

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie



Diverzita anaerobních nálevníků
Diversity of anaerobic ciliates

Bc. Ludmila Nováková

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha, 2011

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, 26. 08. 2011

Ludmila Nováková

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Ivanu Čepičkovi, Ph. D. za pomoc a užitečné rady při psaní mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Elišce Ptáčkové a Mgr. Pavle Smejkalové za pomoc a připomínky k této práci, lidem z laboratoře za vytvoření příjemné atmosféry na pracovním prostředí a všem sběračům materiálu, protože bez nich by tato práce nemohla vzniknout. V neposlední řadě chci poděkovat svým rodičům za to, že mě celou dobu podporovali.

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract	7
1. Úvod a cíle	8
2. Literární přehled	9
2.1. Obecná charakterizace nálevníků.....	9
2.2. Systém a fylogeneze nálevníků	12
2.3. Anaerobní nálevníci	17
2.3.1. Třída Armophorea	17
2.3.2. Třída Litostomatea.....	18
2.3.3. Třída Plagiopylea	19
2.3.4. Třída Oligohymenophorea	20
2.3.5. Třída Prostomatea.....	21
2.4. Ekologie anaerobních nálevníků.....	24
2.4.1. Volně žijící anaerobní nálevníci	24
2.4.2. Nálevníci gastrointestinálního traktu	25
2.4.3. <i>Balantidium coli</i> jako patogen	26
2.5. Hydrogenosom	28
2.5.1. Hydrogenosom nálevníka druhu <i>Nyctotherus ovalis</i>	28
2.6. Metanogenní endosymbionti	30
3. Materiál a metody	33
3.1. Kultivace anaerobních nálevníků a získávání nových izolátů	33
3.1.1. Složení a příprava používaných médií	33
3.1.2. Příprava umělého anaerobního prostředí.....	34
3.1.3. Získávání nových izolátů	34
3.1.4. Kultivace anaerobních nálevníků	35
3.2. Izolace DNA	35
3.3. Amplifikace a elektroforéza DNA.....	35
3.3.1. Amplifikace DNA	35
3.3.2. Elektroforéza amplifikované DNA	36
3.4. Purifikace PCR produktů.....	36
3.5. Klonování	37
3.5.1. Příprava ligační směsi	37

3.5.2. Příprava bakteriálních kolonií	37
3.5.3. Příprava směsi na potírání Petriho misek.....	38
3.5.4. Colony PCR	38
3.5.5. Izolace plasmidů	39
3.6. Sekvence DNA	40
3.7. Vyhodnocování sekvencí a fylogenetická analýza	40
3.7.1. Tvorba a úprava alignmentu	40
3.7.2. Tvorba fylogenetických stromů	41
3.8. Morfologie	41
4. Výsledky	42
4.1. Izoláty	42
4.2. Fylogenetická analýza	44
4.2.1. Třída Armophorea	44
4.2.2. Třída Plagiopylea	47
4.2.3. Rod <i>Cyclidium</i>	49
4.2.4. LIVADIAN.....	51
4.3. Ostatní nálevníci	53
4.4. Morfologie	54
5. Diskuse.....	61
5.1. Kultivace	61
5.2. Diverzita anaerobních nálevníků	62
5.2.1. Třída Armophorea	62
5.2.2. Třída Plagiopylea	64
5.2.3. Rod <i>Cyclidium</i>	65
5.2.4. LIVADIAN.....	66
5.4. Morfologie	68
6. Závěrečné shrnutí.....	69
7. Seznam literatury	70

Abstrakt

Nálevníci (Ciliata) jsou jednobuněčné eukaryotické organismy patřící do skupiny Alveolata. Dělí se na jedenáct tříd. Z toho se anaerobní/mikroaerofilní zástupci nacházejí ve třídách Armophorea, Litostomatea, Plagiopylea, Oligohymenophorea a Prostomatea. Anaerobní nálevníci mají mitochondrii redukovánou na hydrogenosom. V jejich cytoplasmě je okolo hydrogenosomů přítomno velké množství metanogenních symbiontů. Anaerobní nálevníci jsou významní producenti metanu a jsou jak volně žijící, tak endobiotičtí (komezálové, mutualisti či paraziti v zažívacím traktu mnohých živočichů včetně člověka).

Podle dosud publikovaných studií se dá usuzovat, že diverzita anaerobních nálevníků je malá. Je to dáno tím, že se do fylogenetických studií zařazují pouze sekvence určených nálevníků a vynechávají se environmentální sekvence. Cílem této práce bylo získat sekvenční data co nejvíce volně žijících anaerobních nálevníků. Dohromady byly získány sekvence SSU rDNA 32 izolátů sladkovodních i mořských anaerobních nálevníků. Fylogenetická analýza ukázala, že většina jich patří do tříd Armophorea, Plagiopylea a Oligohymenophorea, kde tvoří několik samostatných fylogenetických linií. Kmen LIVADIAN společně s rody *Paraspathidium*, *Askenasia*, *Urotricha*, *Cryptocaryon* a nekultivovanými nálevníky náleží do třídy Prostomatea a nachází se v blízkosti třídy Plagiopylea. Třída Plagiopylea bude nejspíš také patřit do třídy Prostomatea a nebude tak dále tvořit samostatnou třídu nálevníků.

Klíčová slova: anaerobióza; Armophorea; hydrogenosom; metanogenní symbionti; nálevníci; Oligohymenophorea; Plagiopylea; Prostomatea; SSU rDNA

Abstract

Ciliates (Ciliata) are single-celled eukaryotic organisms belonging to the large group Alveolata. Ciliates are classified to eleven classes. Anaerobic/microaerophilic representatives belong to classes Armophorea, Litostomatea, Plagiopylea, Oligohymenophorea, and Prostomatea. The mitochondrion of the anaerobic ciliates has been transformed to hydrogenosome. The anaerobic ciliates are characteristic for the presence of methanogenic symbionts in the cytoplasm near hydrogenosomes. Anaerobic flagellates are free-living or they live as commensals, mutualists or parasites in the digestive tract of animals including humans.

The true diversity of anaerobic ciliates is still not fully understood. The reason is that only sequences of described ciliate species are usually included into phylogenetic analyses. However, many environmental sequences representing considerable part of known molecular diversity of ciliates have been published as well. The aim of this work was to obtain and analyze sequence data of anaerobic free-living ciliates. We have determined SSU rDNA sequences of 32 different freshwater and marine strains of ciliates. Phylogenetic analyses showed that the strains belonged mostly to the classes Armophorea, Plagiopylea and Oligohymenophorea. The strain LIVADIAN belonged, together with genera *Paraspathidium*, *Askenasia*, *Urotricha*, *Cryptocaryon*, and several environmental sequences, to the class Prostomatea. Our data also suggested that the Plagiopylea likely belongs to the class Prostomatea as well, instead of representing an independent ciliate class.

Key words: anaerobiosis; Armophorea; ciliates; hydrogenosome; methanogenic symbionts; Oligohymenophorea, Plagiopylea, Prostomatea, SSU rDNA

1. Úvod a cíle

Nálevníci (Ciliophora) jsou jednou z nejznámějších skupin prvoků. Do dnešní doby jich bylo popsáno něco okolo 3500 druhů, ale očekává se, že jich ve skutečnosti existuje až 30 000 druhů. Většina nálevníků žije volně ve vodě nebo ve vlhkém prostředí, kde se živí bakteriemi. Díky tomu přispívají k regulaci početního stavu bakterií v přírodě a jsou důležitými indikátory organického znečištění vody. Podle přítomnosti určitých druhů nálevníků můžeme odhadnout stupeň znečištění. Dále byly popsány druhy nálevníků, které žijí v zažívacím traktu mnohých skupin živočichů. Většina těchto endosymbiotických druhů jsou mutualisté nebo komenzálové a svým hostitelům nezpůsobují žádné zdravotní obtíže. Na rozdíl od těchto neškodných nálevníků známe i některé druhy, které mohou výrazně poškozovat své hostitele. Mezi nejznámější patogeny patří *Ichthyophthirius multifiliis* a *Balantidium coli*.

Anaerobní nálevníci mohou žít pouze v prostředí, kde se nevyskytuje kyslík nebo je ho tam velmi málo. Byl u nich objeven hydrogenosom, anaerobní derivát mitochondrie, jehož metabolickým produktem je mimo jiné vodík. Předpokládá se, že společný předek všech nálevníků byl původně aerobní a k přechodu na anaerobní způsob života došlo během evoluce nejméně čtyřikrát. Anaerobní nálevníky nalezneme v třídách Armophorea, Litostomatea, Plagiopylea, Prostomatea a Oligohymenophorea. Do dnešní doby stále převládá názor, že diverzita těchto organismů je nízká. My si myslíme pravý opak, proto jsme se zaměřili na studium diverzity anaerobních nálevníků.

Cíle diplomové práce:

1. Kultivace izolátů anaerobních nálevníků získaných ze sbírek na PřF UK.
2. Získat vlastní kultury různých skupin anaerobních nálevníků.
3. Určit sekvence genu pro SSU rRNA co nejvíce izolátů anaerobních nálevníků a provést fylogenetické analýzy.
4. Prozkoumat molekulární a morfologickou diverzitu jednotlivých izolátů.

2. Literární přehled

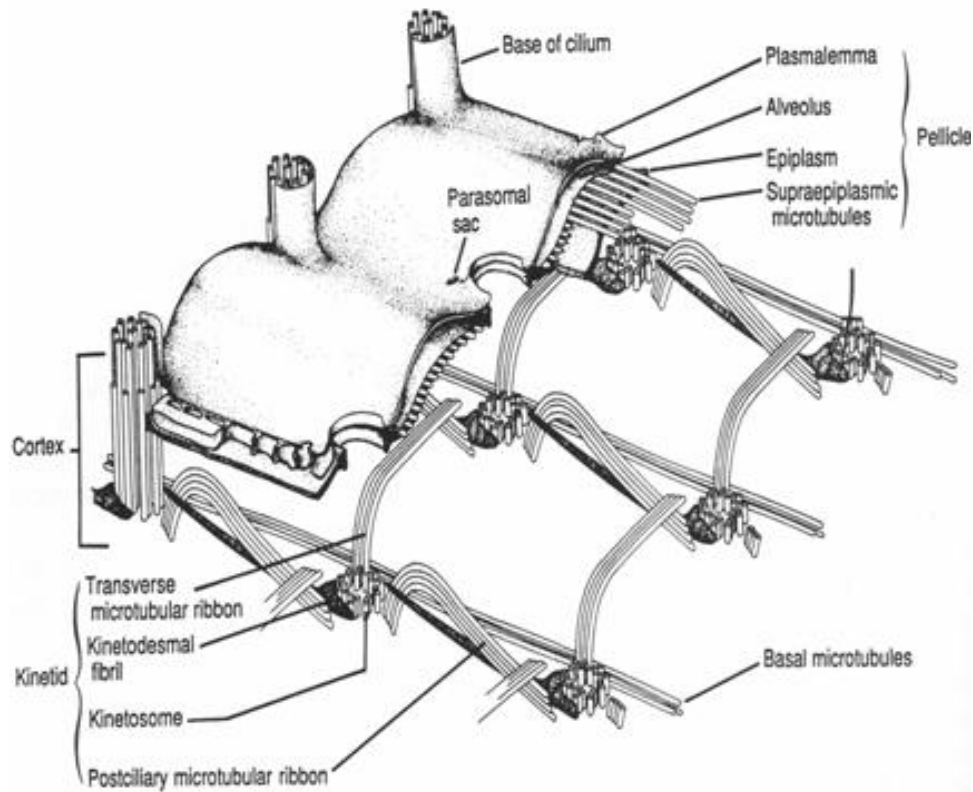
2.1. Obecná charakterizace nálevníků

Nálevníci (Ciliophora) společně s výtrusovci (Apicomplexa), obrněnkami (Dinoflagellata) a malými skupinami Perkinsea, Chromerida a Colpodellidae náleží do jedné velké skupiny Alveolata (Fast *et al.* 2002; Leander a Keeling 2003; Mylnikov 2009; Weatherby *et al.* 2011). Její název vychází z toho, že výše zmíněné kmeny mají pod plazmalemou systém kortikálních alveolů. Alveoly dodávají buňce pevnost a pružnost a také zajišťují stabilitu jejího povrchu (Fast *et al.* 2002). U nálevníků zde dále probíhá regulace obsahu vápníku v buňce (Plattner a Klauke 2001). Někdy mohou být v alveolech bílkovinné (např. u rodu *Euplotes*) nebo zvápenaté polysacharidové pláty (např. u rodu *Coleps*), které kortikální vrstvu zpevňují (Lynn a Small 2002).

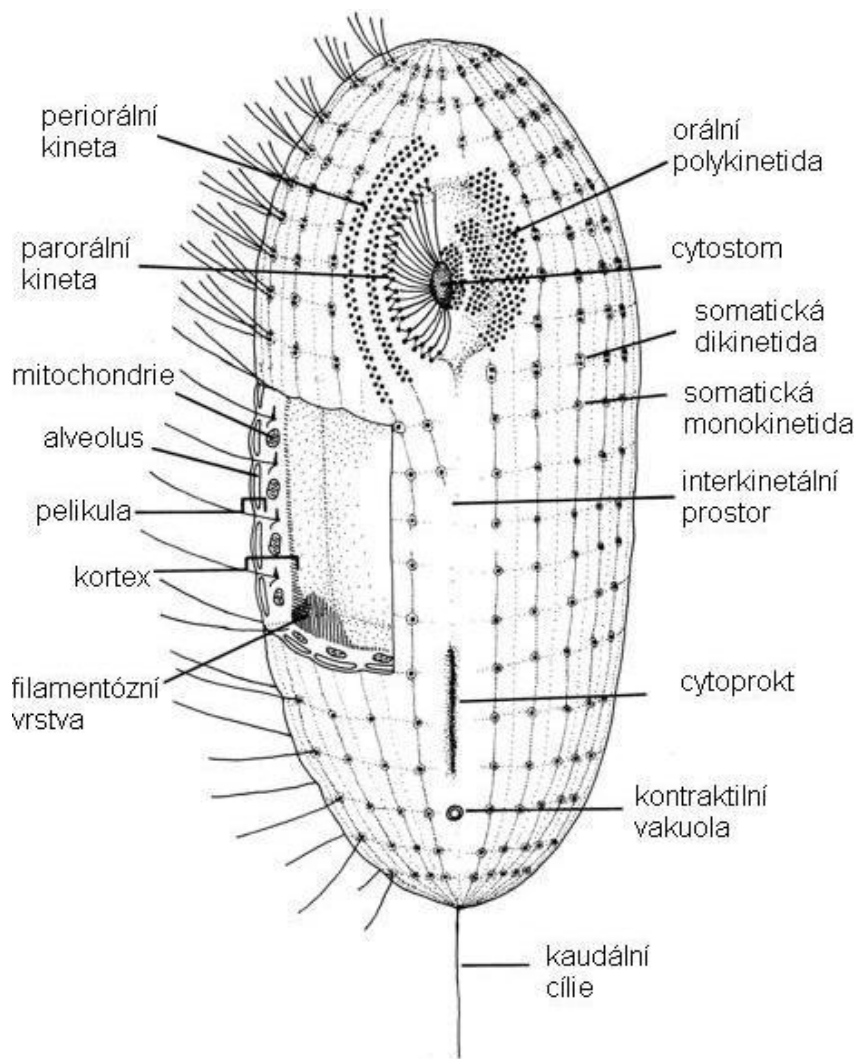
Skupina nálevníků je charakterizována především třemi hlavními rysy. Jsou to specifická stavba kortexu, přítomnost dvou typů jader a konjugace (typ pohlavního rozmnožování).

Kortex (viz obr. 1) je 1 – 4 μm silná podpovrchová vrstva, která pomáhá udržovat relativně stálý tvar těla. Skládá se ze dvou částí: z pelikuly a z infraciliatury tvořené cytoskeletem asociovaným s bazálními tělísky bičíků (kinetidovými kořeny). Základní složkou infraciliatury jsou kinetidy, které se skládají z bazálních tělísek bičíků (kinetosomů) a z několika přidružených kořenových struktur. Kinetosomy většinou nesou bičík a jsou navzájem propojeny bazálními mikrotubulárními pásy. Kinetida může mít buď jedno bazální tělísko (monokinetida), dvě bazální tělíska (dikinetida) či více bazálních tělísek (polykinetida). Přidružené kořenové struktury tvoří kinetodesmální fibrily a dva mikrotubulární pásy (transverzální a postciliární). Podle umístění na buňce nálevníka a funkce můžeme rozlišit ciliaturu dvojího typu: somatickou (pohybová a senzorická funkce) a orální (získávání a zpracování potravy). Somatická ciliatura bývá složena z monokinetid, dikinetid nebo polykinetid. Obvykle se vyskytuje na celém povrchu těla kromě ústního otvoru. Tyto kinetidy jsou uspořádány do podélných pásů, kinet. Ty vedou od předního konce k zadnímu. Kinetidy se mohou na pravé a levé straně sbíhat a vytvářet suturu, která je buď perorální, nebo postorální. Jedná se o dlouhou mezeru v celistvém uspořádání kortexu a probíhá zde příjem a výdej látek. V některých případech mohou být polykinetidy umístěny těsně u sebe a jejich bičíky mohou vytvářet círy, struktury sloužící ke kráčivému pohybu. Orální ciliatura je také tvořena monokinetidami, dikinetidami nebo polykinetidami. Orální kinetidy jsou navzájem spojeny mikrotubuly a mikrofilamenty a společně s cytostomem a cytofaryngem vytváří

orální aparát. Pomocí cytostomu, který je umístěn apikálně nebo ventrálně, přijímají nálevníci potravu. Ta poté putuje přes cytofarynx do potravní vakuoly, v níž dojde k jejímu zpracování. Zbytky nestrávené potravy pak putují ven cytoproctem (Lynn a Small 2002; obr. 2). V některých případech mohou cilie vytvářet jednotky rozprostřené do plochy, tzv. membranely. Ty nálevníkovy slouží k zajištění víření částeczek potravy (Lynn a Small 2002).



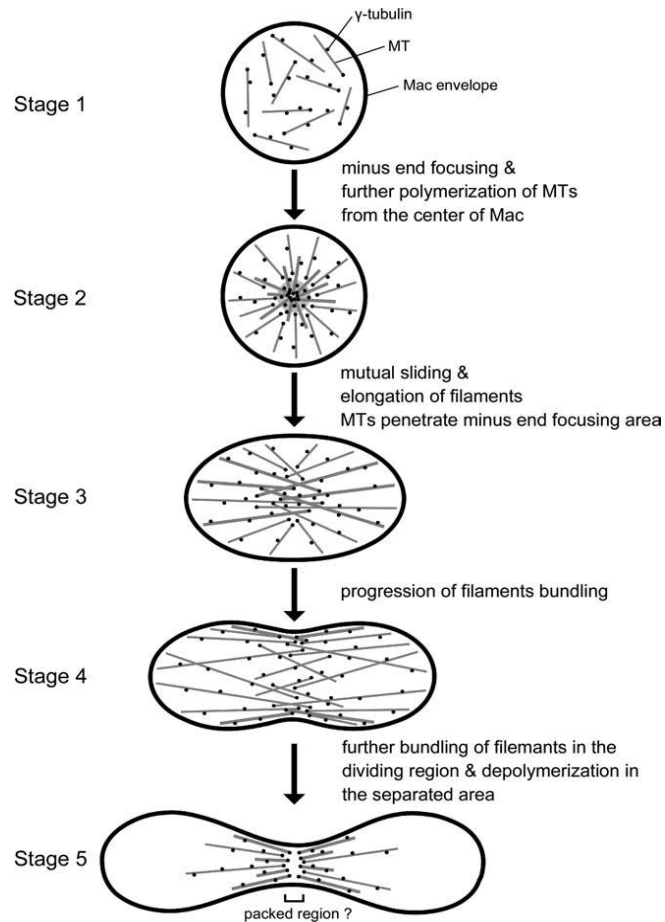
Obr. 1. Schéma ultrastruktury kortexu typického nálevníka (podle Lynn a Small 2002).



Obr. 2. Schéma buňky nálevníka. (podle Lynn a Small 1990).

V každé buňce nálevníka nalezneme dva typy jader: jeden nebo několik malých mikronukleů a jeden nebo více velkých makronukleů. Mikronukleus, generativní jádro, je diploidní a transkripčně téměř neaktivní. Jeho hlavní role spočívá v předávání genetické informace do dalších generací. Dále se uplatňuje při konjugaci a vzniká z něho makronukleus. Mikronukleus obsahuje normální eukaryotické chromozomy a během dělení se vytváří intranukleární dělicí vřetenko. Mikronukleus se dělí uzavřenou mitózou nebo meiózou. Na rozdíl od mikronukleu je makronukleus, somatické jádro, vysoce polyploidní pro část genomu, ale určité úseky genomu vůbec neobsahuje. Probíhá zde masivní syntéza mRNA. Tvarově mohou být makronukleoly velmi proměnlivé (zaokrouhlené, větvené, růžencovité atd.) (Lynn a Small 2002). U makronukleu při dělení nenalezneme typické dělicí vřetenko a kondenzované chromozomy. Makronukleus se vyvíjí z mikronukleu a dělí se tzv. amitózou. I když se při amitóze nevytváří dělicí vřetenko, byly v makronukleu objeveny vnitro-

(Intramacronucleata) nebo mimojaderné (Heterotrichea) mikrotubuly a γ -tubulin, který se vykytuje v mikrotubulárních organizačních centrech (Kushida *et al.* 2011). Průběh amitózy je znázorněn na obr. 3. Makronukleus třídy Karyorelictea se nedělí.



Obr. 3. Průběh amitózy u nálevníka rodu *Tetrahymena*. (podle Kushida *et al.* 2011).

Kromě nepohlavního rozmnožování (příčné dělení) se mohou nálevníci rozmnožovat i pohlavním procesem zvaným konjugace. Při konjugaci dochází ke spojení dvou buněk stejného druhu a ke vzájemné výměně haploidních jader (pronukleů), které vznikly z mikronukleů. Po skončení této migrace se nálevníci od sebe odpojí. Díky konjugaci vznikají nové, vegetativně se množící klony (Lynn a Small 2002).

2.2. Systém a fylogeneze nálevníků

Systém nálevníků se během let několikrát zásadně změnil. Do nedávné doby používaný systém vznikl v osmdesátých letech dvacátého století a byl založený na složitosti orální

ciliatury. Podle toho se nálevníci dělili do tří tříd: Kinetofragminophorea, Oligohymenophorea a Polyhymenophorea (Corliss *et al.* 1980).

Do třídy **Kinetofragminophorea** patřili nálevníci, jejichž orální ciliatura se jen nepatrně lišila od somatické ciliatury a byla odvozena z apikálních částí somatických kinet. Cytostom byl většinou apikální nebo ventrální a cytofaryngeální aparát obvykle nápadný. Třída Kinetofragminophorea se dělila na čtyři podtřídy (Gymnostomatia, Vestibuliferia, Hypostomatia a Suctoria). Třída **Oligohymenophorea** zahrnovala převážně nálevníky, kteří měli orální aparát umístěný alespoň částečně uvnitř ústní dutiny a dobře vyvinutý. Do této třídy byli ale také řazeni astomátní nálevníci, u nichž není orální aparát vůbec vyvinut. Orální ciliatura u zástupců třídy Oligohymenophorea se lišila od somatické. Skládala se z periorální membrány na pravé straně a z malého počtu (obvykle tři) membranel na levé straně. Cytostom byl obvykle ventrální nebo subapikální. Do této třídy patřily pouze dvě podtřídy, Hymenostomatia a Peritrichia (Corliss *et al.* 1980). Zástupci třídy **Polyhymenophorea** se vyznačovali orálním aparátem s mnoha složitými membranelami. Somatická ciliatura mohla být normálně vyvinuta, redukována nebo přeměněna na ciry. Cytostom se nacházel ve spodní části ústní dutiny a cytoprokt většinou chyběl. Třída Polyhymenophorea zahrnovala pouze jednu podtřídu, Spirotrichia (Corliss *et al.* 1980).

Hned po svém vzniku byl ovšem tento systém kritizován. Ukázalo se, že orální ciliatura podléhá silným selekčním tlakům a častým konvergencím (viz např. Lynn 1979, 1981). Byly vytvořeny nové třídy nálevníků (Lynn a Corliss 1991, citováno v Baroin-Tourancheau *et al.* 1992). Při použití prvních molekulárně-fylogenetických metod se skutečně ukázalo, že třídy Polyhymenophorea a Kinetofragminophorea jsou polyfyletické (např. Baroin-Tourancheau *et al.* 1992; Bernhard *et al.* 1995; Hirt *et al.* 1995; Stechmann *et al.* 1998). Došlo tedy k opuštění Corlissova systému tří tříd a k jeho postupnému nahrazení novým systémem se dvěma podkmeny s jedenácti třídami (Lynn 2003; obr. 4). Tento systém, který se používá dodnes, je založen na makronukleárním cyklu a na struktuře somatických kinetid (obr. 5). O těchto znacích se předpokládá, že podléhají konvergencím mnohem méně než orální infraciliatura. Přírozenost těchto jedenácti tříd je podložena několika molekulárně-fylogenetickými studiemi (např. Wright *et al.* 1997; van Hoek *et al.* 1998; Affa'a *et al.* 2004; Strüder-Kypke *et al.* 2006; Stoeck *et al.* 2007; Cho *et al.* 2008).

V současném systému se nálevníci dělí na dva podkmeny Postciliodesmatophora a Intramacronucleata. Nejdůležitějším znakem podkmene **Postciliodesmatophora** jsou postciliodesmy (Km fibrily). Jsou to vlastně spojené mikrotubulární svazky vznikající tak, že postciliární mikrotubuly míří dozadu a překrývají ty, které přicházejí zepředu. Do tohoto

podkmene patří dvě třídy. Třída Heterotrichea má makronukleus, který se dělí pomocí mimojaderných tubulů, a u třídy Karyorelictea se makronukleus nedělí vůbec. U podkmene **Intramacronucleata**, který obsahuje valnou většinu nálevníků, se makronukleus dělí pomocí vnitrojaderných mikrotubulů. Jejich role ale nebyla doposud zcela objasněna a nebylo pozorováno dělicí vřeténko. U jednoho zástupce řazeného do tohoto podkmene (rod *Protocruzia*) byly objeveny i postciliodesmy (Lynn 2003). Do skupiny Intramacronucleata spadá zbývajících devět tříd, které se od sebe navzájem liší strukturou somatické infraciliatury.

