

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Význam filtrátorů pro odstraňování parazitů z vodního prostředí – modelové druhy *Corbicula fluminea* a hlístice *Angiostrongylus cantonensis***

**Diplomová práce**

**Bc. Dagmar Ašková**

**Akvakultura a péče o vodní ekosystémy**

**Ing. Karel Douda, Ph. D.**

© 2024 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Význam filtrátorů pro odstraňování parazitů z vodního prostředí – modelové druhy *Corbicula fluminea* a hlístice *Angiostrongylus cantonensis*“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21. 4. 2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce panu Ing. Karlu Doudovi, Ph.D. za vedení, cenné rady a sdílení zkušeností při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat panu prof. MVDr. Davidu Modrému, Ph.D. za pomoc při porozumění problematice výskytu *A. cantonensis*, poděkování patří také panu MSc. Divakaranovi Pandianovi, BSc. za pomoc při péči o laboratorní potkany. V neposlední řadě bych ráda poděkovala celému týmu, bez kterého by práce v laboratoři trvala mnohem déle, a to Tereze Hanzlíčkové, Bc. Adéle Švajné, Msc. Kateřině Gregarové a také Mgr. Jakubovi Hradečnému, který nás a celý průběh testování skvěle koordinoval.

# Význam filtrátorů pro odstraňování parazitů z vodního prostředí – modelové druhy *Corbicula fluminea* a hlístice *Angiostrongylus cantonensis*

## Souhrn

Testování přirozené schopnosti mlžů filtrovat mikrobiální organismy z vodního prostředí, je předpokladem pro vývoj metod kontroly přenosu parazitických a patogenních organismů. Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit vliv mlžů na perzistenci parazitů ve vodním prostředí – jako modelové druhy byly zvoleny korbikula asijská *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) a hlístice *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935).

Teoretická část práce se zaměřuje na biologii a ekologii mlžů, mechanismy filtrování potravy a na roli těchto filtrátorů v prevalenci parazitů. Popisuje také rozšíření modelových druhů a rizika spojená s výskytem *A. cantonensis*, včetně metod její detekce. Experimentální část práce zahrnovala testování vlivu aktivní filtrace jedinců *C. fluminea* a vliv složitosti prostředí vytvořené přítomností schránek *C. fluminea* v testovacích nádržích na perzistenci larev 1. stádia *A. cantonensis* ve vodním prostředí. Byla také testována interakce mezi typy vodního prostředí – intenzitou proudění vody – a uvedenými faktory. Ačkoliv zjištění v odborné literatuře naznačilo potenciální schopnost *C. fluminea* snížit perzistenci *A. cantonensis* ve vodním prostředí, a v nádržích s mlži byla v experimentu zaznamenána vyšší mediánová hodnota úbytku larev, tak výsledky experimentu nedosáhly statistické významnosti. Proto bylo navrženo několik metodických úprav pro budoucí experimenty.

Práce přispívá k pochopení možností ve využití přirozených filtrátorů jako efektivního nástroje pro snížení parazitické a patogenní zátěže ve vodním prostředí.

**Klíčová slova:** filtrační aktivita mlžů, hlístice, mlži jako predátoři, *Corbicula fluminea*, *Angiostrongylus cantonensis*

# **The importance of filter-feeders for the removal of parasites from aquatic environments – model species *Corbicula fluminea* and the nematode *Angiostrongylus cantonensis***

## **Summary**

Testing the natural ability of bivalves to filter microbial organisms from the aquatic environment is a prerequisite for developing methods to control the transmission of parasitic and pathogenic organisms. The aim of this thesis was to evaluate the effect of bivalves on the persistence of parasites in the aquatic environment – as a model species were selected the Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) and the nematode *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935).

The theoretical part focuses on the biology and ecology of bivalves, their filter-feeding mechanisms and the role of these filter-feeders in prevalence of parasites. It also describes the distribution of the model species and the risks associated with *A. cantonensis*, including methods for its detection. The experimental part included testing the effect of active filtration by *C. fluminea* individuals and the effect of the environmental complexity created by the presence of *C. fluminea* shells in the test tanks on the persistence of first stage larvae of *A. cantonensis* in the aquatic environment. The interaction between types of aquatic environments – water flow intensity – and mentioned factors was also tested. Although findings in the literature suggested a potential ability of *C. fluminea* to reduce the persistence of *A. cantonensis* in aquatic environments, and a higher median larval mortality was observed in the experiment in the bivalve tanks, the results of the experiment did not reach statistical significance. Therefore, several methodological adjustments were suggested for future research.

This work contributes to a understanding of the potential in the use of natural filter-feeders as an effective strategy for reducing parasitic and pathogenic loads in aquatic environments.

**Keywords:** filtration activity of bivalves, nematodes, bivalves as predators, *Corbicula fluminea*, *Angiostrongylus cantonensis*

# Obsah

1	Úvod .....	7
2	Vědecká hypotéza a cíle práce .....	8
3	Literární rešerše .....	9
3.1	Biologie mlžů .....	9
3.1.1	<i>Corbicula fluminea</i> (Müller, 1774) .....	10
3.2	Parazitická hlístice <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Chen, 1935) .....	11
3.2.1	Geografické rozšíření .....	11
3.2.2	Životní cyklus .....	12
3.2.3	Patogeneze .....	13
3.2.4	Detekční metody larválních stádií parazitů .....	14
3.3	Význam mlžů pro prevalenci parazitů .....	14
4	Materiál a metody .....	17
4.1	Odběr a péče o modelové druhy .....	17
4.2	Izolace larev z výkalů .....	18
4.3	Experiment s modelovými druhy .....	21
4.4	Zpracování a analýza dat .....	23
4.4.1	Výpočty a vizualizace dat v R studiu .....	24
5	Výsledky .....	25
5.1	Distribuce dat .....	25
5.1.1	Transformace dat .....	26
5.2	Analýza dat .....	29
5.2.1	Dataset s upravenými zápornými hodnotami .....	29
5.2.2	Dataset bez úpravy záporných hodnot .....	32
6	Diskuze .....	36
6.1	Vliv filtrujících jedinců na perzistenci larev ve vodním prostředí .....	36
6.2	Vliv přítomnosti schránek mlžů na perzistenci larev ve vodním prostředí .....	38
6.3	Stojatá vs. tekoucí voda .....	38
6.4	Budoucí vývoj .....	39
7	Závěr .....	41
8	Literatura .....	42
9	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	51
10	Samostatné přílohy .....	I

# 1 Úvod

Parazitické druhy obývají naprostou většinu vodních stanovišť a mají nepříznivý vliv nejen na jedince a populace hostitelských druhů, ale i na celé ekosystémy (Mouritsen & Jensen 1997). Kromě toho jsou významnou součástí biomasy (Kuris et al. 2008) a negativně ovlivňují stabilitu potravních řetězců (Dunne et al. 2013). Negativní dopady parazitů mohou navíc zhoršovat klimatické změny, dle Burge et al. (2014) vliv nárůstu teplot a bouřkových událostí vedl ke zvýšenému výskytu průjmových onemocnění způsobených bakteriemi *Vibrio vulnificus* (Farmer, 1979) a *Vibrio parahemolyticus* (Fujino, 1950).

Klimatické změny a globalizace navíc přispívají k šíření nepůvodních druhů (Bellard et al. 2016), včetně parazitů (Altizer et al. 2011). Právě parazitická hlístice *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v důsledku klimatických změn rozšiřuje svůj areál výskytu z tropických a subtropických oblastí směrem k mírnému pásu (Cowie et al. 2022). Představuje potenciální riziko nejen pro místní faunu, ale také pro člověka jakožto paratenického hostitele (Wang et al. 2018). Také nárůst lidské populace vyvíjí stále větší tlak na rozvoj produkční akvakultury. V posledních letech je zaznamenáván stoupající výskyt infekčních chorob (Groner et al. 2016), které mohou v akvakulturních systémech způsobovat velké ztráty (Costello 2009). Proto je monitoring a omezení šíření těchto patogenů a parazitů prioritou i v rozvoji akvakultury (Groner et al. 2016).

Parazitické druhy mohou sloužit jako zdroj potravy pro jiné organismy, což může výrazně omezit jejich šíření. Například Steenhard et al. (2001) zjistil, že když testovaní jedinci prasat domácích *Sus scrofa domestica* Linnaeus, 1758 požíly výkaly s vajíčky hlístice *Ostertagia ostertagi* (Stiles, 1892), infekční pro skot, méně než 1 % se po následné kultivaci vyvinulo v larvy 3. stádia. Stále více studií se zaměřuje na potenciál přirozené filtrační schopností mlžů (Bivalvia) v odstraňování parazitů a patogenů z vodního prostředí (Faust et al. 2009; Bartsch et al. 2013; Welsh et al. 2014; Ismail et al. 2015; Gopko et al. 2020). Zároveň roste zájem o využití těchto schopností mlžů ve velkochovech pro snížení mikrobiální zátěže v odpadních vodách (Gomes et al. 2018).

Sladkovodní mlž korbikula asijská *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) je díky svému rozšíření téměř na všech kontinentech (Sousa et al. 2008) a vysoké reprodukční schopnosti významnou součástí vodních ekosystémů. *C. fluminea* je předmětem zkoumání v několika studiích (Silverman et al. 1995, Faust et al. 2009, Welsh et al. 2013), jakožto potenciální predátor několika parazitických a patogenních druhů.

Tato diplomová práce přináší první poznatky o vlivu *C. fluminea* na odstraňování parazitické hlístice *A. cantonensis* z vodního prostředí.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit vliv mlžů na perzistenci parazitů ve vodním prostředí – jako modelové druhy byly zvoleny korbikula asijská *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) a hlístice *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935).

1. Vliv aktivní filtrace jedinců *C. fluminea* na perzistenci larválního stádia *A. cantonensis* ve vodním prostředí.
2. Vliv složitosti prostředí vytvořené přítomností schránek jedinců *C. fluminea* na perzistenci *A. cantonensis* ve vodním prostředí.

Dílčím cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit, jak typ prostředí – stojaté nebo tekoucí vody – ovlivňuje výsledky vlivu aktivně filtrujících jedinců *C. fluminea* nebo přítomnosti schránek *C. fluminea* na perzistenci *A. cantonensis* ve vodním prostředí.

V rámci diplomové práce byly testovány následující hypotézy:

1.  $H_0$ : Přítomnost aktivně filtrujících jedinců *C. fluminea* nesnižuje perzistenci hlístice *A. cantonensis* ve vodním prostředí.
2.  $H_0$ : Složitost prostředí vytvořená přítomností schránek jedinců *C. fluminea* nesnižuje perzistenci hlístice *A. cantonensis* ve vodním prostředí.
3.  $H_0$ : Typ prostředí – stojatá nebo tekoucí voda – neovlivňuje efekt aktivní filtrace jedinců *C. fluminea* nebo přítomnosti schránek *C. fluminea* na perzistenci *A. cantonensis* ve vodním prostředí.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Biologie mlžů

Kmen Měkkýši (Mollusca) zahrnuje jednu fosilní třídu rostrakonchy (Rostroncochia) a sedm recentních tříd, červovce (Aplacophora), chroustnatky (Polyplacophora), přílipkovce (Monoplacophora), kelnatky (Scaphopoda), plže (Gastrophoda), hlavonožce (Cephalopoda) a třídu mlži (Bivalvia).

Mlži představují rozsáhlou skupinu bilaterálně symetrických organismů. Vyznačují se dvojicí odlišně zploštělých až výrazně vyklenutých lastur, které tvoří ochrannou schránku (Smolowitz 2021). Na vnitřní straně schránky, na místě paliální linie je k lasturám připevněn plášť, který chrání měkkou tkáň. Na zadním okraji pláště pak najdeme nálevkovité prodlouženiny – sifony – kterými mlži nasávají vodu s potravou a následně vylučují vodu s odpadními látkami ven (Bruyne 2004).

Mlži mají rozmanité životní strategie, přičemž některé druhy, například z mořských zástupců čeledí ústřicovití (Ostreidae) a ze sladkovodních čeledí slávičkovití (Dressenidae), preferují život na povrchu substrátu, kde formují druhově bohatá společenstva, která se přichycují k pevnému podkladu, včetně schránek předchozích generací. To má podstatný dopad na přilehlé organismy a energetický tok v ekosystému. Zatímco jiné druhy, typicky z řádu Unionida (Vaughn & Hoellein 2018), ale také korbikula asijská *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Cooper et al. 2005), se do substrátu zahrabávají. Také tito zástupci vytvářejí druhově bohatá společenstva, která zásadně ovlivňují sekundární produkci a koloběh prvků ve vodních ekosystémech (Vaughn & Hoellein 2018).

Většina mlžů získává potravu filtrací organických mikročástic z vodního sloupce (Morton & Machado 2019). Fytoplankton sice bývá pro mlže primárním zdrojem potravy, existuje ale celá řada dalších, jako jsou bakterie (Langdon & Newell 1990), detritus – zejména u mlžů, kteří se zahrabávají do substrátu (Vaughn & Hoellein 2018) – a rovněž zooplankton (Lehane & Davenport 2002; 2006), včetně různých mikrobiálních parazitů, kteří přizpůsobili svá životní stadia životu ve vodním sloupci (Ben-Horin et al. 2015). Existují i dravé mořské druhy, které predují na meiobentosu, typicky to jsou zástupci z podtřídy Anamalodesmata (Morton & Machado 2019). Do roku 2024 zatím nebyl popsán dravý sladkovodní mlž. Filtrační aktivita mlžů může pozitivně ovlivňovat ekologické podmínky ve vodních ekosystémech. Filtrováním látek z vodního sloupce mohou přispívat k výraznému zlepšení kvality vody (Rong et al. 2021).

Na druhé straně jsou mlži zdrojem potravy pro ryby, ptáky a další velké živočichy včetně člověka (Klocker & Strayer 2004) a jejich schránky poskytují útočiště dalším bentickým živočichům (Burlakova et al. 2012).

Podle mechanismu příjmu potravy se mlži mohou živit filtrací organických částic z vodního sloupce, nebo přímo ze sedimentu, nebo dokonce mohou využívat oba způsoby (Arapov et al. 2010). Při filtrování částic z vodního sloupce dochází k transportu vody přes žábrý, v nichž se zadržují suspendované částice (Saraiva et al. 2011), které mlži vybírají podle velikosti, tvaru, chemického složení povrchu a množství (Burge et al. 2016). Ačkoliv dodnes nejsou tyto procesy výběru potravy zcela prozkoumány (Vaughn & Hoellein 2018). Vyloučené částice odchází z těla ven ve formě tzv. pseudovýkalů (pseudofaeces), které nejsou výsledkem procesu trávení, částice pak mohou být resuspendované ve vodním sloupci (Silverman et al.

1995). V případě filtrace částic ze sedimentu, mlži využívají inhalantní sifon, který táhnou podél sedimentu, a tak z něj vysávají potravní částice.

Schopnost mlžů měnit potravní strategie v závislosti na nabídce potravy by vysvětlovala variabilitu způsobů příjmu potravy pozorovanou v různých studiích (Nichols et al. 2005). Mnoho filtrujících mlžů také obývá pobřežní vody, které jsou často velmi zakalené v důsledku přírodních procesů a lidské činnosti (např. bagrování), což vede k velkým výkyvům v množství suspendovaných částic ve vodním sloupci (Saraiva et al. 2011).

Intenzita příjmu a selektivita potravy u mlžů se dynamicky proměňuje v závislosti na různých vnějších a vnitřních faktorech, které ovlivňují jednotlivce, populace a celé ekosystémy. Rychlost filtrační aktivity kolísá na základě vnějších faktorů, jako je teplota. Například slávičky mnohotvárné *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) mohou v pseudovýkalech vylučovat toxické sinice *Microcystis aeruginosa* Kützing, 1846, což může přispívat k jejich dalšímu rozvoji (Vanderploeg et al. 2013). Rychlost filtrace je také ovlivněna vnitřními faktory, jako je velikost těla nebo životní stádium apod., ovlivněna může být i zvolenou metodou měření (Vaughn & Hoellein 2018).

### 3.1.1 *Corbicula fluminea* (Müller, 1774)

Korbikula asijská *Corbicula fluminea* je typický bentický mlž. Je vysoce přizpůsobivá k různým prostředím (Hu et al. 2024). Vyskytuje se v malých tocích, ale i velkých jezerech a dokáže se přizpůsobit, jak oligotrofním, tak eutrofním podmínkám (Cataldo et al. 2001). Z těchto důvodů se *C. fluminea* stala rozšířeným invazním druhem v amerických a evropských vodách, a to i přes její původní rozšíření v Asii, v Africe a Austrálii (Cebulska & Krodkiewska 2019). *C. fluminea* je simultánní hermafrodit, ovšem má také schopnost samooplození (Komaru et al. 2006) a je popisována jako r-stratég (McMahon 2002). V původních oblastech výskytu má obvykle kratší délku života, a to 2 až 3 roky, ale v nepůvodních oblastech žije až 5 let (Modesto et al. 2023). Předchozí studie prokázaly, že *C. fluminea* vykazuje toleranci vůči různým biotickým a abiotickým faktorům, jako je například odolnost vůči antibiotikům (Zhang et al. 2021). Podle Rosa et al. (2014) *C. fluminea* dokáže v měkkých tkáních akumulovat těžké kovy, lze ji tedy využít nejen v monitoringu kvality vod, ale také jako potenciální organismus pro bioremediaci v čističkách odpadních vod.

*C. fluminea* dospívá ve velikosti 6,6 mm, ale může dorůstat do velikosti až 60 mm. Lastury mají zaobleně trojúhelníkový tvar a jsou silně klenuté s koncentrickými přírůstkovými valy. U zdravých, rostoucích jedinců mají lastury žlutozelenou barvu, zatímco u starších erodovaných jsou spíše tmavě hnědé a bílé. Vnitřní povrch lastur je leskle bílý až světle šedý se světle modrými, růžovými až nafialovělými odlesky (Sabapathy Allen 2023).

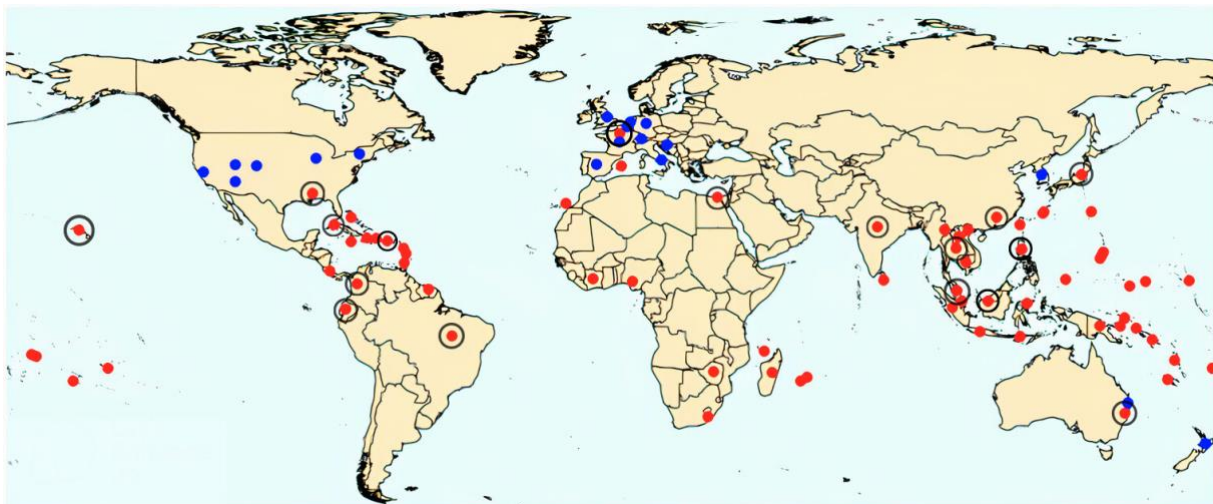
Taxonomie *C. fluminea* je do jisté míry nejednoznačná. Na základě morfologických znaků bylo popsáno mnoho podobných druhů, z nichž až 43 bylo později uznáno jako latinská synonyma *Corbicula fluminea* (Modesto et al. 2023). Může také docházet k záměně s *Corbicula fluminalis* (Müller, 1774), rovněž evropským invazním mlžem, jejichž areály výskytu se často překrývají, přestože *C. fluminalis* žije spíše v brakických vodách (Renard et al. 2000). Podle databáze Mussel Project (Graf & Cummings 2002), po aktualizaci 21. března 2024, se *C. fluminea* řadí do čeledi korbikulovití (Corbiculidae), patřící do řádu Verenoida, který zahrnuje 174 recentních sladkovodních a 26 mořských druhů.

