

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv sladkovodních filtrátorů na invazní druhy parazitů:
modelový druh *Daphnia magna*
Diplomová práce**

Bc. Adéla Švajná

Zájmové chovy zvířat

Ing. Karel Douda, Ph. D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv sladkovodních filtrátorů na invazní druhy parazitů: modelový druh *Daphnia magna*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19. 4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Karlu Doudovi, Ph.D. za čas věnovaný konzultacím, vstřícný přístup a za cenné rady a pomoc při zpracování této práce. Také bych ráda poděkovala za příležitosti zapojení se do činnosti na projektech. Velké díky patří MSc. Divakaranovi Pandianovi za poskytnutí larev, ochotu a pomoc při realizaci experimentu. Také bych ráda poděkovala Mgr. Mehrak Mohammadi, Ing. Kateřině Gregarové a Ing. Juan Felipe Escobarovi Calderónovi, Ph.D. za veškerou pomoc při experimentech. Dále bych vyjádřila velké díky mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

Vliv sladkovodních filtrátorů na invazní druhy parazitů: modelový druh *Daphnia magna*

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá problematikou vlivu sladkovodních filtrátorů na invazní druhy parazitů. Jako modelový organismus byl použit druh *Daphnia magna* (Straus 1820) a parazitická hlístice *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935). Práce je rozdělena na dvě části, a to literární rešerši a experimentální část. Literární rešerše se zabývá uvedením modelového druhu *D. magna*, popsána je jeho biologie a ekologie, dále je zmíněn laboratorní chov těchto organismů. Následně je popsán životní cyklus *A. cantonensis*, metody chovu parazitických hlístic a je stručně představen pojem clearance rate a popsány faktory, které ho ovlivňují v případě planktonních korýšů. Cílem této práce bylo vyhodnotit vliv planktonních korýšů *D. magna* na larvy ve vývojovém stádiu L1 a stejně tak vliv larev na chování a fyziologické funkce filtrátora.

Byl proveden modelový experiment s *D. magna* zaměřený na intenzitu odstraňování (clearance rate) larev parazitických hlístic z vodního prostředí. 18 jedinců *D. magna* bylo vystaveno larvám ve stadiu L1 po dobu 18 hodin ve standardizovaných laboratorních podmínkách. Bylo prokázáno, že dafnie jsou skutečně efektivní při odstraňování těchto larev, a že počet L1 v nádobách s filtrátory byl významně nižší (1890 ± 390 průměr \pm sm. odch), než počet L1 v nádobách bez nich (2600 ± 560 průměr \pm sm. odch). Následně bylo 10 exponovaných a 10 kontrolních jedinců podrobena mikrorespirometrickému měření, pomocí kterého byla detekována spotřeba kyslíku na jedince z obou skupin. Žádné významné rozdíly ve spotřebě kyslíku však nebyly prokázány. U kontrolní skupiny jsme naměřili 539 ± 163 (průměr \pm sm. odch) MO₂ [pmol/jedinec/min] a u exponované 582 ± 112 (průměr \pm sm. odch) MO₂ [pmol/jedinec/min]. Jako další proběhlo zaznamenání pohybové aktivity u 20 dafnií, 10 v kontrolní a 10 v exponované skupině, z kterého byly vyhodnoceny změny projevu chování z hlediska pohybové aktivity (např. rychlost, délka, trajektorie pohybu). Ani toto testování nepotvrdilo zásadní rozdíly mezi kontrolní a exponovanou skupinou. Nakonec byla provedena pitva na průkaz přítomnosti larev v těle dafnií. Nálezy byly negativní a přítomnost larev se nepotvrdila. Z těchto výsledků jsme usoudili, že ačkoliv jsou dafnie efektivní při odstraňování L1 z prostředí, larvy nijak významně neovlivňují jejich fyziologické funkce ani projevy jejich chování. Bylo zjištěno, že filtrátoři mají vliv na larvy této parazitické hlístice ve stadiu L1, ale larvy nemají žádný vliv na filtrátory.

Tato diplomová práce přináší první informace o interakci *D. magna* a *A. cantonensis* v laboratorních podmínkách. Metodické poznatky je možné využít při testování vlivu dalších parazitů na tohoto filtrátora či jako podklad k terénnímu výzkumu vzájemných interakcí dafnie – parazit.

Klíčová slova: korýši, filtrátoři, parazité, laboratorní chov, hlístice

Effect of freshwater filters on invasive parasite species: the model species *Daphnia magna*

Summary

This thesis deals with the issue of the effect of freshwater filters on invasive parasite species. The species *Daphnia magna* (Straus 1820) and the parasitic nematode *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935) were used as model organisms. The thesis is divided into two parts, namely literature review and experimental part. The literature search deals with the introduction of the model species *D. magna*, its biology and ecology are described, and the laboratory rearing of these organisms is also mentioned. Subsequently, the life cycle of *A. cantonensis* is described, methods of rearing parasitic nematodes are described and the concept of clearance rate is briefly introduced and factors affecting it in the case of planktonic crustaceans are described. The aim of this work was to evaluate the effect of the planktonic crustacean *D. magna* on the larvae at the L1 developmental stage, as well as the effect of the larvae on the behaviour and physiological functions of the filter feeders.

A model experiment with *D. magna* was conducted to investigate the removal rate (clearance rate) of parasitic nematode larvae from the aquatic environment. 18 *D. magna* individuals were exposed to L1 stage larvae for 18 h under standardized laboratory conditions. It was shown that daphnia are indeed effective in removing these larvae, and that the number of L1 in containers with filter feeders was significantly lower (1890 ± 390 mean \pm SD) than the number of L1 in containers without them (2600 ± 560 larvae mean \pm SD). Subsequently, 10 exposed and 10 control individuals were subjected to microrespirometric measurements to detect oxygen consumption per individual in both groups. However, no significant differences in oxygen consumption were found. Microrespirometer measurements of 539 ± 163 (mean \pm SD.) MO₂ [pmol/individual/min] were obtained in the control group and 582 ± 112 (mean \pm SD) MO₂ [pmol/individual/min] in the exposed group. As an additional step, the locomotion activity was recorded in 20 daphnia, 10 in the control and 10 in the exposed group, from which the changes in behavioral expression during different types of swimming activity (average speed, meandering, traveled distance, exploration value) were evaluated. Even this testing did not confirm significant differences between the control and exposed groups. Eventually, a necropsy was performed to detect the presence of larvae in the daphnia body. The findings were negative and the presence of larvae was not confirmed. From these results, we concluded that although daphnia are effective in removing L1 from the environment, larvae do not significantly affect their physiological functions or behavioral manifestations. It was found that filter feeders have an effect on the larvae of this parasitic nematode at the L1 stage, but the larvae have no effect on filter feeders.

This thesis provides the first information on the interaction between *D. magna* and *A. cantonensis* under laboratory conditions. The methodological findings can be used to test the influence of other parasites on this filter-feeder or as a basis for field research on daphnia-parasite interactions.

Keywords: crustaceans, bio-filters, parasites, laboratory rearing, nematodes

Obsah

1	Vědecká hypotéza a cíle práce	11
2	Literární rešerše	12
2.1	Daphnia magna	12
2.1.1	Laboratorní chov <i>Daphnia magna</i>	13
2.1.2	Paraziticko-hostitelské interakce	14
2.2	Angiostrongylus cantonensis	14
	Životní cyklus	15
2.2.1	Laboratorní chov parazitických hlístic	15
2.3	Clearance rate	16
	Faktory ovlivňující clearance rate	16
3	Materiál a metody	16
3.1	Pokusní živočichové	16
3.2	Laboratorní chov	18
3.3	Příprava larev	19
3.4	Experimentální chov	20
3.5	Infikace	21
3.6	Kontrola kvality vody během experimentu	22
3.7	Kvantifikace – kapková metoda	22
3.8	Clearance-rate	23
3.9	Mikrorespirometrie	24
3.10	Chování	26
3.11	Pitva	27
3.12	Měření velikosti jedinců	27
3.13	Metody statistické analýzy	28
3.13.1	Clearance rate – efektivita odstraňování L1	28
3.13.2	Clearance rate – rozdíly mezi skupinami	28
3.13.3	Respirometrie	29
3.13.4	Chování	29
4	Výsledky	29
4.1	Clearance rate – efektivita při odstraňování L1	29
4.2	Clearance rate – rozdíly mezi skupinami	30
4.3	Respirometrie	33
4.4	Chování	34
4.5	Pitva	39
4.6	Parametry vody	39

5	Diskuse.....	41
6	Závěr.....	44
7	Literatura.....	45
8	Samostatné přílohy.....	51

Úvod

Vliv lidské činnosti na sladkovodní ekosystémy je stále častěji předmětem zájmu vědecké komunity i veřejnosti, zejména s ohledem na narůstající znečištění a degradaci životního prostředí. Jedním z aspektů, který v poslední době nabývá na popularitě, je studium interakcí mezi invazními druhy a místními organismy v rámci sladkovodních ekosystémů (Poulin et al. 2011). Invazní druhy mohou mít značný dopad na biodiverzitu a ekologickou stabilitu prostředí, a to včetně možného šíření parazitů, kteří mohou představovat zdravotní riziko pro místní populace (Sures et al. 2017).

Jedním z důležitých aspektů ekologického výzkumu je porozumění mechanismům šíření invazních druhů a jejich interakcím s původními druhy organismů (Poulin et al. 2011). V rámci tohoto kontextu má zvláštní význam vliv filtrátorů na transportní procesy v prostředí, které může ovlivnit distribuci a abundanci organismů, včetně parazitů (Brian et al. 2022). Sladkovodní filtrátoři, jako jsou například planktonní korýši rodu *Daphnia*, mají v ekosystémech klíčovou roli ve filtraci vody a jako důležitá složka potravy, což je může činit důležitými v kontrole šíření invazních druhů a parazitů (Decaestecker et al. 2005).

Tato diplomová práce se zaměřuje na výzkum vlivu sladkovodních filtrátorů na invazní druhy parazitů, s důrazem na modelový druh *Daphnia magna* (Straus 1820) a parazita *Angiostrongylus cantonensis* (Chen 1935). *D. magna*, jako jeden z nejběžněji studovaných sladkovodních bezobratlých, poskytuje vhodný model pro pochopení ekologických interakcí v prostředí sladkých vod (Ebert 2005). Na druhé straně, *A. cantonensis*, známý jako "plicní červ", představuje zdravotní riziko pro člověka a jiné savce, a jeho šíření a ekologie jsou stále předmětem výzkumu (Cowie 2017).

Pro pochopení souvislostí a vazeb ve vodním prostředí je potřeba realizovat experimenty a je nezbytné realizovat chovy těchto druhů, které se běžně nechovají.

D. magna, jako primární konzument konzumuje mikroskopické suspendované částice, jako jsou bakterie a řasy, a hraje tak důležitou roli ve vodních ekosystémech (Ebert 2005).

D. magna tak nejen pomáhá udržovat kvalitu vody, ale je také důležitým článkem potravního řetězce, který poskytuje kořist různým druhům ryb a dalším vodním predátorům (Tatarazako & Oda 2007). Průhledné tělo, snadná kultivace a rychlá reprodukce činí z *D. magna* vynikající model pro vědecký výzkum, zejména v oblasti ekotoxikologie, evoluční biologie a monitorování životního prostředí; citlivost *D. magna* na změny prostředí a znečišťující látky vedla k jejímu širokému využití při měření toxicity chemických sloučenin (Shaw et al. 2008; Ahmed 2023).

Přes značnou pozornost věnovanou planktonním korýšům neexistují vědecké důkazy, které by potvrzovaly účast korýšů v životním cyklu parazitické hlístice *A. cantonensis*. Empirických důkazů potvrzujících zapojení korýšů do tohoto cyklu je i přes existenci výzkumů málo (Wallace & Rosen 1965; Rosen et al. 1967; Rachford 1975; Otsuru 1981), a to i v případě, že jsou bráni v úvahu malí planktonní živočichové. Vzhledem k tomu, že planktonní korýši sdílejí řadu onemocnění a mohou působit jako mezihostitelé pro řadu parazitů (Smit et al. 2019; Friesen et al. 2020), jsou v případě interakce mezi *A. cantonensis* a vodními živočichy potenciálními paratenickými (rezervoárovými) hostiteli (Truck et al. 2022). Navzdory pozorovanému nedostatku malých vodních živočichů je cílem naší studie prozkoumat interakce mezi modelovým organismem *D. magna* a *A. cantonensis*.

1 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je vyhodnotit vliv filtrujících planktonních korýšů *D. magna* na vývojová stádia L1 parazitických hlístic *A. cantonensis*. Cílem rešeršní části práce je seznámení s problematikou ekosystémových funkcí planktonních filtrátorů se zaměřením na parazity a laboratorní chov planktonních korýšů.

Primárním cílem je provést modelový experiment s druhem *D. magna* zaměřený na intenzitu odstraňování (clearance rate) parazitických larev hlístic z vodního prostředí. Dalším cílem je za použití mikrorespirometrie detekovat potenciální změny v metabolismu dafnií, vyhodnotit změny projevu chování mezi exponovanou a kontrolní skupinou a provést pitvu na průkaz přítomnosti larev v těle dafnií.

Hypotézy:

1. H₀: Jedinci *D. magna* nejsou efektivní při odstraňování larev *A. cantonensis* ve stadiu L1 z prostředí. Není statisticky významný rozdíl v koncentraci larev L1 mezi nádobami s dafniemi a bez nich.
2. H₀: Neexistuje statisticky významný rozdíl v rychlosti metabolismu exponovaných a kontrolních jedinců.
3. H₀: Neexistuje statisticky významný rozdíl v projevech chování u exponovaných a kontrolních jedinců.
4. H₀: Opakovaná expozice dafnií larvám nemá žádný vliv na efektivitu odstraňování L1 z vodního prostředí.
5. H₀: V tělech exponovaných dafnií nejsou přítomny larvy *A. cantonensis* ve stadiu L1.

2 Literární rešerše

V této části práce je věnována pozornost především dafniím jako primárním filtrátorům jak ve volné přírodě, tak i v laboratorních chovech. V kapitole 2.1 je popsána jejich biologie a ekologie spolu se základní anatomií těla a fyziologií. Zmíněna je také vhodnost tohoto planktonního korýše při laboratorních experimentech. Podkapitola 2.1.1 se věnuje metodám laboratorního chovu dafnií. V podkapitole 2.1.2 jsou stručně popsány hostitelsko-parazitické interakce dafnií s různými parazitickými organismy od virů po tasemnice. V podkapitole 2.2 je stručně popsán *A. cantonensis* a jeho životní cyklus, který je důležitý pro pochopení mezihostitelské interakce mezi ním a dafniemi. Podkapitola 2.2.1 je věnována laboratornímu chovu parazitických hlístic. V poslední podkapitole 2.3 je stručně představen pojem clearance rate a popsány faktory, které ho ovlivňují v případě planktonních korýšů.