Přehled tříd nálevníků. Podle Lynn 2003.

Podkmene 1. Postciliodesmatophora

Třída 1. Karyorelictea

Třída 2. Heterotrichea

Podkmene 2. Intramacronucleata¹

Třída 3. Spirotrichea (podtřídy Protocruziida, Phacodiniida, Hypotrichia, Oligotrichia, Choreotrichia, Stichotrichia, Licnophoria)

Třída 4. Armophorea

Třída 5. Litostomatea (podtřídy Haptoria, Trichostomatia, Rhynchostomatia)

Třída 6. Phyllopharyngea (podtřídy Phyllopharyngia, Rhynchodia, Chonotrichia, Suctoria)

Třída 7. Nassophorea

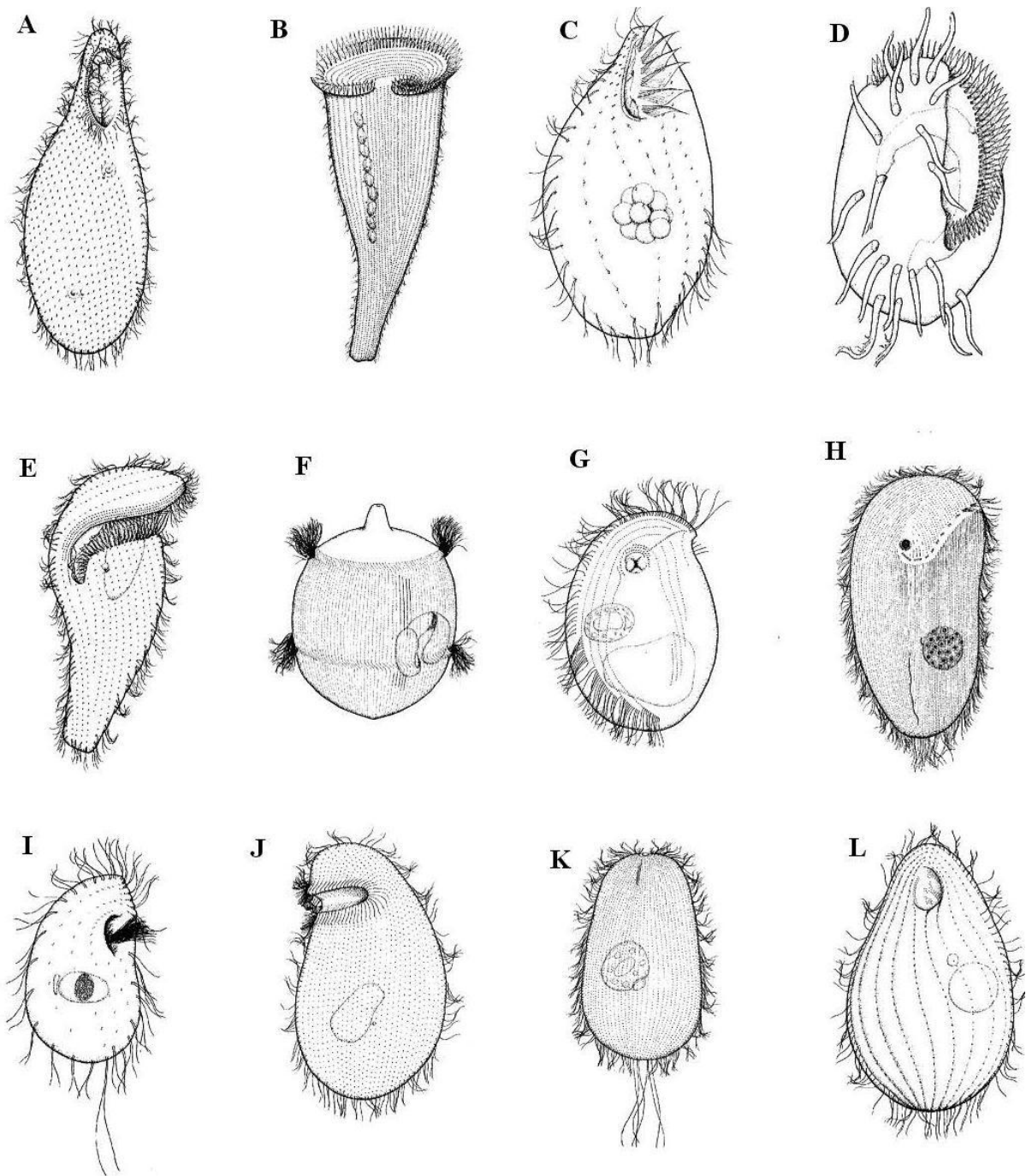
Třída 8. Colpodea

Třída 9. Prostomatea

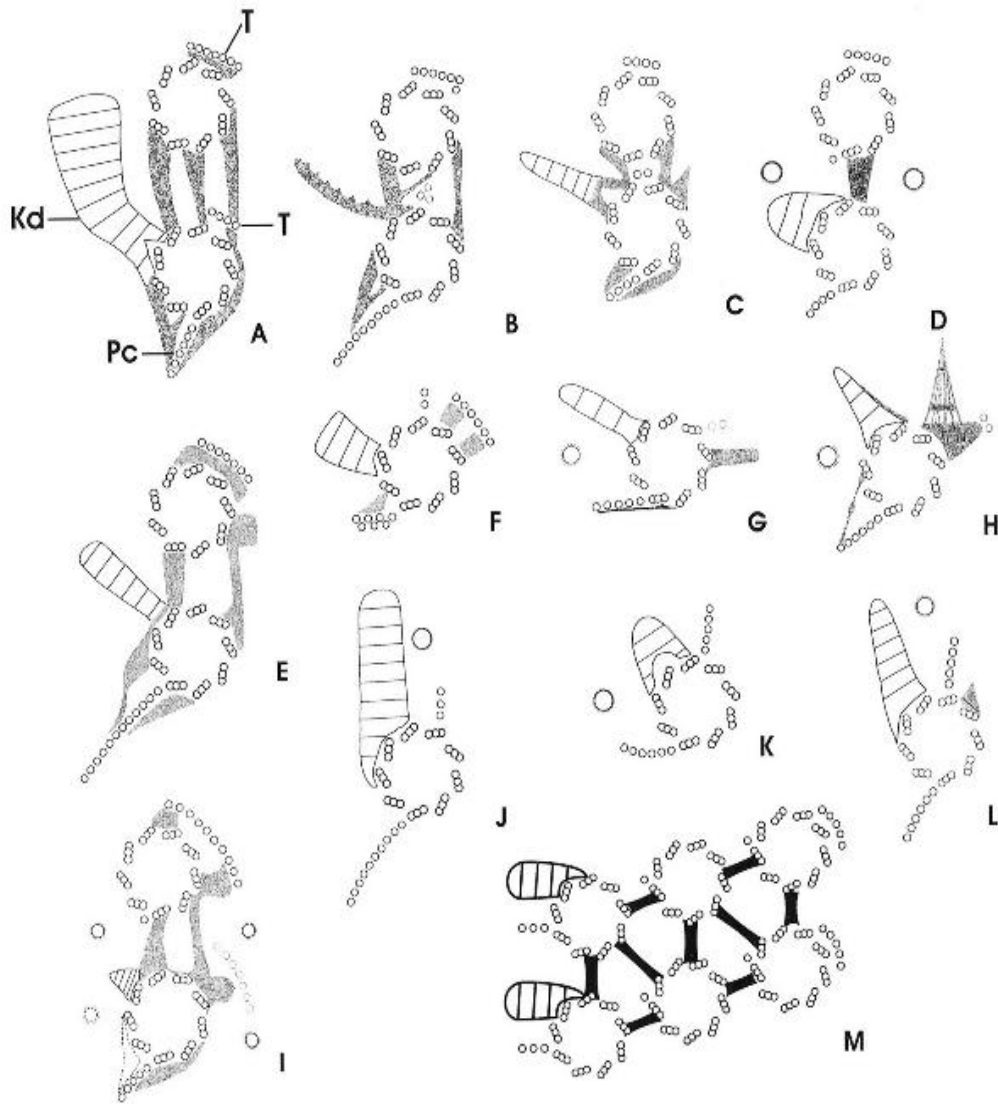
Třída 10. Plagiopylea

Třída 11. Oligohymenophorea (podtřídy Peniculia, Scuticociliatia, Hymenostomatia, Apostomatia, Peritrichia, Astomatia)

¹ Před odevzdáním této diplomové práce byla objevena nová, v pořadí dvanáctá třída nálevníků, třída Cariacotrichea (Orsi *et al.* 2011).



Obr. 4. Ukázky zástupců jednotlivých tříd nálevníků. Podle Lynn (2003). **A:** *Loxodes* (Karyorelictea); **B:** *Stentor* (Heterotrichea); **C:** *Protocruzia* (Spirotrichea); **D:** *Euplotes* (Spirotrichea); **E:** *Metopus* (Armophorea); **F:** *Didinium* (Litostomatea); **G:** *Chilodonella* (Phyllopharyngea); **H:** *Obertruria* (Nassophorea); **I:** *Colpoda* (Colpodea); **J:** *Plagiopyla* (Plagiopylea); **K:** *Holophrya* (Prostomatea); **L:** *Tetrahymena* (Oligohymenophorea).



Obr. 5. Somatické kinetidy reprezentující 11 tříd skupiny nálevníků. Podle Lynn (2003). **A.** *Loxodes* (Karyorelictea); **B.** *Blepharisma* (Heterotrichea); **C.** *Protocruzia* (Spirotrichea); **D.** *Euplotes* (Spirotrichea); **E.** *Metopus* (Armophorea); **F.** *Balantidium* (Litostomatea); **G.** *Chilodonella* (Phyllopharyngea); **H.** *Obertruria* (Nassophorea); **I.** *Colpoda* (Colpodea); **J.** *Plagiopyla* (Plagiopylea); **K.** *Holophrya* (Prostomatea); **L.** *Tetrahymena* (Oligohymenophorea); **M.** *Plagiotoma* (Spirotrichea). Pc = postciliární mikrotubulární pásy; Kd = kinetodesmální fibrily; T = transverzální mikrotubulární pásy.

V roce 2004 Cavalier-Smith rozdělil podkmen Intramacronucleata podle lokalizace cytostomu na tři skupiny (Cavalier-Smith 2004; citováno ve Vďačný *et al.* 2010). Skupina **Spirotrichia** zahrnovala třídy Armophorea a Spirotrichea, skupinu **Rhabdophora** tvořila pouze třída Litostomatea a skupina **Ventrata** obsahovala zbylých šest tříd (Phyllopharyngea, Nassophorea, Colpodea, Plagiopylea, Oligohymenophorea a Prostomatea). Tento systém nálevníků ale Vďačný *et al.* (2010b) opět přepracovali. Ze závěrů jejich studie vyplývá, že třída Armophorea nepatří do skupiny Spirotrichia, ale že se jedná o sesterskou skupinu třídy

Litostomatea. Společně je tedy zařadili do skupiny, kterou pojmenovali Lamellicorticata (Vďačný *et al.* 2010b). Dosud se ale stále více používá systém nálevníků o jedenácti třídách z roku 2003 (Lynn 2003).

Lynnův systém z roku 2003 vznikl na základě fylogenetických analýz genu pro SSU rRNA, ale od konce devadesátých let dvacátého století se zájem vědců zaměřil i na ověřování fylogenetických vztahů pomocí dalších genů, jako je například EF-1 α (Moreira *et al.* 1999). Podle jejich fylogenetické analýzy pro gen EF-1 α je třída Oligohymenophorea a podtřída Hypotrichea polyfyletická a nikoli monofyletická, jako při dřívější analýze genu pro SSU rRNA (Moreira *et al.* 1999). Kromě tohoto genu se provádí fylogenetické analýzy i pro geny eRF1, eRF3 a EF-2 (Moreira *et al.* 2002).

2.3. Anaerobní nálevníci

Většina nálevníků žije v prostředí s přístupem kyslíku. Známe ale i některé rody (např. *Metopus*, *Trimyema*, *Plagiopyla*, atd.), které mohou snášet velmi malou koncentraci kyslíku nebo pro ně může být kyslík dokonce toxický. U těchto organismů nalezneme hydrogenosom. Jedná se o redukovanou mitochondrii, která za anaerobních podmínek produkuje vodík a ATP. Dále se ukázalo, že anaerobní nálevníci rostou pomaleji než ti aerobní. Tento fakt vysvětlují dvě hypotézy. První hypotéza tvrdí, že anaerobní metabolická cesta způsobuje nižší rychlost růstu než ta aerobní, a druhá říká, že anaerobní nálevníci mají nižší příjem potravy než ti aerobní (Massana *et al.* 1994). Předpokládá se, že předek nálevníků byl aerobní a během evoluce došlo nejméně čtyřikrát k přechodu na anaerobní způsob života. Anaerobní nálevníci náleží do skupin Armophorea, Litostomatea, Plagiopylea a několik anaerobních zástupců nalezneme i ve skupinách Oligohymenophorea a Prostomatea.

2.3.1. Třída Armophorea

Fylogenetická pozice třídy Armophorea byla dlouho záhadná. Dříve byla tato třída řazena do skupiny Heterotrichea ke třídě Spirotrichea nebo byla označována jako Ciliophora *incertae sedis* (McGrath *et al.* 2007). Navíc její dva řády (Armophorida a Clevelandellida) byly často řazeny na různá místa v systému nálevníků. Až v roce 2003 na základě struktury somatických kinetid byly tyto dvě skupiny přiřazeny k sobě a vytvořily spolu samostatnou třídu Armophorea (Lynn 2003). To bylo později potvrzeno i na základě molekulárně-fylogenetických studií (Affa'a *et al.* 2004; Šlapeta *et al.* 2005). V roce 2004 vznikl nový

system nálevníků na základě lokalizace cytostomu. Cavalier-Smith rozdělil podkmene Intramacronucleata na tři taxony: Spirotrichia, Rhabdophora a Ventrata. Třída Armophorea společně s třídou Spirotrichea spadaly do taxonu Spirotrichia (Cavalier-Smith 2004; citováno ve Vďačný *et al.* 2010). Podle nejnovější studie ale Armophorea nepatří do Spirotrichia. Na základě analýzy genu pro 18S rRNA vyplývá, že Armophorea jsou sesterská skupina třídy Litostomatea (Vďačný *et al.* 2010b). Autoři této studie proto třídu Armophorea přiřadili ke třídě Litostomatea do taxonu Rhabdophora, jehož název zaměnili za Lamellicorticata. Tato třída zahrnuje anaerobní organismy, jak volně žijící, tak i endosymbiotické druhy. Místo mitochondrie mají hydrogenosom a okolo něho v cytoplasmě velmi často nalezneme metanogenní archebakterie (např. Gijzen *et al.* 1991; Embley *et al.* 1992).

Do řádu **Armophorida** patří ty druhy, které mají tělo většinou stočené doleva, podél ústního okraje mají 3 – 5 periorálních somatických kinetid (Adl *et al.* 2005). Jejich somatická ciliatura je holotrichní, tzn. tělo je rovnoměrně pokryto bičíky. Z tohoto důvodu byli tito nálevníci často zařazováni ke třídě Heterotrichea, se kterou však nejsou blíže příbuzní (viz Lynn 2008).

Zástupci řádu **Clevelandellida** mají tělo hustě pokryté bičíky, na bocích zploštělé s mnoha orálními polykinetidami po levé straně (Lynn 2008). Ve většině případů se jedná o komenzály žijící v širokém spektru hostitelů. Řád Clevelandellida byl ve starších systémech často součástí třídy Polyhymenophorea (např. Corliss *et al.* 1980) a byl do něj zařazován i rod *Metopus*, který dnes patří do řádu Armophorida.

2.3.2. Třída Litostomatea

Jako samostatná třída byla skupina Litostomatea vytvořena v roce 1991 (Lynn a Corliss 1991, citováno v Baroin-Tourancheau *et al.* 1992). Jedná se o skupinu, jejíž monofylie je dobře podpořena molekulárně-fylogenetickými studiemi (Lynn 2003; Strüder-Kypke *et al.* 2006; Gao *et al.* 2008; Vďačný *et al.* 2010a). Třída Litostomatea je značně diverzifikovaná skupina, nalezneme zde jak aerobní volně žijící druhy, tak anaerobní endosymbiotické druhy. Jejich somatická ciliatura je tvořena monokinetidami se dvěma příčnými pásy mikrotubulů (Lynn 2003). V dnešní době je tato skupina součástí podkmene Intramacronucleata a jedná se o sesterskou skupinu třídy Armophorea (viz kap. 2.3.1). Třída Litostomatea se podle systému z roku 2003 dělí na dvě podtřídy: Trichostomatia a Haptoria. Podle nejnovější studie z roku 2010 se tato skupina již dělí na tři podtřídy: Trichostomatia, Haptoria a Rhynchostomatia (Vďačný *et al.* 2010a).

Podtřída **Trichostomatia** je monofyletická skupina. Jednotliví zástupci této podtřídy žijí jako endobionti v zažívacím traktu mnohých herbivorních živočichů (Wright *et al.* 1997). Je pro ně charakteristický vnořený cytostom a absence toxicyst (Strüder-Kypke *et al.* 2006). Jejich orální ciliatura je hustá a bazální tělíska se mohou organizovat do polykinetid (Adl *et al.* 2005). V osmdesátých letech dvacátého století byla tato skupina taxonomicky řazena jako řád Trichostomatida do podtřídy Vestibulifera, která spadala do třídy Kinetofragminophorea (Corliss *et al.* 1980).

Podtřída **Haptoria** je polyfyletický taxon. Dříve se myslelo, že je tato skupina celá aerobní, ale ukazuje se, že by to tak nemuselo být. Bylo popsáno několik druhů (např. *Lacrymaria elegans* nebo *L. sapropelica*), které byly objeveny v bezkyslíkatém prostředí (Esteban *et al.* 1993). Zatím ale nebyl u nich popsán hydrogenosom. Na rozdíl od podtřídy Trichostomatia však u této skupiny nalezneme okolo orálního aparátu toxicisty. Ty jim slouží k obraně proti predátorům a také se podílejí na chytání kořisti (Gao *et al.* 2008). Organismy z této třídy bývají také často predátoři jiných nálevníků. Haptoria mají redukovanou a málo rozlišenou ciliaturu. V minulosti tato skupina spadala do podtřídy Gymnostomatia třídy Kinetofragminophorea, tedy jinam než Trichostomatia (Corliss *et al.* 1980). Na začátku devadesátých let dvacátého století byly společně s podtřídou Trichostomatia zařazeny do třídy Litostomatea (Lynn a Corliss 1991, citováno v Baroin-Tourancheau), kde jsou dodnes.

Skupina **Rhynchostomatia**, by mohla být na základě fylogenetické analýzy genu pro 18S rRNA novou podtřídou třídy Litostomatea. Zahrnuje dva řády: Tracheliida a Dileptida. Pro obě skupiny je charakteristický ústní otvor ležící ventrálně na bázi chobotku (proboscis), který nese komplex orální ciliatury (Vďačný *et al.* 2010a).

2.3.3. Třída Plagiopylea

Jedná se o monofyletickou skupinu, která je blízce příbuzná třídám Prostomatea a Oligohymenophorea (Lynn a Strüder-Kypke 2002; Cho *et al.* 2008). Monofylie této třídy je silně podporována analýzami genu pro SSU rRNA (např. Lynn a Strüder-Kypke. 2002). Somatická ciliatura zástupců třídy Plagiopylea je tvořena monokinetidami a orální ciliatura je velmi jednoduchá. Skládá se v podstatě ze somatických kinet, které se dále rozšiřují do ústní dutiny, jež má nálevkovitý tvar, nebo do vestibulu (Adl *et al.* 2005). Všichni zástupci této třídy jsou anaerobní a mohou být jak volně žijící, tak endobiotičtí (např. Lynn a Strüder-Kypke 2002). I pro tuto třídu je charakteristická přítomnost hydrogenosomů a endosymbiotických metanogenních bakterií (např. Shinzato *et al.* 2007).

Do této třídy patří rod *Trimyema*, ale ne vždy tomu tak bylo. Pozice tohoto rodu v systému nálevníků byla dlouho nejasná. Vzhledem k tomu, že u něho nacházíme apikální orální aparát, který je typický pro prostomátní nálevníky, byla *Trimyema* řazena mezi Prostomatea (Serrano *et al.* 1988). Poté byla přemístěna do třídy Oligohymenophorea (Nerad *et al.* 1995; citováno v Baumgartner *et al.* 2002) a až v roce 2002 na základě fylogenetických analýz genu pro SSU rRNA byla umístěna do třídy Plagiopylea (Baumgartner *et al.* 2002). Zástupce toho rodu můžeme nalézt ve všech typech vod, dokonce i v teplých (*Trimyema minutum*) (Baumgartner *et al.* 2002) nebo v hypersalinních vodách (*Trimyema koreanum*) (Cho *et al.* 2008).

V roce 2007 byla do této třídy zařazena nová skupina nálevníků, řád Odontostomatida. Stalo se to na základě analýzy pro gen SSU rRNA (Stoeck *et al.* 2007). Nejdříve se jednalo o monofyletickou skupinu, která byla součástí řádu Heterotrichida a později, než ji zařadili do třídy Plagiopylea, byla spolu s dalšími nálevníky *incertae sedis* umístěna do třídy Armophorea. Všichni nálevníci z tohoto řádu jsou anaerobní a vyskytují se v sedimentech sladkovodních nádrží. I u nich se vyskytují metanogenní endosymbionti (Stoeck *et al.* 2007).

V nedávné době vyšla studie, jejíž autoři se zabývali systematickou pozicí zvláštního nálevníka rodu *Paraspathidium*. První zmínka o tomto druhu pochází z roku 1937 (Noland 1937) a od toho roku byl pomocí morfologických znaků řazen do podtřídy Haptorida (Litostomatea) (Noland 1937; Long *et al.* 2009). V roce 2010 provedli autoři studie fylogenetickou analýzu genu SSU rRNA a zjistili, že tento rod nepatří do třídy Litostomatea. Spíše se přiklání k tomu, že by se mohlo jednat buď o novou samostanou skupinu, blíže příbuznou třídám Prostomatea a Plagiopylea nebo by mohlo jít o novou skupinu, jež by byla součástí třídy Plagiopylea (Zhang *et al.* 2010b).

2.3.4. Třída Oligohymenophorea

Třída Oligohymenophorea je největší a nejznámější skupina nálevníků. Patří sem např. rody *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Cyclidium* nebo *Vorticella*, které mají orální aparát částečně v ústní dutině. Orální ciliatura je dobře rozlišená od somatické. Skládá se z perorální membrány na pravé straně a malého počtu organel (membranely, peniculi, polykinety) na levé straně. Cytostom mají umístěný ventrálně nebo blízko anteriorního konce. Nalezneme zde jak volně žijící druhy, mikrofágní druhy, tak i endoparazity. Některé druhy mohou tvořit cysty nebo vytvářet kolonie (Corliss *et al.* 1980). V minulosti se tato třída dělila na dvě podtřídy (Hymenostomatia a Peritrichia) se 4 řády (Corliss *et al.* 1980). Dnes se skládá ze šesti podtříd

s neurčitým počtem řádů (Lynn a Small 2002; Lynn 2003). Prvním popsáným anaerobním nálevníkem náležící do této třídy byl volně žijící druh *Cyclidium porcatum*, který spadá do podtřídy Scuticociliatia (Clarke a Finlay 1993).

Podtřída **Scuticociliatia** se dříve řadila jako řád Scuticociliatida do podtřídy Hymenostomatia, která doposud spadá do třídy Oligohymenophorea. Jednotliví zástupci této podtřídy obývají různé typy prostředí. Většina z nich jsou fakultativní parazité mořských živočichů, hlavně ryb, korýšů, měkkýšů. Napadají jejich žábry, pokožku, svaly, srdce nebo bránici a dochází tak k jejich úhynu (např. Jung *et al.* 2005; Bourne *et al.* 2008). Kromě druhu *Cyclidium porcatum* bylo popsáno několik dalších druhů nálevníků (např. *Cyclidium dilectissimum*, *Isocyclidium globosum* a *Cristigera* sp.; Esteban *et al.* 1993), o kterých se předpokládá, že budou také anaerobní. Zatím u nich nebyl objeven hydrogenosom, a proto nelze vyloučit, že by se mohlo nakonec jednat o aerobní organismy.

2.3.5. Třída Prostomatea

Třída Prostomatea stejně jako předchozí třída zahrnuje zejména aerobní druhy. Monofylie této skupiny je podpořena několika fylogenetickými analýzami, i když statistická podpora obvykle nebývá vysoká (např. Stechmann *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2010b). Tato třída je blízce příbuzná třídám Plagiopylea a Oligohymenophorea (Stechmann *et al.* 1998; Lynn 2003) a nově i skupině, která byla popsána teprve nedávno a je tvořena rodem *Paraspathidium* (viz kap 2.3.3). Ale ne vždy se jednalo o samostatnou třídu. V systému z osmdesátých let dvacátého století byla tato skupina označována pouze jako řád Prostomatida, který patřil do třídy Kinetofragminophorea (Corliss *et al.* 1980) a teprve až v roce 1992 se tento řád stal třídou (Baroin-Tourancheau *et al.* 1992). Dnes můžeme tuto třídu rozdělit do dvou řádů (Prostomatida a Prorodontida). Název této třídy vychází z umístění jejich cytostomu, který je apikální. Cytofarynx je obklopen postciliárními mikrotubulárními pásy, které vznikají z orálních polykinetid. Mají typický polyploidní makronukleus (Corliss *et al.* 1980; Lynn a Small 2002). Stejně jako u třídy Oligohymenophorea i zde bylo objeveno několik druhů (*Holophrya bicoronata* a *Prorodon corpulentissimum*), které by mohly být anaerobní (Esteban *et al.* 1993). Ani u nich však nebyl popsán hydrogenosom.

