

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv psychoaktivních látek oproti běžným toxikantům na  
larvální stádium sladkovodních mlžů**

**Bakalářská práce**

**Dagmar Ašková**

**Akvakultura a péče o vodní ekosystémy**

**Ing. Karel Douša, Ph. D.**

© 2022 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv psychoaktivních látek oproti běžným toxikantům na larvální stádium sladkovodních mlžů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24. 4. 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce panu Ing. Karlu Doudovi, Ph.D. za užitečné rady při psaní této práce. Velké poděkování patří také panu Ing. Vojtěchu Barákovi, který mi pomohl porozumět softwaru R a také mi pomohl s korekturou formální části práce. V poslední řadě bych také ráda poděkovala panu Ing. Juanu Felipe Escobarovi Calderónovi za pomoc při práci v prostředí Image J a poskytnutí doplňujících materiálů k praktické části této bakalářské práce.

# Vliv psychoaktivních látek oproti běžným toxikantům na larvální stádium sladkovodních mlžů

## Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou vlivu nových znečišťujících látek ve vodním prostředí na raná vývojová stádia funkčně významných skupin vodních organismů. Cílem bylo stanovit střední letální koncentrace (LC50) karbamazepinu, sertralinu, dusičnanů, amonia a mědi. Jako modelový organismus bylo vybráno larvální stádium (glochidium) sladkovodního mlže *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758).

Glochidia byla vystavena po dobu 24 hodin expozici vybraným polutantům ve standardizovaných laboratorních podmínkách. Následovalo testování životaschopnosti glochidií v titrační destičce pod stereoskopickým mikroskopem s fotografickým záznamem. Byla vyhodnocena behaviorální reakce glochidií („snapping activity“) na standardní referenční signál NaCl o koncentracích 5, 10, 15, 25 a 60 mg/ml. Jejich životaschopnost byla vyhodnocena na základě porovnání stavu glochidií před a po (v intervalech 5, 10 a 180 s) aplikaci signálu pro stanovení podílu životaschopných larev. Z hlediska aplikovaných referenčních signálů bylo zjištěno, že jako spolehlivý indikátor životaschopnosti glochidií lze použít koncentrace NaCl od 10 mg/ml.

Následně byla stanovena LC50 pomocí probit metody. U třech testovaných látek (dusičnany, amonium a měď) se podařilo úspěšně stanovit LC50:  $\text{NO}_3\text{-N} = 673,56 \text{ mg/l}$ ,  $\text{NH}_4\text{-N} = 10,59 \text{ mg/l}$  a  $\text{Cu}^{2+} = 29,75 \text{ }\mu\text{g/l}$ . U karbamazepinu a sertralinu se i přes výrazné navýšení maximálních testovaných hodnot nad environmentálně relevantní hodnoty (použité maximum 100  $\mu\text{g/l}$ ) nepodařilo dosáhnout letálního efektu u glochidií a LC50 tedy nebylo možné stanovit.

Tato bakalářská práce přináší první informace o akutní toxicitě několika významných polutantů u larválního stádia druhu *Anodonta anatina*. Metodické poznatky je možné využít při testování vlivu dalších látek a jako podklad pro studium chronické toxicity.

**Klíčová slova:** toxikanty, psychoaktivní látky, glochidium, LC50, *Anodonta anatina*

# Effect of psychoactive substances against standard toxicants on larval stage of freshwater bivalves

## Summary

This bachelor thesis focuses on the impact of new pollutants in the aquatic environment on the early developmental stages of functionally important groups of aquatic organisms. The aim was to determine the mean lethal concentration (LC50) for carbamazepine, sertraline, nitrate, ammonium and copper. The larval stage (glochidium) of the freshwater bivalve *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) was selected as a model organism.

The glochidias were exposed for 24 hours to the selected pollutants under standardized laboratory conditions. Then, the viability of the glochidia was tested in a titration plate under a stereoscopic microscope with photographic recording. The behavioral response of the glochidia ('snapping activity') was evaluated using a standard reference signal of NaCl concentrations of 5, 10, 15, 25 and 60 mg/ml. Viability was assessed by comparing the state

of the glochidia before and after (5, 10 and 180 s) application of the signal substance to determine the proportion of viable larvae. In terms of the reference signals applied, it was found that NaCl concentrations as low as 10 mg/ml, could be used as a reliable indicator of the glochidia viability.

Subsequently, the LC50 was determined using the probit method. For three test substances (nitrate, ammonium and copper) the LC50 was successfully determined:  $\text{NO}_3\text{-N} = 673.56 \text{ mg/l}$ ,  $\text{NH}_4\text{-N} = 10.59 \text{ mg/l}$  and  $\text{Cu}^{2+} = 29.75 \text{ }\mu\text{g/l}$ . Despite a significant increase of the maximum tested values above the environmentally relevant values (applied maximum of  $100 \text{ }\mu\text{g/l}$ ) no lethal effect of carbamazepine and sertraline on glochidia could be achieved. Therefore, the LC50 could not be determined.

This bachelor thesis provides the first information on the acute toxicity of several important pollutants to the larval stages of *Anodonta anatina*. The methodological findings can be used to test the effects of other pollutants and as a basis for chronic toxicity studies can be used to test the effects of other pollutants and as a basis for chronic toxicity studies.

**Keywords:** toxicants, psychoactive substances, glochidium, LC50, *Anodonta anatina*

## Obsah

<b>1 Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíle práce</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Mezinárodní kritéria kvality povrchových vod</b>	<b>10</b>
3.1.1 Evropská unie	10
3.1.2 Spojené státy americké	11
3.1.3 Austrálie a Nový Zéland	11
3.1.4 Porovnání kritérií kvality povrchových vod	11
<b>3.2 Standardní metody testování toxicity na sladkovodních mlžích</b>	<b>11</b>
3.2.1 Vybavení pro testování toxicity na sladkovodních mlžích	12
3.2.2 Ředící voda	13
3.2.3 Příprava zásobního roztoku	14
3.2.4 Odběr mateřských jedinců	14
3.2.5 Kultivace mateřských jedinců	15
3.2.6 Izolace glochidií	15
3.2.7 Kultivace glochidií	16
3.2.8 Zahájení testů toxicity na sladkovodních mlžích	16
3.2.9 Průběh testování toxicity	16
3.2.10 Odchyly ve výsledcích testů aneb přesnost a předpojatost	17
3.2.11 Budoucí vývoj standardních metod	17
<b>3.3 Psychoaktivní látky oproti běžným toxikantům</b>	<b>18</b>
3.3.1 Psychoaktivní látky ve vodním prostředí	19
3.3.2 Toxikanty běžné ve vodním prostředí	21
<b>4 Metodika</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Testované chemické látky a cílové koncentrace</b>	<b>26</b>
4.1.1 Psychoaktivní látky	26
4.1.2 Toxikanty	27
<b>4.2 Průběh testování</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Výpočet LC50</b>	<b>28</b>
4.3.1 Zpracování dat	28
4.3.2 Metodika výpočtu LC50	29

<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1</b>	<b>Psychoaktivní látky .....</b>	<b>31</b>
5.1.1	Karbamazepin .....	32
5.1.2	Sertralin .....	33
<b>5.2</b>	<b>Výsledky LC50 pro toxikanty .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>36</b>
<b>6.1</b>	<b>Psychoaktivní látky .....</b>	<b>36</b>
<b>6.2</b>	<b>Toxikanty .....</b>	<b>36</b>
6.2.1	Dusičnany .....	37
6.2.2	Měď .....	37
6.2.3	Amonium .....	38
<b>6.3</b>	<b>Budoucí vývoj .....</b>	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>40</b>
<b>9</b>	<b>Seznam obrázků, tabulek a grafů.....</b>	<b>47</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>48</b>

# 1 Úvod

První dochovanou zmínku o sladkovodních mlžích nalezneme v přírodovědecké encyklopedii *Hortus Sanitas* z roku 1491 (Lozoya & Araujo 2011). Anatomii mlže rodu *Anodonta* prvně popsal v roce 1695 nizozemský přírodovědec Antoni van Leeuwenhoek. Ve své práci se rovněž zaměřil na odběr glochidií, které jako první označil za larvy těchto mlžů (Farris & Van Hassel 2019). Zhruba o sto let později Jens Rathke (1797) ve své studii uvádí, že glochidia jsou parazité (*Glochidium parasiticum*) napadající žábry mlžů. Tyto poznatky byly v rozporu s Leeuwenhoekovým tvrzením.

Dnes již víme, že reprodukční biologie řádu Unionida, pod který spadá právě rod *Anodonta*, je velmi specifická. Oplození je vnitřní a z oplozených vajíček vznikají glochidia. Ta jsou chována v žábřích mateřských jedinců, dokud nejsou vypuštěna do vodního sloupce. K dokončení svého vývoje vyžadují tyto larvy parazitovat na určitých hostitelských rybách (Kat 1984). Dodnes tedy přetrvává označení glochidium pro parazitický typ larvy mlžů.

Rané výzkumy vlivu znečišťujících látek na sladkovodní mlže, v druhé polovině 50. let 20. století, prováděl Charles B. Wurtz (1955). Velký vliv na rozvoj ekotoxikologie obecně přináší zooložka Rachel Carson se svou knihou *Tiché jaro* (1962). *Tiché jaro* upozorňuje na negativní dopady intenzivního průmyslu na životní prostředí. V úvodu edice *Tichého jara* z roku 1994 tehdejší prezident USA Albert Gore poznamenává: „v roce 1992 vybrala skupina významných Američanů *Tiché jaro* jako nejvlivnější knihu posledních padesáti let“ (Waddell 2000).

Jak také píše Farris & Van Hassel (2019), ve své monografii *Ekotoxikologie sladkovodních mlžů*, během 60. let 20. století zvýšené povědomí o problémech znečišťování nejen vodního prostředí vyvolalo jednak vznik vládních předpisů, ale také veřejné a soukromé financování výzkumů dopadů znečištění životního, obzvláště vodního prostředí.

Významný nárůst výzkumné činnosti sladkovodních mlžů zaznamenal zejména počátek 80. let 20. století. Ve velkém množství probíhala testování toxicity na vodních organismech s cílem předpovědět možné dopady xenobiotik na vodní ekosystémy. Pro určení toxicity dané látky se většinou pracovalo s jedním konkrétním druhem vodního organismu. S nabýváním znalostí ohledně celkové škály účinků odpadních látek se posléze začalo pracovat s metodami testování na úrovni společenstev (Pavlíková et al. 2009).

Doherty (1990) upozorňuje, že lze velkou část výzkumné činnosti sladkovodních mlžů v 80. letech přičíst narůstajícímu používání *Corbicula* spp., jak v terénu, tak ve studiích v laboratorních podmínkách. Dále následovalo hojné používání sladkovodního rodu *Dreissena* k výzkumným účelům. Přibližně ve stejné době se pro výzkumy (Balogh & Salánki 1984; Holwerda et al. 1985) taktéž používaly sladkovodní druhy taxonů *Anodonta* spp. nebo *Elliptio complanata* (Lightfoot, 1786), primárně za účelem zkoumání vývoje glochidií na juvenilní jedince za pomoci nových *in vitro* metod. Díky vzniku standardních metod testování toxicity na sladkovodních mlžích v roce 2006, byl zaznamenán vyšší zájem o monitorování různých druhů mlžů pro hodnocení dopadů toxických látek (Farris & Van Hassel 2019).



## 2 Cíle práce

Cílem práce bylo testovat hypotézu, že vybrané polutanty (karbamazepin, sertralin, dusičnany, amonium a měď) mají vliv na životaschopnost glochidií *Anodonta anatina*, resp. stanovit střední letální koncentrace (LC50) těchto polutantů.

Pro indikaci životaschopnosti glochidií byla pro tuto bakalářskou práci vybrána NaCl s koncentracemi 5, 10, 15, 25 a 60 mg/ml, a proto byl stanoven tento dílčí cíl:

- Stanovit vhodné koncentrace NaCl pro indikaci životaschopnosti glochidií *Anodonta anatina*.

### 3 Literární rešerše

Tato kapitola se zabývá problematikou znečištění povrchových vod a testováním toxicity na sladkovodních mlžích. Porovnává kritéria kvality povrchových vod v EU ve srovnání s USA a Austrálií. Další podkapitoly přináší rešerši ze standardních metod stanovení akutní toxicity pro glochidia sladkovodních mlžů. V závěru této kapitoly shrnují nejnovější vědecké práce věnující se testování toxicity karbamazepinu, sertralinu, mědi, amonia a dusičnanů na sladkovodních mlžích. Amonium a dusičnany jsou v této bakalářské práci vyjádřeny jako amonný ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) a dusičnanový dusík ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ). Měď je vyjádřena v iontové formě jako  $\text{Cu}^{2+}$ .

Pro odlišení dvou skupin znečišťujících látek zahrnutých v této bakalářské práci pojem „běžné toxikanty“ označuje látky dusičnany, amonium a měď, protože patří mezi jedny z nejčastějších toxikantů v životním prostředí. Pro karbamazepin a sertralin je používán pojem „psychoaktivní látky.“ Souhrnný pojem polutanty označuje v této bakalářské práci dohromady obě zmíněné skupiny látek.

#### 3.1 Mezinárodní kritéria kvality povrchových vod

Polutanty jsou přímo nebo nepřímo vypouštěny do vodních ekosystémů. Kromě kovů se v přirozeném prostředí nevyskytují. Pro nastolení kritérií tedy nelze použít referenční hodnoty. Společné metody pro vymezení kritérií pro sladkovodní ekosystémy jsou založeny na údajích o toxicitě látek uskutečněných testů akutní a chronické toxicity v laboratořích (viz kap. 3.2) a v terénních studiích. Většina kritérií se vztahuje ke koncentraci polutantu ve vodě, ale pro řadu polutantů může být pro ochranu vodního života důležitá i koncentrace v sedimentu a v biotě (UNEP 2014). Definované úrovně ochrany se však v jednotlivých zemích liší.

##### 3.1.1 Evropská unie

V roce 2008 Evropský parlament společně s Radou Evropské unie vydaly aktualizovanou Rámcovou směrnici o vodách Společenství Evropské unie, která stanovila tzv. Standardy environmentální kvality (EQS) pro znečišťující látky označované jako prioritní. Mezi tyto prioritní látky je klasifikováno až 41 pesticidů a biocidů. Dalších 33 látek zahrnuje těžké kovy nebo retardanty hoření. V případě potřeby tyto standardy stanoví pravidla pro zbývající toxikanty na vnitrostátní úrovni. EQS jsou uvedeny jako roční průměrné koncentrace a pro některé látky jako maximální přípustné koncentrace. V případě kovů se EQS vztahuje na koncentraci rozpuštěných látek ve vodě (EU 2008).

##### Česká republika

V souladu s EQS zveřejnilo Ministerstvo životního prostředí České republiky Rámcový program monitoringu, schválený ke dni 22. 11. 2018, kdy sledované přípustné koncentrace byly stanoveny pro amonium na  $0,005 \text{ mg/l NH}_4\text{-N}$ , pro dusičnany  $0,3 \text{ mg/l NO}_3\text{-N}$ , pro měď  $2 \text{ } \mu\text{g/l Cu}^{2+}$  a pro karbamazepin  $0,01 \text{ } \mu\text{g/l}$ . Pro sertralin prozatím nebyla stanovena přípustná koncentrace (MŽP 2018).

### 3.1.2 Spojené státy americké

Doporučená kritéria kvality povrchových vod v USA (USEPA 2022) zahrnují seznam 60 polutantů. Kritéria obsahují dvě varianty vyjádření přípustné koncentrace, a to kritérium maximální koncentrace pro ochranu proti akutním účinkům a kritérium kontinuální nebo chronické koncentrace. Kritéria jsou odvozena ve vztahu k celkové koncentraci polutantu ve vodním sloupci. Pouze u těžkých kovů USEPA doporučuje aplikaci koncentrací rozpuštěných kovů, které se více blíží biologické dostupné frakci (USEPA 2022).

