

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Srovnání citlivosti reakcí perlooček (Daphnia) a vodních
plžů na zvolené toxikanty**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Jan Fechtner, Ph.D.

Autor práce: Josef Radechovský

2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Srovnání citlivosti reakcí perlooček (Daphnia) a vodních plžů na zvolené toxikanty“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Děkuji Ing. Janu Fechtnerovi, Ph.D. z Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedry zoologie a rybářství, za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování této diplomové práce.

Autorský referát

Cílem této práce je shromáždit dostupné informace o využití vodních živočichů pro ekotoxikologická hodnocení rizik environmentálních polutantů a zmínit výhody a nevýhody používání jednotlivých organismů v ekotoxikologii. Dále nastínit, jakým způsobem může být obsah jedovaté látky ve vodním prostředí pro vodní živočichy nebezpečný a vzájemně srovnat citlivost zvolených perspektivních živočichů, tedy plže *Potamopyrgus antipodarum* a standardně užívaných bezobratlých korýšů, perlooček *Daphnia magna*. Hypotéza byla, že vůči určitým toxikantům bude plž *Potamopyrgus antipodarum* výrazně citlivější než *Daphnia magna*. Tato domněnka vychází z odlišného způsobu života písečníka a absence vnější chitinózní kostry (Oehlmann, Schulte-Oehlmann, 2002).

V pokusu byli použiti jedinci vybraného plže pocházející ze zatopené pískovny ve středních Čechách. Testovaní jedinci perlooček byli odchováni za standardních podmínek v laboratoři. S těmito organismy byla provedena zkouška akutní toxicity na $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, která byla vyhodnocována po 24 a 48 hodinách. Po testu plže s měďnatou solí byl proveden regenerační pokus.

Výsledky celého biotestu naznačují, že citlivost tohoto druhu plže na znečištění mědí je zcela srovnatelné s citlivostí standardně používané perloočky. U testu se zinkem byla zaznamenána dokonce průkazně větší citlivost plže oproti perloočce. Dále byly pro oba testované organismy zaznamenány mnohonásobně vyšší toxické účinky v prostředí znečištěném mědí oproti zinku. $\text{EC}_{50_{48\text{h}}}$ byla stanovena u plže: $0,008 \text{ mg.l}^{-1}$ pro měď a $1,53 \text{ mg.l}^{-1}$ pro zinek. Pro perloočku byla $\text{EC}_{50_{48\text{h}}}$ stanovena: $0,008 \text{ mg.l}^{-1}$ pro měď a $\text{EC}_{50_{24\text{h}}}$ $9,23 \text{ mg.l}^{-1}$ pro zinek.

V pokusu se ukázala jako nejlépe hodnotitelná reakce plže (endpoint) ztráta pohyblivosti a neschopnost se přisát. Obě tyto reakce na intoxikaci kovy jsou srovnatelně citlivé. Imobilizaci je potřeba hodnotit nejdříve po 48 hodinách, vzhledem k tomu, že se plži po intoxikaci ještě nějakou dobu pohybují. Vlastní mortalitu tohoto živočicha však nelze dobře prokázat.

Zvolený druh plže je dostatečně citlivý a lze jej doporučit jako alternativní testovací organismus pro stanovování ekotoxicity v případech, kdy použití perlooček není vhodné, například pro testování nerozpustných substrátů, které nelze vyluhovat do vody standardními postupy. Vzhledem k tomu, že se jeví jako průkazně citlivější na účinky zinku, mohlo by se

této vlastnosti také využít při testování ekotoxicity látek a odpadů podezřelých z vyšších koncentrací zinku.

Klíčová slova: ekotoxicita, odhad rizik, *Potamopyrgus*, *Daphnia*, měď, zinek, citlivost

Summary

The aim of this thesis was to gather information about: usage of the water animals in ecotoxicology testing and risk assessment of pollutants, also appreciation of the animals that can be used for various methods. The main aim of this work was to confront the sensitivity of selected advanced organisms: gastropod *Potamopyrgus antipodarum* and standardly used cladoceran *Daphnia magna*. Hypothesis was that snail *P. antipodarum* can be more sensitive than cladoceran *Daphnia magna* for some selected toxicant. This presumption results from sedentary lifeway of *P. antipodarum* and its direct contact with toxin due to absence of external skeleton.

Snails from flooded sandpit in central Bohemia were collected and used in the experiment. Cladoceran was bred in standard surrounding conditions in laboratory. The acute toxicity test on $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ was realised. It was evaluated after 24 and 48 hours. Regeneration test was realised after the test with copper salt.

The results of all biotest significate that the sensitivity of this species of snail to copper toxicity is comparable with sensitivity of the standardly used cladoceran. The experiment with zinc reveal even significantly higher sensitivity of snail compared to cladoceran. Toxicity effect of copper was many times higher then toxicity impact of zinc for both animals. $\text{EC}_{50_{48\text{h}}}$ was detected for gastropod: $0,008 \text{ mg.l}^{-1}$ for copper and $1,53 \text{ mg.l}^{-1}$ for zinc. For cladoceran was $\text{EC}_{50_{48\text{h}}}$ ascertained: $0,008 \text{ mg.l}^{-1}$ for copper and $\text{EC}_{50_{24\text{h}}}$ $9,23 \text{ mg.l}^{-1}$ for zinc.

The best measured reaction of gastropods to toxicity impact was immobilization and inability to attach to base. Both these endpoints are comparably sensitive. Immobilization must be measured first after 48 hours because gastropods are after intoxication in mobilization for some time. Mortality of this organism can be evidenced only with difficulty.

Representative species of gastropod is sensitivitive enough so it can be recommended as alternative organisms for ecotoxicity testing in case the cladoceran is not suitable, for example for testing insoluble waste substances. This snails appear to be more sensitive on zinc. They can be used for testing of waste, which can contain increased toxic content of zinc

Key words: ecotoxicity, risk assessment, *Potamopyrgus*, *Daphnia*, copper, zinc, sensitivity

Obsah

Autorský referát	4
Summary	6
1 Úvod	10
2 Cíl práce.....	11
3 Literární rešerše	12
3.1 Ekotoxikologie	12
3.1.1 Ekotoxikologické biotesty	12
3.1.2 Rozdělení, přehled a použití biotestů	12
3.1.3 Význam ekotoxikologických biotestů	14
3.1.4 Složení a tvorba baterií ekotoxikologických biotestů	14
3.1.5 Postavení živočichů v rámci testování	14
3.2 Standardizované živočišné druhy používané v ekotoxikologických testech ..	15
3.3 Charakteristika živočišných druhů, použitých v experimentu	15
3.3.1 Perloočky	15
3.3.2 Měkkýši	16
3.4 Vliv standardních toxinů Cd a Zn na živočichy používané v ekotoxikologii ..	22
3.4.1 Projevy mědi.....	22
3.4.2 Projevy zinku.....	23
3.5 Ostatní živočichové používání v ekotoxikologickém testování.....	25
3.5.1 Máloštětinatci (Oligochaeta: Annelida)	25
3.5.2 Žábronožky (Branchiopoda: Crustacea).....	25
3.5.3 Raci (Decapoda: Crustacea)	25
3.5.4 Různonožci - blešivci (Amphipoda: Crustacea).....	26
3.5.5 Ryby (Actinopterygii: Vertebrata)	26
3.5.6 Obojživelníci (Amphibia: Vertebrata).....	26

4	Materiál a metodika.....	27
4.1	Zkratky použité v biotestech	27
4.2	Test akutní toxicity měďnaté soli na písečníku novozélandském (<i>Potamopyrgus antipodarum</i>).....	27
4.3	Test akutní toxicity měďnaté soli na hrotnatce velké (<i>Daphnia magna</i>).....	29
4.4	Test akutní toxicity zinečnaté soli na písečníku novozélandském (<i>Potamopyrgus antipodarum</i>).....	30
4.5	Test akutní toxicity zinečnaté soli na hrotnatce velké (<i>Daphnia magna</i>).....	31
4.6	Zkouška regenerace intox. živočichů (<i>Potamopyrgus antipodarum</i>)	31
4.7	Fotodokumentace biotestu:	32
5	Výsledky.....	35
5.1	Srovnání citlivosti živočichů na měď.....	35
5.2	Srovnání citlivosti živočichů na zinek	35
6	Diskuse	40
6.1	Citlivost testovaných živočichů na měď	40
6.2	Citlivost testovaných živočichů na zinek.....	43
7	Závěr.....	45
8	Seznam použité literatury	46

1 Úvod

Se vzrůstající životní úrovní člověka se stále více zvyšuje množství produktů, které negativně ovlivňují životní prostředí. Stále více se tedy ozývá potřeba dostatečného monitoringu veškerých toxických látek. Pro trvale udržitelný rozvoj je důležité zejména minimalizovat odpadní produkty a podporovat především výrobní technologie, které jsou šetrné k životnímu prostředí. Negativní vlivy lidské činnosti nelze plně eliminovat, ale díky moderním technologiím se stále více daří je minimalizovat. Daří se je také stále více postihovat. Je to způsobeno především tím, že současné metody jsou stále méně náročné z hlediska materiálu a času.

K tomu, aby byl tento ekotoxikologický biomonitoring opravdu efektivní, je potřeba si uvědomit, že každý ekosystém se chová jako celek, jehož složky jsou na sebe úzce závislé. Je tedy důležité aby se zkoumaná, potencionálně toxická látka dostala v experimentu do kontaktu s každým živým zástupcem ekosystému. Též je důležité, aby se takto otestovala každá látka, která se do přírody vypouští.

Samotný biotest se může provádět přímo v přírodních podmínkách, zde však často bývá problém s jeho proveditelností a reprodukovatelností. Proto se častěji realizují biotesty laboratorní, kde sice nikdy nelze plně nasimulovat přírodní podmínky, ale testy jsou snadněji proveditelné. Při volbě pokusných živočichů je důležité, aby zvolený druh dobře reprezentoval ekosystém a aby byl nenáročný jeho chov. V bateriích testů aplikovaných na všechny základní složky ekosystému (producenti, konzumenti, reducenti) jsou mnohobuněční živočichové zastoupeni především vodními korýši *Daphnia magna* a rybami *Danio rerio*. Obě tyto standardizované metodiky sledují toxicity výluhů ve vodním prostředí, nemohou tedy plně odrážet reakci na toxicitu danou přímým kontaktem organismu s testovanou látkou. Schopnost zřetelné odezvy po přímém kontaktu s testovanou látkou je žádoucí zejména pro sledování ve vodě špatně rozpustných látek, dále kalů a jiných sedimentů.

Takovéto požadavky mohou plně postihnout vodní plži po vypracování metodiky práce s takovými organismy, pokud se potvrdí jejich dostatečná citlivost vůči toxikantům.

Hlavním cílem těchto biotestů je hodnocení veškerých environmentálních rizik spojených s konkrétním toxikantem a zjišťování účinných preventivních opatření proti znečištění daného ekosystému.

2 Cíl práce

Cílem této práce je shromáždit dostupné informace o využití vodních živočichů pro ekotoxikologická hodnocení rizik environmentálních polutantů, zejména sedimentů. Dále nastínit, jakým způsobem může být obsah jedovaté látky ve vodním prostředí pro vodní živočichy nebezpečný a vzájemně srovnat citlivost zvolených perspektivních živočichů, tedy plže *Potamopyrgus antipodarum* a standardně užívaných bezobratlých koryšů, perlooček *Daphnia magna*.

Hypotéza byla, že vůči určitým toxikantům bude plž *Potamopyrgus antipodarum* výrazně citlivější než *Daphnia magna*. Tato domněnka vychází z odlišného způsobu života písečníka a absence vnější kostry (Oehlmann, Schulte-Oehlmann, 2002).

Práce má také význam pro zlepšení biomonitoringu negativních účinků jedovatých látek na živočišné zástupce přírodních ekosystémů.

3 Literární rešerše

3.1 Ekotoxikologie

Tato vědní disciplína sleduje, jak se živočichové (včetně člověka) vzájemně ovlivňují (zejména poškozují) toxickými látkami, které sami produkují nebo které vzniknou následkem jejich činnosti. Jedná se především o látky vyprodukované člověkem. Cílem tohoto oboru je tedy zjistit, jak jsou které látky nebezpečné v daném množství pro různé organismy. Dle zjištěných výsledků se stanoví, pro které produkované látky je potřeba stanovit kritickou množstevní hodnotu, kterou nelze překračovat, aniž by se ohrozilo životní prostředí. Vždy je potřeba brát ohled na celý ekosystém a jeho biodiverzitu. Též je důležité počítat s možnou autointoxikací. Tento zákeřný děj může mít za následek i havarijní úhyn organismů v lokalitě (Svobodová, 1987; Kočí, 2002). Konkrétních výsledků se dosahuje pomocí biologických testů toxicity /dále jen biotesty/ (Persoone, a kol., 1989).

Podle Kočího (2002) jsou tyto testy nespecifické. Neposkytují tedy informaci o složení dané toxické látky, ale o celkové toxicitě. Ze zjištěných výsledků jsou důležité tyto hodnoty: hodnota PEC (Predicted Environmental Concentration – Předpokládaná koncentrace v životním prostředí) a hodnota PNEC (Predicted No-Effect Concentration – Předpokládaná neškodná koncentrace). V případě, že je poměr PEC / PNEC menší než 1,0 lze považovat riziko toxinu v dané látce za nízké (Kočí 2002).

