou využita při psaní vědeckého článku v týmu vedoucího BP K. Doudy.

V přibližně stejných časech byly zaznamenávány pozice mlžů v kádinkách. Ti jedinci, kteří byli pozorováni na povrchu či v úrovni substrátu, byli schématicky zakresleni v předem připravených protokolech. Kromě pozice mlžů se zaznamenávala i filtrační aktivita („filtruje“ či „nefiltruje“ na základě pozorování sifonů) a také se odhadovala míra zahrabání jedinců (%). Poslední záznam pozice byl proveden těsně před ukončením testu (tj. 70 h. po aplikaci roztoku soli). Po ukončení experimentu byly jednotlivé prvky PFT systému rozebrány a vyčištěny, jak bylo popsáno v kap. 4.1.2. Mlži byli opět zváženi: jelikož při tomto testu došlo k úhynu šesti jedinců *C. fluminea*, uhynulí mlži byli nahrazeni před začátkem dalšího experimentu.

#### 4.1.4 Pre-test NaNO<sub>3</sub>

Roztok pro druhý test se skládal z 2,9 g NaNO<sub>3</sub> a 700 ml destilované vody, přičemž koncentrace dusičnanového dusíku (NO<sub>3</sub>-N), která byla dle výpočtu očekávána, byla 28 mg/l. Podobné a vyšší hodnoty byly naměřeny při událostech povrchovém odtoku v zemědělsky obhospodařovaných povodích v USA (Owens et al. 1984). Pro odhad výsledné koncentrace NO<sub>3</sub>-N v kádinkách bylo předem znát množství dusičnanového dusíku ve vodě před aplikací roztoku, proto bylo odebráno 9 kontrolních vzorků (1-W, 17-W, 25-W; 4-C, 20-C, 36-C; 3-O, 18-O, 31-O). Tyto vzorky byly analyzovány pomocí přenosného spektrofotometru pro stanovení dusičnanů (HANNA Instruments HI 96728): hodnota NO<sub>3</sub>-N dosahovala 7,8 mg/l.

Odběry vzorků volné vody pro měření turbidity a zakreslování pozic mlžů probíhaly ve stejných časech jako v případě pre-testu NaCl (viz kap. 4.1.3). Pro sledování chování NaNO<sub>3</sub> (resp. NO<sub>3</sub>-N) v kádinkách byly odebrané vzorky (v redukovaném počtu) opět analyzovány pomocí spektrofotometru. Počet vzorků pro stanovení NO<sub>3</sub>-N byl snížen z důvodu omezeného množství práškových reagensů (činidel). Celkem bylo získáno 27 hodnot (9x kontrolní měření v čase 2 h. před zahájením pre-testu, 9x měření po aplikaci roztoku NaNO<sub>3</sub>, 9x měření na konci 48hodinového experimentu). Vzorky byly před provedením vlastních analýz uloženy v lednici s teplotou kolem 4 °C.

Ukončení experimentu proběhlo ve shodě s předchozím pre-testem NaCl (viz kap. 4.1.3). Při tomto pre-testu uhynuli celkem tři jedinci druhu *C. fluminea*.

#### 4.1.5 Test CBZ

Roztok karbamazepinu byl připravován smícháním 5,08 mg CBZ a 750 ml destilované vody. Takto připravený roztok se dále naředil destilovanou vodou (přibližně v poměru 1:40), cílová nominální koncentrace byla 5 µg/l. Toto zatížení odpovídá koncentracím CBZ v povrchových vodách v Africe (K'oreje et al. 2020), ale i v Evropě (Wilkinson et al. 2022).

Odběry vzorků volné vody pro měření turbidity a zakreslování pozice mlžů probíhalo ve stejných časech jako při pre-testech NaCl (viz kap. 4.1.3) a NaNO<sub>3</sub> (viz kap. 4.1.4). Chování CBZ v průběhu 48hodinového experimentu bylo zjištěno pomocí analýz vzorků, odebraných ve stejném množství jako v případě experimentu s NaNO<sub>3</sub>. Před provedením vlastních analýz v laboratoři katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin FAPPZ ČZU (Filip Mercl) byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkové filtry a uloženy v mrazáku s teplotou kolem -20 °C. Při psaní této BP bylo k dispozici pouze devět vyhodnocených vzorků, zbylé analýzy budou dokončeny později.

Během tohoto experimentu uhynuli tři zástupci druhu *C. fluminea*. Po skončení všech prací byl provoz PFT systému ukončen. Mlži byli zváženi jako v předchozích případech. Voda z kádinek se vypustila, následovalo vyjmutí a proprání jak písku, tak štěrku. Všechny sedimenty byly odděleně uloženy do předem vypláchnutých plastových nádrží. Vnitřek kádinek byl vyčištěn pomocí houbičky, Uhelon pouze pod tekoucí kohoutkovou vodou. Experimentální jedinci byli očištěni a přesunuti do plastových nádrží s vodou ze zásobní nádrže a provzdušňováním.

## 4.2 Zpracování dat

### 4.2.1 Analýza filtrační aktivity mlžů

První metodou pro hodnocení filtrační aktivity byla přímá neboli tzv. pozorovací metoda („P“), využívající záznamů pozice mlžů v kádinkách. Údaje o počtu filtrujících jedinců pro příslušné časy v průběhu jednotlivých experimentů byly převedeny do tabulek v elektronické formě (zvláště pro *S. woodiana* a *C. fluminea*) a vizuálně zobrazeny pomocí sloupcových grafů v programu Microsoft (MS) Excel (verze 2022).

Druhá metoda pro hodnocení filtrační aktivity byla založena na výpočtech využívajících hodnoty měření turbidity a hmotnosti mlžů v jednotlivých kádinkách (zde označena jako „N“ neboli nepřímá metoda). Pro výpočet „clearance rate“ (CR) byla použita rovnice odvozená v práci Horgan a Mills (1997):

$$CR = V * \ln\left(\frac{conc_i}{conc_f}\right) * (M * t)^{-1}$$

V uvedené rovnici vystupují tyto veličiny:  $V$  jako objem vody (450 ml),  $M$  jako biomasa mlžů (celková hmotnost jedinců na vzduchu (g), zjištěná na konci každého experimentu pro jednotlivé kádinky),  $t$  jako čas (interval 0,5 h. mezi dávkováním řasové suspenze do kádinek a měřením turbidity). Koncentrace řasových buněk na začátku ( $conc_i$ ) a na konci ( $conc_f$ ) intervalu nebyly k dispozici a byly nahrazeny příslušnými hodnotami „biovolume“ (tj. objemu řasových buněk v jednotce objemu vody). Převod turbidity (TURB) na „biovolume“ (BV) byl proveden s pomocí kvadratické křivky (vztah:  $BV = 0,006 * TURB^2 + 4,169 * TURB$ ), prokládající hodnoty zjištěné při přípravě suspenze (data poskytla Laura Alejandra Lamilla Tamayo z katedry botaniky a fyziologie rostlin FAPPZ ČZU). Při výpočtu příslušných hodnot BV byly využity měření TURB v kádinkách bez mlžů (jako počáteční hodnoty) a s mlži (jako konečné hodnoty). Hodnoty CR byly zobrazeny pomocí spojnicových grafů v programu MS Excel.

#### 4.2.2 Statistické vyhodnocení

V případě metody „P“ byly k dispozici údaje o počtu filtrujících/nefiltrujících jedinců pro šest časových oken. Tři z nich (sledování před zahájením testů a dále po 48, resp. 70 hodinách od aplikace roztoků kontaminantů) byly na základě hodnocení chování látek v kádinkách v PFT systému uvažovány jako „kontrolní“. Ve zbývajících třech oknech (těsně, resp. 8 a 24 hodin po aplikaci roztoků) byl předpokládán vliv kontaminantů na mlže v kádinkách. Počty filtrujících/nefiltrujících jedinců byly sečteny pro obě skupiny, a tak byla získána tabulka  $2 \times 2$  (čtyřpolní tabulka). Hodnocení příslušných kontingenčních tabulek bylo provedeno pomocí chí-kvadrát testů. Pokud p-hodnota překročila 0,05, rozdíl mezi oběma skupinami nebyl neprokázán.

Vzhledem k tomu, že test CBZ byl ukončen v návaznosti na další experimenty využívající PFT systém již po 48 hodinách, bylo k dispozici pouze pět časových oken. Pro možné srovnání výsledků mezi všemi třemi experimenty (NaCl, NaNO<sub>3</sub>, CBZ) byly tedy proveny doplňkové analýzy, podobné těm výše popsaným. Standardní hodnocení skupin se třemi okny bylo označeno jako „3P“, při doplňkovém hodnocení byly uvažovány skupiny zahrnující pouze dvě okna (skupina bez vlivu látek: před zahájením testů a 48 hodin od aplikace roztoků; skupina s vlivem látek: těsně, resp. 8 hodin po aplikaci roztoků) (označeno jako „2P“).

Veškeré zde zmíněné zpracování dat se týká kádinek s druhem *S. woodiana*, protože počet filtrujících/nefiltrujících jedinců byl vždy jednoznačně stanovitelný. Pro druh *C. fluminea* bylo nutné vše provést celkem dvakrát: počet nefiltrujících mlžů byl totiž stanoven buď jako počet jedinců se zavřenými sifony („3P“, resp. „2P“), nebo byli do této kategorie zahrnuti i ti mlži, kteří byli zahrabáni v sedimentu a nebyli vůbec pozorováni („3PS“, resp. „2PS“).

V případě metody „N“ byly k dispozici hodnoty CR pro pět časových oken (vzhledem k měření turbidity před zahájením experimentů a těsně po aplikaci roztoků kontaminantů, resp. po uplynutí 8, 24 a 48 hodin). Pro zjednodušení byly statisticky vyhodnoceny pouze rozdíly mezi časy „0 h“ (s vlivem kontaminantu) a „48 h“ (po předpokládaném vyředení kontaminantu z volné vody v kádinkách) – jak pro druh *S. woodiana*, tak *C. fluminea*. K tomu byly využity párové t-testy (při splnění předpokladu o normálním rozdělení rozdílů dvojic hodnot CR pro příslušnou kádinku), p-hodnoty se přitom srovnávaly opět s hodnotou 0,05.

Statistické vyhodnocení dat proběhlo s využitím programu R verze 3.6.0.

## 5 Výsledky

### 5.1 Pre-test NaCl

#### 5.1.1 Chování NaCl ve volné vodě

Před zahájením pre-testu NaCl byla ve všech sledovaných kádinkách konduktivita téměř stejná, a to s hodnotou 400  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Po aplikaci roztoku látky hodnoty prudce vyskočily nahoru (na trojnásobek až čtyřnásobek původní úrovně) s tím, jak se zvedla koncentrace soli v systému. Po 8 hodinách se koncentrace soli již snížila kvůli ředění „čistou“ vodou dodávanou do PFT systému: tento pokles (v průměru o 66,3-68,1 % napříč všemi kádinkami) odhalilo i měření konduktivity. V čase 24 hodin od aplikace kontaminantu NaCl hodnoty dále poklesly, tentokrát méně výrazněji (o 9,5-17,9 %). Na konci 48hodinového měření se již konduktivita dostala na úroveň blízkou počátečním kontrolním podmínkám (viz tab. 2).

