

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Biologie
Ekologická a evoluční biologie



Adéla Varvažovská

Vliv antropogenního znečištění těžkými kovy na sladkovodní bezobratlé

Influence of anthropogenic pollution by heavy metals on freshwater
invertebrates

Bakalářská práce

Vedoucí práce: **RNDr. Robert Tropek, Ph.D.**

Konzultant práce: **Ing. David Boukal, Ph.D.**

Praha, 2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Vliv antropogenního znečištění těžkými kovy na sladkovodní bezobratlé vypracovala pod vedením vedoucího bakalářské práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Datum

.....

podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu práce mé bakalářské práce RNDr. Robertu Tropkovi, Ph.D. za to, že přijal vedení mé práce. Dále mu děkuji za odbornou pomoc, cenné rady, konzultace a jeho čas, který věnoval mé bakalářské práci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své mamince a blízkým za oporu, rady a povzbuzení.

Abstrakt

Cílem bakalářské práce je shrnutí vlivů těžkých kovů na sladkovodní bezobratlé na postindustriálních stanovištích. V přírodě se vyskytují těžké kovy dvojího původu, esenciální a neesenciální. Neesenciální těžké kovy, které se do přírody dostanou vlivem lidské činnosti, mohou mít negativní vliv na fungování organismů v ekosystému. Když se s nimi organismus nedokáže vyrovnat a přizpůsobit se jim, může to být pro organismus smrtelné. Některé organismy jsou tolerantnější než jiné a dokáží přežívat v koncentracích těžkých kovů, které by byly pro jiný organismus nepřekonatelnou překážkou. V případě, že by koncentrace byla nebezpečná i pro odolnější druhy, dochází u přizpůsobivějších organismů ke speciálním adaptacím, které jim pomáhají ve znečištěném prostředí přežívat a prosperovat. Mechanismy a adaptace, kterými se organismus brání proti poškození buněčných struktur a orgánů v těle, mohou být různé. Morfologické změny spočívají ve změně barvy a tvaru těla nebo odstranění částí, kde se těžké kovy hromadí. Fyziologické mechanismy napomáhají pozměnit metabolismus a způsob akumulace látek v těle. Mnoho mechanismů, ale i samotných následků působení těžkých kovů, se dá posléze použít při bioindikaci znečištěných vod. Takové pozorování pak lze použít v dalších oborech, například při ochraně životního prostředí. Pro naplnění cíle bylo použito studium dokumentů z odborných světových databází a odborné literatury.

Klíčová slova:

Těžké kovy, Znečištění těžkými kovy, Industriální stanoviště, Sladkovodní bezobratlí, Mechanismy obrany, Adaptace

Abstract

This bachelor thesis summarizes the effects of heavy metals on freshwater invertebrates in post-industrial areas. There are heavy metals of dual origin in nature, essential and non-essential. Non-essential heavy metals which get to nature by human activities can have a negative impact on lives of organisms in the ecosystem. If the organisms can't cope with and adapt to heavy metals, it can be lethal for them. Some organisms are more tolerant than others and can survive in heavy metal concentrations which would be a big fatal to other organisms. In case of dangerous concentration for more resistant species, the resistant species create special adaptations which help them survive and prosper in the polluted areas. Mechanisms and adaptations that prevent the body from damaging cell structures and organs in the body can be of different nature. Morphological changes consist of changing the color, shape of the body or removing parts where heavy metals accumulate. Physiological mechanisms help to modify the metabolism and mode of accumulation of substances in the body. Many mechanisms, as well as the consequences of heavy metals, can be used to bioindicate polluted waters. Such observation can then be used in other disciplines, for example in environmental protection. Study of documents from professional world databases and professional literature was used to fulfill the aim of this thesis.

Key words:

Heavy metals, Heavy metal pollutant, Industrial areas, Freshwater invertebrates, Defence mechanisms, Adaptations

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Těžké kovy.....	2
3	Následky působení těžkých kovů.....	4
3.1	Zinek.....	4
3.2	Kadmium	5
3.3	Měď	6
3.4	Olovo	8
4	Metallothionein	10
5	Mechanismy fyziologické a morfologické.....	12
5.1	Kadmium	12
6	Mechanismy behaviorální.....	15
7	Bioindikace	18
8	Závěr	20
9	Seznam použité literatury	21

1 Úvod

V dnešní době dochází k čím dál rychlejšímu vývoji technologií. Postupem času byly vytvořeny takové technické vymoženosti, které člověku usnadňují život a přináší určitou míru komfortu. V touze po materiálním blahobytu lidstvo přetváří životní prostředí, ničí jej a nenávratně poznamenává jeho podobu. S tím souvisí vznik mnoha industriálních stanovišť a těžebních míst, jejichž počty stále stoupají. Takové aktivity mají negativní dopad nejen na podobu krajiny, ale i na živočišné a rostlinné druhy žijící na těchto stanovištích.

Přestože dochází k revitalizaci poškozených území, k obnově rostlinných a živočišných společenstev a vzniku sekundárních stanovišť, bývají tato postindustriální území těžební aktivitou i nadále často poznamenána. Negativní následky však nemusí být viditelné na první pohled. Na revitalizovaném území se mohou nacházet ve stopovém množství různé toxické látky, chemikálie a jiné pro živočichy nepřírozené a nebezpečné látky. Následkem toho může být organismus vychýlen z ekologického optima životních podmínek do mezních hodnot, což ovlivní prosperitu a přežívání druhu. V takovém případě dochází ke vzniku tzv. ekologické pasti pro organismy, které osidlují revitalizované území a jsou na daný prvek citlivé.

Některé organismy jsou tolerantnější a přizpůsobivější než jiné a dokázali si na zvláštní podmínky na postindustriálních stanovištích vytvořit speciální mechanismy, které jim pomáhají se s negativními vlivy vyrovnat, například právě se zvýšenými koncentracemi těžkých kovů. Takové organismy pak dokáží na takových územích nejen přežívat, ale dokonce se i rozmnožovat a prosperovat.

Cílem této bakalářské práce je shrnout dostupné studie o vlivu zvýšených koncentrací těžkých kovů na sladkovodní bezobratlé na postindustriálních stanovištích. Zaměřím na fyziologické, behaviorální a morfologické změny a mechanismy obrany sladkovodních organismů proti působení zvýšených koncentrací těžkých kovů. Výsledky experimentálních studií budou srovnávány s terénními studiemi společenstev sladkovodních stanovišť na (post)industriálních lokalitách.

2 Těžké kovy

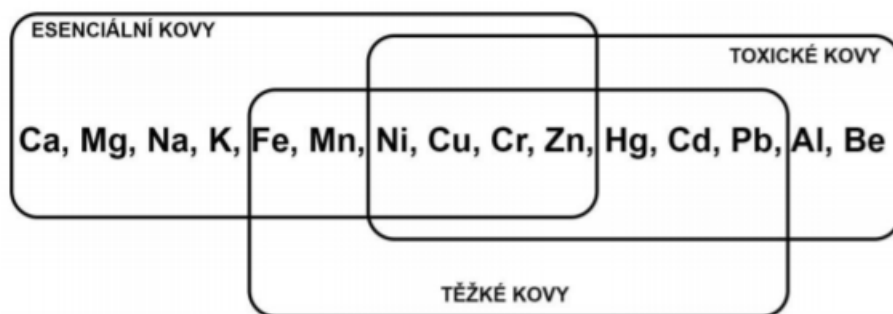
Těžké kovy bývají vysvětlovány různými definicemi. Schindler je definuje jako prvky, jejichž působení a cykly v přírodě jsou poháněné aktivitou člověka (Schindler 1991). Další tvrdí, že těžkým kovem je jakýkoliv kovový prvek s relativně vysokou hustotou, který je toxický nebo jedovatý i při nízké koncentraci (Lenntech Water Treatment and Air Purification 2004). Obdobnou definici nabízí Hawkes (1997) který říká, že těžké kovy jsou ty kovy, které mají hustotu vyšší než 5 g/cm^3 (Hawkes 1997). Definice jsou opravdu různorodé, každá zahrnuje různorodou skupinu prvků (Duffus 2002). Nejvhodnější definicí k této práci je definice podle Hawkese (1997).

Těžké kovy se v přírodě přirozeně vyskytují v biosféře převážně v horninách vulkanického původu, v rudách a nebo jako stopy industriálních aktivit (Janssens, Roelofs, a Van Straalen 2009), ve vodím prostředí je najdeme převážně v sedimentech (Nriagu 1990). Těžké kovy se do hydrosféry dostávají dvěma způsoby – přírodní cestou nebo vlivem lidské činnosti. Přírodní cestou se těžké kovy do vody dostávají z atmosféry, tedy koloběhem vody, erozí půdy nebo díky vulkanické činnosti (Zoller 1984). Těžké kovy antropogenního původu se do přírody dostávají industriálními aktivitami jako těžba a tavení těžkých prvků, produkce a využívání směsí obsahující těžké kovy a pálením fosilních paliv (Nriagu 1990; Smith 1985). Přetrvávání těžkých kovů v malých koncentracích antropogenního původu a jejich hromadění se v půdě je záležitost každého státu s těžební aktivitou (Ahsanullah 1982).

