

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Ekologie
Studijní obor: Hydrobiologie



Bc. Marie Dřížhalová

Chladová adaptace sněžných řas: úloha změn ve složení mastných kyselin

**Cold adaptation of snow algae:
the role of changes in the composition of fatty acids**

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Linda Nedbalová Ph.D.

Praha, 2015

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, 10. 8. 2015

Podpis:

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Lindě Nedbalové Ph.D. za podporu a velkou trpělivost při tvorbě této práce. Dále chci poděkovat RNDr. Janě Kvíderové Ph.D. za pomoc a podporu při měření na zkřížených gradientech v Botanickém ústavu AV ČR v Třeboni a Mgr. Martinu Lukešovi za poskytnutí rad a pomoci při analýze FA v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Třeboni.

Také děkuji mé rodině za podporu a trpělivost při studiu a příteli Mgr. Tomášovi Potfajovi za velkou podporu a pozitivní přístup a všem mým kamarádům.

Abstrakt

Sněžné řasy se jako typičtí extremofilové nabízejí jako modelové organismy pro studium přizpůsobení k životu na hranici fyziologických možností. Dosud není jasné, jakým způsobem je u těchto psychrofilních organismů na molekulární úrovni zajištěna optimalizace fungování fotosyntetických procesů v podmínkách blízkých 0°C a často za velmi vysokého záření. Tato práce zjišťuje růstová optima a mapuje složení mastných kyselin ve vybraných kmenech psychrofilních a psychrotrofních řas, převážně třídy Chlamydomonadaceae (Chlorophyta) ze sbírek UTEX, CCCryo a sběrů na území Evropy včetně kmenů z České Republiky a Slovenska.

Zjistila jsem optimální podmínky růstu metodou zkřížených gradientů (teplota/ozáření) u sněžných řas 2 kmenů: *Chloromonas reticulata* Luční (červený sníh) má optimum růstu v 8-20°C a optimální ozáření 423 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a výše. Určila jsem tuto řasu jako psychrotrofní. Druhým testovaným kmenem byl *Chloromonas pichincae* Meandry. Teplotní optimum je v intervalu 4-10°C. Maximální teplota nepřesahuje 30°C, při tomto průběhu růstu ho mohou považovat za druhý psychrofilní kmen nalezený na území ČR. Tento nález je třeba dále ověřit a doplnit údaje o průběhu teplot mezi 9-20°C. *Chloromonas pichincae* Meandry je stínomilná řasa, vykazuje dobrý růst i při 34 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Práce také sledovala profil mastných kyselin o psychrotrofních a psychrofilních kmenů po kultivaci v teplotním rozsahu 3 – 30°C. Trend zkracování řetězců ani zvyšování dvojných vazeb jsem neprokázala. Důležitou roli při růstu v odlišných teplotách hrál poměr mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin. V nízkých kultivačních teplotách (pro psychrofilní řasy 3°C a psychrotrofní 3°C a 9°C) převládaly mononenasycené FA a ve vyšších teplotách (psychrofilové 9°C a více, psychrotrofové 15°C a více) narostl výrazně obsah polynenasycených FA. Výsledky neposkytly prokazatelný trend závislosti profilu lipidů na teplotě, změnu DBI (index dvojných vazeb) ani rozdílnou strategii pro přežití v teplotách mimo teplotní optimum pro 2 ekologické skupiny - psychrofilní a psychrotrofní řasy.

klíčová slova: sněžné řasy, psychrofil, psychrotrof, *Chloromonas*, *Chlamydomonas*, mastné kyseliny, nenasycené mastné kyseliny, chladová adaptace

Abstract

Snow algae like typical extremophiles are ideal model organisms for study of adaptation for life on the boundary of physiological possibilities. So far, it is not clear how these psychrophilic organisms on the molecular level optimize function of photosynthetic processes in temperatures about 0°C and often in very high radiation. This thesis evaluates growth limits and monitors the composition of fatty acids in selected subclade of psychrophilic and psychrotrophic algae of mainly the Chlamydomonadaceae (Chlorophyta) class isolated from localities in European area (as received from Culture collections UTEX and CCCryo), including the subclade from Czech republic and Slovakia.

I found out optimal conditions of growth using cultivation in crossed gradients (temperature/irradiance) for two subclades snow algae. In *Chloromonas reticulata* Luční (red snow), there is 8-20°C growth optimum and optimal irradiation exceeds $423 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. I classified this alga as psychrophilic. The second tested alga was *Chloromonas pichincha* Meandry. Optimal temperature of growth is in interval 4-10°C. Maximal temperature does not exceed 30°C and in this experiment it is the second psychrophilic algae found in area of the Czech republic. This discovery should be checked and data on growth in temperatures between 9-20°C should be added. *Chloromonas pichincha* Meandry is a snow algae which likes shadow and grows well in low irradiation of $34 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

The thesis also studied fatty acids profiling of psychrotrophic and psychrophilic algae after cultivation in temperature conditions 3-30°C. I did not prove the trend of shorten chains and increase double bonds. Ratio of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids depends on different temperatures of growth. In low temperature of cultivation (psychrophilic algae 3°C, psychrotrophic algae 3°C and 9°C) dominate MUFA and in high temperature of cultivation (psychrophilic 9°C and more, psychrotrophic 15°C and more) dominate PUFA. Results did not show trend of dependence profiles on temperature, change of DBI (double bond index) and did not show different strategy for survival in non optimal conditions for two ecological groups – psychrophils and psychrotrophic algae.

key words: snow algae, psychrophil, psychrotroph, *Chloromonas*, *Chlamydomonas*, fatty acids, unsaturated fatty acids, cold adaptation

Seznam použitých zkratk

- BBM – médium pro kultivaci řas (Bold-Basal/Bristol Medium)
- DBI – podíl dvojných vazeb v mastných kyselinách „double bond index“
- FA – mastné kyseliny „fatty acids“
- FAME – metylester mastné kyseliny
- GC – plynový chromatograf „gass chromatography“
- MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny „monounsaturated fatty acids“
- PUFA – polynenasycené mastné kyseliny „polyunsaturated fatty acids“
- SAFA – nasycené mastné kyseliny „saturated fatty acids“

Obsah

1	Úvod	9
2	Literární přehled	10
2.1	Co jsou sněžné řasy	10
2.1.1	Vybrané kmeny	11
2.1.2	Adaptace na prostředí sněhu	12
2.2	Membrány a mastné kyseliny	14
2.2.1	Membrána a teplota	17
3	Cíle práce	18
	Hypotézy	18
4	Metodika	19
4.1	Kultivace na zkřížených gradientech	19
4.1.1	Kultivace	20
4.1.2	Sledování růstu	21
4.1.3	Vyhodnocování, zjišťování optim růstu	22
4.2	Kultivace v sledovaných teplotách – teplotní experiment	22
4.3	Příprava na analýzu FA	24
4.4	Analýza FA	25
5	Výsledky	26
5.1	Zkřížené gradienty	26
5.2	Teplotní experimenty	45
6	Závěr	92
7	Literární zdroje	94
8	Přílohy	98

1 Úvod

Úkolem této práce je zjistit adaptační mechanismy sněžných řas na úrovni mastných kyselin. Vycházím z předpokladu, že rozdílné teplotní podmínky kultivace se promítnou do struktury membrán, především do skladby mastných kyselin (FA). Tato práce je součástí uceleného výzkumu mapujícího a popisujícího sněžné řasy pod vedením RNDr. Lindy Nedbalové Ph.d. který se věnují ekologii, ekofyziologii, fylogenezi a poskytuje tak komplexější pohled na tyto dosud málo prozkoumané a zajímavé organismy. V mé práci jsou zahrnuty i dosud neprozkoumané kmeny pocházející z českých pohoří (Nedbalová, Lukavský, 2007 Živa). Modelovým organismem pro studium fotosyntézy v chladných oblastech, a proto i lépe prozkoumaným kmenem, je antarktická řasa *Chlamydomonas raudensis* (Dolhi et al., 2013) nebo *Chlamydomonas reinhardtii*.

Aby byly organismy schopny přežít v chladném prostředí, musí být schopny řešit nejen následky nízké teploty, ale často i následky výrazných teplotních výkyvů, které mohou být v mnoha případech i velmi rychlé. V důsledku těchto výkyvů dochází k významným strukturálním a dynamickým změnám, které mohou mít dopad na funkci membránových proteinů a tím i na celý metabolismus (Chintalapati et al., 2004).

Z praktického hlediska je zajímavá produkce karotenoidů, mastných kyselin s více nenasyčenými vazbami (PUFA) a dalších biologicky aktivních látek a dalších biologicky aktivních látek, které by mohly být v budoucnu využity v biotechnologiích. Tomu však bude muset předcházet detailní studium těchto látek a vytipování kmenů, které by byly vhodné pro případnou masovou kultivaci (Nedbalová, 2007, Živa).

2 Literární přehled

2.1 Co jsou sněžné řasy

Sněžné řasy rostou v alpských nebo polárních oblastech po celém světě. Vytváří barevná sněhová pole typických barev - červené, oranžové nebo zelené i další odstíny (obr.1). Tato bohatě pigmentovaná fotosyntetizující eukaryota se často skládají z potenciálně mixotrofních zelených řas rodů *Chlamydomonas*, *Chloromonas* a *Raphidonema* (Hoham et al., 2002). Kromě nich byly rovněž nalezeny vláknité a kokální sinice v ledovcovém ledu (Takeuchi et al., 2011), často jsou dominantní komunitou v kryokonitu, kde se vyznačují vysokou primární produkcí (Anesio et al., 2009). Většina pravých druhů sněžných řas patří do třídy *Chlamydomonadales* (*Chlorophyta*) a jsou psychrofilní, tj. tolerují a rostou v teplotě 0-4°C a jejich optimální teplota růstu je často nižší než 15°C (Leya et al., 2009). Maximální teplota růstu psychrofilních řas nepřesahuje 20°C (Bowman et al., 1997). Druhou početnou ekologickou skupinou jsou psychrotolerantní řasy, ty dokáží žít i v teplotách pod -15°C, avšak nejlépe se jim daří v teplotách nad 18°C (Morgan-Kiss et al., 2006).

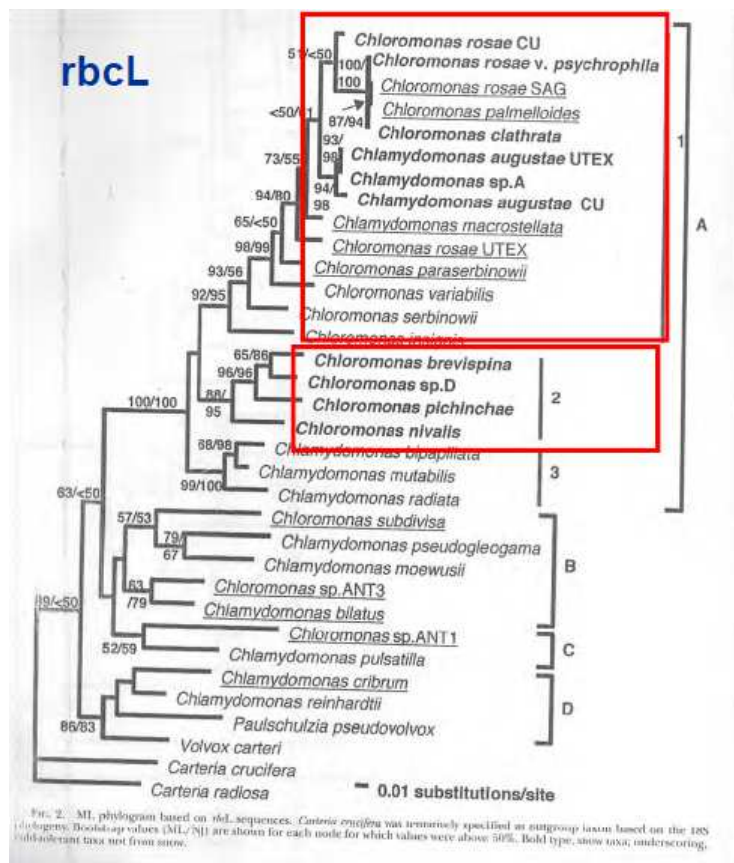
Sněžné řasy z řádu *Chlamydomonadales* se vyznačují poměrně komplikovanými životními cykly, které jsou považovány za jednu z jejich četných adaptací k extrémním podmínkám prostředí. Předky sněžných řas byly pravděpodobně půdní řasy a adaptace k životu ve sněhu se u dominantní skupiny zelených bičíkovců vyvinula minimálně dvakrát (Nedbalová, Lukavský, 2007, Živa).



Obr .1: Nález barevného sněhu (Nedbalová, Lukavský, 2007, Živa)

2.1.1 Vybrané kmeny

Sledovanou skupinou jsou zelené řasy rodů *Chloromonas* a *Chlamydomonas* z řádu Chlamydomonadales ze třídy Chlorophyceae (Volvocales, Chlorophyta). K výzkumu jsem vybrala především kmeny ze sbírky katedry ekologie Přf UK, které se podařilo izolovat na území ČR z horských oblastí jako jsou Krkonoše či Králický Sněžník. Doplněny byly o kmeny nalezené na Slovensku (Ladove), Norsku (Tromso) a Alpské oblasti (Vent). Dále byly využity psychrofilní kmeny ze sbírek UTEX a CCCryo, izolovány převážně na Svalbardu. Jejich úplný seznam s údaji o lokalitě sběru a teplotních optim je příloze (Tab.5). (Obr.2.) Do experimentu byly zařazeny i blíže neurčené sněžné řasy sesbíraných z lokalit Hochgurgl, a Furka.



Obr.2: fylogeneze psychrofilních kmenů (v červeném rámečku) značeny tučným písmem. Hoham et al, 2002.

2.1.2 Adaptace na prostředí sněhu

Životní cyklus a tvorba cyst

Důležitou charakteristikou sněžných řas je schopnost tvorby odolných nepohyblivých buněk „trvalých stádií“ nebo-li cyst, s tlustou buněčnou stěnou, které jsou schopny přežít nepříznivé podmínky prostředí (Nedbalová, Lukavský, 2007, Živa). Schopnost přežít také podporují tvorbou slizového obalu, biosyntézou pigmentů, polyolů, sacharidů a lipidů k tomu určených (Hoham et Duval, 2001, Komárek et Nedbalová 2007). Trvalá stadia nejrozšířenějšího druhu *Chlamydomonas nivalis* mají hladký povrch, zesílenou buněčnou stěnu a obsah buňky je zcela překryt sekundárním karotenoidem astaxanthinem. Cysty jsou schopny přežít nepříznivé podmínky prostředí, včetně nízkých teplot v zimním období. Za příznivých podmínek se opět mění v bičíkaté buňky, které mohou v prostředí mokrého jarního sněhu aktivně migrovat, a tak vyhledat nejvýhodnější podmínky k růstu. Trvalá stadia vznikají pohlavně a označují se jako zygospory, u některých druhů mohou vznikat i nepohlavní cestou (Komárek & Nedbalová 2007).

Membrány

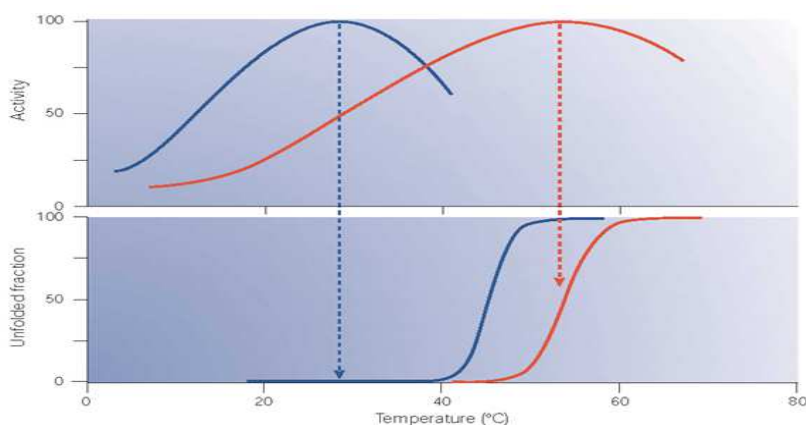
Další adaptací je složení membrán. Udržování správné membránové tekutosti je rozhodující pro membrány sloužící jako selektivní bariéry. Fluidita (tekutost) také ovlivňuje činnost veškerých membránových proteinů pro transport, přenos signálu a výrobu energie (Chintalapati a kol. 2004). Tekutost membrány je úzce spojena s optimální funkcí fotosyntézy při nízkých teplotách, která se opírá o správné složení složitých proteinů spojených s membránou, které tvoří elektronový dopravní řetěz. Většina proteinových složek fotosyntetického aparátu je ukotvena ve fotosyntetických membránách chloroplastu prostřednictvím konkrétních druhů lipidů jako jsou galaktolipidy (monogalactosyldiacylglycerol [MGDG] a digalactosyldiacylglycerol [DGDG]). Membrána tekutost je také důležitá pro transport elektronů mezi fotosyntetickými komplexů prostřednictvím mobilních operátorů, jako jsou plastochinon (Russell, 1997), jakož i vodivosti plynů (Reay, 1999). Odolnost vůči poškození fotoinhibitorů, zejména při nízkých teplotách, a opravy cyklu fotosystému II, jsou závislé na schopnosti desaturace mastné kyseliny (Gombos 1997, Kanervo 1997).

Nejčastější změny lipidů v reakci na nízkou teplotu jsou zvýšení výskytu

nenasycených mastných kyselin a zkrácení délek řetězců MK. Oba tyto trendy se nacházejí ve všech hlavních taxonomických skupinách autotrofních psychrofilních organismů a vedou ke zvýšené membránové fluiditě, a tím i k snížení teploty, při které probíhá přechod od kapalně-krytalické do gelové fáze (Chintalapati a kol. 2004; D'Amico a kol. 2002 ; Hughes a Dunn 1996). Hlavní roli při předcházení ztuhnutí membrány hrají nenasyčené mastné kyseliny v membránových lipidech (Morgan-Kiss a kol., 2006). Navíc mají PUFA ochrannou úlohu proti škodlivému vlivu vysoké intenzity světla a UV záření a tím samozřejmě pomáhají organismu přežít a přizpůsobit se extrémnímu prostředí (Whitelam a Codd, 1986).

Enzymy

Jedním z předpokladů pro život organismů v chladných prostředích je funkčnost enzymů. Schopnost přežít, rozmnožovat se a šířit se v teplotně nepříznivém prostředí vyžaduje syntézu enzymů, jejichž aktivita je v nízkých teplotách relativně vysoká (Obr.3). U těchto adaptovaných enzymů se vyvinula široká škála strukturálních vlastností, které umožňují zvýšit enzymatickou účinnost a být vysoce flexibilní oproti jejich homologům izolovaných u mikroorganismů, které na chlad adaptovaní nejsou (Siddiqui & Cavicchioli, 2006). Vysoká flexibilita je však typicky vyvážena nízkou jejich tepelnou stabilitou (Obr. 3) (Feller & Gerday, 2003, Siddiqui & Cavicchioli, 2005).



Obr. 3: Enzymatická aktivita (horní graf) a změny konformace (dolní graf) psychrofilních a mezofilních enzymů v závislosti na teplotě. Modrá křivka představuje psychrofilní enzymy. Jejich teplotní optimum je zhruba 20 – 30 °C. Je zřejmé, že v této oblasti teplot jsou daleko aktivnější než mezofilní enzymy znázorněné červenou křivkou. Také v teplotách pod 20 °C jsou daleko úspěšnější než mezofilní formy enzymů. Avšak ve vysokých teplotách jsou méně stabilní než mezofilní enzymy, deformují se a ztrácejí svou katalytickou schopnost (40 °C a výše). Na dolním grafu můžeme pozorovat, jak teplotní změny aktivity enzymů korespondují se změnami jejich konformace (Feller & Gerday, 2003).

Proteiny vázající led

Led vázající proteiny pomáhají snížit bod mrznutí vody téměř až o 1°C. Proteiny vylučované do extracelulárního prostoru, pravděpodobně kontrolují růst velkých ledových krystalů v těsném okolí buňky a zřejmě tím zabraňují poškození buněčné membrány, tato funkce se nazývá rekrystalizační inhibice. Rekrystalizační inhibiční aktivita zabraňuje růstu větších krystalů ledu, tím může zvýšit šanci přežití buňky (Lee et al., 2010). U jednobuněčných řas z rodu *Chlamydomonas* izolovaných z antarktického jezera byly popsány čtyři izoformy extracelulárního led vázajícího proteinu, které mají silnou inhibiční rekrystalizační aktivitu, udržují okolní prostředí tekuté a napomáhají přežití buňky v mrazu (Raymond et al., 2009).

Karotenoidy

Karotenoidy (tetraterpenoidní) slouží jako mechanismy, které umí účinně ochránit membránu a udržovat tak „příznivé bezpečné prostředí“ a tím chrání nenasycené vazby v řetězcích mastných kyselin před ataky volných radikálů a oxidativnímu stresu. Nejznámějším z nich je astaxantin, jehož vysoká koncentrace zvyšuje odolnost buňek vůči mrazu (Hoham, 1992). Astaxantin zbarvuje řasy červeně, zároveň jako pasivní filtr účinně brání buňky následkům nadměrné intenzity krátkovlnného viditelného záření. Astaxantin je znám také antioxidačními účinky a aktivní ochranou buňky před volnými radikály, které vznikají jako důsledek nadměrného ozáření. (Komárek & Nedbalová, 2007).

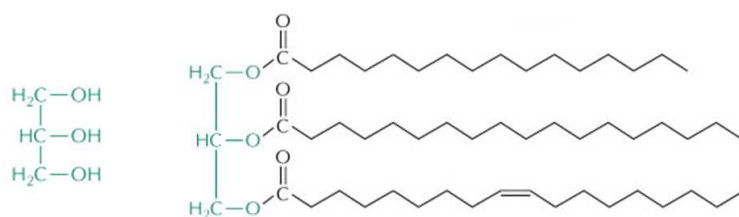
Některé druhy řas vytvářejí jiné karotenoidy, jejichž složení je však dosud málo prozkoumáno. Kromě karotenoidů byly v buňkách sněžných řas nalezeny také zvýšené koncentrace jiných látek s antioxidačními účinky, jako např. fenolických sloučenin nebo α -tokoferolu (vitamin E) (Komárek & Nedbalová, 2007).

2.2 Membrány a mastné kyseliny

Membrány jsou nepostradatelnou součástí každé živé buňky. Jejich hlavní funkcí je selektivně oddělovat dvě různá prostředí. Ať už jde o oddělení vnitřního prostředí od vnějšího okolí u bakterií nebo i rozdílných kompartmentů uvnitř buňky eukaryot. Základem těchto membrán jsou především molekuly lipidů, jejichž hydrofobní části (řetězce mastných kyselin)

k sobě přiléhají pomocí hydrofobních sil a do okolí vystavují jen své hydrofilní části („hlavičky“). Tímto vzniká relativně odolná univerzální struktura - lipidická dvojvrstva (Alberts et al., 2004).

Lipidy jsou různorodé látky, jejichž definice není dosud úplně vyjasněná. Celkový přehled o chemii, výskytu, složení a biologii těchto základních a fascinujících přírodních látek je uveden níže. Základní učebnice obvykle popisují lipidy jako skupiny přirozeně se vyskytujících látek, které jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech, což jsou uhlovodíky, chloroform, benzen, ethery a alkoholy. Patří mezi ně pestrá škála sloučenin, jako jsou mastné kyseliny a jejich deriváty, karotenoidy, terpeny, steroidy, atd. Mnohé z těchto sloučenin se významně liší strukturou nebo funkcí. Dále tyto látky, které jsou dnes všeobecně považovány za lipidy, mohou být téměř stejně snadno rozpustné jak ve vodě, tak i v organických rozpouštědlech. Proto byla poměrně kladně přijata definice IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), která říká, že: Lipidy jsou mastné kyseliny a jejich deriváty a látky s nimi biosynteticky nebo funkčně související. (Obr.4) (T. Řezanka, 2012).



Obr 4: molekula glycerolu a triacylglycerolu (přednášky Biologie buňky, J. Černý)

Mastné kyseliny (FA) jsou uloženy jako rezerva energie přes esterovou vazbou na glycerol za vytvoření triacylglycerolů (Biologie buňky, J. Černý). FA, které se vyskytují v zelených řasách jsou uvedeny v (Tab4) (Pratoomyot J et al, 2005, Bigogno Ch, 2002). Jejich obrazový přehled je uveden v (Tab12). (Tab.3).

Vzorec	Chemický název	Triviální název	Anglický název
C14:0	tetradekanová	myristová	myristic acid
C16:0	hexadekanová	palmitová	palmitic acid
C16:1t	cis-hexadec-9-enová	palmitolejová	palmitoleic acid
C16:2n4	hexadeka-9,12-dienová		hexadecadienoic acid
C16:3n4	hexadeka-6,9,12-trienová		hexadecatrienoic acid
C16:4n1	hexadeka-6,9,12,15-tetraenová		hexadecatetraenoic acid
C18:0	oktadekanová	stearová	stearic acid
C18:1n9	cis-oktadec-9-enová	olejová	oleic acid
C18:1n7	oktadec-11-enová		cis-vaccenic acid
C18:2n6	9cis,12cis-oktadeka-9,12-dienová	linolová	linoleic acid
C18:3n6	6cis,9cis,12cis-oktadeka-6,9,12-trienová	γ-linolenová	gamma-linolenic acid
C18:3n3	9cis,12cis,15cis-oktadeka-9,12,15-trienová	α-linolenová	alfa-linolenic acid
C20:1n9	eikosa-11-enová, metylester	eikosenová	eicosenoic acid
C20:3n6	8cis,11cis,14cis-eikosatrienová		linolenate acid
C20:4n6	arachidonová	arachidonová	arachidic acid
C20:5n3	eikosapentaenová (EPA)	eikosapentaenová	eicosapentaenoic acid

Tab.3: Názvosloví důležitých mastných kyselin vyskytujících se v zelených řasách.

Species	Major fatty acids (% of total)													Ref.	
	14:0	16:0	16:1	16:2	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3 ω6	18:3 ω3	18:4 ω3	20:4 ω6	20:5 ω3		22:6 ω3
Bacillariophyceae															
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	15	10	29	5	6			1				14	15		a
Chlorophyceae															
<i>Parietochloris incisa</i>		10	2	1	1	3	16	17	1	2		43	1		b
Dinophyceae															
<i>Amphidinium carteri</i>	2	12	1	2		2	2	1	3		19	20		24	a
Phaeophyceae															
<i>Desmarestia acculeata</i>	4	12	2				7	6	10	2	16	19	19		c
<i>Dictyopteria membranacea</i>	6	20	1			2	14	14	11	2	11	11	9		d
<i>Ectocarpus fasciculatus</i>	2	17				1	13	4	15	1	23	11	13		e
Prasinophyceae															
<i>Ochromonas danica</i>	13	4				3	7	26	12	7	7	8			f
Rhodophyceae															
<i>Gracilaria confervoides</i>	8	18	3			1	16	2		1	1	46			e
<i>Phycodrys sinuosa</i>	5	22	5	2	1	3	5	1	1			44	2		e
<i>Porphyridium cruentum</i> 1380-la		34	1			1	2	12		1		40	7		g

^a Cobelas and Lechado, 1989.

^b This work.

^c Pohl and Zurheide, 1979.

^d Hofman and Eichenberger, 1997.

^e Makewitz et al., 1997.

^f Vogel and Eichenberger, 1992.

^g Cohen, 1990.

Tab. 4: Hlavní složení mastných kyselin řas relativně bohatých na kyselinu arachidonovou. (Bigogno Ch, 2002)

2.2.1 Membrána a teplota

U mikroorganismů se vyvinula schopnost přizpůsobit a upravovat fluiditu membrán na základě skladby mastných kyselin. Tato adaptace však není univerzální. Změny v lipidech jsou ovlivněny tím, jestli jsou pro organismus žádané. Také záleží na genotypových a fenotypových rozdílnostech jednotlivých organismů. Prokaryota i Eukaryota si v závislosti na taxonomickém zařazení vytvořily strategie, jako jsou například změna lipidové hlavičky, změny proteinů integrovaných v membránách, druhy syntetizovaných karotenoidů, změna délky řetězců mastných kyselin nebo podíl cis- a trans- izomerů nenasycených mastných kyselin. (Chintalapati et al., 2004). U psychrofilních a psychrotolerantních mikroorganismů se vyvinuly různé strategie přizpůsobení se nízkým teplotám. Jedna z klíčových strategií pro přežití buňky je obecně schopnost regulovat tekutost membrány tím, že se mění složení mastných kyselin v lipidech (Chintalapati et al., 2004).

Čím je teplota nižší, tím je fluidita nebo-li tekutost menší, tzn. membrána tuhne a procesy nutné pro životaschopnost buňky se zpomalují. Zastavení pohybu na membráně prakticky znamená smrt buňky. Některé organismy se umí připravit na celkové zastavení životních funkcí a jsou schopny vytvořit klidové stádium (cystu).

Fluidita membrány je jednou z hlavních podmínek ovlivňující kompletní funkčnost celého systému. Jde o fyzikální vlastnost, viskozitu (tekutost, gelovitost) která předurčuje mj. propustnost (permeabilitu) membrány pro látky relativně volně procházející skrz membránu (např. malé molekuly, hydrofobní molekuly a pod.), ale také pro látky využívající k transportu přes membránu kanály či přenašeče, jelikož fluidita má také přímý vliv na účinnost těchto transportních proteinů. Sama fluidita membrán může být ovlivněna několika faktory. Jako např. celkovým složením, poměrem zastoupení lipidů a proteinů a jejich vlastnostmi (velikostí, vazbami atd.). To ovlivňuje prostorovou uspořádanost molekul i celé struktury. Pro zvýšení fluidity je potřeba více neuspořádaných molekul, výskyt nenasycených vazeb, které způsobují zalomení uhlíkatých řetězců, upřednostňování cis- konformací dvojných vazeb před trans- konformací (Gerday & Gladsdorff, 2007).

K vyztužení membrán mohou sloužit i další přítomné molekuly, které však primárně zastávají jinou úlohu, takovým příkladem mohou být membránové proteiny plnící většinu specifických funkcí membrány nebo karotenoidy (deriváty tetraterpenů), které fungují jako pigmenty. (Alberts et al., 2004).

3 Cíle práce

Předpokládáme, že k adaptaci na konkrétní teplotní podmínky chladnomilné řasy dokáží použít mnohé mechanismy včetně změny skladby membránových lipidů, především změn v poměru mastných kyselin, které svým tvarem mají přímý vliv na fluiditu membrán, čímž mohou ovlivňovat pro život nezbytné procesy a látkové výměny.

V této práci si kladu následující konkrétní cíle:

1. Zjištění teplotních optim zkoumaných kmenů *Ch. reticulata* (Luční) a *Ch. pichincae* (Meandry).
2. Stanovení profilu mastných kyselin vybraných kmenů sněžných řas (Chlorophyta) ve zkoumaných teplotách (3, 9, 15, 22, 30°C).

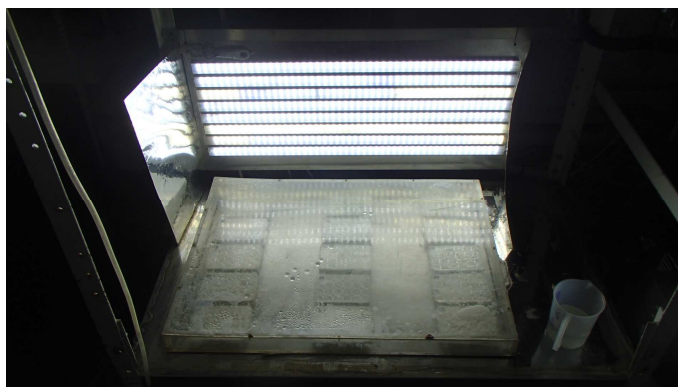
Hypotézy

1. Dokáží psychrofilní a psychrotrofní sněžné řasy (Chlorophyta) produkovat jiný poměr mastných kyselin v závislosti na kultivačních teplotách a ozáření?
2. Je zkracování průměrné délky řetězců mastných kyselin strategií chladové adaptace sněžných řas?
3. Je navyšování dvojných vazeb mastných kyselin další strategií chladové adaptace sněžných řas?
4. Můžeme očekávat výrazné změny ve složení mastných kyselin u psychrotrofních řas a takzvaných „pravých psychrofilů“?

