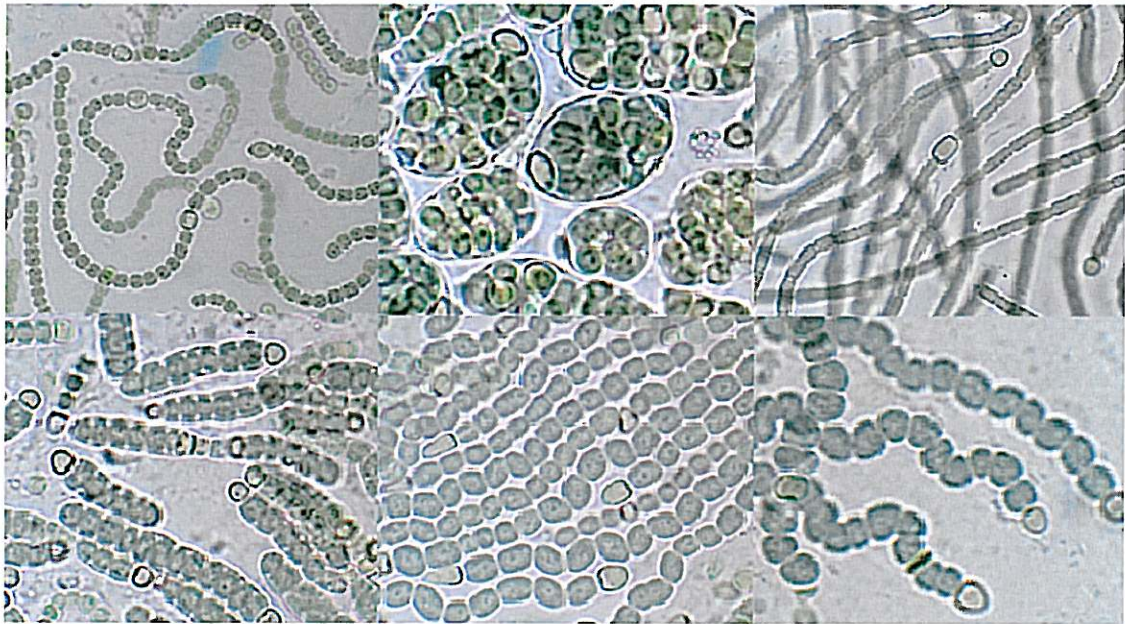




**Jihočeská universita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta**



Bakalářská práce

**Nitrogenázová aktivita a morfologie šesti
vybraných kmenů vláknitých sinic rodu *Nostoc***

Pavel Hrouzek

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Komárek, DrSc.
Konsultant: Doc. Ing. Miloslav Šimek, CSc.

České Budějovice 2002

Bakalářská diplomová práce

Hrouzek, P. (2002): Nitrogenázová aktivita a morfologie šesti vybraných kmenů vláknitých sinic rodu *Nostoc*

[Nitrogenase activity and morphology of six selected strains of filamentous cyanobacteria *Nostoc*. Bachelor diploma work, in Czech] – 14 pp., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace:

Nitrogenase activity of six *Nostoc* strains was determined and compared. Their morphology and frequency of heterocysts were studied. Basic morphological features of cells and filaments and developmental cycles of the strains were described.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, s použitím vlastních výsledků, citované literatury a s pomocí osob uvedených v poděkování.

V Českých Budějovicích 8. května 2002



Pavel Hrouzek

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval několika lidem, kteří mi v mé práci a studiu podporovali a pomáhali mi. Za vzbuzení zájmu o sinice a řasy, za celou řadu dobrých rad a za ochotu pomoci děkuji mnohokrát panu prof. Komárkovi. Mé vřelé díky patří také Doc. Šimkovi a Lindě Jišové za uvedení do metodiky, pomoc při měření, celou řadu potřebných připomínek a především za poskytnutí domácího prostředí v laboratoři. Aleně Lukešové bych rád poděkoval za propůjčení kmenů. Můj největší dík patří Mámě a Tátovi a celé naší rodině za vše co pro mne dělají.

Díky

OBSAH

1. Úvod	1
1.1. Sinice rodu <i>Nostoc</i>	1
1.2. Fixace vzdušného dusíku, metoda nitrogenázové redukce acetylenu (ARA).....	2
2. Materiál a metody	3
2.1. Použité kmeny	3
2.2. Kultivace	3
2.3. Morfometrie	3
2.4. Měření nitrogenázové aktivity	4
2. Výsledky	5
3.1. Morfologie kmenů	5
3.1.1. <i>Nostoc muscorum</i> I	5
3.1.2. <i>Nostoc muscorum</i> II	5
3.1.3. <i>Nostoc calcicola</i> agg. III	6
3.1.4. <i>Nostoc calcicola</i> agg. VI	6
3.1.5. <i>Nostoc ellipsosporum</i> V	6
3.1.6. <i>Nostoc edaphicum</i> X	7
3.2. Nitrogenázová aktivita	9
4. Diskuse	11
4.1. Morfologie kmenů	11
4.2. Nitrogenázová aktivita	12
5. Závěr	14
6. Literatura	15

Přílohy

Příloha č.1: Primární data

Příloha č.2: Grafy

Příloha č.3: Fotografie

Příloha č.4: Vývojové cykly studovaných kmenů

1. Úvod

1.1. Sinice rodu *Nostoc*

Rod *Nostoc* představuje typový taxon pro celý řád sinic Nostocales. Jedná se o vláknité sinice, které na svých vlákních tvoří jak heterocyty, tak akinety. Heterocyty se na vlákních tvoří po téměř konstantních vzdálenostech, akinety pak vznikají v dlouhých řetězcích mezi heterocyty (apoheterocytický vznik). Pro rod *Nostoc* je též charakteristická přítomnost terminálních heterocytů, tvořících se na koncích vláken. Celá vlákna jsou obalena více či méně pevnými, zpravidla však mohutnými slizovými obaly (KOMÁREK *et* ANAGNOSTIDIS 1988). Většina kmenů vytváří charakteristické slizové, makroskopicky patrné kolonie. Vyskytují se ale též kmeny vytvářející povlaky na povrchu substrátu, nebo druhy rostoucí ve volných seskupeních či jednotlivě v půdě. Podle morfologie kolonie byl některými autory tento rod členěn do několika rodů s názvy *Nematonostoc* NYL., *Sphaeronostoc* ELENK., *Stratonostoc* ELENK. a *Amorphonostoc* ELENK (ELENKIN 1935). Podle současných poznatků je však definován pouze rod *Nostoc* (KOMÁREK *et* ANAGNOSTIDIS 1988).

Zástupci tohoto rodu patří bezpochyby mezi nejsložitější sinice vůbec. Svědčí o tom také velikost genomu. Dnes je znám celý genom kmene *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, u nějž byla zjištěna velikost 9,2 Mb (MEEKS *et al.* 2001), což je přibližně čtyřnásobek velikosti genomu jednobuněčných sinic. Jde dosud o největší známý genom mezi sinicemi.

Mezi další zajímavé vlastnosti těchto sinic patří složitý vývojový cyklus, kterým v průběhu času procházejí (GEITLER 1932). V jejich vývojovém cyklu dochází ke střídání dvou hlavních stádií. Pohyblivé hormogonie, které ze svých koncových buněk diferencují terminální, heterocyty se mění na normální vegetativní vlákna s terminálními, ale především interkalárními heterocyty. Vegetativní vlákna se pak za určitých podmínek fragmentují u heterocytů za tvorby pohyblivých hormogonií. Tyto procesy jsou pravděpodobně indukovány změnou kvality světla. Takový vývojový cyklus byl popsán u sinice *Nostoc muscorum* (LAZAROFF 1961, 1970). Kromě změn v morfologii vlákna prochází výraznými změnami též makroskopická morfologie kolonie (MOLLENHAUER 1970).

Podobně jako některé další sinice mají i zástupci rodu *Nostoc* velice pozoruhodnou schopnost - v omezených světelných podmínkách nebo za úplného nepřístupu světla provádějí heterotrofní metabolismus (ALLISON *et al.* 1937). Růst je za těchto podmínek znatelně pomalejší, ale některé sinice jsou tak schopny přežít dlouhá období za nepřístupu světla. V literatuře se uvádí, že kultury rodu *Nostoc muscorum* rostoucí na médiu s glukózou za nepřístupu světla se vyznačují specifickou morfologií vláken – tzv. aseriátní stádium. Při opakovaném vystavení kultur světelným podmínkám se velice rychle vlákna přemění na normální vegetativní vlákna. Světlo zde zřejmě působí také jako morfogenetický faktor (LAZAROFF 1966).

Kompletní seznamy popsáných druhů tohoto rodu byly publikovány Geitlerem (GEITLER 1925), Starmachem (STARMACH 1966), Konradtěvou (KONRADTĚVA 1968) a nakonec Drouetem (DROUET 1978). V těchto klíčích je popsáno zhruba 40 až 200 druhů rodu *Nostoc*. Nutno však dodat, že celá řada těchto druhů byla popsána neoprávněně. Celý systém je v těchto publikacích založen na velikostech vegetativních buněk, heterocytů a akinet a na makroskopickém vzhledu kolonií. Tyto znaky jsou však do jisté míry závislé na okolních podmínkách a tudíž jsou nestálé. Podrobnější revizi kmenů

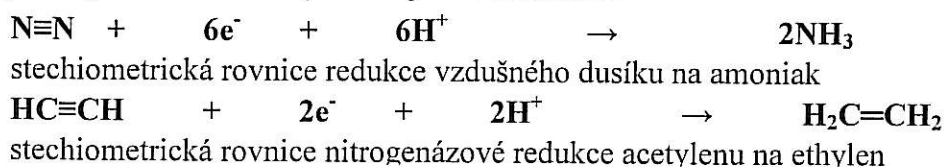
vytvářejících makroskopické kolonie provedl Mollenhauer (MOLLENHAUER 1970). Ostatní kmeny, zejména pak ty vytvářející povlaky, rostoucí volně v půdě nebo ve vodním prostředí, nejsou nikde definovány. Ekologické nároky zástupců rodu *Nostoc* jsou různorodé. Najdeme zde typy bentické, epipelické, striktně půdní, ale též kmeny které v minulosti vstoupily do symbiózy s jinými organismy. Dodnes se vede spor o existenci jediného planktonního druhu *N. planktonicum* W. Poretzky et Tschernom. Dá se říci, že rozšíření rodu *Nostoc* je kosmopolitní. V některých oblastech, například v pouštích či v antarktických oblastech, tvoří tyto sinice spolu s jinými druhy hlavní primární producenty.

1.2. Fixace vzdušného dusíku, metoda nitrogenázové redukce acetylenu (ARA)

Společně s některými bakteriemi patří sinice mezi jediné organismy schopné fixovat vzdušný dusík. V tomto procesu, kdy je jedna molekula dusíku redukována na dvě molekuly amoniaku, hraje ústřední roli složitý enzymatický komplex nazývaný nitrogenáza, obsahující atomy molybdenu nebo vanadu (KENTEMICH 1988). Redukce dusíku je energeticky náročná, a proto se jedná o složitý fyziologický proces. Nitrogenáza je navíc velice citlivá k molekulám kyslíku (FAY *et* COX 1967). Proto všechny organismy, jež jsou schopné fixovat vzdušný dusík musely vyvinout mechanismus jakým bránit tento vysoce účinný enzym před škodlivými účinky kyslíku.

Sinice řádu Nostocales a Stigonematales vyvinuly jedinečnou strategii jak vyřešit tento problém. Za nedostatku přístupného dusíku diferencují na svých vlákních v pravidelných intervalech heterocyty, buňky specializované na fixaci N_2 (FOG 1949, FAY 1969, STEVART 1969, 1970). Heterocyty jsou tlustostěnné, extrémně přeorganizované buňky vzniklé z buněk vegetativních. Při diferenciaci se na povrch ukládá trojvrstevný obal bránící průniku kyslíku (MURRY *et al.* 1994), probíhá řada hlubokých změn v metabolismu a mění se struktura thylakoidů. Z buňky zcela mizí fotosystém II a RuBisCo a je uskutečňován pouze cyklický transport elektronů (STEWART 1969). Výsledkem tohoto asi 24 hodin trvajících procesu je funkční heterocyt schopný fixace N_2 .

Nitrogenáza je schopná kromě dusíku redukovat též jiné látky, které se mu svými vlastnostmi podobají – např. acetylen (C_2H_2) (HARDY *et al.* 1973). Této vlastnosti se využívá při měření fixace N_2 metodou nitrogenázové redukce acetylenu (acetylen reduction assay – ARA). Acetylen je při reakci katalyzované nitrogenázou redukován na ethylen (viz tab.č.1), který lze stanovit plynově chromatograficky. Stechiometrie procesů je uvedena níže.



Nutno však dodat, že vzhledem k rozdílným vlastnostem molekul dusíku a acetylenu, jsou energetické nároky na tuto reakci různé. Proto nelze položit rovnítko mezi jeden mol redukováného acetylenu a jeden mol redukováného dusíku. Teoreticky by měl být tento poměr 3 moly redukováného acetylenu ku jednomu molu redukováného dusíku nebo 4:1 bere-li se v úvahu i souběžně probíhající redukce H^+ (GIBSON 1980, BODLEY 1987). Řada měření však nasvědčuje, že tento poměr může být i vyšší (až 5-7 : 1).

2. Materiál a metody

2.1. Použité kmeny

Pro účel této práce bylo vybráno šest kmenů vláknitých sinic rodu *Nostoc*. Výběr těchto kmenů byl volen tak, aby bylo možno zachytit rozdíly mezi morfologicky velice podobnými kmeny, ale též mezi kmeny morfologicky odlišnými. Z tohoto důvodu byly vybrány následující kmeny:

<u>vědecké jméno</u>	<u>označení kmene</u>	<u>lokalita / datum izolace</u>	<u>izoloval</u>
<i>Nostoc muscorum</i> Ag.	I	Dlouhá ves / 1986	Lukešová
<i>Nostoc muscorum</i> Ag.	II	neznámá / 1985	Lukešová
<i>Nostoc calcicola</i> agg. Bréb.	III	Č.Budějovice / 1989	Lukešová
<i>Nostoc calcicola</i> agg. Bréb.	VI	Dobré Pole / 1998	Kaftan
<i>Nostoc ellipso sporum</i> Rabenh.	V	Nezamyslice / 1980	Stíbrál
<i>Nostoc edaphicum</i> agg. Kondrat.	X	neznámá / 1998	Lukešová

Všechny výše uvedené kmeny byly získány od Ing. Aleny Lukešové, CSc. - ÚPB AV ČR. Jedná se především o kmeny rostoucí v půdě nebo na jejím povrchu.

2.2. Kultivace

Sbírková kultivace probíhala ve zkumavkách za permanentního osvětlení o intenzitě $35 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a teplotě 20 - 25°C. Kultury byly udržovány na šikmém agaru (2,5 – 3% w/w agar). Jako živný roztok bylo použito médium BG 11 bez přídavku NaNO_3 .

Kultivace před měřením nitrogenázové redukce acetyleny probíhala v 150 ml NTS lahvích (lahve na séra) na médiu BG 11 bez přídavku NaNO_3 , ale na poněkud pevnějším agaru (4% w/w agar) za stejných tepelných i světelných podmínek.

2.3. Morfometrie

Veškerá měření a pozorování morfologie vláken včetně pořízení fotodokumentace byla prováděna na mikroskopu OLYMPUS CX 40 se softwarem OLYMPUS DP SOFT (verze 3.0). Pro vyhodnocení morfologie vláken byly použity kultury, které byly kultivovány za výše uvedených podmínek. Měření frekvence heterocytů bylo provedeno přímo u kultur použitých na stanovení nitrogenázové aktivity. Při popisu morfologie vláken bylo vždy změřeno 300 vegetativních buněk, akinet i interkalárních, případně terminálních heterocytů.

Výsledky byly zpracovány pomocí programu STATISTICA (verze 1999) Rozdíly mezi sledovanými charakteristikami (morfologie, nitrogenázová aktivita) byly hodnoceny jednocestnou analýzou variance. Průkaznost rozdílů mezi průměry byla hodnocena Tukeyho HSD testem na pětiprocentní hladině významnosti. Pro vyhodnocování dat nitrogenázové aktivity byla použita nelineární regrese. Některé výsledky jsou vyjadřovány v textu ve tvaru minimum-(průměr)-maximum.

Při pozorování klíčení akinet byly kultury ponechány dostatečně dlouhou dobu na šikmém agaru (120 dní) až se vlákna zcela přeměnila v akinety. Poté byl vzorek kultury přenesen do čerstvého média a byl sledován v dvouhodinových intervalech po dobu 24 hodin. Při sledování

morfologie vláken za heterotrofního růstu byly kultury kultivovány na médiu s přidavkem 2% glukózy ve tmě.

Výsledky měření frekvence heterocytů byly vyjádřeny jako procento heterocytů z celkového počtu buněk. Na malém výseku mikroskopického obrazu (300 x 300 μm) byly sečteny veškeré buňky a heterocyty. Poté byl spočten poměr heterocytů k ostatním buňkám a vyjádřen v procentech. Toto měření bylo provedeno u každé kultury pětkrát. Výsledná hodnota frekvence heterocytů byla vyjádřena jako průměr všech pěti měření.

2.4. Měření nitrogenázové aktivity

Nitrogenázová aktivita byla měřena celkem třikrát a to po 6, 21, 42 dnech kultivace kultur, přičemž při každém měření byla stanovena suchá hmotnost biomasy sinic. Na počátku pokusu bylo připraveno na každé dílčí měření šest opakování od každého kmene, ale vzhledem k nepředvídatelným kontaminacím se počet opakování pohyboval mezi čtyřmi až šesti. Celkem bylo proměřeno 90 kultur.

