

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Využití mikrorespirometrie u sladkovodních mlžů**

**Bakalářská práce**

**Tereza Seidlová**

**Akvakultura a péče o vodní ekosystémy**

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

**© 2023 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití mikrorespirometrie u 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 20.4.2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Karlu Doudovi, Ph.D. za čas věnovaný konzultacím, vstřícný přístup a za cenné rady při zpracování této práce. Také bych ráda poděkovala za příležitosti a získané zkušenosti při zapojení se do činnosti na projektech. Dále bych vyjádřila obrovské díky mé rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

# Využití mikrorespirometrie u sladkovodních mlžů

## Souhrn

Bakalářská práce je rozdělena na dvě části, a to na literární rešerši a experimentální část. Literární rešerše se zabývá uvedením testovaného druhu slávičky mnohotvárné (*Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), použitého toxikantu (mědi), technickým popisem mikrorespirometrického zařízení a konkrétním studiím s vodními organismy. V poslední části literární rešerše je popsána převážná část fyziologie sladkovodních mlžů, která je nutná pro pochopení souvislostí v respirometrických výstupech.

Experimentální práce je zaměřena na metodickou stránku mikrorespirometrie, konkrétně na navrzení různých metod pro zlepšení promíchávání v mikrorespirometrických jamkách. Byly navrzeny 2 typy promíchávání – kontinuální a přerušované, přičemž se pro vyšší efektivitu do polovičního počtu jamek umístila skleněná kulička o rozměru 3 mm. Aby se předešlo zastínění bodového senzoru, byl navržen stoper – zarážka, která udržovala mlže mírně nade dnem jamky.

Nejprve bylo nezbytné navzorkovat jedince *Dreissena polymorpha* v terénu, následně proběhla aklimatizace v laboratorních podmínkách po dobu 5 dnů, a to zejména z hlediska nastavení experimentální teploty. Po aklimatizační periodě se mlži *Dreissena polymorpha* exponovali roztoku  $\text{CuSO}_4$  po dobu 24 hodin a na základě mortalit se určily hladiny mědi vhodné pro mikrorespiometrii. Celkem byly použity čtyři koncentrace mědi, a to 400, 800, 1600 a 3200  $\mu\text{g/l Cu}^{2+}$ . Pro zachycení vlivu koncentrace byli použiti kontrolní jedinci (0  $\mu\text{g/l Cu}^{2+}$ ), kteří měli stejné podmínky jako exponovaní mlži. Celkem byla uskutečněna čtyři měření. V 1. a 3. trialu se použilo kontinuální míchání – orbitální míchač byl zapnut po celou dobu měření. Ve 2. a 4. trialu bylo naopak použito přerušované míchání – orbitální míchač byl uváděn do chodu jen ve stanovené časy měření.

Bylo zjištěno, že měď v koncentracích 800 a 1600  $\mu\text{g/l Cu}^{2+}$  měla významný vliv na metabolismus. Spotřeba kyslíku byla u exponovaných jedinců nižší než u kontroly, což poukazuje na poškození organismu. Z hlediska vlivu míchání nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl v použitých způsobech.

Přítomnost kuličky měla významný vliv na respiraci, spotřeba kyslíku byla nižší a data byla více stejnorodá. Za nepřítomnosti kuličky byla zaznamenána vyšší respirace a vyšší různorodost v datech.

Tato práce přináší nové poznatky ohledně testování invazního druhu *Dreissena polymorpha* v mikrorespirometrickém zařízení Loligo Systems. Na základě metodických informací lze provést další experimenty s respirací se zaměřením na menší druhy sladkovodních mlžů, či na juvenilní jedince.

**Klíčová slova:** *Dreissena polymorpha*, mikrorespirometrie, metabolismus, kyslík, měď

# The Use of Microrespirometry in Freshwater Bivalves

## Summary

This bachelor thesis is divided into two parts: literature review and the experimental part. The literature analysis focuses on the introduction of the tested species the zebra mussel (*Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) and the toxicant used (copper), as well as the technical descriptions of the microrespirometric equipment and specific studies of aquatic organisms. In the last part of the literature review, most of the physiology of freshwater bivalves is described, which is necessary to understand the context in respirometric output.

The experimental work focuses on the methodological aspect of microrespirometry, specifically proposing different methods to improve mixing in microrespirometric wells. Two types of mixing were suggested, continuous and intermittent, with a 3 mm glass bead placed in half of the wells for greater efficiency. To avoid shadowing the sensor spot, a stopper was designed to keep the bivalve slightly above the bottom of the well.

First, it was necessary to collect the *Dreissena polymorpha* specimens in the field, followed by a 5-day acclimatization period in laboratory conditions, especially in terms of experimental temperature settings. After the acclimatization period, the mussels were exposed to the CuSO<sub>4</sub> solution for 24 hours and the copper levels suitable for microrespirometry were then determined based on the mortality levels. A total of four copper concentrations were used: 400, 800, 1600, and 3200 µg/l Cu<sup>2+</sup>. Control specimens (0 µg/l Cu<sup>2+</sup>) were used to plot the effect of concentration, while the conditions were the same as with the exposed bivalves. A total of four measurements were performed. In trials 1 and 3, continuous mixing was used – the orbital shaker was on for the entire measurement time. In contrast, in trials 2 and 4 intermittent mixing was used – the orbital shaker was turned on at the specified measurement times only.

It was found that copper at concentrations of 800 and 1600 µg/l Cu<sup>2+</sup> had a significant effect on metabolism. The oxygen consumption was lower in the exposed specimens than in the control group, indicating damage to the organism. In terms of the mixing effect, there was no significant difference in the methods used.

The presence of the bead had a significant effect on respiration, the oxygen consumption was lower, and the data were more homogeneous. In the absence of the bead, there were higher respiration and greater heterogeneity in the data.

This thesis presents new knowledge about the testing of the invasive species *Dreissena polymorpha* in the Loligo Systems microrespirometric device. Based on the methodological information, future respiration experiments can be conducted focusing on smaller freshwater bivalve species or juveniles.

**Keywords:** *Dreissena polymorpha*, microrespirometry, metabolism, oxygen, copper

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Slávička mnohotvárná (<i>Dreissena polymorpha</i>) .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Měď .....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Technické parametry mikrorespirometrického systému .....</b>	<b>12</b>
3.3.1 Popis systému .....	12
3.3.2 SDR čtečka .....	12
3.3.3 Orientační rám destičky .....	12
3.3.4 Skleněná destička .....	12
3.3.5 Silikonový blok .....	13
3.3.6 Kompresní blok .....	13
3.3.7 Doplnkový materiál .....	13
3.3.7.1 Náhradní bodové senzory .....	13
3.3.7.2 Programovatelný míchač .....	13
3.3.7.3 Vodní lázeň na destičku .....	13
3.3.7.4 PCR těsnicí fólie .....	14
<b>3.4 Využití mikrorespirometrie u vodních organismů .....</b>	<b>14</b>
3.4.1 Jikry ryb .....	14
3.4.2 Mlži .....	15
3.4.3 Sladkovodní krevety .....	17
<b>3.5 Fyziologie sladkovodních mlžů .....</b>	<b>17</b>
3.5.1 Lastury .....	17
3.5.2 Cévní soustava .....	18
3.5.3 Žábry .....	18
3.5.4 Noha .....	19
3.5.5 Vylučování a osmoregulace .....	19
3.5.6 Potrava a trávení .....	20
3.5.7 Reprodukce .....	20
3.5.8 Nervová soustava .....	21
3.5.9 Sezónní fyziologické pochody .....	21
3.5.10 Diurnální cykly .....	22
3.5.11 Další faktory ovlivňující metabolismus .....	22
<b>4 Metodika .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Testované organismy .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Měď a její cílové koncentrace .....</b>	<b>24</b>

<b>4.3</b>	<b>Průběh testování.....</b>	<b>24</b>
4.3.1	Příprava expozice $\text{Cu}^{2+}$ .....	24
4.3.2	Přípravy na experiment s mikrorespiometrem .....	26
4.3.2.1	Kontinuální promíchávání .....	28
4.3.2.2	Přerušované míchání .....	28
4.3.3	Zahájení mikrorespiometrie.....	28
4.3.4	Průběh mikrorespiometrického měření .....	29
<b>4.4</b>	<b>Analýza dat .....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>32</b>
5.1	Vliv koncentrací mědi .....	33
5.2	Vliv způsobu promíchávání.....	34
5.3	Vliv přítomnosti kuličky .....	35
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>36</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 a tabulek .....</b>	<b>47</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>48</b>

# 1 Úvod

Sladkovodní mlži jsou nedílnou součástí diverzity vodních ekosystémů, ale jejich výskyt a početnost jsou dány především fyzikálně-chemickými parametry vody (Shukla et al. 2018). Mlži mohou ovlivňovat struktury potravního řetězce, a to především tím, že recyklují živiny. Přemnožení či vymizení vede k narušení rovnováhy ekosystémů (Pouil et al. 2021). V některých zemích se využívají jako zdroj potravy, léků či na produkci perel (Shukla et al. 2018). Měkké tkáně či schránky mlžů akumulují antropogenní látky, což může sloužit pro monitorování životního prostředí (Shukla et al. 2018).

Akvatické systémy jsou ohroženy jednak z hlediska znečištění, tak i z hlediska hrozby nepůvodních druhů. Názorným příkladem jsou invazní druhy vyskytující se v České republice, a to slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana* (I. Lea, 1834) a korbikula asijská (*Corbicula fluminea* (O. F. Müller, 1774)). Invaze jsou často bez povšimnutí, ale působí obrovské škody na napadených ekosystémech. Odstranění těchto druhů z prostředí je již nemožné. Mezi účinné metody potlačení patří informovanost veřejnosti o identifikaci druhů. Opatrnost při převozech násad ryb je dalším klíčovým faktorem prevence, neboť ryby mohou být infikovány larvami mlžů (Beran 2017). Dalším ohrožením jsou antropogenní látky, které jsou produkovány lidskou činností. Ty ohrožují zejména zdraví organismů (Boyd et al. 2023).

Z hlediska detekce polutantů se dají mlži efektivně využít pro biologické systémy včasného varování, a to díky jejich filtračním schopnostem, citlivosti na znečišťující látky, dlouhověkosti a vysoké početnosti. V ekotoxikologických studiích převládají dva sledované parametry – četnost otevírání lastur měřená pomocí elektromagnetických metod a srdeční aktivita, která je měřena pomocí fotopletysmografie, která funguje na principu prostupu infračerveného světla (Vereycken & Aldridge 2023). Co se týká vlivu na organismus, tak mezi měřitelné znaky zdraví se řadí rychlost metabolismu, která souvisí s životním tempem. Rychlost metabolismu lze definovat jako využití energie a její přeměny, které se napříč druhy liší (Pettersen et al. 2016). V důsledku působení xenobiotik je organismus zatížen a energie, která je nutná pro reprodukční procesy, je využita na biotransformaci a buněčné opravy (Boyd et al. 2023). Jednou z možných metod pro nepřímé měření metabolismu je míra spotřeby kyslíku (Varshney et al. 2022; Pettersen et al. 2016).

Míra spotřeby kyslíku je důležitým ukazatelem stavu organismu. Pokud množství kyslíku klesne pod normoxickou hladinu (běžnou), jedná se o hypoxii. Vodní organismy jsou schopné se proti hypoxii ubránit snížením rychlosti metabolismu a snížením lokomoce. Naopak zvýšení spotřeby kyslíku je přímým měřítkem stresu (Varshney et al. 2023). Účinnou metodou pro měření spotřeby kyslíku je respirometrie. U menších organismů se uplatňuje mikrorespirometrie, kde nachází využití zařízení od firmy Loligo Systems, která nabízí nedestruktivní metodu pro měření dýchání individuálních organismů v čase.



## **2 Cíl práce**

Hlavním cílem bakalářské práce bylo použití mikrorespirometrie u sladkovodního mlže menších rozměrů za působení běžně se vyskytujícího toxikantu v různých koncentracích.

Uplatnilo se zde zařízení Loligo Microplate Respirometry System. Důraz byl kladen zejména na metodickou stránku mikrorespirometrie. Konkrétně navrhnoutí různých metod pro zlepšení promíchávání v mikrorespirometrických jamkách a porovnání jejich efektu mezi sebou.

V závěru práce bude vyhodnocení naměřených výsledků.

### 3 Literární rešerše

Literární rešerše je rozdělena do několika kapitol, které se postupně věnují druhu a použitému toxikantu k experimentu. Dále zde popisují technické parametry mikrorespirometrického zařízení a v další kapitole už pojednávám o konkrétních pokusech na akvatických organismech. V neposlední řadě jsem zahrнула rozsáhlou kapitolu o fyziologii sladkovodních mlžů, důraz byl kladem zejména na podkapitoly o metabolismu.

#### 3.1 Slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*)

*Dreissena polymorpha* je v ČR považována za nepůvodní a nebezpečný invazní druh. V oblasti Moravy je pravděpodobně původní, pocházející z ponto-kaspické oblasti neboli z dolních úseků Černého a Kaspického moře. U povodí Labe došlo k introdukci z Německa, zejména lodní dopravou (Beran 2018).

Velikostně se jedná o menšího mlže, kdy lastura dosahuje délky 2,6-3 (až 5) cm, šířky 1,3-1,5 cm a tloušťky až 1,7 cm (Beran 2018). Lastura je trojhranného tvaru s tmavohnědými klikatými čarami (Beran 2018). Vývoj probíhá přes neparazitickou plovoucí larvu zvanou veliger. U druhu *Dreissena polymorpha* došlo k redukci jednoho svěřacího svalu, tím dochází k otevírání lastury směrem nahoru. Noha, která u mlžů slouží k rytí, je také redukována (Horsák 2013). Do možných míst výskytu řadíme pomale tekoucí, stojaté nížinné vody nebo umělé nádrže (Horsák 2013). Obecně obývá mnoho druhů stanovišť jako větší řeky, pískovny, lomy, přehradní nádrže, kde žije přisedlým způsobem života (Beran 2018). Vyhledává spíše méně organicky zatížené vody, to znamená, že s narůstající eutrofizací mizí i její pole výskytu. Dnes ji považujeme za druh silně přemnožený zejména v řece Labi (Horsák 2013).

Nebezpečí tkví v tom, že se ve vodách s původními druhy dokáže vyskytovat v obrovských populačních hustotách. Přisedá na schránky, například velevrubů nebo škeblí v blízkosti přijímacího otvoru a znesnadňuje tak výměnu vody, dýchání a příjem potravy (Burlakova et al. 2022). Dalším negativním vlivem podle Kůse et al. (2021) jsou technické problémy související s výskytem, jako zvýšená koroze povrchů spojená s nemožností čištění, neprůchodnost chladicích zařízení a s tím spojené riziko přehřátí a dále znemožnění průchodnosti potrubí. Beran (2018) ve své práci uvádí, že zvýšená koroze může být způsobena bakteriemi mezi pružnými nitovitými vlákny (byssovými vlákny), pomocí nichž se *Dreissena polymorpha* přichycuje k podkladu. A to z důvodu, že tyto bakterie produkují acidifikující látky.

Při vysokých populačních hustotách dále ovlivňují lodní dopravu a rybářství, kdy dochází k porůstání částí lodí a rybářských sítí. V neposlední řadě hrozí riziko poranění člověka při koupání (Beran 2018). Ditrich et al. (2010) představuje fakt, že mlži druhu *Dreissena polymorpha* mohou být pozitivním prvkem prostředí jako filtrátoři nebezpečných patogenů. V jejich experimentech se zaměřili na dva invazní druhy, a to slávičku mnohotvárnou (*Dreissena polymorpha*) a škeblici asijskou (*Sinanodonta woodiana*). Zjistili, že oba druhy účinně filtrují oocysty kryptosporidií, ale jde o dlouhodobý proces. K odstranění v systému došlo po 22. dni a s klesající teplotou klesala i rychlost odstraňování (Ditrich et al. 2010).

## 3.2 Měď

Měď, jakožto zástupce těžkých kovů je pro vodní organismy silně toxická látka (Hartman et al. 2005). Přirozeně se vyskytuje ve formě sulfidů (chalkopyrit a chalkosin) a díky rozkladu se tak může dostávat do podzemních vod (Kopp et al. 2015).

Do vod se dostává měď i antropogenně, a to z odpadních vod. Příkladem takového znečištění jsou povrchové úpravy kovů a zemědělství, ve kterém se hojně využívají pesticidy. Mezi neopomenutelné zdroje patří atmosférické spady v okolí hutních závodů, voda z měďnatých střeš a okapů. Ve vodě se může vyskytovat v iontové formě  $\text{Cu}^{2+}$ , hydroxokomplexů a uhličitanových komplexů. Toxicita mědi je ovlivněna zejména rozpustností dané sloučeniny. Pokud bude sloučenina málo rozpustná či nerozpustná, nedochází k pronikání do organismu (Kopp et al. 2015). Toxicita mědi se snižuje při vyšším obsahu organických látek a při vyšším pH a KNK (kyselinová neutralizační kapacita), kdy dochází k vytváření málo rozpustných sloučenin (Hartman et al. 2005). S délkou expozice stoupá i akutní toxicita (Kopp et al. 2015).