4 Metodika

4.1 Kultivace na zkřížených gradientech

Pro zjišťování optimálních podmínek pro růst řas jsem použila jednotku pro zkřížené gradienty (Labio, Česká Republika; Kvíderová a Lukavský 2001) (Obr.5),



Obr.5: zařízení pro zkřížené gradienty

které umožňuje sledovat vliv kombinací 2 faktorů zároveň. V mém případě se teplota pohybovala v rozmezí [0-30°C] a ozáření [34-423 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$]. Základem zařízení, které jsem použila je hliníková deska (100x60cm) vybavená regulací teploty na protilehlých kratších stranách. Na teplejší straně jsou instalovány pouze pulsní ohřívače, na chladnější straně pulsní ohřívače doplňuje kontinuální chlazení (Halldal&French,1958, Kvíderová a Lukavský 2001). Po celé její délce je umístěn panel LED () o rozměrech 80 x 30 cm, pro zvýšení rozsahu ozáření jsem použila světelný filtr z průsvitného papíru.

Pro výpočet teploty a ozáření v konkrétním místě desky jsem měřila teplotu digitálním teploměrem s dotykovým čidlem Gryf 310 (Gryf, Česká Republika) a ozáření zařízením LI-250A s kvantovým čidlem LI-190 (oboje Li-COR, USA) v mřížce 10x10cm. Měření ozáření bylo opakováno při zastínění čidla poloprůsvitným papírem. Z dat byl vypracován regresní model v programu Statistica 12 (StatSoft, USA). Pro teplotu byla zvolena mnohonásobná lineární regrese

$$\text{Teplota } [^{\circ}\text{C}] = a + bD + cS$$

kde D je délka desky v cm, S šířka desky v cm a a , b , c jsou parametry rovnice.

Pro ozáření byla zvolena mnohonásobná kvadratická regrese

$$\text{Ozářenost } [\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}] = a + bD + cS + dD^2 + eDS + fS^2$$

kde D je délka desky v cm, S šířka desky v cm a a, b, c, d, e, f jsou parametry rovnice.

Parametry rovnic jsou uvedeny níže.

Pokus 1 (nízké teploty, souřadnice gradientu A,B,C)

- pro výpočet teploty:

$$\text{Temperature} = 2.0461 + 0.0972 * x - 0.0033 * y$$

- pro ozářenosti v různých stupních zastínění

$$I0 = 83.1475 + 2.4341 * x + 0.1222 * y - 0.0322 * x * x + 0.0003 * x * y + 0.1432 * y * y$$

$$I1 = 53.2631 + 1.9633 * x - 0.0124 * y - 0.0261 * x * x - 0.0088 * x * y + 0.1013 * y * y$$

$$I2 = 34.9041 + 1.6533 * x - 0.1046 * y - 0.0207 * x * x - 0.0064 * x * y + 0.0753 * y * y$$

$$I3 = 29.611 + 0.9811 * x - 0.1499 * y - 0.0133 * x * x - 0.0016 * x * y + 0.0607 * y * y$$

$$I4 = 23.6925 + 0.6965 * x - 0.2603 * y - 0.0082 * x * x - 0.004 * x * y + 0.0501 * y * y$$

Pokus 2 (vysoké teploty, souřadnice gradientu D,E)

- pro výpočet teploty:

$$T = -0.6883 + 0.3743 * x - 0.004 * y$$

- pro ozářenosti v různých stupních zastínění

$$I0 = -154.4392 + 7.1116 * x + 13.9514 * y - 0.0573 * x * x - 0.0058 * x * y - 0.1317 * y * y$$

$$I1 = -104.1126 + 4.5587 * x + 8.3567 * y - 0.0361 * x * x - 0.0074 * x * y - 0.0669 * y * y$$

$$I2 = -84.4173 + 3.7066 * x + 5.9471 * y - 0.0297 * x * x - 0.003 * x * y - 0.0499 * y * y$$

$$I3 = -59.8248 + 2.5703 * x + 4.7396 * y - 0.0204 * x * x - 0.0036 * x * y - 0.0392 * y * y$$

$$I4 = -45.2198 + 2.1592 * x + 3.6347 * y - 0.0178 * x * x - 0.0019 * x * y - 0.0312 * y * y$$

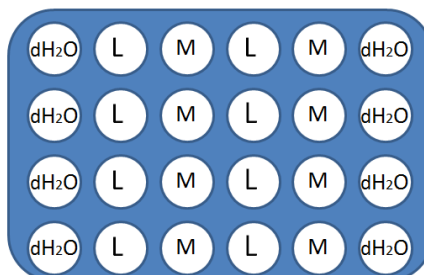
Experimenty byly prováděny ve fyziologické laboratoři v Botanickém ústavu AV ČR v.v.i v Třeboni.

4.1.1 Kultivace

Pro kultivaci bylo použito 15 (3x5) plastových kultivačních destiček s 24 jamkami (Obr.6). V krajních sloupcích (1 a 6) o 4 jamkách byla po dobu kultivace destilovaná H_2O , kultura kmene Luční ČS (sloupec 2 a 4) a kmen Meandry (v sloupci 3 a 5). Pro kultivaci bylo použito tekuté médium BBM (příloha č 13) a počáteční koncentrace byla 10^4 B/ml. Destičky ležely na tenké vrstvě vody pro efektivnější přenos tepla z desky gradientu. Byly zakryty potravinářskou fólií a víčkem proti výparu, a kontaminaci. Vrstvy papírového filtru byly vloženy mezi potravinovou fólii a víčko. Deska gradient byla zakryta plexisklovým víkem. Pokus byl rozdělen na měření nízkých teplot do 10°C a vyšších. V prvním pokusu rostly

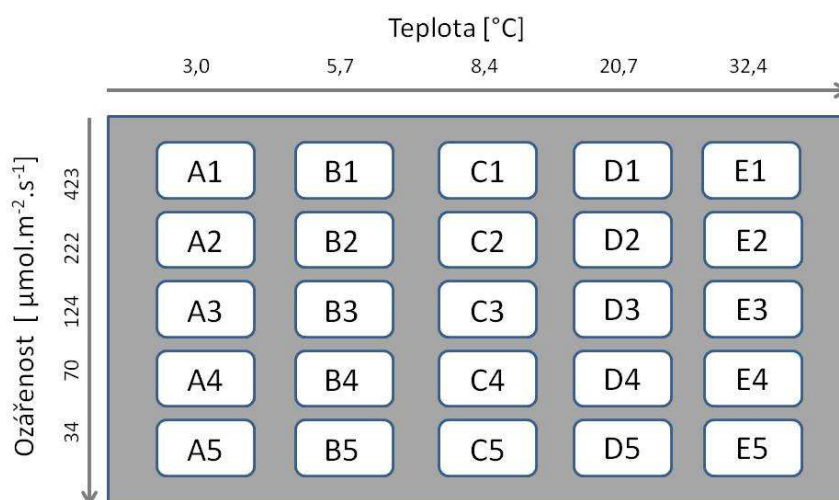
kultury v destičkách A,B, a C, v druhém D a E (Obr 7).

Do vzniklého kultivačního prostoru byl přidáván CO₂ o celkové dávce 14 g CO₂ denně.



Obr 6. Schéma kultivační destičky, dH₂O- destilovaná voda pro udržení žádoucího klima,

L- kmen Luční ČS, M- kmen Meandry



Obr.7: schéma zkřížených gradientů, A1-E5 - polohy kultivačních destiček

4.1.2 Sledování růstu

Nárůst biomasy byl sledován pomocí spektrofluorofotometrické čtečky destiček Varioscan Flash (Thermo scientific, Finsko). Měření jsem opakovala pravidelně po třech dnech. Absorbanci jsem měřila při $\lambda=750$ nm (A_{750}) a $\lambda=682$ nm (A_{682}). Při měření fluorescence (F) jsem používala excitaci při $\lambda=440$ nm a měřila jsem emisi při $\lambda=680$ nm. Po

ukončení kultivace při počátku stacionární fáze byly naposledy změřeny A_{750} , A_{682} a F. Destičky byly vyfotografovány běžným digitálním fotoaparátem. Kultury byly přeneseny z destiček do zkumavek pro následné zamrazení a extrakci MK.

4.1.3 Vyhodnocování, zjišťování optim růstu

Pro přepočet hodnot A_{750} , A_{682} a F na počty buněk v ml (N) jsem vytvořila konverzní křivku pro každý kmen.

Z původního hustého inokula o $A_{750} \sim 1$ jsem vytvořila ředící řadu (factory ředění: 1 = neředěná kultura, 0.5, 0.3, 0.1, 0.05, 0.03, 0.01, 0.005, 0.003, 0.001 a 0 = čisté médium). V každému stupni ředění jsem naměřila hodnoty A_{750} , A_{682} a F. N v neředěné kultuře jsem spočítala pomocí Bürkerovy komůrky, pro další ředění jsem tyto hodnoty vynásobila faktorem ředění. Sestrojila jsem graf závislosti N na A_{750} , A_{682} a F a parametry konverzní rovnice jsem získala proložením polynomické funkce. Pro každý kmen jsem vytvořila 3 nezávislé konverzní křivky, a průměrnou hodnotu jejich parametrů jsem použila pro přepočet.

Při každém měření byla data ošetřena K-kritériem pro vyloučení odlehlých hodnot (Likeš a Laga 1978). Růstová rychlost byla počítána jako směrnice regresní přímky $\ln(N)$ na čase pro každou jamku v každé destičce během exponenciální fáze růstové křivky.

4.2 Kultivace v sledovaných teplotách – teplotní experiment

1) Příprava pro kultivaci

Pro testování v různých teplotách jsou kmeny pěstovány v kultivátorech, kde se teplota pohybuje v rozmezí 7-10°C. Je zajištěno svícení zářivkou v pravidelných intervalech napodobující denní cyklus. Kultury jsem pěstovala ve zkumavkách o objemu 25ml nebo v Erlemeyerových baňkách (100ml) pro nárůst objemu. Pro oba typy nádob jsou použity celulósově špunty překryté hliníkovou fólií. Při podezření na kontaminaci byl dotyčná kultura

přesazna na destičku s 24 (6x4) jamkami o malém objemu cca 4ml. Vzorke bez kontaminace byly následně použity pro další práci. Většina kmenů byla kultivována v BBM (Bold-Basal/Bristol Medium), které je jedno z nejčastějších médií pro pěstování zelených řas. (příloha13) Kultury ze sbírek CCCryo jsou kultivovány v (3N- BBM) – tj. médium obohaceno o dusičnany. Médium jsem pravidelně dolévala, Erlen-meyerovy baňky jsem sterilizovala v autoklávu a schladila na cca 7°C nebo 3°C, dle teploty, ve kterých jsou připravovány dané kultury a které se blíží teplotnímu optimu testovaných kmenů.

2) Kultivace

Počáteční koncentrace v 75ml baňkách odpovídala 10^4 buněk v 1 ml. Poté jsem čerstvě připravené kultury přenesla do kultivátorů, které byly nastaveny na zkoumanou teplotu (3, 9, 15, 22 a 30°C). Pokud je požadovaná teplota 30°C, 22°C nebo 15°C, tj. velký teplotní interval, kultury jsem nechala po dobu několika dní aklimatizovat v mezistupňové teplotě (nebo teplotách), než byly umístěny do boxu nastaveného na cílovou teplotu.

3) Sledování a hodnocování růstu

Nasazené kultury jsem pravidelně kontrolovala po 7-14 dnech a průběžně počítala množství buněk na objemovou jednotku. Koncentrace buněk byla (10^4 B/ml). Během několika týdnů (po adaptaci na danou teplotu a popř. světelné podmínky, které se v jednotlivých chladících mohou lišit, což je zapříčiněno typem zářivky) rychlost růstu zvyšuje. Průběžné kontroly a počítání c [B/ml] probíhala pod mikroskopem s pomocí Burkerovy komůrky. Před sklizní jsem vypěstovanou kulturu vyfotila pod zvětšením 100x10. Spočítala jsem specifickou růstovou rychlost a dobu zdvojení. (Tab.7 v příloze) Po výpočtu specifické růstové rychlosti $\mu = (\ln c - \ln c_0)/(t - t_0)$ [den⁻¹] a následně doby zdvojení $t_d = \ln 2/\mu$ [den⁻¹] (F. Widdel, 2007), jsem dopočítala počet generací v teplotní expozici, všechny kultury se pohybovaly v rozmezí 15-45 generací během 2-3 měsíců (Tab.8 v příloze).

4.3 Příprava na analýzu FA

1) Sklizení

Vzorky, z kultivátorů i ze zkřížených gradientů, připravené na sklizeň jsem vyfotila běžným fotoaparátem pod zvětšením 1000x, abych věděla, jak buňky vypadaly a jaká převládala stádia sledované kultury. Biomasu jsem stočila na centrifuze (Centrifuge 5702, eppendorf) při RCF 60D v plastových zkumavkách 5 minut. Protřepala a opět odstředila v eppendorfkách (Centrifuga MICRO 120, Hettich Zentrigen). Následně jsem ji v těchto eppendorfkách zamrazila. Vzorky byly poté na 24 hodin zlyofylizovány, čímž jsem získala sušinu. Víčka eppendorfek byla přitom propíchnána jehlou, aby páry mohly volně unikat.

2) Extrakce – rozbourání membrán, oddělení lipidů

Metoda vychází od autorů Bligh a Dyer (1959). Z každého vzorku jsem navázila 10-15 mg do šroubovací eppendorfky (při větším množství by se nemusely buňky zcela rozbít). Pro narušení buněčných stěn jsem přidala skleněné kuličky (velikost 9, 100-200 μm) objemu cca 1ml a 500 μl destilované vody. Takto připravený vzorek jsem 2x na 30 vteřin rozbíjela pomocí homogenizátoru (Bead-Beater), přičemž vzorek mezitím chladila, aby nedosáhl kritických 40 C. Přilila jsem 1ml $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$, protřepala v ruce a svrchu odpipetovala 1ml do skleněné šroubovací zkumavky. Do eppendorfky jsem doplnila 1ml Met-OH (methanolu), opět protřepala a 1ml odlila do zkumavky vrstu bez kuliček. Propláchnutí methanolem jsem opakovala. Do zkumavek jsem přidala 1ml rozpouštědla DCM (dichlormethan) a vzorek ve vodní lázni podstoupil 15-ti minutové vystavení ultrazvuku. Ihned jsem přilila 1ml DCM, 1ml DH_2O a chladila. Zchlazený vzorek se protřepal pomocí vortexu a odstředil 600g na 10 minut. Obsah zkumavek se oddělil na 3 fáze. Opatrně jsem odebrala (skrz prostřední s rozpouštědly a nerozpustnými látkami) spodní fázi obsahující lipidy do odpařovací baňky. Vzorek jsem odpařila za pomoci nízkého tlaku na rotační vakuové odparce (Heidolph). Vysušené odpařovací baňky byly vypláchnuty namíchaným roztokem DCM:Met-OH v poměru 2:1 a vše bylo přeneseno na 3 výplachy po cca 400 μl do přednavážené skleněné vialky. Po navážení naplněné a pomocí N_2 vysušené vialky lze určit hmotnost lipidů ze zkoumaného vzorku a vypočítat jejich procento v sušině. V této fázi jsou vzorky stabilizovány a mohou být na nedlouhou dobu zamrazeny.

3) Derivatizace vzorků – příprava metylesterů mastných kyselin

Do vialky jsem odměřila 50 μ l roztoku 2DCM:1Met-OH na 1 μ g lipidů, promíchala a z tohoto odebrala 50 μ l do zkumavky. Mezitím byl připraven roztok mastné kyseliny C17:0, která se v řasách nevyskytuje a v porovnání poskytuje informaci o absolutním množství nalezených FA. Interní standart IST D 17:0 je v koncentraci 3mg (C17:0) /ml hexanu a do každého vzorku bylo přidáno 5 μ tohoto standartu (=15 μ g C17:0). Vše jsem opět vysušila „vyfoukala“ pomocí N₂. Po přidání 1ml BF₃ (roztok fluoridu boritého v 14% met-OH), 500 μ l hexanu, byl vzorek mírně profouknut N₂, aby nedocházelo k oxidaci v přítomnosti O₂. Pevně zazátkované zkumavky byly zahřáty na teplotu 85°C po dobu 60 minut, přičemž dochází k tvorbě metylesterů mastných kyselin a kde BF₃ funguje jako katalyzátor. Do vychlazeného vzorku jsem přilila 1ml hexanu a 1ml d₄H₂O (usnadňuje následné oddělování fází), protřepala na vortexu a odstředila na cetrifuze opět na RCF 600D na 10 min. Odebrala jsem pipetou vrchní hydrofobní vrstvu do odparky. Do zkumavky jsem opět dvakrát za sebou přidala 1ml hexanu, protřepala a stočila a odpipetovala vrchní vrstvu do odpařovací zkumavky. Vše jsem odpařila při sníženém tlaku nebo jen dusíkem (N₂), jelikož hexan se odpařuje velice rychle. Vysušený vzorek metylesteru mastných kyselin jsem přenesla do vialky s insertem, kterou jsem naplnila do objemu 300 μ l. Vzorky jsem až do analýzy MK na GC-FID zamrazila v mrazáku při -20°C.

4.4 Analýza FA

Metylestery (FAME) byly analyzovány plynovým chromatografem – s plamenově ionizačním detektorem – Trace 1300 [Thermo] vybaveným autosamplerem HTA3000. K analýze mastných kyselin jsem se používala kolonu [TR-FAME] o délce 60m a průměrem 25 μ m. Jako nosný plyn bylo použito helium (průtok 2 ml/min). Teplotní rampa pro separaci metylesterů mastných kyselin byla následující: 30 s zdržení při 140°C následně ohřev na 240°C s rychlostí 4°C/min s následným ochlazením zpět na 140°C. Injektor byl nastaven na 250°C a detektor na 260°C. Injektované množství vzorku bylo 5 μ l. FAME byly identifikovány srovnáním retenčních časů se známými standardy (37-komponentní FAME mixu, Supelco™). Kvantifikace jednotlivých složek FAME byla vypočtena na základě známého množství standartu C:17. Tímto postupem jsou identifikovány všechny homology mastných kyselin podle délky řetězce a počtu dvojných vazeb (Kainz et al,2002).

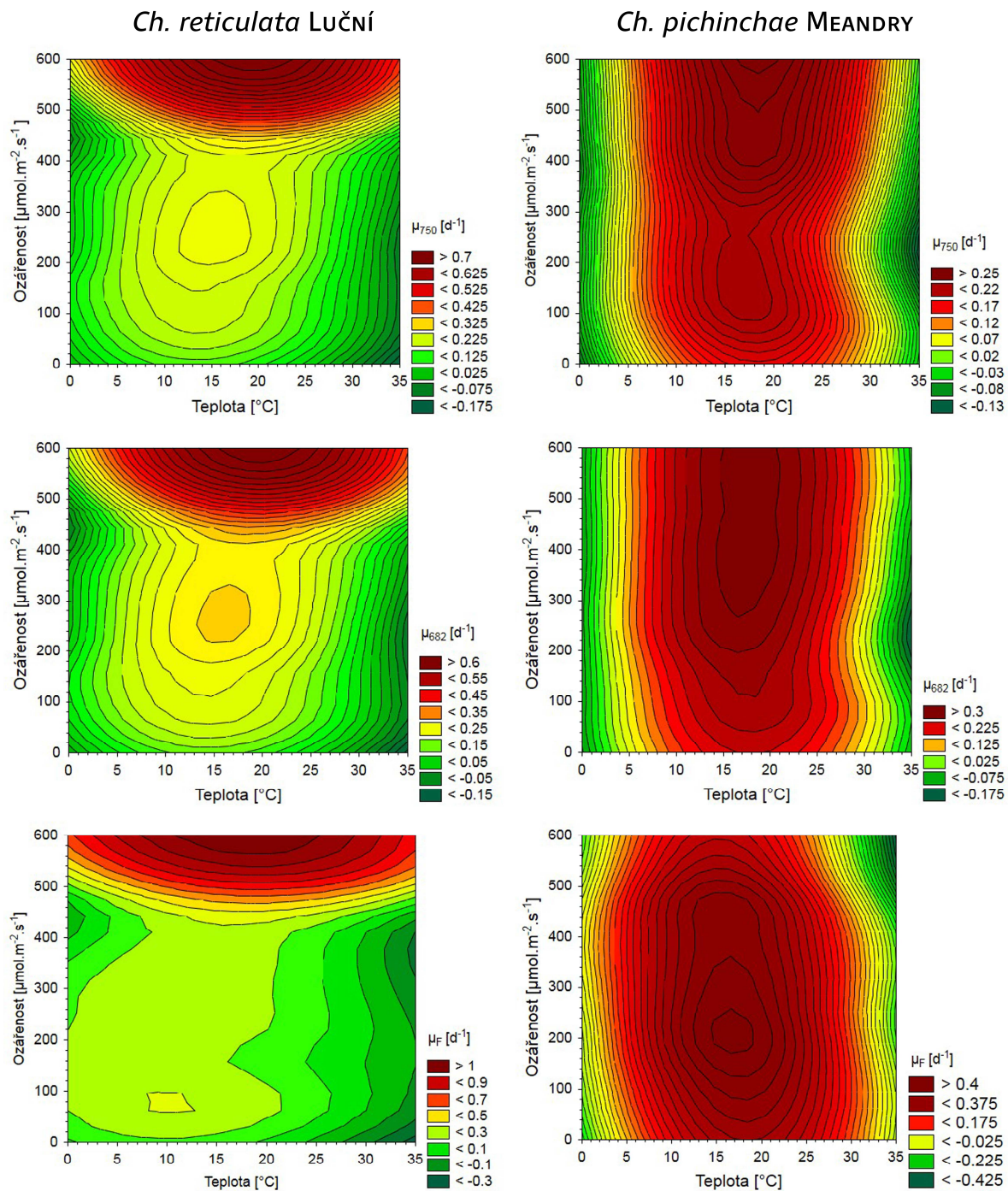
5 Výsledky

5.1 Zkřížené gradienty

1) Průběh růstu

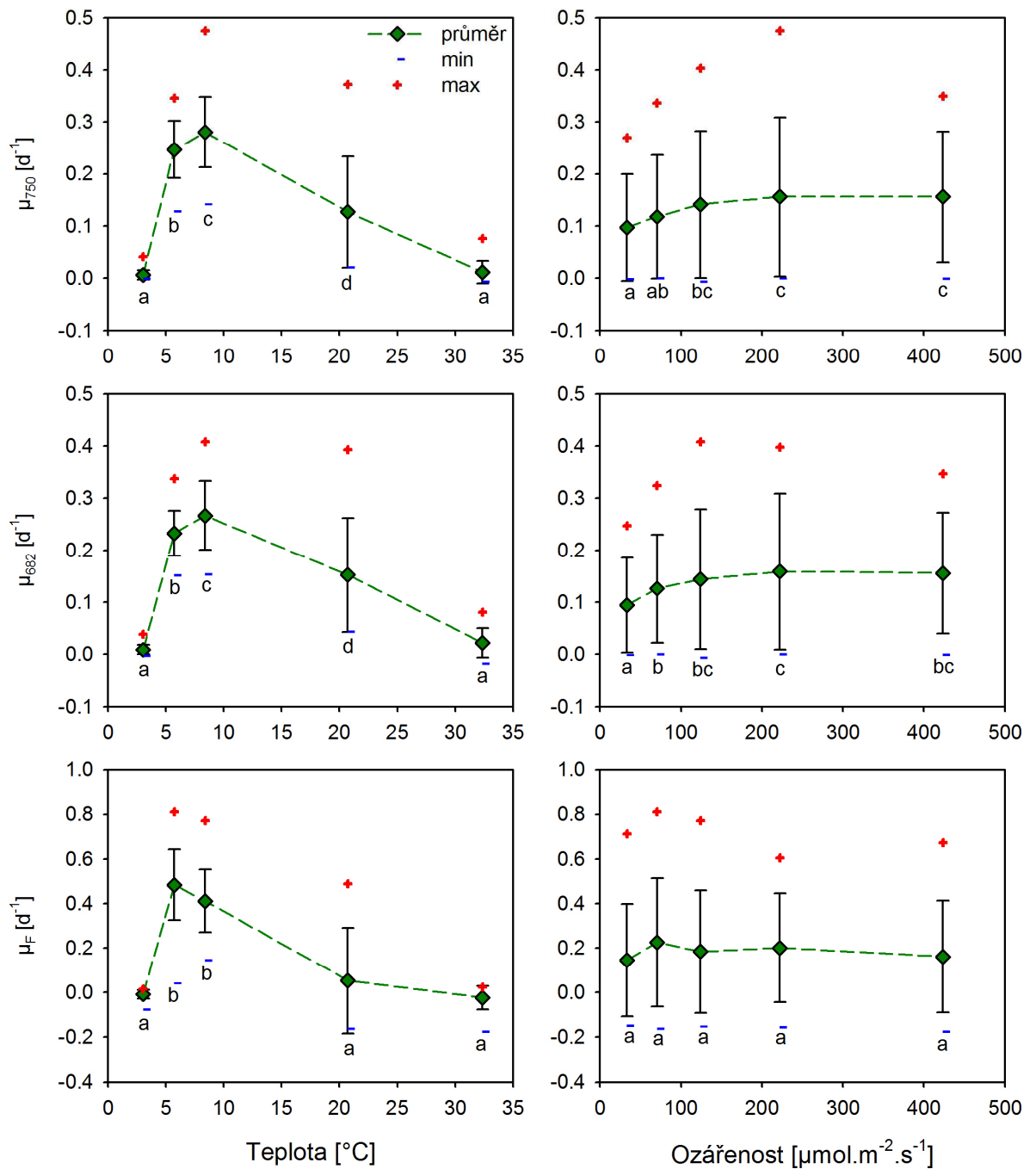
Sledované kmeny *Ch. reticulata* Luční a *Ch. pichincae* Meandry v pokusu dobře rostly, jak lze spatřit v 3D grafech vytvořených v programu Statistika 64 (Obr. 8). Oba kmeny vykazují největší aktivitu ve fázi růstu shodně v teplotách 15 – 20° C, přičemž teplotní interval pro přežití je u *Ch. reticulata* Luční mírně širší – předpokládáme 2 – 35° C, zatímco u *Ch. pichincae* Meandry je rozmezí výskytu 6 – (max) 30°C. Odlišné preference jsou patrné v nárocích na světelné podmínky. *Ch. reticulata* Luční vyžaduje ozáření minimálně 450 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a v pokusu se zářivkami o maximálním výkonu 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ani nedosáhla na optimální ozáření. Kmen *Ch. pichincae* Meandry zdá se je na množství fotonů nezávislý, vykazuje shodnou růstovou aktivitu ve všech hladinách pokusem nabídnuté ozáření.

Dále jsem zkoumala závislost růstu na teplotě a ozáření kmene *Ch. reticulata* Luční, graf ANOVA(Obr. 9) a Gradshift (Obr. 10), pro kmen *Ch. pichincae* Meandry ANOVA(Obr. 4) a Gradshift (Obr. 5). Označení a,b,c,d v grafech v Obr. 2 a Obr. 11 vyjadřuje skupiny podobnosti dle TukeyHSD. Podle ANOVY (Obr. 9) lze soudit, že vrchol růstové rychlosti u kmene *Ch. reticulata* Luční je v mezi 5 – 10° C, naproti tomu ozáření má kladný vliv na růst, jak je zřejmé dle grafů c,d. V (Obr. 10), *Ch. reticulata* Luční, grafy a,b,c ukazují, že vliv světla v sledovaných teplotách není tak podstatný, kromě teplot blízkých 20°C, kde je růst vyšší při ozáření nad 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Řasy v teplotě 3°C nerostly vůbec, při teplotě 5,7°C a 8,4°C vykazovali dobrý růst kromě zatemněné řady, při 20,7°C vliv ozáření na růst stoupá, při 32,5°C už téměř nerostou. U *Ch. pichincae* Meandry (Obr. 12, grafy a,b,c) jsem zaznamenala nejrychlejší růst v T=20°C, významný je také v 8,4°C a v 5,7°C, naopak ve 3°C a 30°C buňky nerostou. Vliv ozáření na růstovou rychlost *Ch. pichincae* Meandry je zanedbatelný (grafy d,e,f). V (Obr. 12, graf a,b) je vidět čistý vliv na růst na teplotě bez efektu ozáření. V grafu c, v teplotách 5,7°C a 8,4°C je v zóně vysoké ozáření sledovatelný zajímavý nárůst chlorofylu (měřeno fluorescencí). Ozáření nemá zásadní vliv na růstovou rychlost (Obr. 12, grafy d,e,f). Grafy byly vytvořeny pomocí programů STATISTIKA 64 a Sigma plot.



