



**Nejvýznamnější složky organického detritu jako
potravy perlorodky říční pro přežití a vývoj mladých
jedinců**

Souhrnná výzkumná zpráva za rok 2023

SS06010027 program TAČR Prostředí pro život 6

**VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VODOHOSPODÁŘSKÝ
T.G. MASARYKA**

veřejná výzkumná instituce



**PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

Nejvýznamnější složky organického detritu jako potravy perlorodky říční pro přežití a vývoj mladých jedinců

Souhrnná zpráva projektu č. SS06010027 programu TAČR Prostředí pro život 6

Sledované období: duben 2023 – březen 2024

Stručné shrnutí sledovaného období:

Ve sledovaném období hlavní řešitel (Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.M., v.v.i., Odbor aplikované ekologie) provedl výběr 8 lokalit s následným odběrem detritu v termínech jarní 7. - 8. 6. 2023, letní 16. - 17. 8. 2023 a podzimní 18. -19. 10. 2023. Byly provedeny základní analýzy z hlediska teploty, vodivosti a pH, dále pak analýzy obsahu vybraných prvků, iontů a organické sušiny. Dále byla provedena optimalizace vyhodnocení přírůstků a přežívání juvenilních jedinců perlorodky říční.

Další řešitel (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra biochemie) ve sledovaném období provedl optimalizace podmínek extrakce aminokyselin a proteinů z detritu jako možných živin pro růst a vývoj perlorodky říční. Dále byly porovnány metody stanovení koncentrace proteinů v detritu s nízkým limitem detekce, byla zavedena elektroforetická separace proteinů (analýza jejich relativní molekulové hmotnosti) a byla provedena detekce volných aminokyselin v detritu. Rovněž byl navržen a vyroben první prototyp odběrového zařízení detritu.

Ve sledovaném období byl dodržen harmonogram prací obou řešitelů a nedošlo k žádným změnám ve složení řešitelských týmů. Na koordinačních schůzkách oba řešitelé pravidelně konzultovali výsledky a dosavadní průběh projektu.

Projekt je navázán na Záchraný program perlorodky říční v České republice, čímž naplňuje v Podprogramu 1 hlavní prioritní výzkumný cíl 3.3. – rozvoj moderních metod a postupů. sledování a vyhodnocování stavu ekosystémů a dále rostlinných a živočišných druhů (a jejich stanovišť). Projekt souvisí i se dvěma vedlejšími prioritními výzkumnými cíli: 3.1. – zachování a obnova struktury a přirozených funkcí vodních, mokřadních a terestrických ekosystémů a rostlinných a živočišných druhů těchto stanovišť, a 3.2. – ochrana biodiverzity na úrovni společenstev, druhů i genetické variability jedinců včetně předcházení šíření a eradikace invazních druhů z unijního seznamu. Spolupráce obou řešitelů vede k identifikaci složek detritu s největším významem pro růst a vitalitu mladých jedinců, což je zásadní pro úspěšnost odchovů, výběr lokalit pro dosazování a posilování stávajících populací, případně reintrodukcí. Ve sledovaném období se oba řešitelé soustředili na výběr vhodných lokalit, optimalizaci a reprodukovatelnost vybraných stanovení dle svého zaměření.

V Praze, dne 30.3.2024

Mgr. Kamila Tichá, Ph.D.

Část 1: Odběry, prvková analýza detritu a růstové parametry juvenilních jedinců perlorodky říční

Hlavní řešitel: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.M., v.v.i., Odbor aplikované ekologie

Mgr. Kamila Tichá, Ph.D., RNDr. Zuzana Hořická, Ph.D., Mgr. Vojtěch Macháček, Ing. Miloš Möhwald

Vzorkování detritu



Obr. 1.: Ilustrační fotografie zájmových toků s výskytem perlorodky říční: Zbytinský potok, Blanický potok, Teplá Vltava a Lužní potok

Na začátku projektu bylo z předem vytipovaných lokalit vybráno 8 nejvhodnějších (tab. 1). V každém povodí, kde se v současnosti vyskytuje perlorodka říční, jsme vybrali dvě lokality, z nichž jedna měla mít pro růst juvenilních perlorodek detrit vhodný a druhá nevhodný. Tato kritéria byla stanovena na základě starších informací znalců a správců lokalit a vlastních zkušeností z dřívějších projektů (např. in-situ bioindikací na juvenilních perlorodkách apod.). V průběhu sezóny 2023 proběhly podle plánu tři vzorkování detritu (jarní 7. - 8. 6. 2023, letní 16. - 17. 8. 2023 a podzimní 18. -19. 10. 2023) na všech osmi lokalitách. Oproti plánu jsme detrit vzorkovali přímým odběrem ze dna toku, protože stav původních pasivních odběráků neumožňoval jejich opětovné použití. Zároveň jsme konstrukci nových odběráků z časových důvodů museli odložit na konec sezóny, abychom zároveň mohli vyzkoušet některá konstrukční zlepšení.

	+	-
Horní Vltava	Vltava nad Ovesnou (V20)	Řasnice – ústí (V11)
Blanice	Zbytinský potok (B6)	Blanický potok (B3)
Malše	Malše pod Hiltchen (MM8)	Malše pod Dolním Dvořištěm (MM35)
Ašsko	Náhon Rokytnice (R1)	Lužní p. nad Fürstbächlein (LP4)

Tab. 1.: Přehled osmi lokalit, na kterých byl vzorkován detrit ve třech sezónách roku 2023



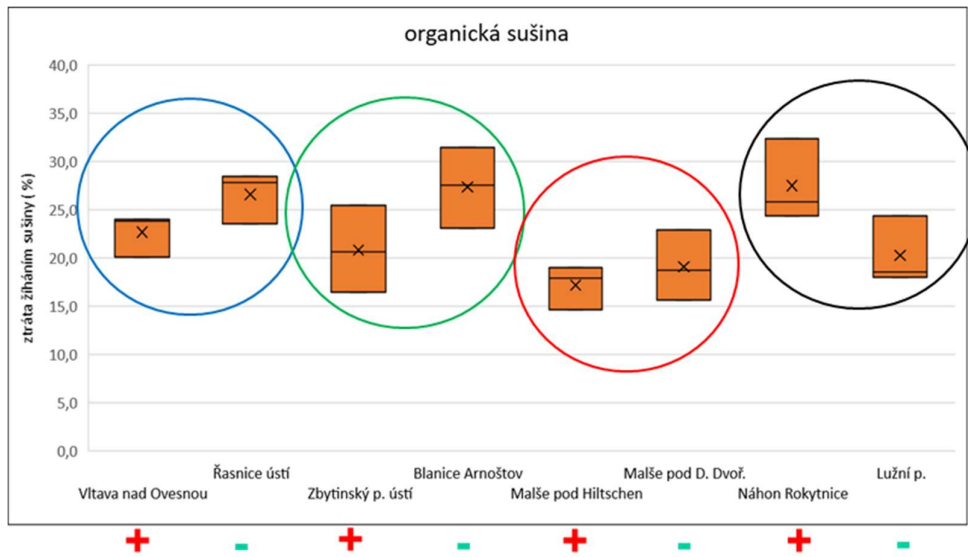
Obr. 2.: Vzorkování detritu z toků přímým odběrem ze dna toku, jeho sedimentace a příprava zahuštěného vzorku.