Pokud se ve vodách vyskytnou vysoké koncentrace mědi, dochází tak k narušení homeostáze sodíku a ovlivnění celkové funkce žaber. Při vysokých dávkách mědi v přijaté potravě negativně působí na trávicí enzymy, přerušuje se jejich funkce a je inhibována vazba na proteiny. Za nejcitlivější organismy jsou považováni vodní měkkýši (Kopp et al. 2015).

V předešlých letech se v rybářském odvětví hojně užíval přípravek Kuprikol 50 k odstraňování sinic, vegetačního zákalu a jako antiparazitikum. Účinnost Kuprikolu je závislá na celé škále faktorů, stejně jako toxicita mědi, je tedy velice obtížné určit aplikační dávku. Vzhledem k problematické dávce a toxicitě pro vodní ekosystémy byl tento přípravek zakázán (Kopp et al. 2015). Dalším hojně využívaným algicidním přípravkem je síran měďnatý. Využívá se zejména pro regulaci růstu sinic, zelených řas a rozsivek. Pro vodní měkkýše jsou letální koncentrace kolem 15  $\mu\text{g/l}$  (Kopp et al. 2015). Podle zákona č. 61/2003 Sb. v platném znění je maximální přípustná norma u povrchových vod 14  $\mu\text{g/l}$  (Kopp et al. 2015). V roce 2017 došlo k přepracování 19 let staré normy kvality vod – Klasifikace kvality tekoucích povrchových vod za účelem revize (Hanslík et al. 2017). Nově stanovené hodnoty mědi pro jednotlivé třídy jakosti vody jsou uvedeny v Tab. 1.

**Tab. 1** Stanovené normy pro jednotlivé třídy kvality tekoucích povrchových vod

	<b>I. neznečištěná voda</b>	<b>II. mírně znečištěná voda</b>	<b>III. znečištěná voda</b>	<b>IV. silně znečištěná voda</b>	<b>V. velmi silně znečištěná voda</b>
měď (celkový vzorek) [ $\mu\text{g/l}$ ]	< 5	< 15	< 30	< 60	$\geq 60$
měď (rozp. fáze) [ $\mu\text{g/l}$ ]	< 3	< 8	< 16	< 32	$\geq 32$

Zdroj: Vodohospodářské technicko-ekonomické informace (2017)

### 3.3 Technické parametry mikrorespirometrického systému

V této kapitole se zaměříme na charakteristiku a popis zařízení od firmy Loligo Systems (Loligo systems 2023).

#### 3.3.1 Popis systému

Mikrorespirometrický systém měří individuální dýchání v reálném čase u menších organismů. Jako jsou například jikry dánie pruhovaného (*Danio rerio* (Fowler, 1934), hrotnatky (*Daphnia*), obecně se jedná o embrya ryb, anebo hmyz octomilky (*Drosophila*), či hlístice (*Caenorhabditis*). Lze tedy testovat jak terestrické, tak i vodní organismy. A to na základě 24-kanálového optického fluorescenčního zařízení pro snímání kyslíku (Turner et al. 2019). Organismy jsou individuálně umístěny do vzduchotěsných skleněných komůrek o objemu 80-1700  $\mu\text{l}$  na jednu jamku (Loligo systems 2023). Zde dochází k měření rychlosti spotřeby kyslíku v čase. V každé jamce je umístěn neinvazivní, nedestruktivní a opakovatelně použitelný bodový senzor, který lze znovu kalibrovat a sterilizovat pro více pokusů. Destička a čtečka se umísťují do inkubátoru pro regulaci teploty, nebo do průtočné vodní lázně, nebo se použije oběhové čerpadlo s chlazením (Turner et al. 2019; Loligo Systems 2023). Horní část destičky se překrývá nejdříve PCR fólií a poté měkkým silikonovým těsněním (Turner et al. 2019). Ke čtečce lze řetězově připojit až 9 dalších čteček a tímto je možno měřit spotřebu kyslíku až ve 240 jamkách z jediného počítače. Postup je takový, že se na první čtečku napojí pomocí kabelů dalších 9 čteček, docílíme tedy celkového počtu  $10 \times 24 = 240$  jamek celkově (Loligo systems 2023).

#### 3.3.2 SDR čtečka

SDR čtečka je zařízení sloužící k detekci kyslíku či pH. Hodnoty se odečítají přes průhledné dno mikrodestičky. Přístroj je opatřen 24 integrovanými senzory (Presens Precision Sensing 2023).

#### 3.3.3 Orientační rám destičky

Rámeček se přikládá těsně ke čtečce, aby udržel skleněnou destičku na místě tak, aby bylo 24 jamek přesně vycentrovaných přímo nad 24 světelnými LED zdroji pro optimální snímání. Rám je určen pro systémy, kde se využívá inkubátor, není potřeba pokud se k regulaci teploty používá průtočná vodní lázeň (Loligo systems 2023).

#### 3.3.4 Skleněná destička

Mikrodestička s 24 jamkami je určena pro měření respirace u drobných organismů. Každá jamka je osazena bodovým senzorem a umožňuje tak neinvazivní optické měření kyslíku po umístění destičky na speciální čtečku. Z hlediska materiálu se jedná o borosilikátové sklo. Destička je k dostání s různými objemy jamek, a to: 80, 200, 500, 940 a 1700  $\mu\text{l}$ . Dle toho se dá měřit respirace u různě velkých organismů. Rozměr destičky je vždy 120 x 80 (délka/šířka), výška se mění u jednotlivých objemů, viz Tab. 2. Sensory se dají vyčistit chlórem či ethanolem mezi jednotlivými pokusy (Loligo systems 2023).

**Tab. 2** Technická data jednotlivých skleněných destiček dostupných na webových stránkách Loligo Systems

Objem jamky ( $\mu\text{l}$ )	80	200	500	940	1700
Délka (mm)	120	120	120	120	120
Šířka (mm)	80	80	80	80	80
Výška (mm)	7	9	12	14	17
Vnitřní průměr jamky (mm)	4,5	6	8	10	12
Hloubka jamky (mm)	5	7	10	12	15

Zdroj: Loligo Systems (2023)

### 3.3.5 Silikonový blok

Měkká silikonová podložka slouží jako kompresní těsnění respirometrických jamek destičky. Je vyrobena z netoxického silikonového materiálu. K vyčištění je doporučeno použít mýdlo (Loligo systems 2023).

### 3.3.6 Kompresní blok

Blok se umísťuje na měkké silikonové těsnění, dojde tak k dostatečnému tlaku pro vzduchotěsné utěsnění (Loligo systems 2023).

### 3.3.7 Doplnkový materiál

#### 3.3.7.1 Náhradní bodové senzory

Senzory jsou kompatibilní se všemi typy mikrodestiček (objemy 80-1700  $\mu\text{l}$ ). Lze jimi nahradit poškozené či vybledlé senzory v destičce (Loligo systems 2023).

#### 3.3.7.2 Programovatelný míchač

Jedná se o programovatelné třepací zařízení s třemi typy pohybu, konkrétně s orbitální 3D rotací, recipročním 3D pohybem a jemným vibračním kýváním plošiny. Tyto 3 typy pohybů lze spustit samostatně, nebo párově, či se sekvence všech tří pohybů může periodicky opakovat. Plošina je protiskluzová a teplotně odolná, tím zajišťuje stabilní polohu umístěných objektů během třepání. Pracuje v teplotním rozmezí od +4 °C až +40 °C. Umožňuje používání v inkubátorech a v chladících místnostech. Pomocí tohoto zařízení se dá docílit míchání média uvnitř skleněných jamek, kdy pro optimální účinky se doporučuje 3D orbitální typ rotace (Loligo systems 2023).

#### 3.3.7.3 Vodní lázeň na destičku

Vodní lázeň slouží k provedení průtočné mikrorespirometrie pro jednu destičku, kdy těsně přiléhá ke čtečce a zajišťuje tak, že 24 senzorů přesně dosedá na 24 LED světelných zdrojů. Na destičku musí být nanесena PCR fólie, silikonový blok a kompresní blok. Lázeň má dva vstupy pro připojení chlazené či ohříváné vody nad destičkou, což umožňuje měření rychlosti respirace při jakékoli požadované teplotě (Loligo systems 2023).

#### 3.3.7.4 PCR těsnící fólie

Hlavní funkcí PCR fólie je utěsnění mikrodestičky. Mezi další funkce patří zabránění rozlití, znečištění a snižuje odpařování vzorku. Mezi poslední doplňkové vybavení patří váleček pro lepší nanášení těsnící fólie (Loligo Systems 2023).

### 3.4 Využití mikrorespirometrie u vodních organismů

#### 3.4.1 Jikry ryb

Varshney et al. (2022) využívá mikrorespirometrii ke zjištění vlivu organických sločenin 6PPD a 6PPDQ na spotřebu kyslíku. Což slouží jako nepřímý faktor pro měření výkonnosti metabolismu jiker ryby *Danio rerio*. Organické sloučeniny 6PPD a 6PPDQ jsou používány pro výrobu pneumatik. Produkce pneumatik je celosvětově na vysoké úrovni, tak není složité, aby se mikročástice těchto sloučenin dostaly do vodního prostředí. Embrya byla 96 hodin exponována dohromady 8 koncentracím (0, 1, 10 a 25 µg/l) a pro srovnání byla vždy vymezena skupina kontrolních jiker, které byly v čisté vodě. Systém byl nakalibrován 24 hodin před měřením. Měření trvalo 3 hodiny a systém byl po celou dobu uzavřen v inkubátoru. Výsledky naznačují zvyšující se trend respirace se zvyšující koncentrací toxikantů. A ačkoliv srdeční aktivita byla nižší, rychlost spotřeby kyslíku byla vyšší. To bylo odůvodněno kompenzací ve prospěch uspokojení kyslíkové potřeby. V prostředí byly evidovány koncentrace kolem 1 µg/l, avšak bylo zjištěno, že to nemělo žádný vliv na zvolené fyziologické parametry (Varshney et al. 2022).

Studie Rothe et al. (2021) se zaměřuje na široce testovaný druh *Danio rerio*. Pokus se týká mikropolutantů v odpadních vodách, kdy konstatují fakt, že se látky dostávají do vodních ekosystémů a mají nepříznivý vliv na ryby či na další akvatické organismy. Proto testovali působení ozonizace na různé typy odpadních vod. Nejsou zde uvedeny žádné nevýhody z hlediska metodiky. Avšak bylo zdůrazněno, že dýchání patří mezi citlivé ukazatele testů ekotoxicity ranných stádií ryb a může přinést hodnotné informace. K samotnému pokusu se použila destička o jednotlivém objemu jamky 80 µl, která byla po celou dobu měření uchována v inkubátoru a každé ošetření bylo provedeno ve 3 opakováních. Výsledkem bylo zjištění, že jikry vystavené odpadní vodě měly vyšší respiraci nežli kontrola. Proto doporučují další testování a možnost zařazení respirace do testů akutní toxicity prováděných na jikrách (Rothe et al. 2021).

Louhi et al. (2023) zmiňuje, že když bude juvenilní jedinec vystaven environmentálním stresorům, tak poté dojde k dalším efektům i v pozdějších fázích života. A proto se zaměřili na lososovitou rybu, a to pstruha obecného (*Salmo trutta* (Linnaeus, 1758)). Nejdříve bylo manipulováno s podmínkami stanoviště a poté byly jikry inkubovány v různých typech substrátu. Jikry byly umístěny do destičky o objemu jednotlivých jamek 2700 µl. Destička byla vložena do 40 litrové vodní lázně pro udržování konstantní teploty. Měření bylo ukončeno, když saturace klesla pod 75 % nasycení. Závěrem studie bylo zjištění, že stres získaný v ranných fázích se projevil i později. Juvenilní jedinci byli menší a měli oproti nestresovaným jedincům vyšší metabolismus (Louhi et al. 2023).

Martin et al. (2020) zkoumal teplotní toleranci jiker lososa čavyča (*Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum, 1792)). V počátečních hypotézách bylo zmíněno, že s rostoucí teplotou

prostředí stoupá i rychlost metabolismu. Narůstá tak spotřeba kyslíku a také se ukazuje, jak omezení kyslíku ovlivňuje charakter embrya. Pro měření se zvolila teplotní škála, do které se vybraly teploty 12; 14,5; 17 °C; jednou týdně po dobu čtyř týdnů. Kromě toho se provedly tři pokusy při 8 °C, aby byla pokryta větší škála teplot a vytvořil se rozsáhlejší odhad teplotní závislosti na rychlosti metabolismu. Před každým pokusem byla během 30 minut teplota vyrovnána na teplotu experimentální. Následně se jikry převedly do skleněné destičky o objemu 1,7 ml (1700 µl). K udržení teploty byla použita průtočná lázeň připojená k vysoce přesnému systému řízení teploty (regulátor + oběhové čerpadlo). K zajištění promíchávání se do každé jamky umístila magnetická tyčinka se skleněným povrchem o průměru 6 mm, následně se celý systém položil na magnetickou míchací desku. Aby nedošlo k porušení jiker magnetickými tyčinkami, bylo nutné vložit tenká síta z nerezové oceli 6 mm nad dno jamky. Tento systém umožnil dost místa pro fungování tyčinek a zároveň pro umístění jiker. Pro každý experimentální běh bylo náhodně vybráno a rozmístěno 12-16 jiker, přičemž ostatní jamky zůstaly prázdné (kontroly). Destička byla mezi jednotlivými pokusy dezinfikována zředěným bělicím roztokem. Kyslík byl zaznamenáván v intervalech po 4 sekundách. K zaznamenávání docházelo do doby, kdy obsah kyslíku klesl pod 10 % nasycení. Během experimentu docházelo k vizuální kontrole funkčnosti systému promíchávání. Každá jamka, kde se magnetická tyčinka přestala otáčet byla vyloučena z analýzy. Při teplotách 8-17 °C se rychlost metabolismu přibližně zdvojnásobila. Metoda podporuje hypotézy a neuvádí žádné nevýhody při měření (Martin et al. 2020).

Pasparakis et al. (2016) zkoumali vliv ropné expozice, teploty a embryonální fáze u mořského druhu ryby zlaka nachového (*Coryphaena hippurus* (Linné, 1758)). Studie byla provedena z mnoha důvodů, a to že se *Coryphaena hippurus* řadí mezi pelagické ryby a jeho jikry se vznášejí v horních vrstvách vodního sloupce a jsou tedy přímo vystaveny působení ropných látek jako PAH (polycyklické aromatické uhlovodíky). Ve spojení s dalšími stresory jako UV záření a teplotním stresem se jedná o velice nebezpečnou látku působící v mořských systémech. Celkem byly provedeny dvě zkoušky, jedna po 24 hodinové expozici a druhá během dne před vykulením, aby se prozkoumalo i pozdější působení. Mimo to se také zkoumal vliv zvyšující se teploty. Jikry byly umístovány do objemu 125 a 200 µl jednotlivých komůrek, vykulený plůdek byl umístěn do objemu 650 µl. Následně se destička vložila do průtočné lázně a celý systém byl uzavřen v inkubátoru. 3-4 jamky byly ponechány jako kontrolní buňky pro bakteriální korekci. Hodnoty, které klesly pod 70 % saturace byly vyřazeny z datasetu. Výsledky studie dokazují, že ropné oleje mají vliv na metabolismus a na počáteční kulení plůdku. Oslabení v počátečních fázích života může mít dopad na celou populaci. Vzhledem k poškození srdce pozorovaného při měření se nepředpokládá pozdější přežití, nebo minimálně dochází k horší funkci oběhového systému. Metoda tedy podporuje počáteční hypotézy (Pasparakis et al. 2016).

### 3.4.2 Mlži

Nel et al. (2023) porovnávali okamžitou odezvu metabolismu mezi druhy mořských mlžů slávka karibská (*Perna perna* (Linnaeus, 1758) a slávka středomořská (*Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) po usednutí, tedy jednalo se o juvenilní jedince. Kondice, abiotické faktory a metabolická citlivost jsou důležitými prvky pro pochopení

dynamiky společně se vyskytujících druhů. Mladší jedinci jsou považováni za fenotypově plastičtější z hlediska teploty. Pod stereomikroskopem došlo k vybrání zdravě vypadajících mlžů s reakcí na podněty uzavřením lastury. Testování jedinci byli před měřením lačnění 18-24 hodin. Zde byla použita destička o objemu jednotlivých jamek 80 a 200  $\mu\text{l}$ . Destička byla po celou dobu měření ponořena v průtočné lázni vybavené teplotním čidlem. Celý systém byl uchován ve tmě. Měření bylo snímáno každé 3 minuty a k ukončení došlo, když hladina klesla pod 60 % saturace. Závěrem je uvedeno, že jedinci obou druhů jsou teplotně plastiční a dokážou se přizpůsobit novým teplotním rozhraním. Zároveň je navrženo, aby se budoucí studie zaměřily na termoregulační schopnosti v různých ročních obdobích (Nel et al. 2023).

