

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv těžkých kovů se zaměřením na měď na sladkovodní
mlže**

Bakalářská práce

Kateřina Dolejšová

Ochrana krajiny a využívání přírodních zdrojů

Ing. Karel Douda, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv těžkých kovů se zaměřením na měď na sladkovodní mlže" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce panu Ing. Karlu Doudovi, Ph.D. za zrealizování experimentu, poskytnutí užitečných rad a zkušeností. Dále bych ráda poděkovala Ing. Kateřině Gregarové za svůj čas a cenné připomínky k mé práci. Nemalé poděkování patří i M.Sc. Mehrak Mohammadi za vstřícnost a pomoc při experimentu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Ing. Laura Lamilla Tamayo za laskavost, ochotu a veškerou poskytnutou pomoc.

Vliv těžkých kovů se zaměřením na měď na sladkovodní mlže

Souhrn

Tato práce byla rozdělena do dvou částí, a to na rešeršní část a experimentální část. Literární rešerše se zaměřovala na sladkovodní mlže, zejména slávičku mnohotvárnou (*Dreissena polymorpha*), a na zástupce těžkých kovů – měď. V experimentální části se zkoumaly účinky mědi z hlediska chování na sladkovodního mlže *Dreissena polymorpha*.

Úvod teoretické části byl věnován shrnutí hlavních informací o sladkovodních mlžích týkajících se taxonomie, výskytu, vývoje a také morfologie a anatomie, především pak oblasti příjmu potravy a filtrace. Pro lepší pochopení jejich důležitosti zmiňovala rešerše také jejich hodnotu a funkci ve vodním ekosystému. Dále se práce zaměřila na charakteristiku nepůvodního druhu mlže *Dreissena polymorpha*, přiblížila tak jeho význam ve vodním prostředí a nastínila vlivy toxikantů, které se mohou v přírodě vyskytovat, jako je například měď. Na konci literární rešerše byly shrnuty klíčové poznatky právě tohoto těžkého kovu s následným zaměřením na jeho toxicitu.

Experimentální část práce na sladkovodním mlži testovala vliv mědi na jeho chování, jako je filtrační aktivita, pohyb, pozice, aktivita nohy, přichycení a respirace. Testováno bylo dvakrát 45 mlžů, na každou koncentraci vycházelo celkem 18 jedinců. Mlži byli vystaveni čtyřem koncentracím mědi a jedné kontrole po dobu 24 hodin, sledování probíhalo po třech a 24 hodinách. Bylo prokázáno, že testované koncentrace mědi měly na chování mlžů vliv, ale zároveň jim nezpůsobily žádnou mortalitu. Na základě provedené respirometrie je zřejmé, že mlži po vyndání z expozice byli schopni normálně respirovat. Testy také ukázaly, že koncentrace mědi v tomto experimentu zásadně neovlivnily filtrační schopnosti mlže *Dreissena polymorpha*. Hodnota EC50, při které přestalo 50 % jedinců v průběhu expozice filtrovat, byla při pozorování po třech hodinách 64,99 µg/l a po 24 hodinách se tato hodnota snížila na 55,97 µg/l.

Tato práce může být přínosem pro lepší pochopení vlivu mědi na chování sladkovodních mlžů. Budoucí výzkumy by se mohly zabývat jinými koncentracemi mědi a různými faktory, které mohou ovlivnit reakci mlžů na měď.

Klíčová slova: Bivalvia, těžké kovy, respirace, toxicita

Effect of heavy metals with focus on copper on freshwater bivalves

Summary

This work was divided into two parts: the literature review and the experimental section. The literature review described freshwater bivalves, more specifically, a zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and one of the heavy metals – copper. In the experimental section, the effect of copper on the behavior of freshwater mussel *Dreissena polymorpha* were investigated.

The introduction of the theoretical part summarized the main information on freshwater bivalves concerning taxonomy, occurrence, and development, as well as morphology and anatomy, especially the areas of food intake and filtration. For a better understanding of their importance, the research also mentioned their value and function in the aquatic ecosystem. Furthermore, the work focused on the characteristics of the non-native species *Dreissena polymorpha*, thereby bringing its importance closer to the aquatic environment and outlining the effects of toxicants that can occur in nature, such as copper. At the end of the literary research, the key findings of this particular heavy metal were summarized, with the consequent focus on its toxicity.

The experimental section of the work on freshwater mussel tested the influence of copper on its behavior, such as filtering activity, movement, position, foot activity, attachment and respiration. 45 bivalves were tested twice, a total of 18 individuals at each concentration. The bivalves were exposed to four concentrations of copper and one control for 24 hours, and the monitoring took place after three and 24 hours. It was proven that the tested concentrations of copper had an effect on the behavior of the bivalves, but at the same time, did not cause any mortality. Based on the respirometry performed, it was evident that the bivalves were able to respire normally after removal from the exposure. The tests also showed that the copper concentrations in this experiment did not significantly affect the filtering capabilities of the *Dreissena polymorpha*. The EC50 value, at which 50 % of subjects stopped filtering during exposure, was 64.99 µg/l after three hours and decreased to 55.97 µg/l after 24 hours.

This work may contribute to a better understanding of the effect of copper on the behavior of freshwater bivalves. Future research could look at other concentrations of copper and different factors that may influence the response of bivalves to copper.

Keywords: Bivalvia, heavy metals, respiration, toxicity

Obsah

1	Úvod	9
2	Cíl práce.....	10
3	Literární rešerše.....	11
3.1	Sladkovodní mlži	11
3.1.1	Výskyt.....	11
3.1.2	Morfologie a anatomie.....	11
3.1.3	Potrava a filtrace	12
3.1.4	Vývoj	13
3.1.5	Význam	13
3.2	Slávička mnohotvárná	14
3.2.1	Popis.....	14
3.2.2	Výskyt.....	14
3.2.3	Podmínky stanoviště	15
3.2.4	Rozmnožování	15
3.2.5	Vlastnosti	15
3.2.6	Vliv toxikantů	16
3.3	Měď'	17
3.3.1	Charakteristické vlastnosti	17
3.3.2	Využití	17
3.3.3	Biologické procesy	18
3.3.4	Toxicita	18
4	Metodika	20
4.1	Popis experimentu	20
4.2	Příprava experimentu	20
4.2.1	Jedinci	20
4.2.2	Materiál	20
4.2.3	Expozice.....	21
4.2.4	Stopery	21
4.3	Expozice	22
4.3.1	Příprava koncentrací	22
4.3.2	Respirometrie.....	22
4.3.3	Průběh experimentu	25
4.3.4	Pozorování chování.....	28
4.3.5	Měření odebraných vzorků vody	29
4.3.6	Vážení jedinců	29
4.3.7	Postup měření mědi	30

4.3.8	EC50 a Fisherův test.....	32
5	Výsledky	33
5.1	Chování	33
5.1.1	Podíl filtrujících jedinců	33
5.1.2	Podíl pozice jedinců.....	36
5.1.3	Podíl změny pozice.....	40
5.1.4	Podíl jedinců v aktivním pohybu	43
5.1.5	Podíl přichycených jedinců.....	44
5.2	Respirometrie	47
5.3	Vlastnosti mlžů	48
5.3.1	Hmotnost jedinců.....	48
5.4	Odebrané vzorky vody.....	49
6	Diskuze	51
6.1	Chování mlže	51
6.2	Respirometrie	52
6.3	Koncentrace mědi	52
7	Závěr.....	54
8	Literatura	55

1 Úvod

Sladkovodní mlži se vyskytují v systémech stojatých i tekoucích vod, jako jsou řeky, potoky, rybníky nebo nádrže (Beran 1998; Strayer 2017). Jsou pro nás velmi důležití, protože zastávají podstatné funkce ve vodním ekosystému, jako je například filtrace vody, zdroj potravy pro jiné organismy nebo schopnost odstraňovat z vody kontaminanty (Vaughn et al. 2008; Gomes et al. 2018; Zhang et al. 2020). Jejich využití je rozmanité, dále se používají třeba pro výrobní účely nebo k monitorování kvality vody (Vaughn 2018; Chmist et al. 2019).

Zvyšování antropogenní činnosti má negativní vliv na vodní ekosystém a způsobuje pokles počtu jedinců těchto živočichů (Strayer et al. 1999; Lopes-Lima et al. 2020). Největším ohrožením je pro ně znečištění vody, změna klimatu a v neposlední řadě degradace a fragmentace stanovišť (Dobler et al. 2022).

Významnými kontaminanty jsou těžké kovy, které se v přírodě vyskytují běžně, ale lidskou činností se jejich koncentrace ještě více zvyšuje (Singh et al. 2011). Jedním z běžně vyskytujících se těžkých kovů je měď (Gundacker 1999), což je kov, který může být toxický pro sladkovodní mlže, pokud je přítomen ve vysokých koncentracích (Cockell et al. 2008; Hong et al. 2010).

Měď může být uvolňována do sladkovodních ekosystémů ze zdrojů, jako je těžba, průmyslové činnosti a zemědělské odpady (Shrivastava 2009). Vystavení vysokým hladinám mědi může vést k řadě negativních účinků na sladkovodní mlže, včetně snížení rychlosti růstu a reprodukce, snížené krmné aktivity a zvýšené úmrtnosti (Dabi 2020; Tavares-Dias 2021). Toxicita mědi může také narušit imunitní systém mlžů, což je činí zranitelnějšími vůči nemocem a dalším stresorům (Dabi 2020; Tavares-Dias 2021). Stojí za zmínku, že rozsah a závažnost účinků mědi na sladkovodní mlže se může lišit v závislosti na řadě faktorů, jako je druh mlžů, věk a velikost jedince nebo délka a koncentrace expozice mědi. Kromě toho mohou účinky toxicity mědi zhoršit i další stresory prostředí, jako jsou změny teploty vody a úrovně pH (Jacobson et al. 1997; Çoğun & Kargin 2004; Malhotra et al. 2020).

Skutečnost, že teplota vody ovlivňuje toxicitu, dokazuje také studie Rao a Khan (2000), která testovala zvýšení toxicity mědi při vysoké teplotě na mlži *Dreissena polymorpha*. Právě tento invazní sladkovodní mlž je známý tím, že je velmi účinný při filtrování vody od znečištění a toxických látek, jako jsou například těžké kovy (Gomes et al. 2018). Výzkum Gundacker (1999) ukázal, že *Dreissena polymorpha* může ve svých tkáních akumulovat vysoké hladiny těžkých kovů, jako je měď, olovo, kadmium a zinek. Hromadění těžkých kovů v mlži může mít několik negativních účinků, jako jsou například narušení buněčných procesů nebo zapříčinění úhynu (Claudi et al. 2014; Le et al. 2021). Akumulace těžkých kovů v *Dreissena polymorpha* může být problémem jak pro ně samotné, tak i pro vodní ekosystém (Karatayev & Burlakova 2022). V souladu s tím, že je *Dreissena polymorpha* v řadě oblastí problematický invazivní mlž (Karatayev et al. 2002), má význam se zabývat toxicitou mědi i z hlediska potenciálního využití jako eradikační metody, jako tomu bylo u *Dreissena rostriformis bugensis* ve studii Watters et al. (2012).

2 Cíl práce

Cílem teoretické části práce bylo nejdříve analyzovat literaturu a shrnout poznatky o sladkovodních mlžích, konkrétně pak o slávičce mnohotvárné (*Dreissena polymorpha*) a o mědi, jejím výskytu a vlivu na organismy.

V experimentální části bylo cílem testovat hypotézu, zda měď ovlivňuje přežívání, chování, filtrační aktivitu a respirační aktivitu vodních organismů ve sladkých vodách. Specificky byl testován efekt mědi na slávičku mnohotvárnou (*Dreissena polymorpha*).

3 Literární rešerše

3.1 Sladkovodní mlži

Sladkovodní mlži je skupina měkkýšů žijících ve sladkých lotických a lentických systémech. Taxonomicky se zařazují mlži do kmene Mollusca a konkrétněji do třídy Bivalvia, která se dále dělí na 4 podtřídy, 12 řádů, 24 nadčeledí, 106 čeledí a 489 rodů. Tato taxonomie je v současné době nejaktuálnější verzí, uznávanou Integrated Taxonomic Information System (ITIS 2013), avšak naše určování fylogeneze mlžů se stále vyvíjí (Bogan 2008). V České republice se dělí sladkovodní mlži hlavně na dva základní řády, a to na Unionoida a Veneroida (Beran 2002).

3.1.1 Výskyt

Sladkovodní mlži se vyskytují v řekách, potocích, rybnících, nádržích nebo jiných sladkovodních systémech (Beran 1998; Strayer 2017). Až na Antarktidu je můžeme nalézt ve všech kontinentech světa (Bogan 2008). V České republice se mlži nachází z větší části v nížinách, ale některé druhy se objevují i v horských oblastech (Beran 1998). V našich podmínkách žijí mlži v hloubkách nepřesahující 1,5 metru, ve větší hloubce je najdeme pouze výjimečně (Beran 1998). Jsou zahrabáni v usazeninách dna a na hladinu se dostává jen okraj schránky mlže spolu s otvory pro přijímání a vyvrhování potravy (Beran 1998).

Česká republika je domovem několika druhů sladkovodních mlžů. Mezi nejhojněji rozšířené druhy se považuje například *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758) – škeble říční, *Musculium lacustre* (O. F. Müller, 1774) – okrouhlice rybničná nebo *Pisidium casertanum* (Poli, 1791) – hrachovka obecná. Tito mlži se nacházejí v řekách, potocích a jezerech po celé zemi (Beran 2002). Hojný výskyt jiných druhů je velmi ovlivňován časovým horizontem, prostorem či oblastí (Beran 1998). Méně časté druhy se u nás označují jako vzácné. Pokládají se za ně například *Pseudanodonta complanata* (Rossmáessler, 1835) – škeble plochá, *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758) – velevrub malířský nebo *Unio crassus* (Philipsson, 1788) – velevrub tupý (Beran 2002).

3.1.2 Morfologie a anatomie

Tělo mlžů je souměrné. Skládá se z trupu a nohy (Beran 1998). Hlava byla redukována (Bogan 2008). Trup pozvolna přechází do svalnaté nohy. Ta může být klínovitá, protáhle jazykovitá nebo stlačená ze stran (Beran 1998). Mlž ji potřebuje k pohybu nebo hrabání, u některých přisedlých druhů může být i redukována (Simone et al. 2015). Pohyb je velmi pomalý. Proti proudu se může většina mlžů aktivně pohybovat při rychlosti nižší, než je sto metrů za rok (Kappes & Haase 2012).

Tělo je chráněno schránkou, která je složena z uhličitanu vápenatého (Bogan 2008). Schránku mlžů vytvářejí dvě souměrné lastury, které se pojí pružným konchinovým vazem. Podle jeho polohy můžeme určit, kde se nachází přední a zadní strany lastur (Beran 1998). Vnitřní strany obou lastur jsou vystlány plášťovými lupeny, jejichž okraje spolu se žlázami a jemnými svaly vytvářejí zesílený lem (Beran 1998). Na hřbetní straně se nachází plášť, který je s ostatním tělem srostlý (Beran 1998).

Povrch lastur je rýhovaný a barevně zpravidla nepříliš výrazný (Beran 1998). Významným aspektem pro určování schránek je zámek, díky němuž se zevnitř mohou spojit obě lastury. Zámek může být jak ozubený, tak i bezzubý (Beran 1998). Pomocí předního a zadního svěracího svalu je mlž schopen lastury otevírat nebo zavírat (Beran 1998). Tvar a pevnost schránky se odvíjí nejen podle druhu určitého mlže, ale i podle stanoviště, ve kterém jedinec přebývá. Mlži, kteří žijí zahrabaní v substrátu, mají mnohdy tvrdší schránku na rozdíl od mlžů, kteří jsou přisedlí na povrchu (Bogan 2008).

Srdce mají mlži jednodukomorové se dvěma souměrnými předsíněmi, pod srdcem se nacházejí párové ledviny nazývané Bojanův orgán (Beran 1998). Nervová soustava je jednoduchá, nervové uzly se nachází především kolem úst a v noze (Beran 1998). Naši mlži nemají oči nebo tykadla, jako smyslový orgán využívají statocysty (Beran 1998). Pohlavní soustava mlžů je také řešena jednoduše, pohlavní žlázy se nachází v noze (Beran 1998).

3.1.3 Potrava a filtrace

Sladkovodního mlže můžeme nazývat jako všežravce (Vaughn et al. 2008). Živí se totiž jak drobným planktonem, jako jsou prvoci či řasy, tak i jemnými odumřelými částmi živočichů a rostlin čili detritem (Beran 1998). Bylo vyzorováno, že mlži si jsou schopni mezi potravou vybírat. Třídění a výběr závisí na velikosti a kvalitě částic, roli mohou hrát i další fyzikální a chemické faktory (Evan Ward & Shumway 2004). Uvádí se, že mlži jsou schopni zachytit částice o velikosti v rozmezí od 1 μm do 750 μm (Burlakova et al. 2022).

Mlži získávají potravu filtrováním vody pomocí žaber (Vaughn et al. 2008). Do žaber se dostává ústy, která jsou na předním úpatí nohy (Beran 1998). Po filtraci potrava putuje dále do trávicí soustavy pomocí střeva, které se poté obrací jako konečník do hřbetní části trupu a dále vyústí rítním otvorem do horní komory nacházející se v zadní části žaberní dutiny (Beran 1998). Valná většina mlžů má v žaludku krystalové těleso, což je trávicí sekret v pevné podobě (Beran 1998).

Sladkovodní mlži mají dva páry žaber (Bogan 2008). Naši mlži využívají k dýchání žábry, které vypadají jako párovité souměrné lupeny s mřížkovitou stavbou. Na každé straně můžeme najít takové lupeny dva, jeden je vnější a druhý vnitřní (Beran 1998).

Rychlost filtrace sladkovodních mlžů se liší v závislosti na několika vnějších faktorech, jako je teplota vody, koncentrace a velikosti filtrovaných částic nebo také průtok vody. Důležitá je také i velikost a druh mlže (Vaughn & Hakenkamp 2001). Některé druhy mají větší filtrační schopnost v porovnání s jinými, jako třeba *Corbicula fluminea* (Castro et al. 2018). V souvislosti s teplotou vody bylo pozorováno, že rychlost filtrace při nízké teplotě rapidně klesá a při vysoké teplotě dochází k postupnému zpomalování (Reeders & bij de Vaate 1990). Například nejideálnější teplota vody pro maximální rychlost filtrace mlže *Dreissena polymorpha* se pohybuje okolo 10 až 20 °C (Fanslow et al. 1995). Velkou roli při rychlosti filtrování může hrát i věk daného mlže. Ukázalo se, že největší mlž druhu *Dreissena polymorpha* prováděl filtraci pomaleji než jedinci stejného druhu o menší velikosti (Reeders & bij de Vaate 1990).

3.1.4 Vývoj

Co se týče rozmnožování, mlži jsou gonochoristé nebo hermafrodité, závisí na druhu (Breton et al. 2018). U nás se mlži obvykle rozmnožují uvolňováním spermií do volné vody, kde jsou poté nasáty samicí a dochází tak k oplození vajíček uvnitř těla samice (Beran 1998). Počet larev sladkovodních mlžů (glochidií) produkovaných jednotlivým sladkovodním mlžem může dosahovat až stovek tisíc (Beran 1998). Než se mlž stane dospělcem, prochází životním cyklem, který zahrnuje hned několik fází. Po oplodnění se vajíčko přeměňuje v larvu (glochidium) a přichycuje se na patřičnou hostitelskou rybu, na které je larva závislá. Zde dochází k dalšímu vývoji. Toto stádium je ukončeno po odpadnutí z hostitele a vyvinutí se do podoby dospělého mlže (Beran 1998; Benedict & Geist 2021).

Věk sladkovodních mlžů není u všech stejný. Někteří mlži se dožívají pouze několika let, ale jsou i tací, kteří žijí více než sto let (Beran 1998).

Sladkovodní mlži jsou vysoce ohrožováni lidskou činností (Lopes-Lima et al. 2014). Důvodem tohoto ohrožení a možností vyhynutí určitých druhů je hlavně ničení a přestavování stanovišť, na kterých se mlži nacházejí (Bogan 2008; Lopes-Lima et al. 2018). Mezi další aspekty úbytku mlžů se řadí znečištění, oteplování a změna klimatu, nadměrné využívání mlžů, snížení populací potřebných rybích hostitelů nebo invazivní druhy (Bogan 1993; Beran 2019; Dobler et al. 2022). Lidské chování může mít dlouhodobě či trvale negativní vliv na celkový vodní ekosystém (Strayer et al. 1999).

3.1.5 Význam

Sladkovodní mlži zastávají mnoho důležitých rolí ve vodních ekosystémech (Vaughn 2018; Zhang et al. 2020). Jednou z nejdůležitějších rolí sladkovodních mlžů je jejich schopnost filtrovat vodu. Tento proces může mít významný pozitivní dopad na kvalitu vody, protože může snižovat zákal a hladinu nečistot ve vodě (Beran 1998; Gomes et al. 2018). Kromě toho poskytují také důležité stanoviště a zdroje potravy pro řadu dalších vodních organismů, jako třeba bezobratlí (Vaughn et al. 2008; Burlakova et al. 2022).

