

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



**Bc. Veronika Kantnerová**

**Možnosti a limitace kultivace brakických a sladkovodních populací tubulárních morfotypů rodu *Ulva* (Ulvophyceae) pro potravinářské či biotechnologické využití**

Potential and limits of cultivation of brackish and freshwater populations of tubular morphotypes of *Ulva* (Ulvophyceae) in food industry or biotechnologies

Diplomová práce

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Neustupa, Ph.D.

Praha, 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22.4.2022

.....

### **Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat především svému školiteli Jiřímu Neustupovi za všechny rady, pomoc a nápady při psaní této práce a za skvělou motivaci. Dále děkuji i všem ostatním členům a přátelům z oddělení algologie, kteří byli skvělou oporou a inspirací během mého studia. A v neposlední řadě také své rodině, která mě podporovala v mém studentském životě.

## Abstrakt

Zelené makrořasy z rodu *Ulva* (Ulvophyceae) jsou běžně využívané v biotechnologickém průmyslu jako zdroj biomasy při výrobě bioplynu či při bioremediaci, nicméně především se zpracovávají v potravinářském průmyslu v Asii a dalších přímořských regionech. V Evropě jsou již tyto řasy řazeny do tzv. „*approved novel food*“, nicméně v potravinářství se většinou používají pouze druhy s listovitou morfologií stélky, které jsou většinou dováženy z Asie, takže využití lokálních evropských zdrojů je minimální.

Tubulární morfotypy rodu *Ulva* (původně patřící do samostatného rodu *Enteromorpha*) jsou potenciálně stejně nadějným zdrojem biomasy pro zpracování v potravinářském průmyslu a dalších odvětvích. Vykazují velkou odolnost vůči abiotickým faktorům a vyskytují se navíc nejen v mořských lokalitách, jako listovité morfotypy, ale zasahují svým výskytem také do brakických, a dokonce i do sladkovodních ekosystémů. Vzhledem k tomu by mohly být vhodným zdrojem biomasy pro zpracování také ve Střední Evropě.

V této práci byly izolovány a kultivovány dvě populace tubulárních morfotypů rodu *Ulva*. Jedna z brakické lokality z Baltského moře (*Ulva flexuosa*) a jedna ze sladkovodní lokality v České republice (*Ulva pilifera*). Cílem bylo zhodnotit jejich kultivační potenciál pro možnosti využití v potravinářství. Byly pozorovány jejich růstové rychlosti během experimentální kultivace na gradientu teploty, salinity a při různých úpravách kultivačního média, co se týká přísadů chelatačního činidla a pH pufru. Měření přírůstků biomasy bylo prováděno neinvazivní metodou za využití PAM fluorometru. Tímto způsobem byly stanoveny optimální kultivační podmínky pro pěstování těchto populací pro případné využití. V případě druhu *Ulva flexuosa* byla stanovena jako optimální salinita v rozmezí 11 až 17 PSU, teplota kolem 18 až 22 °C a složení média pouze se základními živinami, bez přidání chelatačních činidel či pH pufru. Pro druh *Ulva pilifera* se jako optimální podmínky ukázaly salinita 11 PSU, popřípadě 4,25 PSU, jako optimální teplota 22 až 25 °C a složení média s přidaným chelatačním činidlem EDTA. Zároveň byl zkoumán růst studovaných populací ve venkovní kultivaci ve větších objemech média, za využití měření pomocí analýzy obrazu. Přičemž nejvyšších růstových rychlostí dosahovaly obě populace v největším objemu média, který činil 623,8 ml. Celkově vyšších růstových rychlostí dosahoval brakický druh oproti sladkovodnímu, stejně jako u experimentálních pokusů v laboratoři.

Klíčová slova: *Ulva*, tubulární morfotypy, kultivace, PAM fluorometrie, růstová rychlost, biotechnologie, specifická růstová rychlost, venkovní kultivace

## Abstract

The green macroalgae from genus *Ulva* are commonly used in biotechnology as a source of biomass for the production of biofuels or in bioremediation, but mostly for processing in food industry in Asia and other coastal regions. Within Europe, these algae belong to the so-called „approved novel food“, however the species which are mainly used have the leaf-like morphology and they are usually imported, so the usage of local European resources is relatively very low.

However the tubular morphotypes of the genus *Ulva* (originally included in the genus *Enteromorpha*) might probably be an equally promising source of biomass for the use in food industry and other sectors. They show high resistance to wide range of abiotic conditions and they occur not only in marine localities, but also in brackish or even freshwater ecosystems. Considering this, they seem to be a promising source for processing in Central Europe as well.

In this study were isolated and cultivated two populations of the genus *Ulva* typical for the tubular morphotypes. One was from brackish locality in the Baltic sea (*Ulva flexuosa*) and one from freshwater locality in Czech Republic (*Ulva pilifera*). The aim was to evaluate their cultivation potential for their potential use in food industry. Their growth rates were observed during the experimental cultivation on a temperature and salinity gradient and with the respect to adjustment of the medium in terms of chelating agent and pH buffer additions. Biomass increments were measured by a non-invasive method using a PAM fluorometer. In this way the optimal conditions for cultivation of these populations were determined. In the case of *Ulva flexuosa*, the optimal salinity was determined to be in the range of 11 to 17 PSU, the optimal temperature around 18 to 22 °C and the most suitable composition of medium with only essential nutrients. For species *Ulva pilifera* the optimal salinity of 11 or 4,25 PSU, the optimum temperature is around 22 to 25 °C and the addition of chelating agent EDTA do the medium proved to be optimal conditions. At the same time the, the growth of the studied populations in outdoor cultivation in larger media volumes was investigated by measuring the area of the thallus, using digital image analysis. The highest growth rates were achieved by both populations in the biggest volume of media tested. Overall the brackish species achieved higher growth rates compared to freshwater species, as in all laboratory experiments.

Key words: *Ulva*, tubular morphotypes, cultivation, PAM fluorometry, growth rate, biotechnology, specific growth rate, outdoor cultivation

# Obsah

1. Úvod	
1.1. Charakterizace řas patřících do rodu <i>Ulva</i> a jejich význam	1
1.2. Tradiční místa a způsoby kultivace řas rodu <i>Ulva</i>	3
1.3. Nároky rodu <i>Ulva</i> na salinitní a teplotní podmínky a mechanismy obrany proti stresovým podmínkám	7
1.3.1. Salinita	8
1.3.2. Teplota	10
1.3.3. Ostatní faktory	11
1.4. Chelatační činidla, pH pufru a jejich význam při kultivaci řas	12
2. Otázky a cíle práce	15
3. Metody	17
3.1. Odběrové lokality a získávání vzorků	17
3.2. Izolace stélek a jejich kultivace za standartních laboratorních podmínek	18
3.3. Světlená mikroskopie	20
3.4. Experimentální kultivace	20
3.5. Měření přírůstků biomasy pomocí PAM fluorometru a tvorba křivek specifické růstové rychlosti	22
3.6. Kultivace ve velkém objemu a měření přírůstků pomocí analýzy obrazu	23
4. Výsledky	25
4.1. Morfologie stélek a určení druhů	25
4.2. Výsledky měření na gradientech pomocí PAM fluorometru	29
4.2.1. Růst kmenů na gradientu salinity	30
4.2.2. Růst kmenů na gradientu teploty	33
4.2.3. Růst kmenů v závislosti na přidání chelatačního činidla (EDTA) a pH pufru (HEPES)	36
4.3. Výpočet a vytvoření grafů specifické růstové rychlosti	39
4.4. Kultivace stélek rodu <i>Ulva</i> ve vztahu k objemu média	42
5. Diskuse	47
5.1. Zhodnocení vlivu různých kultivačních podmínek na růst tubulárních morfotypů rodu <i>Ulva</i>	47
5.1.1. Efekt salinity na rychlosti růstu	48
5.1.2. Efekt teploty na rychlosti růstu	50
5.1.3. Efekt obsahu chelatačního činidla (EDTA) a pH pufru (HEPES) na rychlosti růstu	51
5.2. Možnosti využití PAM fluorometru jako metody pro stanovení přírůstků biomasy tubulárních makrořas	54

5.3. Zhodnocení kultivace stélek ve větším objemu média a perspektiva jejich pěstování ve velkoplošných kultivacích.....	55
6. Závěr.....	57
7. Přílohy.....	59
8. Reference .....	59

## 1. Úvod

Zelené řasy rodu *Ulva* jsou běžně využívané v biotechnologickém průmyslu, převážně v potravinářství, a to hlavně v asijských zemích a dalších pobřežních regionech (Brundu *et al.*, 2018). Je možné je ale využít i v dalších sektorech, například jako zdroj biomasy při výrobě bioplynu či při bioremediaci (Balar *et al.*, 2020). V Evropě tyto řasy dnes patří mezi tzv. „*approved novel food*“, nicméně druhy, které jsou převážně využívané jsou ty, které vytváří listovitý morfortyp stélky (Rahikainen *et al.*, 2020). Tyto morfortypy se vyskytují především v mořském prostředí a jsou tedy do střední Evropy importovány hlavně z jiných zemí.

Existují nicméně také morfortypy s tubulární stélkou, které jsou pravděpodobně stejně nadějným zdrojem biomasy s velkým množstvím proteinů, minerálů a vitamínů (Tabarsa *et al.*, 2012) a zároveň se hojně nachází v brakickém, a dokonce i ve sladkovodním prostředí. Nabízejí tedy potenciálně využitelný lokální zdroj i pro střeoevropské země (Rybak, 2018). Také se jeví jako vhodné pro velkoplošné kultivace díky vysoké odolnosti vůči širokému množství abiotických faktorů, jako je teplota či salinita (Carl *et al.*, 2014, Rybak, 2018). Přes tyto výhody nejsou tyto morfortypy tak často využívané a je jen málo známo o jejich kvantitativních růstových charakteristikách, převážně u sladkovodních zástupců. Těmto řasám a jejich experimentální kultivaci se proto věnuje tato diplomová práce.

### 1.1. Charakterizace řas patřících do rodu *Ulva* a jejich význam

Zelené řasy rodu *Ulva*, patří do skupiny Ulvophyceae, jedné z hlavních tříd zelených řas ze skupiny Chlorophyta (Rindi *et al.*, 2018). Jsou kosmopolitně rozšířené převážně ve slaných či brakických vodách, ale také můžeme najít několik zástupců obývajících sladkovodní ekosystémy. Ty se pak vyskytují ve vnitrozemí, kompletně bez kontaktu s mořskou vodou. Nicméně i přesto jsou spíše přítomny na místech se zvýšenou salinitou a ne v typicky sladkovodních tocích s hodnotami salinity blízké 0 PSU (Messyas *et al.*, 2011). Žijí převážně přisedlým způsobem života přichycené na kamenech, ale mohou tvořit i volně plovoucí populace, které se mohou namnožit až do rozsáhlých vodních květů (Rybak *et al.*, 2018).

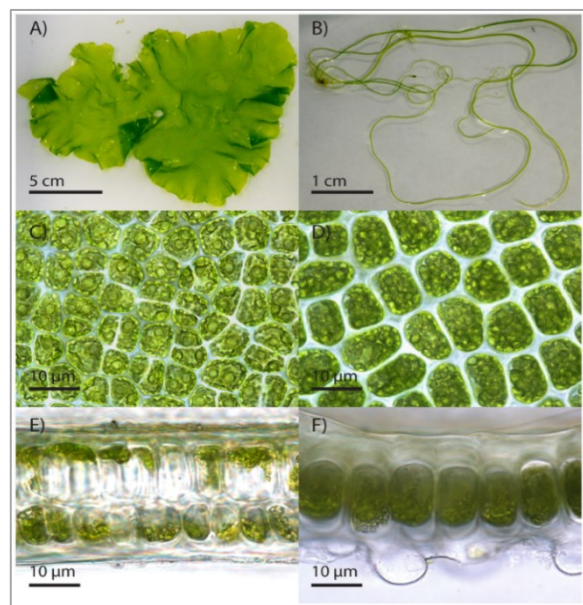
Rod tvoří ve svém životním cyklu nejprve haploidní generaci, tzv. gametofyt, který produkuje bičíkaté gamety, ze kterých přechází ve vývoji do diploidního stádia sporofytu. Jedná se tedy o haplo-diploidní životní cyklus. Tento cyklus je navíc izomorfní, čili obě stádia jsou morfologicky totožná (Hiraoka *et al.*, 2003; Archibald *et al.*, 2017). Gamety jsou dvoubičíkaté a chybí jim buněčná stěna, dělí se na samčí a samičí, které se mírně liší svou velikostí, tedy jsou tzv. anizogamní (Rindi *et al.*, 2018). Haploidní zoospory produkované sporofytem jsou



čtyřbíčíkaté a vznikají po meióze. Gametofytní stádium se nejprve vyvíjí v juvenilní (iniciační) stádium s rhizoidy. To je uniseriátní, tedy tvořeno pouze jednou řadou buněk za sebou a až později se z něj tvoří klasická morfologie stélky (Mantri *et al.*, 2011).

Zástupci těchto řas tvoří mnohobuněčné stélky s dvojitým typem morfologie. Listovité stélky (tzv. distromatické), jsou tvořeny dvěma vrstvami buněk nad sebou a tubulární stélky (tzv. monostromatické), které byly původně popsány jako samostatný rod *Enteromorpha*, jsou tvořeny pouze jednou vrstvou buněk. Tato stélka se stáčí a vytváří malé trubice, které mohou být vyplněny vzduchem nebo vodou (Hayden *et al.*, 2003). Také mohou mít více či méně postranních větví, což je většinou závislé na specifickém druhu (Rybak *et al.*, 2015). Speciální typ morfologie stélky je kombinovaná, která je částečně tubulární a v některých místech přechází v listovitou stélku. Tento morfotyp je ale znám pouze u druhu – *Ulva linza* (Rybak, 2018).

**Obr. č. 1:** Morfologie 2 morfotypů stélek rodu *Ulva*. A) druh *U. ohnoi* s listovitou stélkou, která je na průřezu tvořena dvěma vrstvami buněk. B) *Ulva sp.* s tubulární morfologií, která je na průřezu tvořena pouze jednou vrstvou buněk (Lawton *et al.*, 2013)



Výskyt těchto morfotypů je ale také závislý na podmínkách prostředí a je zde tedy značná morfologická plasticita. Můžeme to pozorovat hlavně na výskytu jednotlivých morfotypů v různých hodnotách salinity (Loughnane *et al.*, 2008). Druhy s tubulárním morfotypem se vyskytují v daleko širší valenci salinity, od sladké vody (kolem PSU <0,5) až po extrémně slané lokality odpovídající oceánické vodě (kolem 35 PSU). Listovité morfotypy přitom lze nalézt pouze ve slaných či mírně brakických habitatech (cca od 10 do 36 PSU) (Mareš *et al.*, 2011; Rybak, 2018). Pravděpodobně to souvisí i s evoluční historií těchto morfotypů. Tubulární morfologie je pravděpodobně evolučně starší a tyto morfotypy se nacházely všude, ale listovitý typ se vyvinul pouze ve slaných podmínkách. Obecně se zdá, že tubulární morfotypy mají také vyšší toleranci například k širokému rozptylu teplot, kdy bylo pozorováno, že stélky přežívají až do teploty cca 40 °C (Moll *et al.*, 1995).

Řasy rodu *Ulva* jsou vhodnými modelovými organismy a také mají velký potenciál pro biotechnologické využití díky několika svým výhodným vlastnostem. Kromě kosmopolitního rozšíření, které umožňuje jejich kultivaci na velkém množství lokalit po celém světě, se jedná také o jejich schopnost akumulovat velké množství živin do svých stélek, a tak jednoduše získat převahu nad ostatními skupinami řas ve vodním sloupci. Dále mají schopnost dosáhnout rychlého nárůstu do velkého množství biomasy za poměrně krátké časové období a schopnost odolávat různým podmínkám prostředí, jako je kolísající salinita, nebo teplota vody (Lawton *et al.*, 2013; Carl *et al.*, 2014). Všechny tyto vlastnosti jsou výhodou pro zpracování těchto řas v potravinářském, nebo jiném biotechnologickém průmyslu.

## **1.2. Tradiční místa a způsoby kultivace řas rodu *Ulva***

Původ využívání makrořas jako zdroje potravy se připisuje Číně a dalším východoasijským zemím, jako je například Japonsko a Korea, kde je jejich zpracování až dodnes nejčastější. Dnes už nicméně můžeme najít spoustu dalších přímořských lokalit i v západních zemích, a to zejména v severní Americe s poměrně rozsáhlou produkcí řas (Prabhu *et al.*, 2019). V Evropě byl prozatím zájem o jejich produkci podstatně nižší, nicméně v posledních letech tento zájem stoupá, a to hlavně v potravinářství. Pomáhá tomu i fakt, že Evropská komise (“European Commission“) uznala v roce 2017 tyto řasy jako potenciální mořský zdroj potravy a krmiva a dnes jsou některé z nich na seznamu tzv. „*approved novel food*“ (Rahikainen *et al.*, 2020).

Makrořasy jsou využívány v dnešní době zejména pro získání fykokoloidů, tedy polysacharidů extrahovaných z řas, jako je například agar nebo karagen (ruduchy a chaluhy) (Kerrison *et al.*, 2015). Uplatnění najdou každopádně také ve velké míře v potravinářství, a to hlavně díky vysokému obsahu vlákniny, minerálů, antioxidantů a vitamínů (hlavně A, K a vitamínu B12). Zároveň mají nízký obsah tuků s relativně vysokými abundancemi polynenasycených mastných kyselin (PUFAs) (MacArtain *et al.*, 2007). Červené a zelené řasové linie navíc také obsahují poměrně vysoké množství proteinů, které zabírá kolem 10-47% suché hmotnosti jejich stélek (Rahikainen *et al.*, 2020). V potravinářském průmyslu je dnes využíváno asi 83-90 % všech zpracovaných řas v globálním měřítku. Ve světě je pro tyto účely vyprodukováno cca 30 miliónů tun makrořasové biomasy ročně (FAO, 2018). Největší produkce je zajištěna pomocí pěstování řas v akvakulturách, kde lze sledovat a zajistit optimální stabilní podmínky pro vysoké rychlosti růstu, která vede k velké výsledné biomase. V akvakulturách byla zaznamenána roční produkce suché biomasy kolem 97 % celkového

množství, v porovnání s pouhými 840 tisíci tun sušiny z přímého sběru stélek z volné přírody (Wei *et al.*, 2013).

Kromě využití v potravinářství pro lidskou konzumaci se řasy dále mohou využívat i jako krmivo pro zvířata, ale také v biotechnologickém průmyslu jako zdroj biomasy pro výrobu bioplynu a bioethanolu apod (Fleurence, 1999; Neori *et al.*, 2020). Využití makrořas v biotechnologiích je možnou alternativou k využívání fosilních paliv jako zdroje energie. Organická biomasa je znovuobnovitelný zdroj a její zpracování nemá disturbující vliv na složení atmosféry. U fosilních paliv je převážně velkým problémem vypouštění skleníkových plynů do atmosféry, což vede ke globálnímu oteplování, zvyšování hladiny moří a mnoha dalším negativním environmentálním důsledkům (Wei *et al.*, 2013; Balina *et al.*, 2017). Bioethanol je biologicky rozložitelný a netoxický. Vyrábí se zpracováním velkého množství rostlinné biomasy či biomasy řas. Rozděluje se na tzv. „bioethanol první generace, který je produkován za použití hospodářských plodin s vysokým obsahem škrobu a cukrů, jeho nevýhodou je využívání plodin, které se používají jako potravina pro velké množství populace. Dále „bioethanol druhé generace“, který je založen na využití biomasy s velkým obsahem lignocelulózy, která je ovšem spojena s poměrně velkými komplikacemi při zpracování, protože přerušování ligninových vazeb je velmi náročný proces. Jako poslední odlišujeme „bioethanol třetí generace“, který vzniká ze zpracování biomasy řas (Daroch *et al.*, 2013). Tento typ sebou přináší řadu výhod, hlavně absenci nebo minimální obsah ligninu a také vysoký obsah sacharidů ve stélkách. Řasy mají zároveň velmi velkou rychlost růstu, která vede k velkému výtěžku biomasy, u mořských řas je navíc výhodou, že nekompetují s hospodářskými plodinami o prostor, protože při jejich kultivaci často není potřeba zabírat místo na souši (Qarri *et al.*, 2020).

Řasy rodu *Ulva*, jako zástupci velké skupiny zelených řas, nabízejí široké množství využití. Neobsahují sice často extrahované fykokoloidy, ale nacházejí významné uplatnění v potravinářství. Obsahují totiž velké množství proteinů, minerálů a vitamínů, a to hlavně vitamíny A, C, E a B<sub>12</sub>. Také mají ve svých stélkách značné zastoupení polynenasycených mastných kyselin, a to jak ve formě omega 6, tak omega 3, které jsou pro člověka esenciální a musí je tedy přijímat v potravě (MacArtain *et al.*, 2007; Carl *et al.*, 2014). Jejich stélky se zároveň dají využívat jako zdroj škrobu. Obsah škrobu ve stélkách těchto řas může být až 32% sušiny a škrob se obecně nachází v okolí pyrenoidů a nebo v podobě škrobových granulí mezi membránami tylakoidů (Prabhu *et al.*, 2019). Také mohou být využity v biotechnologiích při výrobě již zmiňovaného bioplynu (Bolton *et al.*, 2009) a nebo mohou být používány například

v akvakulturách jiných organismů na bioremediaci, tedy při procesu čištění odpadních vod (Yokoyama *et al.*, 2010).

Ze zástupců řas rodu *Ulva* může být využíván také ulvan. Jedná se o sulfátovaný polysacharid složený z kyseliny glukuronové a sulfátované rhamnózy. Je homogenně distribuován ve stélce a nachází se hlavně ve vnitrobuněčném prostoru a fibrilární stěně, přičemž zabírá asi 18-29% stélky (Kaeffer *et al.*, 1999). Funkce ulvanů ve stélkách řas zajišťuje ochranu proti osmotickému stresu, převážně pomocí zajištění balance iontů. Nicméně jsou i jiné možné funkce těchto látek, jako například ochrana stélek proti bakteriální nákaze v mořském prostředí, díky nízké rozložitelnosti stélek z důvodu komplexity chemické struktury ulvanu (Lahaye, 1998). Také je někdy spojován s mechanickou regulací a uvolňováním spor. Z biotechnologického hlediska se tato látka dá využít například díky svému antivirovému a antioxidantnímu účinku (Alves *et al.*, 2013).

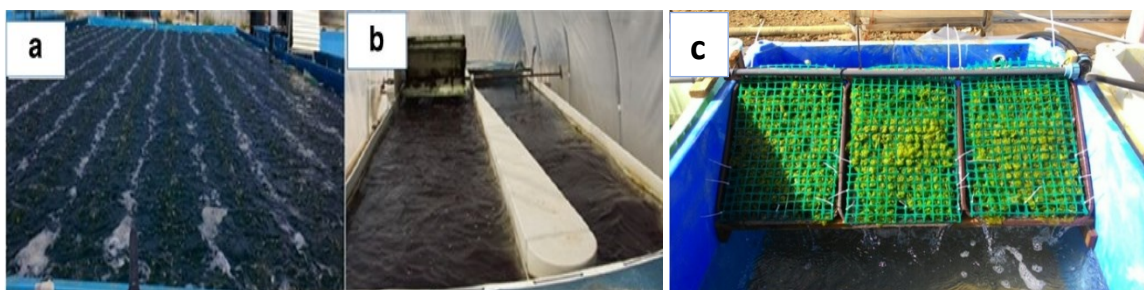
Ve většině kultivací se dnes používají listovité morfotypy, i když u morfotypů tubulárních byly zjištěny velmi srovnatelné rychlosti růstu a často daleko větší odolnost k abiotickým podmínkám, protože dokážou přežívat v širokých valencích teplot až do 40 °C a také velkém spektru salinity. Nacházíme mezi nimi i sladkovodní tubulární zástupce, nicméně jejich kultivace je v současné době velmi málo prozkoumána (Carl *et al.*, 2014).

Kultivace volně plovoucích stélek ve venkovních akvakulturách je z pravidla výhodnější než pouhý sběr stélek přímo z moře. Její výhody spočívají převážně v možnosti produkce uniformního množství biomasy, schopnosti dosáhnout vyšších růstových rychlostí populací, možnosti kontrolovat a zabránit výskytu kontaminantů, tedy možnosti kontroly většiny podmínek důležitých pro kvalitní růst s velkými výtěžky biomasy (Mata *et al.*, 2016; Qarri *et al.*, 2020). Nicméně ačkoliv je u akvakultur často možné vytvoření výhodné celkové či parciální re-cirkulace s recyklací zdrojů, nákladná počáteční investice je stále častým problémem při zavádění těchto systémů do praxe (Balar *et al.*, 2020). Kultivace ve vodních nádržích se týká převážně listovitých morfotypů, které zde dosahují obrovských výsledných výtěžků biomasy (Neori *et al.*, 2020), nicméně je možná i pro tubulární morfotypy, ty se zde kultivují jako volně plovoucí stélky, které většinou tvoří tzv. „clustery“, tedy nikoli jednotlivá vlákna, ale několik málo vláken spojených u báze, čímž vytvářejí větší celkovou plochu a pravděpodobně se jim tak lépe shromažďují živiny a lépe se jim přežívá (Lawton *et al.*, 2021; Carl *et al.*, 2014). Pěstování volně rostoucích nepřichycených stélek je výhodné díky možnosti růstu většího množství stélek. Zároveň díky tomu, že není nutné stélky manuálně oddělovat od

podkladu je jejich sklizení jednodušší a rychlejší (Hiraoka *et al.*, 2008). Kultivace v nádržích je ale navíc spojena s nutností zajistit dostatečné promíchávání a aeraci vodního sloupce (Chemodanov *et al.*, 2019).

Další možnou kultivační technikou, která je čím dál více v dnešní době používána je kultivace na sítích. Jedná se o metodu, kdy řasy rodu *Ulva* jsou „uměle sázeny“ na sítě už ve stádiu, kdy dochází k vypouštění zoospor. Výhodami tohoto postupu je možnost výrazně ovlivňovat počáteční podmínky kultivace, a to hlavně denzitu přichycených zoospor, což má efekt na výsledné množství získané biomasy (Carl *et al.*, 2014). Řasy jsou nejprve kultivovány na sítích v laboratorních podmínkách a později jsou přemístěny do větších venkovních nádrží, kde dochází k velkému nárůstu biomasy stélek (Li *et al.*, 2014).

Jednou z dalších testovaných metod je také tzv. „spray culture“. Tento typ kultivace spočívá v pěstování řas na nakloněné, nebo vodorovně umístěné desce, která je kontinuálně přelévána vodou (Haglund *et al.*, 1988). Mezi výhody této metody patří hlavně cena, která je až 2x nižší než při kultivaci řas ve vodních nádržích. Dále pak může hrát významnou roli také mírné vysoušení, ke kterému zde nevyhnutelně dochází. To brání méně odolným řasovým epifytům, ale také například vodním korýšům apod., aby kultury přerůstaly, a tak navzájem kompetovaly o prostor a světlo. Obecně se tato kultivace zdá být výhodnější zejména v případě vláknitých řas. To platí i u 2 morfotypů rodu *Ulva*, kdy na příkladu druhu *U. compressa*, který má trubicovitou stélku byl výsledný výtěžek biomasy o hodně vyšší než u listovitého druhu *U. fasciata*. Zdá se, že trubicovitá morfologie zajišťuje lepší permeabilitu pro výměnu vody a plynů než listovitá a to hraje při tomto způsobu kultivace pravděpodobně velkou roli (Neori *et al.*, 2020). Při kultivaci dochází, vzhledem k vysychání stélek, často k vybělení a vysoušení horní vrstvy, která také slouží jako ochrana před příliš velkým ozářením, tato specializace vrstev není možná v případě kultur pěstovaných v horizontálních nádržích (Msuya *et al.*, 2010).