Fluharty (2019) se ve své diplomové práci zaměřuje na měření respirace u glochidií druhu *Ligumia subrostrata* (T. Say, 1831) z hlediska efektu zvyšující se teploty. Konstatuje, že modely předpovídají oteplení planety až o 0,2 °C za každé desetiletí, což je nepříznivé zejména pro vodní ekosystémy, kde je množství rozpuštěného kyslíku nepřímo úměrné teplotě. Glochidia byla odebrána od 4-5 samic, kdy byly vyjmuty žábry a přeneseny do kádinky naplněné vodou. Žábry byly propláchnuty za pomoci stříkačky. Poté byla glochidia ve vodě rozmíchána, aby došlo k vytvoření homogenní směsi. Z toho se odebral 1 ml, který měl dle propočtů obsahovat 2000 glochidií. Ke každému stanovení sloužily 3 jamky, které byly náhodně vybrány. Několik jamek zůstalo naplněno pouze vodou pro sledování bakteriální spotřeby. Po vložení glochidií se destička utěsnila přes horní okraj pro zabránění vzniku vzduchových bublin. Celý systém byl přenesen do průtočné vodní lázně. Vodní lázně s destičkou byly umístěny na míchačku, aby bylo zajištěno promíchávání v komůrkách. Snímací intervaly byly nastaveny na každých 15 sekund, pokus byl ukončen, když nasycení kleslo pod 0,5 mg/l kyslíku. V závěru je diskutováno, že došlo k lineárnímu nárůstu spotřeby kyslíku s teplotou (Fluharty 2019).

Agrawal & Jurgens (2023) se zabývaly působením asynchronních stresorů na mořský druh ústřice viržinská (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)). K měření byly použity destičky o velikosti 500 a 1700  $\mu\text{l}$ , do kterých se na základě velikosti umístili daní jedinci. Celkem bylo obsazeno 16 jamek a zbylé sloužily ke sledování mikrobiálního rozkladu. Nakonec potvrdily, že rozklad je zanedbatelný. Intervaly byly nastaveny na 5 sekund. Měření probíhalo 1 hodinu, nebo do doby, kdy se spotřebovalo 30 % celkového kyslíku. Nejvyšší spotřeba kyslíku byla prokázána u mlžů vystavených nízké salinitě a při kombinaci vyšší teploty a nízké salinity došlo k lehkému snížení spotřeby. Pokud by k takovým procesům docházelo ve volné přírodě, počty mlžů tohoto druhu by se výrazně snížily (Agrawal & Jurgens 2023).

Studie Schwaner et al. (2023) se zabývá vlivem zvýšeného parciálního tlaku oxidu uhličitého na organismus mlže *Crassostrea virginica*. Pro každé ošetření byla k dispozici 4 opakování. Při měření byla použita destička o jednotlivém objemu jamek 500  $\mu\text{l}$ . Ke změření požadové mikrobiální spotřeby se vybrala jedna jamka, další dvě jamky byly připraveny pro kontroly. Destička s mlži byla ponořena do vodní lázně s řízenou teplotou a následně došlo k zakrytí, aby se zamezilo ovlivňování senzorů světlem. Každých 15 sekund se snímal obsah kyslíku v jamce. Závěrem bylo dokázáno, že zvýšení parciálního tlaku CO<sub>2</sub> způsobilo zvýšenou respiraci ranných stádií. Mimo to se mobilizovaly energetické zásoby, aby se předešlo stresu. Domnívají se, že přesuny energie jsou adaptační strategií (Schwaner et al. 2023).

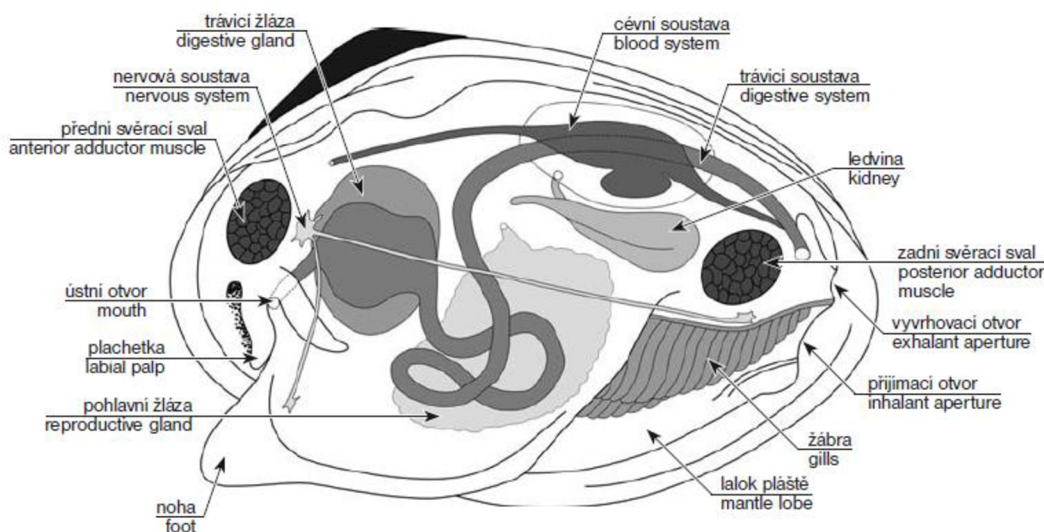


### 3.4.3 Sladkovodní krevety

Kučera et al. (2022) řeší vliv mikroplastických částic polystyrenu na chování a fyziologické reakce u krevetky sladkovodní (*Neocardina heteropoda* (Haan, 1844)) během 14denní expozice. K měření byla použita destička o objemu 1600  $\mu\text{l}$ . Systém byl po dobu měření uzavřen v zatemněném inkubátoru. V destičce bylo 10 exponovaných a 10 kontrolních krevet. 4 jamky byly ponechány pro mikrobiální respiraci. Krevety zůstaly většinou nehybné před i po měření. Výsledky měření ukázaly, že krevety vystavené částicím měly snížený standartní metabolismus a pozměněné vzorce běžného chování. Změny v metabolismu jsou srovnatelné s oxidativním stresem, který lze popsat jako poruchu mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a antioxidanty, které ochraňují tkáň před poškozením (Kučera et al. 2022).

### 3.5 Fyziologie sladkovodních mlžů

Tato kapitola se věnuje popisu fyziologických pochodů, k tomu je částečně nutno pochopit anatomii mlžů, která je vizuálně popsána na Obr 1. Na obrázku je znázorněna obecná orgánová soustava neboli morfologie měkkých tkání, která se podle McMahon & Bogan (2001) napříč známými skupinami mlžů příliš neliší. Naopak morfologie schránek se u mlžů v rámci skupin liší (McMahon & Bogan 2001).



**Obr. 1** Anatomie sladkovodních mlžů (Horsák et al. 2013)

#### 3.5.1 Lastury

Plášť mlžů zajišťuje velice důležitou funkci, a to prvotní vylučování materiálu, ze kterého se následně tvoří schránka. Tato látka je zpočátku měkká a poté tvrdne (McElwain & Bullard 2014). Lastury mlžů sestávají ze 3 vrstev: vnějšího periostraka (organický povlak), středního vápenitého pláště (prismatické vrstvy) a vnitřní perleťové vrstvy, která obsahuje  $\text{CaCO}_3$  (Shukla et al. 2018). Periostrakum nepropouští vodu. Na povrchu periostraka se nachází vrstva konchiolinu zabraňuje rozpouštění  $\text{CaCO}_3$  ve vodách chudých na vápník. Perleťová vrstva je neustále aktivní, a tak dochází ke ztlouštění schránky,

čímž se zvyšuje hmostnost mlžů (McMahon & Bogan 2001).  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{HCO}_3$  jsou nezbytné pro tvorbu lastur, a tak jsou přijímány přes tělní epitel do hemolymfy. Kalcifikace je spojena s metabolickými funkcemi a nepřetržitým pomalým vstřebáváním iontů v průběhu roku. Rychlost růstu lastur je velmi závislá na ročním období, kdy na jaře a v létě jsou nárůsty vyšší a na podzim a v zimě nižší (Lopez-Lima et al. 2008). Zavřenou lasturu definují dva svaly, a to přední a zadní svěrací sval. Při otevírání se tyto svaly uvolňují (Ahmed et al. 2021). Sifony jsou redukované a nazývají se nepravými, někdy i chybí. U mořských druhů nalezneme pravé sifony (McMahon & Bogan 2001). Při porušení lastury či dlouhodobé expozici polutantů dochází ke změnám ve struktuře. Tvar schránky je částečně přizpůsoben podmínkám prostředí, ve kterém se mlži nachází. Schránky mají často ztloustlou vrstvu v okolí vrcholu (Spann et al. 2010).

### 3.5.2 Cévní soustava

Mlži se řadí mezi organismy s otevřeným oběhovým systémem. To znamená, že hemolymfa není uzavřena v cévách. Srdce mlžů je tříkomorové. Hemolymfa se skládá z hemocytů a je roznášena cévami do celého těla, konkrétně do dutin, zde omývá tkáň a proniká do nich (McElwain & Bullard 2014). Poté se přes žábry vrací do srdce. Přes žábry se hemolymfa okysličuje a prochází dále přes plášť, odtud do ledvin, a nakonec do přední a zadní cévy. Dále se dostává i do menších cév, včetně palliálních tepen a do svalnaté nohy. Sekundární tepny se dělí na mnoho menších cév, které vedou do dutin, kde dochází k buněčné výměně živin, plynů a odpadních látek. Hemolymfa oproštěná od kyslíku je odváděna z tělních dutin a orgánů do pláště žaber, aby došlo k okysličení a zavedení znova do srdce. Mlži nemají barviva pro přenos kyslíku, namísto toho je  $\text{O}_2$  obsažen napřímo v lymfě (McMahon & Bogan 2001).

### 3.5.3 Žábry

Funkce žaber u mlžů je jednak k výměně plynů a také k filtrování potravy, což je hlavní způsob získávání potravy. Žábry jsou v soustavném kontaktu s vodou, a tak jsou náchylné na znečištění (Zhang 2023). Z tohoto důvodu mohou být mlži specifickými bioindikátory znečištění vodních ekosystémů. Yoloğlu (2019) ve své práci udává, že změny v aktivitách ATP (adenosindifosfát) mohou být varovným signálem poškození, které bylo způsobeno právě znečištěním prostředí. Snížení či zvýšení aktivity ATP (způsobené polutanty může vést k nepříznivým vlivům na organismus. Navíc mohou tyto změny odrážet poruchy fyziologických procesů.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPáza se uplatňuje zejména jako iontová pumpa, která se podílí na udržování membránového potenciálu a osmotické rovnováhy.  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPáza je spojená s energetickým metabolismem a inhibice tohoto enzymu vede k degradaci oxidační fosforylace. Také uvádí, že působení pesticidů inhibuje aktivitu celkové ATPázy (Yoloğlu 2019). Každá žábra se skládá z vnitřního a vnějšího demibranchia. Strukturálně se jedná o mnoho dlouhých a tenkých vláken, která nesou řasnaté struktury ve dvou řadách. Tvarově připomínají písmeno W (Freitas et al. 2022). Respiratorní a potravní pochody jsou zajišťovány bočními řasinkami, které se nachází poblíž předního svěracího svalu (Kořínková 2007). Řasinky vhání vodu do inhalačního otvoru přes sifon a přes ostie do vodní trubice. Z vodní trubice proudí do exhalačního otvoru. Zatímco je voda poháněna laterálními

řasinkami, množství vody je kontrolováno ostiemi (McMahon & Bogan 2001). Stahy hladké svaloviny zajišťující pohon vody má pod kontrolou nervová soustava, kde dominují serotonin a dopamin (Canesi et al. 2022).

Předpoklad je takový, že juvenilní mlži mají jednodušší strukturu žaber, a tak nejsou schopni filtrovat suspenze. Namísto toho je pravděpodobně většina částic zachycována pomocí řasinkové nohy. Během ontogeneze dochází k vývoji těchto struktur na složitější (Lavictoire et al. 2018). Velikost filtrovaných částic dospělými mlži se pohybuje od 1  $\mu\text{m}$  do nejméně 40  $\mu\text{m}$ . Fitraci lze dobře pozorovat, neboť dochází k otevření lastury a vytáhnutí sifonů (Atkinson et al. 2011).

### 3.5.4 Noha

Noha slouží zejména k pohybu, například při přemísťování na novou lokalitu. Principem pohybu je prodloužení nohy, uchycení špičky nohy obsahující hlen, po níž následuje přitažení těla dopředu (McMahon & Bogan 2001). U mlžů je zaznamenáno zahrabávání, které je uskutečněno právě díky činnosti svalnaté nohy a svěracích svalů. Nejprve zaujmou vhodnou pozici a nohou pronikají do substrátu. Sifon se uzavře a s ním i celá schránka pomocí svěracích svalů. Přebytečná voda je vyvržena na povrch pláště, kde je v kontaktu se sedimentem, který se tak stává propustnějším. Následně dochází ke svírání nejprve předního a poté zadního svěracího svalu, čímž se schránka stahuje do sedimentu. Tento proces se opakuje, dokud mlži nedocílí vhodné pozice (Knoll et al. 2017). Mlži mají silný vliv na nitrifikaci a denitrifikaci tím, že biodegradují organickou hmotu a zvyšují intenzitu obou procesů pohybem v sedimentu (Vaughn 2018). Dle studie Lavictoire et al. (2018) je tvar nohy a ořasení nohy konzistentní ve všech fázích ontogeneze. Skládá se ze dvou částí, přičemž jedna je hustě pokryta řasinkami a druhá je naopak řídko pokryta (Lavictoire et al. 2018).

### 3.5.5 Vylučování a osmoregulace

Vylučování a osmoregulace u mlžů funguje podobně jako například u ryb, které se stejně jako mlži řadí mezi hyperosmotické organismy (Dubský et al. 2003; Santini et al. 2011). Osmotický tlak mezi hemolymfou a prostředím vytváří jistý gradient, který je potřeba neustále vyrovnávat. To vede ke ztrátě iontů difúzí a příjmu za pomoci osmózy (Santini et al. 2011). Principem absorpce je aktivní příjem iontů přes žábry či pronikání iontů přes žábry a celý povrch těla. Poté dochází k vylučování velmi zředěné moči (hypoosmotické). Na osmoregulaci se podílí zejména ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  (Dubský et al. 2003). Na vylučování moči se podílí ledviny, které moč ultrafiltrují (Dietz et al. 2000). To znamená, že dochází ještě k reabsorpci některých látek z primární moči (Santini et al. 2011). Ledviny musí vylučovat přebytečné množství vody, aby nedocházelo ke zředění tělní tekutiny. Jelikož sladkovodní mlži žijí v hypoosmotickém prostředí, je nutné si z vody vychytávat ionty (Seo et al. 2021). Hlavním místem vstřebávání iontů jsou ledviny, které resorbují ionty z filtrátu do hemolymfy. Reabsorpce iontů je méně energeticky náročná než aktivní vychytávání iontů z vodního prostředí. V důsledku rychlého toku vody se zvyšuje obsah vylučované tekutiny (McMahon & Bogan 2001). Amoniak ( $\text{NH}_3$ ) je považován za hlavní odpadní produkt metabolismu mlžů. Autoři Jadhav & Bawane (2012) uvádí, že množství vyloučeného amoniaku závisí na velikosti těla a na ročním období (Jadhav & Bawane 2012).

Larsen et al. (2014) se domnívá, že příjem iontů je závislý na diurnálních rytmech. To nasvědčuje faktu, že nervový systém reguluje funkci příjmu. Serotonin a cAMP podněcují adsorbci iontů. Regulace sodíkového iontu je inhibována prostaglandinem (Larsen et al. 2014).