Mlži hrají také hlavní roli ve strukturování vodního společenstva. Zejména, pokud se jedná o nepůvodní invazní mlže, kteří svojí dominancí obývané stanoviště homogenizují (Ilarri et al. 2018). Negativním důsledkem homogenizace je například pokles či ztráta původních druhů nebo narušování dlouhodobých procesů ve společenství a v ekosystému (Bogan 1993; Karatayev et al. 2002).

Mezi další stěžejní činnosti mlžů se uvádí například čerání vody, koloběh živin nebo potlačování patogenů (Strayer 2017). Jejich biofiltrační a bioakumulační schopnosti umožňují odstraňovat kontaminanty z vody i z odpadních vod. Důsledkem toho je dezinfekce vody, odstraňování živin pro obnovu eutrofizace nebo snižování organických a kovových kontaminantů (Gomes et al. 2018).

Důležité je i zmínit, jakou funkci mlži zastávají přímo pro člověka. Kromě svých ekologických rolí mohou mít také ekonomický a kulturní význam. Některé druhy jsou pro lidi důležitými zdroji potravy, materiálem pro výrobu nástrojů a šperků nebo se využívají v duchovnu (Vaughn 2018). Mlži se také využívají při monitorování kvality vody (Chmist et al. 2019).

3.2 Slávička mnohotvárná

3.2.1 Popis

Slávička mnohotvárná neboli *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) je v České republice nepůvodní sladkovodní mlž, který patří do podtřídy Heterodonta, řádu Myida, nadčeledě Dreissenoida, čeledě Dreissenidae Gray, rodu *Dreissena* van Beneden (Beran 2002; Ludovisi et al. 2022).

Tohoto mlže můžeme poznat podle trojúhelníkového tvaru lastury se špičatým vrcholem, stěny lastur jsou silné a pevné. Lastura má typicky hnědou nebo žlutošedou barvu s proužky světlých a tmavých barev a má zcela bezzubý zámek (Beran 1998). *Dreissena polymorpha* dorůstá délky 2 až 5 cm, výšky 1 až 2,5 cm a tloušťky 1,5 až 3 cm (Uličný 1892). Rychlost růstu závisí na podmínkách, ve kterých se nachází. Jedná se například o teplotu a rychlost proudu vody, dostupnost a kvalitu potravy, hloubku nebo roční období (Karatayev & Burlakova 2022). Okraje plášťových lupenů má tak srostlé, že ponechává pouze tři volné otvory. Vepředu dole je otvor pro nohu. Zbývající dva trubicovitě vytažené otvory jsou vzadu, horní je pojmenován jako anální a spodní jako branchiální, označují se jako sifony (Beran 1998).

Dalším poznávacím znamením je, že se dokáže přichytit na jakýkoliv pevný povrch (Beran 1998). Přichycuje se k němu pomocí byssových vláken a dokáže tak vytvořit trojrozměrné útesové struktury (Karatayev & Burlakova 2022). Na sladkovodního mlže může vytvářet až nevídaně husté kolonie (Karatayev & Burlakova 2022).

3.2.2 Výskyt

Slávička mnohotvárná byla nalezena v řece Ural roku 1769 německým zoologem a botanikem Peterem Simonem Pallasem (Karatayev & Burlakova 2022). *Dreissena polymorpha* se vyskytovala v povodí řek ústících do Kaspického, Černého a Azovského moře. V této oblasti se nachází státy jako jsou Maďarsko, Rumunsko, Bulharsko, Turecko, Ukrajina, Moldavsko, Rusko, Kazachstán, Írán, Turkmenistán a Uzbekistán (Karatayev & Burlakova 2022). Díky postavení kanálu mezi Baltským a Černým mořem se následně rozšířila i do dalších destinací. Rozšíření probíhalo zejména pomocí lodní dopravy, kdy se mlž přichytil ke trupu lodi či k voru (Karatayev & Burlakova 2022). Od té doby se slávička mnohotvárná stala invazním druhem v Evropě a severní Americe, kde se rychle rozšířila (Karatayev & Burlakova 2022).

V České republice byla poprvé objevena v řece Labi v okolí města Ústí nad Labem (Beran 2002). Mohla se ale zřejmě již původně vyskytovat v povodí řeky Moravy (Beran 1998). Tento druh se nachází ve vodních tocích, nádržích a vodních plochách, které vznikaly kvůli těžbě (Beran 2002). Typickou nadmořskou výškou je rozmezí 150–200 metrů (Beran 2002). V současnosti se nachází převážně v našich největších řekách, jako je Labe a Morava (Beran 2018).

Šíření slávičky mnohotvárné má negativní dopady na původní sladkovodní mlže a další vodní druhy, protože může měnit potravní síť a snížit tak dostupnost potravy pro jiné vodní organismy. Považuje se proto za jednoho z nejagresivnějších sladkovodních organismů. Je schopna také narušit koloběh živin a způsobit změny ve složení vody (Burlakova et al. 2022; Karatayev & Burlakova 2022).

3.2.3 Podmínky stanoviště

Původně pochází z mořského prostředí, ale dokázala se přizpůsobit brakickým a sladkovodním vodám (Karatayev & Burlakova 2022). Dobře se jí žije ve sladkovodním prostředí nebo v oblastech do výše 5‰ salinity (Walton 1996). Má schopnost se rychle rozmnožovat a díky tomu rozšiřovat své místo výskytu (Beran 1998; Karatayev & Burlakova 2022). Pro přichycení preferuje *Dreissena polymorpha* stinná místa bez zvýšené intenzity světla (Kobak & Nowacki 2007).

Co se týče teploty vody, dokáže řadu teplot tolerovat (Paukstis et al. 2011). Zvýšení teploty má však vliv na energetické zásoby, oxidační stres, imunitní funkce nebo aktivitu mlže, jako je například filtrační schopnost (Weber et al. 2020). Spodním teplotním limitem je bod mrazu, existují však případy, ve kterých malé procento tohoto mlže vystaveného teplotě $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ přežilo (Paukstis et al. 2011). Horní hranice teploty vody, kterou *Dreissena polymorpha* akceptuje, se pohybuje okolo 29 a 32 $^{\circ}\text{C}$ (Garton & Johnson 2000). Je schopná také tolerovat nízkou hladinu kyslíku a vysoký průtok vody (Karatayev et al. 1998).

Mezi hlavní přirozené nepřátele patří ryby, ptáci a parazité (Karatayev & Burlakova 2022). Ohrozit ji může i znečištění (Beran 1998). Dožívá se zhruba rozmezí 3 až 19 let (Karatayev et al. 2006; Pollux et al. 2010).

3.2.4 Rozmnožování

Dreissena polymorpha je jednopohlavní sladkovodní mlž. Kromě samotného pohlaví má také jedinečnou reprodukční strategii, kdy k oplození vajíček pomocí spermií dochází ve volné vodě (Beran 1998). Reprodukční cyklus je ovlivněn faktory prostředí, jako je teplota vody a dostupnost potravy, může se také lišit v závislosti na specifických podmínkách stanoviště (Stoeckel et al. 2004). Po oplození vajíčka dochází k nepřímému vývoji, který prochází přes několik plovoucích larválních stádií zvaných veliger. Nakonec se přeměňuje na malou slávičku a přichytává se byssovými vlákny na pevný povrch (Beran 2018). Tento životní cyklus je typický pro mořské druhy mlžů (Karatayev & Burlakova 2022).

3.2.5 Vlastnosti

V mnoha případech měla invaze slávičky mnohotvárné negativní dopady na sladkovodní ekosystémy, jako vytlačení původních druhů, změna potravní sítě a snížení kvality vody filtrováním velkého množství fytoplanktonu z vody, což může vést ke snížení hladiny kyslíku a změnám koloběhu živin. Může také způsobit ucpání potrubí pro přívod vody a poškodit vodní infrastrukturu, což má za následek značné ekonomické náklady (Karatayev et al. 2006; Strayer 2009; Gomes et al. 2018; Burlakova et al. 2022; Karatayev & Burlakova 2022).

Kromě toho má *Dreissena polymorpha* přímý vliv na ostatní organismy žijící ve sladkovodním prostředí, jako například podporu rozšíření. Tato jejich vlastnost byla například popsána ve studii Vanderploeg et al. (2001), kde má mlž v důsledku selektivního výběru potravy vliv na přemnožení toxických sinic *Microcystis aeruginosa*, což má následně negativní vliv na ostatní organismy.

Na druhou stranu má *Dreissena polymorpha* mnoho vlastností, které pozitivně ovlivňují ekosystém a živočichy v něm žijící. Mezi pozitivní vlastnosti můžeme zařadit filtrační

schopnosti, pomocí kterých čistí vodu od organického znečištění a toxických látek, včetně těžkých kovů (Gomes et al. 2018). Nejen díky těmto schopnostem se *Dreissena polymorpha* využívá k monitorování chemického znečištění ve vodním prostředí (Binelli et al. 2015; Gomes et al. 2018). Kromě svých významných filtračních schopností je tento mlž známý také svým sociálním chováním. Bylo pozorováno, že *Dreissena polymorpha* vytváří husté shluky, což jsou velké skupiny jedinců držících pohromadě, které následně slouží jako vhodné stanoviště pro jiné organismy, jako jsou například bezobratlí. Ti ho využívají jako útočiště před predátory nebo negativními vlivy prostředí (Karatayev & Burlakova 2022).

3.2.6 Vliv toxikantů

Sladkovodní ekosystémy čelí rostoucímu tlaku řady toxických látek (Donnachie et al. 2016). Tyto toxické látky mohou mít významné účinky na fyziologii a chování sladkovodních mlžů, jako je *Dreissena polymorpha*. Několik experimentů sledovalo vliv různých kontaminantů, jako třeba pesticidů, léčiv nebo právě těžkých kovů na ekologii slávičky mnohotvárné. (Kraak et al. 1994; Marie et al. 2006; Faria et al. 2009; Contardo-Jara et al. 2011).

Dreissena polymorpha se uvádí jako vhodný organismus pro zkoumání dopadu pesticidů v životním prostředí (Bashnin et al. 2019). Pesticid je považován za chemickou látku, kterou využíváme k odstranění různých škůdců, jako hmyz, plevel, hlodavci nebo i bezobratlí (Chmist et al. 2019). Do vody se pesticidy dostávají záměrně jako herbicidy, algicidy nebo moluskocidy, tím však mohou neúmyslně působit i na jiné další organismy (de Oliveira-Filho et al. 2004; Willis & Bishop 2016). Větší množství pesticidů ve vodě může zásadně ovlivnit nejrůznější ekologické procesy a zároveň i větší úmrtnost původních živočichů a rostlin (Chmist et al. 2019). Právě mlži jsou jedním z nejvíce ohrožených organismů, protože filtrují vodu a s pesticidy se dostávají do přímého kontaktu (Chmist et al. 2019).

Intenzita vlivu pesticidu na mlže je přímo závislá na době expozice a druhu pesticidu, což potvrdila studie Dauberschmidt et al. (1996), kde byla *Dreissena polymorpha* vystavena po dobu 96 hodin čtyřem organofosfátům, přičemž se ukázalo, že je velmi odolná vůči toxickým účinkům organofosfátových insekticidů. Avšak ve studii Serdar (2021) se jako testovací látka využíval insekticid cyfluthrin a ukázalo se, že vůči němu nebyla již tolik odolná a způsoboval jí větší oxidační poškození.

Oproti pesticidům můžeme těžké kovy nalézt běžně v přirozeném prostředí, člověk však svými činnostmi může přírodu dále těžkými kovy kontaminovat (Singh et al. 2011). Jedním z příkladů znečištění je doprava, průmysl nebo zemědělství (Alloway 2013).

Mlži nejsou vůči vlivu těžkých kovů zcela odolní. Těžké kovy se mohou hromadit v tkáních mlžů, což vede k toxickým účinkům na jejich fyziologii a chování (Kraak et al. 1994). Ve studii Kraak et al. (1994) se uvádí, že při prodloužení doby působení zinku a olova na *Dreissena polymorpha* došlo ke snížení filtrace. Také se ukázalo, že přežití jedince závisí nejen na koncentraci daného kovu, ale i na rychlosti filtrace a následnému nahromadění neboli akumulaci v živočichovi (Kraak et al. 1994). Účinky toxicity závisí na době expozice i na konkrétním kovu. Například již zmiňovaný zinek vyfiltrovala *Dreissena polymorpha* za 24 hodin v mnohem větším množství než nikl. Zinek následně vylučovala z těla ven, zatímco se většina niklu hromadila v jejím těle. Tento rozdíl by měl být časem pravděpodobně ještě více výrazný (Klerks & Fraleigh 1997).

Každý kov se může akumulovat mimo jiné na rozdílných místech. Následující studii Gundacker (1999) použil *Dreissena polymorpha* jako indikátor těžkých kovů, konkrétně byla vystavena kadmium, olovu, mědi a zinku. Kadmium se v mlži ukládalo převážně v měkkých částech těla. Oproti tomu se zbývající kovy (olovo, měď a zinek) nejvíce vyskytovaly v byssových vláknech. Vylučování kovů pomocí byssového komplexu, který se skládá z byssové žlázy a byssových vláken, může být prevencí proti toxickým účinkům kovů (Gundacker 1999). Také bylo pozorováno, že pokud je mlž vystaven jednomu kovu, mohou být účinky toxicity na mlže nižší, než za přítomnosti více kovů (Timpano et al. 2022).

Další těžký kov, kterým může být *Dreissena polymorpha* negativně ovlivněna, je měď. Studie Kraak et al. (1992) uvádí, že chronická koncentrace EC₅₀ mědi je 43 µg/l po týdnu mlže v expozici. Měď může ovlivnit fyziologii slávičky mnohotvárné narušením buněčných procesů, jako je třeba aktivita enzymů a regulace iontů (Le et al. 2021).

Vystavení *Dreissena polymorpha* vysokým hladinám mědi může vést k řadě negativních účinků, jako je například vysoká mortalita. Tuto skutečnost uvádí i Claudi et al. (2014) ve své studii, kde mimo jiné poukazuje na významný vliv času expozice a teplotě vody na negativní účinky mědi. Zvýšení teploty vody může způsobovat vyšší toxicitu mědi a zároveň vyšší rychlost respirace *Dreissena polymorpha*, což způsobuje větší úmrtnost mlže (Rao & Khan 2000).

3.3 Měď

3.3.1 Charakteristické vlastnosti

Měď má načervenalou barvu a přirozeně se vyskytuje v horninách, půdě, sedimentech, ve vodě i ve vzduchu. Nalezneme ji i ve všech rostlinách a v živočiších. Do životního prostředí se může také dostat pomocí odpadních vod, skládek, spalování fosilních paliv a odpadů nebo výrobou dřeva či fosfátových hnojiv. V přírodě se může nacházet i v čisté formě, proto je řazena společně se zlatem a stříbrem mezi ušlechtilé kovy (Dorsey et al. 2004).

Koncentrace se v nekontaminovaných vodních útvarech, jako jsou řeka nebo jezero, může vyskytovat v rozmezí od 0,5 µg/l do 1000 µg/l, přičemž průměrná koncentrace činí 10 µg/l (Dorsey et al. 2004). Avšak Willis a Bishop (2016) ve své studii uvádějí, že se ve vodních ekosystémech měď nachází obvykle v koncentracích 0,2 µg/l až 30 µg/l. Měď se objevuje mimo jiné i v našich potravinách a nápojích, včetně pitné vody. Každý den pozřeme zhruba 1000 mikrogramů mědi (Dorsey et al. 2004).

Měď je díky svým chemickým a fyzickým vlastnostem považována jako jeden z nejdůležitějších kovů (Dorsey et al. 2004). Považuje se také za třetí nejvíce používaný kov na světě, protože je to vysoce tažný a tvárný kov, který je dobrým vodičem tepla a elektřiny (Go et al. 2021).

3.3.2 Využití

Měď je všestranný kov, který lidé používají hlavně díky jeho vlastnostem (Go et al. 2021). Běžně se využívá pro různé účely, třeba jako stavební materiál (dráty, plechy, trubky) nebo mince. Používáme ji i při výrobě slitin bronzu nebo mosazi (Dorsey et al. 2004). Mezi sloučeniny mědi patří přirozeně vyskytující se minerály, ale i vyrobené chemikálie. Mnoho

takových sloučenin můžeme poznat podle modrozelené barvy (Dorsey et al. 2004). Sloučeniny mědi jsou využívány především v zemědělství (Flemming & Trevors 1989; de Oliveira-Filho et al. 2004). Používají se jako postřiky proti chorobám rostlin (např. plíseň), na úpravu vody, jako doplněk stravy nebo také jako konzervant dřeva, kůže či tkanin (Dorsey et al. 2004; Willis & Bishop 2016). Největší význam ze sloučenin mědi má síran měďnatý, protože může být rozpuštěn ve vodě a aplikován přímo na postižená místa (Dorsey et al. 2004). Jeho nevýhodou je, že při nadměrném používání může mít negativní dopady na životní prostředí, jako je například poškození necílových vodních druhů (Dorsey et al. 2004).

3.3.3 Biologické procesy

Kromě využití v průmyslu a obchodu má měď několik důležitých biologických funkcí. Je základní mikroživinou pro lidi a zvířata (Hong et al. 2010). Vyskytuje se také v mnoha důležitých enzymech, které se podílejí na životně důležitých biologických procesech, například růst a vývoj jedince (Gaetke 2003).

Měď je stopovým prvkem, který se vyskytuje v mozku, játrech a ledvinách. Kvůli své velikosti obsahují kosti a svaly více než polovinu mědi v těle (Collins & Klevay 2011). Do krevního oběhu se dostává velmi rychle a trvá pak několik dní, než se převážně pomocí stolice vylučuje z těla ven (Dorsey et al. 2004). Měď hraje mimo jiné důležitou roli při tvorbě červených krvinek, udržování imunitního systému a zdraví kostí (Dorsey et al. 2004). Je také důležitou živinou pro rostliny, kde je součástí fotosyntézy a dalších metabolických procesů (Yruela 2005).

3.3.4 Toxicita

Měď však nemá pouze pozitivní vlastnosti, ale může být ve vysokých koncentracích toxická pro různé organismy (Cockell et al. 2008; Hong et al. 2010). Například u člověka můžeme zaznamenat příznaky toxicity při požití více než 1 gramu mědi (Sinkovič et al. 2008). Ve vodním prostředí může být měď zavedena z přírodních zdrojů, jako jsou ložiska nerostů, nebo z lidských činností, jako je těžba, zemědělství a průmysl (Shrivastava 2009). Měď se může hromadit v sedimentech řek a jezer, rostlinách a zvířatech. Některé sloučeniny mědi se mohou dostávat i do podzemních vod (Dorsey et al. 2004).

Kromě toho se měď může hromadit i ve tkáních vodních organismů (Çoğun & Kargin 2004). Může tak představovat vážné riziko pro lidi, kteří konzumují kontaminované vodní organismy (Dabi 2020). Dlouhodobé vystavení vysokým hladinám mědi může u člověka způsobit poškození jater či ledvin a v závažných případech může být toxicita mědi i smrtelná (Dorsey et al. 2004; Singh et al. 2011). Člověk může zemřít již při požití 10 gramů mědi (Gamakaranage et al. 2011).

Měď může být toxická nejen pro lidi, ale i pro vodní organismy, jako jsou například ryby a bezobratlí (Naimo 1995; Çoğun & Kargin 2004; Go et al. 2021). Vliv mědi na vodní organismy se odvíjí od různých faktorů (de Oliveira-Filho et al. 2004). Důležitá je především doba, po kterou je organismus mědi vystaven. Také záleží například na teplotě a tvrdosti vody, věku jedince a v neposlední řadě na pH vody (Jacobson et al. 1997; Çoğun & Kargin 2004; Malhotra et al. 2020). Bylo pozorováno, že při nízkém pH je akumulace mědi vyšší (Çoğun & Kargin 2004).

Toxicita mědi může způsobit řadu negativních účinků na vodní organismy, včetně snížení růstu, reprodukce a přežití (Dabi 2020). Například studie Jorge et al. (2013) zjistila, že vystavení koncentracím mědi 12 µg/l po dobu 28 dnů mělo za následek významnou úmrtnost juvenilního mlže *Lampsilis siliquoidea*. Zjistilo se také, že čím mladší jedinci jsou, tím mohou být na expozici citlivější oproti starším jedincům (Kennedy et al. 2006). Studie Jacobson et al. (1997) uvádí, že smrtelná koncentrace mědi u glochidií sladkovodních mlžů je v laboratorních podmínkách přibližně 40–80 µg/l.

Měď může mimo jiné také ovlivnit chování, například při krmení nebo plavecké aktivitě (Tavares-Dias 2021). Plaveckou aktivitou se zabývali ve studii Boukadida et al. (2022), kde se zkoumal vliv mědi na rychlost a trajektorii plavání larvy mlže *Mytilus galloprovincialis*. Kromě toho je měď také schopna u mlžů způsobovat oxidační stres (Gomes et al. 2011). Jako další negativní účinek mědi se považuje i ovlivňování činnosti mozku nebo poškozování řady orgánů a systémů, jako jsou žábry, játra nebo imunitní systém (Dabi 2020).

