

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Ústav komplexních systémů

Bakalářská práce

**Změny hejnové hierarchie ryb jako citlivý indikátor
bioaktivních látek**

Autor: Barbora Macková

Vedoucí bakalářské práce: Renata Rychtáriková-Štysová Ing. Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Kirill Lonhus MSc.

Studijní program a obor: Ekologie a ochrana prostředí, Ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2020

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že, v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Barbora Macková

Poděkování

Tímto bych chtěla vyjádřit dík vedoucímu práce a konzultantovi za poskytnutí péče, materiálů a prostoru laboratoře pro zpracování bakalářské práce. Všem, kteří se podíleli na vytvoření zázemí pro pokusné organizmy a technické podpoře, především Natali Lonhus, za poskytnuté cenné rady a pomoc při zakládání akvárií.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora MACKOVÁ**
Osobní číslo: **V17B036P**
Studijní program: **B1601 Ekologie a ochrana prostředí**
Studijní obor: **Ochrana vod**
Téma práce: **Změny hejnové hierarchie ryb jako citlivý indikátor bioaktivních látek**
Zadávající katedra: **Ústav akvakultury a ochrany vod**

Zásady pro vypracování

Náplní bakalářské práce bude sledování a vyhodnocování vlivu látek ovlivňujících chování na hejnovou hierarchii *Parmiček čtyřpruhých* (*Puntius tetrazona*). Jelikož se jedná o první studii, budou použity látky, s nimiž je povoleno pracovat v běžné laboratorní praxi, a to etanol, kofein a tricaine mesylát. V současné době se jako bioindikátory v úpravách vod používají pstruzi a sleduje se zejména úhyn, případně viditelné změny na kůži, očích, dramatické změny chování a podobně. Všechny tyto charakteristiky se určují subjektivně. Cílem práce bude využít automatické sledovače chování a automatické statistické vyhodnocování pro (a) zvýšení citlivosti metody a (b) případná detekce specifických změn chování pro jednotlivé látky. *Parmička čtyřpruhá* je využita jako malý druh s nízkými náklady, který zároveň vykazuje složitou hierarchii hejnového a sociálního chování. V zařízení 5iD viewer je možno tyto módy chování detekovat automaticky v reálném čase, což zatím nebylo možné. Z dostupných a snadno chovatelných sladkovodních ryb je *Parmička čtyřpruhá* nejdostupnější. To vyvažuje drobnou nevýhodu spočívající v tom, že teplota vody v chovném akváriu bude 32 °C a bude tedy nutné ji přehřívát.

Práce bude zahrnovat:

1. Vypracování literární rešerše na dané téma
2. Experimentální práce na zařízení 5iD viewer
3. Zpracování a analýza obrazových dat a vyhodnocení parametrů
4. Sepsání bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy: **50-70 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby (10 grafů)**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Brown C., Fish intelligence, sentience and ethics; Anim Cogn., 2015
2. Kieffer J., Colgan P., The role of learning in fish behaviour; Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1992
3. Ioannou C., Singh M., Couzin I., Potential Leaders Trade Off Goal-Oriented and Socially Oriented Behavior in Mobile Animal Groups; The American Naturalist 186, 2015.
4. Katz Y., Tunstrøm K., Ioannou C. et al, Inferring the structure and dynamics of interactions in schooling fish; PNAS 2011
5. Pérez-Escudero A., Vicente-Page J., Hinz RC. et al, idTracker: tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals; Nat Methods. 2014
6. Jolles JW., Boogert NJ., Sridhar VH. et al, Consistent Individual Differences Drive Collective Behavior and Group Functioning of Schooling Fish; Curr Biol. 2017

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Renata Štysová Rychtáriková, Ph.D.**
Ústav komplexních systémů

Datum zadání bakalářské práce: 11. ledna 2019
Termín odevzdání bakalářské práce: 4. května 2020

V Českých Budějovicích dne 25. února 2019

 
JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
389 25 Vodňany (2)
prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D. děkan
Ing. Petr Císař, Ph.D. ředitel

Obsah

Úvod.....	8
1 Literární rešerše	8
1.1 Porozumění novým chemickým sloučeninám.....	9
1.1.1 Znečištění vodního prostředí.....	10
1.2 Testy toxicity	11
1.3 Behaviorální ekologie živočichů	13
1.3.1 Pozorování chování živočichů	14
1.3.2 Vliv životního prostředí na chování živočichů	15
1.4 Komunikace živočichů ve vodním prostředí.....	15
1.4.1 Smysly ve vodním prostředí.....	16
1.5 Pohlavní chování ryb.....	17
1.6 Sociální chování ryb.....	18
1.7 Hierarchie	19
2 Návrh experimentu	22
2.1 Modelový organismus	22
2.1.1 Anatomie a morfologie	22
2.1.2 Ekologie	24
2.1.3 Potrava.....	24
2.1.4 Etologie	25
2.2 5iD viewer a analýza obrazu	25
2.3 Metodika experimentu.....	27
3 Výsledky	30
3.1 Vlastní pozorování na kontrolních vzorcích.....	30
3.2 Indikace bioaktivních látek.....	36
4 Diskuze	37
5 Závěr	40
6 Seznam použitých literárních zdrojů	41

7	Seznam použitých zkratek	44
8	Abstrakt.....	45
9	Abstract.....	46

Úvod

Tato práce shrnuje poznatky o využití živých organismů při monitorování kvality vod. Vychází z poznatků z oblasti behaviorální ekologie a endokrinologie ryb, zejména se soustředí na sociální chování hejna a jeho schopnost zrcadlit podmínky prostředí. Vzhledem k tomu, že můžeme předpokládat vliv látek na chování pokusných organismů, je možné jejich pozorováním rozšířit znalost látek na další úroveň, či přispět k jejich lepší detekci.

Ve vodních ekosystémech je směs přirozeně se vyskytujících rozpuštěných látek, obohacená o nezanedbatelné množství obtížně definovatelných odpadních produktů a látek vniklých antropogenní činností. V současné době existují laboratorní metody pro testování přítomnosti polutantů v povrchových vodách, zvláštní důraz je kladen na kvalitu pitné vody. Rozhodnutí o stanovení přípustných koncentračních limitů jednotlivých látek ve vodách jsou vydávána na základě laboratorních testů. V těchto testech se stanovuje nejčastěji letalita exponovaného organismu, u některých látek je znám vliv na vývoj organismu v různých fázích života nebo na jeho fitness či fitness dalších generací.

Obsahem bakalářské práce je studie nového modelového organismu a jeho projevů chování. Součástí je návrh designu experimentu pro sledování vlivu různých látek na chování hejna jako celku a jeho individuálních podjednotek. Jako modelový organismus byla zvolena parmička čtyřpruhá (*Puntigrus tetrazona*), která byla chována v akváriích s monitorovanou kvalitou vody a se zavedeným krmným a světelným režimem, v podmínkách porovnatelných s těmi v pokusu letální toxicity sladkovodních ryb.

Pro standardizaci popisu chování hejna je v této práci navrženo několik parametrů (vztah k těžišti hejna, rychlost, vzájemná vzdálenost ryb a jejich osobní prostor, intenzita zbarvení, komunikace mezi jedinci a jiné projevy chování). Stejně projevy chování jsou navrženy pro sledování hejna po intoxikaci zkoumanou látkou a následně jsou výsledky pilotních experimentů vzájemně porovnány. K účelům této studie byl použit ethanol (0,15 % a 0,25 % obj.) oproti kontrole.

1 Literární rešerše

1.1 Porozumění novým chemickým sloučeninám

Akvatická toxikologie se zabývá efektem umělých chemických sloučenin a látek antropogenního původu na vodní organismy na několika úrovních organizace, od buněk, přes jednotlivé organismy, ke komunitám a celým ekosystémům. U látek můžeme sledovat pozitivní i negativní vliv na exponovaný organismus, toxikologie se však zaměřuje na negativní působení (teratogenita, biochemická a imunologická odezva, mutagenita, karcinogenita).

Součástí studií toxikologie látek je i doba potřebná pro detoxikaci organismu. Pokusní jedinci jsou vlivům toxické látky vystaveny buďto dlouhodobě, nebo krátkodobě. Sledují se *akutní* a *chronické* projevy intoxikace zkoumanou látkou v různých koncentracích. Látky mohou být vstřebávány různým způsobem (perorálně, průnik kůží, vdechnutí,...). Základní popis toxicity látky je v hodnotách letality a subletálních efektů na organismus (změny chování, růstu, či struktury tkání, poruchy vývoje a reprodukce, poruchy příjmu potravy a detoxikační kapacity). Jestliže látka poškozuje genetickou informaci exponovaného organismu, ovlivňuje následně složení populace a druhové zastoupení ekosystému, nelze pak pominout její vliv na populaci a celé společenstvo.

Látky mají v prostředí různý osud a rozdílnou dobu zdržení. Jejich koncentrace se v různých složkách vodního prostředí liší (sedimenty, voda, potrava). Studium koloběhu živin v prostředí je nedílnou součástí akvatické toxikologie. Klíčové je porozumění chemickým (hydrolyza, acidobazické reakce, oxidace–redukce, fotolýza, komplexotvorné rovnováhy), fyzikálním (molekulární struktura, rozpustnost, sorpce) a biologickým (biotransformace, bioakumulace, biodegradace) faktorům toku látek v prostředí (pH, teplota, salinita). Toto porozumění tak vyžaduje podrobnou znalost akvatické ekologie (TRUHAUT, 1977; BUTLER, 1978).

Povědomí o toxicitě odpadních vod panuje u veřejnosti od 40. let minulého století (BUIKEMA, 1982; ANDERSON, 1944). Zlom v míře testování toxicity látek přineslo objevení laboratorních testů toxicity na organismech. Mimo hlodavců byly jako jedny z prvních pokusných organismů použity ryby (HUNN, 1989). Jedno druhové experimenty na rybách (KATZ, 1953) postupně vystřídaly širokospektrální studie zapojující organismy z různých článků potravního řetězce. Tyto studie totiž mají větší vypovídající hodnotu a komplexněji popisují chování látky v prostředí. Toxikologické

testy na rybách byly zařazeny mezi standardní metody při stanovování vlivu látek na prostředí po roce 1960 (ASTM, APHA, ISO).

Díky rozvoji dalších vědních oborů a přístupů (hydrochemie, biochemie, analytická chemie, strojírenství, informatika) následuje období zdokonalování metodiky experimentů (využití průtočných systémů, biomonitring, nové metody detekce látek a matematického modelování), jelikož mnohé státy začaly pociťovat důsledky environmentálního znečištění na kvalitě vod. V této době vycházejí i první čísla ekotoxikologických žurnálů jako *Water Research*, *Marine Pollution*, *Environmental Pollution*. Velkým překvapením bylo také zjištění subletálních efektů při chronické intoxikaci, zejména chlorovanými uhlovodíky (pesticidy, herbicidy, fungicidy) a chování polychlorovaných bifenylnů PCB v prostředí (CARSON, 1962).

V 70. letech 20. století pokračoval výzkum rychle dopředu, jedním z pozitivních důsledků osvěty obyvatelstva bylo uznání akutních testů toxicity na rybách (a jiných vodních organismech) jako nástroje pro zařazení látek do seznamu substancí, jejichž koncentrace je v prostředí podrobena kontrole. Aplikace současných metodik při detekci vlivu látek na prostředí je pro členské státy souhrnně popsána ve sborníku OECD. Přesto stále zůstává vývoj na poli průmyslové produkce polutantů rychlejší než zpracování jejich dostatečných ekotoxikologických profilů.

1.1.1 Znečištění vodního prostředí

Většina přirozených vodních ploch jsou otevřené systémy lišící se mimo jiné hlavně chemickým složením látek. Vody běžně obsahují ionty (Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , S^{2-}), rozpuštěné plyny (CO_2 , O_2 , H_2S , N_2 aj.) a živiny (P, NO_3 – NO_2 , Si, sloučeniny C – např. rozpuštěný/nerozpuštěný organický uhlík DOC, POC a TOC, amino- a huminové kyseliny), stopové množství (Fe, Ni, Li, Cu, Hg, Al) a různé koloidy.

Některé organismy produkují do svého okolí odpadní látky, které mohou ovlivňovat další složky ekosystému. Nejvýznamnějším producentem takových látek je člověk. Systém nakládání s odpady vlastní pro lidskou společnost má za následek současné znečištění povrchových vod. Čistírny odpadních vod (ČOV) sice významně snižují koncentrace látek nebezpečných pro prostředí, přesto se dnes již tyto látky běžně vyskytují ve volných vodách i pod velkými ČOV.

Koncentrace škodlivin, které by způsobovaly hromadné úhyny ryb, se v našich vodách již nevyskytují tak často jako tomu bylo v minulých letech, nicméně i relativně nízké množství cizorodých látek má na vodní organismy včetně ryb negativní vliv a

vyvolává u nich různé adaptační reakce. Často jsou zasaženy systémy jaterních enzymů zbavující tělo toxických látek, probíhají různé stresové reakce apod.

