



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

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

Získání a analýza úplného obsahu zažívacího traktu kapra obecného

M. Bláha, P. Blabolil, V. Draštík, T. Jůza,
L. Kajgrová





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

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

Získání a analýza úplného obsahu zažívacího traktu kapra obecného

M. Bláha, P. Blabolil, V. Drašík, T. Jůza, L. Kajgrová

Vodňany, 2024

Obsahová část publikace byla zpracována za finanční podpory následujících projektů:

Výsledky byly získány za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky – projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QK22010177
Optimalizace příkrmování a managementu rybníční akvakultury – 100%.



č. 207

ISBN 978-80-7514-210-8

1.	Cíl metodiky	7
2.	Vlastní popis metodiky	7
2.1.	Úvod	8
2.2.	Příprava ryb před vlastním proplachem zaživacího traktu	10
2.3.	Proplach zaživacího traktu kapra obecného	11
2.4.	Zpracování vzorku v laboratoři	15
2.4.1.	Stanovení objemu potravy a podílu obilí	15
2.4.2.	Mikroskopická analýza	19
2.4.3.	Interpretace získaných údajů	24
3.	Srovnání novosti postupů	25
4.	Popis uplatnění certifikované metodiky	25
5.	Ekonomické aspekty	25
6.	Seznam použité související literatury	26
7.	Seznam publikací, které předcházely metodice	28

1. Cíl metodiky

Tato metodika rozšiřuje 40 let starou metodu proplachu zažívacího traktu kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a vznikla z potřeby analýzy a kvantifikace potravy kapra k lepšímu pochopení jeho vlivu na fungování ekosystému rybníka a dopadu na společenstvo zooplanktonu a makrozoobentosu. Získání úplného obsahu zažívacího traktu živé ryby představuje výzvu, neboť usmrcení ryby či její vystavení přílišnému stresu je nežádoucí. Proto zde popisujeme celý proces získávání obsahu zažívacího traktu kapra, včetně anestezie a následné rekonvalescence před vypuštěním ryby zpět do prostředí. Významným přínosem této metody je popis zpracování vzorku proplachu v laboratoři a detailní vyhodnocení obsahu zažívacího traktu kapra, včetně určení objemu a početnosti jednotlivých potravních složek. Tato metodika umožňuje posoudit vliv kapra na společenstva zooplanktonu a makrozoobentosu a vyhodnotit, do jaké míry kapr přijímá předkládané doplňkové krmivo. Metoda je aplikovatelná i na další kaprovité ryby, které nemají žaludek, a kde je proplach zažívacího traktu jediným možným způsobem získání reprezentativního vzorku aktuální potravy bez nutnosti usmrcení.

2. Vlastní popis metodiky

Ryby určené pro zjišťování obsahu zažívacího traktu jsou nalooveny některou z dostupných odlovných metod (např. zátahem sítí, elektrolovem nebo hodem vrhací sítí). Nalovené ryby mohou být dočasně umístěné v haltýři, aby se předešlo nadměrnému stresu spojenému s přechováváním v kádích či dalších méně vhodných manipulačních zařízeních. Z haltýře jsou jednotliví jedinci přelovováni a jednotlivě či po menších skupinách (2–4 jedinců) umisťováni do vaničky s připraveným roztokem anestetika pro zklidnění. Vlastní proplach je vhodné provádět alespoň ve dvou, lépe ve třech lidech. Jedna osoba drží kapra zabaleného ve vlhké tkanině. Druhá osoba s proplachovací stříkačkou zavádí katetr do ústní dutiny kapra a umisťuje jeho konec těsně za požerákové zuby. Jemným tlakem na stříkačku vtlačuje do zažívacího traktu vodu. Během krátké doby vychází z řitního otvoru trávenina, která je vytlačována vodou. Tuto tráveninu sbírá třetí osoba do připravené odběrné nádoby. V momentě, kdy z řitního otvoru vytéká čistá voda přerušíme vtlačování vody do zažívacího traktu a katetr jemně vytáhneme z dutiny ústní. Po odběru dojde ihned k zakonzervování zachyceného obsahu zažívacího traktu formaldehydem (na výsledný 4% roztok), případně lihem. Kapr je přenesen do vaničky se vzduchováním a čistou vodou s přídavkem manganistanu draselného (KMnO_4), aby se zotavil před vlastním vypuštěním zpět do volného prostředí. Další

zpracování vzorku probíhá již v laboratoři, kde se stanovuje objem získaného obsahu trávicího traktu v odměrném válci a poměr doplňkového krmiva vůči zbytku obsahu zažívacího traktu. Dále se vzorek promývá čistou vodou přes hrubá (2 000 a 1 000 μm) a jemné sítko (100 μm) pro zachycení obilí a jeho zbytků a odplavení jemných anorganických částic, které by ztěžovaly kvalitativní a kvantitativní analýzu vzorku pod mikroskopem. Následná analýza probíhá obdobně jako mikroskopické hodnocení vzorku zooplanktonu. V kádince či baňce s kulatým dnem se z daného objemu vody s obsahem zažívacího traktu, který je rovnoměrně rozptýlen v celém objemu, odebere pipetou podvzorek o objemu 1–2 ml. Ten je přenesen na počítací sklíčko (Sedgewick-Rafterovu komůrku), na němž jsou pod mikroskopem v jednotlivých sektorech determinovány a počítány potravní organismy v potravě kapra. Doporučujeme pod mikroskopem spočítat alespoň dvě až tři sklíčka, aby případně byly zachyceny méně časté druhy v potravě. Následným přepočtem je vyjádřen počet jednotlivých potravních organismů v obsahu proplachu zažívacího traktu kapra.

2.1. Úvod

Kapr obecný patří mezi světově nejvýznamnější sladkovodní akvakulturně chované druhy ryb, s pozicí v první čtveřici a více než 4 miliony tun celosvětové produkce za rok 2020 (FAO, 2022). Stejně tak se jedná o dominantní druh akvakulturní produkce v České republice s podílem přibližně 85 % na celkové produkci ryb (RS ČR, 2024). Veškerá produkce kapra pochází z rybníčního chovu, kde se kapr chová především polointenzivním způsobem. Kapr je tak závislý na přirozené potravě a zároveň je přikrmován s různou intenzitou obilím jakožto nejdostupnějším typem příkrmu (Adámek a kol., 2023).

