

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



Bc. Veronika Sýkorová

Vliv kvality potravy na růst a přežívání perloočky *Daphnia longispina* (Crustacea: Cladocera)

Food quality impact on growth and survival of *Daphnia longispina* (Crustacea: Cladocera)

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Veronika Sacherová, Ph.D.

Praha, 2013

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 15. srpna 2013

.....

Ráda bych poděkovala své školitelce, RNDr. Veronice Sacherové, Ph.D., a to především za čas, který mi věnovala při sepisování této práce, a za podporu, kterou mi poskytla při jejím dokončování.

Dále můj dík patří mé matce, za podporu při studiu.

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřená na ekologické procesy mezi planktonními organismy. Především si pokládám otázku, jak velký vliv má kvalita potravy na růst a přežívání sladkovodního zooplanktonu. Zaměřuji se na to, jaký vliv na růst konzumenta má různý poměr uhlíku, dusíku a fosforu v potravní nabídce. Také mě zajímá, jaké má nároky na potravu mnou vybraný konzument *Daphnia longispina*. Toto rozsáhlé téma specifikuji na otázku, zda má různá kvalita a kvantita potravy vliv na parametry životní historie u druhu *Daphnia longispina*, a zda absenci běžného druhu perloočky *Daphnia longispina* v Plešném jezeře ovlivňuje nevhodná kvalita potravy.

V laboratorních podmínkách jsem chovala *Daphnia longispina* po dobu 2 let. Krmila jsem je řasou izolovanou z Plešného jezera *Monoraphidium dybowskii* pěstovanou v médiích o dvou různých stechiometrických poměrech. První medium bylo obohacené o fosfor (C:P 290) a druhé mělo přibližně stejný poměr mezi uhlíkem a fosforem jako řasy v Plešném jezeře (C:P 1174), tedy o fosfor ochuzené. Dále jsem použila ještě 4 různé kvantitativy potravy (měřeno obsahem organického uhlíku, 1, 2 a 4 mg C/l).

Perloočky krmeny potravou z media, které mělo C:N:P poměr přibližně stejný, jako má Plešné jezero, žily výrazně kratší dobu a po dobu pokusu se nerozmnožovaly ani ve variantě s největším množstvím potravy (4 mg C/l). To je možný důvod, proč se *Daphnia longispina* nevrátila do Plešného jezera po období silné acidifikace s vrcholem v 80. letech 20. století. Z výsledků mohu usoudit, že potrava (*Monoraphidium*) je pro perloočku nevhodná svým C:N:P poměrem, i když jí je v jezeře nadbytek.

Klíčová slova: Stechiometrie, C:N:P, *Daphnia longispina*, Plešné jezero, zooplankton

ABSTRACT

This thesis focuses on ecological processes among plankton organisms. It especially questions the influence of food quality on growth and survival of freshwater plankton. I focused on the influence of various ratios of nitrogen and phosphorus in available food. I am also interested in finding out the food requirements of chosen consumer *Daphnia longispina*. Within this broad topic, I specify a question, whether various quality and quantity of food influences the life history parameters of the species *Daphnia longispina* and whether the absence of common species of Cladoceran *Daphnia longispina* in Plešné Lake is caused by unsuitable quality of food.

I have bred *Daphnia longispina* in laboratory conditions for two years. I fed it by algae *Monoraphidium dybowskii* isolated from Plešné Lake and grown in two media P-limited (C:P 1174), P-unlimited (C:P 290) and three concentration (1,2, 4 mg C/L).

Cladocerans fed by food from medium that had a C:N:P ratio approximately the same as can be found in Plešné Lake (C:P 1174) lived for a significantly shorter period of time and during the experiment they did not reproduce even in the case with the largest amount of food (4 mg C/L). This is a possible reason why *Daphnia longispina* did not return to Plešné Lake after the period of strong acidification, climax of which was in the 1980s. From the results I can suggest that the food (*Monoraphidium*) is unsuitable for this Cladoceran by its C:N:P ratio, even though there is excessive amount of food in the lake.

Keywords: Stoichiometry, C:N:P, *Daphnia longispina*, Plešné Lake, zooplankton

OBSAH

1. ÚVOD	9
1.1. ZOOPLANKTON	10
1.2. FILTRUJÍCÍ ZOOPLANKTON	10
1.3. POTRAVNÍ SPEKTRUM	11
1.4. KVALITA POTRAVY	12
1.5. STECHIOMETRIE	14
1.6. NEKVALITNÍ POTRAVA	19
1.7. ZMĚNA PODMÍNEK A REAKCE ZOOPLANKTONU	20
1.8. CHARAKTERISTIKA ŠUMAVSKÝCH JEZER	22
1.8.1. PLEŠNÉ JEZERO	22
2. CÍLE PRÁCE	25
3. METODIKA	26
3.1. KULTURA ŘAS A PERLOOČEK	26
3.2. FEEDING EXPERIMENT	27
3.3. VÝPOČTY A ANALÝZY	29
4. VÝSLEDKY	30
5. DISKUZE	37
6. ZÁVĚR	44
SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	45
PŘÍLOHY	50

ÚVOD

Tato práce vznikla jako součást projektu „Limitující faktory a omezení biologického zotavování z acidifikace: jaká je budoucnost horských ekosystémů Šumavy?“ (GAČR 206/07/1200). V rámci tohoto projektu bylo mimo jiné hodnoceno, jak probíhá zotavování jezerních ekosystémů ze silného okyselení s vrcholem v 80. letech 20. století. Zatímco změny chemického složení lze dobře kvantifikovat, u biologických parametrů zůstává mnoho neznámých faktorů. Tato práce se zaměřila na možnosti návratu herbivorních zástupců zooplanktonu (konkrétně rodu *Daphnia*) do jezer, z nichž během acidifikace zcela vymizeli.

Modelovým ekosystémem bylo zvoleno Plešné jezero, kde přes zvýšení pH a rostoucí koncentrace chlorofylu *a* (coby parametru množství dostupné potravy) nedošlo k návratu filtrujících perlooček. Očekávan byl zejména druh *Daphnia longispina*, který se v minulosti v jezeře vyskytoval. Ve své práci jsem se rozhodla testovat jednu z možných hypotéz, proč nedošlo k návratu perlooček, i přes vysoký obsah fytoplanktonu v jezeře (dominuje zelená řasa *Monoraphidium dybowskii* (Wolosz.) Hindak & Kom. Legnerova) není pro perloočky potrava dostatečně kvalitní z hlediska poměru základních prvků C:N:P.

1.1. ZOOPLANKTON

Za zooplankton považujeme organismy, jejichž vlastní pohyb je zanedbatelný vůči pohybu vodních mas. Mezi zooplankton sladkých vod patří larvy mlžů, planktonní larvy hmyzu, ploštěnců a prvoků, medúzka sladkovodní (*Craspedacusta sowerbii*) a další 2 hlavní skupiny - kmen vířníci (Rotatoria) a podkmen korýši (Crustacea). Mezi planktonní korýše řadíme řád perloočky (Cladocera) a podtřídu klanonožci (Copepoda). Nejpočetnější zástupci zooplanktonu (vířníci, perloočky a vznášivky) svou potravu získávají převážně filtrací.

1.2. FILTRUJÍCÍ ZOOPLANKTON

Jednotliví zástupci filtrujícího zooplanktonu mají různou schopnost k získávání potravních částic v závislosti na stavbě filtračního aparátu. Princip filtrace je ve většině případů stejný – jedinci vytvářejí proud vody, který přihání potravní částice k ústnímu otvoru. Ty jsou zde z vody odchyťovány buď díky fyzikálním zákonitostem, nebo pomocí specializovaných struktur.

Mezi jednodušší způsoby filtrace patří filtrace u vířníků (Rotatoria). V přední části těla mají vířivý věnec brv, kterým vytvářejí proud vody směřovaný k ústnímu otvoru. Brvy pokračují i dále do ústního otvoru, zde slouží k posouvání potravních částic. Velikost potravních částic závisí pouze na velikosti vířníka, respektive jeho ústního otvoru; jedná se zpravidla o bakterie, řasy a malé prvoky. Vířníci mají enormní filtrační kapacitu, dokážou za hodinu přefiltrovat takové množství vody, které je rovno tisícinásobku jejich objemu těla (Brönmark et Hansson, 2005; Bruns, 1968).

Podobným způsobem získávají potravu i filtrující vznášivky (Copepoda). Pomocí dlouhých antén se udržují ve vodním sloupci. Anténami druhého páru a maxilipedy pohybují ve tvaru osmičky, vytvářejí dva víry kolem ústního otvoru a tím si přihánějí potravní částice (Cowles et Strickler, 1983).

Nejdokonalejší způsob filtrování potravních částic můžeme pozorovat u filtrujících perlooček (Cladocera). Jejich hrudní končetiny jsou opatřeny filtračními hřebínky, což jsou dlouhé brvy uspořádané vedle sebe. Jednoduché hřebínky se mohou vyskytovat na všech hrudních končetinách (např. čeledi Sididae, Holopediidae), nebo jen na některých končetinách (např. čeledi Chydoridae, Daphniidae). Pohyb končetin vytváří proud vody, který

prochází přes hřebínky, na nichž jsou potravní částice zachycovány. Nejdokonalejšího způsobu filtrace dosahují perloočky rodu *Daphnia*, které mají všechny hrudní končetiny vysoce specializované. Filtrační aparát dafnií se skládá ze všech 5 párů hrudních končetin, každá končetina má odlišnou stavbu. Celý soubor funguje jako vysoce výkonná pumpa, která prohání proud vody s potravními částicemi vnitřním prostorem dafnie směrem shora dolů. Pátá končetina tvoří záklopku spodního prostoru a funguje jako regulace otevírání a zavírání vnitřního prostoru a vytváří tak podtlak nebo sací sílu. Čtvrtá a třetí končetina má velké filtrační hřebínky, složené z dlouhých primárních a menších sekundárních brv tak, že vypadají i fungují podobně jako peří u ptáků (sekundární brvy jsou do sebe zaklesnuté, takže primární brvy se od sebe nevzdalují). Hřebínky jsou položeny těsně na sobě a na nich leží dlouhé brvy druhé a první hrudní končetiny, které podobně jako stěrače na autě shrnují zachycené potravní částice do břišní potravní rýhy a dále k ústnímu otvoru v přední části těla. Celý komplex hrudních končetin tak funguje na principu sacích a tlakových čerpadel (Brendelberger, 1991). Celá soustava přitom nefunguje jen čistě mechanicky, na základě signálů vysílaných po zpracování potravy dokáže velikost ok ve filtračním aparátu zvětšovat či zmenšovat (Sacherová, 1998).

Velikost ok filtračních hřebínků se tedy nemění jen s velikostí těla, ale souvisí i s množstvím a kvalitou dostupné potravy (Geller et Müller, 1981). Bylo prokázáno, že velikost ok se zvětšuje se zvětšující velikostí a/nebo koncentrací potravních částic (aby nedocházelo k zanesení filtračního aparátu), a zároveň mění velikost v závislosti na kvalitě potravních částic. Například filtrační hřebínky u *Daphnia pulicaria* reagovaly v pokusu na velkou koncentraci křídových částic stejně, jako hladovějící populace, přestože filtrační hřebínky jedinců krmených křídou částice zachytávaly a střeva byla na první pohled plná (Pop 1991). Z výše uvedeného vyplývá, že perloočky rodu *Daphnia* jsou velmi výkonnými filtrátory, kteří citlivě reagují na jakékoliv změny v kvalitě nebo kvantitě potravy.

1.3. POTRAVNÍ SPEKTRUM

Sladkovodní filtrátoři se živí řasami i heterotrofními organismy, jako jsou prvoci a bakterie, souhrnně nazývané seston (Sterner et Hessen., 1994).

Vhodná potrava pro *Daphnia* je taková, kterou snadno pozřou, stráví a obsahuje všechny důležité prvky, které organismy vyžadují v dané ontogenetické fázi. Ve většině

případů se organizmy s takovýmto typem potravy neseťkají a jsou vystaveny určitému typu limitace, kterému musí umět čelit. Faktory ovlivňující vhodnost potravy jsou velikost a tvar potravy, toxicita, celkový biochemický obsah potravy, nebo množství hlavních biogenních prvků, jako je uhlík, dusík a fosfor. Množství těchto prvků je v primárních producentech vyšší a velmi variabilní a to v závislosti na okolním prostředí, na rozdíl od jejich konzumentů, kteří si udržují homeostázu. Striktně homeostatičtí živočichové si udržují stálé vnitřní prostředí, bez ohledu na to, jaké zastoupení živin má jejich potrava (Brönmark et Hasson., 2005).

Velikost potravy je také limitující faktor. Filtrátorům, jako jsou perloočky, může dělat problém jak příliš malá potrava, tak i potrava příliš velká. Rozmezí velikosti potravy, kterou jsou perloočky schopny zkonzumovat, je mezi 0,1 - 30 μm (např. 0,2 μm *Diaphanosoma brachyurum*, 4,7 μm *Sida crystallina*; Sommer et Sommer, 2006) vyhovující průměrné rozměry potravy jsou 0,1 - 1,7 μm na šířku a 0,2 - 6 μm na délku (pokus byl proveden na 4 druzích perlooček; Brendelberger, 1991). S typem potravy úzce souvisí i velikost ok ve filtračním aparátu, který se skládá z filtračních hřebínků, které jsou na gnatobazích a enditech všech pěti končetin. Velmi účinný filtrační aparát mají například *Diaphanosoma brachyurum*, *Chydorus sphaericus*, *Daphnia cuculata* a *D. magna* velikost ok se pohybuje 0,24 - 0,64 μm , dokážou vyfiltrovat z vody i bakterie (Geller et Müller, 1981). Méně účinní filtrátoři jsou například *Daphnia galeata*, *D. pulicaria* a *Bosmina coregonii*, velikost ok je mezi 1 - 1,6 μm . Makrofiltrátoři mají většinu filtračních ok okolo 2 μm , proto nejsou schopni vyfiltrovat bakterie. Také filtrační rychlost se mění v závislosti na velikosti, druhu a ontogenetického stadia, juvenilové mají větší retenční schopnost než dospělci (Brendelberger, 1991). Podle Porter et al., filtrující perloočka o velikosti 2,36 mm zvládne přefiltrovat 2,77 ml ind/h (Porter et al., 1983). Maximální velikost potravy, kterou perloočky pozřou, se zvětšuje s rostoucí velikostí těla konzumenta (Burns, 1968).

1.4. KVALITA POTRAVY

Pojmem kvalita potravy rozumíme to, jak potrava ovlivňuje fyziologické funkce konzumenta. Nejlépe tento vliv lze sledovat na růstové rychlosti konzumenta, ale ne všichni konzumenti mají stejné nároky na potravu. To, co konzumenti potřebují, je ovlivněno biochemickou stavbou jejich těl. Kvalita potravy se nejlépe hodnotí jako poměr mezi základními biogenními prvky, tedy mezi uhlíkem, dusíkem a fosforem (C:N:P; Sterner, 2008). Mezi první teze o

limitaci růstu organismů potravou patří Liebigův zákon minima, který nám říká, že růst limituje takový prvek, který se v prostředí vyskytuje v minimu. Hlavním limitujícím prvkem ve sladkých vodách je fosfor, proto kvalitu potravy určuje množství fosforu v potravě. Primární producenti mohou být limitováni také dusíkem (Hessen, 1992; Sterner, 2008). Fosfor je biogenní prvek a limituje procesy ve vodách. Biologicky dostupný fosfor je takový, který fytoplankton dokáže využít. Většinou je ve formě rozpuštěného orthofosforečnanového fosforu nebo jsou to orthofosforečnany vázané v nerozpuštěných látkách. Organicky vázaný fosfor je ve formách fosfoproteinů, fosfolipidů a nukleových kyselin. Do vod se fosfor dostává vyluhováním a rozpuštěním minerálů a hornin (apatit, variscit, strengit), rozkladem zooplanktonu i fytoplanktonu, další možností je přísun pomocí atmosférické depozice a dále antropogenními zdroji.

Dalším takovým klíčovým bodem v této oblasti bylo stanovení Redfieldova poměru, který se posléze stal základním kamenem ekologické stechiometrie. Tento poměr nám říká, jaké je nejběžnější zastoupení uhlíku, dusíku a fosforu v biomase mořského sestonu. Je to atomární poměr mezi C:N:P, který je v hodnotách 106:16:1. Říká nám kolik atomů uhlíku a dusíku připadá na jeden atom fosforu. Na tento poměr přišel Alfred Redfield při analýze mořského sestonu a rozpuštěných látek, poměr byl přibližně stejný od pobřeží po otevřený oceán (Elser et al., 2000b; Sterner et Elser, 2002). Tento vztah byl pozorován i v sladkovodním a terestrickém prostředí. Přibližně stejný poměr byl nalezen i v rostlinné a živočišné biomase (Elser et al., 2000a). Veškeré odchylky od tohoto průměru nasvědčují na nějakou formu limitace v prostředí. Poměr kolísá, jak v čase, tak i v prostoru. Je to dáno především okolními environmentálními podmínkami (Sterner, 2004), jako je průměrná teplota vody, druh podloží, velikost povodí a délka zdržení vody v nádrži (Brönmark et Hansson, 2005). Při zdržení vody delším jak 6 měsíců mají jezera vyšší poměry C:N, C:P a N:P, je to způsobeno procesy, které se odehrávají uvnitř jezera (Heckey et al., 1993). Vysoký poměr mezi N:P mají i jezera oligotrofní, naopak eutrofní jezera mají poměr malý, protože jsou na živiny bohatá a limitace fosforem je malá (Sterner, 2008). Právě proto mají řasy poměr mezi hlavními biogenními prvky velmi variabilní, je to způsobeno tím, že jednotlivé prvky se nevyskytují ve vodách v konstantním množství a řasy na tuto fluktuaci reagují. Podle poměru mezi těmito prvky můžeme zjistit, zda daná potrava bude kvalitní pro konzumenty, nebo ne (Sterner et al., 1993, Štrojsová et al., 2008). Koncentrace živin v řasách může být

odlišná od toho, co jejich konzumenti vyžadují, tím pádem ovlivňují i strukturu společenstva, tedy jaké organismy se budou v prostředí vyskytovat (Sternner et Schwalbach, 2001), organismy pasivně odrážejí složení své potravy (Kopáček et al., 2011).

