

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv přidaného bakteriálního krmiva na chov sladkovodních mlžů v pulzně průtočném
chovném systému**

Bakalářská práce

Autor práce: Anděla Šimečková

Obor studia: Zootecnika - Speciální chovy (ABPS)

Vedoucí práce: Ing. Karel Douša, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv přidaného bakteriálního krmiva na chov sladkovodních mlžů v pulzně průtočném chovném systému" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22. 4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu bakalářské práce Ing. Karlu Doudovi Ph.D. za příležitost účasti se experimentu a za pomoc při zpracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Lauře Alejandře Lamilla Tamayo za cenné rady při psaní práce a hlavně velkou ochotu a trpělivost. Také bych ráda poděkovala Ing. Juanu Felipemu Escobaru Calderonovi za pomoc při zpracování statistických údajů. Mé poděkování patří také Ing. Tereze Kodešové z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky za mikrobiální analýzy během experimentu.

Vliv přidaného bakteriálního krmiva na chov sladkovodních mlžů v pulzně průtočném chovném systému

Souhrn

Tato práce byla zpracována formou literární rešerše a od ní se odvíjejícího experimentu. Nejprve zde byly shrnuty poznatky o výživě a chovu zejména sladkovodních mlžů. V druhé části byl popsán experiment zkoumající vliv přidaného bakteriálního krmiva na chov sladkovodních mlžů.

Na začátku literární rešerše byly stručně popsány klíčové informace o sladkovodních mlžích. Bylo zde uvedeno pár základních informací o taxonomii a výskytu, dále byla stručně popsána anatomie sladkovodních mlžů se zaměřením na trávicí soustavu. Byl zde vysvětlen princip příjmu potravy těchto živočichů. Pro upřesnění souvislostí bylo uvedeno několik informací o ekologii a využití mlžů. Také byla věnována pozornost úbytku a kritickému ohrožení sladkovodních mlžů. Byly zde uvedeny hlavní informace o modelovém druhu sladkovodního mlže *Sinanodonta woodiana*, který byl následně použit v experimentální části. Rešerše byla zaměřena na shrnutí poznatků o chovu sladkovodních mlžů a na vysvětlení důležitosti bakterií v jejich potravě. Také zde bylo uvedeno několik informací o využití probiotik v akvakultuře.

V experimentální části práce byly testovány účinky přidání doplňkových probiotických bakterií *Lactobacillus plantarum* společně se suspenzí zelených jednobuněčných řas *Ettlia oleoabundans*. Mlžům byly podávány tři typy výživy – řasy s bakteriemi, pouze řasy nebo pouze voda. Celkem 36 pokusných jedinců bylo rozděleno do dvou velikostních kategorií – juvenilní jedinci a dospělci. Tedy 6 pokusných jedinců z každé kategorie na typ výživy. Byl zkoumán vliv na růst, změnu hmotnosti a chování (zahrabávání). Pokus byl realizován v pulzně průtočném systému, který průběžně automaticky dodává vodu s potravou chovaným jedincům. Experiment trval celkem 5 týdnů a každý týden byli mlži váženi a měřeni. Výsledek byl stanoven pomocí statistických analýz ANOVA, Shapirův test, Bartlettův test a t-test.

V realizovaném experimentu byl pozorován růst a příbytek hmotnosti pouze u juvenilních jedinců kmených řasami a řasami s bakteriemi. Dospělí jedinci naopak na hmotnosti ztratili při všech typech výživy. Průměrné procento zahrabání juvenilních jedinců bylo vyšší než u dospělých, což bylo předpokládáno. Ztráta hmotnosti dospělců mohla být způsobena větší stresovou reakcí na nepřírozené prostředí. Kvůli stresu se k nim například mohlo dostávat méně kyslíku, což by mohlo zapříčinit úbytek hmotnosti.

Budoucí výzkumy by mohly testovat jiné kombinace a koncentrace probiotických bakterií i jednobuněčných řas.

Klíčová slova: mlži, chov, akvakultura, sladkovodní, bakterie, probiotikum

Effect of added bacterial feed on freshwater bivalve culture in a pulse-flow culture system

Summary

This bachelor thesis was written as a literature review followed by an experiment. First of all the information about nutrition and rearing freshwater mussels was summarized. In the second part, there was an experiment about the effect of added bacterial feed on freshwater bivalves.

At the beginning of the literature review, the key information about freshwater bivalves was briefly described. There was described some basic information about taxonomy and occurrence, followed by a brief description of the anatomy of freshwater bivalves focused on the digestive system. The feeding mechanism of these animals was explained. To provide context there was given some information about ecology and utilization of these animals. There was given attention to the decline and critical threats to freshwater bivalves as well. The thesis also contains main information about model species of freshwater bivalve *Sinanodonta woodiana*, which was subsequently used in the experimental section. The review was aimed at summarizing the knowledge about freshwater bivalve rearing and explaining the importance of bacteria in their diet. Some information about using probiotics in aquaculture was also described.

The effects of adding supplementary probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* together with a suspension of the green unicellular algae *Ettlia oleoabundans* were tested in the experimental part of the thesis. The mussels were given 3 types of treatment – algae with bacteria, only algae or only water. That means 6 experimental animals per treatment. We tested the effect on growth, weight change and behaviour (burrowing). The experiment was performed in a pulse-flow culture system that continuously and automatically supplied water with food to the mussels. The experiment took 5 weeks in total and the bivalves were weighted and measured every week. The results were calculated by statistical analyses ANOVA, Shapiro's test, Bartlett's test and t-test.

During the experiment, growth and weight gain was observed only on juveniles fed by algae and algae with bacteria. On the other hand, adults lost weight on all types of treatment. The average percentage of burrowing behaviour of juveniles was higher than that of adults, which was expected. The weight loss of adults may have been caused by a higher stress response to the non-natural environment. There could be some connection between stress, impaired absorbability of oxygen and subsequently weight loss.

Future research could test other combinations and concentrations of probiotic bacteria and microalgae.

Keywords: bivalves, rearing, aquaculture, freshwater, bacteria, probiotics

Obsah

Úvod	8
Cíl práce.....	9
Literární rešerše	10
1.1 <i>Sladkovodní mlži</i>	10
1.1.1 Taxonomie.....	10
1.1.2 Výskyt	10
1.1.3 Anatomie	10
1.1.4 Příjem potravy.....	11
1.1.5 Ekologie	11
1.1.6 Ohrožení.....	12
1.2 <i>Škeblice asijská (Sinanodonta woodiana Lea, 1834)</i>	13
1.2.1 Popis.....	13
1.2.2 Rozšíření.....	13
1.3 <i>Bakterie v potravě mlžů</i>	13
1.4 <i>Chov mlžů</i>	14
Metodika.....	16
1.5 <i>Materiál a metody</i>	16
1.5.1 Pokusní živočichové.....	16
1.5.2 Příprava řas.....	17
1.5.3 Příprava bakterií	17
1.5.4 Pulzně průtočný systém (PFT) - nastavení, provoz, režim krmení.....	18
1.5.5 Měření velikosti a hmotnosti	19
1.5.6 Kontrola kvality vody.....	19
1.5.7 Sběr mikrobiálních vzorků	19
1.5.8 Mikrobiální analýzy	20
1.5.9 Metody statistické analýzy.....	21
1.6 <i>Výsledky</i>	21
1.6.1 Chování - popisná statistika a grafy	21
Statistická inference – test normality a homogenity	23
ANOVA	23
1.6.2 Velikost - popisná statistika a grafy.....	24
Statistická inference - test normality a homogenity	27
ANOVA	27
1.6.3 Hmotnost – popisná statistika a grafy	28
Statistická inference – test normality a homogenity	31
Diskuse.....	33
Závěr	35
Literatura.....	36

Úvod

Sladkovodní mlži patří mezi bezobratlé vodní živočichy. Živí se jednobuněčnými řasami a bakteriemi, které získávají pomocí filtrace vody. Škeblice asijská - *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) je invazní druh sladkovodního mlže z čeledi Unionidae. Obývá nížinné toky řek, slepá ramena, ale i rybníky, tůň a vodní kanály s bahnitým dnem. Larvy mlžů (glochidia) parazitují na rybách. Původní areál rozšíření škeblice je v Asii, dostala se pravděpodobně prostřednictvím ryb do Evropy, kde se současně šíří (Beran 2008).

Sladkovodní mlži jsou v Evropě nejčastěji chováni za účelem výzkumu invazních druhů a ochrany druhů původních. V Asii jsou chováni především kvůli produkci perel a v jižní Indii jsou chováni pro lidskou spotřebu. V USA a Evropě jsou chovy zaměřeny na ochranu ubývajících ohrožených druhů (Hyvärinen 2021). Evropské sladkovodní mlže ohrožuje přítomnost nepůvodních invazních druhů, především škeblice asijské a v USA také slávičky mnohotvárné (*Dreissena polymorpha* Pallas, 1771) (Cappelletti et al. 2009). Hrozbu pro mlže představují antropogenní zásahy do životního prostředí jako je například znečištění, sedimentace, eutrofizace a přehrazování vodních toků (Hyvärinen 2021). V Evropě se výzkum ochrany sladkovodních mlžů zaměřuje na obnovu původní perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera* Linné, 1758), která je v Evropě podle červeného seznamu IUCN kriticky ohrožená (Reiss 2003; IUCN 2021).

Hlavním úskalím chovu mlžů je vysoká mortalita juvenilních jedinců, kteří jsou velmi citliví na kvalitu potravy a vody. Ke splnění jejich nároků byl v nedávné době vyvinut systém pulzního průtoku s automatickým krmením (PFT), který se zdá být vhodným k odchovu juvenilních jedinců. Hlavní výhodou tohoto systému je, že jedinci jsou rozděleni do samostatných jednotek které zabraňují vniku potenciálních patogenů a predátorů a také je zajištěn neustálý přísun čerstvé vody a potravy (Kunz et al. 2020). Odchov lze také provádět v uzavřených Hruškových boxech (Hruška 1992). Existuje i polopřirozená metoda chovu s průběžným průtokem přirozené říční nebo jezerní vody (Hastie & Young 2003; Lavictoire et al. 2016).

Umělá výživa chovaných mlžů se skládá především z kultivovaných mikrořas nebo jsou také k dispozici komerční řasové koncentráty určené k výživě mlžů (Sicuro 2015). V přirozeném prostředí se mlži živí filtrováním fytoplanktonu, zooplanktonu, bakterií a jemného organického detritu z vody (Haag 2012). Bakterie v potravě mlžů mají především nutriční funkci, ale také zůstávají v žaludku a střevu, kde tvoří mikrobiom. Anaerobní bakterie v žaludku mohou podporovat trávení a vstřebávání potravy, zlepšovat gastrointestinální funkce a podporovat zdraví jedince (Li et al. 2012).

Za cílem zlepšení úspěšnosti a výkonnosti chovů bylo v nedávné době provedeno několik studií o použití probiotik v akvakultuře. Zaměřují se hlavně na výzkum účinnosti probiotik u mořských mlžů a jiných bezobratlých. Účinky probiotik na chov sladkovodních mlžů zatím nejsou zcela ověřeny, ale předpokládá se, že budou obdobné jako u mlžů mořských (Sicuro 2015).

V druhé části práce je popsán experiment zkoumající vliv přidaného bakteriálního krmiva na růst, mortalitu a chování mlžů. Jako přidané krmivo byl zvolen *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen, 1919), u kterého jsou známy jeho probiotické účinky (Kongnum & Hongpattarakere 2012).

Cíl práce

Cílem literární rešerše bakalářské práce je shrnout poznatky o chovu a výživě sladkovodních mlžů. Zaměřuje se na využití bakterií a probiotik v chovech vodních organismů. V chovech sladkovodních mlžů není zatím zcela ověřen přesný účinek probiotik, ale předpokládá se, že bude mít pozitivní účinky na růst a vitalitu jedinců. Cílem experimentální části je vyhodnotit vliv přidaných krmných bakterií *Lactobacillus plantarum* na růst, změnu hmotnosti a chování sladkovodních mlžů (*Sinanodonta woodiana*) v průtočném kultivačním systému (PFT).

Literární rešerše

1.1 Sladkovodní mlži

1.1.1 Taxonomie

Mlži patří do kmene měkkýšů. Sladkovodní mlži nejsou monofyletickou skupinou a představují 19 čeledí ve třech podtřídách. Většina čeledí je zastoupena pouze několika rody nebo druhy. Taxony s velkým zastoupením ve sladkých vodách zahrnují řády Sphaeriidae, Corbiculidae a nejpočetnější Unioniformes se 6 čeleděmi, asi 180 rody a zhruba 800 druhy (Bogan 2007). Naši zástupci velkých mlžů, patří do nadřádu Palaeoheterdonta řádu Unionida. Jsou rozděleni do dvou čeledí perlorodkovití (Margaritiferidae) a velevrubovití (Unionidae) (Beran 1997).