Rybníční hospodaření je v současnosti vystaveno silnému společenskému tlaku (Roy a kol., 2020b). Na jedné straně veřejnost požaduje zlepšení kvality vody a vodního prostředí jako celku, a na druhé straně je ekonomická stránka celého rybníčního chovu (Adámek a kol., 2023; Lososová a Zdeněk, 2024; Vrba a kol., 2024). Rybníky v naší krajině neplní pouze produkční funkce, ale mají také velmi důležité mimoprodukčních funkce, jako je zadržení vody v krajině, podpora biodiverzity nebo rekreační využití (Kořínek a kol., 1987; Roy a kol., 2020a). Nárůst živinové zátěže ze zemědělství, hnojení či komunální znečištění v rybnících ovšem během posledních dekád významně oslabuje mimoprodukční funkce rybníka (Všetičková a kol., 2012; Francová a kol., 2019; Pechar, 2000). Současné postupy hospodaření na rybnících víceméně kopírují zjištění Šusty (1888, 1898), staré více než 100 let, z dob, kdy byly produkce a prostředí rybníků diametrálně odlišné (Pechar, 1995, 2000; Potužák a kol.,

2007; Kajgrova a kol., 2024). Stále však chybí komplexní informace o dopadu chovu kapra na prostředí rybníka, včetně fyzikálně-chemických parametrů, živinové bilance, společenstva zooplanktonu a makrozoobentosu a dalších. Nedostatek těchto informací brání efektivnímu chovu kapra a řízení rybníčního hospodaření, což je klíčový faktor pro dosažení udržitelnosti v této oblasti (Kajgrova a kol., 2024; Vrba a kol., 2024).

Studium potravy ryb obecně přináší důležité informace o potravní ekologii jednotlivých druhů (Gerking, 2014). Detailní popis složení potravy a potravního chování je základem pro pochopení hlubších vztahů společenstev obývajících různá prostředí, toku energií napříč potravními sítěmi anebo proces adaptace nepůvodních druhů na nové podmínky a míru konkurence s původními druhy (Kajgrová a kol., 2022, 2024; Roy a kol., 2022). V oblasti akvakultury jsou informace o složení potravy chovaných druhů ryb klíčové pro management řízení a kontroly potravních zdrojů směřující ke zvyšování a zefektivňování produkce (Anton-Pardo a kol., 2014; Rahman, 2015; Jaeger and Aubin, 2018; Kajgrová a kol., 2024). Na základě znalostí potravního chování a nutričních nároků chovaných ryb můžeme specifickými hospodářskými zásahy ovlivnit společenstva a populace vybraných skupin organismů směřující ke zlepšení kvality vody, podpoření mimoprodukčních funkcí vodních ploch a zároveň udržení ekonomiky chovu (Roy a kol., 2022, 2023; Kajgrová a kol., 2024; Stanivuk a kol., 2024; Vrba a kol., 2024).

V současné době existuje nepřeberné množství způsobů studia potravy ryb (Manko a Adámek, 2019), od tradičních postupů pracujících s obsahem zažívacího traktu, až po nepřímé metody využívající stabilních izotopů a molekulárních technik (Corse a kol., 2010; Hardy a kol., 2010). Neexistuje pravděpodobně jedna ideální metoda analýzy potravy, a proto je obecně doporučeným pravidlem používat kombinaci několika přístupů, pokud je to možné, aby výsledná informace byla co nejrealističtější (Davis a kol., 2012). Záleží také na účelu, pro který jsou dané informace určeny, a do jaké hloubky studia složení potravy je tedy třeba zacházet.

Původní metoda proplachu zažívacího traktu kapra zavedená Fainou (1983) sloužila především k posouzení využívání přirozené potravy v rybníku s cílem adekvátně reagovat na její stav a začít s případným příkrmováním. Hodnocení probíhalo přímo na břehu rybníka, kde byl obsah střev rozplaven na bílém tácu a vizuálně vyhodnocen podíl přirozené potravy, případně množství obilí, a tudíž ochota přijímat předkládané krmivo.

V současné době, jak již bylo naznačeno na počátku úvodu, čelí rybníční hospodářství s chovem kapra jako dominantním druhem silnému tlaku veřejnosti na zlepšování kvality vody v rybnících (Roy a kol., 2020b). Stále větší důraz je kladen na plnění mimoprodukčních funkcí rybníků, což ovlivňuje

i výzkum v této oblasti, který se zaměřuje na nutriční potřeby kapra a jeho interakce s rybníčním prostředím (Roy a kol., 2022, 2023). Je zřejmé, že přirozená potrava hraje klíčovou roli ve výživě kapra, a správné načasování příkrmování společně s typem předkládaného příkrmu hrají zásadní roli v tom, jak efektivně dokáže kapr využívat energii a živiny obsažené v přirozené potravě tak, aby zároveň nedocházelo k vylučování a zatěžování rybníčního prostředí nadbytečnými živinami z podávaného krmiva (Roy a kol., 2020a, 2022, 2023). V tomto směru je zásadní znalost složení potravy kapra, která přináší informace o typech potravních organismů, jejich nutriční hodnotě a také schopnosti a ochotě kapra přijímat různé typy předkládaných krmiv.

2.2. Příprava ryb před vlastním proplachem zaživacího traktu

Po odlovu ryb, který může probíhat klasickými metodami, jako je hod vrhací sítí, zátah sítí nebo elektrolov, uložíme ryby do připraveného haltýře. Záleží na počtu ryb a jejich velikosti, nicméně uchování v prostorném haltýři, kterým může volně protékat voda je vhodnější než držení v menším objemu vody v kádích.

Podle velikosti ryb, u kterých budeme provádět proplach zaživacího traktu, si připravíme vaničku (pro ryby do váhy dvou kilogramů) či kád (pro těžší a větší ryby) s roztokem anestetika, abychom ryby před vlastním výplachem zaživacího traktu zklidnili. Doporučujeme použít běžně dostupná anestetika v podobě 2-phenoxyethanolu v koncentraci 0,3–0,4 ml.l⁻¹ (Kolářová a kol., 2007), hřebíčkového oleje v dávce 0,07 ml.l⁻¹ nebo přípravku MS222 v dávce 25–100 mg.l⁻¹ (Topic Popovic a kol., 2012). Ovšem v současné době je pro ryby určené ke konzumaci registrován pouze poslední jmenovaný přípravek. Ostatní anestetika může předepsat pouze veterinární lékař jako „magistraliter“, přičemž přebírá veškerou zodpovědnost, a je nutné dodržet maximální ochrannou lhůtu 500denních stupňů. Za dodržení ochranné lhůty odpovídá jak veterinární lékař, tak chovatel. Ryby je vhodné uvést do fáze anestezie, kdy setrvávají v poloze na boku nebo mají pouze velmi malou snahu navracet se do původní pozice ve vodním sloupci (fáze 3a–3b podle Kolářové a kol., 2007). Ryby v anestezii pomalu dýchají, musí být patrný občasný pomalý pohyb skřelí. Překrytí části vaničky s roztokem anestetika tkaninou či víkem sníží míru stresu u ryb, než nastane potřebná fáze anestezie. Anestezovanou rybu následně vyjmeme z vaničky, provedeme změření a zvážení jedince a přistoupíme k vlastnímu proplachu zaživacího traktu. Ryba nikdy nesmí být v kontaktu se suchým prostředím, mírku, váhu i ruce zpracovatelů musí být vždy předem namočený. Jedna osoba omotá rybu mokrou tkaninou, ve které se ryba snáze drží, je doporučeno tkaninou

překrýt i oči ryby. Rybu drží hřbetem nahoru, lehce nakloněnou dozadu. Druhá osoba si připraví stříkačku a provádí vlastní proplach zaživacího traktu ryby.