Těžké kovy můžeme dělit na esenciální a neesenciální. Za esenciální těžké kovy jsou považovány ty, které jsou součástí metabolismu organismu a je potřeba pro jeho fungování, například zinek a železo (Duffus 2002; Janssens, Roelofs, a Van Straalen 2009; Sowa a Skalski 2019). Nedostatek esenciálního těžkého kovu by se na organismu podepsal specifickými změnami a mohlo by dojít k narušení životního cyklu organismu (Duffus 2002). U neesenciálních ještě neznáme přesnou biologickou funkci (Janssens, Roelofs, a Van Straalen 2009). Ale u rostlin byla pozorována účast lanthanidů na stimulaci metabolismu nebo titanu na růstu rostliny (Emsley 2011). Oba druhy kovů v přírodě najdeme (Janssens, Roelofs, a Van Straalen 2009). Esenciální i neesenciální kovy mohou být toxické, pokud překročí určitou kritickou koncentraci, která je pro každý kov a organismus charakteristická (Nawrot et al 2006).

Ať je těžký kov esenciální nebo neesenciální, při vyšších koncentracích může být pro organismus toxický. Stupeň toxicity je specifický pro jednotlivé kovy, ale také záleží

i na organismu, jenž je působení těžkého kovu vystaven. U každého se totiž může toxicita projevit jinak a v jiné míře (Duffus 2002). Je tedy nutné si uvědomit rozdíl mezi těžkým kovem a toxickým kovem (Obrázek 1). Těžký kov je ten, jehož hustota je vyšší než 5 g/cm^3 . Toxický kov je ten, jehož účinky mají negativní vliv na organismus, například na správný vývoj (Nábělková 2012).



Obrázek 1: Zařazení vybraných kovů do skupin (Nábělková 2012)

Stupeň toxicity různých chemikálií a těžkých kovů ve vodě může být ovlivněn variacemi fyzikálních nebo chemických faktorů jako jsou teplota a pH vody. Dalším faktorem může být i stav samotného organismu, například v jakém životním cyklu se právě nachází, jeho velikostí nebo hmotností (Gerhardt 1993). Například nitěnka *Tubifex tubifex* je 15x citlivější na znečištění chromem při 30°C s přísunem potravy než při 20°C bez přísunu potravy (Canivet, Chambon, a Gibert 2001).

Jak bude organismus reagovat na těžký kov nezáleží jen na biotických a abiotických podmínkách. Vždy záleží i na koncentraci těžkého kovu ve vodě a na délce působení daného kovu na organismus. Expozice organismu nízkým koncentracím těžkého kovu se na něm může podepsat změnami, které pro něj nejsou život ohrožující. V případě vystavení jedince stejné koncentraci kovu, avšak delší dobu, mohou být následky letální (Blaxter a Hallers-Tjabbes 1992).

Ovšem vystavení organismu působení těžkých kovů, který je pak případně přijímá a hromadí ve svém těle, nemusí vždy vyvolat viditelnou reakci. Kov buď není toxický nebo se naváže na speciální protein metallothionein, který jeho toxicitu neutralizuje (Gerhardt 1993). Je ovšem potřeba myslet na to, že i adaptace na určitý kov může ovlivnit příjem a absorpci kovu jiného (Brown 1975).

3 Následky působení těžkých kovů

Zvýšená koncentrace těžkých kovů, která organismům škodí na postindustriálních stanovištích má mnoho projevů. Jedním z nejčastějších následků testů, v nichž je organismus vystavován zvyšujícím se koncentracím je smrt, která bývá často i konečným stavem experimentu. Ale zvýšená koncentrace těžkých kovů může mít i jiné následky. Například může mít negativní vliv na propustnost pokožky (Blaxter a Hallers-Tjabbes 1992) a její barvu (O’Gara et al. 2004) nebo pohyb samotného organismu (Besser et al. 2016). Například u kadmia se projevilo zpomalení a redukce růstu nebo snížená míra reprodukce (Van Ginneken, Blust, a Bervoets 2017). Široká škála znečištění, ať už jde o organické sloučeniny jako pesticidy nebo anorganické těžké kovy, může mít negativní vliv i na smyslové orgány. Tím dochází k omezení nebo ke změně smyslové informace putující do mozku (Blaxter a Hallers-Tjabbes 1992).

Místa, která bývají jako první vystavena působení toxického znečištění jsou povrchové orgány a pokožka. Jaký bude mít těžký kov vliv na organismus pak záleží na propustnosti pokožky. Následně jsou pak těžkým kovům vystavené struktury jako například smyslové orgány zprostředkovávající komunikaci s prostředím nebo žábry, v jejichž oblasti je pokožka velmi propustná kvůli dýchání. Pokud jsou smyslové orgány v kontaktu s těžkým kovem (nebo jakýmkoliv jiným polutantem), může se očekávat rychlá reakce na toto znečištění, tedy v případě, že polutant vyvolává behaviorální reakci (Blaxter a Hallers-Tjabbes 1992).

3.1 Zinek

Zinek je esenciální kov zastávající velmi důležitou funkci v některých metabolismech organismu. I přesto může být pro organismus ve vyšších koncentracích škodlivý. Jeho působení může být pro organismy vysoce toxické, proto je zinek ve studiích často využíván jako modelový chemický stresor (Van de Perre et al. 2016). Když Van de Perre a jeho kolegové v roce 2018 ve svém experimentu vystavily perloočku *Daphnia longispina* různým koncentracím zinku. Když byli nedospělí jedinci *D. longispina* vystaveni vyšším koncentracím zinku (1,9 mg/L a vyšší), jejich počet v populaci klesal. Když byli vystaveni nižším koncentracím zinku (25.7-13.3 mg/L), jejich počet se v populaci zvýšil. dokazuje, že u esenciálních kovů jako je právě zinek, opravdu záleží na koncentraci, které organismus vystaven. Od toho se pak odvíjí vliv i míra toxicity na organismus.

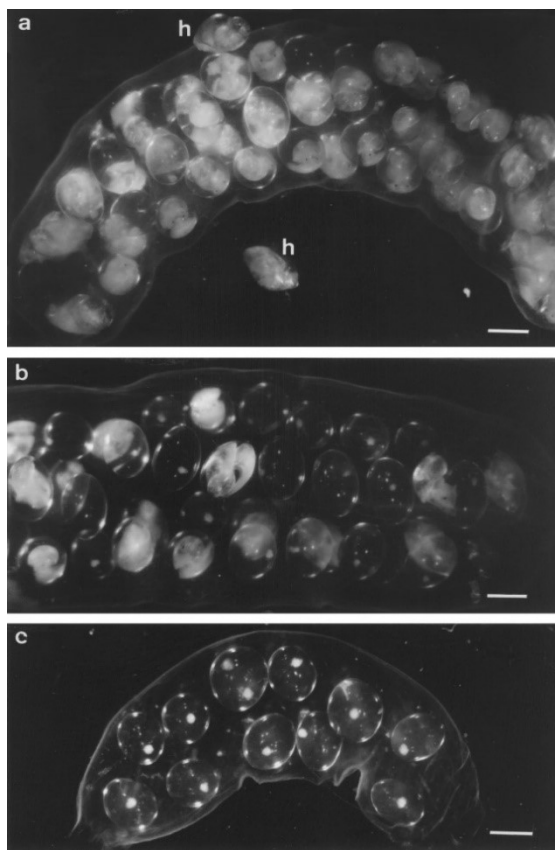
Jiná studie Van de Perreho (2016) ukázala, že odpověď populace na zvyšující se koncentraci zinku je závislá také na citlivosti všech jedinců v populaci, kteří mezi sebou komunikují a interagují, nikoliv na citlivosti jednoho jedince (Van de Perre et al. 2016).

3.2 Kadmium

Kadmium se do přírody dostává spalováním fosilních paliv, spalováním a likvidací odpadu nebo při používání a aplikaci fosfátových hnojiv (Komínková 2008). Vzhledem k tomu, že kadmium není esenciálním kovem, tak může být v přírodě pro organismy toxické a nebezpečné.

