

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie a ornitologická laboratoř



**Využití kumulačních vlastností mlžů pro biomonitoring
antropogenních polutantů v aquatických systémech**

Bakalářská práce

Petra Štifilová

B1501: Biologie - Systematická biologie a ekologie

Prezenční studium

Vedoucí práce: **RNDr. Petr Hekera, Ph.D.**

Olomouc 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením
RNDr. Petra Hekery, Ph.D. a s využitím citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci dne 4. 5. 2012

.....
vlastnoruční podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat zejména RNDr. Petru Hekerovi za ochotu a vstřícnost s jakou vedl mou bakalářskou práci, za odborné rady a celkovou spolupráci.

Dále bych chtěla velice poděkovat Mgr. Aleně Vlácilové, RNDr. Vladimíru Uvírovi, RNDr. Ivoně Uvírové a RNDr. Aloisi Čelechovskému za jejich pomoc a konzultace při tvorbě této práce.

Na závěr bych ráda vyjádřila poděkování své mamince za umožnění studia a podporu.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Petra Štifilová

Název práce: Využití kumulačních vlastností mlžů pro biomonitoring antropogenních polutantů v aquatických systémech.

Typ práce: bakalářská práce

Pracoviště: Katedra zoologie a ornitologická laboratoř

Vedoucí práce: RNDr. Petr Hekera, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2012

Abstrakt:

V rámci své bakalářské práce jsem se zaměřila na v současné době hojně diskutovanou tematiku pojednávající o potencionální schopnosti mlžů kumulovat do svých těl látky znečišťující životní prostředí. S tímto tématem bývá často spjata řada otázek, např.: Proč jsou mlži vhodnými organismy pro monitorování kvality životního prostředí? Jaký je mechanismus kumulace polutantů v jejich tělech? O jaké látky (polutanty) se jedná? Jakým způsobem lze zjistit, zda se dané látky skutečně vyskytují v tělech těchto živočichů? apod.

Vzhledem k tomu, že odpovědi na dané otázky hrají podstatnou roli v pochopení kumulačních procesů, pokusím se je v jednotlivých kapitolách této práce blíže objasnit.

Veškeré níže uvedené informace pocházejí z nastudovaných literárních zdrojů.

Klíčová slova: akumulace, biomarkery, *Dreissena polymorpha*, mikrovlnná mineralizace, mlži, polutanty, vodní ekosystém

Počet stran: 41

Počet příloh: 1

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname: Petra Štifilová

Title: Utilization of accumulation qualities of bivalves for biomonitoring of anthropogenic pollutants in aquatic systems.

Type of thesis: bachelor thesis

Department: Department of zoology and laboratory of ornithology

Supervisor: RNDr. Petr Hekera, Ph.D.

The year of presentation: 2012

Abstract:

In my thesis, I focus on a widely discussed topic concerning potential abilities of molluscs to accumulate pollutants into their bodies. There is a range of questions connected to this topic, such as: Why are molluscs suitable organisms for monitoring environmental quality? What is the mechanism of accumulation of pollutants in their bodies? What kind of substances (pollutants) are they? How to determine whether the given substances are actually present in the bodies of these animals? etc. Because the answers to these questions play an essential role in understanding the accumulation processes, I attempt to further clarify them in the individual chapters of this paper. All the undermentioned information comes from literary sources.

Key words: accumulation, aquatic ecosystem, biomarkers, molluscs, microwave mineralization, pollutants, Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)

Number of pages: 41

Number of appendices: 1

Language: Czech

Obsah

Seznam obrázků:	7
1. Úvod	8
2. Bivalvia	9
2.1. Anatomie mlžů.....	9
2.2. Schopnost mlžů kumulovat antropogenní polutanty	11
3. Antropogenní polutanty	13
3.1. Anorganické polutanty.....	13
3.2. Organické polutanty.....	15
3.3. Vstup polutantů do vodních ekosystémů	17
4. Osud toxických látek v tělech živočichů	18
4.1. Biomarkery polutantů v tělech mlžů.....	19
4.2. Místa kumulace polutantů.....	21
5. Zpracování a analýza biologických vzorků	23
5.1. Mikrovlnná mineralizace	24
6. Metodika	25
7. Závěr	29
8. Použité literární zdroje	30
9. Příloha	42

Seznam obrázků:

Obr.1: Schéma tělní struktury mlže (Lang et al., 1971 in Kvaček et al., 2000)	10
Obr.2: Rozdělení jedinců do velikostních tříd	25
Obr.3: Žábra: (a) Vypreparovaná žábra, (b) Detailní struktura žaber	26
Obr.4: Vypreparovaná bys.vlákna: (a) Byssova žláza s vlákny, (b) Detail byssovy žlázy	27
Obr.5: Rozmístění viscerální hmoty uvnitř lastur	27
Obr.6: Mikrovlnný mineralizátor (Berghof SW-2).....	28

1. Úvod

Biomonitoring lze z obecného hlediska popsat jako sledování výskytu cizorodých či znečišťujících látek v životním prostředí, prostřednictvím biologických indikátorů. Těmito indikátory mohou být jak rostlinné, tak i živočišné organismy. Vzhledem k vážnosti daného tématu a nezbytnosti detailnějšího výzkumu látek znečišťujících životní prostředí, jsem se rozhodla ve své práci zaměřit na kontaminaci vodního prostředí způsobenou vlivem antropogenních polutantů.

Zatímco se v dřívějších dekáдах k hodnocení čistoty povrchových vod využívala převážně technická zařízení, v posledních letech jsou upřednostňovány spíše biologické systémy podávající poměrně přesné údaje o znečištění vodního prostředí (Borcherding, 2006). Tyto systémy se od technických zařízení liší zejména schopností projevovat reálnou odezvu na toxicitu látek v jejich okolí. Díky této schopnosti je možné mít povědomí o znečištění daného prostředí po dobu několika let.

Mezi hojně využívané biologické systémy patří v současnosti systémy využívající bakterie (Putzgu & Gerhardt, 1994), řasy (Putzgu & Gerhardt, 1992), ryby (Sydor et al., 1982) či mlže rodu *Anodonta* (England & Heine, 1994), *Corbicula* (Ham & Peterson, 1994) nebo *Dreissena* (Kramer et al., 1989).

2. Bivalvia

Mlži jsou obecně považováni za druhou největší skupinu měkkýšů. Jsou široce rozšířeni jak ve sladkovodních, tak i v mořských ekosystémech. Počet popsáných recentních druhů se pohybuje kolem 7000, přičemž v naší fauně je možno nalézt přibližně 26 druhů (Sedlák, 2005).

2.1. Anatomie mlžů

Tělo těchto živočichů je bilaterálně souměrné, kryté tělní stěnou nazývanou pláštěm. Mezi pláštěm a viscerální masou se nachází plášťová dutina, obsahující komponenty několika tělních systémů. Z vnější strany je plášť částečně spojen s lasturami, tvořícími pevný kryt těla. Okraje pláště spolu často srůstají, výjimku tvoří pouze rozevíratelné štěrby pro vysunovatelnou nohu, inhalační a exhalační otvor (Sedlák, 2005). Svalnatá noha je využívána především k pohybu nebo k zahrabání do písku či bahna. Samotné vysunutí nohy z lastury je umožněno zejména pumpováním krve do nohy (Storer et al., 1979). U některých druhů se v těsné blízkosti nohy vytváří byssova žláza, jejíž vlákna umožňují přichycení jedince k pevnému podkladu.

Inhalační otvor je vstupním místem pro vodu, která je spolu s částicemi potravy unášena do vnitřní části plášťové dutiny. Voda dále přechází přes žábra (ktenidie), kde dochází k odevzdání kyslíku a současněmu zachycení potravních částic (Sedlák, 2005). Tyto částice stmelené slizem, vylučovaným mukózním řasinkovým epitelem, jsou pomocí cilií posouvány na spodní vrstvu ktenidií a poté přes labiální palpy do úst. Labiální palpy se uplatňují jak při transportu, tak při třídění částic potravy dle jejich velikosti a váhy (Storer et al., 1979).

Malé, lehké částice jsou pomocí palpálního povrchu přenášeny k ústnímu otvoru, zatímco velké částice bývají přenášeny na okraj palpální lamely odkud padají do pláště nebo nohy. Tento „odmítnutý“ materiál, zvaný pseudofaeces, transportovaný z ktenidií a palp, opouští plášťovou dutinu přes pedální ústí nebo častěji, cestou exhalačního otvoru. V druhém případě jsou částice přenášeny podél ventrálního řasnatého traktu pláště a spolu s vodou dochází k jejich vytlačení exhalačním otvorem ven z těla (Barnes, 1980).

Žábry mají řadu velice důležitých funkcí. Kromě výše zmíněné výměny plynů a transportu potravních částic se podílí i na exkreci, osmoregulaci, formování ochranného pláště či zvlhčení povrchového epitelu (Cajaraville et al, 1990).