*C. fluminea* se živí fytoplanktonem a suspendovanými částicemi ve vodním sloupci. Ovšem byly zaznamenány i případy, kdy jedinec filtroval potravu přímo ze sedimentu (Way et al. 1990). Podle zjištění Silverman et al. (1995) rychlost její filtrační aktivity dosahovala až 5 ml vody s bakteriemi *Escherichia coli* Escherich, 1885 na 1 g suché tkáně *C. fluminea* za minutu. Průměrná hmotnost suché tkáně testovaných jedinců byla 368 mg.

## 3.2 Parazitická hlístice *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935)

### 3.2.1 Geografické rozšíření

Hlístice *Angiostrongylus cantonensis* byla poprvé popsána v oblasti Guangzhou v Číně u potkana *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769). Původně byla tato hlístice vnímaná jako endemit tropických oblastí Dálného východu, ovšem výzkum Wang et al. (2008) ukázal, že se její areál výskytu rozšířil do států jihovýchodní Asie, na tichomořské ostrovy, včetně Tahiti (Rosen et al. 1967), do Jižní a Střední Ameriky a na Karibské ostrovy. Novější údaje (Cowie et al. 2022) potvrzují rozšíření *A. cantonensis* na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy.



Obrázek 1 Celosvětové rozšíření *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), kde modré body označují místa hlášených případů onemocnění neuroangiostrongyloidózy u cestujících lidí či exportovaných zvířat ze země potvrzeného výskytu (červené body). Pokud je část země vzdálená od hlavní části země – Guam, Saipan, Havaj, Americká Samoa a Portoriko (USA); ostrovy Rjúkjú a Ogasawara (Japonsko); Nová Kaledonie, Tahiti, Mayotte, Réunion, Guadeloupe a Martinik (Francie); Kanárské ostrovy a Mallorca (Španělsko); Malajský poloostrov, Sarawak (Malajsie); Jáva, Sumatra, Flores, Sulawesi (Indonésie) a Chuuk, Pohnpei (Federativní státy Mikronésie) – jsou kromě hlavní části země (pokud se tam také vyskytují) umístěny body i na těchto místech. U většiny zemí byl umístěn jeden bod přibližně v místě největší koncentrace záznamů. Na základě dat z CABI (Sabapathy Allen 2023) a GBIF (GBIF Secretariat 2023) jsem v místech potvrzeného výskytu *A. cantonensis* (červené body) černou obrysovou linií vyznačila státy, kde se překrývají areály výskytu s *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Havaj, Mississippi, Kuba, Portoriko, Kolumbie, Ekvádor, Brazílie, Francie, Egypt, Indie, Thajsko, Malajsie, Borneo, Čína, Filipíny, Japonsko a Austrálie) (Cowie et al. 2022; upraveno Bc. Dagmar Ašková 2024).

I když bylo onemocnění spojené s *A. cantonensis* – neuroangiostrongyloidóza – doposud hlášena zejména ze subtropických a tropických oblastí, Anettová et al. (2023) poskytla v pilotní studii nové poznatky o přežití larev 3. stádia *A. cantonensis* v experimentálně infikovaných slimácích *Limax maximus* Linnaeus, 1758 chovaných při teplotě 4,5-7 °C po dobu 60 dnů. Larvy přežily období nízké teploty a byly schopné infikovat definitivní hostitele, i když počet živých jedinců výrazně poklesl. Tyto výsledky poukazují na potenciální riziko šíření

*A. cantonensis* do oblastí mírného podnebného pásu, což může znamenat nebezpečí i pro Českou republiku.

### 3.2.2 Životní cyklus

*A. cantonensis* je endoparazit, který během svého životního cyklu parazituje na dvou hostitelích, přičemž vykazuje nízkou specifickou v jejich výběru. Jako definitivní hostitelé *A. cantonensis* se uvádí hlodavci rodu *Rattus* spp., zejména pak druhy krysa obecná *Rattus rattus* (Linnaeus, 1758), *R. norvegicus* a krysa ostrovní *Rattus exulans* (Peale, 1848) (Pandian et al. 2023).

Primárními mezihostiteli *A. cantonensis* jsou plži. Vzhledem k tomu, že byla Evropa poslední nahlášenou oblastí výskytu tohoto parazita, mnoho aspektů života *A. cantonensis* zůstává neznámých. Zatím není definitivně určen konkrétní počet druhů plžů, kteří se na jejím přenosu podílí. Důležité je, že jsou to, jak suchozemští, tak vodní plži, u nichž bylo prokázán přenos na člověka (Morgan et al. 2021). Podle studie ze Španělska (Jaume-Ramis et al. 2023) bylo z 398 testovaných druhů plžů 17 pozitivních na přítomnost *A. cantonensis*, včetně 6 dosud nezaznamenaných druhů jako hostitelů této hlístice – *Papillifera papillaris* (Müller, 1774), *Cochlicella acuta* (Müller, 1774), *Eobania vermiculata* (Müller, 1774), *Ganula lanuginosa* (Boissy, 1835), *Milax nigricans* (Philippi, 1836) a *Rumina decollata* (Linnaeus, 1758).

*A. cantonensis* má pozoruhodnou schopnost překonávat fyziologické bariéry svých paratenických hostitelů, mezi které patří široké spektrum živočichů, jako jsou ježci (Paredes-Esquivel et al. 2019), stonožky, korýši, ryby, obojživelníci, plazy (Turck et al. 2022), vačnatci, primáti (Morgan et al. 2021), skot (Alicata 1964), ptáci a dokonce i člověk (Spratt 2005). Na Kanárských ostrovech byli jako parateničtí hostitelé *A. cantonensis* identifikováni psi (Valladares-Salmeron et al. 2016).

Dospělci *A. cantonensis* žijí v plicních tepnách a pravé srdeční komoře svých definitivních hostitelů. Všechna životní stádia mají tenké válcovité tělo. Samičky kladou vajíčka přímo v plicních tepnách. Z těchto vajíček se líhnou larvy 1. stádia (Barratt et al. 2016), dlouhé asi 0,3 mm a široké přibližně 0,015 mm (Cowie 2013). Dále pak tyto larvy migrují do hlitanu, odkud jsou spolknuty a následně vyloučeny s výkaly (Barratt et al. 2016). Mezihostitelské druhy se primárně infikují pozřením výkalů infikovaných hlodavců (Jaume-Ramis et al. 2023) a sekundárně průnikem larev 1. stádia pláštěm plžů, nebo jejich vdechnutím (Cowie 2013).

Po dvou procesech svlékání vznikají larvy 3. stádia o velikosti přibližně 0,45 × 0,03 mm, které jsou infekční pro definitivní hostitele. Když je infikovaný plž pozřen definitivním hostitelem, larvy migrují do mozku, kde se vyvíjejí do larev 4. stádia, velké asi 1,0 × 0,4 mm. Po dvou týdnech se z nich stanou larvy 5. stádia, tedy mladí dospělci (Barratt et al. 2016; Cowie 2013) o velikosti přibližně 2 × 0,6 mm (Cowie 2013). Než opustí mozek hostitele dorůstají do velikosti asi 12 mm (samice) a 11 mm (samci). Následně migrují do plicních tepen, kde zhruba po 28 dnech pohlavně dospívají (Xie et al. 2017; Turck et al. 2022). Howe et al. (2019) zjistil, že larvy 3. stádia mohou přežívat mimo tělo hostitele po dobu jednoho měsíce, a i v tomto případě jsou významným zdrojem infekcí. Parateničtí hostitelé se infikují obdobně jako definitivní hostitelé konzumací infikovaných plžů. Nepodporují však úplný vývoj larev, ale fungují jako „náhradní hostitelé“ dokud je nepozře definitivní hostitel (Cowie 2013).

### 3.2.3 Patogeneze

Vývoj *A. cantonensis* v dospělé jedince v definitivním hostiteli obvykle nevyvolává závažné příznaky (Morgan et al. 2021). Infekce v paratenických hostitelích však obvykle vede k eozinofilní meningitidě, která může způsobit závažné zdravotní komplikace. Příznaky u infikovaných jedinců jsou důsledkem zvýšeného nitrolebního tlaku, poškození nervové tkáně či zánětlivé reakce hostitele (Graeff-Teixeira et al. 2009; Murphy & Johnson 2013). V mnoha oblastech výskytu *A. cantonensis* žijí invazní plži (například rody *Lissachatina* sp., *Pomacea* sp., *Parmarion* sp. a *Veronicella* spp.), kteří jsou považováni za hlavní zdroj epidemie nemoci (Morgan et al. 2021).

Člověk je paratenickým hostitelem *A. cantonensis*. K infekci dochází, když lidé pozrou syrové či nedostatečně tepelně upravené plže s infekčními larvami 3. stádia (Morgan et al. 2021). Riziko infekce rovněž představují jiní parateničtí hostitelé nebo jejich části obsažené v čerstvých potravinách (Wang et al. 2018). Larvy se mohou v lidském hostiteli vyvinout do 4. nebo 5. stádia, ale zdá se, že nejsou schopny plně dospět (Barratt et al. 2016).

Neuroangiostrongyloidóza je onemocnění způsobené migrací larev 3. stádia do mozku. Primární příčinou patologických změn je fyzické poškození způsobené larvami při jejich pronikání do nervové tkáně, spolu se zvýšenou imunitní odpovědí, která nastává v reakci na úmrtí tohoto parazita. Onemocnění se projevuje širokou škálou klinických symptomů, od mírných, jako je zvracení, nevolnost, slabost, horečka a pocit mravenčení na kůži, dále pak ztuhlost šíje, neustupující bolesti hlavy nebo poruchy funkce močového měchýře a střev (Ansdell et al. 2021). Tyto symptomy mohou spontánně odeznít (Cowie 2017), ale v některých případech dochází k jejich rozvoji do eozinofilní meningitidy a dalších závažných poškozeních centrálního nervového systému, která mohou být trvalá a případně vést ke kómatu a smrti (Barratt et al. 2016; Ansdell et al. 2021). Mezi trvalé následky této nemoci patří i slepota či ochrnutí končetin (Cowie 2017). Úmrtnost je vyšší u dětí, a to až 10 % (McAuliffe et al. 2019).

V posledních letech prevalence lidské neuroangiostrongyloidózy roste alarmujícím tempem (McAuliffe et al. 2019). K šíření *A. cantonensis* přispívají invazní druhy hostitelských hlodavců a plžů, které jsou lidskou činností neúmyslně introdukovány do dalších oblastí. To dokládají případy na Tahiti, kde konzumace syrových paratenických hostitelů – krevet – byla běžná dlouho předtím, než se relativně nedávno začaly projevovat příznaky onemocnění (Alicata 1969).

Zvyšující se riziko tohoto infekčního onemocnění vede k vývoji metod eliminace *A. cantonensis* nejen ve vodním prostředí, nebo alespoň snížení její prevalence. První případy eozinofilní meningitidy byly zaznamenány na tichomořských ostrovech ve 40. letech 20. století, ovšem existují náznaky, že skutečné první případy sahají až do roku 1915 (Alicata 1965), které nebyly spojované s *A. cantonensis* až do počátku 60. let 20. století, kdy byly na Havaji popsány onemocnění způsobené touto hlísticí (Turck et al. 2022). To odstartovalo rozsáhlý výzkum.

Klíčové poznatky o životním cyklu *A. cantonensis* poskytl americký vědec Joseph Everett Alicata (1904-1994), který na toto téma napsal desítky prací. V 60. letech 20. století se zabýval morfologií larev 3. stádia (Alicata 1963) a potenciálními paratenickými hostiteli, jako jsou suchozemští kraby čeledi Gecarcinidae (Alicata 1964), skot (Jindrák & Alicata 1968), ale dokonce i člověk (Alicata 1969).

Výzkum v této oblasti pokračuje až do současnosti, a to, jak v určování mezihostitelských druhů (Martin-Alonso et al., 2015; Jaume-Ramis et al., 2023), tak v identifikaci paratenických hostitelů (Turck et al., 2022). Tento nepřetržitý vědecký zájem umožňuje lepší pochopení rizik spojených s *A. cantonensis*, což je klíčové pro vývoj efektivních opatření proti šíření tohoto parazita a ochranu veřejného zdraví.

### 3.2.4 Detekční metody larválních stádií parazitů

Jedním z prvních přístupů v detekci larev hlístic ve výkalech hostitelských druhů bylo využití procesu sedimentace, který umožnil soustředění většího množství výkalů na dně, čímž se zvýšila šance detekce larev mikroskopickými metodami. Ačkoliv ne všechny metody obstály, několik z nich nebo jejich modifikace se staly standardem při detekci parazitů v hostitelských jedincích (Ballweber et al. 2014). Dodnes je nejpoužívanější Baermannova metoda (Yousif & Lämmler 1975; Schnyder et al. 2015; Xie et al. 2017; Pai et al. 2022), kterou v roce 1917 popsal nizozemský lékař G. K. T. F. Baermann. Baermannova metoda je založena na aktivním pohybu larev. Vzorek výkalu se vloží do nálevky s uzavíratelným dnem vyložené sílonovým sítem. Nálevka se pak naplní vodou, a vzorek se ponoří, zatímco síto jej oddělí od uzávěru. Aktivní larvy hlístice se ze vzorku uvolní do vody, proplují sítem, a nakonec se usadí na dně nálevky (Tintori et al. 2022). Po otevření uzávěru nálevky se larvy mohou vypustit do připravené zkumavky pro další fáze testování. Ve studii provedené na kočkách domácích *Felis silvestris catus* Linnaeus, 1758 (Willard et al. 1988) prokázala Baermannova metoda 90 % účinnost při detekci larev *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898).

Další způsobem detekce jsou tzv. flotační metody, které jsou založené na rozdílných hustotách parazitárních útvarů a použitého flotačního roztoku s vyšší hustotou. Díky tomu parazitární útvary vyplavou na hladinu, odkud se sbírají a následně přenášejí na mikroskopické sklíčko (Pecková & Foitová 2019). Relativně nová metoda je tzv. FLOTAC, což je řada multivalentních kopromikroskopických technik, založených na stejném principu (jako jiné flotační metody), ale s řadou různých potenciálních využití, zejména při malém počtu larev ve vzorku, vhodné pro screeningové testy. Jedním z nevýhod je, že pro tuto metodu je nutná určitá úroveň laboratorního zařízení, které často není v podmínkách s omezenými zdroji k dispozici (Cringoli et al. 2010).

## 3.3 Význam mlžů pro prevalenci parazitů

Filtrující mlži hrají významnou roli ve výskytu a prevalenci parazitických či patogenních organismů (Burge et al. 2016). Mohou v sobě totiž akumulovat patogeny, čímž se mohou stát pasivními rezervoáry například virů (Razafimahefa et al. 2020) a bakterií (Ismail et al. 2015). Kromě toho mohou fungovat jako přenašeči parazitů – podle Arkush et al. (2003) se slávka středomořská *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 podílí na šíření kokcidie kočičí *Toxoplasma gondii* Manceaux, 1908, která může napadat i některé mořské savce. Výskyt bakteriálních a virových onemocnění u lidí, spojené s konzumací mlžů, naznačují, že některé mikroorganismy dokážou degradaci odolat a přetrvávat v tkáních mlžů po delší dobu. K bakteriálním rodům, které nejčastěji způsobují onemocnění v souvislosti s konzumací mlžů, patří *Salmonella* spp. a *Vibrio* spp. (Hernroth et al. 2002; Pruzzo et al. 2005). Mezi viry, které přežívají v mlžích a jsou odolné vůči degradaci, patří například noroviry (Potasman et al. 2002).

Přestože mlži prokazatelně napomáhají šíření některých patogenů, otázkou zůstává, jaká je jejich úloha při odstraňování parazitů a patogenů z vodního prostředí? Stále více se uznává, že různé druhy mohou ovlivňovat volně žijící parazitická stádia tím, že jim brání v infekci hostitelských jedinců. Tento běžný jev ve sladkovodních a terestrických systémech označován jako tzv. „dilution effect“ (Welsh et al. 2014). Bioakumulace patogenů v měkkých tkáních mlžů nemusí mít nutně negativní dopad. V některých případech mohou mlži sloužit jako tzv. hlídkové organismy pro sledování rizik šíření patogenů. Například od roku 1986 NOAA v programu the Mussel Watch monitoruje koncentrace akumulovaných polutantů a patogenních organismů v mlžích. Tento program pokrývá oblasti pobřežních vod USA a od 90. let 20. století také Latinské Ameriky. Do programu jsou zařazena i některá severoamerická velká jezera, kde jsou pro monitoring využívány invazní druhy mlžů, včetně *C. fluminea* (Burge et al. 2016). V Evropě podobné programy biomonitoringu zavedlo několik zemí, včetně Itálie, Finska, Francie (Cantillo 1998) či Norska (Strehse & Maser 2020).

Nové strategie v boji proti infekčním onemocněním také využívají přirozené filtrační aktivity mlžů při redukci patogenní zátěže ve vodním prostředí (Burge et al. 2016). Jak je podrobněji popsáno v kap. 3.1, mlži dokážou filtrovat široké spektrum potravy, a to včetně patogenních organismů. S jejich schopností přefiltrovat od desítek po stovky litrů vody denně a tendencí výskytu ve vysoké populační hustotě, mlži mohou potenciálně ovlivnit výsledky epidemiologických studií (Ben-Horin et al. 2015).

Přestože existují technologie pro čištění odpadních a pitných vod, jejich aplikace je nepřenositelná do povrchových vod, kde se vyskytuje bakterie *E. coli*. Ismail et al. (2015) provedl 28 denní experiment na Mountain Lake v San Franciscu v USA se škeblí kalifornskou *Anodonta californiensis* (Lea, 1852). Na konci experimentu bylo ve výkalech testovaných mlžů detekováno pouze 5 % z testované populace *E. coli*.

Výskyt ektoparazitické mořské vši *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) na lososích farmách vedl ke katastrofálnímu úhynu ryb (Costello 2009). K odstranění tohoto parazita se primárně využívají chemoterapeutika, jako jsou například pyrethroidy a organofosfáty (Burrige et al. 2010). U některých populací *L. salmonis* byla však zaznamenána určitá rezistence vůči těmto látkám (Sevatdal et al. 2005). Proto se Bartsch et al. (2013) rozhodl testovat efekt filtrace slávky jedlé *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 a hřebenatky *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791) na populaci *L. salmonis*. Efekt filtrace testovali ve stojaté a tekoucí vodě, s proměnlivou koncentrací larev a za pomoci světelného stimulu. Po několika experimentech zjistili, že tito mlži dokázali odstranit během hodinového intervalu 18–38 % jedinců z testované populace *L. salmonis*.