Letální koncentrace (LC50) kadmia se ukázala být u vodního korýše *Asellus aquaticus* mnohem nižší, než bývá uváděna v mnohých literaturách. Odlišnost konečných letálních koncentrací u *A. aquaticus* v reakci na kadmium může být vysvětlena podmínkami, ze kterých byl organismus pro výzkum odebrán. Jedinci v populaci mohli být rozdílně citliví nebo byli odebráni z prostředí s vyšší koncentrací těžkých kovů. Tím pádem by se u takového organismu kvůli genetické adaptaci projevila i nižší citlivost na znečištění kadmiem (Van Ginneken, Blust, a Bervoets 2017). *A. aquaticus* je často považován za organismus tolerující velmi široké spektrum podmínek, tedy i pokud jde o znečištění těžkými kovy (Naylor, Pindar, a Calow 1990). V mnohých literaturách je *A. aquaticus* považován za poměrně tolerantní druh vůči znečištění prostředí. Studie Van Ginnekena, Blusta a Bervoetse ukázala, organismus tolik tolerantní není. V literaturách ke kadmiu totiž nebývají uvedené konkrétní letální koncentrace. To by mohlo mít za následek mylné zhodnocení skutečné toxicity kadmia (Van Ginneken, Blust, a Bervoets 2017).

V laboratorní studii Annette Gomot (1998) testovala vliv toxicity kadmia na reprodukci měkkýše *Lymnaea stagnalis*. Šest skupin těchto měkkýšů bylo vystaveno koncentracím Cd^{2+} v rozmezích od 25-400 mg/L⁻¹. Pozorování odhalilo, že kadmium má inhibující účinky na oogenezi, vývoj a formování vajíček v rozmnožovací soustavě a pak později na jejich kladení. Vajíčka nakladená při koncentraci kadmia v rozmezí od 50 do 200 µg/litr⁻¹, měla vývoj embrya znatelně pomalejší a nastaly u nich anomálie v embryogenezi (Obrázek 2) (Gomot 1998).



Obrázek 2: Snůška vajíček šneka *Lymnaea stagnalis* po 12denní inkubaci

a: kontrolní snůška, vajíčka jsou téměř všechna vyvinutá, h - mláďata

b: snůška vystavená $50\mu\text{ Cd}^{2+}$ na litr^{-1} , nevyvinutá vajíčka a téměř vytvořená embrya

c: snůška vystavená 400 Cd^{2+} na litr^{-1} , obsahuje pouze 11 vajíček, žádné z nich není vyvinuté

(Gomot 1998)

3.3 Měď

Měď je esenciální kov, který napomáhá ke správnému fungování metabolismu. Pokud by ale byla koncentrace mědi ve vnějším prostředí vyšší, než by byl organismus schopný snést nebo detoxikovat, byla by pro organismus toxická (Peña, Lee, a Thiele 1999; Schlenk, Davis, a Griffin 1999). I u tohoto kovu úroveň toxicity závisí na podmínkách prostředí. Například na efekt vystavení mědi s akutními hodnotami koncentrace má velký vliv pH vody (Pagenkopf 1983) a nerozpustná organická hmota (Erickson et al. 1996)

Projevy akutní toxicity mědi na vodních bezobratlých se obvykle projevuje inhibicí Na^+/K^+ - ATPázy, která vede k neúspěšné homeostáze hladiny Na^+ (Wood 2001, cit. podle Brix, Esbaugh, and Grosell 2011). Grosell ve svém článku vysvětluje, že citlivost vodních organismů na měď je funkcí velikostí těla, která velmi dobře koreluje s mírou turnoveru Na^+ (Grosell, Nielsen, a Bianchini 2002).

Kmen *Mollusca* a konkrétně skupina *Bivalvia* se obecně velmi dobře přizpůsobuje stresovým podmínkám způsobeným zvýšenou toxicitou prostředí. Ukázalo se, že se při nízkém chemickém ošetření mědi se zástupci skupiny *Bivalvia* pohybovali rychleji, zatímco při vysokém chemickém ošetření se pohybovali pomaleji a udržovali se u dna nádoby, ve které byly testováni. Ze skupiny *Gastropoda* se hlemýžď *Lymnaea* při ošetření mědi vyšplhala nad hladinu vody (Besser et al. 2016). Pasivní chování a zpomalený pohyb organismu souvisí s negativním působením na nervovou soustavu. Konkrétně u červa *Lumbriculus variegatus* vystavení mědi způsobilo zpomalení rychlosti vedení velkého nervového vlákna (*giant fiber conduction*). Vliv mědi na fungování velkého nervového vlákna záleží na čase, po jakou dobu je *L. variegatus* mědi vystaven, ale také na její koncentraci ve vodě (O’Gara et al. 2004). Měď přímo blokuje napěťově řízené iontové kanály (*voltage-gated ion channels*) a inhibicí těchto kanálů je dojde i ke zpomalení rychlosti vedení nervového vlákna (Rogge a Drewes 1993).

Když byl červ *Lumbriculus variegatus* při laboratorním testování vystaven působení mědi, tak kromě behaviorálních změn se u něj projevil změny morfologické. Zadní články těla vybledly a celkově se tělo organismu znatelně zkrátilo a zmenšilo (O’Gara et al. 2004). Podobné projevy byly zaznamenány i u nitěnky *Tubifex tubifex*. (Khangarot 1991). Navíc se ukázalo, že se srdeční pulz u červa *L. variegatus* po vystavení mědi výrazně zpomalil. Jakmile dojde u organismu ke snížení perfúze (průtok krve tkáněmi), mohou se očekávat různé fyziologické abnormality v nervovém systému nebo v jiných orgánech (O’Gara et al. 2004).

Vliv toxicity na skupinu *Crustacea* je specifický mezi různými druhy zástupců, ale i mezi jedinci v rámci jednoho druhu. U jedinců pak záleží na dalších faktorech, jako například na fázi životního cyklu, svlékání krunýře, který brání v růstu, nebo zda byl už organismus dříve vystaven toxickému působení (Naylor, Pindar, a Calow 1990). V laboratorních testech se u koryše *Cambarus bartonii* zjistilo, že se už při relativně nízké koncentraci mědi ($[\text{Cu}] < 1.0 \text{ mg/L}$) snižuje hladina glutathioninu (GSH). Následkem toho se omezují reakce napomáhající detoxifikaci těla (Sherba, Dunham, a Harvey 2000). Glutathionin je důležitý antioxidant, který váže měď, detoxifikuje ji a tím dokáže zabránit

poškození buněčných a hraje velmi důležitou roli v oxidačně-redukčních procesech (Carlberg a Mannervik 1955). Působením se GHS vyčerpá rychleji, než ho tělo dokáže vytvářet (Sherba, Dunham, a Harvey 2000). To nám vysvětluje, proč se náhlý růst mortality objevil až později po projevech prvních projevů. Dokud má tělo alespoň nízkou hladinu GHS, stále může detoxikace do jisté míry fungovat. Jakmile se hladina GSH dostane na kritickou úroveň, může dojít ke smrti organismu (Sherba, Dunham, a Harvey 2000).

Je zajímavé, že některé následky jsou přímo vázané i na pohlaví. U stejnojmenného korýše *Cambarus bartonii* v laboratorních experimentech testovali, jakou prodlevu mezi nalezením potravy budou mít jedinci ošetřeni mědí, ti, kteří byli vystaveni mědi a následně očištěni a jedinci z čistých lokalit bez znečištění mědí (jezero Clayton ve středo-západní oblasti Ontaria.). Ošetření samci nevykazovali žádné rozdíly při hledání potravy v porovnání se samci, kteří byli už od ošetření mědi umytí (po dobu 7 dní byli koupani v čisté vodě). Latence (čas, který korýš potřebuje k nalezení potravy) byla u obou vzorků stejná. Zatím co u samic se latence mezi ošetřenými a čistými jedinci značně snížila (Sherba, Dunham, a Harvey 2000). Důvod, proč se u samců rozdíly neukázaly a u samci ano jsou způsobené skutečností, že samice mají odlišný mechanismus detoxikace při snížené hladině glutathioninu. Způsob detoxikace u samic ale funguje jen při nízkých koncentracích. Při vyšších koncentracích se GHS vyčerpá rychleji než při nízkých koncentracích. Takže v případě vyšších koncentrací může být toxický účinek horší. (Sherba, Dunham, a Harvey 2000).

U koncentrace mědi nižší než 1,0 mg/litr je tedy už možné pozorovat následky lišící se v délce latence (Sherba, Dunham, a Harvey 2000). Hubschman v laboratorních testech zjistil, že už při koncentraci mědi okolo 0,5 mg/litr, se u raka *Orconectes rusticus* objevují degenerace tkání, hlavně ledvinách a maxilárních žláz (Hubschman 1967). To je způsobeno skutečností, že morbidita buněk je rychlejší než jejich regenerace a náprava, která je omezena sníženou hladinou GSH (Sherba, Dunham, a Harvey 2000).

