

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Kristýna Míčková

Využití metody „dvojitě značené vody“ v ekologickém kontextu u ptáků
The utilization of „doubly labelled water“ method in studies of avian ecology

Bakalářská práce

Školitel: doc. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze, dne 12. 05. 2015

Podpis:

Kristýna Míčková

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Mgr. Tomášovi Albrechtovi, Ph.D. za rady během psaní a kontrolu tohoto textu a také své rodině a Petrovi Slavíkovi za podporu a nekonečnou důvěru, že to zvládnou.

Abstrakt

Metoda dvojitě značené vody se používá pro odhad produkce CO₂ a energetického výdeje. Metoda je založena na aplikaci vody obsahující vzácné izotopy vodíku a kyslíku a na jejich rozdílné eliminaci z těla. Rozdíl v koncentraci izotopů (odhad produkce CO₂) je stanoven většinou ze dvou krevních vzorků odebraných v určitém časovém rozmezí ze stejného jedince, ve většině případů během 24 hodin. Tato rešerše shrnuje předpoklady a metodiku metody dvojitě značené vody a dále se zabývá jejím použitím ve studiích využívajících jako objekty ptáky. Studie provedené na ptácích typicky měří energetický výdej spojený s investicemi do reprodukce, létání, investicemi do ornamentace, výdej v souvislosti s přítomností parazitů a imunitní reakcí, změny související se stárnutím. V porovnání s ostatními metodami je využití dvojitě značené vody vhodné pro měření aktuálního energetického výdeje souvisejícího s různými aspekty biologie sledovaných objektů.

Klíčová slova: Dvojitě značená voda, energetický výdej, metabolismus, ptáci, investice do reprodukce, letové náklady

Abstract

Doubly labelled water method is used to estimate CO₂ production and energy expenditure. The method is based on the application of water containing rare hydrogen and oxygen isotopes, and estimation of the difference in elimination of these isotopes from the body (used as an indirect estimate of CO₂ production), which is measured mostly from two blood samples taken over a defined time interval (usually 24 hours). Here I summarize the assumptions and methodological approaches associated with the use of the doubly labelled water method in bird studies. Studies on birds typically evaluate energy expenditure associated with parasitic infections and immune response, ageing, investments into the reproduction, flight and migration, ornamentation. In comparison with other methods doubly labelled water is appropriate for measurement of energy expenditure associated with various aspects of biology in targeted individuals.

Key words: Doubly labelled water, energy expenditure, metabolism, birds, reproductive investments, flight costs

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Metoda dvojité značené vody	7
2.1 Historie metody	8
2.2 Předpoklady metody	8
2.3 Výpočty.....	11
2.4 Validace	13
2.5 Výhody metody	13
2.6 Nevýhody metody.....	14
3. Porovnání s ostatními metodami	14
3.1 Měření srdeční frekvence	15
3.2 Respirometrie.....	15
3.3 Časový rozpočet (Time budget).....	16
4. Využití metody v praxi na ptácích	17
5. Studium energetiky činností, investic a růstu u ptáků.....	18
5.1 Reprodukce	19
5.2 Růst mláďat.....	23
5.3 Létání a plavání.....	24
5.4 Ornamentace	26
5.5 Parazitace	28
5.6 Stárnutí.....	28
5.7 Zimní období	29
6. Závěr.....	30
7. Literatura.....	31

1. Úvod

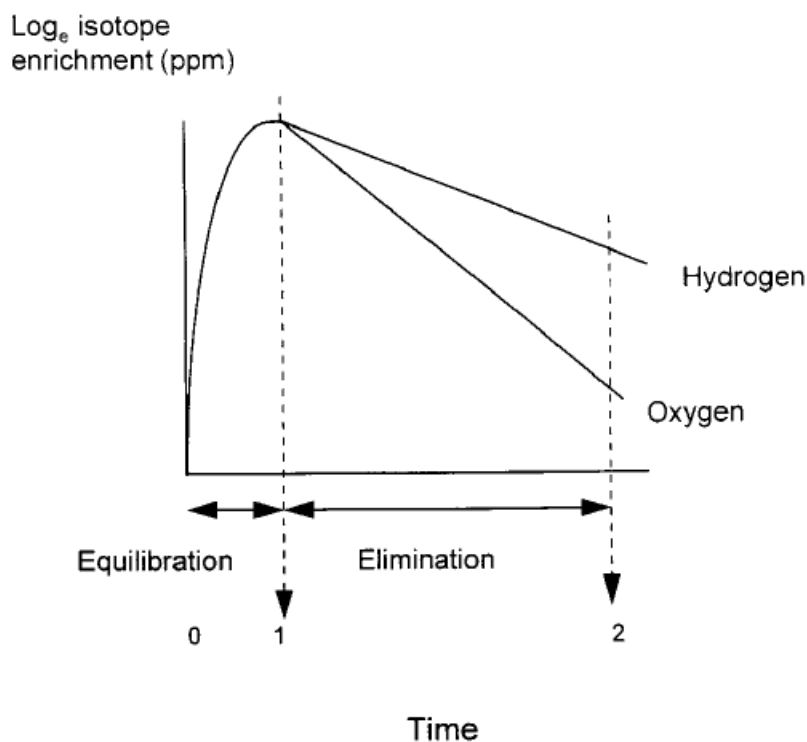
Metoda dvojitě značené vody je jedním ze způsobů měření rychlosti metabolismu. Rychlost metabolismu můžeme vyjádřit tzv. basal metabolic rate (BMR), což je bazální metabolický výdej, resting metabolic rate (RMR), klidová rychlost metabolismu, nebo field metabolic rate (FMR), kdy hodnota odkazuje na rychlost metabolismu neboli energetický výdej během dne včetně všech denních aktivit (např. hledání potravy, útěk před predátorem, starost o potomstvo atd.). Dle FMR lze usuzovat, jak těžce organismus pracuje (Drent & Daan, 1980).

Studium energetiky zvířat přináší pochopení do fyziologie, výživy a chování zvířat, evoluce, ekologie i ochrany přírody. Rychlost metabolismu může například ovlivnit délku života organismu. Menší zvířata mají obecně rychlejší metabolismus a rychleji se jim v těle hromadí reaktivní formy kyslíku tzv. ROS, což by mohlo mít za následek dřívější smrt (např. Montgomery et al. 2011). Zatímco laboratorní analýzy mohou poskytnout velmi přesná data, skutečnější jsou výsledky metod použitých v přirozeném prostředí organismu, protože organismus si neustále vyměňuje energii a hmotu s okolním prostředím (Walsberg 1983). Objevení nových metod pro měření či odhad energetického výdeje, přesunulo experimenty z laboratoře přímo do přirozeného prostředí živočichů.

Cílem této práce je podat krátký přehled o metodických postupech spojených s využitím metody dvojitě značené vody v ekologickém výzkumu a dále zmapování použití metody dvojitě značené vody ve studiích využívajících ptáky jako modelový objekt. Jsou zde shrnuty nejdůležitější práce, které metodu využívaly v ekologickém kontextu u ptáků a metoda sama je srovnána s alternativami využívanými k odhadu rychlosti metabolismu. Ve studiích, které jsou v této práci zmíněny, se většinou pracuje s hodnotou field metabolic rate (FMR) (např. Fyhn et al. 2001) či denní energetický výdej (DEE) (např. Hinsley et al. 2008). DEE značí energetický výdej během dne včetně zahrnutí výdeje souvisejícího s běžnými či experimentálně navozenými aktivitami. FMR udává energetický výdej včetně těchto aktivit během určitého období, nemusí se vždy jednat o 1 den. Ve studiích je tato hodnota však velmi často udávána v časovém období 24 hodin, a proto ve snaze sjednotit výsledky používám ve všech případech termín DEE, tedy denní energetický výdej.

2. Metoda dvojitě značené vody

Metoda dvojitě značené vody umožňuje odhad produkce CO_2 v časovém intervalu a tudíž odhad energetického výdeje v čase. Injikovaná dvojitě značená voda obsahuje těžší izotopy vodíku a kyslíku než voda v těle organismů. Převážně se jedná o deuterium ^2H nebo tritium ^3H a ^{18}O či ^{17}O . Zatímco deuterium (respektive tritium) je vylučováno z těla v molekulách vody v moči, kyslík je vylučován jak s vodou tak i jako CO_2 při respiraci (Lifson et al. 1955) díky izotopické výměně mezi vodou a CO_2 (Lifson & McClintock, 1966). Rozdíl v eliminaci těchto izotopů udává produkci CO_2 v čase (Lifson et al. 1955; Lifson & McClintock, 1966). Rozdílná eliminace značených izotopů je znázorněna na Obr. 1 (Speakman 1998).



Obr. 1 – Eliminace izotopů v čase (Speakman 1998). Dvojitě značená voda byla podána v čase nula. Do ustanovení rovnováhy koncentrace izotopů stoupá, poté začne klesat. Izotop kyslíku je z těla eliminován rychleji než vodík, protože je z těla vymýván dvěma různými cestami. Rozdíl mezi eliminacemi nám udává odhad produkce CO_2 v čase.

Metoda předpokládá, že dochází k úplné izotopové výměně kyslíku mezi respiračním CO_2 a tělesnou vodou (Lifson & Gordon, 1949; Lifson et al. 1955). Tato výměnná reakce je katalyzována karboanhydrázou během transportu CO_2 krví (Maren 1967).

Měření je možno provádět odebráním dvou vzorků krve (Lifson et al. 1955) či moči v čase a sestavením křivky eliminace izotopů. Jeden vzorek se odebírá po dosažení izotopové výměnné rovnováhy, odebrání druhého vzorku závisí na obratu izotopů v těle a tedy i na druhu testovaného zvířete, jeho hmotnosti a aktivitě a složení potravy (Speakman 1997, dle Shaffer 2011). Někdy se však odebírá ještě třetí vzorek před podáním dvojitě značené vody ke stanovení individuálního izotopového pozadí. Vzorky jsou pak analyzovány většinou s použitím izotopové hmotnostní spektromie, „cavity ring-down“ spektroskopie (Thorsen et al. 2011) či aktivační analýzy „Charged particle activation“ (Wood et al. 1975).

Dvojitě značená voda může být podávána i perorálně. Potom se produkce CO₂ počítá z celkového příjmu vody a koncentrace izotopů v přijímané vodě a tělní vodě. Pokud by objekt přijímal ¹⁸O dechem, deuterium by bylo v testování zbytečné a výsledkem by byla spotřeba kyslíku (Lifson et al. 1955).

2.1 Historie metody

První experimenty využívající ¹⁸O byly provedeny Lifsonem na konci 40. let 20. stol. Tyto pokusy ukazují, že se kyslík v respiračním CO₂ účastní izotopové rovnováhy s tělní vodou, což dokládá shodnou koncentrací izotopů v respiračním CO₂ a tělní vodě (Lifson & Gordon, 1949). Lifson et al. (1955) pak popisuje pokusy jak s ¹⁸O tak i s deuteriem. Od počátku 70. let byla metoda použita při testování 230 druhů ptáků, plazů a savců (Nagy et al. 1999). A na počátku 80. let byla metoda poprvé použita na člověku (Schoeller & van Santen 1982, dle Butler et al. 2004).

2.2 Předpoklady metody

Metoda pracuje s několika základními předpoklady, které by měli platit, aby bylo možno stanovit energetický výdej organismu. Z diskuze nad níže zmíněnými předpoklady však vyplývá, že neplatnost těchto předpokladů nezpůsobuje signifikantní chyby v porovnání s analytickými chybami, které mohou vzniknout při výpočtu produkce CO₂ a energetického výdeje (Lifson et al. 1955).

1) „Celkové množství tělní vody (Lifson et al. 1955), váha a množství pevných látek v těle se nemění“ (Lifson & McClintock, 1966).

Tento předpoklad samozřejmě vždy neplatí, a proto byla tato skutečnost zohledněna při výpočtu produkce CO₂. Vznikly dvě rovnice, jedna pro exponenciální změnu objemu tělesné vody a jednu pro lineární změnu. Výsledky za použití jednotlivých rovnic se však lišily o více než 5 % jen v tom případě, kdy celkové množství vody kleslo o 50 % či naopak stoupl o 100 %, což je v přírodě neobvyklé (Nagy 1980). Přestože se v testech Lifsona (1975) tělesná hmotnost myši měnila (nejprve klesla na 88 % a poté stoupla na 95 %), výsledky odhadované produkce CO₂ korelují s hodnotou naměřenou respirometrií (Lifson et al. 1975).

2) „Všechny látky jsou přijímány a vylučovány konstantní rychlostí“ (Lifson & McClintock, 1966).

Lifson et al. (1975) na základě tohoto předpokladu dokazuje, že velká změna v příjmu vody způsobí i odpovídající změnu v koncentraci izotopů (Lifson et al. 1975). To znamená, že výsledná produkce CO₂ nebude ovlivněna.

3) „Značené izotopy vstupují pouze do molekul vody a CO₂. To znamená, že vodík je eliminován z těla pouze v molekulách vody a kyslík v molekulách vody a oxidu uhličitého“ (Lifson et al. 1955; Lifson & McClintock, 1966).