Sledované přípustné koncentrace byly stanoveny pro měď ve slané vodě, a to 4,8  $\mu\text{g/l}$   $\text{Cu}^{2+}$  akutní toxicity a 3,1  $\mu\text{g/l}$   $\text{Cu}^{2+}$  chronické toxicity (USEPA 2022). Kritéria ostatních polutantů se nepodařila dohledat nebo prozatím nebyla stanovena.

### 3.1.3 Austrálie a Nový Zéland

Ve směrnici pro Austrálii a Nový Zéland jsou specifikovány čtyři různé úrovně ochrany o výši 99 %, 95 %, 90 % a 80 % definované pro zhruba 50 znečišťujících látek. Úroveň ochrany zde indikuje procento druhů, které má být před jejich vlivem chráněno. Rozhodnutí aplikovat určitou úroveň ochrany na konkrétní ekosystém je výsadou každého konkrétního správce povodí či státní jurisdikce po konzultaci se zainteresovanými stranami (ANZECC 2000).

Sledované přípustné koncentrace týkající se ochrany sladkovodních druhů byly stanoveny pro amonium sestupně od 99 % po 80 % v koncentracích 0,32, 0,9, 1,43 a 2,3  $\text{mg/l}$   $\text{NH}_4\text{-N}$ , pro dusičnany v 0,017, 0,7, 3,4 a 17  $\text{mg/l}$   $\text{NO}_3\text{-N}$ , pro měď v 1, 1,4, 1,8 a 2,5  $\mu\text{g/l}$   $\text{Cu}^{2+}$  (ANZECC 2000). Pro psychoaktivní látky se opět hodnoty nepodařily dohledat nebo zatím nebyly stanoveny.

### 3.1.4 Porovnání kritérií kvality povrchových vod

Vzhledem k odlišnému přístupu definování kritérií kvality povrchových vod lze těžko říct, které z metod budou neúčinnější. Např. průměrné hodnoty EQS pro kadmium, rtuť a naftalen odpovídají 99 % úrovni ochrany v Austrálii. Na druhou stranu pak nesouhlasí kritéria pro diamizin, endosulfan či simazin, kde se přípustné koncentrace v uvedených zemích liší až o desítky jednotek.

Je však jasné, že odvození kritérií kvality povrchových vod je složitý proces integrace vědeckých poznatků. Kritéria pro znečišťující látky jsou specifická pouze pro dané zkoumané místo, a kromě těžkých kovů, lze doporučit, aby tato kritéria byla vztažena na mezinárodní úrovni, jak bylo uskutečněno u norem WHO pro pitnou vodu. Celosvětově uznávaná kritéria mohou hrát důležitou roli při ochraně vodních ekosystémů (UNEP 2014).

## 3.2 Standardní metody testování toxicity na sladkovodních mlžích

Pro každý organismus a každý polutant platí to, že někteří jedinci jsou vysoce citliví na určité polutanty a někteří jsou naopak k těmto látkám tolerantní. Vědci dokázali přizpůsobit tento interval tolerance v rámci populace a navrhli standardní metody výkonu laboratorních

experimentů k posouzení toxicity dané látky. Statistické metody byly vyvinuty tak, aby poskytly spolehlivý odhad střední letální dávky či koncentrace (Sparling 2016).

Testy toxicity jsou mimo jiné definovány dobou a způsobem expozice a také tzv. endpoints, což jsou parametry, které jsou v testech sledovány a slouží k hodnocení ekotoxicity (např. mortalita jedinců; Pavlíková et al. 2009). Řadu let tzv. „zlatý standard“ určoval medián smrtelné dávky (LD50) nebo koncentrace (LC50), který statisticky usmrtí 50 % jedinců z testované populace. Pojmeme dávkou rozumíme takové množství toxické látky, kterému je organismus vystaven. Toto množství je přesně známo, neboť je látka podána např. injekčně nebo orálně apod. Pojmeme koncentrací naopak rozumíme to, když je daná látka obsažena např. ve vodě či potravě, ale přesné množství přijaté koncentrace není známo a může se mezi jedinci lišit (Sparling 2016).

Rané experimenty rychle odhalily významnost doby expozice pro stanovení smrtelných dávek či koncentrací. Dávka, která první den působení nemusela mít žádný účinek, za týden mohla způsobit 100% úmrtnost populace. Pro standardizaci takových testů existuje několik globálních institucí, a to USEPA, APHA, ASTM, ISO, Environment Canada a OECD. Organizace *ASTM International* vypracovala metodiku pro testování toxicity na sladkovodních mlžích (ASTM 2006).

Standardizované testy zahrnují obvykle dobu expozice definovanou jako:

- *akutní* – testy vyžadující 24–96 hodin
- *chronickou* – obvykle 28 dní a více (Sparling 2016)

Zatímco na konci minulého století důkazy o citlivosti glochidií sladkovodních mlžů na konkrétní znečišťující látky rostly, neexistovaly standardní testovací metody pro raná životní stádia mlžů (Farris & Van Hassel 2019). Nedostatečné informace o požadavcích na laboratorní kultivaci mlžů spjaté s nedostatkem znalostí o celkovém životním cyklu, znemožnilo možnost definovat vhodné podmínky testování (např. dobu expozice). Rozdíly v testovacích metodách bránily porovnávání dat napříč studii. Byly vyjádřeny obavy, že metody pro provádění laboratorních testů toxicity s mlži, zejména pak testy s glochidiemi, byly příliš unikátní a kvalita dat o toxicitě pro mlže neměla být hodnocena podle stávajících pokynů (ASTM 2006). K vyřešení těchto obav, američtí vědci z akademického vládního a soukromého sektoru v roce 2006 přezkoumali pro organizaci *ASTM International* více než 140 studií zabývajících se testováním toxicity na sladkovodních mlžích a dalších malých obratlovců, aby rozšířili své vlastní zkušenosti a usnadnili založení konsenzuálních metod a doporučení pro zajištění kvality pro provádění laboratorních testů toxicity s larvami a juvenilními (sladkovodními) mlži (Augspurger 2007).

Metodika ASTM E2455–06 poskytuje souhrn podmínek pro provádění testů toxicity s glochidiemi a juvenilními mlži. Následující podkapitoly 3.2.1–3.2.10 jsou souhrnem těchto metod (ASTM 2006), které jsou případně doplněny o citace z metodiky ASTM pro testování akutní toxicity na rybách, velkých obratlovcích a obojživelnících (ASTM 1996) a monografie *Základy vodní ekotoxikologie* (Kopp et al. 2015).

### 3.2.1 Vybavení pro testování toxicity na sladkovodních mlžích

Pro testování toxicity na mlžích se nejčastěji využívají průtočné systémy. To znamená, že roztok testované látky a ředící voda se v testovacích nádržích kontinuálně obnovují po

celou dobu testu. Celý průtočný systém by měl být navržen tak, aby umožňoval mísení testovaných látek s ředící vodou (viz kap. 3.2.2) bezprostředně před vstupem do testovacích nádrží. Lze použít různých nástrojů jako jsou např. stříkačky, sifony, čerpadla, saturátory, solenoidy, ventily apod. (ASTM 2006).

Všechny nádrže by měly být vybaveny regulací teploty vody a provzdušňováním. Použitý vzduch by neměl obsahovat oleje a jiné výpary. Nádrže s vodou, které přijdou do styku s testovanými mlži, by neměly obsahovat materiály, resp. látky, které mohou být později vyluhovány nebo rozpuštěny ve vodných roztocích. Zároveň by potřebné vybavení mělo být zvoleno tak, aby se minimalizovala sorpce testovaných látek. Pro nádrže a další nutné vybavení se doporučují materiály jako např. sklo, nerezová ocel typu 316L, nylon a fluorouhlíkové plasty. Beton a tuhé plasty lze použít pro aklimatizační nádrže. Měly by ovšem být namočené v tekoucí vodě alespoň po dobu jednoho týdne před použitím. Pro testování není vhodné litinové potrubí, protože může obsahovat koloidní železo (ASTM 1996).

V případě statického testu jsou testované organismy a roztok testované látky přidány do testovacích nádob na určitou dobu. Frekvence dodávání vody do testovacích nádrží by měla být založena na době expozice a na trvání stability expozičních koncentrací např. na základě degradace, hydrolýzy, oxidace, fotolýzy, redukci, sorpci či výparu. V ideálním případě je třeba provést předběžné zkoušky, k určené toho jak často, je třeba měnit vodu pro zachování její kvality.

Je třeba zachovat oddělené prostory pro kultivaci organismů a přípravu roztoků apod. Ventilační systémy by měly být navrženy tak, aby nedocházelo k recirkulaci, křížené kontaminaci či úniku vzduchu (ASTM 1996).

### 3.2.2 Ředící voda

Pro testování toxicity lze použít jako ředící vodu, přírodní vodu ze studny nebo pramene rovnoměrnějšího rázu, než bývají povrchové vody. Pokud budeme chtít použít povrchovou vodu, měl by být odběr umístěn zhruba 1 m pod povrchem. To slouží k zamezení případné kontaminace, a i k maximalizování koncentrace rozpuštěného kyslíku. Ten pomáhá zajistit, aby koncentrace sulfidů a železa nebyly příliš vysoké (ASTM 1996).

Pro testování toxicity lze použít jako ředící vodu i tzv. rekonstituovanou vodu, která je destilovaná nebo deionizovaná. Případně lze obě možnosti míchat pro vytvoření požadovaných vlastností vody jako je tvrdost, vodivost či pH aj. (ASTM 1996).

Ředící voda by měla být dostupná v dostatečném množství, přijatelná pro organismy a v jednotné kvalitě pro všechny testované mlže. Ideálním požadavkem pro kvalitu ředící vody je, aby se testovaný organismus dokázal ve vodě vyvíjet, případně dále rozmnožovat. Hrotnatky *Daphnia magna* (Straus, 1820) jsou velmi náchylné na změny kvality vody, proto se často používají jako testovaný organismus pro kvalitu ředící vody. Pokud by hrotnatky během 48 hodin vykazovaly známky stresu, je pravděpodobné, že tato voda nebude přijatelná pro většinu sladkovodních živočichů (ASTM 2006).

Pro testy toxicity bychom neměli používat chlorovanou vodu, protože zbytkový chlor a oxidanty produkované chlorem jsou toxické pro mnoho vodních organismů. Ani dechlorovaná voda není vhodným kandidátem, protože dechlorace často neprobíhá úplně a

může stejně jako chlorovaná voda obsahovat zbytky mědi či jiných těžkých kovů a její kvalita značně kolísá (ASTM 1996).

Ředící voda by se měla před zahájením testu intenzivně provzdušnit. Dostatečné provzdušnění zvyšuje pH a koncentraci rozpuštěného kyslíku, která by se měla pohybovat mezi 90–100 % nasycení k zajištění přijatelné koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovacích nádržích. Přílišné přesycení plynů by mělo být znemožněno zahříváním ředící vody. Voda, která by eventuálně mohla být kontaminována fakultativními patogeny, může projít přes hlavní filtr s velikostí pórů 0,45 µm a méně (ASTM 1996).

### 3.2.3 Příprava zásobního roztoku

V některých případech se testované látky přidávají přímo do ředící vody, obvykle se ale pro testování vytváří zásobní roztok. Ten vzniká tím, když je testovaná látka rozpuštěna v rozpouštědle a až následně přidána do ředící vody. S výjimkou hydrolyzovatelných či oxidovatelných látek je preferovaným rozpouštědlem sterilizovaná voda. Pro zásobní roztok lze jako rozpouštědlo použít některé zásady, které ale mohou výrazně ovlivnit pH roztoku. Pokud je použito jiné rozpouštědlo než voda, měla by jeho koncentrace v zásobním roztoku být minimální, aby neovlivnila testované organismy, resp. nesmí překročit 0,5 ml/l při akutních testech toxicity a 0,1 ml/l při chronických testech toxicity. V takovém případě je nejčastějším rozpouštědlem triethylenglykol, protože je málo toxický pro vodní organismy (ASTM 2006).

### 3.2.4 Odběr mateřských jedinců

Pokud chceme provádět testy toxicity na glochidiích, měli bychom nejdříve odebrat gravidní samice a uchovat je před odebráním glochidií v laboratoři (ASTM 2006). Existuje i alternativní metoda, kdy Zimmerman a Neves (2002) navrhl, že glochidia některých druhů, např. *Villosa iris* (Lea, 1829) nebo *Actinonaias pectorosa* (Conrad, 1834) by mohly být odebrány v terénu a převezeny do laboratoře v chladné vodě. V těchto podmínkách mohou být glochidia životaschopná po dobu několika let bez snížení schopnosti úspěšně se přichytit na rybiho hostitele. Tento postup může být zvláště užitečný v případě testování s ohroženými druhy mlžů. Pokud glochidia odebereme již v terénu, samice tak mohou být okamžitě vráceny do jejich původního stanoviště.

Při výběru konkrétních druhů sladkovodních mlžů bychom měli prověřit hledisko snadné manipulace. To znamená, že přednost by měly mít ty druhy, které byly již dříve v provedených výzkumech úspěšně kultivovány v laboratoři s nízkou mortalitou, jako např. *Lampsilis cardium* (Rafinesque, 1820) a *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758). Testované organismy by neměly být před začátkem testu vystaveny polutantům nebo jiným zdrojům stresu. Dospělí mlži odebrání v terénu by neměli vykazovat známky zjevných tělesných abnormalit, jimiž jsou např. rozbité schránky. Vysoká míra přežití dospělých mlžů několik dní po narození v laboratorním prostředí by měla naznačovat, že se organismy přizpůsobily novému prostředí. Dlouhodobě gravidní druhy (*Lampsilinae* a *Anadontinae*) mají tendenci uchovávat svá embrya nebo glochidia během přepravy či manipulace. Dospělé mlže lze do laboratoře dopravit při teplotě asi 4–10 °C pomocí igelitových sáčků s ledem nebo igelitových sáčků umístěných v ledu nebo v chladicích zařízeních (ASTM 2006).

Chen et al. (2001) doporučují přepravu dospělých mlžů v dobře provzdušněné vodě, transport by neměl trvat více jak 12 hodin. Aby matky nepotrátily embrya či glochidia, po transportu je třeba je umístit v laboratoři do podobně studené vody. Tuto vodu je možné zahřívat každou hodinu o 3 °C do požadované hodnoty, většinou zhruba 20 °C.

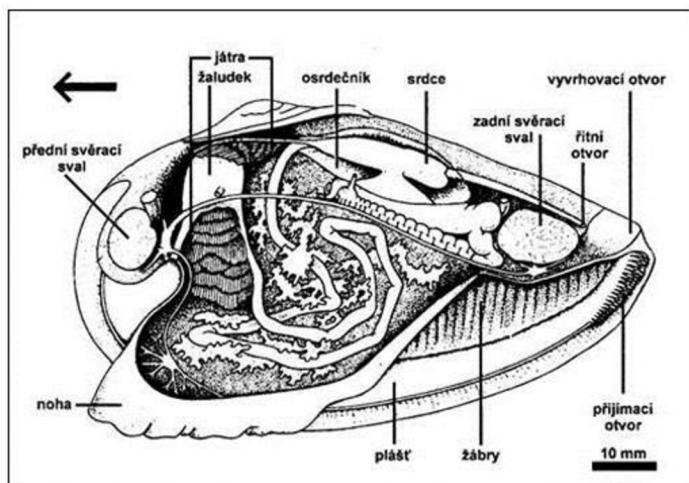
### 3.2.5 Kultivace mateřských jedinců

Kdykoli jsou do laboratoře převezeni dospělí mlži, měly by být tyto organismy umístěny do karantény po dobu 14 dní nebo dokud se tito jedinci nesprostí nákazy. Celkový zdravotní záznam by se měl provádět alespoň jednou týdně. Pokud je skupina mlžů vážně nemocná, je často nejlepším řešením celou skupinu okamžitě vyhubit (Farris & Van Hassel 2019).