Globální oteplování má významný dopad na aktivitu parazitů ve vodních ekosystémech. Při vyšších teplotách ektotermní organismy, jako jsou ryby, zvyšují svoji aktivitu, což může vést k častějšímu kontaktu s parazity (Cable et al. 2017). Protože paraziti a jejich hostitelé mohou mít různá teplotní optima (Horký et al. 2018), může se jedna z těchto konkurenčních stran v teplejších podmínkách ocitnout v evoluční výhodě. Gopko et al. (2020) zkoumal, jak ovlivňuje teplota vody (15–23 °C) a přítomnost škeble říční *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) přenos motolice *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 na pstruha duhového *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Ačkoliv se s rostoucí teplotou zvyšovala aktivita ryb a tím i jejich zranitelnost vůči infekci motolicí, výsledky studie ukázaly, že teplota ve zkoumaném rozsahu neměla vliv na filtrační kapacitu testovaného mlže. Ten byl schopen

odstranit z vody přibližně 28 % larev parazita bez signifikantních změn ve všech testovaných teplotních podmínkách. Nutno podotknout, že testovaná teplotní škála stále odpovídá běžným přírodním podmínkám, ve kterých se *A. anatina* vyskytuje.

Existuje také studie (Faust et al. 2009), která se zabývala vlivem filtrační aktivity *C. fluminea* na odstraňování virů chřipky typu A, podtypu H3N8 z vodního prostředí. Tyto tzv. viry ptačí chřipky byly zaznamenány u 105 druhů ptáků. Řada vodních druhů, včetně řádů vrubozobí (Anseriformes) a dlouhokřídli (Charadriiformes), se považuje za rezervoáry těchto virů (Stallknecht & Shane 1988). Vodní prostředí má zásadní význam v přenosu virů ptačí chřipky mezi populacemi ptáků, přičemž se předpokládá, že k přenosu dochází oro-fekální cestou. (Webster et al. 1978). Faust et al. (2009) testoval vliv aktivní filtrace *C. fluminea* na prevalenci virů. Celkem 18 testovaných kachniček karolínských *Aix sponsa* (Linnaeus, 1758), které byly vystaveny kontaminované vodě, ale přefiltrované jedinci *C. fluminea*, nevykazovaly žádné známky morbidity ani mortality. Naproti tomu *A. sponsa* vystavené pouze kontaminované vodě, uhynuly.

Patogeny a parazity lze z vodního prostředí odstranit i jinak než pouze selektivní filtrací. Například Welsh et al. (2014) testoval vliv několika potenciálních predátorských druhů pro parazitickou motolici *Himasthla elongata* (Mehlis, 1831). Podobný výzkum provedli také Thieltges et al. (2008). Mezi testované druhy patřily blešivec *Gammarus marinus* Leach, 1816, stejnonožec *Idotea balthica* (Pallas, 1772), garnát obecný *Crangon crangon* Linnaeus, 1758 a krab *Hemigrapsus takanoi* Asakura a Watanabe, 2005, dále filtrátoři svijonožec *Semibalanus balanoides* (Linnaeus, 1767) a ústřice velká *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), druhy ve studii označované jako „live biotic obstacle“ mořská řasa *Sargassum muticum* (Prefecture, 1907) a chaluha bublinatá *Fucus vesiculosus* Linnaeus, 1753, ale i druhy označované jako „dead biotic obstacle“ *C. gigas*, respektive jejich schránky a mix schránek *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758), *M. edulis*, *Ensis americanus* (Gould, 1870) a *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758). Přitom zjistili, že *G. marinus* odstranil 100 % cercárií, další úspěšnost vykazovaly organismy

*C. crangon* (93 %), *S. muticum* (87 %), *S. balanoides* (71 %), *C. gigas* (67 %) a *H. takanoi* (> 54 %) a *I. balthica* (24 %). Zajímavý výsledek tohoto experimentu ukazuje, že schránky *C. gigas* redukovaly až 44 % cercárií v testovacích nádržích, přestože v nádržích nebyl přítomen žádný filtrátor. To naznačuje, že přilnavost larev k lasturám může také hrát roli při snížení prevalence parazitů (Welsh et al. 2014).



## 4 Materiál a metody

První fáze pilotního experimentu zaměřená na výzkum vlivu mlže *C. fluminea* na perzistenci hlístice *A. cantonensis* ve vodním sloupci byla realizována v lednu a únoru 2024 ve spolupráci s prof. MVDr. Davidem Modrým, Ph.D. z Masarykovy univerzity. Experiment probíhal v laboratořích FAPPZ na ČZU v Praze. Tato diplomová práce přináší prvotní náhled na získaná data, další experimenty pokračovaly během roku 2024.

### 4.1 Odběr a péče o modelové druhy

Experimentální hlístice *A. cantonensis*, získané v roce 2017 v oblasti Fatu Hiva ve Francouzské Polynésii, byly udržované v laboratorních podmínkách, na Katedře veterinárních disciplín, cirkulací mezi laboratorními potkany *R. norvegicus* a plži *Subulina octana* (Bruguière, 1789) a *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818).

Pro tento experiment byla jako modelový druh filtrujícího mlže zvolena *C. fluminea* z několika důvodů. Její výběr byl motivován především poměrně nenáročným chovem v laboratoři, kde lze tento druh udržovat i po dobu několika měsíců (Rong et al. 2021). Dalším důvodem byl její hojně rozšířený výskyt, který se na několika místech světa překrývá s výskytem *A. cantonensis*, viz kap. 3.2.1.

Přibližně 300 jedinců *C. fluminea*, o délce schránky od 0,9 do 2 cm, bylo nasbíráno 7. listopadu 2023 na řece Ohře na souřadnicích 50.4069144N, 14.0694786E. Tito jedinci byli umístěni do větších aklimatizačních nádrží o objemu 10 a 25 l. Během prvních 7 dní nebyla do nádrží přidávána žádná potrava, aby si mohli vyčistit svá střeva. V tomto týdnu byla také navyšována teplota vody v nádržích postupně z 10 °C na 21,5 °C a voda byla obměňována každý den. Laboratorní podmínky aklimatizace mlžů vycházely z předchozích vědeckých experimentů (Rosa et al. 2012; Castro et al. 2018). Teplota vody během aklimatizace a testování byla udržovaná při 22 °C ± 2 °C a byl dodržován světelný režim s 12hodinovým cyklem. Týden před zahájením experimentu byl nastaven režim krmení testovaných jedinců na každé dva dny po výměně přibližně ½ objemu vody. Mlži byli krmení směsí pro měkkýše, zředěnou v poměru 7,69 ml krmiva na 192 ml vody, přičemž do 25l nádrží bylo přidáno 50 ml a do menších 10l nádrží 25 ml této krmné směsi. Do experimentálních nádrží byli mlži přemístěni 24 hodin před začátkem testování, během něhož již neprobíhalo krmení jedinců.



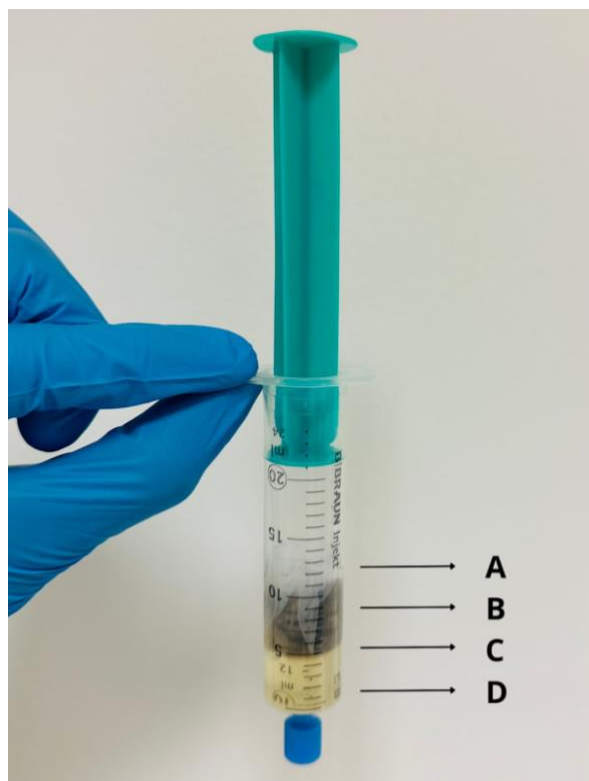
Obrázek 2 Schránky mlžů *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) o délce od 0,9 do 2 cm, kteří uhynuli před zahájením experimentu. Tyto schránky byly použity v experimentální části pro testování vlivu složitosti prostředí vytvořené jejich přítomností v testovacích nádržích.

## 4.2 Izolace larev z výkalů

Při práci s výkaly infikovaných jedinců *R. norvegicus* bylo zapotřebí používat laboratorní ochranné pomůcky, jako je plášť, ochranný štít a rukavice. Dbát na zvýšenou opatrnost, aby nedošlo ke kontaminaci kůže nebo odpadní vody. Larvy byly z výkalů izolovány pomocí modifikované Baermannovy metody. Abychom s vysokou pravděpodobností izolovali z výkalů živé jedince, byl klíčový výběr pouze čerstvých výkalů. „Zlatým standardem“ jsou výkaly vyprázdňené do 24 hodin před jejich sběrem (Cringoli et al. 2010). Ty byly následně přeneseny v navážce zhruba 2 gramy do 9–12 plastových odstředivých stříkaček, na obrázku 3 a 4, nahrazujících nálevku v původní Baermannově metodě, viz kap. 3.2.4.



Obrázek 3 Zleva: Petriho miska s výkaly infikovaných jedinců *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) plastová odstředivá stříkačka, červená výpust, plastové části, které pomáhají při proudění aktivních larev a uhelon s velikostí ok 128  $\mu\text{m}$ . (MSc. Divakaran Pandian, BSc. 2024).



Obrázek 4 A – Stříkačka naplněná kohoutkovou vodou. B – Menší řezaná část injekční stříkačky obsahující výkaly. C – Uhelon s velikostí ok 128  $\mu\text{m}$ . D – Menší řezaná část injekční stříkačky obsahující vodu (MSc. Divakaran Pandian 2024, BSc; upraveno Bc. Dagmar Ašková 2024).

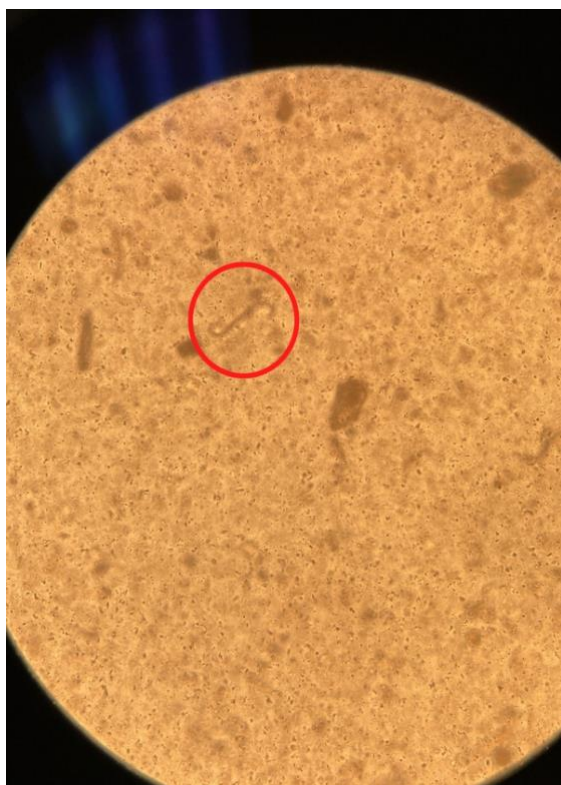
Po dvou hodinách byl roztok s larvami přelit do kónických zkumavek typu Falcon o objemu 15 ml a centrifugován na minutu při 1500 otáčkách. Po centrifugaci byla odstraněna většina supernatantu, ponechány byly přibližně 2 ml roztoku na dně zkumavky. Zbylý roztok byl doplněn kohoutkovou vodou do objemu 7,5 ml (tj. 7 500  $\mu$ l) pomocí Pasteurovy pipety. Obsah všech zkumavek typu Falcon byl přelit do jedné větší zkumavky o objemu 200 ml, která byla obvykle naplněna zhruba do poloviny. Na závěr byl roztok ve větší zkumavce promíchán, tak aby došlo k rovnoměrnému rozložení larev. Z promíchaného roztoku bylo mikropipetou odebráno 25–30 kapek o objemu 25  $\mu$ l do Petriho misky a pod mikroskopem byl proveden součet živých jedinců. Na obrázku 5 jsou zobrazeni živí pohybliví jedinci a na obrázku 6 živí stočení jedinci, pokud by jedinci uhynuli, nepohybovali by se a jejich těla by byla natažena. Následně byl počet živých jedinců přepočten do celkového objemu:

$$n = (A \times B) \times (7\,500 \times C) \quad (1)$$

$A$  = průměrný počet larev v jedné 25 $\mu$ l kapce,

$B$  = počet odebraných kapek,

$C$  = počet použitých zkumavek typu Falcon.



Obrázek 5 Záběr z optického mikroskopu značky Olympus, model CX22, při zvětšení 10x, při identifikaci živých larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) o přibližné velikosti 0,3 mm na délku a 0,015 mm na šířku. V červené kružnici je živý pohyblivý jedinec (Bc. Dagmar Ašková 2024).



Obrázek 6 Záběr z optického mikroskopu značky Olympus, model CX22, při zvětšení 10x, při identifikaci živých larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) o přibližné velikosti 0,3 mm na délku a 0,015 mm na šířku. V červené kružnici je živý stočený jedinec (Bc. Dagmar Ašková 2024).

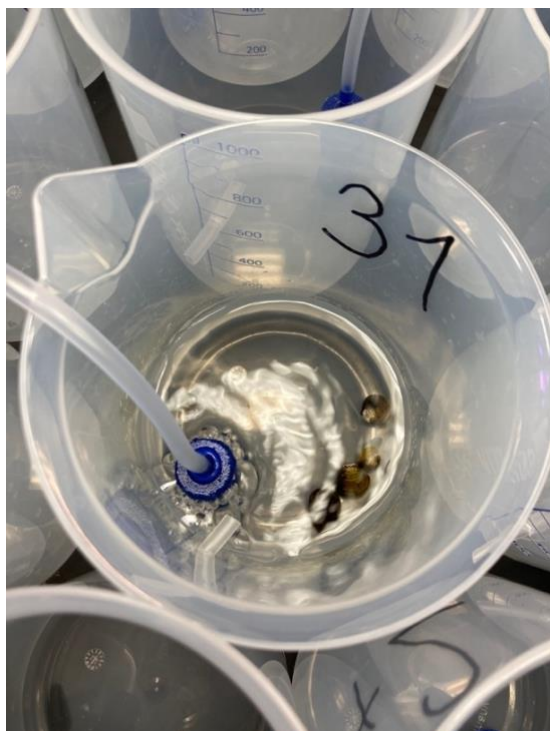
Po kvantifikaci larev 1. stádia v roztoku s výkaly infikovaných *R. norvegicus* byl v kádince o objemu 500 ml naředěn zásobní roztok kohoutkovou vodou na celkový objem 210–270 ml. Kádinka se zásobním roztokem byla před začátkem experimentu důkladně promíchána, tak aby opět došlo k rovnoměrnému rozložení larev v roztoku.

### 4.3 Experiment s modelovými druhy

Během první fáze pilotního experimentu probíhalo testování v celkem 42 testovacích nádržích o objemu 600 ml. Nádrže byly rozděleny do tří skupin ve vztahu k faktoru přítomnosti filtrujících mlžů nebo schránek mlžů *C. fluminea*, včetně kontrolní skupiny bez mlžů. Každá nádrž byla doplněna odstátou kohoutkovou vodou do objemu 330 ml. S ohledem na výskyt obou modelových druhů, jak ve stojatých, tak tekoucích vodách, byla v každé ze skupin zhruba polovina nádrží, ve kterých bylo vzduchováním uměle navýšené promíchávání vodního sloupce tak, aby to odpovídalo podmínkám v tekoucích vodách s vyšší turbulencí (dále jako tekoucí vody), zatímco druhá polovina reprezentovala stojaté vody. Rozdělení nádrží do jednotlivých skupin a typ simulovaného vodního prostředí byl pro každou nádrž určen náhodně, a to s využitím filtrovací funkce v programu Excel 2010. V souhrnné tabulce 1 je prezentován přehled počtu nádrží, které byly využity v konkrétní testovací den. Prostředí experimentu (zejména úprava nádrží, umístění provzdušňování atd.) bylo připraveno týden před zahájením experimentu.

1. První skupina celkem 15 testovacích nádrží – z toho 8 „s tekoucí vodou“ a 7 „se stojatou vodou, na obrázku 5 – obsahovala 5 živých jedinců *C. fluminea* a 30ml roztok s larvami 1. stádia *A. cantonensis*.
2. Druhá skupina celkem 15 testovacích nádrží – z toho 8 „s tekoucí vodou“ a 7 „se stojatou vodou, na obrázku 6 – obsahovala 5 schránek *C. fluminea*, a 30ml roztok s larvami 1. stádia *A. cantonensis*.
3. Třetí (kontrolní) skupina celkem 12 testovacích nádrží – z toho 6 „s tekoucí vodou“ a 6 „se stojatou vodou“ – obsahovala pouze 30ml roztok s larvami 1. stádia *A. cantonensis*.





Obrázek 7 Testovací nádrž č. 31 se simulovaným prostředím stojaté vody s 5 živými jedinci *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) a 30 ml koncentrátu s larvami 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935)



Obrázek 8 Testovací nádrž č. 59 se simulovaným prostředím stojaté vody s 5 schránkami jedinců *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) a 30 ml koncentrátu s larvami 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935)

V testovacích nádržích byli přítomni také plži *B. glabrata*, mezihostitelé *A. cantonensis*. V této diplomové práci se však jejich přítomnost v nádržích v analýze dat nezohledňuje, a to i kvůli nízkému počtu opakování u kontrolních skupin nádrží – bez plžů. Přesto se plánuje zařazení této proměnné v dalších fázích pilotního experimentu.

První fáze experimentu probíhala v 7 testovacích dnech, zároveň každý den byla provedena aklimatizace mlžů pro další testovací den. Součástí denního režimu byla také výměna vody v aklimatizačních nádržích pro mlže, kteří byli využiti až další testovací dny nebo případně pro pokračující fáze experimentu.

Experiment začal přidáním zásobního roztoku s larvami do testovací nádrže. V případě nádrží obsahujících živé jedince *C. fluminea* bylo nutné ověřit, že mají otevřené lastury, což signalizuje jejich filtrační aktivitu. Pro nádrže, kde by mlži filtraci neprováděli, by výsledky nebyly považovány za validní. Do každé nádrže bylo přidáno celkem 30 ml zásobního roztoku, rozděleného do tří dávek po 10 ml, za použití Pasteurovy pipety. Před každým dávkováním bylo nutné roztok důkladně promíchat. Po uplynutí 60 minut bylo z každé nádrže odebráno přibližně 50 kapek o objemu 100  $\mu$ l, které byly přeneseny do Petriho misek pro mikroskopické ověření počtu larev. Výsledky byly zaznamenány do připravených archů. Odběr vzorků z vodního sloupce probíhal náhodně a bylo důležité, aby špička pipety nezavadila o dno nádrže a nenarušila tak sedimentační procesy, které hrají důležitou roli ve výsledcích experimentu. Mezi odběry z nádrží byly špičky pipet vyměněny k zamezení kontaminace mezi nádržemi.

Tabulka 1 Souhrnná tabulka zobrazující zleva: konkrétní testovací den, skupiny testovacích nádrží (1 – s filtrujícími jedinci, 2 – se schránkami mlžů, 3 – kontrolní skupina), v následujícím sloupci souhrn počtu testovacích nádrží se simulovaným prostředím stojaté a v dalším sloupci tekoucí vody pro daný den a danou skupinu nádrží. V dalším sloupci počáteční počet larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) na ml zásobního roztoku a v posledním sloupci počet larev na ml testovací nádrže. Pro účely formátování tabulky byly výsledky zaokrouhleny na 2 desetinná místa.