Kvalita potravy ovlivňuje chování, fitness konzumentů (Sternner, 2004; Elser et al., 2000b) a růstovou rychlost (Sternner et Hessen, 1994). Protože řasy mohou mít takový poměr C:N:P, který perloočkám nebude vyhovovat, dochází tak ovlivnění kaskády společenstva zesponu (tzv. bottom-up), ale stejně tak dochází i k top-down limitaci (Hessen, 1997; Sommer et Sommer, 2006). Změny v trofické kaskádě, například odstranění hlavního predátora, také způsobují změny v zastoupení P a N v ekosystému (Elser et al., 2000a; Sternner, 2004). V nádrži bez přítoku a odtoku dokáže zooplankton změnit atomární poměr C:N:P v nádrži a to díky konzumaci řas a zadržováním živin v těle (Main et al., 1997). Když budou dominovat perloočky, bude časem v nádrži vzrůstat tento poměr, až začnou být řasy limitovány fosforem. Naopak je to u klanonožců, kde bude postupem času docházet k limitaci dusíkem (Carrillo et al., 1996, Elser et al., 2000a, Wang et al., 2009), díky tomuto můžeme vysvětlit trofické kaskády a druhové složení herbivorního zooplanktonu v sladkých vodách (Lampert, 2006).

Už v prvních článkách o kvalitě potravy vyjadřovali jejich autoři zastoupení živin pomocí poměrů. Osvědčilo se to jako dobrý nástroj k zorientování se ve stavu ekosystému a v jeho interakcích. Až v novějších studiích pak přišel Robert W. Sternner s pojmem **ekologická stechiometrie**.

1.5. STECHIOMETRIE

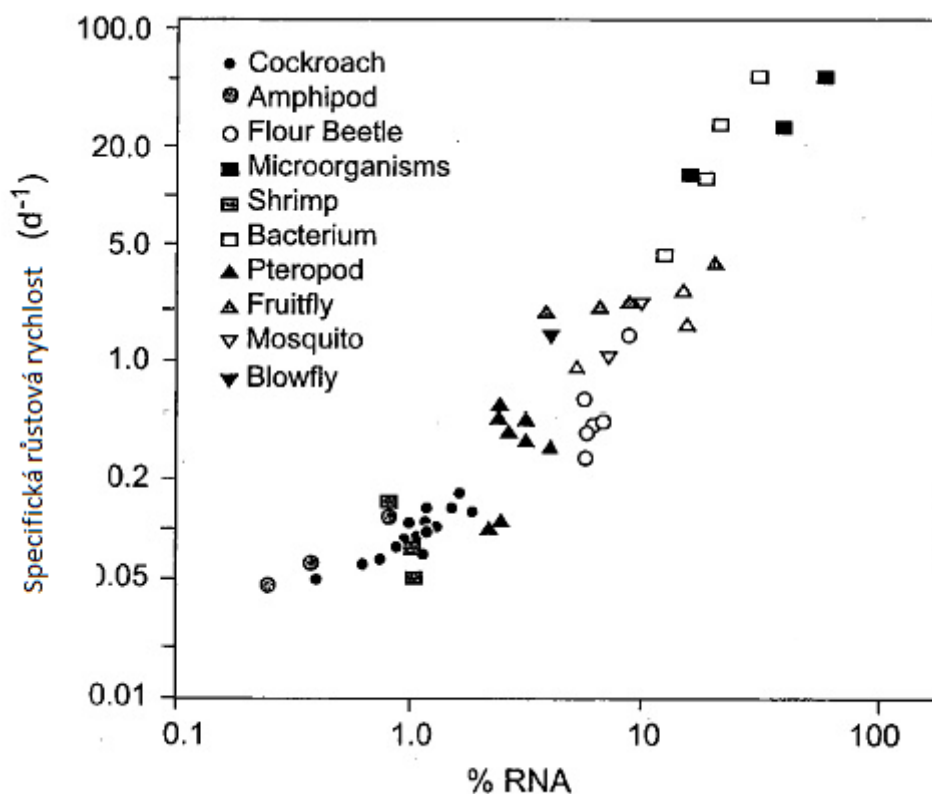
Pomocí chemické stechiometrie můžeme vyjádřit kvantitativní zákonitosti v chemických reakcích, k tomu jsou použity výpočty založené na chemických vzorcích a rovnicích (Sternner et Elser., 2002; Sternner, 2004).

Stechiometrie spojuje interakce mezi potravou a konzumentem, tedy řasami a zooplanktonem, odráží jejich základní biologické procesy (Elser et Urabe, 1999). Pomocí ekologické stechiometrie vyjadřujeme rovnováhu energie a chemických prvků v ekologických procesech (Sternner et Elser 2002). Díky poměrům (C:N:P) můžeme předvídat, jaký bude mít potrava vliv na konzumenta, především na jeho růstovou rychlost (DeMott et Pape, 2005, Sternner et Hessen, 1994). Efekt stechiometrie se projevuje jak ve vodním, tak i v terestrickém

prostředí (Elser et al., 2000a) v pelagiálu i bentosu sladkých vod (Cross et al., 2005), a je velmi důležitý k pochopení trofických interakcí a cyklu živin v prostředí (Sturner, 2004).

Klíčovým prvkem ve sladkých vodách je fosfor, který se snadno stává pro organismy limitujícím. Fosfor se v tělech organismů vyskytuje na mnoha místech: je součástí DNA, RNA, ATP, ADP, AMP, fosfolipidů, minerální fosfor se vyskytuje i v karapaxu. Poměr C:N:P v biomase zooplanktonu pak poukazuje na množství výše zmíněných látek (Main et al., 1997). Z různých studií vyplývá, že rychle rostoucí organismy mají obvykle malý poměr mezi C:P a N:P v biomase, tento jev byl pozorován u mnoha organismů (bakterie, korýši, ryby a další; Elser et al., 2000b). Malý poměr C:P a N:P znamená, že v tělech je dostatek fosforu, přičemž ze zmiňovaných látek v tělech dominují nukleové kyseliny, C:N:P nukleových kyselin je 9,5:3,7:1. Průměrný poměr mezi RNA a DNA je 5:1, kolem 1,5% celkového fosforu je v RNA, 0,13% z celkového fosforu je právě v DNA. 15 % z celkové hmotnosti sušiny zaujímá RNA (Sturner et Elser, 2002). Z celkového množství RNA je 80-90% právě rRNA. Na syntézu proteinu je přitom potřeba v průměru 10 milionů ribozomů, z toho vyplývá, že rychlost růstu je úzce spjata s alokací fosforu do RNA (Acharya et al., 2004; Elser et al., 2000b), C:N:P ribozomů se pohybuje kolem 21:7:1 (Sturner et Elser, 2002).

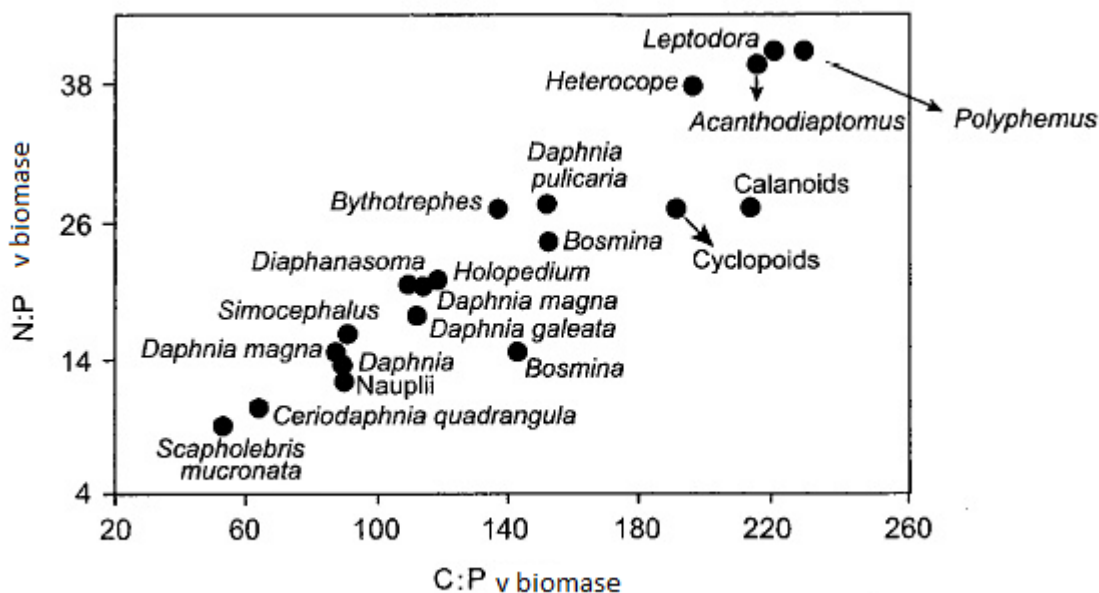
Základním principem ekologické stechiometrie je **hypotéza růstové rychlosti**, která říká, že mezi růstovou rychlostí organismů, jejich obsahem RNA a fosforem existuje pozitivní vztah (Elser et al., 1996; Acharya et al., 2004; Elser et al., 2000b, Sturner 1993). Tento vztah lze dobře demonstrovat na příkladu dvou zástupců zooplanktonu – perlooček rodu *Daphnia* a vznášivek (Calanoida). Klanonožci, které lze považovat spíše za K-stratégy (větší délka života, pohlavní rozmnožování, komplexní přeměna v dospělce, lépe odolávají predaci), mají pouze 2 % RNA z celkové hmotnosti sušiny. Tak malé množství je obvyklé u organismů s pomalým růstem těla. Perloočky, které lze považovat za r-stratégy (krátká délka života, nepohlavní rozmnožování, přímý vývoj, málo odolávají predaci), mají 10 % RNA z hmotnosti. Tento pozitivní vztah platí obecně, jak lze vidět na obr. 1 (Sturner & Elser, 2002).



Obr. 1: Pozitivní závislost mezi růstem a množstvím RNA pro různé členovce a mikroorganismy (Sterner et Elser, 2002).

Organismy z odlišných habitatů jsou vystaveny rozdílným koncentracím fosforu. Eutrofní vody mají 100 mg/m^3 celkového fosforu na rozdíl od oligotrofních jezer, která mají 10 mg/m^3 (Lellák et Kubíček, 1991). Na nízké koncentrace organismy reagují tak, že sníží svou růstovou rychlost, protože nemají dostatek fosforu na stavbu svých těl (Sterner, 1997). Růstová rychlost a citlivost na množství fosforu v potravě je druhově specifická, určená právě tím, kolik daný organismus (zooplankton) má v těle fosforu (Elser et al., 2003). Proto je růstová rychlost ovlivněna nejen faktory prostředí, jako je teplota, pH, kairomony, ale také i kvalitou a kvantitou potravy, tedy množstvím fosforu obsaženého v potravě (Acharya et al., 2004; Urabe et al., 1997).

Množství fosforu vyjadřujeme pomocí molárního poměru. Podle velikosti poměru můžeme určit stupeň limitace. Vysoký poměr nám ukazuje, že je fosforu málo a může nastat limitace fosforem. Poměr C:N:P v biomase těl je taxonomicky specifický obr. 2 (Main et al., 1997).



Obr. 2: Mezidruhové rozdíly v prvkovém složení u různých druhů sladkovodního zooplanktonu (Sternier et Elser, 2002).

Například u korýšů se tento poměr (N:P) pohybuje od 12 - 52, kdy perloočky mají poměr nižší (*Daphnia magna* 12,7) než klanonožci (*Acanthodiaptomus denticornis* 38,7; Sternier et al., 1992). Klanonožci mají až 5 krát méně fosforu než perloočky, ale množství dusíku je v jejich biomase přibližně stejné (Carrillo et al., 2001, Sternier et al., 1992). Rozdíly jsou i v rámci skupiny Branchiopoda, když porovnáme druh *Bosmina liederii* se zástupci rodu *Daphnia*. *Bosmina* má menší množství RNA (*Bosmina* necelá 4 % hmotnosti a *Daphnia* okolo 7 %; Schulz et Sternier, 1999). Například *Daphnia longispina* z přirozené populace jezera s vysokým obsahem huminových látek měla 9,2 % N a 14,12 % P z hmotnosti jedince, atomový poměr N:P je 14,3 (Sternier et al., 1992).

Také byly zdokumentovány ontogenetické rozdíly v poměrech (C:N:P; Elser et al., 2003). Nauplia buchaneč mají menší množství dusíku v biomase než jejich dospělci. Nauplia mají průměrný poměr mezi N:P 3,3 a dospělci až 24,6; tyto rozdíly souvisí s odlišnou růstovou rychlostí a velikostí těla. Nauplia mají více RNA a rychleji rostou, proto mají

v biomase i více fosforu. Úbytek fosforu je pozorován po každém svlékání, souvisí to s buněčnou smrtí jednotlivých buněk (Carrillo et al., 2001; Tessier et Consolatti, 1991).

A jak je to s limitací dusíkem? Tak jasné výsledky jako u limitace fosforem pozorovány nebyly, ale bylo zjištěno, že limitace dusíkem může nastat. Když bylo dusíku v potravě velmi málo, nastalo omezení proteinové syntézy (translace) způsobené nedostatkem aminokyselin, tím pádem se snížila růstová rychlost (Acharya et al., 2004; Elser et al., 2003).

Ke sledování vlivu kvality potravy na konzumenta se hojně využívají modelové organismy rodu *Daphnia*, protože jsou to rychle rostoucí filtrátoři, kteří mají nízký C:P poměr v biomase těl a tudíž větší nároky na množství fosforu v potravě v porovnání s ostatními zástupci zooplanktonu (Sterner et Hessen, 1994). C:P poměr v tělech dafnií se pohybuje okolo 30, proto u nich snadno nastává limitace fosforem, ale specifické nároky na potravu se liší druh od druhu. Ze studií z přirozených podmínek i z laboratoří je zřejmé, že nedostatečné množství fosforu ovlivňuje životní strategie jedince (Urabe et al. 1997, DeMott et al., 1998). Když nastane situace, že perloočky mají fosforu nadbytek, přesouvají si nadbytečný fosforu do zásobních látek, ne do RNA (Acharya et al., 2004). Množství fosforu v potravě také ovlivňuje reprodukci perlooček, v závislosti na kvalitě potravy mění množství vajíček (Urabe et Sterner., 2001). Kvalita potravy ovlivňuje veškerý zooplankton, nejvíce však rychle rostoucí organismy, jako jsou perloočky a vířníci. Vířníci druhu *Brachionus calyciflorus* v laboratorním experimentu dostávali 2 druhy potravy (limitovanou dusíkem a nelimitovanou). Jedinci s potravou nelimitovanou, měli více vajíček a rostli výrazně rychleji než jedinci krmeni potravou limitovanou (Štrojsová et al., 2008).

Nejen kvalita, ale i kvantita potravy ovlivňuje růstovou rychlost zooplanktonu (Hessen, 1992; Štrojsová et al, 2008). I dostatek nekvalitní potravy negativně ovlivňuje přežívání perlooček (Acharya et al., 2004). Množství fosforu v prostředí a následně v řasách není konstantní, ale je velmi důležité protože určuje následné fitness konzumenta. Právě fluktuace fosforu v primárních producentech je důležitý faktor, který ovlivňuje lokální adaptaci perlooček, množství fosforu (C:P poměr) se mění jak v čase, tak i v prostoru. Nespočet studií prokázalo, že perloočky rodu *Daphnia* se těmito fluktuacím dokáží přizpůsobit, například pozměněním filtračního aparátu nebo zvýšením „žrací rychlosti“. (Lampert et Brendelberger, 1996; Sterner et Schwalbach, 2001).

Při znalostech potřeb konzumenta můžeme podle stechiometrického poměru potravy určit, zda nabízená potrava je pro konzumenta dostačující, nebo se konzument potýká s limitací.

1.6. NEKVALITNÍ POTRAVA

Ekologická stechiometrie je založena na tom, že poměr základních živin se mění druh od druhu a podle toho jedinci reagují na svou dostupnou potravu. Ne vždy je potrava vyhovující. Vlivem kvality potravy se zabývala řada experimentů. Z výsledků je patrné, že například perloočka (*Daphnia pulicaria*) nemusí mít nutně vysokou koncentraci P v potravní nabídce, ač při ní nejlépe roste (Shimizu et Urabe, 2008).

Jen málo se ví o tom, jak se perloočky chovají při limitaci fosforem, jak mění své životní strategie. Jednou z tezí je, že zvyšují příjem potravy, aby tak vyrovnaly nedostatek fosforu. Další možností je vytvořit si zásobní látky. U klanonožců a perlooček jsou to lipidy (triacylglyceroly), proto odolnost jedince vůči hladovění více záleží na množství lipidů. Lipidy se shlukují do lipidových kuliček, které lze pozorovat okem a kvantifikovat, mluvíme o tzv. lipidovém indexu. Podle indexu můžeme vyhodnotit, jak kvalitní potravu jedinec měl (Carrillo et al., 2001). Při nedostatku potravy zooplankton upřednostňuje tvorbu zásob před růstem (Main et al., 1997; Sterner, 1997). Při nedostatku potravy, nebo při dostatku nekvalitní potravy měly perloočky větší zásoby lipidů než jedinci, kterým potrava vyhovovala (Hessen, 1992). Pro jedince, kteří strádají, je účinnější si dělat zásoby lipidů, než proteinů nebo sacharidů. Juvenilové získávají tukové zásoby od své matky. Množství zásob, jaké budou mít, závisí na druhu zooplanktonu a na potravních podmínkách matky (Carrillo et al., 2001).

