



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

Souhrnná výzkumná zpráva za rok 2024

SS06010027 program TAČR Prostředí pro život 6

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

veřejná výzkumná instituce



**PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

Souhrn prací, realizační tým a naplnění programu

Ve sledovaném období hlavní řešitel (Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, v. v. i., odbor aplikované ekologie) provedl odběr detritu a vzorkování vody na celkem 17-ti lokalitách. Lokality s výskytem perlorodky říční, které byly vzorkovány již v prvním roce projektu, byly dle plánu (viz Postup a etapy projektu) doplněny o některé lokality, kde perlorodka již vyhynula, kde ale mohou existovat dobré podmínky pro její případnou reintrodukci, jako jsou přítoky perlorodkových toků nebo místa, ležící pod současným výskytem perlorodky se zhoršenou nebo proměnlivou kvalitou vodního prostředí. Na místě vždy byly provedeny základní fyzikálně-chemické analýzy vody (měření teploty, vodivosti a pH), dále pak odebrány vzorky vody i detritu pro analýzy obsahu vybraných prvků a iontů, v případě detritu též organické sušiny. Ve vzorcích z jarního a letního vzorkování byla provedena elementární analýza CNS v externí laboratoři. Byly naplánovány a realizovány tři cykly růstových pokusů na juvenilních jedincích perlorodky říční po prvním roce života (1+), proběhlo jejich vyhodnocení a porovnání s rokem 2023.

Tým dalšího řešitele (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Katedra biochemie) ve sledovaném období projektu dokončil optimalizaci postupů započatou v předchozí etapě a úspěšně určil vhodné extrakční postupy pro sledované látky. V této časově nejrozsáhlejší části byly pro jednotlivé typy stanovení hledány postupy, které (i) jsou kompatibilní s následnou metodou stanovení, (ii) dobře se při nich extrahují sledované analyty, a (iii) co nejméně se při nich extrahují látky interferující s metodou stanovení. Také pro stanovení enzymových aktivit bylo nutné optimalizovat podmínky jednotlivých reakcí, zejména množství detritu použitého v reakcích a délku inkubace. Rovněž byly vyrobeny a testovány prototypy pasivního odběrového zařízení detritu.

Ve sledovaném období byl dodržen harmonogram prací obou řešitelů. V daném období neproběhly změny složení týmu ani výše úvazků členů řešitelského kolektivu. Oba řešitelské týmy se účastnily několika koordinačních schůzek, na kterých byly prezentovány a konzultovány získané výsledky a další postup obou řešitelů. 2. 10. 2024 proběhl kontrolní den projektu s odborným garantem.

Projekt je navázán na Záchranný 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 odchovaných perlorodek za účelem posilování stávajících populací, případně reintrodukci.

Část 1: Odběry vody a detritu, základní fyzikálně-chemické a chemické parametry vody a detritu a růstové parametry juvenilních jedinců perlorodky říční

Hlavní řešitel: Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, v. v. i., Odbor aplikované ekologie

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

Vzorkování detritu

Vzorkování detritu proběhlo opět na jaře, v létě a na podzim, počet lokalit však byl rozšířen o některé lokality, které jsou obecně považovány za málo perspektivní nebo takové, kde perlorodky vyhynuly, kde pro ně ale mohou existovat dobré podmínky (Tab. 1). K osmi původním lokalitám v povodí Blanice, Vltavy, Malše a Rokytnice tak byly nově přidány lokality na Českomoravské Vysočině, Otavě a Zlatém potoce. Lokality vzorkované už v loňském roce byly doplněny o některé profily níže po proudu Blanice, Vltavy a Malše, kde se v minulosti perlorodka vyskytovala, ale vlivem zhoršené kvality vody vymizela. V roce 2024 proběhlo 28.-31. 5. jarní, 20.-22. 8. letní a 8.-10. 10. podzimní vzorkování na 17-ti lokalitách. Součástí jarního vzorkování bylo i testování odběráků, které je popsáno v samostatné části „Výstupy“. Detrit jsme odebírali ručně ze dna toku plastovými stříkačkami v místech, kde se organický materiál přirozeně usazuje, jako jsou tišiny, tůňky nebo oblasti s výskytem makrofyt. Odebraný materiál byl následně přelitím přes síto o velikosti ok 1 mm zbaven větších nečistot a po usazení byla slita voda, aby výsledný vzorek detritu byl co nejhustší. Výsledný vzorek byl poté promíchán a rozdělen na podíly určené na jednotlivé analýzy, na krmení perlorodek i k uschování (v podobě zmražených vzorků detritu a jejich sušin).



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

povodí	lokalita	kód	povodí	lokalita	kód
Blanice	Blanice Arnoštov	B1	Vltava	Řasnice – ústí	V11
Blanice	Zbytinský potok	B6	Vltava	Vltava nad Ovesnou	V20
Blanice	Tetřívčí potok	B20	Vltava	Vltava pod Lipnem	V21
Blanice	Blanice – náhon Blanička	B40	Malše	Malše Ješkov	MM13
Zlatý potok	Zlatý p. – Tisovka	ZP30	Malše	Malše pod Hiltchen	MM8
Zlatý potok	Zlatý p. Čichtice	ZP40	Malše	Malše pod Dolním Dvořištěm	MM35
Otava	Otava – Malé Hydčice	OT1	Ašsko	Lužní p. nad Fürstbächlein	LP4
Vysočina	Jankovský potok	JA1	Ašsko	Náhon Rokytnice	R1
Vysočina	Kladinský potok	KL1			

Tab. 1: Přehled lokalit, na kterých byl vzorkován detrit ve třech sezónách roku 2024.



Obr. 2: Vzorkování detritu z toků přímým odběrem ze dna toku, jeho sedimentace a slévání zahuštěných vzorků.

Analýzy

Každý odebraný směsný vzorek detritu byl rozdělen na čtyři podíly, kdy jeden byl využit na analýzu vybraných základních parametrů v laboratořích VÚV TGM (ztráta žíháním sušiny, tj. podíl organických látek v detritu, obsah celkového fosforu, celkového vápníku a železa v sušině) a zbytek sušiny byl předán externí laboratoři na prvkovou analýzu (stanovení obsahu uhlíku a dusíku). Druhý podíl byl použit na biochemické analýzy v laboratoři PŘF UK (viz Část 2 průběžné zprávy), třetí podíl na růstové pokusy s juvenilními perlorodkami a poslední byl zamražen a stejně jako sušina z něj uschován pro případné pozdější využití.

Na všech lokalitách byl vždy odebrán také vzorek vody, ve kterém byla na místě změřena teplota, vodivost a pH, v roce 2024 na některých lokalitách také obsah O_2 , viz příloha 1. Paralelně odebraný vzorek vody byl analyzován v laboratoři VÚV TGM (pH_{lab} , A_{254} , $KNK_{4,5}$, Cl^- , NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , $P_{celk.}$, $NL\ 105$, Ca^{2+}). Voda pro hromadné chovy perlorodek před a mezi pokusy byla odebírána ze Spálenického potoka, voda pro růstové pokusy byla odebírána přímo na odběrových místech detritu.

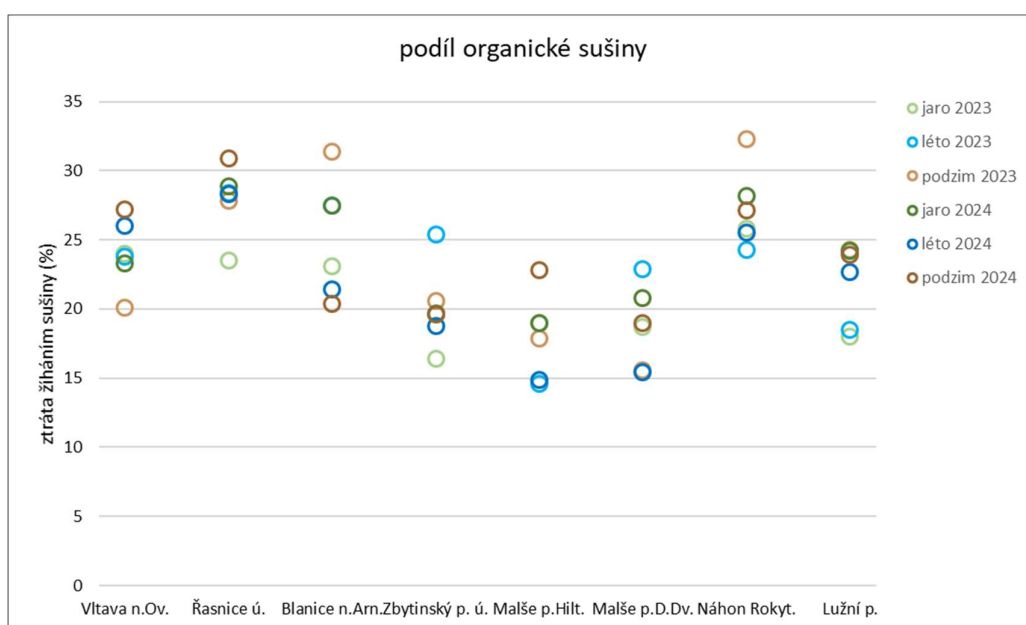
Výsledky

Z hlediska fyzikálně-chemických parametrů vody (Příloha 1) nebyly u teploty vody nikde překročeny limitní hodnoty pro perlorodku říční, uváděné Metodikou podpory perlorodky říční (Simon a kol., 2018). Naměřené koncentrace kyslíku byly vždy vysoké. Téměř ve všech případech však byly vyšší než tyto meze jak hodnoty pH vody, tak především hodnoty vodivosti, a to u vodivosti někdy až 2x – 3x. Potvrzuje to, že přežívající populace perlorodky říční u nás žijí za optimem poměrů svého prostředí. Příloha 2 shrnuje výsledky chemických analýz vod za roky 2023 a 2024. Světle/tmavě zelenou barvou jsou v ní označeny výsledky představující malá/značná překročení uváděných limitních hodnot pro druh. S výjimkou náhonu Rokytnice a Tetřívčího potoka jsou všude překročena množství celkového fosforu a na mnoha lokalitách také množství dusičnanů – zcela nejvíce (až 10x) v Jankovském a Kladinském potoce. Také u koncentrace chloridů a vápníku jsme na některých lokalitách zaznamenali vysoké hodnoty.

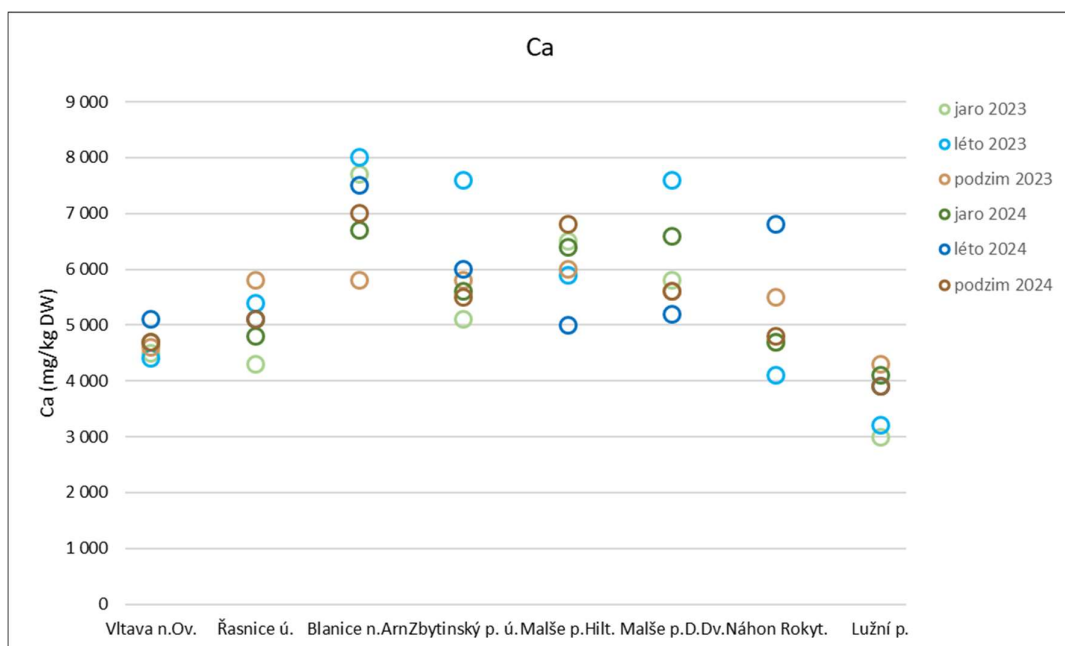
Všechny výsledky analýz detritu jsou v Přílohách 3 a 4; zpětně byly za oba roky doplněny analýzy obsahu železa (Příloha 3). Obr. 3. -5. ukazují podíl organické sušiny, obsah vápníku a celkového fosforu ve vzorcích detritu, který byl na osmi stejných lokalitách odebírán v obou letech.

Organický podíl sušiny detritu byl v r. 2023 obvykle nejvyšší v létě nebo na podzim, v r. 2024 toto s výjimkou Vltavy nad Ovesnou a Řasnice neplatilo. Na jaře 2024 byl až na výjimky (kdy byl stejný) mírně vyšší než na jaře 2023, v létě 2024 však většinou stejný nebo nižší než v létě 2023. Při porovnání lokalit byl celkově nejvyšší v náhonu Rokytnice, Blanici nad Arnoštovem a ústí Řasnice; celkově nejnižší na

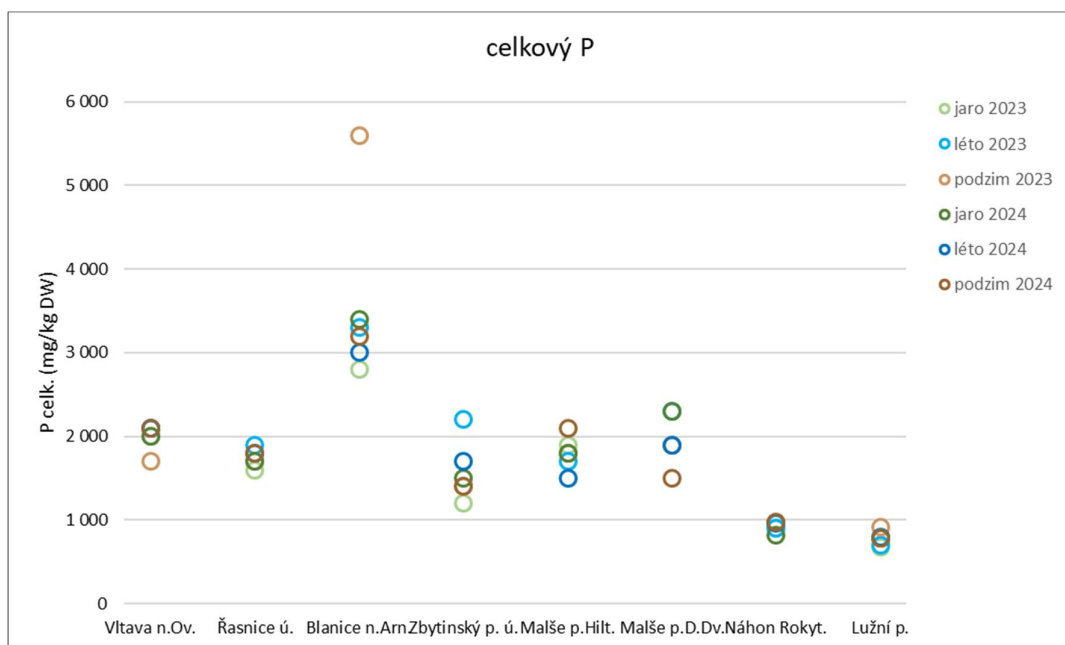
obou profilech Malše, v ústí Zbytinského p. a v Lužním p. Obsah vápníku byl ve srovnání sezón velmi nevyrovnaný, obvykle však byl v létě vyšší než na jaře. Na podzim 2023 byl častěji vyšší než v létě, na podzim 2024 však častěji nižší než v létě. Při porovnání lokalit byl celkově nejvyšší v Blanici nad Arnoštovem, ústí Zbytinského p. a v Malši pod D. Dvořištěm. Množství celkového fosforu v detritu bylo v obou letech mezi sezónami poměrně vyrovnané, s větším nárůstem v létě obou roků v ústí Zbytinského p., v létě 2023 a na jaře 2024 v Malši pod D. Dvořištěm, na podzim 2024 v Malši. Velmi nápadný je vysoký obsah fosforu na podzim 2023 v Blanici nad Arnoštovem. Při porovnání lokalit byl celkově nejvyšší v Blanici nad Arnoštovem a celkově nejnižší v Lužním p. a náhonu Rokytnice. Velmi vysokou koncentraci celkového fosforu i obsahu organické sušiny v Blanici nad Arnoštovem na podzim 2023 si vysvětlujeme výskytem mohutných nárůstů vláknitých řas v toku.