Testovací den	Skupina	Počet nádrží se stojatou vodou	Počet nádrží s tekoucí vodou	Počet larev v zásobním roztoku (ks/ml)	Počet larev v testovací nádrži (ks/ml)
1.	1	2	2	65	3,94
1.	2	2	2	65	3,94
1.	3	1	1	65	3,94
2.	1	1	1	53,14	4,83
2.	2	1	1	53,14	4,83
2.	3	1	1	53,14	4,83
3.	1	1	1	54,45	4,95
3.	2	1	1	54,45	4,95
3.	3	1	1	54,45	4,95
4.	1	1	1	87,71	7,97
4.	2	1	1	87,71	7,97
4.	3	1	1	87,71	7,97
5.	1	0	1	183,57	13,91
5.	3	1	0	183,57	13,91
6.	1	1	0	172,34	15,67
6.	2	1	1	172,34	15,67
6.	3	0	1	172,34	15,67
7.	1	2	1	165,59	15,05
7.	2	2	1	165,59	15,05
7.	3	1	1	165,59	15,05

#### 4.4 Zpracování a analýza dat

Koncové počty larev *A. cantonensis* jsem v programu Excel 2010 sjednotila pro každou testovací nádrž, viz příloha 1, a přepočítala na ml testovací nádže. Na základě počátečního počtu larev v nádržích a získaných koncových hodnot jsem vypočítala procentuální úbytek larev pro každou nádrž. Při analýze dat jsem zohlednila vliv kategorických proměnných, jako jsou přítomnost živých mlžů, schránek mlžů a typ vodního prostředí – stojatá nebo tekoucí voda – na úbytky larev pomocí grafických a výpočetních funkcí v R studiu.

Část procentuálních výsledků úbytků larev vyšla v záporných hodnotách. Proto jsem přistoupila k analýze dat dvěma způsoby; v prvním případě jsem záporné hodnoty zahrnuje do analýzy (dále jako „dataset se zápornými hodnotami“), zatímco v druhém případě jsem záporné hodnoty před samotnou analýzou vynulovala (dále jako „dataset s nulovými hodnotami“).

#### 4.4.1 Výpočty a vizualizace dat v R studiu

Pro zobrazení distribuce dat (procentuální úbytky larev) jsem použila funkci `hist` (balíček `base` verze 4.3.2) a pro ověření normality distribuce dat jsem aplikovala Shapirův-Wilkův test (Shapiro & Wilk 1965) pomocí funkce `shapiro.test` (balíček `stats` verze 4.4.0).

Distribuce dat nespĺňovala předpoklady pro využití parametrických statistických metod, proto jsem hodnoty transformovala. V datasetu s nulovými hodnotami jsem data nejprve transformovala pomocí logaritmu v programu Excel 2010, v případě výskytu nulových hodnot jsem ke všem hodnotám před logaritmizací přičetla 1. Pro vizualizaci nové distribuce dat jsem použila funkci `hist`. Jako alternativní metodu jsem zvolila Yeo-Johnsonovu transformaci (Yeo & Johnson 2000), zobecnění Box-Coxovy transformace (Box & Cox 1964), schopné zpracovávat jak kladné, tak záporné hodnoty. Tuto transformaci jsem vypočetla pomocí funkcí `preProcess` a `predict` (balíček `caret` verze 6.0-94) a opět vizualizovala pomocí funkce `hist`. V datasetu se zápornými hodnotami jsem aplikovala transformaci pomocí třetí odmocniny v Excelu 2010, neboť logaritmická transformace nebyla vhodná bez dalších větších úprav záporných hodnot. Také zde jsem použila alternativu Yeo-Johnsonovu transformaci. Výsledky obou transformací jsem vizualizovala funkcí `hist`.

Vzhledem k tomu, že ani transformovaná data nespĺňovala předpoklady pro parametrické metody, bylo nezbytné použít pro analýzu neparametrické statistické testy. V současné době neexistuje přímá neparametrická alternativa ke dvoufaktorové ANOVA umožňující zohlednění interakcí mezi testovanými faktory. Rozhodla jsem se proto provést analýzu jednotlivých faktorů bez zahrnutí jejich vzájemných interakcí, přičemž potenciální interakce mezi faktory mohou být naznačeny vizualizací výsledků pomocí krabicových a houslových grafů vytvořených s použitím funkce `ggplot` (balíček `ggplot2` verze 3.5.0). Dále jsem vizualizovala souhrnný vliv filtrujících jedinců a schránek *C. fluminea* pomocí funkce `mutate` (balíček `dplyr` verze 1.1.4).

Pro analýzu rozdílů mezi hodnotami – procentuálními úbytky larev – v nádržích ve stojaté oproti tekoucí vodě jsem aplikovala Mannův-Whitneyův  $U$  test (Mann & Whitney 1947) funkcí `wilcox.test` (balíček `stats` verze 4.4.0). Pro výpočet efektové velikosti jsem použila funkci `wilcox_effsize` (balíček `rstatix` verze 0.7.2). Test jsem provedla vždy pro každou skupinu nádrží zvlášť, respektive pro nádrže, kde byl filtrující mlž, následně pro nádrže, kde byly schránky mlže, a poté pro kontrolní skupinu nádrží. Tento test jsem zvolila pro svou schopnost testovat rozdíly mezi dvěma nezávislými výběry bez předpokladu normálního rozložení dat.

Pro posouzení vlivu vícevýběrového faktoru, jakým je přítomnost filtrujících mlžů nebo schránek mlžů oproti kontrolní skupině nádrží bez mlžů, jsem použila Kruskalův-Wallisův test (Kruskal & Wallis 1952), pomocí funkce `kruskal.test` (balíček `stats` verze 4.4.0). Tento test umožňuje porovnání více nezávislých výběrů a je vhodný pro data, která nespĺňují předpoklady pro parametrické testy.

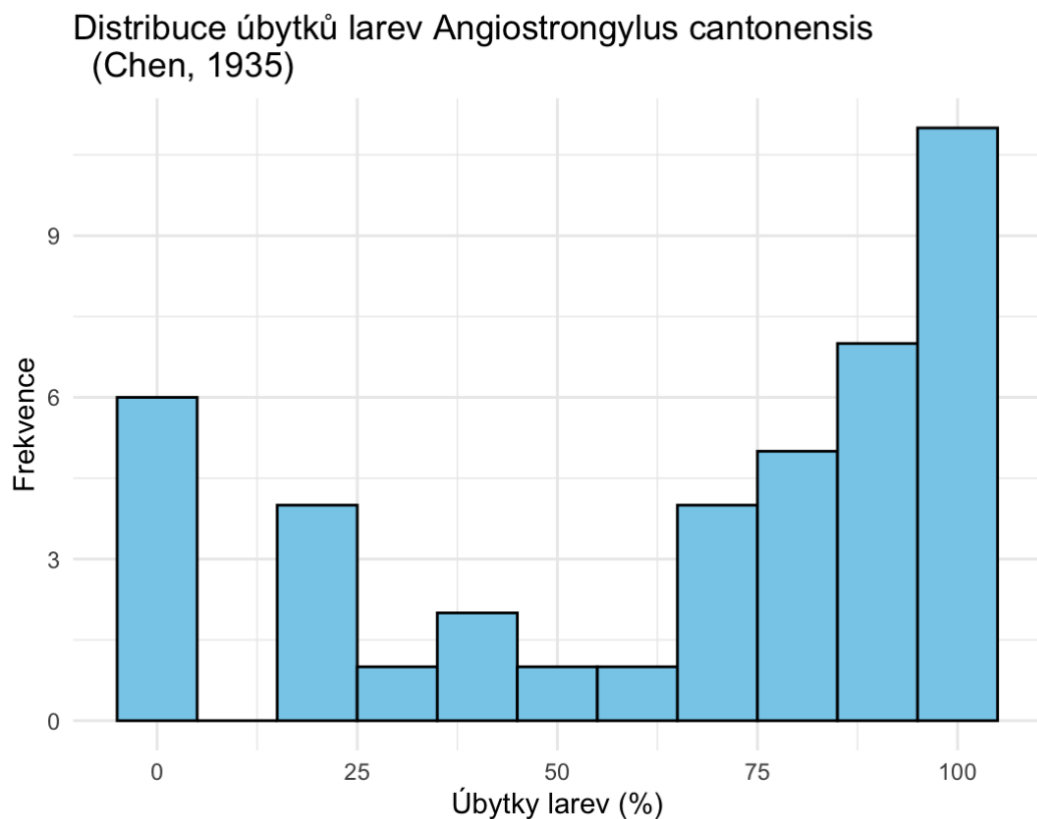


## 5 Výsledky

V této diplomové práci prezentuji výsledky první fáze experimentu. Počáteční i koncová hodnota počtu larev 1. stádia *A. cantonensis* byla naměřena u všech 42 testovacích nádrží. Průměrně se na začátku experimentu v jedné testovací nádrži vyskytovalo 8,38 jedinců na ml a na konci experimentu bylo průměrně v nádržích 3,25 jedinců na ml.

### 5.1 Distribuce dat

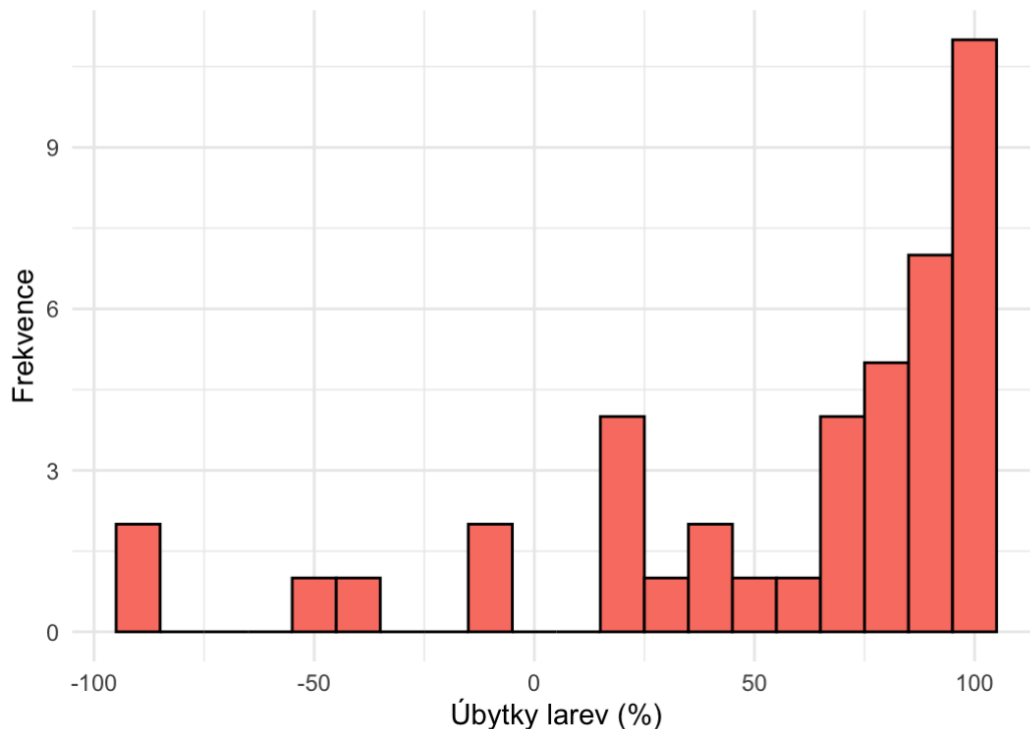
Graf 1 ukazuje rozložení procentuálních úbytků larev v datasetu s nulovými hodnotami. Z grafu je zřejmé, že data nevykazují normální distribuci, což potvrzuje i Shapirův-Wilkův test s p-hodnotou  $1,356 \times 10^{-5}$ , což je daleko pod hranicí 0,05. Tento výsledek umožňuje s vysokou mírou jistoty vyvrátit nulovou hypotézu o normalitě distribuce dat.



Graf 1 Histogram distribuce úbytků larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v datasetu s nulovými hodnotami. Osa X znázorňuje procentuální úbytky larev, osa Y znázorňuje frekvenci hodnot.

Graf 2 prezentuje rozložení procentuálních úbytků larev v datasetu se zápornými hodnotami. Distribuce ukazuje, že data nejsou normálně rozdělena, což signalizuje negativní šikmost – průměr hodnot je vyšší než medián těchto hodnot. Jako v předchozím datasetu, i zde se většina hodnot koncentruje kolem 100 % úbytků larev. Graf 1 zobrazuje také část hodnot, které se koncentrují u hranice 0 %, což způsobilo vynulování záporných hodnot. Výsledek Shapirova-Wilkova testu s p-hodnotou  $2,174 \times 10^{-6}$  s vysokou mírou pravděpodobnosti vyvrací hypotézu o normalitě těchto dat.

## Distribuce úbytků larev *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935)

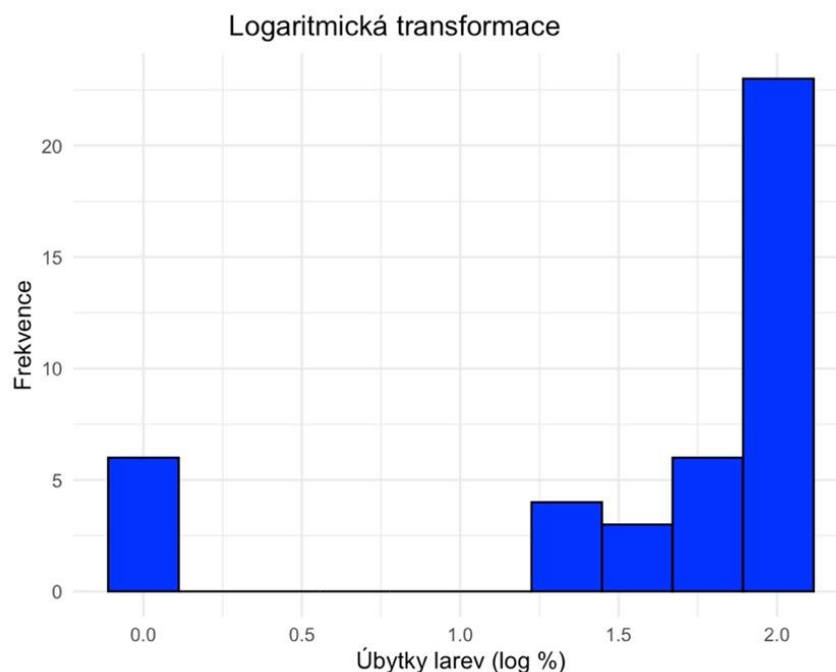


Graf 2 Histogram distribuce úbytků larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v datasetu se zápornými hodnotami. Osa X znázorňuje procentuální úbytky larev, osa Y znázorňuje frekvenci hodnot.

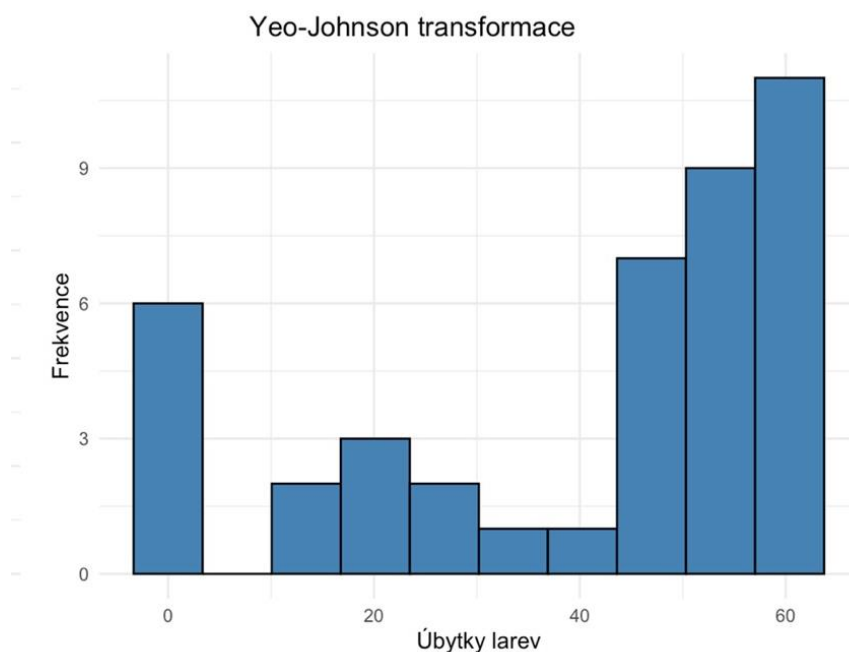
### 5.1.1 Transformace dat

Graf 3 ukazuje výsledky logaritmické transformace s přičtením 1. Ani tato úprava hodnot nevedla k žadáným změnám v rozložení, což dokládá výsledek Shapirova-Wilkova testu s p-hodnotou  $3,522 \times 10^{-9}$ , který vyvrací hypotézu o normalitě dat.

Graf 4 zobrazuje úbytky larev po aplikaci Yeo-Johnsonovy transformace, která také nepřinesla požadované změny v rozložení dat, jak potvrzuje Shapiro-Wilkův test s p-hodnotou  $7,504 \times 10^{-6}$ .



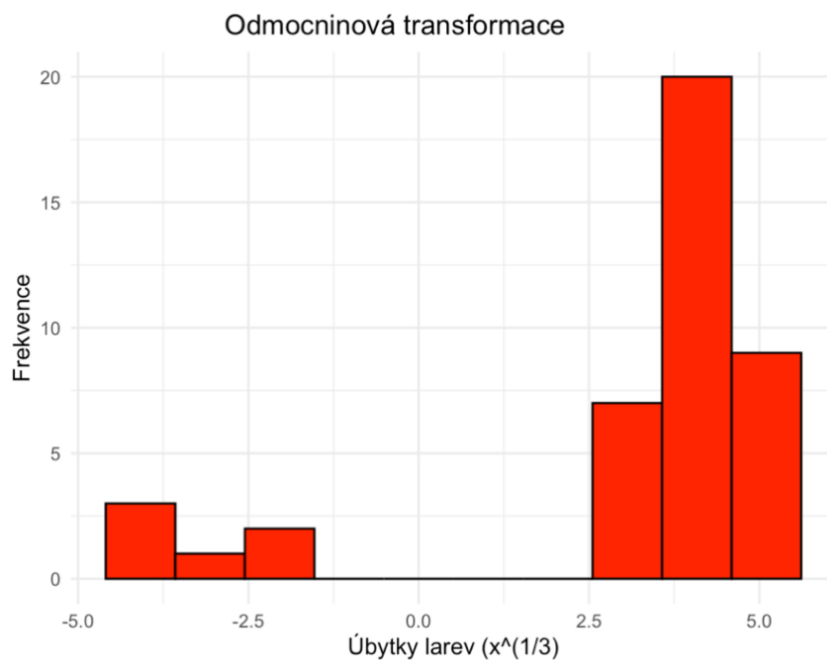
Graf 3 Histogram logaritmicky transformovaných (s přičtením 1) hodnot úbytků larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v testovacích nádržích, v datasetu s nulovými hodnotami. Osa X znázorňuje transformované procentuální úbytky larev, osa Y znázorňuje frekvenci hodnot.