Ke vzniku nekvalitní potravy může dopomoci i sluneční záření. Paradoxně při větším slunečním osvětlení je kvalita potrava nižší, protože více slunečního záření podporuje růst biomasy řas a to zvýšením množství buněčného uhlíku, ne zvýšením fosforu v biomase. Vzroste produkce řas, ale produkce zooplanktonu je v podstatě nulová (Sterner et al., 1998). Nedostatek fosforu ovlivňuje jak růstovou rychlost, tak i hmotnost, rozmnožování, velikost a lipidový index zooplanktonu. Důkazů toho, že nekvalitní potrava ovlivňuje konzumenta, hlavně co se týče zooplanktonu, je mnoho. Je prokázáno, že když potrava obsahovala méně fosforu, konzumenti byli menší (Hessen, 1992; Sterner et al., 1993). Prahový atomový poměr N:P, který už limituje produkci, je u perlooček 300 (Urabe et al., 1997). Když pominou

podmínky, kdy potřebují hromadit uhlík, zbavují se dafnie přebytečného uhlíku pomocí respirace a exkrece ve formě rozpuštěného organického uhlíku (Elser et al., 2000b). Množství uhlíku v sušině zooplanktonu je 48 ± 1 %. Průměrný atomární poměr klanonožců a perlooček se výrazně liší, ukazuje tak na mezidruhové rozdíly v množství P a N v biomase zooplanktonu. Klanonožec *Acanthodiptomus denticornis* má poměr C:N:P 212:39:1 a *Daphnia longispina* 85:14:1. Tyto rozdíly a tedy odlišné nároky na zastoupení N:P v potravě, souvisí s tím, že N:P poměr v biomase řas určuje, jaké společenstvo se v nádrži bude nacházet, tedy které druhy budou dominovat (Andersen et Hessen, 1991).

V období, kdy je největší densita zooplanktonu, se množství potravy může stát tak nízké (clear water), že jedinci nezískají víc, než jen zlomek své denní potřeby. Právě schopnost odolávat hladovění určuje to, které druhy se udrží v kompetici s ostatními (Carrillo et al., 2001). Perloočky se těmto změnám vyhnuly tak, že se u nich projevuje odlišné reprodukční chování (mění počty potomků, dobu vajíček ve schránce, velikost potomků), které se liší klon od klonu a to v závislosti na prostředí (Antunes et al., 2003).

1.7. ZMĚNA PODMÍNEK A REAKCE ZOOPLANKTONU

Chemismus vod ovlivňuje celý potravní řetězec a jeho změna může mít zásadní vliv i na zooplankton. Právě během několika posledních století prošla mnohá evropská jezera zásadními změnami. Především se jednalo o acidifikaci a eutrofizaci jezer. Poměrně dost je známo o průběhu těchto změn, ale jen málo je známo o reakci zooplanktonu na tyto děje.

Acidifikace byla poprvé pozorována na skandinávských jezerech, kde způsobila úhyn ryb. Je to jev, při kterém dochází k okyselování prostředí volnými H^+ ionty. V životním prostředí se vyskytují dva druhy acidifikace a to přirozená a antropogenní. Projevují se snížením pH, nízkými hodnotami kyselinové neutralizační kapacity a zvýšenou koncentrací hliníku (Almer et al., 1974). Nízké pH způsobuje mobilitu toxických Al iontů, které nepříznivě ovlivňují půdu a vodu (Exley, 2003). Hliník se při pH 5,1 - 5,8 vyskytuje ve formě toxických frakcí. Acidifikace má vliv na produkci a stechiometrii planktonu a tím pádem i na celý potravní řetězec v jezerech (Kopáček et al., 2011). Pro acidifikovaná jezera je typické pH pod 5 a velmi malý počet druhů fytoplanktonu. Typickým zástupce acidotolerantních řas je *Dinobryon* sp. ze skupiny Chrysophyceae (Almer et al, 1974; Vrba et al., 2003). V České republice proběhla největší acidifikace v horských ekosystémech. Nejlépe je to

zdokumentováno na Šumavě. Nejvýraznější pokles pH nastal během 60-70. let, kdy pH v Černém jezeře kleslo až na 2. Také během 80. let se v jezeře zvedla koncentrace hliníku na 1 mg l^{-1} , toto množství bylo toxické pro ryby i zooplankton (Vrba et al, 2003). Horské oblasti jsou vystaveny silnějšímu vlivu acidifikace, protože mají menší mocnost půdy, tím pádem mají i menší pufrční schopnost. A většina stromového porostu je složena ze smrku. Acidifikace v smrkových porostech je silnější, protože jehlice mají větší specifický povrch a zachytí větší množství suché depozice síry, navíc mají jehličí celý rok na rozdíl od listnatých lesů, na jehlicích se přemění na kyselinu sírovou a nejbližšími dešti jsou spláchnuty do vody (Hořická et al., 2006). Acidifikace změnila kvalitu vod a drasticky redukovala biodiverzitu v šumavských jezerech. Proto typickým jevem acidifikovaných jezer je jejich obrovská průhlednost, která se pohybuje až do 15 m (Vrba et al, 2003). Dobrým indikátorem úživnosti jezera je poměr mezi uhlíkem, dusíkem a fosforem. V sestonu v šumavských jezerech se průměrný molární poměr pohybuje kolem 5560:204:1. Hlavní rozdíl mezi jezery je ve formě a tedy v mobilitě fosforu. Poměr prvků v atmosférické depozici na Šumavě je C:N:P 175:29:1 (Kopáček et al., 2011).

Z oblasti šumavských jezer existují 130 let staré hydrobiologické a paleolimnologické studie (Vrba et al., 2003). Korýšší zooplankton v jezerech se skládá z malého počtu druhů. Klimatické faktory jasně určují strukturu druhů a produkci zooplanktonu (Pražáková et al., 2006). Většina druhů v jezerech vymřela nebo byla radikálně redukována. Pouze vznášivka *Heterocope saliens* přežila celé období acidifikace. Ve všech jezerech vymřela například *Bosmina longirostris*. Přežily například *Daphnia longispina* a *Cyclops abyssorum* v Prášílském jezeře, v extrémně nízkých počtech *Ceriodaphnia quadrangula* a dva druhy vířníků *Microcodon clavus* a *Polyartha remata* v Černém jezeře a pár dalších druhů (Vrba et al, 2003). V litorálu přežili období acidifikace hlavně zástupci čeledi Chydoridae díky své toleranci k nízkému pH (Pražáková et al., 2006). Ryby vymřely ve všech šumavských jezerech již během 60. - 70. let. Dnes jsou jako vrcholoví predátoři larvy koreter (*Chaoborus*, Diptera, Insecta, Arthropoda), ploštice klešťanky (*Corixa*, Hemiptera, Insecta, Arthropoda; Hořická et al., 2006) nebo buchanka (*Cyclops abyssorum*, Cyclopoida, Maxillopoda, Arthropoda).

1.8. CHARAKTERISTIKA ŠUMAVSKÝCH JEZER

Na území české republiky máme 5 ledovcových jezer, nacházejí se v jižních Čechách na Šumavě (Černé, Čertovo, Plešné, Prášílské a Laka). Plocha jezer se pohybuje mezi 2,8 - 18,4 ha, objem jezer je mezi 0,04 - $2,88 \times 10^6 \text{ m}^3$ a maximální hloubky jezer se pohybují mezi 3 - 40 m. Jezera jsou situována na geologicky citlivém podloží (základem je rula, slída nebo žula) a nadmořské výšce 918 - 1096 m n. m. (Vrba et al., 2003). Jejich malé povodí s plochou okolo 0,58 - 2,79 km^2 je pokryto zejména smrkem ztepilým (*Picea abie*) a více rozptýleně se vyskytují i buk lesní (*Fagus sylvatica*) a jedle bělokorá (*Abies alba*). Průměrné množství TP (total phosphorus) v jezerech je 0,5 - 12,5 $\mu\text{g/l}$ viz tab. 1. Horské ekosystémy jsou vystaveny drsnějším abiotickým podmínkám, jako je dlouhá sněhová pokrývka, dlouhé období zimy, proměnlivé počasí a také citlivost jezer k acidifikaci (Straškrabová et al., 2000).

Tab. 1: Chemické parametry šumavských jezer. Vysvětlivky: TP- veškerý fosfor, TON-veškerý organický dusík, Al_T -veškerý reakční hliník, Chl-*a*- chlorofyl-*a*, vorky jsou brány z epilimnia (Nedbalová et al., 2006).

	pH	TP ($\mu\text{g/l}$)	TON ($\mu\text{g/l}$)	Al_T ($\mu\text{g/l}$)	Chl- <i>a</i> ($\mu\text{g/l}$)	Seston C:P (Mol mol^{-1})	Seston N:P (Mol mol^{-1})
Černé	5,01	1,6	125	217	0,8	904	101
Čertovo	4,68	3,1	215	322	2,8	878	88
Plešné	5,26	8,5	438	361	14,3	1392	111
Prášílské	5,37	7	192	167	4,2	205	33
Laka	6,22	5,8	219	103	6,3	1160	66

1.7.1. PLEŠNÉ JEZERO

Plešné jezero jsem použila jako modelovou lokalitu. Jezero se nachází v nadmořské výšce 1087 m n. m. Jezero je dimiktické, aktuálně mezotrofní (množství fosforu $11 \mu\text{g l}^{-1}$). Plocha jezera je 7,5 ha a maximální hloubka 19 m přibližná doba zdržení vody je 0,7 let a průtok $1,28 \text{ m}^3/\text{rok}$. Objem jezera je $0,62 \text{ m}^3 \cdot 10^6 \text{ l}$. Břeh Plešného jezera je formován žulovými kameny a je bez vodní vegetace. Výjimku tvoří na mělčinách malé oblasti s ostřicí (*Carex*) a místy se vyskytuje i šídlatka ostnovýtrusá (*Isoëtes echinospora*), je to jediná lokalita v České republice, kde se vyskytuje a roste v hloubce 0,5 - 1 m. V lesním pokryvu povodí dominuje smrk ztepilý (*Picea abies*; Pražáková et al., 2006; Kopáček et al., 2011).

Topografické i morfologické vlastnosti podloží v povodí určují dostupnost živin. V povodí Plešného jezera je podloží složené převážně z granitu, který je bohatý na fosfor (Kopáček et al., 2011) a proto se jezero svými vlastnostmi odlišuje od ostatních jezer. Můžeme mezi sebou porovnat 2 šumavská jezera, Čertovo a Plešné jezero, kdy Čertovo má v podloží svor, který obsahuje méně fosforu než na fosfor bohatý granit, který se nachází v povodí plešného jezera (Kaňa et al. 2005). Plešné jezero má více fosforu ($11 \mu\text{g l}^{-1}$), tím pádem nevykazuje vlastnosti typické pro horská jezera, průhlednost je okolo 1 m a to díky silnému zákalu, který je způsobený velkým množstvím fytoplanktonu, 80% biomasy tvoří řasy (Majer et al., 2001). V jezeře dominuje nepohyblivé *Monoraphidium dybowskii*, *Gymnodinium uberrimum* a *Peridinium umbonatum* sinice *Limnothrix* a *Pseudoanabaena* (viz příloha tab. 8). Malá průhlednost vody by mohla mít negativní vliv na růst šídlatky ostnovýtrusé (*Isoëtes echinospora*; Kohout et al. 2004). Mezi lety 1994 - 1998 kleslo množství chlorofylu-*a* o 50%, zatímco množství celkového fosforu se během tohoto období nezměnilo. Pokles biomasy byl způsoben imobilizací fosforu hliníkem. Pokračující ozdravování jezera a snižující množství hliníku zpřístupnilo fosfor pro řasy. První známkou ozdravení jezera byl vzrůst počtu vířníků (Vrba et al., 2003).

Z výzkumu Pražákové a kolektivu, ve kterém provedli paleolimnologický průzkum, vyplývá, že dominantní planktonní druh byl *Daphnia cf. longispina* (Pražáková et al., 2006). Při odběrech v roce 1986 nebyly nalezeny ani *Daphnia longispina* a ani *Cyclops abyssorum*. Po roce 1989 se situace začala zlepšovat, druhové složení viz příloha tab. 9. V letech 2002 - 2003 v rámci grantového projektu GAUK „Zooplankton jako indikátor ozdravení acidifikovaných šumavských jezer“ se Kohout a Fott zabývali myšlenkou, zda je možný návrat i planktonních druhů zooplanktonu, které se vyskytovaly před acidifikací a nyní se vyskytují na lokalitách méně postižených. Jako indikátorový druh použili druh *Daphnia longispina* z Prášílského jezera, který zde přežil celé období acidifikace. Dafnie přežily pravděpodobně díky nižším koncentracím iontů hliníku, který se v tomto jezeře váže na huminové kyseliny. Huminové kyseliny v tomto případě fungují jako pufr, s hliníkem tvoří komplexy nebo cheláty a snižují tak jeho toxicitu. Taktéž byly provedeny laboratorní pokusy na přežívání jedinců v různých vodách z jezer Šumavy. Po ročním laboratorním výzkumu bylo zjištěno, že nejlépe *Daphnia longispina* přežívá ve vodě z Plešného jezera. Dokonce populace z Prášílského jezera přežila vyšší koncentrace hliníku a nižší pH než bylo v roce 2003 v Plešném jezeře Repatriace

byla uskutečněna na podzim v roce 2004 a to tak, že z pelagiálu Prášílského jezera pomocí planktonní sítě nalovili velikostní frakce zooplanktonu obsahující druhy *Daphnia longispina* a *Cyclops abyssorum* v počtu řádově desítek tisíc jedinců. Ty byly přesunuty do Plešného jezera v 25l barelech (Kohout et Fott, 2004). Bohužel již na jaře následujícího roku nebyl nalezen ani jeden živý jedinec druhu *Daphnia longispina*. V jezeře je poměr C:P v sestonu 1392 a N:P 111, u Prášílského jezera je to C:P 205 a N:P 33, viz tab. 1 (Nedbalová et al., 2006).

2. CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit, zda je návrat býložravých zástupců zooplanktonu do horských jezer zotavujících se z acidifikace inhibován nevhodnou potravní nabídkou. Z důvodu zatížení ekosystému probíhá návrat druhů opožděně, některé druhy se zatím nevrátily vůbec. Jedno z možných vysvětlení je, že býložravé druhy jsou limitovány nedostatkem fosforu v potravní nabídce (fytoplanktonu) a zooplankton s touto potravou nedokáže přežít. Cílem mé práce bylo zjistit:

1. Má stechiometrický poměr C:N:P v potravní nabídce vliv na znaky životní historie (life-history traits) konzumenta – konkrétně délku života, růst, počet a velikost snůšek? Konzumentem bude v mém případě perloočka druhu *Daphnia longispina* (Crustacea: Cladocera).
2. Znemožnila potrava limitovaná fosforem v Plešném jezeře návrat herbivorních filtrátorů?

3. METODIKA

3.1. KULTURA ŘAS A PERLOOČEK

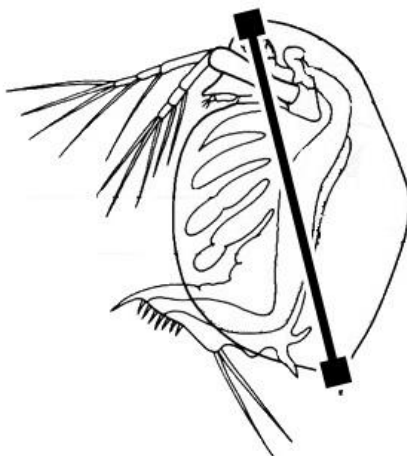
Do pokusu jsem použila druh *Daphnia longispina*, která vyhynula v Plešném jezeře, ale v Prášílském jezeře období acidifikace přežila. Použitá *Daphnia longispina* patří do komplexu několika druhů kam mimo jiné patří i další velmi běžné druhy *D. longispina* (O. F. Müller, 1776), *D. hyalina* (Leydig, 1860), *D. rosea* (G. O. Sars, 1862), *D. lacustris* (G. O. Sars, 1862), *D. cucullata* (G. O. Sars, 1862), *D. galeata* (G. O. Sars, 1863) *D. umbra* (Forbes, 1983), *D. mendotae* (Birge, 1918), *D. dentifera* (Forbes, 1893), *D. thorata* (Forbes, 1893; Petrusek et al, 2008).

Perloočky jsem nachytala planktonní sítí s velikostí ok 40 µm dne 23. 7. 2010 v Prášílském jezeře. V ten samý den jsem odebrala vodu také z Prášílského jezera, aby dafnie byly v první fázi experimentu chovány v co nejpřirozenějších podmínkách. Po převozu do Prahy na katedru ekologie jsem dafnie přebrala od ostatních zástupců zooplanktonu a po 10 jedincích přemístila do 250ml nádob s vodou z Prášílského jezera. Ty jsem umístila do inkubátoru s konstantní teplotou 15 °C. Během roku, kdy jsem se snažila zajistit nejvhodnější podmínky pro růst a rozmnožování perlooček, jsem vodu z Prášílského jezera nahradila médiem pro perloočky (složení viz příloha- media). Po čase jsem namnožila dostatečné množství jedinců k tomu, abych mohla uspořádat pokus. V pokusu jsem použila 2 media. Z/4 je 4 krát zředěné medium Z, které se používá jako univerzální medium pro kultivaci řas (Zehnder et Staub, 1961), toto medium jsem použila jako nelimitované. Modifikované medium P1, bylo ochuzené o fosfor (složení obou medií viz příloha). Řasy byly inkubovány v 2l hruškovitých dělicích nálevkách za stálého provzdušňování (viz příloha obr. 15) a stálého světla zářivky značky GLO, SUN-GLO o parametrech 36"/91 cm, 30 W, T8. V experimentu jsem použila kulturu zelené řasy *Monoraphidium dybowskii* (Wolosz.) Hindak & Kom. Legnerova, která se velmi hojně vyskytuje v již zmiňovaném Plešném jezeře (oddělení Chlorophyta, třída Chlorophyceae, řád Sphaeropleales, čeleď Ankistrodesmaceae). Inokulum řasy pro založení kultury pocházelo přímo z Plešného jezera. Přibližně každý třetí den jsem z 2l nádob odčerpala 250 ml media s řasami a doplnila ho čistým médiem, abych udržovala stále stejné podmínky a řasy si neodčerpaly živiny. Každé medium jsem před použitím sterilizovala v autoklávu, abych zamezila kontaminaci kultury. Řasy jsem v těchto

podmínkách pěstovala 3 měsíce, než jsem začala s experimentem, a během celé té doby jsem pravidelně odebírala vzorky a sledovala jsem počty buněk v jednotlivých mediích, zda se udržují přibližně stejné. V průběhu experimentu jsem odebírala 250 ml řasové kultury, a to kvůli stanovení živin. Pro stanovení poměru C:N:P jsem musela nejprve vzorky lyofilizovat na katedře parazitologie UK v Praze. Před lyofilizací jsem odebrala z obou dělicích nádob 250 ml kultury. Tyto vzorky jsem postupně centrifugovala na co nejmenší objem a následně zmrazila tekutým dusíkem. Takto upravené vzorky jsou připravené na lyofilizaci. Lyofilizace probíhá tak, že ze zmražených vzorků se v prostředí vakua sublimací odděluje voda. V tomto případě proces trval přibližně 4 hodiny. Takto upravené vzorky jsem poslala do Českých Budějovic do laboratoře prof. J. Kopáčka (BC AV ČR, v.v.i., Hydrobiologický ústav) na analýzu celkového fosforu, dusíku, vodíku, uhlíku a molárního poměru C:P a C:N. Analýza probíhala spektrofotometricky po mineralizaci vzorku kyselinou dusičnou a kyselinou chloristou. Stanovení dusíku, uhlíku a vodíku probíhalo na analyzátoru ELEMENTAR vario MICRO cube, na principu vysokoteplotní (1200°C) katalytické oxidaci s teplotně vodivostní detekcí rozkládaných produktů N_2 , H_2O , CO_2 a SO_4 (Vrba, 2012).