U mlžů se  $\text{Na}^+$  vstřebává přes apikální epitel výměnou za  $\text{H}^+$  za účasti  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  transportéru. Ionty  $\text{Ca}^{2+}$ , aniont  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  se také vstřebávají přes apikální epitel z vody, na čemž se podílejí specifické transportéry. Aniont  $\text{SO}_4^{2-}$  je aktivně transportován přes epitel. Transportéry  $\text{Ca}^{2+}$  zachovávají homeostázu  $\text{Ca}^{2+}$  v hemolymfě. Mlži potřebují vysoké množství vápníku, a to nejen k růstu schránek, ale i k uchování vápníku v žábrách pro pozdější vytváření prvotních chránek glochidií, které se zde inkubují. Nicméně  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{H}^+$  mají primární vliv na acidobazickou rovnováhu tekutin u mlžů (Griffith 2017).

### 3.5.6 Potrava a trávení

Trávicí soustava se přímo váže na funkčnost žaber. Boční řasinky formují proud vody, který navádí vodu do inhalačního otvoru. Potrava nejprve přechází přes laterofrontální řasinky, které fungují jako síta. Zde dochází k přesunu k frontálním řasinkám a do ústního kanálku. V labiálních palpách se potrava třídí, buď je posunuta do úst a strávena, nebo se vyloučí jako částice, které se za potravu nepovažují, a to pseudofaeces (Lavicoire et al. 2018). Pseudofaeces nemusí být aktivně vyřazená částice. Při vysokých hustotách sestonu se hromadně vyřazuje mnoho materiálu (Ward & Shumway 2004). Po pozření se potrava dostává do jícnu, zde se obaluje do hleny a pokračuje do žaludku. V žaludku je hlenová potrava pohlcována do dalších trávicích struktur. V prostoru středního žaludku se nachází útvar zvaný krystalický kužel. Kužel slouží k vylučování trávicích enzymů a rozbíjí rotačními pohyby přijaté částice. Nestravitelná hmota se uvolňuje krátkým střevem do konečníku, odkud se vylučovacím otvorem dostává z těla do prostředí. Vylučovací otvor se nachází v blízkosti inhalačního otvoru, každopádně díky husté struktuře výkalů a dalším mechanismům nedochází ke zpětnému přijmutí (Morton 2015).

### 3.5.7 Reprodukce

Gonády u mlžů se vyskytují v páru a nachází se v blízkosti trávicího ústrojí. Gamety jsou uvolňovány při výdechu. Většina druhů sladkovodních mlžů se řadí mezi gonochoristy, pouze malá část patří mezi hermafrodity. Gonochorističtí mlži patří mezi vejcorodé druhy. To znamená, že se jejich embrya líhnou ve specifických žábrách, marsupíích. Výjimkou mezi sladkovodními mlži tvoří čeleď Dreissenidae (Farris & Hassel 2007). Zástupci této skupiny uvolňují spermie a vajíčka do vody, kde se gamety spojí a vytváří tak volně plovoucí larvy (trochofory), ta se poté vyvíjí v planktonního juvenila (veliger) (John & Gautam 2020). K rozmnožování dochází v období jara až léta. S rozmnožováním je spojena vertikální migrace v substrátu. Spermie jsou vypouštěny do vodního prostředí a vajíčka jsou oplodněna v subbranchiálních prostorách, kde dochází k inkubaci (Farris & Hassel 2007). Marsupia jsou speciální formou žaber, která se skládají z interlamellárních prostor. Zcela vyvinutá embrya (glochidia) jsou uvolněna z marsupíí (Modesto et al. 2017). Glochidia následně parazitují na rybách, kde dochází k metamorfóze v juvenilní jedince s životní strategií podobnou dospělým. Konkrétně parazitují jako ektoparazité na žábrách či na ploutvích (Spooner et al. 2005). Kde se živí krví nebo hlenem.

Ryby si na glochidia mohou přirozeně vyvinout či získat imunitu. Přirozená imunita vzniká při nevhodném hostiteli. Získaná imunita je zapříčiněna, pokud glochidium najde vhodného hostitele, ale hostitel byl předtím již infikován (Farris & Hassel 2007). Avšak vztah mezi larválním mlžem a rybou je popisován jako foretický, což je definováno jako forma symbiózy, kdy je symbiont transportován svým hostitelem. Bylo dokázáno, že glochidia mají vliv na kondici a chování ryb (Modesto et al. 2018).

Hlavní faktorem umožňujícím reprodukci je teplota, která podněcuje gametogenezi. Mezi další faktory se řadí hladina neurosekrečních hormonů (serotonin), hustota, diurnální cykly, dostupnost potravy a výskyt parazitů. Bylo dokázáno, že během tmy je vyšší rychlost metabolismu (McMahon & Bogan 2001). Reprodukce je náročný proces, který vysiluje organismus mlžů. Autoři Farris & Hassel (2007) zjistili, že během léta až zimy se zvyšují energetické zásoby mlžů, ale během jara se snižují. Důvodem je investice do reprodukce ve formě glykogenových zásob (Spooner et al. 2005). Žábry mlžů mají během inkubace glochidií omezenou kapacitu pro respiraci (Farris & Hassel 2007).

### 3.5.8 Nervová soustava

U mlžů je typicky redukována hlava a absence raduly (McMahon & Bogan 2001). Cerebrální ganglia jsou lokalizována před trávicí žlázou a pod předním svěracím svalem. Cerebrální nervy jsou jednotlivě složené z předního a zadního laloku. Inervují přední svěrací sval a část pláště (Alavi et al. 2017). Vyskytují se zde ještě pedální a viscerální ganglia. Pedální ganglia inervují svalnatou nohu. Zadní viscerální nervy se nachází na ventrální straně svěracího svalu a inervují vnitřní orgány jako orgány, gonády, žábry, srdce, zadní svěrací sval a další část pláště (Alavi et al. 2017; John & Gautam 2020). Každý ganglion je obklopen perineuriem (Alavi et al. 2017). U inhalačního a exhalačního otvoru jsou shromážděny smyslové orgány. Dalším orgánem jsou statocysty, které jsou vystlány řasnatými strukturami vnímající změny tlaku přenášející infromace o orientaci (Morton 2015). Jedinci *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) byli podrobeni sérii testů na negativní fototaxi. Bylo objeveno, že délka přichycení za pomoci byssových vláken se prodlužuje s rostoucí intenzitou světla (Liu et al. 2020).

### 3.5.9 Sezónní fyziologické pochody

U mlžů, jakožto ektotermních organismů závisí teplota těla na teplotě okolí, což znamená, že při zvýšení teploty nastane odpovídající reakce organismu. V průběhu roku nastávají změny ve fyziologii mlžů, kdy v létě je metabolismus rychlejší a zimě je spíše v útlumu. To je odůvodněno změnami teplot (Lurman et al. 2014). Pro vyjádření rychlosti změny chemických či biologických reakcí na zvýšení teploty existuje rovnice:

$$Q_{10} = \left(\frac{R_1}{R_2}\right)^{10[t_2-t_1]}$$

Kde  $Q_{10}$  je faktor vyjadřující změny rychlosti metabolismu při změně o 10 °C.  $R_1$  je vyjádřeno jako rychlost v nižší teplotě a  $R_2$  vyjadřuje rychlost při vyšší teplotě. Do horního indexu  $t_1$  je dosazována nižší teplota v °C a za  $t_2$  vyšší teplota v °C (Xiao et al. 2014). Výsledné hodnoty by se ideálně měly pohybovat mezi 2-3. Pokud se hodnoty pohybují mimo tuto škálu, organismus vykazuje známky tepelné kompenzace. V rámci druhů

jsou hodnoty Q10 variabilní. Například u druhu *Dreissena polymorpha* se průměrné hodnoty pohybují mezi 1,6-2,7 při teplotách 15-25 °C (Lurman et al. 2014).

Míra neboli rychlost filtrace je definována jak biotickými, tak i abiotickými parametry. Mezi abiotické parametry řadíme teplotu, pH, rychlost proudění vody, množství rozpuštěných částic, což může souviset s prostupností světla do vody. Do biotických faktorů zahrnujeme dostupnost potravy, typ částic, růstový cyklus a reprodukci (Pouil et al. 2021). Množství látek důležitých pro metabolismus (lipidy, sacharidy, bílkoviny) je taktéž ovlivněno změnou teploty. Ganser et al. (2015) testovali vliv zvyšující se teploty na organismus mlžů, tento experiment byl proveden z důvodu zesilující klimatické změny, kdy se zvyšuje teplota. Zjistili, že navyšující se teplota má vliv na spotřebu kyslíku a vylučování amoniaku. Jejich data dokazují, že nárůst teploty může změnit rychlost metabolismu a snížit tak množství energie, které je k dispozici pro nezbytné životní pochody, přežití, reprodukci a růst (Ganser et al. 2015).

### 3.5.10 Diurnální cykly

U mlžů je zaznamenáno diurnální chování. S denními cykly souvisí také rychlost spotřeby kyslíku. S vyšší intenzitou světla se snižuje míra spotřeby a naopak. Schránky mlžů jsou díky jejich způsobu života otevřené až 70 % času. Někdy jsou schránky zavřeny, a to zejména jako reakce na stresové podmínky (Nikolić et al. 2017).

Mlži také mění rytmus uzavírání lastur v závislosti na potravní nabídce. Za nepříznivých potravních podmínek mají lastury zavřené a otevrou je až tehdy, když je dostatek potravy. V průběhu roku dochází ke změnám v metabolismu. S uzavřením lastury se standardní rychlost metabolismu (SMR) snižuje. Tím se organismus přenastavuje do aerobního stavu, aby se ušetřila energie (Ortmann & Grieshaber 2003).

Studie Hills et al. (2020) zkoumala vliv světla na míru filtrace a výsledkem této studie bylo zjištění, že filtrační míra je druhově závislá. Například u invazního druhu *Corbicula fluminea* byla naměřena vyšší míra filtrace za tmy, což naznačuje větší výhodu oproti původním druhům (Hills et al 2020).

### 3.5.11 Další faktory ovlivňující metabolismus

Metabolismu může být potlačen znečišťujícími polutanty jako těžké kovy, kyanidy či pesticidy. Zvýšené hladiny mohou nevratně poškodit žaberní aparáty. Tím, že dojde k poškození žaber se narušuje i osmoregulační mechanismus a respirace (Bhamre et al. 2011).

Liu et al. (2022) uvádí, že když hladina toxikantu dosáhne určité hodnoty, schránky mlžů se uzavřou. Díky tomu se sníží rychlost filtrace a další přijímání toxikantu. Uzavření lastury může vést ke hromadění odpadních látek, zejména amoniaku a snížení výměny kyslíku, což má později vliv na základní životní potřeby, tj. přežití, růst a reprodukci (Liu et al. 2022).

Mnoho druhů mlžů je schopno odolávat hypoxickým či anoxickým podmínkám na základě snížení výkonu metabolismu, tento proces zahrnuje dvě strategie. Jedna z možností je, že za nízkých hladin kyslíku rychle snižují metabolické výdaje, a to až o 90 % původních výdajů, kdy nejprve dochází ke katabolismu energetických zdrojů glykogenu. Další strategií je alternativní oxidáza, která zajišťuje elektronový transport (Yusseppone 2018).

Kalcifikační procesy jsou v průběhu roku velice proměnlivé a vykazují sezónní cykly. To je ovlivňováno acidobazickou rovnováhou v plášťové dutině. V acidobazické rovnováze

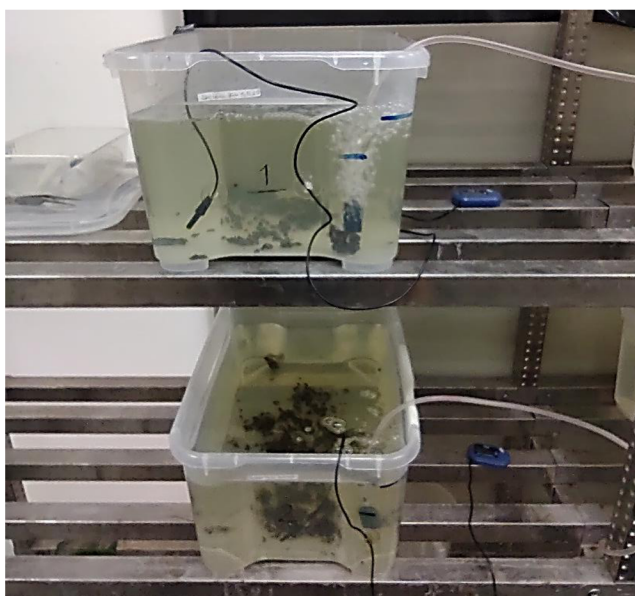
hraje největší roli oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ), který se vyskytuje v hemolymfě a jeho obsah je též závislý na sezóních cyklech (Machado & Lopez-Lima 2011). Oxid uhličitý je často příčinou poklesu pH. pH funguje jako katalyzátor rozpouštění vápenatých látek během jara a podzimu (Lopez-Lima et al. 2009). V období jara až léta se obsah oxidu uhličitého v hemolymfě zvyšuje, zatímco na podzim až v zimě se obsah parciálního tlaku  $\text{CO}_2$  se snižuje. To vyvolává respirační acidózu či alkalózu. Respirační acidóza může být prohloubena zvyšující se tvorbou kyseliny jantarové. Zvýšená acidóza může mít vliv na ukládání vápníku v organismu (Machado & Lopez-Lima 2011). Naopak alkalóza nastává se změnami koncentrací vnitřního  $\text{HCO}_3$  primárně, když epitel lastury vylučuje  $\text{HCO}_3$  do hemolymfy (Lopez-Lima et al. 2009).

## 4 Metodika

### 4.1 Testované organismy

Částečnou předlohou kapitol „Testované organismy, Měď a její cílové koncentrace a Příprava expozice  $\text{Cu}^{2+}$ “ byla Standardní příručka pro provádění laboratorních testů toxicity se sladkovodními mlži neboli norma ASTM (ASTM 2006).

Experimentální jedinci *Dreissena polymorpha* byli navzorkováni na řece Labi poblíž Libotenic. Přesnou lokalitou pro odběr bylo odlehlé rameno, kde došlo i k odběru říční vody pro transport do laboratoře FAPPZ. Po příjezdu byli mlži rozděleni do dvou plastových nádržek opatřených vzduchováním a jednoduchým zařízením na měření teploty (viz Obr. 2). Po několika hodinách došlo k výměně části vody, aby si jedinci navykli na experimentální vodu. A to konkrétně obměnou 25 % říční vody za vodu laboratorní.



**Obr. 2** Plastové nádrže použité k aklimatizaci sláviček mnohotvárných (*Dreissena polymorpha*) se vzduchováním a teploměrem

2. den se zaměnilo 50 % objemu vody za vodu experimentální, 3. den už byl poměr 75 % na 25 % a poslední den byla použita pouze voda experimentální. V laboratorních podmínkách se mlži udržovali při 20 °C, kde se po dobu 5 dní aklimatizovali před samotnými

pokusy. Každý den bylo zajištěno přikrmování tekutým fytoplanktonem Easybooster prof (Easy reefs), obměna části vody, a také se monitoroval vizuální stav jedinců a teplota.

## 4.2 Měď a její cílové koncentrace

Dalším krokem experimentu byla příprava požadovaných koncentrací mědi, k tomu byla použita sloučenina  $\text{CuSO}_4$ , kde se měď nachází ve dvojmocné formě (Sigma Aldrich, produktový kód C1297). Jako prvotní koncentrace byly stanoveny: 0 (kontrola), 20, 35, 50 a 100  $\mu\text{g/l}$   $\text{Cu}^{2+}$ , které po 24 hodinách expozice neměly požadovaný vliv na respiraci. Došlo tedy k několikanásobnému navýšení koncentrací na 0 (kontrola), 400, 800, 1600, 3200  $\mu\text{g/l}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Doplňkově byla také zkoumána i behaviorální aktivita v různých časech, kterou se zabývala kolegyně Kateřina Dolejšová ve své bakalářské práci (Dolejšová 2023). Ve všech částech této bakalářské práce bude pracováno s nominálními hodnotami.

K namíchání zásobního roztoku byla jako ředící voda použita odstátá kohoutková voda. Předpoklad byl takový, že v kohoutkové vodě se žádná měď nevyskytuje.

## 4.3 Průběh testování

### 4.3.1 Příprava expozice $\text{Cu}^{2+}$

Prvotním krokem byla příprava expozičních kádinek, každá hladina  $\text{Cu}^{2+}$  byla vždy ve třech opakováních. Celkem bylo připraveno 15 kádinek (každá s objemem 250 ml), které byly označeny následovně: C-1 až C-3 (kontroly), 400-1 až 400-3, 800-1 až 800-3, 1600-1 až 1600-3 a 3200-1 až 3200-3.

Jedna kádinka byla naplněna pouze 100 ml ředící vody a bylo do ní vloženo zařízení pro monitorování teploty (HOBO, produktový kód MX2202). Do každé kádinky bylo nalito 100 ml daného média. Po tomto kroku byly všechny kádinky zakryty alobalovou fólií, aby nedocházelo k odparu média, viz Obr. 3.