Analýzy

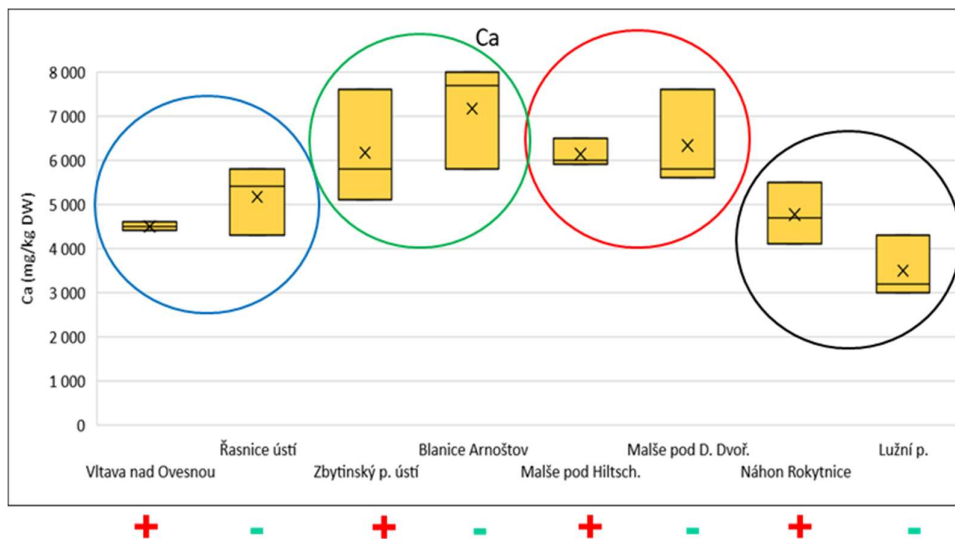
Každý odebraný směsný vzorek byl rozdělen na čtyři podíly, kdy jeden byl využit na analýzu základních parametrů detritu v laboratořích VÚV TGM (ztráta žíháním sušiny, obsah vápníku a celkového fosforu) a druhý po vysušení předán do externí laboratoře na stanovení obsahu uhlíku a dusíku. Třetí podíl byl využit na analýzy v laboratoři PŘF UK (viz část 2. průběžné zprávy) a poslední na růstové pokusy s juvenilními perlorodkami. Na všech lokalitách byl odebrán také vzorek vody, ve kterém byla na místě změřena teplota, vodivost a pH, viz. Tab. 2. Paralelní vzorek vody byl analyzován v laboratoři VÚV (pH, A254, KNK4,5, Cl, NH₄, NO₃, NO₂, N-NH₄, N-NO₃, N-NO₂, P-PO₄, P celk., NL 105, PO₄, Ca)

Výsledky

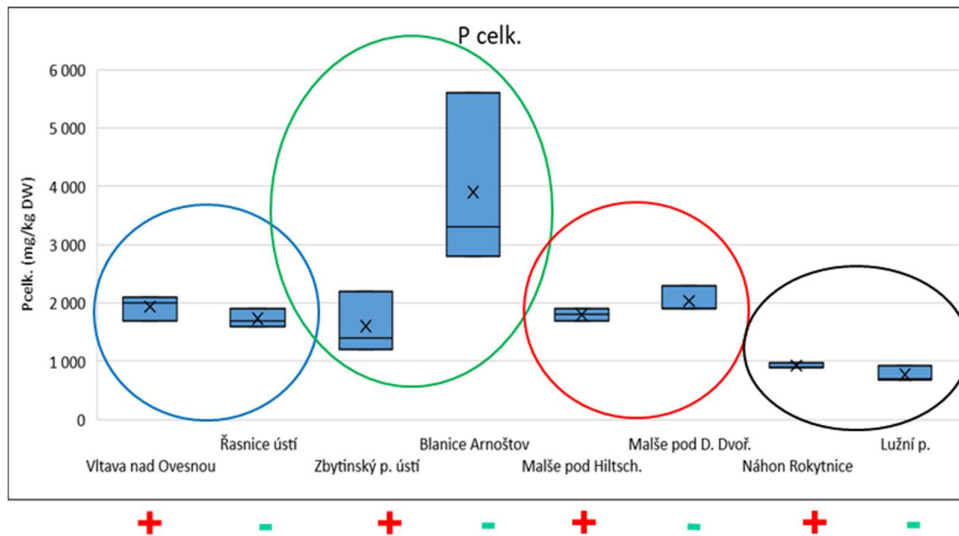
Grafy na obrázcích 3-5 ukazují obsah organické sušiny, vápníku a celkového fosforu. Nejvyšší obsah P a Ca byl naměřen na lokalitě Blanický potok, Arnoštov (B3), kde však v podzimní sezóně byly v toku mohutné nárosty vláknitých řas, které nebylo při odběru možné separovat od sedimentovaného detritu, a které tak výrazně zkreslují výsledek. Blanický potok má také spolu s náhonem Rokytnice (R1) nejvyšší organický podíl, náhon Rokytnice však má nízký obsah P i Ca. Nejnížší obsah P a Ca byl naměřen v Lužním potoce (LP4). Na obr. 6 je znázorněn poměr C:N v jarním detritu, u ostatních vzorků zatím nemáme výsledky analýzy CNS.



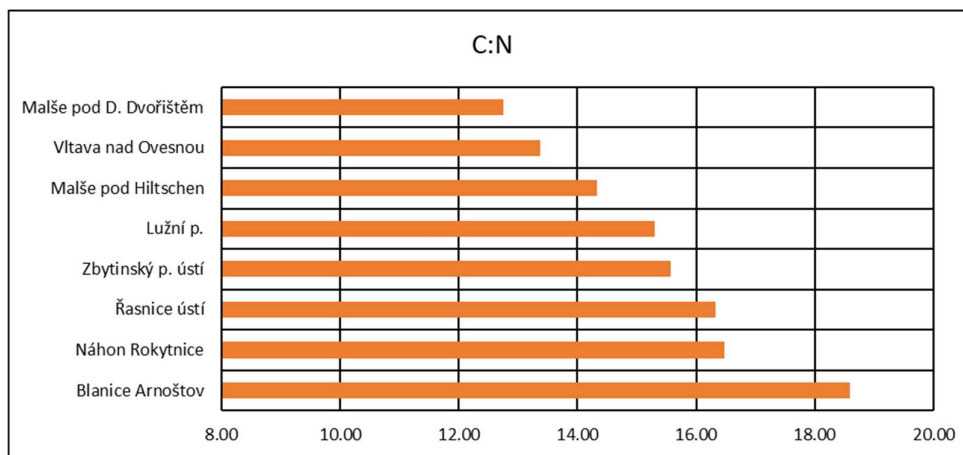
Obr. 3.: Průměrné a mediánové hodnoty organické sušiny v detritu, naměřené v jednotlivých sezónách roku 2023. Povědí jsou zakroužkovány stejnou barvou, znaménka pod grafy označují toky s potenciálně vhodným (+) a nevhodným (-) detritem.



Obr. 4.: Průměrné a mediánové hodnoty celkového vápníku v detritu, naměřené v jednotlivých sezónách roku 2023. Povědí jsou zakroužkovány stejnou barvou, znaménka pod grafy označují toky s potenciálně vhodným (+) a nevhodným (-) detritem.



Obr. 5.: Průměrné a mediánové hodnoty celkového fosforu v detritu, naměřené v jednotlivých sezónách roku 2023. Povodí jsou zakroužkována stejnou barvou, znaménka pod grafy označují toky s potenciálně vhodným (+) a nevhodným (-) detritem.



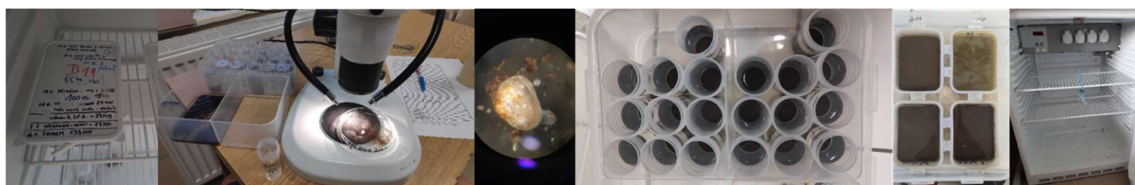
Obr. 6.: Poměr uhlíku a dusíku (C:N) v detritu na jednotlivých lokalitách v jarní sezóně 2023.

