STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie, geografie a geologie

Studium rezistence želvušek k radiačnímu a tepelnému stresu

Jitka Nováková Jakub Pavlík Tadeáš Fryčák

Valašské Klobouky 2024

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie, geografie a geologie

Studium rezistence želvušek k radiačnímu a tepelnému stresu

Study of Resistance of Tardigrades to Radiation and Thermal Stress

Autoři: Jitka Nováková Jakub Pavlík Tadeáš Fryčák

- **Školy:** Gymnázium Valašské Klobouky Gymnázium Jakuba Škody v Přerově Gymnázium Jana Opletala v Litovli
- Kraj: Zlínský kraj
- **Konzultanti:** Mgr. Jiří Voller, Ph.D. Mgr. Dominik Vítek

Valašské Klobouky 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

	Jitka Nováková	
Ve Valašských Kloboucích dne 1. 4. 2024	Jakub Pavlík	
	Tadeáš Fryčák	

Poděkování

Tímto bychom chtěli poděkovat Mgr. Jiřímu Vollerovi, Ph.D., Mgr. Dominiku Vítkovi, Ing. Filipu Fejtovi, Ph.D. a jeho kolegům za jejich vstřícnost, cenný čas a poskytnuté rady při řešení projektu. Dále bychom chtěli poděkovat programu Badatel za zprostředkování možnosti se účastnit této výzkumné činnosti.

Abstrakt

Želvušky jsou mikroskopičtí živočichové, kteří se díky své odolnosti k radiaci a extrémním teplotám stali vděčným objektem zájmu nejen biologů. Proslavily se i díky tomu, že jako první z živočichů přežily vystavení kosmickému prostoru. Náš projekt je příspěvkem k charakterizaci odpovědi želvušek na stres.

V první části projektu jsme se věnovali jejich izolaci z mechů a následné kultivaci v laboratorních podmínkách. K určování byly použity mikroskopické techniky (mikroskopie ve viditelném světle a fluorescenční mikroskopie, Nomarského kontrast) a barkódování DNA.

V druhé části jsme zkoumali odolnost vodního druhu *Hypsibius exemplaris* a vybraných limnoterestrických izolátů k tepelnému stresu a ionizujícímu záření – směsi neutronů a gama záření v lehkovodním jaderném reaktoru.

Odpověď na stres jsme vyhodnotili pomocí automatické mikroskopie a analýzy obrazu využívající konvoluční neuronové sítě. Námi vyvinutá metoda umožňuje vysokoformátové studie želvušek (a po modifikaci i jiných mikroorganismů) na stres různé povahy.

Zatímco aktivní stádia želvušek vykazovala vysokou odolnost k ionizujícímu záření, jejich odolnost k teplotnímu stresu byla překvapivě nízká.

Klíčová slova

Želvušky; kultivace; radiační stres; gama záření; neutronové záření; teplotní stres; automatická mikroskopie; analýza obrazu; konvoluční neuronová síť; DNA barkódování

Abstract

Tardigrades are microscopic animals that, due to their resistance to radiation and extreme temperatures, have become a subject of interest not only for biologists. They became famous for being the first animals to survive exposure to outer space.

Our project contributes to the characterization of tardigrade response to stress.

In the first part, we focused on isolating them from mosses and their cultivation in laboratory. Microscopic techniques (visible light microscopy, fluorescence microscopy, Nomarski contrast) and DNA barcoding were used for identification.

In the second part, we examined the resistance of the water bear species Hypsibius exemplaris and several limnoterrestrial isolates to thermal stress and ionizing radiation – a mixture of neutrons and gamma radiation in a light water nuclear reactor.

The stress response was evaluated by automatic microscopy and image analysis using convolutional neural networks. Our developed method is useful for high-throughput studies of tardigrades (and after modification, other microorganisms) under stress of various natures.

While the active stages of tardigrades showed high resistance to ionizing radiation, their resistance to thermal stress was surprisingly low.

Keywords

Tardigrades; cultivation; radiation stress; gama radiation; neutron radiation; thermal stress; automatic microscopy; image analysis; convolutional neural network; DNA barcoding

Obsah

Ú	vod			9
1	Pře	hled lit	teratury	11
	1.1	Želvuš	ky	11
		1.1.1	Taxonomie	12
		1.1.2	Historie zkoumání	14
		1.1.3	Morfologie a anatomie	15
		1.1.4	Rozmnožování	17
		1.1.5	Potrava	17
		1.1.6	Výskyt	18
		1.1.7	Anabióza (kryptobióza)	18
		1.1.8	Želvušky v kultuře	20
	1.2	Radiao	e	21
		1.2.1	Ionizující záření	21
		1.2.2	UV záření	24
	1.3	Biolog	ické účinky záření	25
		1.3.1	Účinky na tkáň/DNA $\hfill \ldots \ldots$	25
		1.3.2	Základní veličiny dozimetrie	26
		1.3.3	Biologické účinky záření na DNA	27
	1.4	Reziste	ence želvušek vůči záření	29
		1.4.1	Mechanismy ochrany	32
2	\mathbf{Exp}	erimer	ntální část	36
	2.1	Sběr v	zorků	36
	2.2	Izolace	e želvušek	36
	2.3	Předbě	ěžné určování pomocí mikroskopie	37
	2.4	Barkóo	dování DNA	45
		2.4.1	Provedení DNA barkódování v našem projektu	45
		2.4.2	Výsledky DNA barkódování	47
	2.5	Kultiv	ace želvušek	49
	2.6	Studiu	ım odpovědi na stres	50

		2.6.1	Příprava populací	0	
		2.6.2	Ozařování v jaderném reaktoru	1	
3	Vyh	odnoce	ení stresových experimentů 5	4	
	3.1	Detekc	e želvušek	4	
		3.1.1	Detekce želvušek za pomoci deterministických metod 5	4	
		3.1.2	Detekce želvušek za pomoci umělé inteligence	5	
	3.2	Extrak	ce LD50	9	
	3.3	Vyhodi	nocení pohyblivosti želvušek	1	
	3.4	Vyhodi	nocení experimentů	2	
	3.5	Teploti	ní šok	3	
Di	iskuz	e a záv	ěr 6	5	
	Prez	entace p	projektu a jeho výsledků 6	7	
Se	znan	ıy	6	8	
	Sezn	am pou	žitých zdrojů	8	
	Sezn	am pou	žitých přístrojů	4	
	Seznam použitého materiálu				
	Seznam obrázků				
Seznam tabulek					
Seznam rovnic				0	
	Sezn	am zkra	ıtek	1	
	Sezn	am přílo	oh	2	
Pì	ŕílohy		8	3	
	S.1	Ozařov	ání – radiace v jednotlivých kanálech na VR-1 \ldots 8	3	
	S.2	Param	etry finálního ozařování – Hypsibius exemplaris 8	4	
	S.3	Param	etry finálního ozařování – divoké želvušky 9	0	
	S.4	Sběr –	data, fotografie, kovýskyt, statistika	6	
	S.5	Anotov	vaná datová sada – Hypsibius exemplaris	0	
	S.6	Anotov	vaná datová sada – JN105 a HP $\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots$ 12	1	
	S.7	Trénov	ání neuronově sítě – Hypsibius exemplaris	2	
	S.8	Trénov	ání neuronově sítě – JN105 a HP	3	
	S.9	Natrén	ovaná neuronová síť pro $\mathit{Hypsibius}\ exemplaris$ – matice záměny 12	4	
	S.10	Natrén	ovaná neuronová síť pro JN105 a HP – matice záměny 12	5	

Úvod

Želvušky jsou kosmopolitně rozšíření mikroskopičtí živočichové. Obývají vodní i limnoterestrická stanoviště a niky (např. mechy, lišejníky, písečné duny, kryokonity, ...), avšak jejich aktivní stádia jsou vždy vázána alespoň na tenký vodní film.

Jsou odolné vůči působení ionizujícího i neionizujícího záření a extrémních teplot, vysychání a některým toxickým látkám. Přežily i vystavení vesmírnému vakuu [1]. Tato odolnost částečně souvisí se schopností vstoupit za nepříznivých podmínek do anabiózy a vytvořit tzv. soudeček, ale odolná jsou i aktivní stádia (např. k radiaci).

Protože výskyt želvušek a jejich množství v prostředí jsou nevyzpytatelné, objevují se snahy o vytvoření reprodukujících se laboratorních populací, které pak mohou sloužit ke studiu jejich rezistenci vůči rozmanitým stresorům [2]. Z námi sesbíraných mechů a lišejníků jsme vybrali vzorky, v nichž se vyskytovaly početné populace želvušek, a z izolovaných jedinců jsme se pokusili založit kulturu.

K předběžnému určení druhů byla použita mikroskopie (ve viditelném světle, fluorescenční mikroskopie, Nomarského kontrast) doplněná o barkódování DNA, které může rozlišit druhy s minimálními morfologickými rozdíly.

V další části naší práce jsme se zabývali odpovědí želvušek na ionizující radiaci a tepelný stres. V experimentech byly použity želvušky izolované z mechu a známý laboratorní kmen vodní želvušky *Hypsibius exemplaris* [3].

Radiace způsobuje rozsáhlé poškození buněk a tkání, které u většiny organismů vede k jejich odumírání. Želvušky, pravděpodobně proto, že jsou vystavovány poškození buněčných struktur během vysychání, si vyvinuly mechanismy, které je proti radiaci chrání. Patří mezi ně například pro želvušky unikátní proteiny rodiny Dsup, které chrání molekulu DNA jak před přímými účinky radiace, tak před působením reaktivních radikálů vzniklých rozkladem vody [4, 5].

Publikovány byly studie, ve kterých byly želvušky ozařovány proudem protonů, alfa částic, rentgenovým a gama zářením a těžkými jádry železa, a to buď v hydratovaném, nebo dehydratovaném stavu [4]. My jsme pro testování radiorezistence zvolili ozařování směsí gama záření a neutronů. Zdrojem záření byl lehkovodní jaderný reaktor VR-1 Fakulty

jaderné a fyzikálně inženýrské ČVUT. Ozařování neutrony je zmíněno pouze v konferenčním abstraktu [6], bez udání výsledků.

Studovali jsme také efekt tepelného stresu na aktivní jedince. V laboratoři konzultanta již pozorovali překvapivě nízkou odolnost druhu *Hypsibius exemplaris*. Teplota, kdy po hodině uhynulo více jak 50 % jedinců, nepřesáhla 39 °C [7].

Zajímalo nás proto, jestli podobně citlivé jsou i limnoterestrické želvušky. Teplotní citlivost by poněkud překvapivě mohla být možným faktorem omezujícím rozšíření želvušek. Takové pozorování by bylo zajímavé i v souvislosti s globálním oteplováním.

I vzhledem k tomu, že se při stresových experimentech zatím používají běžné stolní mikroskopy, studují se obvykle malé populace a počet studovaných podmínek je silně omezen. My jsme pro vyhodnocování přežití používali automatickou mikroskopii v 384jamkových mikrotitračních deskách.

Pro zpracování takového množství dat jsme se rozhodli natrénovat konvoluční neuronovou síť schopnou na snímcích detekovat želvušky a určit, jestli jsou živé nebo mrtvé jak na základě pohybu, tak i z jediného snímku. Kombinace automatické mikroskopie a analýzy obrazu nám umožnila vysokoformátové hodnocení stresorů.

Kapitola 1

Přehled literatury

1.1 Želvušky

Želvušky jsou mikroorganismy patřící mezi nejodolnější živočichy na naší planetě.

Jejich latinský název jim dal roku 1777 italský kněz, přírodovědec a badatel Lazzaro Spallanzani (1729-1799). Pojmenování vychází z jejich pomalé chůze (z latinského tardus = pomalý, gradus = krok), díky které získaly i slovenský název pomalky (anglicky slow walkers) nebo český název želvušky. Na základě vzhledu a nemotorného pohybu připomínajícího pohyby medvědů se jim říká například vodní medvídci (z německého kleiner Wasser Bär, anglicky water bear) nebo mechová prasátka (z anglického moss piglets).

Doposud bylo objeveno asi 1 400 druhů [8], v České republice asi 110 druhů. Celkový počet druhů se odhaduje až na 10 000 celkem.

Tyto části a následující přehled biologie želvušek vychází především z úvodní kapitoly knihy Water Bears: The Biology of Tardigrades [9] a údajů na Wikipedii. Kromě anglické verze (heslo *Tardigrade* [10]) byla použita i velice rozsáhlá česká verze hesla [11].

Část věnovaná rozmnožování vychází ze souhrnných článků [12, 13]. Část o reakci želvušek na stres se opírá o články [14, 15]. Část kapitoly je založena na nepublikované seminární práci Jitky Novákové, jež v upravené a doplněné podobě slouží jako podklad stránek o biologii želvušek pro střední školy https://tardigrades.netlify.app/, kde je možné najít i některá videa, která vznikla při práci na tomto projektu.

1.1.1 Taxonomie

- Říše: Živočichové (Animalia)
- Podříše: Histozoa (*Eumetazoa*)
- Klad: ParaHoxozoa (ParaHoxozoa)
- Klad: Dvoustranně souměrní (Bilateria)
- Klad: Eubilateria (*Nephrozoa*)
- Nadoddělení: Trojlistí (*Triblastica*)
- Nadkmen: Prvoústí (*Protostomia*)
- Skupina: Ekdysozoa (*Ecdysozoa*)
- Oddělení: Panarthropoda (*Panarthropoda*)
- Kmen: Želvušky (*Tardigrada*)



Obrázek 1.1: Eutardigadní Milnesium tardigradum s hladkou kutikulou [10]

Kmen želvušek zahrnuje 3 třídy – *Eutardigrada* (asi 900 druhů), *Heterotardigrada* (asi 500 druhů) a *Mesotardigrada*.

Třída *Mesotardigrada* je považována za nejistou, neboť zahrnuje jediný druh (viz obrázek 1.3) popsaný v roce 1937 (*Thermozodium esakii*), jehož lokalita výskytu byla zničena při zemětřesení a exemplář ztracen. Zástupci třídy *Eutardigrada* jsou primárně vázáni na sladkou vodu a na jejich těla jsou kryta celistvou hladkou kutikulou bez postranních výrůstků (viz obrázek 1.1), zatímco zástupci třídy *Heterotardigrada* mají tělo kryté pórovitými kutikulárními pláty a postranními výběžky kutikuly (viz obrázek 1.2), na každé noze mají 4 drápky a lze je najít v mořském i limnoterestrickém prostředí.

Eutardigradní druhy se na Zemi vyskytovaly již v druhohorách. Doposud to dokládají dva fosilní nálezy v jantaru, jedna fosilie pochází z třetihor:



Obrázek 1.2: Heterotardigradní $Echiniscus \ insularis$ s kutikulárními pláty a postranními výrůstky [10]



Obrázek 1.3: Mesotardigradní Thermozodium esakii [16]

Beorn leggi (viz obrázek 1.4) – nalezena v jantaru z Manitoby (Kanada), popsána v roce 1964, pochází z doby asi před 72 miliony let [17].



Obrázek 1.4: Fosilní Beorn leggi [17]

 $Milnesium \ swolenskyi$ – nalezena v jantaru z New Jersey (USA) v roce 2000, pochází z doby asi před 90 miliony let.

Paradoryphoribius chronocaribbeua – nalezena v jantaru z Dominikánské republiky v roce 2021, pochází z doby asi před 16 miliony let [18] (viz obrázek 1.5).



(a) Fosilní nález v jantaru

(b) Umělecká rekonstrukce

Obrázek 1.5: Paradoryphoribius chronocaribbeus [18]

1.1.2 Historie zkoumání

Poprvé želvušky popsal německý protestantský pastor a zoolog Johann August Ephraim Goeze (1731-1793), a to v roce 1773 (tedy více než před 250 lety), když se ve volných chvílích věnoval mikroskopování (viz obrázek 1.6). Jeho objev vypadal jako malý vodní medvěd, proto jej pojmenoval *kleiner Wasserbär*.



Obrázek 1.6: První kresba želvušky z roku 1773 [19]

Na jeho objevy navázali další a v roce 1974 se v Itálii konalo první mezinárodní sympozium týkající se želvušek.

1.1.3 Morfologie a anatomie

Tělo želvušky je většinou 0.1 až 1.5 mm dlouhé a má válcovitý tvar. Je složeno z 5 segmentů – jednoho hlavového, tří trupových a jednoho koncového. Z tělních segmentů vybíhá po páru zavalitých končetin, které slouží převážně k pohybu, na koncové části je pár končetin pro přichycení k substrátu. Končetiny jsou zakončeny drápky, jejichž počet a tvar se liší u jednotlivých druhů a slouží tedy jako významný determinační znak. Tělo je kryto chitinózní kutikulou obsahující protein albuminoid nebo je obrněno kutikulárními pláty různé struktury, často zbarvenými. Pláty bývají obměňovány a kutikula bývá pravidelně svlékána (ekdyze) i s drápky a jinými sklerotizovanými částmi (části bukálního aparátu, výstélka předního a zadního střeva). Proces svlékání obvykle vyžaduje 5-10 dnů a probíhá asi 4x-12x za aktivní život želvušky, který trvá obvykle 3-30 měsíců. Některé druhy do svlečky (exuvie) kladou vajíčka nebo se spolu s ní zbavují výkalů.

Tělní dutina označovaná jako pseudocoelom nebo haemocoel kromě orgánů obsahuje i tekutinu s volnými buňkami, které slouží jako primitivní oběhová soustava. Mají také imunitní a zásobní funkci, někdy se jim proto souhrnně říká zásobní buňky.

Svalstvo je příčně pruhované, dokonce i v trávicí soustavě (viz obrázek 1.7). Ta začíná ústy na předním konci živočicha, k příjmu potravy slouží bukofaryngeální aparát, následuje hltan a jícen napojený na střevo končící konečníkem a řitním otvorem (viz obrázek 1.8).



Obrázek 1.7: Uspořádání svalových vláken; v polarizovaném světle. Žlutě svalová vlákna, modře bukální aparát, zeleně obsah středního střeva [20]

Vylučování bylo pozorováno u zástupců třídy *Eutardigrada* pomocí trubic podobných metanefridiím nebo malphigickým trubicím, které vyúsťují v oblasti řitního otvoru.

Dýchání probíhá bez speciálních orgánů celým povrchem těla.

Nervová soustava je gangliová. ve ventrální části propojují nervové provazce jednotlivá tělní ganglia, která odpovídají jednotlivým segmentům těla a ze kterých jsou inervovány končetiny daného článku. Nadjícnový ganglion je s podjícnovým spojen objícnovým prstencem (viz obrázek 1.9).

Smysly jsou prezentovány hmatovými štětinkami (ciry) a jednoduchýma očkama (oční skvrny) tvořenýma jedním pigmentovým pohárkem.



Obrázek 1.8: Detail ústního aparátu želvušky [20]. út = ústní trubička, sh = savý hltan, s = stylety, ma = makroplakoidy, mi = mikroplakoidy



(a) Pohled z boku

(b) Pohled zespodu

Obrázek 1.9: Anatomie želvušek [21]. út = ústní trubička, mo = mozek, hl = hltan, sž = slinná žláza, bnu = břišní nervová uzlina, kl = kloaka, jí = jícen, ss = střední střevo, va = vaječník, mt = malphigická trubice, zs = zadní střevo, st = stylet, ns = nervová spojka, dž = drápková žláza, zb = zásobní buňky

1.1.4 Rozmnožování

Želvušky jsou gonochoristé (samice bývají větší a v populacích běžnější), méně často hermafrodité; u mořských druhů lze pozorovat pohlavní dimorfismus. Jejich pohlavní orgány jsou uloženy poblíž konečníku, u třídy *Eutardigrada* mají samci párové semenné kanálky a samice pouze jeden vejcovod ústící do kloaky nebo u třídy *Heterotardigrada* do otvoru na spodní straně těla.

U gonochoristických želvušek probíhá páření mezi samicí a samcem, kteří k sobě těsně přiléhají pomocí předních končetin. Při pohlavním rozmnožování, tzv. amfimixii, vzniká embryo splynutím gamet samčího a samičího pohlaví (vysoká míra genetické rekombinace). u zástupců třídy *Eutardigrada* dochází k vnitřnímu oplození, zatímco mořské druhy využívají vnější semenné váčky (receptakula).

Hermafroditismus je doložen pouze u vývojově pokročilých zástupců (rody *Isohypsibius*, *Parthexapodibius*, medvíďátka *Macrobiotus* a *Amphibolus*). Reprodukční aparát tvoří společná samčí a samičí zárodečná oblast (ovotestis), kde dochází ke zrání vajíček i spermií, jako první dozrávají spermie, a to ve velkém počtu, teprve poté v menším počtu vajíčka.

Mechanismus jejich páření není zcela přesně znám, byly však pozorovány druhově specifické snubní tance před pářením. Při vnějším oplození samice naklade vajíčka (volně do substrátu nebo do exuvie) a poté jsou překryta spermatem samce.

Vajíčka želvušek jsou velmi rozmanitá, hladká nebo různě strukturovaná, a slouží tedy jako významný determinační znak. Obal vajíček se skládá z polysacharidů, peptidů a lipidů. Množství vajíček se pohybuje do 40 vajíček v jedné snůšce. Líhnutí probíhá již po 10-14 dnech, u jiných může vývoj trvat i několik měsíců a dokonce vyžadovat i vyschnutí.

Možné je i asexuální rozmnožování pomocí partenogeneze. Obligátní partenogeneze byla popsána např. u druhu *Hypsibius exemplaris* [22], který používáme v této práci k experimentům.

1.1.5 Potrava

Želvušky se živí nejen bakteriemi, řasami a rostlinami (především mechy a lišejníky), ale také organismy jako jsou vířníci, hlístice nebo eukaryota. Některé želvušky (rody *Milnesium* nebo *Macrobiotus*) konzumují menší druhy želvušek.