**Obr. č. 2:** a, b) kultivace řas rodu *Ulva* ve vodních nádržích, kde dochází k aeraci systému pomocí trubek na dně nádrže a k promíchávání vodního sloupce, c) „spray culture“ na deskách pokrytých sítěmi, kde dochází ke kontinuálnímu přelévání kultury vodou (Neori *et al.*, 2020)

Nově byla testována i možnost kultivace makrořas ve fotobioreaktorech, například u druhů *U. compressa* a *U. rigida*. Nejedná se ale ještě o kompletně dovyvinutou techniku a metoda s sebou přináší i komplikace v podobě nutnosti zavést celé specializované infrastrukturální vybavení, u kterého se znovu naráží na problém velmi nákladných investic (Chemodanov 2017).

V neposlední řadě je velmi zkoumanou metodou také kultivace řas rodu *Ulva* v tzv. integrovaných multi-trofických akvakulturách (IMTA). Jedná se o způsob kultivace spolu s dalšími vodními organismy, například krevetami. Makrořasy jsou v tomto případě kultivovány pro pozdější využití a zároveň mohou sloužit jako bioremediační složka, protože jako zdroj živin jim slouží právě odpadní voda z akvakultur těchto jiných organismů v podobě rozpuštěného dusíku a fosforu (Al-Hafedh *et al.*, 2015) (Neori *et al.*, 2020). Je to velmi výhodný způsob kultivace, který je zároveň šetrný k životnímu prostředí, makrořasy jsou schopné přebytečné živiny (hlavně C, N a P) zpracovat do své biomasy a tím nedochází k jejich uvolňování do vnějšího ekosystému (Neori *et al.*, 2004).

### **1.3. Nároky rodu *Ulva* na salinitní a teplotní podmínky a mechanismy obrany proti stresovým podmínkám**

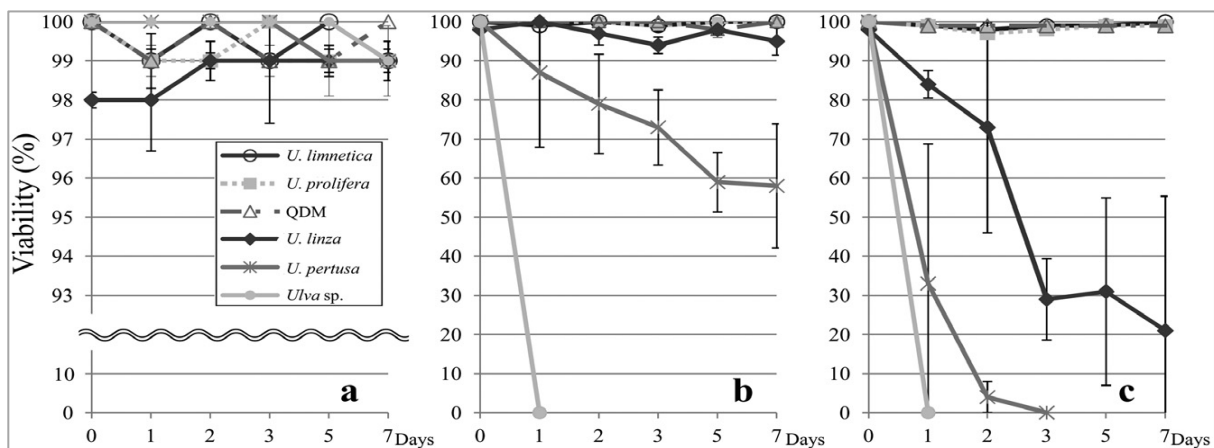
Snaha porozumět nárokům na nejrůznější podmínky prostředí u zástupců řas, které jsou využívány pro zpracování v biotechnologiích a potravinářském průmyslu, je běžný postup pro stanovení optimálních podmínek jejich kultivace a pro získání co nejvyšších možných přírůstků biomasy (Pellizzari *et al.*, 2008). Vzhledem k tomu, že řasy jsou přisedlé organismy jsou ve velkém množství ovlivňovány a jejich rychlosti růstu závisí na abiotických podmínkách okolního prostředí (Balina *et al.*, 2017). Salinita a teplota jsou dva ze základních faktorů, nicméně často hraje důležitou roli také intenzita světla, množství živin a případně i koncentrace CO<sub>2</sub> (Kerrison *et al.*, 2015).

Řasy rodu *Ulva* jsou známé svou vysokou odolností právě k velké většině těchto abiotických faktorů (Rybak *et al.*, 2018). Jsou také někdy označovány za tzv. oportunistické řasy a v případě příhodných podmínek a velkého množství živin dokáží zdroje také velmi rychle využít a tvořit rozsáhlé vodní květy, které jsou schopny konkurovat a přerůst ostatní řasy ve vodním sloupci (Kim *et al.*, 2011; Smetacek *et al.*, 2013).

### 1.3.1. Salinita

Salinita je velmi důležitý abiotický faktor ovlivňující růst a výskyt řas, může mít efekt na řasy zpravidla ve třech základních aspektech. Prvním je osmotický stres, který má přímý vliv na vodní potenciál buněk. Za druhé salinitní stres, který vede k příjmu nebo ztrátě iontů. Za třetí změna buněčného poměru iontů, a to vzhledem k různé selektivitě v permeabilitě plazmatické membrány (Kirst, 1990).

Zástupci rodu *Ulva* se obecně mohou vyskytovat v salinitách od <0,5 do 49 PSU, ale ne všechny druhy jsou adaptované na celé toto spektrum salinit (Rybak, 2018). Obecně vyšší toleranci k různým salinitám vykazují tubulární morfotypy těchto řas, které dokážou poměrně dobře přežívat nejen ve sladké, ale i brakické a mořské vodě. U brakických druhů se tato schopnost výrazně snižuje a u mořských dochází už během dne při kultivaci ve sladkovodním médiu k zastavení růstu a postupné degradaci stélek. U salinity od 10 PSU se už v přírodě v podstatě vůbec nevyskytují (Ichihara *et al.*, 2013). Tato schopnost sladkovodních druhů přežívat ve vyšší salinitě byla pozorována i u jiných řas patřících mezi Ulvophyceae, například u rodů *Aegagrophila*, nebo *Rhizoclonium* z řádu Cladophorales, přičemž v některých případech dokonce vykazovaly i vyšší růstové rychlosti, než v salinitě původního místa nálezu (Imai *et al.*, 1997; Wakana, 1999 cit. podle Ichihara, 2013).



**Obr. č. 3:** Měření tolerance různých druhů z rodu *Ulva* ve 3 různých salinitách po dobu 7 dní: a) ve 30 PSU, b) v 5 PSU a za c) ve sladké vodě. Je vidět, že v mořské vodě se všem druhům daří přibližně stejně dobře, ale při postupném snižování salinity dochází napřed k úplnému zastavení růstu u mořského druhu *Ulva sp.* a k postupnému zpomalování růstu brakických zástupců. Ve sladké vodě dlouhodobě přežívají pouze zástupci s tubulární morfologií (tedy zde *U. limnetica* a *U. prolifera*) (Ichihara *et al.*, 2013).

Změny salinity, jako jednoho ze základních abiotických faktorů, mohou značně ovlivňovat růst a fotosyntetickou aktivitu řas rodu *Ulva* (Li *et al.*, 2017). Inhibice fotosyntézy, v důsledku extrémně vysoké salinity, je zřejmě asociována s fotosystémem II (PS II) v reakčním centru (Lu *et al.*, 2006). Zdá se, že vysoká salinita způsobuje snížení jeho aktivity a také transportu elektronů a tím se celkově snižuje výsledný kvantový výtěžek. Salinita tedy pravděpodobně působí na akceptorové místo elektronů na PSII, dochází zde k modifikaci tohoto místa a snižuje se jeho vazebná afinita pro přenašeče elektronů, jako je plastochinon (Xia *et al.*, 2004). Jako odpověď na sníženou aktivitu PS II řasy produkují větší množství fotosyntetických pigmentů a tím se této limitaci dokážou alespoň částečně bránit a nahradit tak sníženou efektivitu procesu (Kakinuma *et al.*, 2006).

Obecně se jako adaptace na měnící se úroveň salinity objevuje také schopnost udržovat stálý buněčný turgor, a to za pomoci změn osmotického potenciálu díky intracelulárním koncentracím anorganických iontů a organických osmolytů, přičemž toto je klasickým mechanismem u mořských řas (Kakinuma *et al.*, 2006). Jedním z typických osmolitů, které se akumulují u řas rodu *Ulva* při vystavení hypersalinním podmínkám je organický osmolit prolin, ten tedy hraje důležitou roli při stresové odpovědi. Funguje pravděpodobně jako ochrana makromolekul, jako jsou proteiny, a také jako ochrana buněčných membrán před poškozením. Také může fungovat jako zásobárna dusíku a regulátor buněčného redoxního potenciálu (Hare *et al.*, 1999). Naopak v hyposalinním prostředí se tvoří a akumuluje z pravidla polyamin s podobnou funkcí (Liu *et al.* 2000). K evoluci těchto přizpůsobení nejspíš došlo u intertidálních řas kvůli nutnosti se dokázat přizpůsobit zdejšímu často a výrazně se měnícím podmínkám. Kromě salinitních změn zde také bývají tyto řasy dobře přizpůsobeny na vysychání apod. (Luo *et al.*, 2011).

Při měnící se salinitě do extrémních hodnot dochází také často k tvorbě kyslíkatých radikálů, tedy látek, které způsobují oxidativní stres, a proti kterým se organismus musí dokázat efektivně bránit. Této obraně odpovídají zvýšené produkce antioxidantů a aktivita antioxidantních enzymů (Lu *et al.*, 2006). Na druhu *Ulva fasciata* byla zkoumána například schopnost tvořit antioxidanty, jako glutathion a askorbát, které mohou například chránit proteiny před denaturací apod. (Lu *et al.*, 2006). Také dochází ke zvýšení aktivity enzymů katalázy, superoxid dismutázy a glutathion reductázy (Luo *et al.*, 2011).

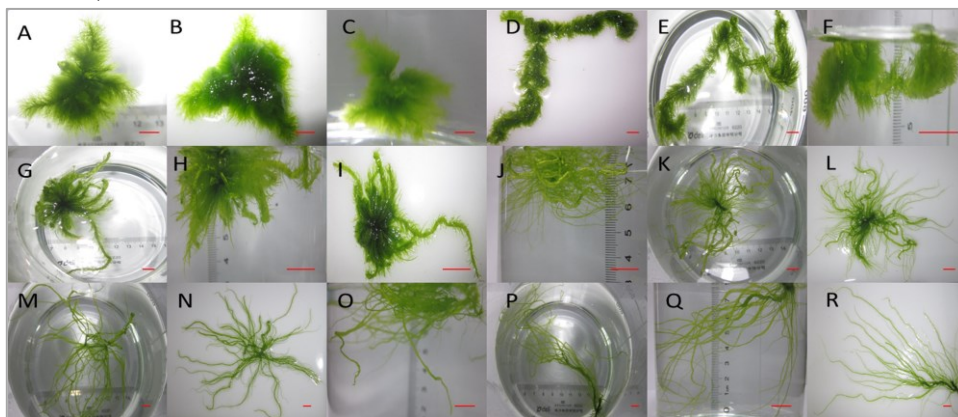


### 1.3.2. Teplota

Teplota vody je významná svým vlivem na přežití řas a jejich rozmnožování (Balar *et al.*, 2020). Může ovlivnit efektivitu jejich metabolismu, především aktivitu enzymů, které hrají roli při akumulaci CO<sub>2</sub>, jako je RuBisCO anebo enzymy hrající roli při asimilaci uhlíku a dusíku. Může mít též výrazný vliv na morfologickou plasticitu stélek (Lee *et al.*, 2020).

Stanovit obecné teplotní optimum pro druhy rodu *Ulva* je nicméně poměrně těžké, protože se u jednotlivých druhů tato optima mohou dost lišit. Například u druhu *Ulva fenestrata*, což je mořský distromatický druh, byla zjištěna optimální teplota pro vegetativní růst kolem 10°C (Kalita *et al.*, 2003). Naproti tomu například druh *Ulva intestinalis*, který tvoří stélky tubulární, má optimum kolem 20-25°C (Ruangchuay *et al.*, 2012). Dnes se do rodu *Ulva* řadí přibližně 148 popsanych a taxonomicky uznávaných druhů a variabilita v optimální teplotě a v rozšíření v různých teplotních podmínkách je velmi rozsáhlá (Guiry and Guiry, 2021).

Zdá se, že teplota může také výrazně ovlivnit rychlosti růstu stélek. U druhu *Ulva prolifera* došlo při vyšší teplotě k nárůstu relativní růstové rychlosti (RGR), nicméně například salinita na RGR v této studii příliš vliv neměla a působila spíše na intenzitu fotosyntézy (Gao, 2016). Obecně to, že vyšší teplota vede k vyššímu růstu může způsobit, že velké množství biomasy způsobuje zastínění populace, proto stélky v těchto teplotách netvoří tak velké množství postranních větví a rostou spíše do délky, opačně je tomu pak v teplotě nižší, kde stélky mívají daleko větší počet krátkých postranních větví, vyrůstajících po celé délce. Velké množství postranních větví pak sice může vést k většímu zastínění, nicméně díky celkově nižším rychlostem růstu to pravděpodobně nepůsobí jako limitující faktor (Messyasz *et al.*, 2011; Gao, 2016).



**Obr. č. 4:** Změny morfologie stélek v závislosti na teplotě a salinitě. A-C) teplota 20 °C a salinita 10 PSU, D-F) 20 °C a 20 PSU, G-I) 20 °C a 30 PSU, J-L) 25 °C a 10 PSU, M-O) 25 °C a 20 PSU, P-R) 25 °C a 30 PSU (Gao, 2016)

Podle studie na druhu *Ulva fasciata* se potvrdila také důležitost teploty a salinity pro indukci tvorby zoospor z vegetativních stélek. Jako optimální podmínky pro jejich produkci byla stanovena salinita 15 PSU a teplota 25 °C. Maximálních růstových rychlostí dosahoval druh ovšem při 25 °C a salinitě 30 PSU, což jsou také podmínky odpovídající jeho přirozenému výskytu (Mantri *et al.*, 2010).

Jako odpověď na stres způsobený vysokou teplotou (>30 °C) dochází v řasách rodu *Ulva* také ke zvýšení intracelulární akumulace fotosyntetických pigmentů, a to z toho důvodu, aby si řasa mohla zachovat vysokou aktivitu fotosyntetického aparátu i přes limitace, kterým je v těchto podmínkách vystavena a aby tímto způsobem nahradila jeho sníženou aktivitu. Tedy mechanismus je víceméně shodný jako při zvýšené salinitě (Kakinuma *et al.*, 2006).

Stres z vysoké teploty nicméně převážně ovlivňuje metabolismus dusíku. Mechanismy, kterými se řasy rodu *Ulva* mohou bránit zahrnují převážně zvýšenou tvorbu volných aminokyselin jakými jsou například asparagin, glutamin, glycin, serin a další, které pomáhají regulovat akumulaci uhlíku a dusíku, protože jsou součástí deaminačních, transaminačních a dalších reakcí v cyklu těchto prvků (Kakinuma *et al.*, 2006).

### 1.3.3. Ostatní faktory

Některé druhy, jako například dobře známý druh *Ulva lactuca*, musí mít také dobré mechanismy na obranu proti vysychání, protože se mohou vyskytovat v horních vrstvách mořského litorálu, kde často dochází k obnažení stélek, které musí tyto stresové podmínky přečkat do dalšího zaplavení vodou. Stres z vysychání často vede ke snížení fotosyntetické aktivity a také může snížit schopnost přijímat živiny jak v podobě NH<sub>4</sub>-N, tak NO<sub>3</sub>-N (Xu *et al.*, 2016). Při srovnání rozdílů mezi zástupci žijícími ve vyšších oproti zástupcům z nižších litorálních zón bylo zjištěno, že zástupci z vyšších zón, které jsou déle a častěji vystaveny vysychání, vykazují také vyšší aktivitu některých enzymů, jako například nitrát reduktázy, amylázy a cytoplazmatické peroxidázy, ty tedy pravděpodobně fungují v mechanismu obrany proti těmto stresovým situacím (Murthy *et al.*, 1989).

Mezi další výhodné vlastnosti těchto řas patří také jejich poměrně různorodé a efektivní rozmnožovací schopnosti. Rozmnožují se sexuálně, ale mohou i asexuálně, přičemž dokážou vyprodukovat poměrně velké množství rozmnožovacích částic najednou. Ve stresové situaci často tedy může docházet k rozpadu stélek a tvorba velkého množství zoospor, které se pak mohou transportovat na lokality s příznivějšími podmínkami (Gao *et al.*, 2016).

V neposlední řadě u některých druhů, například u druhu *Ulva prolifera*, můžeme dokonce pozorovat schopnost měnit klasický C3 metabolismus typický pro zelené řasy za C4 metabolismus, což umožňuje efektivnější akumulaci CO<sub>2</sub> ve fluktuujících podmínkách (Gao *et al.*, 2016). Bylo prokázáno, že se u řas rodu *Ulva* nachází jak geny pro C3, tak pro C4 metabolismus, a i specifické C4 metabolické enzymy, jako pyruvát orthofosfát dikináza (PPDK), fosfoenolpyruvát karboxyláza (PEPC) a fosfoenolpyruvát karboxykináza (PCK) (Xu *et al.*, 2012).

#### **1.4. Chelatační činidla, pH pufrů a jejich význam při kultivaci řas**

Kultivační média jsou obecně složena ze 3 hlavních komponent, a těmi jsou makronutrienty, stopové prvky a vitamíny. Všechny bývají předem připraveny jako zásobní roztoky a do média přidány až následně v potřebném množství, ale není to nutnou podmínkou. Mezi hlavní makronutrienty patří převážně sloučeniny dusíku a fosforu, nejčastěji ve formě NaNO<sub>3</sub> a NaHPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, ovšem používány jsou i další dusíkaté a fosforečné látky (Andersen *et al.*, 2005). Některé řasy mohou vyžadovat také zvýšenou přítomnost křemíku v médiu, jako například Bacillariophyceae a další (Lebeau *et al.*, 2003). V případě vitamínů bývají pro velkou většinu řas důležité především vitamíny B12, thiamin a biotin (Provasoli *et al.*, 1957).

Stopové prvky jsou chemické prvky, které organismus potřebuje v malém množství k životu a správnému vývoji. Patří mezi ně i některé kovy, které v adekvátním množství umožňují řasám růst, nicméně v příliš vysokém množství mohou působit toxicky, a proto je nutné řasy zásobit pouze nezbytnou dávkou. Příkladem kovů, které mají roli esenciálních mikronutrientů, je železo (jeden z nejdůležitějších kovů pro řasy), dále hořčík, zinek, měď, molybden a nikl (Andersen *et al.*, 2005; Navarrete *et al.*, 2019; Mellado *et al.*, 2012). Tyto kovy hrají roli v řadě metabolických drah, převážně těch, které zajišťují základní procesy využívající esenciální zdroje energie, jako je světlo, dusík, fosfor, nebo CO<sub>2</sub>. Důležitost jednotlivých kovů se samozřejmě mění a není úplně stejná pro všechny řasové skupiny (Andersen *et al.*, 2005).

Chelace je v tomto ohledu velmi důležitá, protože zajišťuje dostupnost těchto esenciálních kovů organismu v kontrolovaném množství. Jedná se o proces, kdy kovy vytváří komplexy spolu s chelacním činidlem neboli dobře definovaným organickým ligandem. Tento komplex funguje jako „pufr“ a umožňuje simultánně kontrolovat dostupnost většího množství kovů, a to i za použití jediného ligandu (Andersen *et al.*, 2005). Po určité době se tyto chelatované komplexy začnou disociovat zpátky na volné ionty a ligand, až dojde k tomu, že míra formování nových komplexů a jejich disociace jsou rovnocenné a v médiu jsou využitelné

formy kovů přístupné pro řasy jen v přiměřeném množství tak, aby jejich koncentrace nebyla pro řasy v kultuře toxická (Berges *et al.*, 2001).

EDTA neboli kyselina ethylendiamidtetraoctová je jedním z příkladů syntetických chelatačních činidel, která byla od roku 1950 zaváděna do procesu vytváření kultivačních médií pro fytoplankton (Price *et al.*, 1989). Je běžně dostupná ve formě nerozpustné sloučeniny chelaton 2, ale pro použití v kultivačních médiích se využívá převážně forma chelaton 3, tedy  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , která je ve vodě dobře rozpustná. Velkou výhodou EDTA a dalších syntetických činidel je výsledná možnost kalkulace a možnost manipulace s koncentracemi esenciálních kovů v médiu (Gerringa *et al.*, 2000). EDTA je používána především proto, aby ponechávala železo v roztoku a udržovala koncentrace volných iontů železa na netoxické úrovni. Železo přitom jako jeden z nejdůležitějších prvků zajišťuje správný růst řas, ale jeho množství je nutné kontrolovat (Sauvage *et al.*, 2021).

V kultivačních médiích pro sladkovodní druhy stačí přidávat menší množství chelatačních činidel, protože EDTA v něm působí daleko efektivněji. Díky obecně nižším koncentracím  $\text{Ca}^{2+}$  iontů ve sladké vodě je nižší i kompetice těchto iontů a iontů kovů o navázání a tvoření komplexů s EDTA ligandy. Zároveň jsou zde díky tomu i menší problémy s toxickým působením této kyseliny (Andersen *et al.*, 2005).

V případě řas rodu *Ulva* je riziková jejich tendence akumulovat kovy ve svých stélkách poměrně rychle a ve velkém množství, což by mohlo vést až k dosažení toxické koncentrace (Chakraborty *et al.*, 2014). Nicméně se zdá, že tyto řasy mají samy o sobě některé mechanismy (pro udržení homeostáze a detoxifikaci), kterými se mohou bránit proti škodlivým vlivům nadměrného množství kovů, jež by mohlo vést k oxidativnímu stresu a poničení makromolekul. Jedním takovým mechanismem se zdá být akumulace přirozených triol-obsahujících ligandů, tzv. triol-chelátorů, jako jsou glutathion (GSH), fytochelatiny (PCs) a metalothioneiny (MTs) (Mellado *et al.*, 2012). Ve studii zabývající se akumulací a obranou proti toxickému množství mědi byla zjištěna korelace mezi zvyšováním obsahu mědi v médiu a zvyšováním koncentrace GSH, PCs a MTs ve stélkách řas, které pravděpodobně umožňují zbavovat stélku (detoxifikovat) přebytečného množství mědi, jež je opět vracena do kultivačního média (Navarrete *et al.*, 2019).

Syntetická chelatační činidla mohou tedy udržovat hladinu akumulace na takové úrovni, aby k těmto detoxifikačním mechanismům ani nemuselo docházet, a jsou dobrou možností, jak kontrolovaně udržovat množství kovů na přijatelné hranici (Gerringa *et al.*, 2000).

Další důležitou složkou kultivačních médií je přítomnost stabilizačních pufrů, které umožňují udržovat konstantní pH po celou dobu kultivace. Nestabilita pH je problémem hlavně v kulturách, kde dojde k velkému nárůstu biomasy, protože začne docházet k velmi intenzivnímu příjmu anorganického uhlíku a jeho fixace dosáhne míry, kdy přesahuje možnosti dostupného CO<sub>2</sub> z atmosféry. Dochází tak k snížení koncentrace CO<sub>2</sub> v médiu a to vede ke zvýšení pH (McFadden *et al.*, 1986). Zvýšené pH poté může vést ke změně chemie stopových prvků, hlavně kovů. Například může docházet ke zvýšenému tvoření komplexů kovů s anorganickými ligandy jako CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, nebo OH<sup>-</sup>, případně rozpustnost kovů, které tvoří hydroxid, anebo může docházet ke změně uhličitanových pevných látek (Andersen *et al.*, 2005).

Ve sladké vodě se setkáváme s problémem v podobě nízké koncentrace hydrogenuhličitanu (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), která vede k nedostatečnému pufování pH. U sladkovodních médií se proto doporučuje použití pH pufrů, a to hlavně nechelatujících, u kterých nedochází k tomu, že by nekontrolovatelně pozměnily obsah stopových kovů, jako tomu je u pufrů chelatujících (Andersen *et al.*, 2005). HEPES neboli pufr kyseliny hydroxyethyl – piperazinethansulfonové, který se používá v rozmezí pH od 6,8 až 8,2, je výhodný pro sladkovodní média právě proto, že má zanedbatelnou tuto chelatační kapacitu (tzv. “negligible chelating capacity“), nevyčítává tedy důležité látky z média a ty jsou tak přístupné pro využívání řasou. Nehrozí u něj, že by měl pro řasy v kultuře toxické působení (McFadden *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1974).

V médiích s mořskou vodou se častěji používají pH pufrů jako Tris (2-amino-2 [hydroxyethyl]-1-3-propandiol) a glycyglycin. Tris však může být pro některé druhy řas toxický, způsobovat například inhibici aktivity některých enzymů (Andersen *et al.*, 2005). Tris je organický pufr působící v rozmezí 7,1 a 9,1 pH při pokojové teplotě. Jeho nevýhodou je, že je velmi rychle metabolizován bakteriemi, a tak se jeho použití doporučuje pouze v axenických kulturách (Smith *et al.*, 1974). Při kultivaci řas z rodu *Ulva* to představuje překážku, protože se z pravidla pěstují za přítomnosti svých epifytických bakterií, bez kterých nejsou schopny vytvářet klasickou morfologii stélek (Wichard *et al.*, 2015). Druhým běžně používaným pufrům je glycyglycin, který ale zvyšuje aciditu média a je tedy často nutné ještě přidávat NaOH (Andersen *et al.*, 2005). Pro sladkovodní média jsou nicméně oba tyto pufrů příliš zásadité, takže se u nich jejich využití nedoporučuje (McLachlan, 1963).

## 2. Otázky a cíle práce

### **a) Jakých růstových rychlostí dosahují brakické a sladkovodní tubulární morfotypy řas rodu *Ulva*?**

Řasy rodu *Ulva* jsou známé svou schopností narůstat velmi rychle do velkého množství biomasy, a to v poměrně širokém spektru podmínek (Liu *et al.*, 2010; Smetacek & Zingone, 2013b). Jsou tedy velmi využívanou skupinou v biotechnologických aplikacích. Používané jsou nicméně hlavně mořské druhy s listovitou morfologií a studií, které by se zabývali potenciálem a využitím tubulárních morfotypů není příliš mnoho (Carl *et al.*, 2014). Zároveň existuje jen málo experimentálních dat o kvantitativních růstových charakteristikách jednotlivých populací a druhů s tubulární morfologií z brakických či sladkovodních lokalit. Jedním z cílů této práce je tedy stanovit rychlosti růstu těchto populací za pomoci měření přírůstků biomasy s použitím PAM fluorometru a zjistit, zda jsou sladkovodní populace, o nichž nejsou k dispozici prakticky žádná data tohoto typu, srovnatelné v tomto ohledu s populacemi brakickými.

### **b) Jaké jsou optimální podmínky pro kultivaci brakických a sladkovodních populací s ohledem na teplotu, salinitu a přidávání chelačních činidel a pufrů do média?**

Dalším cílem práce by mělo být zjištění, pokud možno optimálních podmínek pro kultivaci studovaných brakických a sladkovodních tubulárních populací. Mezi velmi důležité podmínky, které ovlivňují růst řas rodu *Ulva*, patří mimo jiné teplota a salinita (Kerrison *et al.*, 2015; Balar *et al.*, 2020). Proto budou zkoumané populace testovány na gradientu těchto podmínek a podle jejich přírůstků biomasy budou stanoveny optimální podmínky pro jejich dlouhodobou kultivaci. Další významnou složkou, která se používá při kultivaci řas jsou přísady chelatačních činidel (např. EDTA), které pomáhají pro řasu zajišťovat esenciální kovy z média a dále také přítomnost pH pufrů (např. HEPES), které udržují v médiu stabilní hodnoty pH po celou dobu kultivace (Andersen *et al.*, 2005). Tyto látky jsou běžně používané, nicméně významně zvyšují náklady související s kultivací řas, a to převážně ve velkém množství ve velkoplošných komerčních kultivacích. Tato práce by se proto měla soustředit i na testování přítomnosti a absence těchto látek v médiu a zda jsou opravdu nezbytné pro kultivaci řas rodu *Ulva*, nebo by bylo možné je v médiu vynechat.

