Fakulta rybářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

METODICKÉ POSTUPY PŘI STUDIU POTRAVY SLADKOVODNÍCH RYB

Peter Manko, Zdeněk Adámek

Vodňany

EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství

Vydání a tisk publikace byly uskutečněny v rámci
Operačního programu Rybářství 2014–2020:
Metodika I č. CZ.10.5.109/5.2/4.0/17_009/0000373.

Obsahová část metodiky je výsledkem řešení výzkumných projektů:
Ministerstvo zemědělství ČR (NAZV QK1810296 Využití alternativních komponent a inovativních postupů ve výživě ryb) – 90 %

INTERREG V-A Rakousko – ČR (KPF-01-016 Posilování spolupráce mezi JU a Verein für Fisch- und Gewässerökologie) – 10 %

č. 177
ISBN 978-80-7514-096-8

Edice Metodik

OBSAH

1. CÍL METODIKY 7

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY 8

2.1. Úvod 8
2.2. Aplikace a interpretace výsledků studia potravy ryb 9
2.3. Metody a přístupy v potravní ekologii ryb vod 11
2.3.1. Přímé pozorování 11
2.3.2. Ohrazování 13
2.3.3. Analýza přijaté potravy 13
2.3.4. Metody radiologie (RTG), radioizotopů, mastných kyselin, barviv a chemických markerů 14
2.3.5. Molekulární metody 16
2.4. Analýza obsahu trávicího traktu v potravní ekologii ryb 17
2.5. Design sběru vzorků v terénu 19
2.6. Velikost vzorku 20
2.7. Subsampling („podvzorkování“) napříč velikostními skupinami 21
2.8. Ošetření (zpracování) vzorků před analýzou 22
2.9. Základní všeobecná pravidla práce a vzorkování v terénu 25
2.10. Analýza trávicího traktu pitvou 27
2.10.1. Příprava vzorků 27
2.10.2. Získání obsahu trávicího traktu 29
2.11. Analýza obsahu trávicího traktu živých ryb 37
2.11.1. Techniky a zařízení (pomůcky) 38
2.11.1.1. Gastroskopy 38
2.11.1.2. Pinzety 38
2.11.1.3. Emetika 38
2.11.1.4. Trvalé vývody 39
2.11.1.5. Trubice 39
2.11.1.6. Vysávání obsahu žaludku 40
2.11.1.7. Výplach žaludku 40
2.11.1.7.1. Ruční pumpy 41
2.11.1.7.2. Mechanický tlak 41
2.11.1.7.3. Stříkačky 42
2.11.2. Zásady získávání vzorků neletálními metodami 44
2.11.3. Postupy získávání obsahu trávicího traktu 44
2.11.3.1. Pasivní výplach trubicemi 45
2.11.3.2 Aktivní výplach pumpami a stříkačkami 48
2.12. Analýza vzorku 51

2.12.1. Prázdné trávicí trakty 51
2.12.2. Stupeň naplnění 52
2.12.3. Stupeň natrávení 53
2.13. Identifikace potravy – kvalitativní hodnocení 54
2.14. Kvantitativní studium potravy 58
2.14.1. Frekvence výskytu (frekvenční metoda) 59
2.14.2. Numerická početnost (abundance) – numerická metoda 61
2.14.2.1. Subsampling (podvzorkování) při stanovování numerické abundance 63
2.14.2.2. Postup při počítání potravních částic 64
2.14.3. Metoda dominance podle počtu potravních složek podle Hynese (1950) (Dn) 68
2.14.4. Metody založené na biomase 68
2.14.4.1. Volumetrická metoda 70
2.14.4.1.1. Metoda vizuálního odhadu 70
2.14.4.1.2. Metoda stanovení objemu odměrnými válci 74
2.14.4.1.3. Index naplnění vyjádřený objemem – Index průměrného naplnění 77
2.14.4.1.4. Metoda dominance založená na objemu potravy 79
2.14.4.2. Gravimetrická metoda 79
2.14.4.2.1. Stanovení vlhké hmotnosti potravy 80
2.14.4.2.2. Index naplnění vyjádřený v hmotnosti (ISF) 83
2.14.4.3. Výpočet objemu a hmotnosti 83
2.14.4.4. Délko-hmotnostní metoda – výpočet biomasy ve formě suché hmotnosti 84
2.14.4.4.1. Vytvoření rovnice lineární regrese a výpočet suché hmotnosti 84
2.14.4.4.2. Výpočet suché hmotnosti s využitím publikovaných dat (regresních modelů) 87
2.14.4.5. Bodová volumetrická metoda 89
2.15. Vyhodnocení významnosti potravních složek použitím složených indexů 91
2.15.1. Index relativní významnosti (IRI, Index of Relative Importance) 93
2.15.2. Procentuální index relativní významnosti (%IRI, Percent Index of Relative Importance) 94
2.15.3. Další složené indexy 94
2.16. Selektivita a preference potravních složek 96
2.16.1. Dostupné potravní zdroje 97

2.16.2. Výběr potravních zdrojů 99
2.16.2.1. Indexy potravní selektivity 100
2.16.2.1.1. Poměr potravních složek (FR, Poměr selekce; Preferenční index) 100
2.16.2.1.2. Ivlevův index výběrovosti (E, Index selekce, Ivlevův poměr potravních složek) 101
2.16.2.1.3. Jacobsův modifikovaný poměr potravních složek (log Q) 102
2.16.2.1.4. Jacobsova modifikovaná výběrovost (D) 103
2.16.2.1.4. Vanderploegův & Scaviův první selekční index (W) 103
2.16.2.1.5. Vanderploegova & Scaviova relativizovaná selektivita (E*) 104
2.16.2.1.6. Manly-Chessonův index (α) 105
2.16.2.1.7. Straussův lineární selekční index (L) 107
2.17. Grafické techniky prezentace dat 108
2.17.1. Costellova grafická metoda 108
2.17.2. Grafická metoda Tokeshiho 110
2.17.3. Amundsenova grafická metoda 111
2.17.4. Cortésova grafická metoda 113

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ 115

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY 115

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY 116

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY 116

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE 130

1. CÍL METODIKY

Metodika byla komponována s cílem přinést ucelený pohled na metody studia potravy ryb a na interpretaci získaných výsledků a poznatků. Její využitelnost je cílena na potřeby rybářského výzkumu a praxe s předpokladem umožnit orientaci v rozhodování, jakou metodu a vyhodnocení potravy ryb zvolit jak v rybníkářské praxi, tak v managementu volných vod. Předpokládá se přednostně její aplikace v rybářském (rybníkářském) sektoru pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení potravy ryb s cílem posoudit potřebu provedení potřebných opatření pro zlepšení využití přirozené potravy, úpravy přikrmování, případně i melioračních a intenzifikačních zásahů. Uplatnění se též předpokládá ve výuce rybářských, ichtyologických a hydrobiologických předmětů.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1. Úvod

Jednou z hlavních úloh studia ekologie živočichů je výzkum toho, jak využívají zdroje v prostředí, které obývají. Populace živočichů potřebují adekvátní kvantitu i kvalitu využitelných zdrojů, přičemž jednou ze základních otázek ekologie je, jaké zdroje pro svou existenci jednotlivé druhy živočichů potřebují (Litvaitis, 2000). Právě proto je nutné identifikovat zdroje, které jsou živočichy využívány a zdokumentovat jejich dostupnost v prostředí. Kromě přirozeného zájmu o poznání je určení těchto zdrojů a posouzení jejich dostupnosti nutným předpokladem snah o ochranu ohrožených druhů a management populací hospodářsky významných druhů (Manly a kol., 2002). Základními zdroji jsou potrava, kterou živočichové konzumují, a habitaty, které osídlují. Poznání složení potravy a potravního chování je tedy významným vstupním podkladem pro studium biologie a ekologie každého živočišného druhu (Litvaitis, 2000; Ahlbeck a kol., 2012).

Potravní chování různých druhů bylo a je zkoumáno z různých významných důvodů i v širším kontextu. Poznání přirozené potravy živočišného druhu je obecně základem pro studie zaměřené na jeho nutriční požadavky, dynamiku hmoty a energie v rámci nejen konkrétního druhu, ale i v souvislosti s využíváním různých habitatů. Tyto informace jsou důležité nejen pro pochopení dynamiky toku energie a hmoty v ekosystémech, ale i pro modelování těchto procesů. Údaje o potravní ekologii jsou využívány nejen při studiu potravních řetězců, ale i pro prognózu možných změn v přenosu energie a živin mezi ekosystémy (Nakano a Murakami, 2001). Umožňuje vysvětlovat vnitrodruhové i mezidruhové interakce (například možné kompetitivní interakce či vztahy mezi predátory a jejich kořistí). Údaje o složení potravy tak přispívají i k pochopení struktury ekosystémů, složení společenstev a populační dynamiky jednotlivých druhů (Litvaitis, 2000; Ahlbeck a kol., 2012).

V ichtyologii, ekologii ryb a rybářství jsou informace o potravě důležité i v rozhodovacích procesech souvisejících s využitím přírodních zdrojů (Kido, 1996) a kvantifikací důsledků působení nepůvodních a invazních druhů pro populace původních druhů ve vodních ekosystémech (Fritts a Pearsons, 2004). Navíc je takováto informace důležitá i pro hodnocení integrity ekosystémů, pro porozumění rozdělení zdrojů, habitatových preferencí, selektivity potravy, evoluce nebo pro stanovení ochranářských strategií. Stává se tak klíčovou záležitostí v ochraně druhů, habitatů a ekosystémů, ale i v chápání ekologie druhu a v trofické ekologii vodních ekosystémů (Braga a kol., 2012).

Je zřejmé, že studium a analýza potravy je nejen cestou k poznání toho, čím se ryby živí, ale i nedocenitelný zdroj informací o mnoha dalších aspektech biologie a ekologie ryb. V této metodice se proto budeme podrobněji zabývat nejen důvody pro studium obsahu trávicího traktu ryb, ale především postupy a metodami, které jsou pro tuto specifickou oblast ichtyologie důležité a využívané.

2.2. Aplikace a interpretace výsledků studia potravy ryb

Jak lze poznatky získané studiem potravy ryb využít? Analýza obsahu trávicího traktu nám přináší informace důležité pro poznání potravní ekologie ryb. Potrava ryb, resp. její příjem, zahrnuje řadu důležitých ekologických aspektů – chování ryb a jejich kondici, využívání habitatů, příjem energie, vnitrodruhové i mezidruhové interakce a mnoho dalších. Přesný popis složení potravy a potravního chování je základem pro pochopení trofických interakcí v potravních řetězcích ve vodním prostředí. Trofické vztahy začínají vždy potravou a jejím příjmem jednotlivými druhy nebo spíše jedinci. Studium jejího složení nám tak poskytuje pohled na jejich význam pro vyšší hierarchické úrovně (společenstvo, ekosystém), ale i podklady pro hodnocení významu ontogeneze v ekologii druhu či pro objasnění procesu adaptace nepůvodních druhů na nové podmínky prostředí (Chipps a Garvey, 2007). Historie analýzy obsahu trávicího traktu ryb je charakteristická posunem od jednoduchého základního popisu složení potravy a potravního chování ke komplexnějším přístupům s využitím těchto informací v dalších oblastech vědeckého bádání. Nejjednodušší metody hodnotí pouze to, které potravní složky jsou nejvíc konzumované nebo pouze konstatují přítomnost či absenci potenciálně dostupné potravy v trávicím traktu studovaného druhu ryby. Někteří autoři se však zasazují o komplexnější a složitější otázky a analýza potravy jim pak pomáhá nacházet odpověď na ty z nich, které se týkají nejen relativního významu jednotlivých potravních složek pro výživu konkrétního druhu, ale i kvantifikace množství přijímaných jednotlivých složek potravy či například kompromisů mezi nejefektivnějším způsobem příjmu potravy, antipredačním chováním a kompeticí. Dalším důležitým aspektem dokumentujícím význam analýzy obsahu trávicího traktu ryb a poznání složení jejich potravy je management v oblasti rybářství a akvakultury. Údaje o složení potravy totiž umožňují zásahy směřující k řízení a kontrole potravních zdrojů s cílem zvýšení produkce nebo ovlivnění složení společenstev a populací pro zlepšení podmínek pro rekreační rybolov (Kamler a Pope, 2001; Pikitch a kol., 2004; Chipps a Garvey, 2007). Je tedy zřejmé, že analýza obsahu trávicího traktu je neocenitelným zdrojem informací, které nám pomáhají porozumět mnohým aspektům biologie a ekologie ryb na úrovni druhu, populace, společenstva či ekosystému. Takto získané výsledky jsou rovněž využívány při studiu specifických otázek interakcí,

evoluce, speciace, invazí v rybářství, akvakultury i ochrany přírody. Tyto analýzy mohou být a často i jsou, součástí studií s různým zaměřením. Konkrétně byly například aplikovány ve výzkumech zaměřených na:

- výběrovost (selekci) kořisti (Kohler a Ney, 1982; Adámek a kol., 2004),
- velikostní vztahy mezi predátorem a kořistí (Hartvig a Andersen, 2013),
- strukturu společenstva (Wilson a Wolkovich, 2011),
- mezidruhové interakce (Robinson a Wilson, 1994; Adámek a kol., 2004; Crow a kol., 2010),
- teritorialitu (Bo a kol., 2010),
- důsledky mezidruhových interakcí (Kido, 1996; Adámek a kol., 2004),
- překrývání nik a rozdělení niky (Crow a kol., 2010),
- koexistenci ekotypů (Hartvig a Andersen, 2013),
- trofické úrovně (Stergiou a Karpouzi, 2002),
- strukturu potravní sítě a trofické kaskády (Garvey a kol., 1998; Mikl a kol., 2016, 2017),
- propojení mezi vodními a terestrickými potravními sítěmi (Nakano a Murakami, 2001),
- vztahy mezi parazity a hostitelem (Barber a kol., 2000),
- vztahy mezi potravními zdroji a morfologií, jako jsou např. vztahy mezi fenotypem a prostředím nebo vnitrodruhový polymorfizmus ve vztahu ke zdrojům (Robinson a Wilson, 1994),
- mechanizmus adaptivní radiace (Cooper a kol., 2010),
- stanovení významu jednotlivých trofických úrovní důležitých v rybářském obhospodařování a akvakultuře pro kvantifikaci efektu ryb na ekosystémy (Stergiou a Karpouzi, 2002; Adámek a kol., 2016; Mikl a kol., 2016),
- ontogenetický posun (Števove a Kováč, 2016),
- důsledky působení nepůvodních a invazních druhů (Grabowska a Grabowski, 2005; Koščo a kol., 2008; Števove a Kováč, 2016),
- důsledky hydrologických podmínek a fluktuace vodní hladiny (Bo a kol., 2011),
- ochranářské strategie, ochranu druhů a ekosystémů (Pusey a Arthington, 2003).

Studium složení potravy se rovněž využívá při testování hypotéz založených na:

- teorii optimálního získávání potravy (Wootton, 2012),
- ekosystémovém modelování (Mikl a kol., 2016, 2017),
- evoluci trofických adaptací a fenotypové plasticitě (Robinson a Wilson, 1994),
- speciaci (Snorrason a Skúlason, 2004).

2.3. Metody a přístupy v potravní ekologii ryb vod

Ve výzkumu zaměřeném na potravní ekologii ryb se využívají různé metody. Všechny mají své výhody i limity, mohou odpovědět na jednotlivé dílčí otázky nebo pomoci pochopit některé aspekty biologie a ekologie ryb. Tyto metody můžeme rozdělit do několika skupin podle toho, jaký přístup využívají pro získání údajů o složení potravy. Některé jsou invazivní, často založené na usmrcení vyšetřované ryby, jiné naopak neinvazivní. Existují dokonce i metody bezkontaktním pozorováním. Uvedená kategorizace je modifikovaným dělením podle Litvaitise (2000).

2.3.1. Přímé pozorování

Přímé pozorování a videonahrávky jsou často využívanými metodami získávání údajů o přijímané potravě převážně ve studiích laboratorního charakteru. Tyto techniky jsou využitelné při výzkumu potravního chování (kontinuální záznam umožňuje zachycení změn v potravním chování a výběru lokalit využívaných k získávání potravy vyvolaných např. diurnálním cyklem, teritorialitou nebo introdukcí konkurentů či predátorů), ve výzkumu reakcí na různé typy nabízené potravy či při studiu potravního chování při různých způsobech podávání potravy. Využívají se při sledování reakcí a změn potravního chování při různých formách shlukování potravy a časových nebo prostorových změnách její dostupnosti (migrace zooplanktonu, rozdílná hustota fytoplanktonu). Význam mají i při hodnocení schopností jednotlivých druhů ryb získávat konkrétní typ potravy (Jobling a kol., 1995). Přímé pozorování se v terénních i laboratorních podmínkách využívá již dlouho. Nejčastěji jsou tyto metody využívány v malých experimentálních souborech, ale i v chovných nádržích, umělých tocích a klecích. V menší míře se využívají i v přírodních podmínkách. V porovnání s jinými metodami umožňují monitoring příjmu potravy jednotlivých ryb v reálném čase a žádnou jinou metodou není možné tak detailně popsat potravní chování ryb. S tím souvisejí i sociální interakce a mechanizmy, které lze odhalit jedině údaji získanými o příjmu potravy konkrétními jedinci (Jobling a kol., 2001). Metody přímého pozorování však mají i mnohá omezení. Jsou využitelné hlavně pro druhy osídlující otevřené habitaty a druhy, které potravu přijímají v průběhu dne, přičemž limitujícím faktorem je i průhlednost vody. Pozorování při špatných světelných podmínkách (resp. v noci) jsou možná jenom s použitím umělého osvětlení, což může vést k ovlivnění výsledků, i když i v tomto směru přinesly moderní technologie značný pokrok. Problémem může být přítomnost pozorovatele v přirozeném prostředí. Ta často ruší pozorované jedince a může ovlivnit jejich

chování i příjem potravy. I tak se ale data získaná přímým pozorováním v jinak nenarušených přirozených podmínkách považují za zdroj informací, které jsou realitě bližší než údaje získané pozorováním v laboratorních podmínkách (resp. v akváriích) i než údaje získané nepřímými metodami (Jobling a kol., 2001). Nevýhodou přímého pozorování v přirozeném prostředí je rovněž extrémní časová a finanční náročnost a složitost pozorování v podmínkách velkých otevřených biotopů, velké hloubky nebo chladné vody. Kromě toho výsledky získané přímým pozorováním přinášejí obvykle jenom krátkodobou informaci a dlouhodobá pozorování, která by mohla zachytit a vyjádřit významné změny, je možné získat pouze s mimořádným dlouhotrvajícím úsilím. Podobně jako při jiných způsobech získávání relevantních údajů, i přímá pozorování musí být prováděna v dostatečném počtu opakování na dostatečně velkém vzorku, aby bylo možno dosáhnout minimální limity pro použití statistických metod. Odpovídající vzorek je důležitý rovněž pro jistotu, že nebyly zachyceny anomálie nebo extrémní hodnoty způsobené vysokou variabilitou v kombinaci s malým vzorkem, případně že údaje nereprezentují informaci zatíženou nějakou neobvyklou okolností (Jobling a kol., 2001).

Potravní chování a příjem potravy se dá lépe studovat na uměle chovaných populacích, resp. populacích v zajetí. V tomto případě je však pozorování obvykle omezené na studium malých skupin. To je důvod, pro který může být zevšeobecnění výsledků problematické, podobně jako v případě, že se jedná o umělé chovy, ve kterých se mohou jedinci chovat odlišně (Jobling a kol., 1995, 2001). V laboratorních podmínkách zaznamenává údaje o příjmu potravy a potravním chování skrytý pozorovatel ze zatemněné části zpoza jednostranně průhledné stěny (Jobling a kol., 2001). Přestože nejsou pozorovaní jedinci rušeni pozorovatelem, pozorování probíhá v umělých podmínkách, které ovlivňují jejich chování. Tato metoda je proto omezená na pozorování ryb žijících dlouhodobě v umělém prostředí, nikoliv těch, které byly přeneseny z přirozeného biotopu.

Současný rychlý vývoj v oblasti video a softwarových technologií umožňuje velmi detailně studovat příjem potravy rybami, jejich potravní chování, sociální interakce při získávání potravy nebo charakteristické vzory příjmu potravy (Talbot, 1985; Jobling a kol., 1995, 2001) a zároveň se snaží vyhnout nedostatkům spojeným s přímým pozorováním. Využití vzdáleného ovládání nahrávacích zařízení nabízí proti konvenčnímu přímému sledování pozorovatelem řadu výhod – umožňuje například relativně nenáročné dlouhodobé pozorování a kvantifikaci přijaté potravy bez přímé přítomnosti pozorovatele jako rušivého faktoru. Podrobnější studium s použitím této metody může zahrnovat i zaznamenávání frekvence jednotlivých postavení těla vůči potravě (kořisti), způsobů příjmu potravy a manipulace s ní, frekvenci

odmítání, resp. ignorování různých typů potravy, výběr míst získávání potravy, sociálních interakcí včetně agresivního chování apod. (Jobling a kol., 2001). Existují rovněž sofistikované metody nahrávání videozáznamů v laboratorních podmínkách a softwarů na jejich analýzu, které se využívají na zaznamenávání a analýzu různých vzorů chování, včetně potravního (Kane a kol., 2004). Přímé pozorování a nahrávání videozáznamů se někdy kombinuje s externím značkováním s cílem získat podrobnější informace o konkrétních jedincích (Jobling a kol., 2001).

2.3.2. Ohrazování

Tato skupina metod je obvykle využívána pro studium dlouhodobých efektů působení konzumentů na potravní zdroje. Jedná se o porovnávání využívaných ploch s plochami, do kterých je zamezený přístup konzumenta (predátora) ohrazením. Ohrazuje se obvykle klecemi, které zamezují přístup rybám (anebo konkrétním druhům či velikostním kategoriím ryb), ale neovlivňují rostliny, plankton a bentos. Tyto metody mohou přinášet informace o všeobecných potravních vzorech herbivorních a bentofágních ryb, pokud jsou porovnávány krátkodobé rozdíly mezi soubory na ohrazených a neohrazených plochách. Nejčastěji se však jedná o sledování efektu působení ryb na společenstva vodních rostlin a makrozoobentosu (méně planktonu), konkrétně na jejich složení, diverzitu, denzitu a biomasu (Bayley a Li, 2008; Mikl a kol., 2016; Zapletal a kol., 2019).

2.3.3. Analýza přijaté potravy

Tato skupina metod zahrnuje postupy, které jsou nejvíce využívány v oblasti potravní ekologie. Primárně jsou tyto metody založené na kvalitativním studiu obsahu trávicích traktů, ale často se uplatňuje i stanovení množství potravy (kvantitativní přístup). Tyto metody zahrnují vzorkování po dobu trávení potravy i po jejím strávení. Obsah trávicího traktu je přitom obvykle získaný až po usmrcení ryby. Výhodou těchto metod je, že zároveň se vzorkem obsahu trávicího traktu umožňují získat mnoho důležitých informací o analyzované rybě – biometrické údaje, hmotnost, pohlaví, věk, tělesnou kondici a v případě odebrání dalších potřebných vzorků i ploidii a po usmrcení i plodnost a údaje o parazitech. Vzhledem k tomu, že jde o nejčastěji využívané metody analýzy potravy, byla jim věnována největší pozornost. Metody využívající emetika (látky vyvolávající zvracení), výplachové trubice a jiné způsoby získání vzorků obsahu z trávicích traktů ryb však dávají možnost získání potřebných údajů bez usmrcení či poškození ryby. Porovnávání a hodnocení metod získávání potravy ryb (resp.

některých z nich) publikovali např. Hynes (1950), Hyslop (1980), Talbot (1985), Cortés (1997), Kamler a Pope (2001) a Ahlbeck a kol. (2012) a Manko (2016).

Primární způsob získávání údajů je v případě těchto metod založený na přímé (většinou mikroskopické) analýze vzorku obsahu žaludku nebo celého trávicího traktu. Zavedení nových metod (biochemické markery, analýza stabilních izotopů a DNA) umožňuje hlavně v projektech specificky zaměřených na potravní ekologii a trofické interakce identifikovat i potravu, která je částečně nebo úplně strávená (např. Teletchea, 2009; Valentini a kol., 2009; Carreon Martinez a Heath, 2010).

2.3.4. Metody radiologie (RTG), radioizotopů, mastných kyselin, barviv a chemických markerů

Radiografické metody jsou přizpůsobeny nejen potřebám analýzy potravy, ale i (a to hlavně) potřebě studia trávení ryb a pohybu potravy (kořisti) v trávicím traktu. V kombinaci s kontrastními médii a markery přinášejí tyto metody i kvantitativní data – pro jejich získání je však obvykle nevyhnutelně nutné ošetření předkládané potravy označenými částicemi. Vzhledem k metodické a technologické náročnosti se radiografie využívá takřka výlučně v laboratorních podmínkách. Považuje se rovněž za vhodnější při studiích využívajících umělou dietu a zároveň je takřka zcela omezená pouze na výzkum příjmu potravy a trávení (Jobling a kol., 2001) nebo jejího pohybu v trávicím traktu (Adámek a kol., 1990). V současnosti byla tato metoda ve formě digitální radiografie znovu používána i jako vhodná neinvazivní metoda na stanovení obsahu trávicích traktů malých ryb Beckmannem a kol. (2015). Podle něj spolehlivě odhaluje přítomnost středně a velmi početných potravních složek (například malých členovců). Navíc tato metoda umožňuje rychlou identifikaci takových složek, jako je detrit, larvy dvoukřídlého hmyzu (Diptera), lasturnatky (Ostracoda), měkkýši (Mollusca) či malé ryby. Digitální RTG snímky se dají získat velmi rychle (cca 30 sekund na jedince) z ryb v anestezii nebo z usmrcených jedinců. Snímky se dají později analyzovat a dlouhodobě archivovat.

Radioizotopy jsou další specifickou a velmi zřídka používanou metodou. Princip jejich použití spočívá v inkorporaci radioizotopů do potravy, která je posléze zkonzumována rybami. Následně se měří radioaktivita potravy v trávicím traktu a množství přijaté potravy se odvozuje od referenčních hodnot. V některých případech sice přinesly tyto metody požadované výsledky, každopádně však trpí mnohými nedostatky a jsou s nimi spojeny relativně velké problémy a rizika, jako např. zdravotní riziko, riziko ztráty izotopů v přírodním prostředí aj. (Jobling a kol., 2001).

Moderní metodou využívanou nejen ve studiu potravy ryb, např. pro srovnání kompetice či pozice v potravní síti, je **analýza stabilních izotopů** (z angl. *Stable Isotope Analysis* – SIA, Parnell a kol., 2010). Některé prvky v přírodě mají totiž různou atomovou váhu pramenící z rozdílného počtu neutronů v jádře, což umožňuje jejich identifikaci metodou hmotnostní spektrometrie (z angl. *Isotope Ratio Mass Spectrometry* – IRMS), neboť všechny látky mají specifické zastoupení svých různých forem. Pro sladkovodní ekosystémy jsou nejčastěji používané stabilní izotopy uhlíku (^{13}C), dusíku (^{15}N) a síry (^{34}S). Uhlík existuje primárně jako ^{12}C izotop (98,89 %), ale menší část (1,11 %) je přítomna jako ^{13}C izotop. Nejběžnější formou dusíku je ^{14}N izotop (99,64 %), přičemž ^{15}N izotop tvoří zbytek (0,36 %). V případě síry je nejběžnější ^{32}S izotop (95,02 %), ale k celkovému množství síry přispívá i ^{34}S izotop (4,21 %) a další dva izotopy.

Podstata metody SIA spočívá v tom, že např. ve vzorcích svaloviny vyšetřovaných ryb, potravních zdrojů nebo zástupců různých trofických úrovní je stanoveno množství specifických stabilních izotopů v porovnání se standardy. Rozdíl těchto hodnot oproti standardům se vyjadřuje jako delta (δ) v promile (‰). Hodnoty jsou vyjádřeny jako $\delta X = [(R_{vzorek} / R_{standard}) - 1] \times 1\,000$, kde X je daný izotop (např. ^{13}C) a R představuje poměr izotopu a jeho přirozené formy (tj. $^{13}C/^{12}C$). Díky obsahu specifických izotopů v zástupcích různých trofických úrovní (ryby, makrozoobentos, nárosty apod.) tak lze zjistit základní zdroje potravních sítí a trofickou pozici daného organizmu nebo míru kompetice mezi různými věkovými kategoriemi nebo druhy (Vašek a kol., 2018). Pro analýzu vztahů v trofických sítích se používá např. MixSIAR (z angl. *Bayesian Mixing Models in R*, Stock a kol., 2018) či SIBER (z angl. *Stable Isotope Bayesian Ellipses in R*, Jackson a kol., 2011).

Korelace mezi **složením mastných kyselin** v kořisti a tukové či svalové tkáni predátora (ryby) se ukazuje jako využitelná pro hodnocení odlišné potravní ekologie různých druhů či populací ryb (viz např. Logan a kol., 2000).

Barviva a různé chemické markery, které jsou přidávány do potravy, slouží ke sledování trávení a průchodu potravy trávicí soustavou. Tyto metody si ale nezískaly velkou oblibu, protože jejich využití je omezené spíše jen na laboratorní experimenty (Jobling a kol., 2001). Barevnou odlišnost nauplií *Artemia* lze využít jako indikátor průchodu potravy střevem raných stadií ryb (Adámek a kol., 2011). Jejich výhodou je, že se jedná o přirozenou potravu, která pohyb potravy ve střevě nijak neovlivňuje. Ryby živené přirozenou nebo umělou potravou jsou za účelem monitorování pohybu potravy ve střevě nakrmeny naupliemi artemií, které jsou snadno odlišitelné a lze je tak snadno (v případě larev a raných stadií i mikroskopicky *in vivo*) detekovat.

2.3.5. Molekulární metody

Molekulární analýzy s použitím polymerázové řetězové rekce (z angl. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) zbytků potravy (kořisti) v trávicím traktu nebo exkrementech jsou rychle se rozvíjejícími metodickými postupy (King a kol., 2008). Širšímu využívání tohoto přístupu k výzkumu potravní ekologie napomáhají rychle rostoucí globální genetické databáze definující jednotlivé potravní druhy, ale i instrumentální, softwarový a statistický vývoj v oblasti molekulárních metod obecně (King a kol., 2008; Corse a kol., 2009; Murray a kol., 2011; Saikia, 2016). Mezi ně patří i nové způsoby sekvenování (metabarkoding – velkoobjemové sekvenování a barkoding), které přinesly do molekulárních analýz trofických interakcí doslova převratné možnosti (Pompanon a kol., 2012; Deagle a kol., 2019). Tyto metody jsou nově využívány i ve výzkumu potravy ryb (např. Carreon-Martinez a kol., 2011; Jo a kol., 2014; 2015; Taguchi a kol., 2014, Sousa a kol., 2016).

Zvládnutí těchto metod je podmíněno znalostí specifik terénního sběru vzorků, pitvy a výplachů pro získání obsahu trávicího traktu, konzervace a uchování vzorků podobně jako při využití ostatních metod, avšak s důrazem na zamezení jejich kontaminace a poškození DNA (King a kol., 2008). Specifikem je nutná znalost metod molekulární biologie – počínaje extrakcí DNA, výběrem vhodných genů (markerů) a primerů použitých pro jejich amplifikaci, dále pak vizualizace na gelech či pomocí kapilárové elektroforézy, využití fluorescenčních primerů, ale i testování a kalibrace. Při vysoce specializovaném výzkumu jsou nároky na teoretické znalosti a praktickou zručnost ještě vyšší a zahrnují i znalost využití teplotní (z angl. *Thermal Gradient Gel Electrophoresis* – TGGE) a denaturační gradientové gelové elektroforézy (z angl. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* – DGGE) ke zkoumání reakce predátorů na diverzitu kořisti a prošetření potenciálu kvantitativních systémů PCR (qPCR nebo *real-time PCR*) ke kvantifikaci potravy. Při analýze a interpretaci výsledků je navíc potřeba poznat alternativní cesty, kterými se mohla dostat DNA do potravy predátora (například sekundární predace – DNA pocházející z trávicího traktu kořisti).

I když se jedná o náročný metodický přístup (laboratorní a přístrojové vybavení, finance, nutnost vynikající znalosti molekulárních metod), nabízí ve srovnání s tradičními postupy mnoho výhod. Multiplexové PCR poskytují prostředek na cílený screening více druhů kořisti (potravy) současně (King a kol., 2008). Jeho podstatou je, že se do PCR reakce přidá vícero primerových párů pro více markerů amplifikovaných současně. Při vysokém stupni natrávení kořisti piscivorních ryb poskytuje DNA barkoding přesnější výsledky analýzy složení potravy než optická identifikace natrávených zbytků, které postrádají důležité identifikační znaky (Carreon-Martinez a kol., 2011). Ani tyto metody však nepřinášejí zcela přesnou informaci o složení potravy a odchylka stoupá

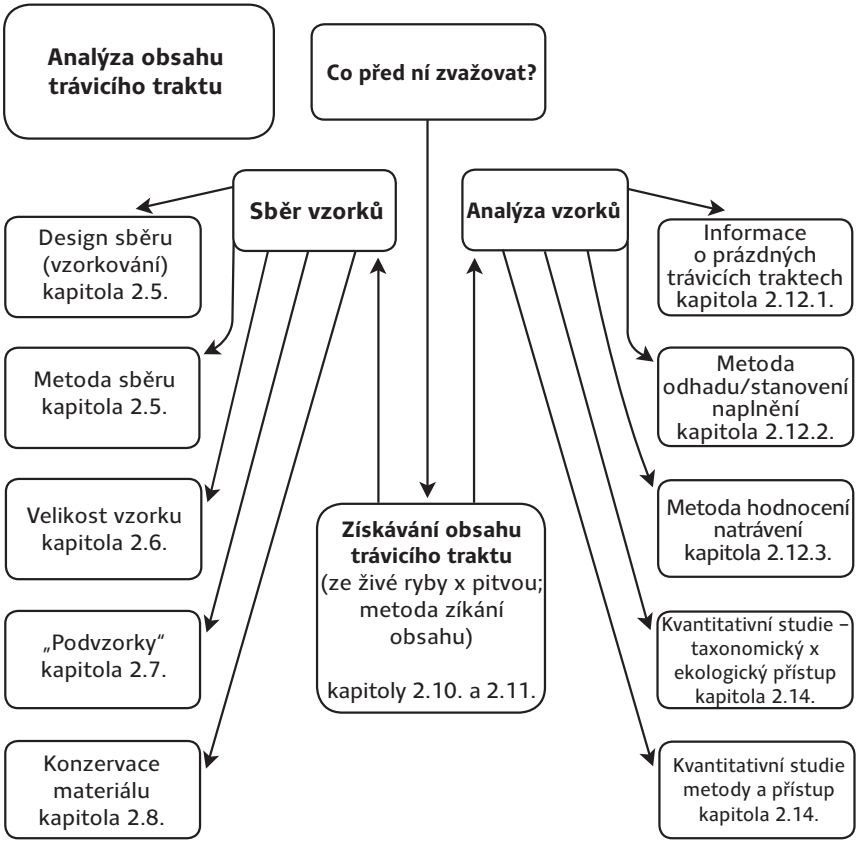
s diverzitou potravy a zastoupením taxonů, které jsou snadno stravitelné a jejichž DNA se rychle degraduje (Deagle a kol., 2019).

Jako doplňková metoda vizuálních a fyzikálních analýz potravy mohou molekulární metody přinést doplňující informace o taxonomické pestrosti potravy, ale v některých případech může být molekulární analýza primární při získávání podrobnějších informací o potravní ekologii ryb (Saikia, 2016). Kromě poznání taxonomického složení potravy mohou údaje získané molekulárními metodami pomoci i při stanovení relativního zastoupení potravních složek (semikvantitativní analýza).

DNA se extrahuje z obsahu žaludku, střeva nebo anusu (Saikia, 2016). I když u sladkovodních ryb obvykle nebývá usmrcení jedinců pro získání obsahu trávicího traktu významným problémem, doporučuje se (zvláště u chráněných nebo vzácných druhů) získání vzorků neinvazivními metodami, tj. z exkrementů (King a kol., 2008) nebo výplachem. Při tomto přístupu se jako metabarkodingový marker obvykle používá COI (Cytochrom Oxidáza podjednotka 1) (Sousa a kol., 2016). Pro stanovení kvality (taxonomické složení) potravy se využívá průkaz prezence, resp. frekvence výskytu sekvencí a pro stanovení podílu jednotlivých složek (semi-kvantitativní analýza potravy) relativní počet sekvencí. Za zmínku stojí, že analýza exkrementů přináší ve srovnání s analýzou obsahu žaludku mnohem přesnější informaci (Deagle a kol., 2019). Využívá se však především u organizmů, kde je studium potravy problematické (pelagické druhy velkých ryb či kytovců), anebo naopak malé druhy (hmyz), kde je identifikace potravy analýzou zažívadel značně komplikovaná a jedině molekulární metody analýzy exkrementů mohou prozradit více.

2.4. Analýza obsahu trávicího traktu v potravní ekologii ryb

Studium potravní ekologie ryb a jiných živočichů, založené na analýze obsahu trávicího traktu, se stalo standardní metodou už před mnoha lety (Hyslop, 1980). V současnosti se využívají i některé jiné metody, jako například výše uvedené radioizotopy a stabilní izotopy, přímá pozorování nebo analýzy mastných kyselin (Braga a kol., 2012). Tyto metody mají svá pozitiva – jsou často přesnější a lze jimi identifikovat i složky, které nejsou detekovatelné vizuálně nebo mikroskopicky, ale i negativa – finanční náročnost a komplikované postupy získávání výsledků. Každopádně, přímá analýza obsahu trávicích traktů získaných pitvou nebo výplachem je stále nejvíce využívanou a nejjednodušší metodou s velkým potenciálem a je stále dostatečně dobrá pro většinu ekologických studií. V této kapitole je popsán proces přípravy designu výzkumu, některé aspekty sběru materiálu, získávání vzorků obsahu trávicích traktů, zpracování vzorků a determinace potravy (Obr. 1).



Obr. 1. *Schéma důležitých kroků v procesu přípravy přímé analýzy obsahu trávicích traktů (jednotlivé kroky jsou vysvětlené v dalších kapitolách).*

2.5. Design sběru vzorků v terénu

Pro lepší pochopení údajů o složení potravy ryb a jejich správnou interpretaci je třeba před začátkem samotného výzkumu zvážit mnoho různých aspektů designu vzorkování. Kromě toho různé otázky týkající se složení potravy ryb vyžadují různé přístupy získávání a analýzy údajů. Škála (velikost vzorkované plochy), ve které bude výzkum probíhat, musí být stanovena tak, aby byla dostatečně velká pro získání pravdivého obrazu o cílové populaci. Pokud je příliš velká, vede to ke zbytečnému mrhání dostupnými zdroji a v extrémním případě i k tomu, že výzkum nebude dokončen. To, zda bude realizován na jediném nebo více habitatech, představujících jeden typ, nebo na větší geografické ploše, závisí na tom, zda plánujeme intenzivní nebo extenzivní výzkum. Extenzivní studie mají malou intenzitu vzorkování na jednotku plochy nebo času. Intenzivní naopak zahrnují opakovaná vzorkování konkrétní populace s cílem získat o ní co nejpřesnější údaje. Vhodný design vzorkování ve výzkumu složení potravy zahrnuje (1) jednoduché náhodné vzorkování, (2) stratifikované náhodné vzorkování, (3) systematické vzorkování a (4) vícestupňové vzorkování. Výběr vhodného designu sběru materiálu závisí na mnohých faktorech, mezi něž patří cíl výzkumu, logistika, dostupnost a náklady (Chipps a Garvey, 2007; Henderson, 2009). Pozornost musí být věnována i časovým aspektům sběru vzorků. Potravní chování ryb se v průběhu dne často mění, proto se při plánování odběrů musí brát v úvahu i diurnální potravní aktivita zkoumaného druhu. Načasování odběrů je důležité i z jiného pohledu. Pokud se čas odběrů na lokalitách liší, může to vést k chybným závěrům o typickém potravním chování. Odlišná délka a začátek intervalu odběru totiž přinášejí odlišné výsledky o chronologii příjmu potravy (Cortés, 1997; Chipps a Garvey, 2007). Diurnální změny v potravní aktivitě a složení potravy tak mohou v kombinaci s nevhodným časem sběru materiálu vést k významným odchylkám ve výsledcích. Týká se to hlavně ryb živících se rostlinnou i živočišnou potravou (Horppila, 1999). Výraznou měrou může výsledky sledování diurnálních změn i samotného složení potravy ovlivnit použité vybavení, resp. metoda odběru. Aktivní techniky odběrů, např. elektrolov, zátahové sítě nebo vlečné sítě, se používají pro získání reprezentativních vzorků v pravidelných intervalech po dobu 24h cyklu. Pro ryby, které mohou při aktivním lovu uniknout, resp. aktivní metody nejsou použitelné, se využívají metody pasivní (např. tenata a vrše). Při jejich využití je nutné zabezpečit pravidelné vybírání odchycených jedinců. Různé metody odběru použité u konkrétní populace ryb mohou vést k odlišnému (chybnému) hodnocení potravní aktivity. Příčinou je například to, že při použití pasivních metod jsou ve vzorku zachyceni hlavně jedinci, kteří aktivně vyhledávají potravu, resp. jsou ve fázi jejího aktivního příjmu a naplnění trávicího traktu je u nich obvykle vyšší než u ryb, které jsou pasivní – odpočívají, resp. tráví

přijatou potravu. Aktivní metody naopak zachytávají i málo aktivní jedince, resp. jedince nepřijímající potravu stejně jako ryby, které potravu aktivně vyhledávají (Hayward a kol., 1989). Navíc je třeba brát v úvahu i to, že při některých metodách může docházet k tomu, že výsledky jsou ovlivněny vyvrhováním přijaté potravy v důsledku stresu, nebo naopak predací ve vrších (Bowen, 1996). Aktivita ryb a příjem potravy jsou často významně ovlivněné různými faktory prostředí. Jejich potravní chování může být závislé na teplotě, světelných podmínkách, zákalu, rychlosti proudu, barometrickém tlaku, větru aj. (Stoner, 2004). To znamená, že při odběrech musí být tyto proměnné prostředí zaznamenávány (Henderson, 2009) a měly by se rovněž odrazit v analýze, a hlavně v intepretaci výsledků.

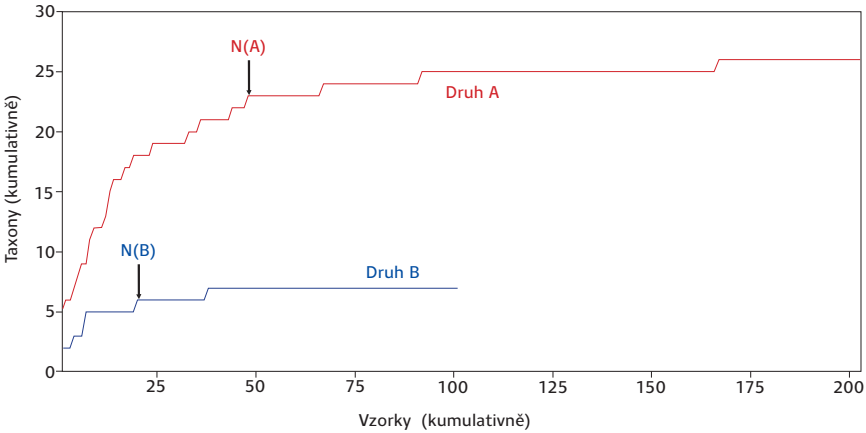
Ve většině případů je rovněž potřeba získat i vzorek potenciálně dostupné potravy (potravní nabídky). Tato problematika je detailně rozebrána v kapitole 2.15. Metody sběru dostupné potravy ryb závisí jednak na cílové skupině organizmů sloužících jako potrava a jejich dostupnosti, ale i na prostředí, ze kterého jsou vzorky odebírány a mnoha dalších faktorech. Po upřesnění toho, co je v rámci výzkumu považováno za potravu dostupnou pro zkoumaný druh v konkrétním prostředí, je potřeba zvolit nejvhodnější metody a techniky odběrů pro získání použitelného vzorku těchto organizmů nebo organické hmoty.