Obr. 3: Množství organické sušiny v detritu osmi lokalit studovaných v obou letech za roky 2023 a 2024.



Obr. 4: Obsah vápníku v sušině detritu osmi lokalit studovaných v obou letech za roky 2023 a 2024.

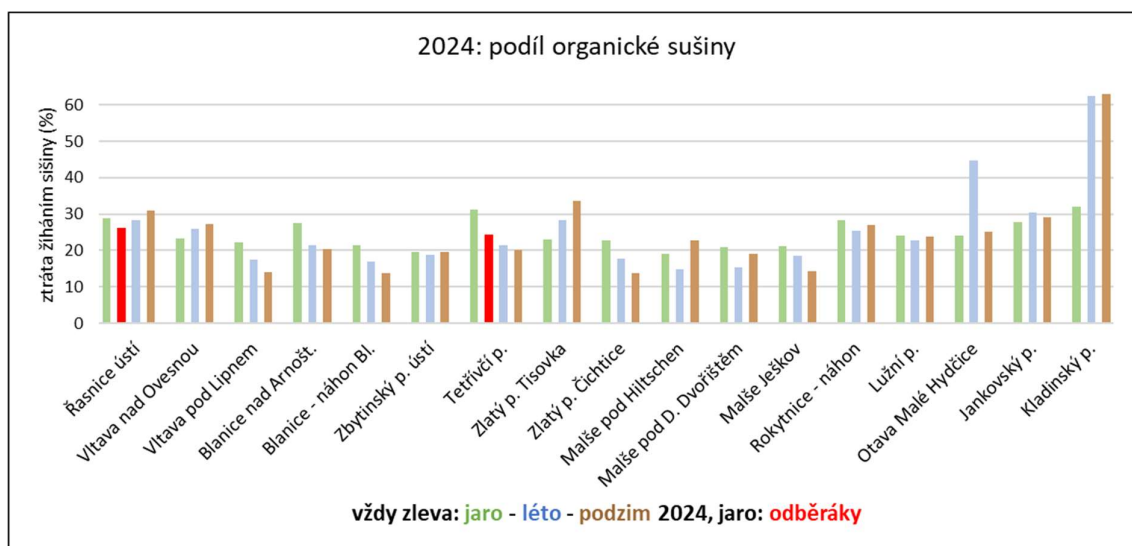


Obr. 5: Obsah celkového fosforu v sušině detritu osmi lokalit studovaných v obou letech za roky 2023 a 2024.

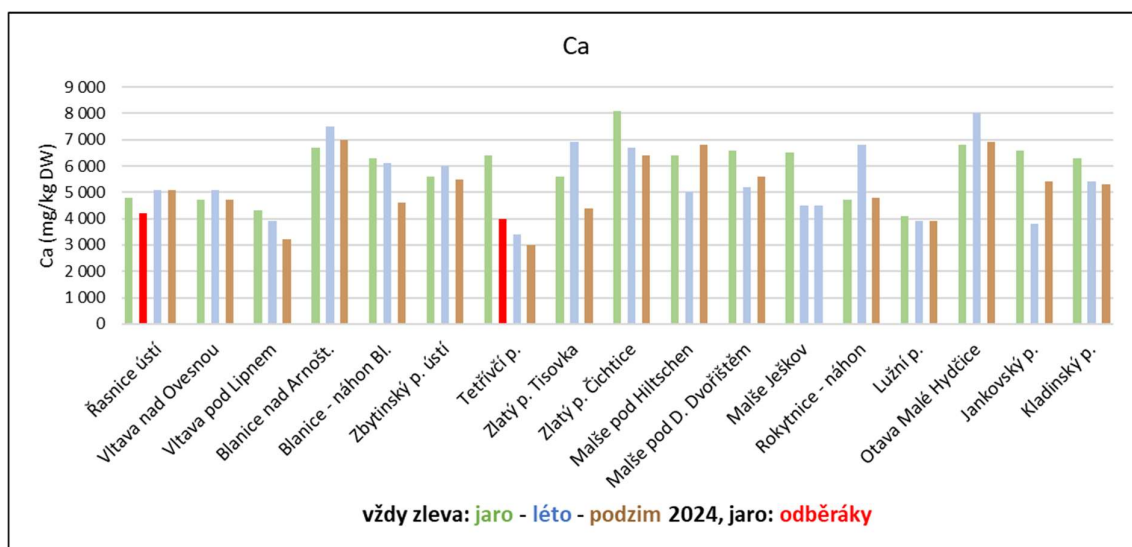
Obr. 6. - 9. ukazují podíl organické sušiny, obsah vápníku, celkového fosforu a železa v detritu na všech 17-ti lokalitách, vzorkovaných v roce 2024, i v detritu nasbíraném pasivními odběračky na dvou z těchto lokalit. Zatímco podíl organické sušiny se u osmi lokalit testovaných v obou letech pohyboval do 20-30 %, u dvou nových lokalit z roku 2024 byly tyto hodnoty vysoce přesaženy: v detritu Kladinského potoka v létě a na podzim (62-63 %) a v detritu Otavy – Malé Hydčice (45 %) v létě. Obsah vápníku se u 8 lokalit testovaných v obou letech pohyboval mezi 4 000-6 000 mg/ kg DW sušiny, pouze na třech lokalitách (v

Blanici nad Arnoštovem, ústí Zbytinského p. a v Malši pod D. Dv.) dosahoval 6 000-8 000 mg/kg DW. Z nových lokalit testovaných v r. 2024 dosahoval jeho obsah hodnot nad 6 000 mg/kg DW v detritu Otavy – M. Hydčice, Zlatého p. Čichtice, Zlatého p. Tisovka a všech tří profilů na Malši. Obsah celkového fosforu se u 8 lokalit testovaných v obou letech pohyboval do 2 000 mg/kg DW (což lehce přesahoval profil Malše pod D. Dv.), u Blanice nad Arnoštovem do 3 000 mg/kg DW. Nové lokality testované v r. 2024 tyto hodnoty nepřesahují s výjimkou Zlatého p. Čichtice a Malše pod D. Dv.

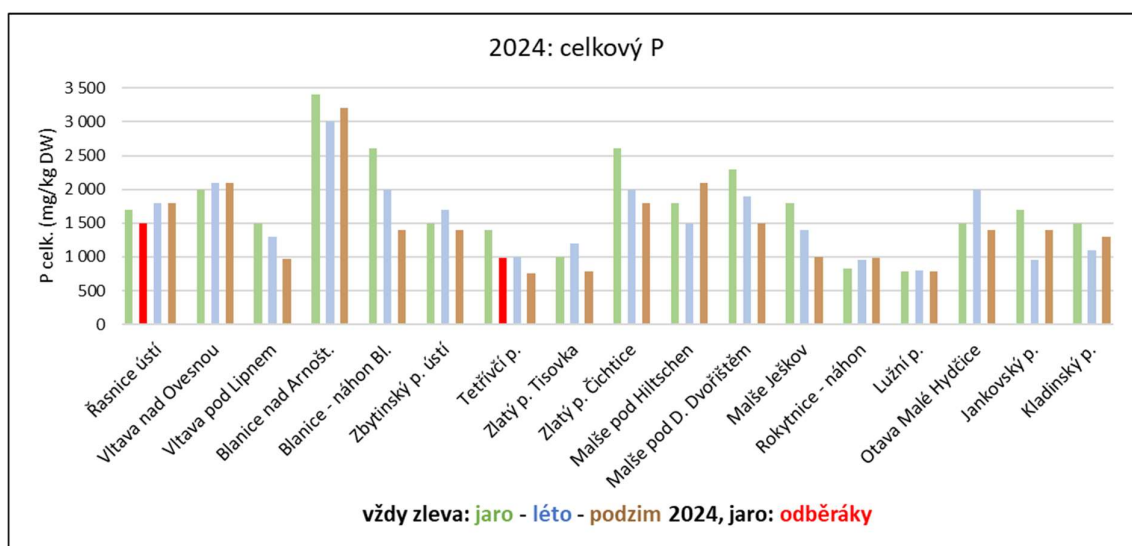
V obou letech byl navíc sledován obsah železa v detritu. Na většině lokalit se pohyboval zhruba do 30 000 mg/ kg DW nebo (častěji) do 40 000 mg/ kg DW, bez zjevné závislosti na ročním období. V ústí Řasnice, Vltavě nad Ovesnou, Lužním potoce a zejména v náhonu Rokytnice a v Blanici nad Arnoštovem však některé hodnoty přesáhly 40 000 mg/kg DW. V náhonu Rokytnice bylo naměřeno až 50 100 mg/kg DW a v Blanici nad Arnoštovem 68 800 mg/kg DW Fe v sušině. Tyto zcela nejvyšší hodnoty byly v detritu zjištěny na podzim 2023 v případě Blanice – Arnoštov a na podzim 2024 v případě Rokytnice. Jediné možné srovnání představují data z rozborů detritu odebraného v Teplé Vltavě na podzim 2018 (O. Simon, nepubl. data): obsah železa v nich byl podobný jako v detritu většiny nyní studovaných lokalit (31 500 - 39 500 mg/kg). Podle zkušeností analytické laboratoře VÚV TGM se složením sedimentů našich oligotrofních toků (O. Taufer, os. sdělení) představují hodnoty nad 40 000 mg/kg DW vysoký obsah železa.



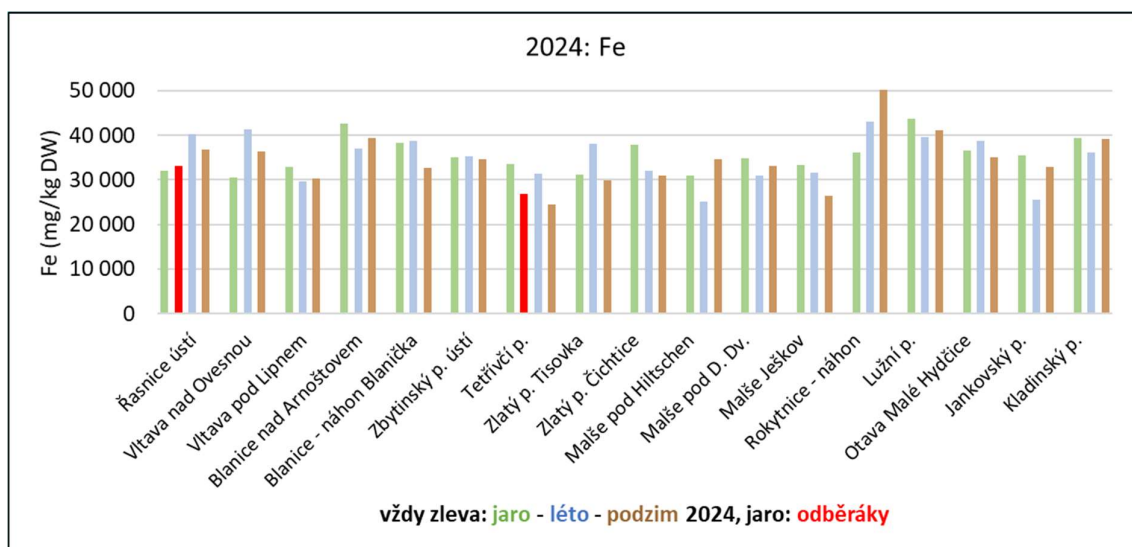
Obr. 6: Množství organické sušiny v detritu 17 lokalit studovaných v roce 2024, včetně vzorků z odběráků detritu použitých souběžně s ručním odběrem vzorků v ústí Řasnice a v Tetřivčím potoce. Barevně jsou odlišena roční období a výsledky pro detrit z odběráků.



Obr. 7: Obsah vápníku v sušině detritu 17 lokalit studovaných v roce 2024, včetně vzorků z odběráků detritu použitých paralelně v ústí Řasnice a v Tetřivčím potoce. Barevně jsou odlišena roční období a výsledky pro detrit z odběráků.

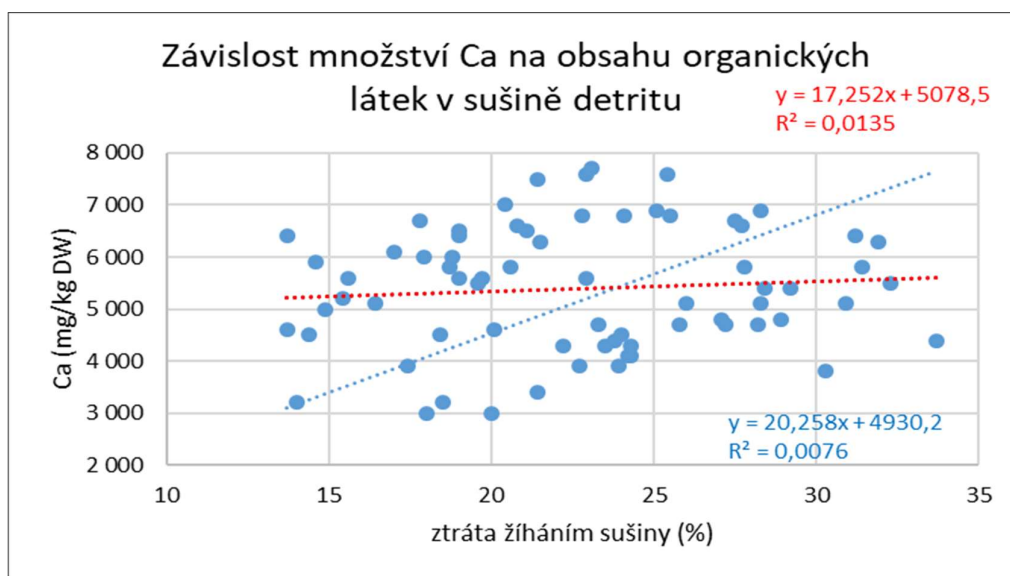


Obr. 8: Obsah celkového fosforu v sušině detritu 17 lokalit studovaných v roce 2024, včetně vzorků z odběráků detritu použitých paralelně v ústí Řasnice a v Tetřivčím potoce. Barevně jsou odlišena roční období a výsledky pro detrit z odběráků.



Obr. 9: Obsah železa v sušině detritu 17 lokalit studovaných v roce 2024, včetně vzorků z odběráků detritu použitých paralelně v ústí Řasnice a v Tetřivčím potoce. Barevně jsou odlišena roční období a výsledky pro detrit z odběráků.

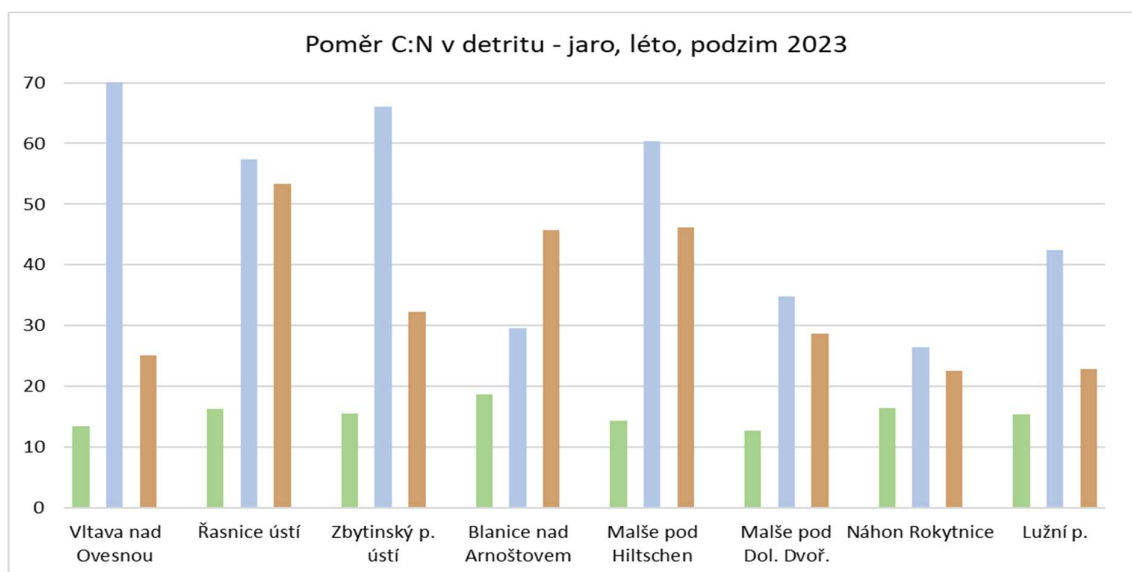
Vztah mezi množstvím celkového vápníku v detritu a podílem organických látek v sušině detritu je vykreslen na Obr. 10. Vápník může být perlorodkami využíván jen v organické podobě, s potravou, jeho organický podíl v celkovém množství vápníku však není možné metodami chemické analýzy přímo stanovit.