Cope et al. (2003) doporučují podávat dospělým mlžům dvakrát denně  $1 \times 10^5$  buněk řas/ml nebo 4 mg/l sušiny řas. Dospělé mlže můžeme krmit i kontinuálně během dne  $2-5 \times 10^4$  buněk řas/ml nebo 1,9 mg/l sušiny řas. Konkrétní množství řas se odvíjí od množství z přirozeného stanoviště odběru dospělé samice. Dospělí jedinci *Lampsilis cardium* byly chovány v laboratoři v provzdušněných průtočných akváriích o objemu 100–150 l s průtokem 20–30 l/h. Akvária obsahovala také písek a voda se udržovala při teplotě 10–15 °C.

### 3.2.6 Izolace glochidií

Během raného vývoje rostou glochidia v žábách matky. Zralost glochidia lze určit podle barvy žaber samice. Žábry, které najdeme pod zadním svěracím svalem, viz anatomie mlže na obr. 1, obsahující zralá glochidia jsou zvětšené a mají hnědou barvu. Naproti tomu zvětšené béžové nebo bílé žábry dospělého jedince mohou obsahovat nezralá glochidia. Vizualní prohlídku žaber samice mlže lze provést opatrným odklopením žaber otevřením boků lastury. Zralá glochidia lze jemně vyplachovat z těla samice do dřezu nebo jiné mělké nádoby pomocí sterilní podkožní injekční stříkačky naplněné ředící vodou, ve které byly samice drženy. Velikost jehly by měla být zhruba 3,8 mm a měrka 16–20 mm. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození žaberní struktury. Je třeba otevírat mlže pomalu pomocí reverzních kleští nebo pomocí Hartmannova rozevíracího nosního zrcátka. Příliš rychle otevírání mlžů může způsobit prasknutí chlopní nebo vyvracení svěračů (ASTM 2006).



Obr. 1 Schéma anatomie mlže (Kvaček 2000)

Při manipulaci s mateřskými jedinci nesmí dojít k poškození vnitřních orgánů, labiální palpy nebo struktury žaber. Glochidia mohou být také izolována odříznutím části žaber ze žaberního otvoru. Glochidia se následně odtrhnou ve vodě. Bohužel tato metoda je destruktivní pro žábry samice (ASTM 2006).

### 3.2.7 Kultivace glochidií

Zimmerman a Neves (2002) zjistili, že glochidia ihned po opuštění žaber kultivovaná při nižších teplotách 0–10 °C zůstala životaschopná déle než ty při 25 °C. Glochidia čerstvě odebraná matce jsou křehká a je nutné s nimi manipulovat opatrně. Transport glochidií by měl proběhnout v co nejkratším možném čase.

Izolovaná glochidia mohou být uchovávána např. v Petriho misce před zahájením testů toxicity. Glochidia *Anadontinae* mohou držet pohromadě pomocí přilnavostí bysálních vláken. Tyto shluky glochidií lze opatrně oddělit nasátím a vyjmutím z pipety. Zralost glochidia lze určit mikroskopickým vyšetřením. Zralá glochidia nemají vyvinuté embryonální membrány a životaschopná glochidia otevírají a zavírají své chlopně. Životaschopnost glochidií izolovaných od matky by měla být vyhodnocena testováním toxicity roztokem NaCl nebo KCl. Zralá a zdravá glochidia se v reakci s přidáním roztoku do vody zavřou. Testy toxicity se obvykle zahajují, pokud je počáteční životaschopnost glochidií >90 %. Izolovaná glochidia během kultivace i v průběhu testů toxicity nejsou krmena (ASTM 2006).

### 3.2.8 Zahájení testů toxicity na sladkovodních mlžích

Expozice se obvykle zahajují ve stejný den, kdy jsou glochidia izolována od matky. Nicméně Wang et al. (2003) pozorovali, že citlivost na měď glochidií *Lampsilis siliquoidea* (Barnes, 1823) izolovaných od matky 24 hodin před zahájením testů toxicity byla stejná jako u čerstvě izolovaných glochidií. Testy toxicity by měly být prováděny na glochidiích minimálně ze tří různých samic, ovšem po kontrole jejich životaschopnosti. Tento způsob testu pomůže s identifikací citlivosti různých druhů glochidií na exponované polutanty. Testy toxicity na glochidiích z jedné samice mohou být prováděny, nebo respektive by měly být prováděny v takovém případě, kdy jde o ohrožený druh, ovšem je nutno výsledky těchto testů interpretovat s opatrností.

### 3.2.9 Průběh testování toxicity

Pro látky s pomalým působením tyto testy trvají 96 hodin. Výhodně je volena logaritmická koncentrační řada jako jsou např. 0.01, 0.1, 1, 10 a 100. Orientační test by měl zjistit koncentraci, která usmrcuje všechny organismy a koncentraci, při které téměř žádné neuhynou. Na základě výsledků orientačního testu v dobře zvolené koncentrační řadě, která zahrnuje koncentrace s 0–100% účinkem (vhodnější 5–95% účinkem), centrované okolo LC50 je uskutečněn tzv. základní test (Kopp et al. 2015).

Citlivost testů toxicity částečně závisí na počtu opakování. Pokud variabilita zůstane konstantní, citlivost testu se zvyšuje s počtem opakování. Minimální doporučený počet opakování se liší podle cílů testů a statistické metody použité pro analýzu dat (Kopp et al. 2015).



Test toxicity, který má umožnit výpočet LC50, se obvykle skládá z jednoho nebo více počátečních tzv. kontrolních pokusů a koncentrační řady nejméně pěti pokusů s různými koncentracemi testované látky. Počáteční pokusy v ředící vodě bez přidané testované látky slouží pro kontrolu životaschopnosti organismů. Následující zvolené koncentrace by podle ASTM (2006) v dalších krocích měly být asi o 50–60 % vyšší než předchozí koncentrace, protože pokud např. neznáme možné účinky polutantu při ředícím faktoru 0,5 – 0,6; testování poskytne výsledky LC50 pro více dob expozic a je pravděpodobné, že všechny koncentrace nebudou příliš vysoké nebo nízké. Pokud je počáteční odhad toxicity látky až příliš nejistý, může být geometrická řada navýšena až na sedm koncentrací (ASTM 2006).

Pokud je cílem testování zjistit, zda je daná specifická koncentrace akutně toxická pro testovaný druh a zda je LC50 vyšší nebo nižší než určená koncentrace, pak je žádoucí pro důvěryhodnost výsledků toxicity zvolit dvě další koncentrace na úrovni přibližné poloviny a dvojnásobku určené koncentrace, která je předmětem zájmu (ASTM 2006).

### 3.2.10 Odchytky ve výsledcích testů aneb přesnost a předpojatost

Přesnost je termín, který popisuje míru, do jaké se získané údaje na základě opakovaných měření liší. Předpojatost je rozdíl mezi zjištěnou a referenční hodnotou. Kvantitativní stanovení přesnosti a odchylky při testech toxicity vodních organismů je obtížné nebo může být v některých případech i nemožné. To je způsobeno mnoha neznámými proměnnými, které ovlivňují reakci organismu. Protože neexistuje žádný přijatelný referenční materiál vhodný pro stanovení běžné odchylky u testů toxicity, vyhodnocuje se pouze porovnáním reakcí s kontrolními grafy, viz kap. 5. Testy toxicity vykazují variabilitu způsobenou několika faktory. Mohou to být např. „vnitrolaboratorní“ faktory odrážející schopnost vyškoleného laboratorního personálu opakovaně získat konzistentní výsledky při provádění stejných testů se stejnými organismy za použití stejného polutantu. Ovšem reprodukovatelnost výsledků v tomto případě zajišťují tzv. „mezilaboratorní faktory.“ Při nichž je stejná metoda testována velkým počtem laboratoří. Paradoxně mezilaboratorní výsledky jsou více variabilní než ty vnitrolaboratorní (ASTM 2006).

Míru přesnosti lze vypočítat pomocí průměru a relativní směrodatné odchylky nebo procentuálního variačního koeficientu výsledků replikovaných testů. Tuto míru přesnosti ovšem nelze použít pro koncentrace, u kterých nebyl pozorován žádný účinek (ASTM 2006).

### 3.2.11 Budoucí vývoj standardních metod

Metodika ASTM E2455–06 zahrnuje budoucí cíle, mezi které patří chybějící porovnání výsledků testů toxicity u glochidií a juvenilních jedinců odebraných z různých zeměpisných oblastí. Chybí také porovnání citlivosti glochidií izolovaných od matek v laboratoři a odebraných z terénu (ASTM 2006).

Co se týče problematiky testování toxicity na sladkovodních mlžích, můžeme metodiku ASTM opravdu nazývat „mezinárodní“. Ovšem co se týče dalších vodních druhů vychází zde několik způsobů testování (viz kap. 3.2). Metody se mezi sebou liší, reprodukovatelnost výsledků je náročnější a závěr je podobný jako v kap. 3.1.4 „*celosvětově uznávaná kritéria mohou hrát důležitou roli při ochraně vodních ekosystémů*“ (UNEP 2014).

Také označovat 28denní expozici mlžů za chronickou je u těchto druhů, které mohou žít desítky let, sporné. Bylo by užitečné poskytnout další pokyny ohledně optimálních požadavků na krmení a dalších testovacích podmínek během dlouhodobé expozice. Zejména u těchto dlouhověkých organismů s opožděnou reprodukční zralostí budou důležité alespoň některé studie reprodukčního cyklu. McKim (1985) ve svých studiích poukazuje na to, že testy raných stádií života s běžně testovanými rybami a bezobratlými poskytují dobrý odhad účinků pozorovaných při testech reprodukce v celém životním cyklu (např. v 83 % případů ve srovnání s přibližně 100 jedinci se jednalo o chronické účinky předpovězené v testech raných stádií života podobné chronickým účinkům v testech celého životního cyklu), což je prediktivní faktor, který nám v současnosti chybí pro naše krátkodobé (24hodinové až 28denní) testy mlžů. Je rovněž zapotřebí vyvinout metody pro testy toxicity s dospělými mlži a standardní metody pro testování sedimentů s využitím různých životních stádií mlžů (Farris & Van Hassel 2019). Metody kultivace v umělých odchovech jsou u mnoha druhů mlžů neznámé nebo nedostatečné, proto je také důležitý další výzkum v oblasti kultivace, který by zajistil rozmanitost testovaných druhů (Barnhart 2006).

### 3.3 Psychoaktivní látky oproti běžným toxikantům

Pro podkapitoly shrnující výskyt, resp. monitorované koncentrace toxikantů v povrchových vodách ČR byla zejména zvolena publikace *Hydrochemie* (Pitter 2015), která shrnuje monitoring znečišťujících látek ve vodách ČR. Pro psychoaktivní látky byla zvolena literatura pracující s daty z evropských zemí. Literární rešerše byla sepsána na základě hledání v databázích JSTOR, ScienceDirect, Web of Science, Wiley případně Google Scholar pod anglickými klíčovými slovy *sertraline*, *carbamazepine*, *concentration*, *freshwater ecosystem* apod. Tyto databáze taktéž sloužily pro hledání literatury v kapitolách o toxicitě daného polutantu. Byla použita anglická klíčová slova jako *acute toxicity*, *glochidium*, *freshwater ecosystem*, *carbamazepine*, *sertraline*, *nitrate*, *ammonia* a *copper*.

Důležitým kritériem pro relevanci studií v této bakalářské práci byl rok vydání minimálně od 2014 a výše. Pro psychoaktivní látky jsou použity studie z USA (Hazelton et al. 2014) Kanady (Gilroy et al. 2017), které taktéž zahrnují citace prací evropských kolegů. Pro karbamazepin byla také použita studie z Chile (Aguirre-Martínez et al. 2015). Tyto práce se zabývají především akutní toxicitou na dospělá stadia sladkovodních mlžů. Pro toxikanty byly dvě studie toxicity dusičnanů provedeny na univerzitách v USA (Fritts et al. 2014; Moore & Bringolf 2018) a jedna v České republice (Douda 2010). Další dvě studie o toxicitě mědi a amonia byly provedeny v Austrálii a Novém Zélandě (Clearwater et al. 2014; Markich 2017).

### 3.3.1 Psychoaktivní látky ve vodním prostředí

Psychoaktivní látky je zastřešující pojem pro různé chemické látky, které mají vliv na psychiku a mohou být silně návykové. Psychoaktivní látky lze zhruba rozdělit do tří kategorií:

1. Látky ve volně prodejných výrobcích (např. kofein, nikotin apod.).
2. Léky na předpis neboli psychoaktivní léčiva (anestetika, analgetika, antidepresiva apod.).
3. Ilegální drogy (např. LSD, marihuana, pervitin apod.) (ÚZIS, 2022).

Psychoaktivní látky se do životního prostředí dostávají např. splachováním nepoužitých nebo prošlých léčiv do záchodu nebo prostřednictvím výkalů a moči (Kümmerer 2009). Psychoaktivní látky užívané lidmi se obvykle uvolňují do kanalizace, procházejí čistírnami odpadních vod (ČOV) a následně se dostávají do vodního prostředí. Léčiva používaná ve veterinární medicíně, např. v chovech hospodářských zvířat a ryb, se však většinou vylučují přímo do půdy nebo do povrchových vod a neprocházejí ČOV (Rivera-Utrilla et al., 2013). Bohužel, i když chemické látky projdou ČOV, nejsou zcela odstraněny (Heberer, 2002). Konvenční čistírny jsou obvykle založeny na použití mikroorganismů, které nejsou schopny zničit složité organické sloučeniny. Proto může být procento odstraněných chemických sloučenin i nižší než 10 % (Rivera-Utrilla et al. 2013).

#### Sertralin

Sertralin se používá k léčbě klinické deprese, obsedantně kompulzivních, panických a posttraumatických poruch. Řadíme ho mezi antidepresiva tzv. třetí generace (TCA), tedy látky inhibující zpětné vychytávání serotoninu. Sertralin patří mezi nejprodávanější antidepresiva v Evropě, o čemž svědčí roční míra spotřeby obyvatel Dánska, Norska či Finska, která činí 122, 157 a 76 g/1000 obyvatel (Christenzen et al. 2007). Dle údajů Státního ústavu pro kontrolu léčiv byl v ČR prokazatelně od roku 2011 do roku 2016 nejpredepisovanějším antidepresivem (ŠefferoVá 2017).

#### Výskyt sertralinu v povrchových vodách

Kromě toho, že byl sertralin detekován ve vypouštěných odpadních vodách (Schultz & Eurlong 2008). Brooks et al. (2005) detekovali sertralin a jeho primární metabolit desmethylsertralin ve svalovině, játrech a mozku několika druhů ryb. Koncentrace sertralinu v povrchových vodách v Evropě a v USA se pohybují v rozmezí 1–20 µg/l (Lamas et al. 2004; Himmelsbach et al. 2006; Vasskog et al. 2006; Metcalfe et al. 2010), přičemž nejvyšší koncentrace kolem 50 µg/l byly příležitostně detekovány například v Minnesotě (Schultz & Eurlong 2008) nebo ve Slovinsku (Klancar et al. 2016). ČOV však mohou odstraňovat poměrně vysoké množství sertralinu; v různých studiích se takové množství pohybuje mezi 40–80 % (Styrishave et al. 2011; Golovko et al. 2014; Klancar et al. 2016).