Pro získání detailnějších informací a přehledu o designu vzorkování je vhodné zohlednit i všeobecné, dosud publikované údaje o ekologických a limnoekologických principech získávání materiálu, plánování vzorkování a cílech výzkumu (např. Cortés, 1997; Chips a Garvey, 2007; Henderson, 2009; Hauer a Lamberti, 2011).

2.6. Velikost vzorku

Mnohé příručky, návody a metodické publikace zdůrazňují pravidlo, podle kterého je vhodné zahájit výzkum až po zvážení otázky, kolik vzorků bude potřeba k dosažení požadovaného cíle, kterým je obvykle složení potravy cílového druhu. Stanovení potřebného počtu vzorků lze provést různými způsoby. Jedním z nich je použití tzv. kumulativních křivek kořisti. Při tomto postupu se graficky zobrazují kumulativní počty druhů (taxonů) kořisti (resp. typů potravy) vůči kumulativnímu počtu zpracovaných vzorků. Bod, ve kterém se křivka spojnic bodů stává asymptotickou, vyjadřuje minimální počet vzorků, které je potřeba zpracovat, abychom dosáhli spolehlivých výsledků, použitelných pro definování obsahu trávicích traktů (Cortés, 1997). Hypotetický příklad je zobrazen a vysvětlen na Obr. 2. Použitelné jsou ale i jiné techniky – například analýzou síly testu (z angl. *Power Analysis*) můžeme stanovit velikost souboru (počet vzorků) například s použitím freeware programu G*Power (Faul a kol., 2007, 2009). Otázka spolehlivosti závěrů odvozených z testu (resp. výzkumu)

je na místě v případech, kdy je velikost vzorku náhodnou proměnnou. V praxi nejsou takovéto případy ojedinělé, protože v ekologickém výzkumu se nezřídka stává, že je odebraných tolik vzorků, kolik je to v daných podmínkách možné (Manly a kol., 2002). Velikost vzorku může totiž být limitovaná velikostí populace, denzitou jedinců, stavem ohrožení nebo ochrany konkrétního druhu, případně finančními nebo jinými zdroji. Tyto okolnosti mohou způsobit, že jednoduše není možné získat optimální vzorek. Každopádně je však nutné velikost vzorku stanovit dopředu a usilovat o její dosažení tak, aby soubory dat byly přinejmenším srovnatelné a výsledky co nejspolehlivější.



Obr. 2. *Hypotetický příklad kumulativních křivek kořisti: u druhu A stačí 50 vzorků [dvou- i čtyřnásobný počet vzorků navýší počet taxonů potravy (kořisti) pouze o jeden, což není efektivní ani šetrné vůči rybám]. U druhu B pak postačuje 20 vzorků (neboť při 6 vzorcích je to pouze o jeden taxon kořisti méně, ale s ohledem na nízkou diverzitu potravy je to 20% nárůst). Body N/A a N/B indikují optimální (efektivní) počet vzorků.*

2.7. Subsampling („podvzorkování“) napříč velikostními skupinami

V případě, že se terénním výzkumem získá velké množství materiálu, je třeba provést tzv. podvzorkování (subsampling), při kterém nejsou zpracováni všichni jedinci, ale jenom část z nich (dílčí vzorky). Důležité je přitom zachytit reprezentativní část jedinců ze všech velikostních skupin. Tato stratifikace podvzorků založená na velikosti těla vyšetřovaných ryb je odůvodněná tím, že velikost jedince ovlivňuje nejen kvantitu, ale i kvalitu potravy jedinců jednoho druhu. Potrava se u některých druhů může lišit jen málo, ale u jiných mohou

jedinci v různých ontogenetických stadiích (resp. při různé velikosti těla) patřit do rozdílných potravních skupin (např. García-Berthou, 2001; Rezsu a Specziár, 2006; Koščo a kol., 2008). Počet podvzorků může odrážet relativní podíl jedinců jednotlivých velikostních skupin nebo stanovený počet jedinců reprezentujících příslušnou velikostní skupinu. V prvním případě se podvzorky skládají z náhodně vybraných jedinců, jejichž počet v každé velikostní skupině přesně odráží podíl této skupiny na celkovém vzorku. Tím je zachován poměr velikostí v celém vzorku. Problémem tohoto přístupu může být nízké zastoupení některých, obvykle největších, velikostních skupin. Velcí jedinci jsou ve vzorcích obvykle nejméně početní, nebo se dokonce do podvzorků vůbec nedostanou, případně je jejich počet tak nízký, že v kombinaci s variabilitou jedinců či náhodnými extrémními hodnotami neodpovídají výsledky reálné situaci. Aby se těmto situacím předešlo, používá se podvzorkování založené na stanovení pevného čísla dílčích vzorků pro každou velikostní skupinu (Chipps a Garvey, 2007).

2.8. Ošetření (zpracování) vzorků před analýzou

Obsah trávicích traktů lze získat z živých, čerstvě usmrcených nebo konzervovaných ryb, případně z jejich čerstvých nebo konzervovaných trávicích traktů. Většina vzorků se obvykle neanalyzuje bezprostředně po odebrání. V těchto případech by měly být vzorky okamžitě po odběru konzervovány zamrazením nebo chemicky, aby se předešlo jejich znehodnocení trávicími procesy a rozkladem (Chipps a Garvey, 2007). I když skutečnost, zda se jednalo o čerstvý nebo konzervovaný materiál, nebývá často zohledňována, může to výsledky analýz významně ovlivnit. Každý z těchto postupů má své výhody i nevýhody. Bez ohledu na vybavení, finanční náklady, zdravotní či environmetální rizika se jednotlivé postupy liší i v tom, zda a jaký mají vliv na odebrané vzorky a jak se tento vliv projevuje. I když se to na první pohled nezdá a často je to v popisu metodických postupů opomíjeno, ošetření vzorků odebraných různými postupy může způsobit nejen rozdíly v kvantitativních stanoveních (nejvíce u gravimetrických metod) a vyhodnocení vzorků, ale i obtížnou srovnatelnost výsledků studií, v nichž nebyly vzorky ošetřeny stejným způsobem. Kromě změn v hmotnosti mohou být některé postupy konzervace vzorků problematické, např. při výpočtu biomasy potravy s použitím délkohmotnostních vztahů. Různé metody konzervace vzorků vedou totiž kromě změn hmotnosti i ke změnám v objemu a rozměrech potravních složek. Tyto skutečnosti je třeba brát do úvahy nejen při plánování výzkumu, volbě metody zpracování, konzervace a analýz, ale i při srovnávání výsledků s dříve publikovanými pracemi. Nejvýznamnějšími změnami způsobenými různými metodami konzervace jsou ztráty hmotnosti

bezobratlých ve vzorcích potravy. Pokles jejich hmotnosti a změny velikosti vlivem konzervačních médií byly dokumentovány v řadě prací (např. Mills a kol., 1982; Leuven a kol., 1985; Heise a kol., 1988; Von Schiller a Solimini, 2005; Paradis a kol., 2007). **Líh (etanol)** například způsobuje ztrátu hmotnosti dehydrací tkání (Leuven a kol., 1985; Heise a kol., 1988; Johnston a Cunjak, 1999; Von Schiller a Solimini, 2005). Zmenšování rozměrů je rovněž příčinou, v jejímž důsledku jsou výsledky získané výpočtem z délkohmotnostních vztahů nižší ve srovnání s výsledky zjištěnými v kontrolním nekonzervovaném vzorku (González a kol., 2002). Tyto rozdíly se zvětšují s velikostí kořisti a způsobují podhodnocení zkonzumované biomasy. Ke konzervaci vzorků potravy slouží nejlépe technický líh, který se při konzervaci neředí, naopak je potřeba, aby takto konzervovaný vzorek obsahoval minimum vody. Navíc je velmi vhodné konzervační médium (líh) po několika dnech vyměnit za čerstvé (postačuje jedenkrát). Nevýhody konzervace lihem spočívají ve vyšší ceně oproti formaldehydu a problémech se skladováním zásobního lihu, které musí odpovídat předpisům pro skladování hořlavých látek (ČSN 65 0201). Konzervace **formaldehydem** (36–38% vodným roztokem, nazývaným formalín) způsobuje obvykle málo významné nebo jen minimální změny délkohmotnostních ukazatelů. Hell (1960) však uvádí, že změny (snížení) hmotnosti nitěnek rodu *Tubifex* konzervovaných ve formalínu jsou poměrně značné. V některých případech však byl dokonce zaznamenaný mírný nárůst hmotnosti v porovnání s kontrolním nekonzervovaným vzorkem (Hyslop, 1980). Copp a Mann (1993) korigovali v reakci na změny způsobené konzervací formaldehydem hodnoty délky (-2,5 %) i hmotnosti (+7,5 %) vyšetřovaných juvenilních línů.

Minimální nebo žádné změny v biomase bezobratlých konzervovaných ve formalínu jsou důvodem, pro který je většinou autorů považován za vhodnější (resp. způsobující menší změny) ve srovnání s lihem (např. Mills a kol., 1982; Leuven a kol., 1985; Paradis a kol., 2007). V protikladu s výsledky a názory takřka všech autorů Wetzel a kol. (2005) nezjistili žádné signifikantní rozdíly mezi vzorky konzervovanými lihem a formalínem, přičemž analyzovali vlhkou (čerstvou) i suchou hmotnost a hmotnost tzv. bezpopelové sušiny. V souvislosti s konzervací formalínem se však objevuje jiný problém, spočívající v dekalcifikaci kostí a otolitů obratlovců (Jobling a kol., 2001) používaných k rekonstrukci velikosti a stanovení věku kořisti po jejím částečném natrávení. Aplikace formalínu může tento zpětný odhad znemožnit. Kromě samotného konzervačního média ovlivňuje změny v hmotnosti, objemu a rozměrech konzervovaných komponentů i teplota a doba skladování vzorků. Význam při tom má i velikost organizmů, jejich taxonomická příslušnost a s tím související rozdíly ve složení těla (např. Paradis a kol., 2007). Vzhledem k zařazení formaldehydu mezi karcinogenní látky je nutno dodržovat při práci s ním základní pravidla bezpečnosti při práci

(digestoř, větrání). Laboratorní předpisy nařizují rovněž použití ochranného oděvu, rukavic a brýlí. V současnosti se obecně od používání formaldehydu ke konzervaci vzorků spíše ustupuje kromě odůvodněných případů, jako je např. extrémní obsah nežádoucí organických sedimentů (*debris*).

Problematika vlivu **zmrazení** vzorků na změny biomasy a rozměrů bezobratlých není tak detailně prozkoumaná jako v případě lihu a formalínu. Je však známo, že k redukci hmoty dochází u larev ryb, což indikuje vysokou pravděpodobnost toho, že zamrazení může být problematickým způsobem konzervování i u bezobratlých v potravě ryb. Haubrock a kol. (2018) prokázali, že zmrazením na -20 °C dochází ke zvětšení délky těla sumečka skvrnitého (*Ictalurus punctatus*, délka těla 12–57 cm) v průměru o 3,3 %. Obecně se jako nejvhodnější způsob dlouhodobé konzervace vzorků zaměřených na stanovení biomasy potravy (zvláště členovců) jeví formalín v kombinaci se zamrazením. V každém případě je však potřeba zvolit způsob konzervace hlavně s ohledem na cíle výzkumu a metody hodnocení vzorků (viz Tab. 1), nejlépe po předběžném screeningu složení potravy a studiu literatury pojednávající o změnách způsobených různými způsoby konzervace s ohledem na konkrétní přítomné potravní složky. Důležité je rovněž uvědomit si, že konzervace ulovených ryb způsobuje nevratné změny v jejich tkáních a ztěžuje další zpracování, což se může odrazit v přesnosti biometrických údajů.

Tab. 1. *Vhodnost různých metod konzervace ryb, resp. trávicích traktů a jejich obsahu pro další analýzy.*

Vhodnost pro Způsob konzervace	Stanovení biomasy na základě délkohmotnostních vztahů	Přímé stanovení biomasy (gravimetrické, volumetrické)	Hodnocení kostí a otolitů
Živá ryba, čerstvá potrava	ANO	ANO	ANO
Zamrazení	ANO*	ANO	ANO
Líh	NE	NE	ANO
Formaldehyd	ANO	ANO**	NE
Formalín + zamrazení	ANO	ANO**	ANO

*Pozn. * drobné změny, ** ovlivnění konzervací.*

Pokud není možné získat vzorky potravy z živých nebo čerstvě usmrcených ryb, obvykle se na konzervaci vzorků, případně celých ryb, používá 4% formaldehyd (10% formalín) nebo technický líh (viz výše). Ryby se usmrcují vysokou dávkou anestetika (např. hřebíčkového oleje ≥ 0,2 $ml.l^{-1}$, Keene a kol., 1998). V případě, že je ryba těžší než 100 g, lze formalín nebo líh injikovat usmrcené rybě do dutiny břišní ještě před jejím vložením do konzervačního média. Další možností je opatrné částečné otevření břišní dutiny nůžkami tak, aby byl zajištěný bezprostřední přístup konzervační tekutiny k trávicímu traktu. Pokud nejsou ryby konzervované chemicky, měly by být do laboratoře transportované na ledu a tam až do doby zpracování zamrazené. Potrava dravých ryb transportovaných na ledu může být zároveň konzervovaná i injikací nasyceného roztoku (22 $g.100\ ml^{-1}$ při 20 °C) jedlé sody (hydrogenuhličitan sodný, Hauer a Lamberti, 2011) do dutiny břišní. Trávicí trakt velkých ryb je vhodné odebrat přímo v terénu a transportovat jednotlivě do laboratoře k zamrazení.

2.9. Základní všeobecná pravidla práce a vzorkování v terénu

Při sběru materiálu v terénu je třeba se řídit vhodnými instruktážními manuály, metodikami a bezpečnostními pravidly. K tomu byla v souvislosti s ichtyologickými odběry publikována celá řada prací (z našich autorů např. Holčík a Hensel, 1972; Kubečka a Prchalová, 2006). Ze základních pravidel je třeba zdůraznit nutnost přesného vyplnění dopředu připravených terénních protokolů (Tab. 2) – zaznamenání data, času, názvu (čísla) lokality a všech dalších důležitých informací, které jsou potřeba pro vyhodnocení a interpretaci výsledků. Patří sem především poznámky o počasí, fyzikálně-chemické charakteristiky vody a popis habitatu. Vhodné je rovněž zaznamenat GPS souřadnice dané lokality a její fotodokumentaci. Získané vzorky musí být bezprostředně po odběru nezaměnitelně a trvale označeny. Při konzervaci lihem je však nutno používat k popisu jiné než lihové popisovače kvůli velmi vysoké pravděpodobnosti smazání nebo poškození označení na povrchu transportních nádob. Při manipulaci s rybami a jejich usmrcení musí být dodržena všechna etická pravidla a principy, především s ohledem na Zákon o týrání (welfare) zvířat č. 246/1992 Sb. v platném znění. Okamžitá konzervace nebo zamrazení usmrcených ryb (resp. trávicích traktů či jejich obsahu) je nevyhnutelné pro to, aby byly vzorky zachovány ve stavu, v jakém byly odebrány a nedocházelo k jejich dalšímu natrávení. To by mohlo ovlivnit výsledky především s ohledem na kvantitu potravy, ale i pokud jde o úroveň a přesnost identifikace potravních složek.

Tab. 2. *Terénní protokol – příklad.*

Datum/čas	7. 7. 2019/10:15 – 11:00					
Druh	Plotice obecná					
Lokalita	A – Dyje pod Novými Mlýny					
Počasí (teplota)	slunečno, 32 °C					
Kvalita vody[1]	0,5–0,7 $m.s^{-1}$, 0,35–0,45 m, 26,4 °C, 11,87 $mg.l^{-1}$/107,9 % O_2, pH 8,77, 499 $mS.m^{-1}$, 47 NTU					
GPS	48°51´28.202"N 16°43´27.031"E					
Specifika[2]	lotický úsek (< 0,7 m, > 0,4 $m.s^{-1}$)					
Substrát[3]	štěrk					
Pokryv makrofyt[4]	vláknité řasy 60 %, *Myriophyllum* sp. 10 %, *Glyceria* +					
Technika odběru	elektrolov					
Konzervace[5]	líh – obsah ½ traktu					
Číslo (kód)[6]	RR/A/Lo/1	RR/A/Lo/2	RR/A/Lo/3	RR/A/Lo/4	RR/A/Lo/5	RR/A/Lo/6
Pohlaví[8]	♂	♂ juv[7]	juv	♀	♀juv	juv
TL (mm)[9]	215	140	97	207	130	77
SL (mm)[10]	177	124	77	174	119	54
W (g)[11]	79,7	34,0	17,4	97,2	64,5	14,1
W_e (g)[12]	57,4	24,9	14,7	54,3	49,6	9,9
Fotodokumentace[13]	NM070719RR/A/Lo/1			NM070719RR/A/Lo/4		
Poznámky[14]	poranění ústa			deformace páteř		

[1] rychlost proudu, hloubka, teplota, obsah a nasycení kyslíkem, pH, vodivost, turbidita aj. podle potřeb a cílů výzkumu,
[2] specifika cíle vyšetření (habitat, parazitace, poranění, výtěrová aktivita, genotyp, fenotyp apod.),
[3] sedimenty, bahno, štěrk, kameny, balvany,
[4] % pokryvu plochy habitatu (ojediněle +),
[5] líh, formaldehyd, zmrazení,
[6] RR – plotice obecná (Rutilus rutilus), A – označení lokality, Lo – lotický habitat, 1 – číslo ryby,
[7] juvenilní,
[8–12] netřeba v případě konzervace celých ryb a/nebo laboratorní analýzy,
[13] identifikace souboru a čísla snímku,
[14] narušení trávicího traktu při pitvě, poranění, výskyt ektoparazitů a ostatní zjevné exteriérové znaky (deformace apod.) aj.

2.10. Analýza trávicího traktu pitvou

Získání obsahu trávicího traktu pitvou je stále nejefektivnější metodou přinášející nejpřesnější výsledky a řadu dalších dat přesto, že je poněkud kontroverzní z pohledu etiky, ochrany ryb a případných ekonomických souvislostí. Kromě možnosti získání úplného obsahu trávicího traktu ryb je po usmrcení a pitvě vyšetřovaných ryb možné získat celou řadu dalších důležitých údajů. Dalšími důvody, pro které je tato metoda nejvíce využívána (pokud se nejedná o výzkum reálně ohrožených málo početných populací), je významně větší možnost získání všech potravních složek a neomezená velikost vyšetřovaných ryb ve srovnání s aplikací neletálních metod (výplachy). Získávání vzorků potravy pitvou je rovněž časově a manuálně méně náročné a nevyžaduje žádné speciální vybavení.

2.10.1. Příprava vzorků

Všechny vzorky, které mají být analyzovány, musí být vhodně připravené. V případě, že byl ke konzervaci použit formalín, měl by být jako nebezpečná látka před analýzou pufrovaný boraxem (tetraboritan sodný $Na_2[B_4O_5(OH)_4] \cdot 8H_2O$) v množství 3 g na litr formalínu (Moulton a kol., 2002).

Před analýzou musí být připravený laboratorní protokol, do něhož se zaznamenávají všechny důležité informace o analyzovaném vzorku (Tab. 3). Po opláchnutí a osušení vyšetřované ryby filtračním papírem nebo buničinou se provádějí potřebná morfometrická měření a zaznamená se hmotnost ryby. V závislosti na cílech výzkumu a velikosti ryby se měří různé metriky s potřebnou mírou přesnosti. Úroveň přesnosti je obvykle kompromisem, kdy jeho preciznost odpovídá času, který měření vyžadují. Měření, resp. zaznamenání celkové a standardní délky na milimetry a hmotnosti na desetiny gramu, představuje pro většinu ekologických studií dostatečnou přesnost i u menších druhů ryb o hmotnosti desítek gramů. Při práci s menšími rybami (ranými vývojovými stadii) je vhodné především hmotnostní údaje více zpřesnit. V případě, že jsou měřeny konzervované ryby, je třeba zvažovat i skutečnost, že hmotnost a rozměry se použitím konzervantů mohou měnit (podobně i potravní složky, viz kapitola 2.8.). Mění se i vlastnosti tkání a dochází ke ztížené manipulaci, což může komplikovat měření, a hlavně ovlivnit přesnost získaných údajů.

Tab. 3. *Laboratorního protokol – příklad nejdůležitějších položek.*

Datum	7. 7. 2019					
Druh	plotice					
Lokalita	A – Dyje pod Novými Mlýny					
Metoda odběru[1]	pitva					
Rozsah analýzy[2]	celý trakt					
Číslo (kód)	RR1/A/ Lo/1	RR1/A/ Lo/2	RR1/A/ Lo/3	RR1/A/ Lo/4	RR1/A/ Lo/5	RR1/A/ Lo/6
Pohlaví[3]						
TL (mm)[4]						
SL (mm)[5]						
W (g)[6]						
W_{st}[7]						
W_{ste}[8]						
Hmotnost potravy[9]						
Naplnění (odhad)[10]						
W_g[11]						
Parazitace traktu						
Fotodokumentace[12]						
Poznámky[13]						

[1] výplach/průplach/pitva (+ důležité detaily),
[2] žaludek, první třetina/polovina/celý trávicí trakt,
[3–6] pokud nebyly zaznamenány při odběru,
[7] W_{st} hmotnost střeva (resp. analyzované části) s potravou,
[8] W_{ste} hmotnost střeva (resp. analyzované části) po vynětí potravy,
[9] W_{st} - W_{ste},
[10] viz kap. 2.12.2.,
[11] W_g hmotnost gonád,
[12] identifikace souboru a čísla snímku,
[13] úspěšnost výplachu/průplachu apod.

Posledním krokem přípravy vzorků je obvykle vnější vizuální kontrola vyšetřované ryby a zaznamenání všech údajů, které mohou mít vliv na příjem potravy, jako jsou například zranění, výskyt ektoparazitů apod. Tyto údaje

mohou později pomoci lépe interpretovat získané údaje, případně vysvětlit extrémní hodnoty či v odůvodněných případech vyloučit některé údaje z dalších analýz. V případě dostatečného množství údajů je rovněž možné statisticky vyhodnotit vliv těchto faktorů na kvantitu či kvalitu přijímané potravy.

2.10.2. Získání obsahu trávicího traktu

Tento krok je kriticky důležitý pro získání optimálních vzorků pro analýzu, kterou mají být dosaženy relevantní výsledky. Některé kroky v prezentovaných postupech nejsou nezbytné (např. měření délky trávicího traktu), pokud nejsou potřeba pro další analýzy. Podobně je vhodné důkladně zvážit případnou separaci a následnou analýzu obsahu žaludku, resp. přední části traktu. Rozhodování o tom, zda bude analyzován celý obsah nebo jenom jeho vybrané části, je velice důležité s ohledem na relativní stravitelnost jednotlivých typů potravy. Absolutní i relativní množství přijatých potravních složek je totiž těžko odhadnutelné v případech, kdy jsou jednotlivé složky v různém stadiu natrávení. Při vyšším stupni natrávení se rovněž snižuje přesnost determinace, a tím i celková přesnost analýzy. Aby se předešlo těmto nepřesnostem zvláště v případech, kdy jsou v potravě přítomné jednak snadno stravitelné složky (larvy ryb, máloštětinatí červi) i typy potravy odolné vůči trávicím enzymům (larvy vodního hmyzu), doporučuje se analyzovat pouze přední část traktu (příp. žaludek) (např. Sutela a Huusko, 2000; Liao a kol., 2001; Baker a kol., 2014). Z našich ryb žaludek nemají pouze kaprovití (Cyprinidae), u ostatních druhů je vhodné (pokud to nevyžadují jiné důvody) analyzovat pouze obsah žaludku. Optimálním přístupem je předběžná analýza několika vzorků obsahu celých trávicích traktů a na základě stavu potravy v jednotlivých částech trávicího traktu pak vyhodnocení dalšího postupu (analýzy pouze vybrané části). I v případě, že trávicí trakt rozdělíme (podle anatomie nebo stupně natrávení potravy), nám informace o obsahu jednotlivých částí mohou pomoci pro získání doplňujících údajů. I když nebude možná přesná identifikace nebo stanovení kvantity v zadní části trávicího traktu, už samotná přítomnost či absence potravy nám může být důležitá pro pochopení chronologie, případně diurnálních aspektů příjmu potravy.

Přirozeně je potřeba okamžitě zapisovat všechna zjištění a výsledky do laboratorního protokolu nebo tabulky. Případnou fotodokumentaci důležitých detailů, objektů nebo potravních složek je vhodné provádět spolu s identifikačním štítkem na milimetrovém papíře nebo srovnávací velikostní identifikací (1 cm škála). Protože stravitelnost potravy a její složení obvykle souvisí s délkou traktu, může měření délky a hmotnosti trávicího traktu přinést další důležité informace pro studium potravy v biologickém kontextu.

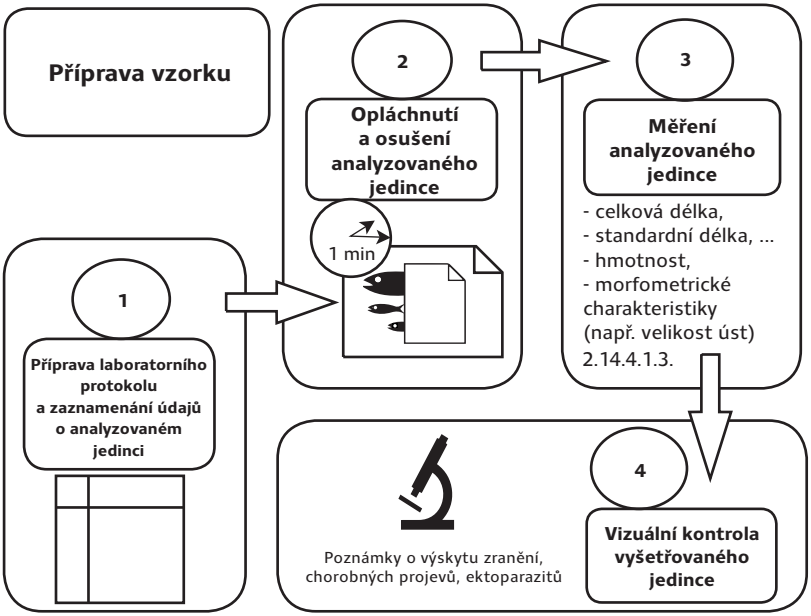
Potřebný materiál: nůžky; skalpel; pinzeta; Petriho misky; stereomikroskop s mikrometrem; filtrační papír nebo buničina; elektronické váhy; voda; pipeta; střička; laboratorní protokol nebo tabulka pro záznam získaných údajů; permanentní popisovač; identifikační štítky; zkumavky (příp. lahvičky, mikrozkumavky); sáčky; konzervační média; digitální fotoaparát; milimetrový papír.

Postup (Obr. 3–7):

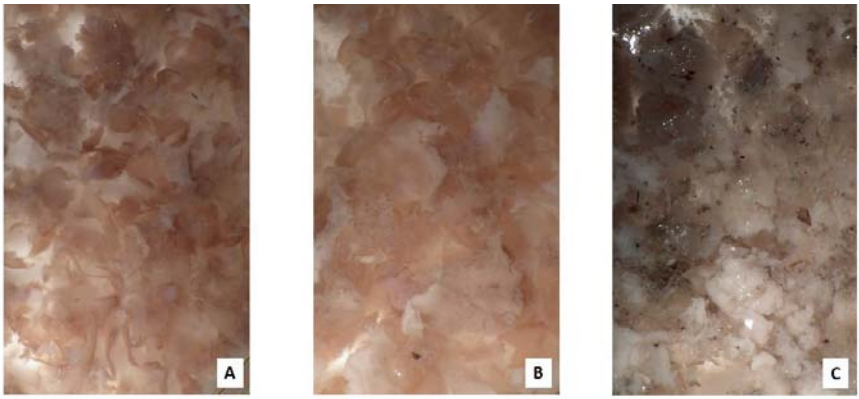
1. Podélný řez na ventrální straně od řitního otvoru po „hrdlo“ (pletenec prsních ploutví) s použitím vhodného skalpelu nebo nůžek.
2. Následné dva transverzální řezy na koncích podélného řezu tak, aby bylo možné otevřít břišní dutinu a odhalit vnitřní orgány (+ zjistit a zaznamenat pohlaví ryby).
3. Podélný řez přes žebra (přestřižení) pod páteří pro oddělení břišní stěny (Obr. 5 a 7).
4. Odstřihnutí jícnu a střeva několik milimetrů před řitním otvorem a ligamentů přidržujících vnitřní orgány pod páteří. To umožní jejich uvolnění a vyjmutí pro snadnější manipulaci s nimi.
5. Kontrola břišní dutiny se zvláštním zřetelem na výskyt parazitů se záznamem případných zvláštností či abnormalit a případnou konzervací parazitů ve 4% formaldehydu nebo 70% etanolu a jejich následnou identifikací a kvantifikací.
6. Oddělení trávicího traktu (jícen, žaludek, střevo) od ostatních vnitřních orgánů a jejich přenesení na Petriho misku odpovídajícího průměru.
7. Stanovení hmotnosti ryby bez vnitřních orgánů.
8. Vizuální parazitologické vyšetření vnější strany trávicího traktu a ostatních vnitřních orgánů se zaznamenáním všech zvláštností a abnormalit a případnou konzervací parazitů a jejich následnou identifikací a kvantifikací.
9. Případná konzervace vnitřností kromě trávicího traktu pro další analýzy (např. ována pro vyhodnocení koeficientu zralosti).
10. Opláchnutí a očištění trávicího traktu s následným osušením buničinou nebo filtračním papírem. Bude-li vyjmutý trávicí trakt konzervován pro pozdější analýzu obsahu, je třeba zabránit ztrátě části jeho obsahu únikem při manipulaci. To lze řešit umístěním traktů jednotlivě do samostatných vzorkovnic anebo jejich zabalením (s popisem) do gázy a následným vložením do společné (větší) vzorkovnice.
11. Změření délky rozvinutého, případně rozřezaného trávicího traktu a jeho jednotlivých částí (přední část, zadní část, resp. žaludek a střevo podle druhu ryby) s přesností na mm s pomocí milimetrového pravítka, posuvného měřidla nebo v případě menších ryb stereomikroskopu s mikrometrem. Alternativně lze použít digitální fotoaparát pro fotografii trávicího traktu

s identifikačním štítkem na milimetrovém papíru a pozdější změření délky s použitím vhodného softwaru.

12. Stanovení hmotnosti trávicího traktu s použitím elektronických vah s odpovídající přesností desetiny až tisíciny gramu. Případně je možné i stanovení objemu trávicího traktu (viz kapitola 2.14.4.1.2.).
13. Oddělení přední části (resp. žaludku) trávicího traktu. U ryb bez žaludku se obvykle odděluje první polovina nebo třetina traktu. V každém případě je nutné tuto skutečnost poznačit a uvést v metodickém popisu vyšetření. Proximální (přední) část (resp. žaludek) obsahuje nejpozději přijatou potravu, a tedy nejméně natrávené složky, které je možné snadněji identifikovat a kvantifikovat. V distální (zadní) třetině až polovině trávicího traktu ryb bez žaludku již nejsou jednotlivé potravní složky až na výjimky (např. hlavové kapsuly larev pakomárů) identifikovatelné (Obr. 4). Při rozhodování, zda budeme dále analyzovat pouze žaludek, celý trávicí trakt nebo pouze jeho část, zohledňujeme rovněž specifika jednotlivých druhů či trofických skupin (Obr. 8 a 9), roční období, teplotní poměry, velikost ryby atd.



Obr. 3. *Schéma postupu přípravy vzorku.*

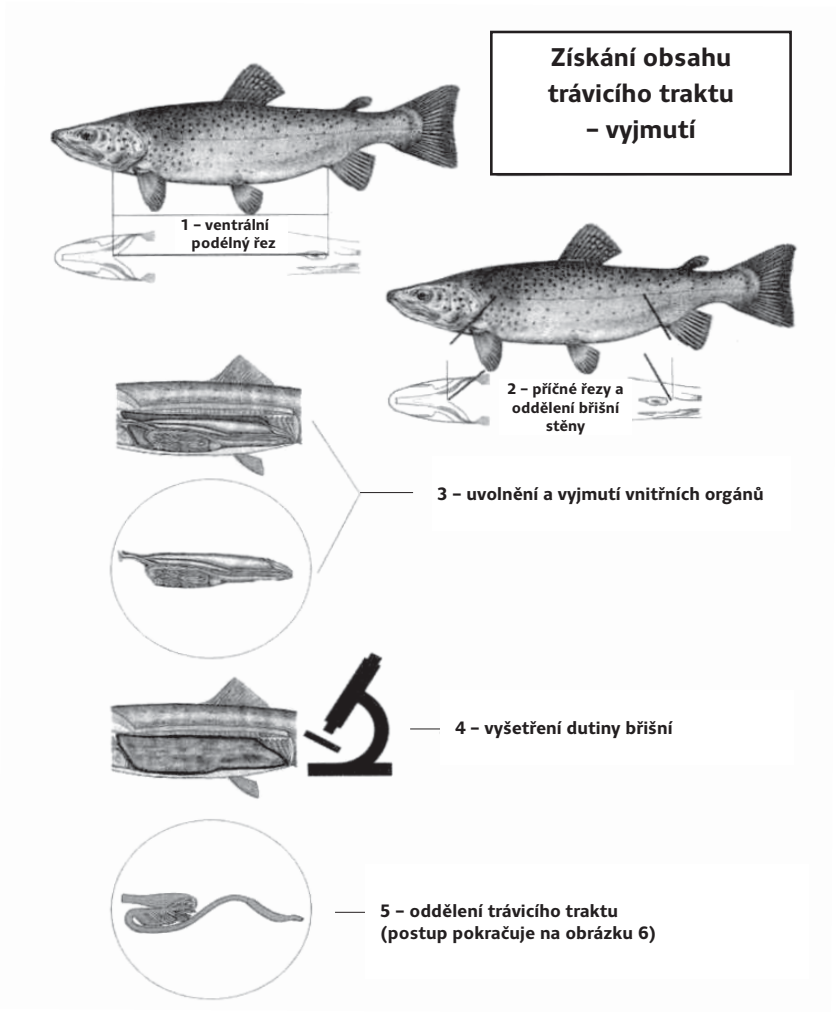


Obr. 4. *Srovnání stupně natrávení potravy v první (0–430 mm, A), druhé (430–860 mm, B) a třetí třetině (860–1 300 mm, C) trávicího traktu kapra (444 mm TL), kontinuálně přijímajícího potravu (obilí) na krmném místě v rybníce (rybník Starý, 19. 7. 2019, teplota vody 24,7 °C, vzorek konzervován 4% formaldehydem, zvětšení 8x). (Foto: Z. Adámek)*

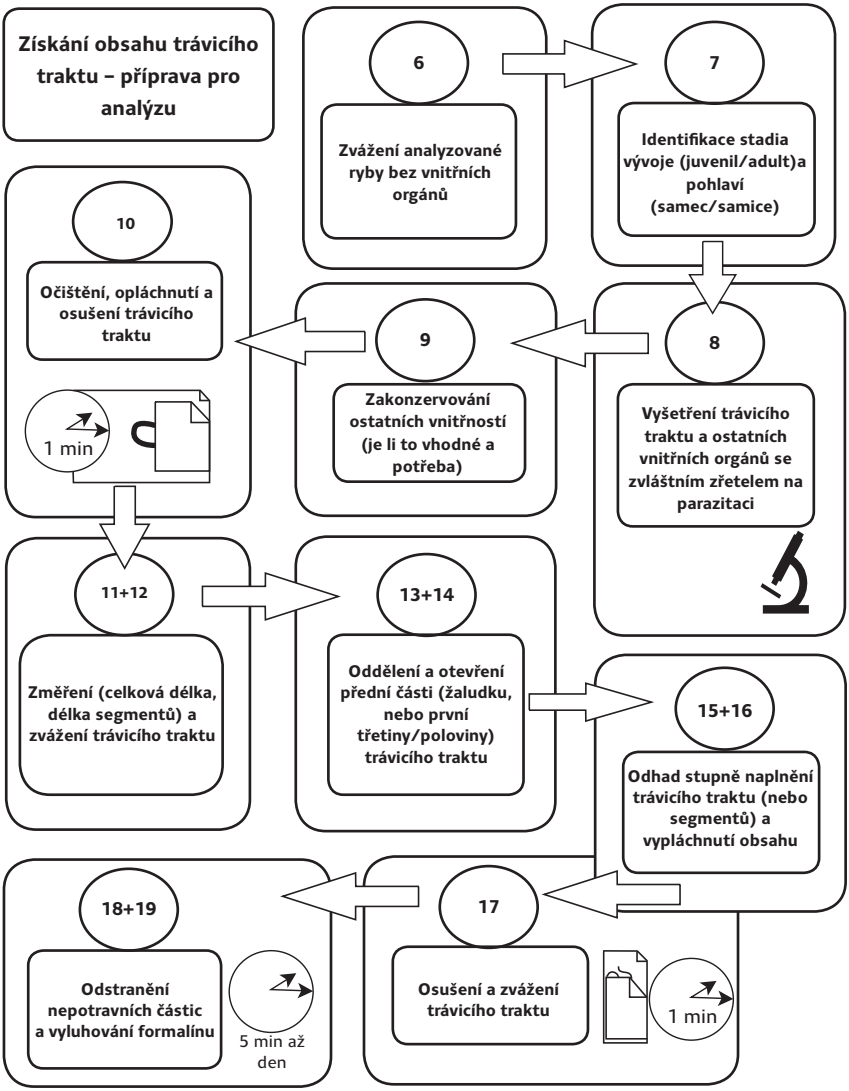
14. Otevření trávicího traktu opatrným mělkým podélným řezem nebo střihem tak, aby nedošlo k poškození potravních složek uvnitř. S malými rybami je lépe pracovat pod stereomikroskopem nebo lupou.
15. Stanovení stupně naplnění trávicího traktu s použitím zvolené metody, resp. stupnice (viz kapitola 2.12.2.).
16. Vybrání velkých potravních složek z analyzovaného segmentu trávicího traktu. Menší potravní složky je vhodné vypláchnout malým množstvím vody střičkou (nebo pipetou) nad Petriho miskou. Jinou možností je vytlačení obsahu posouváním tupého předmětu po délce otevřeného traktu. Tato technika však uvolní kromě potravy i relativně velké množství mukózy a střevního epitelu, což může zkomplikovat determinaci a především kvantifikaci potravy, případně vést k chybné identifikaci jejích součástí (Bowen, 1996).
17. Osušení vyprázdněného trávicího traktu na fosfobronzovém sítku umístěném po dobu 1 minuty na filtračním papíru nebo buničině a stanovení hmotnosti traktu s potřebnou přesností (na desetinu až tisícinu gramu). Rozdíl mezi plným a vyprázdněným traktem je celková hmotnost obsahu.
18. Odstranění materiálu, který je zjevně tvořen parazity, střevním epitelem, minerálními částicemi apod., z obsahu trávicího traktu. Je-li to možné, lze tyto částice spočítat a odhadnout jejich podíl na obsahu, případně

stanovit jejich hmotnost. Tato hmotnost se nezapočítává do hmotnosti potravy, ale poznačí se do protokolu.

19. Vzorky konzervované formalínem se nechávají před zpracováním vyluhovat ve vodě nejméně hodinu, nejlépe však několik hodin až celý den. Toto ošetření nemá vliv na tvarové ani hmotnostní parametry vzorku (ty jsou již beztak ovlivněny konzervací), významně však zredukuje obsah škodlivého formaldehydu.

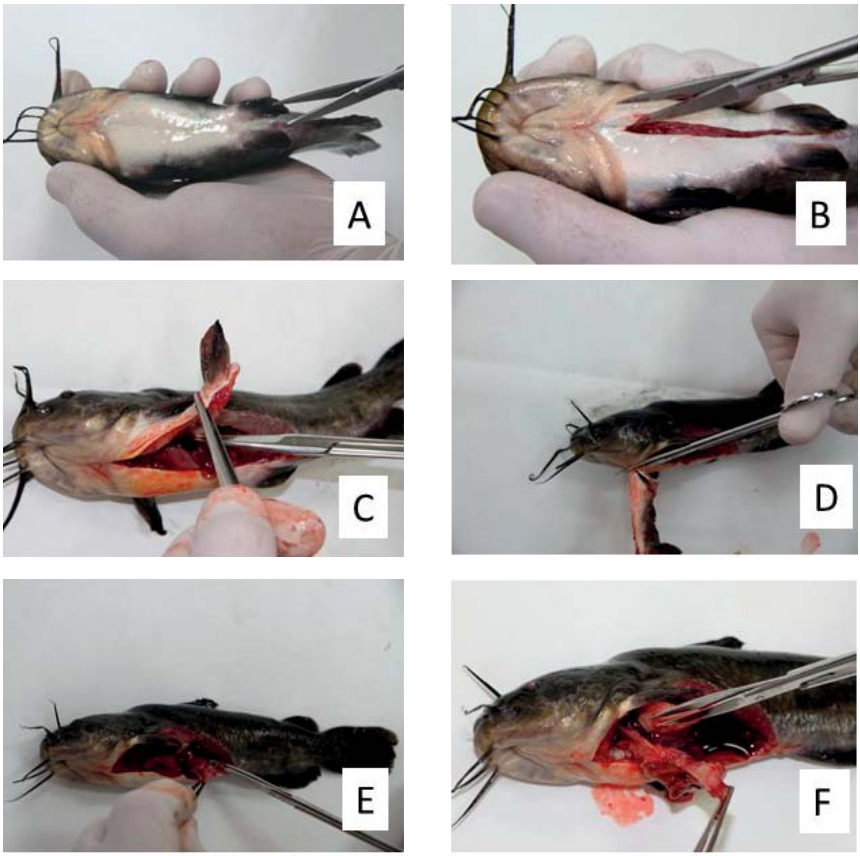


Obr. 5. *Schéma postupu vyjmutí trávicího traktu.*



Bezprostřední zaznamenávání všech získaných údajů.

Obr. 6. *Schéma přípravy obsahu trávicího traktu pro analýzu.*



Obr. 7. *Získání trávicího traktu (sumeček americký) pro analýzu potravy. (Foto: R. Blažek).*

A – Iniciální ventrální podélný střih/řez pro otevření dutiny břišní od análního otvoru.
Pozn.: přednostně používáme nůžky s kulatou špičkou bránící porušení střeva a střih/řez je nutno vést až za pletenec prsních ploutví.

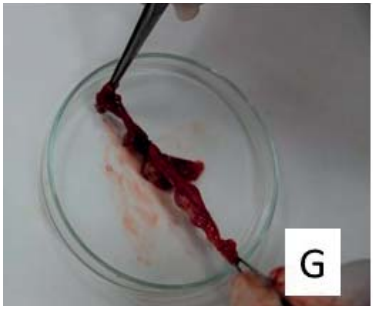
B – Ventrální podélný střih/řez pro otevření dutiny břišní – ukončení.

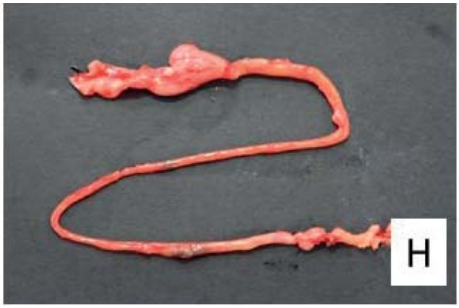
C – Střih pro oddělení stěny břišní.

D – Finální střih pro odstranění stěny břišní.

E – Po odstřižení střeva v distální části (anus) je třeba oddělit všechna spojující ligamenta.