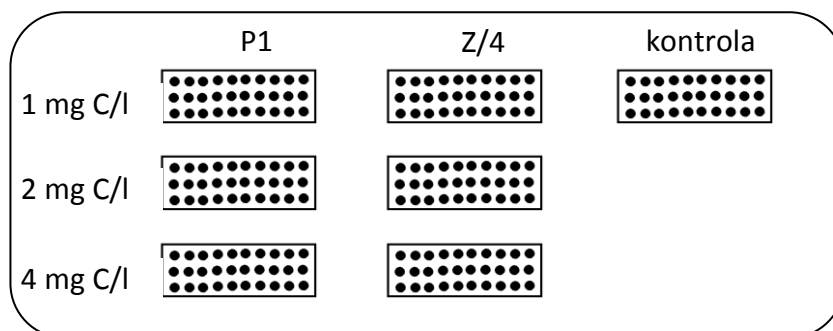
3.2. FEEDING EXPERIMENT

Pokus probíhal následujícím způsobem. Nejdříve jsem odebrala do 250ml nádob s médiem přímo připraveným pro perloočky 10 samic s vajíčky. Jejich narozené neonáty jsem použila do pokusu, stáří se pohybovalo do 48 hodin. Odebrané mladé jedince jsem živé vyfotila a změřila jejich délku od vrcholku hlavy po začátek spiny (viz obr. 3; příloha tab. 11).



Obr. 3: Schéma měření perlooček.

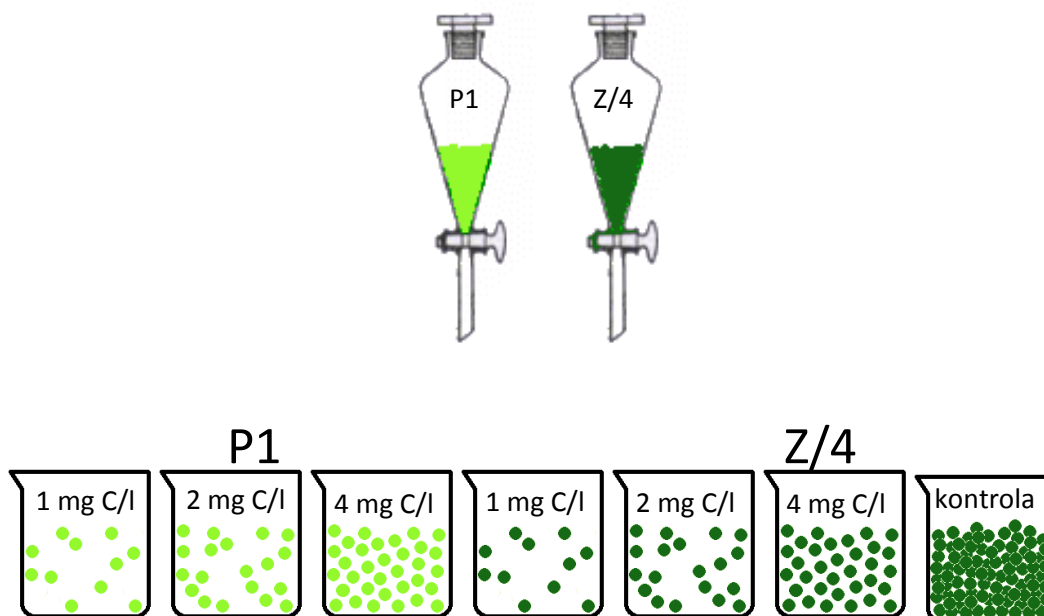
Všechny jedince jsem změřila na mikroskopu s použitím softwaru Lucianet. Celkem jsem použila 210 jedinců, viz obr. 4. Do každé pokusné skupiny jsem použila 30 jedinců. Celý pokus probíhal v inkubátoru Q-CELL-UNIMED s 15 °C a světelným režimem 16:8 (světlo:tma). Pokus jsem uspořádala během podzimu až zimy 2011/2012, protože na jaře jsem zaznamenala velký úhyn.



Obr. 4: Schéma uspořádání pokusu, celkem bylo použito 210 jedinců.

Každá dafnie byla nejdříve vyfocena, změřena a pak umístěna jednotlivě do zkumavky s objemem media 50 ml. Medium, kde dafnie během experimentu rostly, bylo stejné jako to, v kterém byly inkubované předešlé generace. Každý den jsem pokusným dafniím měnila medium a přimíchala do něj příslušné množství řas, aby se zamezilo sedimentaci řas, které by pak pro perloočky byly nedostupné. Po úhynu každé perloočky jsem je jednotlivě nafixovala formalinem, znovu vyfotila a změřila. Také jsem zaznamenávala, kdy se objevily první vajíčka v plodové komůrce a za jak dlouhou dobu se objevily první neonáty a kolik jich celkem ve snůšce bylo. Všechny neonáty jsem odebrala a opět nafixovala formalinem, nafotila a změřila.

Perloočky v experimentu jsem krmila řasami z připravených medií, dále jsem použila 3 různé koncentrace uhlíku (1, 2 a 4 mg C/l) a jednu skupinu kontrolní. Kontrolní dafnie byly krmeny řasami z media Z/4 a to v množství 1 ml což je po přepočtu 100 mg C/l. Pro vysvětlení viz obr. 5.



Obr. 5: Schéma potravní nabídky.

3.3. VÝPOČTY A ANALÝZY

Koncentrace uhlíku v řasách jsem spočítala tak, že jsem použila převodní faktor mezi objemovou biomasou a uhlíkem.

Objemová biomasa se spočítá jako objem jedné buňky vynásobený počtem buněk v nádobě. Abych zjistila objem jednotlivých buněk, musela jsem si nejprve změřit šířku a délku přibližně 30 buněk řas, poté jsem spočítala průměrný objem 1 buňky v jednotlivých mediích (velikosti viz příloha tab. 10). Objem buňky rodu *Monoraphidium* se počítá jako válec

$$V = 0,5236 \cdot \text{šířka}^2 \cdot \text{délka}$$

Po vypočítání objemu jsem spočítala množství řas na 1 mm^3 kultury a to pomocí počítací komůrky Cyrus. Z koncentrace a průměrného objemu buněk řas lze spočítat objemovou biomasu buněk v $\text{mm}^3 \cdot \text{l}^{-1}$. Tuto objemovou biomasu jsem podle vzorce převedla na organický uhlík:

$$\text{Organický C (mg)} = \text{objemová biomasa (mm}^3\text{)} \times 0,2 \text{ (Straškrabová, 1999)}$$

Statistické výsledky byly počítány v programu GraphPad Prism 5.

4. VÝSLEDKY

U perlooček v jednotlivých variantách pokusu byly sledovány následující parametry:

1. celkový přírůstek (délky těla na konci versus na počátku pokusu)
2. délka života
3. počet snůšek
4. počet neonát ve snůšce

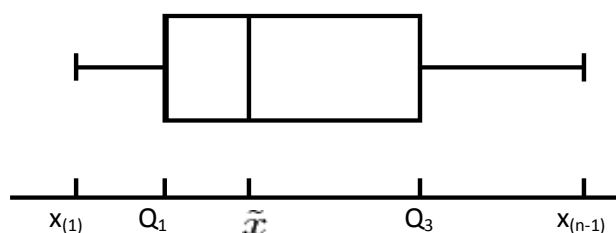
Do pokusu jsem použila řasu (*Monoraphidium dybowskii*), kterou jsem pěstovala ve dvou mediích. Fosforem limitované medium P1 a nelimitované Z/4. Řas z nelimitovaného media bylo v kultivační nádobě více, než v limitované (v průměru P1 4960 buněk/mm³, Z/4 30053 buněk/mm³), i když obě kultury byly ředěny pravidelně a stejným množstvím media. Řasy z limitovaného media P1 byly větší než z nelimitovaného media Z/4 (P1 3,3 x 10,1 μm, objem 55,73 μm³; Z/4 2,4 x 5 μm, objem 15,02 μm³). Řasy z media P1 měly v biomase průměrný poměr C:P 1174, a řasy z media Z/4 měly poměr C:P 290 viz tab. 2. Poměr C:N byl u řas z obou medií stejný a to C:N 9. To je důkaz toho, že řasy nebyly limitovány dusíkem.

Tab. 2: Výsledky z chemického rozboru biomasy řas, průměrné hodnoty (Vrba, 2012).

	P-celk. (mg/g)	N (mg/g)	C (mg/g)	Velikost buněk (μm)	Množství buněk (buněk/ mm ³)	C:P	C:N
Z/4	4,1	67,05	524,78	3,3 x 10,1	4960	290	9,25
P1	1,2	71,15	528,65	2,4 x 5	30053	1174	9

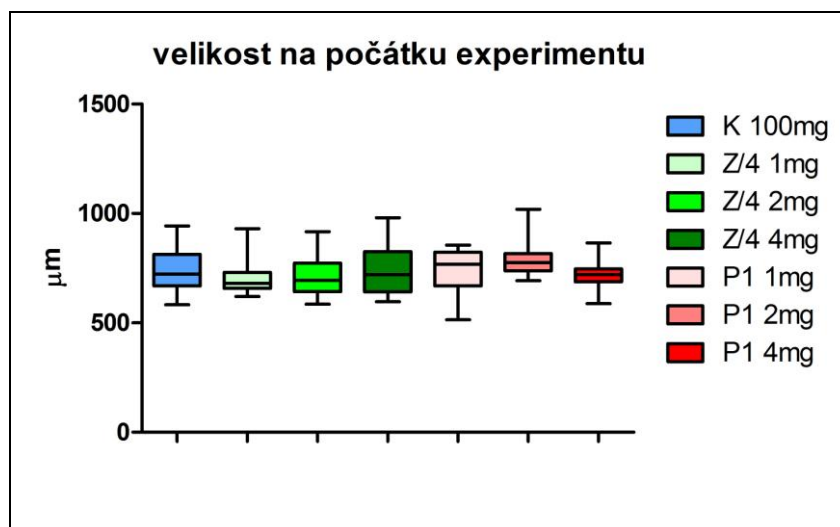
Výsledky jsou zobrazeny pomocí krabicového diagramu (box plot), který nám popisuje:

$x_{(1)}$ – minimum, Q_1 – kvartil, \tilde{x} – medián, Q_3 – kvartil, $x_{(n-1)}$ – maximum, Q_1 - Q_3 =kvartilové rozpětí (viz obr. 6; Zvára 2006).



Obr. 6: Popis krabicového diagramu.

Do pokusných variant jsem použila stejně staré jedince, kteří byli přibližně stejně velcí, viz obr. 7.

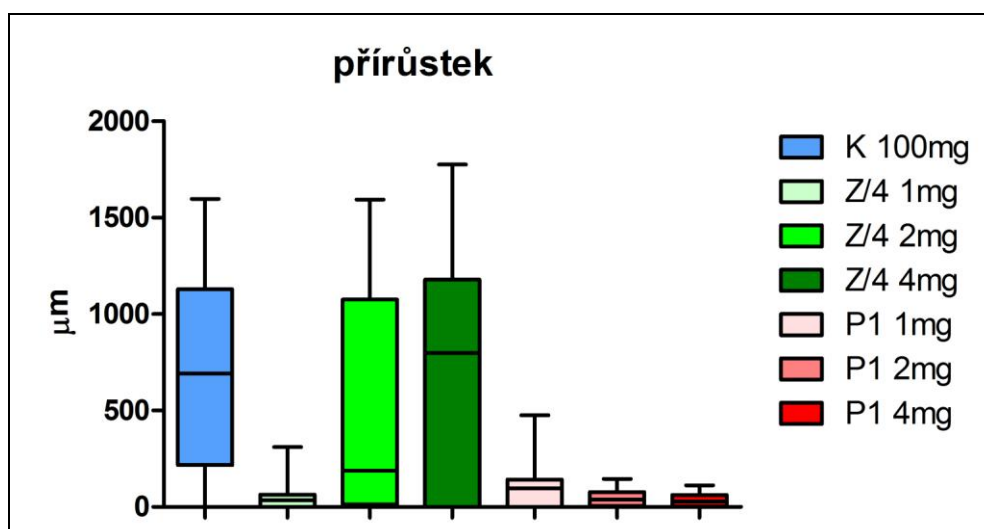


Obr. 7: Počáteční velikost jedinců, kteří byli použiti v experimentu. Vysvětlivky viz obr. 6.

Pro statistickou analýzu byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (ANOVA; data viz příloha tab. 12 – 18). Na parametru „přírůstek“ lze nejlépe pozorovat to, jak se perloočkám dařilo v jednotlivých pokusných variantách. Velikost přírůstku perlooček závisí na kvalitě i kvantitě potravy ($F=20,96$; $p<0,0001$) viz tab. 3.

	n	Min.	Q_1	\tilde{x}	Q_3	Max.	\bar{x}	σ	SE	lower 95% CI	Upper 95% CI
kontrola	28	0	217,3	692,5	1129	1597	697,9	505,1	95,46	502,1	893,8
Z/4_1mg	25	0	0	35	64,5	310	45,36	64,87	12,97	18,58	72,14
Z/4_2mg	28	0	13,75	187	1075	1594	537,6	571,4	108	316	759,1
Z/4_4mg	26	0	0	798,5	1180	1775	744,2	581,1	114	509,5	978,9
P1_1mg	26	0	0	97,5	142,5	476	98,96	104,5	20,5	56,75	141,2
P1_2mg	27	0	6	39	78	146	44,81	43,7	8,409	27,53	62,1
P1_4mg	26	0	4,5	28,5	62,5	113	37,23	34,57	6,779	23,27	51,19

Tab. 3: Statistické hodnoty pro parametr přírůstek. n - počet hodnot, $min.$ - minimum, Q_1 - dolní kvartil, \tilde{x} - medián, Q_3 - 75% percentil, $Max.$ - maximum, \bar{x} - průměr, σ - směrodatná odchylka, SE - střední chyba, $lower\ 95\% CI$ - dolní interval spolehlivosti, $Upper\ 95\% CI$ - horní interval spolehlivosti.



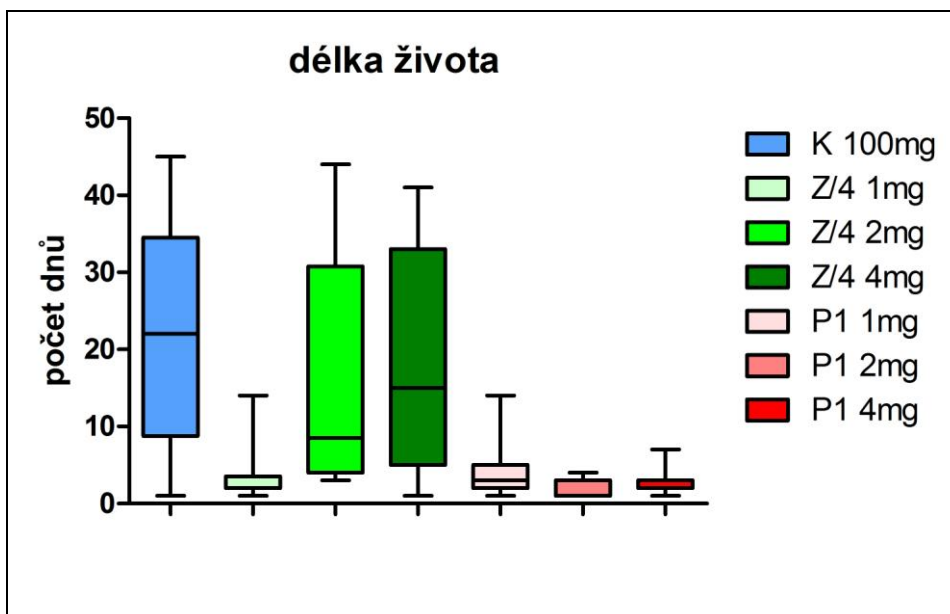
Obr. 7: Krabicový diagram znázorňující přírůstek jedinců u různých potravních skupin. Vysvětlivky viz obr. 6.

Z krabicového grafu (obr. 7) je patrné, že největší přírůstky měli jedinci, kteří byli krmeni řasovou kulturou Z/4 o koncentraci větší než 2 mg C/l. Při malém množství potravy P1 a Z/4 o koncentraci 1mg C/l měli perloočky malé přírůstky, protože uhynuly velmi brzy.

Stejně tak i délka života je závislá na kvalitě i kvantitě potravy ($F=22,57$; $p<0,0001$) viz tab. 4.