Je samozřejmě možné, že by izotopy vstupovaly i do jiných molekul a ředící prostor značené vody by byl větší než objem vody v těle, ale málokdy se to děje v takovém rozsahu, aby byl výsledek výrazně ovlivněn. Pokud by docházelo k eliminaci izotopů skrze jiné molekuly než H₂O a CO₂, výsledná produkce CO₂ by nebyla chybná, pokud by izotopy byly eliminovány v poměru 2 vodíky a 1 kyslík (Lifson & McClintock, 1966). Problém by mohl vzniknout u rostoucích organismů, kde by ¹⁸O mohl vstupovat do nově syntetizovaných látek a nedocházelo by k zpětné výměně za ¹⁶O (Nagy 1980). Nagy a Costa (1980) zkoumali eliminaci tritia výkaly u tarbíkomyši. Ztráta tritia byla velmi nízká (Nagy & Costa, 1980).

4) „Specifická aktivita izotopů v eliminovaných molekulách vody a oxidu uhličitého je shodná se specifickou aktivitou v tělní vodě“.

To znamená, že vypařovaná voda musí být v izotopické rovnováze s vodou v kapalné fázi a to jak z hlediska vodíku, tak i kyslíku a zároveň musí být i CO₂ v izotopické rovnováze s kapalnou vodou v těle (Lifson & McClintock, 1966). Lehčí izotopy však přechází do plynné fáze snadněji, čímž se zvyšuje poměr ¹⁸O: ¹⁶O v tělní vodě (Schoeller et al. 1986a). Tento aspekt byl zapracován do rovnice v podobě frakcionačních koeficientů.

K tomu předpokladu se váže i další podmínka, že normální koncentrace izotopů by měla být shodná ve všech materiálech (Lifson & McClintock, 1966). Tato podmínka nemusí však vždy platit. Atmosférický kyslík např. obsahuje o 3 % více ^{18}O než čerstvá voda (Lane & Dole, 1956). Výskyt těchto izotopů v těle organismu je ovlivněn např. množstvím vody, která je organismem přijata, jejím zdrojem a složením potravy (Schoeller et al. 1986a). Pokud se přírodní koncentrace izotopů mění během testování, může se objevit chyba ve výsledcích. Pokud by byl vztah mezi izotopy kovariantní a poměr mezi nimi by se neměnil, tyto chyby by byly minimální. Výsledky měření Ritze (1994) však tento kovariantní vztah popírají (Ritz et al. 1994), což ale mohlo být způsobeno i velkou analytickou chybou (Horvitz & Schoeller, 2001). Rozdíl ve výsledcích testování vlivu změny přírodní koncentrace izotopů v Horvitzovi a Schoellerovi (2001) by mohl být vysvětlen i frakcionací při ztrátě vody z těla vypařováním (Horvitz & Schoeller, 2001). Je tedy třeba podat takové množství dvojité značené vody, aby typická koncentrace izotopů v přírodě neovlivnila významně výsledky.

Dále je s tímto předpokladem spojená otázka, zda je specifická aktivita eliminovaných izotopů shodná s jejich aktivitou v krvi a zda je koncentrace izotopů ve vodě v moči a v respirační vodě také shodná (Lifson et al. 1955). Chyba v odhadu produkce CO_2 se ukáže tehdy, když se poměr specifické aktivity v eliminované vodě a v krvi pro kyslík bude lišit od poměru specifických aktivit pro vodík (Lifson & McClintock, 1966) nebo když se bude lišit poměr izotopů v eliminované vodě a vodě v krvi (Lifson et al. 1955). Další problém by mohl být spojen s tím, že koncentrace izotopů v krvi nemusí být ve všech částech těla shodná. Například reabsorpce neznačené vody ze střeva by mohla vyvolat nižší koncentraci izotopů v okolní krvi vůči koncentraci izotopů v krvi celkově. Tento problém by však neměl vyvolat výraznou chybu ve výsledném odhadu produkce CO_2 (Lifson & McClintock, 1966).

5) „Voda ani oxid uhličitý, označený či neoznačený, nesmí do těla vstupovat dýcháním nebo přes kůži“ (Lifson & McClintock, 1966).

Eliminované izotopy však mohou znovu vstoupit do těla dýcháním. V následujících třech případech by však nemělo docházet k výrazné chybě v odhadu produkce CO_2 . 1) Izotopy z vdechnutého vzduchu nevstoupí do molekul vody a oxidu uhličitého. 2) Vdechnutý vzduch má stejnou koncentraci izotopů jako tělní voda objektu. 3) Izotopy vdechnutého vzduchu se začlení pouze do molekul vody a ne do oxidu uhličitého a poměr vodíku ve vdechovaném vzduchu a tělní vodě bude shodný s poměrem kyslíku (Lifson & McClintock, 1966).

2.3 Výpočty

Na základě v předchozí kapitole zmíněných předpokladů metody, pak můžeme připravit rovnice k výpočtu produkce CO₂. Nejjednodušší rovnice pro výpočet produkce CO₂ násobí množství tělní vody (N) rozdílem mezi obratem izotopů vodíku a kyslíku (k_o pro kyslík, k_d pro vodík) v těle organismu. Množství tělní vody je děleno 2, protože molekula CO₂ obsahuje 2 atomy kyslíku, zatímco molekula vody pouze 1 atom (Lifson et al. 1955, Lifson & McClintock, 1966).

$$r\text{CO}_2 = (N/2) \cdot (k_o - k_d)$$

Původní rovnice sestavená Lifsonem byla modifikována. Následující rovnice již počítá s frakcionací. Jak již bylo výše napsáno, lehčí izotopy přechází z kapalně fáze do plynné fáze snadněji, takže dochází ke změně poměru koncentrací ¹⁸O: ¹⁶O v tělní vodě. Zároveň rovnice pracuje s tím, že ředící prostor vodíku (N_d) je stejný jako ředící prostor kyslíku (N_o), a proto je zde opět použita hodnota N. Z ředícího prostoru kyslíku je odhadnuto množství tělní vody, které je vynásobeno obratem jednotlivých izotopů (Lifson et al. 1955, Lifson a McClintock 1966).

$$r\text{CO}_2 = (N/2,08) \cdot (k_o - k_d) - 0,015 k_d \cdot N$$

Tato rovnice však obsahuje frakcionační koeficienty při 25 °C. Hodnota 25 °C se však neshoduje s fyziologickou teplotou organismu. Rovnice byla tedy přepracována pro průměrnou tělesnou teplotu člověka 37 °C (Schoeller et al. 1986b).

$$r\text{CO}_2 = [(N/2,078) \cdot (k_o - k_d)] - 0,0246 \cdot 1,05 \cdot N (k_o - k_d)$$

Všechny předchozí rovnice počítají s předpokladem, že ředící prostory kyslíku a vodíku jsou shodné, jedná se o tzv. „single-pool model“. Jak již bylo výše nastíněno, ředící prostor izotopů je množství molekul, do kterých injikované izotopy vstupují. U „single-pool“ metody se tedy předpokládá, že vodík vstupuje pouze do molekul vody. Ředící prostor vodíku je však asi o 3 % větší než kyslíku (Schoeller et al. 1986b). Schoeller rovnici

přepočoval nahrazením množství vody v těle hodnotami ředících prostorů jednotlivých izotopů (Schoeller 1988). Tento model je označován jako „2-pool“ model.

$$r_{CO_2} = (1/2,076) \cdot (N_o \cdot k_o - N_d \cdot k_d) - 0,0246 \cdot 1,05 \cdot (N_o \cdot k_o - N_d \cdot k_d)$$

Je velmi důležité si pro studii vybrat správný model a rovnici. Ve studiích na malých zvířatech (< 5 kg) se pro výpočet používají spíše rovnice, které nepočítají s rozdílným ředícím prostorem izotopů, tedy tzv. „single-pool“ modely. U větších zvířat nebo u lidí je využívána většinou rovnice „2-pool“ modelu, která zahrnuje hodnoty jednotlivých ředících prostorů (Speakman 1993). Dykstra et al. (1997) použili metodu dvojité značené vody pro určení energetický výdejů u orla bělohlavého (*Haliaeetus leucocephalus*) a porovnali výsledky získané s použitím obou modelů. Hodnoty získané použitím „single-pool“ modelu více odpovídaly vstupní energii odhadnuté pomocí složení potravy orla bělohlavého. Z toho vyplývá, že „single-pool“ model je vhodnější pro studie zvířat s podobnou či menší hmotností (Dykstra et al. 1997). Tomu však odporuje studie na berneškách bělolících (*Branta leucopsis*), ve které se výsledky s použitím „2-pool“ modelu více shodují s výsledky respirometrie než výsledky „single-pool“ modelu. Tento případ by však mohl být způsoben tím, že bernešky v pokusu odbourávaly tuk (Nolet et al. 1992).

Pokud známe složení potravy, můžeme pak vypočítat spotřebu kyslíku ze vztahu (Lifson et al. 1975):

$$r_{O_2} = r_{CO_2}/RQ$$

Respirační kvocient (RQ) udává, kolik CO₂ organismus vydechne na 1 litr vdechnutého O₂. A s pomocí energetického ekvivalentu, který nám udává množství energie spotřebované organismem za spotřeby 1 litru O₂, pak získáme denní energetický výdej. Např. Hasselquist a Bensch (2008) použili pro RQ hodnotu 0,8 a jako energetický ekvivalent 20 kJ/l spotřeby O₂ (Hasselquist & Bensch, 2008).

Během výpočtu může dojít k několika analytickým chybám. Hodnota N je určována z tělesné hmotnosti a procentuálního zastoupení vody v těle a pomocí vysušení kostry. Obě tyto metody by neměly způsobovat vyšší odchylku od skutečnosti než 1 %. Velkou chybu na výsledku však může způsobit koncentrace ¹⁸O ve finálním vzorku, kde je tato koncentrace nejnižší (Lifson et al. 1955). Velká chyba může být také způsobena i špatnou hodnotou pro

poměr koncentrace ^{18}O v iniciačním a konečném vzorku a chybným rozdílem mezi obratem vodíku a kyslíku (Nagy 1980).

2.4 Validace

Validace poskytuje informaci o přesnosti metody. Provádí se opakováním metody a také porovnáním výsledků získaných metodou dvojitě značené vody s jinou metodou pro získání produkce CO_2 a energetického výdeje, například s respirometrií (Visser et al. 2000) či metodou měření srdeční frekvence (Bevan et al. 1994). Validační studie zaměřené na přesnost metody porovnáním s jinou metodou pro měření či odhad CO_2 ukazují, že dochází k průměrným odchylkám 3,1 % u savčích studiích, 2,4 % u ptáků a 0,5 % u plazů (Speakman 1997, dle Butler et al. 2004). Validace metody byla provedena jak na zvířatech s obvyklým metabolismem (např. Lifson et al. 1955), tak například na obézních myších (McClintock & Lifson, 1957) či rostoucích mláďatech křepelky japonské (*Coturnix coturnix japonica*) (Visser et al. 2000). Tyto validace ukazují, že metoda dvojitě značené vody je vhodná pro měření produkce CO_2 a energetického výdeje.

2.5 Výhody metody

Hlavní výhodou metody dvojitě značené vody je její vhodnost pro použití v terénu. Metoda přímé kalorimetrie je sice schopna velmi přesně měřit i malé a rychlé změny v energetickém výdeji, ale nelze jí používat dlouhodobě tak jako metodu dvojitě značené vody (Lifson & McClintock, 1966) a stejně tak se metoda přímé kalorimetrie nedá použít v přirozeném prostředí. Používá se tedy pouze ke změření basal/resting metabolic rate, kdy je zvíře v klidu, zatímco dvojitě značená voda se používá pro měření energetického výdeje během aktivit jedince. Metoda se ve volné přírodě používá celkem jednoduše. Pro změření odhadu produkce CO_2 a energetického výdeje je potřeba jen daný objekt dvakrát odchytit, injikovat dvojitě značenou vodu a odebrat vzorky krve. Mezi odebráním vzorků je zvíře vypuštěno a jeho aktivita není nijak omezena. V některých studiích byl tento postup omezen pouze na jeden krevní vzorek (např. Ricklefs et al. 1986). Ricklefs et al. (1986) odebral iniciační vzorek osmi jedincům a průměr získaných hodnot použil ve výpočtech. Konečný vzorek poté odebral jiným jedincům. Snažil se tak eliminovat trauma, kterým zvíře prochází při odebrání vzorku a při držení do ustanovení izotopové rovnováhy. Další výhodou je také

malá velikost zvířat, u kterých lze metodu použít. Zřejmě nejmenší organismus, pro který byla tato metoda ověřena, je čmelák zemní (*Bombus terrestris*) (Wolf et al. 1996).