3.1.1 Ekotoxikologické biotesty

Biotest je metoda zjišťování toxicity, jejíž principem je kontakt testované látky za určitých předem definovaných podmínek se zkušebním organismem. Z jeho reakce potom usuzujeme, zda je testovaná látka toxická.

3.1.2 Rozdělení, přehled a použití biotestů

Podstatou biotestu je reakce živočicha na zkoumanou látku v různých koncentračních stupních. U ekotoxikologického biotestu je důležité, aby byl vztažen ke všem potravním článkům daného ekosystému (producenti, konzumenti, reducenti) a aby byl u jednotlivých organismů proveden ve všech životních fázích. Pro efektivitu každého biotestu je třeba si dále uvědomit, že ačkoliv je odolnost organismů k jednotlivým toxinům často dobře známa, může

se jedovatost projevit až ve směsi různých toxinů. Jinak by potenciálně hrozilo, že případné důsledky z výsledků biotestu mohou některého živočicha ohrozit, přestože závěr zní, že vzorek je netoxický (Maršálek, 2002). Biologická odezva na polutant se může též projevit až za delší dobu.

U biotestů, které se týkají vodních ekosystémů, je třeba počítat s přirozeným výskytem cyanotoxinů produkovaných sinicemi (produkty sekundárního metabolismu). Jejich masový rozvoj je úzce spjat s eutrofizací vod.

Samotná toxicita se rozlišuje na akutní a chronickou. U akutní toxicity je nebezpečná jednorázová vysoká dávka, jejíž účinky již často nelze napravit. U toxicity chronické se sleduje především její dlouhodobý vliv na životní prostředí. Chronická forma toxicity je nebezpečná z hlediska jejího nenápadného počátečního projevu (Svobodová, 1987).

Při jednotlivých testech se sledují zejména tyto projevy: mortalita, imobilizace, chování živočicha (rychlost a směr pohybu), reprodukční aktivita, růst, metabolické změny, patologické změny na orgánech atd.

Hodnocení ekosystémů je možné na třech úrovních biologické organizace: individuální, populační a na úrovni společenstva. Biotesty zauímají individuální úroveň a podle Maršálka (2002) je lze rozdělit na:

A) Biotesty první generace-klasické:

Hlavní výhodou těchto biotestů je jejich relativní jednotnost z hlediska pracovního postupu v rámci jednoho státu. Jsou však dosti náročné na potřebu laboratorního prostoru a testovaného materiálu. Výsledky jsou často variabilní.

B) Biotesty druhé generace-mikrobiotesty:

Zavedení těchto biotestů v 90. letech minulého století bylo nutné hlavně kvůli vzrůstající spotřebě biologických materiálů. Jejich hlavním posláním je měřit specifický efekt testovaného vzorku, kterým byl organismus exponován.

C) Biotesty třetí generace - biosenzory, biosondy:

U těchto testů se jedná o měření specifických mechanismů toxických vlivů.

Dále můžeme biotesty dělit podle: doby expozice (akutní, semiakutní, chronické), trofické úrovně testovacích organismů (producenti, konzumenti, destruenti), testované matrice (voda, půda, vzduch) a podle způsobu vyhodnocování výsledků (Pavlíková, 2008).

3.1.3 Význam ekotoxikologických biotestů

Zásadní význam ekotoxikologického biotestu je ten, že jeho výsledek signalizuje přítomnost či nepřítomnost jedovaté látky v různém stupni nebezpečnosti. Na zjištěném toxinu se dále měří jeho vliv na živočichy. Tyto testy se obvykle podkládají chemickou analýzou (kvalitativní i kvantitativní). Chemicky zjištěná přítomnost polutantu však nemusí vždy signalizovat nebezpečí, neboť v laboratorních podmínkách nelze zohlednit veškeré interakce v ekosystému. Tento fakt platí i obráceně (Maršálek, 2002).

Ze zjištěných výsledků se poté vyvozují závěry, které různými způsoby regulují zacházení s potencionálními polutanty.

3.1.4 Složení a tvorba baterií ekotoxikologických biotestů

Složitost sestavení testovací baterie je dána značnou variabilitou pokusných organismů. V samotném pokusu doléhá na živočicha velké množství faktorů, které ovlivňují jeho chování vůči testovacím činidlům. Vždy je potřeba použít více druhů organismů na různých trofických úrovních, aby se minimalizovaly případné odchylky. Trofickou úroveň konzumentů reprezentují právě živočichové. Druhy pokusných organismů jsou v ČR normované. Zvláštní přísnost v normě vyžaduje zákon o odpadech, zákon o chemických látkách apod. (Maršálek, 2002).

3.1.5 Postavení živočichů v rámci testování

Živočichové jsou v drtivé většině případů mnohobuněčné, primárně pohyblivé, eukaryotické organismy. Živí se chemoheterotrofně (ke svému životu potřebují organickou látku, kterou si nejsou schopni sami vytvořit) a rozmnožují se pohlavně nebo nepohlavně (Rosypal, 2003).

Biotesty je třeba chápat jako neodkladnou nutnost, bez které nelze účinně minimalizovat stávající toxiny a zjišťovat toxiny dosud neznámé. Ve stručnosti se dá říci, že úmrtím několika tisíců pokusných živočichů lze zajistit budoucí život celých jejich populací v přírodě.

Vodní živočichové, které bude tato práce řešit, se od ostatních živočichů liší především tím, že jejich dýchací soustava je uzpůsobena životu ve vodě.

3.2 Standardizované živočišné druhy používané v ekotoxikologických testech

Nejčastěji používaní živočichové v ekotoxikologickém testování jsou perloočky a ryby. Některé postupy testování akutní i chronické toxicity jsou u nich standardizovány. U nás je k testování akutní toxicity zavedena Česká státní norma (ČSN EN ISO 6341), která používá perloočku hrotnatku velkou *Daphnia magna* (Cladocera: Crustacea) a dále ČSN EN ISO 7346, která jako testovací organismus používá sladkovodní rybu danio pruhované *Brachydanio rerio* (Teleostei: Cyprinidae).

Testování chronické subletální toxicity chemických látek, odpadů i povrchových vod na perloočkách je v současné době standardizováno v normě ČSN ISO 10706.

K otestování subchronické toxicity na ryby je zavedena norma ČSN ISO 10229, specifikující metodu stanovení chronické subletální toxicity látek, rozpustných za určitých podmínek ve vodě, vyjádřená jako změna růstové rychlosti na zástupce ryb - pstruha duhového *Oncorhynchus mykiss Walbaum* (Teleostei, Salmonidae) ve sladké vodě po dobu expozice 14 a 28 dní.

3.3 Charakteristika živočišných druhů, použitých v experimentu

3.3.1 Perloočky

Perloočky jsou vůbec nejčastěji v ekotoxikologii používaní živočichové, zde je uvedeno shrnutí několika základních informací k tomuto živočichovi.

Systematicky náleží do čeledi hrotnatkovití (Daphniidae), řádu perloočky (Cladocera), do třídy korýši (Crustacea), kmene členovci (Arthropoda).

Tyto drobné (0,7-5 mm) vodní živočichy lze nalézt téměř v každé vodní nádrži. Mají zde úlohu potravy pro mnohé živočichy, ale též napomáhají regulaci rozšíření vodního fytoplanktonu (Veselá, 2004).

V ekotoxikologii mají stěžejní význam kvůli jejich snadnému chovu a bohatému rozšíření v ekosystémech. Práci s nimi velmi usnadňuje to, že jejich těla jsou průsvitná a lze tedy snadno pozorovat i jejich vnitřní orgány. V biotestech patří k nejcitlivějším organismům.

Pro standardní ekotoxikologické biotesty se používá především druh *Daphnia magna*. Hrotnatky obecně patří k živočichům, které jsou k různým toxickým látkám nejcitlivější. Tento druh je v ekotoxikologických biotestech nejběžněji používán. Děje se tak především kvůli snadné manipulovatelnosti a velkému množství nových jedinců v jedné snůšce. Další nespornou výhodou je časté zabarvení jedinců, které umožňuje snadnější odpočet přeživších jedinců po testu. *Daphnia magna* je druh obývající stojaté vody. Její životní potenciál je dán velikostí přítomnosti rybích zástupců v nádrži. O co je menší odolnost vůči rybím predátorům, o to je větší adaptabilita na neočekávané a poměrně rychlé změny prostředí. Tato adaptabilita je často diskutována, jelikož se tato perloočka jeví jako nejméně citlivá vůči působení toxicity a jiné druhy, jako například *Daphnia galeata* ji v citlivosti značně převyšují (Veselá, 2004).

Méně často se používají *Daphnia pulex* či *Daphnia pulicaria*, případně *Ceriodaphnia dubia* (Veselá, 2004). Průběh a výsledky testů s perloočkami zejména chronické toxicity může ovlivnit kvalita používaného media (Dobšíková, 1999).

Zajímavé srovnání toxicity vybraných kovů (Ag, Hg, Cu, Cd, Cr, Zn, Ni, Pb, Co, As) na perloočky a ryby je zaznamenáno v práci Lazeckého (1993), kde je stanovena toxicita porovnána nejen na základě hodnot LC50, ale i hodnot NOEC a LOEC a je zde poukázáno na to, že hodnoty PML (přípustného množství látek) ve vodním prostředí byly často kodifikované pro tyto kovy, zejména měď, jako příliš vysoké, potenciálně ohrožující biodiverzitu.

3.3.2 Měkkýši

Tento kmen živočišné říše je hned po členovcích (arthropoda) druhově nejbohatší (130 000 známých druhů) a jejich rozšíření, které kromě vzduchu zahrnuje téměř všechny druhy biotopů, jim určuje velmi důležitou roli v životním prostředí (Götting, 1974). Vodní

měkkyši na které se bude tato práce dále soustřeďovat patří k méně pohyblivým živočichům a jejich případná změna stanoviště je často plně závislá na směru proudění vody v prostředí.

Třída plžů (Gastropoda) je z tohoto kmene majoritní. Tito živočichové mohou poskytovat zajímavé specifické výsledky sledování účinků toxicity. Jejich citlivost vůči toxickým látkám je srovnatelná s jinými bezobratlými či rybami, mají však některé specifické vlastnosti, které podle Oehlmana, Schulte-Oehlmana (2002) mohou případně lépe indikovat působení toxicity než běžně používané živočichové. Například v důsledku absence vnější kostry a kutikuly jsou plži v přímém kontaktu s testovaným substrátem. Dále je u nich limitována možnost exkrece polutantů ve srovnání s obratlovci, tudíž dochází k jejich vyšší bioakumulaci a biokoncentraci, a proto u nich mohou polutanty vyvolat negativní odezvu v nižších koncentracích než u jiných živočichů. Mnoho druhů má oproti jiným živočichům značně sníženou pohyblivost, proto měkkyši ideálně indikují stav kontaminace svého stanoviště. Další výhodou při ekotoxikologickém testování je skutečnost, že není potřeba zvláštních povolení, jako je toho třeba například u ryb a ostatních obratlovců.

S touto skupinou živočichů byla v minulosti provedena řada ekotoxikologických testů. Při testování toxicity se plži používají jak pro specifické hodnocení účinků akutní toxicity, např. (Špoljar a kol., 2005; Roses a kol., 1999), častěji však pro různé hodnocení účinků chronické toxicity, např. na změny embryonálního vývoje (Gomot, 1998), růstu a plodnosti (Baturu a Lagadic, 1995), dále na patologické změny vnitřních orgánů (Špoljar a kol., 2005; Roses a kol., 1999; Klobučar a kol., 1997; Klobučar a kol., 2001) nebo mutagenity (Nakano a kol., 2003).

Vliv toxicity PCP na předožábrého plže *Amphimelania holandri* sledovali (Špoljar, a kol., 2005), kde zjistili, že při koncentracích 0,56 a 1 mg.l⁻¹ byla zpozorována větší aktivita plžů, ale u nejvyšší koncentrace docházelo ke značnému útlumu a po 24 hodinách nastala úplná ztráta pohybu.

Baturu a Lagadic (1995; 1996) sledovali vliv hexachlorbenzenu a atrazinu na životní projevy a metabolické pochody plovatky *Lymnaea palustris*. Byly sledovány následující parametry: růst, plodnost, biochemické parametry (aktivitu enzymů hydrolyzujících polysacharidy) a výrazné akumulace hexachlorbenzenu (HCB). Experimenty byly zaměřené na chronickou toxicitu a perzistenci v podmínkách sladkovodního mezokosmu, tedy uměle vytvořeného prostředí, které se blíží přírodním podmínkám (Baturu a Lagadic, 1995). Baturu,

Lagadic (1996) zjistili též průkazné metabolické změny inhibice enzymů (BaPH a GST) při expozici atrazinu (na rozdíl od HCB) v koncentracích, které však ještě neměly vliv na růst a reprodukci, což by bylo možno využít v nepřímých odhadech přítomnosti pesticidů v prostředí.

Russo a Lagadic (2004) sledovali opět subletální efekty atrazinu u plže *Lymnea stagnalis*. Byl zjištěn nárůst počtu hemocytů (fagocytujících granulocytů), avšak snížení jejich fagocytární schopnosti na bakterii *Escherichia coli*. U nižších koncentrací je po delší době tento proces reverzibilní a dochází k znovuoobnovení funkcí. Je uvažováno, že po podrobnějším prozkoumání těchto procesů a po zjednodušení techniky determinace takovýchto změn v polních podmínkách bude možné využít vodních plžů pro usnadnění postupů biomonitoringu sladkovodního prostředí.