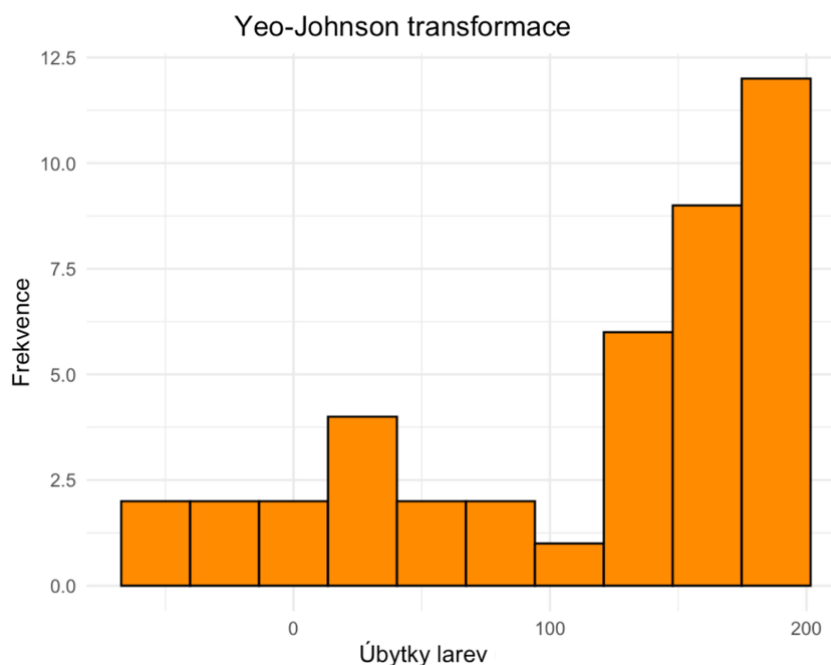
Graf 4 Histogram transformovaných hodnot úbytků larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v testovacích nádržích, pomocí Yeo-Johnsonovy transformace, v datasetu s nulovými hodnotami. Osa X znázorňuje transformované procentuální úbytky larev, osa Y znázorňuje frekvenci hodnot.

Graf 5 prezentuje transformované hodnoty – úbytky larev – pomocí třetí odmocniny v datasetu se zápornými hodnotami. Provedená transformace dat nevedla k výrazným změnám, které by přiblížily distribuci dat k normálními rozdělení. Rozložení dat a výsledek Shapiro-Wilkova testu s p-hodnotou  $1,382 \times 10^{-9}$  se velmi podobají hodnotám zobrazeným na grafu 3. P-hodnota pod hranicí 0,05 rovněž vyvrací hypotézu o normalitě dat.

Graf 6 ukazuje úbytky larev po aplikaci Yeo-Johnsonovy transformace v datasetu se zápornými hodnotami. I přes relativní variabilitu výsledných hodnot data stále nevykazují normální rozdělení, což potvrzuje i Shapirův-Wilkův test s p-hodnotou  $4,344 \times 10^{-5}$ .



Graf 5 Histogram transformovaných hodnot úbytků larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v testovacích nádržích, pomocí třetí odmocniny, v datasetu se zápornými hodnotami. Osa X znázorňuje transformované procentuální úbytky larev, osa Y znázorňuje frekvenci hodnot.



Graf 6 Histogram transformovaných hodnot úbytků larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v testovacích nádržích, pomocí Yeo-Johnsonovy transformace, v datasetu se zápornými hodnotami. Osa X znázorňuje transformované procentuální úbytky larev, osa Y znázorňuje frekvenci hodnot.

## 5.2 Analýza dat

### 5.2.1 Dataset s upravenými zápornými hodnotami

Grafy 7 a 8 znázorňují vliv filtrujících jedinců *C. fluminea* (vlevo) a přítomnosti schránek *C. fluminea* (uprostřed) v testovacích nádržích na procentuální úbytky larev *A. cantonensis* v porovnání s kontrolní skupinou testovacích nádrží bez efektu mlžů (vpravo). Pro lepší orientaci jsou výsledky rozděleny do dvou barevných kategorií, kde tmavě modrá barva představuje nádrže simulující stojatou vodu a světle modrá barva vody tekoucí. Graf 7 představuje krabicové grafy, které lépe vizualizují umístění mediánové hodnoty a případných odlehklých hodnot, to doplňují houslové grafy (graf 8), které detailně zachycují variabilitu dat.

Nádrže se stojatou vodou celkově vykazují vyšší hodnoty a větší konzistenci hodnot s mediány v rozmezí od 86,19–99,34 %, shrnuto v tabulce 2. Medián úbytků u nádrží s filtrujícími jedinci je obecně vyšší, přičemž nejnižší zaznamenaný úbytek larev v nádržích s filtrujícími jedinci byl 90,28 %. V kontrolní skupině nádrží byla sledována odlehlá hodnota 71,90 %. Data z nádrží se schránkami *C. fluminea* vykazují vysokou variabilitu s hodnotami od 71,06 % až do 100 %. Výsledek analýzy pomocí Kruskalova-Wallisova testu, kde hodnota chí-kvadrát  $X^2$  ( $df = 2$ ,  $N = 22$ ) = 2,789 s p-hodnotou 0,2479, která přesahuje hranici 0,05, znamená, že mezi zkoumanými výběry není signifikantní rozdíl.

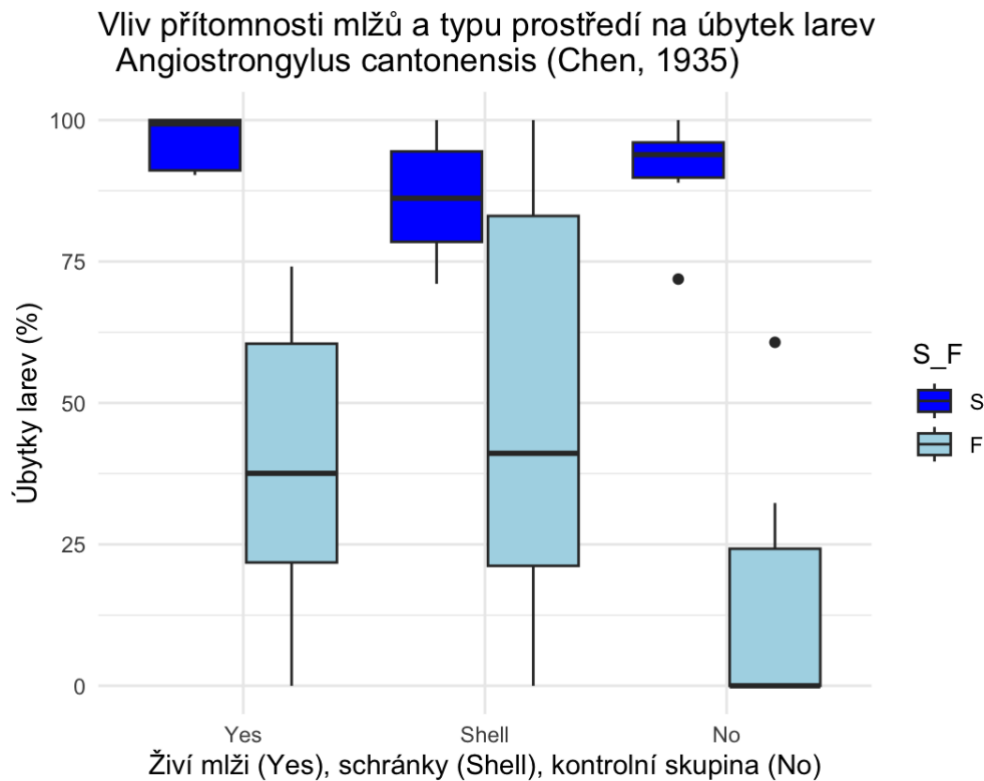
Nádrže s tekoucí vodou přináší obecně nižší mediánové hodnoty. Tvary houslových grafů (graf 8) naznačují vysokou variabilitu výsledných hodnot, ačkoliv kontrolní skupina nádrží vykazuje největší frekvenci nulových hodnot. Nejvyšší medián zde představují nádrže se schránkami, shrnuto v tabulce 2. Druhý největší medián (37,56 %) zastupuje nádrže s filtrujícími jedinci. A nejnižší medián (0 %) představují kontrolní skupina nádrží bez mlžů. U nádrže č. 22 byl zaznamenán nulový úbytek a jedná se o odlehlou hodnotu, nejnižší zaznamenaný úbytek, který je součástí kvartilů, je na 19,74 %. Výsledek analýzy pomocí Kruskalova-Wallisova testu, kde hodnota chí-kvadrát  $X^2$  ( $df = 2$ ,  $N = 20$ ) = 3,8657 s p-hodnotou 0,1447. Tento výsledek znamená, že mezi testovanými výběry není signifikantní rozdíl.

Při srovnání mediánů úbytků larev ve stojaté a tekoucí vodě pomocí Mannova-Whitneyho *U* testu dosáhla p-hodnota pro nádrže s filtrujícími mlži hodnoty 0,001321 a pro kontrolní skupinu 0,004337, což ukazuje na statisticky významný rozdíl. Efektivní velikost byla vypočtena na 0,844 pro nádrže s filtrujícími jedinci a 0,390 pro nádrže se schránkami. V případě nádrží obsahujících schránky, kde byly hodnoty vysoce variabilní, dosáhla p-hodnota 0,1466, a proto nelze konstatovat statisticky významný rozdíl.

*Tabulka 2 Mediány úbytků larev Angiostrongylus cantonensis (Chen, 1935) a počtu opakování v datasetu s nulovými hodnotami. Ve sloupci Skupiny nádrží jsou popsány testovací nádrže s filtrujícími jedinci Corbicula fluminea (Müller, 1774), se schránkami C. fluminea a kontrolní skupina nádrží bez efektu mlžů. Sloupec Typ prostředí, kde F = tekoucí voda, S = stojatá voda. Ve sloupci Opakování je počet opakování pro daný typ prostředí a výběru nádrží. Ve sloupci Medián jsou výsledky mediánů úbytků larev A. cantonensis.*

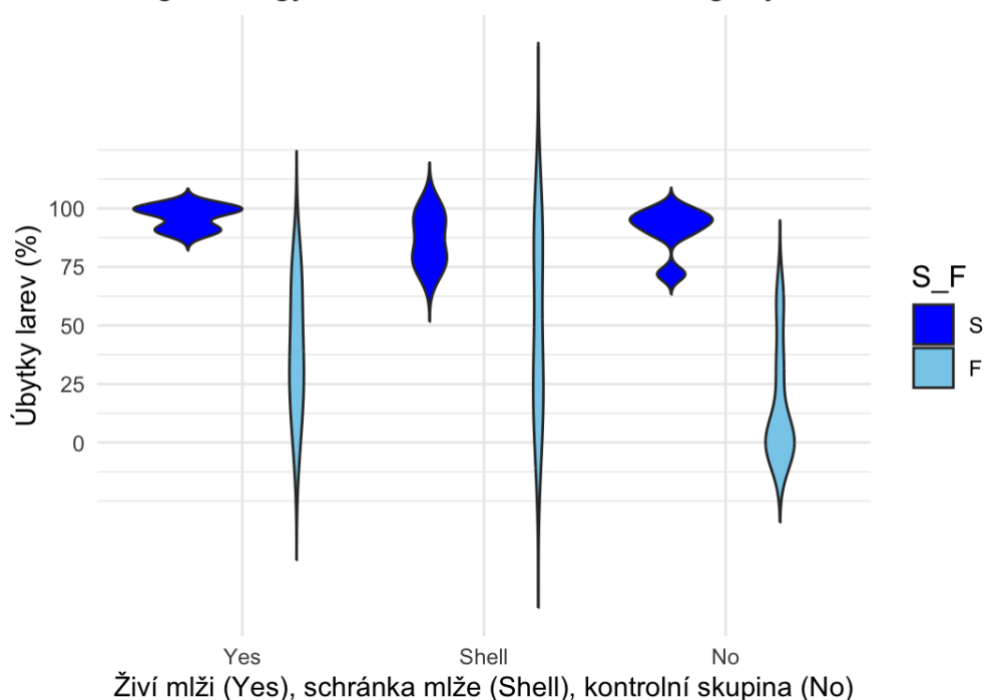
Skupiny nádrží	Typ prostředí	Opakování	Medián (%)
Živí mlži	F	7	37,56
Schránky	F	7	41,09
Kontrolní skupina	F	6	0
Živí mlži	S	8	99,34

Schránky	S	8	86,19
Kontrolní skupina	S	6	93,89



Graf 7 Krabicové grafy vyjadřující míru úbytků larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v testovacích nádržích, v datasetu s nulovými hodnotami, vpravo vlivem přítomnosti filtrujících jedinců *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) a uprostřed vlivem přítomných schránek *C. fluminea*. Vpravo krabicové grafy pro kontrolní skupinu nádrží bez efektu mlžů. Tmavě modré krabicové grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující stojatou vodu (S), světle modré grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující tekoucí vodu (F).

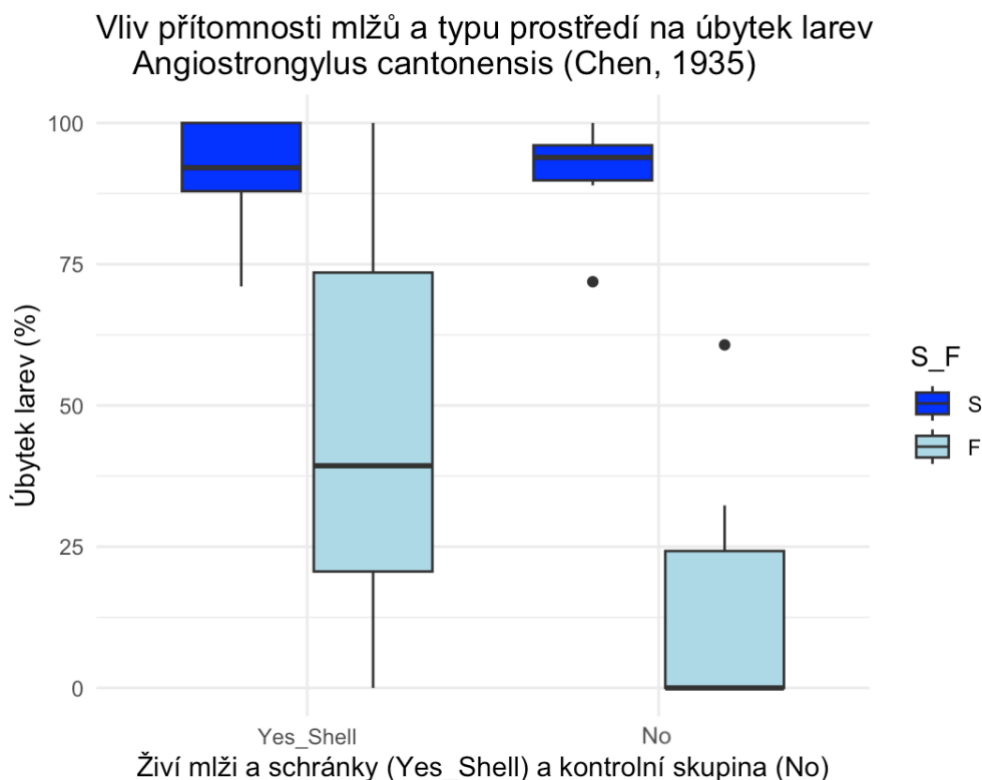
### Vliv přítomnosti mlžů a typu prostředí na úbytek larev *Angiostrongylus cantonensis* - houslové grafy



Graf 8 Houslové grafy vyjadřující míru úbytků larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v testovacích nádržích, v datasetu s nulovými hodnotami, vlevo vlivem přítomnosti filtrujících jedinců *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) a uprostřed vlivem přítomných schránek *C. fluminea*. Vpravo houslové grafy pro kontrolní skupinu nádrží bez efektu mlžů. Tmavě modré krabicové grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující stojatou vodu (S), světle modré grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující tekoucí vodu (F).

Graf 9 prezentuje výsledné hodnoty v testovacích nádržích pro dataset s nulovými hodnotami. K dispozici jsou krabicové grafy pro součet hodnot dvou výběrů (vlevo) – filtrující jedinci a schránky *C. fluminea* – a pro kontrolní skupinu nádrží bez přítomnosti mlžů (vpravo), jejichž zobrazení odpovídá předchozímu grafu 7. Tmavě modré grafy reprezentují nádrže se stojatou vodou, zatímco světle modré grafy nádrže s tekoucí vodou.

V nádržích s mlži se objevuje celkově vyšší variabilita hodnot v nádržích s mlži ve srovnání, ale medián těchto hodnot v nádržích se stojatou vodou je nižší než medián v kontrolní skupině. V nádržích s tekoucí vodou je naopak medián hodnot výrazně vyšší než třetí kvartil v kontrolní skupině.



Graf 9 Krabicové grafy vyjadřující míru úbytků larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v testovacích nádržích, v datasetu s nulovými hodnotami, vlivem přítomnosti filtrujících jedinců *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) a přítomných schránek *C. fluminea*, které byly sloučené do jednoho výběru, grafy vlevo. Vpravo krabicové grafy pro kontrolní skupinu nádrží bez efektu mlžů. Tmavě modré krabicové grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující stojatou vodu (S), světle modré grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující tekoucí vodu (F).

### 5.2.2 Dataset bez úpravy záporných hodnot

Grafy 10 a 11 znázorňují vliv filtrujících jedinců *C. fluminea* (vlevo) a efekt přítomnosti schránek mlžů *C. fluminea* (uprostřed) na úbytky larev 1. stádia *A. cantonensis* v testovacích nádržích v porovnání s kontrolní skupinou nádrží (vpravo), kde filtrující jedinci nebo schránky mlžů nebyli přítomni. Výsledky jsou zobrazeny ve dvou barvách pro lepší orientaci. Tmavě červená barva označuje nádrže simulující stojaté vody, zatímco lososová barva reprezentuje nádrže s tekoucí vodou. Graf 10 představuje krabicové grafy, které lépe vizualizují umístění mediánové hodnoty a případných odlehklých hodnot, to doplňují houslové grafy (graf 11), které detailně zachycují variabilitu dat.

Protože výsledné hodnoty pro stojatou vodu neobsahují záporné hodnoty, pak jsou v tomto případě krabicové i houslové grafy identické pro oba datasety, proto mediány vycházejí stejně, shrnuto v tabulce 3, a taktéž i výsledky Kruskalova-Wallisova testu, kde rozdíly mezi výběry nejsou statisticky signifikantní.

Záporné hodnoty se objevují pouze v případě testovacích nádrží simulujících tekoucí vodu, a to ve všech výběrech. U nádrží s filtrujícími jedinci *C. fluminea* je to opět nádrž č. 22, která byla pro potřeby předchozí analýzy upravena na 0 %. Nejvyšší variabilitu a také největší počet nádrží se zápornými hodnotami úbytků larev vykazuje kontrolní skupina. Výsledek Mannova-Whitneyho *U* testu vyšel pro nádrže s filtrujícími jedinci s *p*-hodnotou 0,001321 a u kontrolní skupiny s *p*-hodnotou 0,002165, která je odlišná od výsledné *p*-hodnoty v datasetu



s nulovými hodnotami. Pro nádrže se schránkami mlžů vyšla p-hodnota 0,1466, kde rozdíly ve výsledných hodnotách pro nádrže se stojatou vodou a tekoucí vodou nejsou statisticky signifikantní.

