

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro hydrodynamiku AV ČR, v. v. i.

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



Hana Vaněčková

Odstraňování microcystinů při úpravě vody
doprovázené ekotoxikologickými testy na druhu *Daphnia magna*

Removal of microcystins during drinking water treatment
accompanied by ecotoxicological tests on *Daphnia magna*

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Martin Pivokonský, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Adam Petrusek, Ph.D.

Praha 2015

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla veškeré použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. května 2015

.....

Hana Vaněčková

Poděkování

Motto: „Chvilím volného času, kdy člověku nic nechybí, není ničím posedlý a nic nemusí, říkali staří Řekové scholé. Římané toto slovo převzali a od nich všichni ostatní, až z něho vznikla škola. Zní to málem jako ironie, ale škola by tedy mělo být to místo, kam se člověk těší, kde nemusí spěchat a ničeho se bát, kde má čas i pohodu na to, aby přemýšlel.“

Jan Sokol, 2007

Na tomto místě bych ráda poděkovala nejen za pomoc a podporu při tvorbě své diplomové práce, ale za celé své studium na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, potažmo na katedře Ekologie, která mi bez nadsázky byla druhým domovem. Studium zde mne posouvalo dál nejen po stránce znalostní, ale i té lidské. Našla jsem zde své zázemí, vzácné přátele, obohacující vzdělání a rozšíření obzorů. Učila jsem se přemýšlet vědecky i lidsky a dospívat. Kdy jindy za to vše poděkovat, když ne kupříkladu teď?

Děkuji především Martinu Pivokonskému a Adamu Petruskovi, kteří mě školili, pomáhali mi v začátcích i při zakončování mé práce, oplývali vstřícností a trpělivostí, za což jsem jim tolik vděčná. Jsou mi inspirací nejen v tom, co člověk může dokázat, chce-li. Děkuji jim za budování *scholé*.

Děkuji Janě Vokurkové, jejíž velké srdce mě obejmulo vždy, jakmile jsem vstoupila do laboratoře, a že jsem do ní vstupovala o to raději. Děkuji Jasně Vukic z naší ekologické laboratoře, Janě Načeradské, Renátě Vašákové a Magdaleně Barešové z hydrochemické laboratoře na Ústavu pro hydrodynamiku AV ČR, v. v. i. za jejich ochotu, trpělivost a cenné rady v průběhu celé mé práce.

Děkuji Lindě Nedbalové, Martinu Černému, Veronice Sacherové a Veerle Lemaire za odborné rady a milé slovo ve chvílích nezdarů.

Děkuji Zuzce Michalové a Petru Janu Juračkovi za jejich optimismus, inspiraci a nezapomenutelnou pomoc při statistickém zpracování mé práce.

Děkuji svým „daphnijkám“ za tanec ve vodním sloupci.

A na závěr jsem si ponechala poděkování svým spolužákům a přátelům, bez kterých by tato stránka nebyla kompletní. Chtěla bych poděkovat Jiřímu Svobodovi. Za to, jak komplexním je mi člověkem. Za to, jak mi po celé mé studium dokázal pomáhat, podporovat mě a posouvat mě dál na cestě ke vzdělání a k tomu být lepším člověkem, aniž bych

si to v danou chvíli uvědomovala. Za to, že mě dokáže jako jeden z mála lidí na světě uklidnit. Díky, že jsi, Jiříku... Na druhou stranu děkuji renesančnímu člověku Radku Lüftnerovi za to, že se mnou dokázal létat a vydržel to velice dlouho. Děkuji Pavlu Pipkovi, Lucii Diblíkové, Martinu Krajíčkovi, Kláře Matasové a svému bráškově za otvírání obzorů, o jejichž existenci jsem neměla ponětí, a za spříznění ve studiu i v životě. Děkuji i dalším blízkým lidem z „naší pracovny“. To, že je tu nejmenuji, neznamená, že jsem na ně zapoměla. Kdepak. A děkuji Tomáši Havelkovi, on sám ví, za co všechno.

Děkuji za chvílky strávené s vámi, považuji to za dar nejvzácnější, když člověku věnujeme kousek času svého života. Ten tvoří mé *scholé*.

Ilustrační obrázky perloček jsou tvorbou autorky této diplomové práce.

Obsah

Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
1. Úvod	9
2. Literární rešerše	11
2.1 Microcystiny a jejich vliv na člověka.....	11
2.2 Microcystiny a zooplankton	12
2.3 Úprava vody a odstraňování microcystinů	15
3. Cíle práce	17
4. Metodika	19
4.1 Materiál a příprava experimentu.....	19
4.1.1 Pokusné klony perlooček a jejich kultivace.....	19
4.1.2 Kultivace řasy druhu <i>Scenedesmus obliquus</i>	20
4.1.3 Příprava dávkované sinicové směsi	20
4.2 Struktura experimentu	21
4.2.1 Fáze experimentu.....	21
4.2.2 Výběr pokusných organismů a manipulace s nimi.....	21
4.2.3 Odběr a dávkování krmné řasy	21
4.2.4 Dávkování sinicové směsi	22
4.2.5 Sklenicová zkouška (jar test)	22
4.3 Průběh ekotoxikologického experimentu	24
4.3.1 Struktura testování	25
4.3.2 I. Fáze experimentu	25
4.3.3 II. Fáze experimentu	26
4.4 Zpracování vzorků z procesu koagulace.....	26
4.4.1 Analýza zbytkové koncentrace Fe, pH a KNK.....	26

4.4.2 Analýza DOC	27
4.4.3 Analýza microcystinů.....	27
4.5 Statistické zpracování dat.....	27
5. Výsledky.....	29
5.1 Sklenicové optimalizační zkoušky	29
5.2 Koagulace.....	30
5.3 Ekotoxikologická studie	32
5.3.1 Úmrtnost.....	32
5.3.2 Změny reprodukčních a růstových parametrů.....	34
6. Diskuse.....	40
6.1 Koncentrace microcystinu v povrchové vodě a po její úpravě	40
6.2 Microcystiny a další látky sinicového květu působící na zooplankton.....	42
6.3 Akutní a chronická toxicita	44
7. Praktický význam výsledků práce.....	48
8. Závěr.....	49
9. Seznam zkratk	51
10. Seznam literatury.....	52
11. Seznam příloh.....	63

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na studii koagulační fáze úpravy vody na pitnou z hlediska účinnosti odstraňování cyanotoxinu microcystinu a z hlediska odpovědi ekotoxikologických indikátorů druhu *Daphnia magna* na různé koncentrace vzorku sinicového květu odebraném z vodní nádrže, kterému dominuje sinice druhu *Microcystis aeruginosa*. Odebraný vzorek sinicového květu byl dávkován ve třech koncentracích, které lze běžně najít v přírodním prostředí, šesti klonům perloočky druhu *D. magna*, přičemž tři klony již měly předchozí zkušenost se sinicí druhu *M. aeruginosa* a tři klony nikoliv. Proces koagulace probíhal za optimálních podmínek: pH = 6,36; KNK_{4,5} = 0,26 mmol.l⁻¹; Fe = 0,162 mg.l⁻¹, DOC = 2,83 mg.l⁻¹ za použití 10,5 ml 0,125M NaHCO₃ ve 2 l ultračisté vody, přičemž jednotlivé formy microcystinu v dávkované sinicové směsi byly detekovány v poměru 31,6 % MC-LR, 53,6 % MC-RR a 14,8 % MC-YR. Ukázalo se, že koagulační proces nebyl schopen odstraňovat microcystin, tj. účinnost procesu byla nulová. V ekotoxikologické studii byl zaznamenán rostoucí negativní účinek na perloočky se zvyšující se koncentrací dávkované sinicové směsi. V rámci jejich odpovědi byla zjištěna meziklonální variabilita, avšak předchozí zkušenost s přítomností sinice druhu *M. aeruginosa* nehrála v této studii roli. Dávkovaný sinicový květ se zvyšující se koncentrací snižoval velikost snůšek a zvyšoval mortalitu jedinců druhu *D. magna*. Lze tedy konstatovat, že sinicový květ může mít negativní účinek na zooplankton již v přírodě se vyskytujících koncentracích.

Klíčová slova: koagulace, ekotoxikologický indikátor druhu *Daphnia magna*, microcystiny, *Microcystis aeruginosa*

Abstract

The aim of this *diploma* thesis is to explore the coagulation phase in water treatment process from two perspectives, the removal of cyanotoxin microcystin and the responses of ecotoxicological indicator species *Daphnia magna* to different concentration of this toxin, contained in a sample of cyanobacterial water bloom, which was extracted from a dam and was dominated by cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. The sample was administered in three environmentally relevant concentrations to 6 clones of *Daphnia magna*, 3 of which had previous experience with *M. aeruginosa*. Coagulation process was performed under optimal conditions: pH = 6.36; $\text{KNK}_{4,5} = 0.26 \text{ mmol.l}^{-1}$; Fe = 0.162 mg.l^{-1} ; DOC = 2.83 mg.l^{-1} using 10 ml of 0.125M NaHCO_3 in two litres of ultrapure water. Individual forms of microcystin were detected in this ratio: 31.6 % MC-LR, 53.6 % MC-RR and 14.8 % MC-YR. The study has shown that under these conditions coagulation does not remove microcystin, e.g. the efficiency of the process is zero. In ecotoxicological study, with growing concentration of cyanobacterial mixture the negative impact on *Daphnia magna* increased. We have found interclonal variability in responses of *D. magna*, however, the previous experience with *M. aeruginosa* had no effect. With growing concentration of cyanobacterial water bloom, the clutches of *D. magna* were smaller and the mortality higher. It was demonstrated that cyanobacterial water flower can have a negative impact on zooplankton even in environmentally relevant concentrations.

Keywords: coagulation, ecotoxicological indicator *Daphnia magna*, microcystins, *Microcystis aeruginosa*

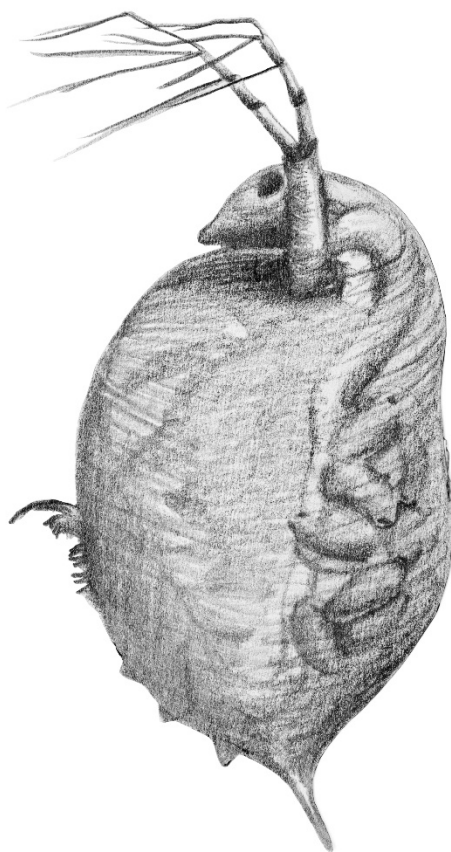
1. Úvod

V posledních desetiletích dochází stále častěji k masovým rozvojem sinic v mnoha vnitrozemských vodních nádržích, pomalu tekoucích vodách a mělkých příbřežních mořích (Babica a kol. 2005, von Gremberghe a kol. 2009), a to především ke konci léta (Bláhová a kol. 2007). Sinicovým květem bývá postiženo přes 80 % evropských vodních nádrží (Bláha a kol. 2010). Tento proces je výsledkem antropogenní eutrofizace vod, a to nedokonalého čištění odpadních vod a zvýšení odtoku ze zemědělské produkce, urbanizace, rekreace, přehrazení řek atd. (Babica a kol. 2005, Dixon a kol. 2011, Mankiewicz a kol. 2005, Zalewski 2000). Sinice (Cyanobacteria) produkují různé typy toxinů, tzv. cyanotoxiny (Wiegand a Pflugmacher 2005, Ferrão-Filho a kol. 2009), mezi které patří mnoho rozličných látek, jež lze rozdělit například na neurotoxiny, dermatotoxiny, hepatotoxiny a dráždivé lipopolysacharidy (Sivonen a Jones 1999, Mankiewicz a kol. 2003, Mankiewicz a kol. 2005).

Cyanotoxiny mohou mít akutní a chronické toxické účinky na ostatní organismy, které se s nimi dostanou do kontaktu, a mohou tedy ohrozit i zdraví člověka. Přitáhly si tak pozornost vědců po celém světě (Magalhães a kol. 2003, Orr a kol. 2003, Jang a kol. 2008, Gérard a kol. 2009, van Gremberghe a kol. 2009, Rodríguez a Wiegand 2010). Nejvíce vystavované cyanotoxinům jsou organismy vodní, a tak lze předpokládat, že právě u nich mohlo dojít k vývoji nějakých adaptací, které by zmírnily negativní vliv sinicového květu (Hairston a kol. 1999). Tato práce se zaměřila mimo jiné na existenci těchto adaptací u perlooček. Konkrétně byly provedeny testy na perloočce druhu *Daphnia magna*, která je jedním z nejvyužívanějších druhů v ekotoxikologických studiích (Liping a kol. 2011, Bláha a kol. 2010, Wiegand a Pflugmacher 2005, Zhang a kol. 2009) a která se ve vodních nádržích se sinicemi může vyskytovat. Studováno bylo šest klonů téhož druhu, přičemž tři z nich již měly předchozí zkušenost s danou sinicí a tři klony nikoliv. Následné vyhodnocování výsledků bylo soustředěno na rozdíly v odpovědích jednotlivých klonů a odhalení potenciálního vlivu jejich předchozích zkušeností se sinicí druhu *Microcystis aeruginosa*, jež se stává dominantním druhem sinicového květu v České republice a střední Evropě (Bláha a Maršálek 2003).

K masivnímu rozvoji sinicového květu dochází i na vodních dílech, odkud se upravuje voda na pitnou (Babica a kol. 2005, van Gremberghe a kol. 2009). Je stále zřetelnější, že téměř každá část světa závislá na pitné vodě získávané z povrchových vod má nebo bude mít problém s toxickými sinicemi v rámci svého systému úpravy pitné vody. Proto je třeba studovat eliminaci sinic a jejich toxinů ze surové vody (Hoeger a kol. 2004, Hoeger a kol. 2005). Základními složkami úpravy vody jsou koagulace, filtrace a hygienické zabezpečení. Nicméně

výběr specifických koagulačních procesů byl tradičně založen na zákalu surové vody a obvykle nebýval optimalizován pro odstraňování látek, jakými jsou microcystiny, tj. cyanotoxiny produkované sinicí druhu *M. aeruginosa*, které mají mnoho forem a nesnadno se odstraňují běžnými procesy úpravy vody (Bláha a Maršálek 2003). To může v konečném důsledku vést k malé účinnosti odstraňování microcystinů a kupříkladu následné tvorbě škodlivých vedlejších produktů dezinfekce vod (Widrig a kol. 1996). Z tohoto důvodu je třeba lépe porozumět procesu koagulace. Proto se studie této diplomové práce zaměřuje mimo jiné i na účinnost odstraňování nejběžnějších forem microcystinů koagulací, procesem běžně využívaným při úpravě vody na pitnou.



2. Literární rešerše

2.1 Microcystiny a jejich vliv na člověka

V České republice a střední Evropě bývá dominantním druhem sinicového květu především druh *Microcystis aeruginosa* (Bláha a kol. 2010), který je významný produkcí toxinů, mimo jiné microcystinů (Shen a kol. 2003, Vieira a kol. 2005, Mohamed 2008). Během celého svého životního cyklu (Dixon a kol. 2011) může produkovat sinice druhu *M. aeruginosa* několik různých toxinů (Lürling 2003); jejich spektrum i obsah v biomase se může výrazně měnit během jedné vegetační sezony (Sivonen and Jones 1999, van Gremberghe a kol. 2009, Lürling 2003). Přitom však množství toxinu koreluje s množstvím biomasy (Carmichael 2001). K nejvyšší produkci toxinů tedy dochází v době, kdy je sinicová biomasa nejvyšší (Pivokonský a kol. 2011).

Microcystiny (MC) představují sekundární metabolity sinic, hepatotoxické cyklické heptapeptidy (Sivonen and Jones 1999, Lürling 2003, Ortiz-Rodríguez a Wiegand 2010, Bláha a kol. 2010, Campinas a Rosa 2010) toxické pro nejružnější organismy. Je známo přes 110 strukturních variant microcystinů (Dietrich a Hoeger 2005, Meriluoto a Codd 2005, Puddick 2013), přičemž zřejmě nejběžnějšími microcystiny jsou microcystiny-LR, -YR a -RR (Lawton a Edwards 2001). Jejich hlavním strukturním rozlišením je druh navázané aminokyseliny: MC-LR obsahuje L-aminokyselinu leucin (L) a arginin (R), MC-YR obsahuje leucin a tyrosin (Y), MC-RR obsahuje dva argininy (Mankiewicz a kol. 2005). Jedná se spíše o malé molekuly s nízkou molekulární hmotností pohybující se v rozpětí 800-1000 Da (Hitzfeld a kol. 2000). Většina microcystinů je poměrně hydrofilní, ve vodě dobře rozpustná a netěkavá (Watanabe a kol. 1995, Tsuji a kol. 1995). Nejfrekventovaněji sledovaný je MC-LR (Ortiz-Rodríguez a Wiegand 2010, Hitzfeld a kol. 2000).

Hlavní mechanismus účinku microcystinů na živočichy spočívá v inhibici aktivity enzymů protein fosfatázy 1 a 2A, které uvnitř buněk všech organismů plní důležitou úlohu v regulačních procesech a při přenosu signálů (MacKintosh a kol. 1990). Bylo také zjištěno, že se microcystiny váží na beta-podjednotky ATP syntázy, a ovlivňují tak i energetické pochody v buňkách (Mikhailov a kol. 2003), dalším účinkem je vyvolání oxidativního stresu (Wiegand a Pflugmacher 2005). U obratlovců působí microcystiny především na játra (hepatotoxicita) (Jochimsen a kol. 1998), dále na ledviny, plíce a střeva (Chorus a Bartram 1999). Navíc jsou považovány za látky podporující nádorové bujení (tzv. promotory karcinogeneze) (Fitzgerald 2001) a existují důkazy o jejich genotoxicitě (Zegura a kol. 2004, Zhan a kol. 2004).

Lidé mohou přijít do styku s toxiny ze sinic požitím či přímým kontaktem s tělním povrchem. Expozice je proto možná například při rekreačních aktivitách, požitím kontaminovaných zemědělských produktů (Abe a kol. 1996, Codd a kol. 1999, McElhiney a kol. 2001) či kontaminovaných koryšů a ryb a dalších potravin (Gilroy a kol. 2000, Palíková a kol. 2007). Již v případě rekreace se v rámci kumulace toxinů může jednat o zdravotní rizika (WHO 2003), kdy při kontaktu s nimi či jejich konzumaci mohou způsobovat podráždění kůže, alergické odpovědi, puchýřky či průjem (Ressom a kol. 1994, Codd 2000, Mankiewicz a kol. 2005).

Kromě toxicity je další problematickou vlastností microcystinů jejich poměrně vysoká stabilita a odolnost vůči rozkladu (Watanabe a kol. 1995, Tsuji a kol. 1995), jež výrazně komplikuje jejich eliminaci v procesu úpravy pitné vody (Bartram a Chorus 1999). Důležitou roli při jejich rozkladu hrají mikrobiální, fotolytické a hydrolytické procesy (Tsuji a kol. 1995).

V reakci na rostoucí obavy z akutních a chronických účinků působením microcystinů stanovila Světová zdravotnická organizace v roce 1998 orientační hodnoty maximálního množství microcystinu-LR v pitné vodě na $1,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Hitzfeld a kol. 2000, WHO 1998). Hodnota byla vypočítána pomocí TDI (*tolerable daily intake* – tolerovaný denní příjem) ($0,04 \text{ mg.kg}^{-1}$ tělesné hmotnosti), se standardním denním příjmem vody v litrech ($L = 2 \text{ l}$) jedince dané tělesné hmotnosti ($BW = 60 \text{ kg}$) a s podílem ($P = 0,8$) z celkové denní dávky příjmu pitné vody vztahem: $\text{TDI} \times BW \times P / L$. Výsledná hodnota $0,96 \mu\text{g.l}^{-1}$ byla zaokrouhlena na $1,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ a měla by být používána pro microcystin-LR extracelulární a vázaný v buňkách (WHO 1998). Vzhledem k tomu, že směrnice hodnota ve skutečnosti platí pouze pro microcystin-LR, v situacích, kdy se nejedná o převládající formu microcystinu, nebo dokonce tato forma není vůbec přítomna, může být vyhodnocení kvantitativních měření s ohledem na maximální koncentraci dle normy problematické (Hitzfeld a kol. 2000).

2.2 Microcystiny a zooplankton

Sinice slouží jako potrava zooplanktonu, který je však sám predován zástupci vyšších trofických stupňů (např. rybami), a významně se proto podílí na transportu látek a toku energie ve vodních ekosystémech (Liping a kol. 2011, Shams a kol. 2014) - přitom však může být zooplankton pro své predátory i zdrojem nakumulovaného microcystinu (Rohrlack a kol. 2005, Ferrão-Filho a kol. 2002). I sinice druhu *Microcystis aeruginosa* obecně vzato slouží jako potrava filtrujícím konzumentům, například některým druhům zooplanktonu. Avšak tato sinice může snižovat predáční tlak několika způsoby. Za prvé, prostřednictvím tvorby kolonií v přítomnosti zooplanktonu (van Gremberghe a kol. 2009), díky čemuž mohou sinice znesnadnit

své požití, a interferovat tak se schopností filtrace zooplanktonu (Kurmayer a kol. 2001, Wilson a kol. 2005).

Za druhé, sinice bývají z nutričního hlediska zpravidla nevýhodnou potravou. Mají nízký obsah nenasycených mastných kyselin a sterolů (Brett a Muller-Navarra 1997, von Elert a kol. 2003, Martin-Creuzburg a kol. 2008) a jejich membrány a slizové vrstvy jsou obtížně stravitelné (Kurmayer a Jüttner 1999), což je činí nutričně chudými ve srovnání např. se zelenými řasami.

Za třetí, rod *Microcystis* produkuje širokou škálu sekundárních metabolitů, mimo microcystinu (Chen a kol. 2005, Nizan a kol. 1986, Jang a kol. 2008, Lürling a Beekman 2006), například anatoxin-a, cylindrospermopsin inhibitory proteázy (Schwarzenberger a kol. 2010), microviridin J či microcin SF608 (Kaebernick a kol. 2001, Rohlack a kol. 2003), mastné kyseliny jako např. gama-linolenové kyseliny (Reinikainen a kol. 2001).

Dokonce je doloženo, že jsou tyto sinice v přítomnosti dospělců (více než mlád'at) schopny produkovat větší množství microcystinů (Jang a kol. 2008, DeMott 2003). Svou roli v této křehké rovnováze kromě filtrátorů hraje vliv bakteriálního rozkladu a přítomnost parazitů sinic (Shams a kol. 2014). Může také dojít k náhlé degradaci sinicových buněk vlivem vodních mikroorganismů (Chorus 2001, Lemes a kol. 2008, Maruyama a kol. 2006, Okano a kol. 2009), načež při tomto rozpadu buněk vzrůstá koncentrace extracelulárních microcystinů ve vodě (Sivonen a Jones 1999).

Efektivní filtrátoři, jako jsou např. perloočky rodu *Daphnia*, jsou považovány za jeden z klíčových druhů potravního řetězce ve sladkovodních ekosystémech. Dokonce mohou za vhodné kombinace počátečních podmínek a předchozích zkušeností kontrolovat vývoj sinicového květu rodu *Microcystis* (Christoffersen a kol. 1993, Dejenie a kol. 2009, Peretyatko a kol. 2012). Populace toxické sinice *Microcystis* ale podle některých studií nemusí být ovlivňovány spásáním zooplanktonem, naopak může tato sinice potlačovat růst populací filtrátorů, což může mít za následek pokles biomasy zooplanktonu a změnu jeho struktury s ohledem na výskyt menších druhů apod. (Ghadouani a kol. 2003, Czarnecki a kol. 2006). V souladu s těmito poznatky existuje několik případů, kdy kupříkladu biomanipulace aplikovaná při výskytu sinic selhala (Gulati a kol. 2008, Jeppesen a kol. 2007).

Předpokládá se, že perloočka rodu *Daphnia* svou kořist neselektuje, tudíž nerozlišuje mezi toxickými a netoxickými částicemi. Variabilita odpovědí perlooček na množství potravních zdrojů, teplotu, toxické příměsi ve studiích a inhibice mechanismu krmení

se v experimentech projevuje v odlišné rychlosti růstu populací, velikostí populace, individuálním růstem, celkovou plodností a schopností pohybu (Jang a kol. 2008, Sarnelle a kol. 2010, Ortiz-Rodríguez a Wiegand 2010, Lürling a Beekman 2006). Několik studií ukázalo silný vliv sinice druhu *Microcystis aeruginosa* na rostoucí mortalitu, vyšší selektivitu a inhibici schopnosti příjmu potravy, snižující se růst, opožděné dospívání a sníženou produkci potomstva u těchto perlooček (DeMott a kol. 1991, Zhang a kol. 2009). Jiné studie naopak dokládají, že jedinci či populace některých druhů rodu *Daphnia* jsou dokonce schopni adaptovat se na přítomnost toxiny produkujících sinic či na další nepříznivé vlivy, kupř. přítomnost kairomonů (Hairston a kol. 1999 a 2001, Gustafsson a Hansson 2004, Riessen 2011, Schwarzenberger a kol. 2010, Martins a kol. 2007).

Vyrovnění se s nepříznivými podmínkami geneticky podmíněnou adaptací není jedinou možností přizpůsobení. Pakliže budou potomci vystaveni stejným podmínkám životního prostředí jako jejich matky, mohou být lépe připraveni než mateřská generace. Tento jev předávání informací o životním prostředí z matek na potomky je známý jako maternální efekt (Mousseauová a Fox 1998). V některých případech může zvýšit produkci populace perlooček až o 40%, a může tak přispět ke stabilizaci materiálového a energetického transferu do vyšších trofických úrovní (Gustafsson a kol. 2005). *Daphnia* je rod, ve kterém jsou účinky maternálního efektu zkoumány, včetně dravcem indukovaných morfologických obranných přizpůsobení (Tollrian 1995) a střídání mezi asexuální a sexuální reprodukcí (LaMontagne a McCauley 2001).