Obsah živin v Blanickém potoce významně ovlivnil podzimní odběr, kdy celé dno bylo zcela porostlé vláknitými řasami, a nebylo možné odebrat sedimentovaný detrit bez těchto řas. Ve výsledcích je to vidět na zvýšeném obsahu fosforu, analýzu dusíku v podzimních vzorcích ještě nemáme k dispozici. Ze stanovení v roce 2023 je patrné, že z hlediska obsahu hlavních biogenních prvků výsledky neodpovídají potenciálně úživným a málo úživným zdrojům tak, jak byla odhadnuta na začátku projektu. Podle rozdílů, které jsme zaznamenali, se profilují jiné rozdíly mezi lokalitami, ale ve výsledcích z jedné sezóny ještě není možné vyvozovat žádné závěry.

Růstové pokusy

Experimenty

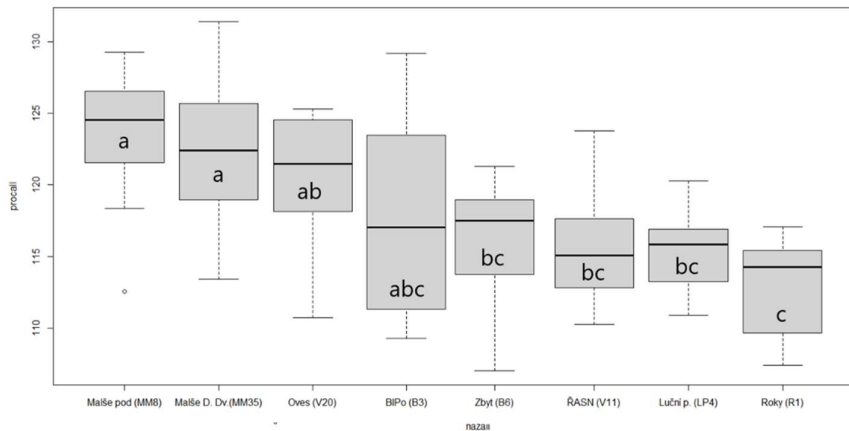
Na základě smlouvy s NP Šumava byli z odchovny perlorodek získáni juvenilní jedinci perlorodky říční po 1. roce života (po odpadnutí z rybího hostitele; 1+). Růstové pokusy následně probíhaly v hydrobiologické laboratoři VÚV TGM, která je vybavena příslušným zařízením pro chov. Experimenty byly prováděny dle Simona a kol. (2018) a Macháčka (2022) ve standardních podmínkách při 19°C v termostatu v individuálním chovu. Celkem proběhla tři kola růstových pokusů, vždy s čerstvě odebraným detritem z jarního, letního a podzimního vzorkování. Na začátku každého pokusu byli jedinci náhodně rozděleni po 12-ti kusech, a každá skupina byla vždy krmena detritem z jedné lokality. Měření velikosti každého jedince probíhalo vždy na začátku pokusu, po 10-ti dnech, po 20-ti dnech a při ukončení pokusu po 30-ti dnech při krmení stejným detritem. V době krmení jsme kromě výměny detritu vždy provedli i výměnu vody, která pocházela ze stejné lokality jako detrit. Detrit a voda byly mimo pokus uchovávány v laboratorní lednici s monitorovanou teplotou při 3°C, aby byly zachovány co nejlépe původní vlastnosti. Měření jsme prováděli na fotografiích, pořízených trinokulárním mikroskopem při maximálním zvětšení, zapsán byl vždy nejdelší rozměr v pixelech. Opakované fotografování každého jedince se nám pro vyhodnocení osvědčilo kvůli zpětné kontrole, která je nutná pro předcházení náhodným chybám.



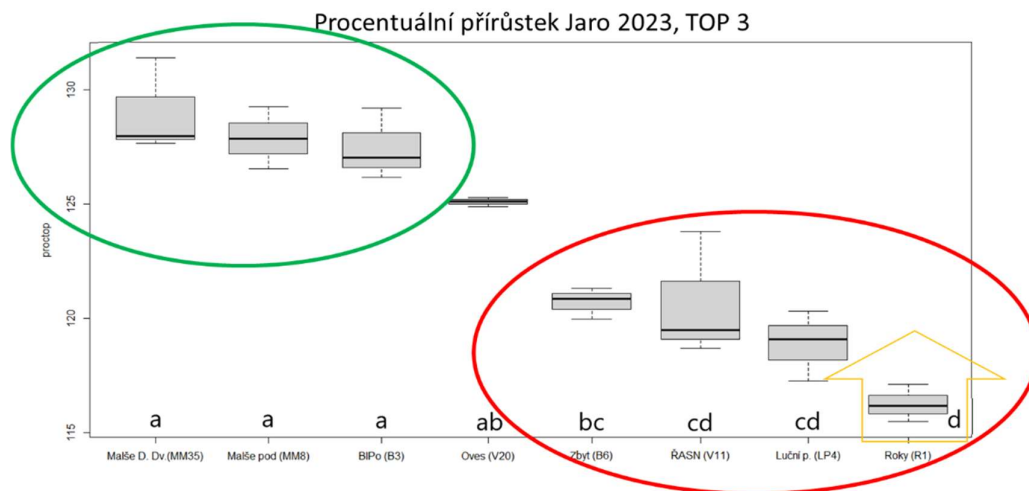
Obr. 7.: Umístění juvenilů 1+ v termostatu v individuálním chovu, fotografování pomocí trinokulárního mikroskopu a příprava detritu na krmení na začátku růstového pokusu.

Výsledky

Jedním z našich cílů na začátku projektu je nastavení metody, jak nejlépe vyhodnotit přírůstky, a přežívání juvenilů, aby bylo možné porovnat úživnost jednotlivých detritů mezi sebou. Na obr. 8. jsou znázorněny přírůstky všech jedinců, krmených jarním detritem, tedy 12 juvenilů v každé skupině. Následně byl proveden post-hoc test Tuckeyovou metodou, který rozdělil testované detrity do skupin na základě podobnosti přírůstků. Z předchozích výzkumů a dat ale víme, že přírůstání je ovlivněno více faktory, tedy i když vnější podmínky jsou standardní, závisí přírůstky kromě potravy např. i na vstupní velikosti, tukových zásobách a kondici juvenilů, vývinu filtračního aparátu apod. Tyto faktory mají vliv i na vyšší úmrtnost podprůměrně velkých jedinců, která nesouvisí s potravou, ale momentální kondicí. Hodnotíme-li tedy přírůstky jen tří nejlépe rostoucích jedinců v každé skupině (obr. 9.), při vyhodnocení Tuckeyho testem dosáhneme přesvědčivějších výsledků, protože z experimentu jsou vyřazeni náhodně uhynulí jedinci a jedinci, kteří málo přirůstají kvůli horší vstupní kondici.

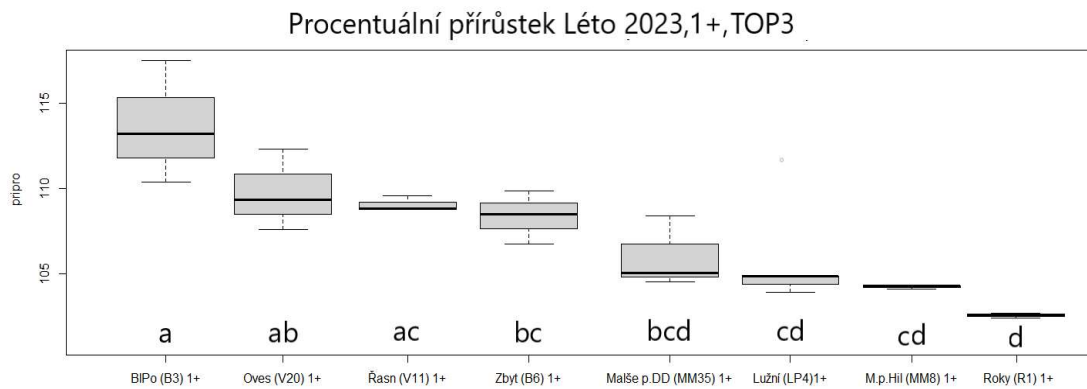


Obr. 8.: Procentuální přírůstek juvenilů, jarní detrit 2023, $n=90=(8*12)$; 6 uhynulých; Tukeyho HSD test



Obr. 9.: Procentuální přírůstek juvenilů, jarní detrit 2023, metoda TOP 3 (z každé skupiny 3 nejlépe rostoucí jedinci)

Dosud byl vyhodnocen růst a přežívání z jarního a letního experimentu. Přežívání bylo v jarní sezóně vyšší než v letní, a také přírůstky byly v průměru vyšší v jarní sezóně (115 – 125% jarní versus 100 – 110% letní). Při porovnávání jednotlivých detritů se v jarní sezóně jasně oddělily čtyři vhodné od čtyř nevhodných, ovšem stejně jako u hydrochemických analýz toto rozdělení neodpovídá našemu původnímu očekávání. V letní sezóně byly rozdíly mezi detrity z jednotlivých lokalit ještě patrnější, což je zejména dobře vidět opět při hodnocení tří nejlépe rostoucích jedinců - TOP 3 (obr. 10.)