Tab. 2. Měření konduktivity (průměr;  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) ve volné vodě během pre-testu NaCl

Typ kádinky / Čas odběru	-2 h	0 h	8 h	24 h	48 h
W	400	1452	463	419	408
C	400	1506	507	416	406
O	401	1383	463	412	407

#### 5.1.2 Reakce mlžů na působení NaCl – přímá metoda

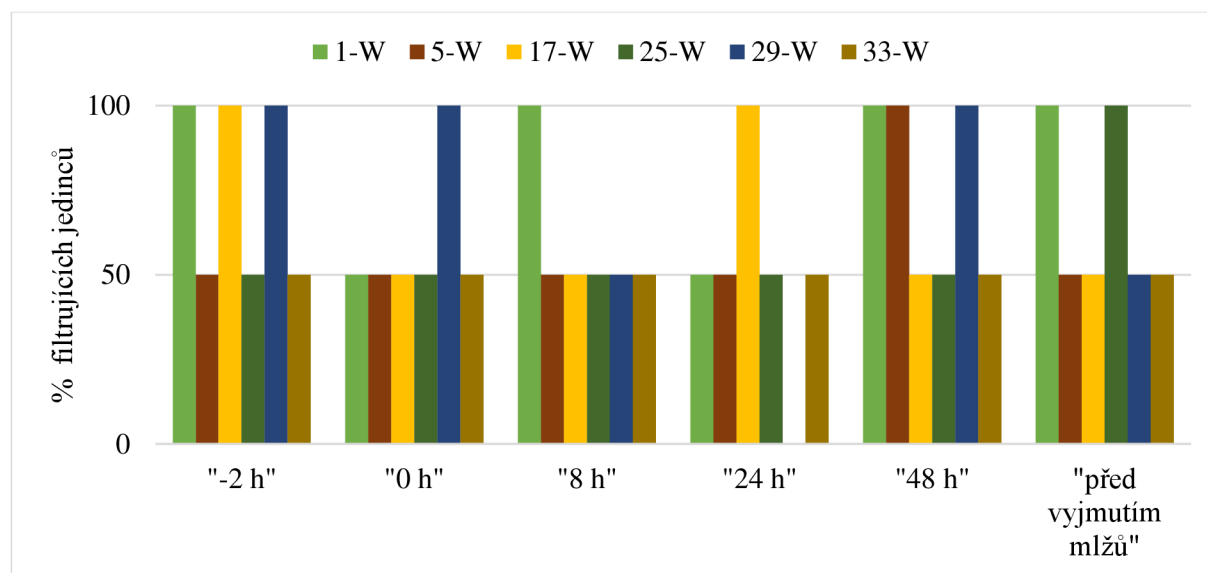
Na obr. 2 (viz str. 26) je možné vidět, že před aplikací roztoku NaCl plně filtrovali oba jedinci *S. woodiana* v jedné polovině kádinek, zatímco v té druhé polovině filtroval vždy jen jeden z nich. Těsně po aplikaci látky již měli 100% filtrační aktivitu jen jedinci v kádince č. 29. Po dalších 8 hodinách experimentu plně mlži filtrovali stále pouze v jedné kádince, tentokrát však č. 1. Za 24 hodin se situace mírně změnila: zatímco v kádince č. 29 nefiltroval ani jeden z mlžů, naopak vzrostla aktivita v kádince č. 17. 48 hodin po aplikaci NaCl se filtrační aktivita mlžů již zvýšila tak, že opět plně filtrovali mlži přesně v polovině počtu hodnocených kádinek. Před vyjmutím mlžů se situace opět mírně změnila: oba mlži projevovali filtrační aktivitu ve dvou kádinkách, kdežto v těch zbylých byl podíl filtrujících 50 %. Při celkovém hodnocení tedy platí, že reakce mlžů na přítomnost přidaného NaCl nastala téměř okamžitě po aplikaci látky. S prodlužující se dobou expozice pak míra filtrace zase stoupala.

Při analýze skupin „2P“ nebyl rozdíl ve filtrační aktivitě druhu *S. woodiana* statisticky významný (chí-kvadrát test,  $p = 0,20$ ). To samé se týkalo skupin „3P“ (chí-kvadrát test,  $p = 0,06$ ), nicméně v tomto případě se hodnota velmi přiblížila zvolené hladině 0,05.

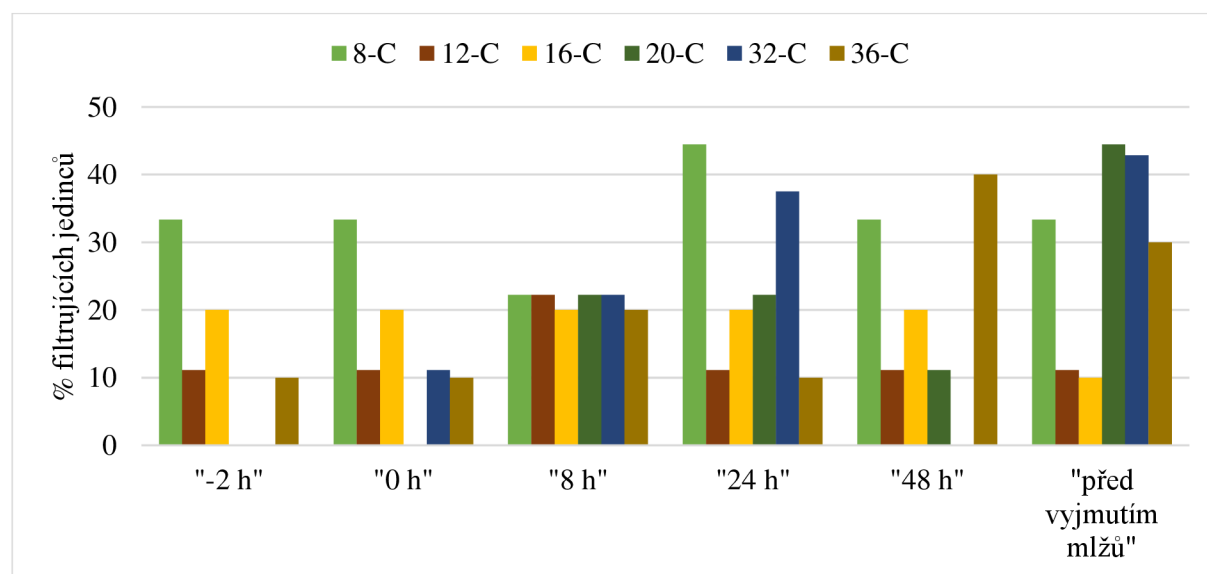
Na obr. 3 (viz str. 26) je vidět, jak se postupně měnila filtrační aktivita druhu *C. fluminea* před a po aplikaci NaCl. Z grafu vyplývá, že před aplikací látky byla aktivita mlžů poměrně nízká. Při prvním sledování po aplikaci látky se filtrační aktivita zvýšila pouze v kádince č. 32, ve všech ostatních zůstaly hodnoty nezměněny. Po 8 hodinách nastal významný nárůst počtu filtrujících jedinců v kádinkách č. 12, 20, 32 a 36, naopak v kádince č. 8 došlo k poklesu. 24 hodin po aplikaci byl zaznamenán nárůst filtrační aktivity mlžů v kádinkách č. 8 a 32, pokles

v tomto časovém okně nastal u kádinek č 12 a 36. Za 48 hodin se hodnoty v kádinkách č. 8 a 12 vrátily na původní úroveň před aplikací. Mlži v kádince č. 20 snížili svou aktivitu oproti předchozímu záznamu a v kádince č. 32 přestali úplně filtrovat. V tomto čase nastal jediný významný nárůst aktivity, a to u kádinky č. 36. Těsně před ukončením experimentu byli mlži v kádinkách č. 8 a 12 stále na své původní hodnotě, naopak pokles dosud stálé filtrační aktivity se projevil u mlžů v kádince č. 16. Oproti hodnotám před aplikací si významně polepšili mlži v kádinkách č. 20, 32 a 36. Při pohledu na popisovaný graf jako na celek je zřejmé, že již před aplikací NaCl mlži příliš nefiltrovali: těsně po aplikaci se začala aktivita zvyšovat, a to se víceméně udrželo až do konce pre-testu.

V tomto případě pro skupiny „2P“ i „3P“ platilo, že rozdíl ve filtrační aktivitě druhu *C. fluminea* nebyl ani zdaleka statisticky významný (chí-kvadrát test,  $p = 1,00$ ; resp.  $p = 0,94$ ). Při zohlednění zahrabaných jedinců (skupiny „2PS“ a „3PS“) byla situace obdobná (chí-kvadrát test,  $p = 1,00$ ; resp.  $0,27$ ).



Obr. 2. Filtrační aktivita jedinců druhu *S. woodiana* při působení NaCl (pozorování)



Obr. 3. Filtrační aktivita jedinců druhu *C. fluminea* při působení NaCl (pozorování)

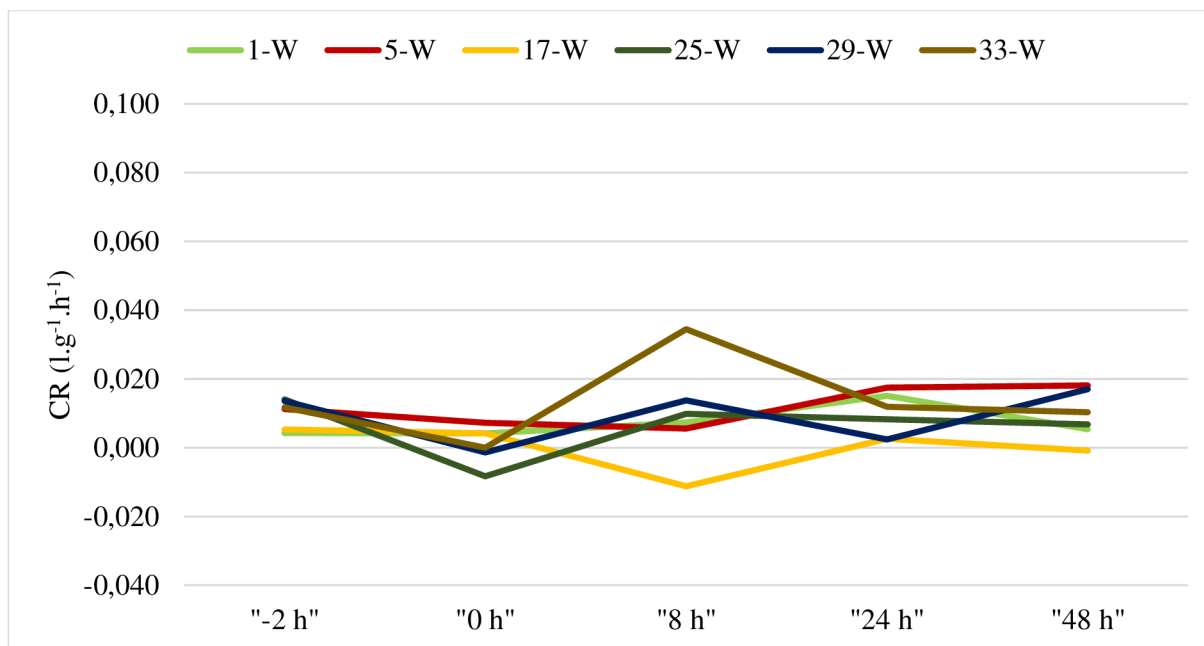
### 5.1.3 Reakce mlžů na působení NaCl – nepřímá metoda

Na obr. 4 (viz str. 28) je viditelný vývoj „clearance rate“ (CR) po aplikaci NaCl do kádinek s mlží *S. woodiana*. Před zahájením pre-testu byly hodnoty CR vesměs na podobně nízké úrovni (do  $0,020 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Těsně po aplikaci roztoku nastal pokles filtrační aktivity u všech kádinek. Po 8 hodinách od začátku experimentu došlo k dalšímu snížení CR u mlžů v kádinkách č. 5 a 17. Naopak jedinci, kteří v tento čas svou aktivitu výrazně zvýšili, byli v beakerech č. 25, 29 a 33 (zde až skoro na úroveň  $0,040 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Ve zbývajících kádince také nastalo zvýšení hodnot CR, ovšem nebylo tak zřetelné jako v ostatních případech. 24 hodin po aplikaci látky se CR opět zvýšilo v kádinkách č. 1, 5 a 17, naopak snížení bylo zřetelné u mlžů v kádinkách č. 17, 25 a 33. Při posledním měření 48 hodin po aplikaci látky bylo zřejmé, že se CR ve všech kádinkách vrátilo na původní úroveň před startem pre-testu. Zvýšení CR bylo zachyceno pouze u jedinců v kádince č. 29. Při pohledu na graf jako celek vidíme výrazný pokles aktivity po aplikaci roztoku soli: v průběhu procesu ředění došlo ke strmému nárůstu hodnot CR a později k jejich ustálení. Lze také vidět odlišnou reakci jedinců, kdy v čase 8 hodin po aplikaci látky byly zaznamenány jak nejvyšší, tak nejnižší hodnoty CR v průběhu celého experimentu.

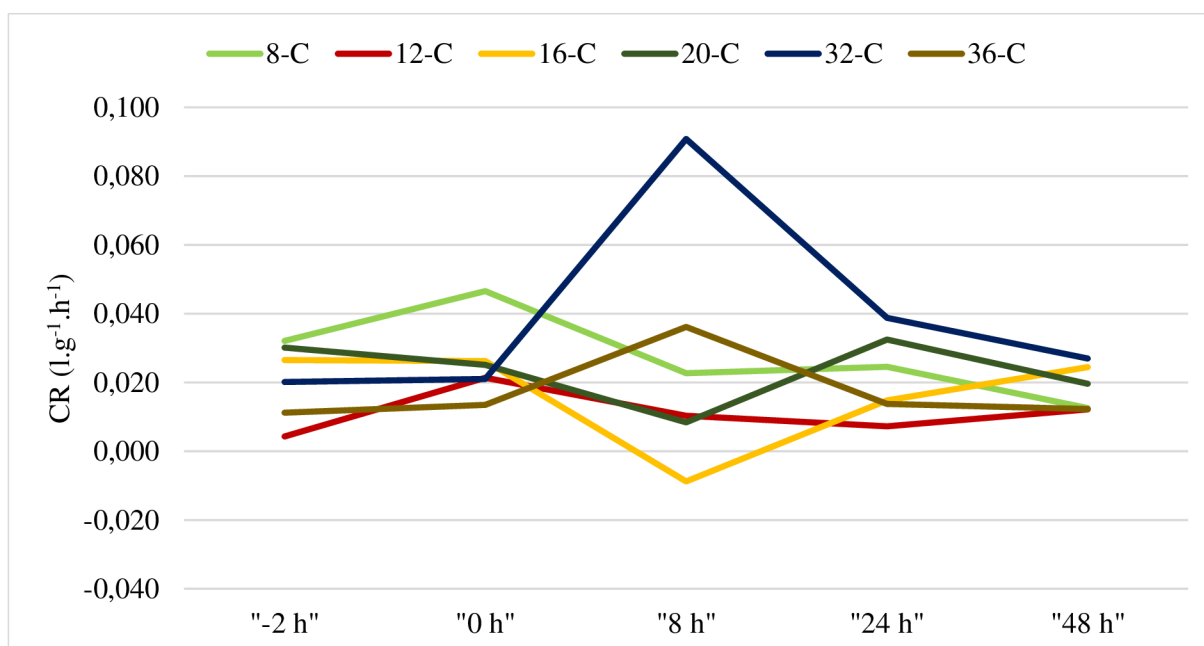
Těsně po aplikaci NaCl byla průměrná hodnota parametru CR v kádinkách s mlží *S. woodiana* rovna  $0,001 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , po uplynutí 48 hodin se zvýšila na úroveň  $0,009 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Jak ukázala statistická analýza, rozdíly nejsou významné (párový t-test,  $p = 0,06$ ), p-hodnota se však velmi blíží hladině 0,05.