Systematický přehled anaerobních nálevníků. Podle Lynn (2002). Doplněno o změny ve třídách Plagiopylea (Stoeck et al. 2007), Litostomatea (Esteban et al. 1993; Ito et al. 2006; Vďačný et al. 2010a), Ologohymenophorea a Prostomatea (Esteban et al. 1993).²

TŘÍDA ARMOPHOREA

Řád Armophorida

Čeď Caenomorphidae (rody *Caenomorpha*, *Cirranter*, *Ludio*)

Čeď Metopidae (rody *Bothrostoma*, *Brachonella*, *Eometopus*, *Metopus*, *Palmarela*, *Parametopus*, *Spirorhynchus*, *Tesnospira*, *Tropidoattractus*)

Řád Clevelandellida

Čeď Clevelandellidae (rody *Clevelandella*, *Metaclevelandella*, *Paraclevelandia*)

Čeď Inferostomatidae (rod *Inferostoma*)

Čeď Neonyctotheridae (rod *Neonyctotherus*)

Čeď Nyctotheridae (rody *Cichlidotherus*, *Metanyctotherus*, *Nyctositum*, *Nyctotheroides*, *Nyctotherus*, *Paracichlidotherus*, *Pronyctotherus*, *Pygmootheroides*)

Čeď Sicuophoridae (rody *Geimania*, *Metasicuophora*, *Parasicuophora*, *Prosicuophora*, *Sicuophora*)

Třída Litostomatea

Podtřída Haptoria

Řád Cyclotrichida

Řád Haptorida

Čeď Lacrymariidae (druhy *Lacrymaria elegans*, *Lacrymaria sapropelica*)

Řád Pleurostomatida

Podtřída Trichostomatia

Řád Vestibuliferida

Čeď Balantidiidae (rod *Balantidium*)

Čeď Isotrichidae (rody *Bitricha*, *Dasytricha*, *Isotricha*, *Protoisotricha*)

Čeď Paraisotrichidae (rody *Enterophrya*, *Paraisotrycha*, *Rhizotricha*)

Čeď Pycnotrichidae (rody *Collinina*, *Infundibulorium*, *Nicollella*, *Pycnothrix*, *Vestibulongum*)

Čeď Protocaviellidae (rody *Hydrochoerella*, *Protocaviella*)

Řád Entodiniomorphida

Podřád Archistomatina

Čeď Buetschliidae (rody *Alloiozona*, *Ampullacula*, *Amylophorus*, *Blepharocodon*, *Blepharoconus*, *Blepharomonas*, *Blepharoplanum*, *Blepharoposthium*, *Blepharosphaera*, *Blepharozoum*, *Buetschlia*,

² Třídy Prostomatea a Oligohymenophorea a podtřídy Haptoria a Rhynchostomatia zahrnují hlavně aerobní nálevníky

Buissonella, Bundleia, Cucurbella, Didesmis, Hemiprorodon, Holophryoides, Holophryozoon, Kopperia, Levanderella, Meiostoma, Paraisotrichochopsis, Pingius, Polymorphella, Prorodonopsis, Protolutzia, Pseudobuetschlia, Sciurula, Sulcoarcus, Wolskana)

Podřád Blepharocorythina

Čeď Blepharocorythidae (rody *Blepharocorys, Charonina, Charonnautes, Circodinium, Ochoterenaia, Pararaabena, Raabena, Spirocorys*)

Podřád Entodiniomorpha

Čeď Cycloposthiidae (rody *Bertolinella, Bozasella, Cycloposthium, Diplolophus, Lavierella, Toxodinium, Tricaudalia, Trifascicularia, Tripalmaria, Triplumaria*)

Čeď Prototapirellidae (rod *Prototapirella*)

Čeď Ditoxidae (rody *Ditoxum, Tetratoxum, Triadinium*)

Čeď Macropodiniidae (rod *Macropodinium*)

Čeď Ophryoscolecidae (rody *Caloscolex, Campylodinium, Cunhaia, Diplodinium, Diploplastron, Elytroplastron, Enoploplastron, Entodinium, Eodinium, Epidinium, Epiplastron, Eremoplastron, Eudiplodinium, Metadinium, Ophryoscolex, Opisthotrichium, Ostracodinium, Polyplastron*)

Čeď Polydiniellidae (rody *Elephantophilus, Polydiniella, Pterodinium, Thoracodinium*)

Čeď Rhinozetidae (rod *Rhinozeta*)

Čeď Spirodiniidae (rody *Cochliatoxum, Spirodinium*)

Čeď Telamodiniidae (rody *Megadinium, Telamodinium, Teratodinium*)

Čeď Troglodytelliidae (rody *Gorillophilus, Troglodytella*)

Čeď Gilchristidae (rody *Gilchristia, Digilchristia*)

Podtřída Rhynchostomatia

Řád Tracheliida

Řád Dileptida

Třída Plagiopylea

Řád Plagiopylida

Čeď Plagiopylidae (rody *Lechriopyla, Paraplagiopyla, Plagiopyla, Pseudoplagiopyla*)

Čeď Sonderiidae (rody *Parasonderia, Sonderia, Sonderiella*)

Čeď Trimyemidae (rod *Trimyema*)

Řád Odontostomatida

Čeď Discomorphellidae (rod *Discomorphella*)

Čeď Epalxellidae (rody *Atopodinium, Epalxella, Pelodinium, Saprodinium*)

Čeď Mylestomatidae (rod *Mylestoma*)

Třída Oligohymenophorea

Podtřída Peniculia

Podtřída Scuticociliatia

Čeď Cyclidiidae (druhy *Cyclidium porcatum*, *Cyclidium dilectissimum*, *Isocyclidium globosum*, *Cristigera* sp)

Podtřída Hymenostomatia

Podtřída Apostomatia

Podtřída Peritrichia

Podtřída Astomatia

Třída Prostomatea

Řád Prostomatida

Čeď Prorodontidae (druh *Prorodon corpulentissimum*)

Čeď Holophryidae (druh *Holophrya bicoronata*)

Řád Prorodontida

2.4. Ekologie anaerobních nálevníků

2.4.1. Volně žijící anaerobní nálevníci

Volně žijící anaerobní nálevníky nalezneme téměř všude. Žijí buď v různých typech vod (mokřady, čističky odpadních vod, atd.), nebo ve vlhké půdě, kde se živí bakteriemi a řasami (Corliss 2002). Existují i takové druhy anaerobních nálevníků (např. *Metopus es* nebo *Plagiopyla nasuta*, obr. 6), které se mohou vyskytovat v prostředí bohatém na sulfidy (Massana *et al.* 1994)



Obr. 6. Volně žijící anaerobní nálevníci: **A: Plagiopyla** (eol. org/pages/2909709); **B: Metopus** (eol. org/pages/488667).

2.4.2. Nálevníci gastrointestinálního traktu

Mimo druhy, které žijí volně v přírodě, nalezneme i některé zástupce v gastrointestinálním traktu býložravých živočichů. Toto anoxické prostředí podporuje rozvoj specifických mikrobiálních společenstev, která se skládají z bakterií, anaerobních hub a anaerobních prvoků, a je charakterizováno dostupností bohatého zdroje rostlinných polymerů (Breznak 1982; Hungate 1966, citováno v Gijzen *et al.* 1991). U přežvýkavců nalezneme tyto mikroorganismy hlavně v bachoru, u živočichů, kteří nemají bachor, se vyskytují především ve střevě (Ricard *et al.* 2006).

Bachor je vysoce specializovaná část žaludku charakteristická pouze pro přežvýkavce (skupina Ruminantia). V této části probíhá veškeré trávení rostlinné potravy (Ricard *et al.* 2006) a právě tady se bachoroví nálevníci starají o zpracování rostlinných sacharidů. Nálevníci produkují aminokyseliny, díky nimž dochází ke zpracování nestravitelných strukturních polysacharidů na lipidy. Ty pak může hostitel snadno absorbovat (Cameron 2003). Bachoroví nálevníci systematicky spadají do podtřídy **Trichostomatia** a můžeme je rozdělit do dvou skupin (Ricard *et al.* 2006): řád **Entodiniomorphida** (*Entodinium simplex*, *Entodinium caudatum*, *Eudiplodinium maggii*, *Metadinium medium*, *Diploplastron affine*, *Polyplastron multivesiculatum* a *Epidinium eucaudatum*) a řád **Vestibuliferida**, který byl

dříve pojmenován jako Holotricha (*Isotricha prostoma*, *Isotricha intestinalis* a *Dasytricha ruminantium*).

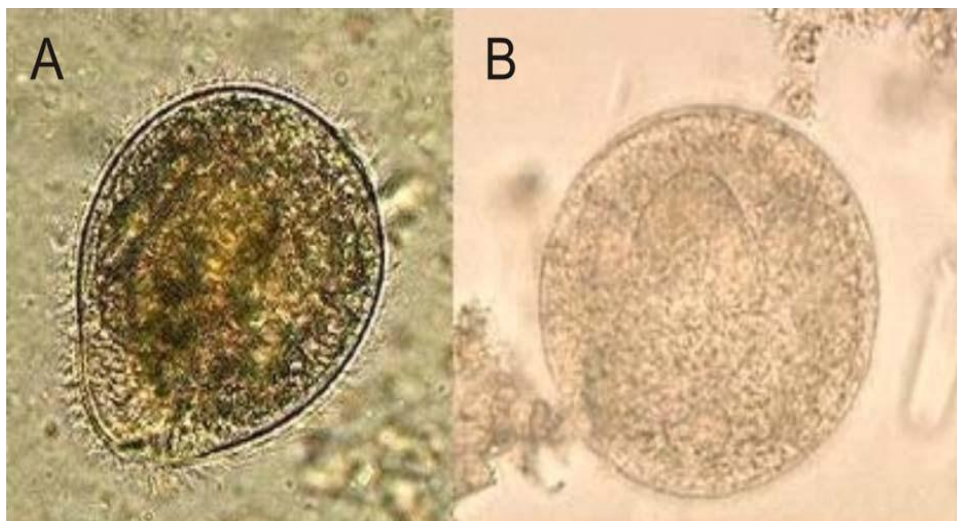
Do dnešní doby vyšlo několik studií, ve kterých byli popsáni jednotliví zástupci střevních nálevníků. Například u zebru (domácí skot žijící v Asii a Africe) se v bachoru vyskytují hlavně rody *Entodinium*, *Eudiplodinium*, *Diplodinium* a *Ostracodinium* (Mishima *et al.* 2009). U koní byly identifikovány ve slepém a tlustém střevě rody *Cycloposthium*, *Tripalmaria*, *Cochliatoxum* a *Paraisotricha* (Strüder-Kypke *et al.* 2007), u vačnatců se jednalo o různé zástupce čeledí Amylovoracidae, Macropodiniidae, Polycostidae a Cycloposthiidae (Trichostomatia, Litostomatea) (Cameron 2003) a u velbloudů byly objeveny rody *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium* a *Epidinium* (Del Valle *et al.* 2008). Kromě těchto živočichů se střevní nálevníci vyskytují i u ryb (např. *Balantidium ctenopharyngodoni* nebo *B. polyvacuolum*) (Li *et al.* 2007, 2009) nebo u šimpanzů a goril. U nich byly popsány tři rody nálevníků, *Gorillophilus*, *Prototapirella* a *Troglodytella* (Pomajbíková *et al.* 2010). O významu nálevníka *Troglodytella abrassarti* u šimpanzů se toho zatím moc neví (Modrý *et al.* 2009). Zajímavé je, že u lidí nebyl tento druh zatím objeven, i když se předpokládá, že u našich předků se vyskytoval, ale nejspíš během evoluce došlo u lidí k jeho ztrátě. Mohlo by to být způsobené potravou, kterou lidé konzumují. Ukazuje se, že šimpanzi, kteří žijí v lidských obydlích jako domácí mazlíčci a živí se jídlem od lidí, troglodytelu nemají (Irbis *et al.* 2008). V těchto starších studiích se předpokládalo, že *Troglodytella* u primátů žijících v zajetí mizí, ale nemuselo by to tak být. V roce 2010 vyšel článek, ve kterém se píše pravý opak. Podle autorů je infekce tímto nálevníkem u volně žijících primátů nižší než u těch v zajetí (Pomajbíková *et al.* 2010). Vysvětlují to také změnou potravy. Primáti žijící v zajetí totiž konzumují potravu, ve které je málo vlákniny, ale je bohatá na škroby. Dále byla v roce 2006 popsána nová skupina endobiotických nálevníků žijících v zažívacím traktu u nosorožců (skupina Gilchristidae), která patří do řádu Entodiniomorpha (Ito *et al.* 2006). Endobiotičtí nálevníci se kromě obratlovců mohou vyskytovat i u bezobratlých, například u švába ve střevě žije druh *Nyctotherus ovalis* (Gijzen a Barugahare 1992) nebo u kroužkoců se vyskytují rody *Plagiotoma* a *Anoplophrya* (Affa'a *et al.* 2004).

2.4.3. *Balantidium coli* jako patogen

Balantidium coli (Litostomatea; viz obr. 7) je anaerobní nálevník s cystami, který parazituje u různých skupin živočichů včetně člověka. Za normálních podmínek žije v lumen tlustého

střeva prasat, koní, primátů a psů (Nakauchi 1999; Headley *et al.* 2008). Další druhy rodu *Balantidium* nalezneme téměř u všech živočichů, například v plazech, obojživelnících (Li *et al.* 2008) nebo rybách (Li *et al.* 2007, 2009). Za normálních podmínek se *B. coli* žije střevním obsahem a nezpůsobuje svému hostiteli závažná poškození. Někdy se ale za nejasných podmínek stává vysoce patogenním. Dochází k proniknutí nálevníků do střevní sliznice nebo do lymfoidní tkáně a ke vzniku vředů. Nálevníci mohou být dále krví rozneseni po celém těle, kde také vznikají vředy, a mohou perforovat i jiné orgány. Toto onemocnění většinou nebývá u zvířat doprovázeno nějakými viditelnými příznaky, ale často končí smrtí (Headley *et al.* 2008).

Balantidium coli je zatím jediný známý patogenní druh, který může napadnout i člověka. Toto málo časté onemocnění se nazývá balantidióza (Zaman 1993). Balantidióza je nemoc, která se vyskytuje téměř po celém světě, ale hlavně v tropických oblastech. K její nákaze dochází po napití vody, která je kontaminovaná výkaly nakažených zvířat (a tedy i cystami druhu *B. coli*) a po těle se dále roznáší pomocí krve. Projevuje se krvavě hlenovými průjmy, vysokými horečkami, nechutenstvím, hubnutím, bez léčby bývají silně poškozena játra a onemocnění v tomto stádiu ve většině případů končí smrtí. Diagnostika je založena na mikroskopickém nálezů cyst nebo trofozoitů v preparátu z čerstvé stolice. K léčbě se používá tetracyklin nebo metronidazol (Biagi 1970). Často se může také stát, že dojde k záměně s jinou nemocí, a to s amébovou dyzentérií, kterou způsobuje druh *Entamoeba histolytica*. Obě onemocnění mají totiž velmi podobné příznaky.



Obr. 7. *Balantidium coli*. **A:** trofozoit (www.nationmaster.com/encyclopedia/Balantidium-coli); **B:** cysta (www.phsource.us/PH/PARA/Chapter_2.htm).

2.5. Hydrogenosom

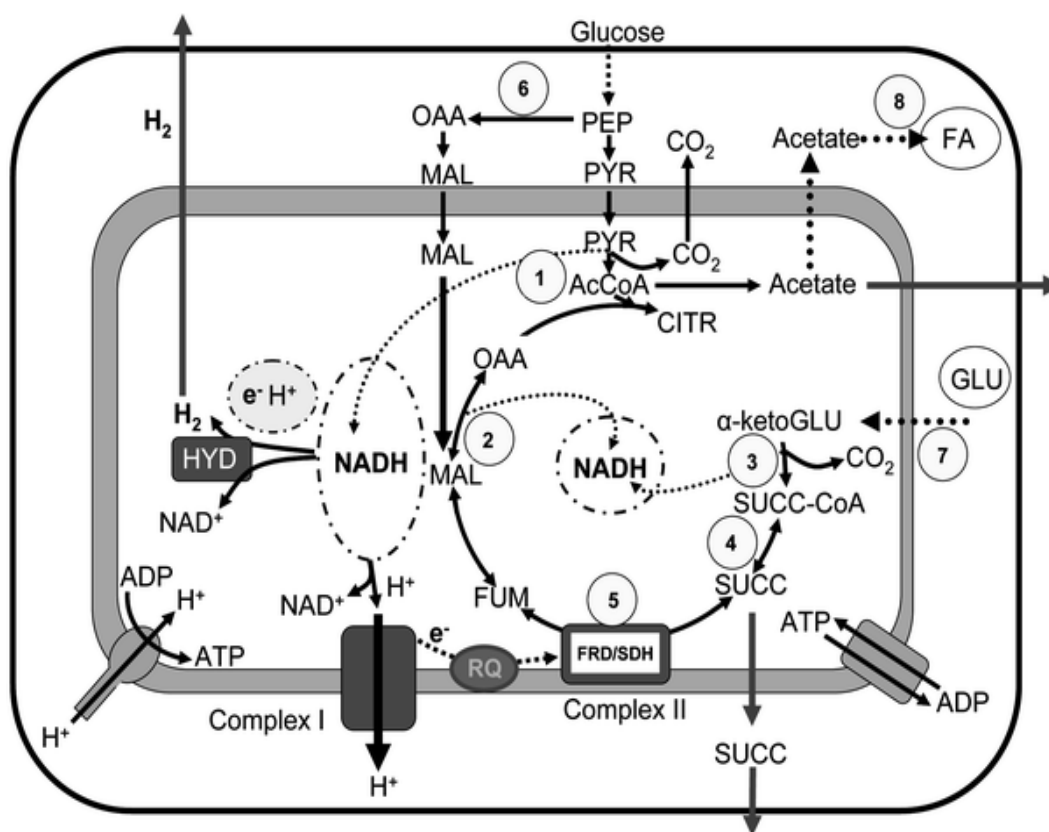
Hydrogenosom je specializovaná organela typická pro eukaryotní organismy žijící v anaerobním prostředí. Jedná se vlastně o redukovanou mitochondrii, jejíž metabolismus probíhá za anaerobních podmínek bez oxidativní fosforylace a konečným produktem není voda, ale vodík (Bui *et al.* 1996; Martin 2005). Předpokládá se, že hydrogenosom a mitochondrie mají společného jednoho předka (Hackstein *et al.* 2006). Kromě nálevníků nalezneme tuto organelu například ještě u anaerobních chytridiomycet (např. Akhmanova *et al.* 1999; James *et al.* 2006), u druhu *Psalteriomonas lanterna* (Heterolobosea) (např. de Graaf *et al.* 2009) nebo u trichomonád (Parabasalia) (např. Hrady *et al.* 2004; Pütz *et al.* 2006; Smutná *et al.* 2009). Jednotlivé hydrogenosomy se ale od sebe navzájem strukturně a metabolicky liší (Boxma *et al.* 2005). To potvrzuje teorii, že hydrogenosom vznikl u různých skupin prvoků několikrát nezávisle na sobě (Dyall a Johnson 2000).

Hydrogenosom, stejně jako mitochondrie, má dvojitou membránu, vnitřní membrána může v některých případech vytvářet krusty a při energetickém metabolismu vzniká ATP, i když méně než při aerobním metabolismu (Bui *et al.* 1996; Martin 2005). Kromě tří výjimek nebyl u hydrogenosomu popsán genom. Těmi výjimkami jsou nálevník *Nyctotherus ovalis* (Akhmanova *et al.* 1998; van Hoek *et al.* 2000a; Boxma *et al.* 2005; de Graaf *et al.* 2011) a prvoci ze skupiny Stramenopiles, rod *Blastocystis* (Stechman *et al.* 2008) a druh *Ptotheromonas lacertae* (Pérez-Brocal *et al.* 2010). Navíc je zde přítomna hydrogenáza a pyruvát-ferredoxin oxireduktáza. Jedná se o enzym, který katalizuje oxidativní dekarboxylaci pyruvátu na acetyl-CoA, nebo v opačném směru tvoří pyruvát z acetyl-CoA a oxidu uhličitého (Müller 1993; Dyall *et al.* 2000). Při energetickém metabolismu glukózy dochází k rozkladu pyruvátu na acetát, laktát, sukcinát, popřípadě butyrát, dále vzniká oxid uhličitý a molekulární vodík (Yarlett *et al.* 1985; Ellis *et al.* 1991; Dyall *et al.* 2000; Tielens *et al.* 2002).

2.5.1. Hydrogenosom nálevníka druhu *Nyctotherus ovalis*

Nyctotherus ovalis je anaerobní nálevník ze třídy Armophorea, který žije ve střevě termitů a švábů (van Hoek *et al.* 1998). Hydrogenosom tohoto druhu představuje unikátní přechod mezi „pravou“ mitochondrií a hydrogenosomem, jak ho známe například u trichomonád (Dyall *et al.* 2000). Tato unikátní organela nese znaky typické jak pro hydrogenosom, tak i několik znaků charakteristických pro mitochondrii (např. genom, krusty, kardiolipin) (Akhmanova *et al.* 1998; van Hoek *et al.* 2000a; Boxma *et al.* 2005). Co se týče jeho genomu,

ukázalo se, že kóduje ribosomální proteiny a dokonce dva komponenty dýchacího řetězce, téměř všechny geny kódující komplex I (pumpuje protony ven z organely) a komplex II (redukce fumarátu), a navíc je tato organela schopna vytvářet membránový potenciál. Geny, jež kódují komplexy III, IV a V, zatím nebyly v hydrogenosomu objeveny. Byly zde identifikovány i některé geny, které zřejmě kódují enzymy Krebsova cyklu, jako jsou malát dehydrogenáza, sukcinát dehydrogenáza, sukcinyl-CoA syntetáza či α -ketoglutarát dehydrogenáza (Boxma *et al.* 2005; Hackstein *et al.* 2006). Hlavním konečným metabolickým produktem je v tomto případě sukcinát, který je typický i pro anaerobní mitochondrii (Boxma *et al.* 2005). Kromě sukcinátu může v hydrogenosomu druhu *N. ovalis* vznikat z pyruvátu i malé množství acetátu (Tielens *et al.* 2002). Předpokládané schéma energetického metabolismu u druhu *N. ovalis* je znázorněno na obrázku 8.



Obr. 8. Předpokládané schéma metabolismu u druhu *Nyctotherus ovalis*. (podle Hackstein *et al.* 2006). Zkratky: AcCoA = acetyl – CoA; CITR = citrát; FRD = fumarát reduktáza; FUM = fumarát; Hyd = hydrogenáza; α – KG = α – ketoglutarát; MAL = malát; OXAC = oxaloacetát; PDH = pyruvát dehydrogenáza; PEP = fosfoenolpyruvát; PYR = pyruvát; RQ = rhodochinon; SUCC = sukcinát; SUCC – CoA = sukcinil – CoA.

Pro hydrogenosom druhu *N. ovalis* je typická přítomnost neobvyklé hydrogenázy. Jedná se o polyprotein, který se skládá z dlouhého řetězce [FeFe] hydrogenázy a dvou modulů, které se podobají dvěma (24kDa a 51kDa) podjednotkám mitochondriálního komplexu I a eubakteriálnímu respiračnímu řetězci (Boxma *et al.* 2007). Pomocí této hydrogenázy nejspíš dochází ke spojení fermentativního glukózového metabolismu se základními komponenty mitochondriálního přenosu elektronů (Akhmanova *et al.* 1998). Tato hydrogenáza může přímo reoxidovat redukované NAD(P) v komplexu I (díky přítomnosti 24kDa a 51kDa modulu, ostatní hydrogenázy potřebují k výrobě vodíku ferredoxin). Dochází tak k ukládání zásobní energie, která se později používá k vypuzení protonů. Ty pak dávají vzniknout molekulárnímu vodíku (Hackstein *et al.* 1999). U hydrogenosomu jiného prvoka, jenž také žije v prostředí bez kyslíku, rodu *Blastocystis* (Stramenopiles, Chromista), došlo ke konvergentní evoluci. Stejně jako u hydrogenosomu druhu *N. ovalis*, tak i tady má hydrogenosom vlastní genom, dva komplexy dýchacího řetězce, Fe-Fe hydrogenázu a vnitřní obalová membrána je i v tomto případě je schopna vytvářet krystaly (Stechmann *et al.* 2008).

2.6. Metanogenní endosymbionti

U téměř všech anaerobních nálevníků byly v cytoplazmě nalezeny prokaryotické organismy. Pomocí fluorescenční mikroskopie byly tyto organismy identifikovány jako metanogenní archebakterie. Stalo se to na základě přítomnosti specifických buněčných komponentů uvnitř archebakterií, koenzymu F₄₂₀ (deazaflavin) a sloučeniny F₃₄₂ (sloučenina pterinu) (van Bruggen *et al.* 1983). Jak se ukázalo, tyto archebakterie žijí s nálevníky v symbiotickém vztahu (Vogel *et al.* 1980) a obývají hlavně prostor okolo hydrogenosomů (Görtz 2001, obr. 9). První zmínka o této symbióze pochází z roku 1982, ve kterém došlo k popsání simbiózy u nálevníků vyskytujících se v bachoru přežvýkavců (Stumm *et al.* 1982). Předpokládá se, že tato vzájemná symbióza funguje již od počátku evoluce anaerobních nálevníků (van Hoek *et al.* 2000b).