2.3. Proplach zaživacího traktu kapra obecného

Proces proplachu zaživacího traktu kapra je možné provádět ve dvou lidech, vhodnější je osoba navíc, která drží nádobu, do níž se zachytává vytékající obsah zaživacího traktu, aby se předešlo ztrátám při náhlém pohybu ryby. Pomůcky jsou běžně dostupné v prodejnách zdravotnického materiálu (stříkačka Janett 150 ml s výměnnými nástavci) nebo v prodejnách elektroinstalačního materiálu (hadičky – katetr) s různým průměrem a tvrdostí, podle velikostní a věkové kategorie proplachované ryby (obr. 1). Při použití tvrdších katetrů, doporučujeme zaoblit hranu konce katetru, aby nedošlo k poškození ústní dutiny či jícnu. Zaoblení hrany lze provést opálením zapalovačem či jemným smirkovým papírem. U menších velikostí kapra (do 400 g) lze použít měkké oranžové katetry dodávané přímo se stříkačkou Janett, pro starší, těžší a větší ryby (nad 400 g) je vhodnější použít tvrdší katetr, který snáze proniká za požerákové zuby. Pro kapra v hmotnostním rozmezí 300–500 g použijeme katetr o vnějším průměru 6 mm, pro hmotnosti 500–800 g zavádíme katetr o vnějším průměru 7,6 mm, pro vyšší hmotnosti nad 1 kg jsme použili katetr s vnějším průměrem 9 mm, přičemž nejtěžší ryby, které jsme tímto katetrem proplachovali, vážily 2,2 kg. Pro větší ryby je vhodné použít katetr se silnějším průměrem a z pevnějšího materiálu, aby odolal silnějšímu tlaku požerákových zubů. Avšak i podle doporučení Fainy (1983) nebylo nutné pro kapry těžší dvou kilogramů používat katetry s vnějším průměrem větším než 10 mm. U některých jedinců kapra jsme použili katetr s menším průměrem, než odpovídal dané hmotnostní kategorii. Lépe se s ním pronikalo za požerákové zuby. Z toho vyplývá, že i použití různých průměrů katetrů je pouze informativní, a až praktické zkušenosti ukáží specifickou potřebu a možné odchylky.



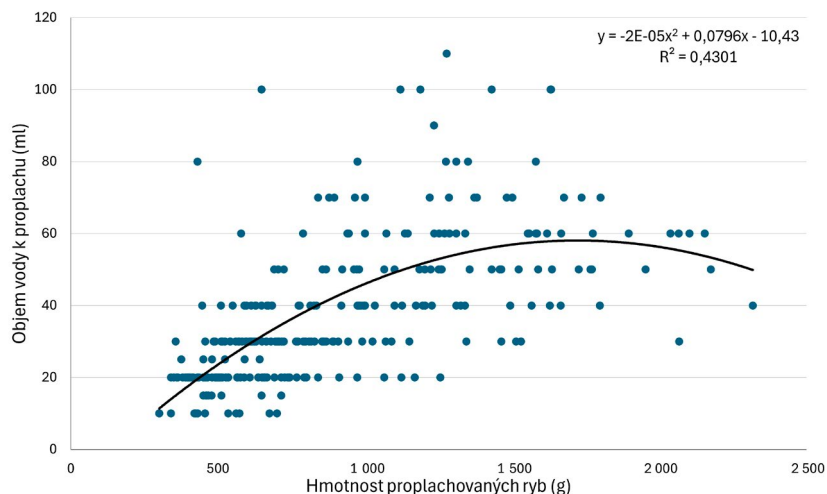
Obr. 1. Stříkačka Janett o objemu 150 ml a sada katetrů použitých při testování této metodiky na kapru obecném. Nálevky různé velikosti pro zachycování vytékajícího obsahu zažívacího traktu kapra (Foto J. Škrabánek).

Při proplachu postupujeme velmi opatrně. Stříkačku Janett s objemem 150 ml naplníme odstátou kohoutkovou vodou, abychom nekontaminovali obsah zažívacího traktu kapra. Připojíme katetr, který též naplníme vodou (vytlačení malého množství ze stříkačky) a postupně jej ústním otvorem kapra zavádíme podél střední podélné osy horního patra, než narazíme na požerákové zuby. V okamžiku, kdy se katetr zarazí o požerákové zuby, měníme způsob pohybu a jemným tlakem pronikáme mezi požerákové zuby a drtící ploténku (obr. 2). Někdy lze proniknout za požerákové zuby velmi snadno, jindy je třeba vyvinout vyšší úsilí. Nesnažíme se však vsunout katetr příliš hluboko do jícnu, mohlo by to vést k jeho poškození. Pokud jsme za požerákovými zuby, jemným tlakem na stříkačku vytlačujeme její obsah do zažívacího traktu. Jak vodu vytlačujeme, osoba, která rybu drží, může cítit přes boky břišní dutiny, jak se střeva plní vodou. Následně vyteče trávenina z řitního otvoru, která je zachycována do připravené nádoby.



Obr. 2. Schématické znázornění proplachu zažívacího traktu kapra se zavedením katetru a zachycením vytékajícího obsahu střeva (Kresba Z. Sajdllová).

V momentě, kdy z řitního otvoru začne vytékat čistá voda, přerušíme vtlačování vody do zažívacího traktu. Pokud i přes zjevné plnění zažívacího traktu vodou nedochází k propláchnutí a z řitního otvoru nevychází trávenina, nedoporučuje se pokračovat v násilném vtlačování vody do střeva kapra. Takový postup by mohl vést k perforaci střeva, což by způsobilo vylití tráveniny do dutiny břišní (popřípadě peritonitidu) a úhyn proplachované ryby. V některých případech může docházet k nahromadění tráveniny, především obilí, ve střevech, což způsobuje blokádu zažívacího traktu. V takovém případě přemístíme rybu do zotavovací vaničky se vzduchováním a manganistanem a pozorujeme její projevy před navrácením do původního prostředí. Během sezóny bylo průměrné množství vody potřebné k propláchnutí potravy kapra 39 ml (obr. 3), objem vody se zvyšoval s velikostí ryby, ale nikdy nebylo nutné aplikovat více než celý objem stříkačky, tj. 150 ml.



Obr. 3. Vztah mezi hmotností ryb a objemem vody nutným k proplachu zaživacího traktu kapra.