F – Odstřižení jícnu v jeho zadní části (oesogaster).

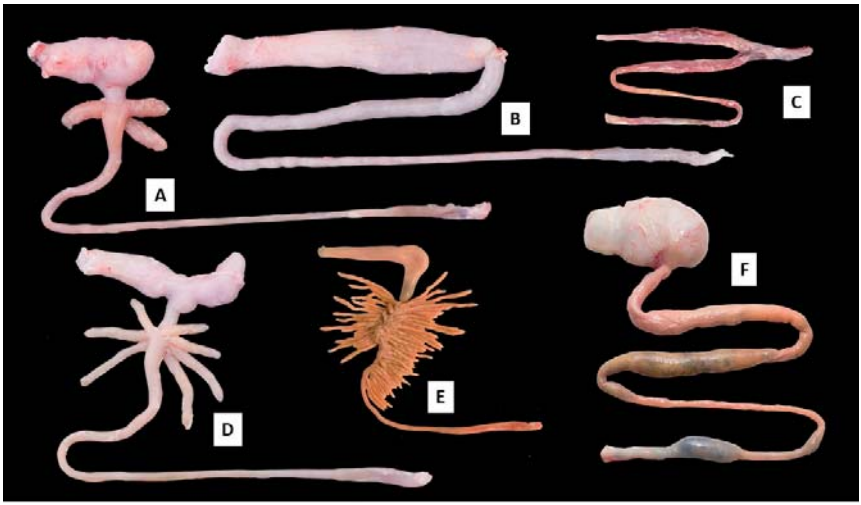




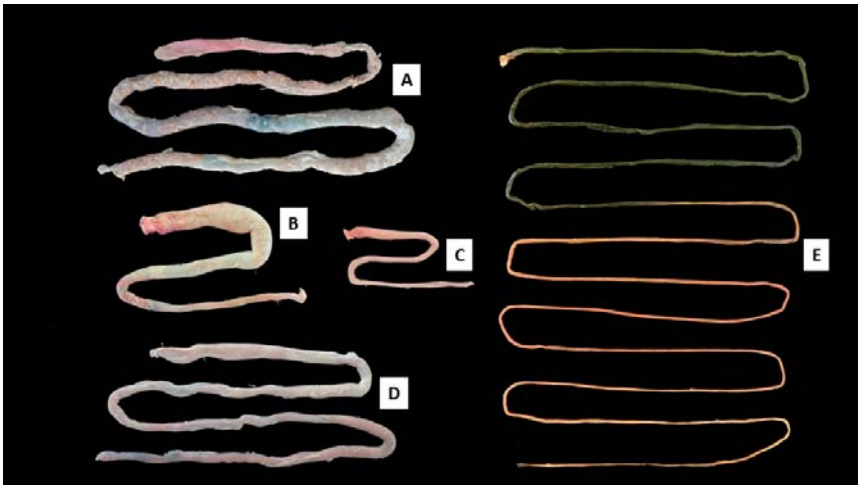
Obr. 7. *Pokračování.*

G – Odstranění vnitřních orgánů (játra, žlučový váček, slezina, gonády) spojených ligamenty s trávicím traktem.

H – Trávicí trakt připravený k vyjmutí potravy rozstřižením stěny střeva a žaludku.



Obr. 8. *Příklady trávicích traktů dravých druhů ryb před vyjmutím potravy (A – okoun říční, B – štika obecná, C – úhoř říční, D – candát obecný, E – pstruh obecný, F – sumec velký). (Foto: P. Vrána).*



Obr. 9. *Příklady trávicích traktů kaprovitých druhů ryb před vyjmutím potravy. V závorce poměr délky střeva k délce těla.*
A – kapr obecný (2,91), B – bolen dravý (0,95), C – lín obecný (1,08), D – amur bílý (2,17), E – tolstolobik bílý (5,97). (Foto: F. Ložek).

2.11. Analýza obsahu trávicího traktu živých ryb

Naprostá většina studií potravy ryb byla spojena s jejich usmrcením. To však může být citlivým problémem v kontextu vztahů s veřejností. Vyšetřované ryby nezřídka patří mezi druhy ohrožené, chráněné, vzácné anebo hospodářsky významné či rybářsky cenné. Kromě toho mohou letální metody studia potravy ryb výrazně ovlivnit populační strukturu, a to i v situacích, kdy jsou studované populace relativně početné. V těchto souvislostech byla vyvinuta řada neletálních metod, díky nimž lze rovněž získat reprezentativní vzorek obsahu trávicího traktu pro potřeby studia potravní ekologie. Efektivita odběru a jeho bezpečnost pro rybu je u všech těchto metod limitovaná dokonalými znalostmi morfologie trávicího traktu konkrétního druhu a velikostní kategorie ryb. Tyto postupy je nutné vždy provádět v anestezi a jsou založeny na získávání obsahu mechanicky nebo s použitím emetik (např Faina, 1975; Hyslop, 1980; Bowen, 1996) a zahrnují použití gastroskopů, trubic, odsávání, výplachů, pinzet nebo trvalých vývodů. Využitelnost těchto postupů sumarizují, popisují, porovnávají a hodnotí Kamler a Pope (2001). Diskutují rovněž jejich účinnost – schopnost získat celý obsah žaludku, resp. přední části trávicí soustavy. S ohledem na

praktickou využitelnost neletálních postupů byl popis náročnějších a méně využívaných postupů zredukován na stručnou informaci o jejich využitelnosti s odkazem na příslušné literární zdroje.

2.11.1. Techniky a zařízení (pomůcky)

2.11.1.1. Gastroskopy

Gastroskopy jsou pravděpodobně nejjednodušší a nejméně invazivní neletální metodou získávání obsahu trávicího traktu ryb (Dubets, 1954). V nejjednodušším provedení je gastroskop dlouhý tubus, který je vsunutý do úst anestezované ryby a přes jícen do přední části trávicí trubice, resp. žaludku. Dnes se namísto dříve používaných kovových tubusů používají akrylátové. Hlavní a největší potravní složky se pomocí gastroskopu dají rozlišit a zaznamenat vizuálně. Gastroskopy však byly používány i na získávání (extrakci) obsahu žaludku ryb, přičemž někteří autoři použili spolu s gastroskopem pinzetu. Tato metoda však není ani s použitím moderních gastroskopů vhodná pro analýzu celého obsahu a v každém případě ovlivňuje výsledky ve prospěch velkých potravních složek. Její použitelnost je tedy omezená pouze na větší ryby a efektivita identifikace či extrakce obsahu žaludku je rovněž sporná až pochybná (Kamler a Pope, 2001).

2.11.1.2. Pinzety

Na přímé získání obsahu přední části trávicí trubice lze použít i pinzetu (výjimečně kyretu). Jak je uvedeno výše, její použití se může kombinovat s použitím gastroskopu u anestezovaných ryb (Kamler a Pope, 2001). Tento postup může, na rozdíl od výlučného použití pinzety, snížit nebezpečí poškození ryby a zvýšit přesnost extrakce. Vyjmutí kořisti ze žaludku velkých ryb (např. sumců velkých) je možné i holou rukou (Vejřík a kol., 2017). Plná vědecká využitelnost tohoto postupu je však sporná, neboť získání (ulovení) takto velkých exemplářů sumce je časově náročné a je známo, že sumec ve stresu (ulovený na udici nebo „long line“) přijatou potravu vyvrhuje.

2.11.1.3. Emetika

Emetika jsou látky vyvolávající zvracení. K jeho vyvolání u ryb se používají roztoky kyseliny arzenité, chlorovodíkové, vínan antimonylo-draselný (tzv. dávivý kámen), peroxid vodíku nebo apomorfin, vstříknuté do žaludku. Ryby jsou umístěny do nádrže s čistou vodou a vyvržený obsah se sbírá ze dna.

Účinnost této metody je však velmi nízká a u některých druhů ryb nejsou emetika použitelná vůbec. Obecně má tento způsob získávání obsahu žaludku i mnoho dalších nevýhod, přičemž i samotný sběr zvratků má spíše charakter získávání hrubých údajů než exaktní vědecké metody. Z těchto důvodů se tyto metody v praxi používají jen skutečně výjimečně (Kamler a Pope, 2001; Barbour a kol., 2012) a nelze je pro běžnou praxi doporučit.

2.11.1.4. Trvalé vývody

Tato kuriozní metoda je nepoužitelná při terénních výzkumech a je jen velmi zřídka aplikovaná výlučně při laboratorních fyziologických experimentech (např. Habibi a Ince, 1983). Jedná se o postupy manuálně a finančně velmi náročné a s ohledem na aspekty spojené s welfare ryb (Zákon č. 246/1992 b.) v současnosti prakticky nevyužívané.

2.11.1.5. Trubice

Skleněné a akrylové trubice vhodných průměrů se někdy používají pro získání obsahu trávicích traktů. Jsou vkládány do jícnu a obsah žaludku je trubicí vytláčen tlakem na oblast břicha, resp. přední části trávicí trubice či žaludku ryby. Někdy je nutné předtím ještě nalít nebo vstříknout touto trubicí do žaludku vodu. Obecně se tato metoda jeví pro získání obsahu žaludku jako relativně účinná, i když ji nelze považovat za kvantitativní odběr. Má i jistá omezení, hlavně pokud jde o velikost ryb a potravních složek. Trubice jsou efektivně použitelné hlavně u větších ryb, naopak nejméně účinné jsou u malých ryb a ryb s relativně malými ústy a velkým žaludkem. Efektivita této metody je rovněž velmi variabilní a významně se liší mezi jednotlivými druhy ryb (50 – > 90 %, Kamler a Pope, 2001; 0–100 %, Quist a kol., 2002). Většinou jsou tímto postupem extrahovatelné všechny typy potravy, které ryba zkonzumovala. Je tudíž relativně dobře použitelná pro stanovení absence a prezence jednotlivých složek v potravě. Její velkou výhodou je i časová nenáročnost a minimum nástrojů potřebných k odebrání vzorku. Každopádně k ní však lze přistoupit až po ověření účinnosti u konkrétního druhu, resp. i jeho jednotlivých velikostních skupin (Kamler a Pope, 2001 a jimi citované práce; Quist a kol., 2002). Doporučuje se proto vždy při plánovaném využití této metody vykonat nejprve pilotní studii na vzorku populace, která má být cílem výzkumu. V ní je třeba porovnat získané výsledky s údaji zjištěnými pitvou, resp. po použití trubic provést pitvu a vyhodnotit zbylý obsah trávicího traktu (žaludku) a tím i efektivitu tohoto postupu, nejlépe u širšího velikostního spektra. Až následně je pak možné posoudit, zda je tato metoda vhodná k použití v konkrétní studii zaměřené na potravní ekologii vybraného druhu (druhů) ryb.

2.11.1.6. Vysávání obsahu žaludku

Při použití této metody získávání obsahu žaludku je skleněná nebo akrylátová trubice připojená na vysávací balonek (resp. odsávačku). Volný konec trubice je vsunut do žaludku ústy a jícnem tak, že při zasouvání je balonek stlačený. Potom je třeba tlak na něj uvolnit a obsah žaludku se nasaje do trubice. Postup lze podle potřeby opakovat, dokud je zřejmé, že v žaludku je ještě neodebraná potrava, ne však neomezeně, aby nedošlo k poškození žaludeční stěny vyvoláním podtlaku v prázdném žaludku. Tato metoda je rovněž relativně jednoduchá a u některých druhů může být i efektivní. Je však problematická až neúčinná, pokud potrava obsahuje relativně velké komponenty (kořist) a vyšetřovaná ryba je relativně malá. Kromě toho je její nevýhodou i fakt, že při něm hrozí riziko poškození nebo zničení některých potravních složek při nasávání a následném přemisťování do vzorkovnice. Ještě komplikovanějším postupem je použití odsávačky, u níž se pro snížení nebezpečí poškození tkání žaludku a jícnu vkládá do jícnu gumová hadička. Až mezi ní a odsávačkou je skleněná trubice, která umožňuje sledovat nasávání obsahu. Odsávačka pracuje s konstantním podtlakem a umožňuje tak citlivější odběr vzorku (Kamler a Pope, 2001), nicméně v praxi se ve větším rozsahu neuplatnila a takto získaný materiál byl využit jen v několika studiích. Hlavním důvodem je to, že tato metoda nemá mnoho předností v porovnání s jinými neletálními technikami. Její účinnost je nízká u malých jedinců a ryb konzumujících relativně velkou potravu (predátoři). Navíc je nepoužitelná u velmi velkých druhů. Rybám při odsávání rovněž hrozí i velké riziko poškození trávicí soustavy. Proto ji nelze pro výzkum potravní ekologie ryb doporučit.

2.11.1.7. Výplach žaludku

Výplach žaludku je často využívanou technikou získávání potravních vzorků živých ryb (Hyslop, 1980). Podobně jako u výše jmenovaných metod je však před samotným výzkumem potřebné posoudit její účinnost a ubezpečit se tak, že nám u konkrétního druhu a velikostní kategorie umožní získat vzorky vhodné pro další vyhodnocení a že je bezpečná pro ryby. V opačném případě hrozí, že výsledky výzkumu budou ovlivněné ve prospěch těch potravních složek, které lze z žaludku snadno vypláchnout (Chipps a Garvey, 2007). V rámci této techniky existuje několik variant a vybavení, které se k výplachu používají. Může se jednat o výplach přes jícen a ústa (např. Braga a kol., 2017), ale i o průplach celého trávicího traktu přes anus (např. Faina, 1975, Obr. 10). Na základě použitého vybavení bývají varianty tohoto postupu kategorizované do skupin využívajících ruční pumpy, mechanický tlak anebo stříkačky (Kamler a Pope, 2001). Hranice mezi nimi však není jednoznačná a často mezi nimi dochází k prolínání.

2.11.1.7.1. Ruční pumpy

Zařízení je tvořeno dvěma kovovými trubicemi o rozdílném průměru, které jsou spolu spojené a na konci zaoblené pro snadnější manipulaci při zasouvání do žaludku přes jícen. Opačný konec větší trubice je připojený ke sběrné nádobě. Menší trubicí je do žaludku pumpovaná voda nebo Ringerův roztok (komerčně dostupný izotonický fyziologický roztok). Na pumpování se používá balonek se zpětnou klapkou (resp. jednosměrný ventil) pro zabezpečení jednosměrného proudění. Obsah žaludku je tímto způsobem vyplachovaný větší trubicí do sběrné nádoby. I v rámci tohoto postupu existují další modifikace, například použití skleněných nebo polotuhých polyetylénových trubic spojených epoxidem namísto kovových. U malých ryb a juvenilů se používají menší a mnohem jednodušší zařízení pracující na stejném principu. Pasteurova pipeta je připojená ke gumové hadičce a malému ručnímu balonku s jednosměrným ventilem. Na konci zařízení je nádržka s vodou. U ryb s jednoduchým trávicím traktem ve tvaru písmene S bez pylorického svěrače se používá vyplachování přes anální otvor (Kamler a Pope, 2001). Metoda výplachu pomocí ručních pump je často používaná a byla úspěšně aplikovaná při výzkumu potravy mnoha druhů ryb (Kamler a Pope, 2001 a jimi citované práce; Hauer a Lamberti, 2011).

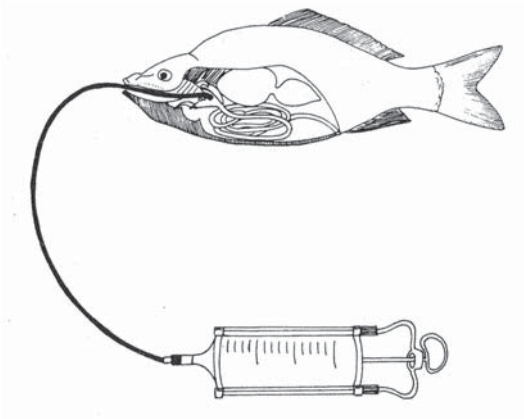
2.11.1.7.2. Mechanický tlak

Sprague a kol. (1993) dokázali jako první, že voda pumpovaná do žaludku pod velkým tlakem může způsobovat zranění až úhyn vyšetřované ryby tím, že vyvolá rupturu plynového měchýře. Kvůli tomu bylo vyvinuto zařízení s kontrolovaným mechanickým tlakem používané na pulzní výplach žaludku, které je tvořeno injekční jehlou na hypodermickou aplikaci a polyetylénovou hadicí spojenou s vodní pumpou. Vodní pumpa s ventilem umožňujícím regulovat tlak má výhodu v možnosti nastavení požadovaného kontinuálního tlaku vody. Velikost jehly a hadice je přizpůsobitelná velikosti vyšetřované ryby. Ventil s nastaveným požadovaným tlakem se po zasunutí zařízení do žaludku střídavě otvírá a zavírá, přičemž pulzující proud vody vyplachuje obsah přes jícen do sběrné nádoby. Podobná, mírně modifikovaná varianta obsahuje i 12voltovou přenosnou elektrickou pumpu a hadicovou rychlospojku pro jednodušší výměnu hadic různého průměru. Tato metoda byla vyhodnocovaná u mnoha druhů ryb, přičemž u některých druhů vykazovala vysokou (nezřídka 100%) efektivitu a nulovou mortalitu. U jiných druhů je však naopak méně účinná při vyplachování velkých potravních složek a je zcela neefektivní u malých ryb. U této metody byla zaznamenaná vysoká mortalita a neúčinnost

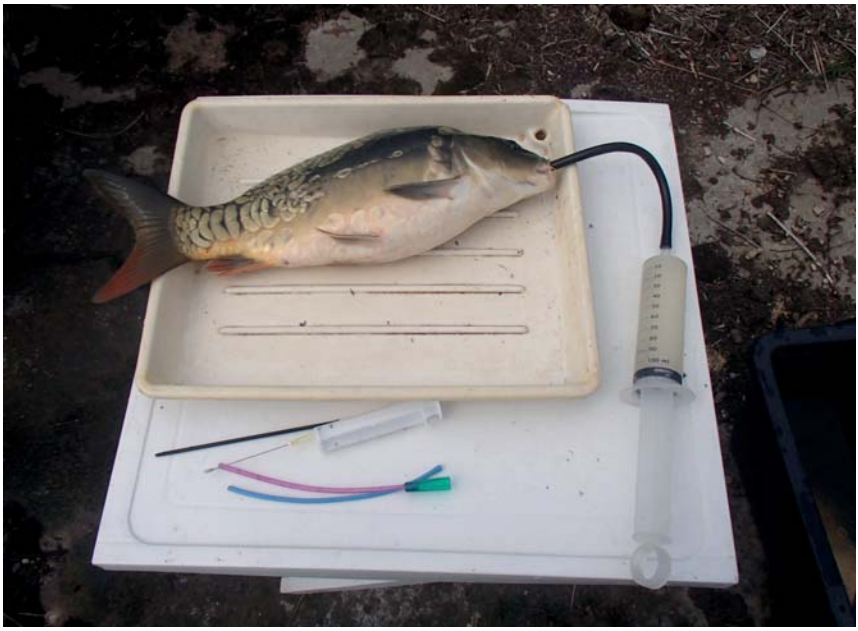
pouze v jednom publikovaném případě (Hartleb a Moring, 1995). Výhodou této techniky je relativně malá finanční náročnost, jednoduché ovládání zařízení jednou osobou, efektivita výplachu obsahu žaludku u většiny ryb, vysoká odolnost a přenosnost zařízení. Na druhou stranu, i když je kontrola tlaku na vyšší úrovni, může dojít k poškození nebo úhynu vyšetřovaných ryb. Proto se tato metoda doporučuje pouze pro odběr vzorků u větších jedinců (Kamler a Pope, 2001; Barbour a kol., 2012).

2.11.1.7.3. Stříkačky

Stříkačky jsou používané k získání obsahu zažívacích traktů malých ryb relativně často. Používají se obvykle tehdy, když jsou jiná zařízení pro konkrétní druh nebo jedince příliš velká. Tato metoda se dá u ryb bez pylorického svěrače s jednoduchou trávicí trubicí použít formou zpětného výplachu, při němž je voda do střeva vstřikována přes ústní otvor a jícen, a vypláchnutý obsah odchází análním otvorem (Obr. 10 a 11, Faina, 1975) nebo u druhů s žaludkem (resp. pylorickým svěračem) ústy. Možný je i zpětný výplach, při němž je do anusu vsunutá krátká trubička. Přes tuto trubičku je do střeva vstřikována voda stříkačkou s hypodermickou jehlou, která obsah vyplachuje přes ústa do sběrné nádoby. Tento postup s úspěchem a bez poškození ryb použili Baker a Fraser (1976) i u drobných ryb rodu *Fundulus*. Autoři však upozorňují, že nefunguje stejně u všech druhů drobných ryb. Jiný způsob výplachu je ten, při kterém vodu vstřikujeme do žaludku přes ústa a jícen. Obsah je vypláchnutý rovněž jícnem a ústy do sběrné nádoby s nálevkou. Komplikovanější zařízení se skládají ze dvou stříkaček o různé velikosti, plastové hadičky a vyměnitelných gumových hadic. Voda je do žaludku vtláčená menší stříkačkou přes umělohmotnou hadičku, větší stříkačka se silnější gumovou hadicí slouží jako sběrná nádoba. Průměr hadic a objem stříkaček závisí na velikosti vyšetřovaných ryb.



Obr. 10. *Perorální aplikace sondy zavedené do jícnu kapra obecného pro průplach trávicího traktu. (Podle J. Gelnarové – převzato ze Svobodová a kol., 2007).*



Obr. 11. *Zavedení sondy do jícnu kapra při perorální aplikaci v anestezi. V popředí další pomůcky (trubice a výplachová jehla s olivkou) používané při výplachu a průplachu. (Foto: Z. Adámek).*

Touto metodou se daří získávat až do 100 % obsahu trávicího traktu nebo žaludku mnohých druhů ryb, avšak u jiných může být její použití málo efektivní nebo zcela neefektivní až letální (amur, tolstolobici). Tlak vody vytvořený stříkačkou může poškodit plynový měchýř, případně způsobit jiné vnitřní zranění malých anebo juvenilních ryb. Měkčí materiál hadic a opatrná manipulace s rybou i výplachovým zařízením mohou riziko zranění ryby pravděpodobně snížit (Kamler a Pope, 2001 a jimi citované práce).

2.11.2. Zásady získávání vzorků neletálními metodami

Před zákrokem je třeba ryby uvést do anesteze (např. 0,03–0,05% roztokem hřebíčkového oleje podle druhu ryby). Za dostatečnou anestezi je považován stav, kdy ryba ztratí rovnováhu a nereaguje na vnější podněty (fáze 3b podle Kolářová a kol., 2012). Veškeré manipulace s anestezovanými rybami musí probíhat ve vlhkém prostředí včetně vlhkých rukou či rukavic, aby se předešlo porušení ochranné slizové vrstvy na povrchu těla ryby. Před odběrem vzorku je třeba do terénního protokolu zaznamenat údaje o pohlaví a vývojovém a reprodukčním stadiu (pokud je to možné) a následně i potřebné morfometrické údaje a hmotnost ryby. Biometrické údaje se zaznamenávají s přesností na 1 mm a hmotnost obvykle na desetiny gramu. Následuje externí vizuální kontrola a zaznamenání zvláštností, poranění a výskytu ektoparazitů. Pro dokumentaci veškerých detailů, které mohou být v budoucnosti důležité, je vhodné vyhotovit i digitální fotografii každé ryby s identifikačním štítkem a škálou (pravítko, milimetrový papír). Po odběru vzorku je ryba opět zvážená pro stanovení hmotnosti vzorku jako rozdílu mezi hmotností před odběrem a po něm. Následně se vyšetřená ryba umístí do nádoby s kontinuálně okysličovanou vodou odebranou ze vzorkované lokality až do úplného zotavení a po něm je vypuštěna zpět do původního prostředí. Zaznamenání případné mortality může přinést důležité informace pro další studie a pomoci příště zvolit optimální postup. Uhynulé ryby lze po pitvě využít k posouzení efektivity odběru vzorků.

2.11.3. Postupy získávání obsahu trávicího traktu

Nejčastějšími postupy neletálního získávání obsahu trávicího traktu ryb jsou metody aktivního a pasivního výplachu žaludku. Tyto metody vyžadují speciální zařízení a delší čas na přípravu i samotný odběr vzorku. Z toho vyplývá, že množství vzorkovaných jedinců bývá menší, zvláště pokud je k dispozici limitovaný čas pro odběr vzorků. Efektivita odběru a jeho bezpečnost pro rybu je u všech metod výplachu limitovaná morfologií trávicího traktu, velikostí

úst i charakterem potravy různých druhů. Pro každý druh, resp. jeho populaci, u níž plánujeme použít tento typ odběru, proto musíme nejprve ověřit jeho spolehlivost a efektivitu (Kamler a Pope, 2001; Waters a kol., 2004; Hauer a Lamberti, 2011). Obecně platí, že tyto metody jsou vhodné spíše pro větší ryby se žaludkem (jeseteři, dravci), případně jako aplikace celkového či zpětného výplachu pro ryby bez žaludku (kaprovití).

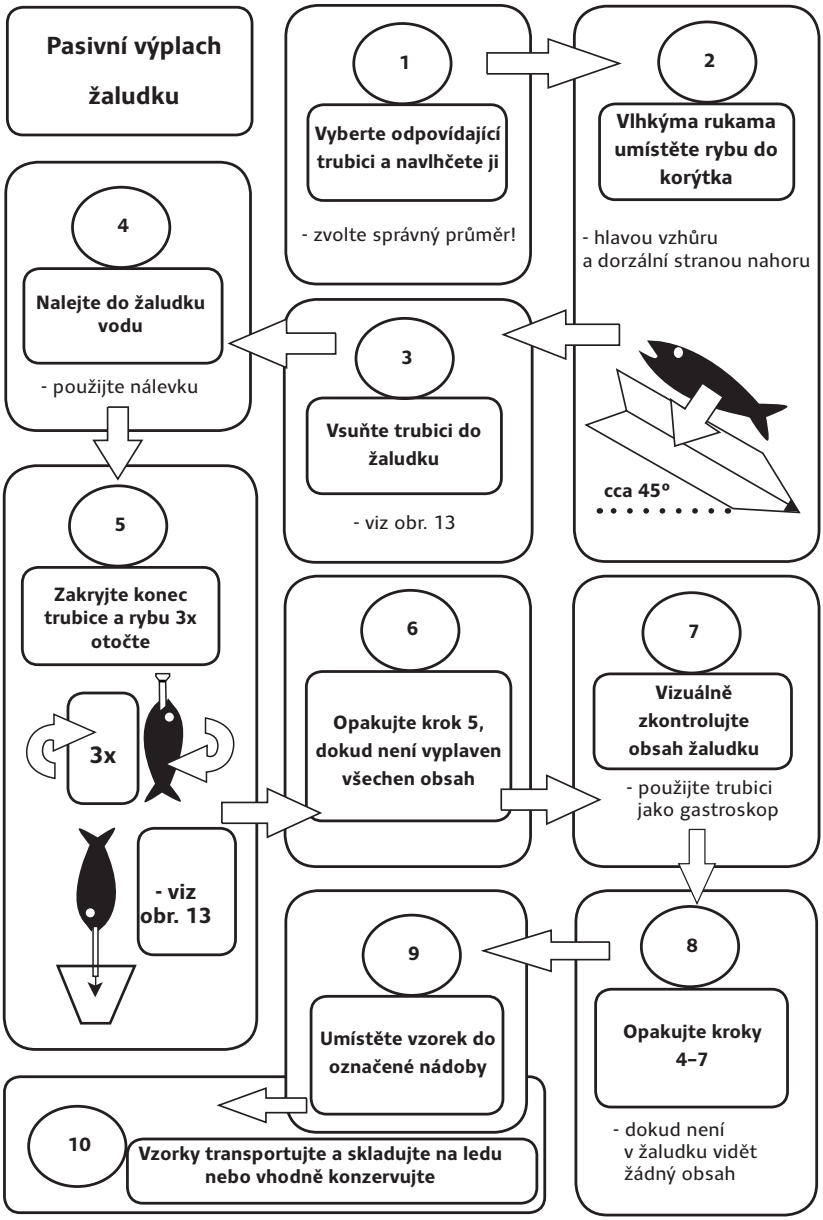
2.11.3.1. Pasivní výplach trubicemi

Potřebný materiál: průhledné, hladké, neohybné trubice různého průměru (plastové, akrylové nebo skleněné) se zaobleným koncem; měřicí korýtko s milimetrovou stupnicí; nádoby s vodou; nálevka; identifikační štítky; permanentní popisovač.

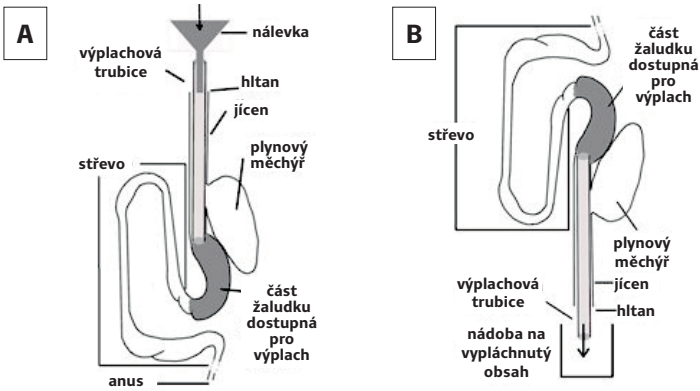
Postup:

K zákroku je třeba dvou osob.

1. Navlhčíme trubice a pro každou rybu vybereme takovou, která má největší průměr vsunutelný jícnem bez odporu.
2. Mokrýma rukama držíme v korýtku anestezovanou rybu, orientovanou hřbetem nahoru ve svislé poloze šikmo. Ryba i s korýtkem je v poloze hlavou nahoru.
3. Vsuneme trubici jícnem do žaludku (Obr. 12 a 13).
4. Nálevkou nalijeme do žaludku vodu.
5. Když voda naplní žaludek a objeví se v trubici, zakryjeme její otevřený konec a rybu opatrně několikrát (třikrát je dostačující) otočíme hlavou dolů a zpět. Potom, v poloze dolů hlavou, uvolníme konec trubice, čímž umožníme vytečení obsahu žaludku s vodou do sběrné nádoby.
6. Tento úkon opakujeme několikrát, pokud se objevují nové potravní částice (4–6x, obvykle 3x).
7. Trubici lze využít jako gastroskop pro vizuální vyšetření obsahu žaludku. Pokud jsou v žaludku ještě patrné zbytky potravy, úkony lze opakovat.
8. Vypláchnutý obsah se umístí do vhodné nádobky nebo zipového plastového sáčku s identifikačním štítkem.
9. Označené vzorky se transportují na ledě nebo konzervované zvoleným médiem (viz kapitola 2.8.).



Obr. 12. *Postup při pasivním výplachu žaludku.*



Obr. 13. *Umístění výplachové trubice, její plnění (A) a výplach (B) žaludku.*

Modifikace: Totální pasivní výplach trávicího traktu trubicemi (Obr. 10 a 11)

Tento postup lze vhodně využít pro výplach trávicího traktu některých (větších) kaprovitých ryb, jako je např. kapr a lín (Faina, 1975). Nelze ho však aplikovat např. u býložravých ryb, kde kvůli délce střeva akutně hrozí v případě jeho naplnění potravou fatální porušení (ruptura).

Potřebný materiál: průhledné, hladké, neohebné trubice různého průměru (plastické, akrylové nebo skleněné) se zaobleným koncem; měřicí korýtko s milimetrovou stupnicí; nádoby s vodou; stříkačky o objemu 100 až 200 ml podle velikosti ryby; identifikační štítky; permanentní popisovač.

Postup:

Při zákroku je vhodnější pracovat ve dvou.

1. Navlhčíme trubice a pro každou rybu vybereme takovou, která má největší průměr vsunutelný do jícnu bez odporu.
2. Mokrýma rukama držíme v korýtku anestezovanou rybu, orientovanou hřbetem nahoru ve svislé poloze šikmo. Ryba i s korýtkem je v poloze hlavou nahoru.
3. Vsuneme trubici na kraj jícnu tak, aby bylo (u kaprovitých) zřetelné její sevření požerákovými zuby (*dentes pharyngei*) a drticí ploténkou (*os basioccipitalis*).
4. Nasazenou stříkačkou opatrně tlačíme do trávicího traktu vodu.
5. Obsah střeva je vytlačován a odchází análním otvorem, pod nímž jej zachytáváme do sběrné nádoby.
6. Úkon (4–5) lze opakovat, pokud se ještě objeví nové potravní částice.

7. Vypláchnutý obsah se umístí do vhodné nádobky nebo zipového plastového sáčku s identifikačním štítkem.
8. Označené vzorky se transportují na ledě nebo konzervované zvoleným médiem (viz kapitola 2.8.).

2.11.3.2 Aktivní výplach pumpami a stříkačkami

Tato metoda využívá na vypláchnutí obsahu žaludku pulzující nebo konstantní proud vody. Na jeho vytvoření se používají stříkačky, ruční pumpy, kompresorové pumpy nebo elektrická čerpadla. K těmto zařízením je připojená hadice, kterou je voda přiváděna do žaludku. Výplach žaludku nebo zpětný výplach malých ryb je založený na použití stříkaček. Pro některé druhy musí být výplachová zařízení speciálně modifikovaná, a tudíž se doporučuje využití dostupných zdrojů informací o vhodnosti této metody, resp. jejích variant pro konkrétní druhy ryb. Rovněž je mimořádně důležité před samotným zákrokem zohlednit anatomická specifika konkrétního druhu ryby a provést pilotní studii s cílem ověření bezpečnosti výplachu pro ryby a efektivity získávání obsahu žaludku. Pro detailnější informace a podrobnější popis těchto technik viz práce Kamler a Pope (2001); Waters a kol. (2004) a Hauer a Lamberti (2011).

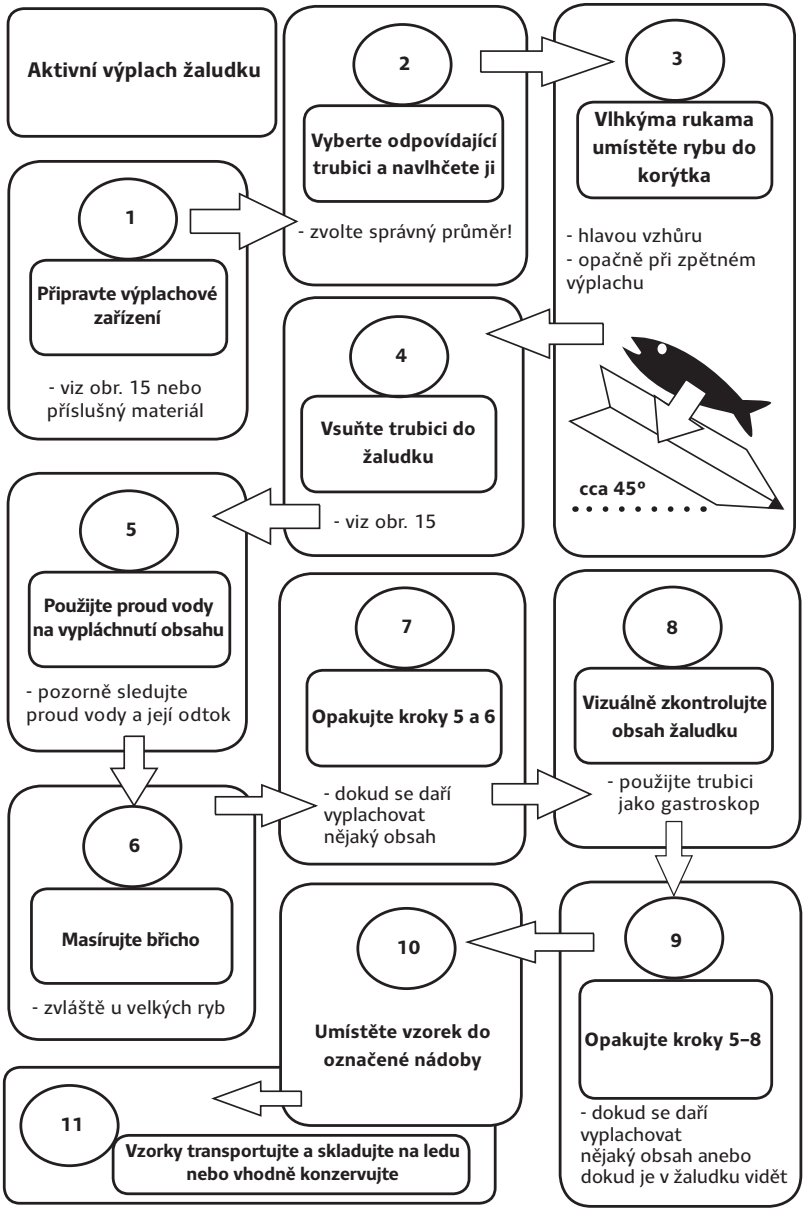
Potřebný materiál: pumpa, čerpadlo nebo stříkačky o vhodném objemu; hadice s různým průměrem; měřicí korýtko s milimetrovou stupnicí; digitální fotoaparát; identifikační štítky; permanentní popisovač; digitální fotoaparát; nádoby, průhledné, hladké a neohebné trubice různého průměru (plastové nebo skleněné).

Postup (Obr. 14 a 15):
K zákroku je třeba dvou osob.

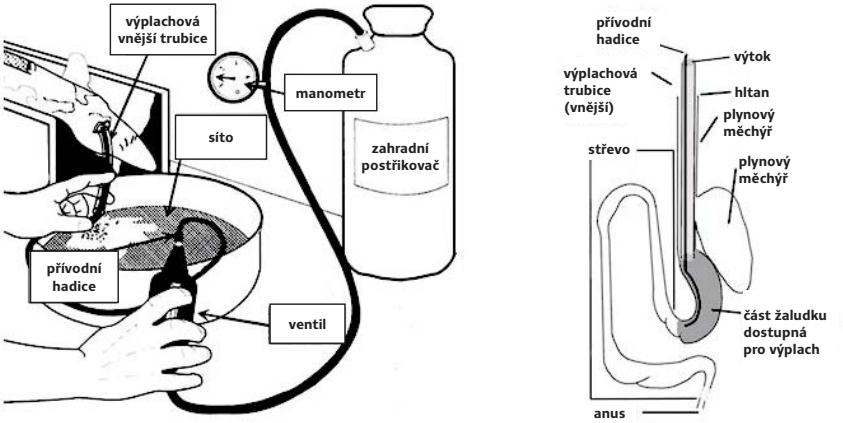
1. Podle Obr. 15, manuálu nebo odpovídající publikace připravíme výplachové zařízení.
2. Navlhčíme trubice předtím, než jsou zasunuty do žaludku ryby. Pro každou rybu zvolte trubici největšího průměru, která bezpečně a bez odporu nebo rizika zranění projde jícnem. V případě zpětného výplachu zvolte vhodnou trubici na zavedení do análního otvoru.
3. Mokrýma rukama držíme rybu v korýtku. Ryba je pro výplach přes ústa orientovaná hlavou vzhůru, v případě zpětného výplachu přes anus opačně (ocasní část vzhůru).
4. Vsuneme výplachovou trubici jícnem do žaludku, případně do análního otvoru pro zpětný výplach.
5. Držíce rybu ústy nad sběrnou nádobou, zapneme pumpu, čerpadlo nebo pumpujeme vodu ručním čerpadlem či stříkačkou do žaludku

tenčí hadicí, která je vsunuta dovnitř výplachové. Pozorně sledujeme proud vody a vizuálně monitorujeme její bezproblémový odtok.

6. U velkých ryb zároveň masírujeme břišní část pro dosažení snadnějšího a efektivnějšího vyprázdnění žaludku.
7. Kroky 5 a 6 opakujeme, dokud se daří vyplachovat nějaký obsah.
8. Trubici lze použít jako gastroskop pro kontrolu, zda je žaludek prázdný.
9. V případě, že je v žaludku vizuálně patrný nějaký obsah, opakujeme kroky 5 až 8, dokud se žaludek zcela nevyprázdní.
10. Vypláchnutý obsah se umístí do vhodné nádobky nebo zipového plastového sáčku s identifikačním štítkem.
11. Označené vzorky se transportují na ledě nebo konzervované zvoleným médiem.



Obr. 14. *Postup při aktivním výplachu žaludku.*



Obr. 15. *Aktivní výplach s použitím koaxiálního systému a mechanického tlaku (upraveno podle Brosse a kol., 2002) a umístění trubic.*

2.12. Analýza vzorku

Před samotnou identifikací obsahu trávicího traktu (a/nebo jeho kvantifikací) je důležité zaznamenat některé další podstatné informace o analyzovaném obsahu. Důležité totiž není jenom složení vzorku, ale i údaje o rybách s prázdným trávicím traktem, jeho naplnění a stav natrávené potravy. Tyto údaje nám pomáhají vytvořit si ucelenější obraz o potravní ekologii, chronologii příjmu potravy a podobně. Jejich význam je blíže osvětlen v následujících kapitolách.

2.12.1. Prázdné trávicí trakty

Žádná potrava = žádná informace?

Není ničím neobvyklým zjistit při analýze prázdný trávicí trakt. Při snaze získat co nejvíc vzorků s potravou je třeba být opatrný, může to totiž vést ke zkreslení výsledků, resp. jejich nesprávné interpretaci (Chipps a Garvey, 2007). I když nebyl exaktně stanovený vliv postupu, při kterém se s velikostí vzorku zvyšuje frekvence výskytu prázdných trávicích traktů, Chipps a Garvey (2007) upozorňují na to, že s velikostí vzorku se mění i odhad variance v porovnání s jinými, menšími soubory. Tím se pak jejich porovnání stává problematickým.

Někteří autoři zahrnují do analýzy jenom údaje od jedinců s potravou a prázdné trávicí trakty z dalších analýz vylučují. Takovýto přístup, a hlavně jeho význam

z pohledu vyhodnocení a interpretace údajů, musí být před použitím důkladně zvážený. Charakteristiky složení potravy a potravní ekologie se obecně mohou u konkrétní populace lišit v případě, že bychom porovnávali výsledky souborů dat s prázdnými trakty a bez nich. Určitě je užitečné a žádoucí zpracovat údaje o všech analyzovaných rybách – ty bez potravy lze uvést samostatně jako absolutní číslo nebo relativní (procentický) podíl, ale v žádném případě je nelze nezohlednit. Umožní nám to totiž lépe interpretovat mnohé aspekty potravní ekologie – například množství prázdných trávicích traktů v různém čase nám hodně napoví o potravní aktivitě. Podobně další detailnější informace (délka, hmotnost, pohlaví, ploidie, vývojové stadium, pohlavní zralost aj.) o rybách bez potravy nám mohou pomoci porozumět vnitrodruhovým interakcím nebo rozdílům mezi ekotypy. Taktéž můžeme hodnotit podíl „prázdných“ ryb i z pohledu reprodukčního cyklu. V tomto případě takový údaj mimořádně závažný a důležitý.