2.1 *Daphnia magna*

Biologie a ekologie

D. magna je malý sladkovodní korýš z čeledi Daphniidae s velmi širokým geografickým rozšířením (Hooper et al. 2008). Tito korýši jsou součástí zooplanktonu, vyskytují se hojně ve sladkovodních ekosystémech a hrají klíčovou roli v potravních řetězcích. Díky svým morfologickým a fyziologickým proporcím se často používají jako modelové organismy v ekologických a toxikologických studiích (Ebert 2005).

Existuje více než 100 popsáných druhů rodu *Daphnia*, přičemž každý z nich má poměrně podobnou stavbu těla charakterizovanou relativně velkou hlavou s jedním jednoduchým složeným okem a tělem obaleným schránkou (De Gelas & De Meester 2005). Dafnie jsou víceméně transparentní, aby se vyhnuly vizuálně lovicím predátorům (Gurney et al. 1990).

Dafnie jsou známé svou schopností nepohlavního rozmnožování (amiktická partenogeneze, tj. diploidní vajíčka schopná vývoje bez oplození) a za příznivých podmínek se mohou nepohlavně množit po mnoho let. V nestabilním prostředí a při zhoršení podmínek prostředí jsou dafnie schopny přejít na pohlavní rozmnožování. V tomto případě populace produkují nejprve samce, poté haploidní vajíčka, která potřebují oplození (Ebert 2005; Tatarazako & Oda 2007).

Dafnie se vyskytují na stanovištích, kde se teplota vody alespoň po část sezóny pohybuje v rozmezí 10-30 °C, jsou schopny přežít náročné podmínky, jako je dočasné sucho, mráz a období s nízkou pravděpodobností přežití (např. predace, parazitismus, toxické podmínky vody) (Ebert 2005).

Dafnie žijí jako planktonní korýši živící se filtrováním v různých typech stojatých sladkovodních nádrží, kde filtrují bakterie, řasy, sinice, prvoky a další drobné částice suspendované ve vodě. Hrají klíčovou roli primárního konzumenta ve vodním potravním řetězci sladkých vod, protože představují potravu pro dravé bezobratlé a ryby. Kromě toho dafnie konzumují řasy, čímž zlepšují kvalitu vody (Tatarazako & Oda 2007, Dietrich et al. 2010).

Anatomie a fyziologie

Dafnie mají 10 párů přívěšků, včetně tykadel, čelistí a mandibul; následuje 5 hrudních končetin na trupu. Na konci břicha je navíc pár břišních klepet (Ebert 2005). Dafnie jsou bezbarví živočichové díky průhlednému chitinovému karapaxu, který chrání hrudník a břicho, nicméně je lze nalézt načervenalé kvůli produkci hemoglobinu. Viditelnost přes průhledný karapax umožňuje pozorovat několik párů končetin s chloupky (Villegas-Navarro et al. 2003; Ebert 2005). Tyto pohyblivé končetiny tvoří aparát pro krmení a respiraci a vytvářejí vodní proud, který směřuje prvoky, řasy, bakterie a organický detrit přímo do úst, kde je potrava mechanicky zpracována (Ebert 2005; Tatarazako & Oda 2007). Nejcharakterističtějším znakem dafnií je jedno velké složené oko a dva páry silně rozvětvených tykadel, která slouží k pohybu (Tatarazako & Oda 2007).

D. magna má mnoho výhod, jako je velikost těla, krátký životní cyklus, vysoká plodnost a partenogenetické rozmnožování. Jedná se o největší herbivorní perloočku s velikostí od 0,5 mm do 6 mm a více, dospělý jedinec se pohybuje od 5 do 6 mm. Velikost těla je důležitým faktorem, který ovlivňuje akumulaci toxických látek (Koivisto 1995; Ebert 2005). Malá velikost dafnií ve srovnání s jinými modelovými organismy způsobuje, že na jedné experimentální desce může být použito několik živočichů současně. Navíc partenogenetické rozmnožování a vysoká plodnost umožňují získat v krátké době mnoho organismů potřebných k testům (Koivisto 1995).

Pohyblivost dafnií je snadno pozorovatelná, proto se tato vlastnost běžně používá při imobilizačních testech, testech letality a reprodukce (de Oliveira et al. 2016; Bownik 2019). Transparentní tělo, které umožňuje měřit různé fyziologické parametry současně pomocí neinvazivních optických metod, jako je videomikroskopie a digitální zpracování obrazu (Villegas – Navarro et al. 2003; Bownik 2019). Průhledný karapax dále umožňuje vyhodnocovat různé fyziologické cílové parametry, včetně srdeční aktivity (Bownik et al. 2019a), parametrů potravní aktivity: rychlost filtrace a rychlost příjmu potravy (Nkoom et al. 2019). Využívají se také další fyziologické parametry založené na pohybu končetin nebo orgánů dafnie, jako jsou: aktivita očí, aktivita postabdominálních klepet, aktivita hrudních končetin, pohyb čelistí nebo pohyb celého organismu (Villegas-Navarro et al. 2003). Kromě toho byly jako vysoce citlivé koncové ukazatele navrženy parametry chování, například plavecká aktivita, doba plavání, rychlost plavání, síla chování a frekvence poskakování (Bownik 2017; Jeong et al. 2018).

2.1.1 Laboratorní chov *Daphnia magna*

Druhy sladkovodních korýšů rodu *Daphnia* jsou v centru pozornosti vědců již staletí – pojmenovány byly již v 17. století, konkrétní vědecké označení *Daphnia* bylo přidáno o století později Muellerem (1785). Dnes jsou dafnie jedním z nejpoužívanějších modelů pro environmentální toxikologická hodnocení (Shaw et al 2008). *D. magna* představuje relativně jednoduše kultivovatelný organismus s krátkou generační periodou a ideální velikostí pro dobrou manipulaci (Sed'a & Petrušek 2011). Zároveň citlivě reaguje na změny vlastností

prostředí a na přítomnost cizorodých látek (Forró et al. 2008). Z rodu *Daphnia* se pro toxikologické testování využívají jak *D. magna*, tak *D. pulex* (Leydig 1860) (Shaw et al. 2008).

Ten Berge (1979) popsal laboratorní kultivaci *D. magna* za použití minerálního média s jednobuněčnou řasou jako potravou (de Groot-van Zijl 1972). Výhodou této metody je, že umožňuje snadným způsobem udržet poměrně konstantní stav populace, což je nezbytné pro reprodukovatelné výsledky různých testů. V chovné místnosti je udržována teplota 19 ± 1 °C se světelným režimem 12:12 hodin denně. Pro kultivaci dafnií se používají dvě média, standardní referenční voda (SRW) podle Freemana (1953) a standardní testovací médium (STM) podle Freara & Boyda (1967). Pro přípravu médií se používá deionizovaná voda (Ten Berge 1979). Pro založení kultury dafnií se juvenilové (16-24 hodin staří) z třítýdenních samic, umístí do média obsahujícího 75 % nového a 25 % původního média, ve kterém se vylíhla. Ideální počet dafnií je zhruba 25 na litr. Médium je z poloviny obnovováno dvakrát týdně (Ten Berge 1979). Je žádoucí, aby dospělí jedinci spotřebovali denně podávané množství potravy (*Chlorella pyrenoidosa*) na 90 % nebo více. Pětadvacet nově narozených jedinců potřebuje denně 10^8 buněk řas a 25 dospělých jedinců 10 až 15krát více (Ten Berge 1979).

2.1.2 Paraziticko-hostitelské interakce

Ve svém přirozeném prostředí jsou dafnie často ve vysoké míře infikovány různými parazity včetně virů, bakterií, mikrosporidií, hub, hlístic, tasemnic a dalších (Ebert 2005; Duffy et al. 2015). Mnohé z těchto parazitů je možné kultivovat společně s jejich hostiteli, což otevírá prostor pro experimenty, které zkoumají interakce mezi hostitelem a parazitem na individuální a populační úrovni. Výhodou dafnie jako hostitele je v první řadě transparentní tělo. Mnoho infekcí lze diagnostikovat zvenčí, aniž by došlo k usmrcení hostitele.

Možnost využívat celé populace nám navíc umožňuje řešit otázky, které vyžadují replikaci na úrovni populací, jako jsou studie v experimentální evoluci a epidemiologii (Roulin et al. 2013).

Ačkoli mnoho parazitů (a epibiontů) bylo použito v terénních a laboratorních pracích, jen několik z nich bylo intenzivně studováno: Bakterie *Pasteuria ramosa* (Metchnikoff 1888) (Auld & Brand 2017; Fredericksen et al. 2021), mikrosporidie *Hamiltosporidium tvaerminnensis* (Lehto & Haag 2010) a *Ordospora colligata* (Larsson 1997) (Haag et al. 2011; Kirk et al. 2019), kvasinka *Metschnikowia bicuspidata* (Kudryatsev 1960) (Duffy et al. 2015), chitrická houba *Caullerya mesnilli* (Chatton 1907) (Lohr et al. 2010) a *iridovirus Daphnia DIV-1* (Toenshoff et al. 2018). Současný výzkum parazitů parazitujících u rodu *Daphnia* se zaměřuje na koevoluci a genetickou epidemiologii (Tambovtseva et al. 2020; Ameline et al. 2021), přičemž nové možnosti se otevírají s tím, jak budou k dispozici genomy většiny těchto parazitů (Ebert 2022).

2.2 *Angiostrongylus cantonensis*

A. cantonensis je parazitická hlístice neboli škrkavka. Má složitý životní cyklus zahrnující plže jako mezihostitele a hlodavce jako definitivního hostitele (Martins et al. 2015). Původně se endemicky vyskytoval v jihovýchodní Asii, ale rozšířil se do různých částí světa (Luessi et al. 2009; Thiengo et al. 2010; Simoes et al. 2011; Kim et al. 2014).

Pochopení biologie, životního cyklu a epidemiologie *A. cantonensis* je zásadní pro vývoj účinných preventivních a kontrolních opatření (Alicata 1965).

Životní cyklus

První larvální stádium je vylučováno ve výkalech potkanů, nebo jiných kosmopolitně rozšířených hlodavců. Tyto infikované výkaly jsou požřeny mezihostiteli – plži nebo slimáky. Larvy se v plžích vyvíjejí do třetího larválního stádia a zůstávají v něm, dokud není plž sežrán definitivním hostitelem nebo neuhyne (Bhaibulaya 1975; Thiengo et al. 2013; Martins et al. 2015). Jakmile jsou plži nesoucí larvy třetího stádia sežráni potkanem, přesunou se do tenkého střeva, kde proniknou stěnami střeva a dostanou se do krevního oběhu. Poté se pasivně pohybují v krevním řečišti a část z nich se nakonec dostane do centrálního nervového systému a do mozku. Po vstupu do mozku se larvy vyvinou do stádia subadultního jedince. Po dosažení subadultního stádia červi opouštějí mozek, přecházejí do žilního oběhu a odtud do pravé srdeční komory a do plicních tepen. Zde červi rostou a dospívají, páří se a samice kladou vajíčka (Mackerras & Sandars 1954; Bhaibulaya 1975). Vajíčka putují krevním oběhem do plic, kde se líhnou larvy prvního stádia. Tyto larvy pak prorazí stěny průdušek a plicních sklípků, v dýchacích sekretech se přesunou do průdušnice a jsou spolknuty, aby se uvolnily ve výkalech. Cyklus se opakuje, za předpokladu, že potkan sežere infikovaného plže trvá přibližně 45 dní (Cowie 2013).

2.2.1 Laboratorní chov parazitických hlístic

Háďátko obecné *Caenorhabditis elegans* (Maupas 1900) se již dlouho etabloval jako velmi účinný modelový organismus pro studium parazitických hlístic (Blaxter 1998). Tento červ se snadno udržuje v laboratoři a má krátký životní cyklus (~3,5 dne), kdy prochází od embrya přes čtyři larvální stadia (L1-L4) až do dospělosti. Většina popsaných parazitických hlístic má složitý životní cyklus, je obtížné je udržet in vitro a musí být chovány v hostitelích (Ghedini et al. 2007). Předchozí studie se snažily o kultivaci vajíček a larev různých stádií in vitro a o stanovení životního cyklu *A. cantonensis* v laboratoři (Gu et al. 2008).

Problémem však stále zůstává nízká míra líhnutí vajíček (pouze 34 % vajíček se vyvine v larvu L1) a úhyn různých stádií larev při kultivaci in vitro (Xie et al. 2017).

Předchozí studie ukázaly, že méně než 10 % vylíhlých vajíček *A. cantonensis* lze pozorovat v médiu NCTC109 s přidavkem inaktivovaného séra potkanů (Uga & Matsumura 1982).

Ke kultivaci vajíček byla použita různá média. V této studii bylo zjištěno, že nejvhodnějším médiem pro vývoj vajíček je Ham's F-12, protože 80 % vajíček se vyvinulo v larvy L1. Vajíčka byla sbírána ze samic dospělých červů po 5, 7 a 10 týdnech infekce larvami L3. Mladé samice dospělých červů, které byly infikovány 5 týdnů, produkovaly nezralá vajíčka, která se nemohla úspěšně vyvinout v larvy L1 (Xie et al. 2017). Patnáct samic dospělých červů, které byly infikovány 10 týdnů po infekci (po 3 hodinách inkubace), produkovalo přibližně 3000 zralých vajíček s typickou podlouhlou formou. Larvy L3 potřebovaly více než 7 týdnů k tomu, aby se vyvinuly ve zcela zralé samice dospělých červů, které produkuje vysoké množství zralých vajíček (Xie et al. 2017).

2.3 Clearance rate

Clearance rate je klíčový parametr, který měří účinnost, s jakou tyto vodní organismy filtrují a odstraňují z vodního sloupce suspendované částice, především řasy ale i jiné malé organismy (Dam & Peterson 1988). Tento proces má zásadní dopad na regulaci populací řas ve sladkovodních ekosystémech a ovlivňuje koloběh živin (Hartgers 1999).

Faktory ovlivňující clearance rate

Velikost a stáří jedince

Clearance-rate je ovlivněn velikostí a stářím jedinců. Větší a starší jedinci mají obecně vyšší míru clearance (Murtaugh 1984).