1.1.2 Výskyt

Mlži z řádu Unionida se nacházejí na všech kontinentech kromě Antarktidy se dvěma hlavními ohnisky výskytu v Severní Americe a Jihovýchodní Asii (Bogan 2008).

Sladkovodní mlži jsou rozšířeni v rybnících, jezerech a vodních tocích po celém světě, nejen na kontinentech, ale i na většině ostrovů. (Charles T. Simpson 1896).

1.1.3 Anatomie

Mlži mají redukovanou hlavu, mají jednu svalnatou nohu obepínající viscerální hmotu a dva páry žaber. Každý jedinec má dvě lastury obklopující tělo. Schránky jsou složeny z uhličitanu vápenatého, jako krystalická struktura kalcitu nebo aragonitu. Lastury mlžů řádu Unioniformes mají aragonitovou krystalickou strukturu (Bogan 2007).

Žaludek mlžů je propojen se střevem a je důležitým orgánem pro trávení potravy. Jeho trávicí funkce zahrnuje: rozmělnování potravy žaludeční stěnou a svalovou vrstvou, změkčování a trávení potravy žaludeční kyselinou a trávicími enzymy (Li 2010).

Mlži mají dva páry žaber, které filtrují vodu. Jejich vnější pár slouží jako místo pro vývoj larev. Chodidlo mezi žábry je největší částí měkkého těla. Noha v závislosti na pohlaví obsahuje vaječníky a vajíčka nebo spermie. Trávicí kanálek prochází také přes nohu. Svalová část nohy v sobě může hromadit vodu a je to jediná část, která může napomáhat pohybu zvířete (Kiss, 1995).

Druhy z čeledí převážně mořských mlžů mají volně plující larvu veliger (McMahon & Bogan 2001). Sladkovodní mlži čeledi Unioniforme jsou mezi mlži jedineční, protože mají obligátní parazitické larvální stadium – glochidie, které parazitují na žábách, ploutvích nebo bocích hostitelské ryby (Wächtler et al. 2001).

Pohlaví jsou u většiny druhů čeledi Unionoida oddělená, ačkoli několik druhů je běžně hermafroditních. Hermafroditismus se příležitostně vyskytuje u mnoha druhů a bylo zjištěno, že může být vyvolán nízkou hustotou populace (Breton et al. 2018).

1.1.4 Příjem potravy

Mlži jsou všežravci a živí se částicemi obvykle o velikosti menší než 20 μm , mezi něž patří fytoplankton, bakterie, spory hub, prvoci, zooplankton a detrit (Strayer 2008). Živí se suspendovanými částicemi (filtrací), sedimentem (vířením usazenin) nebo kombinovaně.

K příjmu potravy dochází přes otvor, sifon nebo proboscidy. Řasinky a hlen pak pohybují částice směrem k labiálním palpům a žaludku (Evan Ward & Shumway 2004). Synchronní pohyb řasinek vytváří vodní proudy uvnitř a vně lastury. Proudů umožňují nepřetržitý přísun čerstvé vody s O_2 a potravou. Zároveň odstraňují odpadní produkty, když voda lasturu opouští. Cirri (srostlé řasinky) nasměrují potenciální potravu z vody směrem k ústům (McIvor 2004).

Jedinec dokáže přečerpávat značné množství vody za 24 hodin. Množství vody, které může jedinec přefiltrovat, se liší podle mnoha abiotických a biotických faktorů, jako je teplota vody, druh, velikost zvířete a hustota populace. Odhady filtrovaného objemu se také liší mezi testovacími postupy. Maximální filtrace byla odhadnuta na 0,5 až 1 l/h pro 61 mm dlouhou škebli (Vaughn et al. 2008). Dříve se předpokládalo, že vstup a výstup vody z pláště probíhá pouze přes sifony. Výzkumy však naznačují, že voda může dovnitř vstoupit také zepředu, kdykoli je lastura otevřená (Nichols et al. 2005).

Mlži mění rychlost filtrace a dokážou třídít potravu před požitím na základě faktorů, jako je velikost částic, tvar, povrchové složení částic a složení filtrátu. Tyto senzorické procesy však zatím nejsou zcela pochopeny. Odmítnuté částice zapouzdřené v hlenu jsou před požitím vypuzeny jako pseudofekálie. Dochází také k třídění potravy po požití. Méně výživné položky jsou přesunuty do střeva k vyloučení jako výkaly a materiál vyšší kvality směřuje do divertiklů k úplnému trávení (Evan Ward & Shumway 2004).

V malých tocích a jezerech mají mlži tendenci se živit převážně bakteriemi a detritem spíše než fytoplanktonem. Fytoplankton může být důležitým zdrojem potravy v lentických biotopech a velkých řekách, stejně jako další suspendovaný materiál (Griffiths & Cyr 2006). Mlži spojují bentické a pelagické systémy filtrováním částic, vylučováním a ukládáním živin. (Cranford et al. 2011).

Střeva mlžů obsahují směs fytoplanktonu, zooplanktonu, vířníků a detritu. Velká část tohoto materiálu přežije průchod střevem živá a nepoškozená. Studie potravy založené pouze na analýzách obsahu střeva nejsou zcela schopny rozlišit mezi náhodným úlovkem a materiálem záměrně zachyceným (Vander Zandenand & Rasmussen 1999).

1.1.5 Ekologie

Sladkovodní mlži působí jako ekosystémoví inženýři a hrají důležitou roli při zpracování částic, uvolňování živin a míchání sedimentů. Zavrtáním do říčního substrátu zvyšují pronikání vody a kyslíku sedimentem, uvolňují živiny ze sedimentů a stabilizují říční substráty (Allen & Vaughn 2009). Filtrací fytoplanktonu a suspendovaných jemných materiálů dopravují živiny z vody na dno řeky (Howard & Cuffey 2006), čímž snižují obsah chlorofylu-a a čistí vodu (Welker & Walz 1998).

Mlži ovlivňují koloběh živin, vytvářejí a upravují stanoviště a ovlivňují potravní sítě přímo (tj. kořist) i nepřímo (tj. pohyb živin a energie). Materiály nahromaděné v tkáních

a lasturách se používají jako biomonitory prostředí. Ve sladkých vodách tvoří mlži řádu Unionida hustá sdružení, často sestávající z mnoha různých druhů, které jsou zásadní pro sekundární produkci a koloběh prvků ve sladkovodních ekosystémech (Strayer 2008).

Schránky mlžů nabízejí přichycovací povrchy pro mechorosty, které zase slouží jako stanoviště pro různá společenstva bezobratlých. Sladkovodní mlži tedy poskytují důležité ekologické služby a spojují více trofických úrovní v říčních ekosystémech (Vaughn 2018).

Mlži patří mezi hospodářsky velmi významné akvakulturní druhy, přičemž světová akvakulturní produkce měkkýšů pro lidskou spotřebu dosáhla v roce 2018 17,5 milionu tun (FAO 2018). Dalším využitím mlžů je produkce moučky, která by mohla být alternativní krmnou složkou ve výživě ryb, korýšů a dalších komerčně chovaných vodních organismů. Rybí moučka, která se používá pro výživu těchto organismů se v budoucnu zdá být limitujícím faktorem při jejich produkci (Sicuro 2010).

1.1.6 Ohrožení

Sladkovodní mlži jsou vysoce ohroženi lidskou činností a jejich celosvětový úbytek v poslední době vyvolává obavy z hlediska ochrany přírody a ekosystémů (Lopes-Lima 2018). Navzdory rozmanitosti ekosystémů jsou sladkovodní mlži jedny z nejohroženějších druhů na planetě (Vaughn 2018). Zhruba 40 % druhů sladkovodních mlžů je ohrožených, kriticky ohrožených nebo vyhynulých, přičemž do nejohroženějších patří i řád Unionida (Lopes-Lima 2018).

Příčinou poklesu populací mlžů byl v minulosti sběr perel. V poslední době je příčinou ztráta biotopů, špatná kvalita vody v důsledku kyselých dešťů nebo eutrofizace a úbytek hostitelských druhů (Schartum et al. 2017). Hrozby pro mlže mohou představovat také sucha, kácení lesů, zemědělství, některé případy využití přehrad pro hospodaření s vodou a s tím spojené změny teploty vody. Ochrana se zaměřuje na obnovu ztracených populací mlžů ve volné přírodě. Také existují snahy o využití těchto organismů ke zlepšení kvality vody a obnovy ekosystémů (Vaughn 2018).

V Evropě se ochrana soustředí na obnovu původního druhu škeble říční *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758) (Hyvärinen 2021). V současné době je perlorodka říční na základě legislativy Evropské unie označena za kriticky ohrožený druh a je chráněna v rámci programu Natura 2000. I přes ochranu trvající již desítky let, je perlorodka stále na ústupu ze svého přirozeného areálu v celé Evropě. Historický rozsah výskytu perlorodky sahá až do povodí Severního moře, nejpočetnější populace se vyskytovaly v povodí Vltavy, v jižních Čechách a především ve velkých řekách, jako je Otava, Blanice a Malše. Velikost současné populace perlorodky říční v České republice byla odhadnuta na 16 000. Perlorodka vymizela ze všech lokalit v nadmořských výškách pod 500 m n. m. a z velkých řek a potoků (Simon et al. 2015). Životní cyklus *M. margaritifera* obsahuje kritické fáze, které komplikují její umělý odchov. Hlavním úskalím je vysoká mortalita juvenilních jedinců a také specializace larev na lososa obecného a pstruha potočního (Hyvärinen 2021).

1.2 Škeblice asijská (*Sinanodonta woodiana* Lea, 1834)

1.2.1 Popis

Škeblice asijská je velkým mlžem, který se vzhledově může podobat našim původním druhům škeblí. Lastury jsou často z vnitřní strany narůžovělé a vrcholy jsou výrazně vystouplé s hrubými valy (Beran 1997). Ve zbarvení jde o poměrně variabilní druh (Kraszewski & Zdanowski 2007). V našich podmínkách je škeblice asijská velikostně srovnatelná jen se škeblí rybničnou (*Anodonta cygnea* Linnaeus, 1758), od které se odlišuje celkovou oblostí lastury. Maximální teoretický věk pro škebli asijskou z Koninských jezer byl stanoven na deset let

a délka lastury na 23 cm s odpovídající hmotností 850 g (Afanasjev & Kraszewski 2001).

Škeblice je považována za nebezpečný invazní druh, který může mít negativní dopad na zachování některých našich vzácnějších druhů velkých mlžů. Škeblice asijská může domácím druhům konkurovat zejména v potravě, což je považováno za jeden z nejvíce ohrožujících faktorů (Beran 2013). Rovněž dochází ke konkurenci ve využívání hostitelských druhů ryb. To lze očekávat zejména u velevrubů (rod *Unio*). Infekce glochidii může dále spustit imunitní reakci napadených druhů ryb a omezit tak dostupnost hostitelů pro domácí druhy velkých mlžů (Donrovich et al. 2017). Mezi faktory přispívající k invazi patří široká tolerance na stanoviště, potravu a znečištění (Bielen et al. 2016).

1.2.2 Rozšíření

Škeblice asijská je teplomilným druhem obývajícím jemné sedimenty stojatých a pomaleji tekoucích vod (Kraszewski & Zdanowski 2001). Tento druh původně pochází z řek jihovýchodní Asie. Do Evropy se zřejmě dostal v larválním stadiu na zábrách asijských amurů bílých - *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844) či tolstolobiků bílých - *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844) dovážených do ČR již od roku 1964. V Evropě byl tento nepůvodní druh nalezen poprvé v Rumunsku v roce 1979, zatímco v České republice až v roce 1996 na jižní Moravě (Beran 2013).

1.3 Bakterie v potravě mlžů

V říčních stanovištích mohou být bakterie důležitější než řasy v potravě mlžů. Mlži mají trávicí enzymy nezbytné pro využití detritu jako nutričního zdroje. Studie mastných kyselin totiž ukázaly, že detrit může v určitých lokalitách tvořit významnou složku potravy mlžů. Alochtonní části břehového detritu na podzim v mírném podnebném pásu poskytují organické zdroje potravy prostřednictvím opadu listů a následnou mikrobiální kolonizaci. Tato mikrobiální hojnost se zvyšuje s teplotou, což poskytuje další zdroje potravy pro Unionidy v jarních a letních měsících (Newton et al. 2013).

Kai Tan, Can Xu a Chegxing Long v roce 2020 vytvořili studii mikrobiální charakteristiky žaludku *Sinanodonta woodiana* a substrátu, na němž byla kultivována. Výsledky ukázaly, že rozmanitost bakterií v *S. woodiana* byly významně vyšší než v kultivační půdě. Na úrovni kmene bylo dominantní složení bakteriální komunity ve dvou skupinách podobné a zahrnovaly Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Fusobacteria

a Acidobacteria. Početnost těchto kmenů se však mezi těmito dvěma skupinami významně lišila a Proteobakterie byly nejhojnějším kmenem. Na úrovni rodu bylo v obou skupinách identifikováno celkem 1001 rodů, z toho 890 rodů v kultivované půdě a 549 v žaludku *S. woodiana*. 452 bylo jedinečných pro kultivovanou půdu a 111 bylo jedinečných pro žaludek *S. woodiana*. Mikroorganismy v žaludku *S. woodiana* vytvořily určitý vlastní bakteriální systém a byly ovlivněny prostředím, které je příznivé pro výživu a zdraví. Bakteriální složení bylo většinou stejné mezi žaludkem *S. woodiana* a substrátem, ale relativní abundance bakteriálních společenstev byly různé (Tan et al. 2020).