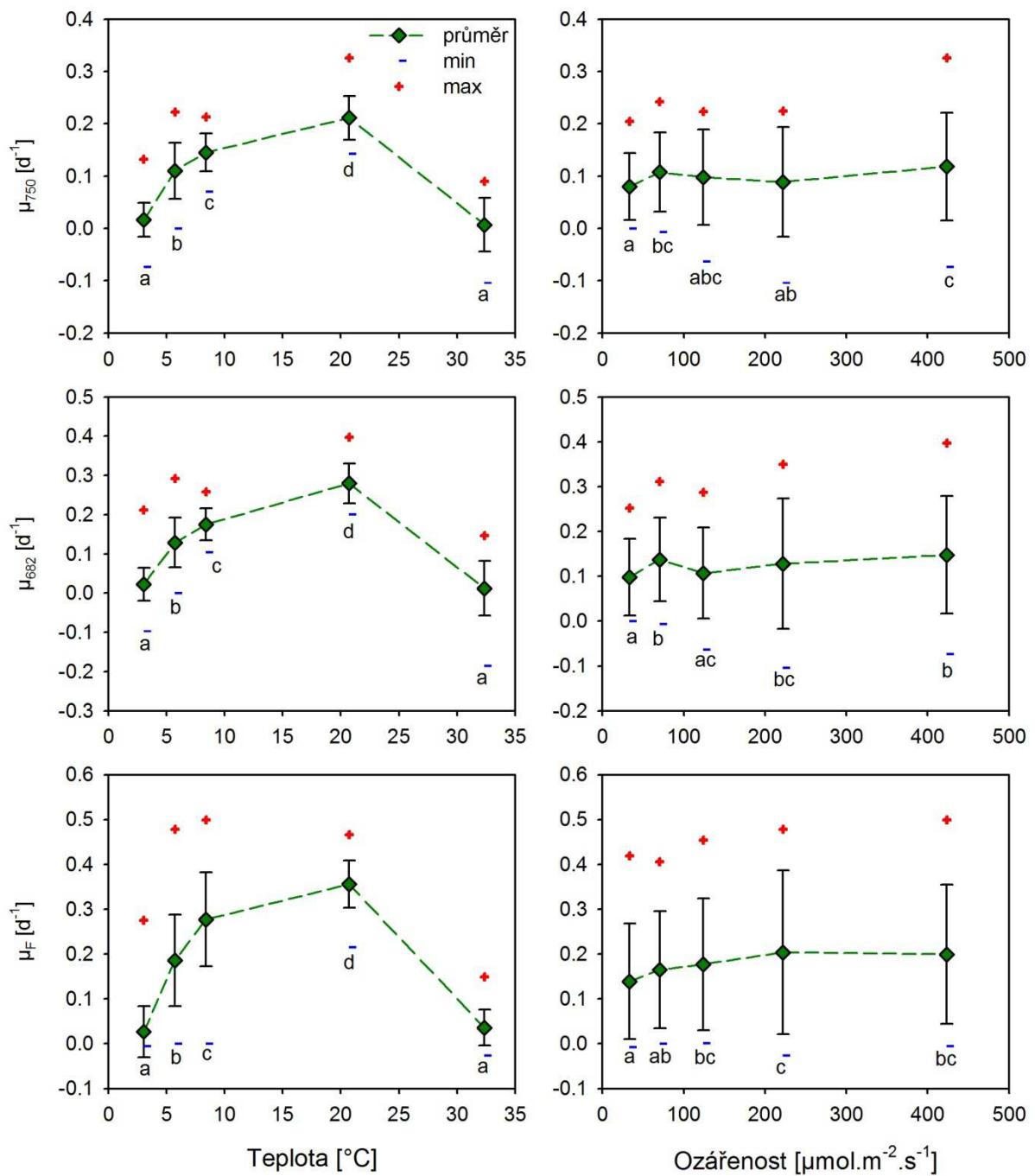
a	d
b	e
c	f

Obr 8: 3D grafy, sledování růstu na zkřížených gradientech. a,b,c – *Ch. reticulata* Luční, d,e,f – *Ch. pichincae* Meandry, a,d – hodnoty absorpance při $\lambda=682$ nm (A_{682}), b,e hodnoty absorpance při $\lambda=750$ nm (A_{750}), c,f - hodnoty absorpance fluorescence

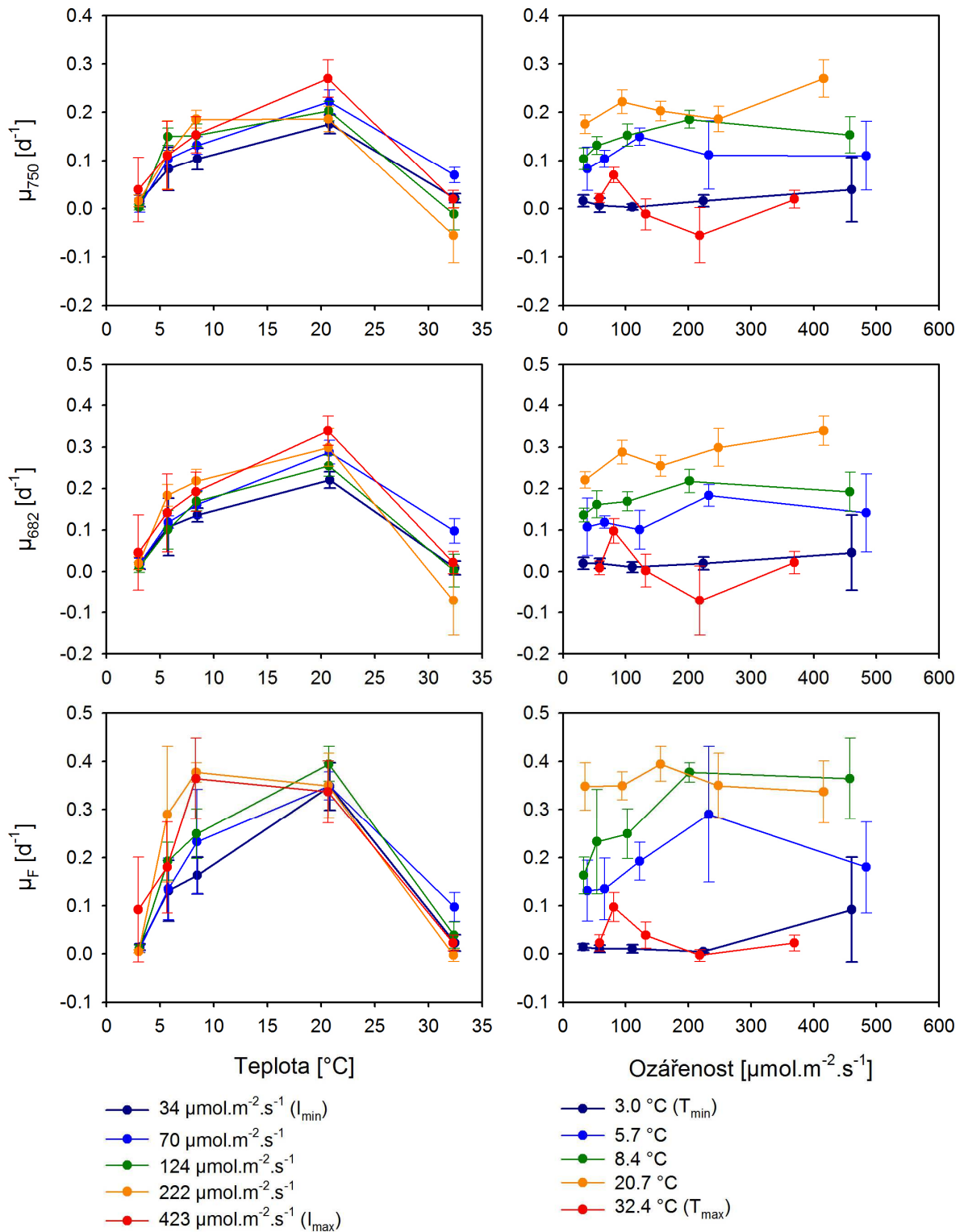


a	d
b	e
c	f

Obr 9: *Ch. reticulata* Luční: a,b,c – graf závislosti růstu na teplotě, d,e,f – graf závislosti růstu na ozářenosti, a,d – hodnoty při absorbanci $\lambda=682$ nm (A_{682}), b,e - hodnoty absorbance při $\lambda=750$ nm (A_{750}), c,f - hodnoty absorbance fluorescence

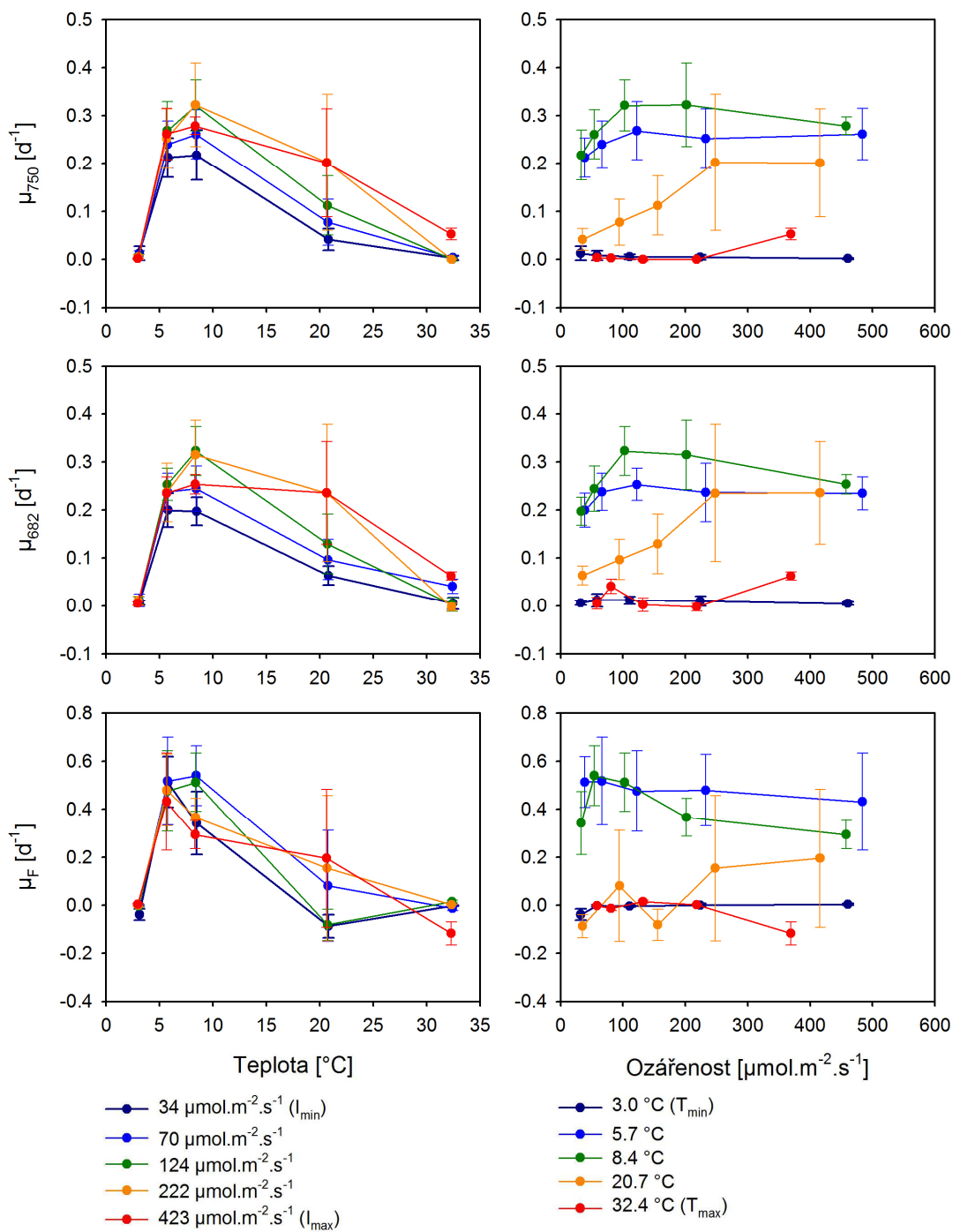


Obr 10: *Ch. reticulata* Luční: a,b,c – graf závislosti ozáření na teplotě, d,e,f – graf závislosti teploty na ozáření, a,d – hodnoty absorbance při $\lambda=682$ nm (A_{682A}), b,e - hodnoty absorbance při $\lambda=750$ nm (A_{750}), c,f - hodnoty absorbance fluorescence



a	d
b	e
c	f

Obr 11: *Ch. pichincae* Meandry, a,b,c – graf závislosti růstu na teplotě, d,e,f – graf závislosti růstu na ozáření, a,d – hodnoty při absorpci $\lambda=682$ nm (A₆₈₂), b,e – hodnoty absorpci při $\lambda=750$ nm (A₇₅₀), c,f – hodnoty absorpci fluorescence

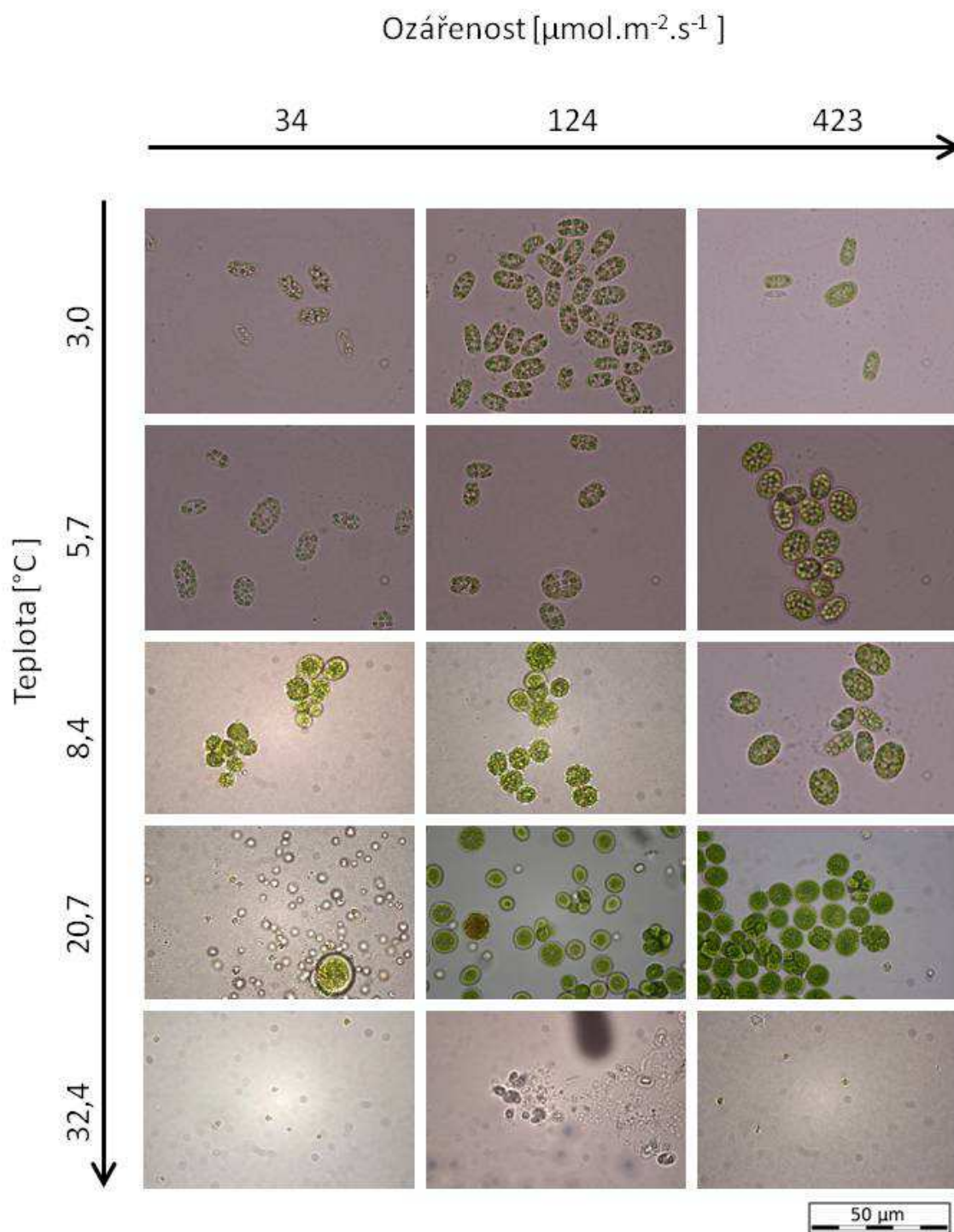


a	d
b	e
c	f

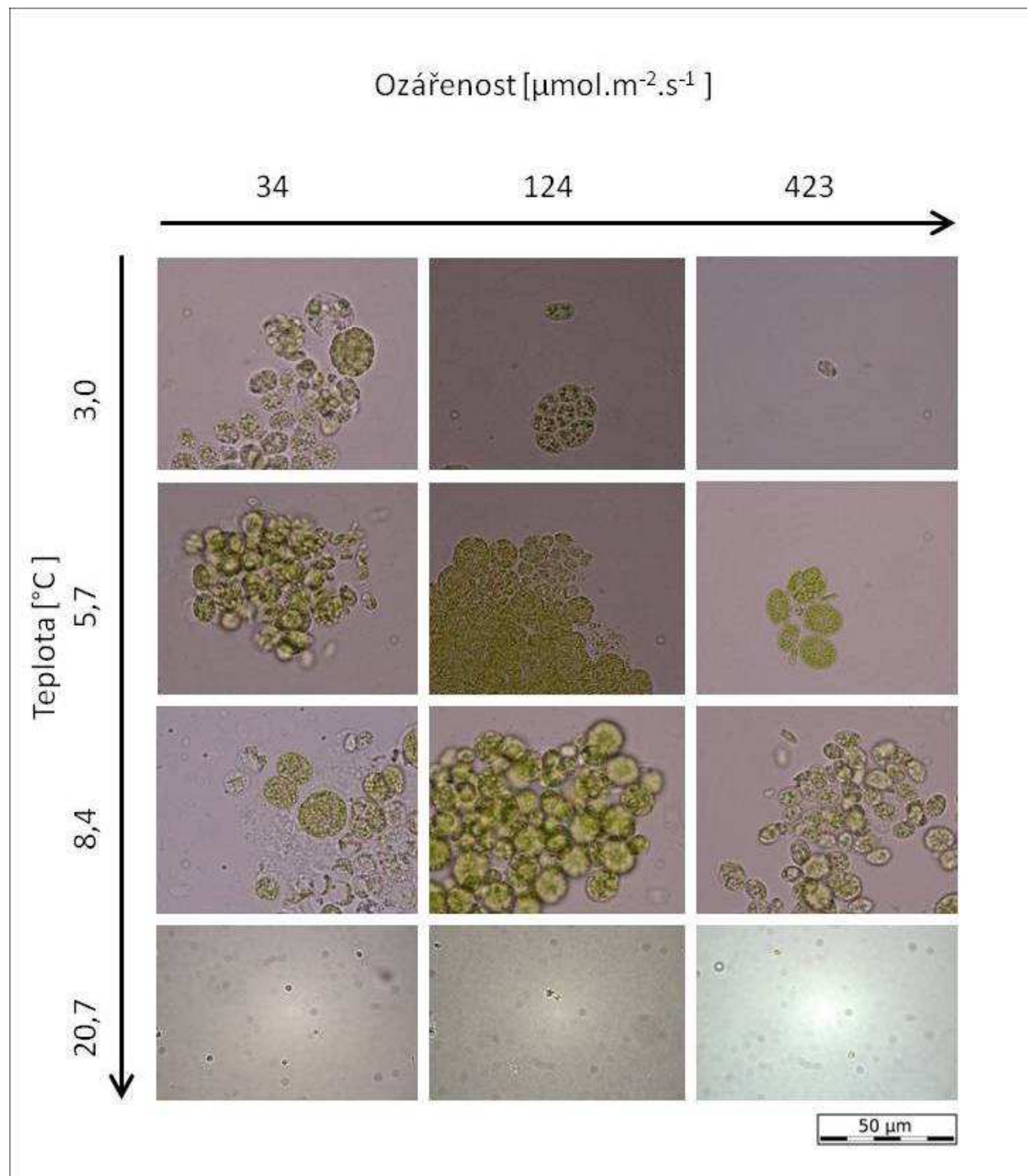
Obr.12: *Ch. pichincae* a,b,c – graf závislosti ozáření na teplotě, d,e,f – graf závislosti teploty na ozáření, a,d – hodnoty absorpance při $\lambda=682$ nm (A_{682}), b,e - hodnoty absorpance při $\lambda=750$ nm (A_{750}), c,f - hodnoty absorpance fluorescence

Živé buňky *Ch. reticulata* Luční (Obr 13). jsem spatřila ve všech sledovaných teplotách kromě 32,7°C, kde populace nepřežila. V teplotách 3°C a 5,7°C byly pouze trvalé buňky oválného tvaru a rozpoznatelná byla i olejová zrna uvnitř buňek. V 8,4°C jsem kromě oválných (a téměř kulatých) buňek různých velikostí viděla i bičíkovce. Ve 20,7 °C jsou buňky vitální, zelené a tvoří shluky. Objevují se i stadia s bičíky. Rozdíly v morfologii množství chlorofylu i životní stadia se zdála podobné ve všech sledovaných hladinách ozáření, pouze ve 20,7°C je počet buněk v 34 $\mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ výrazně nižší než ve zbývajících hladinách.

Buňky *Ch. pichincha* Meandry (Obr. 14) jsem nenalezla v teplotě 32,4°C, ve 20,7°C se pohybovaly pouze sférická bičíkatá stadia v malé koncentraci. V 8,4°C a 5,7°C jsou shluky oválných a sférických sytě zelených buněk jsou vzácně přítomná i bičíkovci. Ve 3°C buňky obsahují výrazné olejové zásoby a koncentrace buněk je nízká. Nezaznamenala jsem žádný výrazný trend vlivu ozáření.



Obr. 13: *Ch. reticulata* Luční: Fotografie jsou uspořádány dle pozice kulturačních destiček, teplota je v rozmezí 3-33 $^{\circ}\text{C}$, ozáření se pohybuje v intervalu 34-423 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obr. 14: *Ch. pichincae* Meandry: Fotografie jsou uspořádány dle pozice kultivačních destiček, teplota je v rozmezí 3-30 $^{\circ}\text{C}$, ozářenost se pohybuje v intervalu 34-423 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

2) Vyhodnocení FA

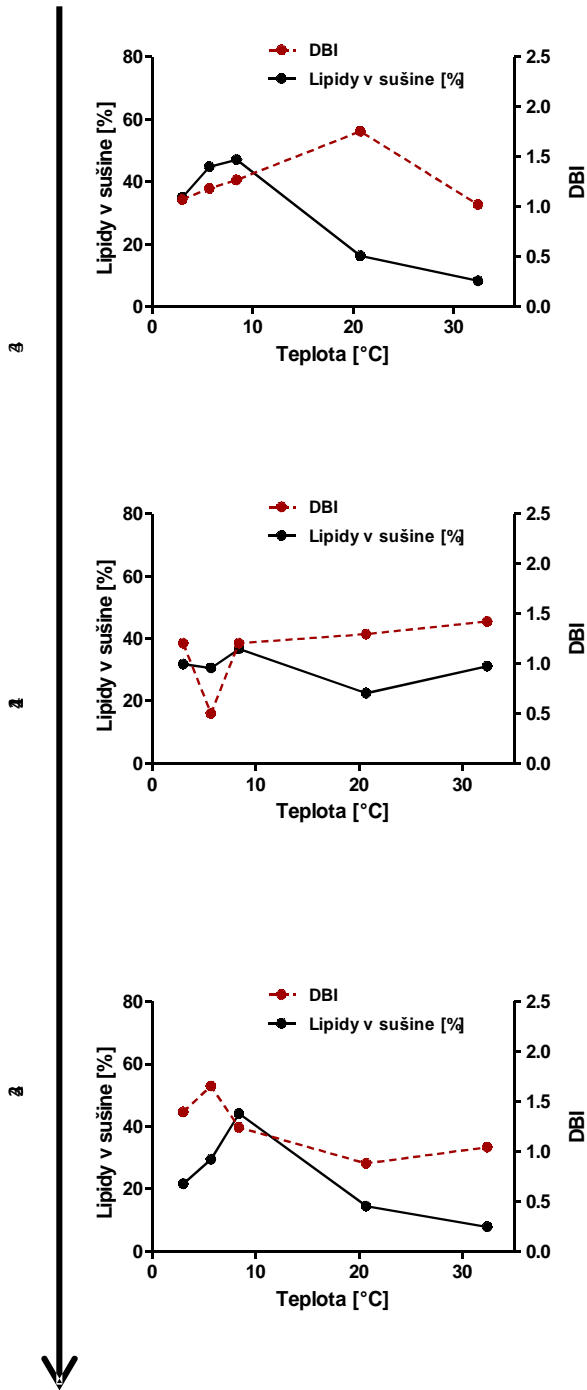
Chloromonas reticulata Luční

Průběh růstu *Chloromonas reticulata* Luční na zkrříženém gradientu je zmíněn výše. Lipidy (obr.8) byly nejhojněji zastoupeny v teplotě 8,4°C a to > 40%. Ve 30°C poměr lipidů v sušině klesl pod 10% při ozáření 34 a 423 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{m}^{-1}$. V této vysoké teplotě a zároveň při středním ozáření 124 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{m}^{-1}$ byly lipidy zastoupeny 30%. Zastoupení lipidů v sušině v teplotním gradientu nevykazoval žádný trend. Lze vyčíst trend, že počet dvojných vazeb (DBI) dosahoval nejvyšších hodnot při nízké ozáření a vysoké teplotě a zároveň při vysoké ozáření a nízké teplotě, a to hodnotou nad 1.4.

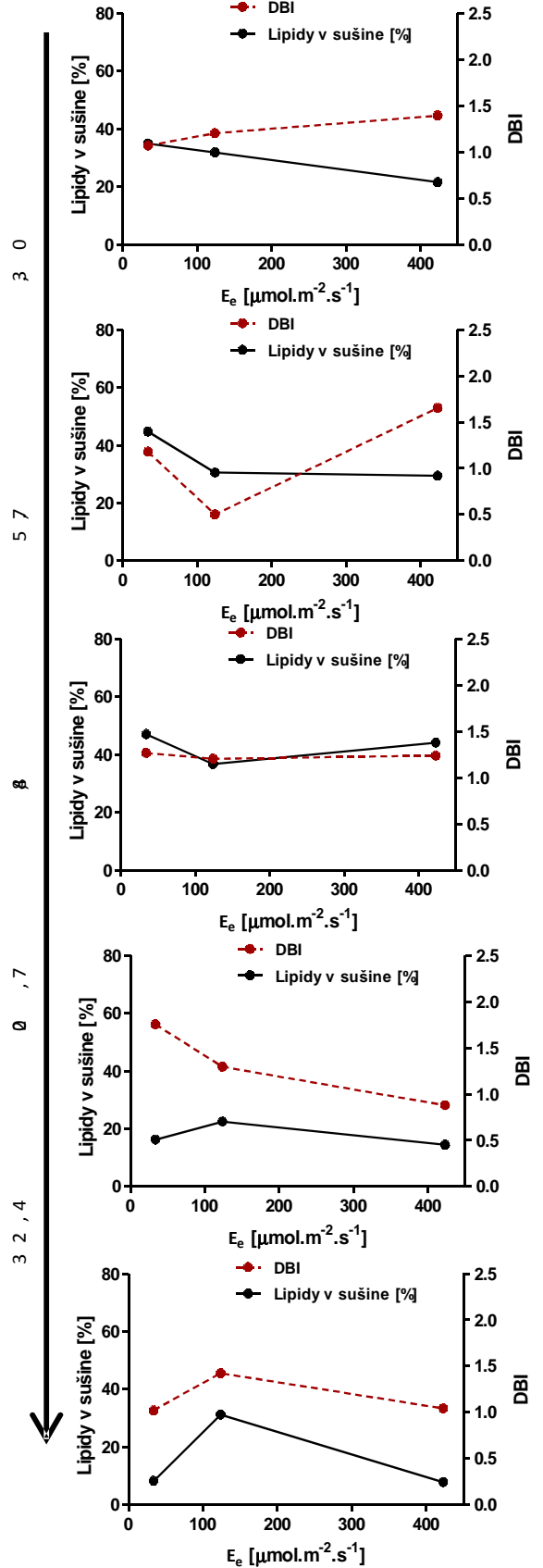
Vliv světla měl při růstu této řasy významnou roli (jak je patrné z průběhu růstu), to se také projevilo velmi vysokým obsahem mononenasycených mastných kyselin (>60%) při 34 a 124 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{m}^{-1}$ v teplotách 3°C, 5,7°C a 8,4°C a při 423 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{m}^{-1}$ v teplotách 8,4°C a vyšších. Výrazný byl stav MUFA v 8,4°C, kde bylo její zastoupení (oproti SAFA a PUFA) nad 60%, a to hlavně FA s řetězcí o délce 18 uhlíků (obr.10). C18 je silně zastoupena ve všech měřených případech (nad 45%). V teplotě 32,4°C bylo sledováno při zvyšování intenzity světla zvyšující se množství C18 na úkor C16. Ve směru ubývající ozáření a snižující se teploty obsah mastných kyselin s 16 uhlíky významný (v 34 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a 3°C >40%).

V hladině ozáření 34 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ve směru zvyšování teploty stoupalo množství C16:4n1, C18:0 a C18:2n6 naopak klesal výskyt C18:1n9 (obr.11). V hladině Ee = 124 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ byl trend stejný a navíc se zvyšoval obsah C18:3n3. Při Ee = 423 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ byl sledovatelný úbytek C18:0, C18:1n7, C18:2n6 a C18:3n3.

Ozářenost [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]

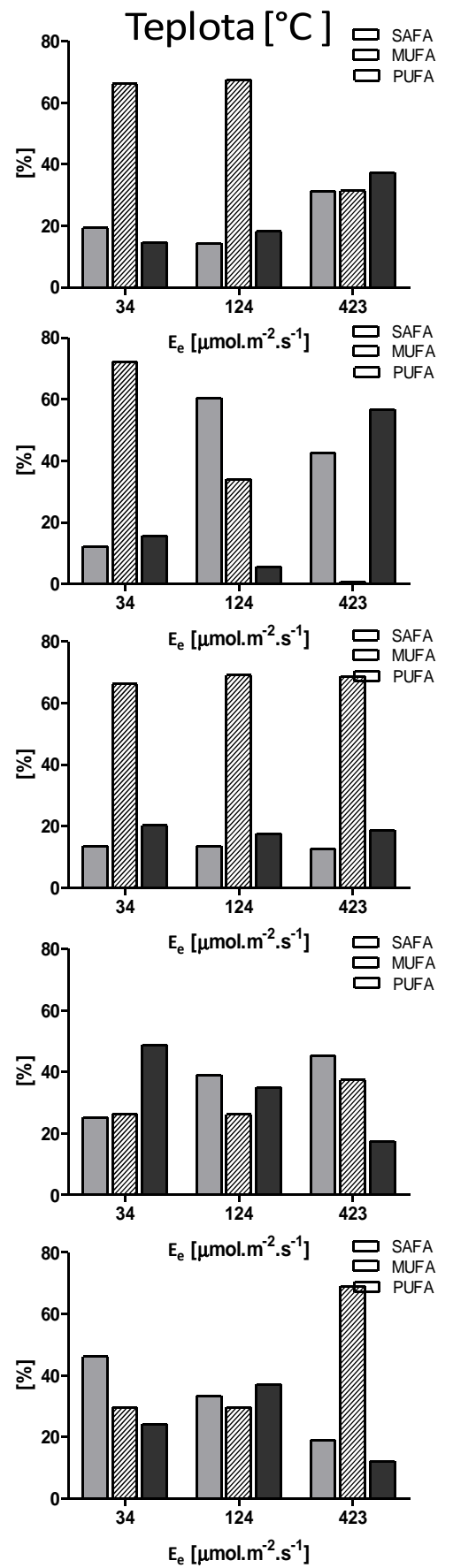
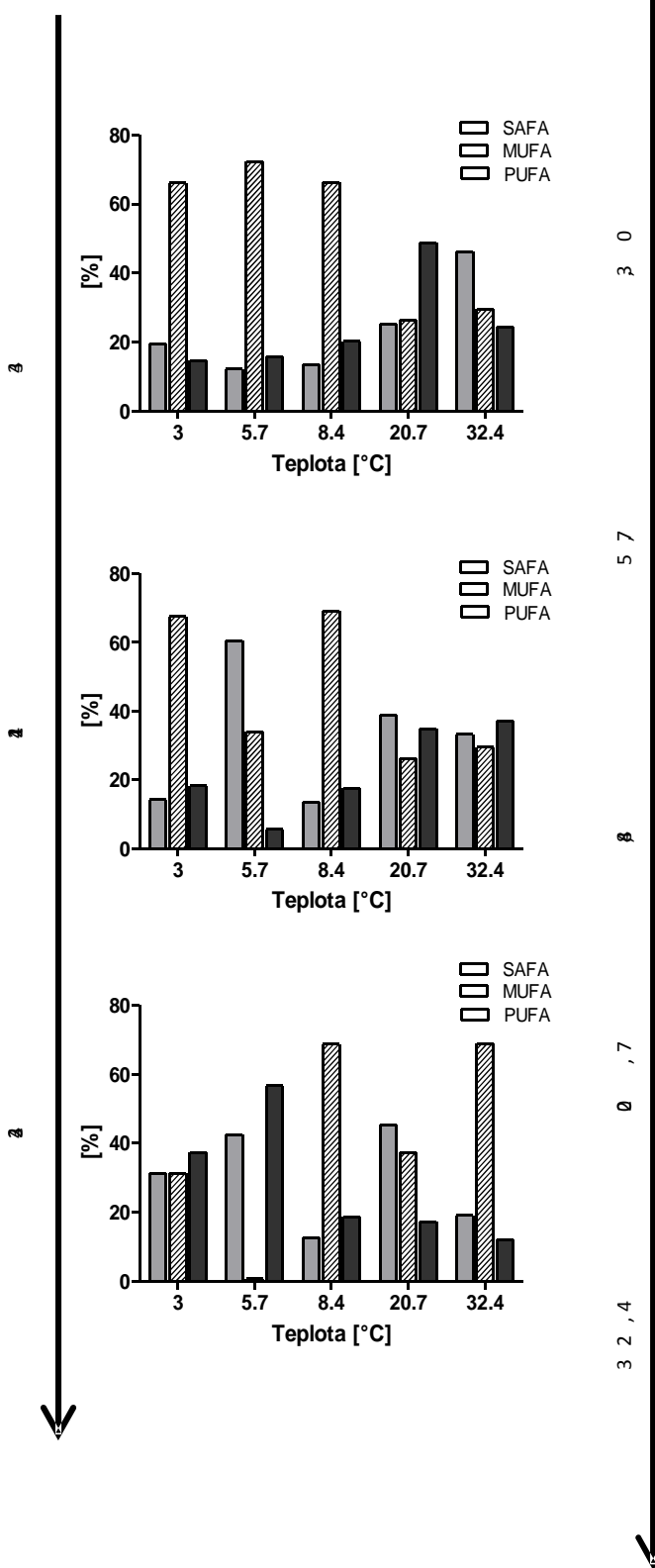


Teplota [°C]