Teplota

Teplota vody hraje významnou roli při regulaci rychlosti metabolismu dafnií a ovlivňuje rychlost krmení a clearance. Vyšší teploty často vedou ke zvýšené metabolické aktivitě (Kiarboe et al. 1982; Dagg & Wyman 1983).

Koncentrace potravy

Rychlost clearance přímo souvisí s koncentrací potravy v prostředí. Se zvyšující se koncentrací suspendovaných částic (řas, bakterií) má clearance tendenci stoupat (Murtaugh 1985; Dagg & Walser 1987; Tsuda & Nemoto 1987).

Složení potravy

Složení potravy, zejména typ přítomných řas nebo částic, může mít vliv na rychlost odfiltrování. Některé druhy řas mohou být snadněji požívány, což ovlivňuje účinnost filtrace (Nicholajsen et al. 1983; Head & Harris 1988).

Přítomnost chemických látek

Vystavení kontaminujícím látkám z prostředí, jako jsou znečišťující látky nebo chemikálie, může ovlivnit chování při krmení a rychlost clearance dafnie. Tato citlivost z nich činí cenné indikátory v ekotoxikologických studiích (Sarnelle & Wilson 2008).

3 Materiál a metody

V rámci tohoto experimentu byly testovány předpoklady *D. magna* jako mezipřehostitele parazitických hlístic rodu *Angiostrongylus* a účinnost těchto dafnií při odstraňování larev ve stádiu L1 z vodního prostředí. Dále byla sledována změna chování u infikovaných a kontrolních jedinců. Následně byli jedinci podrobeni mikrorespirometrii a pitvě na ověření přítomnosti larev. Kapitola materiál a metody obsahuje 13 podkapitol, ve kterých je podrobně popsán design experimentu, použité metody a materiál, příprava a průběh jednotlivých částí experimentu a v neposlední řadě statistické vyhodnocení získaných dat.

3.1 Pokusní živočichové

Daphnia magna

Populace dafnií pocházela z laboratorního chovu z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně v rámci spolupráce. Početná skupina juvenilů (viz Obrázek 1) byla rozdělena nejprve do čtyř a později do 8 plastových nádrží, rozdělení bylo náhodné, nezáviselo na

velikosti ani stáří jedinců. Voda, do které byly dafnie umístěny pocházela z laboratorní nádrže, nikoliv z volné přírody nebo jiného cizího prostředí. Díky tomuto postupu byla zachována uniformita populace a nedošlo k zavlečení jiných druhů organismů a následné konkurenci.



Obrázek 1 – jedinci *D. magna* v měrné kádince (Švajná 2023)

Angiostrongylus cantonensis

Larvy parazitické hlístice *A. cantonensis* (viz Obrázek 2) byly získávány ve spolupráci s prof. MVDr. Davidem Modrým, Ph.D. a s MSc. Divakaranem Pandianem, z Masarykovy univerzity a Katedry veterinárních disciplín (FAPPZ ČZU) z trusu laboratorních infikovaných potkanů *Rattus norvegicus* (Berkenhout 1769) kmen Wistar – Velaz chovaných pro tyto účely ve schváleném chovu v experimentální stáji FAPPZ za dodržování norem, kterým chov laboratorních obratlovců podléhá.

Extrakce byla prováděna modifikovanou Baermannovou metodou popsanou v kapitole níže. Získané a použité larvy byly ve vývojovém stadiu L1. V tomto stadiu nejsou larvy přímo nebezpečné pro obratlovce včetně člověka, i přes to byla dodržována přísná hygienická opatření po celou dobu experimentu a během manipulace s infekčním materiálem.



Obrázek 2 – *A. cantonensis* ve fázi L1 pod mikroskopem během kapkové kvantifikace (Švajná 2023)

3.2 Laboratorní chov

Jedinci rodu *Daphnia* byli chováni v osmi desetilitrových plastových boxech (viz Obrázek 3), které byly zpočátku naplněny vodou o objemu 2 l a během experimentu bylo množství vody navýšeno až na 6 l v rámci pravidelných obměn vody za čerstvou. Světelný režim byl nastaven na 12 hodin svícení a 12 hodin tmy. Každá chovná nádrž měla zajištěné vzduchování pomocí filtrace a vzduchovacího kamene.

Nádrže byly označeny číslem od 1 do 8, krmení bylo prováděno ve dvou variantách, a to následujícím způsobem: frekvence krmení byla pro obě skupiny totožná, krmeno bylo denně. Hlavní rozdílem byl objem krmiva, které bylo skupinám podáváno. Krmná dávka byla vytvořena smícháním 0,8 ml Easy Boosteru (Shellfish Diet 1800® Reed Mariculture) + 80 ml filtrované vody. Do každé nádrže 1-4 bylo přidáváno 10ml suspenze, zatímco každá nádrž s čísly 5-8 dostávala pouze 5 ml suspenze. Tento postup krmení byl použit zpočátku chovu a sloužil k určení správného množství krmné dávky.

Jako ideální množství krmné dávky se osvědčila první varianta ~ 10 ml suspenze (0,8 Easy booster + 80ml voda) pro každou nádrž.



Obrázek 3 – laboratorní chov dafnií v plastových nádržích (Švajná 2023)

Tabulka 1 – parametry vody při založení laboratorního chovu

Datum 28/4/23	Chovná nádrž 1	Chovná nádrž 5
Teplota (°C)	20,2	20,2
Konduktivita (μS/cm)	1534	1213
pH	8,2	8,2
Rozpuštěný O ₂ (mg/l)	8,57	8,54
Rozpuštěný O ₂ (%)	98	97,7

3.3 Příprava larev

Sběr trusu byl proveden vždy několik hodin před započítáním experimentu. Seletovali jsme pouze čerstvý trus, ve kterém byl zaručen dostatek vitálních L1. Extrakce larev byla provedena modifikovanou Baermanovou metodou popsanou níže.

1. Sběr výkalů od infikovaných potkanů
2. Modifikovaná Baermannova larvoskopie (2 hodiny), přibližně 2 gramy trusu
3. Po 2 hodinách jsme tekutinu z larvoskopie přelili do 15 ml zkumavek typu Falcon
4. Zkumavky jsme odstředili v dobře vyvážené stolní centrifuze, 1500 otáček za minutu po dobu 1 minuty (nutné pouze v případě použití larev pro infekci vodních plžů).
5. Odstranili jsme většinu supernatantu, ve zkumavce jsme ponechali přibližně 2 ml tekutiny. Doplnili jsme ji čistou vodou až do objemu 7,5 ml (použita kádinka a Pasteurova pipeta). Následně jsme obsah jemně promíchali, abychom dosáhli rovnoměrného rozložení larev v tekutině ze sedimentu (nutné pouze v případě použití larev k infekci vodních plžů).
6. Počty pohyblivých larev L1 byly spočítány v promíchané tekutině pomocí 5x 25 μl kapek (použity byly 100 μl špičky pipety) tekutiny a přepočítány na daný objem (obvykle cca 7,5 ml, tj. 7500 μl):

$$n = A * 7\ 500 \div 25$$
 (A = průměrný počet larev v jedné 25 μl kapce kapaliny). Lze očekávat zhruba 10 000 larev v jednom gramu. Pohyblivé nebo stočené larvy lze považovat za živé a měly by se počítat.
7. Následně byly larvy připraveny k použití.



Obrázek 4 – Stříkačka naplněná potkaními výkaly (Pandian 2024)



Obrázek 5 – Materiál pro modifikovanou Baermannovu metodu (Pandian 2024)

3.4 Experimentální chov

Testovány byly celkem 3 skupiny dafnií. Ty byly rozděleny na skupinu A – skupina, která během experimentu nebyla vystavena larvám ani jednou – naivní. Skupina B byla vystavena suspenzi L1 celkem dvakrát a skupina C byla vystavena celkem čtyřikrát. Během experimentu byl chov realizován v 200 ml skleněných miskách bez vzduchování (viz Obrázek 6). Svícení

bylo nastaveno na 12:12 (světlo: tma). Krmení probíhalo dle předem sestaveného plánu viz tabulka č 2 a bylo totožné pro všechny testované skupiny.

Experiment probíhal ve 24 nádobách, bylo použito celkem 54 dafnií, 18 pro každou testovanou skupinu, 3 jedinci v každé misce. 6 nádob bylo kontrolních bez dafnií, označených jako L1-L6.

Tabulka 2 – plán hlavního experimentu včetně počtu larev

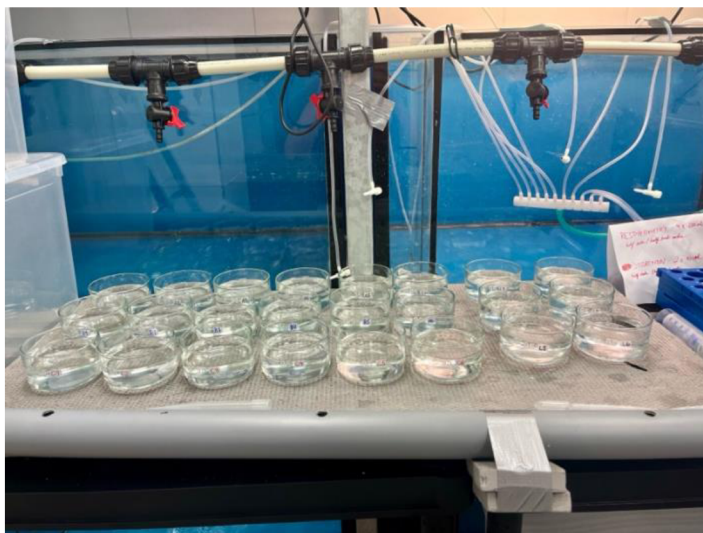
Expozice	Popis	Množství L1
1. expozice (C)	3 dafnie pro každou nádobu (A+B+C) + L1 pouze do nádob C Dafnií celkem: 54 (-4 krmení: krmná dávka 0,33ml/ 200 ml	6000
2. expozice (C)	L1 do nádob C krmení	6000
3. expozice (C+B)	L1 do nádob C + B krmení	6000
4. expozice (C+B)	L1 do nádob C + B krmení	6000
finální expozice hlavního experimentu	24 nádob (A+B+C+ kontrolní L), 6000 L1 do všech nádob Délka expozice 18 h	6000
Počítání	Kapková metoda (A+B+C+ kontrolní L)	

3.5 Infikace

Experiment trval celkem 8 dní, suspenze larev byla do vybraných nádob přidávána obden dle skupin (viz Obrázek 8) stejně tak jako suspenze bez L1. Tento krok byl nezbytný pro udržení stejné kvality vody ve všech testovaných miskách. Vzhledem k tomu, že suspenze s L1 byla získávána filtrací potkaních výkalů výsledný roztok přidávaný do misek měl vysoký obsah dusičnanů a zásadně tak mohl ovlivnit úmrtnost dafnií nebo i samotný clearance rate.

Požadovaný počet larev byl 6000 pro každou misku což odpovídalo přibližně 5ml suspenze pro misku, záleželo ale na koncentraci roztoku, která se stanoví počátečním počítáním larev

v počítací komůrce. Suspenze byla přidávána pomocí 10 mililitrové pipety. Nezbytným krokem bylo roztok L1 důkladně protřepat a během pipetování a odebírání proces několikrát zopakovat, aby se zabránilo sedimentaci larev ve spodu zkumavky. Do neinfikovaných skupin se stejně tak přidalo identické množství roztoku rovněž získaného modifikovanou Baermannovou metodou s tím rozdílem, že použité výkaly pocházely od neinfikovaných potkanů. Chemické složení obou suspenzí bylo téměř identické.



Obrázek 6 – chov dafnií během hlavního experimentu ve skleněných 200ml nádobách dle skupin (Švajná 2023)

3.6 Kontrola kvality vody během experimentu

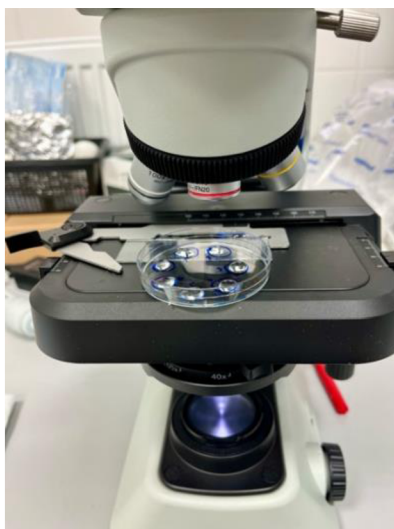
Během experimentu jsme provedli třikrát kontrolní měření parametrů vody u náhodně vybraných nádob – od každé experimentální skupiny 3 různé misky. Měřené parametry byly – teplota, pH, rozpuštěný kyslík, dusičnanový dusík $N-NO_3$ a konduktivita pomocí multimetrů a specializovaných zařízení Hanna instruments. Parametry byly porovnány mezi sebou a s hodnotami naměřenými v čisté odstáté laboratorní vodě. Naměřené hodnoty z jednotlivých dní měření jsou promítnuty v kapitole výsledky.

3.7 Kvantifikace – kapková metoda

Kvantifikaci neboli ověření počtu larev v suspenzi, která byla použita pro infekci, jsme provedli kapkovou metodou. Tato metoda spočívala v odebrání 100 μ l kapky pipetou z výsledné suspenze a následně prohlédnutím pod světelným mikroskopem se zvětšením 10x4 (viz Obrázek 7). Bylo důležité nádobu před každým odběrem pečlivě promíchat, larvy mají tendenci sedimentovat. Celkem bylo odebráno 36 kapek - 6 Petriho misek po 6 kapkách z každé experimentální nádoby. Počty L1 byly zaznamenány do tištěného protokolu, na kterém byl uveden datum, čas, osoba, která výpočet prováděla, počet kapek, počet živých a počet mrtvých larev.

Stejná kvantifikace byla provedena ihned po přidání suspenze do experimentálních misek s dafniemi. Kapky byly odebírány rovnou z vodního sloupce po důkladném promíchání vody plastovou pipetou.

Díky tomuto postupu jsme znali přesný počet larev, kterými jsme infikovali dafnie.



Obrázek 7 – kapková metoda kvantifikace L1 v jednotlivých miskách (Švajná 2023)



Obrázek 8 – přidávání suspenze L1 do jednotlivých misek (Švajná 2023)

3.8 Clearance-rate

V rámci clearance rate experimentu byla testována míra filtrace jednotlivých dafnií a jejich schopnost odstraňovat larvy *A. cantonensis* z vodního sloupce v případě, že jsou mu bezprostředně a opakovaně vystavovány.