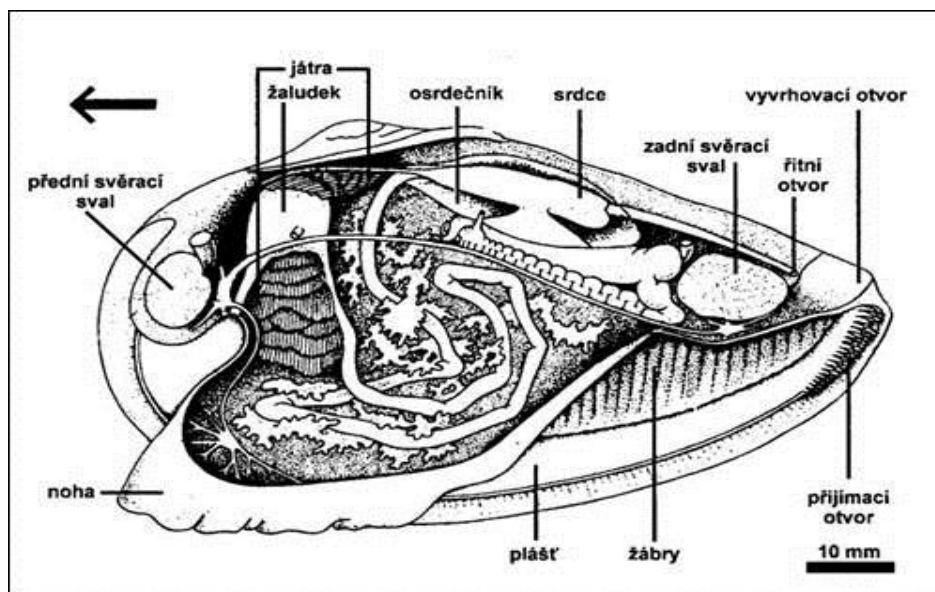
Trávicí systém zahrnuje kromě malých úst, nacházejících se za předním svěřacím svalem, mezi masitými labiálními palpami, také krátký jícen, okrouhlý žaludek s přilehlým hepatopankreatem, střevo procházející ve své konečné fázi perikardiem a řitní otvor vyúsťující do vyvrhovacího otvoru.

Oběhový systém je tvořen hřbetním srdcem, jež je obaleno v perikardiu. Samotné srdce se skládá ze dvou předsíní spojujících svalnatou komoru. Funkce komory spočívá v pumpování krve do přední aorty, která zásobuje nohu a vnitřnosti (kromě ledvin a žaber) a do zadní aorty, ze které je krev transportována do konečníku a pláště. Okysličená krev z pláště se vrací přímo do síně, zatímco krev cirkulující přes jiné orgány se shromažďuje v žíle vedoucí do ledvin. Z tohoto místa krev přechází do žaber, kde dochází k jejímu okysličení před návratem do srdce.

V těsné blízkosti perikardia se nachází párovité ledviny (metanefridia), které odebírají organický odpad z krve a perikardiální tekutiny. Vývody metanefridií zasahují do žaberní dutiny, ze které jsou odpadní látky transportovány do exhalačního otvoru.

Nervová soustava zahrnuje tři páry ganglií: cerebropleurální, pedální (nacházející se v noze) a visceroparietální (umístěné pod zadním svěřacím svalem). Každý pár ganglií je navzájem spojen komisurami, které tvoří spojení i mezi nervy a jednotlivými orgány (Storer et al., 1979).

Struktura těla mlžů je znázorněna na níže uvedeném obrázku (Obr.1).



Obr.1: Schéma tělní struktury mlže (Lang et al., 1971 in Kvaček et al., 2000)

2.2. Schopnost mlžů kumulovat antropogenní polutanty

Schopnost kumulace znečišťujících látek byla prokázána u některých druhů vodních i suchozemských živočichů (jde například o bentos a některé druhy mlžů či ryb).

Mlži jsou v současnosti hojně využíváni jako bioakumulátory polutantů vyskytujících se ve sladkovodních, mořských a estuárních ekosystémech a jako přímé měřítko dostupnosti těchto látek v životním prostředí (Chu et al., 1990; Berrow, 1991; Zatta et al., 1992; Mersch & Johansson, 1993; Camusso et al., 1994; Nelson et al., 1995). Jejich schopnost kumulace znečišťujících látek spočívá zejména v přijímání suspendovaných částic potravy z okolního prostředí či sedimentu a v přímém transportu těchto částic přes žábra (Jamil et al., 1999).

Nejnámějším druhem využívaným zejména v Evropě k monitorování kvality sladkovodních ekosystémů je Slávička mnohotvárná (*Dreissena polymorpha*) (Kraak et al., 1991; Mersch et al., 1996; Hendriks et al., 1998; Smolders et al., 2002; Pain & Parant, 2003). Tento invazivní druh, pocházející původně z ponto-kaspické oblasti, splňuje všechny podmínky testovacího organismu vhodného pro akumulační studie. Vyznačuje se zejména přisedlým způsobem života, dlouhou životností (spojenou s odolností vůči různým druhům znečištění) či vysoce efektivní filtrační aktivitou podporující kumulaci polutantů jak z vody, tak z potravních částic (Salazar & Salazar, 1997; Kraak et al., 1991; Hendriks et al., 1998; Becker & Tarradellas, 1994; Dauberschmidt et al., 1997).

Mezi další druhy mlžů, které jsou využívány k prokázání přítomnosti znečišťujících látek ve vodních systémech patří např. *Hyridella depressa* – u tohoto druhu byla zkoumána schopnost izolovat prvky v extracelulárních vápníko-fosfátových granulích (Byrne & Vesk, 1996; Adams et al., 1997). Dále je možné zmínit benthický druh *Corbicula fluminea*, která se stejně jako již zmíněná *D. polymorpha* živí suspendovaným materiálem přítomným ve vodním sloupci, ale narozdíl od ní využívá také vysunutelné nohy k přijímání částic sedimentu (Way & Hornbach, 1990). Druh *Scrobicularia plana* použitý k hodnocení kumulace stopových prvků (Luque et al., 2007). Mořský druh *Anadara granosa*, u kterého byla prokázána schopnost kumulace těžkých kovů (Yap et al., 2008), stejně jako u dalšího mlže *Cerastoderma edule* (Cheggour et al., 2001) či mlže *Perna viridis*, který je dle Yapa et al. (2003) schopen hromadit ve svém těle těžké kovy rezistentní k detoxikačním mechanismům měkkých tkání.

Některé z výše uvedených studií budou blíže rozebrány v následující kapitole zabývající se osudem toxických látek v tělech živočichů.

3. Antropogenní polutanty

V literárních zdrojích jsou poměrně často zmiňovány termíny „polutant“ či „kontaminant životního prostředí“. Tyto termíny jsou si z obsahového hlediska velice podobné, nicméně je mezi nimi možné najít jisté významové odlišnosti. Obecně lze polutanty i kontaminanty popsat jako chemické látky vyskytující se v životním prostředí v koncentracích, které značně přesahují míru jejich výskytu v jakékoliv složce životního prostředí. Rozdíl mezi těmito látkami je dán skutečností, že kontaminanty (oproti polutantům) nezpůsobují poškození jednotlivých organismů (Walker et al., 2001).

Polutanty, které mohou v důsledku nedbalé lidské činnosti pronikat do životního prostředí, lze obecně rozdělit na anorganické a organické.

3.1. Anorganické polutanty

Hlavními představiteli anorganických polutantů jsou kovy. Z chemického hlediska je kovy možné definovat jako prvky, které jsou dobrými vodiči elektřiny a obecně vstupují do chemických reakcí v podobě pozitivně nabitých iontů. Ačkoliv jsou kovy běžně považovány za elementy znečišťující životní prostředí, je důležité uvědomit si, že jde zároveň o přírodní látky (s výjimkou radioisotopů produkovaných v rámci nukleárních reakcí), které se na Zemi vyskytují už od počátku jejího vzniku (Walker et al., 2001). Díky této skutečnosti, je velká část kovů pro organismy esenciální.

Hlavní příčinou označení kovů jako polutantů je průmyslová či zemědělská činnost produkující široké spektrum kovů, poměrně často v blízkosti sladkovodních systémů, které v konečném důsledku končí právě v těchto vodních rezervoárech. Díky této skutečnosti jsou příspěvky kovů z antropogenních zdrojů mnohem vyšší než z původních zdrojů přírodních (Rodriguez et al., 2008). Rozsah, kterým lidská aktivita přispívá ke globálním cyklům kovů je možné znázornit pomocí faktoru zvaného „AEF“ (anthropogenic enrichment factor). Na základě znalosti tohoto faktoru u jednotlivých kovů bylo prokázáno, že lidská činnost zodpovídá za většinu globálních přesunů kadmia, olova, zinku a rtuti (Walker et al., 2001). Maltby et al. (1995) označil zinek, kadmium, chrom a olovo za hlavní kovové polutanty, představující základní složku brzdového obložení a pneumatik vozidel. Tyto kovy, smývané z povrchu silnice

srážkovou vodou, velice snadno kontaminují okolní půdu či vodní zdroje. Studie Camussa et al. (2001) pokládá za hlavní zdroj znečištění vodního prostředí olovem báňský průmysl, atmosférický přenos z průmyslových závodů či únik paliva z převozních lodí. Nicméně, v některých sladkovodních systémech může být toto znečištění ovlivňováno např. i rybářskou činností (zejména díky využívání olověných závaží).

Termín „těžké kovy“ byl hojně využíván především v minulosti pro popis kovů znečišťujících životní prostředí. Proto, aby tyto kovy získaly přívlastek „těžké“ musely mít hustotu, jejíž hodnota byla pětinasobně větší než hustota destilované vody. V dnešní době se spíše přihlíží k chemickému chování kovů než k hodnotě jejich hustoty, neboť i prvky, které nejsou vyloženě „těžké“ mohou být významnými polutanty. Jako příklad může být uveden hliník ($\rho = 2,70 \text{ g/cm}^3$). Jde o důležitý polutant, který v důsledku acidifikace jezer přechází v rozpustnou formu a stává se tak toxickým pro běžnou jezerní faunu i floru. Narozdíl od pesticidů, kovy nemohou být degradovány na méně toxickou formu.