Tato diplomová práce používá, stejně jako mnohé jiné ekotoxikologické studie, druh *Daphnia magna* (Liping a kol. 2011, Bláha a kol. 2010, Wiegand a Pflugmacher 2005, Zhang a kol. 2009, Villarroel a kol. 2003). Ve většině ekotoxikologických studií s tímto druhem však nebývá brán zřetel na rozlišení využívaného klonu samotného (například Jang a kol. 2008, van Gremberghe a kol. 2009, Hitzfeld a kol. 2000), natož na jeho historii (Lemaire a kol. 2012, Dao a kol. 2010, Zhang a kol. 2009, Kim a kol. 2003, Smutná a kol. 2014).

Na tuto problematiku byla tedy zaměřena pozornost v mé práci v rámci reakcí šesti klonů druhu *Daphnia magna* na přítomnost sinicového květu druhu *Microcystis aeruginosa* a dalších látek vyskytujících se v přírodním prostředí. Historii testovaného klonu tato studie uvažuje tím, že používá tři klony, které se již dříve s druhem *Microcystis aeruginosa* setkaly a tři, které tutu zkušenost nemají. Dosavadní ekotoxikologické studie navíc trpěly úzkým zaměřením na izolované microcystiny, zatímco role ostatních toxických látek přítomných ve vodním květu sinic nebyly komplexně prozkoumány do stejné hloubky (Koski a kol. 1999,

Palikova a kol. 2007, Yang a kol. 2011, 2012). I tento problém se tato studie snaží řešit, a to použitím směsi získané přímo z přírodní lokality.

2.3 Úprava vody a odstraňování microcystinů

Mezi významné problémy úpravy povrchové vody se v současnosti řadí problematika odstraňování organických látek přírodního původu (NOM – *natural organic matter*) (Takaara a kol. 2007). NOM jsou komplexní směsi sloučenin, vzniklou zejména rozkladem živočišného a rostlinného materiálu (Newcombe a Drikas 1997). V rámci úpravy pitné vody odkazují na soubor organických sloučenin přítomných v přírodních vodách (Widrig a kol. 1996), mezi které patří i microcystiny.

NOM mají významný vliv na mnoho aspektů úpravy vody z přírodních zdrojů (např. na oxidaci, koagulaci, filtraci) včetně potenciálu pro vytváření škodlivých vedlejších produktů dezinfekce vody a mohou podporovat růst bakterií v distribučních soustavách (Widrig a kol. 1996). Povaha, distribuce a reaktivita organických látek ve vodních zdrojích jsou determinovány různými biogeochemickými jevy vyskytujícími se v přirozeném systému řek a jejich povodí, a to povahou a silou interakce mezi výchozími organickými látkami, biologickými cykly, chemií půdy a hydrologií (Goel a kol. 1995). Obecně platí, že složení NOM je ve velkých nebo vysoce produktivních jezerech a nádržích ovlivňováno především řasami, zatímco většina NOM v malých jezerech a nádržích s nízkou produktivitou pochází spíše z externích zdrojů (Widrig a kol. 1996).

Obzvláště obtížně odstranitelné látky v rámci NOM jsou látky produkované při masovém rozvoji fytoplanktonu (tzv. *algal organic matter*, AOM) (Takaara a kol. 2007). AOM lze obecně rozdělit na látky, které se uvolňují vlivem metabolické činnosti mikroorganismů (*extracellular organic matter*, EOM) a dále pak na látky uvolňované vlivem jejich masivního odumírání, tj. buněčnou lyzí (*cellular organic matter*, COM) (Pivokonský a kol. 2009). Jsou tvořeny převážně polysacharidy a některými proteiny (Pivokonský a kol. 2006, Takaara a kol. 2007). Při úpravě vody z technologického hlediska znamenají AOM řadu negativ jako jsou kupř. zhoršené organoleptické vlastnosti (Dixon a kol. 2011), vznik vedlejších produktů dezinfekce vody, tedy trihalogenmetanů a halogenderivátů kyseliny octové, a v některých případech i toxicita (Takaara a kol. 2007, Goel a kol. 1995, Pivokonský a kol. 2011). I přesto jim doposud nebylo věnováno příliš mnoho pozornosti (Pivokonský a kol. 2011, Goel a kol. 1995).

Účinné odstranění AOM prostřednictvím koagulace závisí na mnoha proměnných. Koagulace, běžně aplikovaný základní proces úpravy vody, který byl historicky zapojen do praxe čištění odpadních vod za účelem snížení úrovně zákalu a organických látek přírodního původu (Takaara a kol. 2007), spočívá v přidání relativně vysoké dávky destabilizačního činidla, které vede k tvorbě vloček. Právě na tyto vločky jsou vázány nežádoucí látky, což umožňuje jejich odstranění z upravované vody následnou sedimentací a separací vloček (Jurczak a kol. 2005, Pivokonský a kol. 2009). Účinné odstranění AOM (včetně sinic a rozpuštěných toxinů) pomocí koagulačního procesu závisí na pH, reakčním čase, typu destabilizačního činidla a jeho dávkování a na množství AOM, které vstupují do procesu úpravy vody (Jurczak a kol. 2005, Pivokonský a kol. 2009). K destabilizaci při koagulaci jsou nejvíce využívány hlinité a železité soli, zvláště při výskytu DOM (*dissolved organic matter* – rozpuštěných organických látkách) ve vzorcích upravované vody (Rebhun a Lurie 1993).

Mirocystiny jsou biosyntetizovány uvnitř buněk sinic a pouze 2-10 % z celkového množství microcystinu je obsaženo vně buněk (Babica a kol. 2007, Pivokonský a kol. 2009). Toxiny (a jiné organické látky) mohou být uvolňované do vody přirozenou cestou v přírodě (přirozená lýze buněk či jejich poškození) či mechanickým a chemickým rozrušováním (indukované uvolňování toxinu). Důležitou částí úpravy vody je tudíž odseparování intaktních buněk sinic udržujících většinu metabolitů uvnitř buněk (Campinas a Rosa 2010). Zbývající rozpuštěné organické látky přirozeně vypouštěné do vod (cyanotoxiny a AOM) mohou být odstraňovány adsorbováním na aktivní uhlí (Dixon a kol. 2011).

Míra odstranění microcystinů závisí na použité technologii úpravy vody. Základní kroky úpravy jako koagulace či filtrace jsou schopny odstranit microcystiny pod detekovatelné hladiny ve vzorcích s koncentrací nižší než 2-3 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Hitzfeld a kol. 2000, Hoeger a kol. 2005, Bláhová a kol. 2007, Bláha a Maršálek 2003). Eliminace microcystinů přítomných ve vyšších koncentracích je dle několika studií úspěšná, je-li do úpravy vody zahrnuta ozonizace nebo filtrace přes aktivní uhlí (Lambert a kol. 1996, Hrudehy a kol. 1999). Je pravděpodobné, že v rámci odstraňování cyanotoxinů se však účinnost procesu úpravy pitné vody do určité míry liší různými zdroji vody a též různými druhy sinic (Jurczak a kol. 2005), nicméně obě účinné metody (ozonizace a filtrace přes aktivní uhlí) jsou stále poměrně vzácné v úpravě pitné vody v České republice (Bláha a Maršálek 2003). Cílem této práce je tedy i zjistit, na kolik je běžný proces úpravy vody – koagulace - schopen za ideálních podmínek odstranit nejběžnější formy microcystinu pocházející z u nás běžně se vyskytující sinice druhu *M. aeruginosa*.

3. Cíle práce

Dvěma hlavními cíli předkládané diplomové práce je zjistit, jaké množství microcystinu zbývá v upravované vodě po procesu koagulace, a porovnat důsledky působení microcystiny obsahující sinicové směsi na jedince a klony druhu *Daphnia magna*.

Mezi dílčí otázky této práce patří:

- (1) S jakou účinností je při úpravě vody proces koagulace schopen vyvázat zkoumané formy microcystinu?
- (2) Bude se lišit chování druhu *Daphnia magna* v rámci různých koncentrací po vystavení působení sinicové směsi (akutní a chronická toxicita)?
- (3) Reagují jednotlivé klony téhož druhu odlišně?
- (4) Hraje roli předchozí zkušenost s přítomností sinice druhu *Microcystis aeruginosa* u jednotlivých klonů?

Studie byla koncipována tak, že šest klonů druhu *Daphnia magna* odebraných z přírodního prostředí a chovaných posléze v laboratorních podmínkách bylo testováno na vzorek směsi látek odebraný z přírodního prostředí ze sinicového květu ve vodní nádrži, ze které se upravuje voda na pitnou. Složení směsi bylo charakterizováno pomocí množství rozpuštěného organického uhlíku ($\text{DOC} = 2 \text{ g.l}^{-1}$), analyzovány byly i koncentrace některých konkrétních forem microcystinů. Směs byla dávkována tak, aby bylo dosaženo tří koncentrací, jež lze najít v přírodních lokalitách. Na rozdíl od mnoha předchozích studií, kde byl dávkován pouze izolovaný microcystin (např. Ortiz-Rodríguez a Wiegand 2010, Kim a kol. 2003, Hernández a kol. 2009), odpovídalo námi použité zastoupení jednotlivých složek směsi produkované sinicovým květem výskytu v přirozeném vodním prostředí.

Na základě cílů práce vznikly následující počáteční hypotézy:

- a) *Koagulací bude odstraněno minimálně 50 % sledovaných forem microcystinu.*

Při studiu procesu koagulace Pivokonským a kol. (2009) byla účinnost odstranění COM (organických látek nacházejících se uvnitř buněk) procesem koagulace za použití síranu železitého jakožto agregačního činidla rovna 46 %.

- b) *Přítomnost microcystinu se v závislosti na koncentraci projeví různě silně na úmrtnosti a reprodukčních a růstových charakteristikách jedinců a klonů druhu *Daphnia magna*.*

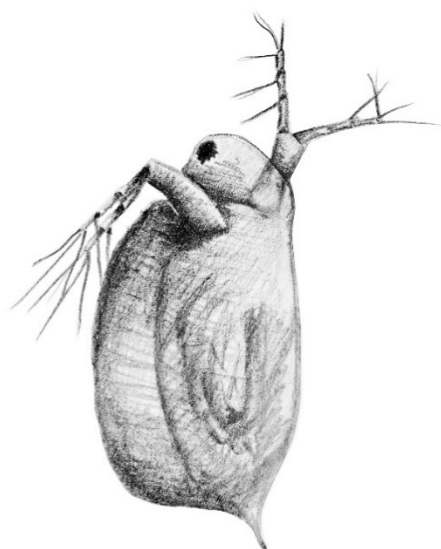
Ukazuje se, že přítomnost microcystinů ve většině případů inhibuje aktivitu, snižuje velikost snůšek, věk primipar, růstovou rychlost jedinců a zvyšuje úmrtnost druhu *D. magna* (Jang a kol. 2008, Sarnelle a kol. 2010, Ortiz-Rodríguez a Wiegand 2010, Lürling a Beekman 2006).

c) *Jednotlivé klony se budou v těchto reakcích lišit.*

Je možné, že jednotlivé klony se budou lišit ve svých reakcích na různé koncentrace sinicové směsi v rámci přizpůsobení se toxických podmínkám prostřednictvím genetické adaptace či epigenetického maternálního efektu (Nizan a kol. 1986, Czarnecki a kol. 2006, Gustafsson a kol. 2005, Sarnelle a Wilson 2005, Wilson a kol. 2006, Smutná a kol. 2014). Což se dotýká problematiky porovnávání ekotoxikologických studií, které jsou prováděny bez přihlídnutí ke konkrétnímu klonu v dané studii využitému.

d) *V rozdílech mezi klony bude hrát roli předchozí zkušenost s přítomností sinice druhu *Microcystis aeruginosa*.*

Adaptace na přítomnost sinice na základě předchozí zkušenosti by se mohla projevit kupříkladu sníženou úmrtností, větší velikostí snůšek, nižším věkem primipar v porovnání s klony bez zmiňované předchozí zkušenosti (Gustafsson a Hansson 2004, Sarnelle a Wilson 2005, Wilson a kol. 2006, Sarnelle a kol. 2010, Hairston a kol. 1999 a 2001, Gustafsson a kol. 2005).



4. Metodika

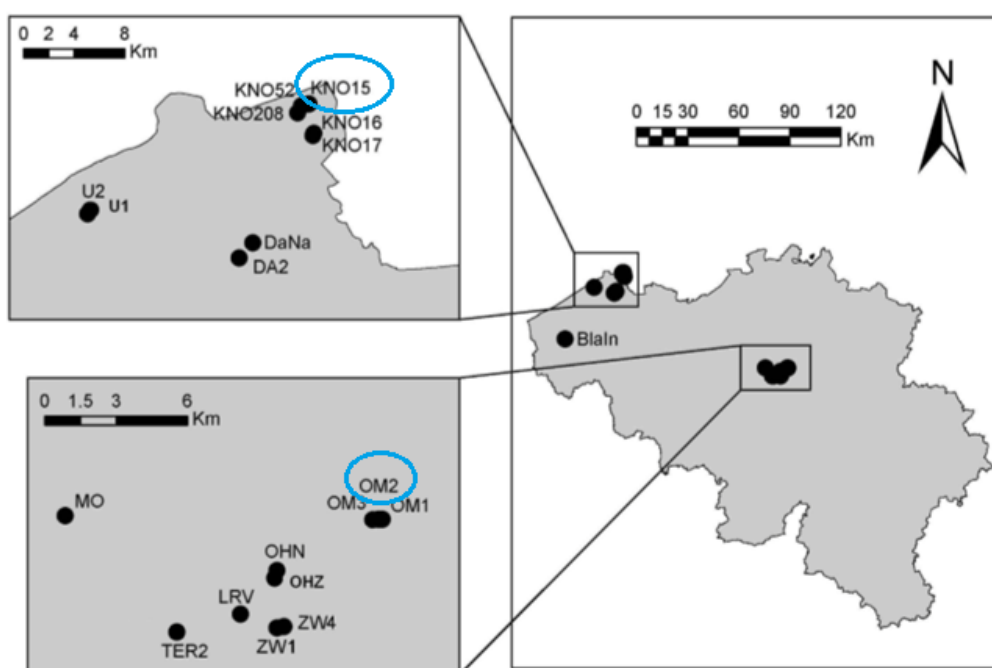
4.1 Materiál a příprava experimentu

4.1.1 Pokusné klony perlooček a jejich kultivace

Do pokusu bylo odchováno 6 klonů perlooček druhu *Daphnia magna* zaslaných službou FedEx (přpravovány 1 den) v plastových 50ml ampulích (po zhruba 25 jedincích od každého klonu) s chladicí lahví z belgické univerzity KU Leuven z laboratoře Laboratory of Aquatic Ecology, Evolution and Conservation spolupracující PhD studentkou Veerle Lemaire.

Klony byly náhodně označeny H₁ až H₆. U všech šesti klonů je známo, zda se setkaly či nesetkaly během svého vývoje se sinicí druhu *Microcystis aeruginosa*. Tyto informace však během experimentů nebyly známy. Tři klony již tu zkušenost měly, tři klony nikoliv (obdobně jako ve studii Sarnelle a kol. 2010).

Klony H₁, H₃ a H₆ byly v roce 2007 odebrány PhD studentkou Sarah Rousseaux z téže belgické univerzity na lokalitě OM2 – Oude Mere 2 (Abdij van Park, Leuven, Belgie 50°51'47,82''N; 04°43'05,16''E) (viz obr. 1) a klony H₂, H₄ a H₅ byly odebrány na lokalitě KNO15 – Knokke 15 (Belgie 51°20'05,62''N; 03°20'53,63''E) (též viz obr. 1). Charakteristiky obou vodních děl jsou shrnuty v tabulce 1. Klony H₁, H₃ a H₆ již měly předchozí zkušenost s přítomností sinice druhu *M. aeruginosa*, zbylé klony H₂, H₄ a H₅ nikoliv.



Obrázek 1 : Lokality odběru klonů – klony H₁, H₃ a H₆ odpovídají odběru OM2, klony H₂, H₄ a H₅ odpovídají odběru KNO15, ostatní lokality se nepojí k této práci (převzato z práce Rousseaux 2011).

Tabulka 1: Charakteristika lokalit, z nichž byly odebrány testované klony.

Lokalita	Poloha	Plocha [m ²]	Množství O ₂ [mg.l ⁻¹]	pH	Konduktivita [μS.cm ⁻¹]	Chlorofyl a [μg.l ⁻¹]
OM2	vnitrozemí	32 000	11	9,24	82	43,5
KNO15	pobřeží	350	10,4	9,32	461	2,52

Klony byly odchovávány ve skleněných třílitrových lahvích podobně jako ve studii Kima a kol. (2003) v dechlorované vodě o teplotě 17 °C (Sarnelle a kol. 2010), které bylo docíleno dlouhodobým provzdušňováním ve velkoobjemových plastových kanystrech s odstraňováním vysrážených oxidů. Odchov probíhal při světelném cyklu 16 h světlo / 8 h tma (Jang a kol. 2008, Lürling a Beekman 2006, Gustafsson a kol. 2005, Hulot a kol. 2012, Kim a kol. 2003, Lemaire a kol. 2012, Smutná a kol. 2014). Postupně byly nové generace přemísťovány do nových paralelních lahví. Perloočky byly krmeny řasou druhu *Scenedesmus obliquus* (Gustafsson a kol. 2005, Hulot a kol. 2012, Lemaire a kol. 2012) každý druhý den (Lürling a Beekman 2006).

4.1.2 Kultivace řasy druhu *Scenedesmus obliquus*

Řasa druhu *Scenedesmus obliquus* byla kultivována v separované místnosti s umělým osvětlením nastaveným na světelný cyklus 12 h světlo / 12 h tma (Sarnelle a kol. 2010, Gustafsson a kol. 2005, Kim a kol. 2003) při teplotě 20 °C (Lürling a Beekman 2006, Gustafsson a kol. 2005, Hulot a kol. 2012) v autoklávem sterilizovaných dělicích baňkách o objemu 2 l. Koncentrace buněk byla udržována na přibližně stejné hustotě s kontrolami pomocí fluorimetru průběžným doléváním živného roztoku. Jako živný roztok bylo použito základní médium pro kultivaci terestrických řas a sinic BBM (Bold-Basal/Bristol Medium) (Bischoff 1963) viz Příloha I. Roztok byl dále v 250ml uzavíratelných skleněných lahvích sterilizován v autoklávu (Kim a kol. 2003). Sterilizovaný živný roztok byl odstaven k vychladnutí na 40 – 20 °C a následně uskladněn v lednici při 4 °C.

4.1.3 Příprava dávkované sinicové směsi

V létě roku 2011, před zahájením mé diplomové práce, byly odebrány ze Zámeckého rybníku v Dobříši vzorky sinicového květu druhu *Microcystis aeruginosa*. Odběr byl prováděn pomocí planktonní sítě o velikosti ok 0,01 mm. Takto získané buňky byly dále odděleny od případných hrubých nečistot promytím v destilované vodě (pH stabilizováno na hodnotě 7 pomocí 0,125M NaHCO₃) a následným cezením přes nerezové síto o velikosti ok 0,1 mm. Buňky byly separovány z vody filtrací přes membránový filtr s velikostí pórů 0,22 μm, načež

byly smíchány s demineralizovanou vodou a následně destruovány ultrazvukem (UP400S, Hielscher Ultrasonics, SRN) v ledové lázni po dobu 5 minut při frekvenci 20 kHz a výkonu 240 W. COM byly dále odděleny od zbytků buněčné hmoty pomocí membránového filtru 0,22 μm (Millipore, USA). V dalším kroku bylo provedeno zahuštění COM při 20 °C na rotační vakuové odparce (Laborota 4000 HB/G1, SRN). Takto získané vzorky COM s koncentrací organického uhlíku (DOC – *dissolved organic carbon*) 2 g.l^{-1} byly následně zamrazeny a uchovávány při teplotě -18 °C.

4.2 Struktura experimentu

4.2.1 Fáze experimentu

V první fázi studie byla jedincům druhu *D. magna* spolu s krmnou řasou dávkována microcystiny obsahující sinicová směs získaná z přírodního prostředí ve třech různých koncentracích, které se mohou v přírodě vyskytovat. Ve druhé fázi studie prošla tatáž sinicová směs koagulačním procesem, který je běžně v ČR při úpravě vody používán, přičemž následné testování jedinců druhu *D. magna* probíhalo stejným způsobem.

4.2.2 Výběr pokusných organismů a manipulace s nimi

Do pokusu byly jedinci vybíráni pipetou z třilitrových lahví. Obsah třilitrové lahve byl mícháním rozptýlen do celého sloupce a přibližně ze středu byli pipetou separováni jedinci podobného juvenilního stadia (stáří 2-3 dnů) do jednotlivých označených kádinek (Jang a kol. 2008). Při přemísťování a sledování jedinců každý druhý den byly z kádinky případně nejdříve odpipetovány a spočítány nad bílou podložkou novorození jedinci nasátím jedince do pipety, po okamžitém přemístění nad odkládací kádinku byla znovu zkontrolována přítomnost jedince v pipetě a terminální kontrola přítomnosti jedince byla provedena po opatrném vpuštění jedince do vody v kádince. Jako poslední byl přemísťován mateřský jedinec do nově připravené pokusné kádinky. Pipeta byla mezi odběry z jednotlivých kádinek promývána provzdušněnou vodou. V případě terminální fáze pokusu, kdy byli již odebráni novorození jedinci, nikoliv mateřský jedinec, tito byli pipetou vybíráni náhodně předem, aby se zamezilo specifikaci výběru, kterou s sebou může přinést kupříkladu poslední zbylý jedinec.

4.2.3 Odběr a dávkování krmné řasy

Kultura kultivované řasy byla před zahájením pokusné fáze odborně zkontrolována RNDr. Lindou Nedbalovou, Ph.D., stáčená byla z dělicí baňky do autoklávem sterilizované Erlenmeyerovy baňky potažené alobalem, aby měření fluorescence bylo konzistentní. Suspenze řas bylo odebráno nadměrné množství, aby bylo zamezeno případnému nedostatku v závěru

dávkování této směsi v pokusu. Koncentrace chlorofylu v roztoku byla šestkrát přeměřena fluorimetrem, hodnoty zaznamenány a zprůměrovány a z nich přepočtena hustota buněk v živném roztoku. Dle potřeby byl roztok naředěn dechlorovanou provzdušněnou vodou, aby mohl být pipetován ve 2ml standardizovaných dávkách do každé kádinky s pokusným organismem, přičemž byl obsah baňky při dávkování pravidelně promícháván. K paralelám při jedné koncentraci byla přiřazena jedna pipeta, která byla mezi paralelami proplachována destilovanou vodou.

4.2.4 Dávkování sinicové směsi

Zamražená plastová 100ml láhev s microcystinovou směsí byla přemístěna do vodní lázně (Memmert) a roztok v ní rozmražen při 30 °C. Do kádinek bylo pipetováno množství sinicové směsi dle odpovídající koncentrace, jak je uvedeno v tabulce 2. Obsah lahve byl při dávkování pravidelně promícháván.

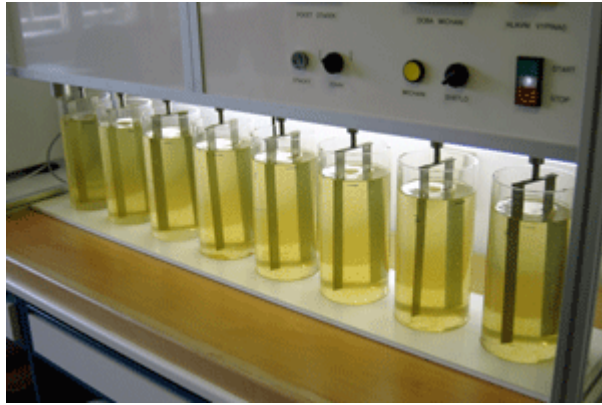
Tabulka 2: Přehled dávkovaných množství microcystiny obsahující sinicové směsi.

Koncentrace	C ₁	C ₂	C ₃	K
MC-směs [ml]	0,05	0,50	2,00	0,00

Dávkování probíhalo pomocí pipet (FinnPipette) přímo nad hladinou vody, aby se zamezilo případnému stékání směsi po stěně kádinky, přičemž každá použitá lahev se zbytkem sinicové směsi byla označena datem a znovu zamrazena.

4.2.5 Sklenicová zkouška (jar test)

Sklenicová optimalizační zkouška je proces optimalizace podmínek destabilizace a agregace. Umožňuje jednoduchým způsobem modelovat úpravu vody za použití odstupňovaných dávek destabilizačního činidla. Optimální dávka destabilizačního činidla je taková, při které je dosaženo maximálního snížení obsahu sledovaného parametru (Al/Fe, DOC, zákal, atd.). Jedná se o dávku, při které dochází k potlačení energetické bariéry a k účinné destabilizaci znečišťujících příměsí (Pivokonský a kol. 2011). Sklenicová zkouška byla uskutečněna v osmimístné míchací koloně ve dvoulitrových reakčních nádobách v laboratoři Ústavu pro hydrodynamiku AV ČR, v. v. i. (viz obrázek 2).



Obrázek 2: Sklenicová optimalizační zkouška probíhající v osmimístné míchací koloně v laboratoři Ústavu pro hydrodynamiku AV ČR, v. v. i. (foto: Bubáková Petra).

