

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Biologická fakulta**

Katedra botaniky



Bakalářská práce

**Marie Šabacká**

# **Adaptační změny na vybraných klonech sinic**

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Jiří Komárek, DrSc.

České Budějovice 2001

Bakalářská diplomová práce:

Šabacká M., 2001: Adaptační změny na vybraných klonech sinic. [Adaptational changes in selected cyanobacterial clones. Bc. Thesis, in Czech.] Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Adaptational changes might be a challenge to question the traditional classification of cyanobacteria into species. Three cyanobacterial clones were cultured in five different temperatures and light conditions. After twelve months morphological, ultrastructural, ecophysiological and biochemical characteristics were examined and compared.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, jen s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, dne 24.12. 2001.....

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Jiřímu Komárkovi a všem ochotným lidem, kteří mi byli nápomocni.

# 1. ÚVOD

## 1.1. Geologický vývoj sinic

Sinice patří mezi gram-negativní bakterie s fotosyntetickou aktivitou. Strukturou a fotosyntetickým aparátem jsou shodné s chloroplasty eukaryotních řas a vyšších rostlin (STANIER *et al.* 1971).

Sinice patří k nejstarším organismům obývajícím naši planetu. Vznik prvních prokaryot spadá do období před 3,8 miliardy let BP (SCHOPF & PACKER 1987). První struktury podobné sinicovým koloniím, takzvané stromatolity (BROCK 1973, MONTY 1977), se objevují v polovině archeanu, 3,8-2,6. 10<sup>9</sup> let BP (CAMPBELL 1982, 1983). Stromatolity se tvoří i dnes, jejich nejznámějším nalezištěm je zátoka Shark Bay na západním pobřeží Austrálie (VAN DEN HOEK *et al.* 1995).

Již na počátku proterozoika (2,5. 10<sup>9</sup> let BP) je zaznamenán významný vzestup koncentrace kyslíku v atmosféře. V proterozoiku (2,5-0,58. 10<sup>9</sup> let BP) již jsou fototrofní sinice dominantní složkou biosféry naší planety, proto se někdy období proterozoika, trvající téměř dvě miliardy let, nazývá „érou sinic“. Během tohoto období sinice postupně zvýšily obsah kyslíku v atmosféře a umožnily vývoj ostatních aerobních organismů (VAN DEN HOEK *et al.* 1995). Na konci „zlatého období“ sinic (SCHOPF & WALTER 1982) se na Zemi vyskytovaly již všechny typy známé z recentní doby, včetně nejodvozenějších skupin fixátorů vzdušného dusíku z řádů Nostocales a Stigonematales (CASTENHOLZ 1989). Přes ohromné stáří sinic se uchovaly v téměř nezměněné podobě do dnešní doby. Sinice nalezené již v nejstarších fosíliích jsou morfologicky velice podobné dnešním typům a některé lze systematicky zařadit do recentních rodů (KNOLL 1985, VAN DEN HOEK *et al.* 1995).

## 1.2. Sinice a prostředí

Sinice můžeme nalézt prakticky v každém prostředí, včetně velice extrémních biotopů (VAN DEN HOEK *et al.* 1995). Hrají významnou roli v symbiotických asociacích s mnoha eukaryotními organismy (WHITTON 1992). Jsou tolerantní k vysokým teplotám, silné UV radiaci, vysychání, nízké koncen-

traci CO<sub>2</sub> atd. (WHITTON 1992). To dokazuje ohromnou adaptabilitu sinic a schopnost přizpůsobovat se změnám prostředí. Přestože se všechny recentní typy sinic vyvinuly již v proterozoiku a prakticky beze změn se zachovaly dodnes (KNOLL 1985, VAN DEN HOEK *et al.* 1995), je již řadu let známá schopnost sinic velice rychle se adaptovat na nové prostředí. Morfologické změny jsou patrné u řady druhů krátce po přenesení do kultury nebo při pěstování v podmínkách neodpovídajících růstovému optimu (PRÁT *et al.* 1972). Na řasách byly takové výzkumy prováděny již v šedesátých letech minulého století (FOTT 1964). Změny ve velikosti a tvaru buněk při pěstování v různých světelných podmínkách byly zkoumány na sinicích *Anacystis nidulans*, dnešní *Synechococcus nidulans* (MANN & CARR 1974) nebo *Anabaena cylindrica* (CARR & WYMAN 1986). Další příklady schopnosti sinic přizpůsobovat se vnějším podmínkám budou podrobněji prezentovány v dalších částech textu.

### **1.3. Význam prokaryotní struktury pro adaptabilitu sinic**

Asi nejdůležitějšími vlastnostmi sinic je jejich jednoduchost a neschopnost pohlavního rozmnožování.

Jednořetězcová DNA je smotaná volně ve středu buňky a od okolí je chráněna jen fosfolipidovou plazmatickou membránou na povrchu buňky pod buněčnou stěnou. U sinic neexistuje jádro, známé u eukaryotních organismů. Mnoho sinic kromě „základní DNA“ obsahuje ještě plazmidy (malé kruhové molekuly DNA), přítomné ve větší míře i u ostatních bakterií (VAN DEN HOEK *et al.* 1995).

Nepřítomnost sexuálního rozmnožování vylučuje genetickou rekombinaci. Přesto i u sinic nacházíme parasexuální procesy jako transformace a konjugace známé u bakterií (KUMAR & UEDA 1984, TANDEAU DE MARSAC & HOUMARD 1987). Během transformace je DNA z jedné buňky (donora) inkorporována do druhé buňky (akceptora), kde může nahradit homologní sekvenci DNA. Při konjugaci jsou dvě buňky spojeny rovnou trubičkou, kterou je DNA přesunuta z jedné buňky do druhé (VAN DEN HOEK *et al.* 1995). Plazmidy, stejně jako u ostatních bakterií, jsou často zodpovědné za genetický přenos (KUMAR & UEDA 1984, TANDEAU DE MARSAC & HOUMARD 1987).

#### 1.4. Obtíže moderní taxonomie sinic

Z výše uvedených vlastností sinic vyplývá jejich ohromná variabilita a mnohokrát zmiňovaná schopnost přizpůsobovat se nejrůznějším podmínkám. Jejich nechráněná DNA je náchylná k vnějším zásahům, které se projeví již po pár generacích, což v případě prokaryotních organismů může být otázkou týdnů nebo dokonce dnů.

Tyto rychlé „adaptace“<sup>1</sup> přináší veliké problémy při taxonomii sinic. S tím vyvstávají otázky, má-li vůbec klasická systematika sinic smysl a není-li lepší sinice klasifikovat podle Bakteriologického kódu namísto Botanického kódu (STANIER *et al.* 1978). Klasifikace podle Bakteriologického kódu je umělá a může být použita jen pro laboratorní kultury, nikoli na živý materiál. Proto, rozhodneme-li se sinice klasifikovat, tak jediné podle botanických pravidel. Dříve byla klasická taxonomie sinic založena výhradně na morfologii (GEITLER 1932). To v dnešní době nestačí, proto je třeba studovat sinice komplexně sledováním jejich morfologie, ultrastruktury, biochemie, ekofyziologie (WHITTON 1992, KOMÁREK *et al.* 1999) a v poslední době hlavně také použitím metod molekulární biologie (PRIYA SETHU *et al.* 1996).

Nepoužitelnost klasické definice druhu, jakou známe u eukaryot (CURTIS & BARNES 1989), daná nepřítomností pohlavního rozmnožování u sinic, je další nepříjemností, stěžující pokusy o systematiku cyanobakterií.

Touto prací bych ráda alespoň malou měrou přispěla k řešení problémů kolem variability a taxonomie sinic.

---

<sup>1</sup> Slovo adaptace bylo záměrně použito v uvozovkách, protože dodnes není jasné, jsou-li tyto fenotypové změny skutečně *adaptacemi* (dlouhodobé přizpůsobení vnějším podmínkám zabudované v genomu organismu), nebo jen *aklimatizacemi* (reakce na krátkodobé změny vnějších podmínek, většinou sezónní) (WYMAN & FAY 1987). Zatímco aklimatizační změny jsou rychlé a vratné, adaptační změny jsou pomalé a většinou nevratné.

### **1.5. Cíle práce**

1. Izolovat klonální linie u tří vybraných kmenů sinic: kokální *Synechococcus bigranulatus*, trichální *Phormidium autumnale* a heterocytózní *Trichormus variabilis*.
2. Dlouhodobá kultivace uvedených kmenů (cca 12 měsíců) ve dvou kombinacích extrémních světelných a teplotních podmínek (+ kontrola)
3. Vyhodnocení morfologických, ultrastrukturních, ekofyziologických a biochemických parametrů.
4. Srovnání všech kultivací na základě uvedených parametrů a sledování případných změn. Dojde-li k nějakým změnám, pokusit se zjistit, zda se jedná o změny reverzibilní (aklimatizace) nebo změny ireverzibilní (adaptace).

## 2. MATERIÁL & METODY

### 2.1. Popis studovaných kmenů

Pro kultivaci byly vybrány tři kmeny, reprezentující tři vývojové stupně sinic - kokální, trichální a heterocytózní. Všechny pocházely z treboňské sbírky fototrofních mikroorganismů CCALA.

***Synechococcus bigranulatus*, CCALA 187 (izol. KOVROV 1972/8-24)**, je kokální sinice, patřící do řádu Chroococcales a čeledi Synechococaceae (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1986). Tento kmen byl vyzolován z termálních pramenišť a dlouhodobě přizpůsoben k nižším teplotám. Jeho jednotlivé cylindrické buňky se vyznačují malými rozměry (v řádu mikrometrů). Buňky se dělí symetricky v příznivých podmínkách nebo asymetricky v nepříznivých podmínkách vždy v jedné rovině. V nepříznivých podmínkách tvoří dlouhé buňky, nazývané involuční. Thylakoidy jsou uloženy parietálně ve třech až čtyřech kružnicích. Nukleoid je tyčinkovitý. S-layer ve formě p4 (KOMÁREK 1996, KOMÁREK 1999, ŠMARDA & ŠMAJS 1999). Pro *Synechococcus* je dále v textu používána zkratka „S“.

Vláknitá sinice ***Phormidium autumnale*, CCALA 144 (izol. ZEHNDER 1964/99a)** patří do řádu Oscillatoriales, čeledi Phormidiaceae a podčeledi Phormidioideae (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1988). Roste benthicky v tekoucích, mírně eutrofních vodách. Trichom je fakultativně obalen vlastní pochvou. Dělí se rozpadem vláken. Thylakoidy jsou uloženy radiálně (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 1988, KOMÁREK & ČÁSLAVSKÁ 1991). Pro *Phormidium* je dále v textu používána zkratka „P“.

***Trichormus variabilis* CCALA 205 (izol. HINDÁK 1963/112)** patří do řádu Nostocales a čeledi Nostocaceae (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1989). Tato vláknitá sinice se vyznačuje přítomností speciálních buněk na trichomech, heterocytů a akinet. Heterocyty jsou schopny fixovat vzdušný dusík (WOLK 1982). Akinety vznikají apoheterocyticky (HINDÁK 1999). Pro *Trichormus* je dále v textu používána zkratka „T“.

## 2.2. Kultivace

Ze sbírkových kmenů byly vyizolovány klonální kultury. Vzniklé kolonie byly přeneseny do tekutého media i na Petriho misky s médiem zpevněným agarem. Bylo použito médium Z (ZEHNDER in STAUB 1961).

Část Erlenmeyerových baněk, Petriho misek a zkumavek s naočkovanými sinicemi byla umístěna zpět do kultivační místnosti třeboňské sbírky CCALA, kde byly nadále kultivovány při teplotě 24°C a s pravidelným střídáním (po 6ti hodinách) světla ( $150 \mu\text{E.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) a tmy. Tyto kultury sloužily v další práci jako kontrola (kultivace *k*, viz Tab.1).

Další část kultur byla umístěna do kultivačního boxu Calex CGR 145C při teplotě 10°C. První část byla pěstována v silně osvětlené části kultivačního boxu, k osvětlení byl použit panel zářivek (kultivace č.2.). Druhá část byla pěstována v zatemněné části boxu, osvětlena jen jednou červenou zářivkou (kultivace č.1). Náskres zařízení je na Obr. I.I. v Příloze I.

Další kultury byly umístěny v Erlenmeyerových baňkách s tekutým médiem ve dvou paralelních akváriích, vyhříváných termostatem MLW U 099 na teplotu 39°C. Jedno akvárium bylo silně ozářeno panelem zářivek (kultivace č.4), druhé bylo zastíněno vrstvami filtračního papíru (kultivace č.3). (Náskres kultivačního zařízení viz. Obr. I.II., Přílohy I, hodnoty teploty a světla viz Tab.1).

Sinice byly v těchto podmínkách kultivovány alespoň devět měsíců. Kultury byly přeočkovávány podle potřeby, vždy asi po jednom měsíci.

Intenzita světla [ $\mu\text{E.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ]  $\longrightarrow$

	50	150	500	750
10	S1 P1 T1		S2 P2 T2	
24		Sk Pk Tk		
39	S3 P3 T3			S4 P4 T4

Teplota [°C]  $\uparrow$

**Tab. 1** Hodnoty teploty a světla všech pěti kultivačních prostorů. Zkratkami jsou označeny jednotlivé kultury, naočkované do příslušných světelných a teplotních podmínek. Písmeno (S, P, T) je zkratkou kmene (viz kapitola 2.1.), číslo označuje příslušný kultivátor.



Hodnoty teploty byly změřeny laboratorním lihovým teploměrem s přesností 0.25°C. Intenzita světla byla měřena luxmetrem PU 550, Metra Blansko. Hodnoty luxů byly empiricky převedeny na vhodnější jednotku  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

*Synechococcus bigranulatus*, *Phormidium autumnale* a *Trichormus variabilis* jsou dále v textu označovány jako kmeny. Jednou kulturou je označován kmen pěstovaný v jedné konkrétních stejných podmínkách, tedy v jednom kultivátoru. Kulturou je tedy např. „*Trichormus variabilis* 1“ (zkratka T1), pěstovaný při teplotě 10°C a intenzitě světla 50  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Podobně T2, S3, P1. atd.

### 2.3. Studium morfologie

Morfologická měření byla prováděna na světelném mikroskopu Olympus CX 40 při zvětšení 10×100, s použitím softwaru Olympus DP soft. Fotografie byly pořízeny digitálním fotoaparátem Olympus DP 10 a následně upraveny programem Adobe Photoshop 5.0.

Pro měření bylo vždy vybráno alespoň 100 náhodných jedinců. Jedna kultura byla měřena několikrát v různém období stáří kultury, aby byla zaznamenána celková variabilita, a vždy ve stejný den jako ostatní paralelní kultury daného kmene, aby se předešlo možným chybám přístroje. U všech kmenů byly měřeny délky a šířky buněk. Pro zhodnocení naměřených dat byl použit program ANOVA/MANOVA-Statistica 5.5.

### 2.4. Hodnocení ultrastruktury

Vzorky byly fixovány 2,5 % glutaraldehydem ve 0.1 M fosfátovém pufru, pH 7.2 po dobu 12 hodin při teplotě 4°C. Pak vzorky prošly trojnásobným promýváním v promývacím pufru (0.1 M fosfátový pufr, 0.02 M glukosa), vždy po 15 minutách při laboratorní teplotě.

Vzorky kmene *Synechococcus* byly po promytí zality do 2% roztoku agarů při teplotě 60°C.

Po následné 4 hodinové postfixaci v 2 %  $\text{OsO}_4$  ve fosfátovém pufru byly vzorky opět třikrát promývány ve fosfátovém promývacím pufru.

Pak prošly vzestupnou acetonovou odvodňovací řadou (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% a 100%) s periodou výměny 15 minut. Poté byl fixovaný a odvodněný materiál postupně prosycován nízko-viskózní pryskyřicí Spurr (SPURR 1969) ve směsích pryskyřice s acetonem o poměrech 1:2, 1:1 a 2:1 vždy po dobu 1 hodiny. V čisté pryskyřici byly vzorky ponechány přes noc.

Čerstvou pryskyřicí byly vzorky zality do plochých formiček. Pryskyřice polymerovala při teplotě 60-70°C a následně minimálně 24 hodin při laboratorní teplotě.

Plošně zalité bločky byly ztrimovány. Poloténkové řezy (0.5-1µm), krájené skleněným nožem na mikrotomu LKB, byly barveny toulidovou modří a pozorovány ve světelném mikroskopu.

Ultratenké řezy (50-80nm) byly připraveny na mikrotomu Leica ultracut UCT diamantovým nožem. Řezy byly zachycovány na měděné hezagonální sítky (300 Mesh)

Po 24 hodinách byly sítky stínovány etanolovým roztokem uranyl acetátu (v etanolové atmosféře bez přístupu světla) po dobu 30 minut, pak byly trojnásobně mechanicky propláchnuty v 30% roztoku etanolu. Nato byly 20 minut kontrastovány citrátem olova (v temné komůrce se sníženou koncentrací CO<sub>2</sub>) a poté třikrát mechanicky promyty redestilovanou vodou. Sítky s řezy byly osušeny na filtračním papíru při laboratorní teplotě.

Takto připravené vzorky byly prohlíženy a fotodokumentovány transmisním elektronovým mikroskopem JEOL 1010 nebo PHILIPS 420 při urychlovacím napětí 80kV.

Zhotovené fotografie byly naskenovány a zpracovány v programu Adobe Photoshop 5.0.

## **2.5. Studium ekofyziologických nároků**

Ekofyziologické nároky jednotlivých kultur byly studovány metodou kultivace na zkřížených gradientech teploty a světla (LUKAVSKÝ 1982, KVÍDEROVÁ & LUKAVSKÝ 2001a, b). Suspenze sinic byla zředěna na cca 10 000 buněk/ml a naočkována do sterilních sérologických destiček. Ty byly umístěny na plochu kultivačního zařízení. Bylo nastaveno rozmezí teplot 4 až 20°C, re-spektive 20 až 40°C a rozmezí ozáření 58 až 1180 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Po dosažení staci-

onární fáze růstu byla změřena absorbance při 750 nm na spektrofotometru iEMS plate reader, Labsystems. Ke zpracování výsledků byl použit tabulkový procesor MS Excel 97 a program Statistica 5.5.

## 2.6. Biochemické analýzy kmenů

### 2.6.1. Analýza pigmentů

U vláknitých sinic (*Phormidium*, *Trichormus*) bylo u každého vzorku menší množství biomasy rozetřeno s mořským pískem v cca 1 ml 90 % acetonu.

Kokální *Synechococcus* byl nejdříve centrifugován při 4000 ot. min<sup>-1</sup> po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a sediment byl rozdrčen s cca 1 ml 90 % acetonu a balotinou.

Všechny extrakty byly centrifugovány při 4000 ot. min<sup>-1</sup> po dobu 10 minut.

Supernatant byl odpipetován a analyzován na kapalinovém chromatografu Beckman se dvěma čerpadly typu 114M a programátorem gradientu Beckman 420. Elutant byl separován kolonou Altech non encapped Spherisorb ODS-1 (5 μm, 4,6 mm × 25 cm) a detekován diodovým polem Waters 900. Extrakce i analýza probíhaly při laboratorní teplotě, vlastní chromatografická analýza při tlaku 12 MPa a s rychlostí průtoku 2 ml.m<sup>-1</sup>. Mobilní fází byla směs acetonitril-metanol- 0.1 M Tris HCl pufr, pH 8.0 v poměru 75:12:4 (KOPECKÝ *et al.* 2000).

Pigmenty byly určeny pomocí prací: DAVIES (1976), JEFFREY *et al.* (1997) a HIRSCHBERG & CHAMOWITZ (1994).

### 2.6.2. Analýza mastných kyselin

Cca 40 ml suspenze bylo odstředěno v 50ml kyvetách 10 min při 4500 ot<sup>-1</sup>. Sediment byl drcen buď balotinou v případě kmene *Synechococcus*, nebo použitím mořského písku u kmenů *Phormidium* a *Trichormus* s malým množstvím izopropanolu. Suspenze byla kvantitativně převedena do kádinky.

Do suspenze bylo přidáno 12 ml horkého metanolu a 3 minuty se vařila za stálého míchaní. Poté byl doplněn objem metanolu do 10 ml. Do suspenze s metanolem byl přidán chloroform, 3 min se suspenze míchala, poté 10 min stála a opět se 3 min míchala.

Směs byla odstředěna v 50 ml kyvetách 10 min při 3500 ot<sup>-1</sup>. Extrakt byl odpařen na vakuové odparce (RVO) a ihned převeden do chloroformu.

Mastné kyseliny byly metylovány přidáním 1 ml 5% acetylchloridu v MetOH a vařením alespoň 45 min pod zpětným chladičem.

Po skončení metylace byl extrakt odpařen na vakuové odparce do sucha a vypláchnut hexanem a několika kapkami vody. Hexanová vrstva s obsahem metylesterů byla převedena do vzorkovnice a použita pro analýzu.

Metyl estery mastných kyselin byly stanoveny na plynovém chromatogramu Carlo Erba Mega 5300, kapilární kolona SE-54 25 m × 0,32 mm, nosný plyn H<sub>2</sub> o tlaku 40 kPa, teplota injektoru 250°C, teplota detektoru 270°C, teplotní gradient 180-250°C rychlostí 4°C za minutu, split 1:30.

### **2.6.3. Analýza mykosporinových aminokyselin (MAA)**

Izolace MAA byla prováděna pouze na kontrolních vzorcích. Pro detekci MAA byly použity extrakce v 70 % metanolu při 45°C po dobu 2,5 hodiny. Mobilní fázi byla 0,2 % kyselina octová a 4 % vodný roztok metanolu (XIONG *et al.* 1997). Pro separaci byla použita kolona Ultrasphere ODS (5 μm, 4,6 mm × 25 cm), řídicí jednotkou byl Beckman/Altex 334 HPLC.

## 3. VÝSLEDKY

### 3.1. Kultivace

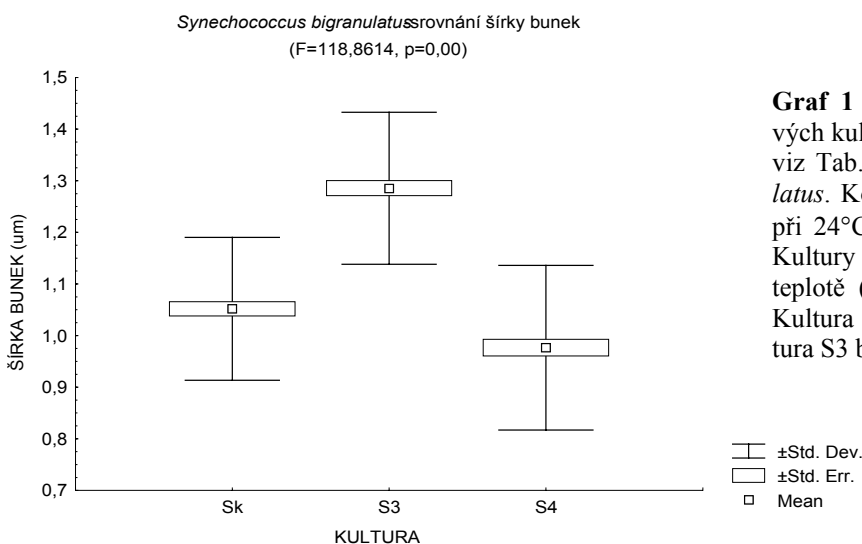
Z původních 15 naočkovaných kultur (3 kmeny, každý vždy ve pěti paralelních kultivátorech (Tab.1) se podařilo nakultivovat 9 kultur, z toho všechny kontroly (Sk, Pk, Tk), dále P1, P2, T1, T2, S3 a S4. Kmeny *Phormidium* a *Trichormus* se nepodařilo naočkovat v kultivátoru č.3 a 4 při teplotě 39°C. Tyto vysoké hodnoty teploty jsou zřejmě pro oba kmeny letální, z toho plyne, že různé kmeny jsou adaptovány na různé hodnoty teploty. Tomu odpovídají i výsledky ze zkřížených gradientů (kap. 3.4.). Stejně tak se nepodařilo nakultivovat kmen *Synechococcus* v nízké teplotě (10°C), i když částečně ve velmi malém množství se podařilo nakultivovat kulturu S2, ale velmi pomalý růst v těchto podmínkách znemožnil analýzu.

Analýzy byly prováděny na sinicích kultivovaných v prostorech č.1 a 2 po 12 měsících, u kmene *Synechococcus* v kultivátorech č.3 a 4 po 9 měsících. U kontrol doba kultivace nehrála roli, protože jsou kultivovány ve stejných podmínkách již několik let.

### 3.2. Výsledky morfologických měření

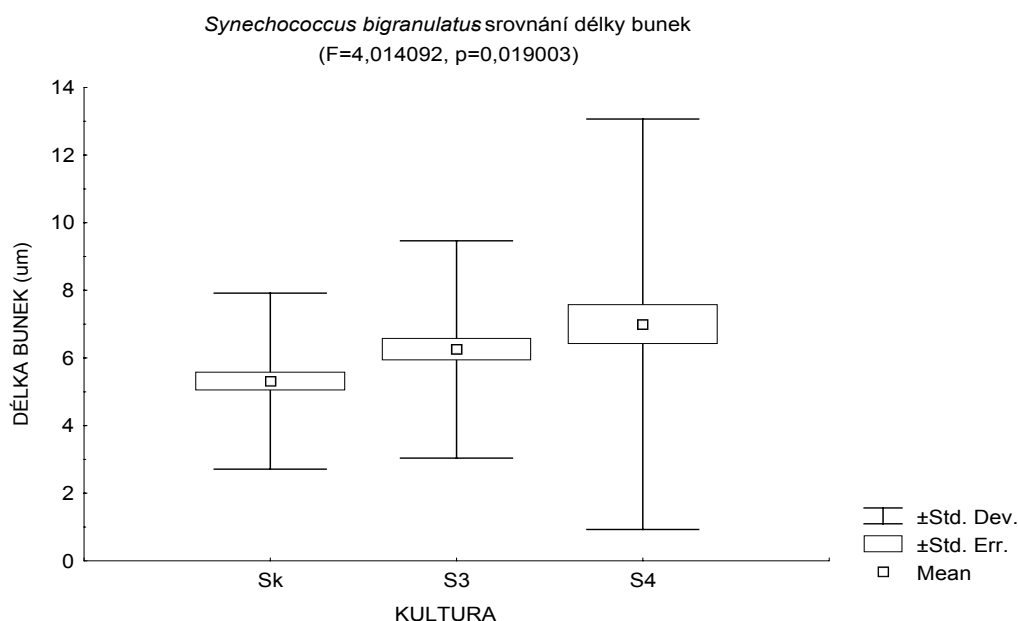
#### 3.2.1. *Synechococcus bigranulatus*

U sinice *Synechococcus bigranulatus* se šířka buněk u všech kontrol prokazatelně lišila ( $F=118,8614$ ,  $p=0,00$ ), jak je patrné z Grafu 1.



**Graf 1** Rozdíly v šířce buněk u jednotlivých kultur (Sk, S3 a S4, vysvětlení zkratk viz Tab.1) kmene *Synechococcus bigranulatus*. Kontrol. kultura (Sk) byla pěstována při 24°C a intenzitě světla 150  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Kultury S3 a S4 byly pěstovány při stejné teplotě (39°C), ale různé intenzitě světla. Kultura S4 byla silně ozářena, zatímco kultura S3 byla zastíněna.

Také nulovou hypotézu, že délka buněk je u všech kultur shodná, můžeme zamítnout ( $F= 4,014092$ ,  $p= 0,019003$ ), jak je vidět z Grafu 2. Použitím dodatečného testu LSD zjistíme, že prokazatelně se liší pouze délka buněk u kontrolní kultury (Sk) a kultury S4 ( $p= 0,004931$ ), zatímco kultury Sk a S3 ( $p= 0,1233$ ) a S3 a S4 ( $p= 0,209443$ ) se od sebe významně neliší.