Antropogenními polutanty vyskytující se ve vodním prostředí jsou zejména průmyslové polutanty, pesticidy a produkty PPCP (z angl. pharmaceuticals and personal care products), a to zejména farmaka. Například antibiotika, steroidní léčiva a jejich metabolity jsou obecně biologicky vysoce účinné látky, což znamená, že působí na organismy již ve velmi nízkých koncentracích. Část PPCP je zahrnována do skupiny tzv. endokrinních disruptorů (EDC). Některá farmaka (zejména antidepresiva) mohou ovlivňovat i chování ryb. Změna chování byla například zaznamenána při expozici živorodek duhových (*Poecilia reticulata*) antidepresivem fluoxetin. Zjištěny byly změny ovlivňující reprodukci u samčího pohlaví. Pozorována byla i změna ve strategii páření (FURSDON A KOL., 2019). Také v nedávno publikované studii (BRODIN, 2013) byly popsány účinky koncentrací antidepresiva oxazepamu na chování volně žijících okounech říčních (*Perca fluviatilis*). Ryby vystavené těmto reálným koncentracím ztrácely plachost a dravost.

Není pochyb o tom, že s rozvojem nových metod a plošného testování bude přibývat látek s prokazatelným vlivem na složky prostředí.

1.2 Testy toxicity

V EU má testování toxických látek ve správě Evropský parlament a REACH (EU, 2006). Jediný předpis regulující potenciální endokrinní disrupci byl vydán Agenturou pro ochranu životního prostředí (USEPA). Pro tyto účely bylo zatím vytypováno 67 látek, z nichž většinu tvoří pesticidy. Testy zahrnují 5 *in vitro* screenů vlivu na receptorovou aktivitu a 6 screenů *in vivo*, přičemž dva z nich zahrnují testy na volně žijících organismech (*OECD TG 229*, *OECD TG 231*). *OECD TG 229* je citlivý na estrogenové, androgenové, aromatázové inhibitory a estrogenové a androgenové antagonisty. *OECD TG 231* je senzitivní na thyroidní disruptory. Navíc může být využit test USEPA 850.1500 životního cyklu ryb s přidanými sledovanými endokrinními parametry, nebo test na halančíku japonském (*Oryzias latipes*). Evropská legislativa od roku 2009 nově upravuje nutnost testovat pesticidní látky na endokrinní disrupci. U ostatních látek se endokrinní disrupce uvažuje, ale legislativa jejich testování nepřikazuje.

Pokud je toxicita látky zcela neznámá, využívá se limitního testu s koncentrací 100 mg·l⁻¹ (pokud je negativní, dále se testy standardně neprovádí). Zároveň se provádí test

na standardu $K_2Cr_2O_7$ tím se kontroluje vhodný stav ryb. Pokud je u pokusu LC_{50} dichromanu nižší/vyšší, než je standard dané laboratoře, znamená to, že dodané ryby jsou na látku citlivější/méně citlivé, než je průměrná populace. Testy toxicity jsou potom neplatné. Ve svých metodikách regulace chemických látek se REACH snaží snížit množství pokusů s rybami na nejnižší možnou míru. Pokusy na živých organismech přesto zůstávají v toxikologii nepostradatelné.

V testech toxicity se nejčastěji používají druhy ryb dánio pruhované (*Danio rerio*), kapr obecný (*Cyprinus carpio*), halančík japonský (*Oryzias latipes*), živorodka duhová (*Poecilia reticulata*), pstruh duhový (*Onchorhynchus mykiss*) a siven americký (*Salvelinus fontinalis*).

Testy na rybách lze technicky provést jako *test statický* (ryby jsou celou dobu testu ve stejném roztoku), *test semistatický* (ryby jsou každý den přeloveny do čerstvě připraveného roztoku), *test recirkulační* (voda koluje v uzavřeném systému s filtrem), *test průtočný* (kontinuální průtok média). U statického testu je nebezpečí velkého kolísání kvality vody, koncentrace zkoumané látky a je zatížen rizikem neplatných výsledků. OECD (1989) zařazuje tyto testy toxicity na rybách:

- *OECD TG 203: Fish, Acute Toxicity Test (1992)* Test je designovaný pro zjištění relativní toxicity chemikálie na zvolený organismus, při krátkodobém vystavení zkoumané látky po dobu 96 h. Data jsou odebírána každých 24 h. U ryb je hodnotícím kritériem letalita, u bezobratlých ztráta rovnováhy a imobilizace, u řas inhibice růstu. Pro získání lepších výsledků může být test prodloužen. Laboratoř pro vedení experimentu vyžaduje oxymetr, pH-metr, luxmetr, teploměr, měření tvrdosti vody, organického uhlíku a chemické spotřeby kyslíku $CHSK_{Cr}$, teploměr, vzduchovač, chemicky inertní pokusná nádoba). Pokusné organismy by měly pocházet ze stejného zdroje a být přibližně stejně staré. Jestliže stáří není známo, je výběr podle velikosti.
- *OECD TG 204: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study (1984)*
- *OECD TG 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test (1992)*
- *OECD TG 212: Fish, Short-term Toxicity Tests on Embryo (1998)*
- *OECD TG 215: Fish, Juvenile Growth Test (2000)*
- *OECD TG 229: Fish Short-Term Reproduction Assay (2009)*
- *OECD TG 230: 21-day Fish Screening Assay (2009)*
- *OECD TG 234: Fish Sexual Development Test (FSDT) (2011)*
- *OECD TG 305: Bioconcentration: Flow-through Fish Test (1996)*

- *Zebrafish Embryo Toxicity Test (ZFET; 2009)*

Testy toxicity *OECD TG 203* jsou vyžadovány, jestliže se látka průmyslově vyrábí, či importuje v množství přesahujícím $10 \text{ t} \cdot \text{rok}^{-1}$. Při přesažení hranice $100 \text{ t} \cdot \text{rok}^{-1}$ jsou vyžadovány testy *OECD TG 203*, *OECD TG 212*, *OECD TG 215*, *OECD TG 210*, *OECD TG 305 a test OECD 315 Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes (2008)*.

Dále OECD plánuje zařadit testy *Androgenised Female Stickleback Screen (AFSS)*, *Fish Full Life-Cycle (FLC) Test Guideline*, *Japanese medaka Multigeneration Test (MMT)*. Vždy je nutné provést validaci testu, kritérii validace jsou:

- 1) V kontrolním vzorku úhyn nepřesahuje 10 % dospělců a 25 % embryí.
- 2) Nasycení vody kyslíkem musí být nejméně 60 %.
- 3) Koncentrace testované látky nesmí poklesnout pod 80 % původní hodnoty.
- 4) Teplota musí odpovídat danému druhu, nesmí kolísat více než $\pm 1^\circ\text{C}$.

Po získání výsledku testů toxicity se látky zařazují do kategorií a jsou jim přiděleny H (*Hazard*) a P (*Precautionary, varování*) věty. K tomu jsou označeny příslušnými piktogramy dle mezinárodní legislativy (GHS, CLP). Dříve se využíval systém R (*Risk*) a S (*Safety*) vět. Výsledkem jsou hodnoty LD_{50} , LC_{50} (dávka/koncentrace způsobující 50% letální efekt), navíc jsou stanovovány nejnižší hodnoty efektivních koncentrací NOEC a LOEC (nejvyšší/nejnižší koncentrace látky, při které není/je pozorován toxický účinek na organismus).

1.3 Behaviorální ekologie živočichů

Vznik, udržení a rozvíjení určitého typu chování živočichů lze vysvětlit odpověďmi na následující čtyři základní otázky (TINBERGEN, 1963):

1. *Funkce*. Jak chování ve své funkci ovlivňuje fitness jedince a jeho potomků?
2. *Příčina*. Jak je daný projev formován prostředím, dostupností potravy a strategiemi chování ostatních členů společenství?
3. *Mechanismus*. Jaké jsou genetické predispozice, stádium ontogeneze a zkušenosti jedince?
4. *Evoluční historie*. Jaká je evoluční minulost vzorce chování a morfologické změny jím podmíněné, včetně vlivu na radiaci druhů a obsazování nik?

Pro studium chování je stěžejní pozorovat živočichy v jejich přirozeném habitatu. Experimentální data ve studiích zaměřených na prvky chování jsou vyhodnocována analýzou nákladů a přínosů („cost“ a „benefits“) (TINBERGEN, 1972). Průkopníci

etologie Konrad Lorenz (1903–1989) a Nikolaas Tinbergen (1907–1988) považují vzorce chování, podobně jako morfologické struktury, za důležitou součást popisu druhu. Pozdější etologické práce z 1. pol. 20. století se zaměřují zejména na *funkci* chování a mají sklon přehlížet ostatní tři otázky. Většinový pohled na živočichy jako na strojky s naprogramovanými reakcemi vystřídaly práce z konce 20. století, které vnímají živočichy jako bravurní společenské taktiky s přísnou ekonomikou chování. Dnešní etologie nachází odpovědi v průniku obou těchto oborů, například ve spojení určitého trendu v chování jedince nebo celého druhu s formujícími faktory prostředí. Prostředí ovlivňuje u živočichů jejich následující životní strategie (CROOK A GARLAN, 1966):

Prostorová strategie – kolonie nebo teritoria

Potravní strategie – solitérní nebo hejnová

Pohlavní strategie – monogamie nebo polygamie

Přístup korelující strategie s životním prostředím živočichů byl později využit i pro studie na různých živočiších jako jsou ryby (FRICKE, 1975) nebo primáti. Studium *mechanismů* chování je doménou neurobiologie, *funkce* a *evoluce* zůstávají v zájmu sociobiologie (WILSON, 1975). Nejnovější práce navazují na starší studie, a zároveň těží hlavně z metodologického pokroku. Studie využívají multivariační statistické metody při ověřování hypotéz, metody kvantifikace chování a ekologických znaků.

1.3.1 Pozorování chování živočichů

Klasické etologické studie (HENROTH, 1911; LORENZ, 1941) jsou odkázány pouze na pozorovací dovednosti vědce. Základem studia chování zůstává *popis*, jehož částí musí být zachyceny přesně a jasně. Velký tlak je kladen na schopnost pozorovatele vyhodnotit chování objektu v interakci se spouštěčem tohoto chování.

Behaviorální studie mají velkou zásluhu na poznání a ocenění zvířat. Popsání komplexního chování v přírodě a přenesení těchto znalostí do chovných zařízení vedlo k výraznému zlepšení způsobu zacházení se zvířaty a zajištění důstojných životních podmínek. Některé studie lze provádět neinvazivně v přirozeném prostředí. Ovšem ani při terénních experimentech se nelze vyhnout použití odchytu či značení, nebo pouhé přítomnosti pozorovatele. Pro pozorování speciálních jevů oproštěných od cizích vzruchů se využívají laboratorní pokusy. Použití zvířat pro laboratorní výzkum a výuku vyvolává důležité etické otázky. Pokusná zvířata držená v zajetí jsou manipulována do umělých situačních designů. V rozsáhlejších pracích je po ukončení etologického experimentu pozorována i vnitřní stavba těla pozorovaného jedince pomocí počítačové tomografie či pitvou.

1.3.2 Vliv životního prostředí na chování živočichů

Životní prostředí má na jedince, tvorbu jeho sociálních vazeb a životní strategie nezpochybnitelný vliv. Toto zjištění je obsahem dvou studií. První práce srovnává reprodukční chování druhů z čeledi okounovitých (*Percidae*) v různých ekotypech (WINN, 1958), druhá studie zmiňuje měnící se velikost a strukturu kolonie mravenců podle zavedených potravních návyků (BROWN A WILSON, 1959).

Protože se chování zakládá na genetické informaci, podléhá evoluci. Podobně jako u morfologických adaptací jsou při projevu chování zvýhodněné prvky zajišťující vyšší míru přínosu (benefits). Pro optimalizaci předpovědi potravního a pohlavního chování vybraného druhu se hledají odpovědi na následující tři otázky (CHARNOV, 1976; PARKER A STUART, 1976):

Jakým volbám organismus čelí?

Jaké jsou preference organismu?

Jaké jsou bariéry?

Životní prostředí je mimo jiné také výrazně kompetiční prostor. Chování individuálního jedince je založeno na pozorování a vyhodnocení rozhodnutí ostatních kompetitorů. Postupně dochází k ustálení systému rozhodování (GIRALDEAU, 1997).

Evolučně stabilní strategie mají v daném prostředí vyvážený systém kompromisů (trade-off). Dle zásad evolučně stabilních strategií je posuzováno bojovné chování, systém páření, či kooperace, komunikace a konflikt uvnitř sociálních skupin. Organismus zvyšuje své fitness variabilitou možných strategií, které ovládá a dokáže využít. Zapojením paměti živočichové drží záznam o současných, ale také minulých rozhodnutích svých soupeřích a nepřátel.

Při rozhodování se živočichové často řídí svými zkušenostmi. Výsledky těchto procesů se překvapivě často shodují se statistickými modely. Různorodost chování jednotlivých členů udává populaci polymorfní charakter (HAMILTON, 1979). Projevy chování také souvisí s velikostí jedince: Malá ryba se ve svém repertoáru obranných mechanismů musí omezit na okusování nebo postrkování, velká ryba může rozvinout pádnější útok, nebo ovládat větší teritorium (VOGEL, 1988).