Pro testování bylo použito celkem 54 jedinců *D. magna* a 24 nádob – krystalizačních skleněných misek o objemu 200 ml. Nádoby byly rozděleny na 3 skupiny dle frekvence infekce A, B, C a L, každá skupina po 6 miskách. Do každé nádoby ze skupiny A+B+C byl zpočátku umístěn stejný počet jedinců, tedy 3 pro každou krystalizační misku. Během experimentu došlo k několika úhynům v rámci skupiny C (C2, C3, C6), uhynulé jedince jsme nenahrazovali. Počet dafnií na misku byl zohledněn ve výpočtu. Nádoby L1-L6 sloužily pouze jako kontrolní, neobsahovaly žádné dafnie a sledovaným parametrem byl přirozený úbytek larev bez přítomnosti filtrátora. Teplota byla během pokusu udržována na $24 \pm 0,5$ °C.

Larvy byly přidávány dle harmonogramu vyobrazeném v tabulce č. 2 výše. Požadovaný počet na 200ml nádobu byl 6000 L1. Expozice trvala 18 hodin přes noc, kvantifikace proběhla vždy druhý den ráno. Po důkladném promíchání obsahu nádob se odebralo 36 kapek o objemu 100 µl z každé misky a proběhla kvantifikace pod světelným mikroskopem se 4x zvětšením. Tyto hodnoty byly zaznamenány do tištěného protokolu. Opakování probíhalo opět dle schématu v tabulce č. 2. Infikace probíhala každý druhý den, ve dnech bez infikace bylo podáváno krmení. Výměna vody prováděna nebyla. Kontrolu kvality vody jsme prováděli ve dnech 9/6, 13/6 a 14/6.

Kompletní data byla převedena do excelu. Pro výpočet clearance rate hodnot byl použit tento vzorec:

$$CR = V/nt (\ln * C_i / C_f - \ln * C_i' / C_f')$$

kde

V= objem vody v nádobě, tedy 200 ml

N= počet dafnií v nádobě, tedy 3, v C3-1 v C2-2 a v C6-2 (v důsledku úhynů během expozice)

T= čas expozice, tedy 18 hodin

C_i= počáteční počet L1 – 6000

C_f= finální počet L1 po 18 hodinách

Exponované/kontrolní

Výsledky byly nakonec vyděleny celkovou hmotností sušiny jednotlivců v miligramech.

Pro tuto diplomovou práci jsme tento komplexní výpočet zjednodušili, vzhledem k tomu, že během testování byla použita jedna nádoba s 1-3 dafniemi (v závislosti na úmrtnosti se hustota misek lišila). Sečetli jsme hmotnost všech přítomných dafnií na misku, počet jedinců N byl tedy vždy roven 1. Výsledná hodnota clearance rate byla vypočtena za celou nádobu, nikoliv na jedince.

Hodnoty clearance rate jsou uváděny v mililitrech na gram sušiny dafnie za hodinu (ml/g/h) s tím, že hmotnost dafnií byla měřena v miligramech.

Hmotnost sušiny byla vypočtena dle vzorce zobrazeného v podkapitole **Měření velikosti jedinců**.

3.9 Mikrospirometrie

Cílem tohoto testování bylo prozkoumat možný vliv parazita *A. cantonensis* na spotřebu kyslíku exponovaného organismu *D. magna*.

Obecný postup spočíval v tom, že 10 dafnií bylo vystaveno působení parazitů po dobu 18 hodin a poté byla změřena spotřeba kyslíku jedince v mikrospirometru u 10 exponovaných a 10 kontrolních dafnií.

Naší hypotézou bylo, že vystavení dafnií parazitům má významný vliv na jejich fyziologické funkce, zejména na spotřebu kyslíku.

Pro tento experiment jsme vyčlenili pouze 20 dafnií, a proto nebylo možné získat rozsáhlá data o této problematice, nicméně nám poskytl představu o tom, jak expozice ovlivnila jejich fyziologii.



Obrázek 9 – příprava dafnií na umístění do destičky k měření mikrorespirometrie (Švajná 2023)

Tabulka 3 – Design mikrorespirometrie pro trial 1 (Seidlová 2023)

	E	E	E	C	C	C
a	E1-E1	E2-E1	PRÁZDNÁ (E)	C11-C1	C12-C1	C13-C1
b	E3-E1	E4-E1	PRÁZDNÁ(E)	C14-C1	C15-C1	C16-C2
c	E5-E1	E6-E2	E7-E2	PRÁZDNÁ (C)	C17-C2	C18-C2
d	E8-E2	E9-E2	E10-E2	PRÁZDNÁ (C)	C19-C2	C20-C2

Teplota inkubátoru byla nastavena na 20 °C, poté do něj byly umístěny nádoby s destilovanou vodou, více – jamková skleněná destička se senzory (MVP) a uzavřené lahve spolu s dafniemi.

Nejdříve bylo nutné hydratovat senzory v destičce po dobu 30 minut.

Dalším krokem bylo připravení destičky. Jamky se zaplnily destilovanou vodou do přibližně $\frac{3}{4}$ objemu zhruba 1, 7 ml.

Díky černému podkladu se dala efektivně pozorovat přítomnost či nepřítomnost nežádoucích bublin. Následně byli dafnie přeneseny do jednotlivých jamek.

na základě designu trialu (viz Tabulka 3). V momentě, kdy byli jedinci již přichystáni (viz Obr. 9) se celá destička pokapala pár kapkami vody. Následně se nanasla PCR fólie, na ni silikonový bloček a na vrch kompresní deska.

Systém se umístil na orientační rámeček, který dále dosedal na SDR čtečkou (Loligo Systems 2016).

Celý systém byl po dobu měření uzavřen v inkubátoru s teplotou nastavenou na 20 °C. Průměrná teplota se po celou dobu měření pohybovala v rozmezí 20-21 °C.

Po ukončení měření se jedinci vyjmuli z jamek do samostatně označených mikrozkušavek s 10% roztokem formaldehydu (Seidlová 2023).

Vzorky se poté uchovaly pro pozdější měření parametrů.

Data byla analyzována podle metody dvoubodové individuální kalibrace. Principem je provést kalibraci na dvou roztocích (Kučera et al. 2022). Kdy prvním měřeným roztokem

je voda nasycená 100 % kyslíkem. K tomu byla použita destilovaná voda, která se pravidelně promíchávala v otevřené baňce. Druhým roztokem byla naopak destilovaná voda zbavená kyslíku. K tomu se použil 1% roztok Na_2SO_3 . Tento roztok bylo nutno udržovat v uzavřené nádobce bez přístupu kyslíku. Oba roztoky se temperovaly alespoň 1 hodinu na testovací teplotu. Po naměření se data ještě dále upravila. Následně došlo k výpočtu koeficientů a, b. Dále se data upravila dle vzorce:

Opravená hodnota = původní hodnota + (a * původní hodnota + b)

Opravená data dle kalibrace se vložila do souboru MicroPlateAnalysisTool, kde se zadala, mimo jiné i fázová data, specifika kalibrace, experimentu a objem jamky (Kučera et al. 2022).

3.10 Chování

Pro sledování chování byly dafnie opět rozděleny na dvě skupiny – infikované a neinfikované. Provedli jsme 2 trialy a během každého bylo sledováno 20 dafnií ve 20 nádobách označených jako C a E.

Dafnie byly umístěny do krystalizačních misek o objemu 200ml společně s vodou. K infikovaným byla přidána suspenze L1, společně s larvami byly dafnie ponechány 16 hodin.

Po 16 hodinách byli všichni jedinci vyjmuti z chovných nádob a umístěni do Petriho misek s čistou vodou. Zvláštní pozornost byla věnována minimalizaci přenosu kontaminované vody spolu s těly dafnií do nových misek.

Vytvořili jsme prostředí vhodné k natočení záběrů (světlo, nastínění, stojan na smartphone viz Obrázek 10). Abychom dosáhli co nejlepší viditelnosti jedinců použili jsme jako podklad nádob černé pozadí, na kterém byl celý proces pokusu zaznamenáván.

Natočili jsme krátké záběry trvající 35 ± 1 s.

K vyhodnocování byl použit program **AnimalTA** (Chiara & Kim 2023). Analýza aktivity probíhala dle originálního manuálu AnimalTA viz příloha.



Obrázek 10 – zaznamenávání chování (Švajná 2023)

3.11 Pitva

Pitva byla provedena za účelem zjištění přítomnosti larev v tělních tkáních exponovaných jedinců. Cílem bylo zjistit, zda dafnie požívají larvy během filtrace, zda je ukládají do tělních tkání nebo trávicí soustavy či nikoliv. Použit byl světelný mikroskop, skalpel, skleněné Petriho misky, podložní a krycí sklíčka.

Pro pitvu bylo použito celkem 23 jedinců, kteří byli exponováni po dobu 18 hodin v 200ml skleněných krystalizačních miskách v laboratoři se světelným režimem 12:12. Expozice probíhala přes noc, tudíž většinu času bez svícení. Všichni jedinci byli nejprve prohlédnuti vcelku, následně rozmáčknuti a pitváni. Výsledky byly zapsány do papírového archu jako aktivní či neaktivní nález.

3.12 Měření velikosti jedinců

Měřili jsme několik bodů, které pak byly použity k výpočtu odhadu biomasy dafnií podle tohoto vzorce: $W = 0,0116Lb^{2,67}$, neboli

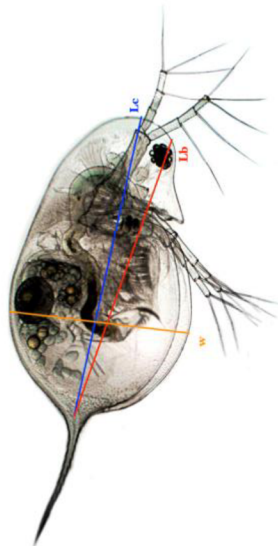
$$\log_{10} W = \log_{10} 0,0116 + 2,67 \log_{10} Lb$$

kde W je hmotnost těla v mg a Lb je délka těla v mm.

- délka těla (Lb) = od základny ocasní páteře po vrchol přílby
- délka karapaxu (Lc) = od základny ocasního hřbetu po střed pohybových tykadel
- Šířka (w)

tak, jak je znázorněno na obrázku 11. Dafnie byly fixovány v roztoku formaldehydu, takže před samotným nafocněním snímků z něj musely být řádně vyjmuty a zbaveny veškerých zbytků chemikálie. Přemístili jsme jedince z nádoby s formaldehydem do malých označených Petriho misek s destilovanou vodou, následně pomocí pipety do finálních označených Petriho misek, na kterých byly nafoceni a později změřeni. Po pořízení snímků byli přemístěni zpět do mikroskopu s formaldehydem. Měření proporcí těla jsme provedli pomocí programu ImageJ (Schneider 2012).

Veškeré snímky byly pořízeny pomocí digitálního mikroskopu na fakultě FAPPZ-A.



Obrázek 11 – osy pro měření tělních proporcí dafnie (Cuenca Cambroner & Orsini 2018)

Při fotografování pod mikroskopem bylo nutné postupovat dle návodu k fotografování embryí: kancelář 53 - děkanát FAPPZ (viz příloha).

3.13 Metody statistické analýzy

3.13.1 Clearance rate – efektivita odstraňování L1

V rámci tohoto experimentu jsme zjišťovali, zda jsou dafnie skutečně efektivní při odfiltrování larev L1 z vodního prostředí či nikoliv. K dispozici jsme měli data ze dvou skupin: exponovaná skupina byla testována celkem v 18 opakováních, zatímco kontrolní skupina měla pouze 6 opakování. Z tohoto důvodu byl použit t-test, který nám poskytl p-hodnotu, která nám umožnila určit statistickou významnost rozdílů mezi kontrolním a exponovaným vzorkem. Před použitím t-testu byla ověřena normalita dat pomocí Shapiro–Wilk testu.

3.13.2 Clearance rate – rozdíly mezi skupinami

Pro zjištění statisticky významných rozdílů mezi třemi skupinami (nezávislá proměnná nazvaná „Skupina“) byla použita jednofaktorová ANOVA.

Sledovali jsme, zda existují statisticky významné rozdíly mezi průměry těchto skupin v závislé proměnné (nazvané „Efekt“).

K dispozici jsme měli data ze tří skupin: naivní skupina A (n=18), skupina B dvakrát vystavená L1 (n=18) a skupina C čtyřikrát vystavena L1 (n=14). Skupina C měla nižší počet opakování z důvodu čtyř úhynů během experimentálního chovu.

Před použitím metody ANOVA byla ověřena normalita dat pomocí Shapiro–Wilk testu a homogenita variancí mezi skupinami pomocí F-testu.

3.13.3 Respirometrie

Pro analýzu dat byl použit nezávislý t-test. Zjišťovali jsme, zda existuje statisticky významný rozdíl v rychlosti metabolismu u exponovaných a kontrolních dafnií (nezávislé proměnné nazvané „Skupina“) na závislou proměnnou (nazvaná „COR_MO“). Před použitím t-testu byla ověřena normalita dat pomocí Shapiro–Wilk testu.

3.13.4 Chování

Pro zjištění statisticky významných rozdílů v různých typech chování u exponovaných (n=10) a kontrolních (n=10) jedinců byl použit nezávislý t-test. Data každé skupiny pocházela z různých populací, měla normální rozdělení a shodnost rozptylů.

Porovnávány byly průměrné hodnoty nezávislých proměnných na závislé proměnné (exploration value, menadering, traveled distance, average speed, moving time).

Před použitím t-testu byla ověřena normalita dat pomocí Shapiro–Wilk testu.

4 Výsledky

Kapitola výsledky je rozdělena do šesti podkapitol. V podkapitole 5.1. Clearance rate – efektivita při odstraňování L1 lze vidět, že dafnie jsou skutečně efektivní při odstraňování larev L1 z prostředí. V nádobách, ve kterých byly přítomny dafnie byl zaznamenán prokazatelně vyšší úbytek L1 než u nádob kontrolních. V podkapitole 5.2 jsou vyobrazeny rozdíly v clearance rate mezi třemi testovanými skupinami, kde se však ukázalo, že rozdíly nejsou statisticky významné. V podkapitole 5.3. Respirometrie je vidět, že nebyly prokázány žádné statisticky významné rozdíly mezi exponovanou a kontrolní skupinou. Podkapitola 5.4. Chování shrnuje výsledky celkem 5 sledovaných typů chování, z čehož jsme u žádného nezaznamenali statisticky významný rozdíl mezi exponovanou a kontrolní skupinou. Podkapitola 5.5. Pitva popisuje negativní nálezy L1 v tělech dafnií a poslední podkapitola 5.6. Parametry vody vyobrazuje přehled měřených parametrů vody (teplota, rozpuštěný kyslík, pH, dusičnanový dusík, konduktivita) v jednotlivých dnech během hlavního experimentu.