Archebakterie jsou prokaryotické organismy, které často žijí v prostředí s extrémními podmínkami, jako jsou například vysoká teplota, nízké pH nebo vysoký obsah různých solí. Nalezneme je v mokřadech, oceánech, bahně, zažívacím traktu živočichů, půdách nebo v odpadních vodách (van Hoek *et al.* 2000b). Spektrum metabolických pochodů u archebakterií je pestré. Chemotrofní archebakterie využívají k získávání energie buď anorganické (litotrofové), nebo organické sloučenin (organotrofové). Oproti tomu fototrofové využívají energie slunečního záření. U nálevníků se jedná o litotrofní archebakterie, které

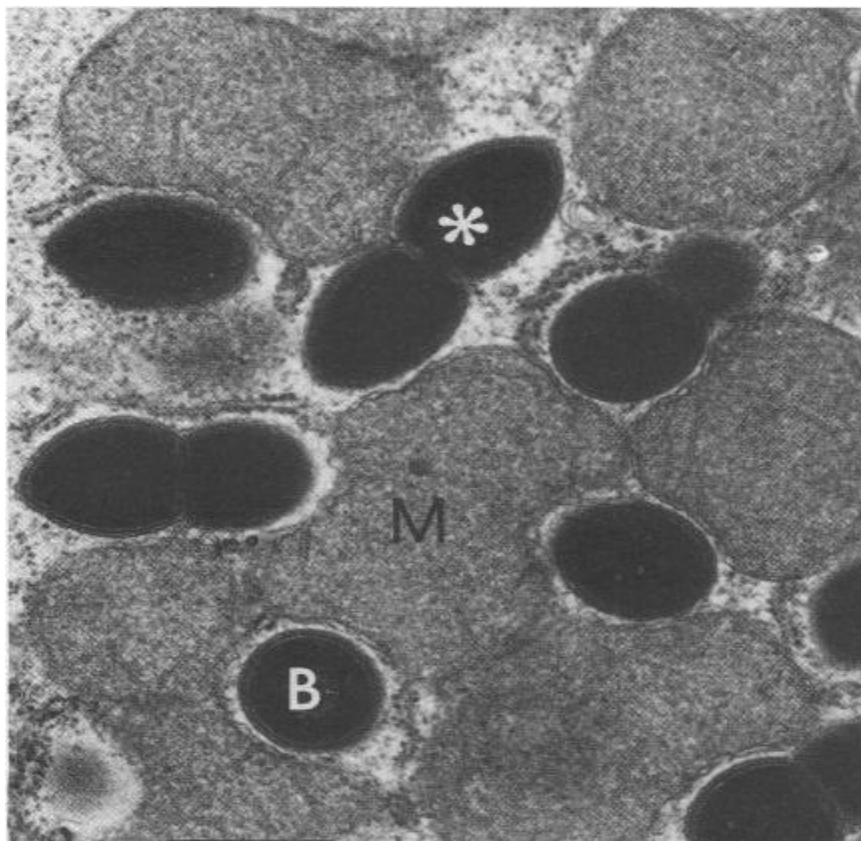
využívají elektrony získané z vodíku nebo kyseliny mravenčí k redukci oxidu uhličitého na metan a vodu. Metan se pak uvolňuje do ovzduší jako jeden ze skleníkových plynů (Hungate *et al.* 1970).

I když závislost mezi výdejem metanu a počtem nálevníků zatím nebyla prokázána (van Hoek *et al.* 2006), můžeme s jistotou očekávat výrazné rozdíly ve tvorbě metanu v přímé závislosti na počtu metanogenních endosymbiontů u jednotlivých druhů nálevníků. Symbióza mezi bachorovými nálevníky a metanogenními archebakteriemi je velmi důležitá a je jedním z hlavních zdrojů metanu v ovzduší. Je to dáno tím, že v bachoru přežvýkavců je mnohem více nálevníků než volně ve vodě (Görtz 2001). Navíc se podle nejnovější studie předpokládá, že i druhové složení nálevníků v bachoru by mohlo hrát významnou roli ve tvorbě metanu. Ukázalo se, že nálevníci rodu *Epidinium* a *Eudiplodinium*, popsaní u jelenů a ovcí, vyráběli více metanu než rody *Polyplastron* a *Ostacodinium* ze skotu (Kittelman a Janssen 2011). Metanogeneze je dále významná pro metabolické působení mikroflóry v bachoru. Metanogenní archebakterie totiž přispívají k eliminaci redukčních ekvivalentů, které vznikají během fermentace (Šurín *et al.* 2006). Už na začátku devadesátých let se zjistilo, že šváb využívá vzniklý metan jako shromažďovací feromon (Gijzen *et al.* 1991). Kromě toho se v dnešní době zkoumá využití metanu pro výrobu bioplynu.

Abychom zjistili přítomnost metanogenů v buňce nálevníka, musíme použít fluorescenční mikroskopii (viz výše) nebo se můžeme zaměřit na přítomnost specifického enzymu, který se vyskytuje pouze v metanogenních archebakteriích. Jedná se o metylkoenzym M reduktázu (*mcrA*), která je velmi důležitá pro konečnou fázi metanogeneze. Během této fáze se podílí na snížení počtu metylových skupin vázajících se na koenzym M (Thauer 1998). Protože víme s jistotou, že nálevníci vlastní metabolismus metanu nemají, nemohou tedy tento enzym produkovat. Pokud tedy v buňce nálevníka objevíme *mcrA*, můžeme s jistotou tvrdit, že tento nálevník má v sobě i metanogenní archebakterie (Denman *et al.* 2007).

První popsanou metanogenní archebakterií u volně žijícího nálevníka byl druh *Methanobacterium formicicum*, a to u druhu *Metopus striatus* (Bruggen *et al.* 1984). Tato archebakterie byla poté pozorována ještě i u jiných nálevníků, jako *Plagiopylea frontata* (Fenchel a Finlay 1991) nebo *Metopus palaeformis* (Embley *et al.* 1992). Kromě tohoto rodu *Methanobacterium* byli popsáni i jiní zástupci metanogenních archebakterií. Například u nálevníka druhu *Metopus contortus* byl popsán endosymbiont druhu *Methanoplanus endosymbiosus* (Görtz 2001) a u druhu *Metopus es* se jednalo o rod *Methanosaeta* (Narayanan *et al.* 2009). Stejně jako u rodu *Metopus*, i u rodu *Trimyema* bylo pozorováno několik různých

druhů archebakterií. U druhu *Trimyema* sp. se jednalo o druh *Methanocorpusculum parvum* (Finlay *et al.* 1993) a u druhu *T. compressum* šlo o druh *Methanobrevibacter arboriphilicus* (Shinzato *et al.* 2007). U nálevníka druhu *Nyctotherus ovalis*, jenž žije jako endosymbiont ve střevě termitů nebo švábů, byl popsán rod *Methanobrevibacter* (Gijzen *et al.* 1991; Gijzen a Barugahare 1992). Společně můžeme všechny tyto rody zařadit do dvou hlavních řádů, a to Methanobacteriales (rody *Methanobacterium*, *Methanoplanus* a *Methanobrevibacter*) a Methanomicrobiales (rody *Methanosaeta* a *Methanocorpusculum*). Předpokládá se, že k této symbióze mezi nálevníky a metanogenními archebakteriemi došlo opakovaně a nezávisle na sobě. Dále můžeme očekávat, že některé tyto vztahy mohly vzniknout relativně nedávno (Embley a Finlay 1993).



Obr. 9. Endosymbiotické bakterie (B) okolo hydrogenosomu (M) druhu *Nyctotherus ovalis*. Podle Gijzen *et al.* (1991).

3. Materiál a metody

3.1. Kultivace anaerobních nálevníků a získávání nových izolátů

3.1.1. Složení a příprava používaných médií

- **Sonnebornovo parameciové médium (ATCC # 802):**

Tab. 1. Sonnebornovo parameciové médium (ATCC # 802)

Cereal Grass Media (Scholar Chemistry)	1,25 g
Na ₂ HPO ₄	0,25 g
destilovaná voda	doplnit do 500 ml

Přípravek Cereal Grass Media byl nasypán do destilované vody a nechal se 5 minut vařit. Po zchladnutí bylo médium přefiltrováno pomocí filtračního papíru, doplněno do 500 ml a nalito do 0,5 l láhve. Nakonec byl k médiu přidán Na₂HPO₄. Hotové médium bylo autoklávováno.

- **Mořské 802 médium (ATCC # 1525):**

Nejdříve bylo připraveno dvakrát koncentrované ATCC # 802 médium (viz výše), ale nebyl do něho přidán Na₂HPO₄. Poté byla připravena 2x koncentrovaná umělá mořská voda, která byla pomocí sterilizačního filtru přefiltrována do vychladlého dvakrát koncentrovaného ATCC # 802 média.

Tab. 2. 2x koncentrovaná umělá mořská voda

NaCl	24,71 g
KCl	0,68 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,36 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	4,66 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	6,3 g
NaHCO ₃	0,18 g
destilovaná voda	doplnit do 500 ml

– Tekuté LB Broth médium

Tab. 3. LB Broth médium

LB Broth (Sigma)	5 g
destilovaná voda	Doplnit do 500 ml

Prášek LB Broth byl rozpuštěn v destilované vodě a poté vykláván v autoklávu. Takto připravené médium se později použilo při klonování (viz kap. 3.5.) jako živné médium pro bakterie.

– Pevné LB Broth médium

Tab. 4. Směs agarů a LB Broth na Petriho misky

LB Broth (Sigma)	10 g
Bakteriologický agar (Oxoid Limited, UK)	6 g
destilovaná voda	Doplnit do 500 ml

Nejprve byl prášek LB Broth rozpuštěn v destilované vodě, poté byl do roztoku přidán bakteriologický agar. Médium bylo autoklávováno a rozplněno do Petriho misek. Ty se pak použily při klonování (viz kap.3.5.).

3.1.2. Příprava umělého anaerobního prostředí

Pro přípravu umělého anaerobního prostředí byly použity sáčky AnaeroGen (Oxoid), které byly společně s vybranými izoláty vkládány do anaerostatu. Pomocí sáčku AnaeroGen 2.5 l (Oxoid) v něm byla vytvořena umělá anaerobní atmosféra.

3.1.3. Získávání nových izolátů

Vzorky kultur byly odebírány z mikrooxických nebo anoxických sladkovodních sedimentů. Poté byl 1 ml získaného materiálu přeočkován do 9 ml ATCC # 802 média. Po čtrnácti dnech byla kultura přeočkována a dále pak každý týden znovu očkována.

3.1.4. Kultivace anaerobních nálevníků

Sladkovodní izoláty byly kultivovány v ATCC # 802 médiu a mořské kultury v ATCC # 1525 médiu. Kultivace probíhala při pokojové teplotě (asi 23 °C). Jednotlivé kultury byly přeočkovány jednou za týden. Některé izoláty byly drženy v uměle vytvořené anaerobní atmosféře, kde byly očkované jednou týdně. Inokulum bylo 1 ml.

3.2. Izolace DNA

Před vlastní izolací DNA bylo ze zkumavky odebráno 2 ml vzorku a stočeno na 7 minut/1000g. Bylo odebráno 1900 µl supernatantu a zbylých 100 µl bylo resuspendováno a použito pro vlastní izolaci DNA. K izolaci DNA byl použit kit DNeasy Blood® & Tissue Kit (Qiagen) dle protokolu „Purification of total DNA from animal blood or cells (spin – column protocol)“ nebo kit ZR Genomic DNA II Kit™ (Zymo Research) podle protokolu „Cell suspension and proteinase K digested samples“. DNA byla uchovávána v -20 °C.

3.3. Amplifikace a elektroforéza DNA

3.3.1. Amplifikace DNA

Amplifikace DNA byla prováděna pomocí LA polymerázy (5 U/µl; Top-Bio). Při amplifikaci byly použity univerzální eukaryotické primery (Medlin *et al.* 1988). V následujících tabulkách je shrnuto složení reakčních směsí při použití LA polymerázy a nastavení teplotního cyklu v termocykléru pro LA polymerázu.

Tab. 5. Použité primery

Medlin A	AYCTGGTTGAYYTGCCAG
Medlin B	TGATCCATCTGCAGGTTACCT

Tab. 6. Složení reakční směsi s LA polymerázou (Top-Bio)

LA pufr (10x konc., + MgCl ₂)	5 µl
dNTP (10 mM každý)	1,5 µl
DMSO	1 µl
Medlin A	12,5 pmol
Medlin B	12,5 pmol
La polymeráza	0,5 µl
DNA	až 5 ng
H ₂ O	doplnit do 50 µl

PCR reakce probíhala v termocykléru při nastavení teplotního cyklu:

Tab. 7. Nastavení teplotního cyklu při použití LA polymerázy

počet cyklů	teplota	čas	část cyklu
1x	94°C	1 min	počáteční denaturace
31x	94°C	20 sec	denaturace
	55 °C	30 sec	nasednutí primerů
	68 °C	2 min 30 sec	polymerace
1x	68 °C	10 min	závěrečná polymerace

3.3.2. Elektroforéza amplifikované DNA

Elektroforéza byla provedena na 1% horizontálním gelu. Pro zvýraznění jednotlivých fragmentů byl přidán ethidiumbromid (finální koncentrace 0,5 µg/ml). Obraz elektroforetického gelu byl vyfocen digitálním fotoaparátem a pomocí programu Alpha DigiDoc RT (Innovantion) byl převeden do počítače a zpracován.

3.4. Purifikace PCR produktů

Pokud byl na elektroforetickém záznamu zviditelněn pouze jeden naamplifikovaný fragment, byl PCR produkt přečištěn pomocí kitu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) dle protokolu „QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Using a Microcentrifuge“. DNA byla eluována do 25 µl EB pufru a skladována při -20°C. Výsledná koncentrace DNA ve vzorku byla změřena na nanodropu, tj. na spektrofotometru pro měření koncentrace DNA v mikroobjemu (NanoDrop[®] ND-1000) a poslána na sekvenaci.

V případě, že bylo naamplifikováno více fragmentů, byla část gelu s fragmentem požadované délky vyříznuta a přečištěna kitem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) a DNA byla eluována do 6 – 8 µl sterilní miliQ H₂O.

3.5. Klonování

Pokud došlo k naamplifikování několika fragmentů nebo v případě, že v kultuře bylo přítomno více druhů nálevníků, bylo nutné přečištěný vzorek zaklonovat. K tomu byl použit klonovací kit pGEM-T Easy Vector System (Promega) a kompetenční buňky *Escherichia coli* JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega).

3.5.1. Příprava ligační směsi

Tab. 8. Složení ligační směsi

2x ligační pufr	5 µl
vektor pGEM T-easy	1 µl
ligáza	1 µl
DNA	asi 50 ng

Vzorek se po namíchání krátce ztočil a nechal se přes noc v lednici při 4°C.

3.5.2. Příprava bakteriálních kolonií

1. Všechna ligační směs byla opatrně přidána do rozmrzlých kompetenčních buněk a nechala se 20 minut na ledu.
2. Mikrozkušavka s buňkami byla vložena na 45 sekund do 42 °C. Po uplynutí času byla zkumavka znovu vrácena na led na 2 minuty.
3. Po 2 minutách bylo do zkumavky opatrně přidáno 800 µl LB média a buňky se nechaly na třepačce (37 °C, 220 rpm) 1,5 hodiny inkubovat.
4. Mezitím byla připravena směs na potírání Petriho misek, která se na ně poté na ně natřela.
5. Po skončení inkubace bylo na připravené Petriho misky natřeno 150 µl buněk.
6. Plotny byly dány přes noc do termostatu o teplotě 37 °C.

3.5.3. Příprava směsi na potírání Petriho misek

Tab. 9. Směs na potírání Petriho misek

IPTG (23,83 µg/ml)	100 µl
ampicilin (100 µg/ml)	25 µl
X-gal (50 µg/ml)	20 µl

3.5.4. Colony PCR

Pomocí sterilní špičky automatické pipety bylo od každého izolátu odebráno kolem 10 bílých kolonií. Bakterie byly resuspendovány v 9 µl vody, která byla předem napipetována do mikrozkušavek. Takto připravené vzorky byly vloženy do termocykléru.

Tab. 10. Nastavení degradačního teplotního cyklu

1x	96°C	5 min
1x	50°C	1 min 50 sec
1x	96°C	1 min 50 sec
1x	45°C	1 min
1x	96°C	1 min
1x	40°C	1 min

Rozpuštěná DNA ve vodě byla použita pro PCR reakci. Při amplifikaci byly použity primery T7 a SP6 komplementární k vektoru.

Tab. 11. Použité primery

Primer SP6	GATTTAGGTGACACTATAG
Primer T7	TAATACGACTCACTATAGGG

Tab. 12. Složení reakční směsy při použití Combi PPP Master Mix (Top-Bio)

Combi PPP Master Mix	10 µl
primer SP6	10 pmol
primer T7	10 pmol
bakteriální lyzát	9 µl

Tab. 13. Nastavení teplotního cyklu při použití Combi PPP Master Mix (Top-Bio)

počet cyklů	teplota	čas	část cyklu
1x	94°C	4 min	počáteční denaturace
31x	94°C	30 sec	denaturace
	50°C	30 sec	nasednutí primerů
	72°C	2 min 30 sec	polymerace
1x	72°C	10 min	závěrečná polymerace

Přítomnost naamplifikovaného fragmentu byla ověřen na horizontální elektroforéze. Pokud vyšel pozitivní výsledek, byl vzorek přečištěn pomocí kitu (viz kap. 3.4.). Výsledná koncentrace DNA byla změřena na nanodropu a poslána na sekvenaci. Jakmile nám vyšla nízká koncentrace DNA nebo jsme věděli, že nám DNA nebude stačit na všechny sekvenační reakce, dali jsme bakteriální kolonie napěstovat a následující den jsme z nich vyizolovali plasmidy.

3.5.5. Izolace plasmidů

1. Vybrané kolonie byly pomocí špičky automatické pipety přeneseny do zkumavky se 4 ml LB média a 4 µl ampicilinu (100 µl/ml) a pěstovány přes noc v třepačce (37°C/220 rpm).
2. Izolace plasmidů byla provedena kitem Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).
3. Množství DNA bylo změřeno na nanodropu a plasmid byl poslán na sekvenaci.
4. Zbylá plasmidová DNA byla skladována v -20°C.

3.6. Sekvence DNA

Sekvence DNA byla provedena v Laboratoři sekvenace DNA na PřF UK. Vzorokly pro sekvenační reakci byly připravovány do mikrozkušavek smícháním templátové DNA, primeru a vody (viz tab. 14).

Tab. 14. Složení sekvenační směsy

DNA	100 ng/1 kbp
primer	3,2 pmol
H ₂ O	doplnit do 14 µl

Tab. 15. Použité primery

Medlin A	AYCTGGTTGAYYTGCCAG
Medlin B	TGATCCATCTGCAGGTTACCT
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
577F	GCCAGCMGCCGCGGT
577R	ACCGCGGCKGCTGGC
1262F	GGTGGTGCATGGCCG

3.7. Vyhodnocování sekvencí a fylogenetická analýza

Jednotlivé osekvenované části sekvencí byly složeny v programu SeqMan (součást programového balíku DNASTAR). Z konečných sekvencí byly odstraněny sekvence primerů.

3.7.1. Tvorba a úprava alignmentu

Alignment byl vytvořen metodou MAFFT (Kato *et al.* 2002) pomocí internetového serveru <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. Byl vybrán algoritmus G-INS-i, ostatní parametry zůstaly nezměněny. Výsledný alignment byl ručně upraven v programu BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999). Z alignmentu byly odstraněny variabilní oblasti, u kterých jsme si nemohli být jisti, že byly správně zalignovány. Začátek a konec byl ořezán tak, aby všechny sekvence začínaly a končily stejně. U neúplných sekvencí byl začátek a konec nahrazen neurčitými bázemi (n).

3.7.2. Tvorba fylogenetických stromů

Fylogenetické stromy byly konstruovány metodou maximum likelihood a Bayesovskou metodou. Analýza maximum likelihood byla provedena v programu RaxML 7.2.6 (Stamatakis 2006) s modelem GTRGAMMAI. V tomto programu byla provedena i bootstrapová analýza s 1000 replikáty. Konsenzuální strom byl konstruován v programu Consense programového balíku Phylip 3.69 (Felsenstein 1989), v jeho uzlech byla čísla bootstrapové hodnoty. Bayesovská analýza byla provedena v programu MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck a Ronquist 2001) s modelem GTR + Γ + I + covarion. Ostatní parametry zůstaly nezměněny. Počet generací byl nastaven tak, aby odchylka dvou samostatně běžících analýz (původní nastavení programu) za posledních 75 % generací byla menší než 0,01. Perioda burn-in byla stanovena jako prvních 25 % generací. Program MrBayes dále spočítal Bayesovské posteriorní pravděpodobnosti jednotlivých větví.

3.8. Morfologie

Nativní preparáty byly pozorovány mikroskopem Olympus BX 51 s použitím Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu. Pozorované objekty byly snímány kamerou Olympus DP70/DP71 a zpracovány v programu Quick PHOTO CAMERA 2.3. Kromě těchto nativních preparátů byly pozorovány i preparáty obarvené protargolem. Preparáty byly zapůjčené ze sbírky PřF UK. Během barvení protargolem se postupovalo dle protokolu podle Nie (1950), který byl modifikován (viz Ptáčková 2010). Preparáty barvené protargolem byly pozorovány pod normálním světlem s použitím modrého filtru.

4. Výsledky

4.1. Izoláty

Vzorky sladkovodních izolátů byly nejčastěji nasbírány v České republice, ale máme k dispozici i vzorky z ciziny (viz tab. 16). Do dnešní doby úspěšně kultivuji 29 různých izolátů s různými druhy nálevníků. Izolát GRUBER zanikl, ostatní kultury jsou k dispozici na Katedře zoologie PřF UK. Vzorky nejčastěji nasbírali kolegové z PřF UK a čtyři izoláty z České republiky jsem získala já, z toho jsme pro naše účely použili pouze jeden (KLEPAC). V ostatních izolátech nenarostli nálevníci. Většinu izolátů mi poskytli RNDr. Ivan Čepička, Ph.D. a Mgr. Eliška Ptáčková, izolát VLH1 jsme obdrželi od Mgr. Vladimíra Hampla, Ph.D.

Ve většině izolátů se kromě nálevníků vyskytovaly i jiné organismy. Nejčastěji se jednalo o zástupce ze skupin Heterolobosea, Euglenozoa a Archamoebae. Přítomnost těchto organismů v kulturách neovlivnila naši práci na nálevnicích.

Všechny sladkovodní izoláty (VT2, HRAD1, HRAD2, BOTANKA, 3ML, SADSKA, SWAN4, KLEPAC, VLADECH, GRUBER, OLSRYB, CSS, IND5, QUEENSLAND, FRIJESKYNE, RADUN, VIT9, SUSBARB, EVROS4B, MORETES, VLH1 a PANT3) byly kultivovány na ATCC #802 médiu, mořské izoláty (COORUNG2B, LARNAKA2N, LUC3, EVROS2, BALIKMARAN, VIT1AN a LAGOS) na ATCC #1525 médiu. Izolát LIVADIAN byl kultivován ve dvoufázovém Dobell-Leidlaw médiu. Toto médium se v naší laboratoři rutinně používá pro pěstování trichomonád, retortamonád a dalších prvoků izolovaných z trávicího traktu živočichů. V kultuře LIVADIAN jsou kromě našeho nálevníka přítomny i volně žijící trichomonády (Yubuki *et al.* 2010). Izoláty LARNAKA2N, LUC3, IND5 a LIVADIAN byly na několik týdnů dány do anaerostatu, abychom zjistili, zda budou schopné přežít anaerobní podmínky. Ukázalo se, že jsou schopné přežít.

Tab. 16. Získané izoláty

Izolát	Lokalita	Souřadnice	Habitat
3ML	Třetí Mlýn, Chomutov, ČR	50°29'S, 13°20'V	strouha
BALIKMARAN	Balikpapan, Borneo, Indonésie	1°20'S, 116°50'V	mořský sediment
BOTANKA	Botanická zahrada PřF UK, Praha, ČR	50°04'S, 14°25'V	jezíčko
COORUNG2B	Národní park Coorong, Salt Creek, Severní Amerika	36°07'S, 139°38'V	mořský sediment
CSS	Jetřichovice, Českosaské Švýcarsko, ČR	50°51'S, 14°22'V	kaluž
EVROS2	delta řeky Evros, Řecko	40°48'S, 26°00'V	sladkovodní sediment
EVROS4B	delta řeky Evros, Řecko	40°50'S, 26°03'V	sladkovodní sediment
FRIJESKYNE	Ribeiro Frio, Madeira	32°44'S, 16°53'V	sladkovodní sediment
GRUBER	Gruberova studánka, ČR	48°48'S, 15°38'V	sladkovodní sediment
HRAD1	vrch Hradiště u Chomutova, ČR	50°27'S, 13°20'V	sladkovodní sediment
HRAD2	vrch Hradiště u Chomutova, ČR	50°27'S, 13°20'V	sladkovodní sediment
IND5	Bhangarh, Indie	27°05'S, 76°17'V	sladkovodní sediment
KLEPAC	hora Klepáč, Králický Sněžník, ČR	50°09'S, 16°47'V	sladkovodní sediment
LAGOS	Lagos, Řecko	41°00'S, 25°06'V	Mořský sediment
LARNAKA2N	Larnaka, Kypr	34°51'S, 33°37'V	mořský sediment
LIVADIAN	Jezero u Středozemního moře, Kypr	34°58'S, 33°39'V	sediment o neznámé salinitě
LUC3	Ostrov Brač, Chorvatsko	43°23'S, 16°34'V	mořský sediment
MORETES	Morretes, Brazílie	25°26'J, 48°47'Z	sladkovodní sediment
OLSRYB	Olšanský Rybník, Praha, ČR	50°0'S, 14°29'V	sladkovodní sediment
PANT3	Národní park Pantanal, Brazílie	16°47'J, 56°51'Z	sladkovodní sediment
QUEENSLAND	Cooktown, QLD	15°27'J, 145°58'V	sladkovodní sediment
RADUN	Raduň, ČR	49°53'S, 17°56'V	rybníček
SADSKA	Sadská, ČR	50°9'S, 14°58'V	sladkovodní sediment
SUSBARB	Národní park Bako, Borneo, Malajsie	1°43'S, 110°26'V	sladkovodní sediment
SWAN4A	Perth, Swan river, WA	31°56'J, 115°53'V	sladkovodní sediment
SWAN4B	Perth, Swan river, WA	31°56'J, 115°53'V	sladkovodní sediment
VIT1AN	Kamenice, ČR	49°54'S, 14°35'V	sladkovodní sediment
VIT9	Kamenice, ČR	49°54'S, 14°35'V	sladkovodní sediment
VLADECH	Česká republika	nespecifikováno	sladkovodní sediment
VT2	rybník Velký Tisý, ČR	49°4'S, 14°42'V	sladkovodní sediment

4.2. Fylogenetická analýza

Celkem bylo získáno 36 sekvencí SSU rDNA, z toho 16 jich bylo ze třídy Armophorea, 10 ze třídy Plagiopylea, 5 sekvencí rodu *Cyclidium*, 1 sekvence izolátu LIVADIAN a zbývající 4 sekvence od různých nálevníků, již patřili mezi aerobní druhy. Celkem bylo provedeno 11 fylogenetických analýz SSU rDNA. Fylogenetické stromy ze sekvencí genu pro SSU rRNA (obr. 10 – 13) byly konstruovány metodou maximum likelihood a Bayesovskou metodou.