3.4 Olovo

Olovo má mnohem horší následky na nedospělé jedince, jejichž vývoj a růst ještě není u konce než na dospělé. Proto byla mortalita u mladších korýš druhu *Asellus aquaticus* pocházejících z řeky Trent ze Středozemí Anglie mnohem vyšší (Fraser, Parkin, a Verspoor 1978). Diferenciace v rámci jednoho druhu u korýše *Asellus aquaticus* se neprojevovala jen u věkově odlišných jedinců, ale i u korýšů rozdílné velikosti. Větší

jedinci korýše *Asellus aquaticus* z řeky Calder v Severní Anglii se ukázali býti vždy více odolnější vůči působení olova než ti menší. Stejně výsledky se ukázali i u kontrolní skupiny korýšů z neznečištěné řeky Woodplumpton z oblasti severo-východní Anglie (Fraser 1980). Olovo je mimo jiné vstřebáváno i přes žábry. Zatímco množství přijatého olova závisí na velikosti povrchu, jeho toxicita je funkcí rostoucího objemu. Menší jedinci mají menší objem na plochu, takže koncentrace olova v tkáních bude stoupat rychleji (Fraser, Parkin, a Verspoor 1978).

Sladkovodní hlemýžď *Lymnaea stagnalis* je velice citlivý na přítomnost zvýšené koncentrace olova. Tato přecitlivělost je způsobena extrémně vysokou rychlostí vstřebávání a vychytávání Ca^{2+} z prostředí, který potřebný ke tvorbě ulity (Brix et al. 2012).

4 Metallothionein

Téměř všechny různé varianty resistance mohou být způsobeny genetickou variací (Klerks a Levinton 1989). U druhu pakomára *Chironomus riparius* odebraného z řeky Dommel v severní části Belgie bylo zjištěno, že schopnost adaptace na znečištění těžkými kovy pozvolna stoupá. Předpokládá se, že je to částečně způsobeno různými faktory prostředí, které postupně přibývají a organismus ovlivňují. V laboratorních testech zkřížili pakomáry adaptované na znečištění těžkými kovy a pakomáry, kteří takové adaptace vyvinuté neměli. Hned v první generaci ubylo pakomárů, kteří by jevíli známky adaptace na znečištění těžkými kovy. Tím se potvrzuje, že tok genů z populací z čistých neznečištěných míst těžkými kovy má značný vliv na úroveň adaptace kovů u pakomárů žijících ve znečištěných vodách (Groenendijk et al. 2002). V tomto případě se nejspíš jedná o polygenickou nežli monogenetickou odpověď (Groenendijk et al. 2002). U chvostoskoků byla objevena rezistence, konkrétně na kadmium, ale nezjistilo se, kolik dalších genetických faktorů v populaci se na rezistenci podílí (Posthuma et al. 1993). Nicméně u rostliny *Mimulus guttatus* se zjistilo, že pouze jeden gen je zodpovědný za odolnost vůči mědi (Macnair 1983).

Metallothioneiny (MT) jsou proteiny s nízkou molekulární hmotností, které se podílejí na detoxikaci těžkých toxických kovů (Bodar et al. 1990; Kotsonis a Klaassen 1978; Schäffer a Kägi 1988). Projevuje se u nich vysoká afinita vůči kovovým iontům, například k mědi, kadmiu a zinku (Dallinger 1994). MT byl objeven v roce 1957 při zkoumání koňské ledvin. V kůře ledviny byl objeven protein, metallothionein, který byl zodpovědný za přirozenou akumulaci kadmia (Schäffer a Kägi 1988). Mnoho bezobratlých živočichů vystavených zvýšeným koncentracím těžkých kovů reaguje na stres syntézou metallothioneinu, za kterou je zodpovědný transkripční faktor kovů 1 (*metal transcript factor 1*, MTF-1). U bezobratlých je gen metallothioneinu je produkován v nadměrném množství u populací, které byly vystavené působení těžkých kovů. Se zvyšující s koncentrací kadmia v substrátu se zvyšovala i četnost alely promotoru metallothioneinu (Janssens, Roelofs, a Van Straalen 2009).

U červa rodu *Limnodrilus hoffmeisteri* se zjišťovalo, zda je jeho rezistence vůči těžkým kovům způsobována geneticky. Tato otázka byla zodpovězena jednoduchým mechanismem adaptace. U odolných jedinců červa *L. hoffmeisteri* v lokalitě Foundry Cove byla nalezena vysoká koncentrace ligandů vázajících kovy (*metal-binding ligands*), jejichž molární hmotnost je v rozmezí proteinů vázajících kovy (*metal-binding proteinu*)

metallothioneinů (Klerks a Bartholomew 1991). Jedinci z oblasti Foundry Cove měli v sobě uložené mnohem větší množství kadmia než jedinci z kontrolních skupin (Obrázek 3). Červy *Limnodrilus hoffmeisteri* ze znečištěných vod (Foundry Cove) v sobě mohly mít vyšší obsah kadmia díky rezistenci vůči němu, protože v sobě mají více proteinů vázajících toxické látky podobných metallothioneinu (Klerks a Bartholomew 1991). Tudíž genetický základ pro odolnost vůči znečištění těžkými kovy může spočívat v evolučních změnách na metallothioneinových genech (MT gene) (Martinez a Levinton 1996).

5 Mechanismy fyziologické a morfologické

Vystavení toxickým chemikáliím zahrnující i stopové kovy, jejichž koncentrace postupně stoupá, zvyšuje nátlak na energetický rozpočet organismu. Aby se předešlo plnému působení toxicity a negativním následkům, musí být koncentrace těžkých kovů uvnitř organismu striktně kontrolována (Sowa a Skalski 2019). Kovy se nemohou rozkládat, proto je jejich koncentrace uvnitř organismu kontrolována jiným způsobem, a to buď omezenou asimilací nebo zvýšeným vylučováním během detoxikace. Ta je založená na fixování kovových iontů na nerozpustné granule (Marigómez et al. 2002).

Rezistence organismu na chemikálii, kov nebo jakékoliv znečištění značí přítomnost mechanismu, který napomáhá organismu vyrovnat se s nepříznivými faktory. Mechanismus buď reguluje a snižuje vstřebávání toxických látek nebo zabráňuje toxickému činidlu ovlivnit metabolismus a poškodit důležité struktury v organismu a jeho buňkách (Bodar et al. 1990). Rezistentní organismy, které nemají omezený příjem kovu mají obvykle vyšší schopnost přeměnit kov v méně toxický nebo ho uložit na místo, kde nebude tolik škodit (Bodar et al. 1990).

U zástupce skupiny *Crustacea* se projeví adaptace, které jim umožňují úspěšně využívat dna znečištěných vod; například nižší metabolická rychlost, pomalý růst, nízká rychlost produkce a zvýšená dlouhověkost (Ginet 1930; cit. podle Canivet, Chambon a Gibert 2001).

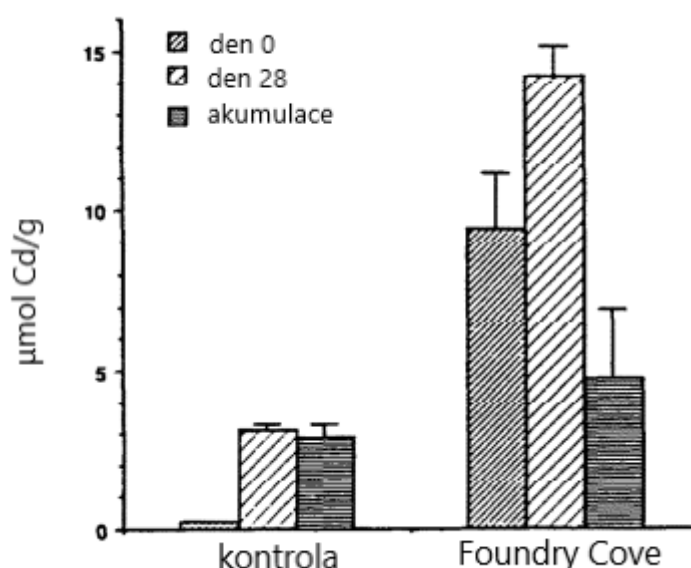
5.1 Kadmium

Kadmium se v přírodě nachází ve velkém množství a je jedním z nejčastějších „aktérů“ při znečištěních způsobených industriálními aktivitami. Toxicita kadmia je připisována jeho schopnosti vázat se na biochemické systémy, které za běžných okolností interagují s dvojmocnými ionty, jako je například vápník (Griffiths 1980). Hlavní cestou, jak se mohou ionty kadmia dostat do organismu a do buněk hmyzu je přes vápníkový kanál (Braeckman et al. 1999).

U sladkovodního kroužkovce *Limnodrilus hoffmeisteri* je schopnost odolávat kadmiu silně dědičná (Martinez a Levinton 1996). Při terénním výzkumu v oblasti Foundry Cove v New Yorku byla u červa rodu *Limnodrilus hoffmeisteri* zjištěna rezistence na zvýšené koncentrace kadmia. Když byl tento organismus umístěn do čistého sedimentu, bez zvýšených koncentrací kadmia, stále se u organismu tato rezistence projevovala. To nám dokazuje, že tato odolnost je geneticky podmíněna (Klerks 2002).