V ČR byl obsah sertralinu analyzován ve vzorcích z řek z celé republiky. Na většině analyzovaných lokalitách byla tato chemická látka nalezena v koncentracích mezi 2–5 µg/l (Fedorova et al. 2014; Grabicova et al. 2014; Grabicova et al. 2015). Golovko et al. (2014) analyzovali množství sertralinu v ČOV v Českých Budějovicích a došli ke koncentracím

od 7 do 27  $\mu\text{g/l}$  v přítoku a koncentracím od 3 do 6  $\mu\text{g/l}$  v odtoku z této ČOV. Koncentrace se lišily v závislosti na ročním období, přičemž spotřeba se zvyšovala v zimním období, kdy více lidí trpí depresemi. Nicméně v ČR nebyl proveden žádný výzkum v exponovaných oblastech, např. v nemocničních odpadních vodách z psychiatrické léčebny.

#### Toxicita sertralinu pro sladkovodní mlže

Hazelton et al. (2014) při studiu účinků antidepresiv třetí generace v koncentracích 0, 0,5, 2,5 a 22,3  $\mu\text{g/l}$  na chování dospělého mlže *Lampsilis fasciola* (Rafinesque, 1820) během 67denního experimentu zjistili, že při těchto koncentracích ve srovnání s kontrolní expozicí (0  $\mu\text{g/l}$ ) docházelo k významnému zvýšení pohybu mlže. Takové změny v chování pravděpodobně zvýší náchylnost k predaci a mohou také ovlivnit koloběh živin v sedimentech. Mlži jsou důležití při udržování stability a struktury sedimentů a také při poskytování stanovišť pro další velké bezobratlé (Sehonova et al. 2018).

Podle studie Gilroy et al. (2017) zaměřené na vliv léčiv (amitriptylin, iopamidol a sertralin) na různá životní stádia *Lampsilis siliquoidea* (Barnes, 1823), vychází sertralin jako nejtoxičtější látka pro všechna životní stádia testovaného mlže. LC50 sertralinu pro glochidia *Lampsilis siliquoidea* byla vypočtena na 60  $\mu\text{g/l}$ . Výsledky studie odhalují, že glochidia, jakožto nejcitlivějším životním stádiem mlže by mohla v budoucnu fungovat jako bioindikátor pro posouzení toxicity látek, které se týkají sladkovodních mlžů.

#### Karbamazepin

Karbamazepin je antikonvulzivní a náladu stabilizující lék používaný především při léčbě epilepsie a bipolární poruchy, stejně jako při neuralgii trojklanného nervu. Karbamazepin je tricyklická sloučenina chemicky příbuzná TCA s antikonvulzivními a analgetickými vlastnostmi (Wu 2012).

Karbamazepin je ve své podstatě hydrofilní, což znamená, že se přednostně nachází v kapalně fázi, než aby se vázal na půdní částice (Carter et al. 2014). Mezi nejčastěji detekovaná protizánětlivá léčiva a analgetika v podzemních vodách patří kromě ibuprofenu, diklofenaku, kyseliny salicylové právě karbamazepin s koncentrací dosahující více jak 1  $\mu\text{g/l}$  (Yang et al. 2017).

Dle studie Kořístkové & Grundmann (2006) byl karbamazepin mezi lety 1993–2004 dokonce nejspotřebovanějším antiepileptikem v ČR vzhledem k 2.0–2.2 spotřebovaných denních dávek na tisíc obyvatel.

#### Výskyt karbamazepinu v povrchových vodách

Důležitým zdrojem karbamazepinu v povrchových vodách jsou odpadní vody. Např. běžně užívaný paracetamol se zdá díky účinnosti ČOV oproti karbamazepinu zcela odstraněn. Karbamazepin je naproti němu relativně perzistentní a čistírny si s ním nedokážou v celkovém souhrnu koncentrací poradit (Gros et al. 2012). Dle studií prováděných v USA (Segura et al. 2011), Německu (Wiegel et al. 2004), Španělsku (Gros et al. 2012) a Velké Británii (Kasprzyk–Hordern et al. 2008) se hodnoty koncentrace karbamazepinu v povrchových

vodách v oblastech pod ČOV pohybovaly mezi 0,0002–0,684 µg/l. Podle studie Wilkinson et al. (2022) byly zaznamenány nejvyšší koncentrace karbamazepinu až 10 µg/l.

#### Toxicita karbamazepinu pro sladkovodní mlže

Je známo, že TCA mají při konzumaci lidmi různé vedlejší účinky. Navíc u ryb vedla expozice k významnému zvýšení mortality, vývojové retardaci, morfologickým anomáliím a patologickým změnám v mozku, srdci a lebečních a ocasních ledvinách. Kromě toho byly pozorovány změny v aktivitě antioxidantních enzymů a také zvýšená peroxidace lipidů, a to i při nejnižších testovaných koncentracích. Podle současných poznatků jsou antidepresiva vyskytující se v povrchových vodách schopna ovlivňovat chování, reprodukci, vývoj a přežívání vodních bezobratlých a obratlovců (Sehonova et al. 2018).

Během 21denní expozice s postupně se zvyšujícími koncentracemi (0,1, 1, 5, 10, 15 a 50 µg/l) karbamazepinu byla pozorována mortalita mlže *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) nižší než 2 % ve všech provedených pokusech. Koncentrace byly zvoleny tak, aby odpovídaly reálným environmentálním hodnotám, dále vyvolaly změny v testovaných biomarkerech (LMS, ERPD, DBF, GST, GR, GPX, LPO, poškození DNA), které přináší důležité ekotoxikologické informace a poskytují užitečnou referenci pro hodnocení vlivu vybraných léčiv a účinků, které léčiva mohou mít na vodní bezobratlé pomocí mlže *Corbicula fluminea* jako biondikačního druhu (Aguirre-Martínez et al. 2015). Zajímavostí je to, že v porovnání se studií Freitas et al. (2015) s mořským druhem *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) s koncentracemi karbamazepinu (0,3, 3, 6 a 9 µg/l) při 28denní expozici způsobily až 10% mortalitu testované populace.

#### 3.3.2 Toxikanty běžné ve vodním prostředí

Při testování toxicity látek během posledních 20 let se mlži jeví jako relativně odolní ve srovnání se standardně testovaným organismem *Daphnia magna* k některým rozpouštědlům, herbicidům a k organochlorovým, organofosforovým či pyrethroidním insekticidům (Farris & Van Hassel 2019). Naopak raná životní stádia mlžů se zdají být citlivá na některé iontové sloučeniny ( $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cd}^{2+}$ ) (Haag 2012). Toxicita mnoha běžných toxických látek pro tuto skupinu zůstává stále neznámá (Moore & Bringolf 2018).

Přestože koncentrace pocházejících z ČOV (např.  $\text{NH}_3^+$  a  $\text{Cl}^-$ ), byly díky moderním ČOV značně sníženy, populace Unionida jsou jimi stále značně ovlivňovány. Mouthon (1996) hodnotil vztah mezi 11 parametry kvality vody a druhovou rozmanitostí i početností měkkýšů na 96 řekách. Došel k závěru, že koncentrace amonia vyšší než 0,6 mg/l  $\text{NH}_3\text{-N}$  a koncentrace dusičnanů vyšší než 20 mg/l  $\text{NO}_3\text{-N}$  vedly k nižší druhové rozmanitosti a početnosti měkkýšů. Ze 48 hodnocených druhů plžů a mlžů byly Unionida nejcitlivější skupinou na dané znečištění, zatímco plži čeledi *Physidae* byli nejtolerantnějšími taxony (Farris & Van Hassel 2019).

#### Dusičnany

Dusičnany jsou konečným stupněm rozkladu dusíkatých organických látek v prostředí kyslíku. Typicky existují v prostředí ve formě vysoce rozpustné ve vodě ve spojení s ionty

jako je sodík a draslík (Pitter 2015). Hlavním zdrojem dusičnanů v podzemní vodě je půda, ze které se mohou dusičnany vyluhovat. Dusičnany jsou obecně stabilní v prostředí, můžou se však redukovat na dusitany biologickými procesy zahrnující rostliny, mikroby atd. V přírodě rostliny využívají dusičnany jako základní živinu (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2021a). Využití dusičnanů platí zejména pro hnojivářský průmysl, v hydrogeologicky významných oblastech je obsah dusičnanů v podzemních vodách sledován v návaznosti na množství hnojiv a dobu aplikace (Pelikán 1983). Mezi další použití komerčních dusičnanů či dusitanů patří konzervace potravin a výroba munice a výbušnin (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2021a).

#### Výskyt dusičnanů v povrchových vodách

Koncentrace dusičnanů v povrchových vodách v posledních letech stále roste v návaznosti na rostoucí počet obyvatel a zemědělské činnosti. Například v Labi vzrostla průměrná koncentrace dusičnanů asi z 0,5 mg/l NO<sub>3</sub>-N v roce 1892 na 3,6 mg/l NO<sub>3</sub>-N v roce 1976 a v roce 1994 až na 5 mg/l NO<sub>3</sub>-N. Oproti konci 19. století se jedná asi o desetinásobný nárůst. Tento trend se však v 90. letech zastavil v důsledku snižování obsahu sloučenin dusíku v atmosférických vodách (Pitter 2015). Dle ČHMÚ (Mayo et al. 2019) byly v roce 2008 na několika řekách ČR naměřeny hodnoty dusičnanů mezi 1,5 mg/l NO<sub>3</sub>-N (Vltava) a 56,8 mg/l NO<sub>3</sub>-N (Jizera).

#### Toxicita dusičnanů pro sladkovodní mlže

Znečištění povrchových vod dusičnany se stalo jednou z nejrozšířenějších příčin degradace kvality vody na celém světě. Akutní toxicita dusičnanů je pro sladkovodní mlže relativně nízká (Baker 2017), ale potenciální účinky expozice dusičnany jsou u sladkovodních mlžů do značné míry neznámé, zejména jeho efekt během jejich parazitické fáze složitěho životního cyklu tohoto organismu (Moore & Bringolf 2018). Nedávné studie (Edwards & Hamlin 2018) naznačují, že exogenní dusičnany jsou biologicky aktivní a mohou ovlivnit produkci hormonů, růst a chování u vodních organismů. Kromě toho existuje stále více důkazů, že dusičnany mohou být spojeny s mortalitou sladkovodních mlžů, viz studie na řece Lužnice (Douda 2010).

Moore & Bringolf (2018) zkoumali vliv dusičnanů na úspěšnost přichycení glochidia na hostitelskou rybu a taktéž úspěšnost metamorfózy v juvenilního dospělého. Expozice glochidia *Lampsilis siliquoidea* vůči 56 mg/l NO<sub>3</sub>-N vedla k významnému 35% snížení celkového počtu produkovaných mláďat, což je kombinovaný výsledek mírného snížení jak přichycení glochidia, tak úspěšnosti metamorfózy. Podobný trend, 28% redukce celkového počtu, byl evidentní u koncentrace 11 mg/l. U druhu *Lampsilis fasciola* nebyly patrné žádné účinky, což naznačuje druhově specifické rozdíly v odpovědích i mezi blízkými příbuznými druhy. Autoři se s koncentracemi 11 a 56 mg/l snažili přiblížit reálným hodnotám, proto mohou být výsledky této studie opravdu alarmující vzhledem k negativním účinkům při tak relativně nízkých koncentracích.

Při interpretaci výsledků této studie je třeba vzít v úvahu několik rysů mlžího životního cyklu mlžů, a to stáří glochidia v době expozice a inokulace. U *Lampsilis siliquoidea* a *Lampsilis fasciola* glochidia často opouští matku koncem jara nebo začátkem léta (Trdan

1981). Fritts et al. (2014) zjistili, že glochidia *Lampsilis cardium* odebraná v prosinci, byly výrazně méně citlivé na NaCl než ty, které byly odebrány v červnu. Ve studii Moore & Bringolf (2018) proběhlo testování toxicity s *Lampsilis siliquoidea* glochidiiemi v březnu, zatímco expozice glochidia *Lampsilis fasciola* proběhla v červnu. I když se nezdálo, že by se *Lampsilis fasciola* stala citlivější na expozici dusičnanům jako ve studii Fritts et al. (2014), stáří glochidia může být faktorem pro různé reakce těchto druhů.

Protože o mechanismech přichycení se glochidii na hostitelskou rybu je známo jen málo, je zapotřebí více výzkumu, aby se zjistilo, jak dusičnany ovlivňují parazitismus bez ovlivnění jejich životaschopnosti. Současné studie také upozorňují na to, že dusičnany se snadno endogenně přeměňují na NO (Edwards & Hamlin 2018), který se podílí na změnách endokrinní funkce a vývoji některých vodních organismů. NO může hrát důležitou roli ve zhoršeném přichycení a metamorfóze sladkovodních mlžů vystavených působení dusičnanů, ale je zapotřebí dalších studií, aby bylo možné porozumět zapojeným mechanismům.

Ve studii Moore & Bringolf (2018) expozice glochidii dusičnanům snížila produkci mláďat u jednoho ze dvou druhů, ale relevance tohoto zjištění na úrovni populace a účinky expozice dusičnanům na jiné druhy a další aspekty životního cyklu mlžů zůstávají klíčovými otázkami pro budoucí studie.

## Měď

V přírodě se měď vyskytuje nejčastěji ve formě sulfidů ( $\text{CuFeS}_2$  a  $\text{Cu}_2\text{S}$ ), ze kterých se v důsledku jejich rozkladu do vod dostává značné množství tohoto prvku. Antropogenním zdrojem mědi v povrchových vodách mohou být odpadní vody z povrchové úpravy kovů a z aplikace některých preparátů, které se dávkuje proti nadměrnému rozvoji řas a sinic (Pitter 2015).

Měď se používá k výrobě mnoha různých druhů výrobků, jako jsou dráty, instalatérské trubky a plechy. Měď je také kombinována s jinými kovy k výrobě mosazných a nerezových trubek. Sloučeniny mědi se běžně používají v zemědělství k léčbě chorob rostlin, jako je plíseň, k úpravě vody a jako konzervační prostředky na dřevo, kůži a tkaniny (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2021b).

## Výskyt mědi v povrchových vodách

V prostých podzemních a povrchových vodách se vyskytuje měď obvykle v koncentracích řádově jednotek až desítek  $\mu\text{g/l}$   $\text{Cu}^{2+}$ . V Labi byly v pěti profilech nalezeny koncentrace mědi v průměrném rozmezí 4  $\mu\text{g/l}$  až 20,5  $\mu\text{g/l}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Agresivní voda stagnující v měděném vodovodním potrubí může obsahovat koncentraci i přes 1  $\text{mg/l}$   $\text{Cu}^{2+}$  a byly popsány případy s koncentrací vyšší než 10  $\text{mg/l}$   $\text{Cu}^{2+}$  (obvykle šlo o nové potrubí, ve kterém se dosud nevytvořila ochranná vrstva hydroxid-uhličitanů). Protože je měď silně toxická pro ryby, je v povrchových vodách mezní koncentrace mnohem nižší než mezní hodnota pro pitnou vodu, v ČR se uvádí jako 1  $\text{mg/l}$   $\text{Cu}^{2+}$ , ovšem při koncentracích nad 0,1  $\text{mg/l}$   $\text{Cu}^{2+}$  může již docházet ke změnám organoleptických vlastností vody (Pitter 2015).

## Toxicita mědi pro sladkovodní mlže

Současné zvyšování koncentrací různých (těžkých) kovů vede ke komplexním toxikologickým interakcím, jejichž konečný dopad na biotu je obtížné předvídat. Glochidia *Anodonta anatina* jsou anatomicky relativně jednodušší živočichové a jejich reakce na různé podněty je omezena na kontrakci a relaxaci adduktoru (Wood 1974). Tato reakce je nezbytná pro jejich uchycení na hostitelské rybě a pro jejich další vývoj. Selhání přichycení k rybímu hostiteli po 10–14 dnech u většiny druhů mlžů vede až k uhynutí (Mackie 1984). Schopnost uzavřít chlopně je proto považován za indikátor životaschopnosti glochidií (Huebner & Pynnönen 1992).