2.6 Nevýhody metody

Jednou z nevýhod metody je validace dat pro jednotlivce s jinou metodou pro získání rychlosti metabolismu (např. s respiometrií, metodou měření srdeční frekvence), která vykazuje velké rozdíly získaných dat. Proto se metoda zatím používá pouze pro odhad energetického výdeje a rychlosti metabolismu pro skupinu jednotlivců stejného druhu (Speakman 1997, dle Speakman 1998). Další nevýhodou je jistě cena, ať už kupní cena deuteria a ^{18}O nebo náklady na analýzu vzorků v laboratoři. Jak bylo výše zmíněno, vzorky se analyzují pomocí izotopové hmotnostní spektromie, „cavity ring-down“ spektroskopie či aktivační analýzy „Charged particle activation“. V současné době však tuto analýzu provádí jen několik laboratoří na světě. Problémem může být i včasné znovu odchycení zvířete. Pokud dojde k eliminaci všech izotopů v důsledku velkého časového odstupu mezi injekcí a odchycením nebo pokud by byla koncentrace injikovaných izotopů příliš nízká, není možné měření dokončit, neboť odhady zbytkové koncentrace izotopů jsou příliš malé vzhledem k chybě jejich stanovení. Např. Flint a Nagy (1984) měřili energetické nároky letu u rybáka černohřbetého (*Sterna fuscata*). Jedinci, kteří zrovna neseděli na hnízdě, ale sháněli potravu, byli odchyceni v rozmezí 15-80 hodin a čtyři jedinci měli po návratu příliš nízkou koncentraci izotopů a z experimentu museli být vyřazeni (Flint & Nagy, 1984). Navíc bylo dokázáno, že dvojitě značená voda s tritiem může mít nepříznivý vliv na organismus zvířete. Může dojít k zpomalení metabolismu či růstu (Nagy & Costa, 1980).

3. Porovnání s ostatními metodami

V následující kapitole bych ráda podala krátké srovnání metody dvojitě značené vody s některými dalšími metodami, které se používají k měření či odhadu energetického výdeje. Jedná se především o srovnání výsledků získaných odlišnými metodami, kterým bych chtěla poukázat na vhodnost (popřípadě nevhodnost) použití metody dvojitě značené vody. Zaměřím se zde na metody nepřímé kalorimetrie.

3.1 Měření srdeční frekvence

Metoda měření srdeční frekvence je také velmi často používána k odhadu energetického výdeje. Je založena na odhadu spotřeby O_2 a energetického výdeje na základě rovnice pro kardiovaskulární systém:

$$V_{O_2} = f_H \cdot V_S (C_a O_2 - C_v O_2)$$

Hodnota f_H udává srdeční frekvenci, V_S je tepový objem (tedy množství krve vypuzené ze srdce během jednoho stahu), $(C_a O_2 - C_v O_2)$ je rozdíl mezi obsahem kyslíku v arteriální a v žilní krvi. K použití této metody je jen potřeba vytvořit kalibraci pro daný druh a implantovat měřič srdeční frekvence (Butler et al. 2004). Metodu lze použít stejně jako dvojitě značenou vodu při dlouhodobých studiích. Nepřesnosti ve výsledku získaném touto metodou mohou být způsobeny například aktivitou jedince, prostředím a stresovou hladinou (Weimerskirch et al., nepublikováno, dle Shaffer et al. 2001). Naopak výhodou je, že nezáleží na čase odchyту jedinců tak jako u dvojitě značené vody, protože data jsou uchována na implantovaném měřiči srdeční frekvence (Woakes et al. 1995).

Ve studii Bevan et al. (1994) nebyl nalezen výrazný rozdíl mezi hodnotami získanými pomocí dvojitě značené vody a odhadu srdeční frekvence u albatrose černobrvého (*Thalassarche melanophrys*) (Bevan et al. 1994). U kajky mořské (*Somateria mollissima*) se sice spotřeba kyslíku také významně nelišila, ale ve studii tato spotřeba nebyla převedena na energetický výdej (Hawkins et al. 2000). U tučňáka oslího (*Pygoscelis papua*) také nebyl nalezen rozdíl v energetických nákladech (Bevan et al. 1995b), stejný výsledek byl nalezen ve studii na polákovi chocholače (Bevan et al. 1995a). Energetické náklady na inkubaci u albatrose stěhovavého (*Diomedea exulans*) měřené těmito metodami byly také shodné (Shaffer et al. 2001).

3.2 Respirometrie

Pomocí respirometrie můžeme měřit spotřebu O_2 a produkci CO_2 v respirační komoře (např. Sparling et al. 2001) nebo pomocí respirační masky (např. Ward et al. 2004). U albatrose černobrvého (*Diomedea melanophrys*) nebyl nalezen výrazný rozdíl mezi měřením respirometrií a odhadem z dvojitě značené vody (Bevan et al. 1994), stejně tak jako u špačka

obecného (*Sturnus vulgaris*) (Ward et al. 2004). Ve validační studii na křepelkách japonských (*Coturnix japonica*) se výsledek s použitím „single-pool“ modelu lišil o 1,3-5,2 % a při kalkulaci s „2-pool“ modelem o 5,7-13,9 % (Visser et al. 2000). Naopak ve studii na polákovi chocholačce (*Aythya fuligula*) se výsledky získané pomocí dvojitě značené vody lišily o 47 až 94 %, což dokazuje, že metoda není vhodná pro potápějící se a plavoucí druhy ptáků (Bevan et al. 1995a).

3.3 Časový rozpočet (Time budget)

Energetický výdej z časového rozpočtu můžeme získat mnoha způsoby. Jedním ze způsobů je určení energetických nákladů jednotlivých aktivit a připočtení nákladů na termoregulaci a nákladů na zkonsumování potravy nebo můžeme vzít hodnotu „metabolismu existence“ (existence metabolism) a přičíst náklady na aktivity a část výdeje při konzumování potravy (Kersten 1996). Tento způsob získávání odhadu energetického výdeje je typický svou variabilitou výsledků, která závisí na volbě modelu pro výpočet (např. Williams & Nagy, 1984), a proto pokládám metodu dvojitě značené vody za vhodnější.

Studie palmovníka tmavého (*Phainopepla nitens*) ukazuje, že denní energetický výdej odhadnutý z časového rozpočtu je o 40 % nižší než hodnota získaná pomocí dvojitě značené vody (Weathers & Nagy, 1980). Ve studii Williams et al. (1993) na pštrosích dvouprstých (*Struthio camelus*) se hodnoty lišily o 7 % (Williams et al. 1993). U moudivláčka žlutohlavého (*Auriparus flaviceps*) byl DEE z časového rozpočtu o $9,3 \pm 2,0$ % vyšší nebo o $0,9 \pm 2,4$ % nižší dle modelu, který byl zrovna použit (Webster & Weathers, 2000). Ve studii na ůhýkovi americkém (*Lanius ludovicianus*) byly použity dva různé modely pro získání odhadu energetického výdeje pomocí časového rozpočtu. Tzv. Pearsonův model (založený na změření standardní rychlosti metabolismu v laboratoři za různých teplot) poskytl srovnatelnou hodnotu s měřením dvojitě značenou vodou, ale Kendeighova metoda (vycházející z existenciálního metabolismu a energetických nároků na jednotlivé aktivity) podala odlišný výsledek (Weathers et al. 1984). Ve studii Williams & Nagy (1984) bylo porovnáno dokonce pět modelů s dvojitě značenou vodou na strnadcí skvrnitým (*Passerculus sandwichensis*). Některé modely se svou hodnotou blížily k výsledku dvojitě značené vody, některé ho podceňovaly či přeceňovaly (Williams & Nagy, 1984).

4. Využití metody v praxi na ptácích

Metoda se v praxi užívá celkem snadno. Její aplikace v terénu je jednoduchá, což ale kontrastuje s následnou složitostí analýzy izotopů v krvi. Nejprve jsou ptáci odchyceni pomocí sítí (např. Hasselquist & Bensch, 2008; Schifferli et al. 2014) nebo na návnadu do pastí (Anava et al. 2002). Zvláštní případ odchyty je pak uveden ve studii Williamse et al. (1993), kde byl pštros dvouprstý (*Struthio camelus*) chycen do sníženy pod napodobeninou hnízda (Williams et al. 1993). Ptáci jsou poté zváženi, popřípadě změřeni (např. Nagy et al. 1984) a označeni. Dvojitě značená voda je jim injikována nejčastěji do peritoneální dutiny, např. u vlaštovek obecných (*Hirundo rustica*) (Cuevo et al. 1996) či křepelek japonských (*Coturnix coturnix japonica*) (Visser et al. 2001), do svalů jako v případě křepela přilbového (*Callipepla gambelii*) (Goldstein & Nagy, 1985) a tučňáka brýlového (*Sphenicus demersus*) (Nagy et al. 1984) či do podkoží v břišní oblasti jako u rákosníka velkého (*Acrocephalus arundinaceus*) (Hasselquist & Bensch, 2008). Ve studii na tučňácích patagonských (*Aptenodytes patagonicus*) byla značená voda injikována do brachiální žíly (Kooyman et al. 1982). Dvojitě značená voda může být podána i perorálně. Tento postup však u ptáků není vhodný, protože si nemůžeme být jisti množstvím dvojitě značené vody vstřebaného do těla organismu, což by mohlo vyvolat velké chyby ve výsledcích (Lifson et al. 1975). Dále jsou ptáci drženi většinou v tmavém boxu bez vody a potravy do ustanovení rovnováhy izotopů. Délka držení je závislá na rychlosti výměny izotopů v těle (jak již bylo dříve zmíněno). U menších druhů to bývá klasicky 1 hodina, ale například ve studii pštrosa dvouprstého (*Struthio camelus*) byli jedinci drženi 3 hodiny (Williams et al. 1993). Ve studii prováděné na tučňácích brýlových (*Sphenicus demersus*) nebyli jedinci do ustanovení rovnováhy drženi v tmavém boxu, tak jak bývá obvyklé, ale byli ponecháni na hnízdě (Nagy et al. 1984). Stejně tomu tak bylo i ve studii na albatrosech stěhovavých (*Diomedea exulans*) (Shaffer et al. 2001b). Po ustanovení rovnováhy je odebrán malý vzorek krve. Ptáci jsou poté vypustěni a jejich aktivita není nijak omezena a neměla by se tedy lišit od normálu. V některých studiích se iniciační vzorek odebírá z jedinců, kteří se dále už měření neúčastní. Snižuje se tak vliv stresu na měření produkce CO₂. K tomuto postupu došlo v případě burňáčka dlouhokřídlého (*Oceanodroma leucorhoa*), kde byl iniciační vzorek odebrán z osmi jedinců a ve výpočtech se použila průměrná hodnota (Ricklefs et al. 1986). Tato metoda byla validována na moudivláčcích žlutohlavých (*Auriparus flaviceps*) a byla prohlášena za vhodnou pro měření produkce CO₂ (Webster & Weathers, 1980). Odběr druhého vzorku krve závisí na cílech

studie. Většinou jsou ptáci znovu chyceni po 24 hod, zváženi a je jim odebrán konečný vzorek. Tato doba může být různě prodloužena, jako v případě již zmíněného pštrosa dvoupřstého (*Struthio camelus*), u kterého byl konečný vzorek odebrán až po 6-8 dnech (Williams et al. 1993). Ve studii na tučňácích brýlových (*Spheniscus demersus*) bylo jedincům odebráno více vzorků a to vždy po 24 hod po dobu trvání 4 dnů. K výpočtu energetického výdeje byly však použity jen první a poslední vzorky (Nagy et al. 1984). Vedle jedinců použitých pro měření produkce CO₂ a tedy i energetického výdeje, je chyceno ještě několik ptáků ke stanovení izotopového pozadí. Naměřená hodnota se zprůměruje a je použita ve výpočtu. Tito jedinci se zpravidla měření eliminace izotopů dále neúčastní.

Kromě odebrání krevního vzorku, můžeme stanovovat koncentraci izotopů i z ptačích exkrementů. Tím je snížen možný účinek stresu na výsledky měření. Anava et al. (2000) vylepšili tuto metodu tak, že se objektů své studie vůbec nedotkli. Ptáky (Timálie šedé, *Turdoides squamiceps*) vycvičili, aby si sami stoupili na váhu, koncentraci izotopů určovali z exkrementů a dvojitě značenou vodu injikovali do cvrčka, který byl pak nabídnut ptákům k pozření (Anava et al. 2000). Další možností jak méně stresovat objekty studie by mohlo být získávání krevních vzorků z krevsajících hmyzu. Tento postup k získávání krevních vzorků byl vyzkoušen na rorýsech obecných (*Apus apus*), kterým bylo do hnízda přidáno falešné vejce plné zákeřnic *Dipetalogaster maxima* (Bauch et al. 1993). Metoda však zatím nebyla použita při měření produkce CO₂ dvojitě značenou vodou.

5. Studium energetiky činností, investic a růstu u ptáků

Jak už jsem zmínila ve výhodách metody dvojitě značené vody, měření energetického výdeje přímou kalorimetrií je sice přesnější, ale nelze díky ní získat energetické náklady na aktivity jedince. Přímá kalorimetrie nám udává hodnotu bazálního metabolismu (BMR), tedy rychlost metabolismu v klidovém stavu jedince. Metoda dvojitě značené vody nám umožňuje změřit hodnotu field metabolic rate (FMR), kterou pomocí přímé kalorimetrie nelze získat. Je velmi důležité provádět tato měření v přirozeném prostředí organismu. Jen tak můžeme získat hodnotu srovnatelnou s reálným energetickým výdejem. V některých případech se může v terénu použít i metoda měření srdeční frekvence. Ne vždy je tato metoda však vhodná pro měření energetického výdeje během aktivit jedince (viz výše, kapitola 4.1), a proto je použití dvojitě značené vody velmi důležité.