4 Metodika

4.1 Popis experimentu

V tomto experimentu byly testovány účinky mědi na sladkovodního mlže *Dreissena polymorpha*. Měď byla zastoupena v několika různých koncentracích. Účinky byly pozorovány na respirometrii a chování mlže. Samotný experiment trval pět dní. Další dny byly měřeny hodnoty mědi z odebraných vzorků.

4.2 Příprava experimentu

4.2.1 Jedinci

Dreissena polymorpha byla nasbírána v České republice dne 15. listopadu 2022 v lokalitě Labe-Libotenice. Do laboratoří ČZU byli jedinci přivezeni ve vodě z původní lokality. Poté byli rozděleni zhruba ve stejném počtu a umístěni do dvou plastových nádrží. Ty byly naplněné říční vodou ze 75 % a zbývajících 25 % obsahovala odstátá kohoutková voda. Tato voda byla předem připravena v provzdušňovací nádrži o objemu 220 litrů, ze které se poté využívala na ředění vody v nádrži a také byla použita při samotném experimentu. Důvodem tohoto ředění bylo aklimatizování živočichů na vodu, která byla využita při experimentu. Následující den se voda skládala z 50 % z říční vody a druhá polovina opět z připravené kohoutkové vody. Další den byla poměrově voda stejná jako první den, ale větší část zastávala odstátá voda. Již navazující den byli mlži pouze ve vodě určené k experimentu.

Voda v aklimatizačních nádržích měla teplotu 12,9 °C a 13,4 °C. Teplota byla v obou nádržích každý den měřena a zaznamenávána. Při teplotě 20 °C se odehrával experiment, a proto bylo cílem vodu postupně navýšit právě na tuto teplotu. Ve dny vložení mlžů do připravených kádinek na experiment voda dosahovala vždy teplot 17,5 °C a 17,8 °C. Před vložení jedinců do expozice byli vybraní jedinci zhruba půl hodiny aklimatizováni ve sběrných nádobách ve vodě z nádrže na místě, kde se prováděl experiment.

Každý den byli jedinci v nádržích také krmeni. Krmení probíhalo vždy až po výměně vody, aby nedošlo k neúmyslnému odebrání potravy pomocí odstranění staré vody. Na jednu nádrž byly aplikovány 2 ml krmiva značky Easy Reefs Easybooster PROF. Mlži, kteří byli v expozici, nebyli již během experimentu krmeni.

Zaznamenávána byla i vizuální kontrola kondice mlžů v plastových nádržích. Byla na nich pozorována aktivita a pohyb. Průměrně se 20 až 30 jedinců přichycovalo na okraj nádrže. Viditelně uhynulí jedinci byli odstraňováni.

4.2.2 Materiál

Zdrojovým toxikantem byla měď. Konkrétně se jednalo o Copper(II) sulfate, ReagentPlus®, ≥ 99% číslo C1297-100G od dodavatele Sigma-Aldrich. Byly zvoleny čtyři cílové koncentrace, a to 20 µg/l, 35 µg/l, 50 µg/l a 100 µg/l mědi.

Měď byla odvážena na analytické váze BXX 22 od výrobce BOECO Germany a podle navážené hmotnosti byla poté opakovaně ředěna odstátou kohoutkovou vodou na požadované koncentrace.

4.2.3 Expozice

Před začátkem samotného experimentu bylo zapotřebí připravit expozici. Plocha stolu byla podložena dvěma vrstvami filtračního papíru. Jako nádoby, ve kterých byla po dobu experimentu uložena *Dreissena polymorpha*, se zvolily krystalizační misky bez výlevky značky SIMAX o kapacitě 200 ml a průměru 95 mm. Misky byly řádně vymyty a vytřeny do sucha. Následně byly popsány lihovou fixou pro lepší manipulaci a rozlišení. Poté se rozestavěly do pěti sloupců po třech řádcích na filtrační papír. Mezi nádobami se dělal záměrně mírný rozestup. Do prostředního řádku byly misky umístěny v opačném pořadí než zbývající dva řádky. Názorné schéma přibližuje Tabulka 1. K prostřednímu sloupci byla přidána další nádoba naplněná čistou odstátou kohoutkovou vodou, ve které bylo umístěno čidlo na měření teploty.

Tabulka 1 Znázorňuje podobu umístění a označení jednotlivých krystalizačních misek s jednotlivými koncentracemi roztoků mědi v expozici. Jako první je uváděna koncentrace, poté následuje označení řady. C = kontrola (odstátá kohoutková voda), 20 = 20 µg/l mědi, 35 = 35 µg/l mědi, 50 = 50 µg/l mědi, 100 = 100 µg/l mědi

C_1	20_1	35_1	50_1	100_1
100_2	50_2	35_2	20_2	C_2
C_3	20_3	35_3	50_3	100_3

Z hliníkové fólie se připravily obdélníky, kterými se pečlivě ze svrchu zakryly všechny misky. Fólie zabezpečovala, aby se do nádob nic nedostalo a zároveň, aby se při experimentu neodpařovala voda a testovaná látka ven z misek.

4.2.4 Stopery

Pro respirometrii bylo potřeba předem vyrobit tzv. stopery, které se při experimentu po jednom kusu vkládaly do každé jamky (komůrky) ve skleněné destičce. Důvodem tohoto kroku bylo, aby se mlži během respirometrie nepřisávali k destičce a tím ji nevratně nepoškodili. Zároveň tak mlž nebyl uchycen na dně jamky, ale zhruba uprostřed, takže senzor nebyl zakrytý jedincem.

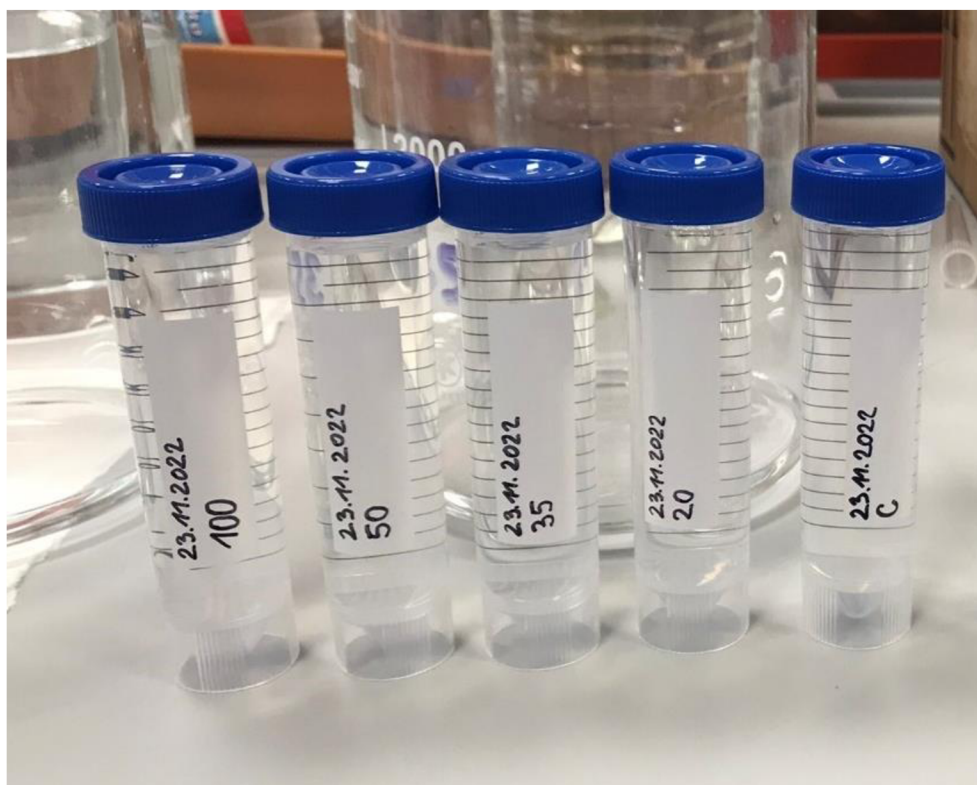
Na jeden stoper byla potřeba silikonová trubička a silikonový proužek. V půlce trubičky se podélně pomocí malých nůžek udělal malý otvor, aby se skrz něj mohl kolmo do půlky protáhnout silikonový proužek. Výsledný stoper měl tvar, který se podobal kříži. Velikost odpovídala průměru komůrky v destičce. Takových stoperů bylo potřeba vyrobit celkem 24 (podle počtu jamek). Pro případ nouze jich bylo vyrobeno ještě několik jako náhradních. Následně bylo potřeba, aby si navykly na podmínky v expozici. Trubička totiž vytvářela ve vodě vzduchovou bublinu a ta byla potřeba odstranit. Stopery se na několik minut před respirometrií vložily do zkumavky s destilovanou vodou a pomocí pinzety se mačkáním odstraňovala vzduchová kapsa z trubičky. Takto upravené stopery se nechaly uzavřené v destilované vodě, než byly potřeba k experimentu. Více podrobností o stoperech najdeme v bakalářské práci in prep Seidlová (2023).

4.3 Expozice

4.3.1 Příprava koncentrací

V laboratoři s váhou byla pomocí laboratorní lžičky nabrána měď CuSO_4 v podobě sypkého prášku a odměřena do uzavíratelné nádoby. Podle naměřené váhy se poté měď musela naředit, aby se vytvořil požadovaný roztok. Čím bylo naměřené množství menší, tím méně bylo potřeba vody na zředění. Pro ředění roztoků se použila odstátá kohoutková voda.

Nejdříve se naředila nejvyšší koncentrace a poté z ní byly postupně namíchávány koncentrace menší. Konečné koncentrace byly v jednotkách $\mu\text{g/l}$. Pro tento experiment byly namíchány roztoky o koncentracích $20 \mu\text{g/l}$, $35 \mu\text{g/l}$, $50 \mu\text{g/l}$ a $100 \mu\text{g/l}$. Následně se od každé naředěné koncentrace odebral vzorek do 50 ml plastové zkumavky (viz Obrázek 1). Více podrobností bylo popsáno v bakalářské práci in prep Seidlová (2023).



Obrázek 1 Znárodnuje způsob uchování a označení odebraných vzorků expozice v 50 ml plastové zkumavce ze dne 23.11.2022. Jedná se o koncentrace C = kontrola (odstátá kohoutková voda), 20 = $20 \mu\text{g/l}$ mědi, 35 = $35 \mu\text{g/l}$ mědi, 50 = $50 \mu\text{g/l}$ mědi, 100 = $100 \mu\text{g/l}$ mědi

4.3.2 Respirometrie

Pro experiment byl využit respirometr Microplate System (Loligo). Respirometrie probíhala v uzpůsobeném inkubátoru s nastavenou teplotou na $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Do něj se ještě den předem umístila orbitální třepačka, aby se aklimatizovala a vyvarovalo se tak výkyvům teploty. Jednalo se o Orbital Multi Shaker typu PSU-10i od výrobce Biosan. Dále bylo potřeba zajistit, aby byla k dispozici destilovaná voda také o teplotě $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Ta se den před respirometrií vložila do lednice o požadované teplotě v litrové kádince.

Připravené stopery se po jednom kusu vkládaly do zkumavky s destilovanou vodou. Zároveň při tom byly zbavovány vzduchových bublin, které se odstranily pomocí mačkání stoperů pinzetou. Jakmile byly ve zkumavce ponořeny všechny stopery bez bublin, vložila se zavřená zkumavka také do inkubátoru.

Dále se přichystala plastová nádoba vypodložená papírovými utěrkami bez vláken, které sloužily jako ochrana před případným poškrábáním destičky a zároveň umožnily lepší manipulaci při vyndávání destičky z nádoby. Do nádoby se poté nalila vytemperovaná destilovaná voda z lednice. Následně se do nádoby vložila destička tak, aby byla celá ponořená ve vodě. Poté se také i s ostatními komponenty destičky vložila do inkubátoru.

Mezitím se připravili mlži k respiometrii. Každý byl pinzetou očištěn od řas a také byl poválen po filtračním papíře, aby se zbavil jiných nečistot. Po očištění bylo všech dvacet jedinců jednotlivě vloženo do připravených Petriho misek a nechali se aklimatizovat v čisté vodě.

Posléze se z inkubátoru vyndala zkumavka se stopery a nádoba se skleněnou destičkou. Destička obsahovala celkem 24 komůrek neboli jamek v podobě šesti sloupců a čtyř řádků. Za použití pinzety se uchopil stoper a pod vodou byl opatrně umístěn do poloviny komůrky. Takto se zaplnila každá komůrka. Následně se do patřičných komůrek umístili určené jedinci (viz Obrázek 2). Čas vložení byl zaznamenán. V Tabulce 2 můžeme vidět názorné schéma. Každá komůrka měla své vlastní označení a bylo důležité, aby písmena sloužící k označení byla na levé straně destičky.



Obrázek 2 Ukazuje skleněnou destičku ponořenou v destilované vodě, vložené stopery ve všech komůrkách a mlže *Dreissena polymorpha* z expozice v určených komůrkách. K porovnání velikosti bylo použito plastové víčko od 50 ml zkumavky

Tabulka 2 Znázorňuje schéma rozestavení jedinců *Dreissena polymorpha* v jednotlivých jamkách destičky při prvním běhu respirometrie. Barva indikuje kategorii expozice. Žlutá barva je C = kontrola (odstátá kohoutková voda), oranžová je 20 µg/l mědi (20), zelená vyobrazuje 35 µg/l mědi (35), modrá barva je 50 µg/l mědi (50) a fialová znázorňuje 100 µg/l mědi (100)

	1	2	3	4	5	6
A	E1	E2	empty	C1	C2	C3
B	E3	E4	empty	C4	C5	C6
C	E5	E6	E7	empty	C7	C8
D	E8	E9	E10	empty	C9	C10

Skleněná destička se pomocí vypodložených papírových utěrek vyndala z nádoby a opatrně se přenesla na připravené suché utěrky. Byla ustřížena speciální parafinová fólie, kterou se poté destička překryla. Nesměly vzniknout žádné bubliny. Na fólii se poté položil silikonový plát, který byl následně překryt těžkým plátem. Opatrně se pomocí šedého hadříku otřely strany a spodní část destičky, následovně se destička vložila na orbitální třepačku do inkubátoru (viz Obrázek 3).



Obrázek 3 Znázorňuje skleněnou destičku na orbitální třepačce (Orbital Multi Shaker typu PSU-10i od výrobce Biosan) přikrytou parafinovým papírem, silikonovým plátem a těžkým plátem. Ve všech jamkách destičky jsou v polovině umístěny stopery, v určených jamkách se nachází jedinci mlže *Dreissena polymorpha*

Respirometrie trvala zhruba hodinu. Během tohoto časového úseku byla třikrát zapnuta orbitální třepačka po dobu tři minuty. Orbitální třepačka představovala říční pohyb a zajišťovala, aby se voda nerozvrstvila. Při zapínání a vypínání orbitální třepačky se musel otevřít inkubátor, protože manipulace s ní probíhala ručně. Inkubátor se otevíral i zavíral

pomalou a jeho otevření trvalo jen po nezbytnou dobu. Po dokončení respirometrie se destička z inkubátoru vyndala a sňaly se z ní oba pláty i fólie. Mlži se pinzetou velmi opatrně vyndali do svých původních Petriho misek a byli připraveni k vážení.

Druhý trial probíhal po 24 hodinách naprosto identickým způsobem jako první běh. Pět kádínek s mlži se vyndalo z lednice a poté se náhodně vybrali jedinci pro respirometrii. Opět byli vybráni od každé koncentrace čtyři jedinci. Před očištěním byli pozorováni po dobu pěti minut a jejich chování se poté zaznamenalo. Každý jedinec se očistil pomocí pinzety a filtračního papíru. Do jamek destičky se jedinci umisťovali podle opačného označení, koncentrace zůstaly na stejném místě (viz Tabulka 3). Destička byla zakryta a vložena na orbitální třepačku v inkubátoru. Poté probíhala respirometrie za stejných podmínek jako předešlý den. Více podrobností o probíhající respirometrii bylo sepsáno v bakalářské práci in prep Seidlová (2023).

Tabulka 3 Ukazuje schéma rozestavení jedinců *Dreissena polymorpha* v jednotlivých jamkách destičky při druhém běhu respirometrie. Barva indikuje kategorii expozice. Žlutá barva je C = kontrola (odstátá kohoutková voda), oranžová znamená 20 µg/l mědi (20), zelená je 35 µg/l mědi (35), modrá barva je 50 µg/l mědi (50) a fialová je 100 µg/l mědi (100)

	1	2	3	4	5	6
A	C1	C2	empty	E1	E2	E3
B	C3	C4	empty	E4	E5	E6
C	C5	C6	C7	empty	E7	E8
D	C8	C9	C10	empty	E9	E10

4.3.3 Průběh experimentu

První den pokusu byli jedinci vybíráni a umisťováni do namíchaných roztoků, kde byli následně pozorováni. Na základě vizuální kontroly byli vybráni ti jedinci, kteří byli prokazatelně aktivnější oproti ostatním. Převážně se vybírali mlži, kteří se pohybovali. Zároveň záleželo i na jejich velikosti a nepoškozené schránce. Požadovaná velikost byla střední, aby mlž nebyl příliš velký, protože by se nevešel do komůrky, a také aby nepropadl stoperem na dno destičky kvůli svému malému vzrůstu. Všichni mlži byli selektováni pouze z první aklimatizační nádrže. Nejdříve bylo potřeba oddělit opatrně všechny přichycené mlže u kraje nádrže na její dno tak, aby nebyli poškozeni. Selektce probíhala pomocí pinzety, kterou byli mlži následně přepravováni do menší plastové přepravky. Ta byla předem naplněna vodou z odebírané nádrže. Pro rychlejší a efektivnější sběr bylo příhodné nevyvolávat žádné otřesy. Celkově bylo potřeba nasbírat 45 mlžů. Takto odebrání jedinci byli dopraveni do laboratoře, kde probíhala expozice. Zatímco byly namíchávány potřebné koncentrace mědi, zůstali mlži v přepravkách, aby se aklimatizovali (viz Obrázek 4).



Obrázek 4 Ukazuje způsob uchování mlžů *Dreissena polymorpha* při aklimatizaci před vložením do expozice

Hotové roztoky se odměřily odměrným válcem na 100 ml a byly rozlity do správných misek. Ve 12 miskách byly namíchané roztoky a ve zbývajících třech byla pouze čistá odstátá kohoutková voda, která sloužila pro kontrolu. Z nevyužitých roztoků byly do zkumavek o objemu 50 ml odebrány vzorky. Následně byli jedinci vkládáni do misek pinzetou tak, aby pinzeta nepřišla vůbec do styku s vodou. Umisťování byli vždy do středu po jednom mlži do každé misky, než se zaplnilo všech 15 nádob. Poté se pokračovalo stejným způsobem, dokud v každé misce nebyli tři jedinci. Dávalo se pozor na to, aby každá miska obsahovala různé velikosti mlžů. Například aby se nestalo, že v jedné misce budou pouze větší jedinci a naopak. To samé platilo i o miskách s různými koncentracemi, tedy aby v jedné koncentraci nebyli mlži pouze s malými rozměry a obráceně. Všechny nádoby se zakryly přichystanou hliníkovou fólií (viz Obrázek 5).



Obrázek 5 Znáznorňuje podobu probíhající expozice a způsob zakrytí krystalizačních misek pomocí hliníkové fólie

Takto se mlži nechali po dobu tří hodin v klidu. Po uplynulém čase byli mlži pozorováni. Z nádrže s čistou odstátou kohoutkovou vodou byly odebrány dvě velké kádinky, které se v laboratoři s expozicí přikryly hliníkovou fólií. Takto se voda nechala odstát na druhý den.

Po 24 hodinách se jedinci znovu pozorovali. Poté byli pomocí pinzety přeskupeni z expozice vždy do jedné krystalizační misky s čistou odstátou vodou podle koncentrace. To znamená, že například všichni jedinci, kteří byli vystaveni koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$, byli seskupeni do jedné misky nadepsané jako koncentrace 100. Nejdříve se přemísťovali mlži s nižší koncentrací a postupně se došlo až k té nejvyšší. Důvodem tohoto postupu bylo se vyvarovat kontaminaci vody a jedinců. Následně bylo těchto pět misek doneseno do laboratoře, kde probíhala respirometrie. Náhodně se vybrali čtyři jedinci z každé koncentrace, celkem jich bylo tedy dvacet, a byli vyjmuti z krystalizačních misek do připravených Petriho misek. Do každé se předem nalila čistá odstátá kohoutková voda tak, aby byl celý jedinec ponořený ve vodě. Před vložením do těchto Petriho misek byli jedinci ještě očištěni pomocí filtračního papíru. Každá miska byla předem popsána lihovou fixou pro lepší manipulaci s mlži. Každý jedinec měl svůj vlastní kód, pod kterým byl vkládán do jamek skleněné destičky viz Tabulka 2. Tito vybraní mlži byli připraveni na první běh respirometrie, který byl označen jako první trial. Zbývající mlži, kteří zůstali v krystalizačních miskách, byli vloženi do inkubátoru. Inkubátor si udržoval stálou teplotu 20 °C. Takto byli jedinci ponecháni po dobu 24 hodin. Respirometrie trvala zhruba hodinu. Po uplynulé době se při vyjímání destičky s mlži z respirometru mohlo okem pozorovat, že byli všichni jedinci otevření a filtrovali. Následně se všichni mlži přemístili zpátky do Petriho misek a byli odneseni do místnosti s váhou. Každá *Dreissena polymorpha* byla zvážena a následně přemístěna z Petriho misky do plastové zkumavky s víčkem o objemu 2 ml. Tyto mikrozkušavky byly předem popsány aktuálním datem a stejnými symboly jako

Petriho misky. Poté se umístily do mrazáku a mlži byli zamrazeni. V odebraných vzorcích vody z expozice bylo měřeno pH, konduktivita, teplota a kyslík pomocí multimetru Multi 3420 SET D typu 2FD46D od výrobce WTW. Opět se nechala odstát voda na další den.