Na obr. 5 (viz str. 28) je viditelný vliv NaCl na mlže druhu *C. fluminea*. Před startem experimentu se hodnoty CR držely na nízké až mírně zvýšené úrovni (do  $0,040 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Těsně po aplikaci roztoku kontaminantu mlží v kádinkách č. 8 a 12 zvýšili svou aktivitu, u ostatních jedinců se CR výrazněji nezměnilo a setrvalo víceméně na původní úrovni. Po uplynutí 8 hodin lze vidět, že mlží v kádince č. 32 byli výrazně aktivní z hlediska jejich filtrace (hodnoty CR dosáhly až úrovně  $0,090 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Méně zřetelné navýšení bylo zachyceno i u jedinců v kádince č. 36. U dalších čtyř kádinek naopak došlo k výraznému poklesu filtrační aktivity organismů. 24 hodin po aplikaci NaCl se CR zvýšilo v případě kádinek č. 8, 16 a 20, zatímco snížení hodnot se týkalo kádinek č. 12, 32 (zde filtrační aktivita strmě poklesla oproti předchozímu času) a 36. Ke konci experimentu (48 hodin po aplikaci kontaminantu) se CR opět ustálilo na hodnotách do  $0,040 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Při pohledu na graf jako celek opět platí, že 8 hodin po aplikaci látky někteří mlží svou aktivitu zvýšili a jiní naopak snížili s tím, že ke konci pre-testu se hodnoty CR začaly vracet na původní úroveň.

V případě mlžů druhu *C. fluminea* průměrná hodnota parametru CR po aplikaci NaCl dosahovala  $0,026 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , kdežto za 48 hodin se snížila na  $0,018 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Rozdíl mezi oběma časovými okny opět nebyl statisticky významný (párový t-test,  $p = 0,24$ ).



Obr. 4. Filtrační aktivita jedinců druhu *S. woodiana* při působení NaCl („clearance rate“)



Obr. 5. Filtrační aktivita jedinců druhu *C. fluminea* při působení NaCl („clearance rate“)



## 5.2 Pre-test NaNO<sub>3</sub>

### 5.2.1 Chování NaNO<sub>3</sub> ve volné vodě

V případě zjednodušeného hodnocení chování dusičnanů pomocí konduktivity (viz tab. 3) lze vidět, že před zahájením pre-testu se hodnoty pohybovaly okolo 400  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Těsně po vstupu kontaminantu do kádinek měření ukázalo mírné zvýšení hodnot (šlo o 1,3násobek počátečních kontrolních měření). Za dalších 8 hodin se konduktivita opět snížila při poklesu obsahu kontaminantu v PFT systému (v průměru o 22,9-26,6 %). Po uplynutí 24, resp. 48 hodin od aplikace roztoku se hodnoty prakticky neměnily a setrvaly mírně nad úrovní 400  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

Tab. 3. Měření konduktivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) ve volné vodě během pre-testu NaNO<sub>3</sub>

Typ kádinky / Čas odběru	-2 h	0 h	8 h	24 h	48 h
W	399	557	409	406	411
C	401	553	415	412	411
O	402	532	410	410	411

Hodnoty NO<sub>3</sub>-N stanovené pomocí spektrofotometru v omezeném počtu (viz tab. 4) odpovídají výše uvedenému hodnocení chování látky NaNO<sub>3</sub> v kádinkách. Koncentrace se před aplikací roztoku pohybovaly okolo 5 až 6 mg/l. Těsně po vstupu kontaminantu došlo ke strmému nárůstu hodnot přesahujících až 20 mg/l. Poslední měření po 48 hodinách experimentu odhalila, že koncentrace se vzhledem k ředění obsahu kádinek vrátily na původní úroveň (5,5 mg/l).

Tab. 4. Měření dusičnanového dusíku NO<sub>3</sub>-N (mg/l) ve volné vodě během pre-testu NaNO<sub>3</sub>

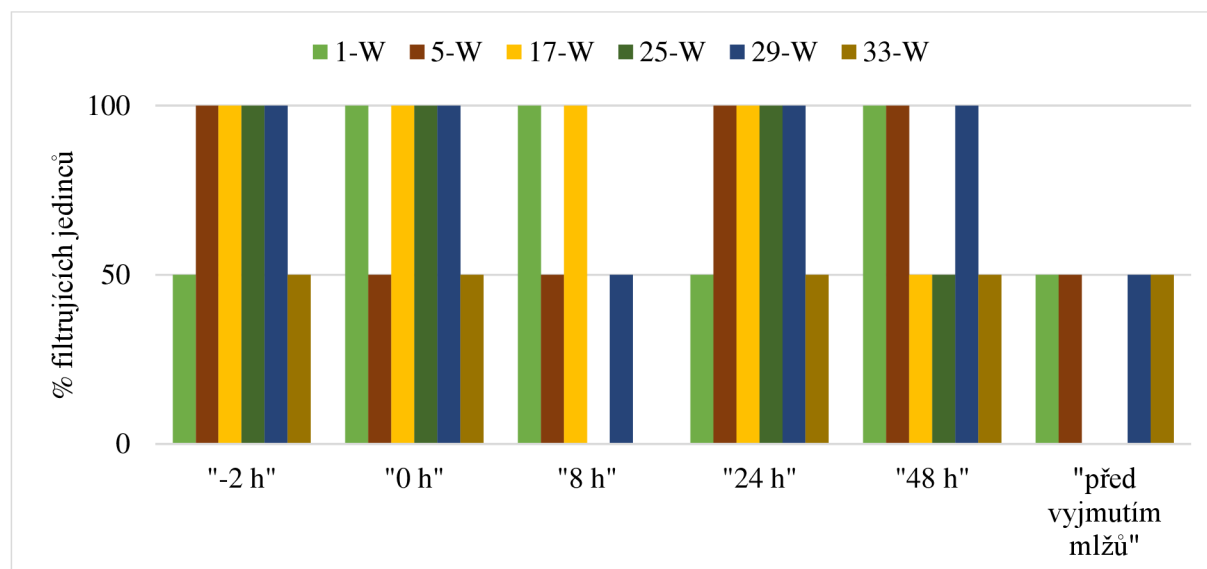
Typ kádinky / Čas odběru	-2 h	0 h	8 h	24 h	48 h
W	5,1	19,3	-	-	5,4
C	5,5	20,3	-	-	5,5
O	5,7	16,6	-	-	5,6

### 5.2.2 Reakce mlžů na působení NaNO<sub>3</sub> – přímá metoda

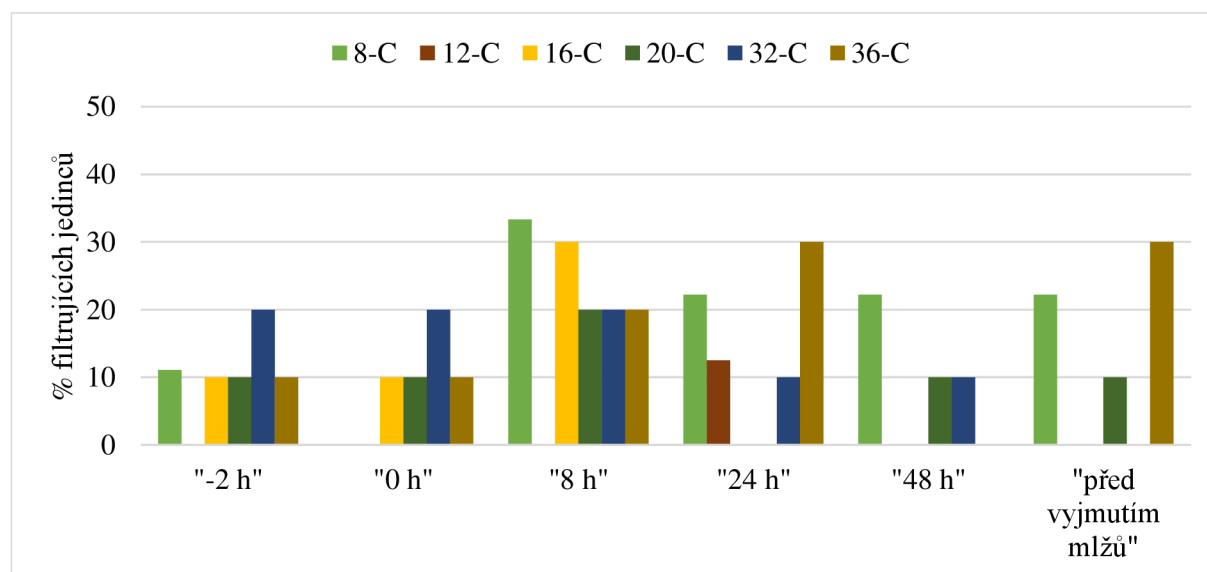
Na obr. 6 (viz str. 30) je možné vidět, jak mlži druhu *S. woodiana* reagovali na aplikaci látky NaNO<sub>3</sub>. Je zřejmé, že před zahájením pre-testu filtrovali všichni jedinci ve dvou třetinách počtu kádinek. Těsně po aplikaci látky nastaly dvě změny, kdy mlži v kádince č. 5 omezili svou filtrační aktivitu, naopak mlži v kádince č. 1 ji navýšili na 100 %. Po 8 hodinách plně filtrovali mlži v kádinkách č. 1 a 17, jen z poloviny byli aktivní mlži v kádinkách č. 5 a 29. Úplně pak přestali filtrovat jedinci v kádinkách č. 25 a 33. Po 24 h. od aplikace roztoku kontaminantu byl stav na stejné úrovni jako před zahájením experimentu. Za dalších 24 hodin (tj. 48 h. po aplikaci látky) zvýšili svou filtraci mlži v kádince č. 1, snížení aktivity se projevilo v kádinkách č. 17 a 25. Před vyjmutím mlžů ze systému nastal výrazný pokles filtrační aktivity v pěti ze šesti hodnocených kádinek: vůbec nefiltrovali jedinci v kádinkách č. 17 a 25, v těch ostatních byla aktivita jedinců omezena pouze na 50 %. Při celkovém pohledu lze spatřit, že před aplikací

NaNO<sub>3</sub> byla filtrační aktivita na vysoké úrovni. Těsně po aplikaci se víceméně držela na stejné úrovni, pak nastal pokles a po 24 h. zase přišlo prudké zvýšení aktivity. Počet filtrujících jedinců přitom výrazněji klesl ještě před úplným koncem experimentu.

Při hodnocení druhu *S. woodiana* nebyl rozdíl ve filtrační aktivitě statisticky významný ani pro skupiny „2P“ (chí-kvadrát test,  $p = 0,61$ ) ani „3P“ (chí-kvadrát test,  $p = 0,69$ ).



Obr. 6. Filtrační aktivita jedinců druhu *S. woodiana* při působení NaNO<sub>3</sub> (pozorování)



Obr. 7. Filtrační aktivita jedinců druhu *C. fluminea* při působení NaNO<sub>3</sub> (pozorování)

Na obr. 7 je vyobrazen vliv látky NaNO<sub>3</sub> na mlže druhu *C. fluminea*. Před zahájením pre-testu můžeme vidět, že v kádinkách č. 8, 16, 20 a 36 filtrovalo 10 % jedinců. Mlži v kádince č. 32 měli vyšší míru aktivity (20 %), zatímco v kádince č. 12 nefiltrovali vůbec. Těsně po aplikaci roztoku kontaminantu přestali mlži v kádince č. 8 úplně filtrovat a připojili se tak k mlžům v kádince č. 12. Ve všech ostatních kádinkách zůstal v tuto dobu stav nezměněn. Po uplynutí 8 hodin nastal zásadní nárůst filtrační aktivity v kádinkách č. 8 a 16, kde hodnoty

přesahovaly až 30 %. Dále narostla aktivita i v kádinkách č. 20 a 36 (na úroveň 20 %). Jedinými mlži, kteří v tuto hodinu nefiltrovali, byli stále mlži v kádince č. 12. 24 hodin po aplikaci úplně přestali filtrovat mlži v kádinkách č. 16 a 20. Pokles aktivity nastal i u kádinek č. 8 a 32, nárůst byl zaznamenán u mlžů v kádinkách č. 12 a 36. Za dalších 24 h. se situace opět změnila: v kádinkách č. 12 a 36 se totiž filtrační aktivita mlžů snížila (až na 0 %), naopak vzrůst nastal v kádince č. 20 (ve zbývajících kádinkách pak zůstala aktivita na stejné úrovni). Těsně před ukončením experimentu byla filtrační aktivita jedinců v kádince č. 8 ustálena na hodnotě 22 %, v kádince č. 20 pak na hodnotě 10 %. Mlži ve třech kádinkách přitom nefiltrovali vůbec, kdežto výrazně se zvedla míra filtrační aktivity v kádince č. 36 (až na 30 %). Během pohledu na graf jako na celek, lze vidět, že přítomnost  $\text{NaNO}_3$  nejprve jedince druhu *C. fluminea* inhibovala jen minimálně. Po 8 hodinách přišel nárůst filtrační aktivity, po kterém opět následoval prudký pokles: až do konce experimentu se již mlži nebyli schopni zotavit.