Jak už bylo uvedeno v úvodu této práce, v přehledu studií používám termín denní energetický výdej (DEE) ve snaze sjednotit výsledky. Přestože hodnota FMR se nemusí vždy vztahovat k časovému období 1 dne, zde zmíněné studie ji tak uvádějí. V následujících podkapitolách bych ráda podala detailnější přehled ptačích studií, které měří denní energetický výdej pomocí metody dvojitě značené vody a poukázala bych na to, k čemu lze tato měření vztahovat. Využití dvojitě značené vody je značně rozmanité a pokrývá většinu témat současné evoluční ekologie ptáků. Metoda se používá například při měření reprodukčních nákladů, investic na růst, migraci a dalších činnostech.

5.1 Reprodukce

Reprodukce je pro většinu organismů jednou z energeticky nejnáročnějších částí života. Pokud do potomstva rodiče investují příliš mnoho energie, mohou výrazně snížit šanci své přežití a celoživotní fitness (Daan et al. 1996). Energetické nároky jednotlivých druhů se liší v závislosti na vývoji jejich mláďat a systému rodičovské péče. Například Siegel et al. (1999) ve své studii zkoumali, zda se sníží energetický výdej, pokud se mláďata papoušička vrabčího (*Forpus passerinus*) líhnou asynchronně. Z výsledků je jasné, že synchronně vylíhnutá mláďata stojí své rodiče více energie než asynchronně vylíhnutí jedinci (Siegel et al. 1999). Během inkubace rodičovský pár nebo jeden z partnerů zahřívá svá vejce. Množství tepla, které musí vyprodukovat, závisí na potřebách embrya, velikosti snůšky ale také například na izolačních vlastnostech hnízda či na okolní teplotě (Walsberg 1983). Čím nižší je okolní teplota, tím rychleji dochází ke ztrátě tepla z vejce a tím více tepla musí rodič dodat (Kendeigh et al. 1977). Ve studiích zabývajících se energetikou během inkubace je důležitá asociace energetických nároků na inkubaci s denním energetickým výdejem (Walsberg 1983). Energetické nároky na péči o mláďata lze odhadnout také v závislosti na množství potravy donesené do hnízda a ztrátě hmotnosti rodičů (Walsberg 1983). Díky použití dvojitě značené vody však můžeme zjistit, které faktory ovlivňují energetické náklady na reprodukci, porovnat náklady během inkubace a péče o mláďata a srovnat je s výdejem během jiných aktivit organismu. Metoda dvojitě značené vody ukazuje, že existuje velká variabilita mezi energetickými nároky na reprodukci mezi jednotlivými ptačími druhy.

Výsledky některých studií ukazují, že energetický výdej spojený s inkubací je nízký. Například studie na albatrosech laysanských ukazuje, že energetický výdej při inkubaci je podobný energetickému výdeji odpočívajících ptáků. Vysvětlovat by to mohla hypotéza, že

tento tropický druh albatrosa nepotřebuje tolik energie na ohřev vejce jako jeho severští příbuzní (Pettit et al. 1988). Cresswell et al. (2004) ve svém pokusu zahřívali hnízda jespáka skvrnitého (*Calidris melanotos*) a očekávali, že se energetický výdej samice sníží. Rozdíl mezi energetickým výdejem samic, kterým bylo hnízdo zahříváno, a samic v kontrolní skupině byl však velmi malý (Cresswell et al. 2004), což by také mohlo ukazovat, že inkubace není u tohoto druhu nákladná. Většina studií také ukazuje, že nároky na inkubaci jsou malé ve srovnání s energetickými nároky dalších fází reprodukce (př. Obst et al. 1987). Ptáci, kteří nosí svým potomkům potravu, mají většinou vyšší energetický výdej během fáze péče o mláďata než při inkubaci (Bryant & Tatner, 1991). Energetický výdej albatrose stěhovavého (*Diomedea exulans*) byl výrazně vyšší během péče o mláďata (Shaffer et al. 2003). Stejně tak i DEE buňňáčka dlouhokřídlého (*Oceanodroma leucorhoa*) byl vyšší po vylíhnutí mláďat. Během inkubace se hodnota pohybovala kolem 124 kJ/d, což je 2,73·BMR, a během krmení mláďat okolo 142 kJ/d, což odpovídá hodnotě 3,13·BMR pro tento druh (Montevecchi et al. 1992). Chappell et al. (1993) měřil DEE u tučňáků kroužkových (*Pygoscelis adeliae*) ve třech fázích reprodukce. Během inkubace DEE odpovídal 2,73·BMR, v druhé fázi, kdy vždy alespoň jeden rodič hlídá mládě, byl DEE odhadnut na 3,03·BMR a v poslední fázi, kdy je už mládě ponecháváno i bez dozoru, 3,29·BMR. To jasně naznačuje, že se energetický výdej zvyšuje od inkubace po vylíhnutí a dále pak se stářím mláděte (Chappell et al. 1993). Stejně výsledky vykazuje i studie na špačkovci obecném (*Sturnus vulgaris*), kde se také denní energetický výdej zvyšoval od inkubace po pozdní fázi péče o mláďata (Ricklefs & Williams, 1984). Studie na albatrosech černobrvých (*Thalassarche melanophrys*) porovnávala energetický výdej dospělce během inkubace v době, kdy sedí na vejcích, s nároky na let a lov potravy. Průměrná hodnota DEE byla 427 kJ/d. Energetický výdej během doby strávené mimo hnízdo byl přibližně 3x větší než v hnízdě (Shaffer et al. 2004). Tento rozdíl můžeme vidět i u buňňáčka dlouhokřídlého (*Oceanodroma leucorhoa*), u kterého měli jedinci mimo hnízdo také vyšší energetický výdej (Montevecchi et al. 1992). Hodnota energetického výdeje mimo hnízdo byla 2,4·EE_(v hnízdě) (Ricklefs et al. 1986).

Přesto, že se dříve soudilo, že inkubace je energeticky nenáročná část reprodukce, novější studie už vykazují vyšší energetické nároky na inkubaci a to především u druhů, kteří žijí ve vysoké zeměpisné šířce (Piersma et al. 2003). Studie na jespákovi malém (*Calidris minuta*) a jespákovi obecném (*Calidris alpina*) nevykazuje signifikantní rozdíly v energetickém výdeji během inkubace a krmné fáze reprodukce (Tulp et al. 2009). Zde to mohlo být způsobeno tím, že jespáci mají prekociální mláďata. Studie Williamse (2001) však také nepodporuje hypotézu, že během krmení mláďat musí ptáci pracovat více než během

inkubace. Denní energetický výdej během inkubace u skřivana (*Mirafra erythroclamys*) byl $88,1 \pm 6,9$ kJ a během péče o mláďata $88,5 \pm 9,9$ kJ (Williams 2001). Samice strnadce skvrnitého (*Passerculus sandwichensis*) nemají během inkubace DEE signifikantně nižší než samice krmící čtyři mláďata po vylíhnutí. Samice tohoto druhu však inkubuje vejce sama a samec jí nenosí žádnou potravu. Samice tedy během 1 hodiny 2-5x opustí hnízdo a nakrmí se, což může vysvětlovat srovnatelný DEE během inkubace a z kraje péče o mláďata.

S rostoucím věkem mláďat však samice zvyšuje počet návštěv u hnízda a počet krmení a tím se zvyšuje i její DEE (Williams 1987). Naopak samice bělořita šedého (*Oenathe oenathe*) měly denní energetický výdej $93,1 \pm 7,5$ kJ/d s mláďaty 1-4 dny po vylíhnutí a $85,4 \pm 9,7$ kJ/d ve stáří mláďat 9-13 dní (Moreno 1989).

Engstrand et al. (2002) manipulovali s velikostí snůšky skorce vodního (*Cinclus cinclus*) a předpokládali, že když do snůšky přidají jedno vejce, energetický výdej samice se zvýší, a naopak když jedno vejce odeberou, energetická cena reprodukce klesne. Samice, kterým bylo z hnízda odebráno jedno vejce, se výrazně nelišili v DEE od kontrolních samic. DEE některých samic s přidaným vejcem se zvýšil, ale u dalších se tak nestalo. Výsledky nejsou signifikantní, přestože byl DEE nejvyšší u samic s přidaným vejcem a nejnižší u samic s odebraným vejcem (Engstrand et al. 2002). Stejný výsledek byl zaznamenán ve studii Morena et al. (1995, 1997), kde se DEE samic lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*) také výrazně nelišil mezi manipulovanými a nemanipulovanými snůškami (Moreno et al. 1997), za to DEE samců byl pozitivně ovlivněn velikostí snůšky (Moreno et al. 1995). Ve studii na sýkorách koňadrách (*Parus major*) se také manipulovalo s velikostí snůšky. Denní energetický výdej zde byl výrazně vyšší s větší velikostí snůšky (Sanz & Tinbergen, 1999). Strnadci žlutoocí (*Junco phaeonotus*) měli nejnižší DEE se čtyřmi mláďaty, což je typická velikost snůšky pro tento druh. Nejvyšší DEE měli jedinci, kteří měli pouze dvě mláďata. Tyto výsledky ukazují, že se vzrůstajícím počtem mláďat, klesají energetické nároky rodičů na zahřívání mláďat. Při šesti mláďatech však energetický výdej rodičů opět stoupá kvůli nárokům na krmení (Sullivan & Weathers, 1992).

Pohlaví, množství času mimo hnízdo, stáří a počet mláďat může vysvětlovat až 65 % rozdílů v DEE ve výsledcích v rámci druhu (Fyhn et al. 2001). DEE se výrazně zvyšuje také s teplotou a délkou dne, ale pouze pokud veličiny působí zároveň (Schifferli et al. 2014). Weathers et al. (2002) porovnával DEE u dvou poddruhů strnadce bělokorunkatého (*Zonotrichia leucophrys*). Strnadec *Z. l. nuttalli* je nemigrující poddruh obývající pobřeží Kalifornie, zatímco *Z. l. oriantha* žije v pohoří USA a na zimu migruje. DEE strnadce z hor byl odhadnut na $103,6 \pm 12,2$ kJ/d a strnadec z pobřeží měl DEE $83,7 \pm 9,6$ kJ/d. Hodnota

denního energetického výdeje pro strnadce žijící v horách je o 24 % vyšší než u pobřežního poddruhu. Stejně tak poměr DEE:BMR byl vyšší pro strnadce z hor, což ukazuje na to, že zde musí více pracovat (Weathers et al. 2002). Břehule říční (*Riparia riparia*) měla energetický výdej výrazně vyšší během špatného počasí (Westerterp & Bryant, 1984) a jiříčky obecné (*Delichon urbica*) dokonce vůbec nelovily (Bryant & Westerterp, 1983). Břehule ale také měla vyšší DEE obecně proti vlaštovkám obecným (*Hirundo rustica*) a jiříčkám obecným (*Delichon urbica*), což bylo pravděpodobně způsobeno vyššími letovými schopnosti (Westerterp & Bryant, 1984). DEE může být dále ovlivněn například kvalitou teritoria. Jedinci se špatným teritoriem musí pro potravu létat dále a tím se zvýší jejich energetický výdej (Kersten 1996). Hinsley et al. (2008) porovnávali DEE u hnízdících sýkorkách koňadrách (*Parus major*) a modřinkách (*Cyanistes caeruleus*) v parku ve městě a v lese a zkoumali zde vliv roztroušených habitatů. Samice koňader měli vyšší DEE v parku, kde byly vhodné biotopy dál od sebe, což odpovídá předpokladům studie. U modřinek však nebyl nalezen rozdíl v DEE způsobený místem hnízdění (Hinsley et al. 2008).

Zajímavá otázka je, který z rodičů v biparentální péči investuje do potomstva více energie. U tučňáků kroužkových (*Pygoscelis adeliae*) se DEE neměnil v závislosti na pohlaví (Chappell et al. 1993). Stejně tak bělořiti šedí (*Oenathe oenathe*) mají pouze malé rozdíly v DEE mezi samicemi a samci (Moreno 1989). Ve studii na jespácích malých (*Calidris minuta*) byl energetický výdej vyšší u samců než u samic (Tulp et al. 2009), stejně tak u albatrose stěhovavého (*Diomedea exulans*) (Shaffer et al. 2001b; Shaffer et al. 2003). I skřivan (*Mirafra erythroclamys*) má vyšší DEE u samců. Je to však alespoň částečně způsobeno tím, že samci jsou těžší než samice (Williams 2001). Strnadci skvrnití (*Passerculus sandwichensis*) měli také vyšší DEE u samců, ale taktéž jsou samci těžší než samice (Williams 1987). Ve studii Droge et al. (1991) na salašníkově modrém (*Sialia sialis*) se také porovnával DEE mezi samci a samicemi. Samci měli více jak o 5 % vyšší produkci CO₂ (Droge et al. 1991). Naopak ve studii na vlaštovkách stromových (*Tachycineta bicolor*) měly vyšší DEE samice (Williams 1988). Williams zde dále porovnává DEE vlaštovek stromových se strnadci skvrnitými z předešlé studie v rámci obstarávání potravy. Zatímco strnadci si obstarávají potravu na zemi, vlaštovky loví ve vzduchu. Energetický výdej strnadců během péče o mláďata je 93 kJ/d pro samce a 80 kJ/d pro samice (Williams 1987), vlaštovky spotřebují 124,9 kJ/d respektive 136,4 kJ/d (Williams 1988).