2.12.2. Stupeň naplnění

Stupeň naplnění trávicího traktu by měl být brán do úvahy jako samostatný důležitý údaj (Hynes, 1950). Tato informace demonstruje sezónní variabilitu v příjmu potravy a taktéž může například pomoci odhalit rozdíly mezi ekotypy, i když je složení jejich potravy identické. Naplnění trávicího traktu je často hodnocené pouze vizuálně (subjektivně) na základě stupně roztažení trávicího traktu způsobeného objemem (množstvím) přijaté potravy vzhledem k velikosti ryby. **Naplnění** je pak prezentováno jako podíl objemu trávicího traktu (nebo žaludku) vyplněného potravou na jeho maximální kapacitě. Vyjadřuje se obvykle v procentech (0–100 %), při přeplněném roztáhnutém traktu se však můžeme dostat i k hodnotám vyšším než 100 %. Toto se dá obejít použitím jiných stupnic, například škály od 1 do 7 (1 – prázdný; 2 – stopy potravy; 3 – naplněný do 25 %; 4 – naplněný od 25 do 50 %; 5 – naplněný od 50 do 75 %; 6 – naplněný od 75 do 100 %; 7 – roztáhnutý; AFSC, 2015) anebo škály od 1 do 4 (1 – prázdný; 2 – naplněný maximálně z poloviny; 3 – naplněný víc než z poloviny; 4 – přeplněný; Garrido a kol., 2008). Možná je i jiná (individuální) interpretace – např. 0–5 (0 – prázdný; 1 – stopy potravy; 2 – naplněný do 25 %; 3 – naplněný od 25 do 50 %; 4 – naplněný od 50 do 75 %; 5 – naplněný od 75 do 100 %), vždy je však třeba uvést způsob hodocení v popisu použitých metod. Jiný způsob vyjádření naplněnosti je vyhodnocení objemu žaludku a objemu jednotlivých komponentů s použitím subjektivních jednotek množství potravy (Knight a Margraf, 1982; Pope a kol., 2001; Chipps a Garvey, 2007 a jimi citované práce; AFSC, 2015). Protože je vizuální hodnocení stupně naplnění možné stanovit a vyjádřit různými způsoby, je vhodné optimální metodiku zvolit na základě předběžného monitoringu menší části trávicího traktu a při publikování zvolenou metodu podrobně popsat

(případně uvést příslušné citace), aby bylo možné ji jednoznačně identifikovat při případném porovnávání výsledků.

Index naplnění se stanovuje jako poměr biomasy potravy k biomase ryby (gravimetricky nebo volumetricky) (Holčík a Hensel, 1972). Někdy se za objem potravy považuje objem celého obsahu trávicího traktu, jindy pouze obsah žaludku (záleží to především na zvolené metodě odběru a zpracování vzorku, vždy je však třeba neopomenout tuto skutečnost v popisu metodiky). Vyjadřuje se jako prodecimile (setina procenta – $^{o}/_{ooo}$) kvůli možnosti jeho interpretace jako celého čísla (např. Kamler, 2002; Chipps a Garvey, 2007; blíže viz kapitola 2.14.4.2.2.).

Někdy se používá, zvláště u mladých vývojových stadií, namísto aktuální biomasy (hmotnosti nebo objemu obsahu trávicího traktu či žaludku) tzv. rekonstruovaná hmotnost, méně často objem. Tento index je označovaný jako **index spotřeby** (z angl. *index of consumption*). Rekonstrukce hmotnosti se provádí na základě výpočtu z rozměrů zachovaných nestrávených částí. Aby bylo dosaženo potřebné přesnosti, je nutné dopředu provést řadu systematických měření celých jedinců různých velikostí pro každý druh, přítomný v potravě (Pope a kol., 2001; Zacharia a Abdurahiman, 2004). Pro tyto účely existují pro zooplankton a některé další hydrobionty včetně ryb potřebné publikované údaje (Horoszewicz, 1960).

2.12.3. Stupeň natrávení

Stupeň natrávení potravy je důležitou charakteristikou z více důvodů. Především to indikuje přesnost a preciznost analýzy. Pokud se obsah trávicího traktu nachází ve vysokém stupni natrávení, je identifikace jednotlivých složek podstatně komplikovanější a i méně přesná. Totéž, možná v ještě větší míře, platí pro kvantifikaci jednotlivých potravních složek. Stupeň natrávení přináší i užitečnou informaci o tom, kdy přibližně byla potrava přijata. Podstatné rozdíly jsou patrné v natrávení stejného typu potravy v různých částech trávicí trubice. Pokud je stupeň natrávení přibližně stejný, byla potrava přijata v krátkém časovém intervalu. Čím větší jsou rozdíly v natrávení konkrétního jednoho typu potravy (kořisti), tím delší byly intervaly mezi jejich přijetím, resp. tím déle se ryba živila. Pro posouzení stavu natrávení je v protokolu vhodné používat jednotnou stupnici (viz níže).

Příklad hodnocení (kódování) stupně natrávení (upraveno podle AFSC, 2015):

1 – **potrava se v trávicím traktu nenachází**

2 – **stopy potravy**

Obsah je tvořen pouze malým počtem fragmentů potravních složek, protože potrava byla takřka kompletně strávená. Tento kód se používá v případě, že v obsahu se nachází pouze takřka zcela strávená potrava, například kosti bez svaloviny, hlavové kapsuly larev pakomárů nebo chitinizované částí těl členovců bez jiných tkání.

3 – **< 50 % nepoškozených potravních složek a jejich částí**

V obsahu je zjevné značné natrávení potravy, ale jsou v něm i identifikovatelné zbytky organizmů s nestrávenými měkkými tkáněmi – například zbytky svaloviny na kostech, větší korýši a chitinizované části členovců s nestrávenými fragmenty. Často však není možné jednotlivé jedince v kašovité trávenině odlišit a spočítat.

4 – **50–70 % nepoškozených potravních složek a jejich částí**

Potrava je zčásti nenarušená, ale tkáně (pletiva) potravních komponentů jsou narušené trávicími enzymy. Například u rybí kořisti je poškozená kůže se šupinovým pokryvem, resp. povrchový epitel a šupiny zcela chybí. Hlavová nebo ocasní část může být rozložená, ale většina svaloviny je zachována. U členovců zůstává zachovaný skelet, ale je narušen, a měkké vnitřní tkáně už mohou být částečně rozložené.

5 – **75–100 % nepoškozených potravních složek a jejich částí**

Potravní složky jsou v dobrém, někdy víceméně původním stavu s mírnými znaky natrávení. Například u ryb lze pozorovat deformace hlavy, mohou chybět části kůže, šupin nebo ploutví. Členovcům mohou chybět tykadla nebo štěty.

6 – **nenatrávené potravní složky**

Potravní složky nejsou narušeny.

2.13. Identifikace potravy – kvalitativní hodnocení

Identifikace potravních složek je často hlavním cílem studia obsahu trávicího traktu. Kvalitativní analýza se skládá z kompletní identifikace organizmů, resp. původu organické hmoty v potravním vzorku nebo jeho části. Identifikace potravy různého původu, navíc mnohdy možná jen na základě částečně nebo téměř zcela natrávených, polámaných a jinak poškozených zbytků či z obsahu rozdrceného požerákovými zuby, je možná jedině s dostatečnými zkušenostmi a s pomocí odpovídajícího referenčního materiálu.

Vhodná determinační (taxonomická) úroveň pro identifikaci potravních složek záleží na cíli výzkumu. Kromě toho je ovlivněná i zkušenostmi a schopnostmi výzkumníka, časovými možnostmi a informací, kterou je potřeba získat. Nižší taxonomické rozlišení (vyšší taxonomická kategorie či méně přesná identifikace) je vhodná například v případě, kdy chceme kvantifikovat ontogenetické změny ve složení potravy. Například přítomnost ryb jako kořisti

v potravě postačuje na stanovení hranice, kdy příslušný jedinec přechází na dravý způsob života (piscivorii). V jiných případech je ale nutná přesnější identifikace, například pro stanovení sezónních nebo prostorových rozdílů a změn či při porovnávání potravy různých druhů ryb (Norton, 1995; Hauer a Lamberti, 2011; Chipps a Garvey, 2007). Často není možné identifikovat potravní složky do úrovně druhu přes velkou snahu a erudici výzkumníka a jednotlivé složky je třeba začleňovat do širších taxonomických skupin. Není však neobvyklé, že se při zkoumání potravy ani nesnažíme určit komponenty do druhů z čistě pragmatických důvodů. Není ani potřeba determinovat konkrétní druhy v potravě, například pokud jsou taxonomicky, morfologicky, ekologicky a nutričně velmi podobné nebo jsou kromě málo významné taxonomické odlišnosti v podstatě totožné. Detailní identifikací vyšších taxonů tak lze ušetřit mnoho času a úsilí. Jiným příkladem je například potřeba sdružit jednotlivé kategorie z důvodu snížení počtu proměnných (v našem případě počtu typů potravy) při analýze nebo spojování neidentifikovatelných taxonů. Intuitivní slučování je založeno na taxonomickém nebo ekologickém základě. Potravní složky lze slučovat podle jejich taxonomické příslušnosti, ale nezřídka i podle jejich podobných ekologických, morfologických nebo behaviorálních charakteristik. Kromě intuitivního slučování lze komponenty spojovat i s použitím kvantitativních statistických metod. V takových případech se testuje hypotéza, že dva nebo více druhů jsou pro rybu jedním potravním zdrojem (např. Chí-kvadrát testem na analýzu kontingenční tabulky). Pozitivní asociace naznačují, že tyto komponenty představují pro rybu v podstatě jeden zdroj a mohou být sloučené do jedné kategorie (Chipps a Garvey, 2007 a jimi citované práce). Přirozeně přesto existuje mnoho důvodů, proč je v konkrétních případech vhodné nebo potřebné identifikovat potravu do co nejnižší taxonomické úrovně. Pokud je studie zaměřená na detailní složení potravy, snažíme se najít i minimální odchylky u podobných druhů či ekotypů, jejichž potrava je tvořená taxonomicky blízkými, ale ekologicky odlišnými druhy. Úroveň druhu (nebo alespoň rodu) je v těchto případech nutným řešením. Dalším důvodem může být například kvantifikace potravy výpočtem pomocí délkohmotnostních regresí. Vyšší nebo různá taxonomická úroveň může v těchto případech přinášet odlišné (chybné) výsledky.

Hodnocení vývojových stadií (kdy jeden druh tvoří víc typů potravy)

Určení a zaznamenání vývojového stadia kořisti je rovněž velmi důležité. Jeden druh se v prostředí i v potravě může vyskytovat ve více vývojových stadiích o různé dostupnosti a rozdílné nutriční hodnotě. Ty se často vyskytují v odlišných habitatech a jsou dostupné pro druhy s odlišnou potravní strategií. Veškerá potrava, ale i složky náležející k jednomu druhu (taxonu), musí být

identifikované jako samostatné typy potravy (potravní složky) se zaznamenáním jejich vývojového stadia (např. vajíčko, larva, kukla, juvenil, adult, kolonie).

Netaxonomická klasifikace typů potravy

Jako alternativa k taxonomické klasifikaci potravy se často používají i klasifikace založené na zjevných behaviorálních a funkčních výzvách, které musí predátor překonat při získávání a zpracování potravy, například typ útoku na kořist versus typ obrany proti predátorovi (Norton, 1995). Typ potravy může být stanovený i na základě habitatu, ve kterém se vyskytuje (bentos, pelagiál, litorál, suchozemský hmyz), či podle toho, která složka dominuje, resp. která je nejfrekventovanější. Tak je možné vyhodnotit nejen funkční potravní skupinu, ale i preference potravních habitatů (Jobling a kol., 2001). S ohledem na potravní ekologii a preference studovaného druhu ryby lze jednotlivé složky podle významu rozlišit i na potravu základní (hlavní), vedlejší, příležitostnou a nouzovou (Adámek a kol., 2010a).

Postup při identifikaci potravních složek

Potřebný materiál: stereomikroskop a světelný mikroskop (optimálně oba s mikrometrem a digitálním fotoaparátem); Petriho misky; entomologické pinzety; milimetrový papír; Pasteurovy pipety různých velikostí a průměrů; preparační jehly; střičky s vodou a konzervačními médii.

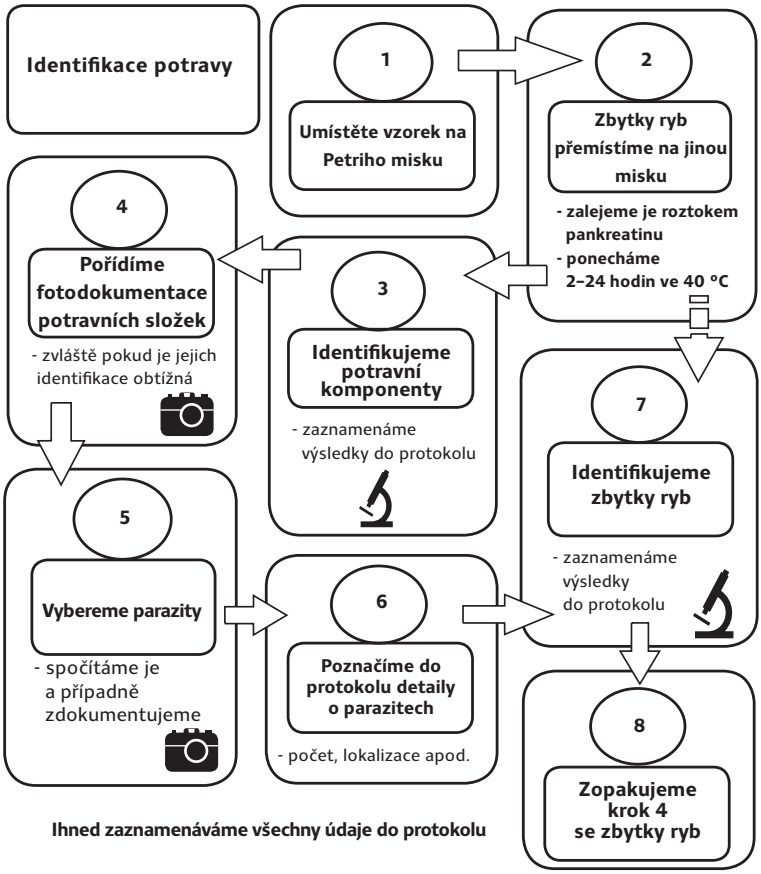
Postup (Obr. 16):

1. Vzorek se umístí na Petriho misku.
2. Pokud se ve vzorku nacházejí zbytky ryb, změří (pokud je to možné) a zváží se a umístí se na jinou Petriho misku. V případě, že jsou v pokročilém stavu natrávení a není možná jejich identifikace, zalijí se roztokem hovězího pankreatinu (1 g práškového pankreatinu + 65 ml vlažné vody + 35 ml nasyceného roztoku tetraboritanu sodného (pH pufr). Vzorek se označí a umístí do termostatu (sušičky) o teplotě 40 °C na 2 až 24 hodin (podle velikosti zbytků). Na základě morfologie kostí bude možná pozdější identifikace či rekonstrukce délky a hmotnosti kořisti. K odstranění organických zbytků z kostí však lze použít i běžné komerční enzymatické přípravky, používané v domácnosti, s aplikací do tří dnů.
3. Potrava se identifikuje na nejnižší možnou (nebo předem zvolenou) úroveň a zaznamená se do laboratorního protokolu. V případě, že byla pro hodnocení zvolena některá z kvantitativních metod, je třeba identifikované komponenty separovat a pokračovat ve stanovení jejich kvantity podle zvolené metody.

4. Je vhodné zhotovit fotodokumentaci komponentů, jejichž identifikace je komplikovaná (nejlépe se škálou a označením, resp. informací o fotografii v protokolu) a uložit jednotlivé komponenty do samostatných označených vzorkovnic (epruvet) s konzervačním roztokem.
5. Parazity je vhodné spočítat, fotograficky zdokumentovat a uložit do samostatných nádob s vhodným konzervačním médiem (např. podle Justine a kol., 2012) s patřičnou poznámkou v protokolu (počet, lokalizace v trávicím traktu apod.).
6. Zbytky ryb z kroku 2 se identifikují, zpracují podle kroku 4 a zaznamenají.

Potrava v trávicím traktu není téměř nikdy nedotknutá. Její identifikace je proto mnohem jednodušší, když je známá potenciálně dostupná potrava ze vzorku odebraného z habitatu, kde analyzovaný jedinec nebo populace žije. Referenční sbírka nestravitelných částí ryb a pomocná sbírka bentických bezobratlých může být velmi užitečná. Kosti, otolity, skřelové kosti, požerákové zuby nebo šupiny mají diagnostické druhově specifické znaky použitelné pro identifikaci ryb v potravě (Garman, 1982). Ale i jiná potrava, zvláště bezobratlí, je velmi často identifikovatelná na základě nestrávených zbytků. Nejvíce chitinizované části, jako jsou hlavové kapsuly, ústní orgány, tarzální drápky nebo schránky, umožňují identifikaci potravy bez větších problémů do úrovně čeledi, ale v mnohých případech i rodu až druhu.

Publikované determinační klíče jsou nezbytné pro určení různých potravních složek. Neexistuje žádný literární zdroj, na jehož základě by bylo možné určit všechny typy potravy v žaludku nebo trávicím traktu (snad pouze s výjimkou některých případů jako např. výlučné piscivorie). Kromě toho jsou determinační klíče orientovány obvykle pouze na druhy či taxony určitého regionu, a nejsou tudíž všeobecně použitelné. Předpokladem spolehlivé identifikace komponentů je její potvrzení více znaky. V případě zpracování vzorků z regionu, ve kterém nemá zpracovatel dostatek zkušeností, je vhodné i ověření přítomnosti druhu (taxonu) v konkrétním regionu na základě check-listů a literatury věnované jeho distribuci.



Obr. 16. *Postup identifikace potravy.*

2.14. Kvantitativní studium potravy

Kvantifikace obsahu trávicího traktu ve smyslu hodnocení významnosti jednotlivých potravních složek je jednou z nejvíce diskutovaných problematik v potravní ekologii ryb. Mnoho autorů publikovalo přehled existujících metod s jejich porovnáním a návrhem těch „nejlepších" pro aplikaci v různých situacích a zodpovězení specifických otázek potravní ekologie (Hynes, 1950; Hyslop, 1980; Macdonald a Green, 1983; Cortés, 1997; Hansson, 1998; Liao a kol., 2001; Ahlbeck a kol., 2012; Baker a kol., 2014; Manko, 2016). Na základě hodnocení a porovnávání různých komponentů v potravě ryb podle významnosti jsou pak

přijímány závěry v tom smyslu, že jeden komponent je důležitější než druhý s ohledem na růst, přežívání, velikostní strukturu, přírůstky, kondici, reprodukční úspěšnost nebo jiné aspekty ekologie studovaného druhu. Přesné stanovení skutečného významu konkrétní potravní složky je tudíž v tomto procesu kritické (Bowen, 1996). Ve snaze identifikovat dominantní nebo nejvýznamnější potravu bylo v oblasti potravní ekologie vyvinuto mnoho metod, které se obecně dají rozdělit do několika skupin podle toho, jak k otázce stanovení významnosti přistupují. Jednotlivé přístupy jsou samozřejmě použitelné pro různé účely a pomáhají odpovědět na různé otázky. Patří mezi ně jak skupiny metod založených na jednoduché numerické početnosti a frekvenci výskytu, tak i postupy založené na stanovení biomasy nebo energetické hodnoty jednotlivých složek (Hynes, 1950; Hyslop, 1980; Macdonald a Green, 1983). Přístup, resp. konkrétní metodu je třeba zvolit nejen podle toho, jaký je cíl výzkumu, ale výběr záleží rovněž na tom, zda je v potravě možné identifikovat diskrétní (jednotlivé, oddělené) jednotky, které jsou počitatelné (např. jedince kořisti) nebo ne (např. detrit). Na druhé straně, s používáním různých postupů a metod kvantifikace a hodnocení významnosti, jsou spojeny mnohé problémy. Hluboké analýzy a porovnávání přinesly mnoho informací o výhodách a nevýhodách jednotlivých postupů, ale přes to všechno nelze s určitostí deklarovat, který z nich je nejlepší nejen všeobecně (univerzálně), ale někdy dokonce ani pro zodpovězení konkrétní otázky v dané situaci. Jednoznačné vyřešení tohoto problému nebo stanovení, který index významnosti je nejpřesnější, je velmi komplikované a dosavadní snahy nepřinesly žádaný určující výsledek (Liao a kol., 2001). Různí autoři proto při studiu toho samého aspektu potravní ekologie volí různé metody i v případě jednoho konkrétního druhu. Přirozeně, výběr postupu hodnocení (např. numerický či založený na biomase) ovlivní výsledky a předběžná analýza vzorků může pomoci s rozhodnutím, jak moc podrobnou informaci jednotlivé postupy přinesou (Macdonald a Green, 1983).

2.14.1. Frekvence výskytu (frekvenční metoda)

Tento postup je založený na prezenci či absenci každé potravní složky v trávicím traktu (známý jako *F*, *%F*, *FO*, či O_i). Zaznamenávání přítomnosti či absence každé potravní složky v trávicích traktech všech jedinců ve vzorku je nejjednodušší cestou, jak vyhodnotit složení potravy studované populace ryb a vyjádřit relativní význam různých potravních složek. Ten je odvozený od podílu počtu traktů obsahujících příslušnou konkrétní složku na celkovém počtu vyšetřených traktů nebo traktů obsahujících potravu. Zvolený přístup je nezbytně nutné uvést v metodické části. Tato tradiční metrika je založena na pozitivní identifikaci potravních složek, resp. jejich částí, umožňujících

spolehlivou identifikaci. Přináší poměrně přesné a relevantní údaje o složení potravy (Baker a kol., 2014) a vyjadřuje i variabilitu výskytu jednotlivých složek v potravě ryb. Počet vzorků (trávicích traktů, resp. ryb), v nichž se konkrétní složky nacházejí, se zaznamenává a vyjadřuje v poměru k celkovému počtu vyšetřených vzorků (nebo jen pozitivních vzorků s potravou), často v procentech (Hynes, 1950).

Frekvence výskytu ve všech vyšetřených rybách se počítá podle vzorce:

$$\%F_i = \frac{N_i}{N} * 100$$

kde $\%F_i$ je frekvence výskytu složky i, N_i je počet trávicích traktů, v nichž se složka i vyskytuje a N je celkový počet všech vyšetřených ryb.

Získat údaje pomocí této metody je jednoduché. Jediným problémem může být to, že frekvence výskytu prázdných trávicích traktů se v průběhu roku u mnoha druhů mění. Proto se výsledky mohou lišit, pokud je frekvence počítaná na základě celkového počtu vyšetřených jedinců. Tuto komplikaci lze eliminovat tak, že frekvenci počítáme pouze na základě počtu vyšetřených vzorků s potravou a prázdné trávicí trakty nejsou do výpočtů zahrnuty. Jejich počty je ale třeba uvést jako zvláštní položku výsledných protokolů. Frekvence výskytu se pak počítá následovně:

$$\%F_{fi} = \frac{N_{fi}}{N_f} * 100$$

kde $\%F_{fi}$ je frekvence výskytu složky i, N_{fi} je počet trávicích traktů, v nichž se složka i vyskytuje a N_f je celkový počet vyšetřených ryb s přijatou potravou.

Obecně je tato metoda rychlá, jednoduchá a lze ji realizovat s významně menším úsilím bez komplikovaných měření a výpočtů, tedy v porovnání s detailnějšími metodami s menšími nároky na čas, vybavení a celkové výdaje. Přinejhorším poskytuje tento přístup výsledky s malou absencí informací ve srovnání s podrobnějšími metodami kvantifikace, ale při optimálním využití přináší robustní i dobře interpretovatelné modely (Ahlbeck a kol., 2012; Baker a kol., 2014), přičemž riziko vyplývající ze subjektivní chyby je při použití této metody minimální. Navíc lze takto přesně vyhodnotit přítomnost konkrétní složky v potravě ryb i na základě malého množství nestrávených zbytků.

Tato metoda demonstruje, co ryby konzumují a umožňuje vyhodnotit mezidruhové interakce. Lze ji též využít ke studiu otázek souvisejících se sezónním využíváním potravních zdrojů (Chipps a Garvey, 2007). Pro prostý popis složení potravy poskytuje nejrobustnější a nejlépe interpretovatelné

výsledky (Baker a kol., 2014). Ahlbeck a kol. (2012) zjistili, že tato metoda přinesla rovněž překvapivě spolehlivé výsledky ve srovnání se skutečnou dietou řízeně krmených ryb v experimentálních podmínkách.

Na druhou stranu však někteří autoři argumentují, že metoda frekvence výskytu neindikuje relativní význam potravy a byla kritizována kvůli tomu, že ignoruje relativní množství jednotlivých potravních složek a podává nekompletní informaci, neboť různé potravní složky mohou být konzumovány se shodnou pravidelností (frekvencí), ale ve zcela odlišné kvantitě (Hyslop, 1980; Bowen, 1996; Lima-Junior a Goitein, 2001; Chipps a Garvey, 2007; Braga a kol., 2012). Frost (1977) zjistil, že procentuální vyjádření výskytu je vhodným ukazatelem pouze v případech, kdy je v potravě přítomno malé množství složek. Se zřetelem na to, jak přesně výsledky reflektují množství skutečně zkonzumované potravy, poskytla frekvence výskytu v porovnání s jinými metodami údaje v rámci experimentu méně robustní a více variabilní v závislosti na druhu ryby – málo významná potrava byla nadhodnocená a naopak, významná potravní složka byla ve výsledcích podhodnocená (Ahlbeck a kol., 2012). Pierce a Boyle (1991) podobně dospěli k názoru, že metoda frekvence výskytu zveličuje význam náhodně přijaté potravy a potravy obsahující obtížně stravitelné části, které se akumulují při dlouhotrvajícím průchodu traktem.

2.14.2. Numerická početnost (abundance) – numerická metoda

Druhou tradiční metodou je metoda numerická, jež je založená na počtu jednotlivých potravních složek v obsahu trávicího traktu. Zjištěný celkový počet každé složky se vyjadřuje jako procentický podíl z celkového počtu všech složek (jedinců v případě kořisti) ve všech vyšetřených rybách (Hynes, 1950). Tato metoda je často úspěšně aplikována ve studiu potravy ryb, které se živí relativně snadno počitatelnou potravou.

Výhodou této metody je, že její použití je v některých případech jednoduché a jednoznačné. Lze snadno spočítat položky (kořist), které patří k snadno identifikovatelným a nezaměnitelně počitatelným (nestravitelné pevné části, např. otolity, hlavové kosti, silně chitinizované části těla, jako např. hlavové kapsuly larev pakomárů či karapaxy korýšů) v trávicích traktech některých ryb (například hmyz v potravě salmonidů nebo malí korýši v potravě sekavcovitých). Problémy ale nastávají, když potrava není pouze ve formě diskrétních počitatelných jednotek, jako jsou například detrit, makroskopické řasy, rostlinné fragmenty. Problematické jsou také příklady, kdy se jedná o tráveninu obsahující potravu (kořist), která je snadno stravitelná a neobsahuje pevné, např. chitinizované součásti (Hyslop, 1980; Ahlbeck a kol., 2012; Baker a kol., 2014). Relativní stravitelnost potravy je proto důležitým faktorem, který je třeba při aplikaci

numerické metody brát v úvahu, abychom se vyhnuli nežádoucím chybám v hodnocení množství snadno stravitelné (hrozí podhodnocení), anebo naopak trávicím enzymům odolávajícím složkám potravy, jež mohou být nadhodnocené. Někteří autoři proto navrhují vyhodnocovat (resp. vzorkovat) pouze přední část trávicího traktu nebo žaludek (např. Sutela a Huusko, 2000). V těchto partiích je potrava nejméně strávená (nebo trávicím procesem ještě nedotčená) a její relativně dobrý stav umožňuje spolehlivější identifikaci i počítání. Jedině tak je možné získat smysluplnou informaci o kvantitě jednotlivých potravních složek. V jistém smyslu je nedostatkem, že podobně jako u frekvenční metody, ani v tomto případě nehrají rozměry potravních složek žádnou roli a nejsou nijak hodnoceny. V případě ryb, které konzumují kromě nutričně významných větších komponentů i drobnější potravní složky, může vést použití numerické metody ke zkreslení výsledků (Hynes, 1950). Rovněž Liao a kol. (2001) a Ahlbeck a kol. (2012) jednoznačně potvrdili, že tato metoda nadhodnocuje malé složky a podhodnocuje velkou kořist. Numerická metoda má proto jen velmi omezené využití, pokud je potrava tvořená nepočitatelnými složkami. Neodráží přesně kvantitativní složení potravy z pohledu skutečného množství a významu (objemu a s ním související nutriční hodnoty), pokud ji tvoří složky s významně variabilní velikostí. Výsledky této metody proto odrážejí reálné složení potravy včetně podílu jednotlivých složek pouze v případech, kdy ryby konzumují potravu relativně vyrovnané velikosti.

Numerická metoda je však velmi dobře aplikovatelná při analýze částečných rozdílů v potravě jedinců, druhů, ontogenetických vývojových stupňů a bio- či ekotypů. Její použití je v těchto případech vhodnější a zároveň jednodušší a efektivnější než vyjadřování významu a hodnoty jednotlivých potravních složek. Drobná potrava totiž někdy přispívá sice málo k celkové biomase potravy, ale její význam spočívá v její početnosti (Hynes, 1950; Ahlbeck a kol., 2012). Pokud frekvenční metoda neodhalí žádné signifikantní rozdíly ve složení potravy, ukáže se tak v některých případech rozdíl v relativním množství přítomných (zkonzumovaných) složek (počet, procentický podíl). Tyto rozdíly mohou souviset s mírně odlišnými vlastnostmi habitatů (mikrohabitatů), v nichž se zkoumané druhy vyskytují, resp. ve kterých vyhledávají potravu. Takto může numerická metoda pomoci vysvětlit nebo potvrdit rozdílné využívání zdrojů (potrava, habitat) například v objasnění principů koexistence. V takovýchto situacích může být při porovnávání užitečná i parciální informace o některých taxonech (nebo typech potravy), pokud nejsou dostupné jiné relevantní údaje. Numerická metoda má informační hodnotu ve vztahu k potravnímu chování (Macdonald a Green, 1983) a může odrážet i úsilí ryb při selektivním získávání potravy. Nejlepší výsledky přináší tato metoda při analýzách potravy piscivorních a bentofágních ryb s kontinuálním příjmem potravy (Ahlbeck a kol., 2012).

Celkově vzato může být tato metoda užitečná a nápomocná v některých specifických situacích, kdy je možné potravu (obvykle kořist) snadno a jednoznačně identifikovat a počítat, získané výsledky však mají jen omezenou využitelnost pro hodnocení významu jednotlivých potravních složek. Počty jednotlivých typů potravy nám poskytují důležité informace o rozdílech mezi jednotlivými druhy a bio- a ekotypy. Doporučuje se proto používat tuto metodu obezřetně nebo v situacích, pro něž je vhodná, a vždy i s ohledem na všechna její omezení.

2.14.2.1. Subsampling (podvzorkování) při stanovování numerické abundance

Potravní složky se počítají, pokud je to možné, v celém vzorku. Je však potřeba posoudit vynaložené úsilí a čas na jedné straně a význam takto získaných výsledků na straně druhé. Jde hlavně o „návratnost investice“, kterou je potřebný čas a práce ve vztahu ke zlepšení kvality výsledku. Zvláště pokud je vzorek velký a homogenní, je možné použít některou z dostupných metod subsamplingu a analyzovat pouze část vzorku. Cílem subsamplingu je zabezpečit, aby se zpracováním určité části vzorku získaly údaje reprezentující celý vzorek – výběr podvzorků proto musí být náhodný (Barbour a Gerritsen, 1996). Většinou to v praxi znamená, že vzorky nejprve zhomogenizujeme a následně náhodně vybereme, třídíme, počítáme a identifikujeme jen menší část původního vzorku. Ve snaze o standardizaci výsledků a redukci nákladů na zpracování celých vzorků se hledá optimální množství původního vzorku – co nejmenší, ale zároveň dostatečně velké na to, aby s co nejmenší chybou reprezentovalo vlastnosti celého vzorku. Jistá paralela je v tomto ohledu s hydrobiologickými studiemi, kdy na toto téma byla publikována řada prací, přičemž velká pozornost byla věnována zvláště interpretaci druhové pestrosti z částečných vzorků vodních bezobratlých. Ti jsou z pohledu subsamplingu studováni mimořádně intenzivně, protože například při vzorkování makrozoobentosu tekoucích vod získáváme velké množství (často až tisíce) jedinců, které je třeba následně potřeba vytřídit, determinovat a spočítat. Subsampling v těchto případech přináší enormní zkrácení času potřebného na zpracování vzorku, a přesto při použití vhodné metody zabezpečuje relevantní údaje. Podobná je situace při zpracování některých vzorků potravy bentofágních či planktonofágních ryb.

V podstatě jsou známy dva základní postupy subsamplingu. Jsou založené na (1) objemu a (2) fixních počtech potravních částic (obvykle 300). V prvním případě se odhaduje objemový podíl částic tvořících potravní složky v podvzorku,

v druhém jsou výsledkem pouze údaje o relativní abundanci. Metoda fixního počtu je efektivnější, ale neposkytuje informaci o skutečném celkovém počtu komponentů obsahu trávicího traktu konkrétních ryb, což může být v potravní ekologii překážkou a omezením vedoucím ke zkreslení výsledků v porovnání se skutečností. Proto se doporučuje použít modifikovanou metodu Barboura a Gerritsena (1996), ve které se metoda fixního počtu kombinuje s náhodným výběrem frakcí vzorku. Ze vzorku umístěného na čtvercové mřížce se analyzuje potrava z několika (obvykle více než pěti) čtverců. Měřítko sítě (velikost čtverců) závisí na velikosti vzorku a velikosti komponentů, které v potravě převládají. Chyba je minimalizována tím, že z vybraných čtverců tvořících podvzorek jsou vybrány, identifikovány a spočítány všechny potravní částice. V případě, že v průběhu analýzy zjistíme, že i ve vybrané frakci je mnohem více potravních částic, než je stanovený cílový počet (optimálně 300 částic), je možno postup opakovat a analyzovat pouze její vybranou část (Vinson a Hawkins, 1996). Dosažení tohoto, resp. velmi podobného počtu identifikovaných a spočítaných potravních částic ve frakci vzorku je důležité pro možnost srovnání. Doporučuje se proto zvolit takovou velikost čtverců a takový počet, aby se výsledné číslo od cílového lišilo co nejméně, jinak nebude porovnávání mezi vzorky zcela spolehlivé a objektivní. Hraniční hodnotou, o kterou může dosažené číslo přesáhnout předem stanovený počet, by mělo být 20 %. Podrobnosti týkající se problematiky subsamplingu a více informací o specifických situacích jsou dostupné v mnoha publikacích zabývajících se subsamplingem vodních bezobratlých, převážně makrozoobentosu a planktonu (např. Barbour a Gerritsen, 1996; Vinson a Hawkins, 1996).

2.14.2.2. Postup při počítání potravních částic

Potřebný materiál: stereomikroskop a světelný mikroskop (podle možnosti oba s mikrometrem a digitálním fotoaparátem) nebo stolní lupa; Petriho misky; entomologické pinzety; mřížka nebo milimetrový papír; Pasteurovy pipety; preparační jehly; střička s vodou.

Postup (Obr. 17):

1. Zvolíme cílové číslo (počet potravních částic). Nejlepší výsledky (optimální poměr mezi přesností a efektivitou) jsou dosahovány s cílovým počtem 300.
2. Homogenizujeme vzorek na Petriho misce tak, aby byl obsah trávicího traktu rovnoměrně rozprostřený nad mřížkou, a v případě potřeby zajistíme počitatelnost (rozlišitelnost) částic naředěním vzorku vodou.
3. Zvolíme vhodné měřítko (velikost čtverců) s ohledem na velikost

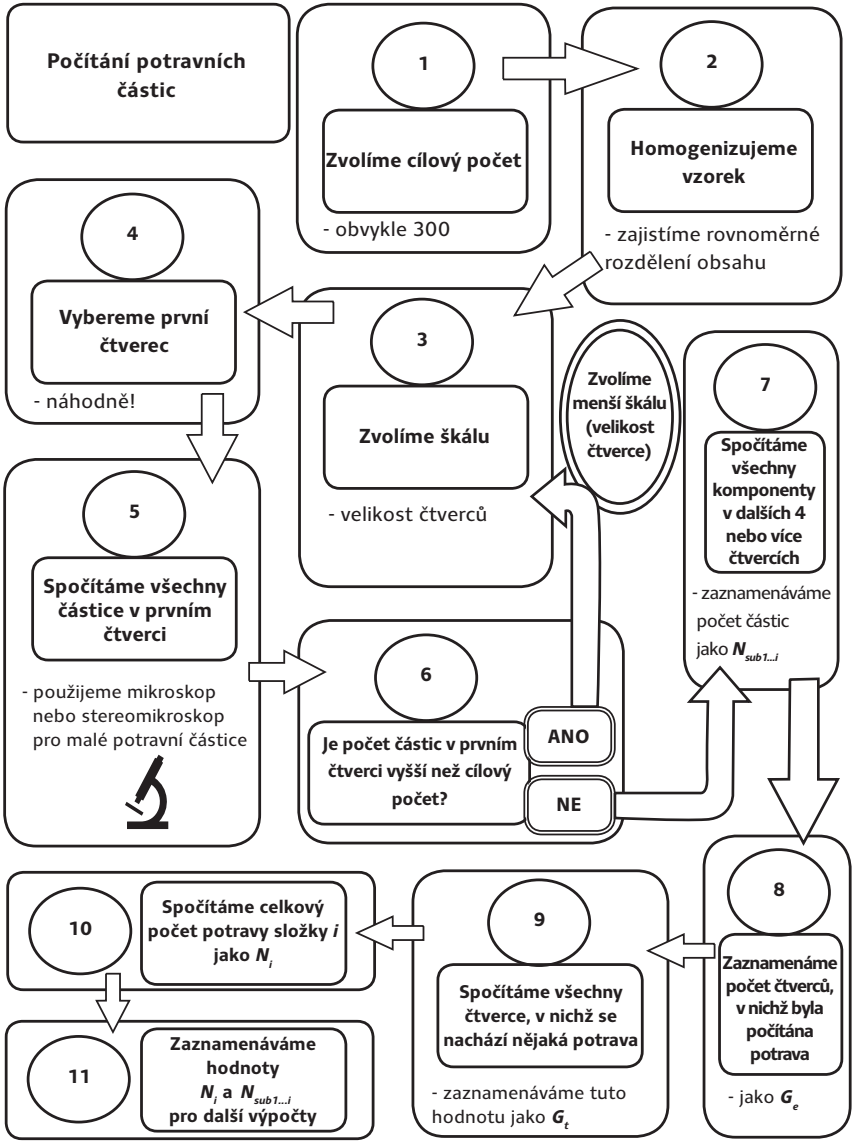
a hustotu potravy. Cílový počet by měl být dosažitelný z víc než čtyř čtverců.

4. Zvolíme náhodně první čtverec (například generátorem náhodných čísel – číslo řádku a číslo sloupce).
5. Identifikujeme a spočítáme všechny částice v prvním čtverci. Při něm započítáváme do čtverce částice na horní a levé hranici čtverce, částice na spodní a pravé hranici nikoliv.
   Pozn.: Pokud jsou jednotlivé potravní částice rozpadlé na fragmenty nebo významně natrávené, počítají se charakteristické a nezaměnitelné zbytky těl – podle možnosti tak, aby platilo, že jedna takováto část = jeden jedinec (například hlavové kapsuly pakomárů). Někdy však není počítání tak jednoduché a množství částic nemusí být na první pohled jednoznačné. V případě, že zbytky potravy ukazují na více nekompletních jedinců, se výsledný počet stanoví jako nejnižší počet, který dokážeme s určitostí stanovit. Vždy vyhodnocujeme všechny zachované zbytky konkrétní složky (kořisti). Například pokud ve vzorku zjistíme 6 hlav a 14 noh larev jepic, výsledný počet je 6. Pokud by však například jednu z těchto 14 nalezených noh nebylo možné spojit ani s jednou hlavou – byla by příliš velká nebo malá, byl by výsledný počet 7. Podobně pokud bychom našli 6 hlav, ale 38 noh, výsledný počet bude 7. Tato metoda je vhodná při analýze potravy piscinivorních, bentofágních a planktonofágních ryb, ale neřeší problém, pokud se jedná o ryby živící se i uhynulými živočichy nebo jejich částmi.
6. Pokud při počítání zjistíme, že počet v prvním čtverci převyšuje cílový počet vydělený čtyřmi, je třeba zmenšit škálu (velikost čtverce).
7. Spočítáme všechny potravní částice v dalších náhodně vybraných čtyřech nebo více čtvercích, dokud nedosáhneme cílový počet, případně cílový počet + max. 20 % (např. 300 až 360). Zaznamenáme tuto hodnotu pro každý typ potravy jako $N_{sub1....i}$.
8. Zaznamenáme počet analyzovaných čtverců jako G_e.
9. Zaznamenáme počet čtverců, v nichž se nachází nějaká potrava jako G_t.
10. Vypočítáme celkový počet jednotlivých částic v celém vzorku podle vzorce:

$$N_i = N_{subi} * \frac{G_t}{G_e}$$

kde N_i je celkový počet potravních částic složky i, N_{subi} je počet částic i v počítaných čtvercích (subsample), G_t je celkový počet čtverců, v nichž se nachází nějaká potrava, a G_e je počet vyhodnocovaných čtverců tvořících subsample.

11. Zaznamenáme $\boldsymbol{N_i}$ a $\boldsymbol{N_{subi}}$ pro další výpočty.
    Cílem studia potravy je vytřídit a identifikovat do stanovené taxonomické úrovně všechny potravní složky. Analýzy pouhým okem přinášejí v konečném důsledku méně identifikovaných a spočítaných organizmů než při použití zvětšení (Carter a Resh, 2001). Dostatečné zvětšení je proto velmi důležité a obsah čtverců, resp. fragmenty vzorku je nevyhnutelně nutné analyzovat s použitím stereomikroskopu (stolní lupy) nebo mikroskopu s využitím počítací komůrky (například když potravu tvoří plankton). Pro počítání nejmenších jednotlivě odlišitelných částic potravy ve známém objemu vzorku nebo jeho části jsou vhodné i hemocytometry na počítání krvinek (Hauer a Lamberti, 2011) nebo dokonce průtokové cytometry.



Obr. 17. *Postup při počítání s podvzorky (subsampling).*

2.14.3. Metoda dominance podle počtu potravních složek podle Hynese (1950) (Dn)

Počet ryb, u nichž se konkrétní potravní komponent nachází jako dominantní složka potravy, lze hodnotit dvěma možnými způsoby používanými ve frekvenční metodě (Hynes, 1950). Vlastní dominance se počítá podle vzorce:

$$D_i = \frac{N_{di}}{N} * 100$$

kde D_i je dominance složky i, N_{di} je počet ryb, v nichž složka i dominuje (dosahuje nejvyšší počet) a N je celkový počet analyzovaných ryb.

Tato metoda byla výsledkem snahy o zdokonalení frekvenční metody s cílem eliminovat problém s chybějící informací o kvantitě potravy (Jobling a kol., 2001; Zacharia a Abdurahiman, 2004). Už Hynes (1950) však zjistil, že dává v podstatě stejné výsledky jako frekvenční metoda. Její aplikace má tedy smysl pouze v případě, kdy je potrava tvořená jednotlivými – oddělenými a počitatelnými složkami, protože dominance je odvozená od jejich numerické abundance. Reálný význam použití této metody v praxi je tedy diskutabilní.

2.14.4. Metody založené na biomase

Stanovení (čerstvé, vlhké nebo suché) biomasy potravy je často doporučovanou metodou pro studie zaměřené na potravní ekologii ryb. Množství potravních složek může být hodnoceno několika způsoby. Ty jsou však v podstatě založené na třech základních přístupech – numerickém, volumetrickém a gravimetrickém (Natarajan a Jhingran, 1961). Dalším způsobem je nepřímá kvantifikace pomocí délko-hmotnostních vztahů pro lineární nebo jinou vhodnou konverzi rozměrů na hmotnost (Benke a kol., 1999; Chipps a Garvey, 2007).

Objem nebo hmotnost odrážejí nutriční hodnotu jednotlivých potravních složek a mají výhodu i při hodnocení vzorků složených z příliš velkého množství drobné, obtížně počitatelné potravy a obsahu trávicího traktu, který není tvořen diskrétními nepočitatelnými jednotkami (Macdonald a Green, 1983; Cortés, 1997). Metody založené na hmotnosti a objemu jsou považovány za nejvíce přijatelné (Hynes, 1950) a poskytují jednoznačně nejpřesnější údaje o kvantitativním složení potravy. Jsou rovněž dobrou volbou při hodnocení toku energie (Chipps a Garvey, 2007) a zdají se být i dobrým ukazatelem významnosti jednotlivých potravních složek (např. Grabowska a Grabowski,

2005). Názory, podle nichž jsou metody založené na biomase nejvhodnější pro přesné vyjádření reálného složení potravy, byly doloženy i experimentální laboratorní studií, při níž vždy dávaly výsledky podobnější skutečnému složení potravy než ostatní metody (Ahlbeck a kol., 2012).