### **c) Je možné použití metody měření kontinuálních přírůstků biomasy pomocí PAM fluorometru u makrořas z rodu *Ulva*?**

Měření přírůstků biomasy pomocí PAM fluorometrie je metoda, která se v současnosti používá zejména pro měření dynamiky biomasy mikrořas (Eggert *et al.*, 2006). Pro makrořasy

se metoda na první pohled nezdá příliš vhodná, vzhledem k tomu, že je vytvořena především jako metoda pro měření efektivity fluorescence, a ne prvoplánově jako metoda pro měření přírůstků biomasy. Řasy rodu *Ulva* nicméně disponují stélkou, která je tvořena velkým množstvím buněk, která má každý svůj chloroplast a jsou rozmístěny po celém povrchu stélky (Hayden *et al.*, 2003; Rybak, 2015). V principu tedy při měření fluorescence celá stélka odráží část světelného záření v podobě fluorescence zpět a na PAM fluorometru je tedy zachycená celá její plocha. Jedním z cílů práce je tedy zhodnotit metodu měření plochy stélek pomocí PAM fluorometru a jestli by bylo možné tuto metodu používat na charakterizaci kontinuálních přírůstků biomasy s výhodou toho, že se jedná o principálně neinvazivní metodu.

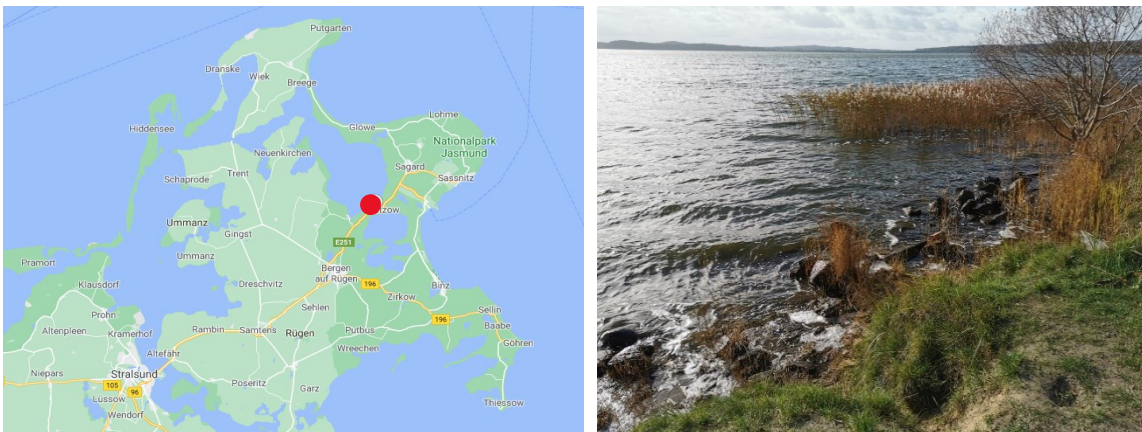
#### **d) Jaký je potenciál kultivace studovaných tubulárních morfotypů ve větších objemech média pro představu jejich pěstování v komerčních velkoplošných kultivacích?**

Potenciál praktického využití rodu *Ulva* spočívá převážně v souvislosti s možnostmi jejich využití v biotechnologickém zpracování, a to nejen v potravinářství, ale i při výrobě bioplynu či bioremediaci (čištění odpadních vod) (Bolton *et al.*, 2009; Neori *et al.*, 2020). Velmi důležitým aspektem v tomto ohledu je tedy možnost jejich kultivace ve velkých objemech média, a to za podmínek, které jsou pro řasy víceméně optimální, ale zároveň umožňují kultivaci s použitím nízkého množství provozních nákladů. Posledním cílem práce by mělo být zhodnocení růstového potenciálu stélek s tubulárním morfotypem ve větších objemech média, a to za pomoci sledování přírůstků biomasy pomocí analýzy obrazu.

### 3. Metody

#### 3.1. Odběrové lokality a získávání vzorků

Vzorky řas byly získány na dvou Evropských lokalitách. První byl odebrán v severním Německu na ostrově Rujána v zátocě Baltského moře u města Lietzow. Zde se nachází malá písčité pláž, kde rostly stélky řas rodu *Ulva* přichycené na malých kamenech ležících volně ve vodě. Nejspíše se tedy jednalo o nějakou rychle narostlou menší populaci. Jedná se o brakickou lokalitu se salinitou přibližně 6,61 PSU (to odpovídá konduktivitě přibližně 11,85 mS/cm). Na lokalitě nebyly tyto řasy příliš rozšířené, ale to je pravděpodobně z toho důvodu, že jsem se na lokalitu vydala až v říjnu, a to už postupně končí hlavní vegetativní období tohoto rodu. Přičemž největšího růstu dosahuje přibližně v období od začátku března až do pozdního července-srpna (Altamirano, 2000).



**Obr.č.5:** Baltická lokalita na ostrově Rujána u města Lietzow, salinita kolem 6,61 PSU

Jako druhá byla zvolena lokalita v Česku, a to bývalá písčivná Vidlák. Jedná se o přírodní rezervaci, která se nachází v severozápadní části Dolních Počernic. Vzhledem k typu lokality se jedná převážně o místo, kde můžeme najít velké množství mokřadních rostlin a ptactva, ale zároveň také o místo vhodné právě pro výskyt řas rodu *Ulva* díky výrazně zásaditému prostředí s pH kolem 9 (pH bylo v tomto období pravděpodobně lokálně zvýšeno zrychlenou fotosyntézou, většinou nebývá tak vysoké). Vzhledem k tomu, že se jedná o sladkovodní lokalitu, konduktivita zde byla pouze 0,96 mS/cm, tedy cca 0,47 PSU, ačkoli i to je na sladkovodní ekosystém poměrně hodně. Řasy jsem zde našla jako součást menšího vodního květu na hladině, také už spíše ke konci vegetačního období.





**Obr.č. 6:** Sladkovodní lokalita v bývalé pískovně Vidlák, salinita kolem 0,47 PSU

Původně byla nalezena ještě jedna jiná populace řas rodu *Ulva* v České republice, v přírodní rezervaci SOOS v okrese Cheb. Zde se nachází rozsáhlá slaniska, kde také při hladině dominoval v některých místech ulvofytní vodní květ. Nicméně vzhledem k vysoké salinitě cca 6,26 mS/cm byla lokalita spíše podobná brakickému prostředí v Baltském moři, a proto k porovnání brakických druhů se sladkovodními ne příliš vhodná.

Výběr lokalit byl určen převážně v závislosti na tom, že v této práci jsme chtěli zjistit nároky a růstové vlastnosti populací z co nejvíce sladkovodního prostředí. Konkrétní lokalita na Rujáně byla vybrána ze článku od Steinhagena, který se zabýval molekulární analýzou a distribucí rodu *Ulva* v této oblasti (Steinhagen *et al.*, 2019) a Baltické moře je známé brakickými oblastmi s velmi nízkou salinitou. České lokality byly původně vybírány hlavně ze článků od Rybaka, nebo Mareše, kteří se zabývají rozšířením těchto řas nejen u nás, ale hodně také například v Polsku (Mareš *et al.*, 2011)(Rybak, 2018). Na velkém množství lokalit, které v článcích zmiňují jsem je nicméně už nenašla, například na Moravě v oblasti lednicko-valtického areálu byly tyto řasy nahrazeny sinicovým vodním květem a podobně. Mohlo to být ale pouze obdobím sběru, nebo se jedná o příliš staré články a původní populace řas se už zde nevyskytují. Proto bylo místo sběru nakonec vybráno úplně jinde.

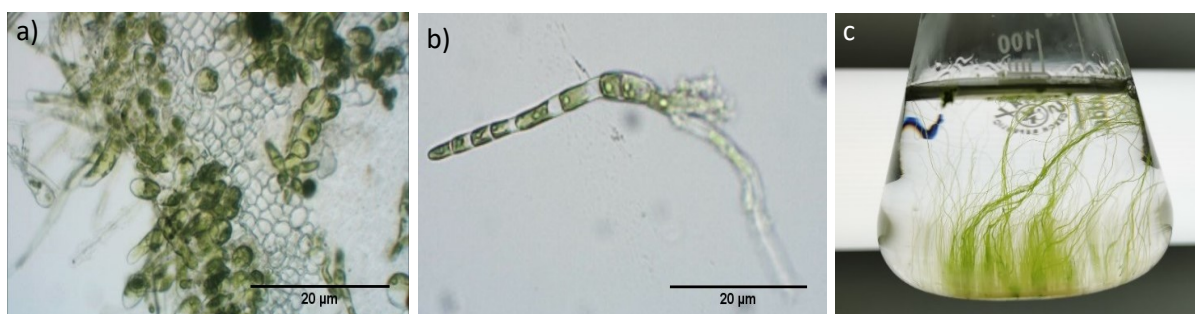
### **3.2. Izolace stélek a jejich kultivace za standartních laboratorních podmínek**

Tubulární stélky nasbírané z přírodních lokalit byly pod binolupou separovány na menší části, které nebyly porostlé epifyty, aby se zamezilo přerůstání kultury jinými druhy řas, které by mohly kompetovat o živiny přítomné v kultivačním médiu. Na očištění stélek nebylo možné použít antibiotika, protože řasy rodu *Ulva* mají na sobě asociované symbiotické bakterie, bez

kterých není možný vývin jejich klasické tubulární morfologie stélek, ale vzniká pouze nediferenciovaný kalus (Wichard, 2015).

Čisté části stélek byly rozočkovány do předem připraveného f/2 média a do média vytvořeného jako ASW („artificial sea water“) (Andersen *et al.*, 2005) se salinitou MV/3 (tedy třetinovou, než je salinita mořské vody, tedy cca 11,6g/l soli) pro brakický kmen. F/2 médium se ale neosvědčilo jako vhodné, stélky rostly pomalu, nebo vůbec, a proto pro další kultivaci bylo zvoleno pouze ASW. Pro kultivaci sladkovodní populace bylo také vybráno ASW pouze více naředěné na MV/20 (tedy cca dvacetinu salinity mořské vody) a to pro lepší srovnání s kultivačními podmínkami brakické populace. ASW médium navíc obsahuje pouze destilovanou vodu a přidané živiny v podobě  $\text{NaNO}_3$  a  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (množství bylo převzato z návodu na f/2 médium) a vitamínovou směs, je tedy výhodné pro kultivace ve velkém měřítku díky nenáročnosti na přípravu a malému množství přidávaných látek do média, čímž se zlevňuje celková kultivace. Sladkovodní kmen jsem zkoušela pěstovat i v BBM, nebo DY-mediumu, ale ani jedno se nejevilo jako výrazně lepší, proto nebylo nutné ASW měnit. Všechny Erlenmeyerovy baňky byly uchovávané pod umělým osvětlením s 12:12 h světlo: tma cyklem.

Ve velkém množství erlenek, kam byla vložena pouze velmi malá část stélky se začaly tvořit zelené povlaky, ze kterých se postupně vyvinula tenká přichycená vlákna. Ta jsme pod mikroskopem identifikovaly jako nová iniciační (juvenilní) stádia vyvíjejících se stélek (viz. obr. č.7: a, b), která vznikla pravděpodobně ze zoospor. Tento jev při rozseparování stélky na malé části pozorovali i například ve studii od Vaibhava A. Mantriho a zdá se, že tento způsob rozdělení stélky může fungovat jako jeden z indukčních faktorů pro tvorbu zoospor, stejně jako například prudká změna teploty, nebo salinity (Mantri *et al.*, 2011).



**Obr.č. 7:** a) průhledně – zbytky původní stélky a na ní vyrůstající nová juvenilní stádia, b) uniseriální (tvořeno jednou řadou buněk) juvenilní stádium stélky s rhizoidy, c) nově vytvořené mladé stélky vyrostlé z juvenilních stádií

Tyto kultury z přírodních populací byly velmi porostlé rozsivkami, které není možné jednoduše ze stélek očistit a dále jsou schopné se velmi dobře v médiu množit, převážně v méně slané variantě. Proto byla potřeba kultury pravidelně přeočkovávat, a to hlavně v počátečních fázích kultivace, aby se udržovali v co nejlepším stavu a bylo možné vytvořit čisté kultury.

### 3.3. Světlená mikroskopie

Morfologické znaky byly pozorovány pod binokulární lupou a pomocí světelného mikroskopu Leica DM 2000 LED s pomocí Normanského diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC), většinou s objektivy se zvětšením 20x až 40x. Fotografie stélek byly pořízeny pomocí fotoaparátu Leica ICC50 W a upraveny v programu LAS X, nebo dále také v programu Image J.

### 3.4. Experimentální kultivace

#### Experimentální kultivace na gradientu salinity

Pro experimentální kultivaci na gradientu salinity pro brakickou populaci bylo připraveno 6 různých kultivačních médií o 6 úrovních salinity. A to rozředěním ASW média se salinitou mořské vody (cca 35 PSU = 35 g soli/l) pomocí destilované vody (viz tabulka č. 1) a pro sladkovodní populaci stejným způsobem dalších 6 úrovní s nižší salinitou. Tedy například MV/2 byla rozředěna na polovinu koncentrace mořské vody, MV/3 na třetinu apod. Ředění probíhalo ještě před přidáním živin, aby se média lišila pouze salinitou.

Úrovně salinity pro brakickou populaci			Úrovně salinity pro sladkovodní populaci		
MV/1	35 PSU	53,09 mS/cm	MV/3	11 PSU	18,470 mS/cm
MV/2	17 PSU	27,564 mS/cm	MV/8	4,25 PSU	7,76 mS/cm
MV/3	11 PSU	18,470 mS/cm	MV/20	1,75 PSU	3,323 mS/cm
MV/4	8,5 PSU	14,63 mS/cm	MV/35	1 PSU	1,968 mS/cm
MV/6	5,6 PSU	10,04 mS/cm	MV/55	0,64 PSU	1,3 mS/cm
MV/8	4,25 PSU	7,76 mS/cm	MV/75	0,75 PSU	0,96 mS/cm

**Tabulky č. 1:** Tabulky s hodnotami PSU a převody na hodnoty konduktivity v mS/cm (Wagner *et al.*, 2006)

Stélky z kultur byly rozřezány za pomoci sterilních nástrojů na cca 7 mm úseky, aby byla počáteční velikost všech přibližně stejná a byly vloženy do UV sterilizovaných kultivačních destiček o 6 komůrkách (jedna komůrka o objemu cca 5 ml). Vždy do 4 komůrek byl přidán jeden typ média, tedy ve výsledku byla 4 opakování pro každou úroveň salinity. Experiment probíhal pod umělým osvětlením s 12:12 h světlo: tma cyklem. Intenzita zářivek byla 5420 lux.

## Experimentální kultivace na gradientu teploty

Pro kultivaci na gradientu teploty bylo použito vždy základně stanovené médium pro kultivaci kmenů, tedy pro brakickou populaci médium MV/3 a pro sladkovodní populaci médium MV/20. Rozočkování stélek do sterilních destiček probíhalo stejným způsobem jako při salinitním experimentu, ale destičky byly následně rozmístěny na gradientový stůl, kde bylo nastaveno rozmezí teploty od 12°C až do 28°C. Destičky se po každém měření otáčely, aby nehrálo při experimentu příliš velkou roli osvětlení dopadající na jednotlivé stélky v kultivačních komůrkách. V tomto experimentu byla pro každou úroveň teploty pouze 3 opakování (kvůli malému prostoru na gradientovém stole). V případě destiček, kde byla testována vyšší teplota bylo médium doplňováno destilovanou vodou v případě odpaření větší části objemu komůrky, aby nedošlo k vysušení stélek a byly všude stejné podmínky po celou dobu experimentu.

## Experimentální kultivace s přidanými chelačními činidly a pH pufrů

Při posledním experimentu byla použita základní média (MV/3 a MV/20) jako kontroly a dále byly vytvořeny 3 varianty tohoto kontrolního média. První varianta s přidáním chelačního činidla EDTA, druhé s přidáním pH pufru HEPES (použití v pH 6.8–8.2) a poslední s přidáním kombinace obojího. Množství přidaného EDTA bylo převzato z protokolu pro f/2 médium pro brakickou populaci a množství HEPES + EDTA pro sladkovodní populaci z protokolu pro modifikované DY – médium (význam činidel a pufrů pro kultivaci řas viz. úvod, kapitola 1.4.). Pro každé vytvořené médium bylo uděláno 6 opakování. V případě EDTA bylo činidlo přidáno v rozpustné formě tzv. chelaton 3 ( $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

Modified DY V Medium

To approx. 950 ml of distilled water, add:

ml	stock solution	g / 100ml H <sub>2</sub> O
1	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5
1	KCl	0.3
1	NH <sub>4</sub> Cl	0.268
1	NaNO <sub>3</sub>	2
1	β - glycerolphosphate	0.216
1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.08
1	Na <sub>2</sub> EDTA	0.7
1	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0.6
1	FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.166
1	CaCl <sub>2</sub>	7.5
243 mg	HEPES	-

f/2 Trace Metals Solution

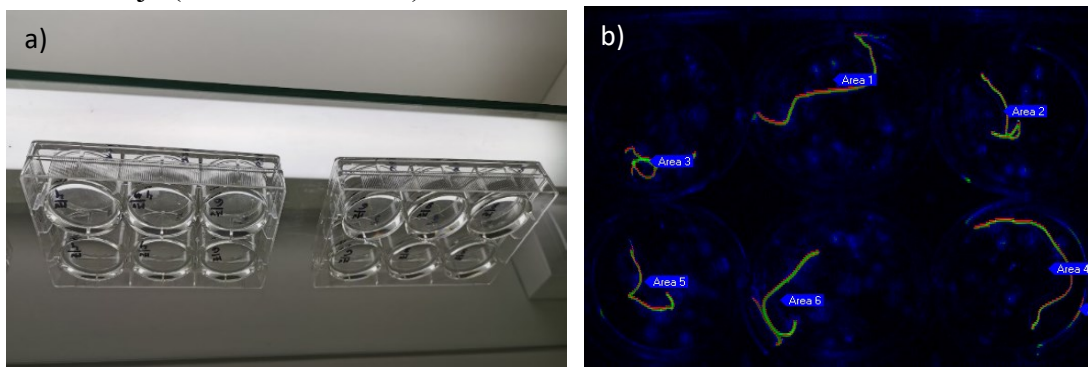
Into 950 mL of dH<sub>2</sub>O, dissolve the EDTA and other components. Bring the final volume to 1 liter with dH<sub>2</sub>O.

Component	l <sup>o</sup> Stock Solution (g · L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	—	3.15 g	$1.17 \times 10^{-5}$
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	—	4.36 g	$1.17 \times 10^{-5}$
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180.0	1 mL	$9.10 \times 10^{-7}$
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.0	1 mL	$7.65 \times 10^{-8}$
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0	1 mL	$4.20 \times 10^{-8}$
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	9.8	1 mL	$3.93 \times 10^{-8}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6.3	1 mL	$2.60 \times 10^{-8}$

**Obr. č. 8:** Návod na přípravu DY V a f/2 média s vyznačením látek použitých v tomto experimentu (Andersen *et al.*, 2005)

### 3.5. Měření přírůstků biomasy pomocí PAM fluorometru a tvorba křivek specifické růstové rychlosti

Měření plochy stélek u všech 3 experimentálních kultivací probíhalo vždy 2x týdně po dobu 35 dní, a to za pomoci PAM (Pulsní Amplitudová Modulace) fluorometru a nastaveného  $F_v/F_m$  protokolu. Metoda fluorometru využívá fakt, že fotosyntetizující organismy vyzářují část přijaté světelné energie zpět v podobě fluorescence chlorofylu, ta je poté zachycena a změřena na detektoru přístroje. Využívá se převážně na měření růstu biomasy mikrořas a pro stanovení fotosyntetické aktivity, která často odráží celkový stav organismu, hlavně při vystavení nepříznivým podmínkám (nadměrná ozáření, UV, sucho, změny teploty apod.) (Roháček *et al.*, 1999; Figueroa *et al.*, 2013). Nicméně díky tomu, že tubulární řasy rodu *Ulva* obsahují velké množství cca stejnocenných buněk s jedním velkým chloroplastem, a to po celé délce stélky, je možné za pomoci změření fluorescence také přibližně stanovit plochu dané stélky v  $\text{mm}^2$ . Vzhledem k neinvazivnosti této metody je tedy takto možné sledovat například postupné přírůstky biomasy v čase, a to, aniž bychom museli nějakým způsobem narušit průběh experimentu, jako například při zjišťování suché hmotnosti, kdy musíme celou stélku z média vyndat, vysušit, zvážit a opětovné vrácení není možné (Steinbruch *et al.*, 2020). Před začátkem měření je ještě nutné vzorky zatemnit cca na 15 minut, protože nejprve dochází k velmi krátkému pulznímu záblesku, a tak lze změřit minimální hodnotu fluorescence ( $F_0$ ) a následuje delší saturační záblesk, díky kterému se dá změřit maximální fluorescence ( $F_m$ ), jejich rozdíl nám poté dá hodnotu variabilní fluorescence ( $F_v$ ) (White *et al.*, 2011). Protokol  $F_v/F_m$  umožňuje změřit maximální účinnost fotosystému II (Roháček and Barták, 1999). Bylo tedy možné, kromě plochy stélek (která mě zajímala nejvíc), sledovat i jak moc jsou jednotlivé stélky vystresované, a to na hodnotách kvantového výtěžku („quantum yield“). Ten by měl být u nestresovaných buněk planktonu přibližně 0,6 až 0,7, ale při působení stresových faktorů se toto číslo snižuje (White *et al.*, 2011).



**Obr.č. 9:** a) kultivační destičky se 6 komůrkami pod laboratorním osvětlením, b) měření stélek pomocí PAM fluorometru – označení plochy podle fluorescenčně svítících částí

Výsledné růstové křivky byly vytvořeny za pomoci naměřených dat v programu Past 4.05. (viz. kapitola 4.4.2 Výsledky měření na gradientech pomocí PAM fluorometru).

Data byla testována pomocí analýzy série lineárních regresí také v programu Past 4.05., kdy naměřené hodnoty byly zlogaritmovány, protože předpokládáme při měření přírůstků biomasy exponenciální růst. Pro linearizaci exponenciálních dat se tedy můžeme řídit rovnicí  $y = Ae^{kx}$ , po zlogaritmování  $\log y = kx + \log A$ , protože pro nás je důležitá převážně konstanta  $k$ , která udává sklon výsledných křivek, které porovnáváme mezi sebou.

### **Stanovení specifické růstové rychlosti**

Pro biotechnologie je nejdůležitější část křivky odpovídající exponenciálnímu růstu, protože je to oblast nejvyšší produktivity (Chisti, 2007). Dynamiku růstu zde obvykle modelujeme rovnicí pro kinetiku chemické reakce 1.řádu, kde jako rychlostní konstanta vystupuje specifická růstová rychlost. Pojem specifická růstová rychlost značí růstovou rychlost přepočtenou na jednotky biomasy, tedy množství biomasy vytvořené jednotkou biomasy za jednotku času. Tedy pokud bychom měli hodnotu SRR například  $\mu = 0,4 \text{ h}^{-1}$ , tak to znamená, že 1 g biomasy vytváří 0,4 g nové biomasy za hodinu (Kaprálek, 1999).

Růstová rychlost byla získána přepočítáním ze vzorečku specifické růstové rychlosti (SRR):  $\mu = \frac{\ln(X) - \ln(X_0)}{\Delta t}$ . (kde  $X$  je velikost plochy stélky z exponenciální fáze (př. 6. měření) a  $X_0$  je naměřená velikost plochy, než došlo k tomu nejvýraznějšímu přírůstku (př. 5. měření),  $\Delta t$  je doba uplynulá mezi těmito pozorováními) (Brundu *et al.*, 2018). Ve většině případů u mých vzorků docházelo k exponenciální fázi cca mezi 15. až 25. dnem kultivace.

Specifická růstová rychlost je pro každý organismus odlišná. Je limitována vnitřními faktory, tedy samotnou geneticky podmíněnou schopností organismu růst, ale také vnějšími podmínkami, jako je například dostupnost základních živin, acidita prostředí, dostupnost kyslíku v médiu atd. Specifická růstová rychlost tedy není během celého procesu růstu konstantní, dochází k jejím změnám, především na konci vývoje, kdy začínají docházet zdroje v médiu v závislosti na velkém přírůstku biomasy, v tomto okamžiků dochází k jejímu značnému poklesu (Kaprálek, 1999; Lawton *et al.*, 2021).

### **3.6. Kultivace ve velkém objemu a měření přírůstků pomocí analýzy obrazu**

Pro kultivaci ve větším objemu byly stélky kultivovány ve 3 různých objemech média v Petriho miskách (A - 628,3 ml, B - 113,1 ml, C - 25,13 ml). Experiment byl prováděn ve venkovních podmínkách, pro simulaci venkovní kultivace, ačkoli misky byly zavřeny, aby

nedocházelo k příliš velkým kontaminacím z okolního prostředí. Pro brakickou populaci bylo použito MV/3 médium (11 PSU) a pro sladkovodní populaci médium MV/20 (1,75 PSU). Na místě byla také změřena intenzita osvětlení, která odpovídala rozmezí 6930 až 38870 luxů na ve stínu a na slunci. Je patrné, že míra osvětlení na lokalitě byla výrazně větší než při kultivaci v laboratorních podmínkách.

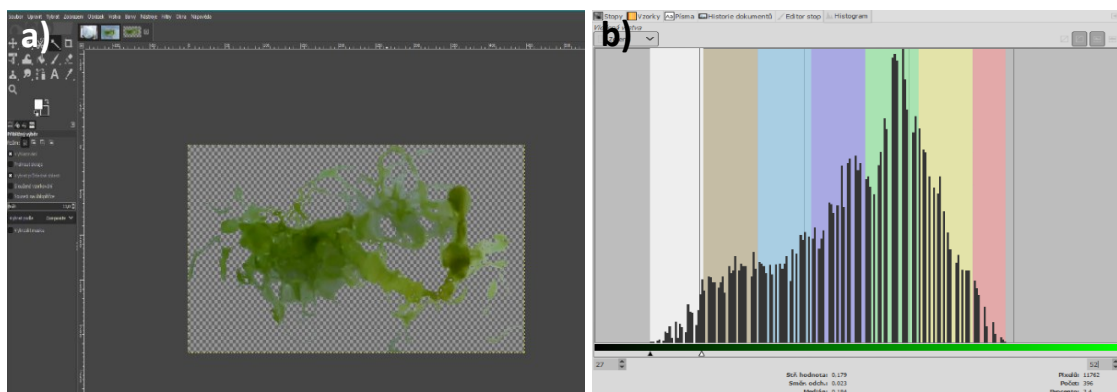
Každý objem měl 4 opakování, jak pro brakickou, tak pro sladkovodní populaci. Stélky v miskách byly foceny vždy jednou za 5 dní po dobu 5 týdnů, přičemž byla stanovena jedna základní vzdálenost fotoaparátu od misky (cca 20 cm) a ta byla dodržována po celou dobu experimentu, aby byly výsledné fotografie srovnatelné mezi sebou při analýze obrazu. V případě, že docházelo k většímu vysoušení média v některé z misek, byla dolévána sterilní destilovaná voda. Nicméně díky tomu, že byly Petriho misky uzavřené docházelo ke srážení odpařovaného média na víčku a následnému skapání zpátky. Po každém focení byly misky proházeny, aby jejich umístění bylo náhodné a jejich pozice neovlivnila nějakým způsobem výsledky měření (například některé byly více ozářené, jiné víc ve stínu).