4.1 Clearance rate – efektivita při odstraňování L1

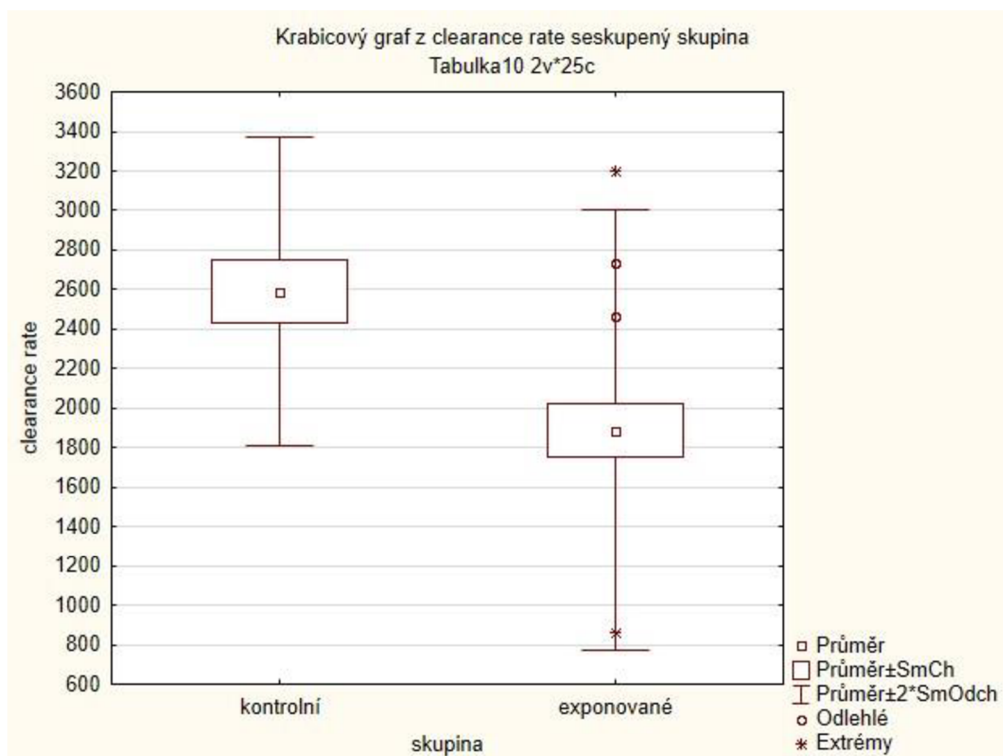
To, zda dafnie skutečně odstraňují L1 bylo porovnáno v rámci dvou skupin: exponované (n=18) a kontrolní (n=6). Výsledek měření ukázal, že v nádržích s dafniemi bylo na konci měření 1890 ± 390 (průměr \pm sm. odch) larev, zatímco v nádržích kontrolních bylo 2600 ± 560 larev (průměr \pm sm. odch).

Výsledek t-testu ukázal, že lze zamítnout nulovou hypotézu H_0 , že Jedinci *D. magna* nejsou efektivní při odstraňování larev *A. cantonensis* ve stadiu L1 z prostředí a že není statisticky významný rozdíl v koncentraci larev L1 mezi nádobami s dafniemi a bez nich (t-test, $p = 0,01$). Korelace mezi velikostí (hmotností) jedinců a účinností filtrování (clearance rate) nebyla statistickým testem (Spearmanův korelační koeficient) potvrzena. Hodnota koeficientu (Spearman. R -0,04) naznačuje velmi slabou negativní korelaci mezi proměnnými Hmotností a

CR. Tato hodnota je blízko nuly, což naznačuje, že existuje jen velmi malá, téměř žádná korelace mezi těmito dvěma proměnnými. P hodnota ($p=0,89$) je velmi vysoká, což naznačuje, že v tomto vzorku není statisticky signifikantní korelace mezi hmotností a CR.

Tabulka 4 – výsledky testování Clearance rate – efektivita při odstraňování L1

Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. Člen skupina	90216028	1	90216028	327,15789	0,000000
Chyba	2216565	1	2216565	8,0381	0,009633
	6066632	22			



Graf 1- popisující rozdíly v efektivitě odstraňování L1 kontrolní a exponované skupiny

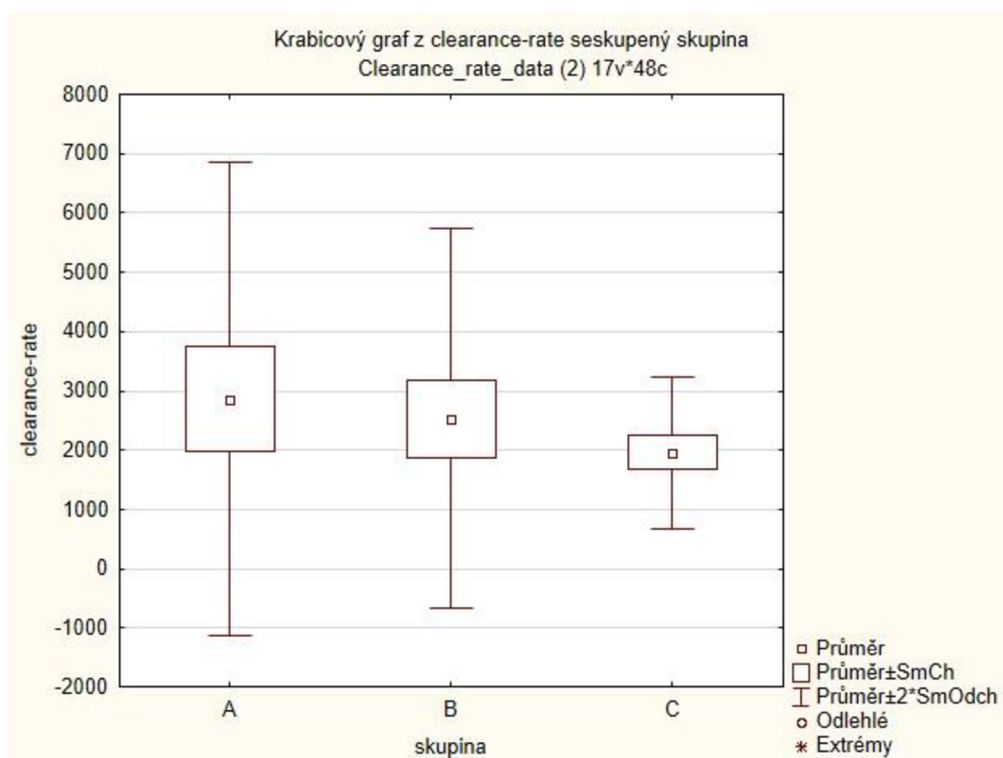
4.2 Clearance rate – rozdíly mezi skupinami

Výsledek statistického testu (jednofaktorová ANOVA, $p=0,65$) u clearance rate analýzy, ukazuje, že nelze zamítnout nulovou hypotézu, že neexistuje rozdíl mezi naivní a vícekrát exponovanou skupinou. To naznačuje, že opakované vystavení jedinců larvám L1

A. cantonensis, nemá signifikantní vliv na efektivitu odstraňování ve srovnání s naivní skupinou. Vzhledem k tomu, že testovaný vzorek obsahoval 50 jedinců, z toho 18 v naivní, 18 v dvakrát exponované a 14 v čtyřikrát exponované skupině, a nebyla zamítnuta nulová hypotéza, lze konstatovat, že všechny tři skupiny jsou si podobné v této funkci. Můžeme tedy vyloučit, že by opakovaná expozice jakýmkoli způsobem ovlivňovala efektivitu dafnií při odstraňování larev z prostředí.

Tabulka 5 - výsledky testování Clearance rate – rozdíly mezi skupinami

Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. Člen	95580686	1	95580686	40,84996	0,000024
skupina	2110929	2	1055465	0,45109	0,646535
Chyba	30417383	13	2339799		



Graf 2 - popisující rozdíly v clearance rate mezi naivní (A), dvakrát exponovanou (B) a čtyřikrát exponovanou (C) skupinou

4.3 Respirometrie

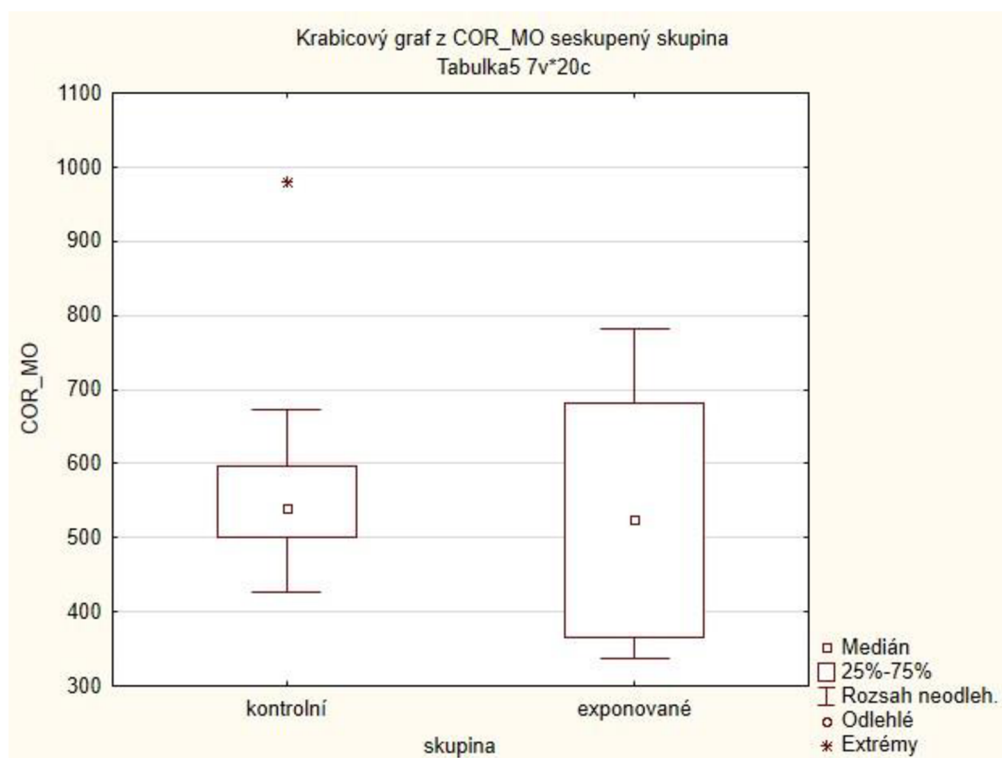
Výsledek statistického testu u respirometrické analýzy, ukazuje, že nelze zamítnout nulovou hypotézu, že existuje rozdíl mezi exponovanou (582 ± 112 průměr \pm sm. odch [pmol/jedinec/min]) a kontrolní (539 ± 163 MO₂ průměr \pm sm. odch [pmol/jedinec/min]) skupinou (t-test, $p = 0,59$). To naznačuje, že vystavení jedinců larvám L1

A. cantonensis, nemá signifikantní vliv na rychlost metabolismu dýchání ve srovnání s kontrolní skupinou. Vzhledem k tomu, že testovaný vzorek obsahoval 20 jedinců, z toho 10 v exponované a 10 v kontrolní skupině, a nebyla zamítnuta nulová hypotéza v jejich rychlosti metabolismu dýchání, lze konstatovat, že obě skupiny jsou si podobné v této fyziologické funkci.

V příloženém krabicovém grafu jsou znázorněny rozdíly mezi kontrolovanou a exponovanou skupinou, přičemž rozdíly jsou minimální.

Tabulka 6 - výsledky testování Respirometrie

Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen skupina	5964494	1	5964494	208,8671	0,000000
Chyba	8811	1	8811	0,3085	0,585808
	485459	17	28556		



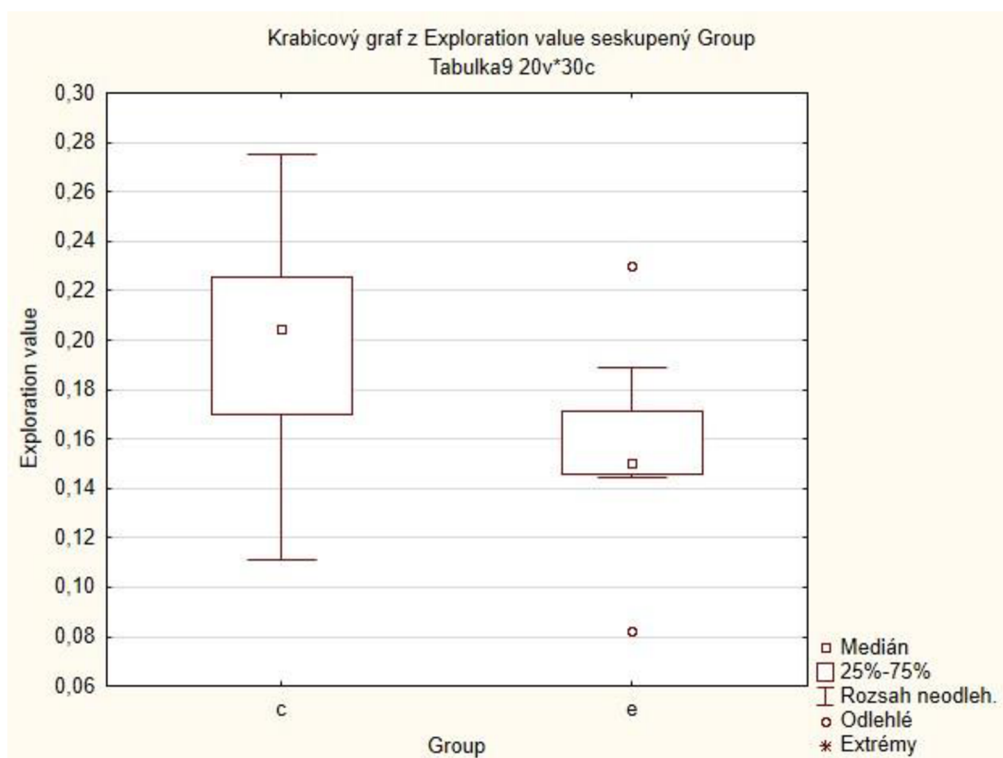
Graf 3 - popisující rozdíly v respirometrii kontrolní a exponované skupiny

4.4 Chování

V rámci statistické analýzy jsme sledovali celkem pět různých typů chování, konkrétně hodnotu prozkoumávání, meandering, uraženou vzdálenost, průměrnou rychlost a dobu pohybu, u dvou skupin dafnií – kontrolní a exponované larvám L1. Testovaný vzorek obsahoval 20 jedinců, z toho 10 v exponované a 10 v kontrolní skupině. Výsledky statistického testu ukázaly, že u žádného sledovaného typu chování nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi exponovanou a kontrolní skupinou (Exploration value: t-test, $p=0,06$; Traveled distance: t-test, $p=0,51$; Average speed: t-test, $p=0,51$; Moving time: t-test, $p=0,51$, Meander: t-test, $p=0,73$). To znamená, že není dostatek důkazů pro zamítnutí nulové hypotézy (H_0), že projevy chování jsou signifikantně odlišné u exponovaných a neexponovaných jedinců. Tento výsledek naznačuje, že expozice dafnií larvám *A. cantonensis*, nemá významný vliv na zkoumané typy chování dafnií ve srovnání s kontrolní skupinou.