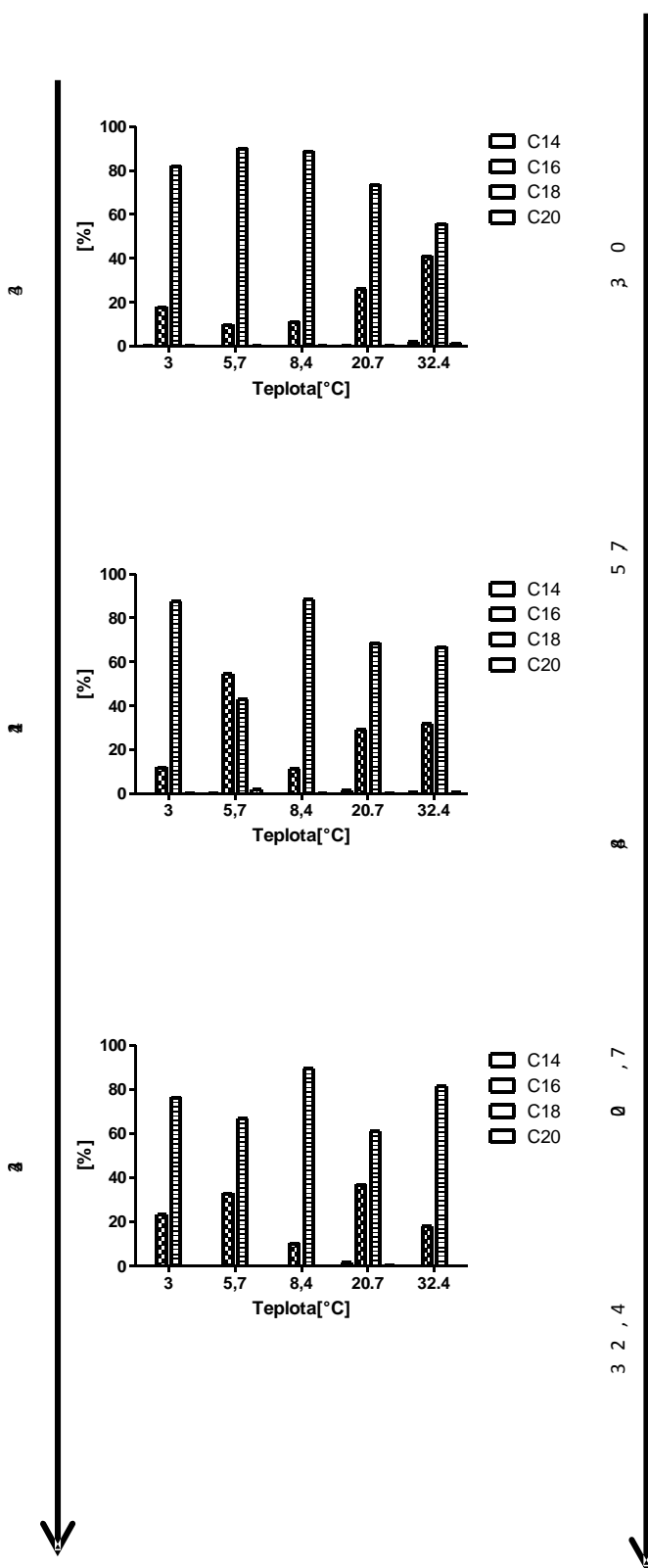
Obr. 8: *Chloromonas reticulata* Luční : Obsah lipidů v sušině a index dvojných vazeb (DBI) v měřených teplotách a ozářenostech

Ozářenost [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]

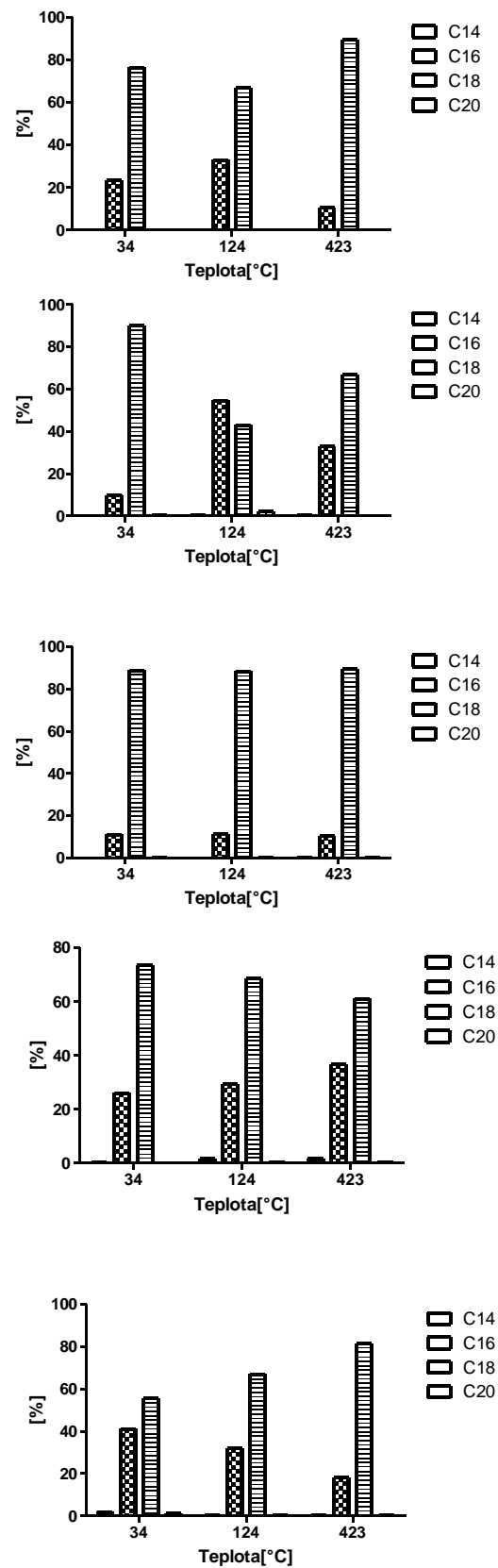


Obr. 9: *Chloromonas reticulata* Luční : Nasycenost FA vyjadřená poměrem SAFA, MUFA, PUFA v měřených teplotách a ozářenostech

Ozářenost [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]



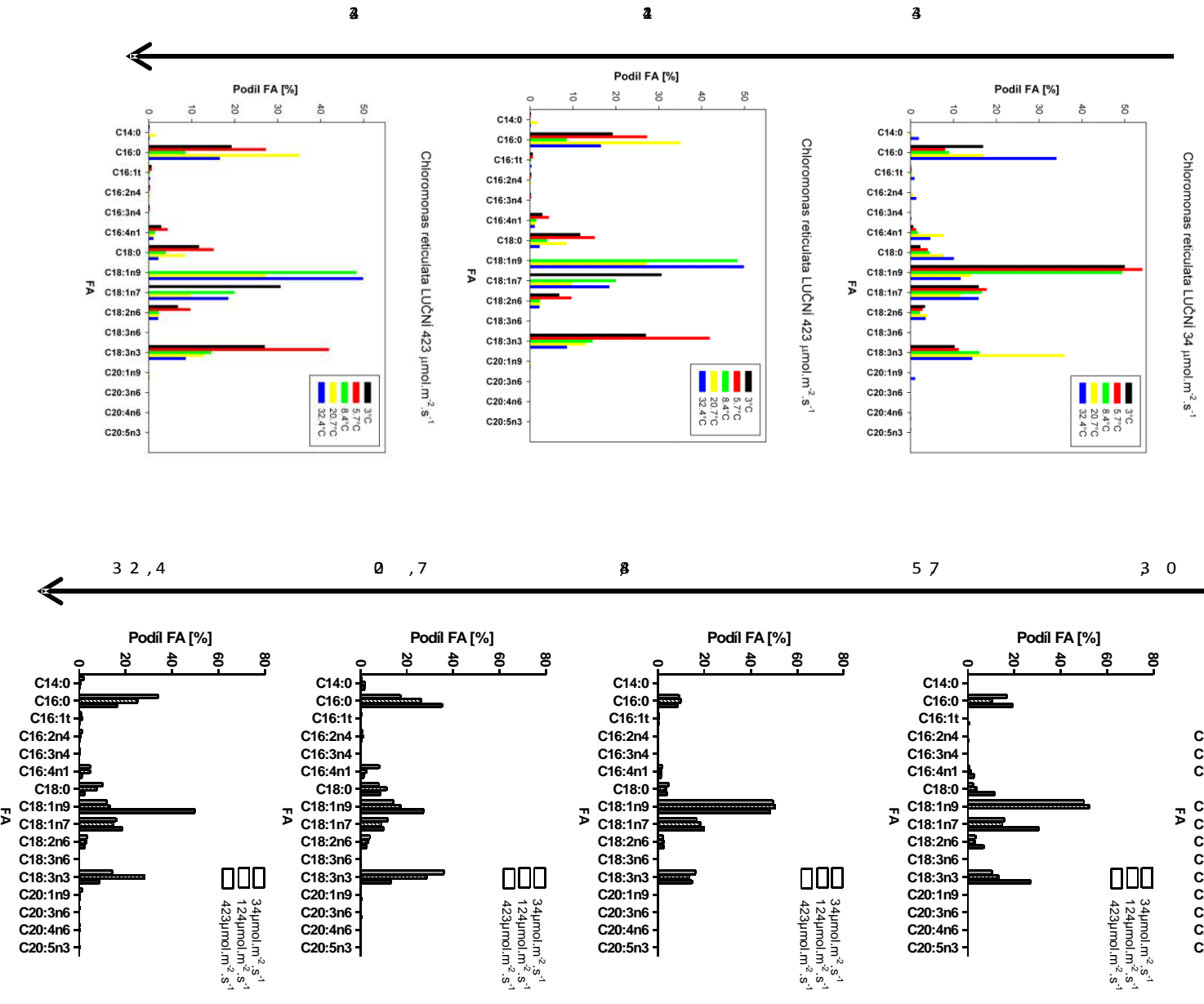
Teplota [°C]



Obr. 10: *Chloromonas reticulata* Luční : Délka řetězců mastných kyselin v měřených teplotách a ozářenostech

Teplota [°C]

Ozářenost [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]

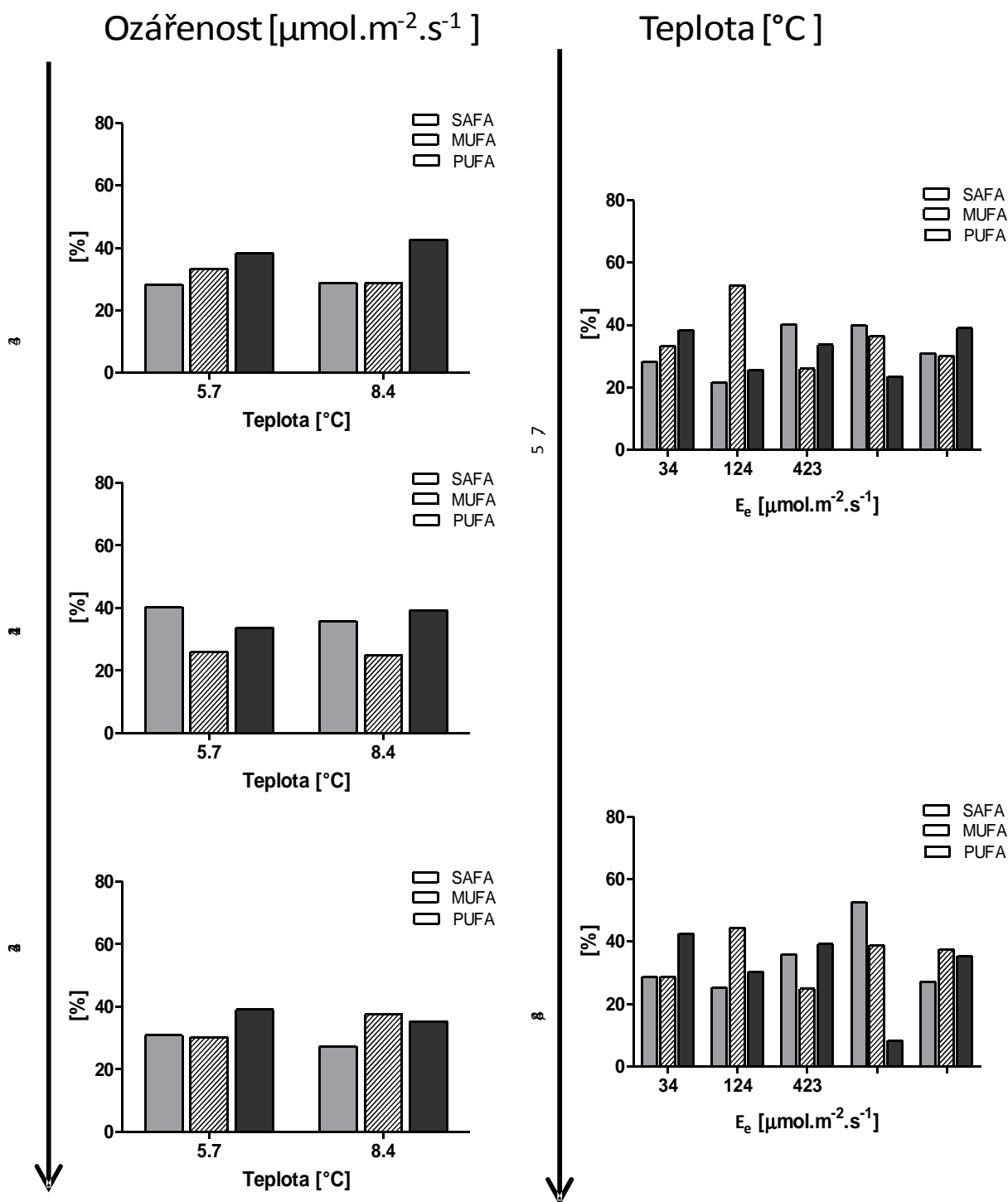


Obř. 11: *Chloromonas reticulata* Lučň : Profil mastných kyselin v měřených teplotách a ozářenostech

Chloromonas pichincae Meandry

Tento kmen rostl nejlépe v teplotách 5,7°C a 8,4°C. Vitální byl ve všech nabídnutých ozářenostech. Ve zbývajících teplotách během pokusu nenarostlo dostatečné množství biomasy pro analýzu FA, proto naměřené hodnoty jsou pro 2 blízké hodnoty teploty (5,7°C a 8,4°C) bez opakování nezhodnotitelné. U *Chloromonas pichincae* Meandry ze zřížených gradientů jsem mohla hodnotit vliv světelných podmínek na mastné kyseliny. Grafy byly pro porovnání těchto teplot byly vytvořeny pro dokreslení situace. Poměr lipidů je v gradientu ozáření bez změny. DBI při 222 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ je na rozdíl od ostatních hodnot ozáření nižší než 40% (obr.12). Obsah nasycených a nenasycených nebyl ozářením určován (obr.13).

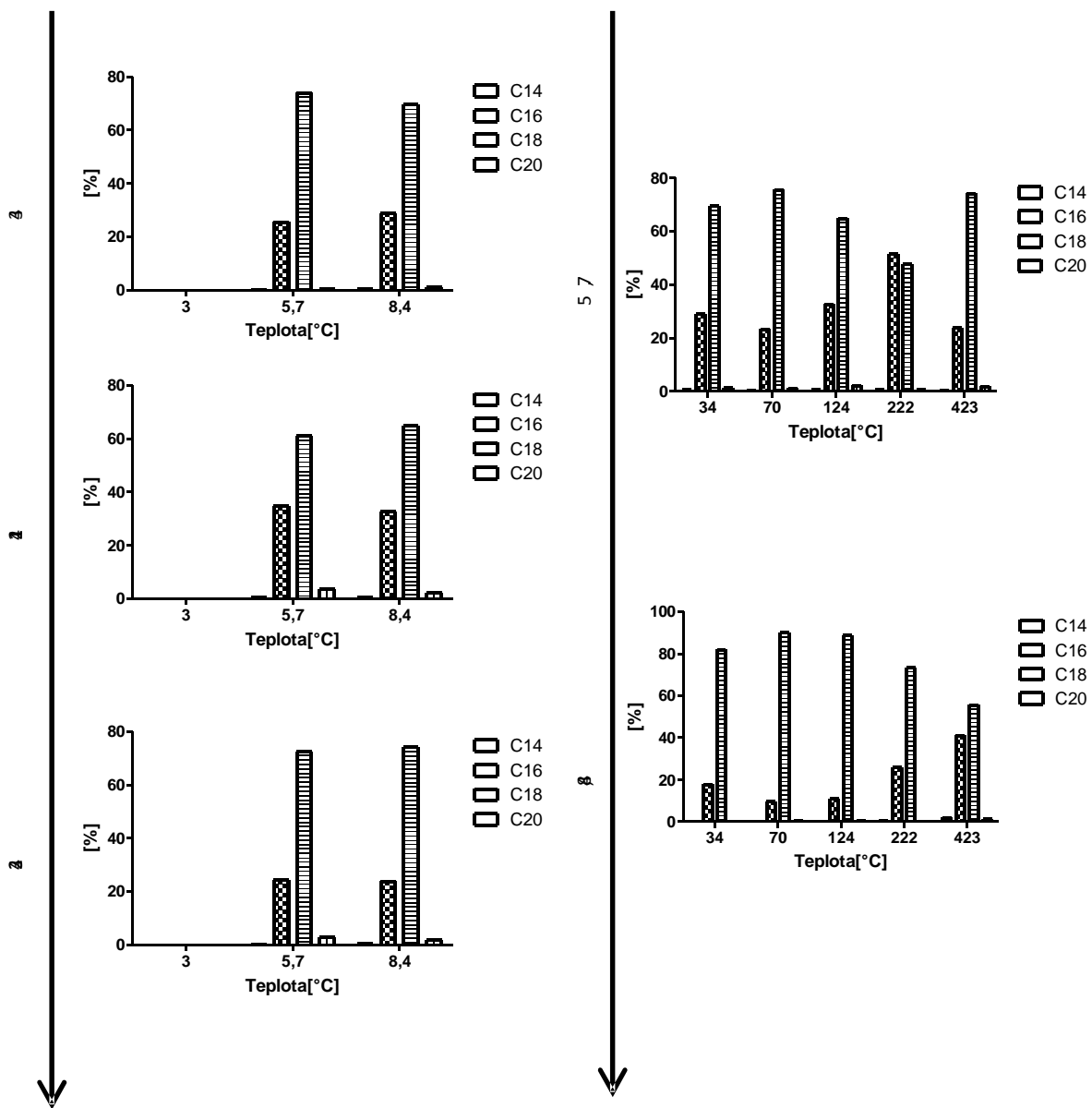
Délka řetězců mastných kyselin prokázala závislost na ozářenosti (obr.14). Především v teplotě 8,4°C vysoký poměr C18 vůči ostatním délkám FA (nad 80%) klesal s přibývajícím ozářením na 60%. Naopak C14 výrazně vzrostl z hodnot blízkých 15% na více než 50% (obr. 15). V gradientu ozářenosti se snižoval obsah C18:1n9 a C18:1n7 (obr.15).



Obr. 13: *Chloromonas pichincae* Meandry: Nasycenost FA vyjadřená poměrem SAFA, MUFA, PUFA v měřených teplotách a ozářenostech

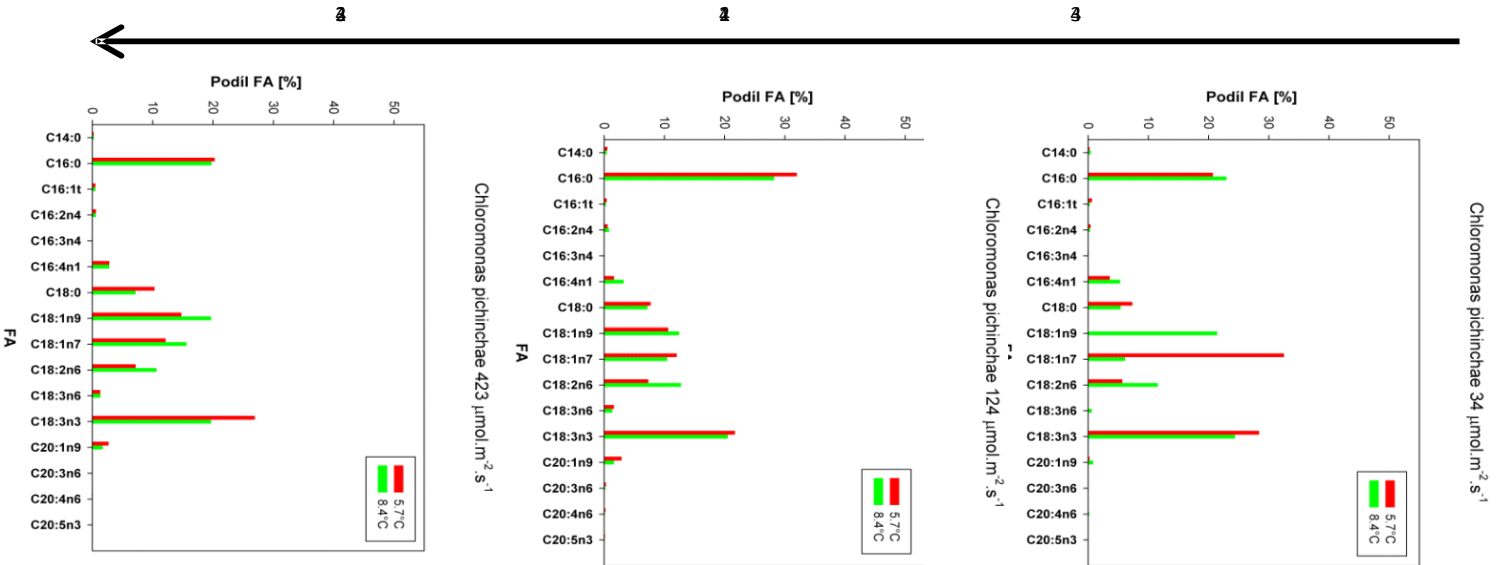
Ozářenost [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]

Teplota [$^{\circ}\text{C}$]

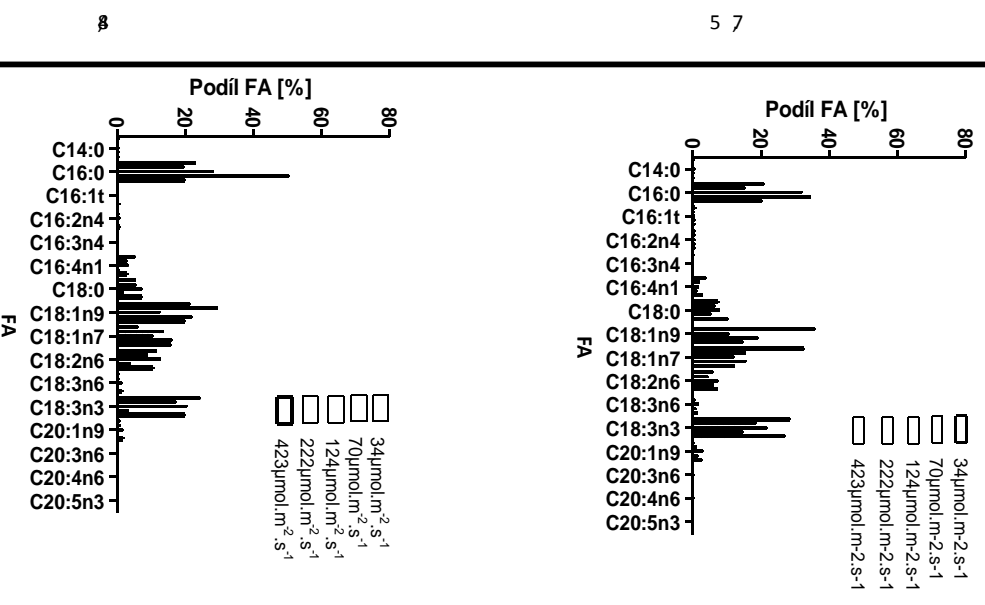


Obr. 14: *Chloromonas pichincae* Meandry: Délka řetězců mastných kyselin v měřených teplotách a ozářenostech

Ozářenost [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]



Teplota [$^{\circ}\text{C}$]



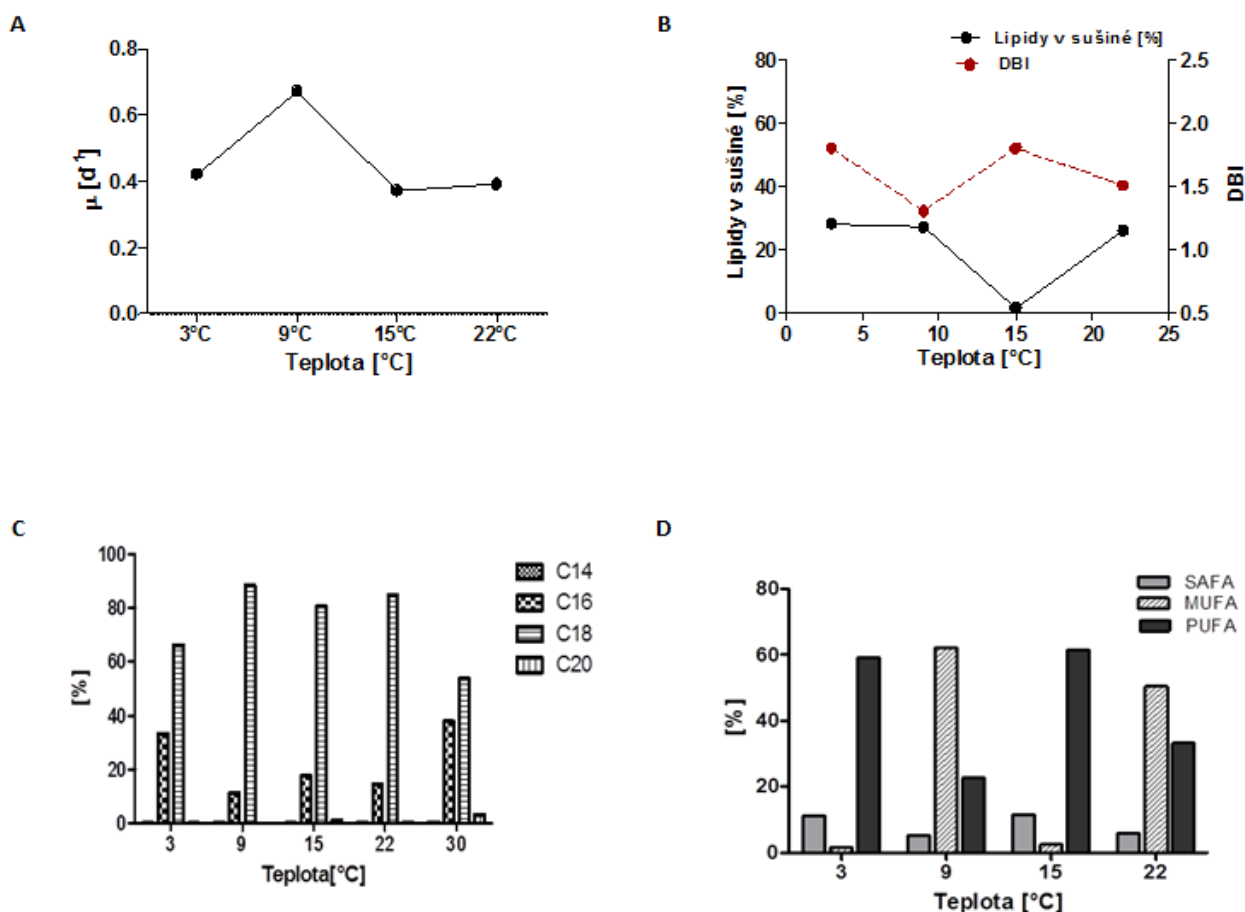
Obř. 15: *Chloromonas reticulata* Meandry: Profil mastných kyselin v měřených teplotách a ozářenostech

5.2 Teplotní experimenty

1. *Chloromonas reticulata* KS4

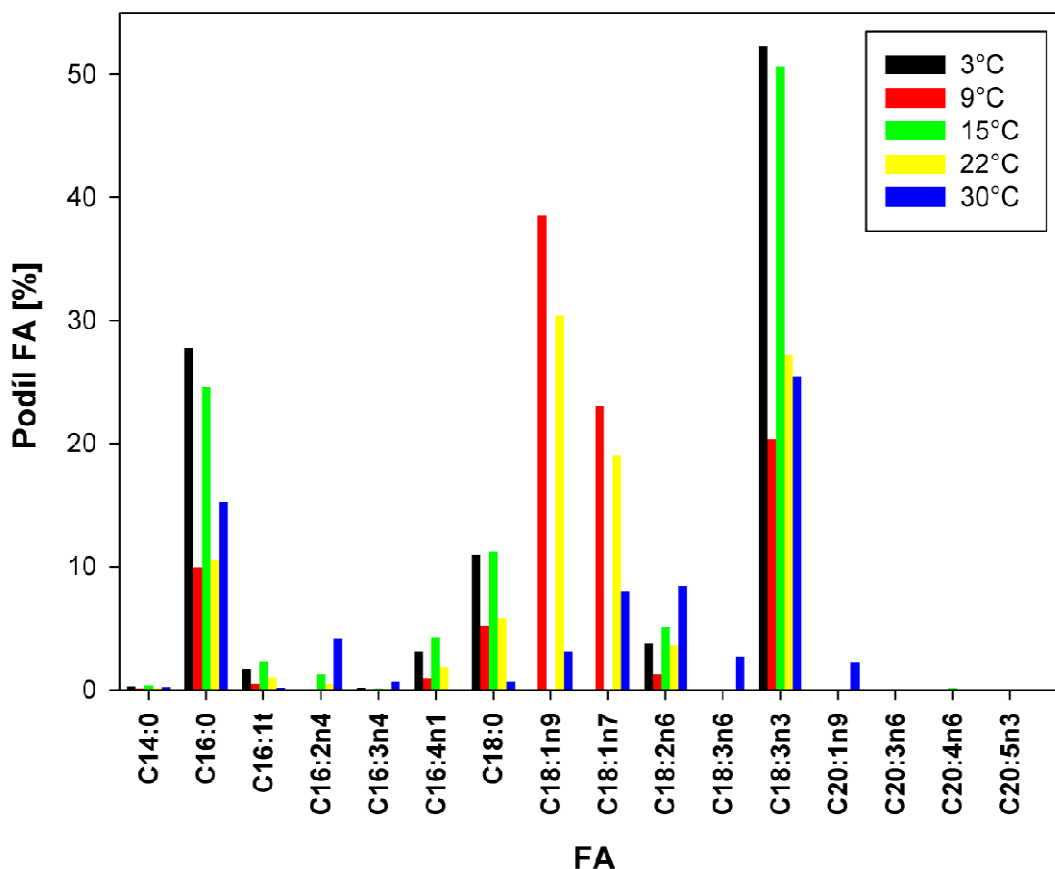
Kmen *Chloromonas reticulata* KS4 se vyznačuje teplotním optimem mezi 3-30°C. Z důvodů ověření růstového optima byl sledován růst řas tohoto kmene v teplotním rozmezí 3 - 22°C. Z výsledků je patrné, že specifická růstová rychlost byla nejvyšší při teplotě 9°C, zatímco při teplotě vyšší než 9°C docházelo k inhibici růstu a při dalším zvyšování teploty nad 15°C se růst již neměnil (Obr 23, A).

Dále byl u tohoto kmene analyzován vliv teploty na poměr lipidů v biomase a index dvojných vazeb DBI (Obr. 23, B), délka uhlíkatých řetězců (Obr.23,C), a zastoupení nasycených mastných kyselin (SAFA), mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a polynenasycených mastných kyselin (PUFA) (Obr. 23, D).



Chloromonas reticulata KS4

E



Obr. 23: *Chloromonas reticulata* KS4,

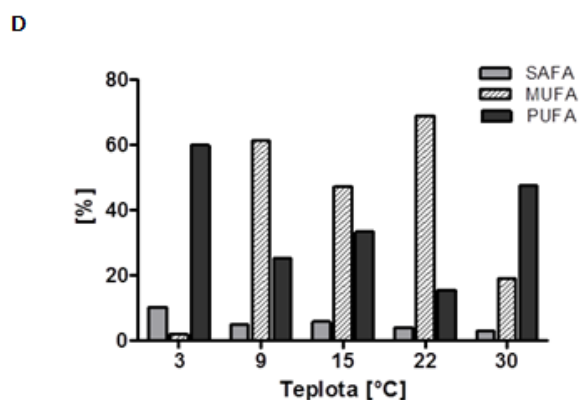
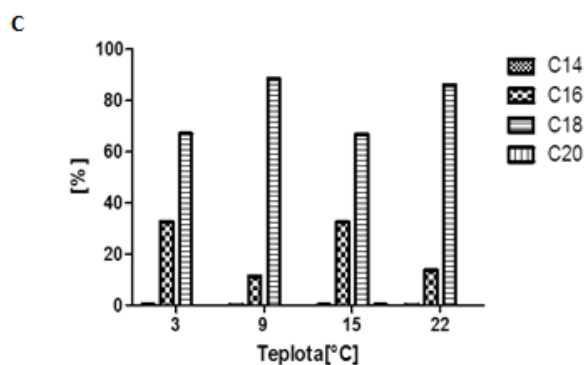
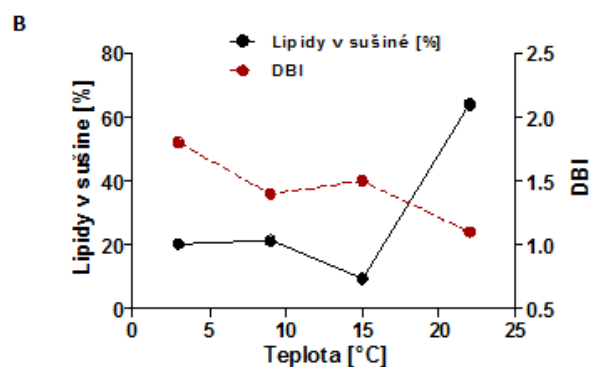
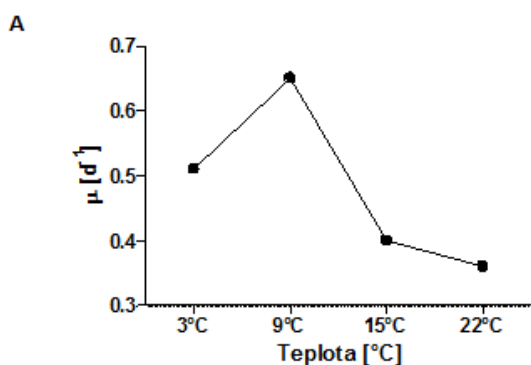
A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

Z obrázku C, D a E je patrné, že pouze v 30°C vykazoval vyšší zastoupení C14 a SAFA na úkor C16 a MUFA. C20 byl zastoupen cca v 10% ve všech teplotách, to je více než v jiných řasách.

