

Effect of food quantity and quality on population growth rate and digestive activity in planktonic rotifers

Doktorská disertační práce předložená studentkou doktorského studijního programu Hydrobiologie akreditovaného na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích Mgr. Martinou Štrojsovou je koncipována v souladu s ustanovením § 47 zák. č. 111/1989 Sb. a článku 42 Studijního a zkušebního řádu Jihočeské univerzity jako komentovaný soubor pěti publikací, a to dvou již publikovaných prací, jedné již přijaté do tisku a dvou rukopisů nalézajících se v době předložení disertace v recenzním řízení ve dvou časopisech, v nichž byly přijaty a publikovány předchozí práce autorky zařazené do disertace. U všech pěti prací je studentka prvou autorkou, dalšími spoluautory jsou její školitel a buď další konzultanti z období jejího doktorského studia nebo spolupracovníci z institucí, ve kterých absolvovala své zahraniční stáže.

Všechny zařazené práce jsou psány v angličtině a uveřejněny nebo posuzovány pro uveřejnění v předních mezinárodních časopisech oboru. Spolu s osmi stranami úvodního komentáře a třemi stranami závěrečné kapitoly (vše rovněž v angličtině) má disertace celkem 65 tiskových stran ve formátu odpovídajícím příslušným třem mezinárodním časopisům.

Úvodní komentář nejprve popisuje specifika vířníků jako periodicky významné skupiny sladkovodních planktonů a okolnosti průběhu jejich trávení, jakož i dva přístupy použité ke studiu funkce hydrolytických enzymů působících při trávení vířníků. Autorka ke zkoumaným jevům a procesům přistupuje s přihlédnutím k současným představám o významu stechiometrických poměrů prvků v potravě a v ekosystému a limitace výživy organismů těmito skutečnostmi.

Těžištěm první úvodní kapitoly jsou odstavce uvádějící cíle předkládané disertace, tedy cíle a smysl série publikací do disertace zařazených a jejich vzájemnou návaznost. Zatímco první tři práce již publikované využívají techniku zviditelnění orgánů vykazujících enzymatickou aktivitu v epifluorescenčním mikroskopu metodou Fluorescently Labelled Enzyme Activity, čtvrtá práce se vyrovnává s možným podílem nárostových bakterií s povrchu vířníků na pozorované enzymatické aktivitě. Poslední zařazená práce hodnotí důsledky příjmu různého množství potravy a s různým obsahem N a P na některé populační charakteristiky jednoho druhu vířníků. Celý soubor prací vytváří celek s jednotící ideou studia výživy vířníků, fungování jejich trávicích procesů a dopadu jednotlivých situací daných stechiometrickými poměry hlavních prvků v potravě na rozvoj populací vířníků. Současně se ve všech uplatňuje k řešení alespoň části otázek stejný metodický přístup.

Poslední zařazená práce (rukopis v recenzním řízení) je využitím postupů ověřených v prvních třech publikacích k řešení otázek s přímým ekologickým dopadem, totiž důsledků výživy řasami s bohatým obsahem N a P nebo s nedostatkem jednoho z těchto elementů. Zavedená metodika vyhodnocení fosfatázové aktivity umožnila posoudit, jak vířníci reagují na potravu se sníženým obsahem živin.

K metodice experimentů zařazených do této práce bych se chtěl ujistit, zda je správná představa plynoucí z prvního odstavce kapitoly Materials and Methods této práce a následně části Experiments with different food quantity and quality této kapitoly, že totiž kultury *Brachionus plicatilis* byly udržovány vždy až do příslušného experimentu v nydbytku potravy a teprve pro vlastní pokus byla nastavena příslušná potravní hladina.

Směřuji tím k vyslovení následující poznámky: všechny v disertaci zařazené práce sice experimentují s organismy s relativně krátkou generační dobou, nicméně po dobu řádově stejně krátkého rozsahu. V jistém smyslu to platí i pro metodické přístupy propracovávané v prvních třech pracích. Nic to nemění na závěrech takto získaných a tedy ani nesnižuje jejich význam. Jen by stálo za úvahu, zda by nebylo vhodné vyhodnocovat např. růstové parametry u paralelních populací držených předem alespoň po tři až pět generací za posuzovaných podmínek (potrava různé kvality a kvantity) nebo při ověřování fluorescenčních technik nezávisle na prováděných měřeních také posoudit stav vířníků exponovaných třeba substrátu MUFP po dalších několika dnech jejich života a zpětně vyvodit, zda ani krátkodobá expozice vířníky nějak neovlivňuje.