Živočichové z oblasti Foundry Cove ukládají výrazně více kadmia (dvakrát větší množství), než jedinci identického druhu v kontrolovaných podmínkách. Zvýšené ukládání kadmia bylo také pozorováno u potomků jedinců ze znečištěné oblasti, kteří ale nikdy nebyly vystaveni zvýšené koncentraci kovu (Klerks a Bartholomew 1991).

U odolných jedinců červa *L. hoffmeisteri* v lokalitě Foundry Cove byla nalezena vysoká koncentrace ligandů vázajících kovy (*metal-binding ligands*), jejichž molární hmotnost je v rozmezí proteinů vázajících kovy (*metal-binding proteinu*), metallothioneinů (Klerks a Bartholomew 1991). Jedinci z oblasti Foundry Cove měli v sobě uložené mnohem větší množství kadmia než jedinci z kontrolních skupin (Obrázek 3). Jedinci ze znečištěných vod (Foundry Cove) v sobě mohly mít vyšší obsah kadmia díky rezistenci vůči němu, protože v sobě mají více proteinů vázajících toxické látky podobných metallothioneinu (Klerks a Bartholomew 1991).



Obrázek 3: Akumulace kadmia organismu *Limnodrilus hoffmeisteri* z kontrolních podmínek a z oblasti Foundry Cove a koncentrace kadmia před a po vystavení kadmii (Klerks a Bartholomew 1991)

Zvýšená akumulace kadmia byla zaznamenána i na buněčné úrovni v cytosolu u organismů z oblasti Foundry Cove. Dospělci červa *L. hoffmeisteri* měli v cytosolu mnohem větší množství nahromaděného kadmia než jejich potomci, kteří na druhou stranu v cytosolu nahromadily více kadmia než jedinci v kontrolovaných podmínkách (Klerks a Bartholomew 1991).

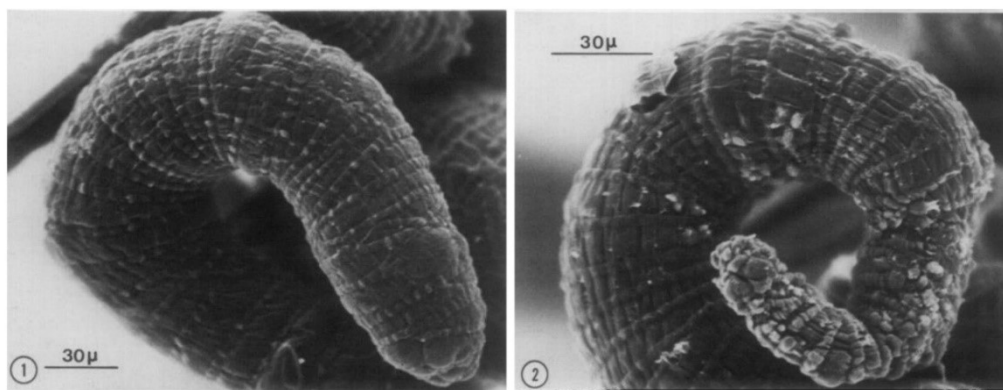
U sladkovodní ryby *Gambusia affinis* byla zkoumána resistance obdobně jako u červa *L. hoffmeisteri*. Nejprve byla resistance pozorována v podmínkách, kde se organismus nachází (v tomto případě v oblasti toku Bayou Trepagnier v Louisianě), poté byl organismus umístěn do „čistého sedimentu“ bez kontaminace kovem (zde převážně olovem a zinkem). Ukázalo se, že resistance vůči olovu je spíše jen projevem aklimatizace než adaptace, protože resistance se v „čistých“ laboratorních podmínkách již neprojevila (Klerks 2002).

S rostoucí vazbou kadmia na MT gen u červů z lokality Foundry Cove souvisí i rostoucí resistance vůči kadmiu. Uvažovalo se i o možnosti, že zvýšená resistance červů z této lokality je způsobená zvýšenou schopností kadmium detoxikovat (Klerks a Bartholomew 1991). Nakonec se zjistilo, že odolnost červů vůči kadmiu není způsobená sníženou akumulací kovů, ale vazbou na proteiny. Tito červy mají vyšší hladinu proteinu vázající kadmium, metallothioneinu, než jedinci, kteří zvýšeným koncentracím vystavení nebyly (Klerks a Bartholomew 1991).

Perloočka *Daphnia magna*, která byla odebrána na severu Londýna, byla v laboratorních podmínkách vystavena zvýšeným koncentracím kadmia. To mělo za následek zmenšení a paralýzu vnitřních orgánů, konkrétně divertikula (Obrázek 4).

Divertikulum u perloočky rodu *Daphnia magna* je párovitý slepý výrůstek, vyskytující se mezi zadním a středním střevem. Elektronovou mikroskopií bylo zjištěno, že se na buněčné membráně u mitochondrií deformovaných orgánů tvoří granulovité útvary kadmia (Griffiths 1980).

Deformace střevního divertikula se projevila i při vystavení působení zinku, ale jen při koncentraci vyšší než $2000 \text{ Zn}^{2+} \mu\text{g na liter}^{-1}$, zatím co u kadmia se změna projevila při $12 \mu\text{g Cd}^{2+} \text{ na liter}^{-1}$ (Griffiths 1980).



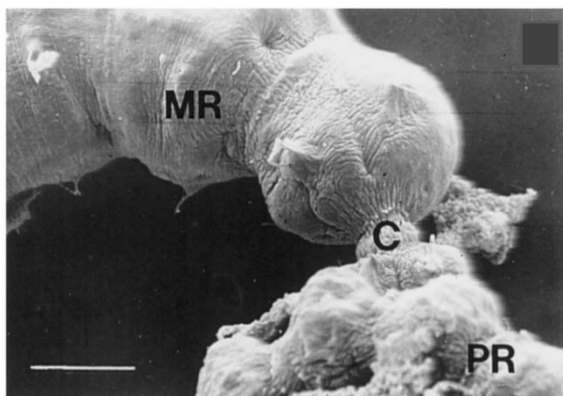
Obrázek 4: vlevo: snímek z elektronového mikroskopu nepoškozeného střevního divertikula korýše *Daphnia magna*; vpravo: snímek z elektronového mikroskopu střevního divertikula korýše *Daphnia magna* po působení vyšší koncentrace kadmia; (Griffiths 1980)

6 Mechanismy behaviorální

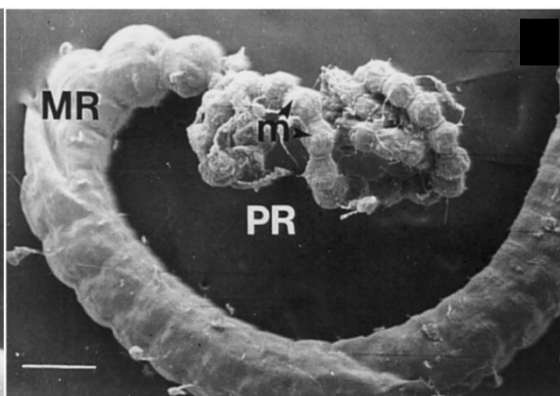
Zvýšená koncentrace mědi u koryšů *Crustacea (Decapoda)* omezila schopnost vyhledávat a orientovat se ve vodním sloupci za potravou, konkrétně zaznamenat pach kořisti (Sherba, Dunham, a Harvey 2000). Někdy byly smyslové receptory narušené natolik, že organismus nebyl schopný uniknout před predátorem (Sullivan et al. 1983). Ale ne všechny změny chování jsou negativní. V některých případech pozměněné chování napomáhalo organismu uniknout před zvýšenou koncentrací mědi (Pynnönen 1996).

Po umístění červa *Lumbriculus variegatus* do uměle vytvořeného prostředí kontaminovaného mědí se dalo pozorovat neobvyklé chování. Většina organismů, která byla vystavena mědi se chovala letargicky a odpověď na stimuly byla nízká. Ovšem červ *L. variegatus* sebou začal prudce zmítat, škubat a svíjet se. Se zvyšující se koncentrací mědi se i zvyšuje míra pasivity organismu (O’Gara et al. 2004). Při delší expozici působení mědi se začaly projevovat i morfologické změny, a nakonec byla u červa *L. variegatus* zaznamenána postupná spontánní autotomie a fragmentace článků. Ta může být vysvětlena skutečností, že červy třídy *Oligochaeta* ukládají přijaté těžké kovy do zadních článků těla (Lucan-Bouché et al. 1999). Potvrzením tohoto vysvětlení je další zástupce z třídy *Oligochaeta* červ *Tubifex tubifex*. Ten byl v laboratoři vystaven subakutním koncentracím mědi po dobu 96 hodin, jejichž důsledkem byla ztráta ocásku, respektive zadních článků těla. Tato autotomie byla pozorována při koncentracích téměř shodných s koncentracemi z oblasti Reuil sur Mare ve Francii, odkud byl červ *T. tubifex* odebrán (Lucan-Bouché et al. 1999).