**Obr. č. 10:** Petriho misky na venkovní kultivaci a příklad jedné z misek focené na analýzu

Získané fotografie byly zpracovány pomocí analýzy obrazu za použití programu GIMP 2.10.24. Stélky byly na zvětšování a pomocí funkce „Přibližný výběr“ s nízkým prahem (cca 4-16) se provedlo postupné označení s výběrem podle složené barvy až do optimálního zachycení plošného rozsahu analyzované biomasy. Pomocí histogramu byl následně změřen rozsah zelené barvy v pixelech od nejtmavší po nejsvětlejší. Postupovalo se po vždy po 25 stupních sytosti (což je pouze uměle vytvořený „decil“), aby se bylo možné dát větší váhu oblastem tmavším, kde pravděpodobně docházelo k překrytí stélky (viz. obr. č. 11). Všechny hodnoty z „decilů“ byly zapsány a následně byly vynásobeny, tak, že hodnoty z nejsvětlejší části histogramu byly násobeny 1.0, tmavší 1.5, další 2.0 apod. Výsledkem jsou přepočtené pixely, které slouží k přibližnému stanovení abundance stélek na misce.

Z výsledných celkových přepočtených pixelů byla vytvořena průměrná hodnota pro každý objem Petriho misek a následně vytvořeny odpovídající grafy pomocí statistického programu Past 4.05. (viz výsledky, kapitola 4.4.).



**Obr.č. 11:** a) označená plocha stélky v programu pomocí přibližného výběru, b) příklad odpovídajícího histogramu s vyznačenými úseky po 25 stupních sytosti

## 4. Výsledky

### 4.1. Morfologie stélek a určení druhů

Identifikace nalezených druhů byla založena na morfologických znacích. U sladkovodních druhů to totiž není příliš složité. Dnes se v Evropě uvádí pouze 3 druhy sladkovodních tubulárních řas rodu *Ulva*, které mají poměrně jasně definované morfologické a anatomické znaky, podle nichž se dají vzájemně odlišit. Zároveň tyto druhy odpovídají dobře definovaným fylogenetickým liniím identifikovaným v řadě recentních studií (Rybak, 2018; Mareš *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2018). Řadí se spolu do tzv. komplexu *Ulva flexuosa*, který zahrnuje druhy *Ulva flexuosa* subsp. *pilifera* a *Ulva flexuosa* subsp. *paradoxa* (dnes ovšem již pouze *U. pilifera* a *U. paradoxa*) (Rindi *et al.*, 2018) a pak druh *Ulva flexuosa* subsp. *flexuosa*, který je výrazně častěji mořským či brakickým zástupcem, ale byly pozorovány i nálezy ve sladkovodním vnitrozemském prostředí (Rybak, 2018; Rindi *et al.*, 2018). U brakických a mořských druhů je spolehlivá identifikace obecně větším problémem, vzhledem k jejich výraznější morfologické plasticitě, která je ovlivněna především environmentálními faktory, jako jsou salinita, teplota vody, koncentrace živin, nebo hloubka vody (Rybak, 2015). Také se zde setkáváme s daleko větším množstvím druhů obecně. Studovaná brakická populace byla tedy spíše určena na základě poměrně nízké salinity na místě objevu, která odpovídá rozšíření druhu *U. flexuosa* subsp. *flexuosa* (Rybak, 2015).



## Identifikace sladkovodního kmene

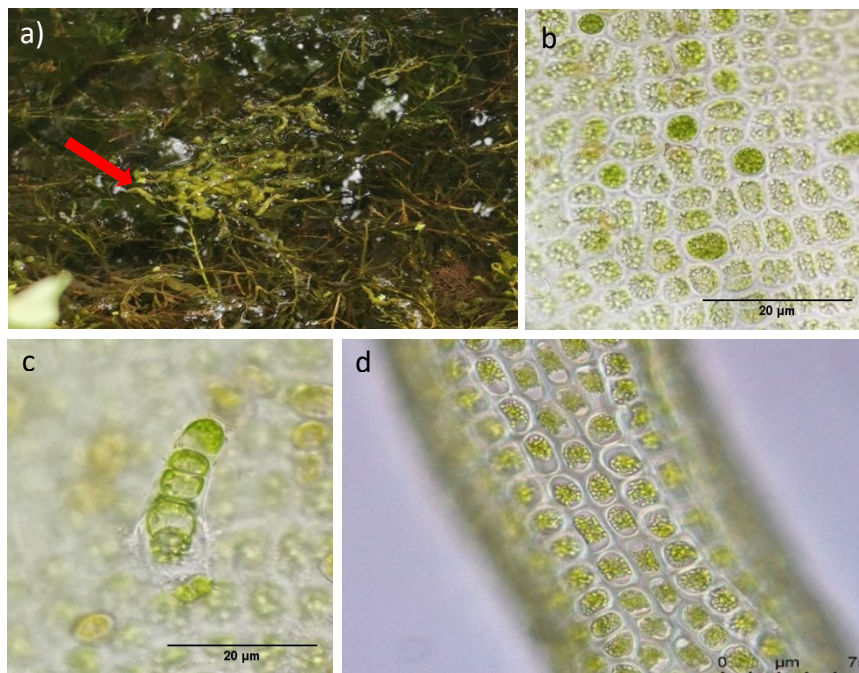
Sladkovodní populace byla určena jako *Ulva pilifera*. Tento druh je pravděpodobně nejčastějším zástupcem ze sladkovodního prostředí s doloženým výskytem na množství středoevropských lokalit, jako je Polsko, Česká republika, Německo, Francie apod. (Rindi *et al.*, 2018). Stélky mohou růst v pomalu tekoucích vodách přichycené na kamenech, nebo jiném pevném substrátu, ale nacházíme je i ve vodách stojatých, kde tvoří převážně volně plovoucí stélky (tzv. „free-floating mats“)(Mareš *et al.*, 2011). Co se týká podmínek prostředí, druh *U. pilifera* preferuje vody vysoce alkalické s dostatečným okysličením, relativně vysokou mineralizací a vyšší koncentrací živin (hlavně dusičnanů, fosforečnanů, amoniaku a sulfátů) (Rybak *et al.*, 2014). Lokalita, kde se nacházela studovaná populace, těmto podmínkám odpovídala. Jednalo se o bývalou pískovnu s vysokým pH cca 9.0 (to však bylo pravděpodobně lokálně zvýšeno intenzivní fotosyntézou fytoplanktonu ve vodním sloupci v období sběru). Ve vodě se ulva vyskytovala v podobě volně plovoucích stélek na hladině.

Druh se vyznačuje hrubou, křehkou stélkou, která může ukládat uhličitán vápenatý na svém povrchu. Ten způsobuje, že stélky jsou poměrně rigidní (Rybak, 2018). Typicky můžeme na stélce pozorovat makro – i mikro – větvení, nicméně jeho intenzita se může lišit v závislosti na vývojovém stádiu, kdy mladší stélky bývají typicky bez větvení, nebo velmi spoře větvené. Mikroskopická boční vlákna jsou uniseriátní, tedy jsou tvořeny pouze jednou řadou buněk za sebou. Makroskopické boční větve jsou polyseriátní, tvořené velkým množstvím buněk vedle sebe. Druh má vždy typickou tubulární morfologii (tzv. monostromatické stélky), kdy vlákna tvoří trubičky z jedné vrstvy buněk, které mohou být vyplněny vodou, nebo vzduchem. Nicméně se nejedná o tenké stejnocenné trubice, ale stélka bývá místy zúžená, nebo naopak širší v určitých částech. V kulturách ovšem docházelo i k tomu, že stélky byly tenčí a rovnoměrnější, což bylo pravděpodobně způsobeno limitací prostorem v Erlenmeyerových baňkách.

Buňky ve stélce jsou řazeny z pravidla nerovnoměrně, mají poměrně tlusté buněčné stěny a zakulacené rohy. To je rozdíl oproti druhému vzácnějšímu sladkovodnímu druhu, který u nás nicméně také můžeme roztroušeně najít. Druh *Ulva paradoxa* má tenkostěnné buňky, které jsou uspořádány ve stélkách rovnoměrně (Rybak, 2018). Chloroplasty v buňkách jsou parietální, tedy nevyplňují celý obsah buňky, ale jsou natisknuté na jednu stranu. Také tvoří některé výraznější, větší buňky, které jsou obklopeny několika menšími, a tak tvoří malé „rozety“ v průběhu vlákna. Tyto větší buňky jsou pravděpodobně bazální buňky uniseriátních

bočních větví. Pokud jsou stélky větvené, postranní mikro větve jsou vždy uniseriální, tedy tvořené pouze jednou řadou buněk za sebou. Dalším zajímavým znakem je, že první buňka uniseriálního postranního vlákna může, ale nemusí být zvětšená. Apikální buňka také bývá odlišná – více protáhlá oproti ostatním buňkám ve vláknu, cca dvojnásobně (ale nebylo to pozorováno u všech mikroskopických větvení).

Všechny tyto pozorované morfologické a anatomické znaky byly srovnávány se znaky, které definoval Rybak ve svém identifikačním klíči pro sladkovodní druhy z komplexu *Ulva flexuosa* (Rybak, 2018).



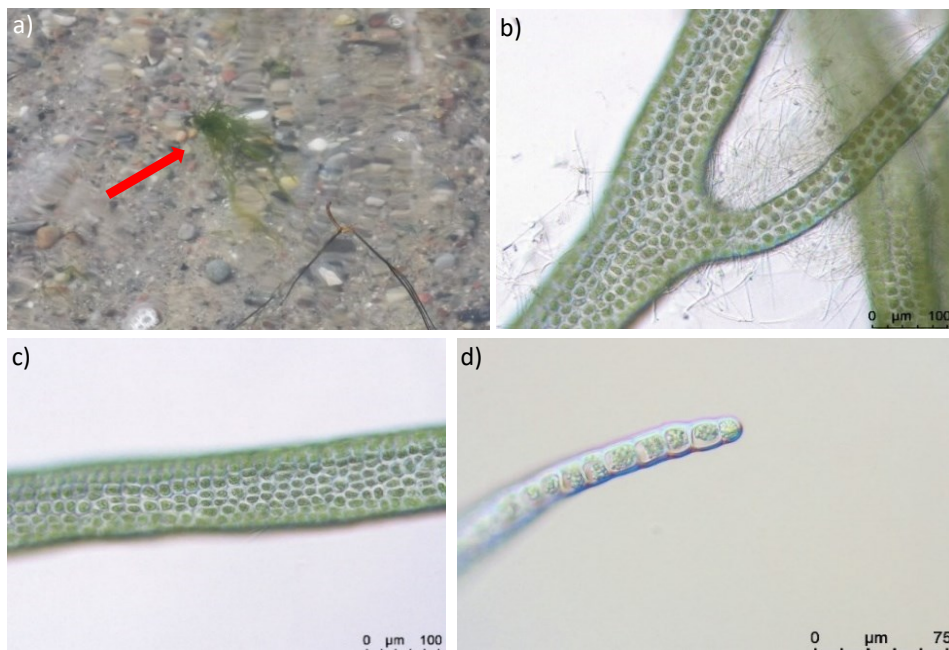
**Obr.č. 12:** Fotografie zachycující základní morfologické a anatomické znaky na stélkách druhu *Ulva pilifera*: a) nález stélky v litorální zóně v rybníku Vidlák, Dolní Počernice, b) buňky tvořící „rozety“ – vždy jedna výraznější buňka a okolo ní několik menších, c) postranní uniseriální vlákno s tlustou bazální buňkou, d) tlustostěnné buňky ve stélce se zaoblenými rohy

## Identifikace brakického kmene

Morfologická identifikace brakické populace byla již o něco složitější. Vzhledem k velké diverzitě a morfologické plasticitě, která může být ovlivněna i podmínkami prostředí, ve kterém se organismus nachází, není možné pozorovat příliš mnoho konzistentních morfologických znaků. Situaci komplikuje i kryptická diverzita, která brání snadnému rozeznání jednotlivých druhů (Rybak, 2015; Steinhagen *et al.*, 2019). Největším problémem je ovšem současná nevyjasněná taxonomická struktura brakických a mořských druhů, kdy tradiční jména reprezentují komplexy druhů či přímo polyfyletické jednotky, ale žádná komplexnější

fylogenetická revize nebyla, zejména pro tubulární druhy, dosud provedena. Druh jsme nicméně pracovníě určili jako součást komplexu *Ulva flexuosa*. Navíc *Ulva flexuosa* subsp. *flexuosa* je jedním z velmi často pozorovaných tubulárních zástupců z brakického prostředí ((Rybak *et al.*, 2014; Rybak, 2015; Rindi *et al.*, 2018). V oblastech Baltického moře ovšem nacházíme i jiné tubulární zástupce, jako například *U. intestinalis*, *U. compressa*, *U. clathrata* či *U. prolifera*, ale jejich optima a salinita na místech nálezů neodpovídá naší lokalitě sběru, kde byla salinita kolem 6,61 PSU a tyto druhy mají optima v průměru spíše mezi 20 – 30 PSU (Rybak, 2018). Stélky byly nalezeny v litorální zóně a rostly přichycené pomocí rhizoidů na drobných kamenech.

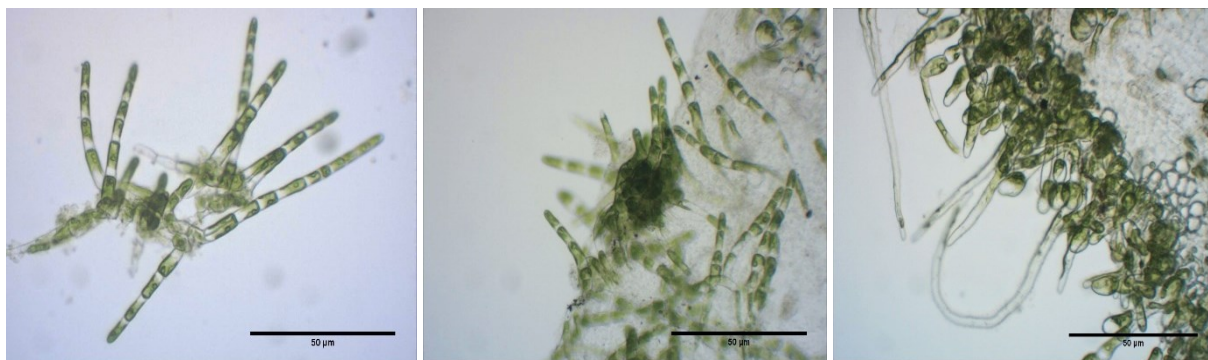
Morfologicky se jedná o druh, který má hladkou tubulární stélku. Ta je velmi málo větvená, nebo větvení chybí úplně. Vlákna jsou po celé délce přibližně stejně široká. Buňky tvoří poměrně pravidelné podélné řady v průběhu stélky, ačkoli například v místech větvení byla tato pravidelnost někdy narušena. Také u mladých stélek by měla být pravidelnost spíše v podélných řadách (Rybak, 2018). Tvarem jsou buňky čtyřúhelníkové a jejich buněčná stěna není nijak výrazně ztloustlá. Chloroplast je parietální.



**Obr.č.13:** Morfologie druhu *U. flexuosa* sp.: a) celková podoba stélky, která roste přichycená na malých kamenech, b, c) morfologie buněk ve vláknech, d) uniseriální boční větvení

Toto určení na základě morfologických a anatomických znaků je nicméně pouze přibližné a pro jistější identifikaci je třeba vyčkat komplexnější fylogenetické revize celého rodu na základě molekulárních dat.

Během kultivace byla také pozorována tvorba juvenilních (iniciačních stádií), která byla následně sledována pod mikroskopem. U řas rodu *Ulva* tato stádia vznikají ze zoospor (bičíkaté se 4 stejně dlouhými bičíky), ty se uvolňují do média pomocí rozpadu buněčné stěny původní stélky. Jako signál pro vypuštění zoospor pravděpodobně funguje teplota a salinita. Optimální teplota pro indukci tvorby zoospor byla stanovena v experimentech od Mantriho na 25 a 30 °C. Jako optimální salinita se ukázala nižší z testovaných – kolem 15 PSU a zdá se být tím hlavním induktorem pro uvolnění zoospor z původní stélky (Mantri *et al.*, 2011). Nicméně se zdá, že pro iniciaci tvorby zoospor stačí i pouhý mechanický stimul v podobě fragmentace vlákna původní stélky (Balar *et al.*, 2020), to bylo pozorováno i v případě některých mých kultur. Je možné, že ale nezáleží pouze na jednom faktoru, pravděpodobně se jedná o kombinace 2 či více stimulů najednou, vzhledem k tomu, že fragmentaci stélek jsem prováděla u většiny stélek, ale ke vzniku zoospor došlo pouze v některých případech. Ze zoospor, dříve, než se vytvoří gametofyt či sporofyt, vznikají iniciační (juvenilní) stádia. Ta mají podobu tenkých uniseriálních vláken – tvořených jednou řadou buněk. Jsou přichycena k pevnému podkladu pomocí malých rhizoidů (Mantri *et al.*, 2011). Zajímavé je, že se v některých případech tvořila juvenilní stádia už na původní mateřské stélce, tedy pravděpodobně došlo ke splynutí zoospor už na jejím povrchu.



**Obr. č. 14:** Juvenilní stádia s rhizoidy tvořící se samostatně, nebo na původní odumřelé stélce.

#### 4.2. Výsledky měření na gradientech pomocí PAM fluorometru

Ve všech provedených experimentech na gradientech docházelo k více či méně výraznému růstu stélek po celou dobu kultivace. U žádných nebyl pozorován výrazný pokles růstu během 35 dní experimentu, je ale pravděpodobné, že při delším pěstování by k němu určitě došlo vzhledem k omezeným velikostem kultivačních komůrek, které by brzy způsobily limitaci prostorem a vedly k úbytku živin v malém množství média (cca 5 ml média na komůrku).

Přírůstky biomasy byly ve všech experimentech měřeny vždy 2x týdně po dobu 5 týdnů. Ve velké většině experimentů docházelo k exponenciální fázi růstu stélek přibližně mezi 15. až 25. dnem kultivace. Pro každý typ experimentu (na gradientu salinity, teploty a při kultivaci s EDTA či HEPES) byla provedena 2 opakování a z obou následně vytvořeny souhrnné grafy, znázorňující přírůstky biomasy v  $\text{mm}^2$ .

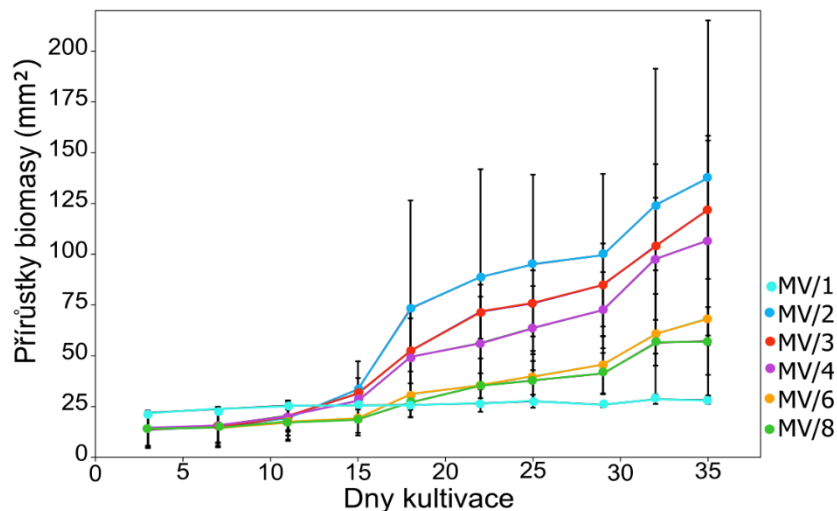
#### 4.2.1. Růst kmenů na gradientu salinity

U brakické populace *Ulva flexuosa* docházelo celkově k poměrně výrazným celkovým přírůstkům biomasy (maximum  $137,57 \text{ mm}^2$  u salinity úrovně MV/2, viz graf č. 1), zejména v porovnání se sladkovodním druhem *Ulva pilifera* (maximum  $26,53 \text{ mm}^2$  u salinity úrovně MV/3, viz graf č. 2). Nejvyšších hodnot plochy (v  $\text{mm}^2$ ) dosahovaly stélky druhu *Ulva flexuosa* v médiích MV/2, MV/3 a MV/4, tedy spíše ve vyšších salinitách mezi 8,5 až 17 PSU. Podle chybových úseček je nicméně vidět značná variabilita, co se týče měření v rámci jednotlivých komůrek v kultivačních destičkách, a to převážně v pozdějších dnech experimentu, kdy docházelo k poměrně velkým náhodným výkyvům hodnot naměřené biomasy stélek.

Nejpomaleji rostl druh *Ulva flexuosa* při nejnižších měřených úrovních salinity MV/6 a MV/8 (odpovídajících salinitě 5,6 a 4,25 PSU). Zajímavě ale také u úrovně salinity MV/1 (35 PSU), kdy při prvním měření došlo k úplnému rozpadu stélek ve všech opakováních pro tuto úroveň a nebylo tedy možné přírůstky dál měřit (proto jsou ve výsledném grafu z obou měření hodnoty pro úroveň salinity MV/1 vytvořeny pouze na základě čtyř opakování, a ne z osmi jako u ostatních úrovní) a při druhém opakování celého měření docházelo v této salinitě k nejméně výrazným přírůstkům po celou dobu kultivace. Měření v úrovni MV/1 také začíná na vyšší hodnotě plochy, protože během prvního pokusu experimentu byly stélky nařezány na větší kusy než při druhém opakování experimentu. Ve výsledku to také vedlo ve většině grafů k větším rozptylům chybových úseček, než kdyby byla opakování experimentů posuzována samostatně.

Výsledné naměřené hodnoty byly testovány pomocí série lineárních regresních analýz analyzujících vztah logaritmovaných hodnot přírůstků biomasy v čase. Salinita v případě obou experimentálních měření signifikantně ovlivňovala přírůstky biomasy (viz. tabulka č. 2). Tento typ analýzy nicméně porovnával dvojice měření v různých úrovních salinity mezi sebou, tedy nikoli všechny dvojice měřených dat (všechny úrovně salinity) se mezi sebou musí nutně signifikantně lišit. V případě měření brakické populace na gradientu salinity se signifikantně lišilo pouze měření v úrovni salinity MV/1 (35 PSU) od všech ostatních úrovní a měření v úrovni salinity MV/2 (17 PSU) od měření v úrovni MV/8 (4,25 PSU). Mezi ostatními

úrovněmi salinity rozdílly nebyly signifikantně odlišné. Zároveň byla provedena Bonferroniho korekce p hodnoty (0.05) s výslednou zpřísněnou hodnotou 0.0083. Výsledná p hodnota z tohoto experimentu nicméně stále nepřesahuje hranici signifikance a výsledný vliv salinity na přírůstky biomasy by tedy opravdu měl být signifikantní.



**Graf č. 1:** Graf znázorňující přírůstky biomasy brakické populace *U. flexuosa* na gradientu o 6 úrovních salinity (MV/1 = 35 PSU, MV/2 = 17 PSU, MV/3 = 11 PSU, MV/4 = 8,5 PSU, MV/6 = 5,6 PSU, MV/8 = 4, 25 PSU). Ve dvou experimentech bylo provedeno dohromady 8 opakování pro každou úroveň. Pro úroveň salinity MV/1 jsou hodnoty založeny pouze na 4 opakováních.

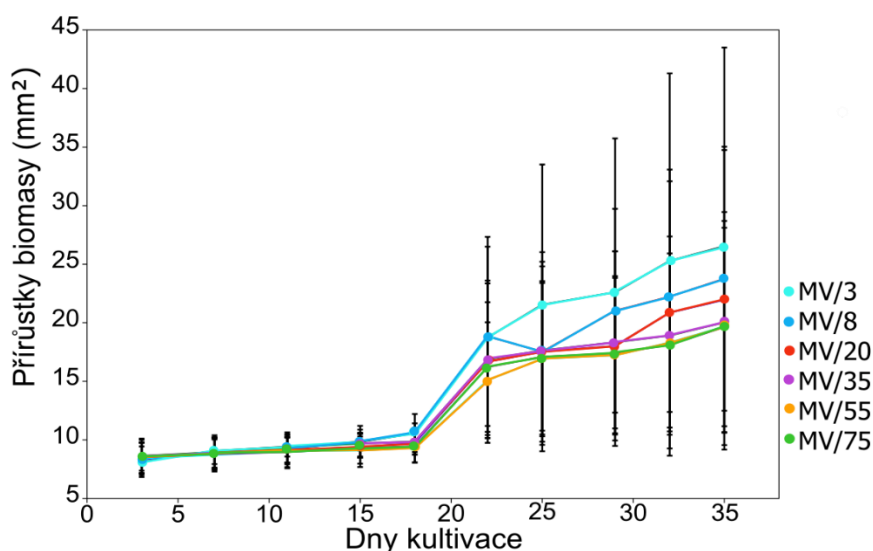
Brakická populace <i>Ulva flexuosa</i>				
salinita1	r	p-val	slope	CI slope
MV/1	0,7375	5,70E-08	0.0029	[0.0021,0.0038]
MV/2	0,821	1,15E-20	0.0362	[0.0302,0.0415]
MV/3	0,891	2,05E-28	0.034	[0.029,0.039]
MV/4	0,8546	6,71E-24	0.0311	[0.0265,0.036]
MV/6	0.7692	7,79E-17	0.0253	[0.019,0.031]
MV/8	0,8041	2,71E-19	0.0242	[0.019,0.029]
F-test: 18,602		p= 9,7914E-17	Bonf.kor. = 0.0083	

**Tabulka č 2.:** Výsledky lineárních regresních analýz pro brakický druh *Ulva flexuosa* na gradientu salinity.

Při pohledu na růst populací na gradientu salinity u sladkovodního druhu *Ulva pilifera* (viz. graf č. 2) je patrné, že sladkovodní druh v tomto případě dosahoval nižších celkových přírůstků než kmen brakický. S maximální výslednou plochou 26,53 mm<sup>2</sup> naměřenou v úrovni salinity MV/3 (tedy přibližně 11 PSU) dosahuje pouze cca pětinové velikosti oproti druhu *U. flexuosa*. Při počátečních dnech experimentu navíc nedocházelo k výrazným přírůstkům biomasy u žádné z měřených úrovní salinity. Teprve po přibližně dvacátém dnu kultivace dochází k výraznému zvýšení přírůstků biomasy a také k většímu rozrůznění v jednotlivých úrovních salinity. Dále je vidět, že k nejvyšším přírůstkům biomasy docházelo v médiích s úrovněmi salinity MV/3,

MV/8 a případně MV/20, které odpovídají salinitě přibližně 11, 4,25 a 1,75 PSU. Jedná se tedy o salinitu vyšší, než je salinita v lokalitách, kde se nachází stélky tohoto druhu v přírodě. Naopak nejnižších přírůstků dosahovala v nejméně slaných médiích MV/55 a MV/75 (tedy cca 0,64 až 0,47 PSU).

Stejným způsobem byly opět výsledné naměřené hodnoty testovány, nicméně tentokrát se vliv salinity ukázal jako nesignifikantní. Výsledný graf je opět vytvořen ze dvou nezávislých opakování experimentu, která byla provedena za shodných podmínek kultivace. Vede to opět k tomu, že výsledné chybové úsečky v grafu jsou velmi výrazné a variabilita v jednotlivých experimentálních komůrkách byla velká. Tento fakt opět pravděpodobně lehce ovlivňuje výslednou nesignifikanci vlivu teploty na tuto sladkovodní populaci. Ani jedno měření v žádné z vytvořených úrovní salinity se signifikantně neliší od žádného jiného měření.



**Graf č. 2:** Graf znázorňující přírůstky biomasy sladkovodní populace *U. pilifera* na gradientu o 6 úrovních salinity (MV/3 = 11 PSU, MV/8 = 4,25 PSU, MV/20 = 1,75 PSU, MV/35 = 1 PSU, MV/55 = 0,64 PSU, MV/75 = 0,47 PSU). Bylo provedeno celkem 8 opakování pro každou úroveň v rámci 2 opakování experimentu.