Potrava se může měnit během vývojového cyklu.

Přijímaná potrava může způsobovat výrazné zbarvení střeva želvušky.

1.1.6 Výskyt

Želvušky jsou díky svým životním strategiím kosmopolitně rozšířeny, obývají sladkovodní, mořská i terestrická prostředí (mechy, lišejníky, řasy, půda, listí, rostliny, duny, pobřeží, sedimenty apod.). Aktivní stádia jsou vždy vázána na vodu, postačuje jim i tenký vodní film. V jejich blízkosti lze nalézt další organismy, jako jsou roztoči (*Acari*), hlísti (*Cycloneuralia*), vířníci (*Rotifera*), ploštěnky (*Turbellaria*), bakterie (*Bacteria*) a prvoci (*Protozoa*). *Pyxidium tardigradum* (viz obrázek 1.10), zástupce nálevníků (*Ciliophora*), lze pozorovat přichycené na zadní části želvušek, a ačkoli nejsou považovány za parazity, znamenají pro želvušky váhu navíc, a tedy i přítěž [23].



(a) Na jedinci Ramazzottius oberhaeuseri [20] (b) Na jedinci rodu Milnesium

Obrázek 1.10: Nálevníci Pyxidium tardigradum

Výhodou života v opakovaně vysychajícím prostředí může být redukce predátorů nebo parazitů vyžadujících vodu.

1.1.7 Anabióza (kryptobióza)

Schopnost želvušek přežít chemické i fyzikální extrémy je neobyčejná [14].

Jejich odolnosti vůči ionizujícímu a neionizujícím záření jsou věnovány samostatné kapitoly této práce.

Teplotní rozmezí, ve kterém jsou klidová stádia želvušek schopna přežít, se pohybuje od -273 °C do 150 °C, odolávají tlaku až 600 MPa a vakuu[24]. Tato rezistence vůči extrémům částečně souvisí se schopností želvušek pozastavit nebo zcela přerušit chod svého metabolismu.

Zhorší-li se podmínky prostředí, želvušky jsou schopné přejít do anabiózy (také kryptobióza = odpověď na nepříznivé podmínky okolního prostředí). Těch je několik typů podle faktorů prostředí: kryobióza, osmobióza, anoxybióza, anhydrobióza (viz obrázek 1.11).



Obrázek 1.11: Reakce želvušek na nepříznivé podmínky [14]

Anabióza je zvratný stav, ve kterém živočich neroste, nepřijímá potravu, nerozmnožuje se a je zastaven proces stárnutí (senescence), dochází se snížení metabolismu a životních funkcí téměř na nulu. Při vstupu do anabiózy želvušky snižují podíl vody v těle z 85 % na 3 %, sbalují se do takzvaného soudečku a vytlačují na povrch těla ochrannou vrstvu kutikuly.

Čím delší dobu stráví želvušky v anabióze, tím vyšší je riziko poškození jejich orgánů. Šance na úplné zotavení se s časem snižují.

Kryobióza

Do kryobiózy želvušky vstupují v případě, že se potřebují vyhnout negativním dopadům způsobovaným mrazem. Při snížení teploty v okolí ustává molekulární aktivita organismu a vytváří se soudeček. Během snižování teploty se syntetizuje sacharid trehalóza (protektivní roli hraje i při vysychání), avšak v mnohem nižším množství než u ostatních do anabiózy upadajících organismů (například bakterií, hlístů a vířníků). Funkci trehalózy nahrazují pro želvušky specifické proteiny TDP (*tardigrade-specific intrinsically disordered proteins* – TDPs, česky vnitřně neuspořádané proteiny). S vodou při ochlazování vytváří amorfní strukturu (vitrifikace = zasklení vody) a tím brání vzniku krystalů ledu a roztrhání buněk a těla zvětšujícím se objemem vody.

Výzkumy také ukázaly, že schopnost přežít zmrznutí je úzce spjata právě se schopností přežít dehydrataci organismu.

Ochrany organismu se účastní i látky schopné vyvolávat tvorbu ledových krystalků (ice

nucleating agents). Ty jsou produkovány do mimobuněčného prostoru a fungují jako "magnety", které přitahují vodu z buněk do mezibuněčných prostor. Snížení teploty vede k procesu tvorby ledu, při němž může být růst krystalků kontrolován, což má za následek vznik menších a potenciálně méně škodlivých krystalků ledu. Poškození buněk a DNA zabraňuje také glycerol.

Osmobióza

Osmobióza je druh kryptobiózy, který nastává, je-li koncentrace solí v okolí vyšší než uvnitř organismu. Želvušky mají vysokou toleranci salinity, někdy vytvářejí soudeček nebo zvyšují obsah solí v těle (hypertonické prostředí).

Anoxybióza

Anoxybióza je vyvolána nedostatkem kyslíku v prostředí, želvušky v ní netvoří soudeček. Jsou velmi citlivé na změny koncentrace kyslíku a jeho dlouhodobější výrazný nedostatek u nich vede k asfyxii (= dušení způsobené nedostatkem kyslíku, při kterém želvuška upadá do kómatu a stává se zcela nepohyblivou, přičemž do organismu vstupuje neregulovaně velké množství vody. Do aktivního stádia ji lze navrátit obohacením prostředí kyslíkem.

Anhydrobióza

Anhydrobióza je nejčastějším druhem anabiózy a je způsobena dehydratací, organismus při ní vysychá. Vytvořením soudečku se zmenšuje povrch těla a odpar vody, kutikula se stává nepropustnou, stabilizují se membrány (pomocí trehalosy – TRH). k obnovení tělesné aktivity dojde rehydratací, při níž se uplatňují *heat shock* proteiny (HSPs – proteiny teplotního šoku) podílející se hlavně na opravných procesech.

V okamžiku snížení tělních hormonů vlivem pomalých změn v prostředí (změna délky dne, teploty nebo nedostatek potravy) nastává tzv. diapauza. Jedná se o spontánní přerušení vývoje, které se vyznačuje snížením nebo úplným pozastavením metabolické aktivity. Želvušky při ní vytvářejí cystu.

1.1.8 Želvušky v kultuře

Želvušky si svou odolností a roztomilým vzhledem získaly oblibu i mezi širokou veřejností. Několik jich je v muzeích po celém světě, například v Austrálii, Itálii, USA, Francii, na Novém Zélandu, v Německu, Švédsku, Dánsku a Polsku. U nás je součástí expozice Národního muzea Zázraky evoluce nebo muzea Mikrokosmos v Hamru na Jezeře. Jejich motiv si vypůjčila česká hudební skupina Hentai Corporation nebo ruská skupina Tardigrade Inferno, píseň Tardigrade Song nahrál anglický hudebník Cosmo Sheldrake. Do povědomí se dostaly i díky Star Treku, kdy byla vesmírná želvuška využívána pro navigaci lodi, a Městečku South Park: Moss Piglets. Mezi děti pak epizodou seriálu Scooby-Doo and Guess Who? – Space Station Scooby, v kreslené podobě komiksem Paper Girls.

1.2 Radiace

1.2.1 Ionizující záření

Tato část je přehledem informací ze stránek Agentury pro ochranu životního prostředí Spojených států [25], webu AstroNuklFyzika, Wikiskript (hesla "Radioaktivita" [26], "Účinky ultrafialového záření"[27], "Rentgenové záření"[28], "Stínění a ochrana před gama zářením"[29], "Záření gama"[30]) a Wikipedie (hesla v češtině: "Radioaktivita" [31], "Ionizující záření" [32], "Záření" [33], "Ultrafialové záření" [34], "Spontánní štěpení" [35], "Přeměna beta plus" [36], "Neutronové záření" [37], "VR-1 Vrabec" [38] a heslo v angličtině: "Neutron radiation" [39]).

Záření (neboli radiace) je emise energie ve formě elektromagnetického vlnění. Může pocházet z radioaktivní přeměny jader atomů, která může být v případě nestabilních atomů samovolná (přirozená radioaktivita), nebo způsobena srážkou s jinou částicí (umělá radioaktivita).

Přírodní radiační pozadí, kterému jsme neustále vystaveni, pochází z vesmíru i naší Země a na různých místech se může i výrazně lišit (rozdílný obsah radioaktivních izotopů v půdě a potravě, výskyt umělých zdrojů radiace, nadmořská výška, síla ozónové vrstvy, …).

V České republice se pohybuje okolo 2.5-3 mSv za rok.

Záření můžeme podle různých faktorů rozdělit několika způsoby.

Neionizující záření je druh nízko
energetického záření, které nemá dostatečnou energii k tomu, aby z atomu nebo molekuly od
trhlo elektron.

Mezi neionizující záření patří UV záření, viditelné světlo, mikrovlny a rádiové vlny.

Ionizující záření má dostatek energie postačující k ionizaci atomů nebo molekul ozářené látky. Toto záření zahrnuje vysokoenergetickou část elektromagnetického spektra (záření gama a rentgenové záření) a částice vznikající při rozpadu nestabilních radionuklidů.

Záření alfa

Alfa částice jsou kladně nabité a skládají se ze dvou protonů a dvou neutronů (jádra helia) pocházejících z jader rozpadajících se prvků (např. uranu, radia a polonia). Heliová jádra jsou i složkou slunečního větru.

Ačkoli mají vysokou energii, jsou málo průrazné a jejich životnost je poměrně krátká. S tím souvisí i jejich účinky na zdraví. Nepronikají ani přes vnější vrstvu kůže. Jsou-li však třeba vdechnuty, pozřeny nebo se do těla dostanou poraněním kůže, mohou způsobit závažné poškození tkání.

Jsou tzv. hustě ionizující (vytváří až 2000 iontových párů / mikrometr tkáně), tj. předávají veškerou svou energii do blízkých buněk a způsobují tak závažnější místní poškození než ostatní druhy záření.

Záření beta

Beta záření je tvořeno elektrony, které jsou emitovány z jádra atomu během radioaktivního rozpadu (např. z radioaktivních izotopů – tritia, uhlíku-14, stroncia-90).

Beta částice jsou sice pronikavější než částice alfa, ale jimi vyvolané poškození není tak nebezpečné, jelikož ionizují řidčeji (zhruba 100 iontových párů / mikrometr tkáně) a poškození není v prostoru tak soustředěné.

Přestože mohou být zastaveny vrstvou oblečení nebo tenkou vrstvou hliníku, některé jsou schopny proniknout kůží, poškodit ji a vytvořit popáleniny.

Záření gama

Gama záření je vysoce energetické elektromagnetické záření, jehož částicemi jsou fotony, ale na rozdíl od výše zmíněných má vlnový charakter.

Gama paprsky vznikají společně s alfa a beta částicemi během některých radioaktivních přeměn. Jsou také součástí kosmického záření. Ve vesmíru vznikají interakcí částic se silnými magnetickými poli.

Jsou životu nebezpečné, protože mohou lehce penetrovat materiály zastavující alfa a beta záření a musí tak být odstiňovány silnějšími vrstvami materiálů, nejlépe s vysokou hustotou a vysokým atomovým číslem (např. olovo, beton).

Rentgenové záření

Stejně jako záření gama je rentgenové záření proud fotonů, ale na rozdíl od něj nepochází z rozpadů jádra, ale z interakcí elektronů s hmotou. Zároveň mívá menší energii, a proto i jeho schopnost penetrace je v porovnání s gama zářením nižší.

Před škodlivými účinky tohoto záření, jehož přirozeným zdrojem je Slunce a další astronomické objekty, je Země chráněna ionosférou. Naopak uměle vyrobené rentgenové záření našlo hojné využití v medicíně a stalo se tak součástí každodenního života.

Neutronové záření

Dalším typem ionizujícího záření je záření neutronové, které je tvořeno proudem volných neutronů.

Tyto neutrony se mohou uvolňovat při procesu štěpení těžkých jader, kdy se jádro původního prvku rozpadne na dvě nová jádra a na několik neutronů, nebo mohou být vyraženy z jádra prvku nabitou částicí nebo fotonem (neutronové záření bylo objeveno jako výsledek pozorování přeměn jader beryllia na jádra uhlíku při srážkách s alfa částicemi).

Vznikat mohou i při beta plus rozpadu přeměnou z protonu za současného vzniku pozitronu a elektronového neutrina.

Volný neutron je nestabilní, jeho životnost je pouze asi 13 minut, a spontánně se rozpadá na proton, elektron a elektronové antineutrino.

Neutrony jsou částice bez náboje a nemohou tedy ionizovat atomy stejným způsobem, jako ionizují částice nabité. Často se tedy označují jako záření nepřímo ionizující, jenž nejprve předává svou energii nabitým částicím, které teprve pak přímými účinky na atomy látku ionizují.

Je-li neutron zachycen jádrem atomu, přemění tento atom na jiný nuklid, často radionuklid, což vede k dalším štěpným reakcím. Pokud jsou takto produkovány další neutrony, mluvíme o řetězové reakci. Energie produkované řetězovou reakcí je možné využít k výrobě elektrické energie v jaderných reaktorech různé konstrukce.

Lehkovodní reaktor VR-1 Vrabec, ve kterém jsme ozařovali želvušky, používá jako palivo uran-235 a spouští se pomocí neutronového zdroje typu Am-Be.

Stínění proti neutronům obecně musí sestávat ze tří vrstev: vrstva lehkého materiálu bohatého na vodík (např. polyetylén), vrstva kadmia nebo bóru a nakonec vrstva olova.

Z hlediska účinků záření na živou tkáň můžeme záření rozlišit na hustě a řídce ionizující. Záření řídce ionizující zahrnuje záření gama, beta a rentgenové.

Při průchodu vodou nebo tkání vytváří asi 100 iontových párů / mikrometr, mají relativně dlouhý dolet a vytvořené ionty jsou podél jejich dráhy rozloženy řídce.

Většinou způsobují poškození nepřímým účinkem, přes radikály vzniklé ionizací vody.

Mezi hustě ionizující záření řadíme protony, alfa částice a neutrony.

Vytváří až 2000 iontových párů / mikrometr tkáně, ve které mají vcelku krátký dolet, a rozložení absorbované energie se tak děje na krátké dráze blízko sebe. Poškozují hlavně přímým účinkem ukládáním velkého množství energie do buněk a tkání.

1.2.2 UV záření

UV záření je elektromagnetické vlnění s kratší vlnovou délkou než má viditelné světlo, avšak delší než má rentgenové záření. Jeho přirozeným zdrojem je Slunce. Podle vlnové délky jej můžeme rozdělit na UVA, UVB a UVC.

Biologické účinky UV záření závisí na energii fotonů, intenzitě záření, době trvání ozáření, schopnosti absorpce záření tkání a na citlivosti organismu.

Jeho negativní účinky již byly zmíněny výše, mezi pozitivní patří syntéza vitaminu D působením na provitamin 7-dehydrocholesterol.

Přirozenou ochranou organismů vůči UV záření je například tvorba pigmentu melaninu, jenž je produkován kožními buňkami melanocyty. Melanocyty obsahují molekuly fotoreceptoru rhodopsinu, který po zaznamenání UV záření uvolňuje ionty vápníku spouštějící tvorbu melaninu. Melanin pak dokáže UV záření absorbovat a ochránit tak podkožní vrstvu před poškozením.

UVA záření

UVA záření pokrývá oblast spektra mezi 315-400nm.Tvoří až 99%UV záření, které dopadne na zemský povrch.

Na rozdíl od UVB a UVC neporušuje DNA přímo, může ale vyvolat vznik radikálů a působit tak nepřímo. Nadměrná expozice může způsobovat předčasné stárnutí kůže, poškození očí, zvyšovat riziko vzniku rakoviny nebo snížení imunity.

UVB záření

Jako UVB záření se označuje záření o vlnových délkách 280-315 nm. Až 95 % UVB záření ze Slunce je zachyceno ozonovou vrstvou atmosféry, část však stále dopadá na Zem.

U organismů může způsobit různě závažné popálení kůže, její zrychlené stárnutí nebo rakovinu, záněty očí a oslabení imunitního systému.

Jeho účinky jsou závažnější než účinky UVA záření, neboť má schopnost přímo poškozovat a rozkládat bílkoviny a jiné organické sloučeniny buňky. To může vyústit v poškození metabolismu nebo ke vzniku rakoviny, jednobuněčné organismy dokáže zničit úplně.

UVC záření

UVC záření o vlnové délce 100-280 nm je nejnebezpečnějším druhem UV záření. UVC nejkratších vlnových délek má již tolik energie, že může indukovat některé ionizační reakce.

Pro organismy se dá považovat za zhoubné, jelikož penetruje hlouběji do buněk a tkání. Našlo tak využití v germicidních lampách a je hojně využíváno k dezinfekci a sterilizaci. Při průchodu atmosférou reaguje s molekulárním kyslíkem a podílí se na tvorbě ozonu, a proto na zem prakticky nedopadá.

1.3 Biologické účinky záření

Podkladem pro tuto kapitolu byly především stránky Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (Biologické účinky záření na tkáň [40]), AstroNuklFyzika (Základní veličiny dozimetrie) [41] a studijní materiály Molekulární fyziologie genomu na MUNI (Biologické účinky záření na DNA)[42], [43].

1.3.1 Účinky na tkáň/DNA

Biologické účinky záření na tkáň můžeme rozdělit na deterministické a stochastické (viz tabulka 1.1.

Závažnost deterministických účinků vzrůstá s dávkou po překročení určitého dávkového prahu. Klinické projevy nastupující často krátce po ozáření jsou důsledkem silného poškození buněk, jejich (programované) smrti nebo senescence (trvalý blok buněčného cyklu spojený s produkcí prozánětlivých působků) a následné dysfunkce tkáně. Příkladem může být akutní nemoc z ozáření nebo radiační zánět kůže. Protože buňky v mitóze jsou citlivější než buňky v interfázi, akutní postižení se týká především tkání, v nichž probíhá rychlé buněčné dělení (krvetvorné orgány, výstelka střeva, kůže, vyvíjející se zárodek).

Kromě dávkou determinované destrukce tkání způsobuje záření mutace v náhodných genech v části buněčné populace. Pro tyto tzv. stochastické efekty se předpokládá bezprahový, lineární vztah mezi dávkou a pravděpodobností výskytu účinku. Můžeme rozlišit mutace gametické, které se týkají zárodečných buněk a které mohou být přeneseny do další generace, a mutace somatické týkající se ostatních orgánů a tkání a projevující se jen u jejich nositele. Vzhledem k náhodnosti postižení konkrétních genů v jednotlivých buňkách somatické mutace nevedou k dysfunkci tkáně, výjimkou jsou mutace podporující nádorové bujení.

Jednotlivé tkáně se liší svojí citlivostí jak k deterministickým, tak stochastickým účinkům.

Na konečném výsledku působení ionizujícího záření se podílí i reparační mechanismy mající schopnost opravovat vzniklé poškození.

Závažnost poškození určuje také to, jakým způsobem byla dávka záření přijata.

Například účinky záření stejné dávky budou menší, bude-li dávka rozdělena do několika frakcí nebo do delšího časového období, než kdyby byla aplikovaná jednorázově.

Reakce je také odlišná při lokálním a celkovém ozáření, kdy při ozáření pouze části těla může být zachována část kmenových buněk, které pak mohou napomoci obnově ozářené tkáně. Rozdíl je také při vnitřní a vnější kontaminaci.

Jednotlivé tkáně a orgány nemají stejnou citlivost k ozáření, tzv. radiosenzitivitu, a při stejné absorbované dávce se tak v různých tkáních projevují rozdílné účinky.

Liší se i vnímavost k vyvolání cytogenetického efektu, což se projevuje různou náchylností ke vzniku nádorů.

Účinky			$\mathbf{Projevy}$	
časné somatické nestochastické		nestochastické	akutní nemoc z ozáření	
			akutní lokální změny;	
			akutní radiodermatitis;	
			poškození fertility	
pozdní	somatické	nestochastické	nenádorová pozdní poškození;	
			chronická radiodermatitis;	
			zákal oční čočky	
pozdní	somatické	stochastické	zhoubné nádory	
pozdní	genetické	stochastické	genetické účinky u potomstva	

Tabulka 1.1: Účinky záření na lidský organismus, poškození vyvíjejícího se plodu je z hlediska matky časným účinkem, z hlediska plodu může jít i o účinek pozdní [40]

1.3.2 Základní veličiny dozimetrie

Dozimetrie ionizujícího záření se zabývá účinky záření na látku ve vztahu k druhům a vlastnostem interakcí záření s látkou a k množství záření, které je látkou pohlceno (pohlcená energie = "dávka").

Míra fyzikálně-chemických účinků záření na látku a posléze i indukovaných účinků biologických je úměrná koncentraci iontů vzniklých v daném objemu látky. Tato koncentrace iontů je zase úměrná energii, která byla látce v daném objemu zářením předána.

Absorbovaná dávka D je energie ionizujícího záření absorbovaná v daném místě ozařované látky na jednotku hmotnosti. Jednotkou je 1 J/kg, která se nazývá 1 Gray [Gy]. Protože biologický účinek závisí na typu záření a typu postižené tkáně, zavádí se dávkový ekvivalent H, nebo také ekvivalentní dávka, jehož jednotkou je 1 Sievert [Sv].

Dávkový ekvivalent v uvažované tkáni je dán součinem absorbované dávky D v daném místě, jakostního faktoru Q a radiačního váhového faktoru W_R .

Bezrozměrný jakostní faktor Q udává, kolikrát je daný druh záření biologicky účinnější než záření fotonové – X nebo gama (za základ se bere rentgenové záření o energii 200 keV).

Bezrozměrný radiační váhový faktor pak zohledňuje citlivost jednotlivých tkání a orgánů (viz obrázek 1.12). Hodnoty těchto parametrů jsou známy pro člověka, ale ne pro želvušky, proto jsou dávky v literatuře udávány v jednotkách Gray s uvedením typu použitého záření.