Roses a kol. (1999) sledovali efekt akutní toxicity atrazinu u plžů *Physa acuta* a *Ancylus fluviatilis*. V tomto testu nebyl zjištěn přímý vliv atrazinu, ale byly zjištěny změny v chování (zejména vzrůst rychlosti vyhledávání potravy a změny různých pohybových vzorců) již při velmi malých koncentracích atrazinu. Dále byly pozorovány nevratné změny na vylučovacích orgánech již při nepříliš vysokých koncentracích atrazinu. Munoz a Roses (2000) dále zmiňují, že vystavení těchto plžů poměrně malé koncentraci atrazinu po dobu 20 dnů znamená jeho kumulaci. Plži podle nich akumulují více atrazinu než třeba ryby, u nichž podobné pokusy prokázaly rychlé zvyšování jeho obsahu v játrech, ale v jiných orgánech k bioakumulaci nedocházelo.

Vliv genotoxicity sledovala Nakano a kol. (2003) u Cyclophosphamidu a mytomycinu na plži *Biomphalaria glabrata*. Výsledky naznačily možnosti účinného, specifického a citlivého hodnocení mutagenity zárodečných buněk. Citlivost plžů vůči účinkům mutagenů byla shledána podle výsledků tohoto testu plně srovnatelná s jinými organismy.

Při testování akutní toxicity pentachlorofenolu zjistil Klobučar a kol. (1997) u okružáka (*Planorbis corneus*), že hodnota $LC50_{96h}$ se rovná koncentraci 1420 mg.l^{-1} a dlouhodobým testem dále zjistil histopatologické změny na digestivních žlázách. Klobučar a kol. (2001) při testu doby trvání 7 dní zjistil nárůst pevných konkréci ve vylučovacím aparátu. Vzrůst počtu těchto konkréci je považován jako užitečný indikátor stresu, ale použití jevu pro biomonitoring vyžaduje podle autora mnohem podrobnější výzkum.

Pavlica a kol. (2000) při dodržení stejných podmínek jako v předchozím testu, zjistil nárůst mikronukleí vůči jeho genotoxicitě (micronucleus test), i když mírně nižší v provedeném srovnání se slávičkou *Dreissena polymorpha*, která je pro tento účel používána.

Cengiz a kol. (2005) zjišťoval mortalitu a histopatologické efekty přípravku Thiodan s účinnou látkou endosulfan na bahnatce *Galba truncatula* v krátkodobém i dlouhodobém testu. Hodnota $LC50_{96h}$ byla zjištěna jako koncentrace 0,83% přípravku, což odpovídá 2,98 $mg.l^{-1}$ endosulfanu. V dlouhodobém (10, 20 a 30 dnů) testu byly zjištěny změny: akumulace amoebocytů v hemolymfatických prostorech mezi tubuly zaživacích žláz, výměšky v lumenu tubulů, expanze (zvětšení) hemolymfatických prostorů mezi tubuly, a vzrůst vakuolalizace (vznik dutinek v buňkách) a nekrotické změny v digestivních buňkách. Změny struktury svalových vláken a epitelu byly detekovány v noze a plášti aj.

Na této bahnatce byl též zkoumán vliv přípravku Thiodan[®] s účinnou látkou endosulfan v jiném krátkodobém testu. Testovalo se pět různých koncentrací zásobního roztoku. Dvě byly vyšší – 0,33 a 0,65%, což odpovídá koncentraci endosulfanu 1,18 a 2,35 $mg.l^{-1}$ a tři koncentrace byly nižší – 0,08; 0,16 a 0,27%, což odpovídá koncentraci účinné látky přípravku 0,30; 0,59 a 0,98 $mg.l^{-1}$. S vyššími koncentracemi se provedl 96 hodinový test a s nižšími 10, 20 a 30 denní test. U jedinců na které působil po dobu 96 hodin 0,33% roztok přípravku bylo pozorováno shlukování amébocytů v hemolymfatické části mezi tubuly. U testu s 0,65% roztokem přípravku docházelo k umrtvení těchto tkání (Cengiz a kol., 2005).

Detergent s účinnou látkou Sodium lauryl sulfate testoval (Tarazona a Nunez, 1987) na druhu plovatky *Radix peregra* v šestidenním testu toxicity. Byla zjištěna značná citlivost těchto plžů vůči této látce, která se projevovala zvýšenou mortalitou, ale i silným poškozením schránek, které se projevilo v podobě zeslabení stěny až dírkami.

Z anorganických látek testoval toxicitu kadmia Gomot (1998) v sedmítýdenním testu na plovatce *Lymnaea stagnalis*. Mortalita po testu byla shledána velmi nízká ($LC50 = 400 - 3200 \mu g.l^{-1}$), kladení vajíček se příliš neměnilo od kontrolní skupiny, vývoj embryí byl dobrý, avšak s narůstající koncentrací kadmia vzrůstal počet aberantních embryí.

Vliv mědi na plže *Burnupia stenochorias* ve speciálně vytvořených umělých průtočných kanálcích sledovali Gerhardt a Palmer (1998), kteří zjistili změny chování těchto plžů i při relativně malých koncentracích mědi.

Písečník novozélandský (*Potamopyrgus antipodarum*) (Gray, 1843)

Tento druh náleží do rodu *Potamopyrgus* (Stimpson, 1865 – Písečník), podčeledi Potamopyrginae (H. B. Baker – 1928), čeledi Hydrobiidae (Troschel – 1857 – Praménkovití), nadčeledi Rissoidea, řádu Neotaenioglossa, nadřádu Caenogastropoda, podtřídy Prosobranchia – předožábří, třídy Gastopoda – plži, kmene Mollusca – měkkýši, podle Berana (2002).

Tento živočich není v Evropě původní, ale byl k nám zavlečen pravděpodobně z Nového Zélandu. Obývá zde nejčastěji zatopené pískovny či jiné vodní plochy vzniklé těžbou nerostných surovin, nejčastěji u dna. Hustota výskytu přesahující až 10 000 jedinců na 1m² ho řadí mezi nejpočetnější druhy v daném biotopu. Jeho přítomnost je také velmi časná. Mimo jiné je tento druh charakterizován partenogenetickým způsobem rozmnožování a je vejcoživorodý (Dorgelo a kol., 1995). Živí se výhradně usazeným rostlinným materiálem, řasami a drobným detritem. Jeho potravním chováním se zabývaly například práce Broekhuizen a kol., (2001), Aberleho a kol. (2005), či také Dorgela a kol., (1995), kteří však sledovali nejen vliv potravy, ale též účinky kadmia na reprodukci u toho plže.

Beran (2002) uvádí, že tento druh je schopen projít bez úhony trávicím traktem ryb. Jedná se o druh extrémně tolerantní vůči teplotě i kvalitě vody a ostatním abiotickým podmínkám (Alonso a Camargo, 2004). Na rozdíl od jiných plžů toleruje například salinitu do 25 % (Richards, 2002).

Nejobvyklejší nadmořská výška pro výskyt tohoto druhu u nás je mezi 150 až 200 m. Jeho rozšiřování u nás se v poslední době soustřeďuje nejvíce do oblasti Polabí a severozápadních Čech, kde je dostatek vyhovujících biotopů. Předpokládá se, že jeho výskyt je limitován nadměrnou eutrofizací vod (Beran, 2002).

V nedávné době byla u tohoto druhu zaznamenána řada studií, která výrazně zviditelnila efektivnost použití písečníka v ekotoxikologických biotestech. Například Duft a kol. 2002 nebo Duft a kol. 2003a se zabývali dlouhodobou toxicitou trifenylytinu a tributyltinu v umělém sedimentu. V testu byl zaznamenán ostrý pokles v počtu zaulitovaných embryí v závislosti na koncentraci toxinu. Koncentrace LOEC byla stanovena na 10 µg.kg⁻¹ u obou látek.

Ekotoxicitu přírodních toxinů produkovaných cyanobakteriemi (mikrocystin-LR) v porovnání se stresory pocházející z lidské činnosti (triazinovou herbicidní látkou atrazin) se

zabývala Gerard a Poullain (2005) v dlouhodobém testu toxicity. Látky byly testovány na jedincích dospělých i nedospělých. Sledoval se pokles růstu, plodnosti, pohybu a vliv na úhyn testovaných jedinců. Kromě změny pohybu byly působením mikrocystinu-LR ostatní parametry negativně ovlivněny. Atrazin byl testován v koncentracích 10 – 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ při které nebylo shledáno zvýšení úhynu ale vliv na pohyb byl patrný pro všechny věkové a velikostní kategorie testovaných jedinců. V porovnání s atrazinem byl mikrocystin-LR vyhodnocen jako podstatně toxičtější pro tento druh plže.

V těchto a dalších pracích (Oehlmann a kol., 2000; Schulte - Oehlmann a kol., 2000; Tillmann a kol. 2001 a Schulte - Oehlmann a kol., 2001; Duft a kol. 2003b) byli používáni jedinci vodních plžů pro studium toxických účinků analogonů hormonů. Jedním z testovaných plžů byl právě i *P. antipodarum*. Jednalo se o spojení testů chronické toxicity s podrobným rozbořem fyziopatologických vlivů, které však vyžaduje velmi specifický přístup, poněkud odlišný od klasických biotestů. Byla zjištěna dobrá citlivost na analogony pohlavních hormonů (tvorbu imposexů, intersexů a jiných znetvoření pohlavních orgánů po expozici těchto látek) u jedinců *Potamopyrgus antipodarum*, partenogeneticky se množících viviparních gonochoristů. Výsledkem jejich práce bylo vytvoření nového biotestu s těmito bentickými organismy, který uvádějí jako vhodný k biotestu na sedimenty.

Tento druh lze považovat za perspektivní, kvůli poměrně vysoké rozmnožovací schopnosti a krátkému životnímu cyklu (spojenému s partenogenetickou ovoviviparií). Diskutabilní je jeho použití z hlediska výše uvedených vlastností (přímého kontaktu trávicí soustavy s obrušovaným a polykaným substrátem), jelikož jeho hlavní potravou je spíše drobný detrit (Frömming, 1956), za vhodnější z tohoto hlediska lze považovat spíše zástupce čeledí ze skupiny plicnatých spodnookých plžů (Gastropoda: Pulmonata: Basommatophora). K odhadu rizik pomocí plžů se též vyjadřují ve své práci Coeurdassier a kol. (2003), kteří zmiňují, že v současnosti není k dispozici žádná metoda hodnocení subletálních účinků polutantů v rámci chronické toxicity pomocí plžů v kontrolovaných podmínkách.

Potamopyrgus antipodarum se ve vodovodní vodě poměrně snadno rozmnožuje. Velkou předností pro jeho chov je i partenogenetické rozmnožování a krátký generační cyklus. Jedná se o druh velmi perspektivní i z hlediska využití pro testování akutní toxicity. Je na něm zvládnuta i metodika sledování účinků endokrinních narušitelů, změny na pohlavních orgánech vlivem xenoestrogenů (Duft, 2002; Duft, 2003a). Je však považován za druh s velmi

vysokou tolerancí vůči rozdílným abiotickým podmínkám (Alonso a Camargo, 2004). Tato euryvalence se může projevit i v odolnosti vůči toxicitě.

3.4 Vliv standardních toxinů Cd a Zn na živočichy používané v ekotoxikologii

Pro zvýšení standardizace testů jsou v ekotoxikologické praxi využívány referenční toxikanty. Testy s těmito tzv. standardními toxikanty jsou realizovány z důvodů zjištění citlivosti, zdravotního stavu testovaných organismů či umožnění mezilaboratorního srovnávání výsledků toxicity. Vhodný referenční toxikant by měl splňovat následující požadavky: toxicita již v nízkých koncentracích, snadná kvantifikace, stabilní čistota, stabilní a necílová toxicita, rychlá letalita, nízká variabilita výsledků, výskyt jako environmentální kontaminant a jako obecný metabolický stresor (Dobšíková, 2003). V ekotoxikologické praxi je využívána řada referenčních toxikantů (NaPCP, NaCl, fenol, p-nitrofenol, HCB, síran zinečnatý, síran měďnatý, dichroman draselný aj.). Pro posouzení citlivosti plžů vůči toxicitě byly zvoleny tyto látky: síran měďnatý a síran zinečnatý, zejména pro relativně jednoduchou práci s nimi, nejsou příliš těkavé látky a značnou probádanost jejich účinků na vodní organismy.

3.4.1 Projevy mědi

Měď je pro ryby poměrně silně toxická, ačkoli se používají její sloučeniny jako algicidní či desinfekční prostředky. Její toxicita je velmi ovlivněna fyzikálně-chemickými vlastnostmi vody (Svobodová, 1987; Winner a Owen 1991). LC50 pro ryby se pohybuje od 1 (0,5) do 10 mg.l⁻¹. Pro vodní bezobratlé je měď ještě toxičtější. Pro bentos je toxická již koncentrace 0,2 mg.l⁻¹, vodní měkkýši hynou při koncentraci 0,015 mg.l⁻¹, pijavky při 0,008 mg.l⁻¹, ploštěnky při 0,004 mg.l⁻¹, nezmaří dokonce při 5. 10⁻⁴ mg.l⁻¹ (Svobodová, 1987). Felts a Heath (1984) zjistili, že koncentrace mědi 0,21 mg.l⁻¹ působila pokles celkového obsahu kyslíku v těle u slunečnice *Lepomis macrochirus* po expozici 32 dní, nikoliv však při expozici do 9 dnů.