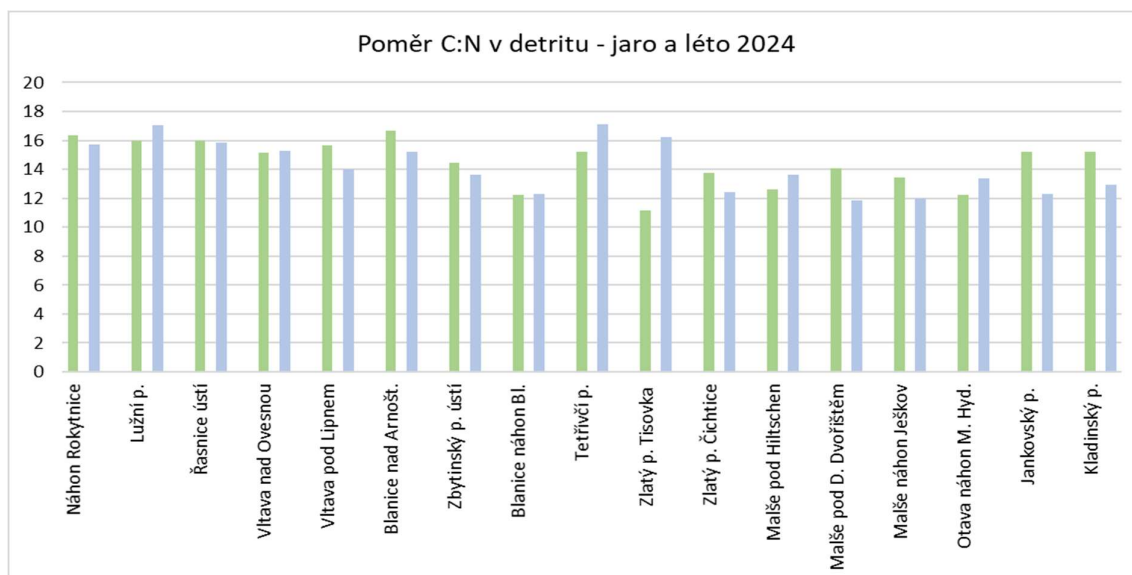
Obr. 10: Vztah mezi množstvím vápníku v detritu a množstvím organických látek v sušině detritu. Modrá spojnice trendu – po vyloučení tří odlehlých hodnot, červená spojnice – s jejich zahrnutím.

Poměr uhlíku a dusíku v detritu osmi lokalit studovaných v obou letech i v detritu nových lokalit z roku 2024, s odlišením ročních období, a porovnání poměru C:N mezi detritem z odběráků a jednorázového odběru na dvou lokalitách ukazují obr. 11.-12. V roce 2023 byl poměr C:N velice vysoký v létě (1,6x až 4x vyšší než na jaře, ve Vltavě nad Ovesnou 12x vyšší), v důsledku nižšího obsahu N. Na podzim byl

poměr C:N vždy vyšší než na jaře, ale (s výjimkou Blanice nad Arnoštovem) nižší než v létě. V roce 2024 byl poměr C:N na jaře vyšší u 10 lokalit ze 17, jinak spíše vyrovnaný (nápadně nižší byl na jaře pouze v detritu Zlatého p. Tisovka). Oproti roku 2023 byl poměr C:N v roce 2024 u všech lokalit hodně vyrovnaný. V obou sezónách (na jaře i v létě) byl nejvyšší v detritu Tetřivčího p., Blanice nad Arnoštovem, Lužního p., náhonu Rokytnice, Řasnice ústí, Vltavy nad Ovesnou a ústí Zbytinského p. Při porovnání osmi lokalit studovaných v obou letech, v roce 2023 byl poměr C:N na všech lokalitách velmi vysoký v létě, mnohem vyšší než v létě 2024. Hodnoty C:N na jaře a v létě 2024 byly téměř stejné a velmi podobné také hodnotám na jaře 2023.



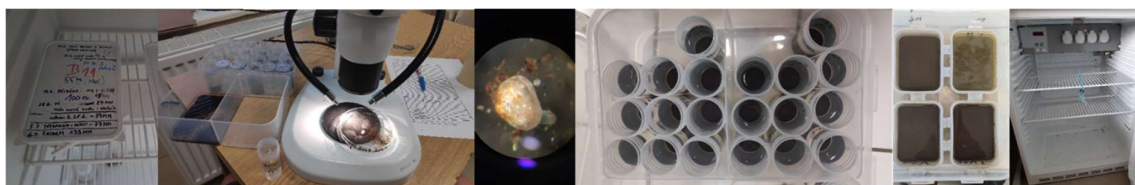
Obr. 11: Poměr uhlíku a dusíku v detritu na osmi lokalitách v roce 2023, s odlišením ročních období (zelená barva – jaro, modrá – léto, hnědá – podzim).



Obr. 12: Poměr uhlíku a dusíku v detritu na lokalitách, odebíraných v roce 2024, s odlišením ročních období (zelená barva – jaro, modrá – léto). Vzorky z podzimu 2024 zatím nebyly analyzovány.

Růstové pokusy

Růstové pokusy probíhaly stejně jako v roce 2023 v hydrobiologické laboratoři VÚV TGM, která je vybavena příslušným zařízením pro chov. K experimentům jsme využívali juvenilní jedince perlorodky říční z odchovny po 1. roce života (po odpadnutí z rybího hostitele; 1+). Měření růstu bylo prováděno ex-situ mikrometodou dle Simona a kol. (2018) a Macháčka (2022) ve standardních podmínkách při 19 °C v termostatu v individuálním chovu. Oddělení jedinců snižuje riziko infekcí a umožňuje přesné sledování jejich růstu, zatímco laboratorní prostředí eliminuje vliv teplotních výkyvů a dalších nechtěných vlivů, které se v řece vyskytují. 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 8 kusech a každá skupina byla vždy krmena detritem z jedné lokality. Krmení detritem ze stejné lokality a měření velikosti každého jedince probíhalo vždy na začátku pokusu, po 10 dnech, po 20 dnech a při ukončení pokusu po 30 dnech při krmení stejným detritem. Vitalita jednotlivých perlorodek byla zkontrolována trinokulárním mikroskopem při 63násobném zvětšení a dvakrát vyfotografována. 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 jednotlivých perlorodek proběhlo hromadně po dokončení krmení všech jedinců. Pro každou byl zaznamenán vždy nejdelší rozměr odečtený z jedné z fotografií, druhá pak sloužila ke zpětné kontrole a předcházení náhodných chyb (Obr. 13).



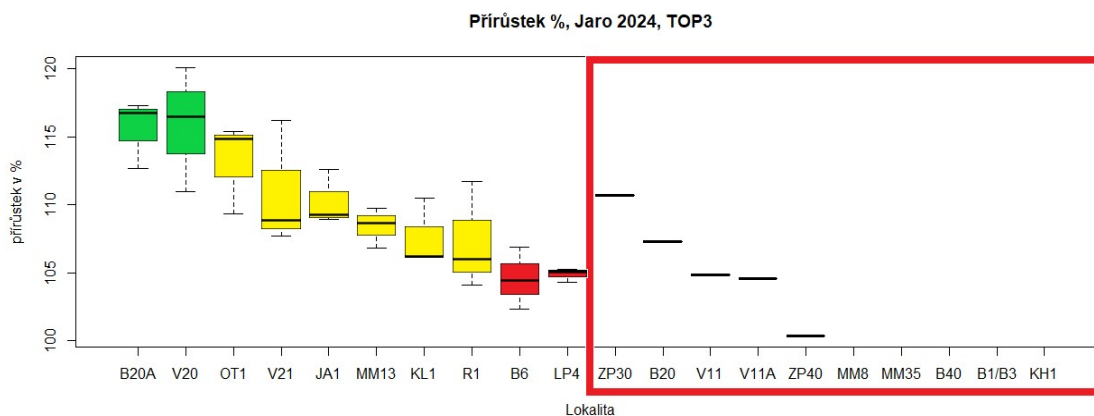
Obr. 13: Umístění juvenilů perlorodky říční (1+) v termostatu v individuálním chovu, fotografování pomocí trinokulárního mikroskopu a příprava detritu na krmení na začátku růstového pokusu.

Výsledky

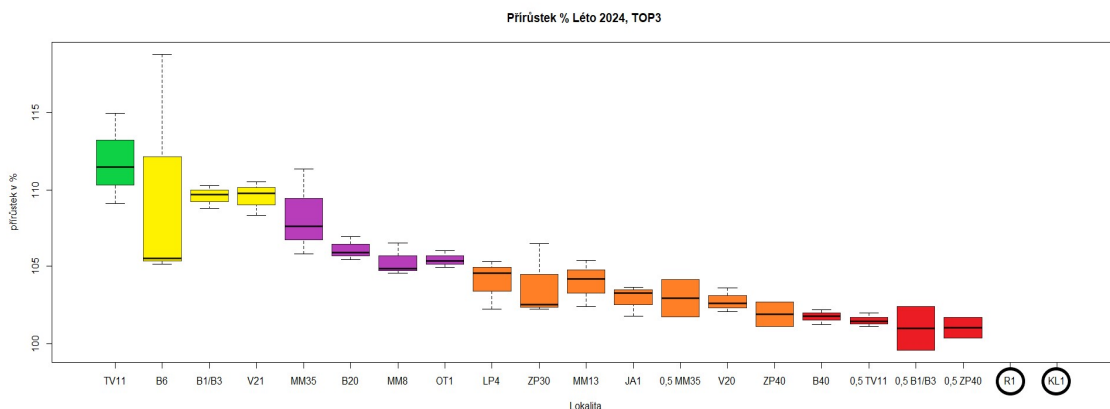
Při interpretaci výsledků jsme použili metodu TOP3, zavedenou Simonem a kol. (2018) po 30-ti dnech pokusu, která hodnotí přírůstky tří nejlépe rostoucích jedinců v každé skupině, takže jsou z hodnocení vyřazeni náhodně uhynulí jedinci a jedinci, kteří málo přirůstají kvůli horší vstupní kondici, která nesouvisí s jejich potravou v době experimentu.

Všem třem odběrům vzorků v roce 2024 předcházely zvýšené srážkové úhrny, čímž se lišily tyto odběry poměrně výrazně od roku 2023, kdy byl detrit odebírán v sušších dnech; tyto rozdíly detailně popisujeme v následující kapitole. Detrit, který byl po srážkách odebrán, může být z výživového hlediska horší než detrit, odebraný po sušším období, protože větší průtoky mohly část živin odmyt. Zatím jsme vyhodnotili pouze přírůstky juvenilů a základní chemické parametry, biochemické složení bude v detailu analyzováno v roce 2025. Nestandardní složení detritu se projevilo nejvíce v jarním období roku 2024 jak nízkými přírůstky, tak bohužel i vysokou úmrtností juvenilů. Z 20-ti skupin juvenilů po osmi jedincích bylo možné vyhodnotit pouze 10 s minimálně třemi jedinci, přeživšími do konce pokusu, v dalších 5-ti skupinách se konce pokusu dožil pouze jeden jedinec a ve zbylých 5-ti skupinách žádný (obr. 14). Na obrázcích 15 a 16 jsou znázorněny přírůstky v sezónách 2024 – léto a 2024 –

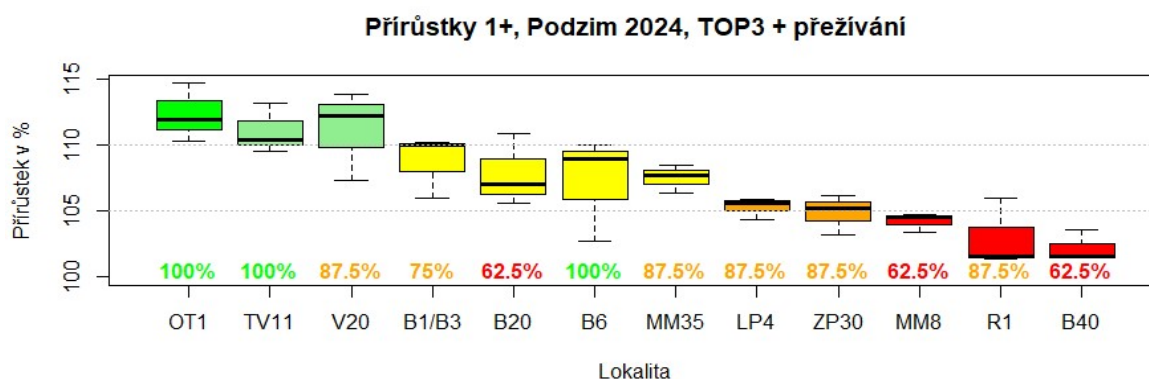
podzim. Data z bioindikačních testů byla statisticky zpracována pomocí Tukeyho HSD (Honestly Significant Difference) testu. Tento test je post-hoc analýzou, která se používá po provedení analýzy rozptylu (ANOVA) a slouží k porovnání průměrů mezi více skupinami. Tukeyho HSD test umožňuje identifikovat, které konkrétní skupiny se od sebe statisticky významně liší. Výsledky analýzy jsou prezentovány ve formě stejnobarevných boxplotů v grafu. Lokality, které sdílejí stejnou barvu, nejsou mezi sebou statisticky významně odlišné, zatímco hodnoty s různými barvami se od sebe liší na statisticky významné úrovni. Tento přístup umožňuje jasnou interpretaci výsledků a identifikaci skupin s podobnými charakteristikami. V letní sezóně byla ještě na dvou lokalitách úmrtnost 100%, přežívání juvenilů, krmených podzimním detritem bylo výrazně lepší.



Obr. 14: Procentuální přírůstek juvenilů, jarní detrit 2024, metoda TOP 3 (z každé skupiny 3 nejlépe rostoucí jedinci). Bioindikace na detritu z lokalit v červeném obdélníku přežila bohužel jenom jedna (lokality s čarou místo boxplotu) nebo žádná (lokality bez čáry) perlorodka a není možné je tedy do hodnocení zahrnout.



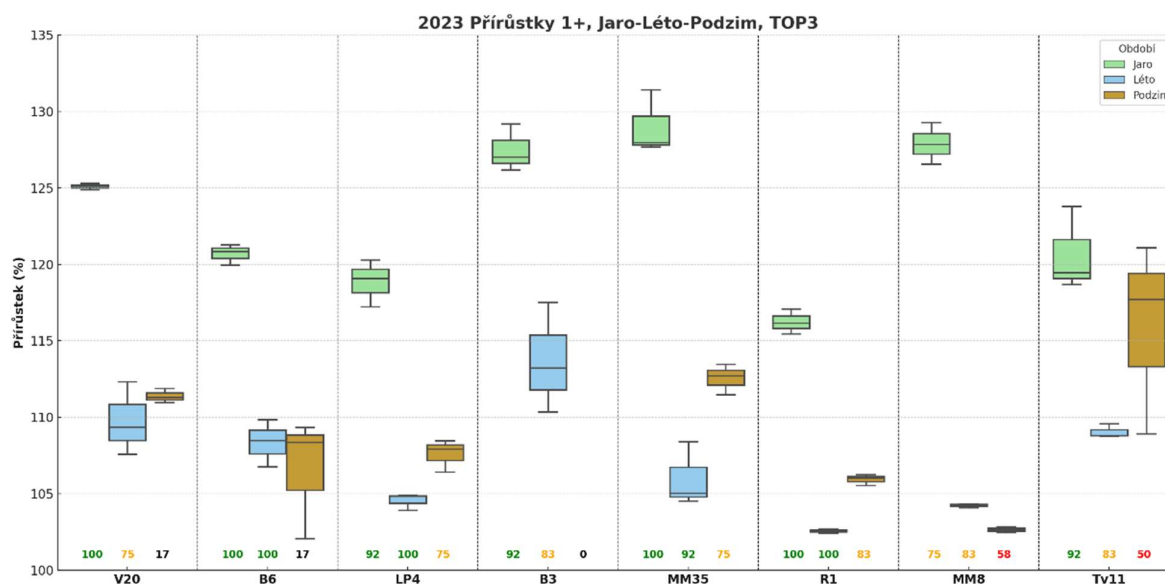
Obr. 15: Procentuální přírůstek juvenilů, letní detrit 2024, metoda TOP 3 (z každé skupiny 3 nejlépe rostoucí jedinci). Zakroužkované lokality nebylo možné vyhodnotit kvůli vysokému úhynu perlorodek.