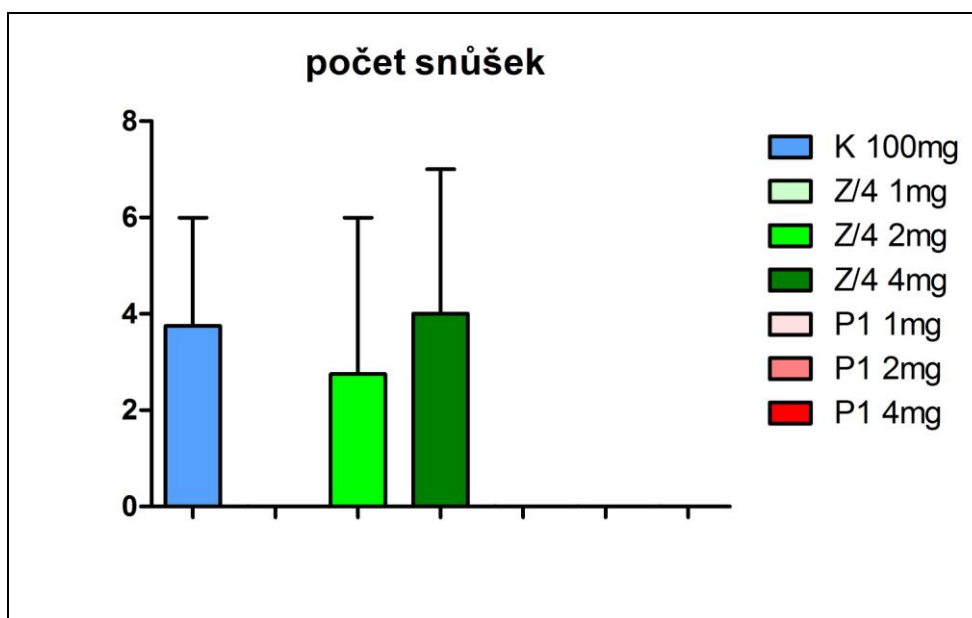
	n	Min.	Q_1	\tilde{x}	Q_3	Max.	\bar{x}	σ	SE	Lower 95% CI	Upper 95% CI
kontrola	28	1	8,75	22	34,5	45	21,79	13,73	2,595	16,46	27,11
Z/4 1mg	25	1	2	2	3,5	14	3,16	2,779	0,5558	2,013	4,307
Z/4 2mg	28	3	4	8,5	30,75	44	15,32	13,48	2,548	10,09	20,55
Z/4 4mg	26	1	5	15	33	41	18,15	14,2	2,786	12,42	23,89
P1 1mg	26	1	2	3	5	14	3,731	2,765	0,5422	2,614	4,848
P1 2mg	27	1	1	1	3	4	1,926	1,141	0,2196	1,475	2,377
P1 4mg	26	1	2	3	3	7	2,731	1,282	0,2515	2,213	3,249

Tab. 4: Statistické hodnoty pro parametr přírůstek. n - počet hodnot, $min.$ - minimum, Q_1 - dolní kvartil, \tilde{x} - medián, Q_3 - 75% percentil, $Max.$ - maximum, \bar{x} - průměr, σ - směrodatná odchylka, SE - střední chyba, $lower\ 95\% CI$ - dolní interval spolehlivosti, $Upper\ 95\% CI$ - horní interval spolehlivosti.



Obr. 8: Délka života u jedinců z různých potravních variant. Vysvětlivky viz obr. 6.

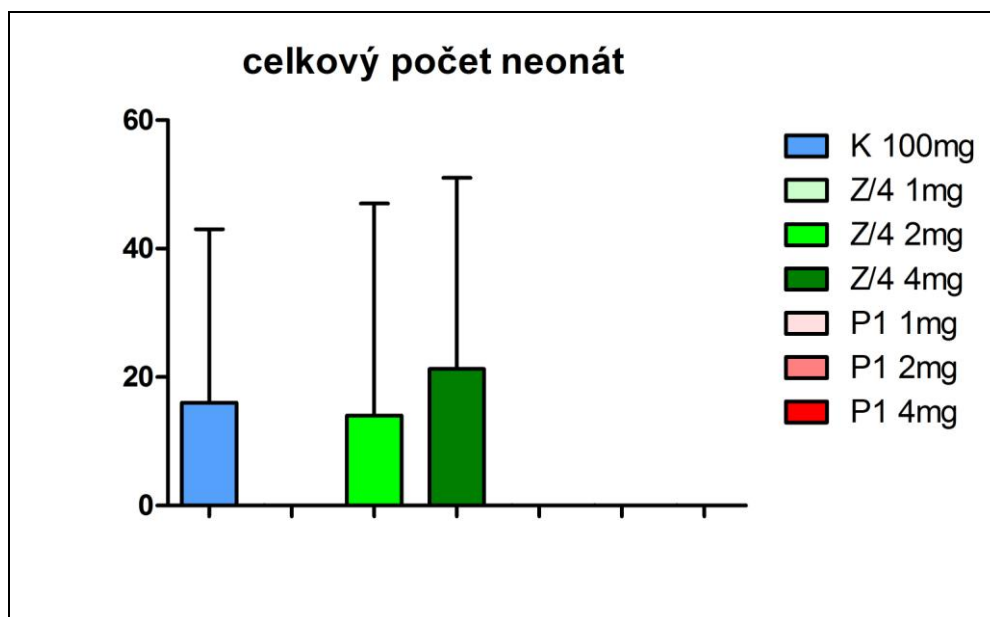
Nejdéle žili jedinci, kteří byli krmeni kulturou Z/4 v množství 2, 4 mg C/l a perloočky z kontroly, a to v průměru 15 dní (Z/4, 2 mg C/l), 18 dní (Z/4, 4 mg C/l) a kontrola 22 dní. Perloočky krmené kulturou z média P1 všech koncentrací a perloočky krmené kulturou z média Z/4 o koncentraci 1 mg C/ žily výrazně kratší dobu – 2 až 3 dny, viz obr. 8.



Obr. 9: Celkový počet snůšek během života jedince. Vysvětlivky viz obr. 6.

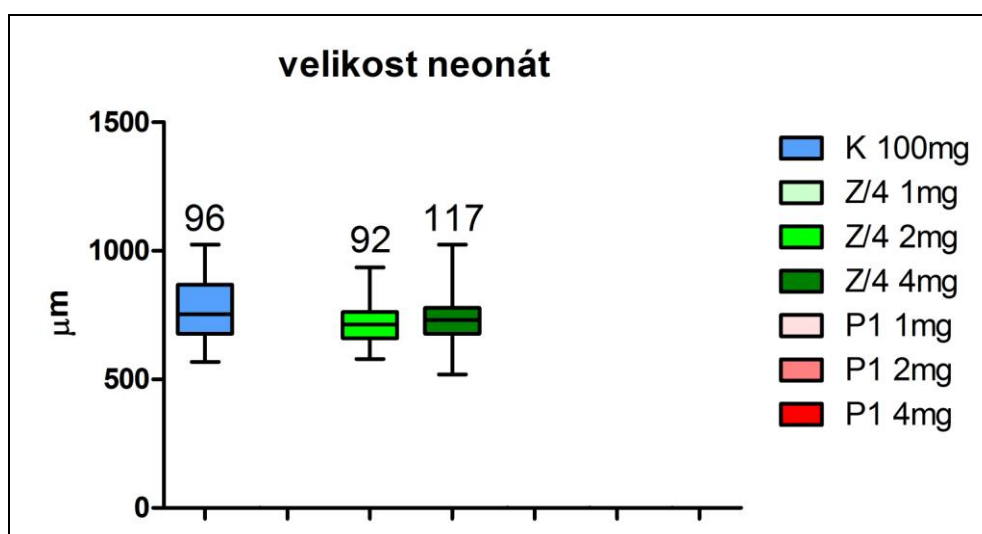
U jedinců krmených řasovou kulturou P1 se ani jednom případě neobjevila vajíčka v plodové komůrce, stejně tak i u jedinců ze Z/4 1mg C/l. Nejvíce snůšek a následně potomků měli jedinci ze Z/4 4 mg C/l a to v průměru 11 neonát ve snůšce viz obr 9. Nejkratší věk první

reprodukce měli jedinci Z/4 4 mg C/l. V průměru v 10 dnech jejich života se v plodové komůrce objevila první vajíčka.



Obr. 10: Počet neonát u různých potravních variant. Vysvětlivky viz obr. 6.

Všeobecně je patrné, že nejvíce *D. longispina* vyhovovaly řasy z media Z/4 a množství rovné nebo větší jak 2 mg C/l. Takto krmení jedinci měli největší přírůstky, žili nejdéle a také se rozmnožovali, na rozdíl od ostatních pokusných variant. Nejvíce neonát měli jedinci z pokusné varianty Z/4 4mg C/l, viz obr. 10 v průměru 11 jedinců na snůšku, viz tab. 5. Neonáty byly ze všech variant přibližně stejně velké. Průměrná velikost se pohybovala kolem 740 μm , viz obr 11.



Obr. 11: velikost neonát v závislosti na kvalitě a kvantitě potravy. Vysvětlivky viz obr. 6.

Tab. 5: Průměrné hodnoty.

		délka života (dny)	počáteční velikost (μm)	konečná velikost (μm)	přírůstek (μm)	věk první reprodukce (dny)	počet snůšek (ks)	počet neonát (ks)	velikost neonát (μm)
Z/4	1 mg C/l	3	699	744	45	0	0	0	0
	2 mg C/l	15	716	1254	537	11	1	8	724
	4 mg C/l	18	739	1484	744	10	2	11	737
P1	1 mg C/l	4	739	838	99	0	0	0	0
	2 mg C/l	2	784	829	45	0	0	0	0
	4 mg C/l	3	719	756	37	0	0	0	0
Z/4 – kontrola	100 mg C/l	22	742	1440	698	14	2	8	770

K vyhodnocení výsledků jsem použila post-hoc analýzu Tukeyův test, který se používá k ověření předpokladu, že vliv jednoho faktoru nezávisí na současné úrovni faktoru druhého (Zvára, 2006).

Tab. 6: signifikantní rozdíly ($P < 0,05$) mezi pokusnými skupinami v rámci parametru „přírůstek“. Post-hoc Tukeyův test.

	kontrola	Z/4 1 mg	Z/4 2 mg	Z/4 4 mg	P1 1 mg	P1 2 mg	P1 4 mg
kontrola							
Z/4 1 mg	yes						
Z/4 2 mg	no	yes					
Z/4 4 mg	no	yes	no				
P1 1 mg	yes	no	yes	yes			
P1 2 mg	yes	no	yes	yes	no		
P1 4 mg	yes	no	yes	yes	no	no	

Signifikantní rozdíly v přírůstku byly mezi perloočkami, které jsem krmila nelimitovanou potravou (kontrola a Z/4 o koncentraci 4 a 2mg C/l) a perloočkami limitovanými ve všech koncentracích ($P < 0,05$). Rozdíly v přírůstku nebyly nalezeny mezi skupinami, které byly krmeny limitovanou potravou ve všech skupinách a Z/4 1mg C/l (viz tab. 6). Na velikosti přírůstku má zásadní vliv právě dostatek kvalitní potravy.

Tab. 7: signifikantní rozdíly ($P < 0,05$) mezi pokusnými skupinami v rámci parametru „délka života“. Post-hoc Tukeyův test.

	kontrola	Z/4 1 mg	Z/4 2 mg	Z/4 4 mg	P1 1 mg	P1 2 mg	P1 4 mg
kontrola							
Z/4 1 mg	yes						
Z/4 2 mg	no	yes					
Z/4 4 mg	no	yes	no				
P1 1 mg	yes	no	yes	yes			
P1 2 mg	yes	no	yes	yes	no		
P1 4 mg	yes	no	yes	yes	no	no	

Zřejmé rozdíly v délce života byly mezi perloočkami, které jsem krmila nelimitovanou potravou (kontrola a Z/4 o koncentraci 4 a 2 mg C/l) a perloočkami limitovanými ve všech koncentracích ($P < 0,05$). Rozdíly v délce života nebyly nalezeny mezi skupinami, které jsem krmila limitovanou potravou ve všech skupinách a Z/4 1 mg C/l a také nebyly jasné rozdíly mezi perloočkami krmenými nelimitovanou potravou o koncentraci 2 a 4 mg C/l a kontrolou, viz tab. 7. Na délce života má zásadní vliv právě dostatek kvalitní potravy.

5. DISKUZE

1. Vliv kvality a kvantity potravy na zooplankton

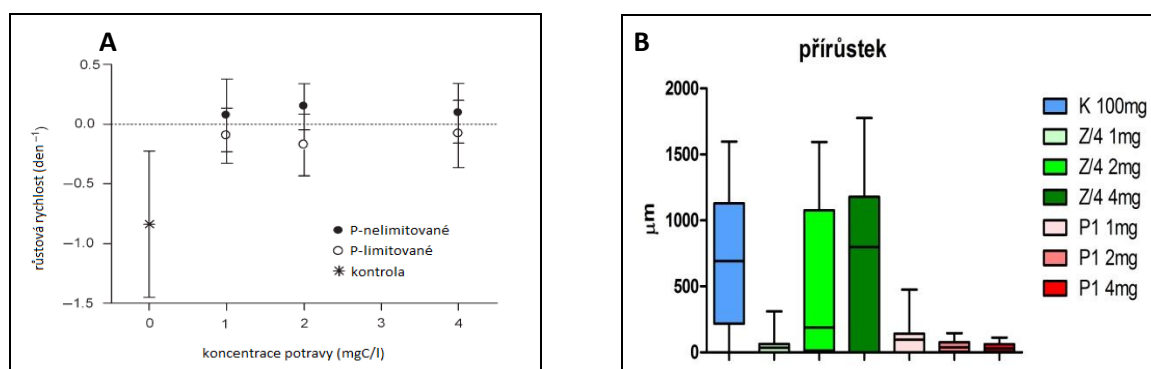
To že, kvalita i kvantita potravy ovlivňují zooplankton, není nic nového. První zmínky o této interakci zmínil J. A. Lotka (1925), který propojil termodynamické zákony s procesy v živé přírodě. Tento koncept se stal pilířem ekologie, stechiometrie (Elser et al., 2000b). V počátcích studia se kvalita dostupné potravy pro herbivorní zooplankton odhadovala podle změřeného množství chlorofylu-*a*. Posléze se začaly používat poměry mezi dusíkem, uhlíkem a fosforem. Poprvé s poměry přišel A. Redfield v roce 1958 a určil tak Redfieldův poměr z mořského sestonu (Sterner et Elser, 2002). Až později R. W. Sterner zavedl pojem ekologická stechiometrie.

Je potvrzeno, že kvalita potravy opravdu ovlivňuje přežívání zooplanktonu, jak perlooček, buchanek, vznášivek, tak i vířníků. Vířníci nejsou schopni získávat minerální látky a živiny přímo z prostředí, proto jsou závislí na složení a množství potravy (Jensen et Verschoor, 2004). Vířníky, jakožto rychle rostoucí organismy, limituje také kvalita potravy, tedy množství fosforu obsaženého v potravě, avšak i kvantita potravy má zásadní vliv na jejich životní historii (Rothhaupt, 1995). Vířníky ovlivňuje i biochemické složení biomasy protist, kteří jsou součástí jejich jídelníčku (Boëchat et Adrian, 2006). To bylo pozorováno u druhu *Keratella cochlearis*. Jako potrava bylo použito řas rodu *Cryptomonas*, které byly kultivovány ve dvou různých podmínkách. Výsledný poměr C:N:P v biomase byl u potravy kvalitní 75:16:1 a nekvalitní 133:16:1. Proto vířníci krmeni nekvalitní potravou měli pomalejší růst než ti, kteří byli krmeni potravou kvalitní. Vířníci měli největší přírůstky, když byli krmeni malým množstvím kvalitní potravy ($p < 0,0001$) avšak když byli krmeni velkým množstvím nekvalitní nebo kvalitní potravy, jejich růst byl stejný, tato reakce u *Daphnia longispina* pozorována nebyla, hynula velmi brzy i když měla dostatek nekvalitní potravy. Tedy kvalita potravy nemá signifikantní význam na rychlost růstu vířníků v momentě, kdy je potravy dostatek, ale ovlivňuje růst, když je potravy nedostatek. Tento efekt je výsledkem proměnlivého prostředí. Vířníci se tak adaptují na fluktuaci koncentrace potravy v prostředí (Ramos-Rodríguez et Conde-Porcuna, 2003).

Štrojsová a kol. provedli feeding experiment na vířnících druhu *Brachionus calyciflorus*, použili limitované (C:P=920±140) a nelimitované (C:P=107±18) medium o 3

koncentracích (1, 2, a 4 mg C/l). Díky jejich výsledkům jsem se rozhodla provést srovnatelný experiment s tím rozdílem, že jsem použila jako pokusný organismus druh *Daphnia longispina* a pozměnila jsem i množství fosforu v limitované verzi tak, aby se co nejvíce výsledný C:P poměr blížil poměru v sestonu Plešného jezera pro otestování konkrétních přírodních podmínek.

U vířníků *Brachionus calyciflorus* krměných nelimitovanou potravou (C:P 107±18) o koncentracích uhlíku 1, 2, a 4 mg C/l byl zaznamenán také pozitivní růst jako u *D. longispina*. S tím rozdílem, že pro perloočku byla koncentrace 1 mg C/l limitující. Další rozdíl byl v případě limitované potravy, u vířníků byl zaznamenán pozitivní růst (Štrojsová et al., 2008), perloočkám tato potrava nevyhovovala, měly jen velmi malé přírůstky, viz obr. 12. Jako kontrolu použili vířníky, kteří nedostávali žádnou potravu, perloočky v mé kontrole byly krmeny Z/4 o koncentraci 100 mg C/l, tedy kvalitní potravou ve velkém nadbytku.

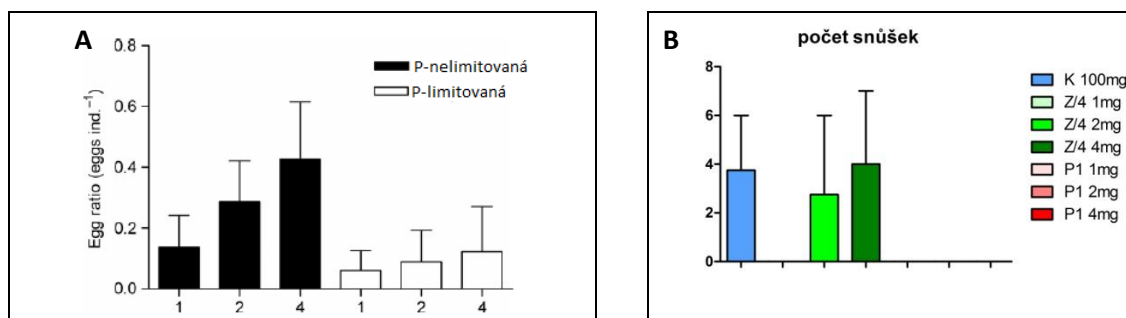


Obr. 12: Vliv kvality a kvantity potravy na růst **A.** vířníka *Brachionus calyciflorus* a **B.** *Daphnia longispina*. **A.** P-nelimitovaná – C:P 107, P-limitovaná – C:P 920, kontrola – bez potravy, **B.** Z/4 – C:P 290, P1 – C:P 1174, K – kontrola Z/4.