Měření bylo prováděno metodou, která využívá nitrogenázové redukce acetylenu na ethylen. Ethylen byl stanovován na plynovém chromatografu HEWLETT PACARD 5890 Series II s automatickým integrátorem. Jako koncový detektor byl použit FID (plamenový ionizační detektor). Měření bylo prováděno ve spolupráci s Doc. Ing. Miloslavem Šimkem, CSc. a Lindou Jišovou z ÚPB AV ČR. Při měření byly kultury v kultivačních lahvích neprodyšně uzavřeny gumovými zátkami. Poté bylo přidáno 10 ml acetylenu. Ihned byl odebrán vzorek vnitřní atmosféry o objemu 0,5 ml a byla stanovena koncentrace ethylenu. Jako standard pro veškerá měření byla použita směs ethylenu (59 ppm) a methanu (39 ppm). Poté byly kultury ponechány k inkubaci v acetylenové atmosféře po dobu 60 minut. Po uběhnutí této doby byl opět odebrán vzorek atmosféry a bylo provedeno stanovení koncentrace ethylenu v baňce. Množství ethylenu bylo spočítáno podle následujícího vzorce (ŠIMEK *et al.* 1987):

$$n(C_2H_2) = \frac{0,0446 \cdot P(C_2H_2) \cdot V(b) \cdot c(ST)}{P(ST)}$$

$n(C_2H_2)$ - množství C_2H_4 v baňce [nmol]	$c(ST)$ - koncentrace standardu [ppm]
$V(b)$ - objem kultivační lahve [ml]	$P(ST)$ - plocha píku standardu [integrační jednotky]
$P(C_2H_2)$ - plocha píku ethylenu [integrační jednotky]	

Po měření nitrogenázové redukce acetylenu byla kultura kvantitativně odebrána z povrchu agaru a přenesena na předem vysušený a zvážený filtrační papír. Poté byla na malém vzorku odebraném z kultury počítána frekvence heterocytů (viz 2.2. Morfometrie). Nakonec byly kultury vysušeny při 85°C po dobu čtyř hodin a zváženy na analytických vahách s přesností na 0,00001 g. Výsledná nitrogenázová aktivita byla přepočtena na jeden gram suché hmotnosti kultury a vyjádřena jako množství ethylenu redukovaného kolonií o suché hmotnosti jeden gram za jednu hodinu ($\mu\text{mol } C_2H_4 \cdot g^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$).

3. Výsledky

3.1. Morfologie studovaných kmenů

Průměrné hodnoty sledovaných charakteristik (délka a šířka vegetativních buněk, akinet a heterocyt) se mezi kmeny statisticky významně liší ($p=0.0000$). Grafické znázornění naměřených dat je uvedeno v příloze č.2. Souhrn výsledků je uveden v tabulce č.1, strana 8.

3.1.1. *Nostoc muscorum* I

Tento kmen vytváří na agaru drobné, světle zelené, kulovité kolonie o průměru cca 0,1 – 5 mm. Na vlhčím agaru však může vytvářet až homogenní povlaky.

Klíčením akinet vzniká krátké vlákno, na jehož konci se za nepřítomnosti dusíku vytváří kulovitý terminální heterocyt. Buňky ve vláknu se dále dělí a vytvářejí dlouhá, mírně zvlněná vlákna. Vegetativní buňky jsou maximálně 1,7 x delší než širší, dlouhé 3,6-(5,5)-7,7 μm a široké 4-(5,7)-6,8 μm . Heterocyty jsou poměrně velké, 6,2-(8,6)-11,1 μm dlouhé a 5,0-(6,5)-8,3 μm široké, oválného až kulovitého tvaru. Vytvářejí se na vláknech v poměrně velkých rozestupech 10-20 buněk. Průměrná frekvence heterocytů je tedy 7,0%. Byla sledována i tvorba dvou sousedících heterocytů. Akinety jsou 5,3-(8,6)-12,5 μm dlouhé a 3,8-(5,6)-8,0 μm široké. Na vláknech jsou zpravidla postaveny delší stranou kolmo na osu vlákna. Zůstávají dlouho spojeny a často dochází k jejich klíčení přímo ve vláknech.

Při heterotrofním růstu za tmy se vegetativní buňky velice rychle mění na akinety. Vlákna jsou velice krátká a rychle se fragmentují. Jednotlivé akinety, nebo akinety spojené ve vlákna pak opět klíčí. *Viz příloha č.3 – tabule č.1 a příloha č.4 – obr.č.1.*

3.1.2. *Nostoc muscorum* II

Morfologií kolonií i vláken se tento kmen velmi podobá předešlému kmenu. Kolonie jsou též kulovité, světle zelené, na vlhčím agaru kmen vytváří homogenní povlaky.

Klíčení akinet probíhá stejně jako u předešlého kmene. Vegetativní buňky jsou v obryse oválné, maximálně 1,5 x delší než širší, 2,8-(4,7)-6,8 μm dlouhé a 4,0-(4,8)-5,9 μm široké. Na vegetativních vláknech se za nepřítomnosti dusíku vytváří v odstupech cca 10-20 buněk heterocyty. Průměrná frekvence heterocytů je 6,9%. Interkalární heterocyty jsou oválné až kulovité, občas hruškovitého tvaru, 5,3-(7,4)-10,2 μm dlouhé a 4,4-(5,8)-7,2 μm široké. Akinety jsou ve vláknech většinou uloženy delší stranou kolmo na osu vlákna. Jsou relativně velké, 4,5-(7,0)-9,4 μm dlouhé a 3,4-(4,9)-6,3 μm široké.

Při heterotrofním růstu se též velice rychle vegetativní buňky mění v akinety, které mohou ještě přímo ve vláknech klíčit. *Viz příloha č.3 – tabule č.2 a příloha č.4 – obr.č.1.*

3.1.3. *Nostoc calcicola* agg. III

Na povrchu agaru vytváří tento kmen zeleně až hnědě zbarvené, homogenní, ale též vláknité povlaky.

Pravděpodobně klíčením akinet vznikají rovná vlákna (přímo klíčení akinet nebylo pozorováno), která jsou složená z čtvercovitých až obdélníkovitých buněk, dlouhých 2,2-(3,6)-6,0

μm a 2,6-(3,5)-4,0 μm širokých. Buňky se ve vláknu velice intensivně dělí. Terminální buňka vlákna je protažená až zašpičatělá. Na těchto vláknecích se vytvářejí jak terminální, tak interkalární heterocyty. Interkalární heterocyty jsou kulovité až oválné, 2,6-(4,4)-6,7 μm dlouhé a 2,8-(3,9)-5,6 μm široké. Frekvence heterocytů je u tohoto kmene poměrně vysoká (13,7%), především díky velkému počtu terminálních heterocytů. Vlákna jsou relativně křehká a tak se často fragmentují za vzniku kratších kusů, které se opět dělením buněk prodlužují. Většina povlaku tak bývá tvořena právě masou těchto vláken. Po určité době se vegetativní buňky nápadně zvětší a ztmavnou. Dělení již neprobíhá striktně kolmo na osu vlákna, ale šikmo. Vlákna se tak začínají kroutit. Buňky kolem sebe produkují slizový obal. Z těchto buněk pak pravděpodobně za nepříznivých podmínek vznikají zralé akinety.

Při heterotrofním růstu na médiu s glukózou nebyla zaznamenána žádná změna morfologie. Viz příloha č.3 – tabule č.3 a příloha č.4 – obr.č.2.

3.1.3. *Nostoc calcicola* agg. VI

Tento kmen je svou morfologií velmi podobný kmenu *N. calcicola* agg. III, vytváří též tmavozelené až hnědé homogenní povlaky.

Při klíčení akinet vznikají rovná vlákna složená ze čtvercovitých až obdélníkovitých buněk, jež se velice rychle dělí. Na koncích vláken se diferencují terminální heterocyty. Ty jsou u tohoto kmene ve svém tvaru velice variabilní. Mohou být protažené až kulovité. Interkalární heterocyty jsou oválné až kulovité, 2,9-(4,9)-8,3 μm dlouhé a 2,4-(3,7)-5,8 μm široké. Vegetativní buňky rovných vláken se po určité době zvětšují a dělí šikmo na osu vlákna a tím zohýbají celé vlákno. Také slizové pochvy jsou velice podobné jako u předešlého kmene. Akinety jsou kulovité až oválné, 2,8-(4,5)-7,42 μm dlouhé a 2,7-(4,5)-6,4 μm široké.

Obdobně jako u předešlého kmene se při heterotrofním růstu morfologie vláken nezměnila. Viz příloha č.3 – tabule č.4 a příloha č.4 – obr.č.2.

3.1.5. *Nostoc elliposporum* V

Tento kmen vytváří pevné povlaky až mohutné kulovité, slizové, tmavě hnědé kolonie. Zřejmě díky pevnému slizu se na koloniích často vytvářejí velké vzduchové bubliny.

Vegetativní vlákna jsou rovná až mírně zvlněná. Vegetativní buňky jsou protáhlé, v obrysu obdélníkovité, 3,6-(7,0)-11,3 μm dlouhé a 3,4-(4,5)-5,8 μm široké a mohou být až 2,5x delší než širší. Jednotlivá vlákna jsou uzavřena v nevýrazné slizové pochvě, která nikdy neobklopuje heterocyt. Na vláknecích se vytvářejí výrazné oválné heterocyty 6,1-(9,7)-15,9 μm dlouhé a 4,1-(7,1)-11,0 μm široké. Frekvence heterocytů je u tohoto kmene relativně nízká, pohybuje se kolem 5%. Velice často se z obou stran kolem interkalárního heterocytu vytvoří sousední heterocyty. V takovém místě pak dochází k fragmentaci vlákna a vzniku terminálních heterocytů.

Za nepříznivých podmínek (nedostatek světla či úplná tma) se vegetativní buňky mírně zaoblují a zvětšují a postupně dochází k fragmentaci vlákna. Takto je schopna kolonie vydržet poměrně dlouhé období (pozorováno až 6 měsíců) aniž by se vegetativní buňky přeměnily na akinety. Po přenesení kolonie do čerstvého média jsou tyto „dormantní buňky“ schopné normálního

dělení a tvorby nového vegetativního vlákna, aniž by klíčily jako akinety. Stejnou morfologii měly též vegetativní buňky při heterotrofním růstu kolonie. Postupem času se vegetativní buňky mění v pravé akinety. Ty jsou velké, v obrysu obdélníkovité až oválné 5,6-(9,0)-14,0 μm dlouhé a 4,6-(6,1)-8,4 μm široké uložené ve slizovém obalu.

Viz příloha č.3 - tabule č.5 a příloha č.4 – obr.č.3.

3.1.6. *Nostoc edaphicum* agg. X

Tento kmen vytváří tmavě zelené povlaky až bochánkovité kolonie složené z velice drobných, nejvýše 1 mm velkých kolonií.

Vegetativní vlákna jsou uložena v pevných, jasně zřetelných slizových obalech. Zpravidla vně obalu je na jednom či obou koncích připojen terminální heterocyt. Tato vlákna vznikají fragmentací starších vegetativních vláken a uvolňují se ze slizového obalu mateřské kolonie. Z terminálních buněk vláken se diferencují terminální heterocyty. Poté začínají vegetativní buňky produkovat slizový obal, který je zde relativně tenký avšak velmi pevný. Terminální heterocyt se tak dostává vně slizového obalu. Vegetativní buňky se neustále dělí a mírně zvětší svůj objem, v místě spojení s ostatními buňkami jsou smáčklé. Vlákno je nakonec v obalu nepravidelně stočené. Na koncích vláken uvnitř obalu se mohou tvořit další terminální heterocyty. Vlákna se nakonec fragmentují a opět opouštějí prasklý mateřský obal.

Nebyla zaznamenána žádná změna morfologie při heterotrofním růstu za nepřístupu světla.
Viz příloha č.3 – tabule č.6 a příloha č.4 – obr.č.4.

Tabulka č.1: Důležité morfologické charakteristiky studovaných kmenů

Pozn.: tučně jsou označeny morfologické charakteristiky v nichž se kmeny výrazně liší.

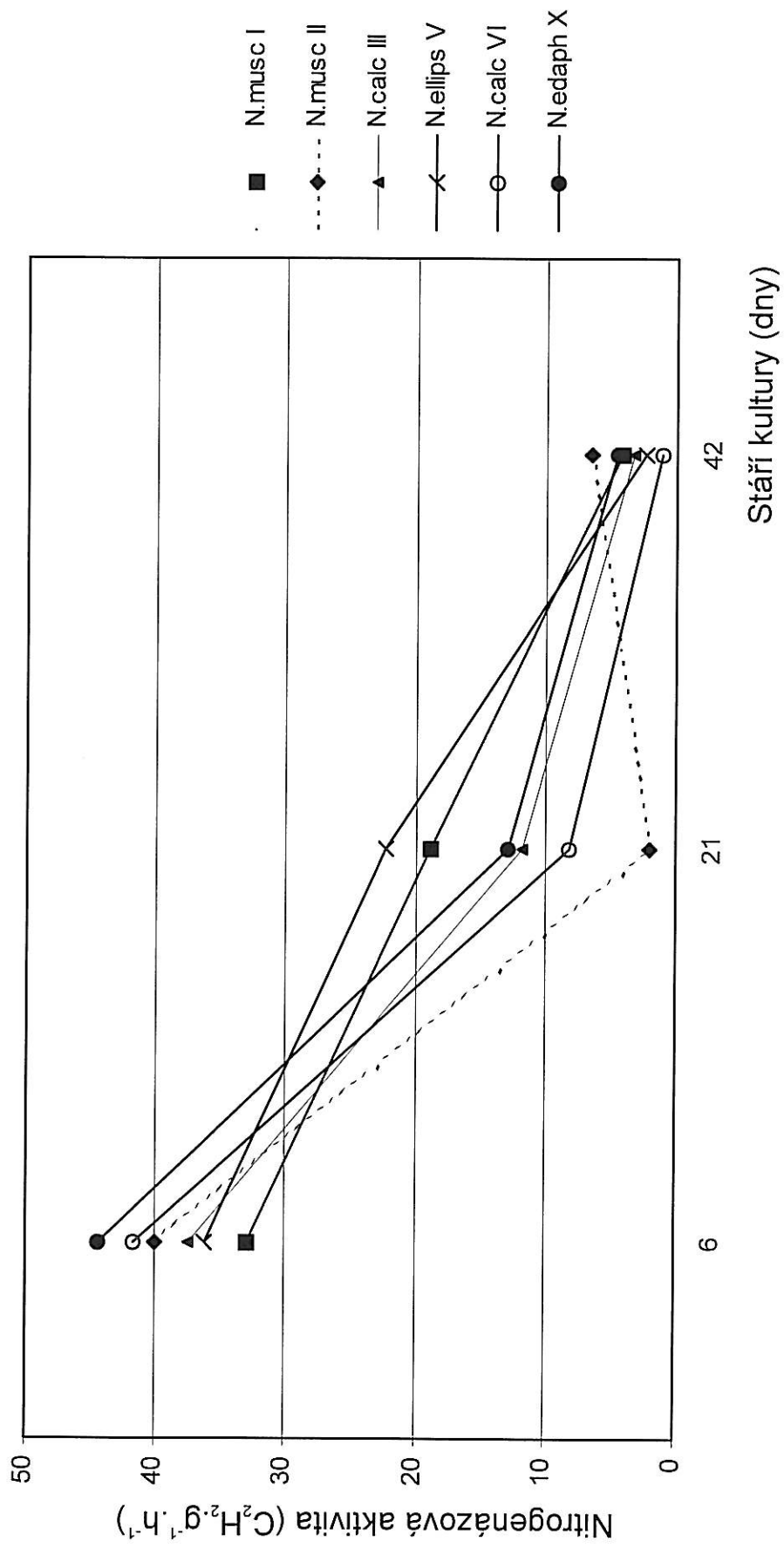
kmen	vegetativní buňky		max. poměr d/s	interkalární heterocyty		akinetý					
	prům. rozměry (μm)	délka (μm)		šířka (μm)	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)				
<i>N. muscorum I</i>	5,5 x 5,6	3,6 - 7,7	4,1 - 6,8	1,7	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)				
					8,6 x 6,5	6,2 - 11,1	5,0 - 8,3	7	8,6 x 5,6	5,4 - 12,5	3,8 - 8,0
<i>N. muscorum II</i>	4,7 x 4,9	2,8 - 6,8	4,0 - 5,9	1,5	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)	frekvence (%)	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)
					7,4 x 5,8	5,3 - 10,2	4,4 - 7,2	6,9	7,0 x 4,9	4,5 - 9,4	3,4 - 6,3
<i>N. calcicola III</i>	3,7 x 3,6	2,2 - 6,1	2,6 - 4,6	2,1	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)	frekvence (%)	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)
					4,4 x 3,9	2,6 - 6,7	2,8 - 5,6	13,7	5,0 x 3,9	3,2 - 7,3	2,7 - 5,7
<i>N. calcicola VI</i>	3,9 x 2,4	2,4 - 6,9	2,4 - 5,4	2,2	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)	frekvence (%)	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)
					4,9 x 3,7	2,9 - 8,0	2,4 - 5,8	15,2	4,5 x 4,5	2,7 - 7,4	2,7 - 6,4
<i>N. elliposporum V</i>	7,0 x 4,5	3,6 - 11,3	3,4 - 5,8	2,6	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)	frekvence (%)	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)
					9,7 x 7,0	6,1 - 15,9	4,1 - 11,0	4,9	9,0 x 6,2	5,6 - 14,0	4,6 - 8,4
<i>N. edaphicum X</i>	2,5 x 2,7	1,3 - 4,8	1,4 - 5,5	1,8	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)	frekvence (%)	prům. rozměry (μm)	délka (μm)	šířka (μm)
					interkalární heterocyty se vyskytují zřídka			21	3,2 x 3,8	1,8 - 5,7	2,4 - 5,6

3.2. Nitrogenázová aktivita u sledovaných kmenů

Nitrogenázová aktivita (dále NA) vykazuje u šesti sledovaných kmenů značnou variabilitu. U měřených kultur se pohybovala v rozmezí 0,5 – 78 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$. Primární data měření jsou přiložena v příloze č.1. Základní charakteristiky naměřených dat jsou uvedeny v tabulce č.2 a v grafech č.9 – č.12 (příloha č.2). Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi průměrnými hodnotami nitrogenázové aktivity sledovaných kmenů (celkové průměry 6, 21, 42 dní starých kultur). U všech kmenů byly naměřeny hodnoty řádově od jednotek do několika desítek $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$. Z naměřených dat je ovšem patrný pokles celkové NA kolonie s jejím stářím (viz graf č.1 strana č.10). Několik rozdílů bylo nalezeno v dílčích měřeních. U kultur starých šest dní se hodnoty NA pohybovali v rozmezí 70-(40)-15 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$. Byly velmi variabilní, takže nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi průměrnými hodnotami NA kmenů (graf č.9). Po 21 dnech kultivace byl patrný pokles hodnot nitrogenázové aktivity na 2-(13)-36 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$ a statisticky významné rozdíly byly nalezeny mezi dvojicemi kmenu I-II a II-V (graf č.10). Nakonec u 42 dní starých kultur byly naměřeny hodnoty v rozmezí 0,5-(4,0)-16 $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$, statisticky průkazný rozdíl byl nalezen mezi kmény II a IV (graf č.11). Podrobnější pohled na průměrné hodnoty NA u různě starých kolonií jednotlivých kmenů ukazuje graf č.1.