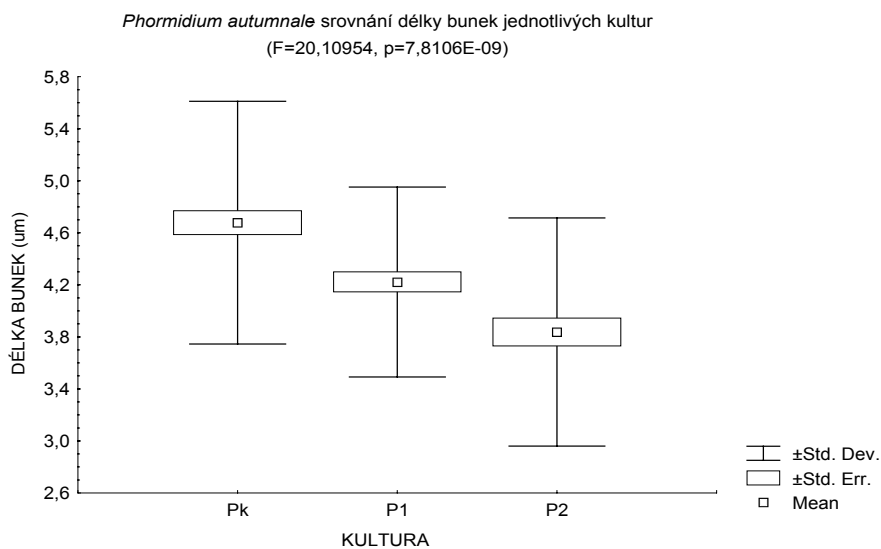
**Graf 2** Rozdíly v délce buněk jednotlivých kultur kmene *Synechococcus bigranulatus*. Z grafu je patrný významný rozdíl pouze mezi kulturami Sk a S4. Kontrolní kultura (Sk) byla pěstována při 24°C a intenzitě světla 150  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Kultury S3 a S4 byly pěstovány při stejné teplotě (39°C), ale různé intenzitě světla. Kultura S4 byla silně ozářena, zatímco kultura S3 byla zastíněna.

### 3.2.2. *Phormidium autumnale*

Jak je patrné z Grafu 3, šířka vláken se u kmene *Phormidium autumnale* prokazatelně lišila ( $F= 7,414$ ,  $p= 0,000715$ ). Použitím dodatečného LSD testu byl prokázán rozdíl mezi kulturami Pk a P1 ( $p= 0,005493$ ) a mezi Pk a P2 ( $p= 0,000254$ ), ale nebyl prokázán rozdíl mezi kulturami P1 a P2 ( $p= 0,313484$ ).

**Graf 3** Rozdíly v šířce vláken u jednotlivých kultur kmene *Phormidium autumnale*. Z grafu je patrný významný rozdíl mezi kulturami Pk a P1 a Pk a P2. Kontrolní kultura (Pk) byla pěstována při 24°C a intenzitě světla 150  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Kultury P1 a P2 byly pěstovány při stejné teplotě (10°C), ale různé intenzitě světla. Kultura P2 byla silně ozářena, zatímco kultura P1 byla zastíněna.

Délka buněk byla prokazatelně odlišná u všech tří studovaných kultur kmene *Phormidium autumnale* ( $F= 20,10954$ ,  $p= 7,8106\cdot 10^{-9}$ ). Viz Graf 4.

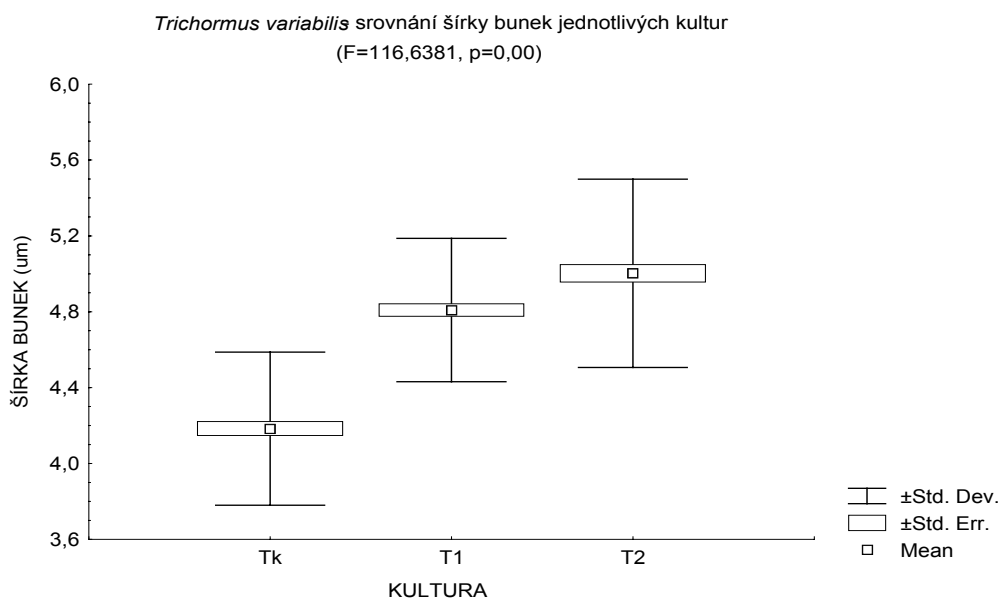


**Graf 4** Srovnání délek buněk jednotlivých kultur kmene *Phormidium autumnale*. Kontrolní kultura (Pk) byla pěstována při 24°C a intenzitě světla 150  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Kultury P1 a P2 byly pěstovány při stejné teplotě (10°C), ale různé intenzitě světla. Kultura P2 byla silně ozářena, zatímco kultura P1 byla zastíněna.

Z uvedených výsledků vyplývá, že buňky kontroly (Pk) jsou nejdelší (průměr 4,68  $\mu\text{m}$ ) a nejtenčí (průměr 5,51  $\mu\text{m}$ ). Naproti tomu buňky kultury P2 jsou nejkratší (průměr 3,84  $\mu\text{m}$ ) a nejsilnější (průměr 5,79  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2.3. *Trichormus variabilis*

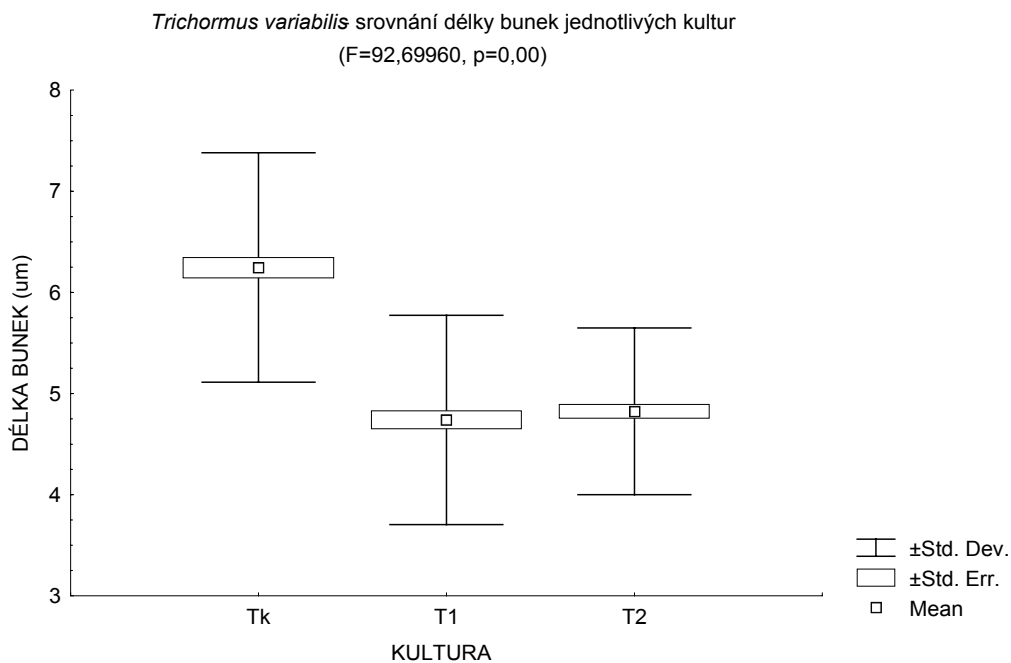
Šířka buněk se prokazatelně liší u všech tří kultur kmene *Trichormus variabilis* ( $F= 116,6381$ ,  $p= 0,00$ ), což je patrné z Grafu 5.



**Graf 5** Rozdíly v šířce buněk u jednotlivých kultur (Tk, T1, T2) kmene *Trichormus variabilis*. Kontrolní kultura (Tk) byla pěstována při 24°C a intenzitě světla 150  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Kultury T1 a T2 byly pěstovány při stejné teplotě (10°C), ale různé intenzitě světla. Kultura T2 byla silně ozářena, zatímco kultura T1 byla zastíněna.

Jak je patrné z Grafu 6, délka buněk se u jednotlivých kultur kmene *Trichormus* také prokazatelně lišila ( $F= 92,69960$ ,  $p= 0,00$ ). Použitím dodatečného testu LSD byla prokázána odlišnost délky buněk mezi kontrolní kulturou (Tk) a kulturou T1 ( $p= 0,00$ ) a mezi kontrolou (Tk) a kulturou T2 ( $p= 0,00$ ). Naproti tomu kultury T1 a T2 nevykazují prokazatelnou odlišnost ( $p= 0,478417$ ).





**Graf 6** Rozdíly v délce buněk u jednotlivých kultur (Tk, T1, T2) kmene *Trichormus variabilis*. Patrný je signifikantní rozdíl mezi kontrolní kulturou (Tk) a kulturami T1 a T2. Kontrolní kultura (Tk) byla pěstována při 24°C a intenzitě světla 150  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Kultury T1 a T2 byly pěstovány při stejné teplotě (10°C), ale různé intenzitě světla. Kultura T2 byla silně ozářena, zatímco kultura T1 byla zastíněna.

Podobně jako u kmene *Phormidium* byly buňky kontrolní kultury kmene *Trichormus* prokazatelně nejdelší (průměr 6,25  $\mu\text{m}$ ) a nejtenčí (průměr 4,18  $\mu\text{m}$ ). Rozdíly mezi kulturou T1 a T2 byly jen v šířce buněk.

Frekvence heterocytů byla sledována nevhodným ukazatelem k porovnání jednotlivých kultur. Početnost HTC je ovlivněna hlavně přítomností dusíku v prostředí. Všechny kultury byly pěstovány na stejném médiu, proto i množství N bylo u všech kultur shodné. V kontrolní kultuře vlákna heterocyty nikdy netvořila. Naproti tomu u kultur pěstovaných v nízké teplotě byla sice frekvence heterocytů vysoká, ale jen u starších a špatných vzorků (kontaminace plísněmi, bakteriemi). V čistých nepřerostlých nárostech se heterocyty také nevyskytovaly.

Velikost a tvar akinet se jevil velice rozmanitý už v rámci jedné kultury, proto této charakteristice rovněž nebyl přikládán žádný význam.

Fotografie všech kultur ze světelného mikroskopu jsou uvedeny v Příloze II, Obr. II.I.-II.XXVI.

### 3.3. Výsledky ultrastrukturních pozorování

K výraznějším ultrastrukturním změnám u jednotlivých kultur daného kmene nedošlo. U kultur P1 a P2 je oproti kontrole patrné výrazně vyšší procento zničených a poškozených vláken. Změna ve tvaru nebo počtu thylakoidů nebyla zaznamenána. Fotografie řezů všech kultur jsou uvedeny v Příloze III, Obr. III.I.-III.XXVIII.

### 3.4. Výsledky ekofyziologických pokusů

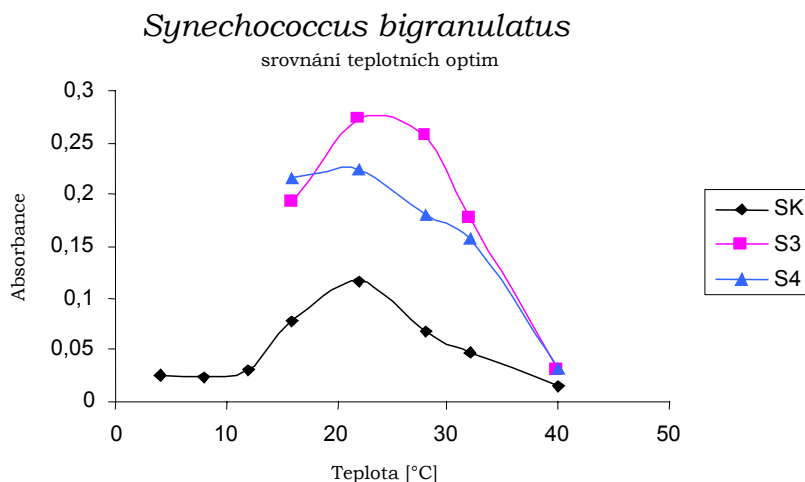
#### 3.4.1. *Synechococcus bigranulatus*

U kontrolní kultury kmene *Synechococcus bigranulatus* (Sk) byl největší nárůst biomasy zaznamenán při teplotě 20 až 25°C a při nejnížší nastavené intenzitě světla  $58 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , jak je patrné z Grafu IV.I. (viz Přílohy IV). To odpovídá nastaveným kultivačním podmínkám.

U kultury S3 rostoucí při zvýšené teplotě v zastíněném akváriu narostla biomasa nejvíce při teplotě 28°C a opět nejmenší nastavené intenzitě světla  $58 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Graf IV.II., Přílohy IV).

Naproti tomu u kultury S4, která rostla při stejné teplotě jako S3, ale byla silně exponována světlem, byl největší nárůst biomasy při 28°C (podobně jako u kultury S3) a nejvyšší nastavené intenzitě světla  $1180 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Graf.IV.III., Přílohy IV).

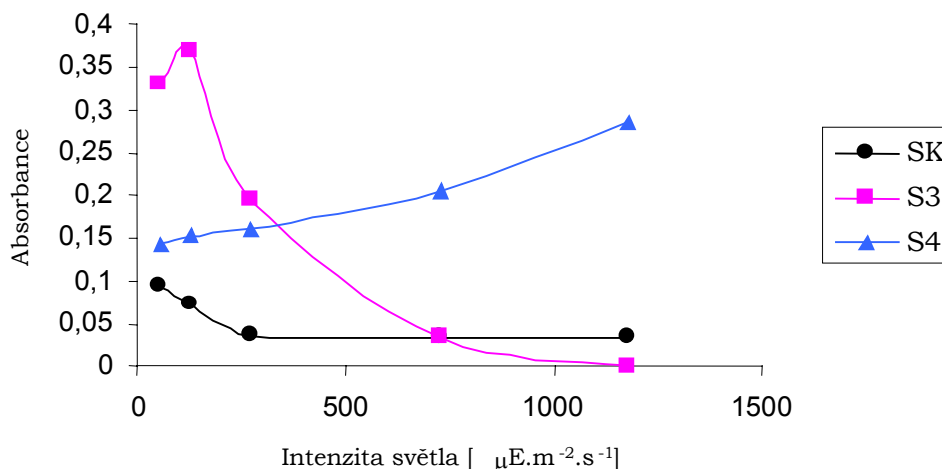
Srovnání teplotních, resp. světelných optim všech tří kultur kmene *Synechococcus bigranulatus* je patrné z Grafu 7, resp. Grafu 8.



**Graf 7** Závislost absorbance na teplotě u jednotlivých kultur kmene *Synechococcus bigranulatus*. Každá hodnota teploty vznikla zprůměrováním nárůstu při dané teplotě a pěti hodnotách světla. Proto není rozdíl optim tak názorný, jako při srovnání grafů IV.I., IV.II. a IV.III. (viz Přílohy IV). Kultury S3 a S4 byly pěstovány při stejné teplotě (39°C), zatímco kultura Sk byla pěstována při nižší teplotě (24°C).

*Synechococcus bigranulatus*

srovnání světelných optim



**Graf 8** Závislost absorbance na intenzitě světla u kultur kmene *Synechococcus bigranulatus*. Kultura Sk byla pěstována při intenzitě světla  $150 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , kultura S3 při  $50 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a kultura S4 při  $750 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

**3.4.2. *Phormidium autumnale***

U kontrolní kultury kmene *Phormidium autumnale* byl největší nárůst biomasy, podobně jako u kontrol ostatních kmenů (Sk, Tk), při teplotě 18 až 20°C a nejnižší nastavené intenzitě světla  $58 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Graf IV.IV., Přílohy IV)

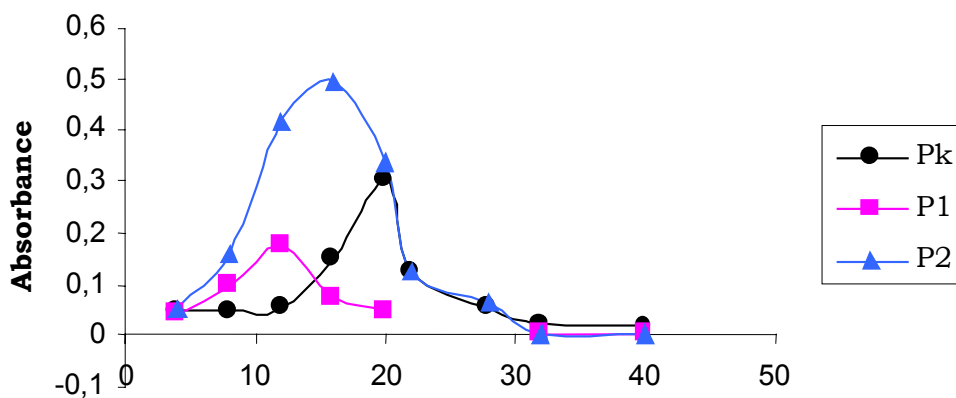
U kultury P1, pěstované při nízké teplotě a nízké intenzitě světla, byl největší nárůst při teplotě 12°C a světle  $58 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Graf IV.V., Přílohy IV).

U kultury P2, pěstované stejně jako P1 při nízké teplotě, ale při vysoké intenzitě světla, byl největší nárůst při teplotě 14 až 16°C a při světle  $725 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Graf IV.VI., Přílohy IV).

Různé teplotní nároky jednotlivých kultur kmene *Phormidium autumnale* jsou patrné z Grafu 11. Rozdíly v nárocích na světlo jsou vidět na Grafu 12.

*Phormidium autumnale*

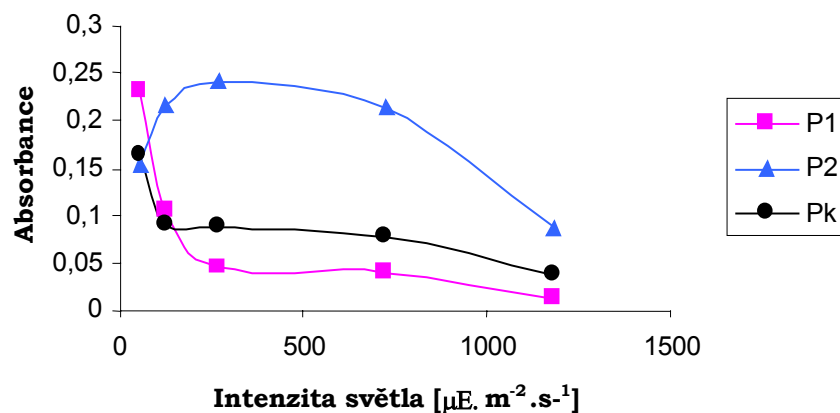
srovnání teplotních optim



**Graf 11** Závislost absorbance na teplotě u jednotlivých kultur (Pk, P1, P2) kmene *Phormidium autumnale*. Z grafu je patrný výrazný posun teplotních optim kultur P1, P2, pěstovaných v nízké teplotě, oproti kontrole (Pk).

*Phormidium autumnale*

srovnání světelných optim



**Graf 12** Závislost absorbance na intenzitě světla u jednotlivých kultur (Pk, P1, P2) kmene *Phormidium autumnale*. Patrný je výrazný posun světelného optima u kultury P2, pěstované pod silným světlem. Kultura Pk byla pěstována při intenzitě světla  $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , kultura P1 při  $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  a kultura P2 při  $500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

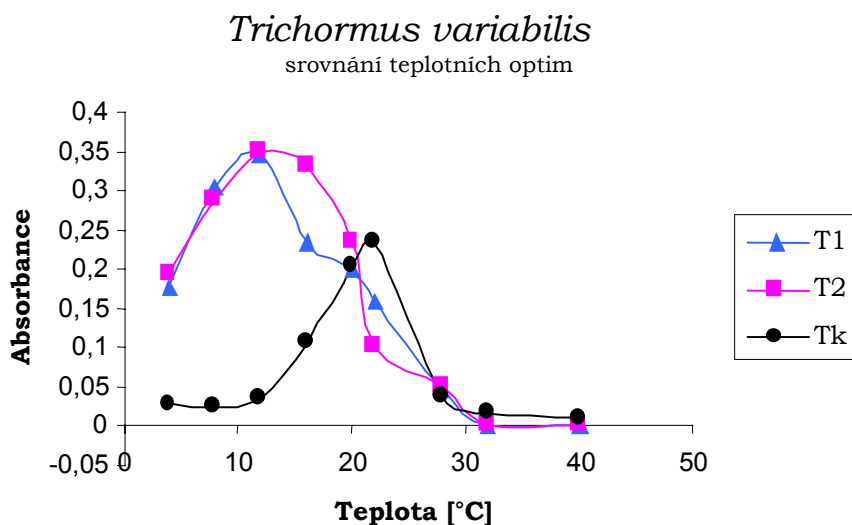
### 3.4.3. *Trichormus variabilis*

U kontrolní kultury kmene *Trichormus variabilis* byl největší nárůst biomasy při teplotě 22°C a nejnižší nastavené intenzitě světla 58  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , jak je patrné z Grafu IV.VII. (viz Přílohy IV).

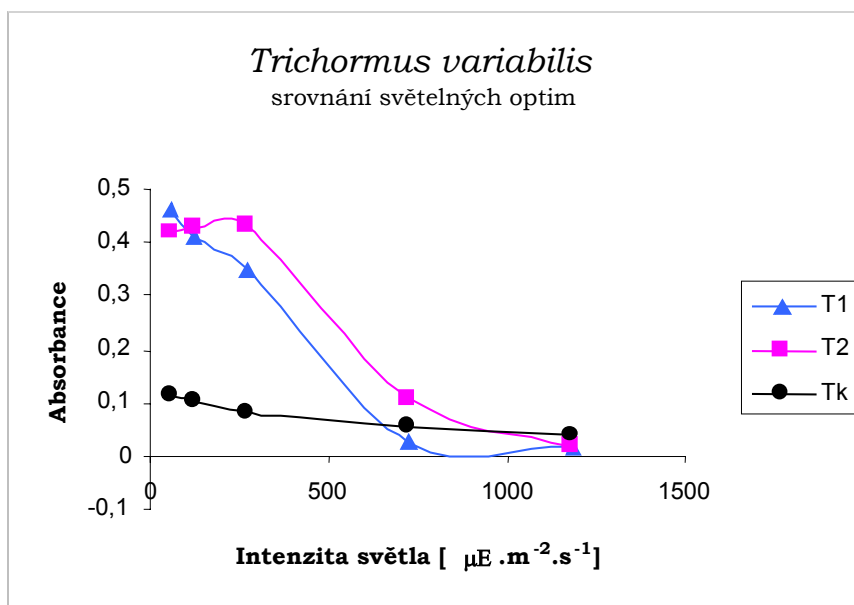
U kultury T1, která rostla v nízké teplotě při nízké intenzitě světla byl největší nárůst při teplotě 10-12°C a při nejnižší nastavené intenzitě světla 58  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Graf IV.VIII., Přílohy IV).

U kultury T2, která rostla v nízké teplotě a při vysoké intenzitě světla, byl největší nárůst při teplotě 12°C a intenzitě světla 270  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Graf IV.IX., Přílohy IV).

Rozdíly teplotních optim všech tří odlišně pěstovaných kultur kmene *Trichormus variabilis* jsou patrné z Grafu 9. Rozdíly světelných optim jsou patrné z Grafu 10.



**Graf 9** Závislost absorbance na teplotě u jednotlivých kultur (Tk, T1, T2) kmene *Trichormus variabilis*. Z grafu je patrný výrazný posun (směrem k nízkým hodnotám) teplotních optim u kultur pěstovaných v nízké teplotě (T1, T2) oproti kontrole (Tk).



**Graf 10** Závislost absorbance na intenzitě světla u jednotlivých kultur kmen *Trichormus variabilis*. Kultura Tk byla pěstována při intenzitě světla  $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , kultura T1 při  $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  a kultura T2 při  $500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### 3.5. Výsledky biochemických analýz

#### 3.5.1. Analýza pigmentů

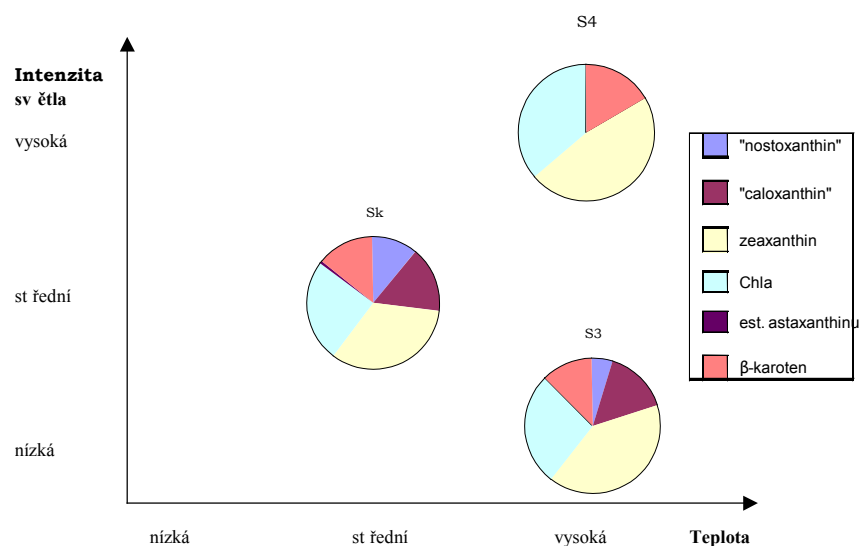
##### 3.5.1.1. *Synechococcus bigranulatus*

Kultury kmene *Synechococcus bigranulatus* se mezi sebou lišily již ve složení pigmentů. U kontroly (Sk) bylo kromě chlorofylu *a* nalezeno 5 karotenoidů:  $\beta$ -karoten, zeaxanthin, estery astaxanthinu a dva blíže neurčené karotenoidy, pravděpodobně se jedná o nostoxanthin a caloxanthin, které již byly nalezeny u jiných kmenů rodu *Synechococcus*, spektrální složení pigmentů i retenční čas tomu nejlépe odpovídají (COUFAL *et al.* 1989 a HIRSCHBERG & CHAMOWITZ 1994). Zajímavá je nepřítomnost myxoxanthophylu u všech kultur studovaného kmene, ačkoli již byl u řady jiných kmenů rodu *Synechococcus* pozorován a vyskytoval se zde ve velikém množství (COUFAL *et al.* 1989). Celkově byl u kmene *Synechococcus bigranulatus* nižší poměr chlorofylu ke karotenoidům než u ostatních kmenů (viz níže). Sekundární karotenoidy (estery astaxanthinu) byly přítomny jen u kontroly, a to v zanedbatelném množství. Výrazně nejvyšší je

poměr Chl/kar u kultury S4, která je silně exponována světlem. U této kultury byly nalezeny pouze tři pigmenty (chlorofyl *a*, zeaxanthin a  $\beta$ -karoten), jejichž poměrný obsah je proto ve srovnání s ostatními kulturami vyšší. Kontrolní kultura (Sk) a kultura S3 se od sebe nijak významně nelišily.