Z analýzy daných parametrů v závislosti na teplotě vyplývá, že kmen *Chloromonas reticulata* KS4 nevykazuje významný trend, což naznačuje, že je teplotně nezávislý.

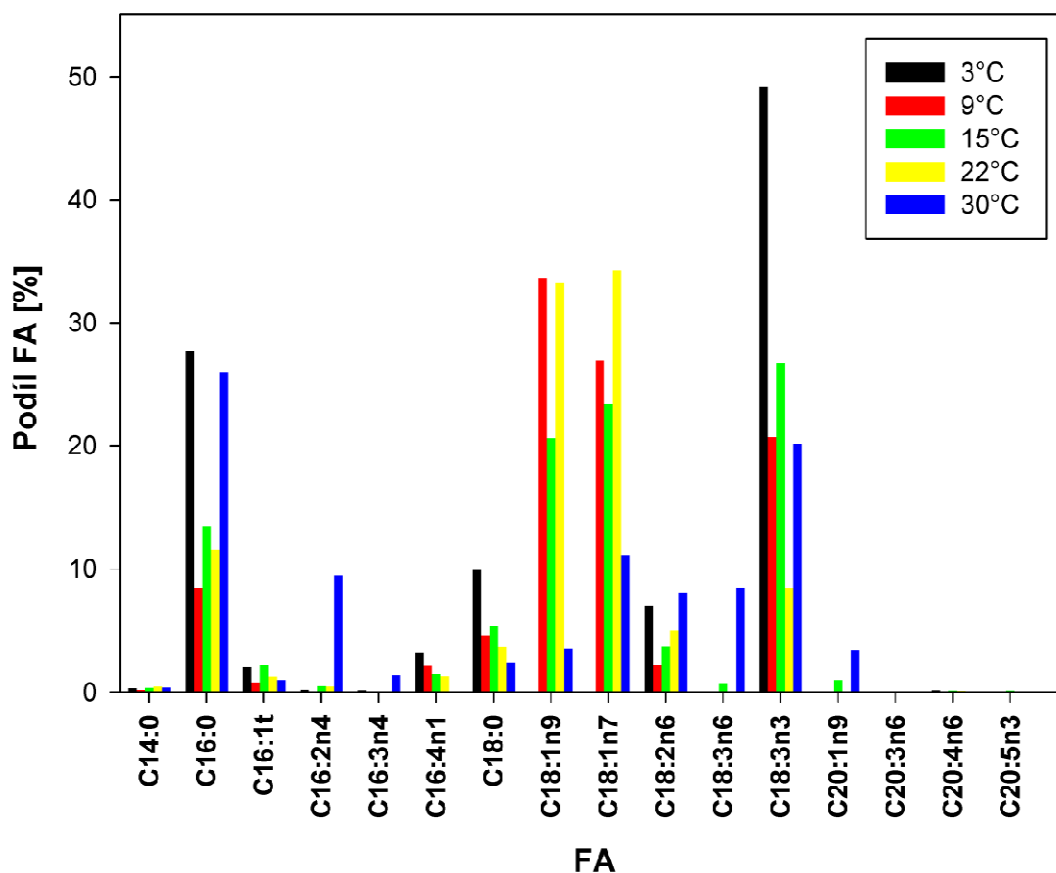
2. *Chloromonas reticulata* Tromso

Nejvyšší zjištěná hodnota specifické růstové rychlosti byla v 9°C (Obr.24,A). *Chloromonas reticulata* Tromso pěstované ve 9°C, 15°C a 22°C charakterizoval vysoký podíl MUFA (Obr.24,D) Ve všech sledovaných teplotách byly řetězce dlouhé 18 uhlíků zastoupeny více jak 60%. Obsah C16 v lipidech měl hodnoty 10 - 30% (Obr.24,C). Na grafu (Obr.24,D) je vidět, že v teplotách 3°C a 30°C bylo velké zastoupení polynenasycených mastných kyselin (PUFA) nad 60%. Ve vzestupním teplotním gradientu se snížil se výskyt C18:0 a C18:3n3 (Obr24,E). Obsah lipidů v sušině byl bez změny, přibližně na 20%. Index DBI klesal z 1,7 na 1,1 (Obr 24,B).



Chloromonas reticulata TROMSO

E

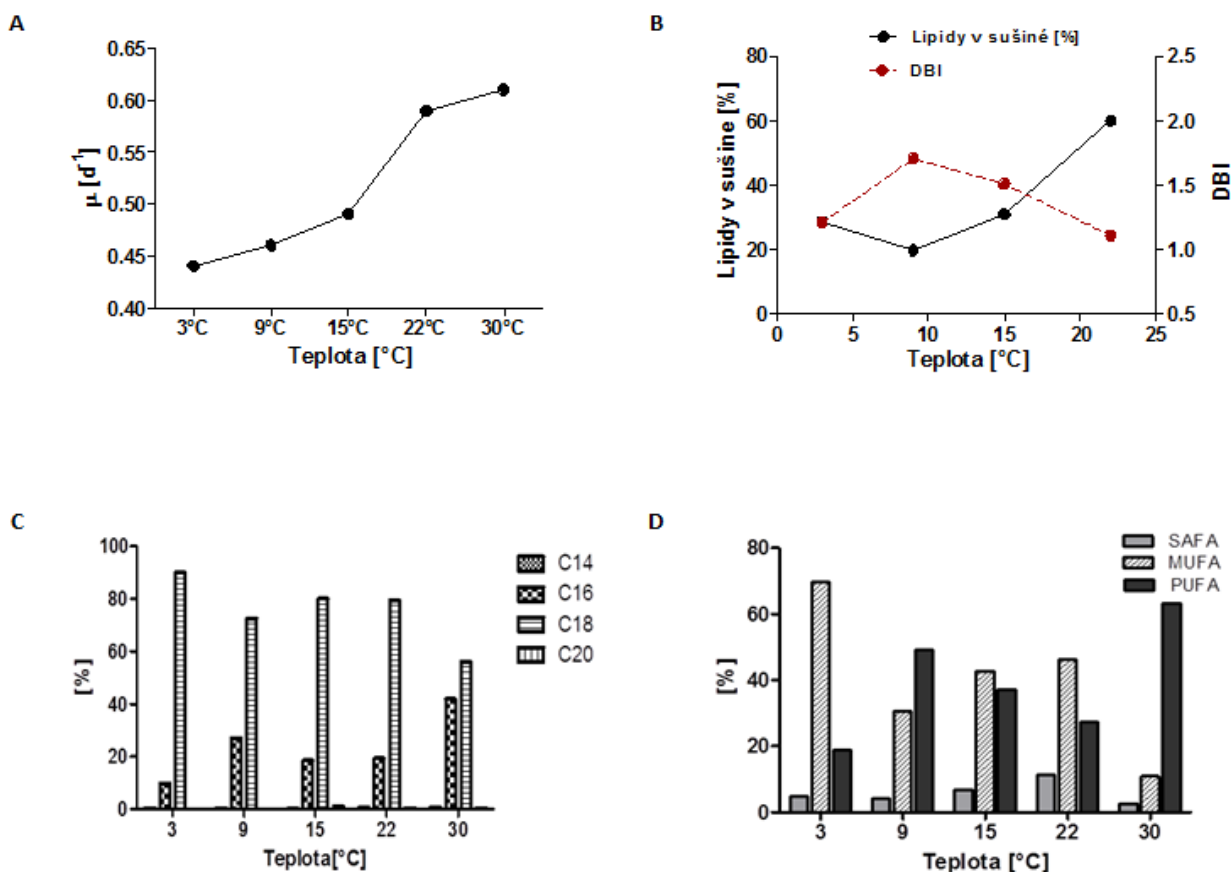


Obr. 24: *Chloromonas reticulata* Tromso ,

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

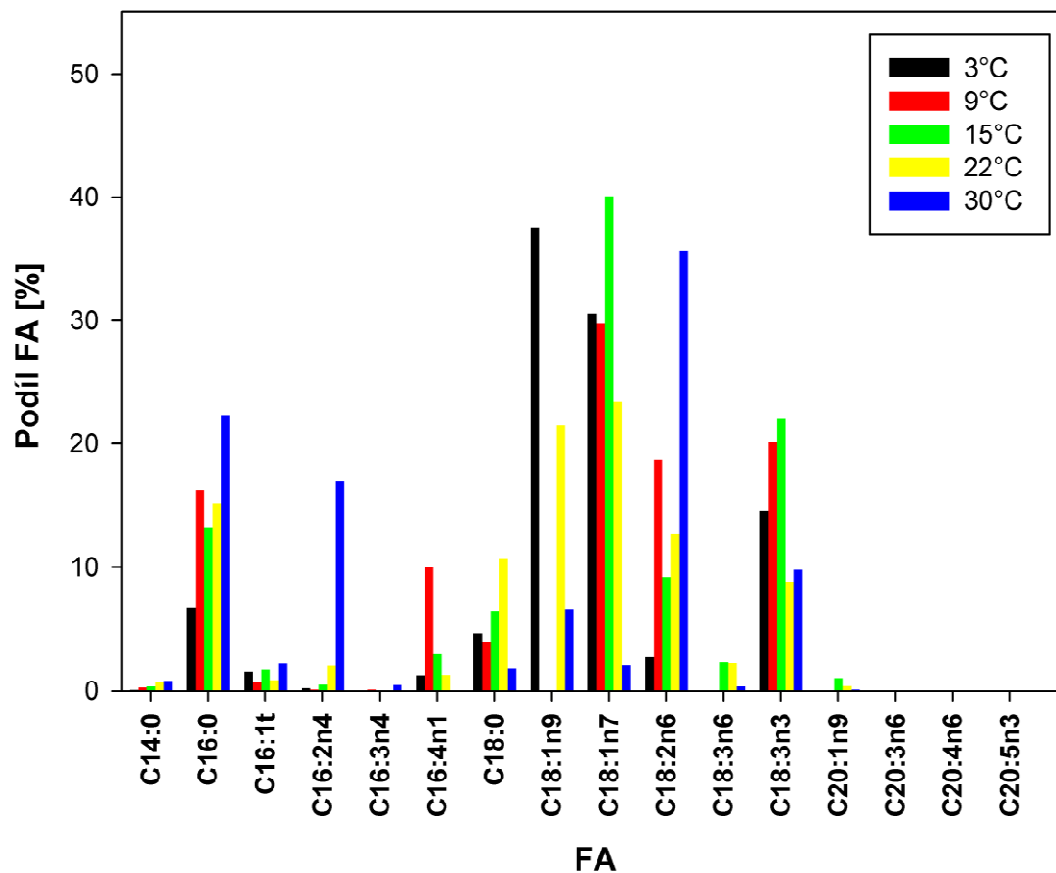
3. *Chloromonas reticulata* Vent

Specifická růstová rychlost tohoto kmene má vzestupný charakter až do nejvyšší měřené teploty 30°C, kde $\mu=0.61$ byla nejvyšší ze všech měřených hodnot (Obr. 25,A). Došlo k snížení podílu MUFA a zvýšení podílu SAFA a PUFA v závislosti na rostoucí teplotě (Obr.25,D). Délka řetězců mastných kyselin se zkrátila (Obr.25,C). Vysoký podíl C18 (90%) v teplotě 3°C klesl ve 30°C na 56%. C16 naopak v teplotní škále vystoupal z 10% na 41%. Obsah lipidů se průběžně zvyšoval. DBI jsem spočítala nejvyšší hodnotu 2,0 v 15°C.



Chloromonas reticulata VENT

E

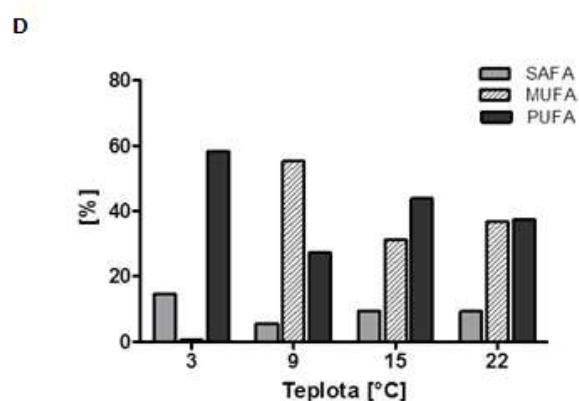
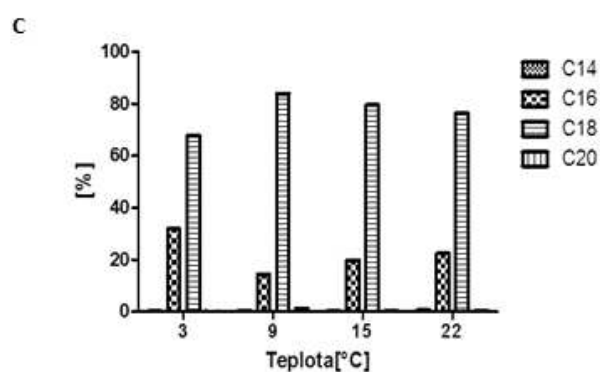
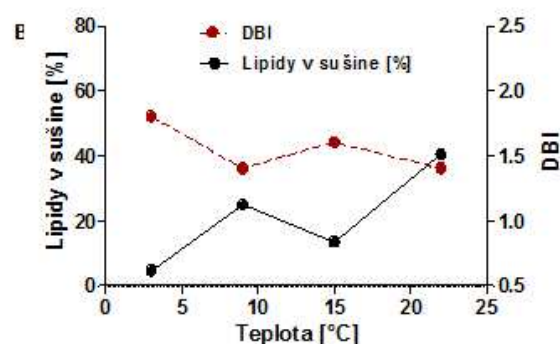
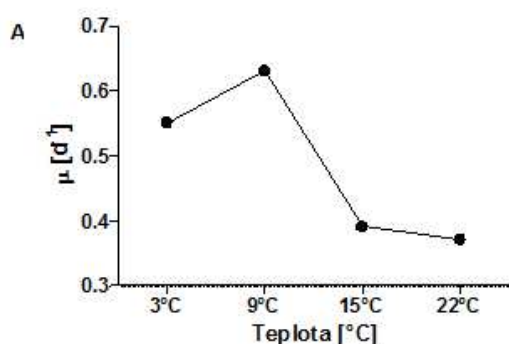


Obr. 25: *Chloromonas reticulata* Vent,

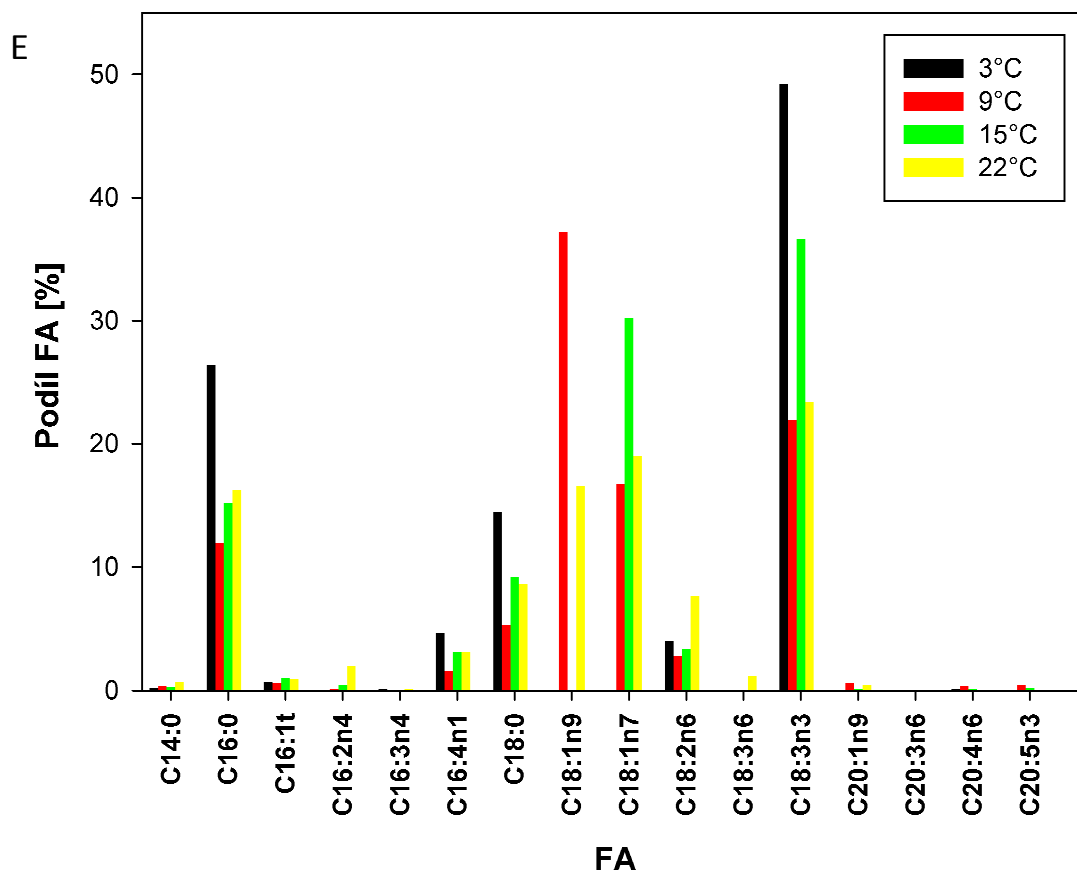
A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených tepotách.

4. *Chloromonas reticulata* Ladové

Teplotní optimum této řasy se pohybuje kolem 9°C, dle naměřené hodnoty specifické růstové rychlosti (Obr.26,A). Teplotu 30°C jsem u tohoto kmene netestovala. Kompozice mastných kyselin se v teplotě 3°C odlišovala minimálním množstvím mononenasycené mastné kyseliny MUFA. V teplotách 15°C a 22°C se poměr SAFA, MUFA a PUFA vyrovnal. Zastoupení MUFA bylo stejné jako MUFA (Obr.26D). Kmen *Chloromonas reticulata* Ladové obsahoval hodně C18 řetězců (65-95%) v celé teplotní škále (Obr.26, C). Vzrostl podíl C18:0 a C18:2n6 a naopak klesl u C18:3n3. Obsah lipidů v biomase vzrůstal podobný. Index dvojných vazeb se v průběhu teplot neměnil a pohyboval se kolem hodnoty 1.5 (Obr.26,B).



Chloromonas reticulata L'ADOVÉ

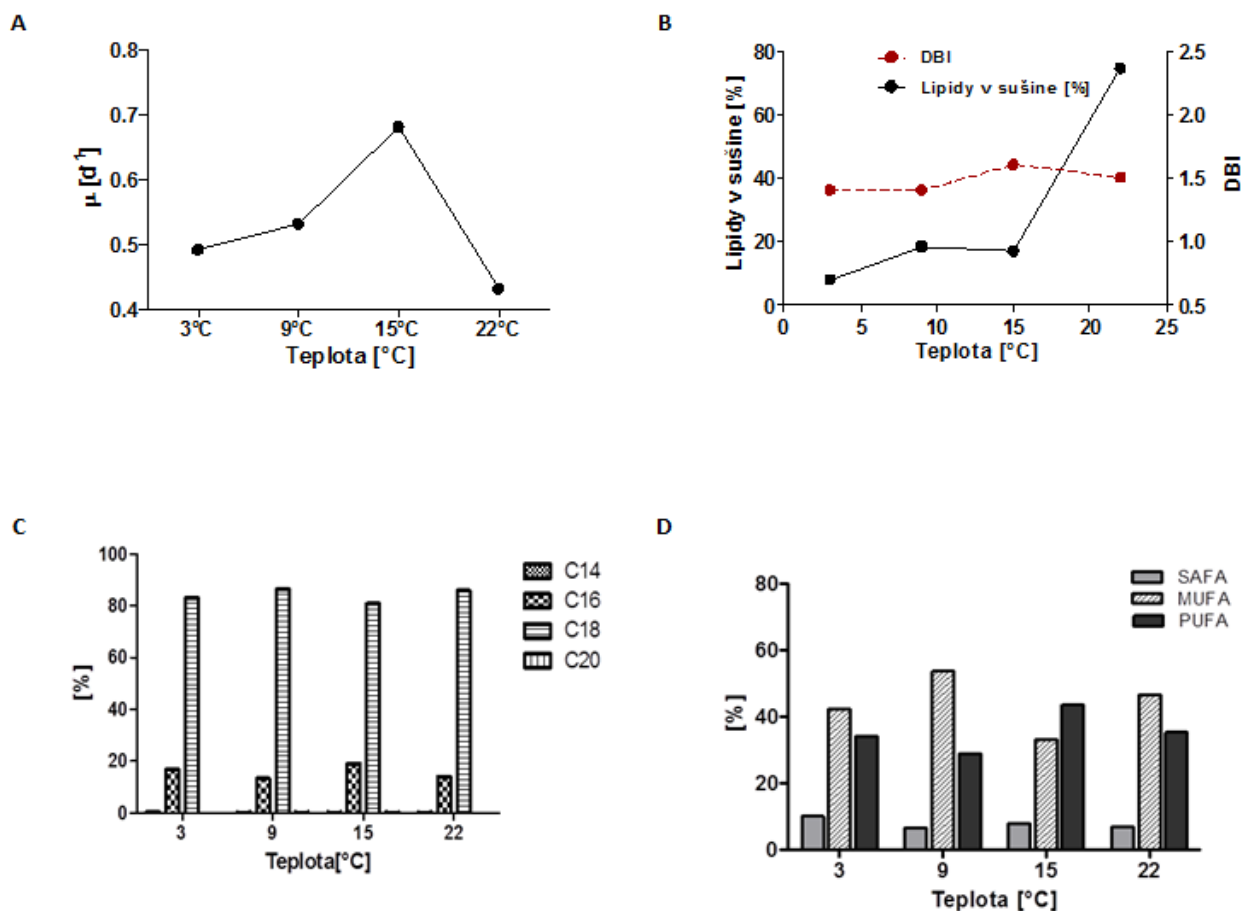


Obr. 26: *Chloromonas reticulata* Ladové,

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

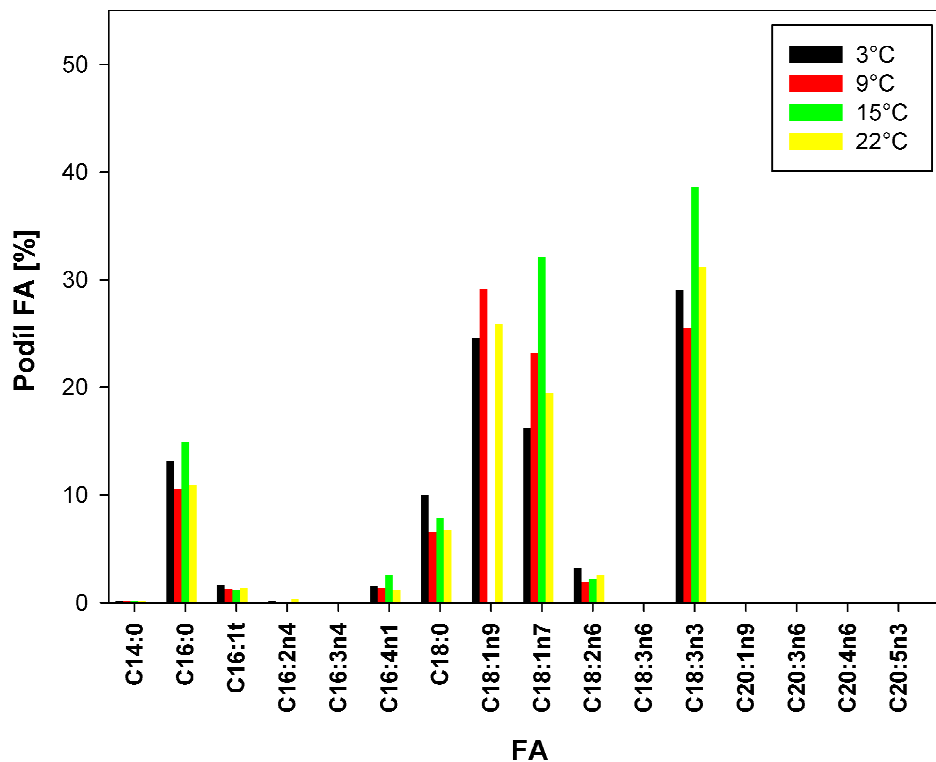
5. *Chloromonas reticulata* Luční

Růstová rychlost u *Chloromonas reticulata* Luční měla maximum v 15°C. Ve 22°C je přírůstek řasy minimální (Obr27,A). Profil mastných kyselin zůstal ve všech teplotách neměnný, tj. mastné kyseliny C18 byly zastoupeny vysokou hodnotou 80-85%. C16 bylo zastoupeno necelými 20% (Obr26,C). Z grafu (Obr. 26,D) je patrné, že podíl nasycených, mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin byl u každé měřené teploty podobný, tedy SAFA se vyskytovala okolo 8%, MUFA v rozsahu 35-55% a PUFA se vyskytovala mezi 30-45%. Index dvojných vazeb DBI (1,5) se ve vzorcích rostoucích v odlišných teplotách neměnil. V e všech případech měl hodnotu 1,5.



E

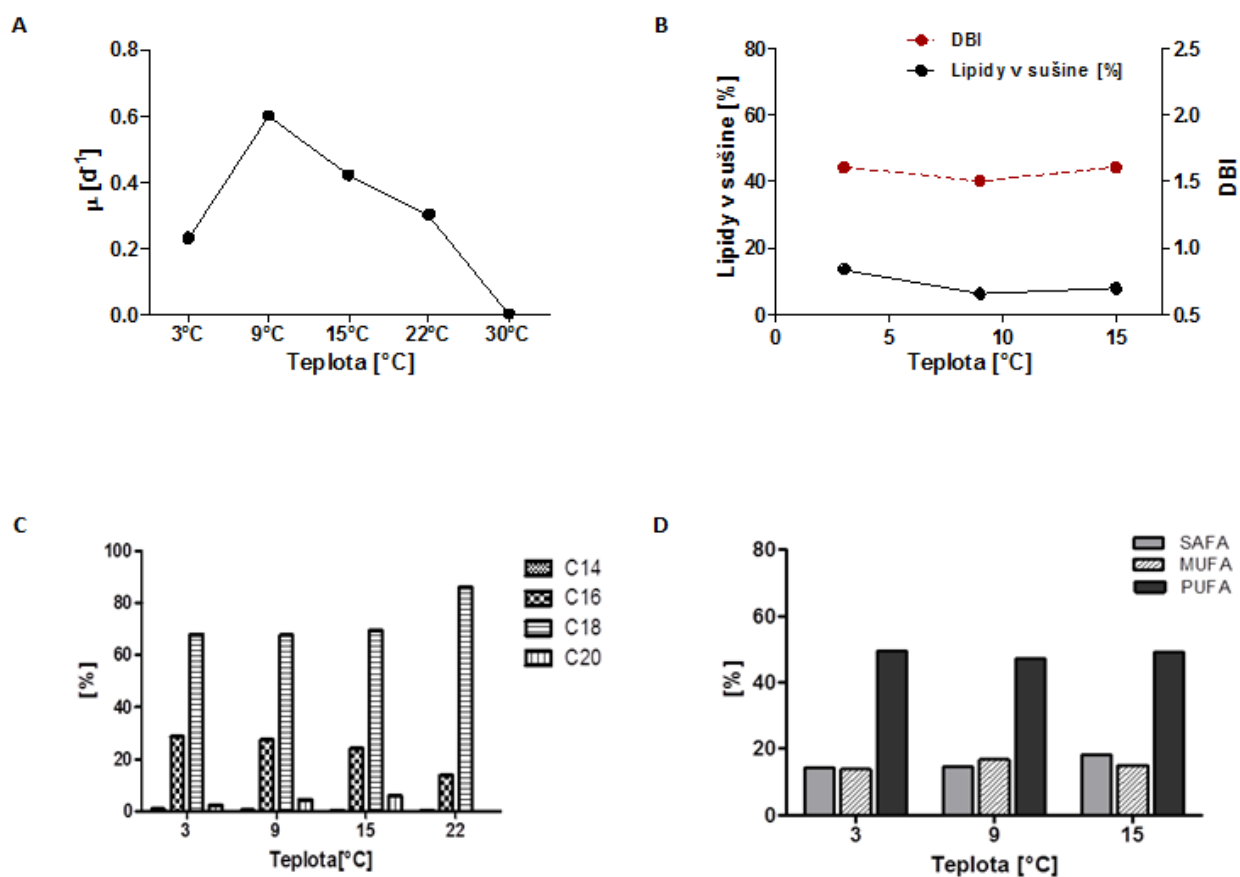
Chloromonas reticulata LUČNÍ

Obr. 27: *Chloromonas reticulata* Luční

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

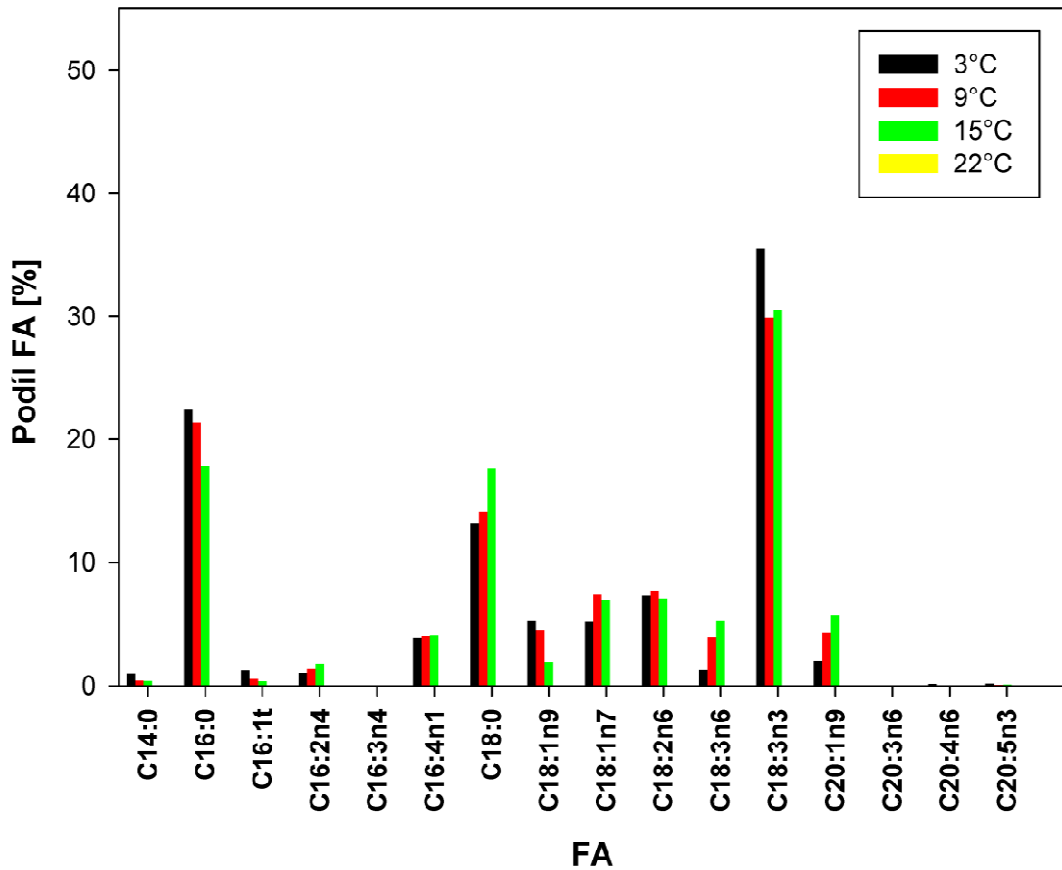
6. *Chloromonas pichincae* Meandry

Ze všech měřených teplot se kmenu *Chloromonas pichincae* nejlépe rostlo v 9°C, kde specifická rychlost růstu dosahovala maxima 0,6 (Obr.28,A). Ve 30°C už tento kmen neroste. Jeho teplotní maximum je nižší než 30°C, proto mohu *Chloromonas pichincae* Meandry prohlásit za psychrofilní kmen. V tomto teplotním pokusu byly všechny naměřené hodnoty (nasycenost, délka řetězce, %lipidů v biomase i DBI) konstantní. Kmen Meandry neprovedl žádné změny ve skladbě mastných kyselin v teplotním profilu (Obr28,B,C,D). Byl sledovatelný pouze nevýrazný nárůst 20-uhlíkatých řetězců a pokles C16 (Obr 28C).