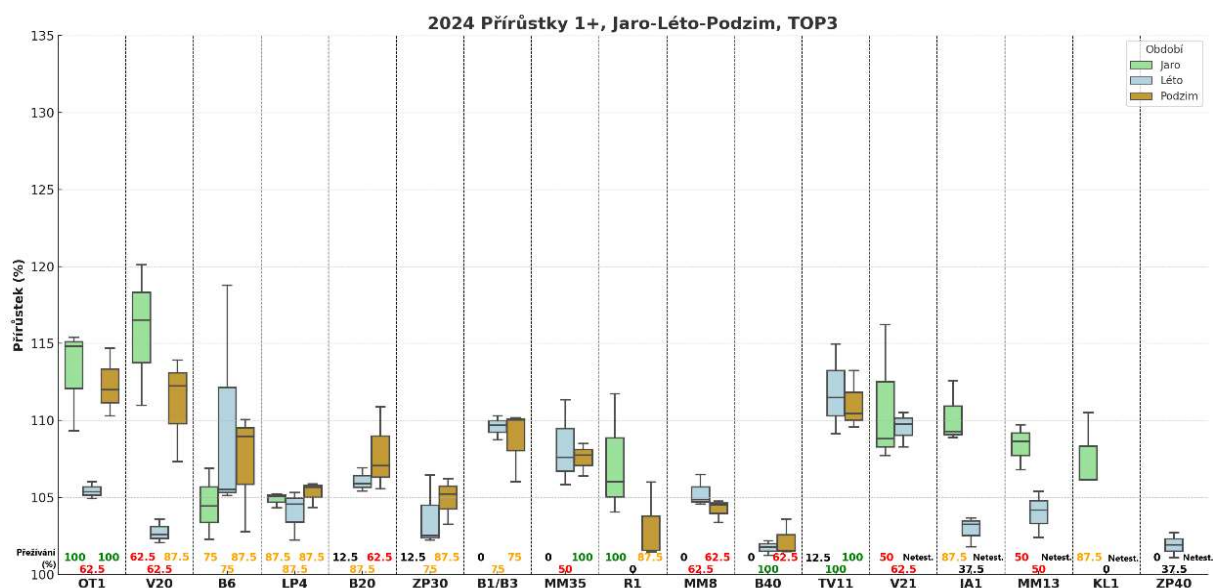
Obr. 16: Procentuální přírůstek juvenilů, podzimní detrit 2024, metoda TOP3 (z každé skupiny 3 nejlépe rostoucí jedinci), číselnou hodnotou doplněno % přežívání.

Porovnání sezón 2023 a 2024

Z grafů znázorňujících přírůstky v bioindikačních pokusech 2023 (Obr. 17) a 2024 (Obr. 18) je patrné že jarní detrity 2023 vykazují dobré přírůstky, naopak podzimní bioindikace měly vysokou úmrtnost; vždy se jedná o vyhodnocení po 30-ti dnech pokusu. V roce 2024 se v testovaných obdobích řadily lokality OT1, V20, TV11 a V21 mezi pro perlorodky perspektivnější, naopak např. B40, MM8, LP4, ZP40 by šly označit jako méně perspektivní. Zároveň u některých lokalit vidíme velké výkyvy, zejména u letní části pokusu, které mohou být dány odběrem detritu po zvýšených průtocích.



Obr. 17: Procentuální přírůstky perlorodek v bioindikačních pokusech v roce 2023 po 30-ti dnech krmení. Pro každou lokalitu a každé období je vykreslen boxplot ze tří nejvyšších dosažených procentuálních hodnot přírůstků perlorodek krmených detritem z dané lokality (metoda TOP3), v pořadí jaro-léto-podzim. Barevná čísla nad osou X znázorňují procentuální přežívání perlorodek při pokusu ($n=12$, tj. jeden jedinec = 8,3 %). Boxplot není uveden na podzimní lokalitě B3, kdy došlo ke 100% vymření perlorodek.



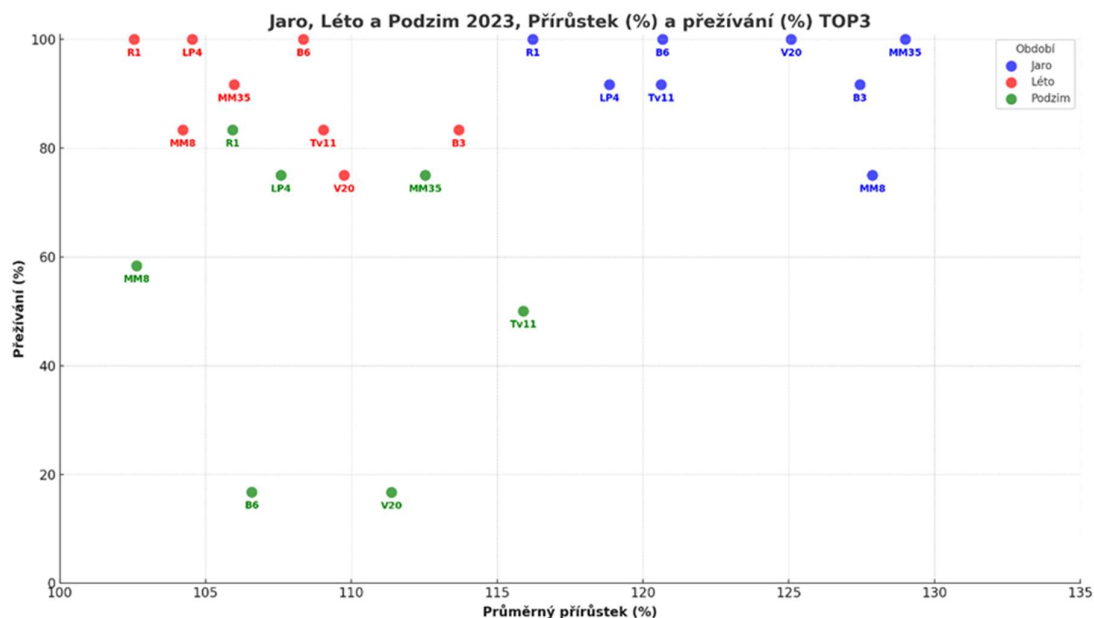
Obr. 18: Procentuální přírůstky juvenilů v bioindikačních pokusech v roce 2024. Pro každou lokalitu a každé období je vykreslen boxplot ze tří nejvyšších dosažených procentuálních hodnot přírůstků perlorodek krmených detritem z dané lokality (metoda TOP3), v pořadí jaro-léto-podzim. Barevná čísla nad osou X znázorňují procentuální přežívání perlorodek při pokusu ($n=8$, tj. jeden jedinec = 12,5 %). Hodnota „Netest.“ Je u lokalit, které na podzim nebyly testovány z důvodu nedostatku perlorodek. Boxploty dále chybí u lokalit/období, kdy bylo přežívání 25 % a nižší.

V následujících grafech je možné porovnat obě sezóny 2023 (Obr. 19) a 2024 (Obr. 20) z hlediska přežívání a přírůstků. Na obr. 19 vidíme 3 skupiny bodů pro jaro (modrá) léto (červená) a podzim (zelená), přičemž jarní skupina ukazuje dobré přírůstky a vysoké přežívání (= nízkou úmrtnost), léto vykazovalo nižší přírůstky a nízkou úmrtnost a podzim nízké přírůstky a na některých lokalitách vyšší úmrtnost. Na grafu není podzimní hodnota lokality B3, která měla 100% úmrtnost. Z grafu tedy vyplývá, že v roce 2023 byl pro perlorodky nejlepší detrit na jaře, naopak podzimní detrit lze označit za méně vhodný, na některých lokalitách (B6 s V20) až za nevhodný. Na obr. 20 se skupina bodů pro léto (červená) a podzim (zelená) víceméně překrývá, letní hodnoty vykazují oproti roku 2023 nižší přežívání, naopak podzimní hodnoty mají oproti roku 2023 přežívání výrazně lepší. V grafu nejsou zaneseny letní hodnoty lokalit R1 a KL1, které měly 100% úmrtnost.

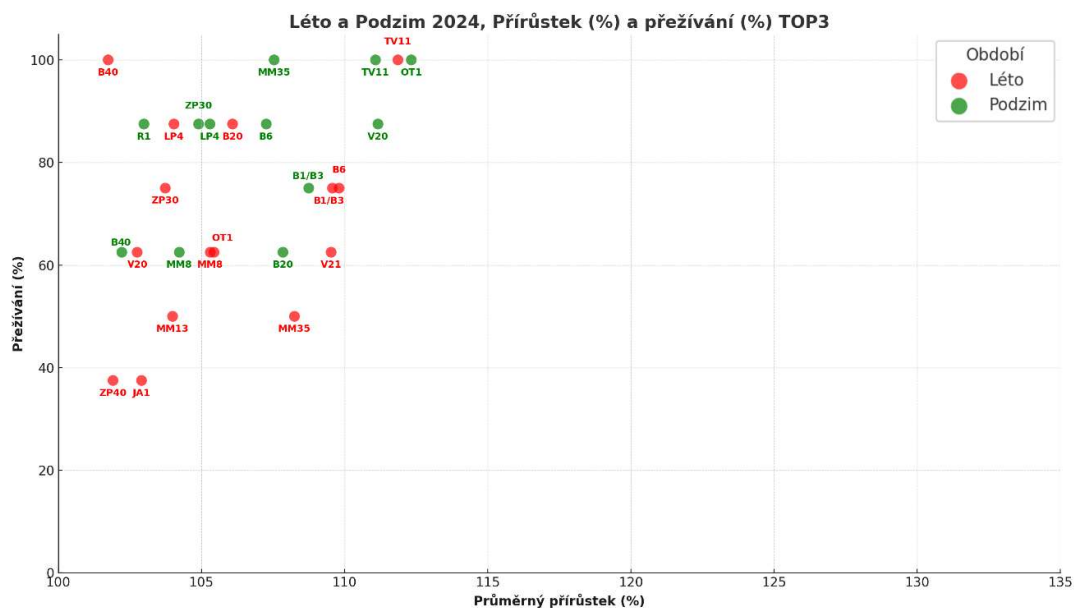
V sezóně 2023 se na přírůstcích a přežívání ukázaly sezónní změny známé z odchoven perlorodek, využívajících in-situ bioindikace na lokalitách. V roce 2024 s netypickým průběhem teplot a srážek se žádné změny v ročním průběhu neukázaly, přirůstání a přežívání bylo podprůměrné. Vliv sezóny, tedy vnějších podmínek, je zatím z našeho porovnání výrazně vyšší, než vliv lokality; z osmi lokalit, které jsme zkoumali v obou sezónách dosud nelze označit žádné, které by se kvalitou detritu výrazně odlišovaly ať už v pozitivním nebo negativním smyslu. Malé množství vzorků detritu s dobrými přírůstky juvenilů může do budoucna komplikovat vyhodnocení specifických chemických sloučenin, které nejvýrazněji přispívají k růstu.

První předběžné výsledky, popisující na příkladu detritu z podzimu 2023 přírůstky perlorodek v souvislosti s obsahem aminokyselin v detritu, jsou popsány v části 2 a zobrazeny na grafech na obr. 21A a 22A. V následující etapě projektu se kromě pokračování odběrů a růstových pokusů zaměříme

již také na statistické analýzy a hledání možných závislostí obsahu jednotlivých složek potravy a růstu juvenilů.



Obr. 19: Průměrné přírůstky (%) tří nejperspektivnějších jedinců (metoda TOP3) ve vztahu k přežívání (%) ve třech sezónách roku 2023 na všech lokalitách; (n =12, tj. jeden jedinec = 8,3 %)



Obr. 20: Průměrné přírůstky (%) tří nejperspektivnějších jedinců (metoda TOP3) ve vztahu k přežívání (%) ve dvou sezónách roku 2024 (jaro vyřazeno z důvodu nestandardně vysoké úmrtnosti) na všech lokalitách; (n =8, tj. jeden jedinec = 12,5 %).

Část 2: Analýza vybraných látek a aktivit enzymů souvisejících s metabolismem dusíku, fosforu a uhlíku v 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.

Shrnutí analýzy detritu z pohledu biochemicky významných sloučenin

Pro svůj růst a přežívání musí organismy v některé z jejich forem přijímat uhlík, dusík, kyslík, vodík, fosfor a řadu dalších biogenních prvků. Jejich zdrojem jsou pro heterotrofy, kterým je také perlorodka říční, aminokyseliny a z nich složené proteiny, sacharidy obsahující jednu nebo více cukerných jednotek, mastné kyseliny a z nich složené lipidy, vitamíny a minerály. V rámci tohoto projektu se soustředíme na detailní charakterizaci složení krmeného detritu pomocí biochemických a analytických přístupů, a snažíme se určit, které z faktorů jsou pro prospívání perlorodek klíčové. Kromě kvantifikace biochemicky významných skupin molekul také stanovujeme aktivitu vybraných enzymů, které se podílejí na rozkladu složitějších, a pro některé organismy obtížně vstřebatelných nebo využitelných sloučenin. V detritu jako zdroj enzymů předpokládáme zejména různé mikroorganismy, jejichž zastoupení může výrazně ovlivnit dostupnost živin.

Pomocí postupů, optimalizovaných v předchozí etapě projektu jsme provedli všechna měření pro vzorky detritu odebraného na jaře, léte a podzim 2023, kde některá stanovení bylo potřeba provést pro vzorky s nízkou či naopak vysokou koncentrací/aktivitou opakovaně (Obr. 23-34).

Zjištěné charakteristiky detritů ze všech lokalit z průběhu celého projektu budou v jeho závěru korelovány s přírůstkem a úmrtností jimi krmených perlorodek. Parametry klíčové pro růst a přežívání budou určeny pomocí multifaktoriální analýzy celého používaného k současnému zkoumání vlivu více faktorů na celkový výsledek. Metoda umožňuje odhalit i na první pohled méně zřejmé závislosti a vzájemné interakce mezi sledovanými parametry. Již z průběžných výsledků vyvozujeme dále popsané předběžné závěry.

Metody

Lyofilizace detritu

Všechny vzorky detritu z oblastí Blanice Arnoštov, Lužní p., Malše pod D. Dvořištěm, Malše pod Hiltchen, Náhon Rokytnice, Řasnice ústí, Vltava na Ovesnou, Zbytinský p. ústí odebrané v období jaro, léto a podzim roku 2023 byly vysušeny mrazem (lyofilizovány) na přístroji Lyovac GT 2 (FinnAqua) a uchovávány při 4°C před další analýzou.

Stanovení aminoskupin

K cca 50 mg detritu byl přidán 1 ml 2M KCl. Tato směs byla inkubována 30 minut při 30°C za kontinuálního třepání (1200 RPM). Poté následovala centrifugace po dobu 15 min, 13400 RPM (stolní centrifuga MiniSpin, Eppendorf, Německo). Primární aminoskupiny byly stanoveny pomocí fluorescenčního detekčního činidla o-ftalaldehydu (excitace 340 nm, emise 455 nm). Měření bylo optimalizováno a provedeno dle Rovelli a Wilson (2023).

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 . Metoda byla optimalizována a provedena dle Hodek et al. 2017.

Stanovení obsahu proteinů

K cca 50 mg detritu byl přidán 1 ml 100 mM Bis-Tris pufru o pH 7,0 obsahujícím 15%(w/v) glycerol. Tato směs byla inkubována 1 hodinu při 30°C za kontinuálního třepání (1200 RPM). Poté následovala centrifugace po dobu 15 min, 4°C a 16,100 $\times$ g. K 0,5 ml získaného supernatantu byl přidán 1 ml ledově vychlazeného acetonu a ponechán přes noc v -28°C. Poté následovala centrifugace za stejných podmínek. Získaná sraženina byla promyta 0,8 ml ledově vychlazeného acetonu a opět centrifugována. Sraženina byla poté ponechána proschnout na vzduchu a byla rozpuštěna v 0,1 ml deionizované vody. V tomto vzorku byl poté detekován obsah proteinů na principu stanovení pomocí kyseliny bicinchoninové (Smith et al. 1985). Kalibrace byla provedena nahrazením vzorku roztokem standardního proteinu (hovězí sérový albumin).