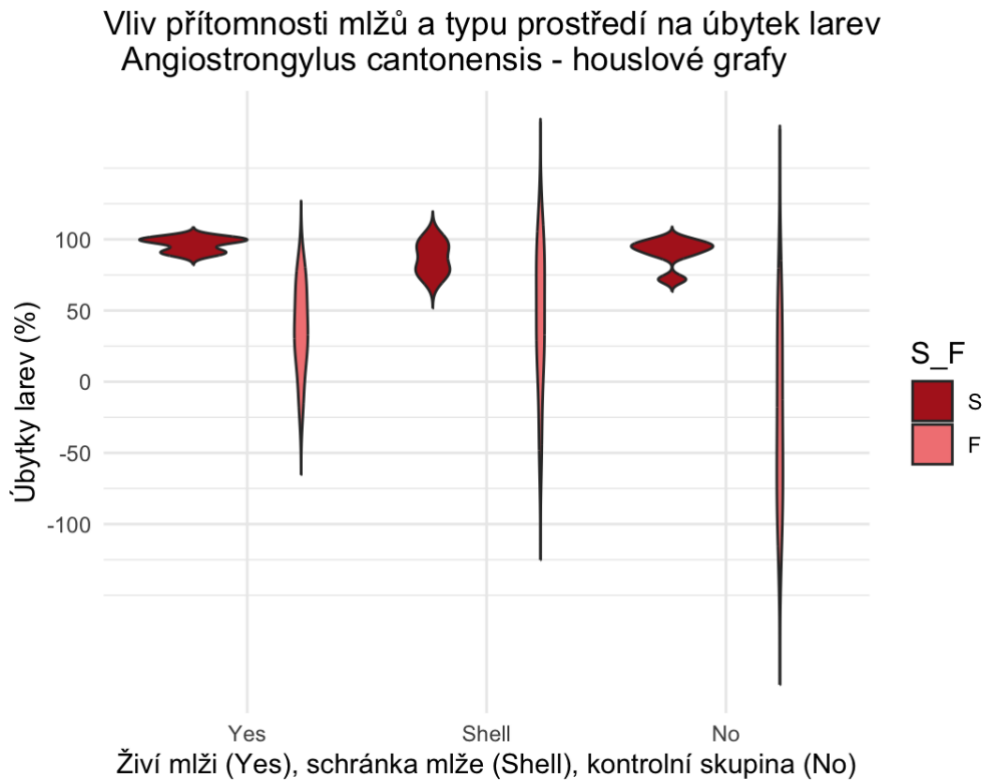
Pro dataset se zápornými hodnotami je výsledek Kruskalova-Wallisova testu s hodnotou chí-kvadrát  $X^2$  ( $df = 2$ ,  $N = 20$ ) = 4,3823 a p-hodnotou 0,1118, což také znamená, že rozdíly mezi výběry ve srovnání s kontrolní skupinou nádrží nejsou statisticky významné.

Tabulka 3 Mediány úbytků larev *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) a počtu opakování v datasetu se zápornými hodnotami. Ve sloupci Skupiny nádrží jsou popsány testovací nádrže s filtrujícími jedinci *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), se schránkami *C. fluminea* a kontrolní skupina nádrží bez mlžů. Sloupec Typ prostředí, kde F = tekoucí voda, S = stojatá voda. Ve sloupci Opakování je počet opakování pro daný typ prostředí a výběru nádrží. Ve sloupci Medián jsou výsledky mediánů úbytků larev *A. cantonensis*.

Skupiny nádrží	Typ prostředí	Opakování	Medián (%)
Živí mlži	F	7	37,56
Schránky	F	7	41,09
Kontrolní skupina	F	6	-29,35
Živí mlži	S	8	99,34
Schránky	S	8	86,19
Kontrolní skupina	S	6	93,89



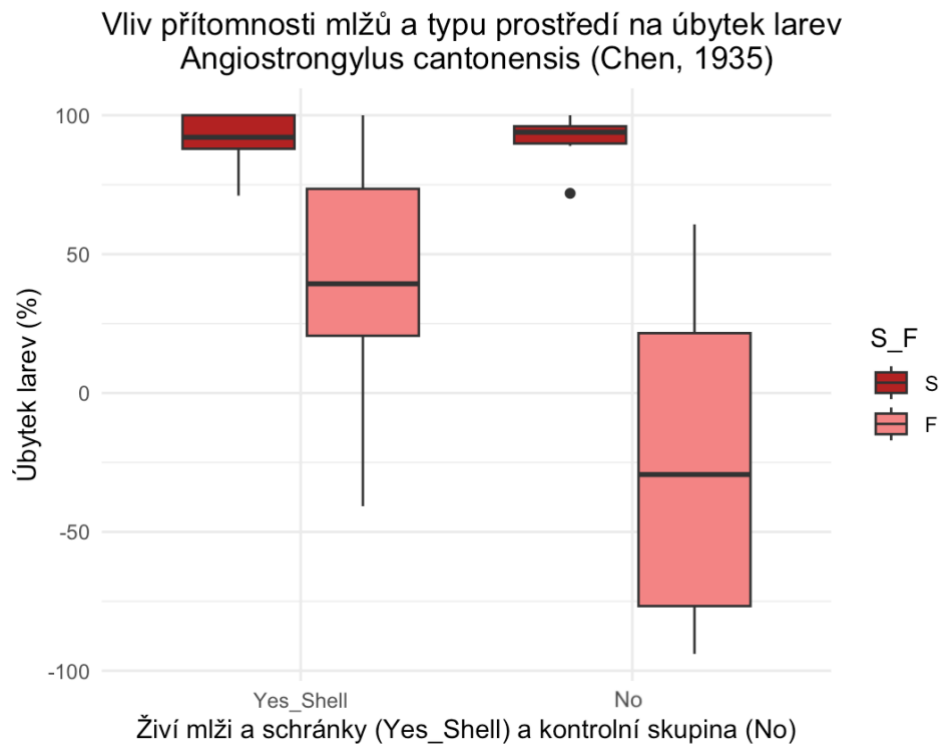
Graf 10 Krabicové grafy vyjadřující míru úbytků larev I. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v testovacích nádržích, v datasetu se zápornými hodnotami, vlevo vlivem přítomnosti filtrujících jedinců *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) a uprostřed vlivem přítomných schránek *C. fluminea*. Vpravo krabicové grafy pro kontrolní skupinu nádrží bez efektu mlžů. Tmavě modré krabicové grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující stojatou vodu (S), světle modré grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující tekoucí vodu (F).



*Graf 11 Houslové grafy vyjadřující míru úbytků larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v testovacích nádržích, v datasetu se zápornými hodnotami, vlevo vlivem přítomnosti filtrujících jedinců *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) a uprostřed vlivem přítomných schránek *C. fluminea*. Vpravo houslové grafy pro kontrolní skupinu nádrží bez efektu mlžů. Tmavě modré krabicové grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující stojatou vodu (S), světle modré grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující tekoucí vodu (F).*

Graf 12 představuje výsledné hodnoty úbytků larev 1. stádia *A. cantonensis* v testovacích nádržích pro dataset se zápornými hodnotami. Krabicové grafy pro kontrolní skupinu nádrží bez přítomnosti mlžů (vpravo) jsou shodné se zobrazením v grafu 10. Na grafu 12 jsou zobrazeny též sloučené výběry (vlevo) – filtrující jedinci a schránky mlžů. Tmavě červené grafy zastupují nádrže se stojatými vodami a grafy v lososové barvě nádrže s vodami tekoucími.

Hodnoty v nádržích se stojatými vodami jsou relativně konzistentní v obou případech. Medián pro nádrže s mlži je nižší než medián pro kontrolní skupinu nádrží se stojatými vodami. V tomto datasetu je zřetelná vysoká variabilita výsledků v kontrolní skupině nádrží s tekoucí vodou, kde se objevuje několik hodnot v záporném rozsahu, včetně záporného mediánu. Výsledné hodnoty pro nádrže s tekoucí vodou vykazují vyšší variabilitu a kvartily pro nádrže s mlži jsou výrazně výše než kvartily kontrolní skupiny. Hodnoty v kvartilech se téměř nepřekrývají, ačkoliv je vidět, že část hodnot v nádržích s mlži taktéž zasahuje do záporných čísel. Vzdálenost mezi mediány je v nádržích s tekoucí vodou výrazně vyšší než mezi výběry v nádržích se stojatou vodou.



Graf 12 Krabicové grafy vyjadřující míru úbytků larev 1. stádia *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) v testovacích nádržích, v datasetu se zápornými hodnotami, vlivem přítomnosti filtrujících jedinců *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) a vlivem přítomných schránek *C. fluminea*, které byly sloučené do jednoho výběru, grafy vlevo. Vpravo krabicové grafy pro kontrolní skupinu nádrží bez efektu mlžů. Tmavě modré krabicové grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující stojatou vodu (S), světle modré grafy zobrazují výsledky z nádrží simulující tekoucí vodu (F).

## 6 Diskuze

V této diplomové práci byl poprvé testován vliv mlže *C. fluminea* na perzistenci parazitické hlístice *A. cantonensis* ve vodním prostředí. Předchozí studie se zaměřovaly na vliv *C. fluminea* na odstraňování ptačích virů (Faust et al. 2009; Huyvaert et al. 2012), případně parazitických prvoků (Graczyk et al. 2003; Miller et al. 2005). Je však důležité zkoumat význam takto rozšířeného mlže pro širší spektrum parazitických druhů, jejichž výskyt v Evropě narůstá v důsledku klimatických změn.

### 6.1 Vliv filtrujících jedinců na perzistenci larev ve vodním prostředí

1.  $H_0$ : Přítomnost aktivně filtrujících jedinců *C. fluminea* nesnižuje perzistenci hlístice *A. cantonensis* ve vodním prostředí.

Filtrující jedinci *C. fluminea* měli největší vliv na úbytek larev *A. cantonensis* v testovacích nádržích se stojatou vodou s mediánem 99,34 %, ačkoliv se tato hodnota významně nelišila od mediánové hodnoty (93,89 %) v kontrolní skupině nádrží. Mediánová hodnota u nádrží s filtrujícími jedinci (37,56 %) byla v porovnání s kontrolní skupinou (-29,35 % a 0 %) výrazně vyšší v nádržích s tekoucí vodou. V nádržích se stojatou vodou byly výsledné hodnoty variabilnější oproti kontrolní skupině nádrží, což však neplatilo pro nádrže s tekoucí vodou.

Podle Lauritsen (1986) je filtrační aktivita u infaunálních mlžů často nepravidelná a druhově specifická, a to jak v rychlosti, tak v načasování zahájení filtrace, ačkoliv Silverman et al. (1995) tvrdí, že mlži obecně začínají nasávat vodu sifonem přibližně do 10 minut od umístění do testovací nádrže. Rychlost filtrace, v anglické odborné literatuře termín „clearance rate“, je objem přefiltrované vody zbavené suspendovaných částic za jednotku času (Riisgård 2001), to závisí na mnoha faktorech včetně druhu a velikosti filtrujících jedinců, teploty vody či režimu průtoku vody (Vaughn et al. 2008).

Silverman et al. (1995) zjistil, že *D. polymorpha* dokáže odstranit  $6 \times 10^8$  bakterií *E. coli*, o délce 1,7 do 2,9  $\mu\text{m}$ , z nádrže s 20 ml umělé rybníční vody za 30 minut, přičemž *C. fluminea* je zhruba 30krát pomalejší. Nutno dodat, že testované koncentrace larev *A. cantonensis* v experimentální části nebyly tak vysoké. Orlofske et al. (2012) testoval schopnost sedmi vodních organismů, včetně mlže okružanky *Sphaerium* sp., odstraňovat larvální stádia – cercárie – motolice *Ribeiroia ondatrae* (Price, 1931) z vodního prostředí. V každém pokusu umístil na 30 minut jednoho zástupce do nádrže s 60 ml vody a 30 cercáriemi *R. ondatrae*. Následně byli zástupci z nádrží odstraněni a spočteny všechny zbývající cercárie. Testování jedinci *Sphaerium* sp. neměli významný vliv na odstraňování cercárií z vodního sloupce, zároveň se tyto jedinci nepodíleli na jejich dalším vývoji v metacercárie. Bartsch et al. (2013) testoval schopnost *M. edulis* a *P. magellanicus* filtrovat *L. salmonis* z vodního prostředí. Součástí studie byly čtyři experimenty. V prvních dvou experimentech byla hodnocena schopnost *M. edulis* a *P. magellanicus* filtrovat larvy *L. salmonis* ve stojaté vodě, v prvním experimentu s nízkou koncentrací larev a v druhém s vysokou koncentrací larev. V dalších experimentech byla testovaná schopnost filtrovat larvy v tekoucí vodě, opět s proměnlivou koncentrací larev. Ačkoliv v druhém experimentu byli mlži s larvami v testovacích nádržích po dobu 2,5 hodiny, z důvodu testování potenciálního vlivu světelného stimulu, v ostatních

experimentech byla zvolena délka testu 60 minut. Welsh et al. (2019) testoval vliv různých velkých korýšů (Crustacea) a mlžů, včetně *C. gigas*, na cercárie *H. elongata*. Každého jedince přenesli do 2l nádrže, naplněné mořskou vodou do objemu 1500 ml. K nim přidali zhruba 40-50 cercárií a pokus trval 3 hodiny, což podle Welsh et al. (2019) mělo zajistit pohyb cercárií v celém vodním sloupci. Nutno podotknout, že v tomto případě byl použit zhruba 4,5krát větší objem vody v testovací nádrži než v experimentální části této diplomové práce. Přístupy ve výše zmíněných studiích naznačují, že délka experimentu byla zvolena vhodně, a i kdyby testování jedinci měli odlišné filtrační schopnosti, během 60 minut měli dostatečné množství času přefiltrovat celkový objem vody s larvami *A. cantonensis*. To podporuje zjištění Way et al. (1990), že *C. fluminea* může provádět různé fyziologické úpravy rychlosti své filtrace, aby dosáhla určité optimální rychlosti odstraňování částic v daném prostředí.

Podle Vaughn et al. (2008) je rychlost filtrace ovlivněná také velikostí a koncentrací filtrovaných částic. K selekci potravy dochází, jak před jejím samotným zachycením, tak po něm, ale ještě před strávením, kdy mlži vyřazenou potravu vyloučí společně s pseudovýkaly. U konzumace mořských řas tento proces trvá přibližně 5 minut (Nichols et al. 2005), larvy by tak mohly kontakt s mlži přežít. Nicméně Davenport et al. (2000) uvedl, že zooplankton vázaný na pseudovýkaly *M. edulis*, buď uhynul právě při vyloučení s pseudovýkaly nebo v brzké době. Je také pravděpodobné, že by larvy uvězněné v pseudovýkalech byly brzy zkonsumovány dalšími organismy, a to ať už ve vodním sloupci nebo na dně, kam pseudovýkaly klesají poměrně rychle (Davenport et al. 2000).

Existují parazitické druhy, které se přizpůsobily nejen mechanismům při selekci potravy, ale dokážou přežít i trávicí procesy. Provost et al. (2011) zjistil, že lidský patogen Enterovirus 72, jinak známý jako hepatitida A, patřící do čeledi Picornaviridae, dokázal přežít v jedincích ústřice *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) až 21 dní. Odolnost patogenů a parazitů může být ovlivněna jejich velikostí (Burge et al. 2016). Například *C. gigas* a *M. edulis* mohou filtrovat eukaryotické rozsivky (šířka > 4  $\mu\text{m}$ ) se 100% účinností, ale účinnost filtrace klesá s klesající velikostí potravy (Haven & Morales-Alamo 1970; Riisgård 1998). Naproti tomu Lehane a Davenport (2006) zjistili, že testování jedinci *M. edulis*, o délce schránek od 4,50 do 7,81 cm s průměrem 5,89 cm, mohou pozřít zooplanktonní organismy o délce až 3 mm, i když jich v žaludcích nebylo pozorováno mnoho, což podle Lehane a Davenport (2006) také naznačuje, že dochází k selekci podle velikosti. Existuje tedy nějaká maximální limitní hodnota, tedy alespoň u *M. edulis*, někde mezi 4  $\mu\text{m}$  (Haven & Morales-Alamo 1970; Riisgård 1998) a 3 mm, kdy účinnost filtrace opět začne klesat. Ačkoliv je selekce potravy podmíněná více faktory a je druhově specifická – například Yahel et al. (2009) pozoroval, že tropický mlž *Lithopaga simplex* Iredale, 1939 si nevybírání částice pouze na základě jejich velikosti, ale také podle charakteristiky vnějších buněk a vyššího obsahu pigmentu – předpokládám, že by velikost larev *A. cantonensis* – široké přibližně 15  $\mu\text{m}$  a dlouhé 300  $\mu\text{m}$  – nemusela být u průměrně 3,1x menších testovaných jedinců mlže *C. fluminea*, než byly testování jedinci *M. edulis* ve studii Lehane a Davenport (2006), důvodem k jejich vyřazení z procesu trávení. V pokračujících fázích experimentu bude proces selekce na základě velikosti lépe vysvětlen, a to díky pitvě jedinců *C. fluminea* metodou qPCR, kde bude možné zjistit kolik larev skutečně testování jedinci z nádrží odstranili.

Vizualizace výsledků pilotního experimentu, na grafech 7,8,10 a 11, poukázala na potenciální vliv přítomnosti aktivně filtrujících jedinců *C. fluminea*. Mediány byly v obou

typech testovaného vodního prostředí vyšší než mediány hodnot v kontrolních skupinách nádrží, shrnuto v tabulkách 2 a 3. Přesto rozdíly mezi výběry nebyly podle analýzy Kruskalovým-Wallisovým testem statisticky významné a 1. hypotézu se prozatím nepodařilo vyvrátit.

## 6.2 Vliv přítomnosti schránek mlžů na perzistenci larev ve vodním prostředí

2.  $H_0$ : Složitost prostředí vytvořená přítomností schránek jedinců *C. fluminea* nesnižuje perzistenci hlístice *A. cantonensis* ve vodním prostředí.

V obou analyzovaných datasetech a v obou typech testovaného vodního prostředí vykazovaly výsledné hodnoty pro nádrže se schránkami *C. fluminea* největší variabilitu, přičemž se tyto hodnoty lišily v závislosti na typu prostředí. V nádržích s tekoucí vodou měly nádrže se schránkami nejvyšší medián 41,09 %, což je více než u nádrží s aktivně filtrujícími jedinci (37,56 %) a výrazně více než u kontrolní skupiny, kde hodnoty dosáhly 0 % a -29,35 %. Tyto výsledky mohou naznačovat, že se některé larvy *A. cantonensis* dostaly vlivem turbulence v nádržích dovnitř schránek, a proto je nebylo možné odebrat z vodního sloupce. K podobnému výsledku dospěl Welsh et al. (2014), který popsal redukcii cercárií *H. elongata* ve vodním sloupci v testovací nádrži vlivem přítomností schránek *C. gigas*. To interpretuje, takže schránky těchto mlžů pravděpodobně působí jako fyzická překážka, cercárie se do struktury schránek zamotávají, čímž je znemožněno volně žijícím stádiím parazita dostat se ke svým hostitelům během jejich krátké životnosti. Pokud larvy *A. cantonensis* dokážou přežít mimo hostitele až po dobu jednoho měsíce (Howe et al. 2019), pak přítomnost samotných schránek relativně malých mlžů *C. fluminea* pravděpodobně nebude mít potřebný dlouhodobý efekt. Na druhou stranu v kontextu rozmanitého vodního prostředí by například v kombinaci s vodními rostlinami mohli přispět ke snížení perzistence těchto parazitů.

Dále Welsh et al. (2014) poukazuje na to, že složitá struktura lastur *C. gigas* přispívá k účinnějšímu zachytávání cercárií ve srovnání se schránkami dalších testovaných druhů, jako byly *C. edule*, *M. edulis*, *E. americanus* a plže *L. littorea*, kteří mají hladší povrch (podobně jako *C. fluminea*) a na odstraňování cercárií z vodního sloupce neměly významný vliv. Výsledné hodnoty experimentu této práce tedy mohly být také ovlivněny nepřesností v metodě odběru. V nádržích se stojatou vodou byly mediány úbytků nižší, avšak stále relativně vysoké (86,19 %), což může být vzhledem k velkým úbytkům v kontrolní skupině výsledkem kombinace se sedimentačními procesy. To potvrzuje i absence signifikantních výsledků analýzy pomocí Kruskalova-Wallisova testu, kdy se nepodařilo vyvrátit 2. hypotézu.