V zachyceném obsahu zaživacího traktu můžeme snadno zjistit přítomnost střevních parazitů, jako jsou hlístice (Nematoda) či tasemnice (Cestoda), které díky svému zbarvení, velikosti a způsobu pohybu upozorní na svou přítomnost. Po odběru přistoupíme ihned ke konzervaci zachyceného obsahu zaživacího traktu, který jsme z nádoby převedli s pomocí stříčky s odstátou pitnou vodou do připravené vzorkovací lahve adekvátního objemu. Ke konzervaci vzorku použijeme formaldehyd (na výsledný 4% roztok), abychom zamezili dalšímu rozkladu potravy vedoucímu ke snížení přesnosti dalších kroků v analýze potravy v laboratoři. Je možné konzervovat vzorek i technickým lihem (na výsledný 50% roztok), spotřeba je však vyšší než u formaldehydu.

Pokud se rozhodneme zmrazit nebo zchladit odebraný vzorek tráveniny, je třeba mít na paměti, že v terénu budeme potřebovat vhodné chladičské zařízení, jako je klasický či suchý led, kterým uchováme vzorky do doby jejich zpracování. Dále je důležité zdůraznit, že i při zchlazení dochází ve vzorku tráveniny k rozkladným procesům, které mohou výsledky zkreslit, a proto je třeba tento fakt brát v úvahu při následném vyhodnocování vzorku.

Rybu po proplachu umístíme do další vaničky s připraveným roztokem manganistanu draselného a vzduchováním. Opět doporučujeme vytvoření zástinu ke zklidnění ryby i omezení zahřívání vody slunečním zářením. Zde by mělo dojít k regeneraci po anestezii a rovněž preventivnímu ošetření 1–2% roztokem manganistanu draselného (KMnO_4) před navrácením zpět do vodního prostředí (Kolářová a Svobodová, 2009).

2.4. Zpracování vzorku v laboratoři

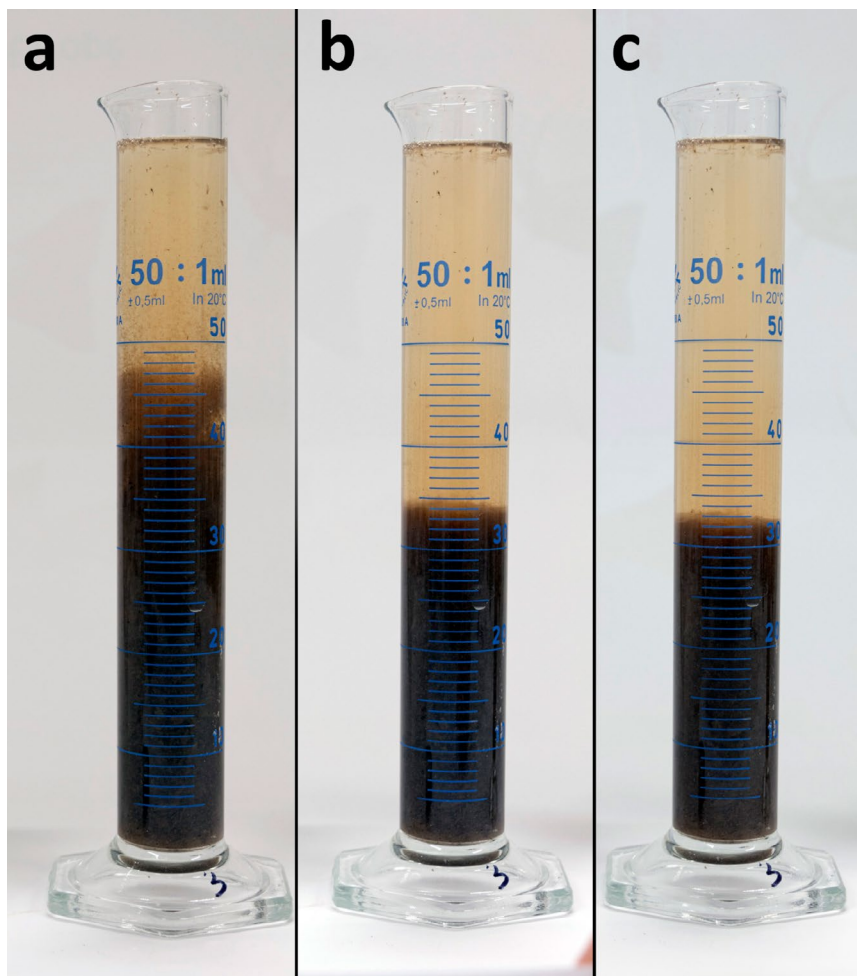
Pokud se rozhodneme použít formaldehyd k fixaci vzorku, doporučuje se následující postup provádět v digestoři nebo ve velmi dobře odvětrávané místnosti. Při dbání zásad bezpečnosti práce v laboratoři a práci s nebezpečnými látkami, nehrozí žádné nebezpečí. V našem případě jsme konzervaci vzorku prováděli formaldehydem.

2.4.1. Stanovení objemu potravy a podílu obilí

Pro stanovení objemu použijeme odměrné válce s adekvátním objemem podle množství obsahu zažívacího traktu kapra. V našem případě a pro práci s potravou kapra o hmotnosti 300–2 100 g byly dostačující válce s objemem od 25 do 50 ml (obr. 4). Objem válce je však možné přizpůsobit objemu vzorku proplachu zažívacího traktu podle druhu ryby a její velikosti. Obsah zažívacího traktu ze vzorkovnice převedeme do odměrného válce. Pomůžeme si stříčkou s kohoutkovou vodou, kterou zbytky potravy ulpělé na stěnách vzorkovnice vyplavíme do válce. Po přelití jsou potravní částice ve vznosu a je nutné počkat, než sedimentují a objem získaného obsahu zažívacího traktu se ustálí. Z válce odečteme hodnotu objemu potravy obsažené v proplachu zažívacího traktu kapra. Zjistili jsme, že čas 25–30 minut je dostačující, po uplynutí delšího časového intervalu se již objem mění pouze minimálně (obr. 5).



Obr. 4. Odměrné válce použité pro stanovení objemu obsahu zažívacího traktu kapra. V levé části obrázku jsou škálované zkumavky pro objemy potravy u malých ryb (Foto M. Bláha).



Obr. 5. Usazování obsahu zaživacího traktu po převedení do odměrného válce (a), po uplynutí 10 minut (b) a po uplynutí 30 minut (c) (Foto M. Bláha).