1.4 Komunikace živočichů ve vodním prostředí

Každý živočišný druh vlastní repertoár optimálních, ritualizovaných signálů, které jsou vysílané/přijímané pomocí různých smyslových kanálů. Tyto signály mohou být uniformní i mezi živočišnými druhy navzájem. Signály, které jsou určeny ke

komunikaci jsou extrémně specifické a jejich diverzita je ohromná. Jsou nositeli informace a správné vyhodnocení je během jakékoliv interakce klíčové. Signály musí zapadat na přijímající nervová zakončení a receptory jako klíč do zámku a nechtěné přenosy musí být co nejvíce eliminovány. Komunikace často probíhá na velké vzdálenosti a její signál je v „hlučném“ prostředí rušen. Nejvíce jsou riziku záměny vystaveny druhy s podobným biorytmem obývající stejný biotop.

Komunikace probíhá, když akce jednoho jedince způsobí reakci druhého, jejíž projevem je změna chování. V mnoha situacích jsou zvýhodněni jedinci, kteří dokážou odečítat psychický, motivační a fyzický stav ostatních. U signalizátora je kladen důraz na design signálu a vyvolání správné reakce u přijímajícího jedince, jeho signalizace je forma manipulace. Zároveň jsou preferovány ty komunikační prostředky, které nevystavují signalizátora nebezpečí a jsou energeticky nenáročné. Za některých okolností se vyplatí využít nepravdivých nebo nadhodnocených signálů pro oklamání přijímajícího jedince, například při zastrašování. Přijímající jedinec je zase tlačěn k lepšímu pochopení záměru signalizujícího jedince a odhalení klamavých signálů. Je tedy jakýmsi vykladačem mysli signalizátora a signály jsou pro něho cenným zdrojem informace. Nicméně účastníci komunikace jsou, alespoň v průměru, v neustálém tlaku chovat se upřímně a informovat pravdivě o své situaci (DAWKINS A KREBS, 1978).

Při obraně teritoria a jiných stresujících situacích nebo během páření zaujímají ploutve či jiné tělní výrůstky ryb různá postavení. Údernost jejich sdělení může být umocněna barevným zvýrazněním. Další možností je úmyslné zvětšení objemu, při zastrašování nepřítele. Predační tlak může vytvářet rozdíly v barevnosti i mezi jednotlivými populacemi stejného druhu. Ryby, které jsou barevně méně výrazné v oblasti spektra pod rozlišovací schopností predátora, čelí také menší pozornosti ze strany predátorů (WILEY, 1983).

1.4.1 Smysly ve vodním prostředí

Pro orientaci v prostoru využívají organismy různé smyslové adaptace. Signalizace mezi jedinci je vizuální, akustická i chemická, převládá podle podmínek prostředí a liší se druh od druhu. Způsob komunikace je ovlivněn fyzikálními vlastnostmi prostředí. Ekologické faktory působí formujícím evolučním tlakem na anatomické a morfologické struktury sensorických orgánů. Způsob života rodičů rozvíjí funkční struktury potomků, čímž vznikají nové adaptace pro daný způsob života (DUSENBERY, 1992).

Organismy se vyrovnávají s nedokonalostí svých smyslů různým způsobem. Ve vodním prostředí je zrak limitovaný rozptýlením světla na dispergovaných částicích,

načež mnoho druhů ryb odpovídá evolučním zvýšením barevnosti a kontrastu, zvýšením fotosenzibility či zvětšením oka. Vesměs je zrak otázka přenosu na krátké vzdálenosti. Výhodou optického signálu je jeho přesnost (DOUGLAS, 1990).

Podvodním komunikačním prostředkem využívaným savci jsou zvukové signály, především sonar o vysoké frekvenci. Šíření zvukových vln je ve vodě až pětkrát rychlejší než ve vzduchu. U ryb se vyvinul proudový orgán (postranní čára), který vnímá změny tlaku vody.

Další významnou platformou předávání informací je chemorecepce. Chemické signály (feromony) se účastní komunikace pro udržení hejna, značení teritorií, komunikace mezi druhy, pohlavní a individuální identifikace, páření a během péče o potomstvo. Ještě nejsou zcela popsány všechny mechanismy fungování feromonů a jejich metabolické dráhy. Ne všechny chemické látky vylučované organismem se účastní komunikace mezi jedinci, jejich působení je závislé na faktorech prostředí a u ryb se zatím nejeví jako ritualizované (LILEY, 2011).

Jako příklad chemické komunikace se uvádí specializované dermální buňky mnoha sladkovodních ryb, které vypouštějí po poškození do prostředí feromony, jež jsou pro ostatní jasnými signály pro nebezpečí. Druhy sdílející predátory mohou sdílet i antipredační signály. Pro získání informace o koncentračním gradientu látky musí ryba ve vodě zaujmout více než jednu směrovou pozici. Někteří jedinci si pomáhají nastavením různých tělních výrůstků a chemoreceptory (DUSENBERY, 1992).

1.5 Pohlavní chování ryb

Jedním ze základních příkladů kooperace mezi jedinci stejného druhu i mezi živočišnými druhy navzájem je signalizace pro rozpoznání druhů během páření. Zamezuje se tak neplodným spojením a zbytečným energetickým a časovým investicím.

Prostředí tropů bohaté na niky stimuluje druhovou radiaci. Spolu s novými druhy vznikají i reprodukční bariéry (izolace). V oblastech vysoké míry druhové diverzity může být mimo prostorovou izolaci důležitými evolučními mechanismy také důraz jedinců na výběr různých atraktivních morfologických znaků, potravní preference nebo výhodné strategie. U vizuálních znaků se samičky při výběru partnera soustředí na velikost, souměrnost, aktivitu a barevnost (ZHAHAVI, 1975,1977). Jsou to znaky, které jsou dobře průkazné v termínech fitness. Souměrnost značí dobré genetické vlastnosti. Velikost, intenzita karotenového zbarvení a míra pigmentace zase ukazují nutriční status jedince, jelikož závisí na množství a kvalitě získané potravy (HILL, 1991, 1992). Jako

příklad je uvedena závislost mezi celkovou melanizací samců *Lebistes reticulatus* a počtem jejich pokusů o páření (Graf 1). Některé barevné struktury mohou být ale naopak pro živočicha znevýhodňující a mohou je vykazovat pouze jedinci s dobrou energetickou bilancí.

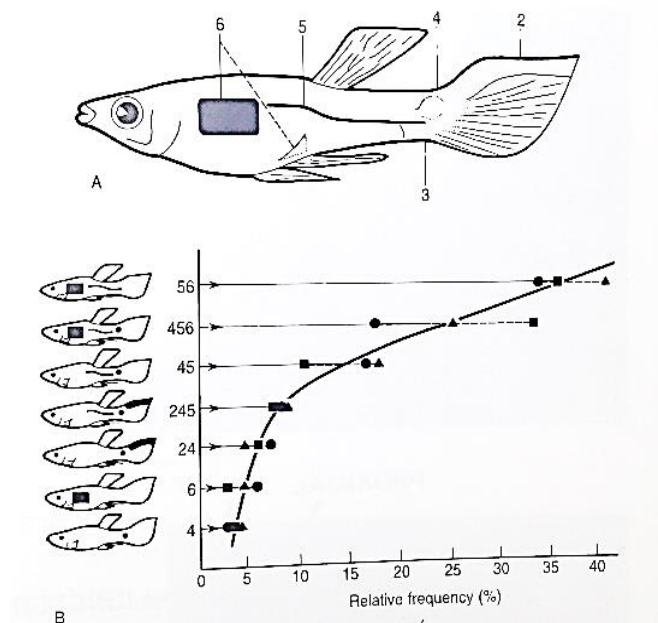
Dalším ekologickým faktorem ovlivňujícím míru motivace se rozmnožovat je velikost hejna. Je-li v nádrži pouze jeden pár, rozmnožování probíhá intenzivně a krátce. Se stoupajícím počtem párů motivace rozmnožovat se klesá, ale pokusy jsou činěny významně déle (FARR A HERRNKIND, 1974).

1.6 Sociální chování ryb

Většina zvířat nachází zvýšení fitness pro sebe a své potomky v sociálních svazcích. Tato uskupení jsou druhově specifická s návazností na prostředí. Dlouho byly skupiny jedinců považovány za samostatnou jednotku a sociální chování popisováno z pohledu výhodnosti pro celou skupinu. Sociální uskupení jsou vnímána jako adaptace na regulaci počtu jedinců a čistá selekce uvnitř populace za faktor formující chování.

Přestože sociální chování vede hlavně ke zvýšení fitness jedince, jedinci uvnitř skupiny v mnoha aspektech spolupracují. Některé druhy těží ze vzájemné přítomnosti a spolupráce zejména při hledání potravy a obraně proti predátorům. Kooperace nastává, jestliže obě vstupující strany získávají z interakce nějaký užitek. Útvary složené ze schopných, spolehlivých a altruistických jedinců lépe prospívají. Fitness může být zvýšena přímo i nepřímo, například při využití fenoménu pomoci příbuzným (HAMILTON, 1964).

V pracích z 2. pol. 20. století se klade důraz na výhody, které sociální chování přináší jednotlivcům, a poukazuje se na fakt, že se chování a fitness mění s postavením jednotlivce ve skupině (WILLIAMS, 1966a). Při koexistenci dvou jedinců dochází



Graf 1. A) Typy tmavé kolorace samců *Lebistes reticulatus*, B) Relativní frekvence pokusů o páření (BAERENDS, 1955).

k interakci na úrovni jejich behaviorální strategie. Společnost je uspořádaná skupina jedinců stejného druhu, která vyniká určitou měrou kooperace.

Sociálním uspořádáním většiny ryb je *hejno* formované za účelem tření a přežití (BROWN, 1975). Třecí hejna jsou rovnoměrně seskupena za účelem rozmnožování obou pohlaví a nevykazují známky péče o potomstvo. Konflikt mezi pohlavími není tak extrémní, jako třeba u ptáků (TRIVERS, 1972). Hejna utvořená za účelem přežití jsou tvořena náhodně příbuznými jedinci, kteří jsou k sobě vzájemně přitahováni za účelem zvýšení fitness. Samičky se páří s několika samci pro zajištění rozmanitosti potomstva. Při oplozování dochází ke kompetici spermií různých samců, to vysvětluje vznik promiskuitního chování (PARKER, 1970c).

Skupinová agregace je původně antipredační, potravní, potažmo rozmnožovací strategií jedince. Jedním takovým nástrojem je synchronicita plavání v hejnu, kdy se ryby snaží odvést pozornost na ostatní a zvýšit tak svou vlastní naději na únik. Míra pozornosti, kterou ryba od svých souputníků v hejnu dostává, může vypovědět mnoho o jejím sociálním postavení a zkušenostech.

Analýza chování jednotlivce odhalila vztah mezi predacním tlakem, dynamikou pohybu hejna a jeho kohezí, tj. největší vzdáleností mezi jedinci, při jejímž dosažení jedinci plavou zpět do centra. Polarizace hejna se však zdá být predací neovlivněna (HERBERT-READ, 2017). Většina experimentů vystavuje pozorované organismy netradičním situacím a následně analyzuje jejich reakci. Jen málo studií se soustředí na volně se pohybující hejno. Mechanismy řídicí základní chování a přirozenou anatomii hejna jsou stále předmětem diskuse.

1.7 Hierarchie

Téměř ve všech skupinách obratlovců existují hierarchické struktury. Společenský status je měřen úspěšností předání genetické informace. Dominantní jedinci užívají výjimečných privilegií, ale jsou v neustálém nebezpečí ztráty postavení. Společenské souboje jsou vyčerpávající a nesou s sebou nebezpečí zranění, či dokonce smrti. Jsou-li ve skupině i jen malé rozdíly v síle jedinců, dochází k soubojům častěji, protože níže postavení jedinci mají vyšší motivaci se pokoušet vůdčího jedince svrhnout. Jestliže je míra riziku dostatečně vysoká, vyplatí se podřízenému jedinci zůstat v mírovém stavu (REEVE, 1993).