Aktivita celkových proteas

K cca 25 mg detritu byla přidána reakční směs obsahující 0,01 mg/ml fluoresceinem značený kasein rozpuštěný v 50 mM Tris-HCl pufru o pH 7,0. Tato směs byla inkubována 16 hodin při 37°C za kontinuálního třepání (1000 RPM). Poté následovala centrifugace po dobu 10 min, 4°C a 16,100 $\times$ g. V získaném supernatantu byl stanoven obsah uvolněného fluoresceinu měřením fluorescence při excitaci 485 nm a emisi 538 nm. Měření bylo provedeno dle kitu Pierce Fluorescent Protease Assay Kit (Thermo-Scientific, USA).

Detekce proteolytické aktivity po elektroforetické separaci

Metoda je založena na elektroforetické separaci proteinů v gelu s následnou detekcí proteolytické aktivity. Polyakrylamidový gel je připraven s obsahem želatiny, která slouží jako substrát pro proteasy. Proteolytická aktivita se tedy poté projeví jako prázdná (bílá) místa v gelu, kde došlo k rozštěpení želatiny a zbývající gel zůstane obarven dle Leber a Balkwill 1997.

Ke cca 25 mg byl přidán neredukující vzorkový pufr (63 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% (w/v) glycerol, 2% (w/v) SDS a 0,0013% (w/v) bromfenolová modř). Vzorky byly 1 hodinu inkubovány při 37°C a třepání 900 RPM, poté centrifugovány po dobu 5 min, 13400 RPM (stolní centrifuga MiniSpin, Eppendorf, Německo).

Elektroforetická separace probíhala v 12% separačním polyakrylamidovém gelu obsahujícím 0,15% želatiny při teplotě 4°C. Následně byly gely několikrát promyty destilovanou vodou a roztokem 2,5%(v/v) Tritonu X-100 v rámci jedné hodiny. Následně byly gely inkubovány po dobu 24 hodin při 37°C v roztoku 50 mM Tris-HCl o pH 8,4 s 5 mM chloridem vápenatým. Poté byly promyty deionizovanou vodou a barveny v roztoku Coomassie Brilliant Blue (0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 ve 40% (v/v) methanolu a 10% (v/v) kyselině octové) po dobu 2 hodin. Gely byly následně inkubovány v odbarvovacím roztoku (10% (v/v) kyselina octová ve 25% (v/v) ethanolu) až do objevení bílých pruhů.

Aktivita alkalických a kyselých fosfat

K cca 25 mg detritu byla přidána reakční směs obsahující 10 mM p-nitrofenylfosfát ve 100 mM MOPS-NaOH pufru o pH 5,0 pro stanovení aktivity kyselých fosfat nebo ve 100 mM borátový pufr o pH 9,0 pro stanovení alkalických fosfat. Tato směs byla inkubována 10 min při 30°C za kontinuálního třepání (1200 RPM). Poté následovala centrifugace po dobu 10 min, 4°C a 16,100×g. V získaném supernatantu byl stanoven obsah uvolněného p-nitrofenolu měřením při 405 nm v alkalickém prostředí (pH 9,0). Kalibrační závislost byla provedena pomocí roztoků p-nitrofenolu. Měření bylo optimalizováno a provedeno dle (Bělonožníková et al. 2020).

Celkový obsah sacharidů

K cca 3 mg detritu byl přidán 1 ml vody, 1 ml roztoku 5%(w/v) fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Po 30 minutové inkubaci byla změřena absorbance při 490 nm. Kalibrace byla provedena nahrazením vzorku detritu roztokem glukosy. Měření bylo provedeno metodou dle Dubois et al. 1951.

Aktivita β-glukosidasy

K cca 25 mg detritu byla přidána reakční směs obsahující 10 mM p-nitrofenyl-β-D-glukopyranosid v 100 mM MOPS-NaOH pufru o pH 5,0. Tato směs byla inkubována 3 hodiny při 30°C za kontinuálního třepání (1200 RPM). Poté následovala centrifugace po dobu 10 min, 4°C a 16,100×g. V získaném supernatantu byl stanoven obsah uvolněného p-nitrofenolu měřením při 405 nm v zásaditém prostředí (pH 9,0). Kalibrační závislost byla provedena pomocí roztoků p-nitrofenolu. Měření bylo optimalizováno a provedeno dle Bělonožníková et al. 2020.

Stanovení fenolických látek

K cca 50 mg detritu byl přidán 1 ml 50%(v/v) EtOH a tato směs byla inkubována 1 hodinu při 30°C za kontinuálního třepání (1200 RPM). Poté následovala centrifugace po dobu 10 min, 4°C a 16,100×g. V získaném supernatantu byl poté stanoven celkový obsah fenolických látek pomocí Folinova reagens. Metoda byla měřena dle Hýšková et al. 2023.

Aktivita ureasy

K cca 25 mg detritu bylo přidáno 0,5 ml 50 mM močovinu. Tato směs byla inkubována 3 hodiny při 37°C za kontinuálního třepání (1200 RPM). Poté následovala centrifugace po dobu 10 min, 4°C a 16,100×g. V získaném supernatantu byl stanoven obsah amonných iontů pomocí reakce s 5,5%(v/v) NaClO v 0,5%(w/v) NaOH a 0,05%(w/v) nitroprussidu sodného v 1%(w/v) fenolu. Kalibrační závislost byla provedena pomocí roztoků síranu amonného. Měření bylo optimalizováno a provedeno dle Pawar et al. 2022.

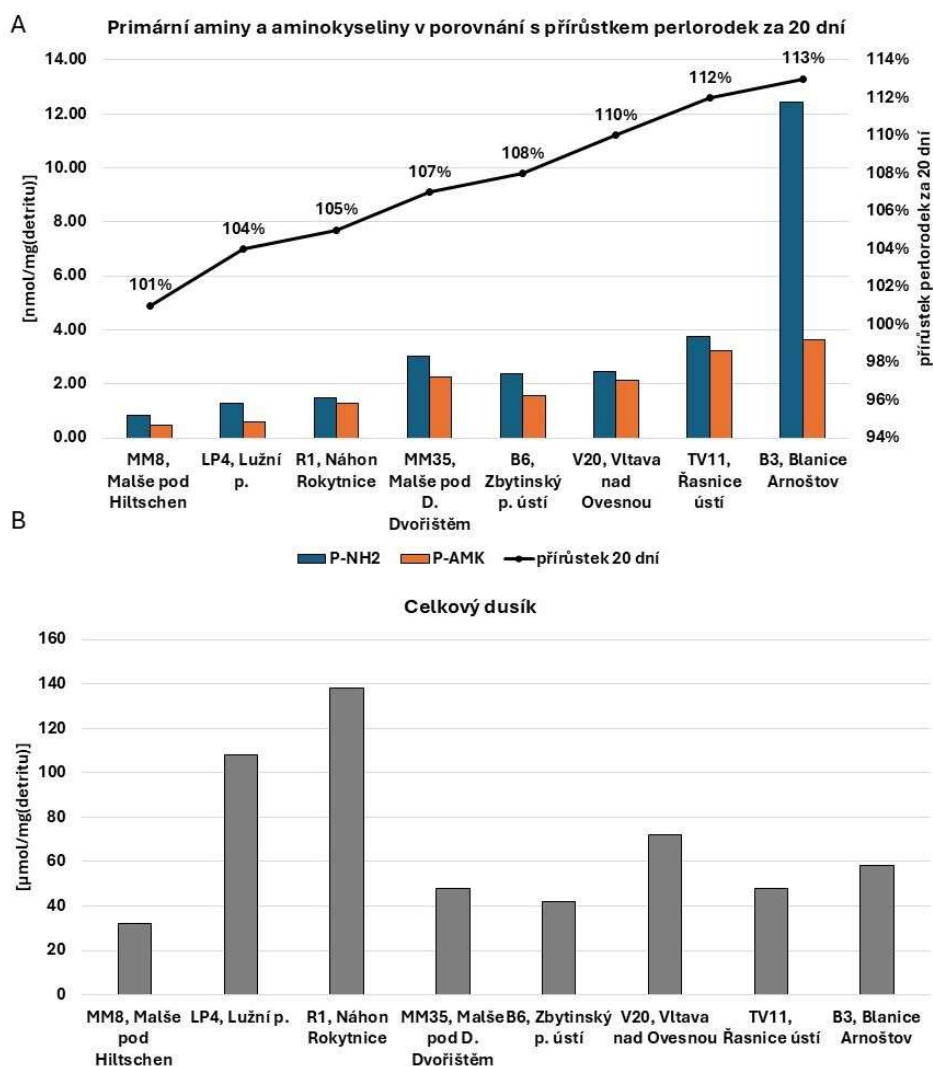
Výsledky

Kvantifikace biochemicky významných látek v detritu a stanovení aktivit přítomných enzymů souvisejících s metabolismem dusíku, fosforu a uhlíku

Volné proteinogenní aminokyseliny jsou dusíkaté látky obsahující vždy primární α-aminoskupinu, a jsou hlavní organickou složkou tkání. Ve vzorcích detritu jsme proto stanovovali celkové zastoupení dusíku (zavedená standardní metoda) a srovnávali jej se stanovením celkového množství látek s primární aminoskupinou (relativně levná, citlivá a rychlá metoda) a stanovení množství

proteinogenních aminokyselin (nákladnější a instrumentálně složitější analytická metoda, která však navíc poskytuje kvantitativní informaci o jednotlivých esenciálních a neesenciálních aminokyselinách). Pro srovnání metod jsme zvolili charakteristiky podzimních detritů sezóny 2023, a k hodnocení vlivu na krmené perlorodky jsme použili relativní přírůstky dosažené po 20 dnech bioindikačního experimentu, kdy úmrtnost nebyla ještě tak vysoká jako po 30 dnech (viz Část 1).

Z celkového dusíku (50-650 nmol/mg) stanoveného pomocí prvkové analýzy ve vzorcích detritu odebraného ve všech časových obdobích vždy jen relativně malá část (1-12 nmol/mg) představuje sloučeniny s primárními aminoskupinami, mezi něž spadají – jak ukazují naše výsledky – z 50-100 % proteinogenní aminokyseliny. Porovnáním měření primárních aminů a celkových aminokyselin z podzimního experimentu je možné vysledovat v obou případech obdobné trendy, které navíc kopírují trend v relativním nárůstu perlorodek (Obr. 21A, 22A-B).



Obr. 21: (A) Obsah primárních aminů (-NH₂) a celkových aminokyselin (AMK) v porovnání s přírůstkem perlorodek za 20 dní, a (B) celkový dusík. Detrit odebraný na podzim (P) v roce 2023.

Naopak stanovené hodnoty celkového dusíku do těchto trendů nezapadají, kdy např. pro vzorky LP4 a R1, které jsou na aminokyseliny relativně chudé, patří hodnoty celkového dusíku k nejvyšším (Obr. 21B). V rámci podzimní sady detritů jsme nezaznamenali, že by množství konkrétních aminokyselin (Obr. 25) mělo zásadní dopad na růst perlorodek, přesto tuto metodu považuje za přínosnou, jelikož faktor limitující růst perlorodek může představovat jediná z esenciálních aminokyselin, i když všechny ostatní aminokyseliny budou perlorodce k dispozici v nadbytku.

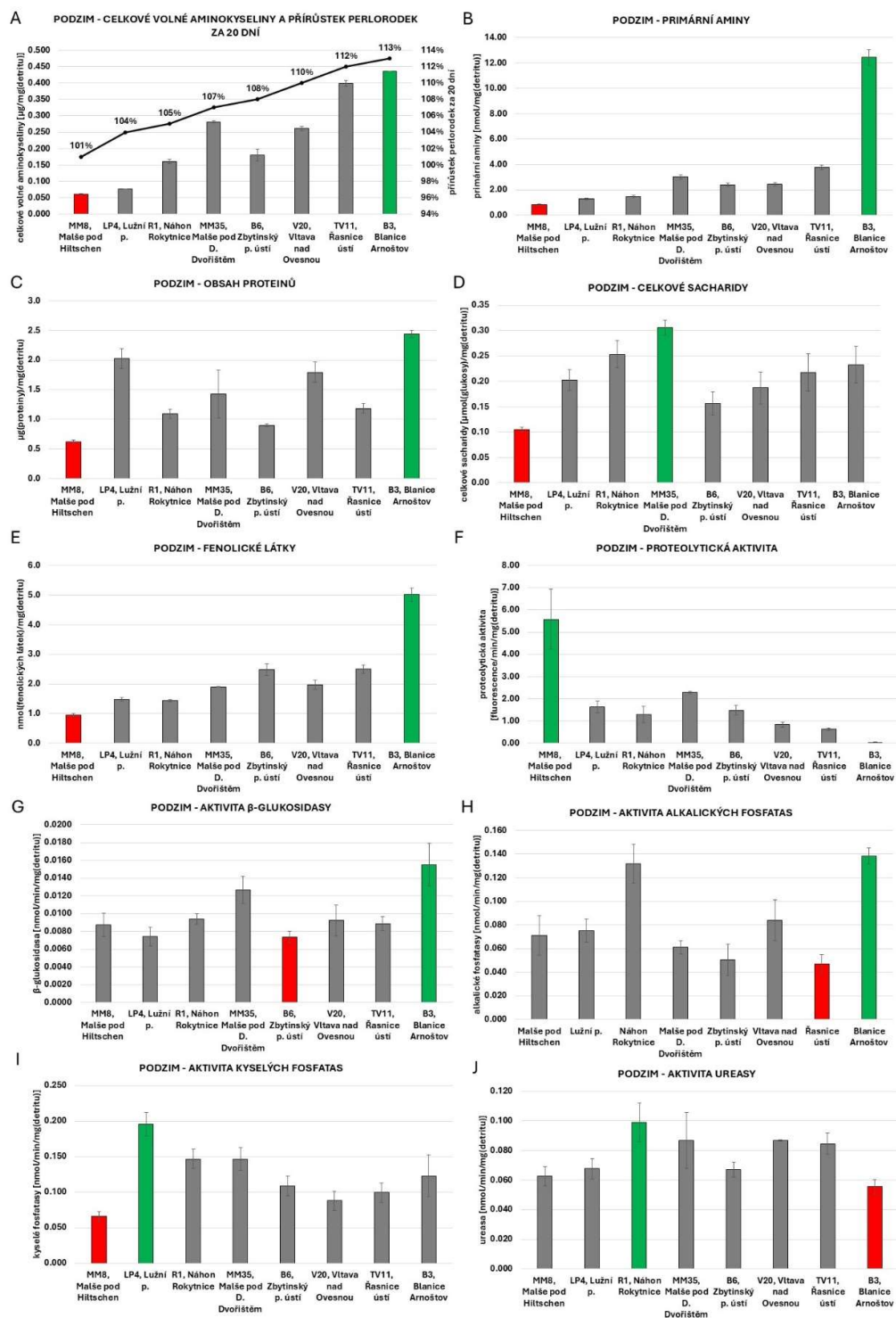
Ostatní stanované skupiny látek jsou (i) proteiny, které mohou po štěpení sloužit jako další zdroj aminokyselin, (ii) sacharidy využitelné jako zdroj energie nebo jako zdroj uhlíku pro biosyntézu složitějších biochemických molekul a (iii) fenolické látky mohou plnit antioxidační, protizánětlivou nebo antimikrobiální funkci. Ve všech třech charakteristikách detrit z lokality Malše pod Hiltchen, jímž krmené perlorodky dosahovaly nejmenších přírůstků, dosahoval nejnižších hodnot z celého souboru; naopak množství proteinů a fenolických látek v detritu z lokality Blanice Arnoštov, jímž krmené perlorodky přirůstaly nejvíce, byla z celého souboru nejvyšší a množství sacharidů také patřilo k vyšším (Obr. 22C-E).

Aktivity jednotlivých enzymů také vždy alespoň pro jednu z těchto dvou lokalit patřily k nejnižším nebo naopak nejvyšším. Proteasy byly nejvíce aktivní v detritu z lokality Malše pod Hiltchen, která se zároveň vyznačovala nejnižší koncentrací proteinů i volných aminokyselin, zatímco u detritu z lokality Blanice Arnoštov se jednalo o přesně opačný trend (Obr. 22A,C,F). Nabízí se vysvětlení, že v prostředí chudém na zdroje aminokyselin zejména mikroorganismy do prostředí sekretují ve velkém množství enzymy, které jim umožní rozložit i řídce se vyskytující proteiny. Elektroforetická separace proteinů s následnou detekcí proteolytické aktivity navíc ukazuje, že se detrit z různých lokalit neliší pouze v celkové proteolytické aktivitě, ale také v jejich profilu proteas, kdy se jednotlivé enzymy liší v molekulové hmotnosti (Obr. V6). Předpokládáme, že rozdíly v profilech jsou důsledkem odlišného společenství mikroorganismů v jednotlivých lokalitách.