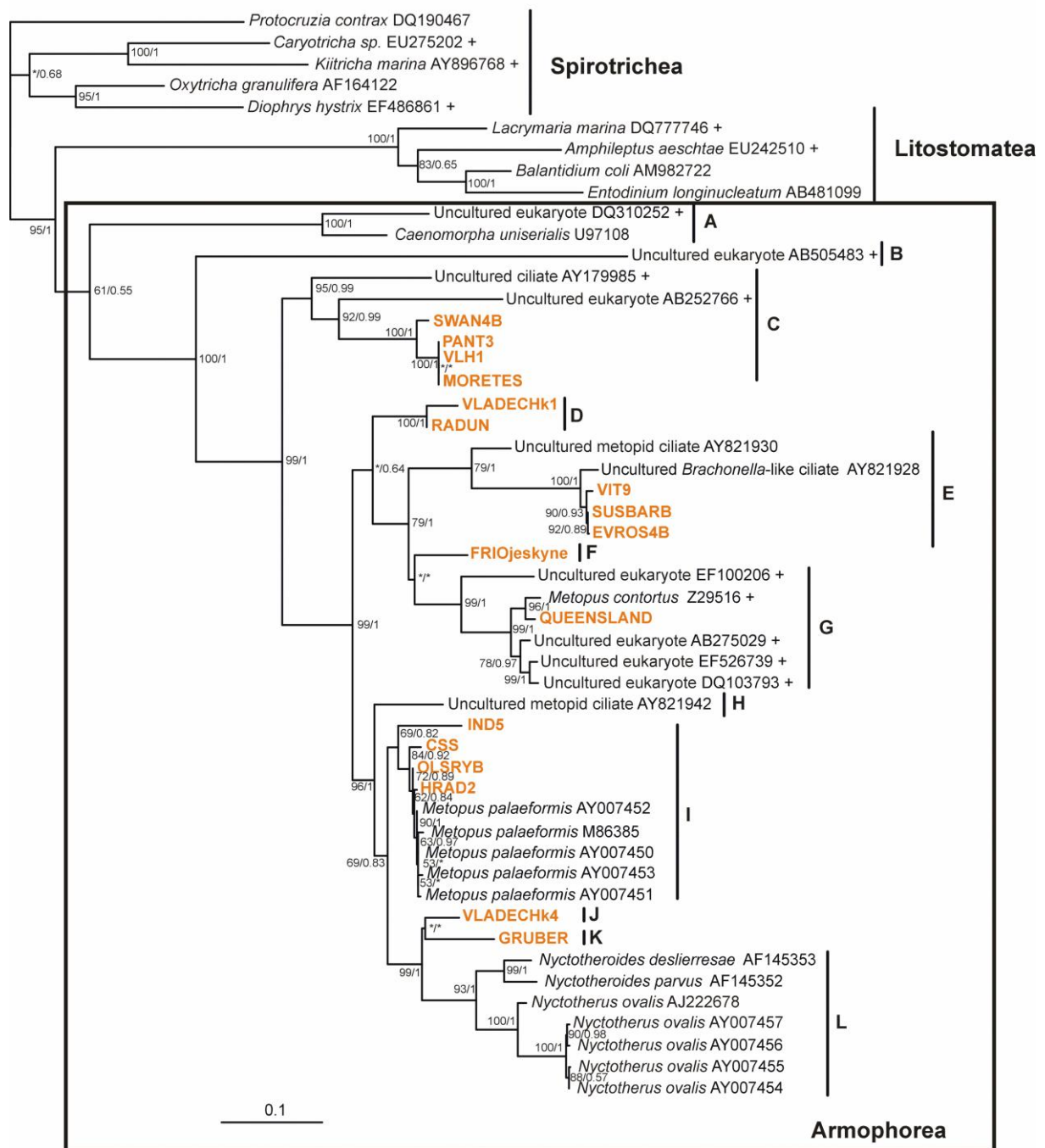
4.2.1. Třída Armophorea

Kromě našich nově získaných sekvencí SSU rDNA bylo použito 25 sekvencí různých zástupců třídy Armophorea získané z databáze GenBank. Jako outgroup byly použity 4 sekvence nálevníků ze třídy Litostomatea a 5 sekvencí nálevníků ze třídy Spirotrichea. Třídy Litostomatea a Spirotrichea jsou nejpříbuznější skupiny ke třídě Armophorea (Vďačný *et al.* 2010b).

Třída Armophorea nám vyšla jako monofyletická skupina, která je ale statisticky slabě podpořena (bootstrap 61; posterior probability (PP) 0,55). Podle naší analýzy se třída Armophorea dělí na 12 odlišných linií (A – L), viz obr. 10. Jednotlivé vztahy mezi nimi nebyly rozřešeny, navíc se výsledky podle obou použitých metod v některých případech lišily. Naše izoláty se vyskytují v liniích C, D, F, G, I, J a K. Linie A – I patří do řádu Armophorida, linie L je tvořena řádem Clevelandellida. Linie J a K, které zastupují naši dva nálevníci GRUBER a VLADECH klon 4, nemůžeme zařadit ani do jednoho řádu. Na základě našich výsledků se jedná o skupiny příbuzné řádu Clevelandellida.

Jako první se oddělila linie A, jež zahrnuje rod *Caenomorpha* a enviromentální sekvenci DQ310252. Další odvětvující se skupinou byla linie B s nekultivovaným nálevníkem AB505483. Následující skupiny C a D jsou tvořeny dvěma environmentálními sekvencemi a našimi organismy SWAN4B, PANT3, VLH1, MORETES, VLADECH klon 1 a RADUN. Linie E je zastoupena jedním nekultivovaným nálevníkem, dále rodem *Brachonella* a jemu příbuznými izoláty VIT9, SUSBARB a EVROS4B. Izolát FRIOJESKYNE tvoří samostatnou skupinu F. Následující skupina G zahrnuje environmentální sekvence a jeden popsáný druh *Metopus contortus*. Tomuto druhu je příbuzný náš izolát QUEENSLAND (bootstrap 96; PP 1). Poté se odděluje linie H, ve které se nachází jeden nekultivovaný nálevník. Linie I je zastoupena popsáným druhem *Metopus palaeformis*, k němuž jsou příbuzné naše izoláty HRAD2, OLSRYB, CSS a IND5. Celá tato skupina je středně podpořena (bootstrap 69;

PP 0,82). Poslední dvě naše sekvence, GRUBER a VLADECH klon 4, vytvářejí již zmiňované skupiny J a K. Izolát GRUBER nám při předběžných analýzách pokaždé přeskakoval na jiná místa. Zřejmě to bylo dáno tím, že jsme měli k dispozici pouze částečnou sekvenci SSU rDNA, jež je dlouhá 575 bp. Proto jsme provedli i molekulárně fylogenetickou analýzu bez tohoto izolátu. Výsledná topologie fylogenetického stromu se nezměnila, sekvence VLADECH klon 4 byla stále příbuzná řádu Clevelandellida (data nejsou zařazena do výsledků). Poslední oddělující se skupinou je již zmiňovaný řád Clevelandellida.

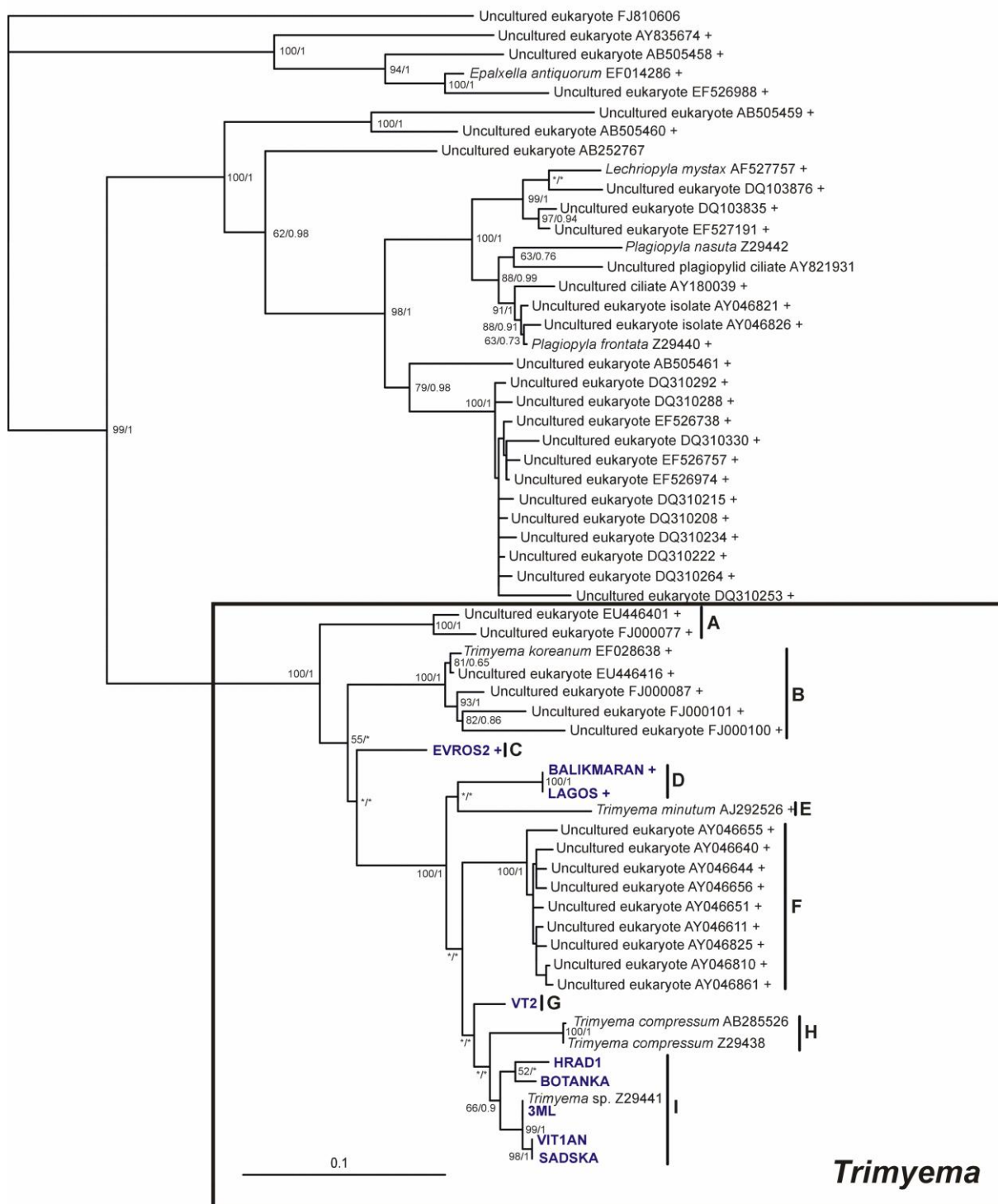


Obr. 10. Fylogenetická analýza SSU rDNA třídy Armophorea. Strom byl konstruován metodou maximum likelihood v programu RaxML. Čísla v uzlech představují hodnotu bootstrapu z maximum likelihood analýzy a posterior probability z Bayesovské analýzy, hodnoty < 50/0,5 jsou označeny hvězdičkou (*). Mořské organismy jsou označeny plusem (+). Strom je zakořeněn sekvencemi ze třídy Spirotrichea.

4.2.2. Třída Plagiopylea

Podářilo se nám osekvenovat 9 (3 mořské a 6 sladkovodní) izolátů rodu *Trimyema*. Kromě našich nově získaných sekvencí jsme v analýze použili 51 sekvenci organismů třídy Plagiopylea získaných z databáze GenBank. Většinou patřily nekultivovaným nálevníkům.

Rod *Trimyema* se podle našich výsledků rozpadl na 9 linií (viz obr. 11), fylogenetické vztahy mezi jednotlivými liniemi však nebyly vyřešeny. Rod *Trimyema* je monofyletická (bootstrap 100; PP 1). Až na druhy *Trimyema koreanum*, *T. minutum* a *T. compressum* se jednalo o neurčené nálevníky. Jako první se oddělila linie A, kterou tvořily dva nekultivovaní nálevníci. Poté následovala linie B s rodem *T. koreanum* a čtyřmi environmentálními sekvencemi. Izolát EVROS2 tvoří samostatnou linii C. Kultury BALIKMARAN a LAGOS vytvořily skupinu D. Dále následovala skupina E s druhem *T. minutum*. Následující skupinu F představovalo devět nekultivovaných nálevníků. Za ní se oddělila skupina G, ve které byl náš izolát VT2. Předposlední linii H utvořil druh *T. compressum* a do poslední skupiny I spadaly naše izoláty HRAD1, BOTANKA, 3ML, VIT1AN a SADSKA a *T. sp.* Z29441.

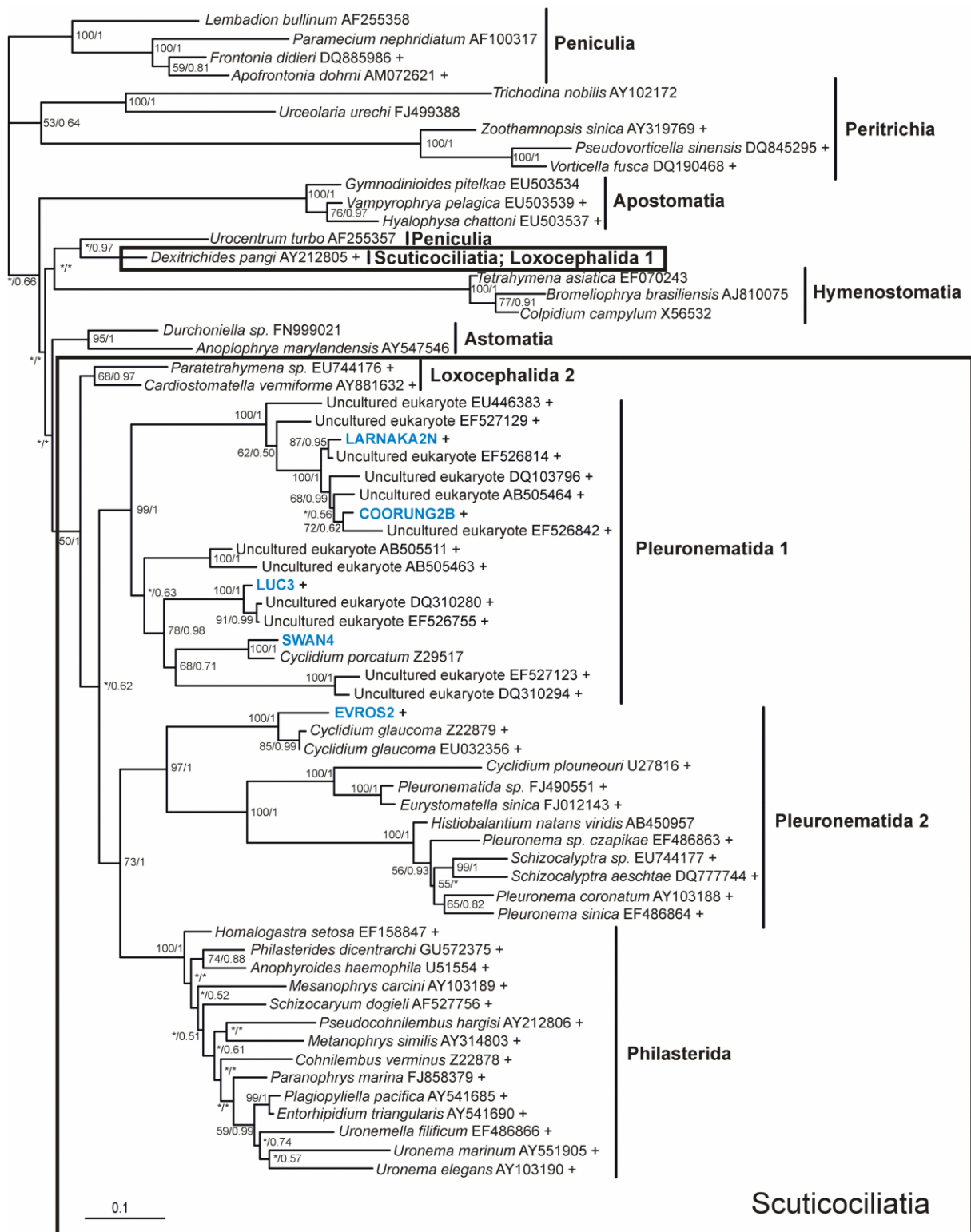


Obr. 11. Fylogenetická analýza SSU rDNA třídy Plagiopylea. Strom byl konstruován metodou maximum likelihood v programu RaxML. Čísla v uzlech představují hodnotu bootstrapu z maximum likelihood analýzy a posterior probability z Bayesovské analýzy, hodnoty < 50/0,5 jsou označeny hvězdičkou (*). Mořské organismy jsou označeny plusem (+). Strom je zakořeněn druhem *Epalxella antiquorum* a jí příbuznými environmentálními sekvencemi.

4.2.3. Rod *Cyclidium*

Rod *Cyclidium* náleží do třídy Oligohymenophorea a podtřídy Scuticociliatia. Podařilo se nám osekvenovat 1 sladkovodní a 4 mořské izoláty rodu *Cyclidium*. Kromě těchto 5 sekvencí jsme pro molekulárně fylogenetickou analýzu využili 41 sekvencí z podtřídy Scuticociliatia z databáze GenBank. Jako outgroup jsme použili zástupce dalších podtříd třídy Oligohymenophorea: podtřída Peniculida (5 sekvencí), podtřída Peritrichia (5 sekvencí), podtřída Apostomatia (3 sekvence), podtřída Hymenostomatia (3 sekvence) a podtřída Astomatia (2 sekvence).

Podtřída Scuticociliatia vytvořila polyfyletickou skupinu a rozpadla se na skupiny Loxocephalida 1, Loxocephalida 2, Pleuronematida 1, Pleuronematida 2 a Philasterida (viz obr. 12). Jako první se oddělila Loxocephalida 1. Do této skupiny patří druh *Dextrichides pangi*. Tento druh se nám přiřadil ke druhu *Urocentrum turbo*, který náleží do podtřídy Peniculia. Tedy mimo podtřidu Scuticociliatia. Poté následovaly skupiny Loxocephalida 2, Pleuronematida 1, Pleuronematida 2 a jako poslední se oddělila skupina Philasterida. Tento výsledek se shoduje s již publikovanými studiemi (např. Zhang *et al.* 2010). Naše nově osekvenované izoláty LARNAKA2N, COORUNG2B, LUC3 a SWAN4 náležely do skupiny Pleuronematida 1. O druh *Cyclidium porcatum* se jedná v případě izolátu SWAN4, o zbylých třech našich nálevnicích více nevíme, protože se odvětvují ve skupinách jinak obsahujících pouze environmentální sekvence. Izolát EVROS2 je příbuzný druhu *Cyclidium glaucoma* a patří do skupiny Pleuronematida 2.



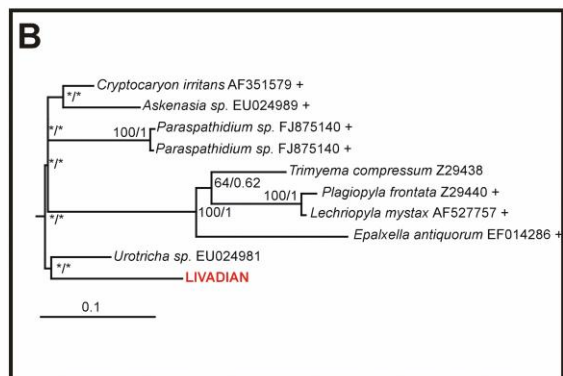
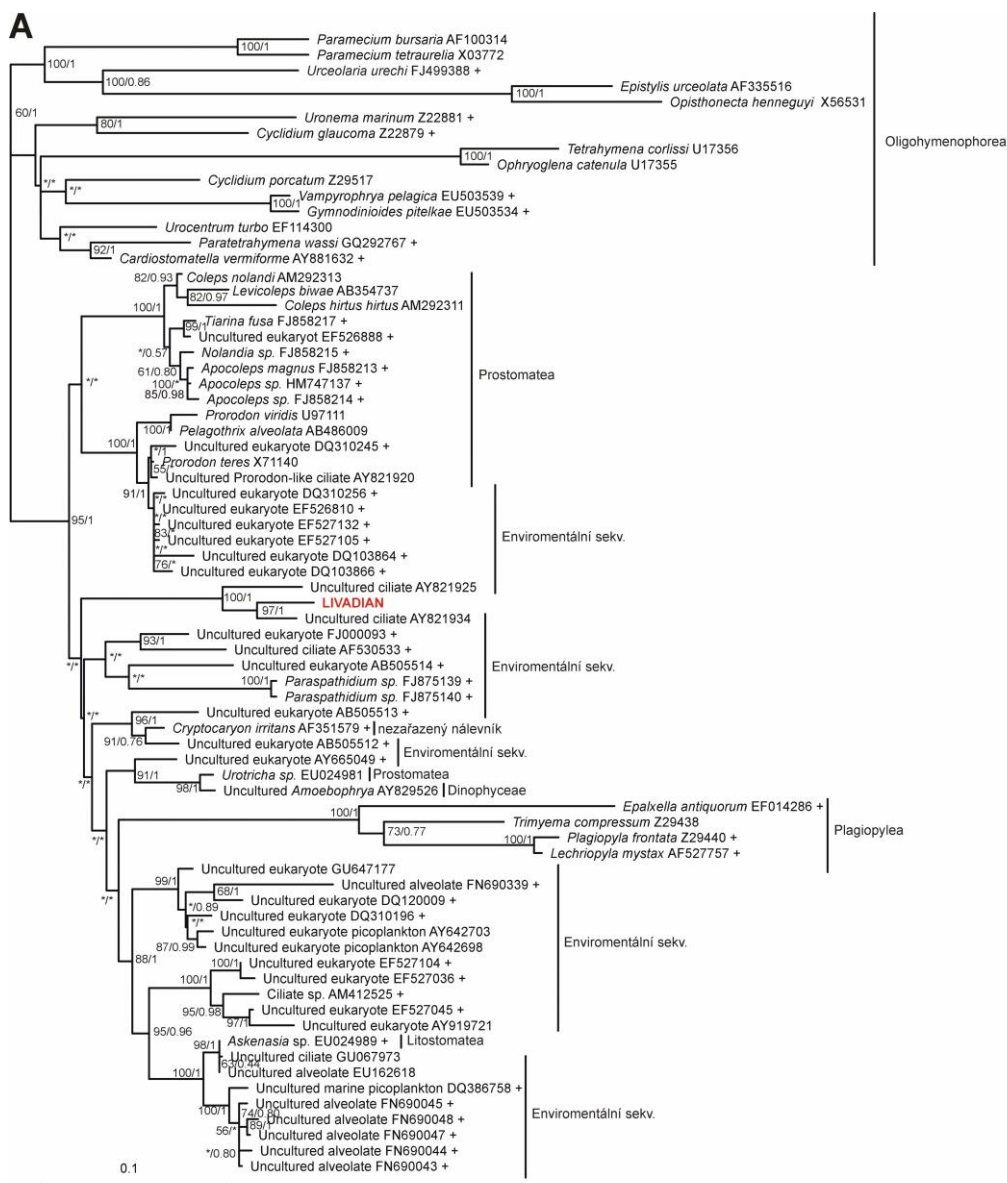
Obr. 12. Fylogenetická analýza SSU rDNA rodu *Cyclidium*. Strom byl konstruován metodou maximum likelihood v programu RaxML. Čísla v uzlech představují hodnotu bootstrapu z maximum likelihood analýzy a posterior probability z Bayesovské analýzy, hodnoty < 50/0,5 jsou označeny hvězdičkou (*). Mořské organismy jsou označeny plusem (+). Strom je zakořeněn podtřídou Peritrichia.

4.2.4. LIVADIAN

Nálevník z kultury LIVADIAN pochází z Kypru. Sekvenci tohoto nálevníka jsme vyhodnotili pomocí metody BLAST, která se nachází na internetovém serveru <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Na základě výsledků této metody jsme pro fylogenetické analýzy použili kromě sekvence LIVADIAN dalších 74 sekvencí nálevníků. Jako outgroup byly použity sekvence zástupců třídy Oligohymenophorea (15 sekvencí). Kromě této třídy byly do datasetu zařazeny i sekvence tříd Prostomatea (14 sekvencí) a Plagiopylea (4 sekvence).

Podle našich analýz se sekvence rozdělily do 11 linií. Fylogenetické vztahy mezi těmito skupinami nebyly rozřešeny (obr. 13A). Třída Prostomatea v našem případě vyšla jako polyfyletická skupina. Druhy *Cryptocaryon irritans* a *Urotricha* sp. EU024981 se přiřadily k nálevníkům mimo třídu Prostomatea. Nálevník LIVADIAN se dvěma environmentálními sekvencemi vytvořil samostatnou skupinu, ke které byly příbuzné třídy Prostomatea a Plagiopylea. Kromě těchto dvou tříd byly k izolátu LIVADIAN příbuzné i další skupiny. Ty ale obsahovaly environmentální sekvence, proto o nich nemůžeme téměř nic říci.

Kromě této analýzy jsme provedli ještě jednu fylogenetickou analýzu, tentokrát bez environmentálních sekvencí (viz obr. 13B). Izolát LIVADIAN se přiřadil ke druhu *Urotricha* sp. EU024981, ale bez statistické podpory (bootstrap < 50, PP < 0,50). Ten náleží do třídy Prostomatea. K této skupině byly příbuzné třídy Plagiopylea, dále skupina, jež je tvořena rodem *Paraspathidium*, a nakonec skupina, ve které jsou druhy *Cryptocaryon irritans* a *Askenasia* sp. EU024989.