V posledních letech byl vliv mědi zjišťován například na perloočce *Ceriodaphnia silvestri*. Byl hodnocen vliv potravy (řasa *Pseudokirchneriella subscapitata*) kontaminované mědí (Cu(NO₃)₂) na změny v životních projevech (růst, mortalita, rozmnožování) a na

rychlosti přijímání živin v chronickém testu. Ekotoxický efekt mědi se zde ukázal již při koncentraci v řádu nanogramů (Rodgher a kol., 2008).

Na sladkovodní tropické rybě *Prochilodus scrofa* byla zkoušena v testu akutní toxicity míra akumulace mědi v různých tkáních. $LC_{50_{96h}}$ byla stanovena na $29 \mu\text{g.l}^{-1}$. K podobnému výsledku se v minulosti došlo i s druhy: *Pimephales promelas*, *Carassius auratus* či s *Poecilia reticulata*. Při 96 hodinové expozici v roztocích o koncentraci $25 - 29 \mu\text{g.l}^{-1}$ byla nejvyšší bioakumulace zaznamenána v játrech, střevu, ledvinách a na žábrách (Mazon a Fernandes, 1999).

Akutní toxicitu mědi na sladkovodní krevetce *Macrobrachium lanchesteri* zjišťoval Shuhaimi – Othman a kol. (2009). Koncentrace LC_{50} byly stanoveny na $0,261 \text{ mg.l}^{-1}$ pro 24 hodinovou expozici a $0,172 \text{ mg.l}^{-1}$ pro 48 hodinovou expozici. V pokusu byl dále testován nikl a byla zjištěna větší ekotoxicita i bioakumulace pro měď.

3.4.2 Projevy zinku

Zinek se řadí mezi důležité esenciální prvky jejichž hlavní funkcí je podpora důležitých metaloenzymů. Z vodního prostředí nemá tendenci unikat do ovzduší a je adsorpčně vázán na sedimenty. Vyskytuje se v dvoumocné oxidační formě. Mimo jiné je potřebný pro syntézu nukleových kyselin (Oehlmann, 2003). Jeho přebytek má pro ryby podobnou míru toxicity jako měď, také pro některé vodní bezobratlé je to kov s vysokou biologickou účinností, v koncentraci $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ vyvolává vymizení pošvatek a zoobentosu, $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ usmrcuje blešivce a některé vodní měkkýše. Perloočky však hynou až v koncentracích 4 mg.l^{-1} a nitěnky přežívají i koncentrace 28 mg.l^{-1} . (Svododová, 1987). Jeho koncentrace se v životním prostředí pohybuje mezi hodnotami 20 – 200 ppm. Toxicita zinku je však silně ovlivněna ostatními rozpuštěnými látkami ve vodě (Bengeri a Patil, 1986; Paulauskis a Winner, 1988). Jeho toxicitu pro vodní organismy také velmi ovlivňuje teplota prostředí (Khangarot a Ray, 1988).

V současné době byla toxicita zinku zkoumána například na sladkovodní krevetě *Macrobrachium rosenbergii* v testu akutní toxicity. Zjišťoval se vliv zinku na zpomalování příjmu potravy. $EC_{50_{24h}}$ náležela hodnotě $0,11 \text{ mg.l}^{-1}$ a $LC_{50_{24h}}$ se tímto biotestem stanovila na koncentraci $0,44 \text{ mg.l}^{-1}$ (Satapornvavit a kol., 2008). K podobnému výsledku došel u druhu *Macrobrachium lanchesteri* Shuhaimi-Othman a kol. (2004), kde srovnával ekotoxicitu a bioakumulaci zinku a olova. Olovo se projevilo jako toxičtější.

Změny v jaterních tkáních u sladkovodní ryby *Oreochromis mossambicus* po vystavení působení zinku zjišťoval van Dyk a kol. (2007). Testovací roztok obsahoval kromě zinku také kadmium a zkoušeli se 5% a 10% roztoky známých koncentrací LC50. Zkouška se vyhodnocovala po 24, 96 a 672 hodinách. V porovnání s kadmiiem byl zinek shledán jako jeden z nejméně nebezpečných polutantů v akutní i chronické formě příjmu.

Akutní toxicita tohoto kovu byla také sledována na vířníku *Lecane quadridentata*. Pokus byl realizován s jedinci z mexických řek ovlivněných průmyslem. V testu se dále zkoumala toxicita hliníku a železa a zinek se zde projevil jako nejtoxičtější. Jeho LC50_{48h} byla stanovena na hodnotu 0,123 mg.l⁻¹ (Guzmán a kol., 2010).

Vliv zinku ve vodním prostředí na růst, mortalitu, bioakumulaci a příjem potravy byl sledován na běžně lovené, významné indické kaprovité rybě, ostroretce čtyřvousé (*Cirrhinus mrigala*). Byla hodnocena toxicita dlouhodobého třicetidenního působení. Testování jedinci byly po dobu zkoušky vystaveny koncentracím: 0,01; 0,03; 0,06; 0,10 a 0,15 mg.l⁻¹. Mortalita nebyla zjištěna, ale ostatní testované parametry se dle zvyšující koncentrace projevovaly. Bylo zjištěno, že do koncentrace 0,03 – 0,06 mg.l⁻¹ je vliv zinku na růst ryby esenciální (Mohanty a kol., 2009).

V testu chronické toxicity stanovil Muysen a kol. (2006) 93 % úmrtnost již při koncentraci Zn²⁺ 340 µg.l⁻¹ pro hrotnatku velkou (*Daphnia magna*). Předpokládá takto vysoký účinek zinku v důsledku zjištěné kompetice příjmu Zn a vápníku. Zinek prokazatelně snižoval příjem vápníku organismem.

Toxicitu pesticidů a těžkých kovů zkoumal na plži *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia) v embryonálním stádiu Sawasdee a Kohler (2009). Bylo zaznamenáno, že koncentrace 1 – 5 mg.l⁻¹ ovlivňuje srdeční aktivitu a rychlost líhnutí embryí. Dávka 5 mg.l⁻¹ výrazně zpomalovala vývoj očí a střev a při 10 denní expozici způsobila 100% úhyn testovaných organismů. Zpomalování vývoje zmíněných orgánů bylo prokázáno i v druhé sadě testu i při koncentraci 0,2 mg.l⁻¹. Během 20 denní expozice dlouhodobého testu při koncentraci 0,5 – 2 mg.l⁻¹ se stále snižovala rychlost líhnutí, ale mortalita ani snižování hmotnosti vylíhnutých jedinců oproti kontrole se zde neobjevilo.

3.5 Ostatní živočichové používání v ekotoxikologickém testování

3.5.1 Máloštětinatci (Oligochaeta: Annelida)

Máloštětinatci žijící v půdě, především žížaly, se používají k různým terestrickým testům. Vodní máloštětinatci se pro testování využívají méně často. Proti jiným standardně používaným živočichům se jeví často několikrát méně citlivé na základní toxické látky, údaje shrnula Svobodová a kol. (1987). Například vodní máloštětinatci nitěnky se však používají pro různá specifická testování toxicity sedimentů, pro která nevyhovují běžně používané výluhové techniky s perloočkami nebo rybami. Tyto specifické postupy užil v poslední době také Maestre a kol. (2007), který testoval říční sedimenty. Dále Maestre a kol. (2009) otestoval citlivost nitěnek vůči některým kovům, mědi, kadmiu a chromu.

3.5.2 Žábronožky (Branchiopoda: Crustacea)

Pro některá jednoduchá testování se používají halofilní korýši žábronožky solné. Tento korýš se ve velkých množstvích nachází ve slaných jezerech nebo v solných dolech. Dobrým indikátorem znečištění prostředí jsou též larvy, které jsou vysoce citlivé na celou řadu chemických látek. Testy s těmito živočichy jsou metodicky velmi dobře zvládnuté a poměrně finančně nenáročné. Vyrábějí se s nimi tzv. testy druhé generace, které jsou komerčně distribuované v podobě tzv. kitů. Nevýhodou takového testování je, že není podloženo státními normami a nemají tedy tak přesnou vypovídací schopnost. Tuto problematiku též diskutuje Dvořák (1995)

3.5.3 Raci (Decapoda: Crustacea)

Jednou z významných složek našich vodních ekosystémů jsou také raci. V našich volných vodách se v současnosti vyskytuje několik druhů těchto korýšů. Původními druhy jsou rak říční *Astacus astacus* a rak kamenáč *Austropotamobius torrentium*, kteří jsou velmi citliví vůči znečištění. Tito živočichové jsou však zákonem chráněni. Dále se u nás vyskytuje několik nepůvodních druhů (rak pruhovaný *Orconectes limosus* či rak signální *Pacifastacus leniusculus*) jejichž nároky na kvalitu vody se od našich původních raků značně liší (Policar, a kol., 2003).

3.5.4 Různonožci - blešivci (Amphipoda: Crustacea)

Blešivci jsou živočichové, kteří se v našich podmínkách vyskytují především v bystře tekoucích úsecích toků. Jsou považováni za živočichy obývající vody relativně méně znečištěné s vysokým obsahem kyslíku (Blockwell a kol., 1996).

3.5.5 Ryby (Actinopterygii: Vertebrata)

Ryby jsou základní skupinou testovacích organismů, která se používá velmi často při testování toxicity, jak akutní, tak chronické. Metodiky práce s rybami jsou často standardizovány v již výše uvedených normách. Citlivost ryb na toxicitu je velmi variabilní. Mezi nejvíce citlivé patří z domácích ryb pstruzi, střevle potoční nebo třeba akvarijní rybky razbory klínoskvrnné. Za středně až méně citlivé jsou spíše považovány kapr, lín, z akvarijních rybek živorodka duhová (Svobodová, 1987). Test akutní toxicity je standardizován pro danio pruhované (*Brachydanio rerio*) a pro pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Zejména při testování chronické toxicity se používají jak dospělé ryby, tak juvenilní jedinci a vývojová stadia. Nejčastějšími sledovanými ukazateli jsou mortalita, růst, vývoj embryí, patologické změny krevního obrazu a vnitřních orgánů.

Mezi nejčastěji používané ryby patří živorodka duhová *Poecilia reticulata*. Oproti normovanému druhu daniu se živorodka duhová v laboratorním prostředí lépe množí. Dále se pro ekotoxikologické biotesty používají: kapr obecný (*Cyprinus carpio*), lín obecný (*Tinca tinca*), sumec velký (*Silurus glanis*) či střevlička východní (*Pseudorasbora parva*) (Svobodová, 1987).

Pro testování toxicity na vybraných zástupců ryb se používají dospělí jedinci, živočichové v juvenilním stádiu i jedinci ve stádiu jiker. V minulosti bylo nejrozšířenější testování toxicity těžkých kovů zejména rtuti (Lazecký, 1993).

3.5.6 Obojživelníci (Amphibia: Vertebrata)

Testování s touto živočišnou skupinou je finančně více náročné, a proto se k němu přistupuje jen zřídka. Ze zástupců tohoto živočišného kmene se z hlediska ekotoxikologického testování používá například drápatka vodní (*Xenopus laevis*) (Vršková, 2003).

4 Materiál a metodika

4.1 Zkratky použité v biotestech

NOEC	koncentrace látky nepůsobící žádný zaznamenaný efekt
LOEC	nejnižší koncentrace, při které nebyla zaznamenána žádná mortalita, nicméně působící zpravidla nějaký jiný zaznamenaný efekt u organismu (imobilizaci, nepřísátí jedinců)
LC100	koncentrace působící 100 % úhyn všech testovaných jedinců
EC50	hodnota, vypočtená nelineární regresí, statisticky odhadující koncentraci látky, působící efekt u poloviny testovaných jedinců
LC50	hodnota, vypočtená nelineární regresí, statisticky odhadující koncentraci látky, působící mortalitu u poloviny testovaných jedinců
EC50 _{24h}	v indexu je uvedena doba expozice, tj. hodnota EC50 získaná pro 24 hodinovou expozici látky
EC50 _i	hodnota EC50 pro zaznamenaný efekt 24 hodinové imobilizace (neschopnost se 24 hodin pohnout z místa)
EC50 _n	hodnota EC50 pro zaznamenaný efekt - neschopnost plže se přisát k podkladu.

4.2 Test akutní toxicity měďnaté soli na písečníku novozélandském (*Potamopyrgus antipodarum*)

Zkoumaný druh (viz. Obr. 2 a 3) byl pomocí celokovového hydrobiologického cedníku odloven v zatopené pískovně nedaleko obce Ostrá poblíž Lysé nad Labem, střední Čechy (179 m n. m., Loc: 50°10'56.41"N, 14°54'29.829"E – viz. Obr. 1) a několik dnů byl v laboratoři ponechán k aklimatizaci ve vodě, z které byl odchycen. Během aklimatizace nebyl prováděn dodatečný přísun potravy.