Objem obilí lze odhadnout již z profilu proplachu usazeného ve válci. Pokud kapr přijímal obilí, můžeme snadno pozorovat jednotlivé obilky, které jsou makroskopicky odlišitelné od zbytku obsahu střeva. I tento hrubý odhad nám dá určitou představu, do jaké míry tvoří předkládaná potrava podíl na celkovém objemu potravy v zaživacím traktu. Pokud chceme přesnější odhad, použijeme kovová síta s velikostí ok 2 000, 1 000 a 100 μm (obr. 6a). Pomocí těchto sít

oddělíme nejen obilky od zbytku potravy, ale zároveň se zbavíme jemnějších částic. Tyto jemné částice znesnadňují další zpracování vzorku pod mikroskopem a vlastní determinaci s počítáním jednotlivých složek potravy. Mírným a stálým proudem vody proplachujeme soustavu sít, dokud z ní vidíme odtékat vodu se zákalem. V momentě, kdy jsou jemné částice odmyty, můžeme s proplachem přestat. Na hrubých sítích (především však 2 000 μm) zachytíme obilí a další větší rostlinné zbytky. Tento materiál převedeme pomocí stříčky do odměrného válce a postupujeme obdobným způsobem jako na počátku. Necháme obilky sedimentovat a po uplynutí 25 minut odečteme objem obilí v obsahu střeva.

V případě, že kapr má v rybníku k dispozici pouze přirozenou potravu, zachytí se na těchto hrubých sítích (především 1 000 μm) velcí jedinci perlooček (hrotnatky rodu *Daphnia*) či zástupci dvoukřídleho hmyzu (larvy pakomárů Chironomidae a koreter Chaoboridae) a hrubé organické zbytky vodní vegetace, kterou kapr pozřel společně s benthickými organismy při příjmu potravy ze dna. Abychom zjistili přesně, o jaké organismy či jejich zbytky se jedná, převedeme pomocí stříčky zachycené organismy na větší Petriho misky, které následně prohlédneme pod binokulární lupou s adekvátním zvětšením. Zaznamenáme si množství a typ organismů. Při jejich stanovení postupujeme obdobně jako při mikroskopické analýze. Snažíme se rovnoměrně rozptýlit organismy a organické zbytky na Petriho misce, pod kterou umístíme milimetrový papír. V závislosti na množství a počtu jednotlivých typů organismů spočítáme celý prostor Petriho misky anebo náhodně vybrané čtverce, celkový počet organismů pak získáme jednoduchým přepočtem. Ve frakci 1 000 μm se mohou rovněž zachytit parazité vyskytující se v trávicím traktu kapra, tj. zástupci hlístic či tasemnic. Frakci zachycenou na sítku 100 μm převedeme pomocí stříčky do kádinky (obr. 6b). Velikost kádinky volíme podle množství zachycené potravy, většinou postačí kádinka s objemem 50, 100 či 250 ml.



Obr. 6. Soustava kovových sít s velikostí ok 2 000, 1 000 a 100 μm , které slouží k oddělení předkládané potravy od zbytku přirozené potravy a zároveň k odmytí jemného sedimentu (a). Převádění frakce 100 μm do kádinky pro další zpracování pod mikroskopem (b) (Foto M. Bláha).

2.4.2. Mikroskopická analýza

Následující zpracování vzorku přebírá s drobnými úpravami základní postupy zpracování vzorku zooplanktonu popsané Hrbáčkem a kol. (1972). Vzorek převedený do kádinky doplníme kohoutkovou vodou na přesný objem (v případě vzorku z obr. 6b jsme vzorek doplnili na celkový objem 200 ml), se kterým budeme později pracovat při kalkulaci počtu organismů na obsah zažívacího traktu kapra, hodnotu si proto zapíšeme. Objem, na který doplníme vzorek, závisí na množství organismů ve vzorku. Čím více organismů ve vzorku, tím bychom měli vzorek více naředit a naopak. Tento krok ovlivní i následující množství podvzorku, které odebereme pipetou a se kterým budeme následně pracovat pod mikroskopem (obr. 7a). Před vlastním odběrem podvzorku je nutné homogenizovat rozmístění organismů v kádince důkladným promícháním. To je možné provést probubláváním pipetou anebo k tomu

použijeme skleněnou tyčinku, kterou promícháme celý obsah kádinky a ihned odebereme pipetou 0,5–2 ml podvzorku, jež převedeme na počítací sklíčko (obr. 7b). Špičku pipety je třeba předem seříznout a okraje zahladit skalpelem, aby byl vstupní otvor dostatečně široký pro průchod velkých perlooček a larev pakomárů. V tomto kroku záleží na zkušenostech hodnotitele. Příliš velký objem podvzorku znamená velké množství organismů na počítacím sklíčku, které se mohou překrývat a jejich počítání a determinace bude nesnadná. Na druhou stranu při nanesení malého objemu podvzorku je vzorek příliš řídký, tudíž nereprezentativní a můžeme tak pominout méně početné zástupce v potravě.

Po několika pokusech s vhodným objemem získá hodnotitel představu, jaké množství podvzorku je nejlepší a se kterým se mu dobře pracuje.

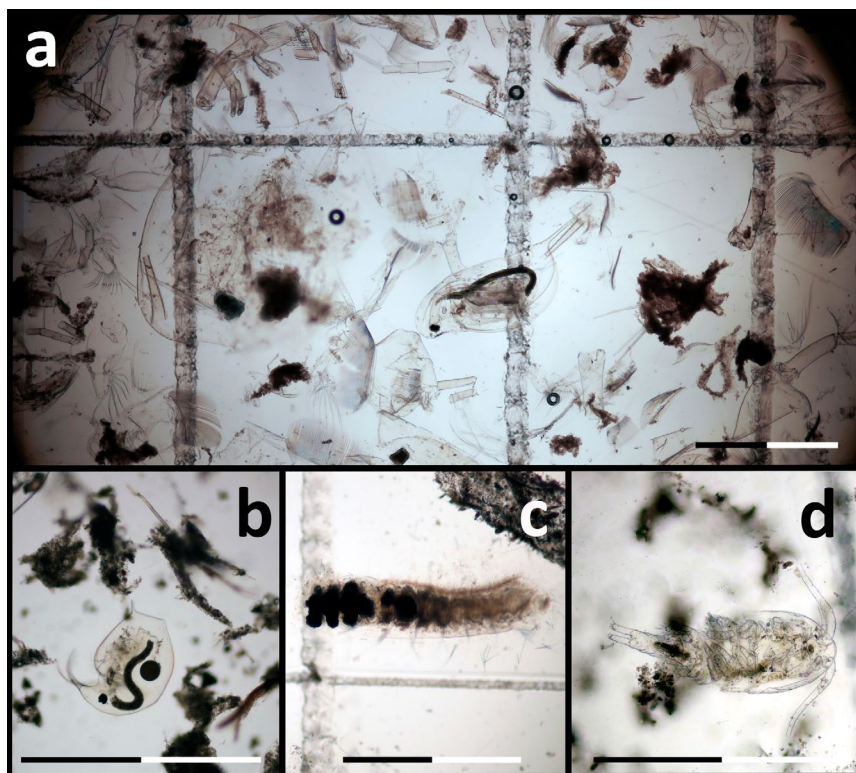


Obr. 7. Vybavení potřebné pro přípravu vzorku pro mikroskopické vyhodnocení (a), nanesený podvzorek obsahu zažívacího traktu kapra na počítací sklíčko připravený k vyhodnocení pod mikroskopem (b) (Foto M. Bláha).