V úvahu je samozřejmě třeba vzít i slabiny těchto metod. I když by se mohlo zdát, že stanovení biomasy při analýze potravy v podstatě nemá chybu, omezení a slabin lze najít hned celou řadu. První a nejdůležitější je fakt, že separace jednotlivých komponentů v obsahu trávicího traktu je někdy velmi komplikovaná a nejednoznačná. Ve snaze o separaci jednotlivých složek může při hodnocení docházet k nekvantifikovatelné chybě (Baker a kol., 2014). Někdy je identifikace, separace a stanovení biomasy jednotlivých složek dokonce zcela nemožné kvůli tomu, že potravní složky jsou nekompletní a ve vysokém nebo značně rozdílném stupni natrávení (viz kapitola 2.12.3.; Johnston a Cunjak, 1999) a tvoří směs natrávených tkání či pletiv rozličných potravních složek (Baker a kol., 2014). Značná část obsahu je často tvořena hmotou, kterou není možné jednoznačně přiřadit k žádnému z přítomných komponentů. Protože potrava není obvykle analyzovaná ihned po získání vzorků, je třeba počítat i s dalším zdrojem chyb, kterým je vliv použitých konzervačních médií nebo zamrazení vzorku. Problémem je i rozdílný efekt působení jednoho média na různé organizmy, což komplikuje nejen absolutní, ale i relativní hodnocení získaných údajů. Ale i v případě analýzy zcela čerstvých vzorků a možnosti je jednoznačně separovat na jednotlivé složky a přesně změřit jejich objem či stanovit hmotnost, je nutno počítat s tím, že jejich aktuální složení ovlivňuje řada faktorů, které není možno kvantifikovat (Macdonald a kol., 1982). Například mechanické zpracování potravy při jejím příjmu či průchodu traktem nebo různá rychlost trávení (např. máloštětinatí červi versus larvy pakomárů nebo larvy ryb versus juvenilní či adultní stadia), pohyb ve střevě a vyprazdňování různých potravních složek jsou dalšími důvody, proč vyhodnocování prostřednictvím biomasy zahrnuje další nekvantifikovatelné a těžko interpretovatelné chyby (Hyslop, 1980; Macdonald a kol., 1982; Baker a kol., 2014). Rovněž je známo, že i když zůstává pokožka potravy (kořisti) na pohled celistvá a nepoškozená, trávení tkání probíhá a projevuje se snižováním biomasy (např. larvy pakomárů). Ryby tvořící kořist v trávicím traktu nemusí vždy jevit známky natrávení, přesto však byla vážením zjištěna relativně velká ztráta biomasy. Pořadí důležitosti jednotlivých složek v kombinaci s jejich rozdílnou mírou stravitelnosti (resp. rozdílnou rychlostí trávení) může vést k významnému nadhodnocení významu naposledy zkonzumovaných anebo nejméně stravitelných složek, což je problémem zvláště v případech, kdy je do hodnocení zahrnutý malý počet vzorků (Baker a kol., 2014). Navíc částice, které jsou nestravitelné nebo mají jinak omezenou nutriční hodnotu (například schránky měkkýšů – Hyslop,

1980), mohou mít relativně velký objem i hmotnost. Před stanoveními by měly být ze vzorku odstraněny, což je však náročné a pracné, zvláště pokud je jich ve vzorku hodně. Problémem, který může do jisté míry ovlivnit výsledky a jejich interpretaci, je přítomnost neobvyklé potravy. Pokud se v potravě nachází a má velký objem (a hmotnost), může významně ovlivnit výsledky stanovení a vyvolat odchylky v hodnocení relativního podílu jednotlivých složek. V každém případě je potřeba i u metod založených na měření objemu a hmotnosti znát všechny jejich nedostatky a nespoléhat na to, že obvykle poskytují nejpřesnější údaje blížící se reálnému složení potravy. Při interpretaci kvantitativních údajů je proto nutné pečlivě zvážit všechny okolnosti a rozsah, do jakého získané výsledky objektivně vystihují složení potravy tak, jak ji konzument (ryba) reálně přijal (Baker a kol., 2014).

2.14.4.1. Volumetrická metoda

S použitím této metody se měří objem každé potravní složky nebo celkový objem potravy přijaté vyšetřovanou rybou (Hynes, 1950). Mnoho autorů považuje tuto metodu kvantitativního studia za vyhovující. Jak zdůrazňuje Hynes (1950), stanovení objemu je vhodným způsobem zvláště v případě herbivorů a detritofágů konzumujících organické zbytky a sedimenty. Objem jednotlivých potravních složek se často vyjadřuje i v procentech jako podíl na celkovém objemu obsahu trávicího traktu. Tento výsledek se získává s pomocí rovnice:

$$\%V_i = \frac{V_i}{V_t} * 100$$

kde $\%V_i$ je procentický podíl složky i, V_i je objem složky i a V_t je celkový objem potravy v analyzovaném trávicím traktu.

Existují čtyři postupy, kterými lze získat údaje V_i a V_t objemu jednotlivých složek: (1) vizuální metoda, (2) měření odměrnými válci, (3) výpočet s použitím délko-objemových regresí a (4) výpočet s použitím geometrických výpočtů objemu těles.

2.14.4.1.1. Metoda vizuálního odhadu

Při aplikaci této metody je individuálně (výzkumníkem) odhadován objem jednotlivých složek potravy ve vzorku obsahu trávicího traktu vizuálně. Stanovuje se a zaznamenává relativní objem každého komponentu v každém analyzovaném vzorku ve formě jeho procentického podílu na objemu celého

vzorku. Je to pravděpodobně nejjednodušší a nejrychlejší způsob stanovení objemu potravy ryb. Výsledky lze v porovnání ostatními volumetrickými metodami získat s relativně malým úsilím. Na druhou stranu má tato metoda celou řadu závažných nedostatků. V první řadě je už z podstaty vysoce subjektivní a výsledky jsou velmi pravděpodobně ovlivněny subjektivním hodnocením vyšetřujícího. Tento nedostatek lze do značné míry minimalizovat dlouhodobými zkušenostmi a jistým tréninkem při zpracování velkého množství vzorků. V této souvislosti lze rovněž doporučit opakované vyhodnocení toho samého souboru vzorků v jiném (náhodném) pořadí a následné porovnání výsledků, případně korekce odhadu. Takováto zpětná vazba může významně napomoci správnosti a spolehlivosti odhadu. Přesnost a spolehlivost výsledků je možné zvýšit co nejpřesnějším definováním a jeho přesným dodržováním. Potvrdilo se to při návrhu designu testování přesnosti metod, jimiž se relativní denzita (resp. procentické složení) potravy terestrických herbivorů stanovovala odhadem plochy v mikroskopickém zorném poli. Tato metoda je často využívaná a přináší výsledky, které se jen velmi málo liší od výsledků získaných velmi přesným stanovením sušiny. Lze tedy předpokládat, že přesnost této nebo podobné metody odhadu bude podobně spolehlivá i při analýzách potravy jiných živočichů včetně ryb, minimálně v případě herbivorů, detritovorů a omnivorů. Přesto všechno je však velmi obtížné hodnotit přesnost jednotlivých výzkumníků, pokud nebyl tento postup exaktně testován. Teoretické přesnosti, která je sice dosažitelná, nemusí dosáhnout všichni výzkumníci, což může vést k potenciálním odchylkám a obtížně srovnatelným výsledkům.

Metoda odhadu objemu je alternativou k numerické metodě hodnocení v případech, kdy není možné potravní složky počítat (např. rostlinný materiál, detrit). Obcházení problému pracným mechanickým separováním potravních složek a částic bez nutriční hodnoty, které jsou při použití jiných metod předpokladem měření objemu, je značnou komplikací. Metoda odhadu objemu je tedy použitelná v případě, kdy by ani při maximálním úsilí nebylo možné komponenty z tráveniny fyzicky oddělit a kvantifikovat nějakým jiným způsobem. Je však skutečností, že v některých případech není možné jednotlivé složky obsahu trávicího traktu oddělit ani vizuálně. Objem může být v rámci této metody stanovený jako reálný (skutečný) objem (viz krok 3a v popisu metody) nebo jako relativní objem (viz krok 3b). První možnost má výhodu v možnosti porovnávání mezi vzorky (jedinci), ale nese s sebou vyšší riziko nepřesnosti výsledků. Druhá možnost má nevýhodu v tom, že výsledky neříkají nic o celkovém množství potravy, což ztěžuje porovnávání vzorků a může rovněž ovlivnit interpretaci výsledků.

Odhad objemu v homogenní mase malých potravních složek

Při stanovování objemu drobné potravy pomocí této metody se vzorek rovnoměrně rozmístí na Petriho misku nebo podložní sklo. Je nutno zabezpečit, aby výška vrstvy byla ve všech částech stejná (např. vymezením výšky mikroskopickým sklíčkem a přikrytím vzorku jiným sklem). Následně měříme (odhadujeme) plochu, kterou konkrétní složka zaujímá (Hyslop, 1980 a jím citované práce; Hauer a Lamberti, 2011).

Potřebný materiál: stereomikroskop a světelný mikroskop (podle možnosti oba s mikrometry a digitálním fotoaparátem); Petriho misky; milimetrový papír; mikroskopická sklíčka (se čtvercovou mřížkou nebo počítací komůrky).

Postup (Obr. 18):

1. Materiál se rozmístí v rovnoměrně vysoké vrstvě na Petriho misce (případně na mikroskopickém sklíčku nebo v počítací komůrce, pokud jde o velmi malé částice). Výška vrstvy záleží na velikosti a hustotě částic a je vymezená předmětem o známé výšce (např. mikroskopické sklíčko) a zabezpečená stlačením vzorku dalším sklem přiloženým shora.
2. Tento krok lze vykonat třemi způsoby (a–c) podle charakteru potravy a dostupného nebo preferovaného vybavení.

a. Vzorek se umístí na misce na milimetrový papír. Plocha, kterou složka zaujímá, se odhadne systematickým počítáním čtverců (např. shora dolů, zprava doleva) pod stereomikroskopem. Velikost čtverců a zvětšení se volí podle charakteru a velikosti hodnocené potravní složky. Počet čtverců, které složka ***i*** zabírá, se zaznamená jako $\boldsymbol{N_{ci}}$.

b. Použije se stereomikroskop (nebo mikroskop) s indexovaným okulárem (s mřížkou) při optimálním zvětšení. Systematickým počítáním čtverců (např. zprava doleva, shora dolů), které jsou složkou ***i*** pokryté v jednom zorném poli, se odhadne plocha jím pokrytá, potom se vzorek systematicky posouvá a postup se opakuje, dokud není takto zpracován celý. Počet čtverců, které složka ***i*** zaujímá, se zaznamená jako $\boldsymbol{N_{ci}}$.

c. Použije se indexované mikroskopické sklíčko s mřížkou při optimálním zvětšení. Systematickým počítáním čtverců (např. zprava doleva, shora dolů), které jsou složkou ***i*** pokryté, se odhadne plocha, kterou zaujímá. Počet čtverců, které složka ***i*** zaujímá, se zaznamená jako $\boldsymbol{N_{ci}}$.

3. Tento krok lze vykonat dvěma způsoby (a, b) podle toho, jaké výsledky jsou vyžadovány.

a. přepočet plochy na skutečný objem podle vzorce:

$$V_i = N_{ci} * a^2 * h$$

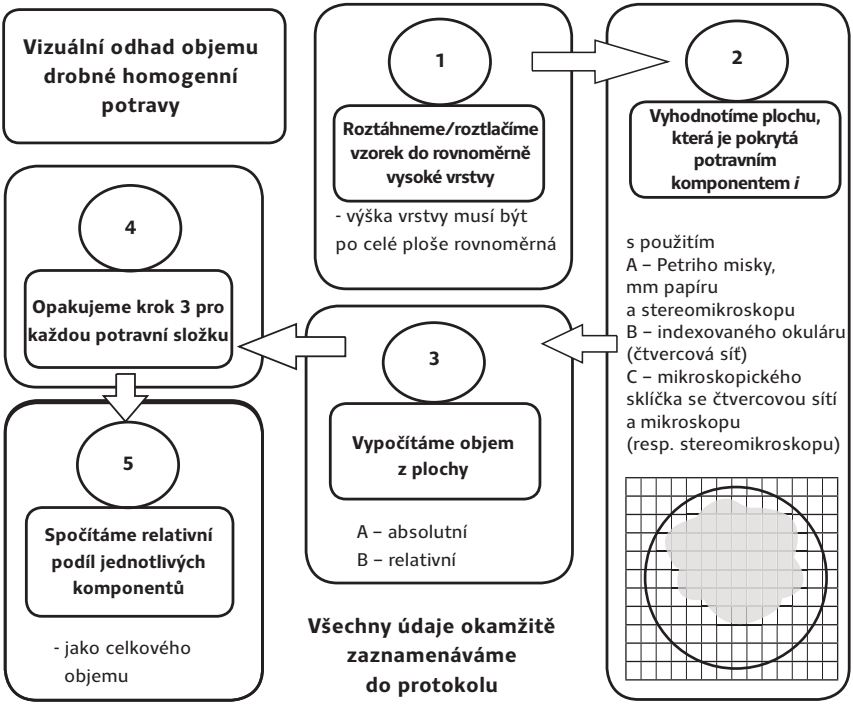
kde V_i je objem složky i, N_{ci} je počet čtverců pokrytých složkou i, a^2 je plocha čtverce (a je délka jedné jeho strany) a h je výška vrstvy vzorku vyjádřená ve stejných jednotkách jako a.

b. přepočet plochy na relativní objem podle vzorce:

$$V_i = N_{ci} * a^2$$

kde V_i je objem složky i, N_{ci} je počet čtverců pokrytých složkou i, a^2 je plocha čtverce (a je délka jedné jeho strany).

4. Objem každé složky se spočítá podle výše uvedených postupů a stanoví se celkový objem potravy součtem objemu jednotlivých složek.
5. Procentický podíl každé složky se spočítá podle obecné rovnice uvedené v kapitole 2.14.4.1.



Obr. 18. *Postup vizuálního odhadu objemu homogenní potravy tvořené drobnými potravními složkami.*

2.14.4.1.2. Metoda stanovení objemu odměrnými válci

S použitím této metody se stanovuje objem každé potravní složky nebo celkového objemu potravy každé vyšetřené ryby. V případě jednotlivých komponentů ji lze vyjadřovat jako procentický podíl na celkovém objemu přijaté potravy. Relativní podíl celkově přijaté potravy se obvykle vyjadřuje jako procento celkového objemu ryby. Tato přímá metoda měření objemu pravděpodobně nejlépe vystihuje biomasu potravních složek, resp. potravy jako takové. Objem se stanovuje měřením v kalibrovaných odměrných válcích s co nejmenším možným průměrem pro zajištění přesnosti měření a výpočtu poměrného podílu jednotlivých složek (Hynes, 1950). Objem změřený touto metodou je logicky totožný s objemem složky ve vzorku za předpokladu, že jednotlivé složky bylo možno jednoznačně identifikovat a separovat (fyzicky oddělit). Měří se ponořením potravy jednoho typu do odměrného válce, ve kterém je známý objem vody. Rozdíl objemů se rovná objemu složky. Alternativním způsobem měření je umístění potravní složky do prázdného odměrného válce (Hyslop, 1980) – toto měření je však možné pouze v případě tekuté, resp. polotekuté potravy, po jejímž usazení nezůstávají mezi potravními částečkami prázdné prostory a povrch masy je relativně rovný, umožňující přesný odpočet hodnoty objemu na stupnici válce. V podstatě je to obdoba měření objemu (tzv. „biovolume“) zooplanktonu, používaného pro jeho rychlou orientační (relativně přesnou) kvantifikaci (Schlott a kol., 2011; Adámek a kol., 2016).

Tato metoda je vhodná zvláště pro kvantitativní analýzy potravy predátorů konzumujících velkou kořist. Nevhodná je na vyhodnocování těch drobných potravních složek, které se v obsahu trávicích traktů nacházejí jen zřídka a v malých objemech. Ty jsou často menší, než je objem dílků v odměrném válci, a jsou tedy v nízkých počtech takto neměřitelné i při použití nejpřesnějších válců s nejmenším průměrem. Jedná se například o malé korýše, řasy a rozsivky v potravě planktivorních nebo detritovorních ryb. Pokud se taková potrava nachází ve vzorcích ve velkém množství, lze metodu stanovení objemu odměrnými válci použít za předpokladu, že je možné jednotlivé komponenty oddělit. I tak však při hodnocení drobných potravních složek touto metodou existují další omezení. Významnou komplikací snižující přesnost měření je voda zadržená mezi malými částečkami potravy. Zatímco v případě velkých potravních částic lze vodu nechat odkapat a osušit odsátím přebytečné vody, u malých komponentů je to složité, pokud ne zcela nemožné (Hyslop, 1980). Dalším problémem je rozdílná rychlost trávení různých typů potravy. Úbytek objemu trávením a jeho odlišný rozsah u jednotlivých potravních složek snižují přesnost měření absolutního i relativního objemu. Pro překonání tohoto

nedostatku bylo navrženo řešení, které je však natolik pracné a komplikované, že jeho odůvodněné používání je v praxi velmi diskutabilní. Jedná se o metodu výpočtu objemu natrávené potravy na základě známých objemů jedinců různých velikostních skupin konkrétního typu potravy (Zacharia a Abdurahiman, 2004). Je to velmi pracná metoda a v podstatě nepatří k metodám přímého stanovení objemu – spíše má blíže k metodám výpočtu hmotnosti na základě délko-hmotnostních vztahů. Stanovený objem potravy z konzervovaného vzorku se může od reálného objemu lišit i v důsledku konzervačních médií nebo mrazení. Jak je uvedeno v kapitole 2.8., tato média způsobují i rozdílné změny objemu u různých skupin organizmů, což komplikuje i relativní porovnávání a hodnocení významnosti jednotlivých typů potravy. V neposlední řadě se na snižování přesnosti této metody podílí i přítomnost velkého objemu mukózních sekretů u některých druhů. Ty mohou být jednak komplikací při separování komponentů, ale mohou též zůstávat na potravních částicích, a navyšovat tak naměřený objem (Hynes, 1950; Baker a kol., 2014).

Měření objemu velkých složek potravy odměrnými válci

Je známo několik variant této metody. Zde uvádíme dvě nejvíce používané.

Varianta A: Měření objemu je založeno na ponoření potravy do vody v odměrném válci. Rozdíl mezi hodnotou původního známého objemu vody a celkovým objemem po ponoření potravy je objemem potravy.

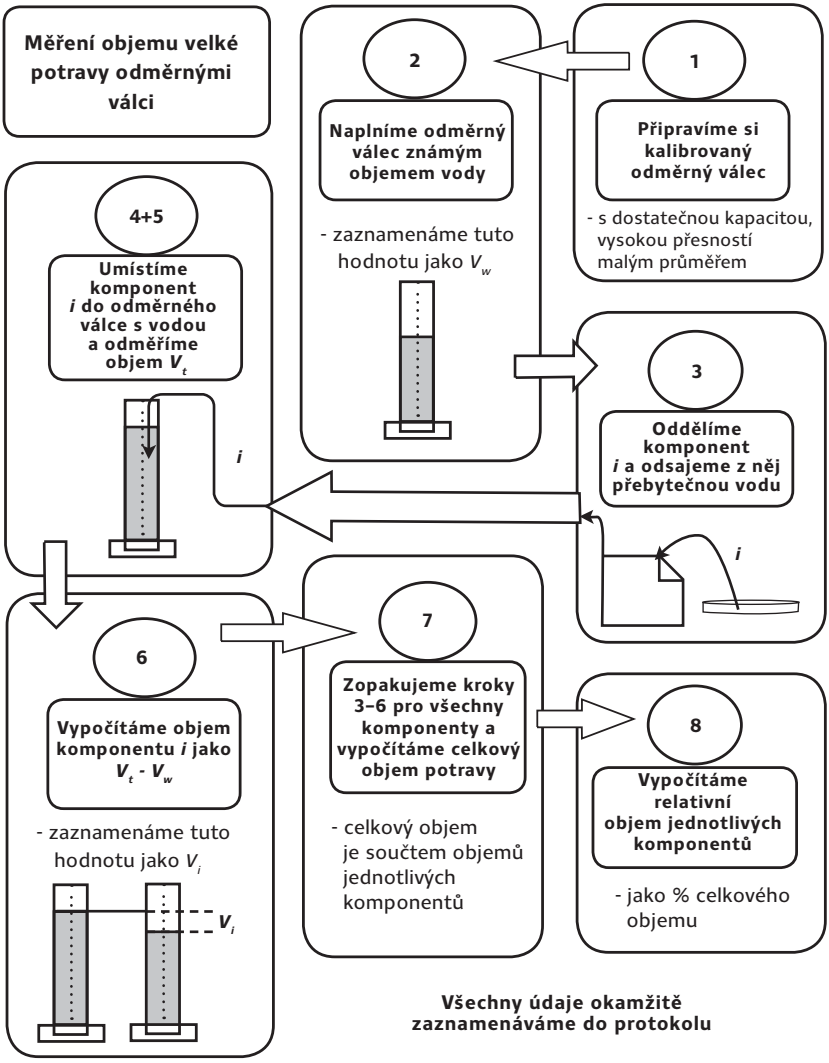
Potřebný materiál: odměrné válce; destilovaná voda; pinzety; pipety; filtrační papír.

Postup (Obr. 19):

1. Připravíme si odměrný válec s nejmenším možným průměrem pro konkrétní typ a množství potravy. Měl by mít dostatečnou kapacitu, malé dělení na stupnici a vysokou přesnost.
2. Válec se naplní vodou tak, aby bylo možné potravu kompletně ponořit a aby celkový objem vody a potravy nepřekročil kapacitu válce. Tento objem vody se zaznamená jako V_w. Při plnění válce vodou a potravou se objem kontroluje vizuálně očima ve výšce hladiny.
3. Potravní složka ***i*** se oddělí od ostatního obsahu trávicího traktu a odstraní se z něj přebytečná voda.
4. Tato složka se umístí do odměrného válce.
5. Naměřená hodnota se odečítá vizuálně ve výšce hladiny a zaznamená se jako V_t.
6. Objem V_i složky ***i*** se spočítá pomocí rovnice:

$$V_i = V_t - V_w$$

7. Uvedeným postupem se stanoví objem všech potravních složek a spočítá celkový objem potravy jako součet objemů jednotlivých složek.
8. Procentuální hodnota každé složky se spočítá podle obecné rovnice uvedené v kapitole 2.14.4.1.



Obr. 19. *Postup měření objemu potravy odměrnými válci (velké komponenty)***.**

Varianta B: Měření objemu je založené na umístění potravy do jednoho odměrného válce a dolití vody z druhého odměrného válce. Rozdíl mezi objemem dolité vody a konečným objemem vody s potravou je objem potravní složky. Tato metoda je vhodná v případě, že je těžké dopředu odhadnout správný iniciální objem vody, do které bychom potravu ponořili, a vyhneme se tak případnému problému s překročením kapacity odměrného válce.

Potřebný materiál: dva kalibrované odměrné válce; voda; pinzety; pipety; filtrační papír.

Postup:

1. Připravíme si kalibrovaný odměrný válec (I.) s co nejmenším možným průměrem použitelným pro konkrétní potravní složku, dostatečnou kapacitou a vysokou přesností měření.
2. Připravíme si druhý odměrný válec (II.) a naplníme ho známým objemem vody. Tento objem zaznamenáme jako $\boldsymbol{V_a}$.
3. Oddělíme potravní složku ***i*** od ostatního obsahu trávicího traktu a odsajeme z něj přebytečnou vodu.
4. Potravní složka se umístí do odměrného válce I.
5. Válec I. se naplní vodou z válce II. tak, aby zakrývala veškerou potravu a dosáhla přesně odečitatelnou hladinu (objem $\boldsymbol{V_c}$).
6. Zjištěná zbylá hodnota ve válci II. se zaznamená jako $\boldsymbol{V_b}$.
7. Objem $\boldsymbol{V_i}$ složky ***i*** se spočítá podle vzorce:

$$\boldsymbol{V_i} = \boldsymbol{V_c} - (\boldsymbol{V_a} - \boldsymbol{V_b})$$

8. Tímto způsobem se stanoví objem každé potravní složky a spočítá se celkový objem potravy jako součet objemů jednotlivých složek.
9. Relativní objem každé potravní složky se spočítá jako procentický podíl na celkovém objemu s použitím rovnice z kapitoly 2.14.4.1.

2.14.4.1.3. Index naplnění vyjádřený objemem – Index průměrného naplnění

Tento index se počítá jako poměr objemu zjištěné potravy vůči odhadnuté kapacitě trávicího traktu (žaludku) (Kimball a Helm, 1971; Knight a Margraf, 1982). Celkový objem potravy je obvykle vyhodnocovaný přímo měřením objemu odměrnými válci a je dáván do vztahu k maximální kapacitě trávicího traktu. Ta se zjišťuje různými způsoby, z nichž se za nejpřirozenější považuje ten, při němž je maximální objem stanovený jako největší množství potravy zjištěné v konkrétně velké rybě zkoumané populace (Knight a Margraf, 1982). Vychází z toho, že ryby mají většinou tendenci se živit, dokud není jejich trávicí trakt

zcela plný a v každém vzorku by se měla teoreticky objevit ryba s plným trávicím traktem nebo žaludkem (Gosch a kol., 2009). Z každé velikostní skupiny je proto vybrána ryba s největším množstvím potravy, změří se její objem a regresním vztahem se vytvoří model, na jehož základě se počítá kapacita trávicího traktu každé vyšetřené ryby na základě její délky podle vzorce:

$$V_s = a * L^b$$

kde V_s je maximální kapacita trávicí soustavy (žaludku), L je celková délka ryby a a a b jsou regresní koeficienty (b je koeficient okamžité rychlosti změny; Knight a Margraf, 1982; Pope a kol., 2001; Gosch a kol., 2009).

Jinými způsoby zjišťování kapacity trávicího traktu (žaludku) jsou měření objemu vody, kterou pojme, nebo výpočet podle geometrických měření a vzorců (Pope a kol., 2001; Gosch a kol., 2009). Poměr mezi zjištěným objemem potravy (V_i) a maximálním objemem trávicí soustavy (kapacita, V_s) je potom hodnota indexu naplnění konkrétní ryby. Index průměrného naplnění se vypočítá podle vzorce:

$$MSF_i = \frac{1}{P} \sum_{j=1}^{P} \frac{V_{ij}}{V_{sj}}$$

kde MSF_i (*Mean Stomach Fullness*) je Index průměrného naplnění potravní složkou i, P je počet ryb, které měly v trávicím traktu potravu, j je analyzovaná ryba, V_{ij} je objem potravní složky i v rybě j a V_{sj} je kapacita trávicího traktu ryby j (upraveno podle Pope a kol., 2001). MSF je potom počítaný jako součet jednotlivých indexů pro jednotlivé potravní složky, ale je samozřejmě možné počítat ho i přímo, pokud nezamýšlíme vyjadřovat index naplnění jednotlivými složkami.

Tento index má několik výhod v porovnání s jinými indexy naplnění: (1) eliminuje subjektivitu spojenou například s bodovou metodou (viz dále), (2) je relativně rychle a jednoduše aplikovatelný, (3) může být aplikovaný u konzervovaných i čerstvých vzorků, (4) může být analyzován různými statistickými metodami. Koreluje rovněž s kalorickým obsahem (nutriční hodnotou) potravy, a je proto zdrojem robustních údajů pro hodnocení energetického významu jednotlivých složek (Knight a Margraf, 1982; Pope a kol., 2001). Tento index rovněž vyjadřuje absolutní a relativní podíl jednotlivých složek, což ho činí použitelným nejen pro hodnocení naplnění, ale i pro vyhodnocení složení potravy, tak jako ostatní volumetrické metody. Oproti nim však poskytuje dodatečné informace vztahující se k objemu žaludku či trávicího traktu.

2.14.4.1.4. Metoda dominance založená na objemu potravy

Pokud nemá smysl potravu počítat, případně to není možné, protože se nevyskytuje v diskrétních jednotkách, lze namísto vyjádření dominance numerickou abundancí použít dominanci na základě objemu. Při tomto přístupu bereme v úvahu údaje zjištěné výše uvedenými metodami a informace o dominanci je vlastně jenom jejich rozšířením. Po změření nebo odhadu objemu složek a vypočítání jejich procentického podílu spočítáme jedince (ryby), v nichž jednotlivé složky dominovaly. Tato metoda je podobná Hynesově (1950) metodě dominance, založené na numerické abundanci a její výhody a nevýhody jsou shodné s výhodami a nevýhodami metod založených na dominanci a metod využívajících k hodnocení potravy objem.

2.14.4.2. Gravimetrická metoda

Celková biomasa potravy (obsahu trávicího traktu) může být stanovená odečtením hmotnosti prázdného trávicího traktu od hmotnosti před jeho otevřením a vyprázdněním. Následně lze stanovit hmotnost každé potravní složky. Celková hmotnost potravy je obvykle vyjádřena jako její procentický podíl z celkové hmotnosti ryby a podíl jednotlivých složek jako procentický podíl z celkového množství potravy (Hyslop, 1980). Výhody a nevýhody této metody jsou podobné jako při metodě měření objemu odměrnými válci.

Hmotnost lze stanovovat několika způsoby – jako vlhkou biomasu, suchou biomasu nebo bezpopelovou sušinu (Hyslop, 1980). Obecně se vlhká hmotnost měří po odsátí přebytečné vody filtračním papírem. To by mělo zabezpečit eliminaci nebo aspoň redukci případné chyby způsobené hmotností vody zachycené mezi částicemi potravy. Měření suché hmotnosti je náročnější na čas a je pracnější. Přináší však přesnější výsledky, zcela eliminuje chybu způsobenou vodou a lépe odpovídá nutriční (kalorické) hodnotě potravy. Sušinu potravy však lze vážit jedině v případě, že je dostatečně velká na to, aby s ní bylo možno manipulovat a nesmí být v pokročilejším stadiu natrávení (Bowen, 1996).

Suchá hmotnost se stanovuje po vysušení potravních složek na konstantní hmotnost (obvykle v sušárně při 60–105 °C po dobu 48 hodin). Pokud jsou potřebné mimořádně přesné výsledky, vzorky je třeba následně zchladit ve vakuové sušárně a až potom se stanovuje jejich hmotnost. Protože u některých ryb může tvořit podstatnou část potravy detrit, může být obsah trávicího traktu v případě potřeby spálený a stanovuje se jako hmotnost bezpopelové sušiny (z angl. *Ash-Free Dry Mass* – AFDM). Spočítá se jako rozdíl mezi suchou hmotností a hmotností popela. I v případě kořisti (živočišné

potravy), která se obecně považuje za výlučně organickou, je potřeba upravit hmotnost měkkýšů, kteří mají schránky. Stanovení AFDM je však i v tomto případě rovněž namístě (Hauer a Lamberti, 2011). Stanovení AFDM zahrnuje zpopelnění vzorku v muflové peci při teplotě 450 až 550 °C. Následně je popel zchlazený ve vakuové sušárně a zvážený. Biomasa obsahu trávicího traktu se potom vyjadřuje v miligramech suché hmoty na gram hmotnosti ryby, resp. se přepočítává na procentický podíl, jak je uvedeno výše.

Biomasu potravy lze stanovovat vcelku jako kompletní obsah trávicího traktu nebo se stanovuje hmotnost každé složky zvlášť. Samozřejmostí je podmínka, že potravy musí být minimálně takové množství, které bude měřitelné. To logicky není problém u velkých složek, například v potravě piscivorních druhů ryb. Komplikované, případně zcela nemožné, však může být separování a stanovení hmotnosti menší potravy, například drobného zooplanktonu (Hyslop, 1980; Jobling a kol., 2001). Nízká hmotnost je u této metody problémem, neboť mikrováhy schopné vážit hmotnost do 10^{-7} g (což je například přesnost potřebná při stanovení suché hmotnosti drobných planktonních korýšů) nejsou obvykle součástí běžného vybavení laboratoří. Kromě toho je stanovování hmotnosti drobné potravy ve velkém počtu vzorků mimořádně náročným a nepraktickým postupem.

Někteří autoři počítali hmotnost zkonzumované potravy na základě známé průměrné hmotnosti jedinců každé potravní složky (kořisti) po sečtení hmotností jednotlivých jedinců složky. Kromě toho bylo vyvinuto mnoho různých variant stanovení hmotnosti potravy a indexu naplnění, založeného na hmotnosti (viz níže). To umožňuje zvolit optimální variantu nebo kombinaci variant gravimetrické metody podle cíle výzkumu, dostupného vybavení a specifik potravy konkrétního druhu. I v tomto případě je však nutné počítat se změnou hmotnosti složek vlivem konzervace (pokles způsobený lihem i formaldehydem – viz kapitola 2.8.). Odchylky v metodice konzervace a skladování vzorků mohou způsobit odchylky v hmotnostech, a tak ztížit interpretaci a srovnatelnost výsledků.

Dále je popsána metoda hodnocení na příkladě stanovení vlhké hmotnosti. Postup stanovení suché hmotnosti a AFDM je podobný, vyžaduje však více kroků souvisejících se sušením a spalováním. Jelikož je známo mnoho obměn této metody, lze jednotlivé kroky či celý postup přizpůsobit konkrétním potřebám. Vždy je však nutné jej patřičně popsat v metodické části.

2.14.4.2.1. Stanovení vlhké hmotnosti potravy

Potřebný materiál: entomologické pinzety; Pasteurovy pipety; filtrační papír; analytické váhy.

Postup (Obr. 20):

1. Vynulujeme váhy s Petriho miskou a oddělíme a zvážíme nejméně zastoupenou potravní složku.
2. Přebytečná voda se odsaje filtračním papírem.
3. Stanovíme hmotnost konkrétní potravní složky ***i*** a hodnota se zaznamená jako m_i.
4. Kroky 1 až 4 se opakují, dokud není stanovena hmotnost všech identifikovatelných složek.
5. Opět vynulujeme váhy s Petriho miskou.
6. Odseparujeme neidentifikovatelné zbytky potravy a přemístíme na misku (krok 5) a odsajeme přebytečnou vodu.
7. Stanoví se hmotnost neidentifikovatelných zbytků potravy a hodnota se zaznamená jako m_u.
8. Znovu vynulujeme váhy s Petriho miskou.
9. Odseparujeme části obsahu nepatřící k potravě (kamínky, písek, parazity, střevní epitel apod.), přemístíme na misku (krok 9) a odsajeme přebytečnou vodu.
10. Stanoví se jejich hmotnost a hodnota se zaznamená jako m_r.
11. Spočítají se hmotnosti jednotlivých potravních složek $m_{i1...n}$ a neidentifikovatelné potravy m_u. Získá se tak údaj o celkové vlhké hmotnosti potravy ve vzorku m_t.
12. Relativní podíl každé složky se spočítá v procentech celkové hmotnosti potravy podle vzorce:

$$\%m_i = \frac{m_i}{m_t} * 100$$

kde $\%m_i$ je procentický podíl složky ***i***, m_i je hmotnost složky ***i*** a m_t je celková hmotnost potravy.

13. Relativní hmotnost neidentifikovatelné potravy v procentech se spočítá podle vzorce:

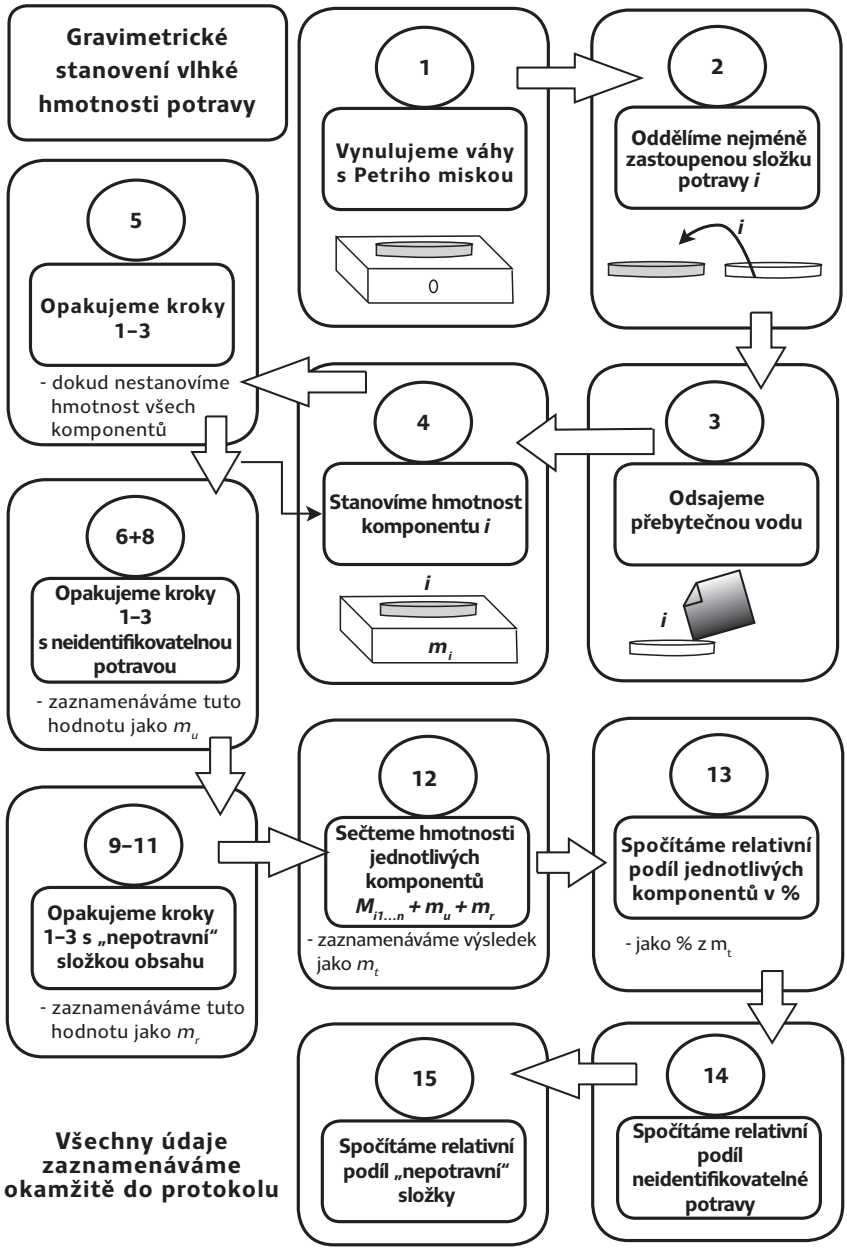
$$\%m_u = \frac{m_u}{m_t} * 100$$

kde $\%m_u$ je procentický podíl neidentifikovatelné potravy ***u***, a m_u je hmotnost neidentifikovatelné potravy a m_t je celková hmotnost potravy.

14. Relativní hmotnost „nepotravní“ části obsahu trávicího traktu v procentech se spočítá podle vzorce:

$$\%m_r = \frac{m_r}{m_t + m_r} * 100$$

kde $\%m_r$ je procentický podíl „nepotravní“ složky, ***r***, m_r je hmotnost „nepotravní“ složky a m_t je celková hmotnost potravy.



Obr. 20. *Postup stanovení vlhké hmotnosti.*

2.14.4.2.2. Index naplnění vyjádřený v hmotnosti (ISF)

Tento index, rovněž známý jako *Index of Stomach Fulness* (ISF), vyjadřuje poměr hmotnosti potravy k hmotnosti ryby. Je velmi často používaný a může být aplikován na obsah žaludku, přední (definované) části trávicího traktu nebo celého traktu. Je obvykle vyjadřován jako prodecimile (setina procenta, $^{o}/_{ooo}$) a počítá se podle vzorce:

$$ISF = \frac{m_g}{m_s} * 10\,000$$

kde ***ISF*** je Index naplnění, m_g je celková hmotnost obsahu žaludku nebo trávicího traktu a m_s je hmotnost ryby obvykle bez vnitřních orgánů [„vypitvané“ („empty“ nebo „eviscerated“ fish), např. Kamler, 2002].

2.14.4.3. Výpočet objemu a hmotnosti

Vztahy mezi hmotností nebo objemem těla a snadno měřitelnými biometrickými údaji, jako je šířka hlavy nebo délka těla živočichů, jsou v ekologickém výzkumu velmi užitečnými nástroji (např. Culver a kol., 1985) a mohou být efektivně využity i při studiu potravy ryb. Pokud je potrava příliš malá na to, aby se dala přesně zvážit, je nemožné nebo nepraktické z téhož důvodu i stanovení jejího objemu. Pak je obvykle nutné biomasu některých typů potravy stanovit výpočtem objemu po aproximaci na přibližný tvar (koule, hranol) a přepočtem na hmotnost. Dalším důvodem pro tento postup může být potřeba vyhnout se nepřesnostem způsobeným výraznými změnami (ztrátou) hmotnosti konzervací.

Délko-hmotnostní regresní vztahy jsou nejčastěji používaným přístupem pro stanovení biomasy bentických bezobratlých, protože jsou u těchto organizmů přesnější a rychlejší než jiné metody (Burgherr a Meyer, 1997; Benke a kol., 1999). Umožňují stanovit biomasu kořisti v trávicích traktech predátorů, resp. bentofágů, i když jsou rozkouskované nebo částečně natrávené. Tvrdé a relativně nestravitelné části zkonzumovaných organizmů (například schránek, silně chitinizovaných částí, hlav vodních bezobratlých nebo kostí, otolitů či šupin) se proto při studiu potravy často používají ke stanovení rozměrů (délky) zkonzumované kořisti a její hmotnosti (Chipps a Garvey, 2007). Dokonce je možné zrekonstruovat i velikost a hmotnost rozdrcených měkkýšů a korýšů z taxonomicky relevantních částí exoskeletu nalezených v mukozních shlucích tráveniny (Brandner a kol., 2013).

2.14.4.4. Délko-hmotnostní metoda – výpočet biomasy ve formě suché hmotnosti

Dva nejpoužívanější postupy výpočtu hmotnosti bentických bezobratlých jsou (a) s použitím vlastního měření (2.14.4.5.1.) anebo (b) publikovaných údajů (2.14.4.5.2.).

2.14.4.4.1. Vytvoření rovnice lineární regrese a výpočet suché hmotnosti

Nekonzervovaní (čerstvě odebraní) jedinci, pocházející z lokality odběru ryb, jejichž potravu studujeme, poskytují nejlepší výsledky pro vytvoření potřebných rovnic lineární regrese. Nedošlo u nich totiž k žádným změnám vlivem konzervace (viz kapitola 2.8.). V případě nutnosti lze výsledků srovnatelných s čerstvými vzorky dosáhnout i s pomocí vzorků konzervovaných formaldehydem. Tento postup je nejpoužitelnější u vodních larev hmyzu se zřetelně vymezenou hlavou (hlavovou kapsulou), jako jsou larvy pakomárů, jepic, chrostíků, pošvatek aj.), neboť vychází z předpokladu, že hlava roste proporcionálně s tělem (tj. i s hmotností).

Potřebný materiál: entomologické pinzety; stereomikroskop a světelný mikroskop s mikrometrem nebo s digitální kamerou (fotoaparátem) a softwarem na měření; mikroskopická sklíčka; Petriho misky; sušárna; exikátor; přesné analytické váhy.