Střevní mikrobiom je virtuální endokrinní orgán, bariéra proti invazi patogenů a metabolická cesta k získávání živin (Clarke et al. 2014). Žaludek je propojen se střevem a je důležitým orgánem pro trávení potravy. Jeho trávicí funkce zahrnuje především rozměňování potravy žaludeční stěnou a svalovou vrstvou, změkčování a trávení potravy žaludeční kyselinou a trávicími enzymy (Li 2010). Anaerobní bakterie v žaludku, včetně *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, mohou podporovat trávení a vstřebávání potravy, zlepšovat gastrointestinální funkce a podporovat zdravotní stav mlžů (Li et al. 2012). V přirozeném prostředí se v kultivované půdě ukládá velké množství materiálu, čímž se kultivovaný substrát stává nosičem mnoha mikrobiálních druhů a místem časté výměny materiálu (Zhu et al. 2018). Hlavními faktory ovlivňujícími strukturu a množství střevní mikroflóry mlžů jsou složení potravy a vlivy vnějšího prostředí (Meng et al. 2019).

1.4 Chov mlžů

V Asii jsou sladkovodní mlži chováni za účelem produkce perel. Nejvíce chovaným druhem je zde velevrub goliáš (*Hyriopsis cumingii* Lea, 1852) (Xu et al. 2011). Sladkovodní mlži jsou chováni i jako zdroj obživy. Například v Indii a Bangladéši jsou tyto živočichové tradiční potravinou. V USA je chov sladkovodních mlžů zaměřen na ochranu ohrožených druhů. V Evropě se chov sladkovodních mlžů zaměřuje na výzkum nepůvodních druhů (škebllice asijská) a ochranu druhů ohrožených, zejména perlorodky říční (Sicuro 2015).

Původní způsob, kterým lze sladkovodní mlže chovat, je v takzvaných Hruškových boxech (Hruška, 1992), v nichž se musí pravidelně obnovovat část vody společně s potravou. Tento typ chovu je zcela uzavřený a jako zdroj vody slouží řeky nebo potoky. Dalším způsobem kultivace mlžů je chov v Buddensiekových klecích (Buddensiek 1995), které jsou umístěny v řekách, kde se jedinci živí přirozenou potravou, jako je fytoplankton, zooplankton a detrit. Jako alternativa k uzavřeným nebo polopřirodním chovným systémům byly vyvinuty průtočné systémy, které umožňují automatický průtok vody a jsou úspěšnější při odchovu juvenilních jedinců (Patterson et al. 2018, Kunz et al. 2020).

Metoda pulzního průtoku (Obrázek 1), umožňuje průběžnou obnovu vody a potravy v kultivačních nádobách (Hyvärinen et al. 2021). Průtoková metoda byla poprvé použita v ekotoxikologickém výzkumu k vystavení nedospělých mlžů známým koncentracím kontaminantů (Ingersoll et al. 2007), ale dále byla přijata pro chov mlžů v zajetí (Kunz et al. 2020). V tomto systému (PFT) je každých 60–90 minut automaticky uskutečněn pulzní „průtok“ do kádinek, kde se nachází nedospělí mlži (Obrázek 2). Při průtoku se vymění voda,

odstraní odpad a dodává potrava (Patterson et al. 2018). Tento systém se ukázal jako vhodný pro kultivaci čerstvě oddělených mláďat mlžů čeledi Unionidae (Kunz et al. 2020).

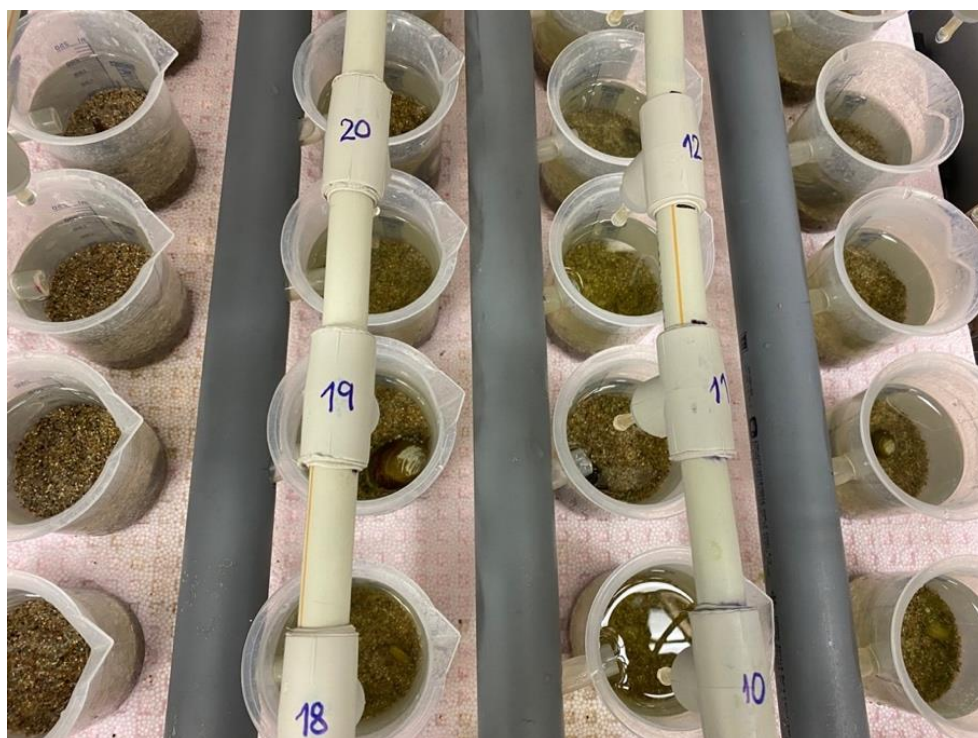
Potrava mlžů chovaných v zajetí je složena z jednobuněčných řas, které jim jsou uměle přidávány do vody. Řasy mají velký obsah nenasycených mastných kyselin a vhodný poměr živin pro výživu mlžů. Jejich nutriční hodnota se však může v závislosti na druhu lišit, proto je pro větší rovnováhu živin vhodné krmivo nakombinovat z více druhů řas. Vhodná kombinace řas může zajistit větší růst a přežití chovaných jedinců. Nejčastěji používané rody mikrořas ve výživě mlžů jsou *Isochrysis*, *Pavlova*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Tetraselmis*, *Nannochloropsis gaditana*, *Neochloris* a *Chlorella sp.* Kombinace mikrořas s doplňkovými živinami může být pro růst mlžů příznivější. (Cheng et al. 2020).

Používání probiotik v akvakultuře nejen zlepšuje imunitu a zdraví hostitele, ale má také příznivý vliv na trávicí procesy vodních živočichů (Balcázar et al. 2006). Prospěšné bakterie mohou sloužit i jako zdroj esenciálních aminokyselin, mastných kyselin a vitaminů (Sakata 1990). Probiotika nastolují mikrobiální rovnováhu v okolním prostředí hostitele a zlepšují odolnost vůči nemocem (Ponnachan 2021).

Rychlý nárůst akvakultury přinesl různá infekční onemocnění chovaných vodních druhů způsobená různými mikroorganismy, jako jsou bakterie, viry, prvoci, houby a paraziti. Tyto patogeny mohou vést ke zvýšení mortality jedinců v chovech (Carrias 2012). Se zvyšujícím se počtem chovaných živočichů se zvyšuje pravděpodobnost onemocnění a následného úhynu. Je nutné zajistit prostředí, které pomáhá předcházet nemocem a také podporuje imunitní reakci na možné patogeny. Probiotikum po dosažení střeva bojuje s patogenem o výživu a kyslík a nakonec přilne k epitelialním buňkám. Při konkurenční boji s patogeny produkují probiotika bakteriální inhibitory a umožňují zvířatům být odolnější vůči plísním, virům a dalším patogenům (Ponnachan 2021).



Obrázek 1 ukazuje pulzně průtočný systém (PFT) v malakologické laboratoři na Katedře zoologie a rybářství České zemědělské univerzity v Praze.



Obrázek 2 ukazuje kádinky s pokusnými mlži *Sinanodonta woodiana* v malakologické laboratoři na Katedře zoologie a rybářství České zemědělské univerzity v Praze.

Metodika

1.5 Materiál a metody

V tomto experimentu byly testovány účinky přidání doplňkové krmné suspenze bakterií *Lactobacillus plantarum* společně se suspenzí jednobuněčných zelených řas *Ettlia oleoabundans*, (S. Chantanachat & Bold; J. Komárek, 1989). Bakterie byly přidány do potravy modelového druhu sladkovodního mlže - *Sinanodonta woodiana*. Pozorován byl jejich vliv na růst, změnu hmotnosti a chování.

1.5.1 Pokusní živočichové

Jedinci *Sinanodonta woodiana* byli ručně odebráni z experimentálního chovu KZR ČZU v povodí řeky Lužice (Douda et al. 2021). 36 mlžů bylo rozděleno do dvou velikostních kategorií – juvenilové a dospělci. Průměrné míry juvenilních jedinců byly - výška = $11,424 \pm 1,21$ mm; délka = $17,60 \pm 2,20$ mm; hmotnost = $0,25 \pm 0,11$ g. Průměrné míry dospělých jedinců byly – výška = $22,93 \pm 4,83$ mm; délka = $32,45 \pm 6,42$ mm; hmotnost = $4,26 \pm 3,21$ g.

Mlži byli do laboratoře přeneseni ve vodě z lokality, ze které byli odebráni. Po příjezdu byl každý jedinec umístěn do polypropylenové kádinky naplněné ~2 cm vrstvou písku (velikost zrn 1-3 mm) a 250 ml odstáté vody z vodovodu.

Následovalo aklimatizačního období, které trvalo 8 dní. Teplota vody se pomalu zvyšovala, aby dosáhla 18 °C. Po dobu prvních čtyř dnů aklimatizace byli mlži krmeni pouze jednobuněčnými řasami, které se denně připravovaly a byly kultivovány v in-situ. Potřebný bioobjem řas byl 7,5 nl.ml⁻¹. Řasy byly míchány s chloridem sodným, aby se dosáhlo vodivosti 2,74 ± 0,44 mS cm⁻¹, což pomáhalo omezit mykotické infekce na lasturách mlžů. Pátý den byl cílový objem řas zdvojnásoben na 15 nl.ml⁻¹. Po celou dobu pokusu byly mlži vystaveni režimu světlo/tma (12 h/12 h). Celkově trval experiment 5 týdnů, včetně aklimatizačního týdne.

1.5.2 Příprava řas

Zelená řasa *Ettlia oleoabundans* (UTEX 1185), byla kultivována v bublinkovém sloupcovém fotobioreaktoru o objemu 100 l (Industrial Plankton, Victoria BC, Kanada) za kontrolované teploty (25,0 °C ± 0,21), na tekutém médiu s Guillardovým složením. Automatické přidávání oxidu uhličitého se uskutečňovalo pomocí provzdušňovacího filtru, aby se udržovalo pH 8,33 ± 0,20. Kultura byla udržována ve fotoperiodě 24:0 světlo:tma (480 W LED světla se spektrem řas). Kultura jednobuněčných řas nebyla axenická, nicméně médium bylo před přidáním do kultury sterilováno při 121 °C > 15 psi, 20 minut. Následně bylo přefiltrováno přes filtr o velikosti pórů 0,1 µm. Přidávání vody bylo také prováděno přes sterilní filtrační systém (velikost pórů 0,1 µm), aby se zabránilo kontaminaci.

Kultura řas byla sklízena každý den a odebraný objem byl podroben odstředivé filtraci pomocí 60 W odstředivky na mléko. Z odstředivky byl získán řasový koncentrát, který byl následně použit k přípravě výživy.

1.5.3 Příprava bakterií

Jako krmivo byla předem vybrána bakterie *Lactobacillus plantarum* ATCC, u které se u sladkovodních mlžů předpokládají probiotické účinky (Kongnum & Hongpattarakere 2012).

Příprava bakterií probíhala ve spolupráci s Katedrou mikrobiologie na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze, proto je v této kapitole uveden její stručný popis.

Bakterie byly kultivovány ve sterilních nádobách o objemu 1 l s neselektivním médiem Tryptone soya Broth (Oxoid). *L. plantarum* byla kultivována při 37 °C v anaerobních podmínkách po dobu 48 hodin. Po kultivaci byla čistota bakterií kontrolována pod mikroskopem. Zkontrolované bakterie byly za sterilních podmínek přemístěny do 50 ml plastových centrifugačních zkumavek a byly odstředovány při 3000 otáčkách za minutu po dobu 30 minut. Přebytek byl zlikvidován a peleta byla propláchnuta 1 ml sterilního fyziologického roztoku. Koncentrované bakteriální buňky byly skladovány v 1 l baňkách (obrázek 3) ve tmě při 4 °C po dobu maximálně 7 dnů. Počet bakteriálních buněk v 1 ml byl stanoven mikrobiologickou analýzou na sójovém agaru (Tryptone) a měření hustoty bylo provedeno pomocí turbidimetru.