Třetího dne se založila nová expozice a zároveň probíhal druhý trial respirometrie. Noví jedinci byli vybíráni opět identickým způsobem jako při první selekci. Rozdíl byl pouze v tom, že se odebírali z druhé nádrže. Jakmile byli mlži doneseni do laboratoře, ve které probíhala expozice, nechali se znovu aklimatizovat. Roztoky byly namíchaný a rozděleny do požadujících krystalizačních misek. Misky byly předem umyty a vysušeny filtračním papírem. Jejich uskupení v expozici se ponechalo stejné. Jedinci byli umístováni do expozice stejným postupem jako první den. Až byli všichni mlži rozděleni, zakryli se nově připravenou hliníkovou fólií. Takto se ponechali po dobu tří hodin, než bylo chování jedinců v nové expozici pozorováno. Následně se odebraly vzorky namíchaných koncentrací. Když pro mlže v inkubátoru uběhlo 24 hodin, vyndalo se z něj všech pět krystalizačních misek s mlži. Z každé misky byli vybráni čtyři jedinci a rozdělili se do Petriho misek. Před respirometrií byli jedinci očištěni a pozorováni. Do jamek skleněné destičky se vkládali podle Tabulky 3. Druhý trial probíhal ve velmi podobném čase. Mlži se po respirometrii vyndali z destičky zpět do Petriho misek a v místnosti s váhou byli zváženi. Poté se v popsaných mikrozkušavkách umístili do mrazáku. Nechala se odstát voda na další den.

Čtvrtý den byli jedinci v expozici znovu pozorováni po 24 hodinách. Poté byli z expozice vyjmuti a přendali se do depurace s odstátou kohoutkovou vodou. Během přemísťování se dbalo na to, aby nedošlo ke kontaminaci. Postupovalo se od nejnižší koncentrace po nejvyšší. Při vkládání do čisté vody se používaná pinzeta nesměla dotýkat vody ani krystalizační misky. Opět bylo provedeno odebrání vzorků koncentrací a jejich měření. Po třech hodinách byli jedinci v depuraci pozorováni.

Poslední den expozice bylo po 24 hodinách hodnoceno chování jedinců. Všichni se následně zvážili a přemístili do zkumavek o větší velikosti. V každé zkumavce byli tři jedinci, kteří spolu byli v krystalizační misce od začátku expozice. Poté byly všechny náležitě popsané zkumavky vloženy do mrazáku.

Následující dny byly měřeny koncentrace mědi v odebraných vzorcích vody v expozici. Dále se doměřovaly základní parametry vody, které se nestihly naměřit v daný den odběru vzorků.

4.3.4 Pozorování chování

Pozorování mlžů probíhalo v předem určený čas, který se vypočítal podle požadovaného intervalu. Jedinci se od vložení do nové expozice pozorovali vždy po třech hodinách a následně po 24 hodinách v expozici. Všichni vybraní jedinci před umístěním do expozice aktivně filtrovali, proto nebylo pozorováno chování hned po začátku expozice.

Do laboratoře s expozicí by měl pozorovatel přijít ještě před daným časem, aby si mlži navykli na jeho přítomnost a zároveň se aklimatizoval. Po celou dobu výskytu bylo vhodné vyvarovat se různým otřesům.

Při každém pozorování bylo určeno i pořadí krystalizačních misek, ve kterém se mlži sledovali. Začalo se od té misky, do které se začali mlži vkládat jako první. Konečné pozorování

proběhlo u nádoby, která byla zaplněna všemi jedinci jako poslední. Toto pořadí se dodržovalo u všech pozorování chování mlžů.

Přesně po uplynutí určeného intervalu se opatrně odkryla hliníková fólie první krystalizační misky a odložila se vnější stranou na vedlejší stůl. Miska zůstala na stejném místě a nijak se s ní nemanipulovalo. Při odkrývání misky bylo možné pozorovat změnu chování, jednalo se především o zavření schránky. Pokud jedinec nefiltroval a nereagoval ani při sundání fólie, čekalo se několik minut na jeho reakci. Pozorovalo se otevření schránky jedince, zda filtroval nebo uhynul. Dále se zaznamenával pohyb nohou. Důležitá byla i pozice, ve které se mlž nacházel a zároveň její změna od minulého pozorování. Následně bylo sledováno, zda byl jedinec přichycený na misce či jiném mlži. Po celou dobu pozorování se pozorovatel neopíral o stůl, nedělal prudké pohyby, nedotýkal se misky a ani s ní nehýbal. Jakmile se zapsaly všechny parametry, byla krystalizační miska opět zakryta hliníkovou fólií. Tímto postupem se pokračovalo dále i u ostatních nádob. Doba pozorování by měla být dlouhá zhruba jako čas, po který trvalo umístění jedinců do expozice.

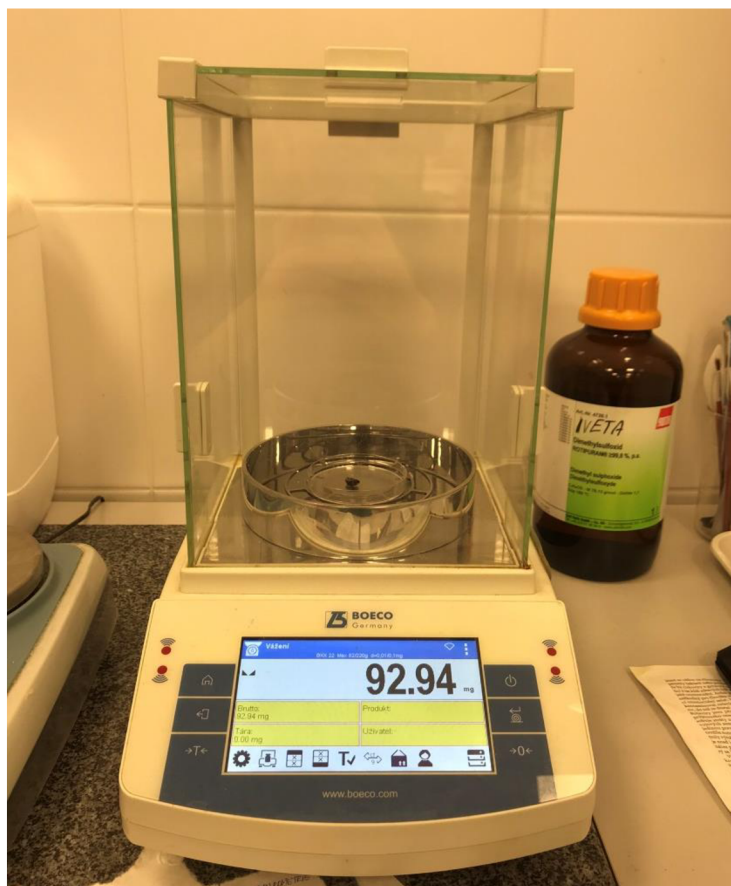
Pro zaznamenávání informací o chování postačil předem připravený papír a propisovací tužka. Zápis probíhal na vedlejším stole, aby se předešlo případnému otřesu a následném vyrušení pozorovaných jedinců. Celý záznam chování byl následně přepsán do tabulky v Excelu a originál byl zachován.

4.3.5 Měření odebraných vzorků vody

Odebrané vzorky vody byly vždy změřeny a uchovány v mrazáku. Měřeny byly základní parametry vody, jako je vodivost, pH, kyslík a teplota. Všechna měření probíhala pomocí mobilního digitálního multimetru Multi 3420 SET D typu 2FD46D od výrobce WTW. Multimetr byl vybaven třemi měřicími sondami pro elektrolytickou vodivost.

4.3.6 Vážení jedinců

Všichni mlži v nádobách byli doneseni do místnosti s váhou. Jednalo se o analytickou váhu BXX 22 od výrobce BOECO Germany. Po zapnutí se na váhu položil spodní díl čisté Petriho misky, pomalu se zavřela postranní dvířka a miska se nechala zvážit. Následně se váha resetovala. Vážený jedinec musel být při vážení čistý a osušený. Toho se dosáhlo díky následujícímu postupu. Na filtrační papír se pomocí pinzety přenesl daný jedinec a opatrně se poválel po papíru, dokud na něm přestal zanechávat stopy vody. Případné nečistoty byly odstraněny pinzetou a otřeny do filtračního papíru. Poté se pomalu otevřela postranní dvířka a již očištěný jedinec byl vložen do připravené nádoby. Pinzeta se nesměla dotýkat váhy ani Petriho misky. Dvířka se musela otevírat i zavírat pomalým pohybem, aby se předešlo případnému rozladění váhy. Jedinec byl vážen v miligramech. Na Obrázku 6 můžeme vidět, jak vážení vypadalo. Po zvážení se mlž opatrně vyndal pinzetou a byl vložen do zkumavky. Navážené hmotnosti byly zapisovány na papír ke konkrétním jedincům.



Obrázek 6 Ukazuje analytickou váhu značky BOECO Germany, váženého jedince *Dreissena polymorpha* na Petriho misce a výslednou hmotnost mlže v miligramech

4.3.7 Postup měření mědi

Jelikož byly všechny odebrané vzorky vody zmrazeny, bylo pro měření mědi nejdříve potřeba požadované vzorky vyndat z mrazáku a rozmrazit je. Vzorky vody se přinesly do laboratoře s expozicí, kde po celou dobu probíhalo měření. Umyvadlo se zajistilo tak, aby z něj nemohla odtékat voda. Poté do něj byly vloženy plastové nádoby a naplnily se teplou vodou. Plastová nádoba byla zvolena z důvodu bezpečnosti a funkčnosti. Skleněná nádoba by mohla kvůli rozdílným hodnotám teplot prasknout. Následně se do naplněných nádob vložily zmrazené vzorky, které se tímto způsobem začaly ohřívat a jejich obsah zkapalňovat. Pro lepší efekt se do zajištěného umyvadla napustila horká voda. Voda v nádobách postupně snižovala svoji teplotu, a proto byla vyměňována za horkou vodu. Na začátku rozmrazování vzorků stačilo použít teplou vodu, aby se předešlo případnému rozbití nádob vlivem vysokých rozdílů teplot. Postupně se mohla využít voda s vyšší teplotou.

Zatímco se odebrané vzorky rozmrazovaly, přichystala se pracovní plocha. Na část plochy se položil filtrační papír. Měřicí přístroj se postavil stranou na rovnou čistou plochu. Skleněné nádoby, ve kterých se měřily vzorky a patřily k přístroji, byly spolu s uzávěry umyty kohoutkovou vodou. Následně se odložily do plastové misky vystlané filtračním papírem, kde se nechaly odkapat.

Rozmrazené vzorky se vyskládaly od nejnižší koncentrace po nejvyšší. V tomto pořadí byly následně i měřeny. Na filtrační papír se připravily tři skleněné nádoby. Do každé z nich se

pomocí pipety umístilo 10 ml stejného vzorku. Poté se násada na pipetu opláchnula kohoutkovou vodou a byla připravena na odebrání vzorku s vyšší koncentrací. Skleněné nádoby se zavíčkovaly. První z nich byla umístěna do měřicího přístroje, aby byl vzorek zapamatován jako výchozí. Pro měření se využíval přístroj Copper Low Range Portable Photometer model HI 96747 od výrobce Hanna Instruments, který měl rozsah od 0 až 1500 $\mu\text{g/l}$ a omezenou přesnost $\pm 10 \mu\text{g/l}$. Jakmile se na displeji přístroje ukázalo číslo nula, mohlo se pokračovat dále. Lahvička byla vyjmuta a otevřena. Do nádoby se nasypalo všechno činidlo pro stanovení mědi od dodavatele Hanna Instruments označené jako HI96747-01. Prášek se musel nejdříve sklepat v sáčku a sáček podle postupu odštíhnout. Tento prášek způsobil obarvení vzorku. Tento jev můžeme pozorovat na Obrázku 7. Po zavíčkování byla lahvička protřepávána po dobu 15 vteřin. Až poté se vložila do spektrofotometru a bylo zapnuto měření.



Obrázek 7 Znázorňuje působení reagentu pro stanovení mědi z odebraných vzorků, jehož účinek se projevuje zružovněním vody ve skleněné lahvičce

Po dobu měření byly dveře i okna uzavřeny, aby nemohl vzniknout průvan. V místnosti byla také přerušena veškerá činnost a pohyb. Všechny tyto faktory by mohly ovlivnit výsledky měření. Naměřený výsledek byl zaznamenán. Stejným postupem se měřily i ostatní vzorky. Na konci měření byly k dispozici od každé koncentrace tři vzorky z jednoho dne. Pokud přístroj naznal, že se vyskytla nějaká chyba, celý proces měření se opakoval. Tímto způsobem byl vadný výsledek nahrazen.

Výsledky měření u zvolených namíchaných standardů (kontrola, 50 $\mu\text{g/l}$, 100 $\mu\text{g/l}$, 300 $\mu\text{g/l}$, 500 $\mu\text{g/l}$, 750 $\mu\text{g/l}$ a 1000 $\mu\text{g/l}$) byly naneseny na bodový graf a pomocí rovnice vytvořené polynomickou spojnici trendu (stupeň čtyři) se provedla kalibrace naměřených hodnot.

4.3.8 EC50 a Fisherův test

Pro výpočet EC50 mědi byla za pomoci Excelu využita probitová analýza. Do tabulky se zadaly hodnoty pro daný čas nefiltrujících jedinců a dosadily se do vzorce pro výpočet probit metody. Na základě výsledků se vytvořil bodový graf se spojnicí trendu, poté se podle rovnice vypočítala hodnota EC50. Díky tomuto výpočtu bylo zjištěno, v jaké koncentraci mědi přestalo filtrovat 50 % jedinců po třech a 24 hodinách v expozici.

Kromě toho byl použit i Fisherův test, který se vypočetl pomocí online kalkulátoru (<https://www.socscistatistics.com/tests/fisher/default2.aspx>). Tento test udával, zda se podíl aktivních jedinců výrazně lišil mezi kontrolou a danými koncentracemi mědi za určitý čas. Podrobnější statistické zpracování bude probíhat v rámci navazujícího zpracování dat pro odborný článek.

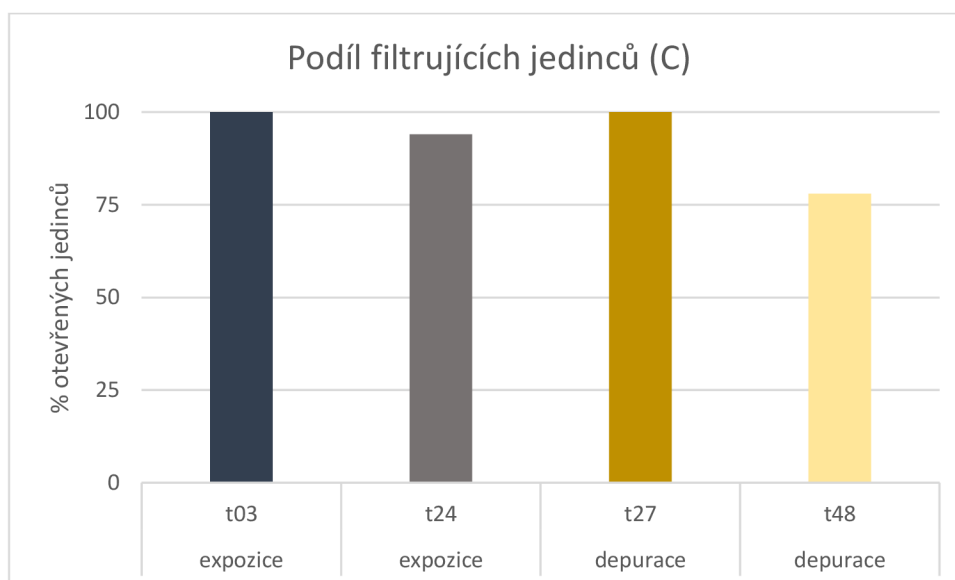
5 Výsledky

V této kapitole jsou shrnuty výsledky celého experimentu. Tyto výsledky jsou jednotlivě popsány a následně mezi sebou porovnávány.

5.1 Chování

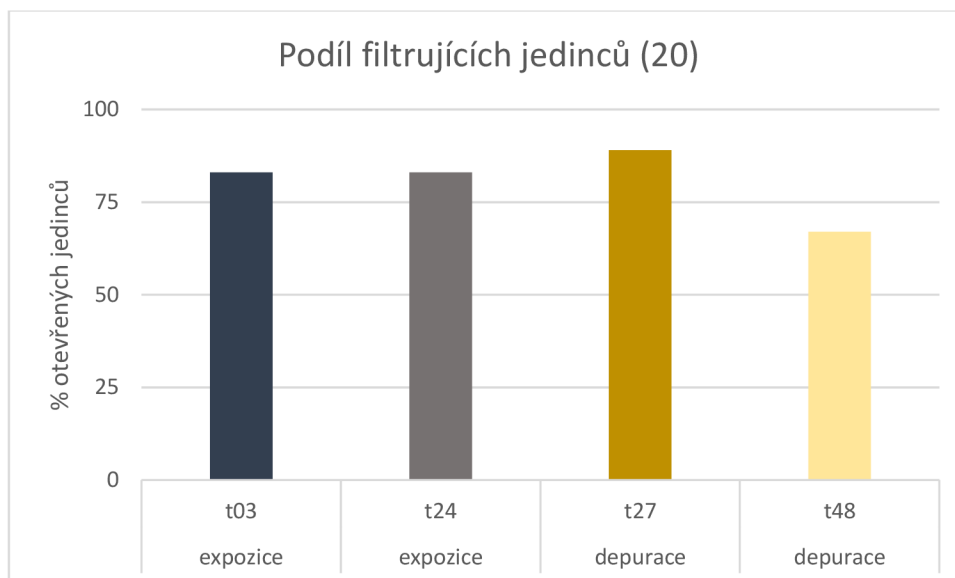
5.1.1 Podíl filtrujících jedinců

V Grafu 1 můžeme vidět v časech pozorování podíl filtrujících jedinců mlže *Dreissena polymorpha* v kontrole (C). Všichni jedinci, kteří byli sledováni po třech hodinách v expozici, byli otevření a filtrovali. To samé platí i u pozorování v čase 27 hodin, kdy byli jedinci přemístěni do depurace s novou čistou vodou. Při sledování po 24 hodinách v expozici byl zaznamenán mírný pokles. Větší propad lze sledovat po 24 hodinách depurace, kdy filtrovalo 77,78 % mlžů.



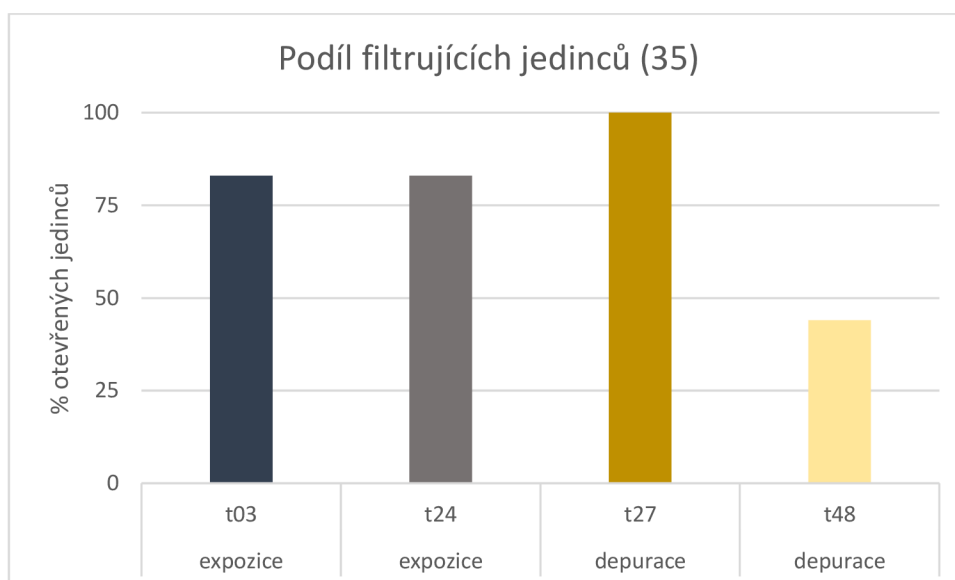
Graf 1 Znárodnuje podíl filtrujících jedinců *Dreissena polymorpha*, kteří byli vystaveni koncentraci C (kontrola) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

Viditelnou změnu filtrace můžeme pozorovat v Grafu 2, který vyobrazuje podíl filtrujících jedinců vystavených koncentraci 20 µg/l (20). Při pozorování po třech i po 24 hodinách v expozici filtrovalo stejné procento jedinců. Nepatrný nárůst aktivních jedinců proběhl při depuraci v čisté vodě. Po 24 hodinách můžeme však pozorovat výrazný úbytek, kdy filtrovalo již jen 66,67 % jedinců.