Některé anorganické polutanty nejsou samy o sobě příliš toxické. Za jejich negativní dopad na životní prostředí zodpovídá především jejich nadměrné využívání, příkladem mohou být dusičnany a fosforečnany. Umělá dusíkatá hnojiva, která jsou hojně využívána v zemědělství, mají schopnost snadno pronikat do půdy, díky čemuž může dojít i ke kontaminaci přilehlých vodních toků. V případě kontaminace dusičnany se zvýší dostupnost dusíku v akvatických systémech, což může vést až k eutrofizaci vodních zdrojů.

Fosforečnany jsou dalším typem umělých hnojiv, často využívaných v zemědělství. Stejně jako v předešlém případě, mohou být tyto sloučeniny fixovány v půdním komplexu. Jejich přechod z půdy do vodních toků probíhá zejména prostřednictvím splachů půdy (při intenzivních deštích) či vlivem vodní eroze. V minulosti docházelo ke kontaminaci vodních systémů fosforečnany zejména prostřednictvím odtoků z továren na výrobu mýdla či odtoků z domácností obsahujících zbytky pracích prášků. V dnešní době mohou být významným zdrojem těchto sloučenin také fekální odpadní vody.

Mezi anorganické polutanty patří též metaloidy, vyskytující se v periodické soustavě prvků na pomezí kovů a nekovů. Tyto prvky mají tendenci vytvářet kovalentní vazby, což přináší dvě značná toxikologická rizika (Walker et al., 2001).

Prvním rizikem je jejich schopnost kovalentně se vázat na organické skupiny a tvořit tak lipofilní sloučeniny a ionty, přičemž některé z těchto sloučenin jsou vysoce toxické (např. tetraalkylolovo). Díky jejich lipofilitě je distribuce a toxické působení daných látek, v rámci živočichů a rostlin, odlišné od jednoduchých iontových forem stejných prvků.

Druhé riziko představuje schopnost způsobovat toxický efekt, vyvolaný jejich navázáním na nekovové složky buněčných makromolekul (např. vazba rtuti, olova či arsenu na sulfhydrylové skupiny proteinů) (Walker et al., 2001).

3.2. Organické polutanty

Převážná většina sloučenin obsahujících uhlík je označována jako „organická“. Výjimku tvoří některé kyslíkaté sloučeniny uhlíku, kterými jsou například oxidy (oxid uhličitý a oxid uhelnatý) či soli kyseliny uhličitě (uhličitany) nebo kyanidy. Molekuly, které se skládají pouze z uhlíku (např. grafit) či z uhlíku a vodíku (uhlovodíky), mají velice nízkou polaritu a díky tomu i nepatrnou rozpustnost ve vodě. Molekuly s vysokou polaritou mnohem snadněji vstupují do chemických a biochemických reakcí než ty s polaritou nízkou.

Níže popsané organické polutanty jsou antropogenními sloučeninami, které se objevily v životním prostředí až v průběhu minulého století. Jde tedy o evolučně krátký časový úsek, během kterého ještě nedošlo k vývoji obranných mechanismů umožňujících živočichům vypořádat se s toxickými efekty těchto sloučenin. Výjimku tvoří již existující obranné mechanismy, účinkující například proti xenobiotikům vyskytujícím se běžně v přírodě (pyretrin, rotenon, aj.).

Uhlovodíkové polutanty mají obecně nízkou polaritu, jsou tedy poměrně málo rozpustné ve vodě, ovšem dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a tucích. Lze je rozdělit na alifatické (alkany, alkeny a alkyny) a aromatické sloučeniny, obsahující benzenové jádro (Walker et al., 2001). Dle studie Jaffé et al. (1998) patří mezi hlavní zdroje uhlovodíkového znečištění v mořských systémech zejména fosilní paliva a s nimi spojená lodní doprava. Jako další, neméně důležitý zdroj uhlovodíků, je možné zmínit i automobilovou dopravu.

Polychlorované bifenylly (PCB) jsou komerční směsí vzájemně příbuzných sloučenin. Jde převážně o stabilní, nereaktivní, viskózní tekutiny, které se využívají

v podobě hydraulických, chladících a izolačních kapalin v transformátorech, změkčovačích barev a mazadlech (Walker et al., 2001). Hlavními zdroji znečištění jsou odpady z výroby výše zmíněných produktů či jejich nedbalé využívání a odstraňování (Waid, 1985-1987). Nicméně ve většině zemí byla již výroba látek založených na bázi PCB zakázána.

Organochlorové insekticidy tvoří poměrně velkou skupinu insekticidů se značně rozdílnou strukturou, vlastnostmi i využitím (Brooks, 1974). Jde o stabilní pevné látky s velice nízkou rozpustností ve vodě a poměrně vysokou lipofilitou. Některé z nich jsou stále ve své původní formě, některé až ve formě metabolitů. Nicméně, všechny jsou nervovými jedy.

Patrně nejznámějším organochlorovým insekticidem je DDT, hojně využívané k regulaci bacionosů v průběhu 2. světové války, k regulaci zemědělských škůdců či k likvidaci komárů rodu *Anopheles* v malarických oblastech Afriky.

Dalším insekticidem z této skupiny je Kelthane zvaný též Dicofol. Strukturou je velice podobný DDT, avšak jeho insekticidní aktivita je velice nízká. V tělech živočichů může způsobit poruchy endokrinní soustavy.

Organofosforové insekticidy jsou kapaliny lipofilního charakteru, případně pevné látky (Walker et al., 2001). Obecně jsou méně stabilní než organochlorové insekticidy a jejich rozklad pomocí chemických a biochemických činidel probíhá podstatně snadněji (Eto, 1974; Fest & Schmidt, 1982). V mnoha zemích se stále používají na ochranu zemědělských plodin nebo k regulaci bezobratlých škůdců.

Karbamátové insekticidy byly objeveny podstatně dříve než organochlorové či organofosforové insekticidy (Kuhr & Dorough, 1977). Převážně jde o pevné, zřídka kapalné látky, které se v živých organismech chovají jako inhibitory acetylcholinesterasy. Využívají se jako systémové insekticidy (Aldikarb či Karbofuran) nebo molluscidy (Methiokarb) (Walker et al., 2001).

Chlorfenoly patří mezi další sloučeniny vyskytující se v podobě rozličných ekologických polutantů. Jejich hlavním zdrojem jsou odpadní vody z továren na výrobu celulosy, kde vznikají navázáním chloru (užívaného jako bělicí činidlo) na fenolické látky vyskytující se ve dřevě dřeva (Södergren, 1991). Patrně jedním z nejznámějších polutantů tohoto typu je pentachlorfenol.

Jako další podstatné organické polutanty je možné zmínit organokovové sloučeniny, pyretroidové insekticidy či polybromované bifenoly (Walker et al., 2001).

3.3. Vstup polutantů do vodních ekosystémů

Obecný zdroj znečištění vodních ekosystémů představuje zejména vypouštění odpadních vod do vod povrchových. Zatímco odpady z domácností bývají převážně vypouštěny do odpadních systémů, průmyslové odpady jsou vypouštěny buď do odpadních systémů, nebo přímo do povrchových vod. Situace týkající se průmyslových odpadů se ale ve světě značně liší a bývá často odrazem rozvinutosti dané země (Walker et al., 2001). V České republice bývají průmyslové odpadní vody napojeny přímo na městskou odpadní kanalizaci nebo bývají přečišťovány vlastní čistírnou daného průmyslového podniku. Díky této skutečnosti by se z průmyslových zařízení měly do toků dostávat pouze „přečištěné“ odpadní vody.

Odpadní vody jsou tvořeny jak anorganickými, tak organickými polutanty. V tekoucích vodách mohou být tyto polutanty rozpouštěny či unášeny v podobě malých částic dál po proudu, stejně jako mohou být sorbované na povrchu anorganických či organických částic nebo mohou vytvářet sedimenty ukládané na dnech vodních toků.

Mezi hlavní místa vstupu polutantů do vodních systémů patří zaústění odpadních vod, kterým vytéká široká škála organických i anorganických látek z komerčních i domácích zdrojů. Dále je možné zmínit případné odtoky z průmyslových objektů (jejichž složení závisí především na průmyslové činnosti), odtoky z jaderných elektráren, úniky polutantů z ropných vrtů, ztroskotaných lodí či kontejnerů skladovaných na dnech oceánů.

Ze vzduchu vstupují znečišťující látky do povrchových vod v podobě prachových částic nebo kapének, prostřednictvím dešťových srážek či sněhu. Polutanty obsažené v půdě mohou být do vodních systémů transportovány prostřednictvím vydatných srážek (kdy jsou smývány z povrchu půdy do vodních toků) či prostřednictvím průsaků (Walker et al., 2001).

4. Osud toxických látek v tělech živočichů

Příjem antropogenních polutantů živočichy může probíhat několika způsoby. U vodních obratlovců a bezobratlých, vystavených přímému působení polutantů rozptýlených ve vodním prostředí, probíhá příjem chemikálií nejčastěji prostřednictvím dýchacího systému či pokožky. Neméně důležitý je ovšem i příjem polutantů prostřednictvím potravních částic. Tento způsob příjmu látek je typický jak pro vodní bezobratlé, tak např. i pro mořské savce nacházející se na vrcholu potravního řetězce. U těchto živočichů se nepředpokládá rozsáhlejší příjem toxických látek přímo z vody (vzhledem k absenci žaber a nízké propustnosti pokožky pro organické molekuly).