Roztoky činidel jsem čerstvě připravila před začátkem testů. Připravila a navázila jsem 2,625 g 0,125M NaHCO₃ do 250ml odměrné baňky, dolila destilovanou vodou a protřepala. Odměřila jsem 7,7 ml Fe₂(SO₄)₃ do 500ml baňky v digestoři a dolila destilovanou vodou. Vytvořila jsem vzorek „surová voda“ nadávkováním 2,5 ml sinicové směsi (2 g DOC v 1 litru vzorku) do litrové odměrné baňky a dolila destilovanou vodou. Do očíslovaných reakčních nádob jsem nalila destilovanou vodu 2 cm pod okraj 2l rysky, načež jsem nádoby umístila na své pozice v míchací koloně a v případě provedení sklenicové zkoušky za účelem zjištění optimální dávky sody pro tvorbu vloček jsem do reakčních nádob nadávkovala po 0,5 ml odstupňovaná množství NaHCO₃ od 4,5 ml do 11,0 ml.

Při provádění koagulaci v II. fázi experimentu jsem již po vyhodnocení optimalizačních sklenicových zkoušek používala stabilní dávku sody 10,5 ml (viz tabulka 3 ve Výsledcích) na dvoulitrovou reakční nádobu.

Do reakčních nádob jsem pipetou nadávkovala 5 ml sinicové směsi a doplnila destilovanou vodou po rysku. Na závěr jsem do všech nádob napipetovala 6 ml destabilizačního činidla Fe₂(SO₄)₃. Dávkování jsem prováděla v co nejkratším časovém úseku, aby časová prodleva mezi nadávkováním do první a poslední reakční nádoby byla zkrácena na minimum. První minutu bylo provedeno míchání s gradientem $G = 400 \text{ s}^{-1}$, načež zbývajících 15 minut s gradientem $G = 100 \text{ s}^{-1}$. Po domíchání jsem z nádob odebrala 200ml vzorky pro odstředění a nádoby ponechala 60 minut v klidu za účelem sedimentace vzniklých vloček. Vzorky byly odstředovány ve 200ml kyvetách v laboratorní odstředivce s výkyvným rotorem, poloměrem otáčení 90 mm a nastavitelnými otáčkami po dobu 20 minut při 3000 otáčkách.

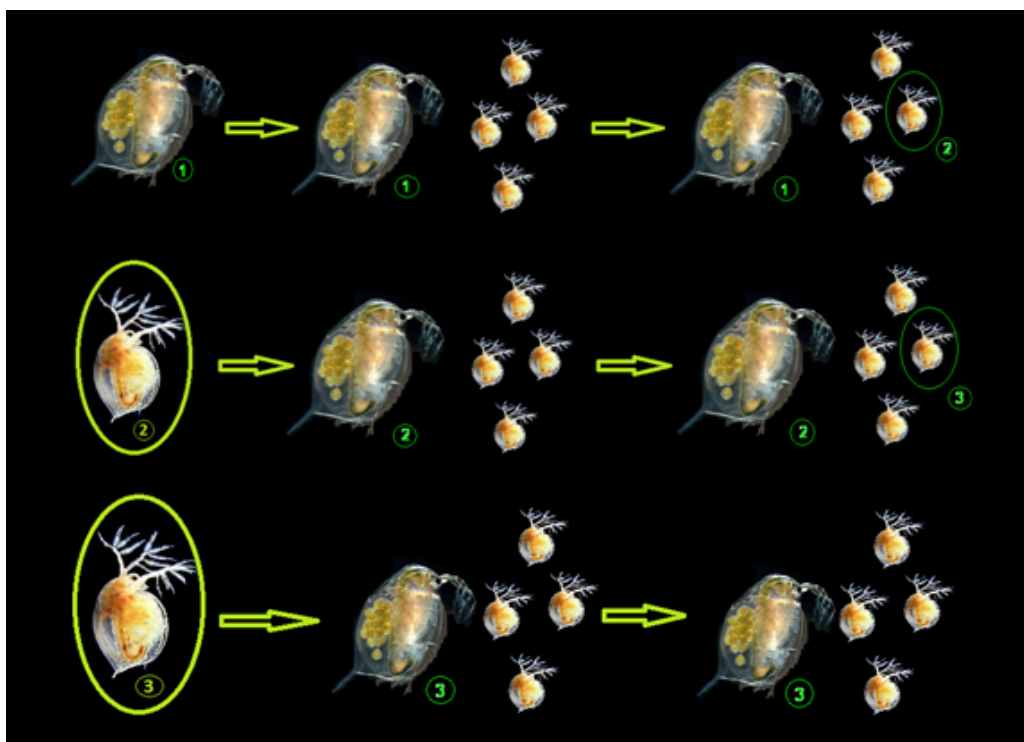
Po odstředění jsem z kyvet opatrně odpipetovala z 1/3 výšky od hladiny 5 ml vzorku do 25ml odměrných baněk tak, aby nebyl zviřen sediment u dna kyvety. Zbytek vzorku jsem

opatrně slila do 200ml kádinek pro určení pH a KNK a do flakonky pro změření TOC do TOC analyzátoru.

Do 25ml odměrných baněk se vzorky jsem nadávkovala 0,5 ml HCl a 0,5 ml H₂O₂ a reakční směs promíchala. Nejdříve za 5 minut, nejpozději za 24 hodin jsem vzorek doplnila destilovanou vodou na cca 15 až 20 ml, rozmíchala a poté do něj přidala 2,5 ml KSCN. Nejpozději do jedné minuty jsem vzorek doplnila vodou po rysku, rozmíchala a kolorimetricky stanovila obsah železa při vlnové délce 480 nm (detaily viz kapitola 3.4.1). Měření jsem prováděla v rozmezí do 5-60 minut od doplnění baněk. Množství detekovaného železa korespondovalo s množstvím reziduí nevysrážených Fe iontů, které se nepodílelo na tvorbě vloček, jež byly prostřednictvím sedimentace odstraňovány z roztoku.

4.3 Průběh ekotoxikologického experimentu

Obě fáze ekotoxikologického experimentu probíhaly dle schematu na obrázku 3.



Obrázek 3: Schéma průběhu ekotoxikologické studie v rámci zkoumaných generací: 1 - odebraný jedinec; 2 – mateřská generace v pokusu; 3 – dceřiná generace. Jedinci zakládající novou generaci byli odebráni z druhých snůšek.

Zkoumaní jedinci 1. generace vyvedli první snůšku (ta jim byla odebrána) a z jejich druhé snůšky byl namátkou vybrán jedinec, který byl zakladatelem druhé pokusné generace (mateřské). Ten opět vyvedl dvě snůšky, přičemž z druhé byl též odebrán jedinec – zakladatel zkoumané dceřinné 3. generace (Riessen 2011), na jejíž monitorování byl brán největší zřetel

z důvodu vyloučení případného maternálního efektu (Lüring 2003, Sarnelle a kol. 2010, Gustafsson a kol. 2005).

4.3.1 Struktura testování

Do experimentu bylo zahrnuto všech 6 klonů druhu *Daphnia magna* – partenogeneticky se množících samic. Klony H₁, H₃ a H₆ již měly předchozí zkušenost s přítomností sinice druhu *Microcystis aeruginosa*. Každý klon značený H₁ až H₆ byl testován na 3 koncentrace microcystinové směsi C₁ až C₃; zařazena byla i negativní kontrola (K), do které nebyla žádná směs přidávána. Vše bylo uskutečněno v 5 replikacích značených A až E (Riessen 2011). Kádinky klonu H₁ byly tedy v experimentu značeny H₁/C₁, H₁/C₂, H₁/C₃, H₁/K dle koncentrací a vše bylo provedeno v 5 paralelních kádinkách značených A až E, tudíž H₁/C₁-A, H₁/C₁-B, ... (viz schéma na obrázku 4). Do každé kádinky byl umístěn 1 jedinec. Shodně tomu bylo i u zbylých pěti klonů.



Obrázek 4: Schéma zahrnutí tří koncentrací (C₁ až C₃), kontroly (K) a pěti paralel (A až E) v rámci jednoho klonu (H₁).

4.3.2 I. Fáze experimentu

Pokus probíhal v temperované místnosti s teplotou nastavenou na 17 °C a světelným hodinovým cyklem 16 h světlo / 8 h tma (Jang a kol. 2008, Gustafsson a kol. 2005, Smutná a kol. 2014, Kim a kol. 2003, Lemaire a kol. 2012). Do každé kádinky byl s 200 ml provzdušněné dechlorované vody podobně jako ve studii Lemaire a kol. (2012) umístěn jeden jedinec druhu *Daphnia magna*. Všichni jedinci byli krmeni stejným množstvím suspenze řasy

druhu *Scenedesmus obliquus*, a to každý druhý den obdobně jako ve studiích Sarnelle a kol.(2010), Gustafssona a kol. (2005) či Shamse a kol. (2014), kdy probíhalo sledování, zápis změn a výměna vody s nadávkováním nové microcystiny obsahující sinicové směsi.

Vyskytly-li se nové novorozené perloočky (neonaty), byly při separaci spočítány a experiment probíhal s náhodně zvolenou neonatou druhé snůšky – neonaty z první snůšky bývají zpravidla menší (Lampert a Trubetskova 1996) a údajně mívají větší úmrtnost než jedinci z dalších snůšek (Gustafsson a kol. 2005). U dceřině (třetí) generace byly odseparované neonaty z obou snůšek fixovány v 500 μ l epruvetách v 4% formaldehydu. V závěru experimentu byl fixován i mateřský jedinec a jedinci, kteří v této terminální fázi studie uhynuli.

Sledovanými proměnnými byly:

- mortalita jedinců (tj. byl (1)/ nebyl (0) živ na konci cyklu),
- délka cyklu, tedy sledovaná doba uplynulá od separace narozeného jedince po vyvedení jeho 2. snůšky,
- doba do 1. snůšky, tzn. časový úsek od odseparování narozeného jedince od matky (počátek jeho zkoumání) po vyvedení jeho 1. snůšky neboli věk primipary,
- velikost 1. snůšky, tj. počet neonat v 1. snůšce,
- doba do 2. snůšky, tedy časový úsek mezi vyvedením první a druhé snůšky,
- velikost 2. snůšky, tzn. počet neonat narozených ve 2. snůšce.

4.3.3 II. Fáze experimentu

V druhé fázi experimentu při téže struktuře pokusu byl každý testovaný jedinec odchováván ve 200 ml směsi, která prošla procesem koagulace. Vzorek sinicové směsi byl dávkován v množství 2,5 ml do 1 l destilované vody (s koagulačními činidly). Tato směs prošla procesem koagulace, jež probíhala v osmimístné míchací koloně v laboratoři Ústavu pro hydrodynamiku AV ČR, v. v. i. pod vedením RNDr. Martina Pivokonského, Ph.D., Mgr. Jany Načeradské a Ing. Renáty Vašákové.

4.4. Zpracování vzorků z procesu koagulace

4.4.1 Analýza zbytkové koncentrace Fe, pH a KNK

Zbytkové koncentrace Fe po sklenicové zkoušce byly stanoveny spektrofotometricky po reakci s rhodanidem při 480 nm (Spekol 11, Carl Zeitz Jena, SRN). Zákal byl analyzován spektrofotometricky při 560 nm (Spekol 11, Carl Zeitz Jena, SRN). Hodnota pH byla měřena potenciometricky (pH metr SevenCompactTM pH/Ion, Mettler Toledo, Švýcarsko; elektroda

InLabR Expert Pro, Metler Toledo, Švýcarsko). Celková kyselinová neutralizační kapacita (KNK_{4,5}) byla stanovena titrací 0,1 M HCl pomocí indikátoru methylooranž (viz Příloha II). Veškeré chemikálie byly připraveny s demineralizovanou vodou. Měření byla prováděna opakovaně, nejméně však třikrát, chyba stanovení se vždy pohybovala do 5 %. Podrobné metodiky stanovení jednotlivých ukazatelů lze nalézt v literatuře (Horáková a kol. 2003).

4.4.2 Analýza DOC

Rozpuštěný organický uhlík (DOC – *dissolved organic carbon*) byl stanoven pomocí analyzátoru Shimadzu TOC-VCPH (Shimadzu Corporation, Japonsko). DOC byl spočítán jako rozdíl celkového (TC – *total carbon*) a anorganického uhlíku (IC – *inorganic carbon*) (Leenheer a Croue 2003). Jako kalibrační standardy byly použity hydrogenftalát draselný (TC standard), hydrogenuhličitan sodný (TC standard) a bezvodý uhličitan sodný (IC standard). Jakožto slepý vzorek byla použita demineralizovaná voda. Vzorky byly filtrovány přes 0,22 μ m membránový filtr (Millipore, USA). Všechna měření byla prováděna třikrát. Chyby měření byly vždy menší než 2 % (Horáková a kol. 2003).

4.4.3 Analýza microcystinů

Analýza microcystinů ve vzorcích byla odborně provedena ve vodohospodářské laboratoři Plzeň státního podniku Povodí Vltavy metodou standardních operačních postupů (viz Protokol o zkoušce v Příloze IV). Analyzovány byly tři konkrétní formy microcystinů, a to MC-LR, MC-RR a MC-YR. Analýza proběhla u dávkované microcystinové směsi před koagulací (I. fáze experimentu) a po koagulaci (II. fáze experimentu).

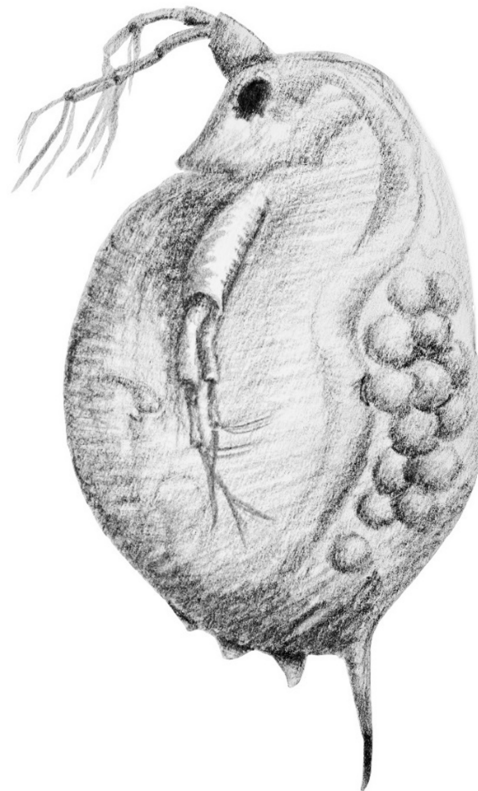
4.5 Statistické zpracování dat

Pozornost při zpracování dat byla zaměřena především na případné rozdíly mezi klony, generacemi, potažmo na odlišnosti související s předchozí zkušeností se sinicí druhu *M. aeruginosa* a dále pak na rozdíly v reakcích na různé koncentrace dávkované sinicové směsi, jež byly použity jako vysvětlující proměnné. Důraz byl pak zvláště kladen na 3. (dceřinnou) generaci, u které se předpokládalo vyloučení maternálního efektu.

Pro analýzu vlivu klonu, koncentrace sinic a generace a jejich vzájemných interakcí na délku cyklu, čas do první a druhé snůšky a velikosti daných snůšek byly použity zobecněné lineární modely (glm) s quasi-poissonovým rozdělením pravděpodobnosti (kvůli nadměrnému rozptylu, dle Crawley 2007). Ověření správnosti použití modelů bylo provedeno s použitím regresních reziduálových grafů. Komplexní model s interakcemi byl vždy postupně zjednodušován, tj. byly vyřazovány členy s nízkým příspěvkem k vysvětlené variabilitě

a srovnáván s komplexnějším modelem pomocí funkce ANOVA, s Chi-rozdělením pravděpodobnosti (Chi-test; dle metodiky Crawley 2007). Pro podrobnější pochopení efektů byly následně provedeny parciální analýzy variance pro signifikantní modely z předešlých analýz a rozdíly mezi hladinami faktorů (tj. koncentrace, generace, případně klon) byly ověřeny Tukeyho testem dobré shody pro zobecněné lineární modely, pomocí balíčku multcomp.

Mortalita byla testována hierarchickým smíšeným modelem lme knihovny (nlme) ve smyslu klon v koncentraci a v generaci, přičemž jako pevné efekty byly brány koncentrace (jako faktor) a předchozí zkušenost se sinicí, jakožto náhodný efekt byl brán klon. Data z 1. generace byla testována zobecněným lineárním modelem pomocí funkce glmer knihovny lme4 (Crawley 2007). Pro testování byla využita knihovna KMsurv. Veškeré analýzy byly provedeny v programu R 3.0.1 (R Core Team 2013).



5. Výsledky

5.1 Sklenicové optimalizační zkoušky

Prostřednictvím provedených sklenicových optimalizačních zkoušek (viz tabulka 3) byly stanoveny parametry, při nichž by měl být proces koagulace v rámci odstraňování nejběžnějších forem microcystinu nejúčinnější – zvýrazněny modře. Optimální parametry pro realizaci koagulace byly vztaženy především k množství vyvázaného železa, které bylo odečteno z kalibrační křivky (viz obrázek II-1 v Příloze II) s využitím hodnot adsorbance. Samotný proces koagulace byl realizován za podmínek uvedených v tabulce 4.

Tabulka 3: Výsledky sklenicových optimalizačních zkoušek (DOC = množství rozpuštěných organických látek, A = adsorbance vzorku vyjadřující zákal, modře zvýrazněny opt. podmínky).

Reakční nádoba	0,125M NaHCO ₃ [ml/2l]	pH [-]	DOC [mg.l ⁻¹]	A-A(sl) [-]	Fe [mg.l ⁻¹]
1	4,5	4,04	-	-	-
2	5,0	Bez koagulace	-	-	-
3	5,5	Bez koagulace	-	-	-
4	6,0	Bez koagulace	-	-	-
5	6,5	5,32	3,25	0,243	4,057
6	7,0	5,48	3,34	0,099	1,680
7	7,5	5,56	3,35	0,052	0,905
8	8,0	5,85	3,13	0,031	0,550
9	8,5	5,94	3,04	0,013	0,261
10	9,0	6,01	3,23	0,01	0,211
11	9,5	6,14	3,08	0,01	0,211
12	10,0	6,39	2,96	0,007	0,162
13	10,5	6,44	2,83	0,007	0,162
14	11,0	6,52	2,98	0,008	0,178

Tabulka 4: Shrnutí podmínek, za nichž byla realizována koagulace ve II. fázi experimentu (zpracování podkladů viz tabulky III-1 až III-3 v Příloze III).

pH [-]	KNK _{4,5} [mmol.l ⁻¹]	Fe [mg.l ⁻¹]	DOC [mg.l ⁻¹]
6,36	0,26	0,162	2,83

5.2 Koagulace

Analýza microcystinů, účinnost koagulace

Analyzovány byly tři konkrétní formy microcystinů, a to MC-LR, MC-RR a MC-YR a jejich suma. Analýza vzorků byla provedena u zásobní směsi (pro I. fázi experimentu), u vzorků surové vody před koagulací a u vzorků těsně po koagulaci (pro II. fázi experimentu a výpočet účinnosti procesu). Měření bylo provedeno pro každý vzorek dvakrát a obě hodnoty byly zprůměrovány. Odchylka se pohybovala vždy do 5 %. Vzhledem k přesnosti detekce, instrumentální a finanční náročnosti bylo od třetích opakování analýz upuštěno.

V sinicové směsi odebrané z přírodního prostředí byly detekovány vysoké koncentrace microcystinů (viz tabulka 5) s poměrem forem: 31,6 % MC-LR, 53,6 % MC-RR a 14,8 % MC-YR, což odpovídá poměrům vyskytujícím se v přírodním prostředí (Bláhová a kol. 2007).

Tabulka 5: Obsah daných forem microcystinu v dávkované sinicové směsi (TOC = 2 g.l⁻¹).

MC-LR (μg.l ⁻¹)	MC-RR (μg.l ⁻¹)	MC-YR (μg.l ⁻¹)	Celkem (μg.l ⁻¹)
760	1290	356	2406

Při přepočtu těchto koncentrací na koncentrace jednotlivých forem microcystinů dávkovaných do jedné 200ml pokusné kádinky v I. fázi experimentu (viz tabulka 6) lze konstatovat, že celková množství analyzovaných microcystinových forem, a to 0,60 μg.l⁻¹, 6,02 μg.l⁻¹ a 24,06 μg.l⁻¹, jsou též porovnatelná s koncentracemi nacházejícími se v přírodním prostředí (Bláhová a kol. 2007).

Tabulka 6: Tabulka vyjadřující množství forem microcystinu dávkovaných v I. fázi pokusu.

Koncentrace	Dávka [ml]	TOC [mg.l ⁻¹]	MC [μg.l ⁻¹]	MC celkem [μg.l ⁻¹]
C ₁	0,05	0,5	MC-LR: 0,19	0,60
			MC-RR: 0,32	
			MC-YR: 0,09	
C ₂	0,50	5	MC-LR: 1,90	6,02
			MC-RR: 3,23	
			MC-YR: 0,89	
C ₃	2,00	20	MC-LR: 7,60	24,06
			MC-RR: 12,90	
			MC-YR: 3,56	

Pro surovou vodu vstupující do koagulačního procesu (tedy II. fáze experimentu) byla zvolena koncentrace sinicové směsi nejlépe odpovídající koncentraci v přírodním prostředí,

tnzn. množství microcystinů odpovídající koncentraci C₂ z I. fáze experimentu. S využitím tabulky 6 a tabulky III-4 v Příloze III lze shrnout dávkované množství analyzovaných forem microcystinů do jedné kádinky během pokusu v I. a II. fázi experimentu následovně (viz tabulka 7), přičemž je patrné, že výsledná koncentrace microcystinů ve II. fázi experimentu jsou téměř totožné s dávkováním sinicové směsi v koncentraci C₂ v I. fázi experimentu.

Tabulka 7: Tabulka shrnující obě fáze studie z hlediska množství analyzovaných forem MC.

	Koncentrace	I. fáze experimentu		II. fáze experimentu	
		MC [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	MC celkem [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	MC [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	MC celkem [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
Množství MC v jedné kádince během pokusu	C ₁	MC-LR: 0,19	0,60		
		MC-RR: 0,32			
		MC-YR: 0,09			
	C ₂	MC-LR: 1,90	6,02	MC-LR: 2,11	6,50
		MC-RR: 3,22		MC-RR: 3,42	
		MC-YR: 0,89		MC-YR: 0,97	
	C ₃	MC-LR: 7,60	24,06		
		MC-RR: 12,90			
		MC-YR: 3,56			

Ze srovnání hodnot množství forem microcystinů obsažených v surové vodě před procesem koagulace a po tomto procesu (viz tabulka 8, zpracování viz tabulka III-4 v Příloze III) vyplývá, že koagulace byla v rámci odstranění microcystinu zcela neúčinná. Dokonce jsou analýzou vzorků zaznamenané vyšší hodnoty po procesu koagulace, ale to je přičítáno odchylce měření. Lze tedy usuzovat, že námi provedená koagulace nebyla schopna odstranit žádnou formu microcystinu (viz tabulka 8). Vzhledem k tomu, že proces koagulace nevyvázal microcystiny, jejich původní množství tedy zůstalo v koagulačním roztoku obsaženo v nezměněném množství odpovídajícímu množství forem microcystinu dávkovanému i v I. fázi experimentu ve zvolené koncentraci C₂.

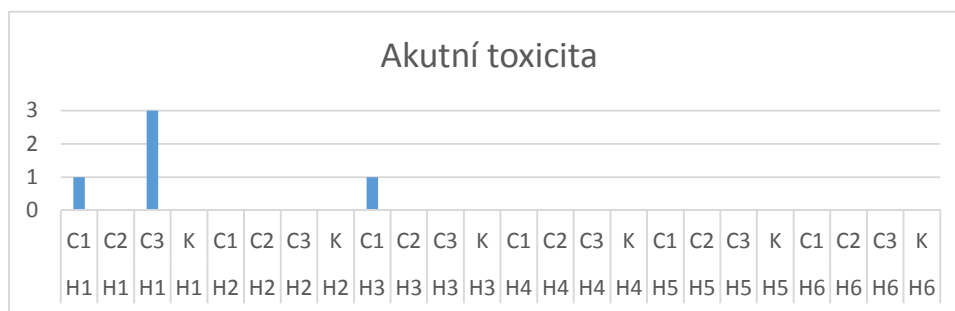
Tabulka 8: Tabulka vyjadřující účinnost koagulačního procesu z hlediska odstranění množství sledovaných forem MC.

	Před koagulací	Po koagulaci	Účinnost
MC-LR [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	1,93	2,11	0 %
MC-RR [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	3,52	3,415	0 %
MC-YR [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	0,84	0,965	0 %
MC celkem [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	6,29	6,49	0 %

5.3 Ekotoxikologická studie

5.3.1 Úmrtnost

Ekotoxikologické testy akutní toxicity s organismy rodu *Daphnia* probíhají po dobu 24 hodin či 48 hodin exponování, zatímco testy chronické toxicity vyžadují alespoň 14 dní (OECD 1984). Vzhledem k tomu, že do 48 hodin od započetí I. fáze experimentu zahynul v koncentraci C₁ pouze 1 jedinec klonu H₁ a 1 jedinec klonu H₃ a v koncentraci C₃ zahynuli 3 jedinci klonu H₁ (viz obrázek 5), statistickými metodami byly analyzovány pouze účinky chronické toxicity.



Obrázek 5: Graf úmrtnosti jedinců exponovaných akutní toxicitě po 48 hodin v I. fázi pokusu.

Vliv nejvyšší koncentrace C₃ na mortalitu klonů v rámci chronické toxicity v 1. generaci vystavené toxicitě byl značný a signifikantní (viz Příloha V), což je patrné i z tabulky 9 vyjadřující počet a poměr přeživších a uhynulých, přičemž některé klony (H₄, H₅ a H₆) byly zasaženy uhynutím pouze v nejvyšší koncentraci C₃. Naopak ve 2. generaci koncentrace z hlediska odlišnosti klonů nehrály v rámci mortality dominantní roli, ale projevila se zde signifikantní meziklonální variabilita (viz Příloha V), což je patrné z tabulky 9. Byť přeživší jedinci v nejvyšší koncentraci C₃ ve 2. generaci vyhynuli u všech klonů, v rámci ostatních koncentrací byly zaznamenány odlišné reakce mezi klony. Kupř. u klonu H₆ vyhynuli i zbylí jedinci v koncentraci C₂, oproti klonu H₁, u kterého uhynul jen 1 jedinec v koncentraci C₂, či u klonu H₃, který ztratil pouze 1 jedince v kontrolní paralele. Statistické zpracování mortality v rámci 3. generace nemohlo být realizováno z důvodu příliš malého souboru použitelných dat. I přesto je z grafů v tabulce 9 patrné, že i přes malý počet přeživších se počet jedinců v paralelách ustálil a ve 3. generaci již nedocházelo k tak četnému vymírání.