Hierarchii můžeme chápat jako *lineární žebříček* nebo *nelineární síť*. Perfektně lineární společenská posloupnost je vzácná, ale míra nelineárnosti je někdy tak malá, že

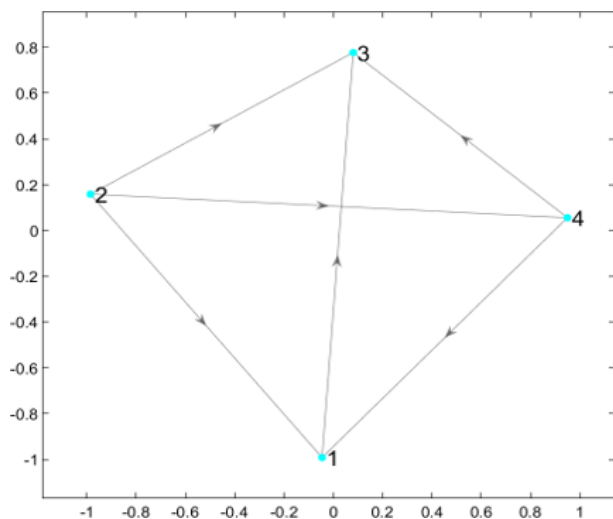
se vůbec neuvažuje. Společenské uspořádání je nutné začít popisovat chováním jednotlivců, pokračovat popisem vznikajících interakcí, a teprve potom postoupit na úroveň organice hejna nebo jeho struktury. Interakce mezi individuálními jedinci tvoří základ pro vyšší organizační struktury. Hierarchie může být ovlivněna ekologickými faktory působícími na hejno, sezonalitou, stářím jedinců, složením hejna a jeho velikostí. Obecně hejna mladších vývojových stádií vykazují větší míru nelinearity než hejno složené z vyspělých jedinců. Při popisu hierarchie hejna se postupuje následujícím způsobem (BOYD A SILK, 1983):

- *Identifikace dominantních projevů chování.*
- *Stanovení definice vítězství a prohry při konfliktu dvou jedinců.*
 1. *Dlouhodobá řada dat o interakcích mezi jedinci.*
 2. *Priorita při získávání zdrojů.*
 3. *Počet agonistických setkání.*
 4. *Počet konfliktních setkání.*
 5. *Opětovanost útoku.*
- *Počet konfliktních setkání.*
- *Ustanovení statistického vzorce výsledků interakcí.*
- *Konstrukce matice členů pozorovaného hejna s přiřazenými hodnotami (Tab. 1).*
- *Vytvoření diagramu hierarchie (Graf 2).*
 1. *Jedinci jsou všichni navzájem spojeni stejným počtem čar symbolizující sociální interakce.*
 2. *Diagram zaznamenává pouze interakce, které se opravdu udály, někdy za použití manipulace k vyvolání konfliktu (LANDAU,1951).*
 3. *Veličinou popisující míru dominance v hierarchii je Landauův index linearity $h = \frac{12}{n^3-n} \sum_{a=1}^n \left(v_a - \frac{n-1}{2} \right)^2$, kde n je počet jednotlivců ve skupině, a je dominantní jedinec a v_a je počet jedinců podřazených dominantnímu jedinci a . Hodnoty $h > 0.9$ obecně indikují vysoce lineární hierarchii (DE VRIES, 1995).*

	A	B	C	D	E
A	-	21	0	29	11
B	0	-	0	0	0
C	22	11	-	8	18
D	0	11	0	-	6
E	0	2	0	0	-

	A	B	C	D	E
A	-	22	8	18	11
B	0	-	29	11	21
C	22	11	-	6	11
D	0	11	0	-	2
E	0	0	0	0	-

Tabulka 1. (vlevo) Jedinci A, B, C, D, E a počet výherních setkání, (vpravo) stejná tabulka seřazena podle hierarchie. Příklad dokonale lineárního uskupení, kdy $h = 1,0$ (LANDAU, 1951).



Graf 2. Diagram síly (délka) a směru (šipka) interakcí mezi jedinci (LONHUS, 2020).

2 Návrh experimentu

2.1 Modelový organismus

Jako modelový organismus byl zvolen druh běžně dostupné akvariijní ryby z čeledi kaprovití (*Cyprinidae*), v současnosti referované jako *Puntigrus tetrazona* (BLEEKER, 1955). V literatuře najdeme druh pod synonymy *Barbus tetrazona*, *Barbus tetrazona tetrazona*, *Capoeta tetrazona*, *Puntius tetrazona* *Systemus tetrazona* (BLEEKER, 1855), *Systemus sumatranus*, *Systemus sumatrensis* (BLEEKER, 1860). Velká podobnost s příbuznými druhy způsobila nejasnosti v nomenklatuře. Současné taxonomické ukotvení nalézají mezi čtyřpruhá mezi druhy řazenými do rodu *Puntigrus* (KOTTELAT 2013, 147).

ŘÁD	<i>Cypriniformes</i>
ČELEĎ	<i>Cyprinidae</i>
PODČELEĎ	<i>Barbinae</i>
ROD	<i>Puntigrus</i> (KOTTELAT, 2013, 147)
DRUH	<i>Puntigrus tetrazona</i>

Obrázek 1. Současná taxonomie *Puntigrus tetrazona*.

2.1.1 Anatomie a morfologie

Akvariijní variety *P. tetrazona* mají neúplnou postranní čáru s 6–7 nebo 10–13 kanálky. Liší se tak od původní divoké formy, která má v postranní čáře 8–9 kanálků. Pozorujeme červené zbarvení na nose a všech ploutvích, zejména na lemu hřbetní ploutve a celé prsní ploutvi. Zbarvení je oproti divoké varietě výraznější. V oblasti rozšíření je v současné době známo pět druhů tohoto rodu, které si liší počtem a šířkou pruhů, délkou postranní čáry, počtem šupin v laterální linii a zbarvením ploutví. Jejich rodová determinace se provádí na základě znaků uvedených v Tabulce 2.



Obrázek 2. Fotografie samce (nahore) a samice (dole) *P. tetrazona* (BAKKER, 1982 v TAMARU, 1998).

Podle určujících charakteristik pro jednotlivé zástupce skupiny *Puntigrus* není jisté, jestli je akvariijní linie samostatným druhem, mezidruhovým hybridem, nebo zda se

jedná výhradně o produkt šlechtění (COLLINS, 2012). Samečci jsou poměrně štíhlí s nápadnými červenými znaky. Samičky jsou zavalité většinou bez výrazného zbarvení. Pohlavně dospívá při 20–30 mm, s maximální délkou těla 50 mm a šířkou 20 mm (KORTMULDER, 1972). Na trhu existuje v několika barevných varietách, černé pruhy na stříbrolesklém základu jsou však nejbližší přirozeně se vyskytující formě. Přestože rozložení pruhů je pro zástupce druhu *P. tetrazona* uniformní, jednotlivé pruhy se u různých jedinců mohou mírně lišit. Zbarvení je ovlivněno množstvím a kvalitou potravy. Kombinace tělesných a barevných parametrů je jedinečná pro každou rybu (TAKI, 1977). Tvar těla a intenzita zbarvení se mění se stářím a může být sezónní, vyspělí jedinci disponují výraznějšími znaky.

Tabulka 2. Charakteristika druhů rodu *Puntigrus*.

Druh	Postranní čára	Počet šupin laterální linie	Zbarvení ploutví	Šířka pruhů	Rozšíření
<i>P. anchisporus</i> (Vaillant, 1902)	úplná	21–23+2	Hřbetní černá s červeným lemem Břišní celočervené	≤ 3 šupiny	Borneo
<i>P. navjotsodhii</i> (Tan, 2012)	úplná	20–21	Hřbetní černá s červeným lemem a kořenem 1. paprsku Břišní celočervené	≤ 5 šupin	Borneo
<i>P. partipentazona</i> (Fowler, 1934)	neúplná	18–23	Hřbetní z části černá s červeným lemem a kořenem 1. paprsku Břišní načervenalé	≤ 2,5 šupiny 5. pruh neúplný	Malajsie, Kambodža, Vietnam, Thajsko
<i>P. pulcher</i> (Rendahl, 1922)	neúplná	19–21+2	Hřbetní i břišní černé	≤ 1,5 šupiny	Borneo
<i>P. tetrazona</i> (Bleeker, 1955)	neúplná	19–21+2	Hřbetní i břišní černé se světlým lemem	≤ 2,5 šupiny	Sumatra

Morfologické změny v průběhu ontogeneze jsou znázorněny na Obrázku 3. Poměr mezi délkou a váhou těla odpovídá stáří ryb a je definován níže uvedenou rovnicí. (WCC, 1995).

$$TL = 0,488Days - 0,0017Days^2 + 1,536$$

$$\ln(WT) = 0,126TL - 4,268$$

TL	délka těla [mm]
Days	počet dní v kultuře
ln(WT)	přirozený logaritmus hmotnosti v [g]



Obrázek 3. Stadium ontogeneze jedince přibližně 3. den (5,3 mm), 5. den (6,0 mm), 7. den (7,3 mm), 15. den (10,1mm) a 25. den (25,0 mm) po vylíhnutí (BAILEY v TAMARU, 1998).

2.1.2 Ekologie

Oblast původního rozšíření a těžiště diverzity rodu *Puntigrus* leží v tropické Asii. Potvrzené nálezy pochází z Bornea, Sumatry, Thajska a Malajsie. Odchyty jsou zaznamenány z různých typů mělkých stojatých a tekoucích vod, což značí překvapivou míru adaptace na změny chemismu a výkyvy hladiny vody. Distribuce druhu dle výzkumu v Malajsií indikuje preferenci tvrdší vody, s vysokou koncentrací uhličitanu vápenatého ($40\text{--}250 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ CaCO}_3$). Parmičkám se daří ve vodě o pH 6,5–7,5, obsahu celkového dusíku do $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, množství kyslíku kolem $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a relativně nízké průhlednosti (ponor Secchiho desky 30–40 cm). Teplotní optimum je v rozmezí 22–28 °C. Rozmnožování probíhá, neklesne-li teplota dlouhodobě pod 23 °C. Dlouhodobé snížení teploty pod 18 °C může být letální. Nálezy jsou však zaznamenány z různých částí Asie i mimo předpokládané rozšíření, a to bez prokázané introdukce (BAENSCH A RIEHL 1993; SCHEURMANN, 1990).

2.1.3 Potrava

Celá skupina je popisována jako omnivorní. Analýza střev jedinců odchycených z volné přírody ukazuje poměrově větší zastoupení primárních producentů v obsahu tráveniny. Podrobnější studie obsahu střev ukázala přítomnost patnácti druhů fytoplanktonu, vyšších rostlin, čtyř druhů zooplanktonu a neurčených drobných bezobratlých (SHIRAISHI, 1972; KORTMUNDLER, 1982).

Parmičky, podobně jako jiné akvarijní ryby, mají neefektivní zažívání. Krmná dávka by proto měla být rozložena alespoň na tři díly, podávané v průběhu dne. Tím se sníží spotřeba krmiva, organický vnos a kyslíkové poměry v akváriu. Je-li nutné krmení podávat najednou, je čas krmení upraven podle aktivní fáze ryb. Správná dávka krmení

by měla být spotřebována do 15 min. Množství je upraveno podle teploty vody v akváriu a velikosti ryb. Prospívající jedinci přijímají denně asi 10 % své váhy.

Složení potravy je významným faktorem ovlivňujícím růst, celkové zdraví jedince a také zbarvení. Důležitý je poměr mezi proteiny (alespoň 30 %), esenciálními aminokyselinami, tuky, sacharidy, vitamíny a minerály. Pigmenty ovlivňující zbarvení pocházejí většinou z přirozené potravy. V umělých chovech se do krmiva přidávají barviva (astaxanthin, karoteny aj.) (TAMARU, 1998).

2.1.4 Etologie

Mezi akvaristy je tento druh známý svým hejnovým chováním, v přírodě tvoří hejna již relativně v malých počtech od 5 kusů. Je možné pozorovat silnou tendenci vytvářet kompaktní uskupení při pohybu v akváriu nebo během manipulace v oddělených chovných nádobách. Přestože se jedná o hejnový druh, jedinci vykazují známky teritoriálního a sex-dependentního chování. Teritorialita samců je známá v různé míře i u příbuzných kaprovitých druhů ryb (KORTMUNDLER, 1982).

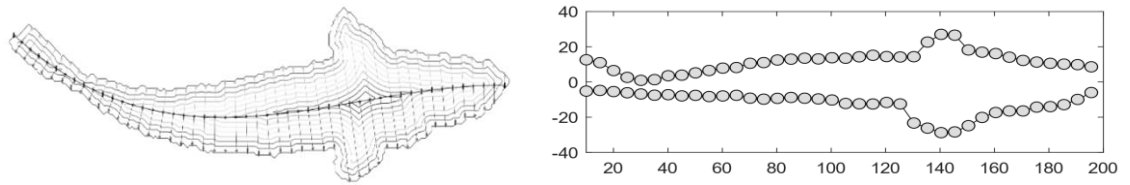
Všichni zástupci *Barbinae* se páří v poměru jeden samec ku jedné samici. Samci se vyznačují agresivním antagonistickým a kompetičním chováním. Samice jsou spíše submisivní. Během tření samec drží samici pevným stiskem ploutví. V tomto sevření mohou zůstat po dobu několika hodin do vypuštění všech pohlavních buněk. Stovky oplozených vajíček společně kladou na ponořené části vodních rostlin či jiných ponořených objektů. Mezi jednotlivými druhy se rituál páření mírně mění. Reprodukční strategie parmiček je vesměs promiskuitní, bez energie vložené do rodičovské péče (BAKKER, 1982 v TAMARU, 1998).

Vyznačují se diurnálním rytmem aktivity v průběhu 24 h. V nočních hodinách je aktivita výrazně utlumena, s charakteristickým postavením hlavou dolů, přibližně 45° s osou dna po dobu až 6 h. Největší aktivitu vykazují v odpoledních hodinách. Délka aktivní fáze je asi 4 h (SHIRAISHI, 1972).