Tabulka č.2: Hodnoty nitrogenázové aktivity u 6, 21 a 42 dní starých kultur šesti sledovaných kmenů.

kmen	Nitrogenázová aktivita ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$)					
	6 dní staré kultury		21 dní staré kultury		42 dní staré kultury	
	rozsah	průměr	rozsah	průměr	rozsah	průměr
<i>N. muscorum I</i>	23,0 - 47,7	33	10,8 - 23,8	18,8	3,5 - 5,0	4,2
<i>N. muscorum II</i>	25,0 - 51,7	40,1	1,5 - 2,6	2,1	2,9 - 16,6	6,4
<i>N. calcicola III</i>	15,4 - 73,6	37,6	6,1 - 15,8	11,8	2,4 - 4,5	3,3
<i>N. calcicola VI</i>	32,0 - 49,4	41,7	4,2 - 11,6	8,1	0,5 - 3,2	1,2
<i>N. ellipsosporum V</i>	28,2 - 43,7	36,2	4,4 - 36,2	22,3	1,5 - 4,5	2,3
<i>N. edaphicum X</i>	27 - 78,0	44,3	6,6 - 28,1	12,8	4,0 - 5,0	4,5
průměr		36,9		12,7		3,7



Graf č.1: Závislost nitrogenázové aktivity kolonie na jejím stáří

4. Diskuse

4.1. Morfologie kmenů

Z výsledků uvedených v kapitole 3.1. je patrné, že se studované kmeny za daných kultivačních podmínek liší. Odlišnosti nacházíme jak na makroskopické úrovni, tak v morfologii vláken. Základní charakteristiky naměřených dat jsou shrnuty v příloze č.2. Z pohledu na grafy je patrné, že se až na výjimky mezi sebou liší na pětiprocentní hladině významnosti všechny kmeny ve všech studovaných charakteristikách. I přes průkazný rozdíl je ale z grafů patrná podobnost kmenů *N. muscorum* I-II a *N. calcicola* III-VI. Rozdíly ve velikostech buněk, akinet a heterocytů jsou natolik malé, že na jejich základě nelze kmeny v praxi odlišovat. Pouze kmen *N. elliposporum* V se svými rozměry liší výrazně (viz tab.č.2). Vzhledem ke známé proměnlivosti velikosti buněk u sinic v závislosti na okolních podmínkách je nutné považovat tyto znaky za méně významné.

Výraznějším znakem je frekvence heterocytů – zejména terminálních u kmenů *N. calcicola* III, *N. calcicola* VI a *N. edaphicum* X. Zde se na rozdíl od zbývajících kmenů vytvářejí terminální heterocyty téměř na koncích všech vláken. Frekvence heterocytů se u těchto kmenů pohybuje mezi 13 – 21%. Tato pozorování jsou též v rozporu s dosud publikovanými pracemi, kde se průměrná frekvence heterocytů u vláknitých sinic uvádí kolem 5% (ADAMS *et* DUGGAN 1999). U kmenů *N. muscorum* I, *N. muscorum* II, *N. elliposporum* V se frekvence pohybuje v rozmezí 5 – 7% a převažuje tvorba interkalárních heterocytů.

Další výrazné odlišnosti mezi kmeny jsou v jejich vývojovém cyklu. Zatímco u kmenů *N. muscorum* I, *N. muscorum* II, *N. elliposporum* V nebyla v kultivačních podmínkách zaznamenána tvorba rovných vegetativních vláken, na jejichž koncích se diferencují terminální heterocyty, u kmenů *N. calcicola* III, *N. calcicola* VI a *N. edaphicum* X ano. Zda lze tato vlákna označit jako hormogonie či nikoliv je sporné, neboť u kmenů III a VI se tato vlákna normálně dělí a mohou dosahovat délky až několika desítek buněk. Značné zvětšení buněk, jejich zakulacení a ztmavnutí se též vyskytuje u všech kmenů vytvářejících tato rovná vlákna. V takových případech je téměř nemožné odlišit, zda se jedná o vegetativní buňku, která se bude dále dělit, nebo zrající akinetu. Kmen *N. edaphicum* X se zcela odlišuje od ostatních kmenů tvorbou velice pevných slizových obalů na povrchu vláken. Tento kmen je shodný s popisem učiněným Kondratěvou (KONDRATĚVA 1968). Vývojové cykly, jimiž studované kmeny za kultivačních podmínek procházejí, jsou zobrazeny v příloze č.4.

Morfologie vláken při heterotrofním růstu za nepřístupu světla se výrazně odlišuje od morfologie vláken popisované v dřívějších publikacích (LAZAROFF 1960). U poloviny studovaných kmenů (*N. calcicola* III, *N. calcicola* VI, *N. edaphicum* X) se morfologie vláken při heterotrofním růstu vůbec nezměnila. U kmenů *N. muscorum* I, *N. muscorum* II, *N. elliposporum* V docházelo za heterotrofního růstu k rychlé tvorbě akinet. U kmenů *N. muscorum* I a II docházelo k jejich klíčení v krátká vlákna. Domnívám se, že dříve popisované aseriátní stádium (LAZAROFF 1960) je pouze vlákno složené z klíčících akinet (viz tabule č.1 a č.2) a nikoliv zvláštní druh vlákna vznikající pouze při heterotrofním růstu.

4.2. Nitrogenázová aktivita

Porovnání naměřených hodnot celkové nitrogenázové aktivity s publikovanými pracemi ve světové literatuře je poněkud obtížné. Především z toho důvodu, že pro uvedená měření byl použit přepočítaný NA přímo na váhu sušiny. Většina publikovaných prací dosud využívala pro určení množství biomasy jiných, zpravidla nepřímých charakteristik jako např. množství chlorofylu nebo množství proteinů. Pro velice hrubé porovnání je možná tato data zpětně přepočítat na celkovou biomasu, avšak přepočítání je zatíženo řadou chyb. Pro přepočítání hodnot nitrogenázové aktivity sedmi kmenů rodu *Nostoc* (JAYASANNKARI *et al.* 1984) z mg proteinů na celkovou hmotnost sušiny bylo vycházeno z předpokladu, že sušina sinic obsahuje 50% proteinů (FONTES *et al.* 1987). Porovnání naměřených výsledků s několika publikovanými pracemi je uvedeno v tabulce č.3.

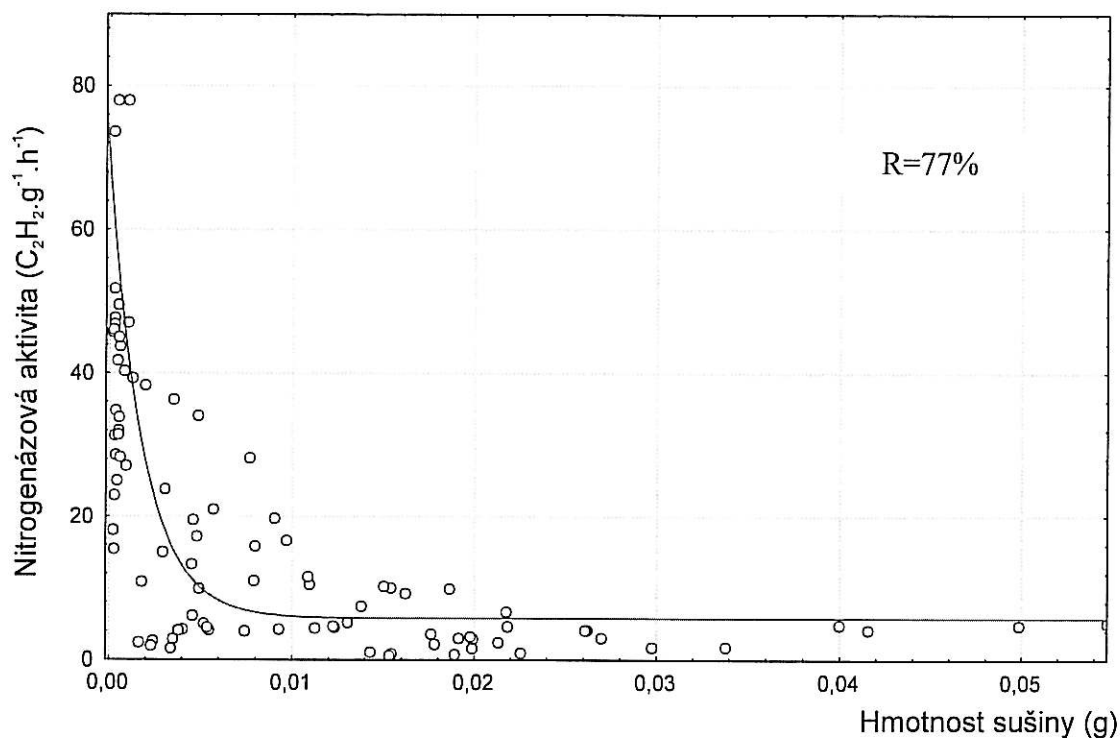
Tabulka č.3: Porovnání naměřených hodnot nitrogenázové aktivity u několika kmenů

Hrouzek (2001)		Jones (1989)*		Jayasankari <i>et al.</i> (1984) (b)		Yosida (1984)*	
Nitrogenázová aktivita ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{hod}^{-1}$)							
kmen	NA	kmen	NA	kmen	NA(a)	kmen	NA(a)
<i>N. muscorum I</i>	3,5 - 47,7	<i>N. commune</i>	2.75 - 5.65	<i>N. muscorum</i> ARM 211	10,4	<i>Nostoc</i> sp.	1,1
<i>N. muscorum II</i>	1,5 - 51,7			<i>N. muscorum</i>	16,1		
<i>N. calcicola III</i>	2,3 - 73,6			<i>N. carneum</i> ARM 211	58,1		
<i>N. calcicola VI</i>	0,5 - 49,4			<i>N. endophyllia</i> A 124	86,9		
<i>N. ellipsoforum V</i>	1,5 - 43,7			<i>N. ellipsoforum</i> A 127	46,7		
<i>N. edaphicum X</i>	4,0 - 77,9			<i>N. parameloides</i> A 620	93,0		
				<i>Nostoc</i> sp. MKU-1	56,0		

* - hodnoty byly získány měřením v terénu
(a) - jedná se o průměrné hodnoty nitrogenázové aktivity
(b) - hodnoty ARA byly původně vztaženy na mg proteinů, pro účel porovnání byly přepočteny na hmotnost sušiny

*tohle jasně jsou
některé další s
originále? Nechtěl jsem
př.*

Jak je patrné z hodnot v tabulce č.3 jsou naměřené hodnoty řádově srovnatelné s dříve publikovanými výsledky (JAYASANNKARI *et al.* 1984, JONES 1989, YOSIDA 1984). Nutno však dodat, že ve většině prací jsou uváděny průměrné hodnoty nitrogenázové aktivity. Navíc jsou tyto hodnoty získány měřením kultur jednoho stáří, nebo v krátkém časovém rozpětí. Při takovém postupu dochází, tedy alespoň podle výše uvedených výsledků, ke značnému zkreslení skutečného rozsahu hodnot, které NA u určitého kmene nabývají. Nitrogenázová aktivita kmene totiž zcela zřejmě závisí, zejména u sinic tvořících kolonie, na celkové biomase kolonie (viz graf č.4).



Graf č.2: Závislost nitrogenázové aktivity na celkové hmotnosti šušiny kolonie

Z grafu je patrný pokles nitrogenázové aktivity s narůstající biomasou kolonie. Tento strmý pokles je zřejmě dán vlastností sinic rodu *Nostoc* vytvářet velice kompaktní slizové kolonie a povlaky. Právě slizové obaly vláken a jejich seskupování do kolonií ovlivňuje výrazně difúzi plynů a pronikání světla do hlubších vrstev kolonie. Vlákná uložená hlouběji v kolonii pak zřejmě nemají kontakt s okolní atmosférou a tudíž nemohou fixovat vzdušný dusík. Špatnou propustnost plynů obaly vláken může dokumentovat též častý vznik vzduchových bublin na koloniích. Plyny vznikající v kolonii nemohou proniknou obaly, hromadí se a vytvářejí často až několik mm velké vzduchové bubliny na povrchu kolonií. Z výsledků nelineární regrese vyplývá, že exponenciální model vysvětluje variabilitu v naměřených hodnotách ze 77%. Je tedy zřejmé, že celková biomasa není jediných faktorem ovlivňujícím NA kolonie.

Je velmi zajímavé, že celková biomasa kolonie ovlivňuje nitrogenázovou aktivitu kolonie více než frekvence heterocytů. Zatímco totiž není statisticky významný rozdíl mezi průměrnými hodnotami NA kolonie, frekvence heterocytů je u jednotlivých kmenů poměrně stálá a výrazně se liší mezi kmeny (viz tab.č.2).

V neposlední řadě NA ovlivňuje momentální stav kolonie a fáze vývojového cyklu v níž se vlákna v kolonii nacházejí. Jednoznačně je tento vliv patrný z výsledků měření NA u kmene *N. muscorum II*. U kultur 21 dní starých byla průměrná NA nižší než u kultur 42 dní starých. Kolonie tohoto kmene byly v době měření po 21 dnech inkubace tvořeny krátkými, fragmentovanými vlákny, na nichž se začínaly diferencovat akinety. K takovému jevu, kdy celá kolonie byla homogenní, docházelo v průběhu měření zřídka. Při ostatních měřeních byla

morfologie vláken co do úrovně diferenciacie heterocytů a akinet velice heterogenní. Právě tato heterogenita kolonie je zřejmě dalším faktorem způsobujícím variabilitu v hodnotách NA.

Nutno dodat, že část variability v naměřených hodnotách NA je způsobena experimentálními chybami. Zejména při stanovování sušiny kolonie u mladých kultur mohlo dojít vlivem špatné manipulace při vážení ke vzniku chyb. Hmotnosti sušiny nejmladších kolonií byly na hranici vážitelnosti (0,00001 g). Proto výsledky NA mladých kolonií přepočtené na hmotnost mohou být zatíženy chybou až 30%.

5. Závěr

Sledované kmeny vláknitých sinic rodu *Nostoc* se z morfologického hlediska liší v několika charakteristikách. Rozdíly ve velikostech vegetativních buněk, heterocyt a akinet jsou statisticky průkazné, avšak natolik malé, že je nelze používat pro praktické odlišení kmenů. Pouze kmen *N. ellipso sporum* V se ve velikostech buněk od ostatních lišil výrazněji. Podstatnější rozdíly byly nalezeny v pozici a tvorbě heterocytů – především terminálních. Důležitou charakteristikou kmene je též frekvence heterocytů, která je u kmene poměrně stálá a výrazně se liší mezi kmeny. Zřejmě nejdůležitější rozdíly byly nalezeny ve změnách morfologie vláken a buněk v průběhu celého vývojového cyklu.

Průměrné hodnoty nitrogenázové aktivity se u sledovaných kmenů neliší. Nitrogenázová aktivita může u kmene nabývat poměrně velkého rozpětí hodnot od desetin do několika desítek $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$. Z naměřených dat je jednoznačně patrná závislost NA na stáří a tedy na celkové biomase kolonie. Zdá se, že tvar, morfologie kolonie a její biomasa ovlivňují nitrogenázovou aktivitu více než frekvence heterocytů kmene.

6. Literatura

- Adams D. A., Guggan P. S.** (1999): Heterocysts and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.* **144**: 3 – 33
- Allison, F. E., Hoover, S. R., Morris, H. J.** (1937): Physiological studies with *Nostoc muscorum*. *Bot. Gaz.* **98**: 433
- Anagnostidis, K., Komárek, J.** (1988): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4 – Nostocales, *Arch. Hydrobiol./Algol. Stud.* **56**: 247 - 345
- Attridge, E. T., Rowell, P.** (1997): Growth, heterocyst differentiation and nitrogenase activity in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Anabaena cylindrica* in response to molybdenum and vanadium. *New Phytol.* **135**: 517 – 526
- Drouet, F.** (1978): Revision of the Nostocaceae with constricted trichomes. *Beih. Nova Hedwigia*: 1 - 258
- Elenkin, A. A.** (1935): Ob osnových principach sistemy Cyanophyceae (Main principles of the system of Cyanophyceae). *Sov. bot. (Bot. Akad. Nauk SSSR)* **5**: 51-83.
- Fay, A. G.** (1969): Cell differentiation and pigment composition in *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* **67**: 62 - 70
- Fay, P., Cox, R. M.** (1967): Oxygen inhibition of nitrogen fixation in cell-free preparation of blue-green algae. *Biochem. biophys. Acta* **143**: 562 –569
- Fog, G. E.** (1949): Growth and heterocysts production in *Anabaena cylindrica* Lemm. II. in relation to carbon and nitrogen metabolism. *Ann. Bot. N.S.* **13**: 241 - 259
- Fontes, A. G., Vargas M. A., Moreno J., Guerrero M. G., Losada, M.** (1987): Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture. *Biomass* **13**: 33 – 43
- Geitler, L.** (1925): Cyanophyceae. *PASCHER'S Süßwasserflora* **12**: 1 –450
- Geitler, L.** (1932): Cyanophyceae. In: Rabenhorst's *Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* **14**: 1 - 1196
- Hardy, R. W. G., Burns, R. C., Holsten, R. D.** (1973): Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil. Biol. Biochem.* **5**: 47 - 81.
- Jayasankari, N., Shanmugasudaran, S.** (1985): Nitrogen fixation by *Nostoc* strains. *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.)*. Vol. **94**(1): 59 – 64
- Jones, K.** (1989): Interaction between desiccation and dark nitrogen fixation in tropical *Nostoc commune*. *New Phytol.* **113**: 1 – 6