Kvalita potravy má signifikantní vliv na přežívání vířníků ($P < 0,0001$), vliv koncentrace řas (množství uhlíku) nebyl signifikantní ($P > 0,05$). Jsou zřejmé rozdíly mezi vířníky z media limitovaného a nelimitovaného, kteří byli krmeni potravou o koncentraci 2 mg C/l (potvrzeno post-hoc Bonferroniho testem; $P < 0,001$), u koncentrací 1 a 4 mg C/l to již potvrzeno nebylo ($P > 0,05$). Vířníci jsou dle očekávání limitováni kvalitou potravy, avšak i při nekvalitní potravě dokážou růst a rozmnožovat se. Rozmnožování bylo signifikantně vyšší u kvalitní potravy než u potravy limitované fosforem a kontroly. Jedinci krmeni nelimitovanou potravou o koncentracích 1 a 4 mg C/l se jasně lišili i v množství vyprodukovaných vajíček (one-way

ANOVA, Tukey test; $P < 0,001$) u limitované potravy tento efekt pozorován nebyl ($P > 0,05$).

Kvalita i kvantita ovlivňují množství vajíček u vířníka *Brachionus calyciflorus* (two-way ANOVA; $P < 0,0001$ a $P < 0,01$), viz obr. 13. Vířníci, kteří byli krmeni potravou chudou na fosfor, měli potomky dříve a měli jich méně než jedinci krmeni kvalitní potravou (Štrojsová et al., 2008). *D. longispina* krmená limitovanou potravou a potravou o malé koncentraci (Z/4 1 mg C/l) se nerozmnožovala, ani netvořila vajíčka.



Obr. 13: Vliv koncentrace potravy (1, 2 a 4mg C/l) na tvorbu vajíček **A.** *Brachionus calyciflorus* **B.** *Daphnia longispina*, **A.** krmených na fosfor bohatou potravou (černé sloupce) a na fosfor chudou potravu (béle sloupce; Štrojsová et al., 2008), **B.** Z/4 – C:P 290, P1 – C:P 1174, K – kontrola Z/4.

Kvalita a kvantita potravy jsou velmi provázané, protože i nadbytek nekvalitní potravy nemusí být vhodnou potravou pro perloočky. Toto jsem potvrdila v pokusu s *Daphnia longispina*. Při nadbytku nekvalitní potravy (P1, 4 mg C/l) perloočky výrazně strádaly, ani v jednom případě se nerozmnožily, stejně tak i při nedostatku kvalitní potravy (Z/4, 1 mg C/l). Jsou patrné rozdíly v přežívání a délce života jedinců, kteří byli krmeni kvalitní potravou v dostatečném množství (kontrola, Z/4 - 2; 4 mg C/l) a jedinců krmených nekvalitní potravou, nebo nedostatečným množstvím potravy (Z/4 - 1 mg C/l, P1 - 1; 2; 4 mg C/l) tyto rozdíly jsou potvrzeny statistickým testem, ($p < 0,05$).

Perloočky krmeny řasami bohatými na fosfor Z/4 se rozmnožily a za svůj život dokonce několikrát na rozdíl od perloček z limitované kultury P1. Perloočky z kontroly a Z/4 2mg C/l měly 6 snůšek, nejvícekrát se rozmnožili jedinci krmeni kulturou Z/4 4 mg C/l (7 snůšek). Kultura P1 byla pro perloočky tak špatná, že se ani v jednom případě nerozmnožily, na rozdíl od vířníků, kteří při dostatku kvalitní potravy měli více potomků než jedinci, kteří byli krmeni dostatečným množstvím na fosfor chudé potravy (Štrojsová et al., 2008).

Existují rozdíly i v rámci skupiny perloček. Perloočky rodu *Bosmina*, pomalu rostoucí zástupce herbivorního zooplanktonu, s poměrem C:P 150 ± 10 mají fosforu v těle méně

perloočka rodu *Daphnia* (C:P 100 \pm 20). *Bosmina* má menší požadavky na fosfor v potravě. Ve všech typech potravy (C:P 150 a C:P 1600, koncentrace 0,2mg C/l a 1mg C/l) *Bosmina leideri* měla přibližně stejné přírůstky a konečné velikosti se příliš nelišily (\pm 2 μ m; Schulz et Sterner, 1999) na rozdíl od *Daphnia longispina*, které měly výrazné rozdíly v přírůstcích \pm 707 μ m. Jak jsem zjistila, nevhodná kvalita potravy pro *D. longispina* je už C:P 1174, na rozdíl od *Bosmina leideri*, kterou poměr C:P 1600 ještě neomezuje (Schulz et Sterner, 1999). Je to dáno rozdílnými životními historiemi, kdy hrotnatky jsou rychle rostoucí organismy a proto mají větší nároky na fosfor v potravě na rozdíl od nosatičky (*Bosmina*).

I v rámci skupiny *Daphnia* jsou rozdíly. *D. pulicaria* a *D. pulex* při feeding experimentu, kdy byly krmeny nedostatkem nekvalitní potravy (C:P 750; 1 mg C/l), měly první vajíčka v plodové komůrce mezi 10-14 dny, v mém případě *Daphnia longispina* krmená řasami z media P1 (C:P 1174) a Z/4 o 1 mg C/l (C:P 290) neměla ani v jednom případě vajíčka. Naopak u jedinců (*D. pulicaria* a *D. pulex*) krmených dostatkem kvalitní potravy se čas první reprodukce zkrátil na 7-9 dnů (Weider et al., 2008). *D. longispina* měla první neonáty z kultury Z/4 mezi 9. - 11. dnem. Tyto reakce souvisí s množstvím fosforu v jejich biomase, *D. longispina* C:P 85; *D. pulicaria* C:P 150.

Je patrné, že environmentální podmínky silně ovlivňují fenotyp potomků zooplanktonních zástupců tak, aby byli lépe adaptováni na prostředí, ve kterém žijí, a ve kterém budou vyrůstat jejich potomci (Frost et al., 2010). V mém případě se perloočky krmené chudou potravou vůbec nerozmnožily. Z těch, které se rozmnožily, jich bylo nejvíce ve variantě s dostatkem kvalitní potravy (Z/4, 4 mg C/l).

2. Jaký je možný dopad na návrat druhů do habitatu, který se zotavuje z poškození

Jak už jsem zmínila výše, kvalita i kvantita potravy ovlivňují životní historii konzumenta, proto jsem se ve svém pokusu chtěla podívat na vliv potravy na konzumenta trochu z jiného úhlu a to z hlediska toho, zda může málo kvalitní potrava inhibovat osidlování lokalit. Jako modelovou lokalitu jsem použila Plešné jezero, kde perloočky vymřely díky acidifikaci na Šumavě. V současnosti se chemismus jezer výrazně zlepšil, jezera se zotavují, a také byl zaznamenán návrat zooplanktonu do některých jezer. Avšak jak se ukázalo, potrava, které je v Plešném jezeře zdánlivě dostatek (množství chlorofylu *a* = 419 μ g C/l), je silně

limitovaná fosforem. V Plešném jezeře je C:P poměr 1396 u ostatních jezer se pohybuje kolem 205 (Nedbalová et al. 2006). Ačkoli perloočky druhu *Daphnia longispina* v krátkodobém (10 - 15 dní) experimentu ve vodě z Plešného jezera přežívaly velmi dobře, při pokusné repatriaci nepřežila do další sezóny ani jedna perloočka (Kohout et Fott, 2004).

Ze zjištěných C:P poměrů ze sestonu jezera (C:P 1392) lze usuzovat, že tento poměr představuje pro druh *Daphnia longispina* silnou limitaci fosforem, a tak se stává nevyhovující. Proto jsem připravila medium P1 (C:P poměr 1174), které simuluje poměr v jezeře. Uvádí se, že prahový poměr (N:P) pro perloočky je 300 (Urabe et al., 1997) Zdá se, že limitace fosforem tedy opravdu může blokovat návrat druhů do jezer.

Dobrym příkladem vývoje společenstva acidifikovaných ekosystémů jsou norská jezera. Během období acidifikace v 70. letech kleslo pH o půl stupně (z 5,9 na 5,4). Tento pokles se ustálil, protože jezera mají malou pufrací kapacitu, a to vzhledem ke geologickému složení, které je převážně ze žuly. Díky okyselení postupně vymizely ryby, larvy dvoukřídlých rodu *Chaoborus* i perloočky. S postupnou acidifikací se společenstvo jezer změnilo od ekosystému regulovaného rybami (okoun, pstruh) na společenstvo ovládané bezobratlými predátory. Především s dominantními buchankami rodu *Heterocope* a klešťankami (Corixidae; Nilssen, 1980). Za posledních 20 let se depozice dusíku i síry snížily o 60 %. Při průběžném sledování skandinávských jezer byl zaznamenán úbytek sulfátu v 69 % sledovaných jezer (celkové množství pozorovaných jezer 344), v 90. letech došlo k největšímu ozdravení (Skjelkvåle et al., 2001). Jezera začínají po snižování depozice měnit i svou biotu, ale o uzdravení se mluvit ještě nedá. Silně acidifikovaná jezera (pH<6) se z velmi poškozeného stavu dostaly do stavu neutrálního (pH=6), to ještě není stav úplného ozdravení, avšak už jsou zaznamenány návraty zooplanktonních druhů (Holt et Yan, 2003).

Dalším možným vysvětlením, proč se perloočky nemohou navrátit do jezer postižených acidifikací je, že je na ně vyvíjen vysoký predáční tlak. V acidifikovaných jezerech se zvyšuje množství hliníku, první organismy, které na toto zvýšení reagují, jsou ryby, reaktivní hliník v rozpuštěné formě se na dobře prokysličených žábrách vysráží na formu nerozpustnou a tím se ryby udusí (Veselý et Hruška, 1998). K úhynu ryb došlo v horských potocích Krkonoš, Jeseníků, Jizerských hor, Orlických hor, Krušných hor a v jezerech na Šumavě, v Tatrách, v Alpách, Skandinávii atd. Již v počátcích acidifikace na Šumavě došlo

k úhynu pstruha potočního (*Salmo trutta*), oligotrofizaci a tedy ke zvýšení průhlednosti, úhynu pelagického zooplanktonu a rapidnímu snížení množství bentosu (larvy jepic a pošvatek Pražáková et al., 2006). Ryby jako vrcholoví predátoři jsou nahrazeni bezobratlými organismy. V šumavských jezerech to byly buchanky (*Cyclops*) a klešťanky (*Corixa*, *Glaenocorisa propinqua*), dále pak to mohou být i koretry (*Chaoborus*). Je prokázáno, že rod *Chaoborus* dokáže velmi účinně regulovat zooplankton, velikost populaci i velikost organismů (Neill, 1981).

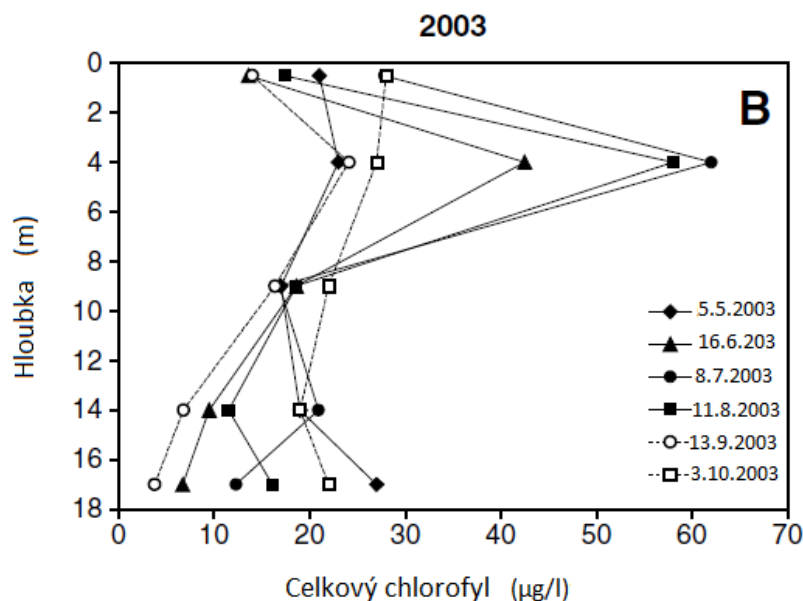
V Plešném jezeře je bezobratlých predátorů – klešťánek - velké množství, je to jeden z možných důvodů, proč se tam perloočky neuchytí. V blízkosti Plešného jezera se nachází lipenská přehrada, která by mohla být zásobárnou inokula vhodných druhů perlooček. Prostřednictvím divokých kachen by se perloočky mohly dostat do jezera, ale pravděpodobně jich je tak malé množství, že se nestačí namnožit na tak velkou populaci, aby mohly vzdorovat predačnímu tlaku. Jsou prokázány případy, kdy bezobratlí predátoři – koretra (*Chaoborus*) opravdu dokážou regulovat zooplankton v oligotrofních nádržích bez ryb. Koretry zooplankton regulují v letních měsících a to kvůli teplotě vody a větší denzitě potravy (Neill, 1981).

Příkladem toho, že jezera se mohou ozdravit a oživit původní faunou je návrat pelagiální perloočky *Ceriodaphnia quadrangula* do Černého jezera, která díky acidifikaci vymizela z pelagiálu. Návrat nastal již v roce 1997 (Vrba et al., 2004). *Ceriodaphnia* byla nalezena i v Prášílském jezeře. Od roku 2002 se hojně vyskytovala v litorálu a vzácně i v pelagiálu. Litorální perloočky mohly v Černém jezeře přežít díky tomu, že se živí převážně nárostovou potravou, která je bohatší na živiny, než řasy v pelagiálu.

Právě Plešné jezero bylo jedno z jezer nejvíce postižených acidifikací. V roce 1994 bylo stanoveno množství hliníku, které přesahovalo Al_T 0,5 mg/l, díky nízkému pH se dá předpokládat převažující výskyt iontového hliníku. Plešné jezero má největší přísun fosforu z povodí v porovnání s ostatními šumavskými jezery. Ač bylo fosforu v jezeře dostatek, nebyl přímo dostupný organismům, protože při $pH < 5$ jsou částečně blokovány extracelulární fosfatázy a při $pH > 5$ je fosfor vázán hliníkem a ze sloupce odstraňován sedimentací (Kopáček et al., 2011) V dalších letech koncentrace Al_T klesala a to díky snížené depozici S, N a vzrostlo

pH a proto se zvýšilo množství fytoplanktonu, protože se fosfor stal řasám dostupný (Vrba et al. 2004). Došlo tak k znatelnému ozdravení jezera.

Podle tradičního měření chlorofylu *a* mají perloočky potravy dost, viz obr. 14:



Obr. 14: stratifikace chlorofylu během roku 2003 (Nedoma et Nedbalová, 2006).

Nejvíce je v jezeře *Monoraphidium dybowskii* a vláknitých sinic (Nedoma et Nedbalová, 2006). Řas je v jezeře dostatek, jejich C:P poměr je 1392, když poměr srovnáme s pokusnou variantou P1, která měla C:P 1174 je vidět, že tato potrava je pro *D. longispina* nevyhovující. Z výsledků z pokusu je zřejmé, že při takové potravě perloočky nemohou žít ani přežít, ač mají řas dostatek (4 mg C/l)

Proto lze usuzovat, že k návratu *Daphnia longispina* nedošlo právě kvůli nevyhovujícímu stechiometrickému poměru C:N:P v biomase řas v Plešném jezeře.

ZÁVĚR

Laboratorní experiment s *Daphnia longispina* potvrdil, že kvalita i kvantita potravy ovlivňuje životní historii perloočky. Ke krmení perlooček jsem použila (*Monoraphidium dybowskii*), které se hojně vyskytuje v Plešném jezeře. Media pro řasové kultury jsem připravila tak, aby napodobovaly reálné přírodní podmínky. Nelimitované řasy z media Z/4 měly v biomase (C:P poměr 290) a limitované z media P1 (C:P 1174). Řasy z limitovaného media P1 měli v biomase C:P poměr přibližně stejný jako řasy z Plešného jezera (C:P 1392). Dále jsem perloočky krmila řasami o 3 koncentracích (1, 2 a 4 mg C/l).

Perloočky krmené kvalitní potravou (nelimitovaná fosforem, Z/4), měly větší přírůstky (průměrné o 600 μm), množství potomků (P1 se nerozmnožovali), délku života. Perloočky žily 5 krát déle než jedinci, které jsem krmila řasami z limitovaného medi P1. Jedinou výjimku tvořila skupina, která byla krmena kvalitní potravou, ale o malé koncentraci (1 mg C/l), nerozmnožili se a přežívali velmi krátkou dobu (průměrně 3 dny). Perloočkám limitovaná potrava nevyhovovala ani v případě, kdy bylo potravy nadbytek (4 mg C/l).