**Obr. 3** Začátek expozice a rozmístění skleněných kádinek u testovaného druhu slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) za použití mědi ve formě  $\text{Cu}^{2+}$



Pro minimalizaci chyb z hlediska podmínek se kádinky náhodně rozdělily. Kádinka s monitorovacím zařízením byla umístěna doprostřed. Ještě před zahájením pokusu bylo z obou plastových nádrží vybráno 21 aktivnějších nepoškozených jedinců pro každou koncentraci, tj. celkem 105 jedinců pro celý expoziční den. Z navzorkovaných mlžů se vybíraly takové velikosti, aby se vtěsnily do jamek, ale zároveň se necílilo na nejmenší jedince. Ideální tedy byla střední velikost. Ty se poté náhodně rozmístily. Do každé kádinky se vložilo 7 jedinců. Teplota v kádinkách po celou dobu expozičních dnů byla  $20,81 \pm 0,57$  °C (průměr $\pm$ směrodatná odchylka).

Po 24 hodinách expozice se určila mortalita daných koncentrací a na základě toho, se vybraly vhodné koncentrace pro mikrorespirometrii, viz Tab. 3. Hodnocení probíhalo na základě otevřené/zavřené schránky, kdy uhynulí jedinci byli široce otevřeni a dále nereagovali na jakékoliv podněty. Živí jedinci byli zavřeni a reagovali na změnu světla či pohyb kádinky.

**Tab. 3** Mortalita testovaných mlžů druhu *Dreissena polymorpha* daných koncentrací mědi  $\text{Cu}^{2+}$  (1. den testování)

Koncentrace $\text{Cu}^{2+}$ ( $\mu\text{g/l}$ )	Označení kádinek	Počet uhynulých	CELKEM uhynulých (ks)	CELKEM uhynulých (%)
<b>0</b>	C-1	0/7	0	<b>0</b>
	C-2	0/7		
	C-3	0/7		
<b>400</b>	400-1	0/7	2	<b>9,52</b>
	400-2	1/7		
	400-3	1/7		
<b>800</b>	800-1	0/7	6	<b>28,57</b>
	800-2	3/7		
	800-3	3/7		
<b>1600</b>	1600-1	6/7	13	<b>61,9</b>
	1600-2	4/7		
	1600-3	3/7		
<b>3200</b>	3200-1	5/7	13	<b>61,9</b>
	3200-2	4/7		
	3200-3	4/7		

Pro náš účel se zvolily koncentrace, kde je vyšší mortalita, ale zároveň nejsou jedinci ve velmi špatném stavu. Pro samotnou respirometrii byly zvoleny koncentrace 800 a 1600  $\mu\text{g/l}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Mimo to byly použiti kontrolní jedinci pro vykreslení efektů mědi. Viditelně živí mlži se postupně osušili na filtračním papíře, vložili se do přechodné kádinky s čistou vodou a poté do kádinky s přesným označením jako u expozičních nádob. Tento způsob přemístování byl zvolen z toho důvodu, aby se zabránilo jakékoli kontaminaci čisté vody  $\text{Cu}^{2+}$ .

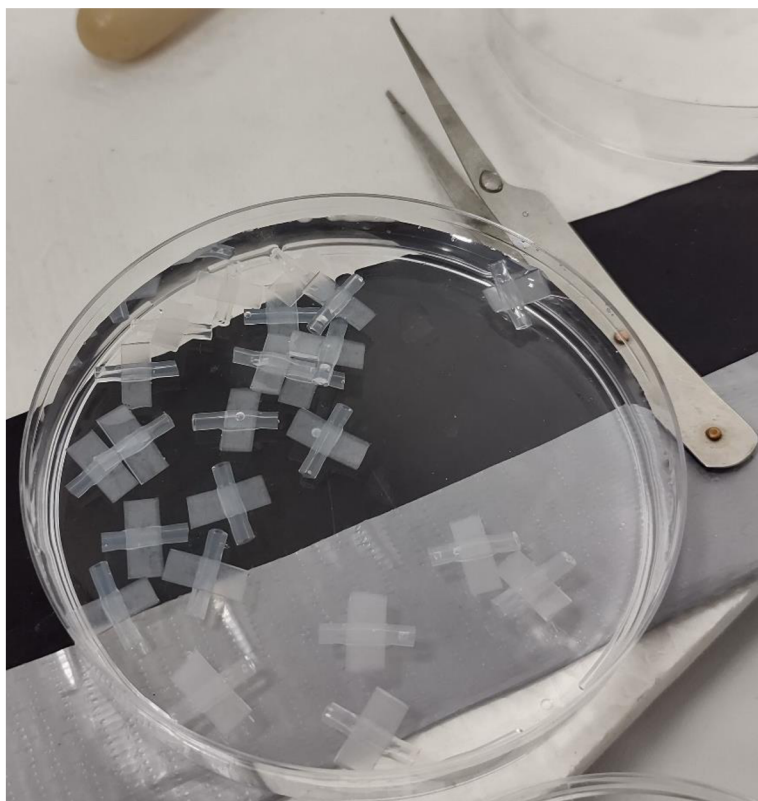
Následně se jedinci v kádinkách přemístili do laboratoře malakologie. Zde se přesunuli do Petriho misek s označením E1-E20 (exponované) a C1-C20 (kontroly). Během 5 minut se pozorovala aktivita všech jedinců.

### 4.3.2 Přípravy na experiment s mikrorespirometrem

Tato kapitola se zabývá už konkrétním návrhem řešení problému s promícháváním. Byly navrženy dvě metody promíchávání. Obě byly provedené pomocí orbitálního míchače, a to: kontinuální a přerušované míchání. K eliminaci stagnace vody ve spodní vrstvě byla použita skleněná kulička. Aby nedošlo ke konfliktu mlže s kuličkou, byl navržen stoper – zarážka, která udržovala mlže mírně nade dnem jamky.

Před celým pokusem proběhlo testování tří velikostí kuliček. A to 1, 2, 3 mm. Kulička s rozměrem 1 mm byla příliš lehká a nedostatečně promíchávala vodu v respirometrické destičce. Stejně tak tomu bylo i u kuličky o rozměru 2 mm. V našem případě nejlépe fungovala kulička o rozměru 3 mm při rychlosti orbitálního míchače 120 rpm. Pro zlepšení efektu promíchávání v jednotlivých komůrkách se do poloviny jamek umístila skleněná kulička o velikosti 3 mm (Sigma Aldrich, produktový kód 1040150500).

Další částí této přípravy bylo sestavení stoperu – zarážky, která bude držet testovaný organismus nad senzorem, ale zároveň nedojde k úplnému rozdělení jamky. Cílem bylo zamezení zastínění bodového senzoru, neboť zařízení pracuje na principu snímání intenzity světla. K tomu se zvolil netoxický silikonový materiál. Konkrétně se jednalo o silikonový bloček a hadičku. Vyrobil se jeden vzorový stoper, který přesně odpovídal rozměrům jamky. Dle toho se vytvořilo všech 24 zarážek, viz Obr. 4. Ty se jednotlivě provázily, aby se předešlo velkým rozdílům.



**Obr. 4** Silikonové zarážky použité při mikrorespirometrii

Zprvu bylo nutné stanovit experimentální design. Nejlépe tak, aby nedocházelo k systematickému vnášení chyb. Ten zajišťoval lepší orientaci jak v umístování jedinců do destičky, tak i v umístování skleněných kuliček, viz Obr. 5. Ve všech buňkách byla umístěna

zarážka. V buňkách s názvem „Prázdná“ byla všude umístěna jak kulička, tak i zarážka. Pro lepší přehlednost byla políčka zanechána bílá.

ŽLUTÁ		bez kuličky				
ZELENÁ		s kuličkou				
Design pro 1. trial: kontinuální míchání						
	1	2	3	4	5	6
A	E1	E2	Prázdná	C1	C2	C3
B	E3	E4	Prázdná	C4	C5	C6
C	E5	E6	E7	Prázdná	C7	C8
D	E8	E9	E10	Prázdná	C9	C10
Design pro 2. trial: přerušované míchání						
	1	2	3	4	5	6
A	C1	C2	Prázdná	E1	E2	E3
B	C3	C4	Prázdná	E4	E5	E6
C	C5	C6	C7	Prázdná	E7	E8
D	C8	C9	C10	Prázdná	E9	E10
Design pro 3. trial: kontinuální míchání						
	1	2	3	4	5	6
A	E1	E2	Prázdná	C1	C2	C3
B	E3	E4	Prázdná	C4	C5	C6
C	E5	E6	E7	Prázdná	C7	C8
D	E8	E9	E10	Prázdná	C9	C10
Design pro 4. trial: přerušované míchání						
	1	2	3	4	5	6
A	C1	C2	Prázdná	E1	E2	E3
B	C3	C4	Prázdná	E4	E5	E6
C	C5	C6	C7	Prázdná	E7	E8
D	C8	C9	C10	Prázdná	E9	E10

**Obr. 5** Schéma všech trialů – designy pro lepší orientaci při metodickém postupu

Hodnotil se taktéž i vliv orbitálního míchače a nejlépe se projevovaly rychlosti 100, 110, 120 rpm. V průběhu celého testování byl používán orbitální míchač se specifikacemi (Biosan 2022), viz Tab. 4.

**Tab. 4** Charakteristika použitého orbitálního míchače. Upraveno podle (Biosan 2022)

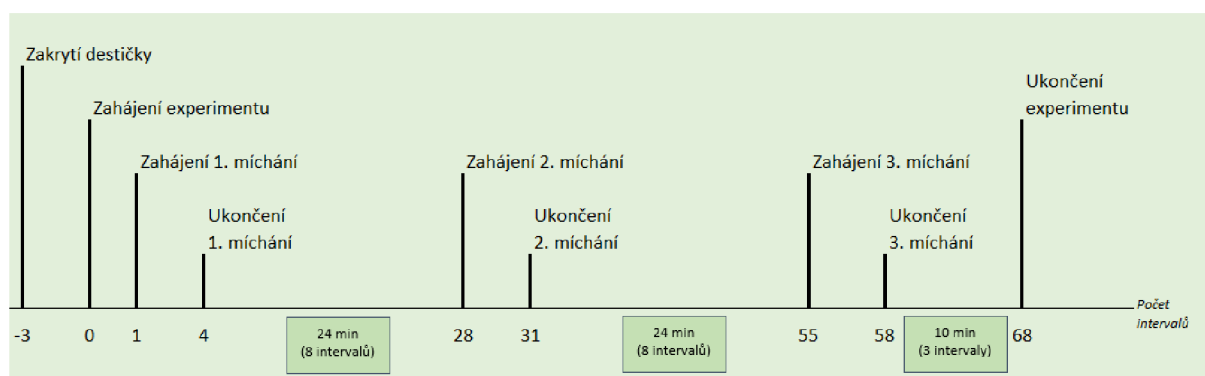
Název:	PSU-10i Orbital Shaker
Výrobce:	Biosan
Rozsah otáček:	50–450 rpm (zvyšování po 10 rpm)
Nastavení času:	1 min–96 h / non–stop
Maximální doba nepřetržitého provozu:	168 h (7 dní)
Orbit:	10 mm
Maximální zátěž:	3 kg
Operativní teploty:	+4 °C až +40 °C

#### 4.3.2.1 Kontinuální promíchávání

Nepřetržité promíchávání bylo zajištěno pomocí orbitálního míchače. Ten byl zapnutý po celou dobu měření. Na tuto metodu byly provedeny dvě opakování, viz Obr. 5 Schéma všech trialů – designy pro lepší orientaci při metodickém postupu.

#### 4.3.2.2 Přerušované míchání

K přerušovanému míchání byl taktéž použit orbitální míchač. Byla stanovena časová osa, viz Obr. 6, která nám umožňovala lepší vizualizaci časů, kdy bude potřeba zapnout míchač. Vždy byl stanoven takový čas, aby došlo k promíchání uprostřed intervalu. Tedy aby nedošlo k narušení výsledných dat.



Obr. 6 Časová osa přerušovaného míchání

#### 4.3.3 Zahájení mikrorespirometrie

Předlohou pro tuto část metodiky byl instrukční manuál SDR SensorDish® Reader a zkrácený startovní manuál SDR SensorDish® Reader – Getting Started (Presens Precision Sensing 2016).

Na začátku se připravily všechny potřebné části k zapojení celého systému, viz Obr. 7.



Obr. 7 Propojení jednotlivých částí mikrorespirometru. Upraveno podle (Presens Precision Sensing 2016).

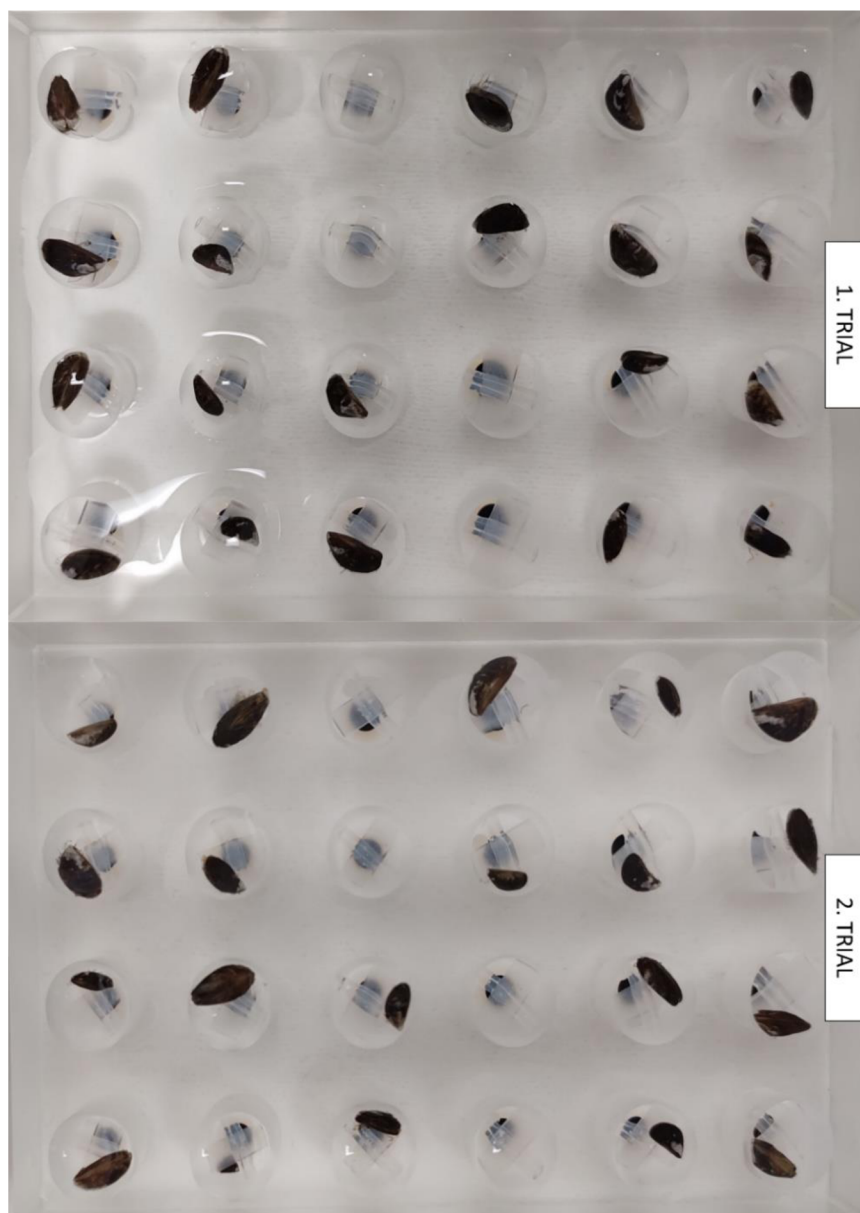
Všechny části byly umístěny venku až na SDR čtečku, která byla přes zploštělé místo (propojení SDR-Rozbočovač) propojena do inkubátoru.

Vzápětí bylo nutné připojit USB, na kterém byl nahraný MicroResp™ software, který zajišťuje automatizovanou respiometrii (Presens Precision Sensing 2016). Celá aplikace byla již nainstalována v počítači, takže se jen zapnul program s totožným názvem. Do aplikace se muselo nejdříve přihlásit a pak kliknout na Connect SDRs – což umožnilo systémové propojení všech částí. Dále se nastavily všechny parametry měření. Nejdříve nastavení teploty, v našem případě 20 °C, interval (3 minuty). Každé 3 minuty došlo k proměřování jamek a zaznamenávání hodnot (dle manuálu se musí pro dlouhodobá měření volit interval delší jak 2 minuty). Tlak jsme zadávali vždy pro aktuální den a lokalitu z portálu chmi.cz (Český hydrometeorologický ústav 2022). Parametr měření v našem případě byl kyslík. A v neposlední řadě označení destičky: PSt5\_1621\_O2user. Při zadání všech charakteristik již stačilo kliknout na Log measurement a v ten moment došlo k zahájení měření.