Mezi nutričně málo využitelné vysokomolekulární složky detritu patří také další polymery – polysacharidy. Ty mohou být rozloženy na snadno vstřebatelné jednoduché sacharidy skupinou enzymů s glykosidasovou aktivitou, mezi jejíž zástupce patří také námi sledovaná β -glukosidasa. Tento enzym uvolňuje z komplexních sacharidů jako je celulóza – hlavní stavební složka rostlinné buněčné stěny – jednotlivé glukózové jednotky a podílí se tak na mobilizaci a zvýšení dostupnosti živin. Fosfatasy jsou pak enzymy, které hydrolyticky štěpí fosfátovou skupinu z řady biochemicky významných molekul (např. DNA, RNA nebo fosfolipidů) přítomných ve formě fosforečných esterů. Tato forma fosforu je na rozdíl od anorganického fosforu pro perlorodku využitelným zdrojem prvku, jehož dostupnost je v přírodě často limitujícím faktorem růstu. Nejvyšší aktivita β -glukosidasy (Obr. 22G) a alkalické fosfatasy (Obr. 22H) byla stanovena v detritu z relativně bohatého na sacharidy (Obr. 22D) a nejbohatší na celkový fosfor (Obr. 5), z lokality Blanice Arnoštov. Naopak kyselá fosfatasa, druhý ze zástupců této skupiny enzymů měla v rámci vzorků detritu průměrnou aktivitu, nejnižší pak byla zjištěna v detritu z lokality Malše pod Hiltchen (Obr. 22I).

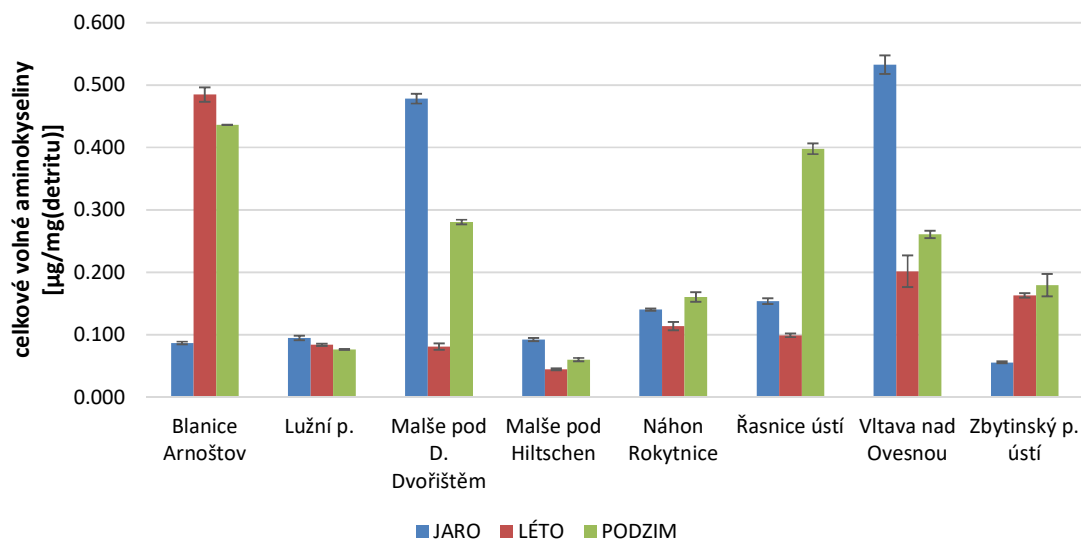
Posledním měřeným enzymem byla ureasa, která katalyzuje hydrolýzu močoviny na oxid uhličitý a amoniak. Aktivita ureasy je často měřena v souvislosti s činností mikroorganismů. Lokalita Blanice Arnoštov vykazovala nejnižší aktivitu ureasy (Obr. 22J). Vzhledem k tomu, že nadměrné množství amoniaku může být pro perlorodky toxické, je tedy nižší aktivita ureasy v detritu spíše výhodou pro jejich růst. Nízká aktivita ureasy také může souviset s nízkým výskytem substrátu močoviny v lokalitě Blanice Arnoštov a tedy i nižší produkcí amonných iontů (Příloha 2, NH_4^+).

Pro zhodnocení vzorků z podzimu 2023 na základě provedených biochemických stanovení lze detrit z lokality Malše pod Hiltchen považovat jako zdroj živin pro perlorodky za nejméně vhodný, zatímco z lokality Blanice Arnoštov jako nejvíce úživný.

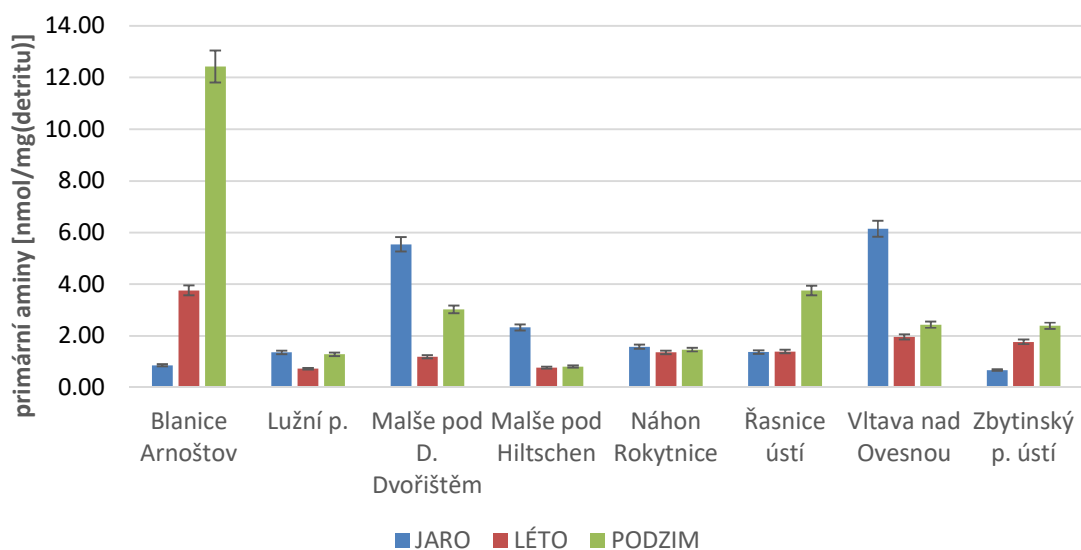


Obr. 22: Porovnání charakteristik vzorků detritu z podzimu roku 2023. Lokality řazeny podle přírůstků TOP3 po 20 dnech bioindikačního experimentu. Pro každou charakteristiku označena nejnižší (červená) a nejvyšší (zelená) stanovená hodnota souboru.

Srovnání jednotlivých období roku 2023

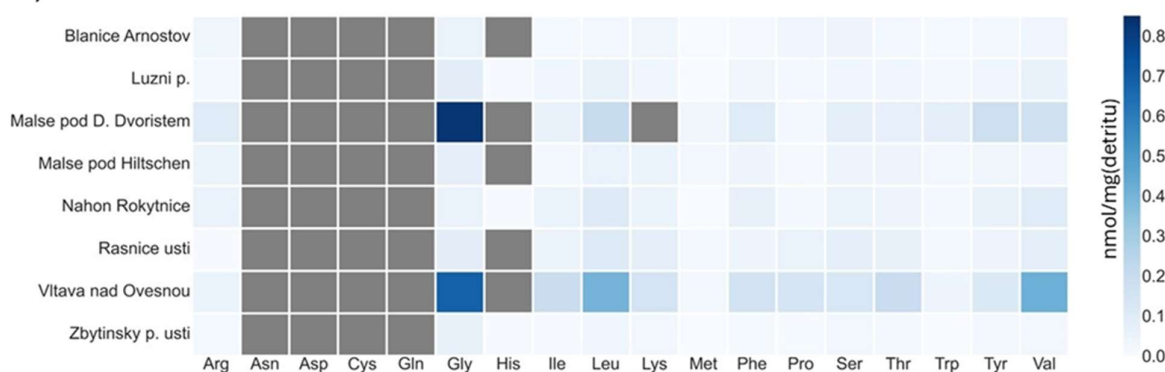


Obr. 23: Stanovení obsahu celkových volných aminokyselin v detritu odebraném v období jaro, léto a podzim roku 2023.

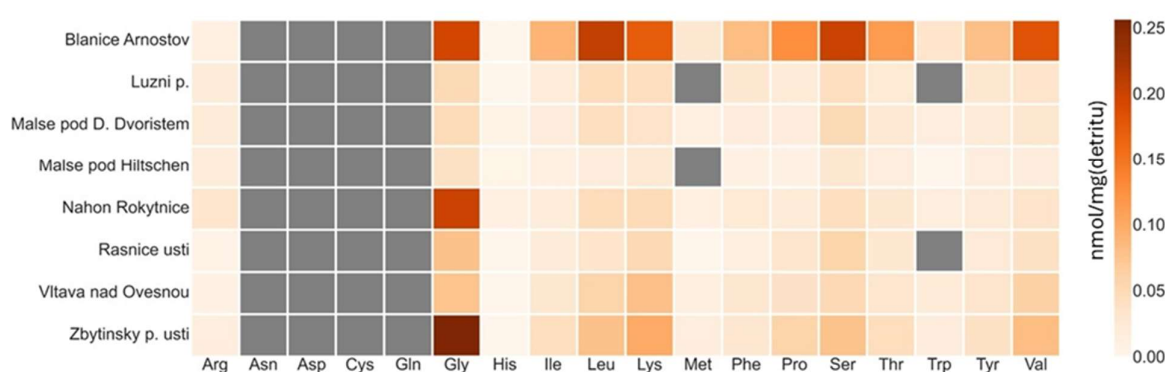


Obr. 24: Stanovení primárních aminů v detritu odebraném v období jaro, léto a podzim roku 2023.

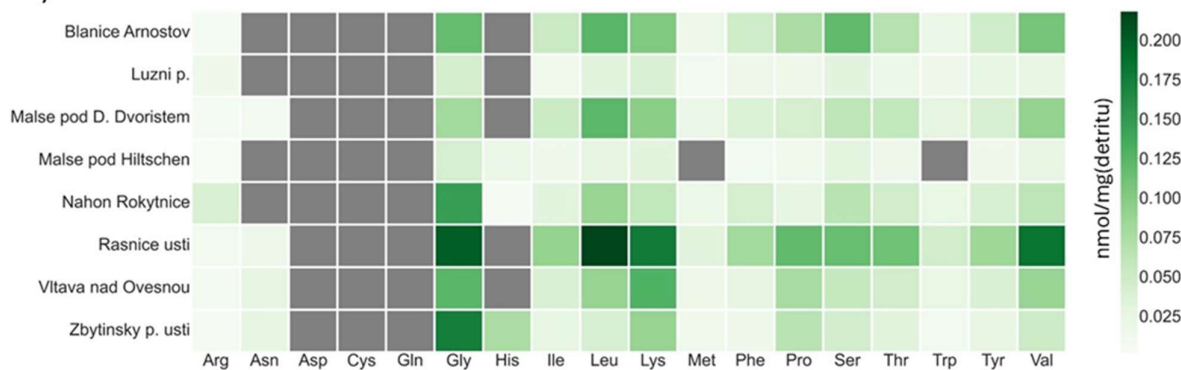
A) JARO



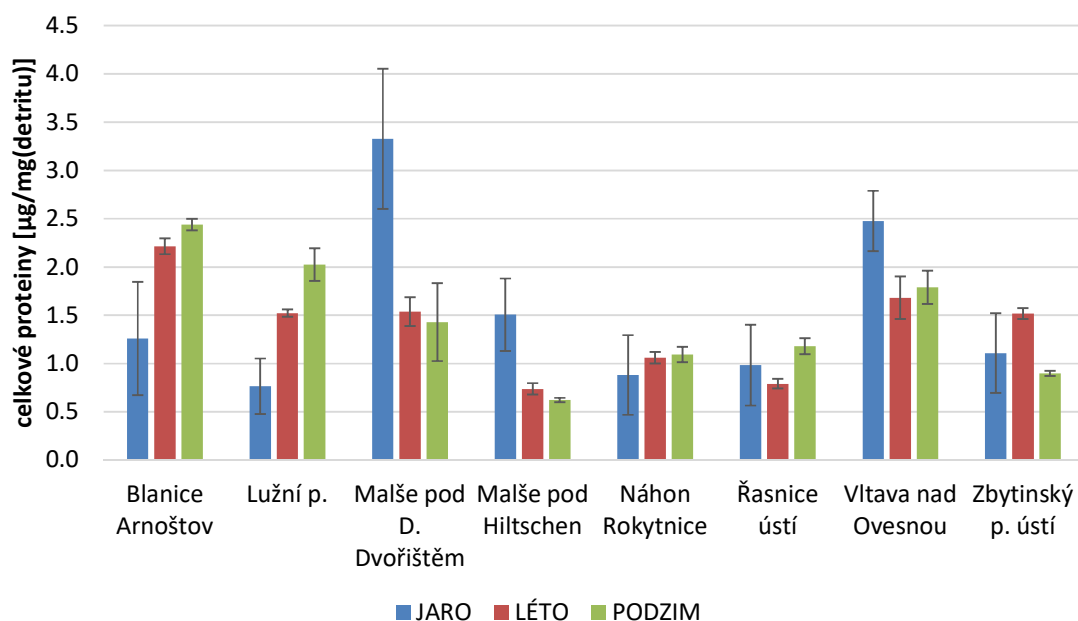
B) LÉTO



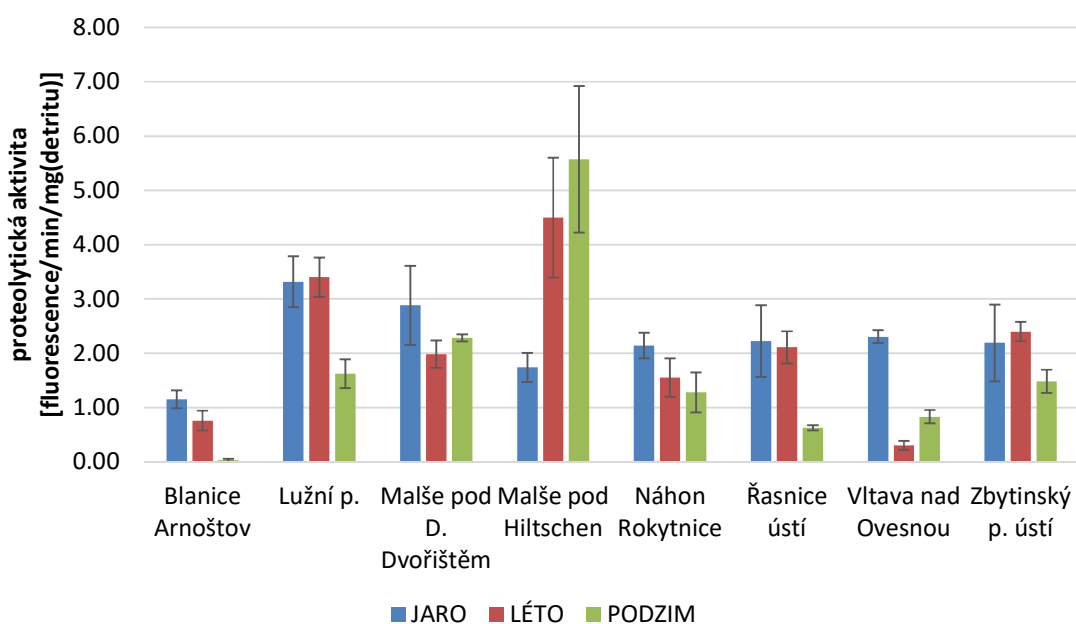
C) PODZIM



Obr. 25: Stanovení jednotlivých volných aminokyselin v detritu odebraném v období jaro, léto a podzim roku 2023. Šedě označené jsou hodnoty pod limitem detekce; v případě Asn, Asp, Cys a Gln se však jedná o neesenciální aminokyseliny, které si perlorodka dokáže sama syntetizovat (Bishop et al. 1983). Koncentrace aminokyselin Ala a Glu byla oproti ostatním aminokyselinám ve významném nadbytku; v mapě není uvedena z důvodu lepší porovnatelnosti koncentrací ostatních aminokyselin.