Obrázek 1.12: Převod absorbované dávky na ekvivalentní dávku. Vynásobením absorbovaných dávek jednotlivých tkání a orgánů jejich příslušnými radiačními váhovými faktory zohledňujících druh záření získáme ekvivalentní dávky. Tyto dávky vynásobíme příslušnými tkáňovými váhovými faktory pro zohlednění rozdílů v citlivosti jednotlivých orgánů a jejich součin sečteme [44]

1.3.3 Biologické účinky záření na DNA

DNA, nositelka dědičné informace, neustále čelí poškození. Tento tzv. genotoxický stres může být způsoben vnitřními i vnějšími faktory. Do první skupiny patří například kyslíkové

radikály a jiné reaktivní kyslíkové formy vznikající při běžných metabolických procesech; do druhé různé genotoxické chemikálie a všudypřítomná radiace, tzv. přírodní radiační pozadí.

Působením těchto mutagenních faktorů mohou být poškozeny jak báze DNA, tak kovalentní vazby ve vlákně DNA (viz obrázek 1.13).



Obrázek 1.13: Druhy poškození DNA [45]

Báze mohou být buďto chemicky modifikované, nebo může dojít k jejich ztrátě (depurinace, depyrimidinace). Příkladem chemické přeměněny je deaminace C na U. Důsledkem změn bází může být chybné párování bází (anglicky *mismatch*), které pokud nebude opraveno, povede ke vzniku mutace.

Působením UV záření mohou vznikat kovalentní vazby mezi sousedními pyrimidinovými bázemi (T, C) a tvořit tak dimery, které mohou způsobovat špatné párování bází při replikaci nebo zastavení replikace.

Při poškození vlákna rozlišujeme 2 typy zlomů – jednořetězcové (porušení vazby mezi cukrem a fosfátovou skupinou) a dvouřetězcové (dva jednoduché zlomy naproti sobě).

Nejnebezpečnější jsou dvouvláknové zlomy, protože fragmenty DNA se mohou uvolnit a ztratit. Při pokusu o opravu může dojít také ke spojení DNA z různých oblastí genomu, a to i z různých chromozomů.

V jediné buňce za den vznikne až 70 000 poškození DNA, tzv. lézí (asi 55 000

jednovláknových zlomů, 12 000 depurinací), které se buňka snaží různými mechanismy odstranit, aby předešly mutacím a potenciálním fatálním důsledkům (buněčná smrt).

Tyto mechanismy jsou specifické pro jednotlivé typy poškození. Některé jsou evolučně staré, a proto je najdeme např. u všech eukaryot.

Obecně lze říci, že aby chyba mohla být opravena, musí být nejprve rozeznána. Proteiny rozpoznávající poškození DNA obvykle nejsou s to chybu opravit, ale jsou s to přímo nebo nepřímo předat informaci o poškození reparačním enzymům.

Je-li DNA správně opravena, vrací se do původního stavu.

Pokud při opravě dojde ke změnám sekvence (zařazení špatné báze, ztráta báze – delece, vložení bází – inzerce) stává se léze mutací (asi 1 z 1000, většinou škodlivé), jež může ovlivnit další funkce nejen na úrovni buňky, ale i na úrovni celého organismu.

Pokud se jedná o mutaci zárodečných buněk, může být přenesena dokonce i na potomky.

Dělení buněk s nahromaděnými mutacemi může vést ke vzniku rakoviny nebo jiných onemocnění, a proto se vyvinuly mechanismy, jak buňky, u nichž hrozí vznik mutací (neopravené léze), z reprodukce vyřadit (viz obrázek 1.14).

Patří mezi ně například různé typy programované buněčné smrti (konec života buňky) nebo buněčná senescence (trvalé přerušení buněčného cyklu, buňka může přežívat, avšak ne se dělit), leč ne vždy jsou účinné.

Nejlepším způsobem, jak se vyhnout důsledkům poškození a neúspěšných oprav, je poškození předejít, a to například zhášením kyslíkových radikálů pomocí antioxidantů, metabolizací mutagenů nebo pohlcováním UV záření pomocí pigmentů.

1.4 Rezistence želvušek vůči záření

Želvušky jsou extrémně odolné vůči různým druhům ionizujícího záření a některé druhy i vůči UV.

Ačkoli existují i další radiorezistentní organismy, nejsou pro většinu lidí tak zajímavé jako právě želvušky. Na rozdíl od želvušek se totiž jedná převážně o jednodušší jednobuněčné organismy jako archea a bakterie.

Tyto extremofilní organismy dokáží přežít dávky až tisíce Gy, což je v porovnání se savci a člověkem, u nichž se letální dávka pohybuje v jednotkách Gy, o několik řádů více (např. *Deinococcus radiodurans* 5 000 Gy, člověk 4 Gy) [4].

Tolerance vůči ionizující radiaci se napříč kmenem želvušek může značně lišit (viz tabulka 1.2), ale LD50, tj. dávka, kdy dochází k úmrtí 50 % jedinců, se zatím pro všechny zkoumané



Obrázek 1.14: Odpověď poškozených buněk na stres. SASP a SAHF jsou biomarkery senescence $\left[46\right]$

druhy pohybovala v tisících Gy. Srovnání dat mezi studiemi je obtížné – liší se nejen délkou pozorování po ozáření, ale i tím, jaká vývojová stádia se v populaci nacházela.

Obecně jsou limnoterestrické druhy považovány za odolnější než druhy vodní. Předpokládá se, že jejich schopnost odolat vyšším dávkám radiace souvisí se schopností přežít vysychání [4].

Mechanismy bránící fragmentaci DNA při vysychání a rehydrataci se uplatňují i v ochraně DNA proti radiaci.

Přestože by se dalo očekávat, že v hydratovaném stavu budou želvušky méně odolné kvůli radikálům vznikajícím ionizací vody, pokusy ukazují, že rozdíly v odolnosti želvušek mezi hydratovaným a dehydratovaným stavem nejsou nijak markantní, možná právě kvůli ochranným mechanismům [47].

Experimenty na *Hypsibius exemplaris* ukazují, že vajíčka jsou k radiaci daleko citlivější než dospělci. Efekt je markantní zejména u vajíček obsahující embryo v časné fázi vývoje. Zpomalení líhnutí je vidět již při dávce 50 Gy gama záření a snížená úspěšnost při dávce 200 Gy. Vajíček ozářených dávkou 500 Gy se vylíhlo méně než 11 %. Pokud bylo embryo v pozdější fázi vývoje, dávka 500 Gy snižovala líhnutí pouze mírně (asi o 3 %).

Důvodem této citlivosti časného embrya může být fakt, že buňky vyvíjejícího se organismu se dělí s vyšší frekvencí, nebo to, že mechanismy buněčné ochrany ještě nejsou plně vyvinuty nebo aktivovány [47].

Druh	Stav	Ionizující záření	LD50	Doba
Macrobiotus areolatus	dehyd.	RTG	5 700 Gy	d+1
	hyd.	γ -záření	4 700 Gy	18h
	hyd.	γ -záření	2 500 Gy	30 d
Richtersius coronifer	dehyd.	γ -záření	$3 \ 000 \ Gy$	22 h
	dehyd.	proud protonů	10 240 Gy	24 h
	dehyd.	RTG	$2 \ 000 \ Gy^1$	7 d
	dehyd.	${}^4_2He,{}^{56}_{26}Fe$	$2 \ 000 \ Gy^1$	7 d
	hyd.	γ -záření	$5 \ 000 \ Gy$	48 h
Milnesium tardigradum	dehyd.	γ -záření	$4 \ 400 \ Gy$	48 h
	hyd.	$^4_2 He$	$6 \ 200 \ Gy$	48 h
	dehyd.	$^4_2 He$	$5\ 200\ Gy$	48 h
Damaggatting namicon atmus	hyd.	$\frac{4}{2}He$	$4 \ 000 \ Gy^1$	48 h
Ramazzoilius varieonairus	dehyd.	$^4_2 He$	$4 \ 000 \ Gy^1$	48 h
Hypsibiues dujardini	hyd.	γ -záření	4 180 Gy	48 h
Echimicacidos sisiementi	hyd.	γ -záření	$1 \ 270 \ Gy$	48 h
Echiniscolaes sigismunal	hyd.	γ -záření	1 550 Gy	7 d

Tabulka 1.2: Přehled středních letálních dávek různých druhů záření pro vybrané druhy želvušek. *Echiniscoides sigismundi* je druh mořský. Hyd. = hydratovaný stav, dehyd. = dehydratovaný stav [4]

Jedna studie se zaměřovala na pozorování tzv. bystander efektu – vlivu přímo ozářených jedinců na neozářené. Přítomnost želvušek ozářených zářením gama měla negativní vliv na přežití neozářených jedinců. Mechanismus tohoto efektu je nejasný [48].

V roce 2007 se želvušky staly prvním živočichem, který přežil vystavení podmínkám kosmického prostoru [49].

Dehydratovaní jedinci druhů *Richtersius coronifer* a *Milnesium tardigradum* byli vyneseni na nízkou oběžnou dráhu Země (258-281 km nad povrchem Země), kde byly po dobu 10 dnů vystaveni vesmírnému vakuu a kosmickému záření.

Vzorky byly rozděleny do několika skupin tak, aby pomocí filtrů bylo možné odstínit určité frakce záření. Po návratu na Zem byly vzorky rehydratovány a vyhodnoceny.

Samotné vakuum nemělo na přežití želvušek ani na kladení vajíček a jejich následné líhnutí významný vliv, kdežto jedinci vystavení kombinaci vakua a solární radiace vykazovali vyšší úmrtnost a menší schopnost reprodukce.

 $^{^1 \}mathrm{v\check{e}t\check{s}ina}$ jedinců se probrala do doby uvedené v tabulce 1.2

Ze želvušek *Milnesium tardigradum* vystavených směsi UVA a UVB záření se 68 % probralo během 30 minut, avšak následná úmrtnost byla vysoká. Druhý den bylo naživu méně než 20 % jedinců a po 20 dnech méně než 10 %.

V případě Richtersius coronifer tyto podmínky přežil pouze jeden jedinec.

Celému spektru UV (116.5-400 nm) odolali jen tři jedinci druhu Milnesium tardigradum.

1.4.1 Mechanismy ochrany

Proteiny Dsup

DNA, nositelka dědičné informace, je neustále vystavována různým formám genotoxického stresu vnitřního i vnějšího původu, např. při metabolismu vzniklým reaktivním kyslíkovým formám (*reactive oxygen species*, ROS) nebo radiaci.

Organismy si proto vyvinuly různé efektivní ochranné a opravné (= reparační) mechanismy [4]. Vzhledem k vysoké frekvenci poškození DNA (např. vzniku zlomů) ale v každém organismu v průběhu života v některých buňkách dochází k nevratnému poškození (neopravitelné léze, mutace).

Želvušky, které čelí poškození DNA včetně rozsáhlé fragmentace během vysychání, mají nejen běžné opravné mechanismy, ale vyvinuly si i unikátní způsob jak poškození předejít, fragmentaci DNA potlačit a jak ji ubránit před přímými (vznik DNA zlomů) i nepřímými (vznik hydroxylových radikálů) účinky záření[50].

To jim umožňují proteiny rodiny Dsup (z anglického *damage suppressor*). První byl izolovaný z *Ramazzottius varieornatus* a později byly příbuzné proteiny nalezeny i v jiných druzích.

Dsup byl vytipován jako potenciální ochranný faktor na základě toho, že se nacházel v proteinové frakci obsahující chromatin. Prokázána byla jeho vazba na DNA a ještě silnější vazba na nukleozómy [50].

Bioinformatická analýza aminokyselinové sekvence Dsup předpověděla, že tento protein je vnitřně neuspořádaný, tj. nevytváří stabilní sekundární strukturu. To spolu s přítomností kladně nabitých aminokyselinových zbytků umožňuje těsnou vazbu na záporně nabitou DNA, která strukturu proteinu stabilizuje. Experimentální data ukazují, že pro vazbu na DNA je nutná přítomnost C-terminální domény. Zajímavé je, že ta část, kterou se Dsup váže na DNA, se velmi podobá části proteinů HMG (anglicky *high-mobility group*), které se nacházejí pouze u obratlovců.

Funkcí i vlastnostmi podobný protein byl objeven u druhu Hypsibius exemplaris [50].

Ačkoliv sekvenční podobnost mezi Dsup a tímto Dsup podobným (Dsup-like) proteinem je nízká (24.5 %), přítomnost DNA vážící domény, předpovězené fyzikální vlastnosti a

pozice mezi příbuznými geny v obou genomech ukazují na to, že obě varianty se vyvinuly ze společného předka. Jsou to tedy tzv. orthology.

Ačkoli dosud nebylo přesně objasněno, jakým mechanismem Dsup DNA chrání, předpokládá se, že ji obaluje a tvoří tak jakýsi štít fyzicky ji chránící namísto toho, aby plnil funkci reparačního enzymu [4]. Je možné, že tento obal brání i tomu, aby došlo k oddělení přerušených řetězců DNA.

Po přenosu DNA kódující Dsup *Ramazzottius varieornatus* protein do lidské buněčné linie vzniklé imortalizací buněk embryonální ledviny, vykazovaly tyto buňky značně menší poškození než kontrolní buněčná linie neexprimující Dsup (viz obrázek 1.15).

Po ozáření RTG zářením o intenzitě 10 Gy byly vzorky vyhodnoceny pomocí kometového testu. Za indikátor zlomů byly považovány krátké fragmenty DNA, které vycestovaly z jádra nejdále ("na ohon komety").

V buňkách exprimujících D
sup činil podíl jednořetězcových zlomů jen 16 % z veškeré DNA, kdežto v kontrole činil 33 %. Obdobným způsobem bylo zjištěno, že počet dvouřetězcových zlomů v modifikovaných buňkách ozářených 5 Gy RTG záření představoval zhruba 21 %, v buňkách kontroly asi 35 %.

RTG záření může buněčné struktury poškozovat buď přímo předáním energie, nebo nepřímým účinkem přes vzniklé reaktivní kyslíkové formy.

Aby bylo možné lépe posoudit ochranu proti reaktivním kyslíkovým formám, byly buněčné linie vystaveny působení peroxidu vodíku poškozujícím jen přes radikály. Vznik jednořetězcových zlomů DNA byl proteinem Dsup potlačen ze 71 % na pouhých 18 % [51].

Exprese proteinu Dsup *Ramazzottius varieornatus* chrání před poškozením také DNA rostlin [5].



Obrázek 1.15: Vnesení genu pro ochranný protein Dsup chrání lidské buňky rostoucích v Petriho miskách v živném médiu proti radiaci. ROS – "*reactive oxygen species*", reaktivní kyslíkové formy. Zahrnují kyslíkové radikály vzniklé při průchodu radiace vodným prostředím [4]

Modrý štít

Jak se želvušky chrání proti všudypřítomnému UV záření, není zatím zcela objasněno. U rodu *Paramacrobiotus*, konkrétněji *Paramacrobiotus* BLR, souvisí ochrana s jeho pigmentací.

Červenohnědé pigmenty absorbují vysoce energetické UV záření. Když se zářením excitované molekuly pigmentu vrací do základního stavu, vyzařují neškodné modré světlo (viz obrázky 1.16 a 1.17). Přirozená fluorescence v tomto případě slouží jako jakýsi štít (jako například u korálů).



(a) Nomarského kontrast

(b) Fluorescenční mikroskopie

Obrázek 1.16: Paramacrobiotus BLR [52]



Obrázek 1.17: Extrakt z nepigmentovaných želvušek *Hypsibius exemplaris* a pigmentovaných *Paramacrobiotus* BLR v lyzačním pufru pod UV zářením [52]

Experimenty s tímto druhem zahrnovaly hodinové ozáření germicidní UV lampou (emisní maximum 253 nm, dávka 4 kJ/m) a následné sledování po dobu 30 dní. V případě plně pigmentovaných jedinců přežilo 60 %. Hypopigmentovaní jedinci nejenže vykazovali slabší fluorescenci než ti plně zbarvení, ale také nedokázali přežít déle než 20 dní.

Dalším zajímavým zjištěním bylo, že extrakt z pigmentovaných želvušek dokázal zvýšit odolnost jinak k UV vysoce senzitivnímu nepigmentovanému druhu *Hypsibius exemplaris*.

Jedinci pro tyto pokusy byli izolováni z mechu tropické jižní Indie, kde hodnota UV indexu může dosahovat až 10 (v typický letní den dávka asi 4 kJ/m). Je možné, že schopnost fluorescence je formou adaptace na tamější podmínky a že hypopigmentovaní jedinci žijí hlouběji v mechu, kam neproniká tak velké množství UV záření [52].

Kapitola 2

Experimentální část

2.1 Sběr vzorků

V období od září 2022 do května 2024 jsme nasbírali na různých lokalitách (viz obrázek 2.1) především Zlínského, Olomouckého a Jihomoravského kraje přes 220 vzorků materiálu pro izolace.

Vzorky zahrnovaly 188 mechů, zbylé vzorky zahrnovaly různé množství lišejníků, rozkládajícího se listí, půdy, vody nebo játrovek pro pilotní experimenty. V těchto doplňkových vzorcích byly ojediněle nalezeny pouze jednotky želvušek, většinou mrtvých a rozkládajících se, a proto nebyly podrobněji zkoumány a analyzovány. V dalším sběru jsme se tedy zaměřili pouze na mechy, ale k ostatním typům materiálu se plánujeme vrátit, protože představují příležitost rozšířit druhové spektrum izolovaných želvušek. Dva vzorky mechu, HP a HOL, kde již byly pozorovány populace želvušek, poskytl konzultant.

Vzorky jsme značili ve většině případů iniciálami nálezce a pořadovým číslem.

2.2 Izolace želvušek

Želvušky jsme z mechů izolovali 2–3 dny pomocí Baermanovy nálevky (viz obrázek 2.2).

Nálevka je v horní třetině opatřena sítkem, na které se klade materiál na izolaci.

Aby se snížilo množství nežádoucích částic ve vzorku, lze mezi biologický materiál a sítko vložit vrstvu toaletního papíru.

Na stopku nálevky je připojena silikonová hadička se sběrnou zkumavkou. Aparatura se plní vodou.

Metoda je založená na aktivní migraci želvušek z mechu do vody. V prostoru pod sítkem želvušky díky gravitaci klesají do sběrné zkumavky. Jako alternativu jsme


Obrázek 2.1: Mapa zachycující lokality sběru vzorků. Žluté oblasti značí místa s nejvyšším počtem sběrů

používali aparatury fungující na stejném principu jako Baermannova nálevka skládající se z 6jamkového panelu pro kultivaci buněk a plastových inzertů se sítkem (viz obrázek 2.3).

Migraci želvušek jsme navíc podpořili vyvinutím teplotního gradientu zahříváním vzorku shora pomocí vyhřívací podložky (35-50 °C) a chlazením spodní části nálevky v ledové lázni. K chlazení panelů s inzerty na 15 °C slouží vodní chladič.

Vzhledem k tomu, že vzorek vyizolovaných želvušek bývá znečištěn částicemi půdy a fragmenty mechu, množí se v něm bakterie a kromě želvušek do něj migrují i další organismy, je vhodné želvušky přenést do nového média (minerální voda Volvic).

2.3 Předběžné určování pomocí mikroskopie

Vyizolované želvušky jsme pozorovali inverzním mikroskopem Olympus IX s kamerou DP73 při zvětšení 40x-400x a předběžně určovali na úroveň rodu. K získání fotografií



(a) Izolační aparatura

(b) Baermannova nálevka

Obrázek 2.2: Izolační aparatura z Baermannových nálevek



Obrázek 2.3: Šestijamkový panel pro kultivaci buněk s plastovými inzerty se sítkem

v různých rovinách řezu a ke sledování autofluorescence jsme používali automatický mikroskop Voyager 7000 (Yokogawa). Pro detailní záběry bukálního aparátu a drápků jsme vytvořili trvalé preparáty, které jsme pozorovali pomocí skeneru skel SLIDEVIEW VS200 (Olympus).

Pro bližší klasifikaci je obvykle zapotřebí experta a zvětšení 600-1000x.

Mezi hojně využívané znaky k určování želvušek patří například tvar drápků a jejich vzájemná poloha (viz obrázek 2.4), přítomnost a počet mikroplakoidů a makroplakoidů nebo pórovitost kutikuly.

Pro detailní pozorování těchto struktur je navíc potřeba znehybnění želvušek a jejich trvalá fixace.

V našich vzorcích jsme nejčastěji pozorovali zástupce čeledi Macrobiotidae (Macrobiotus,



(a) Drápky čtvrtého páru končetin

(b) Drápky prvního až třetího páru končetin

Obrázek 2.4: Drápky želvušky rodu Paramacrobiotus, JN105

Paramacrobiotus, Mesobiotus) a Hypsibiidae (Hypsibius, Diphascon, Itaquascon), poté zástupce rodu Milnesium, Ramazzottius, Echiniscus, Isohypsibius (viz obrázky 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 a dále obrázek S.13). Želvušky se nám podařilo pozorovat v 78.87 % vyizolovaných mechů.

Souhrnnou čeleď *Macrobiotidae* volíme proto, že část vzorků byla studována pouze s použitím běžného světelného mikroskopu, což neumožňuje přesnější určení rodu. Při analýze vybraných želvušek při větším zvětšení se ukazuje, že čeleď zahrnuje rody *Macrobiotus*, *Paramacrobiotus* a *Mesobiotus*.

Mezi další organismy nacházející se ve vzorcích patřili hlísti, vířníci, roztoči, drobní korýši, prvoci, améby a vířenky.

Z dat jsme sestavili několik grafů popisujících vzorky s jednotlivými taxony želvušek (viz obrázky S.13, S.15, S.16 a S.17), data jsme ale dále hlouběji statisticky neanalyzovali, neboť vzorky byly sbírány v různých ročních obdobích (viz obrázek S.12 a tabulky S.14, S.15 a S.16) a za různých přírodních podmínek. Dále proto, že z lokality byl odebrán nejčastěji jen jeden vzorek mechu, a ne několik odlišných z různých míst lokality. Také izolační procedura pro jednotlivé vzorky se z důvodů optimalizací a zefektivňování lišila v čase. Ekologická studie ani nebyla cílem našeho projektu.