Při promíchávání vzorku v kádince i při jeho nanášení na počítací komůrku může docházet k zachycování organismů v povrchové blance. Tomu lze předejít přidáním malého množství detergentu, který naruší povrchové napětí a organismy „propadnou“ na dno. Jednoduše stačí navlhčit prst a přejet přes uzávěr mycího prostředku a poté se lehce dotknout hladiny v kádince či na počítacím sklíčku. Nanesení takto malého množství detergentu je většinou dostačující pro daný efekt.

Hodnocení potravy má svá specifika, jedním z nich je deformace či rozpad těla jednotlivých potravních složek díky natrávení, které znesnadňuje jejich určení. Je dobré si na začátku stanovit, které části organismů budeme počítat jako jedince. U larev pakomárů jsou to například silně chitinizované hlavové kapsule. U velkých perlooček rodu *Daphnia* to může být buďto postabdomen či hlavová část těla perloočky. Menší perloočky, jako jsou rod nosatička (*Bosmina*) nebo rod čočkovec (*Chydorus*), bývají většinou zachované celé. Zástupci klanonožců, buchanky a vznášivky jsou většinou silně deformovaní a jejich rozpoznání vyžaduje zkušenost.

Počítací sklíčko s naneseným podvzorkem vložíme pod mikroskop. Pokud nejsou organismy na sklíčku rovnoměrně rozmístěné a vytváří výrazné shluky, můžeme rychlejšími pohyby stolku mikroskopu (zleva doprava a k sobě a od sebe) rovnoměrně rozptýlit organismy. Následně procházíme jednotlivé sektory na sklíčku při použití objektivu s nejnižším zvětšením (4x) (obr. 8a), dokud od jednoho konce sklíčka nedorazíme na následující. V zorném poli vždy vidíme většinou kompletní pouze dva svislé sektory (v závislosti na použitém počítacím sklíčku a šířce sektorů), a tak postupujeme po dvou sektorech. Každý sektor prohlížíme, počítáme jednotlivé typy planktonních a bentických organismů a zapisujeme druh/typ a početnost. Pomocí většího zvětšení (10x) sledujeme detaily na tělech a zbytcích potravy nutné k jejich určení (obr. 8b,c,d). Vzhledem ke konstrukci počítacího sklíčka není možné použít většího zvětšení. Je také možné počítat každý druhý či třetí sektor, abychom zrychlili analýzu vzorku. Zde je však důležité, aby byly organismy na sklíčku rovnoměrně rozmístěné a přepočtem počtu organismů nalezených v polovině či třetině sektorů jsme získali realistický počet v podvzorku.



Obr. 8. Záběr počítacího sklíčka s podvzorkem potravy kapra při použití objektivu 4x (a), detaily zobrazené objektivem 10x nosatíčka obecná (*Bosmina longirostris*) (b), zbytek máloštětinatce (c) a buchanka *Acanthocyclops americanus* (d). Měřítka představuje 1 mm (Foto M. Bláha).

U každého vzorku proplachu spočítáme alespoň dva, lépe tři podvzorky, tj. počítací sklíčka. Před každým odběrem podvzorku vzorek v kádince homogenizujeme způsobem uvedeným dříve. Důvodem je přesnější odhad a minimalizace chyby při pipetování podvzorku z kádinky. Snadno si také ověříme přesnost a shodnost jednotlivých podvzorků. Z počtů zaznamenaných pro jednotlivé kategorie potravních organismů získaných z hodnocení třech počítacích sklíček uděláme v závěru průměr.

Pokud máme současně k dispozici informace o potravní nabídce a složení společenstva zooplanktonu a zoobentosu, je hodnocení vzorku snazší, neboť známe druhy, které můžeme v potravě očekávat. Pokud tyto informace nemáme, je vhodné před vlastním počítáním a hodnocením obsahu zaživacího

traktu kapra věnovat krátký čas tréninku. Ještě, než nanese podvzorek na počítací sklíčko, odebereme kapátkem malé množství organismů z kádinky, které si rozprostřeme na klasické podložní sklíčko. Pod mikroskopem pak determinujeme jednotlivé typy organismů, které lze ve vzorku nalézt. Následně organismy vrátíme zpět do kádinky.

Celkový počet organismů v obsahu zaživacího traktu kapra zjistíme přepočtem, kdy počet organismů zjištěných na sklíčku (v objemu naneseného podvzorku) přepočteme na objem vzorku v kádince. Protože množství potravních organismů v kádince reprezentuje celkový obsah zaživacího traktu, získáme tak celkový počet jednotlivých typů potravních organismů v potravě daného jedince pro dané vzorkovací období. Jelikož to ale mohou být poměrně vysoká čísla, je vhodnější počet organismů převést na objem 1 ml obsahu zaživacího traktu kapra.

Příklad výpočtu: Obsah zaživacího traktu, jehož objem činil 33 ml, jsme převedli do kádinky a objem jsme doplnili na 200 ml. Z tohoto objemu jsme odebrali podvzorek o objemu 1,5 ml, který jsme převedli na počítací sklíčko. Na počítacím sklíčku jsme ze tří počítacích sklíček napočítali v průměru 85 jedinců rodu *Bosmina*.

$$\text{počet organismů v celém objemu proplachu} = \frac{200}{1,5} \times 85 = 11\,333 \text{ ind.}$$

$$\text{počet organismů v 1 ml proplachu} = \frac{1}{33} \times 11\,333 = 343 \text{ ind.ml}^{-1}$$

Kromě detailního hodnocení přijaté potravy počítáním jednotlivých taxonů, lze na počítacím sklíčku stanovovat četnosti odhadní stupnicí procentického zastoupení přítomných druhů či skupin (např. perloočky rodu *Daphnia*, ostatní perloočky, klanonožci, larvy pakomárů). V tomto případě by nemělo být nanesené množství organismů v podvzorku odebraném z kádinky příliš vysoké, abychom v zorném poli a v jednotlivých sektorech snadno získali představu o zastoupení jednotlivých druhů/skupin. Běžně se používá několik odhadních stupnic, nicméně pro následné statistické i grafické hodnocení je vhodné použít stupnici podle Příkryla (2006; tab. 1).

Tab. 1. Odhadní stupnice podílu podle Přikryla (2006).