Použitím statistických analýz bylo i u druhého sledovaného druhu mlže zjištěno, že rozdíl ve filtrační aktivitě nebyl významný (skupina „2P“: chí-kvadrát test,  $p = 0,27$ ; skupina „3P“: chí-kvadrát test,  $p = 0,10$ ). Nicméně pro „3P“ se daná  $p$ -hodnota přiblížila hladině 0,05. Při zohlednění mlžů v sedimentu již byla situace méně příznivá z hlediska průkaznosti rozdílů (skupina „2PS“: chí-kvadrát test,  $p = 0,35$ ; skupina „3PS“: chí-kvadrát test,  $p = 0,38$ ).

### 5.2.3 Reakce mlžů na působení $\text{NaNO}_3$ – nepřímá metoda

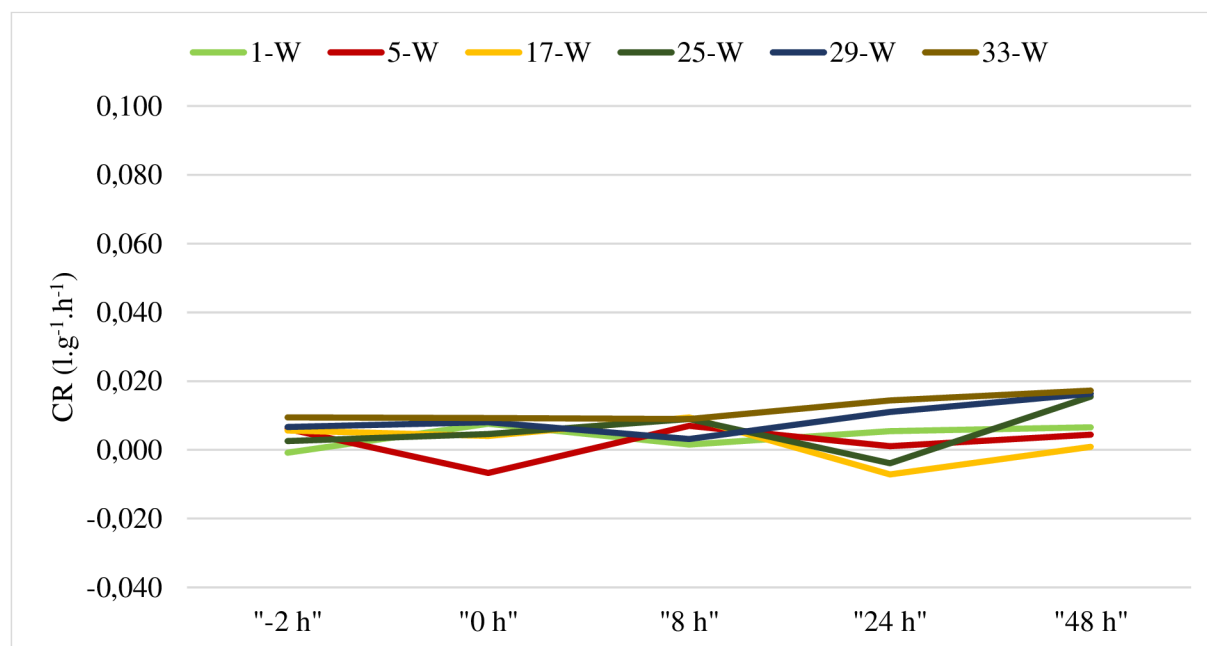
Na obr. 8 (viz str. 32) lze vidět vliv působení  $\text{NaNO}_3$  na mlže *S. woodiana*. Na první pohled nejsou zřejmé žádné výrazné změny filtrační aktivity organismů. Když se však zaměříme na jednotlivé kádinky, zjistíme, že před zahájením druhého pre-testu se hodnoty CR dosahovaly nejvýše úrovně  $0,009 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Po aplikaci roztoku látky došlo k poklesu aktivity mlžů v kádince č. 5, naopak zvýšení bylo zachyceno v kádince č. 1. U ostatních kádinek se hodnoty prakticky vůbec nezměnily. Po 8 hodinách bylo zřejmé, že ve všech kádinkách se CR pohybovalo v rozsahu hodnot jako před aplikací kontaminantu. Po uplynutí 24 hodin se opět filtrační aktivita jedinců výrazněji proměnila: zatímco v kádinkách č. 5, 17 a 25 bylo zaznamenáno snížení, nárůst se týkal zbývajících tří kádinek. Na konci 48hodinového pre-testu se hodnoty CR ve všech kádinkách vrátily na původní úroveň jako před startem experimentu. Přitom mlži v kádinkách č. 29 a 33 zvyšovali aktivitu průběžně s ředěním kontaminované vody.

Zatímco po aplikaci  $\text{NaNO}_3$  byla průměrná hodnota CR v kádinkách s druhem mlžů *S. woodiana* na úrovni  $0,004 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , po dalších 48 hodinách se zvýšila na  $0,010 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Ačkoli rozdíly nebyly statisticky významné (párový  $t$ -test,  $p = 0,08$ ),  $p$ -hodnota byla velmi blízká hodnotě 0,05.

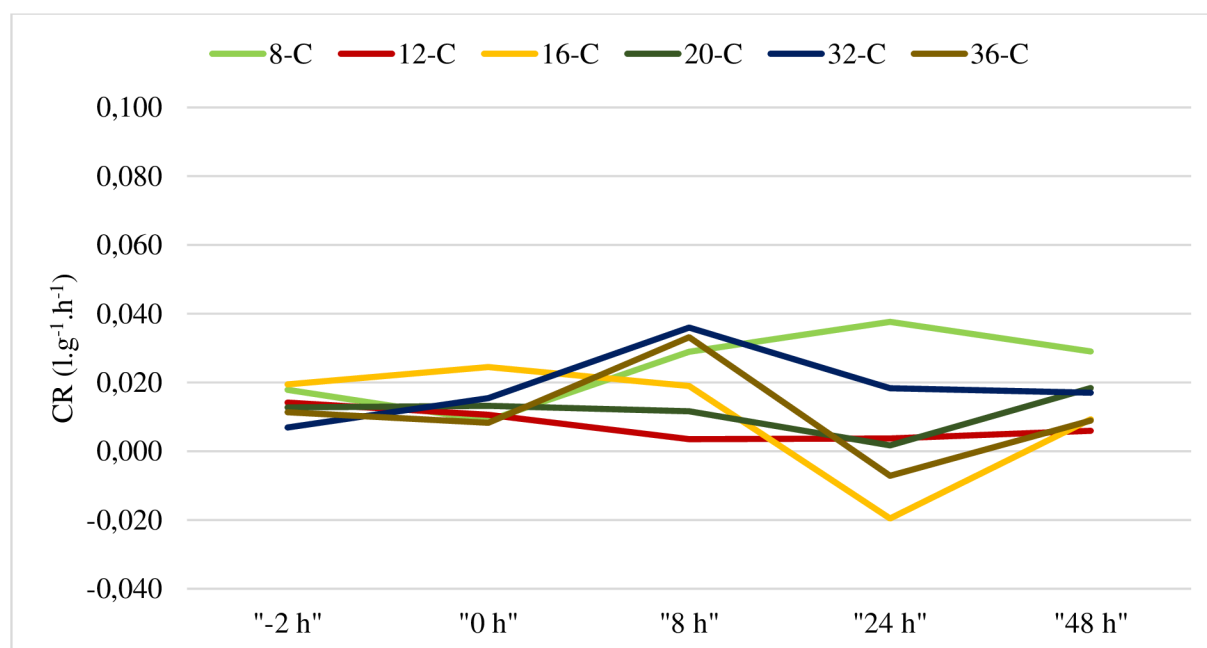
Na obr. 9 (viz str. 32) je vyobrazen vliv  $\text{NaNO}_3$  na „clearance rate“ mlžů *C. fluminea*. Před zahájením pre-testu byly hodnoty CR opět nízké s maximem  $0,020 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Těsně po vstupu látky do PFT systému lze vidět mírný pokles hodnot u mlžů v kádinkách č. 8 a 36, naopak k růstu hodnot došlo u jedinců v kádinkách 16 a 32. O osm hodin později se filtrační aktivita výrazněji změnila: mlži v kádinkách č. 8, 32 a 36 byli aktivnější než v předchozím časovém okně (hodnoty se blížily až  $0,040 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), kdežto v dalších kádinkách byla zaznamenána snížená míra filtrace. Po 24 hodinách experimentu se hodnoty dále diverzifikovaly. Ve většině kádinek nastal pokles aktivity, výjimkou byli pouze mlži v kádince č. 8. Na konci pre-testu se hodnoty CR vrátily na úroveň na počátku. To se netýkalo jedinců ve

zmiňované kádince č. 8, kde nadále přetrvávala zvýšená míra filtrace. Při pohledu na graf jako celek lze vidět, že ačkoli na začátku pre-testu byly hodnoty CR relativně stálé, v průběhu experimentu začaly výrazněji kolísat s maximálními rozsahy hodnot po 24 h. od aplikace látky. Poté se již zase pomalu ustalovaly a vracely se zpět k hodnotám v prvních časových oknech pre-testu.

Hodnota CR v přítomnosti druhu *C. fluminea* po aplikaci  $\text{NaNO}_3$  dosahovala  $0,013 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , kdežto po uplynutí 48 h. se nepatrně zvýšila na  $0,015 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Statistické hodnocení odhalilo, že rozdíly nebyly významné (párový t-test,  $p = 0,80$ ).



Obr. 8. Filtrační aktivita jedinců druhu *S. woodiana* při působení  $\text{NaNO}_3$  („clearance rate“)



Obr. 9. Filtrační aktivita jedinců druhu *C. fluminea* při působení  $\text{NaNO}_3$  („clearance rate“)

## 5.3 Test CBZ

### 5.3.1 Chování CBZ ve volné vodě

Měření koncentrací CBZ na omezeném množství vzorků volné vody ukázalo, že před zahájením testu se hodnoty pohybovaly pod 2 ng/l (mez detekce). Po aplikaci roztoku léčiva se koncentrace CBZ výrazně zvýšila na úroveň dosahující několika tisíců ng/l (jednotek µg/l). Po uplynutí 48 hodin tohoto experimentu se naměřené koncentrace opět přiblížily stavu na začátku testu (viz tab. 5).