(a) Vzorek JN20

(b) Vzorek JN36

Obrázek 2.5: Želvuška rodu Ramazzottius, zvětšeno 200x



(a) Želvuška rodu Macrobiotus, vzorek
 JN38
 (b) Želvuška rodu Echiniscus, vzorek JN15

Obrázek 2.6: Želvuška rodu *Echiniscus* a *Macrobiotus*, zvětšeno 200x



(a) Vzorek JN17, svlečka s dospělcem a třemi vajíčky, zvětšeno 100x

(b) Vzorek JN37, zvětšeno 200x

Obrázek 2.7: Želvuška rodu Milnesium



(a) Zelený kanál spektra

(b) Červený kanál spektra

Obrázek 2.8: Želvuška rodu *Echiniscus*, fluorescenční mikroskopie, zvětšeno 200x. Všechny námi studované želvušky vykazují autofluorescenci. Po ozáření UV světlem emitují viditelné světlo v širokém rozsahu vlnových délek.



(a) Želvuška rodu Isohypsibius

(b) Svlečka želvušky rodu Hypsibius

Obrázek 2.9: Želvuška rodu Isohypsibius a Hypsibius

Počty želvušek v izolátech se nejčastěji pohybovaly v rozmezí nižších desítek, v několika málo případech byly přítomny populace čítající přes sto jedinců. Některé mechy neobsahovaly želvušky vůbec.

Kromě dospělců byla ve vzorcích pozorována i další vývojová stádia, jako jsou vajíčka (viz obrázky 2.10, 2.12 a 2.13) či mláďata (viz obrázek 2.11).



Obrázek 2.10: Svlečka s vajíčky. Modře svítí stylety vyvíjejících se mláďat. Oranžové objekty jsou pravděpodobně zásobní buňky. Polarizační mikroskopie, zvětšeno 400x



Obrázek 2.11: Kutikula s líhnoucími se jedinci, Nomarského kontrast, zvětšeno 400x



Obrázek 2.12: Vajíčka čeledi Macrobiotidae, fluorescenční mikroskopie



Obrázek 2.13: Vajíčka čeledi Paramacrobiotidae, fluorescenční mikroskopie



(a) V procházejícím světle

(b) Fluorescenční mikroskopie

Obrázek 2.14: Vzorek JN36



(a) V procházejícím světle

(b) Fluorescenční mikroskopie

Obrázek 2.15: Mesobiotus, vzorek HOL



(a) V procházejícím světle

(b) Fluorescenční mikroskopie





Obrázek 2.17: Želvuška tvořící vajíčka, vzorek JN36



Obrázek 2.18: Parmacrobiotus v procházejícím světle, vzorek HP

2.4 Barkódování DNA

Tradiční metody taxonomie mikroskopických bezobratlých založené na analýze morfologických charakteristik jsou časově náročné, subjektivní a náchylné k chybám. Morfologická taxonomie želvušek je obzvláště obtížná, druhy jsou často rozlišovány na detailech uspořádání ústního aparátu a drápků. Proto jsme přistoupili i k analýze sekvencí DNA, takzvanému barkódování, které nabízí podstatně spolehlivější identifikaci druhů.

Barkódování DNA funguje na principu porovnávání sekvence DNA z konkrétní části genomu určovaného organismu s již známými sekvencemi pro jednotlivé druhy uloženými v databázi (viz obrázek 2.19). Vhodné sekvence by měly vykazovat minimální vnitrodruhovou variabilitu a vysokou mezidruhovou variabilitu. Kromě genů pro ribozomální RNA (18S rRNA, 28S rRNA) se používají i sekvence vybrané pro užší skupiny taxonů. Nejvíce používanou oblastí genomu u živočichů je gen pro podjednotku I mitochondriální cytochrom c oxidázy (COX1), zatímco u rostlin a hub jsou často používány oblasti interních transkribovaných spacerů (ITS).



Obrázek 2.19: Schéma postupu při DNA barkódování [53]

2.4.1 Provedení DNA barkódování v našem projektu

První krokem DNA barkódování je izolace DNA z biologického vzorku. Tímto vzorkem byly jednotlivé želvušky nebo malé populace pocházející z izolací z mechů nebo z kultury. Želvušky byly polapené pomocí mikropipety a opakovaně přenášeny do čistého média (minerální voda Volvic). Toto umožnilo alespoň částečně se zbavit dalšího materiálu s obsahem DNA. Kutikula želvušek byla narušena pomocí inzulínové jehly o průměru 0,30 mm, aby se do média uvolnily jednotlivé buňky.

Následně byl přidán extrakční pufr, který zajistil popraskání cytoplazmatických membrán. K dalšímu rozrušení tkání byla použita metoda opakovaného vystavování nízkým teplotám (-80 °C v hlubokomrazícím boxu, 15 minut) a vysokým (55 °C v termocycleru BIORAD C1000 TouchTM Thermal Cycler, 15 minut). Tento proces se opakoval celkem čtyřikrát.

DNA byla izolována pomocí komerční sady Quick-DNA
TM Microprep Plus Kit obsahující

kolonku se sorbentem vážícím DNA a pufry. Vzorek byl nanesen na kolonku, na které se DNA zachytila. Průtok pufrů kolonkou byl urychlen centrifugací. Promývací kroky jednotlivými pufry v sadě podle návodu umožnily zbavit se nežádoucích složek vzorku. Ve finálním kroku byla čistá DNA vymyta elučním pufrem do mikrozkumavky. Amplifikace DNA pro cílové geny COX1, 18S rRNA a 28S rRNA pomocí PCR probíhala v termocykleru s primery převzatými z literatury [54] (viz tabulka 2.1) a tzv. master mixem obsahujícím další komponenty pro PCR (polymerázu, nukleotidy, hořčík, interkalační značku SYBR green). Program zahrnoval úvodní denaturaci (180 s, 95 °C) a 40 cyklů skládajících se z denaturačního kroku (30 s, 94 °C), kroku umožňujícího nasednutí primerů na DNA (30 s, 45 °C) a syntézy (60 s, 72 °C). Finální enlongace trvala 360 s při 72 °C.

Cílový gen	Sekvence primeru v	Sekvence primeru v
	přímém směru	opačném směru
COX1	5'-GGTCAACAAATC	5'-TAAACTTCAGGGT
	ATAAAGATATTGG-3'	GACCAAAAAATCA-3'
28S rRNA	5'-ACCTATTCTCA	5'-GACTTCCCT
	AACTTTAAATGG-3'	TACCTACAT-3'
18S rRNA	5'-GCTTGTCTCA	3'-CATTCTTGGC
	AAGATTAAGCC-3'	AAATGCTTTCG-5'

Tabulka 2.1: Přehled použitých primerů a cílových genů [54]

Čistota PCR produktů byla hodnocena pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. Metoda umožňuje rozdělit DNA ve vzorku na základě jejich velikosti. Po obarvení gelu barvivem GelRed (Sigma Aldrich), které se váže na DNA a svítí v UV světle, byly gely přeneseny na transluminátor a vyfoceny (viz obrázek 2.20).

Sekvence byly získány pomocí komerčního Sangerova sekvenování (firma Seqme). Před odesláním byly vzorky byly zbaveny použitých primerů pomocí enzymu exonukleázy I a alkalické fosfatázy (ExoCleanUp FAST PCR, firma VWR).

Výsledky pro skenování byly získány zatím pro vzorky *Paramacrobiotus* HP. Pro ostatní druhy, které byly podrobeny radiačnímu experimentu, čekáme na výsledky.

Zvlášť se sekvenovala DNA izolovaná z 1 jedince a zvlášť z 5 jedinců dohromady. Jedinci pocházeli z udržované kultury *Paramacrobiotus* HP. Ze stejného mechu byly později pro sekvenování získány další dva vzorky, ze kterých byla DNA izolována stejným způsobem pro stejný počet jedinců.

Sekvenování bylo neúspěšné pro cílový gen COX1, nejspíše z důvodu nízké koncentrace DNA. Pro úspěšně sekvenované geny 18S rRNA a 28S rRNA bylo provedeno mnohonásobné srovnání sekvencí ve formátu FASTA v programu TCoffee. Výstup ve formátu CLUSTAL ukázal, že sekvence pro každý gen z kultury a z mechového izolátu se shodují kromě počátků a konců záznamu, což je způsobeno omezením technologie. V několika případech přístroj také neuměl nukleotid určit jednoznačně. Nespolehlivé počáteční a koncové sekvence byly



Obrázek 2.20: Ukázka rozdělení PCR produktů pro sekvenci 18S rRNA pomocí elektroforézy v agarózovém gelu. V dráze zcela vlevo je standard velikosti

z FASTA souboru odstraněny. Konsensová sekvence, která již neobsahovala sekvenační nejasnosti, byla získána pomocí programu EMBOSS Cons. Konsensová sekvence byla porovnána v programu BLAST se sekvencemi v databázi NCBI. Program BLAST dokáže najít podobné sekvence pomocí párového srovnání.

Pomocí programu BLAST bylo pro oba geny 18S rRNA a 28S rRNA nalezeno více než 100 sekvencí, které patří želvuškám a mají podobnost větší než 90 %. Byla vytvořena tabulka (viz tabulka 2.2, obrázky 2.21 a 2.22) s deseti nejvíce podobnými sekvencemi podle skóre pro oba geny. Pokud se ve výsledcích objevilo více sekvencí pro jeden druh, byla vybrána sekvence s nejvyšším skóre. Výjimkou byl *Paramacrobiotus richtersi*, kde bylo do tabulky zahrnuto více genetických variant. Pro každý druh, který se vyskytoval jen v jedné části tabulky, byly dohledány podobné sekvence s nižším skóre a doplněny do tabulky. Podobné sekvence byly pro oba geny nalezeny pro 5 druhů želvušek a jsou v tabulce barevně označeny. Pokud sekvence pro daný druh nebyla nalezena i u druhého genu, bylo to pravděpodobně z důvodu, že tato sekvence v databázi chybí a ne proto, že je nepodobná.

2.4.2 Výsledky DNA barkódování

Analýza sekvencí pro 18S a 28S rRNA geny potvrzuje to, že želvušky ze vzorku HP jsou *Paramacrobiotus.* Určit jednoznačně druh nebylo možné z důvodu velké evoluční podobnosti sekvencí pro oba primery. Lepší informace by mohla poskytnout sekvence pro gen COX1.

Gen	Organismus	Max.	Pokrytí	Shoda	Délka
		skóre	sekvence	:	sekvence
A:	$Parama crobiotus\ metropolitanus$	1611	100%	99.55%	3768
28S	Paramacrobiotus richtersi group	1591	97%	99.88%	2123
rRNA	sp. NG-2008				
	Paramacrobiotus richtersi	1574	97%	99.54%	1349
	Macrobiotus pallarii	1563	97%	99.31%	2123
	Diaforobiotus islandicus	1507	99%	97.51%	897
	Richtersius cf. coronifer	1483	99%	97.06%	883
	Minibiotus sp. TarCPH28	1482	97%	97.57%	1315
	$Minibiotus \ gumers indoi$	1478	97%	97.47%	2137
	Adorybiotus granulatus	1426	97%	96.44%	1356
	Hebesuncus ryani	1386	99%	94.96%	911
	Acutuncus antarcticus	1386	99%	95.04%	896
	Macrobiotus hufelandi group sp.	1380	97%	95.52%	2131
	NG-2008				
B:	Paramacrobiotus richtersi group	1591	100%	100.00%	1767
	sp, NG-2008				
18S	Paramacrobiotus fairbanksi	1591	100%	100.00%	1480
rRNA	Paramacrobiotus richtersi	1585	100%	99.88%	1814
	$Parama crobiotus\ metropolitanus$	1563	100%	99.42%	1817
	$Parama crobiotus\ experimental is$	1555	100%	99.30%	895
	Macrobiotus hufalendi	1546	100%	99.07%	1808
	Paramacrobiotus arduus	1519	95%	100.00%	822
	Paramacrobiotus depressus	1519	95%	100.00%	822
	Paramacrobiotus aff. spatialis	1510	05%	100 00%	<u> </u>
	[Ca1 Guidetti et al. 2019]	1919	9970	100.0070	044
	Paramacrobiotus spatialis	1519	95%	100.00%	822
	Macrobiotus pallarii	1511	100%	97.56%	1767

Tabulka 2.2: Srovnání sekvencí částí genu 28S rRNA a 18 rRNA *Paramacrobiotus* HP s databázovými sekvencemi.

Z výsledků vyplývá, že se může jednat o *Paramacrobiotus richtersi* nebo *Paramacrobiotus metropolitanus*, pro které jsme zjistili vysokou shodu pro oba geny. Ale nemůžeme vyloučit, že se jedná o některý druh, který měl stoprocentní shodu pro 18S rRNA, ale pro 28S rRNA sekvenci v databází nemá. Je také možné, že se jedná o zcela jiný druh, který ještě v databázi sekvenci vůbec nemá.

Barevné označení umožňuje snadno dohledat, pro které druhy byly nalezeny podobné geny pro obě sekvence.

ignment																					Link To Viou	Enodh
																					LINK TO VIEW	Treedu
50	100	150	200)	250	300	35	0	400	450	5	500	550	600	65	i0	700		750		800	850
13					13	A. C.	0.10	1		•		13 (7 . 1			-	H.			131			Pie-
Find:		~ \$\$	Q. ()		0, 10										🔀 Tools •	Colu	umns	Rows	2. D	ownload •	Coloring •	12
equence ID Start	1	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600	650	700	750	800	850	884	End	Organism	
uery_1498161 (+)1	*																			884		
R. 008692103.1 (→)1,302 A35757.1 (→)1,260 H079493.1 (→)1,260 H37575.1 (→)1,260 H35756.1 (→)1,260 T786794.1 (→)1,260 H079492.1 (→)452 H35761.1 (→)1,271 H079492.1 (→)452 H35761.1 (→)1,271 H079495.1 (→)452 H079496.1 (→)422 K87957.1 (→)22 F446654.1 (→)12			1	1						1	ı b				I					2,185 2,123 1,349 2,123 897 883 1,315 2,137 1,356 911 896 911 896	Paramacrobiot Paramacrobiot Paramacrobiotus pa Diaforobiotus i Richtersius cf. Minibiotus gun Adorybiotus gr Hebesuncus ny Acutuncus ant Marabiotus h	is metroj us richter allarii slandicus coronifer TarCPH28 nersindoi anulatus rani arcticus ufalardi z

Obrázek 2.21: Srovnání sekvencí genů v programu MView. Query je osekvenovaný gen *Paramacrobiotus* HP. Velikost sekvence udává měřítko. Shoda = šedá barva, neshoda = červená a modrá barva

1 5	0 1	0 15	i0 :	200	250	300		350	400	450		500	550		600	650	700		750	800		86
12		۲. · · ·			12						12			• • •				12			Pile-up	
*																						
5 Find:		~ ¢ •	> 9		0, 11										X Tools -	Columns	Rows	٠.	Download -	Coloring	-12 3	
Sequence ID	Start	1 50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600	650	700	750	800	861	End	Organism		
Query_23430	17 (+)1	*								• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •									861			
ON872388.1	(*)9	¥																	869	Paramacrobio	tus fairbar	ksi
FJ435743.1	(+)61	*																	921	Paramacrobio	tus richter	si
EU038078.1	(*)84	¥			1														944	Paramacrobio	tus richter	si
XR_008692085.	1 (+)84	¥.																	944	Paramacrobio	tus metro	10
MN073468.1	(+)32	\$																	891	Paramacrobio	tus experi	n
X81442.1	(+)84	*					- 11						1						942	Macrobiotus h	utelandi	
MK041032.1	(+)1	*																	822	Paramacrobio	tus arduus	<u> </u>
MK041030.1	(+)1																		822	Paramacrobio	tus depres	sus
MK041020.1	(+)1	•																	822	Paramacrobio	tus an, sp	10
PIK041025.1	(*)1	•																	822	Paramacrobio	tus spatia	s

Obrázek 2.22: Srovnání sekvencí genů v programu M
View. Query je osekvenovaný genParamacrobiotus HP. Velikost sekvence udává měřítko. Shoda = šedá barva, neshoda = červená a modrá barva

2.5 Kultivace želvušek

Problematika kultivace želvušek je dosti komplexní vzhledem k tomu, že každý druh vyžaduje pro své rozmnožování specifické mikroklima. Neexistuje proto univerzální způsob jejich chovu v laboratorních podmínkách [2].

Eutardigradní druhy se chovají v kultivačních panelech nebo Petriho miskách v Chalkneyho médiu s půdním extraktem nebo v různých minerálních vodách (např. Volvic) za různých světelných a teplotních podmínek. Pohyb je usnadněn zdrsněním povrchu kultivační nádoby (např. smirkovým papírem). Alternativou je pěstovat želvušky na agaru překrytém výše uvedeným médiem.

Kultivování heterotardigradních druhů bývá mnohem náročnější, neboť pro svůj životní cyklus vyžadují vysychání, na které jsou v přirozeném prostředí zvyklé [55].

Potravou pro býložravé druhy a některé juvenily dravých druhů bývá mikroskopická řasa

(obvykle *Chlorella* spp., *Chlorococcus* spp.), ale popsáno je také krmení mechem. Pro dravé druhy to jsou např. hlísti, vířníci a jiné želvušky.

Abychom zajistili stálé populace využitelné pro naše experimenty, pokusili jsme se kultivovat želvušky rodu *Milnesium*, *Ramazzottius*, *Macrobiotus*, *Paramacrobiotus* a *Echiniscus* pocházející z izolací.

Želvuškám v 6jamkových panelech pro kultivaci buněk v minerální vodě Vovic byla nabídnuta *Chlorella vulgaris* a kultura *Caenorhabditis elegans* obsahující jak larvální stádia, tak dospělce. Panely byly umístěny do inkubátoru o teplotě 17 °C. Zatímco jedinci *Milnesium, Ramazzottius, Echiniscus* obvykle umírali během 1-2 týdnů, jedinci *Macrobiotus* a *Paramacrobiotus* přežívali 2-6 měsíců. Tvorbu vajíček jsme pozorovali u želvušek *Paramacrobiotus* HP. Vajíčka se také úspěšně líhnula (viz 2.23). Pozorovali jsme také zásnubní chování.

V současné době úspěšně udržujeme homogenní kultur
uParamacrobiotus HP, populace dosahuje 500 jedinců.



Obrázek 2.23: Želvuška líhnoucí se z vajíčka v kultuře HP, zvětšeno 400x

2.6 Studium odpovědi na stres

2.6.1 Příprava populací

Pro stresové experimenty byly použity želvušky *Hypsibius exemplaris* z laboratorní kultury udržované v minerální vodě Vovic v plastových kultivačních lahvích běžně používaných pro pěstování buněk (firma TPP) a želvušky izolované z mechů pomocí Baermannovy nálevky. Populace byly izolovány z rájů JN36, JN17, JN105, HOL a HP.

Řasy obsažené v kultuře *Hypsibius exemplaris* byly odstraněny odlitím vody z kultivační lahve, přičemž aktivní želvušky se držely na smirkovým papírem zdrsněném povrchu a

mohly pak být z lahve získány zvlášť. Další drobné nežádoucí složky kultivačního roztoku byly odstraněny centrifugací, při níž se želvušky zkoncentrovaly na dně zkumavky.

Živé želvušky z vlastních izolátů získaných pomocí Baermannovy nálevky byly vybrány mikropipetou, zbaveny nečistot a rozděleny podle druhů. Uchovávány byly v minerální vodě Volvic.

Želvušky byly rozděleny do stripů s PCR mikrozkumavkami, na jednu mikrozkumavku připadalo $50 - 100 \ \mu l$ suspenze želvušek v minerální vodě Volvic ředěné vodou v poměru 1:1. V těchto stripech probíhalo ozařování (viz obrázek 2.24) a vystavení zvýšené teplotě.

2.6.2 Ozařování v jaderném reaktoru

Želvušky jsme vystavili směsi neutronového a gama záření v lehkovodním reaktoru VR-1 na FJFI ČVUT. Vzorky byly do aktivní zóny reaktoru spouštěny vertikálními kanály. Stripy PCR mikrozkumavek byly navázány na vlasec takové délky, aby po vložení do kanálů byly umístěny přímo ve středu aktivní zóny reaktoru. Intenzitu dávek v jednotlivých kanálech uvádí tabulka S.1. Odběr vzorků probíhal v předem vybraných časech vytažením stripu z kanálu a odstřižením příslušných zkumavek (viz obrázek 2.25). Jako kontroly sloužily stripy se želvuškami položené v místnosti s reaktorem. Po ozáření byly želvušky dopraveny do Olomouce a rozděleny do 384jamkových desek (viz obrázek 2.26a). Ty byly umístěny do inkubátoru a v určené dny fotografovány pomocí automatického mikroskopu Voyager 7000 (Yokogawa) (viz obrázek 2.26b).

Rozložení vzorků v destičkách a ostatní parametry jsou zaneseny v tabulkách S.2, S.3, S.4, S.5, S.6, S.7, S.8, S.9, S.10, S.11, S.12 a S.13.