- Kondrateva, N.** (1962): A new species of the blue-green algae – *Nostoc edaphicum*. Ukr. Bot. Ž. **19**(1): 58 – 65
- Kondrateva, N.** (1968): Sin'ó-zeleni vodorosti – Cyanophyta. Viznač. prisnov. Vodorost. Ukr. RSR **1**(2): 1 - 524
- Kentemich, T., Danneberg, G., Hundeshagen, B., Bothe, H.**, (1988): Evidence for the occurrence of the alternative, vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. FEMS Microbiology Letters **51**: 19 - 24
- Lazaroff, N.** (1966): Photoinduction and photoreversal of the Nostocacean developmental cycle. J. Phycol **2**: 7 – 17
- Lazaroff, N.** (1970): Experimental control of Nostocacean development. Papers to the First Int. Symp. on Tax. and Biol. of Blue-green algae – Madras: 521 – 544
- Lazaroff, N., Vishniac, W.** (1961): The effect of light on the developmental cycle of *Nostoc muscorum*, a filamentous blue-green alga. J. gen. Microbiol. **25**: 365 – 374
- Meeks, J. C., Elhai, J., Thiel, T., Potts, M., Larimer, F., Lamerdin J., Predki, P., Atlas, R.** (2001): An overview of the genome on *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium. Phot. Res. **70**: 85 – 106
- Mollenhauer, D.** (1970): Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Nostoc* I. – Abh. Senckenb. Naturf. Ges. **524**: 1 – 80
- Murry, M. A., Wolk, C. P.** (1989): Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope. Arch. Microbiol. **151**: 469 – 474
- Stewart, W. D. P.** (1969): Biological and ecological aspects of nitrogen fixation in free living micro-organisms. Proc. R. Soc. B **172**: 367 -388
- Stewart, W. D. P.** (1970): Heterocysts of blue-green algae. Papers to the First Int. Symp. on Tax. and Biol. of Blue-green algae – Madras: 227 – 235
- Starmach, K.** (1966): Cyanophyta – sinice. Flora słdkow. Polski **2**: 1 - 108
- Šimek, M.** (1993): Nitrogenáza – unikátní enzym fixátorů N₂. Biologické listy **58** (4): 241 – 258
- Šimek, M., Šantrůčková, H.** (1993): Metody studia fixace N₂. In: Metody studia přeměn dusíku v půdě, sborník příspěvků ze semináře, ÚPB AV ČR: 45 – 63
- Šimek, M., Vacek, V., Úlehlová, B.** (1987): Stanovení fixace dusíku u jetele plazivého (*Trifolium repens* L.). Rostlinná výroba **33**: 279 - 291
- Yoshida, S.** (1984): Algal nitrogen fixation in grassland. Journal of Jap. Soc. of Grassland Sci. Vol. **30**(2): 145 – 150

Příloha č.1: Primární data

kmen	označení	stáří (d)	fH (%)	pr.fH (%)	hm. suš. (g)	n ET	μmol ET/g(suš).hod
<i>N. muscorum I</i>	IA(1)	6	8,1		0,00035	2447	28,51
	IB(1)	6	7,3	6,6	0,00031	3699	47,68
	IC(1)	6	4,5		0,00030	1751	22,93
<i>N. muscorum II</i>	IIA(1)	6	9,5		0,00031	2375	31,24
	IIB(1)	6	4,1		0,00029	3281	46,75
	IIC(1)	6	5,9	7,1	0,00043	2724	24,97
	IID(1)	6	9,2		0,00020	2279	45,69
	IIE(1)	6	6,7		0,00030	3923	51,72
<i>N. calcicola agg. III</i>	IIIA(1)	6	11,9		0,00028	1085	15,38
	IIIB(1)	6	8,3		0,00023	1006	18,07
	IIIC(1)	6	27,4	15,1	0,00025	2833	46,05
	IIID(1)	6	12,7		0,00025	4606	73,62
	IIIE(1)	6	15,4		0,00035	2940	34,71
<i>N. ellipsosporum V</i>	VB(1)	6	5,6		0,00055	4711	33,76
	VC(1)	6	8,2	6,5	0,00061	6493	43,69
	VD(1)	6	5,1		0,00061	4207	28,21
	VE(1)	6	7,1		0,00129	12294	39,25
<i>N. calciloca agg. VI</i>	VIA(1)	6	23,6		0,00082	8199	40,23
	VIB(1)	6	16,2		0,00053	4042	31,93
	VIC(1)	6	15,8	17,3	0,00045	4948	41,69
	VID(1)	6	15,4		0,00055	6070	45,00
	VIF(1)	6	15,4		0,00050	6358	49,43
	<i>N. edaphicum agg. X</i>	XA(1)	6	21,7		0,00105	12694
XB(1)		6	21,7		0,00103	20428	77,90
XC(1)		6	21,7	21,7	0,00093	5904	27,01
XD(1)		6	21,7		0,00198	18964	38,27
XE(1)		6	21,7		0,00051	3907	13,00
<i>N. muscorum I</i>	IA(2)	21	7,5		0,00460	22519	19,50
	IB(2)	21	2,8	4,3	0,00571	30241	20,95
	IC(2)	21	3,8		0,00305	18572	23,76
	ID(2)	21	3,1		0,00179	4937	10,84
<i>N. muscorum II</i>	IIA(2)	21	6,7		0,00164	997	2,37
	IIB(2)	21	5,9	6,3	0,00241	1588	2,59
	IIC(2)	21	6,4		0,00339	1286	1,50
	IID(2)	21	6,0		0,00230	1082	1,87
<i>N. calcicola agg. III</i>	IIIA(2)	21	19,8		0,00293	10870	14,97
	IIIB(2)	21	15,8	15,4	0,00454	15102	13,29
	IIIC(2)	21	11,8		0,00493	12031	9,85
	IIID(2)	21	14,4		0,00458	7175	6,09
	IIIE(2)	21	14,3		0,00793	21757	11,00
	IIIF(2)	21	16,4		0,00799	33301	15,82
<i>N. ellipsosporum V</i>	VA(2)	21	4,0		0,00486	41759	33,99
	VB(2)	21	3,7	3,5	0,00354	32429	36,24
	VC(2)	21	2,9		0,01125	12408	4,36
	VD(2)	21	3,6		0,00905	45043	19,69
	VE(2)	21	3,4		0,00481	20900	17,19
<i>N. calciloca agg. VI</i>	VIA(2)	21	16,4		0,01096	28978	10,46
	VIB(2)	21	16,2	16,2	0,01088	31806	11,56
	VIC(2)	21	15,8		0,00929	9844	4,19
	VID(2)	21	16,4		0,01304	16929	5,14
	VIE(2)	21	15,7		0,01380	25779	7,39
	VIF(2)	21	16,4		0,01542	38920	9,98
<i>N. edaphicum agg. X</i>	XA(2)	21	19,8		0,01622	37501	9,21
	XB(2)	21	19,8	19,8	0,02176	35901	6,61
	XC(2)	21	19,8		0,01504	38396	10,17
	XD(2)	21	19,8		0,00767	54085	28,08
	XE(2)	21	19,8		0,01863	47221	9,82

kmen	označení	stáří (d)	fH (%)	pr.fH (%)	hm. suš. (g)	n ET	μmol ET/g(suš).hod
<i>N. muscorum I</i>	IA(3)	42	8,8		0,00405	4398	4,22
	IB(3)	42	12,1	10,2	0,00520	6672	4,99
	IC(3)	42	7,7		0,01233	14660	4,46
	ID(3)	42	11,7		0,01763	15228	3,49
	IE(3)	42	10,7		0,00742	7483	3,92
<i>N. muscorum II</i>	IIA(3)	42	10,9		0,00547	5409	4,08
	IIB(3)	42	6,7	7,2	0,01224	14756	4,62
	IIC(3)	42	5,9		0,00970	40026	16,58
	IID(3)	42	6,4		0,00381	4090	4,06
	IIE(3)	42	6,0		0,00352	2643	2,86
<i>N. calcicola agg. III</i>	IIIA(3)	42	11,0		0,01915	13991	2,92
	IIIB(3)	42	8,1	10,6	0,02622	27888	4,02
	IIIC(3)	42	8,0		0,02700	20882	2,98
	IIID(3)	42	6,8		0,00538	6090	4,49
	IIIE(3)	42	13,2		0,02133	12288	2,34
	IIIF(3)	42	16,5		0,01993	13830	2,82
<i>N. ellipsosporum V</i>	VA(3)	42	8,5		0,01782	9370	2,12
	VB(3)	42	4,7	4,6	0,01988	7868	1,54
	VC(3)	42	3,3		0,02183	25239	4,55
	VE(3)	42	2,8		0,03380	15557	1,70
	VF(3)	42	3,7		0,02976	12741	1,66
<i>N. calciloca agg. VI</i>	VIA(3)	42	17,6		0,01893	3209	0,69
	VIB(3)	42	13,1	12,0	0,01430	3478	0,99
	VIC(3)	42	10,5		0,01546	2906	0,77
	VID(3)	42	10,9		0,02255	5232	0,91
	VIE(3)	42	9,7		0,01534	1861	0,50
	VIF(3)	42	10,5		0,01978	16049	3,15
<i>N. edaphicum agg. X</i>	XA(3)	42	21,7		0,04987	61946	4,73
	XB(3)	42	21,7	21,7	0,03999	48779	4,77
	XC(3)	42	21,7		0,05473	68484	5,03
	XD(3)	42	21,7		0,02610	27472	4,03
	XE(3)	42	21,7		0,04158	43472	4,09

fH (%)

frekvence heterocytů vyjádřená v procentech

prům. fH (%)