Sladkovodní populace <i>Ulva pilifera</i>				
salinita	r	p-val	slope	CI slope
MV/3	0,6412	1,50E-10	0.0156	[0.0111,0.0201]
MV/8	0,71	1,65E-13	0.0152	[0.012,0.0184]
MV/20	0,639	1,72E-10	0.0132	[0.0092,0.0168]
MV/35	0,654	4,96E-11	0.0124	[0.009,0.016]
MV/55	0,6798	4,08E-12	0.0125	[0.0094,0.0156]
MV/75	0,6865	2,09E-12	0.013	[0.0094,0.0156]
F-test: 0,716		p= 0,612	Bonf.kor. = 0.0083	

**Tabulka č. 3:** Výsledky lineárních regresních analýz pro sladkovodní druh *Ulva pilifera* na gradientu salinity

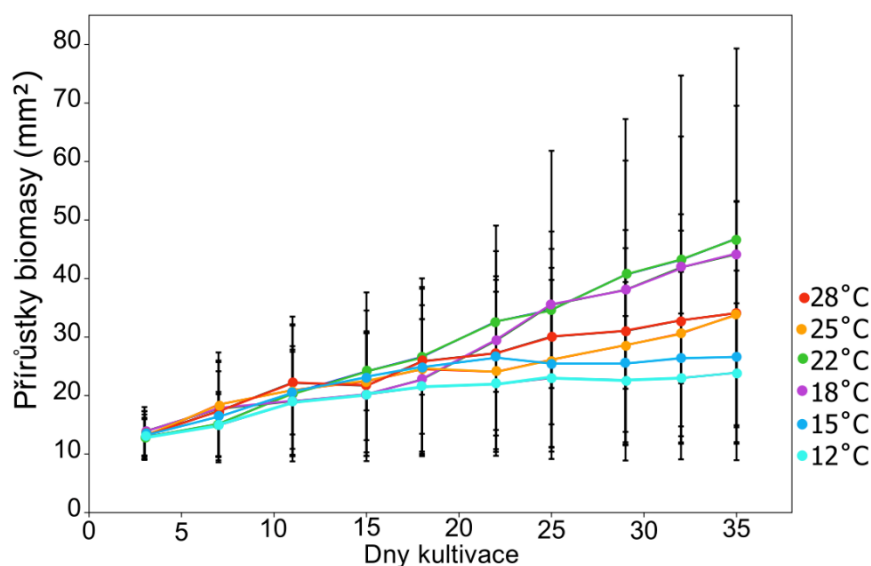
#### 4.2.2. Růst kmenů na gradientu teploty

Růst stélek byl opět analyzován během 35denního experimentu, tentokrát ale na gradientovém stole v šesti různých hodnotách teploty (v rozmezí od 12 do 28 °C). Největší maximální přírůstek biomasy byl pozorován u brakické populace s výslednou nejvyšší hodnotou 46,84 mm<sup>2</sup> v teplotě 22 °C. U sladkovodní populace byla nejvyšší naměřená plocha stélky 44,198 mm<sup>2</sup> také v teplotě 22 °C. Rozdíl mezi populacemi v celkových maximálních přírůstcích biomasy v závislosti na teplotě tedy není tak výrazný. Pro obě populace se jako nejméně příznivá ukázala nejnižší teplota 12/15 °C. Obecně lze z výsledných grafů říci, že optimální teplota pro obě populace se pohybuje cca v rozmezí 18 až 25 °C.

U populace *U. flexuosa* bylo dosažení maximální růstové rychlosti při kultivaci v teplotě 22 °C, nicméně v teplotě 18 °C byly výsledné přírůstky velmi podobné (viz. graf č. 3.). Opět vidíme, že k většímu rozrůznění mezi přírůstky u jednotlivých úrovní teploty dochází až kolem patnáctého až dvacátého dne kultivace. Znovu také vidíme, že je velká variabilita v rámci jednoho měření, což je opět dáno tím, že byly lehce rozdílné počáteční velikosti stélek během prvního provedeného experimentu na gradientu a jeho pozdějšího opakování. Je zřejmá částečná souvislost mezi počáteční velikostí stélek a jejich následnou rychlostí růstu. Je dobře vidět limitace růstu nízkou teplotou, kdy křivky měření v 12 a 15 °C jsou výrazně nejnižší. U měření v teplotě 15 °C můžeme dokonce vidět slabý pokles růstu přibližně kolem dvacátého druhého dne kultivace.

Při testování výsledných zlogaritmovaných hodnot ze série lineárních analýz se ukázalo, že teplota na rychlosti růstu stélek brakické populace nemá signifikantní vliv. Signifikantně se mezi sebou liší pouze měření v teplotě 22 °C a měření v teplotě 12 °C (viz. tabulka č. 4).





**Graf č. 3:** Graf znázorňující přírůstky biomasy brakické populace *U. flexuosa* na gradientu o 6 úrovních teploty (28, 25, 22, 18, 15 a 12 °C). Bylo provedeno 6 opakování pro každou úroveň teploty během 2 opakování experimentu.

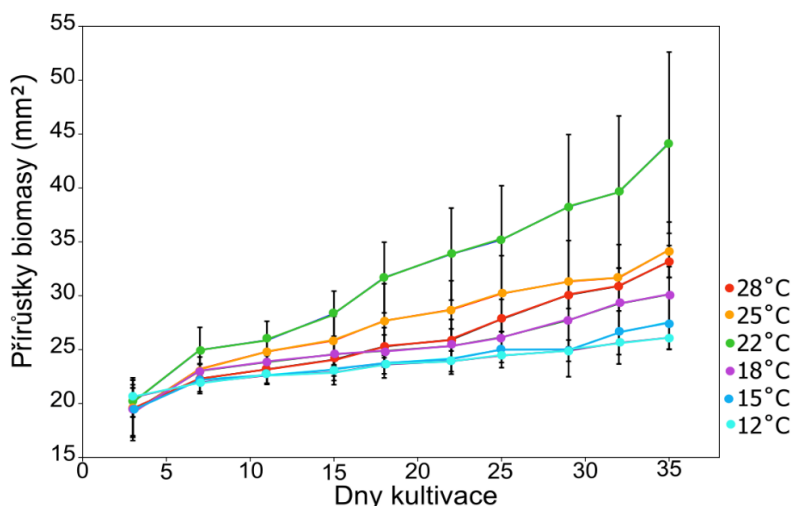
Brakická populace <i>Ulva flexuosa</i>				
teplota1	r	p-val	slope	CI slope
28°C	0,3622	4,50E-03	0.0097	[0.0035,0.016]
25°C	0,3755	3,10E-03	0.0093	[0.0039,0.0151]
22°C	0,7089	2,32E-10	0.0166	[0.0122,0.0212]
18°C	0,3681	3,80E-03	0.0116	[0.0039,0.0192]
15°C	0,2941	2,26E-02	0.0073	[0.0019,0.0128]
12°C	0,3013	1,90E-02	0.0065	[0.00197,0.012]
F-test: 1,4047		p= 0,2219	Bornf.kor. = 0.0083	

**Tabulka č. 4:** Výsledky lineárních regresních analýz pro brakický druh *Ulva flexuosa* na gradientu teploty

U sladkovodní populace byla nejvyšší dosažená hodnota plochy 44,19 mm<sup>2</sup> v teplotě 22 °C (graf. č. 4.), kde docházelo ke zdatně vyšším přírůstkům po celou dobu kultivace oproti měřením v ostatních úrovních teploty. Stélkám se dařilo poměrně dobře také v teplotě 25 °C, naopak teplota, ve které stélky rostly nejpomaleji se pohybovala kolem 12 až 18 °C. Nízké teploty tedy znovu působily jako limitující faktor pro růst stélek.

Teplota v případě experimentů u sladkovodní populace signifikantně ovlivňovala přírůstky biomasy stélek (viz. tabulka č. 5). Ve výsledných hodnotách přírůstků biomasy se signifikantně liší měření v teplotě 22 °C od všech ostatních, kromě měření v teplotě 25 °C. Měření v teplotě 25 °C se liší od měření v teplotě 15 a 12 °C. Měření v teplotě 28 °C se

signifikantně liší od všech měření kromě měření v teplotě 25 a 18 °C. Měření v 18 °C se liší od měření v 22 a 12 °C. Měření v teplotě 15 °C se liší od všech měření kromě měření v teplotě 18 a 12 °C a měření ve 12 °C se signifikantně liší od všech ostatních kromě měření v 15 °C. Celková p hodnota je signifikantní i po zpřísnění hranice signifikance pomocí Bonferroniho korekce.



**Graf č. 4:** Graf znázorňující přírůstky biomasy sladkovodní populace *U. pilifera* na gradientu o 6 úrovních teploty (28, 25, 22, 18, 15 a 12 °C). Bylo provedeno 6 opakování pro každou úroveň teploty během 2 opakování experimentu.

Sladkovodní populace <i>Ulva pilifera</i>				
teplota	r	p-val	slope	CI slope
28°C	0,909	8,23E-24	0.0066	[0.0056,0.0075]
25°C	0,8447	2,19E-17	0.0067	[0.0056,0.0079]
22°C	0.8502	8,42E-18	0.0095	[0.0079,0.0113]
18°C	0,8287	3,01E-16	0.0049	[0.0039,0.0059]
15°C	0,739	1,62E-11	0.0038	[0.0027,0.0049]
12°C	0,835	1,11E-16	0.0029	[0.0023,0.0035]
F-test: 21,714		p= 6,2843E-19		Bonf.kor.= 0.0083

**Tabulka č. 5:** Výsledky lineárních regresních analýz pro sladkovodní druh *Ulva pilifera* na gradientu teploty

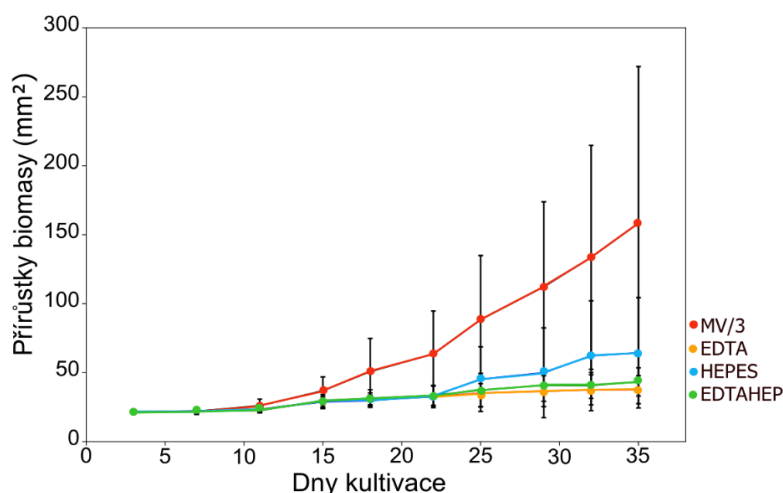
Stélky vytvářely v nízké teplotě (15 až 12 °C) krátké husté boční větvení v celém průběhu stélky. Tento fenomén byl pozorován jak u brakické, tak u sladkovodní populace. Ve vyšších teplotách byly přírůstky větší, a to spíše co se týče růstu stélek do délky. Pokud se objevovalo boční větvení, tak bylo spíše velmi řídké a větve byly dlouhé a tlustší.

### 4.2.3. Růst kmenů v závislosti na přidání chelatačního činidla (EDTA) a pH pufru (HEPES)

Separátní experiment s měřením dat na PAM fluorometru se týkal vlivu chelatačních činidel a pH pufrů v médiu na rychlost růstu populací. Cílem těchto analýz bylo zjistit, zda jsou tyto látky často přidávané do kultivačních médií, která ale zvyšují jejich cenu, pro růst studovaných řas rodu *Ulva* nezbytné. Zhodnotit tedy, zda se růst stélek jejich účinkem výrazně zvyšuje, nebo zda je možné je při kultivačním procesu vynechat a tím snížit celkové náklady kultivace. Celkově nejvyšší přírůstky byly pozorovány u brakické populace s maximální plochou stélek 158,38 mm<sup>2</sup> v kontrolním médiu MV/3 (viz. graf č. 5), oproti tomu u sladkovodní populace byl maximální přírůstek biomasy jen 55,65 mm<sup>2</sup> v médiu pouze s přidaným chelatačním činidlem EDTA (viz. graf č. 6).

U brakické populace měl experiment poměrně překvapivé výsledky. Přítomnost chelatačního činidla EDTA i pH pufru HEPES se ukázala být víceméně zbytečná. Nejlépe se stélkám dařilo v kontrolním médiu, které obsahovalo pouze živiny a vitamínovou směs (MV/3). Ostatní tři varianty média (medium s přídavkem EDTA, s přídavkem HEPES a s kombinací EDTA a HEPES) se projevily jen malými přírůstky biomasy během 35denního experimentu. Pouze v případě přidání samotného HEPES pH pufru byl patrný marginální vliv tohoto média na rychlosti růstu, ale to až po cca dvacátém druhém dni kultivace. Maximální dosažená hodnota plochy byla 158,38 mm<sup>2</sup> v kontrolním médiu MV/3. Stélky měly nejmenší přírůstky (pouze přibližně 37,7 mm<sup>2</sup>) v médiu s obsahem EDTA, ale bez stabilizačního pufru.

Testování zlogaritmovaných naměřených hodnot pomocí série lineárních regresí a porovnání sklonů růstových křivek ukázalo, že byl vliv odlišného složení média signifikantní (Tabulka č. 6). Zdá se tedy, že složení média (přítomnost chelatačních činidel a pufrů) má signifikantní vliv na růst stélek, nicméně to zjevně ovlivňují hlavně velké přírůstky u kontrolního média. Nemůžeme tedy přesně říci, jestli má některá z přidaných složek do média vliv na rychlosti růstu studované brakické populace, nicméně pravděpodobně nikoli.



**Graf č. 5:** Graf znázorňující přírůstky biomasy brakické populace *U. flexuosa* v závislosti na složení média (MV/3 – kontrolní médium, EDTA – médium s přidavkem chelatačního činidla, HEPES – s přidavkem pH pufru, EDTAHEP – s kombinací chelatačního činidla a pH pufru). Bylo provedeno 12 opakování pro každý typ média ve dvou opakováních experimentu.

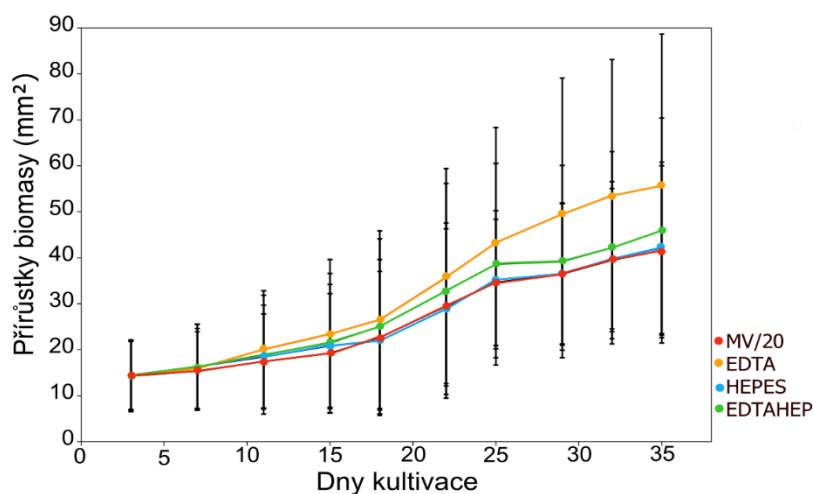
Brakická populace <i>Ulva flexuosa</i>				
složení média1	r	p-val	slope	CI slope
MV/3	0,7378	7,10E-22	0.025	[0.0206,0.0296]
EDTA	0,6598	2,50E-16	0.008	[0.0062,0.0093]
HEPES	0,6633	1,52E-16	0.0133	[0.0103,0.0163]
EDTA+HEPES	0,7786	1,22E-25	0.011	[0.0088,0.0113]
F-test: 31,019		p= 2,5645E-18		Bonf.kor.= 0.0013

**Tabulka č. 6:** Výsledky lineárních regresních analýz pro brakický druh *Ulva flexuosa* na gradientu teploty

V případě experimentu na sladkovodní populaci vidíme, že jednotlivá měření ve všech médiích jsou si svými přírůstky značně podobná (graf. č. 6). Největší maximální přírůstek plochy 55,65 mm<sup>2</sup> byl naměřen v médiu pouze s přidaným chelačním činidlem EDTA. Naproti tomu nejhůře se stélkám dařilo v kontrolním médiu MV/20, popřípadě v médiu s přidaným HEPES, což je naprosto opačný trend, než byl pozorován u brakické populace. V hodnotách naměřených v tomto experimentu opět vidíme velkou variabilitu odrážející se ve velmi výrazných chybových úsečkách. Byly zde velké rozdíly v počátečních velikostech stélek při prvním měření a jeho pozdějším opakování, které při spojení obou experimentů dohromady způsobily velké směrodatné odchylky.

Vliv složení média na rychlosti růstu stélek se podle testování zlogaritmovaných hodnot za pomoci série lineárních regresních analýz u sladkovodního druhu nicméně ukázal jako nesignifikantní (viz tabulka č. 7), není zde tedy patrný žádný vliv obsažených látek v médiu na

přírůstky biomasy. Ani jedno měření se od žádného jiného signifikantně neliší. Nemůžeme tedy s jistotou tvrdit, že některá z přidaných látek opravdu efektivně zlepšovala kultivaci této studované populace.



**Graf č. 6:** Graf znázorňující přírůstky biomasy sladkovodní populace *U. pilifera* v závislosti na složení média (MV/3 – kontrolní médium, EDTA – médium s přidavkem chelatačního činidla, HEPES – s přidavkem pH pufru, EDTAHEP – s kombinací chelatačního činidla a pH pufru). Bylo provedeno 12 opakování pro každý typ média ve dvou opakováních experimentu.

Sladkovodní populace <i>Ulva pilifera</i>				
složení média	r	p-val	slope	CI slope
MV/20	0,5973	5,98E-13	0.0183	[0.0141,0.0223]
EDTA	0,5832	2,75E-12	0.0206	[0.0159,0.0252]
HEPES	0,5851	2,27E-12	0.0177	[0.0136,0.0215]
EDTA+HEPES	0,5601	2,91E-11	0.0184	[0.0142,0.0229]
F-test: 0,2799		p= 0,8399	Bonf.kor.= 0.0013	

**Tabulka č. 7:** Výsledky lineárních regresních analýz pro sladkovodní druh *Ulva pilifera* na gradientu teploty

Celkové „optimální“ podmínky pro jednotlivé populace jsou shrnuty v tabulce č. 8. Na základě těchto experimentů se pro sladkovodní druh *U. pilifera* ukázaly jako optimální podmínky, tedy ty, které vedou k největšímu množství výsledné biomasy – salinita úrovně MV/3, tedy odpovídající cca 11 PSU, teplota 22 °C a typ média s přidaným chelatačním činidlem EDTA. U brakické populace byla nejvhodnější salinita úrovně MV/2, tedy cca 17 PSU, teplota 22 °C a médium bez přidaných chelatačních činidel či pH pufru. Podle signifikance jednotlivých faktorů na růst stélek se zdá, že na přírůstky biomasy u brakického druhu má největší vliv teplota vody. U sladkovodního druhu má nejvyšší vliv naopak salinita, popřípadě složení média, co se týká obsahu chelatačního činidla a pH pufru.

Sladkovodní populace <i>Ulva pilifera</i>	Testování v malém objemu v kultivačních destičkách					
	gradient salinity		gradient teploty		složení média	
	max biomasy	úroveň salinity	max biomasy	teplota	max.biomasy	typ média
	26,53 mm <sup>2</sup>	MV/3	44,2 mm <sup>2</sup>	22°C	55,65 mm <sup>2</sup>	EDTA
Brakická populace <i>Ulva flexuosa</i> sp.	Testování v malém objemu v kultivačních destičkách					
	gradient salinity		gradient teploty		složení média	
	max biomasy	úroveň salinity	max biomasy	teplota	max.biomasy	typ média
	137,57 mm <sup>2</sup>	MV/2	46,84 mm <sup>2</sup>	22°C	158,38 mm <sup>2</sup>	MV/3 - kontrolní

**Tabulka č. 8:** Výsledné optimální podmínky pro kultivaci studovaných populací

### 4.3. Výpočet a vytvoření grafů specifické růstové rychlosti

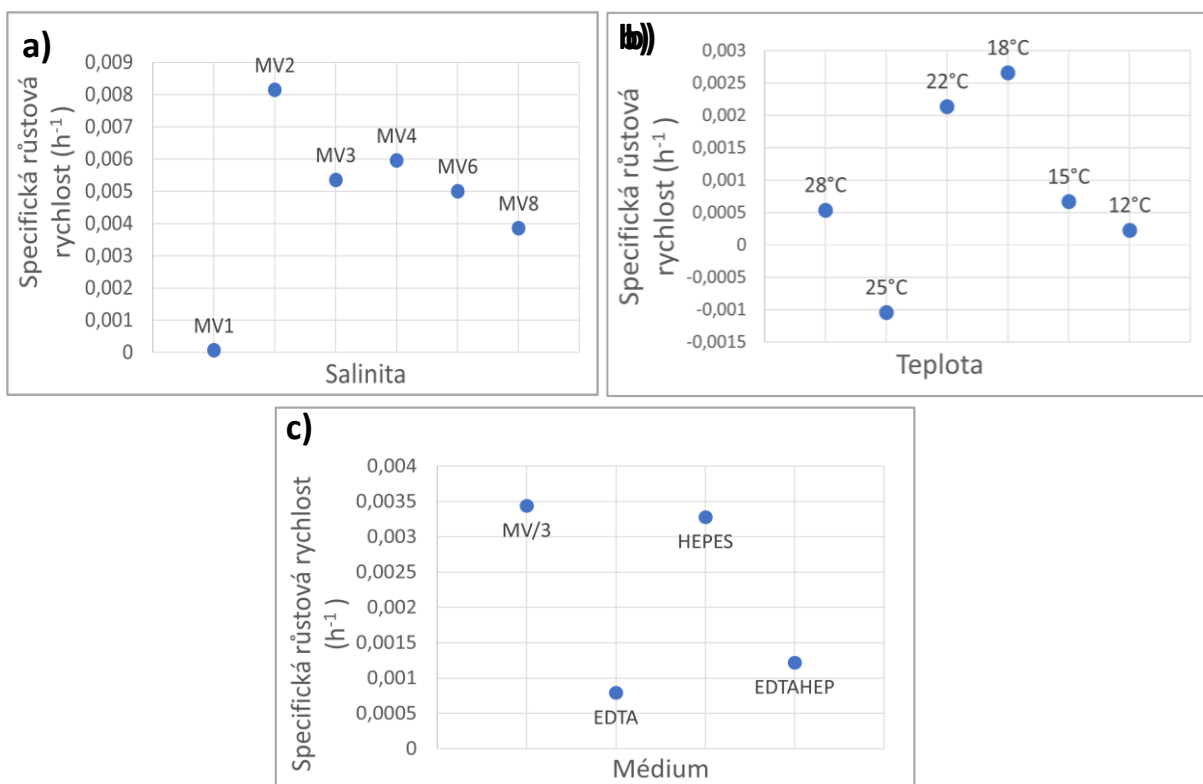
Ve většině případů docházelo u studovaných kultur k exponenciální fázi růstu cca mezi 15. až 25. dnem kultivace (tedy mezi 4. až 7. měřením). Z naměřených hodnot plochy během exponenciální fáze byly vypočteny jednotlivé specifické rychlosti růstu ( $\mu$ ).

U brakické populace pěstované na gradientu salinity se po vypočítání specifických růstových rychlostí (SRR) ukázalo, že během exponenciální fáze růstu dochází k nejvyšším přírůstkům biomasy v úrovni salinity MV/2 (cca 17 PSU), a to s hodnotou  $\mu = 0,00815 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$  (tedy 1 g původní biomasy vytváří přibližně 0,00815 g nové biomasy za hodinu) (viz. graf. č. 7, za a). Naopak nejmenší hodnoty SRR dosahovaly stélky v salinitě úrovně MV/1 (tedy přibližně 35 PSU). V ostatních úrovních salinity byly hodnoty SRR velmi podobné a jejich rozdíly v přírůstcích během exponenciální fáze nejsou signifikantně odlišné. Nejvhodnější teplotní podmínky pro nejvyšší přírůstky během exponenciální fáze odpovídají i teplotám vedoucím k celkovým největším přírůstkům biomasy, které jsou patrné z růstových křivek pro brakickou populaci (viz. kapitola 4.2.1 – Výsledky měření na gradientech pomocí PAM fluorometru, graf č. 1).

Na gradientu teploty z měření v exponenciální fázi pro brakický druh vyšla jako nejvyšší hodnota SRR  $\mu = 0,00266 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$  a to u teploty 18 °C (viz. graf. č. 7, za b). Velmi podobně nicméně vyšla i hodnota SRR při 22 °C, a to  $\mu = 0,00214 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ , rozdíl mezi nimi tedy není signifikantní. Hodnoty specifických růstových rychlostí pro měření v teplotách 25, 15 a 12 °C jsou si také velmi podobné a přírůstky plochy stélek v těchto teplotách během exponenciální fáze nebyly příliš vysoké. Nejnižší hodnoty SRR vyšli při teplotě 25 °C, a to dokonce jako záporné hodnoty  $\mu = -0,00104 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ . Důvodem je, že během toho, co u ostatních měření docházelo k exponenciální fázi růstu, tak v této teplotě naopak růst stélek poklesl. Je možné, že došlo k částečnému rozpadu stélky, kdy byla plocha změřena jako menší, nicméně

pravděpodobně šlo pouze o chybu měření, protože u grafů přírůstků biomasy (viz. kapitola 4.2.2, obr. č. 3) je vidět, že později biomasa opět přibývá. Opět zde odpovídá, že k největším přírůstkům během exponenciální fáze dochází při teplotách, kde byl zaznamenán i největší celkový přírůstek biomasy, kromě hodnoty v teplotě 25 °C (viz. kapitola 4.2.2 – Výsledky měření na gradientech pomocí PAM fluorometru, graf č. 3).

U posledního pokusu při měření v závislosti na složení média vyšla jako nejvyšší hodnota SRR  $\mu = 0,00344 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$  v médiu MV/3, tedy kontrolním médiu bez přidání chelatačního činidla a pH pufru (viz. graf. č. 7, za c). Opět ale vidíme, že druhá nejvyšší hodnota SRR  $\mu = 0,00328 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$  v médiu pouze s pufrům HEPES je velmi podobná a přírůstky biomasy v exponenciální fázi růstu se v těchto testovaných médiích signifikantně neliší. Podobně se od sebe signifikantně neliší ani hodnoty SRR měření v médiu pouze s přidáním činidlem EDTA a v médiu s kombinací EDTA a HEPES. Nejnižší hodnoty SRR nicméně stélky dosahovaly v médiu s přidáním EDTA, kdy byla zjištěna hodnota SRR  $\mu = 0,00079 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ . Výsledné nejlepší podmínky média pro nejvyšší hodnoty SRR se opět shodují s nejlepšími podmínkami pro nejvyšší celkové přírůstky biomasy stélek u růstových křivek (viz. kapitola 4.2.3 – Výsledky měření na gradientech pomocí PAM fluorometru, graf č. 5).