Jako výchozí materiál pro realizaci pokusu byla použita standardní metodika normovaná pro použití vodních živočichů (ryb a perlooček) k testování akutní letální toxicity

(jedná se např. o normy ČSN EN ISO 7346, ČSN EN ISO 6341) s modifikacemi pro použití vodních plžů. Vlastní pokus probíhal ve skleněných akváriích (viz. Obr. 5) o rozměru 130 x 130 x 200 mm, které byly pro absolutní dekontaminaci po dobu 12 hodin vystaveny účinku 5% kyseliny dusičné. Do těchto nádob bylo odměřeno vždy 2 litry demineralizované vody a přidáno 10 ml od každého ze 4 živných roztoků tak, aby bylo výsledné složení standardní vody dle ČSN EN ISO 7346 a ČSN EN ISO 6341: (294 mg.l⁻¹ CaCl₂ · 2H₂O, 123,3 mg.l⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O, 63,0 mg.l⁻¹ NaHCO₃, 5,5 mg.l⁻¹ KCl). Nádrže byly promíchány a pročeřeny. Nejdříve byla provedena předběžná zkouška s 3 jedinci a řadou koncentrací obsahující hodnoty: 0,001; 0,01; 0,1 1,0 a 10 mg.l⁻¹. Podle výsledků této zkoušky byla navržena řada koncentrací základní zkoušky. Předběžná zkouška také detekovala přibližné hodnoty nejvyšší koncentrace, která ještě nezpůsobí na testovaných jedincích žádný efekt (NOEC) a dále nejnižší koncentraci, která způsobí 100% úhyn (LC100).

Na základě výsledků předběžného testu byla nadávkována koncentrační řada pro základní test, která obsahovala tyto hodnoty: 0,005; 0,01; 0,02; 0,04 a 0,08 mg.l⁻¹. Jednotlivé dávky mědi byly do akvárií odměřeny pomocí analytických pipet. Poslední 2 akvária sloužila jako kontroly bez nadávkovaného toxikantu.

V základní zkoušce bylo odpočítáno 20 jedinců odloveného měkkýše do každého z akvárií. Jedinci nebyli během experimentu krmeni. Experiment byl osvětlován lineární chladnou bílou zářivkou o světelném toku 2850 lm a o výkonu 36 W a probíhal při světelné periodě 16:8 (16 hodin světlo, 8 hodin tma). Nádrže nebyly během experimentu provzdušňovány. Před testem a také po každém vyhodnocení bylo v akváriích prováděno měření těchto parametrů: konduktivita, pH, obsah kyslíku a teplota. Během testu se konduktivita pohybovala mezi 130-135 ms.m⁻¹ hodnota pH byla mezi 7,60 – 8,10, obsah kyslíku neklesl pod hranici 80% a výkyvy teploty se pohybovaly v rozmezí 21- 23 °C.

Jako testovaná měďnatá sůl byl zvolen pentahydrát síranu měďnatého čistoty p.a., z něhož byl připraven vodní roztok, jenž obsahoval 1g.l⁻¹ mědi.

První vyhodnocení biotestu bylo provedeno po 24 hodinách. Sledovaly se tyto parametry: pohyblivost, přísátost na stěnách, uzavřenost ulit, reaktivnost na mechanické podněty a úhyn. Po 48 hodinách proběhlo druhé vyhodnocení, po kterém byli přeživší jedinci přesunuti do čisté vody s živnými roztoky.

Z výsledků biotestu byly pomocí statistického programu zjišťovány hodnoty EC50 pro 24 a 48 hodinové působení látky. Statistické vyhodnocení výsledků probíhalo pomocí programu GraphPadprism nelineární regresi (majitel licence ÚCHOP VŠCHT Praha – ve spolupráci).

4.3 Test akutní toxicity měďnaté soli na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

Tento biotest byl prováděn s jednodenními jedinci. Odchov dospělých perlooček (viz. Obr. 4) byl prováděn za standardních podmínek při kterých měli živočichové přístup k potravě v podobě zelených řas *Desmodesmus communis* (syn. *Scenedesmus quadricauda*) a zásobní nádoba byla provzdušňována. Po vyzorování většího množství březích samiček byli tyto jedinci přesunuti do skleněných nádob o objemu 750 ml, do kterých bylo odměřeno 0,5 l demineralizované vody se standardním množstvím živných roztoků solí jako v předchozím testu. Před samotným testem byly tyto nádoby vystaveny působení v 5% roztoku kyseliny dusičné pro jejich absolutní dekontaminaci.

Po 24 hodinách od vylíhnutí mladých jedinců byly matky odebrány pomocí upravených Pasteurových pipet a k jednodenním jedincům byly nadávkovány koncentrace mědi z předem připraveného roztoku síranu měďnatého o hodnotách: 0,001; 0,01; 0,1; 1 a 10 mg.l⁻¹

Vyhodnocení tohoto předběžného testu bylo provedeno po 24 hodinách, během kterých neměli denní jedinci přísun potravy. Sledovala se ztráta pohyblivosti a úhyn. Na základě zjištěných výsledků byla navržena užší koncentrační řada, která zahrnovala tyto hodnoty: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 a 0,1 mg.l⁻¹.

Pro tento biotest byli použiti jiní 24 hodinoví jedinci, získaní stejným způsobem jako pro předběžný test.

Před každým testem a po jeho každém vyhodnocení bylo prováděno měření konduktivity, pH, teploty a obsahu kyslíku. Během testu se konduktivita pohybovala mezi 130-135 ms.m⁻¹ hodnota pH byla mezi 7,60 – 8,10, obsah kyslíku neklesl pod hranici 80% a výkyvy teploty se pohybovaly v rozmezí 21- 23 °C.

Z výsledků biotestu byly pomocí statistického programu zjišťovány hodnoty EC50 pro 24 a 48 hodinové působení látky. Statistické vyhodnocení výsledků probíhalo pomocí programu GraphPadprism nelineární regresí (majitel licence ÚCHOP VŠCHT Praha – ve spolupráci).

4.4 Test akutní toxicity zinečnaté soli na písečníku novozélandském (*Potamopyrgus antipodarum*)

Tento biotest proběhl za stejných podmínek jako zkouška akutní toxicity měďnaté soli. Jako testovaná látka byl použit heptahydrát síranu zinečnatého čistoty p.a. z kterého byl připraven roztok obsahující 1g zinku na litr. Před každým testem a po jeho každém vyhodnocení bylo prováděno měření konduktivity, pH, teploty a obsah kyslíku. Během testu se konduktivita pohybovala mezi 130-135 ms.m⁻¹ hodnota pH byla mezi 7,60 – 8,10, obsah kyslíku neklesl pod hranici 80% a výkyvy teploty se pohybovaly v rozmezí 21- 23 °C.

Stejně jako při testu s mědí byl nejprve proveden předběžný test z jehož výsledků se poté navrhla koncentrační řada chemikálie pro test základní. V předběžném testu byly do testovacích akvárií vždy s třemi jedinci nadávkovány ze zásobního roztoku tyto koncentrace: 0,01; 0,1; 1; 10 a 100 mg zinku na litr. Test se vyhodnotil po 48 hodinách a z jeho výsledků byla navržena řada koncentrací pro základní test, která obsahovala hodnoty: 1; 2; 3 a 4 mg zinku na litr. Poslední akvárium bez zinku sloužilo jako kontrola.

V základním testu bylo do jednotlivých akvárií odpočítáno 20 jedinců. Po uplynutí stanovené doby intoxikace (24 a 48 hodin) byly zjišťovány reakce zkoušených jedinců na zinek jako při testu s mědí.

Z výsledků biotestu byly pomocí statistického programu zjišťovány hodnoty EC50 pro 24 a 48 hodinové působení látky. Statistické vyhodnocení výsledků probíhalo pomocí programu GraphPadprism nelineární regresí (majitel licence ÚCHOP VŠCHT Praha – ve spolupráci).

4.5 Test akutní toxicity zinečnaté soli na hrotnatce velké (*Daphnia magna*)

Odchov živočichů a samotný průběh testu byl proveden stejně jako při zkoušce s mědí. Během biotestu bylo prováděno měření stejných chemicko-fyzikálních parametrů prostředí a jejich hodnoty byly srovnatelné jako v předešlých zkouškách.

Po předběžném testu, který byl proveden s koncentracemi 0,01; 0,1; 1; 10 a 100 mg zinku na litr, byla navržena řada koncentrací pro základní test. Tato řada obsahovala hodnoty 4; 8; 12; 16 a 20 mg.l⁻¹ zinku. První vyhodnocení bylo provedeno po 24 hodinách a byly též opět změřeny fyzikální parametry. Po 48 hodinách intoxikace nebylo možno test hodnotit z důvodu příliš vysokého množství imobilizovaných jedinců i v kontrole.

Vyhodnocení koncentrace EC₅₀ bylo realizováno opět jako v předešlých testech. Hodnota EC₅₀_{48h} nebyla vzhledem k výsledku biotestu stanovována

4.6 Zkouška regenerace intox. živočichů (*Potamopyrgus antipodarum*)

Tento biotest byl proveden po základním testu s mědí. Přeživší jedinci byli po 48 hodinovém testu akutní toxicity přesunuti do akvárií s 2 litry redestilované vody obohacené živnými roztoky vybraných esenciálních solí stejného složení jako v předchozích testech. Opět byly změřeny důležité chemicko-fyzikální parametry (teplota, pH, obsah kyslíku a vodivost) jejichž výsledky, byli obdobné s předešlými testy.

V samotném biotestu byla objektivně hodnocena schopnost testovaných jedinců vzpamatovat se z působení toxické látky a bylo zjišťováno, která koncentrace zanechá na organismech reverzibilní změny (dojde k obnovení standardních životních projevů) a která koncentrace způsobí následky nevratného charakteru.

Výsledky regeneračního testu byly vyhodnocovány po 24 a 48 hodinách. Při hodnocení vratnosti či nevratnosti změn byla zkoumána schopnost testovaných plžů pohnout se za časový limit ze značky a schopnost živočichů přisát se k podkladu.

4.7 Fotodokumentace biotestu:



Obrázek 1 Lokalita odlovu Písečníka – Ostrá



Obrázek 2 Písečník novozélandský – *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1843)

Foto: Ing Kubík



Obrázek 3 Zavičkovaný Písečník

Foto: Ing Kubík



Obrázek 4 Perloočka velká – *Daphnia magna* (Straus, 1820) [zdroj: <http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/584661>]



Obrázek 5 Pokusná akvária

Foto: Josef Radechovský

5 Výsledky

5.1 Srovnání citlivosti živočichů na měď

Srovnání zaznamenaných efektů v podobě imobilizace, ke kterým po 24 a 48 hodinové intoxikaci mědi docházelo jak u písečníků, tak perlooček, je vyjádřeno jako EC50i, NOEC a LC100 v tabulce 1. Citlivost plže vůči mědi je srovnatelná, nebyl zaznamenán průkazný rozdíl v působení mědi na tohoto plže a na standardní používaný organismus - perloočky po 24 ani 48 hodinách (Graf 1).

Rozdíl v citlivosti byl zaznamenán při hodnocení schopnosti písečníka přisát se k podkladu po intoxikaci oproti imobilizaci perlooček ve 24 hodinovém testu. Výsledky stejného testu po 48 hodinách však ukázaly opět velmi podobnou citlivost obou živočichů na měď (Tabulka 2, Graf 2).

Podíl písečníků kterým se v čisté vodě během 48 hodin obnovila funkce základních životních funkcí úměrně stoupal se snižující koncentrací toxinu (Tabulka 5)

5.2 Srovnání citlivosti živočichů na zinek

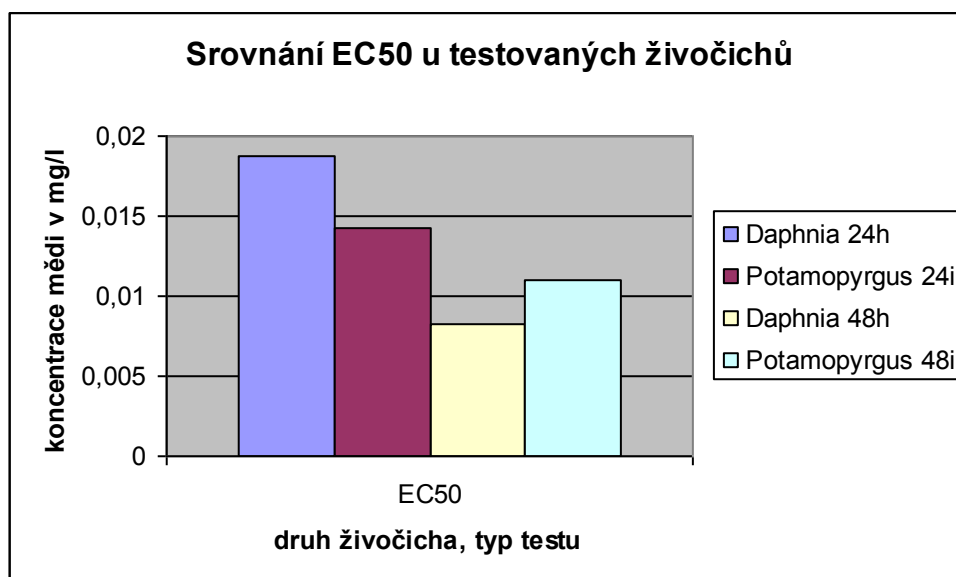
Při srovnání citlivosti testovaných živočichů na zinek byla zaznamenána průkazně vyšší citlivost u plže. Výsledek byl zjištěn při srovnávání imobilizace i neschopnosti se přisát k podkladu (Tabulky 3 a 4, Graf 3)

Dále bylo zjištěno, že není vhodné z hlediska přesnosti výsledků hodnotit působení zinku u písečníků již po 24 hodinách, protože působení toxické látky se může projevit až po delší době expozice. Z výsledků působení zinku na perloočky lze usoudit, že je ideální odečítat hodnoty po 24 hodinách.