## 6.3 Stojatá vs. tekoucí voda

3.  $H_0$ : Typ prostředí – stojatá nebo tekoucí voda – neovlivňuje efekt aktivní filtrace jedinců *C. fluminea* nebo přítomnosti schránek *C. fluminea* na perzistenci *A. cantonensis* ve vodním prostředí.

V nádržích se stojatou vodou byly pozorovány relativně konzistentní hodnoty úbytků larev s vysokými mediány v rozpětí od 86,19 % do 99,34 %. Oproti tomu v nádržích s tekoucí vodou se mediány úbytků pohybovaly v nulovém datasetu v rozmezí od 0 % do 41,09 % a v datasetu se zápornými hodnotami v rozmezí od -29,35 % do 41,09 %. Tyto rozdílné hodnoty mezi testovanými typy vodního prostředí naznačují převahu sedimentačních procesů v nádržích se stojatou vodou, kde larvy byly usazené na dně (nebo na schránkách) a nebylo je tak možné z vodního sloupce odebrat. V nádržích s tekoucí vodou, díky turbulenci ve vodním sloupci sedimentační procesy nepřevažují, což může lépe vysvětlit vliv aktivně filtrujících jedinců, případně schránek mlžů v nádržích. Ovšem Bartsch et al. (2013) zjistil, že *M. edulis* a *P. magellanicus* dokážou za hodinu odstranit z vodního sloupce 18–38 % dospělých samic *L. salmonis*, dlouhých 8–18 mm, a to navzdory rozdílu v poměru jedinců *L. salmonis* a testovaných mlžů, objemu vody a typu vodního prostředí. Velikost podílu sedimentace v nádržích ve stojatých vodách by mohla opět vysvětlit pitva mlžů a zjištění skutečného počtu pozřených larev *A. cantonensis*.

V nádržích s tekoucí vodou se objevily záporné výsledky. Možné vysvětlení je, že nedostatečné promíchání zásobního roztoku s larvami mohlo vést k nerovnoměrnému rozložení larev ve vodním sloupci, počáteční koncentrace larev, shrnuty v tabulce 1, v testovací nádrži byly tedy ve skutečnosti vyšší než předpokládané. V nádržích se stojatou vodou mohly sedimentační procesy převážet a tím maskovat tento jev. Případně to mohla způsobit nepřesnost při kvantifikaci hustoty suspenze larev ve výkalech laboratorních potkanů *R. norvegicus*. Největší počet nádrží se zápornými hodnotami úbytků larev vykazuje kontrolní skupina nádrží s tekoucí vodou, která těmto úvahám nasvědčuje.

Provedená analýza pomocí Mannova-Whitneyho *U* testu částečně vyvrátila 3. hypotézu, protože rozdíly výsledků byly statisticky signifikantní ve skupině nádrží s filtrujícími jedinci a v kontrolní skupině, zatímco rozdíly v nádržích se schránkami mlžů nebyly statisticky významné a tato část hypotézy se vyvrátit nepodařila. To mohla způsobit vysoká variabilita výsledných dat v obou typech testovaného vodního prostředí.

## 6.4 Budoucí vývoj

Přestože předchozí studie (Graczyk et al. 2003; Miller et al. 2005; Faust et al. 2009; Huyvaert et al. 2012; Welsh et al. 2014; Ismail et al. 2015; Gopko et al. 2020) prokázaly, že mlži mohou odstraňovat některé patogenní či parazitické druhy, otázka, zda má *C. fluminea* vliv na perzistenci *A. cantonensis* ve vodním prostředí prozatím nebyla zodpovězena. Ačkoliv výsledky nebyly statisticky významné, výsledky souhrnného efektu aktivně filtrujících jedinců a schránek *C. fluminea*, zobrazené na grafech 8 a 12, naznačují vliv těchto faktorů na koncové počty larev v nádržích, to by mohly upřesnit například pitvy testovaných mlžů v pokračujících fázích experimentu, které nebyly součástí experimentální části této diplomové práce.

V pokračujících fázích experimentu byl navyšován počet opakování, který by mohl minimalizovat výkyvy výsledků a zvýšit statistickou sílu experimentu. Ve srovnání s metodickým přístupem ve studii Vielma et al. (2019), kde se testoval vliv několika nehostitelských organismů na vývoj a případné odstranění cercárií motolice *Philophthalmus* spp. Looss, 1899 z vodního prostředí. Mezi testujícími nehostitelskými organismy byli například sasanka *Anthopleura aureoradiata* (Stuckey, 1909) a mlž *Austrovenus stutchburyi*

(Wood, 1828). Testy s těmito organismy zahrnovaly až 16 replikací. Predace *A. aureoradiata* vedla k odstranění téměř dvou třetin původního počtu cercárií. Naproti tomu predace *A. stutchburyi* způsobila ztrátu o něco méně než poloviny cercárií, hodnoty se ale výrazně nelišily od kontrolního testování.

V 5. až 7. dni experimentu byly koncentrace larev, shrnuty v tabulce 1, v testovacích nádržích výrazně vyšší. Protože během experimentu jeden z hostitelských potkanů uhynul, byl nahrazen novým infikovaným jedincem s dospělcem *A. cantonensis*, který reprodukoval vyšší množství larev. Tento fakt poukazuje na možnost doplnění metodiky pokračujících experimentů o zavedení pre-testů „výnosnosti“ laboratorních potkanů v produkci larev. Takový přístup by umožnil zařadit do experimentu pouze ty jedince, kteří produkují nejvyšší množství larev, což by mohlo vést k přesnějším a konzistentnějším výsledkům.

Absence signifikantních výsledků způsobena vysokou variabilitou výsledných hodnot a s tím spojenou přítomností záporných výsledků naznačuje nepřesnost, ať už v použitých metodách stanovení hustoty suspenze larev, nebo odběru z testovacích nádrží, případně chybě při zápisu koncových počtů larev v odebraných kapkách atd. Navrhované metodické úpravy pro pokračující fáze experimentu by mohly odpovédět na otázku vlivu *C. fluminea* na odstraňování larev *A. cantonensis* z vodního prostředí.



## 7 Závěr

V této diplomové práci byl sledován vliv mlžů – modelový druh *Corbicula fluminea* – na odstraňování parazitů z vodního prostředí, konkrétně parazitické hlístice *Angiostrongylus cantonensis*. V literární rešerši byly shrnuty informace o biologii a životních strategiích modelových druhů, včetně rizik spojených s přítomností *A. cantonensis*. Dále byly shrnuty studie, zabývající se mlži jakožto potenciálními predátory parazitických organismů. V několika případech mlži skutečně prokázali schopnost odstraňovat nebo alespoň omezovat přenos parazitických či patogenních druhů ve vodním prostředí.

Součástí této práce byl pilotní experiment, který testoval vliv 5 filtrujících jedinců a stejný počet schránek *C. fluminea* v testovacích nádržích na proměnlivé koncentrace larev 1. stádia *A. cantonensis*. Nádrže byly rozděleny kvůli kontextu prostředí, ve kterém se modelové druhy vyskytují, na nádrže se stojatými vodami a tekoucími vodami. Statistickou analýzou Kruskalovým-Wallisovým testem se nepodařilo vyvrátit první dvě nulové hypotézy, ačkoliv mediánové hodnoty a jejich vizualizace naznačují možný vliv mlžů na úbytky larev v testovacích nádržích. To pravděpodobně způsobila vysoká variabilita v datech, které by se mohlo zabránit navyšováním počtu replikací plánovaných v navazující části experimentu, který již nebyl předmětem této diplomové práce.

1.  $H_0$ : Přítomnost aktivně filtrujících jedinců *C. fluminea* nesnižuje perzistenci hlístice *A. cantonensis* ve vodním prostředí. Hypotézu nebylo možné vyvrátit.
2.  $H_0$ : Složitost prostředí vytvořená přítomností schránek jedinců *C. fluminea* nesnižuje perzistenci hlístice *A. cantonensis* ve vodním prostředí. Hypotézu nebylo možné vyvrátit.

Třetí nulovou hypotézu se podařilo vyvrátit částečně, protože v nádržích s filtrujícími jedinci byl Mannova-Whitneyho  $U$  testem vypočten signifikantní rozdíl v úbytcích larev *A. cantonensis* mezi prostředím stojaté a tekoucí vody. To mohly způsobit jednak sedimentační procesy, jejichž skutečný podíl může být osvětlen pitvou testovaných jedinců *C. fluminea* v dalších fázích experimentu. U nádrží se schránkami se tato hypotéza vyvrátit nepodařila.

3.  $H_0$ : Typ prostředí – stojatá nebo tekoucí voda – neovlivňuje efekt aktivní filtrace jedinců *C. fluminea* nebo přítomnosti schránek *C. fluminea* na perzistenci *A. cantonensis* ve vodním prostředí. Hypotézu bylo možné vyvrátit v prostředí s filtrujícími jedinci.

Testování interakcí mezi parazity a filtrátory může pomoci při kontrole nemocí v akvakulturních systémech, zlepšení zdraví vodních ekosystémů a při prevenci šíření infekčních chorob, které mohou být potenciálně nebezpečné i pro člověka. Metodické poznatky a návrhy úpravy mohou být využity v pokračujících fázích pilotního experimentu, případně v dalších studiích, které by objasnily význam *C. fluminea* pro odstraňování *A. cantonensis* z vodního prostředí.

## 8 Literatura

- Alicata JE. 1963. Morphological and biological differences between the infective larvae of *Angiostrongylus cantonensis* and those of *Anafilaroides rostratus*. *Canadian Journal of Zoology* **41**:1179–1183.
- Alicata JE. 1964. Land crabs as probable paratenic hosts for the infective larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *The Journal of Parasitology* **50**:2–39.
- Alicata JE. 1965. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. Pages 223–248 in *Advances of Parasitology*. Elsevier.
- Alicata JE. 1969. Present status of *Angiostrongylus cantonensis* infection in man and animals in the tropics. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **72**:53–63.
- Altizer S, Bartel R, Han BA. 2011. Animal migration and infectious disease risk. *Science* **331**:296–302.
- Anettová L, Šípková A, Izquierdo-Rodriguez E, Velič V, Modrý D. 2023. Rat lungworm survives winter: experimental overwintering of *Angiostrongylus cantonensis* larvae in European slugs. *Parasitology* **150**:950–955.
- Ansdell V, et al. 2021. Guidelines for the diagnosis and treatment of neuroangiostrongyliasis: updated recommendations. *Parasitology* **148**:227–233.
- Arapov J, Ezgeta-Balić D, Peharda M, Ninčević Gladan Ž. 2010. Bivalve feeding—how and what they eat. *Ribarstvo* **68**:105–116.
- Arkush KD, Miller MA, Leutenegger CM, Gardner IA, Packham AE, Heckerroth AR, Tenter AM, Barr BC, Conrad PA. 2003. Molecular and bioassay-based detection of *Toxoplasma gondii* oocyst uptake by mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *International Journal for Parasitology* **33**:1087–1097.
- Ballweber LR, Beugnet F, Marchiondo AA, Payne PA. 2014. American Association of Veterinary Parasitologists' review of veterinary fecal flotation methods and factors influencing their accuracy and use—Is there really one best technique? *Veterinary Parasitology* **204**:73–80.
- Barratt J, Chan D, Sandaradura I, Malik R, Spielman D, Lee R, Marriott D, Harkness J, Ellis J, Stark D. 2016. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. *Parasitology* **143**:1087–1118.
- Bartsch A, Robinson SMC, Liutkus M, Ang KP, Webb J, Pearce CM. 2013. Filtration of sea louse, *Lepeophtheirus salmonis*, copepodids by the blue mussel, *Mytilus edulis*, and the Atlantic sea scallop, *Placopecten magellanicus*, under different flow, light and copepodid-density regimes. *Journal of Fish Diseases* **36**:361–370.
- Bellard C, Leroy B, Thuiller W, Rysman J-F, Courchamp F. 2016. Major drivers of invasion risks throughout the world. *Ecosphere* **7** (e01241) DOI: 10.1002/ecs2.1241.
- Ben-Horin T, Bidegain G, Huey L, Narvaez DA, Bushek D. 2015. Parasite transmission through

- suspension feeding. *Journal of Invertebrate Pathology* **131**:155–176.
- Bolam BA, Rollwagen-Bollens G, Bollens SM. 2019. Feeding rates and prey selection of the invasive Asian clam, *Corbicula fluminea*, on microplankton in the Columbia River, USA. *Hydrobiologia* **833**:107–123.
- Box GEP, Cox DR. 1964. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* **26**:211–243.
- Bruyne RH de. 2004. *Encyklopedie ulit a lastur*. Rebo International CZ, Praha.
- Burge CA, et al. 2014. Climate change influences on marine infectious diseases: Implications for management and society. *The Annual Review of Marine Science* **6**:249–277.
- Burge CA, Closek CJ, Friedman CS, Groner ML, Jenkins CM, Shore-Maggio A, Welsh JE. 2016. The use of filter-feeders to manage disease in a changing world. *Integrative and Comparative Biology* **56**:573–587.
- Burlakova LE, Karatayev AY, Karatayev VA. 2012. Invasive mussels induce community changes by increasing habitat complexity. *Hydrobiologia* **685**:121–134.
- Burridge L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K. 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* **306**:7–23.
- Cable J, Barber I, Boag B, Ellison AR, Morgan ER, Murray K, Pascoe EL, Sait SM, Wilson AJ, Booth M. 2017. Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 372 (20168088) DOI: 10.1098/rstb.2016.0088.
- Cantillo AY. 1998. Comparison of results of Mussel Watch Programs of the United States and France with worldwide Mussel Watch studies. *Marine Pollution Bulletin* **36**:712–717. ,
- Castro BB, Silva C, Macário IPE, Oliveira B, Gonçalves F, Pereira JL. 2018. Feeding inhibition in *Corbicula fluminea* (O.F. Müller, 1774) as an effect criterion to pollutant exposure: Perspectives for ecotoxicity screening and refinement of chemical control. *Aquatic Toxicology* **196**:25–34.
- Cataldo DH, Boltovskoy D, Stripeikis J, Pose M. 2001. Condition index and growth rates of field caged *Corbicula fluminea* (Bivalvia) as biomarkers of pollution gradients in the Paraná river delta (Argentina). *Aquatic Ecosystem Health & Management* **4**:187–201.
- Cebulska KD, Krodkiewska M. 2019. Further dispersion of the invasive alien species *Corbicula fluminea* (O.F. Müller, 1774) in the Oder River. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems* 420 (14) DOI: 10.1051/kmae/2019008.
- Cooper NL, Bidwell JR, Cherry DS. 2005. Potential effects of Asian clam (*Corbicula fluminea*) die-offs on native freshwater mussels (Unionidae) II: porewater ammonia. *Journal of the North American Benthological Society* **24**:381–394.
- Costello MJ. 2009. The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry. *Journal of Fish Diseases* **32**:115–118.

- Cowie RH. 2013. Biology, systematics, life cycle, and distribution of *Angiostrongylus cantonensis*, the cause of rat lungworm disease. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health: A Journal of Asia Pacific Medicine & Public Health* **72**:6–9.
- Cowie RH. 2017. *Angiostrongylus cantonensis*: Agent of a Sometimes Fatal Globally Emerging Infectious Disease (Rat Lungworm Disease). *ACS Chemical Neuroscience* **8**:2102–2104.
- Cowie RH, Ansdell V, Panosian Dunavan C, Rollins RL. 2022. Neuroangiostrongyliasis: Global spread of an emerging tropical disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **107** (1166) DOI: 10.4269/ajtmh.22-0360.
- Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli MP, Utzinger J. 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols* **5**:503–515.
- Dame RF, Kenneth Michael J. 2016. *Ecology of Marine Bivalves: An Ecosystem Approach*, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton.
- Davenport J, Smith R, Packer M. 2000. Mussels *Mytilus edulis*: significant consumers and destroyers of mesozooplankton. *Marine Ecology Progress Series* **198**:131–137.
- Dunne JA et al. 2013. Parasites affect food web structure primarily through increased diversity and complexity. *PLoS Biology* **11** (e1001579) DOI 10.1371/journal.pbio.1001579.
- Faust C, Stallknecht D, Swayne D, Brown J. 2009. Filter-feeding bivalves can remove avian influenza viruses from water and reduce infectivity. *Proceedings of the Royal Society B* **276**:3727–3735.
- GBIF Secretariat. 2023. GBIF Backbone Taxonomy. [*Corbicula fluminea*]. GBIF Secretariat, Copenhagen. Available from: <https://www.gbif.org/dataset/d7dddbf4-2cf0-4f39-9b2a-bb099caae36c> (accessed April 14, 2024).
- Gomes J, Matos A, Quinta-Ferreira RM, Martins RC. 2018. Environmentally applications of invasive bivalves for water and wastewater decontamination. *Science of The Total Environment* **630**:1016–1027.
- Gopko M, Mironova E, Pasternak A, Mikheev V, Taskinen J. 2020. Parasite transmission in aquatic ecosystems under temperature change: effects of host activity and elimination of parasite larvae by filter-feeders. *Oikos* **129**:1531–1540.
- Graczyk T, Conn D, Marcogliese D, Graczyk H, Lafontaine YD. 2003. Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitology Research* **89**:107–112.
- Graeff-Teixeira C, Da Silva ACA, Yoshimura K. 2009. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews* **22**:322–348.
- Graf D, Cummings K. 2002. *The Mussel Project*. The National Science Foundation, The University of Wisconsin-Stevens Point. Available from: <https://mussel-project.uwsp.edu/> (accessed March 23, 2024).

- Groner ML et al. 2016. Managing marine disease emergencies in an era of rapid change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 371 (20150364) DOI: 10.1098/rstb.2015.0364.
- Haven DS, Morales-Alamo R. 1970. Filtration of particles from suspension by the american oyster *crassostrea virginica*. *The Biological Bulletin* **139**:248–264.
- Hernroth BE, Conden-Hansson A-C, Rehnstam-Holm A-S, Girones R, Allard AK. 2002. Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: the First Scandinavian Report. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:4523–4533.
- Horký P, Slavík O, Douda K. 2018. Altered thermoregulation as a driver of host behaviour in glochidia-parasitised fish. *Journal of Experimental Biology* 222 (jeb.184903) DOI: 10.1242/jeb.184903/259509/Altered-thermoregulation-as-a-driver-of-host.
- Howe K, Kaluna L, Lozano A, Torres Fischer B, Tagami Y, McHugh R, Jarvi S. 2019. Water transmission potential of *Angiostrongylus cantonensis*: Larval viability and effectiveness of rainwater catchment sediment filters. *PLOS ONE* 14 (e0209813) DOI: 10.1371/journal.pone.0209813.
- Hu F, Cai Y, Kong L, Zhou M, Sun D, Guo X, Li W, Mai Y, Wang X. 2024. Effects of polystyrene nanoplastics on the amino acid composition of Asian Clam (*Corbicula fluminea*). *LWT* 198 (e115998) DOI: 10.1016/j.lwt.2024.115998.
- Huyvaert KP, Carlson JS, Bentler KT, Cobble KR, Nolte DL, Franklin AB. 2012. Freshwater Clams As Bioconcentrators of Avian Influenza Virus in Water. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **12**:904–906.
- Ismail NS, Dodd H, Sassoubre LM, Horne AJ, Boehm AB, Luthy RG. 2015. Improvement of Urban Lake Water Quality by Removal of *Escherichia coli* through the Action of the Bivalve *Anodonta californiensis*. *Environmental Science & Technology* **49**:1664–1672.
- Jaume-Ramis S, Martínez-Ortí A, Delgado-Serra S, Bargues MD, Mas-Coma S, Foronda P, Paredes-Esquivel C. 2023. Potential intermediate hosts of *Angiostrongylus cantonensis* in the European Mediterranean region (Mallorca, Spain). *One Health* 17 (e100610) DOI: 10.1016/j.onehlt.2023.100610.
- Jindrák K, Alicata JE. 1968. Comparative pathology in experimental infection of pigs and calves with larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *Journal of Comparative Pathology* **78**:371–382.
- Klocker CA, Strayer DL. 2004. Interactions among an invasive crayfish (*Orconectes rusticus*), a native crayfish (*Orconectes limosus*), and native bivalves (Sphaeriidae and Unionidae). *Northeastern Naturalist* **11**:167–178.
- Komaru A, Kumamoto A, Kato T, Ishibashi R, Obata M, Nemoto T. 2006. A hypothesis of ploidy elevation by formation of a female pronucleus in the androgenetic clam *Corbicula fluminea* in the Tone River Estuary, Japan. *Zoological Science* **23**:529–532.