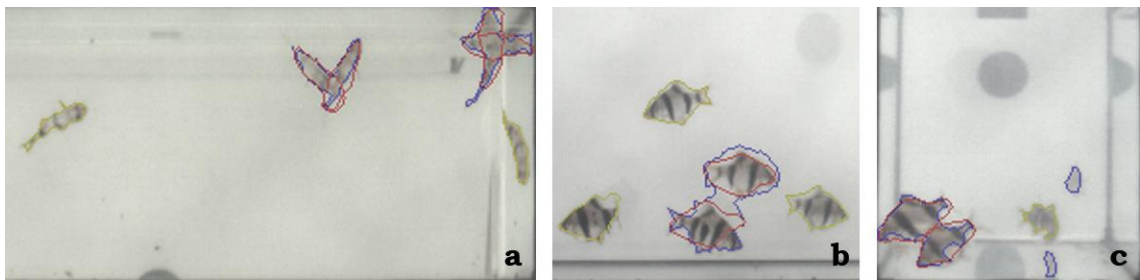
2.2 5iD viewer a analýza obrazu

Zařízení 5iD viewer vyvinuté na Ústavu komplexních systémů (ÚKS) v Nových Hradech umožňuje sledovat objekt ve 3D perspektivě využitím soustavy čtyř zrcadel a jedné kamery. Díky nastavení zrcadel je jejich odraz snímán současně a následně vyhodnocen jako trojrozměrné souřadnice pohybu pozorovaného objektu. Klíčové je rozpoznání jednotlivých ryb v systému. Pro tyto účely jsou využity rozdíly individuální anatomie jedinců, snímání krajních bodů jejich siluet (Graf 3). Každému jedinci je

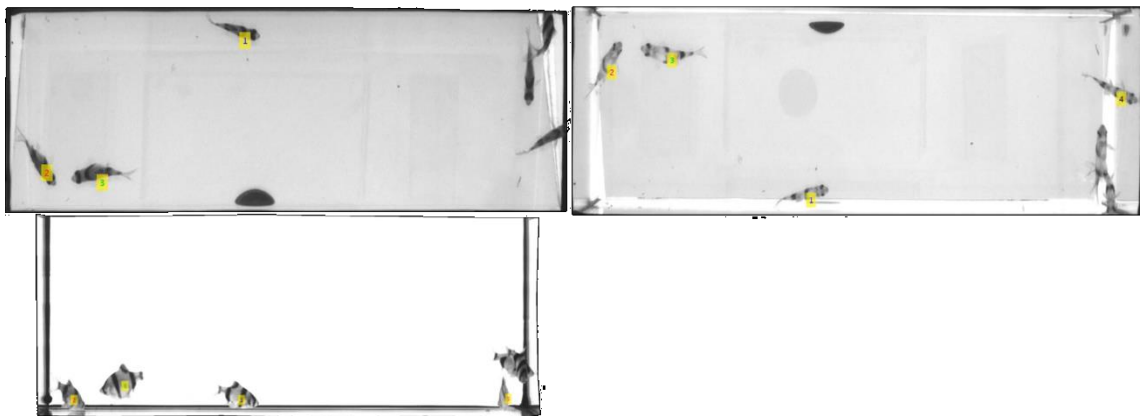
přiřazen profil založený na jeho tělesných a barevných parametrech. Pohyb jedince je možné sledovat i v případě, že dojde k překrytí siluetou jiného jedince (Obrázek 4).



Graf 3 Identifikační znaky na siluetě jedince (LONHUS A KOL., 2019).



Obrázek 4. Řešení překrytí obrazu sledovaných objektů při nízkém rozlišení, a pohled zespodu, b, c pohledy ze stran. V bočních pohledech obraz objektů není symetrický, ale díky algoritmu nedochází ke ztrátě stopy jedince během experimentu (LONHUS A KOL., 2019).



Obrázek 5. Identifikace individuálních ryb na základě souřadnic extrahovaných ze tří pohledů: svrchního pohledu (vlevo nahoře), spodního pohledu (vpravo nahoře) a pohledu zředu (dole).

2.3 Metodika experimentu

Podle ANIMAL BEHAVIOUR, 1995 bylo pro experiment využito nejmenší potřebné množství zvířat, které vykazuje žádoucí hejnové chování. V pilotních studiích mohou byly počty záměrně podhodnoceny. Dobré životní podmínky *P. tetrazona* byly udržovány během experimentu i v období, kdy žádné experimenty neprobíhaly.

Počet jedinců účastnících se experimentu byl 24: ve čtyřech domovských akváriích byly chovány pokusné skupiny 6 jedinců. Jednotlivá hejna byla sestavena náhodně. Hejna byla pro zajištění stabilního hierarchického rozvrstvení po dobu trvání experimentu držena odděleně.

Tabulka 3. Původ a transport pokusných zvířat *P. tetrazona* do laboratoře v Nových Hradech.

Původ	Zverimex Globus, České Budějovice, 7/2019
Mikrobiologický status	Konvenční
Transport	Krátkodobý
Sedativa během transportu	Ne
Úmrtnost během transportu [%]	6,6
Minimální aklimatizace na podmínky pokusu	1 týden, vybudování hejnové hierarchie

Domovská akvária jsou koncipována jako simulace přirozeného prostředí se zapojeným porostem vodních rostlin. Ryby jsou drženy v režimu s 12hod. fotoperiodou při 25 °C. Parametry je možné dočasně upravit podle podmínek panujících v akváriu. Každé akvárium je vybaveno vzduchovým čerpadlem, ohříváčem vody s termostatem a teploměrem. Oběh vody je zajištěn samostatným filtrem. Validační test kvality vody je prováděn v týdenních intervalech a před každým experimentem, zároveň je posouzen stav ryb. Krmení bylo podáváno jedenkrát denně v aktivní fázi ryb.

Samotné pozorování probíhalo v zařízení 5iD viewer umístěného v osvětlovacím boxu zajišťujícím homogenní osvětlení akvária. Akvárium bylo těsně před začátkem experimentu naplněno vodou z domovského akvária, kvůli eliminaci stresu ze změny prostředí, v případě velkého zakalení se voda naředila připravenou odstátou vodou.

V pokusném akváriu byly ryby přemístěny do zařízení. Při pozorování vlivu látky na pokusnou skupinu byla dávka 0,15% a 0,25% ethanolu (96%) podávána ještě před umístěním do zrcadlové soustavy světelného boxu. Před zahájením pozorování byl ponechán čas na uklidnění ryb po manipulaci, a také na rozvoj působení přidaných látek (6 min, 30 min). Po dobu sběru dat bylo hejno odděleno od examinátora neprůhlednou

stěnou. Doba trvání experimentu nepřesáhla 40 min, bez vzduchování, kvůli dodržení kyslíkových poměrů. Po skončení pozorování byly ryby jednotlivě váženy v malé odměrně nádobě. Pro snížení počtu omylů při identifikaci jednotlivých ryb byla v pokusném akváriu během experimentu data sbírána 12bitovou rgb kamerou JAI s vysokým rozlišením. Velikost ryby v digitálním obraze odpovídala přibližně 50×30 px ($5 \mu\text{m}^2 \text{px}^{-1}$). Kalibrace obrazu byla provedena softwarem VerCa (PLATONOVA A KOL., 2019).



Obrázek 6. Pohled na zařízení domovských akvárií (vlevo) a pokusné akvárium 5iD viewer s rybami (vpravo).

Tabulka 4. Parametry akvárií a vody pro experiment v Nových Hradech.

Parametry akvária	Domovské akvárium	Experimentální akvárium
Dezinfekce	ethanol, var, NaHCO ₃	ethanol
Rozměry [mm ³]	600×350×400	385×200×140
Počet jedinců	6	6
System	otevřený	Otevřený
Hladina vody [cm]		14,8
Objem [l]		6,5
Kvalita vody		
Vodní zdroj	úpravna vody Nové Hradky, Čevak	domovské akvárium
pH	6,9	kvalita vody validována před započítím každého experimentu
Mg ²⁺ [mg·l ⁻¹]	4,9	
NO ₃ [mg·l ⁻¹]	5,5	
Ca ²⁺ [mg·l ⁻¹]	12	
Tvrdost [°dH]	2,8	
Předúprava	2 dny ponechána na odstátí	ředění dle průhlednosti
Vybavení		Ne
Filtrace	Sera fil bioactive, do 130 l	Ne
Vzduchování	Sera Air, 110 l·h ⁻¹	Ne
Osvětlení	Sera LED 360, 20 V, 8,1 W	
Světelná perioda	12 h den / 12 h noc*	může být dočasně upravena pro zlepšení parametrů akvária
Substrát [mm]	kámen 4–8	Ne
Rostliny	ano	Ne
Síťka [cm ²]	12×38	
Krmení		Ne
Krmivo	komerčně prodávaný MIX Tetra	
Frekvence	jedenkrát denně	
Údržba		
Filtrace	každé 1–3 týdny	
Substrát	každé 1–3 týdny	
Voda	dle stavu akvária	

Tabulka 5. Návrh experimentu pro porovnání vlivu ethanolu na chování ryb.

Kontrola		
Látka		—
Aklimatizace na 5iD viewer	6 min	
Doba záznamu	10-20 min	podle množství dat
Ethanol		
Látka	ethanol, C ₂ H ₆ O	$M(\text{et}) = 46,07 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\rho(\text{et}) = 0,00076 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (při 23 °C) (PUBCHEM, 2020)
Čistota [%]	96	
Dávka [obj. %]	0,15; 0,25	
Podání látky	30 min	působení před samotným experimentem (LADU, 2014)
Aklimatizace na 5iD viewer	6 min	

Doba záznamu	10–20 min	podle množství dat
--------------	-----------	--------------------

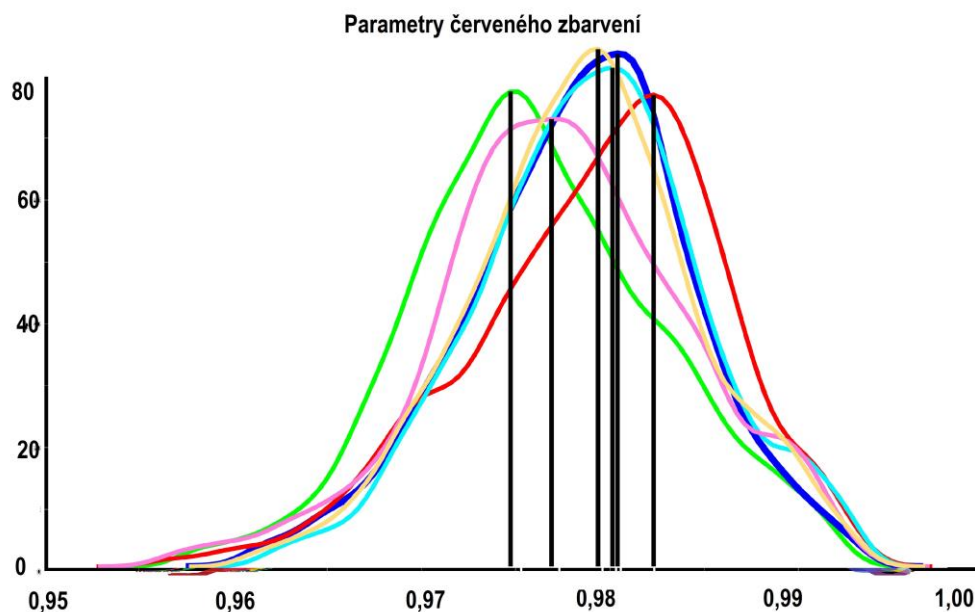
3 Výsledky

3.1 Vlastní pozorování na kontrolních vzorcích

Graf 4 znázorňuje intenzitu a odstín červeného zbarvení jednotlivých ryb v pokusném akváriu. Podle grafu je možné usuzovat pohlaví jedinců, jestliže vycházíme ze znaků pohlavního dimorfismu parmiček popsaných v kapitole 2.1.1.

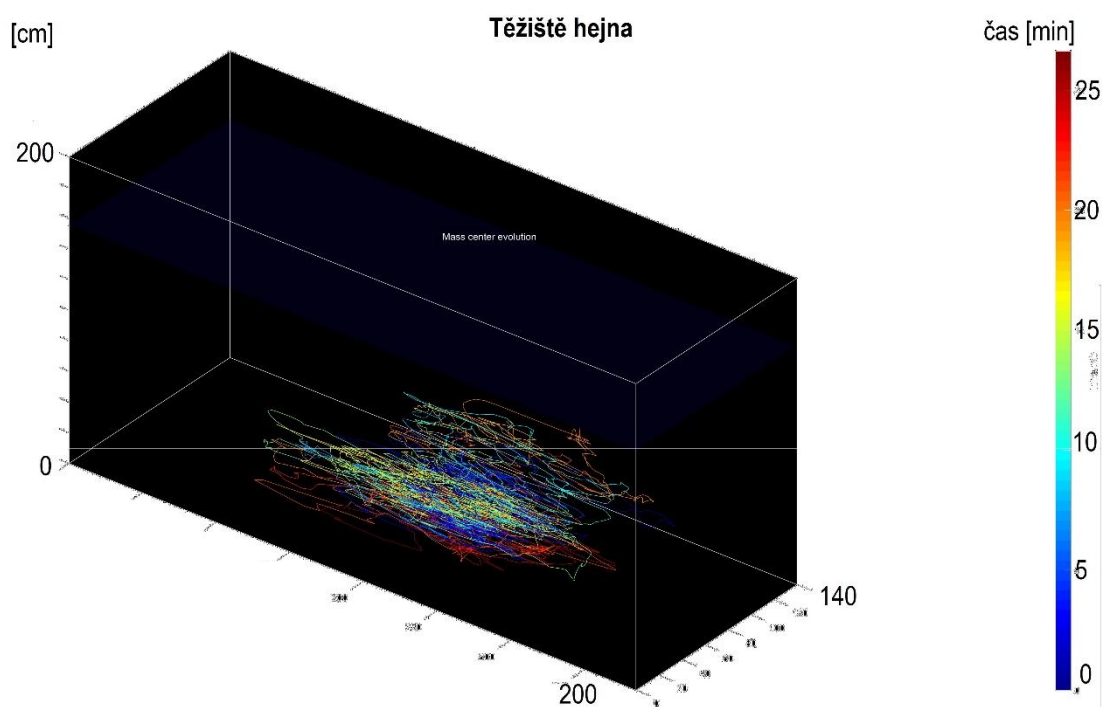
Tabulka 6. Identifikace individuálních ryb z pilotní studie.