Tabulka 1 Srovnání toxického účinku mědi na písečnky a perloočky (jako kontrolu) vyjádřené jako imobilizace po 24 a 48 hodinovém působení

Doba expozice	Organismus	EC50i	EC 50 interval 95% spolehlivosti	NOEC	EC100
		(mg.l ⁻¹)	(mg.l ⁻¹)		
24 hodin	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	0,014	0,007028 – 0,00906	< 0,005	>0,02
	<i>Daphnia magna</i>	0,02	0,01162 - 0,03029	< 0,01,	>0,04
48 hodin	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	0,008	0,006531 – 0,009652	< 0,005	>0,02
	<i>Daphnia magna</i>	0,008	0,003973 - 0,01736	< 0,005	>0,04

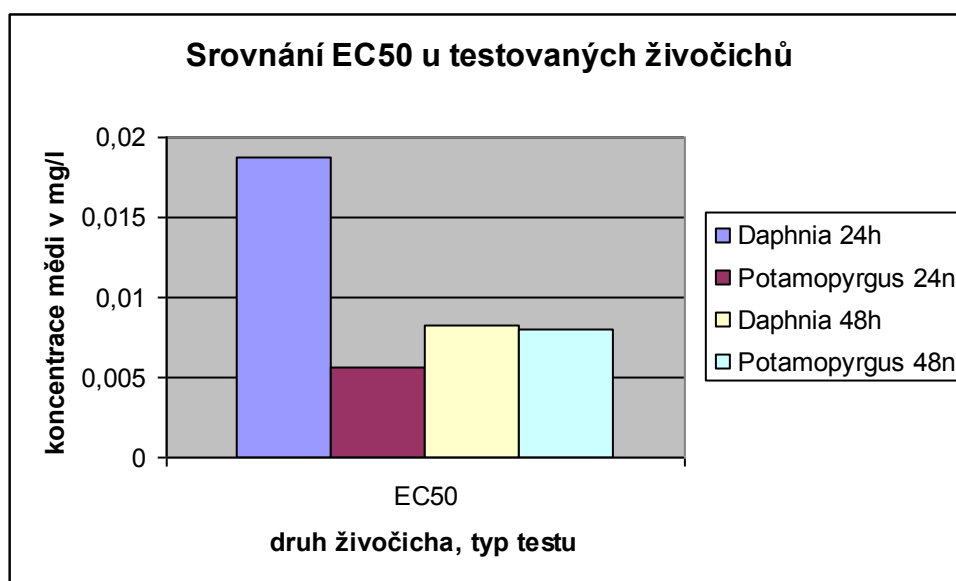
Graf 1 Srovnání toxického účinku mědi na písečnky a perloočky (jako kontrolu) vyjádřené jako imobilizace po 24 a 48 hodinovém působení



Tabulka 2 Srovnání toxického účinku mědi na písečníky a perloočky (jako kontrolu) vyjádřené jako % plžů neschopných se přisát po 24 a 48 hodinovém působení

Doba expozice	Organismus	EC50i	EC 50 interval 95% spolehlivosti	NOEC	EC100
		(mg.l ⁻¹)	(mg.l ⁻¹)		
24 hodin	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	0,005	0,005008 – 0,006191	< 0,005	>0,01
	<i>Daphnia magna</i>	0,02	0,01162 - 0,03029	< 0,01	>0,04
48 hodin	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	0,008	0,006531 – 0,009652	< 0,005	>0,04
	<i>Daphnia magna</i>	0,008	0,003973 - 0,01736	< 0,005	>0,04

Graf 2 Srovnání toxického účinku mědi na písečníky a perloočky (jako kontrolu) vyjádřené jako % plžů neschopných se přisát po 24 a 48 hodinovém působení



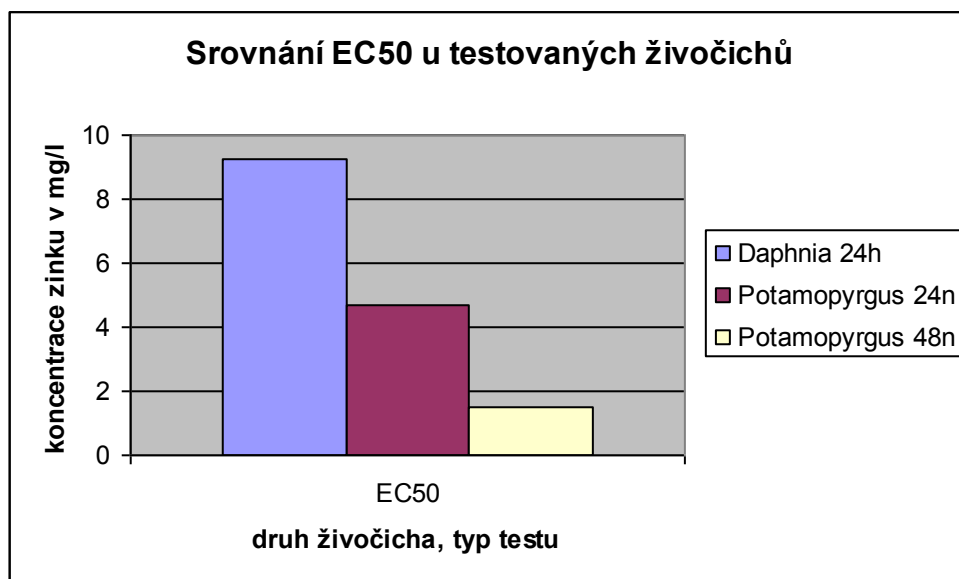
Tabulka 3 Srovnání toxického účinku zinku na písčánky a perloočky (jako kontrolu) vyjádřené jako imobilizace po 24 a 48 hodinovém působení

Doba expozice	Organismus	EC50i	EC 50 interval	NOEC	EC100
		(mg.l ⁻¹)	95% spolehlivosti (mg.l ⁻¹)		
24 hodin	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	nelze hodnotit			
	<i>Daphnia magna</i>	9,2	8,049 – 10,59	< 4	>16
48 hodin	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	2,1	1,487 - 2,943	< 1	> 4

Tabulka 4 Srovnání toxického účinku zinku na písčánky a perloočky (jako kontrolu) vyjádřené jako % plůž neschopných se přisát po 24 a 48 hodinovém působení

Doba expozice	Organismus	EC50i	EC 50 interval	NOEC	EC100
		(mg.l ⁻¹)	95% spolehlivosti (mg.l ⁻¹)		
24 hodin	<i>Potamopyrgu antipodarum</i>	4,7	3,290-6,776	< 1	>12
	<i>Daphnia magna</i>	9,2	8,049 - 10,59	< 4	16
48 hodin	<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	1,5	1,312 - 1,787	< 1	> 4

Graf 3 Srovnání toxického účinku zinku na pískovky a perloočky (jako kontrolu) vyjádřené jako % plžů neschopných se přisát po 24 a 48 hodinovém působení



Tabulka 5 Výsledky regeneračního testu s pískem, vyjádřené jako % jedinců bez obnovených životních projevů

Koncentrace měďi v předešlém biotestu	% imobilizovaných po 24 hodinách	% nepřisátých po 24 hodinách	% imobilizovaných po 48 hodinách
K	20	35	20
0,005	25	45	30
0,01	25	40	25
0,02	30	50	20
0,04	85	80	50
0,08	80	65	45

6 Diskuse

Přístup k odlovu písečníka novozélandského (*Potamopyrgus antipodarum*) v našich podmínkách lze konstatovat za dobrý. V sekundárních čistých biotopech (zatopené pískovny) se jich ve středních Čechách vyskytuje dostatek. Chov tohoto nepůvodního druhu předožábrého plže v laboratorních podmínkách se ukázal jako poměrně nenáročný. Životně limitující pro chov písečníka v laboratoři je teplota chovné vody během aklimatizace i během samotného ekotoxikologického biotestu. Jako optimální teplota vody byla shledána hodnota do 21 °C. Teplota přesahující 25 °C způsobovala podstatný nárůst úhynu jedinců v akváriích. Hodnota pH byla v přírodním biotopu neutrální a v jednotlivých biotestech neutrální až slabě alkalická (pH 7,5-8).

Při posuzování účinků akutní toxicity na tohoto vodního plže bylo hodnoceno větší množství reakcí (endpointů). Mortalita se ukázala jako obtížně stanovitelná, protože přirozenou reakcí plže na znečištění prostředí je zavíčkování se do ulity. Většina takto zavíčkovaných plžů je však po pominutí působení toxinu schopna obnovit své životní projevy. Proto při hodnocení toxicity dané látky není mortalita vhodným kritériem. Při vyhodnocení je třeba přistoupit k zjišťování účinků na snížení pohyblivosti plžů a jejich schopnosti přisát se k podkladu.

Při vyhodnocování testu se ukázala jako přesnější doba expozice až po 48 hodinách. Hodnocení okamžité imobilizace (plži se nehnou ze značky v řádu minut nebo hodin) je obtížné, vzhledem k tomu, že v tomto časovém horizontu se nemusí někteří jedinci pohybovat dokonce ani v kontrole. Mnohem lépe se zaznamenává celková 24 hodinová imobilizace (ze značky se plži nehnou za 24 hodin). Jako nejefektivnější pro hodnocení se tedy jeví doba, kdy se plž nepohne ze značky od 24. hodiny po intoxikaci do 48. hodiny. V případě sledování imobilizace již po 24 hodinách od intoxikace je však nutné vytvořit značky nejméně 2 hodiny po nadávkování toxikantu, tj. stanovit dobu hodnocení imobilizace od 2. do 24. hodiny od nadávkování toxikantu.

6.1 Citlivost testovaných živočichů na měď

Při intoxikaci mědí docházelo u písečníků podobně jako u perlooček ke změnám chování, tyto změny jsou tedy lépe zaznamenatelným efektem u tohoto zástupce živočichů,

než je vlastní mortalita a stejně jako u perlooček je možné doporučit tuto odpověď organismu jako efekt vyjadřující míru toxicity sledované látky. Co se týče imobilizace, hodnota EC50i obou druhů se příliš neliší (0,0143 mg.l⁻¹ pro 24 hodinovou imobilizaci písečníka a 0,0188 mg.l⁻¹ pro 24 hodinovou imobilizace perlooček) a i intervaly spolehlivosti se víceméně překrývají. Vzhledem k tomu, že u písečníka nedošlo k průkazně menší citlivosti na intoxikaci touto látkou oproti perloočkám, jeví se jako dostatečně citlivý druh pro monitorování ekotoxicity látek obsahujících například měď. V této odpovědi na intoxikaci mědi vychází dokonce písečník jako mírně citlivější. Sledovaná odpověď má také dostatečně úzký rozsah hodnot intervalu spolehlivosti, v kterém se s 95 % pravděpodobností hodnota EC50 nachází, z toho můžeme usuzovat, že tato odpověď organismu na intoxikaci je značně vyrovnaná, stabilní a je jí možno doporučit při testování toxicity. Z hlediska časového došlo u písečníků při prodloužení doby expozice z 24 na 48 hodin k zvýšení citlivosti, podobně jako u perlooček. U perlooček bylo zvýšení citlivosti více než dvojnásobné (z 0,0188 mg.l⁻¹ na 0,0083 mg.l⁻¹), také u písečníků se hodnota EC50 snížila téměř na polovinu z 0,0143 mg.l⁻¹ na 0,0079 mg.l⁻¹, vyrovnanost odpovědi vychází dokonce u písečníků lepší - interval spolehlivosti 95% (0,006531 – 0,009652 mg.l⁻¹). U písečníků se však jeví sledování imobilizace efektivnější až po 48 hodinách také z důvodu obtížnějšího způsobu hodnocení imobilizace, jelikož intoxikovaní plži se ještě nějakou dobu pohybují.

Kromě imobilizace byla sledována také druhá změna chování v podobě procenta jedinců nepřisátých se k podkladu. Vychází z předpokladu, že jedinci tohoto plže jsou přisáti k podkladu, pokud jsou zdraví a neovlivnění působením žádného toxikantu. Pokud dojde k jejich násilnému odtržení od podkladu (například drážděním skleněnou tyčinkou), velmi rychle se opět přichytnou. Toto bylo ověřené u všech jedinců před intoxikací a také u kontroly docházelo vždy k opětovnému okamžitému přichycení jedinců k podkladu během celé doby expozice testu. Tento efekt se zdá být ještě citlivější než imobilizace ve srovnání s perloočkami.

Jiné efekty, zejména mortalita, se v testu ukázaly jako méně citlivé a především podstatně obtížněji stanovitelné. Za 100 % mrtvé lze považovat pouze jedince, kterým upadla schránka (operculum) či se v její blízkosti vytvořila jakási blána, popřípadě jedinci, kteří jsou polootevření a nereagují na mechanické podněty.