Postup (Obr. 21):

1. Vybereme nejméně 20 jedinců druhu, který tvoří kořist typu ***i*** tak, abychom zachytili široké spektrum velikostí. Přednostně se použije vzorek těchto živočichů z habitatu, odkud pocházejí i vzorky analyzovaných ryb.
2. Změříme šířku hlavy těchto jedinců s použitím mikroskopu nebo stereomikroskopu. Hlava je nejvíc sklerotizovanou částí, relativně odolnou vůči trávení a mechanickému poškození ve srovnání s jinými tělními partiemi. Naměřené hodnoty se zaznamenají jako $\boldsymbol{L_{1...i}}$.
3. Změřené jedince umístíme do samostatných Petriho misek s identifikačními štítky, které umožní přiřadit změřené šířky hlav k později stanovené suché hmotnosti příslušného jedince.
4. Vzorek vysušíme v sušárně při teplotě 60 až 105 °C po dobu minimálně 24 hodin.
5. Vysušené jedince zchladíme v exikátoru.
6. Stanovíme hmotnost každého jedince na přesných analytických váhách a zaznamenáme ji jako $\boldsymbol{m_i}$.

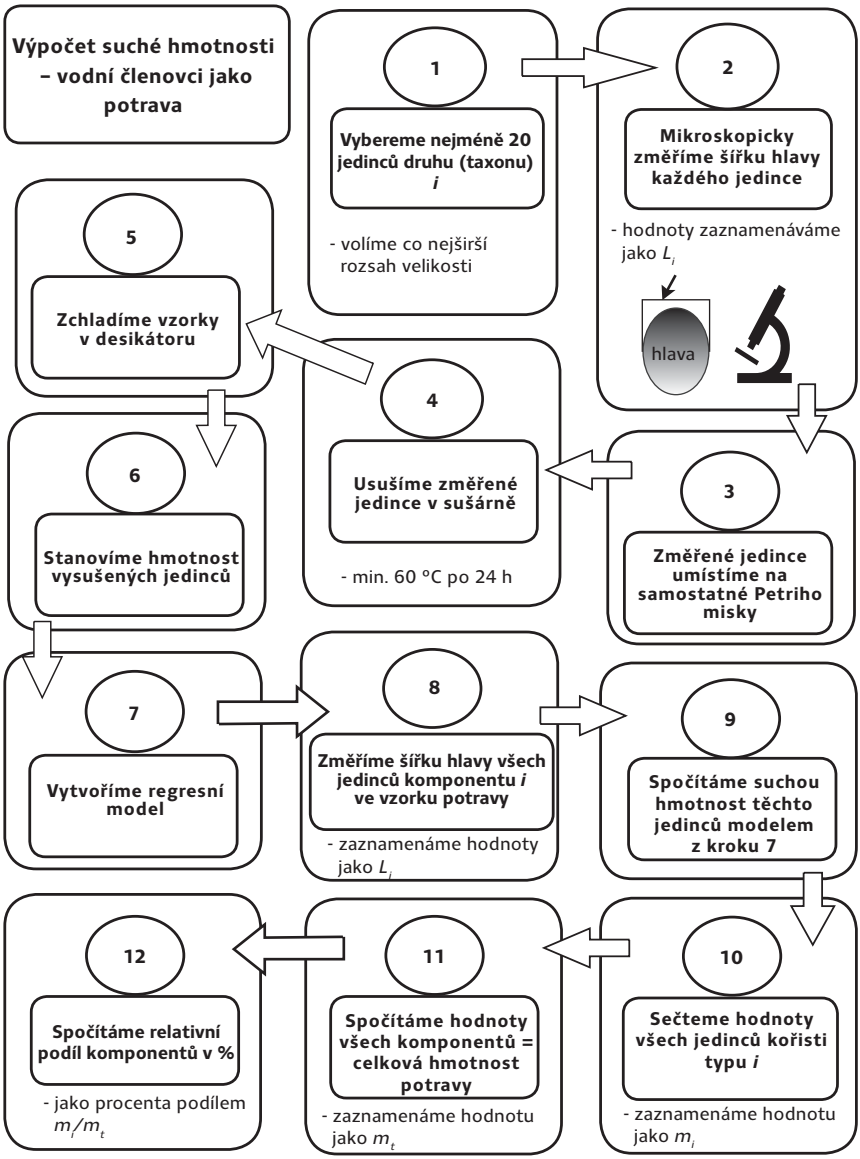
7. Ve statistickém programu nebo tabulkovém programu vytvoříme regresní model s použitím funkce ***regrese*** a ***„mocninná*** (nebo parabolická) ***křivka"*** k získání regresní rovnice ve formě:

$$m_i = a_i * L^{bi}$$

kde m_i je suchá hmotnost složky (kořisti) i, L_i je šířka hlavy kořisti i, a_i je regresní konstanta a b_i je sklon regrese [jelikož mezi L a m předpokládáme kubický vztah, b by mělo být velmi blízké hodnotě 3 (Benke a kol., 1999)].
8. Separujeme jednotlivé typy potravy (druhy či taxony kořisti) ze vzorku obsahu trávicího traktu na samostatnou Petriho misku.
9. Změříme šířku hlavy každého jedince kořisti i a zaznamenáme hodnoty jako L_i.
10. Vypočítáme hodnoty suché biomasy každého jedince s použitím regrese získané v kroku 7.
11. Sečteme jednotlivé hmotnosti, čímž získáme celkovou hmotnost potravní složky i.
12. Sečtením hmotností jednotlivých potravních složek stanovíme celkovou suchou hmotnost potravy a zaznamenáme ji jako m_t.
13. Spočítáme relativní hmotnost každé složky jako procentický podíl z celkové hmotnosti potravy podle vzorce:

$$\%m_i = \frac{m_i}{m_t} * 100$$

kde $\%m_i$ je procentický podíl složky i, m_i je hmotnost složky i a m_t je celková hmotnost potravy (obsahu trávicího traktu).



Obr. 21. *Postup stanovení suché hmotnosti (vodních členovců).*

2.14.4.4.2. Výpočet suché hmotnosti s využitím publikovaných dat (regresních modelů)

Při výpočtu suché hmotnosti je samozřejmě možné použít i dříve publikované hodnoty ($\boldsymbol{a}_i$ a $\boldsymbol{b}_i$) pro konkrétní typ potravy (kořisti). Někteří autoři vyhodnotili a sumarizovali tyto údaje pro velké geografické oblasti – pro Evropu např. Burgherr a Meyer (1997). Mnoho dalších publikací je věnováno délko-hmotnostním vztahům jednotlivých druhů či vyšších taxonů a ekologických skupin vodních bezobratlých (např. Smock, 1980; Bird a Prairie 1985, Culver a kol., 1985; Lawrence a kol., 1987; Meyer, 1989; Wenzel a kol., 1990; González a kol., 2002; Stoffels a kol., 2003).

S takovýmto řešením (použití publikovaných údajů) jsou však spojena i jistá rizika. Problémem je například taxonomická úroveň, do níž je potrava identifikována a úroveň, pro niž byly publikovány regresní modely. Obecně jsou publikované údaje většinou zobecněné pro jednotlivé rody nebo čeledě. Potenciální odchylka způsobená mezidruhovými rozdíly je však často podceněná. Například studie Stoffelse a kol. (2003) dokumentuje vysokou variabilitu v parametrech publikovaných pro pakomáry (Chironomidae). Na základě výsledků této studie lze předpokládat, že aplikace publikovaných modelů vytvořených pro vyšší taxony může v důsledku signifikantních rozdílů mezi rody a druhy vyústit do relativně velké chyby ve vypočítané suché hmotnosti. Tato variabilita je daná hlavně u velké a heterogenní čeledi pakomárů mnohými morfologickými rozdíly mezi druhy a rody (Johnston a Cunjak, 1999) a pravděpodobně tomu tak je i u jiných taxonů vodních bezobratlých. Na druhou stranu však Méthot a kol. (2012) argumentují, že mnohem větší odchylka může být způsobená metodickou chybou nebo regionálními a latitudálními (souvisejícími se zeměpisnou šířkou) rozdíly. Podle nich jsou modely pro úroveň čeledě pravděpodobně spolehlivé, pokud jsou použity v regionu, z něhož pocházejí. Další autoři však uvádějí dokonce vnitrodruhové rozdíly v délko-hmotnostních vztazích bezobratlých tekoucích vod (např. Benke a kol., 1999; Johnston a Cunjak, 1999). Tato variabilita v hodnotách parametrů regresí pro tentýž druh v různých publikacích může být způsobená přirozenými rozdíly v morfologii bezobratlých. Ty vyvolává například rozdílná teplota prostředí, dostupnost potravy, avšak příčinou rozdílnosti mohou být i drobné metodologické rozdíly při vytváření modelů (Johnston a Cunjak, 1999; González a kol., 2002; Stoffels a kol., 2003; Méthot a kol., 2012). Na základě uvedených informací je proto vždy potřebné zvážit použití modelů vytvořených na základě měření bezobratlých v jiných geografických oblastech nebo pro vyšší taxony. V případě, že jsou použity, je třeba zvažovat potenciální chybu a opatrnost při interpretaci, a porovnávání je proto v těchto případech zcela namístě. Další

těžkosti mohou být chyby vznikající drobnými odchylkami a nepřesnostmi při měřeních. Zatímco u malých a málo početných komponentů nemusí mít významný vliv, kumulací nepřesností u početných, případně velkých složek mohou vést k signifikantní chybě. Ta potom, pokud jsou měření nepřesná, ještě naroste při stanovení celkové hmotnosti potravy sčítáním hmotností vypočítaných pro jednotlivé složky (Chipps a Garvey, 2007). Metodickým problémem spojeným s použitím publikovaných údajů je i to, že někteří autoři pro výpočet regresních rovnic nepoužívají šířku hlavy, ale délku těla. Protože je většinou nemožné měřit délku kořisti (je poškozená konzumací a trávením), je potřeba především stanovit vztah pro konverzi mezi šířkou hlavy a délkou těla. To ale přináší další možný zdroj chyb a snižuje přesnost a spolehlivost odhadu.

Potřebný materiál: entomologické pinzety; stereomikroskop a světelný mikroskop s mikrometrem nebo s digitální kamerou (fotoaparátem) a softwarem pro měření; mikroskopická sklíčka; Petriho misky.

Postup:

1. Separujeme jednotlivé typy potravy (druhy či taxony kořisti) ze vzorku obsahu trávicího traktu na samostatnou Petriho misku.
2. Změříme šířku hlavy každého jedince kořisti ***i*** a zaznamenáme hodnoty jako L_i.
3. Spočítáme hodnoty suché biomasy každého jedince s použitím regrese z příslušné publikace.
4. Sečteme jednotlivé hmotnosti, čímž se získá hmotnost m_i potravní složky ***i***.
5. Součtem hmotností jednotlivých potravních složek stanovíme celkovou suchou hmotnost potravy zaznamenanou jako m_t.
6. Spočítáme relativní hmotnost každé složky jako procentický podíl celkové hmotnosti potravy podle vzorce:

$$\%m_i = \frac{m_i}{m_t} * 100$$

kde $\%m_i$ je procentický podíl složky ***i***, m_i je hmotnost složky ***i*** a m_t je celková hmotnost potravy (obsahu trávicího traktu).

Kromě výše uvedených možností výpočtů existují samozřejmě i další obměny tohoto postupu. Jsou často publikované v pracích věnovaných růstu a produkci fauny, ale mohou stejně tak dobře posloužit při analýzách v rámci studií potravní ekologie ryb. Jsou však pro tyto účely využívané jenom ojediněle. Jako příklad může v těchto souvislostech sloužit volumetrická analýza založená na srovnání objemu potravních složek s tělesy o známém objemu. Výpočet průměrných rozměrů kořisti vychází ze stanovení počtu jedinců a vytvoření rovnice pro

výpočet objemu z trojrozměrného tvaru kořisti a její podobnosti s jiným prostorovým geometrickým tělesem (Hyslop, 1980). V praxi se někdy používá takovýto výpočet objemu některých typů potravy s relativně jednoduchým tvarem (např. fytoplankton). Výpočtu předchází pracné měření, odhad tvaru a formulování rovnic pro výpočet objemu. Rekonstrukce velikosti a hmotnosti ryb tvořících potravu je možné i s použitím informací o rozměrech některých nestravitelných částí (Jobling a kol., 2001) jako například otolitů nebo obratlů.

2.14.4.5. Bodová volumetrická metoda

Bodová metoda je v podstatě variantou metody vizuálního odhadu a byla vyvinuta jako modifikace, která by zlepšila výsledky numerické metody tím, že poskytne i informaci o množství potravních složek. Každé potravní složce je při použití této metody přiřazený počet bodů podle toho, jaký je jeho vizuálně odhadnutý podíl na celkovém objemu (Hyslop, 1980). Tato metoda má několik variant, někteří autoři berou při vyhodnocování v úvahu i velikost ryby a naplnění jejího trávicího traktu. Bodová metoda je užitečná při analýzách omnivorních a herbivorních ryb, kde je komplikované stanovit objem složek, jejich hmotnost, případně je z masy tráveniny fyzicky oddělit (například mikroskopické organizmy jako rozsivky, sinice, ale i vláknité řasy či detrit) (Zacharia a Abdurahiman, 2004). I v případě, že je možné objem nebo hmotnost stanovit, bodová metoda je považovaná za jakousi zkratku umožňující dosáhnout takřka totožné výsledky rychleji a jednodušeji (Hynes, 1950). I Ahlbeck a kol. (2012) potvrdili, že se jedná o rychlou a jednoduchou metodu, která podle jejich výsledků zároveň přináší velmi dobré výsledky při hodnocení kvantitativního složení skutečně zkonzumované potravy. Velkou výhodou je to, že nevyžaduje fyzickou separaci vzorků z obsahu trávicího traktu, což umožňuje její použití i v případě, kdy se potrava neskládá z diskrétních jednotek. Ani tato metoda se však nevyhnula opodstatněné kritice a mnozí autoři poukazují na její nedostatky a nevýhody, například vizuální identifikaci složek. I když je v mnoha případech výhodou, při tomto způsobu identifikace a bodové kvantifikace jsou odhady značně subjektivní, často i v simulovaných podmínkách (Hyslop, 1980; Marrero a Lopez-Rojas, 1995; Baker a kol., 2014). Hynes (1950) rovněž správně uvádí, že výsledky získané touto metodou nemohou být použity pro porovnání množství složek v potravě s množstvím a dostupností potenciální potravy jednotlivých typů v prostředí (habitatu). Další těžkostí spojenou s bodovou metodou je možné zkreslení výsledků, ke kterému dochází zejména, pokud se vyšetřovaný vzorek skládá z ryb velmi rozdílných velikostí (Lima-Junior a Goitein, 2001).

Z mnoha metod založených na přidělování bodů lze pro objasnění principu uvést a obecně popsat variantu navrženou Hynesem (1950). Tato původní varianta je relativně jednoduchá, ale časem byla mnohokrát upravovaná a vylepšovaná, což vedlo k vývoji často velmi komplikovaných technik, jako je např. varianta, kterou navrhli Lima-Junior a Goitein (2001), při níž je potřeba kromě alokace bodů vykonat i celou sérii kroků zahrnujících vážení a přepočítávání.

Bodová metoda podle Hynese (1950)

Tato metoda je rychlá a jednoduchá, přičemž nevyžaduje žádné speciální vybavení ani měřicí přístroje. Není ovlivněná vysokou frekvencí výskytu malých organizmů v malých množstvích ani pevných nestravitelných částí bez nutriční hodnoty (např. schránky měkkýšů a larev chrostíků). Není při ní potřeba počítat velké počty malých a nekompletních organizmů. Nedává ani klamný dojem přesnosti, jako je tomu u některých jiných metod, které sice mohou vypadat velmi sofistikovaně, ale často skrývají mnoho nekvantifikovatelných nepřesností (Hynes, 1950).

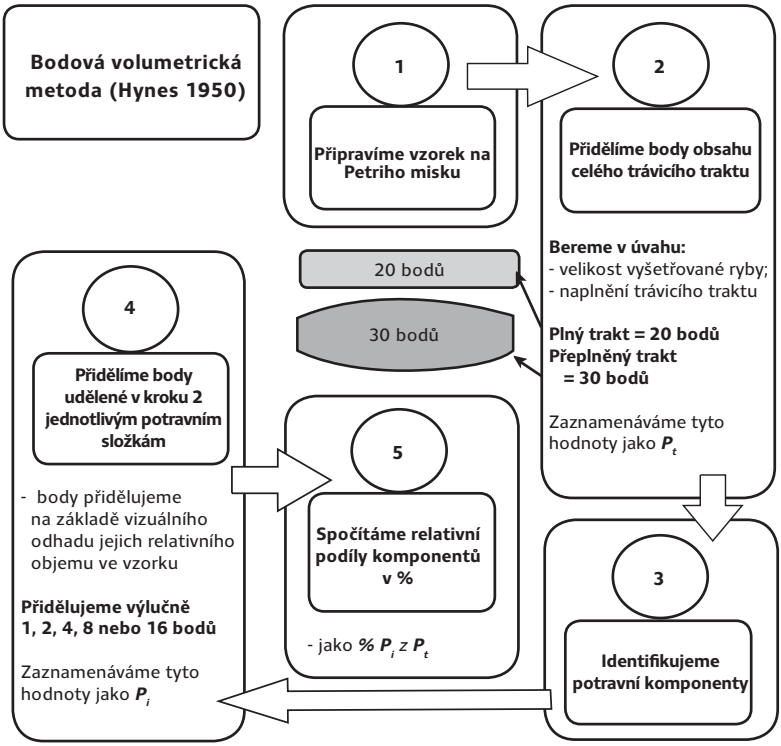
Potřebný materiál: entomologické pinzety; stereomikroskop a mikroskop; mikroskopická sklíčka; Petriho misky.

Postup (Obr. 22):

1. Připravíme si vzorek potravy na Petriho misce tak, jak je popsáno v krocích 1 až 8 postupu na Obr. 16 a 22.
2. Přidělíme nejprve body celému obsahu žaludku (trávicího traktu), přičemž je třeba mít na zřeteli i velikost ryby a naplnění trávicího traktu. Plný žaludek má, bez ohledu na velikost ryby 20 bodů, přeplněný 30. Přidělený počet bodů zaznamenáme jako hodnotu P_t.
3. Identifikujeme jednotlivé složky potravy.
4. Rozdělíme body udělené v kroku 2 mezi jednotlivé složky ve vzorku. Vždy se uděluje pouze 1, 2, 4, 8, nebo 16 bodů, žádné jiné hodnoty. Množství bodů se přiděluje složkám podle toho, jaký je jejich podíl (objem) na celkovém množství potravy ve vzorku. Tímto postupem získají velké složky takové množství bodů jako mnoho malých. Zaznamenáme hodnoty pro jednotlivé složky jako P_i.
5. Vypočítáme relativní množství jednotlivých složek ve vyšetřovaném trávicím traktu jako jejich procentický podíl podle vzorce:

$$\%P_i = \frac{P_i}{P_t} * 100$$

kde $\%P_i$ je procentický podíl složky i, P_i je počet bodů přidělených složky i, a P_t je počet bodů přidělených celému obsahu trávicího traktu.



Obr. 22. *Postup při použití Hynesovy bodové metody.*

2.15. Vyhodnocení významnosti potravních složek použitím složených indexů

Údaje o obsahu trávicích traktů nám poskytují údaje, které pomáhají zodpovědět i náročné a komplexnější otázky ekologie ryb. Aby bylo možné z údajů o potravě vyzískat co nejvíce potřebných doplňujících informací, je důležité vyhodnotit i význam jednotlivých typů potravních složek. Význam potravních složek přináší neocenitelné informace umožňující hlubší proniknutí do podstaty potravní ekologie ryb, jejich nároků na potravní zdroje, potenciální kompetice a jiných aspektů ekologie a biologie ryb, například růstu, trávení, spotřeby potravy či predace (Liao a kol., 2001). V praxi je přesné stanovení významu potravních složek a jejich souvislostí se zdravotním stavem a kondicí konzumentů, resp. predátorů, nutné pro efektivní management zdrojů

v rybářství (Bowen, 1996) a pro kvalifikovaná ochranářská rozhodnutí a aktivity (Pusey a Arthington, 2003). S použitím metod uvedených v předešlých kapitolách se lze dopracovat k údajům o složení potravy a relativního podílu konkrétních typů potravy. Mnoho autorů tyto údaje ve formě procentuálního vyjádření numerické početnosti (***%N***), hmotnosti (***%m***), objemu (***%V***) a frekvence výskytu (***%O***) používá jako měřítko významnosti. Nejčastěji jsou pro tyto účely využívány hmotnost a objem, které vyjadřují podle mnohých autorů význam jednotlivých typů potravy (druhů kořisti) a jejich vztah ke kondici a zdraví ryb či dostupnosti potravních složek v prostředí. Na druhou stranu však tyto informace ne vždy vyjadřují skutečný význam jednotlivých složek, například ve smyslu jejich nutriční hodnoty. Proto mnozí autoři vyvinuli metody, speciálně určené k vyjádření významu potravních složek zjištěných v trávicích traktech vyšetřovaných ryb – některé z nich jsou prezentovány v této kapitole.

Složené indexy pro stanovení významnosti potravních složek byly vytvářeny s cílem získat unikátní a v mnoha ohledech relevantnější, objektivnější a komplexnější informace. Jejich použití by mělo rovněž zabránit ztrátě důležitých informací. Spojují proto vždy minimálně dva typy stanovení (vyhodnocení obsahu trávicích traktů) do jednoho indexu. Autoři těchto indexů jsou vedeni snahou o aplikaci dokonalejší analytické metody, schopné zachytit a spojit více informací do jednotlivých jednoduchých metod hodnocení a považují je za reprezentativnější (Cortés, 1997; Chipps a Garvey, 2007; Hauer a Lamberti, 2011). Navíc by měly tyto indexy kompenzovat odchylky ve stanoveních, které se objevují při použití různých klasických metod (Cortés, 1997). Liao a kol. (2001) považují za důležité, aby index významnosti potravy (kořisti) přinesl rovnováhu mezi informacemi o významu konkrétní složky z pohledu výživy populace konzumenta (predátora) jako celku a informací o pravděpodobnosti výskytu této složky v potravě jednotlivých jedinců v populaci. Jejich výsledky naznačují, že složený index (konkrétně ***%IRI*** viz níže) splňuje tyto požadavky a poskytuje optimální kombinaci informací charakterizujících potravní významnost. Podle nich je tento index ideální pro použití v různých typech studií věnujících se vyjadřování významnosti v obecném pojetí. Na druhou stranu však tito autoři zároveň připouštějí, že tento složený index neřeší všechny problémy a v jistých situacích (např. podobná velikost dominantních taxonů tvořících kořist) je vhodnější použít jednoduché indexy či metriky. Někteří autoři však považují složené indexy obecně za ne zcela vhodné. Často argumentují tím, že tyto indexy nepřinášejí žádné nebo takřka žádné nové informace oproti jednoduchým indexům (Macdonald a Green, 1983; Hansson, 1998). Kromě toho jsou též těžko interpretovatelné a jejich statistické hodnocení je složité. Dodatečné nebo vícenásobné převádění na procenta nedává výsledné informaci biologický význam (smysl), protože se jedná o bezrozměrné ukazatele (Bowen,

1996). Výsledek může být navíc ovlivněný taxonomickou úrovní, do které byla potrava identifikována (Cortés, 1997; Hansson, 1998). Rovněž je možné, že násobí základní odchylky a nekvantifikovatelné nepřesnosti vlastní jednotlivým parametrům zahrnutým do složeného indexu, což zvyšuje množství potenciálních zdrojů chyb (Hyslop, 1980; Baker a kol., 2014). Ahlbeck a kol. (2012) například experimentálně potvrdili, že složený index (opět konkrétně ***%IRI***) přinášel výsledky, které byly signifikantně odlišné od složení skutečně zkonzumované potravy a významu jednotlivých složek v ní. Obecně je tedy použití složených indexů omezené vícero nedostatky, aniž přinášejí nové podstatné informace. Naopak mohou být zdrojem zbytečných dezinformací. Proto se nepovažuje za potřebné kombinovat vícero typů měření do jediného indexu, zvláště pokud nám jednoduché stanovení přináší většinu potřebných informací (Macdonald a Green, 1983).

2.15.1. Index relativní významnosti (IRI, *Index of Relative Importance*)

Jeden z nejvíce používaných indexů ve výzkumu potravy ryb je index relativní významnosti (Pinkas, 1971). Při jeho výpočtu se frekvence výskytu složky násobí součtem procentického podílu numerické abundance a procentického podílu objemu nebo hmotnosti této složky v potravě. Využívají se v něm tedy tři jednoduché indexy, tři různé způsoby kvantifikace potravy popsané v předešlých kapitolách. Používá se k charakterizaci potravy a identifikaci relativního významu běžných kategorií potravy (Pinkas, 1971). Pro výpočet tohoto indexu se používá rovnice:

$$IRI_i = (\%N_i + \%V_i) * \%F_i$$

nebo alternativně

$$IRI_i = (\%N_i + \%m_i) * \%F_i$$

kde IRI_i je index relativní významnosti potravní složky i, $\%N_i$ je procentický numerický podíl složky i, $\%V_i$ je procentický podíl objemu složky i, $\%m_i$ je procentický podíl hmotnosti složky i a $\%F_i$ je frekvence výskytu složky i ve vzorku.

IRI je na jedné straně jeden z nejpoužívanějších, ale i jeden z nejvíce kritizovaných indexů a je často uváděný jako příklad při popisu nedostatků složených indexů. Je to typický příklad kontroverze, kdy se autoři spoléhají na výsledky získané touto metodou a pravděpodobně ji považují za nejlepší alternativu přes mnohé důkazy a argumenty svědčící o tom, že jednodušší

metody (jednoduché samostatné indexy) mohou přinést lepší, robustnější a snadněji interpretovatelné výsledky.

2.15.2. Procentuální index relativní významnosti (%IRI, *Percent Index of Relative Importance*)

Porovnání jednotlivých typů potravy a porovnání mezi vzorky je s použitím ***IRI*** komplikované. Z toho důvodu bylo navrženo, aby se tento index vyjadřoval na procentuální bázi, která takovéto porovnání umožní (Cortés a kol., 1997). K procentuálnímu vyjádření tohoto indexu (***%IRI***) pro konkrétní typ potravy ***i*** se používá vzorec:

$$\%IRI_i = 100 * \frac{IRI_i}{\sum_{i=1}^{n} IRI_i}$$

kde $\%IRI_i$ je procentuální index relativní významnosti složky ***i***, IRI_i je index relativní významnosti potravní složky ***i*** a ***n*** je celkový počet kategorií potravy vyhodnocených na stanovené taxonomické úrovni.

%IRI má rovněž mnohá důležitá omezení, charakteristická i pro ostatní složené indexy uvedené v této kapitole. Na druhou stranu, Liao a kol. (2001) považují tento index za vhodný pro mnohé typy studií zaměřených na výzkum potravní ekologie. Argumentují rovnováhou v hodnocení významnosti složek a minimálními odchylkami od skutečnosti ve srovnání s jinými indexy.

2.15.3. Další složené indexy

Někteří autoři používají další složené indexy, které kombinují jiné metriky a indexy nebo tytéž (výše uvedené), ale jiným způsobem. Dále jsou prezentovány čtyři z nich jako příklady.

Hobson (1974) zavedl ***Ranking Index*** (***RI***), který se počítá podle vzorce:

$$RI_i = \%F_{fi} * \frac{V_{si}}{V_{st}} * 100$$

kde RI_i je Ranking Index složky ***i***, $\%F_{fi}$ je frekvence výskytu složky ***i***, V_{si} je volumetrická hodnota složky ***i*** (součet hodnot pro složku ***i*** ze všech analyzovaných ryb) a V_{st} je celková volumetrická hodnota potravy ze všech analyzovaných ryb. Volumetrická škála je výsledkem bodového hodnocení objemu, kdy objem každé složky v obsahu trávicího traktu je ohodnocený body od 0 do 1, přičemž množství je možné vyjádřit pouze jako násobek 0,05 bodu.

Jedná se o relativní bodování, celý obsah potravy má hodnotu 1, což znamená, že se součet hodnot složek rovněž musí rovnat jedné.

Index relativní významnosti (z angl. ***Relative Importance Index*** **– RII)** navrhli George a Hadley (1979) jako lineární kombinaci tří jednoduchých indexů. Počítá se podle vzorce:

$$RII_i = 100 * \frac{\%F_{fi} + \%N_i + \%m_i}{\sum_{n=1}^{p} (\%F_{fi} + \%N_i + \%m_t)}$$

kde RII_i je index relativní významnosti (***RII***) potravní složky ***i***, $\%F_{fi}$ je frekvence výskytu, $\%N_i$ je numerická početnost, $\%m_i$ je procentický podíl hmotnosti složky ***i*** na celkové hmotnosti obsahu trávicího traktu, ***p*** je celkový počet zjištěných potravních komponentů, resp. kořisti. Podobně jako u ostatních složených indexů, ani ***RII*** není pravděpodobně přesnější než jednoduché indexy. Příčin je více, první z nich je zatížení dvěma potenciálními zdroji chyb a variance (jedná se o chybu spojenou s procentuálním vyjádřením a o chybu spojenou s frekvencí výskytu; Hyslop, 1980). Kromě toho jsou výsledkem výpočtů s použitím procentuálních vyjádření různých proměnných jako bezrozměrných údajů (čísel bez interpretačního významu; Bowen, 1996). ***RII*** dává výsledky ve formě hodnot pro jednotlivé typy potravy konzumované populací, což neumožňuje přímé statistické srovnání hodnot mezi populacemi, ontogenetickými stadii a podobně (Pope a kol., 2001).

Ve snaze o co nejpřesnější vyjádření významnosti potravních složek lze zvažovat i bioenergetický přístup a kalorický obsah potravy. Například index významnosti kořisti (z angl. ***Prey Importance Index*** **– PII**) formulovaný Probstem a kol. (1984) kombinuje data o abundanci, hmotnosti a kalorické hodnotě kořisti:

$$PII_i = \frac{1}{N_f} * \sum_{j=1}^{N_f} \left(\frac{m_{ij} * X_i}{\sum_{j=1}^{Q} m_{ij} * X_i} \right)$$

kde PII_i je index významnosti kořisti, N_f je celkový počet žaludků s potravou, m_{ij} je hmotnost kořisti typu ***i*** v rybě ***j***, X_i je kalorická hustota potravy ($J.g^{-1}$ vlhké hmotnosti) potravy typu ***i*** a ***Q*** je počet typů potravy (upraveno z Pope a kol., 2001). Použitelnost indexu založeného na kalorimetrickém stanovení (jako je PII) spočívá v tom, že prezentuje kvantitativní hodnocení nutričního přínosu konkrétní kořisti lépe než hodnoty relativní významnosti založené na počtech, hmotnosti a jejím výskytu v potravě (Chipps a Garvey, 2007). ***PII*** nezohledňuje

sezónní rozdíly v kalorické hodnotě kořisti, avšak srovnání sezón podle hodnot ***PII*** lze podle Pope a kol. (2001) provést.

Index převahy (z angl. ***Index of Preponderance*** – **IP**), který zformulovali Natarajan a Jhingran (1961), dává pro každý z atributů jednoduchou hodnotu, založenou na frekvenci výskytu a objemu (hmotnosti) potravy podle rovnice:

$$IP_i = 100 * \frac{\%V_i * \%F_i}{\sum_{i=1}^{p} \%V_i * \%F_i}$$

kde IP_i je index převahy, $\%V_i$ je procentický podíl objemu složky ***i***, $\%F_i$ je frekvence výskytu složky ***i*** (upraveno podle Natarajan a Jhingran, 1961), ***p*** je celkový počet zjištěných potravních komponentů, resp. kořisti. Porovnání získaných hodnot umožňuje zařazení kořistí podle matematické dominance jakožto vyjádření jejího významu v potravě a autoři tohoto indexu se domnívají, že má velké výhody zvláště při studiu potravy ryb ve volných vodách, kde mají přístup k různým organizmům (Mohan a Sankaran, 1988). Považují ho rovněž za objektivní a vhodné stanovení dominance kořisti v potravě. Na druhou stranu však tato technika nerozlišuje mezi významem potravních složek podle hmotnosti nebo výskytu a není vhodná pro potravní srovnávání (Marshall a Elliot, 1997).

2.16. Selektivita a preference potravních složek

I když lze určit, jaký typ potravy či jaká kořist jsou pro určitý druh, populaci, biotyp či ekotyp důležité, neznamená to automaticky, že si takovou potravu konzument vybírá nebo jí dává přednost. Lze pouze říci, že zdroje (v našem případě druh potravy) jsou selektivní, pokud nejsou využívány úměrně vzhledem k jejich dostupnosti. Dostupnost zdrojů není v přírodě stabilní a se změnou jejich dostupnosti se mění i jejich využívání. Chceme-li tedy dospět k platným závěrům o výběru zdrojů, měly by být spotřebované zdroje porovnávány se zdroji dostupnými či nespotřebovanými (Manly a kol., 2002). Často se předpokládá, že konkrétní druh si vybírá potravní zdroje, které jsou nejlépe schopny pokrýt jeho životní potřeby, a že tedy zdroje vysoké kvality budou vybírány častěji než zdroje méně kvalitní. Určení typů potravy, které jsou vybírány častěji než jiné, má obzvláštní důležitost, protože nám poskytuje základní informace o potravním chování ryb a o tom, jak uspokojují své potřeby nutné k přežití (Manly a kol., 2002). Na druhé straně je diferencovaný výběr zdrojů jedním ze základních předpokladů umožňujících koexistenci různých druhů (Rosenzweig, 1981). Používání dat o složení potravy získaných analýzou potravy tedy umožňuje vyšší úroveň poznání jejích zdrojů a využití.

Je zcela zřejmé, že kvantitativní vyhodnocení složení potravy je velmi komplikované. Pokoušíme-li se zhodnotit selektivitu či preference v příjmu potravy, musíme řešit další, neméně obtížnou otázku: co přesně znamená „dostupná“ potrava? V řadě případů se nerozlišuje rozdíl mezi výběrem a preferencí. Pojmy jako využívání, výběr a preference jsou při popisu vzorců přijímání potravy používány zaměnitelně, což vede k matení pojmů (Litvaitis, 2000; Manly a kol., 2002). V první řadě je tedy třeba tyto pojmy definovat. Podle autorů Johnson (1980) a Manly a kol. (2002) je **využívání** (*usage*) zdroje definováno jako množství zdroje, které živočich (či živočišná populace) zkonzumuje za dané časové období. **Dostupnost** (*availability*) zdroje označuje množství dosažitelné živočichovi (či populaci) během téhož časového období. Zásadním parametrem (jak je vysvětleno níže) je právě dosažitelnost, protože odlišuje dostupnost od **hojnosti** (*abundance*), což je množství dané složky v prostředí (zahrnující využitelnou i nevyužitelnou složku). **Výběr** (*selection*) je proces, v němž si živočich volí z dostupné potravy konkrétní zdroj. **Preference** (*preference*) je nezávislá na dostupnosti. Vyjadřuje pravděpodobnost, že konkrétní zdroj potravy bude vybrán, bude-li nabídnut za stejných podmínek spolu s dalšími zdroji. V této publikaci raději pojmu „preference“ nepoužíváme a chápeme ho ve výše uvedeném významu jako specifický případ selektivity, kdy je zkoumaná potravní položka nabídnuta spolu s dalšími za stejných podmínek, což je implicitně možné zejména v experimentálních situacích.

2.16.1. Dostupné potravní zdroje

Jak je zřejmé, jakékoli hodnocení výběru potravy lze provést pouze tehdy, jsou-li k dispozici informace o její dostupnosti. Dostupnost druhů sloužících jako potrava či kořist může ovšem bohužel být těžké odhadnout. Tyto obtíže mají více důvodů. Odhady relativní hojnosti se často vyjadřují v jednotkách, které ne vždy odpovídají skutečné hojnosti (hustotě) nebo biomase. Navíc hojnost (případně biomasa) jsou často používány namísto dostupnosti, aniž by byla vzata v úvahu omezení odhadů dostupnosti (Litvaitis, 2000). To, co je kvantifikováno jako dostupnost potravy, tak může být značně odlišné od potravy, která je rybám v přirozených podmínkách skutečně dostupná. Odhad dostupných potravních zdrojů ve skutečnosti znamená, že je třeba získat nezkreslený vzorek z prostředí, který přesně reprezentuje relativní hojnost potenciálních složek potravy, s nimiž se potravu přijímající organizmus setkává (Strauss, 1979). Používání vzorků reprezentujících hojnost kořisti k odhadu její dostupnosti pro predátory v praxi znamená, že je třeba vzorky získávat přesným způsobem, že tyto vzorky skutečně demonstrují relativní hustotu kořisti a že predátor vnímá dostupnou kořist stejně jako výzkumník (Hauer a Lamberti,

2011). Definice dostupnosti potravy pro určitý druh, populaci a dokonce i určitou třídu velikosti, biotyp či ekotyp populace tak závisí na konkrétním výzkumníkovi. Je nepravděpodobné, aby jakýkoli výzkumník byl schopen vnímat potravní zdroje stejným způsobem jako ryba, a jeho rozhodování je tedy do určité míry arbitrární (Kohler a Ney, 1982). Tato závislost (= subjektivita) je důležitějším faktorem, než se může zprvu zdát (Johnson, 1980). Zaprvé může být obtížné a komplikované určit pro hodnocení dostupnosti vhodné škály. Má výzkumník hodnotit dostupnost určitých potravních složek v celé lokalitě výzkumu, v habitatu, ve kterém zkoumaný druh žije, nebo pouze v mikrohabitatech, kde tento druh potravu přijímá? Každá z těchto možností má mnoho kladů i záporů. Už samotný fakt, že se ryba v určité lokalitě (či v nějakém habitatu) vyskytuje, může naznačovat, že ryba už provedla výběr, a její přítomnost svědčí, že si danou lokalitu přinejmenším z části zvolila kvůli zde dostupným složkám potravy (Litvaitis, 2000). Výběr habitatu (případně mikrohabitatu) může být ovlivněn přítomností predátorů, kvůli nimž se potenciálně dostupná potrava mění v nedosažitelnou (např. McIvor a Odum, 1988). K tomu může docházet v periodickém rytmu nebo nepravidelně, podle denních biologických (případně jiných) cyklů a pod vlivem dalších náhodných vlivů, které nemohou být zohledněny. Je tedy zapotřebí rozhodnout, na jaké načasování, subpopulaci a aktivity se mají studie zkoumající dostupnost potravy zaměřit, protože jsou-li shromážděna data napříč časy, subpopulacemi a aktivitami, může to vést k chybným závěrům (Manly a kol., 2002). Dalšími faktory, které mohou ovlivnit dostupnost a dosažitelnost určité potravy pro jednotlivé ryby nebo část rybí populace, jsou sociální interakce a konkurence (Perry a Pianka, 1997), a je tedy důležité vzít v úvahu pohlaví, věkovou skupinu a potenciální konkurenty. Tyto skutečnosti a předpoklady zpochybňují spolehlivost a přesnost hodnocení skutečného výběru potravy. Výzkumník hodnotící dostupnost potravních zdrojů v dílčí studii by tedy měl všechny důležité skutečnosti a otázky soustavně zvažovat. Jeho závěry týkající se selektivity kritickým způsobem závisejí na škále složek, o nichž se výzkumník domnívá, že jsou živočichovi dostupné (Johnson, 1980). Rozhodně by měl být schopen obhájit tvrzení a metodické postupy vedoucí k rozhodnutí o tom, co je či není dostupným nebo dosažitelným zdrojem. Je třeba respektovat, že jediným správným postupem je vnímat, vysvětlovat a interpretovat výsledky výzkumu dostupnosti potravy (a tedy výběru potravy) pouze ve vztahu k určitým okolnostem a považovat je za proměnlivé v závislosti na měnících se podmínkách. Bohužel se ukazuje, že dospět k adekvátním odhadům dostupnosti potravních zdrojů je za určitých okolností přes veškeré úsilí nemožné (např. malý konzument, malá velikost potravních částic, zákal habitatu; Hynes, 1950).

Při hodnocení potravních zdrojů je vhodné použít dostupné metodiky odběru a zpracování vzorků různých akvatických společenstev, např. pro:

- fytoplankton (Komárková, 2006),
- nárosty (ČSN 75 7715, 2015),
- makrofyta (Grulich a Vydrová, 2006),
- zooplankton (Přikryl, 2006; Niedobová a Řezníčková, 2014),
- zoobentos (ČSN 757714, 1998; Adámek, 2006; Kokeš a Němejcová, 2006; Němejcová a kol., 2013; Niedobová a Řezníčková, 2014),
- ryby (Kubečka a Prchalová, 2006; Jurajda a kol., 2006; Kubečka a kol., 2010).

Aplikace metod v nich uvedených je pro hodnocení potravní nabídky pro ryby plně dostačující. Přirozeně, při specifických studiích potravní biologie, chování či výběrovosti je třeba jejich rozsah a náplň adekvátně upravit a přizpůsobit.

2.16.2. Výběr potravních zdrojů

Diferencovaný výběr zdrojů je jedním ze základních vztahů umožňujících společnou existenci druhů (Rosenzweig, 1981). Jsou-li zdroje užívány neproporcionálně ke své dostupnosti, je takovéto užívání označováno jako selektivní (Johnson, 1980; Litvaitis, 2000; Manly a kol., 2002). Často se předpokládá, že druh si vybírá zdroje, které nejlépe uspokojují jeho životní potřeby, a že zdroje vyšší kvality budou vybírány častěji než zdroje nižší kvality. Ve hře je ovšem mnohem více faktorů a proměnných a celá tato oblast výzkumu je mnohem složitější a komplikovanější, než je na první pohled patrné. K faktorům ovlivňujícím volbu zdrojů se řadí hustota populace, konkurence jiných druhů, přírodní výběr, chemické složení a textura potravy, dědičnost, přítomnost predátorů, velikost dílčích částí habitatu, vzdálenost mezi nimi a svůj vliv mají také roční doba, pohlaví, věková skupina, behaviorální aktivity a denní vzorce aktivit zkoumaného druhu ryby (Manly a kol., 2002). Byly navrženy četné modely a teorie výběru zdrojů zahrnující podmnožiny výše zmíněných faktorů. Ve snaze porozumět výběru potravy ekologové vytvořili na základě svých hodnocení tohoto jevu tzv. teorii optimálního získávání potravy (Perry a Pianka, 1997) a množství modelů získávání potravy (další odkazy viz Manly a kol., 2002).

K určení selektivity z terénních dat srovnávají výzkumníci relativní důležitost každé součásti kořisti v obsahu trávicího traktu predátorů s její relativní hojností v habitatu. Ke srovnání existují v zásadě dva přístupy. Prvním je nejjednodušší metoda korelace, která obnáší srovnání pořadí typů kořisti v potravě predátora se stavem v habitatu analýzou s využitím Spearmanovy pořadové korelace (z angl. *Spearman's rank correlation*). Významná pozitivní korelace znamená

absenci selektivity (v potravě predátorů i v prostředí je podobné pořadí potravních složek). Žádná či významně záporná negativní korelace naznačuje, že predace probíhá selektivně a že získaná potrava je v nepoměru k dostupnosti kořisti v prostředí (Hauer a Lamberti, 2011). Druhý způsob zahrnuje výpočty různých indexů výběrovosti, z nichž některé jsou prezentovány v následujících kapitolách.

2.16.2.1. Indexy potravní selektivity

Prvotní badatelé svá zjištění o příjmu potravy a její dostupnosti pouze popisovali. V některých raných studiích se poté objevily údaje o počtu živočichů konzumujících jednotlivé potravní složky a procentuální přehled jejich konzumace. Variabilita napříč různými živočichy a lokalitami výzkumníkům ztěžovala vzájemné srovnání jejich výsledků, protože rozdíly byly hodnoceny subjektivním způsobem až do doby, kdy Scott (1920), první autor, který selekci kvantifikoval, vydělil průměrný počet každého druhu kořisti na rybí žaludek za jednotku času počtem nalezeným v odběrech planktonu na jednotku plochy. První index využíval poměr míry konzumace typu kořisti k hustotě, v níž byla kořist přítomna (Manly a kol., 2002). Poté byly navrženy další indexy, z nichž v následujících částech popisujeme ty nejčastěji používané.