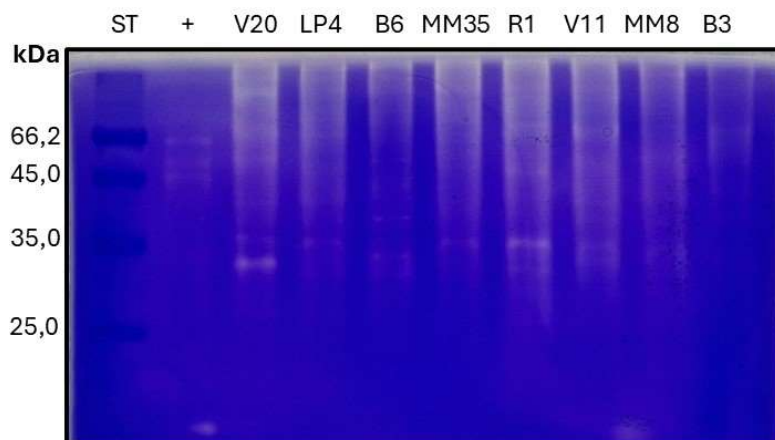


Obr. 26: Stanovení obsahu proteinů v detritu odebraném v období jaro, léto a podzim roku 2023.

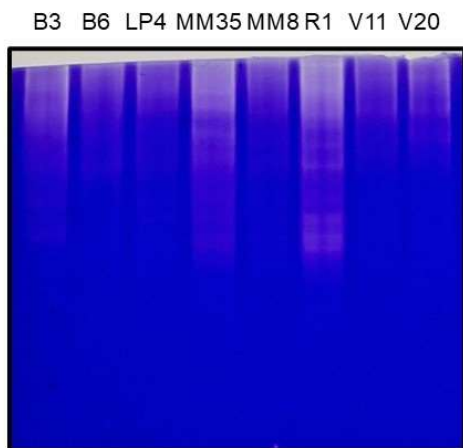


Obr. 27: Stanovení proteolytické aktivity pomocí fluorescenčně značeného kaseinu v detritu odebraném v období jaro, léto a podzim roku 2023.

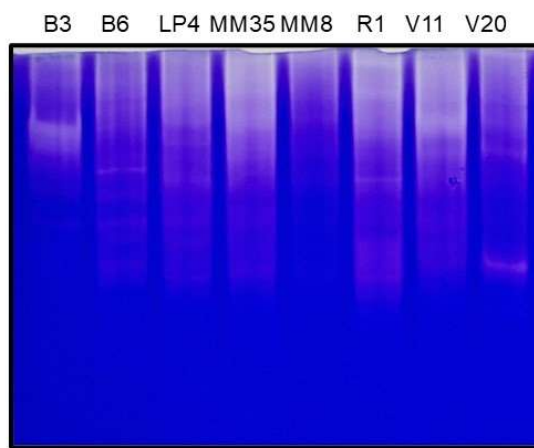
A) JARO



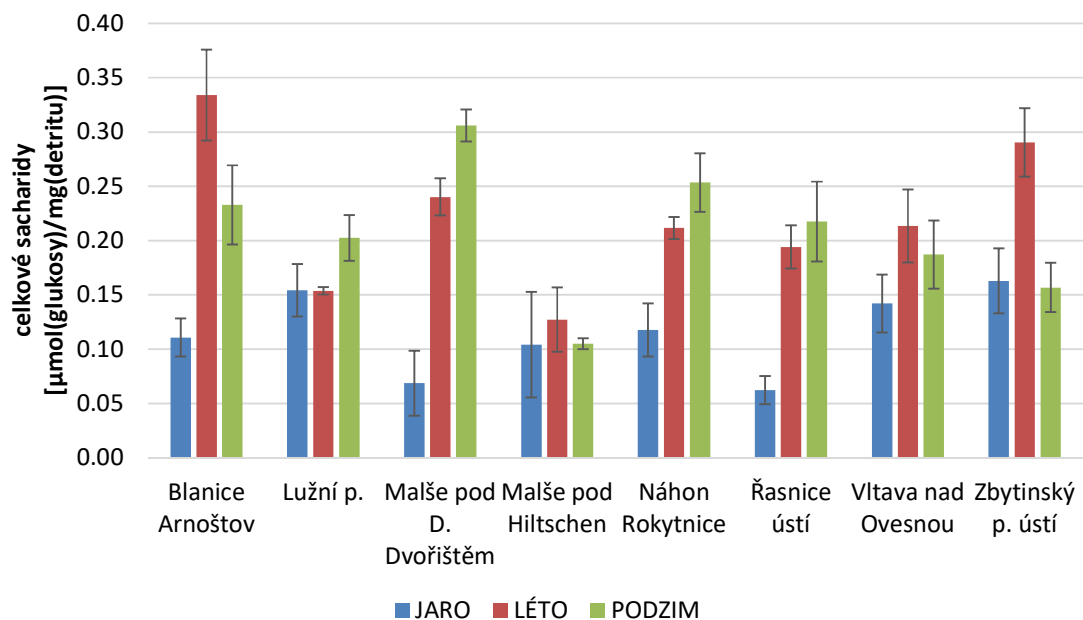
B) LÉTO



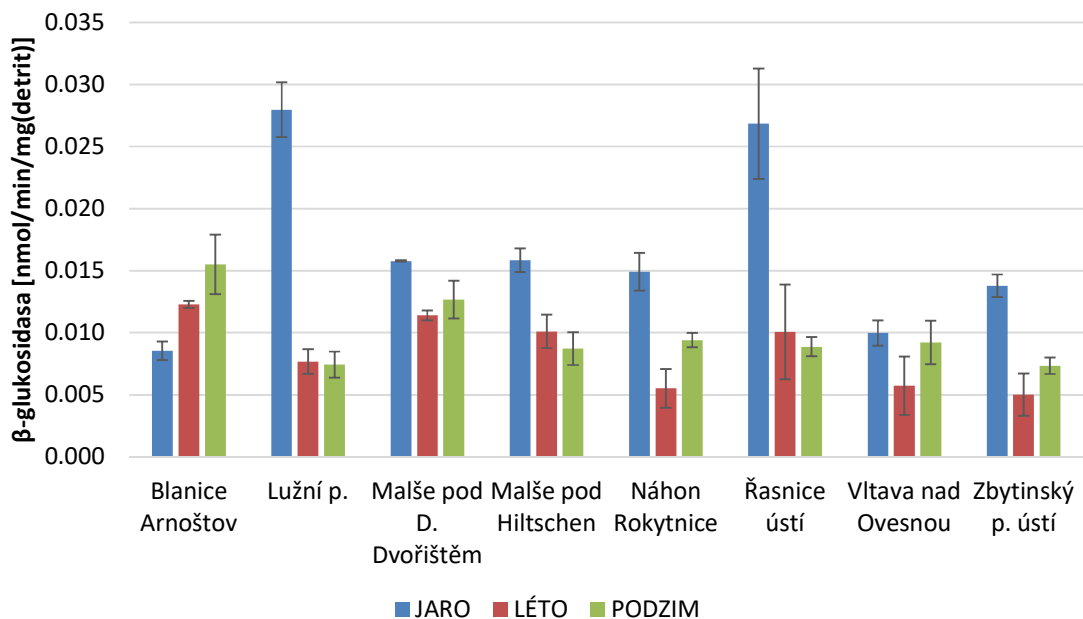
C) PODZIM



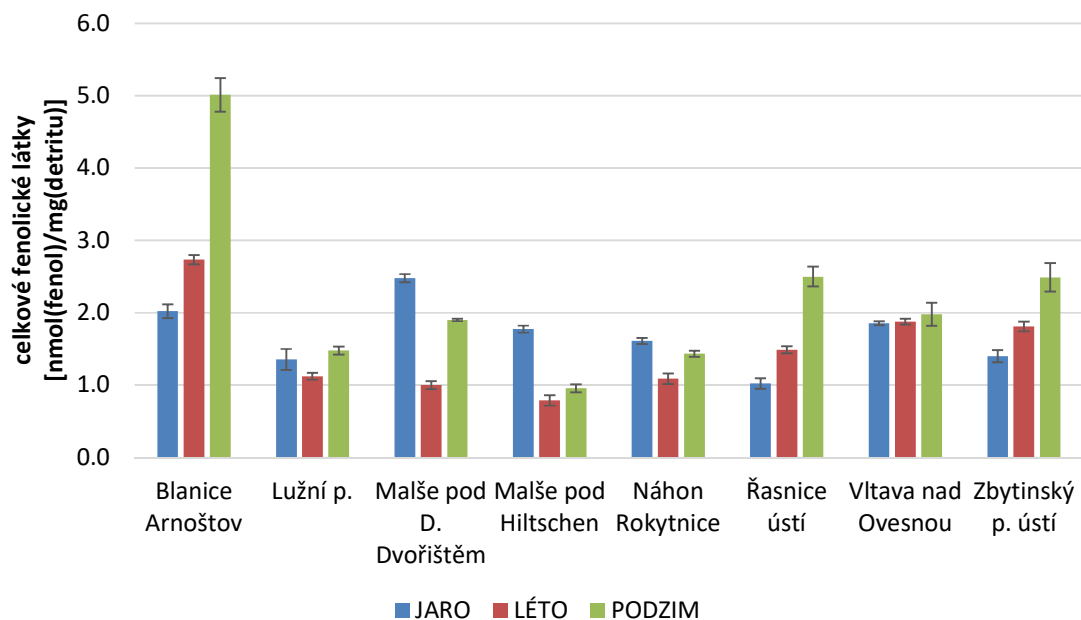
Obr. 28: Elektroforetická separace proteinů v gelu s následnou detekcí proteolytické aktivity v detritu odebraném v období jaro (A), léto (B) a podzim (C) roku 2023. Zkratky: +, pozitivní kontrola proteolytické aktivity; B3, Blanice Arnoštov; B6, Zbytinský p. ústí; LP4, Lužní p.; MM35, Malše pod D. Dvořištěm; MM8, Malše pod Hiltchen; R1, Náhon Rokytнице; V11, Řasnice ústí; ST, standardní směs proteinů; V20, Vltava nad Ovesnou.



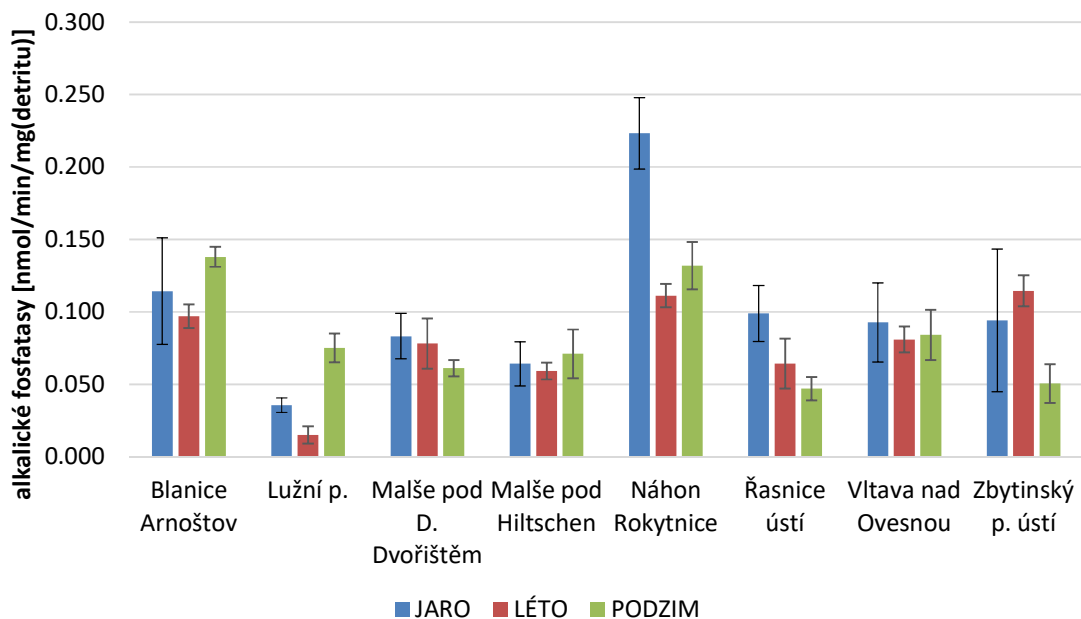
Obr. 29: Stanovení obsahu celkových sacharidů v detritu odebraném v období jaro, léto a podzim roku 2023.



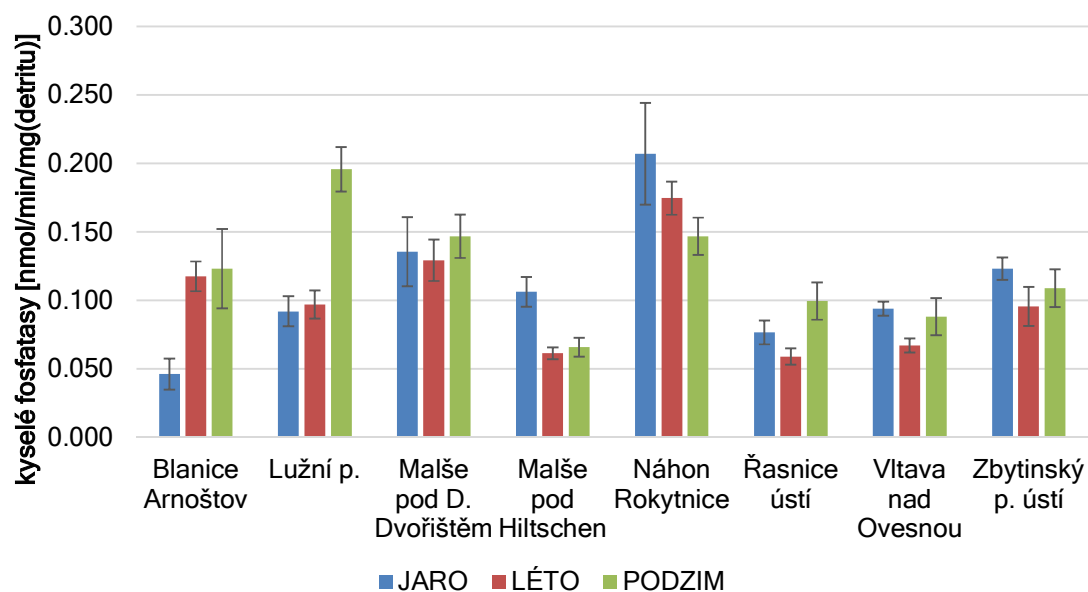
Obr. 30: Stanovení aktivity β-glukosidasy v detritu odebraném v období jaro, léto a podzim roku 2023.



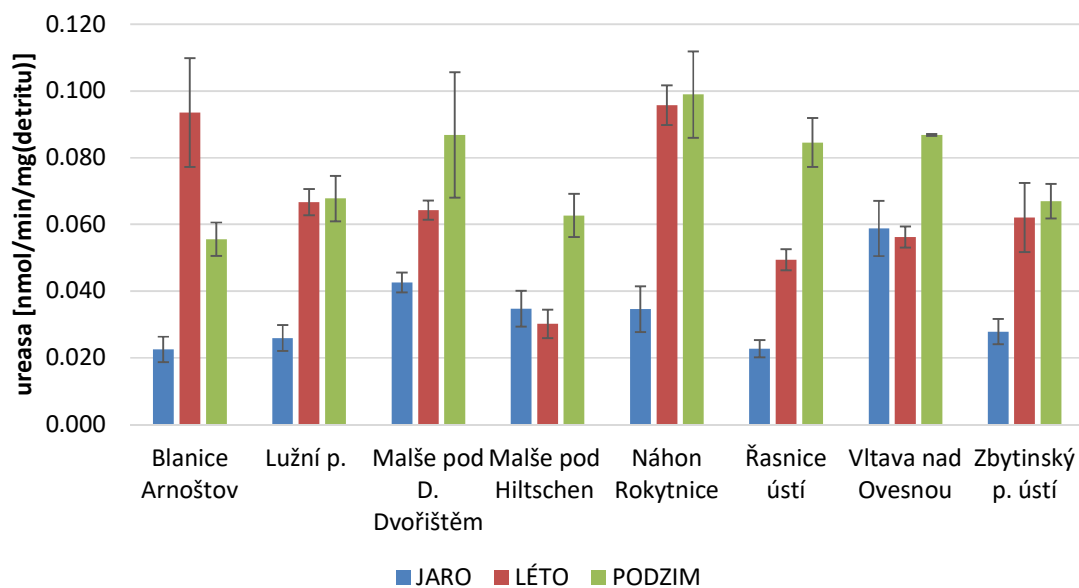
Obr. 31: Stanovení obsahu celkových fenolických látek v detritu odebraném v období jaro, léto a podzim roku 2023.