Je mi zřejmé, že to jsou případně spíše náměty pro další studie, ale zmínka o podobných úvahách by možná nemusela chybět v poslední, sedmé kapitole disertace. Ta se totiž omezuje jen na velice stručné celkové závěry, zatímco daleko více by jí slušela jakási generální diskuse, která by celý soubor jistě hodnotných výsledků doktorandky jednak zařadila úplněji do kontextu současného stavu problematiky a jednak, a to zejména, naznačila, jak doktorandka vidí další otázky plynoucí z její práce.

K souboru všech pěti publikací mám ještě jednu administrativní poznámku: ačkoliv doktorandka je ve všech případech prvou autorkou prací (v pořadí nikoliv abecedním) a lze tedy předpokládat její hlavní podíl na výsledcích, ani ve vlastním disertačním spise ani v příloženém autoreferátu (Summary of Ph.D. Thesis) jsem nenalezl prohlášení spoluautorů o podílu doktorandky ani její vlastní výrok v podobném smyslu.

Předložený soubor publikací, na kterých doktorandka participuje a které zařadila do své disertace, obsahuje mimo jiné tři publikace prošlé recenzním řízením a již uveřejněné mezinárodními vědeckými časopisy a tím splňuje požadavky, které pro disertační práci studenta doktorského studijního programu stanoví zákon č. 111/1998 Sb., Studijní a zkušební řád JU a Opatření děkana Přírodovědecké fakulty JU číslo D 19. Proto doporučuji, aby disertační práce Mgr. Martiny Štrojsové Effect of food quantity and quality on population growth rate and digestive activity in planktonic rotifers byla přijata k obhajobě a po úspěšném obhájení jako podklad ke splnění požadavků státní závěrečné zkoušky doktorského studia.

V Českých Budějovicích 17.10.2008.



Prof. RNDr. Zdeněk Brandl

Posudek

na disertační práci Marty Štrojsové

Effect of food quantity and quality on population growth rate and digestive activity in planktonic rotifers

(Jihočeská Univerzita, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice 2008, 65 p.)

Disertační práce je založena na pěti originálních vědeckých publikacích. Dvě z nich vyšly v letech 2005 a 2007, jedna je v tisku a dvě byly nabídnuty k publikaci. Periodika, v nichž články vyšly nebo vyjdou jsou vesměs impaktové a v oboru hydrobiologie renomované časopisy. Martina Štrojsová je ve všech těchto publikacích prvním autorem dvou až čtyřčlenného autorského kolektivu.

Prvá kapitola disertace obsahuje úvod do problematiky, krátkou charakteristiku zaměření jednotlivých publikací a souhrn všech získaných výsledků. Kapitoly 2 – 6 obsahují přetištěné publikace. Sedmá kapitola vytyčuje ve třech odstavcích obecné závěry.

Vířníci jsou sladkovodní mnohobuněčné (správněji: mnohojaderné) organismy mikroskopické velikosti, které se mohou vyskytovat, zejména v planktonu, ve vysokých počtech. V takovém případě mají značný význam pro koloběh biogenních prvků ve sladkých vodách. V porovnání s většími zooplanktony jsou to r-specialisté, vyznačující se v případě dostatku vhodné potravy vysokou reprodukční rychlostí. Reprodukční rychlost může však být limitována buď celkovým nedostatkem potravy, anebo některým biogenním prvkem, který je nedostatkový vzhledem k stechiometrii biomasy produkovaného potomstva. Předložená práce je zaměřena na lokalizaci působení trávicích enzymů a na studium mechanismů, jakými vířníci modifikují proces trávení s výsledkem minimalizace nepříznivých efektů suboptimálního množství nebo složení potravy.

Na tyto úkoly se kandidátka velmi dobře metodicky připravila. Musela zvládnout metodiku fluorescenčního značení enzymové aktivity, jakož i metodiku fluorescenčního stanovení celkové aktivity v homogenátech. Dále metodiku kultivace vířníků, včetně axenické. Jako doplňkové metody použila SEM k přesné lokalizaci výskytu bakterií na povrchu vířníků.