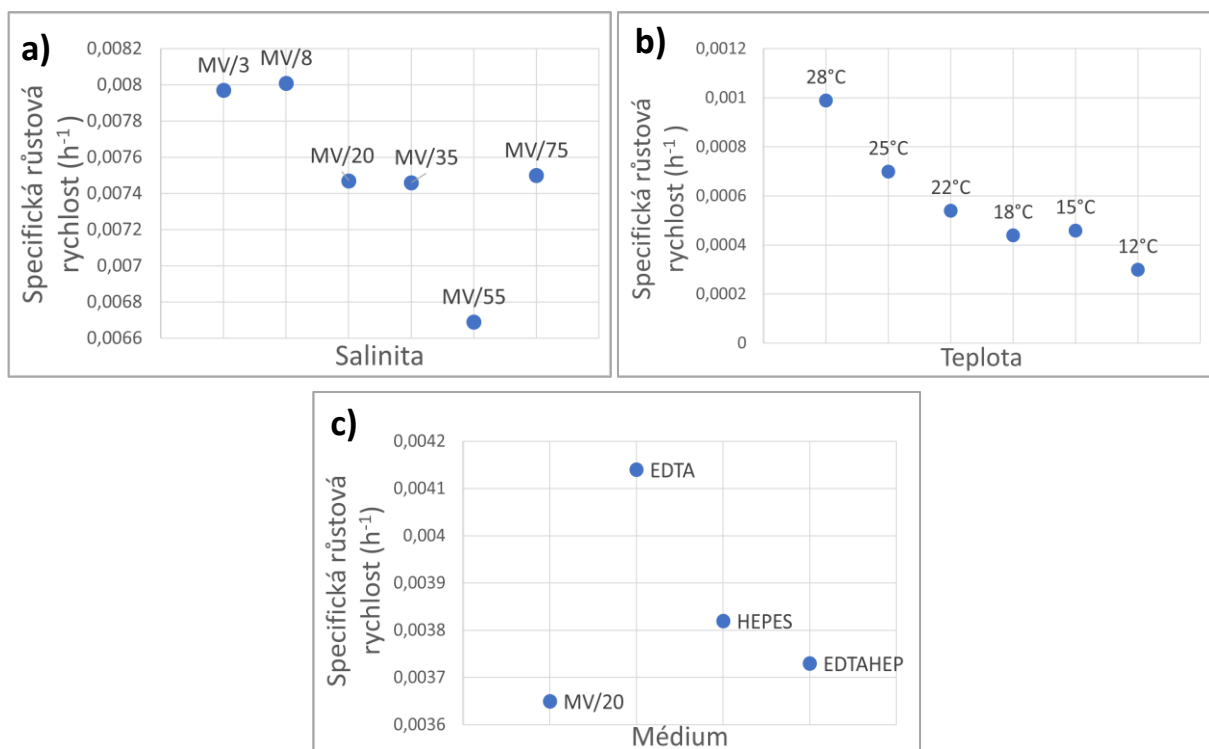
**Graf č. 7:** Grafy specifických růstových rychlostí pro brakickou populaci druhu *U. flexuosa*: a) graf vytvořený z měření v exponenciální fázi na gradientu salinity, b) z měření na gradientu teploty, c) z měření v závislosti na složení média.

U sladkovodní populace vyšla u experimentálního měření na gradientu salinity jako nejvyšší hodnota SRR  $\mu = 0,00801 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$  a to u salinity MV/8 (cca 4,25 PSU), velmi podobně vyšla také hodnota pro úroveň salinity MV/3 (11 PSU) a to  $\mu = 0,00797 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$  (viz. graf. č. 8, za a), rozdíly mezi přírůstky biomasy během exponenciální fáze zde nebyly signifikantně rozdílné. Hodnoty SRR pro úrovně salinity MV/20, MV/35 a MV/75 (tedy 1,75, 1 a 0,47 PSU) také nebyly mezi sebou signifikantně rozdílné a nemůžeme u nich tedy určit, při které z těchto úrovní dochází k nejvýraznějším přírůstkům. Naopak hodnota SRR v salinitě MV/55 (0,64 PSU) byla výrazně nižší než v ostatních úrovních, s hodnotou SRR pouze  $\mu = 0,00669 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ . Salinity vedoucí k nejvyšším výsledným hodnotám specifické růstové rychlosti během exponenciální fáze růstu znovu poměrně dobře odpovídají salinitám, u kterých dochází k výsledným maximálním celkovým přírůstkům biomasy při měření na PAM fluorometru (viz. kapitola 4.2.1, graf č. 2)

Při měření na gradientu teploty vyšla jako nejvyšší hodnota SRR  $\mu = 0,00099 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$  pro měření při teplotě 28 °C (viz. graf. č. 8, za b). Dále byl pozorován poměrně plynulý sestupný gradient výsledných hodnot SRR z dat přírůstků biomasy během exponenciální fáze pro ostatní teploty. Mezi teplotami od 12 do 25 °C nebyl nijak výrazný signifikantní rozdíl ve výsledných hodnotách. Nejnižší hodnota SRR byla naměřena v teplotě 12 °C a odpovídala  $\mu = 0,0003 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ . V tomto případě teploty s nejvyššími hodnotami SRR v exponenciální fázi růstu (tedy 28 °C, popřípadě 25 °C) neodpovídají teplotě s nejvyššími celkovými maximálními přírůstků biomasy v experimentu měřeném na PAM fluorometru (22 °C) z předešlé kapitoly (viz. kapitola 4.2.2, graf č. 4). Závislost mezi velikostí exponenciální fáze a výslednou biomasou tedy není vždy nutně stejná.

V experimentu, který se týkal závislosti rychlosti růstu na složení média se jako médium, kde docházelo k největším přírůstkům během exponenciální fáze, ukázalo médium s přidavkem chelatačního činidla EDTA (viz. graf. č. 8, za c). Zde vyšla hodnota SRR  $\mu = 0,00414 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$ . Média s přidavkem stabilizačního pH pufru HEPES, či s přidanou kombinací jak EDTA, tak HEPES, a i hodnota SRR naměřená v kontrolním médiu MV/20, jsou si velmi podobné a výrazně nižší než hodnota nejvyšší v médiu s EDTA. Signifikantně se tedy liší pouze hodnota SRR u média s EDTA od všech ostatních. Nejnižší naměřená hodnota SRR byla  $\mu = 0,00365 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}$  a to u kontrolního média MV/20. Zdá se tedy, že v případě sladkovodní populace více záleželo na přidání chelatačního činidla a stabilizačního pufru do média, ve srovnání s brakickým druhem. Výsledky se opět poměrně dobře shodují s podmínkami pro maximální celkové přírůstky při měření růstových křivek na PAM fluorometru z předešlé kapitoly (viz. kapitola 4.2.3, graf č. 6).





**Graf č. 8:** Grafy specifických růstových rychlostí pro sladkovodní populaci druhu *U. pilifera*: a) graf vytvořený z měření v exponenciální fázi na gradientu salinity, b) z měření na gradientu teploty, c) z měření v závislosti na složení média

#### 4.4. Kultivace stélek rodu *Ulva* ve vztahu k objemu média

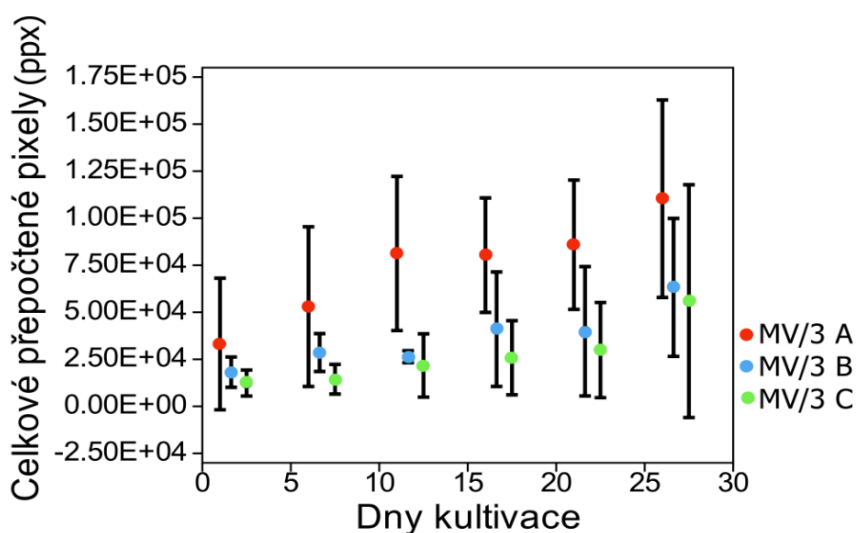
Při kultivaci ve větším objemu byly studované populace pěstovány ve venkovním prostředí v Petriho miskách po dobu 26 dní. Hodnocení stélek pro následnou analýzu obrazu bylo prováděno vždy v intervalu po 5 dnech. Během celého průběhu kultivace docházelo k více či méně výrazným přírůstkům biomasy a v žádné kultivační misce nedošlo k úplnému odumření stélek. Pro brakickou populaci (*Ulva flexuosa*) bylo použito MV/3 médium, tedy základní médium o salinitě 11 PSU, a pro sladkovodní populaci (*Ulva pilifera*) základní médium MV/20 o salinitě 1,75 PSU, která byla v předchozích experimentech vyhodnocena jako relativně optimální pro růst těchto kmenů. Pro pěstování obou populací byly použity 3 objemy kultivačního média a to A - 628,3 ml, B - 113,1 ml a C - 25,1 ml. Pro každý objem média byla vytvořena 4 opakování.

velikost Petriho misky	objem média (cm <sup>3</sup> )	povrch hladiny (cm <sup>2</sup> )	poměr
A - největší	628,3	754	4/5
B - střední	147	275	1/2
C - nejmenší	50,3	125,7	2/5

**Tabulka č. 9:** Poměry objemů ku povrchům média v jednotlivých kultivačních Petriho miskách

U brakické populace se stélkám nejlépe dařilo v největším objemu média, kde podle měření pomocí analýzy obrazu docházelo k největším přírůstkům plochy v přepočtených pixelech (viz. graf. č. 9). Mezi jednotlivými opakováními v rámci jednoho objemu média nicméně docházelo k výrazné variabilitě, a to nejvýrazněji právě v médiu s největším objemem, jak je vidět i na chybových úsečkách v příslušném grafu. U dvou menších objemů média (B, C) se zdá, že k větší variabilitě mezi velikostmi stélek v rámci opakování pro určitý objem docházelo hlavně v pozdějších dnech kultivace.

Obdobně jako u výsledných měření u růstových křivek při pokusech na gradientech v laboratorním prostředí (viz. kapitola 4.2.), i zde byly výsledné hodnoty testovány pomocí série lineárních regresních analýz, kdy byly analyzovány logaritmované hodnoty přírůstků biomasy vyjádřené v přepočtených pixelech. Při porovnání křivek lineárního modelu a statistických dat je patrné, že vliv objemů média, ve kterých byla mnou studovaná brakická populace kultivována, nemá signifikantní vliv na přírůstky biomasy stélek (viz. tabulka č. 10). Žádné z analyzovaných křivek v modelu nebyly vůči sobě signifikantně odlišné a nelze tedy říci, že by některý objem média byl pro výsledné přírůstky výhodnější. To by naznačovalo, že ani ve velkých objemech média pravděpodobně nedochází po 26 dnech kultivace k výraznému poklesu množství živin, které by se mělo stát limitující pro růst stélek. Pokud by se tedy zachoval stejný poměr povrchu hladiny a celkového objemu média v nádrži i při dalším „upscalingu“ kultivace, měl by tento princip fungovat nadále a objem kultivačního média by neměl růst stélek signifikantně ovlivnit.



**Graf č. 9:** Graf znázorňující přírůstky plochy stélek brakické populace *U. flexuosa* v přepočtených pixelech. Kultivace probíhala ve 3 objemech média MV/3 (11 PSU): A - 628,3 ml, B - 113,1 ml a C - 25,1 ml.

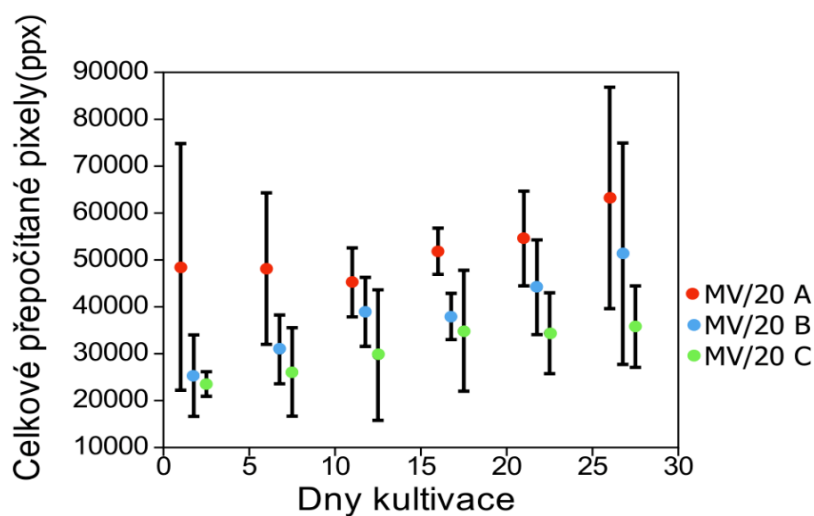
Brakická populace <i>Ulva flexuosa</i>				
objem	r	p-val	slope	CI slope
MV/3A	0,612	1,50E-03	0.0244	[0.01,0.0397]
MV/3B	0,634	8,90E-04	0.0172	[0.0065,0.0286]
MV/3C	0,496	1,37E-02	0.0185	[0.0036,0.0323]
F-test: 0,3896		p= 0,6789		Bonf.kor.=0,016

**Tabulka č. 10:** Výsledky lineárních regresních analýz pro brakický druh *Ulva flexuosa* ve třech různých objemech média při venkovní kultivaci

U sladkovodní populace byly sledovány velmi podobné výsledky, kdy největších přírůstků dosahovaly stélky v největším objemu média, nicméně opět s největšími rozdíly mezi jednotlivými opakováními pro daný objem (viz graf. č. 10). Celkové hodnoty plochy byly ale u sladkovodního druhu menší než u brakické populace.

Při testování výsledných hodnot měření se efekt objemu média na přírůstky biomasy stélek během 26 dní kultivace opět ukázal jako nesignifikantní, tedy i v tomto případě také platí, že objem kultivačního média nehraje zřejmě limitující roli na přírůstky biomasy stélek. Ani v jednom objemu média podle křivek lineárního modelu a statistických hodnot nebyly přírůstky biomasy v hodnotě přepočtených pixelů signifikantně rozdílné (viz. tabulka č. 11).

Jak u sladkovodní, tak u brakické populace byla v některých Petriho miskách nicméně pozorována kontaminace rozsivkami, která mohla působit částečně limitujícím způsobem na výsledné přírůstky biomasy. Při velkých kultivacích bývá nicméně kontaminace, nebo přerůstání řas jinými epifytickými druhy poměrně časté, a mělo by se s tímto faktorem počítat.



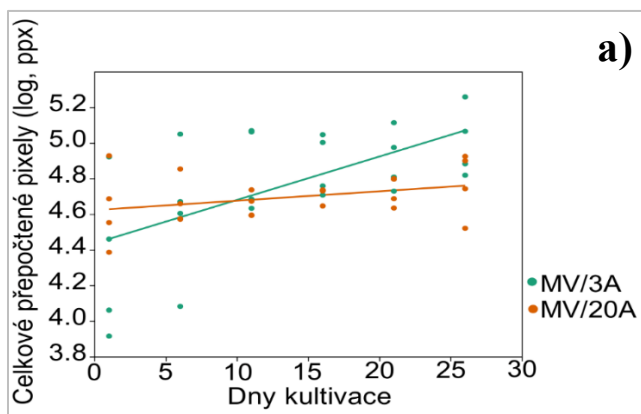
**Graf č. 10:** Graf znázorňující přírůstky plochy stélek sladkovodní populace *U. pilifera* v přepočtených pixelech. Kultivace probíhala ve 3 objemech média MV/20 (1,75 PSU): A - 628,3 ml, B - 113,1 ml a C - 25,1 ml.

Sladkovodní populace <i>Ulva pilifera</i>				
objem	r	p-val	slope	CI slope
MV/20A	0,3461	9,76E-02	0.0053	[-0.0023,0.0132]
MV/20B	0,6657	3,90E-04	0.0112	[0.0055,0.0177]
MV/20C	0,4459	2,89E-02	0.0076	[0.0027,0.0121]
F-test: 0,9797		p= 0,381		Bonf.kor. = 0,016

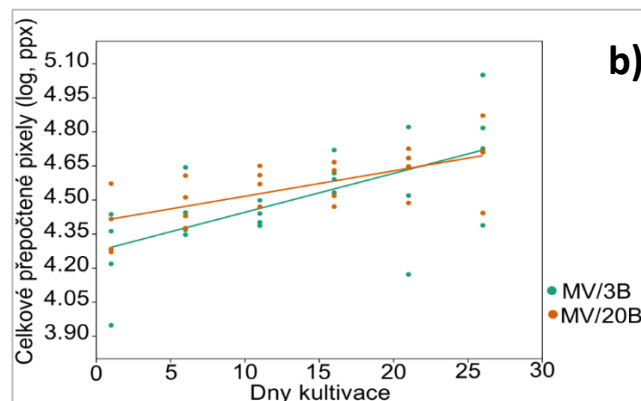
**Tabulka č. 11:** Výsledky lineárních regresních analýz pro sladkovodní druh *Ulva pilifera* ve třech různých objemech média při venkovní kultivaci

Jednotlivé objemy média pro sladkovodní a brakickou populaci byly porovnávány ještě mezi sebou navzájem, aby se stanovil vhodnější kmen pro případné kultivace ve velkém objemu. Opět byla provedena lineární regresní analýza všech zlogaritmovaných hodnot přírůstků biomasy v hodnotách přepočtených pixelů, přičemž zajímavý byl hlavně sklon (slope) jednotlivých lineárních křivek a jejich vzájemné porovnání u studovaných populací (viz. graf. č. 11). Jako výhodnější se ukázala brakická populace druhu *U. flexuosa*, která ve všech třech objemech média vykazovala vyšší rychlosti růstu, než sladkovodní populace druhu *U. pilifera*, přičemž vysoká rychlost růstu a velké množství výsledné biomasy jsou hlavní žádané aspekty ve velkoplošných kultivacích. Ani v jednom případě rozdíl mezi daty pro tyto dva druhy nebyl signifikantní, nicméně sklon křivek jasně vypovídá o tom, že sladkovodní populace měla přírůstky biomasy během 26denního experimentu daleko méně výrazné a k přirůstání biomasy docházelo relativně velmi pomalu. U brakické populace je sklon křivek lineární regrese vždy strmější, a tedy rychlosti přírůstků biomasy stélek byly výraznější.

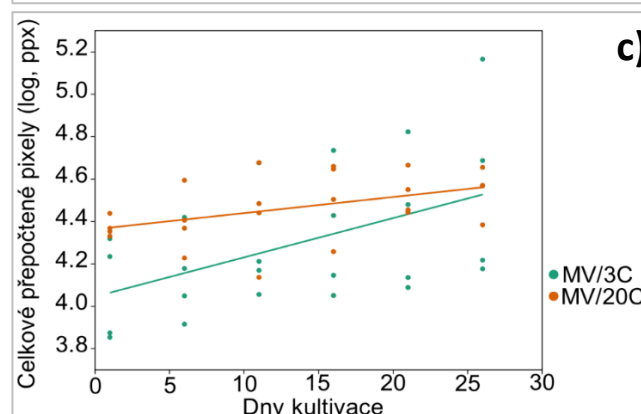
Ve výsledku se podle získaných dat zdá, že pro kultivace ve velkém objemu by měly být výhodnější zástupci brakické populace *U. flexuosa* v porovnání se sladkovodní populací druhu *U. pilifera*, nicméně objem média při jejich kultivaci nehraje ani u jednoho signifikantní roli pro přírůstky biomasy stélek.



objem A (628, 3 ml)	r	p-val	slope	CI slope
MV/3A	0,611	1,50E-03	0.0244	[0.010,0.038]
MV/20A	0,346	9,76E-02	0.0053	[-0.0023,0.014]
F-test: 6,684		p= 0,013		



objem B (113, 1 ml)	r	p-val	slope	CI slope
MV/3B	0,635	8,90E-04	0.0172	[0.0073,0.028]
MV/20B	0,666	3,90E-04	0.0112	[0.0055,0.0178]
F-test: 1,3153		p= 0,258		



objem C (25, 1 ml)	r	p-val	slope	CI slope
MV/3C	0,4959	1,37E-02	0.0185	[0.0036,0.0321]
MV/20C	0,446	2,89E-02	0.0076	[0.0028,0.012]
F-test: 2,0415		p= 0,16012		

**Graf č. 11:** Grafy znázorňující křivky lineární regrese pro 3 objemy média srovnávající rozdíly přírůstků biomasy pro druh *U. flexuosa* (médium MV/3) a sladkovodní druh *U. pilifera* (médium MV/20), a) v objemu média 628,3 ml, b) v objemu média 113,1 ml a c) v objemu média 25,1 ml. Uvedené jsou také příslušné hodnoty získané při testování pomocí lineárních regresí.

## 5. Diskuse

### 5.1. Zhodnocení vlivu různých kultivačních podmínek na růst tubulárních morfortypů rodu *Ulva*

V této práci byla zkoumána schopnost kultivace řas rodu *Ulva* s tubulární morfologií, a to dvou populací, jedné z brakického (*Ulva flexuosa*) a druhé ze sladkovodního (*Ulva pilifera*) prostředí. Tyto řasy jsou schopné odolávat širokému spektru podmínek a narůstat do značného množství biomasy (Rybak, 2018), a i přes to se nároky na jejich kultivaci a stanovení dynamiky jejich růstu, převážně u sladkovodního druhu, zabývá zatím jen málo studií.

Ačkoli je tyto řasy možné sbírat přímo z přírody, jejich kultivace v laboratorních podmínkách a následně ve větších venkovních kultivacích s sebou nese řadu výhod, převážně pokud chceme řasy využívat v potravinářství či biotechnologicky. Důležitým požadavkem je zde schopnost dosáhnout velmi efektivní konstantní produkce, a to především pomocí stanovení optimálních podmínek a jejich kontrolovaného udržování během celého průběhu kultivace (Balina *et al.*, 2017; Chemodanov *et al.*, 2019). Zároveň je v laboratorních podmínkách výhodná možnost kontrolovat denzitu uchycených zoospor pěstovaných řas a tak zabránit kompetici způsobené nedostatečným množstvím živin v médiu, popřípadě zabránit vzájemnému stínění apod (Carl *et al.*, 2014). Je možné vytvořit klonální populace od jednotlivých druhů, nebo kultivarů, které vykazují nejvýhodnější vlastnosti a nejvyšší rychlosti růstu (Hiraoka & Oka, 2008).

Experimentální kultivace byla prováděna vždy po dobu 35 dní, což se ukázalo jako minimální vhodná doba pro stanovení optimálních podmínek. U velké většiny měření byla pozorována poměrně dlouhá *lag* fáze, kdy stélky přibližně do patnáctého dne rostly velmi pomalu s malými přírůstky a k rozdílu mezi působením sledovaných abiotických podmínek či efektu složení média docházelo až přibližně v půlce průběhu experimentu. Zdá se tedy, že kratší doba kultivace by nebyla schopna ukázat žádné signifikantní výsledky. Ve většině jiných studií nicméně experimentální kultivace vede často k rychlému počátečnímu růstu a jeho rapidním přírůstkům během celé doby kultivace. Důvodem může být, že tyto kultivace zpravidla začínají na mnohonásobně vyšších počátečních velikostech stélek, často se jedná například i o kultivace „clusterů“ apod. (Floretovet *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2001; Lawton *et al.*, 2021a), oproti počátečním velikostem stélek v rámci několik mm<sup>2</sup> použitých v této práci. Popřípadě jsou nejprve řasy inkubovány (předpěstovány) po nějakou dobu po vypuštění zoospor, dokud nedosáhnou větší velikosti a až následně jsou prováděny experimentální kultivace (Lu *et al.*,

2006). Počáteční velikost stélek tedy pravděpodobně hodně ovlivňuje následný růst a umožňuje, aby se stélky lépe uchytily v novém médiu.

### 5.1.1. Efekt salinity na rychlosti růstu

Při experimentální kultivaci na gradientu salinity u brakické populace *Ulva flexuosa* dosahovaly stélky nejvyšších hodnot přírůstků biomasy v salinitě úrovně MV/2, tedy přibližně 17 PSU. Poměrně dobře se druhu také dařilo v salinitách úrovní MV/3 a MV/4, odpovídající hodnotám salinity 11 a 8,5 PSU. Jedná se o salinity vyšší než salinita na původním místě výskytu, kde bylo naměřeno pouze 6,61 PSU. To nicméně poměrně dobře odpovídá salinitním nárokům druhu *Ulva flexuosa*, který se vyskytuje velmi často v lokalitách mesohalinních, či polyhalinních a jeho možný výskyt je dokonce i v salinitě až 38 PSU, která plně odpovídá mořskému ekosystému (Rybak *et al.*, 2014; Rybak *et al.*, 2015; Rybak, 2018). Zdá se tedy, že stélky preferují spíše vyšší obsah solí a lokalita zálivu na ostrově Rujána, kde došlo k izolaci stélek, je spíše okrajovým biotopem výskytu tohoto druhu řas a je možné, že zde nedosahují tak velkých růstových rychlostí, jakých by bylo možné dosáhnout v jiném prostředí.

Snižování salinity tedy naopak vedlo spíše ke zpomalení růstu a stélky nedosahovaly tak vysokých celkových přírůstků biomasy. Jedny z nejmenších přírůstků byly pozorovány v úrovních média MV/6 a MV/8, které odpovídají salinitě 5,6 a 4,25 PSU. Stélky druhu *Ulva flexuosa* by měly být schopné v nižší salinitě poměrně dobře přežít, a to díky široké ekologické valenci ve vztahu k salinitě vody, která byla zjištěna u celé řady druhů (Rybak, 2018). To se potvrdilo i při experimentální kultivaci v této práci, kdy stélky viditelně přirůstaly a nedocházelo k jejich rozpadu. Zdá se tedy, že tento druh je schopen v nízkých salinitách růst, nicméně zde nedosahuje tak výrazných růstových rychlostí a výsledný výtěžek biomasy je téměř dvojnásobně nižší (viz. kapitola výsledky 4.2.1). Popisovaná extrémní tolerance k salinitě u tohoto druhu v některých starších článcích může být nicméně lehce zkreslena, protože se v nich uvádí celý druhový komplex, který zahrnuje i sladkovodní druh *Ulva pilifera* (dříve *Ulva flexuosa* subsp. *pilifera*) a druh *Ulva paradoxa* (dříve *Ulva flexuosa* subsp. *paradoxa*), jež je znám například z některých vnitrozemských slanisek (Mareš *et al.*, 2011).

Zajímavým pozorovaným fenoménem během experimentů bylo, že k úplně nejnižším celkovým přírůstkům biomasy a obecně nejpomalejšímu růstu stélek docházelo v médiu MV/1, tedy 35 PSU, což odpovídá salinitě v mořském prostředí. Řasám se zde vedlo ještě hůř než v salinitě nejnižší, kdy při prvním experimentu se v této salinitě stélky dokonce úplně rozpadly a nebylo možné dále měřit dynamiku vývoje populace pomocí PAM fluorometru. Při opakování

experimentu byla rychlost růstu velmi pomalá a přírůstky biomasy stélek téměř nulové. Je možné, že i když stélky příznivě snášejí vyšší salinitu, v tomto médiu už byla koncentrace solí příliš vysoká, neboť její obsah salinity byl v tomto médiu dvojnásobný oproti médiu MV/2. Zdá se tedy, že v mořské vodě by tato populace nebyla schopná vůbec přežít, nebo by její růst byl pravděpodobně velmi limitovaný. Zjištění je to zajímavé hlavně z toho důvodu, že brakické druhy bývají poměrně dobře odolné i ke zvýšeným salinitám. Což je zaprvé vidět na výsledcích měření zde, ale také na příkladu jiných studií zabývajících se kultivací brakických ulv, jako v již zmíněné studii od Rybaka, kde uvádí výskyt i v salinitě 38 PSU (Rybak, 2018). Také například ve studii Ichihara et al. (2013) přežívaly jiné podobné brakické druhy jako například *Ulva prolifera* v mořském médiu stejně dobře jako striktně mořské druhy, a to například testovaná *Ulva pertusa* či *Ulva* sp. (Ichihara et al., 2013). Je tedy otázkou, zda v tomto médiu se salinitou 35 PSU nedocházelo k limitaci jiným faktorem, ačkoli ostatní podmínky v médiu byly vytvořeny pro všechna úrovně salinity stejně. Zdá se tedy, že výskyt v extrémní salinitě je pro tento brakický druh možný pouze v krajních případech za velmi příznivých podmínek, nebo v případě větších populací.