Tab. 5. Měření karbamazepinu CBZ (ng/l) ve volné vodě během testu CBZ

Typ kádinky / Čas odběru	-2 h	0 h	8 h	24 h	48 h
W	< 2	5730,1	-	-	12,5
C	< 2	5345,5	-	-	5,6
O	< 2	5062,8	-	-	3,5

### 5.3.2 Reakce mlžů na působení CBZ – přímá metoda

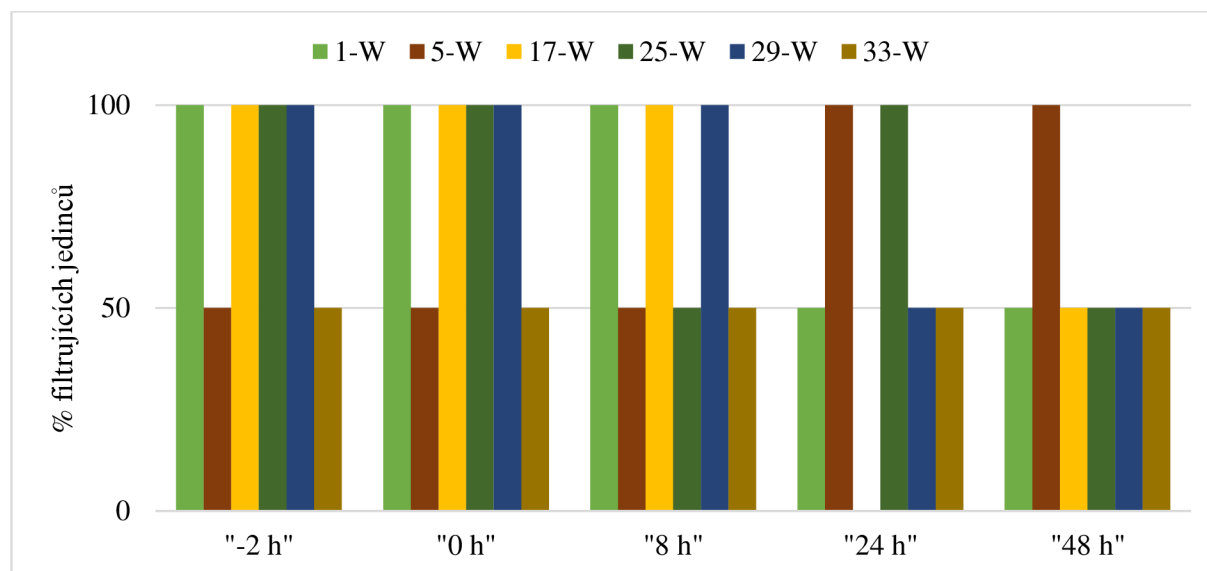
Obr. 10 (viz str. 34) znázorňuje situaci, kdy byl použit karbamazepin v kombinaci s mlži *S. woodiana*. Je vidět, že jak před startem testu, tak i po aplikaci CBZ se úroveň filtrační aktivity nezměnila. První změny lze pozorovat až po 8 hodinách, a to pouze v kádince č. 25, kde došlo k poklesu aktivity ze 100 na 50 %. Výraznější změna nastala po 24 hodinách po aplikaci roztoku cílového kontaminantu, kdy došlo ke snížení počtu filtrujících mlžů na polovinu v kádinkách č. 1 a 29. V jedné kádince dokonce přestali filtrovat oba dva jedinci. Naopak k nárůstu aktivity došlo v kádinkách č. 5 a 25, a to z 50 na 100 %. Při posledním záznamu mlžů (po uplynutí 48 hodin) lze vidět, že 100 % filtrační aktivitu vyvinuli jedinci *S. woodiana* pouze v kádince č. 5. Ve všech zbývajících kádinkách probíhala filtrace jen na úrovni 50 %. Kádinka č. 33 se vymyká tím, že aktivita zdejších mlžů se v průběhu sledování nezměnila. V tomto grafu tedy nejprve není pozorován žádný rozdíl před a po aplikaci CBZ – následně došlo k mírnému poklesu, který se postupně stává výraznějším až do ukončení experimentu.

V tomto případě byla k dispozici data jen pro skupinu „2P“. Rozdíl ve filtrační aktivitě nebyl stejně jako u pre-testů statisticky významný (chí-kvadrát test,  $p = 0,59$ ).

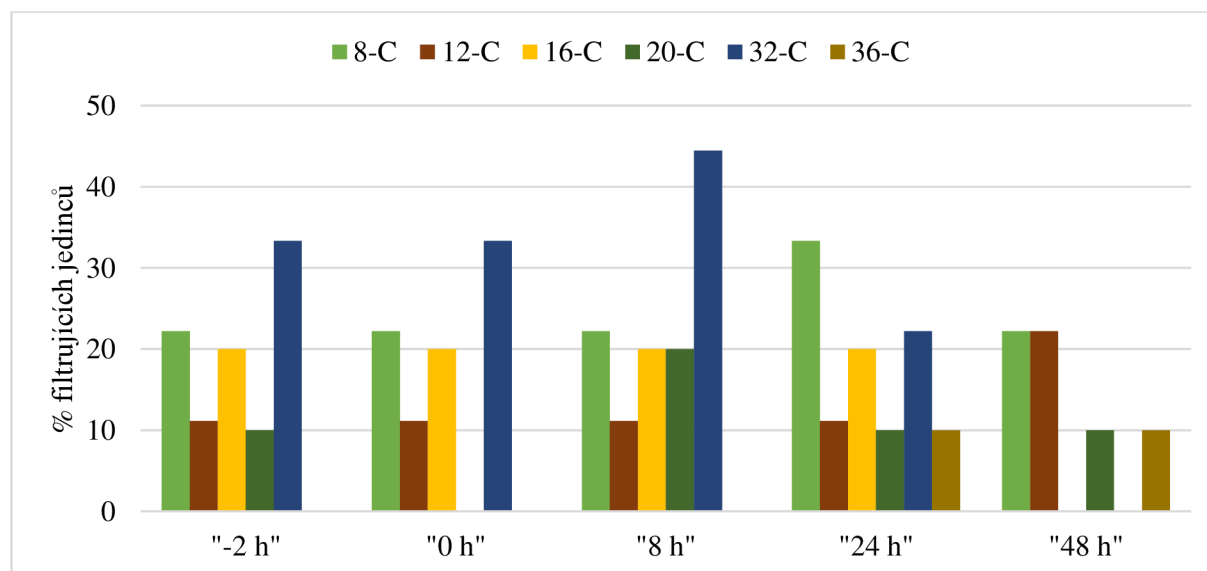
Na obr. 11 (viz str. 34) je patrné, jak na karbamazepin reagoval druh *C. fluminea*. V kádinkách č. 8, 12, 16 a 32 zůstaly hodnoty filtrační aktivity před i těsně po aplikaci látky na stejné úrovni. Jediná změna vzhledem k přítomnosti CBZ nastala v kádince č. 20, kde jedinci zcela přestali filtrovat. Po uplynutí 8 hodin zástupci druhu v kádinkách č. 8, 12 a 16 stále drželi stejnou úroveň filtrační aktivity jako v předchozích časových oknech. Změny v tomto čase nastaly u mlžů v kádince č. 20, kde jedinci začali opět filtrovat, a také v kádince č. 32 (zde aktivita přesáhla hodnotu 40 %). 24 hodin od aplikace kontaminantu nastal mírný pokles filtrační aktivity mlžů. K nárůstu došlo pouze v kádinkách č. 8 a 36 (ve druhé uvedené kádince přitom do té doby vůbec mlži nefiltrovali). Těsně před ukončením experimentu (v čase 48 h.) lze vidět výrazný pokles v aktivitě jedinců v kádinkách č. 8, 16 a 32. Na stejné filtrační úrovni se drželi mlži ve dvou kádinkách (č. 20 a 36), naopak svou aktivitu zvýšili ve zbývajících kádince.

Při celkovém pohledu na situaci s CBZ je jasně vidět, že po aplikaci cílového kontaminantu se aktivita mlžů mírně snížila, kdežto po uplynutí 8 hodin byla míra filtrace nejvyšší a s délkou expozice pak klesala až do konce experimentu.

Stejně jako u druhu *S. woodiana*, i zde bylo možné vyhodnocovat pouze data pro skupinu „2P“, resp. „2PS“. Rozdíly ve filtrační aktivitě opět nebyly statisticky významné, jak dokládají výsledky testové statistiky (chí-kvadrát test,  $p = 0,44$ ; resp.  $p = 0,28$ ).



Obr. 10. Filtrační aktivita jedinců druhu *S. woodiana* při působení CBZ (pozorování)



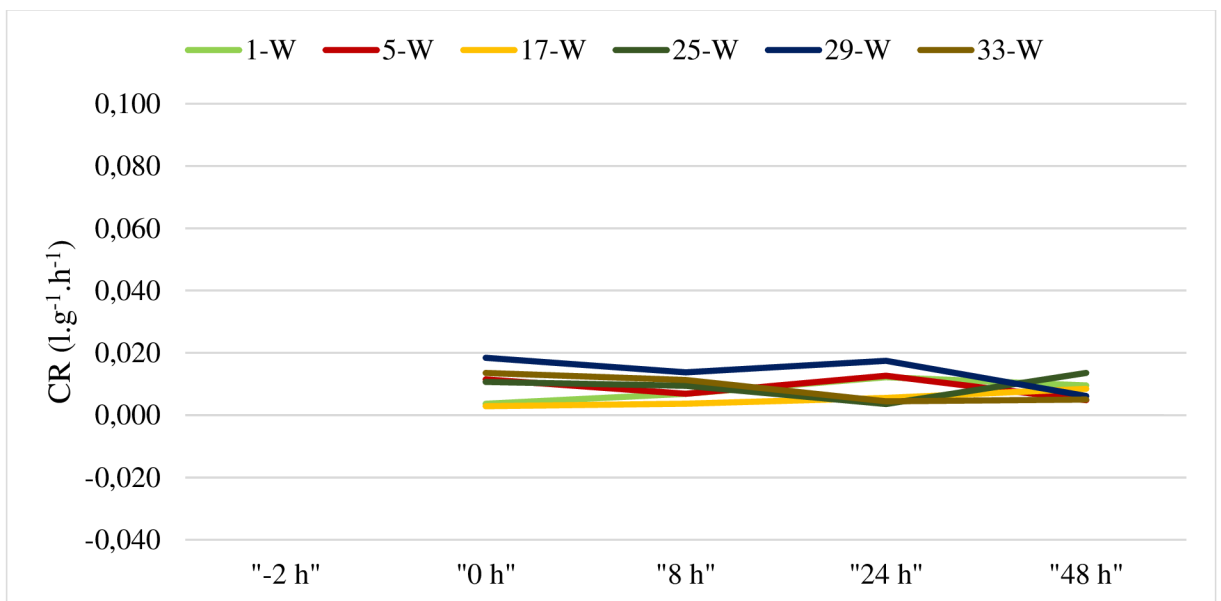
Obr. 11. Filtrační aktivita jedinců druhu *C. fluminea* při působení CBZ (pozorování)

### 5.3.3 Reakce mlžů na působení CBZ – nepřímá metoda

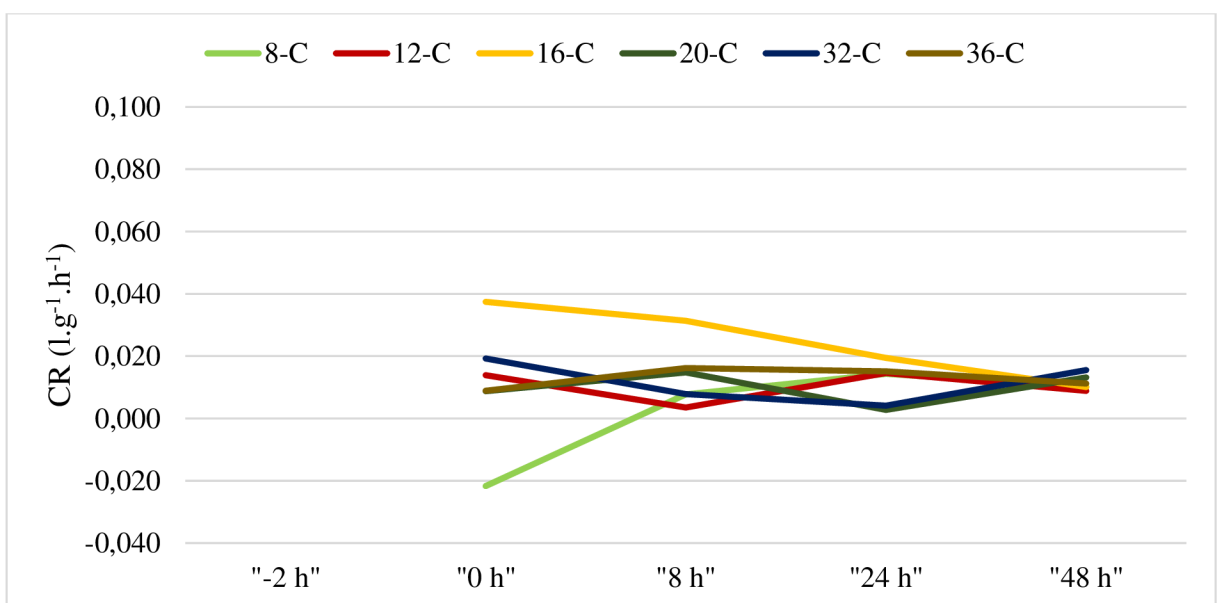
Na obr. 12 (viz str. 35) je viditelný vliv karbamazepinu na „clearance rate“ mlžů *S. woodiana*. V tomto případě nebyly k dispozici naměřené hodnoty turbidity před startem testu, tudíž ani vypočtené hodnoty CR. Těsně po vstupu léčiva do kádínek se filtrační aktivita mlžů držela na podobné úrovni (s nejvyššími hodnotami dosahujícími  $0,020 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Po dalších osmi

hodinách se tato situace téměř nezměnila, pouze u některých kádinek došlo k nepatrnému poklesu CR. 24 hodin po aplikaci CBZ se filtrační aktivita mírně zvýšila u jedinců v kádinkách 1, 5, 17 a 29, kdežto ve zbývajících případech poklesla. Na konci 48hodinového experimentu se vývoj obrátil, avšak hodnoty CR se dále držely v příslušném rozmezí ( $0,000-0,020 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Při pohledu na graf jako na celek lze vidět, že po aplikaci CBZ byly hodnoty CR relativně stálé. Později v průběhu experimentu nastal mírný pokles aktivity, přičemž po 24 h. u některých jedinců došlo k dalšímu poklesu, u jiných zase k nárůstu. Bližší charakteristice chování léčiva brání absenci kontrolních měření.

V případě aplikace CBZ do kádinek s druhem *S. woodiana* byla hodnota CR těsně po vstupu rovna  $0,010 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , za dalších 48 hodin se nepatrně snížila na  $0,008 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Rozdíly opět nebyly statisticky významné (párový t-test,  $p = 0,53$ ).