#### **4.3.4 Průběh mikrorespiometrického měření**

Nejdříve bylo nutné hydratovat senzory v destičce po dobu 30 minut. Mezitím proběhly přípravy. Po zapojení všech částí mikrorespiometru byla pozorována aktivita mlžů *Dreissena polymorpha* během 5 minut. Dalším krokem bylo připravení destičky, nejprve se jamky zaplnily vodou do přibližně  $\frac{3}{4}$  objemu.

Dle designu se vložily skleněné kuličky do poloviny jamek. Do všech komůrek byly vloženy silikonové zarážky, které byly po nějaký čas ponořeny do destilované vody, aby nedošlo ke vzniku bublin. Voda i se zarážkami byla přemístěna do Petriho misky na černém podkladu. Díky černému podkladu se dala efektivně pozorovat přítomnost či nepřítomnost bublin. Následně už byli mlži přeneseni do jednotlivých jamek, jak lze vidět na Obr. 8, na základě designu trialu a označení na Petriho miskách.



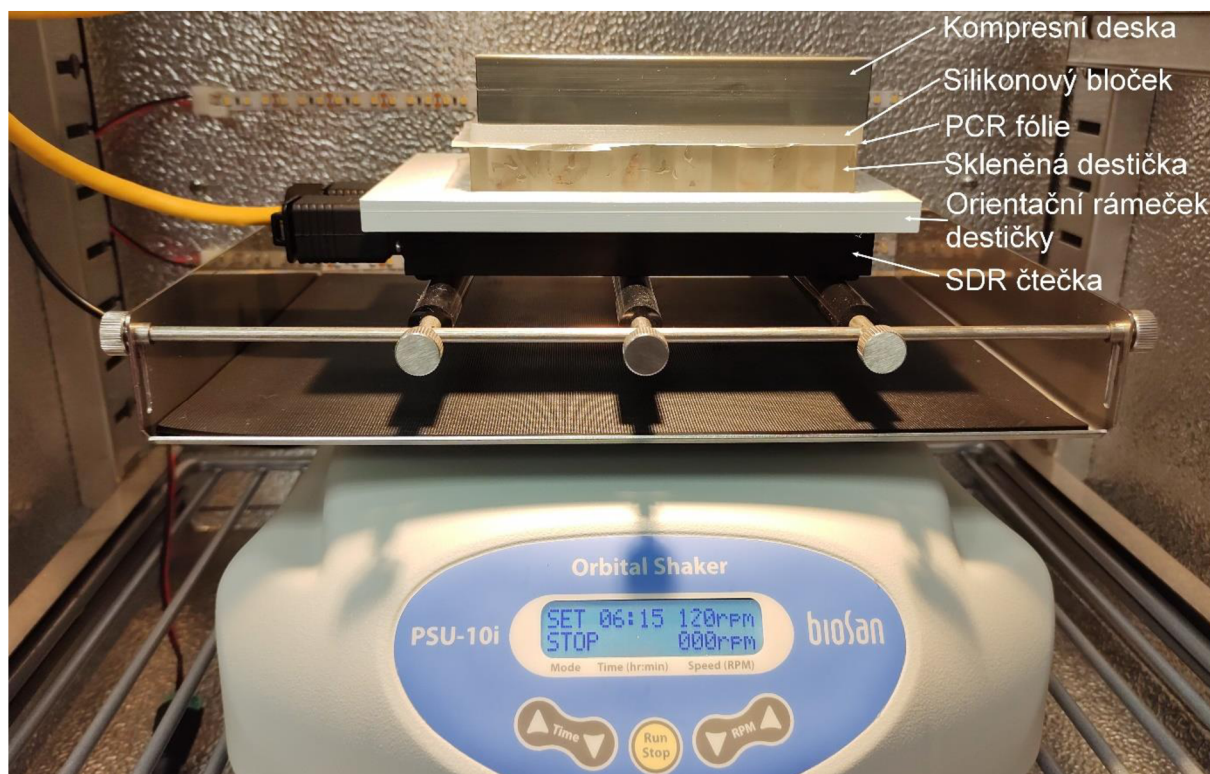
**Obr. 8** Destičky u jednotlivých trialů připravené na zakrytí a následné vložení do inkubátoru

Počty jedinců z daných koncentrací byly stejné v 1. a 2. trialu, ale lišily se ve 3. a 4. trialu, viz Tab. 5.

**Tab. 5** Počet jedinců na jednotlivé trial

Počty jedinců použitých na daný trial			
	0 $\mu\text{g/l}$ $\text{Cu}^{2+}$ (kontrola)	800 $\mu\text{g/l}$ $\text{Cu}^{2+}$	1600 $\mu\text{g/l}$ $\text{Cu}^{2+}$
<b>1.trial</b>	10	6	4
<b>2.trial</b>	10	6	4
<b>3.trial</b>	10	4	6
<b>4.trial</b>	10	4	6

V momentě, kdy byli jedinci již přichystáni, viz Obr. 8, se celá destička pokapala pár kapkami vody. Následně se nanasla PCR fólie, na ni silikonový bloček a na vrch kompresní deska. Celá takto sestavená aparatura se opatrně nadzvedla, aby došlo k otření skleněné destičky od přebytečného množství vytlačené vody. Systém se umístil na orientační rámeček, který dále dosedal na SDR čtečku. Takto připravené zařízení (viz Obr. 9) bylo připraveno k uvedení do chodu.



**Obr. 9** Sestavení kompletní mikrorespirometrické aparatury v inkubátoru připravené k zahájení experimentu

Celý systém byl po dobu měření uzavřen v inkubátoru (Pol-Eko Aparatura) se zalepenými dvířky s teplotou nastavenou na 20 °C. Průměrná teplota se po dobu experimentu pohybovala v rozmezí 20-21 °C, jak je uvedeno v Tab. 6. Teploty se v jednotlivých typech míchání významně nelišily.

**Tab. 6** Průměrné teploty ( $\pm$  směrodatná odchylka) v inkubátoru po dobu měření v jednotlivých trialech v závislosti na typu měření

Číslo trialu	Teplota (°C)	Typ míchání
1.	20,53 $\pm$ 0,08	kontinuální
2.	20,39 $\pm$ 0,05	přerušované
3.	20,57 $\pm$ 0,05	kontinuální
4.	20,62 $\pm$ 0,04	přerušované

Po ukončení měření se jedinci vyjmuli z jamek do samostatně označených zkumavek s víčky. Vzorčky mlžů se poté zamrazily pro pozdější zkoumání.

2. testovací den byl totožný. Opět bylo nejprve nutno určit mortality daných koncentrací.

Počty byly navýšeny už z minulého dne tak, aby byl dostatek jedinců k měření, viz Tab. 7.

**Tab. 7** Mortalita testovaných mlžů druhu *Dreissena polymorpha* daných koncentrací mědi  $\text{Cu}^{2+}$  (2. den testování)

Koncentrace $\text{Cu}^{2+}$ ( $\mu\text{g/l}$ )	Označení kádinek	Počet uhynulých	CELKEM uhynulých (ks)	CELKEM uhynulých (%)
0	C-1	0/7	1	4,76
	C-2	0/7		
	C-3	1/7		
800	800-1	2/7	10	47,62
	800-2	5/7		
	800-3	3/7		
1600	1600-1	2/7	17	80,95
	1600-2	3/7		
	1600-3	1/7		
	1600-4	4/7		
	1600-5	3/7		
	1600-6	4/7		

#### 4.4 Analýza dat

Data byla upravena podle metody dvoubodové individuální kalibrace. Principem je provést kalibraci na dvou roztocích (Kučera et al. 2022). Kdy prvním měřeným roztokem je voda nasycená 100 % kyslíkem. K tomu byla použita destilovaná voda, která se pravidelně promíchávala v otevřené baňce. Druhým roztokem byla naopak destilovaná voda zbavená kyslíku. K tomu se použil 1% roztok  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Tento roztok bylo nutno udržovat v uzavřené nádobce bez přístupu kyslíku. Oba roztoky se temperovaly alespoň 1 hodinu na testovací teplotu (Loligo Systems 2016). Po naměření se data ještě dále upravila. Následně došlo k výpočtu koeficientů a, b. Dále se data upravila dle vzorce:

$$\text{Opravená hodnota} = \text{původní hodnota} + (a * \text{původní hodnota} + b)$$

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

Podrobnější analýza dat bude provedena v připravovaném článku.

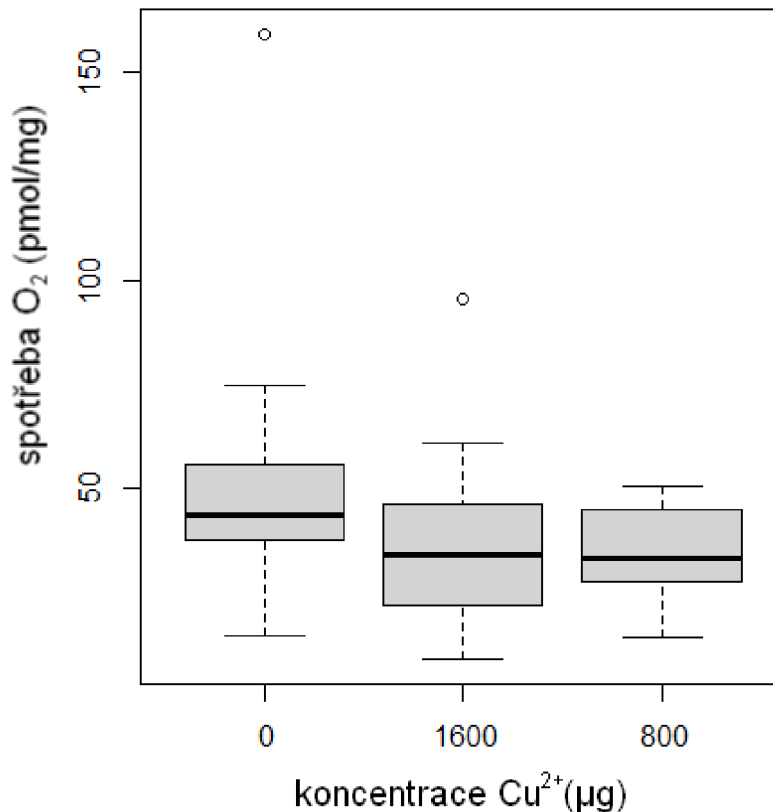
## 5 Výsledky

Kapitolu výsledky jsem rozdělila do tří podkapitol, kde se jednotlivě věnuji sledovaným vlivům. Krabicové grafy byly vytvořeny pomocí softwaru R. Významnost vysvětlující proměnné byla posuzována t-testy a u koncentrací na základě ANOVA analýzy rozptylu. U všech grafů se na ose y nachází spotřeba kyslíku v pikomolech na miligram živé váhy.



## 5.1 Vliv koncentrací mědi

V grafu (Obr. 10) je dobře viditelný vliv koncentrací mědi na metabolismus. Při koncentraci 0 je metabolismus nejvyšší, což vypovídá o dobré kondici testovaných jedinců. U koncentrací 800 a 1600  $\mu\text{g}$  je výsledek podobný. Naznačuje, že spotřeba kyslíku byla nižší než u kontrolních mlžů. To naznačuje významnou degradaci metabolismu.



**Obr. 10** Vliv koncentrací ( $\mu\text{g/l}$ ) mědi na spotřebu kyslíku v pmol/mg váhy jedinců

Data koncentrací byla posuzována na základě analýzy rozptylu (ANOVA), která umožnila porovnání 3 sledovaných skupin. Na počátku celého testování se stanovily dvě možné hypotézy – nulová hypotéza a alternativní hypotéza.

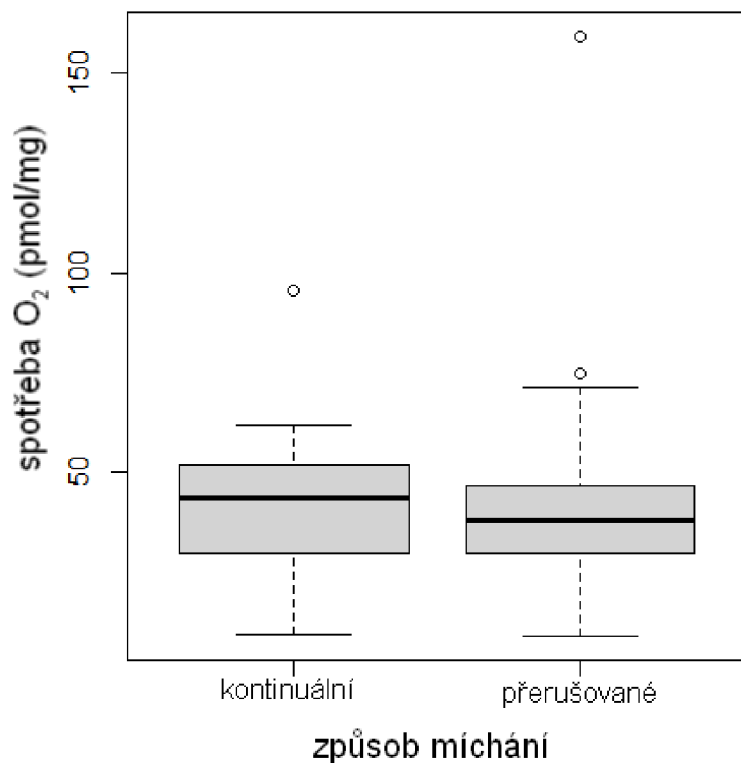
Nulovou hypotézu nelze zamítnout, pokud výsledek vykazuje p-hodnotu vyšší než 0,05 a naznačuje tak, že data se neliší. Alternativní hypotéza obecně vykazuje p-hodnotu nižší jak 0,05 a připouští, že data se liší.

V případě stanovení vlivu koncentrace Cu<sup>2+</sup> bylo stanoveno, že p-hodnota ( $p = 0,035$ ) je nižší nežli hodnota 0,05. Data tak indikují, že můžeme zamítnout nulovou hypotézu a přijmout alternativní hypotézu, tedy že existuje rozdíl ve spotřebě kyslíku mezi skupinami jedinců exponovaných různým koncentracím mědi.

Data budou podrobněji analyzována v připravovaném vědeckém článku.

## 5.2 Vliv způsobu promíchávání

V grafu (Obr. 11) je zobrazen rozdíl v naměřené spotřebě kyslíku u obou typů míchání. Mediány obou skupin jsou na přibližně stejné úrovni.



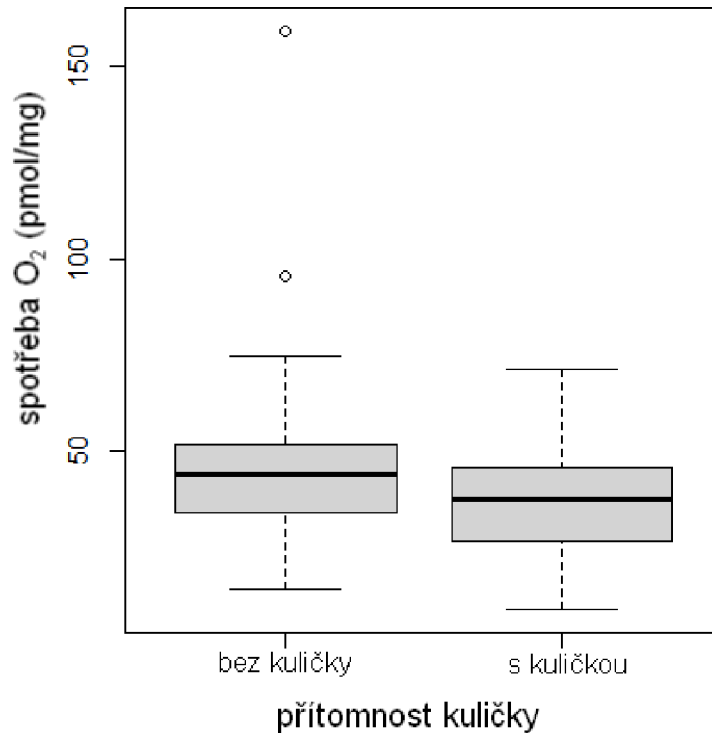
**Obr. 11** Vliv způsobu míchání vody na spotřebu kyslíku v pmol/mg váhy jedinců

Datové soubory způsobu míchání byly analyzovány t-testem (s odlišnými rozptyly). Analýza prokázala, že p-hodnota ( $p = 0,952$ ) je vyšší nežli 0,05.

Tento výsledek naznačuje, že se zde nevyskytuje statisticky významný rozdíl.