(a) Strip PCR mikrozkumavek

(b) Odstřihávání jednotlivých zkumavek ze stripu

Obrázek 2.24: Ozařování želvušek



(a) Volně

(b) Uspořádány a připraveny pro transport

Obrázek 2.25: Odstřižené zkumavky



(a) 384 jamkové destičky s ozářenými želvuškami

(b) Automatická mikroskopie

Obrázek 2.26: Mikroskopie ozářených želvušek

Experiment 1

V listopadu 2022 jsme provedli pilotní experiment v reaktoru VR-1. Nejdelší expozice vzorků trvala 1 hodinu, celková maximální dávka byla 502 Gy pro *Hypsibius exemplaris*, 1229 Gy pro *Milnesium* sp. pocházejícího z mechu JN17, 809 Gy pro *Paramacrobiotus* HP a 1653 Gy pro *Macrobiotus* ze vzorku JN36. Po ozáření byla destička s želvuškami uchovávána v 15 °C. V žádném případě však nebylo dosaženo takové dávky, po jejímž působení by během 14 dní zemřelo více než 20 % ozařovaných jedinců.

Experiment 2

Další experiment, během něhož byly želvušky *Macrobiotus* JN36, *Mesobiotus* HOL a *Paramacrobiotus* HP 8 hodin ozařovány při vysokém výkonu reaktoru, proběhl v dubnu 2023. Maximální dávka činila 22 000 Gy. Po ozáření byla destička s želvuškami uchovávána v 15 °C. Protože dávky LD50 byly pro *Paramacrobiotus* JN36, *Mesobiotus* HOL a *Paramacrobiotus* HP 15 000 Gy a výše (asi 3x výše, než uvádí literatura), je možné, že se zavěšený strip nedostal v kanálu do plánovaného místa ozařování s nejvyšší intenzitou záření. Nebyla ani patrná dávková závislost. Experiment bylo tedy nutné opakovat.

Experiment 3

V dubnu 2024 jsme ozařovali želvušky při vysokém výkonu reaktoru (1670 Gy/h; gama 568 Gy/h, neutrony 1102 Gy/h v kanále s nejvyšší intenzitou záření) 7,5 hodiny. Jednotlivé mikrozkumavky obsahovaly celkem 400 jedinců *Hypsibius exemplaris*. Izolované želvušky z mechů JN105, JN36, HP a HOL byly ozařovány ve zkumavkách po 20-30 jedincích, následně z každé zkumavky rozpipetovány do 2-3 jamek a inkubovány jednotně při 17 °C.

Po provedení experimentu byly želvušky *Hypsibius exemplaris* rozděleny do 3 destiček, které byly umístěny do různých teplot – 4 °C, 12 °C a 17 °C. Divoké želvušky byly přeneseny do jedné destičky a uchovávány při 17 °C.

Kapitola 3

Vyhodnocení stresových experimentů

3.1 Detekce želvušek

Destičky byly snímány pomocí automatického mikroskopu Voyager 7000 (Yokogawa) 3, 5, 6, 7, 10 a 14 dní po ozáření. Při snímání jsme želvušky fotografovali v několika rovinách ostrosti (tzv. Z-stack) a několika intenzitách osvitu pro simulaci efektu odparu. V rámci jednotlivých dní byl také skenovací program nastaven tak, aby vyfotografoval veškeré jamky několikrát s předdefinovanými časovými rozestupy. Za třetí experiment z roku 2024 tak bylo nasnímáno celkem 226 459 snímků (2.5 TB dat).

3.1.1 Detekce želvušek za pomoci deterministických metod

Navrhli jsme vlastní algoritmus detekující želvušky pomocí deterministických metod.

Zkoušeli jsme několik druhů metod. Abychom dokázala určit, jaké pixely z obrazu patří želvuškám a jaké nikoli, vyzkoušeli jsme metodu práhování. Bohužel jsme zjistili, že pozadí – jež je gradientní – nám hrubě zkresluje následnou segmentaci.

Proto jsme přišli s nápadem – gradient světla z pozadí odečíst. Jelikož se ale úroveň osvětlení liší snímek od snímku, není možné osvětlení určit staticky; museli jsme tudíž vymyslet robustnější způsob.

Vytvořili jsme proto metodu, která nejprve aplikuje mediánový filtr s velkým konvolučním okénkem (například 5-10 % šířky/výšky obrázku) na vstupní obrázek za cílem určení gradientu pozadí. Medianový filtr se liší od ostatních rozostřovacích filtrů zejména svou dobrou schopností ignorovat malé objekty – díky tomu tak určí jednoduše a přesně celé pozadí.

Jakmile jsme měli k dispozici pro každý obrázek i jeho pozadí, mohli jsme je vzájemně odečíst a získat to, co je oproti pozadí odlišné – želvušky.

Abychom zvýšili robustnost deterministického rozpoznávacího algoritmu, aplikovali jsme konvolučně ještě Gaussovský filtr pro rozmazání všech objektů. Díky tomuto jsme odfiltrovali nejmenší nečistoty, velmi se lišící svou barvou od pozadí, a poté i vyhladili kontury jednotlivých želvušek.

Finálně jsme již využili prahování s automaticky určeným prahem (Otsuova metoda).



Obrázek 3.1: Segmentace želvušek za pomoci deterministických metod

Metoda je díky adaptivnímu prahování poměrně robustní a ve většině případů funguje spolehlivě. Avšak neumí si poradit, pokud se želvušky drží shluků řas či zbytků materiálu z izolace. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli provést rešerši i v oblasti umělé inteligence, která je vůči těmto jevům rezistentní.

3.1.2 Detekce želvušek za pomoci umělé inteligence

\mathbf{SAM}

Abychom vyřešili problémy předchozího řešení, provedli jsme rešerši v oblasti konvolučních neuronových sítí. Vyhledali a otestovali jsme několik nejmodernějších technologií umělé inteligence včetně variant nejmodernějších řešení, jako například Segment Anything Model od společnosti Meta.

Tato na první pohled skvělá řešení však nebyla nikterak účinná; stejně jako deterministické metody tato řešení selhávala zejména v určení rozsahu segmentace (ten byl potřebný zadat ručně).



Obrázek 3.2: Segmentace SAMu pro dva různé ručně zadané parametry určující rozsah segmentace od zadaného bodu

YOLO

Jelikož předchozí řešení selhávalo zejména na rozpoznávání shluků želvušek, zjistili jsme, že budeme potřebovat využít konvoluční neuronové sítě pro tzv. instanční segmentování (segmentace s detekcí, zda pixel stejné třídy patří k objektu 1, 2 nebo 3). Z tohoto důvodu jsme vybrali rodinu Yolo (*You Look Only Once*), která je právě pro tyto účely svou architekturou uzpůsobená.

Zároveň již nabízí i předtrénované modely z datasetu Coco pro objekty z reálného světa (člověk, auto, autobus, kolo, …). To se na první pohled může zdát jako nevyužitelné pro segmentaci želvušek, avšak právě díky tomuto si můžeme dovolit mnohonásobně zrychlit zdlouhavý trénovací proces neuronové sítě. Díky předtrénování se síť již nemusí učit základní koncepty jako rozpoznání hran objektů nebo barev ve svých prvních vrstvách neuronů; rovnou se může zaměřit na své poslední a často menší vrstvy, které slouží pro klasifikaci cílového objektu.

Anotace

Abychom mohli natrénovat neuronovou síť, potřebovali jsme nejprve vlastní dataset obrázků. Vyzkoušeli jsme několik anotačních programů (ImageJ, Fiji, Roboflow, LabelMe, Labelimg, …). Jako nejlepší jsme vyhodnotili V7 Darwin, který oproti ostatním disponuje několika funkcionalitami pro jednoduché označování (přehledné uživatelské rozhraní, nastavení



Obrázek 3.3: Anotovaný snímek $\mathit{Macrobiotus}$ JN105 v programu V7

pracovního postupu pro schvalování anotací, jednoduché exportování anotací do různých formátů, několik AI nástrojů zjednodušujících označování želvušek (včetně implementace SAM), souhrnné statistiky o anotovaném souboru dat, ...).

Natrénování neuronové sítě a detekce želvušek z experimentů

Pro každý morfologicky odlišný druh želvušek jsme natrénovali neuronovou síť zvlášť. Zjistili jsme, že v případě hromadného trénování má neuronová síť horší performanci a nezvládne dobře rozlišit jednotlivé želvušky od pozadí.

V anotačním programu V7 jsme anotovali 112 snímků pro *Hypsibius exemplaris*, z čehož 18 (16 %) snímků jsme poté použili pro validaci sítě (viz příloha S.5). Pro vzorky JN105 a HS jsme anotovali 285 snímků, z čehož bylo 45 (16 %) použito pro validaci (viz příloha S.6).







Obrázek 3.5: Instanční segmentace neuronové sítě Yolo v
8 natrénované na anotacích snímků $Hypsibius\ exemplaris$

Po natrénování neuronové sítě jsme vytvořili predikce pro veškeré obrázky (konkrétně pro *Hypsibius exemplaris* to bylo 117 519 snímků a pro vzorky JN105 a HP 38 766 snímků). Chytře jsme využili míry jistot (p_d pro mrtvé a p_l pro živé želvušky) udávané neuronovou sítí Yolo a vytvořili jsme si tak vlastní robustní metriku úmrtnosti u pro vyhodnocení procentuálního zastoupení mrtvých želvušek oproti těm živým následovně na jednom snímku:

$$u = \frac{\sum_{n=0}^{N} p_{d,n}^2}{\sum_{n=0}^{N} p_{d,n}^2 + \sum_{n=0}^{N} p_{l,n}^2},$$

Rovnice 3.1: Metrika úmrtnosti

kde n_d je počet mrtvých a n_l počet živých želvušek na predikovaném snímku.

3.2 Extrakce LD50

Abychom dokázali korektně určit hodnotu LD50, potřebujeme nejprve určit správnou křivku, kterou data prokládat.

Předpokládejme, že každá želvuška umře od určité dávky záření. Abychom simulovali rozmanitost přírody, tuto hodnotu určeme z normálního rozdělení

$$d \sim \mathcal{N}(\mu = 5000 \ Gy, \ \sigma = 1000 \ Gy),$$

Rovnice 3.2: Určení letální dávky d pro simulační model

Z obrázku 3.7 můžeme vidět, že se jedná o logistickou křivku, přiřadíme proto každému snímku s želvuškami dávku d [Gy], kterou byly v reaktoru ozářeny, a data proložíme logistickou křivkou.

$$f(d) = \frac{A}{1 + e^{-B(d+C)}} + D,$$

Rovnice 3.3: Rovnice logistické funkce

kde A je maximální možná hodnota úmrtnosti dosažená želvuškami (z důvodu malých nepřesností neuronové sítě se může stát, že neuronová síť nevyhodnotí úplně všechny želvušky správně, a proto toto číslo může být lehce menší než 100 %), B vyjadřuje tempo růstu dosažené úmrtnosti v závislosti na zvyšování radiační dávky, C určuje radiační dávku (v Gy), při které zemře přesně 50 % želvušek z A a D posun (úmrtnost kontrol).

Určení výše zmíněných hodnot jsme provedli za pomoci optimalizace metodou nejmenších



Obrázek 3.6: Zobrazení 100 křivek závislostí smrtelnosti na dávce pro každou želvušku zvlášť



Obrázek 3.7: Zobrazení průměrné křivky smrtelnosti pro 1, 10, 100 a 1000 želvušek

čtverců. Jelikož to bylo možné, do vizualizačních grafů jsme v souvislosti s posledním vědeckým statistickým trendem vykreslili veškeré datové body místo metod, které pouze nejistotu aproximují.

Díky interpretace parametru C z logistické křivky můžeme jednoduše přímo určit hodnotu LD50 z ozařování.



Obrázek 3.8: Ukázka finální vizualizace dat úmrtností s proložením logistickou křivkou

3.3 Vyhodnocení pohyblivosti želvušek

Vyvinuli jsme dvě metody pro vyhodnocování míry pohyblivosti želvušek. Jako první jsme se kvantifikovali pohyblivost želvušek na základě predikovaných poloh želvušek z neuronové sítě za pomoci:

$$p(t) = \sum_{n=0}^{N} \frac{\sqrt{(x_{n,t} - x_{n,t-1})^2 + (y_{n,t} - y_{n,t-1})^2}}{N},$$

Rovnice 3.4: Metrika pohyblivosti želvušek z dat z neuronové sítě

kde t je čas snímání dané jamky na dané destičce a x a y jsou souřadnice centroidů příslušných želvušek v příslušných časových bodech.

Jelikož se nám výsledky zdály pozoruhodné, vytvořili jsme pro ověření ještě druhou metodu,

která prováděla pouze diferenci jednotlivých obrázků v čase a následně filtrovala nejmenší objekty za pomocí morfologických operací. Hodnotu do výsledné metriky (viz obrázek 3.9) jsme poté určili jako průměr všech změn mezi dvěma časovými body, které byly vyšší než stanovený práh.



Obrázek 3.9: Ukázka závislosti nenormalizované míry pohyblivosti želvušek *Hypsibius* exemplaris na ozářené dávce

I při maximální kategorizaci a rozdělení (kterému se mimo jiné říká A/A testování) výsledků (dle druhu želvušek, teploty uschování, ...) jsme zjistili, že neozářené želvušky se typicky pohybují méně než než želvušky ozářené malou dávkou radiačního záření. Tento efekt však rychle mizí a s vyššími dávkami se průměrná pohyblivost želvušek snižuje.

3.4 Vyhodnocení experimentů

LD50 po 7 dnech inkubace v 17 °C odečtená z dávkových křivek byla pro *Hypsibius* exemplaris 2 377 Gy (viz obrázek 3.10) a pro *Macrobiotus* JN105 6 288 Gy (viz obrázek 3.10). Pro druhy patřící do čeledi *Macrobiotidae* JN 36 a HP, které byly umístěny v kanálu/kanálech z nižší energie, se nepodařilo v experimentu LD50 dosáhnout. Je ale možné konstatovat, že přesahovala 4 800 Gy. Pro druh HOL se nám nepodařilo natrénovat dostatečně robustní model neuronové sítě, pravděpodobně z důvodu velkých rozdílů ve velikosti v rámci populace a nevyváženého počtu snímků živých a mrtvých želvušek v anotační sadě. Prohlídka snímků pouhým okem ukazuje, že hodnoty LD50 přesahují 3 000 Gy.

Hodnoty LD50 jsou proto řádově stejné jako hodnoty pro gama záření uváděné v literatuře. Zdá se tedy, že neutrony, které podle literatury poškozují tkáně s daleko vyšší účinností, nezpůsobují želvuškám tak velké poškození jako vyšším živočichům.

LD50 byla závislá i na teplotě, jedinci *Hypsibius exemplaris* po ozáření ponechaní ve 4 °C (LD50 4 752 Gy) a 12 °C (LD50 4 200 Gy) měli mnohem menší úmrtnost než ti ponechaní při 17 °C (2 377 Gy). Aktivita při vyšších teplotách možná klade větší nároky na radiací poškozené struktury. Vyšší aktivita možná vede i k tomu, že na opravné mechanismy není dost energie. Dalším z vysvětlení by mohl být i fakt, že vyšší teploty působí příznivě na růst bakterií přítomných ve vzorcích. Zářením oslabené želvušky tak mohou být k infekci náchylnější než kontroly. V průběhu času bylo možné pozorovat umírání ozářených populací. Hodnoty LD50 postupně klesaly. LD50 pro 4 °C v den 7. byla téměř o 18 % nižší oproti dni 3, LD50 pro 12 °C téměř o 25 % a LD50 pro 17 °C ve dni 7. byla více než o 50 % nižší oproti dni 3.



Obrázek 3.10: Dávky LD50 pro $Hypsibius \ exemplaris$ a a JN105 měnící se v závislosti na teplotě a na času

3.5 Teplotní šok

V laboratoři konzultanta již pozorovali vysokou citlivost aktivních forem vodního druhu *Hypsibius exemplaris* ke zvýšené teplotě. Želvušky nepřežívaly hodinovou inkubaci při teplotách přes 39 °C. Zajímalo nás proto, jestli jsou limnoterestrické druhy podobně citlivé. K našemu experimentu byl použit gradientový termocykler na PCR mikrozkumavky (BIORAD C1000 TouchTM). V každé mikrozkumavce bylo 5-10 želvušek v 50 μl média (minerální voda Volvic zředěná v poměru 1:1 destilovanou vodou).

Během pilotního testu na podzim 2022 jsme sledovali odolnost želvušek rodů *Paramacrobiotus, Milnesium* a *Echiniscus* izolovaných ze vzorků mechů HP a JN36 na 1. radiační experiment. Želvušky přežívali teplotu 38 °C, další testovaná teplota 42 °C byla už letální. Experiment jsme v dubnu 2024 opakovali s želvuškami ze vzorků HOL, JN105, HP a JN36 připravených na 3. radiační experiment. U vzorků *Mesobiotus* HOL a *Paramacrobiotus* JN105 jsme sledovali vliv 8 teplot v rozmezí 35 °C až 44 °C. Želvušky přežívaly teplotu 38,5 °C, teplota 40,7 °C byla už letální.

Pro vzorky *Paramacrobiotus* HP a *Paramacrobiotus* JN36 jsme testovali pouze dvě teploty, a to 40,7 °C a 44 °C. Teplotu 40,7 °C nepřežila žádná želvuška ze vzorku HP a ze vzorku JN36 přežily 3 z 5 želvušek. Teplota 44 °C byla letální.

Limnoterestrické želvušky v aktivním stavu jsou tak vůči vyšším teplotám podobně citlivé jako vodní.

Diskuze a závěr

Želvušky patří mezi nejodolnější organismy. Jejich přežití po vystavení ionizující radiaci a extrémní teplotě prokázala řada studií. Překvapivě ale zatím nebyla publikována data o působení neutronového záření. Málo je také známo o odolnosti aktivních forem k teplotnímu šoku, publikované práce uvádí teplotní extrémy pro soudečky. Cílem našeho projektu bylo doplnit tato bílá místa.

Prvním krokem experimentální části byla izolace limnoterestrických želvušek z 188 vzorků mechů; pomocí mikroskopických technik jsme izoláty předběžně klasifikovali do čeledi *Macrobiotidae* a *Hypsibiidae* a dalších 4 známých rodů želvušek – *Milnesium, Echiniscus, Ramazzottius* a *Isohypsibius*. Z jednoho izolátu čeledi *Macrobiotidae*, rodu blíže určeného jako *Paramacrobiotus*, se nám podařilo založit kulturu, v níž se želvušky úspěšně reprodukují. Toto orientační určení jsme upřesňovali pomocí DNA barkódování. Finální výsledky zatím máme pro kultivovatelný izolát. Použití sekvencí pro 18S a 28S rRNA umožnilo značně zúžit počet možných druhů, ale nebylo dostatečné pro finální rozhodnutí. Pro tyto účely by mohla být lepší více variabilní sekvence COX1, pro kterou sekvenování nebylo zatím úspěšné.

Pro radiační experimenty jsme použili vybrané limnoterestrické želvušky a vodní laboratorní druh *Hypsibius exemplaris*. Ozařovali jsme je směsí neutronů a gama zářením v lehkovodním reaktoru VR-1.

Dle literatury se hodnoty LD50 pro gama záření pro aktivní stádia různých druhů v různých časových bodech pohybují mezi 1300-5000 Gy. Pro Hypsibius exemplaris literatura uvádí LD50 po 48 hodinách 4 200 Gy. Protože neutrony působí daleko větší poškození tkání než gama záření (pro člověka až 10x větší), překvapilo nás, že dávky dosažené při pilotním experimentu (502-1653 Gy, 1 h) neměly na ozářené želvušky významný vliv.

Úspěšné třetí ozařování probíhající v kanále s vysokým výkonem (1 670 Gy/h; gama 568 Gy/h, neutrony 1 102 Gy/h) zahrnovalo 7.5hodinovou expozici. Ozářené a kontrolní želvušky jsme následně fotografovali automatickým mikroskopem v 384jamkových deskách. Snímky jsme vyhodnocovali pomocí konvoluční neuronové sítě, kterou jsme předtím natrénovali na rozpoznávání živých a mrtvých jedinců. Síť umožňuje nejen nalézt obdélník ohraničující objekt, ale i přibližné obrysy objektu. Dá se tedy použít k detekci pohybu.

Pro *Hypsibius exemplaris*, JN105 a HP pracuje s vysokou spolehlivostí, pro další rody čeledi *Macrobiotidae* síť stále vylepšujeme pro dosažení obdobné kapacity.

LD50 po 7 dnech inkubace v 17 °C odečtená z dávkových křivek byla pro *Hypsibius* exemplaris 2 377 Gy a pro *Macrobiotus* JN105 6 288 Gy (viz obrázek 3.10). Pro druhy patřící do čeledi *Macrobiotidae* JN 36 a HP, které byly umístěny v kanálu/kanálech z nižší energie, se nám nepodařilo v experimentu LD50 dosáhnout. Můžeme ale konstatovat, že přesahovala 4 800 Gy. Pro druh HOL se nám zatím nepodařilo natrénovat dostatečně robustní model neuronové sítě, pravděpodobně z důvodu velkých rozdílů ve velikosti v rámci populace a nevyváženého počtu snímků živých a mrtvých želvušek v anotační sadě. Prohlídka snímků pouhým okem ukazuje, že hodnoty LD50 přesahují 3 000 Gy.

Dosažené hodnoty odečtené z výsledných dávkových křivek jsou tedy řádově stejné jako pro gama záření uváděné v literatuře. Zdá se tedy, že neutrony nezpůsobují želvuškám tak velké poškození jako vyšším živočichům.

LD50 byla závislá i na teplotě, jedinci *Hypsibius exemplaris* po ozáření ponechané ve 4 °C (LD50 4 752 Gy) a 12 °C (LD50 4 200 Gy) měli mnohem menší úmrtnost než ti ponechaní při 17 °C. Aktivita při vyšších teplotách možná klade větší nároky na radiací poškozené struktury. Vyšší aktivita možná vede i k tomu, že na opravné mechanismy není dost energie. Dalším z vysvětlení by mohl být i fakt, že vyšší teploty působí příznivě na růst bakterií přítomných ve vzorcích. Zářením oslabené želvušky tak mohou být k infekci náchylnější než kontroly.