Podle práce Markich (2017) citlivost glochidií šesti druhů sladkovodních mlžů ke všem studovaným kovům ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) rostla se zvyšující se dobou expozice. U všech druhů mlžů i kovů se citlivost zvýšila (nebo se hodnoty  $\text{LC}_{50}$  snížily) 1,7krát mezi 24 a 48 hodinami, 1,5krát mezi 48 a 72 hodinami a kumulativně 2,5krát mezi 24 a 72 hodinami. Tyto výsledky jsou srovnatelné s dalšími studiemi (Hansten et al. 1996; Gillis et al. 2008; Wang et al. 2010; Clearwater et al. 2014)

Glochidia šesti studovaných druhů byla nejcitlivější na měď. Pro glochidia *Anodonta anatina* byla zjištěna  $\text{LC}_{50} = 43 \mu\text{g/l Cu}^{2+}$  s alkalinitou  $\leq 50 \text{ CaCO}_3 \text{ mg/l}$ , nejméně pak byla glochidia citlivá na zinek. Kromě toho byla glochidia 5–6krát citlivější na měď než dospělci všech druhů mlžů. Tento výsledek se shoduje s předchozími studiemi, že raná životní stádia sladkovodních mlžů jsou nejcitlivější na expozici kovům (Farris & Van Hassel 2019).

Výzkum v práci Markich (2017) byl zaměřen zejména na druhy žijící v zalidněných pobřežních řekách v jihovýchodní části Austrálie, a poukázal na to, že národní kritéria (viz kap. 3.1.3) pro povrchovou vodu, resp. koncentrace  $1 \mu\text{g/l Cu}^{2+}$  (pro 99% úroveň ochrany) a  $2,5 \mu\text{l Cu}^{2+}$  (pro 80% úroveň ochrany), neodpovídají citlivostí glochidií na testované kovy, což naznačuje, že tyto druhy nebudou v oblasti dostatečně chráněny.

## Amonium

Amonium je produktem rozkladu většiny organických dusíkatých látek živočišného a rostlinného původu. Je jedním z klíčových zdrojů dusíku v buněčné biosyntéze aminokyselin. V živých organismech je nepřetržitě produkován řadou biochemických procesů, a jeho akumulace v buňkách vede k poškození tkání (Bittsánszky et al. 2015). Antropogenním zdrojem amonia organického původu ve vodách mohou být splaškové odpadní vody, odpady ze zemědělských výroby a kalová voda z anaerobní stabilizace čistírenských kalů. Nezanedbatelným zdrojem amonia ve vodách mohou být i emise amoniaku v okolí závodů živočišné výroby. Antropogenním zdrojem amonia anorganického původu jsou především dusíkatá hnojiva, která se infiltrací a splachem ze zemědělsky obdělávaných ploch dostávají do vod podzemních i povrchových (Pitter 2015).



## Výskyt amonia v povrchových vodách

V povrchových vodách obvykle koncentrace nedosahují hodnot 1 mg/l. například v labských vodách v profilu Děčín se v roce 2000 pohybovaly koncentrace amonia od 0,006 do 0,84 mg/l NH<sub>4</sub>-N. Amonium se vyskytuje zejména ve velmi znečištěných vodách např. Bílina), kde průměrné koncentrace převyšují i 10 mg/l (Pitter 2015), obecně má amonium leptavé účinky a může snižovat účinnost dezinfekce, vést k tvorbě dusitanů v potrubí či zapříčinit chuťové a pachové problémy pitné vody (Kožíšek 2003).

## Toxicita amonia pro sladkovodní mlže

V rámci studie Clearwater et al. (2014) byly odebrány dospělé samice novozélandského sladkovodního mlže *Echyridella menziesii* (Gray, 1843) ze tří lokalit na severním ostrově Nového Zélandu. V sérii testů, které probíhaly podle standardních pokynů ASTM, byla glochidia vystavena amoniu po dobu 6, 24 nebo 48 hodin. V porovnání s ostatními původními novozélandskými druhy byla glochidia poměrně citlivá na působení amonia. U glochidií z různých oblastí byly naměřeny hodnoty LC50, po 24hodinové expozici, při pH 7,7, (21,9, 27 a 9,6 mg/l NH<sub>4</sub>-N) a při pH 8,0, (15,2, 14,3, 6.6 mg/l NH<sub>4</sub>-N). Autoři uvádějí, že *Echyridella menziesii* patří mezi nejcitlivější vodní druhy na akutní toxicitu amonia.

## 4 Metodika

Předlohou pro metodiku experimentální části bakalářské práce byla metodika *ASTM International*: ASTM E2455–06 (ASTM 2006).

Mlži byli navzorkováni na lokalitě Sázava – Čtyřkoly a transportováni do laboratoře v říční vodě. V laboratoři byli v průběhu 12 dní aklimatizováni na laboratorní vodu a teplotu zhruba 20 °C. Dále byli přikrmováni denně suspenzí jednobuněčné řasy *Ettlia oleoabundans*.

Glochidia byla odebrána proplachem žaber pomocí injekční stříkačky dle standardních metod (ASTM 2006). Glochidia získaná z několika jedinců byla po ověření životaschopnosti pomocí NaCl (>90 %) smíchána a použita pro test toxicity.

### 4.1 Testované chemické látky a cílové koncentrace

Testovací podmínky použité při stanovení vlivu vybraných polutantů (karbamazepin, sertralin, dusičnany, amonium a měď) na glochidia *Anodonta anatina* jsou shrnuty v tab. 1.

Tab. 1 Shrnutí testovacích podmínek

Doba expozice	24 h
Endpoint	LC50
Ředící voda	Kohoutková voda
Tvrdość ředící vody	1,14 mmol/l (114 mg CaCO <sub>3</sub> /l)
pH	7,63 ± 0,46
Teplota	20 ± 2 °C
Krmení glochidií	Žádné
Počet test. koncentrací	4–5
Počet opakování	3
Počet glochidií v titrační destičce	15–30

#### 4.1.1 Psychoaktivní látky

Psychoaktivní látky (karbamazepin, sertralin) byly získány od spolupracujících laboratoří v rámci projektů NutRisk (FAPPZ ČZU) a GAČR (JČU).

Pro karbamazepin i sertralin byly zvolené cílové koncentrace pro akutní test 1, 10, 50 a 100 µg/l. Tyto koncentrace byly vybrány vzhledem k pokrytí environmentálně relevantních hodnota několika vyšších koncentrací vzhledem k absenci dat v literatuře.

### 4.1.2 Toxikanty

Zdrojové toxikanty (dusičnany, amonium a měď) byly získány od chemicko-biotechnologické společnosti Sigma-Aldrich, s. r. o. (ČR).

Pro dusičnany byly zvolené cílové koncentrace 200, 500, 750 a 1000 mg/l NO<sub>3</sub>-N. Kontrolní testování probíhalo na základě koncentrace 4 mg/l NO<sub>3</sub>-N, která byla naměřena na začátku testu v kohoutkové ředící vodě. Pro amonium byly vytyčeny hodnoty 4, 8, 16 a 24 mg/l NH<sub>4</sub>-N, kdy koncentrace 0,02 mg/l NH<sub>4</sub>-N je též koncentrace naměřena v kohoutkové ředící vodě, na začátku testování. U ostatních polutantů se provádělo kontrolní testování na základě nulové koncentrace dané látky, protože nebyly zaznamenány v ředící vodě. Pro měď byly zvoleny koncentrace 5, 10, 25 a 100 µg/l Cu<sup>2+</sup>. Všechny zmíněné cílové koncentrace byly vybrány na základě analýzy literatury, aby pokrývaly očekávaný rozsah s přítomností LC50.

U všech studovaných látek pracuji v bakalářské práci s nominálními hodnotami testových hladin. V průběhu experimentů byly zároveň odebrány kontrolní vzorky vody, které budou po zpracování obsaženy v navazující studii založené na výsledcích bakalářské práce.

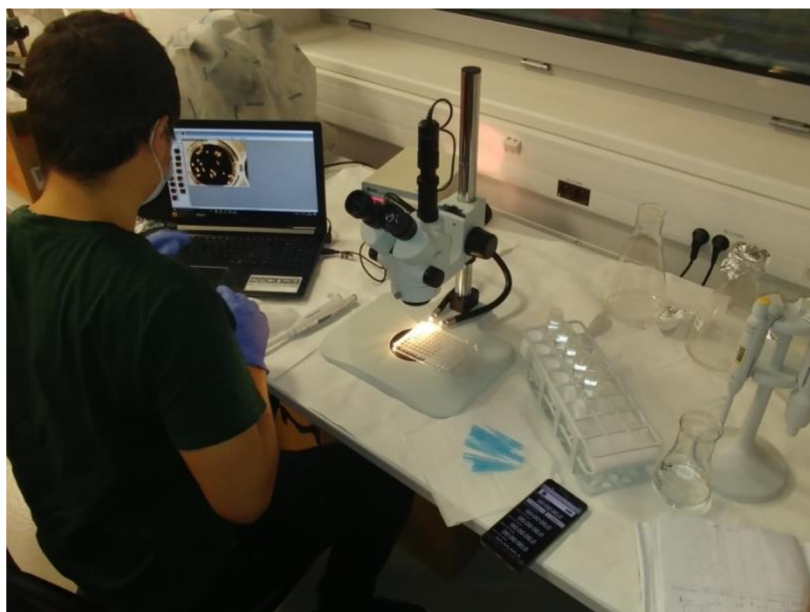
## 4.2 Průběh testování

Na začátku každého testu byla glochidia přenesena do expozičních nádob a vystavena po dobu 24 hodin expozici vybraným polutantům ve standardizovaných podmínkách (kádinka 250 ml, objem 100 ml, viz obr. 2).



Obr. 2 Skleněné kádinky (250 ml) použité pro exponovaná glochidia

Následovalo testování životaschopnosti glochidií v titrační destičce pod stereoskopickým mikroskopem s fotografickým záznamem. Skupina glochidií (cca 15–30 jedinců) z expoziční kádinky byla přenesena do jednotlivých jamek titrační destičky ve třech opakováních. Následně byla vyhodnocena behaviorální reakce glochidií („snapping activity“), viz obr. 3, na standardní referenční signál (vodný roztok NaCl) aplikovaný do jamek titrační destičky pomocí automatické mikropipety.



Obr. 3 Ing. Juan Felipe Escobar Calderón při záznamu behaviorální reakce glochidií

Životaschopnost byla vyhodnocena na základě porovnání stavu glochidií před a po (5, 10 a 180 s) aplikaci signálu pro stanovení podílu životaschopných larev. Následně byla stanovena LC50 pomocí probit metody. Při každém testování bylo použito pět různých výsledných koncentrací NaCl (5, 10, 15, 25 a 60 mg/ml). Tyto koncentrace měly vliv na motivaci glochidií se uzavírat a tím byla stanovena jejich životaschopnost, resp. sloužily jako indikátory životaschopnosti glochidií.

## 4.3 Výpočet LC50

### 4.3.1 Zpracování dat

Reakce glochidií v titrační destičce, byly zaznamenány pomocí okulárové kamery Dino-Eye, model AM7025X, stereomikroskopu, model SZM 45.

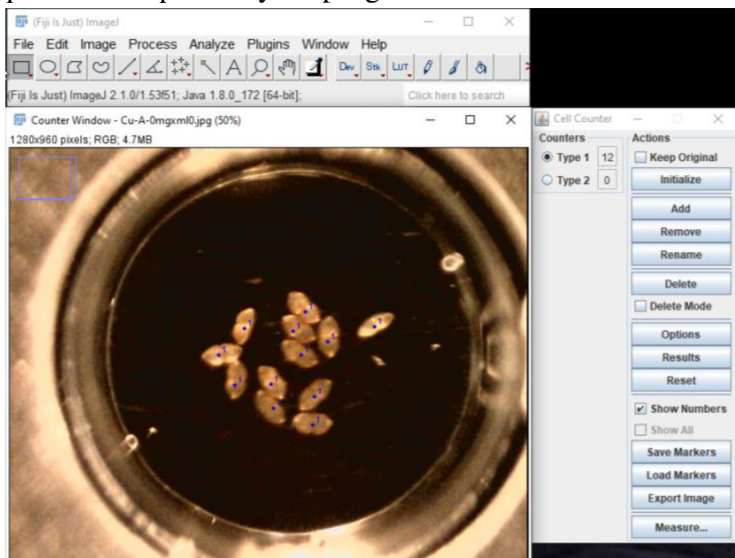


Obr. 4 Otevřené glochidium



Obr. 5 Uzavřené glochidium

Celkem bylo zapotřebí vyhodnotit 1710 fotografií, tedy pro každý toxikant či psychoaktivní látku sadu 19 fotografií ve třech opakováních. Pro hodnocení otevřených (viz obr. 4) a uzavřených glochidií (viz obr. 5) na každé fotografii byl použit software Image J, viz obr. 6. Každá fotografie obsahovala jedinečný název, který následně sloužil pro určení použité koncentrace NaCl a pořadí opakování (A, B, C) např.: NO3-A-0mgxml0. Výsledky byly průběžně zapisovány do programu MS Excel 2010.



Obr. 6 Zpracování fotografie v Image J

#### 4.3.2 Metodika výpočtu LC50

Hodnoty LC50 byly vypočteny na základě probit metody. Probitová analýza byla použita z důvodu potřeby kvantifikovat reakce získané na základě testování akutní toxicity vybraných polutantů na glochidiích *Anodonta anatina*. Glochidia byla vystavena podnětu (různým koncentracím vybraných polutantů), což vedlo k binární odpovědi odpovídající úhynu nebo přežití ošetřených jedinců. Jednalo se tedy o případ testu s binární odezvou s jednou vysvětlující proměnnou: různými koncentracemi polutantů.

Tímto způsobem byly výsledky získané v tomto testování podrobeny probitové analýze pomocí softwaru R (balíček drc; Ritz et al. 2015), aby bylo možné vypočítat LC50 a 95% interval spolehlivosti (Hashim et al. 2020) vybraných polutantů.

V posledních dvaceti letech stále více vědecké literatury vyžaduje uvedení intervalů spolehlivosti pro každý z klíčových výsledků. Uvádění tohoto intervalu spolehlivosti poskytuje další informace o vzorku a výsledcích (Simundic 2008).

Interval spolehlivosti představuje rozsah možných hodnot, v jehož rámci můžeme s určitou jistotou nalézt statistickou míru populace. Jako takový je objektivním odhadem (ne)přesnosti a velikosti vzorku určitého výzkumu. Proto můžeme interval spolehlivosti považovat také za měřítko kvality vzorku a výzkumu. Interval spolehlivosti je definován svými hranicemi chyb. V závislosti na úrovni spolehlivosti, kterou zvolíme, se mění i rozpětí chyby intervalu a příslušný rozsah. V biomedicínské literatuře se nejčastěji používají intervaly spolehlivosti 90 %, 95 %, 99 % a ne tak často 99,9 %. Čím užší jsou rozpětí intervalu, tím vyšší je přesnost odhadu. Tradičně nejpoužívanějším intervalem v literatuře je 95% interval spolehlivosti, který souvisí s obecně přijímanou hladinou statistické významnosti  $P < 0,05$ . Pro

stejně velké vzorky platí pravidlo: čím menší je hladina spolehlivosti, tím vyšší je přesnost odhadu. Pouze studie s velkým vzorkem poskytnou velmi malý interval spolehlivosti, který poukazuje na vysokou přesnost odhadu při vysoké hladině spolehlivosti (Simundic 2008).