Pigment	Složení pigmentů [%]		
	Sk	S3	S4
"Nostoxanthin"	11,467	5,129	0
"Caloxanthin"	15,887	15,259	0
Zeaxanthin	32,608	39,782	47,074
Chlorofyl <i>a</i>	25,239	27,218	36,307
Estery astaxanthinu	0,628	0	0
$\beta$ -karoten	14,171	12,612	16,619
Chl <i>a</i>	25,239	27,218	36,307
Karotenoidy	74,761	72,782	63,689
<b>Chl <i>a</i>/karotenoidy</b>	<b>0,34</b>	<b>0,38</b>	<b>0,57</b>

**Tab. 2** Pigmentové složení jednotlivých kultur kmene *Synechococcus bigranulatus*.



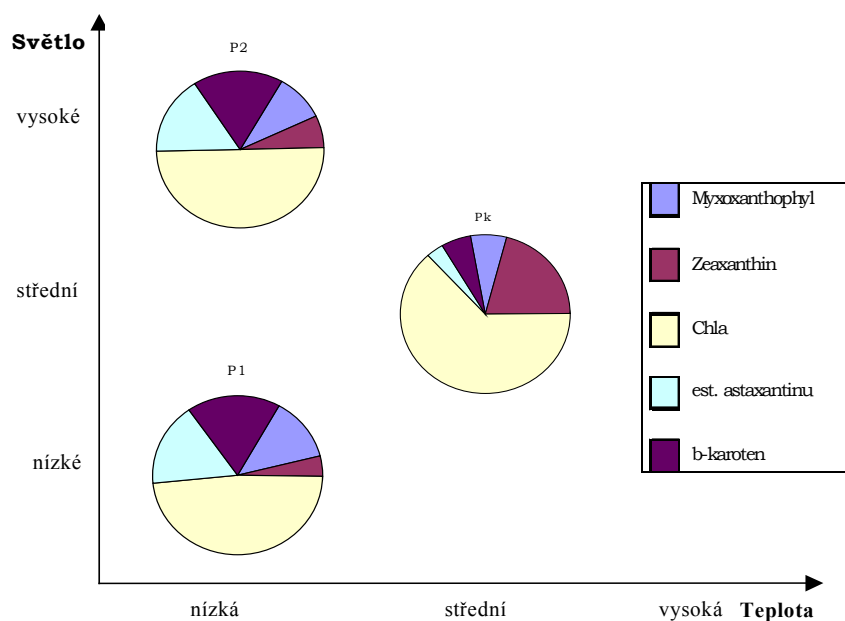
**Obr. 1** Grafické znázornění poměrného zastoupení pigmentů u jednotlivých kultur kmene *Synechococcus bigranulatus*.

**3.5.1.2. *Phormidium autumnale***

U kmene *Phormidium autumnale* bylo u všech tří kultur vyizolováno pět stejných pigmentů (viz Tab.3). Z Tab. 3 a Obr. 2 je patrný výrazně vyšší podíl karotenoidů u kultur pěstovaných v nízké teplotě (P1, P2). Celkové množství karotenoidů a xanthofylů v těchto kulturách převyšuje celkové množství chlorofylu. S nižší teplotou kultivace vzrůstá podíl  $\beta$ -karotenu (více jak trojnásobně), monoesterů astaxanthinu (téměř pětinasobně) a mírně vzrůstá podíl myxoxanthofylu, naproti tomu celkové množství chlorofylu a zeaxanthinu (až pětinasobně) klesá.

Pigment	Složení pigmentů [%]		
	Pk	P1	P2
Myxoxanthophyl	7,068	13,125	9,831
Zeaxanthin	20,753	4,183	6,605
Chlorofyl <i>a</i>	63,24	47,431	49,718
Estery astaxanthinu	3,521	17,254	16,225
$\beta$ -karoten	5,418	18,007	17,62
Chl <i>a</i>	63,24	47,431	49,718
Karotenoidy	36,76	52,569	50,281
<b>Chl<i>a</i>/karotenoidy</b>	<b>1,73</b>	<b>0,90</b>	<b>0,99</b>

Tab. 3 Pigmentové složení jednotlivých kultur kmene *Phormidium autumnale*.



Obr. 2 Grafické znázornění poměrného zastoupení pigmentů u jednotlivých kultur kmene *Phormidium autumnale*.



**3.5.1.3. *Trichormus variabilis***

U všech tří kultur studovaného kmene *Trichormus variabilis* byly vyizolovány čtyři pigmenty. Zajímavá je nepřítomnost zeaxanthinu u všech kultur, ačkoli tento xanthofyl již byl u jiných kmenů druhu *Trichormus variabilis* nalezen (HIRSCHBERG & CHAMOWITZ 1994). Všechny tři kultury se od sebe v poměrném obsahu pigmentů příliš nelišily. U kontrolní kultury je nejvyšší poměr chlorofylu ke karotenoidům (1,38). U kultury T1 je poměr chlorofylu ke karotenoidům téměř 1:1. Mezi kulturami pěstovanými v nízké teplotě (T1 a T2) je oproti kultuře (Tk) patrný pouze mírný pokles v poměrném obsahu chlorofylu a mírný nárůst myxoxanthophylu. U kultury T2 je oproti kultuře T1, lišící se vzájemně jen intenzitou světla při kultivaci, patrný mírný pokles poměrného množství  $\beta$ -karotenu, vyšší přítomnost sekundárních esterů astaxanthinu, pokles myxoxanthophylu a zvýšení poměrného množství Chl *a*.

Pigment	Složení pigmentů [%]		
	Tk	T1	T2
Myxoxanthophyl	2,618	10,72	6,456
Chlorofyl <i>a</i>	57,945	49,948	53,734
Estery astaxanthinu	14,248	14,229	16,882
$\beta$ -karoten	25,189	25,103	22,929
Chl <i>a</i>	57,945	49,948	53,734
Karotenoidy	42,055	50,052	46,267
<b>Chl<i>a</i>/karotenoidy</b>	1,38	1,00	1,16

**Tab. 4** Poměrné zastoupení pigmentů u jednotlivých kultur kmene *Trichormus variabilis*

**Obr. 3** Grafické znázornění poměrného zastoupení pigmentů u jednotlivých kultur kmene *Trichormus variabilis*.

Chromatogramy pigmentových extraktů jednotlivých kultur jsou v Příloze V, Graf V.I.-V.IX. Spektra nalezených látek jsou také v Příloze V, Graf V.X.-V.XIV.

### **3.5.2. Analýza mastných kyselin**

U všech kmenů byly vyizolovány stejné mastné kyseliny s počtem uhlíků 14, 16 a 18. Jen u kmene *Synechococcus bigranulatus* nebyly nalezeny kyseliny hexadekadienová a hexadekatrienová (16:2, 16:3).

#### **3.5.2.1. *Synechococcus bigranulatus***

U kmene *Synechococcus* byly dominantními mastnými kyselinami: palmitová, palmitolejová a linolová, jak je patrné z Obr 1 a Tab. 5. Je zde patrná závislost zastoupení mastných kyselin na kultivační teplotě. S rostoucí teplotou kultivace se snižuje poměr nenasycených mastných kyselin k nasyceným (od 1,53 u kontroly až k 0,83 u kultury S3). U kultur pěstovaných při vyšší teplotě (S3 a S4) je patrný vyšší poměrný obsah nenasycených kyselin myristilové a pal-

mitové a výrazně nižší obsah kyseliny linolové. Z Tab. 5 a Obr. 1 je také patrná závislost délky C-řetězce mastných kyselin na teplotě kultivace. S vyšší teplotou kultivace vzrůstá podíl C<sub>14</sub> a C<sub>16</sub> kyselin. Naopak se snižuje procentuální zastoupení C<sub>18</sub> mastných kyselin, a to až dvojnásobně. Rozdíl mezi obsahem mastných kyselin u kultury S3 a S4, jejichž kultivační podmínky se liší jen intenzitou světla, je nepatrný.

Mastná kyselina		Složení MK u jednotlivých kultur [%]		
		teplota kultivace		
název	počet C: počet dvojn. vaz.	Sk 24°C	S3 39°C	S4 39°C
myristilová	14:0	1,11	5,26	2,69
hexadekatrienová	16:3	0	0	0
hexadekadienová	16:2	0	0	0
palmitolejová	16:1	20,40	28,36	33,14
palmitová	16:0	33,34	42,22	42,14
linolenová	18:3	0	0	5,85
linolová	18:2	31,54	8,01	13,10
olejová	18:1	8,49	9,10	1,49
stearová	18:0	5,13	7,05	1,64
	nasycené	39,58	54,53	46,47
	nenasycené	60,43	45,47	53,58
	<b>nenasycené/nasycené</b>	<b>1,53</b>	<b>0,83</b>	<b>1,15</b>
	C <sub>14</sub>	1,11	5,26	2,69
	C <sub>16</sub>	53,74	70,58	75,28
	C <sub>18</sub>	45,16	24,16	22,08
	<b>C<sub>16</sub>/C<sub>18</sub></b>	<b>1,19</b>	<b>2,92</b>	<b>3,41</b>

**Tab. 5** Složení mastných kyselin jednotlivých kultur kmene *Synechococcus bigranulatus*.

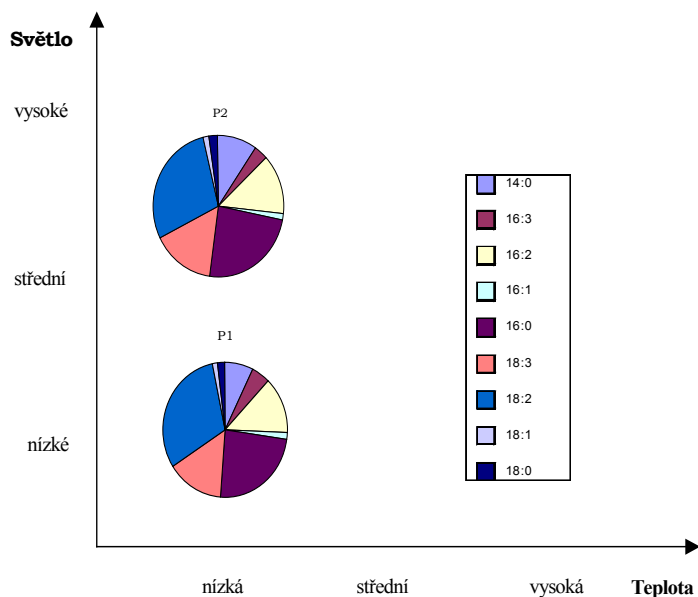
**Obr. 4** Grafické znázornění poměrného zastoupení mastných kyselin u jednotlivých kultur kmene *Synechococcus bigranulatus*.

#### **3.5.2.2. *Phormidium autumnale***

U kmene *Phormidium* byly zanalyzovány pouze kultury P1 a P2. Kontrolní kulturu se nepodařilo zanalyzovat. Rozdíl v poměrném obsahu mastných kyselin je mezi oběma kulturami nepatrný, což vylučuje vliv světla. Poměr nenasycených mastných kyselin k nasyceným je 2,03 (kultura P2)-možné srovnání s kontrolní kulturou kmene *Synechococcus* (viz výše). Podobně jako u kmene *Synechococcus* je patrný vliv teploty na délku C řetězce kyselin. Oproti kontrolní kultuře kmene *Synechococcus*, mají o něco vyšší obsah C<sub>18</sub> kyselin a výrazně vyšší obsah C<sub>14</sub> kyselin. Poměrné množství C<sub>16</sub> kyselin je nižší než u kontroly kmene *Synechococcus*, pěstované při vyšší teplotě.

Mastná kyselina		Složení MK u jednotlivých kultur [%]	
		teplota kultivace	
název	počet C: počet dvoj. vaz	P1	P2
		10°C	10°C
myristilová	14:0	7,47	10,09
hexadekatrienová	16:3	4,68	3,40
hexadekadienová	16:2	13,63	13,63
palmitolejová	16:1	1,64	1,58
palmitová	16:0	23,68	23,82
linolenová	18:3	14,87	15,26
linolová	18:2	30,73	29,68
olejová	18:1	1,43	1,26
stearová	18:0	1,87	2,28
nasycené		33,02	36,19
nenasycené		66,98	64,81
<b>nenasycené/nasycené</b>		<b>2,03</b>	<b>1,79</b>
C <sub>14</sub>		7,47	10,09
C <sub>16</sub>		43,64	42,43
C <sub>18</sub>		48,9	48,48
<b>C<sub>16</sub>/C<sub>18</sub></b>		<b>0,89</b>	<b>0,88</b>

Tab. 6 Složení mastných kyselin u jednotlivých kultur kmene *Phormidium autumnale*.



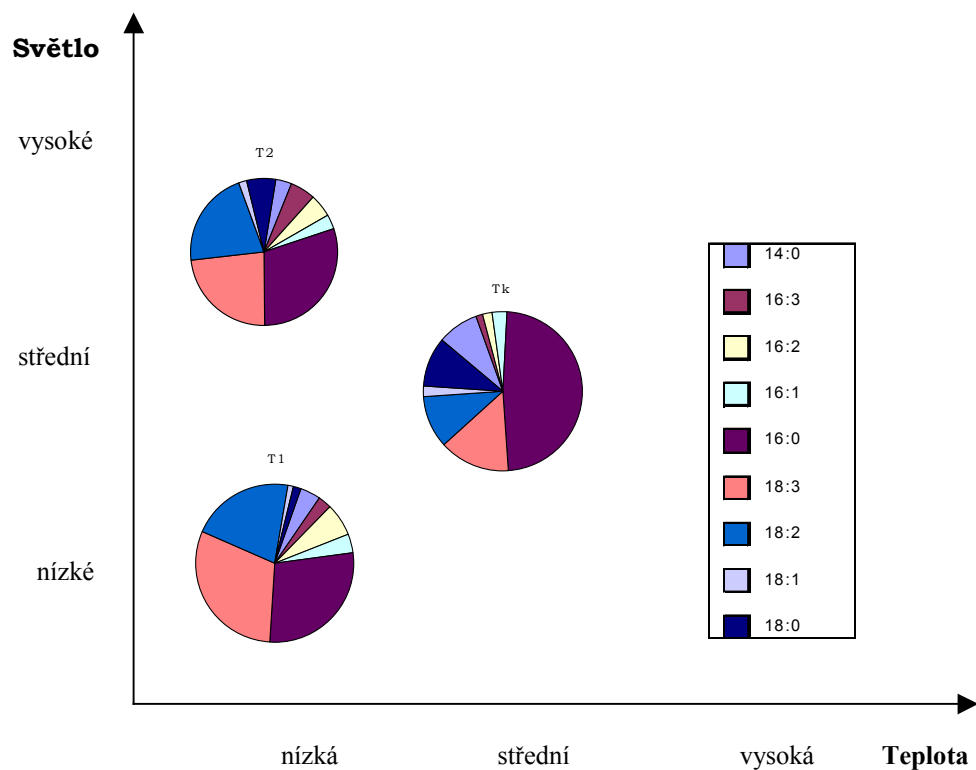
Obr. 5 Grafické znázornění poměrného zastoupení mastných kyselin u jednotlivých kultur kmene *Phormidium autumnale*.

**3.5.2.3. *Trichormus variabilis***

U kmene *Trichormus* je opět patrný vliv teploty na složení mastných kyselin. Poměr nenasycených k nasyceným kyselinám vzrůstá až na 1,97 u kultury T2, oproti kontrole, kde je poměr přesně opačný. S nižší růstovou teplotou kultur klesá až dvojnásobně poměrné množství C<sub>14</sub> kyselin, mírně klesá množství C<sub>16</sub> kyselin. Celkový obsah C<sub>18</sub> kyselin vzrůstá.

Mastná kyselina		Složení MK u jednotlivých kultur [%]		
		teplota kultivace		
název	počet C: počet dvoj. vaz.	Tk	T1	T2
		24°C	10°C	10°C
myristilová	14:0	8,62	4,22	3,60
hexadekatrienová	16:3	1,48	2,75	5,63
hexadekadienová	16:2	1,78	6,65	4,99
palmitolejová	16:1	3,18	3,83	3,08
palmitová	16:0	47,52	27,71	29,57
linolenová	18:3	14,48	30,74	23,40
linolová	18:2	10,56	21,32	21,45
olejová	18:1	2,03	1,03	1,83
stearová	18:0	10,35	1,74	6,45
nasycené		66,49	33,67	39,62
nenasycené		33,51	66,32	60,38
<b>nenasycené/nasycené</b>		<b>0,5</b>	<b>1,97</b>	<b>1,52</b>
C <sub>14</sub>		8,62	4,22	3,6
C <sub>16</sub>		53,96	40,94	43,27
C <sub>18</sub>		37,42	54,83	53,13
<b>C<sub>16</sub>/C<sub>18</sub></b>		<b>1,44</b>	<b>0,75</b>	<b>0,81</b>

**Tab. 7** Poměrné zastoupení mastných kyselin u jednotlivých kultur kmene *Trichormus variabilis*.



**Obr. 6** Grafické znázornění poměrného zastoupení mastných kyselin u jednotlivých kultur kmene *Trichormus variabilis*.

Ukázka chromatogramu extraktu mastných kyselin je v Příloze IV, Graf IV.I.

### 3.5.3. Analýza mykosporinových aminokyselin

Mykosporinové aminokyseliny se u testovaných kmenů nepodařilo nalézt. Výsledné chromatogramy neodpovídaly chromatogramům uváděným v pracích XIONGA (1997) a KAFTANA (1997). MAA se pravděpodobně u mých kmenů nevyskytují.

## 4. DISKUSE

### 4.1. Morfologie

Vliv vnějších podmínek na morfologickou strukturu sinic je známým, ale málo publikovaným jevem. Řada morfologických změn je těžko měřitelná a statisticky zaznamenanatelná.

Morfologická variabilita jednoho organismu způsobená vlivem světelných podmínek může vyústit ve změny tvaru a velikosti buněk a změny v morfologii trichomů. Takovéto morfologické odezvy na vnější podmínky mohou být způsobeny změnami v růstové rychlosti, která je ovlivněna dostupností světelné energie. Navíc se světlo zdá být nezbytným spouštěcím mechanismem při kontrole diferenciaci heterocytů, akinet a hormogonií (WYMAN & FAY 1987).

KRÜGER *et al.* (1981) zaznamenali zvětšení průměrného objemu buněk u kultur *Microcystis aeruginosa* pěstováním při nízké intenzitě světla.

U kmene *Synechococcus* byly v mém experimentu zaznamenány průměrně nejširší buňky u kultury S3, rostoucí při nejnižší intenzitě světla a naopak nejtenčí buňky u kultury S4, rostoucí při nejvyšší intenzitě světla. To by mohlo být způsobeno vyšší rychlostí dělení při vyšší intenzitě světla, buňky se často dělí a nemohou dorůst větší velikosti (PRÁT *et al.* 1972) Délka buněk u kmene *Synechococcus bigranulatus* je velice variabilní už v rámci jedné kultury, proto není příliš dobrým ukazatelem vlivu vnějších podmínek. Nejkratší a zároveň nejdelší buňky (tzv. involuční buňky) byly nalezeny u kultury S4, rostoucí pod silným světlem.

U kmene *Phormidium* byla situace opačná. Kultura rostoucí při největší intenzitě světla (P2) měla nejširší a nejkratší buňky, zatímco kontrolní kultura (Pk) měla nejtenčí a nejdelší buňky. To může mít dvě příčiny: za prvé *Phormidium autumnale* je bentický druh pravděpodobně preferující spíše zastíněná místa, proto je nepřilíš osvětlené prostředí kontrolního kultivátoru příznivější pro dělení vláken než přesvětlené prostředí kultivátoru č.2, nebo zde dochází k interakci s teplotou: nízká teplota, při které se kultivuje P2 (a P1) je nepříznivá pro dělení buněk a podporuje ukládání zásobních látek v buňkách; to je ale jen spekulace, protože literatura zabývající se vlivem teploty na morfologii sinic neexistuje.

Druhé teorii by nasvědčovaly výsledky zjištěné u kmene *Trichormus variabilis*, kde byla situace obdobná jako u kmene *Phormidium*, tj. kontrola (Tk) měla nejtenčí a nejdelší buňky, tedy i nejčastěji se dělící, zatímco kultura rostoucí při nízké teplotě (T1 a T2) měly buňky kratší a širší. Navíc se od sebe kulture



T1 a T2 v šířce a hlavně délce buněk příliš nelišily. Nasnadě je ještě třetí vysvětlení: v kontrolních podmínkách rostly kmeny řadu let před mým experimentem: jsou to tedy pro ně stále ještě nejprůzračnější podmínky k dělení a na nové si za dvanáct měsíců kultivace ještě příliš nezvykly, tomu ale odporují výsledky ze zkřížených gradientů, kde je jasně patrný posun teplotních a světelných optim směrem k nastaveným kultivačním podmínkám (viz kapitola 3.3).

Nejpravděpodobnějším vysvětlením všech těchto morfologických změn (pokud budeme předpokládat, že jsou způsobeny odlišnou rychlostí dělení buněk) je to, že každý kmen roste nejlépe v podmínkách, které nejlépe kopírují jeho přirozené teplotní a světelné podmínky v přírodě (podmínky zabudované v jeho genomu). Těmito podmínkami jsou kontrolní kultury u kmenů *Phormidium autumnale* (bentický druh) a *Trichormus variabilis* (půdní druh) a kultura S4 u kmene *Synechococcus bigranulatus*. Pak by to znamenalo, že pozorované změny v morfologii nebo ekofyziologii (u kmenů *Trichormus* a *Phormidium* u kultur P1, P2 a T1, T2; u kmene *Synechococcus* u kultur Sk a S3) jsou aklimatizačními, nikoli adaptačními mechanismy.

Kvantitou, ale i kvalitou použitého kultivačního světla lze ovlivnit diferenciaci heterocytů (BRADLEY & CARR 1977, TYAGI & AHLUWALIA 1978, ADAMS & CARR 1981 a WU-GUO-LIANG *et al.* 1982). Nic takového nebylo objeveno u studovaného kmene *Trichormus variabilis*. Frekvence heterocytů byla silně variabilní už v rámci jedné kultury a to v závislosti na stáří a kvalitě kultury, tedy na množství dusíku v médiu.

Stejně jako diferenciace heterocytů může být i diferenciace akinet ovlivněna vnějšími podmínkami (FAY 1969, WYMAN & FAY 1986 a NICHOLS *et al.* 1980), ale žádná z těchto prací se nezmiňuje o rozdílu ve velikosti nebo tvaru akinet. Velikost akinet byla u studovaného kmene *Trichormus* velice variabilní v rámci jedné kultury a srovnání velikostí akinet jednotlivých kultur nepřineslo výsledky s dobrou výpovědní hodnotou, proto nejsou publikovány.

Velikost a tvar buněk může být ovlivněn nejen kvantitou použitého světla, ale i kvalitou (BENNET & BOGORAD 1973).

## 4.2. Ultrastruktura

Aklimatizace na nízkou intenzitu světla je u sinic charakteristická zvýšením počtu thylakoidů, což je nutné pro optimální činnost fotosyntetického aparátu, hlavně pro zvýšení absorpce světelné energie při nízkých intenzitách

světla. Naproti tomu aklimatizace na vysokou intenzitu světla je charakteristická redukcí plošné hustoty thylakoidních membrán. Také hromadění tělísek se zásobními látkami je charakteristické pro buňky aklimatizované na silné světlo jako odpověď k intenzivní fotosyntetické aktivitě (BERNER & SUKENIK 1998). Takovéto změny u mých kmenů nebyly pozorovány a ani se nedají při základní práci s transmisním elektronovým mikroskopem zachytit. Jak již bylo řečeno (kap. 3.3.), je u kultur P1 a P2 kmene *Phormidium autumnale* vyšší procento poškozených vláken oproti kontrole a proto se zdá, že podmínky kontrolní kultury (Pk) se nejvíce blíží optimálním podmínkám pro daný kmen. Z pořízených snímků je patrné, že jednotlivé kultury daného kmene byly na první pohled poměrně odlišné, ale takovéto pozorování se obtížně kvantifikuje a není jasné, nakolik se může jednat o variabilitu v rámci jedné kultury.

### 4.3. Ekofyziologie

Ze srovnání ekofyziologických nároků jednotlivých kultur je vidět, že se poměrně rychle přizpůsobily novým kultivačním podmínkám. Zatímco kultury kmenů *Phormidium* a *Trichormus* narostly na zkřížených gradientech nejvíce v hodnotách teploty a světla odpovídajících nastaveným kultivačním podmínkám pro jednotlivé kultury, u kmene *Synechococcus*, kde byla provedena analýza po kratší době kultivace (9 měsíců), byl největší nárůst u kultur S3 a S4 posunut oproti kontrolní kultuře (Sk), ale ještě nedosáhl hodnot nastavených kultivačních podmínek, hlavně teplotních. Jedním z důvodů může být veliká obtížnost s udržení stálé teploty v kultivátoru 3 a 4, hlavně z počátku instalace pokusu.

Z výsledků zkřížených gradientů jsou také patrné rozdíly v přizpůsobení se ke světlu u jednotlivých kmenů. Zatímco kmen *Trichormus* se přizpůsoboval vysoké intenzitě světla (kultura T2) neochotně a pomalu, kmen *Synechococcus* (kultura S4) a *Phormidium* (kultura P2) se vysoké intenzitě světla přizpůsobil rychleji a ochotněji.

Je jasné, že sinice si přizpůsobují svá teplotní a světelná optima velice rychle v závislosti na vnějších růstových podmínkách. Domnívám se, že pozorované změny jsou jen aklimatizacemi, nikoli adaptacemi. Všechny sledované změny oproti kontrole byly v rámci fyziologických možností kontroly, tedy žádná kultura nenarostla tam, kde by kontrolní kmen nemohl růst. O adaptaci by se jednalo například pokud by *Phormidium autumnale* nebo *Trichormus variabilis* narostly v kultivátoru č.3 a 4, kde kontrolní kultura není schopna růstu (viz kapitola 3.4.2.

a 3.4.3.). Adaptace na vnější podmínky se dá docílit postupnou a pozvolnou změnou vnějších podmínek. Například použitý kmen *Synechococcus bigranulatus* je původně termofilní kmen izolovaný z termálních pramenišť, jehož optimální teplota činila 58°C, a který nerostl pod 25°C. Postupným snižováním růstové teploty se docílilo snížení jeho teplotního optima na 20-25°C (viz kapitola 3.4.1.). Schopnost růstu, i když velice pomalého, u kmene *Synechococcus* v kultivátoru č.2 (viz kapitola 3.1.) je s velkou pravděpodobností příkladem adaptace na vnější podmínky. Každopádně ekofyziologické změny jsou asi nejrychlejšími reakcemi na změnu vnějších podmínek.

#### 4.4. Pigmenty

Změny v obsahu a složení karotenoidů jsou jedním z adaptačních mechanismů na vysokou intenzitu světla, které existují u sinic (HIRSCHBERG & CHAMOWITZ 1994). Ochranná role karotenoidů byla popsána v pracích KELLARA & PAERLA (1980) nebo CODDA (1981).

Kultivace při vysoké intenzitě světla je charakteristická poklesem poměru chlorofylu ke karotenoidům (RAPS *et al.* 1983). To se u mých výsledků nepotvrdilo. U kultury S4, pěstované při vysoké intenzitě světla, byl poměr chl/kar nejvyšší ze studovaných kultur kmene *Synechococcus bigranulatus* a u kultur P2 a T2 pěstovaných pod silným světlem byl poměr o něco málo vyšší než u kultur pěstovaných při stejné teplotě, ale nízké intenzitě světla (P1 a T1), ale nižší než u kontrolních kultur pěstovaných při vyšší teplotě. Příčinou je zřejmě spolupůsobení teploty, která byla v mém pokuse neoddělitelná od světelné složky. Ve studii RAPS *et al.* (1983) došlo u *Microcystis aeruginosa* ke snížení obsahu chlorofylu při pěstování při vyšší intenzitě světla, naproti tomu kvantitativní obsah karotenoidů zůstal konstantní.

Snížení poměru chlorofylu ke karotenoidům (zvýšení množství karotenoidů na úkor chlorofylu) při vyšší intenzitě světla byly přikládány dvě funkce: nutnost udržovat vysokou kapacitu pro fotosyntetickou absorpci světla a poskytovat ochranu před fotooxidací (PAERL *et al.* 1983, PAERL 1984). Druhá funkce karotenoidů je velice pravděpodobná, ale první zřejmě ne. Karotenoidy hrají minimální roli při zachycování fotosynteticky aktivního světla (GLAZER 1983, SIEFERMANN-HARMS 1985). Také excitační spektra pro fluorescenci Chl *a* (680 nm) u buněk pěstovaných při vyšší intenzitě světla nevykazují odlišnou aktivitu v oblasti absorpce karotenoidů: 470-490 nm (KANA & GLIBERT 1988).