Graf 2 Ukazuje podíl filtrujících jedinců *Dreissena polymorpha*, kteří byli vystaveni koncentraci mědi 20 $\mu\text{g/l}$ (20) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

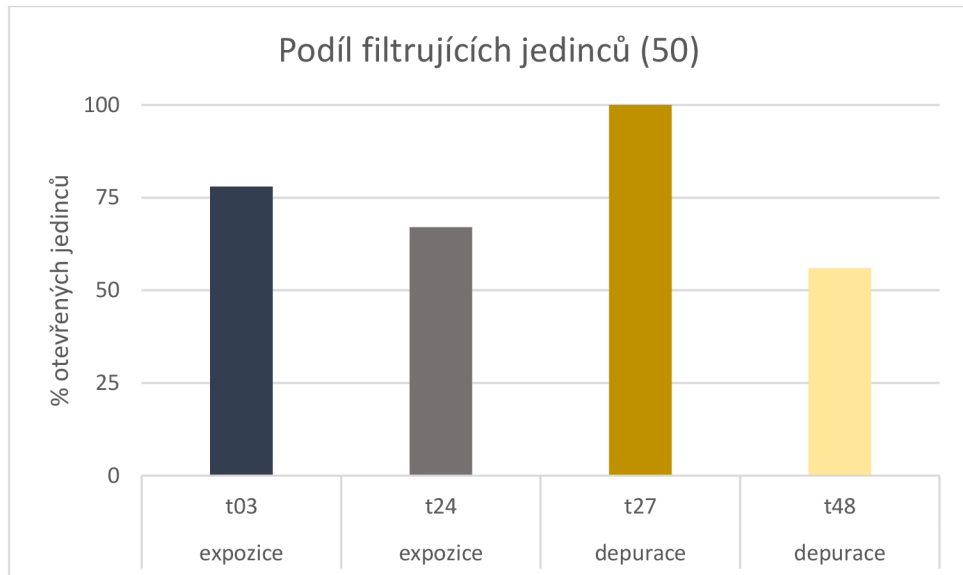
V expozici koncentrace 35 $\mu\text{g/l}$ (35) je podle Grafu 3 stejné procento filtrujících jedinců jako v expozici koncentrace 20 $\mu\text{g/l}$ (20). Změna nastala po třech hodinách v odstáté kohoutkové vodě v depuraci, kdy byli všichni jedinci otevření a filtrovali. Více jak poloviční pokles nastal po 24 hodinách, filtraci provádělo již jen 44,44 % jedinců.



Graf 3 Zobrazuje podíl filtrujících jedinců *Dreissena polymorpha*, kteří byli vystaveni koncentraci mědi 35 $\mu\text{g/l}$ (35) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

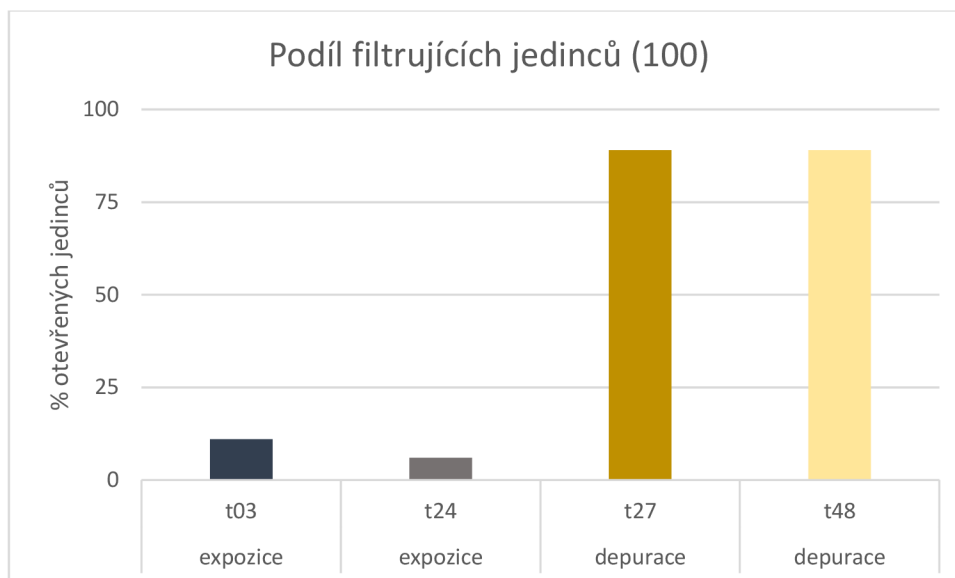
Na následujícím Grafu 4 můžeme vidět, že podíl filtrujících jedinců po třech hodinách v expozici při koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$ (50) oproti předchozím koncentracím poklesl. Po 24 hodinách se snížil ještě více, a to na 66,67 % filtrujících jedinců. To byl pro srovnání stejný

podíl jako po 24 hodinách v depuraci koncentrace 20 µg/l (20). Velký nárůst filtrujících jedinců nastal po třech hodinách, když se mlži přesunuli do depurace. V odstáté kohoutkové vodě filtrovali všichni jedinci. Po 24 hodinách v depuraci bylo však filtrujících jedinců téměř o polovinu méně, přesněji filtrovalo 55,56 %.



Graf 4 Ukazuje podíl filtrujících jedinců *Dreissena polymorpha*, kteří byli vystaveni koncentraci 50 mědi µg/l (50) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

Na Grafu 5 lze vidět, že nejmenší procento jedinců filtrovalo, když byli vystaveni v expozici s koncentrací 100 µg/l (100). Po 24 hodinách se podíl filtrujících jedinců v expozici oproti třem hodinám ještě snížil, a to na hodnotu 5,56 %. Následně v depuraci s čistou vodou vykazovali jak po třech hodinách, tak i po 24 hodinách 88,89 % filtrujících jedinců. Byla to jediná koncentrace, při které při posledním pozorování neklesl sledovaný podíl.



Graf 5 Znárodnuje podíl filtrujících jedinců *Dreissena polymorpha*, kteří byli vystaveni koncentraci mědi 100 µg/l (100) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu.

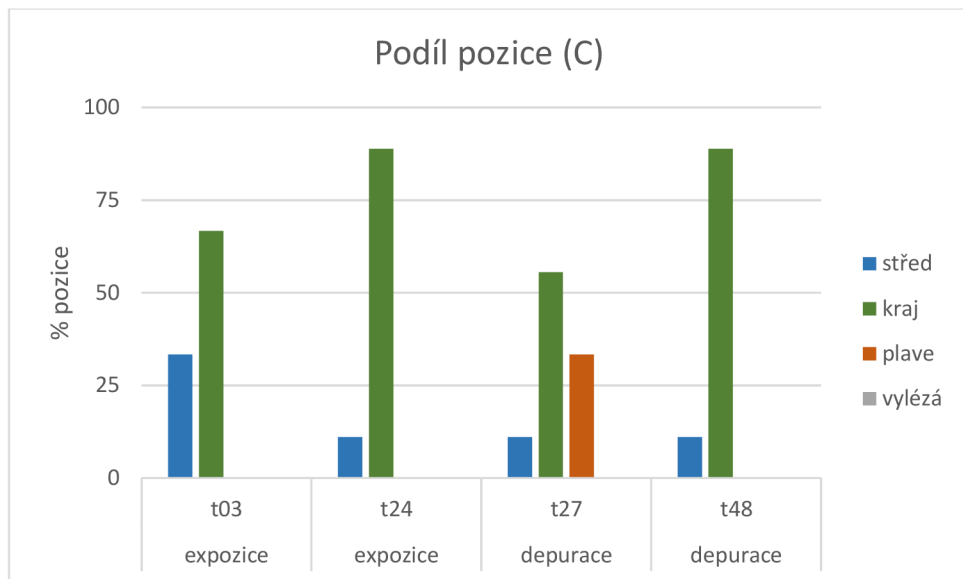
Pomocí probitové analýzy byla vypočtena hodnota EC50, při které přestalo 50 % jedinců v průběhu expozice filtrovat. Při pozorování po třech hodinách vyšlo EC50 64,99 µg/l, v expozici po 24 hodinách se tato hodnota snížila na 55,97 µg/l.

Statistická hodnota Fisherova exaktního testu je menší než 0,00001 u všech koncentrací i hodin při porovnání s kontrolou (C). Pouze u testu při porovnání kontroly (C) s koncentracemi mědi 20 µg/l (20) a 35 µg/l (30) po 24 hodinách v expozici vyšla hodnota 0,0249. Výsledky Fisherova testu znamenají, že všechny koncentrace mědi měly významný vliv na filtraci mlže při porovnání s kontrolou (C).

5.1.2 Podíl pozice jedinců

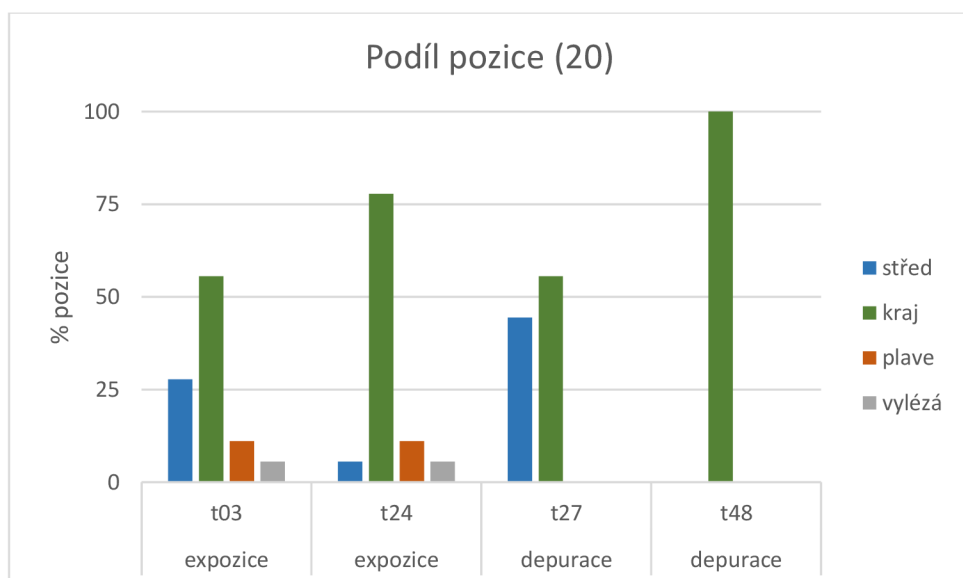
Mlži měli možnost se ve svých přidělených krystalizačních miskách s určitými koncentracemi libovolně pohybovat. Všechny formy pozic, ve kterých se jedinci nacházeli, byly zaznamenány a vloženy do grafů pro lepší vizualizaci. Každý graf byl určen pro jednotlivou koncentraci a obsahuje čtyři možné pozice v určených časech, při kterých byli mlži pozorováni.

Na následujícím Grafu 6 byl znázorněn podíl pozice jedinců v kontrole (C). Na první pohled je zřejmé, že u všech pozorovaných časů měla největší zastoupení pozice na kraji. U všech pozorování byli nalezeni mlži na středu, nejvíce po třech hodinách v expozici. U ostatních časů zůstávalo ve středu 11,11 % jedinců. Z misky nevylézal žádný jedinec. Zato při depuraci po třech hodinách bylo nalezeno nejvíce plavajících jedinců ze všech koncentrací, a to 33,33 %.



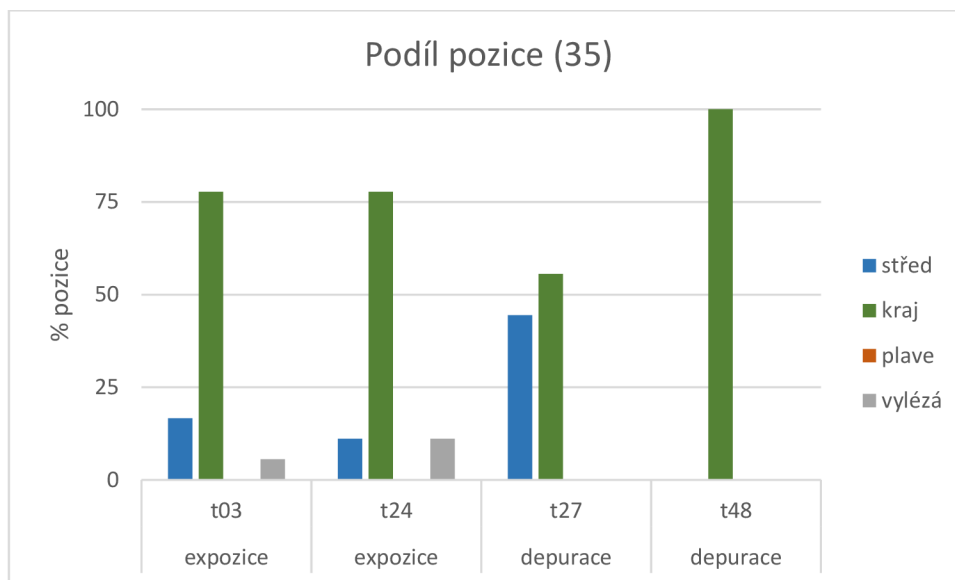
Graf 6 Zobrazuje podíl pozice, ve které se jedinci *Dreissena polymorpha* vyskytovali při časech pozorování v kontrole (C) u expozice i depurace

Další graf je oproti předešlému více rozmanitý. V expozici koncentrace 20 $\mu\text{g/l}$ (20) se vyskytovaly všechny možnosti pozic, avšak v depuraci již všechny zastoupené pozice nebyly (viz Graf 7). Podíl plavání a vylézání byl po třech i po 24 hodinách v expozici stejný. Plavalo 11,11 % jedinců a vylézalo 5,56 %. Jak v expozici, tak v depuraci se jedinci na středu vyskytovali vždy více při prvním pozorování. Nejpočetnější byla celkově pozice na kraji. Po třech hodinách v expozici i depuraci měl podíl pozice na kraji stejné hodnoty, a to 55,56 %. Při pozorování po 24 hodinách v expozici i depuraci byl podíl vždy vyšší. U posledního sledování dosáhl dokonce na 100 %.



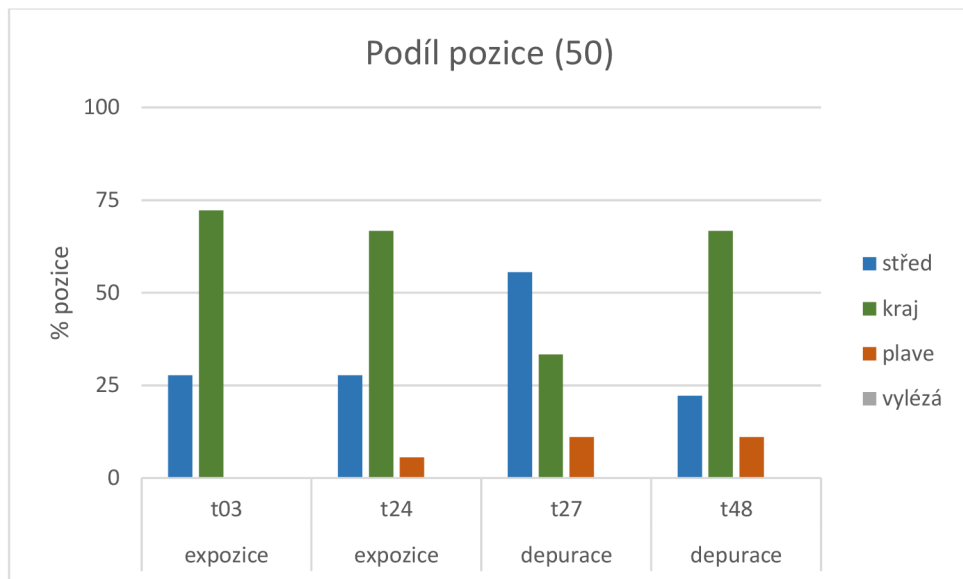
Graf 7 Znázorňuje podíl pozice, ve které se jedinci *Dreissena polymorpha* vyskytovali v koncentraci mědi 20 $\mu\text{g/l}$ (20) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

I u mlžů, kteří byli vystaveni koncentraci 35 $\mu\text{g/l}$ (35), bylo při posledním pozorování 100 % jedinců umístěno na kraji. Na Grafu 8 lze vidět, že u všech pozorování převládala opět pozice u kraje. Po třech hodinách v čisté vodě v depuraci dosahovaly hodnoty i pozice stejného výsledku jako u 20 $\mu\text{g/l}$ (20). Za celou dobu nebyli pozorováni žádní jedinci, kteří by plavali, ale v expozici bylo nalezeno ze všech koncentrací nejvíce vylézajících jedinců.



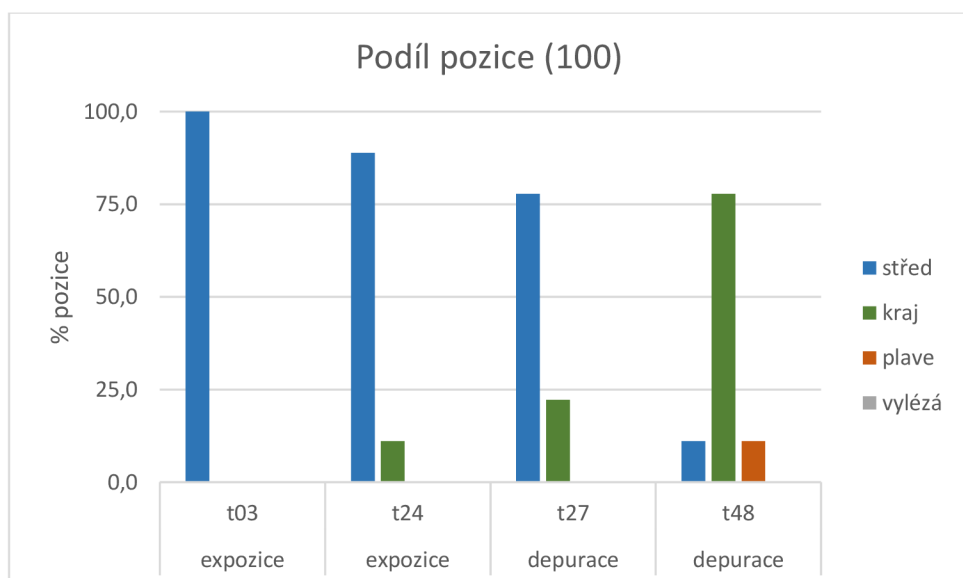
Graf 8 Zobrazuje podíl pozice, ve které se jedinci *Dreissena polymorpha* vyskytovali v koncentraci mědi 35 $\mu\text{g/l}$ (35) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

Graf 9 znázorňuje podíl pozice mlžů vystavených koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$ (50). V expozici bylo více jedinců na kraji, po 24 hodinách se tento počet snížil o plavající mlže. Po třech hodinách depurace byla však více než polovina jedinců stále ve středu. To se změnilo po 24 hodinách, kdy počet mlžů na kraji dosahoval stejného podílu, jako při posledním sledování mlžů v expozici. Plavající jedinci se nevyskytovali pouze v expozici při pozorování po třech hodinách.



Graf 9 Ukazuje podíl pozice, ve které se jedinci *Dreissena polymorpha* vyskytovali v koncentraci mědi 50 $\mu\text{g/l}$ (50) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

Poslední pozorování se zabývalo koncentrací 100 $\mu\text{g/l}$ (100). Na Grafu 10 můžeme zaznamenat převahu mlžů, kteří zůstali na svém původním místě ve středu krystalizační misky. Při sledování po třech hodinách takových jedinců bylo dokonce 100 %. Po 24 hodinách v expozici se 11,11 % jedinců přesunulo na kraj. Dvojnásobek mlžů na kraji byl poté po třech hodinách v depuraci. Velký zlom nastal až po 24 hodinách depurace. Počet jedinců na kraji vzrostl na 77,78 %. Dále byl vypořádan stejný procentuální podíl plavajících mlžů jako těch na středu, a to 11,11 %.