Po uplynutí doby testu akutní toxicity mědi (48 hodin) byl proveden tzv. regenerační test, ve kterém se zjišťovalo, zda-li jsou intoxikovaní jedinci schopny z dávky toxinu

vzpamatovat aby se jim navrátily projevy základních životních funkcí (pohyb, schopnost se přisát k podkladu. Po 48 hodinovém pobytu v čisté vodě (tedy po 72 hodinách od intoxikace) bylo zaznamenáno, že menší část jedinců (až 20 %) se vzpamatovala k pohybu i z působení navržené nejvyšší dávky mědi ($0,08 \text{ mg.l}^{-1}$) a 35 % jedinců se bylo schopno přisávat k podkladu, zatímco při koncentraci $0,005 \text{ mg.l}^{-1}$ $\frac{3}{4}$ jedinců obnovili pohyb a základní životní funkce.

Citlivost písečníků *P. antipodarum* vůči toxicitě mědi byla vysoká. Hodnoty LC50 pro akutní toxicitu byly zjištěny mnohem nižší, než se pohybují u ryb i pro působení chronické toxicity (Felts & Heath, 1984; Ali a kol., 2003). To víceméně potvrzuje fakt, že bezobratlí jsou vůči mědi citlivější než ryby (Svobodová, 1987).

Jiné životně důležité vlastnosti jako je například růst či plodnost u tohoto plže jsou podle Dorgela a kol. (1995) ohroženy už při koncentraci $30 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ pro snížení plodnosti a $13 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ pro snížení růstu.

Zjištěné hodnoty EC50 pro písečníky a perloočky byly o řád nižší než hodnoty LC50, které zaznamenali Gerhardt a Palmer (1998) pro přilipkovitého plže *Burnupia stenochorias* (1998), LC50_{24h} $0,36 \text{ mg.l}^{-1}$ a LC50_{48h} $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$.

Také akutní toxicita mědi pro sladkovodní krevetku *Macrobranchium lanchesteri* zjištěná Shuhaimi – Othmanem a kol. (2009) - LC50_{24h} $0,261 \text{ mg.l}^{-1}$ a LC50_{48h} $0,172 \text{ mg.l}^{-1}$ byla vyšší, než zjištěné koncentrace jak pro perloočku, tak pro písečníky. Nicméně velmi vysoký vliv mědi byl zjištěn například na perloočce *Ceriodaphnia silvestri* ve velmi specifických testech chronické toxicity, při kterých byl hodnocen vliv potravy (řasa *Pseudokirchneriella subscapitata*) kontaminované mědí ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) na změny v životních projevech (růst, mortalita, rozmnožování) a na rychlost přijímání živin v testu. Ekotoxický efekt mědi se zde ukázal dokonce již při koncentraci v řádu nanogramů (Rodgher a kol., 2008).

Také pro sladkovodní tropickou rybu *Prochilodus scrofa* (Characiformes) byla zjištěna vysoká toxicita mědi, v testu akutní toxicity byla stanovena LC50_{96h} jen $29 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$. Což odpovídá koncentracím EC50, které jsme zjistili pro naše testované živočichy. K podobnému výsledku se v minulosti došlo i s druhem *Carassius auratus* či s *Poecilia reticulata* (Mazon & Fernandes, 1999). Nicméně pro naše ryby byly zjištěny hodnoty toxicity mědi až řádově vyšší (Svobodová a kol., 1987).

6.2 Citlivost testovaných živočichů na zinek

V tomto testu se hodnotily stejné parametry jako u testu s mědí. U výsledků experimentu s písečnicí po 24 hodinách expozice ($EC_{50_{24h}}$) se projevil příliš široký interval 95% spolehlivosti a proto se efekt imobilizace odečetl pouze po 48 hodinách. U hrotnatek bylo možno vyhodnotit experiment pouze po 24 hodinách.

Výsledná citlivost organismů na toxin se zde několika násobně lišila a citlivost písečnicka se zde ukázala téměř dvojnásobně vyšší oproti perloočkám. Výsledky tohoto biotestu naznačují větší citlivost na obsah zinku ve vodě u vybraného zástupce plžů oproti perloočkám. Zinek se obecně řadí mezi prvky pro vyšší živočichy esenciální a škodlivé účinky se projevují až u vyšších koncentrací. Jeho toxicita se v nižších koncentracích projevuje pouze u nižších živočichů. Senzitivita u plžů vůči zinku je druhově specifická, Khangarot et Ray (1988) detekoval hodnoty LC_{50} pro plže plovatku *Radix luteola* však ještě dvakrát nižší, než byly nalezeny pro tento modelový druh.

Zjištěná citlivost perlooček v rámci testování akutní toxicity není příliš vysoká ($EC_{50_{24h}} = 9,2 \text{ mg.l}^{-1}$), nicméně Muysen a kol. (2006) při delší době expozice (po sedmi dnech) zjistil až 93 % mortalitu již při koncentraci $Zn^{2+} 340 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$. Předpokládá takto vysoký účinek chronické toxicity zinku v důsledku zjištěné kompetice v příjmu Zn a vápníku. Zinek prokazatelně snižoval příjem vápníku organismem. Z těchto výsledků je možno předpokládat, že běžné testy akutní toxicity neodhalí koncentrace zinku, které však mohou negativně působit na organismy chronickým působením. Z tohoto hlediska se jeví citlivější písečník ($EC_{50_{48h}} = 1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ pro neschopnost se přisát podkladu) jako vhodnější pro monitorování toxických účinků zinku v rámci jednoduchých stanovení akutní toxicity. Některé životně důležité funkce jako je například růst jsou podle Dorgela a kol. (1995) ohroženy u písečnicků už při koncentraci $103 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$.

Toxicita zinku pro různé bezobratlé se může až řádově lišit, Guzmán a kol. (2010) zjistil akutní toxicitu tohoto kovu na vířníku *Lecane quadridentata* velmi vysokou. $LC_{50_{48h}}$ byla stanovena na hodnotu $0,123 \text{ mg.l}^{-1}$. Což ukazuje potřebu monitoringu zinku v prostředí, jelikož je pro vyšší organismy včetně ryb relativně netoxický (Van Dyk, 2007) a jeho toxické působení se nemusí na těchto organismech viditelně projevit, nicméně může narušit diverzitu některých bezobratlých. I data zjištěná pro ryby (Stubblefield a kol. 1999; Schampelaere a

Janssen 2004) však ukazují například řádově vyšší citlivost juvenilních stádií ryb, než jaká byla zjištěná citlivost plže *P. antipodarum*.

Například nitěnky, které se používají také jako alternativní organismy pro testování sedimentů v kontaktních testech stejně jako plži jsou proti zinku však velmi málo citlivé, Svobodová (1987) uvádí, že hynou až při koncentraci 28 mg.l⁻¹. Plž písčák se jeví jako mnohem citlivější. Rozdíl v toxicitě bezobratlých a obratlovců se projevuje i v tom, že pro obratlovce je dokonce v malých koncentracích (do 0,03 – 0,06 mg.l⁻¹) esenciálním prvkem a negativně se projevuje u ryb naopak jeho nedostatek (Mohanty a kol., 2009).

Při hodnocení citlivosti písčáků na obsah zinku ve vodě se ukázal jako vhodnější parametr, schopnost jedinců přisát se k povrchu dna akvária po 48 hodinách působení toxinu. Výsledky expozice toxikantu po 24 hodinách nemají zdaleka tak přesnou vypovídací hodnotu. Svědčí o tom užší EC50 Interval 95% spolehlivosti a také snadnější identifikace reakce živočicha.

7 Závěr

Hypotéza, že vůči určitým toxikantům bude plž *Potamopyrgus antipodarum* výrazně citlivější než perloočka *Daphnia magna* se potvrdila pouze v případě testu se zinkem. V biotestech s mědí byly rozdíly mezi oběma organismy v řádu jednotek mikrogramů. Prokázalo se však, že vůči oběma toxikantům je plž *Potamopyrgus antipodarum* srovnatelně citlivý jako perloočky, vůči toxicitě zinku je dokonce průkazně citlivější. Z výše uvedených poznatků lze tedy jednoznačně doporučit tohoto plže jako alternativní testovací organismus pro stanovování ekotoxicity v případech, kdy použití perlooček není vhodné, tedy například pro testování nerozpustných substrátů, které nelze vyluhovat do vody standardními postupy. Vzhledem k tomu, že se jeví průkazně citlivější na účinky zinku, mohlo by se této vlastnosti také využít při testování ekotoxicity látek a odpadů podezřelých z vyšších koncentrací zinku.

Jako nejcitlivější a nejreprezentativnější parametr životních funkcí po intoxikaci se v případě tohoto měkkýše ukázala schopnost živočicha přisát se k podkladu a dále schopnost samotného pohybu. Stejně jako perloočky reagují tyto plži citlivěji na účinky imobilizací než vlastní mortalitou. Imobilizaci je možné efektivně zjistit nejdříve po 48 hodinách. Mortalita písečníka se vzhledem k obtížnému vizuálnímu vyhodnocení aktuálního stavu testovaného jedince, ukázala oproti hrotnatce jako velmi těžko stanovitelná. Testování plži na jedovatost prostředí reagovali nejčastěji uzavřením se do ulity, ale v následném testu regenerace se jim v čisté vodě často navrátily základní životní funkce. Vlastní mortalitu lze z tohoto důvodu jen obtížně hodnotit.

Ačkoli je v literatuře biologická účinnost mědi a zinku (Svobodová a kol., 1987) hodnocena jako podobná, vzhledem k tomu, že se jedná o kovy s podobnými chemickými vlastnosti a podobnou molekulovou hmotností, byl zaznamenán mnohem toxičtější účinek mědi oproti zinku (až o tři řády) pro oba dva živočichy.

8 Seznam použité literatury

- ABERLE, N., HILLEBRAND, H., GREY, J., WILTSHIRE, K. H. 2005: Selectivity and competitive interaction between two benthic invertebrate grazers (*Asellus aquaticus* and *Potamopyrgus antipodarum*): an experimental study using ¹³C and ¹⁵N labelled diatoms. *Freshwater Biology*, 50 (2): 369-379.
- ALI, S. M., AL-OGAILY, N.A., AL-ASGAH, GROPP, J. 2003: Effect of sublethal concentrations of copper on the growth performance of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 183.
- ALONSO, A., CAMARGO, J. A. 2004: Sublethal Responses of the Aquatic Snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca) to Unionized Ammonia: A Tolerant Invading Species. *Fressenius Environmental Bulletin*, 13 (7): 607-615.
- BATURO, W., LAGADIC, L. 1996: Benzo[*a*]pyrene hydrolase and glutathione *s*-transferase activities as biomarkers in *Lymnaea palustris* (Mollusca, Gastropoda) exposed to atrazine and hexachlorbenzene in freshwater mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (5): 771 – 781.
- BATURO, W., LAGADIC, L., CAQUET, T. 1995: Growth, fecundity and glycogen tilization in *Lymnaea palustris* exposed to atrazine and hexachlorbenzene in freshwater mesocosmos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(3): 503 – 511.
- BENGERI, K. V., PATIL, H. S. 1986: Influence of hardness on the toxicity of zinc sulfate to fish *Lepidocephalichthyes guntea*. *Environment and Ecology*, 4 (1): 115-117.
- BERAN, L. 2002: Vodní měkkýši České republiky – rozšíření a jeho změny, stanoviště, šíření, ohrožení a ochrana, červený seznam, Přírodovědný klub v Uherském hradišti a Muzeum jihovýchodní Moravy ve Zlíně, 258 str.
- BLOCKWELL, S. J. PASCOE, D. TAYLOR, E. J. 1996: Effects of lindane on the growth of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Chemosphere*, 32: 1795 – 1803.
- BROEKHUIZEN, N., PARKYN, S., MILLER, D. 2001: Fine Sediment Effects on Feeding and Growth in the Invertebrate Grazers *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropoda, Hydrobiidae) and *Deleatidium* sp. (Ephemeroptera, Leptophlebiidae). *Hydrobiologia*, 457(1-3): 125-132.
- CENGIZ, E. I., YILDIRIM, M.Z., OTLUDIL, B., ÜNLÜ, E. 2005: Histopathological effect of Thiodan on the freshwater snail, *Galba truncatula* (Gastropoda, Pulmonata). *Journal of applied toxicology*, 25: 464 – 469.
- COEURDASSIER, M., VAUFLEURY, A., BADOT, P. M. 2003: Bioconcentration of cadmium and toxic effects on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory bioassays. *Archives of Enviromental Contamination and Toxicology*, 45 (1): 101-109.

DOBŠÍKOVÁ, R. 1999: Vliv živného média na reprodukční parametry *Daphnia magna* s. 119 – 123. In: Dočkal, P. Maszjarová, E. 1999: Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, Sborník referátů z 9 konference, Soláň 13. – 15.9. 1999, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický Aquachemie Ostrava, 227 stran.

DOBŠÍKOVÁ, R. 2003: Vliv kvality živného média na chronickou toxicitu referenčního toxikantu pro *Daphnia magna* Straus, s. 43-49. In: Dočkal, P., Máchová, J.: Toxicita a biodegradabilita látek a odpadů významných ve vodním prostředí, sborník referátů 11. konference Soláň 2003, JČU v Českých Budějovicích, VURH ve Vodňanech, Aquachemie Ostrava, 322 str.

DORGELO, J., MEESTER, H., VELZEN, C. 1995: Effects of diet and heavy metals on growth rate and fertility in the deposit-feeding snail *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith) (Gastropoda: Hydrobiidae). *Hydrobiologia*, 316: 199-210.