Z důvodu reprodukovatelnosti postupu při výpočtu LC50 je v následujících řádcích popsán přesný postup tvoření podkladů pro výpočet LC50 v programu MS Excel 2010.

V tabulkách pro polutanty byly vytvořené sloupce „Otevřená“ a „Zavřená“ glochidia (viz kap. 4.3.1) a k nim příslušné koncentrace NaCl a koncentrace polutantů. V rámci tvorby úspěšného datasetu pro balíček drc (Ritz et al. 2015) v softwaru R bylo zapotřebí získat finální data s hodnotami koncentrace dané látky a mortality glochidií. Proto bylo nejdříve nutné převést data z formátu „Otevřená“ a „Zavřená“ glochidia na „Živá“ a „Uhynulá“. Živá, resp. životaschopná glochidia byla ta, která reagovala v čase 180 s oproti kontrolnímu testování v čase 0 s. Takzvaně, pokud byla v čase 0 s otevřená, v čase 180 s byla zavřená. Uhynulá glochidia byla pak ta, která se nezavřela, resp. nezareagovala na přítomnost indikátoru životaschopnosti NaCl a pak ta, která byla už zpočátku zavřená.

Živá glochidia (Z) byla vypočtena podle vztahu:

$$Z = O_{0s} - O_{180s}$$

, kde  $O_{0s}$  je počet otevřených glochidií před přidáním NaCl a  $O_{180s}$  je počet glochidií 180 sekund po přidání NaCl.

Uhynulá glochidia (U) byla vypočtena podle vztahu:

$$U = (O_{180s} + Z_{180s}) - Z$$

, kde  $O_{180s}$  je počet otevřených glochidií a  $Z_{180s}$  počet zavřených glochidií v čase 180 s. Tento součet by měl vyjít stejně jako součet otevřených a zavřených glochidií v čase 0 s.

Fotografie glochidií byly v některých případech se sníženou čitelností, nebo glochidia byla nad sebou a mohlo tak dojít k pochybení při určení celkového počtu glochidií v titrační destičce. Proto bylo ještě před výpočtem nutné převést „uhynulá“ glochidia na procenta, tak že součet živých a uhynulých glochidií se rovnal 100 %.

## 5 Výsledky

Kapitola výsledky je rozdělena do dvou podkapitol. V podkapitole 5.1 *Psychoaktivní látky* lze vidět, že nejvyšší testovaná koncentrace (100 µg/l) pro psychoaktivní látky ležela pod potřebnou hladinou koncentrace, která by způsobila mortalitu alespoň 50 % jedinců. I když byly koncentrace v případě karbamazepinu 10krát vyšší, než byly pozorovány nejvyšší koncentrace v terénu, tedy 10 µg/l (Wilkinson et al. 2022). U sertralínu byly pozorovány nejvyšší koncentrace 50 µg/l (Schultz & Eurlong 2008; Klancar et al. 2016), což je 2krát méně, než byla testovaná nejvyšší koncentrace. Zobrazené grafy vizualizují předběžné výsledky akutní toxicity psychoaktivních látek na glochidia *Anodonta anatina*, vč. kontrolního testování (koncentrace 0) a koncentrace NaCl 5 mg/ml, která byla později vyřazena z výpočtů LC50 (viz níže). Grafy byly vytvořeny pomocí softwaru R s balíčkem ggplot2 (Wilkinson et al. 2005).

Podkapitola 5.2 *Výsledky LC50 pro toxikanty* shrnuje konečné výsledky střední letální koncentrace pro dusičnany, amonium a měď.

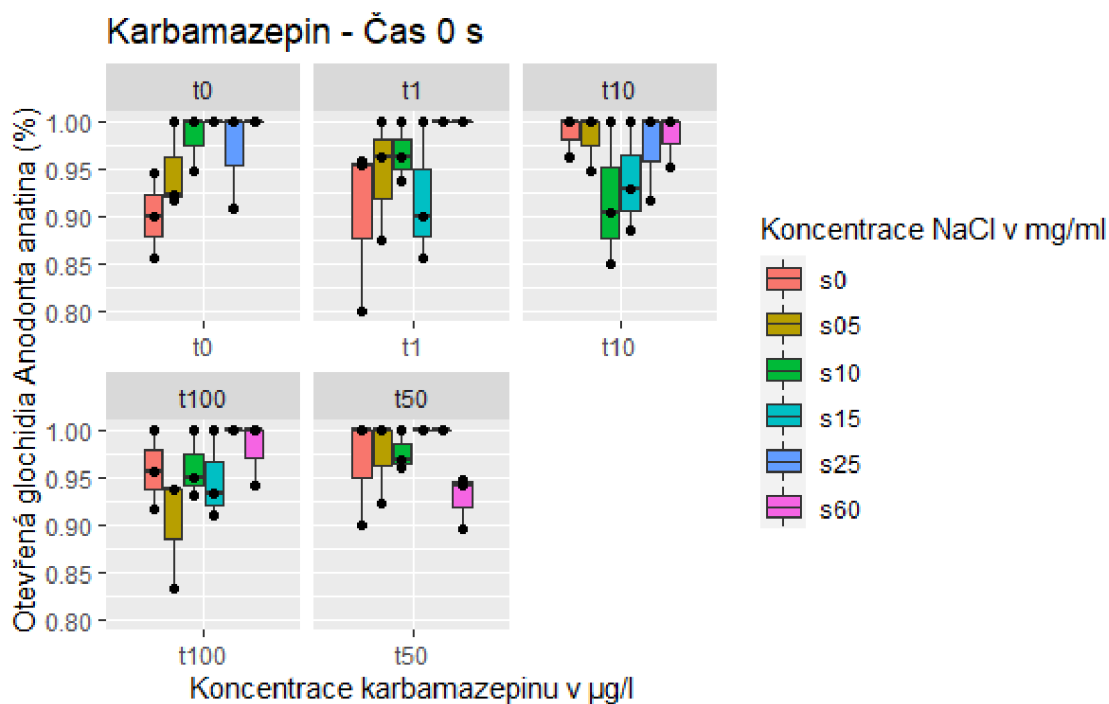
### 5.1 Psychoaktivní látky

Všechny přiložené grafy zobrazují koncentraci vybraných psychoaktivních látek na ose x a procentuální podíl otevřených glochidií *Anodonta anatina* na ose y po 24hodinové expozici. Pět zobrazených oken značí pět použitých koncentrací, vč. té kontrolní (0, 1, 10, 50 a 100 µg/l). Grafy 1 a 3 značí kontrolní testování, kdy ještě nebyla použita NaCl jako indikátor životaschopnosti testovaných glochidií. Šest barevných boxplotů v grafu zastupuje šest různých kádinek, do kterých poté byly přidány příslušné koncentrace NaCl.

V čase 0 s tedy ještě nedokážeme přesně říct, která glochidia byly životaschopná, můžeme ale pozorovat počáteční vlivy testovaných polutantů po 24hodinové expozici na glochidia, resp. poměr zdánlivě živých a uhynulých glochidií. Ověření skutečné životaschopnosti glochidií zjistíme tak, že otevřená glochidia se po expozici NaCl uzavřou, což můžeme pozorovat v grafech 2 a 4.

### 5.1.1 Karbamazepin

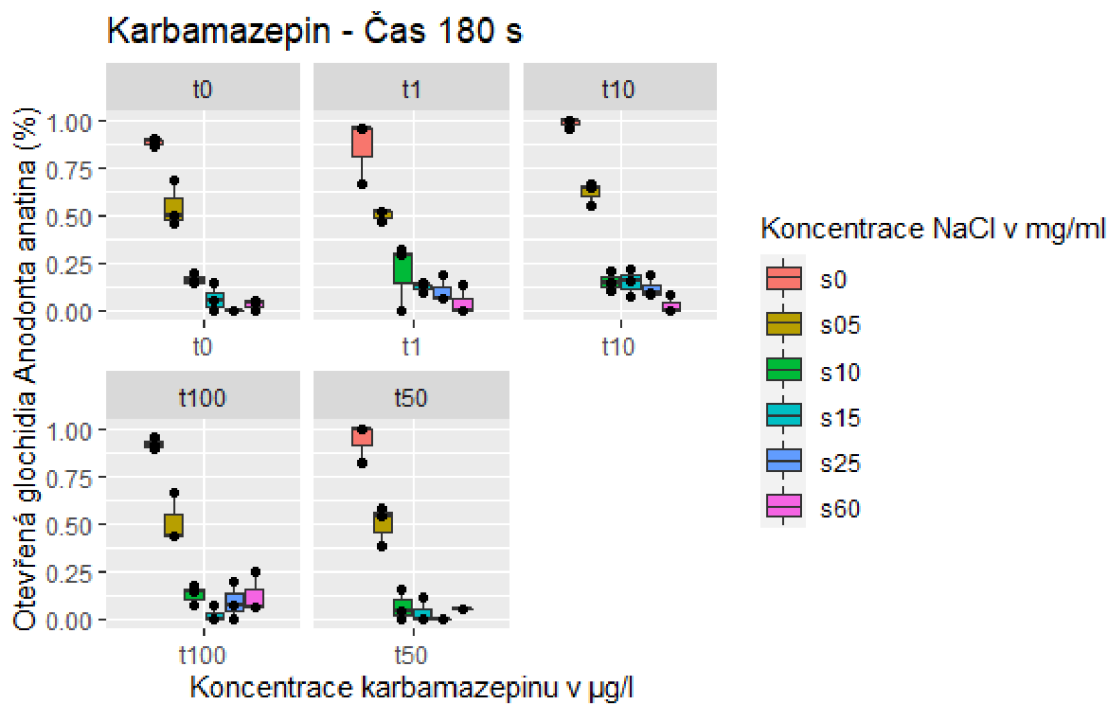
U všech koncentrací karbamazepinu v grafu 1 (počáteční stav před testováním životaschopnosti) je vysoký podíl otevřených glochidií, která následně dobře reagují po stimulaci dostatečnou koncentrací referenčního signálu NaCl (Graf 2). Podíl na počátku zavřených larev, které lze považovat za uhynulé, je do 20 % jedinců a vyskytuje se i v kontrolní skupině (t0), což znamená, že tuto mortalitu nelze připsat vlivu karbamazepinu.



Graf 1 Karbamazepin a expozice NaCl v čase 0 s

V grafu 2, pro všechny koncentrace platí, že nejnižší přidaná koncentrace NaCl, tedy 5 mg/ml, neslouží jako spolehlivý indikátor životaschopnosti glochidií. Není dostatečně silná, aby na ni glochidia zareagovala. V tomto zjištění nás utvrzují vyšší koncentrace, kde se glochidia skutečně uzavřela zhruba v 80 %, což také podporují výsledky grafu 1. Oba grafy ukazují, že testované koncentrace karbamazepinu nejsou významně akutně toxické pro glochidia *Anodonta anatina*, proto bude nemožné v tomto případě vypočítat LC50.

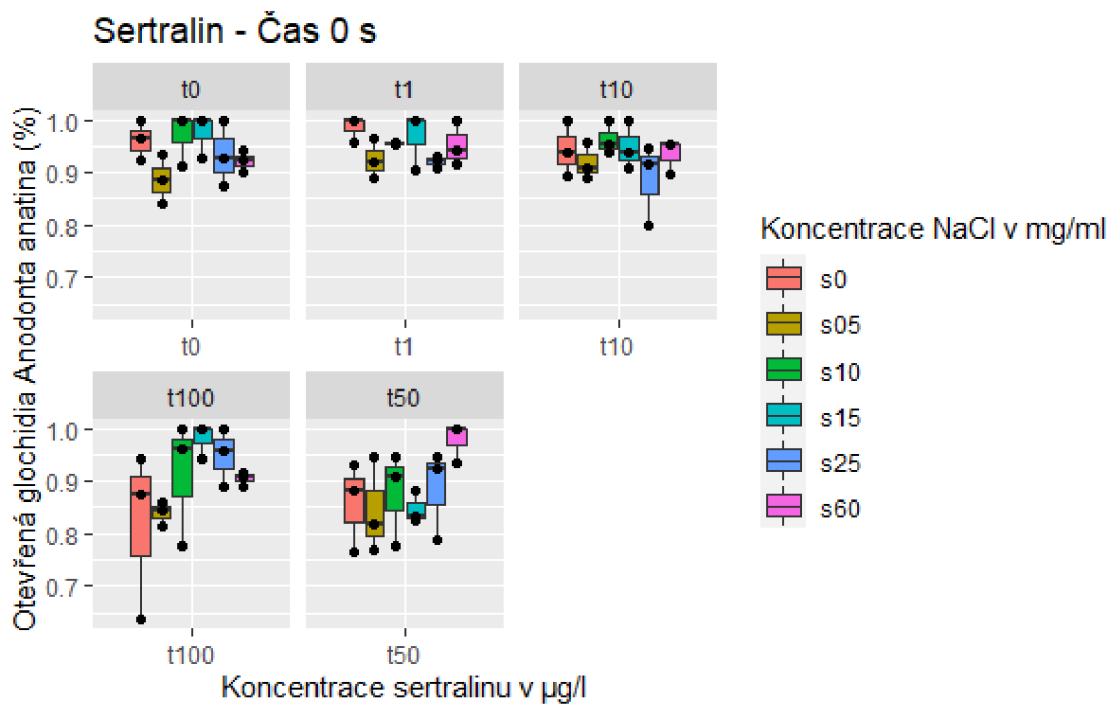




Graf 2 Karbamazepin a expozice NaCl v čase 180 s

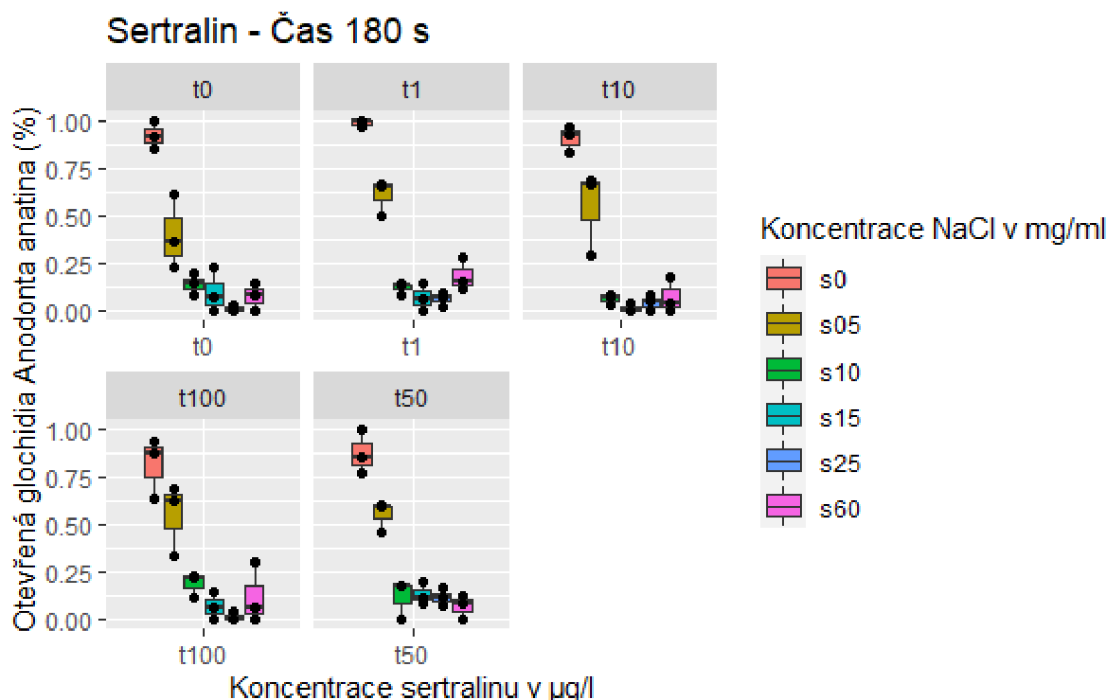
#### 5.1.2 Sertralin

V porovnání s výsledky testování karbamazepinu lze na první pohled říct, že v obou časových záznamech mají velmi podobné účinky. Sertralin i v nejvyšší koncentraci 100 µg/l nezvýšil významně podíl nereagujících glochidií.