### 5.3 Vliv přítomnosti kuličky

V grafu (Obr. 12) lze pozorovat významnější rozdíl v hladinách mediánu obou skupin. Skupina bez kuličky vykazuje vyšší míru spotřeby kyslíku, což může znamenat rozdělení a nepromíchání vrstev vody v jamce.



**Obr. 12** Vliv skleněné kuličky o rozměru 3 mm na spotřebu kyslíku v pmol/mg váhy jedinců

Na základě provedeného t-testu vyšla p-hodnota ( $p = 0,005$ ), tedy hodnota nižší než 0,05. Zde se tedy nulová hypotéza zamítá a přijímá se alternativní hypotéza, tedy že lze detekovat statisticky významný rozdíl ve spotřebě kyslíku.

## 6 Diskuze

Smyslem této bakalářské práce je přinést, jak nové informace o metodice mikrorespirometrie sladkovodních mlžů, tak i důkladné popsání procesu a v neposlední řadě i přínos poznatků o působení toxikantu na druh *Dreissena polymorpha* ve spojení s mikrorespirometrií. Část literární rešerše je zameřena na fyziologii mlžů, která slouží k lepšímu pochopení mikrorespirometrických dat.

Autoři Lopes-Lima et al. (2012) zkoumali vliv subletálních koncentrací toxikantů po dobu 30 dnů v laboratorních podmínkách a zjistili, že  $\text{Cu}^{2+}$  má negativní vliv na morfologii schránky v prismatické (střední) a perleťové (vnitřní) vrstvě. Je to dáno tím, že se těžké kovy hromadí v plášti i žábrách a ovlivňují metabolismus. Narušují tím vstřebávání vápníku. Mědi vyvolaná acidóza a toxicita je definitivní příčinou kolísání hladin  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ , což vyvolává změny respiračních funkcí (Lopes-Lima et al. 2012).

Rychlost respirace se dá dobře využívat jako kritérium hodnocení stresu, kondice, přežití a rozmnožování u mlžů. Poměr dusíku a kyslíku je ukazatelem využití bílkovin v energetickém metabolismu. Množství spotřebovaného kyslíku a vyloučeného odpadního amoniaku závisí na řadě faktorů, a to na ročním období a tělesné hmotnosti. Při zvyšující se hmotnosti těla se zvyšuje i spotřeba kyslíku a vylučování amoniaku. Spotřeba kyslíku u druhu *Lamellidens marginalis* (Lamarck, 1819) byla měřena u různě velkých jedinců a bylo zjištěno, že jedinci s nižší hmotností mají vyšší spotřebu kyslíku nežli jedinci s vyšší hmotností. Autoři zdůvodňují zvýšenou spotřebu tím, že malí jedinci mají v zimních měsících nízké zásoby glykogenu, které zvyšují katabolismus bílkovin, naopak velcí jedinci mají zásoby vyšší (Jadhav & Bawane 2012). To vede k myšlence, že míra respirace by mohla být důležitým ukazatelem při ekotoxikologických studiích. Kučera et al. (2022) konstatují, že je menší množství ekotoxikologických studií zkoumající vliv znečišťujících látek na bezobratlé živočichy. V této studii zaměřují pozornost na jednu z nejproblematictějších látek působící na vodní ekosystémy, a tou jsou mikroplasty. Přínosem studie je zaměření se na behaviorální ekotoxikologii, což by se mohlo později přidat k hodnocení rizik toxických látek (Kučera et al. 2022).

Již desítky let je známo, že chemické látky ovlivňují ekosystémy. Díky vědeckému pokroku se dává na vědomí, že široká škála látek a stresorů stále negativně působí na chování živočichů. Rovněž je povědomí o mezerách v ekotoxikologických metodách, kdy je málo standardizovaných metodik a rovněž nezohledňuje behaviorální chování. Z hlediska legislativy je to složitý proces. Na výsledky behaviorálních studií je pohlíženo negativně z hlediska spolehlivosti dat a relevance údajů. Navzdory mnoha studiím se na tyto údaje v ochraně životního prostředí pohlíží minimálně. Jedním z možných důvodů je nižší prosazení behaviorálních indikátorů v legislativě (Ford et al. 2021).

V rámci toxikologických studií se tak často hodnotí pouze růst, plodnost a úmrtnost. V dokumentech jsou například uvedeny ryby jako indikátory kvality vody. Změny v chování často nejsou používány k regulačním nařízením, ale jsou uváděny jako podkladový materiál. Nedůvěru ve výsledky zapříčiňuje zejména malý počet opakování, chybějící informace pro vyhodnocení a chybějící ověření nominálních koncentrací. Velkým problémem je zajištění opakovatelnosti experimentů, kdy je snaha o minimalizaci variability. Také je důležité mít výsledky v rámci celé populace, což je obtížné na provedení. Pozitivně k tomu přistupuje

farmaceutický průmysl, který se při vývoji léčiv zaměřuje více na vodní organismy jako na modelové živočichy. Výzkumníci navrhli tato opatření pro zlepšení situace: více laboratorních studií, vysvětlení možných působení a propojení mechanismů, snaha o zavedení dokonalejších metod a navrhnutí nových metodik, zapojení umělých inteligencí a počítačových softwarů, vypracování podrobnějších protokolů (Ford et al. 2021).

Young et al. (2022) zkoumali několik fyziologických endpointů působení toxikantu na běžně používanou rybu v testech ekotoxicity *Danio rerio*, mezi které zařadili: spotřebu kyslíku, vibrační podněty (vyhodnocování neurotoxicity), rychlost proudění krve, srdeční rytmus, srdeční výkonnost a chování v závislosti na světelném režimu (Young et al. 2022).

Osobně se tedy domnívám, že v dnešní době nestačí pohlížet pouze na to, zda daný živočich uhne či nikoliv. Dle mého názoru by se do legislativních opatření měly přidat prvky jak behaviorální, tak i fyziologické povahy.

V kapitole 3.4.2 je možno shledat, že studií se sladkovodními mlži ve spojení s mikrorespirometrií bylo provedeno je velmi málo. Většina provedených studií se zaměřuje na mořské mlže, či plže. Co se týká přesné metodiky, tak ve většině studií není metodická stránka příliš rozsáhle popsána. Studie Martin et al. (2020) využívá k lepšímu promíchávání v mikrorespirometrických jamkách magnetické tyčinky, avšak uvádí, že některé tyčinky se v průběhu měření přestaly točit (Martin et al. 2020). Tedy v porovnání se skleněnou kuličkou, která funguje na principu pohybu po obvodu ve spojení s orbitálním míchačem, může být o něco spolehlivější. Studie Polymeropoulos et al. (2013) používala podobnou kombinaci jako v této bakalářské práci, kdy popisují použití nerezových kuliček o rozměru 2 mm ve spojení s orbitálním míchačem a sítku pro oddělení kuličky od organismu (Polymeropoulos et al. 2013). Jamky, kde se vyskytovala kulička naznačují menší variabilitu dat, což poukazuje na fakt, že voda v jamkách byla lépe promíchávána. Skupina s kuličkou vykazuje nižší spotřeby kyslíku pravděpodobně z toho důvodu, že docházelo k lepšímu promíchávání, a tedy i lepší stratifikaci kyslíku v celém objemu komůrky, viz Obr. 12. Tento fakt podporuje studie Rollera et al. (2022-2025), kde používali dvě skleněné kuličky (Roller et al. 2022-2025).

Z hlediska studie invazních druhů je nutno podotknout, že i mimo negativní dopady jsou zaznamenány i pozitivní působení. Burlakova (et al. 2022) ve své rozsáhlé práci uvádí, že mezi jeden z pozitivních účinků patří filtrace vody za účelem dýchání a krmení, čímž se z vody odstraňují živiny a zvyšuje se tak průhlednost vody. Tuto ekosystémovou službu účinně používají v Německu, kde druh *Dreissena polymorpha* úspěšně testují na přečišťování odpadních vod (Burlakova et al. 2022). V minulosti se hojně používaly různé sloučeniny k hubení invazních druhů. Avšak jejich negativní dopad nemusí zasáhnout jen cílený invazní druh, ale i druhy původní (Sprecher & Getsinger 2000). Domnívám se tedy, že bysme měli lépe porozumět všem pochodům v organismech invazních druhů mlžů. K tomu je nutné testovat různé metody pro poodhalení skrytých mechanismů.

Skvělým příkladem je studie Liu et al. (2020), kde se zabývali druhem *Limnoperna fortunei* a řešili škody způsobené biofoulingem. Problém se vyskytuje zejména u vodního potrubí, kdy může dojít k zamezení průchodu. Navrhnutá řešení se týkala zvýšení teploty vody (>35 °C) procházející potrubím, snížení hladiny rozpuštěného kyslíku (<1,4 mg/l), navýšení pH (>9,7), což může způsobit smrt. Jako prevenci navrhuje zvýšení intenzity světla (>55,000 lx), což odrazuje mlže od přichycení za pomoci byssových vláken (Liu et al. 2020).

Autor Liu et al. (2022) konstatuje, že mlži jsou stále v kontaktu s vodou a jsou tedy citliví na přítomnost kontaminantů. Rychlost filtrace by mohla být dobrým znakem včasných fyziologických odpovědí. Změny v rychlosti filtrace mají nadále vliv na další životní pochody (Liu et al. 2022). Ahmmed et al. (2021) uvádí, že chování mlžů slouží jako užitečný prostředek sledování polutantů ve vodním prostředí. Mezi fyziologické indikátory přítomnosti xenobiotik patří srdeční aktivita, filtrace a otevírání lastur. Zavření lastury je obranou na nepříznivou situaci (Ahmmed et al. 2021).

## 7 Závěr

- V této bakalářské práci byly shrnuty poznatky ohledně mikrorespirometrického zařízení od firmy Loligo Systems i s uvedením konkrétních studií využívajících právě toto zařízení.
- V experimentální části byl popsán provedený pokus s invazním druhem *Dreissena polymorpha* v kontextu působení běžně se vyskytujícího toxikantu, a to mědi.
- Jako účinné koncentrace se projevíly 800 a 1600  $\mu\text{g/l Cu}^{2+}$ , tyto hladiny působily vyšší mortalitu, avšak vitálnějších jedinců byl dostatečný počet pro provedení respirometrie.
- Byly navrženy a otestovány dvě metody promíchávání – kontinuální a přerušované, obě s využitím orbitálního míchače. Nebyl zde zjištěn signifikantní rozdíl v datech.
- Navíc bylo pro zefektivnění navrženo řešení proti zastínění senzoru sledovaným organismem – stoper – zarážka, která oddělila mlže od senzoru. Avšak způsobem, který neoddělil objemy vody v jamce.
- Pro zabránění možných chyb ve stagnaci vody byla otestována skleněná kulička o rozměru 3 mm. Potvrdilo se, že kulička měla vliv na účinnost promíchávání, což naznačovala naměřená data promítnutá do grafů. Data byla více homogenní a nebyly zaznamenány vychýlené hodnoty.

Závěrem lze říci, že tato práce přináší nové poznatky ohledně testování invazního druhu *Dreissena polymorpha* v mikrorespirometrickém zařízení Loligo Systems. Na základě metodických informací lze provést další experimenty s respirací se zaměřením na menší druhy sladkovodních mlžů, či na juvenilní jedince.

## 8 Literatura

- Agrawal A, Jurgens LJ. 2023. Effects of Asynchronous Stressors on the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*). *Estuaries and Coasts*. **46**(3):697-706.
- Ahmed P, Reynolds J, Levine JF, Bozkurt A. 2021. An Accelerometer-Based Sensing System to Study the Valve-Gaping Behavior of Bivalves. *IEEE Sensors Letters* **5**(4):1-4.
- Alavi SMH, Nagasawa K, Takahashi KG, Osada M. 2017. Structure-Function of Serotonin in Bivalve Molluscs. Pages 38-39 in Kaneez FS, editor. *Serotonin - A Chemical Messenger Between All Types of Living Cells*.
- Atkinson CL, First MR, Covich AP, Opsahl SP a Golladay SW. 2011. Suspended material availability and filtration–biodeposition processes performed by a native and invasive bivalve species in streams. *Hydrobiologia* **667**(1):191-204.
- Beran L. 2017. Nepůvodní druhy vodních měkkýšů v ČR. *Fórum ochrany přírody* **2017**(3):31-34.
- Bhamre PR, Thorat SP, Desai AE, Deoray BM. 2011. Evaluation of Acute Toxicity of Mercury, Cadmium and Zinc to a Freshwater Mussel *Lamellidens consobrinus*fi. *Our Nature* **8**(1):180-184.
- Biosan. 2022. PSU-10i, PSU-20i – User instructions. Medical-Biological Research & Technologies. Biosan, Latvia. Available from <https://biosan.lv/products/psu-10i-orbital-shaker/> (Accessed March 2023).
- Boyd A, Choi J, Ren G, How ZT, El-Din MG, Tierney KB, Blewett TA. 2023. Can short-term data accurately model long-term environmental exposures? Investigating the multigenerational adaptation potential of *Daphnia magna* to environmental concentrations of organic ultraviolet filters. *Journal of Hazardous Materials* (e130598) DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.130598.
- Burlakova LE, Karatayev AY, Boltovskoy D, Correa NM. 2022. Ecosystem services provided by the exotic bivalves *Dreissena polymorpha*, *D. rostriformis bugensis*, and *Limnoperna fortunei*. *Hydrobiologia* (e35990416) DOI: 10.1007/s10750-022-04935-4.
- Canesi L, Miglioli A, Balbi T, Fabbri E. 2022. Physiological Roles of Serotonin in Bivalves: Possible Interference by Environmental Chemicals Resulting in Neuroendocrine Disruption. *Frontiers in Endocrinology* (e792589) DOI: 10.3389/fendo.2022.792589.
- Český hydrometeorologický ústav. 2022. CHMI: Přehled hodnot tlaku vzduchu na stanicích, Praha-Ruzyně. Available from <https://www.chmi.cz/aktualni-situace/aktualni-stav-pocasi/ceska-republika/stanice/profesionalni-stanice/tabulky/tlak-vzduchu> (accessed January 2023).
- Coughlan NE, et al. 2021. Biometric conversion factors as a unifying platform for comparative assessment of invasive freshwater bivalves. *Journal of Applied Ecology* **58**(9):1945-1956.



- Dietz TH, Udoetok AS, Cherry JS, Silverman H, Byrne RA. 2000. Kidney function and sulfate uptake and loss in the freshwater bivalve *Toxolasma texasensis*. *The Biological Bulletin* **199**(1):14-20.
- Ditrich O, Kváč M, Květoňová D, Sak B, Brůčková P, Kociánová J, Ryvolová K, Rousková L. 2010. Role vodních bezobratlých při odstraňování oocyst kryptosporidií z vody. Pages 71-74 in Dolejš P, editor. *Pitná voda*. W&ET Team, České Budějovice.
- Dubský K, Šrámek V, Kouřil J. 2003. *Obecné rybářství*. Informatorium, Praha.
- Farris JL, Van Hassel JH. 2007. *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton.
- Fluharty RS. 2019. *Effects of Thermal Stress on Unionid Glochidia and Rising Salinity on Adult Unionid Mussels* [MSc. Thesis]. Auburn University, Alabama.
- Ford AT, et al. 2021. The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection. *Environmental Science & Technology* **55**(9):5620-5628.
- Freitas ETF, Moreira AMS, De Paula RS, Andrade GR, De Carvalho MD, Assis PS, Jorge EC, Cardoso AV. 2022. Ultrastructure of the gill ciliary epithelium of *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857), the invasive golden mussel. *BMC Zoology* (e246032844) DOI: 10.1186/s40850-022-00107-y.
- Ganser AM, Newton TJ, Haro RJ. 2015. Effects of elevated water temperature on physiological responses in adult freshwater mussels. *Freshwater Biology* **60**(8):1705-1716.
- Griffith MB. 2017. Toxicological perspective on the osmoregulation and ionoregulation physiology of major ions by freshwater animals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **36**(3):576-600.
- Hanslík E, Němejcová D, Baudišová D. 2017. Klasifikace kvality povrchových vod. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace* **59**(6):4-11.
- Hartman P, Příkryl I, Štědranský E. 2005. *Hydrobiologie*. 3. přeprac. vyd. Informatorium, Praha.
- Hills A, Pouil S, Hua D, Mathews TJ. 2020. Clearance rates of freshwater bivalves *Corbicula fluminea* and *Utterbackia imbecillis* in the presence and absence of light. *Aquatic Ecology* **54**(4):1059-1066.
- Horsák M, Juříčková L, Pícka J. 2013. *Měkkýši České a Slovenské republiky*. Kabourek, Zlín.
- Hviid Larsen E, Deaton LE, Onken H, O'donnell M, Grosell M, Dantzler WH, Weihrauch D, 2014. Osmoregulation and Excretion. *Comprehensive Physiology* **4**(2):417-418.
- Ingersoll CG, et al. 2013. Standard guide for conducting laboratory toxicity tests with freshwater mussels. ASTM (e2455-06) DOI: 10.1520/E2455-06R13.