2.16.2.1.1. Poměr potravních složek (FR, Poměr selekce; Preferenční index)

Poměr potravních složek vyvinutý Savagem (1931) využívá relativní množství (podíl v procentech) potravní složky ***i*** ve střevě jako poměrnou část (podíl v procentech) celkového střevního obsahu a relativní množství téže potravní složky v prostředí jako poměrnou část (podíl v procentech) celkového množství dostupné potravy v prostředí. Vypočítává se pomocí následujícího vzorce:

$$FR_i = \frac{r_i}{p_i}$$

kde FR_i je ***poměr potravních složek***, r_i je relativní množství (procentický podíl) složky potravy ***i*** v obsahu trávicího traktu a p_i je relativní množství potravní složky ***i*** v prostředí. Poměr potravních složek nabývá hodnoty 1,0 u neselektivního příjmu potravy a asymetricky se mění, když se konzumace odlišuje od dostupnosti. Hodnoty v rozmezí od 0,1 do 0,99 znamenají odmítání potravní složky a hodnoty vyšší než 1,0 (1,1–∞) její preferenci. Tento index se častěji používal pouze v raných studiích a podle několika autorů je zatížen některými omezeními a slabinami. Jeho nedostatkem je v praxi obtížné

vyhodnocení, neboť jde o index otevřený, trpící asymetrií a je citlivý na chyby při shromažďování vzorků vzácné nebo málo užívané potravy. Rovněž se nehodí ke kvantitativnímu srovnání ***FR*** získaného z různých vzorků, protože vypovídá o výběru v konkrétních zkoumaných okolnostech (Strauss, 1979; Lechowicz, 1982; Manly a kol., 2002).

2.16.2.1.2. Ivlevův index výběrovosti (E, Index selekce, Ivlevův poměr potravních složek)

Index výběrovosti podle Ivleva (1961) je stále široce užíván při srovnávání potravních zvyklostí u ryb. Ivlevův index výběrovosti využívá relativní abundanci složky kořisti ***i*** ve střevě jakožto část (procentický podíl) celkového střevního obsahu a relativní množství téže potravní složky v prostředí jakožto část (procentický podíl) celkového množství kořisti dostupné v prostředí. Tento index byl vyvinut, aby bylo možno charakterizovat selektivitu jako stupeň výběru určitého druhu kořisti zkoumaným predátorem. Ivlev (1961) vyvinul index výběrovosti, aby eliminoval slabé stránky ***FR*** vyplývající z rozmezí 0 až nekonečno. Možné hodnoty Ivlevova indexu výběrovosti se pohybují v rozmezí od -1 do +1. Negativní hodnoty jsou interpretovány jako odmítání dané dostupné potravy (případně někdy jako její nedostupnost), nulová hodnota znamená neselektivní výběr z prostředí a pozitivní hodnoty naznačují aktivní selekci. Ivlevův index výběrovosti se vypočítává následujícím způsobem:

$$E_i = \frac{r_i - p_i}{r_i + p_i}$$

kde E_i je ***Ivlevův index výběrovosti***, r_i je relativní množství (procentický podíl) potravní složky ***i*** v obsahu trávicího traktu, a p_i je relativní množství této potravní složky v prostředí.

Prvotní předpoklady o tom, že tento index je objektivní a relativně nezávislý na velikosti vzorku prohlásil později, po provedení empirického a teoretického vyhodnocení, za neplatné Strauss (1979). Potvrdil, že tento index je (podobně jako ***FR***) významně neobjektivní, je-li velikost vzorků z trávicího traktu a z prostředí odlišná, že závisí na velikosti vzorku (relativní i absolutní) a nehodí se pro kořist, která není v prostředí dominantní. Tato slabina tedy ovlivňuje výsledky týkající se vzácných potravních složek bez ohledu na velikost vzorku (Lechowicz, 1982). Dalším problémem jsou mezní hodnoty (-1 a +1). Hodnotu -1 (úplné odmítání) lze získat pouze v případě, kdy se daná potravní položka neobjeví v trávicím traktu, ale vyskytuje se v prostředí, a to bez ohledu na to jak vzácně (např. jeden exemplář ve vzorku obsahujícího tisíce dalších potravních

složek či kořisti) či hojně. Na druhém konci spektra lze k maximálnímu pozitivnímu výběru dospět pouze v případě, kdy se zkoumaná položka potravy či kořisti nevyskytuje v prostředí, ale objeví se ve střevním obsahu bez ohledu na to, jak velký či malý podíl v něm tvoří (Strauss, 1979). Badatelé si musí být vědomi toho, že takové výsledky jsou potenciálně zavádějící, a podle toho interpretovat experimentální data. Tento index rovněž vyjadřuje výběr pouze v daných podmínkách výzkumu (Pearre, 1982) a nepřináší žádnou biologicky významnou hodnotu (Manly a kol., 2002).

Z praktického hlediska může být tento index užitečný a spolehlivý u planktonofágů, ale nikoli u predátorů živících se větší či vzácnější kořistí. Je rovněž možno kvantitativně srovnat výběr konkrétních druhů potravy získaných z různých vzorků, pokud je relativní hojnost těchto potravních složek (kořisti) v prostředí stejná. V ostatních případech je přípustné pouze srovnání výsledků výběrovosti v rámci vícedruhových vzorků podle jejich pořadí.

2.16.2.1.3. Jacobsův modifikovaný poměr potravních složek (log Q)

Modifikaci poměru potravních složek navrhl a také výrazně upřednostňoval Jacobs (1974). Tato modifikovaná verze poměru potravních složek byla založena přímo na rychlosti úbytku (mortalitě) potravy v důsledku její konzumace a podle Jacobse (1974) měla být nezávislá na relativní hojnosti. Tento index se vypočítává pomocí následujícího vzorce:

$$\log Q_i = \frac{r_i * (1 - p_i)}{p_i * (1 - r_i)}$$

kde $\log Q_i$ je ***Jacobsův modifikovaný poměr potravních složek***, r_i je relativní množství (procentický podíl) potravní složky ***i*** v obsahu trávicího traktu a p_i je relativní množství potravní složky ***i*** v prostředí.

Tato modifikace ***FR*** má stejné výhody a nevýhody jako ***D*** (viz níže). Nabývá hodnot od plus nekonečna do minus nekonečna, ale maximálních hodnot upřednostňování (+ ∞) a odmítání (- ∞) lze dosáhnout pouze v případě dvou typů potravy. Tento index zachycuje výběr pro konkrétní zjištěné okolnosti a nestanoví žádnou biologicky významnou hodnotu (Manly a kol., 2002). Je také neobyčejně citlivý na chyby při sběru vzorků, pokud jsou dostupnost (hojnost) nebo využití nižší než zhruba 0,1, a má tedy omezenou praktickou vypovídací hodnotu (Lechowicz, 1982).

2.16.2.1.4. Jacobsova modifikovaná výběrovost (D)

Jacobs (1974) odvodil modifikaci ***E*** založenou na mortalitě u jednotlivých typů potravy. Domníval se, že index ***D*** je nezávislý na relativní hojnosti potravy. Vypočítává se pomocí vzorce:

$$D_i = \frac{r_i - p_i}{r_i + p_i - 2 * r_i * p_i}$$

kde D_i je ***Jacobsova modifikovaná výběrovost***, r_i je relativní množství (procentický podíl) potravní složky ***i*** v obsahu trávicího traktu a p_i je relativní množství potravní složky ***i*** v prostředí.

Tento index nabývá hodnoty 0 při neselektivní konzumaci potravy a symetricky se od této hodnoty odchyluje v rozmezí -1 (odmítaná položka) do +1 (upřednostňovaná položka). Na rozdíl od Ivlevova indexu selectivity (***E***) se může pohybovat po celém rozmezí při jakékoli konkrétní hodnotě dostupnosti. Na druhé straně je ve srovnání s ***E*** pouze o něco málo méně nezávislý na chybách výběru vzorků u vzácných potravních složek a rovněž se nehodí pro kvantitativní srovnávání hodnot indexů pocházejících z různých vzorků s výjimkou neobvyklých (pravděpodobně téměř nereálných) situací zahrnujících pouze dva typy potravy (Vanderploeg a Scavia, 1979a,b; Lechowicz, 1982). Rovněž patří do skupiny indexů, které nedávají žádné biologicky významné hodnoty (Manly a kol., 2002).

2.16.2.1.4. Vanderploegův & Scaviův první selekční index (W)

Tento index je odvozen od potravního racionu. Je normalizován tak, aby se součet všech dílčích poměrů potravních složek ve vzorku rovnal jedné. Index ***W*** byl navržen ve snaze vyhnout se hlavním slabinám poměru potravních složek a Ivlevova indexu výběrovosti a získat tak lepší odhad výběrovosti za různých podmínek relativní hojnosti kořisti. Také umožňuje prozkoumat preference týkající se velikosti, chuti a dalších faktorů (Vanderploeg a Scavia, 1979a) a je odvozen z prvotních neupravených dat, úmrtnosti kořisti, rychlosti filtrace, hodnot konzumace potravy a indexů výběrovosti. Index ***W*** je definován v rozmezí 0 a 1 a vypočítává se pomocí rovnice:

$$W_i = \frac{F_i}{\sum_{i=1}^{n} F_i}$$

kde W_i je Vanderploegův & Scaviův první selekční index pro potravní složku i, F_i je poměr dostupných složek kategorie i, které jsou využity (nebo stálá vlastnost živočicha přijímajícího potravu, jak bylo původně uvedeno autory) a n je počet druhů potravy.

Výše uvedený vzorec popisuje pouze jeden ze způsobů výpočtu W a tento index poskytuje širokou škálu možností, jak od různých typů dat dospět k finální hodnotě, ale hodí se spíše pro pokročilé badatele (více informací viz Vanderploeg a Scavia 1979a, b). Další hodnocení tohoto indexu (Lechowicz, 1982) říká, že je totožný s Chessonovým indexem α představeným v kapitole 2.16.2.1.6.

Tento index vypovídá o tom, jak živočich přijímající potravu vnímá hodnotu potravní složky ve vztahu k její hojnosti a k dalším dostupným typům potravy. Měří invariantní stupeň preference, má biologický význam a lze jej vykládat jako index pravděpodobnosti (nebo nějakého násobku pravděpodobnosti), že další využitý potravní zdroj bude určitého typu (Manly a kol., 2002). Confer a Moore (1987) zjistili, že tento index je nejvhodnější v situacích, kdy počet složek v potravě a relativní hojnost potravních zdrojů u jednotlivých vzorků kolísají. Na druhou stranu je index W závislý na počtu typů potravy a nabývá hodnot od 0 do 1, což je v oblasti výběru potravy neobvyklé, neboť se zde většinou používají indexy s rozpětím od -1 do +1.

2.16.2.1.5. Vanderploegova & Scaviova relativizovaná selektivita (E*)

Možné rozpětí hodnot poskytovaných Vanderploegovým & Scaviovým prvním selekčním indexem (W) bylo jedním z důvodů, proč Vanderploeg a Scavia (1979b) navrhli další index nazvaný E^*, analogický lvlevovu koeficientu selectivity E, založený na selekčním koeficientu W a počtu dostupných potravních typů. Vypočítává se s pomocí rovnice:

$$E_i^* = \frac{W_i - n^{-1}}{W_i + n^{-1}}$$

kde E^*_i je Vanderploegova & Scaviova relativizovaná selektivita, W_i je Vanderploegův & Scaviův první selekční index pro složku kořisti i, a n je počet potravních typů.

K výhodám E^* patří, že odráží, jak živočich přijímající potravu vnímá její hodnotu jakožto funkci její hojnosti a hojnosti dalších typů potravy v prostředí. Také zohledňuje odchylku od neselektivního příjmu potravy v hierarchickém pořadí, díky čemuž se srovnání výběrovosti v různých lokalitách stává smysluplným. Pro tyto vlastnosti hodnotil Lechowicz (1982) tento index jako nejlepší a nejužitečnější (byť ne dokonalý). Rovněž Confer a Moore (1987) hodnotili tento index jako

vhodný pro terénní studie charakterizované vysokou proměnlivostí počtu složek v potravě a relativní hojností potravních zdrojů, podobně jako tomu je u ***W***.

Teoreticky se hodnoty tohoto indexu pohybují v rozmezí od -1 do +1, přičemž hodnota 0 odpovídá neselektivnímu příjmu potravy, což by se mohlo jevit jako výhoda. V praxi ovšem, podobně jako v případě Ivlevova indexu (***E***), může tento index nabýt hodnoty +1 pouze za málo reálných podmínek, kdy se v trávicím traktu vyskytuje pouze jeden typ potravy, k čemuž v prostředí s neurčitým počtem typů potravy nedochází. Tento index je také výrazně nelineární a asymetrický, ovšem tyto charakteristiky jsou nevyhnutelné, má-li být index stabilizován při změnách relativní hojnosti potravních typů. Maximální dosažitelná hodnota preference je rostoucí funkcí počtu potravních typů. Náchylnost k chybě pramenící z odběru vzorků vzácné a ne zcela běžné potravy roste se zvyšujícím se počtem potravních typů, srovnatelné jsou tedy pouze vzorky obsahující stejný počet typů potravy a tento index nemůže být využit v parametrických statistických analýzách (Lechowicz, 1982). Tokeshi a Daud (2011) navíc experimentálně prokázali, že index nutně neodráží odchylku od neselektivního příjmu potravy.

2.16.2.1.6. Manly-Chessonův index (α)

Tento index je odvozen od stochastického modelu setkání s kořistí a jejího ulovení (Manly, 1974; Chesson, 1978, 1983; Lechowicz, 1982). Ve studiích potravní ekologie se běžně užívá v několika variantách odvozených ze vzorce:

$$\alpha_i = \frac{r_i}{p_i} \Big/ \sum_{i=1}^{n} \frac{r_i}{p_i}$$

kde α_i je ***Manly-Chessonův index*** selektivity pro potravní typ ***i***, r_i je relativní množství potravní složky ***i*** v obsahu trávicích traktu a p_i je relativní množství potravní složky ***i*** v prostředí. Manly a kol. (2002) rozlišují mezi následujícími indexy:

1. Chessonův index:

$$\alpha_i = \frac{r_i}{p_i} \Big/ \sum_{i=1}^{n} \frac{r_i}{\pi_i}$$

kde α_i je ***Chessonův index*** selektivity pro potravní typ ***i***, r_i je relativní množství potravní složky ***i*** v obsahu trávicího traktu, p_i je podíl dostupných jednotek kategorie ***i*** ve vzorku a π_i je podíl populace dostupných jednotek, které jsou v kategorii ***i***.

2. Manlyův standardizovaný selekční index při doplňování jednotek spotřebovaných zdrojů:

$$B_{i1} = \frac{u_i}{k_i} \Big/ \sum_{i=1}^{n} \frac{u_i}{k_i}$$

kde B_{i1} je Manlyův standardizovaný selekční index pro potravní složku i, u_i je počet jednotek v kategorii i ve vzorku zkonzumovaných jednotek, k_i je počet dostupných jednotek v kategorii i ve vzorku dostupných jednotek zdrojů.

Tato podoba indexu se používá, je-li počet zkonzumovaných jednotek kořisti (či obecně potravních složek) ve srovnání s celkovou velikostí populace této kořisti (či dostupných zásob potravy) velmi nízký nebo když se kořist (potrava) doplňuje (např. v laboratorních studiích).

3. Manlyův standardizovaný selekční index bez doplňování jednotek spotřebovaných zdrojů:

$$B_{2i} = \frac{\log\,(1 - f_i)}{\sum_{i=1}^{n} \log\,(1 - f_i)}$$

kde B_{2i} je Manlyův standardizovaný selekční index, f_i je podíl dostupných položek kategorie i, které jsou zkonzumovány.

V této rovnici doporučuje Lechowicz (1982) dekadický logaritmus ($\log_{10}$), avšak podle Chipps a Garvey (2007) lze použít logaritmus o jakémkoli základu. Tato podoba indexu se užívá, je-li počet jednotek zkonzumované kořisti (potravy) v poměru k celkové populaci kořisti (zásob potravy) v prostředí vysoký nebo když v experimentálních studiích není kořist (potrava) po zkonzumování doplňována.

Hodnoty tohoto indexu (těchto indexů) jsou normalizovány následovně:

$$\sum_{j=1}^{k} \alpha_i = 1{,}0$$

kde k je počet potravních složek ve vzorku a α_i je hodnota Manly-Chessonova indexu (respektive B_{i1}, či B_{2i}). Očekávaná hodnota se pohybuje mezi 0 (naprosté odmítání) a 1 (naprostý pozitivní výběr) a je funkcí počtu potravních složek. To znamená, že hodnoty pod $1/k$ znamenají odmítání, kdežto hodnoty nad $1/k$ znamenají preferenci. Hodnota odpovídající $1/k$ ukazuje na příjem potravy, který je ve vztahu ke konkrétní potravní složce i neselektivní.

Tento index je nelineární a změny v přítomnosti potravy v trávicím traktu a v prostředí neovlivňují všechny hodnoty stejným způsobem. Podobně jako

v případě ***W*** je výhodou, že tento index umožňuje smysluplné srovnání mezi jednotlivými vzorky, protože není ovlivněn relativní hojností typů potravy (Lechowicz, 1982) a zjištěná hodnota selekce je biologicky významná (Manly a kol., 2002). Ve srovnání s dalšími indexy se tento jeví jako jeden z nejvhodnějších při kvantifikaci výběru typů potravy (Chesson, 1983; Chipps a Garvey, 2007). Manly-Chessonův index se doporučuje u proměnlivých populací kořisti, kdy je počet jednotek zkonzumované a zbývající kořisti větší než 10 (Manly, 1974; Chesson, 1983; Chipps a Garvey, 2007). Problém při interpretaci tohoto indexu může nastat, když jsou v potravě přítomny velmi vzácné složky (kořist). Ty vykazují velký vliv na hodnoty složek veškeré ostatní potravy, protože převyšují součet jejich jednotlivých podílů. Tato situace by mohla být interpretována jako přesný obraz situace ve výběru anebo může být důsledkem malé velikosti vzorku. Je třeba mít na paměti, že vysoká hodnota neznamená automaticky, že konkrétní položka je v potravě kvantitativně důležitá (Confer a Moore, 1987).

2.16.2.1.7. Straussův lineární selekční index (L)

Nedostatky Ivlevova indexu výběrovosti a potravního racionu vedly k vytvoření indexu lineární selekce potravy (Strauss, 1979). Výpočet tohoto indexu s využitím následujícího vzorce je velmi prostý:

$$L_i = r_i - p_i$$

kde L_i je Straussův lineární selekční index pro potravní složku i, r_i je relativní množství potravní složky i v obsahu trávicího traktu a p_i je podíl dostupných jednotek kategorie i ve vzorku. K vlastnostem tohoto indexu patří rozpětí hodnot od -1 (odmítání) do +1 (maximální pozitivní výběr), přičemž očekávaná hodnota indexu pro neselektivní příjem potravy je vždy nula. Podobně jako u ***E*** se extrémní hodnoty objevují pouze tehdy, kdy je určitá složka kořisti sice vzácná, ale téměř výhradně konzumovaná, nebo je-li složka kořisti v prostředí velmi hojná, ale jen zřídka konzumována, a vyskytuje se přibližně rovnoměrně. Vzhledem ke svým vlastnostem by měl tento index být ve většině situací vhodnější než ***FR***, ***E, D*** a ***log Q*** (Strauss, 1979). Straussův index ***L*** se může hodit při popisu důsledků predace na populaci kořisti (Confer a Moore, 1987). Strauss (1979) ovšem nezmiňuje pouze kladné stránky tohoto indexu. Připouští, že je náchylný k chybám při sběru vzorků u vzácných položek (v prostředí či v potravě), i když je vliv v tomto případě menší než v případě indexů ***E*** a ***E´*** a chyba narůstá s rostoucí hodnotou využívání dané položky (Strauss, 1979). Navíc index ***L*** trpí stejnými zásadními vadami jako ***FR***, ***E, D*** a ***log Q*** a nelze ho užít při srovnávání vzorků lišících se hojností v prostředí či v potravě (Lechowicz, 1982). Vyjadřuje výběr pouze pro danou konkrétní situaci a nestanovuje žádnou biologicky významnou hodnotu (Manly a kol., 2002).

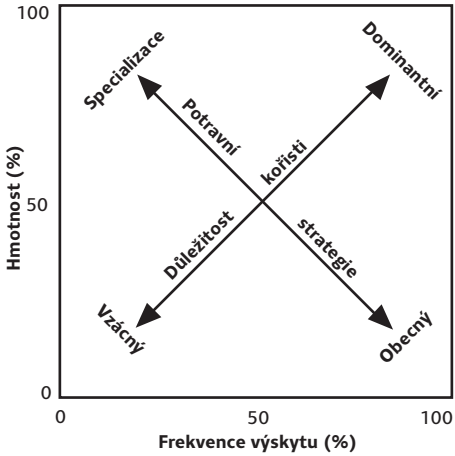
2.17. Grafické techniky prezentace dat

Po dlouhou dobu byly informace získané analýzou střevního obsahu prezentovány ve formě tabulek nebo číselných údajů. Tento způsob prezentace ztěžuje interpretaci dvou či více indexů (a/nebo hodnot) současně a na první pohled přehledně. Tento problém se grafické techniky pokoušejí překonat kombinací dvou či více potravních metrik ve dvou či vícerozměrném prostoru (např. bivariantní diagramy). Takto pojaté znázornění vlastností potravy využívající výhody vizuálního vnímání je snáze interpretovatelné než pouhé tabulky nebo čísla (Costello, 1990; Cortés, 1997). A také je možno využít grafických technik při zkoumání vztahů mezi různými parametry příjmu potravy, k vyhodnocení a výkladu složitějších aspektů ekologie příjmu potravy u ryb a jejich potravního chování, například strategií příjmu potravy u predátorů (specializovaný či obecný), relativní důležitosti typů kořisti, variability potravy, šíře škály přijímané potravy, případně ke zjištění potenciálního překrývání potravních nároků. Grafické techniky poskytují možnost provést rychlé vizuální vyhodnocení a srovnání dat ještě před jejich další statistickou analýzou (Costello, 1990; Cortés, 1997). Byly vyvinuty a používány především ve výzkumu potravy dravých ryb. Těchto metod lze využít v kombinaci s dalšími technikami například k určení potravních složek, které kvantitativně vyčnívají nad ostatní a k výzkumu specializačních/ generalizujících tendencí.

2.17.1. Costellova grafická metoda

Tato metoda, kterou navrhl Costello (1990), vztahuje hojnost kořisti (%***N***, ***%V***, nebo ***%m***) k frekvenci jejího výskytu (***%F***). Byla vyvinuta k vyhodnocení potravní strategie a důležitosti kořisti. V praxi každý bod v grafu vyjadřuje procento výskytu a hojnosti taxonu dané kořisti (Obr. 23). Body znázorňující kořist umístěné v okolí rohů lze vykládat následovně: (1) body v blízkosti 100 % frekvence výskytu a 100 % hojnosti představují dominantní taxony kořisti; (2) body v blízkosti 100 % výskytu a 1% hojnosti naznačují, že predátor loví nevelké množství kořisti z mnoha různých taxonů (obecná potrava); (3) body poblíž 1 % výskytu a 100 % hojnosti vyjadřují specializaci některých predátorů na určité taxony kořisti; (4) body v okolí 1 % výskytu a 1 % hojnosti znamenají, že taková kořist je nejméně důležitá a k její konzumaci dochází jen náhodně. Do grafu lze zaznamenat diagonály, které vyjadřují důležitost kořisti a potravní strategii predátorů. Vyskytují-li se body znázorňující kořist podél a současně pod diagonálou označenou jako „důležitost kořisti“, vycházející z počátku (0 % a 0 % = dolní levý roh), svědčí to u zkoumaných ryb o homogenním příjmu potravy. Naopak nacházejí-li se body podél a pod druhou diagonálou

označenou jako „potravní strategie“ vycházející z bodu 0 % na 100 % (horní levý roh), znamená to, že příjem potravy je více heterogenní a důležité mohou být různé taxony kořisti, a to buď díky hojnému množství nalezeném v malém počtu predátorů, nebo malému množství, ale s vysokou frekvencí výskytu ve velkém počtu predátorů (upraveno z Costello, 1990).



Obr. 23. *Diagram vysvětlující grafickou metodu podle Costello (1990). Překresleno a upraveno ze zdrojů Costello (1990) a Amundsen a kol. (1996).*

Tato metoda je zjevně subjektivní. Potravní návyky jsou popsány umístěním odpovídajících bodů v grafu a interpretace jejich pozice a rozptýlení záleží na hodnotícím. Kromě toho bylo poukázáno i na další nedostatky této metody a na obtížnost (či nejednoznačnost) interpretace. Například může být považován za nepravděpodobný výskyt „obecné“ potravy, tedy potravy s velkou šíří niky vyznačený shlukem bodů v pravém dolním rohu, na což poukázal Tokeshi (1991). Rovněž výskyt složek kořisti charakterizované vysokým množstvím, ale nízkou frekvencí výskytu (levý horní roh) spíše znamená výskyt velkého organizmu jakožto vzácného prvku v potravě než obecnou potravu pro tento druh (Marshall a Elliot, 1997). Body značící obecnou potravu nejsou přísně omezeny na pravou dolní část diagramu, ale mohou být rozprostřeny podél celé osy x (Tokeshi, 1991; Amundsen a kol., 1996). Kromě toho musí být součet procentické hojnosti všech typů kořisti přesně roven 100. Není tedy možné, aby se několik bodů vyskytovalo ve shluku v levé horní části diagramu (Amundsen a kol., 1996). Tyto obtíže vedly k vylepšení a úpravě Costellovy metody a objevily se nové varianty

grafického znázornění. Poskytují odlišnou interpretaci dat získaných z obsahu trávicího traktu a jsou založeny na vynesení různých vlastností potravy do grafu. Tyto metody jsou popsány v následujících kapitolách.

2.17.2. Grafická metoda Tokeshiho

Tokeshi (1991) vyvinul novou metodu, která měla odstranit nedostatky Costellovy metody. Jeho přístup spočívá v užití „průměrné individuální potravní diverzity“ (D_i) vynesené proti „potravní diverzitě populace“ (D_p) k vyjádření potravní strategie druhu nebo různých tříd velikosti. D_i a D_p, založené na Shannon-Wienerově indexu diverzity (H) a jsou vypočítány podle následujících vzorců:

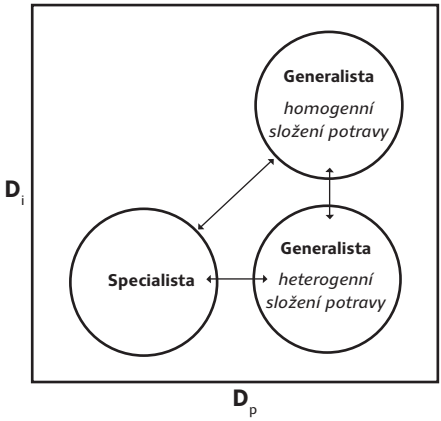
$$D_p = -\sum_{i=1}^{r} p_i * lnP_i$$

a

$$D_i = \frac{-\sum_{i=1}^{r} p_i * lnP_{ij}}{N}$$

kde D_p je potravní diverzita populace, D_i je průměrná individuální potravní diverzita, r je celkový počet zkoumaných ryb, P_i je podíl typu kořisti i v celém souboru dat o rybách (“populaci”), P_{ij} je podíl typu kořisti i v rybách j.

Datové body pro každý druh (velikostní skupinu, bio- či ekotyp) jsou zaznamenány do grafu a analyzovány (Obr. 24).



Obr. 24. *Diagram vysvětlující interpretaci potravní strategie podle Tokeshi (1991). Překresleno a upraveno podle Tokeshi (1991).*

Populace vyznačující se nízkým D_i a nízkým D_p (levý dolní roh v diagramu) odpovídá specializaci na určitou potravu, kdežto vysoké D_i a vysoké D_p (pravý horní roh) odpovídá generalistům s homogenním potravním režimem. Vysoké D_i a nízké D_p (pravý dolní roh) značí generalisty s heterogenním potravním režimem, zatímco vysoké D_i a nízké D_p se považuje za vzácný případ (Tokeshi, 1991).

Tato metoda se jeví jako objektivnější než metoda Costellova a umožňuje objektivnější analýzu dat (Marshall a Elliot, 1997). Nicméně se jedná o nejméně užívanou grafickou metodu.

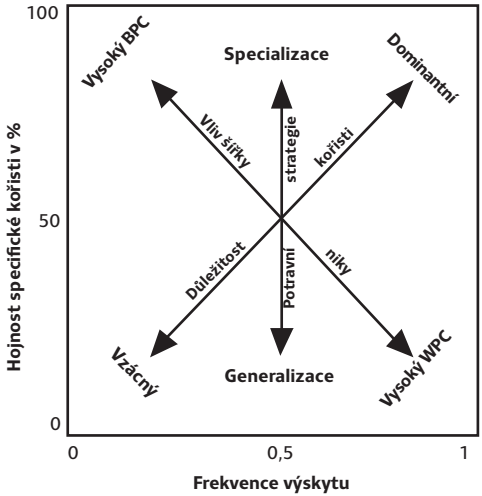
2.17.3. Amundsenova grafická metoda

Další, velmi často používanou úpravu Costellovy metody provedli Amundsen a kol. (1996). K překonání problémů inherentně přítomných v Costellově metodě navrhli začlenit do grafického znázornění složení potravy nový parametr, „hojnost specifické kořisti“ (P_i) (Obr. 25). Index P_i je definován jako procentický podíl určitého taxonu kořisti na všech složkách kořisti pouze u těch predátorů, v nichž se tato kořist vyskytuje. Vypočítává se následovně:

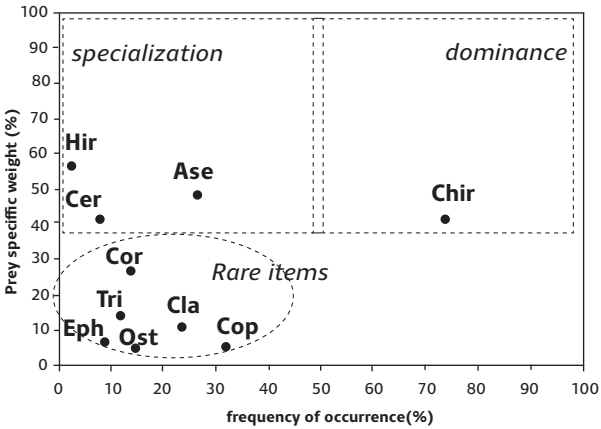
$$P_i = \left(\frac{\sum S_i}{\sum S_{ti}} \right) * 100$$

kde P_i je hojnost specifické kořisti i (vyjádřená počtem, hmotností či objemem), S_i je hojnost kořisti i v potravě (vyjádřená počtem, hmotností či objemem) a S_{ti} je celková hojnost kořisti v predátorech s kořistí i (Amundsen a kol., 1996).

Hojnost specifické kořisti (P_i) je vynesena proti frekvenci výskytu vyjádřené podle původního popisu této metody spíše zlomkem než procenty. Konečné zanesení do grafu vyjadřuje vyhodnocení tří důležitých aspektů potravy ryb: (1) potravní strategie (specializovaná versus všeobecná), (2) důležitost kořisti (dominantní versus vzácná), (3) šíře niky (Obr. 26). Tato metoda tak prohlubuje ekologické poznání, které lze odvodit z dat o obsahu trávicího traktu (Amundsen a kol., 1996).



Obr. 25. *Diagram vysvětlující interpretaci potravní strategie, vliv šíře niky a důležitost kořisti podle Amundsena a kol. (1996). Překresleno a upraveno podle Amundsen a kol. (1996). Pozn.: BPC = "between phenotype component" – mezifenotypový komponent (mezifenotypová variabilita), WPC = „within phenotype component" – vnitrofenotypový komponent (vnitrofenotypová variabilita).*



Obr. 26. *Příklad aplikace Amundsenovy grafické metody (Amundsen a kol., 1996) na hodnocení potravy hlavačky na nádrži Mušov. Převzato z Adámek a kol. (2010b). Zkratky: Chir – Chironomidae, Hir – Hirudinea, Cla – Cladocera, Cop – Copepoda, Ost – Ostracoda, Ase – Asellus aquaticus, Cor – Corixidae, Eph – Ephemeroptera, Tri – Trichoptera, Cer – Ceratopogonidae.*

Informace jsou získány z distribuce bodů. Důležitá je pozice bodů podél diagonál a os diagramu (Amundsen a kol., 1996):

důležitost kořisti se určí podle pozice na diagonále vedoucí z dolního levého rohu do horního pravého rohu. Dominantní kořist je umístěna na jejím horním, zatímco vzácná nebo nevýznamná kořist na dolním konci. Je však třeba zdůraznit, že důležitost kořisti (či její hojnost) není vyjádřena lineárním nárůstem podél diagonály, ale spíše jako funkce hojnosti specifické kořisti a frekvence výskytu;

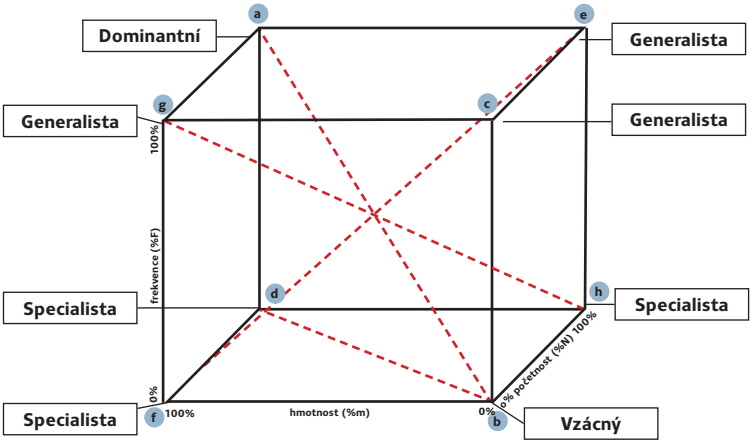
potravní strategie predátora je vyhodnocena podle pozice na vertikální ose. Predátoři se specializují na typy kořisti nacházející se v horní části grafu, kdežto kořist nacházející se v dolní části je konzumována spíše příležitostně (generalizace);

vliv **šíře niky a vliv pozice uvnitř fenotypu a mezi fenotypy** je určen s využitím diagonály vedoucí z levého horního rohu do pravého dolního rohu. Pozorování zaznamenaná v pravé horní části diagramu (populační specializace) jsou nutně omezena na jediný nebo jen několik málo bodů, což odpovídá populaci predátorů s malou šířkou niky. Pokud se v pravé horní části diagramu žádné body znázorňující kořist nevyskytují a zároveň jsou všechny body umístěny podél nebo pod diagonálou z levého horního do pravého dolního rohu, zaujímá populace predátorů širokou niku. V populaci s významnou složkou pozice mezi fenotypy se různí jedinci specializují na různé zdroje a body se nacházejí v levém horním rohu, zatímco u populací, kde je významná pozice uvnitř jednoho fenotypu, většina jedinců využívá mnoho typů zdrojů současně a body se shlukují v pravém dolním rohu.

Jiný, poněkud složitější postup při použití dvourozměrné prezentace složení potravy uvádí De Billy a kol. (2000).

2.17.4. Cortésova grafická metoda

Další oblíbenou a velmi často užívanou grafickou metodou je Cortésova (Cortés, 1997) úprava Costellovy metody (Costello, 1990). Jeho nová grafická metoda využívá frekvenci výskytu (***%F***), relativní numerickou hojnost (***%N***) a hmotnost (***%m***) nebo (***%V***) v třírozměrném grafickém znázornění dat o obsahu trávicích traktů na úrovni populace (Obr. 27).



Obr. 27 *Trojrozměrné grafické znázornění obsahu trávicího traktu ryb podle Cortés (1997). Definice a vysvětlení následuje v textu. Překresleno a upraveno z Cortés (1997) a Hauer a Lamberti (2011).*

Ve srovnání s ostatními grafickými metodami je interpretace složitější, a to vzhledem k trojrozměrnosti, a tedy mnohem většímu počtu možných pozic bodů. Podle Cortése (1997) vyjadřuje každý bod v grafu procentuální výskyt a hojnost kategorie kořisti. Body nacházející se v blízkosti 100 % ***F***, 100 % ***m***, a 100 % ***N*** (bod ***a***) představují dominantní potravní taxon nebo složku. Naopak body umístěné v blízkosti počátku (bod ***b***) tří os označují vzácné typy kořisti. Jakýkoli bod nacházející se blíže ose ***%N*** než ose ***%m*** v horizontální rovině znamená, že pro hojnost dané složky je významnějším faktorem počet jedinců než hmotnost. Naopak jakýkoli bod nacházející se blíže osy ***%m*** než osy ***%N*** v horizontální rovině naznačuje, že hojnost dané položky je vytvářena spíše hmotností než počtem jedinců.

Dalších šest vrcholů krychle lze považovat za extrémní případy poukazující buď na specializovanou nebo všeobecnou potravu. Shluk bodů umístěných blízko 100 % ***F*** a počátku ostatních dvou os (***%W*** a ***%N***; bod ***c***) by tedy vyjadřoval generalizované složení potravy (většina predátorů konzumuje několik různých taxonů kořisti malé hojnosti). Naopak bod v blízkosti 1% ***F***, 100 % ***m***, a 100 % ***N*** (bod ***d***) by vyjadřoval specializované složení potravy u několika málo predátorů, kteří by konzumovali velký počet těžkých položek či položky tvořící velmi vysoký podíl celkového počtu položek a hmotnosti obsahu trávicího traktu. Bod nacházející se poblíž 100 % ***F***, 100 % ***N***, a 1 %

m (bod ***e***) by vypovídal o drobnějších potravních složkách konzumovaných většinou predátorů. Naopak bod nacházející se blízko 1 % ***F***, 1 % ***N***, a 100 % ***m*** (bod ***f***) by znamenal specializovanou skladbu potravy u nemnoha predátorů, kteří by konzumovali malý počet větších složek nebo složky tvořící velmi vysoký podíl celkové hmotnosti obsahu trávicího traktu. Bod umístěný poblíž 100 % ***F***, 100 % ***m***, a 1 % ***N*** (bod ***g***) by vyjadřoval, že většina predátorů konzumuje několik větších složek nebo složky tvořící velmi vysoký podíl celkové hmotnosti obsahu trávicího traktu. A naopak bod v blízkosti 1 % ***F***, 1 % ***m***, a 100 % ***N*** (bod ***h***) by vypovídal o specializované skladbě potravy u několika predátorů konzumujících velmi vysoký počet drobnějších potravních složek (Cortés, 1997).

V trojrozměrném grafu mohou rovněž být zakresleny diagonály, jak navrhl Costello (1990) ve své dvojrozměrné grafické analýze. Mohou vizuálně znázorňovat důležitost kořisti (dominantní versus vzácné taxony kořisti) a potravní strategii predátorů (všeobecný versus specializovaný příjem potravy). Linie spojující body ***b*** a ***a*** by vyjadřovala vzrůstající důležitost kořisti, zatímco linie spojující body **d** a ***c***, ***f*** a ***e***, a ***h*** a ***g*** by naznačovaly posun směrem ke generalizovanější potravní strategii (Cortés, 1997).

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Tato metodika přináší nový sumarizující pohled na metody studia potravy ryb s kritickým hodnocením předností a nedostatků dříve používaných metod. Usnadňuje tak rozhodovací proces pro zvolení optimálních postupů, aplikovatelných s konkrétních cílem od screeningového hodnocení přes pravidelný provozní monitoring až po vědecký výzkum zaměřený na řešení konkrétního problému v chovu ryb nebo rybářském managementu volných vod.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena pro praktické využití v rybářském (rybníkářském) sektoru pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení potravy ryb s cílem posoudit potřebu provedení potřebných opatření pro zlepšení využití přirozené potravy, úpravy přikrmování, případně i melioračních a intenzifikačních zásahů. Uplatnění se předpokládá i výuce rybářských, ichtyologických a hydrobiologických předmětů.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Zavedení postupů uvedených v metodice není spojeno s žádnými finančními náklady. Ekonomický přínos pro uživatele lze v případě aplikace uvedených metod odhadovat na řádově desetitisíce Kč ročně.

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Adámek, Z., 2006. Metodika odběru a zpracování vzorků makrozoobentosu stojatých vod. Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, Praha, 10 s.

Adámek, Z., Kašpar, Z., Spittler, P., 1990. X-ray determination of the rate of feed passage through the digestive tract of the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Živočišná výroba 35 (10): 869–873.

Adámek, Z., Musil, J., Sukop, I., 2004. Diet composition and selectivity in O+ perch (*Perca fluviatilis* L.) and its competition with adult fish and carp (*Cyprinus carpio* L.) stock in pond culture. Agriculturae Conspectus Scientificus 69 (1): 21–27.

Adámek, Z., Helešic, J., Maršálek, B., Rulík, M., 2010a. Aplikovaná hydrobiologie. FROV JU, Vodňany, 350 s.

Adámek, Z., Jurajda, P., Prášek, V., Sukop, I., 2010b. Seasonal diet pattern of non-native tubenose goby (*Proterorhinus semilunaris*) in the lowland reservoir (Mušov, Czech Republic). Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 397: 2.

Adámek, Z., Lepičová, A., Kozák, P., Hamáčková, J., Lepič, P., Bláha, M., 2011. Gut passage time in zooplankton-fed dace (*Leusciscus leuciscus*) larvae under laboratory conditions. In: Curcubet, G. (Ed.), Aquaculture in Central and Eastern Europe: Present and Future, Chisinau, Moldavsko, 8–12.

Adámek, Z., Mrkvová, M., Zukal, J., Roche, K., Mikl, L., Šlapanský, L., Janáč, M., Jurajda, P., 2016. Environmental quality and natural food performance at feeding sites in a carp (*Cyprinus carpio*) pond. Aquaculture International 24 (6): 1591–1606.

AFSC (Alaska Fisheries Science Center), 2015. Resource ecology and ecosystem modeling stomach content analysis procedures manual. AFSC, Seattle.

Ahlbeck, I., Hansson, S., Hjerne, O., 2012. Evaluating fish diet analysis methods by individual-based modelling. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 69 (7): 1184–1201.

Amundsen, P.A., Gabler, H.M., Staldvik, F.J., 1996. A new approach to graphical analysis of feeding strategy from stomach contents data—modification of the Costello (1990) method. Journal of Fish Biology 48 (4): 607–614.

Baker, A.M., Fraser, D.F., 1976. A method for securing the gut contents of small, live fish. Transactions of the American Fisheries Society 105 (4): 520–522.

Baker, R., Buckland, A., Sheaves, M., 2014. Fish gut content analysis: robust measures of diet composition. Fish and Fisheries 15 (1): 170–177.

Barber, I., Hoare, D., Krause, J., 2000. Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. Reviews in Fish Biology and Fisheries 10 (2): 131–165.

Barbour, M.T., Gerritsen, J., 1996. Subsampling of benthic samples: a defense of the fixed-count method. Journal of the North American Benthological Society 15 (3): 386–391.

Barbour, A.B., Boucek, R.E., Adams, A.J., 2012. Effect of pulsed gastric lavage on apparent survival of a juvenile fish in a natural system. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 422: 107–113.

Bayley, P.B., Li, H.W., 2008. Stream fish responses to grazing exclosures. North American Journal of Fisheries Management 28 (1): 135–147.

Beckmann, M.C., Gilliam, J.F., Langerhans, R.B., 2015. X-ray imaging as a time-saving, non-invasive technique for diet analysis. Fisheries Research 161: 1–7.

Benke, A.C., Huryn, A.D., Smock, L.A., Wallace, J.B., 1999. Length-mass relationships for freshwater macroinvertebrates in North America with particular reference to the southeastern United States. Journal of the North American Benthological Society 18 (3): 308–343.