Tabulka 7 - výsledky testování Exploration value - „hodnota prozkoumávání“

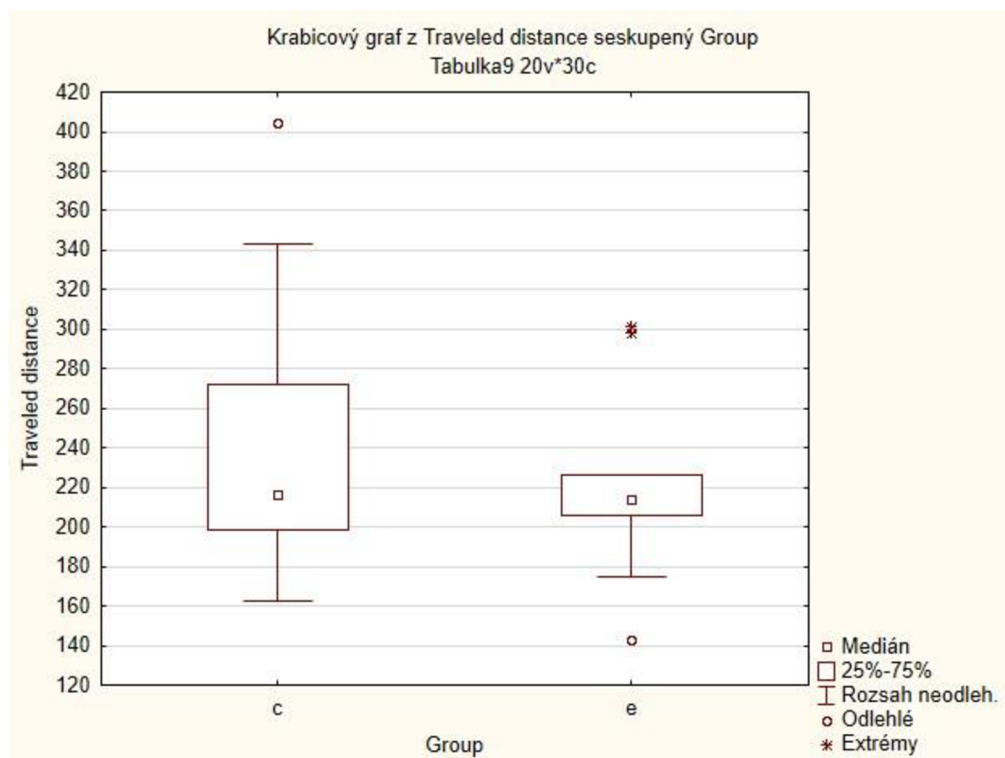
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. Člen	0,623107	1	0,623107	340,6199	0,000000
Skupina	0,007461	1	0,007461	4,0786	0,058573
Chyba	0,032928	18	0,001829		



Graf 4 - znázorňující rozdíly mezi exponovanou (e) a kontrolní (c) skupinou u sledovaného parametru „hodnota prozkoumávání“

Tabulka 8 - výsledky testování Traveled distance – „uražená vzdálenost“

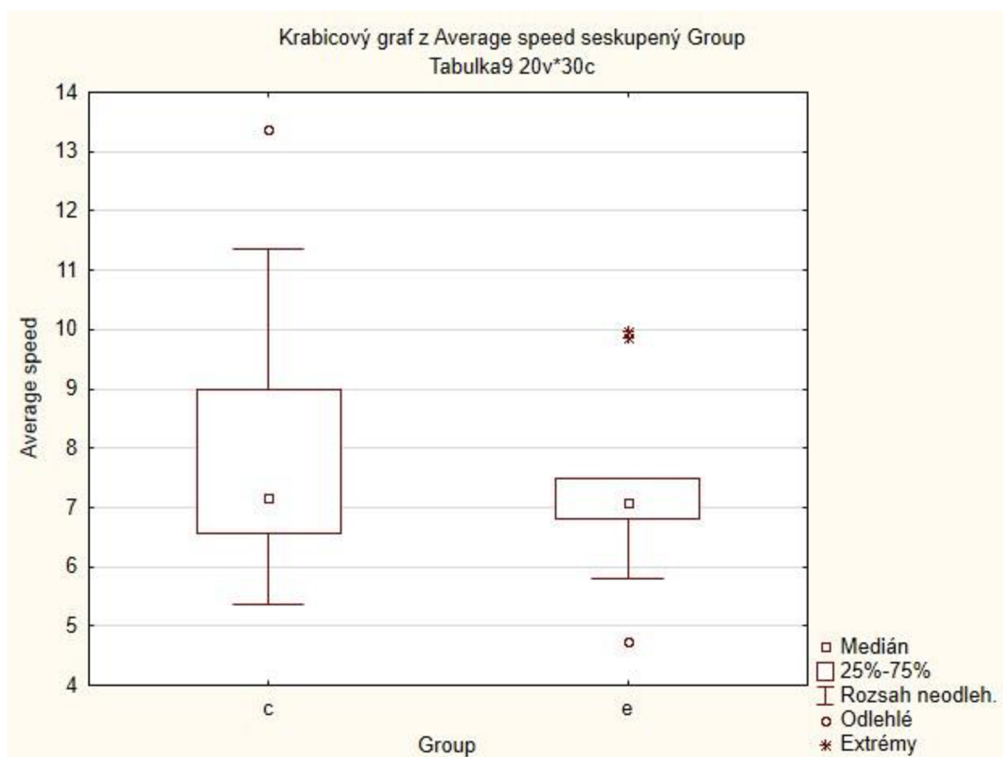
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. Člen	1068048	1	1068048	254,1964	0,000000
Skupina	1869	1	1869	0,4449	0,513225
Chyba	75630	18	4202		



Graf 5 - znázorňující rozdíly mezi exponovanou (e) a kontrolní (c) skupinou u sledovaného parametru „uražená vzdálenost“

Tabulka 9 – výsledky testování Average speed – „průměrná rychlost“

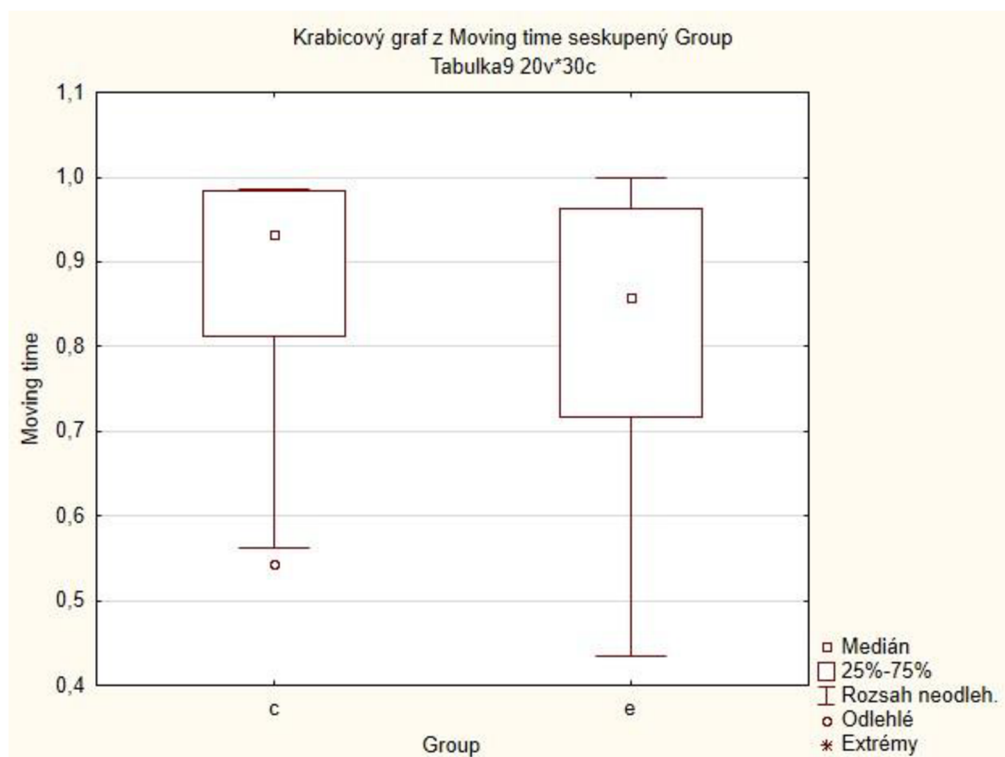
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. Člen	1168,450	1	1168,450	254,5952	0,000000
Skupina	2,069	1	2,069	0,4508	0,510459
Chyba	82,610	18	4,589		



Graf 6 - znázorňující rozdíly mezi kontrolní (c) a exponovanou (e) skupinou u sledovaného parametru „průměrná rychlost“

Tabulka 10 - výsledky testování Moving time – „doba pohybu“

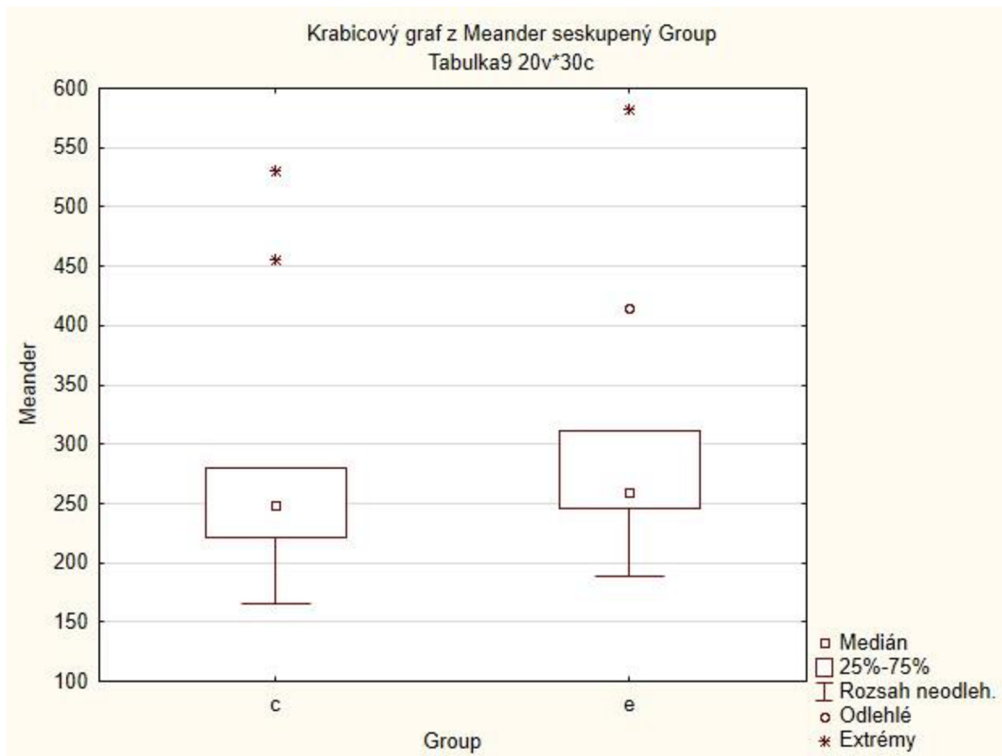
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. Člen	14,0586	1	14,05864	471,7184	0,000000
Group	0,00656	1	0,00656	0,2202	0,644530
Chyba	0,53645	18	0,02980		



Graf 7 - znázorňující rozdíly mezi kontrolní (c) a exponovanou (e) skupinou u sledovaného parametru „doba pohybu“

Tabulka 11 – výsledky testování Meander – menadering (trajektorie/míra změny směru)

Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. Člen	1723122	1	1723122	128,3537	0,000000
Skupina	1667	1	1667	0,1241	0,728677
Chyba	241646	18	13425		



Graf 8 - znázorňující rozdíly mezi kontrolní (c) a exponovanou (e) skupinou u sledovaného parametru „meandering“

4.5 Pitva

Pitva byla provedena u 23 jedinců *D. magna* po 18hodinové expozici larvám. U všech z nich byl nález L1 negativní. Můžeme tedy říci, že v testované populaci nebyly nalezeny žádné larvální stádia L1. Tento výsledek naznačuje absenci infekce či přítomnost nízké prevalence parazitárního organismu ve zkoumané populaci.

4.6 Parametry vody

Hodnota pH se u všech měřených nádob pohybovala v normě $7,86 \pm 0,2$. Koncentrace rozpuštěného kyslíku se snižovala, počáteční den experimentu se pohybovala kolem 90 % nasycení, v dalších dnech měření klesla na průměrných 84 %, nejnižší hodnota byla naměřena v nádobě B2 a to 74,6 %. Průměrná teplota byla $23 \pm 0,5$ °C, první a druhý den měření dosáhla $24 \pm 0,5$ °C, v poslední den měření se snížila ve všech nádobách na $22 \pm 0,5$ °C. Dusičnanový dusík dosahoval nejvyšších hodnot v první den měření u misek C3 a A6. Po zbytek experimentu průměrná koncentrace N-NO₃ dosahovala $4,8 \pm 2$ mg/l. Průměrná konduktivita dosahovala hodnoty $764 \pm 0,5$ μS/cm.