průměrná frekvence heterocytů vyjádřená v procentech

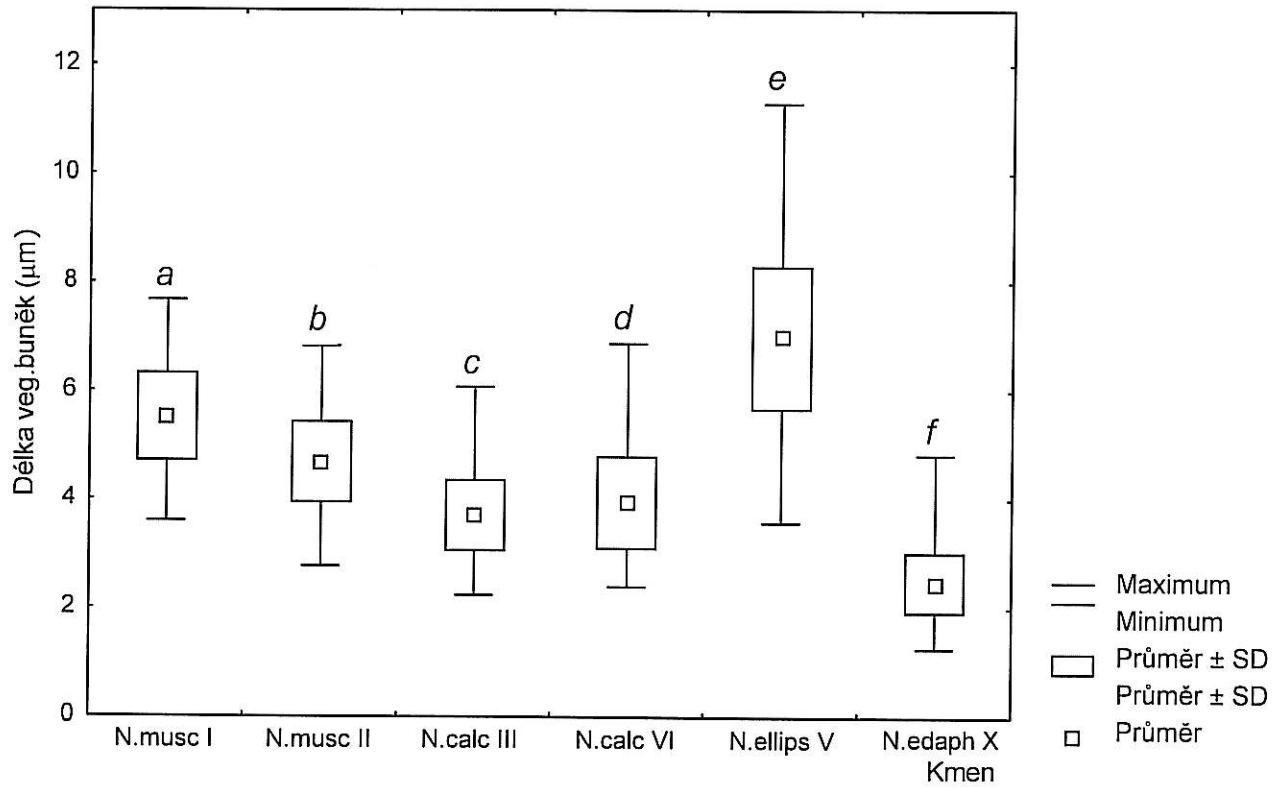
n ET

množství ethylenu v baňce

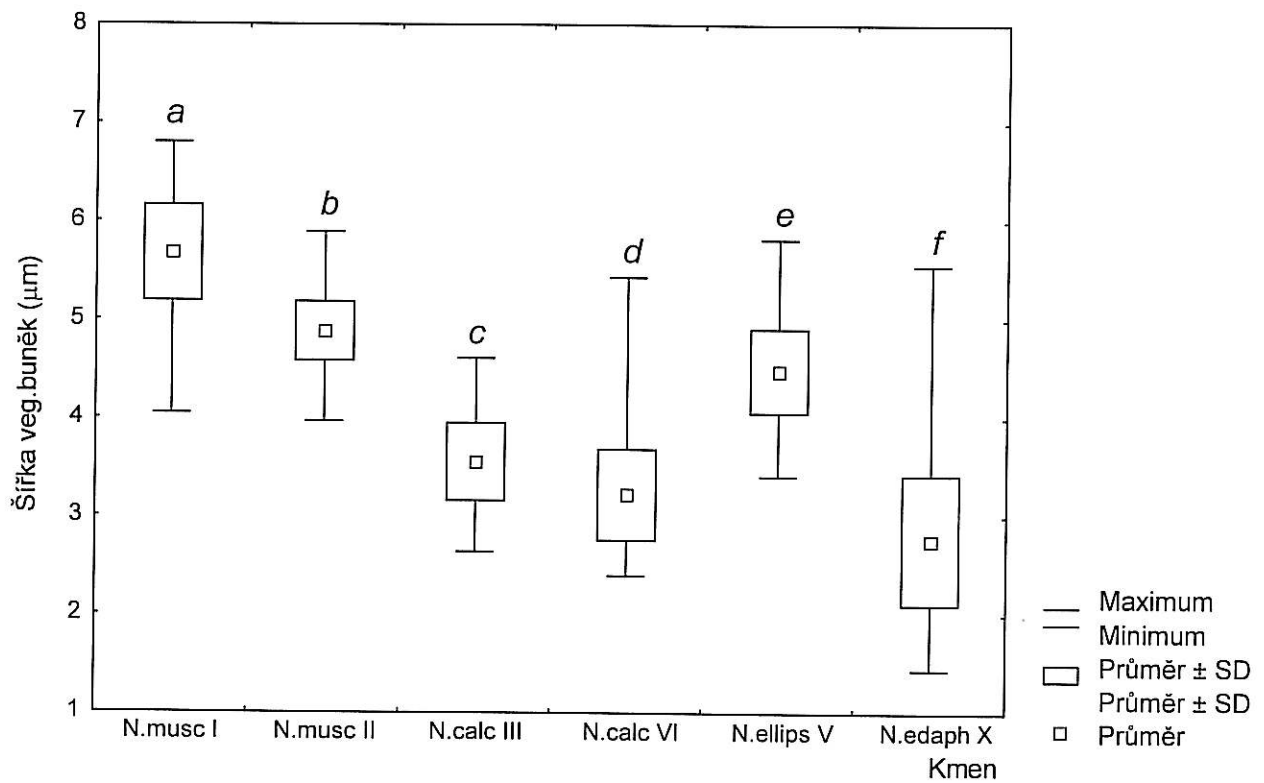
μmol ET/g(suš)/hod

množství redukovaného ethylenu přepočtené na 1g suché biomasy za 1 h. inkub

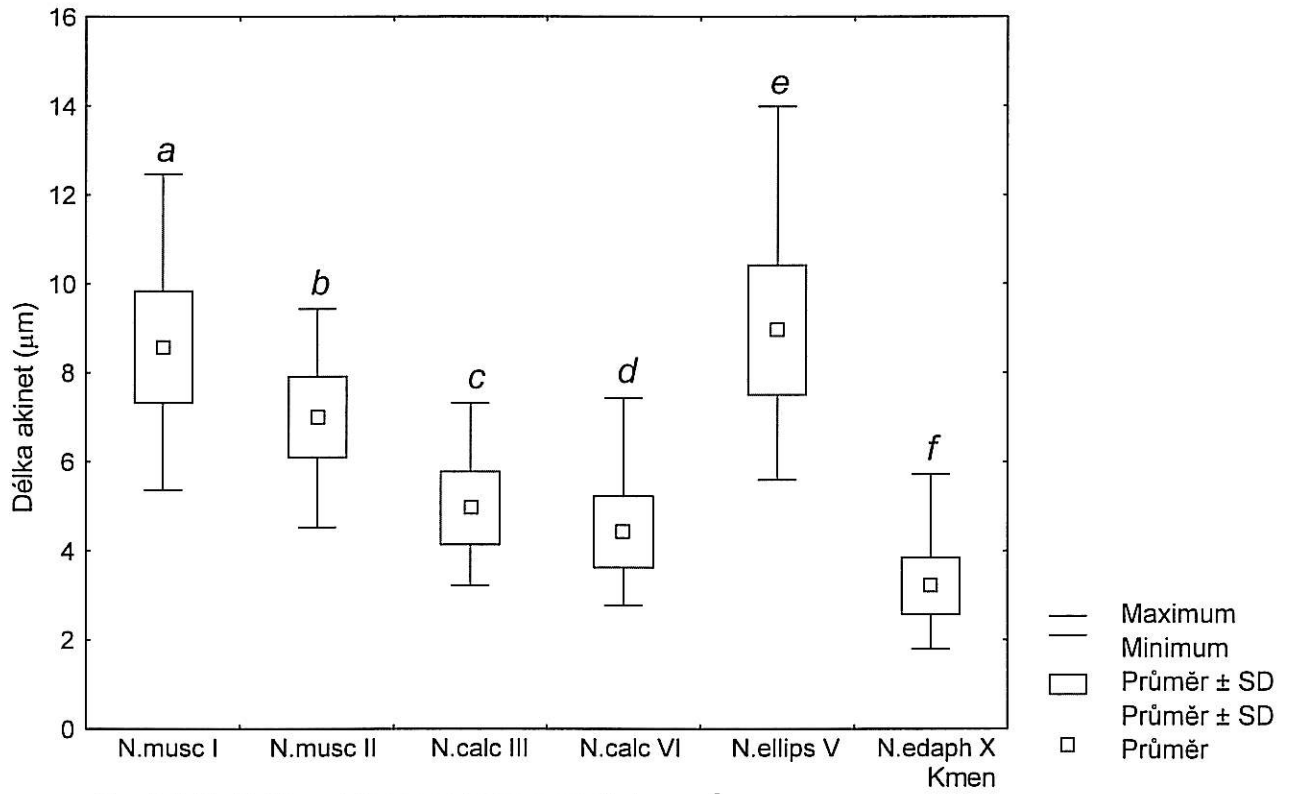
Příloha č.2: Grafy



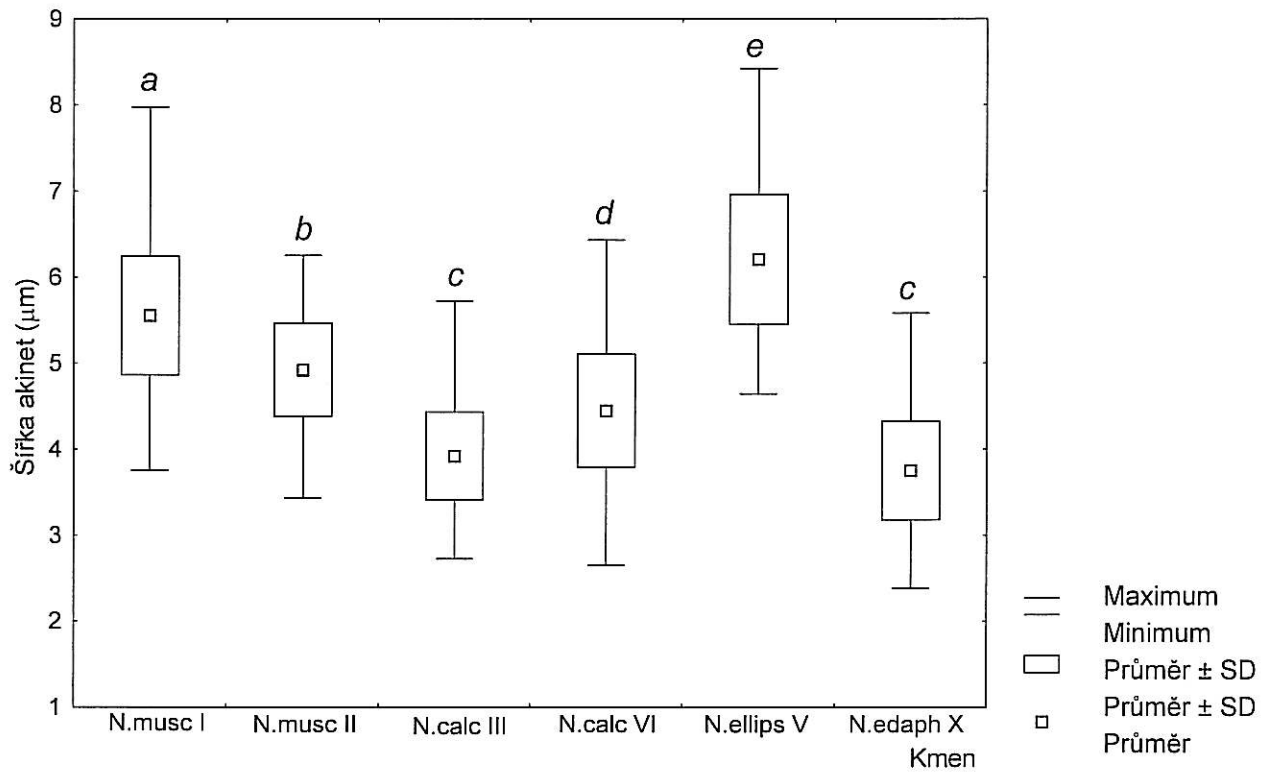
Graf č.3: Délka vegetativních buněk u sledovaných kmenů



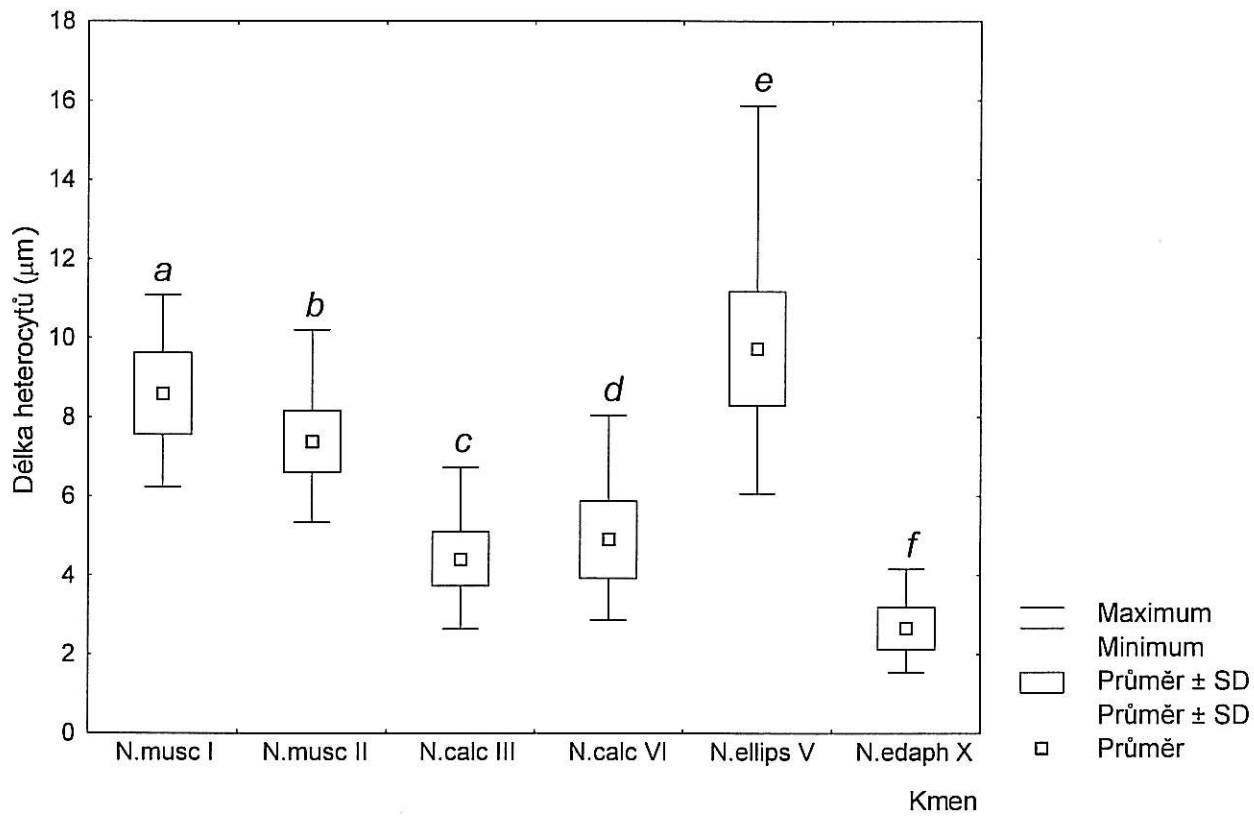
Graf č.4: Šířka vegetativních buněk u sledovaných kmenů



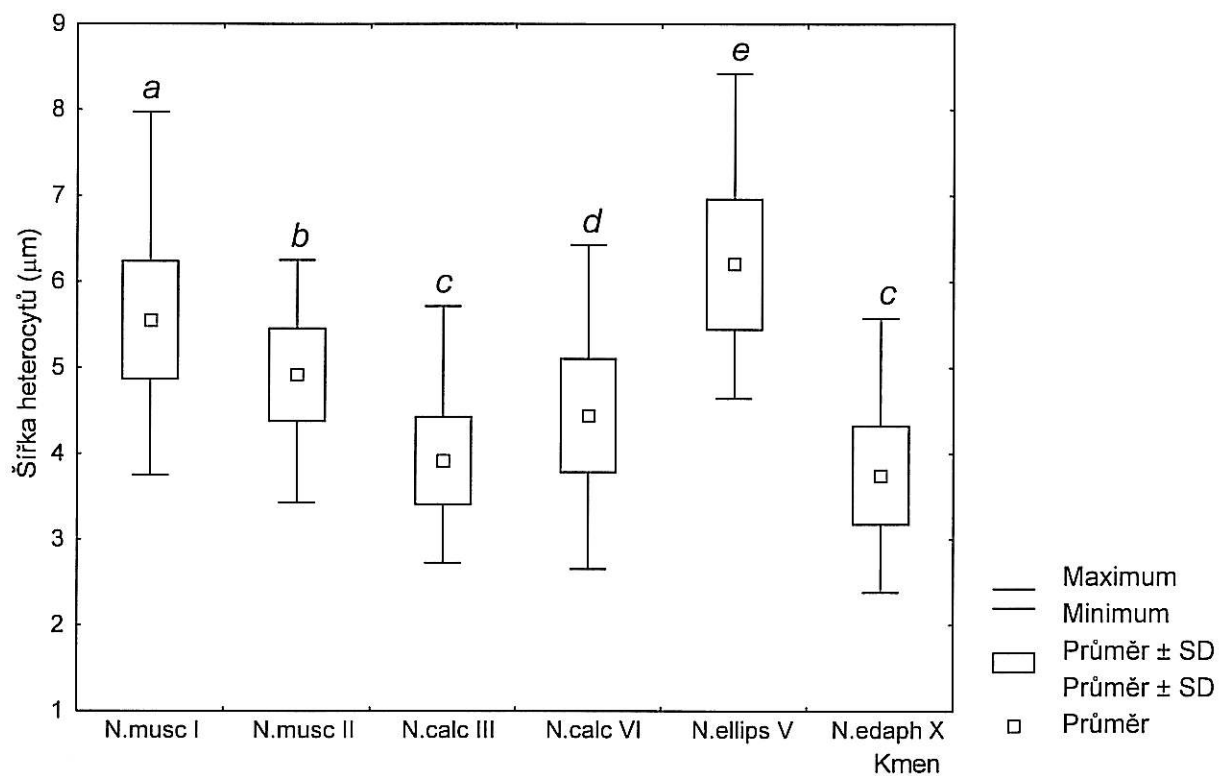
Graf č.5: Délka akinet u sledovaných kmenů



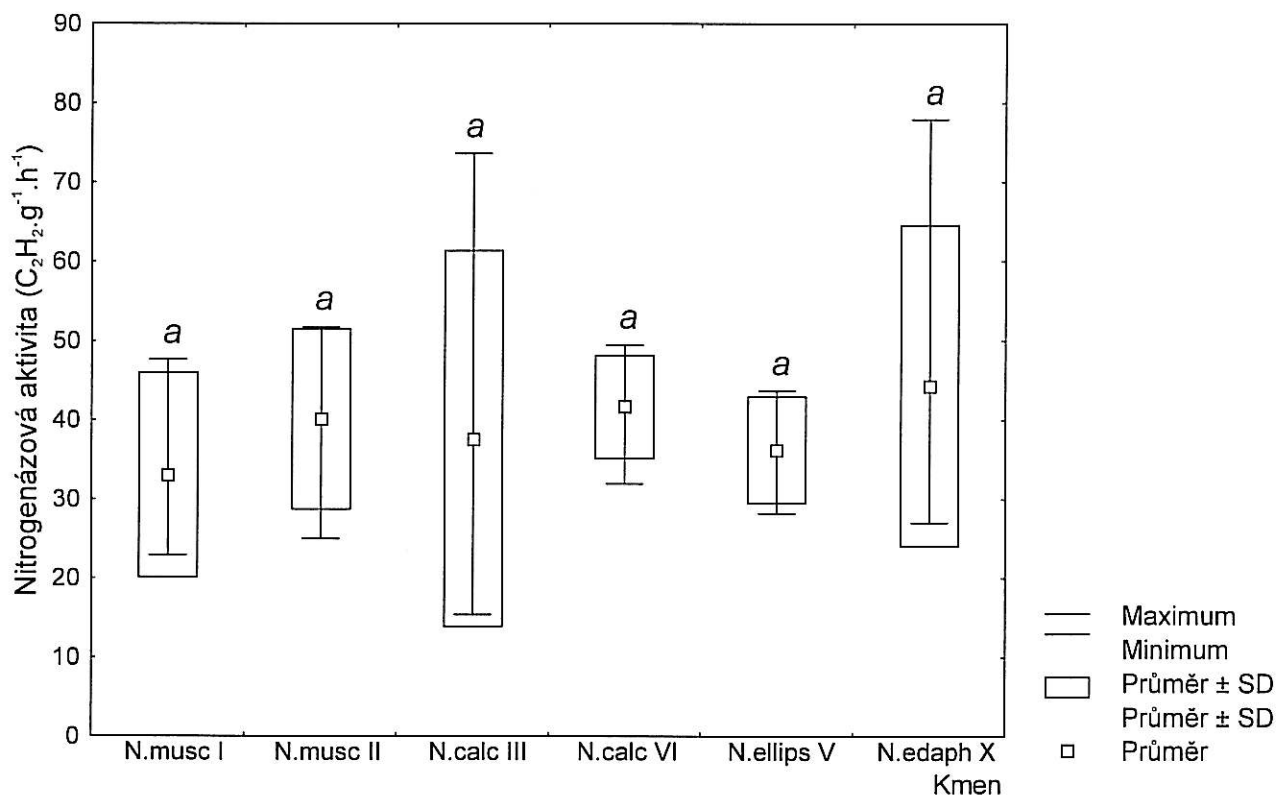
Graf č.6: Šířka akinet u sledovaných kmenů



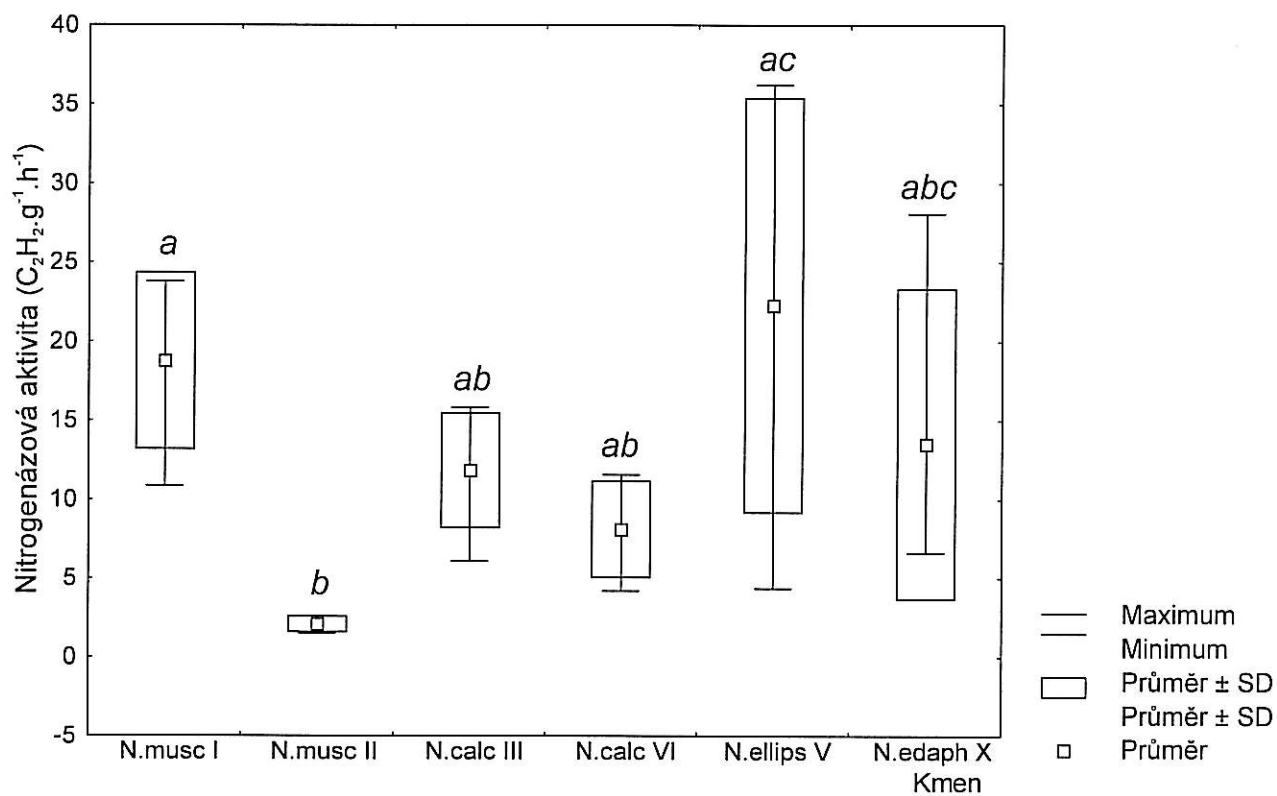
Graf č.7: Délka heterocytů u sledovaných kmenů



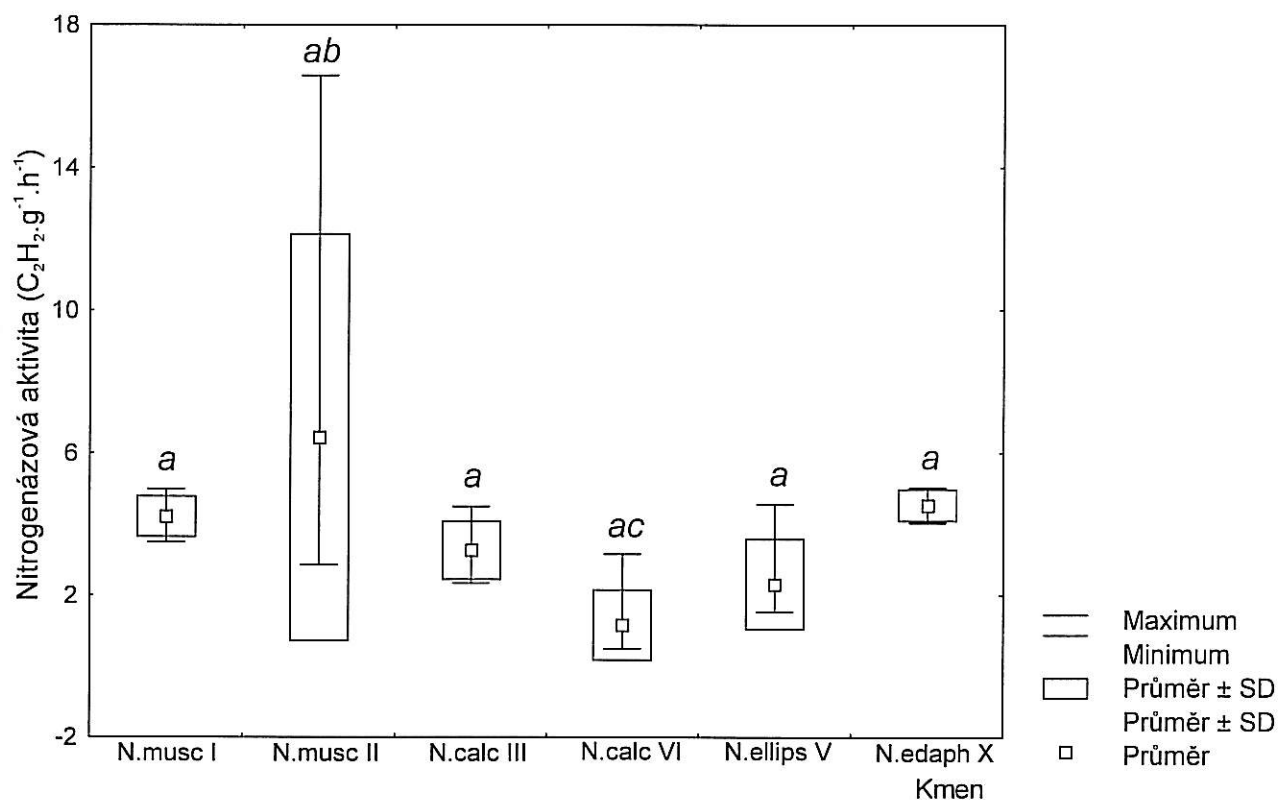
Graf č.8: Délka heterocytů u sledovaných kmenů