Obr. 12. Filtrační aktivita jedinců druhu *S. woodiana* při působení CBZ („clearance rate“)



Obr. 13. Filtrační aktivita jedinců druhu *C. fluminea* při působení CBZ („clearance rate“)

Na obr. 13 (viz str. 35) opět chybí kontrolní měření před zahájením testu, je zde však vidět vývoj CR po přidání CBZ do prostředí s výskytem *C. fluminea*. Po aplikaci roztoku léčiva byly zřejmé výrazné rozdíly filtrační aktivity mlžů v jednotlivých kádinkách. Nejnížší hodnoty CR byly zjištěny v kádince č. 8, zatímco mlži v kádince č. 16 byli velice aktivní z hlediska filtrace (CR se blížilo úrovni  $0,040 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Po osmi hodinách došlo k mírnému vyrovnání uvedených rozdílů napříč kádinkami. Při zkoumání jednotlivých kádinek bylo zaznamenáno obnovení aktivity mlžů v kádince č. 8, přičemž v dalších dvou kádinkách se hodnoty CR také zvýšily. Jedinci v kádinkách č. 12, 16 a 32 naopak vykazovali sníženou filtrační aktivitu. Po uplynutí 24 hodin od aplikace kontaminantu se variabilita hodnot parametru CR nadále snižovala. Mlži v kádinkách č. 16, 20 a 32 mírně snížili svou aktivitu, kdežto v ostatních případech došlo buď k mírnému nárustu, nebo stagnaci CR. Po 48 hodinách se již hodnoty CR prakticky nelišily, kdy se pohybovaly okolo  $0,015 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Ačkoli není známo, jak zástupci druhu *C. fluminea* byli aktivní při filtraci před experimentem, většina kádinek s mlži vykazovala proměnlivé hodnoty CR během celého experimentu (kromě kádinky č. 16, kde se aktivita jedinců neustále v čase snižovala).

Při přítomnosti CBZ v kádinkách s mlži *C. fluminea* byla hodnota CR těsně po aplikaci rovna  $0,011 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , po 48hodinovém testu se prakticky nezměnila ( $0,012 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Rozdíly tedy opět nebyly statisticky významné (párový t-test,  $p = 0,96$ ).



## 6 Diskuze

### 6.1 Mlži a CBZ

Pro sledování vlivu kontaminantů na chování vodních organismů byl zvolen karbamazepin, jako běžně se vyskytující mikropolutant ve vodním prostředí s potenciálními nepříznivými účinky na filtrační aktivitu mlžů. Mezi typické zástupce této skupiny organismů patří dva invazní druhy *S. woodiana* a *C. fluminea*. Před vlastním experimentem s CBZ byly provedeny pre-testy, využívající NaCl a NaNO<sub>3</sub> pro určení vhodné frekvence odběrů vzorků. V rámci experimentu nebyl zaznamenán statisticky významný vliv studovaných látek na aktivitu experimentálních mlžů, ale přesto bylo možné pozorovat určité trendy v ovlivnění filtrační aktivity, které jsou níže diskutovány.

U pre-testu, v němž byla využita látka NaCl, byly při hodnocení přímé metody (P) zjištěny rozdílné reakce mezi oběma druhy mlžů. Zatímco *S. woodiana* snižovala účinnost filtrace hlavně během prvních 24 hodin po aplikaci, *C. fluminea* naopak svoji aktivitu zvýšila. Určitý nárůst byl patrný zejména po 8 hodinách. Ke konci 48hodinového experimentu se filtrační aktivita jedinců *C. fluminea* stále zvyšovala. Je možné, že po snížení koncentrace látky vlivem ředění jsou zástupci tohoto druhu schopni rychleji reagovat na zlepšení podmínek v prostředí. Toto bylo naznačeno i nepřímou metodou (N) s větší variabilitou výsledných hodnot jak pro *S. woodiana*, tak pro *C. fluminea*. Pro druhý druh byla během experimentu zjištěna vysoká hodnota CR, nicméně to bylo spíše způsobeno technickou závadou, jako např. ucpanou hadičkou pro přívod suspenze. V takovém případě by byl chybou zatížen i následný výpočet. Doměnkou je, že důvodem, proč měla *S. woodiana* menší účinnost filtrace i druhý den po aplikaci látky, může být fakt, že po uzavření sifonů omezila svou aktivitu a vyčkávala do doby, než koncentrace látky poklesne na úroveň, která by pro ni byla přijatelná. V tomto případě mlž nemá žádný vliv na snižování koncentrace látky – ta byla vyředňována dodáváním nové nekontaminované vody. Ke konci experimentu se již látka v kádinkách vyskytovala pouze v nepatrném množství.

Při využití pre-testu NaNO<sub>3</sub> a metody P bylo zřejmé, že na mlže *S. woodiana* látka významně nepůsobila a nevýrazný účinek se objevil až před koncem testu. U druhu *C. fluminea* došlo nejdříve ke zvýšení filtrační aktivity a následně k jejímu poklesu: z této situace je tedy zřejmé, že látka oba druhy mlžů významně neovlivnila. Jedinci *C. fluminea* mohli snášet přítomnost NO<sub>3</sub>-N hůře než mlži *S. woodiana*, což vyplývá i z hodnocení druhé metody N. Obě metody přinášejí shodné výsledky především při pohledu na začátek a konec experimentu.

Při vlivu kontaminace prostředí karbamazepinem za využití metody P opět výsledky neprokázaly signifikantní účinek látky. Výkyvy hodnot byly zaznamenány u druhu *C. fluminea*, zatímco u mlže druhu *S. woodiana* se vyskytovaly až delší dobu po kontaminaci. Hodnocení pomocí metody N se lišilo zejména pro *S. woodiana*, protože v tomto případě byly hodnoty i delší dobu po kontaminaci velice podobné těm na začátku. Odchylna mezi metodami mohla být způsobena tím, že metoda P zahrnovala data pouze v čase, ve kterém jsme mlže pozorovali: některý jedinec mohl být ovlivněn v důsledku neúmyslné disturbance v čase záznamu pozice mlžů v kádinkách. Metoda N zahrnovala delší časový interval, kdy se měření turbidity provádělo 30 minut po dávkování suspenze, a tak byly zahrnuty veškeré děje, které se během tohoto časového úseku vyskytly.

Vzhledem k pozorovaným účinkům léčiva na oba druhy mlžů lze konstatovat, že karbamazepin se z hlediska vlivu na filtrační aktivitu mlžů choval spíše jako  $\text{NaNO}_3$  než  $\text{NaCl}$ . Obě látky přitom nevykazovaly signifikantní vliv na filtrační aktivitu jedinců, i když zde byly určité změny naznačeny, především u jedinců druhu *C. fluminea*.

V provedeném experimentu nebylo prokázáno, že znečišťující látky působí na mlže omezením filtrační aktivity, ale nemusí tomu tak být u všech kontaminantů, koncentrací, příp. mlžů. Zástupci různých druhů reagují na přítomnost kontaminantů různým způsobem. Chen et al. (2014) prováděli experiment, během něhož využívali koncentraci karbamazepinu  $0,5 \mu\text{g/l}$  a sledovali jeho vliv na filtrační aktivitu mlžů *C. fluminea*. Stejně jako během zde provedeného experimentu negativní vliv nebyl prokázán – ten autoři prokázali až při stonásobném zvýšení koncentrace. Vliv CBZ na filtrační aktivitu mlžů *C. fluminea* sledovali také Baali & Cosio (2022) s využitím koncentrace  $50 \mu\text{g/l}$  po dobu 30 dní. Během tohoto experimentu prokázali výrazné snížení filtrační aktivity, což mohlo být způsobeno jak vysokou koncentrací, tak i tím, že experiment probíhal mnohem delší dobu oproti tomu našim podmínkám. Dalším z faktorů, který mohl mít vliv na reakci mlžů, byl použitý systém. V laboratorních experimentech se totiž často využívají neměnné podmínky, jimž jsou mlži vystaveni (Chen et al. 2014), tudíž koncentrace látky v prostředí zůstává víceméně stejná. Experimentální PFT systém v důsledku přítoku nové vody a suspenze je přitom daleko bližší skutečným podmínkám.

## 6.2 Mlži a léčiva

Jak již bylo popsáno, nejen karbamazepin je schopen ovlivňovat filtrační aktivitu mlžů. Na další léčiva se zaměřila práce Gilroy et al. (2014), kdy byli sladkovodní mlži druhu *Lampsilis siliquoidea* vystaveni účinkům moxifloxacinu (antibiotikum; MOX), rosuvastatinu (regulátor lipidů; RSV) a drospirenonu (regulátor hormonální úrovně; DRS). Vliv na filtrační aktivitu organismů měly především MOX a RSV. MOX byl schopen při koncentracích  $10 \text{ mg/l}$  snížit filtrační aktivitu mlžů na 51 % a při  $100 \text{ mg/l}$  dokonce pouze na 17 %, a to již během prvního týdne experimentu. V následujících dvou týdnech tato hodnota klesla při  $100 \text{ mg/l}$  až na 6 %. RSV během prvního týdne účinek nevykázal, ovšem během dvou dalších týdnů při koncentraci  $10 \text{ mg/l}$  snížil filtrační aktivitu na 51 % a při nejvyšší koncentraci  $100 \text{ mg/l}$  na 34 %. Cauty et al. (2009) sledovali reakci mořského mlže druhu *Mytilus edulis* na přítomnost cyklofosfamidu (lék na léčbu rakovinu; CP). Během 7denního experimentu prokázali, že CP je schopen ovlivňovat rychlost filtrační účinnosti při jakékoliv použité koncentraci ( $18, 32$  a  $56 \text{ mg/l}$ ). Negativní účinky na rychlost filtrační aktivity mlžů jinou farmaceuticky aktivní sloučeninou zjistili také Peters a Granek (2016), kteří se zabývali vlivem fluoxetinu (antidepresant) na mořského mlže druhu *Mytilus californianus*. Bylo prokázáno, že daná látka může snižovat úroveň míry filtrace organismů již při velice nízkých koncentracích ( $0,3\text{-}300 \text{ ng/l}$ ), pokud působí dostatečně dlouhou dobu. Projevil se zde zřetelný rozdíl v odstraňování řas z vodního sloupce mezi kontrolní a kontaminovanou skupinou mlžů. 67 dní od začátku experimentu autoři pozorovali snížení čirosti vody ve všech nádržích při koncentraci látky  $300 \text{ ng/l}$ , čímž prokázali narušení „clearance rate“ mlžů. Je tedy zřejmé, že každá látka je schopna ovlivňovat živé organismy při různých koncentracích: některé látky musí pro detekci nepříznivých účinků dosahovat relativně vysokých hodnot, zatímco u jiných stačí naprosté minimum. To potvrzuje, že některé látky mohou mít negativní vliv na chování mlžů, i když jich

ve vodách zatím není mnoho. V experimentu provedeném pro tuhle BP jsme při koncentraci CBZ v řádu jednotek  $\mu\text{g/l}$  nezjistili výrazný negativní účinek působení látky, nicméně inovativní podmínky provádění testů (tj. environmentálně blízké hodnoty zatížení a jejich snižování vlivem ředění během relativně krátkého času) simulující reálné situace v terénu lze jen obtížně srovnávat s dosud využívanými postupy.

Svoji roli mohou hrát i různé vývojové fáze mlžů. Gilroy et al. (2017) se snažili zjistit během experimentu provedeného za pomoci léčiv amitriptylin, sertralin (oba patří mezi antidepresanty) a iopamidol (kontrastní látka využívaná při zkoumání těla pomocí rentgenu), jak jsou tyto látky schopny ovlivnit mlže *L. siliquoidea*. Autoři pracovali s jedinci v larválním stádiu, dále s juvenilními a také dospělými jedinci. Zkoumaná léčiva v environmentálně relevantních koncentracích neměla toxické účinky, nicméně glochidie a juvenilní mlži byli citlivější na jejich přítomnost ve vodě. Míra odstraňování řas pro juvenilní jedince byla vyhodnocena jako nejcitlivější endpoint:  $\text{EC}_{50}$  (koncentrace způsobující ovlivnění 50 % jedinců) totiž dosahovala 0,1 mg/l pro amitriptylin, resp. 0,02 mg/l pro sertralin (platí pro 14- až 28denní sledování). Lze tedy říct, že juvenilní mlži byli nejcitlivějšími vývojovými stádii a znečištění prostředí se nich nejvíce podepisuje. Je tedy zřejmé, že záleží nejen na úrovni zatížení kontaminantů, ale i stáří organismů, které jsou jim vystaveni. Využití raných stádií vývoje mlžů by mohlo přinést odlišné výsledky oproti experimentu provedenému pro tuhle BP.