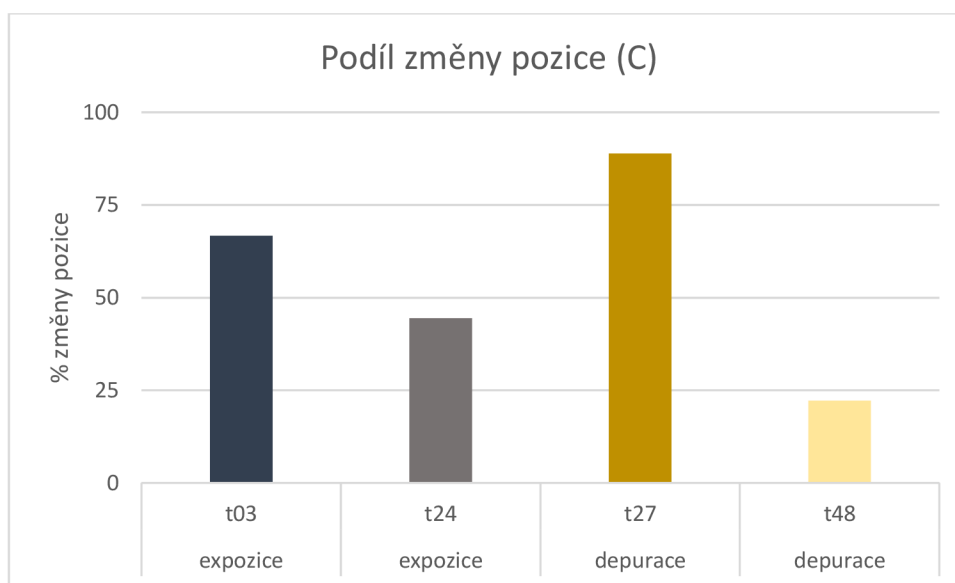


Graf 10 Znárodnuje podíl pozice, ve které se jedinci *Dreissena polymorpha* vyskytovali v koncentraci mědi 100 $\mu\text{g/l}$ (100) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

5.1.3 Podíl změny pozice

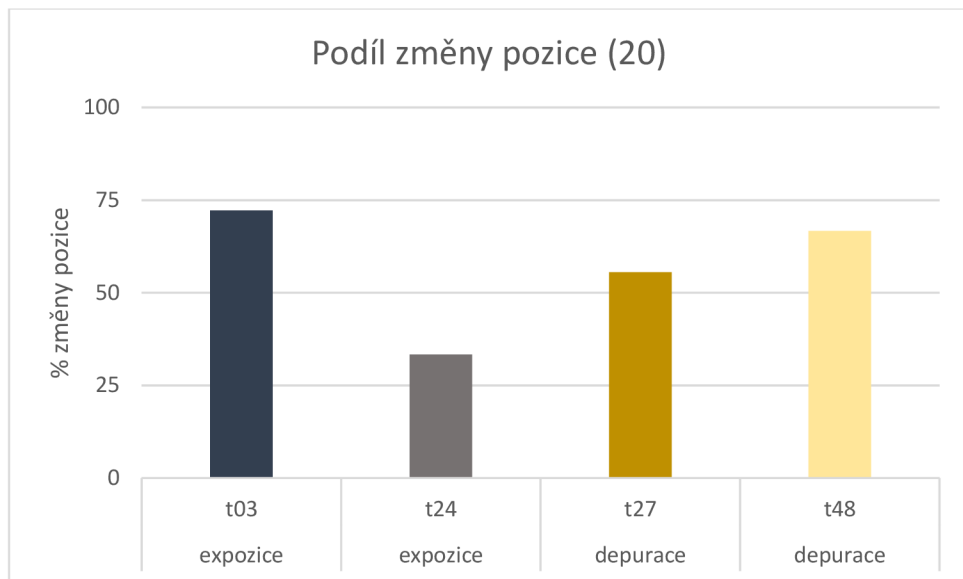
Při experimentu byla nejen pozorována pozice, ve které se jednotliví jedinci nacházeli, ale zároveň i její změna. Pokud jedinec změnil pozici z předchozího pozorování, byla tato skutečnost zaznamenána.

Po třech hodinách v expozici C (kontrola) změnila svoji pozici více jak polovina jedinců (viz Graf 11). Po 24 hodinách to byla již méně než polovina. Po vložení do nové čisté vody se po třech hodinách ze středu přemístilo 88,89 %. Při posledním pozorování byl podíl změny pozice pouze 22,22 %, což je nejmenší sledovaný výsledek při porovnání s ostatními koncentracemi v depuraci po 24 hodinách. Můžeme zaznamenat, že většina jedinců po 24 hodinách v depuraci zachovala svoji původní pozici.



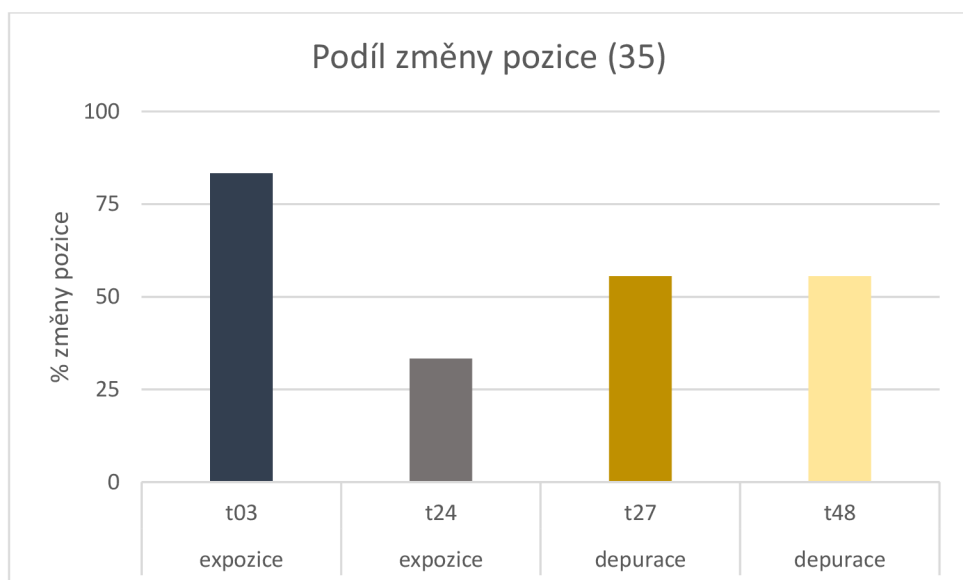
Graf 11 Zobrazuje podíl změny pozice mlžů *Dreissena polymorpha* v časech pozorování experimentu. Mlži byli vystaveni kontrole (C) v expozici i depuraci

Na následujícím Grafu 12 je již přítomná měď v koncentraci 20 $\mu\text{g/l}$ (20). Po třech hodinách v expozici změnilo svoji pozici 72,22 % jedinců. Následující den to bylo o více než polovinu méně. V depuraci se za tři hodiny stihlo přemístit 55,56 % mlžů, což je méně než jedinci v kontrole (C). Po 24 hodinách se to však změnilo a na novém místě bylo 66,67 % jedinců. To je pro změnu o dost více, než tomu bylo v kontrole (C).



Graf 12 Znárodnuje podíl změny pozice mlžů *Dreissena polymorpha* v časech pozorování experimentu. Mlži byli v koncentraci mědi 20 $\mu\text{g/l}$ (20) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci

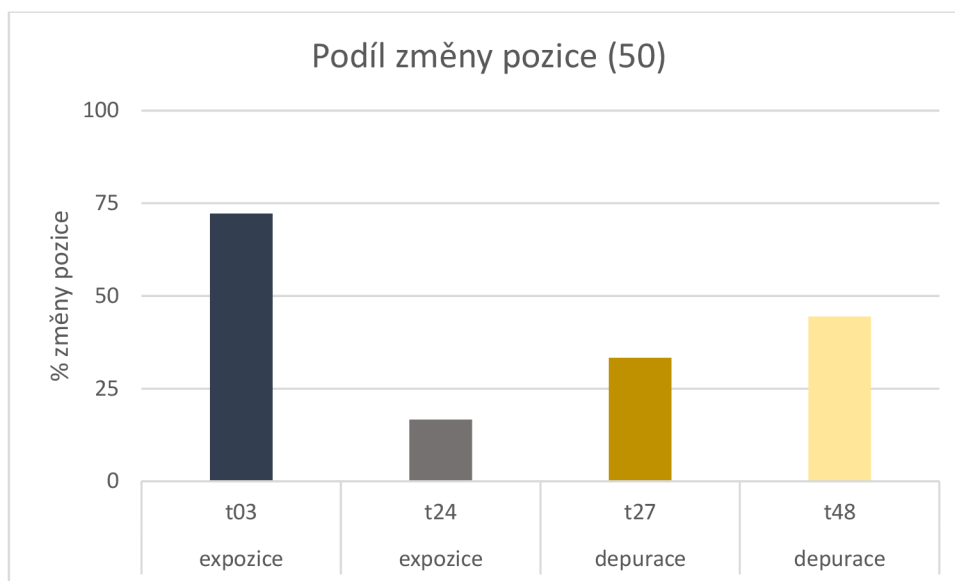
Největší změna pozice mlžů po třech hodinách expozice byla sledována u koncentrace 35 $\mu\text{g/l}$ (35), a to 83,33 % (viz Graf 13). Po 24 hodinách v expozici a po třech hodinách v čisté vodě byl zaznamenán podíl změny pozice naprosto identický jako u 20 $\mu\text{g/l}$ (20). Při posledním pozorování mlžů se jich přesunulo 55,56 %. Tato hodnota je stejná i při depuraci v čase po třech hodinách.



Graf 13 Ukazuje podíl změny pozice mlžů *Dreissena polymorpha* v časech pozorování experimentu. Mlži byli v koncentraci mědi 35 $\mu\text{g/l}$ (35) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci

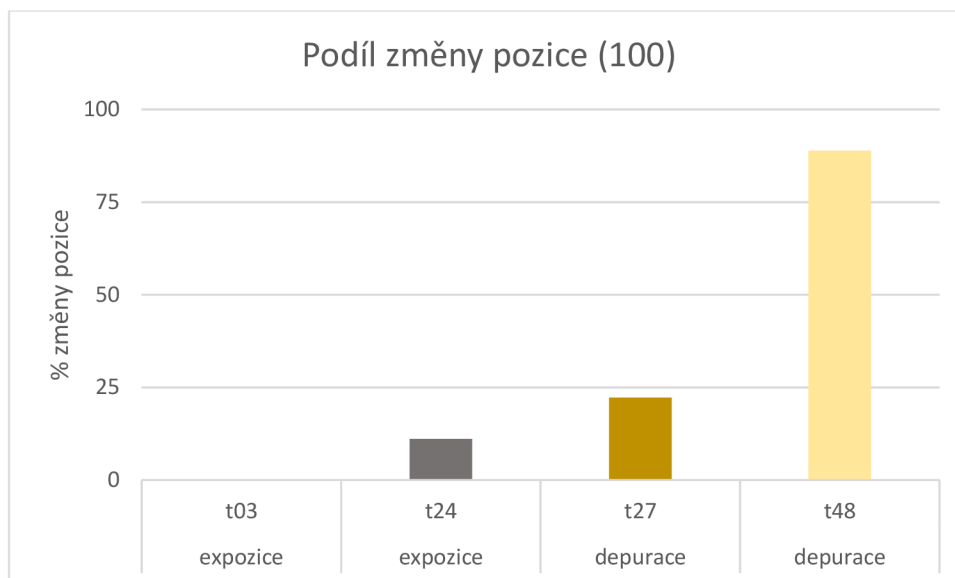
Předposlední koncentrace 50 $\mu\text{g/l}$ (50) má stejný podíl změny pozice jedinců po třech hodinách v expozici, jako bylo pozorováno u koncentrace 20 $\mu\text{g/l}$ (20). Celkově to je druhá

nejvyšší hodnota, jedná se o 72,22 %. Po 24 hodinách již nebyli jedinci příliš aktivní, přemístilo se jich pouze 16,67 %. Ani po třech hodinách v depuraci se jich příliš nepřesunulo (viz Graf 14). Po 48 hodinách změnilo pozici 44,44 %.



Graf 14 Zobrazuje podíl změny pozice mlžů *Dreissena polymorpha* v časech pozorování experimentu. Mlži byli v koncentraci mědi 50 $\mu\text{g/l}$ (50) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci

Žádní jedinci, kteří byli vloženi do expozice 100 $\mu\text{g/l}$ (100), po třech hodinách nezměnili svoji pozici a všichni zůstali ve středu krystalizační misky. Graf 15 také zobrazuje, že za 24 hodin expozice změnilo pozici pouze 11,11 % mlžů. Ale po třech hodinách v depuraci se přesunulo jedinců dvakrát více. Největší zlom nastal po 24 hodinách v čisté vodě, kdy se podíl změny pozice vyšplhal na 88,89 %. U tohoto času to byla nejvyšší pozorovaná hodnota vůbec.

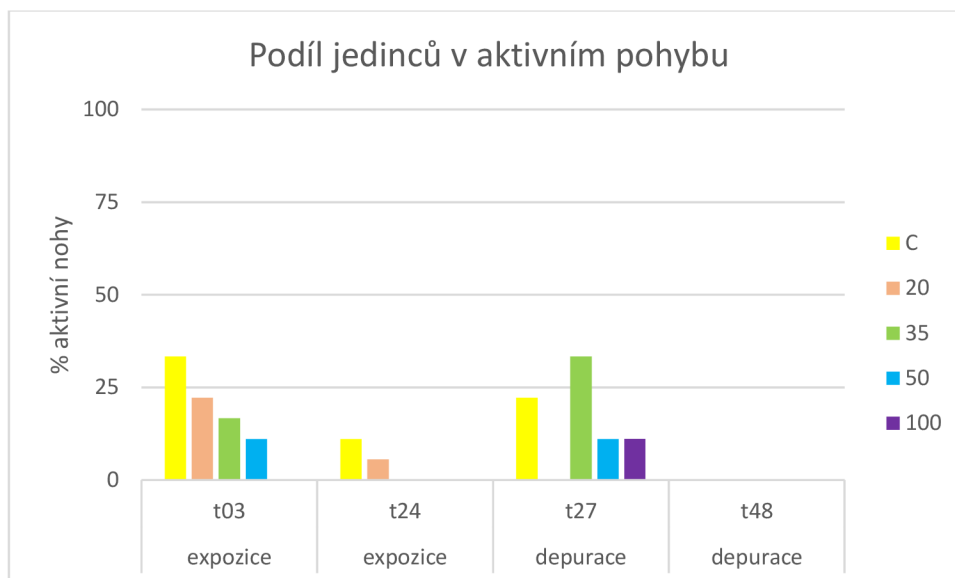


Graf 15 Ukazuje podíl změny pozice mlžů *Dreissena polymorpha* v časech pozorování experimentu. Mlži byli v koncentraci mědi 100 $\mu\text{g/l}$ (100) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci

5.1.4 Podíl jedinců v aktivním pohybu

V expozici i v depuraci byl pozorován podíl jedinců v aktivním pohybu. Záznam všech aktivních jedinců můžeme vidět na Grafu 16. Každá koncentrace mědi je barevně odlišena. Žlutá barva znázorňuje kontrolu (C), oranžová je 20 $\mu\text{g/l}$ (20), zelená barva je 35 $\mu\text{g/l}$ (35), modrá barva je 50 $\mu\text{g/l}$ (50) a fialová zobrazuje koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$ (100).

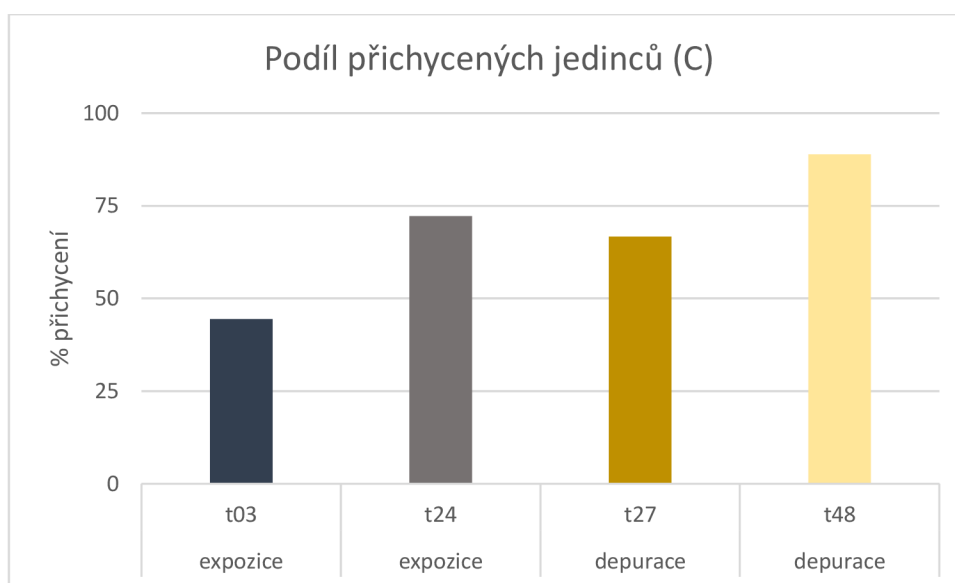
Na první pohled lze vidět, že nejčastěji měli aktivní nohu jedinci v kontrole (C), a to při třech pozorování ze čtyř. Nejmenší zastoupení měli jedinci z koncentrace 100 $\mu\text{g/l}$ (100). Po třech hodinách v expozici bylo nejvíce aktivních jedinců v čisté vodě a sestupně se tato hodnota snižovala až po koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$ (50). Celkově mělo v tomto čase viditelnou nohu v přepočtu na všechny jedince 16,67 % mlžů. Po 24 hodinách expozice mělo dohromady aktivní nohu už jen 3,33 % jedinců, kteří se skládali z kontroly (C) a koncentrace 20 $\mu\text{g/l}$ (20). Celkem bylo v depuraci po třech hodinách v aktivním pohybu 15,56 % jedinců. Z toho byl největší podíl u koncentrace 35 $\mu\text{g/l}$ (35), který byl stejný jako u kontroly (C) při expozici po třech hodinách. Po 24 hodinách v depuraci nebyl pohybově aktivní ani jeden jedinec.



Graf 16 Znárodnuje podíl jedinců v aktivním pohybu v určitých časech experimentu a při určité koncentraci mědi. Barva indikuje kategorii expozice. Žlutá barva = C (kontrola), oranžová = 20 µg/l (20), zelená = 35 µg/l (35), modrá = 50 µg/l (50), fialová = 100 µg/l (100)

5.1.5 Podíl přichycených jedinců

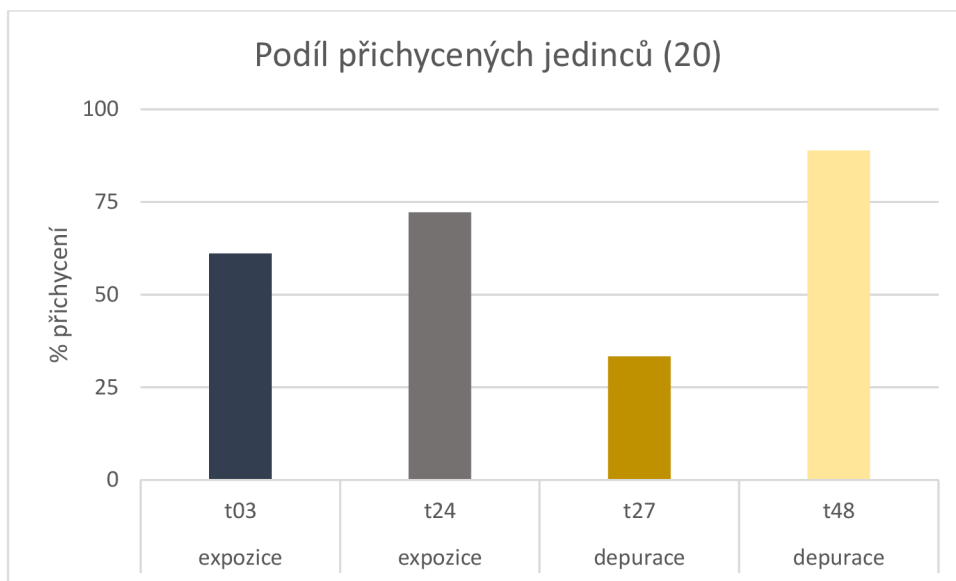
V Grafu 17 můžeme vidět, jaký byl podíl jedinců, kteří byli přichyceni ke krystalizační misce v jednotlivých časech u kontroly (C). Vyšších hodnot dosahovalo přichycení vždy po 24 hodinách sledování v expozici i v depuraci. Nejméně přichycených jedinců bylo po třech hodinách vložení mlžů do expozice, a to 44,44 %.



Graf 17 Ukazuje podíl přichycených jedinců *Dreissena polymorpha* vystavených kontrole (C) ve čtyřech časech pozorování

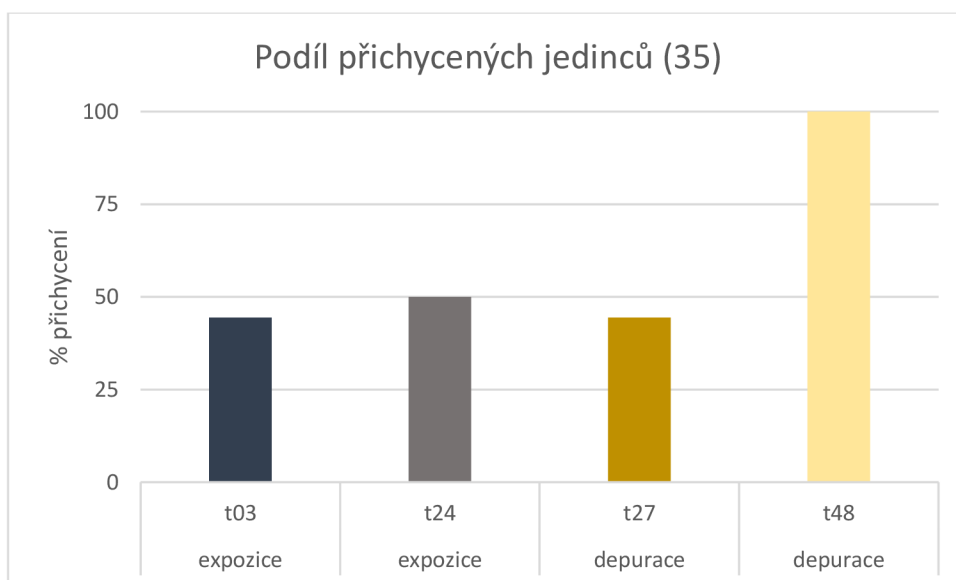
U koncentrace 20 µg/l (20) pokračoval trend vyšších hodnot po 24 hodinách sledování jak v expozici, tak v depuraci (viz Graf 18). Hodnoty dokonce odpovídaly stejným výsledkům jako v kontrole (C). Zato při sledování mlžů po třech a 27 hodinách je podíl přichycených

jedinců rozdílný. V expozici je po třech hodinách podíl 61,11 % a v depuraci hodnota klesla až na 33,33 %.