Při kultivaci sladkovodního druhu *Ulva pilifera* docházelo celkově k nižším přírůstkům biomasy a stélky se celkově zdály být celou dobu více stresované. Maximální přírůstek biomasy byl v salinitě 11 PSU (úroveň salinity MV/3), naopak nejnižších přírůstků stélky dosahovaly v salinitách od 0,64 do 0,47 PSU (MV/55 a MV/75) (viz. Výsledky, kapitola 4.2.1, obr.). Toto je velmi překvapivé zjištění, vzhledem k tomu, že *Ulva pilifera* je druh sladkovodní a byl nalezen v přírodní lokalitě s PSU pouze cca 0,47 (to by tedy odpovídalo médiu MV/75). Mohlo jít o chybu měření, anebo je možné, že tyto sladkovodní druhy žijí v přírodě na okraji své ideální niky a ve sladké vodě pouze přežívají. Tento podobný fenomén byl popsán i u dalších rodů řas ze skupiny Ulvophyceae, jako je například *Aegagrophila*, nebo *Rhizoclonium*, kdy se těmto rodům při kultivaci daří lépe ve vyšších salinitách než v těch, které jsou přítomny v místech jejich přirozeného výskytu (Imai et al., 1997; Wakana, 1999 cit. podle Ichihara, 2013). Obecně u tubulárních sladkovodních morfotypů se zdá, že mají poměrně širokou salinitní niku. Je možné, že je to dáno tím, že tubulární morfotypy vznikly v evoluci nejprve ve slané vodě a následně došlo až k jejich druhotnému přesunu do sladké vody a zafixovala se tak možná predispozice sladkovodních druhů k životu v mořském prostředí, jak je o tom spekulováno na příklad u dalšího sladkovodního druhu *Ulva limnetica* (Arai et al., 2009).

U obou morfotypů byla pozorována tendence dosahovat vyšších rychlostí růstu a celkových maximálních přírůstků biomasy v kultivačních médiích, kde byla koncentrace



obsažených solí vyšší. Z hlediska jejich potenciální kultivace ve středoevropských zemích je toto relativně nemilé zjištění, protože obecným cílem velkoplošných kultivací je co nejvíce snížit finanční náklady, aby nebylo nutné využívat uměle vytvořenou, nebo složitě dodávanou mořskou vodu (Jensen, 1993). Nicméně k nějakému růstu během kultivace i v nízké salinitě docházelo, je tedy možné, že při určité kombinaci se změnou dalších faktorů prostředí by se dalo dosáhnout vyšších růstových rychlostí než během těchto experimentů.

### 5.1.2. Efekt teploty na rychlosti růstu

Kultivace na gradientu teploty vedla u brakického druhu k maximálním přírůstkům biomasy v rozmezí teplot 18 až 22 °C. Naopak jako nejméně vhodná se ukázala teplota kolem 12 až 15 °C, kde byly přírůstky zřetelně nejnižší a celkové rychlosti růstu nejpomalejší. Pravděpodobně zde docházelo k limitaci růstu nízkou teplotou. Podobné výsledky jsou uváděny i ve studii Cui et al., (2015), kde dosahovala *U. flexuosa* nejpomalejších růstových rychlostí v nejnižší studované teplotě 5 až 10 °C. Stejně tak se stélkám nevedlo nejlépe ani v hodně vysokých teplotách kolem 25 až 28 °C. Tyto výsledky poměrně dobře odpovídají například studii na velmi podobném druhu *U. compressa*, která se také vyskytuje v oblasti severního Německa, jako mnou studovaná brakická populace druhu *Ulva flexuosa*. Jako optimální teplotní podmínky pro kultivaci u ní byla stanovena teplota v rozmezí >15 až 20 °C, naopak nižší a vyšší teploty vedly ke zpomalení růstu (Taylor et al., 2001).

Při kultivaci sladkovodní populace *Ulva pilifera* na gradientu teploty byla pozorována maximální hodnota přírůstku biomasy při teplotě 22°C. Maximální hodnota plochy stélek a jejich optimální teplota se velmi shodují s pozorováním u brakické populace, ačkoli u sladkovodní sledujeme další poměrně výhodnou teplotu 25 °C. Optimální rozpětí teplot pro nejvyšší růstové rychlosti by v tomto případě bylo spíše od 22 do 25 °C, tedy o něco vyšší. Opět zde nicméně vidíme limitující působení nízké teploty s nejnižšími růstovými rychlostmi v teplotách 12 až 15 °C. Není zatím velké množství studií, které by se konkrétně zabývali nároky sladkovodního druhu *U. pilifera* na teplotní podmínky a obecně ani optimálními teplotními podmínkami pro další sladkovodní zástupce rodu *Ulva*. Nicméně v přírodě se druh vyskytuje v místech, kde může teplota vody kolísat v rozmezí od 11 do 27 °C (Rybak, 2021), měla by tedy být velmi odolná k širokému spektru teplot, což je možné, protože stélky přežívali ve všech testovaných teplotách. Experiment však ukázal, že optimum maximálního růstu se pohybuje někde ve středních teplotách a v extrémech roste pouze velmi pomalu.

U obou populací se jako nejoptimálnější ukázala teplota v rozmezí od 18 až do 25 °C, kde stélky dosahovaly nejvyšších přírůstků biomasy během kultivačního období. Obě populace nicméně dosahovaly i srovnatelných finálních přírůstků a ani jedna se tedy při tomto experimentu nejevila jako výrazně výhodnější pro kultivaci. Extrémní teplota u obou vedla naopak k poklesu růstu, a to převážně v případě nízké teploty, kolem 12 až 15 °C. Můžeme tedy předpokládat, že obě studované populace mají přibližně stejné nároky na teplotní podmínky.

V nízké teplotě kolem 12 až 15 °C byl navíc pozorován zajímavý efekt, jak u sladkovodní, tak i brakické populace, velmi podobný tomu, který ve svém článku popisuje Gao et al., (2016). V kultivačních komůrkách v nižší teplotě docházelo k tomu, že stélky vytvářely větší množství krátkých bočních větví po celém povrchu stélek. Zdá se tedy, že v nízké teplotě stélky tvoří spíše tuto shlukovitou morfologii namísto toho, aby rostly do délky, pravděpodobně proto výsledné přírůstky byly v těchto teplotách nejnižší. Při mých pokusech k tomuto jevu nicméně docházelo pouze při testování na gradientu teploty, na rozdíl od toho Gao et al. (2016) prováděl experimenty na zkříženém gradientu jak teploty, tak zároveň i salinity, kdy právě nízká hodnota obou faktorů vedla k této morfologii (Gao *et al.*, 2016). V nízké salinitě jsem nicméně tento jev vůbec nepozorovala, je tedy možné, že teplota má v tomto ohledu vyšší vliv a u nízké salinity se tento jev ukáže až v případě současné přítomnosti nízké teploty na zkříženém gradientu těchto dvou abiotických faktorů, nebo je tato plastická reakce spouštěna odlišnými faktory či jejich kombinacemi u různých druhů.

### **5.1.3. Efekt obsahu chelatačního činidla (EDTA) a pH pufru (HEPES) na rychlosti růstu**

U poslední experimentální kultivace byl sledován vliv chelatačního činidla EDTA a pH pufru HEPES na rychlost růstu stélek studovaných populací. U brakického druhu se jako médium, ve kterém dochází k nejvyšším růstovým rychlostem, ukázalo kontrolní médium MV/3, tedy médium pouze s přítomností základních živin a vitamínové směsi o salinitě 11 PSU. U média s přídavkem HEPES docházelo také k marginálním přírůstkům biomasy, ale u média pouze s EDTA anebo s kombinací EDTA a HEPES stélky vykazovaly velmi nízké rychlosti růstu a výsledné nízké finální hodnoty biomasy (viz. výsledky, kapitola 4.2.3, graf č. 5). Jedná se o poměrně zajímavý efekt, který by z hlediska velkoplošné kultivace představoval u této brakické populace výhodu, vzhledem k tomu, že bez přidávání těchto látek do média může vést ke snížení nákladů kultivace.

Otázkou nicméně je, jestli velmi nízký vliv chelačního činidla nebyl dán pouze jeho špatnou volbou či dávkováním této látky do média. Obecně u řas kultivovaných ve slaném médiu totiž bývá přítomnost chelačních činidel velmi důležitá, protože zde často dochází k akumulaci většího množství kovů, jejichž hranice při nedostatečné chelataci může vést až k toxickému působení (Andersen *et al.*, 2005). Přítomnost chelatačního činidla by tedy naopak měla růst ve slaném médiu podporovat nejvíc. Pro kultivaci bylo zvoleno činidlo EDTA, protože se jedná o jedno z nejčastěji používaných chelatačních činidel pro kultivaci řas (Spencer, 1958). Koncentrace přidaného činidla byla převzata podle návodu na přípravu f/2 média (Andersen, 2015), které je často využíváno pro pěstování mořských i brakických druhů řas rodu *Ulva* (Rasmussen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012), jedná se ale o mořské médium a je tedy možné, že pro brakickou řasu byla přidaná koncentrace příliš vysoká a mohla u ní působit spíše inhibičním způsobem. Podle článku od Provasoli *et al.* (1957) může vést příliš vysoká koncentrace EDTA v mořském médiu, kde je vysoké pH (>8) k tomu, že EDTA aktivně váže  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  ionty a může s nimi vytvářet soli, které jsou méně rozpustné a tedy příliš velké množství EDTA není ve výsledku tak vhodné (Provasoli *et al.*, 1957).

Poměrně nízký efekt přidaného pH pufru HEPES není tolik překvapivý, protože u mořských a brakických médií většinou není tak velký problém udržet konstantní hodnoty pH, neboť ve slané vodě dochází k obecně lepší pufraci (Andersen *et al.*, 2005). Rozdíl v růstových rychlostech mezi médiem s HEPES a kontrolním médiem byl nicméně velmi vysoký, a to působí dojmem, že zde pH pufr vlastně na růst působil dokonce jako inhibiční faktor. Je možné, že je to dáno nevhodností pufru jako takového, protože se pro slaná média doporučují spíš pufrы jako Tris, který má ale nevýhodu, že se dá použít pouze v axenických podmínkách, kterých nejde při kultivaci řas rodu *Ulva* kvůli symbiotickým bakteriím dosáhnout (Smith *et al.*, 1974). Existují navíc studie, které potvrzují, že použití HEPES jako pH pufru je vhodné i pro mořská média jako ASW (artificial sea water) (Mcfadden *et al.*, 1986; Iijima *et al.*, 2015), takže by tento pufr měl pro zde zvolené médium být vhodný. Množství přidaného HEPES bylo převzato z návodu na sladkovodní DY médium (Andersen *et al.*, 2005), a je tedy možné, že byla pro toto médium zvolena příliš vysoká koncentrace, která neměla na kulturu požadovaný vliv. Zdá se však nejpravděpodobnější, že zde prostě pH pufr nebyl příliš potřeba, a tak růst nijak významně neovlivnil.

U sladkovodního druhu rozdíly v rychlosti růstu mezi jednotlivými testovanými médii nebyly tak výrazné, a ani u jednoho média se neprojevil významný efekt na růst stélek. Nejvyššího přírůstku biomasy nicméně dosáhly řasy v médiu pouze s přidaným činidlem

EDTA, naopak nejnižší hodnota byla naměřena v kontrolním médiu MV/20 (viz. výsledky, kapitola 4.2.3, graf č. 6). Jedná se tedy o úplně opačnou situaci než v případě brakické populace. U sladkovodních médií by efekt chelačních činidel neměl hrát takovou roli, nicméně možná byla mnou studovaná populace nějakým způsobem částečně limitována v ostatních médiích, nebo je možné, že nebylo vhodné zvolené kultivační médium, kterým byla velmi naředěná ASW. Médium mohlo obsahovat oproti jiným, běžně používaným sladkovodním médiím, jako BBM, nebo DY, příliš velké množství  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, které mohou kompetovat s ionty kovů při vazbě s EDTA ligandem (Andersen *et al.*, 2005). To by pak znamenalo, že zde tedy hrála přítomnost EDTA větší roli, než by tomu bylo za použití vhodnějšího média, a proto v médiích bez ní byl růst limitován. Díky nesignifikantnímu výsledku vlivu složení média na výsledné rychlosti růstu ale nemůžeme s jistotou tvrdit, že by bylo médium s obsahem EDTA opravdu to nejoptimálnější a bylo by pravděpodobně nutné provést další experimenty.

Zajímavější jsou velmi nízké růstové rychlosti při použití média s obsahem pH pufru HEPES. U sladkovodních médií by měl být efekt pufru výraznější, než při kultivaci brakického druhu (Andersen *et al.*, 2005), ale v tomto případě byly růstové rychlosti velmi nízké jako v případě, kdy bylo použito pouze kontrolní médium. Tím, že se rychlosti růstu v kontrolním médiu a médiu s HEPES vlastně neliší, můžeme předpokládat, že nedocházelo k tak velkému nárůstu řas, aby množství fixace  $\text{CO}_2$ , kterou způsobují, měla za následek změnu pH (McFadden *et al.*, 1986), a to znamená, že pH pufr byl v tomto případě nedůležitý. Navíc se zdá, že zde pufr měl také spíše negativní vliv na růst stélek, protože v médiu s kombinací EDTA i HEPES došlo k výraznému poklesu rychlosti růstu oproti médiu, kde bylo použito médium pouze s EDTA, které samo o sobě vedlo k růstu nejvyššímu.

Přítomnost chelatačního činidla se ukázala jako významná pro zvýšení rychlosti růstu stélek pouze při kultivaci druhu *Ulva pilifera*, nicméně i tento rozdíl oproti ostatním použitým médiím nebyl signifikantní. Z experimentů u druhu *Ulva flexuosa* se zdá, že nejvhodnější je pouze kontrolní médium a použití pH pufru HEPES mělo u obou populací pouze marginální vliv na přírůstek biomasy. Můžeme předpokládat, že přítomnost chelatačních činidel a pH pufrů tedy není nezbytná pro kultivaci tubulárních morfotypů rodu *Ulva*, protože díky nim nedochází k významnému zvýšení růstových rychlostí, ani k vyšším výsledným ziskům biomasy. Tyto morfotypy by tedy mohly být velmi nadějnými pro využití ve velkoplošných kultivacích zacílených na snížení provozních nákladů.

Celkově se zdá, že obecně vyšších růstových rychlostí ve všech experimentech dosahovaly řasy ze studované brakické populace *Ulva flexuosa*. Zároveň dosahovaly i větších maximálních přírůstků biomasy, a to za přijatelných optimálních kultivačních podmínek, vzhledem k náročnosti pěstování. Jejich využití pro velkoplošné kultivace by tedy bylo výhodnější než využití sladkovodního druhu *Ulva pilifera*. Byla zde však testována pouze jedna populace a nelze tedy říct, že by toto platilo pro všechny brakické a sladkovodní druhy. Mezi různými druhy, ale dokonce také i mezi kultivary v rámci jednoho druhu, může docházet k velké variabilitě v rychlostech růstu a jejich nárocích na kultivační podmínky (Lawton *et al.*, 2021a). Bylo by tedy nutné otestovat větší množství populací z dalších brakických a sladkovodních lokalit.

## **5.2. Možnosti využití PAM fluorometru jako metody pro stanovení přírůstků biomasy tubulárních makrořas**

Pro měření kontinuálních přírůstků biomasy byla vybrána metoda měření pomocí PAM fluorometru. Tato metoda se pro měření biomasy zatím rozsáhleji využívá pouze pro měření u mikrořas, kde není nutné stanovit přírůstky pomocí přesného měření plochy. Dá se zde, podle velikosti buněk dané mikrořasy, vypočítat kolik buněk může být v jedné měřené vrstvě, aniž by se buňky překrývaly v oblasti, která je zachytitelná detektorem a sledovat tak přírůstky biomasy (množení buněk) (Eggert *et al.*, 2006).

U makrořas se fluorometr, jako způsob měření biomasy tradičně nepoužívá, většinou se měření provádí pomocí vážení suché a nebo mokré hmotnosti stélek (Lawton *et al.*, 2021, Rasmussen *et al.*, 2011, Taylor *et al.*, 2001). Tyto metody ovšem nenabízejí příliš dobré výsledky pro měření přírůstků kontinuálně a pro stanovení dynamiky růstových křivek přímo během kultivace, protože u vážení suché hmotnosti je nutné stélky vyjmout z média, vysušit a zvážit a opětovný návrat už není možný. Můžeme tedy takto zjistit pouze finální hmotnost biomasy po skončení celého experimentu (Steinbruch *et al.*, 2020). U mokré hmotnosti sice můžeme stélky vážit pravidelně po dobu experimentu, ale výsledná hmotnost je vždy značně ovlivněna obsahem vody ve stélkách. Tento obsah je velmi problematické u každého vážení udržovat pokaždé stejný, a tak zkresluje výsledné hodnoty množství biomasy. Navíc je to invazivní metoda, kdy může docházet ke kontaminaci stélek a jejich manuálnímu poškození (Ale *et al.*, 2011).

Oproti klasickým metodám je tedy měření přírůstků biomasy s využitím PAM fluorometru nadějnou náhradou, nicméně zatím ne příliš využívanou, protože ho nelze použít

v případě všech makrořas. Výhodou stélek tubulárních morfotypů rodu *Ulva* je, že jsou tvořeny pouze jednou vrstvou buněk, přičemž každá buňka má vlastní chloroplast (Rybak, 2015). Celá stélka je schopna emitovat záření v podobě fluorescence zpátky na detektor přístroje a ten pak dokáže celou tuto svítící část změřit v hodnotách  $\text{mm}^2$  (Schreiber, 1999). Výsledné hodnoty plochy lze tedy měřit s poměrně velkou přesností, ačkoli automatické označení, někdy část stélky může vynechat, popřípadě může být v kultivační komůrce nějaký šum, způsobený například vylitím části obsahu stélky, ke kterému může dojít z místa separace stélek na menší části. V tomto případě je pak nutné označení měřené plochy upravit manuálně a tím se výsledné měření stává lehce ovlivněné tím, kdo měření provádí. Zároveň, vzhledem k limitované velikosti fluorometru, lze rychlosti růstu tímto způsobem sledovat pouze v začátcích růstu, kdy stélky ještě nejsou tak robustní. Nicméně pro stanovení přibližných přírůstků biomasy, které mohou být prováděny kontinuálně, a to neinvazivní metodou, se fluorometr jeví jako nadějná alternativa klasických technik (Juneau *et al.*, 2005). Navíc stanovení počátečních podmínek kultivace bývá velmi důležitý první krok pro zajištění správného uchycení stélek pro jejich další kvalitní růst (Carl *et al.*, 2014). Studované řasy by se daly pěstovat v určitých daných podmínkách a za pomoci fluorometru studovat jejich vliv na rychlost růstu, stejně jako v experimentech této práce. Při nalezení optimálních podmínek, pak tyto řasy přesunout do větších kultivačních médií či do venkovních nádrží apod. Dala by se tak zvýšit úspěšnost uchycení a zlepšit následný růst těchto řas, popřípadě makrořas s podobnou vláknitou morfologií, ve velkoplošných kultivacích.

### **5.3. Zhodnocení kultivace stélek ve větším objemu média a perspektiva jejich pěstování ve velkoplošných kultivacích**

Testování růstu řas ve větším objemu média je důležité pro následný „upscaling“ kultivace v kultivačních nádržích a pro velkoplošné pěstování se zaměřením na technologické využití či využití v potravinářství.

V této práci se jako vhodnější druh pro kultivaci ve velkém objemu ukázala *Ulva flexuosa*, která ve všech objemech média dosahovala vyšších růstových rychlostí a vyšších finálních přírůstků biomasy (Výsledky, kapitola 4.4., graf. 9). K podobným závěrům jsme došli i při experimentální kultivaci na různých gradientech podmínek a vzhledem k tomu se tedy zdá, že sladkovodní druh *Ulva pilifera* není pro kultivaci příliš vhodným. Mohlo se nicméně jednat také o to, že stélky tohoto druhu byly nějakým způsobem více limitované ve svém růstu už na začátku experimentů. Zároveň byl sladkovodní druh více náchylný k přerůstání stélek nárosty

rozsivek a bylo nutné se jich zbavovat pomocí častého přeočkování kultur. Ne vždy se to však povedlo stoprocentně a je možné, že rozsivky poněkud limitovaly růst stélek ulv, například kompeticí o zdroje živin, či zastíněním jejich stélek. Rozsivek se lze v kulturách zbavit přidavkem  $\text{GeO}_2$  (Lewin, 1966), který jsem pro svoje experimenty však nepoužila, neboť germanium je toxický kov, který by se mohl ve stélkách těchto řas akumulovat (Andersen *et al.*, 2005). Vzhledem k hodnocení růstu stélek této práci s cílem jejich potenciálního využití v potravinářství, by to zjevně nebyla vhodná metoda.

Pro kultivaci řas ve větších objemech byla použita základní média bez přidavku chelatačního činidla a pH pufru za účelem simulace kultivace v podmínkách, které jsou udržitelné s co nejnižšími výdaji. Zároveň se tato základní kontrolní média ukázala při experimentální kultivaci jako relativně vhodná pro kultivaci těchto druhů. K růstu řas v těchto médiích docházelo i při větších objemech kultivačního média. Bylo by tedy možné efektivně pěstovat řasy rodu *Ulva* bez potřeby zvyšovat produkční náklady těmito látkami. Podobné výsledky byly pozorovány také například ve studii od Rasmussen *et al.* (2011), kde byly řasy rodu *Ulva* pěstovány na přírodním hnoji bez použití chelatačních činidel, mikronutrientů atd. Studie byla však zaměřena na listovité morfotypy a v případě kultivace pro využití v potravinářství pěstování na hnoji pravděpodobně není nejvhodnější (Rasmussen *et al.*, 2011), nicméně tato studie dobře ukazuje, že tyto řasy jsou poměrně nenáročné z hlediska přidávaných látek do média. To podporují i studie, které se zabývají kultivací řas rodu *Ulva* v multi-trofických akvakulturách, kde řasy dokáží růst výlučně z živin (N, P) z odpadní vody, která je odváděna z akvakultur jiných organismů, převážně ryb či korýšů (Yokoyama & Ishihi, 2010; Al-Hafedh *et al.*, 2015)

Celkově se zdá, že na objemu kultivačního média, ve kterém jsou stélky pěstovány, příliš nezáleží. Přestože nejvyšších přírůstků dosahovaly obě populace při kultivaci v největším objemu média, jeho efekt se při žádném z experimentů neprojevil signifikantně (viz. výsledky, kapitola 4.4., graf č. 9 a 10) a je tedy pravděpodobné, že by růst těchto řas nebyl limitován ani ve velkých komerčních kultivacích, pokud by byly zachovány poměry objemu ku povrchu média jako v této práci. Nicméně byly zde opět testovány pouze dvě přírodní populace a musela by být provedena rozsáhlejší studie pro přesnější zhodnocení.

Pro měření přírůstků biomasy při této kultivaci bylo použito fotografování stélek a následná analýza obrazu v programu GIMP 2.10.24. Pro stanovení přírůstků biomasy ve venkovních nádržích se často používá spíše metoda měření mokré hmotnosti stélek, jak už bylo

zmíněno dříve, nicméně analýza obrazu je také využitelnou metodou pro pozorování růstu velkého množství řas. Díky analýze obrazu lze zjistit například maximální délka stélek a postranních větví, popřípadě celá plocha stélky (Haddad & Ormond, 1994). Jedná se o neinvazivní metodu, která umožňuje sledovat postupné přírůstky bez nutného zásahu do kultivačního média (Jiang & Nakano, 2021). Její nevýhodou nicméně může být vliv člověka při měření plochy v pixelech, kde může docházet k vynechání některých částí, popřípadě špatnému odhadu programu při označení barev, může také docházet k odrazům světla od skla kultivačních nádob při focení apod. Je tedy potřeba co nejlépe zajistit srovnatelné podmínky pro všechny vzorky a při měření volit vždy stejná nastavení. Nejdůležitější je zajistit vysoký kontrast měřené oblasti od pozadí (kultivační nádoby s médiem), aby bylo možné efektivně plochu změřit bez větších chyb (Oberholzer *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2009). Pro stanovení přibližných přírůstků biomasy řas rodu *Ulva* se metoda osvědčila jako relativně vhodná, bylo možné sledovat rozdíly ve velikosti stélek během celé doby kultivace, a to bez nutného zásahu do kultivačních nádob. Metoda by však pravděpodobně nebyla použitelná, pokud by byla stélka řasy v kultivační nádobě namnožena natolik, že by se jednotlivé stélky překrývaly ve více vrstvách nad sebou.

## 6. Závěr

V rámci diplomové práce byly izolovány dvě populace řas rodu *Ulva* s tubulární morfologií, a to z brakického a mořského prostředí. Brakická populace byla na základě morfologických znaků a lokality nálezu určena jako druh *Ulva flexuosa* a sladkovodní druh jako *Ulva pilifera*.

Následně byly obě populace podrobeny sérii experimentálních kultivací na gradientech salinity a teploty a v médiích s přidávaným chelatačním činidlem EDTA a pH pufrům HEPES s cílem zjistit optimální podmínky pro jejich kultivaci a pro znázornění dynamiky jejich růstu pomocí růstových křivek. U druhu *Ulva flexuosa* se ukázala jako nejvhodnější salinita cca 17,5 PSU, teplota 22 °C a médium bez přidaného chelatačního činidla a pH pufru. Pro druh *Ulva pilifera* byla stanovena optimální salinita cca 11 PSU, teplota 22 °C a médium pouze s přidaným chelatačním činidlem EDTA. Obecně ve všech experimentech dosahovala populace brakického druhu *Ulva flexuosa* vyšších růstových rychlostí a zdá se tedy vhodnějším druhem pro případnou další kultivaci, popřípadě i jako pravděpodobně vhodnější pro velkoplošné kultivace zacílené na kultivaci těchto řas pro využití v potravinářství. Obecně také obě populace vykazovaly víceméně velmi podobné výsledné optimální podmínky, tedy kultivace



sladkovodního druhu by pravděpodobně nebyla o tolik výhodnější ani z hlediska nákladů kultivace. Z ekofyziologického hlediska se ukázalo, že optimum salinitní niky obou studovaných populací leží ve vyšších úrovních, než jaké byly ty, z nichž byly populace izolovány v přírodě. Pro měření přírůstků byla testována neinvazivní metoda měření plochy stélek pomocí PAM fluorometru, která se zdá být vhodnou pro stanovení přibližných přírůstků během průběhu kultivace na tomto, popřípadě morfologicky podobném typu vláknitých řas.

Populace byly také kultivovány a sledovány během růstu ve větších objemech média pro lepší představu velkoplošných kultivací. V obou případech se jako nejvýhodnější ukázal největší objem kultivačního média, kde docházelo u obou populací k nejvyšším přírůstkům během průběhu celého experimentu. Stejně jako při kultivaci na gradientech podmínek se i zde jako výhodnější pro kultivaci ukázal druh *Ulva flexuosa*, u kterého docházelo k nejvyšším přírůstkům stélek a k nejvyšším finálním hodnotám biomasy. Výsledky měření byly nicméně nesignifikantní v případě kultivace obou populací a objem kultivačního média tedy má na růst těchto řas pravděpodobně zanedbatelný vliv. Z pozitivního hlediska to nicméně ukazuje, že ve větších objemech nebylo zaznamenáno žádné zpomalení růstu, které by mohlo být přičteno zastínění stélek mezi sebou navzájem.

Tato práce shrnuje optimální podmínky pro kultivaci vybraných tubulárních morfotypů rodu *Ulva* a nabízí novou metodu měření přírůstku stélek, která je neinvazivní a umožňuje sledovat dynamiku růstu těchto řas během celé doby kultivace. Práce se ale zaměřuje pouze na dvě izolované populace a pro lepší zhodnocení podmínek by bylo vhodné se v budoucnosti zaměřit například na zkřížené gradienty mezi testovanými podmínkami, kdy kombinace faktorů může vést ke změně vlivu některých z nich. Zároveň by bylo možné navázat na studii například testováním většího množství populací od brakických a sladkovodních zástupců, které by mohlo lépe nastínit efekt kultivačních podmínek na zástupce z konkrétního prostředí obecně.

Studované populace se nicméně ukázali jako nadějně na další kultivaci a můžeme předpokládat, že při kultivaci ve velkoplošných kultivacích by mohli mít velký potenciál, ačkoli se nepotvrdilo, že by zde testovaná sladkovodní populace byla výhodnější pro pěstování ve střeoevropských lokalitách, protože zjištěné nároky na kultivaci jsou téměř shodné jako u brakického zástupce.