### 6.3 Mlži a kontaminanty

Změna filtrační aktivity mlžů byla sledována i po vlivu některých jiných látek, než jakými jsou farmaceuticky aktivní sloučeniny. Těmito látkami jsou například hnojiva, pesticidy, kovy a soli, na které se autoři zaměřili v práci Castro et al. (2018). V jejich experimentu bylo zkoumáno celkem devět látek, z nichž osm vedlo k uzavření sifonů mlžů *C. fluminea* a omezení jejich filtrační aktivity, přičemž obojí bylo přímo závislé na koncentraci látky v prostředí. Po přidání většiny kontaminantů tedy mlži snížili svou filtraci – až na dichlorvos (insekticid), který byl schopen mlže mírně stimulovat. Po jeho vstupu do vody nedošlo k uzavření sifonů mlžů: při příliš vysoké koncentraci také nebyla omezena filtrační aktivita organismů, ale nastal jejich úhyn. To potvrzuje naše domněnky, že ne všechny látky snižují rychlost filtrace. Bylo by jistě zajímavé zkombinovat kontaminaci dichlorvosem a karbamazepinem a sledovat, jestli bude dominovat účinek karbamazepin či nikoliv.

Možnost využití „clearance rate“ jako endpointu při testování toxicity prostředí s velkými mlži z čeledi Unionidae (kam patří i *S. woodiana*) blíže zkoumali Salerno et al. (2018). Autoři se snažili optimalizovat kvantifikaci filtrační kapacity a „clearance rate“ po expozici mlžů druhu *L. siliquoidea* vůči NaCl. Chloridy mohou kromě inhibice filtrace také omezit schopnost zahrabat se do sedimentu a v některých případech způsobit dokonce i úhyn jedinců. Bylo zjištěno, že hodnoty  $\text{EC}_x$  pro CR se významně nelišily ve srovnání s hodnocením přežití a hrabání mlžů. To je rozdíl oproti našim výsledkům, kdy schopnost hrabání ovlivněna nebyla, zatímco schopnost filtrovat ano. Nicméně koncentrace chloridů byly několikanásobně vyšší oproti našim podmínkám a mlži jim byli vystaveni 7 dní.

V případě dospělých jedinců je nutné uvažovat také jejich reprodukční stav, pokud se zkoumá reakce organismů na přítomnost kontaminantů (González-Fernández et al. 2016). Navíc některé druhy mlžů žijí v symbióze, což může hodnocení účinků znečištění dále ztížit.

Caro et al. (2015) sledovali filtrační aktivitu mlže *Ruditapes decussatus*, který využívá jako potravu částice ve vodním sloupci i v sedimentu, a symbiotického druhu *Loripes lecteus*. Mlži byli umístěni přímo ve svém prostředí na třech stanovištích s gradientem znečištění několika kovy, a autoři během několikadenního experimentu měřili bioakumulaci kovů v měkkých tkáních mlžů a jejich filtrační aktivitu. Zjistili přitom, že symbiotické druhy nejsou vhodné pro sledování vlivu znečištění kovy a upozornili na význam umístění druhů v trofické síti. I tato skutečnost by měla být zohledněna v budoucím výzkumu účinků kontaminantů na chování filtrujících organismů ve vodním prostředí.

## 7 Závěr

- V rešeršní práci provedené pro tento experiment došlo ke shrnutí komplexní problematiky kontaminace životního prostředí se zaměřením na sladkovodní mlže.
- Některé studované látky se sice v současné době nenacházejí v tak vysokých koncentracích, aby dokázaly negativně přímo ovlivnit organismy včetně člověka, ale jejich dlouhodobý a chronický efekt by neměl být zanedbán. V případě, že koncentrace nadále porostou, mohly by tyto látky významně ovlivňovat i mlže a následně organismy vyšších potravních úrovní, jakými mohou být například ryby či obojživelníci. Ovlivnění mlžů spočívá i v tom, že jsou vystaveni toxickým látkám jak rozpuštěným ve vodním sloupci, tak vázaným v potravě, což vede k akumulaci těchto látek v organismu.
- V bakalářské práci byly použity koncentrace relevantní pro životní prostředí, které nebyly schopny významně ovlivnit vybrané invazní druhy mlžů (*Sinanodonta woodiana*, *Corbicula fluminea*).
- Cíle bakalářské práce byly naplněny, nicméně koncentrace relevantní v životním prostředí byly příliš nízké na to, aby způsobily výraznější omezení filtrační aktivity.
- Výsledky by mohly být využity pro další experimenty spojené s negativním vlivem kontaminantů. Směry, kterými by se mohly tyto práce ubírat, jsou například experimenty s větším počtem mlžů, aby data obsahovala širší skupinu a tím pádem by bylo zohedněno různé niance mezi organismy. Dále by bylo dle mého názoru možné kontaminovat CBZ naše původní druhy mlžů, protože jak je známo, ty nejsou tolik odolné jako invazní, kteří byli použiti v našem experimentu. Navíc je zde možnost přidávat do vodního prostředí různé směsi kontaminantů, protože v životním prostředí se také nevyskytuje pouze jedna sloučenina, nýbrž hned několik najednou. Další směr, kterým by bylo zajímavé zaměřit pozdější experimenty, je sledování, jak by právě CBZ nebo i jiné kontaminanty ovlivnily různá vývojová stádia mlžů. Na místě by bylo taktéž vystavit mlže látkám i po delší časový horizont, protože by nastala delší chronická expozice a účinky by se mohly projevit až po delší době.
- V praxi je možné výsledky z této práce využít například na ČOV, kde by mlži mohli být zařazeni do terciárního stupně čištění odpadních vod. V tomto případě by vychytávali znečišťující látky farmaceutického původu a mohli by tudíž fungovat jako "lapače". Bylo by to výhodné z hlediska nízkých pořizovacích nákladů. Tyto náklady by byly nízké především z důvodu, že invazní druhy mlžů jsou schopny produkovat nemalou biomasu, a kolonizovat tak poměrně velká území. Dále je výhodou i vysoká odolnost těchto organismů vůči různým typům znečištění.

## 8 Literatura

- Aguirre-Martínez GV, DelValls AT, Martín-Díaz ML. 2015. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **120**:142-154.
- Almeida Â, Calisto V, Esteves VI, Schneider RJ, Soares AMVM, Figueira E, Freitas R. 2014. Presence of the pharmaceutical drug carbamazepine in coastal systems: Effects on bivalves. *Aquatic Toxicology* **156**:74-87.
- Almeida Â, Freitas R, Calisto V, Esteves VI, Schneider RJ, Soares AMVM, Figueira E. 2015. Chronic toxicity of the antiepileptic carbamazepine on the clam *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **172-173**:26-35.
- Almeida Â, Calisto V, Domingues MRM, Esteves VI, Schneider RJ, Soares AMVM, Figueira E, Freitas R. 2017. Comparison of the toxicological impacts of carbamazepine and a mixture of its photodegradation products in *Scrobicularia plana*. *Journal of Hazardous Materials* **323**:220-232.
- Almeida Â, Soares AMVM, Esteves VI, Freitas R. 2021. Occurrence of the antiepileptic carbamazepine in water and bivalves from marine environments: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 86 (103661) DOI: 10.1016/j.etap.2021.103661.
- Almeida Â, Calisto V, Esteves VI, Schneider RJ, Soares AMVM, Freitas R. 2022. Responses of *Ruditapes philippinarum* to contamination by pharmaceutical drugs under ocean acidification scenario. *Science of the Total Environment* 824 (153591) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153591.
- Arumugam A, Li J, Krishnamurthy P, Jia ZX, Leng Z, Ramasamy N, Du D. 2020. Investigation of toxic elements in *Carassius gibelio* and *Sinanodonta woodiana* and its health risk to humans. *Environmental Science and Pollution Research* **27**:19955-19969.
- Bai X, Acharya K. 2017. Algae-mediated removal of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) from Lake Mead water. *Science of the Total Environment* **581-582**:734-740.
- Baali H, Cosio C. 2022. Effects of carbamazepine in aquatic biota. *Environmental Science: Processes & Impacts* **24**:209-220.
- Baratange C, et al. 2022. Metabolic, cellular and defense responses to single and co-exposure to carbamazepine and methylmercury in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution* 300 (118933) DOI: 10.1016/j.envpol.2022.118933.
- Batucan NSP, Tremblay LA, Northcott GL, Matthaei CD. 2022. Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. *Environmental Advances* 7 (100164) DOI: 10.1016/j.envadv.2021.100164.
- Beggel S, Hinzmann M, Machado J, Geist J. 2017. Combined impact of acute exposure to ammonia and temperature stress on the freshwater mussel *Unio pictorum*. *Water* 9 (455) DOI: 10.3390/w9070455.
- Beran L. 2018. Slávička mnohotvárná – náš nejstarší přistěhovalec mezi mlži. *Živa* **5**:255.

- Bolotov IN, Bespalaya YV, Gofarov MY, Kondakov AV, Konopleva ES, Vikhrev IV. 2016. Spreading of the Chinese pond mussel, *Sinanodonta woodiana*, across Wallacea: One or more lineages invade tropical islands and Europe. *Biochemical Systematics and Ecology* **67**:58-64.
- Brandts I, Teles M, Gonçalves AP, Barreto A, Franco-Martinez L, Tvarijonaviciute A, Martins MA, Soares AMVM, Tort L, Oliveira M. 2018. Effect of nanoplastics on *Mytilus galloprovincialis* after individual and combined exposure with carbamazepine. *Science of the Total Environment* **643**:775-784.
- Calisto V, Domingues MRM, Erny GL, Esteves VI. 2011. Direct photodegradation of carbamazepine followed by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry. *Water Research* **45**:1095-1104.
- Canty MN, Hutchinson TH, Brown RJ, Jones MB, Jha AN. 2009. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: Differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology* **94**:68-76.
- Caro A, Chereau G, Briant N, Roques C, Freydier R, Delpoux S, Escalas A, Elbaz-Poulichet F. 2015. Contrasted responses of *Ruditapes decussatus* (filter and deposit feeding) and *Loripes lacteus* (symbiotic) exposed to polymetallic contamination (Port-Camargue, France). *Science of the Total Environment* **505**:526-534.
- Castro BB, Silva C, Macário IPE, Oliveira B, Gonçalves F, Pereira JL. 2018. Feeding inhibition in *Corbicula fluminea* (O. F. Müller, 1774) as an effect criterion to pollutant exposure: Perspectives for ecotoxicity screening and refinement of chemical control. *Aquatic Toxicology* **196**:25-34.
- Chander V, Sharma B, Negi V, Aswal RS, Singh P, Singh R, Dobhal R. 2016. Pharmaceutical compounds in drinking water. *Journal of Xenobiotics* **6** (5774) DOI: 10.4081/xeno.2016.5774.
- Chen H, Zha J, Liang X, Li J, Wang Z. 2014. Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Aquatic Toxicology* **155**:1-8.
- Contardo-Jara V, Lorenz C, Pflugmacher S, Nützmann G, Kloas W, Wiegand C. 2011. Exposure to human pharmaceuticals carbamazepine, ibuprofen and bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* **105**:428-437.
- Coughlan J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology* **2**:356-358.
- Couto CF, Lange LC, Amaral MCS. 2018. A critical review on membrane separation processes applied to remove pharmaceutically active compounds from water and wastewater. *Journal of Water Process Engineering* **26**:156-175.
- Couto CF, Lange LC, Amaral MCS. 2019. Occurrence, fate and removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) in water and wastewater treatment plants – A review. *Journal of Water Process Engineering* **32** (100927) DOI: 10.1016/j.jwpe.2019.100927.

- Cravo A, Silva S, Rodrigues J, Cardoso VV, Benoliel MJ, Correia C, Coelho MR, Rosa MJ, Almeida CMM. 2022. Understanding the bioaccumulation of pharmaceutical active compounds by clams *Ruditapes decussatus* exposed to a UWWTP discharge. *Environmental Research* 208 (112632) DOI: 10.1016/j.envres.2021.112632.
- Crespo D, Dolbeth M, Leston S, Sousa R, Pardal MA. 2015. Distribution of *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in the invaded range: A geographic approach with notes on species traits variability. *Biological Invasions* 17:2087-2101.
- Diniz V, Reyes GM, Rath S, Cunha DGF. 2020. Caffeine reduces the toxicity of albendazole and carbamazepine to the microalgae *Raphidocelis subcapitata* (Sphaeropleales, Chlorophyta). *International Review of Hydrobiology* 105:151-161.
- Dobler AH, Hoos P, Geist J. 2022. Distribution and potential impacts of non-native Chinese pond mussels *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) in Bavaria, Germany. *Biological Invasions* (in press).
- dos Santos CR, Arcanjo GS, de Souza Santos LV, Koch K, Amaral MCS. 2021. Aquatic concentration and risk assessment of pharmaceutically active compounds in the environment. *Environmental Pollution* 290 (118049) DOI: 10.1016/j.envpol.2021.118049.
- Douda K, Vrtílek M, Slavík O, Reichard M. 2012. The role of host specificity in explaining the invasion success of the freshwater mussel *Anodonta woodiana* in Europe. *Biological Invasions* 14:127-137.
- Dudgeon D, et al. 2006. Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81:163-182.
- Dumas T, Courant F, Almunia C, Boccard J, Rosain D, Duporté G, Armengaud J, Fenet H, Gomez E. 2022. An integrated metabolomics and proteogenomics approach reveals molecular alterations following carbamazepine exposure in the male mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 286 (131793) DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131793.
- Dzierżyńska-Białończyk A, Jermacz L, Zielska Z, Kobak J. 2019. What scares a mussel? Changes in valve movement pattern as an immediate response of a byssate bivalve to biotic factors. *Hydrobiologia* 841:65-77.
- Escobar-Calderón JF, Chmíst-Sikorska J, Douda K. 2022. High-frequency video analysis extends beyond the capabilities of valvometry in acute behavioral disturbance detection in bivalves. *Ecological Indicators* 136 (108656) DOI: 10.1016/j.ecolind.2022.108656.
- Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* 317:207-233.
- Fontes MK, Maranhão LA, Pereira CDS. 2020. Review on the occurrence and biological effects of illicit drugs in aquatic ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research* 27:30998-31034.