U obratlovců jsou absorbované polutanty roznášeny do těla prostřednictvím krevního řečiště (v menší míře i krevní lymfy), zatímco u bezobratlých tento transport probíhá přes hemolymfu (Walker et al., 2001). Do krevního řečiště jsou látky distribuovány pomocí trávicího systému (střeva či žaludku), dýchacího systému nebo pokožky. Naopak z krevního řečiště přechází molekuly do tkání přes epiteliální bariéry nacházející se mezi tkáněmi a krví. Jako každé biomembrány jsou i tyto epiteliální membrány tvořeny souvislou vrstvou fosfolipidů, proto jimi snadno pronikají molekuly lipofilního charakteru.

Z krve bývají látky transportovány do již zmíněných tkání, tělních orgánů a cílových buněk. Poměrně snadno se dostávají do jater (hepatopankreatu) či srdce, naopak transport do mozku bývá znesnadněn díky přítomnosti hematoencefalické bariéry. V případě absorpce chemikálií přes plíce či kůži není nutná jejich distribuce do krevního řečiště (tyto tkáně bývají vystaveny přímému působení toxických látek) (Knejzlík et al., 2000).

Dle Timbrella (1999) lze enzymatický metabolismus řady lipofilních látek popsat pomocí dvou biotransformačních fází. Počáteční biotransformace (fáze I) zahrnuje oxidační, hydroxylační, deaminační, hydrolytické či redukční procesy, které vedou ke tvorbě metabolitů obsahujících hydroxylové skupiny. Tyto skupiny jsou nezbytné pro konjugací reakce typické pro druhou fázi biotransformace. Obě zmíněné fáze vedou ke tvorbě produktů charakteristických podstatně větší rozpustností, než jakou vykazovala původní toxická látka. Díky zvýšené rozpustnosti vzniklých konjugátů může dojít k jejich snadnému vyloučení z těla (Walker et al., 2001).

Hlavní třídy enzymů (fáze I) metabolizujících xenobiotika v tělech živočichů, byly popsány ve studii Gibsona & Sketta (1986). Jde zejména o mikrosomální monooxygenasy (vyskytující se v endoplazmatickém retikulu mnoha živočišných tkání, speciálně v játrech obratlovců či hepatopankreatu a střevech bezobratlých), karboxylesterasy (přítomné např. v endoplazmatickém retikulu jaterních buněk), reduktasy, aj.

Mezi enzymy katalyzující konjugací reakce v druhé fázi, patří zejména enzymy ze třídy transferas (např. glukuronyltransferasa, sulfotransferasa či glutathion-S-transferasa) (Walker et al., 2001).

Chemické látky přeměněné v průběhu biotransformačních reakcí jsou z buněk transportovány do krevního řečiště a následně vylučovány z těla v podobě moči nebo výkalů (Knejzlík et al., 2000).

4.1. Biomarkery polutantů v tělech mlžů

Jak již bylo řečeno ve druhé kapitole, mlži jsou skupinou živočichů, která se hojně využívá k hodnocení stupně kontaminace vodních ekosystémů. Při studiích kumulačních schopností těchto organismů hrají podstatnou roli biomarkery (vyskytující se přímo v tělech těchto živočichů), které v současnosti představují alternativu přímého stanovení obsahu kovů v tělech mlžů. Používání těchto přirozených indikátorů je vhodné zejména díky jejich vypovídací schopnosti o vystavení organismu okolnímu znečištění. Jednou z mála nevýhod ale může být jejich poměrně náročná analýza.

Jako hlavní biomarkery, citlivé na přítomnost kovů ve vodních organismech, byly na základě několika studií (Pavičić et al., 1993; Viarengo et al., 1999; Isani et al., 2000) navrženy metallothioneny (MT). Jde o cytosolické proteiny, vyznačující se nízkou molekulovou hmotností a vysokým obsahem cysteinových zbytků. Tyto proteiny se podílí na příjmu, transportu a buněčné regulaci esenciálních prvků (mědi a zinku) a na buněčné ochraně zprostředkované vazbou a detoxikací kovových iontů (např. při zvýšené koncentraci kadmia, rtuti, stříbra, mědi, zinku, aj.) (Marie et al., 2006). Metallothioneny také slouží jako „vychytávače“ volných radikálů a jako zprostředkovatele imunitních reakcí (Kägi, 1991; Nordberg, 1998; Viarengo et al., 2000). Za silné induktory syntézy metallothionenů jsou považovány kadmium, měď,

zinek a rtuť. Nicméně biosyntéza těchto proteinů může být indukována nejen kovy ale i hormony, produkty oxidačního stresu, atd. (George & Olsson, 1994; Andrews, 2000).

Ačkoliv byla u řady mlžů prokázána schopnost indukce MT výše zmíněnými kovy, ukázalo se, že jednotlivé druhy mohou na přítomnost daných kovů reagovat zcela odlišně. Jako příklad je možné uvést druh *Pyganodon grandis* a *Mytilus edulis*, u kterých množství MT jasně odpovídá koncentracím kadmia a mědi kumulované v jednotlivých částech těla. Nicméně pro zinek tato skutečnost neplatí (Couillard et al., 1993; George & Langston, 1994). Opačná situace pak nastává u druhu *Mytilus galloprovincialis*, kde obsah MT silně koreluje s obsahem zinku nebo u druhu *Dreissena polymorpha*, u kterého expozice mědi nemá vliv na změny koncentrace MT (Irato et al., 2003; Lecoeur et al., 2004).

V současnosti jsou k monitorování kvality sladkovodních systémů (prostřednictvím analýzy metallothionenových koncentrací) využívány druhy *Corbicula fluminea* a *Dreissena polymorpha* (Baudrimont et al., 1999; de Lafontaine et al., 2000; Kwan et al., 2003).

Jako hlavní místo kumulace a následné detoxikace kovů je u měkkýšů označována trávicí žláza (hepatopankreas) (Herwig et al., 1989; Soto & Marigómez, 1997; Marigómez et al., 2002). Důležitou buněčnou složkou této žlázy je endolysozomální systém trávicích buněk podílející se na metabolickém zpracování kovových iontů (Marigómez et al., 1995; Dimitriadis & Papadaki, 2004).

Lysozomy jsou buněčné organely obsahující velké množství specifických hydrolas podílejících se na intracelulárním rozkladu endogenních či exogenních látek (Cajaraville et al., 1995a,b). Jsou známy dva typy lysozomů-primární a sekundární. Pro sekundární lysozomy je typické, že mohou kromě hydrolas obsahovat také lipofuscinová granula. Tato granula, jež jsou koncovými produkty peroxidace lipidů (Nagy, 1988; Viarengo & Nott, 1993), se svou vazbou na kationty kovů výrazně podílí na jejich detoxikaci (George, 1983a,b). V průběhu vývoje sekundárních lysozomů může dojít k růstu lipofuscinových granulí (v závislosti na kumulaci konečných produktů peroxidace) (George & Viarengo, 1985; Viarengo, 1989; Viarengo & Nott, 1993). Tento granulární růst indukující zvětšení lysozomální velikosti, může v konečném důsledku vést až ke zvýšení počtu samotných lysozomů (Lowe et al., 1981; Cajaraville et al., 1991,1995a,b). Tato skutečnost byla potvrzena i prací Giambériniho & Cajaraville (2005), kdy byla zkoumána reakce lysozomů trávicí žlázy, u druhu *Dreissena polymorpha*, při expozici kadmii. V rámci tohoto studia bylo prokázáno, že

po týdenním vystavení nejnižším koncentracím kadmia (potencionálně se vyskytujícím v životním prostředí), bylo v trávicích buňkách patrné působení lysozomálního systému. Toto působení mělo charakter strukturálních změn zahrnujících jak zvýšení počtu, tak i velikosti lysozomů. Podobné změny struktury byly pozorovány i u mořských mlžů vystavených působení zinku, mědi a kadmia a to v rámci terénních i uměle vytvořených podmínek (Etxeberria et al., 1994; Regoli et al., 1998). Díky těmto prokazatelným změnám mohou být lysozomální reakce využívány jako buněčné markery (Moore, 1985; Cajaraville et al., 1995a,b).

V kapitole číslo 2 jsem se zmínila o studii Veska & Byrne (1999), která se zabývala schopností kumulace kovů tkáňovými granulemi druhu *Hyridella depressa*. Za použití rentgenové mikroanalýzy, byly u tohoto mlže objeveny dva typy granulí. Prvním typem byly granule obsahující vápník a fosfor. Druhým typem byly tzv. S-granule, které se svým vzhledem a složením podobají granulím s předpokládaným výskytem již dříve zmíněného metallothionenu (George & Pirie, 1979; High et al., 1997). Pro S-granule byla typická přítomnost mědi, zinku, olova, železa či síry (Veska & Byrne, 1999). Díky těmto skutečnostem se autoři dané studie domnívají, že by rentgenová mikroanalýza granulí, vyskytujících se ve tkáních mlžů, mohla být přínosem pro studium kontaminace sladkovodních ekosystémů.