Obrázek 3 ukazuje suspenze krmných bakterií *Lactobacillus plantarum* v 1 l nádobách v malakologické laboratoři na Katedře zoologie a rybářství České zemědělské univerzity v Praze.

1.5.4 Pulzně průtočný systém (PFT) - nastavení, provoz, režim krmení

Po aklimatizačním týdnu byl pulzně průtočný systém nastaven tak, aby v naprogramovaných intervalech dodával do každé polypropylenové kádinky vodu smíchanou s příslušným krmným roztokem. Byli testovány následující způsoby krmení:

Tabulka 1 znázorňuje testované typy výživy (řasy, bakterie s řasami a voda) u dospělých a juvenilních mlžů *Sinanodonta woodiana*.

Výživa	Cílová koncentrace objemu	Počet juvenilních jedinců	Počet dospělých jedinců
<i>E. oleoabundans</i> + <i>L. plantarum</i>	AxL [10nl.ml ⁻¹ +5nl.ml ⁻¹]	6	6
<i>E. oleoabundans</i>	A15 [15 nl.ml ⁻¹]	6	6
pouze voda		6	6

Všechny krmné roztoky byly uchovávány odděleně v tmavých, provzdušněných polypropylenových zásobnících o objemu 1,2 l a teplotě 4 °C, které byly čerstvě připraveny a denně měněny. Každou hodinu čerpadla automaticky dodávala 50 ml každé suspenze do krmného systému. Suspenze se v nádržích smíchala s filtrovanou odstátou vodou pomocí ponorného vodního čerpadla, které bylo řízeno časovým spínačem z provzdušněné 200l vodní

nádrže. Biovolumetr byl nastaven tak, aby těsně před dodáním vody s krmným roztokem do určených kádinek, byl cílový objem 15 nl.ml⁻¹.

Následně byla pomocí vodních čerpadel řízených druhým časovým spínačem každá suspenze čerpána do příslušného dávkovače, který směs dávkoval do každé ze 36 kádinek podle přiřazeného druhu výživy. Přesnost dodávání potravy byla denně vyhodnocována měřením zbývajícího objemu v jednotlivých polypropylenových zásobnících.

Všechny kádinky byly třikrát týdně čištěny, aby se snížilo hromadění výkalů a pseudovýkalů. Vnitřní povrch byl ručně vyčištěn a opláchnut, substrát byl promíchán a promyt odstátou vodou z vodovodu. Také byly každý den kontrolovány ventily umožňující doplňování vody a v případě potřeby byly vyčištěny.

1.5.5 Měření velikosti a hmotnosti

Jako ukazatele výkonnosti experimentu jsme zaznamenávali tři proměnné: hmotnost, délku schránky a chování. Kvůli měření těchto hodnot byli mlži jednou týdně vyjmuta z kádinek a veškerý materiál uchycený na jejich schránkách byl očištěn. U každého jedince byly pořízeny dva snímky. Délka schránky byla později změřena pomocí programů ImageJ a Fiji (Schindelin 2012; Schneider 2012). Vnější schránka byla osušena papírovými ručníky a poté byla nad vodou změřena hmotnost pomocí váhy.

1.5.6 Kontrola kvality vody

Každý týden 24 hodin před měřením hmotnosti a velikosti jedinců byly kontrolovány základní parametry vody (pH, vodivost, kyslík). Kontrola probíhala pomocí mobilního multimetru se třemi měřicími sondami pro elektrolytickou vodivost. Teplota vody v kádinkách byla měřena dvakrát denně a dosahovala 18,08 ± 0,70 °C. pH vody bylo naměřeno 7,85 ± 0,17. Elektrolytická vodivost dosahovala hodnoty 2,72 ± 0,44 mS cm⁻¹.

1.5.7 Sběr mikrobiálních vzorků

Bakterie byly přidávány do 36 kádinek, 12 jedinců bylo krmeno řasovou suspenzí, dalších 12 jedinců bylo krmeno suspenzí řas a bakterií *L. plantarum* a 12 zbývajícím jedincům byla dodávána pouze voda. Na jeden typ výživy bylo přiřazeno 6 juvenilních a 6 dospělých jedinců (tabulka 1).

První den před zahájením přidávání bakterií byl proveden první odběr vzorků. Finální odběr vzorků byl proveden poslední den experimentu. Vzorky byly odebrány z vody a sedimentu z každé chovné kádinky, a také z krmných roztoků před jejich aplikováním do PFT. Odběr vzorků vody byl prováděn pomocí sterilní injekční stříkačky ponořené do poloviny hloubky kádinky. V průběhu odběru nebyl porušen sediment ani poloha mlže. Před odběrem vzorků bakterií ze sedimentu se musel být každý živočich opatrně vyjmout a sediment byl sterilní lžičkou rozvířen. Následoval další odběr sterilní injekční stříkačkou ponořenou do poloviny hloubky kádinky. Vzorky krmných roztoků byly odebrány přímo z krmných nádrží pomocí sterilní injekční stříkačky.

Poslední den pokusu byly odebrány vzorky žaludku, střeva a zbytku těla pokusným jedincům. Vzorky žaludku a střeva byly odebrány injekční stříkačkou (Obrázek 4) a po jednom

umístěny do fyziologického roztoku do sterilních nádob. Zbytky těl mlžů byly také po jednom umístěny do sterilních nádob s fyziologickým roztokem. Vzorky tkání byly uchovávány při teplotě 4 °C až do analýzy, která proběhla do 24 hodin od odběru vzorků.



Obrázek 4 znázorňuje odebrání vzorku z vnitřností mlže *Sinanodonta woodiana* v malakologické laboratoři na Katedře zoologie a rybářství České zemědělské univerzity v Praze.

1.5.8 Mikrobiální analýzy

Mikrobiální analýzy probíhaly ve spolupráci s Katedrou mikrobiologie na Fakultě agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze. Analýzy byly provedeny z vzorků ve vodě PFT, sedimentu PFT, krmiva z řas a ve vnitřnostech mlžů, a to v celém těle, žaludku a střevě.

Ke stanovení počtu aerobních bakterií ve vzorcích vody, sedimentu, krmných směsí a celých vnitřností byl použit tryptonový sójový agar. Počet anaerobních a fakultativně anaerobních bakterií byl stanoven pomocí Wilkins-Chargerova agaru. Aerobní bakterie byly kultivovány za aerobních podmínek při 30 °C po dobu 3 dnů. Anaerobní a fakultativně anaerobní bakterie byly kultivovány při stejné teplotě po dobu 4 dnů v anaerobních nádobách. Po inkubaci byly všechny kolonie počítány.

Na konci krmného pokusu byl také zkoumán výskyt *Lactobacillus sp.* ve vodě, sedimentu, krmných směsích a tělech mlžů pomocí selektivního agaru Rogosa (Oxoid). Kultivace *Lactobacillus sp.* trvala 48 hodin v mikroaerofilních podmínkách při 37 °C s použitím druhé vrstvy neselektivního agaru.

1.5.9 Metody statistické analýzy

Pro každou z měřených proměnných (chování, rychlost růstu, rychlost změny hmotnosti) byla vypočtena popisná statistika. Zastoupení jednotlivých proměnných bylo vykresleno pomocí histogramů, zobrazení vlivu typů výživy na proměnné bylo provedeno pomocí boxplotů.

Analýza byla provedena pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) pro každou z měřených proměnných reakcí (chování, rychlost růstu, rychlost změny hmotnosti) a typu výživy jako proměnné reakce. ANOVA byla provedena zvlášť pro juvenilní a zvlášť pro dospělé jedince v každé skupině. Před provedením ANOVA byly proměnné reakce testovány na normalitu pomocí Shapiro-Wilkova testu a na homogenitu rozptylu pomocí Bartlettova testu.

V případech, kdy ANOVA zjistila významné rozdíly mezi typy výživy, byl proveden t-test, který porovnával údaje z každého typu s ostatními po dvojicích.

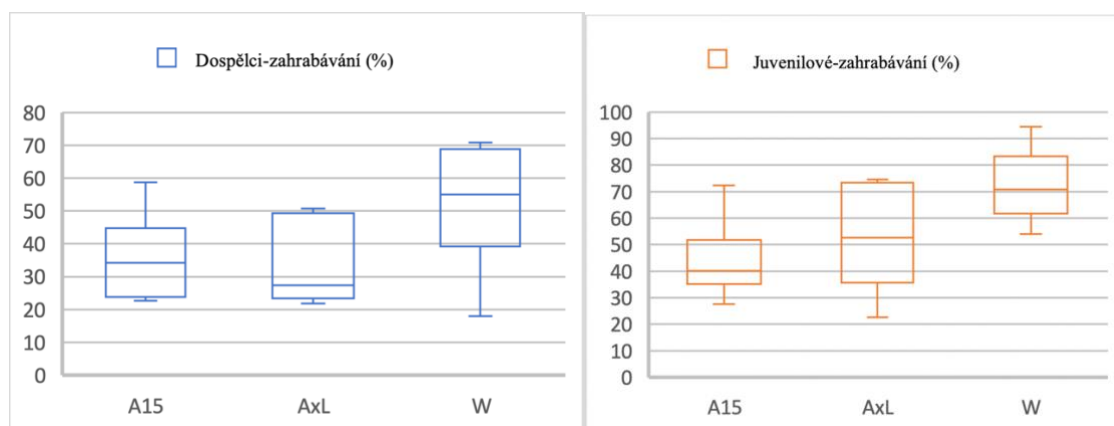
Pro všechny statistické analýzy byla úroveň významnosti 0,05. ANOVA a grafy byly provedeny v programu Microsoft Excel 2016 a Shapirov a Bartlettův test byly provedeny pomocí online kalkulaček (<https://www.gigacalculator.com/calculators/normality-test-calculator.php> a <https://www.statology.org/bartletts-test-calculator/>).

1.6 Výsledky

1.6.1 Chování - popisná statistika a grafy

V Grafu 1 jsou znázorněny boxploty pro chování dospělých (vlevo) a juvenilních jedinců (vpravo) při třech různých typech výživy. Kromě toho jsou v tabulkách 2 a 3 uvedeny některé popisné statistiky chování mlžů v průběhu celého experimentu i průměr a směrodatné odchylky procenta zahrabávání v rámci jednotlivých typů výživy. Obecně mají juvenilní jedinci tendenci k vyššímu procentu zahrabávání než dospělí. Průměrné procento zahrabávání u juvenilních jedinců bylo během celého experimentu 56,22 %, zatímco u dospělých jedinců 40,44 %. Z hlediska vlivu typu výživy bylo zjištěno, že u dospělců nebyl velký rozdíl v zahrabávání u výživy řasami a u výživy řasami s bakteriemi. Naopak u výživy pouze vodou bylo pozorováno nejvyšší průměrné procento zahrabávání, ale s většími odchylkami (Graf 1).

U juvenilních jedinců byla situace podobná, nejvyšší procento zahrabávání bylo zaznamenáno u výživy vodou, u výživy řasami a řasami s bakteriemi byly hodnoty podobné.



Graf 1 obsahuje boxploty znázorňující % zahrabání mlžů, které bylo denně odhadováno podle části těla zahrabaného v sedimentu. Graf vlevo znázorňuje chování dospělců a vpravo znázorňuje chování juvenilů. Mohlo být zahrabáno 0-100% těla (osa y). Osa x udává způsoby výživy mlžů. A15 je výživa pouze řasami, AxL je výživa řasami s bakteriemi a W znamená, že mlžům byla dodávána pouze voda.

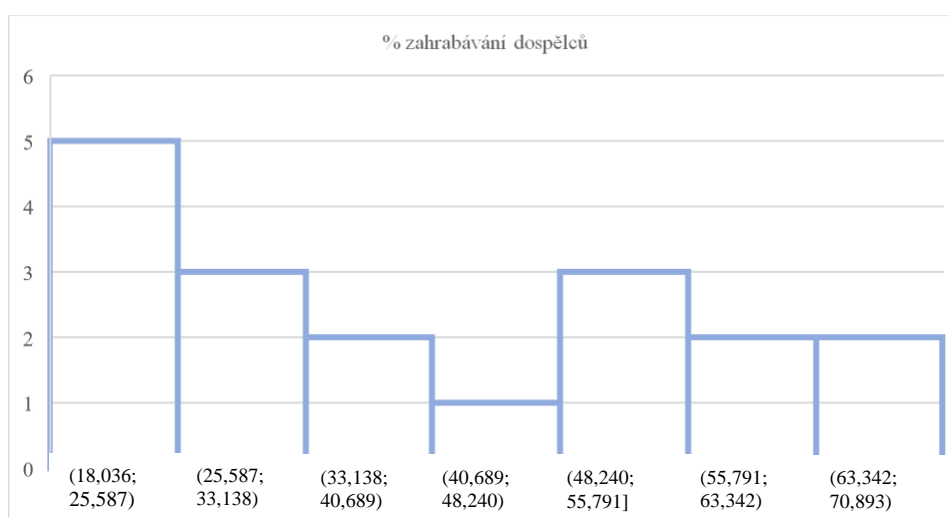
Tabulka 2 obsahuje hodnoty popisné statistiky údajů o chování dospělých a juvenilních jedinců.