- Franzellitti S, Balbi T, Montagna M, Fabbri R, Valbonesi P, Fabbri E, Canesi L. 2019. Phenotypical and molecular changes induced by carbamazepine and propranolol on larval stages of *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* **234**:962-970.
- Géba E, Rioult D, Palluel O, Dedourge-Geffard, Betoulle S, Aubert D, Bigot-Clivot A. 2021. Resilience of *Dreissena polymorpha* in wastewater effluent: Use as a bioremediation tool? *Journal of Environmental Management* **278** (111513) DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.111513.
- Gilbert TW, Sone ED. 2010. The byssus of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Spatial variations in protein composition. *Biofouling* **26**:829-836.
- Gilroy ÉAM, Klinck JS, Campbell SD, McInnis R, Gillis PL, de Solla SR. 2014. Toxicity and bioconcentration of the pharmaceuticals moxifloxacin, rosuvastatin, and drospirenone to the unionid mussel *Lampsilis siliquoidea*. *Science of the Total Environment* **487**:537-544.
- Gilroy ÉAM, Gillis PL, King LE, Bendo NA, Salerno J, Giacomini M, de Solla SR. 2017. The effects of pharmaceuticals on a unionid mussel (*Lampsilis siliquoidea*): An examination of acute and chronic endpoints of toxicity across life stages. *Environmental Toxicology and Chemistry* **36**:1572-1583.
- Gomes J, Matos A, Quinta-Ferreira RM, Martins RC. 2018. Environmentally applications of invasive bivalves for water and wastewater decontamination. *Science of the Total Environment* **630**:1016-1027.
- González-Fernández C, Albentosa M, Campillo JA, Viñas L, Franco A, Bellas J. 2016. Effect of mussel reproductive status on biomarker responses to PAHs: Implications for large-scale monitoring programs. *Aquatic Toxicology* **177**:380-394.
- Guo X, Feng C. 2018. Biological toxicity response of Asian clam (*Corbicula fluminea*) to pollutants in surface water and sediment. *Science of the Total Environment* **631-632**:56-70.
- Gutiérrez JL, Jones CG, Strayer DL, Iribarne OO. 2003. Mollusks as ecosystem engineers: the role of shell production in aquatic habitats. *Oikos* **101**:79-90.
- Hai FI, Yang S, Asif MB, Sencadas V, Shawkat S, Sanderson-Smith M, Gorman J, Xu ZQ, Yamamoto K. 2018. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in water: Occurrences, toxicological effects, regulations and removal by wastewater treatment technologies. *Water* **10** (107) DOI: 10.3390/w10020107.
- Horgan MJ, Mills EL. 1997. Clearance rates and filtering activity of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Implications for freshwater lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**:249-255.
- Iglesias JIP, Urrutia MB, Navarro E, Ibarrola I. 1998. Measuring feeding and absorption in suspension-feeding bivalves: an appraisal of the biodeposition method. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **219**:71-86.
- Jos A, Repetto G, Rios JC, Hazen MJ, Molero ML, del Peso A, Salguero M, Fernández-Freire P, Pérez-Martín JM, Cameán A. 2003. Ecotoxicological evaluation of carbamazepine

- using six different model systems with eighteen endpoints. *Toxicology in Vitro* **17**:525-532.
- Khan S, Nuashad M, Govarathanan M, Iqbal J, Alfadul SM. 2022. Emerging contaminants of high concern for the environment: Current trends and future research. *Environmental Research* 207 (112609) DOI: 10.1016/j.envres.2021.112609.
- Kolarević S, Knežević-Vukčević J, Paunović M, Kračun M, Vasiljević B, Tomović J, Vuković-Gačić B, Gačić Z. 2013. Monitoring of DNA damage in haemocytes of freshwater mussel *Sinanodonta woodiana* sampled from the Velika Moravia River in Serbia with the comet assay. *Chemosphere* **93**:243-251.
- K'oreje KO, Okoth M, Van Langenhove H, Demeestere K. 2020. Occurrence and treatment of contaminants of emerging concern in the African aquatic environment: Literature review and a look ahead. *Journal of Environmental Management* 254 (109752) DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.109752.
- Kosjek T, Andersen HR, Kompare B, Ledin A, Heath E. 2009. Fate of carbamazepine during water treatment. *Environmental Science and Technology* **43**:6256-6261.
- Kovacevic V, Simpson AJ, Simpson MJ. 2016. (1)H NMR-based metabolomics of *Daphnia magna* responses after sub-lethal exposure to triclosan, carbamazepine and ibuprofen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **19**:199-210.
- Kunz JL, Brunson EL, Barnhart MC, Glidewell EA, Wang N, Ingersoll CG. 2020. Pulsed flow-through auto-feeding beaker systems for the laboratory culture of juvenile freshwater mussels. *Aquaculture* 520 (734959) DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.734959
- Linares MS, Callisto M, Marques JC. 2017. Invasive bivalves increase benthic communities complexity in neotropical reservoirs. *Ecological Indicators* **75**:279-285.
- Louis F, et al. 2020. Seasonal monitoring of cellular energy metabolism in a sentinel species, *Dreissena polymorpha* (bivalve): Effect of global change? *Science of the Total Environment* 725 (138450) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138450.
- Lu G, Yang H, Xia J, Zong Y, Liu J. 2017. Toxicity of Cu and Cr nanoparticles to *Daphnia magna*. *Water, Air, and Soil Pollution* 228 (18) DOI: 10.1007/s11270-016-3206-3.
- Marescaux J, Falisse E, Lorquet J, Van Doninck K, Beisel JN, Descy JP. 2016. Assessing filtration rates of exotic bivalves: Dependence on algae concentration and seasonal factors. *Hydrobiologia* **777**:67-78.
- Meng Y, Li Z, Tan J, Li J, Wu J, Zhang T, Wang X. 2022. Oxygen-doped porous graphitic carbon nitride in photocatalytic peroxydisulfate activation for enhanced carbamazepine removal: Performance, influence factors and mechanisms. *Chemical Engineering Journal* 429 (130860) DOI: 10.1016/j.cej.2021.130860.
- Mezzelani M, Nardi A, Bernardini I, Milan M, Peruzza L, d'Errico G, Fattorini D, Gorbi S, Patarnello T, Regoli F. 2021. Environmental pharmaceuticals and climate change: The case study of carbamazepine in *M. galloprovincialis* under ocean acidification scenario. *Environment International* 146 (106269) DOI: 10.1016/j.envint.2020.106269.

- Mistry R, Ackerman JD. 2018. Flow, flux, and feeding in freshwater mussels. *Water Resources Research* **54**:7619-7630.
- Mohammadi M, Barák V, Escobar-Calderón F, Lamilla Tamayo L, Ranglová K, Douda K. 2022. Individual quantification of feeding and substrate effects on freshwater bivalve growth performance in a pulse flow-through system. *Aquaculture* (in prep.).
- Mohan H, Rajput SS, Jadhav EB, Sankhla MS, Sonone SS, Jadhav S, Kumar R. 2021. Ecotoxicity, occurrence, and removal of pharmaceuticals and illicit drugs from aquatic systems. *Biointerface Research in Applied Chemistry* **11**:12530-12546.
- Monaco P, Famiani F, La Iacona F. 2016. Bulldozing and resting traces of freshwater mussel *Anodonta woodiana* and substrate characteristics in lake-margin and river settings of Umbria, Italy. *Research in Paleontology and Stratigraphy* **122**:53-62.
- Mukhopadhyay A, Duttagupta S, Mukherjee A. 2022. Emerging organic contaminants in global community drinking water sources and supply: A review of occurrence, processes and remediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10 (107560) DOI: 10.1016/j.jece.2022.107560.
- Nardi A, Mezzelani M, Costa S, d'Errico G, Benedetti M, Gorbi S, Freitas R, Regoli F. 2022. Marine heatwaves hamper neuro-immune and oxidative tolerance toward carbamazepine in *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution* 300 (118970) DOI: 10.1016/j.envpol.2022.118970.
- Navon G, Novak L, Shenkar N. 2021 Proteomic changes in the solitary ascidian *Herdmania momus* following exposure to the anticonvulsant medication carbamazepine. *Aquatic Toxicology* 237 (105886) DOI: 10.1016/j.aquatox.2021.105886.
- Nkoom M, Lu G, Liu J, Yang H, Dong H. 2019. Bioconcentration of the antiepileptic drug carbamazepine and its physiological and biochemical effects on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **172**:11-18.
- Owens LB, Edwards WM, Van Keuren RW. 1984. Peak nitrate-nitrogen values in surface runoff from fertilized pastures. *Journal of Environmental Quality* **13**:310-312.
- Pal A, Yew-Hoong Gin K, Yu-Chen Lin A, Reinhard M. 2010. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment* **408**:6062-6069.
- Peters JR, Granek EF. 2016. Long-term exposure to fluoxetine reduces growth and reproductive potential in the dominant rocky intertidal mussel, *Mytilus californianus*. *Science of the Total Environment* **545-546**:621-628.
- Pouil S, Hills A, Mathews TJ. 2021. The effects of food quantity, light, and temperature on clearance rates in freshwater bivalves (Cyrenidae and Unionidae). *Hydrobiologia* **848**:675-689.
- Pruell RJ, Lake JL, Davis WR, Quinn JG. 1986. Uptake and depuration of organic contaminants by blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to environmentally contaminated sediment. *Marine Biology* **91**:497-507.

- Riisgård HU, Kittner C, Seerup DF. 2003. Regulation of opening state and filtration rate in filter-feeding bivalves (*Cardium edule*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*) in response to low algal concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **284**:105-127.
- Rivett MO, Cuthbert MO, Gamble R, Connon LE, Pearson A, Shepley MG, Davis J. 2016. Highway deicing salt dynamic runoff to surface water and subsequent infiltration to groundwater during severe UK winters. *Science of the Total Environment* **565**:324-338.
- Salerno J, Gillis PL, Bennett CJ, Sibley PK, Prosser RS. 2018. Investigation of clearance rate as an endpoint in toxicity testing with freshwater mussels (Unionidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **163**:165-171.
- Sousa R, Antunes C, Guilhermino L. 2008. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: An overview. *Annales de Limnologie – International Journal of Limnology* **44**:85-94.
- Sousa R, Gutiérrez JL, Aldridge DC. 2009. Non-indigenous invasive bivalves as ecosystem engineers. *Biological Invasions* **11**:2367-2385.
- Sousa R, Novais A, Costa R, Strayer DL. 2014. Invasive bivalves in fresh waters: Impacts from individuals to ecosystems and possible control strategies. *Hydrobiologia* **735**:233-251.
- Vaughn CC, Hakenkamp CC. 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology* **46**:1431-1446.
- Vernouillet G, Eullaffroy P, Lajeunesse A, Blaise C, Gagné F, Juneau P. 2010. Toxic effects and bioaccumulation of carbamazepine evaluated by biomarkers measured in organisms of different trophic levels. *Chemosphere* **80**:1062-1068.
- Wilkinson JL, et al. 2022. Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 119 (e2113947119) DOI: 10.1073/pnas.2113947119.
- Xia X, Huang C, Zhang D, Zhang Y, Xue S, Wang X, Zhang Q, Guo L. 2016. Molecular cloning, characterization, and the response of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase to PBDE-47 and -209 from the freshwater bivalve *Anodonta woodiana*. *Fish & Shellfish Immunology* **51**:200-210.
- Xie Z, Lu G, Yan Z, Liu J, Wang P, Wang Y. 2017. Bioaccumulation and trophic transfer of pharmaceuticals in food webs from a large freshwater lake. *Environmental Pollution* **222**:356-366.
- Xin X, Huang G, Liu X, An C, Yao Y, Weger H, Zhang P, Chen X. 2017. Molecular toxicity of triclosan and carbamazepine to green algae *Chlorococcum* sp.: A single cell view using synchrotron-based Fourier transform infrared spectromicroscopy. *Environmental Pollution* **226**:12-20.
- Zhang Y, Geißen SU, Gal C. 2008. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* **73**:1151-1161.
- Zhang W, Zhang M, Lin K, Sun W, Xiong B, Guo M, Cui X, Fu R. 2012. Eco-toxicological effect of carbamazepine on *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **33**:344-352.

Zhou C, Huang JC, Liu F, He S, Zhou W. 2018. Removal of selenium containing algae by the bivalve *Sinanodonta woodiana* and the potential risk to human health. *Environmental Pollution* **242A**:73-81.