Díky výsledkům z experimentu se mi potvrdila domněnka, že potravní nabídka v Plešném jezeře znemožňuje návrtu *Daphnia longispina*. V jezeře je řas (*Monoraphidium dybowskii*) dostatek avšak mají v biomase malý C:P poměr (1392) a tím se řasy stávají pro perloočky nevyhovující.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- ANDERSEN, T. et HESSEN, D. O., (1991): Carbon, nitrogen, and phosphorus content of freshwater zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 36(4): 807-814.
- ANTUNES, S. C., CASTRO, B. B. et GONÇALVES, F. (2003): Chronic responses of different clones of *Daphnia longispina* (field and *ephippia*) to different food levels. *Acta Oecologica*, 24: S325-S332.
- ACHARYA, K., KYLE, M. et ELSER, J. J. (2004): Biological stoichiometry of *Daphnia* growth: An ecophysiological test of the growth rate hypothesis. *Limnol. Oceanogr.*, 49(3): 656-665.
- ALMER, B., DICKSON, W., EKSTRÖM, C., HÖRNSTRÖM, E. et MILLER, U. (1974): Effects of acidification on Swedish lakes. *AMBIO*, 3(1): 30-36.
- BOËCHAT, I. G. et ADRIAN, R. (2006): Evidence for biochemical limitation of population growth and reproduction of the rotifer *Keratella quadrata* fed with freshwater protist. *J. Plankton Res.*, 28(11): 1027-1038.
- BRENDELBERGER, H. (1991): Filter mesh size of cladocerans predicts retention efficiency of bacteria. *Limnol. Oceanogr.*, 36(5): 884-894.
- BRÖNMARK, CH. et HANSSON, L. A. (2005): The biology of lakes and ponds-2nd ed. *Oxford University Press, University of Oxford*, str. 285.
- BURNS, C. W. (1968): The relationship between body size of filter-feeding cladocera and the maximum size of particle ingested. *Limnol. Oceanogr.* 13(4): 675-678.
- CARRILLO, P., RECHE, I. et CRUZ-PIZARRO, L. (1996): Intraspecific stoichiometric variability and the ratio of nitrogen to phosphorus resupplied by zooplankton. *Freshwater Biol.*, 36: 363-374.
- CARRILLO, P., VILLAR-ARGAIZ, M. et MEDINA-SÁNCHEZ, J. M. (2001): Relationship between N:P ratio and growth rate during the life cycle of calanoid copepods: An *in situ* measurement. *J. Plankton Res.*, 23(5): 537-547.
- COWLES, T. J. et STRICKLER, J. R. (1983): Characterization of feeding activity patterns in the planktonic copepod *Centropages typicus* Kroyer under various food conditions. *Limnol. Oceanogr.* 28(1): 106-115.
- CROSS, W. F., BENSTEAD, J. P., FROST, P. C. et THOMAS, S. A. (2005): Ecological stoichiometry in freshwater benthic systems: recent progress and perspectives. *Freshwater Biol.*, 50: 1895-1912.
- DeMOTT, W. R., GULATI, R. D. et SIEWERTSEN, K. (1998): Effects of phosphorus-deficient diets on the carbon and phosphorus balance of *Daphnia magna*. *Limnol. Oceanogr.*, 43(6): 1147-1161.
- DeMOTT, W. R. et PAPE, B. J. (2005): Stoichiometry in an ecological context: testing for links between *Daphnia* P-content, growth rate and habitat preference. *Oecologia*, 142: 20-27.
- ELSER, J. J., DOBBERFUHL, D. R., MacKAY, N., A. et SCHAMPEL, J. H. (1996): Organism size, life history, and N:P stoichiometry. *Bioscience*, 46(9): 674-684.
- ELSER, J. J., ACHARYA, K., KYLE, M., COTNER, J., MAKINO, W., MARKOW, T., WATTS, T., HOBBIIE, S., FAGAN, W., SCHADE, J., HOOD, J. et STERNER, R. W. (2003): Growth rate-stoichiometry couplings in diverse biota. *Ecol. Lett.*, 6: 936-943.

- ELSER, J. J., STERNER, R. W., GALFORD, A. E., CHRZANOWSKI, T. H., FINDLAY, D. L., MILLS, K. H., PATERSON, M. J., STANTON, M. P., SCHINDLER, D. W. (2000a): Pelagic C:N:P Stoichiometry in a eutrophied lake: responses to a whole-lake food-web manipulation. *Ecosystems*, 3: 293-307.
- ELSER, J. J., STERNER, R. W., GOROKHOVA, E., FAGAN, W. F., MARKOW, T. A., COTNER, J. B., HARRISON, J. F., HOBBIE, S. E., ODELL, G. M. et LAWRENCE, J. W. (2000b): Biological stoichiometry from genes to ecosystems. *Ecol. Lett.*, 3: 540-550.
- ELSER, J. J. et URABE, J. (1999): The stoichiometry of consumer-driven nutrient recycling: theory, observations, and consequences. *Ecology*, 80(3): 735-751.
- EXLEY, C. (2003): A biogeochemical cycle for aluminium? *J. Inorg. Biochem.*, 97(1): 1-7.
- FROST, P. C., EBERT, D., LARSON, J. H., MARCUS, M. A., WAGNER, N. D. et ZALEWSKI, A. (2010): Transgenerational effects of poor elemental food quality on *Daphnia magna*. *Oecologia*, 162: 865-872.
- GELLER, W. et MÜLLER, H. (1981): The filtration apparatus of Cladocera: filter mesh-sizes and their implications on food selectivity. *Oecologia* 49: 316-321.
- HECKEY, R. E., CAMPBELL, P. et HENDZEL, L. L. (1993): The stoichiometry of carbon, nitrogen and phosphorus in particulate matter of lakes and oceans. *Limnol. Oceanogr.*, 38(4): 709-724.
- HESSEN, D. O. (1992): Nutrient element limitation of zooplankton production. *The American Naturalist*, 140(5): 799-814.
- HESSEN, D. O. (1997): Stoichiometry in food webs- Lotka revisited. *Oikos*, 79(1): 195-200.
- HOLT, C. et YAN, N. D. (2003): Recovery of Crustacean Zooplankton Communities from Acidification in Killarney Park, Ontario, 1971–2000: pH 6 As a Recovery Goal. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 32(3): 203-207.
- HOŘCKÁ, Z., STUHLÍK, E., HUDEC, I., ČERNÝ, M. et FOTT, J. (2006): Acidification and the structure of crustacean zooplankton in mountain lakes: The Tatra Mountains (Slovakia, Poland). *Biologia*, 61(18): S121-S134.
- JENSEN, T. C. et VERSCHOOR, A. M. (2004): Effects of food quality on life history of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Freshwater Biol.*, 49(9): 1138-1151.
- KAŇA, J. et KOPÁČEK, J. (2005): Impact of soil sorption characteristics and bedrock composition on phosphorus concentrations in two bohemian forest lakes. *Water, Air, and Soil Pollution*, 173: 243-259.
- KOHOUT, L. et FOTT, J. (2004): Obnova zooplanktonu Plešného jezera pomocí repatriace dvou klíčových druhů. *Aktuality šumavského výzkumu II*, 172-175.
- KOPÁČEK, J., HEJZLAR, J., VRBA, J. et STUHLÍK, E. (2011): Phosphorus loading of mountain lakes: Terrestrial export and atmospheric deposition. *Limnol. Oceanogr.*, 56(4): 1343-1354.
- LAMPERT, W. (2006): *Daphnia*: model herbivore, predator and prey. *Pol. J. Ecol.*, 54(4): 607-620.
- LAMPERT, W. et BRENDENBERGER, H. (1996): Strategies of phenotypic low-food adaptation in *Daphnia*: Filter screens, mesh sizes, and appendage beat rates. *Limnol. Oceanogr.* 41(2): 216-223.
- LELLÁK, J. et KUBÍČEK, F. (1991): Hydrobiologie, *Karolinum*, str. 257.
- MAIN, T. M., DOBBERFUHL, D. R. et ELSER, J. J. (1997): N:P stoichiometry and ontogeny of crustacean zooplankton: A test of the growth rate hypothesis. *Limnol. Oceanogr.*, 42(6): 1474-1478.

- MAJER, V., KOPÁČEK, J. et VESELÝ, J. (2001): Modelování budoucího vývoje chemismu Plešného jezera. *Aktuality šumavského výzkumu*, 60-62.
- NEDBALOVÁ, L., VRBA, J., FOTT, J., KOHOUT, L., KOPÁČEK, J., MACEK, M. et SOLDÁN, T. (2006): Biological recovery of the Bohemian Forest lakes from acidification. *Biologia*, 61(20): S453-S465.
- NEDOMA, J. et NEDBALOVÁ, L. (2006): Chlorophyll content of Plešné Lake phytoplankton cells studies with image analysis. *Biologia*, 61(20): S491-S498.
- NEILL, W. E. (1981): Impact of *Chaoborus* predation upon the structure and dynamics of a crustacean zooplankton community. *Oecologia*. 1981(48): 164-177.
- NILSSEN, J.P. (1980): Acidification of a small watershed in southern Norway and some characteristics of acidic aquatic environments. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 65(2): 177-207.
- PETRUSEK, A., HOBĚK, A., NILSSEN, J. P., SKAGE, M., ČERNÝ, M., BREDE, N. et SCHWENK, K. (2008): A taxonomic reappraisal of the european *Daphnia longispina* complex (Crustacea, Cladocera, Anomopoda). *Zoologica Scripta*, 37(5): 507-519.
- POP, M. (1991): Mechanism of the filtering area adaptation in *Daphnia*. *Hydrobiologia*, 225(1): 169-176.
- PORTER, K. G., FEIG, Y. S. et VETTER, E. F. (1983): Morphology, flow regimes, and filtering rates of *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, and *Bosmina* fed natural bacteria. *Oecologie*, 58(2): 156-163.
- PRAŽÁKOVÁ, M., VESELÝ, J., FOTT, J., MAJER, V. et KOPÁČEK, J. (2006): The long-term succession of cladoceran fauna and palaeoclimate forcing: A 14,600 year record from Plešné Lake, the Bohemian Forest. *Biologia*, 61(20): S387-S399.
- ROTHHAUPT, K. O. (1995): Algal nutrient limitation affects rotifer growth but not ingestion rate. *Limnol. Oceanogr.* 40: 1201-1208.
- RAMOS-RODRÍGUEZ, E. et CONDE-PORCUNA, J. M. (2003): Nutrient limitation on a planktonic rotifer: Life history consequences and starvation resistance. *Limnol. Oceanogr.*, 48(2): 933-938.
- SACHEROVÁ, V. (1998): Vliv koncentrace a typu potravy na vybrané filtrační struktury dvou druhů perlooček (Crustacea: Cladocera). *Disertační práce*.
- SHIMIZU, Y. et URABE, J. (2008): Regulation of phosphorus stoichiometry and growth rate of consumers: theoretical and experimental analyses with *Daphnia*. *Oecologia*. 155: 21-31.
- SCHULZ, K. L. et STERNER, R. W. (1999): Phytoplankton phosphorus limitation and food quality for *Bosmina*. *Limnol. Oceanogr.* 44(6): 1549-1556.
- SKJELKVÅLE, B.L., MANNIO, J., WILANDER, A. et ANDERSEN, T. (2001): Recovery from acidification of lakes in Finland, Norway and Sweden 1990-1999. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions*, 5: 3(327-338).
- SOMMER U. et SOMMER, F. (2006): Cladocerans versus copepods: the cause of contrasting top-down controls on freshwater and marine phytoplankton. *Oecologia*, 147: 183-194.
- STERNER, R. W. (1993): *Daphnia* growth on varying quality of *Scenedesmus*: mineral limitation of zooplankton. *Ecology*, 74(8): 2351-2360.
- STERNER, R. W. (1997): Modelling interaction of food quality and quantity in homeostatic consumers. *Freshwater Biol.*, 38: 473-481.
- STERNER, R. W. (2004): A one-resource "Stoichiometry"? *Ecology*, 85(7): 1813-1816.

- STERNER, R. W., (2008): On the phosphorus limitation paradigm for lakes. *Internat. Rev. Hydrobiol.* 93: 433-445.
- STERNER, R. W., CLASEN, J., LAMPERT, W. et WEISSE, T. (1998): Carbon:phosphorus stoichiometry and food chain production. *Ecol. Lett.*, 1: 146-150.
- STERNER, R. W. et ELSER, J. J. (2002): Ecological stoichiometry the biology of elements from molecules to the biosphere. *Princeton University Press, Princeton.* str. 439.
- STERNER, R. W., ELSER, J. J. et HESSEN, D. O. (1992): Stoichiometric relationships among producers, consumers and nutrient cycling in pelagic ecosystems. *Biochemistry*, 17: 49-67.
- STERNER, R. W., HAGEMEIERS, D. D., SMITH, W. L. et SMITH, R. F. (1993): Phytoplankton nutrient limitation and food quality for *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 38(4): 857-871.
- STERNER, R. W. et HESSEN, D. O. (1994): Algal nutrient limitation and the nutrition of aquatic herbivores. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 25: 1-29.
- STERNER, R. W., et SCHWALBACH, M. S. (2001): Diel integration of food quality by *Daphnia*: Luxury consumption by a freshwater planktonic herbivore. *Limnol. Oceanogr.* 46(2): 410-416.
- STRAŠKRABOVÁ, V., CALLIERI, C., CARRILLO, P., CRUZ-PIZARRO, L., FOTT, J., HARTMAN, P., MACEK, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J., M. et NEDOMA, J., ŠIMEK, K. (1999): Investigations on pelagic food webs in mountain lakes - aims and methods. *J. Limnol.*, 58(2): 77-87.
- STRAŠKRABOVÁ, V., FOTT, J., HARTMAN, P., MACEK, M., NEDOMA, J., ŠIMEK, K. et VRBA, J. (2000): Structure of pelagic food webs in low-alkalinity lakes-forested and alpine catchments. *Silva Gabreta*, vol. 4: 199-212.
- ŠTROJISOVÁ, M., NEDOMA, J., SEĎA, J. et VRBA, J. (2008): Diet quality impact on growth, reproduction and digestive activity in *Brachionus calyciflorus*. *J. Plankton Res.*, 30(10): 1123-1131.
- TESSIER, A. J. et CONSOLATTI, N. L. (1991): Resource quantity and offspring quality in *Daphnia*. *Ecology*, 72(2): 468-478.
- URABE, J., CLASEN, J., STERNER, R. W. (1997): Phosphorus limitation of *Daphnia* growth: Is it real? *Limnol. Oceanogr.*, 42(6): 1436-1443.
- URABE, J., STERNER, R. W. (2001): Contrasting effects of different types of resource depletion on life-history traits in *Daphnia*. *Functional Ecology*, 15: 164-174.
- VESELÝ, J. et HRUŠKA, J. (1997): Trends in water chemistry of acidified Bohemian lakes from 1984 to 1995: II. Trace elements and aluminium. *Water, Air and Soil Pollution*, 108: 425-443.
- VRBA, J., FOTT, J., KOHOUT, L. et KOPÁČEK, J. (2004): Současné zotavování acidifikovaných jezer na Šumavě. *Aktuality šumavského výzkumu II.* 99-103.
- VRBA, J., KOPÁČEK, J., FOTT, J., KOHOUT, L., NEDBALOVÁ, L., PRAŽÁKOVÁ, M., SOLDÁN, T. et SCHAUMBURG, J. (2003): Long-term studies (1871-2000) on acidification and recovery of lakes in the Bohemian Forest (central Europe). *The Science of the Total Environment*, 310: 73-85.
- VRBA, J. (2012) Osobní sdělení
- WANG, H., JIANG, L. et WEITZ, J. S. (2009): Bacterivorous grazers facilitate organic matter decomposition: a stoichiometric modeling approach. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 69: 170-179.

- WEIDER, L. J., JEYASINGH, P. D. et LOOPER, K. G. (2008): Stoichiometric differences in food quality: impacts on genetic diversity and the coexistence of aquatic herbivores in a *Daphnia* hybrid complex. *Oecologia*, 158: 47-55.
- ZEHNDER, A. A. et STAUB, R. (1961): Ernährungphysiologisch-autökologische Untersuchung an den planktonischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. *Schweiz. Z. Hydrol.*, 23: 82-198.
- ZVÁRA, K. (2006): Biostatistika. *Karolinim*. str 213.

PŘÍLOHY

Tab. 8: Seznam fytoplanktonu pozorovaný během roku 1999 (Vrba et al., 2003).

	Plešné jezero	Prášílské jezero
Cyanobacteria:		
<i>Limnothrix</i> sp.	XX	X
<i>Pseudanabaena</i> sp.	XX	X
Dinophyceae:		
<i>Gymnodinium uberrimum</i> (Allman) Kofoid et Sweezy	XX	XX
<i>Gymnodinium</i> sp.	X	X
<i>Katodinium bohemicum</i> (Fott) Litvinenko	X	0
<i>Peridinium umbonatum</i> Stein	XX	XX
Cryptophyceae:		
<i>Cryptomonas erosa</i> Ehrenberg	X	XX
<i>Cryptomonas gracilis</i> Skuja	X	X
<i>Cryptomonas marssonii</i> Skuja	X	X
Chrysophyceae:		
<i>Bitrichia ollula</i> (Fott) Bourrelly	X	X
<i>Dinobryon</i> spp.	XX	XX
<i>Mallomonas</i> sp.	X	X
<i>Ochromonas</i> sp. (large)	X	X
<i>Ochromonas</i> sp. (small)	X	X
<i>Spiniferomonas</i> sp.	X	X
<i>Synura echinulata</i> Korschikov	X	X
Xanthophyceae:		
<i>Isthmochloron trispinatum</i> (W. et G.S. West) Skuja	X	X
Chlorophyta:		
<i>Carteria multifilis</i> (Fres.) DillqC. radiosa Korschikov	X	X
<i>Chlamydomona</i> ssp.	X	X
<i>Chlorogonium fusiforme</i> Matwienko	X	X
<i>Chloromonas angustissima</i> (Ettl) Gerl. et Ettl	X	X
<i>Koliella corcontica</i> Hind.	X	X
<i>Monoraphidium dybowskii</i> (Wolosz.) Hind. et Kom.-Legn.	XX	X
x-přítomní zástupci		
(x)-pouze 1-2 zástupci ve vzorku		
xx-důležitý zástupce zooplanktonu		
0-absence druhu		

Tab. 9: Výskyt zástupců vířníků, perlooček a klanonožců v Plešném a Prášílském jezeře během let 1997-2000 (Vrba et al., 2003).