Při realizaci ekotoxikologického testování II. fáze studie došlo v kádinkách k opětovné koagulaci již jednou zkoagulované sinicové směsi, nastalo vločkování a jedinci všech klonů do druhého dne zahynuli.

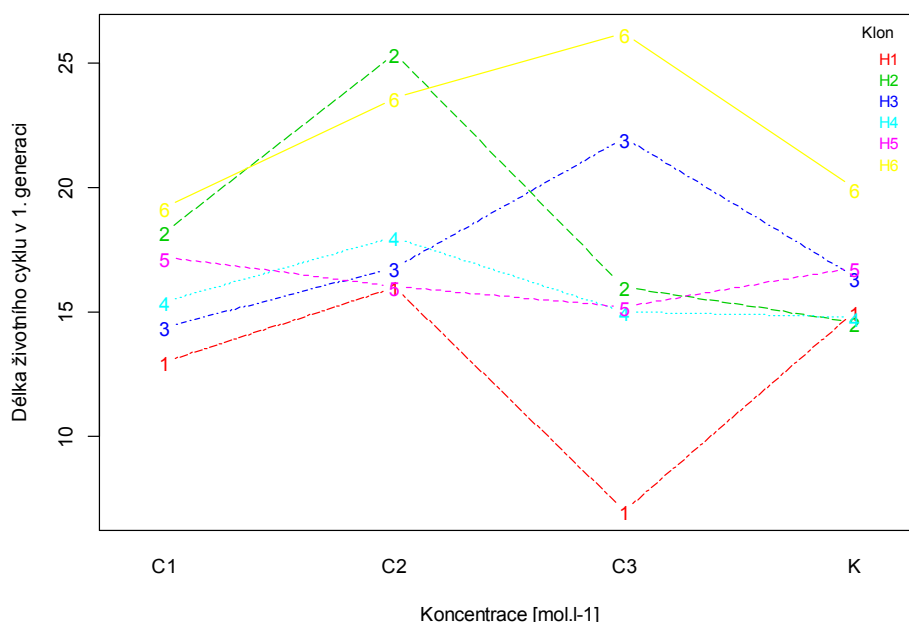
Tabulka 9: Tabulka vyjadřující počet přeživších a uhynulých v rámci všech klonů a koncentrací v průběhu celé studie (zelená – přeživší, červená – uhynulí, černá – NA – tzn. nedošlo na danou generaci); klony označené * měly předchozí zkušenost se sinicí druhu *M. aeruginosa*.

	1. generace	2. generace	3. generace
Klon H ₁ *			
Klon H ₂			
Klon H ₃ *			
Klon H ₄			
Klon H ₅			
Klon H ₆ *			

5.3.2 Změny reprodukčních a růstových parametrů

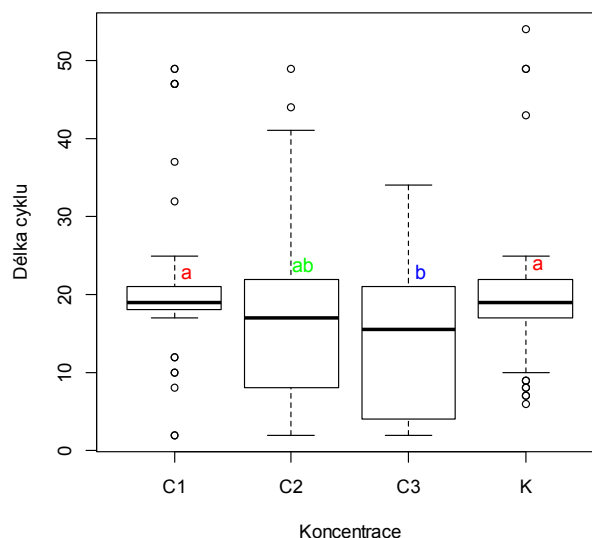
Délka cyklu

V 1. generaci byl nalezen rozdíl mezi klony v délce cyklu, tj. v době od začátku studie po vyvedení 2. snůšky, v závislosti na koncentraci. Zde se projevila (nikoliv však signifikantně) větší délka cyklu u klonů H₁, H₃ a H₆, tj. u klonů, které se již dříve setkaly se sinicí druhu *Microcystis aeruginosa*. Z grafu na obrázku 6 je patrné, že každý klon v jednotlivých koncentracích po vsazení do pokusu měl odlišné doby cyklu. Pouze klony H₃ a H₆ měly v podmínkách s nejvyšší koncentrací delší populační cykly než kontroly. Klon H₁ v nejvyšší koncentraci téměř vyhybnul, zatímco klony H₄ a H₅ koncentracemi nebyly příliš zasaženy a klon H₂ se projevoval prodloužením cyklu na koncentraci C₂.



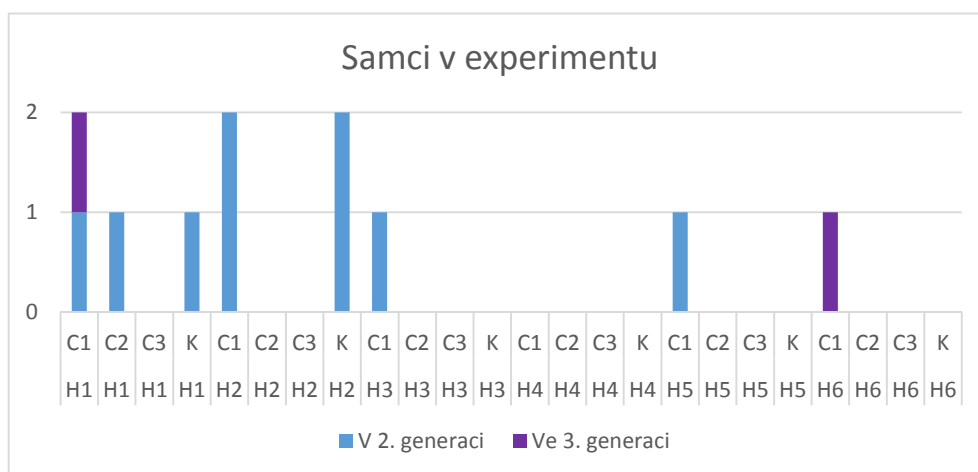
Obrázek 6: Graf vyjadřující délku cyklu v závislosti na koncentraci u všech klonů v 1. generaci.

Po vystavení klonů toxicitě v 1. generaci, kde každý klon reagoval jiným způsobem, ve 2. a 3. generaci se tyto meziklonální rozdíly již neprojevily, naopak byly nalezeny signifikantní rozdíly v délce cyklu v rámci jednotlivých koncentrací ($p = 0,0206$), přičemž se zvyšující se koncentrací se délka cyklu zkracovala (viz obrázek 7).



Obrázek 7: Graf vyjadřující závislost délky cyklu na koncentraci ve 2. a 3. generaci.

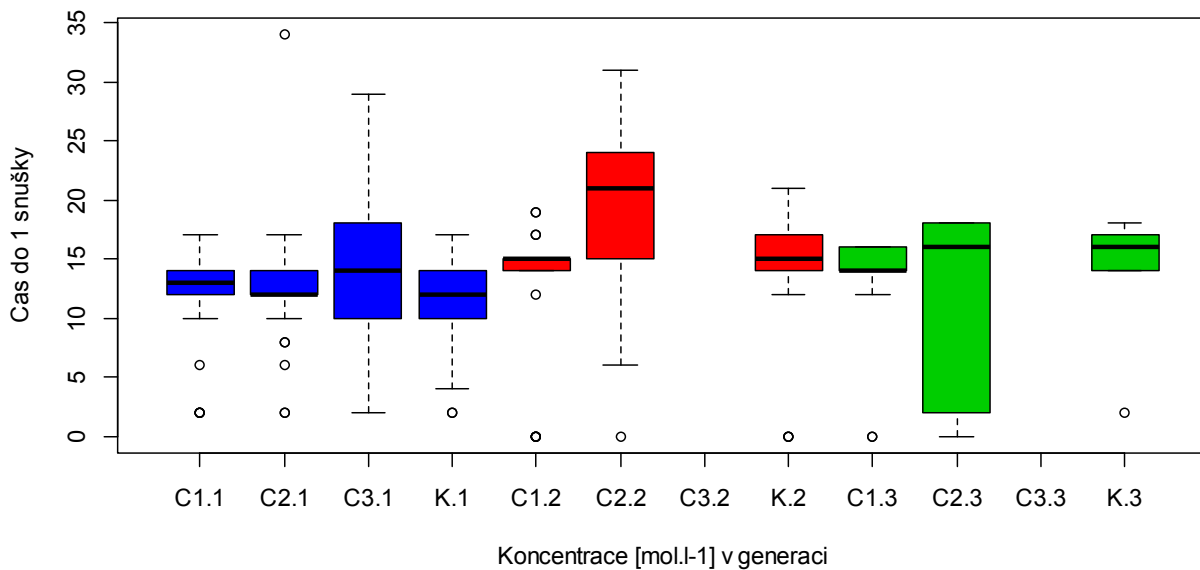
Zaznamenána byla i nadprůměrná délka cyklu u jedinců z 2. snůšky 2. a 3. generace, kteří žili kupříkladu 47 dní až do ukončení experimentu bez vyvedení snůšek. U těchto jedinců bylo zpětně pod mikroskopem zjištěno, že se jednalo o samce (viz graf na obrázku 8).



Obrázek 8: Graf vyjadřující výskyt samců v 2. a 3. generaci I. fáze experimentu.

Doba do 1. snůšky

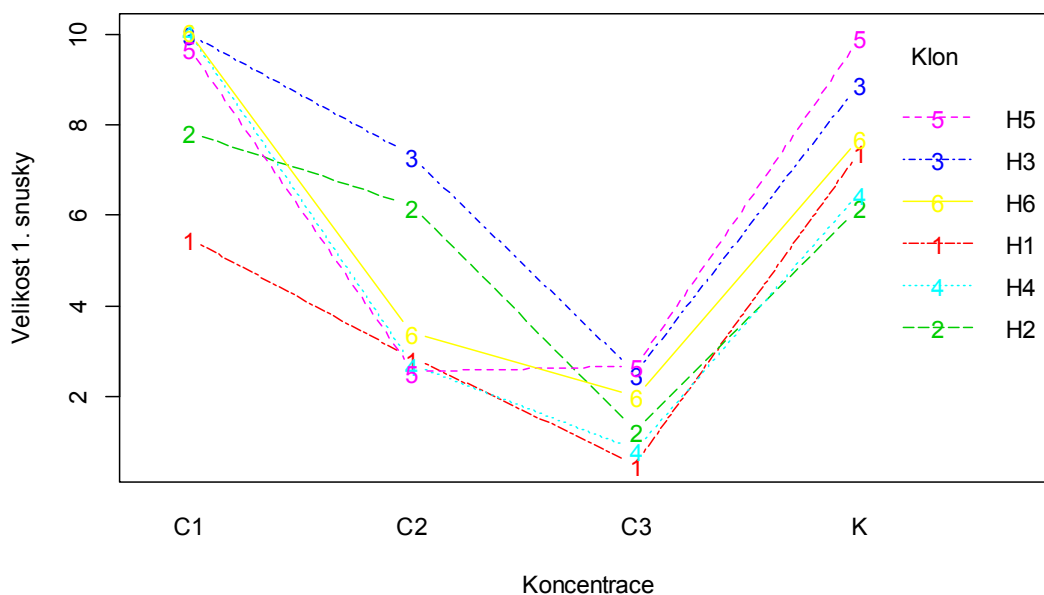
Klony se celkově dobou do 1. snůšky, tedy věkem primipary, nelišily, ani rozdíly v závislosti na koncentraci nebyly signifikantní. Pouze u 2. generace signifikantní rozdíly nalezeny byly, přičemž bylo stáří primipar v koncentraci C₂ delší než v koncentraci C₁ a kontrolách ($p = 0,00258$) (viz obrázek 9).



Obrázek 9: Graf vyjadřující dobu do 1. snušky v závislosti na koncentracích ve 3 generacích.

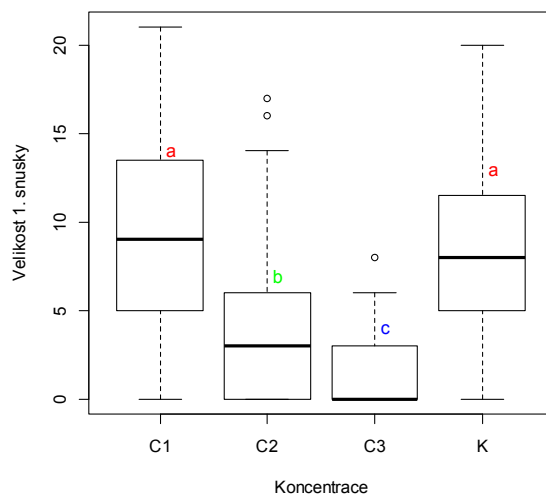
Velikost 1. snušky

Klony se mezi sebou velikostí 1. snušky, tj. počtem jedinců v 1. snůšce, nelišily, což je patrné i z grafu na obrázku 10.



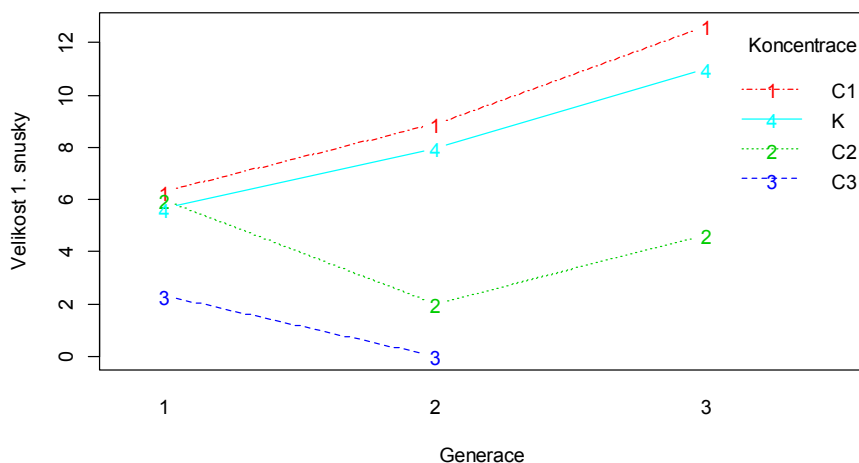
Obrázek 10: Graf vyjadřující závislost velikosti 1. snušky na koncentraci u všech klonů.

Velikost 1. snušky byla průkazně větší u koncentrace C₁ nežli u koncentrace C₂, taktéž u koncentrace C₂ byla prokázána větší 1. snůška než u C₃, přičemž se velikost 1. snušky nelišila v koncentraci C₁ a kontrolách ($p < 0,001$) (viz obrázek 11).



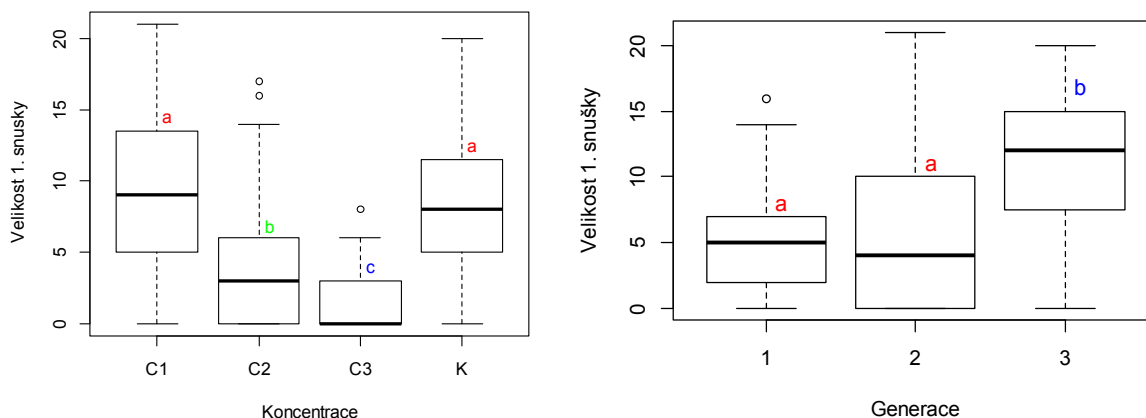
Obrázek 11: Graf vyjadřující signifikantní rozdíl ve velikosti 1. snůšek v závislosti na koncentraci – nejnižší koncentrace C₁ a K (a) se neliší, dále platí: čím vyšší koncentrace, tím méně narozených neonat.

Napříč generacemi byl nalezen trend, avšak statisticky neprůkazný: čím více času do 1. snůšky uplyne, tím je 1. snůška větší. Byl však nalezen významný rozdíl ve velikosti 1. snůšky mezi třetí generací a první s druhou generací ($p < 0,001$). Ve 3. generaci, kde je premisa nulového maternálního efektu, byly zjištěny větší snůšky než v generacích předchozích (viz obrázek 12).



Obrázek 12: Graf velikosti 1. snůšek v jednotlivých koncentracích v průběhu tří generací.

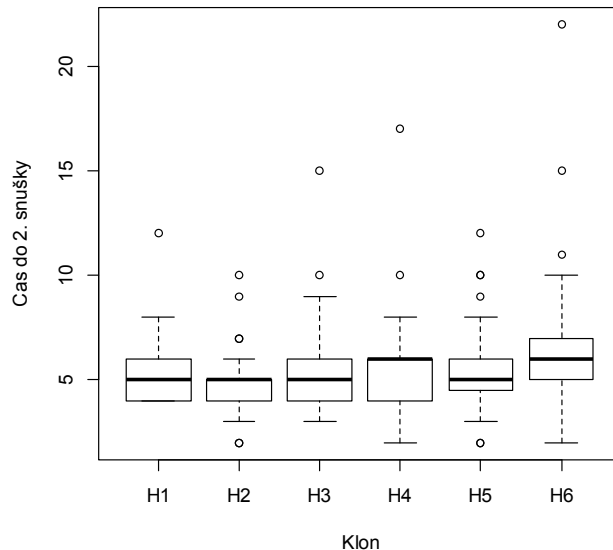
S každou další generací rostla velikost 1. snůšky ($p < 0,001$) a zároveň byla diferencována dle koncentrací ($p < 0,001$) (viz grafy na obrázku 13). Byl také nalezen trend, v rámci něhož se délka cyklu s generacemi prodlužuje a jedinci mají větší snůšky, leč tato závislost se neukázala statisticky významnou.



Obrázek 13: Graf vlevo vyjadřuje velikost 1. snůšky v závislosti na koncentraci se signifikantními rozdíly; graf vpravo zachycuje zvyšující se velikosti 1. snůšek v průběhu tří generací.

Doba do 2. snůšky

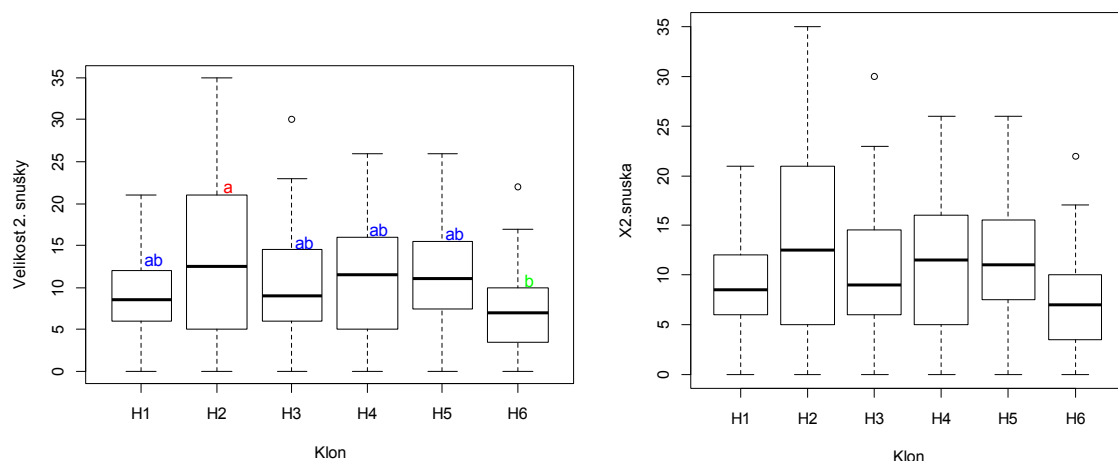
Koncentrace, předchozí zkušenost s přítomností sinice, ani jejich interakce neměly signifikantní vliv na dobu do 2. snůšky v první generaci, která byla vystavena toxicitě sinicové směsi. V době do 2. snůšky, tedy časovém úseku mezi vyvedením první a druhé snůšky, byl však ve 2. a 3. generaci nalezen signifikantní rozdíl mezi klony H₂ a H₆ ($p = 0,0492$ a $p = 0,040$), přičemž klon H₆ měl vždy delší dobu do 2. snůšky než klon H₂ (viz obrázek 14).



Obrázek 14: Graf doby do 2. snůšky jednotlivých klonů ve 2. a 3. generaci.

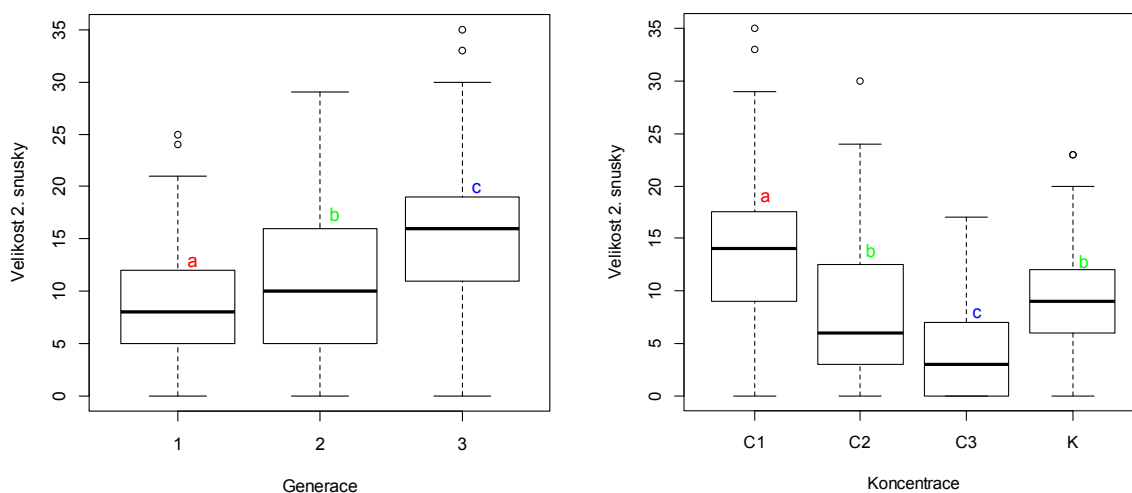
Velikost 2. snůšky

Bylo zjištěno, že klon H₂ měl ve druhé a třetí generaci signifikantně více potomstva než klon H₆ ($p = 0,00241$ a $p = 0,00248$) (viz grafy na obrázku 15).



Obrázek 15: Graf vlevo vyjadřuje velikost 2. snůšky u jednotlivých klonů v 2. generaci, přičemž je u klonu H₂ (a) a H₆ (b) patrný rozdíl ve velikosti 2. snůšek; graf vpravo vyjadřuje tentýž rozdíl velikosti 2. snůšek klonů v rámci 3. generace.

Velikost 2. snůšky byla ovlivněna jak generací, tak koncentrací i velikostí první snůšky (a to i u 3. generace). Čím větší byla první snůška, tím větší byla snůška druhá ($p < 0,001$), přičemž s každou další generací byla velikost druhé snůšky větší ($p = 0,00115$) (viz graf vlevo na obrázku 16). A zároveň platilo, že čím větší byla koncentrace, tím menší byla velikost 2. snůšky ($p < 0,001$), přičemž v koncentraci C₁ byly větší 2. snůšky než v kontrole (viz graf vpravo na obrázku 16).



Obrázek 16: Graf vpravo vyjadřuje zvyšující se velikosti 2. snůšek v rámci třech zkoumaných generací; graf vpravo vystihuje velikosti 2. snůšek v závislosti na koncentraci, přičemž v nejnižší koncentraci C₁ (a) se rodilo více potomků než v kontrolních paralelách (b) a zbylých koncentracích, kdy platilo, že se zvyšující se koncentrací se snižuje velikost 2. snůšek.

6. Diskuse

6.1 Koncentrace microcystinu v povrchové vodě a po její úpravě

V přírodě se microcystiny vyskytují v různých strukturách a především pohromadě, nikoliv pouze jeden typ (Babica a kol. 2006), proto byla v naší studii dávkována sinicová směs odebraná z přírody v koncentracích odpovídajících koncentracím microcystinů *in vivo*, a to $0,60 \mu\text{g.l}^{-1}$, $6,02 \mu\text{g.l}^{-1}$ a $24,06 \mu\text{g.l}^{-1}$. Poměr forem microcystinů v této studii činil 31,6 % MC-LR, 53,6 % MC-RR a 14,8 % MC-YR, což by mohlo být považováno za poměrně srovnatelné s hodnotami naměřenými ve vzorcích Bláhové a kol. (2007): 42 % MC-LR, 38 % MC-RR a 8 % MC-YR. Ve studiích Bláhové a kol. (2007) na 94 lokalitách v ČR byla naměřena od července do září koncentrace (medián) microcystinů $0,67 \mu\text{g.l}^{-1}$ s maximem (naměřeným v srpnu až září) pohybujícím se od $8 \mu\text{g.l}^{-1}$ do $36,9 \mu\text{g.l}^{-1}$ (což přibližně koresponduje s koncentracemi dávkovanými v mém experimentu). Ve vodních nádržích, z nichž je upravována voda na pitnou, byl medián koncentrací $0,22 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Bláhová a kol. 2007). Ke konci vegetační sezony však může koncentrace (extracelulárních) forem microcystinu v České republice dosáhnout až $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Bláha a kol. 2010), což je již množství, u něhož je dokázána i úmrtnost zkoumaného druhu *Daphnia magna* vyvolaná akutní toxicitou (Ortiz-Rodríguez a Wiegand 2010).