- Jadhav M, Bawane V. 2012. Size Specific Changes in the Rate of Oxygen Consumption, Ammonia Excretion and O: N Ratio of Freshwater Bivalve Mollusc, *Lamellidens Marginalis* (Lamarck) from Jayakwadi Dam at Paithan During Winter Seasons. *Bioscience Discovery* **3**(3):331-336.
- John VK, Gautam A. 2020. Mollusk. Pages 1-14 in Vonk J, Shackelford TK, editors. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer International Publishing, Cham.
- Knoll K, Chamberlain R, Chamberlain J. 2017. Escape Burrowing of Modern Freshwater Bivalves as a Paradigm for Escape Behavior in the Devonian Bivalve *Archonodon catskillensis*. *Geosciences* (e7040102) DOI: 10.3390/geosciences7040102.
- Kopp R, Hilscherová E. 2015. *Základy vodní ekotoxikologie*. Mendelova univerzita v Brně, Brno.
- Kořínková T. 2007. Pohled na naše okružankovité mlže zevnitř. *Živa* 2007(5):222-223.
- Kučera J, et al. 2022. Polystyrene Microparticles and the Functional Traits of Invertebrates: A Case Study on Freshwater Shrimp *Neocardina heteropoda*. *Fishes* (e7060323) DOI:10.3390/fishes7060323.
- Kůs P, Skala M, Sedlák F. 2021. *Ekomonitor: Slávička mnohotvárná vs. technologické okruhy*. Praha. Available from [http://www.ekomonitor.cz/sites/default/files/filepath/prezentace/29\\_kus.pdf](http://www.ekomonitor.cz/sites/default/files/filepath/prezentace/29_kus.pdf) (accessed March 2023).
- Lavictoire L, Ramsey AD, Moorkens EA, Souch G, Barnhart MC, Duperron S. 2018. Ontogeny of juvenile freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia: Margaritiferidae). *PLOS ONE* (e193637) DOI: 10.1371/journal.pone.0193637.
- Liu S, Zhao H, Zheng M, Wang H, Jing C, Zhang W, Hu F. 2022. The physiological, biochemical and transcriptional responses to sulfamethoxazole in the Asian clam, *Corbicula fluminea* (O. F. Müller, 1774). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* (e109406) DOI: 10.1016/j.cbpc.2022.109406.
- Liu W, Xu M, Zhang J, Zhang T. 2020. Survival and attachment of biofouling freshwater mussel (*Limnoperna fortunei*) to environmental conditions: potential implications in its invasion, infection and biofouling control. *Limnology* **21**(2):245-255.
- Lopes-Lima Manuel, Lopes A, Casaca P, Nogueira I, Checa A, Machado J. 2009. Seasonal variations of pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Ca<sup>2+</sup> in the haemolymph: implications on the calcification physiology in *Anodonta cygnea*. *Journal of Comparative Physiology B* **179**(3):279-286.
- Lopes-Lima M, Freitas S, Pereira L, Gouveia E, Hinzmann M, Checa A, Machado J. 2012. Ionic regulation and shell mineralization in the bivalve *Anodonta cygnea* (swan mussel) following heavy-metal exposure. *Canadian Journal of Zoology* **90**(2):267-283.

- Louhi P, Pettinau L, Härkönen LS, Anttila K, Huusko A. 2023. Carryover effects of environmental stressors influence the life performance of brown trout. *Ecosphere* (e4361) DOI: 10.1002/ecs2.4361.
- Lurman GJ, Walter J, Hoppeler HH. 2014. The effect of seasonal temperature variation on behaviour and metabolism in the freshwater mussel (*Unio tumidus*). *Journal of Thermal Biology* **43**:13-23.
- Machado J, Lopes-Lima M. 2011. Calcification mechanism in freshwater mussels: Potential targets for cadmium. *Toxicological & Environmental Chemistry* **93**(9):1778-1787.
- Martin BT, Dudley PN, Kashef NS, Stafford DM, Reeder WJ, Tonina, D, Del Rio AM, Foott JS, Danner EM. 2020. The biophysical basis of thermal tolerance in fish eggs. *Royal society publishing* **287**(1937):20201550 DOI: 10.1098/rspb.2020.1550.
- McElwain A, Bullard SA. 2014. Histological Atlas of Freshwater Mussels (Bivalvia, Unionidae): *Villosa nebulosa* (Ambleminae: Lampsilini), *Fusconaia cerina* (Ambleminae: Pleurobemini) and *Strophitus connasaugaensis* (Unioninae: Anodontini). *Malacologia* **57**(1):99-239.
- McMahon RF, Bogan AE. 2001. Mollusca: Bivalvia, Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. Pages 332-354 in Thorp JH, editor. ProQuest Ebook Central. Elsevier Science.
- Loligo Systems. 2023. Microplate System (CORE). Denmark. Available from <https://www.loligosystems.com/products/microplate/systems/microplate-system-core-24-channels80ul/> (accessed March 2023).
- Loligo Systems. 2016. Microplate reader - User manual: SDR SensorDish® Reader. PreSens, Germany. Available from <https://www.loligosystems.com/resources/user-manuals/> (accessed March 2023).
- Modesto V, Ilarri M, Souza AT, Lopes-Lima M, Douda K, Clavero M, Sousa R. 2018. Fish and mussels: Importance of fish for freshwater mussel conservation. *Fish and Fisheries* **19**(2):244-259.
- Morton B. 2015. The Biology and Anatomy of *Limnoperna fortunei*, a Significant Freshwater Bioinvader: Blueprints for Success. Pages 3-41 in Boltovskoy D editor. *Limnoperna Fortunei: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel*. Springer International Publishing, Cham.
- Nel A, McQuaid CD, Duna OO, Giménez L, Porri F. 2023. Similar metabolic responses of co-occurring post-settlement mussels to temperature change despite distinct geographical distributions. *Marine Biology* **170**(2) DOI: 10.1007/s00227-022-04147-3.
- Nikolić Marko, Gvozdrenović S, Kholodkevich S, Kuznetsova T, Kurakin A. 2017. Valve movements in bivalves as a behavioral biomarker. 22nd Internacionalna Naučno-Stručna Konferencija Informacione Tehnologije 2017, Podgorica.

- Ortmann Christian, Grieshaber MK. 2003. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Journal of Experimental Biology* **206**(22):4167-4178.
- Pasparakis C, Mager EM, Stieglitz JD, Benetti D, Grosell M. 2016. Effects of Deepwater Horizon crude oil exposure, temperature and developmental stage on oxygen consumption of embryonic and larval mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Aquatic Toxicology* **181**:113-123.
- Pettersen AK, White CR, Marshall DJ. 2016. Metabolic rate covaries with fitness and the pace of the life history in the field. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**(1831):20160323 DOI: 10.1098/rspb.2016.0323.
- Polymeropoulos ET, Elliott NG, Wotherspoon SJ, Frappell PB. 2013. Respirometry: Correcting for Diffusion and Validating the Use of Plastic Multiwell Plates with Integrated Optodes. *Physiological and Biochemical Zoology: Ecological and Evolutionary Approaches* **86**(5):588-592.
- Pouil S, Hills A, Mathews TJ. 2021. The effects of food quantity, light, and temperature on clearance rates in freshwater bivalves (Cyrenidae and Unionidae). *Hydrobiologia* **848**(3):675-689.
- PreSens Precision Sensing. 2022. SDR SensorDish® Reader Basic Set. PreSens. Germany. Available from <https://www.presens.de/products/detail/sdr-sensordish-reader-basic-set> (accessed March 2023).
- Roller BR, Lee ZM, Studer-Rabeler KE, Schmidt TM. 2022. Real Time Respiration Measurements: Measuring the aerobic respiration of complex microbial communities. PreSens. USA. Available from <https://www.presens.de/knowledge/publications/application-note/real-time-respiration-measurements-594> (accessed March 2023)
- Rothe, LE, Botha TL, Feld CK, Weyand M, Zimmermann S, Smit NJ, Wepener V, Sures B. 2021. Effects of conventionally-treated and ozonated wastewater on mortality, physiology, body length, and behavior of embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution* (e117241) DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117241.
- Santini O, Chahbane N, Vasseur P, Frank H. 2011. Effects of low-level copper exposure on Ca<sup>2+</sup>-ATPase and carbonic anhydrase in the freshwater bivalve *Anodonta anatina*. *Toxicological & Environmental Chemistry* **93**(9):1826-1837.
- Schwaner C, Barbarosa M, Schwemmer TG, Pales Espinosa E, Allam B. 2023. Increased Food Resources Help Eastern Oyster Mitigate the Negative Impacts of Coastal Acidification. *Animals* **13**(7) DOI:10.3390/ani13071161.

- Seo E, Wakashin H, Seo Y. 2021. The kidney of the Nodularia freshwater mussel has a larger filtration-size and counter-current system with improved water excretion compared with the seawater mussel *Mytilus*. *Biology Open* **10**(6):bio058692 DOI:10.1242/bio.058692.
- Shukla S, Shukla S, Shukla R, Shukla S, Sharma J, Sharma UD. 2018. A Report on fresh water bivalves and their shell structure from Lucknow (U.P.) India. *International Journal of Advanced Research* **6**(2):601-605.
- Spann N, Harper EM, Aldridge DC. 2010. The unusual mineral vaterite in shells of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* from the UK. *Naturwissenschaften* **97**(8):743-751.
- Spooner DE, Vaughn CC, Galbraith HS. 2005. Physiological determination of mussel sensitivity to water management practices in the Kiamichi River and review and summarization of literature pertaining to mussels of the Kiamichi and Little River watersheds, Oklahoma. University of Oklahoma, Oklahoma. Available from [https://biosurvey.ou.edu/download/publications/FINAL\\_REPORT\\_T-P-10.pdf](https://biosurvey.ou.edu/download/publications/FINAL_REPORT_T-P-10.pdf) (accessed March 2023).
- Sprecher SL, Getsinger KD. 2000. Zebra Mussel Chemical Control Guide. US Army Corps of Engineers, Vicksburg. Available from <https://erdc-library.erdcdren.mil/jspui/bitstream/11681/10074/1/EL-TR-00-1.pdf?fbclid=IwAR01MvTn1GK9LFx3XOpCuLdeMJmwQ2swwdgPmdgH5kHI95IY4Yyjc9vyKo> (accessed March 2023).
- Turner AN, Hoffman JM, Powell ML, Sammy MJ, Moellering DR, Nagy TR, Austad SN, Smith DL. 2019. Assessment of a Microplate System for Measuring Individual Real-Time Respiration in Small Model Organisms of Aging. *Innovation in Aging* **3**(1):918-919.
- Varshney S, Gora AH, Kiron V, Siriyappagouder P, Dahle D, Kögel T, Ørnstrud R, Olsvik PA. 2023. Polystyrene nanoplastics enhance the toxicological effects of DDE in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Science of The Total Environment* **859**(2) (e160457) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.160457.
- Varshney S, Adnan HG, Siriyappagouder P, Kiron V, Olsvik PA. 2022. Toxicological effects of 6PPD and 6PPD quinone in zebrafish larvae. *Journal of Hazardous Materials* **424**(Part C) (e127623) DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.127623.
- Vaghn CC. 2018. Ecosystem services provided by freshwater mussels. *Hydrobiologia* **810**(1):15-27.
- Vereycken JE, Aldridge DC. 2023. Bivalve molluscs as biosensors of water quality: state of the art and future directions. *Hydrobiologia* **850**(2):231-256.
- Ward EJ, Shumway SE. 2004. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **300**(1-2):83-130.

- Xiao B, Li E, Du Z, Jiang R, Chen L, Yu N. 2014. Effects of temperature and salinity on metabolic rate of the Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). SpringerPlus **3**(455) DOI: 10.1186/2193-1801-3-455
- Yologlu E. 2019. Assessment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Mg<sup>2+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase, and Total- ATPase Activities in Gills of Freshwater Mussels Exposed to Penconazole. Commagene Journal of Biology **3**(2):88-92.
- Young AYW, Aidira G, Saputra F, Alos HC, Aventurado CA, Lai Y, Vasquez RD, Hsiao C, Hung C. 2022. Toxicity Assessment of an Anti-Cancer Drug of p-Toluene Sulfonamide in Zebrafish Larvae Based on Cardiovascular and Locomotion Activities. Biomolecules **12**(8):1103 DOI: 10.3390/biom12081103
- Yusseppone MS, Rocchetta I, Sabatini SE, Luquet CM, Ríos de Molina MC, Held C, Abele D. 2018. Inducing the Alternative Oxidase Forms Part of the Molecular Strategy of Anoxic Survival in Freshwater Bivalves. Frontiers in Physiology **9**(100) DOI: 10.3389/fphys.2018.00100
- Zhang J, Yu M, Gao Y, Zhang M, Dong J, Li M, Li X. 2023. Feeding behavior, microcystin accumulation, biochemical response, and ultramicrostructure changes in edible freshwater bivalve *Corbicula fluminea* exposed to *Microcystis aeruginosa*. Environmental Science and Pollution Research **30**(5):13560-13570.

## 9 Seznam obrázků a tabulek

**Obr. 13** Anatomie sladkovodních mlžů (Horsák et al. 2013)

**Obr. 14** Plastové nádrže použité k aklimatizaci sláviček mnohotvárných se vzduchováním a teploměrem

**Obr. 15** Začátek expozice a rozmístění skleněných kádinek u testovaného druhu slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) za použití mědi ve formě  $\text{Cu}^{2+}$

**Obr. 16** Silikonové zarážky použité při mikrorespirometrii

**Obr. 17** Schéma všech trialů – designy pro lepší orientaci při metodickém postupu

**Obr. 18** Časová osa přerušovaného míchání

**Obr. 19** Propojení jednotlivých částí mikrorespirometru. Upraveno podle (Presens Precision Sensing 2016).

**Obr. 20** Destičky u jednotlivých trialů připravené na zakrytí a následné vložení do inkubátoru

**Obr. 21** Sestavení kompletní mikrorespirometrické aparatury v inkubátoru připravené k zahájení experimentu

**Obr. 22** Vliv koncentrací ( $\mu\text{g/l}$ ) mědi na spotřebu kyslíku v  $\text{pmol/mg}$  váhy jedinců

**Obr. 23** Vliv způsobu míchání vody na spotřebu kyslíku v  $\text{pmol/mg}$  váhy jedinců

**Obr. 24** Vliv skleněné kuličky o rozměru 3 mm na spotřebu kyslíku v  $\text{pmol/mg}$  váhy jedinců

**Tab. 1** Stanovené normy pro jednotlivé třídy kvality tekoucích povrchových vod

**Tab. 2** Technická data jednotlivých skleněných destiček dostupných na webových stránkách Loligo Systems

**Tab. 3** Mortalita testovaných mlžů druhu *Dreissena polymorpha* daných koncentrací mědi  $\text{Cu}^{2+}$  (1. den testování)

**Tab. 4** Charakteristika použitého orbitálního míchače. Upraveno podle (Biosan 2022)

**Tab. 5** Počet jedinců na jednotlivé trialy

**Tab. 6** Průměrné teploty v inkubátoru po dobu měření v jednotlivých trialech

**Tab. 7** Mortalita testovaných mlžů druhu *Dreissena polymorpha* daných koncentrací mědi  $\text{Cu}^{2+}$  (2. den testování)

## 10 Seznam použitých zkratek a symbolů

<b>ASTM</b>	–	Americká společnost pro testování a materiály
<b>ATP</b>	–	Adenosintrifosfát
<b>cAMP</b>	–	Cyklický adenosinmonofosfát
<b>KNK</b>	–	Kyselinová neutralizační kapacita
<b>LED</b>	–	Light-Emitting Diode - Elektroluminiscenční dioda
<b>PAH</b>	–	Polycyklické aromatické uhlovodíky
<b>PCR</b>	–	Post-consumer recycled - Recyklát po spotřebiteli
<b>SMR</b>	–	Standartní rychlost metabolismu
<b>SRD</b>	–	Sensor Dish reader – Sensorová čtečka
<b>USB</b>	–	Univerzální sériová sběrnice
<b>UV</b>	–	Ultrafialové záření
<b>3D</b>	–	Trojrozměrný
<b>6PPD</b>	–	n-(1,3-dimethylbutyl)-n'-fenyl-p- fenylendiamin
<b>6PPDQ</b>	–	n-(1,3-dimethylbutyl)-n'-fenyl-p- fenylendiamin-chinon