Obr. 10.: Procentuální přírůstek juvenilů, letní detrit 2023, metoda TOP 3 (z každé skupiny 3 nejlépe rostoucí jedinci)

Část 2: Extrakce a detekce aminokyselin a proteinů z detritu

Další řešitel: Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra biochemie

RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D., RNDr. Kateřina Bělonožníková, Ph.D., prof. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.,
doc. RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

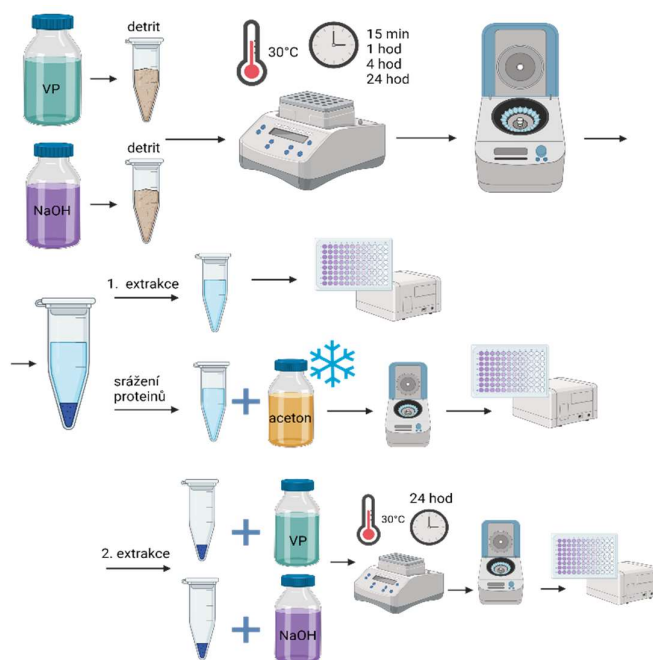
Metody

Lyofilizace detritu

Všechny vzorky detritu z vybraných oblastí (Blanice Arnoštov, Lužní p., Malše pod D. Dvořištěm, Malše pod Hiltchen, Náhon Rokytnice, Řasnice ústí, Vltava na Ovesnou, Zbytinský p. ústí) byly vysušeny mrazem (lyofilizovány) na přístroji Lyovac GT 2 (FinnAqua) a uchovávány v -28°C před další analýzou.

Extrakce proteinů z lyofilizovaného detritu

Optimalizace extrakčních podmínek byla provedena na detritu z Blanice Arnoštov (obrázek 11). Extrakce proteinů z detritu byla optimalizována ve dvou typech extrakčních roztoků (VP: 100 mM Tris-HCl, 2%(w/v) dodecylsírán sodný (SDS), pH 6,8; NaOH: 0,1 M NaOH, pH 13), za různých časů inkubace (15 min, 1 hod, 4 hod, 24 hod) za konstantní teploty (30°C) a kontinuálním třepáním (200 RPM). Dále byl sledován vliv opakované extrakce po 24 hodinách. Srážení proteinů za účelem odstranění možných kontaminant bylo provedeno pomocí ledového acetonu a inkubací přes noc při -28°C . Centrifugace probíhala vždy 10 minut při 13 400 RPM ve stolní centrifuzě Mini-Spin firmy Eppendorf.



Obrázek 11.: Schéma optimalizace extrakce proteinů z detritu z Blanice Arnoštov. VP: 100 mM Tris-HCl, 2% SDS, pH 6,8; NaOH: 0,1 M NaOH, pH 13.

Stanovení koncentrace proteinů dle Lowryho

Chemikálie: 50 % (v/v) fenolové reagens (komerčně dostupné), Roztok A: 2% Na₂CO₃ v 0,1 M NaOH, Roztok B: 0,5% CuSO₄ v 1% vinanu sodném, Roztok C se připraví smísením 10 ml roztoku A a 0,2 ml roztoku B.

Postup: Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno po patnácti mikrolitrech vzorku vždy v triplicátech. Poté bylo přidáno vždy 165 µl roztoku C. Po deseti minutové inkubaci za laboratorní teploty bylo přidáno 20 µl 50 % (v/v) fenolového reagens. Po třiceti minutové inkubaci za laboratorní teploty byla změřena absorbance při 700 nm. Kalibrace metody byla provedena pomocí standardních roztoků hovězího sérového albuminu.

Stanovení koncentrace proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové (BCA)

Chemikálie: Roztok A: 2% (w/v) Na₂CO₃; 0,95% (w/v) NaHCO₃; 0,16% (w/v) vinan sodný; 0,4% (w/v) NaOH; 1% (w/v) sodná sůl BCA; pH 11,25 (upravit pH, případně titrovat 50%(w/v) NaOH nebo přidat pevný NaHCO₃), Roztok B: 4% (w/v) CuSO₄ · 5 H₂O.

Činidlo pro stanovení proteinů bylo připraveno smícháním roztoků A a B v poměru 50:1.

Postup: Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno po deseti mikrolitrech vzorku vždy v triplicátech. Poté bylo přidáno 200 µl činidla pro stanovení koncentrace proteinů a následovala inkubace po dobu 30 min při 37°C. Po skončení inkubace byla změřena absorbance při 562 nm. Kalibrace metody byla provedena pomocí standardních roztoků hovězího sérového albuminu.

Elektroforetická separace proteinů v prostředí dodecylsírany sodného

Chemikálie: 30% Akrylamid/bisakrylamid, 1,5M Tris-HCl, pH 8,8, 0,5M Tris-HCl, pH 6,8, 10% (w/v) dodecylsírany sodný (SDS), 10%(w/v) peroxodisírany sodný, TEMED, vzorkový pufr redukující (2,4 ml destilované vody; 2,6 ml 0,5 M Tris-HCl pufru pH 6,8; 2 ml glycerolu; 2 ml 10% SDS; 0,5 ml 2-merkptoethanolu; 0,5 ml 1% bromfenolové modři), Elektrodotový pufr, pH 8,3, 5× koncentrovaný (15 g Tris, 72 g glycinu, 5 g SDS bylo doplněno do 1 l destilovanou vodou).

Složení vždy 1 gelu pro systém Mini-Protean firmy Bio-Rad:

- 15% malopórový (separační) gel: 1,35 ml destilované vody, 3,0 ml 30% akrylamid/bis, 1,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,06 ml 10%(w/v) SDS, 0,005 ml TEMED, 0,06 ml 10%(w/v) peroxodisírany amonný.
- 4% velkopórový (zaostřovací) gel: 1,22 ml destilované vody, 0,26 ml 30% akrylamid/bis, 0,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,02 ml 10%(w/v) SDS, 0,005 ml TEMED, 0,02 ml 10%(w/v) peroxodisírany amonný.

Postup: Elektroforetická separace proteinů probíhala v 15% malopórovém (separačním) gelu a 4% velkopórovém (zaostřovacím) gelu v systému Mini-Protean firmy Bio-Rad. Vzorky pro elektroforetickou separaci byly při ředěny 1:1 redukujícím vzorkovým pufrem. Elektroforetická separace probíhala v zaostřovacím gelu při napětí 70 V a v separačním gelu při 180 V. Po ukončení elektroforézy byl gel obarven pomocí dusičnanu stříbrného.