V práci KÖNIGA (1987) bylo zjištěno zvýšení poměrného množství zeaxanthinu u kultur kmene *Synechococcus* PCC 7942 pěstovaných při vysoké intenzitě světla, což odpovídá i mým výsledkům. U kultury S4 kmene *Synechococcus bigranulatus* je vyšší poměrné množství zeaxanthinu než u kultury S3, pěstované při stejné teplotě, ale nižší intenzitě světla. To samé bylo zaznamenáno i u kmene *Phormidium autumnale*, kde kultura P2 obsahuje vyšší poměrné množství zeaxanthinu než kultura P1. Kontrolní kultura Pk obsahuje sice třikrát větší poměrné množství zeaxanthinu než kultura P2, ačkoli je pěstována při nižší intenzitě světla, ale je kultivována v jiných teplotních podmínkách.

Jiných výsledků dosáhli KANA & GLIBERT (1988) při studiu kmene *Synechococcus* WH7803. *Synechococcus* pěstovali při různých intenzitách světla od 30 do 2000  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . S vyšší intenzitou světla zaznamenali pokles obsahu  $\beta$ -karotenu, ale konstantní obsah zeaxanthinu. Poměr  $\beta$ -karotenu k chlorofylu *a* se se vzrůstající intenzitou světla nezměnil, ale poměr zeaxanthinu k chlorofylu *a* se se vzrůstající intenzitou světla zvyšoval. Konstantní koncentrace zeaxanthinu se vzrůstající intenzitou světla je vysvětlována tím, že zeaxanthin se vyskytuje primárně v cytoplazmě nebo na vnější straně plazmatické membrány (MURATA *et al.* 1981), zatímco  $\beta$ -karoten, jehož obsah se vzrůstající intenzitou světla klesá, je primárně spojen s membránou thylakoidů (MURATA *et al.* 1981, OMATA & MURATA 1983). Tyto výsledky se v mém pokusu nepotvrdily. Jedním z důvodů je to, že vycházím pouze z poměrných zastoupení, a ty neodráží přímý vzestup nebo pokles konkrétního pigmentu. Poměr  $\beta$ -karotenu k chlorofylu ani poměr zeaxanthinu k chlorofylu není v mých výsledcích konstantní a ani jeden neodráží vliv světla.

U vláknité sinice *Oscillatoria agardhii* bylo zaznamenáno vyšší poměrné množství myxoxanthophylu a zeaxanthinu a nižší poměrné množství echinenonu a  $\beta$ -karotenu při pěstování při vysoké intenzitě světla (MILLIE *et al.* 1990). Tyto výsledky se částečně potvrdily i v mém pokusu. S vyšší intenzitou světla u kmene *Phormidium autumnale* (P2), který je ze studovaných kmenů druhu *Oscillatoria agardhii* nejpříbuznější, se zvyšuje poměrné zastoupení zeaxanthinu a snižuje poměrné zastoupení  $\beta$ -karotenu, ale v rozporu s prací MILLIE *et al.* (1990) se zvyšuje poměrné množství myxoxanthophylu. Podobně u kmene *Trichormus* při pěstování na silném světle (T2) se snižuje poměrné množství  $\beta$ -karotenu a myxoxanthophylu oproti kultuře pěstované při stejné teplotě a nižší intenzitě světla (T1). U kmene *Synechococcus* s vyšší intenzitou světla vzrůstá poměrný obsah

zeaxanthinu, ale i  $\beta$ -karotenu. To je pravděpodobně způsobeno nepřítomností jiných karotenoidů u kultury pěstované při vysoké intenzitě světla (S4).

Složení karotenoidů není ovlivněno jen kvantitou použitého světla, ale i kvalitou, jak ukazuje studie OLAIZOLA & DUERR (1990), provedená na druhu *Spirulina platensis* (dnešní *Arthrospira maxima*). Pokud byly buňky kultivovány pod bílým světlem, obsah  $\beta$ -karotenu a echinenonu byl nejvyšší při nejnižších a nejvyšších intenzitách světla, zatímco obsah myxoxanthophylu a zeaxanthinu se se změnou intenzity světla neměnil. Pokud byly buňky pěstovány pod modrým nebo červeným světlem, se vzrůstající intenzitou se snížil obsah myxoxanthophylu, ostatní karotenoidy zůstaly konstantní.

Vliv teploty na složení pigmentů zatím nebyl nijak výrazně studován. Pouze u termofilního kmene *Synechococcus* sp., jehož optimální růstová teplota je 58°C, byl zaznamenán vyšší obsah myxoxanthophylu při kultivaci v 38°C (MILLER *et al.* 1987).

Z uvedené krátké rešerše studií týkajících se vlivu vnějších faktorů na složení a obsah pigmentů vyplývá veliká nejednotnost objevených výsledků. Z mých výsledků je patrný vliv nebo spolupůsobení teploty, což je nejvíce patrné u kmene *Phormidium*. Kultury P1 a P2 rostoucí při stejné teplotě, ale výrazně jiné intenzitě světla se vzájemně téměř neliší, ale liší se od kultury kontrolní (Pk) pěstované při vyšší teplotě. Je jasné, že výsledky jedné studie nelze generalizovat: už z mých výsledků je patrný rozdíl u jednotlivých kmenů. Každý druh nebo dokonce kmen reaguje na změnu vnějších podmínek jiným způsobem. Navíc záleží na tom, v jakých ekologických podmínkách se daný druh primárně vyskytuje. Například planktonní rod tvořící vodní květy (např. *Microcystis*), zvyklý na vysokou intenzitu světla, bude mít při kultivaci pod slabým světlem jiné složení pigmentů než stejně kultivovaný bentický rod, preferující nízké intenzity světla (např. *Phormidium*). Pro *Microcystis* na rozdíl od rodu *Phormidium* jsou takovéto podmínky suboptimální a stresové.

Kvantitativní rozdělení karotenoidů značně kolísá s růstovými podmínkami, i když převládající pigmenty zůstávají stejné (HIRSCHBERG & CHAMOWITZ 1994). To je rozhodně málo na to, abychom mohli pomocí pigmentů sinice klasifikovat, jak navrhuje práce KARSTENA & GARCIA-PICHELA (1996). Jejich studie se zaměřila na různé druhy rodu *Microcoleus*. Všechny kmeny (to je velice důležité) s podobnými morfologickými a ekologickými charakteristikami měly pozoruhodně podobné složení karotenoidů. Autoři navrhují použití chemotaxonomie (analýza karotenoidů a MAA) pro řešení současných problémů taxonomie sinic. To je

však v rozporu s mými výsledky. Abychom mohli provést biochemické analýzy, musíme druh nejdříve kultivovat, čímž změním jeho růstové podmínky a s největší pravděpodobností dojde i ke změně v obsahu a složení pigmentů. Navíc u stejného druhu, ale jiného kmene se mohou běžně vyskytovat jiné a to i převládající pigmenty, jak ukazuje srovnání mých výsledků provedených na kmeni *Synechococcus bigranulatus* s výsledky práce COUFALA *et al.* (1989). Příkladem přímo z této práce je srovnání kultury S4 s kulturami S3 a Sk, které jsou původně vzešlé z jednoho genotypu: u kmene S4 se nevyskytuje karotenoid „caloxanthin“, tvořící u kultur Sk a S3 přes 15%.

#### 4.5. Mastné kyseliny

Složení lipidů nebo mastných kyselin je u celé řady organismů ovlivněno teplotou, je-li růstová teplota snížena, množství nenasycených mastných kyselin se zvýší a množství nasycených se sníží. To poprvé i u sinic pozoroval HOLTON *et al.* (1964). To se ukázalo i v mém experimentu. U kultur pěstovaných při nižší teplotě je vždy menší poměr nasycených MK ku nenasyceným (často je menší než 1), než u kultur pěstovaných při vyšší teplotě. To je dáno především výrazným nárůstem kyselin linolové a linolenové a poklesem kyseliny palmitové s nižší teplotou kultivace. To víceméně souhlasí s pracemi HOLTONA *et al.* (1964), FORKA *et al.* (1978), SATOA *et al.* (1978), BAASCHE *et al.* (1984) a COHENA *et al.* (1986). Vyšší procento nenasycených MK při nižší kultivační teplotě je vysvětlováno nutností zvýšit fluiditu membrány (LEHNIGER *et al.* 1993). Zatím nebyl objeven žádný organismus, u něhož by byl patrný opačný trend, tj. s nižší teplotou kultivace by se zvyšovalo množství nasycených kyselin. Proto lze říci, že zvyšování nenasycenosti při nižší teplotě MK je obecným jevem všech živých organismů.

Teplotou je ovlivněn nejen poměr nasycených k nenasyceným kyselinám, ale také délka jejich řetězce, což bylo pozorováno u mnoha organismů (LEHNIGER *et al.* 1993). V mém pokusu se s nižší kultivační teplotou snižuje poměr C<sub>16</sub>/C<sub>18</sub> kyselin, a to u všech kmenů. Je to dáno hlavně poklesem poměrného množství kyseliny palmitové a palmitolejové a nárůstem poměrného množství kyseliny linolové a linolenové s nižší kultivační teplotou. Mé výsledky se neshodují s prací SATO *et al.* (1978), kteří již sami dospěli k rozdílným výsledkům studováním dvou odlišných kmenů. Zatímco u kmene *Anabaena variabilis* (dnešní *Trichormus variabilis*), zůstal poměr C<sub>16</sub>/C<sub>18</sub> se změnou kultivační teploty konstantní, u *Anacystis nidulans* (dnešní *Synechococcus nidulans*), se se zvyšující teplotou kultivace snižoval

poměr  $C_{16}/C_{18}$ , což je přesný opak toho, co ukazují mé výsledky. Stejně změny v délce C řetězce, jaké našli SATO *et al.* (1978) u *Anacystis nidulans*, byly objeveny u kvasinek a termofilních bakterií. Přesně opačný efekt, tedy stejný jako moje výsledky, byl objeven u řasy *Chlorella sorokiniana* a u *E. coli*. Z uvedeného výčtu (vše SATO *et al.* 1978) je patrné, že výsledky provedené na jednom organismu nelze generalizovat pro všechny organismy.

Vliv intenzity světla nebyl v mém experimentu zaznamenán. Kultury lišící se vzájemně intenzitou světla, ale nikoli teplotou, měly téměř shodné složení mastných kyselin. Přesto byl vliv světla na složení MK již několikrát pozorován u různých organismů: u *Porphyridium cruentum* (AHERN *et al.* in COHEN *et al.* 1986), u sinice *Anacystis nidulans* (DÖHLER & DATZ 1980) nebo u řasy *Chlorella minutissima* (SETO *et al.* in COHEN *et al.* 1986)). Už tito tři autoři dospěli k protikladným výsledkům. Ke shodným výsledkům s mými dospěla studie COHENA *et al.* (1986), kde studovali 19 kmenů sinice *Spirulina*. Efekt intenzity světla na složení mastných kyselin a stupeň jejich nenasycenosti tedy nelze zobecňovat.

Autoři LI & WATANABE (2001) srovnali analýzu zastoupení a obsahu mastných kyselin s morfologickými charakteristikami jednotlivých druhů rodu *Anabaena*. Skladba mastných kyselin dobře souhlasila s morfologickými charakteristikami. Autoři navrhují využití analýzy MK jako jednoho z diakritických znaků pro taxonomické určení sinic. Z mých výsledků a výsledků autorů HOLTONA *et al.* (1964), FORKA *et al.* (1978), SATO *et al.* (1978), BAASCHE *et al.* (1984) a COHENA *et al.* (1986) vyplývá, že pro taxonomii lze použít pouze srovnání zastoupení jednotlivých MK, nikoli jejich poměrné nebo celkové složení (jak navrhují LI & WATANABE 2001), které je silně ovlivněno kultivačními podmínkami. Není ani jasné, zda se u různých kmenů jednoho „druhu“ sinice nemohou vyskytovat i odlišné kyseliny, včetně převládajících.

## 4.6. Shrnutí

Po poměrně krátké době pěstování ve třech světelně a teplotně odlišných podmínkách se všechny studované kmeny výrazně rozrůznily a to téměř ve všech studovaných charakteristikách. Z toho vyplývá ohromná fenotypová (a asi i genotypová) plasticita studovaných kmenů. Dokážou se velice rychle přizpůsobit změnám vnějších podmínek. V této práci byly sledovány pouze fenotypové a nikoli genotypové změny, které však spolu úzce souvisí. Není proto jasné, nakolik se jedná o pouhou aklimatizaci nebo jde-li o adaptaci na vnější podmínky využitím genetic-

kých mechanismů. Zajímavé by bylo zjistit, zda by jednotlivé kultury daného kmene byly pomocí molekulární analýzy (sekvenování) určeny jako shodné, nebo jako velice blízce příbuzné organismy, ale i potom by byla interpretace velice obtížná. Abychom docílili adaptačních změn, je třeba vnější podmínky měnit pozvolna a pokus by pravděpodobně zabral i více času.

Jedno je jasné- všechny použité metody pro studium jednotlivých kultur jsou ovlivněné vnějšími podmínkami a proto i komplexní využití všech těchto metod nestačí pro kvalitní taxonomické určení.

Proto nemá rozdělování na druhy, jaké známe u eukaryot, u sinic smysl. V tomto smyslu druh jako takový u nich jakožto prokaryotních organismů de facto neexistuje. Dle mého názoru by bylo vhodnější použití jiných jednotek (např. ekotyp), které by charakterizovaly morfologický typ sinice v přesně daných ekologických podmínkách. Pro takovýto ekotyp by poté mohl být použit název jaký používáme dnes pro „druhy“.



## 5. ZÁVĚR

Klonální kultury sinic *Synechococcus bigranulatus*, *Phormidium autumnale* a *Trichormus variabilis* byly kultivovány v pěti světelně a teplotně odlišných podmínkách po dobu alespoň devíti měsíců. Každý kmen se podařilo nakultivovat jen ve třech kultivačních prostorech a to ve shodě s výsledky ze zkřížených gradientů.

Na konci kultivace byly jednotlivé kultury zhodnoceny morfologicky, byla srovnána jejich ultrastruktura na základě snímků z transmisního elektronového mikroskopu, byly sledovány ekofyziologické nároky jednotlivých kultur a byla provedena analýza pigmentů a mastných kyselin.

Po devíti- až dvanáctiměsíční kultivaci ve třech světelně a teplotně odlišných podmínkách se každý studovaný kmen (*Synechococcus bigranulatus*, *Phormidium autumnale* a *Trichormus variabilis*) rozrůznil na tři odlišné kultury a to ve všech sledovaných charakteristikách.

U všech kmenů byly sledovány jen fenotypové charakteristiky, takže není jasné, zda jsou pozorované změny jen aklimatizacemi (reakce na krátkodobé změny vnějších podmínek bez nutnosti změn v genotypu daného organismu) nebo už adaptacemi (trvalé přizpůsobení se vnějším podmínkám změnou genotypu organismu). Většina pozorovaných změn byly s největší pravděpodobností aklimatizacemi, i když byl zaznamenán i náznak adaptací.

Všechny charakteristiky použité pro studium u jednotlivých kultur (morfologie, ultrastruktura, ekofyziologické nároky, složení a obsah pigmentů a mastných kyselin) jsou ovlivnitelné vnějšími podmínkami a proto není vhodné pouze podle nich sinice klasifikovat.

## 6. LITERATURA

- ADAMS D. G. & CARR N. G. (1981): Heterocyst differentiation and cell division in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*: effect of high light intensity. *J. Cell Sci.* **49**, 341-352.
- ANAGNOSTIDIS K. & KOMÁREK J. (1988): Modern approach to the classification system of cyanophytes 3- Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol./Alg. Studies* **50-53**, 327-472.
- BAASCH K-H., KOHLHASE M. and POHL P. (1984): Axenic mass culture of prokaryotic and eukaryotic microalgae and lipid production: influence of the temperature and of the nitrate concentrations in the nutrient medium. In *Function and Metabolism of Plant Lipids*, SIEGENTHALER P. A. & EICHENBERGER W. (eds.), pp. 587-590, Elsevier Science Publisher B. V.
- BENNET A. & BOGORAD L. (1973): Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell. Biol.* **58**, 419-435.
- BERNER T. & SUKENIK A. (1998): Photoacclimation in photosynthetic microorganisms: An ultrastructure response. *Israel J. Plant Science* **46**, 141-146
- BRADLEY S. & CARR N. G. (1977): Heterocyst development in *Anabaena cylindrica*: The necessity for light as an initial trigger and sequential stages of commitment. *J. Gen. Microbiol.* **101**, 291-297.
- BROCK T. D. (1973): Evolutionary and ecological aspects of the Cyanophytes. In *The Biology of Blue-green Algae*, CARR N. G. & WHITTON B. A. (eds.), pp. 487-500, Blackwell, Oxford.
- CAMPBELL S. E. (1982): Precambrian endoliths discovered. *Nature*, Vol. **299**, 5882, 429-431.
- CAMPBELL S. E. (1983): The modern distribution and geological history of calcium carbonate boring microorganism. In *Biomineralisation and Biological Metal Accumulation*, WESTBROEK P. and JONG E. W. (eds.), 99-104.
- CARR N. G. & WYMAN M. (1986): Cyanobacteria: Their biology in relation to oceanic picoplankton. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* **214**, 159-204.
- CASTENHOLZ R. W. (1989): Section 19: Oxygenic Photosynthetic Bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. STANLEY, J. T., BRYANT M. P., PFENNING N. and HOLT J. G. (eds.), Williams and Wilkins Co, Baltimore. Vol. **3**: 1710-1806.

- CODD G. A. (1981): Photoinhibition of photosynthesis and photoinactivation of ribulose biphosphate carboxylase in algae and cyanobacteria. In *Plant and the Daylight Spectrum*, SMITH H. (ed), pp 315-337, Academic Press, London.
- COHEN Z., VONSHAK A. and RICHMOND A. (1986): Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. *Phytochemistry*, Vol. **26**, No. 8, 2255-2258.
- COUFAL J., HLADÍK J. and SOFROVÁ D. (1989): The Carotenoid Content of Photosystem 1-Pigment-Protein Complexes of the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Photosynthetica* **23** (4), 603-616.
- CURTIS H. & BARNES N. S. (1989): *Biology*, Fifth Edition, pp. 407-408, Worth Publisher, New York.
- DAVIES B. H. (1976): Carotenoids. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* **2**, 38-165.
- DÖHLER G. & DATZ G. (1980): Effect of Light on Lipid and Fatty Acid Composition of Cyanobacteria, *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*). *Z. Pflanzenphysiol.* **100S**, 427-435.
- FAY P. (1969): Metabolic activities of isolated spores of *Anabaena cylindrica*. *J. Exp. Bot.* **20**, 100-109.
- FORK D. C., MURATA N. and SATO N. (1978): Effect of Growth Temperature on the Lipid and Fatty Acid Composition, and the Dependence on Temperature of Light-induced Redox Reactions of Cytochrome *f* and of Light Energy Redistribution in the Thermophilic Blue-Green Alga *Synechococcus lividus*. *Plant. Physiol.* **63**, 524-530.
- FOTT B. (1964): Phycological Activity at the Department of Botany of Charles University. *Acta Universitatis Carolinae, Biologica* **2**, 89-110.
- GEITLER L. (1932): Cyanophyceae. *Dr. L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, Vol. XIV, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- GLAZER A. N. (1983): Comparative biochemistry of light-harvesting systems. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 125-157.
- HINDÁK F. (1999): Observation on *Trichormus azollae* and *Nodularia sphaerocarpa* (Nostocales, Cyanophyta/Cyanobacteria). *Arch. Hydrobiol./Alg. Studies* **94**, 163-171.

- HIRSCHBERG J. & CHAMOWITZ D. (1994): Carotenoids in Cyanobacteria. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, BRYANT D. A. (ed.), pp. 559-579, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.
- HOLTON R. W., BLECKER H. H. AND ONORE M. (1964): Effect of growth temperature on the fatty acid composition of a blue-green alga. *Phytochemistry* **3**, 595-602
- JEFFREY S. W., MANTOURA R. F. C. and WRIGHT S. W. (eds.): Phytoplankton pigments in oceanography, pp. 1-661, UNESCO Publishing, Paris, 1997.
- KAFTAN D. (1997): Variabilita kmenů *Nostoc commune* (Cyanobacteria, Nostocales, Nostocaceae) ve Střední Evropě a srovnání s kmeny z Antarktidy. Magisterská diplomová práce, Biologická fakulta JU, 1-14
- KANA T. M. & GLIBERT P. M. (1988): Zeaxanthin and  $\beta$ -karoten in *Synechococcus* WH7803 respond differently to irradiance. *Limnol. Oceanogr.* **33**, 1623-1627.
- KARSTEN U. & GARCIA-PICHEL F. (1996): Carotenoids and mycosporine-like amino acid compounds in members of the genus *Microcoleus* (Cyanobacteria): A chemosystematic study. *Syst. Appl. Microbiol.* **19** (3), 285-294.
- KELLAR P. E. & PAERL H. W. (1980): Physiological adaptation in response to environmental stress during an N<sub>2</sub>-fixing *Anabaena* bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 587-595.
- KNOLL A. H. (1985): The distribution and evolution of microbial life in the late Proterozoic era. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 391-417.
- KOMÁREK J. (1996): Toward a combined approach for taxonomy and species delimitation of picoplanktic cyanoprokaryotes. *Arch. Hydrobiol./Alg. Studies* **83**, 377-401.
- KOMÁREK J. (1999): Intergeneric characters in unicellular cyanobacteria, living in solitary cells. *Arch. Hydrobiol./Alg. Studies* **94**, 195-205.
- KOMÁREK J. & ANAGNOSTIDIS K. (1986): Modern approach to the classification system of cyanophytes 2-Chroococcales. *Arch. Hydrobiol./Alg. Studies* **43**, 157-226.
- KOMÁREK J. & ANAGNOSTIDIS K. (1989): Modern approach to the classification systems of Cyanophytes 4- Nostocales. *Arch. Hydrobiol./Alg. Studies* **56**, 247-345.
- KOMÁREK J. & ČÁSLAVSKÁ J. (1991): Thylakoid patterns in oscillatoriacean cyanophytes. *Arch. Hydrobiol./Alg. Studies* **64**, 267-270.

- KOMÁREK J., KOPECKÝ J. and CEPÁK V. (1999): Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*. *Cryptogamie Algologie* **20** (3), 209-222.
- KÖNIG F. (1987): A role of the Q<sub>B</sub> binding protein in the mechanism of cyanobacterial adaptation to light intensity. *Z. Naturforsch.* **42c**, 727-732.
- KOPECKÝ J., SCHOEFS B, LOEST K., ŠTYS D. and PULZ O. (2000): Microalgae as a source for secondary carotenoid production: a screening study. *Arch. Hydrobiol./Alg. Studies* **98**, 153-168.
- KRÜGER G. H. J., ELOFF J. N. and PRETORIUS J. A. (1981): Morphological changes in toxic and non-toxic *Microcystis* isolates at different irradiance levels. *J. Phycol.* **17**, 52-56.
- KUMAR H. D. & UEDA K. (1984): Conjugation in cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Molec. Gen.Genet.* **195**, 356-7.
- KVÍDEROVÁ J. & LUKAVSKÝ J. (2001a): Gradienty- základní charakter prostředí a možnosti jejich modelování v laboratoři. *Czech Phycology* **1**, 77-85.
- KVÍDEROVÁ J. & LUKAVSKÝ J. (2001b): A new unit for crossed gradient of temperature and light. *N. Hedwigia, Beih.* **123**, 539-548.
- LEHNIGER A. L., NELSON D. L. and COX M. M. (1993): Principles of Biochemistry, Second Edition, pp. 246-253, 269-270, Worth publisher, New York.
- LI R. H. & WATANABE M. M. (2001): Fatty acid profiles and their chemotaxonomy in planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) with straight trichomes. *Phytochemistry* **57** (5), 727-731.
- LUKAVSKÝ J. (1982): Cultivation of chlorococcal algae in crossed gradients of temperature and light, *Arch. Hydrobiol./Alg. Studies* **29**, 517-528.
- MANN N. & CARR N. G. (1974): Control of macromolecular composition and cell division in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **83**, 399-405.
- MILLER M., PEDERSEN J. Z. and COX. R. P. (1987): Effect of growth temperature on membrane properties in a thermophilic cyanobacterium (*Synechococcus* sp.). In *Progress in Photosynthesis Research*, BIGGINS J. (ed.), Vol II, pp.789-792, Martinus-Nijhoff, Dordrecht.
- MILLIE D. F., INGRAM D. A. and DIONIGI C. P. (1990): Pigment and photosynthetic response of *Oscillatoria agardhii* (Cyanophyta) to photon flux density and spectral quality. *J. Phycol.* **26**, 660-666.

- MONTY C. (1977): Evolving concepts on the nature and the ecological significance of stromatolites. In *Fossil Algae*, FLÜGEL E. (ed.), pp. 15-35, Springer-Verlag, Berlin.
- MURATA N., SATO N., OMATA N. and KUWABARA T. (1981): Separation and characterisation of thylakoid and cell envelope of the blue-green alga (cyanobacterium) *Anacystis nidulans*. *Plant Cell Physiol.* **22**, 855-866.
- NICHOLS J. M., ADAMS D. G. and CARR N. G. (1980): Effect of canavanine and other amino acid analogues on akinete formation in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Arch. Mikrobiol.* **127**, 67-75.
- OLAIZOLA M. & DUERR E. O. (1990): Effect of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *J. Applied Phycol.* **2**, 97-104.
- OMATA N. & MURATA N. (1983): Isolation and characterisation of the cytoplasmic membranes from blue-green alga (cyanobacterium) *Anacystis nidulans*. *Plant Cell Physiol.* **24**, 1101-1112.
- PAERL H. W. (1984): Cyanobacterial carotenoids: Their roles in maintaining optimal photosynthetic production among aquatic bloom-forming genera. *Oceanologia* **61**, 143-149.
- PAERL H. W., TUCKER J. and BLAND P. T. (1983): Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green alga (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms. *Limnol. Oceanogr.* **28**, 847-857.
- PRÁT S., DVOŘÁKOVÁ J. and BASLEROVÁ M. (1972): Cultures of algae in various media, pp. 30-34, Academia, Prague.
- PRIYA SETHU K. M., PRABHA T. N., RAVISHANKAR G. A. and VENKATARAMAN L. V. (1996): Developments in cyanobacterial genetics. In *Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae*, CHAUDHARY B. R. & AGRAWAL S. B. (eds.), pp. 377-393, SPB Academic Publishing bv, Amsterdam.
- RAPS S., WYMAN K., SIEGELMAN H. W. and FALKOWSKI P. G. (1983): Adaptation of Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to Light Intensity. *Plant. Physiol.* **72**, 829-832.
- SATO N., MURATA N., MIURA Y. and UETA N. (1978): Effect of growth temperature on lipid and fatty acid composition in the blue-green algae, *Anabaena variabilis* and *Anacystis nidulans*. *Biochem. Biophys. Acta* **572**, 19-28.
- SCHOPF J. W. & PACKER B. M. (1987): Early Archean (3.3 billion to 3.5 billion-year-old) microfossils from the Warrawoona Group, Australia. *Science* **237**, 70-73.