Při odběrech vzorků přímo z rozvodného systému úpravny vod v ČR odhalila studie Bláhy a Maršálka (2003) relativně vysoký výskyt rozpuštěného microcystinu. Celková koncentrace microcystinů se pohybovala v rozmezí $0,29$ až $39,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ v surové vodě a $0,18$ až $7,8 \mu\text{g.l}^{-1}$ ve vzorcích upravené vody. Jeden z pěti vzorků po úpravě vody překračoval povolený limit $1 \mu\text{g.l}^{-1}$. Úprava vody zahrnovala koagulaci, ve které byl aplikován síran hlinitý, filtraci, úpravu ozonem a filtraci přes aktivní uhlí. První krok procesu úpravy vody (koagulace/filtrace) významně snížil celkové množství extracelulárních microcystinů stanovených v surové vodě (více než 80% MC-LR odstraněno). Druhým krokem, ozonizací, bylo množství microcystinu-LR odstraněno a po posledním kroku úpravy vody (filtrace přes aktivní uhlí) bylo odstraněno i celkové množství microcystinů (veškeré formy) (Bláha a Maršálek 2003).

Konvenční úprava vody (koagulace, filtrace a chlorinace) v kombinaci s použitím aktivního uhlí (granulovaného i práškového) dle Lamberta a kol. (1996) odstraní více než 80 % z celkového množství microcystinu ze surové vody. I tak se však zbytková koncentrace pohybovala v rozmezí $0,1$ - $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ MC-LR (Lambert a kol. 1996). Dle Hoegera a kol. (2005)

byly provedeny dvě studie na povrchových vodách určených pro úpravu vody na pitnou ve Švýcarsku a Německu. Koncentrace microcystinů se v těchto případech pohybovala od $1,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ do více než $8,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ před úpravou vody, přičemž po úpravě (preozonace, rychlá písková filtrace, ozonace, filtrace přes aktivní uhlí, pomalá písková filtrace ve Švýcarsku; flokulace se sedimentací, písková filtrace, chlorinace v potrubním systému v Německu) výrazně méně než $1,0 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Hoeger a kol 2005). I z několika studií úpravy vody Lamberta a kol. (1996) prováděných v laboratoři a v poloprovozním měřítku bylo vyvozeno, že filtrace s využitím granulovaného aktivního uhlí je účinný proces při odstraňování toxinů sinic z pitné vody (Lambert a kol. 1996). Snížení množství microcystinů pod mezinárodně schválený limit je s použitím konvenční technologie úpravy vody (koagulace, filtrace, ozonace, chlorinace) možné i dle Jurczaka a kol. (2005).

Na druhou stranu konvenční úprava vody v Portugalsku zahrnující koagulaci, flokulaci, sedimentaci a pískovou filtraci je schopna odstraňovat do určité míry sinicové buňky, ale byla vyhodnocena jako neúčinná pro odstraňování extracelulárních cyanotoxinů (Campinas a Rosa 2010). Ani ve studii Hitzfelda a kol. (2000) nebyly chlorace, flokulace či písková filtrace schopny odstranit toxiny ze surové vody. Pouze poslední krok, filtrace přes práškové aktivní uhlí v poměru 1:10 až 1:100 (toxin:aktivní uhlí), odstranil koncentrace toxinu $3 \mu\text{g/ml}$ pod mezinárodní limit ($1 \mu\text{g.l}^{-1}$). Pouze zahrnutí kroku adsorpce na aktivní uhlí tak dospělo k 100% účinnosti odstranění microcystinů z vody (Hitzfeld a kol. 2000).

Z výše uvedených studií vyplývá, že celkovým procesem úpravy vody lze vyvázat v podstatě 100% rozpuštěných forem microcystinů, avšak za předpokladu, že je do procesu zahrnuta filtrace přes aktivní uhlí. Uvedené studie se však zaměřily především na rozpuštěný microcystin-LR, který odráží koncentraci extracelulárních toxinů. Nicméně většina microcystinů ve vodách je uložena intracelulárně v biomase sinic – do doby, než jsou buňky rozrušeny (Hitzfeld a kol. 2000, Babica a kol. 2007, Zheng a kol. 2004). Při studiu procesu koagulace Pivokonským a kol. (2009) byla účinnost odstranění COM (organických látek nacházejících se uvnitř buněk) procesem koagulace relativně nízká. Účinnost koagulace za použití síranu železitého jakožto agregačního činidla (shodně jako v experimentu mé práce) byla rovna 46% (Pivokonský a kol. 2009). Vyvázány však byly především proteiny vyšších molekulových hmotností, do nichž microcystiny s molekulovou hmotností pohybující se v rozmezí 800-1000 Da (Hitzfeld a kol. 2000) rozhodně nepatří.

Při mých experimentech byla účinnost odstranění analyzovaných forem microcystinu koagulačním procesem úpravy vody nulová. Tato skutečnost je tak v souladu s hypotézou,

že v oblasti nejvyšší vazebné kapacity Fe peptidů/proteinů (pH = 6,2) je proces koagulace inhibován vznikem Fe-peptidových/proteinových komplexů (Pivokonský a kol. 2012). Každopádně, lze konstatovat, že při aplikaci koagulace jakožto jediného procesu úpravy vody by mohlo být odstraňování obsažených microcystinů zcela neúčinné.

Množství microcystinů v II. fázi studie dávkované ke koagulaci bylo zvoleno tak, aby odpovídalo koncentraci C_2 z I. fáze experimentu, a to $6,02 \mu\text{g.l}^{-1}$. Celý proces koagulace se ukázal pro vyvážení molekul microcystinu neúčinný, proto ve výsledné směsi po koagulaci bylo detekováno téměř totožné množství analyzovaných forem microcystinu. Tento vzniklý roztok byl připraven začátkem II. fáze pokusu do 200ml kádinek, kam byli přemístěni i zkoumaní jedinci druhu *D. magna*. Bohužel došlo k opětovné koagulaci roztoku a všechny perloočky do druhého dne zcela vyhynuly. Jelikož množství microcystinu obsažené v kádinkách v II. fázi pokusu odpovídalo množství microcystinu dávkovaného v I. fázi experimentu, na něž většina jedinců nereagovala úhynem, lze předpokládat, že microcystin příčinou vymření perlooček nebyl.

Vysvětlení náhlého úhynu jedinců může být vícero. Filtrační aparát jedinců *D. magna* mohl být mechanicky zablokován vysráženými vločkami při opětovné koagulaci dávkované směsi, a to mohlo být dostatečným důvodem pro úhyn jedinců. Dávkované množství řasy druhu *Scenedesmus obliquus* spolu se svým živným roztokem se mohlo též podílet na vyvolání opětovné koagulace. Na úhynu jedinců se mohlo podílet i reziduum koagulačních činidel vyskytujících se ve směsi po procesu koagulace. A vyloučit samozřejmě nelze ani to, že kritickou se stala až kombinace výše zmíněných faktorů. Proto by mohla být přínosná realizace II. fáze experimentu za dávkování sinicové směsi, jež prošla procesem koagulace, leč aplikována by byla do ekotoxikologické studie bez koagulačních činidel.

6.2 Microcystiny a další látky sinicového květu působící na zooplankton

Mnoho ekotoxikologických testů je primárně studováno na izolovaných microcystinech (Wiegand a Plugmacher 2005) a role ostatních toxických složek sinicového květu nebývá zkoumána do stejné hloubky (Yang a kol. 2011 a 2012, Koski a kol. 1999). Z práce Tarczynské a kol. (2001) vyplynulo, že ve všech případech s dávkovaným izolovaným microcystinem byly tyto vzorky mnohem méně toxické než vzorky obsahující odpovídající množství MC v rámci komplexního vzorku získaného z vodní biomasy. Taktéž Chen a kol. (2005) pozorovali, že dávkovaný čistý MC-LR působil menší oxidativní stres na jedince druhu *Daphnia magna*

nežli celé buňky sinice druhu *Microcystis aeruginosa*. Rovněž Dao a kol. (2010) ve svém výzkumu zjistili, že se jedinci vystavení působení izolovaného (5 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) MC-LR příliš nelišili od kontrol. Podobně, ve studii Lürlinga (2003) byl přítomností sinic v potravě blokován růst perloočky, leč inhibice byly pozorovány jak u sinic produkujících microcystiny, tak u sinic microcystiny neprodukujících. Přibývá tedy důkazů, že další bioaktivní sloučeniny významně přispívají k toxicitě sinicového květu.

Navíc je tu možnost vzájemného synergického působení a zesílení účinku působení v rámci různých metabolitů sinic a interakce s jinými toxickými sloučeninami, které se mohou vyskytovat ve studovaných vzorcích (Pires kol. 2011, Best a kol. 2002, Nováková a kol. 2012). Tato problematika vede k důležitosti studia dalších intracelulárních látek obsažených v buňkách sinic, jako jsou lipopolysacharidy, mnoho peptidů a depsipeptidů, polárních alkaloidních metabolitů či dalších metabolitů, které dosud nejsou dostatečně prozkoumány (Yang a kol. 2011, 2012; Smutná a kol. 2014).

Již dnes se předpokládá zajímavá role lipopolysacharidů či dalších bioaktivních molekul sinicového květu kupř. ve funkci estrogenů a endokrinních disruptorů (Štěpánková a kol. 2011, Sychrová a kol. 2012), inhibice toxicity v koordinaci s produkty biodegradace jako jsou nitrity (Yang a kol. 2012), nehledě na srovnatelnou inhibici parametrů u jedinců druhu *Daphnia magna* prostřednictvím působení sinic neprodukujících microcystiny rovněž jako ve studiích se sinicemi microcystin produkujícími (Lürling 2003). Již bylo prokázáno, že přítomnost kupříkladu lipopolysacharidů snižuje schopnost detoxikace od microcystinů, čímž zvyšuje jejich toxicitu pro dané organismy. Je však velmi pravděpodobné, že role lipopolysacharidů je složitější (Bernardová a kol. 2008).

Jedna studie dokonce ukázala, že čistá frakce lipopolysacharidů sinic nezpůsobila akutní toxicitu u některých vodních druhů, a že dokonce působila jako jakási prevence a ochrana vůči toxicitě MC-LR (Lindsay kol. 2006). Také byly nedávno popsány další bioaktivní molekuly sinic, jako jsou estrogeny a další endokrinní disruptory (Štěpánková a kol. 2011, Sychrová a kol. 2012). Je tedy nakonec možné, že jiné metabolity sinic než microcystiny se časem ukáží jako nositelé toxického efektu, kde microcystiny budou hrát roli pouze minoritní (Dao a kol. 2010, Ortiz-Rodríguez a Wiegand 2010, Ortiz-Rodríguez a kol. 2012).

Výše diskutované studie tedy naznačují, že další, dosud nedostatečně charakterizované, sloučeniny mohou hrát důležitou roli v akutní i chronické toxicitě sinicového květu (Smutná a kol. 2014), a proto byla do studie mé práce dávkována sinicová směs odebraná z přírody, u níž

je sice konkrétně znám pouze obsah microcystinů a celkové množství organického uhlíku (TOC = 2 g.l⁻¹), leč účinky působení na ekotoxikologické indikátory a úpravu vody jsou o to komplexnější a lépe vystihující situaci *in vivo*.

6.3 Akutní a chronická toxicita

Při testování akutní toxicity v mém experimentu nebyla nalezena výrazná korelace úmrtnosti jedinců do dvou dnů po započetí experimentu jak s koncentrací, tak s jednotlivými klony. Taktéž Arzate-Cardenas a kol. (2010) nepozorovali korelaci mezi úmrtností druhu *Daphnia magna* a koncentrací microcystinů sinice rodu *Microcystis* v jednom z mexických městských jezer. Úmrtnost jedinců druhu *Daphnia magna* reakcí na akutní toxicitu byla zaznamenána v ekotoxikologických testech Ortiz-Rodríguez a Wieganda (2010) až v rámci koncentrací microcystinu-LR nad 100 µg.l⁻¹, přičemž nejvyšší koncentrace dávkovaná v mé práci dosahovala pouze 24 µg.l⁻¹. Je tedy možné, že pro analýzu úmrtnosti v rámci akutní toxicity byly dávkované koncentrace (0,6 µg.l⁻¹, 6,0 µg.l⁻¹, 24,0 µg.l⁻¹) příliš nízké.

Též počet zkoumaných jedinců se v rámci mé ekotoxikologické studie vlivem úmrtnosti a dalších příčin postupně snižoval natolik, až ve 3. generaci byl již soubor dat pro mnohé analýzy nedostačující. Jednou z příčin byla i skutečnost, že se v 2. generaci vlivem podmínek začali rodit samci, kteří nemohli vyvést žádnou snůšku, a tudíž u těchto jedinců nemohlo dojít na zkoumanou 3. generaci. Má studie proto v tomto směru může sloužit jakožto podklad a pilotní pokus pro podrobnější studii, při níž bude využito dostatečného množství jedinců a mikroskopicky bude ověřováno pohlaví vybíraných jedinců z 2. snůšky v každé generaci.

I přes nevelký soubor dat bylo možné provést analýzy chronických účinků sinicové směsi na jedince a klony druhu *D. magna*. Z těchto analýz vyplývá, že s rostoucí koncentrací se u všech klonů snižovaly reprodukční a růstové parametry. Stejně tak tomu bylo ve studii, kterou provedl Dao a kol. (2010), přičemž i v tomto případě přežívání klesalo během chronické expozice s rostoucími koncentracemi MC-LR. Výsledky Lemaire a kol. (2012) dokonce naznačují, že genetická variabilita v klonech *Daphnia* více vysvětluje rozdíly v úmrtnosti, než geneticky podmíněné rozdíly v toxicitě jednotlivých klonů *Microcystis*. V mé studii žádná závislost předchozí zkušenosti perloočky *Daphnia magna* na přítomnosti sinice druhu *Microcystis aeruginosa* zjištěna nebyla, leč pozorovány byly odlišnosti mezi klony v rámci úmrtnosti, doby do 2. snůšky a její velikosti. Zároveň bylo pozorováno kupříkladu postupné zvyšování velikosti snůšek jedinců napříč generacemi, což by mohlo svědčit o jejich postupném přizpůsobování se vnějším toxickým podmínkám s ohledem na koncentraci obsažených microcystinů.

Z analýzy mé studie vyplynulo, že jednotlivé generace se od sebe v reakcích liší. Kupříkladu jsem pozorovala, že délka cyklu v 1. generaci není závislá na koncentraci dávkované směsi, na rozdíl od 2. a 3. generace, leč úmrtnost v 1. generaci byla signifikantně ovlivněna nejvyšší koncentrací C₃. V 1. generaci byly rozhodující rozdíly mezi jednotlivými klony. Rovněž ve studii Smutné a kol. (2014) nebyly reakce v 1. generaci závislé na koncentracích microcystinů. Je tedy možné, že se jednalo o individuální přizpůsobení se akutní toxicitě vyvolané změnou podmínek spojenou se zahájením experimentu, přičemž předchozí zkušenost s přítomností sinice nehrála dominantní roli. S generacemi se zvyšovala velikost snůšek, což bychom mohli přičítat postupnému přizpůsobování se daným podmínkám v rámci možností koncentrace, jelikož velikost 1. i 2. snůšky odpovídala nepřímo úměrně koncentraci dávkované sinicové směsi. Svou roli mohl sehrát i maternální efekt.

V posledních letech přibývá důkazů, že jsou jedinci rodu *Daphnia* schopni vyvinout toleranci vůči toxickým sinicím (Gustafsson a Hansson 2004, Sarnelle a Wilson 2005, Wilson a kol. 2006, Sarnelle a kol. 2010) a geneticky se přizpůsobit výskytu cyanotoxinů (Hairston a kol. 1999, Hairston a kol. 2001; Gustafsson a kol. 2005).

Sarnelle a Wilson (2005) izolovali z jezer klony rodu *Daphnia* s nízkou a vysokou prevalencí tvořícího se sinicového květu a dospěli k závěru, že populace vystavené vysokým koncentracím sinic po dlouhou dobu se mohou geneticky přizpůsobit tak, aby byly více tolerantní k výskytu toxických sinic v potravě. Hairston a kol. (2001) dospěli k podobným výsledkům ve své studii genetického přizpůsobení zooplanktonu rodu *Daphnia* v Bodamském jezeře. Gustafsson a Hansson (2004) a Gustafsson a kol. (2005) prokázali toleranci vůči výskytu sinice rodu *Microcystis* předanou maternálním efektem u jedinců rodu *Daphnia*, kteří byli předem této sinici vystaveni v mateřské generaci. Pozorovali vyšší pravděpodobnost přežití, zrychlené dospívání stejně jako větší počet potomků ve srovnání s jedinci, jejichž matky této expozici vystaveny nebyly. Sarnelle a kol. (2010) uvedli, že populace jedinců rodu *Daphnia* s předchozí zkušeností s toxickými sinicemi mohou vykazovat pozitivní populační růst i při vysokých koncentracích cyanotoxinů. Maternální efekt a genetická adaptace pravděpodobně hrají velmi silnou roli při hodnocení interakcí *Microcystis-Daphnia*.

Analýzou F1, F2 a F3 generace bylo ve studii Gustafssona a kol. (2005) zjištěno, že zvýšená tolerance vůči toxickému *Microcystis* byla vyvolanou obranou vyvinutou během celého života jedince, a že tato vlastnost by mohla být převáděna z matky na potomka. Tento tzv. maternální efekt byl vyjádřen v několika reprodukčních a růstových parametrech, včetně kratší doby do 1. snůšky a větší velikostí 1. snůšky v porovnání s jedinci v kontrolách. Rovněž

ve studii mé diplomové práce byla zaznamenána větší velikost 1. snůšky ve 2. generaci vystavené maternálnímu efektu, leč doba do 1. snůšky se spíše prodloužila, a to u všech klonů.

Zvýšení věku primipar (tj. doby do 1. snůšky) v důsledku působení sinice druhu *Microcystis* na druh *Daphnia magna* byl zaznamenán i ve studii Gustafssona a kol. (2005). V tomto případě přispěl k prodloužení věku primipar i fakt, že mateřští jedinci byli schopni své snůšky zlikvidovat ještě před vypuzením z těla, což bylo pozorováno i v průběhu mé práce, leč nebylo to zahrnuto jako sledovaný parametr pozorování. Perloočky vystavené působení sinicové směsi měly nižší reprodukční a růstové projevy ve všech směrech než jedinci téhož druhu v kontrolách. Na druhou stranu některé jevy jako kupříkladu velikost 1. a 2. snůšky ve 3. zkoumané generaci studie mé práce byly nejnižší koncentrací C_1 spíše podmiňovány pozitivněji než samotné kontroly.

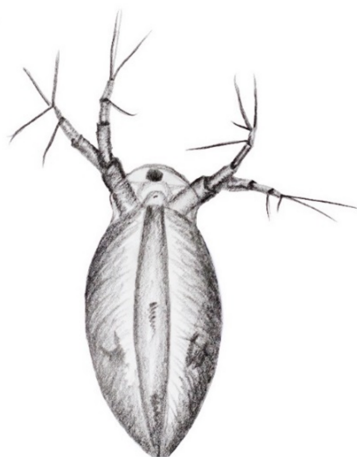
Podobný trend byl prokázán též v experimentu Ortiz-Rodríguez a Wieganda (2010), kde oproti kontrole vzrostla aktivita jedinců druhu *Daphnia magna* při nižších koncentracích MC-LR, ale naopak klesla při koncentracích vyšších. Gustafsson a kol. (2005) uvádí, že při koncentraci microcystinů $0,73-1,37 \mu\text{g.l}^{-1}$ (což přibližně odpovídá mnou dávkované koncentraci C_1) měla *Daphnia magna* menší fitness než kontroly. Sinice druhu *Microcystis aeruginosa* tak ovlivňovala reprodukční a růstové parametry perloočky druhu *Daphnia magna* negativně. Bylo zjištěno, že exponovaným jedincům se postupně velikost snůšek zvětšovala (Gustafsson a kol. 2005), což by korespondovalo s postupným zvětšováním snůšek v průběhu tří generací studie mé práce, čehož bylo pozorováno i v porovnání druhu *Daphnia magna* v rámci studia diapauzujících vajíček odebraných z vrstev sedimentu uložených v průběhu různých fází eutrofizace jezera Constance Hairstonem a kol. (1999). I v tomto případě byla zjištěna narůstající resistance druhu *Daphnia magna* vůči přítomnosti sinice druhu *Microcystis aeruginosa* během eutrofizačního procesu. Populace druhu *Daphnia magna* vyvíjela zvýšenou schopnost vyrovnat se s potravou obsahující sinice. Byla zkoumána široká škála genotypu perlooček rodu *Daphnia* a snižování jejich rychlosti růstu v jezeře v letech 1962-1964 a 1969-1971. Přitom genotypy, které byly nejvíce zasaženy přítomností a požíráním sinic, byly během deseti let pokračujícího letního působení sinicového květu dokonce eliminovány.

Lemaire a kol. (2012) navrhli experiment, který kvantifikoval, do jaké míry je v interakci genotyp *Microcystis* závislý na genotypu rodu *Daphnia* a naopak. Tyto interakce závislé na genotypu by vysvětlovaly, proč se v některých studiích jedinci rodu *Daphnia* zdají být schopni ovlivňovat sinici rodu *Microcystis*, zatímco v jiných studiích je pozorován opak. Wilson a kol. (2006) rovněž dospěli k závěru, že toxicita vyvolaná sinicí působící na rychlost

růstu a přežití perlooček je silně závislá na rodu přítomné sinice a zooplanktonu více než na přítomnosti či absenci samotných microcystinů. Lemaire a kol. (2012) testovali postupně všechny možné dvojice sestavené z 10 klonů druhu *Daphnia magna* a 10 klonů druhu *Microcystis* sp. různých genotypů. Odhalili, že na interakcích mezi konkrétními genotypy záleží. Statistické testy přitom naznačily, že interakci výrazněji řídí genotyp perlooček (Lemaire a kol. 2012). Tyto výsledky korespondují s předchozími studiemi genetické rozdílnosti daných klonů (Nizan a kol. 1986, Czarnecki a kol. 2006, Gustafsson a kol. 2005, Sarnelle a Wilson 2005, Wilson a kol. 2006).

Zaměříme-li se na výsledky mé práce z hlediska klonů druhu *Daphnia magna* a jejich reakcí na různé proměnné, je možné konstatovat, že v chování jednotlivých klonů byly nalezeny signifikantní rozdíly – v úmrtnosti, v době do 2. snůšky i ve velikosti 2. snůšky. Po vystavení klonů toxicitě v 1. generaci reagoval každý klon na koncentrace sinicové směsi jiným způsobem, vyjma úmrtnosti, která byla signifikantně závislá na nejvyšší koncentraci C₃. Dále pak se klony H₂ a H₆ od sebe prokazatelně lišily nejen v době do 2. snůšky, ale i velikostí 2. snůšky v následujících generacích. Klon H₂ měl signifikantně kratší dobu do 2. snůšky než klon H₆ a zároveň větší 2. snůšku (klon H₂ neměl předchozí zkušenost s přítomností sinice druhu *M. aeruginosa*, klon H₆ tuto zkušenost měl). Meziklonální variabilita zjištěná v mé studii podtrhuje důležitost podrobnějšího zkoumání této problematiky, jelikož mnoho ekotoxikologických studií po celém světě je vystavěno na srovnávání poznatků z experimentů, u nichž nebyl brán zřetel na klon využívaného ekotoxikologického indikátoru druhu *D. magna*. Je tedy možné, že je porovnáváno neporovnatelné.

Skupina klonů H₂, H₄ a H₅, které neměly předchozí zkušenost se sinicí *M. aeruginosa*, se od zbylé skupiny klonů během studie nikterak výrazně nelišily, této zkušenosti se sinicí proto v mé studii není připisován vliv na perloočku druhu *D. magna*.



7. Praktický význam výsledků práce

Ještě nyní nejsou v Evropě jasně stanovené regule zohledňující výskyt cyanotoxinů, nicméně Evropská rámcová směrnice o vodě (2000/60/EC) již charakterizuje znečišťující látky ve vodě. Sinice produkující toxiny byly speciálně zmíněny jakožto hlavní potenciálně nebezpečné znečišťující látky. Škodlivý potenciál toxinů produkujících sinic pro obyvatelstvo je dnes již zřejmý (Hoeger a kol. 2005).

V roce 2002 polské ministerstvo zdravotnictví zahrnuje microcystinový limit do své legislativy, stalo se tak prvním evropským státem, který tomu tak učinil spolu s dalšími 4 státy na světě (Austrálie, Nový Zéland, Kanada a Brazílie). Dnes již toto opatření zavedly i další státy v Evropě, mezi něž patří i Česká republika, Španělsko, Francie a Itálie (Jurczak a kol. 2005). V mnoha státech EU už je tento limit implementován do legislativy, ovšem v některých státech, kupříkladu ve Španělsku, není množství microcystinu v pitné vodě kontrolováno či není kontrolováno všude – ve Španělsku je kontrolováno jen ve městech (Hernández a kol. 2009).

Způsobů opatření proti pronikání microcystinů do pitné vody je několik. V roce 2003 se kupříkladu polská správa úpravny vod v reakci na naměření $6,7 \mu\text{g.l}^{-1}$ v nádrži rozhodla zvýšit podíl podzemních vod v úpravně vody na pitnou (Jurczak a kol. 2005). **Má studie koagulačního procesu podpořila problematiku odstraňování microcystinů při běžné úpravě vody a poukázala na naléhavou potřebu jejího řešení**, jelikož poskytování nezávadné pitné vody lidské populaci je jedním z nejdůležitějších úkolů v oblasti veřejného zdraví a v budoucnosti lze předpokládat další růst jeho významu (Hitzfeld a kol. 2000).