Graf 3 Sertralin a expozice NaCl v čase 0 s

Mortalitu glochidií i v nejvyšší koncentraci sertralinu nelze odlišit od kontroly. Ve výsledku tedy ani sertralin není v testovaných koncentracích natolik toxický, aby dokázal usmrtit polovinu testovaných glochidií. Z tohoto důvodu nebude možné LC50 u sertralinu vyjádřit.



Graf 4 Sertralin a expozice NaCl v čase 180 s

## 5.2 Výsledky LC50 pro toxikanty

Testy toxicity byly prováděny z glochidií ze tří různých mateřských jedinců. K výpočtu LC50 pro jednotlivé toxikanty byly zahrnuty výsledky ze všech třech pokusů. Vzhledem k potřebě binomického rozdělení, nebylo možné do výpočtu zahrnout jak koncentrace NaCl, tak koncentrace toxikantů. Proto byly hodnoty vytvořeny pro všechny NaCl koncentrace zvlášť viz tab. 2–4. Konečná hodnota LC50 byla vyjádřena na základě aritmetického průměru těchto hodnot (viz druhý sloupec v tab. 2–4).

Tab. 2 Hodnoty LC50 NO<sub>3</sub>-N

Koncentrace NaCl (mg/ml)	LC50 v čase 180 s (mg/l)	95% interval spolehlivosti (mg/l)
10	459,31	367,58–623,03
15	698,28	555,14–841,41
25	778,02	608,16–947,89
60	758,61	658,77–858,46

$$\bar{x}_{LC50} = 673,56 \text{ mg/l NO}_3\text{-N}$$

Tab. 3 Hodnoty LC50 Cu<sup>2+</sup>

Koncentrace NaCl (mg/ml)	LC50 v čase 180 s (μg/l)	95% interval spolehlivosti (μg/l)
10	19,73	9,49–29,98
15	55,21	35,92–74,50
25	30,51	23,47–37,54
60	13,55	10,61–16,49

$$\bar{x}_{LC50} = 29,75 \mu\text{g/l Cu}^{2+}$$

Tab. 4 Hodnoty LC50 NH<sub>4</sub>-N

Koncentrace NaCl (mg/ml)	LC50 v čase 180 s (mg/l)	95% interval spolehlivosti (mg/l)
10	10,35	7,57– 3,13
15	10,33	8,70–11,95
25	10,40	8,94–11,87
60	11,26	9,00–13,53

$$\bar{x}_{LC50} = 10,59 \text{ mg/l NH}_4\text{-N}$$

## 6 Diskuze

### 6.1 Psychoaktivní látky

V podkapitole 3.3.4 je možné pozorovat, že dodnes nebylo provedeno mnoho studií zaměřených na vliv psychoaktivních látek na glochidia sladkovodních mlžů. U dospělců můžeme pozorovat při opravdu nízkých koncentracích změnu chování, případně změnu na úrovni DNA, nebyla ale zjištěna velká mortalita sladkovodních druhů mlžů. Podle studie Aguirre-Martínez (2015) byla mortalita mlže *Corbicula fluminea* zhruba na 2 % při koncentraci karbamazepinu 50 µg/l. Jediná studie, která se zaměřuje na všechna životní stádia sladkovodního mlže *Lampsilis siliquoidea* a vliv psychoaktivních látek (amitriptylinu, iopamidolu a sertralinu), Gilroy et al. (2017) přináší hodnoty LC50 sertralinu 60 µg/l.

Přestože o mnoho nižší koncentrace měli prokazatelný vliv na chování dospělých mlžů, zvolená koncentrační řada u obou testovaných psychoaktivních látek pro tento výzkum nedokázala usmrtit alespoň 50 % testovaných jedinců. Na základě literární rešerše vlivu různých zněčišťujících látek na (nejen) larvální stádia mlžů víme, že může docházet ke značným mezidruhovým rozdílům (Moore & Bringolf 2018). Výsledky napovídají faktu, že zvolené koncentrace mohou být akutně toxické pro *Lampsilis siliquoidea*, nikoli pro *Anodonta anatina*. Pro budoucí výzkumy v toxicitě karbamazepinu i sertralinu na glochidia *Anodonta anatina* bude potřeba snížit hodnoty použitých koncentrací.

Pro sertralin nebyla v ČR stanovena maximální přípustná koncentrace a vzhledem k vysokému užívání psychoaktivních látek v posledních letech (Kořístková & Grundmann 2006; ŠefferoVá 2017) by bylo dobré sertralin zařadit na seznam potenciálně nebezpečných látek. I kvůli tomu, že byla tato látka v českých vodách pozorována (Golovko et al. 2014).

### 6.2 Toxikanty

Rozdílnost výsledků LC50 pro dusičnany a amonium v různých koncentracích NaCl viz tab. 2–4 je relativně malá. Tato různorodost by tak mohla zahrnovat variabilitu glochidií *Anodonta anatina* v reakci na různé koncentrace NaCl. Dodnes nevíme, jaké koncentrace NaCl jsou 100 % indikátorem životaschopnosti, resp. jsou dostatečně silné, aby vyvolaly reakci u všech testovaných jedinců. Jak uvádí již Fritts et al. (2014), rozdíly mezi výsledky také může způsobit stáří mlžů.

V případě mědi je rozdíl mezi výsledky větší. Výsledky se zdají matoucí, protože nejvyšší zaznamenaná hodnota LC50 není z logiky věci u nejvyšších koncentrací NaCl. Proto předpokládám, že došlo k lidskému pochybení v laboratoři např. při zpracování dat záznamů fotografií apod.

Citlivost glochidií *Anodonta anatina* v porovnání mezi toxikanty byla prokazatelně nejslabší u mědi, jelikož u mědi bylo pro usmrcení alespoň 50 % jedinců potřeba několikanásobně nižší koncentrace (29,75 µg/l Cu<sup>2+</sup>) oproti amoniu (10,59 mg/l NH<sub>4</sub>-N) i dusičnanům (673,56 mg/l NO<sub>3</sub>-N).

### 6.2.1 Dusičnany

Hodnota LC50 pro dusičnany rovna 673,56 mg/l NO<sub>3</sub>-N, viz tab. 2 naznačuje, že citlivost glochidií *Anodonta anatina* bude mnohem vyšší oproti glochidiím *Lampsilis siliquoidea*. *Lampsilis siliquoidea*, podle studie Moore & Bringolf (2018), uhynuly z 35 % při koncentraci 56 mg/l NO<sub>3</sub>-N. Na druhou stranu, glochidia taxonu *Lampsilis fasciola* na testovanou koncentraci 56 mg/l NO<sub>3</sub>-N nezareagovala vůbec. Protože cílem studie nebylo zjistit LC50, tyto výsledky nemohu přesně porovnat. Přesto rozdíly v hodnotách LC50 této bakalářské práce a ve výsledcích Moore & Bringolf (2018) při 35 % úhynu glochidií *Lampsilis siliquoidea* se na první pohled až příliš liší, přestože mezi úhyny glochidií je rozdíl „pouze“ v 15 %. To je pravděpodobně zapříčiněné tím, že autoři pracovali odlišným způsobem při odběru glochidií. Zatímco v této práci se odebírala glochidia v laboratoři proplachem žaber mateřských jedinců a pomocí injekční stříkačky, Moore & Bringolf (2018) odebírali glochidia studovaných mlžů přímo v terénu.

V ČR jsou glochidia *Anodonta anatina* dostatečně chráněna, protože dle MŽP (2018) je přípustná koncentrace 0,3 mg/l NO<sub>3</sub>-N v povrchových vodách. LC50 dusičnanů se pohybuje v několiknásobně vyšších koncentracích, než byly pozorovány zaznamenané nejvyšší koncentrace dusičnanů v ČR, 56,8 mg/l NO<sub>3</sub>-N. (Mayo et al. 2019).

### 6.2.2 Měď

Testy akutní toxicity mědi odhalily, že polovina testovaných glochidií *Anodonta anatina* hyne při koncentraci 29,75 µg/l, což odpovídá výsledkům studie Markich (2017). Ten stanovil LC50 mědi, po 24hodinové expozici, pro glochidia *Anodonta anatina* na 43 µg/l Cu<sup>2+</sup>. Markich sice neuvádí pro tento výsledek interval spolehlivosti, ale vzhledem k chování intervalu v tab. 4, lze předpokládat, že zjištěná hodnota v této bakalářské práci bude v rozmezí intervalu použitým u studie Markich (2017), protože pro koncentraci NaCl 15 mg/ml byla zjištěna hodnota LC50 55,21 µg/l, která zahrnuje v intervalu spolehlivosti právě i hodnotu 43 µg/l. Výsledky práce Markich (2017) byly zopakovány na základě této bakalářské práce.

V ČR mají glochidia *Anodonta anatina* dostatečnou ochranu, protože dle MŽP (2018) je přípustná koncentrace mědi 2 µg/l Cu<sup>2+</sup> v povrchových vodách. Nejvyšší koncentrace mědi byly zaznamenány v profilech Labí až v 20,5 µg/l Cu<sup>2+</sup> (Pitter 2015). Toto naznačuje, že glochidia *Anodonta anatina* jsou v českých vodách potenciálně ohroženy.

### 6.2.3 Amonium

Výsledky této bakalářské práce ( $LC_{50} = 10,59 \text{ mg/l NH}_4\text{-N}$ ) odpovídají výsledkům Wang et al. (2007), kteří zjistili průměrné hodnoty  $LC_{50}$ , po 24hodinové expozici,  $10 \text{ mg/l NH}_4\text{-N}$  (s intervalem spolehlivosti  $5\text{-}16 \text{ mg/l NH}_4\text{-N}$ ). Tyto výsledky se naopak mírně liší ve srovnání s prací Clearwater et al. (2014), kteří vypočetli hodnoty  $LC_{50}$  po 24hodinové expozici, při pH 7,7, (21,9, 27 a  $9,6 \text{ mg/l NH}_4\text{-N}$ ) a při pH 8,0, (15,2, 14,3 a  $6,6 \text{ mg/l NH}_4\text{-N}$ ). Jak samy o sobě výsledky napovídají, dochází nejen k mezidruhovým rozdílům, ale také k rozdílům na základě původu mateřských jedinců. Výsledky různých vědeckých prací se mění také na základě změny pH, která mohla samozřejmě ovlivnit i výsledky této bakalářské práce. Použité hodnoty pH se pohybovaly v rozmezí  $7,63 \pm 0,46$ .

Ve velmi znečištěných tocích (např. Bílina) byly zjištěny koncentrace převyšující  $10 \text{ mg/l}$ . Z výsledků této bakalářské práce víme, že glochidia *Anodonta anatina* jsou v těchto oblastech zvláště ohrožené.

### 6.3 Budoucí vývoj

Je třeba uskutečnit další testování toxicity většího počtu druhů sladkovodních mlžů, které by lépe reprezentovalo přibližně 28 druhů (Horsák, 2010) žijících v ČR. Kromě toho je třeba porovnat citlivosti populací z různých oblastí v celém areálu výskytu druhu. Více obdobných typů testů by pravděpodobně pomohlo vysvětlit některé rozdíly v citlivosti těchto organismů k testovaným látkám.

Kromě dalších laboratorních testů toxicity by měla být sledována kvalita okolní vody, zejména v místech s vysokou rozmanitostí mlžů ke zjištění, zda koncentrace vybraných polutantů se pohybuje na úrovni přijatelné pro mlže nebo ne.

Dále je nezbytný výzkum variability citlivosti glochidií, které jsou sbírány v různých ročních obdobích. Některé druhy jako např. druhy rodu *Lampsilis*, vylučují glochidie téměř po celý rok, zatímco jiné druhy sladkovodních mlžů vypouští glochidia jen několik týdnů v roce (Fritts, 2014). Také jen málo studií porovnávali citlivost glochidií odebraných na začátku období vypouštění s glochidii odebranými ke konci období vypouštění (Bringolf, 2022).

Na základě získaných vědomostí o problematice testování toxicity na sladkovodních mlžích, bych se v budoucnu ráda věnovala specifikaci možných rozdílů výsledků podobných studií na základě použité metodiky při testování toxicity a různých parametrů jako je např. vliv tvrdosti ředící vody či použitých nástrojů při testování toxicity pro larvální stádia sladkovodních mlžů.

## 7 Závěr

U glochidií sladkovodního mlže *Anodonta anatina* byl sledován vliv vybraných polutantů (karbamazepin, sertralin, dusičnany, amonium a měď) na jejich životaschopnost.

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

- Pro výzkum akutní toxicity vybraných psychoaktivních látek (karbamazepin a sertralin) byla zvolena koncentrační řada, která neumožnila stanovit LC50. Můžeme v obou případech říct, že hodnoty LC50 pro glochidia *Anodonta anatina* budou vyšší než 100 µg/l.
- LC50 dusičnanů pro glochidia *Anodonta anatina* byla aritmetickým průměrem výsledků pro koncentrace NaCl 10, 15, 25 a 60 mg/ml vypočtena na 673,56 mg/l NO<sub>3</sub>-N.
- LC50 amonia pro glochidia *Anodonta anatina* byla aritmetickým průměrem výsledků pro koncentrace NaCl 10, 15, 25 a 60 mg/ml vypočtena na 10,59 mg/l NH<sub>4</sub>-N.
- LC50 mědi pro glochidia *Anodonta anatina* byla aritmetickým průměrem výsledků pro koncentrace NaCl 10, 15, 25 a 60 mg/ml vypočtena na 29,75 µg/l Cu<sup>2+</sup>.
- Byly stanoveny vhodné koncentrace NaCl pro indikaci životaschopnosti glochidií *Anodonta anatina*, a to 10, 15, 25 a 60 mg/ml. Zpočátku testovaná koncentrace NaCl 5 mg/ml se ukázala jako nedostatečná.

Tato bakalářská práce přináší první informace o akutní toxicitě několika významných znečišťujících látek pro larvální stádia druhu *Anodonta anatina*. Metodické poznatky je možné využít při testování vlivu dalších látek a jako podklad pro studium chronické toxicity.

## 8 Literatura

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2021a. Nitrate and nitrite. Available from <https://wwwn.cdc.gov/TSP/substances/ToxSubstance.aspx?toxid=258> (accessed February 2021)
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2021b. Copper. Available from <https://wwwn.cdc.gov/TSP/substances/ToxSubstance.aspx?toxid=37> (accessed February 2021)
- Aguirre-Martínez GV, DelValls AT, Martín-Díaz ML. 2015. Yes, caffeine, ibuprofen, carbamazepine, novobiocin and tamoxifen have an effect on *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **120**:142–154.
- ANZECC. 2000. Australian and New Zealand guidelines for fresh and marine water quality. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand, Canberra.
- ASTM. 1996. Standard guide for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- ASTM. 2006. Standard guide for conducting laboratory toxicity tests with freshwater mussels. E2455-06. ASTM International, Philadelphia, PA.
- Augspurger T, Dwyer FJ, Ingersoll CG, Kane CM. 2007. Advances and opportunities in assessing contaminant sensitivity of freshwater mussel (Unionidae) early life stages. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**:2025–2028.
- Baker JA, Gilron G, Chalmers BA, Elphick JR. 2017. Evaluation of the effect of water type on the toxicity of nitrate to aquatic organisms. *Chemosphere* **168**:435–440.
- Balogh KV, Salánki J. 1984. The dynamics of mercury and cadmium uptake into different organs of *Anodonta cygnea* L. *Water Research* **18**:1381–1387.
- Barnhart MC. 2006. Bucket of muckets: A compact recirculating system for rearing juvenile freshwater mussels. *Aquaculture* **254**:227–233.
- Bittsánszky A, Pilinszky K, Gyulai G, Komives T. 2015. Overcoming ammonium toxicity. *Plant Science* **231**:184–190.
- Bringolf RB, Raines BK, Ratajczak RE, Haskins DL. 2022. Major ion toxicity to glochidia of common and imperiled freshwater mussel species. *Diversity* **14** (95) DOI: 10.3390/d14020095.
- Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, Lewis RJ. 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**:464–469.