Míra	Dospělci	Juvenilové
Min.	18,04	22,68
1st Qu.	24,96	40,09
Median	39,64	56,34
Mean	40,44	56,22
3rd Qu.	50,27	72,16
Max.	70,89	94,46

Tabulka 3 znázorňuje \pm směrodatnou odchylku chování dospělých a juvenilních jedinců.

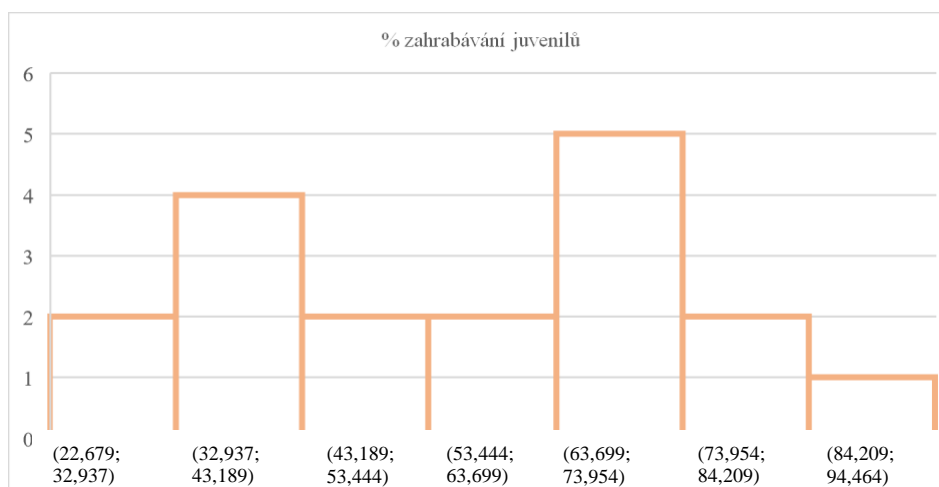
Výživa	Dospělci	Juvenilové
A15	35,71 \pm 13,45	43,8 \pm 15,09
LxA	33,34 \pm 12,96	52,56 \pm 20,13
W	52,26 \pm 19,55	72,29 \pm 13,81

Rozložení údajů o zahrabávání u dospělých, je uvedeno v Grafu 2 a v Grafu 3 u juvenilů. U dospělých jedinců byla zjištěna nižší míra zahrabávání. Rozložení se zdá být zkreslené, odchylka od normality bude testována v následující části.



Graf 2 znázorňuje rozložení údajů o zahrabávání dospělých jedinců. Osa y představuje četnost výskytů pozorování, osa x představuje rozmezí procentuální míry zahrabání mlžů za den.

V případě juvenilních jedinců se chování nejčastěji pohybovalo mezi hodnotami 32,93-43,19 a 63,70-73,95. V tomto případě dochází k symetričtějšímu rozložení údajů.



Graf 1 znázorňuje rozložení údajů o zahrabávání juvenilních jedinců. Osa y představuje četnost výskytů pozorování, osa x představuje rozmezí procentuální míry zahrabání mlžů za den.

Statistická inference – test normality a homogenity

Hodnoty-p pro Shapirův test a Bartlettův test jsou uvedeny v Tabulce 4, ve všech případech byly hodnoty vyšší než 0,05, což znamená, že je předpoklad normality a homogenity rozptylu dodržen.

Tabulka 4 znázorňuje hodnoty-p pro test normality (Shapiro) a homogenity rozptylů (Bartlett) pro údaje o chování dospělých a juvenilních mlžů.

Skupina	p-hodnoty	
	Shapiro test	Bartlett test
Dospělí	0,131	0,603
Juvenilní	0,596	0,689

ANOVA

V Tabulce 5 je uveden výsledek analýzy rozptylu míry zahrabávání, u dospělců byla zjištěna p-hodnota 0,106, což znamená, že test nebyl schopen najít žádné rozdíly v míře zahrabávání v rámci tří různých typů výživy. U juvenilů byla zjištěna p-hodnota přibližně 0,027, což znamená, že výživa měla významný vliv na míru zahrabávání u juvenilů.

Tabulka 5 znázorňuje výsledky jednofaktorové ANOVY po testování normality získané z pozorování míry zahrabávání.

ANOVA						
Zdroj variací						
Dospělci	SS	df	MS	F	P-hodnota	F crit
Mezi skupinami	1275,364	2	637,682	2,618	0,106	3,682
Ve skupinách	3653,39	15	243,559			
Celkem	4928,754	17				
Zdroj variací						
Juvenilové	SS	df	MS	F	P-hodnota	F crit
Mezi skupinami	2555,191	2	1277,596	4,653	0,027	3,682
Ve skupinách	4118,357	15	274,557			
Celkem	6673,548	17				

Protože ANOVA prokázala významný vliv typů výživy na zahrabávání, přistoupili jsme k párovému srovnání typů výživy (Tabulka 6). Jak je z tabulky patrné, významný rozdíl byl zjištěn mezi výživou řasami a vodou (p-hodnota 0,01), ačkoliv nebyl významný, byl zjištěn také rozdíl mezi výživou řasami s laktobacily a vodou (p-hodnota 0,08).

Tabulka 6 znázorňuje párové srovnání mezi typy výživy. A15 je výživa pouze řasami, AxL je výživa řasami s bakteriemi a W znamená, že mlžům byla dodávána pouze voda.

	A15	AxL	A15	W	AxL	W
Mean	43,80	52,56	43,80	72,29	52,56	72,29
Variance	227,59	405,24	227,59	190,85	405,24	190,85
Observations	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Pooled Variance	316,41		209,22		298,04	
Hypothesized Mean Difference	0,00		0,00		0,00	
df	10,00		10,00		10,00	
t Stat	-0,85		-3,41		-1,98	
P(T<=t) two-tail	0,41		0,01		0,08	
t Critical two-tail	2,23		2,23		2,23	

1.6.2 Velikost - popisná statistika a grafy

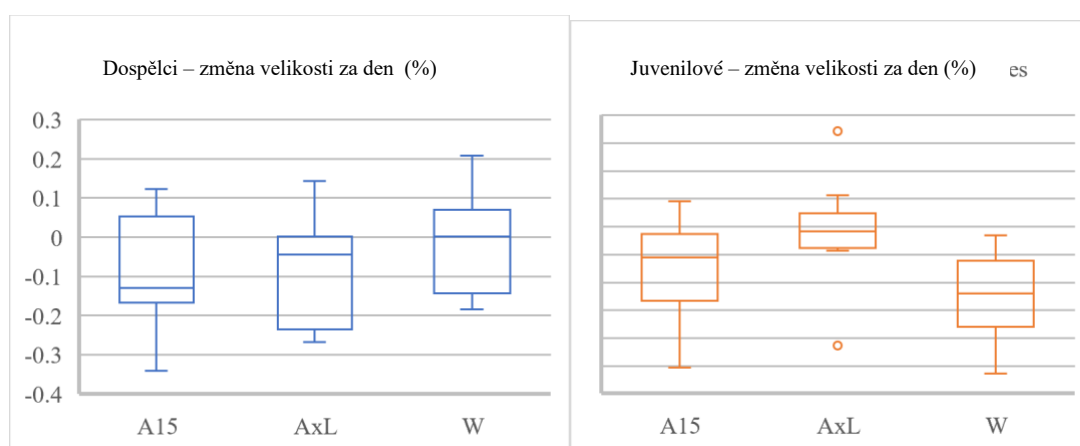
V Grafu 4 jsou znázorněny boxploty pro multiplikativní míru růstu vypočtenou na základě informací získaných z vážení dospělých jedinců (vlevo) a juvenilních jedinců (vpravo). V Tabulce 7 jsou navíc uvedeny průměrné délky získané měření jedinců (mm): po příjezdu, první den pokusu a poslední den pokusu.

Tabulka 7 znázorňuje souhrn naměřených délek (mm) po příjezdu, v první a v poslední den pokusu. A15 je výživa pouze řasami, AxL je výživa řasami s bakteriemi a W znamená, že mlžům byla dodávána pouze voda.

		Délka (mm)					
		Po příjezdu		První den		Poslední den	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD
A15	Dospělci	46,034	0,101	43,719	1,260	41,893	0,136
	Juvenilové	16,761	1,963	16,661	2,882	16,121	2,411
AxL	Dospělci	29,386	4,040	29,318	3,719	31,337	1,904
	Juvenilové	19,235	1,546	19,553	1,694	20,000	3,467
W	Dospělci	30,750	1,555	33,342	4,320	30,843	2,213
	Juvenilové	15,210	0,314	16,361	1,096	15,105	0,394

Tabulka 8 a Tabulka 9 ukazují souhrn popisné statistiky po výpočtu multiplikačního přírůstku délky za den. Juvenilní jedinci ve skupině A15 dosáhli ($0,039 \pm 0,177$, procento denní změny délky) a LxA ($0,161 \pm 0,211$, procento denní změny délky). V kategorii dospělých i juvenilních jedinců nebyl pozorován přírůstek procenta denní změny délky ve výživě vodou (W).

Graf 5 a Graf 6 představují rozložení denní procentní míry růstu hmotnosti u dospělých a juvenilních jedinců. U dospělých jedinců se nejčastější pozorování pohybovala mezi hodnotami (-0,07 - 0,16) procenta za den a byla vychýlena doprava (Graf 5). V případě nedospělých jedinců se nejčastější pozorování pohybovala mezi hodnotami (-0,09 - 0,20) g za den a zdá se být vychýlena doleva (Graf 6).



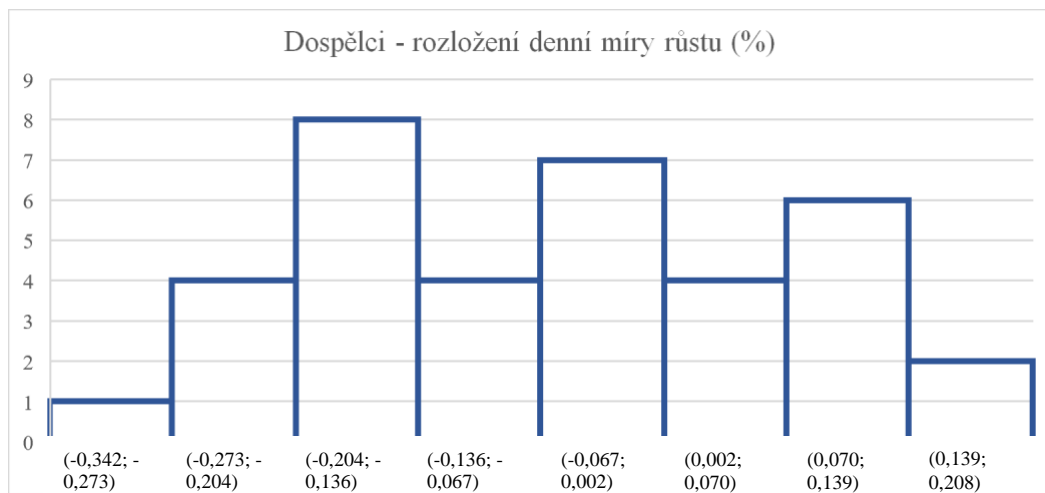
Graf 2 obsahuje boxploty znázorňující multiplikační rychlost růstu na základě měření délky u dospělých (vlevo) a juvenilních (vpravo) jedinců. Osa y znázorňuje změnu délky v % za den a osa x znázorňuje typ výživy. A15 je výživa pouze řasami, AxL je výživa řasami s bakteriemi a W znamená, že mlžům byla dodávána pouze voda.

Tabulka 8 znázorňuje popisnou statistiku pro délku dospělých a juvenilních mlžů.