Pořadí	Barva	Pohlaví	Popis
1	zelená	♀	méně atraktivní
2	modrá	♂	nedefinovaný
3	červená	♂	dominantní, α
4	tyrkysová	♂	méně dominantní, β
5	fialová	♀	atraktivní
6	žlutá	♂	nedefinovaný



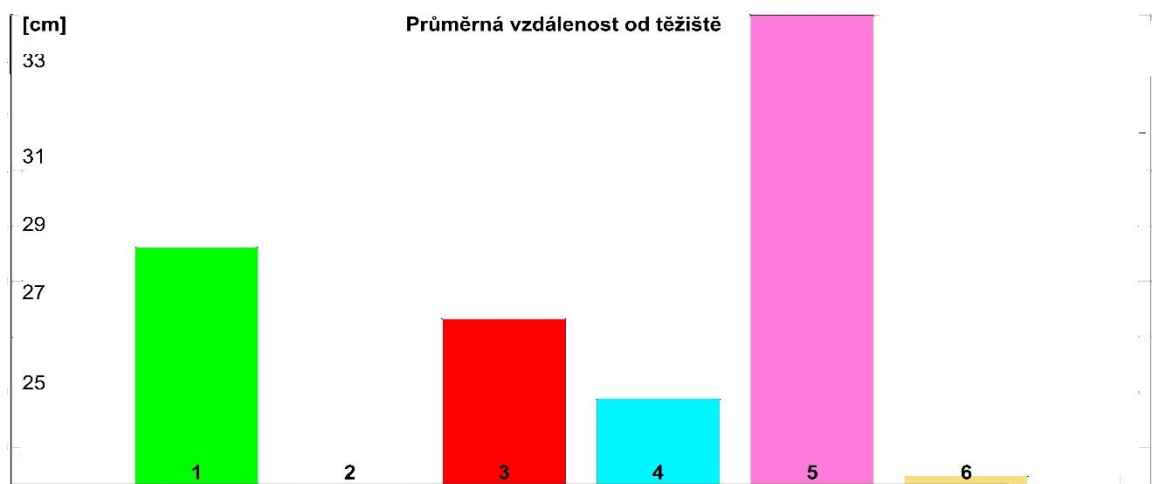
Graf 4. Parametry červeného zbarvení pro jednotlivé ryby. Osa x – normalizovaná intenzita červeného kanálu, osa y – pravděpodobnost výskytu červené intenzity.

Graf 5 znázorňuje pohyb těžiště hejna v čase. Prostor, ve kterém se těžiště v časovém úseku (0–25 min) nachází, je barevně odlišen. Barvy odpovídající příslušným časům jsou vyneseny v legendě. Pohyb se realizuje u dna uprostřed pokusného akvária a ustupuje k zadní stěně akvária (0–5 s). Postupně, jak se ryby seznamují s prostorem, se těžiště pohybu posouvá výš ve vodním sloupci podél zadní stěny akvária (5–10 min). Následně se těžiště pohybu opět přesouvá do středu akvária (15–20 min). Ke konci experimentu se pohyb centra zrychluje a realizuje se v okrajových částech akvária (20–25 min). V této fázi je možné pozorovat zauzlení dráhy centra pohybu, a s ním ustálení pohybu ryb uvnitř akvária. Doba, kdy ryby zůstávají relativně v klidu, se prodlužuje s uplynulým časem od přemístění do pokusného akvária a tento trend očekáváme i při delším trvání experimentu. Myšlené těžiště výskytu ryb v akváriu se neustále přesouvá mezi protilehlými boky akvária. Těžiště rybího hejna se v akváriu neustále přesouvá mezi protilehlými boky akvária. Přemísťování ryb z jedné strany na druhou je pozorovatelné pouhým okem, vysvětlují ho jako kompenzaci potravního a antipredačního chování.



Graf 5. Vizualizace časové evoluce [min] pohybu těžiště hejna v prostoru akvária.

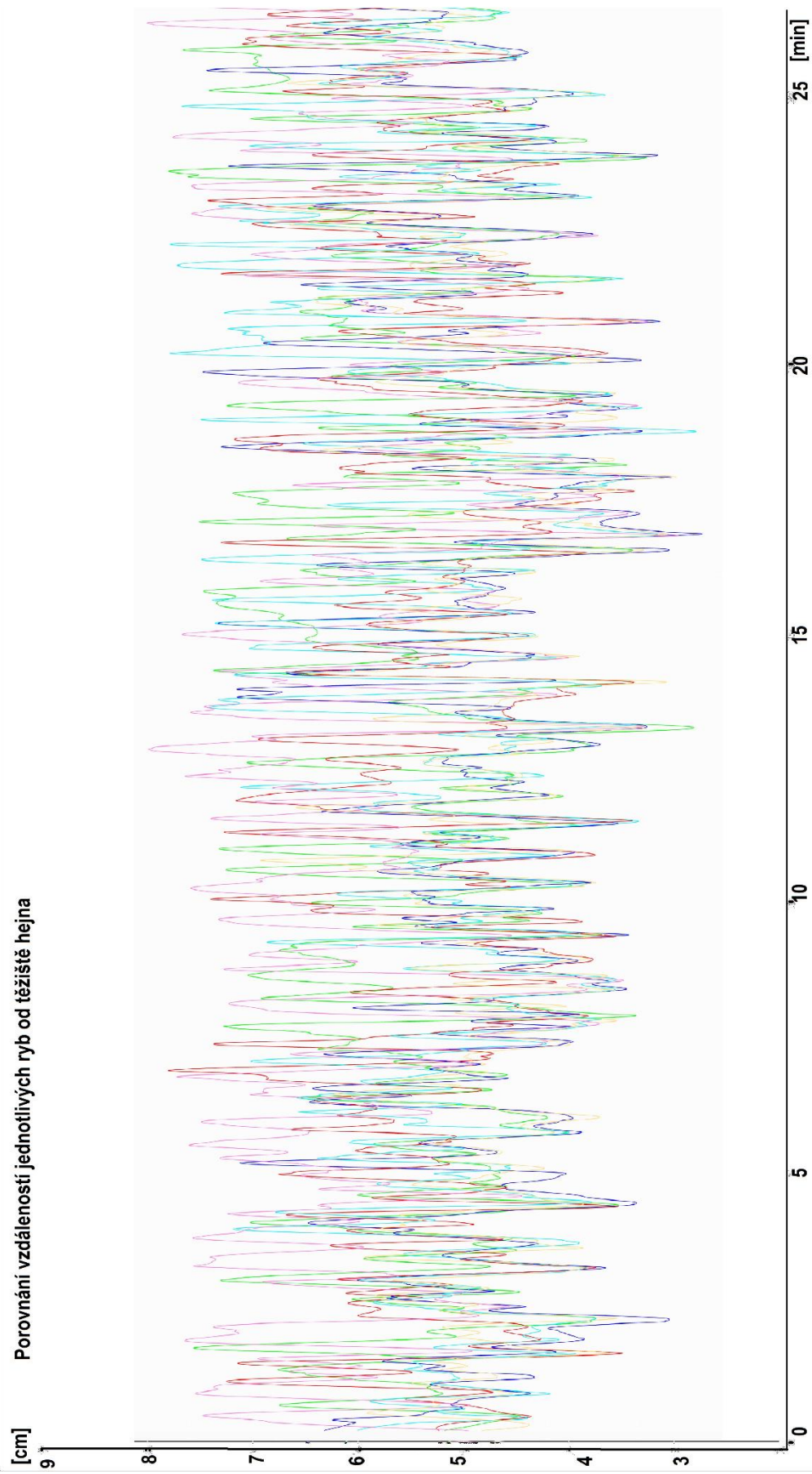
Těžiště hejna je podle Grafu 6 tvořeno trajektoriemi pohybu samců a trajektorie pohybu samic se jeví jako vzdálená. Čím je pohyb v průměru realizován blíže těžišti hejna, tím je ryba nejistější.



Graf 6. Vzdálenost jednotlivých ryb od těžiště hejna [cm].

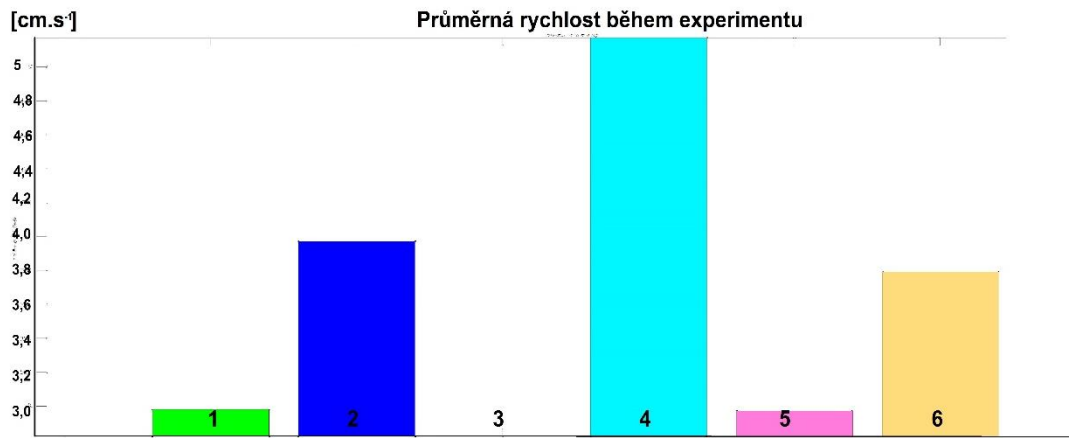
V Grafu 7 je vynesena vzdálenost individuálních ryb od těžiště hejna (v cm). Pozorujeme pulzaci hejna jako celku v čase (0–25 min). V první polovině experimentu je pohyb samic vychýlen, ale téměř vždy odpovídá na vychýlení pohybu některého ze samců. Po porovnání grafu s analyzovaným videem vysvětlují tento jev jako prohánění samic samci. Jako dominantní se jeví samec (červeně) a samec (tyrkysově), ti jsou svým pohybem svázáni s atraktivní samicí (fialově) a méně se samicí (zeleně). Samci (modře) a (žlutě) iniciují častěji pohyb méně dominantní samice. Červený dominantní samec iniciuje pohyb ostatních mimo těžiště, ačkoli se však sám od něho výrazně nevzdaluje a pohybuje se přitom nejvyšší rychlostí.

Ke konci experimentu je vzdálenost všech ryb od těžiště hejna větší než na počátku. V tomto grafu ještě pravděpodobně nedošlo k ustálení vzdáleností mezi rybami. Trajektorie jedinců se v různých intervalech vychylují od trajektorie těžiště hejna a zase se k němu vrací zpět se vzrůstající pravidelností. Často vznikají situace, kdy je hejno relativně kompaktní a všichni jedinci se vyskytují v blízkosti hejna současně, zejména ke konci experimentu. Celý průběh pohybu ryb v akváriu je výrazně ovlivněn sex-dependentním chováním.

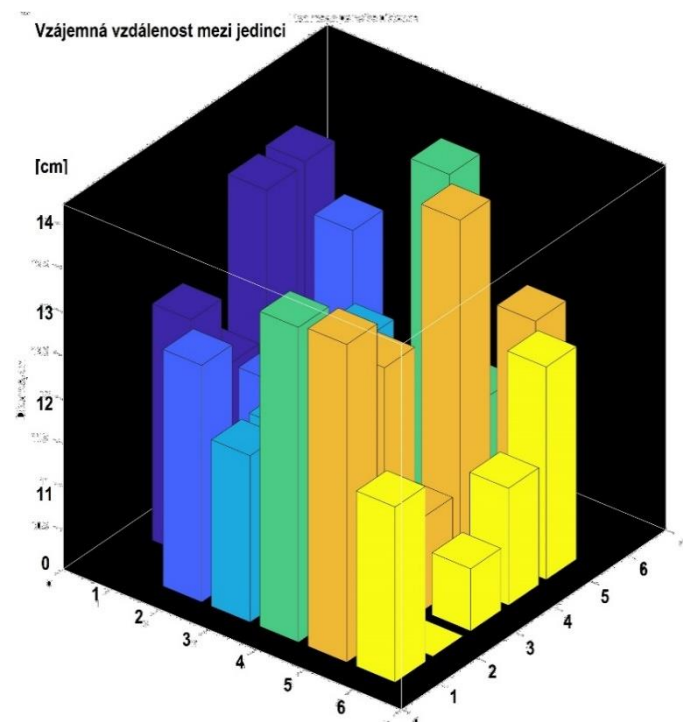


Graf 7. Vizualizace vzdálenosti [cm] jednotlivých ryb od těžiště hejna v čase [min].

Z průměrných rychlostí ryb (Graf 8) během experimentu je patrné, že nejrychleji se pohybují jedinci s nejistým postavením, zejména tyrkysový samec konkurující dominantnímu červenému samci. Oba níže postavení samci (modrý a žlutý) se svými rychlostmi příliš neliší, pravděpodobně zaujímají podobné postavení v hejnu. Rychlost pohybu samic v tomto experimentu je konstantní.