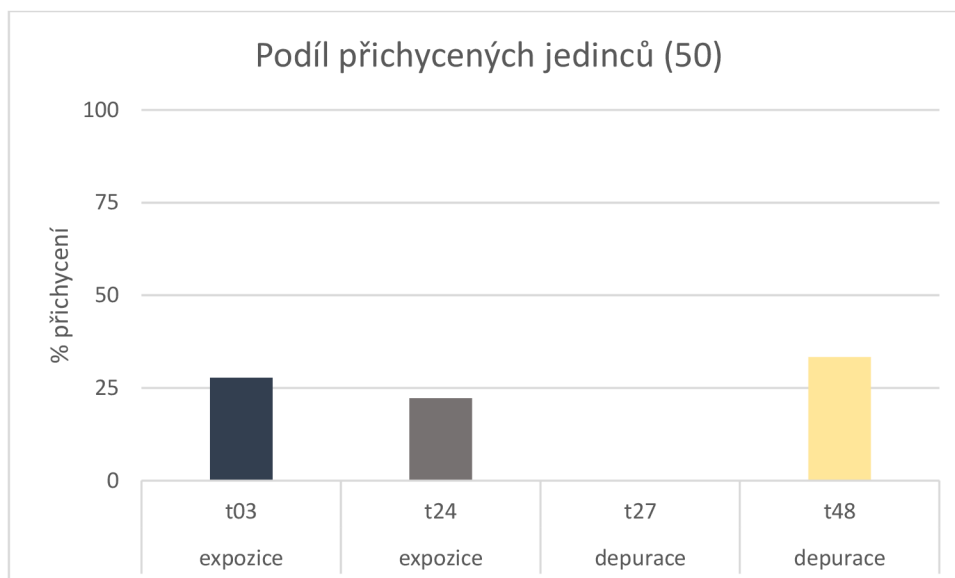
Graf 18 Zobrazuje podíl přichycených jedinců *Dreissena polymorpha* vystavených koncentraci mědi 20 µg/l (20) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

Na následujícím Grafu 19 týkajícího se přichycených jedinců vystavených v koncentraci 35 µg/l (35) je zřetelná změna oproti předešlým koncentracím. V prvních třech pozorování se hodnoty umísťovaly u poloviny celkového počtu. Změna nastala po 24 hodinách v depuraci, kde byl podíl všech přichycených jedinců 100 %.



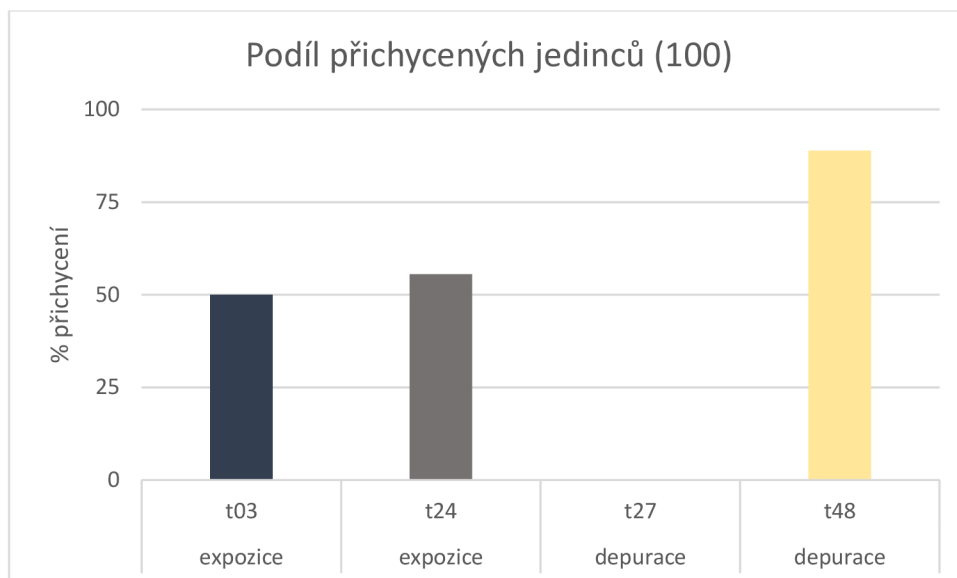
Graf 19 Znárodnuje podíl přichycených jedinců *Dreissena polymorpha* vystavených koncentraci mědi 35 µg/l (35) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

Nejméně přichycených jedinců bylo prokazatelně při vystavení koncentrace 50 µg/l (50), dokazuje to Graf 20. Hodnoty dosahovaly nanejvýše 33,33 %, a to při pozorování po 48 hodinách. V depuraci s čistou kohoutkovou vodou nebyl přichycen ani jeden jedinec. Procentuální podíl byl v expozici po třech hodinách vyšší než po 24 hodinách.



Graf 20 Vyobrazuje podíl přichycených jedinců *Dreissena polymorpha* vystavených koncentraci mědi 50 µg/l (50) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

Poslední Graf 21 se věnuje koncentraci 100 µg/l (100). Oproti předešlé koncentraci má mnohem vyšší hodnoty. Hned po třech hodinách v expozici byla polovina mlžů přichycených a po 24 hodinách se tato hodnota ještě navýšila na 55,56 %. Stejně jako u koncentrace 50 µg/l (50), nebyl pozorován žádný přichycený jedinec v čase experimentu 27 hodin. Po 48 hodinách pozorování bylo přichyceno 88,89 % mlžů, což byla stejná hodnota jako u kontroly (C) a koncentrace 20 µg/l (20).

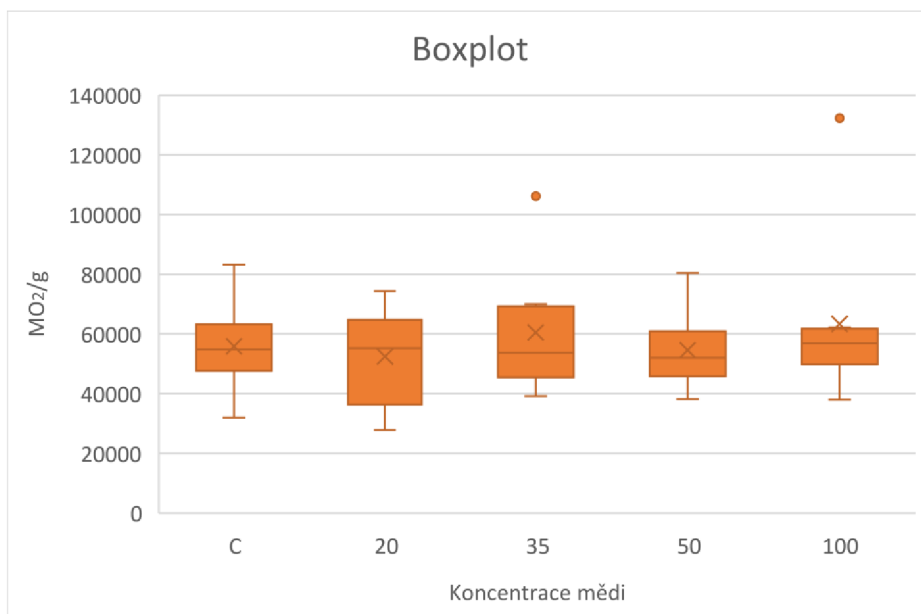


Graf 21 Ukazuje podíl přichycených jedinců *Dreissena polymorpha* vystavených koncentraci mědi 100 $\mu\text{g/l}$ (100) v expozici a odstáté kohoutkové vodě v depuraci v určitých časech experimentu

5.2 Respirometrie

Následující krabicový Graf 22 neboli boxplot se věnuje hodnotám spotřeby kyslíku mlžů po vyjmutí z expozice mědi. Vodorovná osa znázorňuje koncentrace mědi, kterým byli mlži v expozici vystaveni. C je kontrola (odstátá kohoutková voda), 20 je koncentrace 20 $\mu\text{g/l}$, 35 zastupuje koncentraci 35 $\mu\text{g/l}$, 50 je 50 $\mu\text{g/l}$ a 100 znamená 100 $\mu\text{g/l}$ mědi. Svislá osa vyobrazuje množství spotřebovaného kyslíku v jamce destičky, který byl normalizovaný hmotností mlže.

Každý box představuje koncentraci společně s její kontrolou a případně odlehlé hodnoty, které znázorňují body. Tyto body byly zaznamenány v koncentracích 35 $\mu\text{g/l}$ (35) a 100 $\mu\text{g/l}$ (100). V boxplotu je také zobrazena hodnota medián (linie uprostřed), průměr naměřených hodnot (křížek) a mezikvartilové rozpětí (výška boxu). Kromě toho ukazuje graf i maxima a minima naměřených hodnot spotřeby kyslíku. Horní linie v boxplotu znamená nejvyšší naměřenou hodnotu a spodní linie znázorňuje hodnotu nejnižší. Hodnoty spotřeby kyslíku mlžů byly u všech koncentrací podobné.



Graf 22 Znárodnuje spotřebu kyslíku mlžů *Dreissena polymorpha* přepočtenou na hmotnost při obou běžích respirometrie. C = kontrola (odstátá kohoutková voda), 20 = 20 µg/l mědi, 35 = 35 µg/l mědi, 50 = 50 µg/l mědi, 100 = 100 µg/l mědi

5.3 Vlastnosti mlžů

5.3.1 Hmotnost jedinců

Tabulka 4 znázorňuje od každé koncentrace mědi průměrnou hmotnost a směrodatnou odchylku všech jedinců, kteří byli vybráni pro respirometrii. Hmotnost je uvedena v miligramech. Mezi hmotnostmi mlžů bylo velké rozpětí. Nejnížší naměřená hmotnost byla 14,42 mg, nejvyšší byla 153,20 mg.

Nejvyšší průměrnou hmotnost a zároveň i odchylku měli jedinci, kteří byli v expozici s koncentrací mědi 50 µg/l (50). Nejnížší průměrná hmotnost byla u koncentrace 100 µg/l (100) a nejnížší směrodatná odchylka vyšla u kontroly (C).

Tabulka 4 Ukazuje průměrnou hmotnost a směrodatnou odchylku mlžů *Dreissena polymorpha* vybraných pro respirometrii. Údaje jsou vyhodnoceny pro každou koncentraci zvlášť

Koncentrace	Hmotnost [mg]
C	53,50 ± 22,04
20	59,90 ± 31,25
35	54,04 ± 31,37
50	65,38 ± 34,36
100	52,32 ± 25,21

5.4 Odebrané vzorky vody

Odebraným vzorkům byla zvlášť měřena hladina mědi, pH, konduktivita a O₂. Všechny naměřené hodnoty byly pro každou koncentraci zprůměrovány a byla vypočítána směrodatná odchylka.

V Tabulce 5 můžeme vidět hodnoty měření mědi pro každou koncentraci. Průměr i směrodatná odchylka se vypočítala ze dvanácti naměřených hodnot. Kontrola (C) měla vyšší naměřené hodnoty i směrodatnou odchylku než koncentrace 20 µg/l (20). Poté již následoval trend, při kterém se průměrné hodnoty zvětšovaly vzestupně společně s koncentrací. Nejvyšší odchylka byla zaznamenána u koncentrace 50 µg/l (50).

Tabulka 5 Zobrazuje nominální hodnoty koncentrací mědi a průměrné výsledky měření po kalibraci se směrodatnou odchylkou z odebraných vzorků. C = kontrola (odstátá kohoutková voda), 20 = 20 µg/l, 35 = 35 µg/l, 50 = 50 µg/l, 100 = 100 µg/l

Koncentrace	Měření Cu [µg/l]
C	17 ± 28
20	6 ± 23
35	40 ± 51
50	63 ± 88
100	77 ± 25

Následující hodnoty se týkají pH vody (viz Tabulka 6). Každý průměr i směrodatná byla vypočítána na základě pěti měření od každé koncentrace. Výsledky pH nebyly výrazně odlišné. Průměrné hodnoty i odchylka se zvyšující se koncentrací stoupaly.

Tabulka 6 Znázorňuje průměr a směrodatnou odchylku pH naměřených hodnot z odebraných vzorků. C = kontrola (odstátá kohoutková voda), 20 = 20 µg/l, 35 = 35 µg/l, 50 = 50 µg/l, 100 = 100 µg/l

Koncentrace	pH
C	7,28 ± 0,19
20	7,66 ± 0,31
35	7,70 ± 0,39
50	8,00 ± 0,44
100	8,09 ± 0,46

Hodnoty konduktivity všech koncentrací jsou uvedeny v Tabulce 7. Výsledky měření byly opět zprůměrovány a stanovila se směrodatná odchylka. Průměrné hodnoty měly velice podobné výsledky, ale směrodatná odchylka byla výrazně odlišná, a to nejvíce u kontroly (C) a koncentrace 50 µg/l mědi (50).

Tabulka 7 Vyobrazuje průměrné výsledky měření konduktivity se směrodatnou odchylkou z odebraných vzorků. C = kontrola (odstátá kohoutková voda), 20 = 20 $\mu\text{g/l}$, 35 = 35 $\mu\text{g/l}$, 50 = 50 $\mu\text{g/l}$, 100 = 100 $\mu\text{g/l}$

Koncentrace	Konduktivita [$\mu\text{S/cm}$]
C	$341,4 \pm 3,6$
20	$340,4 \pm 5,7$
35	$344,2 \pm 6,9$
50	$341,0 \pm 12,6$
100	$345,6 \pm 9,8$

V poslední Tabulce 8 jsou znázorněny výsledky měření O_2 . Při srovnání dat všech koncentrací bylo zjištěno, že se průměrné hodnoty ani směrodatná odchylka mezi sebou výrazně neodlišovaly.

Tabulka 8 Ukazuje průměrné výsledky měření O_2 a směrodatnou odchylkou z odebraných vzorků. C = kontrola (odstátá kohoutková voda), 20 = 20 $\mu\text{g/l}$, 35 = 35 $\mu\text{g/l}$, 50 = 50 $\mu\text{g/l}$, 100 = 100 $\mu\text{g/l}$

Koncentrace	O_2 [mg/l]
C	$7,76 \pm 0,53$
20	$7,68 \pm 0,69$
35	$7,49 \pm 0,84$
50	$7,33 \pm 0,87$
100	$7,50 \pm 0,85$

6 Diskuze

Tento experiment zkoumal vliv koncentrace mědi na chování (filtrační aktivitu, pohyb, pozici, aktivitu nohy, přichycení mlžů a respiraci) u sladkovodního mlže *Dreissena polymorpha*. Z experimentu vyplynulo několik zajímavých zjištění.

6.1 Chování mlže

Celkově bylo pozorováno, že sladkovodní mlž *Dreissena polymorpha* svým chováním reagoval na přítomnost mědi v expozici, stejně jako tomu bylo i v jiných studiích (Fisher et al. 1994; Curtis et al. 2000; Kennedy et al. 2006). Před samotným experimentem bylo předpokládáno, že někteří jedinci v koncentracích 100 µg/l již nebudou vykazovat známky života. Ukázalo se však, že měď ve zvolených koncentracích neměla po 24 hodinách v expozici na žádného z jedinců smrtící účinky. Clayton et al. (2000) ve své studii dokonce uvádí, že po 24 hodinách akumulaci mědi se na slávičce mnohotvárné v koncentraci 500 µg/l nepozorovaly žádné výrazné toxické účinky. V kontrastu s tím Kraak et al. (1992) pozoroval, že již vystavení 53 µg/l mědi po dobu 12 týdnů vedlo u *Dreissena polymorpha* ke zvýšené mortalitě. To naznačuje, že krátkodobá expozice *Dreissena polymorpha* ve zvýšené koncentraci mědi nemá na mlže zásadní vliv na rozdíl od dlouhodobé expozice, což je v souladu i s našimi výsledky a bylo to dále potvrzeno studií Ekelund Ugge et al. (2022).

V našem experimentu jsme zaznamenali, že koncentrace mědi má tendenci způsobovat snížení filtrační aktivity mlžů, což bylo pozorováno i v minulosti (Naimo 1995). Konkrétně jsme zjistili, že mlži vystaveni koncentraci 100 µg/l mědi měli nejnižší filtrační aktivitu po 24 hodinách expozice. To odpovídá skutečnosti, že se mlž při škodlivé změně okolního prostředí uzavře a nefiltruje (Rajalakshmi & Mohandas 2005). Po třech hodinách expozice mědi byla hodnota EC50 64,99 µg/l, po 24 hodinách se tato hodnota o něco snížila, a to na 55,97 µg/l. Naše výsledky jsou v souladu s jinými studiemi, které prokazují, že měď může ovlivňovat chování mlžů. Každý druh mlže může reagovat jinak na různé koncentrace mědi (Wang et al. 2007). Například mlž druhu *Mytilus edulis* je známý svojí citlivostí na nízké koncentrace mědi (Parry & Pipe 2004). Srdeční aktivitou tohoto mlže se ve své studii zabýval Curtis et al. (2000) a zaznamenal změnu srdeční frekvence mlže *Mytilus edulis* již u koncentrace 3,8 µg/l. To naznačuje, že i *Dreissena polymorpha* mohla v tomto experimentu reagovat na expozici mědi nejen svým chováním, ale i změnou srdeční aktivity.

Za pozornost stojí také fakt, že po 24 hodinách vložení mlžů do čisté vody (depurace) bylo zaznamenáno nejvíce filtrujících a zároveň i přemístěných jedinců, kteří byli vystaveni právě koncentraci 100 µg/l mědi. To bylo nejspíše způsobeno tím, že po celou dobu expozice filtrovali minimálně (viz Graf 5) a zůstávali převážně na původním místě (viz Graf 15). Z toho můžeme usuzovat, že sladkovodní mlž *Dreissena polymorpha* nebyl pravděpodobně poškozován během expozice mědi, protože po vyndání z expozice do depurace byl dále způsobilý filtrační schopnosti.

Zajímavé jsou také výsledky týkající se přichycených mlžů, protože nejvyšší podíl byl u všech koncentrací vždy po 24 hodinách v depuraci. To by mohlo souviset s tím, že již jedinci nebyli vystaveni v koncentracích mědi a zároveň mohli být ve stresu z nového prostředí. Rajagopal et al. (2005) ve své studii zmiňuje, že nepřichycení mlži se mají tendenci opět

přichycovat, což by vysvětlovalo, proč bylo více jedinců přichycených až po 24 hodinách od jejich manipulace. V expozici však žádný trend přichycených jedinců nebyl. Největší podíl přichycených mlžů v expozici (viz Graf 18) byl v koncentraci 20 µg/l a překvapivě nejmenší zastoupení přichycených jedinců *Dreissena polymorpha* (viz Graf 20) bylo v koncentraci 50 µg/l. Expozice mědi při 200 µg/l na mlže *Mytilus edulis* snižovala přichycení byssovými vlákny (Sunila 1981), stejného výsledku s nižšími koncentracemi se dosáhlo u mlže *Mytilus galloprovincialis* i ve studii Lowes et al. (2023), což neodpovídá trendu našich výsledků, jelikož více jak polovina jedinců vystavených v expozici s koncentrací 100 µg/l byla přichycených. V jiné studii Rajagopal et al. (2002) uvádí, že přichycený sladkovodní mlž *Dreissena polymorpha* přežil v laboratorních podmínkách déle než nepřichycení jedinci téhož druhu, a proto doporučuje při experimentech používat přichycené mlže.

V tomto experimentu byl také pozorován vliv koncentrace mědi na pohybovou aktivitu mlžů. Podíl jedinců v aktivním pohybu byl po třech hodinách v expozici i depuraci takřka podobný. V expozici byl nejvyšší podíl u kontroly (C), hodnoty se postupně snižovaly se zvyšováním koncentrace mědi. To může naznačovat vliv vysokých koncentrací mědi na mlže. Na rozdíl od toho u depurace koncentrace mědi, ve které byli mlži vystaveni v expozici, neovlivňovala výši podílu mlžů v aktivním pohybu. Po 24 hodinách v depuraci nebyl zaznamenán žádný jedinec s aktivní nohou. To může být dáno tím, že depurace probíhá v čisté vodě a je v ní méně podnětů pro mlže k opuštění dané pozice.

6.2 Respirometrie

Výsledky experimentu také ukázaly, že na výši respirace nemělo vystavení mlžů v mědi žádný významný vliv. Studie provedená Scott a Major (1972) avšak ukázala, že koncentrace mědi označená za práh toxicity v hodnotě 200 µg/l měla negativní vliv na respirační a kardiovaskulární depresi mlže druhu *Mytilus edulis*. Tato skutečnost napovídá tomu, že při vyšší koncentraci mědi může být respirace mlže ovlivněna. Kromě toho jiná studie Rao a Khan (2000) uvádí, že zvýšení teploty zásadně ovlivňuje respiraci mlže *Dreissena polymorpha*. To naznačuje, že je více faktorů, které mohou respiraci ovlivňovat.