Bird, D.F., Prairie, Y.T., 1985. Practical guidelines for the use of zooplankton length-weight regression equations. Journal of Plankton Research 7 (6): 955–960.

Bo, T., López-Rodríguez, M.J., Fenoglio, S., Cammarata, M., Tierno de Figueroa, J.M., 2010. Feeding Habits of *Padogobius bonelli* (Osteichthyes: Gobiidae) in the Curone Creek (Northwest Italy): Territoriality influences diet? Journal of Freshwater Ecology 25 (3): 367–371.

Bowen, S.H., 1996. Quantitative Description of the Diet. In: Murphy, B.R., Willis, D.W. (Eds), Fisheries Techniques, 2nd edition. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, pp. 513–532.

Braga, R.R., Bornatowski, H., Vitule, J.R. S., 2012. Feeding ecology of fishes: an overview of worldwide publications. Reviews in Fish Biology and Fisheries 22 (4): 915–929.

Braga, R.R., Ribeiro, V.M., Bornatowski, H., Abilhoa, V., Vitule, J.R.S., 2017. Gastric lavage for dietary studies of small fishes: Efficiency, survival and applicability. Acta Ichthyologica et Piscatoria 47 (1): 97–100.

Brandner, J., Auerswald, K., Cerwenka, A.F., Schliewen, U.K., Geist, J., 2013. Comparative feeding ecology of invasive Ponto-Caspian gobies. Hydrobiologia 703 (1): 113–131.

Burgherr, P., Meyer, E.I., 1997. Regression analysis of linear body dimensions vs. dry mass in stream macroinvertebrates. Archiv für Hydrobiologie 139 (1): 101–112.

Carreon-Martinez, L., Heath, D.D., 2010. Revolution in food web analysis and trophic ecology: diet analysis by DNA and stable isotope analysis. Molecular Ecology 19 (1): 25–27.

Carreon-Martinez L., Johnson T.B., Ludsin S.A., Heath, D.D., 2011. Utilization of stomach content DNA to determine diet diversity in piscivorous fishes. Journal of Fish Biology 78 (4): 1170–1182.

Carter, J.L., Resh, V.H., 2001. After site selection and before data analysis: sampling, sorting, and laboratory procedures used in stream benthic macroinvertebrate monitoring programs by USA state agencies. Journal of the North American Benthological Society 20 (4): 658–682.

Chesson, J., 1978. Measuring preference in selective predation. Ecology 59 (2): 211–215.

Chesson, J., 1983. The estimation and analysis of preference and its relationship to foraging models. Ecology 64 (5): 1297–1304.

Chipps, S.R., Garvey, J.E., 2007. Assessment of Food Habits and Feeding Patterns. In: Guy, C.S., Brown, M.L. (Eds), Analysis and Interpretation of Freshwater Fisheries Data. American Fisheries Society, Bethesda, USA, pp. 473–514.

Confer, J.L., Moore, M.V., 1987. Interpreting selectivity indices calculated from field data or conditions of prey replacement. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 44 (9): 1529–1533.

Cooper, W.J., Parsons, K., McIntyre, A., Kern, B., McGee-Moore, A., Albertson, R.C., 2010. Bentho-pelagic divergence of cichlid feeding architecture was prodigious and consistent during multiple adaptive radiations within African rift-lakes. PLoS One 5 (3): e9551.

Copp, G.H., Mann, R.H.K., 1993. Comparative growth and diet of tench *Tinca tinca* (L.) larvae and juveniles from river floodplain biotopes in France and England. Ecology of Freshwater Fish 2: 58–66.

Corse, E., Costedoat, C., Chappaz, R., Pech, N., Martin, J.F., Gills, A., 2009. A PCR-based method for diet analysis in freshwater organisms using 18S rDNA barcoding on faeces. Molecular Ecology Resources 10 (1): 96–108.

Cortés, E., 1997. A critical review of methods of studying fish feeding based on analysis of stomach contents: application to elasmobranch fishes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54 (3): 726–738.

Costello, M.J., 1990. Predator feeding strategy and prey importance: a new graphical analysis. Journal of Fish Biology 36 (2): 261–263.

Crow, S.K., Closs, G.P., Waters, J.M., Booker, D.J., Wallis, G.P., 2010. Niche partitioning and the effect of interspecific competition on microhabitat use by two sympatric galaxiid stream fishes. Freshwater Biology 55 (5): 967–982.

Culver, D.A., Boucherle, M.M., Bean, D.J., Fletcher, J.W., 1985. Biomass of freshwater crustacean zooplankton from length-weight regressions. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 42 (8): 1380–1390.

ČSN 757714, 1998. Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení bentosu. ČNI Praha, 12 s.

ČSN 65 0201, 2003. Hořlavé kapaliny. Provozovny a sklady. ČNI Praha.

ČSN 75 7715, 2015. Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení nárostů. ČNI Praha, 12 s.

Deagle, B.E., Thomas, A.C., McInnes, J.C., Clarke, L.J., Vestrinen, E.J., Clare, E.L., Kartzinel, T.R., Eveson, J.P., 2019. Counting with DNA in metabarcoding studies: How should we convert sequence reads to dietary data? Molecular Ecology 28 (2): 391–406.

De Billy, V.D., Doledec, S., Chessel, D., 2000. Biplot presentation of diet composition data: an alternative for fish stomach analysis. Journal of Fish Biology 56 (4): 961–973.

Dubets, H., 1954. Feeding habits of the largemouth bass as revealed by a gastroscope. Progressive Fish-Culturist 16 (3): 134–136.

Faina, R., 1975. Získání úplného obsahu zažívacího traktu živého kapra. Buletin VÚRH Vodňany 2: 11–14.

Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.G., Buchner, A., 2007. G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behavior Research Methods 39 (2): 175–191.

Faul, F., Erdfelder, E., Buchner, A., Lang, A.G., 2009. Statistical power analyses using G* Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. Behavior Research Methods 41 (4): 1149–1160.

Fritts, A.L., Pearsons, T.N., 2004. Smallmouth bass predation on hatchery and wild salmonids in the Yakima River, Washington. Transactions of the American Fisheries Society 133 (4): 880–895.

Frost, W.E., 1977. The food of charr, *Salvelinus willughbii* (Günther), in Windermere. Journal of Fish Biology 11 (6): 531–547.

García-Berthou, E., 2001. Size- and depth-dependent variation in habitat and diet of the common carp (*Cyprinus carpio*). Aquatic Sciences 63 (4): 466–476.

Garman, G.C., 1982. Identification of ingested prey fish based on scale characteristics. North American Journal of Fisheries Management 2 (2): 201–203.

Garrido, S., Murta, A.G., Moreira, A., Ferreira, M.J., Angélico, M.M., 2008. Horse mackerel (*Trachurus trachurus*) stomach fullness off Portugal: index calibration and spatio-temporal variations in feeding intensity. ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil 65 (9): 1662–1669.

Garvey, J.E., Dingledine, N.A., Donovan, N.S., Stein, R.A., 1998. Exploring spatial and temporal variation within reservoir food webs: predictions for fish assemblages. Ecological Applications 8 (1): 104–120.

George, E.L., Hadley, W.F., 1979. Food and habitat partitioning between rock bass (*Ambloplites rupestris*) and smallmouth bass (*Micropterus dolomieui*) young of the year. Transactions of the American Fisheries Society 108 (3): 253–261.

González, J.M., Basaguren, A., Pozo, J., 2002: Size-mass relationships of stream invertebrates in a northern Spain stream. Hydrobiologia 489 (1–3): 131–137.

Gosch, N.J., Pope, K.L., Michaletz, P.H., 2009: Stomach capacities of six freshwater fishes. Journal of Freshwater Ecology 24 (4): 645–649.

Grabowska, J., Grabowski, M., 2005. Diel-feeding activity in early summer of racer goby *Neogobius gymnotrachelus* (Gobiidae): a new invader in the Baltic basin. Journal of Applied Ichthyology 21 (4): 282–286.

Grulich V., Vydrová A., 2006: Metodika odběru a zpracování vzorku makrofyt tekoucích vod. Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, Praha, 7 s.

Habibi, H.R., Ince, B.W., 1983. Effects of steroids and sex reversal on intestinal absoprtion of L-[^{14}C]leucine *in vivo*, in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. General and Comparative Endocrinology 52 (3): 438–444.

Hansson, S., 1998. Methods of studying fish feeding: a comment. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 55 (12): 2706–2707.

Hartleb, C.F., Moring, J.R., 1995. An improved gastric lavage device for removing stomach contents from live fish. Fisheries Research 24 (3): 261–265.

Hartvig, M., Andersen, K.H., 2013. Coexistence of structured populations with size-based prey selection. Theoretical Population Biology 89: 24–33.

Haubrock, P.J., Balzani, P., Inghilesi, A.F., Tricarico, E., 2018. The effects of two different preservation methods on morphological characteristics of the alien channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818) in European freshwater. Croatian Journal of Fisheries 76 (2): 80–84.

Hauer, F.R., Lamberti, G.A., 2011. Methods in Stream Ecology. Academic Press, 896 pp.

Hayward, R.S., Margraf, F.J., Knight, C.T., Glomski, D.J., 1989. Gear bias in field estimation of the amount of food consumed by fish. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 46 (5): 874–876.

Heise, B.A., Flannagan, J.F., Galloway, T.D., 1988. Production of *Hexagenia limbata* (Serville) and *Ephemera simulans* Walker (Ephemeroptera) in Dauphin Lake, Manitoba, with a note on weight loss due to preservatives. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 45 (5): 774–781.

Hell, W., 1960. Zur Methodik der quantitativen Gewinnung und Gewichtsbestimmung der Makrostein- und Schlammfauna. Wasser und Abwasser: 28–34

Henderson, P.A., 2009. Practical Methods in Ecology. John Wiley & Sons.

Hobson, E.S., 1974. Feeding relationships of teleostean fishes on coral reefs in Kona, Hawaii. Fishery Bulletin 72: 915–1031.

Holčík, J., Hensel, K., 1972. Ichtyologická príručka. Obzor, Bratislava, Slovensko.

Horoszewicz, L., 1960. The value of lower pharyngeal arches as species criteria for defining fish of the Cyprinidae family. Roczniki Nauk Rolniczych 75: 237–256. (v polštině s anlickým souhrnem)

Horppila, J., 1999. Diel changes in diet composition of an omnivorous cyprinid - a possible source of error in estimating food consumption. Hydrobiologia 400: 33–39.

Hynes, H.B.N., 1950. The food of fresh-water sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* and *Pygosteus pungitius*), with a review of methods used in studies of the food of fishes. The Journal of Animal Ecology 19 (1): 36–58.

Hyslop, E.J., 1980. Stomach contents analysis – a review of methods and their application. Journal of Fish Biology 17 (4): 411–429.

Ivlev, V.S., 1961. Experimental Ecology of the Feeding of Fishes. Yale. University Press, New Haven, CT, USA.

Jackson, A.L., Inger, R., Parnell, A.C., Bearhop S., 2011. Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER – Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. Journal of Animal Ecology 80: 595–602.

Jacobs, J., 1974. Quantitative measurement of food selection. Oecologia 14 (4): 413–417.

Jo, H., Gim, J.A., Jeong, K.S., Kim, H.S., Joo, G.J., 2014. Application of DNA barcoding for identification of freshwater carnivorous fish diets: Is number of prey items dependent on size class for *Micropterus salmoides*? Ecology and Evolution 4 (2): 219–229.

Jo, H., Ventura, M., Vidal, N., Gim, J.S., Buchaca, T., Barmuta, L.A., Jeppesen, E., Joo, G.J., 2015. Discovering hidden biodiversity: the use of complementary monitoring of fish diet based on DNA barcoding in freshwater ecosystems. Ecology and Evolution 6 (1): 219–232.

Jobling, M., Arnesen, A.M., Baardvik, B.M., Christiansen, J.S., Jørgensen, E.H., 1995. Monitoring feeding behaviour and food intake: methods and applications. Aquaculture Nutrition 1 (3): 131–143.

Jobling, M., Covès, D., Damsgård, B., Kristiansen, H.R., Koskela, J., Petursdottir, T.E., Kadri, S., Gudmundsson, O., 2001. Techniques for Measuring Feed Intake. Food Intake in Fish 827: 49–87.

Johnson, D.H., 1980. The comparison of usage and availability measurements for evaluating resource preference. Ecology 61 (1): 65–71.

Johnston, T.A., Cunjak, R.A., 1999. Dry mass–length relationships for benthic insects: a review with new data from Catamaran Brook, New Brunswick, Canada. Freshwater Biology 41 (4): 653–674.

Jurajda, P., Slavík, O., Adámek, Z., 2006. Metodika odlovu a zpracování vzorku plůdkových společenstev ryb tekoucích vod. Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, Praha, 10 s.

Justine, J.L., Briand, M.J., Bray, R.A., 2012. A quick and simple method, usable in the field, for collecting parasites in suitable condition for both morphological and molecular studies. Parasitology Research 111 (1): 341–351.

Kamler, E., 2002. Inter-individual and seasonal variability of biological indices in notothenioid fishes from Admiralty Bay, Antarctica. Polish Polar Research 23 (3–4): 265–278.

Kamler, J.F., Pope, K.L., 2001. Nonlethal methods of examining fish stomach contents. Reviews in Fisheries Science 9 (1): 1–11.

Kane, A.S., Salierno, J.D., Gipson, G.T., Molteno, T.C., Hunter, C., 2004. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. Water Research 38 (18): 3993–4001.

Keene, J.L., Noakes, D.L. G., Moccia, R.D., Soto, C.G., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research 29 (2): 89–101.

Kido, M.H., 1996. Morphological variation in feeding traits of native Hawaiian stream fishes. Pacific Science 50 (2): 184–193.

Kimball, D.C., Helm, W.T., 1971. A method of estimating fish stomach capacity. Transactions of the American Fisheries Society 100 (3): 572–575.

King, R.A., Read, D.S., Traugott, M., Symondson, O.C., 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practices for DNA-based approaches. Molecular Ecology, 17 (4): 947–963.

Knight, R.L., Margraf, F.J., 1982. Estimating stomach fullness in fishes. North American Journal of Fisheries Management 2 (4): 413–414.

Kohler, C.C., Ney, J.J., 1982. A comparison of methods for quantitative analysis of feeding selection of fishes. Environmental Biology of Fishes 7(4): 363–368.

Kokeš, J., Němejcová, D., 2006. Metodika odběru a zpracování vzorku makrozoobentosu tekoucích vod metodou Perla. Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, Praha, 10 s.

Kolářová, J., Velíšek, J., Nepejchalová, L., Svobodová, Z., Kouřil, J., Hamáčková, J., Máchová, J., Piačková, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Klimánková, E., Modrá, H., Dobšíková, R., Groch, L., Novotný, L., 2012. Anestetika pro ryby. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 77, 25 s.

Komárková, J., 2006. Metodika odběru a zpracování vzorku fytoplanktonu stojatých vod. Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, Praha, 11 s.

Koščo, J., Manko, P., Miklisová, D., Košuthová, L., 2008. Feeding ecology of invasive *Perccottus glenii* (Perciformes, Odontobutidae) in Slovakia. Czech Journal of Animal Science 53 (11): 479–486.

Kubečka, J., Prchalová, M., 2006. Metodika odlovu a zpracování vzorků ryb stojatých vod. Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, Praha, 22 s.

Kubečka, J., Frouzová, J., Jůza, T., Kratochvíl, M., Prchalová, M., Říha, M., 2010. Metodika monitorování rybích společenstev nádrží a jezer. Biologické centrum AV ČR, 63 s.

Lawrence, S.G., Malley, D.F., Findlay, W.J., MacIver, M.A., Delbaere, I.L., 1987. Method for estimating dry weight of freshwater planktonic crustaceans from measures of length and shape. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 44 (S1): 264–274.

Lechowicz, M.J., 1982. The sampling characteristics of electivity indices. Oecologia 52 (1): 22–30.

Leuven, R.S., Brock, T.C., van Druten, H.A., 1985. Effects of preservation on dry-and ash-free dry weight biomass of some common aquatic macro-invertebrates. Hydrobiologia 127 (2): 151–159.

Liao, H., Pierce, C.L., Larscheid, J.G., 2001. Empirical assessment of indices of prey importance in the diets of predacious fish. Transactions of the American Fisheries Society 130 (4): 583–591.

Lima-Junior, S.E., Goitein, R., 2001. A new method for the analysis of fish stomach contents. Acta Scientiarum 23 (2): 421–424.

Litvaitis, J.A., 2000. Investigating Food Habits of Terrestrial Vertebrates. In: Investigating Food Habits of Terrestrial Vertebrates. In: Boitani, L., Fuller, T.K. (Eds), Research Techniques in Animal Ecology: Controversies and Consequences Columbia University Press, New York, USA, pp. 165–190.

Logan, M.S., Iverson, S.J., Ruzzante D.E., Walde, S.J., Macchi, P.J., Alonso, M.F., Cussac, V.E., 2000. Long term diet differences between morphs in trophically polymorphic *Percichthys trucha* (Pisces: Percichtyidae) populations from the southern Andes. Biological Journal of the Linnean Society 69: 599–616.

Macdonald, J.S., Green, R.H., 1983. Redundancy of variables used to describe importance of prey species in fish diets. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 40 (5): 635–637.

Macdonald, J.S., Waiwood, K.G., Green, R.H., 1982. Rates of digestion of different prey in Atlantic cod (*Gadus morhua*), ocean pout (*Macrozoarces americanus*), winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*), and American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 39 (5): 651–659.

Manko, P., 2016. Stomach Content Analysis in Freshwater Fish Feeding Ecology. Vydavateľstvo Prešovskej Univerzity, Prešov, 116 s.

Manly, B.F.J., 1974. A model for certain types of selection experiments. Biometrics 30 (2): 281–294.

Manly, B.F.L., McDonald, L., Thomas, D., McDonald, T.L., Erickson, W.P., 2002. Resource Selection by Animals: Statistical Design and Analysis for Field Studies. Kluwer Academic Publishers.

Marrero, C., Lopez-Rojas, H., 1995. Quantitative evaluation of the point method for fish stomach contents analysis. Journal of Fish Biology 47 (5): 914–916.

Marshall, S., Elliott, M., 1997. A comparison of univariate and multivariate numerical and graphical techniques for determining inter-and intraspecific feeding relationships in estuarine fish. Journal of Fish Biology 51 (3): 526–545.

McIvor, C.C., Odum, W.E., 1988. Food, predation risk, and microhabitat selection in a marsh fish assemblage. Ecology 69 (5): 1341–1351.

Méthot, G., Hudon, C., Gagnon, P., Pinel-Alloul, B., Armellin, A., Poirier, A.M.T., 2012. Macroinvertebrate size-mass relationships: how specific should they be? Freshwater Science 31 (3): 750–764.

Meyer, E., 1989. The relationship between body length parameters and dry mass in running water invertebrates. Archiv für Hydrobiologie 117 (2): 191–203.

Mikl, L., Adámek, Z., Všetičková, L., Janáč, M., Roche, K., Šlapanský, L., Jurajda, P., 2016. Response of benthic macroinvertebrate assemblages to round (*Neogobius melanostomus*, Pallas 1814) and tubenose (*Proterorhinus semilunaris*, Heckel 1837) goby predation pressure. Hydrobiologia 785 (1): 219–232.

Mikl, L., Adámek, Z., Roche, K., Všetičková, L., Šlapanský, L., Jurajda P., 2017. Invasive Ponto-Caspian gobies in the diet of piscivorous fish in a European lowland river. Fundamental and Applied Limnology 190 (2): 157–171.

Mills, E.L., Pittman, K., Munroe, B., 1982. Effect of preservation on the weight of marine benthic invertebrates. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 39 (1): 221–224.

Mohan, M.V., Sankaran, T.M., 1988. Two new indices for stomach content analysis of fishes. Journal of Fish Biology 33 (2): 289–292.

Moulton, S.R., Kennen, J.G., Goldstein, R.M., Hambrook, J.A., 2002. Revised protocols for sampling algal, invertebrate, and fish communities as part of the National Water-Quality Assessment Program. Open-File Report 02-150, U.S. Department of Interior & U.S. Geological Survey, Reston, Virgina.

Murray, D.C. Bunce, M., Cannell, B.L., Oliver, R., Houston, J., White, N.E., Barrero, R.A., Bellgard, M.I., Haile, J., 2011. DNA-based faecal dietary analysis-a comparison of qPCR and high throughput sequencing approaches. PLoS One 6 (10): e25776.

Nakano, S., Murakami, M., 2001. Reciprocal subsidies: dynamic interdependence between terrestrial and aquatic food webs. Proceedings of the National Academy of Sciences 98 (1): 166–170.

Natarajan, A.V., Jhingran, A.G., 1961. Index of preponderance - a method of grading the food elements in the stomach analysis of fishes. Indian Journal of Fisheries 8 (1): 54–59.

Němejcová, D., Zahrádková, S., Opatřilová, L., 2013. Metodika odběru a zpracování vzorků makrozoobentosu velkých nebroditelných řek. Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, Praha, 9 s.

Niedobová, J., Řezníčková, P., 2014. Odchytové a odběrové metody bezobratlých. Mendelova univerzita v Brně, 72 s.

Norton, S.F., 1995. A functional approach to ecomorphological patterns of feeding in cottid fishes. Environmental Biology of Fishes 44 (1–3): 61–78.

Paradis, Y., Magnan, P., Brodeur, P., Mingelbier, M., 2007. Length and weight reduction in larval and juvenile yellow perch preserved with dry ice, formalin, and ethanol. North American Journal of Fisheries Management 27 (3): 1004–1009.

Parnell, A.C., Inger, R., Bearhop., S., Jackson, A., 2010. Source partioning using stable isotopes: Coping with too much variation. PloS One, 5 (3) :e9672.

Pearre, S. Jr, 1982. Estimating prey preference by predators: uses of various indices, and a proposal of another based on χ^2. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 39 (6): 914–923.

Perry, G., Pianka, E.R., 1997. Animal foraging: past, present and future. Trends in Ecology and Evolution 12 (9): 360–364.

Pierce, G.J., Boyle, P.R., 1991. A review of methods for diet analysis in piscivorous marine mammals. Oceanography and Marine Biology 29: 409–486.

Pikitch, E., Santora, C., Babcock, E.A., Bakun, A., Bonfil, R., Conover, D.O., Dayton, P., Doukakis, P., Fluharty, D., Heneman, D., Houde, E.D., Link, J., Livingston, P.A., Mangel, M., McAllister, M.K., Pope, J., Sainsbury, K.J., 2004. Ecosystem-based fishery management. Science 305 (5682): 346–347.

Pinkas, L., 1971. Food habits study. Fish Bulletin 152 (5): 10.

Pompanon, F., Deagle, B.E., Symondson, W.O., Brown, D.S., Jarman, S.N., Taberlet, B., 2012. Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing. Molecular Ecology 21: 1931–1950.

Pope, K.L., Brown, M.L., Duffy, W.G., Michaletz, P.H., 2001. A caloric-based evaluation of diet indices for largemouth bass. Environmental Biology of Fishes 61 (3): 329–339.

Probst, W.E., Rabeni, C.F., Covington, W.G., Marteney, R.E., 1984. Resource use by stream-dwelling rock bass and smallmouth bass. Transactions of the American Fisheries Society 113 (3): 283–294.

Přikryl, I., 2006. Metodika odběru a zpracování vzorku zooplanktonu stojatých vod. Výzkumný ústav vodohospodářský TGM, Praha, 14 s.

Pusey, B.J., Arthington, A.H., 2003. Importance of the riparian zone to the conservation and management of freshwater fish: a review. Marine and Freshwater Research 54 (1): 1–16.

Quist, M.C., Guy, C.S., Bernot, R.J., Stephen, J.L., 2002. Efficiency of removing food items from walleyes using acrylic tubes. Journal of Freshwater Ecology 17 (2): 179–184.

Rezsu, E., Specziár, A., 2006. Ontogenetic diet profiles and size dependent diet partitioning of ruffe *Gymnocephalus cernuus*, perch *Perca fluviatilis* and pumpkinseed *Lepomis gibbosus* in Lake Balaton. Ecology of Freshwater Fish 15 (3): 339–349.

Robinson, B.W., Wilson, D.S., 1994. Character release and displacement in fishes: a neglected literature. American Naturalist 144 (4): 596–627.

Rosenzweig, M.L., 1981. A theory of habitat selection. Ecology 62 (2): 327–335.

Saikia, K., 2016. On the methodology of feeding ecology in fish. European Journal of Ecology 2 (1): 35–46.

Savage, R.E., 1931. The relation between the feeding of the herring off the east coast of England and the plankton of the surrounding waters. [Great Britain] Fishery Investigations Series 2 (12) Ministry of Agriculture and Fisheries, London, England.

Schlott, K., Bauer, C., Fichtenbauer, M., a kol., 2011. Bedarfsorientierte Fütterung in der Karpfenteichwirtschaft: Das Absetzvolumen von Zooplankton. Schriftenreihe des Bundesamtes fur Wasserwirtschaft, Gebharts, Austria, pp. 35.

Scott, A., 1920. Food of Port Erin Mackerel in 1919. In: Proceedings and Transactions of the Liverpool Biological Society 34: 107–111.

Smock, L.A., 1980. Relationships between body size and biomass of aquatic insects. Freshwater Biology 10 (4): 375–383.

Snorrason, S. S., Skúlason, S., 2004. Adaptive Speciation in Northern Freshwater Fishes. In: Dieckmann, U., Doebeli, M., Metz, J.A.J., Tautz, D. (Eds), Adaptive Speciation. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 210–228.

Sousa, L.L., Raquel, X., Costa, V., Humphries, N.E., Trueman, C., Rosa, R., Sims, D.W., Queiroz, N., 2016. DNA barcoding identifies a cosmopolitan diet in the ocean sunfish. Scientific Reports 6: 28762.

Sprague, C.R., Beckman, L.G., Duke, S.D., 1993. Prey selection by juvenile white sturgeon in reservoirs of the Columbia River. Status and habitat requirements of the white sturgeon populations in the Columbia River downstream from McNary Dam 2: 229–243.

Stergiou, K.I., Karpouzi, V.S., 2002. Feeding habits and trophic levels of Mediterranean fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries 11 (3): 217–254.

Stock B.C., Jackson, A.L., Ward, E.J., Parnell, A.C., Phillips, D.L., Semmens, B.X., 2018. Analyzing mixing systems using a new generation of Bayesian tracer mixing models. PeerJ 6: e5096.

Stoffels, R.J., Karbe, S., Paterson, R.A., 2003. Length-mass models for some common New Zealand littoral-benthic macroinvertebrates, with a note on within-taxon variability in parameter values among published models. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 37 (2): 449–460.

Stoner, A.W., 2004. Effects of environmental variables on fish feeding ecology: implications for the performance of baited fishing gear and stock assessment. Journal of Fish Biology 65 (6): 1445–1471.

Strauss, R.E., 1979. Reliability estimates for Ivlev's electivity index, the forage ratio, and a proposed linear index of food selection. Transactions of the American Fisheries Society 108 (4): 344–352.

Sutela, T., Huusko, A., 2000. Varying resistance of zooplankton prey to digestion: implications for quantifying larval fish diets. Transactions of the American Fisheries Society 129 (2): 545–551.

Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, S., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J., 2007. Nemoci sladkovodních ryb. Informatorium, Praha, 246 s.

Števove, B., Kováč, V., 2016. Ontogenetic variations in the diet of two invasive gobies, *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) and *Ponticola kessleri* (Günther, 1861), from the middle Danube (Slovakia) with notice on their potential impact on benthic invertebrate communities. Science of the Total Environment 557: 510–519.

Taguchi, T., Miura, Y., Krueger, D., Sugiura, S., 2014. Utilizing stomach content and faecal DNA analysis techniques to assess the feeding behaviour of largemouth bass *Micropterus salmoides* and bluegill *Lepomis macrochirus*. Journal of Fish Biology 84 (5): 1721–1288.

Talbot, C., 1985. Laboratory Methods in Fish Feeding and Nutritional Studies. In: Tytler, P., Calow, P. (Eds), Fish Energetics: New Perspectives, Croom-Helm, London, UK, pp. 125–154.

Teletchea, F., 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. Reviews in Fish Biology and Fisheries 19 (3): 265–293.

Tokeshi, M., 1991. Graphical analysis of predator feeding strategy and prey importance. Freshwater Forum 1: 179–183.

Tokeshi, M., Daud, J.R.P., 2011. Assessing feeding electivity in *Acanthaster planci*: a null model analysis. Coral Reefs 30 (1): 227–235.

Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M.A., Bellemain, E.V.A., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., Wincker, P., Swenson, J.E., Taberlet, P., 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. Molecular Ecology Resources 9 (1): 51–60.

Vanderploeg, H.A., Scavia, D., 1979a. Calculation and use of selectivity coefficients of feeding: zooplankton grazing. Ecological Modelling 7 (2): 135–149.

Vanderploeg, H.A., Scavia, D., 1979b. Two electivity indices for feeding with special reference to zooplankton grazing. Journal of the Fisheries Board of Canada 36 (4): 362–365.

Vašek, M., Eloranta, A.P., Vejříková, I., Blabolil, P., Říha, M., Jůza, T., Šmejkal, M., Matěna, J., Kubečka, J., Peterka, J., 2018. Stable isotopes and gut contents indicate differential resource use by coexisting asp (*Leuciscus aspius*) and pikeperch (*Sander lucioperca*). Ecology of Freshwater Fish, 27: 1054–1065.

Vejřík, L., Vejříková, I., Blabolil, P., Eloranta, A.P., Kočvara, L., Peterka, J., Sajdlová, Z., Chung, S.H.T., Šmejkal, M., Kiljunen, M., Čech M., 2017. European catfish as a freshwater apex predator drives ecosystem via its diet adaptability. Scientific Reports 7: 15970.

Vinson, M.R., Hawkins, C.P., 1996. Effects of sampling area and subsampling procedure on comparisons of taxa richness among streams. Journal of the North American Benthological Society 15 (3): 392–399.

Von Schiller, D., Solimini, A.G., 2005. Differential effects of preservation on the estimation of biomass of two common mayfly species. Archiv für Hydrobiologie 164 (3): 325–334.

Waters, D.S., Kwak, T.J., Arnott, J.B., Pine III, W.E., 2004. Evaluation of stomach tubes and gastric lavage for sampling diets from blue catfish and flathead catfish. North American Journal of Fisheries Management 24 (1): 258–261.

Wenzel, F., Meyer, E., Schwoerbel, J., 1990. Morphometry and biomass determination of dominant mayfly larvae (Ephemeroptera) in running waters. Archiv für Hydrobiologie 118 (1): 31–46.

Wetzel, M.A., Leuchs, H., Koop, J.H., 2005. Preservation effects on wet weight, dry weight, and ash-free dry weight biomass estimates of four common estuarine macro-invertebrates: no difference between ethanol and formalin. Helgoland Marine Research 59 (3): 206–213.

Wilson, E.E., Wolkovich, E.M., 2011. Scavenging: how carnivores and carrion structure communities. Trends in Ecology and Evolution 26 (3): 129–135.

Wootton, R., 2012. Ecology of Teleost Fishes (Vol. 1). Springer Science & Business Media.

Zacharia, P.U., Abdurahiman, K.P., 2004. Methods of stomach content analysis of fishes. Winter School on Towards Ecosystem Based Management of Marine Fisheries - Building Mass Balance Trophic and Simulation Models: 148–158.

Zákon ČNR 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.

Zapletal, T., Andreas, M., Adámek, Z., Špaček, J., Mikl, L., Mareš, J., 2019. Endangered aquatic macrophytes in the diet of rudd (*Scardinius erythrophthalmus*). Folia Zoologica 68 (1): 1–8.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Adámek, Z., Obrdlík, P., 1977. Food of important cyprinid species in the warmed barb zone of the Oslava river. Folia Zoologica 26 (2): 171–182.

Adámek, Z., Sanh, T.D., 1981. The food of grass carp fry (*Ctenopharyngodon idella*) in southern Moravian fingerling ponds. Folia Zoologica 30 (3): 263–270.

Adámek, Z., Spittler, P., 1984. Particle size selection in the food of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*. Folia Zoologica 33 (4): 363–370.

Adámek, Z., Jirásek, J., Pravda, D., Sukop, I., Heteša, J., Provázek, R., Škrabánek, A., 1985. Potravní biologie a biologická hodnota plotice obecné (*Rutilus rutilus*) v Mušovské zdrži. Živočišná výroba 30 (10): 901–910.

Adámek, Z., Jirásek, J., Příhoda, J., Sukop, I., Halama, M., 1985. Potrava a rast hlavátky v rybničnom chove. Poľovníctvo a rybárstvo 37 (3): 28.

Adámek, Z., Jirásek, J., Sukop, I., 1987. Potravní biologie hospodářsky významných druhů ryb Dalešické nádrže. Živočišná výroba 32 (10): 909–920.

Adámek, Z., Kubec, V., Sukop, I., 1988. Růstová a potravní charakteristika plůdku bolena dravého (*Aspius aspius*) v rybničních podmínkách. Živočišná výroba 33 (10): 907–915.

Adámek, Z., Fašaič, K., Debeljak, L., 1990. Lower temperature limits of plant food intake in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.). Ichthyologia 22 (1): 1–8.

Adámek, Z., Baruš, V., Prokeš, M., 1996. Summer diet of roach (*Rutilus rutilus*) infested by *Ligula intestinalis* (Cestoda) plerocercoids in the Dalešice reservoir (Czech Republic). Folia Zoologica 45 (4): 347–354.

Adámek, Z., Horecká, M., Fašaić, K., 1996. Food relationships among young tench (*Tinca tinca* L.), grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) in polycultures. Ichthyos 13 (1): 50–61.

Adámek, Z., Siddiqui, M.A., 1997. Reproduction parameters in a natural population of topmouth gudgeon, *Pseudorasbora parva*, and its condition and food characteristics with respect to sex dissimilarities. Polish Archives of Hydrobiology 44 (1–2): 145–152.

Adámek, Z., Fašaić, K., Siddiqui, M.A., 1999. Prey selectivity in wels (*Silurus glanis*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). Ribarstvo 57 (2): 47–60.

Adámek, Z., Sukop, I., Moreno Rendón, P., Kouřil, J., 2003. Food competition between 2+ tench (*Tinca tinca* L.), common carp (*Cyprinus carpio* L.) and bigmouth buffalo (*Ictiobus cyprinellus* Val.) in pond polyculture. Journal of Applied Ichthyology 19: 165–169.

Adámek, Z., Opačak, A., 2005. Prey selecitivity in pike (*Esox lucius*), zander (*Sander lucioperca*) and perch (*Perca fluviatilis*) under experimental conditions. Biologia (Bratislava) 60 (5): 567–570.

Adámek, Z., Opačak, A., 2006. Výběrovost kořisti štikou obecnou (*Esox lucius*), candátem obecným (*Sander lucioperca*) a okounem říčním (*Perca fluviatilis*) v experimentálních podmínkách. Bulletin VÚRH Vodňany 42 (1): 45–47.

Adámek, Z., Andreji, J., Martín Gallardo, J., 2007. Food habits of four bottom-dwelling gobiid species at the confluence of the Danube and Hron Rivers (South Slovakia). International Review of Hydrobiology 92 (4–5): 554–563.

Adámek, Z., Prokeš, M., Baruš, V., Sukop, I., 2007. Diet and growth of 1+ Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* in alternative pond culture. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science 7: 153–160.

Adámek, Z., Helešic, J., Maršálek, B., Rulík, M., 2010. Aplikovaná hydrobiologie. Fakulta rybářství a ochrany vod FROV JU, Vodňany, 350 s.

Adámek, Z., Jurajda, P., Prášek, V., Sukop, I., 2010. Seasonal diet pattern of non-native tubenose goby (*Proterorhinus semilunaris*) in the lowland reservoir (Mušov, Czech Republic). Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 397: 2.

Adámek, Z., Lepičová, A., Kozák, P., Hamáčková, J., Lepič, P., Bláha, M., 2011. Gut passage time in zooplankton-fed dace (*Leusciscus leuciscus*) larvae under laboratory conditions. In: Curcubet G. (Ed.): Aquaculture in Central and Eastern Europe: Present and Future, Chisinau: 8–12.

Adámek, Z., Maršálek, B., 2013. Bioturbation of sediments by benthic macroinvertebrates and fish and its implication for pond ecosystems: a review. Aquaculture International 21 (1): 1–17.

Adámek, Z., Mrkvová, M., Zukal, J., Roche, K., Mikl, L., Šlapanský, L., Janáč, M., Jurajda, P., 2016. Environmental quality and natural food performance at feeding sites in a carp (*Cyprinus carpio*) pond. Aquaculture International 24 (6): 1591–1606.

Adámková, I., Adámek, Z., Šútovský, I., 2000. Early feeding of new artificially propagated fish: weather loach, *Misgurnus fossilis*, larvae. Krmiva (Zagreb) 42 (2): 65–70.

Anton-Pardo, M., Hlaváč, D., Másílko, J., Hartman, P., Adámek, Z., 2014. Natural diet of mirror and scaly carp (*Cyprinus carpio*) phenotypes in earth ponds. Folia Zoologica 63 (4): 229–237.

Debeljak, L., Adámek, Z., Fašaič, K., Jirásek, J., 1993. Natural food of carp fry under conditions of intensive fertilizing. Ichthyos 10 (12): 35–44.

Gavel, A., Maršálek, B., Adámek, Z., 2004. Viability of *Microcystis* colonies is not damaged by silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) digestion. Algological Studies 153: 189–194.

Jančula, D., Mikovcová, M., Adámek, Z., Maršálek, B., 2008. Changes in photosynthetic activity of *Microcystis* colonies after gut passage through Nile tilapia (O*reochromis niloticus*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Aquaculture Research 39: 311–314.

Jurajda, P., Adámek, Z., Roche, K., Mrkvová, M., Štarhová, D., Prášek, V., Zukal, J., 2016. Carp feeding activity and habitat utilisation in relation to supplementary feeding in a semi-intensive aquaculture pond. Aquaculture International 24 (6): 1627–1640.

Manko, P., 2016. Stomach Content Analysis in Freshwater Fish Feeding Ecology. Vydavateľstvo Prešovskej Univerzity, Prešov, 116 s.

Koščo, J., Košuth, P., Košuthová, I., Manko, P., Straka, M., Andreji, J., Stráňai, I., 2006. Príspevok k poznaniu ekológie inváznych druhov rodu *Neogobius* v slovenskom úseku Dunaja. IX. Česká ichtyologická konference, Vodňany: 51–55.

Koščo, J., Manko, P., Miklisová, D., Košuthová, L., 2008. Feeding ecology of invasive *Perccottus glenii* (Perciformes, Odontobutidae) in Slovakia. Czech Journal of Animal Science 53 (11): 479–486.

Martyniak, A., Jerzyk, M.S., Adámek, Z., 1987. The food of bream (*Abramis brama*) in the Pierzchaly reservoir (Poland). Folia Zoologica 36 (3): 273–280.

Martyniak, A., Girtler, K., Adámek, Z., 1991. Food biology of roach (*Rutilus rutilus*) in the Pierzchaly reservoir (Poland). Folia Zoologica 40 (4): 377–384.

Mikl, L., Adámek, Z., Všetičková, L., Janáč, M., Roche, K., Šlapanský, L., Jurajda, P., 2016. Response of benthic macroinvertebrate assemblages to round (*Neogobius melanostomus*, Pallas 1814) and tubenose (*Proterorhinus semilunaris*, Heckel 1837) goby predation pressure. Hydrobiologia 785 (1): 219–232.

Mikl, L., Adámek, Z., Roche, K., Všetičková, L., Šlapanský, L., Jurajda, P., 2017. Invasive Ponto-Caspian gobies in the diet of piscivorous fish in a European lowland river. Fundamental and Applied Limnology 190 (2): 157–171.

Musil, J., Adámek, Z., 2003. Predační tlak okouna říčního (*Perca fluviatilis*) na střevličku východní (*Pseudorasbora parva*) v modelových rybničních podmínkách. Bulletin VÚRH Vodňany 39 (1–2): 75–81.

Musil, J., Adámek, Z., 2007. Piscivorous fishes diet dominated by the Asian cyprinid invader, topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*). Biologia (Bratislava) 64 (4): 488-490.

Musil, J., Adámek, Z., 2007. Asijský cyprinid, střevlička východní (*Pseudorasbora parva*) dominovala v potravě dravých ryb. Bulletin VÚRH Vodňany 43 (1): 47–54.

Polačik, M., Janáč, M., Jurajda, P., Adámek, Z., Ondračková, M., Trichkova, T., Vasilev, M., 2009. Invasive gobies in the Danube: invasion success facilitated by availability and selection of superior food resources. Ecology of Freshwater Fish 18 (4): 640–649.

Roche, K., Adámek, Z., Jurajda, P., 2018. Utilisation of natural food resources by carp in fish ponds. In: Rahman M.M., Balcombe S.R. (Eds): *Cyprinus carpio*. Biological Features, Ecology and Diseases and Control Measures, Nova Science Publishers, New York, p. 65 – 101.

Sukop, I., Heteša, J., Adámek, Z., Mareš, J., 1989. Analýza potravního spektra jednoletých ryb v polykulturních obsádkách kapra s býložravými rybami při různé intenzitě výroby. Živočišná výroba 34 (10): 889–898.

Sukop, I., Adámek, Z., 1995. Food biology of one-, two- and three-year-old tench in polycultures with carp and herbivorous fish. Polish Archives of Hydrobiology 42 (1–2): 9–18.

Šetlíková, I., Adámek, Z., 2004. Feeding selectivity and growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed on temperate-zone aquatic macrophytes. Czech Journal of Animal Science 49 (6): 271–278.

Všetičková, L., Mikl, L., Adámek, Z., Prášek, V., Roche, K., Jurajda, P., 2018. The diet of reservoir perch before, during and after establishment of non-native tubenose goby. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 419: 4.

Zapletal, T., Adámek, Z., Jurajda, P., Roche, K., Všetičková, L., Mareš, J., 2016. Consumption of plant material by perch (*Perca fluviatilis*). Folia Zoologica 65 (2): 95–97.

Zapletal, T., Andreas, M., Adámek, Z., Špaček, J., Mikl, L., Mareš, J., 2019. Endangered aquatic macrophytes in the diet of rudd (*Scardinius erythrophthalmus*). Folia Zoologica 68 (1): 1–8.

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumných projektů na rozvoj výzkumné organizace č. QK1810296 Využití alternativních komponent a inovativních postupů ve výživě ryb) – 90 %,

INTERREG V-A Rakousko – ČR (KPF-01-016 Posilování spolupráce mezi JU a Verein für Fisch- und Gewässerökologie) – 10 %.

Externí odborný oponent

prof. Dr. Ing. Jan Mareš

Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Oddělení rybářství a hydrobiologie, Zemědělská 1, 613 00 Brno www.is.mendelu.cz

Interní odborný oponent

Ing. Martin Bláha, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany www.frov.jcu.cz

Oponent za státní správu

Ing. Petr Chalupa, Ph.D., Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. 42599/2019

vydalo Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 65/17, Praha 1, 110 00

Adresa autorského kolektivu

doc. Mgr. Petr Manko, Ph.D. (peter.manko@unipo.sk) – 50 %

Prešovská univerzita v Prešove, Fakulta humanitných a prírodných vied, Katedra ekológie, Ul. 17 novembra č. 1, 081 16 Prešov, Slovensko https://www.unipo.sk

doc. RNDr. Zdeněk Adámek, CSc. (zadamek@frov.jcu.cz) – 50 %

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany www.frov.jcu.cz

V edici Metodik (technologická řada)
vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Fakulta rybářství a ochrany vod,
Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz;
odborný editor: Ing. Antonín Kouba, Ph.D.,
redakce: MVDr. Jitka Kolářová, Zuzana Dvořáková;
náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2019;
vytištěna v roce 2019;
grafický design a technická realizace: Petr Brázda

ISBN 978-80-7514-096-8