- Kruskal WH, Wallis WA. 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* **47**:583–621.
- Kuris AM et al. 2008. Ecosystem energetic implications of parasite and free-living biomass in three estuaries. *Nature* **454**:515–518.
- Langdon CJ, Newell RIE. 1990. Utilization of detritus and bacteria as food sources by two bivalve suspension-feeders, the oyster *Crassostrea virginica* and the mussel *Geukensia demissa*. *Marine Ecology Progress Series*, **58**:299–310.
- Lauritsen DD. 1986. Filter-Feeding in *Corbicula fluminea* and Its Effect on Seston Removal. *Journal of the North American Benthological Society* **5**:165–172.
- Lehane C, Davenport J. 2002. Ingestion of mesozooplankton by three species of bivalve; *Mytilus edulis*, *Cerastoderma edule* and *Aequipecten opercularis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **82**:615–619.
- Lehane C, Davenport J. 2006. A 15-month study of zooplankton ingestion by farmed mussels (*Mytilus edulis*) in Bantry Bay, Southwest Ireland. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **67**:645–652.
- Mann HB, Whitney DR. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics* **18**:50–60.
- McAuliffe L et al. 2019. Severe CNS angiostrongyliasis in a young marine: a case report and literature review. *The Lancet Infectious Diseases* **19**:132–142.
- McMahon RF. 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: *r* selection versus resistance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **59**:1235–1244.
- Miller WA, Atwill ER, Gardner IA, Miller MA, Fritz HM, Hedrick RP, Melli AC, Barnes NM, Conrad PA. 2005. Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *International Journal for Parasitology* **35**:673–684.
- Modesto V, Ilarri M, Labecka AM, Ferreira-Rodríguez N, Coughlan NE, Liu X, Sousa R. 2023. What we know and do not know about the invasive Asian clam *Corbicula fluminea*. *Hydrobiologia* 23 (s10750) DOI: 10.1007/s10750-023-05280-w.
- Morgan ER, Modry D, Paredes-Esquivel C, Foronda P, Traversa D. 2021. Angiostrongylosis in Animals and Humans in Europe. *Pathogens* 10 (1236) DOI: 10.3390/pathogens10101236.
- Morton B, Machado FM. 2019. Predatory marine bivalves: A review. Pages 1–98 in *Advances in Marine Biology*. Elsevier.
- Mouritsen K, Jensen K. 1997. Parasite transmission between soft-bottom invertebrates: temperature mediated infection rates and mortality in *Corophium volutator*. *Marine Ecology Progress Series* **151**:123–134.

- Murphy GS, Johnson S. 2013. Clinical aspects of eosinophilic meningitis and meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*, the rat lungworm. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health: A Journal of Asia Pacific Medicine & Public Health* **72**:35–40.
- Nichols SJ, Garling D. 2000. Food-web dynamics and trophic-level interactions in a multispecies community of freshwater unionids. *Canadian Journal of Zoology* **78**:871–882.
- Nichols SJ, Silverman H, Dietz TH, Lynn JW, Garling DL. 2005. Pathways of Food Uptake in Native (Unionidae) and Introduced (Corbiculidae and Dreissenidae) Freshwater Bivalves. *Journal of Great Lakes Research* **31**:87–96.
- Orlofske SA, Jadin RC, Preston DL, Johnson PTJ. 2012. Parasite transmission in complex communities: Predators and alternative hosts alter pathogenic infections in amphibians. *Ecology* **93**:1247–1253.
- Pai TY, Meyer W, Torpy FR, Donahoe SL, Ellis J, Malik R, Lee R. 2022. Host transmission dynamics of first- and third-stage *Angiostrongylus cantonensis* larvae in *Bullastra lessoni*. *Parasitology* **149**:1034–1044.
- Pandian D, Najer T, Modrý D. 2023. An Overview of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae), an Emerging Cause of Human Angiostrongylosis on the Indian Subcontinent. *Pathogens* **12**:851–872.
- Paredes-Esquivel C, Sola J, Delgado-Serra S, Puig Riera M, Negre N, Miranda MÁ, Jurado-Rivera JA. 2019. *Angiostrongylus cantonensis* in North African hedgehogs as vertebrate hosts, Mallorca, Spain, October 2018. *Eurosurveillance* **24** (1900489) DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.33.1900489.
- Pecková R, Foitová O. 2019. Koprologické metody. Masaryková univerzita, Brno. Available from [https://is.muni.cz/el/sci/jaro2019/Bi8761/Koprologicke\\_metody.pdf](https://is.muni.cz/el/sci/jaro2019/Bi8761/Koprologicke_metody.pdf) (accessed March 19, 2024).
- Potasman I, Paz A, Odeh M. 2002. Infectious Outbreaks Associated with Bivalve Shellfish Consumption: A Worldwide Perspective. *Clinical Infectious Diseases* **35**:921–928.
- Provost K, Dancho BA, Ozbay G, Anderson RS, Richards GP, Kingsley DH. 2011. Hemocytes Are Sites of Enteric Virus Persistence within Oysters. *Applied and Environmental Microbiology* **77**:8360–8369.
- Pruzzo C, Gallo G, Canesi L. 2005. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology* **7**:761–772.
- Razafimahefa RM, Ludwig-Begall LF, Thiry E. 2020. Cockles and mussels, alive, alive, oh – The role of bivalve molluscs as transmission vehicles for human norovirus infections. *Transboundary and Emerging Diseases* **67**:9–25.

- Renard E, Bachmann V, Cariou ML, Moreteau JC. 2000. Morphological and molecular differentiation of invasive freshwater species of the genus *Corbicula* (Bivalvia, Corbiculidea) suggest the presence of three taxa in French rivers. *Molecular Ecology* **9**:2009–2016.
- Riisgård H. 2001. On measurement of filtration rate in bivalves—the stony road to reliable data: review and interpretation. *Marine Ecology Progress Series* **211**:275–291.
- Riisgård H. 1998. Filter feeding and plankton dynamics in a Danish fjord: a review of the importance of flow, mixing and density-driven circulation. *Journal of Environmental Management* **53**:195–207.
- Rong Y, Tang Y, Ren L, Taylor WD, Razlutskiy V, Naselli-Flores L, Liu Z, Zhang X. 2021. Effects of the Filter-Feeding Benthic Bivalve *Corbicula fluminea* on Plankton Community and Water Quality in Aquatic Ecosystems: A Mesocosm Study. *Water* **13** (1827) DOI: 10.3390/w13131827.
- Rosa IC, Pereira JL, Costa R, Gonçalves F, Prezant R. 2012. Effects of Upper-Limit Water Temperatures on the Dispersal of the Asian Clam *Corbicula fluminea*. *PLoS ONE* **7** (e46635) DOI: 10.1371/journal.pone.0046635.
- Rosa IC, Costa R, Gonçalves F, Pereira JL. 2014. Bioremediation of Metal-Rich Effluents: Could the Invasive Bivalve *Corbicula fluminea* Work as a Biofilter? *Journal of Environmental Quality* **43**:1536–1545.
- Rosen L, Loison G, Laigret J, Wallace GD. 1967. Studies on eosinophilic meningitis. 3. Epidemiologic and clinical observations on pacific islands and the possible etiologic role of *Angiostrongylus cantonensis*. *American Journal of Epidemiology* **85**:17–44.
- Sabapathy Allen U. 2023. *Corbicula fluminea* (Asian clam). CABI Compendium. Available from <http://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.88200> (accessed March 24, 2024).
- Saraiva S, Van Der Meer J, Kooijman SALM, Sousa T. 2011. Modelling feeding processes in bivalves: A mechanistic approach. *Ecological Modelling* **222**:514–523.
- Sevatdal S, Copley L, Wallace C, Jackson D, Horsberg TE. 2005. Monitoring of the sensitivity of sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) to pyrethroids in Norway, Ireland and Scotland using bioassays and probit modelling. *Aquaculture* **244**:19–27.
- Shapiro SS, Wilk MB. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **52**:591–611.
- Schnyder M, Jefferies R, Schucan A, Morgan ER, Deplazes P. 2015. Comparison of coprological, immunological and molecular methods for the detection of dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* before and after anthelmintic treatment. *Parasitology* **142**:1270–1277.
- Silverman H, Achberger EC, Lynn JW, Dietz TH. 1995. Filtration and Utilization of Laboratory-Cultured Bacteria by *Dreissena polymorpha*, *Corbicula fluminea* and *Carunculina texasensis*. *The Biological Bulletin* **189**:308–319.



- Smolowitz R. 2021. Mollusca: Bivalvia. Pages 163–183 in LaDouceur EEB, editor. *Invertebrate Histology*, 1st edition. Wiley.
- Sousa R, Antunes C, Guilhermino L. 2008. Ecology of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in aquatic ecosystems: an overview. *International Journal of Limnology* **44**:85–94.
- Spratt D. 2005. Neuroangiostrongyliasis: disease in wildlife and humans. *Microbiology Australia* **26**:63–64.
- Stallknecht DE, Shane SM. 1988. Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Veterinary Research Communications* **12**:125–141.
- Steenhard NR, Roepstorff A, Thamsborg SM. 2001. Inactivation of eggs and larvae of the cattle nematodes *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* after passage in pigs. *Veterinary Parasitology* **101**:137–142.
- Strehse JS, Maser E. 2020. Marine bivalves as bioindicators for environmental pollutants with focus on dumped munitions in the sea: A review. *Marine Environmental Research* 158 (105006) DOI: 10.1016/j.marenvres.2020.105006.
- Thieltges DW, Bordalo MD, Caballero Hernández A, Prinz K, Jensen KT. 2008. Ambient fauna impairs parasite transmission in a marine parasite-host system. *Parasitology* **135**:1111–1116.
- Tintori SC, Sloat SA, Rockman MV. 2022. Rapid Isolation of Wild Nematodes by Baermann Funnel. *Journal of Visualized Experiments* 179 (e63287) DOI: 10.3791/63287.
- Turck HC, Fox MT, Cowie RH. 2022. Paratenic hosts of *Angiostrongylus cantonensis* and their relation to human neuroangiostrongyliasis globally. *One Health* **15**:100426. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352771422000581> (accessed February 27, 2024).
- Turck HC, Fox MT, Cowie RH. 2022. Paratenic hosts of *Angiostrongylus cantonensis* and their relation to human neuroangiostrongyliasis globally. *One Health* 15 (100426) DOI: 10.1016/j.onehlt.2022.100426.
- Valladares-Salmeron B, Martín-Alonso A, Valladares-Salmeron M, Martín-Carrillo N, García-Livia K, Valladares B, Foronda P. 2016. Pathogens in domestic cats and dogs in the Canary Islands, Spain. *International Journal of Infectious Diseases* 53 (65) DOI: 10.1016/j.ijid.2016.11.164.
- Vaughn CC, Hoellein TJ. 2018. Bivalve Impacts in Freshwater and Marine Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **49**:183–208.
- Vaughn CC, Nichols SJ, Spooner DE. 2008. Community and foodweb ecology of freshwater mussels. *Journal of the North American Benthological Society* **27**:409–423.
- Vielma S, Lagrue C, Poulin R, Selbach C. 2019. Non-host organisms impact transmission at two different life stages in a marine parasite. *Parasitology Research* **118**:111–117.

- Wang H, Lu L, She D, Wen Z, Mo Z, Li J, Li H. 2018. Eating Centipedes Can Result in *Angiostrongylus cantonensis* Infection: Two Case Reports and Pathogen Investigation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **99**:743–748.
- Wang Q-P, Lai D-H, Zhu X-Q, Chen X-G, Lun Z-R. 2008. Human angiostrongyliasis. *The Lancet Infectious Diseases* **8**:621–630.
- Way CM, Hornbach DJ, Miller-Way CA, Payne BS, Miller AC. 1990. Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). *Canadian Journal of Zoology* **68**:115–120.
- Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Copal Murti K. 1978. Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* **84**:268–278.
- Welsh JE, Hempel A, Markovic M, Van Der Meer J, Thieltges DW. 2019. Consumer and host body size effects on the removal of trematode cercariae by ambient communities. *Parasitology* **146**:342–347.
- Welsh JE, Van Der Meer J, Brussaard CPD, Thieltges DW. 2014. Inventory of organisms interfering with transmission of a marine trematode. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **94**:697–702.
- Willard MD, Roberts RE, Allison N, Grieve RB, Escher K. 1988. Diagnosis of *Aelurostrongylus abstrusus* and *Dirofilaria immitis* infections in cats from a human shelter. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **192**:913–916.
- Xie H, Yuan D, Luo S, Zeng X, Zeng X, He P, Lv Z, Wu Z. 2017. *Angiostrongylus cantonensis*: An optimized cultivation of this parasitic nematode under laboratory conditions. *Parasitology Research* **116**:2231–2237.
- Yahel G, Marie D, Beninger P, Eckstein S, Genin A. 2009. In situ evidence for pre-capture qualitative selection in the tropical bivalve *Lithophaga simplex*. *Aquatic Biology* **6**:235–246.
- Yeo I-K, Johnson RA. 2000. A new family of power transformations to improve normality or symmetry. *Biometrika* **87**:954–959.
- Yousif F, Lämmler G. 1975. The effect of some biological and physical factors on infection of *Biomphalaria glabrata* with *Angiostrongylus cantonensis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **47**:191–201.
- Zhang T et al. 2021. Dissecting the chromosome-level genome of the Asian Clam (*Corbicula fluminea*). *Scientific Reports* 11 (15021) DOI: 10.1038/s41598-021-94545-2.

## 9 Seznam použitých zkratk a symbolů

**CABI** – Centre for Agriculture and Biosciences International

**GBIF** – Global Biodiversity Information Facility

**NOAA** – Národní úřad pro oceán a atmosféru (USA)

**USA** – Spojené státy americké

**FAPPZ** – Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

**ČZU** – Česká zemědělská univerzita v Praze

# 10 Samostatné přílohy

## Příloha I – Výsledková tabulka

Datum experimentu	Testovací nádrž	Objem odebraných kapek (ml)	Počet <i>A. cantonensis</i> v kapkách (ks)	Délka testu (min)	Stojatá (S), Tekoucí(F)	<i>Corbicula fluminea</i>	Objem roztoku (ml)	Počet larev v nádrži (ks/ml)	Počet <i>A. cantonensis</i> v kapkách (ks/ml)	Úbytky <i>A. cantonensis</i> (%)
23.1.2024	5	3	1	60	S	Shell	260	3,939393939	0,3333333333	91,53846154
23.1.2024	10	3	6	60	F	Yes	260	3,939393939	2	49,23076923
23.1.2024	15	3,2	0	60	S	No	260	3,939393939	0	100
23.1.2024	31	3,3	0	60	S	Yes	260	3,939393939	0	100
23.1.2024	52	3	9	60	F	Yes	260	3,939393939	3	23,84615385
23.1.2024	59	3,6	3	60	S	Shell	260	3,939393939	0,8333333333	78,84615385
23.1.2024	66	3	8	60	F	No	260	3,939393939	2,666666667	32,30769231
23.1.2024	79	2,9	1	60	S	Yes	260	3,939393939	0,3448275862	91,24668435
23.1.2024	86	2,9	0	60	F	Shell	260	3,939393939	0	100
23.1.2024	116	2,7	2	60	F	Shell	260	3,939393939	0,7407407407	81,1965812
25.1.2024	18	5,6	1	60	S	No	210	4,831168831	0,1785714286	96,30376344
25.1.2024	22	5,7	31	60	F	Yes	210	4,831168831	5,438596491	-12,57309942
25.1.2024	32	1	0	60	S	Yes	210	4,831168831	0	100
25.1.2024	56	5	34	60	F	Shell	210	4,831168831	6,8	-40,75268817
25.1.2024	60	0,8	0	60	S	Shell	210	4,831168831	0	100
25.1.2024	67	5	45	60	F	No	210	4,831168831	9	-86,29032258
30.1.2024	6	5	48	60	F	No	210	4,95021645	9,6	-93,93091386
30.1.2024	25	5,3	0	60	S	Yes	210	4,95021645	0	100
30.1.2024	58	5	7	60	F	Yes	210	4,95021645	1,4	71,7184084
30.1.2024	74	5	20	60	F	Shell	210	4,95021645	4	19,19545256
30.1.2024	93	5,4	2	60	S	No	210	4,95021645	0,3703703704	92,51809746
30.1.2024	113	5,1	0	60	S	Shell	210	4,95021645	0	100
31.1.2024	8	4,9	30	60	F	Shell	210	7,974025974	6,12244898	23,22010237
31.1.2024	28	5	32	60	F	Yes	210	7,974025974	6,4	19,73941368
31.1.2024	35	5,2	12	60	S	Shell	210	7,974025974	2,307692308	71,05988474
31.1.2024	39	5,3	2	60	S	No	210	7,974025974	0,3773584906	95,26765411
31.1.2024	73	5	0	60	S	Yes	210	7,974025974	0	100
31.1.2024	118	5	59	60	F	No	210	7,974025974	11,8	-47,98045603

Příloha I – Výsledková tabulka

Datum experimentu	Testovací nádrž	Objem odebraných kapek (ml)	Počet <i>A. cantonensis</i> v kapkách (ks)	Délka testu (min)	Stojatá (S), Tekoucí(F)	<i>Corbicula fluminea</i>	Objem roztoku (ml)	Počet larev v nádrži (ks/ml)	Počet <i>A. cantonensis</i> v kapkách (ks/ml)	Úbytky <i>A. cantonensis</i> (%)
14.2.2024	21	5,2	8	60	S	No	210	13,907	1,538461538	88,93750242
14.2.2024	52x	5	18	60	F	Yes	210	13,907	3,6	74,11375566
21.2.2024	61	4,6	7	60	S	Yes	210	15,666	1,52173913	90,28635816
21.2.2024	119	5	15	60	S	Shell	210	13,256	3	77,36873868
21.2.2024	120	5,2	32	60	F	No	210	15,666	6,153846154	60,71845938
21.2.2024	116x	4	8	60	F	Shell	210	13,256	2	84,91249246
23.2.2024	1	5	1	60	S	Yes	270	15,054	0,2	98,67144945
23.2.2024	29	6,3	7	60	S	Shell	270	15,054	1,111111111	92,6191636
23.2.2024	36	5,4	90	60	F	No	270	15,054	16,66666667	-10,71254595
23.2.2024	37	5	7	60	S	Yes	270	15,054	1,4	90,70014614
23.2.2024	40	5	47	60	F	Yes	270	15,054	9,4	37,55812409
23.2.2024	47	5,2	15	60	S	Shell	270	15,054	2,884615385	80,8382132
23.2.2024	80	5,3	47	60	F	Shell	270	15,054	8,867924528	41,09256989
23.2.2024	87	5,2	22	60	S	No	270	15,054	4,230769231	71,89604603