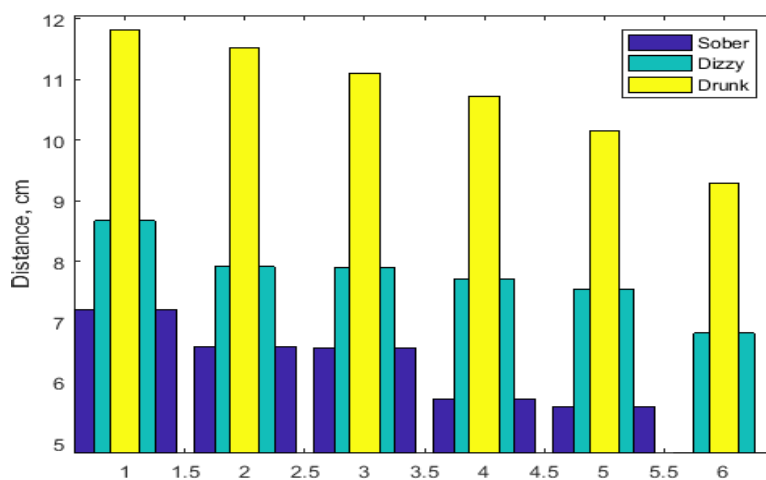
Graf 8. Průměrná rychlost ryb během experimentu [$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$].



Graf 9. Průměrná vzájemná vzdálenost [cm] ryb během experimentu.

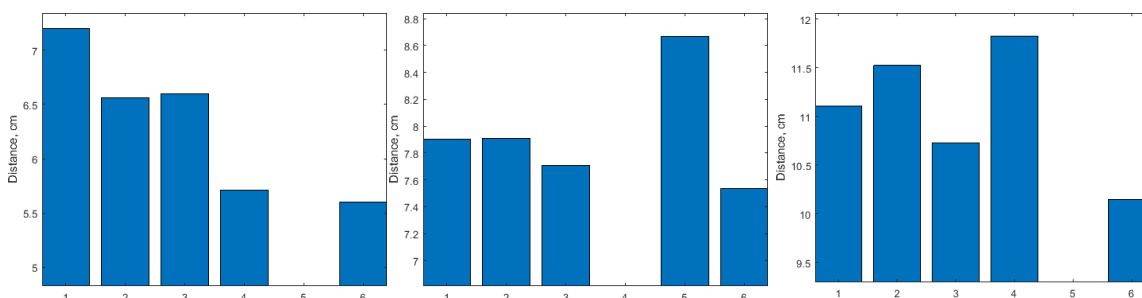
3.2 Indikace bioaktivních látek

Graf 10 je porovnáním výsledků analýzy vzdálenosti jednotlivých ryb od těžiště v kontrolní skupině (*Sober*) vůči hejnům pod dávkou ethanolu 0,15 % (*Dizzy*) a 0,25 % (*Drunk*). Z grafu je patrné, že po přidání testovací substance ethanolu se vzdálenost jedinců od těžiště zvětšuje. Výsledné hodnoty průměrných vzdáleností jsou rozdílné pro obě testované koncentrace.



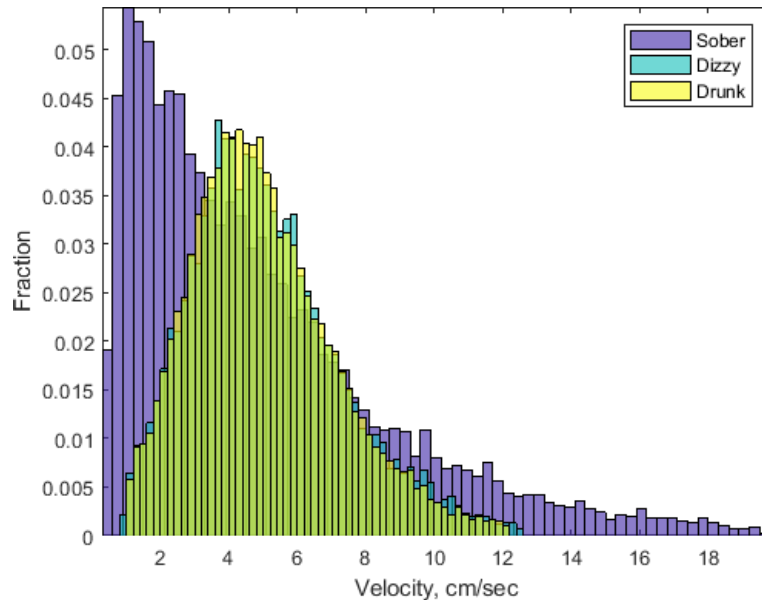
Graf 10. Porovnání průměrných vzdáleností ryb [cm] v pokusných hejnech (dle podobnosti, sestupně).

Graf 11 udává hodnoty průměrné vzdálenosti od těžiště pro jednotlivé ryby z experimentu (zleva: kontrola, 0,15% ethanol, 0,25% ethanol). Hejna nejsou unifikována, není přesně znám podíl pohlaví, ale z grafu je možné jej usuzovat (dle Graf 6). Patrný je fenomén vzrůstající průměrné vzdálenosti s množstvím přidaného ethanolu.



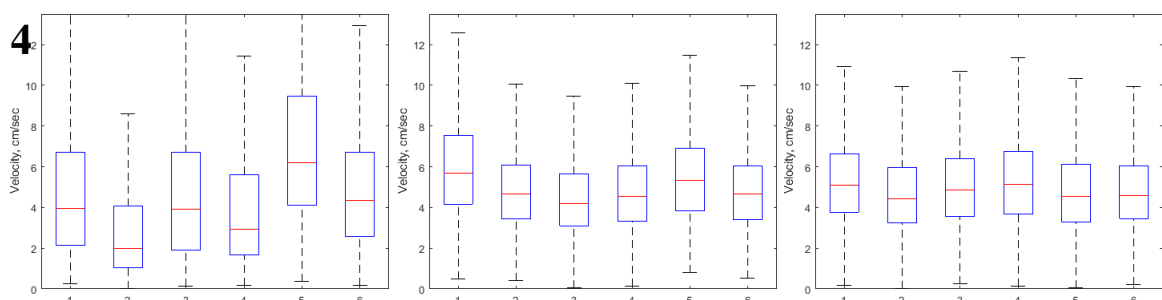
Graf 11. Průměrná vzdálenost ryb od těžiště [cm] pro: zleva kontrola (*Sober*), 0,15% et (*Dizzy*), 0,25% et (*Drunk*).

Graf 12 dává do poměru průměrnou rychlost všech jedinců v hejnech (*Sober*, *Dizzy*, *Drunk*) se zlomkem času, po který je daná rychlost udržována. Omámené ryby plavou rychleji, než jedinci v kontrolní skupině. Tento parametr se nejeví jako průkazný pro detekci koncentrace ethanolu, protože průměrné výsledky jsou pro obě koncentrace téměř totožné.



Graf 12. Rozdělení rychlostí [$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$] ryb v pokusných hejnech v čase.

Graf 13 udává hodnoty průměrné rychlosti pro jednotlivé ryby z experimentu (zleva: kontrola, 0,15%, ethanol, 0,25% ethanol). Rozdíly mezi jedinci se zdají být stírány se vzrůstající dávkou ethanolu. Není jisté, do jaké míry lze výsledky porovnávat vzhledem k tomu, že se nejedná stále o též hejno, ale o náhodně vybrané skupiny.



Graf 13. Porovnání průměrných rychlostí jednotlivých ryb pro: zleva kontrola (*Sober*), 0,15% et (*Dizzy*), 0,25% et (*Drunk*).

Diskuze

Pro vizuální komunikaci mezi jedinci je zapojený systém postavení ploutví a změna intenzity zbarvení. Z pozice ryb v akváriu je možné vypořádat jejich vnitřní vyladění. Ryby vystavené stresové situaci zároveň okamžitě ztrácí na intenzitě zbarvení. Sledování detailních projevů chování může pomoci ke zlepšení přesnosti metody. Pro zlepšení kvality výsledků další série experimentů navrhuji provést celou sadu vybraných měření na jednom hejně tak, aby nedošlo ke vzájemné interferenci látek, ale byla zachycena změna struktury hejna a osobité projevy chování v různých modelových podmínkách. Na základě pilotní studie jsou popsány některé projevy chování.

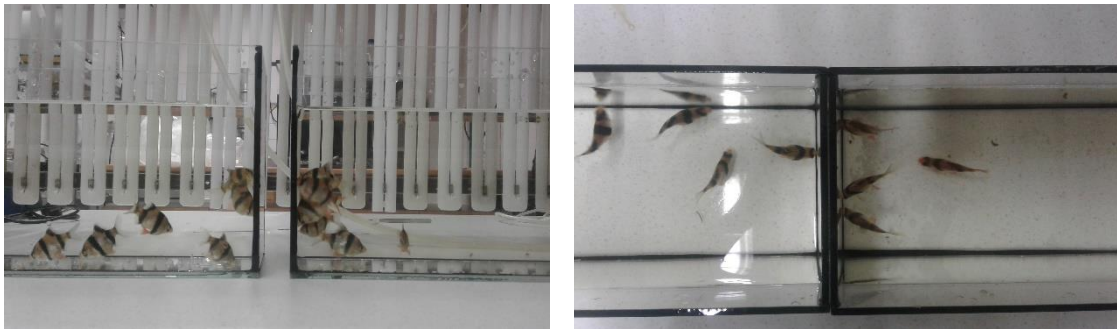
V neznámém prostředí ryby plavou blíž u sebe a drží se u dna, prostor akvária zaplňují postupně. Zejména v čase krmení reagují ryby na příchod obsluhy houfováním při přední stěně akvária. Po dobu, kdy mají jedinci možnost vizuálního kontaktu s examínátorem, nesmí být měření zahrnuto do statistik, nebude-li zrovna toto chování předmětem výzkumu. Podle situace jsou při výzkumných plavbách pozorováni jedinci různého postavení v hejnu. Ryby si prostor pokusného akvária pamatují nejméně týden po provedení experimentu (ŠTYS, 2020). Jsou-li ryby drženy ve větších počtech, rozpadá se jejich struktura na menší podjednotky, což potvrzuje, že navržené využití 6 jedinců je pro experiment ideální, a je otázka, jestli množství v příštích experimentech ještě upravovat. Dobu trvání experimentu je nutné v následujících experimentech dle možností vybavení prodlužovat.

V tomto experimentu není zajištěna antireflexní úprava skel akvária, ryby mohou registrovat svůj odraz, což může významně ovlivnit pozorované pohybové projevy. Reakce ryb na vlastní odraz je jedním z vysvětlení přemístění těžiště hejna k zadní stěně akvária. Zejména u samců může dojít ke změnám trasy ryb na základě pozorování vlastního odrazu. Samci při přiložení zrcadla ke stěně akvária reagují na svůj obraz větší motivací plavat proti sklu, než když je jim umožněno sledovat samice v druhém akváriu (Obr. 8). Samice reagují na vlastní obraz jen z počátku, později, na rozdíl od samců, o něj jeví jen nepatrný zájem. V následujících pokusech se s takovou úpravou počítá. Plavání z jedné strany akvária na druhou může být reakcí na přemístění ryb do menší nádoby (Graf 5).

Při odpočinku míří podélná osa těla ryby směrem ke dnu. Ryba je v klidu u dna nádrže. Pro 24hodinový monitoring kvality vody bude potřeba dlouhodobě sledovat diurnální rytmy parmiček. Zajímavé může být též pozorování osobního prostoru ryb, tedy nejmenší vzdálenost mezi ostatními jedinci.

Struktura pohlavně diverzního hejna parmiček je poměrně dynamická a projevuje se neustálými šarvátkami mezi jedinci. Protože se v některých projevech chování samci a samice liší, je pohlaví ryb nutné brát v úvahu (Obr. 7). Z tohoto důvodu doporučuji provést další pokusy také na pohlavně uniformních skupinách.

Rozmístění ryb v akváriu se mění podle pohlavní skladby a je ovlivněno zkušenostmi jednotlivců v hejnu, pravděpodobně i postavením a tělesnými charakteristikami jedinců. Po separaci samců a samic do zvláštních akvárií na delší dobu bez možnosti vizuálního kontaktu je patrný rozdíl ve strategii využívání prostoru. Jsou-li odděleně, samci plavou rychleji a efektivněji po celém objemu akvária, a také častěji iniciují vzájemné interakce. Samice se drží v dolní části poměrně blízko u sebe. Po odstranění clony přichází snaha plavat ve společném uskupení téměř okamžitě.



Obrázek 7. Na levé fotografii je ohled na samce (vpravo) a samice (vlevo) v oddělených akváriích, na pravé je vidět rozdílná motivace samců (vpravo) a samic (vlevo) plavat společně j



Obrázek 8. Reakce samců na vlastní odraz v zrcadle a ve stěnách akvária

5 Závěr

První studie ukazují, že jednotliví jedinci uvnitř uměle sestaveného hejna *Puntigrus tetrazona* se liší ve svých pohybových strategiích, na základě těchto pozorování je možné dále prohlubovat znalosti o hejnovém sociálním chování ryb. Výsledky experimentů s ethanolem jako pilotní testovanou látkou prokazatelně potvrzují reakci hejna na změnu podmínek, která je zachycena jako změna ve vybraných parametrech pohybu a chování. Očekáváme, že hejna budou reagovat na další přidané bioaktivní látky změnou, a to alespoň v některém z parametrů.