5.2 Růst mlád'at

S použitím metody dvojité značené vody můžeme zkoumat i energetické nároky na růst a vývoj mlád'at. I zde lze díky této metodě objevit faktory ovlivňující náklady na růst a také porovnat energetický výdej u mlád'at se sexuálním dimorfismem. Aplikace metody na mlád'atech se výrazně neliší od jejího použití na dospělých. Jedinci jsou zpravidla odchyceni (jedná-li se o prekociální mlád'ata) (př. Krijgsveld et al. 2012) nebo jsou odebráni z hnízda (u altriciálních mlád'at) (př. Hodum & Weathers, 2003). Poté jsou zváženi a je jim injikována dvojitě značená voda do peritoneální dutiny (Schekkerman & Visser, 2001), do podkoží v břišní oblasti (Schekkerman et al. 2003) nebo do prsního svalu (Mock et al. 1991). Mlád'ata jsou poté držena nebo vrácena do hnízda do stanovení izotopové rovnováhy převážně 45 minut až 1 hodinu. Po odebrání iniciačního vzorku jsou mlád'ata ponechána v hnízdě či puštěna volně až do konečného vzorku, jehož odebrání se časově liší. V některých studiích byly konečné vzorky odebrány klasicky po 24 hod (např. Weathers et al. 2003; Tjørve et al. 2007), ve studii Krijgsveld et al. (2012) však byla mlád'ata odchycena v intervalu 5 hod 30 min až 28 hod. Ve studii Tjørve et al. (2007) byly iniciační vzorky odebrány jen u některých jedinců, ostatním se odebral pouze konečný vzorek a za počáteční hodnotu byl použit průměr z jiných objektů. Měření se poté opakovalo v různých stádiích růstu.

Krijgsveld et al. (2012) porovnávali energetický výdej rostoucích mlád'at v rámci pěti druhů: jespák drobný (*Calidris minutilla*), jespák obecný (*Calidris alpina*), vodouš žltonohý (*Tringa flavipes*), břehouš aljašský (*Limosa haemastica*) a koliha malá (*Numerius phaeopus*). Nejrychleji rostla mlád'ata jespáka drobného, který je z těchto druhů nejmenší, a naopak nejpomaleji rostl břehouš a koliha. Nejnížší hodnoty v DEE byly nalezeny u jespáka drobného a vodouše žltonohého. DEE se zvětšoval s věkem mlád'at (Krijgsveld et al. 2012). I u ústříčníka jihoafrického (*Haematopus moquini*) se zvyšoval DEE s věkem mlád'at, od 49,7 kJ/d po vylíhnutí až na 452,0 kJ/d před opeřením (Tjørve et al. 2007). DEE rostl s věkem mlád'at i u strnadce bělokorunkatého (*Zonotrichia leucophrys*) (Weathers et al. 2003). Hodum & Weathers (2003) porovnávali DEE a hmotnostně specifický DEE u mlád'at čtyř druhů buňňáků. Všechny druhy měly vyšší DEE s vyšší hmotností. Hmotnostně specifický DEE pak klesal se vzrůstající hmotností u buňňáka sněžného (*Pagodroma nivea*) a antarktického (*Thalassoica antarctica*). Tento vztah ale nebyl nalezen u buňňáka černobílého (*Daption capense*) či jižního (*Fulmarus glacialisoides*) (Hodum & Weathers, 2003). Schekkerman & Visser (2001) studovali energetické nároky růstu u břehouše černoocasého (*Limosa limosa*) a

čejky chocholaté (*Vanellus vanellus*). V této studii DEE rostl s hmotností mlád'at obou druhů, ale hmotnostně specifický DEE se výrazně lišil mezi druhy (Schekkerman & Visser, 2001). Přestože DEE se zvyšoval se zvětšující se hmotností u salašníka západního (*Sialia mexicana*) i tyrana bledohrdlého (*Myiarchus cinerascens*), mlád'ata tyrana měla vyšší DEE než salašníci stejné velikosti (Mock et al. 1991).

Denní energetický výdej růstu mlád'at může být ovlivněn i počasím. V již zmíněné studii Krijgsveld et al. (2012) DEE rostl se zvyšující se rychlostí větru a snižující se teplotou (Krijgsveld et al. 2012). Tento vztah mezi teplotou a DEE byl nalezen i u jespáka rezavého (*Calidris canutus*) (Schekkerman et al. 2003). DEE během růstu břehouše chocholatého (*Limosa limosa*) byl ovlivněn změnou teploty a také množstvím srážek, zatímco rychlost větru zde neměla žádný vliv. Rychlost větru, množství srážek ani okolní teplota neměly vliv na DEE u čejky chocholaté (*Vanellus vanellus*) (Schekkerman & Visser, 2001). Růst ústříčníka jihoafrického (*Haematopus moquini*) také nebyl nijak ovlivněn počasím (Tjørve et al. 2007).

Další studie na energetický výdej růstu mlád'at proběhly u ptáků, u nichž jsou samice výrazně větší a těžší než samci. Tento sexuální dimorfismus se objevuje už u mlád'at v hníždě. Cílem studie bylo zjistit, které pohlaví mlád'at potřebuje více energie. Zda se jedná o větší pohlaví, které rychleji roste (Teather & Weatherhead, 1988), nebo menší pohlaví, které musí vydat více energie na termoregulaci či boj o potravu (Richter 1983). Samice krahujce obecného (*Accipter nisus*) je 1,6x větší než její protějšek. Jejich mlád'ata byla během experimentu měřena pomocí dvojité značené vody ve třech obdobích. Nejprve ve stáří 4-6 dní, kdy je dimorfismus pouze velmi málo znatelný, dále v 10-12 a 18-20 dnech. Ve všech třech fázích měly samice vyšší DEE a hmotnostně specifický energetický výdej (Vedder et al. 2005). Naopak ve studii na motácích pochopech (*Circus aeruginosus*) byl sice DEE také vyšší u samic, ale hmotnostně specifický energetický výdej byl u obou pohlaví stejný (Riedstra et al. 1998).

5.3 Létání a plavání

Energetické nároky letu jsou ovlivněny mnoha faktory, např. rozpětím křídel, rychlostí mávání, tahem a rychlostí větru, odporem a hustotou vzduchu. Například ve studii na buňňákově ledním (*Fulmarus glacialis*) byl nalezen vliv rychlosti větru na frekvenci mávání křídel a tím i na energetický výdej během letu (Furness & Bryant, 1996). Pokud jedinec více využívá pasivní let, jako vznášení se a plachtění, energetická cena jeho letu je nižší. Vzlet a

zrychlení je potom náročnější než horizontální let. Metoda dvojitě značené vody nám umožňuje odhadnout energetické nároky na letové aktivity ptáků a faktory, které mohou ovlivnit velikost těchto nákladů.

Ballance (1995) zkoumala energetické nároky letu u tereje červenonohého (*Sula sula*). Předpokládala, že energetická cena letu by se měla pohybovat okolo hodnoty 61 W (219,6 kJ/h), což byla hodnota predikovaná z aerodynamického modelu. Výsledek získaný dvojitě značenou vodou byl však o 2/3 nižší, což mohlo být způsobeno přizpůsobením letového chování aktuálním podmínkám počasí (Ballance 1995). Energetické nároky letu albatrose stěhovavého (*Diomedea exulans*) odpovídají 2,35·BMR (Adams et al. 1986) nebo také 1,4-2,0·BMR, což je jedna z nejnižších hodnot nalezených u mořských ptáků (Shaffer et al. 2001a). U burňáčka Wilsonova (*Oceanites oceanicus*) během reprodukce byl energetický výdej letu odhadnut z času stráveného mimo hnízdo. Burňáček během letu příliš neodpočívá na vodě, a proto energetický výdej během doby mimo hnízdo (157 kJ/d) lze přirovnat k energetickým nárokům letu během dne (Obst et al. 1987). V experimentu na zebříčkách pestrých (*Taeniopygia guttata*) ve voliére se porovnával energetický výdej jedinců během krátkého letu s kontrolní skupinou, která byla v klidu. Létající zebříčky vynaložily o 27 % (13,6 kJ) více energie a jejich energetický výdej byl odhadnut na $30,1 \pm 5,24 \cdot \text{BMR}$ (Nudds & Bryant, 2000). Studie na sýkorách lužních (*Poecile montanus*) ukazuje pozitivní vztah mezi časem stráveným letem a DEE. S každou hodinou, kterou strávily sýkory létáním, se jejich DEE zvýšil o 10,05 kJ. Celková cena krátkého letu byla odhadnuta na 11,47 kJ/h a DEE byl stanoven na $38,09 \pm 4,66 \text{ kJ/d}$ (Carlson & Moreno, 1992). Tento pozitivní vztah byl objeven i u červenky obecné (*Erithacus rubecula*). DEE zde stoupal o 23,4 kJ s každou hodinou letu (Tatner & Bryant, 1986).

Kromě nároků na krátký let můžeme měřit i energetický výdej během migrace. Takto zaměřené studie se provádí s využitím větrného tunelu, ve kterém ptáci létají po delší dobu. Například ve studii na drozdech malých (*Catharus ustulatus*) a drozdech rezavoocasých (*Catharus guthatus*) se zkoumaly energetické nároky na migrační let během noci. Ten tvoří u těchto malých pěvců 18 dnů ze 42-denní migrace. Energetický výdej letu byl odhadnut na 15,5 kJ/h (Wikelski et al. 2003). Ptáci si před započítím migrace utvoří tukové zásoby. Tím zvýší svojí hmotnost a energetické nároky na jejich let. Ve studii Schmidt-Wellenburg et al. (2008) špačci růžoví (*Sturnus roseus*) nosili během letu postroj či postroj s vysílačkou. Let pouze s postrojem se energeticky příliš nelišil od kontrolního letu, ale let s postrojem a vysílačkou byl nejvíce nákladný. Byl zde tedy nalezen pozitivní vztah mezi hmotností a energetickou cenou letu (Schmidt-Wellenburg et al. 2008). Se stejným ptačím druhem

experimentovali i Engel et al. (2006). Hledali faktory, které by mohly ovlivňovat energetický výdej během migrace. Pouze hmotnost jedince ovlivňovala signifikantně energetickou cenu letu (Engel et al. 2006). Poštovní holubi (*Columba livia*) létali 90 a 320 km s postrojem a s postrojem a vysílačem. Produkce CO₂ za hodinu byla o 41-52 % vyšší u jedinců s postrojem a vysílačem (Gessemán & Nagy, 1988). Gessemán et al. (1991) také provedli podobný test u holubů (*Columba spp.*). Zde se však produkce CO₂ výrazně nelišila. Test byl však založen pouze na malé skupině jedinců a byla zde přílišná variabilita, což ukazuje na to, že test nebyl dobrý a výsledek nemusí být správný (Gessemán et al. 1991).

Vliv hmotnosti na energetický výdej během letu byl testován i u krátkých letů. Takový test provedli Nudds & Bryant (2002) na zebříčkách pestrých (*Taeniopygia guttata*). Jedinci nesoucí 27 % své hmotnosti navíc, neměli výrazně vyšší energetický výdej, ale snížila se jejich hmotnost a rychlost během přistání byla nižší než u kontrolní skupiny. Z toho lze odvodit, že změna hmotnosti neovlivňuje energetiku letu ale spíše chování jedince během této aktivity (Nudds & Bryant, 2002). Těžší jedinci vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) však měli vyšší energetický výdej během letu než lehčí jedinci (Schmidt-Wellenburg et al. 2007). I u faetona žlutozobého (*Phaethon lepturus*) byl energetický výdej během letu vyšší u jedinců, kteří měli na těle připevněnou vysílačku (Pennycuick et al. 1990).

Ne všichni ptáci však létají. Plavání tučňáků však může být považováno za ekvivalent letu, a proto se některé studie zabývají energetickým výdejem této činnosti. Během doby strávené v moři byl energetický výdej tučňáků brylových (*Spheniscus demersus*) 1 860 kJ na jedince a energetická cena plavání byla odhadnuta na 379 kJ/km·d (Nagy et al. 1984). Energetický výdej během lovu pod vodou u tučňáků patagonských (*Aptenodytes patagonicus*) odpovídal 2,8·BMR (Kooyman et al. 1982).

5.4 Ornamentace

Metoda dvojité značené vody nám umožňuje odhadnout vliv ornamentace na denní energetický výdej jedinců. Je všeobecně známo, že samice mnoha druhů ptáku preferují samce s nákladnými znaky, které signalizují kvalitu jedince. Samci se snaží samice zaujmout barvou peří, pohybem či přímo tancem, zpěvem atd. Samci ale musejí do těchto aktivit investovat energii. U mnoha druhů ptáků se samci výrazně liší ve svém zbarvení od samic. Barevní samci mohou být kvůli zbarvení znevýhodněni, tím že jsou nápadní pro predátory, a nákladné ornamenty mohou odčerpávat energii, která by mohla být použita jinde (princip

handicapu, Zahavi 1975). Saetre et al. (1997) zkoumali vliv zbarvení na DEE u lejska černohlavého (*Ficedula hypoleuca*), kde se vyskytují samci černě zbarvení a samci, kteří ornament postrádají a vypadají jako samice. Světlí samci však neměli vyšší denní energetický výdej než tmavší jedinci (Saetre et al. 1997).