Detekce proteinů pomocí barvení dusičnanem stříbrným po elektroforetické separaci

Chemikálie:

- fixační roztok: 50%(v/v) ethanol +12%(v/v) kys.octová + 0,05% formaldehyd
- promývací roztok: 20%(v/v) ethanol
- senzitivizující roztok: 0,02%(w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- barvicí roztok: 0,2% (w/v) AgNO_3 + 0,076% formaldehyd
- vyvíjecí roztok: 6%(w/v) Na_2CO_3 + 0,0004% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + 0,05% formaldehyd
- terminační roztok: 12%(v/v) kys.octová

Postup

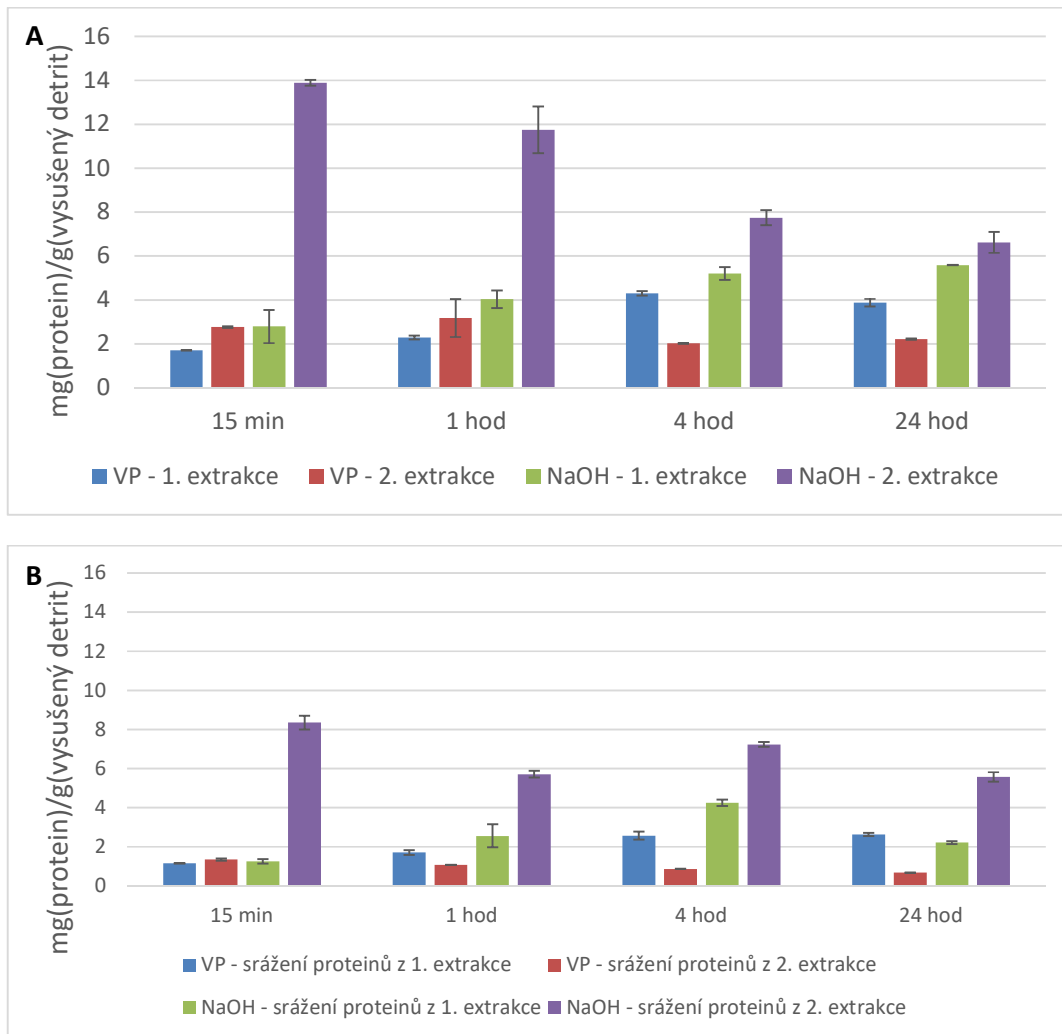
Separanční gel byl vložen do fixačního roztoku přes noc. Druhý den byl během 20 min 2× důkladně promyt přibližně 100 ml promývacího roztoku a 2× vodou. Gel byl ponořen do 100 ml senzitivizujícího roztoku na 2 min. Gel byl 2× krátce promyt destilovanou vodou. Gel byl vložen do vychlazeného barvicího roztoku na dobu 20 min. Po barvení byl barvicí roztok vylit a gel promyt větším objemem vody po dobu 60 s. Gel byl ponořen do vyvíjecího roztoku, rychle vylit. Byla přidána další část vyvíjecího roztoku a ponechána vyvíjet do požadovaného vzhledu. Vyvíjení bylo zastaveno přidáním asi 50 ml terminačního roztoku přímo do vyvíjecí lázně.

Stanovení volných aminokyselin

Kapilární elektroforéza s bezkontaktním detektorem vodivosti byla použita k oddělení 20 proteinogenních aminokyselin v kyselém pozadí elektrolytu. Všechny elektroforetické experimenty byly prováděny kapilárou z taveného oxidu křemičitého (Polymicro Technologies, Phoenix, USA) za použití kapilárního elektroforetického přístroje G7100A (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s bezkontaktním detektorem vodivosti. Detektor byl tvořen dvěma válcovitými elektrodami o délce 4 mm s 1 mm izolační štěrbinou. Vnitřní průměr elektrod byl 400 μm .

Popis řešení:

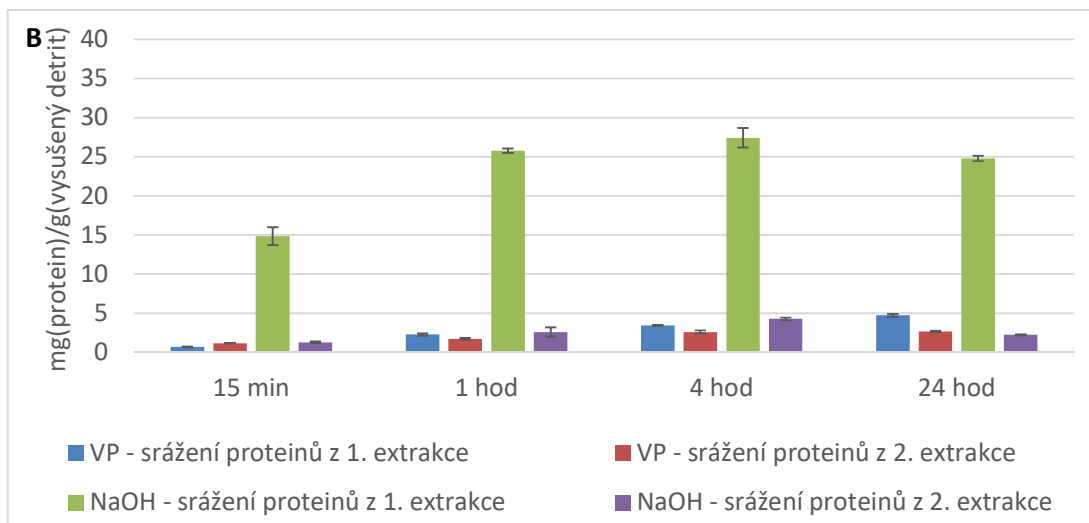
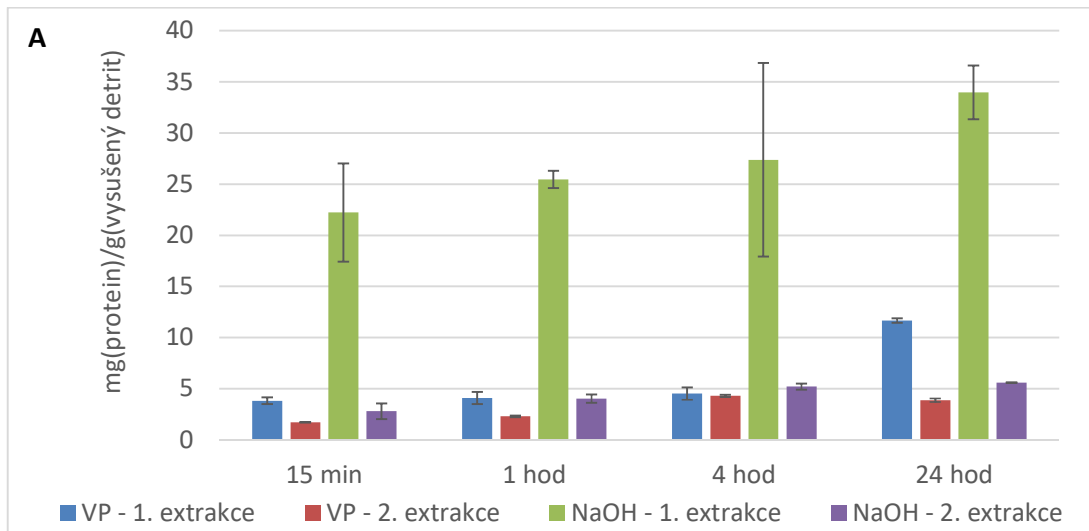
V případě stanovení dle Lowryho byl u obou extrakčních roztoků (VP, NaOH) zjištěno vyšší množství proteinů po delší inkubaci (obrázek 12). V případě opakované alkalické extrakce (NaOH) bylo detekováno další významné množství uvolněných proteinů z detritu. V případě srážení proteinů acetonem bylo detekováno nižší množství proteinů, jelikož touto metodou dochází k odstranění kontaminujících látek, které mohou interferovat v daném stanovení, ale také může docházet ke ztrátám během manipulace s materiálem. Stanovení metodou kyseliny bicinchoninové vykazovalo celkově vyšší hodnoty než stanovení proteinů dle Lowryho (obrázek 3). V tomto případě bylo detekováno nejvyšší množství proteinů po alkalické extrakci (NaOH).