DUFT, M., SCHULTE-OEHLMANN, U., TILMANN, M., MARKET, B. 2003A: Toxicity of Triphenyltin and Tributyltin to the Freshwater Mudsnailed *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (1): 145-152.

DUFT, M., SCHULTE-OEHLMANN, U., WELTJE, L., TILMANN, M., OEHLMANN, J. 2003B: Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology* 64: 437-449.

DUFT, M., TILMANN, M., SCHULTE-OEHLMANN, U., MARKERT, B., OEHLMANN, J. 2002: Entwicklung eines Sedimentsbiotests mit der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropoda: Prosobranchia). *Umweltchem Ökotox*, 14 (1): 12-17.

DVOŘÁK, P. 1995: Modifikovaný test s *Artemia salina* pro sledování vlivu interakce cizorodých látek s. 25 – 29. In: Máchová, J. Vykusová, B. Svobodová, Z. 1995 Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, Sborník referátů z 7 konference, Milenovice 12. – 15.6. 1995, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany, 202 stran.

FELTS, P. A., HEATH, A. G. 1984: Interactions of temperature and sublethal environmental copper exposure on the energy metabolism of bluegill, *Lepomis macrochirus* Rafinesque. *Journal of Fish Biology*, 25: 445.

FRÖMMING, E. 1956: Biologie der Mitteleuropäischen Süßwasserschnecken. Duncker and Humblot, Berlin, 313 pp.

GERARD, C., POUILLAIN, V. 2005: Variation in the response of the invasive species *Potamopyrgus antipodarum* (Smith) to nature (cyanobacterial toxin) and anthropogenic (herbicide atrazine) stressors. *Environmental pollution*, 138: 28 – 33.

GERHARDT, A., PALMER, C. 1998: Copper tolerances of *Adenophlebia auriculata* (Eaton) 1884 (Insecta: Ephemeroptera) and *Bunurpia stenochoria* Cawston 1932 (Gastropoda: Ancyliidae) in indoor artificial streams. *The Science of the Total Environment* 215: 217-229.

GOMOT, A. 1998: Toxic Effects of Cadmium on Reproduction, Development, and Hatching in the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis* for Water Quality Monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41: 288 – 297.

GÖTTING, K. J. 1974: *Malakozoologie, Grundriß der Weichtierkunde*. Gustav Fischer verlag Stuttgart, 320.

GUZMÁN, F., GONZÁLEZ, F., MARTÍNEZ, R. 2010: Implementing *Lecane Quadridentata* acute toxicity tests to assess the toxic effects of selected metals (Al, Fe and Zn). *Ecotoxicology and environmental safety*, 73: 287 – 295.

KHANGAROT, B. S., RAY, P. K. 1987: Zinc Sensitivity of a Freshwater Snail, *Lymnaea luteola* L., in Relation to Seasonal Variations in Temperature. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 39: 45-49.

KHANGAROT, B. S., RAY, P. K. 1988: Sensitivity of Freshwater Pulmonate Snails, *Lymnaea luteola* L., to heavy Metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41: 208-213.

KLOBUČAR, G. I. V., JASNA, L., ERBEN, R. 2001: Increase in number and size of kidney concretions as a result of PCP exposure in the freshwater snail *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata). *Diseases of Aquatic Organismus*, 44: 149 – 154.

KLOBUČAR, G., I., V., LAJTNER, J., ERBEN, R. 1997: Lipid Peroxidation and Histopathological Changes in the Digestive Gland of a Freshwater Snail *Planorbarius corneus* L. (Gastropoda, Pulmonata) Exposed to Chronic and sub-chronic Concentration of PCP. *Bulletin of Contamination and Toxicology*, 58: 128 – 134.

KOČÍ, V. 2002: Postavení testů toxicity v monitoringu životního prostředí s. 3 – 7. In: Kočí, V. Halousková, O. 2002: *Ekotoxikologické biotesty 1*, Seč 18. – 19.9 2002, Vodní zdroje Ekomonitor spol.s.r.o., 190 stran.

LAZECKÝ, P. 1993: Akutní a chronická toxicita vybraných kovů pro vodní organismy s. 30 – 33. In: Lazecký, P. 1993: *Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí*, Sborník referátů z 6 konference, Milenovice 2. – 5. 11. 1993, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Vodňany, 257 stran

MAESTRE, Z., MARTINEZ, M. M., RODRIGUEZ, P. 2009: Monitoring the sensitivity of the oligochaete *Tubifex tubifex* in laboratory cultures using three toxicants. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 72 (8): 2083-2089.

MAESTRE, Z., MARTINEZ-MADRID, M., RODRIGUEZ, P., REYNOLDSON, T. 2007: Ecotoxicity assessment of river sediments and a critical evaluation of some of the procedures used in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* chronic bioassay, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53: 559–570.

- MARŠÁLEK, B. 2002: Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití s. 8 – 24. In: Kočí, V. Halousková, O. 2002: Ekotoxikologické biotesty 1, Seč 18. – 19.9 2002, Vodní zdroje Ekomonitor spol.s.r.o., 190 stran.
- MAZON, A. F., FERNANDES, M. N. 1999: Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). Environmental contamination and toxicology, 63: 797 – 804.
- MOHANTY, M., ADHIKARI, S., MOHANTY, P., SARANGI, N. 2009: Effect of waterborn Zinc on survival, growth and feed intake of Indian major Carp, *Cirrhinus Mrigala* (Hamilton). Water Air Soil Pollut, 201: 3 – 7.
- MUNOZ, I., ROSÉS, N. 2000: Comparison of extraction methods for the determination of atrazine accumulation in freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll., Gastropoda). Water research, 34 (10): 2846 – 2848.
- MUYSSSEN, B.T.A., DE SCHAMPHELAERE, K. A. C., JANSSEN, C.R., 2006: Mechanism of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol., 77: 393–401.
- NAKANO, E., WATANABE, L. C., OHLWEILER, F. P., DE BRAGANCA, P. C. A.,
- KAWANO, T. 2003: Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Mutation Research, 536 (1 – 2): 145 – 154.
- OEHLMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U. 2002: Molluscs as bioindicators. Bioindicators and biomonitors (in Market, B. A., Breure A. M., Zechmeister, H. G. editors): 577-635
- OEHLMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U., TILLMANN, M., MARKERT, B. 2000: Effects of Endocrine Disruptors on Prosobranch Snails (Mollusca: Gastropoda) in the Laboratory. Part I: Bisphenol A and Octylpentol as Xeno-Estrogens. Ecotoxicology, 9(6): 383-397.
- PAULAUSKIS, J. D., WINNER, R. W. 1988: Effects of water hardness and humic acid on zinc toxicity to *Daphnia magna* Straus. Aquatic Toxicology, 12(3): 273-290.
- PAVLICA, M., KLOBUČAR, G. I. V., VETMA, N., ERBEN, R., PAPEŠ D. 2000: Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. Mutation research, 465: 145 – 150.
- PAVLÍKOVÁ, D., PAVLÍK, M., MATĚJŮ, L., BALÍK, J. 2008: Ekotoxikologie, Česká zemědělská univerzita v Praze, 171 str.
- PERSOONE, G. A., VAN DE VEL, M. ET VAN STEERTEGEM DE NAYER, B. 1989: Predictive value of laboratory tests with aquatic invertebrates: influence of experimental conditions. Aquat. Toxicol. 14: 149 – 166.

- POLICAR, T. MÁCHOVÁ, J. KOZÁK, P. 2003: Akutní toxicita volného amoniaku a dusitanů pro ročky Raka říčního (*Astacus astacus*) s. 215 – 222. In: Dočkal, P. Máchová, J. 2003: Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, Sborník referátů z 11 konference, Soláň 1 – 3.9. 2003 Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. Aquachemie Ostrava, 324 stran.
- RICHARDS, D. C. 2002: The New Zealand mudsnail invades the western United States. Aquatic Nuisance Species Digest (Gray Freshwater Center, Navarre, MN) 4(4): 42-44.
- RODGHER, S., LOMBARDI, A., MELAO, M., TONIETTO, A. 2008: Change in life cycle parameters and feeding rate of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) exposure to dietary copper. Ecotoxicology, 17: 826 – 833.
- ROSES, N., POQUET, M., MUNOZ, I. 1999: Behavioural and Histological Effect of Atrazine on Freshwater Mollusc (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll., Gastropoda). Journal of Applied Toxicology, 19: 351 – 356.
- ROSYPAL, S. A KOL. 2003: Nový přehled biologie, Scientia Praha, 797 str.
- RUSSO, J., LAGADIC, L. 2004: Effect of environmental concentration of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). Environmental Pollution, 127: 303 – 311.
- SATAPORNVANIT, K., BAIRD, D. J., LITTLE, D. S. 2008: Laboratory toxicity test and post-exposure feeding inhibition using the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Chemosphere, 74: 1209 – 1215.
- SAWASDEE, B. & KOHLER, H. 2009: Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). Chemosphere, 75: 1539 – 1547.
- SHUHAIMI OTHMAN M. AND NOR AZWA M. 2004: Acute toxicity and bioaccumulation of zinc and lead in the freshwater prawn *Macrobrachium Lanchesteri*. Malaysian Journal of Science, 23 (2): 11 – 18.
- SHUHAIMI-OTHMAN, M., NADZIFAH, Y., NUR-AMALINA, R., AHMAD, A. 2009: Toxicity of Copper and Nickel to Freshwater Prawn *Macrobrachium lanchesteri*. Sains Malaysiana, 38: 353 – 358.
- SCHAMPHELAERE, K. A., JANSSEN, C. R. 2004: Bioavailability and Chronic Toxicity of Zinc to Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Comparison with Other Fish Species and Development of a Biotic Ligand Model. Envir. Sci. Technol., 38(23): 6201-9.
- SCHULTE-OEHLMANN, U., TILLMANN, M., CASEY, D., DUFT, M., MARKERT, B., OEHLMANN, J. 2001: Östrogenartige Wirkungen von Bisphenol A auf Vorderkiemensschnecken (Mollusca: Gastropoda: Prosobranchia). Umweltchem Ökotox, 13 (6): 319-333.

SCHULTE-OEHLMANN, U., TILLMANN, M., MARKERT, B., OEHLMANN, J. 2000: Effects of Endocrine Disruptors on Prosobranch Snails (Mollusca: Gastropoda) in the Laboratory. Part II: Triphenyltin as a Xeno-Androgen. *Ecotoxicology*, 9: 399-412.

STUBBLEFIELD, W. A., STEADMAN, B. L., LA POINT, T. W., BERGMAN, H. L. 1999: Acclimation – induced changes in the toxicity of zinc and cadmium to rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 (12): 2875–2881

SVOBODOVÁ, Z. A KOL. 1987: Toxikologie vodních živočichů. Ministerstvo zemědělství a výživy ČR a Český rybářský svaz v SZN Praha, 232 p.

ŠPOLJAR, M. LAJTNER, J. PRIMC-HABDIA, B. 2005: The effect of sodium pentachlorophenolate on histopathological changes in the digestive gland of *Amphimelania holandri* (Gastropoda, Prosobranchia). *Biologia*, Bratislava, 60/2: 201 – 205.

TARAZONA, J. V., NUNEZ, O. 1987: Acute Toxicity of Synthetic Detergents to Snails: Effect of Sodium Lauryl Sulphate on *Limnaea peregra* Shells. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 39: 1036 – 1040.

TILLMANN, M., SCHULTE OEHLMANN, DUFT, M., MARKERT, B., OEHLMANN, J. 2001: Effect of Endocrine Disruptors on Prosobranch Snails (Mollusca: Gastropoda) in the Laboratory. Part III: Cyproterone Acetate and Vinclozin as Antiandrogens. *Ecotoxicology*, 10: 373-388.

VAN DYK, J. C., PIETERSE, G. J., VAN VUREN, H. J. 2007: Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 432 – 440.

VESELÁ, Š. 2004: Co víme (a nevíme) o perloočkách, perloočky v ekotoxikologii s. 18 – 25 In: Kočí, V. Maršálek, B. Tlustá, P. 2004 Ekotoxikologické biotesty 4, Chrudim 15. – 17.9 2004, Vodní zdroje EKOMONITOR spol.s.r.o.,2004, 220 stran.

VRŠKOVÁ, D. 2003 : Model FETAX – využití pro stanovení embryotoxicity látek u Drápatky vodní (*Xenopus laevis*) s. 301 – 304. In: (Dočkal, P. Máchová, J. 2003: Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí, Sborník referátů z 11 konference, Soláň 1 – 3.9. 2003 Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický ve Vodňanech. *Aquachemie Ostrava*, 324 stran.

WINNER, R.W., OWEN, H. A. 1991: Toxicity of copper to *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) and *Ceriodaphnia dubia* (Crustacea) in relation to changes in water chemistry of a freshwater pond. *Aquatic Toxicology*, 21 (3-4): 157-169.

ČSN EN ISO 6341 (1998): Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity

ČSN EN ISO 7346 (1996): Jakost vod – Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton- Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]

ČSN ISO 10229 (1997): Jakost vod - Stanovení subchronické toxicity látek pro sladkovodní ryby - Metoda vyhodnocení účinků látek na růstovou rychlost pstruha duhového [*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae)]

ČSN ISO 10706 (2001): Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Staus (Cladocera: Crustacea)