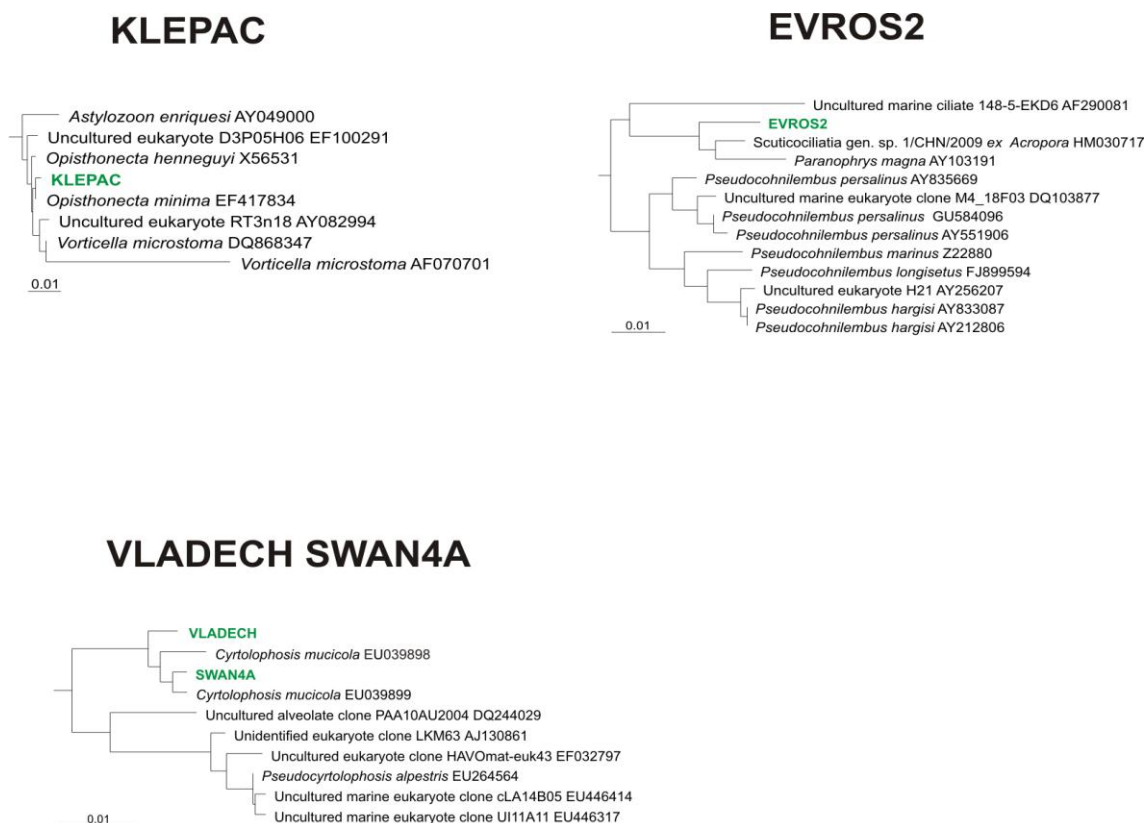


Obr. 13. Fylogenetická analýza SSU rDNA izolátu LIVADIAN. Strom byl konstruován metodou maximum likelihood v programu RaxML. Čísla v uzlech představují hodnotu bootstrapu z maximum likelihood analýzy a posterior probability z Bayesovské analýzy, hodnoty < 50/0,5 jsou označeny hvězdičkou (*). Mořské organismy jsou označeny plusem (+). **A:** s environmentálními sekvencemi; **B:** bez environmentálních sekvencí. Strom není zakofeněn.

4.3. Ostatní nálevníci

Kromě anaerobních nálevníků se nám podařilo osekvenovat i SSU rDNA druhů, které byly aerobní. Jednalo se o izoláty KLEPAC, EVROS2, VLADECH a SWAN4A. U těchto druhů jsme neprováděli fylogenetické analýzy. Jednotlivé sekvence jsme vyhodnotili metodou BLAST pomocí internetového serveru <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Fylogenetické stromy jsme převzali také z tohoto serveru.

Izolát KLEPAC se nám přiřadil do třídy Oligohymenophorea a jednalo se o nálevníka příbuzného druhu *Opisthnecta minima*. Izolát EVROS2 byl příbuzný druhu *Paranophrys magna* a také náležel do třídy Oligohymenophorea. V případě zbylých dvou izolátů VLADECH a SWAN4A šlo o zástupce třídy Colpodea a byly příbuzné druhu *Cyrtolophosis mucicola* (viz obr. 14).



Obr. 14. Fylogenetická pozice aerobních izolátů KLEPAC, EVROS2, VLADECH a SWAN4A. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.4. Morfologie

Živé buňky byly pozorovány a nafoceny s použitím světelného mikroskopu a DIC. Mohli jsme tak sledovat způsob jejich pohybu a některé orgány. V jednom případě se nám podařilo nafotit dělící se buňky. Pro zvýraznění některých struktur jsme obarvili několik izolátů nálevníků protargolem. Po obarvení jsme tak mohli na jednotlivých preparátech vidět různé tvary makronukleů, mikronukleus, bičíky, orální aparát a kinetidy.

Izoláty:

Třída Armophorea

Jedná se o organismy velkých rozměrů (okolo 80 μm) s tělem zatočeným jednou (obr. 15 B – E, G, H, J) nebo dvakrát (obr. 15 A, F) doleva. Jednotliví zástupci se od sebe navzájem liší tvarem těla. Pozorovali jsme organismy, které měly štíhlé, podlouhlé tělo (obr. 15 C, G, H, J), nebo byl tvar jejich těla kapkovitý (obr. 15 B, D, E) až téměř kulatý (obr. 15 A, F). Na živých buňkách byla na první pohled vidět pulzující vakuola. Dále byl rozeznatelný orální aparát a makronukleus. Na protargolových preparátech (obr. 18 A, B, C, E) došlo ke zvýraznění orální ciliatury, kinetid a makronuleu. Makronukleus se nacházel buď v přední části, nebo uprostřed těla. Jednotlivé makronukleidy se lišily tvarem (kulatý, fazolovitý, zakroucený atd.) a v jeho blízkosti se nacházel mikronukleus.

Třída Plagiopylea

Do této třídy patří nálevníci, kteří jsou mnohem menších rozměrů než organismy náležící do třídy Armophorea. Živé buňky jsou velké okolo 30 μm . Jednotliví zástupci se tvarově od sebe navzájem téměř neliší. Tvar těla je oválný až téměř kulatý, na konci těla je patrné kaudální cilium (viz obr. 16). Makronukleus jsme na živých buňkách téměř nepozorovali. Pulzující vakuola a orální aparát nebyly tak výrazné jako u předchozí třídy. Na protargolových preparátech (obr. 19A - D) byl na první pohled vidět výrazný kulatý makronukleus. Nacházel se uprostřed těla a v jeho blízkosti jsme mohli vidět mikronukleus. V přední části těla se nacházel subapikální orální aparát, který je pro rod *Trimyema* typický. Na konci těla jsme mohli pozorovat kaudální cilium.

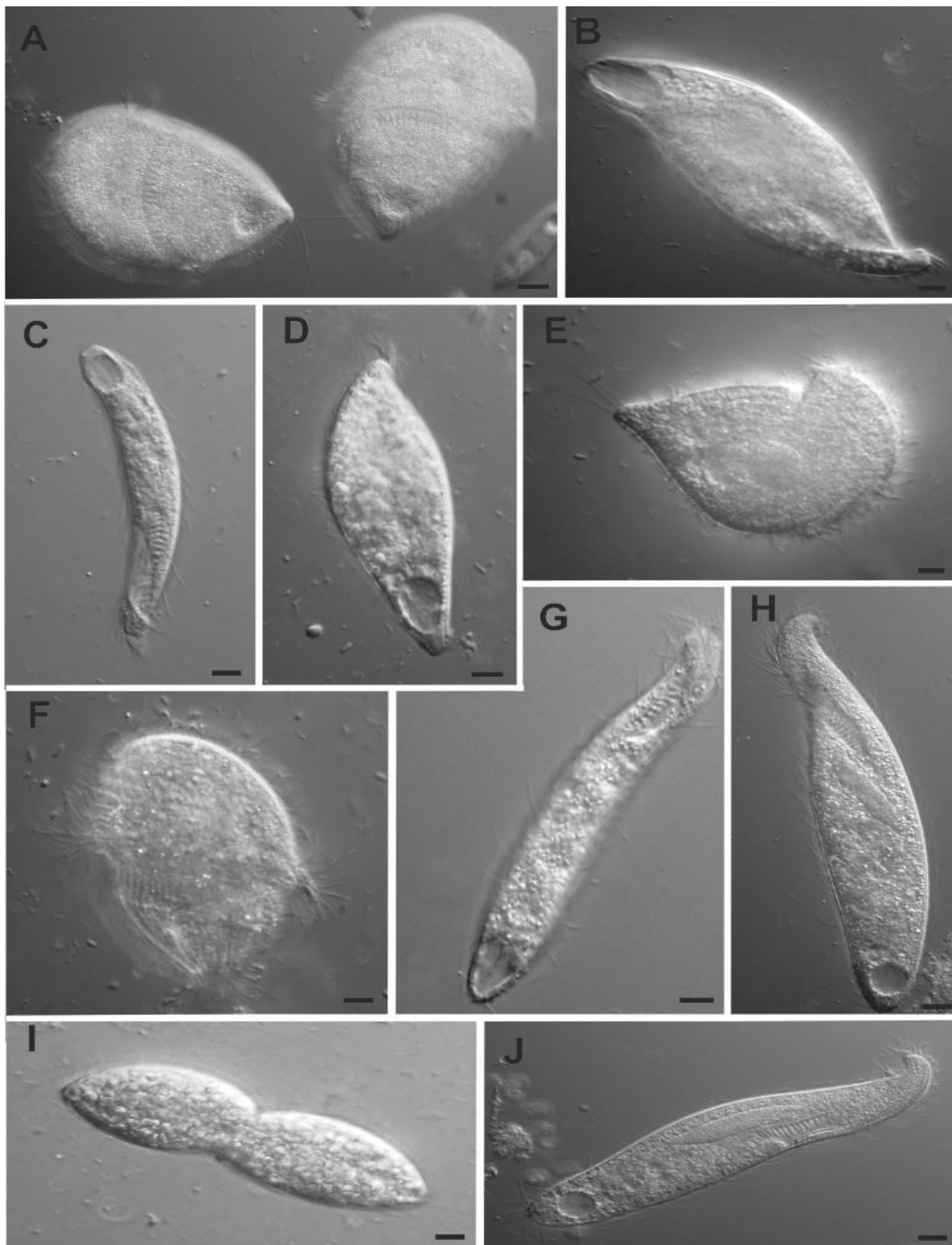
LIVADIAN

Jedná se o nálevníka podobných rozměrů jako u třídy Armophorea. Tvar těla je oválný, dopředu zúžený, vybíhající v apikální orální aparát. Živé buňky jsou asi 70 μm dlouhé.

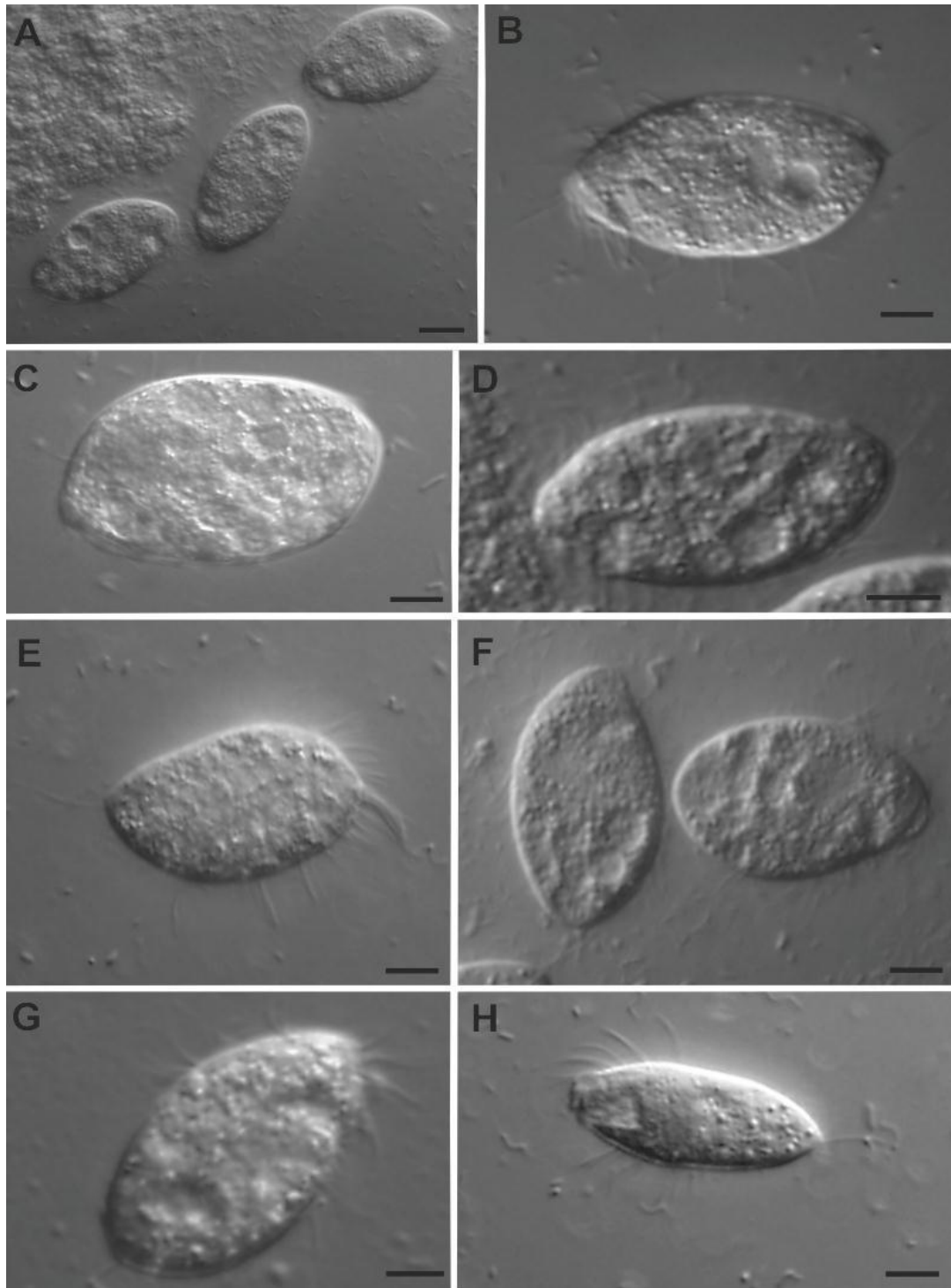
Na živých buňkách můžeme vidět výraznou pulzující vakuolu a makronukleus (viz obr. 17). Po obarvení protargolem došlo ke zvýraznění oválného makronukleu, jenž se nachází uprostřed buňky nálevníka, a u kterého opět nalezneme mikronukleus. Kromě jader jsme mohli pozorovat orální aparát a kinety (obr. 18D).

Rod *Cyclidium*

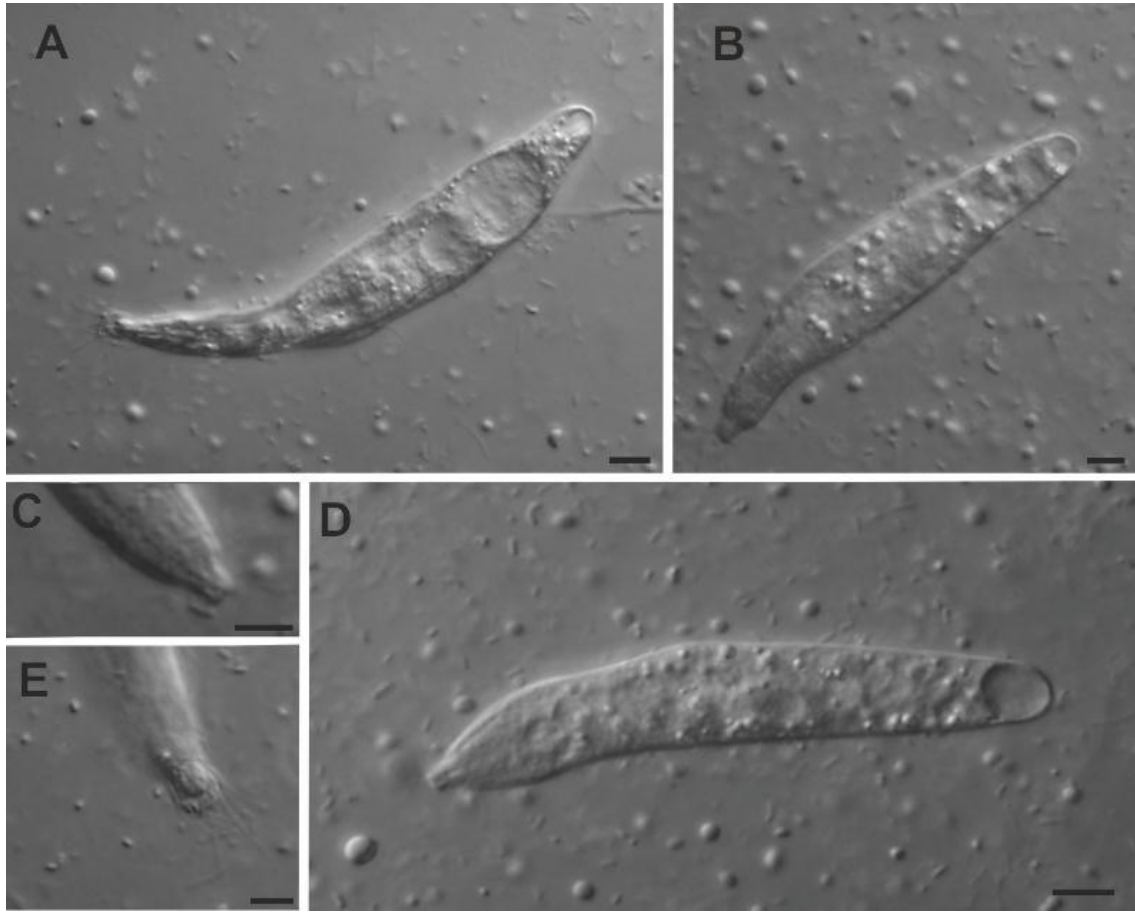
Tento rod jsme pozorovali jenom na protargolových preparátech (izolát LARNAKA2N). Pro nedostatek času jsme se nezabývali focením živých buněk. Rod *Cyclidium* je velký přibližně jako rod *Trimyema* (okolo 30 μm). Má oválný tvar buňky a na jejím konci nalezneme dlouhé kaudální cilium. V přední části těla je nápadný cytostom, makronukleus a mikronukleus (viz obr. 19E).



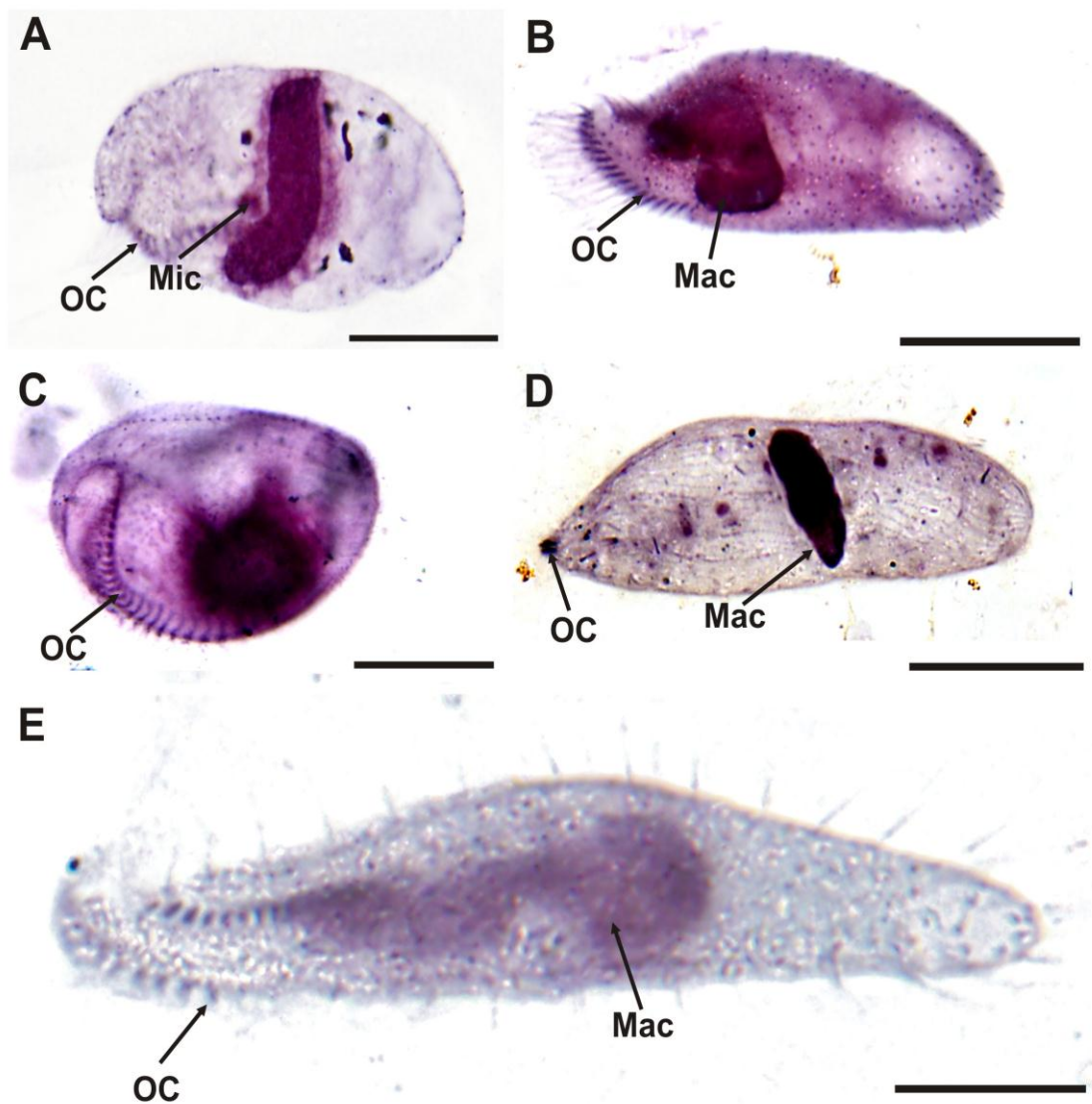
Obr. 15. Fotografie živých buněk izolátů náležících do třídy Armophorea. **A:** izolát VLADECH; **B:** izolát IND5; **C:** izolát HRAD2; **D:** izolát MORETES; **E:** izolát RADUN; **F:** izolát VIT9; **G:** izolát CSS; **H:** izolát VLADECH; **I:** izolát MORETES-konjugace; **J:** izolát VLADECH. Měřítko 10 μm .



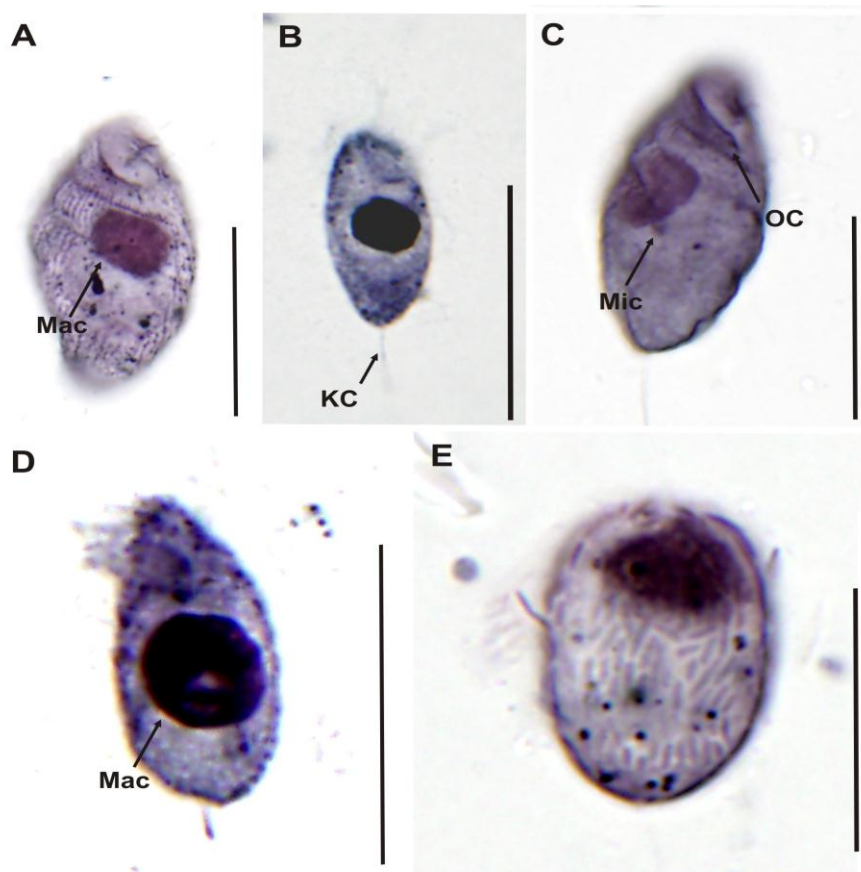
Obr. 16. Fotografie živých buněk izolátů náležící do rodu *Trimyema*. **A:** izolát VIT1AN; **B:** izolát SADSKA; **C:** izolát VT2; **D:** izolát VIT1AN; **E:** izolát SADSKA; **F:** izolát VIT1AN; **G:** izolát 3ML; **H:** izolát SADSKA. Měřítka 10 µm.



Obr. 17. Fotografie živých buněk izolátu LIVADIAN. **A, B, D:** nálevník; **C:** orální aparát; **E:** pulzující vakuola. Měřítko 10 μm .



Obr. 18. Fotografie buněk nabarvených protargolem. **A:** izolát MORETES; **B:** izolát IND5; **C:** izolát EVROS4B; **D:** izolát LIVADIAN; **E:** izolát CSS. OC-orální ciliatura; Mic-mikronukleus, Mac-makronukleus. Měřítko 20 μ m.