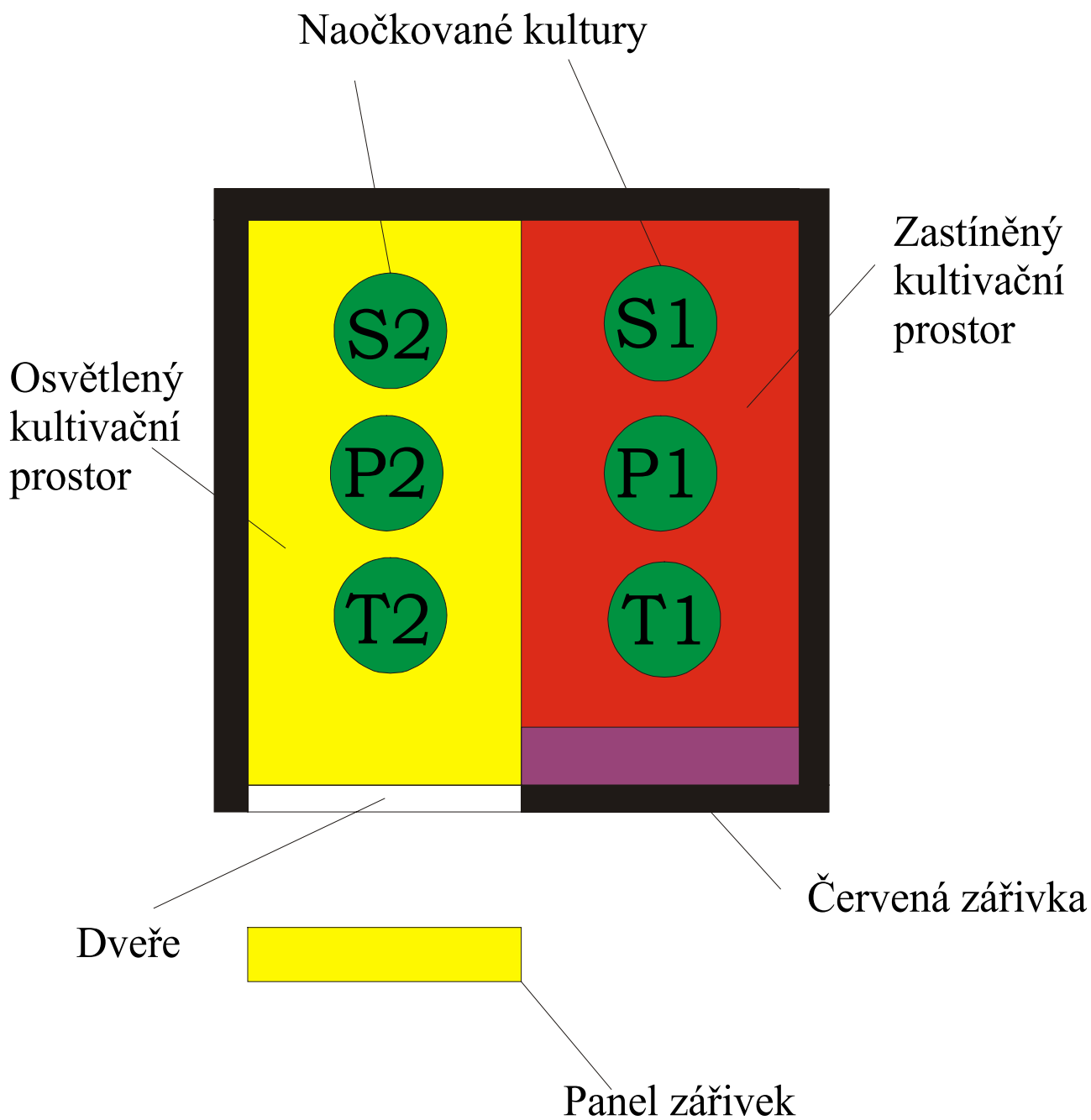
- SCHOPF J. W. & WALTER M. R. (1982): Origin and early evolution of Cyanobacteria. In *The Biology of Cyanobacteria*, CARR N.G. & WHITTON B. A., pp. 543-564, Blackwell, Oxford.
- SIEFERMANN-HARMS D. (1985): Carotenoids in photosynthesis. 1. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochem. Biophys. Acta* **811**, 325-355.
- SPURR A. R. (1969): A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Ultrastruct. Res.* **26**, 31-43.
- STANIER R. Y., KUNISAWA R., MANDEL M. and COHEN-BAZIRE G. (1971): Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bact. Rev.* **35**, 171-205.
- STANIER R. Y., SISTROM W. R., HANSEN T. A., WHITTON B. A., CASTENHOLZ R. W., PFENNING N., GORLENKO V. N., KONDRATIEVA E. M. N., EIMHJELLEN K. E., WHITTENBURY R., GHERNA R. L. and TRÜPER H. G. (1978): Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**, 335-336.
- STAUB R. (1961): Ernährungphysiologisch- autökologische Untersuchungen an der planktonische Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. *Schweiz. Z. Hydrol.* **23**, 82-198a.
- ŠMARDA J. & ŠMAJS D. (1999): Cytomorphology of the smallest picoplanktic Cyanobacteria. *Arch. Hydrobiol./Alg. Studies* **94**, 333-351.
- TANDEAU DE MARSAC N. & HOUMARD J. (1987): Advances in cyanobacterial molecular genetics. In *The Cyanobacteria*, FAY P. & VAN BAALEN C. (eds.), pp 251-302, Elsevier, Amsterdam.
- TYAGI V. V. S. & AHLUWALIA A. S. (1978): Heterocyst formation in the blue-green alga *Anabaena doliolum*- a study of some aspects of photoregulation. *Ann. Bot.* **42**, 1333-1341.
- VAN DEN HOEK C., MANN D. G., JAHNS H. M. (1995): Algae. An introduction to phycology, pp. 16-34, Cambridge University Press.
- WHITTON B. A. (1992): Diversity, Ecology and Taxonomy of the Cyanobacteria. In *Photosynthetic Prokaryotes*, MANN N. H. & CARR N. G. (eds.), pp. 1-51, Plenum Press New York.
- WOLK C. P. (1982): Heterocysts. In *The Biology of Cyanobacteria*, CARR N. G. & WHITTON B. A. (eds.), pp. 359-386, Blackwell, Oxford and University of California Press, Berkeley.

- WU-GUO-LIANG, ZHONG ZE-PU, BAI KE-ZHI, WANG FA-ZHU and Cui CHENG. (1982): The effect of light quality on the growth and development of *Anabaena azollae*, *Acta Bot. Sin.* **24**, 46-53.
- WYMAN M. & FAY P. (1986): Interaction between light quality and nitrogen availability in the differentiation of akinets of blue-green alga *Gloeotrichia echinulata*. *Br. Phycol. J.* **21**, 147-153.
- WYMAN M. & FAY W. (1987): Acclimation to the natural light climate. In *The Cyanobacteria*, FAY W. & VAN BAALEN C. (eds.), pp. 347-376, Elsevier Science publishers B. V.
- XIONG F., KOMENDA J., KOPECKÝ J. and NEDBAL L. (1997): Strategies of ultraviolet-B protection in microscopic algae. *Physiol. Plant.* **100**, 378-388.

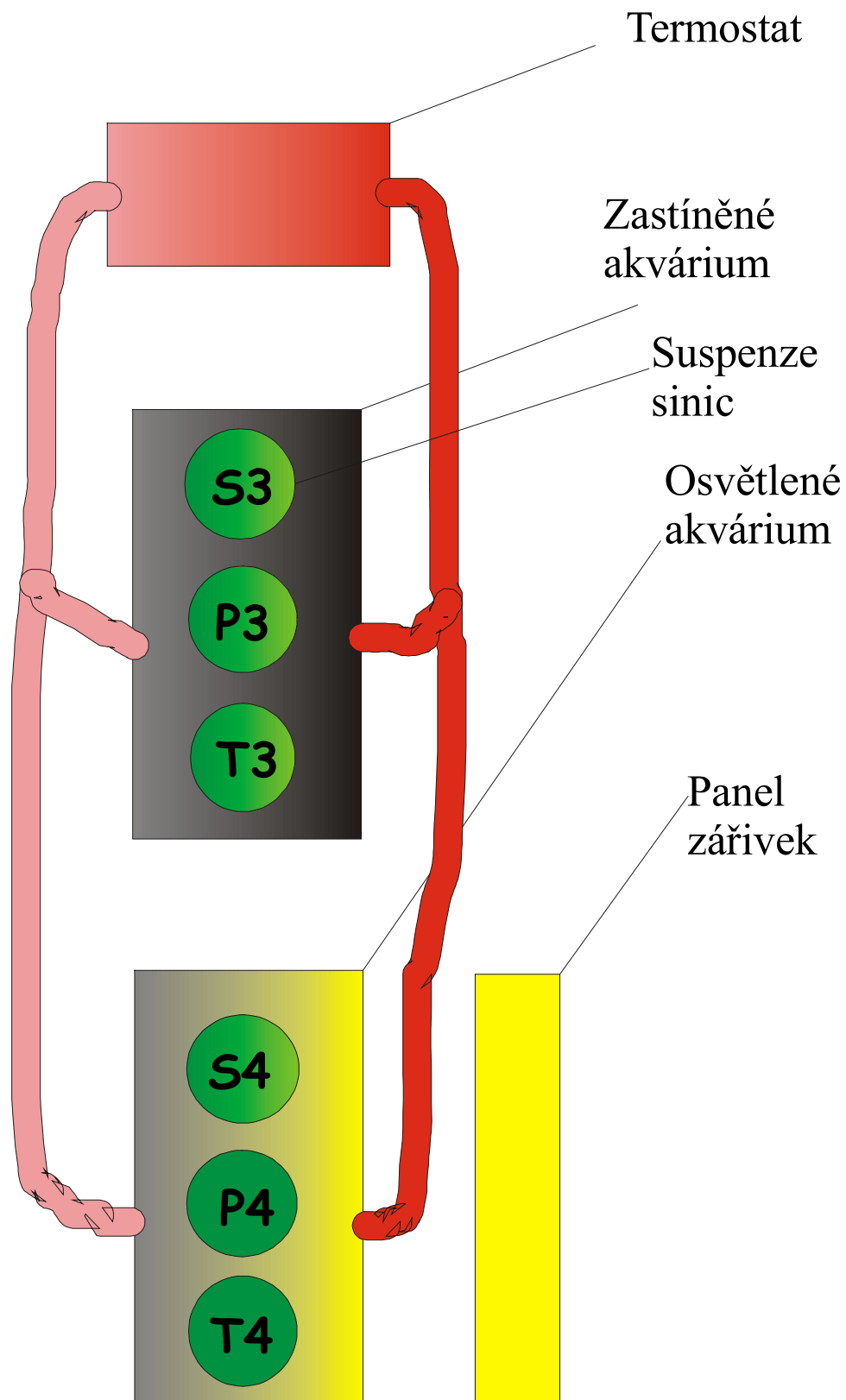


# PŘÍLOHY

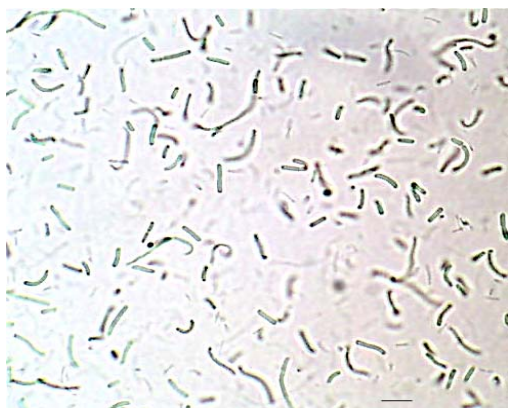
PŘÍLOHY I.....	Kultivace
PŘÍLOHY II.....	Morfologie
PŘÍLOHY III.....	Ultrastruktura
PŘÍLOHY IV.....	Ekofyziologie
PŘÍLOHY V.....	Pigmenty
PŘÍLOHY VI.....	Mastné kyseliny



**Obr. I.I.** Schéma kultivátoru pro kultivaci při nízké teplotě (10°C). Kultivátor je rozdělen do dvou oddělených prostorů. Prostor 2 je silně osvětlen panelem bílých zářivek (intenzita světla  $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), zatímco prostor 1 je zatemněn a osvětlen jen malou červenou zářivkou (intenzita světla  $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).



**Obr. I.II.** Na obrázku je schématicky znázorněno kultivační zařízení pro pěstování sinic ve vysoké teplotě. Voda je ohřívána v termostatu a systémem hadic přiváděna do měděných trubek na dně obou akvárií a odtud je hadicemi opět odváděna zpět do termostatu. Akvária jsou naplněna do poloviny vodou a k měděným trubkám jsou připevněny Erlenmeyerovy baňky se suspenzí sinic, na schématu jsou znázorněny zelenými kolečkami se zkratkou příslušné kultury. Jedno akvárium (prostor č.4) je osvětleno panelem zářivek a druhé je zastíněno vrstvami filtračního papíru (prostor č.3)



**Obr. II.I.** *Synechococcus bigranulatus*, kultura S4. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



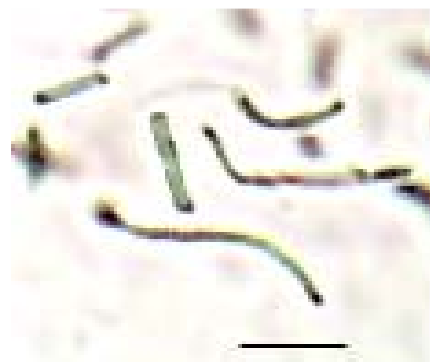
**Obr. II.II.** *Synechococcus bigranulatus*, kultura S4. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



**Obr. II.IV.** *Synechococcus bigranulatus*, kultura S4. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



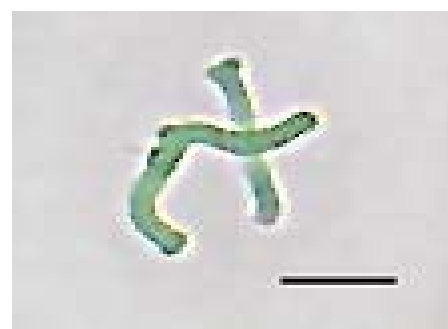
**Obr. II.III.** *Synechococcus bigranulatus*, kultura S4. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



**Obr. II.V.** *Synechococcus bigranulatus*, kultura S4. Úsečka představuje délku 10 $\mu$ m. Patrná je variabilita v šířce buněk.



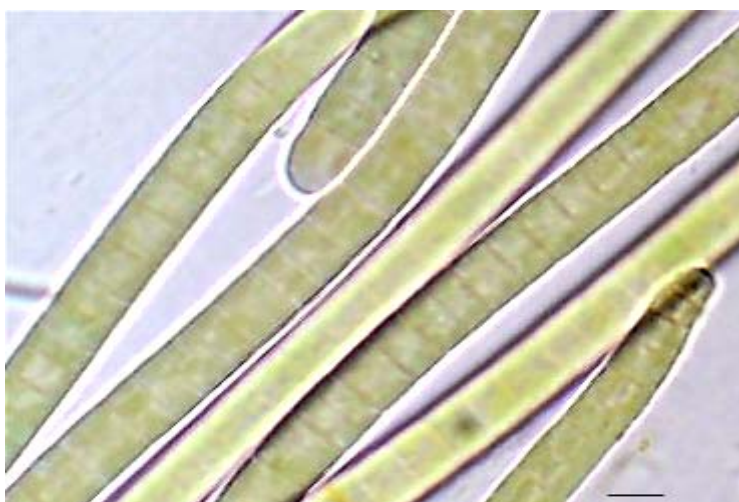
**Obr. II.VI.** *Synechococcus bigranulatus*, kultura S4. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



**Obr. II.VII.** *Synechococcus bigranulatus*, kultura S3. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



**Obr. II.VIII.** *Phormidium autumnale*, kultura P2. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



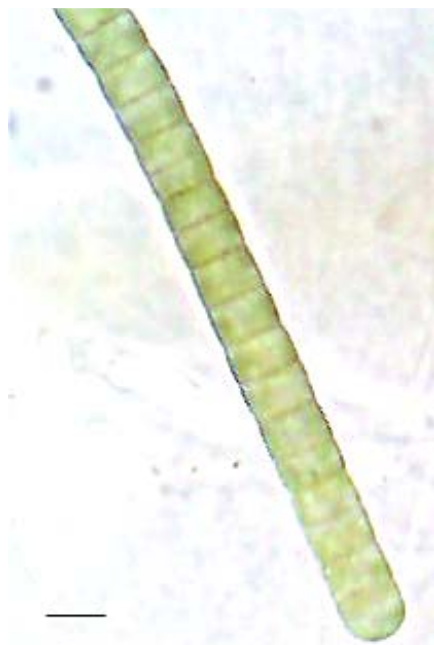
**Obr. II.IX.** *Phormidium autumnale*, kultura P2. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



**Obr. II.X.** *Phormidium autumnale*, kultura P2. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



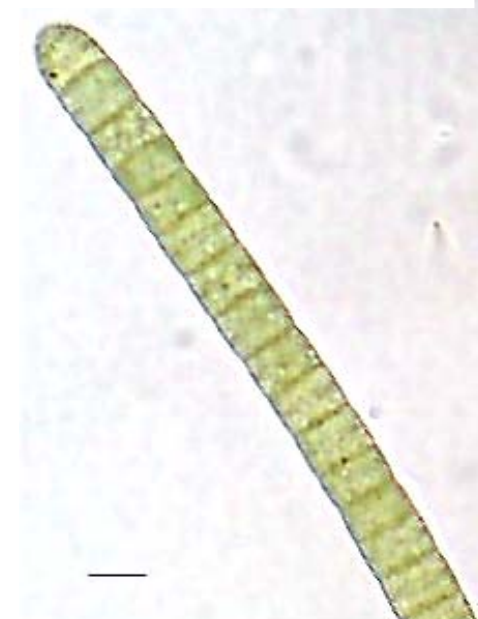
**Obr. II.XI.** *Phormidium autumnale*, kultura P2, uprostřed vlákna je patrná nekroidní buňka. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



**Obr. II.XII.** *Phormidium autumnale*, kultura P1. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



**Obr. II.XIII.** *Phormidium autumnale*, kultura P1. Úsečka je 5 $\mu$ m.



**Obr. II.XIV** *Phormidium autumnale*, kultura P1. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.





**Obr. II.XV.** Kontrolní kultura kmene *Trichormus variabilis*. Patrná je nepřítomnost heterocytů. Úsečka představuje délku 5  $\mu\text{m}$ .



**Obr. II.XVI.** Kultura T2 kmene *Trichormus variabilis*. Patrná je nepřítomnost heterocytů v mladé kultuře. Úsečka představuje délku 5  $\mu\text{m}$ .

**Obr. II.XVII.** Kontrolní kultura kmene *Trichormus variabilis*. Patrná je nepřítomnost heterocytů. Úsečka představuje délku 5  $\mu\text{m}$ .



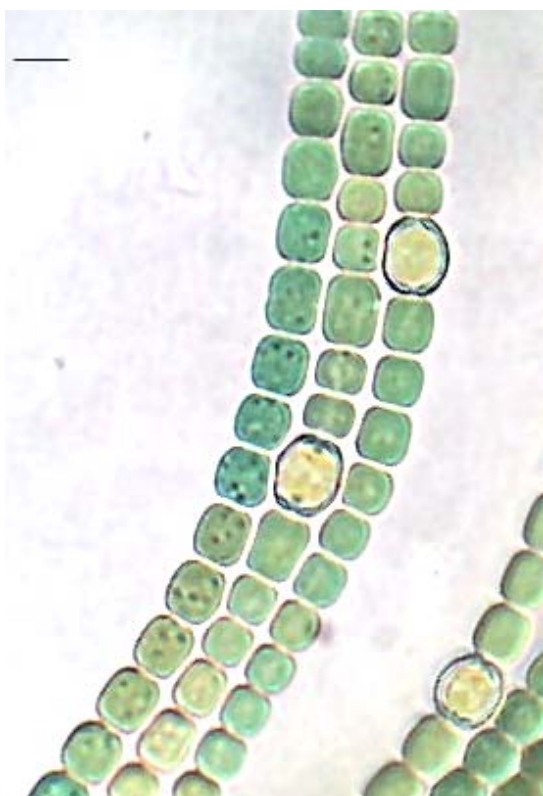
**Obr. II.XVIII.** Kontrolní kultura kmene *Trichormus variabilis*. Patrná je nepřítomnost heterocytů. Úsečka je 5  $\mu\text{m}$ .



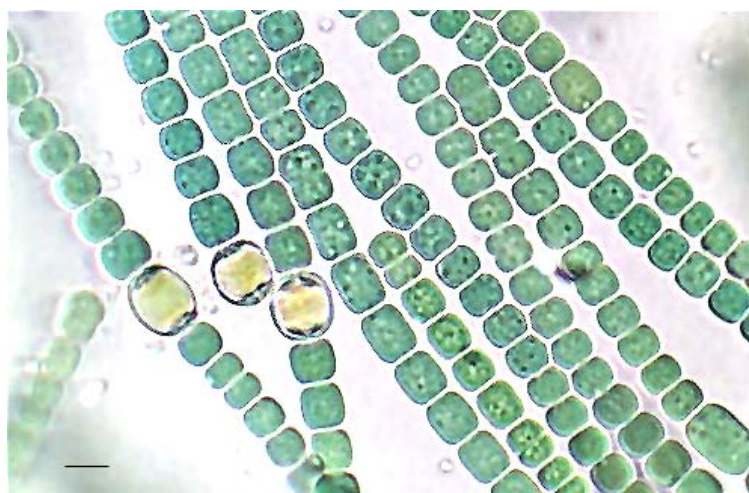
**Obr. II.XIX.** Kontrolní kultura kmene *Trichormus variabilis*. Patrná je nepřítomnost heterocytů. Úsečka představuje délku 5  $\mu\text{m}$ .



**Obr. II.XX.** Kultura T1 kmene *Trichormus variabilis*. Patrná je nepřítomnost heterocytů. Úsečka je 5  $\mu\text{m}$ .



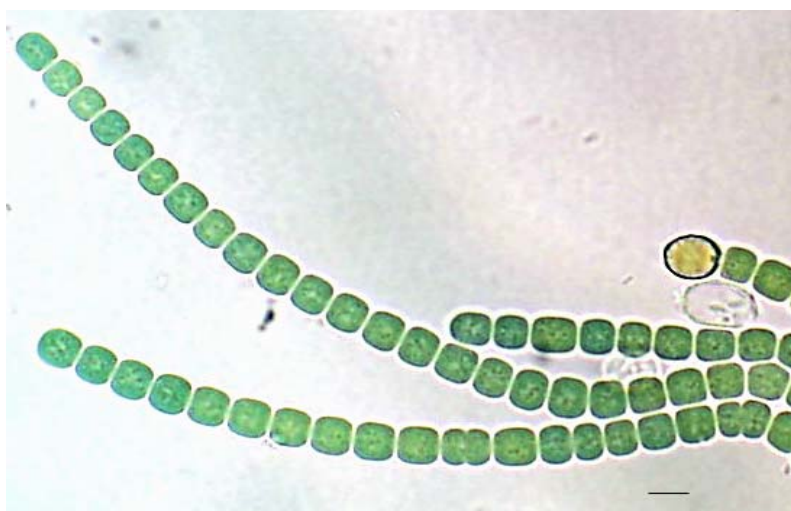
**Obr. II.XXI.** *Trichormus variabilis*, kultura T1. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



**Obr. II.XXII.** *Trichormus variabilis*, kultura T1. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



**Obr. II.XXIII.** *Trichormus variabilis*, kultura T2, řetězec akinet. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



**Obr. II.XXIV.** *Trichormus variabilis*, kultura T2, u horního vlákna je patrný koncový heterocyt. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.



**Obr. II.XXV.** *Trichormus variabilis*, kultura T2. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.

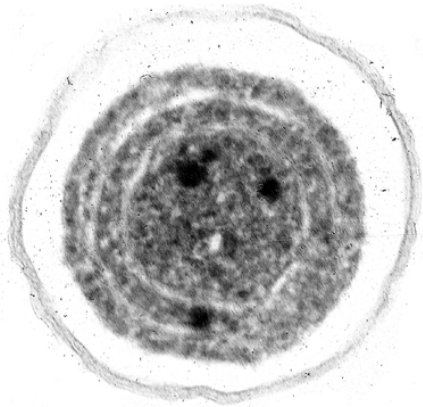


**Obr. II.XXVI.** *Trichormus variabilis*, kultura T2, uprostřed vlákna je patrný heterocyt. Úsečka představuje délku 5 $\mu$ m.

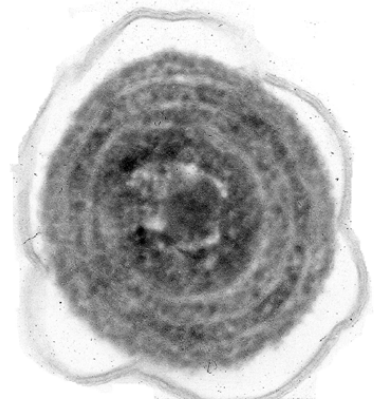




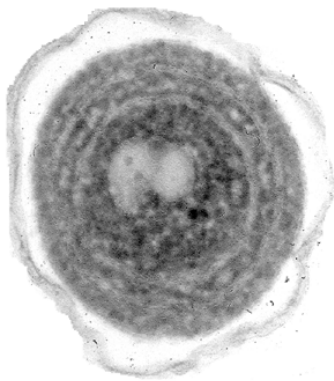
**Obr. III.I.** Podélný řez sinicí *Synechococcus bigranulatus*, kontrolní kultura Sk. Snímek z transm. el. mikroskopu. Zvětšeno 25 000×.



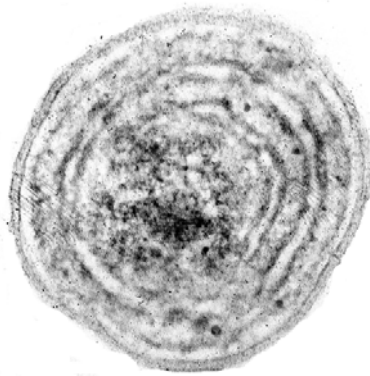
**Obr. III.II.** Příčný řez sinicí *Synechococcus bigranulatus*, kontrolní kultura Sk. Snímek z transm. el. mikroskopu. Zvětšeno 50 000×.



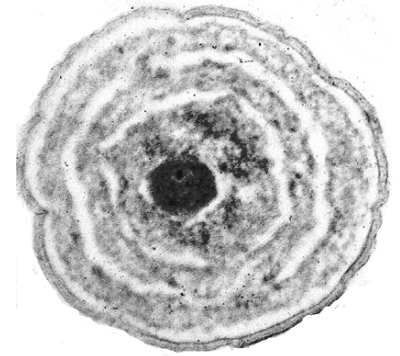
**Obr. III.III.** Příčný řez sinicí *Synechococcus bigranulatus*, kontrolní kultura Sk. Snímek z transm. el. mikroskopu. Zvětšeno 50 000×.



**Obr. III.IV.** Příčný řez sinicí *Synechococcus bigranulatus*, kontrolní kultura Sk. Snímek z transm. el. mikroskopu. Zvětšeno 50 000×.



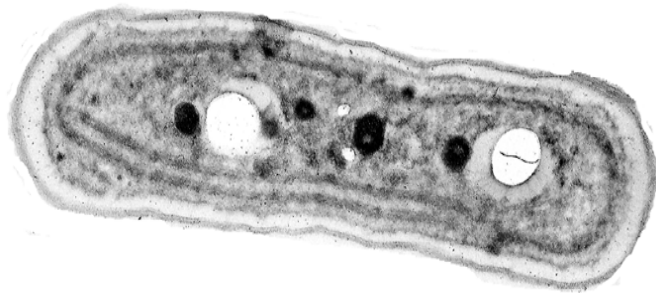
**Obr. III.V.** Příčný řez sinicí *Synechococcus bigranulatus*, kultura S4. Snímek z transm. el. mikroskopu. Zvětšeno 60 000×.



**Obr. III.VI.** Příčný řez sinicí *Synechococcus bigranulatus*, kultura S4. Snímek z transm. el. mikroskopu. Zvětšeno 60 000×.