Chloromonas pichincae MEANDRY

E

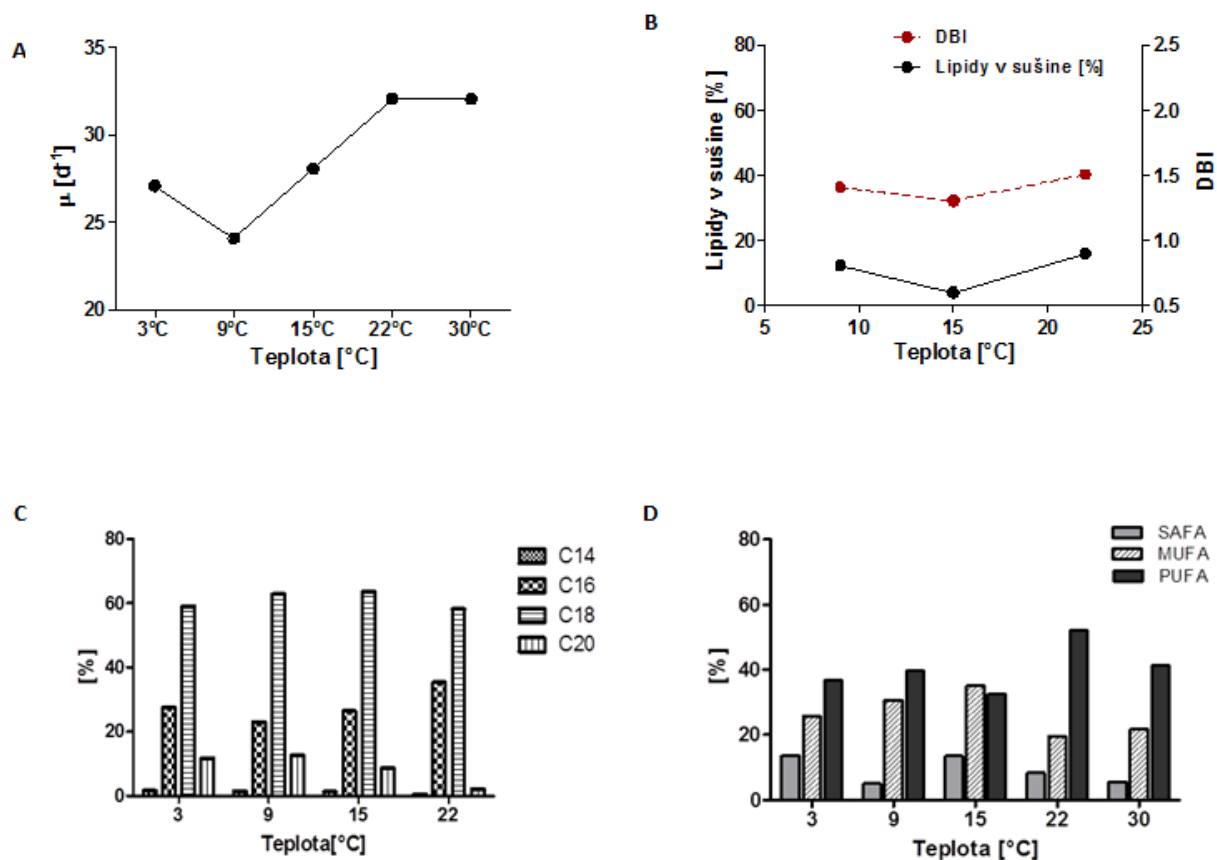


Obr. 28: *Chloromonas pichincae* Meandry

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

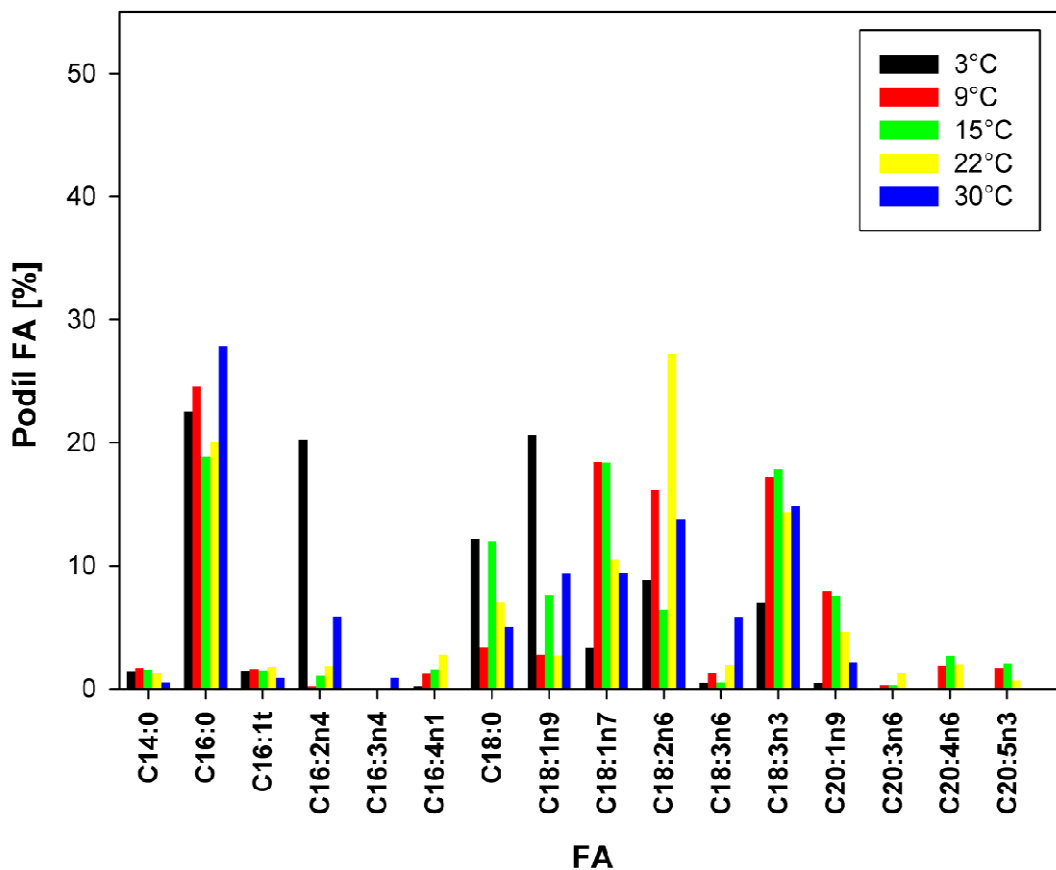
7. *Chloromonas sp. Abisco*

Nejaktivněji rostl kmen *Chloromonas sp. Abisco* v 9°C, kde vykazoval nejvyšší specifickou růstovou rychlost (Obr. 29,A). Jedná se o psychrofilní kmen. *Chloromonas sp. Abisco* byl bohatý na mastné kyseliny o délce C16, dle grafu (29,C) jejich procentuální výskyt činil cca 25-40%. Zastoupeny byly v hojné míře ve srovnání s ostatními kmeny také mastné kyseliny o délce 20C. Procento výskytu C20 dosahovalo 10%. Procento lipidů v sušině se stále pohybovalo mezi 5-18% (Obr,29,B) a DBI a se v vzrůstající teplotě neměnilo a zůstalo na hodnotě 1,5 (Obr.29,B).



E

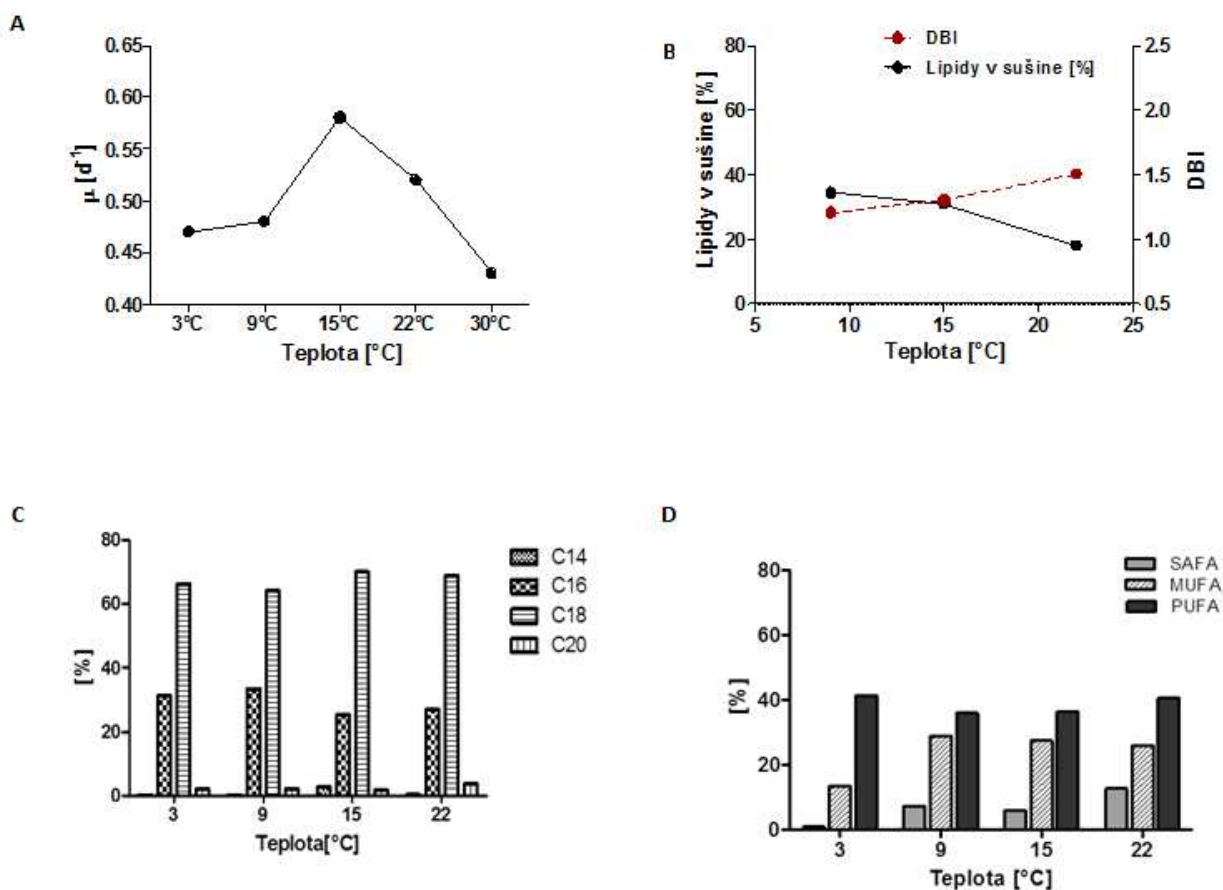
Chloromonas sp. ABISCO

Obr.29: *Chloromonas sp.* Abisco

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

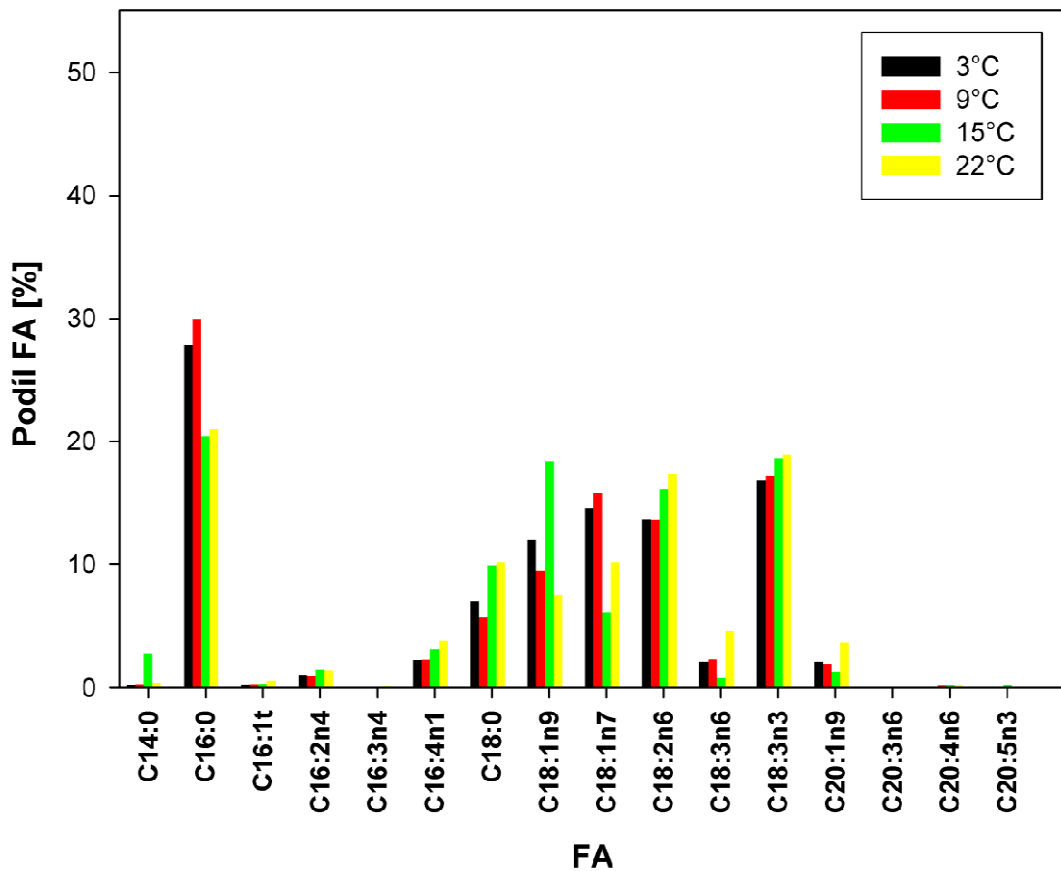
8. *Chloromonas sp.* KSŽZ

Optimální podmínky pro růst se vyskytují kolem teploty 15°C. Ve 30°C růstová rychlost klesá na minimum (Obr.30,A). V teplotách nad 20°C převažovaly polynenasycené mastné kyseliny a ubyly C18.(Obr.30,C,D) Celkově C18 výrazně převládaly ve všech teplotách (70%). Podíl C16:0 je ve všech teplotách poměrně vysoký (~30%) . U všech kyselin o délce 18C se jevil nepatrný nárůst(Obr 30,E). DBI měl stoupavou tendenci (1,2-1,5). Obsah lipidů v sušině se ve vyšších teplotách snížil 36%→18% (Obr 30, B).



Chloromonas sp. KSŽZ

E

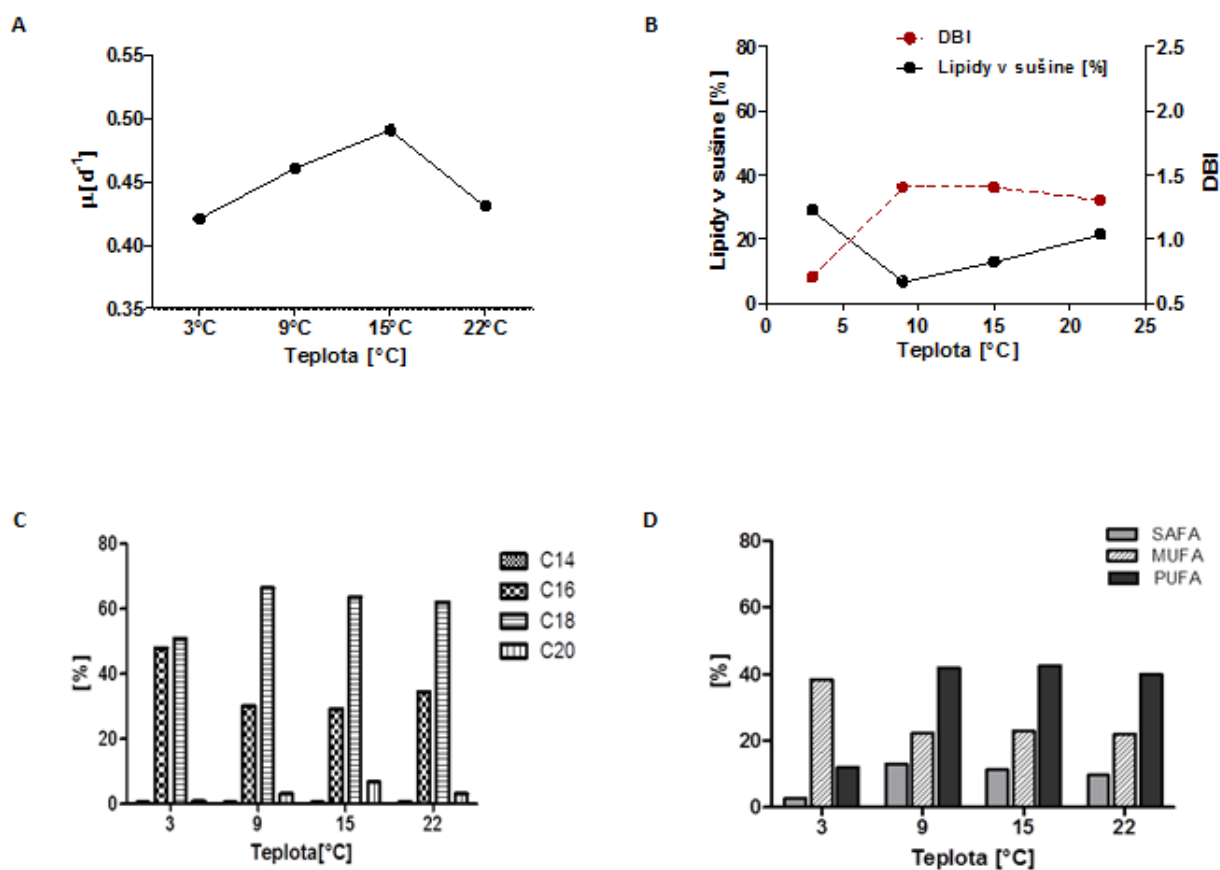


Obr. 30: *Chloromonas sp. KSŽZ*

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

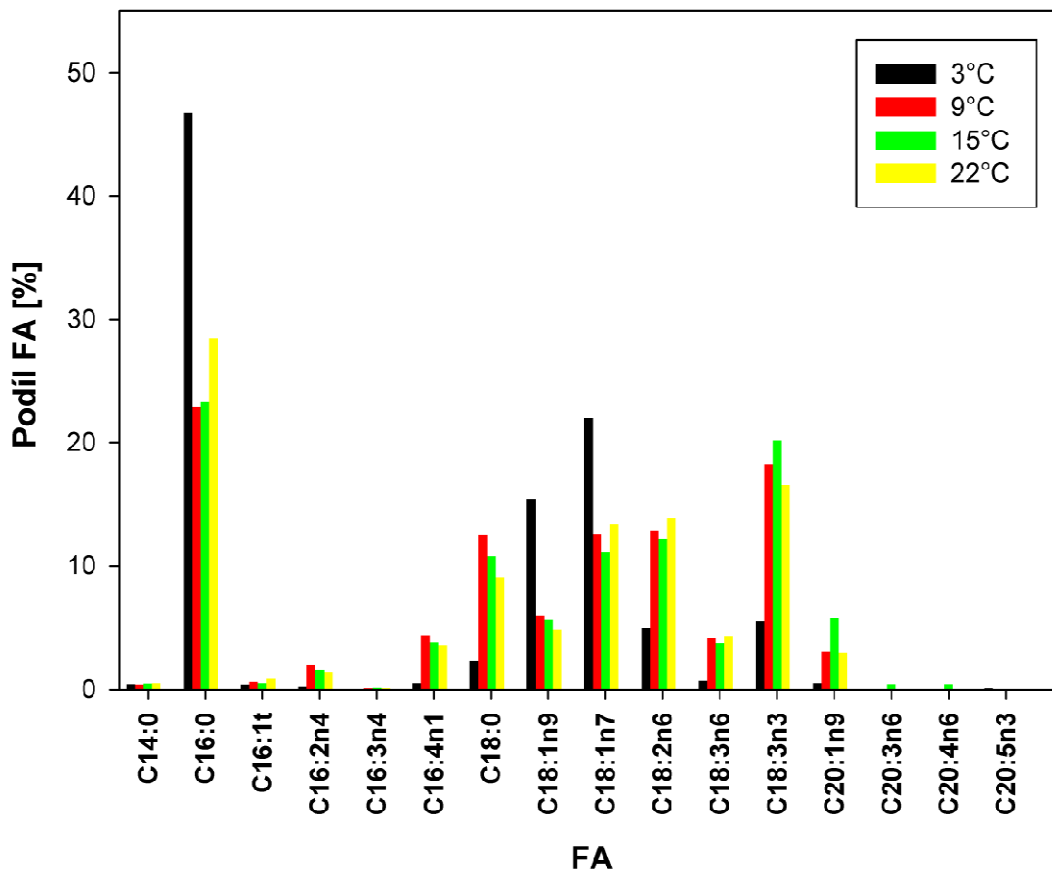
9. *Chloromonas chenangoensis* UTEX, B SNO 147

Tato sněžná řasa nejrychleji rostla v 15°C ve 3°C byl růst shodný s hodnotou ve 22°C (Obr.31,A). Ve 3°C byla nízká hodnota polynenasycených mastných kyselin (PUFA) 12%, v ostatních teplotách se poměr změnil a PUFA (40%) převažuje nad MUFA a SAFA. SAFA se v případech >3°C pohybuje v úzkém rozmezí 30-40% a převyšuje MUFA (~20%) (31,D). Délka řetězců nebyla průkazně v teplotní škále proměnlivá (31,C). Podíl lipidů klesal. DBI byl ve 3°C nízký (0,7), ve zbývajících teplotách se pohyboval nad 1,2 (Obr31,B).



Chloromonas chenangoensis UTEX, B SNO 147

E



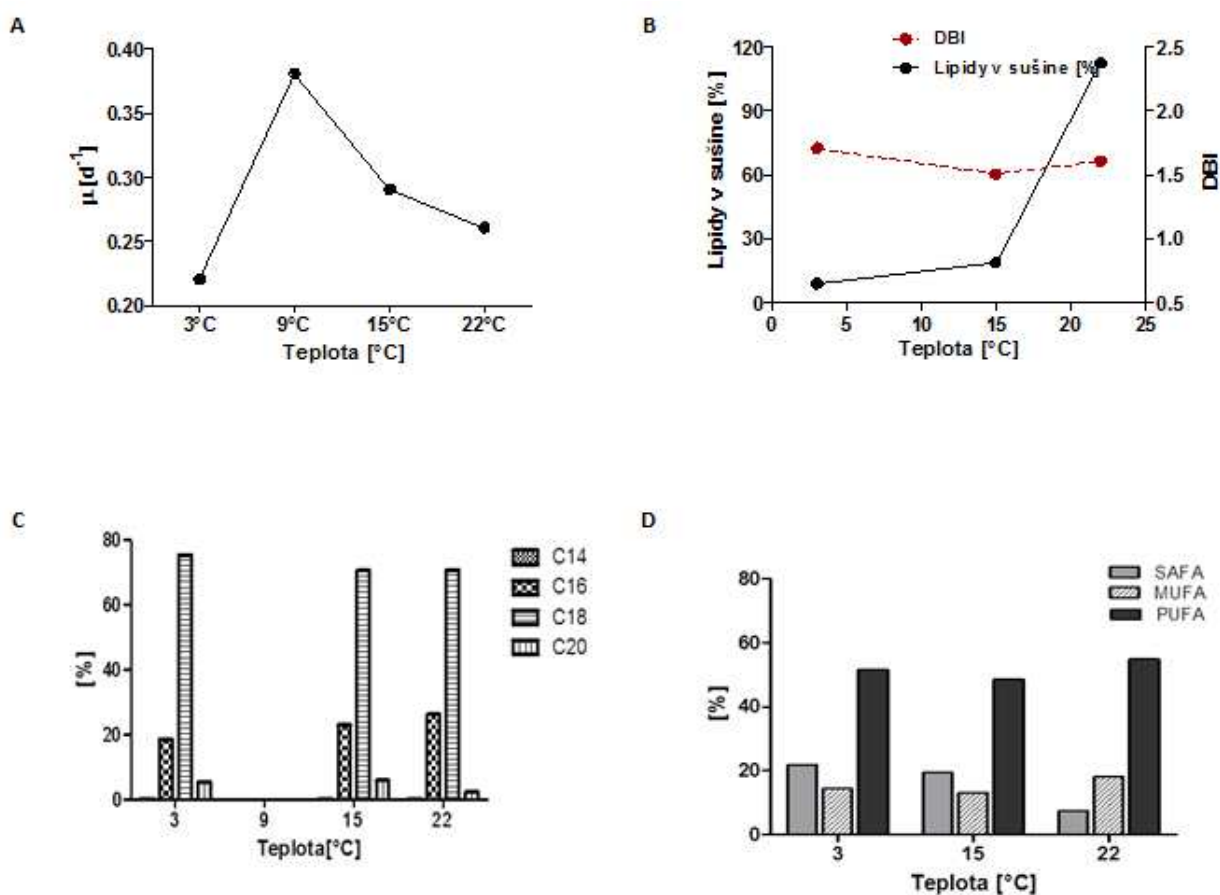
E

Obr. 31: *Chloromonas chenangoensis* UTEX, B SNO 147

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

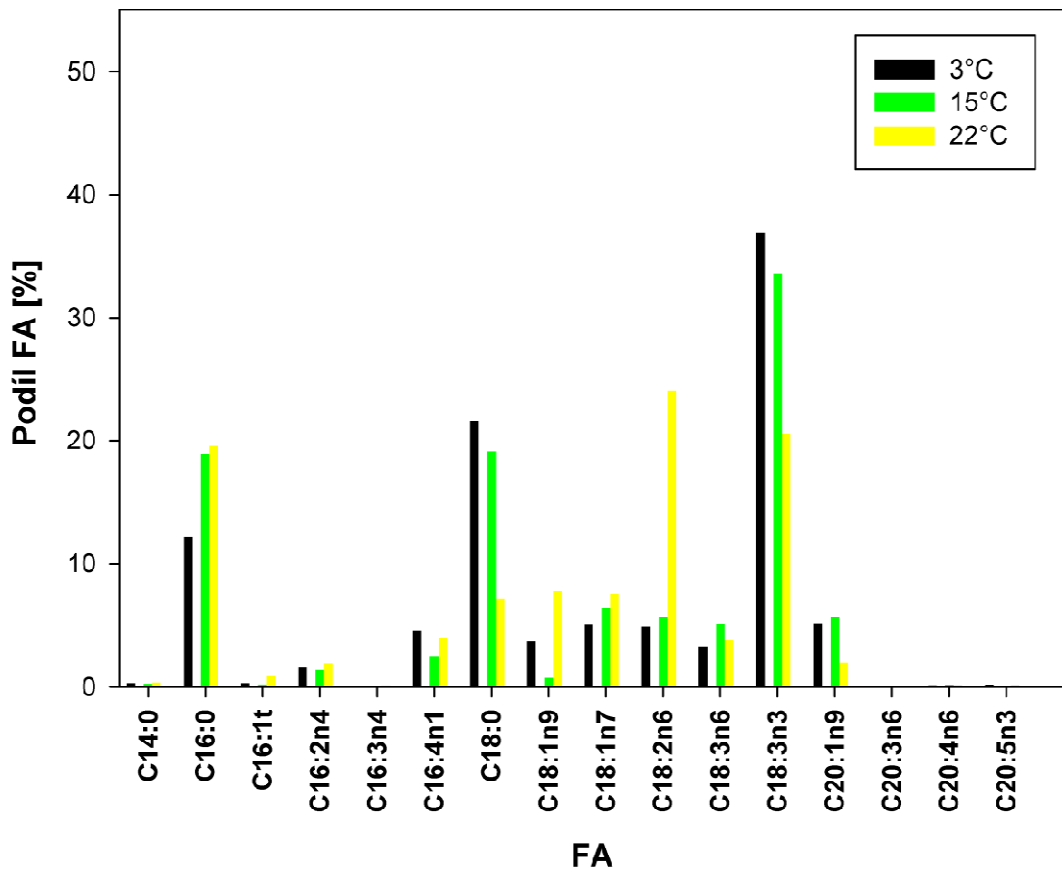
10. *Chloromonas tughillensis* UTEX, SNO 91

Ve 3°C tato řasa rostla pomalu, největší specifickou rychlost růstu vykazovala při 9°C, poté klesala do 22°C (Obr.32,A). I přes chybějící údaje o FA z 9°C je patrné, že podíl SAFA:MUFA:PUFA žádný vzestup ani pokles nezachytil (Obr.32,D). Totéž platí i o délce řetězců. Konkrétní mastné kyseliny C18:0 a C18:3n3 klesly, C16:0, C18:1n7 a C18:2n6 vzrostly (Obr. 32, C). Tendence obsahu lipidů v biomase nelze z dat vyčíst. Index dvojných vazeb (DBI) byl ve všech měřených případech velice vysoký >1.5 (Obr.32,D). V teplotě 22°C se vyskytovaly více C16:0 a méně C:18:0 a C18:3n3 než v t=3°C (Obr. 32, E).