## 7. Přílohy

**Příloha 1:** Naměřená data z PAM fluorometru pro stanovení růstových rychlostí 2 zkoumaných populací na gradientech podmínek. (Měření na PAM fluorometru – složka)

**Příloha 2:** Naměřená data pomocí analýzy obrazu použítá pro stanovení přírůstků biomasy ve vztahu k objemu kultivačního média. (Data analýza obrazu z venkovní kultivace.xlsx)

**Příloha 3:** Grafy lineární regrese pro data měřená na PAM fluorometru a pro data získaná při analýze obrazu u druhů *Ulva flexuosa* a *Ulva pilifera*. (Grafy lineární regrese pro data z PAM fluorometru a analýzy obrazu - složka)

Všechny přílohy lze najít na odkazu: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6472224>

## 8. Reference

Al-Hafedh, Y. S., Alam, A. and Buschmann, A. H. (2015) ‘Bioremediation potential, growth and biomass yield of the green seaweed, *Ulva lactuca* in an integrated marine aquaculture system at the Red Sea coast of Saudi Arabia at different stocking densities and effluent flow rates’, *Reviews in Aquaculture*, 7(3), pp. 161–171. doi: 10.1111/raq.12060.

Ale, M. T., Mikkelsen, J. D. and Meyer, A. S. (2011) ‘Differential growth response of *Ulva lactuca* to ammonium and nitrate assimilation’, *Journal of Applied Phycology*, 23(3), pp. 345–351. doi: 10.1007/s10811-010-9546-2.

Alves, A., Sousa, R. A. and Reis, R. L. (2013) ‘A practical perspective on ulvan extracted from green algae’, *Journal of Applied Phycology*, 25(2), pp. 407–424. doi: 10.1007/s10811-012-9875-4.

Andersen, R. A. (Ed.). (2005). ‘Algal culturing techniques’. London. *Elsevier*. ISBN: 0-12-088426-7

Arai, S. *et al.* (2009) ‘New species of freshwater *Ulva*, *Ulva limnetica* (Ulvales, Ulvophyceae) from the Ryukyu Islands, Japan’, *Phycological Research*, 57(2), pp. 94–103. doi: 10.1111/j.1440-1835.2009.00525.x.

Archibald, J.M., Simpson, A.G.B and Slamovits C.H. (2017): ‘Handbook of the Protists’. 2nd ed. Boston: *Springer, Cham*. doi: 10.1007/978-3-319-28149-0

Balar, N. B. and Mantri, V. A. (2020) ‘Insights into life cycle patterns, spore formation,

induction of reproduction, biochemical and molecular aspects of sporulation in green algal genus *Ulva*: implications for commercial cultivation', *Journal of Applied Phycology*, 32(1), pp. 473–484. doi: 10.1007/s10811-019-01959-7.

Balina, K. *et al.* (2017) 'Seaweed Cultivation Laboratory Testing: Effects of Nutrients on Growth Rate of *Ulva intestinalis*', *Energy Procedia*, 113, pp. 454–459. doi: 10.1016/j.egypro.2017.04.038.

Berges, J. A., Franklin, D. J. and Harrison, P. J. (2001) 'Evolution of an artificial seawater medium: Improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades', *Journal of Phycology*, 37(6), pp. 1138–1145. doi: 10.1046/j.1529-8817.2001.01052.x.

Bolton, J. J. *et al.* (2009) 'Growing *Ulva* (chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South africa: A swot analysis', *Journal of Applied Phycology*, 21(5), pp. 575–583. doi: 10.1007/s10811-008-9385-6.

Brundu, G. and Chindris, A. (2018) 'Nutrients uptake and growth of *Ulva lactuca* (Linnaeus, 1753) in grey mullet (*Mugil cephalus*) wastewater versus natural estuarine water', *Chemistry and Ecology*. Taylor & Francis, 34(6), pp. 495–505. doi: 10.1080/02757540.2018.1452918.

Carl, C., De Nys, R. and Paul, N. A. (2014) 'The seeding and cultivation of a tropical species of filamentous *Ulva* for algal biomass production', *PLoS ONE*, 9(6). doi: 10.1371/journal.pone.0098700.

Chakraborty, S. *et al.* (2014) 'Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment', *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier, 100(1), pp. 61–68. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.12.003.

Chemodanov, A. *et al.* (2019) 'Feasibility study of *Ulva* sp. (Chlorophyta) intensive cultivation in a coastal area of the Eastern Mediterranean Sea', *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(4), pp. 864–877. doi: 10.1002/bbb.1995.

Chemodanov, A., Robin, A. and Golberg, A. (2017) 'Design of marine macroalgae photobioreactor integrated into building to support seagrass agriculture for biorefinery and bioeconomy', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 241, pp. 1084–1093. doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.061.

- Cheng, J. *et al.* (2009) 'Application of connected morphological operators to image smoothing and edge detection of algae', *Proceedings - 2009 International Conference on Information Technology and Computer Science, ITCS 2009*. IEEE, 2, pp. 73–76. doi: 10.1109/ITCS.2009.153.
- Chisti, Y. (2007) 'Biodiesel from microalgae', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 25(3), pp. 294–306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.
- Cui, J. *et al.* (2018) 'Taxonomic reassessment of *Ulva prolifera* (Ulvophyceae, Chlorophyta) based on specimens from the type locality and Yellow Sea green tides', *Phycologia*, 57(6), pp. 692–704. doi: 10.2216/17-139.1.
- Daroch, M., Geng, S. and Wang, G. (2013) 'Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks', *Applied Energy*. Elsevier Ltd, 102, pp. 1371–1381. doi: 10.1016/j.apenergy.2012.07.031.
- Eggert, A. *et al.* (2006) 'Quantification of algal biofilms colonising building materials: Chlorophyll  $\alpha$  measured by PAM-fluorometry as a biomass parameter', *Biofouling*, 22(2), pp. 79–90. doi: 10.1080/08927010600579090.
- FAO (2018) 'The Global Status of Seaweed Production'. *Trade and Utilization*, Globefish Research Program, Volume 124.
- Figuerola, F. L., Jerez, C. G. and Korbee, N. (2013) 'Use of in vivo chlorophyll fluorescence to estimate photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture systems', *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(5), pp. 801–819. doi: 10.3856/vol41-issue5-fulltext-1.
- Fleurence, J. (1999) 'Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses', *Trends in Food Science and Technology*, 10(1), pp. 25–28. doi: 10.1016/S0924-2244(99)00015-1.
- Floreto, E. A. T., Teshima, S. and Ishikawa, M. (1996) 'Effects of nitrogen and phosphorus on the growth and fatty acid composition of *Ulva pertusa* kjellman (chlorophyta)', *Botanica Marina*, 39(1), pp. 69–74. doi: 10.1515/botm.1996.39.1-6.69.
- Gao, G. *et al.* (2016) 'Changes in morphological plasticity of *Ulva prolifera* under different environmental conditions: A laboratory experiment', *Harmful Algae*. Elsevier B.V., 59, pp. 51–

58. doi: 10.1016/j.hal.2016.09.004.

Gerringa, L. J. A., De Baar, H. J. W. and Timmermans, K. R. (2000) 'A comparison of iron limitation of phytoplankton in natural oceanic waters and laboratory media conditioned with edta', *Marine Chemistry*, 68(4), pp. 335–346. doi: 10.1016/S0304-4203(99)00092-4.

Haddad, A. and Ormond, R. (1994). 'Use of photography and image analysis for In situ monitoring of growth rates of intertidal fucoid algae'. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 74(3), 727-730. doi:10.1017/S0025315400047767

Haglund, K. and Pedersén, M. (1988) 'Spray cultivation of seaweeds in recirculating brackish water', *Aquaculture*, 72(1–2), pp. 181–189. doi: 10.1016/0044-8486(88)90158-5.

Hare, P. D., Cress, W. A. and Van Staden, J. (1999) 'Proline synthesis and degradation: A model system for elucidating stress-related signal transduction', *Journal of Experimental Botany*, 50(333), pp. 413–434. doi: 10.1093/jxb/50.333.413.

Hayden, H. S. *et al.* (2003) 'Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera', *European Journal of Phycology*, 38(3), pp. 277–294. doi: 10.1080/1364253031000136321.

Hiraoka, M. *et al.* (2003) 'Asexual life history by quadriflagellate swimmers of *Ulva spinulosa* (Ulvales, Ulvophyceae)', *Phycological Research*, 51(1), pp. 29–34. doi: 10.1046/j.1440-1835.2003.00290.x.

Hiraoka, M. and Oka, N. (2008) 'Tank cultivation of *Ulva prolifera* in deep seawater using a new "germling cluster" method', *Journal of Applied Phycology*, 20(1), pp. 97–102. doi: 10.1007/s10811-007-9186-3.

Ichihara, K., Miyaji, K. and Shimada, S. (2013) 'Comparing the low-salinity tolerance of *Ulva* species distributed in different environments', *Phycological Research*, 61(1), pp. 52–57. doi: 10.1111/j.1440-1835.2012.00668.x.

Iijima, H. *et al.* (2015) 'Seawater cultivation of freshwater cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 drastically alters amino acid composition and glycogen metabolism', *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2015.00326.

Imai, M., Katayama, N. and Yamaguchi, Y. (1997) 'Effects of salinity on growth, photosynthesis and respiration in a freshwater alga *Rhizoclonium riparium*', *Phycological*

*Research*, pp. 233–237.

Ireland, C. (2008) ‘Morphology , rbcL phylogeny and distribution of distromatic *Ulva*’, *Phycologia*, 47(July), pp. 416–429. doi: 10.2216/07-61.1.

Jensen, A. (1993) ‘Present and future needs for algae and algal products’, *Hydrobiologia*, 260–261(1), pp. 15–23. doi: 10.1007/BF00048998.

Jiang, M. and Nakano, S. ichi (2021) ‘Application of image analysis for algal biomass quantification: a low-cost and non-destructive method based on HSI color space’, *Journal of Applied Phycology*. Springer Netherlands, 33(6), pp. 3709–3717. doi: 10.1007/s10811-021-02571-4.

Juneau, P., Green, B. R. and Harrison, P. J. (2005) ‘Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects’, *Photosynthetica*, 43(1), pp. 75–83. doi: 10.1007/s11099-005-5083-7.

Kaeffer, B., Lahaye, M. and Cherbut, C. (1999) ‘Biological Properties of Ulvan, a New Source of Green Seaweed Sulfated Polysaccharides, on Cultured Normal and Cancerous Colonic Epithelial Cells’, *Planta Medica*, (12), pp. 527–531. doi: 10.1055/s-1999-14009.

Kakinuma, M. *et al.* (2006) ‘Physiological and biochemical responses to thermal and salinity stresses in a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta)’, *Marine Biology*, 149(1), pp. 97–106. doi: 10.1007/s00227-005-0215-y.

Kalita, T. L. and Tytlianov, E. A. (2003) ‘Effect of temperature and illumination on growth and reproduction of the green alga *Ulva fenestrata*’, *Russian Journal of Marine Biology*, 29(5), pp. 316–322. doi: 10.1023/A:1026361627982.

Kaprálek, F. (1999) ‘Základy bakteriologie’, 1st ed, Praha, nakladatelství *Karolinum*, ISBN: 80-7184-811-5

Kerrison, P. D. *et al.* (2015) ‘The cultivation of European kelp for bioenergy: Site and species selection’, *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, 80(0), pp. 229–242. doi: 10.1016/j.biombioe.2015.04.035.

Kim, J. H. *et al.* (2011) ‘Effects of temperature and irradiance on photosynthesis and growth of a green-tide-forming species (*Ulva linza*) in the Yellow Sea’, *Journal of Applied Phycology*, 23(3), pp. 421–432. doi: 10.1007/s10811-010-9590-y.

- Kirst, G. O. (1990) 'Salinity tolerance of eukaryotic marine algae', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41(1), pp. 21–53. doi:10.1146/annurev.pp.41.060190.000321.
- Lawton, R. J. *et al.* (2013) 'Algal Bioremediation of Waste Waters from Land-Based Aquaculture Using *Ulva*: Selecting Target Species and Strains', *Plos One*, 8(10). doi: 10.1371/journal.pone.0077344.
- Lawton, R. J. *et al.* (2021a) 'Selection of temperate *Ulva* species and cultivars for land-based cultivation and biomass applications', *Algal Research*. Elsevier B.V., 56(January), p. 102320. doi: 10.1016/j.algal.2021.102320.
- Lawton, R. J. *et al.* (2021b) 'Selection of temperate *Ulva* species and cultivars for land-based cultivation and biomass applications', *Algal Research*. Elsevier B.V., 56(April), p. 102320. doi: 10.1016/j.algal.2021.102320.
- Lebeau, T. and Robert, J. M. (2003) 'Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(6), pp. 612–623. doi: 10.1007/s00253-002-1176-4.
- Lee, J. E. and Kang, J. W. (2020) 'The interactive effects of elevated temperature and nutrient concentrations on the physiological responses of *Ulva linza* Linnaeus (Ulvales, Chlorophyta)', *Journal of Applied Phycology*. *Journal of Applied Phycology*, 32(4), pp. 2459–2467. doi: 10.1007/s10811-019-02031-0.
- Lewin, J. (1966) 'Silicon Metabolism in Diatoms. V. Germanium Dioxide, a Specific Inhibitor of Diatom Growth', *Phycologia*, 6(1), pp. 1–12. doi: 10.2216/i0031-8884-6-1-1.1.
- Li, J., Kangas, P. and Terlizzi, D. E. (2014) 'A Simple Cultivation Method for Chesapeake Bay *Ulva intestinalis* for Algal Seed Stock', *North American Journal of Aquaculture*, 76(2), pp. 127–129. doi: 10.1080/15222055.2013.869287.
- Li, Y. H. *et al.* (2017) 'Physiological responses of a green algae (*Ulva prolifera*) exposed to simulated acid rain and decreased salinity', *Photosynthetica*, 55(4), pp. 623–629. doi: 10.1007/s11099-017-0689-0.
- Liu, C. H., Shih, M. C. and Lee, T. M. (2000) 'Free proline levels in *Ulva* (Chlorophyta) in response to hypersalinity: Elevated NaCl in seawater versus concentrated seawater', *Journal of Phycology*, 36(1), pp. 118–119. doi: 10.1046/j.1529-8817.2000.99127.x.

- Liu, F. *et al.* (2010) 'The dominant *Ulva* strain of the 2008 green algal bloom in the Yellow Sea was not detected in the coastal waters of Qingdao in the following winter', *Journal of Applied Phycology*, 22(5), pp. 531–540. doi: 10.1007/s10811-009-9489-7.
- Lu, I. F., Sung, M. S. and Lee, T. M. (2006) 'Salinity stress and hydrogen peroxide regulation of antioxidant defense system in *Ulva fasciata*', *Marine Biology*, 150(1), pp. 1–15. doi: 10.1007/s00227-006-0323-3.
- Luo, M. B. and Liu, F. (2011) 'Salinity-induced oxidative stress and regulation of antioxidant defense system in the marine macroalga *Ulva prolifera*', *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Elsevier B.V., 409(1–2), pp. 223–228. doi: 10.1016/j.jembe.2011.08.023.
- MacArtain, P. *et al.* (2007) 'Special Article Nutritional Value of Edible Seaweeds', *Nutrition Reviews*, 65(12), pp. 535–543. doi: 10.1301/nr.2007.dec.535.
- Mantri, V. A. *et al.* (2011) 'Differential response of varying salinity and temperature on zoospore induction, regeneration and daily growth rate in *Ulva fasciata* (Chlorophyta, Ulvales)', *Journal of Applied Phycology*, 23(2), pp. 243–250. doi: 10.1007/s10811-010-9544-4.
- Mareš, J. *et al.* (2011) 'True identity of the european freshwater *Ulva* (Chlorophyta, Ulvophyceae) revealed by a combined molecular and morphological approach', *Journal of Phycology*, 47(5), pp. 1177–1192. doi: 10.1111/j.1529-8817.2011.01048.x.
- Mata, L. *et al.* (2016) 'The intensive land-based production of the green seaweeds *Derbesia tenuissima* and *Ulva ohnoi*: biomass and bioproducts', *Journal of Applied Phycology*, 28(1), pp. 365–375. doi: 10.1007/s10811-015-0561-1.
- Mcfadden, G.I. and Melkonian, M. (1986) 'Use of HEPES buffer for micro algal culture media and fixation for electron microscopy', *Phycologia*, 25(4), pp. 551–557. doi: 10.2216/i0031-8884-25-4-551.1
- McLachlan, J. (1963) 'Some Effects of Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane on the Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow', *Canadian Journal of Botany*, 41(1), pp. 35–40. doi: 10.1139/b63-004.
- Mellado, M. *et al.* (2012) 'Copper-induced synthesis of ascorbate, glutathione and phytochelatin in the marine alga *Ulva compressa* (Chlorophyta)', *Plant Physiology and*



*Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 51, pp. 102–108. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.10.007.

Messyasz, B. and Rybak, A. (2011) ‘Abiotic factors affecting the development of *Ulva* sp. (Ulvophyceae; Chlorophyta) in freshwater ecosystems’, *Aquatic Ecology*, 45(1), pp. 75–87. doi: 10.1007/s10452-010-9333-9.

Moll B. and Deikman J. (1995) ‘*Enteromorpha clathrata*: A potential seawater-irrigated crop’, *Bioresource Technology*, Volume 52, Issue 3, Pages 255-260, ISSN 0960-8524, doi: 10.1016/0960-8524(95)00036-E.

Msuya, F. E. and Neori, A. (2010) ‘The performance of spray-irrigated *Ulva lactuca* (Ulvophyceae, chlorophyta) as a crop and as a biofilter of fishpond effluents’, *Journal of Phycology*, 46(4), pp. 813–817. doi: 10.1111/j.1529-8817.2010.00843.x.

Murthy, M. S. and Sharma, C. L. N. S. (1989) ‘Peroxidase Activity in *Ulva lactuca* under Desiccation’, *Botanica Marina*, 32(6), pp. 511–514. doi: 10.1515/botm.1989.32.6.511.

Navarrete, A. *et al.* (2019) ‘Copper excess detoxification is mediated by a coordinated and complementary induction of glutathione, phytochelatins and metallothioneins in the green seaweed *Ulva compressa*’, *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier, 135(November 2018), pp. 423–431. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.11.019.

Neori, A. *et al.* (2004) ‘Integrated aquaculture: Rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture’, *Aquaculture*, 231(1–4), pp. 361–391. doi: 10.1016/j.aquaculture.2003.11.015.

Neori, A. *et al.* (2020) ‘The suitability of *Ulva fasciata*, *Ulva compressa*, and *Hypnea musciformis* for production in an outdoor spray cultivation system, with respect to biomass yield and protein content’, *Journal of Applied Phycology*, 32(5), pp. 3183–3197. doi: 10.1007/s10811-020-02130-3.

Oberholzer, M. *et al.* (1996) ‘Methods in quantitative image analysis’, *Histochemistry and Cell Biology*, 105(5), pp. 333–355. doi: 10.1007/BF01463655.

Pellizzari, F., Oliveira, E. C. and Yokoya, N. S. (2008) ‘Life-history, thallus ontogeny, and the effects of temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from Southern Brazil’, *Journal of Applied Phycology*, 20(1), pp. 75–82. doi: 10.1007/s10811-007-9183-6.

- Prabhu, M. *et al.* (2019) ‘Starch from the sea: The green macroalga *Ulva ohnoi* as a potential source for sustainable starch production in the marine biorefinery’, *Algal Research*. Elsevier, 37(November 2018), pp. 215–227. doi: 10.1016/j.algal.2018.11.007.
- Price, N. M. *et al.* (1989) ‘Preparation and Chemistry of the Artificial Algal Culture Medium Aquil’, *Biological Oceanography*, 6(5–6), pp. 443–461. doi: 10.1080/01965581.1988.10749544.
- Provasoli, L., McLaughlin, J. J. A. and Droop, M. R. (1957) ‘The development of artificial media for marine algae’, *Archiv für Mikrobiologie*, 25(4), pp. 392–428. doi: 10.1007/BF00446694.
- Qarri, A. and Israel, A. (2020) ‘Seasonal biomass production, fermentable saccharification and potential ethanol yields in the marine macroalga *Ulva* sp. (Chlorophyta)’, *Renewable Energy*. Elsevier Ltd, 145, pp. 2101–2107. doi: 10.1016/j.renene.2019.07.155.
- Rahikainen, M. and Yang, B. (2020) ‘Macroalgae as food and feed ingredients in the Baltic Sea region – regulation by the European Union’, pp. 1–20.
- Rasmussen, M. B. *et al.* (2011) ‘Cultivation of *Ulva lactuca* with manure for simultaneous bioremediation and biomass production’, *Journal of Applied Phycology*, 24(3), pp. 449–458. doi: 10.1007/s10811-011-9767-z.
- Rindi, F., Boedeker, C., Leliaert, F. and Škaloud, P. (2018): ‘Freshwater Flora of Central Europe, Chlorophyta: Ulvophyceae (Süßwasserflora von Mitteleuropa, Chlorophyta: Ulvophyceae)’. 13th ed. Berlin: Springer Spektrum.
- Roháček, K. and Barták, M. (1999) ‘Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: Basic concepts, useful parameters, and some applications’, *Photosynthetica*, pp. 339–363. doi: 10.1023/A:1007172424619.
- Ruangchuay, R. *et al.* (2012) ‘Effects of culture conditions on the growth and reproduction of Gut Weed, *Ulva intestinalis* Linnaeus (Ulvales, Chlorophyta)’, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 34(5), pp. 501–507.
- Rybak, A. *et al.* (2014) ‘*Ulva flexuosa* (Ulvaceae, Chlorophyta) inhabiting inland aquatic ecosystems: molecular, morphological and ecological discrimination of subspecies’, *European Journal of Phycology*. Taylor & Francis, 49(4), pp. 471–485. doi:

10.1080/09670262.2014.976662.

Rybak A.S. (2015) 'Revision of herbarium specimens of freshwater *Enteromorpha*-like *Ulva* (Ulvaceae, Chlorophyta) collected from Central Europe during the years 1849–1959', *Phytotaxa*, 218(1), pp. 1–29. doi: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.218.1.1>.

Rybak, A.S. and Czerwoniec, A. (2015) 'Differentiation of inland *Ulva flexuosa* Wulfen (Ulvaceae, Chlorophyta) from Western Poland' *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 44(3), 393-409. doi: 10.1515/ohs-2015-0037

Rybak, A.S. (2018) 'Species of *Ulva* (Ulvophyceae, Chlorophyta) as indicators of salinity', *Ecological Indicators*. Elsevier, 85(October 2017), pp. 253–261. doi: 10.1016/j.ecolind.2017.10.061.

Rybak, A.S. (2018) 'The *Ulva flexuosa* complex (Ulvaceae, Chlorophyta): an updated identification key with special reference to the freshwater and hyperhaline taxa', 345(2), pp. 83–103. doi: 10.11646/phytotaxa.345.2.1

Rybak, A. S. (2021) 'Freshwater macroalga, *Ulva pilifera* (Ulvaceae, Chlorophyta) as an indicator of the trophic state of waters for small water bodies', *Ecological Indicators*. Elsevier, 121(September 2020), p. 106951. doi: 10.1016/j.ecolind.2020.106951.

Rybak, A. S. and Gąbka, M. (2018) 'The influence of abiotic factors on the bloom-forming alga *Ulva flexuosa* (Ulvaceae, Chlorophyta): possibilities for the control of the green tides in freshwater ecosystems', *Journal of Applied Phycology*, 30(2), pp. 1405–1416. doi: 10.1007/s10811-017-1301-5.

Sauvage, J. *et al.* (2021) 'Biodegradable, metal-chelating compounds as alternatives to EDTA for cultivation of marine microalgae', *Journal of Applied Phycology*. Springer Netherlands, (0123456789). doi: 10.1007/s10811-021-02583-0.

Smetacek, V. and Zingone, A. (2013a) 'Green and golden seaweed tides on the rise', *Nature*, 504(7478), pp. 84–88. doi: 10.1038/nature12860.

Smetacek, V. and Zingone, A. (2013b) 'Green and golden seaweed tides on the rise', *Nature*, 504(7478), pp. 84–88. doi: 10.1038/nature12860.

Smith, R. V. and Foy, R. H. (1974) 'Improved hydrogen ion buffering of media for the culture of freshwater algae', *British Phycological Journal*, 9(3), pp. 239–245. doi:

10.1080/00071617400650271.

Spencer, C. P. (1958) 'The chemistry of ethylenediamine tetra-acetic acid in sea water', *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 37(1), pp. 127–144. doi: 10.1017/S0025315400014880.

Steinbruch, E. *et al.* (2020) 'Hydrothermal processing of a green seaweed *Ulva* sp. for the production of monosaccharides, polyhydroxyalkanoates, and hydrochar', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 318(September). doi: 10.1016/j.biortech.2020.124263.

Steinhagen, S., Weinberger, F. and Karez, R. (2019) 'Molecular analysis of *Ulva compressa* (Chlorophyta, Ulvales) reveals its morphological plasticity, distribution and potential invasiveness on German North Sea and Baltic Sea coasts', *European Journal of Phycology*. Taylor & Francis, 54(1), pp. 102–114. doi: 10.1080/09670262.2018.1513167.

Tabarsa, M. *et al.* (2012) 'Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(12), pp. 2500–2506. doi: 10.1002/jsfa.5659.

Taylor, R., Fletcher, R. L. and Raven, J. A. (2001) 'Preliminary studies on the growth of selected "green tide" algae in laboratory culture: Effects of irradiance, temperature, salinity and nutrients on growth rate', *Botanica Marina*, 44(4), pp. 327–336. doi: 10.1515/BOT.2001.042.

Wang, R. *et al.* (2012) 'Allelopathic growth inhibition of *Heterosigma akashiwo* by the three *Ulva* species (*Ulva Pertusa*, *Ulva Linza*, *Enteromorpha intestinalis*) under laboratory conditions', *Acta Oceanologica Sinica*, 31(3), pp. 138–144. doi: 10.1007/s13131-012-0214-z.

Wei, N., Quarterman, J. and Jin, Y. S. (2013a) 'Marine macroalgae: An untapped resource for producing fuels and chemicals', *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 31(2), pp. 70–77. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.009.

Wei, N., Quarterman, J. and Jin, Y. S. (2013b) 'Marine macroalgae: An untapped resource for producing fuels and chemicals', *Trends in Biotechnology*, 31(2), pp. 70–77. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.10.009.

White, S., Anandraj, A. and Bux, F. (2011) 'PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 102(2), pp. 1675–1682. doi: 10.1016/j.biortech.2010.09.097.

- Wichard, T. (2015) 'Exploring bacteria-induced growth and morphogenesis in the green macroalga order Ulvales (Chlorophyta)', *Frontiers in Plant Science*, 6(March), pp. 1–19. doi: 10.3389/fpls.2015.00086.
- Wichard, T. *et al.* (2015) 'The green seaweed *Ulva*: a model system to study morphogenesis', *Frontiers in Plant Science*, 6(February), pp. 1–8. doi: 10.3389/fpls.2015.00072.
- Xia, J., Li, Y. and Zou, D. (2004) 'Effects of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements', *Aquatic Botany*, 80(2), pp. 129–137. doi: 10.1016/j.aquabot.2004.07.006.
- Xu, D. *et al.* (2016) 'Responses of photosynthesis and nitrogen assimilation in the green-tide macroalga *Ulva prolifera* to desiccation', *Marine Biology*. Springer Berlin Heidelberg, 163(1), pp. 1–8. doi: 10.1007/s00227-015-2806-6.
- Xu, J. *et al.* (2012) 'Evidence of coexistence of C3 and C4 photosynthetic pathways in a green-tide-forming alga, *ulva prolifera*', *PLoS ONE*, 7(5), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0037438.
- Yokoyama, H. and Ishihi, Y. (2010) 'Bioindicator and biofilter function of *Ulva* spp. (Chlorophyta) for dissolved inorganic nitrogen discharged from a coastal fish farm - potential role in integrated multi-trophic aquaculture', *Aquaculture*. Elsevier B.V., 310(1–2), pp. 74–83. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.10.018.