- Carson R. 1962. *Silent Spring*. Fawcett World Library, New York.
- Carter LJ, Harris E, Williams M, Ryan, JJ, Kookana RS, Boxall ABA. 2014. Fate and uptake of pharmaceuticals in soil–plant systems. *Agricultural Food Chemistry* **62**:816–825.
- Clearwater SJ, Thompson KJ, Hickey CW. 2014. Acute toxicity of copper, zinc, and ammonia to larvae (glochidia) of a native freshwater mussel *Echyridella menziesii* in New Zealand. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **66**:213–226.
- Cope WG, Newton TJ, Gatenby CM. 2003. Review of techniques to prevent introduction of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) during native mussel (Unionoidea) conservation activities. *Journal of Shellfish Research* **22**:177–184.
- Doherty FG. 1990. The Asiatic clam, *Corbicula* spp., as a biological monitor in freshwater environments. *Environmental Monitoring and Assessment* **15**:143–181.
- Douda K. 2010. Effects of nitrate nitrogen pollution on Central European unionid bivalves revealed by distributional data and acute toxicity testing. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **20**:189–197.
- Edwards TM, Hamlin HJ. 2018. Reproductive endocrinology of environmental nitrate. *General and Comparative Endocrinology* **265**:31–40.
- European Union (EU). 2008. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and the Council. *Official Journal of the European Union* **L348**:92–97.
- Farris JL, Van Hassel JH. 2019. *Freshwater bivalve ecotoxicology*. CRC Press, Florida.
- Fedorova G, Randak T, Golovko O, Kodes V, Grabicova K, Grabic R. 2014. A passive sampling method for detecting analgesics, psycholeptics, antidepressants and illicit drugs in aquatic environments in the Czech Republic. *Science of the Total Environment* **487**:681–687.
- Freitas R, Almeida N, Pires A, Velez C, Calisto V, Schneider RJ, Esteves VI, Wrona, FJ, Figueira E, Soares AMM. 2015. The effects of carbamazepine on macroinvertebrate species: Comparing bivalves and polychaetes biochemical responses. *Water Research* **85**:137–147.
- Fritts AK, Barnhart MC, Bradley M, Liu N, Cope WG, Hammer E, Bringolf RB. 2014. Assessment of toxicity test endpoints for freshwater mussel larvae (glochidia). *Environmental Toxicology and Chemistry* **33**:199–207.
- Gillis PL, Mitchell RJ, Schwalb AN, McNichols KA, Mackie GL, Wood CM, Ackerman JD. 2008. Sensitivity of the glochidia (larvae) of freshwater mussels to copper: Assessing the effect of water hardness and dissolved organic carbon on the sensitivity of endangered species. *Aquatic Toxicology* **88**:137–145.
- Gilroy VA, Gillis PL, King LE, Bendo NA, Salerno J, Giacomini M, de Solla SR. 2017. The effects of pharmaceuticals on a unionid mussel (*Lampsilis siliquoidea*): An

examination of acute and chronic endpoints of toxicity across life stages. *Environmental Toxicology and Chemistry* **36**:1572–1583.

Golovko O, Kumar V, Fedorova G, Randak T, Grabic R. 2014. Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant. *Chemosphere* **111**:418–426.

Grabicova K, Grabic R, Blaha M, Kumar V., Cervený D, Fedorova G, Randak T. 2015. Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water Research* **72**:145–153.

Grabicova K, Lindberg RH, Östman M, Grabic R, Randak T, Larsson DGJ, Fick J. 2014. Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant. *Science of the Total Environment* **488**:46–50.

Gros M, Rodríguez-Mozaz S, Barceló D. 2012. Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1248**:104–121.

Haag WR. 2012. North American freshwater mussels; Natural history, ecology and conservation. Cambridge University Press, New York.

Hansten C, Heino M, Pynnönen K. 1996. Viability of glochidia of *Anodonta anatina* (Unionidae) exposed to selected metals and chelating agents. *Aquatic Toxicology* **34**:1–12.

Hashim NH, Mohamat-Yusuff F, Joni AA, Mohd K, Mohamed KN, Zulkeflee Z, Zahmir Zulkifli S. 2020. Determination of median lethal concentration (LC50) and nitrite accumulation in the blood and tissue of blood cockle (*Tegillarca granosa*, Linnaeus 1758). *Water* **12** (2197) DOI: 10.3390/w12082197

Hazelton PD, Du B, Haddad SP, Fritts AK, Chambliss CK, Brooks BW, Bringolf RB. 2014. Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. *Aquatic Toxicology* **151**:27–35.

Heberer T. 2002. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology* **266**:175–189.

Himmelsbach M, Buchberger W, Klampfl CW. 2006. Determination of antidepressants in surface and waste water samples by capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection after preconcentration using off-line solid-phase extraction. *Electrophoresis* **27**:1220–1226.

Holwerda D, Herwig H, Zandee D. 1985. Effects of dichloride (DBTC) on *Anodonta anatina*. *Marine Environmental Research* **17**:200–201.

- Horsák M, Juříčková L, Beran L, Čejka T, Dvořák L. 2010. Annotated list of mollusc species recorded outdoors in the Czech and Slovak Republics. *Malacologica Bohemoslovaca* **1**:1–37.
- Huebner JD, Pynnönen KS. 1992. Viability of glochidia of two species of *Anodonta* exposed to low pH and selected metals. *Journal of Zoology* **70**:2348–2355.
- Chen L, Heath AG, Neves R. 2001. Comparison of oxygen consumption in freshwater mussels (Unionidae) from different habitats during declining dissolved oxygen concentration. *Hydrobiologia* **450**: 209–214.
- Christensen AM, Faaborg-Anderson S, Ingerslev F, Baun A. 2007. Mixture and single-substance toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors toward algae and crustaceans. *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**:85–91.
- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research* **42**:3498–3518.
- Kat PW. 1984. Parasitism and the Unionacea (Bivalvia). *Biological Reviews* **59**:189–207.
- Klancar A, Trontelj J, Kristl A, Justin MZ, Roskar R. 2016. Levels of pharmaceuticals in Slovene municipal and hospital wastewaters: A preliminary study. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **67**:106–115
- Kopp R, Hilscherová K, Poštulková E. 2015. *Základy vodní ekotoxikologie*. Mendelova univerzita, Brno.
- Kořístková B, Grundmann M. 2006. Metodika studia spotřeby léků. *Klinická farmakologie a farmacie* **20**:219–222.
- Kožíšek F. 2003. *Studna jako zdroj pitné vody: Příručka pro uživatele domovních a veřejných studní*. Praha: Státní zdravotní ústav.
- Kümmerer K. 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *Environmental Management* **90**:2354–2366.
- Kvaček Z. 2000. *Základy systematické paleontologie I. Paleobotanika, paleozoologie bezobratlých*. Karolinum, Praha.
- Lamas JP, Salgado-Petinal C, Garcia-Jares C, Llompарт M, Cela R, Gomez M. 2004. Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of selective serotonin reuptake inhibitors in environmental water. *Journal of Chromatography A* **1046**:241–247.
- Lozoya AVD, Araujo R. 2011. How the naiad was drawn: S pre-linnean iconography of freshwater mussels. *Malacologia* **53**:381–402.
- Mackie GL. 1984. Bivalves. *The Mollusca* **7**:351–418.

- Markich SJ. 2017. Sensitivity of the glochidia (larvae) of freshwater mussels (Bivalvia: Unionida: Hyriidae) to cadmium, cobalt, copper, lead, nickel and zinc: Differences between metals, species and exposure time. *Science of The Total Environment* **602**:1427–1436.
- Mayo AL, Ritter DJ, Bruthans J, Tingey D. 2019. Contributions of commercial fertilizer, mineralized soil nitrate, and animal and human waste to the nitrate load in the Upper Elbe River Basin, Czech Republic. *HydroResearch*, **1**:25–35.
- McKim JM. 1985. Early life stage toxicity tests. *Fundamentals of Aquatic Toxicology* **1**:58–95.
- Metcalf CD, Chu SG, Judt C, Li HX, Oakes KD, Servos MR, Andrews DM. 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**:79–89.
- Moore AP, Bringolf RB. 2018. Effects of nitrate on freshwater mussel glochidia attachment and metamorphosis success to the juvenile stage. *Environmental Pollution* **242**:807–813.
- Mouthon J. 1996. Molluscs and biodegradable pollution in rivers: Studies into the limiting values of 11 physicochemical variables. *Hydrobiologia* **319**:57–63.
- MŽP. 2018. Rámcový program monitoringu. Ministerstvo životního prostředí ČR, Praha.
- Pavlíková D, Pavlík M, Matějů L, Balík J. 2009. *Ekotoxikologie*. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Pelikán V. 1983. *Ochrana podzemních vod*. 1. vyd. SNTL, Praha.
- Pitter P. 2015. *Hydrochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha.
- Rathke J. 1797. *Naturhistorie Selskabets Skrifter*. Om Dam-Muslingen, Oslo.
- Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. 2015. Dose-response analysis using R. *PLoS One* **10** (e0146021) DOI: 10.1371/journal.pone.0146021
- Rivera-Utrilla J, Sánchez-Polo M, Ferro-García MÁ, Prados-Joya G, Ocampo-Pérez R 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* **93**:1268–1287.
- Segura PA, MacLeod SL, Lemoine P, Sauvé S, Gagnon C. 2011. Quantification of carbamazepine and atrazine and screening of suspect organic contaminants in surface and drinking waters. *Chemosphere* **84**:1085–1094.
- Sehonova P, Svobodova Z, Dolezelova P, Vosmerova P, Faggio C. 2018. Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: A review. *Science of The Total Environment* **632**:789–794.

- Schultz M, Furlong ET. 2008. Trace analysis of antidepressant pharmaceuticals and their select degradates in aquatic matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Analytical Chemistry* **80**:1756–1762.
- Simundic AM. 2008. Confidence interval. *Biochemia Medica* **18**:154–161.
- Sparling DW. 2016. *Ecotoxicology essentials: Environmental contaminants and their biological effects on animals and plants*. Academic Press, Carbondale.
- Styrishave B, Halling-Sørensen B, Ingerslev F. 2011. Environmental risk assessment of three selective serotonin reuptake inhibitors in the aquatic environment: A case study including a cocktail scenario. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30**:254–261.
- ŠeffEROVÁ M. 2017. The impact life of antidepressant (sertraline) on *Daphnia magna* history traits under different food levels [Bachelor thesis]. Jihočeská univerzita, České Budějovice.
- Trdan RJ. 1981. Reproductive biology of *Lampsilis radiata siliquoidea* (Pelecypoda: Unionidae). *American Midland Naturalist* **1**:243–248.
- UNEP. 2014. Review of existing water quality guidelines for freshwater ecosystems and application of water quality guidelines on basin level to protect ecosystems. UNEP - UN Environment Programme, Kenya.
- USEPA. 2022. National recommended water quality criteria. USEPA, Washington, D.C. Available from <https://www.epa.gov/wqc/national-recommended-water-quality-criteria-aquatic-life-criteria-table#table> (accessed February 2022)
- ÚZIS. 2022. Psychoaktivní látky. Národní informační zdravotnický portál, Praha. Available from <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/2197> (accessed March 2022)
- Vasskog T, Berger U, Samuelsen, PJ, Kallenborn R, Jensen E. 2006. Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø. *Journal of Chromatography A* **1115**:187–195.
- Wang N, Greer E, Whites D, Ingersoll CG, Roberts A, Dwyer J, Augspurger T, Kane C, Tibbott C. 2003. An evaluation of the viability of glochidia after removal from mussels. Pages 16-19 in Symposium in Durham. The Freshwater Mollusk Conservation Society, New York City.
- Wang N, Ingersoll CG, Ivey CD, Hardesty DK, May TW, Augspurger T, Barnhart MC. 2010. Sensitivity of early life stages of freshwater mussels (Unionidae) to acute and chronic toxicity of lead, cadmium, and zinc in water. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**:2053–2063.
- Wang N, Mebane CA, Kunz JL, Ingersoll CG, Brumbaugh WG, Santore RC. 2007. Influence of dissolved organic carbon on toxicity of copper to a unionid mussel (*Villosa iris*) and a cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) in acute and chronic water exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30**:2115–2125.

- Wiegel S, Aulinger A, Brockmeyer R, Harms H, Löffler J, Reincke, H, Wanke A. 2004. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere*, **57**:107–126.
- Wilkinson JL, Boxall AB, Kolpin DW, Leung, KM, Laj RW, Galbán-Malagón C, Teta C. 2022. Pharmaceutical pollution of the world's rivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **119**:e2113947119.
- Wilkinson L, Wills D, Rope D, Norton A, Dubbs R. 2005. *The grammar of graphics (statistics and computing)*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wood EM. 1974. Development and morphology of the glochidium larva of *Anodonta cygnea* (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Zoology* **173**:1–13.
- Wu YJ. 2012. Heterocycles and medicine. *Progress in Heterocyclic Chemistry* **1**:1–53.
- Wurtz CB. 1955. Stream biota and stream pollution. *Sewage and Industrial Wastes* **27**:1270–1278.
- Yang Y, Ok YS, Kim KH, Kwon EE, Tsang TF. 2017. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment* **597**:303–320.
- Zimmerman LL, Neves RJ. 2002. Effects of temperature on the longevity and viability of glochidia of freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae). *American Malacological Bulletin* **17**:31–35.

## 9 Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obr. 1 Schéma anatomie mlže (Kvaček 2000) .....	15
Obr. 2 Skleněné kádinky (250 ml) použité pro exponovaná glochidia.....	27
Obr. 3 Ing. Juan Felipe Escobar Calderón při záznamu behaviorální reakce glochidií .....	28
Obr. 4 Otevřené glochidium .....	28
Obr. 5 Uzavřené glochidium .....	28
Obr. 6 Zpracování fotografie v Image J .....	29
Tab. 1 Shrnutí testovacích podmínek .....	26
Tab. 2 Hodnoty LC50 NO <sub>3</sub> -N.....	34
Tab. 3 Hodnoty LC50 Cu <sup>2+</sup> .....	35
Tab. 4 Hodnoty LC50 NH <sub>4</sub> -N.....	35
Graf 1 Kaarbamazepin a expozice NaCl v čase 0 s .....	32
Graf 2 Karbamazepin a expozice NaCl v čase 180 s .....	33
Graf 3 Sertralin a expozice NaCl v čase 0 s .....	33
Graf 4 Sertralin a expozice NaCl v čase 180 s .....	34

## 10 Seznam použitých zkratek a symbolů

<b>APHA</b>	- Americká asociace veřejného zdraví
<b>ASTM</b>	- ASTM International, Americká společnost pro testování a materiály
<b>CBZ</b>	- Karbamazepin
<b>ČOV</b>	- Čistička odpadních vod
<b>EQS</b>	- Standardy environmentální kvality v EU
<b>ISO</b>	- Mezinárodní organizace pro normalizaci
<b>LSD</b>	- Diethylamid kyseliny lysergové
<b>OECD</b>	- Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
<b>TCA</b>	- Tricyklická antidepresiva
<b>USEPA</b>	- Agentura pro ochranu životního prostředí v USA
<b>WHO</b>	- Světová zdravotnická organizace