Obr. 19. Fotografie buněk nabarvených protargolem. **A:** izolát VT2; **B:** izolát BALIKMARAN; **C:** izolát VIT1AN; **D:** izolát HRAD1; **E:** izolát LARNAKA2N. OC-orální ciliatura; Mic-mikronukleus; Mac-makronukleus; KC-kaudální cilie. Měřítko 20 μm .

5. Diskuse

5.1. Kultivace

Jedním z našich cílů bylo osekvenovat a analyzovat SSU rDNA z co nejvíce volně žijících anaerobních nálevníků. V první řadě jsme se proto zaměřili na získávání co největšího počtu kultur. V současné době se nám daří úspěšně kultivovat 29 kultur, které nám posloužily ke studiu nálevníků, z toho jich je 23 sladkovodních a 6 mořských. V budoucnosti by se případně tyto kultury mohly dále hodit při popisu nových anaerobních linií. Mohlo by se tak dát předejít hromadění enviromentálních sekvencí, u kterých nelze s jistotou říct, zda pocházejí z anaerobních nebo aerobních organismů. Kromě našich kultur se nálevníci vyskytovali i v izolátech, které byly kultivovány kvůli jiným organismům, jako např. Heterolobosea, Parabasalia nebo Archamoebae.

Při amplifikaci DNA nálevníků jsme neměli problémy. Důvodem, proč to tak je, je nejspíš velikost a počet nálevníků v kulturách. Nálevníci jsou jedni z největších jednobuněčných organismů, v jednotlivých kulturách se vyskytují ve velmi hojném počtu a hlavně mají mnoho kopií SSU rDNA v genomu. Proto jsme se dále nezabývali tvorbou monoekaryotických kultur.

Pro kultivaci nálevníků v literatuře nalezneme několik specifických médií, jako jsou např. SES (modifikovaný půdní extrakt s přidavkem soli), CMV (minerální médium pro nálevníky) nebo PM (specifické médium pro prvoky); viz např. Narayanan *et al.* (2007). Ve většině případů se jedná o média, jež jsou časově a finančně poměrně náročná na přípravu. Nám se osvědčilo Sonnebornovo parameciové médium, ATCC #802. Toto médium se v naší laboratoři úspěšně používá na kultivaci jiných sladkovodních prvoků již delší dobu. Vzhledem k velké spotřebě (velké množství kultur) tohoto média je hlavní výhodou snadná a rychlá příprava. Nemůžeme ale vyloučit kultivační systematickou chybu. V médiích, jež jsou specifická pro nálevníky, by mohly přežívat jiné druhy nálevníků. Pro účely naší studie postačovalo toto parameciové médium. Další roli v úspěšné kultivaci hraje i to, že vytváříme polyxenické kultury (tj. jsou v nich přítomny další mikroorganismy, zejména bakterie). Po odebrání vzorku z předem určeného místa jsme vždy odebrali 2ml a inokulovali do zkumavky s médiem. Tímto způsobem společně s nálevníky došlo k odebrání různých bakterií, které vytvářejí ve volné přírodě jejich přirozený zdroj potravy. To způsobilo, že než byla kultura přeočkována, bakterie se stihly namnožit, takže jsme nemuseli do kultur dodávat jiné.

5.2. Diverzita anaerobních nálevníků

Podle doposud publikovaných studií se dá usuzovat, že diverzita anaerobních nálevníků je malá. My jsme se však přesvědčili o opak.

Nízká známá diverzita anaerobních nálevníků je dána tím, že téměř ve všech studiích se do fylogenetických analýz zařazují pouze sekvence určených druhů nálevníků. Pouze v několika případech byly do analýz cíleně zahrnuty i environmentální sekvence (tj. sekvence, u kterých není znám původ) (např. Šlapeta *et al.* 2005; Yi *et al.* 2010). I když bylo získáno mnoho environmentálních sekvencí, nedokážeme k těmto sekvencím přiřadit popsání druhy nálevníků. Známe pouze místo, ze kterého izoláty pochází, tedy zda se jedná o mořské, sladkovodní nebo brakické organismy. Avšak jak tyto nálevníci vypadali a jestli byli opravdu anaerobní nebo aerobní, již zjistit nemůžeme. V každém případě však environmentální sekvence představují významnou část diverzity všech skupin nálevníků a není dobré je ve fylogenetických analýzách opomíjet. My jsme je proto do našich datasetů zařadili. Ve většině případů byly naše izoláty příbuzné právě environmentálním sekvencím. I tak víme, že anaerobních nálevníků je mnohem více, než se očekávalo. Kromě anaerobních nálevníků ze tříd Armophorea a Plagiopylea, jsme osekvenovali nálevníky i z jiných skupin, kteří budou také nejspíš anaerobní. Usuzujeme tak na základě kultivace. Izoláty, o kterých jsme se chtěli přesvědčit, že jsou anaerobní, jsme vložili do anaerostatu. Tady byly schopny přežít několik týdnů. Podle výsledků naší fylogenetické analýzy vyvozujeme, že v podtřídě Scuticociliatia bude nejméně jedna celá skupina, která zahrnuje anaerobní organismy. Dále ve třídě Prostomatea bude také několik nových anaerobních skupin.

5.2.1. Třída Armophorea

Během naší práce jsme získali 16 sekvencí SSU rDNA různých zástupců třídy Armophorea. Sekvenci kmenu VLH1 jsme získali od Dr. V. Hampla. Ve všech případech se jednalo se o sladkovodní nálevníky, jak z České republiky, tak z ciziny. Ve většině případů se nám podařilo osekvenovat SSU rDNA velkých nálevníků s podlouhlým tvarem buňky, kteří na první pohled vypadali jako rod *Metopus*. Nálevníci z kultur EVROS2, VIT9 a SUSBARB vypadali ale zcela jinak než typický *Metopus*. Jednalo se o organismy spíše kulatého tvaru a na první pohled připomínali rod *Brachonella*. Proto jsme na základě morfologického

pozorování očekávali, že půjde buď přímo o tento rod, nebo jemu blízce příbuzné rody. Výsledky naší analýzy zcela potvrdili naše předpoklady.

Třída Armophorea nám, stejně jako v jedné studii (Affa'a *et al.* 2004), sice vyšla monofyletická, ale s nízkou statistickou podporou. V některých publikacích (např. Lynn a Strüder-Kypke 2002; Lynn 2003; Stoeck *et al.* 2007) můžeme nalézt tuto třídu také monofyletickou, ale s tím rozdílem, že se jedná o dobře podpořený výsledek. Pokud nahlédneme do jejich analýz, zjistíme, že autoři do datasetu nezařadili sekvenci rodu *Caenomorpha*. V článcích, kde byla sekvence rodu *Caenomorpha* součástí analýzy, nebyla třída Armophorea monofyletická (např. Kim *et al.* 2007; Miao *et al.* 2009).

Třída Armophorea bude mnohem diverzifikovanější, než se do teď soudilo. Do dnešní doby bylo ve třídě Armophorea popsáno něco okolo 30 rodů a 40 druhů. Z toho pouze asi u 10 druhů je známá sekvence. Z řady dalších druhů také nejspíš existují SSU rDNA sekvence, což usuzujeme z počtu environmentálních sekvencí, ale nedokážeme je k nim přiřadit. Nám se podařilo rozšířit diverzitu nejméně o šest nových sekvencí. Jestli se ale jedná o již popsané druhy, nelze říci. Naše práce se týkala hlavně molekulárně fylogenetických analýz, popis druhů nebyl cílem této práce.

Z našich dat vyplývá, že se třída Armophorea rozpadá na dvě velké linie, které jsou složeny z jednotlivých 11 skupin. Do první linie patří rod *Caenomorpha* a jedna environmentální sekvence DQ310252, zbylí nálevníci spadají již do druhé. Vztahy mezi těmito skupinami ovšem nejsou jasné. Jak bylo uvedeno v kapitole 2.3.1, třída Armophorea se dělí na dva řády, Armophorida a Clevelandellida. Do řádu Armophorida se nám zařadily skupiny A – I, řád Clevelandellida je tvořen skupinou L. Linie D - G jsou si pravděpodobně blízce příbuzné. Jestli je na bázi těchto unikátních skupin linie D s nálevníky VLADECH klon 1 a RADUN, není zcela jisté. V těchto čtyřech skupinách nalezneme nálevníky, kteří jsou tvarově zcela odlišné a žijí jak v moři, tak i ve sladkých vodách. Mořští nálevníci vytvořili monofyletickou skupinu a sladkovodní bazální parafyletickou skupinu. Z toho vyplývá, že společný předek těchto čtyř skupin byl nejspíš sladkovodní. Podle sekvenčních dat je izolát QUEENSLAND blízce příbuzný druhu *Metopus contortus*. Zajímavé je, že naše kultura QUEENSLAND je sladkovodní a druh *Metopus contortus* je nálevník žijící v moři (Fenchel *et al.* 1977). Izoláty VIT9, EVROS4B a SUSBARB jsou příbuzné nekultivovanému nálevníkovi *Brachonella*-like ciliate (sekvence AY821928). Jedná se o organismy blízce příbuzné druhu *Brachonella* sp. Organismy VLADECH klon 1 a RADUN zřejmě představují jeden druh, ale nejsou blíže příbuzné žádnému osekvenovanému druhu, proto víc o nich nemůžeme říci.

Kmeny z České republiky HRAD2, OLSRYB a CSS jsou blízce příbuzné druhu *Metopus palaeformis* a k nim je sesterský kmen IND5, jenž pochází z Indie. Podle výsledků fylogenetických analýz usuzujeme, že by se ve skutečnosti mohlo jednat o jeden druh, a to právě *M. palaeformis*. Podle našich výsledků nevyšel rod *Metopus* monofyletický. To se shoduje s několika studii (např. Šlapeta *et al.* 2005; van Hoek *et al.* 2006). Na základě výsledků fylogenetických analýz můžeme říci, že skupiny J a K jsou příbuzné řádu Clevelandellida. Důležité je ale připomenout, že řád Clevelandellida zahrnuje pouze endosymbiotické zástupce, a přitom naši sekvence GRUBER a VLADECH klon 4 náleží volně žijícím sladkovodním nálevníkům. Proto by mohly tyto dvě skupiny tvořit přechodný článek mezi řády Armophorida a Clevelandellida. Třída Armophorea by se tak mohla rozdělovat do tří řádů a předek této třídy by byl původně volně žijící.

5.2.2. Třída Plagiopylea

Naše analýza zahrnovala kromě nově získaných sekvencí velký vzorek sekvencí jednotlivých zástupců ze třídy Plagiopylea. Protože víme, že všechny naše izoláty patří do rodu *Trimyema*, sekvence ostatních nálevníků třídy Plagiopylea byly použity jako outgroup. Třída Plagiopylea zahrnuje jak mořské, tak i sladkovodní zástupce. Až na pár výjimek jsou všechny druhy volně žijící.

Rod *Trimyema* se v naší analýze rozpadá na devět skupin, šest jich zahrnuje pouze mořské zástupce a zbylé tři jsou tvořeny sladkovodními organismy. Na základě našich výsledků nemůžeme určit vztahy mezi jednotlivými skupinami, protože se jednalo o výsledky, které nebyly statisticky podpořeny.

Podařilo se nám rozšířit rod *Trimyema* nejméně o pět nových sekvencí. Z toho dvě sekvence náleží mořským a tři patří sladkovodním nálevníkům. Mořské izoláty BALIKMARAN a LAGOS patří pravděpodobně do jednoho druhu, který je sesterský druhu *Trimyema minutum*. Sladkovodní izolát 3ML zase nejspíš konspicivně s *Trimyema* sp. (sekvence Z29441). Jemu jsou příbuzné SADSKA a VIT1AN. Tyto dva izoláty společně s druhem *Trimyema* sp Z29441 a dalšími dvěma izoláty HRAD1 a BOTANKA tvoří jednu sladkovodní skupinu.

V naší fylogenetické analýze se devět jednotlivých skupin z rodu *Trimyema* rozdělilo podle toho, jestli jsou sladkovodní nebo mořské. Linie A až F jsou tvořeny mořskými zástupci a dohromady tvoří parafyletickou skupinu. Linie G až I jsou sladkovodní. Kromě toho rody *Epaxella*, *Lechriopyla* a *Plagiopyla*, jež jsou příbuzné rodu *Trimyema*, jsou také mořské.

Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že původní společný předek rodu *Trimyema* byl mořský a během evoluce se někteří jeho zástupci stali sladkovodními.

5.2.3. Rod *Cyclidium*

Rod *Cyclidium* patří do podtřídy Scuticociliatia, která náleží do velké třídy Oligohymenophorea (Lynn 2003). Jedná se o třídu zahrnující převážně aerobní nálevníky. Prvním popsáním anaerobním nálevníkem z této třídy byl druh *Cyclidium porcatum* (Clarke a Finlay 1993). Kromě něho byly ve španělském jezeře poblíž města Cuenca objeveny další druhy (*Cyclidium dilectissimum*, *Isocyclidium globosum*, *Cristigera sp.*), které jsou nejspíš také anaerobní (Esteban *et al.* 1993). To je podpořeno například tím, že ani jeden z těchto organismů nebyl nalezen ve vodě, ve které by byl kyslík, dobře rostly v anaerobních podmínkách a vykazovaly autofluorescenci typickou pro endosymbiotické metanogenní archebakterie (Esteban *et al.* 1993).

Cyclidium porcatum je volně žijící nálevník, jenž obývá sladké vody bez přístupu kyslíku. Byl u něho objeven hydrogenosom a okolo něj v cytoplazmě byly pozorovány metanogenní bakterie (Clarke a Finlay 1993). Podařilo se nám osekvenovat SSU rDNA pěti různých izolátů rodu *Cyclidium*, čtyř mořských a jednoho sladkovodního.

Podtřída Scuticociliatia nám v analýze vychází polyfyletická, což se shoduje s výsledky předchozích studií (např. Zhang *et al.* 2010a). Dále se nám tato skupina rozpadá na pět jednotlivých linií, mezi kterými nelze určit jednotlivé vztahy. Nejedná se o výsledky, jež by byly statisticky podpořeny. Skupina Loxocephalida 1, kterou tvoří druh *Dextrichides pangi*, se nám přiřadila k druhu *Urocentrum turbo* (podtřída Peniculia), tedy jinam než ostatní nálevníci z podtřídy Scuticociliatia. Pokud vynecháme v analýze enviromentální sekvence, tak se náš výsledek shoduje s nedávno vydanou publikací autorů Zhang *et al.* (2010a). Tito autoři rozdělili podtřídu Scuticociliatia na 3 skupiny: Philasterida, Pleuronematida a Loxocephalida. My jsme skupinu Philasterida dále rozdělili na dvě podskupiny: Pleuronematida 1 a Pleuronematida 2.

Náš izolát EVROS2 se přiřadil ke druhům, které náleží do podskupiny Pleuronematida 2. Jedná se o organismus, který je příbuzný druhu *Cyclidium glaucoma*. Tento nálevník žije v moři a je aerobní. Poněvadž je EVROS2 příbuzný aerobnímu druhu, předpokládáme, že se také jedná o aerobní organismus. Zbylé naše izoláty nalezneme v podskupině Pleuronematida 1. Do této skupiny, kromě enviromentálních sekvencí, náleží jenom *Cyclidium porcatum*. Podle molekulárně fylogenetické analýzy usuzujeme, že v případě izolátu SWAN4 se jedná o anaerobní druh *Cyclidium porcatum*. Ostatní izoláty jsou příbuzné nekultivovaným

nálevníkům, o kterých víme pouze to, že jsou mořské. Z toho důvodu jsme zkusili dát kultury LUC3, LARNAKA2N a COORUNG2B do anaerostatu, abychom zjistili, zda přežijí anoxické podmínky. Po několika týdnech pravidelného očkovaní jsme kultury vyndali a zkontrolovali. Zjistili jsme, že nálevníci v těchto kulturách přibývali stejně jako před vložením do anaerostatu. Z toho vyplývá, že podskupina Pleuronematida 1 se nejspíš skládá z anaerobních nálevníků a Pleuronematida 2 bude pravděpodobně aerobní.

5.2.4. LIVADIAN

LIVADIAN je izolát, který byl dovezen z Kypru (Yubuki *et al.* 2010). Jedná se o vzorek odebraný z jezera, které se nachází poblíž Středozemního moře. Salinita tohoto jezera nebyla určena, z tohoto důvodu nemůžeme tohoto nálevníka s určitostí zařadit ani mezi sladkovodní, ani mezi mořské organismy. Jak bylo už uvedeno v kapitole 5.1, jedná se o kulturu, ve které se vyskytují kromě našeho nálevníka i volně žijící trichomonády druhu *Pseudotriconomonas keilini* (viz Yubuki *et al.* 2010). Ze začátku jsme předpokládali, že bude nálevník žijící v tomto izolátu patřit do třídy Armophorea. Až při podrobném prohlížení pod mikroskopem jsme zjistili, že tomu tak není. Tento organismus spíše připomínal nálevníka ze třídy Prostomatea. Podobnost byla hlavně v orálním aparátu (viz obr. 17C), který je u všech zástupců této třídy umístěn apikálně. Proto jsme očekávali, že fylogenetické analýzy SSU rDNA ho tam zařadí. To se ale nestalo.

Téměř ve stejné době, kdy jsme dokončovali předběžné analýzy SSU rDNA, byl publikován nový a pro nás velmi zajímavý článek. V něm se jeho autorům z Číny podařilo osekvenovat již popsaného mořského nálevníka rodu *Paraspathidium* (Zhang *et al.* 2010b). Tento rod až do roku 2010 patřil do třídy Litostomatea, kde často měnil pozice. Na základě podobnosti struktury orálního aparátu s rodem *Spathidium* byl původně zařazován do čeledi Spathidiidae (podtřída Haptoria) (Noland 1937), později byl přemístěn do čeledi Coelosomididae (podtřída Trichostomatia) (Corliss 1961, citováno v Zhang *et al.* 2010). Nakonec byl přeložen do čeledi Paraspathidiidae, která náleží opět do podtřídy Haptoria (Long *et al.* 2009). Až vědci Zhang *et al.* (2010b) objevili, že tomu tak není. Díky výsledkům analýz SSU rDNA se zjistilo, že by rod *Paraspathidium* podle jedné teorie mohl vytvářet zcela novou samostatnou skupinu, která leží bazálně ke třídě Plagiopylea a společně dohromady tvoří sesterskou linii ke třídě Prostomatea. Druhá teorie tvrdí, že rod *Paraspathidium* tvoří nový řád, který je součástí třídy Prostomatea a je příbuzný ke třídě Plagiopylea. Ta tvoří

vnitřní skupinu třídy Prostomatea (Zhang *et al.* 2010b). Navíc se rod *Paraspathidium* morfologicky od zástupců podtřídy Haptoria liší.

Kromě rodu *Paraspathidium* byly v roce 2009 popsány druhy *Apotrachelotractus variabialis* a *Trachelotractus entzi*, o kterých se očekává, že jsou příbuzné právě druhu *Paraspathidium apofuscum* (Long *et al.* 2009). Proto jsme zkusili na základě morfologických znaků porovnat našeho nálevníka LIVADIAN s těmito dvěma druhy. Myslíme si, že izolát LIVADIAN by mohl být blíže příbuzný druhu *Apotrachelotractus variabialis*. *A. variabilis* má kulovitou hlavu, apikálně umístěný orální aparát trychtýřovitého tvaru, cytoplasma je hyalinní a na zadním konci těla má pulzující vakuolu, která je nepravidelně zaoblená. V případě druhu *A. variabialis* se jedná o mořský druh. O našem izolátu LIVADIAN to s jistotou nevíme, protože, jak bylo již výše uvedeno, salinita v jezeře nebyla zjišťována. Druhy *A. variabilis* a *T. entzi* jsou stále ještě formálně zařazovány, stejně jako dříve *P. apofuscum*, do třídy Litostomatea, kam však nejspíš nepatří. Očekávali bychom, že ve skutečnosti budou společně s rodem *Paraspathidium*, třídami Prostomatea a Plagiopylea, a nejspíš i s naším izolátem LIVADIAN tvořit jednu velkou skupinu.

Díky těmto skutečnostem a tomu, že naše předběžná analýza poukazovala na podobný výsledek jako u rodu *Paraspathidium*, jsme do konečné analýzy zařadili kromě jak environmentálních, tak i známých sekvencí příbuzných našemu nálevníku i sekvenci rodu *Paraspathidium*.

Podle výsledků našich fylogenetických analýz vyšla třída Prostomatea polyfyletická. Druhy *Urotricha* sp. EU024981 a *Cryptocaryon irritans* se přiřadily do skupin mimo třídu Prostomatea. Zajímavé je, že do skupiny, ve které je *Urotricha* sp. EU024981, se zařadila sekvence i jedné obrněnky (*Amoebophrya*). Nejspíše se jedná o špatně určenou sekvenci. Kromě třídy Prostomatea je našemu izolátu LIVADIAN příbuzná i třída Plagiopylea. Naš izolát LIVADIAN najdeme společně s dvěma environmentálními sekvencemi, ke kterým je blíže příbuzný, v jedné samostatné linii. V případě těchto dvou sekvencí se jedná o sladkovodní izoláty, které byly odebrány z jezera poblíž Paříže (Šlapeta *et al.* 2005). Už ve studii, ve které byly tyto sekvence publikovány, je nebylo možno zařadit do žádné třídy. Na kladogramu se vyskytovaly na podobném místě, jako v naší analýze. Pokud víme, že jsou tyto dvě sekvence sladkovodní, tak můžeme očekávat, že izolát LIVADIAN bude také sladkovodní. V tom případě by se nemohlo jednat o druh *Apotrachelotractus variabialis*. Dlouhou dobu jsme nevěděli, jestli je izolát LIVADIAN aerobní nebo anaerobní. Proto jsme přistoupili ke kultivačním pokusům. Zkusili jsme umístit izolát LIVADIAN do anaerostatu. Po několika týdnech, kdy byl pravidelně očkovan, jsme ho vyndali a zkontrolovali. Ukázalo

se, že během té doby nálevníci v kultuře narůstali stejně jako před vložením. To poukazuje na to, že by izolát LIVADIAN, společně s příbuznými nálevníky, mohl být ve skutečnosti anaerobní. Poslední linie, která se oddělila, se skládá z environmentálních sekvencí a jednoho mořského nálevníka. Jedná se o *Askenasia* sp. (sekvence EU024989). Rod *Askenasia* je zatím formálně klasifikován ve třídě Litostomatea (Earland a Montagnes 2002), kam však pravděpodobně nepatří.

V dnešní době se třída Prostomatea dělí na dva řády: Prostomatida a Prorodontida. Domníváme se, že tato třída je mnohem diverzifikovanější, než se zdá. Vyvozujeme to z našich dat. Myslíme si, že našich jedenáct skupin bude ve skutečnosti patřit právě do třídy Prostomatea. Pokud by tomu tak opravdu bylo, tak by třída Plagiopylea už nebyla dále samostatnou třídou. Jednalo by se o jednu z linií náležejících do třídy Prostomatea. Abychom mohli rozhodnout, jaké vztahy ve skutečnosti opravdu platí, museli bychom provést fylogenetické analýzy dalších genů.

5.4. Morfologie

Kromě pozorování živých buněk jsme nálevníky obarvili protargolem. Protargol se v naší laboratoři používá k barvení bičíkovců a několikrát se stalo, že se mimo jiné obarvili i nálevníci. Z toho důvodu jsme protargol tentokrát vyzkoušeli přímo na nálevníky. Během naší práce jsme pořídili pouze ilustrační fotografie jednotlivých izolátů, ze kterých jsme mohli určit přibližnou velikost a tvar buňky. Díky tomuto barvení došlo ke zvýraznění některých struktur a organel (makronukleus, mikronukleus, kinety, orální aparát, pulzující vakuola atd.). Kromě protargolu se k barvení nálevníků využívá hlavně impregnace uhličitanem stříbrným (Ma et al. 2003) nebo dusičnanem stříbrným (Song a Wilbert 1995). Více jsme se morfologií jednotlivých izolátů nezabývali. Na základě morfologických znaků totiž zatím neumíme zařadit nálevníky do druhů. Navíc určování morfologických znaků jednotlivých druhů nálevníků nebylo našim hlavním cílem. Zaměřovali jsme se na molekulárně fylogenetické analýzy volně žijících anaerobních nálevníků. Rádi bychom ale naše preparáty nabídli jiným pracovištím, pokud budou mít zájem.

6. Závěrečné shrnutí

Podařilo se nám získat 32 sekvencí SSU rDNA anaerobních a 4 sekvence SSU rDNA aerobních nálevníků. Fylogenetické analýzy ukázaly, že třída Armophorea je monofyletická skupina a rozpadá se na 12 linií. Je tedy mnohem diverzifikovanější, než bylo dosud známo. Nálevníci VLADECH klon 4 a GRUBER nejspíš budou představovat nový řád ve třídě Armophorea. Dále se nám podařilo rozšířit rod *Trimyema* nejméně o pět nových sekvencí. Společný předek rodu *Trimyema* byl původně mořský a až později se staly některé druhy sladkovodními. Podtřída Scuticociliatia je polyfyletická a rozdělila se na 5 jednotlivých skupin, z toho skupina Pleuronematida 1 je pravděpodobně tvořena anaerobními nálevníky a do skupiny Pleuronematida 2 budou patřit aerobní zástupci. Izolát LIVADIAN společně s příbuznými nekultivovanými nálevníky a třídou Plagiopylea, která je mu příbuzná, budou nejspíš náležet do třídy Prostomatea. Třída Plagiopylea nebude tak dále už samostatnou třídou, ale bude tvořit jednu skupinu v rámci třídy Prostomatea. Třída Prostomatea tedy bude mnohem diverzifikovanější, než se myslelo. Během dokončování této práce, projevil o naše výsledky zájem Mgr. Peter Vďačný PhD (UK Bratislava), který se zabývá evolucí nálevníků. Proto do budoucnosti můžeme očekávat další zajímavé informace ohledně diverzity anaerobních nálevníků.