Chloromonas tughillensis UTEX, 91

E

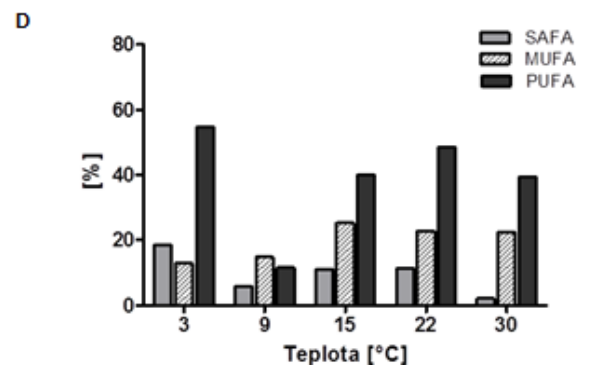
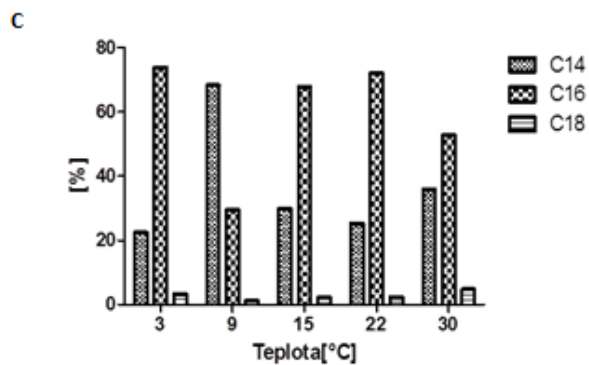
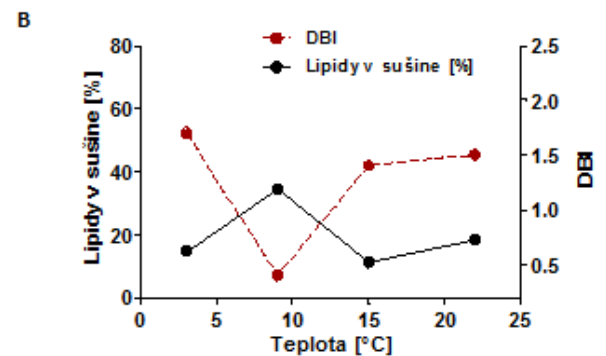
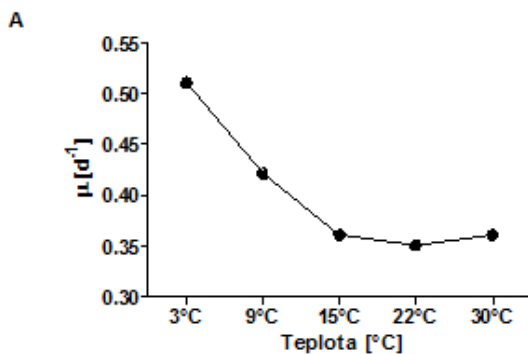


Obr. 32: *Chloromonas tughillensis* UTEX SNO 91

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

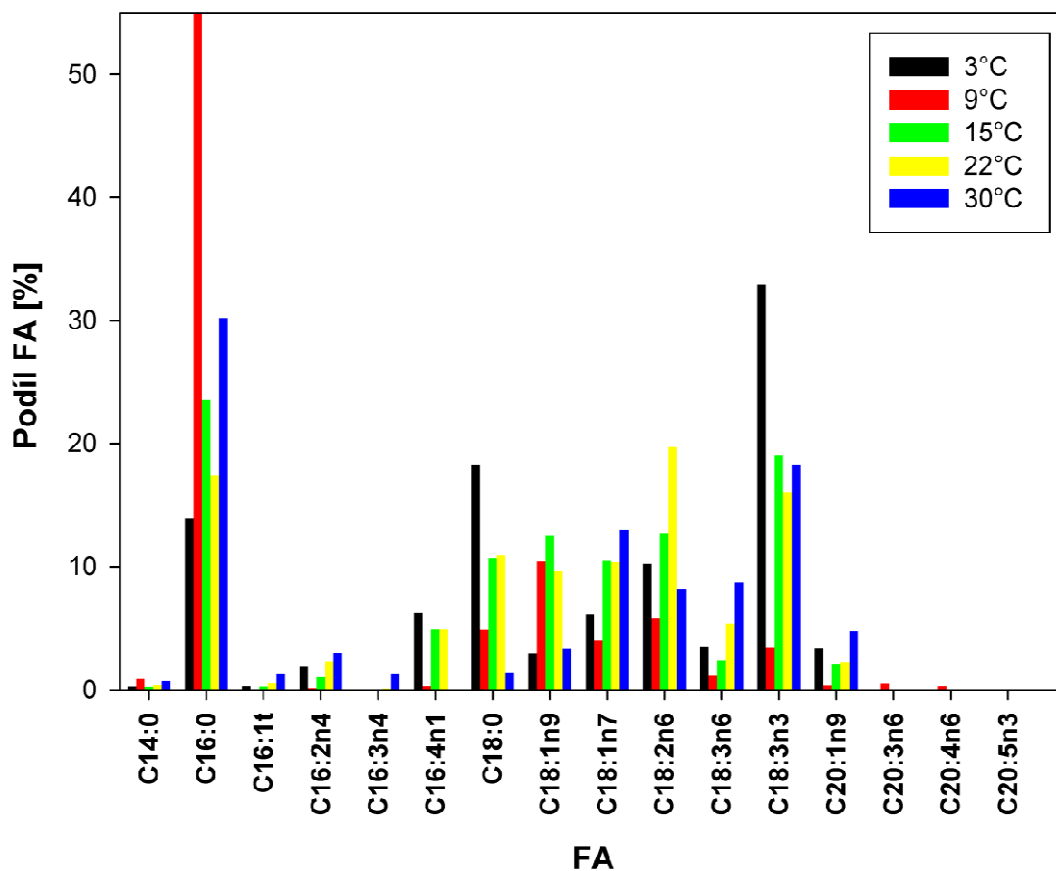
11. *Chlamydomonas sp. Gossen*

Kmen *Chlamydomonas sp. Gossen* vykazoval zajímavý pokles specifické růstové rychlosti ve vzrůstající teplotě (Obr.33,A). Jeho aktivita se snižovala. Ve 30°C řasa ještě roste a její T_{max} byla vyšší než 30°C. Při vzrůstu teploty klesá množství saturovaných mastných kyselin a naopak přibývá polynenasycených mastných kyselin (Obr.32,D). V 10°C výrazně převládají C16 na úkor C18 (Obr.32,D), především C18:3n3 (Obr. 32,E). Obsah lipidů byl beze změny (10-30%). Hodnota DBI nevykazuje žádný teplotně závislý trend trendu. (Obr. 32,B).



Chlamydomonas sp. GOSSSEN

E

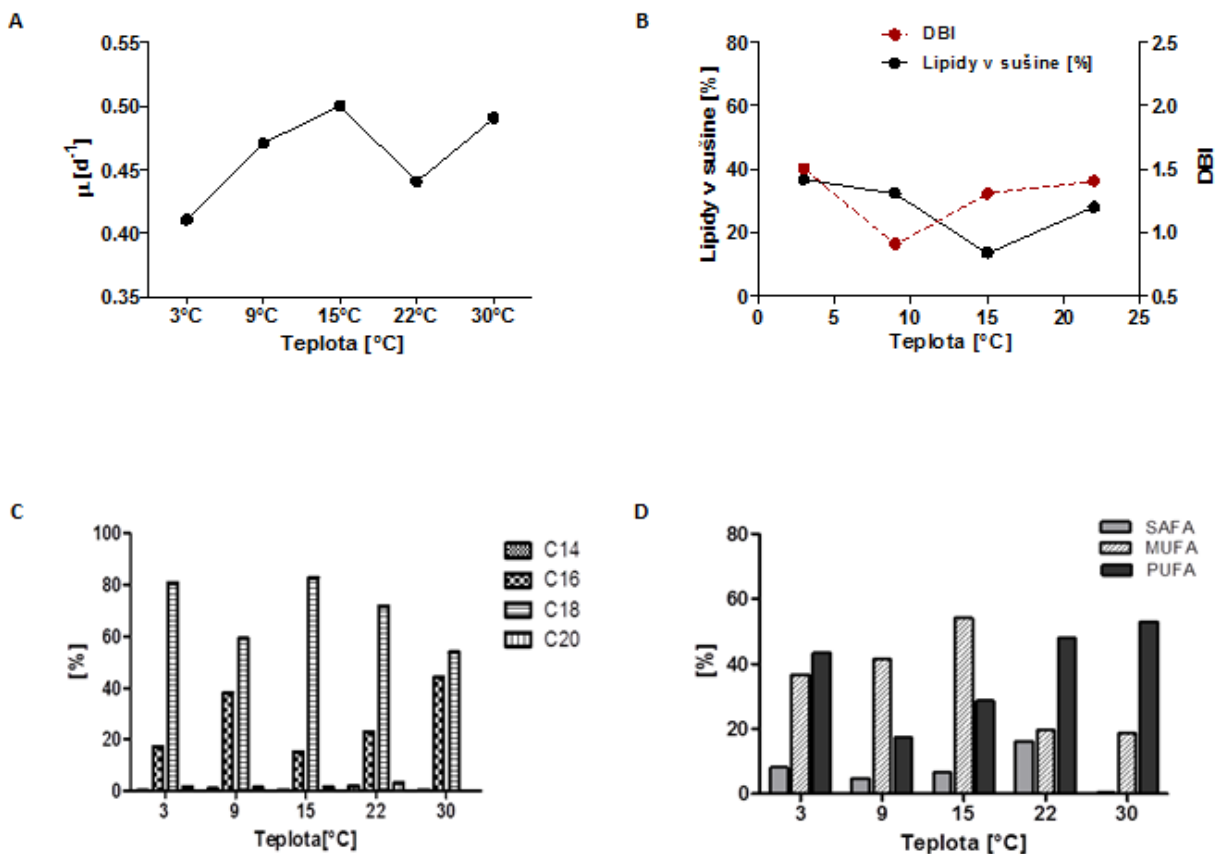


Obr. 33: *Chlamydomonas sp.* Gossen

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

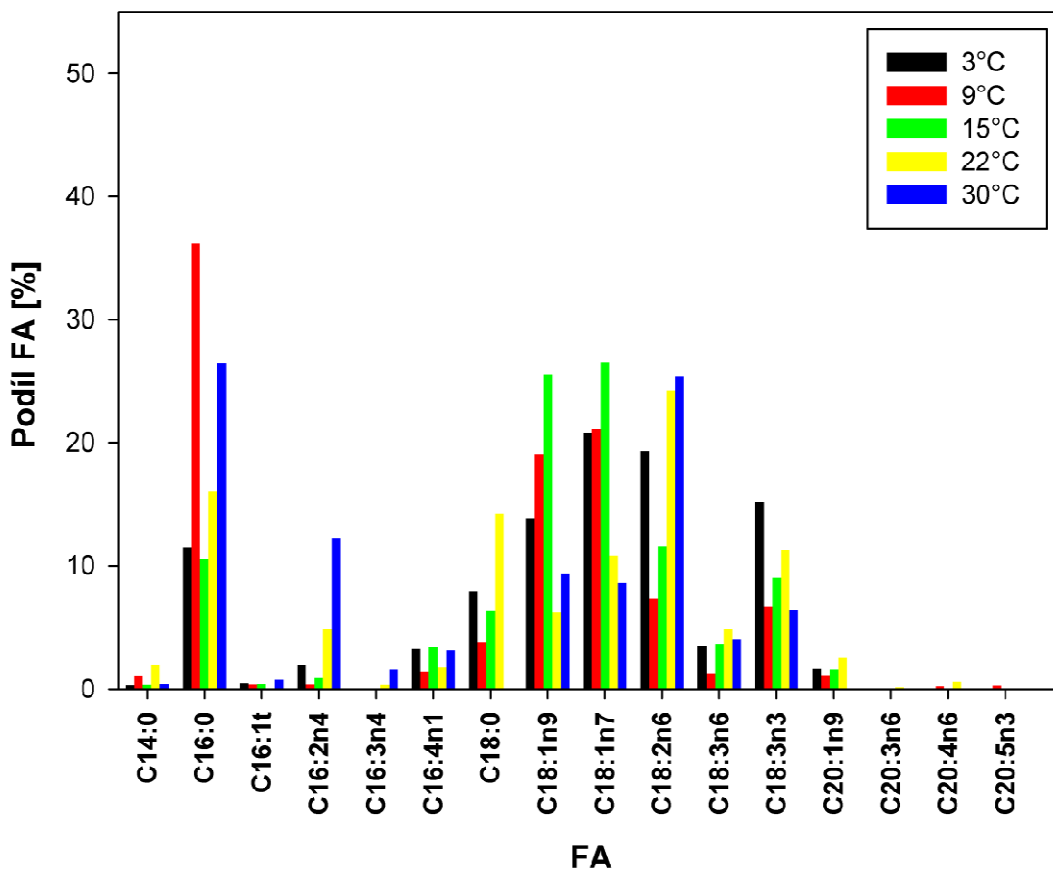
12. Chlorophyta g. sp. Furka

Růstová rychlost Chlorophyta g. sp. Furka vzrůstala od 3°C do 15°C. Dle vitality ve vysokých teplotách má tato řasa psychrotrofní charakter (Obr.34,A). SAFA množství v teplotní gradientu nemění. Ve 22°C a 30°C jsem sledovala pokles MUFA a nárůst PUFA (Obr.34,D). 16-tiuhlíkatých mastných kyselin bylo výrazné množství ve srovnání s jinými řasami, od 15°C výše jejich se jejich procento zastoupení v lipidech zvyšovalo (~20→45%) zatímco C18 klesá (Obr.34C) především C18:3n3 (Obr.34,E). Obsah lipidů s rostoucí teplotou klesal. DBI ve 3°C vysoký od 10°C nízký a do 30°C opět stoupl (Obr.34,B).



Chlorophyta g. sp. FURKA

E

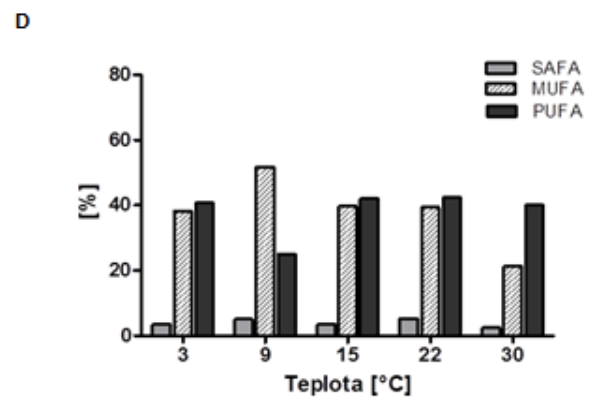
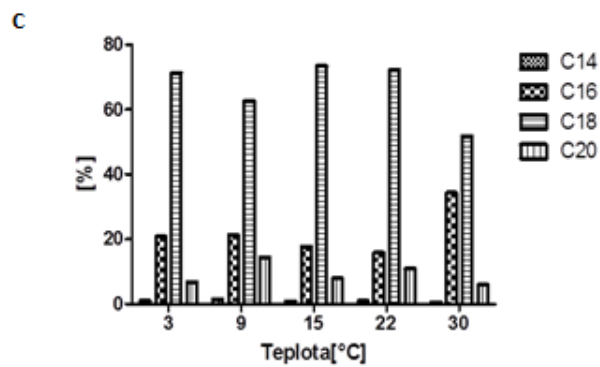
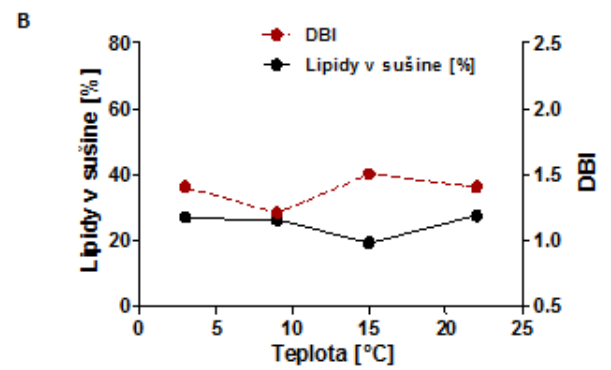
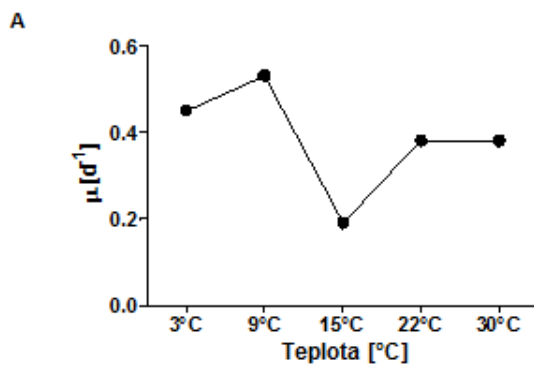


Obr. 34: Chlorophyta g. sp. Furka

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

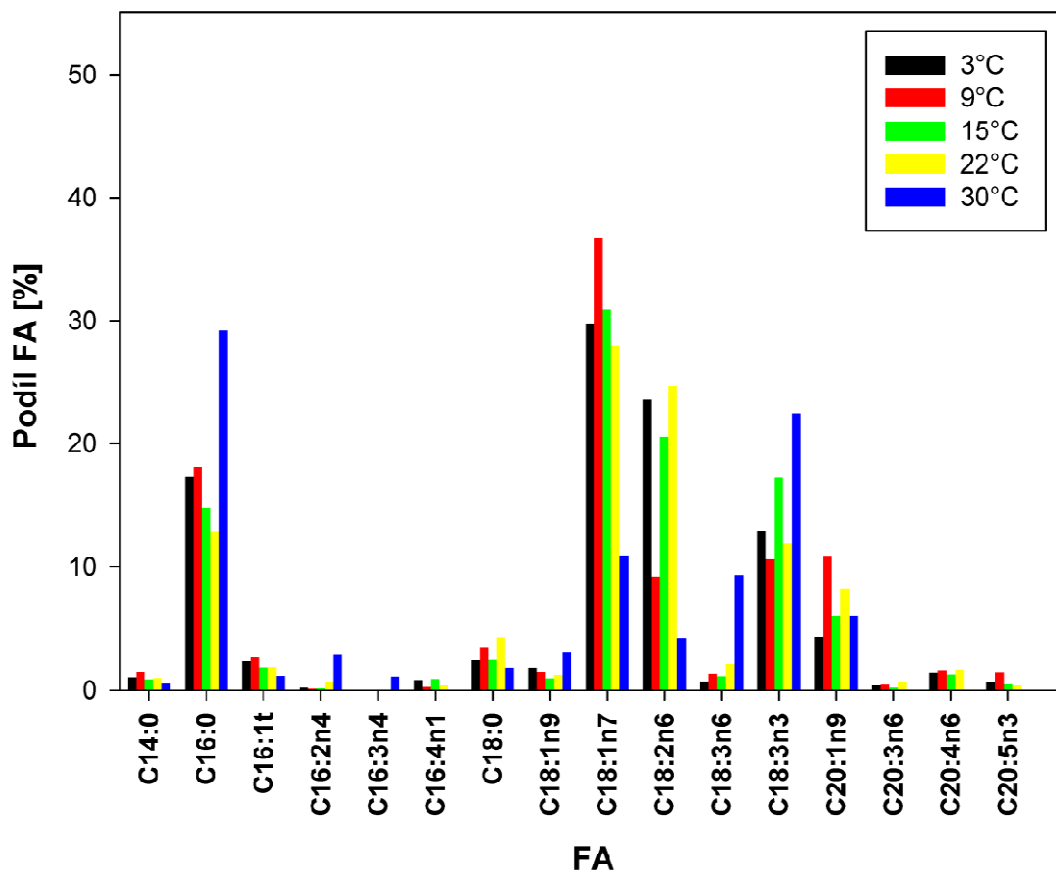
13. Chlorophyta g. sp. Hochgurgl

Tento kmen rostl v teplotách 3°C – 30°C, mohu ho považovat za psychrotrofní (Obr.35,A). Během stoupající teploty poměr MUFA klesly. Ve 30°C podmínkách stoupal podíl C16 na úkor C18 (Obr,D), avšak obsah C18:3n3 v teplotním gradientu stále stoupal (Obr35,E). Obsah lipidů a index dvojných vazeb (DBI) zůstal neměnný (Obr35,B).



E

Chlorophyta g. sp. HOCHGURGL

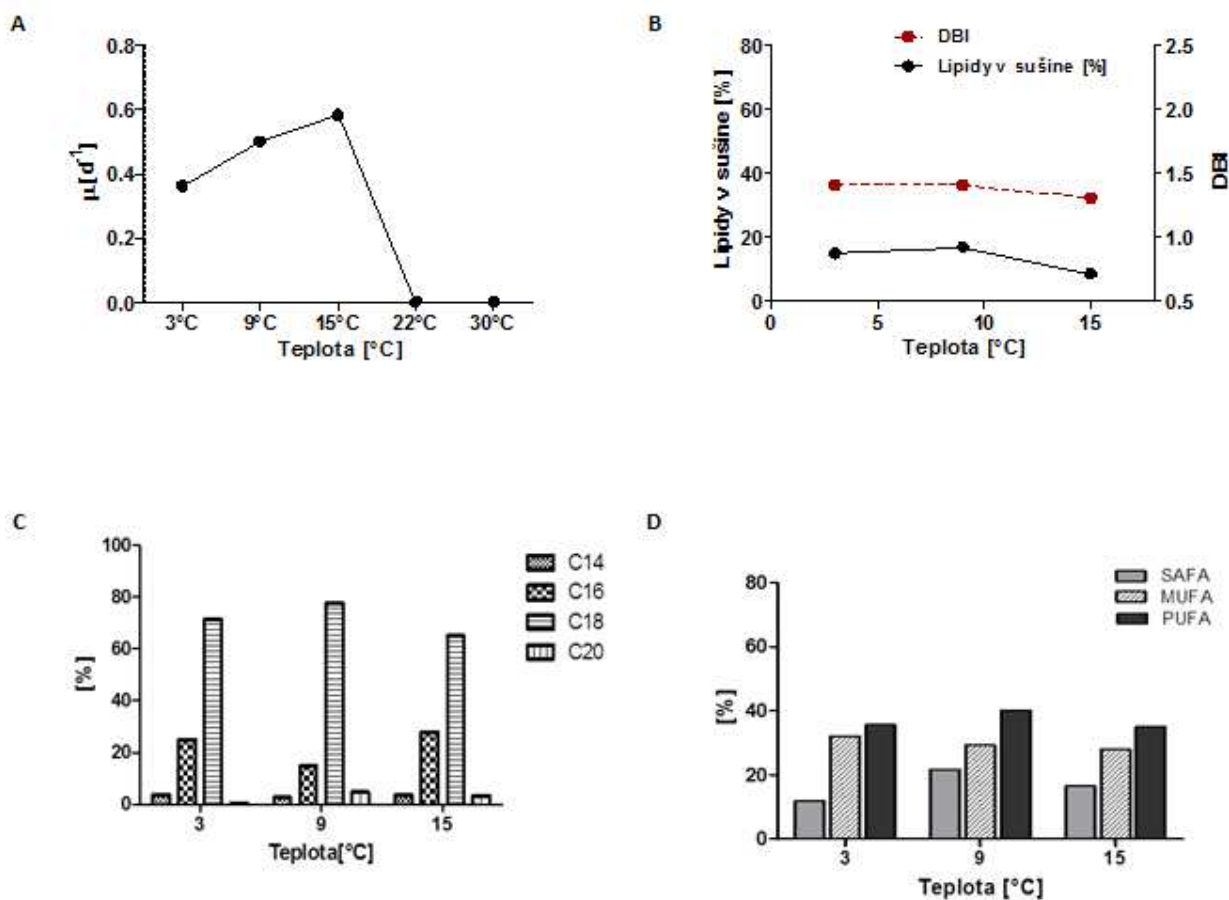


Obr. 35: Chlorophyta g. sp. Hochgurgl

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teloptách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených tepotách.

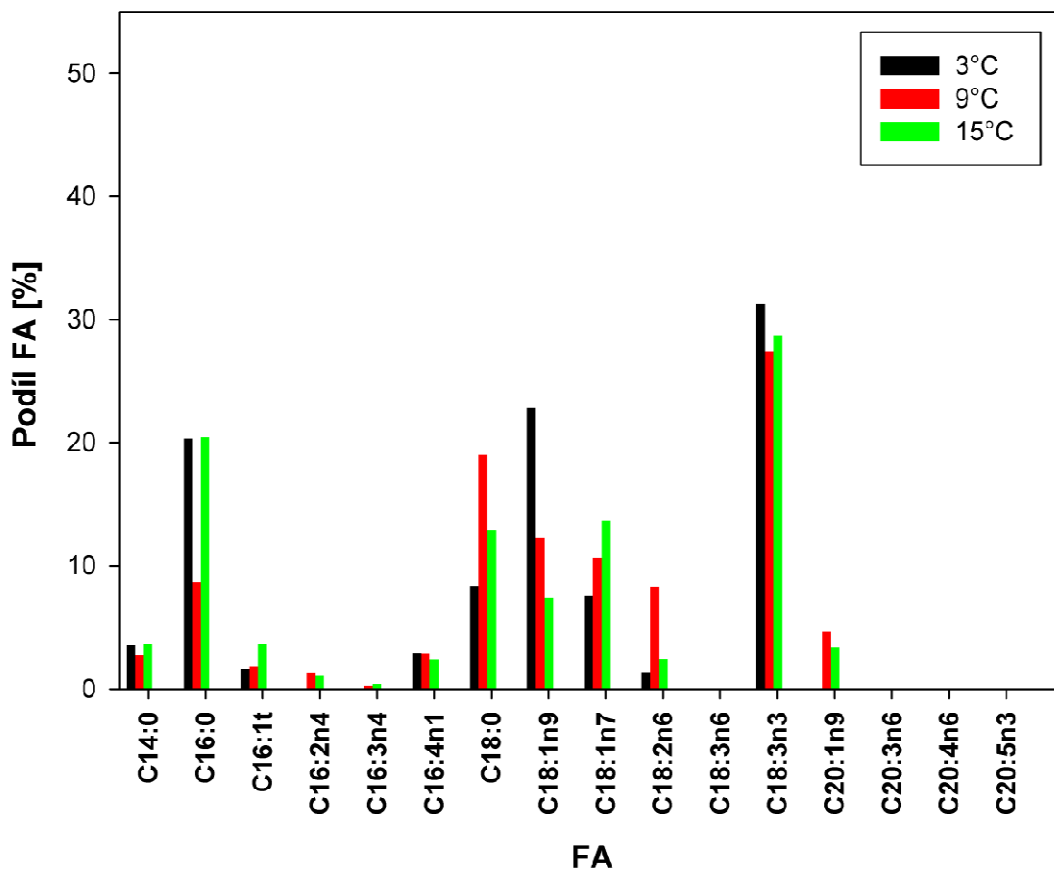
14. *Chloromonas nivalis* CCCryo 004-99

Chloromonas nivalis CCCryo 004-99 je psychrofilní řasa, jejíž růst měl do 15°C vzestupný charakter. Ve 22°C už růst tohoto kmene neprobíhal. Hodnoty nasycených, mononenasycených a polynenasycených byly ve stejném poměru ve všech teplotách (Obr 36,D). Všechny hodnoty se pohybovaly v rozmezí 29-40%. Vysoký podíl C18 klesl v 15°C, ne však pod 60%, zároveň se mírně zdvihl podíl C16 (Obr 26,C). Lipidický podíl (10-15%) a DBI (cca 1,4) zůstaly bez změny (Obr 36,D).



E

Chloromonas nivalis, CCCryo, 004-99



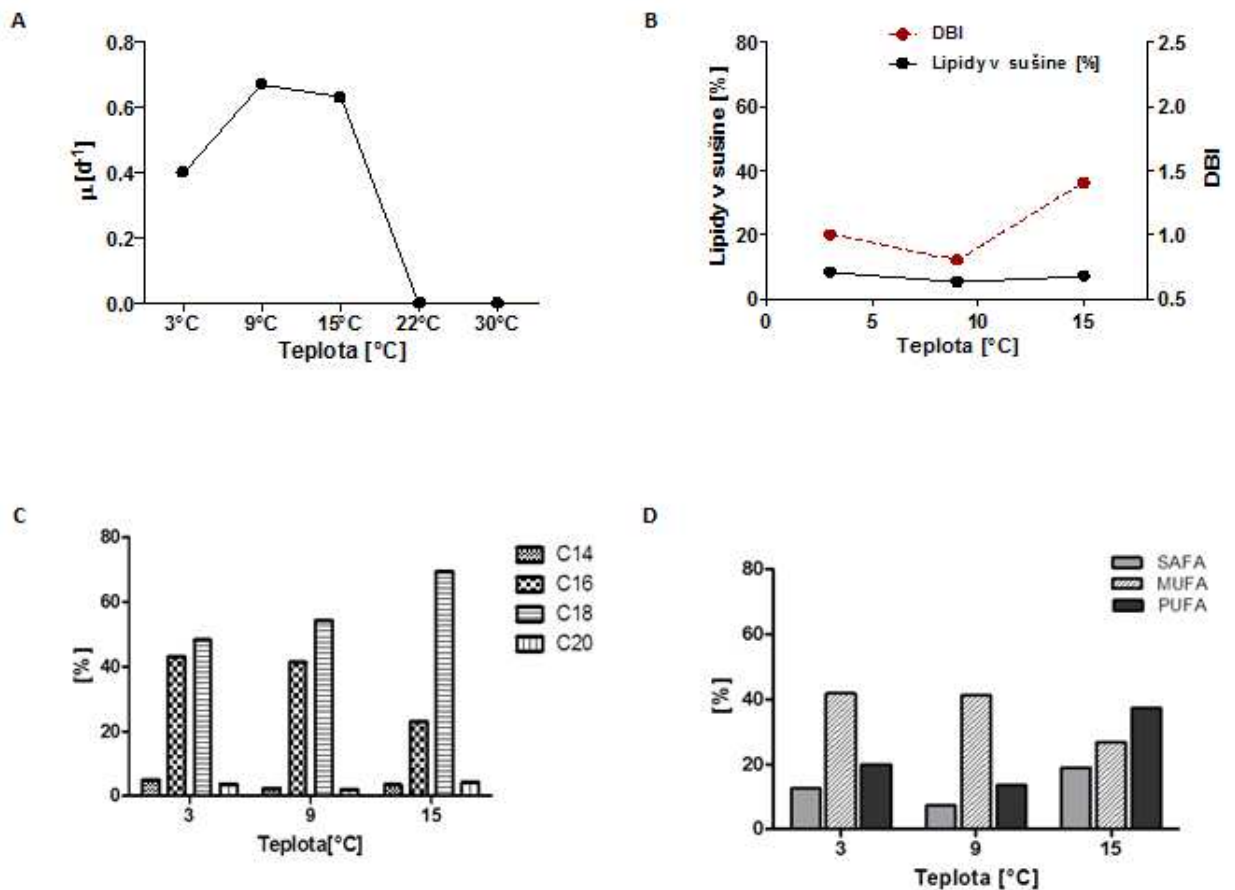
E

Obr. 36: *Chloromonas nivalis* CCCryo 004-99

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

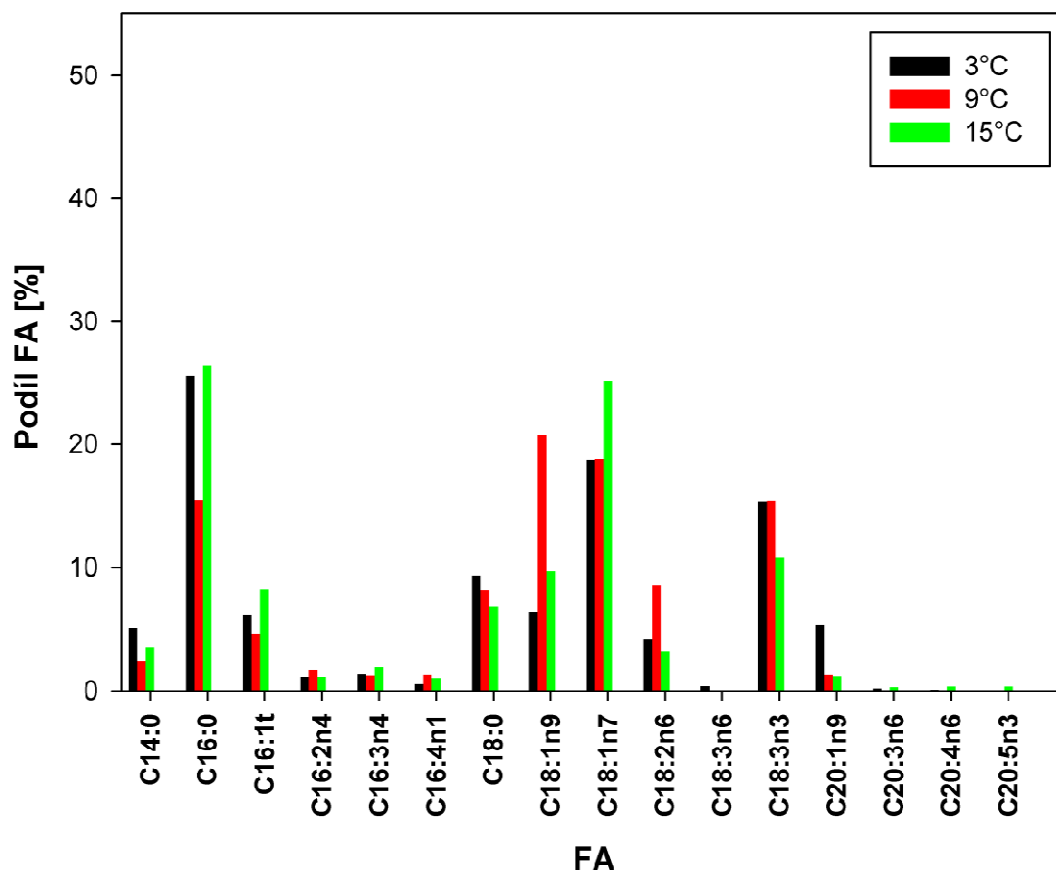
15. *Chloromonas sp. CCCryo 044-99*

Nejvyšší specifická rychlost růstu byla naměřena při teplotě 9°C, ve 22°C buňky vymřely a kultura nepřežila (Obr.37,A). Tím jsem potvrdila psychrofilní povahu tohoto kmene. V příznivých 3°C a 9°C kultura obsahovala malý podíl PUFA (>20%). V 15°C byly PUFA obsaženy v hojné míře (37%) a tvořily tak největší podíl v lipidech (Obr.36,D). Řetězce mastných kyselin měly prodlužující tendenci, stoupal podíl C18 na úkor C16 (Obr.36,C). DBI byl nevyšší v 15°C (Obr. 36,B).