Microcystin-LR je nejstudovanějším sinicovým toxinem, leč informace o jiných formách tohoto toxinu do značné míry chybí (Hitzfeld a kol. 2000). Vzhledem ke stále častěji se vyskytujícím sinicovým květům v mnoha vnitrozemských vodních nádržích, pomalu tekoucích vodách a mělkých příbřežních mořích a vzhledem k nesnadnému odstraňování těchto látek i v rámci mé studie **vyvstává potřeba rozšíření a konkretizování limitů přípustného množství microcystinů v pitné vodě na další formy a další metabolické látky sinic**.

Nelze také opominout aspekt rozdílnosti jednotlivých klonů v rámci jednoho druhu jakožto **podnět důležitý k dalšímu testování**. Druh *Daphnia magna* je jedním z nejvyužívanějších indikátorů v ekotoxikologických studiích po celém světě. **A vzhledem k nalezeným signifikantním meziklonálním rozdílům je srovnávání ekotoxikologických studií při nejmenším zpochybnitelné**.

8. Závěr

V rámci mé diplomové práce jsem experimentálně zjišťovala, zda je možné odstranit látky produkované sinicovým květem prostřednictvím běžného procesu úpravy vody – koagulace. Souběžně s tímto byly provedeny ekotoxikologické testy s využitím nejběžnějšího indikátoru, druhu *Daphnia magna*. Důležitým aspektem mé studie byla snaha o zachování co nejkompexnějších podmínek *in vivo* prostřednictvím dávkování sinicové směsi odebrané z přírody klonům druhu *Daphnia magna*, které byly rovněž získány z přírodního prostředí a které navykly laboratorním podmínkám, podobně jak tomu bylo v některých předešlých studiích (Lemaire a kol. 2012, Smutná a kol. 2014, Dao a kol. 2010).

Díličními otázkami mé práce byly:

- (1) S jakou účinností je při úpravě vody proces koagulace schopen vyvázat zkoumané formy microcystinu?
- (2) Bude se lišit chování druhu *Daphnia magna* v rámci různých koncentrací sinicové směsi po vystavení chronické toxicitě?
- (3) Reagují odlišně jednotlivé klony téhož druhu?
- (4) Hraje roli předchozí zkušenost s přítomností sinice druhu *Microcystis aeruginosa* u jednotlivých klonů?

Z provedených testů vyplývá:

- (1) Prostřednictvím procesu koagulace bylo s nulovou účinností odstraňováno analyzovaných forem microcystinu z vody obsahující sinicový květ s dominantním druhem *M. aeruginosa*. Tudíž byla vyvrácena i počáteční hypotéza, že procesem koagulace bude odstraňováno přinejmenším 50 % sledovaných forem microcystinu. Mé výsledky by naopak mohly podporovat hypotézu, že v oblasti nejvyšší vazebné kapacity Fe peptidů/proteinů (pH = 6,2) je proces koagulace inhibován vznikem Fe-peptidových/proteinových komplexů (Pivokonský a kol. 2012). Lze tak konstatovat, že při aplikaci koagulace jakožto jediného procesu úpravy vody by mohlo být odstraňování obsažených microcystinů neúčinné.
- (2) Pro statistické zpracování úmrtnosti v rámci akutní toxicity, tj. uhynutí jedinců v rámci 48 hodin expozice daným toxickým látkám, nebyl soubor dat dostatečně velký, neboť jedinci do dvou dnů téměř nehynuli. Je možné, že i nejvyšší dávkovaná koncentrace v experimentu (24,0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) byla ve skutečnosti příliš nízká na dosažení efektu úmrtnosti v důsledku akutní toxicity, což dokládá i studie Ortiz-Rodríguez a Wieganda (2010)

na shodných organech, leč při koncentraci $100 \mu\text{g.l}^{-1}$, kterážto se také v přírodních podmínkách může vyskytovat při kulminaci sinicového květu (Bláha a kol. 2010). Přítomnost sinicové směsi v různých koncentracích se projevila jak na úmrtnosti, tak na ostatních studovaných projevech jedinců druhu *D. magna*.

Po vystavení 1. generaci toxicitě dávkovaného sinicového květu se v průběhu následujících generací prodlužovala délka cyklu i zvětšovala velikost snůšek, což je přičítáno postupné aklimatizaci a přizpůsobení se přítomnosti toxického sinicového květu, nehledě na možnou existenci maternálního efektu, který tomuto přizpůsobení napomáhá z hlediska předávání informací mateřského jedince svým potomkům. Svou roli hrála i závislost studovaných projevů na koncentraci dávkovaných sinicových směsí, přičemž se s narůstající koncentrací zkracovala délka cyklu a snižoval se počet neonat v 1. a 2. snůšce, tudíž lze konstatovat, že studované projevy chronické toxicity byly na koncentracích microcystinu závislé.

Se zvyšující se koncentrací rostl negativní účinek na sledované organismy. Tento výsledek by však bylo vhodné podpořit dalšími studii čítajícími větší počet jedinců. Zároveň by mohlo být zajímavé zahájit studii na generacích klonů druhu *D. magna* ještě před jejich vystavením toxickým účinkům sinicové směsi. Samotné porovnání projevů jednotlivých klonů v netoxickém prostředí a v ekotoxikologické studii by mohlo přinést zajímavé osvětlení účinků akutní toxicity na jednotlivé klony.

- (3) Meziklonální variabilita zaznamenána byla. Projevila se především v úmrtnosti ve 2. generaci, v rámci které již mohl hrát roli maternální efekt, který mohl mít na každý klon odlišně silný vliv. Signifikantní rozdíl byl také zaznamenán v době do 2. snůšky a ve velikosti 2. snůšky v rámci 2. a 3. generace, přičemž klon H₆ měl signifikantně delší dobu do 2. snůšky a menší snůšky než klon H₂. Podpořila jsem tudíž počáteční hypotézu, že se jednotlivé klony v projevech budou lišit. Otázkou tedy stále zůstává: je vůbec možné porovnávat výsledky ekotoxikologických studií využívající různé klony, na něž není brán zřetel? Liší-li se jednotlivé klony, neliší se tedy i výsledky mnoha studií?
- (4) V průběhu celého experimentu nebyla zaznamenána signifikantní závislost projevu klonů na předchozí zkušenosti s přítomností sinice druhu *M. aeruginosa*. Počáteční hypotéza, že v rozdílnosti klonů bude hrát tato zkušenost roli, tedy nebyla v rámci mé studie podpořena. Neznamena to však, že neprojevila-li se v mé studii zmíněná závislost, že není. Naopak. Jen nemusí být silná, leč v přírodě může hrát svou roli.

9. Seznam zkratek

AOM – *algal organic matter* – organické látky produkované fytoplanktonem

BBM - *Bold-basal/Bristol medium* – živný roztok pro pěstování řas

COM – *cellular organic matter* – celulární organické látky, které se do vodního prostředí dostávají především odumíráním buněk sinic a řas

DOC – *dissolved organic carbon* – množství rozpuštěného organického uhlíku

EOM – *extracellular organic matter* – extracelulární organické látky, které se do vody dostávají především cestou metabolické činnosti sinic a řas

KNK – kyselinová neutralizační kapacita

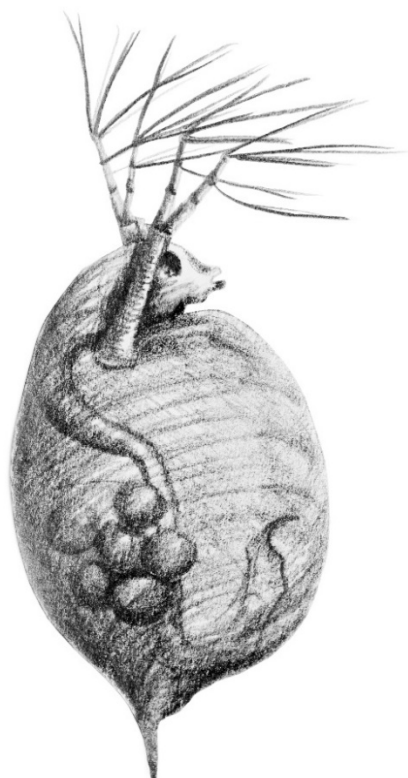
KNK_{4,5} – KNK titrována methyloranží až do hodnoty pH = 4,5

MC – obecná zkratka pro toxin microcystin

NOM – *natural organic matter* – přírodní organické látky

TOC – *total organic carbon* – celkové množství organického uhlíku ve vzorku

TDI - *tolerable daily intake* – tolerovaný denní příjem



10. Seznam literatury

- Abe, T., Lawson, T., Weyers, J. D. B., Codd, G. (1996): Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytologist* 133: 651-658.
- Arzate-Cardenas, M. A., Overa-Ramirez, R., Martinez-Jeronimo, F. (2010): *Microcystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Ecotoxicology* 19: 1157-1165.
- Babica, P., Maršálek, B., Bláha, L. (2005): Microcystiny – cyklické heptapeptidy sinic. *Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny* (www.sinice.cz/res/file/popular/microcystiny.pdf).
- Babica, P., Bláha, L., Maršálek, B. (2006): Exploring the natural role of microcystins - a review of effects on photoautotrophic organisms. *Journal of Phycology* 42: 9-20.
- Babica, P., Hilscherová, K., Bártová, K., Bláha, L., Maršálek, B. (2007): Effects of dissolved microcystins on growth of planktonic photoautotrophs. *Phycologia* 46: 137-142.
- Bernardová, K., Babica, P., Maršálek, B., Bláha, L. (2008): Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green alga. *Journal of Applied Toxicology* 28: 72-77.
- Best, J. H., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Eddy, F. B., Metcalf, J. S., Codd, G. A. (2002): Effects of enterobacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 60: 223-231.
- Bischoff, H. W., Bold, H. C. (1963): Phycological Studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *University of Texas Press* 6318: 1-95.
- Bláha, L., Bláhová, L., Kohoutek, J., Adamovský, O., Babica, P., Maršálek, B. (2010): Temporal and spatial variability of cyanobacterial toxins microcystins in three interconnected freshwater reservoirs. *Journal of the Serbian Chemical Society* 75(9): 1303-1312.
- Bláha, L., Maršálek, B. (2003): Contamination of drinking water in the Czech Republic by microcystins. *Archiv für Hydrobiologie*, 158(3): 421-429.
- Bláhová, L., Babica, P., Maršálková, E., Maršálek, B., Bláha, L. (2007): Concentrations and Seasonal Trends of Extracellular Microcystins in Freshwaters of the Czech Republic – Results of the National Monitoring Program. *Clean* 35(4): 348-354.
- Brett, M., Müller-Navarra, D. (1997): The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology* 38: 483-499.
- Campinas, M., Rosa, M. J. (2010): Evaluation of cyanobacterial cells removal and lysis by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology* 70: 345-353.

- Codd, G., Metcalf, J. S., Beattie, K. A. (1999): Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 37: 1181-1185.
- Codd, G. A. (2000): Cyanobacterial toxin, the perception of water quality, and the prioritisation in eutrophication control. *Ecological Engineering* 16: 51-60.
- de la Cruz, A. A., Antoniou, M. G., Hiskia, A., Pelaez, M., Song, W., O'Shea, K. E., He, X., Dionysiou, D. D. (2011): Can ee effectively degrade microcystins? – Implications on Human Health. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 11: 19-37.
- Crawley, M. J. (2007): The R book. Wiley: 949 str.
- Czarnecki, O., Henning, M., Lippert, I., Welker, M. (2006): Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (Cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity in planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). *Environmental Microbiology* 8: 77-87.
- Dao, T. S., Do-Hong, L.-C., Wiegand, C. (2010): Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. *Toxicon* 55: 1244-1254.
- Dejenie, T., Asmelash, T., Rousseaux, S., Gebregiorgis, T., Gebrekidan, A., Teferi, M., Nyssen, J., Deckers, J., van der Gucht, K., Vyverman, W., de Meester, L., Derlerck, S. A. J. (2009): Impact of the fish Garra on the ecology of reservoirs and the occurrence of *Microcystis* blooms in semi-arid tropical highlands: an experimental assessment using enclosures. *Freshwater Biology* 54: 1605-1615.
- DeMott, W. R., Zhang, Q.-X., Carmichael, W. W. (1991): Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 36(7): 1346-1357.
- DeMott, W. R. (2003): Implications of element deficits for zooplankton growth. *Hydrobiologia* 491: 177-184.
- Dietrich, D. R., Hoeger, S. J. (2005): Guidance values for microcystin in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algae supplements): a reasonable or misguided approach? *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 273-289.
- Dixon, M. B., Richard, Y., Ho, L., Chow, C. W. K., O'Neill, B. K., Newcombe, G. (2011): A coagulation-powdered activated carbon-ultrafiltration - Multiple barrier approach for removing toxins from two Australian cyanobacterial blooms. *Journal of Hazardous Materials* 186: 1553-1559.
- von Elert, E., Martin-Creuzburg, D., Le Coz, J. R. (2003): Absence of sterols constrains carbon transfer between cyanobacteria and a freshwater herbivore (*Daphnia galeata*). *Proceedings of the Royal Society of London, Series B – Biological Sciences* 270: 1209-1214.

- El Semary, N. A. (2010): Modern Methods for Detection and Elimination of Microcystins Toxins Produced by Cyanobacteria: Mini-review. *Journal of Applied Sciences* 10(15): 1662-1666.
- Ferrão-Filho, A. S., Soares, M. C. S., Magalhães, V. F., Azevedo, S. M. F. O. (2009): Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 479-489.
- Ferrão-Filho, A. S., Suzuki, B. K., Azevedo, S. M. F. O. (2002): Accumulation of microcystins by a tropical zooplankton Community. *Aquatic Toxicology* 59: 201–208.
- Gérard, C., Poullain, V., Lance, E., Acou, A., Brient, L., Carpentier, A. (2009): Influence of toxic cyanobacteria on community structure and microcystin accumulation of freshwater molluscs. *Environmental Pollution* 157(2): 609-617.
- Ghadouani, A., Pinel-Alloul, B., Prepas, E. E. (2003): Effects of experimentally induced cyanobacterial blooms on crustacean zooplankton communities. *Freshwater Biology* 48: 363-381.
- Gilroy, D. J., Kauffman, K. W., Hall, R. A., Huang, X., Chu, F. S. (2000): Assessing Potential Health Risks from Microcystin Toxins in Blue-Green Algae Dietary Supplements. *Environmental Health Perspectives* 108: 439-439.
- Goel, S., Hozalski, R. M., Bouwer, E. J. (1995): Biodegradation of NOM: effect of NOM source and ozone dose. *American Water Works Association*: 90-105.
- Gulati, R. D., Pires, L. M. D., van Donk, E. (2008): Lake restoration studies: failures, bottlenecks and prospects of new ecotechnological measures. *Limnologica* 38: 233-247.
- Gustafsson, S., Hansson, A. (2004): Development of tolerance against toxic cyanobacteria in *Daphnia*. *Aquatic Ecology* 38: 37-44.
- Gustafsson, S., Rengefors, K., Hansson, L.-A. (2005): Increased consumer fitness following transfer of toxin tolerance to offspring via maternal effects. *Ecology* 86(10): 2561-2567.
- Hairston, N. G., Lampert, W., Cáceres, C. E., Holtmeier, C. L., Weider, L. J., Gaedke, U., Fischer, J. M., Fox, J. A., Post, D. M (1999): Rapid evolution revealed by dormant eggs. *Nature* 401: 446.
- Hairston, N. G., Jr, Holtmeier, C. L., Lampert, W. (2001): Natural selection for grazer resistance to toxic cyanobacteria: evolution of phenotypic plasticity? *Evolution* 55: 2203-2214.
- Hernández, J. M., López-Rodas, V., Costas, E. (2009): Microcystins from tap water could be a risk factor for liver and colorectal cancer: A risk intensified by global change. *Medical Hypotheses* 72: 539-540.
- Hitzfeld, B. C., Hoger, S. J., Dietrich, D. R. (2000): Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment and human risk assessment. *Environmental Health Perspectives* 108: 113-122.

- Hoeger, S. J., Hitzfeld, B. C., Dietrich, D. R. (2004): Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon* 43: 639-649.
- Hoeger, S. J., Hitzfeld, B. C., Dietrich, D. R. (2005): Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 231-242.
- Horáková, M., Janda, V., Koller, J., Kollerová, L., Palatý, J., Koubíková, J., Pokorná, D., Ptáková, H., Schejbal, P., Smrčková, Š., Strnadová, N., Sýkora, V. (2003): Analytika vody. VŠCHT v Praze: 335 str.
- Hrudey, S., Burch, M., Drikas, M., Gregory, R. (1999): Remedial measures. Chapter 9 In: Chorus, I., Bartram, J., Burch, M., Drikas, M. (eds.): Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization: 417 str.
- Hulot, F. D., Carmignac, D., Legendre, S., Yéprémian, C., Bernard, C. (2012): Effects of microcystin-producing and microcystin-free strains of *Planktothrix agardhii* on long-term population dynamics of *Daphnia magna*. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 48: 337-347.
- Chen, W, Song, L., Ou, D., Gan, N. (2005): Chronic toxicity and responses of several important enzymes in *Daphnia magna* on exposures to sublethal microcystin-LR. *Environmental Toxicology* 20: 323-330.
- Chorus, I., Bartram, J. (1999): Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management. World Health Organization: 417 str.
- Chorus, I. (2011): Cyanotoxins – Occurrence, Causes, Consequences. Springer: 357 str.
- Christoffersen, K., Riemann, B., Klyser, A., Søndergaard, M. (1993): Potential role of fish predation and natural populations of zooplankton in structuring a plankton community in eutrophic lake water. *Limnology and Oceanography* 38: 561-573.
- Jang, M. H., Ha, K., Takamura, N. (2008): Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* exposed to different stages of herbivorous zooplankton. *Toxicon* 51(5): 882-889.
- Jeppesen, E., Meerhoff, M., Jacobsen, B., Hansen, R., Søndergaard, M., Jensen, J., Lauridsen, T., Mazzeo, N., Branco, C. W. C. (2007): Restoration of shallow lakes by nutrient control and biomanipulation – the successful strategy varies with lake size and climate. *Hydrobiologia* 581: 269-285.
- Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E. M., Antunes, M. B. C., de Melo Filho, D. A., Lyra, T. M., Barreto, V. S. T., Azevedo, S. M. F. O., Jarvis, W. R. (1998): Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine* 13(338): 873-878.

- Jurczak, T., Tarczynska, M., Izydorczyk, K., Mankiewicz, J., Zalewski, M., Meriluoto, J. (2005): Elimination of microcystins by water treatment processes-examples from Sulejow Reservoir, Poland. *Water Research* 39: 2394-2406.
- Kaebnick, M., Rohrlack, T., Christoffersen, K., Neilan, B. A. (2001): A spontaneous mutant of microcystin biosynthesis: genetic characterization and effect on *Daphnia*. *Environmental Microbiology* 3: 669-679.
- Kim, J.-H., Yoon, B.-D., Oh, H.-M. (2003): Rapid bioassay for microcystin toxicity based on feeding activity of *Daphnia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicity* 70: 861-867.
- Koski, M., Engström, J., Viitasalo, M. (1999): Reproduction and survival of the calanoid copepod *Eurytemora affinis* fed with toxic and non-toxic cyanobacteria. *Marine Ecology Progress Series* 186: 187-197.
- Kotak, B. G., Zurawell, R. W., Prepas, E. E., Holmes, C. F. B. (1996): Microcystin-LR concentration in aquatic food web compartments from lakes of varying trophic status. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53(9): 1974-1985.
- Kurmayer, R., Jüttner, F. (1999): Strategies for the co-existence of zooplankton with the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* in Lake Zurich. *Journal of Plankton Research* 21: 659-683.
- Kurmayer, R., Christiansen, G., Chorus, I. (2003): The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 787-795.
- Lambert, T. W., Holmes, C. F. B., Hrudehy, S. E. (1996): Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Research* 30: 1411-1422.
- LaMontagne, J. M., McCauley, E. (2001): Maternal effects in *Daphnia*: what mothers are telling their offspring and do they listen? *Ecology Letters* 4: 64-71.
- Lampert, W., Trubetskova, I. (1996): Juvenile growth rate as measure of fitness in *Daphnia*. *Functional Ecology* 10: 631-635.
- Lawton, L. A., Edwards, C. (2001): Purification of microcystins – review. *Journal of Chromatography A* 912: 191-209.
- Leenheer, J. A., Croue, J. P. (2003): Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology* 37(1): 19A-26A.
- Lemes, G. A. F., Krsanach, R., Pinto, L. S., Dellagostin, O. A., Yunes, J. S., Matthiensen, A. (2008): Biodegradation of microcystins by aquatic *Burkholderia* sp. from a South Brazilian coastal lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69: 358-365.

- Lindsay, J., Metcalf, J. S., Codd, G. A. (2006): Protection against the toxicity of microcystin-LR and cylindrospermopsin in *Artemia salina* and *Daphnia* spp. by pre-treatment with cyanobacterial lipopolysaccharide (LPS). *Toxicon* 48: 995-1001.
- Liping, L., Kang, L., Taoying, C., Xilin, D., Min, J., James, S. D. (2011): Effects of *Microcystis aeruginosa* on life history of water flea *Daphnia magna*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 29(4): 892-897.
- Lürling, M. (2003): Effects of Microcystin-Free and Microcystin-Containing Strains of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on Growth of the grazer *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology* 18 (3): 202-210.
- Lürling, M., Beekman, W. (2006): Growth of *Daphnia magna* males and females fed with the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and the green alga *Scenedesmus obliquus* in different proportions. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 34: 375-382.
- MacKintosh, C., Beattie, K., Klumpp, S., Cohen, C., Codd, G. A. (1990): Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264: 187-192.
- Magalhães, V. F., Marinho, M. M., Domingos, P., Oliveira, A. C., Azevedo, M. T., Azevedo, S. M. (2003): Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ). *Toxicon* 42(3): 285-295.
- Mankiewicz, J., Komárková, J., Izydoczyk, K., Juczak, T., Tarczynska, M., Zalewski, M. (2005): Hepatotoxic Cyanobacterial Blooms in the Lakes of Northern Poland. *Environmental Toxicology* 20(5): 499-506.
- Martin-Creuzburg, D., von Elert, E., Hoffmann, K. H. (2008): Nutritional constraints at the cyanobacteria-*Daphnia magna* interface: the role of sterols. *Limnology and Oceanography* 53: 456-468.
- Martins, J., Teles, L. O., Vasconcelos, V. (2007): Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International* 33(3): 414-425.
- Maruyama, T., Park, H. D., Ozawa, K., Tanaka, Y., Sumino, T., Hamana, K., Hiraishi, A., Kato, K. (2006): *Sphingosinicella microcystinivorans* a microcystin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 85-89.
- McElhiney, J., Lawton, L. A., Leifert, C. (2001): Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. *Toxicon* 39: 1411-1420.
- Meriluoto, J., Codd, G. A. (2005): Toxic - Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. Åbo Akademi University Press: 150 str.

- Mikhailov, A., Harmala-Brasken, A. S., Hellman, J., Meriluoto, J. A. O., Eriksson, J. E. (2003): Identification of ATP-synthetase as a novel intracellular target for microcystin-LR. *Chemico-Biological Interactions* 142: 223-237.
- Mohamed, Z. A. (2008): Toxic cyanobacteria and cyanotoxins in public hot springs in Saudi Arabia. *Toxicon* 51(1): 17-27.
- Mousseau, T. A., Fox, C. W. (1998): The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 403–407.
- Newcombe, G., Drikas, M. (1997): Adsorption of NOM onto activated carbon: electrostatic and non-electrostatic effects. *Carbon* 35: 1239-1250.
- Nizan, S., Dimentman, C., Shilo, M. (1986): Acute toxic effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography* 31: 497-502.
- Nováková, K., Bláha, L., Babica, P. (2012): Tumor promoting effects of cyanobacterial extracts are potentiated by anthropogenic contaminants-evidence from in vitro study. *Chemosphere* 89: 30-37.
- OECD (1984): *Daphnia* sp., acute immobilisation test and reproduction test. No. 202. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals. *Organisation for Economic Cooperation and Development*, Paris: 14 str.
- Okano, K., Shimizu, K., Kawauchi, Y., Maseda, H., Utsumi, M. Zhang, Z., Neilan, B. A., Sugiura, N. (2009): Characteristics of a microcystin-degrading bacterium under alkaline environmental conditions. *Journal of Toxicology*: 1-8.
- Orr, P. T., Jones, G. J., Hunter, R. A., Berger, K. (2003): Exposure of beef cattle to sub-clinical doses of *Microcystis aeruginosa*: toxin bioaccumulation, physiological effects and human health risk assessment. *Toxicon* 41(5): 613-620.
- Ortiz-Rodríguez, R., Wiegand, C. (2010): Age related acute effects of microcystin-LR on *Daphnia magna* biotransformation and oxidative stress. *Toxicon* 56: 1342-1349.
- Palíková, M., Krejčí, R., Hilscherová, K., Babica, P., Navrátil, S., Kopp, R., Bláha, L. (2007): Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* 81: 312–318.
- Peretyatko, A., Teissier, S., de Backer, S., Triest, L. (2012): Biomanipulation of hypereutrophic ponds: when it works and why it fails. *Environmental Monitoring and Assessment* 184: 1517–1531.
- Pires, L. M., Sarpe, D., Brehm, M., Ibelings, B. W. (2011): Potential synergistic effects of microcystins and bacterial lipopolysaccharides on life history traits of *Daphnia galeata* raised on low and high food levels. *Aquatic Toxicology* 104: 230-242.
- Pitter, P. (2009): Hydrochemie. VŠCHT Praha: 579 str.