Prvá a druhá předložená publikace se zabývá lokalizací tří trávicích enzymů uvnitř a na povrchu vířníků z eutrofní nádrže (prvá práce) a laboratorních kultur (druhá práce). Studované tři enzymy byly běžně nacházeny v oblasti trávicího traktu. Překvapením bylo zjištění poměrně časté lokalizace aktivity dvou enzymů (fosfatáza, acetyhexosaminidáza) v oblasti vířivého orgánu, kterou autoři předběžně vysvětlovali přítomností požíraných bakterií.

Moje poznámky:

- (i) Absence indikovaných enzymů uvnitř těla druhu *Ascomorpha ecaudis* (Štrojsová & Vrba 2005, Fig. 1Z), je zřejmě jen zdánlivá a lze ji vysvětlit způsobem trávení tohoto druhu. K trávení potravy dochází uvnitř vakuol trávicího syncytia, které nemá žádnou dutinu komunikující z vnějším prostředím, takže rozpustné fluorogenní substráty nemohou do těchto vakuol proniknout.
- (ii) Je zajímavé jak málo aktivity bylo zjištěno v oblasti mastaxu, ačkoliv právě na mastaxu sedí trávicí „slinné“ žlázy. Snad se to dá vysvětlit tím, že dutina mastaxu je velmi malá, takže ani potrava, ani sekrety slinných žláz se v mastaxu nezdržují.

Třetí publikace je zaměřena na vliv stechiometrie potravy na růst, reprodukci a trávicí aktivitu druhu *Brachionus calyciflorus*. Nejvíce mě zaujalo zjištění, že populační růstová

rychlost byla vždy negativní v případě potravy deficientní fosforem, a to i podmínkách vysoké koncentrace potravy. To znamená, že vířníci nebyli schopni čerpat dostatek fosforu nejen v podmínkách blízkých hladovění, ale i v podmínkách hojnosti. Snad tady mohl mít vliv druh podávané potravy. *Chlorella kessleri* má odolnou buněčnou stěnu. Zvýšením ingesce se zkrátí doba pasáže potravy trávicí trubici a část potravy patrně prochází více méně intaktní. Bylo by zajímavé provést obdobný pokus s P – deficientní kulturou druhu, který nemá celulózni stěnu, takže je lépe stravitelný (*Rhodomonas minuta*, *Stephanodiscus* nebo jiná drobná rozsivka). Lze hypotetizovat, že v takovém případě budou vířníci saturovat svou potřebu fosforu zvýšením ingesce. Nicméně, i situace podobná té, jež byla realizována v experimentu, se v přírodě může vyskytovat. Např. *Monoraphidium* převažující na Plešném jezeře je zřejmě P- deficientní a přitom jeho buněčná stěna je velmi odolná. Snad by to mohlo být příčinou, proč se v současnosti daňím na Plešném jezeře nedaří.

Čtvrtá předložená práce je krátké sdělení, které řeší elegantním způsobem otázku, zda příčinou aktivity enzymů v oblasti vířivého orgánu jsou bakterie. Ačkoliv zkoumaní vířníci (*Brachionus calyciflorus*) vykazovali enzymatickou aktivitu v oblasti vířivého orgánu, žádné bakterie tam metodou SEM nalezeny nebyly. Zjištěné enzymy jsou zřejmě produkovány v hypodermis pod vířivým orgánem.

Moje poznámky

- (i) Smysl vylučování enzymů mezi brvy vířivého orgánu zůstává přesto záhadou.
- (ii) Bakterie podobné těm, jaké rostly na povrchu krunýře *Brachionus calyciflorus* (obr. 1C citované práce), jsme s P. Juračkou běžně nacházeli na SEM snímcích povrchu těla buchaneček rodu *Cyclops*. Zdá se, že je to u zooplanktonu běžný jev.

Pátá předložená práce se zabývá vlivem stechiometrie potravy na na růst, rozmnožování a trávicí aktivitu druhu *Brachionus plicatilis* v axenické kultuře.