U některých ptačích druhů byly zjištěny rozdíly v délce ocasních per samce a samice a bylo prokázáno, že samice upřednostňují samce s delšími ocasními pery (Andersson 1992). Pokud by byl tento předpoklad správný, délka ocasních per by byla sekundárním pohlavním znakem. Dlouhá ocasní pera mohou mít své výhody i nevýhody. Mohou být například problémem při útěku před predátorem, ale mohou překážet i při každodenních aktivitách (Zahavi 1975). Ve studii Cuevo et al. (1996) se manipulovalo s délkou ocasních per vlaštovek obecných (*Hirundo rustica*). Předpokladem studie bylo, že dlouhá ocasní péra zvyšují denní energetický výdej. Výsledky však tento předpoklad nepodporují. Mohlo by to být vysvětleno např. tím, že jedinci s delšími pery sice více létají, ale využívají klouzavý způsob letu. To by znamenalo, že se vracejí k hnízdu v delších intervalech a méně krmí. Studie však zároveň neukázala rozdíly v růstu či váze mláďat jedinců s delšími a kratšími pery. Dalším vysvětlením by mohla být zvýšená frekvence krmení druhého rodiče. Ale ani to výsledky studie nepotvrzují (Cuevo et al. 1996). Délka ocasních per byla prodloužena i u zebříček pestrých (*Taeniopygia guttata*). Ani zde však nebyl zaznamenán vztah mezi délkou ocasních per a DEE (Nudds & Bryant, 2003). Naopak studie Nudds & Spencer (2004), provedená také na vlaštovkách obecných, ukazuje, že nejvyšší DEE (71,2 kJ/d) měli jedinci s průměrnou délkou ocasních per 119 mm (Nudds & Spencer, 2004).

Za ornamentální znak by mohl být považován i zpěv samce během reprodukčního období. Pouze jedna studie proběhla v přirozeném prostředí a to na rákosníkoví velkém (*Acrocephalus arundinaceus*). Tento výzkum prokázal korelační vztah mezi zpěvem a denním energetickým výdejem. Zpívající jedinci měli vyšší DEE (Hasselquist & Bensch, 2008). Garamszegi et al. (2006) zkoumali vliv komplexity zpěvu na energetický výdej. Předpokládali, že samice si vybírají samce s více druhy zpěvu a ti by měli vydávat více energie než ostatní. Našli pozitivní vztah mezi hmotnostně specifickým DEE (energetický výdej na jednotku hmotnosti) a velikostí repertoáru (Garamszegi et al. 2006).

5.5 Parazitace

Paraziti mohou ovlivnit fitness svého hostitele (Gulland 1995), jeho přežití (Murray et al. 1997) či reprodukci (Albon et al. 2002) a také energetický výdej související s imunitou (Gulland 1995). Zvýšení energetického výdeje může být způsobeno imunitní odpovědí hostitele (Lochmiller & Deerenberg, 2000), ale i odstraňováním ektoparazitů z těla či pelicháním. S použitím dvojité značené vody můžeme zkoumat vliv parazitů na energetický výdej jejich hostitelů.

Ve studii Møller et al. (1994) se zkoumal vliv počtu parazitů štěnice ptačí (*Oeciacus hirundinis*) na energetický výdej jiříčky obecné (*Delichon urbica*). Autoři objevili negativní vztah mezi množstvím štěnic v hnízdě a váhou hnízdicích jiříček. Jedinci, kteří měli v hnízdě okolo 100 štěnic, vážili méně než ti s 10 štěnicemi či v kontrolní skupině. DEE nebylo výrazně ovlivněno množstvím štěnic v hnízdě, ale hmotnostně specifický DEE byl signifikantně vyšší u jedinců s vyšším počtem parazitů (Møller et al. 1994). Moreno et al. (1999) studovali vliv čmelíka lejsčího (*Dermanyssus gallinoides*) na lejska černostravého (*Ficedula hypoleuca*). DEE samic se nelišil v rámci experimentu (někteří jedinci měli vyšší počet čmelíků než ostatní). Experiment však zvyšoval úmrtí mláďat (Moreno et al. 1999). Zatímco u předešlých studií se testoval vliv ektoparazitů na DEE jedince, ve studii Saetre et al. (1997) testovali vliv intestinálních parazitů také u lejska černostravého. Počet parazitů neovlivňoval výrazně DEE, přestože zde byl objeven malý negativní vliv parazitů na energetický výdej (Saetre et al. 1997).

5.6 Stárnutí

Další zajímavou otázkou je, zda se energetický výdej mění během života jedinců. Například zda se zvyšují investice do reprodukce s věkem, což by znamenalo vyšší energetický výdej jedince. Metodou dvojité značené vody byl porovnán denní energetický výdej ptačích druhů u různě starých jedinců. Ve studii Galbraight et al. (1999) autoři zkoumali energetický výdej u samců rybáka obecného (*Sterna hirundo*) ve věku od 6 do 24 let během hnízdění. Přestože s věkem mezi 6-12 lety stoupla frekvence krmení mláďat a poté opět klesla, nebyl nalezen signifikantní vztah mezi věkem samců a jejich DEE (Galbraight et al. 1999). Naopak u samic lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) se se zvýšenou frekvencí krmení během let, zvýšil i energetický výdej (Pärt et al. 1992). DEE měnící se s věkem však

nemusí být vztahován pouze k reprodukci. Nedospělí samci čápa bílého (*Ciconia ciconia*) měli větší rozdíl mezi energetickým výdejem v létě a v zimě (Mata et al. 2010). Naopak u krocana divokého (*Meleagris gallopavo silvestris*) nebyl nalezen vztah mezi věkem a DEE v zimě (Coup & Pekins, 1999).

5.7 Zimní období

Mnoho ptačích druhů severní polokoule migruje a před zimou odlétá do teplých krajin, ale mnohé druhy se zde vyskytují i celoročně. Některé studie používající metodu dvojité označené vody se zaměřují právě na změny energetického výdeje způsobené změnou ročního období a na odchylky mezi jedinci během zimy. Existuje několik studií, které porovnávají energetický výdej v zimě a v létě. Ve studii na timáliích šedých (*Turdoides squamiceps*) nebyl nalezen rozdíl v denním energetickém výdeji mezi zimou a létem. V létě se hodnoty pohybovaly kolem 1,68 kJ/d·kg a v zimě byla průměrná hodnota 1,61 kJ/d·kg (Anava et al. 2000). DEE samců čápa bílého (*Ciconia ciconia*) se výrazně lišil mezi létem a zimou, ale u samic nebyl nalezen rozdíl (Mata et al. 2010). Studie na moudivláčkovi žlutohlavém (*Ariparus flaviceps*) ukázala, že energetický výdej je nižší v létě ($22,8 \pm 0,45$ kJ/d) než v zimě ($33,6 \pm 0,9$ kJ/d). Přičemž největší podíl na rozdílném DEE v zimě a v létě má zřejmě termoregulace (Webster & Weathers, 2000). Polák chocholačka (*Aythya fuligula*) má například velmi vysoký denní energetický výdej během zimy a to v průměru 1080 kJ/d. Jeho DEE v zimě je přibližně o 70 % vyšší než v létě (de Leeuw et al. 1999). Ve studii na sýkoře karolínské (*Poecile carolinensis*) se porovnával denní energetický výdej během hnízdění a v zimě. I zde byl DEE v hnízdící sezóně nižší než mimo hnízdění (40,22 kJ/d, respektive 57,11 kJ/d). Jelikož jedinci byli těžší v zimě, byl denní energetický výdej přepočítán na hmotnostně specifický DEE, ale výsledek zůstal stejný (Doherty et al. 2001). Ve studii Godfrey & Bryant (2000) zahřívali a ochlazovali červenky obecné (*Erithacus rubecula*) během zimní noci. Průměrný denní energetický výdej v noci byl $24,88 \pm 0,65$ kJ pro skupinu, která byla ochlazována, a $15,78 \pm 1,03$ kJ pro zahřívání ptáky. Ochlazovaná skupina ptáku však měla vyšší DEE i během dne (přibližně o 5 kJ) (Godfrey & Bryant, 2000).

Ve studii Keller & Visser (1999) se zkoumal rozdíl v DEE během zimy u kormoránů velkých (*Phalacrocorax carbo sinensis*) žijících volně a ve voliře. Přestože mezi dvěma skupinami nebyl váhový rozdíl, denní energetický výdej volně žijících kormoránů byl 2094 ± 174 kJ/d a u zajatých kormoránů pouze 1325 ± 130 kJ/d (Keller & Visser, 1999). Ve

studii Klaassen (1994) byl porovnáván energetický výdej u ptáků žijících v mírném podnebném pásu a v polárních oblastí. Za druhy z mírného pásu vybral rybáka obecného (*Sterna hirundo*) a severního (*Sterna sandvicensis*). Mezi polární druhy zařadil rybáka jižního (*Sterna vittata*). Dále měřil energetický výdej u rybáka dlouhoocasého (*Sterna paradisaea*) ve dvou koloniích v mírné a polární oblasti. Nenašel však výrazné rozdíly v DEE (Klaassen 1994). Moreno et al. (1988) porovnávali DEE během zimního období u sýkory lužní (*Parus montaneus*), uhelníčka (*Parus ater*) a parukářky (*Parus cristatus*). DEE se mezi druhy nelišil, ale jejich hmotnostně specifický energetický výdej byl rozdílný. U sýkory uhelníčka bylo zaznamenáno také zvýšení denního energetického výdeje se zvyšující se okolní teplotou (Moreno et al. 1988). Ani ve studii porovnávající energetický výdej sýkory lužní (*Parus montaneus*) a laponské (*Parus cinctus*) nebyl nalezen rozdíl v DEE (Carlson et al. 1993).

6. Závěr

Metoda dvojité značené vody se používá již od 50. let minulého století. Dochází k neustálému vývoji a vylepšování jejího použití. Existuje několik rovnic, které lze použít k výpočtu energetického výdeje, a ne vždy jsou všechny vhodné, proto je výběr rovnice pro výpočet velmi důležitý. Dle validačních studií je metoda použitelná pro odhad energetického výdeje u velkého množství zvířat i u člověka a podává nám hodnotu, která je blízká skutečnosti. Přesto má i své limity, například při použití pro získání energetického výdeje vodních zvířat (např. Jones et al. 2009). Použití metody v přirozeném prostředí není nijak obtížné, a proto se běžně používá pro celou řadu experimentů a měření. Její použití ve studiích ptačí energetiky se může vztahovat k velkému množství aktivit či okolností. Časté je například měření energetických nároků na reprodukci či létání. Během reprodukce je většinou energetický výdej vyšší než u ptáků, kteří nehnízdí. Nároky na letové aktivity se liší dle ptačího druhu, jeho způsobu letu, ale i dle vnějších faktorů jako je například rychlost větru. Záleží také na délce letu, a proto je energetický výdej vyšší při migraci než při krátkém letu. Pomocí metody však můžeme měřit a zkoumat i jiné vlivy na DEE (ornamentace, parazitace, věk zvířete, chladné prostředí atd.). Při srovnávání s ostatními metodami bylo zjištěno, že některé metody podávají výsledky více blízké skutečné hodnotě než jiné. Dle toho lze usuzovat, kdy je použití metody či daného postupu vhodné a kdy je třeba energetický výdej získat s pomocí jiné techniky. Nevýhodou metody zůstává analýza koncentrace izotopů v krvi. V současné době je tyto koncentrace izotopů schopno stanovit pouze několik laboratoří na

světě, např. Centre for Isotope Research, University of Gröningen, Nizozemí; Scottish Universities Research and Reactor Centre a laboratoř University of California, Los Angeles

7. Literatura

- Adams, N. J., Brown, C. R., & Nagy, K. A. (1986). Energy expenditure of free-ranging wandering albatrosses *Diomedea exulans*. *Physiological Zoology*, 59:6, 583–591
- Albon, S. D., Stien, A., Irvine, R. J., Langvatn, R., Ropstad, E., & Halvorsen, O. (2002). The role of parasites in the dynamics of a reindeer population. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 269, 1625–1632
- Anava, A., Kam, M., Shkolnik, A., & Degen, A. A. (2000). Seasonal field metabolic rate and dietary intake in Arabian Babblers (*Turdoides squaniceps*) inhabiting extreme desert. *Functional Ecology*, 14:5, 607–613
- Anava, A., Kam, M., Shkolnik, A., & Degen, A. A. (2002). Seasonal daily, daytime and night-time field metabolic rate in Arabian babblers (*Turdoides squaniceps*). *The Journal of Experimental Biology*, 205:22, 3571–3575
- Andersson, S. (1992). Female preference for long tails in lekking jakson widowbirds: experimental evidence. *Animal Behaviour*, 43:3, 379–388
- Ballance, L. T. (1995). Flight energetics of free-ranging red-footed boobies (*Sula sula*). *Physiological Zoology*, 68:5, 887–914
- Bauch, C., Wellbrock, A. H. J., Nagel, R., Rozman, J., & Witte, K. (2013). “Bug-eggs” for Common Swifts and other small birds: Minimally-invasive and stress-free blood sampling during incubation. *Journal of Ornithology*, 154, 581–585. doi:10.1007/s10336-013-0931-x
- Bevan, R. M., Speakman, J. R., & Butler, P. J. (1995a). Daily energy expenditure of tufted ducks: a comparison between indirect calorimetry, doubly labelled water and heart rate. *Functional Ecology*, 9, 40–47
- Bevan, R. M., Woakes, A. J., Butler, P. J., & Boyd, I. L. (1994). The use of heart rate to estimate oxygen consumption of free-ranging black-browed albatrosses *Diomedea melanophrys*. *Journal of Experimental Biology*, 193, 119–137
- Bevan, R. M., Woakes, A. J., Butler, P. J., & Croxall, J. P. (1995b). Heart rate and oxygen consumption of exercising gentoo penguins. *Physiological Zoology*, 68:5, 855–877
- Bryant, D. M., & Westerterp, K. R. (1983). Time and energy limits to brood size in house martins (*Delichon urbica*). *Journal of Animal Ecology*, 52:3, 905–925
- Bryant, D. M. & Tatner, P. (1991). Intraspecies variation in avian energy expenditure: correlates and constraints. *Ibis*, 133:3, 236–245