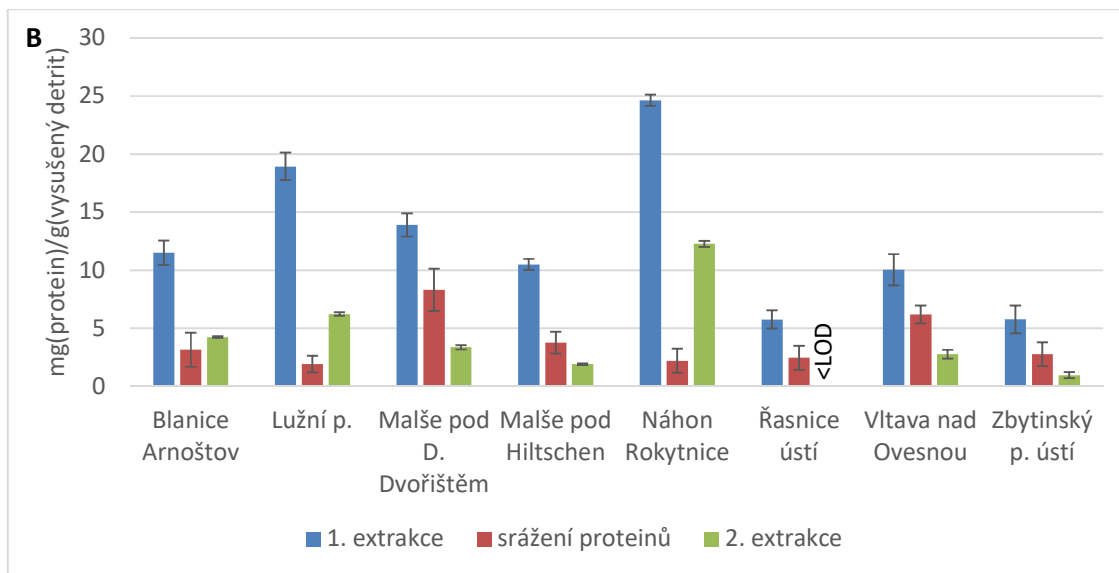
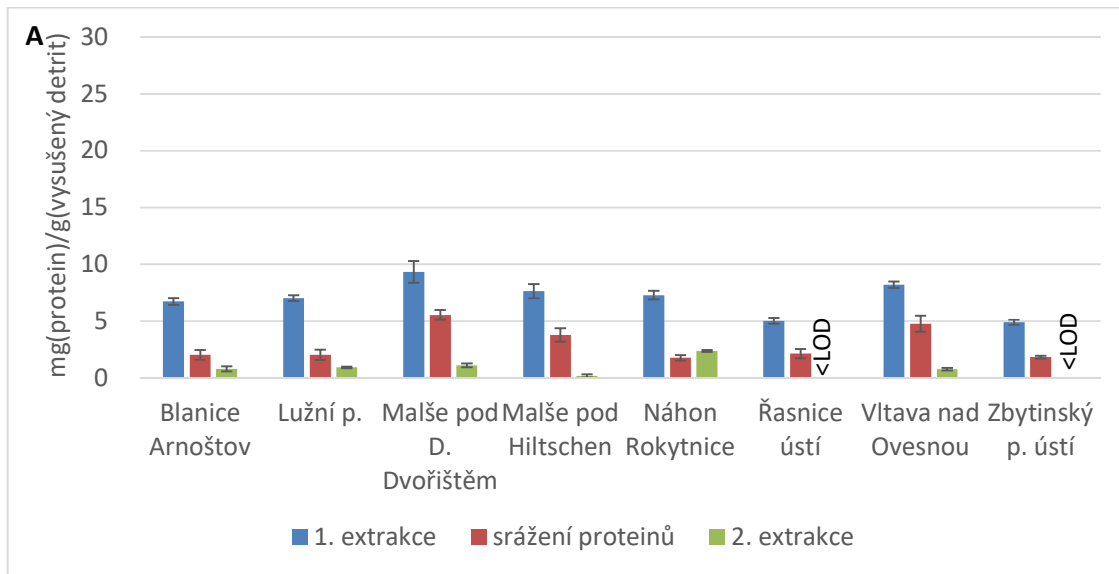
Obrázek 12.: Stanovení koncentrace proteinů dle Lowryho metody. VP: 100 mM Tris-HCl, 2% SDS, pH 6,8; NaOH: 0,1 M NaOH, pH 13. Obsah proteinů byl stanoven v extrakčním čínidle (A) a po srážení proteinů ledovým acetonem (B). Druhá extrakce představuje opakovanou extrakci proteinů z detritu po dobu 24 hod.

Optimalizace extrakce proteinů byla sledována i z hlediska reprodukovatelnosti a také pomocí metody standardního přídávku proteinu. Z hlediska reprodukovatelnosti je potřeba pracovat s větším množstvím detritu (řádově desetiny gramu). Metoda standardního přídávku prokázala, že extrakce je dostatečně účinná, jelikož vždy byl sledován nárůst extrakce proteinů o stejné množství (o standardní protein, data nejsou součástí zprávy).

Koncentrace proteinů byla stanovena ve vzorcích detritu z vybraných oblastí (Blanice Arnoštov, Lužní p., Malše pod D. Dvořištěm, Malše pod Hiltchen, Náhon Rokytnice, Řasnice ústí, Vltava na Ovesnou, Zbytinský p. ústí) odebraných v červnu 2023 (obrázek 4).