Tabulka 12 – parametry vody v experimentálních miskách dle skupin

ID	pH	O2 %	Teplota °C	N-NO3 mg/l	Konduktivita µS/cm
A4	8.01	90.1	24.2	4	501
A6	8.01	90.4	24.2	9.7	949
A5	8.03	90	24.4	7.5	971
B4	8.03	91.3	24.4	6.7	757
B2	8.02	90.5	24.5	7.4	783
B6	7.99	90.2	24.5	7.2	766
C3	7.98	88.7	24.5	10.4	778
C4	7.94	88.1	24.6	6.2	770
C2	7.97	88.3	24.6	6.9	786
A2	7.86	83.1	24.5	2.4	689
A5	7.84	84.7	24.5	5.6	654
A4	7.86	82.5	24.5	4.6	642
B3	7.94	85.6	25	4.2	708
B6	7.93	88.2	24.7	4.4	695
B2	7.86	85.9	24.5	4.7	707
C2	7.86	85.5	24	5.4	700
C4	7.8	84.2	23.5	4.2	773
C1	7.8	85.2	23.2	5.6	651
A2	7.7	87	22	3.6	813
A5	7.7	86.4	22	6.2	831
A4	7.7	85.5	21.8	5.8	823
B3	7.7	87	21.6	5.3	808
B6	7.8	87	22	5.6	816
B2	7.7	74.6	22	5.6	818
C2	7.7	85.9	21.9	4.4	806
C4	7.8	83.7	22	4.4	820
C1	7.7	83.5	22	4.6	815
Laboratorní dechlorovaná voda	8.01	98.2	24.4	6.5	334

5 Diskuse

Smyslem této diplomové práce je přinést nové poznatky o předpokladech *D. magna* jako potenciálním mezihostiteli parazitické hlístice *A. cantonensis* a v případě infekce prokázat nebo zamítnout případné fyziologické a behaviorální změny způsobené interakcí s tímto parazitem. Část literární rešerše je zaměřena na obecné informace o testovaných organismech, část je věnována metodám jejich chovu, což slouží pro lepší pochopení mezidruhových interakcí a následně pochopení výsledných dat.

Studium interakce mezi *D. magna* a parazitickými hlísticemi je důležité nejen pro pochopení biologie těchto organismů, ale i pro pochopení funkcí a dynamiky sladkovodních ekosystémů jako celku. Znalost těchto interakcí může vést k lepšímu řízení a ochraně těchto ekosystémů v rámci ochrany biodiverzity.

Tato studie dokládá zásadní význam dafnií ve vodním laboratorním prostředí. Z výsledků je patrné, že v kontrolovaných laboratorních podmínkách dafnie účinně filtrovala L1 *A. cantonensis* z vody a že v porovnání s přirozeným úbytkem bez přítomnosti těchto filtrátorů byl úbytek larev signifikantně vyšší. Tento výsledek odráží její schopnost omezit počet larev, které jsou k dispozici pro infekci dalších mezihostitelů a zdůrazňuje složitou souhru mezi hostiteli a L1 a naznačují, že strategie biologické kontroly mohou účinně snížit míru výskytu ve vodním sloupci na úrovni stádia L1 (nikoliv však na úrovni infekčního stadia L3, které zde nebylo studováno).

Dalším testovaným parametrem byly rozdíly mezi naivní, dvakrát exponovanou a čtyřikrát exponovanou skupinou v účinnosti filtrace v mililitrech na gram tělesné hmotnosti za hodinu (ml/mg/h). Výsledky prokázaly minimální rozdíl mezi těmito skupinami, což odpovídá tomu, že clearance rate jedinců *D. magna* se neliší bez ohledu na to, zda byli daní jedinci larvám vystavováni opakovaně či nikoliv.

Předpokládali jsme, že pokud dafnie skutečně odstraňují L1 z vodního prostředí pomocí filtrace částic, mohly by larvy signifikantně ovlivňovat jejich fyziologii či chování. Exponované jedince jsme proto podrobili respirometrické analýze a sledovali jsme 5 typů jejich pohybové aktivity, které nám umožnily vyhodnotit behaviorální změny mezi exponovanou a kontrolní skupinou. Výsledky však neprokázaly ani rozdíly v chování ani v rychlosti metabolismu. Tyto výsledky můžeme přisoudit nedostatečné interakci mezi *D. magna* a larvami *A. cantonensis*. Provedená pitva navíc potvrdila, že larvy ve stádiu L1 v dafních nejsou přítomné ani po 18hodinové expozici, což zároveň může vysvětlovat neexistující rozdíly v chování a metabolismu mezi exponovanými a kontrolními jedinci. Tyto skutečnosti poukazují na nedostatek interakce mezi *D. magna* a larvami *A. cantonensis*. Možnými vysvětleními této nepřítomnosti může být nedostatek schopnosti dafnií zadržet nebo konzumovat larvy, nekompatibilita mezi životními cykly dafnií a *A. cantonensis*, nebo nevhodné životní podmínky pro larvy v prostředí dafnií. Jedním z dalších možných důvodů může být nízká hustota populace *D. magna*, která v našich experimentálních nádobách čítala pouze 3-10 jedinců na 200ml. Green (1955) uvádí, že hustota dafnií v přirozeném prostředí se v hustě osídlených oblastech pohybuje v řádech tisíců na litr. V souladu s tím by se u parazitů vyskytujících se u rodu *Daphnia* dal očekávat pozitivní vztah mezi hustotou hostitele a parametry přenosu parazita, kdy by tento vztah byl způsoben cykly potravního omezení, spojenými s přenosem parazita

v závislosti na hustotě (tento druhý efekt byl experimentálně prokázán u rodu *Daphnia* a jeho mikroparazitů; Ebert 1995; Ebert et al. 2000b; Bittner et al. 2002; Regoes et al. 2003).

Decaestecker ve své studii z roku 2008 však prokázal negativní souvislost mezi populační hustotou dafnií a parametry přenosu endoparazitů (Decaestecker 2008). Jedním z dalších faktorů, které by mohly hrát roli v nekompatibilitě dafnií jako mezihostitele pro tuto hlístici, je velikost a stáří jedinců. Předchozí studie ukázaly, že k vyššímu příjmu infekčních stadií dochází velkými dafniemi (díky jejich vyšší filtraci) a k hromadění parazitických spor s věkem (Mangin et al. 1995; Stirnadel & Ebert 1997). Tento faktor se však naší studií vylučuje, protože všichni testovaní jedinci byli stejně staří a podobně velcí s průměrnou hmotností $0.18 \pm 0,1$ mg.

Ebert et al. (2000) testovali efekt šesti různých parazitů na *D. magna*. Jejich studie prokázala přítomnost některých druhů parazitů v těle dafnií, avšak musíme brát v potaz velký rozdíl v trvání experimentu. Jejich experiment trval 16 týdnů, zatímco náš trval pouze 8 dní. Během takto krátkého intervalu expozice *D. magna* larvám pravděpodobně nemohlo dojít k infekci a případnému vývoji parazita uvnitř hostitele.

Decaestecker ve svých studiích z roku 2002 a 2004 uvádí, že pokud jsou dafnie vystaveny rybničním sedimentům, které obsahují spory parazitů, je riziko nákazy prokazatelně vyšší, než když se spory nachází volně ve vodním sloupci. To souvisí i s filtrační aktivitou dafnií, které jsou stimulovány k filtrování, a tedy přijímání částic do těla, s vyšší koncentrací částic ve vodě. Tedy čím čistší voda v jejich prostředí je, tím méně filtrují. Tato fakta by mohla podpořit naše negativní výsledky, vzhledem k tomu, že testované dafnie byli v nádobách bez sedimentu a v den infekce neprobíhalo krmění a přidávaná suspenze L1 byla zbavena většiny organického materiálu. Stejně tak učinili ve své studii Chadwick & Little (2005), kdy cílem použití různých kontrol bylo zabránit možnosti, že by spory parazitů a/nebo doprovodný sediment měli určitou výživnou hodnotu, což by mohlo způsobit rozdíly mezi jednotlivými pokusy. V prvním pokusu použili sedimentovaný trus jak pro kontroly, tak pro exponované, přičemž jediným rozdílem mezi kontrolami a exponovanými byla nepřítomnost nebo přítomnost spor parazitů.

Další proměnná, kterou bychom měli zohlednit, je denní aktivita dafnií. Tito filtrátoři filtrují převážně během dne za světla (Serra et al. 2019). Naše experimenty byly realizovány po dobu 18 hodin přes noc s nastaveným svícením 12:12, což znamená že většina experimentu probíhala právě za tmy. I to může být důvodem nízké filtrační aktivity a nízkému příjmu L1. Při interpretaci výsledků studie je nicméně třeba postupovat opatrně, protože jsou omezeny na interakci mezi dafniemi a *A. cantonensis* a nemusí být obecně relevantní pro různé ekologické situace a interakce mezi hostitelem a parazitem.

Předchozí studie, které se zabývaly *D. magna* jako potenciálním mezihostitelem parazitů uvádí, že je laboratorní podmínky nejsou pro tyto studie úplně vhodné. V experimentální studii (Pulkinnen & Ebert 2004) se skutečně ukázalo, že filtrace větších dafnií přítomných ve vodním prostředí vede populaci parazita k vymírání, ale to pouze za předpokladu dodržení podmínek, které není možné v kontrolovaném laboratorním prostředí nasimulovat. Takové podmínky jsou např. sezónnost, predace filtrátorů rybami nebo specifické složení rybiho společenstva (Duffy et al. 2005).

Naše studie uznává, že převod laboratorních výsledků do reálného prostředí má svá omezení. Tato omezení vyplývají z faktorů ovlivňujících životní prostředí, specifických vlastností různých druhů a omezení metod identifikace larev. Tyto proměnné mohou ovlivnit přesnost výsledků o filtračním účinku dafnií a jejich roli při kontrole přenosu *A. cantonensis*.

Navzdory těmto omezením studie ukazuje užitečné poznatky pro budoucí využití dafnií pro kontrolu *A. cantonensis* a dalších vodních parazitů, ačkoliv nedochází k osídlení dafnií ani k jakémukoli pozorovatelnému vlivu na fyziologii těchto filtrátorů. Tato nepřítomnost interakce naznačuje, že *D. magna* nejsou vhodnými hostiteli pro vývoj larev *A. cantonensis* ve stádiu L1 nebo jejich přenos.

Závěrem lze říci, že i přes původní hypotézu o možnosti významu *D. magna* jako mezihostitele a přenašeče larev *A. cantonensis*, naše studie neprokázala žádnou podstatnou interakci mezi těmito organismy. Tento výzkum však přispívá k lepšímu porozumění biologii a interakci mezi různými druhy ve vodním prostředí a naznačuje, že je třeba hledat alternativní metody kontroly nákazy *A. cantonensis*.

K vyhodnocení proveditelnosti a účinnosti použití dafnií nebo srovnatelných organismů v přírodních vodách je zapotřebí další výzkum, zejména terénní výzkum praktických aplikací. Studie rovněž zdůrazňuje význam pochopení interakcí mezi hostitelem a parazitem a úlohy mezihostitelů při přenosu parazitárních onemocnění. Zabývá se také možností využití biologických organismů v integrovaných strategiích kontroly parazitů s cílem snížit dopad invazních druhů.

Tato diplomová práce nám poskytuje dostačující informace o tom, jak dafnie pomáhají filtrovat larvy *A. cantonensis*, ale také ukazuje, že je třeba provést mnohem více terénního výzkumu, abychom zjistili, jak užitečné tyto interakce v přirozeném vodním prostředí jsou.

6 Závěr

U dospělých jedinců planktonního filtrátora *D. magna* byla sledována interakce s prvním larválním stádiem parazitické hlístice *A. cantonensis*. V první řadě byla testována efektivita dafnií při odstraňování larev L1 v z vodního prostředí, rozdíly v clearance rate hodnotách s opakující se expozicí larvám, dále byl pozorován potenciální vliv parazitů na fyziologické funkce a behaviorální změny *D. magna*.

V návaznosti na stanovené cíle a ze získaných výsledků lze vyvodit následující závěry:

- Jedinci *D. magna* jsou prokazatelně efektivní při odstraňování larev *A. cantonensis* ve stadiu L1 z prostředí.
- Opakované vystavení dafnií larvám L1 *A. cantonensis*, nemá signifikantní vliv na míru odstraňování ve srovnání s naivní skupinou.
- Expozice jedinců *D. magna* žádným způsobem neovlivňuje jejich metabolismus dýchání a lze konstatovat, že exponovaná a kontrolní skupina jsou si v této fyziologické funkci podobné bez ohledu na expozici L1 *A. cantonensis*.
- Expozice dafnií larvám *A. cantonensis*, nemá významný vliv na zkoumané typy chování dafnií ve srovnání s kontrolní skupinou.
- V testované populaci nebyly nalezeny žádná larvální stádia L1. Tento výsledek naznačuje absenci infekce či přítomnost nízké prevalence parazitárního organismu ve zkoumané populaci.

Tato diplomová práce přináší první informace o interakci *D. magna* a *A. cantonensis* v laboratorních podmínkách a poskytuje pilotní data, která budou podrobněji analyzována v připravovaném článku. Metodické poznatky je možné využít při testování vlivu dalších parazitů na tohoto filtrátora či jako podklad k terénnímu výzkumu vzájemných interakcí dafnie – parazit.

7 Literatura

Ahmed S. 2023. Applications of *Daphnia Magna* in Ecotoxicological Studies: A Review. *Journal of Advanced Research in Biology* 5:16–35.

Alicata JE. 1965. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. *Advances in parasitology*, 3, 223-248.

Ameline C, Bourgeois Y, Vöggtli F, Savola E, Andras J, Engelstädter J & Ebert D. 2021. A two-locus system with strong epistasis underlies rapid parasite-mediated evolution of host resistance. *Molecular biology and evolution*, 38(4), 1512-1528.

Auld SK & Brand J. 2017. Simulated climate change, epidemic size, and host evolution across host–parasite populations. *Global Change Biology*, 23(12), 5045-5053.

Bownik A. 2017. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. *Science of the total environment*, 601, 194-205.

Bownik A & Pawlik-Skowrońska B. 2019. Early indicators of behavioral and physiological disturbances in *Daphnia magna* (Cladocera) induced by cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. *Science of the total environment*, 695, 133913.

Brian JI, Reynolds SA & Aldridge DC. 2022. Parasitism dramatically alters the ecosystem services provided by freshwater mussels. *Functional Ecology*, 36(8), 2029-2042.

Cowie RH. 2017. *Angiostrongylus cantonensis*: agent of a sometimes fatal globally emerging infectious disease (rat lungworm disease). *ACS Chemical Neuroscience*, 8(10), 2102-2104.

Cuenca Cambronero M, Orsini L. 2018. Resurrection of Dormant *Daphnia magna*: Protocol and Applications. (131):56637. doi: 10.3791/56637

Dagg MJ & Wyman KD. 1983. Natural ingestion rates of the copepods *Neocalanus plumchrus* and *N. cristatus* calculated from gut contents. *Marine Ecology Progress Series*, 37-46.