6.3 Koncentrace mědi

Koncentrace mědi byla odlišná před a na konci experimentu, s tím se setkal i Clayton et al. (2000) ve své studii. Rozdíl mezi nominální a naměřenou hodnotou může být způsoben právě aktivitou mlžů, kteří odebírají kontaminanty z jejich prostředí. Hodnota koncentrací mědi byla měřena po týdnu expozice, zatímco vzorky byly uloženy do mrazáku. Kvůli této skutečnosti mohlo dojít k naměření nepřesných hodnot. Přístroj, který byl k měření použit, měl omezenou přesnost (± 10 µg/l), a proto byla preferována interpretace dle nominálních hodnot.

Je několik důvodů, které mohly způsobit snížení koncentrace mědi ve vodě během expozice, ale nejpravděpodobněji se jedná o filtraci mědi mlži a její následná bioakumulace v mlžích. To bylo potvrzeno i ve studii Lowes et al. (2023), kde bylo zjištěno, že se měď ve velkém množství akumulovala v žábrách, noze, hemolymfě a v neposlední řadě ve schránce mlže *Mytilus galloprovincialis*, ve které následně způsobovala úbytek vápníku. To pak může

mít zásadní vliv na celý ekosystém, protože to dokazuje potenciál mlžů jako čističů vody a zároveň jejich ohrožení.

7 Závěr

V literární rešerši této práce byla analyzována literatura, která shrnovala poznatky o sladkovodních mlžích a jejich vlivu na vodní ekosystém. Dále se rešerše věnovala problematice konkrétního druhu mlže slávičky mnohotvárné (*Dreissena polymorpha*). Také zde byla charakterizována měď a její působení na organismy. Experimentální část práce se zabývala vlivem mědi na sladkovodního mlže *Dreissena polymorpha*. Konkrétně se pozoroval dopad tohoto těžkého kovu na mortalitu a celkové chování mlže.

Byl očekáván vliv na respirační efektivitu mlže *Dreissena polymorpha* po expozici v mědi, avšak tento předpoklad nebyl potvrzen. To mohlo být způsobeno krátkou dobou expozice nebo nízkou koncentrací mědi. Nicméně bylo pozorováno, že mlži svým chováním na měď reagovali.

Celkově lze říci, že tato práce může přispívat k lepšímu porozumění vlivu mědi na mlže a jejich chování v prostředí. Výsledky tohoto experimentu mohou mít praktický význam pro ochranu vodních ekosystémů, nicméně je důležité brát v úvahu i různé faktory, které mohou ovlivnit reakci mlžů na měď. Z tohoto důvodu je vhodné provádět další výzkumy, aby bylo možné lépe porozumět této problematice.

8 Literatura

Alloway BJ. 2013. Sources of Heavy Metals and Metalloids in Soils. Pages 11–50 in Alloway BJ, editor. Heavy Metals in Soils. 3rd ed. Springer Netherlands, Dordrecht.

Bashnin T, Verhaert V, De Jonge M, Vanhaecke L, Teuchies J, Bervoets L. 2019. Relationship between pesticide accumulation in transplanted zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and community structure of aquatic macroinvertebrates. Environmental Pollution **252**:591–598.

Benedict A, Geist J. 2021. Effects of water temperature on glochidium viability of *Unio crassus* and *Sinanodonta woodiana*: implications for conservation, management and captive breeding. Journal of Molluscan Studies 87 (eyab011) DOI: 10.1093/mollus/eyab011.

Beran L. 1998. Vodní měkkýši ČR. ZO ČSOP Vlašim, Vlašim.

Beran L. 2002. Vodní měkkýši České republiky: rozšíření a jeho změny, stanoviště, šíření, ohrožení a ochrana, červený seznam. Přírodovědný klub v Uherském Hradišti, Uherské Hradiště.

Beran L. 2018. Slávička mnohotvárná – náš nejstarší přistěhovalec mezi mlži. Živa **66**:255–256.

Beran L. 2019. Distribution and recent status of freshwater mussels of family Unionidae (Bivalvia) in the Czech Republic. Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems **420**:15.

Binelli A, Della Torre C, Magni S, Parolini M. 2015. Does zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) represent the freshwater counterpart of *Mytilus* in ecotoxicological studies? A critical review. Environmental Pollution **196**:386–403.

Bogan AE. 2008. Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. Pages 139–147 in Balian E, Lévêque C, Segers H, Martens K, editors. Freshwater Animal Diversity Assessment. Springer Netherlands, Dordrecht.

Bogan AE. 1993. Freshwater Bivalve Extinctions (Mollusca: Unionoida). American Zoologist **33**:599–609.

Boukadida K, Banni M, Romero-Ramirez A, Clerandeanu C, Gourves P, Cachot J. 2022. Metal contamination and heat stress impair swimming behavior and acetylcholinesterase activity in embryo-larval stages of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Marine Environmental Research 179 (105677) DOI: 10.1016/j.marenvres.2022.105677.

Breton S, Capt C, Guerra D, Stewart D. 2018. Sex-Determining Mechanisms in Bivalves. Pages 165–192 in Leonard J, editor. Transitions Between Sexual Systems. Springer International Publishing, Cham.

Burlakova LE, Karatayev AY, Boltovskoy D, Correa NM. 2022. Ecosystem services provided by the exotic bivalves *Dreissena polymorpha*, *D. rostriformis bugensis*, and *Limnoperna fortunei*. Hydrobiologia **2022**:1–44.

Castro BB, Silva C, Macário IPE, Oliveira B, Gonçalves F, Pereira JL. 2018. Feeding inhibition in *Corbicula fluminea* (O.F. Muller, 1774) as an effect criterion to pollutant exposure: Perspectives for ecotoxicity screening and refinement of chemical control. *Aquatic Toxicology* **196**:25–34.

Claudi R, Prescott TH, Mastisky S, Coffey H. 2014. Efficacy of copper based algacides for control of quagga and zebra mussels. RNT Consulting Inc., Picton. Available from <http://www.rntconsulting.net/Publications/Articles/RNT2014AlgaecideMusselMortality.pdf> (accessed December 2022)

Clayton ME, Steinmann R, Fent K. 2000. Different expression patterns of heat shock proteins hsp 60 and hsp 70 in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) exposed to copper and tributyltin. *Aquatic Toxicology* **47**:213–226.

Cockell KA, Bertinato J, L'Abbé MR. 2008. Regulatory frameworks for copper considering chronic exposures of the population. *The American Journal of Clinical Nutrition* **88**:863–866.

Çoğun HY, Kargin F. 2004. Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere* **55**:277–282.

Collins JF, Klevay LM. 2011. Copper. *Advances in Nutrition* **2**:520–522.

Contardo-Jara V, Lorenz C, Pflugmacher S, Nützmann G, Kloas W, Wiegand C. 2011. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* **105**:428–437.

Curtis TM, Williamson R, Depledge MH. 2000. Simultaneous, long-term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper. *Marine Biology* **136**:837–846.

Dabi S. 2020. Effect and necessity of anthropogenic copper on fresh water aquaculture organisms: A review. *Open Journal of Fisheries Research* **4**:36–40.

Dauberschmidt C, Dietrich DR, Schlatter C. 1996. Toxicity of organophosphorus insecticides in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha* P. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **30**:373–378.

de Oliveira-Filho EC, Lopes RM, Paumgartten FJR. 2004. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere* **56**:369–374.

Dobler AH, Hoos P, Geist J. 2022. Distribution and potential impacts of non-native Chinese pond mussels *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) in Bavaria, Germany. *Biological Invasions* **24**:1689–1706.

Donnachie RL, Johnson AC, Sumpter JP. 2016. A rational approach to selecting and ranking some pharmaceuticals of concern for the aquatic environment and their relative importance compared with other chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **35**:1021–1027.

Dorsey A, Ingerman L, Swarts S. 2004. Toxicology profile for copper. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.

- Ekelund Ugge GMO, Jonsson A, Walstad A, Berglund O. 2022. Evaluation of transcriptional biomarkers using a high-resolution regression approach: Concentration-dependence of selected transcripts in copper-exposed freshwater mussels (*Anodonta anatina*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 90 (103795) DOI: 10.1016/j.etap.2021.103795.
- Evan Ward J, Shumway SE. 2004. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 300:83–130.
- Fanslow DL, Nalepa TF, Lang GA. 1995. Filtration Rates of the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) on Natural Seston from Saginaw Bay, Lake Huron. *Journal of Great Lakes Research* 21:489–500.
- Faria M, Carrasco L, Diez S, Riva MC, Bayona JM, Barata C. 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149:281–288.
- Fisher S, Dabrowska H, Waller D, Babcock-Jacks L, Zhang X. 1994. Sensitivity of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) life stages to candidate molluscicides. *Journal of Shellfish Research*. 13:373–377.
- Flemming CA, Trevors JT. 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air, and Soil Pollution* 44:143–158.
- Gaetke L. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189:147–163.
- Gamakaranage CSSK, Rodrigo C, Weerasinghe S, Gnanathasan A, Puvanaraj V, Fernando H. 2011. Complications and management of acute copper sulphate poisoning; a case discussion. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 6 (34) DOI: 10.1186/1745-6673-6-34.
- Garton DW, Johnson LE. 2000. Variation in growth rates of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, within Lake Wawasee. *Freshwater Biology* 45:443–451.
- Go JLC, Madrazo CF, Orbecido AH, de Castro MEG, Deocarís CC, Belo LP. 2021. Analysis of the copper removal kinetics of the Philippine giant bamboo (*Dendrocalamus asper*) in hydroponics. *Heliyon* 7 (e06208) DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e06208
- 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.
- Gomes T, Pinheiro JP, Cancio I, Pereira CG, Cardoso C, Bebianno MJ. 2011. Effects of Copper Nanoparticles Exposure in the Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science & Technology* 45:9356–9362.
- Gundacker C. 1999. Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the zebra mussel *Dreissena polymorpha pallas*. *Chemosphere* 38:3339–3356.

Hong JH, Duncan SE, Dietrich AM. 2010. Effect of copper speciation at different pH on temporal sensory attributes of copper. *Food Quality and Preference* **21**:132–139.

Chmist J, Szoszkiewicz K, Drożdżyński D. 2019. Behavioural Responses of *Unio tumidus* Freshwater Mussels to Pesticide Contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **77**:432–442.

Ilarri MI, Amorim L, Souza AT, Sousa R. 2018. Physical legacy of freshwater bivalves: Effects of habitat complexity on the taxonomical and functional diversity of invertebrates. *Science of The Total Environment* **634**:1398–1405.

ITIS. 2013. *Bivalvia* Linnaeus, 1758. Available from https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=79118#null (accessed January 2023).

Jacobson PJ, Neves RJ, Cherry DS, Farris JL. 1997. Sensitivity of glochidial stages of freshwater mussels (*Bivalvia: Unionidae*) to copper. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**:2384–2392.

Jorge MB, Loro VL, Bianchini A, Wood CM, Gillis PL. 2013. Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoidea*) chronically exposed to copper. *Aquatic Toxicology* **126**:137–147.

Kappes H, Haase P. 2012. Slow, but steady: dispersal of freshwater molluscs. *Aquatic Sciences* **74**:1–14.

Karatayev AY, Burlakova LE. 2022. What we know and don't know about the invasive zebra (*Dreissena polymorpha*) and quagga (*Dreissena rostriformis bugensis*) mussels. *Hydrobiologia* **2022**:1–74.

Karatayev AY, Burlakova LE. 2022. *Dreissena* in the Great Lakes: what have we learned in 30 years of invasion. *Hydrobiologia* **2022**:1–28.

Karatayev AY, Burlakova LE, Padilla DK. 1998. Physical factors that limit the distribution and abundance of *Dreissena polymorpha* (PALL). *Journal of Shellfish Research*. **17**:1219–1235.

Karatayev AY, Burlakova LE, Padilla DK. 2002. Impacts of Zebra Mussels on Aquatic Communities and their Role as Ecosystem Engineers. Pages 433–446 in Leppäkoski E, Gollasch S, Olenin S, editors. *Invasive Aquatic Species of Europe. Distribution, Impacts and Management*. Springer, Dordrecht.

Karatayev AY, Burlakova LE, Padilla DK. 2006. Growth rate and longevity of *Dreissena polymorpha* (Pallas): a review and recommendations for future study. *Journal of Shellfish Research* **25**:23–32.

Kennedy AJ, Millward RN, Steevens JA, Lynn JW, Perry KD. 2006. Relative Sensitivity of Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) Life-stages to Two Copper Sources. *Journal of Great Lakes Research* **32**:596–606.

- Klerks PL, Fraleigh PC. 1997. Uptake of Nickel and Zinc by the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **32**:191–197.
- Kobak J, Nowacki P. 2007. Light-related behaviour of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*, Bivalvia). Fundamental and Applied Limnology **169**:341–352.
- Kraak MHS, Lavy D, Peeters WHM, Davids C. 1992. Chronic ecotoxicity of copper and cadmium to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **23**:363–369.
- Kraak MHS, Toussaint M, Lavy D, Davids C. 1994. Short-term effects of metals on the filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Environmental Pollution **84**:139–143.
- Kraak MHS, Wink YA, Stuijzand SC, Buckert-de Jong MC, de Groot CJ, Admiraal W. 1994. Chronic ecotoxicity of Zn and Pb to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. Aquatic Toxicology **30**:77-89.
- Le TTY, Grabner D, Nachev M, García MR, Balsa-Canto E, Peijnenburg WJGM, Hendriks AJ, Sures B. 2021. Development of a toxicokinetic-toxicodynamic model simulating chronic copper toxicity to the Zebra mussel based on subcellular fractionation. Aquatic Toxicology 241 (106015) DOI: 10.1016/j.aquatox.2021.106015.
- 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**:1–14.
- Lopes-Lima M, et al. 2020. Freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) from the rising sun (Far East Asia). Molecular Phylogenetics and Evolution 146 (106755) DOI: 10.1016/j.ympev.2020.106755.
- Lopes-Lima M, Teixeira A, Froufe E, Lopes A, Varandas S, Sousa R. 2014. Biology and conservation of freshwater bivalves: past, present and future perspectives. Hydrobiologia **735**:1–13.
- Lowes HM, Eliason EJ, Snihur KN, Alessi DS, Blewett TA. 2023. Copper toxicity does not affect low tide emersion tolerance of *Mytilus galloprovincialis*. Marine Pollution Bulletin 189 (114750) DOI: 10.1016/j.marpolbul.2023.114750.
- Ludovisi A, Goretti E, Pallottini M, Lucentini L, Pizzirani C, Vizzini S, Mancinelli G. 2022. Stable isotope analysis reveals trophic segregation between the invasive zebra mussel *Dreissena polymorpha* and the native duck mussel *Anodonta anatina* in Lake Trasimeno (Italy). Hydrobiologia **849**:2091–2108.
- Malhotra N, Ger T-R, Uapipatanakul B, Huang J-C, Chen KH-C, Hsiao C-D. 2020. Review of Copper and Copper Nanoparticle Toxicity in Fish. Nanomaterials 10 (1126) DOI: 10.3390/nano10061126.
- Marie V, Gonzalez P, Baudrimont M, Bourdineaud J-P, Boudou A. 2006. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. BioMetals **19**:399–407.

- Naimo TJ. 1995. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology* **4**:341–362.
- Parry HE, Pipe RK. 2004. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology* **69**:311–325.
- Paukstis GL, Janzen FJ, Tucker JK. 2011. Response of Aerially-Exposed Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) to Subfreezing Temperatures. *Journal of Freshwater Ecology* **11**:513–519.
- Pollux BAJ, van der Velde G, bij de Vaate A. 2010. A perspective on global spread of *Dreissena polymorpha*: a review on possibilities and limitations. Pages 45–58 in van der Velde G, Rajagopal S, bij de Vaate A, editors. *The Zebra Mussel in Europe*. Backhuys Publishers, Nijmegen.
- Rajagopal S, van der Velde G, Jenner HA. 2002. Does status of attachment influence survival time of zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, exposed to chlorination?. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**:342–346.
- Rajagopal S, van der Velde G, van der Gaag M, Jenner HA. 2005. Byssal detachment underestimates tolerance of mussels to toxic compounds. *Marine Pollution Bulletin* **50**:20–29.
- Rajalakshmi S, Mohandas A. 2005. Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **62**:140–143.
- Rao DGVP, Khan MAQ. 2000. Zebra Mussels: Enhancement of Copper Toxicity by High Temperature and Its Relationship with Respiration and Metabolism. *Water Environment Research* **72**:175–178.
- Reeders HH, bij de Vaate A. 1990. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): a new perspective for water quality management. *Hydrobiologia* **200**:437–450.
- Scott DM, Major CW. 1972. The effect of copper (II) on survival, respiration, and heart rate in the common blue mussel, *Mytilus edulis*. *The Biological Bulletin* **143**:679–688.
- Seidlová T. 2023. Využití mikrorespirometrie u sladkovodních mlžů [Bakalářská práce in prep]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Serdar O. 2021. Determination of the Effect of Cyfluthrin Pesticide on Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) by Some Antioxidant Enzyme Activities. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences* volume **6**:77–83.
- Shrivastava AK. 2009. A review on copper pollution and its removal from water bodies by pollution control technologies. *Indian Journal of Environmental Protection*, **29**:552–560.
- Simone LRL, Mikkelsen PM, Bieler R. 2015. Comparative Anatomy of Selected Marine Bivalves from the Florida Keys, with Notes on Brazilian Congeners (Mollusca: Bivalvia). *Malacologia* **58**:1–127.

- Singh R, Gautam N, Mishra A, Gupta R. 2011. Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology* **43**:246–253.
- Sinkovič A, Strdin A, Svenšek F. 2008. Severe Acute Copper Sulphate Poisoning: A Case Report. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **59**:31–35.
- Stoeckel JA, Padilla DK, Schneider DW, Rehmann CR. 2004. Laboratory culture of *Dreissena polymorpha* larvae: spawning success, adult fecundity, and larval mortality patterns. *Canadian Journal of Zoology* **82**:1436–1443.
- Strayer DL. 2009. Twenty years of zebra mussels: lessons from the mollusk that made headlines. *Frontiers in Ecology and the Environment* **7**:135–141.
- Strayer DL. 2017. What are Freshwater Mussels Worth?. *Freshwater Mollusk Biology and Conservation* **20**:103–113.
- Strayer DL, Caraco NF, Cole JJ, Findlay S, Pace ML. 1999. Transformation of Freshwater Ecosystems by Bivalves: A case study of zebra mussels in the Hudson River. *BioScience* **49**:19–27.
- Sunila I. 1981. Toxicity of copper and cadmium to *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) in brackish water. *Annales Zoologici Fennici*, **18**:213–223.
- Tavares-Dias M. 2021. Toxic, physiological, histomorphological, growth performance and antiparasitic effects of copper sulphate in fish aquaculture. *Aquaculture* 535 (736350) DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.736350.
- Timpano AJ, Jones JW, Beaty B, Hull M, Soucek DJ, Zipper CE. 2022. Combined effects of copper, nickel, and zinc on growth of a freshwater mussel (*Villosa iris*) in an environmentally relevant context. *Aquatic Toxicology* 242 (106038) DOI: 10.1016/j.aquatox.2021.106038.
- Uličný J. 1892. Měkkýši čeští. Klub přírodovědecký, Praha.
- Vanderploeg HA, Liebig JR, Carmichael WW, Agy MA, Johengen TH, Fahnenstiel GL, Nalepa TF. 2001. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic *Microcystis* blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Erie. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**:1208–1221.
- Vaughn CC. 2018. Ecosystem services provided by freshwater mussels. *Hydrobiologia* **810**:15–27.
- Vaughn CC, Hakenkamp CC. 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology* **46**:1431–1446.
- Vaughn CC, Nichols SJ, Spooner DE. 2008. Community and foodweb ecology of freshwater mussels. *Journal of the North American Benthological Society* **27**:409–423.
- Walton WC. 1996. Occurrence of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the oligohaline Hudson River, New York. *Estuaries* **19**:612–618.

Wang N, et al. 2007. Acute toxicity of copper, ammonia, and chlorine to glochidia and juveniles of freshwater mussels (unionidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**: 2036–2047.

Watters A, Gerstenberger SL, Wong WH. 2012. Effectiveness of EarthTec® for killing invasive quagga mussels (*Dreissena rostriformis bugensis*) and preventing their colonization in the Western United States. *Biofouling* **29**:21–28.

Weber A, Jeckel N, Wagner M. 2020. Combined effects of polystyrene microplastics and thermal stress on the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Science of The Total Environment* 718 (137253) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137253.

Willis BE, Bishop WM. 2016. Understanding fate and effects of copper pesticides in aquatic systems. *Journal of Geoscience and Environment Protection* **4**:37–42.

Yruela I. 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**:145–156.

Zhang F, Man YB, Mo WY, Man KY, Wong MH. 2020. Direct and indirect effects of microplastics on bivalves, with a focus on edible species: A mini-review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **50**:2109–2143.