4.2. Místa kumulace polutantů

Jak již bylo dříve zmíněno, hlavním místem kumulace polutantů v tělech mlžů je trávicí žláza nebo-li hepatopankreas. Hepatopankreas však bývá zkoumán zejména v kontextu s přítomností lysosomálních reakcí a s nimi spojenou možností přímého stanovení kovů. Poměrně častěji se ale využívá stanovení jednotlivých prvků na základě speciálních analytických metod (AAS, autometallografie, aj.). V rámci těchto metod je možné analyzovat celá těla nebo se zaměřit na konkrétní tělní části (lastury, byssova vlákna, gonády, žábra). Jednotlivé druhy mlžů se mohou ve svých kumulačních schopnostech značně lišit. Tato skutečnost je velice dobře patrna v Tabulce č.1 pocházející ze studie Jamila et al. (1999), zabývající se srovnáním koncentrací jednotlivých prvků v tělech některých druhů mlžů. Oproti tomu práce Gundackera (1999) zabývající se analýzou těžkých kovů v jednotlivých tělních částech těla mlže *Dreissena polymorpha* naznačuje,

že vysoké koncentrace olova, mědi a zinku je možné najít jak ve viscerální hmotě, tak i v byssových vláknech. Žábra jsou poté typická zvýšenou koncentrací mědi.

5. Zpracování a analýza biologických vzorků

Velice významnou částí analytického zpracování vzorku je jeho příprava. Tato příprava se může značně lišit v závislosti na zvolené analytické metodě sloužící ke stanovení jednotlivých prvků nacházejících se v odebraném materiálu. Většina elementárních analytických metod využívaných běžně v laboratoři, vyžaduje částečný nebo úplný rozklad původní hmoty (příkladem může být gravimetrie, spektrometrie či chromatografie). Jen poměrně malé množství metod je schopno provést analýzu vzorku bez předchozího zpracování. Jde například o termogravimetrii, spektrografické metody či neutronovou aktivační analýzu (de Oliveira, 2003). Z fyzikálního hlediska vede předchozí zpracování ke snížení viskozity či zvýšení homogenity daného materiálu. Z chemického hlediska naopak zajišťuje rozložení vazeb (nebo případných formací), ve kterých byl analyt vázán. Samotný rozklad organické hmoty je umožněn pouze za předpokladu, že při destrukci této hmoty dojde k překonání poměrně vysoké aktivační energie.

Metody vedoucí k rozkladu biologických vzorků je možné na základě jejich charakteru rozdělit do dvou kategorií. První kategorií jsou metody suchého rozkladu zahrnující například spalování ve vysokotlaké nádobě, vysokoteplotní rozklad v muflové peci, aj. Pro tyto metody obecně platí, že rozklad vzorku probíhá v otevřeném systému působením vzduchu a atmosférického tlaku. Nicméně, podstatnou nevýhodou těchto metod bývají ztráty těkavých složek (rtuti, olova, atd.) či časová a energetická náročnost samotného procesu (obecně se tento proces skládá ze čtyř hlavních částí-vysoušení, zuhelnatění, zpopelnění a konečného loužení popela). Druhou kategorií jsou metody tzv. mokrého rozkladu. Tento rozklad vyžaduje přítomnost několika faktorů-zvýšené teploty, minerálních kyselin a atmosférického tlaku. Přítomnost minerálních kyselin má za následek kyselou hydrolýzu a následnou oxidaci vzorku, vedoucí k narušení jeho původní struktury (Mader & Čurdová, 1997). Mezi nejčastěji používané minerální kyseliny, působící jako oxidační činidla, patří například kyselina dusičná či směsi kyseliny dusičné a peroxidu vodíku, kyseliny dusičné a kyseliny sírové, aj. (Hoenig et al., 1996; Ostapczuk et al., 1990; Angerer et al., 1988).

Je známo několik metod založených na mokrému rozkladu biologického materiálu. Jako příklad je možné uvést rozklad využívající energie infračerveného

záření, rozklad využívající ultrazvukového působení či rozklad vyvolaný působením mikrovlnné energie (de Oliveira, 2003).

5.1. Mikrovlnná mineralizace

Rozklad vzorku prostřednictvím mikrovlnné mineralizace je v současné době hojně používanou metodou vyznačující se řadou předností. Vzhledem k tomu, že rozklad vzorku probíhá v uzavřeném systému, dochází ke značnému zamezení ztrát těkavých prvků. Další výhodou je např. i podstatně nižší spotřeba reakčních činidel (oproti klasickému rozkladu v otevřených systémech), kratší doba samotného rozkladného procesu či možnost naprogramování průběhu rozkladu, který bude nejlépe odpovídat nárokům zpracovávaného materiálu (Mader & Čurdová, 1997). Vzhledem k uvedeným přednostem jsem i já při zpracování odebraných vzorků využila metody mikrovlnné mineralizace.

Jak již z názvu vyplývá, mikrovlnná mineralizace je založena na mikrovlnném záření. Mikrovlnné záření je typem elektromagnetického záření o frekvenci 3-300 GHz. Toto záření má schopnost vyvolat v molekulách rotaci dipólů či pohyby iontů, vedoucí k vibraci těchto molekul. Z dané skutečnosti je tedy možné usuzovat, že pokud látka absorbuje mikrovlnnou energii o jisté frekvenci (v analytické chemii se využívá frekvence 24,5 GHz), dojde ke zvýšení její teploty. Při mikrovlnné digesci se využívají nádoby vyrobené z materiálů propustných pro mikrovlnné záření (př. křemenné sklo, polytetrafluorethylen). Díky tomu, záření proniká do vnitřního prostoru nádoby, kde reaguje s jejím obsahem (vzorkem nacházejícím se v reakční směsi) a způsobuje jeho ohřev. V současnosti se můžeme setkat se dvěma typy mikrovlnných rozkladných zařízení. První využívá prostor s rozptýlenou mikrovlnnou energií, zatímco druhé lokalizuje mikrovlnné záření do místa, kde má dojít k rozkladu vzorku. Příkladem mineralizačního systému využívajícího fokusované záření je např. zařízení firmy Anton Paar či Berghof. U těchto systémů probíhá rozklad matrice za vysokého tlaku. Z hlediska bezpečnosti je v nádobách kontrolován tlak i teplota pomocí speciálních senzorů nacházejících se ve stěnách těchto nádob (Mader & Čurdová, 1997).

6. Metodika

Vzhledem k hojně dostupnosti a pozitivním výsledkům předchozích studií jsem při analýze vybraných antropogenních polutantů ve sladkovodních systémech v rámci své bakalářské práce využila jako modelový organismus *Dreissena polymorpha*.

Vzorky živočichů byly odebrány z vodních nádrží nacházejících se v olomouckém kraji (zatopený lom Výkleky a pískovna s aktuální těžbou štěrkopísku Troubky). Prvním krokem v mé práci bylo rozřídění nasbíraných živočichů, na základě jejich velikostí, do dvou velikostních tříd (20-29mm; ≥ 30 mm) (Obr.2).



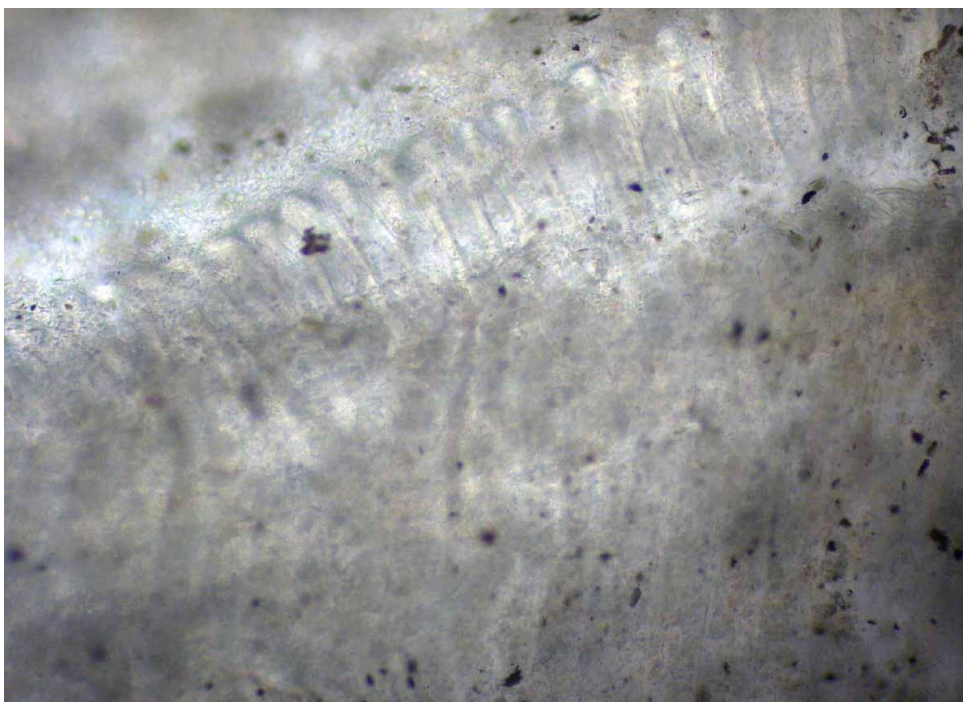
Obr.2: Rozdělení jedinců do velikostních tříd

Ze selektovaných jedinců (cca 40 jedinců) jsem poté vypreparovala žábra (Obr.3a,b), byssovu žlázu s vlákny (Obr.4a,b), vnitřní viscerální masu (Obr.5) a lasturu. Po získání potřebné gramáže jednotlivých částí (≥ 1 g), byly tyto vzorky vloženy do sušičky a vysoušeny při teplotě 105°C po dobu dvou hodin.