Podíl v %	Stupnice
taxon nezjištěn	0
< 1 %	1
1–5	2
5–10	3
10–20	4
20–40	5
40–60	6
> 80	7

2.4.3. Interpretace získaných údajů

Pokud obsah trávicího traktu tvoří pouze přirozená potrava, je interpretace získaných informací snazší v porovnání s obsahem zaživacího traktu, ve kterém je směs přirozené potravy a příkrmu, nejčastěji obilovin. V případě nálezu pouze přirozené potravy můžeme abundance jednotlivých taxonů v zaživacím traktu porovnat s jejich zastoupením v prostředí rybníka, například použitím Ivlevova indexu elektivity E (Ivlev, 1961). Tím získáme informaci, které potravní složky jsou preferované nebo naopak opomíjené. K výpočtu použijeme jednoduchý vzorec:

$$E = (r - p) / (r + p)$$

Kde r je abundance taxonu zjištěného v potravě a p abundance taxonu v prostředí. Ivlevův index elektivity může nabývat hodnot od -1 do +1. Záporné hodnoty indexu naznačují, že jedinec danou složku potravy přijímá náhodně spolu s ostatními složkami potravy. Naopak kladné hodnoty indexu značí, že kapr danou potravní složku preferuje.

Pokud je součástí proplachu trávicího traktu i obilí z příkrmování, máme dvě možnosti, jak postupovat. Rychlejší, ale méně přesnou metodou je přímý odečet objemu přijatého krmiva z odměrného válce, kam je převeden celý obsah trávicího traktu získaného proplachem. Využíváme vlastnosti obilí, které jako první klesnou na dno odměrného válce, a vytvářejí tak téměř kompaktní vrstvu, na níž sedimentuje přirozená potrava. Druhá, přesnější metoda spočívá v oddělení potravní složky obilí od přirozené potravy, abychom ji mohli adekvátně kvantifikovat. Při použití sít zmíněných v předchozí části zachytíme natrávené obilky na hrubších sítích (především 2 000 μm). Následně použijeme odměrný válec a stanovíme přesný objem pozřené obilí. V obou případech

získáme objemový podíl této přijaté složky potravy z celkového objemu potravy získaného proplachem trávicího traktu a informaci o procentuálním zastoupení přirozené potravy a přijatého krmiva, s níž můžeme dále pracovat.

3. Srovnání novosti postupů

Tato metodika přináší aktualizované postupy proplachu zažívacího traktu kapra obecného a doplňuje je o laboratorní zpracování, včetně detailní kvalitativní a kvantitativní analýzy pozřených složek potravy kapra. Podstata novosti postupu spočívá v rozšíření postupu o laboratorní zpracování, které přináší detailnější a přesnější informace o potravě kapra. Tyto informace lze dále využít při výpočtech nutriční potřeby kapra, při hodnocení vlivu kapra na společenstva zooplanktonu a makrozoobentosu a v neposlední řadě i pro přesnější stanovení spotřebovaného předkládaného krmiva.

4. Popis uplatnění certifikované metodiky

Předkládaná metodika prezentuje způsob, jakým lze velmi přesně analyzovat potravu kapra potažmo i ostatních ryb, které nemají žaludek a je u nich možné provést proplach zažívacího traktu. Cílovou skupinou uživatelů této metodiky jsou vědecké instituce a progresivní rybářské podniky, které mohou pomocí přesné analýzy potravy ryb popsat vliv rybí obsádky na vodní ekosystémy a v případě rybářských podniků pružně upravovat typ a množství příkrmování.

5. Ekonomické aspekty

Následování postupu této metodiky nevyžaduje žádné speciální investice. Může přinést nadstavbovou informaci o přesné potravě kapra, jeho nutriční potřebě a vhodnosti použití specifického typu doplňkového krmiva. Tím pádem lze dosáhnout ekonomických úspor při aplikaci vhodných doplňkových krmiv ve správnou dobu.

6. Seznam použité související literatury

- Adámek, Z., Kajgrova, L., Regenda, J., Roy, K., 2023. Carp pond aquaculture: Concordance of production and nature. *Aquaculture Europe* 48: 6–15.
- 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: 229–237.
- Corse, E., Costedoat, C., Chappaz, R., Pech, N., Martin, J. F., Gilles, A., 2010. A PCR-based method for diet analysis in freshwater organisms using 18S rDNA barcoding on faeces. *Molecular Ecology Resources* 10: 96–108.
- Davis, A.M., Blanchette, M.L., Pusey, B.J., Jardine, T.D., Pearson, R.G., 2012. Gut content and stable isotope analyses provide complementary understanding of ontogenetic dietary shifts and trophic relationships among fishes in a tropical river. *Freshwater Biology* 57: 2156–2172.
- Faina, R., 1983. Využívání přirozené potravy kaprem v rybnících. Edice Metodik, VURH, Vodňany, č. 8, 15 s.
- FAO, 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. doi:<https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Francová, K., Šumberová, K., Janauer, G. A., Adámek, Z., 2019. Effects of fish farming on macrophytes in temperate carp ponds. *Aquaculture International* 27: 413–436.
- Gerking, S.D., 2014. *Feeding Ecology of Fish*. London: Academic Press Limited. ISBN 978-0-12-280780-0
- Hardy, C.M., Krull, E.S., Hartley, D.M., Oliver, R.L., 2010. Carbon source accounting for fish using combined DNA and stable isotope analyses in a regulated lowland river weir pool. *Molecular Ecology* 19: 197–212.
- Hrbáček, J., Blažka, P., Brandl, Z., Fott, J., Kořínek, V., Kubíček, F., Lellák, J., Procházková, L., Straškraba, M., Straškrabová, V., Zelinka, M., 1972. *Limnologické metody*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 208 s.
- Ivlev, V., 1961. *Experimental ecology of the feeding of fishes* (2nd Ed.). New Heaven: Yale University Press, 302 pp.
- Jaeger, C., Aubin, J., 2018. Ecological intensification in multi-trophic aquaculture ponds: an experimental approach. *Aquatic Living Resources* 31: 36.
- Kajgrová, L., Blabolil, P., Drozd, B., Roy, K., Regenda, J., Šorf, M., Vrba, J., 2022. Negative effects of undesirable fish on common carp production and overall structure and functioning of fishpond ecosystems. *Aquaculture* 549: 737811.
- Kajgrova, L., Kolář, V., Roy, K., Adámek, Z., Blabolil, P., Kopp, R., Mráz, J., Musil, M., Pecha, O., Pechar, L., Potužák, J., Vrba, J., 2024. A stoichiometric insight into seasonal imbalance of phosphorus and nitrogen in Central European fishponds. *Environmental Sciences Europe* 36: 139.