V laboratoři konzultanta již pozorovali překvapivě nízkou odolnost aktivních stádií vodního druhu *Hypsibius exemplaris* k teplotnímu stresu. Teplota, kdy po hodině uhynulo více jak 50 % jedinců, nepřesáhla 39 °C. Zajímalo nás proto, jestli podobně citlivé jsou i limnoterestrické želvušky.

Výše zmíněné limnoterestrické druhy jsme proto vystavili 1 hodinu teplotnímu stresu v rozmezí 35 °C až 44 °C. Pozorovali jsme silný negativní vliv rostoucí teploty na přežití. Želvušky přežívaly 38.5 °C, teplota 40.7 °C byla letální. Nízká tepelná odolnost se zdá být obecnou vlastností aktivních stádií. Je také možné, že teplota omezuje rozšíření želvušek v prostředí.

Naše výsledky prohlubují znalosti o odpovědi želvušek na stres. Pozorování vysoké odolnosti k neutronům nebylo zatím, podle našich znalostí, publikováno. Nový je také popis nízké odolnosti několika druhů aktivních limnoterestrických želvušek vůči teplotě. Efektivní protokol pro hodnocení stresu v 384jamkových destičkách pomocí automatické mikroskopie a analýzy obrazu může najít využití např. v toxikologických studiích. Možná by měla být i adaptace na další mikroskopické bezobratlé. Proto široké možnosti aplikace vidíme v ekotoxikologii.

Zjednodušená rešeršní část práce je součástí online výukového materiálu pro střední školy.

Ten byl nabídnut 28 gymnáziím, která se zapojila do mapování želvušek organizovaného na Univerzitě Palackého v Olomouci a kde studenti v praktických cvičeních izolovali želvušky.

Prezentace projektu a jeho výsledků

Část literární rešerše byla použita jako podklad pro vytvoření stránek o biologii želvušek pro střední školy https://tardigrades.netlify.app/, kde je možné najít i některá videa, která vznikla při práci na tomto projektu.

Část výsledků byla prezentována na:

- Konferenci mladých přírodovědců, Olomouc, 2023
 Název přednášky: Odolnost želvušek k radiačnímu a tepelnému stresu Autoři: Jakub Pavlík, Jitka Nováková, Tadeáš Fryčák Oceněno druhým místem a cenou publika
- 15th International Symposium on Tardigrada, Krakow 2022
 Název přednášky: Tardigrade phenotype classification using neural networks Autoři: Vítek, Fryčák, Fürst, Lacey, Vavruša & Voller
- 3. Konferenci Reaktor, Velké Karlovice, 2023 Název přednášky: Stress response in Hypsibius exemplaris Autoři: Dominik Vítek, Sarah Miriam Berger, Tadeáš Fryčák, Tomáš Fürst, Matthew Lacey, Marián Hajdúch, Rastislav Sladkovský, Jitka Nováková, Jakub Pavlík, Jiří Voller
- 4. Konferenci Reaktor, Velké Karlovice, 2022 Název přednášky: Stress response in Hypsibius exemplaris Autoři: Dominik Vítek, Tadeáš Fryčák, Tomáš Fürst, Matthew Lacey, Jiří Voller, Marián Hajdúch, Rastislav Sladkovský
- Setkání lovců želvušek, Olomouc, 2024
 Název přednášky: Studium rezistence želvušek k radiačnímu a tepelnému stresu Autoři: Jakub Pavlík, Jitka Nováková, Tadeáš Fryčák
- Setkání lovců želvušek, Olomouc, 2023
 Název přednášky: Odolnost želvušek k radiačnímu a tepelnému stresu Autoři: Jitka Nováková, Jakub Pavlík, Tadeáš Fryčák

Seznamy

Seznam použitých zdrojů

- WERONIKA, Erdmann; ŁUKASZ, Kaczmarek. Tardigrades in Space Research Past and Future. Origins of Life and Evolution of Biospheres. Říjen 2016, roč. 47, č. 4, s. 545–553. ISSN 1573-0875. Dostupné z DOI: 10.1007/s11084-016-9522-1.
- ROSZKOWSKA, M.; WOJCIECHOWSKA, D.; KMITA, H.; CERBIN, S.; DZIUBA, M. K.; FIAŁKOWSKA, E.; SOBKOWIAK, R.; SZYDŁO, W.; KACZMAREK, Ł. Tips and tricks how to culture water bears: simple protocols for culturing eutardigrades (Tardigrada) under laboratory conditions. *The European Zoological Journal*. Leden 2021, roč. 88, č. 1, s. 449–465. ISSN 2475-0263. Dostupné z DOI: 10.1080/24750263. 2021.1881631.
- POPRAWA, Izabela; BARTYLAK, Tomasz; KULPLA, Adam; ERDMANN, Weronika; ROSZKOWSKA, Milena; CHAJEC, Łukasz; KACZMAREK, Łukasz; KARACHITOS, Andonis; KMITA, Hanna. Verification of Hypsibius exemplaris Gąsiorek et al., 2018 (Eutardigrada; Hypsibiidae) application in anhydrobiosis research. *PLOS ONE*. Březen 2022, roč. 17, č. 3, e0261485. ISSN 1932-6203. Dostupné z DOI: 10.1371/journal.pone.0261485.
- HASHIMOTO, Takuma; KUNIEDA, Takekazu. DNA Protection Protein, a Novel Mechanism of Radiation Tolerance: Lessons from Tardigrades. *Life*. Červen 2017, roč. 7, č. 2, s. 26. ISSN 2075-1729. Dostupné z DOI: 10.3390/life7020026.
- KIRKE, Justin; JIN, Xiao-Lu; ZHANG, Xing-Hai. Expression of a Tardigrade Dsup Gene Enhances Genome Protection in Plants. *Molecular Biotechnology*. Září 2020, roč. 62, č. 11–12, s. 563–571. ISSN 1559-0305. Dostupné z DOI: 10.1007/s12033-020-00273-9.
- KLETETSCHKA, Gunther; HORIKAWA, D.; PARSONS, Ann; BODNARIK, Julia; CHERVENAK, J. Neutron Dose and Sub-Kelvin Resistance of the Tardigrade: Ramazzottius Varieoranatus. *LPI Contributions*. Duben 2010.
- LUŠŇÁKOVÁ, Jana. Studium odpovědi Hypsibius dujardini na stres [online]. 2020.
 [cit. 2024-04-01]. Dostupné z: https://theses.cz/id/jdcsb0/. Supervizor: Mgr. Jiří Voller, Ph.D.

- DEGMA, Peter; BERTOLANI, Roberto; GUIDETTI, Roberto. Actual checklist of Tardigrada species. Università di Modena e Reggio Emilia, 2019. Dostupné z DOI: 10.25431/11380_1178608.
- SCHILL, Ralph O. Water Bears: The Biology of Tardigrades. Springer International Publishing, 2018. ISBN 9783319957029. ISSN 2523-3912. Dostupné z DOI: 10.1007/978-3-319-95702-9.
- WIKIPEDIA CONTRIBUTORS. Tardigrade Wikipedia, The Free Encyclopedia [online]. 2024. [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index. php?title=Tardigrade&oldid=1218312315.
- 11. WIKIPEDIE. Želvušky Wikipedie: Otevřená encyklopedie [online]. 2024. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=%C5% BDelvu%C5%A1ky&oldid=23835367.
- MICHAELA, Czerneková. "Pomalé" želvušky a jejich rozmnožování. Živa [online]. Červen 2011, s. 285–286 [cit. 2024-04-01]. Dostupné z: https://ziva.avcr.cz/ files/ziva/pdf/pomale-zelvusky-a-jejich-rozmnozovani.pdf.
- SUGIURA, Kenta; MATSUMOTO, Midori. Sexual reproductive behaviours of tardigrades: a review. *Invertebrate Reproduction & Development*. Říjen 2021, roč. 65, č. 4, s. 279–287. ISSN 2157-0272. Dostupné z DOI: 10.1080/07924259.2021.1990142.
- MØBJERG, Nadja; NEVES, Ricardo Cardoso. New insights into survival strategies of tardigrades. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. Duben 2021, roč. 254, s. 110890. ISSN 1095-6433. Dostupné z DOI: 10.1016/j.cbpa.2020.110890.
- NEVES, Ricardo Cardoso; STUART, Robyn M.; MØBJERG, Nadja. New insights into the limited thermotolerance of anhydrobiotic tardigrades. *Communicative & Integrative Biology*. Leden 2020, roč. 13, č. 1, s. 140–146. ISSN 1942-0889. Dostupné z DOI: 10.1080/19420889.2020.1812865.
- WIKIPEDIA CONTRIBUTORS. Mesotardigrada Wikipedia, The Free Encyclopedia [online]. 2024. [cit. 2024-04-12]. Dostupné z: https://en.wikipedia. org/w/index.php?title=Mesotardigrada&oldid=1197781683.
- COOPER, Kenneth W. The First Fossil Tardigrade: Beorn Leggi Cooper, From Cretaceous Amber. *Psyche: A Journal of Entomology.* Leden 1964, roč. 71, č. 2, s. 41–48. ISSN 1687-7438. Dostupné z DOI: 10.1155/1964/48418.
- MAPALO, Marc A.; ROBIN, Ninon; BOUDINOT, Brendon E.; ORTEGA-HERNÁNDEZ, Javier; BARDEN, Phillip. A tardigrade in Dominican amber. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Říjen 2021, roč. 288, č. 1960. ISSN 1471-2954. Dostupné z DOI: 10.1098/rspb.2021.1760.

- GREVEN, Hartmut. From Johann August Ephraim Goeze to Ernst Marcus: A Ramble Through the History of Early Tardigrade Research (1773 Until 1929). In: Zoological Monographs. Springer International Publishing, 2018, s. 1–55. ISBN 9783319957029. ISSN 2523-3912. Dostupné z DOI: 10.1007/978-3-319-95702-9_1.
- 20. BERDAN, Robert. How to Collect and Photograph Water Bears (Tardigrades) [online]. 2024-06. [cit. 2024-04-01]. Dostupné z: https://www.canadiannaturephotographer. com/waterbears.html.
- 21. GROSS, Vladimir; MÜLLER, Mark; HEHN, Lorenz; FERSTL, Simone; ALLNER, Sebastian; DIEROLF, Martin; ACHTERHOLD, Klaus; MAYER, Georg; PFEIFFER, Franz. X-ray imaging of a water bear offers a new look at tardigrade internal anatomy. *Zoological Letters*. Květen 2019, roč. 5, č. 1. ISSN 2056-306X. Dostupné z DOI: 10.1186/s40851-019-0130-6.
- JEZIERSKA, Marta; MIERNIK, Aleksandra; SOJKA, Julia; STUDENT, Sebastian; ŚLIWIŃSKA, Małgorzata A.; GROSS, Vladimir; POPRAWA, Izabela. Oogenesis in the tardigrade Hypsibius exemplaris Gąsiorek, Stec, Morek & Michalczyk, 2018 (Eutardigrada, Hypsibiidae). *Micron*. Listopad 2021, roč. 150, s. 103126. ISSN 0968-4328. Dostupné z DOI: 10.1016/j.micron.2021.103126.
- VICENTE, Filipe; MICHALCZYK, Łukasz; KACZMAREK, Łukasz; BOAVIDA, Maria-José. Observations on Pyxidium tardigradum (Ciliophora), a protozoan living on Eutardigrada: infestation, morphology and feeding behaviour. *Parasitology Research*. Srpen 2008, roč. 103, č. 6, s. 1323–1331. ISSN 1432-1955. Dostupné z DOI: 10.1007/s00436-008-1136-8.
- SEKI, Kunihiro; TOYOSHIMA, Masato. Preserving tardigrades under pressure. Nature. Říjen 1998, roč. 395, č. 6705, s. 853–854. ISSN 1476-4687. Dostupné z DOI: 10.1038/27576.
- 25. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Radiation Basics [online]. 2023-07. [cit. 2024-04-01]. Dostupné z: https://www.epa.gov/radiation/ radiation-basics.
- 26. WIKISKRIPTA. Radioaktivita (2. LF UK) [online]. 2023. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Radioaktivita_(2._LF_UK) &oldid=470425.
- 27. WIKISKRIPTA. Účinky ultrafialového záření [online]. 2021. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=%C3%9A%C4% 8Dinky_ultrafialov%C3%A9ho_z%C3%A1%C5%99en%C3%AD&oldid=451964.
- 28. WIKISKRIPTA. Rentgenové záření [online]. 2024. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Rentgenov%C3%A9_z%C3%A1% C5%99en%C3%AD&oldid=472196.

- 29. WIKISKRIPTA. Stínění a ochrana před gama zářením [online]. 2017. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=St%C3%ADn%C4% 9Bn%C3%AD_a_ochrana_p%C5%99ed_gama_z%C3%A1%C5%99en%C3%ADm&oldid= 380068.
- 30. WIKISKRIPTA. Záření gama [online]. 2023. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https: //www.wikiskripta.eu/index.php?title=Z%C3%A1%C5%99en%C3%AD_gama& oldid=470638.
- 31. WIKIPEDIE. Radioaktivita Wikipedie: Otevřená encyklopedie [online]. 2024. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title= Radioaktivita&oldid=23832467.
- WIKIPEDIE. Ionizující záření Wikipedie: Otevřená encyklopedie [online]. 2023.
 [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title= Ionizuj%C3%ADc%C3%AD_z%C3%A1%C5%99en%C3%AD&oldid=22817134.
- 33. WIKIPEDIE. Záření Wikipedie: Otevřená encyklopedie [online]. 2023. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title= Z%C3%A1%C5%99en%C3%AD&oldid=22905991.
- WIKIPEDIE. Ultrafialové záření Wikipedie: Otevřená encyklopedie [online]. 2024.
 [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title= Ultrafialov%C3%A9_z%C3%A1%C5%99en%C3%AD&oldid=23606128.
- 35. WIKIPEDIE. Spontánní štěpení Wikipedie: Otevřená encyklopedie [online]. 2024. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title= Spont%C3%A1nn%C3%AD_%C5%A1t%C4%9Bpen%C3%AD&oldid=23668560.
- 36. WIKIPEDIE. Přeměna beta plus Wikipedie: Otevřená encyklopedie [online]. 2021. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=P% C5%99em%C4%9Bna_beta_plus&oldid=20265063.
- 37. WIKIPEDIE. Neutronové záření Wikipedie: Otevřená encyklopedie [online]. 2024.
 [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title= Neutronov%C3%A9_z%C3%A1%C5%99en%C3%AD&oldid=23635007.
- 38. WIKIPEDIE. VR-1 Vrabec Wikipedie: Otevřená encyklopedie [online]. 2022. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=VR-1_Vrabec&oldid=21345895.
- 39. WIKIPEDIA CONTRIBUTORS. Neutron radiation Wikipedia, The Free Encyclopedia [online]. 2024. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Neutron_radiation&oldid=1216746543.
- 40. STÁTNÍ ÚŘAD PRO JADERNOU BEZPEČNOST. Stručný přehled biologických účinků záření [online]. [cit. 2024-04-01]. Dostupné z: https://www.sujb.cz/ radiacni-ochrana/oznameni-a-informace/strucny-prehled-biologickychucinku-zareni.

- 41. ULLMANN, Vojtěch. *Biologické účinky ionizujícího záření* [online]. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://astronuklfyzika.cz/RadiacniOchrana.htm#2.
- 42. SLANINOVÁ, Iva. Mutace, poškození DNA, "DNA repair" [online]. 2006-04. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/1499/el/estud/lf/js06/ bltm0111p/p23_Mutace-06-web.pdf.
- KOZUBEK, Stanislav. Poškození genomu na molekulární úrovni [online]. 2012-04. [cit. 2024-04-18]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/Bi8141/um/2poskozeni_genomu_-_molek.pdf.
- 44. MINISTRY OF THE ENVIRONMENT, GOVERNMENT OF JAPAN. Conversion from Gray to Sievert [online]. 2013-03. [cit. 2024-04-01]. Dostupné z: https://www. env.go.jp/en/chemi/rhm/basic-info/1st/02-03-04.html.
- DEXHEIMER, Thomas S. DNA Repair Pathways and Mechanisms. In: DNA Repair of Cancer Stem Cells. Springer Netherlands, červenec 2012, s. 19–32. ISBN 9789400745902. Dostupné z DOI: 10.1007/978-94-007-4590-2_2.
- PRIETO, Luis I.; GRAVES, Sara I.; BAKER, Darren J. Insights from In Vivo Studies of Cellular Senescence. *Cells.* Duben 2020, roč. 9, č. 4, s. 954. ISSN 2073-4409. Dostupné z DOI: 10.3390/cells9040954.
- JÖNSSON, K. Ingemar. Radiation Tolerance in Tardigrades: Current Knowledge and Potential Applications in Medicine. *Cancers.* Září 2019, roč. 11, č. 9, s. 1333. ISSN 2072-6694. Dostupné z DOI: 10.3390/cancers11091333.
- FERNANDEZ, C.; VASANTHAN, T.; KISSOON, N.; KARAM, G.; DUQUETTE, N.; SEYMOUR, C.; STONE, J. R. Radiation tolerance and bystander effects in the eutardigrade speciesHypsibius dujardini(Parachaela: Hypsibiidae). *Zoological Journal* of the Linnean Society. Listopad 2016, roč. 178, č. 4, s. 919–923. ISSN 0024-4082. Dostupné z DOI: 10.1111/zoj.12481.
- JÖNSSON, K. Ingemar; RABBOW, Elke; SCHILL, Ralph O.; HARMS-RINGDAHL, Mats; RETTBERG, Petra. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology*. Září 2008, roč. 18, č. 17, R729–R731. ISSN 0960-9822. Dostupné z DOI: 10.1016/j.cub.2008.06.048.
- MÍNGUEZ-TORAL, Marina; CUEVAS-ZUVIRÍA, Bruno; GARRIDO-ARANDIA, María; PACIOS, Luis F. A computational structural study on the DNA-protecting role of the tardigrade-unique Dsup protein. *Scientific Reports.* Srpen 2020, roč. 10, č.
 ISSN 2045-2322. Dostupné z DOI: 10.1038/s41598-020-70431-1.
- 51. HASHIMOTO, Takuma; HORIKAWA, Daiki D.; SAITO, Yuki; KUWAHARA, Hirokazu; KOZUKA-HATA, Hiroko; SHIN-I, Tadasu; MINAKUCHI, Yohei; OHISHI, Kazuko; MOTOYAMA, Ayuko; AIZU, Tomoyuki; ENOMOTO, Atsushi; KONDO, Koyuki; TANAKA, Sae; HARA, Yuichiro; KOSHIKAWA, Shigeyuki; SAGARA, Hiroshi; MIURA, Toru; YOKOBORI, Shin-ichi; MIYAGAWA, Kiyoshi; SUZUKI, Yutaka; KUBO, Takeo; OYAMA, Masaaki; KOHARA, Yuji; FUJIYAMA, Asao;
ARAKAWA, Kazuharu; KATAYAMA, Toshiaki; TOYODA, Atsushi; KUNIEDA, Takekazu. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nature Communications*. Září 2016, roč. 7, č. 1. ISSN 2041-1723. Dostupné z DOI: 10.1038/ncomms12808.

- 52. SUMA, Harikumar R.; PRAKASH, Swathi; ESWARAPPA, Sandeep M. Naturally occurring fluorescence protects the eutardigrade Paramacrobiotus sp. from ultraviolet radiation. *Biology Letters*. Říjen 2020, roč. 16, č. 10, s. 20200391. ISSN 1744-957X. Dostupné z DOI: 10.1098/rsbl.2020.0391.
- TRIVEDI, Subrata; REHMAN, Hasibur; SAGGU, Shalini; PANNEERSELVAM, Chellasamy; GHOSH, Sankar K. DNA Barcoding and Molecular Phylogeny. Springer International Publishing, 2020. ISBN 9783030500757. Dostupné z DOI: 10.1007/978-3-030-50075-7.
- 54. MASSA, Edoardo; GUIDETTI, Roberto; CESARI, Michele; REBECCHI, Lorena; JÖNSSON, K. Ingemar. Tardigrades of Kristianstads Vattenrike Biosphere Reserve with description of four new species from Sweden. *Scientific Reports.* Březen 2021, roč. 11, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z DOI: 10.1038/s41598-021-83627-w.
- 55. MOMENI, Sogol; FUENTES-GONZÁLEZ, Jesualdo Arturo; PIENAAR, Jason. How To Culture Limnoterrestrial Heterotardigrades: A Case Study In The Echiniscus, Pseudechiniscus And Viridiscus Genera. Červen 2021. Dostupné z DOI: 10.21203/ rs.3.rs-578089/v1.