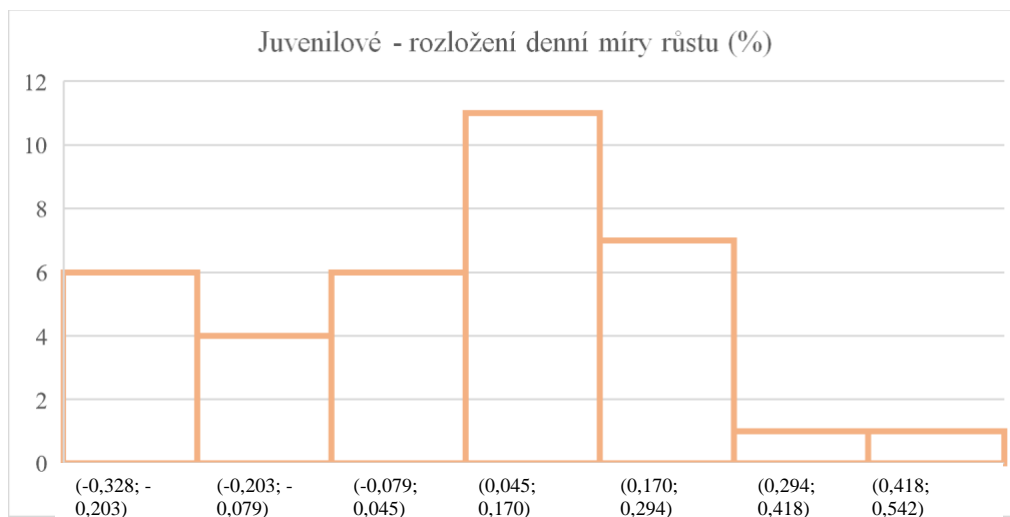
Míra	Dospělci	Juvenilové
Min.	-0,342	-0,328
1st Qu.	-0,168	-0,089
Median	-0,058	0,102
Mean	-0,063	0,047
3rd Qu.	0,023	0,173
Max.	0,208	0,542

Tabulka 9 znázorňuje průměr \pm směrodatné odchylky procentuální denní změny délky dospělých a juvenilních mlžů. A15 je výživa pouze řasami, AxL je výživa řasami s bakteriemi a W znamená, že mlžům byla dodávána pouze voda.

Výživa	Dospělci	Juvenilové
A15	-0,093 \pm 0,136	0,039 \pm 0,177
AxL	-0,077 \pm 0,141	0,161 \pm 0,211
W	-0,018 \pm 0,119	-0,058 \pm 0,152



Graf 3 znázorňuje rozložení denní procentuální míry růstu u dospělých jedinců. Osa y představuje četnost výskytů pozorování, osa x představuje rozmezí procentuální míry růstu za den.



Graf 4 znázorňuje rozložení denní procentuální míry růstu u juvenilních jedinců. Osa y představuje četnost výskytů pozorování, osa x představuje rozmezí procentuální míry růstu za den.

Statistická inference - test normality a homogenity

Shapiroův test normality a Bartlettův test homogenity rozptylů, které ukázaly, že při aplikaci na údaje o délce nebyl porušen předpoklad normality v žádné z obou skupin. Hodnoty p nebyly významné ($< 0,05$), hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 10 znázorňuje p-hodnoty testu normality (Shapiro) a homogenity rozptylů (Bartlett) pro údaje o délce dospělých a juvenilních mlžů.

Skupina	p-hodnoty	
	Shapiroův test	Bartlettův test
Dospělci	0,789	0,856
Juvenilové	0,274	0,568

ANOVA

ANOVA prokázala významný vliv výživy (p-hodnota 0,021) u juvenilní skupiny, Tabulka 11 ukazuje výsledek analýzy rozptylu rychlosti růstu do délky, v případě dospělců byla zjištěna p-hodnota 0,358, což znamená, že test nebyl schopen najít žádné rozdíly pro tuto velikostní kategorii v rámci tří různých typů výživy.

Tabulka 11 znázorňuje výsledky jednofaktorové ANOVY po testování normality získané z výpočtu multiplikativní míry růstu pomocí hodnot délek mlžů.

Zdroj variací	SS	df	MS	F	P-hodnota	F crit
---------------	----	----	----	---	-----------	--------

Dospělci						
Mezi skupinami	0,037	2	0,019	1,061	0,358	3,285
Ve skupinách	0,579	33	0,018			
Celkem	0,616	35				
Zdroj variací						
Juvenilové	SS	df	MS	F	P-hodnota	F crit
Mezi skupinami	0,287	2	0,144	4,348	0,022	3,285
Ve skupinách	1,091	33	0,033			
Celkem	1,379	35				

ANOVA ukázala významný vliv na rychlost růstu délky naměřené v jednotlivých typech výživy u juvenilních jedinců (Tabulka 11). Párové srovnání mezi výživami je znázorněno v Tabulce 12, ve které můžeme pozorovat významný rozdíl mezi výživami AxL a W.

Tabulka 12 znázorňuje párové srovnání délek mlžů. A15 je výživa pouze řasami, AxL je výživa řasami s bakteriemi a W znamená, že mlžům byla dodávána pouze voda.

	A15	AxL	A15	W	AxL	W
Mean	0,039	0,161	0,039	-0,058	0,161	-0,058
Variance	0,031	0,045	0,031	0,023	0,045	0,023
Observations	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
Pooled Variance	0,038		0,027		0,034	
Hypothesized Mean Difference	0,000		0,000		0,000	
df	22,00		22,00		22,00	
t Stat	-1,532		1,429		2,907	
P(T<=t) one-tail	0,070		0,084		0,004	
t Critical two-tail	2,074		2,074		2,074	

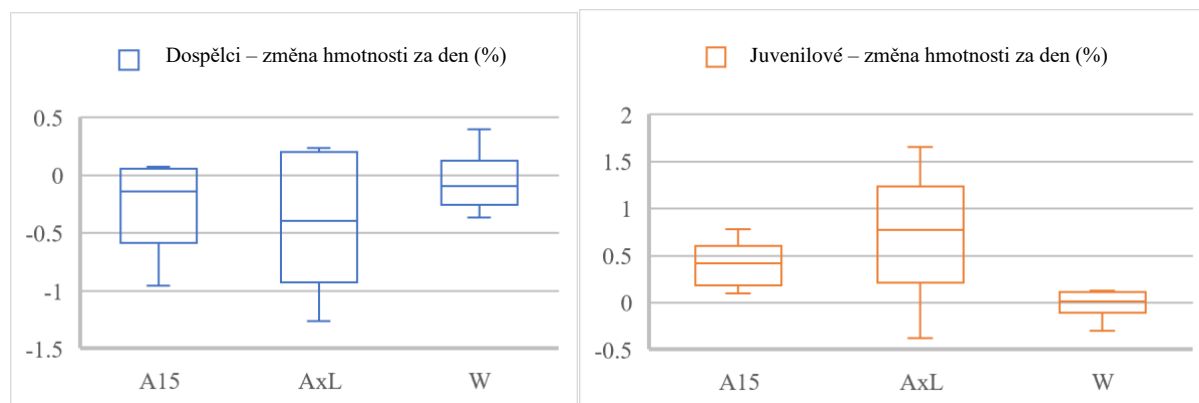
1.6.3 Hmotnost – popisná statistika a grafy

V Grafu 7 jsou znázorněny boxploty pro multiplikatívni míru růstu vypočtenou na základě informací získaných z vážení dospělých zvířat (vlevo) a juvenilů (vpravo). Tabulka 13 a Tabulka 14 ukazují souhrn popisných statistik, první ukazuje hrubou hmotnost získanou přímo z vážení (g) a druhá ukazuje hmotnost po výpočtu multiplikatívni míry růstu. Dospělá zvířata ztratila hmotnost při každém typu výživy (A15 $-0,222 \pm 0,422$; LxA $-0,415 \pm 0,565$; W $-0,057 \pm 0,267$ procentní změny hmotnosti za den), zatímco juvenilové vykazovali přírůstek $0,420 \pm 0,270$ při výživě A15 a přírůstek $0,673 \pm 0,646$ při krmení výživou LxA. Naproti tomu juvenilní jedinci ztráceli na hmotnosti tempem $-0,0141 \pm 0,155$ % za den, když jim byla dodávána pouze voda.

Graf 8 a Graf 9 znázorňuje rozložení denní procentuální rychlosti růstu hmotnosti u dospělců a juvenilů, přičemž v případě dospělců se nejčastější pozorování pohybovala mezi hodnotami (-0,07 - 0,16) g za den a zdá se, že byla vychýlena doprava (Graf 8). V případě juvenilních jedinců se nejčastější pozorování pohybovala mezi hodnotami (-0,09 - 0,20) a zdá se být vychýlena doleva (Graf 9).

Tabulka 13 znázorňuje souhrn hmotností (g) dospělých a juvenilních mlžů v den příjezdu, v první den experimentu a v poslední den experimentu. A15 je výživa pouze řasami, AxL je výživa řasami s bakteriemi a W znamená, že mlžům byla dodávána pouze voda.

		Váha (g)					
		Den příjezdu		První den experimentu		Poslední den experimentu	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD
A15	Dospělci	6,103	4,519	6,293	4,629	5,725	3,818
	Juvenilové	0,249	0,081	0,263	0,087	0,290	0,108
AxL	Dospělci	2,450	1,241	2,451	1,226	2,726	1,239
	Juvenilové	0,312	0,169	0,342	0,182	0,406	0,226
W	Dospělci	4,224	2,288	4,337	2,434	4,304	2,403
	Juvenilové	0,216	0,049	0,230	0,049	0,228	0,040



Graf 5 obsahuje boxploty znázorňující multiplikativní míru růstu na základě měření hmotnosti pokusným mlžům. Osa x znázorňuje typ výživy a osa y znázorňuje multiplikativní míru růstu za den. A15 je výživa pouze řasami, AxL je výživa řasami s bakteriemi a W znamená, že mlžům byla dodávána pouze voda.

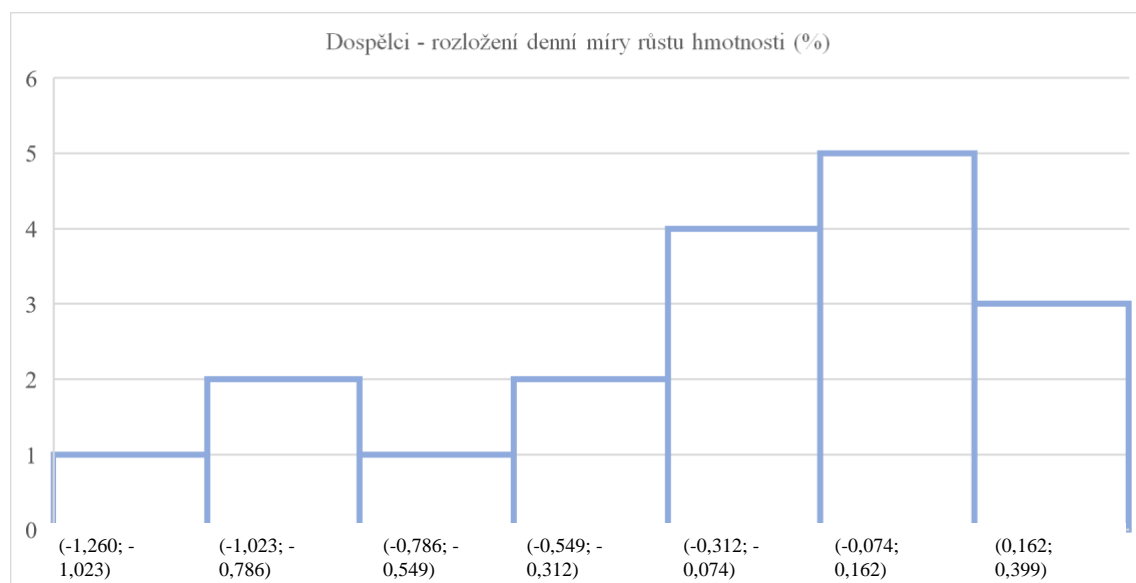
Tabulka 14 znázorňuje popisnou statistiku údajů o hmotnosti dospělých a juvenilních mlžů.

Míra	Dospělci	Juvenilové
Min.	-1,260	-0,375
1st Qu.	-0,436	0,043
Median	-0,142	0,297

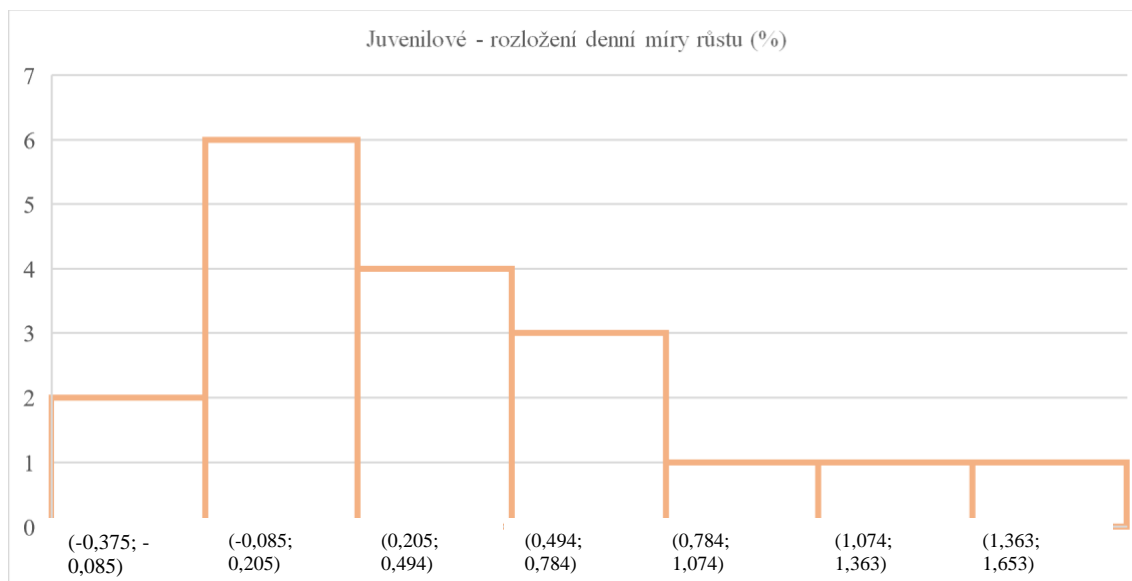
Míra	Dospělci	Juvenilové
Mean	-0,242	0,374
3rd Qu.	0,047	0,556
Max.	0,399	1,653

Tabulka 15 znázorňuje průměrnou \pm směrodatnou odchylku procentuální denní změny růstu dospělých a juvenilních mlžů. A15 je výživa pouze řasami, AxL je výživa řasami s bakteriemi a W znamená, že mlžům byla dodávána pouze voda.