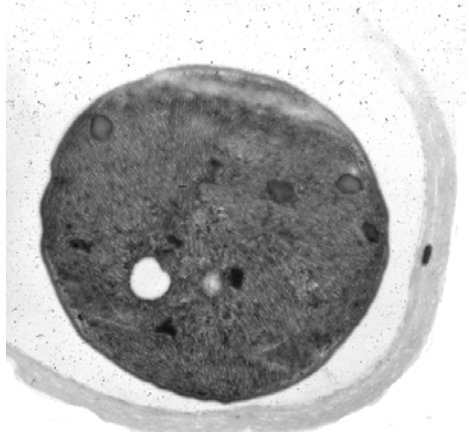


**Obr. III.VII.** Podélný řez sinicí *Synechococcus bigranulatus*, kultura S4. Snímek z transm. el. mikroskopu. Zvětšeno 25 000×.

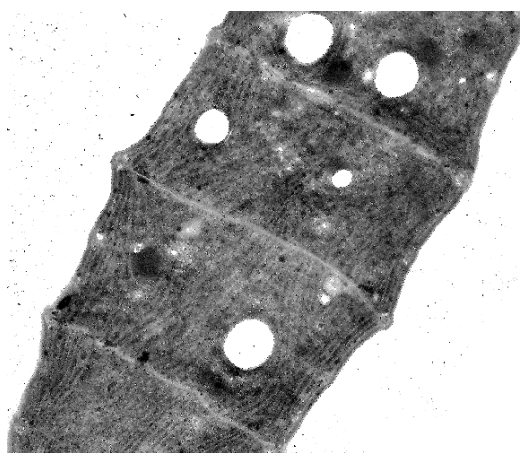


**Obr. III.VIII.** Příčný řez sinicí *Synechococcus bigranulatus*, kultura S4. Snímek z transm. el. mikroskopu. Zvětšeno 25 000×.

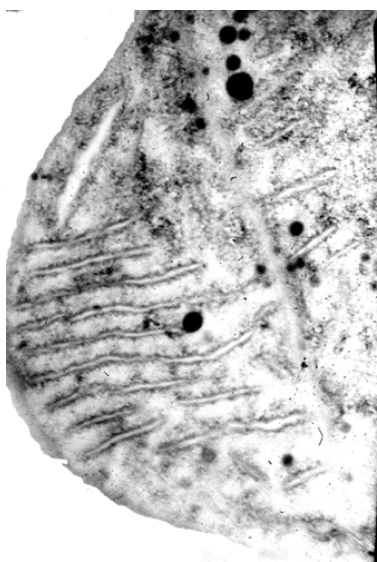




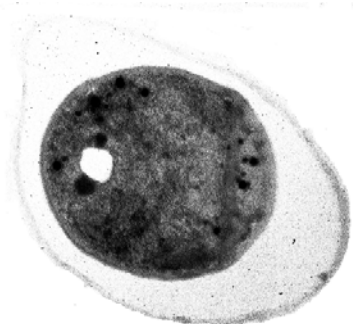
**Obr. III.IX.** Příčný řez sinicí *Phormidium autumnale*, kontrolní kultura Pk. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 10 000×.



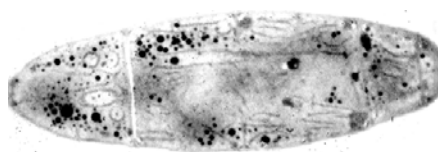
**Obr. III.X.** Podélný řez sinicí *Phormidium autumnale*, kontrolní kultura Pk. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 12 000×.



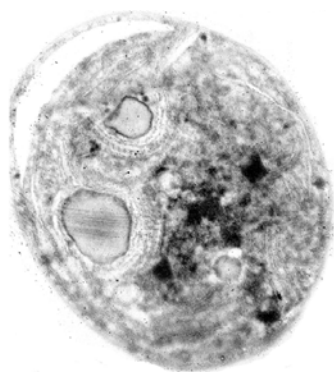
**Obr. III.XI.** Podélný řez sinicí *Phormidium autumnale*, kontrolní kultura Pk. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 30 000×.



**Obr. III.XII.** Příčný řez sinicí *Phormidium autumnale*, kultura P1. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 10 000×.



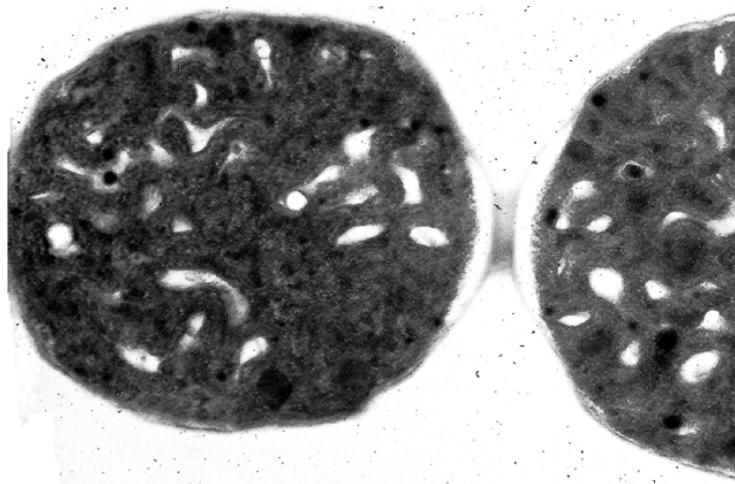
**Obr. III.XIII.** Podélný řez sinicí *Phormidium autumnale*, kultura P1. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 8 000×.



**Obr. III.XIV.** Příčný řez sinicí *Phormidium autumnale*, kultura P2. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 12 000×.

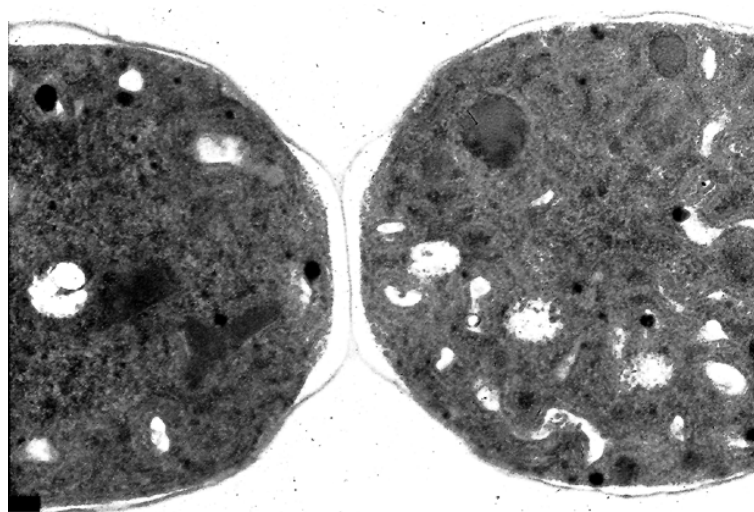
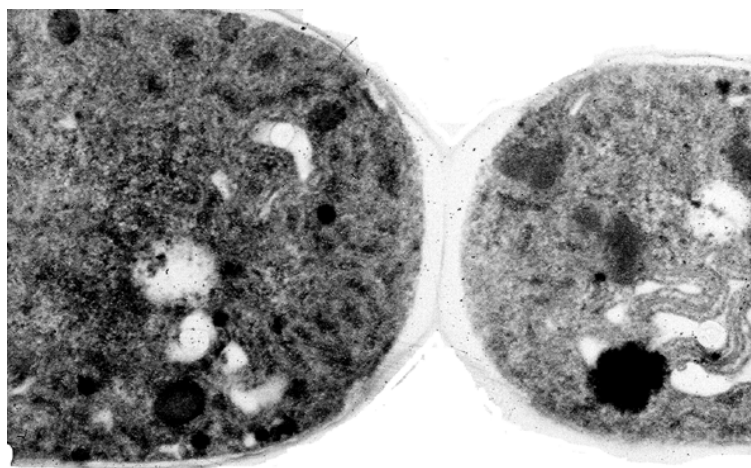


**Obr. III.XV.** Podélný řez sinicí *Phormidium autumnale*, kultura P2. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 5 000×.

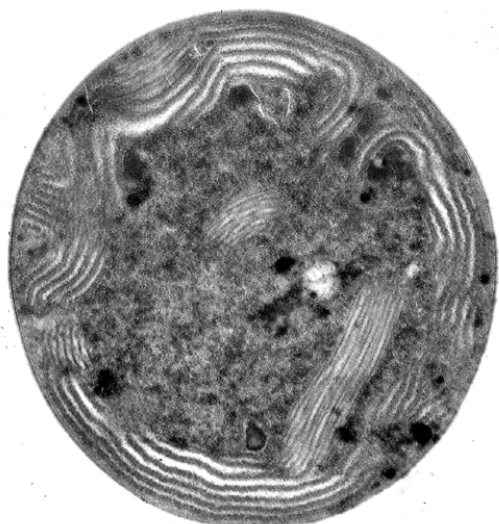


**Obr. III.XVI.** Podélný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kontrolní kultura Tk Snímek z transmis. elektronového mikroskopu. Zvětšeno 15 000 $\times$ .

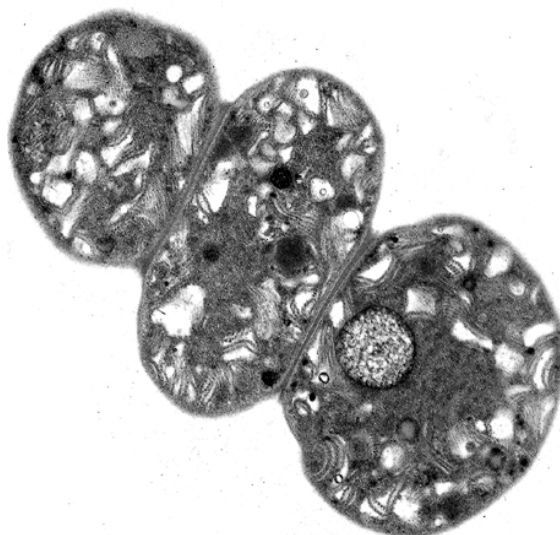
**Obr. III.XVII.** Podélný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kontrolní kultura T2. Snímek z transmisního elektronového mikroskopu.. Zvětšeno 15 000 $\times$ .



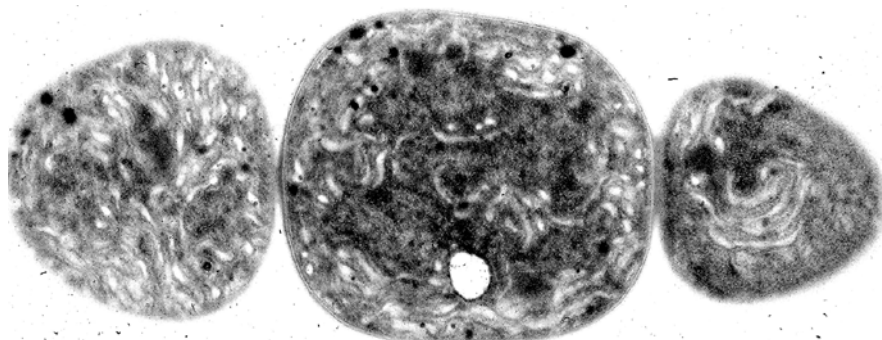
**Obr. III.XVIII.** Podélný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kontrolní kultura Tk. Snímek z transmis. elektronového mikroskopu.. Zvětšeno 15 000 $\times$ .



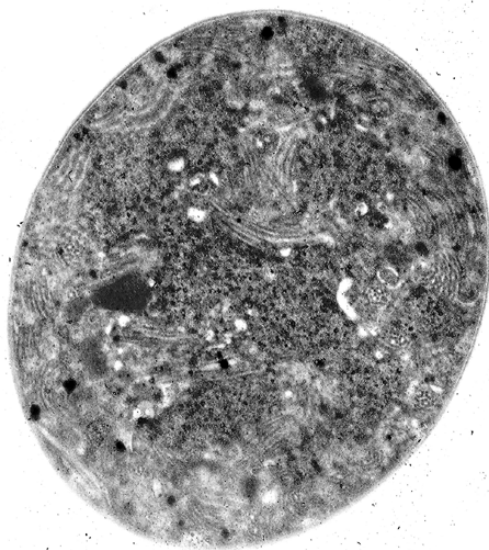
**Obr. III.XIX.** Příčný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kultura T1. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 12 000X.



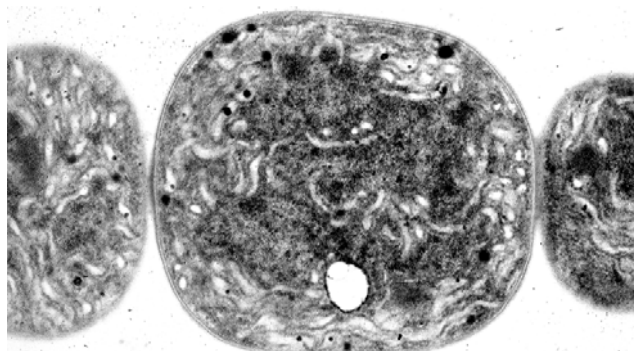
**Obr. III.XX.** Podélný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kultura T1. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 8 000X.



**Obr. III.XXI.** Podélný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kultura T1. Snímek z transmisního el. mikroskopu. Zvětšeno 12 000X.



**Obr. III.XXII.** Příčný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kultura T1. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 12 000X.



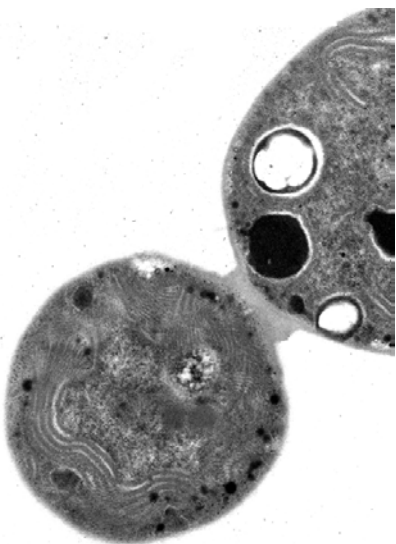
**Obr. III.XXIII.** Podélný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kultura T1. Snímek z transmisního el. mikroskopu. Zvětšeno 20 000X.



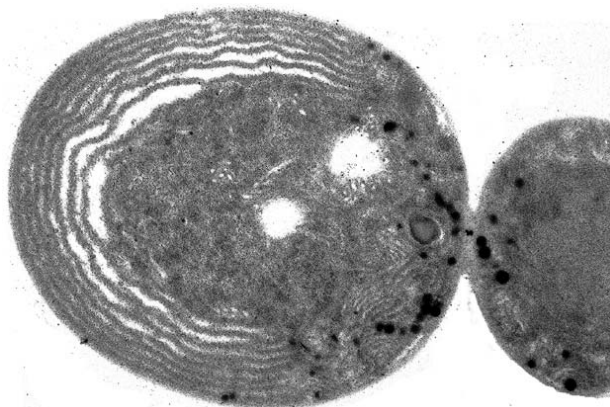
**Obr. III.XXIV** Příčný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kultura T2. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 15 000 $\times$ .



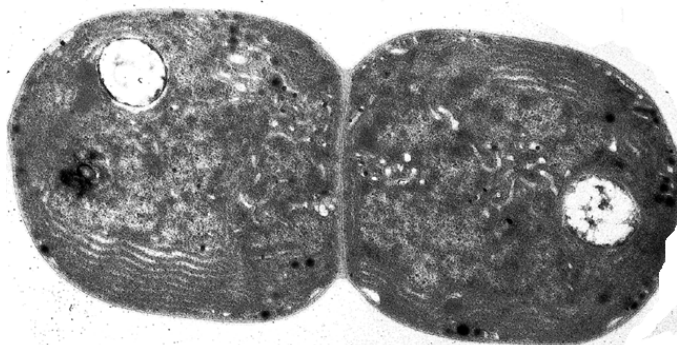
**Obr. III.XXV.** Příčný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kultura T2. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 12 000 $\times$ .



**Obr. III.XXVI.** Podélný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kultura T2. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 15 000 $\times$ .

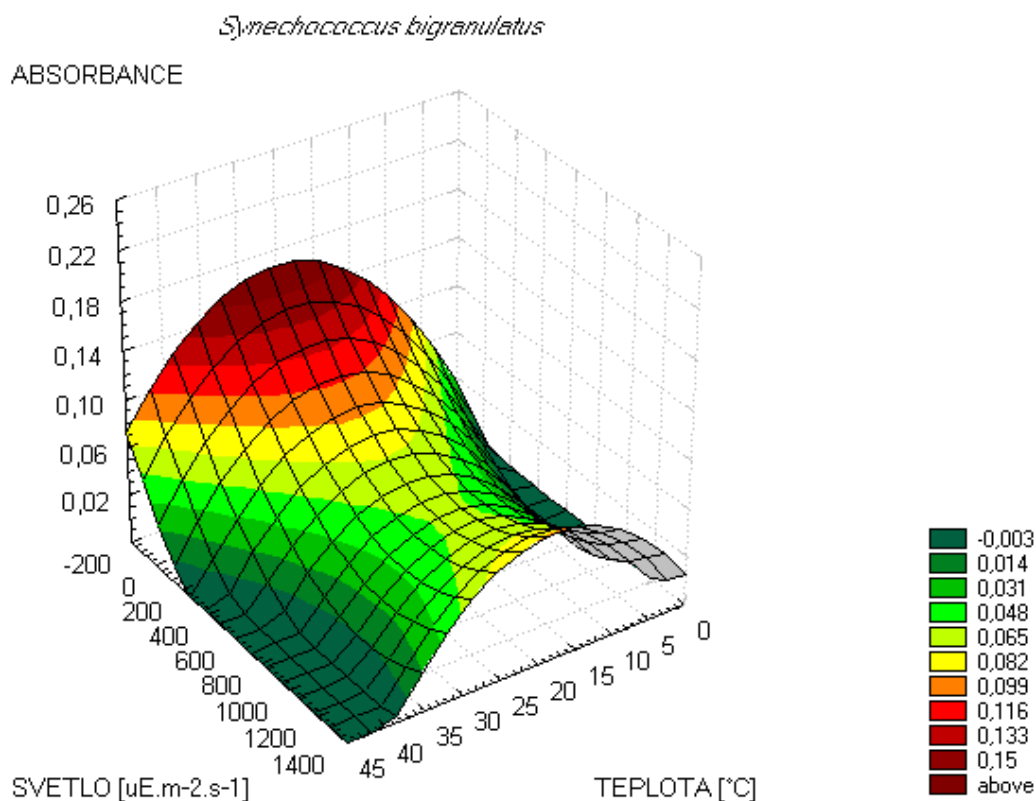


**Obr. III.XXVII.** Podélný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kultura T2. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 12 000 $\times$ .

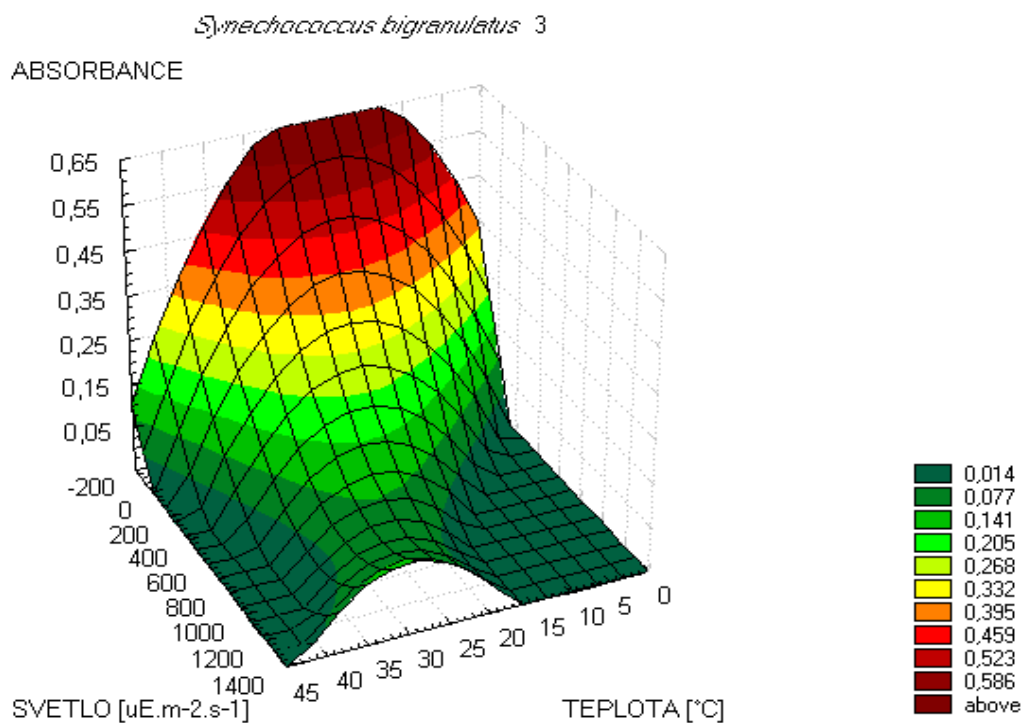


**Obr. III.XXVIII.** Podélný řez sinicí *Trichormus variabilis*, kultura T2. Snímek z transmis. el. mikroskopu. Zvětšeno 10 000 $\times$ .

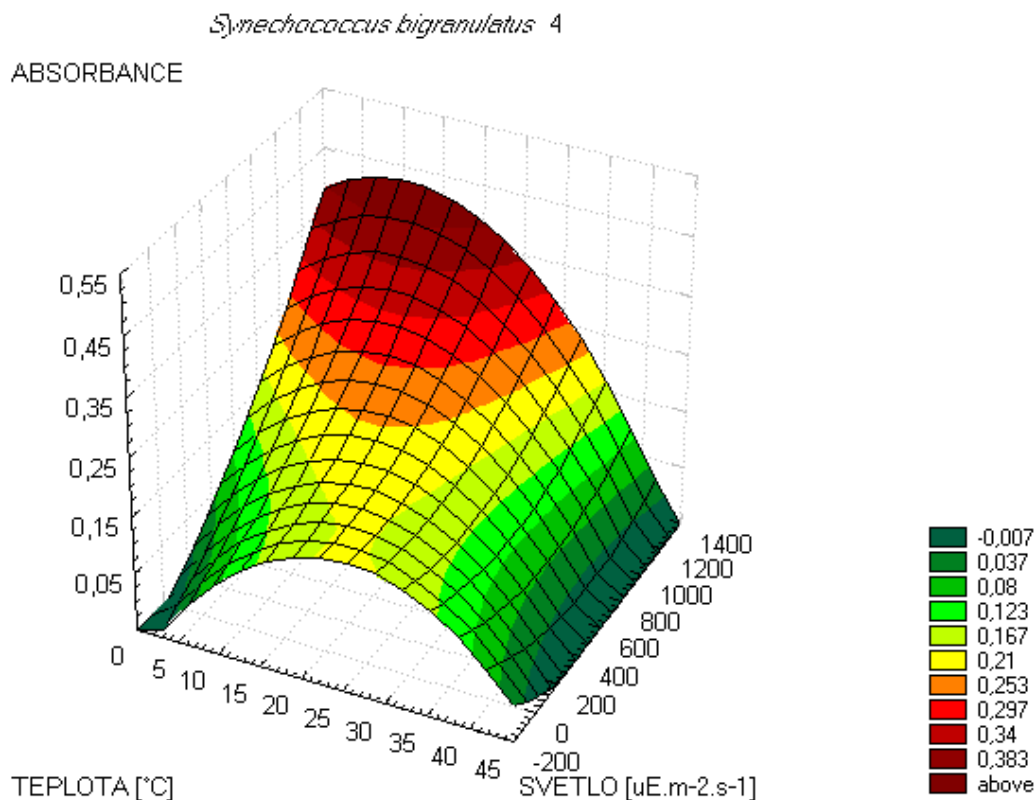




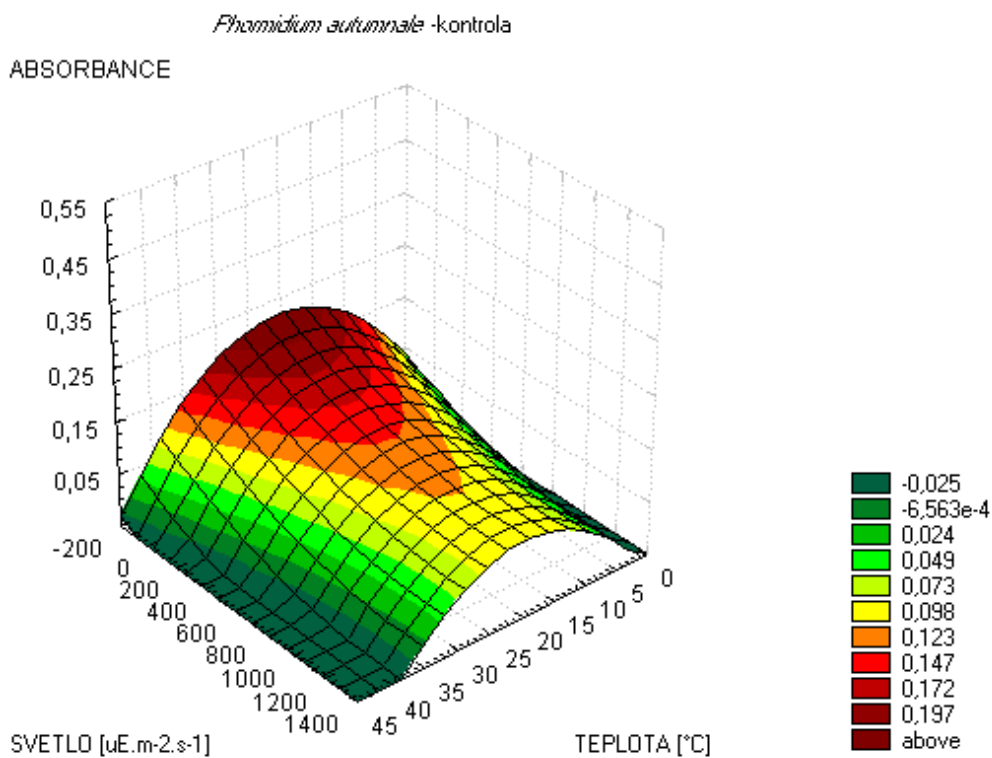
**Graf IV.I.** Ekofyziologické nároky kontrolní kultury kmene *Synechococcus bigranulatus* na teplotu a světlo. Kontrolní kultura byla pěstována při teplotě 24°C a intenzitě světla 150  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



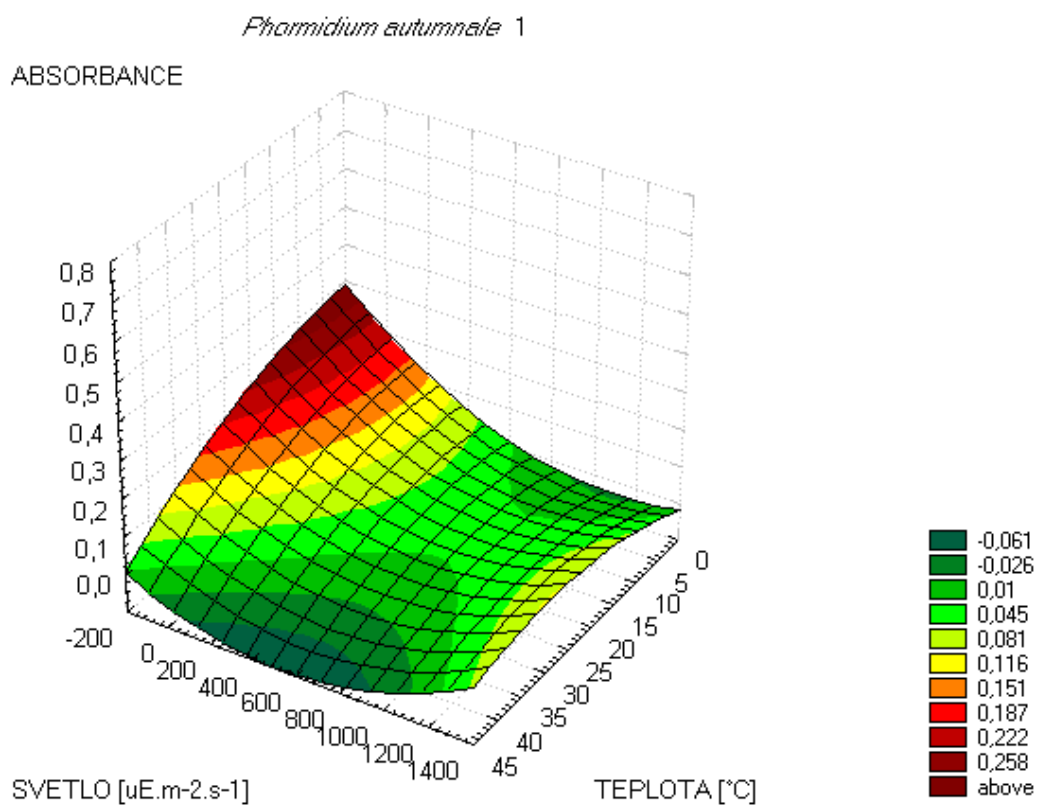
**Graf IV.II.** Ekofyziologické nároky kultury S3, kmene *Synechococcus bigranulatus* na teplotu a světlo. Kultura S3 byla pěstována při teplotě 39°C a intenzitě světla 50  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



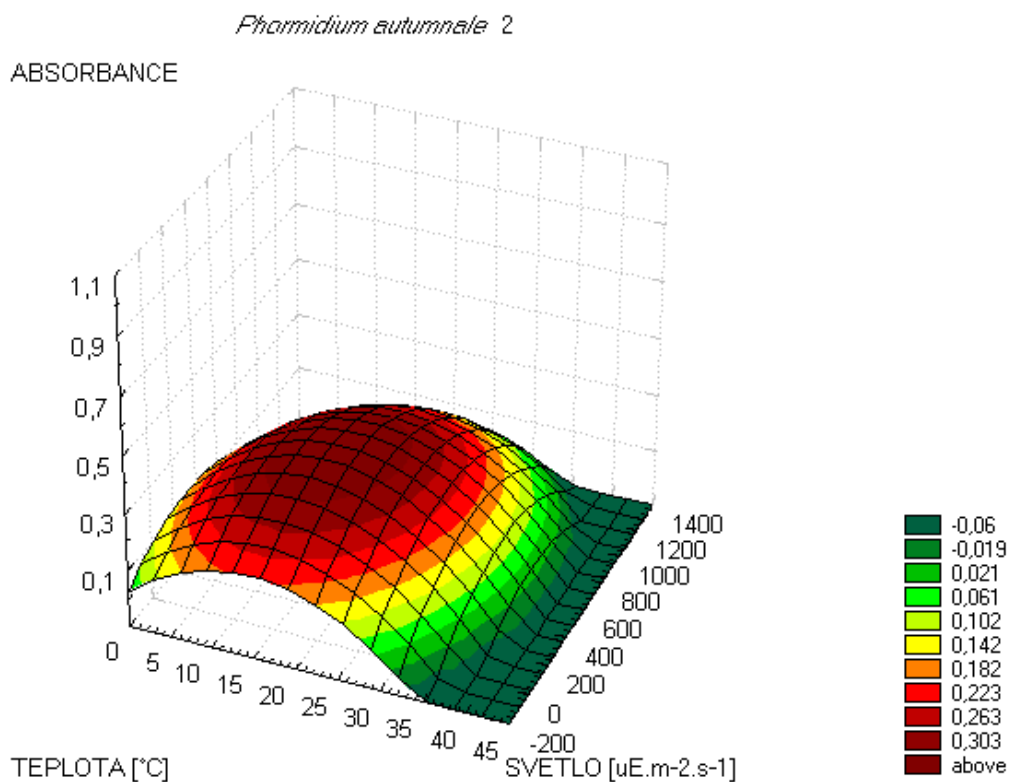
**Graf IV.III.** Ekofyziologické nároky kultury S4, kmene *Synechococcus bigranulatus* na teplotu a světlo. Kultura S4 byla pěstována při teplotě 39°C a intenzitě světla 750  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .



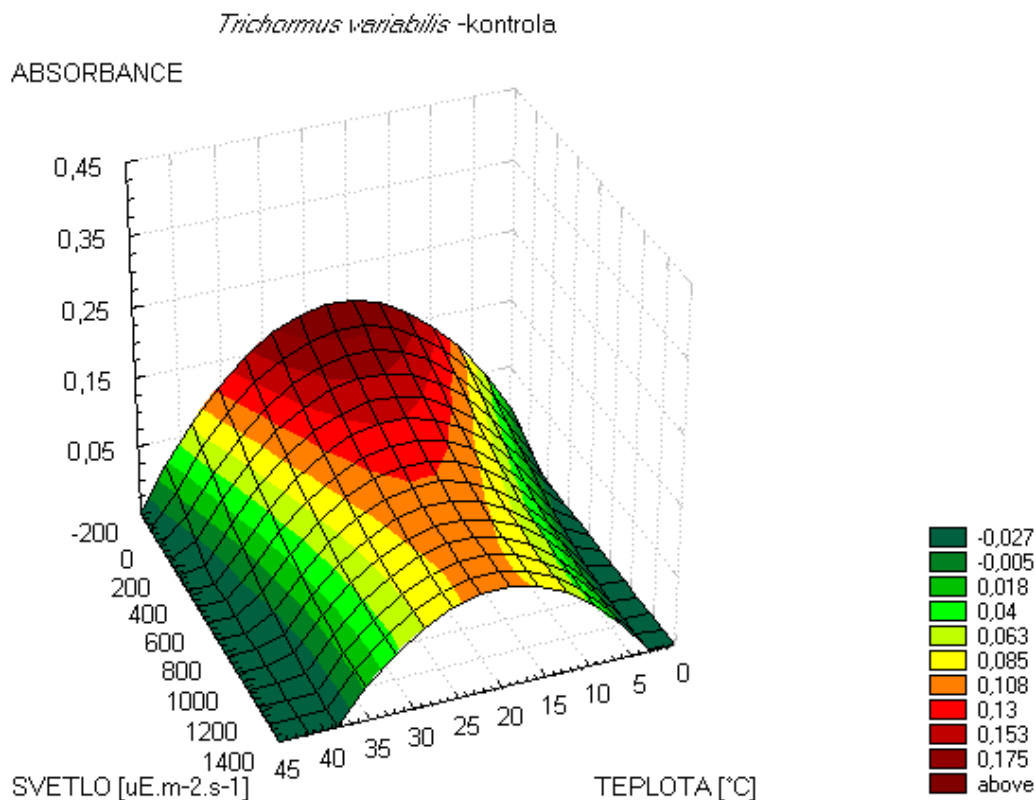
**Graf IV.IV.** Ekofyziologické nároky kontrolní kultury kmene *Phormidium autumnale* na teplotu a světlo. Kontrolní kultura Pk byla pěstována při teplotě 24°C a intenzitě světla 150  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .



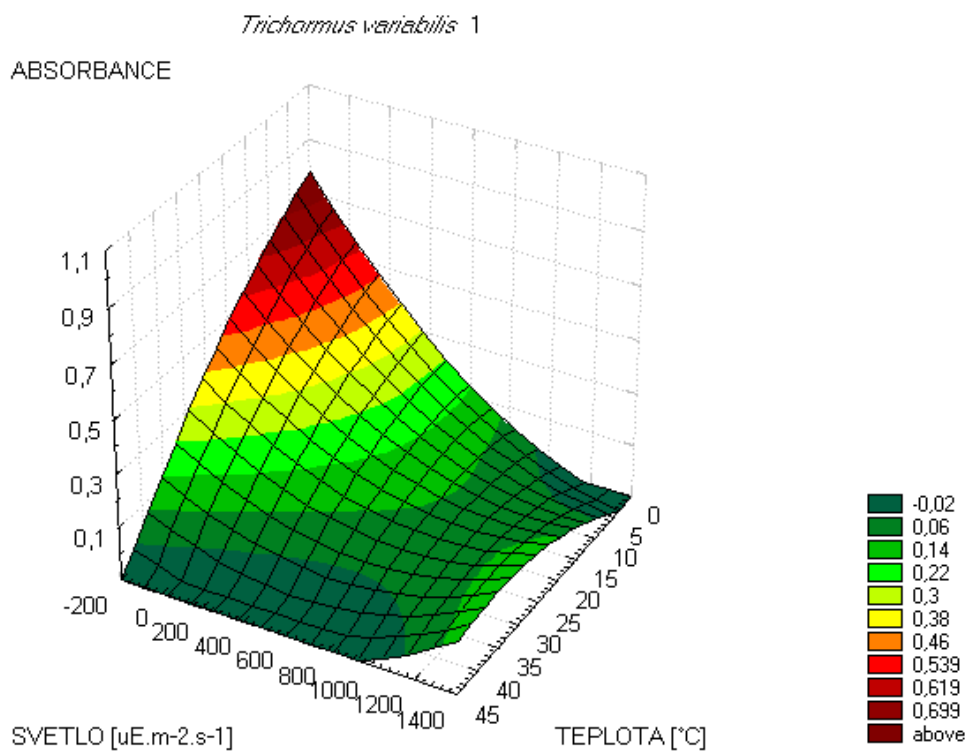
**Graf IV.V.** Ekofyziologické nároky kultury P1, kmene *Phormidium autumnale* na teplotu a světlo. Kultura P1 byla pěstována při teplotě  $10^{\circ}\text{C}$  a intenzitě světla  $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



**Graf IV.VI.** Ekofyziologické nároky kultury P2, kmene *Phormidium autumnale* na teplotu a světlo. Kultura P2 byla pěstována při teplotě  $10^{\circ}\text{C}$  a intenzitě světla  $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

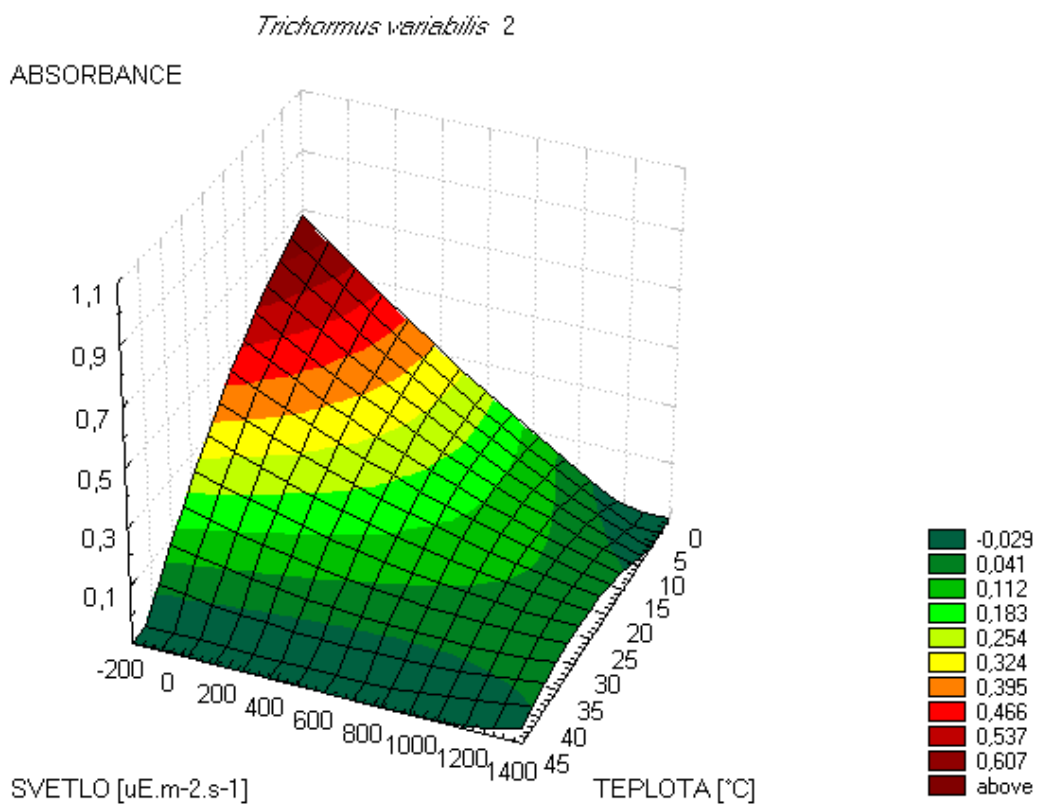


**Graf IV.VII.** Ekofyziologické nároky kontrolní kultury kmene *Trichormus variabilis* na teplotu a světlo. Kontrolní kultura Tk byla pěstována při teplotě  $24^{\circ}\text{C}$  a intenzitě světla  $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

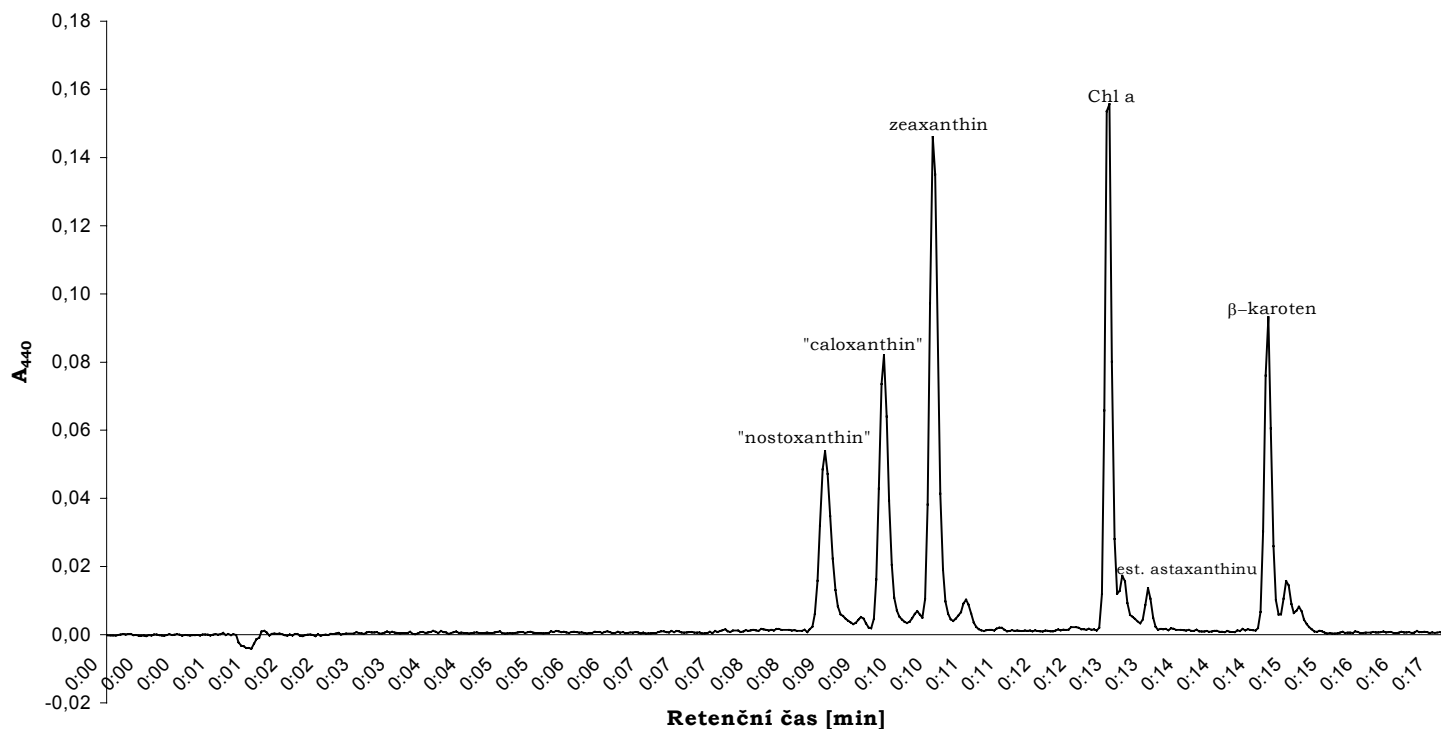
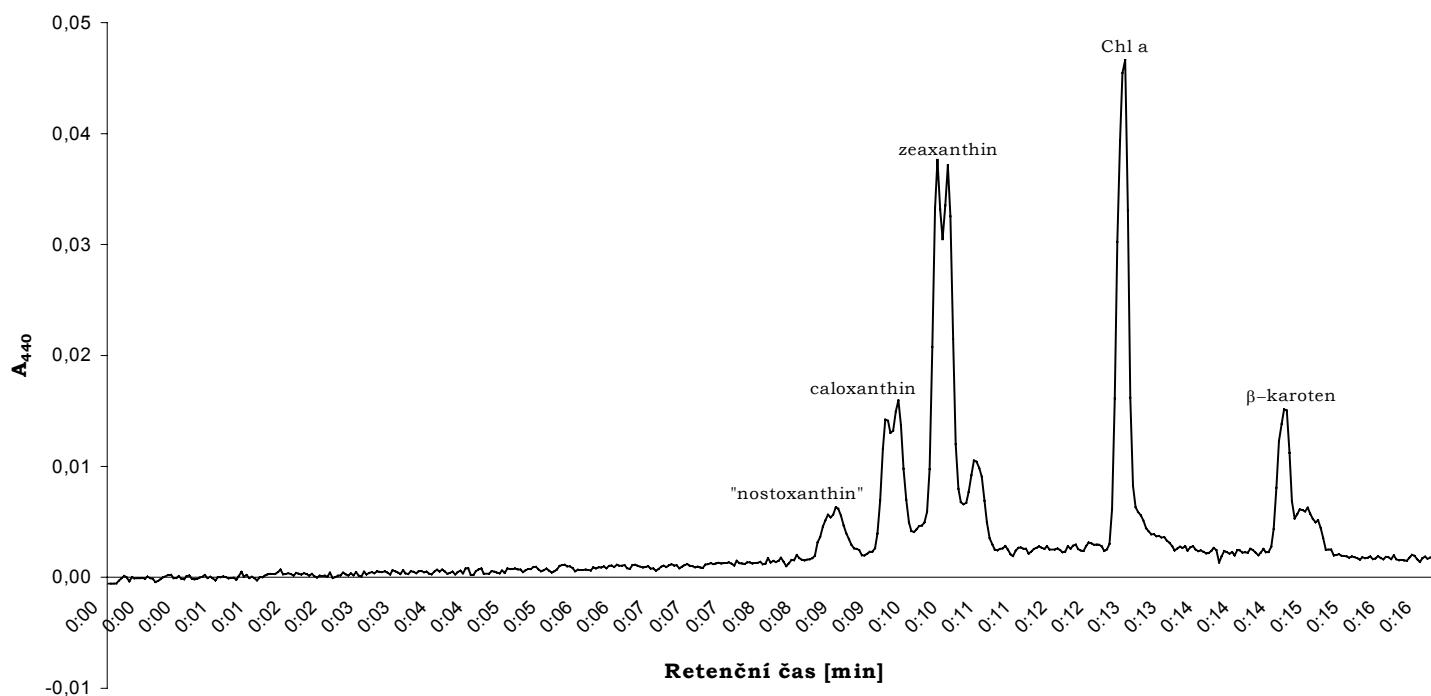


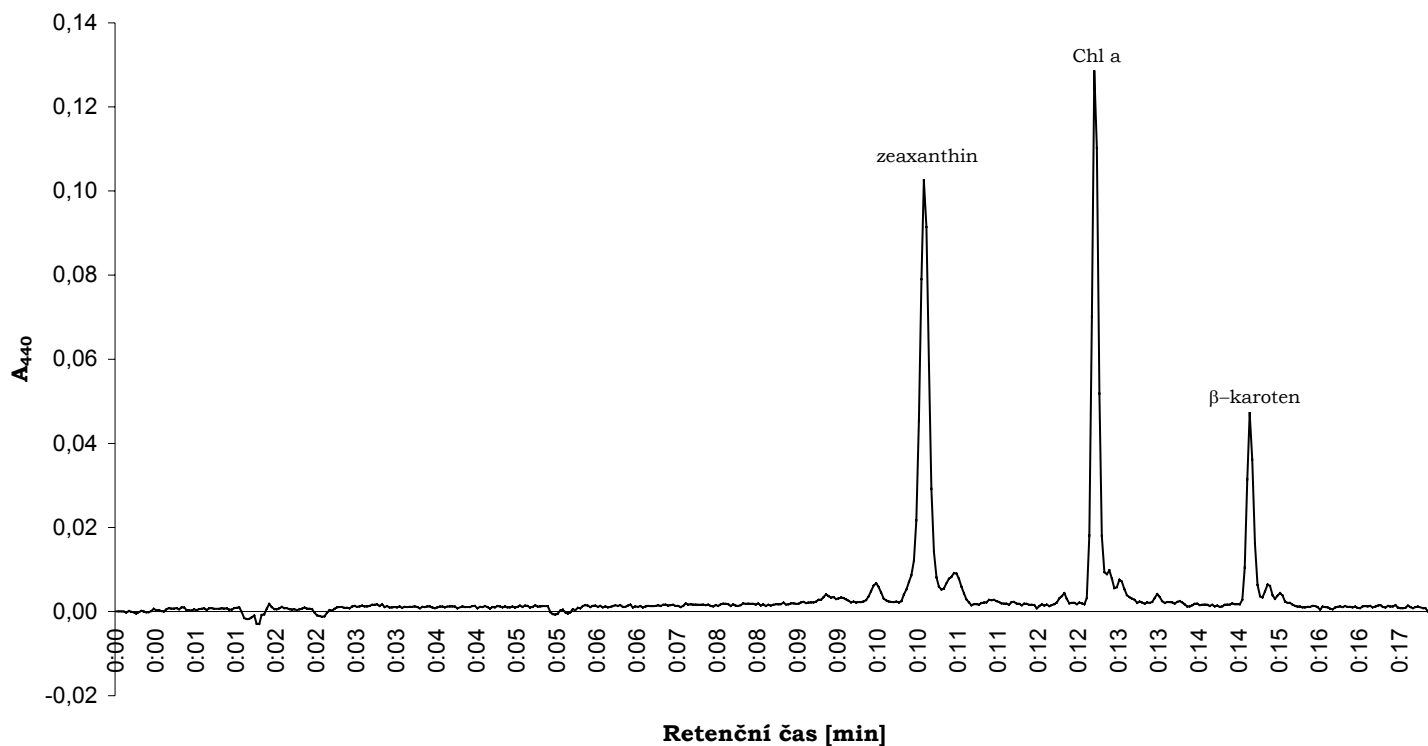
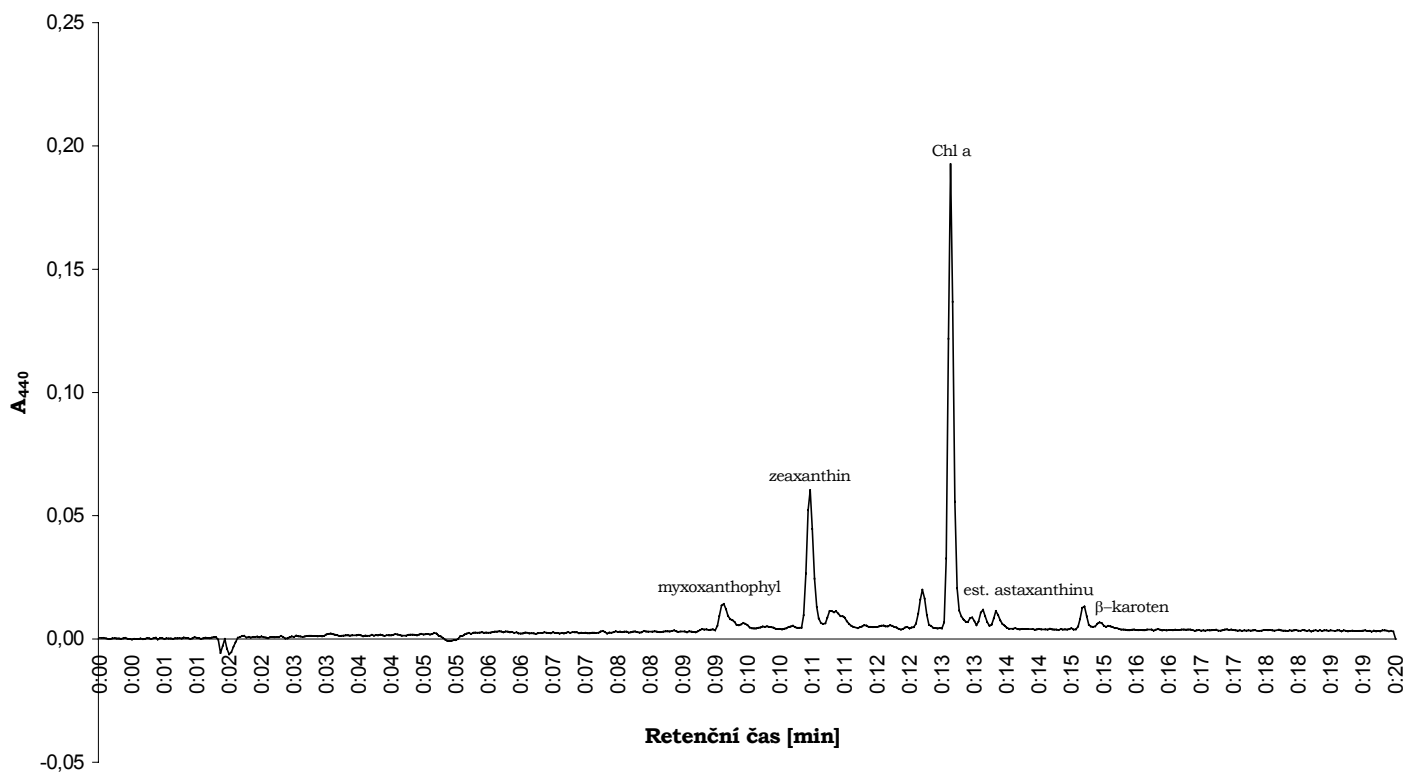
**Graf IV.VIII.** Ekofyziologické nároky kultury T1, kmene *Trichormus variabilis* na teplotu a světlo. Kultura T1 byla pěstována při teplotě  $10^{\circ}\text{C}$  a intenzitě světla  $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