- Pivokonský, M., Klouček, O., Pivokonská, L. (2006): Evaluation of the production, composition and aluminium and iron complexation of algogenic organic matter. *Water Research* 40(16): 3045-3052.
- Pivokonský, M., Pivokonská, L., Bäumeltová, J., Bubáková, P. (2009): The effect of cellular organic matter produced by cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* on water purification. *Journal of Hydrology and Hydromechanics* 57: 121-129.
- Pivokonský, M., Bubáková, P., Pivokonská, L., Knesl, B. (2011): Tvorba suspenze při úpravě vody. Medim, spol. s r.o.: 218 str.
- Pivokonský, M., Šafaříková, J., Bubáková, P., Pivokonská, L. (2012): Coagulation of peptides and proteins produced by *Microcystis aeruginosa*: Interaction mechanisms and the effect of Fe-peptide/protein complexes formation. *Water Research* 46: 5583-5590.
- Puddick, J. (2013): Spectroscopic Investigations of Oligopeptides from Aquatic Cyanobacteria - Characterisation of New Oligopeptides, Development of Microcystin Quantification Tools and Investigations into Microcystin Production. The University of Waikato: 283 str.
- R Core Team (2013): R: a language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rebhun, M., Lurie, M. (1993): Control of organic matter by coagulation and floc separation. *Water Science and Technology* 27: 1-20.
- Reinikainen, M., Meriluoto, J. A. O., Spoof, L., Harada, K.-I. (2001): The toxicities of a polyunsaturated fatty acid and a microcystin to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicity* 16: 444-448.
- Ressom, R., San Soong, F., Fitzgerald, J., Turczynowicz, L., El Saadi, O., Roder, D., Maynard, T., Falconer, I. (1994): Health effects of toxic cyanobacteria (blue-green algae). *National Health and Medical Council, Australian Government Publishing Service, Canberra*, ISBN 0644329084.
- Riessen, H. P. (2011): Costs of predator-induced morphological defense in *Daphnia*. *Freshwater Biology*: 1-38.
- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Hansen, P. E., Zhang, W., Czarnecki, O., Henning, M., Fastner, J., Erhard, M., Neilan, B. A., Kaebernick, M. (2003): Isolation, characterization, and quantitative analysis of microviridin J, a new *Microcystis* metabolite toxic to *Daphnia*. *Journal of Chemical Ecology* 29: 1757-1769.
- Rohrlack, T., Christoffersen, K., Dittmann, E., Nogueira, I., Vasconcelos, V., Börner, T. (2005): Ingestion of microcystins by *Daphnia*: intestinal uptake and toxic effects. *Limnology and Oceanography* 50: 440-448.

- Rousseaux, S. (2011): The importance of genetic diversity and evolution in metacommunities. Disertační práce na KU Leuven, Belgie: 240 str.
- Sarnelle, O., Wilson, A. E. (2005): Local adaptation of *Daphnia pulicaria* to toxic cyanobacteria. *Limnology and Oceanography* 50: 1565-1570.
- Sarnelle, O., Gustafsson, S., Hansson, L.-A. (2010): Effects of cyanobacteria on fitness components of the herbivore *Daphnia*. *Journal of Plankton Research* 32(4): 471-477.
- Shams, S., Cerasino, L., Salmaso, N., Dietrich, D. R. (2014): Experimental models of microcystin accumulation in *Daphnia magna* grazing on *Planktothrix rubescens*: Implications for water management. *Aquatic Toxicology* 148: 9-15.
- Shen, P. P., Shi, Q., Hua, Z. C., Kong, F. X., Wang, Z. G., Zhuang, S. X., Chen, D. C. (2003): Analysis of microcystins in cyanobacteria blooms and surface water samples from Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Environment International* 29(5): 641-647.
- Schwarzenberger, A., Zitt, A., Kroth, P., Mueller, S., von Elert, E. (2010): Gene expression and activity of digestive proteases in *Daphnia*: effects of cyanobacterial protease inhibitors. *BMC Physiology* 10: 6-20.
- Smutná, M., Babica, P., Jarque, S., Hilscherová, K., Maršálek, B., Haeba, M., Bláha, L. (2014): Acute, chronic and reproductive toxicity of complex cyanobacterial blooms in *Daphnia magna* and the role of microcystins. *Toxicon* 79: 11-18.
- Sokol, J. (2007): Malá filosofie člověka a Slovník filosofických pojmů. Vyšehrad, Praha: 411 str.
- Sychrová, E., Štěpánková, T., Nováková, K., Bláha, L., Giesy, J. P., Hilscherová, K. (2012): Estrogenic activity in extracts and exudates of cyanobacteria and green algae. *Environment International* 39: 134-140.
- Štěpánková, T., Ambrožová, L., Bláha, L., Giesy, J. P., Hilscherová, K. (2011): In vitro modulation of intracellular receptor signalling and cytotoxicity induced by extracts of cyanobacteria, complex water blooms and their fractions. *Aquatic Toxicology* 105: 497-507.
- Takaara, T., Sano, D., Konno, H., Omura, T. (2007): Cellular proteins of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminium chloride. *Water Research* 41: 1653-1658.
- Tarczynska, M., Nalecz-Jawecki, G., Romanowska-Duda, Z., Sawicki, J., Beattie, K., Codd, G., Zalewski, M. (2001): Tests for the toxicity assessment of cyanobacterial bloom samples. *Environmental Toxicology* 16: 383-390.
- Tollrian, R. (1995): Predator-induced morphological defenses: costs, life history shifts, and maternal effects in *Daphnia pulex*. *Ecology* 76: 1691-1705.

- Tsuji, K., Naito, S., Kondo, F., Ishikawa, N., Watanabe, M. F., Suzuki, M., Harada, K.-I. (1995): Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerisation. *Environmental Science and Technology* 28: 173-177.
- van Gremberghe, I., Vanormelingen, P., Gucht, K., Mancheva, A., D'hondt, S., De Meester, L., Vyverman, W. (2009): Influence of *Daphnia* infochemicals on functional traits of *Microcystis* strains (Cyanobacteria). *Hydrobiologia* 635: 147-155.
- Vieira, J. M., Azevedo, M. T., Azevedo, S. M., Honda, R. Y., Corrêa, B. (2005): Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. *Toxicon* 45(7): 901-909.
- Villarroel, M. J., Sancho, E., Ferrando, M. D., Andreu, E. (2003): Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 53(8): 857-864.
- Watanabe, M. F., Harada, K.-I., Carmichael, W. W., Fujiki, H. (1995): Toxic Microcystis. CRC Press: 272 str.
- WHO (1998): Guidelines for drinking water quality. World Health Organization, Geneva: 281 str.
- WHO (2003): Guidelines for drinking water quality. World Health Organization, Geneva: 293 str.
- Wilson, A. E., Sarnelle, O., Neilan, B. A., Salmon, T. P., Gehringer, M. M., Hay, M. E. (2005): Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among lakes: implications for harmful algal blooms. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6126-6133.
- Wilson, A. E., Sarnelle, O., Tillmanns, A. R. (2006): Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: meta-analyses of laboratory experiments. *Limnology and Oceanography* 51: 1915-1924.
- Widrig, D. L., Gray, K. A., McAuliffe, K. S. (1996): Removal of algal-derived organic material by preozonation and coagulation: monitoring changes in organic quality by pyrolysis-GC-MS. *Water Research* 30: 2621-2632.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S. (2005): Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203: 201-218.
- Yang, Z., Xiang, F., Minter, E. J., Lu, K., Chen, Y., Montagnes, D. J. (2011): The interactive effects of microcystin and nitrite on life-history parameters of the cladoceran *Daphnia obtusa*. *Journal of Hazardous Materials* 190: 113-118.
- Yang, Z., Lu, K., Chen, Y., Montagnes, D. J. (2012): The Interactive Effects of Ammonia and Microcystin on Life-History Traits of the Cladoceran *Daphnia magna*: Synergistic or Antagonistic? *PLoS ONE* 7(3): e32285. Zalewski, M. (2000):

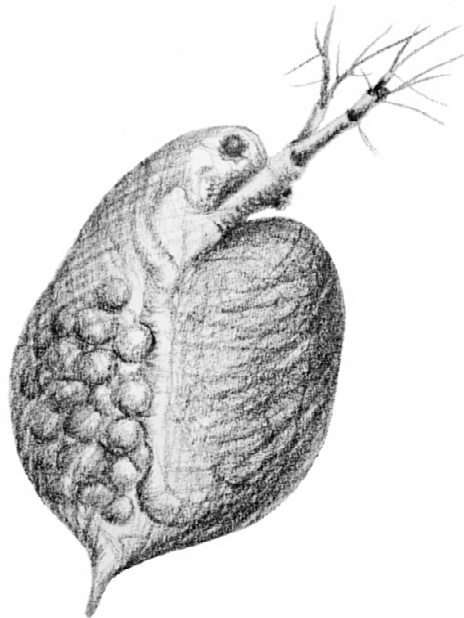
Ecohydrology – the scientific background to use ecosystem properties as management tools toward sustainability of water resources. *Ecological Engineering* 16: 1-8.

Zegura, B., Lah, T. T., Filipic, M. (2004): The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology* 200: 59-68.

Zhan, L., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Wu, D.-S., Zhang, L.-S., Suzuki, T., Hayashi, M., Honma, M. (2004): Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. Mutation Research. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 557: 1-6.

Zhang, X., Warming, T. P., Hu, H.-Y., Christoffersen, K. S. (2009): Life history responses of *Daphnia magna* feeding on toxic *Microcystis aeruginosa* alone and mixed with a mixotrophic *Poterioochromonas* species. *Water Research* 43: 5053-5062.

Zheng, L., Xie, P., Li, Y. L., Yang, H., Wang, S. B., Guo, N. C. (2004): Variation of intracellular and extracellular microcystins in a shallow, hypereutrophic subtropical Chinese lake with dense cyanobacterial blooms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 73: 698-706.



11. Seznam příloh

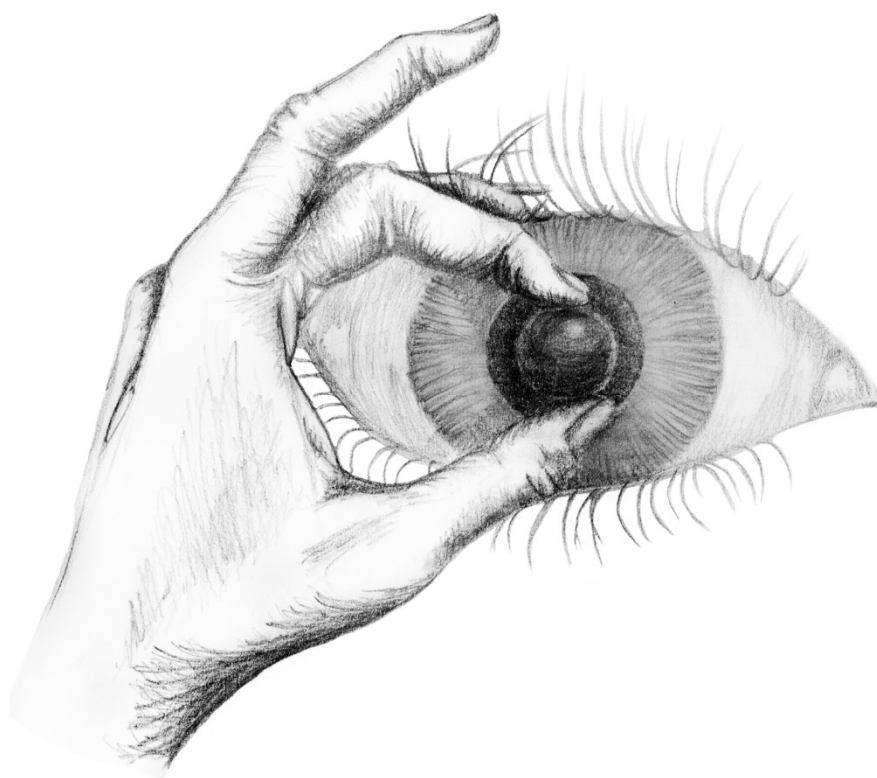
Příloha I – Příprava živného roztoku BBM

Příloha II – Sklenicové zkoušky – kalibrace obsahu Fe a stanovování KNK

Příloha III – Parametry koagulačního procesu

Příloha IV - Protokol o zkoušce, stanovení množství forem MC v sinicové směsi

Příloha V – Shrnutí statistického zpracování práce



Příloha I: Příprava živného roztoku BBM

Do velké Erlenmeyerovy baňky bylo odměřeno :

- 10 ml roztoku NaNO_3 (připraven 6,25 g NaNO_3 na 250 ml roztoku),
- 10 ml roztoku $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (připraven 1,25 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na 250 ml roztoku),
- 10 ml roztoku $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (připraven 1,875 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ na 250 ml roztoku),
- 10 ml roztoku K_2HPO_4 (připraven 1,875 g K_2HPO_4 na 250 ml roztoku),
- 10 ml roztoku NaCl (připraven 0,625 g NaCl na 250 ml roztoku),
- 10 ml roztoku KH_2PO_4 (připraven 4,375 g KH_2PO_4 na 250 ml roztoku),
- 1 ml roztoku $\text{EDTA} + \text{KOH}$ (připraven 5 g EDTA s 3,1 g KOH na 100 ml roztoku),
- 1 ml roztoku $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4$ (připraven 0,498 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ s 0,1 ml H_2SO_4 na 100 ml roztoku),
- 1 ml roztoku H_3BO_3 (připraven 1,142 g H_3BO_3 na 100 ml roztoku),
- 1 ml roztoku “mikroprvků” (připraven 0,882 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ s 0,144 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ s 0,0242 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ s 0,157 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,049 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na 100 ml roztoku)

a zalito destilovanou vodou po rysku 1 litru. Roztok byl promíchán a rozlit do sklenic. Prošel procesem klávování a po vychladnutí byl označen a přemístěn do lednice.

Příloha II: Sklenicové zkoušky – kalibrace obsahu Fe a stanovování KNK

Před standardizovaným provedením sklenicových zkoušek byla provedena kalibrace stanovení obsahu železa rhodanidem.

Byla využita následující činidla:

- peroxid vodíku (1,5 % H_2O_2) - 50 ml 30% H_2O_2 bylo zředěno destilovanou vodou na objem 1000 ml; roztok byl uchováván v tmavé láhvi po 2 měsíce,
- rhodanid (20 % KSCN) - 200g KSCN bylo rozpuštěno v 500ml destilované vody, po vytemperování na 20 °C byla doplněno destilovanou vodou na 1000ml; roztok byl uchováván v tmavé láhvi po 2 měsíce,
- koncentrovaná kyselina chlorovodíková (HCl),
- standardní kalibrační roztok Fe (1000 mg.l^{-1}) - komerčně dodávaný od firmy Analytika,
- kalibrační roztok I ($c_{\text{Fe}} = 10 \text{ mg.l}^{-1}$) – bylo odpipetováno 5 ml standardního kalibračního roztoku Fe (viz výše) do 500 ml odměrné baňky, doplněno po rysku destilovanou vodou a promícháno,
- kalibrační roztok II ($c_{\text{Fe}} = 1 \text{ mg.l}^{-1}$) – bylo odpipetováno 10 ml kalibračního roztoku I (viz výše) do 100 ml odměrné baňky, doplněno po rysku destilovanou vodou a promícháno,
- kontrolní roztoky Fe:
 - 2 a 5 mg.l^{-1} pro vyšší koncentrace Fe – připraveny ze standardizovaného kalibračního roztoku Fe (1000 mg.l^{-1}):
 - 2 mg.l^{-1} : odpipetováno 0,5 ml, doplněno do 250 ml destilovanou vodou
 - 5 mg.l^{-1} : odpipetováno 0,5 ml, doplněno do 100 ml destilovanou vodou
 - 0,2 a 0,5 mg.l^{-1} pro nižší koncentrace Fe – připraveny naředěním z kontrolních roztoků o koncentracích 2 a 5 mg.l^{-1} :
 - 0,2 mg.l^{-1} : odpipetováno 10 ml z kontrolního roztoku o koncentraci 2 mg.l^{-1} , doplněno do 100 ml destilovanou vodou,
 - 0,5 mg.l^{-1} : odpipetováno 10 ml kontrolního roztoku o koncentraci 5 mg.l^{-1} , doplněno do 100 ml destilovanou vodou.

Při kalibračním postupu byly do 25ml odměrných baněk pipetovány objemy pracovních kalibračních roztoků I a II (viz tabulka II-1 a II-2). Roztoky byly dále zpracovávány postupem stanovení obsahu železa (viz dále). S každou kalibrací byly měřeny slepé pokusy. Výsledkem kalibrace stanovení obsahu železa byla kalibrační přímka (viz obr. II-1) dle tabulek II-1 a II-2 pro nižší a vyšší koncentrace Fe zároveň.

Tabulka II-1: Dávkování kalibračního roztoku II pro nižší koncentrace železa.

Baňka	1	2	3	3	5	6
c_{Fe} [mg.l ⁻¹]	0,04	0,08	0,16	0,24	0,40	0,60
V_{II} [ml.25ml ⁻¹]	1	2	4	6	10	15

Tabulka II-2: Dávkování kalibračního roztoku I pro vyšší koncentrace železa.

Baňka	7	8	9	10	11	12	13	14	15
c_{Fe} [mg.l ⁻¹]	0,60	0,80	1,20	1,60	2,40	3,20	4,00	4,80	6,00
V_I [ml.25ml ⁻¹]	1,5	2	3	4	6	8	10	12	15

Postup stanovení obsahu železa

Kontrolní roztoky Fe byly zpracovávány stejně jako vzorky sklenicových zkoušek po odstředění. Do odměrné baňky o objemu 25 ml bylo napipetováno 5 ml vzorku předem dokonale zhomogenizovaného, přidáno 0,5 ml HCl a 0,5 ml H₂O₂ a reakční směs byla promíchána. Nejdříve za 5 minut, nejpozději za 24 hodin byl vzorek doplněn vodou na cca 15 až 20 ml, rozmíchán a poté do něj bylo přidáno 2,5 ml KSCN. Nejpozději do jedné minuty byl vzorek doplněn vodou po rysku, rozmíchán a kolorimetrován při vlnové délce okolo 480 nm. Kolorimetrování bylo prováděno v rozmezí 5-60 minut po doplnění baněk.

S každou sérií vzorků byly proměřeny i kontrolní vzorky (5 ml) o koncentracích 0,2; 0,5; 2 a 5 mg.l⁻¹ a slepý pokus.

Stanovení KNK (kyselinové neutralizační kapacity)

Kyselinovou neutralizační kapacitou je vyjadřováno látkové množství silné jednosytné kyseliny v mmol, které je spotřebováno 1 litrem vody k dosažení určité hodnoty pH, která je udávána jako index u zkratky KNK (Pitter 2009).

Při stanovování KNK byla používána následující činidla:

- 0,1 M HCl - 8,83 ml 35% HCl bylo naředěno do litru destilovanou vodou,

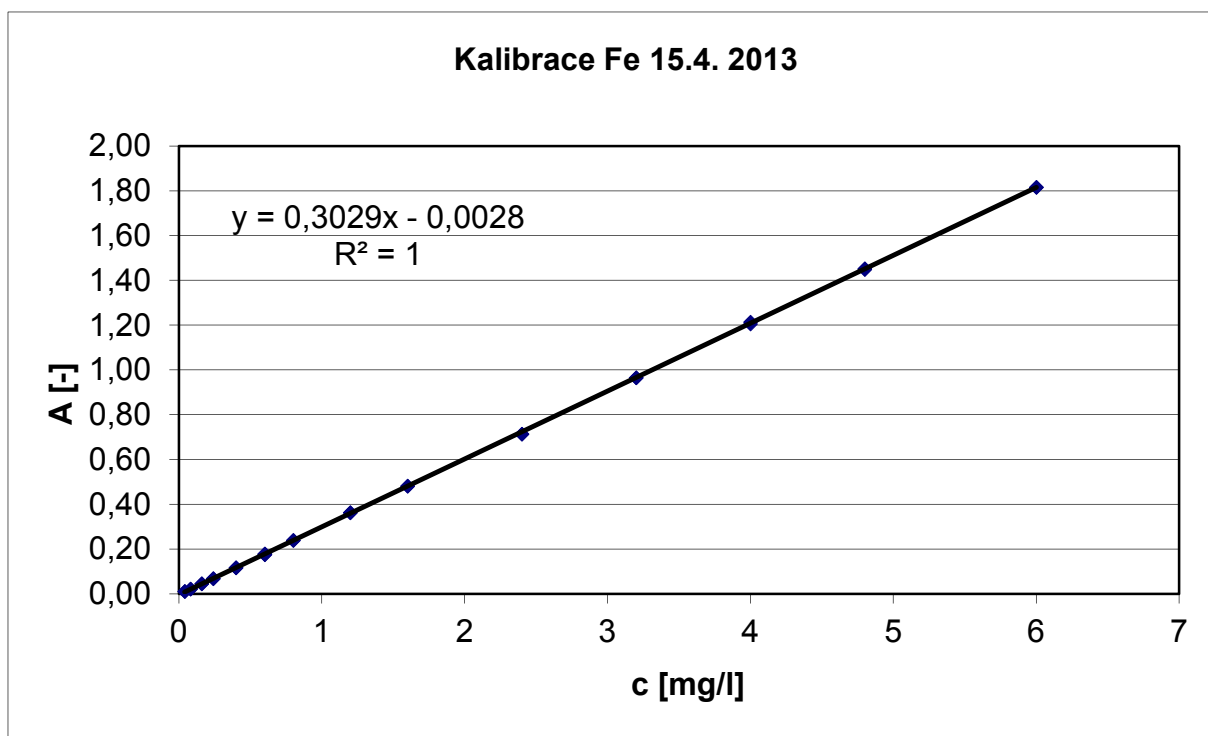
- methylovanž 0,05% indikátorový roztok (*pro stanovení KNK_{4,5}*) – 0,05 g sodné soli methylovanže bylo rozpuštěno ve 100 ml horké destilované vody a po vychladnutí zfiltrováno,

Stanovení faktoru roztoku

Bylo naváženo přibližně 0,13 g Na₂CO₃ vysušeného 2 h při 105°C, rozpuštěno v titrační baňce v 50 ml čerstvě převařené a ochlazené destilované vody. Po rozpuštění byly přidány 3 kapky methylovanže a roztok byl titrován 0,1 M HCl z oranžového do růžového zabarvení. Titrovaný roztok byl zahřát téměř k varu a po ochlazení dotitrován. Tento postup byl opakován, dokud zbarvení roztoku nebylo stálé.

Postup stanovení KNK

KNK_{4,5} (*celková alkalita*): K odměřeným 100 ml vzorku byly přidány 3 kapky methylovanže a vzorek byl titrován odměrným roztokem 0,1 M HCl z oranžového do růžového zbarvení (*pH* = 4,5).



Obrázek II-1: Kalibrační křivka železa kalibračního roztoku I a II pro nižší a vyšší koncentrace železa zároveň (A je adsorbance vzorků).

Příloha III: Parametry koagulačního procesu

Tabulka III-1: Naměřené hodnoty pH.

Den	30. 4.	2. 5.	3. 5.	19. 6.
pH	6,46	6,28	6,47	6,23

→ průměr: pH = 6,36

Tabulka III-2: Naměřené hodnoty kyselinotvorné neutralizační kapacity ke dni 19. 6. 2013.

19. 6. KNK	0,28	0,25	0,26
------------	------	------	------

→ průměr: KNK = 0,263

Tabulka III-3: Naměřené hodnoty adsorbance odebraných vzorků (sl. – slepý vzorek obsahující destilovanou vodu; vz. – vzorek s nadávkovanými činidly).

Den/A	30. 4.	2. 5.	3. 5.	19. 6.	
sl. 1	0,006	0,007	0,007	0,007	
sl. 2	-	0,006	0,007	0,006	
vz. 1	-	0,014	0,014	0,016	
vz. 2	0,013	0,013	0,013	0,015	
vz. 3				0,015	
vz. 4				0,015	
vz. 5				0,016	
vz. 6				0,015	Průměr
sl. průměr	0,0060	0,0065	0,007	0,0065	0,0065
vz. průměr	0,0130	0,0135	0,0135	0,0153	0,0138

Tabulka III-4: Analýza obsahu jednotlivých forem microcystinu po procesu koagulace.

	MC-LR [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	MC-RR [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	MC-YR [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	MC Suma [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
Vzorek 1	2,18	3,40	1,04	6,62
Vzorek 2	2,04	3,43	0,89	6,36
„Surová“	1,93	3,52	0,84	6,29

Příloha IV – Protokol o zkoušce, stanovení množství forem microcystinu v sinicové směsi



Povodí Vltavy, státní podnik
vodohospodářská laboratoř Plzeň
Denisovo nábřeží 14, 304 20 Plzeň, tel. 377 307 383 (384)
ZKUŠEBNÍ LABORÁTOŘ Č.1252 AKREDITOVANÁ ČIA DLE ČSN EN ISO/IEC 17025

Protokol č.: 37/13
Strana: 1/1



PROTOKOL O ZKOUŠCE

Zadavatel: IČO: 67985874
DIČ: CZ67985874

Ústav pro hydrodynamiku AV ČR v.v.i.
Pod Paťankou 30/5
166 12 P r a h a 6

Kontakt:

Evid.č.vz.	Vzorkoval	Typ odběru	Datum odběru	Čas odběru
332	Zadavatel do vlastní vzorkovnice	prostý	24.1.2013	neznámý

U vzorků neodebraných osobami pracujícími ve VHL Plzeň neručíme za kvalitu a reprezentativnost odběru vzorků, v tomto případě VHL Plzeň zodpovídá pouze za správné provedení analýzy v dodaném vzorku.

Evid.č.vz.	Název vzorku	Materiál	Datum dodání
332	AOM 2011	Voda	24.1.2013

	Stanovení / SOP - metoda	Jednotky	č. 332/13
O-19-A	Microcystin LR <i>(EPA 1694, ČSN ISO 20179, ČSN ISO 25101, EPA 535)</i>	ug/l	760
			<i>LC-MS/MS Nejistota: ±35%</i>
O-19-A	Microcystin RR <i>(EPA 1694, ČSN ISO 20179, ČSN ISO 25101, EPA 535)</i>	ug/l	1 290
			<i>LC-MS/MS Nejistota: ±35%</i>
O-19-A	Microcystin YR <i>(EPA 1694, ČSN ISO 20179, ČSN ISO 25101, EPA 535)</i>	ug/l	356
			<i>LC-MS/MS Nejistota: ±35%</i>

Vysvětlivky k metodě stanovení:

- Metody nepodléhající akreditaci ČIA jsou označeny * před kódem SOP.
- Výsledky získané subdávku z jiné laboratoře jsou označeny **sub**.
- Zkratka FRA u čísla SOP označuje zkoušku podléhající flexibilnímu rozsahu akreditace.
- Zkratka CFA označuje zkoušku provedenou metodou kontinuální průtokové analýzy.