	Dospělci	Juvenilové
A15	-0,222 \pm 0,422	0,420 \pm 0,269
LxA	-0,415 \pm 0,565	0,673 \pm 0,646
W	-0,057 \pm 0,267	-0,014 \pm 0,155



Graf 8 znázorňuje rozložení denní procentuální míry růstu hmotnosti u dospělých. Osa y představuje četnost výskytů pozorování, osa x představuje rozmezí procentuální míry růstu za den.



Graf 7 znázorňuje rozložení denní procentuální míry růstu hmotnosti u juvenilních jedinců. Osa y představuje četnost výskytů pozorování, osa x představuje rozmezí procentuální míry růstu za den.

Statistická inference – test normality a homogenity

Tabulka 16 znázorňuje p-hodnoty testu normality (Shapiro) a homogenity rozptylů (Bartlett) pro údaje o hmotnosti dospělých a juvenilních mlžů.

skupina	p-hodnota	
	Shapirův test	Bartlettův test
Dospělci	0,164	0,284
Juvenilci	0,337	0,011

V případě údajů o hmotnosti, Shapirův test ukázal, že předpoklad normality nebyl porušen v žádné z obou skupin. Údaje o juvenilních jedincích však vykazovaly hodnotu nižší než 0,05 pro Bartlettův test, což naznačuje, že nemusí existovat homogenita rozptylů. Z tohoto důvodu jsme hodnotu p uváděnou pro hmotnost juvenilů získali pomocí Welchova testu ANOVA v softwaru R (R Core Team, 2020) po konzultaci s vedoucím.

ANOVA Welch test

V tabulce 17 je uveden výsledek analýzy rozptylu rychlosti růstu hmotnosti. U dospělců byla zjištěná p-hodnota 0,419, což znamená, že test nebyl schopen najít žádné rozdíly v rychlosti růstu hmotnosti dospělců v rámci tří různých typů výživ. V případě juvenilů byla zjištěna p-hodnota 0,01486, což znamená, že typ výživy měl významný vliv na rychlost růstu hmotnosti juvenilů.

Tabulka 17 znázorňuje výsledky jednofaktorové ANOVY po testování normality získané z výpočtu multiplikační rychlosti růstu pomocí hodnot hmotnosti.

ANOVA						
Zdroj variace						
Dospělci	SS	df	MS	F	P-hodnota	F crit
Mezi skupinami	0,373	2	0,186	0,922	0,419	3,682
Ve skupinách	3,030	15	0,202			
Celkem	3,403	17				
Zdroj variace						
Juvenilové	SS	df	MS	F	P-hodnota	F crit
Mezi skupinami	1,639	2	0,820	7,293	0,015	3,682
Ve skupinách	2,815	15	0,188			
Celkem	4,455	17				

Jelikož ANOVA prokázala významný vliv typů výživy na rychlost růstu hmotnosti juvenilů, přistoupili jsme k párovému porovnání typů výživy (Tabulka 18). Jak je vidět z tabulky, byl zjištěn významný rozdíl mezi výživou řasami a vodou (p-hodnota 0,01) a také mezi výživou řasami s laktobacily a vodou (p-hodnota 0,08).

Tabulka 18 znázorňuje výsledky t-testu pro všechna párová srovnání mezi výživami a rozdíly rychlosti růstu hmotnosti.

	<i>A15</i>	<i>AxL</i>	<i>A15</i>	<i>W</i>	<i>AxL</i>	<i>W</i>
Mean	0,41	0,72	0,41	-0,01	0,72	-0,01
Variance	0,06	0,48	0,06	0,02	0,48	0,02
Observations	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Pooled Variance	0,27		0,04		0,25	
Hypothesized Mean Difference	0,00		0,00		0,00	
df	10,00		10,00		10,00	
t Stat	-1,03		3,64		2,54	
P(T<=t) two-tail	0,33		0,01		0,03	
t Critical two-tail	2,23		2,23		2,23	

Diskuse

Před realizací pokusu jsme předpokládali, že probiotika zlepšují odolnost vůči nemocem, zdravotní stav, růstovou výkonnost, využití krmiva, reakci na stres a celkové zdraví jedince (Ponnachan 2021). Bakterie přítomné ve vodě hrají rozhodující roli ve složení a struktuře střevní mikroflóry vodních živočichů a také podporují cirkulaci materiálu a tok energie v akvakulturních systémech, což napomáhá jejich normálnímu fungování (Wang et al. 2012). Použití probiotik tedy může zlepšit úroveň výživy vodních živočichů a zlepšit imunitu chovaných zvířat vůči patogenním mikroorganismům (Abumourad 2013).

V experimentální části se u sladkovodních mlžů *Sinanodonta woodiana* testoval vliv přidaných bakterií do krmiva. Část mlžů byla krmena řasami, část řasami s bakteriemi a zbylým mlžům byla podávána pouze voda. Jedincům byly přidávány bakterie *Lactobacillus plantarum*, u kterých je předpokládán probiotický účinek a pozitivní vliv na vitalitu. V realizovaném experimentu bylo zjištěno, že dospělí jedinci ztratili hmotnost při každém typu výživy. Při výživě řasami $-0,222 \pm 0,422$; při výživě řasami s laktobacilem $-0,415 \pm 0,565$ a při podávání pouze vody $-0,057 \pm 0,267$ procentuální změny hmotnosti za den. Je pozoruhodné, že negativní vliv na růst dospělců měla i řasová výživa. Je možné, že nebyla stanovena optimální dávka řas pro dospělce, kteří by mohli mít vyšší nároky na jejich koncentraci.

Juvenilní jedinci přibyli na hmotnosti při výživě řasami $0,420 \pm 0,269$ a při krmení řasami s laktobacilem byl přírůstek $0,673 \pm 0,646$ procentuální změny hmotnosti za den. Oproti tomu, při krmení pouze vodou juvenilní jedinci ztráceli na hmotnosti tempem $-0,014 \pm 0,155$ procentuální změny za den. Haag et al. ve své studii z roku 2019 uvádí, že nedospělí jedinci přijímají potravu převážně ze sedimentu, zatímco dospělí jedinci se živí spíše z vodního sloupce. Toto by možná mohlo být důvodem, proč dospělí jedinci ztratili hmotnost. Byli totiž také méně zahrabaní a bakterie se mohly držet více v sedimentu než ve vodním sloupci, takže juvenilové k nim měli lepší přístup a více rostli. Pozitivní přírůstek juvenilních jedinců možná mohl být také ovlivněn jejich větší schopností růstu. Úbytek hmotnosti dospělců by také mohl být zapříčiněn stresem způsobeným změnou prostředí a každotýdenním vážením a měřením pokusných jedinců. Z toho by mohlo plynout, že dospělci byli náchylnější na stres, například kvůli větší velikosti jejich těla. Je také možné, že kvůli stresu měli dospělci nižší schopnost příjmu kyslíku.

V souladu s naším experimentem je známo, že juvenilní jedinci mají větší tendenci k zahrabávání a dospělí žijí ve větší míře na substrátu nebo jsou v něm zahrabaní jen částečně (Schartum et al. 2017). Experiment ukázal, že juvenilní jedinci byli průměrně zahrabaní na 56 % během celého experimentu. Dospělí jedinci byli průměrně zahrabaní na 40,44 %. V chování nebyl zjištěn žádný významný rozdíl mezi výživou pouze řasami a výživou řasami s laktobacilem. Při dodávání pouze vody se jedinci obou velikostních kategorií zahrabávali nejvíce, což je pochopitelné, protože se jim nedodávala žádná potrava.

Při měření velikosti byl zjištěn průměrný denní přírůstek (%) pouze u juvenilních jedinců, kteří byli krmeni řasami $0,039 \pm 0,177$ a řasami s laktobacilem $0,161 \pm 0,211$, což mohlo být způsobeno stejnou příčinou jako u hmotnosti.

Do současnosti nebylo použití probiotik u sladkovodních mlžů příliš zkoumáno. Výzkumy byly zaměřené především na jiné bezobratlé vodní živočichy. Například Soohwan Kim et al. v roce 2021 zjistili, že dva druhy bakterií (*Bacillus albus* SMG-1 a *Bacillus safensis*

SMG-2) zlepšují růst a účinnost krmiva krevet *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) a mohly by tvořit nová akvakulturní probiotika (Kim et al. 2021).

Macario Savin-Amador et al. ve své studii z roku 2021 uvádí, že přídavek probiotických bakterií rodu přispěl k přežití, růstu a uchycení larev veligerů *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973). Přídavek *L. plantarum* společně s řasami *Isochlorysis galbana* (Parke, 1949) a *Chaetoceros calcitrans* (Takano, 1968) vykazoval nejlepší výsledky. Z toho vyplývá, že přídavek bakterií do larvální kultury se dá považovat za udržitelnou a spolehlivou možnost produkce larev ústřic (Savin-Amador et al. 2021). Na rozdíl od této studie jsme dělali pokus na juvenilních a dospělých jedincích a pozitivní efekt použití probiotik se dostavil pouze u juvenilů. Použití probiotik by možná mohlo být obecně účinnější na postlarvální a juvenilní jedince. V naší studii byla použita zelená jednobuněčná řasa *Ettlia oleoabundans*, která díky své bohatosti na polynenasycené mastné kyseliny má vysokou výživovou schopnost. Tato řasa byla již v minulosti úspěšně používána v chovech sladkovodních mlžů. Možná by bylo vhodné vyzkoušet kombinaci více druhů zelených řas jako v uvedené studii Macaria Savin-Amadora et al. z roku 2021.

Jones J., Mair R. a Neves R. v roce 2005 provedli porovnání juvenilů velevruba tobolekoviého - *Epioblasma capsaeformis* (Lea, 1834) narozených na podzim a na jaře téhož roku. Zjistili, že juvenilové narození na podzim nepřijímali potravu tak aktivně jako juvenilové narození na jaře a jejich následné přežívání a růst byly slabé. V případě, že by se dospělí mlži použití v našem experimentu vylíhli na podzim a juvenilní na jaře, mohla by tato studie přinést vysvětlení, proč dospělci na váze ubývali.

Výsledek experimentu by mohl napomoci vylepšit způsob výživy v chovech sladkovodních mlžů, zejména při odchovu juvenilních jedinců. Je třeba otestovat, jestli má přidání laktobacilu do potravy jiným, například ohroženým druhům stejné nebo podobné pozitivní účinky na růst juvenilních jedinců. Otázkou může také být, zda by kombinace více druhů bakterií a řas nemohla dosáhnout lepších výsledků. Lze také zkusit podávat větší nebo menší množství probiotik, zejména dospělým jedincům. Pro další výzkum by mohlo být zajímavé porovnat mortalitu dospělých jedinců, kteří jako juvenilní měli přístup k probiotikům a kteří naopak k dispozici probiotika neměli.

Škebllice asijská by vzhledem ke své velikosti a odolnosti mohla mít využití při výrobě krmných směsí pro ostatní sladkovodní živočichy, kteří jsou chováni za účelem produkce.

Závěr

Literární rešerše této práce shrnuje poznatky o způsobu příjmu a zpracování potravy sladkovodními mlži a o jejich chovu. Také jsou zde uvedena důležitá obecnější fakta pro získání uceleného pohledu na složitý životní cyklus mlžů a jejich ohrožení. Práce byla zaměřena na škeblici asijskou (*Sinanodonta woodiana*), se kterou byl následně proveden experiment, ve kterém jí byly přidávány bakterie do krmiva.

Předpokládali jsme, že přidané probiotické bakterie *Lactobacillus plantarum* budou mít pozitivní vliv na růst a zdraví jedinců, jak bylo uvedeno v rešeršní části práce. Tento předpoklad se potvrdil pouze v případě juvenilních jedinců. Mohlo to být způsobeno tím, že juvenilní jedinci mohli mít větší možnost využít přidané probiotické krmivo protože jsou v ranější fázi svého vývoje a mohli by mít větší schopnost růstu. Také žijí více zahrabaní v sedimentu, kde může být k dispozici vyšší koncentrace bakterií.