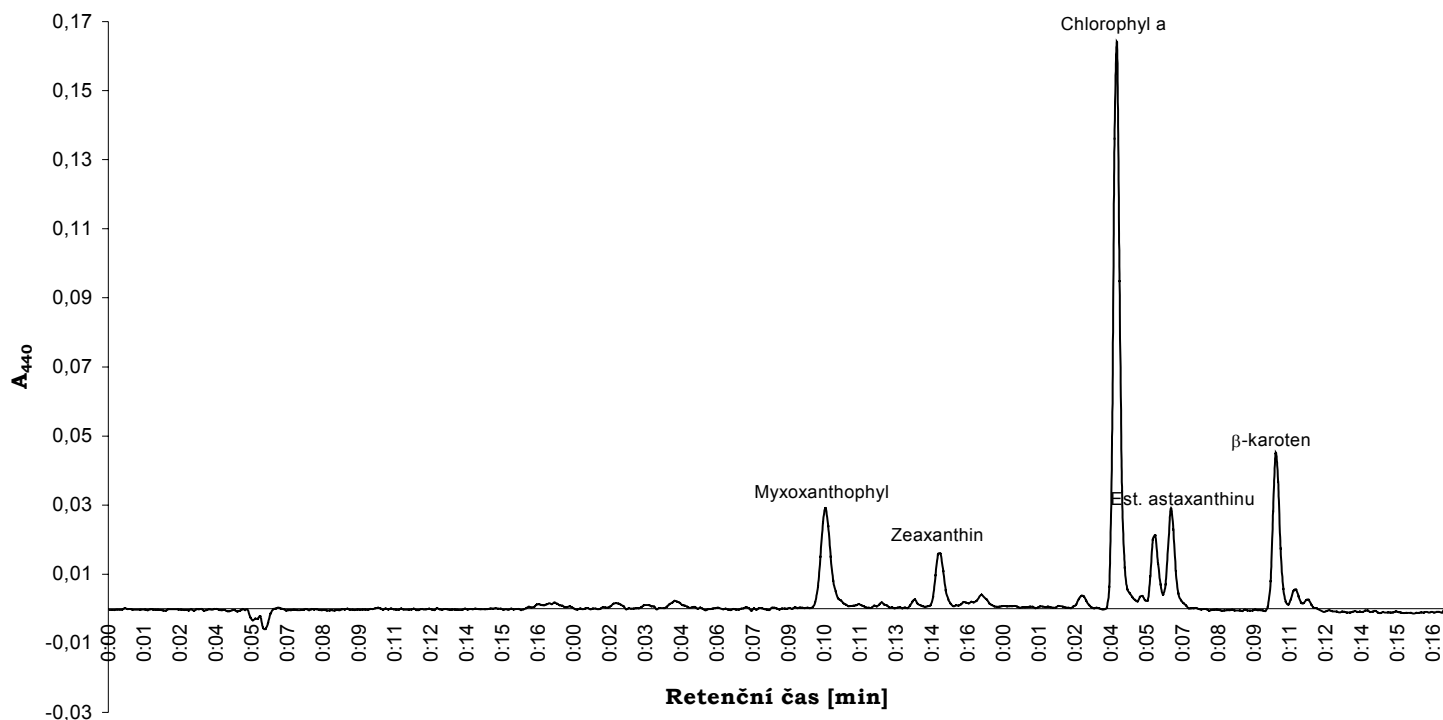
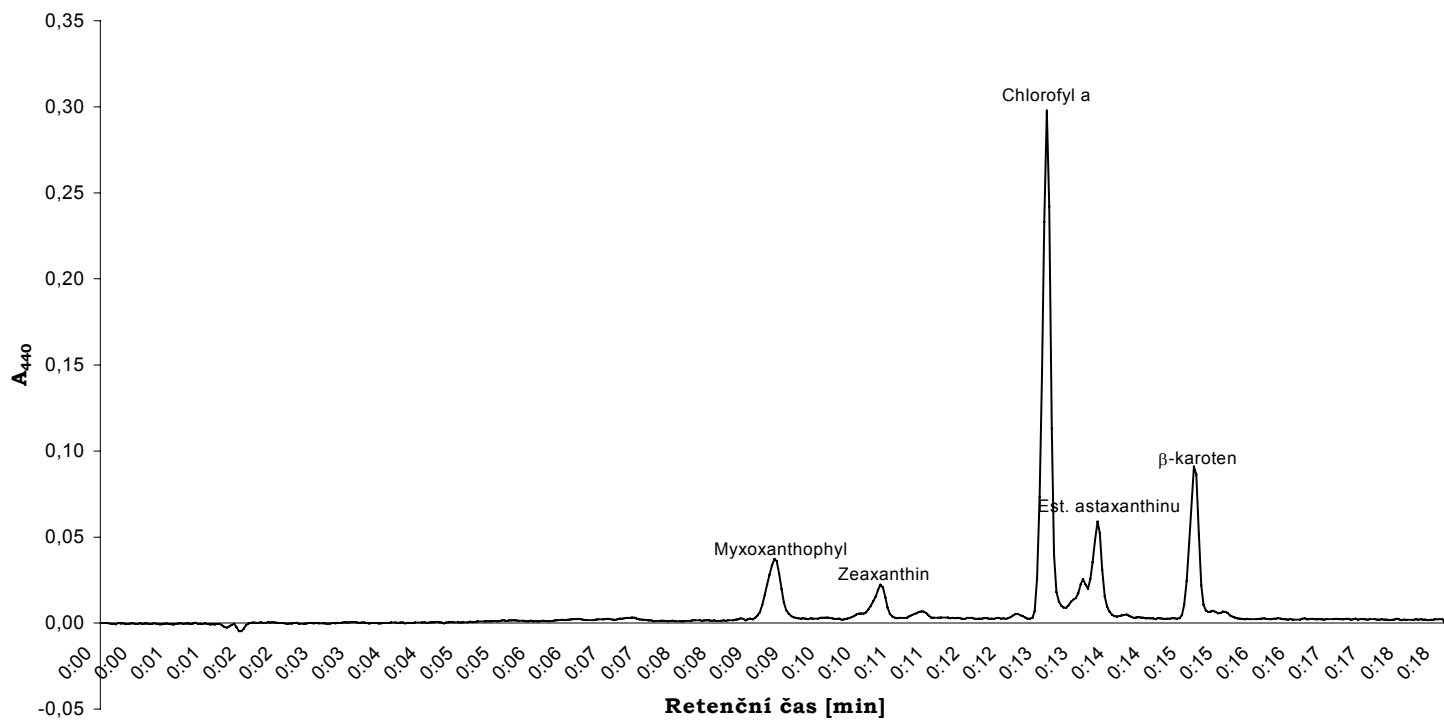


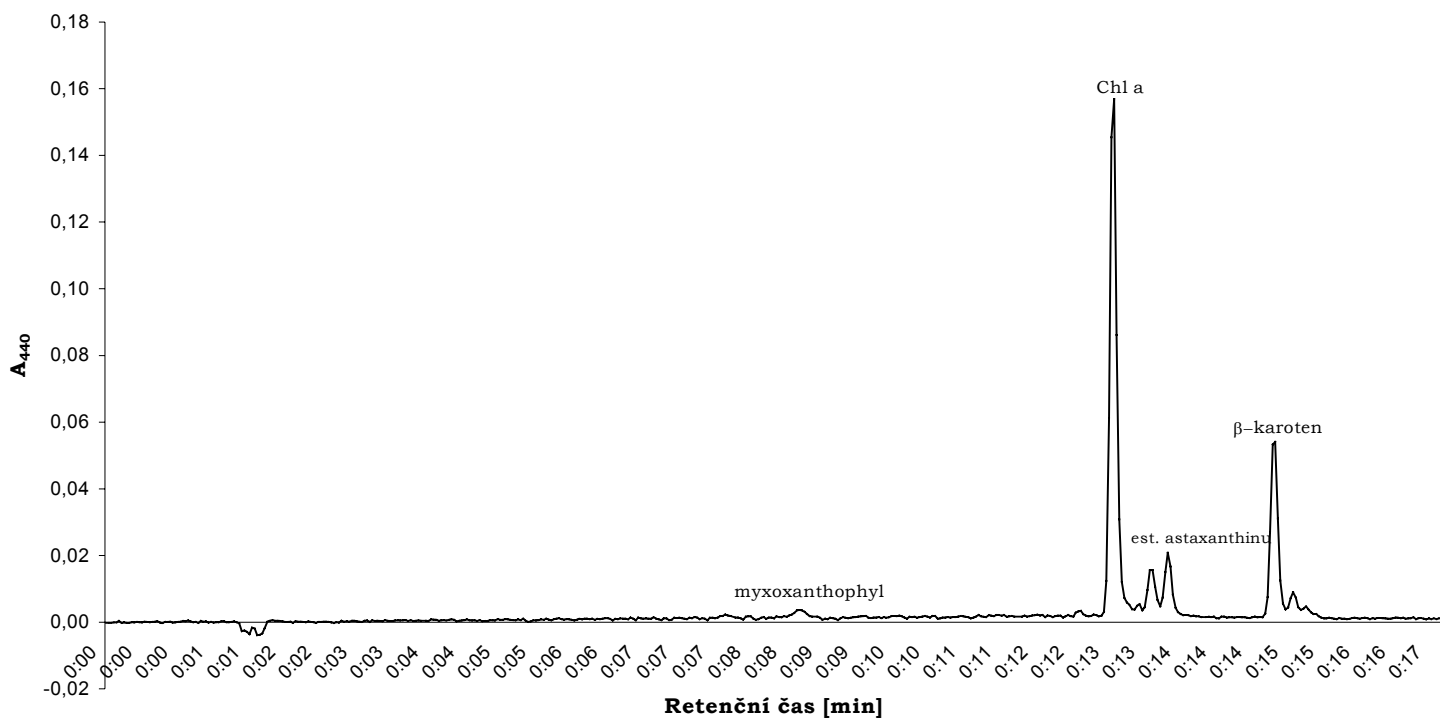
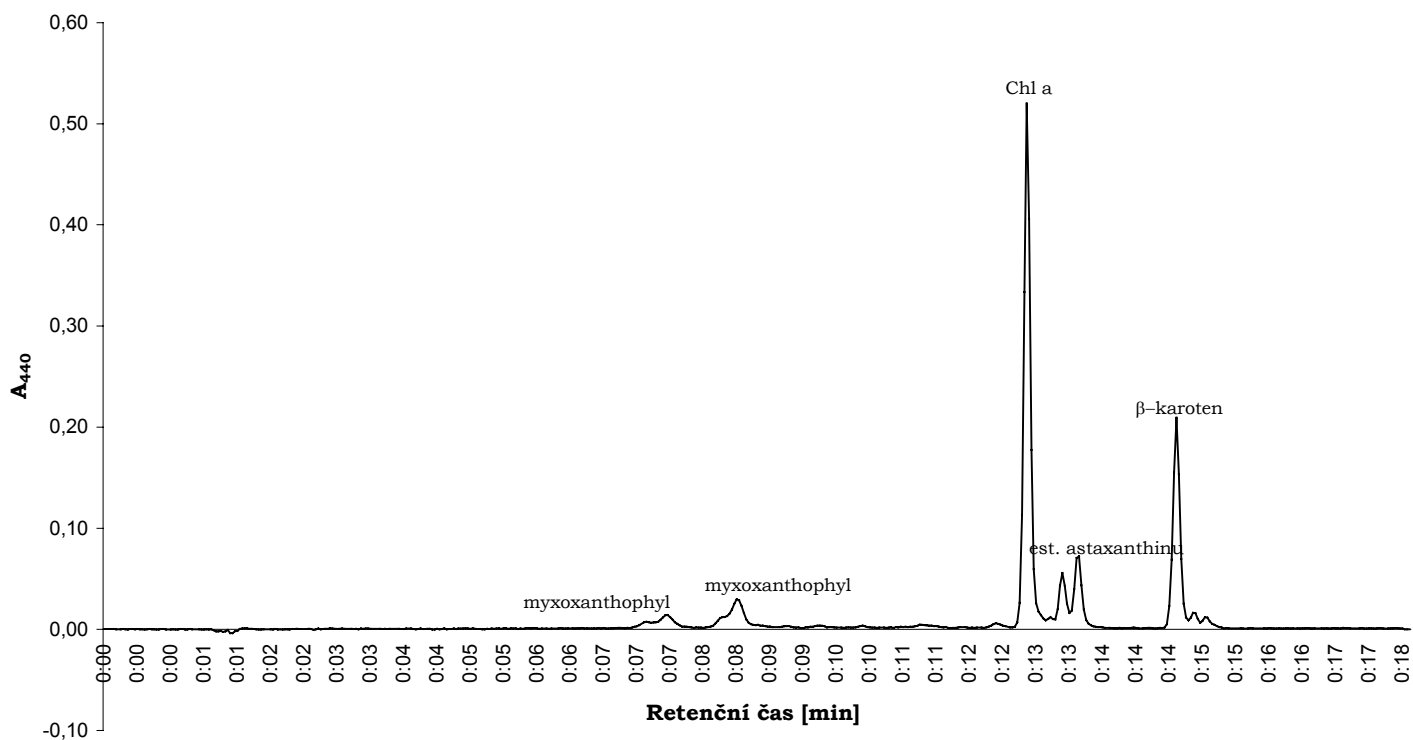


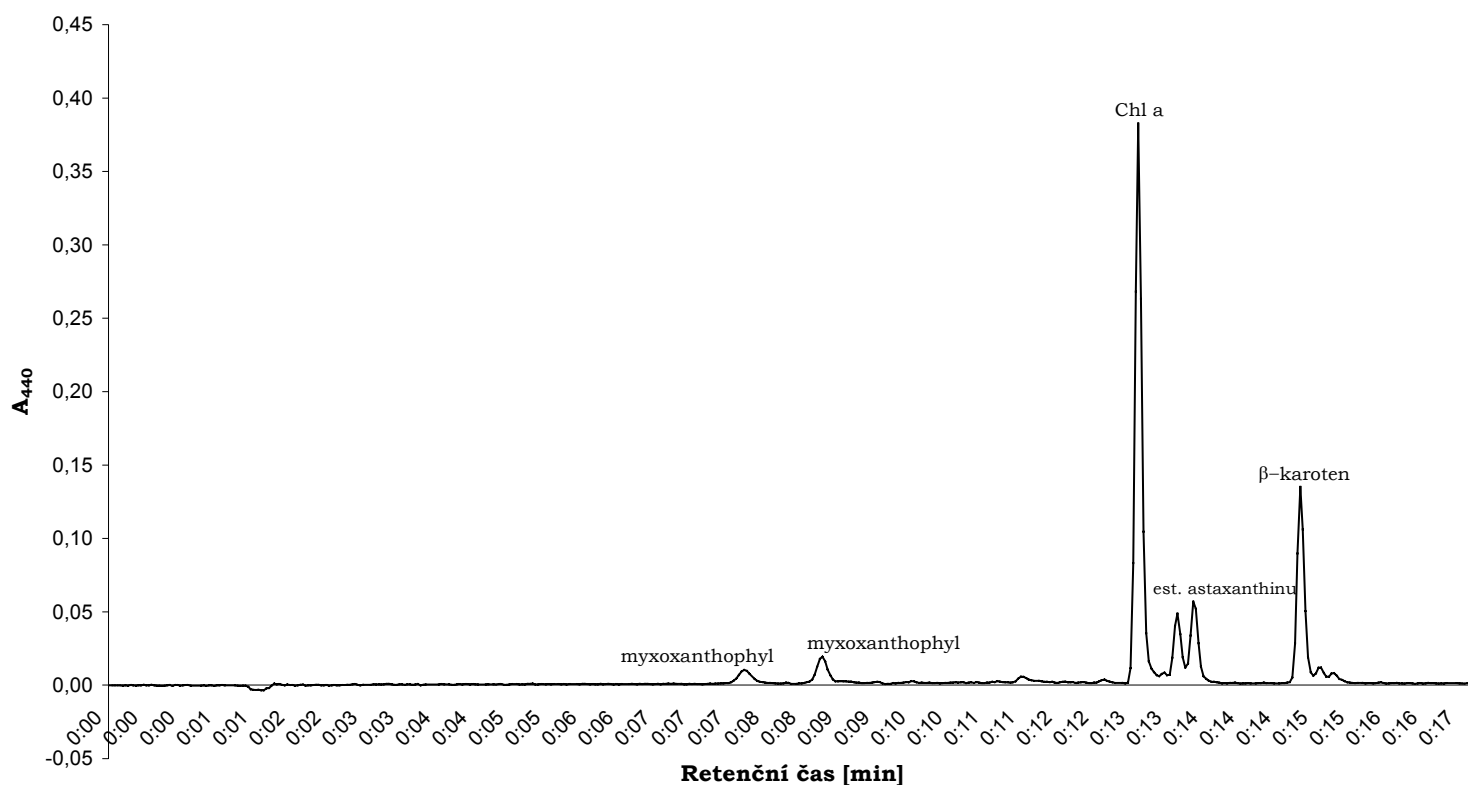
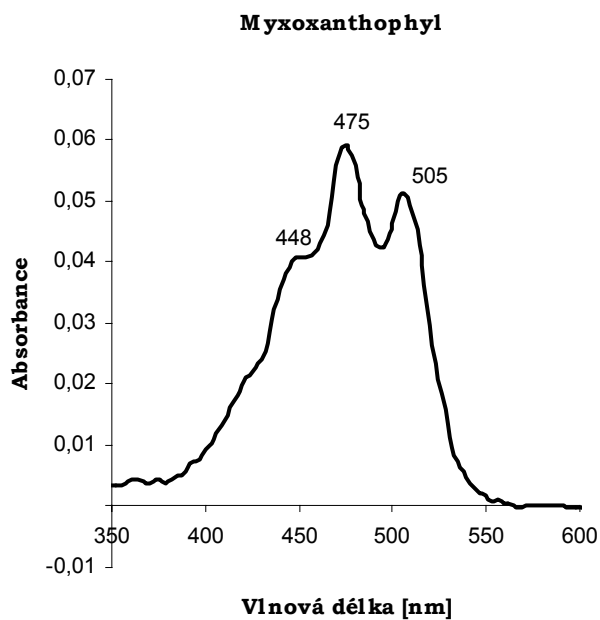
**Graf IV.IX.** Ekofyziologické nároky kultury T2, kmene *Trichormus variabilis* na teplotu a světlo . Kultura T2 byla pěstována při teplotě  $10^{\circ}\text{C}$  a intenzitě světla  $500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

*Synechococcus bigranulatus* - kontrola**Graf V.I.** Chromatogram pigmentových extraktů u kontrolní kultury sinice *Synechococcus bigranulatus*.*Synechococcus bigranulatus* 3**Graf V.II.** Chromatogram pigmentových extraktů u S3 kultury sinice *Synechococcus bigranulatus*.

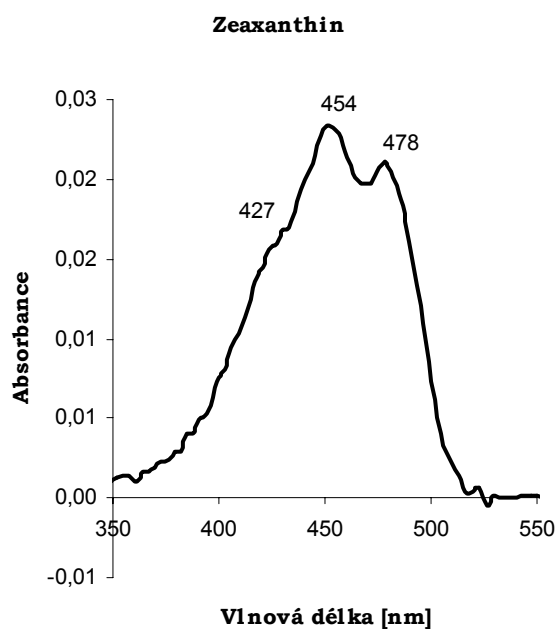
*Synechococcus bigranulatus* 4Graf V.III. Chromatogram pigmentových extraktů u S4 kultury sinice *Synechococcus bigranulatus**Phormidium autumnale*-kontrolaGraf V.IV. Chromatogram pigmentových extraktů u kontrolní kultury sinice *Phormidium autumnale*.

*Phormidium autumnale* 1**Graf V.V.** Chromatogram pigmentových extraktů u kultury P1 kmene *Phormidium autumnale*.*Phormidium autumnale* 2**Graf V.VI.** Chromatogram pigmentových extraktů u kultury P2 kmene *Phormidium autumnale*.

*Trichormus variabilis* - kontrola**Graf V.VII.** Chromatogram pigmentových extraktů u kontrolní kultury kmene *Trichormus variabilis*.*Trichormus variabilis* 1**Graf V.VIII.** Chromatogram pigmentových extraktů u kultury T1 kmene *Trichormus variabilis*.

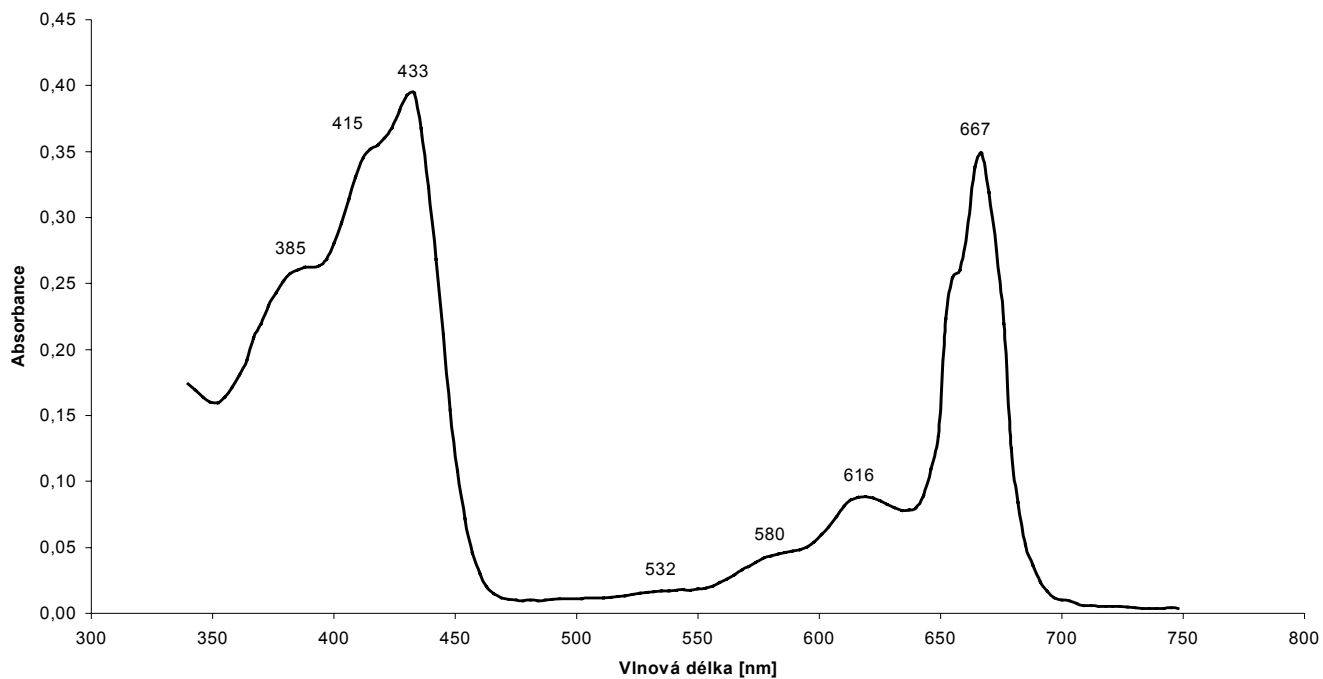
*Trichormus variabilis* 2Graf V.IX. Chromatogram pigmentových extraktů u kultury T2 kmene *Trichormus variabilis*.

Graf V.X. Spektrum myxoxanthofylu.



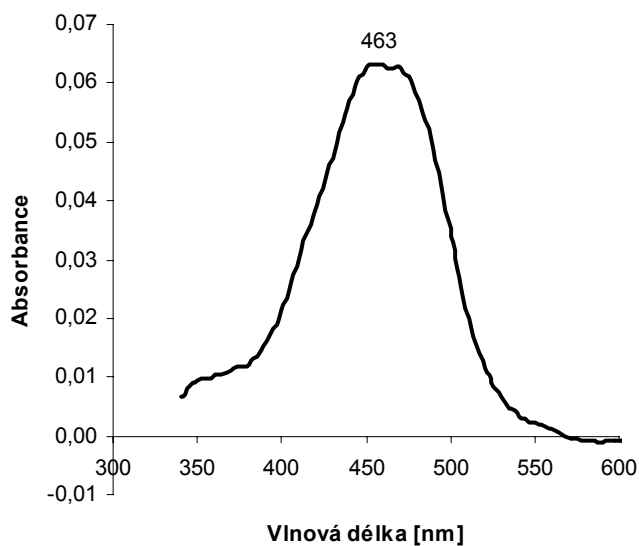
Graf V.XI. Spektrum zeaxanthinu

## Chlorofyl a

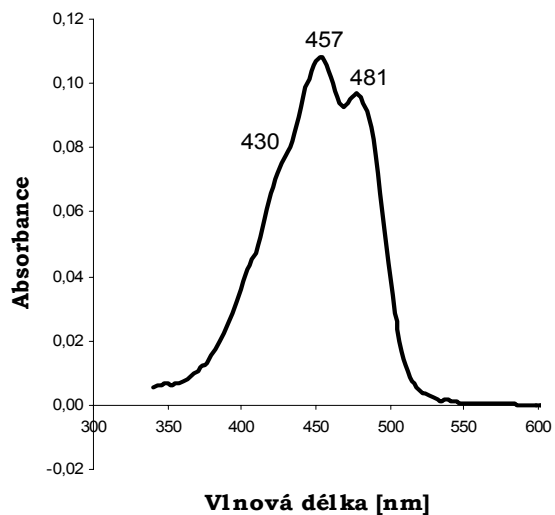


Graf V.XII. Spektrum chlorofylu a

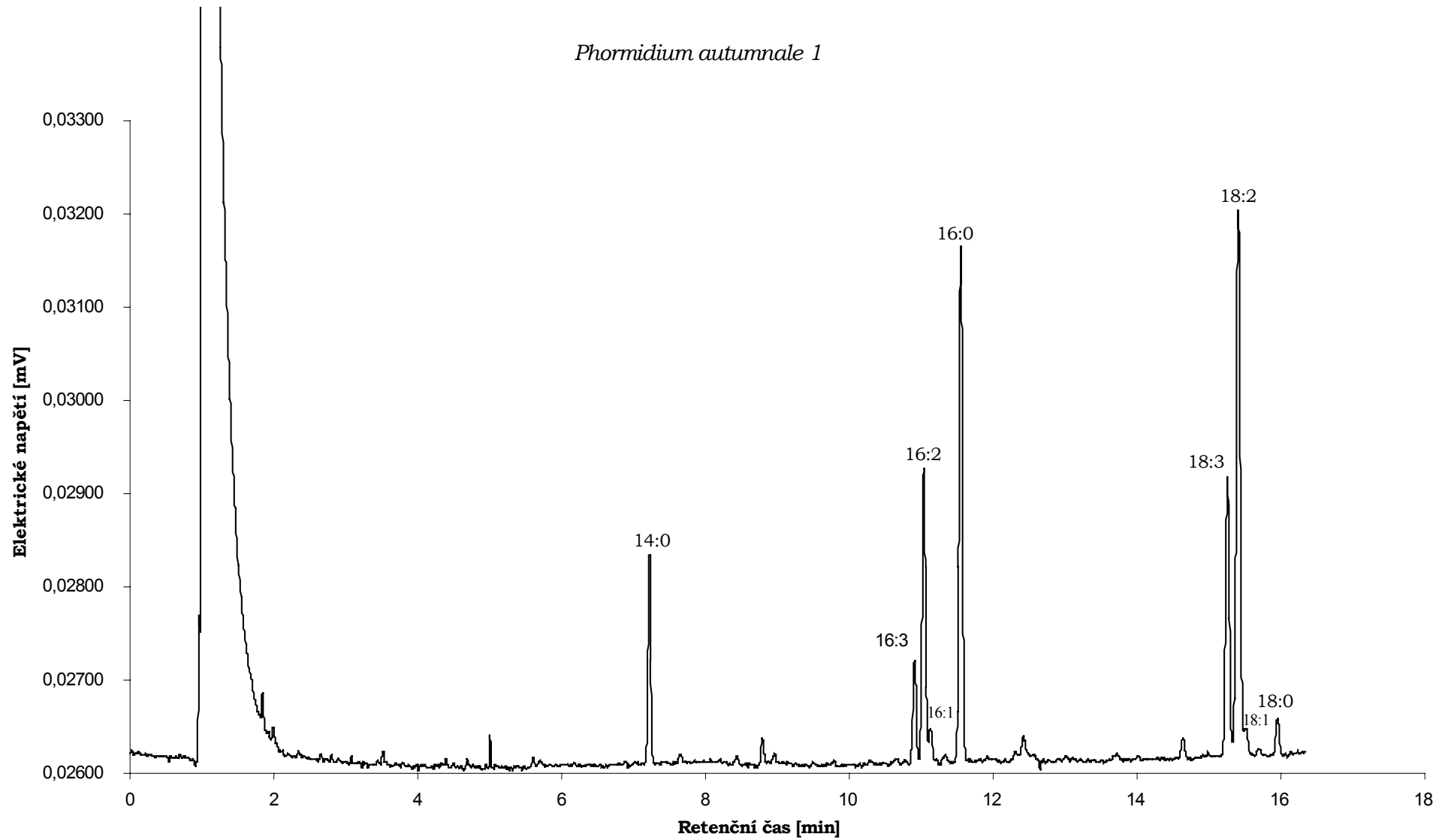
## Astaxanthin



Graf V.XIII. Spektrum astaxanthinu

 $\beta$ -karotenGraf V.XIV. Spektrum  $\beta$ -karotenu.

*Phormidium autumnale 1*



Graf VI.I. Ukázka chromatogramu extraktů mastných kyselin.