- Butler, P. J., Green, J. A., Boyd, I. L. & Speakman, J. R. (2004). Measuring metabolic rate in the field: the pros and cons of the doubly labeled water and heart rate methods. *Functional Ecology*, 18, 168–183
- Carlson, A., & Moreno, J. (1992). Cost of short flights in the willow tit measured with doubly labeled water. *The Auk*, 109:2, 389–393
- Carlson, A., Moreno, J., & Alatalo, R. V. (1993). Winter metabolism of coniferous forest tits (Paridae) under arctic conditions: a study with doubly labeled water. *Ornis Scandinavica*, 24:2, 161–164
- Coup, R., N., & Pekins, P. J. (1999). Field metabolic rate of wild turkey in winter. *Canadian Journal of Zoology*, 77:7, 1075–1082
- Cresswell, W., Holt, S., Reid, J. M., Whitfield, D. P., Mellanby, R. J., Norton, D., & Waldron, S. (2004). The energetic costs of egg heating constrain incubation attendance but do not determine daily energy expenditure in the pectoral sandpiper. *Behavioral Ecology*, 15:3, 498–507. doi:10.1093/beheco/arh042
- Cuevo, J. J., de Lope, F., Møller, A. P., & Moreno, J. (1996). Energetic cost of tail streamers in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *Oecologia*, 208:2, 252–258
- Daan, S., Deerenberg, C., & Dijkstra, C. (1996). Increased daily work precipitates natural death in the kestrel. *Journal of Animal Ecology*, 65:5, 539–544
- Doherty, P. F. Jr., Williams, J. B., & Grubb, T. C. Jr. (2001). Field metabolism and water flux of Carolina Chickadees during breeding and nonbreeding seasons: a test of the „peak-demand“ and „reallocation“ hypothesis. *The Condor*, 103, 370–375
- Drent, R. H., & Daan, S. (1980). The prudent parent: energetic adjustments in avian breeding. *Ardea*, 68, 225–252
- Droge, D. L., Gowaty, P. A., & Weathers, W. W. (1991). Sex-biased provisioning: a test for differences in field metabolic rates of nestling eastern bluebirds. *The Condor*, 93, 793–798
- Dykstra C. R., Meyer M. W. & Karasov W. H. (1997). Validation of doubly labeled water method in bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) and a comparison for the calculation of energy expenditure. *Physiological Zoology*, 70, 19–26
- Engel, S., Biebach, H., & Visser, G. H. (2006). Metabolic costs of avian flight in relation to flight velocity: A study in Rose Coloured Starlings (*Sturnus roseus*, Linnaeus). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 176, 415–427. doi:10.1007/s00360-006-0063-1
- Engstrand, S. M., Ward, S., & Bryant, D. M. (2002). Variable energetic responses to clutch size manipulations in white-throated dippers *Cinclus cinclus*. *Journal of Avian Biology*, 33, 371–379

- Flint, E. N., & Nagy, K. A. (1984). Flight energetics of free-living Sooty Terns. *The Auk*, 101:2, 288–294
- Furness, R. W., & Bryant, D. M. (1996). Effect of wind on field metabolic rates of breeding Northern Fulmars. *Ecology*, 77:4, 1181–1188
- Fyhn, M., Gabrielsen, G. W., Nordoy, E. S., Moe, B., Langseth, I., & Bech, C. (2001). Individual variation in field metabolic rate of kittiwakes (*Rissa tridactyla*) during the chick-rearing period. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74:3, 343–355
- Galbraith, H., Hatch, J. J., Nisbet, I. C. T., & Kunz, T. H. (1999). Age-related changes in efficiency among breeding Common Terns *Sterna hirundo*: measurement of energy expenditure using doubly labelled water. *Journal of Avian Biology*, 30, 85–96
- Garamszegi, L. Z., Moreno, J., & Møller, A. P. (2006). Avian song complexity is associated with high field metabolic rate. *Evolutionary Ecology Research*, 8, 75–90
- Gessaman, J. A., & Nagy, K. A. (1988). Transmitter loads affect the flight speed and metabolism of homing pigeons. *The Condor*, 90, 662–668. doi:10.2307/1368356
- Gesseman, J. A., Workman, G. W., & Fuller, M. R. (1991). Flight performance, energetics and water turnover of tinker pigeons with a harness and dorsal load. *The Condor*, 93, 546–554
- Godfrey, J. D., & Bryant, D. M. (2000). State-dependent behaviour and energy expenditure: an experimental study of European robins on winter territories. *Ecology*, 69, 301–313
- Goldstein, D. L., & Nagy, K. A. (1985). Resource utilization by desert Quail – time and energy, food and water. *Ecology*, 66:2, 378–387
- Gulland, F. M. D. (1995). The impact of infectious diseases on wild animal populations: a review. In *Ecology of infectious diseases in natural population*, 20–51. Cambridge University Press, Cambridge
- Hasselquist, D., & Bensch, S. (2008). Daily energy expenditure of singing great reed warblers *Acrocephalus arundinaceus*. *Journal of Avian Biology*, 39, 384–388
- Hawkins, P. A. J., Butler, P. J., Woakes, A. J., & Speakman, J. R. (2000). Estimation of the rate oxygen consumption of the common eider duck (*Somateria mollissima*), with some measurement of the heart rate during voluntary dives. *Journal of Experimental Biology*, 203:18, 2819–2832
- Hinsley, S. A., Hill, R. A., Bellamy, P. E., Harrison, N. M., Speakman, J. R., Wilson, A. K., & Ferns, P. N. (2008). Effects of structural and functional habitat gaps on breeding woodland birds: working harder for less. *Landscape Ecology*, 23, 615–626
- Hodum, P. J., & Weathers, W. W. (2003). Energetics of nestlings growth and parental effort in Antarctic fulmarine petrels. *The Journal of Experimental Biology*, 206, 2125–2133

- Horvitz, M. A., & Schoeller, D. A. (2001). Natural abundance deuterium and 18-oxygen effects on the precision of the doubly labeled water method. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 280, E965–E972.
- Chappell, M. A., Shoemaker, V. H., Janes, D. N., Maloney, S. K., & Bucher, T. L. (1993). Energetics of foraging in breeding Adélie penguins. *Ecology*, 74, 2450–2461. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/1939596>
- Jones, T. T., Hastings, M. D., Bostrom, B. L., Andrews, R. D., & Jones, D. R. (2009). Validation of the use of doubly labeled water for estimating metabolic rate in the green turtle (*Chelonia mydas L.*): a word of caution. *The Journal of Experimental Biology*, 212, 2635–2644
- Keller, T. M., & Visser, G. H. (1999). Daily energy expenditure of Great Cormorants *Phalacrocorax carbo sinensis* wintering at Lake Chiemsee, southern Germany. *Ardea*, 87, 61–69
- Kendeigh, S. C., Dolnik, V. R., & Gavrilov, V. M. (1977). Avian energetics. In *Granivorous Birds in Ecosystems*, 127–204, ed. Pinowski, J., & Kendeigh, S. C. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Kersten, M. (1996). Time and energy budgets of Oystercatchers *Haematopus ostralegus* occupying territories of different quality. *Ardea*, 84A, 291–310
- Klaassen, M. (1994). Growth and energetics of tern chicks from temperate and polar environments. *The Auk*, 111:3, 525–544
- Krijgsveld, K. L., Ricklefs, R. E., & Visser, G. H. (2012). Daily energy expenditure in precocial shorebird chicks: smaller species perform at higher levels. *Journal of Ornithology*, 153, 1203–1214
- Kooyman, G. L., Davis, R. W., Croxall, J. P., & Costa, D. P. (1982). Diving depths and energy requirements of King Penguins. *Science*, 217:4561, 276–277
- Lane, G. A., & Dole, M. (1956). Fractionation of oxygen isotopes during respiration. *Science*, 123, 574–576
- de Leeuw, J. J., van Eerden, M. R., & Visser, G. H. (1999). Wintering Tufted Ducks *Aythya fuligula* diving for zebra mussels *Dreissena polymorpha* balance feeding costs within narrow margins of their energy budget. *Journal of Avian Biology*, 30, 182–192
- Lifson, N., & Gordon, G. B. (1949). The fate of utilized molecular oxygen and the source of the oxygen of. *The Journal of Biological Chemistry*, 180, 803–811.
- Lifson, N., Gordon, G. B. & McClintock, R. (1955). Measurement of total carbon dioxide production by means of D₂O¹⁸. *Journal of Applied Physiology*, 7:6, 704–710
- Lifson N., Little W. S., Levitt D. G., & Henderson R. M. (1975). D218O method for CO₂ output in small mammals and economic feasibility in man. *Journal of Applied Physiology*, 39:4, 657–664

- Lifson, N., & McClintock, R. (1966). Theory of use of the turnover rates of body water for measuring energy and material balance. *Journal of Theoretical Biology*, 12, 46–74
- Lochmiller, R. L., & Deerenberg, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, 88, 87–98
- Maren, T. H. (1967). Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiological reviews*, 47:4, 595–&
- Mata, A., Massemin-Chalett, S., Caloin, M., Michard-Picamelot, D., & Le Maho, Y. (2010). Seasonal variation in energy expenditure and body composition in captive White Storks (*Ciconia ciconia*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 150, 19–24
- Mock, P. J., Khubesian, M., & Larcheveque, D. M. (1991). Energetics of growth and maturation in sympatric passerines that fledge at different ages. *The Auk*, 108, 34–41
- Møller, A. P., de Lope, F., Moreno, J., González, G., & Pérez, J. J. (1994). Ectoparasites and host energetics: house martin bugs and house martin nestlings. *Oecologia*, 98:3/4, 263–268
- Montevecchi, W. A., Birt-Friesen, V. L., & Cairns, D. K. (1992). Reproductive energetics and prey harvest of Leach's storm-petrels in the Northwest Atlantic. *Ecology*, 73, 823–832. doi:10.2307/1940160
- Montgomery, M. K., Hulbert, A. J., & Buttemer, W. A. (2011). The long life of birds: The rat-pigeon comparison revisited. *PLoS One*, 6:8, e24138
- Moreno, J. (1989). Variation in daily energy expenditure in nestling Northern Weatears (*Oenathe oenathe*). *The Auk*, 106:1, 18–25
- Moreno, J., Cowie, R. J., Sanz, J., & Williams, R. S. R. (1995). Differential response by males and females to brood manipulation in the pied flycatcher: energy expenditure and nestling diet. *Journal of Animal Ecology*, 64:6, 721–732
- Moreno, J., Merino, S., Potti, J., de León, A., & Rodríguez, R. (1999). Maternal energy expenditure does not change with flight costs or food availability in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*): costs and benefits for nestlings. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 46, 244–251
- Moreno, J., Potti, J., & Merino, S. (1997). Parental energy expenditure and offspring size in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Oikos*, 79:3, 559–567
- Murray, D. L., Cary, J. R., & Keith, L. B. (1997). Interactive effects of sublethal nematodes and nutrition status on snowshoe hare vulnerability to predation. *Journal of Animal Ecology*, 66:2, 250–264
- Nagy, K. A. (1980). CO₂ production in animals - analysis of potential errors in the doubly labeled water method. *American Journal of Physiology*, 238:5, 466–473