	Plešné jezero	Prášílské jezero
Vířníci (pouze pelagičtí zástupci):		
<i>Bdelloidea g. sp.</i>	x	x
<i>Brachionus sericus</i> Rouss.**	x	0
<i>Collotheca pelagica</i> (Rouss.)**	x	x
<i>Erignatha clastopis</i> (Gosse)	x	x
<i>Euchlanis dilatata</i> (Ehr.)	x	x
<i>Keratella serrulata</i> (Ehr.)**	xx	x
<i>Lecane ligona</i> (Dunl.)	(x)	(x)
<i>Lepadella acuminata</i> (Ehr.)	x	0
<i>Microcodon clavus</i> Ehr.***	x	x
<i>Monommata sp.</i>	0	(x)
<i>Monostyla lunaris</i> (Ehr.)	x	x
<i>Monostyla pyriformis</i> (Dad.)	0	x
<i>Polyarthra remata</i> Skor.**	0	xx
<i>Synchaeta oblonga</i> Ehr.**	xx	xx
<i>Trichocerca spp.</i>	(x)	x
<i>Trichotria tetractis</i> (Ehr.)		x
perloočky (pelagičtí i litorální zástupci):		
<i>Acantholeberis curvirostris</i> (O.F.M.)	0	x
<i>Acroperus harpae</i> Baird	x	x
<i>Alona affinis</i> (Leydig)	x	x
<i>Alona guttata</i> Sars	x	x
<i>Alonella excisa</i> (Fisch.)	x	x
<i>Alonopsis elongata</i> (Sars)	0	(x)
<i>Daphnia longispina</i> (O.F.M.)**	0	xx
<i>Polyphemus pediculus</i> L.	0	x
klanonožci (pelagičtí i litorální zástupci):		
<i>Acanthocyclops vernalis</i> (Fisch.)***	xx	0
<i>Cyclops abyssorum</i> Sars**	0	xx
<i>Diacyclops nanus</i> (Sars)	x	x
<i>Eucyclops serrulatus</i> (Fisch.)	x	(x)
<i>Heterocope saliens</i> (Lillj.)***	xx	0
<i>Macrocyclus fuscus</i> (Jur.)	0	x
<i>Paracyclops fimbriatus</i> (Fisch.)	(x)	0
**-typický pelagický zástupce		
***-litorálně pelagický zástupce		
x-přítomní zástupci		
(x)-pouze 1-2 zástupci ve vzorku		
xx-důležitý zástupce zooplanktonu		
0-absence druhu		

MEDIA:

Z/4

Medium Z/4 je 4x zředěné medium Z.

Roztok č.

1	NaNO ₃	23,35 g/500 ml
2	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	2,95 g/500 ml
3	K ₂ HPO ₄	1,55 g/500 ml
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,25 g/500 ml
5	Na ₂ CO ₃	1,05 g/500 ml
6	Fe EDTA	
7	Roztok mikroprvků (Gaffron)	

Do 2 l nádoby jsem smíchala 5 ml roztoků č. 1-5, 100 µl roztoku č. 6 a 40 µl roztoku č. 7. Do 2 litrů jsem roztok doplnila deionisovanou vodou.

P1

Medium P1 je modifikované medium Z/4, roztok č. 3 má jiné množství K₂HPO₄.

Roztok č.

1	NaNO ₃	23,35 g/500 ml
2	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	2,95 g/500 ml
3	K ₂ HPO ₄	0,3 g/1000 ml
4	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,25 g/500 ml
5	Na ₂ CO ₃	1,05 g/500 ml
6	Fe EDTA	
7	Roztok mikroprvků (Gaffron)	

Do 2 l nádoby jsem smíchala 5 ml roztoků č. 1, 2, 4 a 5, 2 ml roztoku č. 3, 100 µl roztoku č. 6 a 40 µl roztoku č. 7. Do 2 litrů jsem roztok doplnila deionisovanou vodou.

MEDIUM PRO PERLOOČKY

Pro dafnie jse připravovala medium, které se mi osvědčilo, jako nejlepší prostředí pro rozmnožení chovu. Složení tohoto media je takové: do 4,5l kanystru

3 l H₂O z vodovodu

1,5 l H₂O destilované

45 ml roztoku SMB

6,75 ml 10% roztoku mořské soli

SMB roztok:

Roztok č. 1

NaCl	17,53g/l
KCl	0,74g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	11,76g/l
MgCl ₂ .2H ₂ O	2,03g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,46g/l
Roztok č.2	
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	27,60g/l
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	35,60g/l

Na SMB roztok jsem použila 2,7ml roztoku číslo 1 a 5ml roztoku číslo 2 poté jsem doplnila destilovanou vodou do 0,5l.



Obr. 15: Dělicí nádoby s medii Z/4 a P1 a pohled na celou soustavu.

Tab. 10: Přehled šířky a délky *Monoraphidium dybowskii* z media Z/4 a media P1.

buňka	Z/4 šířka	Z/4 délka	P1 šířka	P1 délka
1	2,36	4,29	2,54	9,69
2	2,42	4,9	2,66	9,22
3	2,49	4,53	2,7	9,87
4	1,99	5,85	3,13	7,53
5	2,42	6,24	2,58	10,47
6	2,36	3,94	2,99	10,44
7	3,06	5,8	3,26	9,77
8	2,07	5,53	2,41	9,21
9	1,69	4,55	2,75	11,33
10	2,83	4,9	2,68	11,36
11	2,58	4,88	1,8	9,72
12	2,29	4,85	2,61	9,46
13	1,51	4,81	3,05	11,12
14	2,54	4,87	3,79	10,6
15	2,32	4,83	3,53	10,02
16	2,85	5,34	3,3	7,9
17	2,49	5,13	3,29	9,24
18	2,29	5,09	3,08	9,74
19	2,25	4,73	3,81	11,18
20	2,52	5,31	4,12	10,1
21	1,38	4,54	4,36	12,16
22	2,1	4,83	4,05	11,32
23	2,1	4,8	4,22	9,95
24	2,39	5,24	3,67	9,49
25	2,83	4,9	3,84	11,08
26	3,28	5,27	3,78	9,94
27	2,73	5,12	3,29	10,68
28	2,46	4,22	3,45	10,4
29	2,32	5,07	3,4	9,91
30	3,23	5,18	3,51	9,56
průměrná velikost [μm]	2,405	4,984667	3,255	10,082

Tab. 11: Průměrné hodnoty jednotlivých měření. h - výška jedince na začátku (měřeno od počátku spiny po okraj hlavy), d - výška jedince na konci pokusu, $d-h$ - výškový přírůstek, n_d - počet dnů, který jedinec žil, n_s - počet snůšek, n_j - počet juvenilů.

jedinec	h	d	d-h	n_d	n_s	n_j
KONTROLA	742	1440		698	23	2 8
Z/4 1mg	694	757		63	3	0 0
Z/4 2mg	721	1405		684	18	2 10
Z/4 4mg	731	1572		841	20	2 12
P1 1mg	717	853		135	4	0 0
P1 2mg	787	842		55	2	0 0
P1 4mg	720	762		42	3	0 0

Tab. 12: Počáteční velikosti perlooček.

d-start						
kontrola	Z/4_1mg	Z/4_2mg	Z/4_4mg	P1_1mg	P1_2mg	P1_4mg
805,00	770,00	897,00	635,00	715,00	827,00	730,00
654,00	692,00	778,00	707,00	836,00	771,00	745,00
845,00	777,00	800,00	597,00	693,00	759,00	689,00
681,00	688,00	670,00	644,00	667,00	851,00	588,00
648,00	654,00	882,00	789,00	853,00	781,00	718,00
713,00	681,00	751,00	766,00	656,00	909,00	700,00
833,00	931,00	820,00	727,00	700,00	833,00	750,00
733,00	741,00	682,00	629,00	856,00	704,00	623,00
743,00	653,00	824,00	821,00	670,00	718,00	743,00
790,00	753,00	758,00	843,00	833,00	840,00	865,00
840,00	620,00	619,00	617,00	757,00	793,00	797,00
641,00	653,00	622,00	621,00	661,00	802,00	763,00
914,00	662,00	612,00	733,00	561,00	741,00	687,00
653,00	668,00	702,00	631,00	543,00	776,00	721,00
583,00	654,00	640,00	649,00	804,00	771,00	720,00
721,00	657,00	657,00	696,00	514,00	762,00	690,00
724,00	660,00	917,00	716,00	692,00	773,00	729,00
815,00	666,00	641,00	918,00	721,00	813,00	688,00
668,00	725,00	650,00	725,00	779,00	693,00	646,00
661,00	683,00	679,00	981,00	811,00	738,00	778,00
883,00	696,00	714,00	925,00	811,00	1019,00	737,00
697,00	669,00	687,00	727,00	831,00	785,00	676,00
789,00	711,00	716,00	703,00	779,00	712,00	798,00
679,00	670,00	719,00	933,00	810,00	704,00	677,00
700,00	736,00	637,00	664,00	836,00	784,00	710,00
672,00		683,00	840,00	820,00	817,00	732,00
736,00		708,00			703,00	
943,00		586,00				

Tab. 13: Velikost perlooček na konci pokusu.

d-konec						
kontrola	Z/4_1mg	Z/4_2mg	Z/4_4mg	P1_1mg	P1_2mg	P1_4mg
805,00	776,00	1310,00	1381,00	792,00	906,00	736,00
701,00	692,00	1665,00	1853,00	1034,00	883,00	771,00
1450,00	874,00	800,00	1288,00	790,00	795,00	731,00
710,00	688,00	670,00	1698,00	788,00	975,00	670,00
1278,00	692,00	1734,00	1687,00	1329,00	781,00	718,00
2092,00	717,00	1035,00	1617,00	690,00	928,00	713,00
1140,00	931,00	820,00	1423,00	941,00	873,00	837,00
739,00	762,00	763,00	1605,00	969,00	712,00	690,00
1418,00	693,00	1783,00	1840,00	829,00	809,00	774,00
1268,00	1063,00	813,00	1915,00	931,00	918,00	867,00
1142,00	620,00	1485,00	2392,00	757,00	793,00	910,00
1534,00	671,00	1906,00	621,00	821,00	802,00	796,00
1436,00	728,00	612,00	2190,00	705,00	787,00	707,00
1410,00	675,00	2056,00	631,00	685,00	776,00	771,00
772,00	654,00	2020,00	1102,00	931,00	784,00	720,00
1444,00	697,00	1755,00	2388,00	648,00	878,00	743,00
786,00	660,00	1923,00	2081,00	757,00	839,00	817,00
1916,00	729,00	1919,00	918,00	721,00	863,00	704,00
750,00	725,00	650,00	2163,00	807,00	699,00	694,00
2116,00	708,00	1966,00	2261,00	811,00	794,00	874,00
2168,00	758,00	789,00	1149,00	811,00	1039,00	798,00
1613,00	704,00	758,00	727,00	831,00	786,00	681,00
1697,00	790,00	2310,00	703,00	800,00	751,00	798,00
1817,00	794,00	795,00	1449,00	810,00	704,00	680,00
1410,00	803,00	637,00	664,00	836,00	794,00	710,00
2131,00		745,00	840,00	958,00	963,00	758,00
2333,00		708,00			757,00	
2230,00		676,00				

Tab. 14: Rozdíl velikostí perlooček na začátku a na konci pokusu.

přírůstek						
kontrola	Z/4_1mg	Z/4_2mg	Z/4_4mg	P1_1mg	P1_2mg	P1_4mg
0,00	6,00	413,00	746,00	77,00	79,00	6,00
47,00	0,00	887,00	1146,00	198,00	112,00	26,00
605,00	97,00	0,00	691,00	97,00	36,00	42,00
29,00	0,00	0,00	1054,00	121,00	124,00	82,00
630,00	38,00	852,00	898,00	476,00	0,00	0,00
1379,00	36,00	284,00	851,00	34,00	19,00	13,00
307,00	0,00	0,00	696,00	241,00	40,00	87,00
6,00	21,00	81,00	976,00	113,00	8,00	67,00
675,00	40,00	959,00	1019,00	159,00	91,00	31,00
478,00	310,00	55,00	1072,00	98,00	78,00	2,00
302,00	0,00	866,00	1775,00	0,00	0,00	113,00
893,00	18,00	1284,00	0,00	160,00	0,00	33,00
522,00	66,00	0,00	1457,00	144,00	46,00	20,00
757,00	7,00	1354,00	0,00	142,00	0,00	50,00
189,00	0,00	1380,00	453,00	127,00	13,00	0,00
723,00	40,00	1098,00	1692,00	134,00	116,00	53,00
62,00	0,00	1006,00	1365,00	65,00	66,00	88,00
1101,00	63,00	1278,00	0,00	0,00	50,00	16,00
82,00	0,00	0,00	1438,00	28,00	6,00	48,00
1455,00	25,00	1287,00	1280,00	0,00	56,00	96,00
1285,00	62,00	75,00	224,00	0,00	20,00	61,00
916,00	35,00	71,00	0,00	0,00	1,00	5,00
908,00	79,00	1594,00	0,00	21,00	39,00	0,00
1138,00	124,00	76,00	516,00	0,00	0,00	3,00
710,00	67,00	0,00	0,00	0,00	10,00	0,00
1459,00		62,00	0,00	138,00	146,00	26,00
1597,00		0,00			54,00	
1287,00		90,00				

Tab. 15: Délka života.

Délka života						
kontrola	Z/4_1mg	Z/4_2mg	Z/4_4mg	P1_1mg	P1_2mg	P1_4mg
1,00	7,00	27,00	10,00	3,00	1,00	4,00
2,00	2,00	13,00	29,00	5,00	1,00	3,00
30,00	3,00	3,00	33,00	5,00	1,00	1,00
41,00	2,00	8,00	17,00	2,00	2,00	4,00
14,00	2,00	44,00	22,00	14,00	1,00	1,00
41,00	2,00	9,00	10,00	2,00	1,00	1,00
8,00	7,00	8,00	27,00	3,00	2,00	3,00
3,00	3,00	7,00	13,00	3,00	1,00	3,00
27,00	2,00	32,00	31,00	2,00	3,00	3,00
18,00	14,00	3,00	21,00	7,00	3,00	7,00
11,00	3,00	20,00	41,00	7,00	2,00	4,00
21,00	2,00	19,00	1,00	3,00	1,00	3,00
23,00	5,00	3,00	35,00	4,00	1,00	2,00
30,00	3,00	17,00	1,00	5,00	4,00	3,00
3,00	4,00	32,00	6,00	3,00	1,00	2,00
21,00	1,00	14,00	37,00	5,00	1,00	4,00
5,00	1,00	32,00	41,00	2,00	4,00	3,00
45,00	2,00	41,00	1,00	1,00	1,00	2,00
1,00	1,00	4,00	33,00	3,00	4,00	3,00
24,00	2,00	35,00	33,00	1,00	1,00	3,00
36,00	2,00	4,00	7,00	1,00	4,00	3,00
20,00	2,00	4,00	9,00	2,00	2,00	2,00
24,00	2,00	32,00	1,00	2,00	3,00	2,00
19,00	1,00	4,00	10,00	2,00	1,00	1,00
30,00	4,00	4,00	2,00	3,00	1,00	2,00
36,00		4,00	1,00	7,00	3,00	2,00
40,00		3,00			2,00	
36,00		3,00				

Tab. 16: Počet snůšek.

Počet snůšek						
kontrola	Z/4_1mg	Z/4_2mg	Z/4_4mg	P1_1mg	P1_2mg	P1_4mg
0,00	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	6,00	1,00	0,00	0,00	0,00
6,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	3,00	4,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	7,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	6,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	4,00	6,00	0,00	0,00	0,00
4,00	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00
3,00	0,00	2,00	5,00	0,00	0,00	0,00
5,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,00		0,00			0,00	
4,00		0,00				

Tab. 17: Celkový počet neonát.

Počet juvenilů celkem						
kontrola	Z/4_1mg	Z/4_2mg	Z/4_4mg	P1_1mg	P1_2mg	P1_4mg
0,00	0,00	23,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26,00	0,00	0,00	8,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	47,00	4,00	0,00	0,00	0,00
43,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	14,00	21,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	10,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	51,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	16,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	29,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	12,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	32,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	43,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	21,00	51,00	0,00	0,00	0,00
16,00	0,00	14,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00	22,00	0,00	0,00	0,00
18,00	0,00	11,00	36,00	0,00	0,00	0,00
25,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,00	0,00	27,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
43,00		0,00			0,00	
16,00		0,00				

Tab. 18: Velikost a počet neonát.

1. snuska		2. snuska			3. snuska			4. snuska			5. snuska			6. snuska			7. snuska		
kontrola	Z/4_2mg	Z/4_4mg	kontrola	Z/4_2mg	Z/4_4mg	kontrola	Z/4_2mg	Z/4_4mg	kontrola	Z/4_2mg	Z/4_4mg	kontrola	Z/4_2mg	Z/4_4mg	kontrola	Z/4_2mg	Z/4_4mg	kontrola	
603	606	789	728	762	561	597	881	802	670	710	677	696	715	763	917	758	724		
824	626	768	753	858	705	875	722	704	610	866	715	653	692	776	898	714	727		
642	934	759	648	621	648	923	648	897	847	726	787	674	753	679	1024	700	725		
825	759	655	577	687	683	649	641	732	896	750	721	676		714		730			
893	691	953	670	709	669	965	711	714	808	735	745	708		735		743			
753	663	567	703	702	685	623	710	713	856	705	736	774		773		727			
853	668	892	701	765	730	924	749	704	683	866	763	782		703					
850	672	806	794	624	780	689	762	905	622	712	743	737		731					
881	621	1006	726	865	702	891	742	704	817	718	697	688		739					
748	814	801	718	711	662	934	834	923	867	714	674	764		760					
630	579	600	703	761	628	661	642	665	782	660	651	736		669					
845	588	787	568	809	702	700	936	661	665	919	738	659		730					
818	860	776	661	632	669	923	708	742	664	701	718								
818	754	636	712	619	629	692	783	625	908	719	777								
835	719	664	707	727	738	884	748	903	889		726								
867	642	964	670	695	828	925	645	691	917		688								
764	661	618	735	731	519	699	859	824			736								
623	804	806	717	709	573	690	731	738			717								
800	602	933	677	798	634	868		701			763								
917	603	841	745	886	672			747			723								
871	648	598	903	867	688			671			771								
907	767	845	925	703	724														
860	695	832		654	760														
752	645	775		737															
	642	677		589															
	808	838		753															
		571		606															
		786		669															
		1024																	
		874																	
		637																	