ZÁVĚR

Výzkumy prezentované v předložené disertaci významně přispívají k porozumění toho, jak populace planktonních vířníků reagují na změny v množství a kvalitě (ve smyslu poměrného zastoupení biogenních prvků) dostupné potravy. Doporučuji proto komisi, aby tuto disertaci přijala jako práci doktorskou.

V Praze, dne 21. října 2008



RNDr. Jan Fott, CSc.

Oponentský posudek na doktorandskou práci Martiny Štrojsové

Celkové posouzení

Obsahem předložené disertační práce Martiny Štrojsové je výzkum ekofyziologie příjmu potravy a reakcí zkoumaných plantkonních organismů na různou nutriční kvalitu dostupné potravy. Tato oblast bádání rozhodně patří v současné době mezi velmi aktuální a progresivní směry v rámci biologie vodních organismů. Autorka se zaměřila ve své práci na vířníky, o kterých bylo zatím na toto téma publikováno poměrně málo a získané výsledky jsou tudíž velmi cenné. K vyhotovení studie bylo použito celé řady moderních metod, část disertace byla vypracována mimo domovský ústav a ve spolupráci se zahraničními kolegy. Disertační práce má formu pěti rukopisů, z nichž tři jsou již publikované a u všech je Martina Štrojsová první autorkou; práce je doplněna úvodní a závěrečnou kapitolou. Celkově velmi dobrý dojem poněkud snižuje skutečnost, že je bohužel poznat, které části práce již prošly recenzním řízením a které ne. V dosud nepublikovaných kapitolách působí text místy nejasně a je jen škoda, že patrně nezbyl čas na dotazování kontroly a korekci (včetně jazykové), nicméně nejedná se v žádném případě o chyby zásadní.

Komentáře k jednotlivým kapitolám

Chapter 1

Poněkud nelogické mi přijde umístění souhrnných výsledků na závěr kapitoly úvod – souhrn (summary) se obvykle uvádí v samostatné kapitole mezi poděkováním a úvodem. Dále, rozčlenění podle témat s náležitými podtitulky, podobně jako je první část úvodu, by velmi zpřehlednilo orientaci v textu.

Chapter 2

Tato kapitola shrnuje výsledky přímé detekce třech typů trávicích enzymů na vířnicích čerstvě přivezených z terénu a jak autorka sama uvádí, jde v tomto ohledu o první publikovanou studii. I přes místy značnou variabilitu a nejednoznačnost interpretace výsledků jsou získaná data velmi cennou dokumentací fyziologie trávení vířníků přímo v přírodních populacích.

K dané práci mám několik dotazů a připomínek: 1) Proč byly vybrány právě tyto tři skupiny enzymů?; 2) Při inkubaci byla použita teplota *in situ*, která se ve zkoumaném období od března do listopadu jistě značně lišila. Ve výsledcích a v diskusi však není o možném vlivu teploty na získaná data ani zmínky přesto, že v úvodu je citováno několik studií o vlivu teploty na funkci hydrolytických enzymů. To samé platí pro potenciální efekt pH, které se během manipulace s vířníky mohlo měnit a ovlivnit určitým způsobem výsledky. Je známo něco o tom, jaký je rozsah teplot a pH, při kterých jsou zkoumané enzymy nejvíce aktivní?; 3) Na základě čeho byly očekávány sezónní změny v expresi enzymů? Je něco takového známo u jiných skupin organismů?; 4) Ohledně autofluorescence chlorofylu u dravých vířníků rodu *Asplanchna* – nejednalo se spíš chlorofyl přítomný v těle herbivorních vířníků, kteří byli *Asplanchnou* sežráni?. Dále mne poněkud zarazilo, jakto že je součástí disertace článek, který byl evidentně

vypracován před zahájením doktorandského studia (pokud se nemýlím jako magisterská práce studentky)?

Chapter 3

V této části práce se autorka ve spolupráci se školitelem zaměřila na rozvinutí a optimalizaci metody přímého značení trávicích enzymů v laboratorních podmínkách a vyjasnění některých sporných bodů z předchozí terénní studie. V experimentech byly použity čtyři různé druhy vířníků. Počty prohlédnutých jedinců se však u jednotlivých druhů lišily řádově, tudíž je podle mého názoru vzhledem k přirozené variabilitě, která klesá s vyšším n poněkud obtížné z dosažených výsledků činit závěry ohledně rozdílné potravní biologie. Na základě čeho byly pro tyto experimenty vybrány použité druhy vířníků? Za další, zatímco u vířníků z terénu nebyla pozorována aktivita enzymů na lorice a epidermis, u těchto laboratorních chovů byla – jaké je pro to vysvětlení?