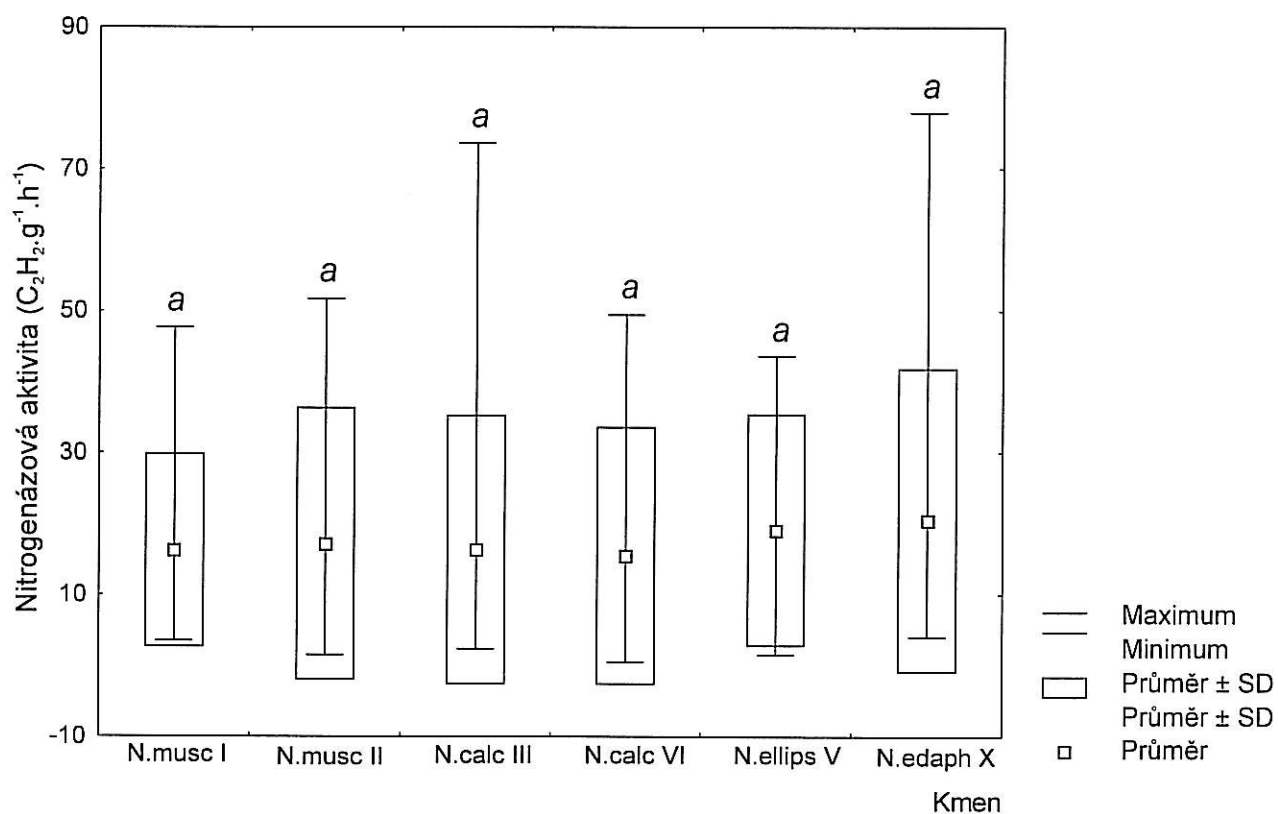
Graf č.9: Nitrogenázová aktivita 6 dní starých kultur



Graf č.10: Nitrogenázová aktivita 22 dní starých kultur

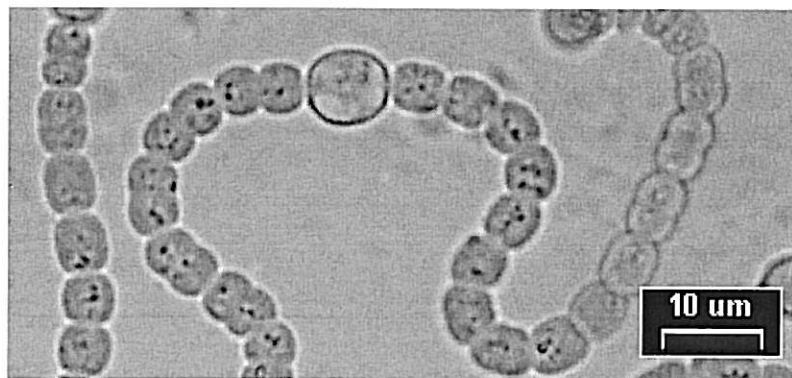


Graf č.11: Nitrogenázová aktivita 42 dní starých kultur

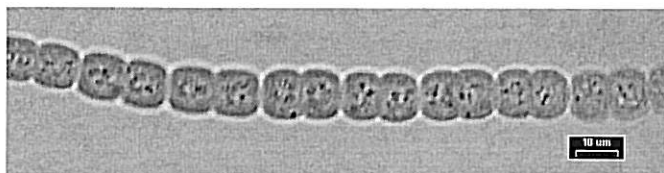


Graf č.12: Nitrogenázová aktivita sledovaných kmenů (6, 21, 42 dní)

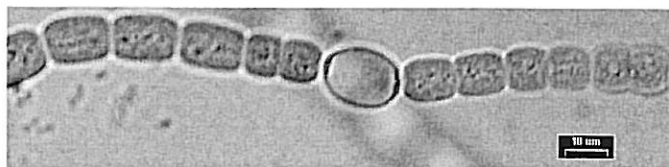
Příloha č.3: Fotografie



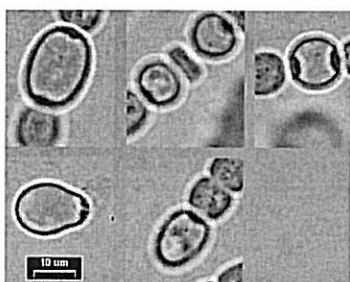
Obr.č.1: vegetativní vlákno s interkalárním heterocytem



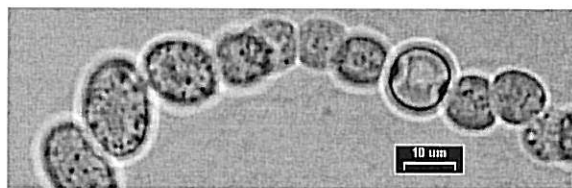
Obr.č.2: mladé, dělicí se vegetativní vlákno



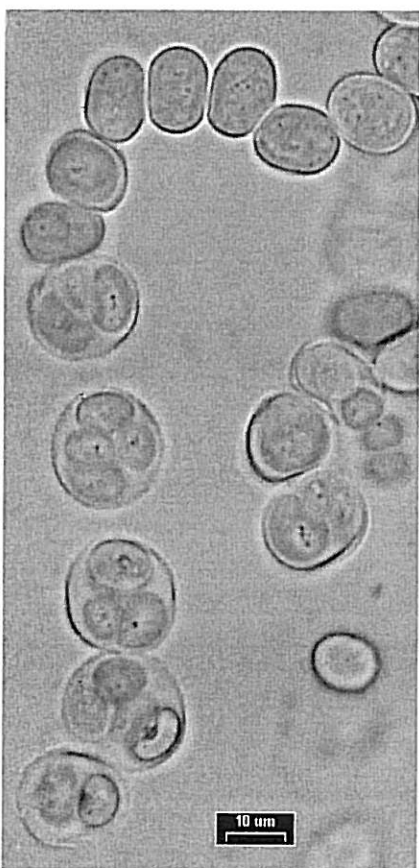
Obr.č.3: vegetativní vlákno s interkalárním heterocytem



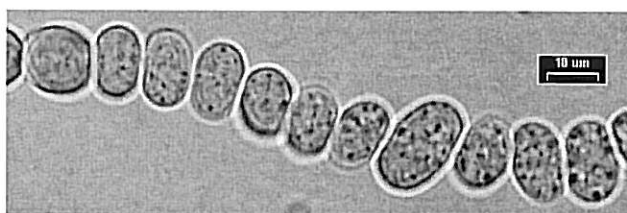
Obr.č.4: různé tvary terminálních a interkalárních heterocytů



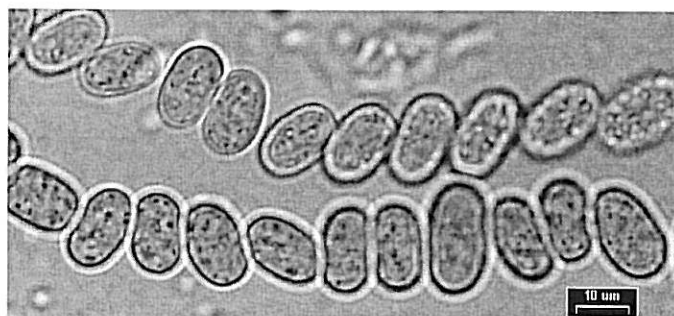
Obr.č.5: postupná diferenciacie akinet



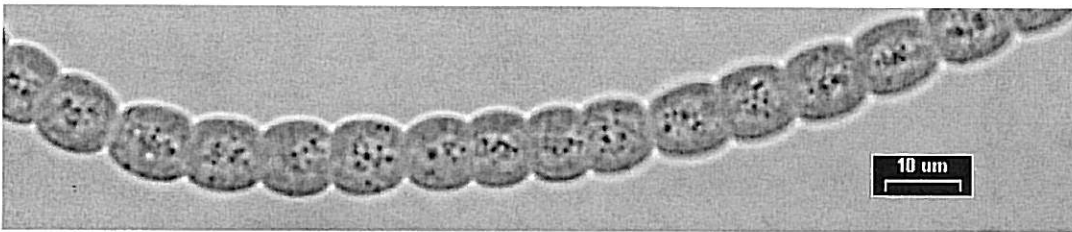
Obr.č.6: ke klíčení akinet dochází často ještě ve vláknech



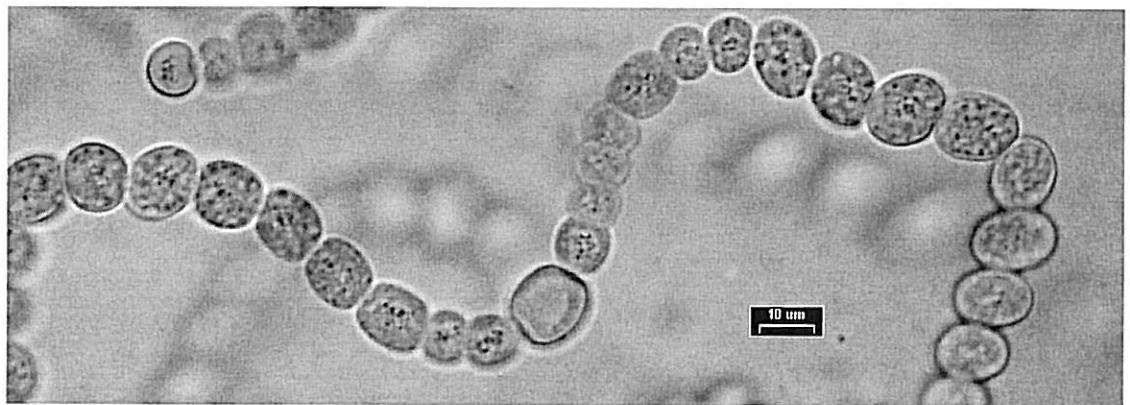
Obr.č.7: akinety



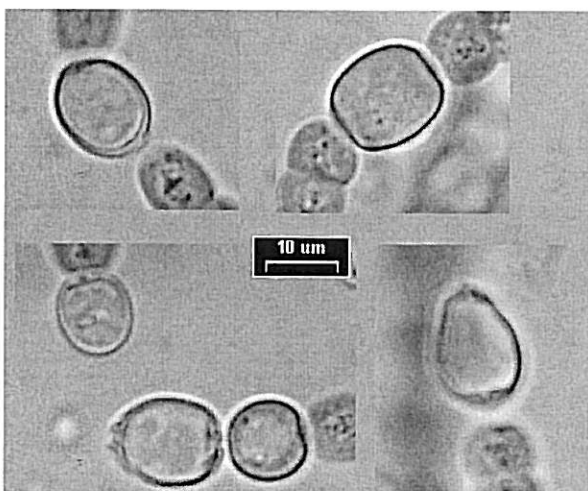
Obr.č.8: akinety



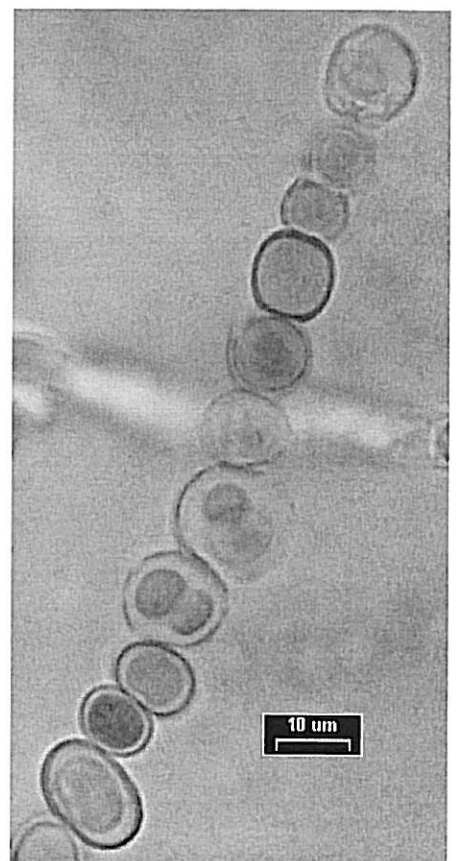
Obr.č.1: mladé vegetativní vlákno



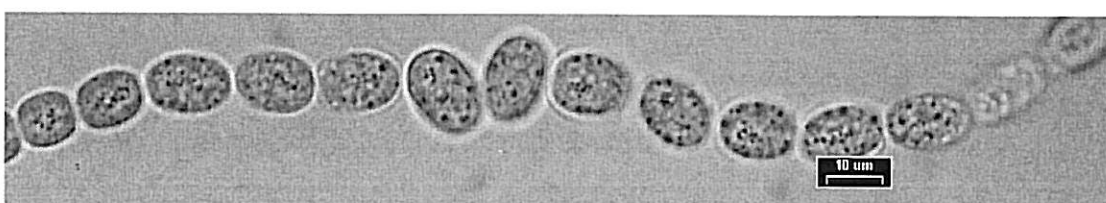
Obr.č.2: vegetativní vlákno s interkalárním heterocytem a akinetami



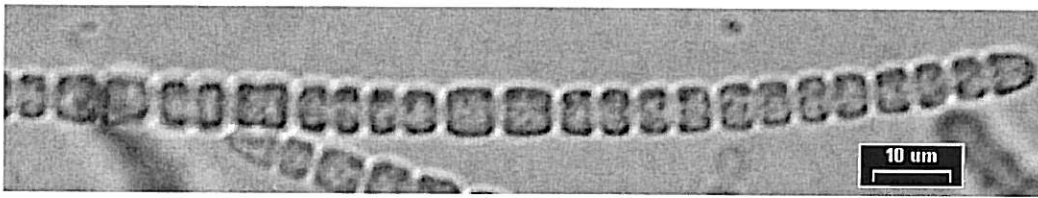
Obr.č.3: interkalární heterocyty



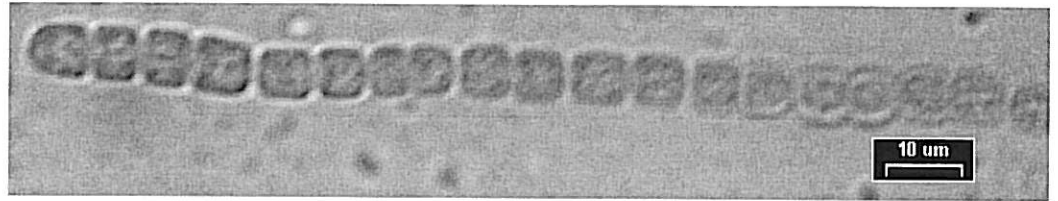
Obr.č.4: morfologie vlákna při heterotrofním růstu