Seznam použitých přístrojů

- automatický mikroskop CV7000 (Yokogawa)
- centrifuga Jouan BR4I (Jouan)
- centrifuga Microstar 17R (VWR)
- elektroforéza SUB13 Mini-Plus (Hoefer)
- inverzní mikroskop s Nomarského kontrastem Olympus IX70 (Olympus), kamera DP70
- laminární box MSC-Advantage (Thermo Fisher Scientific)
- laboratorní váha Vibra AJ-420CE (Shinko Denshi)
- NanoDrop 1000 (Thermo Fisher) na měření koncentrace DNA
- PCR Termocykler CFX96 Real-Time systém (Biorad)
- scanner mikroskopických skel VS2000 (Olympus)
- systém na focení gelů Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences)
- vortex V-1 plus (Biosan)
- zdroj k elektroforéze PowerPac Basic Power Supply (BioRad)

Seznam použitého materiálu

- 6, 24 a 96jamkové desky pro kultivaci buněk (TPP)
- 384 jamkové desky pro mikroskopii Cell Carrier Ultra (Perkin Elmer)
- DNA hmotností standard 100 bp Molecular Ruler (BioRad)
- DNA Electrophoresis Sample Loading Dye (BioRad)
- ExoCleanUp FAST (VWR) přečištění PCR produktů před sekvenací
- GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) barvení DNA v gelu
- minerální voda Volvic
- podložní a krycí skla
- polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO®, antifading (Supelco)
- Quick-DNATM Microprep Plus Kit (Zymo Research) izolace DNA
- SSoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (BioRad) mastermix pro PCR
- stripy s PCR zkumavkami (P-lab)
- TAE elektroforetický pufr

Seznam obrázků

1.1	Eutardigadní <i>Milnesium tardigradum</i> s hladkou kutikulou	12
1.2	Heterotardigradní <i>Echiniscus insularis</i> s kutikulárními pláty a postranními výrůstky	13
1.3	Mesotardigradní Thermozodium esakii	13
1.4	Fosilní Beorn leggi	13
1.5	Paradoryphoribius chronocaribbeus	14
1.6	První kresba želvušky z roku 1773	14
1.7	Uspořádání svalových vláken; v polarizovaném světle	15
1.8	Detail ústního aparátu želvušky	16
1.9	Anatomie želvušek	16
1.10	Nálevníci <i>Pyxidium tardigradum</i>	18
1.11	Reakce želvušek na nepříznivé podmínky	19
1.12	Převod absorbované dávky na ekvivalentní dávku	27
1.13	Druhy poškození DNA	28
1.14	Odpověď poškozených buněk na stres	30
1.15	Vnesení genu pro ochranný protein Dsup chrání lidské buňky rostoucích v Petriho miskách v živném médiu proti radiaci	34
1.16	Paramacrobiotus BLR	34
1.17	Extrakt z nepigmentovaných želvušek <i>Hypsibius exemplaris</i> a pigmentovaných <i>Paramacrobiotus</i> BLR v lyzačním pufru pod UV zářením	35
2.1	Mapa zachycující lokality sběru vzorků	37
2.2	Izolační aparatura z Baermannových nálevek	38
2.3	Šestijamkový panel pro kultivaci buněk s plastovými inzerty se sítkem	38
2.4	Drápky želvušky rodu <i>Paramacrobiotus</i> , JN105	39
2.5	Želvuška rodu <i>Ramazzottius</i> , zvětšeno 200x	40
2.6	Želvuška rodu <i>Echiniscus</i> a <i>Macrobiotus</i> , zvětšeno 200x	40
2.7	Želvuška rodu <i>Milnesium</i>	40
2.8	Želvuška rodu Echiniscus, fluorescenční mikroskopie, zvětšeno 200 x \ldots .	41
2.9	Želvuška rodu <i>Isohypsibius</i> a <i>Hypsibius</i>	41
2.10	Svlečka s vajíčky	42
2.11	Kutikula s líhnoucími se jedinci, Nomarského kontrast, zvětšeno 400 x $\ .$.	42
2.12	Vajíčka čeledi <i>Macrobiotidae</i> , fluorescenční mikroskopie	42
2.13	Vajíčka čeledi Paramacrobiotidae, fluorescenční mikroskopie	43
2.14	Vzorek JN36	43

2.15	Mesobiotus, vzorek HOL	43
2.16	Paramacrobiotus, vzorek JN105	44
2.17	Želvuška tvořící vajíčka, vzorek JN36	44
2.18	Parmacrobiotus v procházejícím světle, vzorek HP	44
2.19	Schéma postupu při DNA barkódování	45
2.20	Ukázka rozdělení PCR produktů pro sekvenci 18S rRNA pomocí	
	elektroforézy v agarózovém gelu	47
2.21	Srovnání sekvencí genů v programu MView	49
2.22	Srovnání sekvencí genů v programu MView	49
2.23	Želvuška líhnoucí se z vajíčka v kultuře HP, zvětšeno 400x	50
2.24	Ozařování želvušek	51
2.25	Odstřižené zkumavky	52
2.26	Mikroskopie ozářených želvušek	52
3.1	Segmentace želvušek za pomoci deterministických metod	55
3.2	Segmentace SAMu pro dva různé ručně zadané parametry určující rozsah	
	segmentace od zadaného bodu	56
3.3	Anotovaný snímek <i>Macrobiotus</i> JN105 v programu V7	57
3.4	Instanční segmentace neuronové sítě Yolo v8 natrénované na anotacích snímků s izoláty JN105 a HP	58
3.5	Instanční segmentace neuronové sítě Yolo v8 natrénované na anotacích	
	snímků Hypsibius exemplaris	58
3.6	Zobrazení 100 křivek závislostí smrtelnosti na dávce pro každou želvušku zvlášť	60
3.7	Zobrazení průměrné křivky smrtelnosti pro 1. 10. 100 a 1000 želvušek	60
3.8	Ukázka finální vizualizace dat úmrtností s proložením logistickou křivkou	61
3.9	Ukázka závislosti nenormalizované míry pohyblivosti želvušek <i>Hupsibius</i>	
	exemplaris na ozářené dávce	62
3.10	Dávky LD50 pro <i>Hypsibius exemplaris</i> a JN105 měnící se v závislosti na	
	teplotě a na času	63
S.11	Počet nalezišť dle druhu materiálu	96
S.12	Sběr – četnost sběru vzorků v závislosti na čase \hdots	96
S.13	Počet nalezišť dle taxonu želvušek	97
S.14	Sběr – histogram počtu druhů taxonů želvušek ve vzorcích $\ . \ . \ . \ . \ .$	97
S.15	Společný výskyt taxonů – mechy a lišejníky $\hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill $	98
S.16	Společný výskyt taxonů – mechy $\hfill \ldots \hfill \hfill \ldots \hfill \ldots$	99
S.17	Společný výskyt taxonů – lišejníky \hdots	100
S.18	Společný výskyt taxonů – listí	101

S.19	Společný výskyt taxonů – voda
S.20	Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část 1 $\ .$
S.21	Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část 2 $\ .$
S.22	Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část 3 $\ .$
S.23	Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část 4 $\ \ldots \ \ldots \ \ldots \ \ldots \ \ldots \ 106$
S.24	Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část 5 $\ .$
S.25	Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část 6 108
S.26	Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část 7 $\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .$ 109
S.27	Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část 8 $\ .$
S.28	Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část 9 $\ .$
S.29	Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část 10 \ldots \ldots \ldots \ldots 112
S.30	Sběr – fotografie vzorků – část $1 \ . \ . \ . \ . \ . \ . \ . \ . \ . \ $
S.31	Sběr – fotografie vzorků – část $2 \ldots 114$
S.32	Datová sada k natrénování neuronové sítě pro rozpoznávání Hypsibius
	exemplaris
S.33	Datová sada k natrénování neuronové sítě pro rozpoznávání JN105 a HP $$. 121
S.34	Metriky úspěšnosti při trénování neuronové sítě pro ${\it Hypsibius\ exemplaris}$. 122
S.35	Metriky úspěšnosti při trénování neuronové sítě pro JN105 a HP 123
S.36	Matice záměny pro Hypsibius exemplaris
S.37	Matice záměny pro JN105 a HP

Seznam tabulek

1.1	Účinky záření na lidský organismus	26
1.2	Želvušek	31
2.1	Přehled použitých primerů a cílových genů	46
2.2	Srovnání sekvencí částí genu 28S rRNA a 18 rRNA <i>Paramacrobiotus</i> HP s databázovými sekvencemi.	48
S.1	Parametry záření v jednotlivých kanálech reaktoru při ozařování	83
S.2	Rozmístění želvušek v jednotlivých jamkách destičky \hdots	84
S.3	Označení kanálů jaderného reaktoru (B3 a E3), ve kterých byly želvušky z jednotlivých jamek destičky ozařovány	85
S.4	Doba [min], po kterou byly želvušky z jednotlivých jamek destičky ozařovány	86
S.5	Dávka gama záření [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech	
	ozářeny	87
S.6	Dávka neutronového záření [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech ozářeny	88
S.7	Celková dávka záření (gama a neutronového záření) [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech ozářeny	89
S.8	Druhy divokých želvušek (JN36, JN105, HOL a HP) v jednotlivých jamkách	00
S.9	Označení kanálů jaderného reaktoru (G3, B3 a E3), ve kterých byly želvušky	90
	z jednotlivých jamek destičky ozařovány	91
S.10	Doba [min], po kterou byly želvušky z jednotlivých jamek destičky ozařovány	92
S.11	Dávka gama záření [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech ozářeny	93
S.12	Dávka neutronového záření [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech ozářeny	94
S.13	Celková dávka záření (gama a neutronového záření) [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech ozářeny	95
S.14	Přehled taxonů želvušek izolovaných ze vzorků – část 1	115
S.15	Přehled taxonů želvušek izolovaných ze vzorků – část 2	116
S.16	Přehled taxonů želvušek izolovaných ze vzorků – část 3	117
S.17	Přehled taxonů želvušek izolovaných ze vzorků – část 4	118
S.18	Přehled taxonů želvušek izolovaných ze vzorků – část 5	119

Seznam rovnic

3.1	Metrika úmrtnosti	59
3.2	Určení letální dávky d pro simulační model	59
3.3	Rovnice logistické funkce	59
3.4	Metrika pohyblivosti želvušek z dat z neuronové sítě $\hfill \ldots \ldots \ldots \ldots$.	61

Seznam zkratek

Zkratka	Význam zkratky
AI	umělá inteligence
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
COX1	cytochrom c oxidáza 1
ČVUT	České vysoké učení technické v Praze
dehyd.	$dehydratovan \acute{y}$
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EMBOSS	European Molecular Biology Open Software Suite
HMG	high-mobility group
HSP	protein teplotního šoku
hyd.	hydratovaný
ITS	interní transkribovaný spacer
LD	letální dávka
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species
rRNA	ribosomální RNA
RTG	rentgenové záření
SAM	Segment Anything Model
sp.	druh
spp.	zkratka pro různé druhy taxonomické jednotky
TDP	tardigrade-specific intrinsically disordered protein
TRH	trehalosa
UV	ultrafialové
UVA	dlouhovlnné UV záření
UVB	středněvlnné UV záření
UVC	krátkovlnné UV záření
VR-1	lehkovodní výukový reaktor
Yolo	You Look Only Once

Seznam příloh

- Ozařování radiace v jednotlivých kanálech na VR-1
- Parametry finálního ozařování Hypsibius exemplaris
- Parametry finálního ozařování divoké želvušky
- Sběr data, fotografie, kovýskyt, statistika
- Anotovaná datová sada Hypsibius exemplaris
- Anotovaná datová sada JN105 a HP
- Trénování neuronové sítě Hypsibius exemplaris
- Trénování neuronové sítě JN105 a HP
- Natrénovaná neuronová síť pro Hypsibius exemplaris matice záměny
- Natrénovaná neuronová síť pro JN105 a HP matice záměny

Přílohy

S.1 Ozařování – radiace v jednotlivých kanálech na VR-1

Kanál	Experiment	Celková dávka	Gama záření	Neutronové záření
B5	1.	541 Gy/h	285 Gy/h	256 Gy/h
C2	1.	$864 \mathrm{~Gy/h}$	$319~{ m Gy/h}$	$545 \mathrm{~Gy/h}$
C3	1.	$1327 \mathrm{~Gy/h}$	$456~{ m Gy/h}$	871 Gy/h
E4	1.	$1740 { m ~Gy/h}$	$610~{ m Gy/h}$	$1130 { m ~Gy/h}$
C2	2.	1382 Gy/h	510 Gy/h	871 Gy/h
C3	2.	$2123 { m ~Gy/h}$	$730~{ m Gy/h}$	$1394 \mathrm{~Gy/h}$
E4	2.	$2782 { m ~Gy/h}$	$975~{ m Gy/h}$	$1807 { m ~Gy/h}$
B3	3.	$655~\mathrm{Gy/h}$	304 Gy/h	351 Gy/h
E3	3.	$1670 { m ~Gy/h}$	$568~{ m Gy/h}$	$1102 \mathrm{~Gy/h}$
G3	3.	$637~\mathrm{Gy/h}$	$298 { m ~Gy/h}$	339 Gy/h

Tabulka S.1: Parametry záření v jednotlivých kanálech reaktoru při ozařování

S.2 Parametry finálního ozařování – Hypsibius exemplaris

	D	\mathbf{E}	\mathbf{F}	\mathbf{G}	Н	Ι	J	K	\mathbf{L}	\mathbf{M}
1	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE
2	HE	HE	ΗE	HE	HE	ΗE	HE	HE	HE	HE
3	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE
4	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE
5	HE	HE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE	HE	ΗE	HE
6	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE
7	HE	HE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE	HE	ΗE	HE
8	HE	HE	ΗE	ΗE	ΗE	ΗE	HE	HE	ΗE	HE
9	HE	HE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE	HE	ΗE	HE
10	HE	HE	ΗE	ΗE	ΗE	ΗE	HE	HE	ΗE	HE
11	HE	HE	ΗE	ΗE	ΗE	ΗE	HE	HE	ΗE	ΗE
12	HE	HE	ΗE	ΗE	ΗE	ΗE	HE	HE	ΗE	HE
13	HE	HE	ΗE	ΗE	HE	HE	HE	HE	ΗE	HE
14	HE	HE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE
15	HE	HE	ΗE	ΗE	ΗE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	ΗE
16	HE	ΗE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE
17	HE	ΗE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE
18	HE	HE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE
19	HE	HE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE
20	HE	HE	HE	HE	HE	ΗE	HE	HE	HE	HE
21	HE	HE	HE	HE	ΗE	ΗE	HE	HE	-	-
22	HE	HE	ΗE	HE	ΗE	ΗE	HE	ΗE	-	-
23	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	-	-
24	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	-	-

Tabulka S.2: Rozmístění želvušek v jednotlivých jamkách destičky

	D	\mathbf{E}	\mathbf{F}	G	н	Ι	J	K	\mathbf{L}	\mathbf{M}
1	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
2	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
3	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
4	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
5	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
6	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
7	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
8	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
9	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
10	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
11	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
12	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
13	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
14	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
15	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
16	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
17	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
18	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
19	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
20	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	CTRL	CTRL
21	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	-	-
22	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	-	-
23	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	-	-
24	B3	B3	B3	B3	E3	E3	E3	E3	-	-

Tabulka S.3: Označení kanálů jaderného reaktoru (B3 a E3), ve kterých byly želvušky z jednotlivých jamek destičky ozařovány. CTRL značí kontroly

	D	\mathbf{E}	\mathbf{F}	\mathbf{G}	Н	Ι	J	Κ	\mathbf{L}	\mathbf{M}
1	14	14	14	14	60	60	60	60	0	0
2	14	14	14	14	60	60	60	60	0	0
3	60	60	60	60	90	90	90	90	0	0
4	60	60	60	60	90	90	90	90	0	0
5	150	150	150	150	120	120	120	120	0	0
6	150	150	150	150	120	120	120	120	0	0
7	210	210	210	210	150	150	150	150	0	0
8	210	210	210	210	150	150	150	150	0	0
9	270	270	270	270	180	180	180	180	0	0
10	270	270	270	270	180	180	180	180	0	0
11	300	300	300	300	210	210	210	210	0	0
12	300	300	300	300	210	210	210	210	0	0
13	360	360	360	360	240	240	240	240	0	0
14	360	360	360	360	240	240	240	240	0	0
15	375	375	375	375	270	270	270	270	0	0
16	375	375	375	375	270	270	270	270	0	0
17	392	392	392	392	300	300	300	300	0	0
18	392	392	392	392	300	300	300	300	0	0
19	420	420	420	420	330	330	330	330	0	0
20	420	420	420	420	330	330	330	330	0	0
21	450	450	450	450	360	360	360	360	-	-
22	450	450	450	450	360	360	360	360	-	-
23	464	464	464	464	417	417	417	417	-	-
24	464	464	464	464	417	417	417	417	-	-

Tabulka S.4: Doba [min], po kterou byly želvušky z jednotlivých jamek destičky ozařovány

	D	\mathbf{E}	\mathbf{F}	\mathbf{G}	\mathbf{H}	Ι	\mathbf{J}	Κ	\mathbf{L}	\mathbf{M}
1	70.9	70.9	70.9	70.9	568	568	568	568	0	0
2	70.9	70.9	70.9	70.9	568	568	568	568	0	0
3	304	304	304	304	852	852	852	852	0	0
4	304	304	304	304	852	852	852	852	0	0
5	760	760	760	760	1136	1136	1136	1136	0	0
6	760	760	760	760	1136	1136	1136	1136	0	0
7	1064	1064	1064	1064	1420	1420	1420	1420	0	0
8	1064	1064	1064	1064	1420	1420	1420	1420	0	0
9	1368	1368	1368	1368	1704	1704	1704	1704	0	0
10	1368	1368	1368	1368	1704	1704	1704	1704	0	0
11	1520	1520	1520	1520	1988	1988	1988	1988	0	0
12	1520	1520	1520	1520	1988	1988	1988	1988	0	0
13	1824	1824	1824	1824	2272	2272	2272	2272	0	0
14	1824	1824	1824	1824	2272	2272	2272	2272	0	0
15	1900	1900	1900	1900	2556	2556	2556	2556	0	0
16	1900	1900	1900	1900	2556	2556	2556	2556	0	0
17	1986.1	1986.1	1986.1	1986.1	2840	2840	2840	2840	0	0
18	1986.1	1986.1	1986.1	1986.1	2840	2840	2840	2840	0	0
19	2128	2128	2128	2128	3124	3124	3124	3124	0	0
20	2128	2128	2128	2128	3124	3124	3124	3124	0	0
21	2280	2280	2280	2280	3408	3408	3408	3408	-	-
22	2280	2280	2280	2280	3408	3408	3408	3408	-	-
23	2350.9	2350.9	2350.9	2350.9	3947.6	3947.6	3947.6	3947.6	-	-
24	2350.9	2350.9	2350.9	2350.9	3947.6	3947.6	3947.6	3947.6	-	-

Tabulka S.5: Dávka gama záření [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech ozářeny

	D	\mathbf{E}	\mathbf{F}	\mathbf{G}	н	Ι	J	Κ	\mathbf{L}	\mathbf{M}
1	81.9	81.9	81.9	81.9	1102	1102	1102	1102	0	0
2	81.9	81.9	81.9	81.9	1102	1102	1102	1102	0	0
3	351	351	351	351	1653	1653	1653	1653	0	0
4	351	351	351	351	1653	1653	1653	1653	0	0
5	877.5	877.5	877.5	877.5	2204	2204	2204	2204	0	0
6	877.5	877.5	877.5	877.5	2204	2204	2204	2204	0	0
7	1228.5	1228.5	1228.5	1228.5	2755	2755	2755	2755	0	0
8	1228.5	1228.5	1228.5	1228.5	2755	2755	2755	2755	0	0
9	1579.5	1579.5	1579.5	1579.5	3306	3306	3306	3306	0	0
10	1579.5	1579.5	1579.5	1579.5	3306	3306	3306	3306	0	0
11	1755	1755	1755	1755	3857	3857	3857	3857	0	0
12	1755	1755	1755	1755	3857	3857	3857	3857	0	0
13	2106	2106	2106	2106	4408	4408	4408	4408	0	0
14	2106	2106	2106	2106	4408	4408	4408	4408	0	0
15	2193.75	2193.75	2193.75	2193.75	4959	4959	4959	4959	0	0
16	2193.75	2193.75	2193.75	2193.75	4959	4959	4959	4959	0	0
17	2293.2	2293.2	2293.2	2293.2	5510	5510	5510	5510	0	0
18	2293.2	2293.2	2293.2	2293.2	5510	5510	5510	5510	0	0
19	2457	2457	2457	2457	6061	6061	6061	6061	0	0
20	2457	2457	2457	2457	6061	6061	6061	6061	0	0
21	2632.5	2632.5	2632.5	2632.5	6612	6612	6612	6612	-	-
22	2632.5	2632.5	2632.5	2632.5	6612	6612	6612	6612	-	-
23	2714.4	2714.4	2714.4	2714.4	7658.9	7658.9	7658.9	7658.9	-	-
24	2714.4	2714.4	2714.4	2714.4	7658.9	7658.9	7658.9	7658.9	-	-

Tabulka S.6: Dávka neutronového záření [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech ozářeny

	D	${f E}$	\mathbf{F}	\mathbf{G}	Η	Ι	J	Κ	\mathbf{L}	\mathbf{M}
1	152.8	152.8	152.8	152.8	1670	1670	1670	1670	0	0
2	152.8	152.8	152.8	152.8	1670	1670	1670	1670	0	0
3	655	655	655	655	2505	2505	2505	2505	0	0
4	655	655	655	655	2505	2505	2505	2505	0	0
5	1637.5	1637.5	1637.5	1637.5	3340	3340	3340	3340	0	0
6	1637.5	1637.5	1637.5	1637.5	3340	3340	3340	3340	0	0
7	2292.5	2292.5	2292.5	2292.5	4175	4175	4175	4175	0	0
8	2292.5	2292.5	2292.5	2292.5	4175	4175	4175	4175	0	0
9	2947.5	2947.5	2947.5	2947.5	5010	5010	5010	5010	0	0
10	2947.5	2947.5	2947.5	2947.5	5010	5010	5010	5010	0	0
11	3275	3275	3275	3275	5845	5845	5845	5845	0	0
12	3275	3275	3275	3275	5845	5845	5845	5845	0	0
13	3930	3930	3930	3930	6680	6680	6680	6680	0	0
14	3930	3930	3930	3930	6680	6680	6680	6680	0	0
15	4093.75	4093.75	4093.75	4093.75	7515	7515	7515	7515	0	0
16	4093.75	4093.75	4093.75	4093.75	7515	7515	7515	7515	0	0
17	4279.3	4279.3	4279.3	4279.3	8350	8350	8350	8350	0	0
18	4279.3	4279.3	4279.3	4279.3	8350	8350	8350	8350	0	0
19	4585	4585	4585	4585	9185	9185	9185	9185	0	0
20	4585	4585	4585	4585	9185	9185	9185	9185	0	0
21	4912.5	4912.5	4912.5	4912.5	10020	10020	10020	10020	-	-
22	4912.5	4912.5	4912.5	4912.5	10020	10020	10020	10020	-	-
23	5065.3	5065.3	5065.3	5065.3	11606.5	11606.5	11606.5	11606.5	-	-
24	5065.3	5065.3	5065.3	5065.3	11606.5	11606.5	11606.5	11606.5	-	-