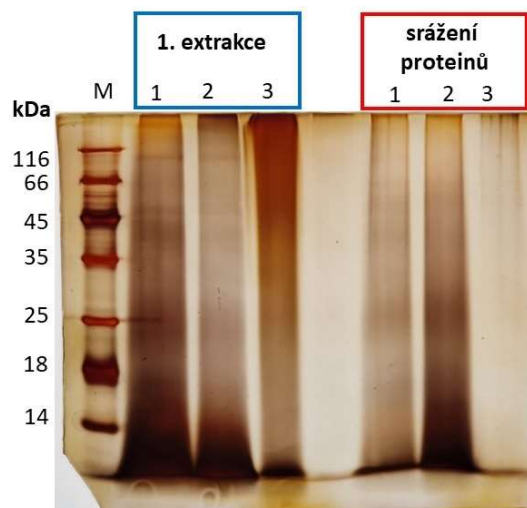
Obrázek 13.: Stanovení koncentrace proteinů dle metody kyseliny bichinoninové. VP: 100 mM Tris-HCl, 2% SDS, pH 6,8; NaOH: 0,1 M NaOH, pH 13. Obsah proteinů byl stanoven v extrakčním činidle (A) a po srážení proteinů ledovým acetonem (B). Druhá extrakce představuje opakovanou extrakci proteinů z detritu po dobu 24 hod.



Obrázek 14.: Stanovení obsahu proteinů dle Lowryho metody (A) dle metody kyseliny bicinchoninové (B). Extrakce byla provedena VP extrakčním pufrem (100 mM Tris-HCl, 2% SDS, pH 6,8). Srážení proteinů bylo provedeno ledovým acetonem. Druhá extrakce představuje opakovanou extrakci proteinů z detritu po dobu 24 hod.

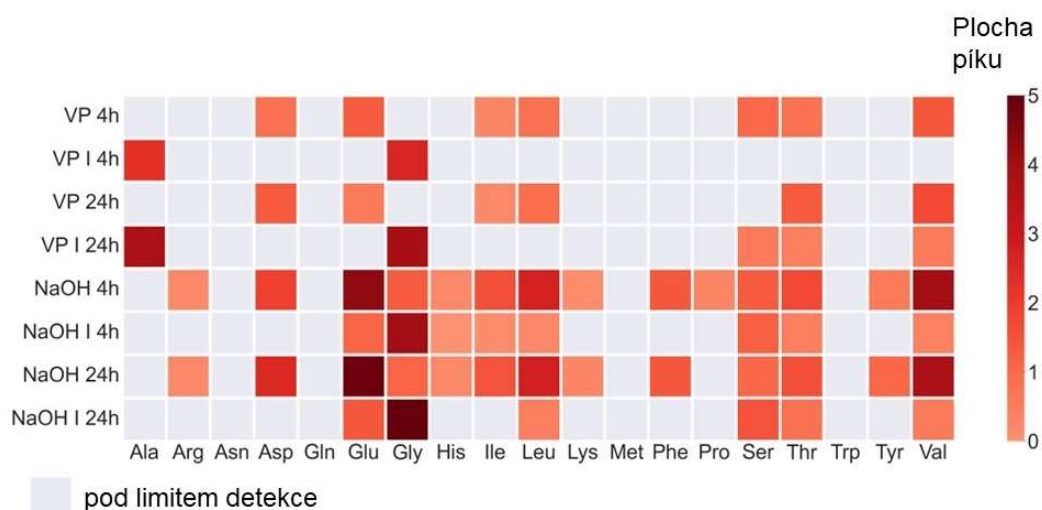
V případě odběrových míst Řasnice ústí, Zbytinský p. ústí a Malše pod Hiltischen byla koncentrace proteinů při opakované extrakci pod limitem detekce příp. velmi nízká. V těchto případech lze předpokládat velmi nízké množství proteinů (resp. látek) dostupných k postupnému uvolňování z detritu. Metoda stanovení pomocí kyseliny bicinchoninové vykazovala vyšší naměřené hodnoty (obrázek 4B), ale trend jednotlivých odběrových míst zůstal zachován kromě Lužního p. a Náhonu Rokytnice, které vykazovaly výrazně vyšší koncentrace proteinů než při stanovení dle Lowryho (obrázek 4A). Všechna odběrová místa budou dále analyzována z hlediska množství dalších látek jako jsou např. sacharidy, fenolické látky, které mohou mít interferující vliv na metody stanovení koncentrace proteinů.

Detekce a analýza proteinů z hlediska molekulové hmotnosti byla provedena pomocí elektroforetické separace v 15% polyakrylamidovém gelu v uspořádání s dodecylsíránem sodným (SDS) za denaturujících a redukujících podmínek. Barvení bylo provedeno stříbrem (obrázek 5). Elektroforetická separace bude dále optimalizována se zaměřením na malé proteiny a peptidy (< 10kDa). Ve všech variantách extrakce byly detekovány proteiny o širokém rozpětí molekulové hmotnosti.



Obrázek 15.: Elektroforetická separace proteinů v 15% polyakrylamidovém gelu. 1 - 1 - 0,1 M Tris HCl, 1% (w/v) SDS, 20% (w/v) glycerol, 0,005% (w/v) bromfenol. modř, pH 6,8; 2 - 0,1 M Tris HCl, 1% (w/v) SDS, 20 mM DTT, pH 6,8; 3 - 0,1 M NaOH, pH 13 ; extrakční podmínky: 24 hod, 30°C, 220 RPM.

Stanovení obsahu volných aminokyselin pomocí kapilární elektroforézy s vodivostní detekcí bylo optimalizováno na základě analýzy vzorků po 4 a 24 hodinové inkubaci a obou extrakčních roztocích (VP, NaOH) a opětovné extrakci (obrázek 6). V alkalické extrakci (NaOH) bylo detekováno více volných aminokyselin. Zároveň se jejich počet neměnil mezi 4 a 24 hodinovou inkubací. Po opětovné extrakci bylo detekováno méně volných aminokyselin.



Obrázek 16.: Optimalizace stanovení volných aminokyselin. Extrakční činidla VP a NaOH, inkubace 4 hod nebo 24 hod, 1 – 2. extrakce.

Pasivní odběrové zařízení detritu

Ve sledovaném období byl také navržen a vyroben první prototyp odběrového zařízení detritu, který bude dále testován během odběrů v další fázi projektu.