Je potřeba provést další výzkum, ve kterém by se vyjasnilo, zda úbytek dospělců na váze byl ovlivněn vlivy vnějšího prostředí nebo jestli probiotika skutečně mají negativní vliv na jejich růst. Bylo by vhodné vyzkoušet jiné probiotické bakterie nebo jejich kombinace. Také by se daly otestovat jiné koncentrace řas i bakterií.

Literatura

- Abumourad I, Abbas WT, Awaad ES, Authman MMN, El-Shafei K, Sharaf OM, El-Sayed HS. 2013. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic in aquaculture: Emphasis on growth performance and innate immunity. Hydrobiology Department, National Research Centre.
- Afanasjev S & Kraszewski A. 2001. Growth and population structure of the mussel *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia, Unionidae) in the heated Konin lakes system. Archives of Polish Fisheries, 9: 123–131.
- Allen DC & Vaughn CC. 2009. Burrowing behavior of freshwater mussels in experimentally manipulated communities. Journal of North American Benthological Society 28: 93–100. Aquacultural Engineering.
- Balcázar JL, Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology, Volume 114, Issues 3–4.
- Beran L. 1997. First record of *Sinanodonta woodiana* (Mollusca: Bivalvia) in the Czech republic. Acta Soc. Zool. Bohem. 61: 1–2.
- Beran L. 2008. Expansion of *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae) in the Czech republic. Aquatic Invasions 3 (1), s. 91–94.
- Beran L. 2013. Freshwater molluscs of the Dyje (Thaya) river and its tributaries – the role of these water bodies in expansion of alien species and as a refuge for endangered gastropods and bivalves. Folia Malacol. 21(3), s. 143–160.
- Bielen A, Bošnjak I, Sepčić K, Jaklič M, Cvitanić M, Lušić J, Hudina S. 2016. Differences in tolerance to anthropogenic stress between invasive and native bivalves. Science of the Total Environment, 543, 449–459.
- Bogan AE. 2007. Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. Hydrobiologia, 595(1).
- Bogan AE. 2008. Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. Hydrobiologia 595: 139–147.
- Breton, S., Capt, C., Guerra, D., Stewart, D. 2018. Sex-Determining Mechanisms in Bivalves. In: Leonard, J. (eds) Transitions Between Sexual Systems. Springer, Cham.
- Buddensiek V. 1995. The culture of juvenile freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. in cages: a contribution to conservation programmes and the knowledge of habitat requirements. Biological Conservation 74: 33–44.

- Cappelletti C, Cianfanelli S, Beltrami ME, Ciutti F. 2009. *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae): a new non-indigenous species in Lake Garda (Italy). *Aquatic Invasions*, 4: 685–688.
- Carrias A, Ran Ch, Williams MA, Capps N, Dan Bui C T, Newton JC, Kloepper JW, Ooi EL, Browdy CL, Terhune JS, Liles MR. 2012. Identification of *Bacillus* Strains for Biological Control of Catfish Pathogens.
- Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. 2014. Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol* 28(8):122–1238.
- Cranford PJ, Evans DA, Shumway SE. 2011. Bivalve filter feeding: variability and limits of the aquaculture biofilter. In *Shellfish Aquaculture and the Environment*, ed. SE Shumway, pp. 157–228. Chichester, UK: John Wiley & Sons
- Donrovich SW, Douđa K, Plechingerová V, Rylková K, Horký P, Slavík O, Sousa R. 2017. Invasive Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* threatens native mussel reproduction by inducing cross-resistance of host fish. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 27(6), 1325-1333.
- Douđa K, Haag WR, Escobar-Calderón F, Vodáková B, Reichard M, Chen X, Lopes-Lima M. 2021. Effects of in vitro metamorphosis on survival, growth, and reproductive success of freshwater mussels. *Biological Conservation*, 254, 108964.
- Evan Ward J & Shumway SE. 2004. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension and deposit feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300:83–130
- FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. 2018. FAO Annuaire. Statistiques des Pêches et de l'Aquaculture. Estadísticas de pesca y acuicultura. freshwatermussels of the United States and Canada. *Fisheries*18(9):6–22.
- Griffiths NA, & Cyr 2006. Are there hot spots for *Elliptio complanata* in the shallow littoral zone of a large Canadian Shield lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63:2137–2147.
- Haag WR. 2012. *North American Freshwater Mussels: Natural History, Ecology, and Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Haag WR, Culp JJ, McGregor MA, Bringolf R, Stoecke JA. 2019. Growth and survival of juvenile freshwater mussels in streams: Implications for understanding enigmatic mussel declines.
- Hastie LC & Young MR. 2003. Conservation of the freshwater pearl mussel. I: Captive breeding techniques. *Conserving Natura 2000 Rivers Conservation Techniques Series No. 2*, University of Aberdeen, Culterty Field Station, 26.

- Howard J & Cuffey KM. 2006. The functional role of native freshwater mussels in the fluvial benthic environment. *Freshwater Biology* 51: 460–474.
- Hruška J, 1992. The freshwater pearl mussel in South Bohemia: evaluation of the effect of temperature on reproduction, growth and age structure of the population. *Archiv für Hydrobiologie* 126: 181–191.
- Hyvärinen HSH, Chowdhury MMR, Taskinen J. 2021. Pulsed flow-through cultivation of *Margaritifera margaritifera*: Effects of water source and food quantity on the survival and growth of juveniles. *Hydrobiologia* 848, 3219–3229
- Cheng P, Zhou Ch, Chu R, Chang T, Xu J, Roger R, Paul Ch, Xiaojun Y. 2020. Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements, *Algal Research*,
- Ingersoll CG, Kernaghan NJ, Gross TS, Bishop CD, Wang N, Roberts A. 2007. Laboratory toxicity testing with freshwater mussels. In Farris, J. L. & J. H. van Hassel (eds), *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. SETAC Books, CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton: 95–149.
- IUCN. 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3.
- Jones JW, Mair RA, Neves RJ. 2005. Factors affecting survival and growth of juvenile freshwater mussels cultured in recirculating aquaculture systems. *North American Journal of Aquaculture*, 67(3), 210-220.
- Kim S, Jeon H, Han HS, Hur J W. 2021. Evaluation of *Bacillus albus* SMG-1 and *B. safensis* SMG-2 isolated from Saemangeum Lake as probiotics for aquaculture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Reports*, 20, 100743.
- Kiss Á. 1995. The propagation, growth and biomass of the chinese huge mussel (*Anodonta woodiana* 1834) in Hungary [PhD. Dissertation]. University of Agricultural Sciences of Gödöllő. Mad'arsko. Private Edition, Second Ed., 33 pp.
- Kongnum K & Hongpattarakere T. 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish Shellfish Immunol*.
- Kraszewski A & Zdanowski B. 2001. Distribution and abundance of the Chinese mussel *Anodonta woodiana* (Lea, 1834) in the heated Konin lakes. *Archives of Polish Fisheries*, 9: 253–265.

- Kraszewski A, Zdanowski B. 2007. *Sinanodonta wodiana* (Lea, 1834) (Mollusca) – a new mussel species in Poland: occurrence and habitat preference in a heated lake system. *Polish Journal of Ecology* 55(2): 337–356
- Kunz JL, Brunson EL, Barnhart MC, Glidewell EA, Wang N, Ingersoll GG. 2020. Pulsed flow-through auto-feeding beaker systems for the laboratory culture of juvenile freshwater mussels. *Aquaculture*.
- Lavictoire, L, Moorkens E, Ramsay A, Sweeting R. 2016. Effects of substrate size and cleaning regime on growth and survival of captive-bred juvenile freshwater pearl mussels, *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Hydrobiologia* 766: 89–102.
- Li RD, Li J, Zeng A, Cai GX, Tan ZJ. 2012. The dynamic change of microbes in stomach by ultra-micro Wuji pills in mice. *Chin J Microecol* 24(8):711–714.
- Li YK. 2010. Histology of stomach of *Anodonta woodiana* elliptica and effects of heavy metal copper on their structures. *Ecological Sci* 29(5):461–466.
- Lopes-Lima M, Burlakova LE, Karatayev AY, Mehler K, Seddon M, Sousa R. 2018. Conservation of freshwater bivalves at the global scale: diversity, threats and research needs. *Hydrobiologia*, 810(1), 1-14.
- Mcivor AL. 2004. Freshwater mussels as biofilters [PhD. Dissertation]. University of Cambridge, Cambridge, UK.
- McMahon RF & Bogan AE. 2001. Mollusca: Bivalvia. In J. H. Thorpe & A. P. Covich. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*, 2nd edn. Academic Press, 331–429.
- Meng XL, Li WJ, Nie GX. 2019. Effect of different factors on the fish intestinal microbiota. *J Fisheries China* 43(1):143–155.
- Newton TJ, Vaughn CC, Spooner DE, Nichols SJ, Arts MT. 2013. Profiles of biochemical tracers in unionid mussels across a broad geographical range. *Journal of Shellfish Research*, 32(2), 497-507.
- Nichols SJ, Silverman H, Dietz TH, Lynn JW, Garling DL. 2005. Pathways of food uptake in native (Unionidae) and introduced (Corbiculidae and Dreissena) freshwater bivalves. *Journal of Great Lakes Research* 31:87–96.
- Patterson M, Mair R, Eckert N, Gatenby C, Brady T, Jones J, Simmons BR, Devers J. 2018. *Freshwater Mussel Propagation for Restoration*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Ponnachan B, Dash N, Jaybhay P, Tiwari R. 2021. REVIEWING ISOLATION AND PRODUCTION OF PROBIOTICS. *International Journal of Medical and Biomedical Studies*. 5: 64-83
- Reiss J. 2003. The freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* (L)) (Bivalvia, Unionoida) rediscovered in Portugal and threats to its survival. *Biological Conservation*, 114:447–452.
- Sakata T. 1990. Microflora in the digestive tract of fish and shellfish. In: Lesel R (ed) *Microbiology of Poekilotherms*. Elsevier, Amsterdam, pp 217–223
- Savin-Amador M, Rojas-Contreras M, Arce-Amézquita PM, Rangel-Dávalos C, Vázquez-Juárez R. 2021. *Lactobacillus* strains isolated from oysters improve the production of *Crassostrea gigas* larvae. *Latin american journal of aquatic research*, 49(4), 551-564.
- Schartum E, Mortensen S, Pittman k, Jakobsen PJ. 2017. From pedal to filter feeding: ctenidial organogenesis and implications for feeding in the postlarval freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Journal of Molluscan Studies*.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
- Sicuro B, Mioletti S, Abete C, Amedeo S, Panini E, Forneris G. 2010. Potential utilisation of farmed freshwater mussels (*Anodonta anatina* and *Unio mancus*) in Italy.
- Sicuro B. 2015. Freshwater bivalves rearing: a brief overview. *Int Aquat Res* 7, 93–100
- Simon O, Vaníčková I, Bílý M, Douda K, Patzenhauerová H, Hruška J, Peltánová A. 2015. The status of freshwater pearl mussel in the Czech Republic: several successfully rejuvenated populations but the absence of natural reproduction. *Limnologia*, 50, 11-20.
- Simpson CT. 1896. The classification and geographical distribution of the pearly fresh-water mussels, *Proceedings of the United States National Museum*, vol. 18 (pg. 295-343)
- Strayer DL. 2008. *Freshwater Mussel Ecology: A Multifactor Approach to Distribution and Abundance*. Berkeley, CA: Univ. Calif. Press
- Tan K, Xu C, Long C. 2020. Association of microbiota in the stomach of *Sinanodonta woodiana* and its cultured soil. *3 Biotech* 10, 319.
- Vander Zander MJ, & Rasmussen JB. 1999. Primary consumer d13C and d15N and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology* 80:1395–1404

Vaughn CC, Nichols SJ, Spooner DE. 2008. Community and foodweb ecology of freshwater mussels. *Journal of the North American Benthological Society* 27: 41–55.

Vaughn CC. 2018. Ecosystem services provided by freshwater mussels. *Hydrobiologia* 810: 15–27.

Wächtler K, Dreher-Mansur MC, Richter T. 2001. Larval types and early postlarval biology in Naiads (Unionoida). In Bauer, G. & K. Wächtler (eds), *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida*. *Ecological Studies*, Vol. 145. Springer-Verlag, Berlin, 95–125.

Welker M & Walz N. 1998. Can mussels control the plankton in rivers? A planktological approach applying a Lagrangian sampling strategy. *Limnology and Oceanography* 43: 753–762.

Xu Q, Guo L, Xie J, Zhao C. 2011. Relationship between quality of pearl cultured in the triangle mussel *Hyriopsis cumingii* of different ages and its immune mechanism. *Aquaculture*, 315(3-4), 196–200.

Zhu TT, Tian CK. 2018. Analysis on microbial diversity in the sediments and its relationship with environmental factors in a reservoir. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis* 54(3):625–632.