(a)



(b)

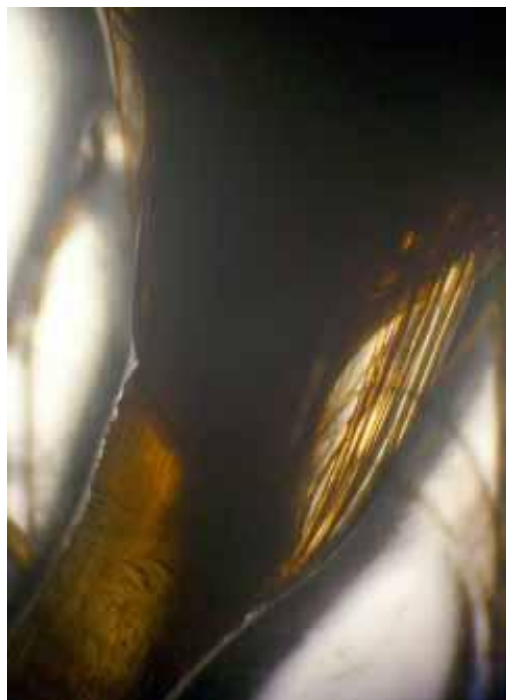


Obr.3: Žábra: (a) Vypreparovaná žábra, (b) Detailní struktura žaber

(a)



(b)

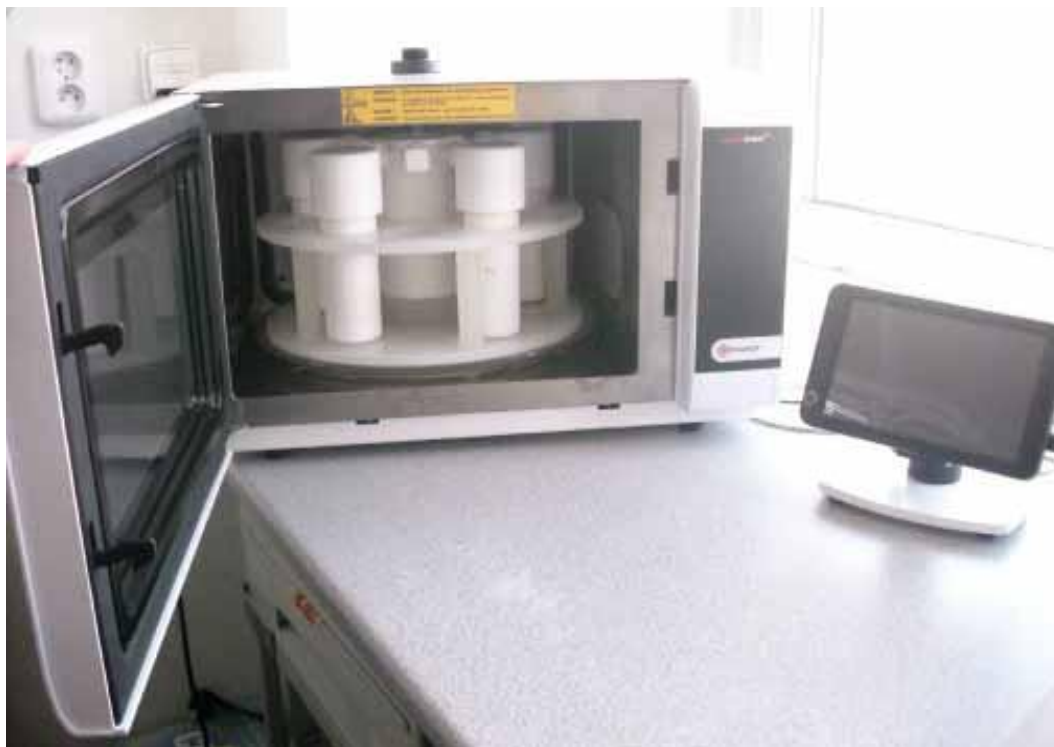


Obr.4: Vypreparovaná bys.vláknna: (a) Byssova žláza s vlákny, (b) Detail byssovy žlázy



Obr.5: Rozmístění viscerální hmoty uvnitř lastur

Po vysušení byly vzorky uloženy do exikátoru a to do doby dalšího zpracování. Dále následovala homogenizace těchto vzorků pomocí třecí misky a tloučku. Rozdrcený a homogenizovaný materiál byl následně vložen do teflonových nádob využívaných při mikrovlnné digesti a doplněn kyselinou dusičnou a peroxidem vodíku (v poměru 7:1 ml). Po přenesení nádob se vzorky do mikrovlnného zařízení (Obr.6) a nastavení aplikace vhodné pro mineralizaci biologického materiálu, byla spuštěna mikrovlnná mineralizace.



Obr.6: Mikrovlnný mineralizátor (Berghof SW-2)

V případě přítomnosti nezmineralizovaných organických částic (typických hnědým až černým zbarvením) ve vzorku podrobenému mineralizaci, bylo nutné mineralizaci opakovat. V případě získání čistého vzorku, mohlo dojít k jeho doplnění destilovanou vodou na žádaný objem (50 ml). Na závěr byl tento vzorek přefiltrován do plastové zkumavky a připraven k analýze procesem atomové absorpční spektrometrie.

V rámci mé práce jsem k analýze antropogenních polutantů využila výše uvedených tělních částí (lastur, byssových vláken, žaber a zbylé tělní masy) k získání předběžných informací o výskytu vybraných prvků v jednotlivých tělních částech a také pro osvojení dané metodiky.

7. Závěr

Na začátku této práce bylo položeno několik základních otázek spojených s problematikou kumulace antropogenních polutantů v tělech mlžů. Šlo o otázky typu:

Proč jsou mlži vhodnými bioindikátory životního prostředí?

Jejich hojné využití v rámci biomonitoringu spočívá zejména v jejich vlastnostech, ať už jde např. o jejich hojné rozšíření, přisedlý způsob života, relativní odolnost vůči různým druhům znečištění či jejich efektivní filtrační aktivitu.

Jaký je mechanismus kumulace polutantů v jejich tělech?

První fází spojenou s kumulací polutantů je samotný příjem látek do těla. Ten se u vodních živočichů děje prostřednictvím dýchacího systému, pokožky či potravních částic. Absorbované polutanty jsou následně roznášeny do jednotlivých částí těla pomocí krve (u obratlovců) nebo hemolymfy (u bezobratlých). Z krve (hemolymfy) jsou pak chemikálie transportovány do tkání, posléze konkrétních tělních orgánů a cílových buněk, kde jsou metabolizovány prostřednictvím specifických enzymatických tříd.

O jaké látky (polutanty) se jedná?

Může se jednat o polutanty anorganického typu (např. kovy či umělá hnojiva-dusičnany, fosforečnany) či organického typu (např. polychlorované bifenylly, organochlorové, organofosforové či karbamátové insekticidy, aj.).

Jakým způsobem lze zjistit, zda se dané látky skutečně vyskytují v tělech těchto živočichů?

Přítomnost chemikálií v tělech mlžů je možno stanovit na základě standardních analytických metod jako je atomová absorpční spektrometrie či autometallografie. Taktéž je možné využít analýz biomarkerů, představujících v současné době alternativu přímého stanovení obsahu kovů v tělech živočichů.

V rámci mé bakalářské práce jsem se blíže seznámila s problematikou antropogenních polutantů a jejich působení na mlže a vodní ekosystémy jako takové. Tato tematika mi připadá velice zajímavá, a proto bych se jí ráda zabývala i nadále v rámci své diplomové práce, ve které bych chtěla využít získaných poznatků a výše zmíněné metodiky analýzy polutantů pro výzkum koncentrací znečišťujících látek v tělech mlže *Dreissena polymorfa* v rámci oblastí ČR.

8. Použité literární zdroje

- Adams, S.M., Shorey, C.D. & Byrne, M. (1997): An ultrastructural and microanalytical study of metal-ion content in granular concretions of the freshwater mussel *Hyridella depressa*. *Micron* 28: 1-11.
- Andrews, G.K (2000): Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology* 59: 95-104.
- Angerer J., Fleischer, M., Machata, G., Pilz, W., Stoepler, M. & Zorn, H. (1988):
In: Angerer, J. & Schaler, K.H. editor. *Analyses of hazardous materials*. DFG, Berlin. 2.
- Barnes, R.D. (1980): *Invertebrate Zoology*. Fourth edition. Philadelphia: Saunders College Publishing. 389-397.
- Baudrimont, M., Andres, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C. & Boudou, A. (1999): Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 2472–2477.
- Becker-van Slooten, K. & Tarradellas, J. (1994): Accumulation, depuration and growth effects of tributyltin in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* under field conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 755-762.
- Berrow, S.D. (1991): Heavy metals in sediments and shellfish from Cork Harbour, Ireland. *Marine Pollution Bulletin* 22: 467–469.
- Bocherding, J. (2006): Ten years of practical experience with the Dreissena-Monitor, a biological early warning system for continuous water quality monitoring. *Hydrobiologia* 556: 417–426

- Brooks, G.T. (1974): Chlorinated insecticides (2 vols). Cleveland, OH: CRC Press.
- Byrne, M. & Vesik, P.A. (1996): Microanalysis of elements in granules in *Hyridella depressa* (Bivalvia): multivariate analysis and biomonitoring potential. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 2: 91-97.
- Cajaraville, M.P., Marigómez I. & Angulo E. (1990): Light and electron microscopic study of the gill epithelium of *Littorina littorea* (Gastropoda: Prosobranchia). *Biological Structure and Morphology* 3(1): 1–12.
- Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A. & Angulo, E. (1991): Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum derived hydrocarbons. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21: 395–400.
- Cajaraville, M.P., Abascal, I., Etxeberria, M. & Marigómez, I. (1995a): Lysosomes as cellular markers of environmental pollution: time and dose dependent responses of the digestive lysosomal system of mussels after petroleum hydrocarbon exposure. *Environmental Toxicology and Water Quality* 10: 1–8.
- Cajaraville, M.P., Robledo, Y., Etxeberria, M. & Marigómez, I. (1995b): Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. In: Cajaraville MP, editor. *Cell Biology in Environmental Toxicology*. Bilbao: University of the Basque Country Press Service. 29–55.
- Camusso, M., Balestrini, R., Muriano, F. & Mariani, M. (1994): Use of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* to assess trace metal pollution in the Lower River Po (Italy). *Chemosphere* 29: 729–745.
- Camusso, M., Balestrini, R. & Binelli, A. (2001): Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere* 44: 263-270.