- Kajgrová, L., Pecha, O., Roy, K., Dvořák, J., Let, M., Potužák, J., Vrba, J., Bláha, M., 2024. Pond cascades as a tool for ecological aquaculture allowing natural zooplankton succession, nutrient retention, and multiple stocking-harvesting cycles. *Aquacultural Engineering* 104: 102374.
- Kolářová, J., Svobodová, Z. 2009. Léčebné a preventivní postupy v chovech ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 88, 30 s.
- Kolářová, J., Velíšek, J., Nepejchalová, L., Svobodová, Z., Kouřil, J., Hamáčková, J., Máchová, J., Piačková, V., Hajšlová, J., Holadová, K., 2007. Anestetika pro ryby. Edice Metodik VÚRH JU, č. 77, 20 s.
- Kořínek, V., Fott, J., Fuksa, J., Lellák, J., Prazakova, M., 1987. *Carp ponds of central Europe* (Vol. 29). New York: Elsevier Science Publishing Co.
- Lososová, J., Zdeněk, R., 2024. Is the aquaculture industry in the Czech Republic financially healthy? A company-level analysis. *Aquaculture International* 32: 2865–2882.
- Manko, P., Adámek, Z., 2019. Metodické postupy při studiu potravy sladkovodních ryb. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 177, 134 s.
- Pechar, L., 1995. Long-term changes in fish pond management as 'an unplanned ecosystem experiment': Importance of zooplankton structure, nutrients and light for species composition of cyanobacterial blooms. *Water Science and Technology* 32: 187–196.
- Pechar, L., 2000. Impacts of long-term changes in fishery management on the trophic level water quality in Czech fish ponds. *Fisheries management and Ecology* 7: 23–31.
- Potužák, J., Hůda, J., Pechar, L., 2007. Changes in fish production effectivity in eutrophic fishponds – impact of zooplankton structure. *Aquaculture International* 15: 201–210.
- Přikryl, I., 2006. Metodika odběru a zpracování vzorků zooplanktonu stojatých vod. Metodika VÚV TGM, Praha, 14 s.
- Rahman, M.M., 2015. Role of common carp (*Cyprinus carpio*) in aquaculture production systems. *Frontiers in Life Science* 8: 399–410.
- Roy, K., Vrba, J., Kaushik, S. J., Mraz, J., 2020a. Feed-based common carp farming and eutrophication: is there a reason for concern? *Reviews in Aquaculture* 12: 1736–1758.
- Roy, K., Vrba, J., Kaushik, S. J., Mraz, J., 2020b. Nutrient footprint and ecosystem services of carp production in European fishponds in contrast to EU crop and livestock sectors. *Journal of Cleaner Production* 270: 122268.
- Roy, K., Vrba, J., Kajgrova, L., Mraz, J., 2022. The concept of balanced fish nutrition in temperate European fishponds to tackle eutrophication. *Journal of Cleaner Production* 364: 132584.
- Roy, K., Másilko, J., Kajgrova, L., Kuebutornye, F. K. A., Oberle, M., Mraz, J., 2023. End-of-season supplementary feeding in European carp ponds with appropriate plant protein and carbohydrate combinations to ecologically boost productivity: lupine, rapeseed and, triticale. *Aquaculture* 577: 739906.

- RS ČR, 2024. Produkce a trh ryb. <https://www.cz-ryby.cz/produkce-ryb/produkce-a-trh-ryb> (navštíveno 06/2024)
- Stanivuk, J., Berzi-Nagy, L., Gyalog, G., Ardó, L., Vitál, Z., Plavša, N., Krstović, S., Fazekas, G. L., Horváth, Á., Ljubobratović, U., 2024. The rank of intensification factors strength in intensive pond production of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 583: 740584.
- Šusta, J., 1888. Die Ernährung des Karpfen und seiner Teichgenossen. Neue Grundlagen der Teichwirthschaft. Stettin: Druck und Verlag von Herrcke & Lebeling, 252 s.
- Šusta, J., 1898. Fünf Jahrhunderte der Teichwirthschaft zu Wittingau : ein Beitrag zur Geschichte der Fischzucht mit besonderer Berücksichtigung der Gegenwart. Stettin: Druck und Verlag von Herrcke & Lebeling, 232 s.
- Topic Popovic, N., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Barisic, J., Jadan, M., Persin Berakovic, A., Sauerborn Klobucar, R., 2012. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. *Journal of Applied Ichthyology* 28: 553–564.
- Vrba, J., Šorf, M., Nedoma, J., Benedová, Z., Kröpfelová, L., Šulcová, J., Tesařová, B., Musil, M., Pechar, L., Potužák, J., 2024. Top-down and bottom-up control of plankton structure and dynamics in hypertrophic fishponds. *Hydrobiologia* 851: 1095–1111.
- Všetičková, L., Adamek, Z., Rozkošný, M., Sedláček, P., 2012. Effects of semi-intensive carp pond farming on discharged water quality. *Acta ichthyologica et piscatoria* 42: 223–231.

7. Seznam publikací, které předcházejí metodice

- Faina, R., 1983. Využívání přirozené potravy kaprem v rybnících. Edice Metodik, VURH, Vodňany, č. 8, 15 s.
- Hrbáček, J., Blažka, P., Brandl, Z., Fott, J., Kořínek, V., Kubíček, F., Lellák, J., Procházková, L., Straškraba, M., Straškrabová, V., Zelinka, M., 1972. Limnologické metody. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 208 s.

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství České republiky – projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QK22010177 Optimalizace přikrmování a managementu rybníční akvakultury.

Externí odborný oponent

doc. Ing. Pavel Jurajda, Ph.D.

Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v. v. i., Květná 8, 603 00 Brno

Interní odborný oponent

doc. RNDr. Zdeněk Adámek, CSc.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Zátiší
728/II, 389 25 Vodňany

Oponent za státní správu

Ing. Ondřej Tomášek

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

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. MZE-72095/2024-16232 ze dne
21. 10. 2024 vydalo Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy myslivosti a rybář-
ství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha.

Adresa autorského kolektivu

doc. Ing. Martin Bláha, Ph.D. (30 %)

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

Ing. Lenka Kajgrová, Ph.D. (25 %)

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské
výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz,
Ústav akvakultury a ochrany vod, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice

RNDr. Petr Blabolil, Ph.D. (15 %)

RNDr. Vladislav Drašík, Ph.D. (15 %)

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, Branišovská 1760,
370 05, České Budějovice
Biologické centrum Akademie věd ČR, Hydrobiologický ústav, Na Sádkách 8,
370 05 České Budějovice

Mgr. Tomáš Jůza, Ph.D. (15 %)

Biologické centrum Akademie věd ČR, Hydrobiologický ústav, Na Sádkách 7,
370 05 České Budějovice

V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovi-
cích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, www.frov.jcu.cz; přidělený editor: dr. hab.
Ing. Josef Velíšek, Ph.D.; redakce: Zuzana Dvořáková
náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2024; vytištěna v roce 2024; grafic-
ký design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk.



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

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



ISBN 978-80-7514-210-8