Dam HG & Peterson WT. 1988. The effect of temperature on the gut clearance rate constant of planktonic copepods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 123(1), 1-14.

De Gelas K & De Meester L. 2005. Phylogeography of *Daphnia magna* in Europe. *Molecular ecology*, 14(3), 753-764.

de Oliveira LLD, Antunes SC, Gonçalves F, Rocha O & Nunes B. 2016. Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna*. *Drug and Chemical Toxicology*, 39(1), 13-21.

Decaestecker E, Declerck S, De Meester L & Ebert D. 2005. Ecological implications of parasites in natural *Daphnia* populations. *Oecologia*, 144, 382-390.

Dietrich S, Ploessl F, Bracher F & Laforsch C. 2010. Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna*—A multigenerational study. *Chemosphere*, 79(1), 60-66.

Duffy MA, James TY & Longworth A. 2015. Ecology, virulence, and phylogeny of *Blastulidium paedophthorum*, a widespread brood parasite of *Daphnia* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), 5486-5496.

Green J. 1955. *Studies on a Population of Daphnia magna*. *The Journal of Animal Ecology*, 24(1), 84. doi:10.2307/1880

Ebert D. 2005. Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia* [Review of Parasite-host interactions between *Daphnia magna* and its parasites]. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information.

Ebert D. 2022. *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution. *EvoDevo*, 13(1), 16.

Ebert D. 2005. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*; National Library of Medicine. ISBN 1932811060.

Fredericksen M, Ameline C, Krebs M, Hüsey B, Fields PD, Andras JP & Ebert D. 2021. Infection phenotypes of a coevolving parasite are highly diverse, structured, and specific. *Evolution*, 75(10), 2540-2554.

Freeman L. 1953. A standardized method for determining toxicity of pure compounds to fish. *Sewage and Ind. Wastes* 25: 845-8.

Friesen OC, Goellner S, Poulin R, Lagrue C. 2020. Parasites Shape Community Structure and Dynamics in Freshwater Crustaceans. *Parasitology*. 147, 182–193.

Gu J, Liu M, Li H, Luo Y, Li X, Chen X. 2008. Construction of the life cycle of *Angiostrongylus cantonensis* in laboratory. *J South Med Univ* 28(4):551–554

Gurney WSC, McCauley E, Nisbet RM & Murdoch WW. 1990. The physiological ecology of *Daphnia*: a dynamic model of growth and reproduction. *Ecology*, 71(2), 716-732.

- Haag KL, Larsson JR, Refardt D & Ebert D. 2011. Cytological and molecular description of *Hamiltosporidium tvaerminnensis* gen. et sp. nov., a microsporidian parasite of *Daphnia magna*, and establishment of *Hamiltosporidium magnivora* comb. nov. *Parasitology*, 138(4), 447-462.
- Hartgers EM, Heugens EHW & Deneer JW. 1999. Effect of lindane on the clearance rate of *Daphnia magna*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 36, 399-404.
- Head EJH, Bedo A & Harris LR. 1988. Grazing, defecation and excretion rates of copepods from inter-island channels of the Canadian Arctic archipelago. *Marine Biology*, 99, 333-340.
- Hooper HL, Connon R, Callaghan A, Fryer G, Yarwood-Buchanan S, Biggs & Sibly RM. 2008. The ecological niche of *Daphnia magna* characterized using population growth rate. *Ecology*, 89(4), 1015-1022.
- Chiara V & Kim SY. 2023. AnimalTA: A highly flexible and easy-to-use program for tracking and analysing animal movement in different environments. *Methods in Ecology and Evolution*, 14, 1699–1707. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.14115>
- Jeong CB, Kang HM, Lee YH, Kim MS, Lee JS, Seo JS & Lee JS. 2018. Nanoplastic ingestion enhances toxicity of persistent organic pollutants (POPs) in the monogonont rotifer *Brachionus koreanus* via multixenobiotic resistance (MXR) disruption. *Environmental science & technology*, 52(19), 11411-11418.
- Kjørboe T, Møhlenberg F & Nicolajsen H. 1982. Ingestion rate and gut clearance in the planktonic copepod *Centropages hamatus* (Lilljeborg) in relation to food concentration and temperature. *Ophelia*, 21:181 – 194 .
- Kirk D, Luijckx P, Stanic A & Krkošek M. 2019. Predicting the thermal and allometric dependencies of disease transmission via the metabolic theory of ecology. *The American Naturalist*, 193(5), 661-676.
- Koivisto S. 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?. *Environmental Pollution*, 90(2), 263-267.
- Kučera J, Půček Belišová N, Mackuľak T, Ryba J, Douda K, Bondarev D & Horký P. 2022. Polystyrene Microparticles and the Functional Traits of Invertebrates: A Case Study on Freshwater Shrimp *Neocardina heteropoda*. *Fishes*, 7(6), 323.
- Lehto MP & Haag CR. 2010. Ecological differentiation between coexisting sexual and asexual strains of *Daphnia pulex*. *Journal of Animal Ecology*, 79(6), 1241-1250.

- Lohr JN, Laforsch C, Koerner H & Wolinska J. 2010. A *Daphnia* parasite (*Caullerya mesnili*) constitutes a new member of the Ichthyosporea, a group of protists near the animal–fungi divergence. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(4), 328-336.
- Luessi F, Sollors J, Torzewski M, Müller HD, Siegel E, Blum J & Thömke F. 2009. Eosinophilic meningitis due to *Angiostrongylus cantonensis* in Germany. *Journal of travel medicine*, 16(4), 292-294.
- Mangin KL, Lipsitch M & Ebert D. 1995. Virulence and transmission modes of two microsporidia in *Daphnia magna*. *Parasitology*, 111(2), 133-142.
- Martins YC, Tanowitz HB, & Kazacos KR. 2015. Central nervous system manifestations of *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Acta tropica*, 141, 46-53.
- Murtaugh PA. 1985. The influence of food concentration and feeding rate on the gut residence time of *Daphnia*. *Journal of plankton research*, 7(3), 415-420.
- Nicolajsen H, Møhlenberg F & Kiørboe T. 1983. Algal grazing by the planktonic copepods *Centropages hamatus* and *Pseudocalanus* sp.: diurnal and seasonal variation during the spring phytoplankton bloom in the Øresund. *Ophelia*, 22(1), 15-31.
- 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.
- Otsuru, M. 1981. *Angiostrongylus Cantonensis* and *Angiostrongyliasis* in Japan, with Those of Neighbouring Taiwan.
- Poulin R, Paterson RA, Townsend CR, Tompkins DM & Kelly DW. 2011. Biological invasions and the dynamics of endemic diseases in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 56(4), 676-688.
- Rachford FW. 1975. Potential Intermediate and Paratenic Hosts for *Angiostrongylus Cantonensis*. *J Parasitol.* 61, 1117–1119.
- Rosen L, Loison G, Laigret J & WALLACE GD. 1967. Studies on eosinophilic meningitis. 3. Epidemiologic and clinical observations on Pacific islands and the possible etiologic role of *Angiostrongylus cantonensis*. *American Journal of Epidemiology*, 85(1), 17-44.
- Roulin A, Auer PL, Libault M, Schlueter J, Farmer A, May G & Jackson SA. 2013. The fate of duplicated genes in a polyploid plant genome. *The Plant Journal*, 73(1), 143-153.
- Sarnelle O & Wilson AE. 2008. TYPE III FUNCTIONAL RESPONSE IN DAPHNIA. *Ecology*, 89: 1723-1732. <https://doi.org/10.1890/07-0935.1>

Seda J & Petrusek A. 2011. Daphnia as a model organism in limnology and aquatic biology: introductory remarks. *Journal of Limnology*, 70(2), 337-344.

Seidlová T. 2023. Využití mikrorespirometrie u sladkovodních mlžů [bakalářská práce]. Česká zemědělská univerzita v Praze.

Serra T, Müller MF, Barcelona A, Salvadó V, Pous N & Colomer J. 2019. Optimal light conditions for Daphnia filtration. *Science of the total environment*, 686, 151-157.

Shaw JR, Pfrender, ME, Eads BD, Klaper R, Callaghan A, Sibly RM, Colson I, Jansen B, Gilbert D, Colbourne JK. 2008. Daphnia as an Emerging Model for Toxicological Genomics. *Adv Exp Biol* 2. 165–328.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.

Simoes RO, Monteiro FA, Sanchez E, Thiengo SC, Garcia JS, Costa-Neto SF & Maldonado Jr, A. 2011. Endemic angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 17(7), 1331.

Smit NJ, Bruce NL & Hadfield KA. 2019. Introduction to parasitic Crustacea: state of knowledge and future trends. *Parasitic Crustacea: State of knowledge and future trends*, 1-6.

Stirnadel HA & Ebert D. 1997. Prevalence, host specificity and impact on host fecundity of microparasites and epibionts in three sympatric Daphnia species. *Journal of Animal Ecology*, 212-222.

Sures B, Nachev M, Pahl M, Grabner D & Selbach C. 2017. Parasites as drivers of key processes in aquatic ecosystems: Facts and future directions. *Experimental Parasitology*, 180, 141-147.

Tambovtseva VG, Zharov AA, Haag CR & Galimov YR. 2020. Strong whole life-cycle inbreeding depression in Daphnia magna enhanced by partial asexuality. *bioRxiv*, 2020-10.

Tatarazako N, Oda S. 2007. The Water Flea Daphnia Magna (Crustacea, Cladocera) as a Test Species for Screening and Evaluation of Chemicals with Endocrine Disrupting Effects on Crustaceans. *Ecotoxicology*. 16, 197–203, doi:10.1007/s10646-006-0120-2.

Ten Berge WF. 1978. Breeding daphnia magna. *Hydrobiologia*, 59(2), 121-123.

Thiengo SC, Maldonado A, Mota EM, Torres E JL, Caldeira R, Carvalho ODS & Lanfredi RM. 2010. The giant African snail Achatina fulica as natural intermediate host of

Angiostrongylus cantonensis in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta tropica*, 115(3), 194-199.

Toenshoff ER, Fields PD, Bourgeois YX & Ebert D. 2018. The end of a 60-year riddle: identification and genomic characterization of an iridovirus, the causative agent of white fat cell disease in zooplankton. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(4), 1259-1272.

Tsuda A & Nemoto T. 1987. The effect of food concentration on the gut clearance time of *Pseudocalanus minutus* Krøyer (Calanoida Copepoda). *Journal of experimental marine biology and ecology*, 107(2), 121-130.

Turck HC, Fox MT, Cowie RH. 2022. Paratenic Hosts of *Angiostrongylus Cantonensis* and Their Relation to Human Neuroangiostrongyliasis Globally. *One Health*. 15, 100426, doi:10.1016/j.onehlt.2022.100426.

Uga S & Matsumura T. 1982. In vitro cultivation of *Angiostrongylus cantonensis* eggs. *Japanese journal of parasitology*, 31, 59-66.

Villegas-Navarro A, Rosas-L E & Reyes JL. 2003. The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136(2), 127-134.

Wallace GD, Rosen LR. 1969. Studies on eosinophilic meningitis V. Molluscan hosts of *Angiostrongylus cantonensis* on Pacific Islands. *Am J Trop Med Hyg*. 18:206–216.

Xie H, Yuan D, Luo S, Zeng X, Zeng X, He P & Wu Z. 2017. *Angiostrongylus cantonensis*: An optimized cultivation of this parasitic nematode under laboratory conditions. *Parasitology Research*, 116, 2231-2237.

8 Samostatné přílohy

Manuál pro práci v programu Animal TA

Chiara V & Kim SY. 2023. AnimalTA: A highly flexible and easy-to-use program for tracking and analysing animal movement in different environments. *Methods in Ecology and Evolution*, 14, 1699–1707. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.14115>

Návodů k fotografování embryí: kancelář 53 - děkanát FAPPZ

1. Zapište se do dokumentů.
2. Zapněte box, fotoaparát, světlo 2x, celkem 4 tlačítka a zapněte počítač.
3. Pro přihlášení stačí stisknout klávesu ENTER.
4. Otevřete program na ploše – NIS (NIS-Elements AR).
5. Uživatelské jméno a heslo ...
6. Nastavte světla, nasad'te otevřenou desku (stupnici), zapněte spodní světlo.
7. Nejdříve musíme vyfotit měřítko – vždy vyfotíme na začátku (Meritko1) focení, uprostřed (Meritko2) a na konci (Meritko3).
8. Klikneme na ikonu zelené šipky – Živý (+) - Live (+).
9. Snímáme v rozsahu 2 až 8 cm.
10. Poté zaostříme pomocí šroubu, na kterém se nachází zvětšení.
11. Zachytíme obraz ikony fotoaparátu (ctrl +).
12. V horní liště klikneme na Soubor, Uložit jako...
13. Objeví se okno – uložte pod správným názvem, např. Meritko1, E1 atd. - ULOŽIT
14. Vždy vytvoříme novou složku s aktuálním datem.
15. Uložíme do složky DATA D
16. V horní liště klikneme na soubor, Import/Export (pro uložení ve formátu programu).
17. Klikneme na tlačítko Exportovat ND do formátu TIFF.
18. Objeví se okno – uložte pod správným názvem, např. Meritko1, E1 atd. - ULOŽIT
19. Uloží se do složky DATA D

20. Připravte první embryo do Petriho misky s vodou z umístění (objem vody přibližně do 3/4 objemu misky, aby bylo embryo zcela potopené) a klikněte na ikonu zelené šipky - Živý (+) - Live (+).
21. Zaostříme pomocí šroubů (nikdy se nedotýkejte tlačítka s obrázkem plus a mínus).
22. Je důležité, aby byly vidět obrysy embrya.
23. A pak pořídíme snímek – zachytíme obraz ikony fotoaparátu (ctrl +).
24. V horní liště klikneme na soubor, Uložit jako...
25. Objeví se okno – uložte pod správným názvem, např. Meritko1, E1 atd.
26. Vždy se vytvoří nová složka s aktuálním datem.
27. Ukládá se do složky DATA D
28. V horní liště klikneme na soubor, Import/Export (pro uložení ve formátu programu).
29. Klepneme na tlačítko Exportovat ND do formátu TIFF.
30. Objeví se okno – uložte pod správným názvem, např. Meritko1, E1 atd. - ULOŽIT.
31. Uloží se do složky DATA D
32. A takto postupujeme u všech embryí. + načteme všechna data do listu excelu
33. Na konci fotografování – kontrola uložení, uložení fotografií na USB nebo DISK.
34. Zavřete program, vypněte PC, mikroskop (4 tlačítka).
35. Vraťte vše zpět, zakryjte mikroskop.