- Couillard, Y., Campbell, P.G.C. & Tessier, A. (1993): Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnology and Oceanography* 38: 299–313.
- Dauberschmidt, C., Dietrich, D.R. & Schlatter, C. (1997): Esterases in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*: activities, inhibition and binding to organophosphates. *Aquatic Toxicology* 37: 295-305.
- de Lafontaine, Y., Gagne, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P. & Chan, H.M. (2000): Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50: 51–71.
- de Oliveira, E. (2003): Sample preparation for atomic spectroscopy: Evolution and future trends. *The Journal of the Brazilian Chemical Society* 14 (2): 174-182.
- Dimitriadis, V.K. & Papadaki, M. (2004): Field application of autometallography and X-ray microanalysis using the digestive gland of the common mussel. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 31–7.
- Englund, V.P.M. & Heino, M.P. (1994): Valve movement of *Anodonta anatina* and *Unio tumidus* (Bivalvia, Unionidae) in a eutrophic lake. *Annales Zoologici Fennici* 31: 257–262.
- Eto, M. (1974): *Organophosphorus insecticides: Organic and biological chemistry*. Cleveland, OH: CRC Press.
- Ettxeberria, M., Sastre, I., Cajaraville, M.P. & Marigómez, I. (1994): Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd and Zn) in mussels collected from a zinc-polluted site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27: 338–345.

- Fest, C. & Schmidt, K.J. (1982): Chemistry of organophosphorus pesticides, 2nd edition Berlin: Springer-Verlag.
- García-Luque, E., DelValls, T.A., Forja, J.M. & Gómez-Parra, A. (2007): Biological adverse effects on bivalves associated with trace metals under estuarine environments. *Environmental Monitoring and Assessment* 131: 27–35.
- George, S.G. (1983a): Heavy metal detoxification in the mussel *Mytilus edulis*. Composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 76C: 53–57.
- George, S.G. (1983b): Heavy metal detoxification in the mussel *Mytilus edulis*. An in vitro study of Cd and Zn binding to isolated tertiary lysosomes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 76C: 59–65.
- George, S.G. & Langston, W.J. (1994): Metallothionein as an indicator of water quality: assessment of the bioavailability of cadmium, copper, mercury and zinc in aquatic animals at the cellular level. In: Sutcliffe, D.W. (Ed.), *Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Ecosystems: Linking Levels of Organisation (Individuals, Populations, Communities)*. The Freshwater Biological Association, Ambleside, 138–153.
- George, S.G. & Olsson, P.E. (1994): Metallothionein as indicators of trace metal pollution. In: Kramer, K.J.M, editor. *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. Boca Raton: CRC Press. 151–178.
- George, S.G. & Pirie, B.J.S. (1979): The occurrence of cadmium in sub-cellular particles in the kidney of the marine mussel, *Mytilus edulis*, exposed to cadmium. *Biochimica et Biophysica Acta* 580: 234–244.

- George, S.G. & Viarengo, A. (1985): A model for heavy metal homeostasis and detoxication in mussels. In: Vernberg, F.J., Thurberg, F.P., Calabrese, A. & Vernberg, W.B. (eds) Marine pollution and physiology: recent advances. University of South Carolina Press, Columbia, SC. 125–143.
- Gerhardt, V. & J. Putzger, 1992. Ein Biotest zur Gewässerüberwachung auf der Grundlage der verzögerten Fluoreszenz von Algen. In: Hansen, P.D. & Steinhäuser, K.G.(eds), Biologische Testverfahren – Beiträge zu den Biotest-Statusseminaren 1989 und 1992, Nr. 89. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 277–292.
- Giambérini, L. & Cajaraville, M.P. (2005): Lysosomal responses in the digestive gland of the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, experimentally exposed to cadmium. Environmental Research 98: 210–214.
- Gibson, G. & Skett, P. (1986): Introduction to drug metabolism. London: Chapman & Hall.
- 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 (14): 3339–3356.
- Ham, K.D. & Peterson, M.J. (1994): Effect of fluctuating lowlevel chlorine concentrations on valve-movement behavior of the asiatic clam (*Corbicula fluminea*). Environmental Toxicology and Chemistry 13: 493–498.
- Hendriks, A.J., Pieters, H. & de Boer, J. (1998): Accumulation of metals, polycyclic (halogenated) aromatic hydrocarbons and biocides in zebra mussel and eel from the Rhine and Meuseriver. Environmental Toxicology and Chemistry 17: 1885–1898.

- Herwig, H.J, Brands, F., Krutwagen, E. & Zandee, D.I. (1989): Bioaccumulation and histochemical localization of cadmium in *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium chloride. *Aquatic Toxicology* 15: 269–86.
- High, K.A., Barthet, V.J., McLaren, J.W. & Blais, J.S. (1997): Characterization of metallothionein-like proteins from zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1111-1118.
- Hoenig, M. & Kersabiec, A.M. (1996): *Spectrochimica Acta*, Part B 57: 1297.
- Cheggour, M., Chafik, A., Langston, W.J., Burt, G.R., Benbrahim, S. & Texier, H. (2001): Metals in sediments and the edible cockle *Cerastoderma edule* from two Moroccan Atlantic lagoons: Moulay Bou Selham and Sidi Moussa. *Environmental Pollution* 115: 149-160.
- Chu, K.H., Cheung W.M. & Lau S.K. (1990): Trace metals in bivalves and sediments from Tolo Harbour, Hong Kong. *Environmental International* 16: 31–36.
- Irato, P., Santovito, G., Cassini, A., Piccinni, E. & Albergoni, V. (2003): Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis*, and *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 476–484.
- Isani, G., Adreani, G., Kindt, M. & Carpené, E. (2000): Metallothioneins in marine molluscs. *Cell and Molecular Biology* 46: 295–309.
- Jaffé, R., Leal, I., Alvarado, J., Gardinali, P.R. & Sericano, J.L. (1998): Baseline study on the levels of organic pollutants and heavy metals in bivalves from the Morrocoy National Park, Venezuela. *Marine Pollution Bulletin* 36 (11): 925-929.
- Jamil, A., Lajtha, K., Radan, S., Ruzsa, G., Cristofor S. & Postolache C. (1999): Mussels as bioindicators of trace metal pollution in the Danube Delta of Romania. *Hydrobiologia* 392: 143–158.

- Kägi, J.H.R. (1991): Overview of metallothionein. *Methods in Enzymology* 205: 613–626.
- Knejzlík, Z., Káš, J. & Ruml, T. (2000): Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické Listy* 94: 913-918.
- Kraak, M.H.S., Scholten, M.C.T., Peeters, W.H.M. & Dekock, W.C. (1991): Biomonitoring of heavy-metals in the western-european rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution* 74: 101-114.
- Kramer, K.J.M., Jenner, H.A. & Zwart, D.d. (1989): The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia* 188: 433–443.
- Kuhr, R. & Dorough, W. (1977): Carbamate insecticides. Cleveland, OH: CRC Press.
- Kwan, K.H.M., Chan, H.M. & de Lafontaine, Y. (2003): Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River. *Environmental Monitoring and Assessment* 88: 193–219.
- Lecoeur, S., Videmann, B. & Berny, P. (2004): Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Research* 94: 184–191.
- Lowe, D.M., Moore, M.N. & Clarke, K.R. (1981): Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic Toxicology* 1: 213–226.
- Lugue, E.G., DelValls, A.T., Forja, J.M. & Parra, A.G. (2007): Biological adverse effects on bivalves associated with trace metals under estuarine environments. *Environmental monitoring and assessment* 131: 27–35.