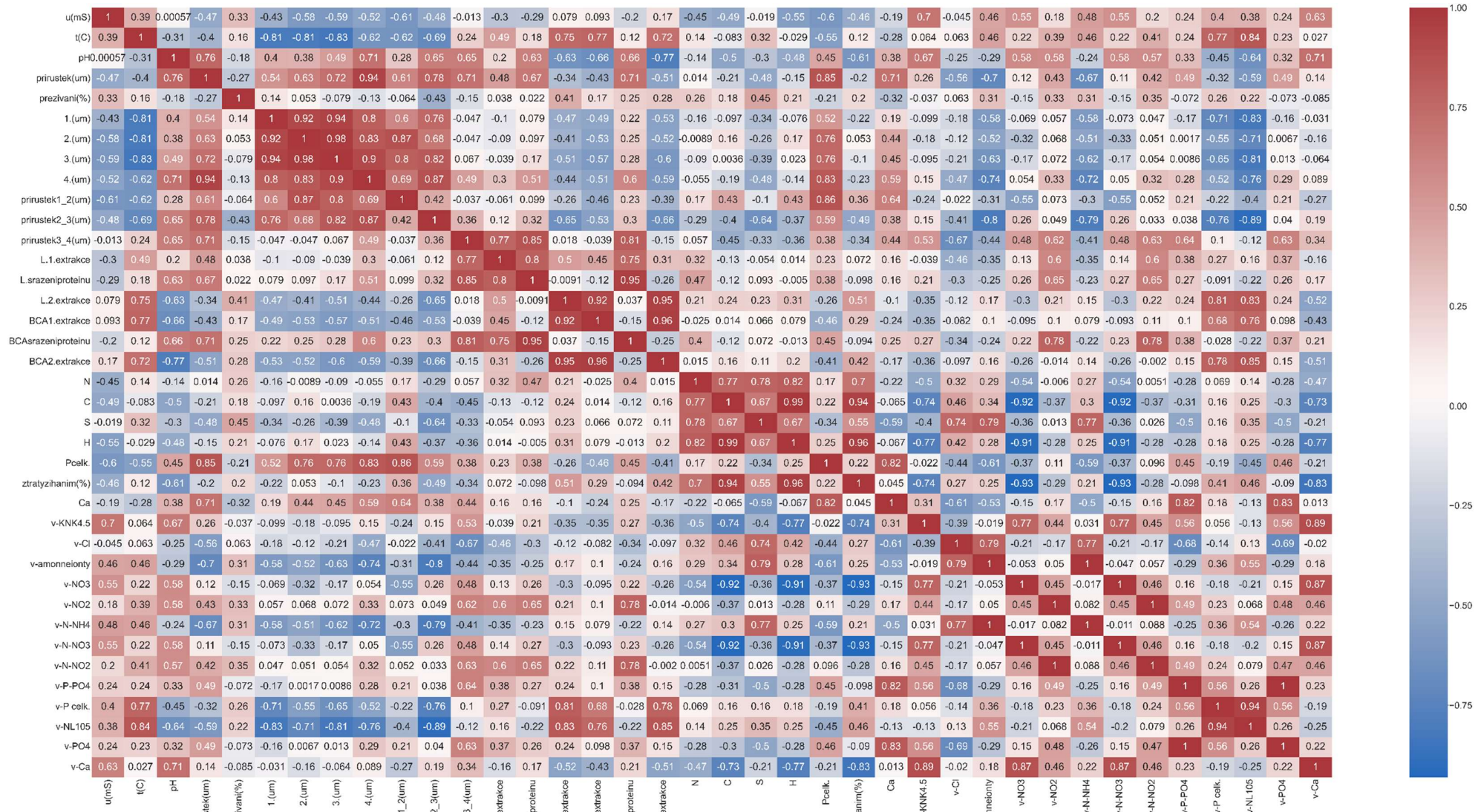


Obrázek 17.: První prototyp odběrového zařízení. Na prvních dvou obrázcích jsou původní odběráky a jejich dle užitečného vzoru, na třetím obrázku jsou vidět nové jednotlivé součásti, které lze dle potřeby přidat/odebrat (senzor), případně vyměnit (různá velikost/tvar trychtýře) a na čtvrtém obrázku je pohled na složené odběrové zařízení.

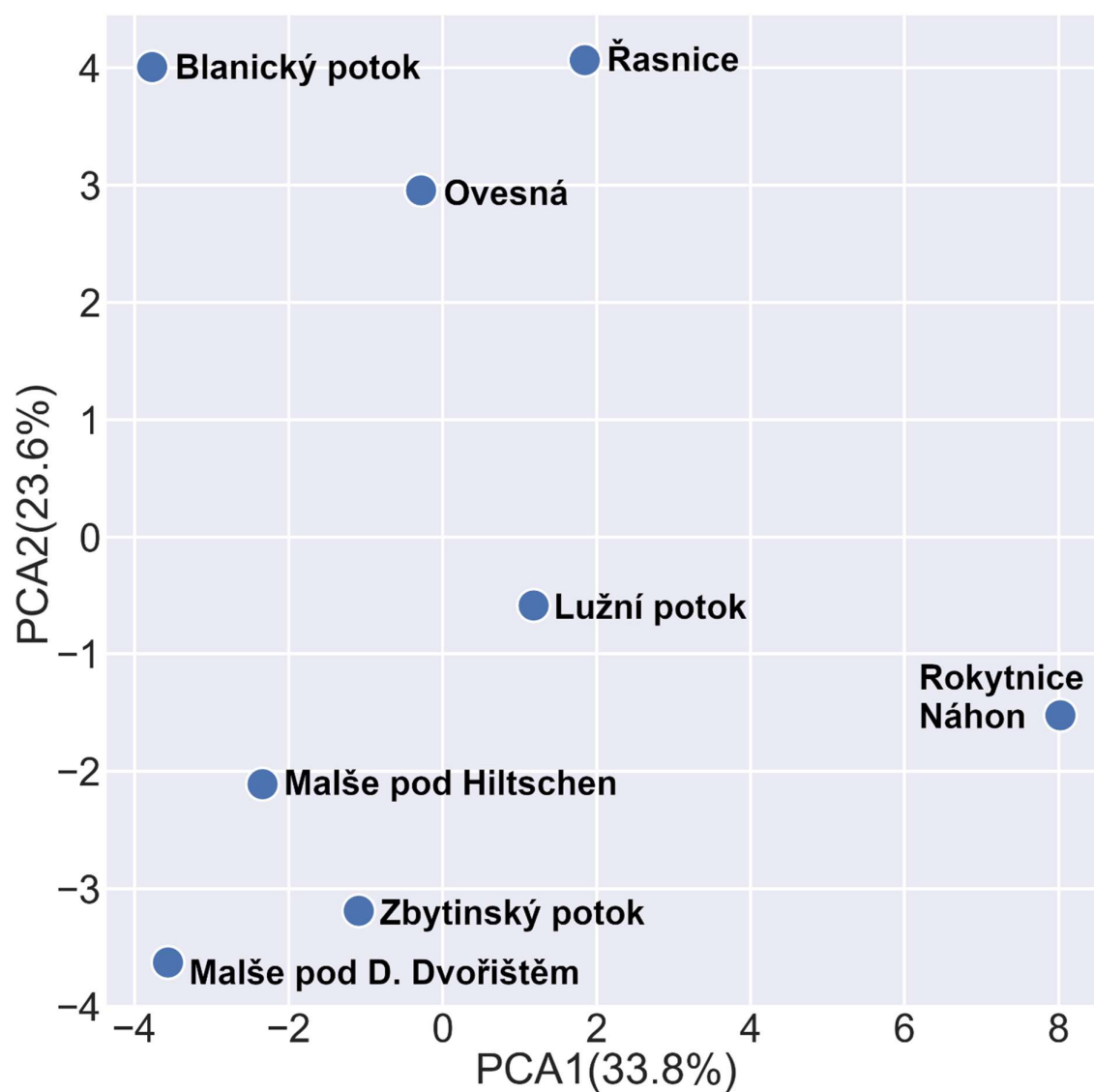
Korelace dat

Získaná data ze stanovení vodivosti, teploty, a pH měřené na místě odběru, dále prvková analýza detritu, data z bioindikací (přírůstky a % přežívání), analýza obsahu extrahovatelných proteinů z detritu, a stanovení sušiny, ale také detekce vybraných iontů ve vodě z detritů z osmi lokalit z jara 2023 byla podrobena korelační analýze (obrázek 18). V případě metody srážení proteinů (a obou stanovení, tj. dle Lowryho a BCA) byla zjištěna pozitivní korelace (0,67 a 0,71) s celkovým přírůstkem juvenilů v μm a (0,85 a 0,81) s přírůstkem oproti kontrole ve variantě 3_4.

Všechny výše uvedené výsledky z odběrových lokalit byly také podrobeny analýze hlavních komponent (PCA, obrázek 19). Lokality Blanický potok a Ovesná korelují společně pozitivně a zároveň negativně korelují s lokalitami Lužní potok a Rokytnice Náhon. Lokalita Řasnice negativně koreluje s lokalitami Malše pod Hiltchen, Zbytinský potok a Malše pod D. Dvořištěm.



Obrázek 18.: Korelační analýza všech dat získaných v analýze detritů z osmi lokalit z jara 2023 (Blanický potok, Lužní potok, Malše pod D. Dvoříštěm, Malše pod Hiltchen, Ovesná, Rokytnice Náhon, Řasnice, Zbytinský potok). Zkratky: 1-4 (um) označují přírůstky v μm , BCA 1.extrakce/srážení proteinu/2.extrakce ukazuje stanovení koncentrace proteinů dle metody kyseliny bicinchoninové, L. 1.extrakce/srážení proteinu/2.extrakce ukazuje stanovení koncentrace proteinů dle Lowryho metody, označení v- znamená stanovení ve vodě nikoliv detritu.



Obrázek 19.: Analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis, PCA) byla provedena ze všech dat získaných v analýze detritů z osmi lokalit z jara 2023 (Blanický potok, Lužní potok, Malše pod D. Dvoříštěm, Malše pod Hiltchen, Ovesná, Rokytnice Náhon, Řasnice, Zbytinský potok).