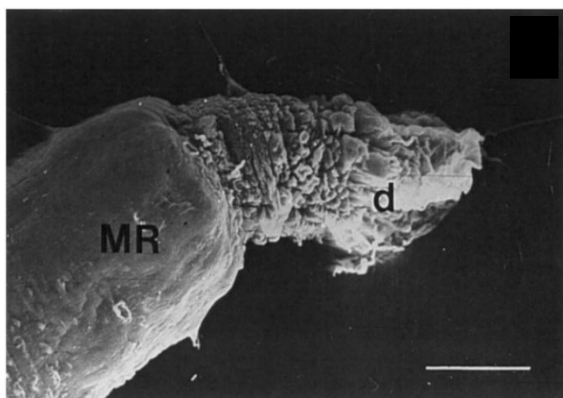
Zahození koncových článků je postupný proces. Nejprve dojde k zaškrcení mezi střední a zadní části těla (Obrázek 5), kterým se vytvoří přepážka (*septum*). Izolovaná část potom degraduje, odumírá a odděluje se od těla (Obrázek 6 a 7). Nakonec se rána zahojí a začne regenerace nového ocásku (Obrázek 8) (Lucan-Bouché et al. 1999).



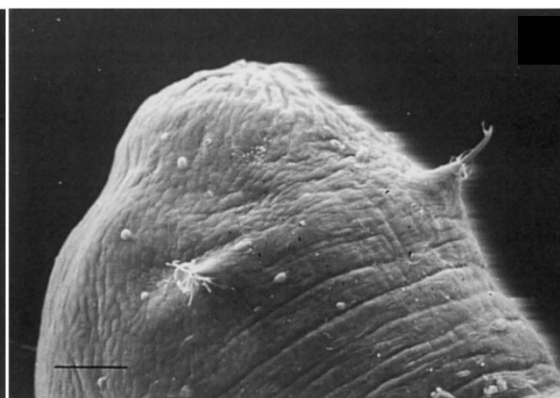
Obrázek 5: Zaškrcení střední a zadní části; C: zaškrcení (*constriction*), MR: střední část (*median region*), PR: koncová část (*posterior region*); (Lucan-Bouché et al. 1999)



Obrázek 6: Izolace a začínající degradace zadní části; MR: střední část (*median region*), PR: koncová část (*posterior region*), m: metamery (*metamere*); (Lucan-Bouché et al. 1999)



Obrázek 7: Degenerovaná část těla odpadající od těla; MR: střední část (*median region*), d: degenerovaná část (*degenerating part*); (Lucan-Bouché et al. 1999)



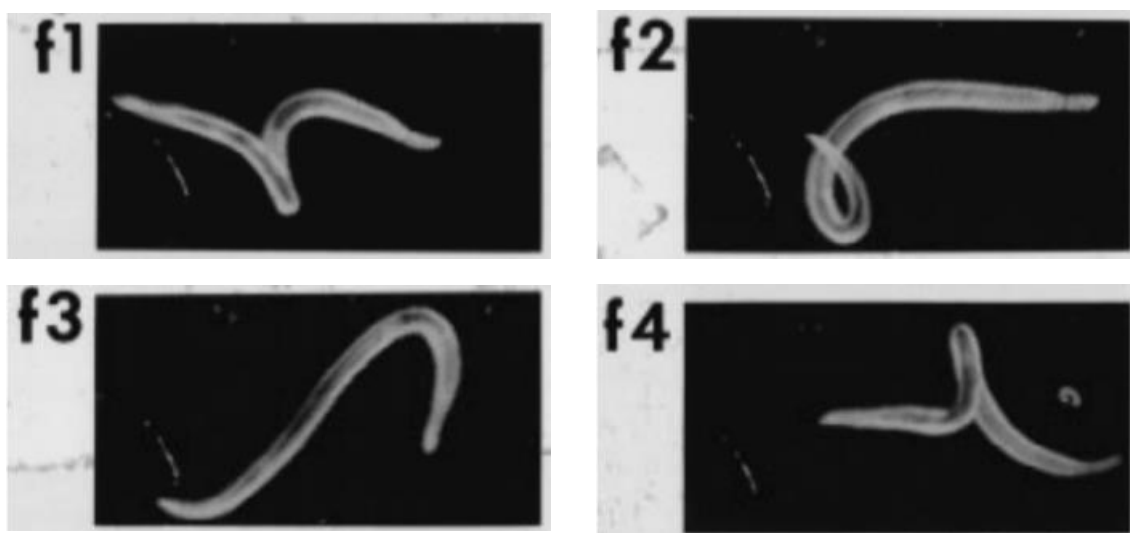
Obrázek 8: Uzavřená a zahojená rána; (Lucan-Bouché et al. 1999)

Tento mechanismus odstranění koncových článků těla, kde se akumulují toxické látky, napomáhá organismu chránit se před vysokou vnitřní koncentrací těžkých kovů, které by jinak mohly být pro organismus škodlivé nebo i dokonce smrtelné (Lucan-Bouché et al. 1999).

U organismů vystavených těžkým kovům nebo jiným toxickým látkám, můžeme pozorovat varovné chování. Varovné chování se může projevovat buď výraznými pohyby těla (škubáním nebo svíjením) nebo utlumením funkcí, při jejichž přirozeném průběhu by mohl organismus přijmout více škodlivých látek.

U zvířat se při hrozícím nebezpečí dají pozorovat dvě obvyklé změny chování. Takzvaný *helical swimming* (do češtiny lze přeložit jako spirálovité plavání, Obrázek 9) spočívá v tom, že se organismus například při hmatovém stimulu začne rytmicky

spirálovitě vlnit od předních částí těla k zadním (C. D. Drewes a Fournier 1993; Ch. D. Drewes 1999). Dalšímu chování se říká *body reversal* (do češtiny lze přeložit jako obrácení těla), kdy si sekvencí několika mrštných ohybových pohybů hlava a ocas obrátí své polohy (Ch. D. Drewes 1999). Obě tato chování mají organismu pomoci uniknout predátorovi. Po umístění červa *Lumbriculus variegatus* při laboratorním testování do vody s koncentrací mědi v rozmezí 0,2 a 0,4 μM , se snížila citlivost reakce na hmatovou stimulaci, vedoucí k těmto dvěma behaviorálním reakcím. Na mechanismus *helical swimming* měla měď větší vliv než na *body reversal*. Jakmile byl červ *L. variegatus* umístěn do čisté vody bez mědi, oba mechanismy chování a citlivost reakce se vrátila do původních hodnot během 1 až 2 dní. Důvodem, proč bylo *helical swimming* vážněji postiženo po působení mědi nejspíš spočívá ve složitosti pohybů, které jsou pro tento pohyb základem (O’Gara et al. 2004).



Obrázek 9: Čtyři fáze pohybu *Helical swimming* u červa *Lumbriculus variegatus*; F1: spirálovitá vlna v oblasti středu těla po směru hodinových ručiček; F2: spirálovitá vlna v oblasti ocasu; F3: začátek druhé spirálovité vlny v oblasti hlavy; F4: druhá spirálovitá vlna v oblast středu těla proti směru hodinových ručiček (Charles D. Drewes 1999)

7 Bioindikace

Mnoho mechanismů, ale i samotných následků působení těžkých kovů se dá posléze použít i při bioindikaci znečištěných vodních toků. Takové pozorování pak lze použít v dalších oborech, například při ochraně životního prostředí. Včasným odhalením a detekcí potenciálně nebezpečných látek ve vodním prostředí, se dá snadno předejít dalšímu zhoršení prostředí, které by pak v kritických hodnotách mohlo vést k vymírání druhů.

Bioindikátorem může být jakýkoliv druh nebo skupina druhů, kteří reagují na změny biotických a abiotických změn prostředí. Změny v prostředí pak mohou vést ke specifickým změnám v organismu (Sowa a Skalski 2019). Znamením, že je v ekosystému nějaký problém se znečištěním může být jakákoliv chemická, fyziologická nebo behaviorální reakce. V mnoha laboratorních i terénních výzkumech, ve kterých se zaměřují na efekty těžkých kovů na organismy a rezistenci organismů proti nim, se dají výsledky použít na sledování čistoty životního prostředí a posouzení úrovně znečištění.

Indikátory znečištění životního prostředí těžkými kovy jsou často používány organismy, které mají účinný mechanismus akumulace těžkých kovů (Dallinger 1994). Pokud má organismus zvýšenou hladinu vnitřní koncentrace těžkého kovu, syntéza metallothioneinu je závislá na reakci na konkrétní těžké kovy. Proto je metallothionein u bezobratlých potencionálně vhodným biomarkerem stresu způsobeného těžkými kovy (Dallinger 1994).