Pro zpřesňování kapacity metody detekce specifických látek ve vodním prostředí by měl budoucí výzkum pokračovat ve dvou větvích, a to 1) ve studii individuálních projevů chování a struktury hejna a 2) v samotném testování bioaktivních látek a následném vhodném zvolení parametrů pro vzájemné porovnání.

Zadání bakalářské práce nebylo zcela naplněno, protože komplexnost problému a složitost jeho technického řešení nedovoluje postupovat rychleji.

6 Seznam použitých literárních zdrojů

- ANDERSON, B. G. The Toxicity Thresholds of Various Substances Found in Industrial Wastes as Determined by the Use of *Daphnia Magna*. *Sewage Works J.* 1944, **16**(6), 1156–1165.
- BAENSCH, H.A. a R. RIEHL. Aquarium Atlas. *Mergus-Veriag GmbH Hans A.* 1993, -(1-2), -.
- BLEEKER, P. *Nalezingen op de vischfauna van Sumatra. Visschen van Lahat en Sibogha. Natuurkundig Tijdschrift voor Nederlandsch Indië, , Vol. , s. . 9.* 1855, 257-280.
- BOYD, R. a J. B. SILK. A Method for Assigning Cardinal Dominance Ranks. *Animal Behaviour.* 1983, **31**(1), 45-58. DOI: 10.1016/S0003-3472(83)80172-9.
- BROWN, J. L. The Evolution of Behavior. *Norton*, New York, 1975, **1**(-), 761.
- BROWN, W. L. a E. O. WILSON. The Evolution of the Decapine Ants. *Q. Rev. Biol.* 1952, **34**(-), 278-294.
- BUIKEMA, A. L. Water Research Biological Monitoring Part IV—Toxicity Testing. *Water Research.* 1982, **16**(3), 239-262.
- BUTLER, C. a D. PARKE. *Principles of Ecotoxicology, Edited by Gordon C. Butler. 254–255.: Environmental Conservation. 12.* Chichester–New York–Brisbane–Toronto: Cambridge University Press, 1978, **7**(3).
- CARSON, R. *Silent Spring. 2.* Houghton Mifflin Company, 1962. ISBN-10: 0618249060 ISBN-13: 978-0618249060.
- COLLINS, R., K. F. ARMSTRONG a R. MEIER, ET AL. Barcoding and Border Biosecurity: Identifying Cyprinid Fishes in the Aquarium Trade. *PloS One.* 2012, **7**(1), e28381.
- CROOK, J. H. a J. S. GARLAN. Evolution of primate societies. *Nature.* 1966, -(210), 1200-1203.
- DE VRIES, H. An improved test of linearity in dominance hierarchies containing unknown or tied relationships. *Anim. Behav.* 1995, **50**(1), 1375-1389.
- DOUGLAS, R. H. a M. B. A. DJAMGOS. The Visual System of Fish. *Chapman and Hall.* New York: London, 1990, **1**(-), ?
- DUSENBERY, D. B. Sensory Ecology. *Freeman.* New York, 1992, **1**(-), ?
- FARR, J. a W. F. HERRNKIND. A Quantitative Analysis of Social Interaction of the Guppy *Poecilia reticulata (Poeciliidae)* as a Function of Population Density. *Anim. Behav.* 1974, **22**(3), 582-591.
- FRICKE, H. W. Sozial Struktur und Ökologische Spezialisierung bei verwandten Fischen (*Pomacentridae*). *Zeitschrift für Tierpsychologie.* 1975, **39**(-), 492-520.
- GIRALDEAU, L. A. *Game theory and social foraging: models and tests of producer-scrounder game: Advances in Game Theory and the Study of Animal Behaviour. 1.* Oxford: Oxford University Press, 1997. ISBN (-).
- HAMILTON, W. D. Wingless and fighting males in fig wasps and other insects. *Academic Press.* New York, 1979, 167-120.
- HAMILTON, W. D. The Genetical Evolution of Social Behaviour. *J. Theoret. Biol.* 1964, **7**(-), 1-16.

- HENROIT, O. Beitrage zur Biologie, namentlich Ethologie und Psychologie der Anatiden. *Proc. V. Int. Ornith.* 1911, **1**(1), 598-702.
- HERBERT-READ A KOL., J. E. How Predation Shapes the Social Interaction Rules of Shoaling Fish. *Royal Soc.* 2017, -(), 284. DOI: 20171126.
- HILL, G. E. Plumage Colouration is a Sexually Selected Indicator of Male Quality. *Nature Lond.* 1991, -(350), 337-339.
- HILL, G. E. The Proximate Basis of Variation in Carotenoid Pigmentation in Male House Finches. *Auk.* 1992, -(109), 1-12.
- HUNN, J. B. History of acute toxicity tests with fish: Fish Control 98. *US Fish and Wildlife Service.* 1989, 1863–1987.
- CHARNOV, E. L. Optimal Foraging: Attack Strategy of Mantid. *Am. Natur.* 1976a, **110**, 141-151.
- KATZ, L. A New Status Index Derived from Sociometric Analysis. *Psychometrika.* 1953, **18**(1), 39-43.
- KORTMULDER, K. A Comparative Study in Colour Patterns and Behaviour in Seven Asiatic *Barbus* Species (*Cyprinidae*, *Ostariophysi*, *Osteichthyes*): A Progress Report. *Int. J. Compar. Ethol.* 1972, **14**, 1-60.
- KORTMULDER, K. Etho-ecology of Seventeen *Barbus* Species (*Pisces*; *Cyprinidae*). *J. Zool. Netherlands*, 1982, **32**(2), 144-168.
- KOTTELAT, M. The identity of *Barbus johorensis* Duncker, 1904 (Teleostei: Cyprinidae). *Raffles Bull. Zool.* 1993, **40**(2), 187-192.
- KOTTELAT, M. a. *The Fishes of the Inland Waters of Southeast Asia: A Catalogue and Core Bibliography of Fishes Known to Occur in Freshwaters, Mangroves and Estuaries* [online]. 27. Singapore, Raffles Bull. Zool., 2013, 65-170 [cit. 2020-06-01]. ISBN 978-2-8399-1344-7.
- LADU, F. Sociality Modulates the Effects of Ethanol in Zebra Fish. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2014, **38**(7), 2096-2104. DOI: 10.1111/acer.12432.
- LANDAU, H. G. On Dominance Relations and the Structure of Animal Societies: I. The Effect of Inherent Characteristics. *Bull. Math. Biophys.* 1951, -(13), 1–19.
- LILEY, N. Chemical Communication in Fish. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 2011, **39**(-), 22-35. DOI: 10.1139/f82-005.
- LONHUS, K. Osobní prezentace. Ústav komplexních systémů, Nové Hrady, České republika, únor 2020.
- LONHUS, K. A KOL. Segmentation of Laterally Symmetric Overlapping Objects: Application to Images of Collective Animal Behavior. *Symmetry*, **11**(7), 866. DOI: 10.3390/sym11070866.
- LORENZ, K. Verliechends Bewegungstudien an Anatien. *J. Ornithol.* 1941, **suppl.**(1), 194-294.
- PARKER, G. A. The Reproductive Behaviour and the Nature of Sexual Selection in *Scatophaga stercoraria* L. (*Diptera*: Scatophagidae). II. The Fertilization Rate and Spatial and Temporal Relationships of Each Sex around the Site of Mating and Oviposition. *J. Anim. Ecol.* 1970c, **39**(-), 205-228.
- PETHIYAGODA, R. at al. A synopsis of the South Asian fishes referred to *Puntius* (*Pisces*: *Cyprinidae*). *Ichthyol. Explor. Fres.* 2012, **23**(1), 63-95.

- PLATONOVA A KOL., G. Technically Correct Visualization of Biological Microscopic Experiments. *ArXiv* **1903.06519**, 2019.
- REEVE, H. K. a P. W. SHERMAN. Adaptation and the Goals of Evolutionary Research. *Q. Rev. Biol.* 1993, **68**(1), 1-32. DOI: 10.1086/417909.
- SHIRAIISHI, Y., N. MIZUNO, M. NAGAI, M. YOSHIMI a K. NISHIYAMA. Studies on the diel activity and feeding habit of fishes at Lake Bera. *Jap. J. Ichthyol.* Malaysia, 1972, **19**(4), 295-305.
- SCHEURMANN. Aquarium Fish Breeding. *Baron's Educational Series Inc.* N.Y.: Hauppauge, 1990, (1).
- ŠTYS, D. Osobní sdělení. Nové Hrady, Česká republika, 25. května 2020.
- STYS, D., M. CHKALOVA a P. KOUBA. 5iD Viewer - Observation of Fish School Behaviour in Labyrinths and Use of Semantic and Syntactic Entropy for School Structure Definition. *Int. J. Comp. Control Quantum Inf. Eng.* 2015, **9**(1), 281-285.
- TAKI, Y., A. KATSUYAMA a T. VRUSHIDO. Comparative morphology and interspecific relationships of the Cyprinid genus *Puntius*. *Jap. J. Ichthyol.* 1977, **25**(1), 1-7.
- TAMARU, C.S. A Manual for Commercial Production of the Tiger Barb, *Capoeta Tetrazona*, a Temporary Paired Tank Spawner. *Center for Tropical and Subtropical Aquaculture.* Hawaii, 1997, **1998**(129), 50.
- TINBERGEN, N. *The Animal in its World. 2.* Cambridge: Harvard University Press, 1972. ISBN 0674037278.
- TINBERGEN, N. The search for animal roots of animal behaviour. *The Animal in Its World: Exploration of an Ethologist.* 1973, **2**(-), 1932-1972.
- TINBERGEN, N. On aims and methods of ethology. *Z. Tierpsychol.* 1963, **20**(-), 410-433.
- TRIVERS, R. L. Parental investment and sexual selection. *Sexual Selection and the Descent of Man 1871-1971: ed. B. Campbell.* 1972, **-**(-), 136-179.
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 1977, **1**(2), 151-173.
- VOGEL, S. Life's Devices. *Princeton University Press.* 1988, **1**(-).
- WILEY, R. H. The evolution of communication: information and manipulation. *Communication.* Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1983, **1**(-), 82-113.
- WILLIAMS, G. C. Adaptation and Natural Selection a Critique of Some Current Evolutionary Thought. *Princeton University Press.* Princeton, 1966a, **1**(-), -.
- WILSON, E. O. *Sociobiology.* Cambridge: Harvard University Press, 1975. ISBN 9780674816244.
- WINN, H. A. The Comparative Ecology and Reproductive Behaviour of Fourteen species of Darter (*Percidae*). *Ecol. Monogr.* 1958, **28**(1), 91-155.
- ZAHAVI, A. Mate Selection-A Selection for a Handicap. *J. Theor. Biol.* 1975, **53**(-), 205-214.
- Ethanol, CID=702. *National Center for Biotechnology Information: PubChem Database* [online]. [cit. 2020-06-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>.
- Animal signals: information or manipulation? *Behavioural Ecology: an Evolutionary Approach.* Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978, **1**(-), 282-309.

GBIF Backbone Taxonomy. Catalogue of Life: Puntigrus Kottelat, 2013 [online]. Copenhagen: GBIF Secretariat, 2019 [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: <https://www.gbif.org/species/8069699>.

7 Seznam použitých zkratk

ASTM	American Society for Testing and Materials
ISO	International Organization for Standardization
APHA	American Pharmacists Association
GHS/CLP	Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemikálií
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
USEPA	United States Environmental Protection Agency
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
GHS	Globální harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek
CLP	Klasifikace, označování a balení látek a směsí
TOC	Total Organic Carbon
DOC	Dissolved Organic Carbon
POC	Particulate Organic Carbon
EDC	Endocrine Disruptors
PPCP	Personal Care Products
ČOV	Čistírna odpadních vod

8 Abstrakt

Tato práce vychází z poznatků z oblasti behaviorální ekologie, zejména se soustředí na sociální chování hejna. Zabývá se možností využití nové, velice jemné metody analýzy chování na *Puntigrus tetrazona* pro rozšíření popisu antropogenních polutantů a jejich vlivu na prostředí. Pro účely studie jsou detailně popsány některé projevy chování pokusného organismu. Vybrané projevy chování kontrolní skupiny ryb jsou následně porovnány s průběhem chování, který byl zaznamenán po intoxikaci 0,15% a 0,25% obj. koncentrací ethanolu.

Klíčová slova: analýza chování, *Puntigrus tetrazona*, detekce bioaktivních látek

9 Abstract

The study is compilation of behavioural ecology knowledge, namely focused on social behaviour of fish school. It considers possible opportunity of usage of a novel, highly specific analytic method for a broader description of anthropogenic pollutants and its influence on the environment. The method is based on observation of changes in behavioural manifestations of *Puntigrus tetrazona*. Chosen parameters of behaviour are compared for a control school and for a school after intoxication with 0.15% and 0.25% vol. concentration of ethanol.

Key words: behaviour analysis, *Puntigrus tetrazona*, detection of bioactive substances