Chapter 4

Vyvinutá metoda přímého značení trávicích enzymů byla dále aplikována v následující laboratorní studii o vlivu různé kvality potravy na růst a reprodukci vířníka druhu *Brachionus calyciflorus*. Její použití vedlo k získání dříve nepublikovaného poznatku, že totiž u vířníků (alespoň tohoto druhu) nedochází ke zvýšené aktivitě fosfatáz při nedostatku fosforu v potravě. Autoři práce použili pro vyjádření růstové rychlosti na různých potravních médiích počty individuů, což je rychlé a jednoduché. Nicméně domnívám se, že pro přesnější vyjádření růstu by bylo vhodnější spíše biomasa vyjádřená např. tělesným objemem, podobně jako v práci Jensen & Verschoor (2004). Zajímalo by mne, jestli byla u různých treatmentů pozorována různá velikost vířníků. Pokud vířníci za určitých okolností investují více do individuálního růstu než do reprodukce (či naopak), jako například perloočky, pak je obtížné s jinými autory porovnávat výsledky růstové rychlosti v krátkém časovém horizontu získané odlišnou metodikou.

Chapter 5

Pátá kapitola poskytuje vysvětlení pro moji otázku ke kapitole třetí – totiž proč byla pozorována aktivita enzymů na lorice a epidermis u laboratorně chovaných vířníků, kdežto v terénních vzorcích nebyla. Jde evidentně o artefakt způsobený přítomností bakterie v krmné kultuře řas, který byl odhalen až scanovací elektronovou mikroskopií. Z textu mi není jasné, jak zároveň může být podíl enzymové aktivity bakterií vzhledem k aktivitě vířníků zanedbatelný a významný (Výsledky a diskuse, str. 45). Zařazení této kapitoly by bylo vzhledem k tématu logičtější hned za třetí kapitolu disertace.

Chapter 6

Poslední článek rozvíjí téma růstu a reprodukce vířníků na limitující a nelimitující potravě, se zařazením dusíku a využitím dalších metodických postupů. Svým komplexním přístupem k problému přináší opět nové, dosud nepublikované poznatky. K textu mám následující poznámky: 1) V posledním odstavci úvodu je pořadí testovaných hypotéz opačné než v jakém sledu jsou pak sepsány metodika, výsledky a diskuse.; 2) Při studiu fosfatáz v homogenátu vířníků bylo použito různé pH. Informace proč vlastně a proč byly použity tyto konkrétní hodnoty pH je uvedena až v diskusi, chybí v úvodu.; 3) Experimenty byly prováděny v poměrně teplé vodě (25 °C) a kultura řas

byla pěstována dokonce při teplotě 35 °C, přičemž většinou se používá spíše teploty nižší (18-20 °C). Zajímalo by mne proč byly použité tyto teploty jaký mohl být vliv na výsledky. ; 4) Chybí informace kolik zhruba vířníků bylo použito v jednotlivých treatmentech v experimentech s fosfatázovou aktivitou v homogenátech?; 5) V obrázku č. 1 a 5 se užívá termín "control" pro nutričně saturovanou potravu, nicméně z popisků u obrázků není vůbec zřejmé, co vlastně bylo kontrolou a v textu se to musí hledat. Dále, v tomto kontrolním médiu byla u řady parametrů dvakrát větší variabilita než u nutričně ochuzená média (Fig. 5) – je pro to nějaké vysvětlení?

Chapter 7

Závěrečné shrnutí je poněkud ošizené a velmi stručné, zvláště vzhledem k rozsahu práce. Je škoda, že se autorka nepokusila o zařazení výsledků do širšího kontextu a kritické zhodnocení jejich implikací, včetně diskuse dalších potenciálních směrů výzkumu v této oblasti.

Závěr

Předložená práce rozhodně splňuje požadavky na kvalitu a rozsah doktorandské práce na PřFJU a doporučuji ji proto k přijetí.

Radka Ptáčnicková

Oslo, 20. října 2008

Radka Ptáčnicková