Chrostík *Hydropsyche pellucidula* ze skupiny *Trichoptera*, má širokou oblast výskytu a splňuje všechny důležité požadavky pro to, aby byl ideálním bioindikátorem znečištění těžkými kovy. *Trichoptera* dokáží snášet široké spektrum kvality vody a na tyto podmínky reagují morfologickými, behaviorálními a chemickými změnami (Vuori a Kukkonen 1996). Také červ rodu *Tubifex* ze třídy *Oligochaeta* je známý pro svou vysokou odolnost a toleranci vůči těžkým kovům. Často se stává, že znečištěné prostředí opouští ze všech organismů jako poslední. Naopak když se podmínky zlepšují, území obsazuje jako první (Milbrink 1980).

U skupiny *Mollusca* dochází k akumulaci a detoxikaci těžkých kovů v trávicí žláze (Marigómez et al. 2002). Intralysosomální akumulace (uvnitř lysosomu eukaryotických buněk) kovů se dá použít v trávicích buňkách jako biomarker pro vystavení těžkým kovům. Když se v trávicích buňkách začne akumulovat nějaký kov, dochází u lysosomálních buněk ke strukturním změnám, což se dá použít jako spolehlivý

biomarker (Zaldibar et al. 2006). Aby se zjistilo, kde se těžké kovy v tkáních organismů hromadí, využívá se metoda autometallografie (AMG). Je to vysoce specifická histochemická metoda, která dokáže v organismu vyhledat ionty konkrétního kovu (Sorensen et al. 1997). Následně za pomoci světelné nebo elektronové mikroskopie je možné odhalit místo, kde se určitý kov v tkáních hromadí (Miller, Yu, a Genter 2016).

Při laboratorních testech byla perloočka *Daphnia magna* vystavena působení kadmia, přičemž se následně projevíly strukturální změny na střevním divertikulu. Koncentrace kadmia, při níž se změny projevíly, byla ovšem poměrně nízká. Hladina koncentrace kadmia se blížila limitům pitné vody podle organizace W.H.O. (*World Health Organization*). Kdyby se tyto změny projevovaly i v terénu, bylo by možné uvažovat o perloočce *Daphnia magna* jako o vhodném bioindikátoru mírně znečištěných vod kadmiem (Griffiths 1980).

U červa *Tubifex tubifex* získaného z oblasti v blízkosti Reuil sur Mare ve Francii se při vystavení mědi v laboratorních podmínkách také projevíla chování, která měla za následek morfologickou změnu v podobě autotomie ocásku. Tento mechanismus se při testování projevil i přímo v terénu, tudíž se může použít při bioindikaci vod znečištěných mědí (Lucan-Bouché et al. 1999).

8 Závěr

Většina studií zabývajících se rezistencí a tolerancí bezobratlých živočichů vůči znečištění těžkými kovy, pozoruje odolnost v terénních testech a výzkumech na skupině různých druhů. Často se tedy diskutuje o skutečnosti, že by zvýšená tolerance vůči působení těžkých kovů mohla být způsobena změnou druhového složení. Jakmile organismy žijí ve znečištěné oblasti po delší čas, citlivé druhy postupně nahrazovány druhy méně citlivými (Klerks a Weis 1987).

Pro vodní bezobratlé živočichy je výhodné dokázat regulovat koncentraci těžkých kovů ve svém těle. Výhodu to může mít i vzhledem k dalším trofickým úrovním. V případě, že je organismus pozřen predátorem, přenese akumulované těžké kovy i na svého konzumenta. V případě, že konzument nedokáže regulovat koncentraci těžkých kovů uvnitř svého těla, může pro něj být takové sousto smrtelné (LeBlanc 1982).

Metallothionein se ukázal býti velmi důležitým účastníkem při detoxikaci toxických kovů v organismu. Účast metallothioneinového systému při odpovědi na stres byla do roku 2009 dokázána pouze u některých obratlovců a mušky rodu *Drosophila* (Janssens, Roelofs, a Van Straalen 2009). Recentnější studie se zaměřují na účinky metallothioneinu v souvislosti s lidským tělem a jeho zdravím.

Myslím si, že problematika, které jsem se v této bakalářské práci věnovala, není dostatečně prozkoumána. Bude potřeba více podrobnějších výzkumů, aby bylo téma dostatečně pochopeno a abychom získali více informací. Většina prací, laboratorních testů a terénních výzkumů je prováděna na mořských druzích. Ovšem už značně menší množství publikací se zabývá sladkovodními organismy nebo konkrétně sladkovodními bezobratlými. Práce na bezobratlých živočiších jsou zaměřeny převážně na následky působení těžkých kovů, které bývají v podobně snížení počtu jedinců v populaci, zpomalení růstu nebo reprodukce. Ale o samotných mechanismech aktivní obrany proti působení těžkého kovu nebo jiné toxické látky zatím mnoho prací.

Další háček spočívá v tom, že jsou studie často zaměřené na působení pouze jednoho těžkého kovu na organismus, nikoliv směsí více kovů. Ale v přírodě je znečištění těžkými kovy způsobeno více odlišnými kovy, které spolu navzájem interagují. Pokud je tedy studie zaměřena na účinky jen jednoho těžkého kovu na organismus, pak se reakce organismu v přírodě a v laboratorních podmínkách mohou lišit (Gerhardt 1993).

9 Seznam použité literatury

- Ahsanullah, M. 1982. „Acute Toxicity of Chromium, Mercury, Molybdenum and Nickel to the Amphipod *Allorchestes compressa*”. *Marine and Freshwater Research* 33(3): 465–74.
- Besser, J. M., R. A. Dorman, D. L. Hardesty, a C. G. Ingersoll. 2016. „Survival and Growth of Freshwater Pulmonate and Nonpulmonate Snails in 28-Day Exposures to Copper, Ammonia, and Pentachlorophenol”. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 70(2): 321–31.
- Blaxter, J. H. S., a C. C. Ten Hallers-Tjabbes. 1992. „The Effect of Pollutants on Sensory Systems and Behaviour of Aquatic Animals”. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 26(1): 43–58.
- Bodar, C. W.M. et al. 1990. „Cadmium Resistance in *Daphnia magna*”. *Aquatic Toxicology* 16(1): 33–40.
- Braeckman, B. et al. 1999. „Cadmium Uptake and Defense Mechanism in Insect Cells”. *Environmental Research* 80(3): 231–43.
- Brix, K. V., A. J. Esbaugh, K. M. Munley, a M. Grosell. 2012. „Investigations into the Mechanism of Lead Toxicity to the Freshwater Pulmonate Snail, *Lymnaea stagnalis*”. *Aquatic Toxicology* 106–107: 147–56.
- Brown, B. E. 1975. „Observations on the Tolerance of the Isopod *Asellus meridianus* Rac. to Copper and Lead”. *Water Research* 10: 555–59.
- Canivet, V., P. Chambon, a J. Gibert. 2001. „Toxicity and Bioaccumulation of Arsenic and Chromium in Epigean and Hypogean Freshwater Macroinvertebrates”. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40(3): 345–54.
- Carlberg, I., a B. Mannervik. 1955. „Glutathione Reductase”. *Methods in Enzymology* 113: 484–90.
- Dallinger, R. 1994. „Invertebrate Organisms as Biological Indicators of Heavy Metal Pollution”. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48(1): 27–31.
- Drewes, C. D., a C. R. Fournier. 1993. „Helical Swimming in a Freshwater Oligochaete”. *The Biological Bulletin* 185(1): 1–9.
- Drewes, Ch. D. 1999. „Helical Swimming and Body Reversal Behaviors in *Lumbriculus variegatus* (Annelida: Clitellata: Lumbriculidae)”. *Hydrobiologia* 406: 263–69.
- Duffus, J. H. 2002. „Heavy Metals’ - A Meaningless Term?” *Pure Applied Chemistry* 74(5): 793–807.
- Emsley, J. 2011. *Nature’s Building Blocks*. Oxford University Press.
- Erickson, R. J. et al. 1996. „The Effects of Water Chemistry on the Toxicity of Copper to Fathead Minnows”. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(2): 181–93.
- Fraser, J. 1980. „Acclimation To Lead in the Freshwater Isopod *Asellus aquaticus*”. *Oecologia* 45(3): 419–20.
- Fraser, J., D. T. Parkin, a E. Verspoor. 1978. „Tolerance to Lead in the Freshwater Isopod *Asellus aquaticus*”. *Water Research* 12(8): 637–41.
- Gerhardt, A. 1993. „Review of Impact of Heavy Metals on Stream Invertebrates with Special Emphasis on Acid Conditions”. *Water, Air, and Soil Pollution* 66(3): 289–314.
- Van Ginneken, M., R. Blust, a L. Bervoets. 2017. „How Lethal Concentration Changes Over Time: Toxicity of Cadmium, Copper, and Lead to the Freshwater Isopod *Asellus aquaticus*”.