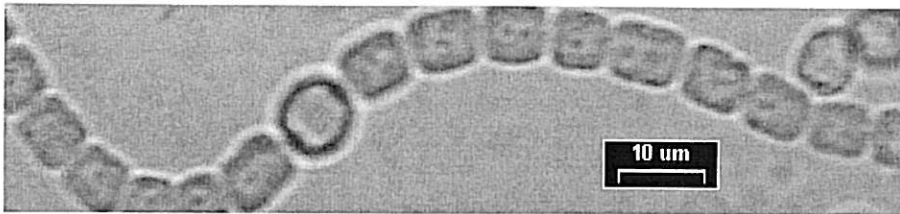
Obr.č.5: akinety



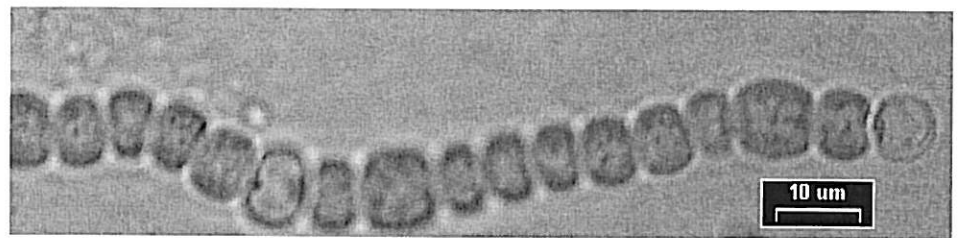
Obr.č.1: rovná vegetativní vlákna



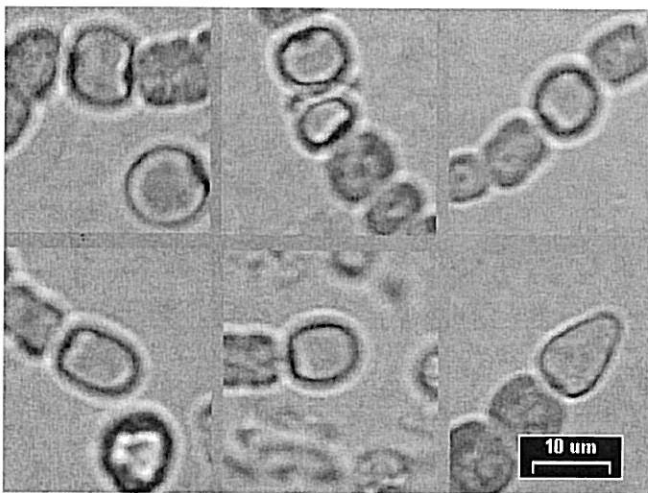
Obr.č.1: rovná vegetativní vlákna



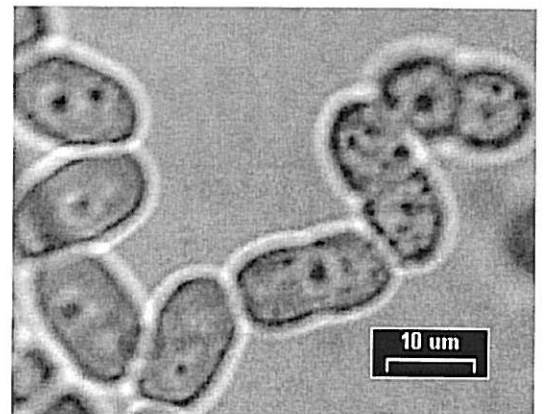
Obr.č.3: interkalární heterocyt na rovném vegetativním vláknu



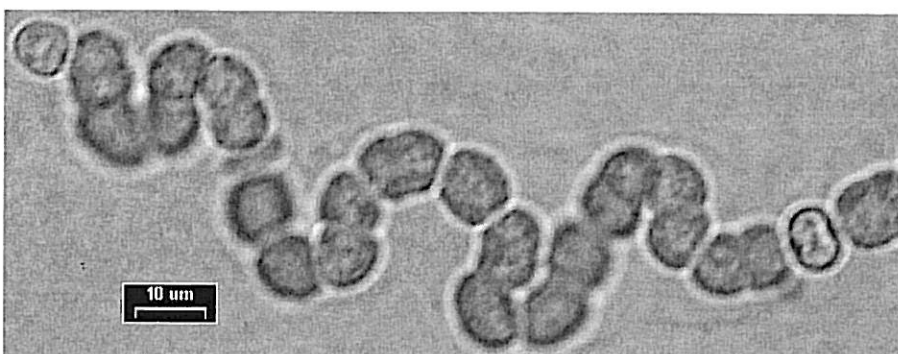
Obr.č.4: vegetativní buňky se výrazně rozšiřují a tmavnou



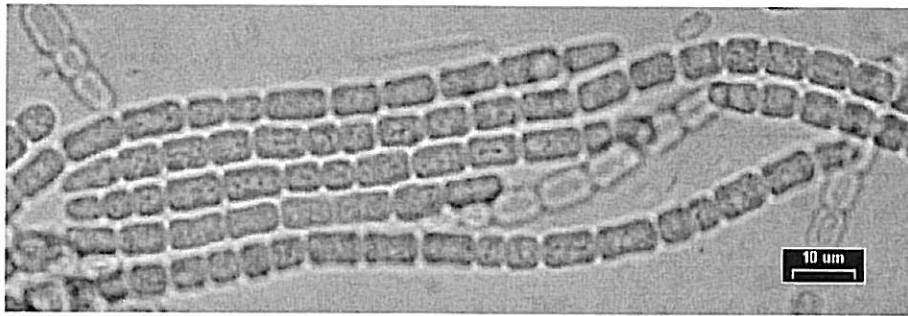
Obr.č.5: variabilita interkalárních a terminálních heterocytů



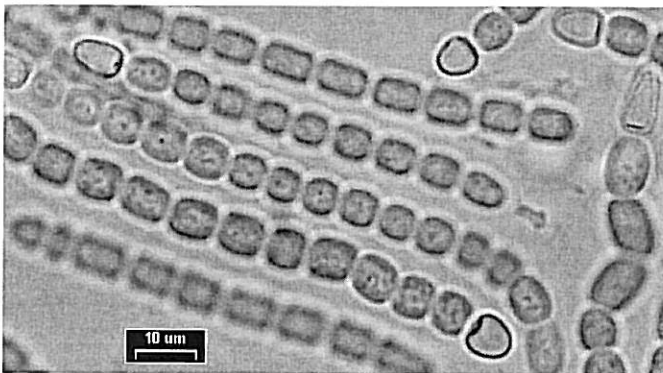
Obr.č.6: zvětšené vegetativní buňky



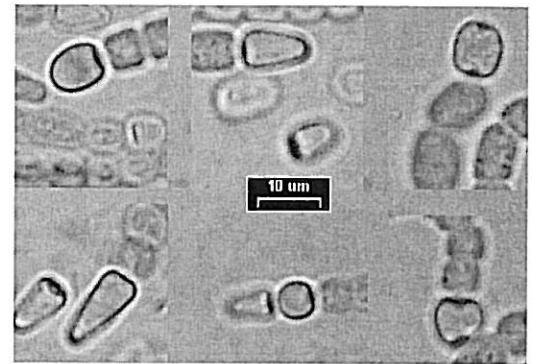
Obr.č.7: vegetativní vlákno se slizovým obalem obalem



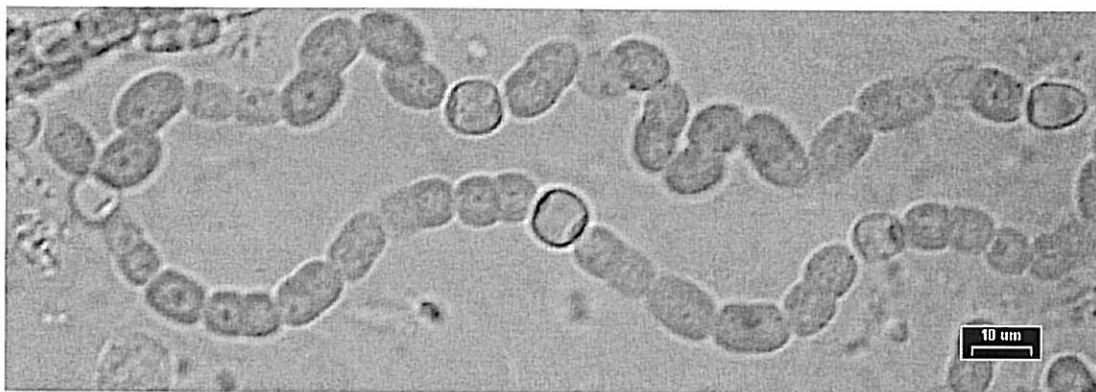
Obr.č.1: rovná vegetativní vlákna



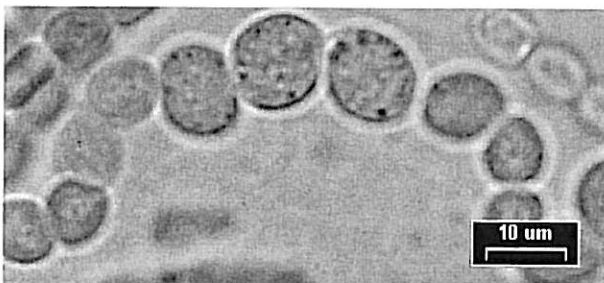
Obr.č.2: tvorba terminálních heterocytů na koncích rovných vláken



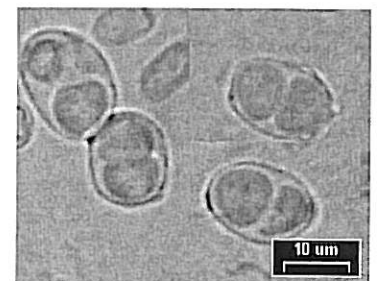
Obr.č.3: Tvar terminálních a interkalárních heterocytů



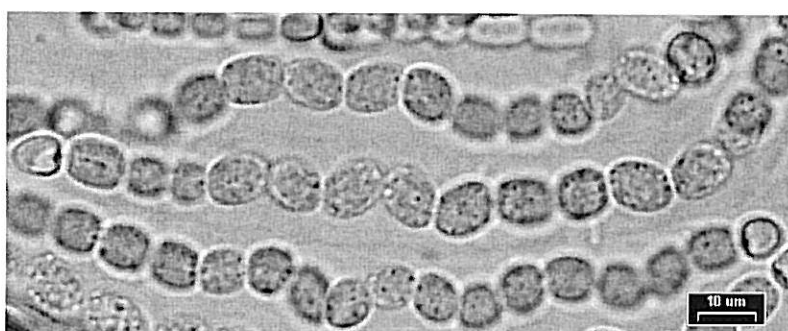
Obr.č.4: vegetativní vlákna s terminálními a interkalárními heterocyty



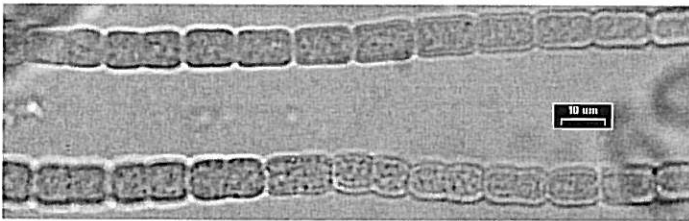
Obr.č.5: tvorba akinet



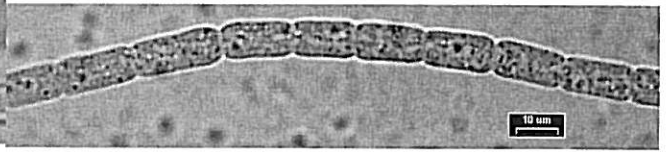
Obr.č.7: klíčení akinet



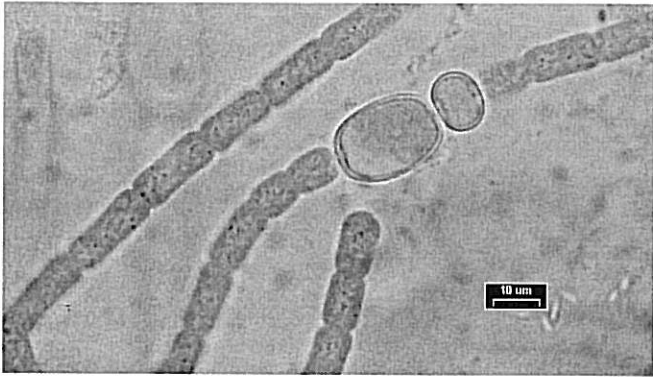
Obr.č.6: akinety



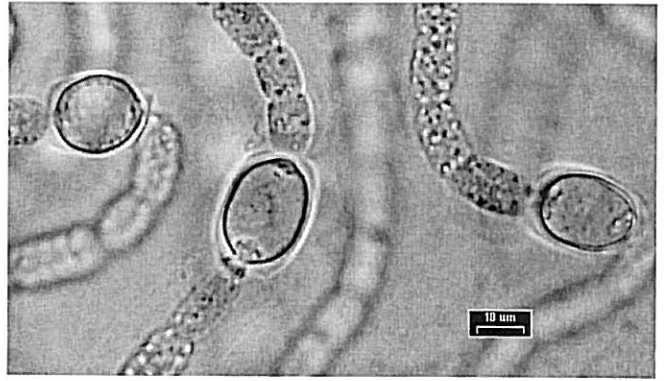
Obr.č.1: vegetativní vlákna s dělčími se veg. buňkami



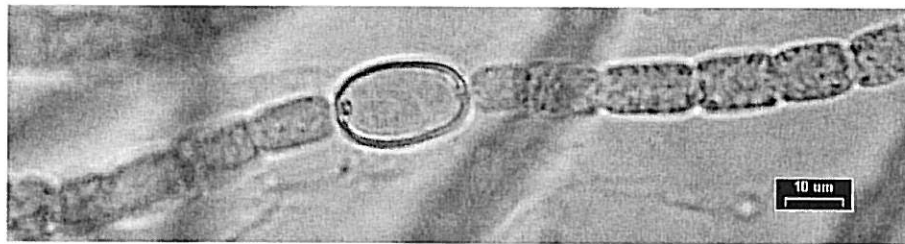
Obr.č.2: mladé vegetativní vlákno



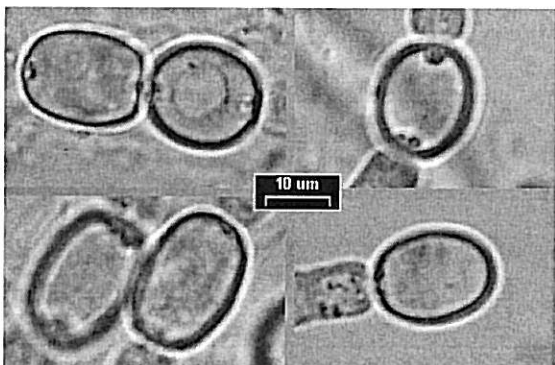
Obr.č.3: tvorba sousedících heterocytů



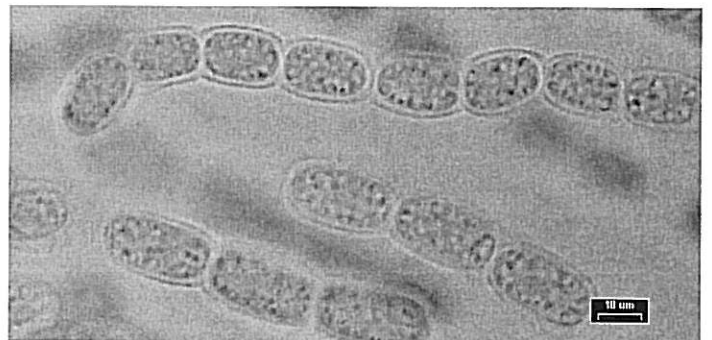
Obr.č.4: vegetativní vlákna s interkalárními heterocyty



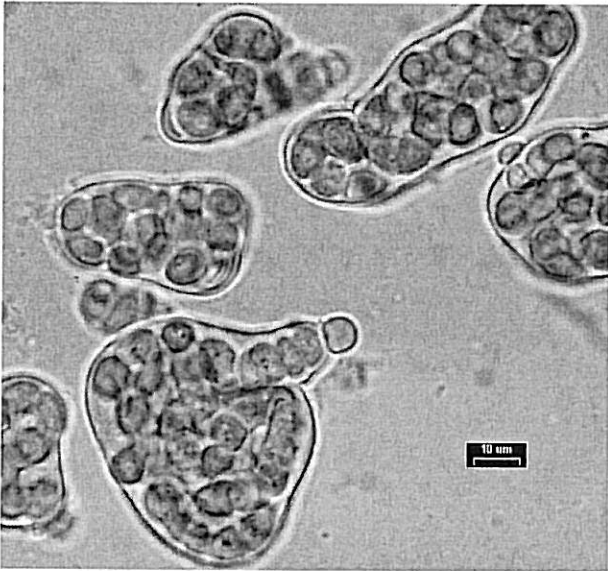
Obr.č.5: vegetativní vlákno s interkalárním heterocytem, dobře jsou patrné slizové obaly vlákn



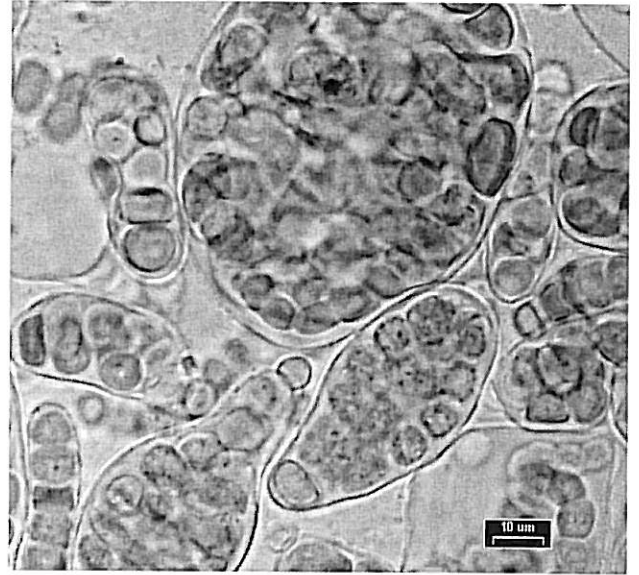
Obr.č.6: různé tvary terminálních a interkalárních heterocytů



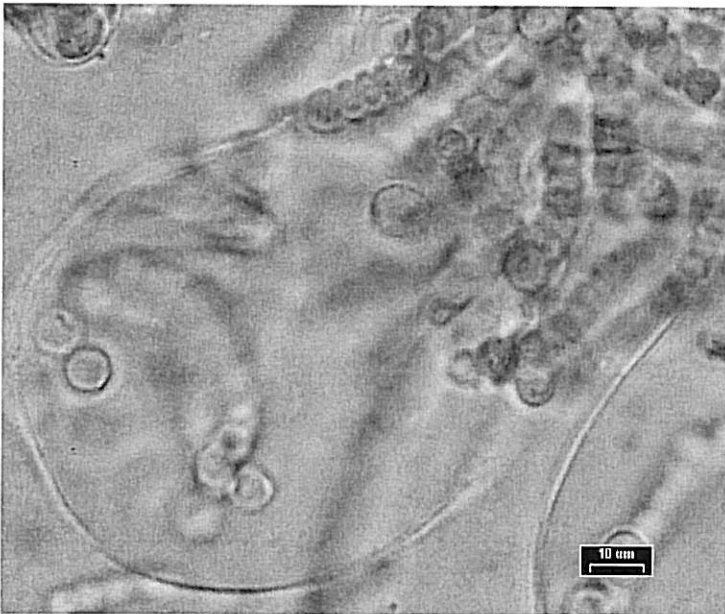
Obr.č.7: akinety



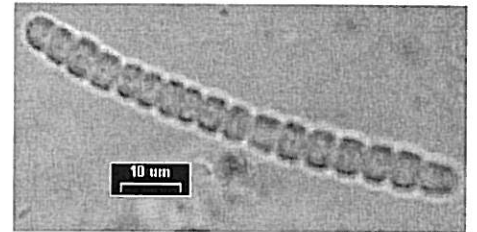
Obr.č.1: vegetativní vlákna v silném slizovém obalu