Laboratoři byl ČIA přiznán flexibilní rozsah akreditace typu 1, 2 a 3. Laboratoř může zařazovat aktuální normalizované nebo technicky ekvivalentní metody zkoušení a modifikované metody zkoušení v dané oblasti akreditace v případě, že princip měření je zachován.

VHL Plzeň na požádání poskytne údaje o použitých SOP (standardních operačních postupech).

Uvedená nejistota je rozšířená nejistota vypočtená za použití koeficientu rozšíření rovnajícího se 2 a charakterizuje s pravděpodobností 95% interval hodnot, ve kterém lze očekávat skutečnou hodnotu. Tato nejistota nezahrnuje nejistotu odběru vzorků.

Výsledky se týkají pouze předmětů zkoušek uvedených na tomto protokolu.

Protokol nesmí být bez písemného souhlasu laboratoře reprodukován jinak než celý.

Datum zahájení analýzy: 5.2.2013
Datum dokončení analýzy: 5.2.2013
Datum vystavení protokolu: 11.2.2013

Ing. Václav Tajč
vedoucí vodohospodářské laboratoře Plzeň

Povodí Vltavy,
státní podnik
Holečkova 8
160 24 Praha 6



Příloha V: Shrnutí statistického zpracování práce

MORTALITA

Linear mixed-effects model fit by REML

Data: NULL

AIC	BIC	logLik
485.4422	510.4403	-232.7211

Random effects:

Formula: ~1 | clone

	(Intercept)	Residual
StdDev:	0.7139749	2.836247

Fixed effects: time ~ conc * ma

Efekt	Velikost efektu	Směrodatná odchylka	Stupně volnosti	t-testové kritérium	Hodnota signifikance
(Intercept)	5.600000	0.8403609	86	6.663804	0.0000
concC2	1.227204	1.0543990	86	1.163890	0.2477
concC3	0.967657	1.4740047	86	0.656482	0.5133
concK	-0.272796	1.0543990	86	0.258722	0.7965
mayes	0.268384	1.2230616	4	0.219437	0.8371
concC2:mayes	-0.623336	1.5185828	86	-0.410472	0.6825
concC3:mayes	0.256884	1.9532452	86	0.131516	0.8957
concK:mayes	-0.395589	1.5059206	86	-0.262689	0.7934

Correlation:

	(Intr)	Konc. C2	Konc. C3	Kontrola	mayes	Konc. C2:mayes	Konc. C3:mayes	Kontrola:mayes
Konc. C2	-0,605							
Konc. C3	-0,433	0,342						
Kontrola	-0,605	0,483	0,342					
mayes	-0,687	0,416	0,297	0,416				
Konc. C2:mayes	0,42	-0,694	-0,694	-0,237	-0,335	-0,622		
Konc. C3:mayes	0,327	-0,258	-0,258	-0,755	-0,258	-0,484	0,387	
Kontrola:mayes	0,424	-0,338	-0,338	-0,239	-0,7	-0,628	0,506	0,391

Standardized Within-Group Residuals:

Min	Q1	Med	Q3	Max
-1.4121867	-0.5388094	-0.1924558	0.1278371	5.2240679

Number of Observations: 98

Number of Groups: 6

Mortalita 1. generace

y<-cbind(Live, Dead)

library(lme4)

```
> model<-glmer(y~Clone+Concentration+(1|Clone/Concentration),family=binomial)
> summary(model)
Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace Approximation) [glmerMod]
Family: binomial ( logit )
Formula: y ~ Clone + Concentration + (1 | Clone/Concentration)
```

AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
60.3	73.2	-19.1	38.3	13

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.9515	-0.6808	0.3542	0.6279	1.18

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
Concentration:Clone	(Intercept)	0	0
Clone	(Intercept)	0	0

Number of obs: 24, groups: Concentration:Clone, 24; Clone, 6
Fixed effects:

	Průměr	Standardní chyba	z-testové kritérium	Hodnota signifikance
(Intercept)	2.074e+00	9.188e-01	2.258	0.023961
CloneH2	4.658e-01	9.693e-01	0.481	0.630870
CloneH3	9.890e-01	1.013e+00	0.976	0.329000
CloneH4	4.658e-01	9.693e-01	0.481	0.630870
CloneH5	4.658e-01	9.693e-01	0.481	0.630870
CloneH6	1.611e+00	1.091e+00	1.476	0.139890
ConcentrationC2	-4.608e-10	1.041e+00	0.000	1.000000
ConcentrationC3	-3.019e+00	8.386e-01	-3.599	0.000319
ConcentrationK	7.346e-01	1.258e+00	0.584	0.559313

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Correlation:

	(Intr)	ClonH2	ClonH3	ClonH4	ClonH5	ClonH6	ConC2	ConC3
CloneH2	-0.471							
CloneH3	-0.429	0.462						
CloneH4	-0.471	0.477	0.462					
CloneH5	-0.471	0.477	0.462	0.477				
CloneH6	-0.384	0.434	0.429	0.434	0.434			
ConC2	-0.567	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
ConC3	-0.643	-0.062	-0.112	-0.062	-0.062	-0.141	0.621	
ConK	-0.472	0.004	0.005	0.004	0.004	0.005	0.414	0.513

```
>tapply(Dead,list(Concentration,Clone),sum)/tapply(Dead+Live,list(Concentration,Clone),sum)
```

	H1	H2	H3	H4	H5	H6
C1	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
C2	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0
C3	0.8	0.4	0.2	0.8	0.8	0.4
K	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0

Mortalita 2. generace

```
>model<-glmer(y~Clone+Concentration+(1|Clone/Concentration),family=binomial)
```

Warning messages:

1: In checkConv(attr(opt, "derivs"), opt\$par, ctrl = control\$checkConv, : Model failed to converge with max|grad| = 0.512279 (tol = 0.001, component 10)

2: In checkConv(attr(opt, "derivs"), opt\$par, ctrl = control\$checkConv, : Hessian is numerically singular: parameters are not uniquely determined

```
> summary(model)
```

Generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace Approximation) [glmerMod]

Family: binomial (logit)

Formula: y ~ Clone + Concentration + (1 | Clone/Concentration)

AIC	BIC	logLik	deviance	df.resid
51.1	64.1	-14.6	29.1	13

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.75118	-0.05181	0.00000	0.07847	1.13825

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.
Concentration:Clone	(Intercept)	4.162e-01	6.452e-01
Clone	(Intercept)	5.562e-09	7.458e-05

Number of obs: 24, groups: Concentration:Clone, 24; Clone, 6

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	z-value	Significance
(Intercept)	25.773	21902.183	0.001	0.9991
CloneH2	-2.026	1.614	-1.255	0.2093
CloneH3	-0.440	1.771	-0.248	0.8038
CloneH4	-2.788	1.526	-1.827	0.0677
CloneH5	-2.159	1.571	-1.374	0.1694
CloneH6	-3.417	1.615	-2.116	0.0343
ConcentrationC2	-24.084	21902.183	-0.001	0.9991
ConcentrationC3	-46.116	25875.524	-0.002	0.9986
ConcentrationK	-21.885	21902.183	-0.001	0.9992

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Correlation:

	(Intr)	ClonH2	ClonH3	ClonH4	ClonH5	ClonH6	ConC2	ConC3
CloneH2	0.000							
CloneH3	0.000	0.565						
CloneH4	0.000	0.667	0.603					
CloneH5	0.000	0.641	0.581	0.688				
CloneH6	0.000	0.638	0.575	0.698	0.659			
ConC2	-1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
ConC3	-0.846	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.846	
ConK	-1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.846

Warning messages:

1: In vcov.merMod(object, use.hessian = use.hessian) : variance-covariance matrix computed from finite-difference Hessian is not positive definite: falling back to var-cov estimated from RX
 2: In vcov.merMod(object, correlation = correlation, sigm = sig) : variance-covariance matrix computed from finite-difference Hessian is not positive definite: falling back to var-cov estimated from RX
 >tapply(Dead,list(Concentration,Clone),sum)/tapply(Dead+Live,list(Concentration,Clone),sum)

	H1	H2	H3	H4	H5	H6
C1	0.0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0
C2	0.2	0.75	0.0	0.4	0.8	1.0
C3	1.0	1.00	1.0	1.0	1.0	1.0
K	0.0	0.00	0.2	0.6	0.0	0.2

Reprodukční a růstové parametry

Délka cyklu

glm(formula = Delka.cyklu ~ Klon * Koncentrace * Generace, family = quasipoisson)

Efekt	Velikost efektu	Směrodatná odchylka	t-testové kritérium	Hodnota signifikance
(Intercept)	2.75684	0.20490	13.455	<2e-16 ***
KlonH2	0.14458	0.26655	0.542	0.5881
KlonH3	0.10536	0.28243	0.373	0.7095
KlonH4	-0.02247	0.27629	-0.081	0.9353
KlonH5	0.08807	0.26970	0.327	0.7444
KlonH6	0.19807	0.26370	0.751	0.4535
KoncentraceC2	0.01575	0.27394	0.057	0.9542
KoncentraceC3	-0.08269	0.36495	-0.227	0.8210
KoncentraceK	-0.04879	0.27794	-0.176	0.8608
Generace2	0.52030	0.25872	2.011	0.0457 *
Generace3	0.48835	0.27629	1.768	0.0787 .
KlonH2:KoncentraceC2	0.31758	0.35346	0.898	0.3700
KlonH3:KoncentraceC2	-0.05657	0.37989	-0.149	0.8818
KlonH4:KoncentraceC2	0.14026	0.37254	0.376	0.7070
KlonH5:KoncentraceC2	-0.08807	0.37264	-0.236	0.8134

Efekt	Velikost efektu	Směrodatná odchylka	t-testové kritérium	Hodnota signifikance
KlonH6:KoncentraceC2	0.19059	0.35357	0.539	0.5905
KlonH2:KoncentraceC3	-0.04614	0.44195	-0.104	0.9170
KlonH3:KoncentraceC3	0.31153	0.44161	0.705	0.4814
KlonH4:KoncentraceC3	0.05637	0.45034	0.125	0.9005
KlonH5:KoncentraceC3	-0.04092	0.44581	-0.092	0.9270
KlonH6:KoncentraceC3	0.39354	0.42536	0.925	0.3560
KlonH2:KoncentraceK	-0.17161	0.37755	-0.455	0.6500
KlonH3:KoncentraceK	-0.01613	0.38378	-0.042	0.9665
KlonH4:KoncentraceK	0.00905	0.38385	0.024	0.9812
KlonH5:KoncentraceK	0.02526	0.37349	0.068	0.9461
KlonH6:KoncentraceK	0.08961	0.36229	0.247	0.8049
KlonH2:Generace2	-0.02722	0.33727	-0.081	0.9358
KlonH3:Generace2	-0.03260	0.35766	-0.091	0.9275
KlonH4:Generace2	-0.26899	0.35778	-0.752	0.4530
KlonH5:Generace2	-0.17886	0.34576	-0.517	0.6055
KlonH6:Generace2	-0.45968	0.34701	-1.325	0.1868
KlonH2:Generace3	-0.42794	0.38859	-1.101	0.2721
KlonH3:Generace3	-0.40612	0.42863	-0.947	0.3446
KlonH4:Generace3	-0.24719	0.37104	-0.666	0.5061
KlonH5:Generace3	-0.32511	0.37382	-0.870	0.3855
KlonH6:Generace3	-0.28202	0.35539	-0.794	0.4284
KoncentraceC2:Generace2	0.06051	0.34423	0.176	0.8606
KoncentraceC3:Generace2	-0.62950	0.60133	-1.047	0.2965
KoncentraceK:Generace2	0.07486	0.34878	0.215	0.8303
KoncentraceC2:Generace3	-0.77604	0.46862	-1.656	0.0993 .
KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA
KoncentraceK:Generace3	-0.16386	0.37877	-0.433	0.6658
KlonH2:KoncentraceC2:Generace2	-1.24938	0.50571	-2.471	0.0143 *
KlonH3:KoncentraceC2:Generace2	-0.08306	0.48548	-0.171	0.8643
KlonH4:KoncentraceC2:Generace2	-0.06671	0.48161	-0.139	0.8900
KlonH5:KoncentraceC2:Generace2	-0.62510	0.49548	-1.262	0.2086
KlonH6:KoncentraceC2:Generace2	-1.44980	0.54790	-2.646	0.0088 **
KlonH2:KoncentraceC3:Generace2	-0.64374	0.74947	-0.859	0.3914
KlonH3:KoncentraceC3:Generace2	-1.15748	0.81673	-1.417	0.1580
KlonH4:KoncentraceC3:Generace2	-0.38395	0.91421	-0.420	0.6750
KlonH5:KoncentraceC3:Generace2	0.70226	0.75101	0.935	0.3509
KlonH6:KoncentraceC3:Generace2	-1.31059	1.04714	-1.252	0.2122
KlonH2:KoncentraceK:Generace2	0.27001	0.47359	0.570	0.5692
KlonH3:KoncentraceK:Generace2	-0.41541	0.49268	-0.843	0.4002
KlonH4:KoncentraceK:Generace2	-0.42555	0.50787	-0.838	0.4031
KlonH5:KoncentraceK:Generace2	-0.20273	0.48082	-0.422	0.6737
KlonH6:KoncentraceK:Generace2	0.11915	0.47126	0.253	0.8007
KlonH2:KoncentraceC2:Generace3	0.47661	0.66884	0.713	0.4769

Efekt	Velikost efektu	Směrodatná odchylka	t-testové kritérium	Hodnota signifikance
KlonH3:KoncentraceC2:Generace3	0.58047	0.63448	0.915	0.3614
KlonH4:KoncentraceC2:Generace3	0.28356	0.61099	0.464	0.6431
KlonH5:KoncentraceC2:Generace3	0.61279	0.69382	0.883	0.3782
KlonH6:KoncentraceC2:Generace3	NA	NA	NA	NA
KlonH2:KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA
KlonH3:KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA
KlonH4:KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA
KlonH5:KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA
KlonH6:KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA
KlonH2:KoncentraceK:Generace3	-0.01263	0.59674	-0.021	0.9831
KlonH3:KoncentraceK:Generace3	0.28007	0.56229	0.498	0.6190
KlonH4:KoncentraceK:Generace3	0.36356	0.54594	0.666	0.5062
KlonH5:KoncentraceK:Generace3	0.30599	0.51143	0.598	0.5503
KlonH6:KoncentraceK:Generace3	-0.12044	0.50559	-0.238	0.8120

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Velikost 1. snůšky

glm(formula = X1.snuska ~ Klon + Koncentrace + Generace + Koncentrace:Generace, family = quasipoisson)

Efekt	Velikost efektu	Směrodatná odchylka	t-testové kritérium	Hodnota signifikance	
(Intercept)	1.667238	0.158534	10.517	< 2e-16	***
KlonH2	0.201523	0.153212	1.315	0.189632	
KlonH3	0.502179	0.141705	3.544	0.000472	***
KlonH4	0.133913	0.149653	0.895	0.371759	
KlonH5	0.303249	0.143181	2.118	0.035187	*
KlonH6	0.256778	0.145280	1.767	0.078395	
KoncentraceC2	-0.126070	0.168872	-0.747	0.456055	
KoncentraceC3	-0.983459	0.226606	-4.340	2.09e-05	***
KoncentraceK	-0.177657	0.171151	-1.038	0.300286	
Generace2	0.275706	0.156159	1.766	0.078718	
Generace3	0.643594	0.152917	4.209	3.61e-05	***
KoncentraceC2:Generace2	-1.286144	0.293015	-4.389	1.69e-05	***
KoncentraceC3:Generace2	-16.524033	686.312810	-0.024	0.980811	
KoncentraceK:Generace2	0.063348	0.226165	0.280	0.779639	
KoncentraceC2:Generace3	-0.841573	0.293161	-2.871	0.004454	**
KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA	
KoncentraceK:Generace3	0.002918	0.224259	0.013	0.989628	
KoncentraceK:Generace3	0.002918	0.224259	0.013	0.989628	

Velikost 2. snůšky

glm(formula = X2.snuska ~ Klon * Koncentrace * Generace, family = quasipoisson)

Efekt	Velikost efektu	Směrodatná odchylka	t-testové kritérium	Hodnota signifikance	
(Intercept)	2.25129	0.26036	8.647	6.7e-15	***
KlonH2	0.49598	0.31751	1.562	0.12033	
KlonH3	-0.08224	0.37601	-0.219	0.82717	
KlonH4	0.41594	0.32181	1.292	0.19814	
KlonH5	0.14660	0.33856	0.433	0.66561	
KlonH6	0.05129	0.34541	0.149	0.88214	
KoncentraceC2	0.12825	0.33984	0.377	0.70640	
KoncentraceC3	-2.25129	1.62594	-1.385	0.16819	
KoncentraceK	-0.27721	0.37328	-0.743	0.45884	
Generace2	0.50024	0.35013	1.429	0.15512	
Generace3	0.58192	0.37888	1.536	0.12663	
KlonH2:KoncentraceC2	-0.67830	0.45360	-1.495	0.13688	
KlonH3:KoncentraceC2	-0.41024	0.51686	-0.794	0.42859	
KlonH4:KoncentraceC2	-1.63233	0.55880	-2.921	0.00402	**
KlonH5:KoncentraceC2	0.03880	0.44939	0.086	0.93131	
KlonH6:KoncentraceC2	-1.20706	0.56438	-2.139	0.03405	*
KlonH2:KoncentraceC3	1.20877	1.67146	0.723	0.47067	
KlonH3:KoncentraceC3	1.30601	1.69375	0.771	0.44185	
KlonH4:KoncentraceC3	0.27721	1.99184	0.139	0.88950	
KlonH5:KoncentraceC3	0.72887	1.70446	0.428	0.66953	
KlonH6:KoncentraceC3	2.43361	1.66336	1.463	0.14550	
KlonH2:KoncentraceK	-0.21877	0.49005	-0.446	0.65593	
KlonH3:KoncentraceK	0.10964	0.53156	0.206	0.83687	
KlonH4:KoncentraceK	-0.28588	0.48779	-0.586	0.55869	
KlonH5:KoncentraceK	-0.11920	0.50576	-0.236	0.81399	
KlonH6:KoncentraceK	-0.10845	0.51635	-0.210	0.83392	
KlonH2:Generace2	-0.37583	0.45191	-0.832	0.40689	
KlonH3:Generace2	-0.77218	0.57007	-1.355	0.17757	
KlonH4:Generace2	-0.43310	0.43798	-0.989	0.32428	
KlonH5:Generace2	-0.45579	0.47479	-0.960	0.33858	
KlonH6:Generace2	-1.08006	0.51586	-2.094	0.03793	*
KlonH2:Generace3	0.03810	0.45407	0.084	0.93323	
KlonH3:Generace3	-0.18603	0.56233	-0.331	0.74124	
KlonH4:Generace3	-0.38125	0.45672	-0.835	0.40516	
KlonH5:Generace3	0.08824	0.46940	0.188	0.85114	
KlonH6:Generace3	-0.11192	0.48509	-0.231	0.81784	
KoncentraceC2:Generace2	-1.33934	0.59522	-2.250	0.02586	*
KoncentraceC3:Generace2	NA	NA	NA	NA	
KoncentraceK:Generace2	-0.30527	0.51744	-0.590	0.55608	

Efekt	Velikost efektu	Směrodatná odchylka	t-testové kritérium	Hodnota signifikance	
KoncentraceC2:Generace3	-17.26405	1241.89241	-0.014	0.98893	
KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA	
KoncentraceK:Generace3	-0.25342	0.52868	-0.479	0.63238	
KlonH2:KoncentraceC2:Generace2	1.79030	0.80880	2.214	0.02834	*
KlonH3:KoncentraceC2:Generace2	1.83442	0.84427	2.173	0.03134	*
KlonH4:KoncentraceC2:Generace2	1.98086	0.82679	2.396	0.01779	*
KlonH5:KoncentraceC2:Generace2	0.80939	0.90484	0.895	0.37246	
KlonH6:KoncentraceC2:Generace2	NA	NA	NA	NA	
KlonH2:KoncentraceC3:Generace2	NA	NA	NA	NA	
KlonH3:KoncentraceC3:Generace2	NA	NA	NA	NA	
KlonH4:KoncentraceC3:Generace2	NA	NA	NA	NA	
KlonH5:KoncentraceC3:Generace2	NA	NA	NA	NA	
KlonH6:KoncentraceC3:Generace2	NA	NA	NA	NA	
KlonH2:KoncentraceK:Generace2	0.12679	0.74851	0.169	0.86571	
KlonH3:KoncentraceK:Generace2	1.45211	0.75897	1.913	0.05758	
KlonH4:KoncentraceK:Generace2	0.77305	0.70128	1.102	0.27204	
KlonH5:KoncentraceK:Generace2	0.92657	0.68991	1.343	0.18125	
KlonH6:KoncentraceK:Generace2	0.30317	0.78905	0.384	0.70135	
KlonH2:KoncentraceC2:Generace3	17.49133	1241.89251	0.014	0.98878	
KlonH3:KoncentraceC2:Generace3	18.05686	1241.89253	0.015	0.98842	
KlonH4:KoncentraceC2:Generace3	NA	NA	NA	NA	
KlonH5:KoncentraceC2:Generace3	NA	NA	NA	NA	
KlonH6:KoncentraceC2:Generace3	NA	NA	NA	NA	
KlonH2:KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA	
KlonH3:KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA	
KlonH4:KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA	
KlonH5:KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA	
KlonH6:KoncentraceC3:Generace3	NA	NA	NA	NA	
KlonH2:KoncentraceK:Generace3	0.09015	0.70412	0.128	0.89829	
KlonH3:KoncentraceK:Generace3	0.51280	0.75298	0.681	0.49688	
KlonH4:KoncentraceK:Generace3	0.39096	0.72067	0.542	0.58827	
KlonH5:KoncentraceK:Generace3	0.13122	0.68275	0.192	0.84784	
KlonH6:KoncentraceK:Generace3	-0.83423	0.82535	-1.011	0.31373	

Doba do 1. snůšky

glm(formula = Do.1.snusky ~ Klon * Koncentrace * Generace – Klon : Koncentrace : Generace - Koncentrace :
Generace, family = quasipoisson)

Efekt	Velikost efektu	Směrodatná odchylka	t-testové kritérium	Hodnota signifikance	
(Intercept)	2.223059	0.131617	16.890	< 2e-16	***
KlonH2	0.397205	0.173793	2.286	0.023497	*
KlonH3	0.253467	0.178384	1.421	0.157143	
KlonH4	-0.060139	0.179866	-0.334	0.738516	
KlonH5	0.063694	0.178882	0.356	0.722222	
KlonH6	0.335510	0.173317	1.936	0.054520	
KoncentraceC2	0.226584	0.142747	1.587	0.114269	
KoncentraceC3	0.721380	0.289752	2.490	0.013731	*
KoncentraceK	-0.022800	0.136343	-0.167	0.867389	
Generace2	0.562538	0.128124	4.391	1.96e-05	***
Generace3	0.499200	0.146980	3.396	0.000847	***
KlonH2:KoncentraceC2	-0.023164	0.201751	-0.115	0.908724	
KlonH3:KoncentraceC2	-0.228841	0.194121	-1.179	0.240074	
KlonH4:KoncentraceC2	0.006872	0.196701	0.035	0.972172	
KlonH5:KoncentraceC2	-0.069200	0.218930	-0.316	0.752322	
KlonH6:KoncentraceC2	-0.189898	0.228010	-0.833	0.406078	
KlonH2:KoncentraceC3	-0.720605	0.346202	-2.081	0.038865	*
KlonH3:KoncentraceC3	-0.516885	0.340289	-1.519	0.130599	
KlonH4:KoncentraceC3	-1.498005	0.644588	-2.324	0.021289	*
KlonH5:KoncentraceC3	-0.810909	0.356042	-2.278	0.023976	*
KlonH6:KoncentraceC3	-0.159053	0.339544	-0.468	0.640065	
KlonH2:KoncentraceK	-0.131285	0.201819	-0.651	0.516225	
KlonH3:KoncentraceK	0.014973	0.188305	0.080	0.936714	
KlonH4:KoncentraceK	0.070373	0.192504	0.366	0.715135	
KlonH5:KoncentraceK	0.062001	0.177962	0.348	0.727966	
KlonH6:KoncentraceK	0.137184	0.176143	0.779	0.437148	
KlonH2:Generace2	-0.521857	0.196065	-2.662	0.008508	**
KlonH3:Generace2	-0.181025	0.175137	-1.034	0.302758	
KlonH4:Generace2	0.050272	0.178981	0.281	0.779137	
KlonH5:Generace2	-0.094492	0.183678	-0.514	0.607599	
KlonH6:Generace2	-0.419924	0.183493	-2.289	0.023318	*
KlonH2:Generace3	-0.597106	0.214110	-2.789	0.005883	**
KlonH3:Generace3	-0.332444	0.198431	-1.675	0.095669	
KlonH4:Generace3	0.022535	0.212968	0.106	0.915851	
KlonH5:Generace3	-0.014714	0.203567	-0.072	0.942461	
KlonH6:Generace3	-0.318113	0.204973	-1.552	0.122495	

Doba do 2. snůšky

glm(formula = Do.2.snusky ~ Klon + Koncentrace, family = quasipoisson)

Efekt	Velikost efektu	Směrodatná odchylka	t-testové kritérium	Hodnota signifikance	
(Intercept)	1.56846	0.08652	18.127	< 2e-16	***
KlonH2	-0.07859	0.10988	-0.715	0.47536	
KlonH3	0.03328	0.09976	0.334	0.73908	
KlonH4	0.09588	0.10122	0.947	0.34472	
KlonH5	0.07386	0.10033	0.736	0.46255	
KlonH6	0.25732	0.09796	2.627	0.00934	**
KoncentraceC2	0.22720	0.07579	2.998	0.00309	**
KoncentraceC3	0.28353	0.11294	2.511	0.01290	*
KoncentraceK	0.04477	0.07010	0.639	0.52385	