- Environmental Toxicology and Chemistry* 36(10): 2849–54.
- Gomot, A. 1998. „Toxic Effects of Cadmium on Reproduction, Development, and Hatching in the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis* for Water Quality Monitoring". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41(3): 288–97.
- Griffiths, P. R. E. 1980. „Morphological and Ultrastructural Effects of Sublethal Cadmium Poisoning on *Daphnia*". *Environmental Research* 22(2): 277–84.
- Groenendijk, D. et al. 2002. „Dynamics of Metal Adaptation in Riverine Chironomids". *Environmental Pollution* 117(1): 101–9.
- Grosell, M., C. Nielsen, a A. Bianchini. 2002. „Sodium Turnover Rate Determines Sensitivity to Acute Copper and Silver Exposure in Freshwater Animals". *Comparative Biochemistry and Physiology* 133(1–2): 287–303.
- Hawkes, S. J. 1997. „What Is a „Heavy Metal“?" *Jurnal od Chemical Education* 74(11): 1374.
- Hubschman, J. H. 1967. „Effects of Copper on the Crayfish *Orconectes rusticus* (Girard): II . Mode of Toxic Action". *Crustaceana* 12(2): 141–50.
- Janssens, T. K.S., D. Roelofs, a N. M. Van Straalen. 2009. „Molecular Mechanisms of Heavy Metal Tolerance and Evolution in Invertebrates". *Insect Science* 16(1): 3–18.
- Khargarot, B. S. 1991. „Toxicity of Metals to a Freshwater tubificid worm, *Tubifex tubifex*". *Environmental Contamination and Toxicology* 46: 906–12.
- Klerks, P. L. 2002. „Adaptation, Ecological Impacts, and Risk Assessment: Insights from Research at Foundry Cove, Bayou Trepagnier, and Pass Fourchon". *Human and Ecological Risk Assessment* 8(5): 971–82.
- Klerks, P. L., a P. R. Bartholomew. 1991. „Cadmium Accumulation and Detoxification in a Cd-Resistant Population of the Oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*". *Aquatic Toxicology* 19(2): 97–112.
- Klerks, P. L., a J. S. Levinton. 1989. „Effects of Heavy Metals in a Polluted Aquatic Ecosystem". In *Ecotoxicology: Problems and Approaches*, , 41–67.
- Klerks, P. L., a J. S. Weis. 1987. „Genetic Adaptation to Heavy Metals in Aquatic Organisms: A Review". *Environmental Pollution* 45(3): 173–205.
- Komínková, D. 2008. *Ekotoxikologie*. Praha: České Vysoké Učení Technické.
- Kotsonis, F. N., a C. D. Klaassen. 1978. „The Relationship of Metallothionein to the Toxicity of Kadmium After Prolonged Oral Administration to Rats". *Toxicology and Applied Pharmacology* 46(1): 39–54.
- LeBlanc, G. A. 1982. „Laboratory Investigation into the Development of Resistance of *Daphnia magna* (Straus) to Environmental Pollutants". *Environmental Pollution* 27: 309–22.
- Lucan-Bouché, M. L., S. Biagianti-Risbourg, F. Arsac, a G. Vernet. 1999. „An original decontamination process developed by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead". *Aquatic Toxicology* 45(1): 9–17.
- Macnair, M. R. 1983. „The Genetics of Copper Tolerance in the Yellow Monkey Flower, *Mimulus guttatus*". *Heredity* 50(3): 283–93.
- Marigómez, I. et al. 2002. „Cellular and Subcellular Distribution of Metals in Molluscs". *Microscopy Research and Technique* 56(5): 358–92.
- Martinez, D. E., a J. Levinton. 1996. „Adaptation to Heavy Metals in the Aquatic Oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*: Evidence for Control by One Gene". *Evolution* 50(3): 1339–43.

- Milbrink, G. 1980. „Oligochaete Communities in Pollution Biology: The European Situation with Special Reference to Lakes in Scandinavia". *Aquatic Oligochaete Biology*: 433–45.
- Miller, D. L., I. J. Yu, a M. B. Genter. 2016. „Use of Autometallography in Studies of Nanosilver Distribution and Toxicity". *International Journal of Toxicology* 35(1): 47–51.
- Nábělková, J. 2012. *Analýza Těžkých Kovů v Sedimentech Vodních Toků*.
- Naylor, C., L. Pindar, a P. Calow. 1990. „Inter- and Intraspecific Variation in Sensitivity to Toxins; the Effects of Acidity and Zinc on the Freshwater Crustaceans *Asellus aquaticus* (L.) and *Gammarus pulex* (L.)". *Water Research* 24(6): 757–62.
- Nriagu, J. O. 1990. „Global Metal Pollution Poisoning the Biosphere?" 32(7): 7–33.
- O’Gara, B. A., V. K. Bohannon, M. W. Teague, a M. B. Smeaton. 2004. „Copper-Induced Changes in Locomotor Behaviors and Neuronal Physiology of the Freshwater Oligochaete, *Lumbriculus variegatus*". *Aquatic Toxicology* 69(1): 51–66.
- Pagenkopf, G. K. 1983. „Gill Surface Interaction Model for Trace-Metal Toxicity to Fishes: Role of Complexation, pH, and Water Hardness". *Environmental Science and Technology* 17(6): 342–47.
- Peña, M. M., J. Lee, a D. J. Thiele. 1999. „A Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution." *The Journal of nutrition* 129(7): 1251–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395584>.
- Posthuma, L., R. F. Hogervorst, E. N. G. Joosse, a N. M. Van Straalen. 1993. „Genetic Variation and Covariation for Characteristics Associated with Cadmium Tolerance in Natural Populations of the Springtail *Orchesella cincta* (L.)". *Evolution* 47(2): 619–31.
- Pynnönen, Kirsi. 1996. „Heavy Metal-Induced Changes in the Feeding and Burrowing Behaviour of a Baltic Isopod, *Saduria* (Mesidotea) Entomon L." *Marine Environmental Research* 41(2): 145–56.
- Rogge, R. W., a Ch. D. Drewes. 1993. „Assessing Sublethal Neurotoxicity Effects in the Freshwater Oligochaete, *Lumbriculus variegatus*". *Aquatic Toxicology* 26(1–2): 73–90.
- Schäffer, A., a J. H. R. Kägi. 1988. „Biochemistry of Metallothionein". *American Chemical Society* 27(23): 8510–15.
- Schindler, Paul W. 1991. „The Regulation of Heavy Metal Concentrations in Natural Aquatic Systems". In *Heavy Metals in the Environment*, , 95–124.
- Schlenk, D., K. B. Davis, a B. R. Griffin. 1999. „Relationship Between Expression of Hepatic Metallothionein and Sublethal Stress in Channel Catfish Following Acute Exposure to Copper Sulphate". *Aquaculture* 177(1–4): 367–79.
- Sherba, M., D. W. Dunham, a H. H. Harvey. 2000. „Sublethal Copper Toxicity and Food Response in the Freshwater Crayfish *Cambarus bartonii* (Cambaridae, Decapoda, Crustacea)". *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46(3): 329–33.
- Smith, D. G. 1985. „Sources of Heavy Metal Input to the New Zealand Aquatic Environment". *Journal of the Royal Society of New Zealand* 15(4): 371–84.
- Sorensen, M. B. et al. 1997. „Ultrastructural Localization of Zinc Ions in the Rat Prostate: An Autometallographic Study". *The Prostate* 31(2): 125–30.
- Sowa, G., a T. Skalski. 2019. „Effects of Chronic Metal Exposure on the Morphology of Beetles Species Representing Different Ecological Niches". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102(2): 191–97. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-018-02532-7>.

- Sullivan, B. K., E. Buskey, D. C. Miller, a P. J. Ritacco. 1983. „Effects of Copper and Cadmium on Growth, Swimming and Predator Avoidance in Eurytemora affinis (Copepoda)". *Marine Biology* 77(3): 299–306.
- Van de Perre, D. et al. 2016. „The Effects of Zinc on the Structure and Functioning of a Freshwater Community: A Microcosm Experiment". *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(11): 2698–2712.
- Vuori, K. M., a J. Kukkonen. 1996. „Metal Concentrations in Hydropsyche pellucidula Larvae (Trochopoda, Hydropsychidae) in Relation to the Anal Papillae Abnormalities and Age of Exocuticle". *Water Research* 30(10): 2265–72.
- Zaldibar, B. et al. 2006. „Freshwater Molluscs from Volcanic Areas as Model Organisms to Assess Adaptation to Metal Chronic Pollution". *Science of the Total Environment* 371(1–3): 168–75.
- Zoller, W. H. 1984. „Anthropogenic Perturbation of Metal Fluxes into the Atmosphere". In *Changing Metal Cycles and Human Health*, , 27–41.