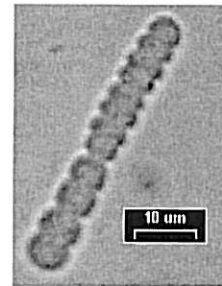
Obr.č.2: vegetativní vlákna v silném slizovém obalu



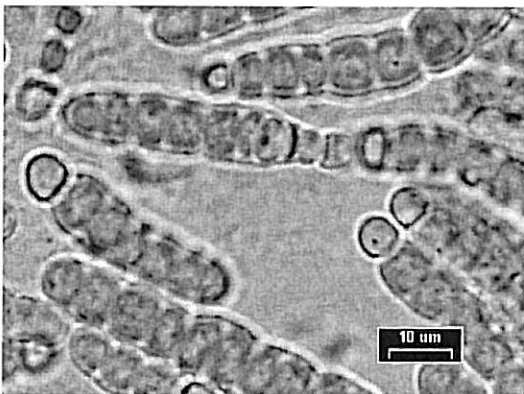
Obr.č.3: fragmentace vláken u heterocyt a tvorba hormogonií



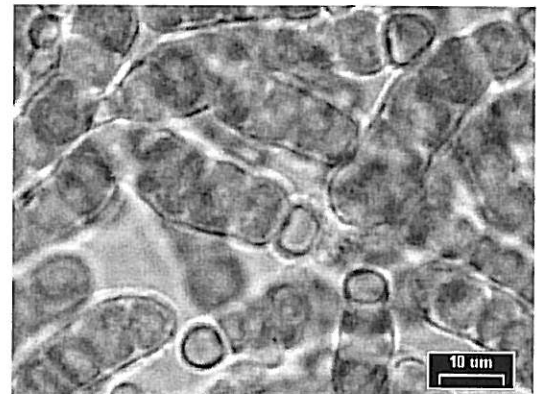
Obr.č.4: hormogonium



Obr.č.5: hormogonium

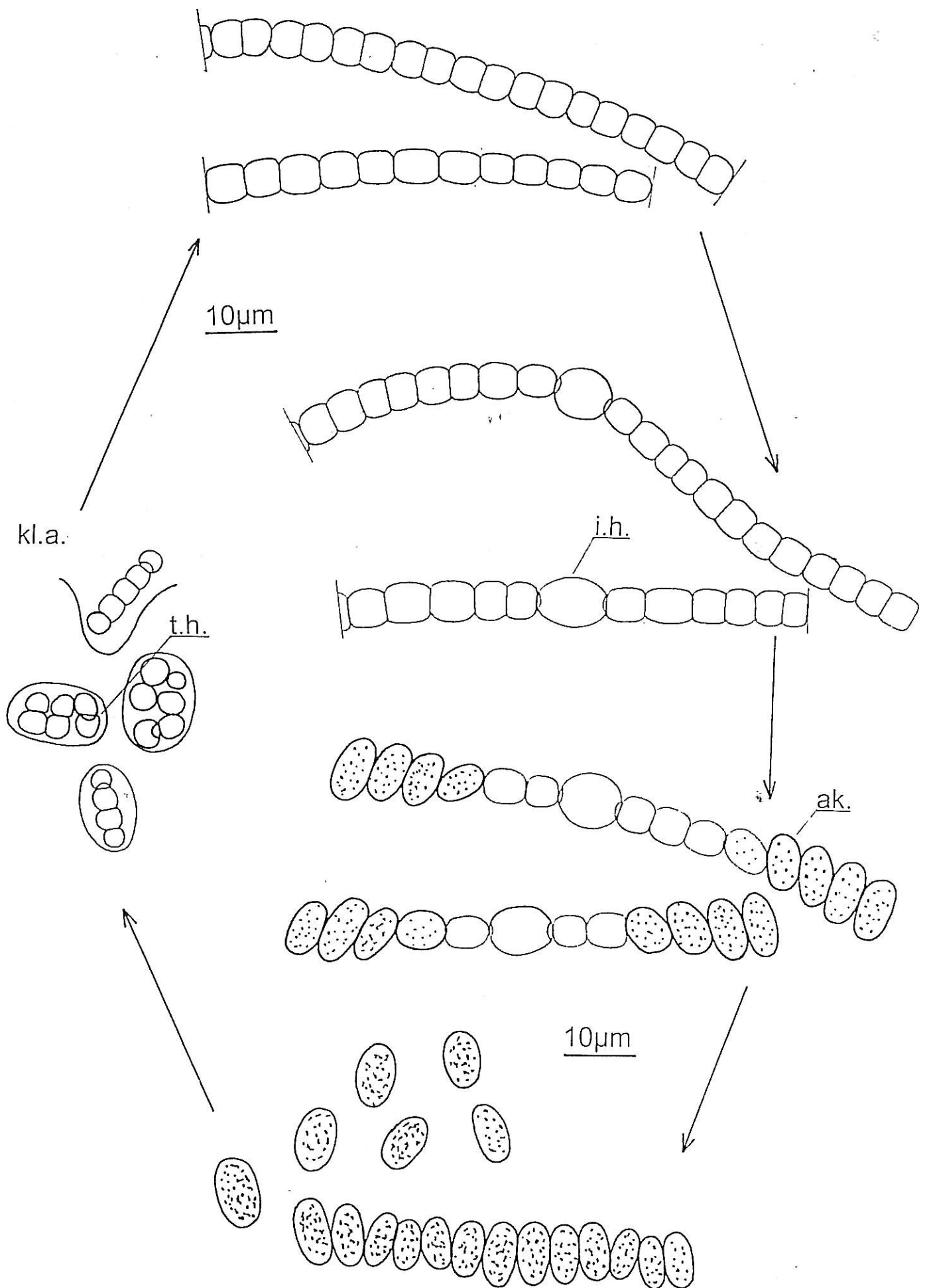


Obr.č.6: růst nových vegetativních vláken

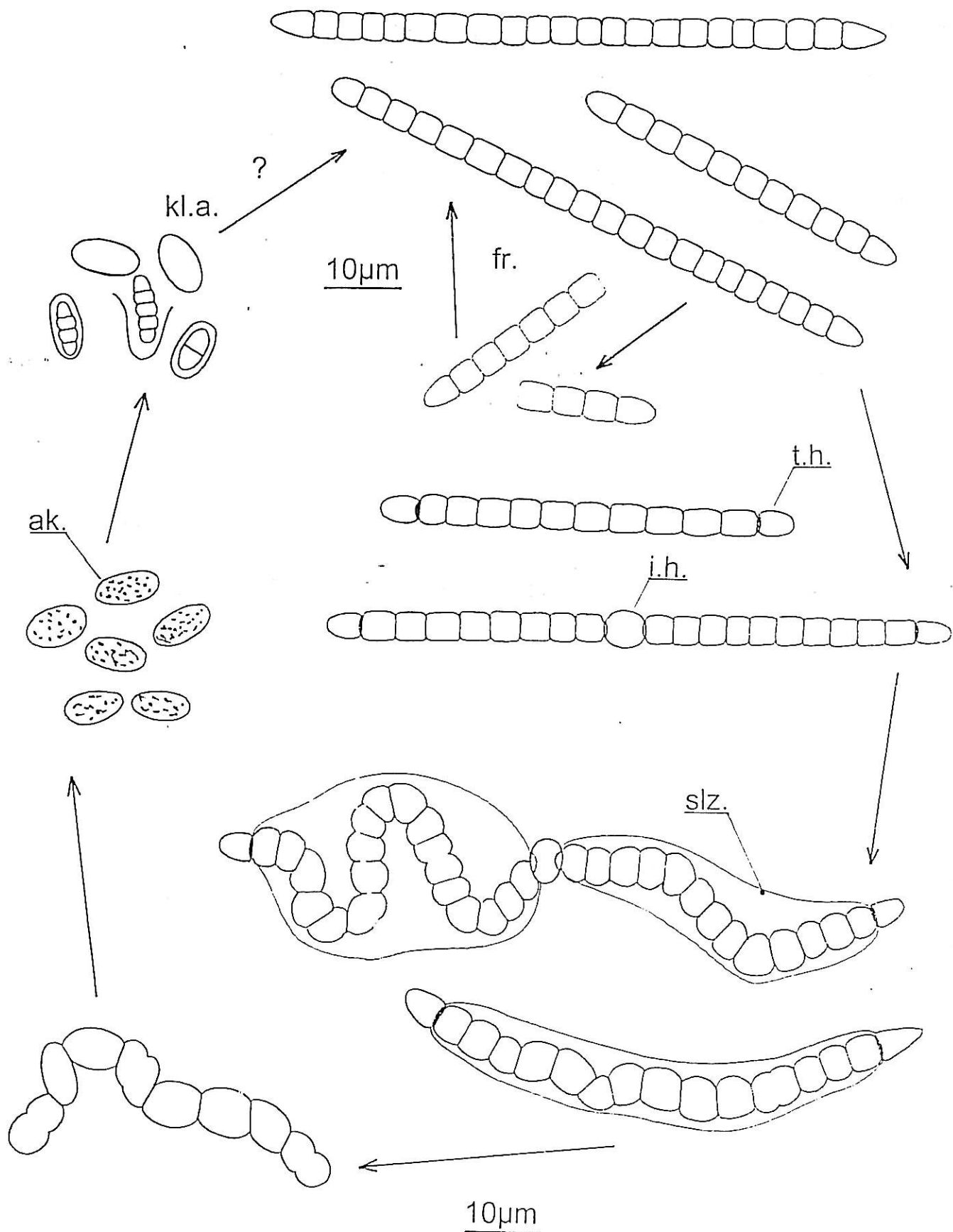


Obr.č.7: růst nových vegetativních vláken

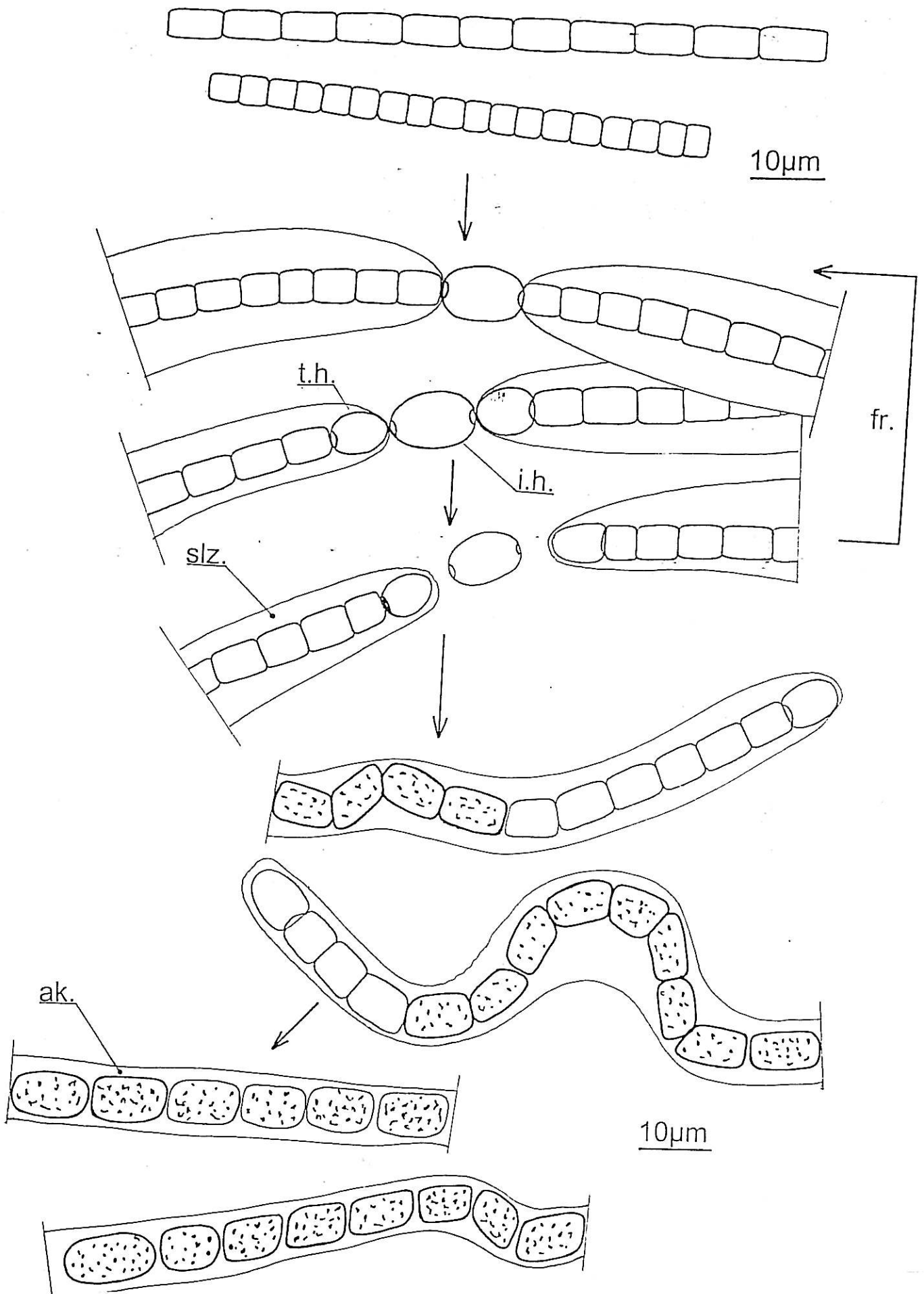
Příloha č.4: Vývojové cykly
sledovaných kmenů



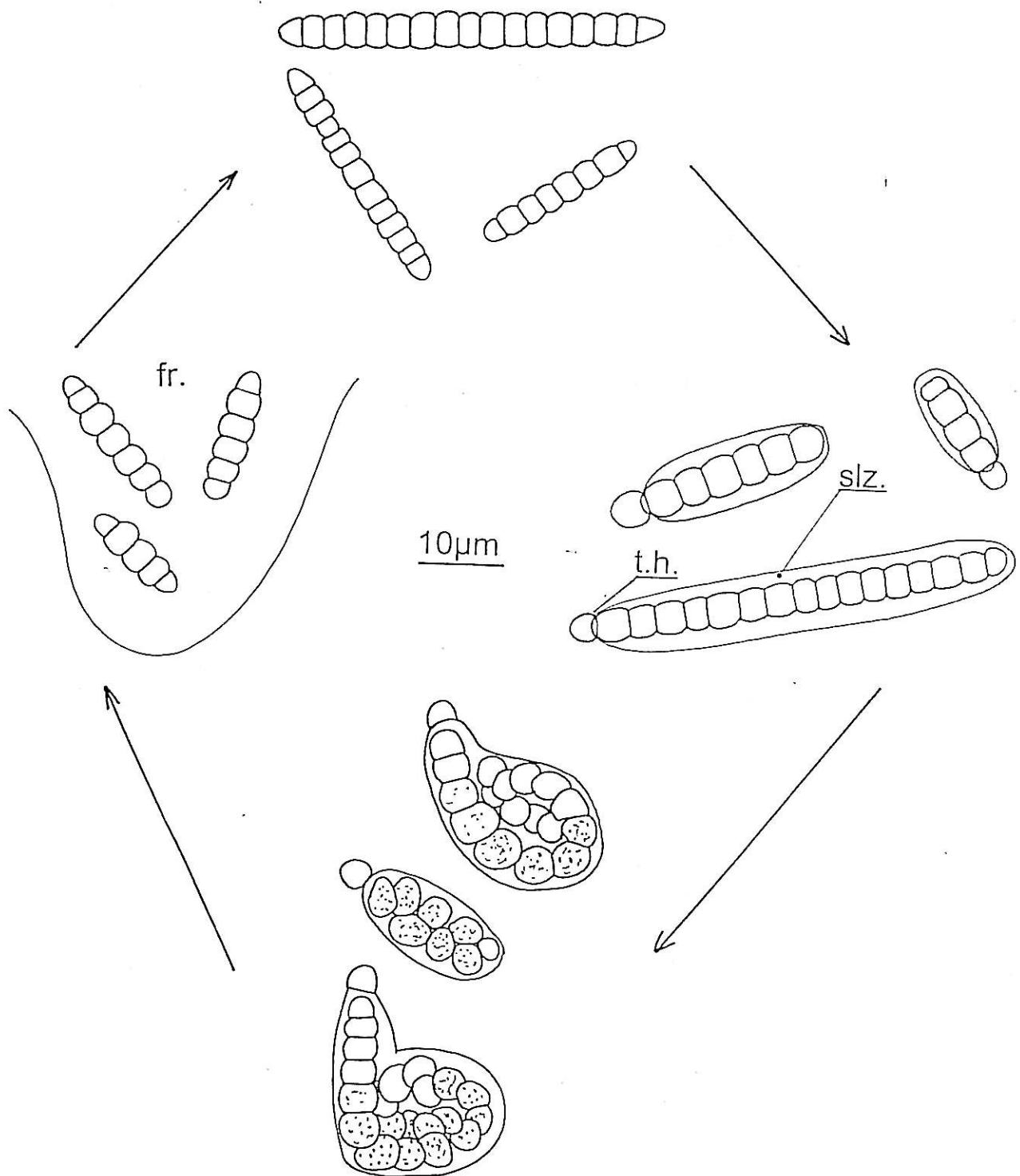
Obr.č.1: Vývojový cyklus kmene *Nostoc muscorum* I a II za kultivačních podmínek
 pozn.: t.h. - terminální heterocyt, i.h. - interkalární heterocyt, ak. - akineta, kl.a. - klíčení akinet,
 slz. - slizový obal, fr. - fragmentace a následující dorůstání vlákn, ? - předpokládaný vývoj



Obr.č.2: Vývojový cyklus kmene *Nostoc calcicola agg. III a VI* za kultivačních podmínek
 pozn.: t.h. - terminální heterocyt, i.h. - interkalární heterocyt, ak. - akineta, kl.a. - klíčení akinet,
 slz. - slizový obal, fr. - fragmentace a následující dorůstání vlákna, ? - předpokládaný vývoj



Obr.č.3: Vývojový cyklus kmene *Nostoc ellipsosporum* V za kultivačních podmínek
 pozn.: t.h. - terminální heterocyt, i.h. - interkalární heterocyt, ak. - akinet, kl.a. - klíčení akinet,
 slz. - slizový obal, fr. - fragmentace a následující dorůstání vlákna, ? - předpokládaný vývoj



Obr.č.4: Vývojový cyklus kmene *Nostoc edaphicum* agg. X za kultivačních podmínek
 pozn.: t.h. - terminální heterocyt, i.h. - interkalární heterocyt, ak. - akineta, kl.a. - klíčení akinet,
 slz. - slizový obal, fr. - fragmentace a následující dorůstání vlákna, ? - předpokládaný vývoj