Obr. 32: Stanovení aktivity alkalických fosfatasy v detritu odebraném v období jaro, léto a podzim roku 2023.



Obr. 33: Stanovení aktivity kyselých fosfatasy v detritu odebraném v období jaro, léto a podzim roku 2023.



Obr. 34: Stanovení aktivity ureasy v detritu odebraném v období jaro, léto a podzim roku 2023.

Část 3: Výstupy

Pasivní odběrové zařízení detritu

V minulém roce byla vyvinuta nová konstrukce odběrového zařízení na detrit, která vychází ze staršího užitého vzoru, a využívá zejména technologie 3D tisku dílů, která dříve nebyla k dispozici, a bylo nutné při sestavování vycházet pouze z dostupných součástí primárně určených pro jiné účely. Konkrétně byla navržena základní modulární konstrukce skládající se z nástavce s otvorem pro vtok vody s detritem, otvory pro uchycení hadiček pro odtok vody, se závitem na běžně dostupnou, levnou 5litrovou PET lahev sloužící k zachytu detritu. Na vnitřní část nástavce je závit pro připevnění volitelně dlouhé clony bránící nasátému detritu přímo vstoupit do odtokové hadičky, aniž by měl čas sedimentovat v lahvi. Na vnější části nástavce je pak závit na připevnění vtokového trychtýře různého tvaru a velikosti, případně lze volitelně mezi nástavec a trychtýř vložit další funkční prvky (např. teplotní senzor, průtokoměr...)

V návaznosti na to jsme v letošním roce následným způsobem konstrukci upravili (Obr. 35):

- (i) změnili jsme geometrii tak, abychom maximalizovali plochu otvoru pro vtok vody ($\sim 630 \text{ mm}^2$);
- (ii) upravili vedení odtokové hadičky, aby ta v něm dostatečně pevně držela bez použití lepidla, zároveň jí však bylo možné v případě potřeby vytáhnout a zpět nasunout bez použití většího úsilí a speciálních nástrojů;
- (iii) byly vytvořeny konstrukce pro 1 hadičku o vnitřním průměru 4 mm, 6 mm, nebo 8 mm a pro 2 hadičky o průměru 8 mm; dle potřeby tak lze použít odtok s plochou $12\text{-}100 \text{ mm}^2$;
- (iv) vtokový trychtýř byl doplněn o úchyty pro snadnější kotvení odběráku v toku; ty zároveň zpevňují celou konstrukci trychtýře;
- (v) byla clona upravena do formy za sebe sešroubovatelných dílů o délce 6 cm, aby bylo možné dle potřeby upravovat její délku; na poslední z dílů je možné také na závit přišroubovat víčko se sítkou.



Obr. 35: Vývoj odběrového zařízení detritu. Vlevo – model vtokového trychtýře (průměr 12 cm, výška 10 cm); vpravo – model nástavce na sběrnou lahev a jeho řezy. Nádkresy byly vytvořeny v programu Autodesk Fusion Personal.

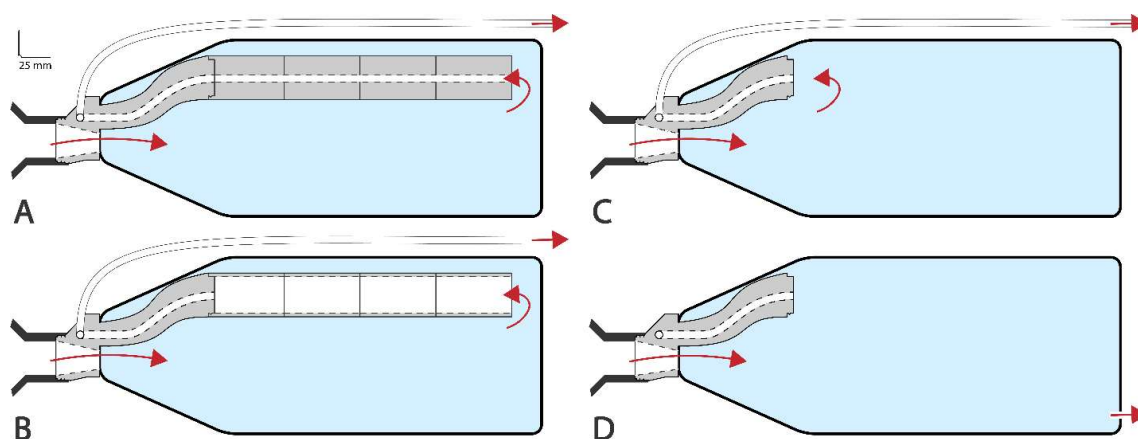
Jednotlivé díly byly navrženy v programu Autodesk Fusion Personal, exportované modely upraveny pro 3D tisk v programu Prusa Slicer 2.8.0 s různým nastavením tiskových parametrů pro jednotlivé díly a vytištěny na tiskárně Original Prusa i3 MK3S z PETG materiálu. Barva byla zvolena tmavě šedá či černá, aby byly odběráky ve vodě co nejméně nápadné.

Funkci odběráků sestavených z různých kombinací vytištěné díly jsme nejprve otestovali při odběru detritu z menšího toku (Bakovský potok). Odběráky byly ukotveny v toku ke dnu pomocí roxorových tyčí a uvázány na laně kotveném do břehu potoka, a detrit byl pomocí zařízení sbírán po dobu 7 dnů. Vývody vybraných typů odběráků byly zavedeny do další sběrné lahve, aby bylo možné odhadnout, jaké množství detritu se při průchodu odběrákem nepodaří zachytit. Poté bylo porovnáno celkové množství detritu, získaného odlišnými typy odběráků (Obr. 36). Z výsledků testování jsme vyvodili následující závěry, a ty budou zohledněny při výrobě další verze odběráku, který bude dále upravován a používán v dalším roce projektu:

- (i) pomocí odběráků typu A a B jsme získali menší než očekávané množství detritu (celkem 2,5-4 g detritu po žihání), kde referenční typ A se jevil jako nejhorší; při použití více odběráků najednou je takovéto množství získaného detritu dostačující pro bioindikační pokusy, tyto 2 typy zařízení se v nezměněné podobě nehodí k odběru většího množství detritu pro potřeby odchoven perlorodek;
- (ii) nebyly pozorovány rozdíly v množství získaného detritu v poměrech odpovídajících poměru průměrů odtokových hadiček, které představují nejužší místo celého systému; důvodem zde však mohlo být také nestejné umístění odběráků v toku, kdy nebyl zajištěn stejný protečený objem vody;
- (iii) použití clony dle předpokladu brání v odtoku detritu – při zapojení 2 sběrných lahví za sebe bylo ve druhé sběrné lahvi zachyceno 5 % detritu v porovnání s množstvím, zachyceným v první lahvi v sestavení bez clony (typ C) a pouze 1 % u zařízení se clonou (typ B);

(iv) největší množství detritu (celkem 10-20 g po žíhání) bylo získáno u odběráku typu D; jeho zásadní nevýhodou však je následný obtížný transport vzorku, kdy sběrnou lahev není snadné jednoduše a spolehlivě uzavřít;

(v) úchyty pro kotvení pomocí roxorů a vázání ke břehu plnily svou předpokládanou funkci; zejména pro ukotvení odběráků v obtížných podmínkách by ale bylo přínosné konstrukci pozměnit pro snadnější použití.



Obr. 36: Testované typy odběráků. A/ Typ odpovídající staršímu návrhu s hadičkou (průměr 4 mm) vedenou do zadní části sběrné lahve, pouze s vyšší plochou vtokového otvoru; B/ Typ s clonou do zadní části lahve, průměr hadičky 4 mm, 6 mm, 8 mm nebo 2x 8 mm; C/ Typ bez clony, průměr hadičky 8 mm nebo 2x 8 mm; D/ Typ s proraženým dnem sběrné lahve opatřeným odtokovou hadičkou o průměru 8 mm. U všech odběráků použit vtokový trychtýř o průměru 12 cm, vyústění odtokových hadiček ve všech případech cca 1 m po proudu od hrdla lahve.

Současná verze odběráků byla též na 2 vybraných lokalitách použita paralelně s jednorázovým ručním odběrem detritu (Tetřivčí potok v povodí Blanice a Řasnice – ústí v povodí Teplé Vltavy, jaro 2024). Pro odběr byl zvolen odběrák s průměrem trychtýře 12 cm, bez clony, se 2 odtokovými hadičkami o průměru 8 mm. Pro získání dostatečného množství detritu pro další analýzy a experimenty jsme na každé lokalitě zachycovali plavený detrit zároveň do 5 odběráků, po dobu 2 týdnů.



Obr. 37: Prototypy pasivních odběráků a jejich testování. Na prvním obrázku jsou vidět jednotlivé součásti, které lze dle potřeby přidat/odebrat, případně vyměnit, na druhém obrázku je pohled na složené nové odběrové zařízení. Třetí a čtvrtý obrázek ilustrují umístění v toku, respektive stav po vyjmutí.

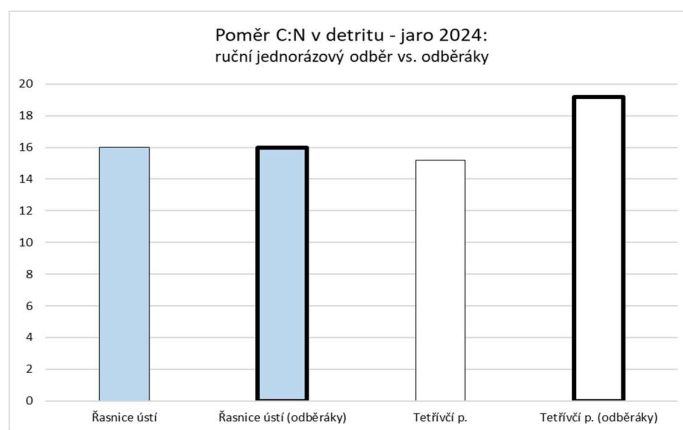
Směsné vzorky, které jsme z nich získali, proto reprezentovaly delší období než vzorky odebrané přímo z toku v době, kdy jsme odběráky vyjmuli z toku. Z dřívějšího využití odběráků víme, že v případě, že jsou podmínky srážkově stabilní, rozdíl v chemických parametrech různě odebraných detritů je malý.

V tomto případě ale byly dva dny před odběrem zaznamenány v povodí poměrně silné srážky, dá se tedy předpokládat, že kvalitativně se tyto na stejných lokalitách, ale dvěma způsoby odebrané detrity mohly lišit. V detritu z odběráků byly na obou profilech základní chemické parametry (poměr org. sušiny, vápník, celkový fosfor, železo) nižší než v detritu sbíraném ručně, pouze obsah železa v detritu z odběráku v ústí Řasnice byl mírně vyšší než v detritu odebraném ručně. Celkově však tyto chemické parametry detritu z odběráků nevybočují z průměru, jak je vidět na obr. 6-9, ve kterých jsou data z odběráků vyznačena červenými sloupci. Co se týče srovnání u detritu z odběráků s ručním odběrem, na profilu Řasnice ústí byl detrit poměrem C:N stejný, v Tetřívčím potoce mírně vyšší (obr. 38)

Oba směsné vzorky z odběráků byly také zařazeny do růstových experimentů s juvenilími. Zde se projevil významný rozdíl pouze u detritů z Tetřívčího potoka, kde při krmení detritem z odběráku přežilo 6 z 8 jedinců 30-ti dní do konce pokusu (tab. 2). Detrit z odběráků z Řasnice vykazoval obdobně špatné přežívání a přírůstky jako velká část detritů z jara 2024 obecně. Pro lepší porovnání kvality detritů z odběráků a z přímého odběru bychom však potřebovali více dat, takže kromě testování odběráků a jejich úpravám směrem k vyššímu zachytu detritu, se zaměříme v sezóně 2025 také na porovnání kvalitativních parametrů detritů, odebraných oběma způsoby a na porovnání přežívání a přírůstků.

		um	%	Přežívání (%)	přežilo
B20A	Odb.	185,5	113,9	75	6 z 8
B20		119,0	107,3	12,5	1 z 8
V11A	Odb.	64,2	104,6	12,5	1 z 8
V11		75,3	104,8	12,5	1 z 8

Tab. 2: Průměrné hodnoty přírůstků juvenilů (v mikrometrech i procentech) a přežívání (v procentech i počtech jedinců) na detritu, odebraného přímo z toku a na detritu z odběráků (B20 Tetřívčí potok, V11 Řasnice – ústí+ A značí detrit z odběráku).



Obr. 38: Porovnání poměru uhlíku a dusíku v sušině detritu odebíraného ručně nebo pomocí odběráku

Ostatní výstupy

Slíbenými výstupy v roce 2024 byla v březnu Souhrnná výzkumná zpráva (Vsouhrn) za první rok řešení projektu a v prosinci populárně - naučný článek (O). Zpráva byla zaslána odbornému garantovi na MŽP ve slíbeném termínu, na žádost Agentury ochrany přírody a krajiny ČR jsme zaslali zprávu také koordinátorce Záchraného programu perlorodky říční. Popularizační článek na téma „Klíčové složky potravy perlorodky říční“ byl přijat do časopisu Šumava, vydávaného Národním Parkem Šumava, a bude publikován v jarním čísle 2025 vzhledem k tomu, že zimní číslo už bylo obsazené.

Téma projektu a jeho předběžné výsledky jsme v roce 2024 také prezentovali na dvou seminářích. Prvním byl XXII. Hejného seminář z ekologie mokřadů a hydrobotaniky, který byl zaměřen na témata zaměřená na vodní a mokřadní ekosystémy a současně financovaná programem PPŽ od TAČR, který se konal 10. 4. 2024 v Praze za MŽP. Druhým byl Poradní sbor Záchraného programu perlorodky říční ve dnech 15. -16. 10. 2024 ve Zbytinách.

Reference

Belonoznikova, K., Vaverova, K., Vanek, T., Kolarik, M., Hyskova, V., Vankova, R., Dobrev, P., Krizek, T., Hodek, O., Cokrtova, K., Stipek, A., Ryslava, H. Novel insights into the effect of Pythium strains on rapeseed metabolism. *Microorganisms* 8:1472, 2020.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8101472>

Bishop, S.H., Ellis, L.L., Burcham, J.M. 6 - Amino Acid Metabolism in Molluscs, In *Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics*, (Editor: P.W. Hochachka), 243-327, Academic Press, 1983.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-751401-7.50013-2>

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168:167, 1951. <https://doi.org/10.1038/168167a0>

Hodek, O., Krizek, T., Coufal, P., Ryslava, H. Design of experiments for amino acid extraction from tobacco leaves and their subsequent determination by capillary zone electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409:2383–2391, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0184-2>

Hýsková, V., Jakl, M., Jaklová Dytrtová, J., Čavar Zeljković, S., Vrobel, O., Bělonožníková, K., Kavan, D., Křížek, T., Šimonová, A., Vašková, M., Kovač, I., Račko Žufić, A., Ryšlavá, H. Antifungal triazoles affect key non-target metabolic pathways in *Solanum lycopersicum* L. plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 268:115729, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115729>

Leber, T.M., Balkwill, F.R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical Biochemistry*, 249:24-28, 1997. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2170>

Macháček, V. (2022). *Vliv obsahu a poměru vápníku v potravě perlorodky říční (Margaritifera margaritifera) na její přežívání a rychlost růstu* [Diplomová práce]. Univerzita Karlova

Pawar, V.S., Bhande, D., Pawar, S.D., Mudila, H., Kaushik, A., Kumar, A. Investigating purification and activity analysis of urease enzyme extracted from jack bean source: A green chemistry approach. *Analytical Biochemistry*, 659:114925, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114925>

Rovelli, G., Wilson, K.R. Elucidating the Mechanism for the Reaction of o-Phthalaldehyde with Primary Amines in the Presence of Thiols. The Journal of Physical Chemistry B, 127:3257-3265, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c08785>

Simon O., Tichá K., Rambousková K., Bílý M., Černá M., Dort B., Horáčková J., Hruška J., Kladivová V., Švanyga J., Vydrová A., 2018: Metodika podpory perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera*). – VÚV TGM, Praha, 283 s., ISBN 978-80-87402-63-4 (tištěná verze), ISBN 978-80-87402-64-1 (on-line verze, 2017).

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, 150:76-85, 1985. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)