- Mader, P. & Čurdová, E. (1997): Metody rozkladu biologických materiálů pro stanovení stopových prvků. *Chemické Listy* 91: 227-236.
- Maltby, L., Forrow, D.M., Boxall, A.B.A., Calow. P. & Betton, C.I. (1995): The effects of motorway runoff on freshwater ecosystems: 1. field study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 1089-1092.
- Marie, V., Baudrimont, M. & Boudou, A. (2006): Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65: 609–617.
- Marigómez, I., Soto, M. & Cajaraville, M.P. (1995): Cell and tissue models for the study of the cellular metabolism of metals. In: Cajaraville, M.P., editor. *Cell Biology in Environmental Toxicology*. University of the Basque Country Press Service. 89-134.
- Marigómez , I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E. & Giamberini, L. (2002): Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique* 56: 358–392.
- Mersch, J. & Johansson, L. (1993): Transplanted aquatic mosses and freshwater mussels to investigate the trace metal contamination in the Rivers Meurthe and Plaine, France. *Environmental Technology* 14: 1027–1036.
- Mersch, J., Wagner, P. & Pihan, J.C. (1996): Copper in indigenous and transplanted zebra mussels in relation to changing water concentrations and body weight. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 886-893.
- Moore, M.N. (1985): Cellular responses to pollutants. *Marine Pollution Bulletin* 16: 134–139.
- Nagy, I.Z. (1988): Lipofuscin-1987: State of the art. *Excerpta Medica*. 462.

- Nelson, W.G., Bergen, B.J. & Cobb, D.J. (1995): Comparisons of PCB and trace metal bioaccumulation in the blue mussel, *Mytilus edulis*, and the ribbed mussel, *Modiolus demissus*, in New Bedford Harbour, Massachusetts. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 513–521.
- Nordberg, M. (1998): Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta* 46: 243–253.
- Ostapczuk, P., Stoeppler, M. & Dürbeck, H.W. (1990). Toxicological and Environmental Chemistry 27: 49.
- Pain, S. & Parant, M. (2003): Response of multixenobiotic defence mechanism in *Dreissena polymorpha* exposed to environmental stress. *Chemosphere* 52: 1105-1113.
- Pavičić, J., Raspor, B. & Martinčić, D. (1993): Quantitative determination of metallothionein-like proteins in mussels. Methodological approach and field evaluation. *Marine Biology* 115: 435–444.
- Putzger, J. & Gerhardt V. (1994): Regensburger Leuchtbakterientest–Erweiterung des DF-Algentests zum on-line monitor mit *Bacterium phosphoreum*. In: Pluta, H. J., Knie J. & Leschber R. (eds), *Biomonitoring in der Gewässerüberwachung*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York. 119–123.
- Regoli, F., Nigro, M. & Orlando, E. (1998): Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic Toxicology* 40: 375–392.
- Rodríguez, J.A., Nanos, N., Grau, J.M., Gil, L. & López-Arias, M. (2008): Multiscale analysis of heavy metal contents in Spanish agricultural topsoils. *Chemosphere* 70: 1085–1096.

- Salazar, M.H. & Salazar, S.M. (1997): Using caged bivalves to characterize exposure and effects associated with pulp and paper mill effluents. *Water Science and Technology* 35: 213-220.
- Sedlák, E. (2005): Zoologie bezobratlých. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. 62-63.
- Smolders, R., Bervoets, L. & Blust, R. (2002): Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in an effluent dominated river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1889-1896.
- Södergren, A. (1991): Environmental fate and effects of bleached pulp mill effluents. Swedish environment protection agency 4031.
- Soto, M. & Marigómez, I. (1997): Metal bioavailability assessment in Mussel Watch programmes by automated image analysis of autometallographical black silver deposits (BSD) in digestive cell lysosomes. *Marine Ecology Progress Series* 156: 141–50.
- Storer, T.I., Usinger, R.L., Stebbins, R.C. & Nybakken, J.W. (1979): General Zoology. Sixth edition. New York: McGraw-Hill. 467-485.
- Sydor, W.J., Miller W.R. Iii, Cairns J. Jr & Gruber, D. (1982): Use of box and line plots to assess fish ventilatory behaviour in biological monitoring systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 1719–1722.
- Timbrell, J.A. (1999): Principles of biochemical toxicology, 3rd edn. London: Taylor and Francis.
- Vesk, P.A. & Byrne, M. (1999): Metal levels in tissue granules of the freshwater bivalve *Hyridella depressa* (Unionida) for biomonitoring: the importance of cryopreparation. *The Science of the Total Environment* 225: 219-229.

- Viarengo, A. (1989): Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences* 1: 295–317.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N. & Panfoli, I. (2000): Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell and Molecular Biology* 46: 407–417.
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A. & Fabbri, R. (1999): Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* 4: 455–466.
- Viarengo, A. & Nott, J.A. (1993): Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 104C: 355–372.
- Waid, J.S. (ed.) (1985-1987): *PCBs in the Environment*, vols I-III. Cleveland, OH: CRC Press.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M. & Peakall, D.B. (2001): *Principles of ecotoxicology*. Second edition. New York: Taylor & Francis. 309.
- Way, C.M. & Hornbach, D.J. (1990): Dynamics of filter feeding in *Corbicula fluminea*. *Canadian Journal of Zoology* 68: 115-120.
- Yap, C.K., Hatta, Y., Edward, F.B. & Tan, S.G. (2008): Comparison of heavy metal concentrations (Cd, Cu, Fe, Ni and Zn) in the shells and different soft tissues of *Anadara granosa* collected from Jeram, Kuala Juru and Kuala Kurau, Peninsular Malaysia. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 31(2): 205-215.
- Yap, C.K., Ismail, A., Tan, S.G. & Abdul Rahim, I. (2003): Can the shell of the green-lipped mussel *Perna viridis* from the west coast of Peninsular Malaysia be a potential biomonitoring material for Cd, Pb and Zn? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57: 623-630.

Zatta, P., Gobbo, S., Rocco, P., Perzzolo, M. & Favarato, M. (1992): Evaluation of heavy metal pollution in the Venetian lagoon by using *Mytilus galloprovincialis* as biological indicator. The Science of the Total Environment 119: 29–41.

9. Příloha

Tabulka 1 : Koncentrace vybraných polutantů (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb) vyskytujících se v tělech některých druhů mlžů (Jamil et al., 1999)

Table 64. Cd, Co, Cr, Cu, Ni and Pb concentrations in different mussel species expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ and reported as means or range of means (SE, when available) from regions in freshwater ecosystems of the world. When depuration before analysis is indicated, this is noted in the species identification column

Site description	Species	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Reference
Danube Delta, Romania	<i>Anodonta anatina</i>	0.4 (0.1)	0.3 (0.0)	1.4 (0.2)	4.2 (0.5)	0.7 (0.1)	1.5 (0.4)	This study
	(depurated)	4.7 (1.7)	1.2 (0.4)	4.4 (2.0)	7.7(0.2)	7.3 (3.8)	6.9 (0.2)	
	<i>Unio</i>	0.3 (0.1)	0.3 (0.1)	0.7 (0.1)	5.4 (0.7)	0.8 (0.2)	1.0 (0.2)	
	(<i>umidus</i> and <i>pictorum</i>)	-	-	-	-	-	-	
		5.1 (0.5)	1.0 (0.2)	4.3 (1.8)	13 (3.4)	3.6 (0.9)	9.5 (1.6)	
Rhine-Meuse Delta, Western Europe	<i>Dreissena polymorpha</i>	0.2 (0.1)			7.0 (2.0)		0.5 (0.0)	Kraak et al. (1991) ¹
	(depurated)	6.5 (2.5)			22 (0.7)		11 (3.0)	
Rhine River	<i>Dreissena polymorpha</i>	1.0 - 90			10-30		2.0 - 25	Kraak et al. (1991) ¹
Meuse River		1.0 - 9.0			5.0 - 25			
Meurthe and Plaine Rivers, France	<i>Dreissena polymorpha</i>			1.2 (0.0)		16 (1.0)	1.4 (0.0)	Mersch and Johansson (1993a) ¹
	(depurated)			-		-	-	
				16 (1.3)		40 (1.0)	10 (1.0)	
Maarsseven Lake System, The Netherlands	<i>Dreissena polymorpha</i>	0.0			11		0.3	Timmermans et al. (1991) ¹
	(depurated)	16			15		1.5	
Wiltz River, Luxembourg	<i>Dreissena polymorpha</i>	1.0 (0.0)		2.0 (0.0)	20 (0.1)		0.5 (0.1)	Mersch and Pihan (1993b) ¹
	(depurated)	14 (0.5)		18 (0.1)	21 (2.0)		2.7 (0.2)	
River Po, Italy	<i>Dreissena polymorpha</i>	1.3 (0.3)		3.5 (0.5)	18 (1.5)	14 (0.2)	2.3 (0.3)	Camusso et al. (1994) ¹
		1.57 (0.0)		3.5 (0.8)	21 (3.1)	16 (1.9)	3.9 (0.2)	
	<i>Unio elongatulus</i>	1.2 (0.1)		1.7 (0.4)	12 (2.2)	2.7 (0.8)	3.2 (0.0)	
		-		-	-	-	-	
		1.8 (0.3)		4.0 (0.6)	19 (0.8)	4.5 (0.4)	3.8 (0.6)	
New York State Waters, New York	<i>Dreissena polymorpha</i>	0.6		1.6	4.4	4.2	1.0	Secor et al. (1993)
		5.9		5.0	16.6	20	4.4	
Johns and Ashumet Ponds, Cape Cod, Massachusetts	<i>Elliptio complanata</i>	4.5 (0.4)					1.8 (0.6)	I. Callard pers. comm.
	(depurated)	7.1 (0.2)					2.5 (0.2)	
Mississippi River, Minnesota	<i>Amblema plicata</i>	0.5 (0.01)			6.5 (0.5)			Naimo et al. (1992)
		-			-			
		1.3 (0.1)			13 (0.5)			

¹ABM: Active Biological Monitoring.