- Nagy, K. A., & Costa, D. P. (1980). Water flux in animals: analysis of potential errors in the tritiated water method. *American Journal of Physiology*, 5, 454–465
- Nagy, K. A., Girard, I. A., & Brown, T. K. (1999). Energetics of free-ranging mammals, reptiles and birds. *Annual Review of Nutrition*, 19, 247–277
- Nagy, K. A., Siegfried, W. R., & Wilson R. P. (1984). Energy utilization by free-ranging jackass penguins, *Sphenicus demersus*. *Ecology*, 65:5, 1648–1655
- Nudds, R. L., & Bryant, D. M. (2000). The energetic cost of short flights in birds. *Journal of Experimental Biology*, 203:10, 1561–1572
- Nudds, R. L., & Bryant, D. M. (2002). Consequences of load carrying by birds during short flights are found to be behavioral and not energetic. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283, 249–256. doi:10.1152/ajpregu.00409.2001
- Nudds, R. L., & Bryant, D. M. (2003). Zebra finches, *Taeniopygia guttata*, with elongated tails delay taking flight group take-offs. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 55, 122–128
- Nudds, L. Z., & Spencer, K. A. (2004). Daily energy expenditure of male barn swallows correlates with tail-streamer length: handicap-mediated foraging strategies. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 271:4, 160–163
- McClintock, R., & Lifson, N. (1957). CO₂ output and energy balance of hereditary obese mice. *American Journal of Physiology*, 189, 463–469
- Nolet, B. A., Butler, P. J. Masman D., & Woakes A. J. (1992). Estimation of daily energy-expenditure from heart-rate and doubly labeled water in exercising geese. *Physiological Zoology*, 65, 1188–1216
- Obst, B. S., Nagy, K. A., & Ricklefs, R. E. (1987). Energy utilization by Wilson's storm-petrel (*Oceanites oceanicus*). *Physiological Zoology*, 60:2, 200–210
- Pärt, T., Gustafsson, L., & Moreno, J. (1992). „Terminal investment“ and a sexual conflict in the collared flycatcher (*Ficedula albicollis*). *The American Naturalist*, 140:5, 868–882
- Pennycuik, C. J., Schaffner, F. C., Fuller, M. R., Obrecht, H. H., III, & Sternberg, L. (1990). Foraging flights of the white-tailed tropicbird (*Phaethon lepturus*): radiotracking and doubly labelled water. *Colonial Waterbirds*, 13:2, 96–102
- Pettit, T. N., Nagy, K. A., Ellis, H. I., & Whittow, G. C. (1988). Incubation energetics of the Laysan Albatross. *Oecologia*, 74:4, 546–550
- Piersma, T., Lindström, Å., Drent, R. H., Tulp, I., Jukema, J., Morrison, R. I. G., Reneerkens, J., Schekkerman, H., & Visser, G. H. (2003). High daily energy expenditure of incubating shorebirds on High Arctic tundra: A circumpolar study. *Functional Ecology*, 17, 356–362. doi:10.1046/j.1365-2435.2003.00741.x

- Richter, W. (1983). Balanced sex ratio in dimorphic altricial bird: the contribution of sex-specific growth dynamics. *The American Naturalist*, 121:2, 158–171
- Ricklefs, R. E., Roby, D. D., & Williams, J. B. (1986). Daily energy expenditure by Leach's storm petrels during the nestling cycle. *Physiological Zoology*, 59, 649–660
- Ricklefs, R. E., & Williams, J. B. (1984). Daily energy expenditure and water turnover rate of adult European Starlings (*Sturnus vulgaris*) during the nestling cycle. *The Auk*, 101:4, 707–716
- Riedstra, B., Dijkstra, C., & Daan, S. (1998). Daily energy expenditure of male and female Marsh Harrier nestlings. *The Auk*, 115:3, 635–641
- Ritz, P., Johnson, P. G., & Coward, W. A. (1994). Measurements of ^2H and ^{18}O in body water: analytical considerations and physiological implications. *The British Journal of Nutrition*, 72, 3–12. doi:10.1079/BJN19940004
- Sanz, J., & Tinbergen, J. (1999). Energy expenditure, nestling age, and brood size: an experimental study of parental behavior in the great tit *Parus major*. *Behavioral Ecology*, 10:5, 598–606. doi:10.1093/beheco/10.5.598
- Saetre, G.-P., Slagsvold, T., Kruszewicz, A., & Viljugrein, H. (1997). Parental care in pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*: energy expenditure in relation to plumage colour and mating status. *Ardea*, 85:2, 233–242
- Shaffer, S. A. (2011). A review of seabird energetics using the doubly labeled water method. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 158:3, 315–322. doi:10.1016/j.cbpa.2010.07.012
- Shaffer, S. A., Costa, D. P., & Weimerskirch, H. (2001a). Behavioural factors affecting foraging effort of breeding wandering albatrosses. *Journal of Animal Ecology*, 70, 864–874. doi:10.1046/j.0021-8790.2001.00548.x
- Shaffer, S. A., Costa, D. P., & Weimerskirch, H. (2001b). Comparison of methods for evaluating energy expenditure of incubating wandering albatrosses. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74:6, 823–831
- Shaffer, S. A., Costa, D. P., & Weimerskirch, H. (2003). Foraging effort in relation to the constraints of reproduction in free-ranging albatrosses. *Functional Ecology*, 17, 66–74. doi:10.1046/j.1365-2435.2003.00705.x
- Shaffer, S. A., Costa, D. P., & Weimerskirch, H. (2004). Field metabolic rates of black-browed albatrosses *Thalassarche melanophrys* during the incubation stage. *Journal of Avian Biology*, 35, 551–558. doi:10.1111/j.0908-8857.2004.03264.x
- Schekkerman, H., Tulp, I., Piersma, T., & Visser, G. H. (2003). Mechanisms promoting higher growth rate in arctic than in temperate shorebirds. *Oecologia*, 134, 332–342
- Schekkerman, H., & Visser, G. H. (2001). Prefledging energy requirements in shorebirds: energetic implication of self-feeding precocial development. *The Auk*, 118:4, 944–957

- Schifferli, L., Gruebler, M. U., Meijer, H. a J., Visser, G. H., & Naef-Daenzer, B. (2014). Barn Swallow *Hirundo rustica* parents work harder when foraging conditions are good. *Ibis*, 156, 777–787. doi:10.1111/ibi.12186
- Schmidt-Wellenburg, C. A., Biebach, H., Daan, S., & Visser, G. H. (2007). Energy expenditure and wing beat frequency in relation to body mass in free flying Barn Swallows (*Hirundo rustica*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 177, 327–337. doi:10.1007/s00360-006-0132-5
- Schmidt-Wellenburg, C. A., Engel, S., & Visser, G. H. (2008). Energy expenditure during flight in relation to body mass: Effects of natural increases in mass and artificial load in Rose Coloured Starlings. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 178, 767–777. doi:10.1007/s00360-008-0267-7
- Schoeller, D. A. (1988). Measurement of energy expenditure in free-living humans by using doubly labeled water. *The Journal of Nutrition*, 118, 1278–1289
- Schoeller, D. A., Leitch, C. A., & Brown, C. (1986a). Doubly labeled water method: in vivo oxygen and hydrogen isotope fractionation. *American Journal of Physiology*, 251:6, 1137–1143
- Schoeller, D. A., Ravussin, E., Schutz, Y., Acheson, K. J., Baertschi, P., & Jéquier, E. (1986b). Energy expenditure by doubly labeled water: validation in humans and proposed calculation. *American Journal of Physiology*, 250:5, 823–830
- *Schoeller, D. A., & van Santen, E. (1982). Measurement of energy expenditure in humans by doubly labelled water. *Journal of Applied Physiology*, 53:4, 955–959
- Siegel, R. B., Weathers, W. W., & Beissinger, S. R. (1999). Hatching asynchrony reduces the duration, not the magnitude, of peak load in breeding green-rumped parrotlets (*Forpus passerinus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 45, 444–450. doi:10.1007/s002650050583
- Sparling, C. E., Thompson, D., Fedak, M. A., Gallon, S. L., & Speakman, J. R. (2001). Estimating field metabolic rates of pinnipeds: doubly labelled water gets the seal of approval. *Functional Ecology*, 22, 245–254
- Speakman, J. R. (1993). How should we calculate CO₂ production in doubly labelled water studies of animals? *Functional Ecology*, 7:6, 746–750
- *Speakman, J. R. (1997). *Doubly labeled water: Theory and Practice*. Chapman and Hall, London
- Speakman, J. R. (1998). The history and theory of the doubly labeled water technique. *The American Journal of Clinical nutrition*, 68:4, 932–938
- Sullivan, K. A., & Weathers, W. W. (1992). Brood size and thermal environment influence field metabolism of nestling yellow-eyed juncos. *The Auk*, 109:1, 112–118

- Tatner, P., & Bryant, D. M. (1986). Flight cost of a small passerine measured using doubly labeled water: implications for energetics studies. *The Auk*, 103, 169–180
- Teather, K. L., & Weatherhead, P. J. (1988). Sex-specific energy requirement of great-tailed grackle (*Quiscalus mexicanus*) nestlings. *Journal of Animal Ecology*, 57:2, 659–668
- Thorsen, T., Shriver, T., Racine, N., Richman, B. A., & Schoeller, D. A. (2011). Doubly labeled water analysis using cavity ring-down spectroscopy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25:1, 3–8
- Tjørve, K. M. C., Underhill, L. G., & Visser, G. H. (2007). Energetics of growth in semi-precocial shorebird chicks in a warm environment: the African black oystercatcher, *Haematopus moquini*. *Zoology*, 110, 176–188
- Tulp, I., Schekkerman, H., Bruinzeel L. W., Jukena, J., Visser, G. H., & Piersma, T. (2009). Energetic demands during incubation and chick rearing in a uniparental and a biparental shorebird breeding in the high Arctic. *The Auk*, 126:1, 155–164
- Vedder, O., Dekker, A. L., Visser, G. H., & Dijkstra, C. (2005). Sex-specific energy requirements in nestlings of an extremely sexually size dimorphic bird, the European sparrowhawk (*Accipiter nisus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58, 429–436
- Visser, G. H., Boon, P. E., & Meijer, H. A. (2000). Validation of the doubly labeled water method in Japanese Quail *Coturnix c. japonica* chicks: is there an effect of growth rate? *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 170, 365–372.
- Walsberg, G. E. (1983). Avian ecological energetics. In *Avian biology*, 7, 161–220, ed. Farner, D. S., King, J. R., & Parkers, K. C. Academic Press, New York
- Ward, S., Möller, U., Rayner, J. M. V., Jackson, D. M., Nachtigall, W., & Speakman, J. R. (2004). Metabolic power of European starlings *Sturnus vulgaris* during flight in a wind tunnel, estimated from heat transfer modelling, doubly labelled water and mask respirometry. *The Journal of Experimental Biology*, 207, 4291–4298
- Weathers, W. W., Buttemer, W. A., Hayworth, A. M., & Nagy, K. A. (1984). An evaluation of time-budget estimates of daily energy expenditure in birds. *The Auk*, 101:3, 459–472
- Weathers, W. W., Davison, Ch. L., & Morton, M. L. (2003). Energetics of altricial nestlings in cold climates: insight from the Mountain White-crowned Sparrow. *The Condor*, 105:4, 707–718
- Weathers, W. W., Davison, Ch. L., Olson, Ch. R., Morton, M. L., Nur, N., & Famula, T. R. (2002). Altitudinal variation in parental energy expenditure by white-crowned sparrows. *The Journal of Experimental Biology*, 205, 2915–2924
- Weathers, W. W., & Nagy, K. A. (1980). Simultaneous doubly labeled water ($^3\text{H}^18\text{O}$) and time budget estimates of daily energy expenditure in *Phainopepla nitens*. *The Auk*, 97:4, 861–867

- Webster, M. D., & Weathers, W. W. (1980). Validation of single-sample doubly labeled water method. *American Journal of Physiology*, 256, 572–576
- Webster, M. D., & Weathers, W. W. (2000). Seasonal changes in energy and water use by verdins, *Auriparus flaviceps*. *The Journal of Experimental Biology*, 203, 3333–3344
- *Weimerskirch, J., Shaffer, S. A., Mabile, G., Martin, J., Boutard, O., & Rouanet, J. L.
Nepublikovaná data
- Westerterp, K. R., & Bryant, D. M. (1984). Energetics of free existence in swallows and martins (*Hirundinidae*) during breeding: a comparative study using doubly labeled water. *Oecologia*, 62:3, 376–381
- Wikelski, M., Tarlow, E. M., Raim, A., Diehl, R. H., Larkin, R. P., & Visser, G. H. (2003). Costs of migration in free-living songbirds. *Nature*, 423:6941, 704
- Williams, J. B. (1987). Field metabolism and food consumption of savannah sparrows during the breeding-season. *The Auk*, 104:2, 277–289
- Williams, J. B. (1988). Field metabolism of tree swallows during the breeding season. *The Auk*, 150:4, 706–714
- Williams, J. B. (2001). Energy expenditure and water flux of free-living Dune Larks in the Namib: A test of the reallocation hypothesis on a desert bird. *Functional Ecology*, 15, 175–185. doi:10.1046/j.1365-2435.2001.00512.x
- Williams, J. B., & Nagy, K. A. (1984). Daily energy expenditure of savannahs sparrows: comparison of time-energy budget and doubly-labeled water estimates. *The Auk*, 101:2, 221–229
- Williams, J. B., Siegfried W. R., Milton, S. J., Adams N. J., Nagy K. A., Dean W. R. J., du Plessis, M. A., & Jackson S. (1993). Field metabolic rate, water requirements, and foraging behavior of wild ostriches in the Namib. *Ecology*, 74:2, 390–404
- Woakes, A. J., Butler, P. J., & Bevan, R. M. (1995). Implantable data logging system for heart rate and body temperature: its application to the estimation of field metabolic rates in Antarctic predators. *Medical and biological engineering and computing*, 33:2, 145–151
- Wolf, T. J., Ellington, Ch. P., Davis, S., & Feltham, M. J. (1996). Validation of doubly labelled water technique for bumblebees *Bombus terrestris*. *The Journal of Experimental Biology*, 199:4, 959–972
- Wood, R. A., Nagy, K. A., MacDonald, N. S., Wakakuwa, S. T., Beckman, R. J., & Kaaz, H. (1975). Determination of oxygen-18 in water contained in biological samples by charged particle activation. *Analytical Chemistry*, 47:4, 646–650
- Zahavi, A. (1975). Mate selection - a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, 53, 205–214