Tabulka S.7: Celková dávka záření (gama a neutronového záření) [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech ozářeny

S.3 Parametry finálního ozařování – divoké želvušky

	D	\mathbf{E}	\mathbf{F}	\mathbf{G}	\mathbf{H}	Ι	J
1	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	HP
2	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
3	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
4	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
5	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
6	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
7	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
8	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
9	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
10	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
11	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
12	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
13	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
14	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
15	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
16	JN36	JN105	JN105	JN105	HOL	HOL	ΗP
17	JN36	JN105	JN105	JN105	-	HOL	ΗP
18	JN36	JN105	JN105	JN105	-	HOL	ΗP
19	-	JN105	JN105	-	-	-	-
20	-	JN105	JN105	-	-	-	-
21	-	JN105	JN105	-	-	-	-
22	-	JN105	JN105	-	-	-	-
23	-	JN105	JN105	-	-	-	-
24	-	JN105	JN105	-	-	-	-

Tabulka S.8: Druhy divokých želvušek (JN36, JN105, HOL a HP) v jednotlivých jamkách destičky

	D	\mathbf{E}	\mathbf{F}	\mathbf{G}	\mathbf{H}	Ι	J
1	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
2	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
3	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
4	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
5	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
6	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
7	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
8	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
9	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
10	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
11	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
12	G3	B3	B3	E3	G3	E3	G3
13	G3	B3	B3	CTRL	G3	CTRL	G3
14	G3	B3	B3	CTRL	G3	CTRL	G3
15	G3	B3	B3	CTRL	G3	CTRL	G3
16	G3	B3	B3	CTRL	G3	CTRL	G3
17	CTRL	B3	B3	CTRL	-	CTRL	CTRL
18	CTRL	B3	B3	CTRL	-	CTRL	CTRL
19	-	B3	B3	-	-	-	-
20	-	B3	B3	-	-	-	-
21	-	B3	B3	-	-	-	-
22	-	B3	B3	-	-	-	-
23	-	B3	B3	-	-	-	-
24	-	B3	B3	-	-	-	-

Tabulka S.9: Označení kanálů jaderného reaktoru (G3, B3 a E3), ve kterých byly želvušky z jednotlivých jamek destičky ozařovány. CTRL značí kontroly

	D	\mathbf{E}	\mathbf{F}	\mathbf{G}	Η	Ι	J
1	12	14	14	120	12	120	12
2	12	14	14	120	12	120	12
3	60	60	60	180	60	180	60
4	60	60	60	180	60	180	60
5	150	150	150	240	150	240	150
6	150	150	150	240	150	240	150
7	240	210	210	300	240	300	240
8	240	210	210	300	240	300	240
9	300	270	270	360	300	360	300
10	300	270	270	360	300	360	300
11	360	300	300	420	360	420	360
12	360	300	300	420	360	420	360
13	420	360	360	0	420	0	420
14	420	360	360	0	420	0	420
15	460	375	375	0	460	0	460
16	460	375	375	0	460	0	460
17	0	392	392	0	-	0	0
18	0	392	392	0	-	0	0
19	-	420	420	-	-	-	-
20	-	420	420	-	-	-	-
21	-	450	450	-	-	-	-
22	-	450	450	-	-	-	-
23	-	464	464	-	-	-	-
24	-	464	464	-	-	-	-

Tabulka S.10: Doba [min], po kterou byly želvušky z jednotlivých jamek destičky ozařovány

	D	\mathbf{E}	\mathbf{F}	\mathbf{G}	\mathbf{H}	Ι	J
1	59.6	70.9	70.9	1136	59.6	1136	59.6
2	59.6	70.9	70.9	1136	59.6	1136	59.6
3	298	304	304	1704	298	1704	298
4	298	304	304	1704	298	1704	298
5	745	760	760	2272	745	2272	745
6	745	760	760	2272	745	2272	745
7	1192	1064	1064	2840	1192	2840	1192
8	1192	1064	1064	2840	1192	2840	1192
9	1490	1368	1368	3408	1490	3408	1490
10	1490	1368	1368	3408	1490	3408	1490
11	1788	1520	1520	3976	1788	3976	1788
12	1788	1520	1520	3976	1788	3976	1788
13	2086	1824	1824	0	2086	0	2086
14	2086	1824	1824	0	2086	0	2086
15	2284.7	1900	1900	0	2284.7	0	2284.7
16	2284.7	1900	1900	0	2284.7	0	2284.7
17	0	1986.1	1986.1	0	-	0	0
18	0	1986.1	1986.1	0	-	0	0
19	-	2128	2128	-	-	-	-
20	-	2128	2128	-	-	-	-
21	-	2280	2280	-	-	-	-
22	-	2280	2280	-	-	-	-
23	-	2350.9	2350.9	-	-	-	-
24	-	2350.9	2350.9	-	-	-	-

Tabulka S.11: Dávka gama záření [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech ozářeny

	D	${f E}$	\mathbf{F}	G	\mathbf{H}	Ι	\mathbf{J}
1	67.8	81.9	81.9	2204	67.8	2204	67.8
2	67.8	81.9	81.9	2204	67.8	2204	67.8
3	339	351	351	3306	339	3306	339
4	339	351	351	3306	339	3306	339
5	847.5	877.5	877.5	4408	847.5	4408	847.5
6	847.5	877.5	877.5	4408	847.5	4408	847.5
7	1356	1228.5	1228.5	5510	1356	5510	1356
8	1356	1228.5	1228.5	5510	1356	5510	1356
9	1695	1579.5	1579.5	6612	1695	6612	1695
10	1695	1579.5	1579.5	6612	1695	6612	1695
11	2034	1755	1755	7714	2034	7714	2034
12	2034	1755	1755	7714	2034	7714	2034
13	2373	2106	2106	0	2373	0	2373
14	2373	2106	2106	0	2373	0	2373
15	2599	2193.75	2193.75	0	2599	0	2599
16	2599	2193.75	2193.75	0	2599	0	2599
17	0	2293.2	2293.2	0	-	0	0
18	0	2293.2	2293.2	0	-	0	0
19	-	2457	2457	-	-	-	-
20	-	2457	2457	-	-	-	-
21	-	2632.5	2632.5	-	-	-	-
22	-	2632.5	2632.5	-	-	-	-
23	-	2714.4	2714.4	-	-	-	-
24	-	2714.4	2714.4	-	-	-	-

Tabulka S.12: Dávka neutronového záření [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech ozářeny

	D	\mathbf{E}	\mathbf{F}	\mathbf{G}	н	Ι	J
1	127.4	152.8	152.8	3340	127.4	3340	127.4
2	127.4	152.8	152.8	3340	127.4	3340	127.4
3	637	655	655	5010	637	5010	637
4	637	655	655	5010	637	5010	637
5	1592.5	1637.5	1637.5	6680	1592.5	6680	1592.5
6	1592.5	1637.5	1637.5	6680	1592.5	6680	1592.5
7	2548	2292.5	2292.5	8350	2548	8350	2548
8	2548	2292.5	2292.5	8350	2548	8350	2548
9	3185	2947.5	2947.5	10020	3185	10020	3185
1 0	3185	2947.5	2947.5	10020	3185	10020	3185
1 1	3822	3275	3275	11690	3822	11690	3822
1 2	3822	3275	3275	11690	3822	11690	3822
1 3	4459	3930	3930	0	4459	0	4459
1 4	4459	3930	3930	0	4459	0	4459
15	4883.7	4093.75	4093.75	0	4883.7	0	4883.7
1 6	4883.7	4093.75	4093.75	0	4883.7	0	4883.7
17	0	4279.3	4279.3	0	-	0	0
1 8	0	4279.3	4279.3	0	-	0	0
1 9	-	4585	4585	-	-	-	-
20	-	4585	4585	-	-	-	-
2 1	_	4912.5	4912.5	-	-	-	-
2 2	_	4912.5	4912.5	-	-	-	-
2 3	_	5065.3	5065.3	-	-	-	-
2 4	-	5065.3	5065.3	-	-	-	-

Tabulka S.13: Celková dávka záření (gama a neutronového záření) [Gy], kterou byly želvušky v jednotlivých kanálech ozářeny

S.4 Sběr – data, fotografie, kovýskyt, statistika



Obrázek S.11: Počet nalezišť dle druhu materiálu



Obrázek S.12: Sběr – četnost sběru vzorků v závislosti na čase



Obrázek S.13: Počet nalezišť dle taxonu želvušek. Uvedeno je i kolik vzorků neobsahovalo žádné želvušky



Obrázek S.14: Sběr – histogram počtu druhů taxonů želvušek ve vzorcích



Obrázek S.15: Společný výskyt taxonů. Jednotlivá čísla značí, v kolika případech se dané taxony vyskytovaly ve vzorcích společně. Čísla ležící na úhlopříčce odpovídají celkovému počtu výskytů taxonu ve vzorcích



Obrázek S.16: Společný výskyt taxonů – mechy. Jednotlivá čísla značí, v kolika případech se dané taxony vyskytovaly ve vzorcích společně. Čísla ležící na úhlopříčce odpovídají celkovému počtu výskytů taxonu ve vzorcích



Obrázek S.17: Společný výskyt taxonů – lišejníky. Jednotlivá čísla značí, v kolika případech se dané taxony vyskytovaly ve vzorcích společně. Čísla ležící na úhlopříčce odpovídají celkovému počtu výskytů taxonu ve vzorcích



Obrázek S.18: Společný výskyt taxonů – listí. Jednotlivá čísla značí, v kolika případech se dané taxony vyskytovaly ve vzorcích společně. Čísla ležící na úhlopříčce odpovídají celkovému počtu výskytů taxonu ve vzorcích



Obrázek S.19: Společný výskyt taxonů – voda. Jednotlivá čísla značí, v kolika případech se dané taxony vyskytovaly ve vzorcích společně. Čísla ležící na úhlopříčce odpovídají celkovému počtu výskytů taxonu ve vzorcích



Obrázek S.20: Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část1



Obrázek S.21: Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část2



Obrázek S.22: Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část3











Obrázek S.25: Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část6


Obrázek S.26: Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část 7



Obrázek S.27: Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část8



Obrázek S.28: Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část9



(i) JP75

Obrázek S.29: Sběr – fotografie nalezišť a odebraných vzorků – část10



(a) JN1



(b) JN5



(c) JN6



(d) JN7



(e) JN8



(f) JN9



(g) JN11



(h) JN12



(i) JN13



(j) JN14



(k) JN15



(l) JN16



(m) JN17



(n) JN18



(o) JN20



(p) JN21



Obrázek S.30: Sběr – fotografie vzorků – část1



(a) JN26



(b) JN27



(c) JN28



(d) JN30



(e) JN31



(f) JN35



(g) JN36



(h) JN37



(i) JN38



(j) JP1



(k) JP2



(l) JP5



(m) JP21



(n) JP68



(o) JP69



(p) JP70



(q) JP71

Obrázek S.31: Sběr – fotografie vzorků – část2

ID	Datum	Vzorek	Mi.	Ec.	Ma.	Ra.	Is.	Hy.	Di.	It.	NA
JN1	11.09.2022	mech	х	х	х						
JN2	12.09.2022	mech									х
JN3	12.09.2022	mech									х
JN4	13.09.2022	mech									х
JN5	15.09.2022	mech			x						
JN6	15.09.2022	mech			x						
JN7	15.09.2022	mech		х	X						
$\mathbf{JN8}$	16.09.2022	mech	х								
JN9	17.09.2022	mech				x					
JN10	17.09.2022	mech									х
JN11	17.09.2022	mech	х								
JN12	17.09.2022	mech		х	x						
JN13	17.09.2022	mech			x						
JN14	17.09.2022	mech	х		x						
JN15	21.09.2022	mech	x	x	x						
JN16	21.09.2022	mech	х		X						
JN17	21.09.2022	mech	х		x						
JN18	23.09.2022	mech			x						
JN19	23.09.2022	mech			X						
JN20	21.09.2022	mech	х		x	x					
JN21	21.09.2022	mech			X						
JN22	24.09.2022	mech			x						
JN23	24.09.2022	mech			X	x					
JN24	24.09.2022	mech			x						
JN25	25.09.2022	mech			x						
JN26	25.09.2022	mech									х
JN27	25.09.2022	mech			x						
JN28	25.09.2022	lišejník			x						
JN29	29.09.2022	lišejník									х
JN30	29.09.2022	lišejník	х			x					
JN31	29.09.2022	lišejník	х		x	x					
JN32	30.09.2022	mech									х
JN33	30.09.2022	mech			x						
JN34	30.09.2022	mech									
JN35	03.10.2022	mech	x		x	x					
JN36	03.10.2022	mech	x	х	x	x					
JN37	03.10.2022	mech	x	х	x						
JN38	06.10.2022	mech			x						
JN39	07.10.2022	mech									х

Tabulka S.14: Přehled taxonů želvušek izolovaných ze vzorků – část1

ID	Datum	Vzorek	Mi.	Ec.	Ma.	Ra.	Is.	Hy.	Di.	It.	$\mathbf{N}\mathbf{A}$
JN40	07.10.2022	mech			х	х					
JN49	28.10.2022	mech	х								
JN50	21.10.2022	mech									х
JN51	21.10.2022	játrovka									х
JN52	28.10.2022	mech		x							
JN53	17.11.2022	lišejník									х
JN54	17.11.2022	mech									х
JN55	17.11.2022	mech	х								
JN56	18.11.2022	mech									х
JN57	19.11.2022	mech									х
JN58	19.11.2022	mech		x	х						
JN59	19.11.2022	listí									х
JN60	24.06.2023	mech									х
JN61	28.06.2023	mech									х
JN62	28.06.2023	mech			х						
JN63	02.08.2023	mech			х						
JN64	02.08.2023	mech			х						
JN65	02.08.2023	mech			х						
JN66	02.08.2023	mech									Х
JN67	02.08.2023	mech									Х
JN68	02.08.2023	mech									Х
JN69	02.08.2023	mech	х	X	х	X					
JN70	22.08.2023	mech		X	х						
JN71	22.08.2023	lišejník			х						
JN72	17.08.2023	mech			х						
JN73	19.08.2023	mech			х						
JN74	27.08.2023	voda			х	X					
JN75	15.09.2023	mech		X		х					
JN76	15.09.2023	mech	х								
JN77	15.09.2023	mech			Х						
JN78	15.09.2023	mech									х
JN79	22.09.2023	mech	х	X	Х						
JN80	22.09.2023	mech			Х						
JN81	26.09.2023	mech	х		х						
JN82	26.09.2023	mech			х						
JN83	11.10.2023	mech			Х		x				
JN84	20.10.2023	mech		X	Х	X					
JN85	20.10.2023	mech			х						
JN86	25.10.2023	mech			Х						

Tabulka S.15: Přehled taxonů želvušek izolovaných ze vzorků – část2

ID	Datum	Vzorek	Mi.	Ec.	Ma.	Ra.	Is.	Hy.	Di.	It.	NA
JN87	25.10.2023	mech	х	х	х	х					
JN88	02.11.2023	mech			х						
JN89	16.11.2023	mech									х
JN90	16.11.2023	mech	х		х						
JN91	17.11.2023	mech						х			
JN92	27.12.2023	mech	х								
JN93	01.12.2023	mech					х				
JN94	23.12.2023	mech									х
JN95	29.12.2023	mech									х
JN96	29.12.2023	mech						х			
JN97	29.12.2023	mech			х	х					
JN98	29.12.2023	mech	х	х	х	х					
JN99	29.12.2023	mech									х
JN100	29.12.2023	mech			х						
JN101	12.01.2024	mech			х						
JN102	14.01.2024	mech			х	х	х				
JN103	14.01.2024	mech			х	х					
JN104	14.01.2024	mech			х						
JN105	18.01.2024	mech			х						
JN106	27.01.2024	mech			х						
JN107	27.01.2024	mech									х
JN108	27.01.2024	mech			х						
JN109	27.01.2024	mech			х						
JN110	27.01.2024	mech			х						
JN111	10.02.2024	mech									х
JN112	10.02.2024	mech									х
JN113	10.02.2024	mech			х						
JN114	18.02.2024	mech			х						
JN115	27.03.2024	mech			х						
JN116	30.03.2024	mech			х						
JN117	30.03.2024	mech			х						
JN118	06.04.2024	mech	х		х	х		х			
JN119	06.04.2024	mech				х					
JN120	06.04.2024	mech									х
JN121	06.04.2024	mech			х		x	х			
JN122	06.04.2024	mech			х						
JN123	06.04.2024	mech									х
JN124	06.04.2024	mech			х						
JN125	06.04.2024	mech					x	x			

Tabulka S.16: Přehled taxonů želvušek izolovaných ze vzorků – část3

ID	Datum	Vzorek	Mi.	Ec.	Ma.	Ra.	Is.	Hy.	Di.	It.	NA
JN126	06.04.2024	mech							х		
JN127	06.04.2024	mech							х		
JN128	08.04.2024	mech			х						
JN129	13.04.2024	mech			х						
JN130	24.04.2024	mech			х						
JN131	24.04.2024	mech			х					x	
JN132	24.04.2024	mech									х
JN133	24.04.2024	mech	х								
JN134	24.04.2024	mech		х	х	х					
JN135	24.04.2024	mech			х						
JN136	24.04.2024	mech			х	х		x			
JN137	24.04.2024	mech						x	х		
JN138	24.04.2024	mech				х					
JN139	24.04.2024	mech	х								
JN140	25.04.2024	mech	х		х						
JN141	25.04.2024	mech			х						
JN142	28.04.2024	lišejník			х	х					
JN143	28.04.2024	mech			х						
JN144	28.04.2024	mech				х	х				
JN145	28.04.2024	mech	х		х						
JN146	29.04.2024	mech									х
JN147	29.04.2024	mech									х
JN148	29.04.2024	mech			х	х					
JN149	29.04.2024	mech			х	х					
JN150	29.04.2024	mech	х		х	х					
JN151	4. 5. 2024	mech			х						
JN152	24.04.2024	voda									х
JN153	24.04.2024	voda			х						
JN154	24.04.2024	voda			х						
HOL	26.03.2024	mech			х						
\mathbf{HP}	26.03.2024	mech			х						
JP1	26.09.2023	listí									х
$_{\rm JP2}$	26.09.2023	listí									х
JP3	26.09.2023	listí									х
JP4	26.09.2023	listí									х
$_{\rm JP5}$	30.09.2023	listí									х
JP6	05.10.2023	lišejník									х
JP7	30.09.2023	mech									х
$\mathbf{JP8}$	30.09.2023	listí									х

Tabulka S.17: Přehled taxonů želvušek izolovaných ze vzorků – část4

ID	Datum	Vzorek	Mi.	Ec.	Ma.	Ra.	Is.	Hy.	Di.	It.	NA
JP9	02.10.2023	listí									х
JP10	02.10.2023	listí						х			
JP11	02.10.2023	listí								х	
JP12	04.10.2023	listí									х
JP13	04.10.2023	listí									х
JP14	04.10.2023	listí									х
JP15	14.09.2023	listí									х
JP16	14.09.2023	listí									х
JP17	14.09.2023	listí									х
JP18	14.09.2023	listí									х
JP20	14.09.2023	listí									х
JP21	14.09.2023	listí									х
JP40	30.09.2023	mech					х				
JP68	27.10.2022	mech	х		х						
JP69	27.10.2022	mech			X						
JP70	27.10.2022	mech			x	х					
JP71	27.10.2022	mech			x						
JP72	27.10.2022	mech	x		x						
JP74	27.10.2022	mech			x						

Tabulka S.18: Přehled taxonů želvušek izolovaných ze vzorků – část 5. Mi. = Milnesium, Ec. = Echiniscus, Ma. = Macrobiotidae, Ra. = Ramazzottius, Is. = Isohypsibius, Hy. = Hypsibius, Di. = Diphascon, It. = Itaquascon, N = žádné želvušky



Obrázek S.32: Datová sada k natrénování neuronové sítě pro rozpoznávání Hypsibius exemplaris. HEL = žíví jedinci, HEE = svlečka, HED = mrtví jedinci



Obrázek S.33: Datová sada k natrénování neuronové sítě pro rozpoznávání JN105 a HP. $MACL = \check{z}ivi$ jedinci, MACE = svlečka, MACD = mrtví jedinci, MACegg = vajíčka

S.7 Trénování neuronově sítě – Hypsibius exemplaris



Obrázek S.34: Metriky úspěšnosti při trénování neuronové sítě pro *Hypsibius exemplaris* v závislosti na trénovací epoše



Obrázek S.35: Metriky úspěšnosti při trénování neuronové sítě pro JN105 a HP v závislosti na trénovací epoše

S.9 Natrénovaná neuronová síť pro *Hypsibius* exemplaris – matice záměny



Obrázek S.36: Matice záměny pro *Hypsibius exemplaris*. Na diagonále je možné vidět, jakou část objektů ve validačních obrázcích klasifikovala neuronová síť správně. Části nad/pod diagonálou značí množství špatně klasifikovaných objektů (osa x = správná třída z anotovaných dat; osa y = predikovaná třída z neuronové sítě)

S.10 Natrénovaná neuronová síť pro JN105 a HP – matice záměny



Obrázek S.37: Matice záměny pro JN105 a HP. Na diagonále je možné vidět, jakou část objektů ve validačních obrázcích klasifikovala neuronová síť správně. Části nad/pod diagonálou značí množství špatně klasifikovaných objektů (osa x = správná třída z anotovaných dat; osa y = predikovaná třída z neuronové sítě)