7. Seznam literatury

Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Miccourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MFJR. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 399-451

Affa'a FM, Hickey DA, Strüder-Kypke M, Lynn DH. 2004. Phylogenetic position of species in the genera *Anoplophrya*, *Plagiotoma*, and *Nyctotheroides* (phylum Ciliophora), endosymbiotic ciliates Annelids and Anurans. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51: 301-306

Akhmanova A, Voncken F, van Alen T, van Hoek A, Boxma B, Vogels G, Veenhuis M, Hackstein JHP. 1998. A hydrogenosome with genome. *Nature* 396: 527-528

Akhmanova A, Voncken FGJ, Hosea KM, Harhangi H, Keltjens JT, op den Camp HJM, Vogels GD, Hackstein JHP. 1999. A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Molecular Microbiology* 32: 1103-1114

Baroin-Tourancheau A, Delgado P, Perasso R, Adoutte A. 1992. A broad molecular phylogeny of ciliates: Identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of USA* 89: 9764-9768

Baumgartner M, Stetter KO, Foissner W. 2002. Morphological, small subunit rRNA, and physiological characterization of *Trimyema minutum* (Kahl, 1931), an anaerobic ciliate from submarine hydrothermal vents growing from 28 °C to 52 °C. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 227-238

Bernhard D, Leipe DD, Sogin ML, Schlegel KM. 1995. Phylogenetic relationships of the Nassulida within the phylum Ciliophora inferred from the complete small subunit rRNA gene sequences of *Furgasonia blochmani*, *Obertruria georgiana*, and *Pseudomicrothorax dubius*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42: 126-131

Biagi F. 1970. Unusual isolates from clinical material - *Balantidium coli*. *Annals of the New York Academy of Science of USA* 174: 1023-1026

Bourne DG, Boyett HV, Henderson ME, Muirhead A, Willis BL. 2008. Identification of a ciliate (Oligohymenophorea: Scuticociliatia) associated with Brown Band Disease on Corals of the Great Barrier Reef. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 883-888

Boxma B, Graaf RM, Staay GWM, Alen TA, Richard G, Gabaldón T, Hoek AHAM, Moon-van der Staay SY, Koopman WJH, van Hellemond JJ, Tielens AGM, Friedrich T, Veenhuis M, Huynen MA, Hackstein JHP. 2005. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* 434: 74-79

Boxma B, Ricard G, Ham von Hoek A, Severing E, Moon-van der Staay, S-Y, van der Staay GWM, van Alen TA, de Graaf RM, Cremers G, Kwantes M, McEwan NR, Newbold CJ, Jouany J-P, Michalowski T, Pristas P, Huynen MA, Hackstein JHP. 2007. The [FeFe] hydrogenase of *Nyctotherus ovalis* has a chimeric origin. *BMC Evolutionary Biology* 7: 1-12

Bruggen JJA, Zwart KB, Assema RM, Stumm CK, Vogels GG. 1984. *Methanobacterium formicicum*, an endosymbiont of the anaerobic ciliate *Metopus striatus* McMurrich. *Archives of Microbiology* 139: 1-7

Bui ETN, Bradley PJ, Johnson PJ. 1996. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of USA* 93: 9651-9656

Cameron SL. 2003. Taxonomy and phylogeny of endosymbiotic ciliates (Ciliophora: Litostomatea) associated with Australian herbivorous marsupials. *International Journal of Parasitology* 33: 347-355

Cho BCh, Park JS, Xu K, Choi JK. 2008. Morphology and molecular phylogeny of *Trimyema koreanum* n. sp., a ciliate from the hypersaline water of a solar saltern. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55: 417-426

Clarke KJ, Finlay BJ. 1993. *Cyclidium porcatum* n. sp.: a free-living anaerobic Scuticociliate containing a stable complex of hydrogenosomes, Eubacteria and Archaeobacteria. *European Journal of Protistology* 29: 262-270

Corliss JO. 2002. Biodiversity and biocomplexity of the protists and an overview of their significant roles in maintenance of our biosphere. *Acta Protozoologica* 41: 199-219

Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology* 27: 37-58

De Graaf RM, Duarte I, van Alen TA, Kuiper JWP, Schotanus K, Rosenberg J, Huynen MA, Hackstein JHP. 2009. The hydrogenosome of *Psalteriomonas lanterna*. *BMC Evolutionary Biology* 9

De Graaf RM, Ricard G, van Alen TA, Duarte I, Dutilh BE, Burgtorf C, Kuiper JWP, van der Staay GWM, Tielens AGM, Huynen MA, Hackstein JHP. 2011. The organellar genome and metabolic potential of the hydrogen-producing mitochondrion of *Nyctotherus ovalis*. *Molecular Biology and Evolution*, in press

Del Valle I, De La Fuente G, Fondevila M. 2008. Ciliate protozoa of the forestomach of llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Vicugna pacos*) from the Bolivian Altiplano. *Zootaxa* 1703:62-68

Denman SE, Tomkins NW, McSweeney C. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 313-322

Dyall SD, Johnson PJ. 2000. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 3: 404-411

Dyall SD, Koehler CM, Delgadillo-Correa MG, Bradley PJ, Plümper E, Leuenberger D, Turck ChW, Johnson PJ. 2000. Presence of a member of the Mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: Conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Molecular and Cellular Biology* 20: 2488-2497

Earland KA, Montagnes DJS. 2002. Description of a new marine species of *Askenasia* Blochmann, 1895 (Ciliophora, Haptoria), with notes on its ecology. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 423-427

- Ellis JE, McIntyre PS, Saleh M, Williams AG, Lloyd D.** 1991. Influence of CO₂ and low concentrations of O₂ on fermentative metabolism of the rumen ciliate *Dasytrichia ruminantium*. *Journal of General Microbiology* 137: 1409-1417
- Embley TM, Finlay BJ.** 1993. Systematic and morphological diversity of endosymbiotic methanogens in anaerobic ciliates. *Antonie van Leeuwenhoek* 64: 261-271
- Embley TM, Finlay BJ, Thomas RH, Dyal PL.** 1992. The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeobacterial endosymbiont. *Journal of General Microbiology* 138: 1479-1487
- Esteban G, Finlay BJ, Embley TM.** 1993. New species double the diversity of anaerobic ciliates in a Spanish lake. *FEMS Microbiology Letters* 109: 93-100
- Fast NM, Xue L, Bingham S, Keeling PJ.** 2002. Re-examining Alveolate evolution using multiple protein molecular phylogenies. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 30-37
- Felsenstein J.** 1989. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166
- Fenchel T, Finlay BJ.** 1991. Synchronous division of an endosymbiotic methanogenic bacterium in the anaerobic ciliate *Plagiopyla frontata* Kahl. *The Journal of Protozoology* 38: 22-28
- Fenchel T, Perry T, Thane A.** 1977. Anaerobiosis and symbiosis with bacteria in free-living ciliates. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 24: 154-163
- Finlay BJ, Embley TM, Fenchel T.** 1993. A new polymorphic methanogen, closely related to *Methanocorpusculum parvum*, living in stable symbiosis within the anaerobic ciliate *Trimyema* sp. *Journal of General Microbiology* 55: 562-566
- Gao S, Song W, Ma H, Clamp JC, Yi Z, Al-Rasheid KAS, Chen Z, Lin X.** 2008. Phylogeny of six genera of the subclass Haptoria (Ciliophora, Litostomatea) inferred from sequences of the gene coding for small subunit ribosomal RNA. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55: 562-566
- Gijzen HJ, Barughare M.** 1992. Contribution of anaerobic protozoa and methanogens to hindgut metabolic activities of the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2565-2570

- Gijzen HJ, Broers CAM, Barughare M, Stumm CK.** 1991. Methanogenic bacteria as endosymbionts of the ciliate *Nyctotherus ovalis* in the cockroach hindgut. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1630-1634
- Görtz H-D.** 2001. Intracellular bacteria in ciliates. *International Microbiology* 4: 143-150
- Hackstein JHP, Akhmanova A, Boxma B, Harhangi HR, VonckenGJ.** 1999. Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends in Microbiology* 7: 441-447
- Hackstein JHP, Tjaden J, Huynen M.** 2006. Mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes: Products of evolutionary tinkering! *Current Genetics* 50: 225-245
- Hall TA.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98
- Headley SA, Kummala E, Sukura A.** 2008. *Balantidium coli*-infection in Finnish horse. *Veterinary Parasitology* 158: 129-132
- Hirt RP, Dyal PL, Wilkinson M, Finlay BJ, Roberts DMcL, Embley TM.** 1995. Phylogenetic relationships among Karyorelictids and Heterotrichs inferred from small subunit rRNA sequences: Resolution at the base of the ciliate tree. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 77-87
- Hrdy I, Hirt RP, Dolezal P, Bardonova L, Foster PG, Tachezy J, EmbleyTM.** 2004. *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* 432: 618-622
- Huelsenbeck JP, Ronquist F.** 2001. MrByes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755
- Hungate RE, Smith W, Bauchop T, Yu I, Rabinowitz JC.** 1970. Formate as an intermediate in the Bovine rumen fermentation. *Journal of Bacteriology* 102: 389-397
- Irbis Ch, Garriga R, Kabasawa A, Ushida K.** 2008. Phylogenetic analysis of *Troglodytella abrossarti* isolated from Chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) in the wild and in captivity. *The Journal of General and Applied Microbiology* 54: 409-413

Ito A, Van Hoven W, Miyazaki Y, Imai S. 2006. New entodiniomorphid ciliates from the intestine of the wild African white rhinoceros belong to a new family, the Gilchristidae. *European Journal of Protistology* 42: 297-307

James TY, Letcher PM, Longcore JE, Mozley-Standridge SE, Porter D, Powell MJ, Griffith GW, Vilgalys R. 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* 98: 860-871

Jung S-J, Kitamura S-I, Song J-Y, Joung I-Y, Oh M-J. 2005. Complete small subunit rRNA gene sequence of the scuticociliate *Miamiensis avidus* pathogenic to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 64: 159-162

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059-3066

Kim JS, Jeong HJ, Lynn DH, Park JY, Lim YW, Shin W. 2007. *Balanion masanensis* n. sp. (Ciliophora: Prostomatea) from the Coastal waters of Korea: morphology and small subunit ribosomal RNA gene sequence. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 482-494

Kittelmann S, Janssen PH. 2011. Charakterization of rumen ciliate community composition in domestic sheep, deer and cattle, feeding on varying diets, by means of PCR-DGGE and clone libraries. *FEMS Microbiology Ecology* 75: 468-481

Kushida Y, Nakano K, Numata O. 2011. Amitosis requires γ -Tubulin-mediated microtubule assembly in *Tetrahymena thermophila*. *Cytoskeleton* 68: 89-96

Leander BS, Keeling PJ. 2003. Morphostasis in alveolate evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 395-402

Li M, Li D, Wang J, Zhang J, Gu Z, Gong X. 2007. Light and scanning electron microscopic study of *Balantidium ctenopharyngodoni* Chen, 1955 (Class: Litostomatea) from China. *Parasitology Research* 101: 185-192

Li M, Wang C, Wang J, Li A, Gong X, Ma H. 2009. Redescription of *Balantidium polyvacuolum* Li 1963 (Class: Litostomatea) inhabiting the intestines of Xenocyprinae fishes in Hubei, China. *Parasitology Research* 106: 177-182

- Li M, Wang J, Zhang J, Gu Z, Ling F, Ke X, Gong X.** 2008. First report of two *Balantidium* species from the chinese giant salamander, *Andrias davidianus*: *Balantidium sinensis* nie 1935 and *Balantidium andianusis* n. sp. *Parasitology Research* 102: 605-611
- Long H, Song W, Al-Rashed KA, Gong J.** 2009. Three marine haptorid ciliates from northern China: *Paraspathidium apofusum* n. sp., *Trachelotractus entzi* (Kahl, 1927) Foissner, 1997 and *Apotrachelotractus variabialis* Long, Song and Warren, 2009 (Protozoa, Ciliophora). *Journal of Natural History* 43: 1749-1761
- Lynn DH.** 1979. Fine structural specializations and evolution of carnivory in *Bresslaua* (Ciliophora: Colpodida). *Transactions of the American Microscopical Society* 98: 353-368
- Lynn DH.** 1981. The organization and evolution of microtubular organelles in ciliated protozoa. *Biological Reviews* 56: 243-292
- Lynn DH.** 2002. The ciliate resource archive. <http://www.uoguelph.ca/~ciliates/classification/genera.htm>
- Lynn DH.** 2003. Morphology or molecules: How we identify the major lineages of ciliate (Phylum Ciliophora). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 39: 356-364
- Lynn DH.** 2008. Subphylum 2. Intramacronucleata: class 2. Armophorea – sapropeleibionts that once were Heterotrichs. In Lynn DH (ed.) *The ciliated protozoa, characterization, classification, and guide to the literature*. 3rd edition. Springer Science + Business Media B. V., Netherlands, pp. 175-185
- Lynn DH, Small EB.** 1990. Phylum Ciliophora. In: Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ (eds.). *Handbook of Protoctista*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, pp. 498-523
- Lynn DH, Small EB.** 2002. Phylum Ciliophora. In: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (eds.). *An illustrated guide to the Protozoa*. 2nd edition. Allen Press. Inc., Lawrence, Kansas, pp. 371-656
- Lynn DH, Strüder-Kypke M.** 2002. Phylogenetic position of *Licnophora*, *Lechriopyla*, and *Schizocaryum*, three unusual ciliates (Phylum Ciliophora) endosymbiotic in Echinoderms (Phylum Echinodermata). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 460-468
- Ma H, Choi JK, Song W.** 2003. An improved silver carbonate impregnation for marine ciliated protozoa. *Acta Protozoologica* 42: 161-164

Martin W. 2005. The missing link between hydrogenosomes and mitochondria. *Trends in Microbiology* 13: 457-459

Massana R, Stumm CK, Pedrós-Alió C. 1994. Effects of temperature, sulfide, and food abundance on growth and feeding of anaerobic ciliates. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1317-1324

McGrath CL, Zufall RA, Katz LA. 2007. Variation in macronuclear genome content of three ciliates with extensive chromosomal fragmentation: A preliminary analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 242-246

Miao M, Song W, Clamp JC, Al-Rasheid KAS, Al-Khedhairy AA, Al-Arifi S. 2009. Further consideration of the phylogeny of some “traditional” Heterotrichs (Protista, Ciliophora) of uncertain affinities, based on new sequences of the small subunit rRNA gene. *Journal of eukaryotic Microbiology* 56: 244-250

Mishima T, Katamoto H, Horii Y, Kakengi VAM, Ito A. 2009. Rumen ciliates from Tanzanian short horn zebu cattle, *Bos taurus indicus*, and the infraciliature of *Entodinium palmáre* n. sp. and *Enoploplastron stokyi*. *European Journal of Protistology* 45: 77-86

Modrý D, Petrželová K, Pomajbíková K, Tokiwa T, Křížek J, Imai S, Vallo P, Profousová I, Šlapeta J. 2009. The occurrence and ape-to-ape transmission of the entodiniomorphid ciliate *Troglodytella abrassarti* in captive gorillas. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56: 83-87

Moreira D, Le Guyader H, Philippe H. 1999. Unusually high evolutionary rate of the elongation factor 1 α genes from the Ciliophora and its impact on the phylogeny of eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 16: 234-245

Moreira D, Kervestin S, Jean-Jean O, Philippe H. 2002. Evolution of eukaryotic translation elongation and termination factors: variations of evolutionary rate and genetic code deviations. *Molecular Biology and Evolution* 19: 189-200

Müller M. 1993. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology* 139: 2879-2889

Mylnikov AP. 2009. Ultrastructure and phylogeny of Colpodellids (Colpodellida, Alveolata). *The Biology Bulletin* 36: 582-590

- Nakauchi K.** 1999. The prevalence of *Balantidium coli* infection in fifty-six mammalian species. *The Journal of Veterinary Medical Science* 61: 63-65
- Narayanan N, Krishnakumar B, Anupama VN, Manila VB.** 2009. *Methanosaeta sp.*, the major archaeal endosymbiont of *Metopus es.* *Research in Microbiology* 160: 600-607
- Narayanan N, Priya M, Haridas A, Manilal VB.** 2007. Isolation and culturing of a most common anaerobic ciliate, *Metopus sp.* *Anaerobe* 13: 14-20
- Nie D.** 1950. Morphology and taxonomy of the intestinal protozoa of the guinea-pig *Cavia porcella.* *Journal of Morphology* 86: 391-493
- Noland LE.** 1937. Observations on marine ciliates of the gulf coast of Florida. *Transactions of the American Microscopical Society* 56: 160-171
- Orsi W, Edgcomb V, Faria J, Foissner W, Fowle WH, Hohmann T, Suarez P, Taylor C, Taylor GT, Vdacny P, Epstein SS.** 2011. Class Cariacotrichea, a novel ciliate taxon from the anoxic Cariaco Basin, Venezuela. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, in press
- Pérez-Brocal V, Shahar-Golan R, Clark CG.** 2010. A linear molecule with two large inverted repeats: the mitochondrial genome of the stramenopile *Proteromonas lacertae.* *Genome Biology and Evolution* 2: 257-266
- Plattner H, Klauke N.** 2001. Calcium in ciliated protozoa: sources, regulation, and calcium-regulated cell functions. In: Jeon KW (ed). *International review of cytology: A survey of cell biology.* Academic press, California, pp 115-208
- Pomajbíková K, Petrzeltková KJ, Profousová I, Petrásová J, Kisidayová S, Varádyová Z, Modrý D.** 2010. A survey of entodiniomorphid ciliates in chimpanzees and bonobos. *American Journal of Physical Anthropology* 142: 42-48
- Ptáčková E.** 2010. Fylogeneze archaméb. Diplomová práce. Katedra zoologie, PřF UK
- Pütz S, Dolezal P, Gelius-Dietrich G, Bohacova L, Tachezy J, Henze K.** 2006. Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis.* *Eukaryotic Cell* 5: 579-586

Ricard G, McEwan NR, Dutilh BE, Jouany J-P, Macheboeuf D, Mitsumori M, McIntosh FM, Michalowski T, Nagamine T, Nelson N, Newbold ChJ, Nsabimana E, Takenaka A, Thomas NA, Ushida K, Hackstein JHP, Huynen MA. 2006. Horizontal gene transfer from Bacteria to rumen Ciliates indicates adaptation to their anaerobic, carbohydrates-rich environment. *BMC Genomics* 7: 22

Serrano S, Martín-González A, Fernández-Galiano D. 1988. *Trimyema compressum* Lackey, 1925: morphology, morphogenesis and systematic implications. *Journal of Protozoology* 35: 315-320

Shinzato N, Watanabe I, Meng X-Y, Sekiguchi Y, Tamaki H, Matsui T, Kamagata Y. 2007. Phylogenetic analysis and fluorescence *In situ* hybridization detection of archaeal and bacterial endosymbionts in the anaerobic ciliate *Trimyema compressum*. *Microbial Ecology* 54: 627- 636

Smutná T, Gonçalves VL, Saraiva LM, Tachezy J, Teixeira M, Hrdý I. 2009. Flavodiiron protein from *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes: the terminal oxygen reductase. *Eukaryotic cell* 8: 47-55

Song W, Wilbert N. 1995. Benthische ciliaten des Süßwassers [Benthic ciliates in freshwater]. In: Röttger R, editor. *Praktikum der Protozoologie [Protocols of Protozoology]*. New York: Gustav Fischer Verlag. p. 156–168.

Stamatakis A. 2006. RaxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690

Stechmann A, Schlegel M, Lynn DH. 1998. Phylogenetic relationships between Prostome and Colpodean ciliates tested by small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 48-54

Stechmann A, Hamblin K, Pérez-Brocal V, Gaston D, Richmond GS, van der Giezen M, Clark CG, Roger AJ. 2008. Organelles in blastocysts that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current Biology* 18: 580-585

Stoeck T, Foissner W, Lynn DH. 2007. Small-subunit rRNA phylogenies suggest that *Epalxella antiquorum* (Penard, 1922) Corliss, 1960 (Ciliophora, Odontostomatida) is a member of the Plagypylea. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 436-442

Strüder-Kypke MC, Wright ADG, Foissner W, Chatzinotas A, Lynn DH. 2006. Molecular phylogeny of litostome ciliates (Ciliophyla, Litostomatea) with emphasis on free-living haptorian genera. *Protist* 157: 261-278

Strüder-Kypke MC, Kornilova OA, Lynn DH. 2007. Phylogeny of trichostome ciliates (Ciliophora, Litostomatea) endosymbiotic in the Yakut horse (*Equus caballus*). *European Journal of Protistology* 43: 319-328

Stumm CK, Gijzen HJ, Vogels GD. 1982. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *British Journal of Nutrition* 47: 95-99

Šlapeta J, Moreira D, López-García P. 2005. The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272: 2073-2081

Šurín S, Čuboňová L', Majerník AI, Šmigáň P. 2006. Amiloride resistance in the methanoarcheon *Methanothermobacter thermoautotrophicus*: characterization of membrane-associated proteins. *Folia Microbiologica* 51: 313-316

Thauer RK. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* 144: 2377-2406

Tielens AGM, Rotte C, van Hellemond JJ, Martin W. 2002. Mitochondria as we don't know them. *Trends in Biochemical Science* 27: 564-572

Van Bruggen JJA, Stumm CK, Vogels GD. 1983. Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. *Archives of Microbiology* 136: 89-95

Van Bruggen JJA, Zwart KB, Van Assema RM, Stumm CK, Vogels GD. 1984. *Methanobacterium formicum*, an endosymbiont of the anaerobic ciliate *Metopus striatus* McMurrich. *Archives of Microbiology* 139: 1-7

Van Hoek AHAM, van Alen TA, Sprakel VSI, Hackstein JHP, Vogels GD. 1998. Evolution of anaerobic ciliates from the gastrointestinal tract: phylogenetic analysis of the ribosomal repeat from *Nyctotherus ovalis* and its relatives. *Molecular Biology of Evolution* 15: 1195-1206

Van Hoek AHAM, Akhmanova AS, Huynen MA, Hackstein JHP. 2000. A mitochondrial ancestry of the hydrogenosomes of *Nyctotherus ovalis*. *Molecular Biology of Evolution* 17: 202-206

Van Hoek AHAM, van Alen TA, Sprakel VSI, Leunissen JAM, Brigge T, Vogel GD, Hackstein JHP. 2000. Multiple acquisition of methanogenic archaeal symbionts by anaerobic ciliates. *Molecular Biology and Evolution* 17: 251-258

Van Hoek AHAM, van Alen TA, Vogel GD, Hackstein JHP. 2006. Contribution by the methanogenic endosymbionts of anaerobic ciliates to methane production in Dutch freshwater sediments. *Acta Protozoologica* 45: 215-224

Vd'ačný P, Bourland WA, Orsi W, Epstein SS, Foissner W. 2010. Phylogeny and classification of the Litostomatea (Protista, Ciliophora), with emphasis on free-living taxa and the 18S rRNA gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, in press

Vd'ačný P, Orsi W, Foissner W. 2010. Molecular and morphological evidence for a sister group relationship of the classes Armophorea and Litostomatea (Ciliophora, Intramacronucleata, Lamellicorticata infraphyl. nov.), with an account on basal litostomateans. *European Journal of Protistology* 46: 298-309

Weatherby K, Murray S, Carter D, Šlapeta J. 2011. Surface and flagella morphology of the motile form of *Chromera velia* revealed by field-emission scanning electron microscopy. *Protist* 162: 142-153

Wright A-DG, Dehority BA, Lynn DH. 1997. Phylogeny of the rumen ciliates *Entodinium*, *Epidinium* and *Polyplastron* (Litostomatea: Entodiniomorpha) inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44: 61-67

Yarlett N, Lloyd D, Williams AG. 1985. Butyrate formation from glucose by the rumen protozoan *Dasytrichia ruminantium*. *Biochemical Journal* 228: 187-192

Yi Z, Dunthorn M, Song W, Stoeck T. 2010. Increasing taxon sampling using both unidentified environmental sequences and identified cultures improves phylogenetic inference in the Prorodontida (Ciliophora, Prostomatea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 937-941

Yubuki N, Céza V, Cepicka I, Yabuki A, Inagaki Y, Nakayama T, Inouye I, Leander BS. 2010. Cryptic diversity of free-living Parabasalids, *Pseudotrichomonas keilini* and *Lacustera cypriaca* n. g., n. sp., as inferred from small subunit rDNA sequences. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 57: 554-561

Zaman V. 1993. *Balantidium coli*. In: Kreier JP, Baker JR (eds.). Parasitic protozoa. 2nd edition. Academic Press, Inc., San Diego, California, pp. 43-63

Zhang Q, Fan X, Clamp JC, Al-Rasheid KAS, Song W. 2010. Description of *Paratetrahymena parawassi* n. sp. using morphological and molecular evidence and a phylogenetic analysis of *Paratetrahymena* and other taxonomically ambiguous genera in the order Loxocephalida (Ciliophora, Oligohymenophorea). *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 57: 483-493

Zhang Q, Yi Z, Song W, Al – Rasheid KAS, Warren A. 2010. The systematic position of *Paraspathidium* Noland, 1937 (Ciliophora, Litostomatea?) inferred from primary SSU rRNA gene sequences and predicted secondary rRNA structure. *European Journal of Protistology* 46: 280-288

Sekundární citace:

Baroin-Tourancheau A, Delgado P, Perasso R, Adoutte A. 1992. A broad molecular phylogeny of ciliates: Identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of USA* 89: 9764-9768

Gijzen HJ, Broers CAM, Barughare M, Stumm CK. 1991. Methanogenic bacteria as endosymbionts of the ciliate *Nyctotherus ovalis* in the cockroach hindgut. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1630-1634

Vd'ačný P, Orsi W, Foissner W. 2010. Molecular and morphological evidence for a sister group relationship of the classes Armophorea and Litostomatea (Ciliophora, Intramacronucleata, Lamellicorticata infraphyl. nov.), with an account on basal litostomateans. *European Journal of Protistology* 46: 298-309

Zhang Q, Yi Z, Song W, AlKhedhairy-Rasheid KAS, Warren A. 2010. The systematic position of *Paraspathidium* Noland, 1937 (Ciliophora, Litostomatea?) inferred from primary SSU rRNA gene sequences and predicted secondary rRNA structure. *European Journal of Protistology* 46: 280-288