Chloromonas sp. CCCryo, 044-99

E

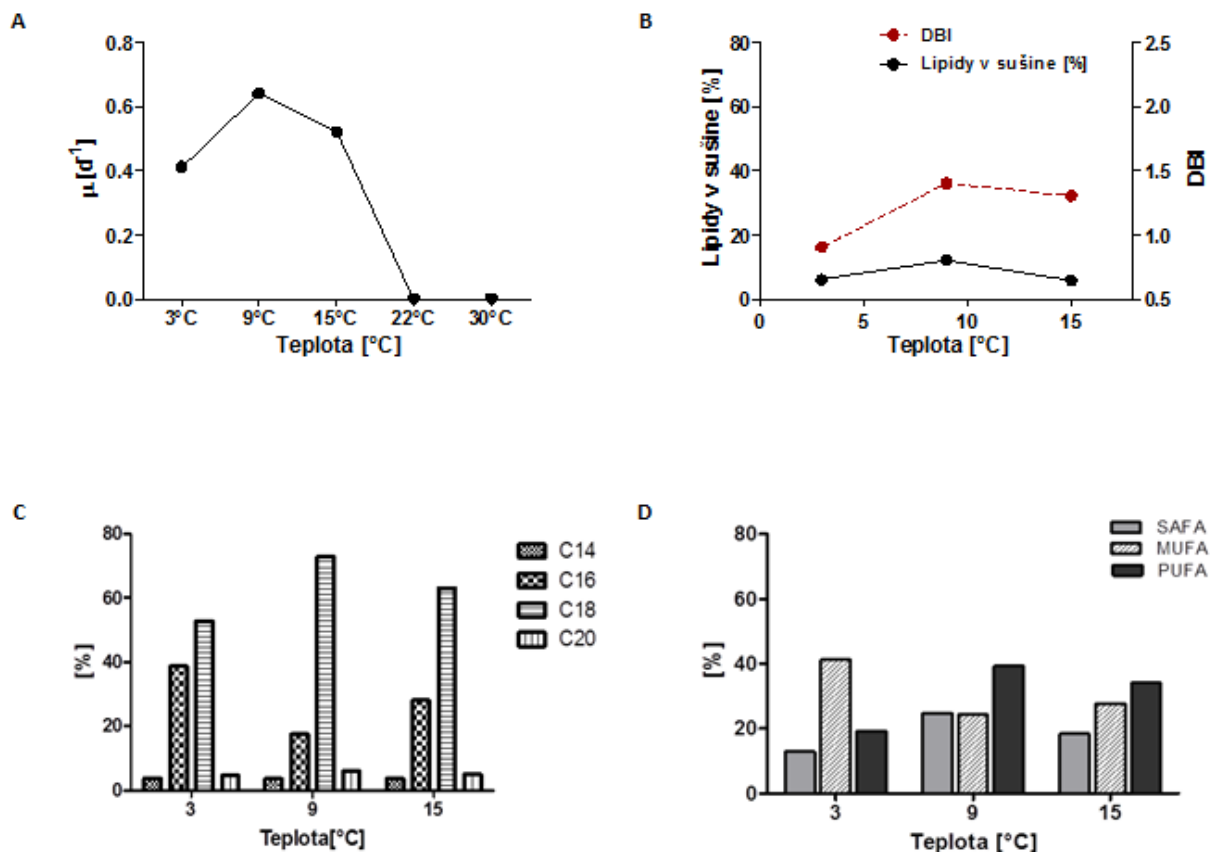


Obr. 37: *Chloromonas sp.* CCCryo 044-99

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

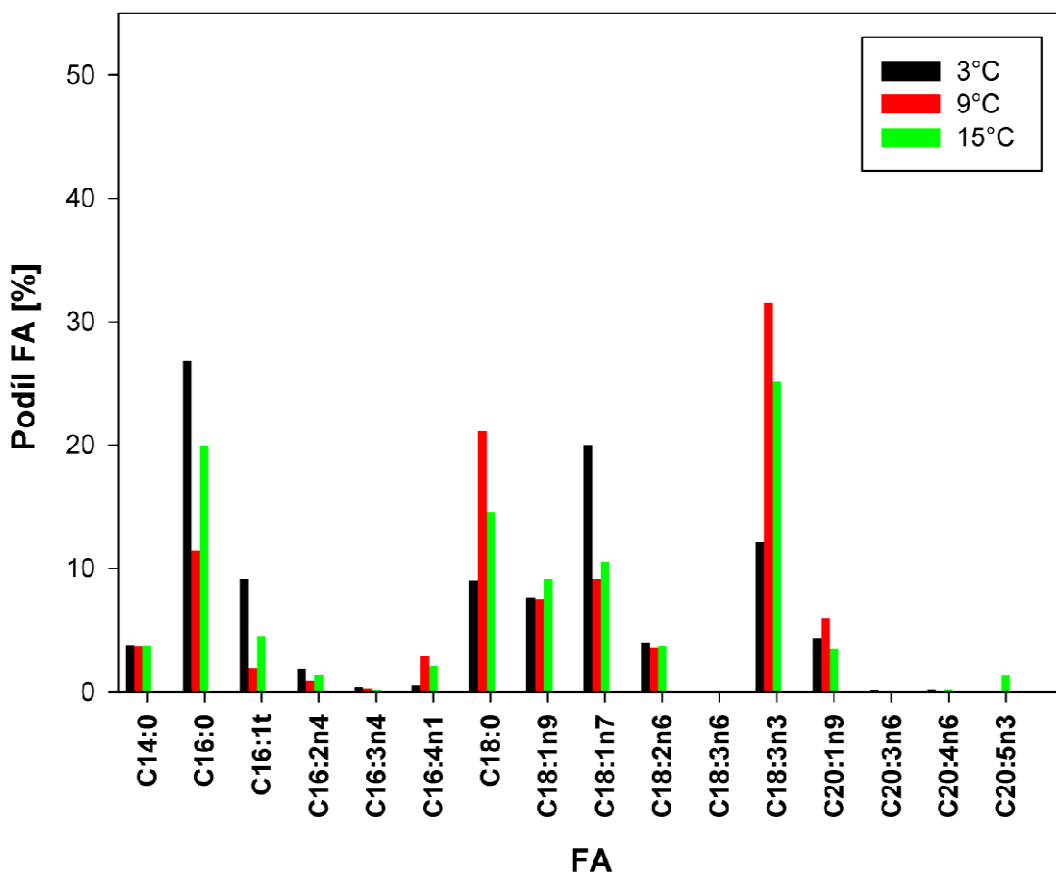
16. *Chloromonas alpina* CCCryo 089-99

Její růstové maximum bylo zjištěno při 9°C, ve 22°C už kultura, jako pravý psychrofil, nedokázala přežít (Obr.38, A). PUFA ve 3°C byly (oproti dalším teplotám) na nízké hladině (19%). MUFA naopak na škále 3°C-15°C klesly z 41% na 20% (Obr.38,D). Délky řetězců dosahovaly v 9°C maxima C18 na úkor C16 (Obr.38,C). Zastoupení lipidů je ve všech sledovaných teplotách obdobné. Index dvojných vazeb měl ve 3°C nejnižší hodnotu, vzestupný trend ale nebyl prokázán(38,B).



E

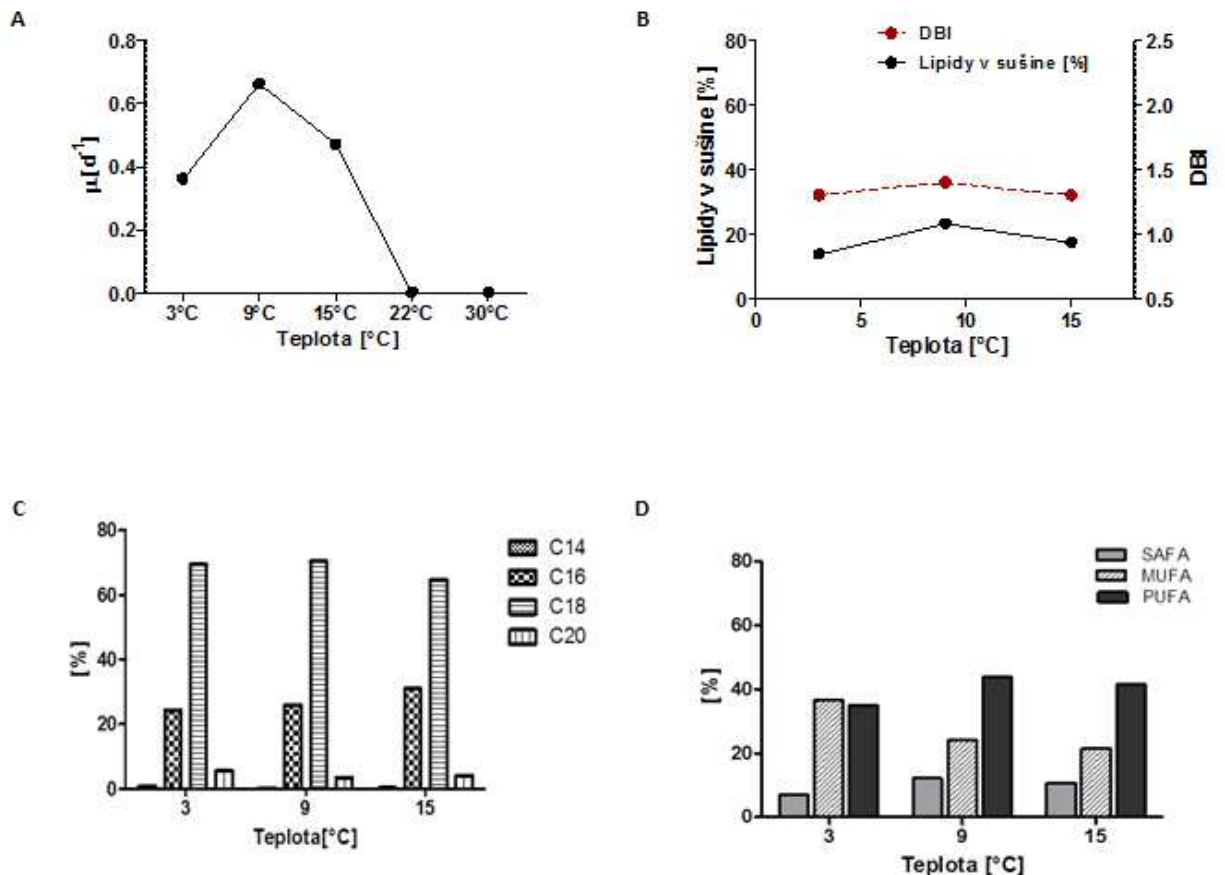
Chloromonas alpina CCCryo, 089-99

Obr. 38: *Chloromonas alpina* CCCryo 089-99

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

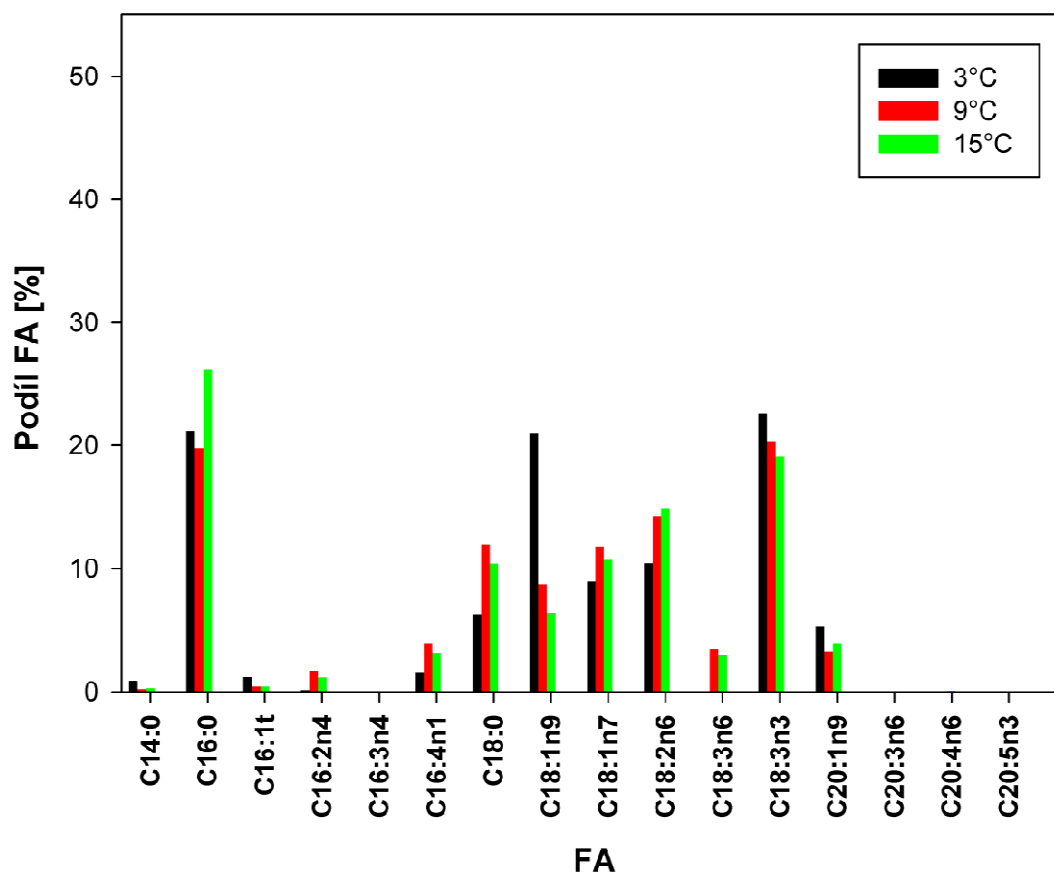
17. *Chloromonas brevispina* CCCryo 091-99

Tento kmen měl největší specifickou rychlost růstu v 9°C. Při kultivaci v teplotních podmínkách 22°C vymřel (Obr.39,A). potvrdil tak svůj psychrofilní charakter. SAFA zaznamenala rostoucí trend, MUFA naopak klesajícím (Obr.39,D). Řetězce odélce 18 uhlíků (C18) se svým výskytem pohybovaly mezi 60-70% ze všech FA. Stoupající trend C16 nebyl průkazný (Obr.39,C). Také podíl lipidů v buňkách (20%) a DBI (<1,2) zůstal neměnný (Obr.39,B).



Chloromonas brevispina CCCryo, 091-99

E

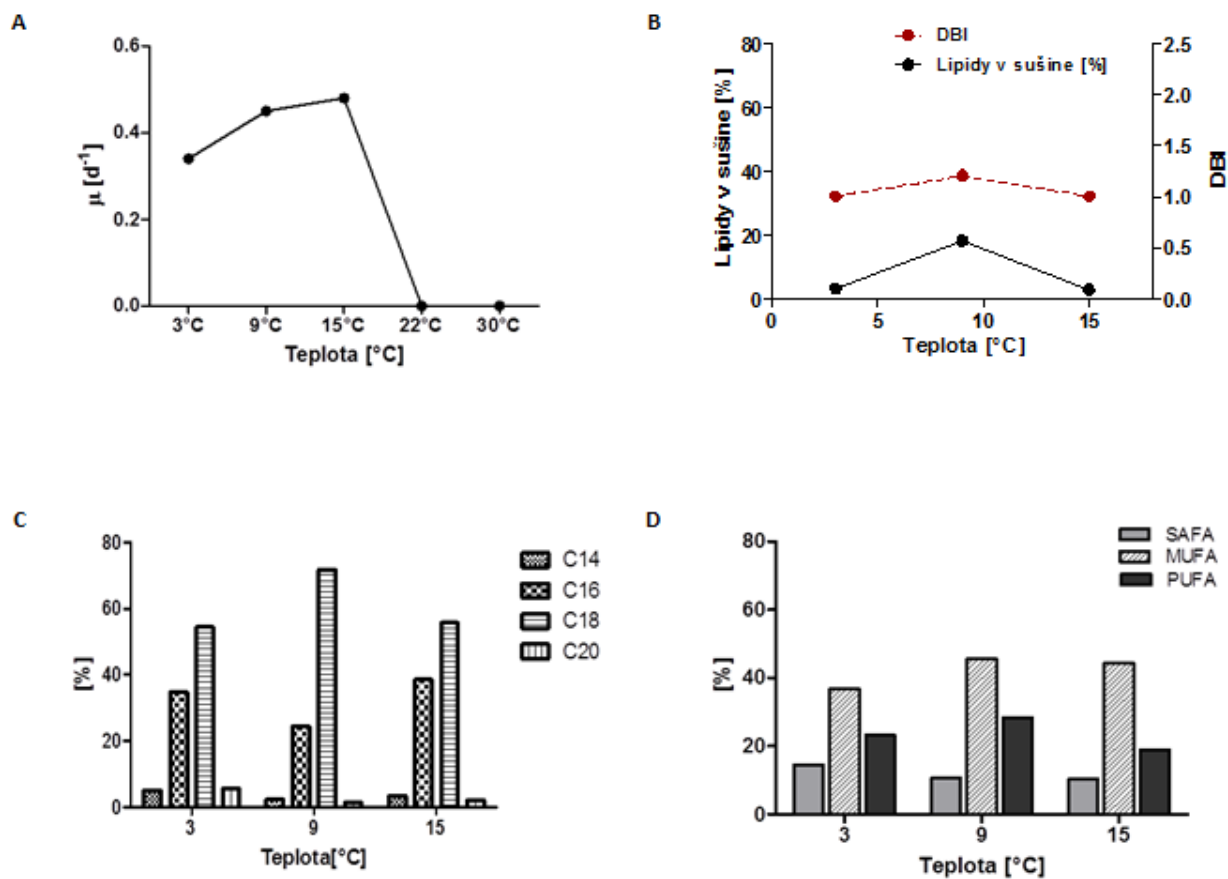


Obr. 39: *Chloromonas brevispina* CCCryo 091-99

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených teplotách.

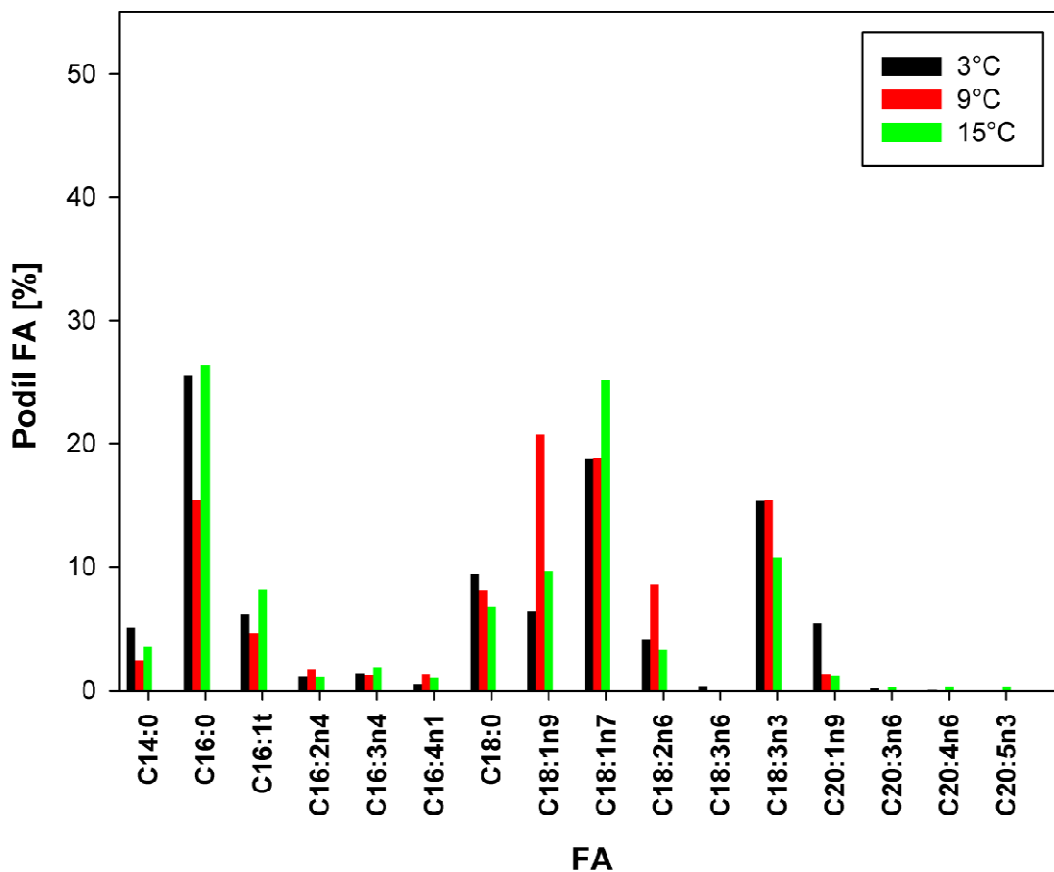
18. *Chlamydomonas platystigma* CCCryo 020-99

Nejvyšší specifická růstová rychlost μ byla zjištěna v 15°C (Obr.40,A). Podmínky v 9°C byly také příznivé. Ve 22°C řasa nepřežila. Nejvíce nasycených mastných kyselin bylo obsaženo při kultivačních podmínkách 3°C. V 10°C byl také zjištěn nejvyšší podíl C18 řetězců (Obr.40,C). Množství lipidů a DBI byl neměnný (Obr.40,B).



Chlamydomonas platystigma CCCryo, 020-99

F

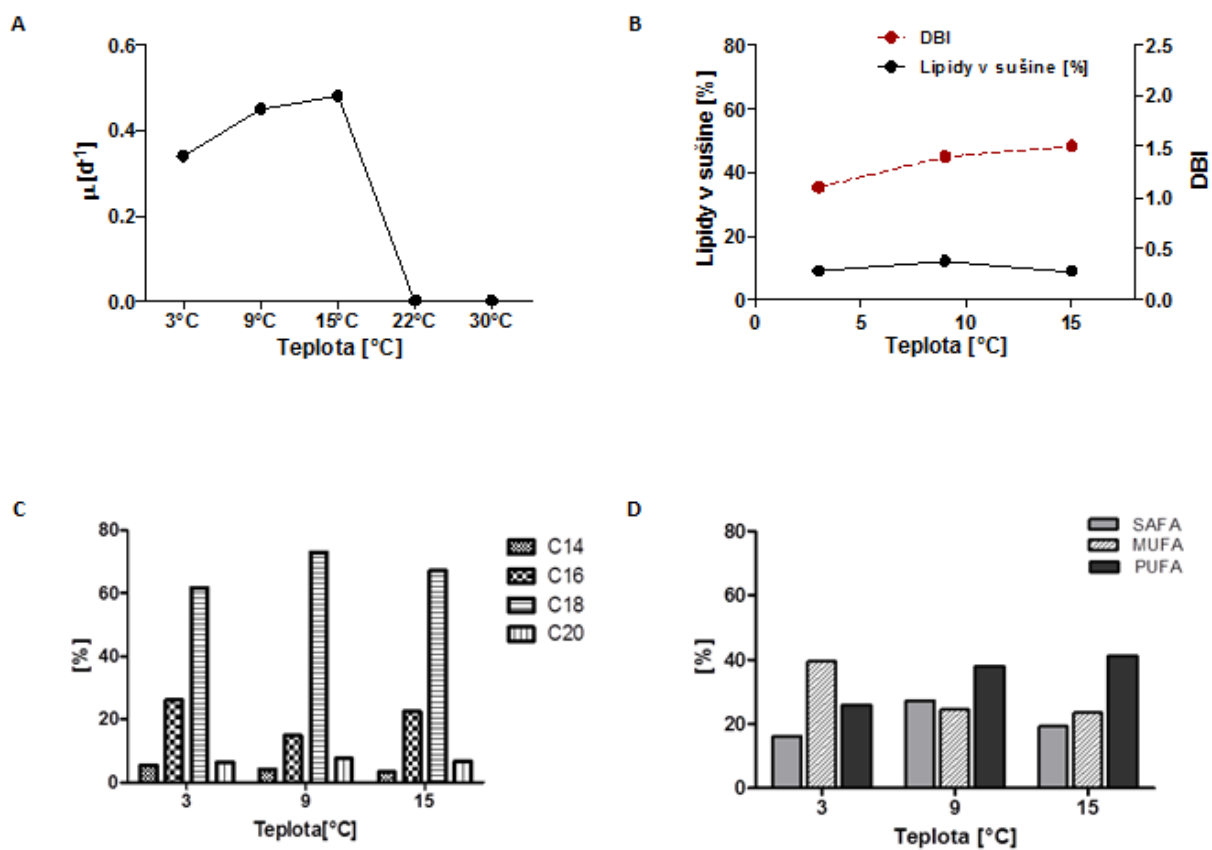


Obr. 40: *Chlamydomonas platystigma* CCCryo 020-99

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených tepotách.

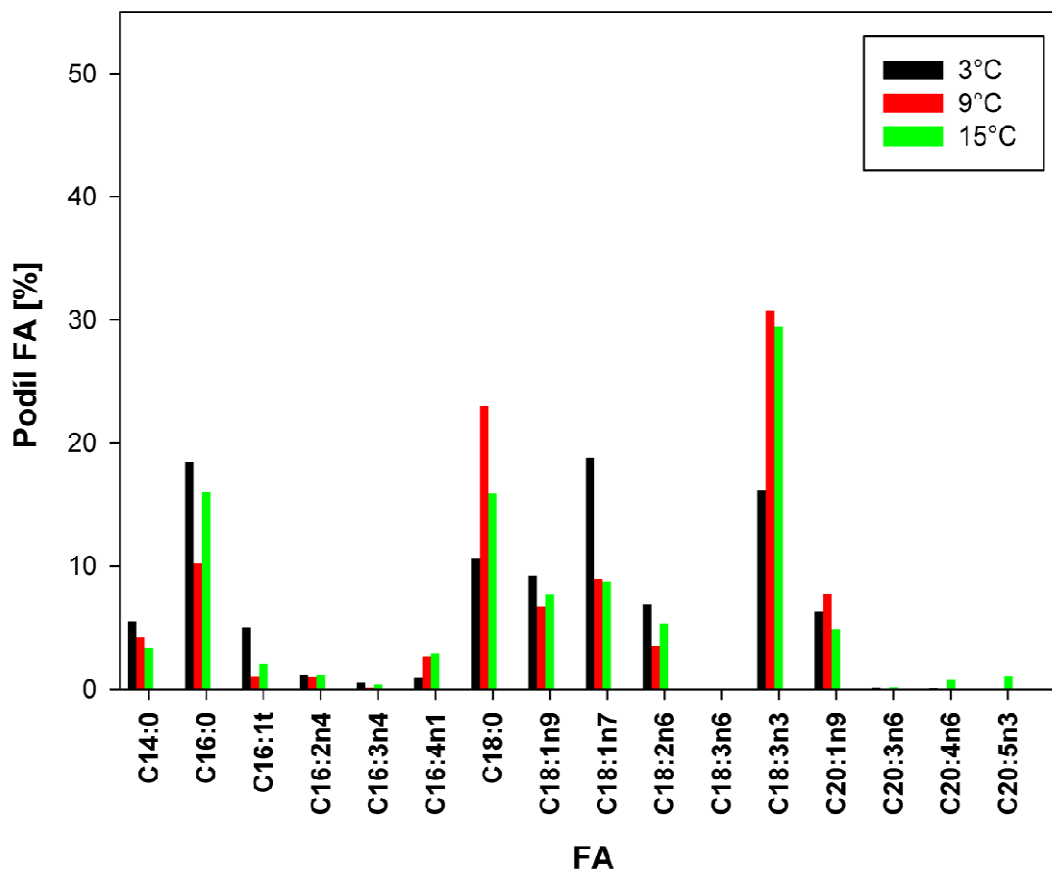
19. *Chlamydomonas raudensis* CCCryo 125-100

Tato psychrofilní řasa má obdobný průběh růstové rychlosti jako předchozí *Ch. platystigma* (Obr.41,A). PUFA měla vzrůstající charakter (23→40%), MUFA klesající (40→25%) (Obr.41,D). Dlouhé řetězce C18:3n3 a C20:1n9 byly zastoupeny méně (Obr.41,D). Lipidický podíl byl bez změny. DBI stoupl z přibližně 1,0 na 1,5 (Obr.41,B).



Chlamydomonas raudensis CCCryo, 125-100

E



Obr. 41: *Chlamydomonas raudensis* CCCryo 125-100

A – Specifická růstová rychlost μ [d^{-1}] ve zkoumaných teplotách, B – zastoupení lipidů v sušině [%] a DBI – index dvojných vazeb (celkový počet dvojných vazeb/FA) vyjadřuje celkovou míru ne/nasycenosti, C – poměry délek uhlíkatých řetězců, C16 – C20 (16 až 20 uhlíků v řetězci mastných kyselin), D – a) zastoupení SAFA - nasycených mastných kyselin (C16:0, C18:0, C:20), MUFA - mononenasycených mastných kyselin (C16:1t, C18:1n9, C18:1n7, C20:1n9), c) PUFA - polynenasycených mastných kyselin (C16:2n4, C16:3n4, C16:4n1, C18:2n6, C18:3n6, C18:3n3, C20:3n6, C20:4n6, C20:5n3), E – profil mastných kyselin v měřených tepotách.

6 Diskuze

1. Průběh růstu – gradienty

V přírodních podmínkách se kryosestonní řasy rozvíjejí v místech, která jsou charakteristická mnohými extrémními prostředí – nízkou teplotou, vysokou a variabilní ozářeností, vysokými dávkami UV záření, cykly zamrzání a tání, nízkou dostupností živin (Hoham et Duval 2001, Komárek et Nedbalová 2007). Řadí se tak k dalším polyextrémofilním organismům, které jsou schopny tolerovat několik extrémních podmínek najednou. (Seckbach et al. 2007).

Díky toleranci teplot blízkých 0 °C patří sněžné řasy k modelovým organismům pro studium mechanismů adaptace/aklimatizace k nízkým teplotám. Tolerance k nízkým teplotám je kmenově specifická, zahrnuje kmeny od obligátně psychrofilních, např. *Chloromonas tughilensis* či *Chloromonas rosae* var. *psychrophila* (Hoham et al. 2008).

Podle mých experimentů kmen *Ch. reticulata* Luční nejlépe roste v teplotách 8,4°C a 20,7°C, z čehož usuzuji, že teplotní optimum se nachází mezi 8°C a 20°C. Jedná se tedy o psychrotrofní kmen (Morita 1975), protože je schopen přežít v podmínkách blízkých 0 °C, ale teplotní optimum růstu je vyšší než 15 °C a horní teplotní limit růstu by nepřesáhl 35°C. Tolerance relativně vysokých teplot nad 20°C může být adaptací na pravidelné roztání sněžných polí na počátku léta (Hejcman et al. 2006, Jeník 1961), kdy se cysty dostávají s tavnou vodou na povrch půdy.

Naproti tomu *Ch. pichincae* Meandry vykazovala nejlepší životaschopnost v podmínkách 5,7°C a 8,4°C. Ve 20,7°C se vyskytují jen bičíkatá stádia a ve 32,4°C už žádné buňky této řasy nepřežívají. Bohužel chybí informace, jak by růst probíhal mezi teplotami 9°C a 20°C, avšak je velice pravděpodobné, že optimální teplota pro tento kmen by mohla být nižší než 15°C, v tom případě by se jednalo o druhou psychrofilní (sensu (Morita 1975) sněžnou řasu nalezenou na území České republiky. První psychrofilní kmen byl nalezen ve svahu nad Plešným jezeře na Šumavě (Stibal 2003). Pro potvrzení psychrofilní charakteristiky kmene *Ch. pichincae* Meandry je třeba detailnějšího zkoumání.

Rozsah pozorovaných teplotních optim odpovídá ostatním sněžným řasám (Hoham et al. 2008, Kvíderová et Lukavský 2005, Stibal 2003). Rozsah optim a limity růstu jednotlivých kmenů tak nejspíše odrážejí adaptaci mikroklimatické podmínky v původních lokalitách, jak prokázali různé kmeny zelené řasy *Stichococcus* (Kvíderová et Lukavský 2005).

Teplota také ovlivňuje morfologii buněk. Změny byly prokázány např. u zelených řas *Raphidonema nivale* a *Raphidonema sempervirens*. Tyto změny jsou často spojeny s životním cyklem (Stibal et Elster 2005).

Tvorba tlustostěnných cyst na konci vegetačního období je obecnou obrannou strategií sněžných řas rodů *Chlamydomonas* a *Chloromonas* (Hoham et Ling 2000, Hoham et Duval 2001, Komárek et Nedbalová 2007). Během kultivace se u obou kmenů, *Ch. reticulata* Luční a *Ch. pichinchae* Meandry, jsem rovněž pozorovala trend ve změně morfologie buněk v závislosti na teplotě. Tento trend byl stejný v obou kmenech. Při teplotách blízkých hornímu limitu růst (Luční 32,4 °C, Meandry 20,7 °C) existovala pouze pohyblivá bičíkatá stádia, zatímco v nízkých teplotách blízkých 0 °C se vytvářely oválné cysty naplněné zásobními látkami a menším obsahem chlorofylu. Tvorba zoospor ve vyšších teplotách může v přírodních podmínkách napomáhat k migraci a hledání přijatelnějších podmínek pro život. U cyst kmene *Ch. reticulata* Luční se jejich oválný tvar se zvyšující se teplotou přibližoval sférickému, pravděpodobně kvůli akumulaci zásobních látek (Remias et al. 2010).

Ozářenost (FAR i UV) je dalším významným faktorem, který ovlivňuje rozvoj kryosestonních společenstev. Ve vysokohorských podmínkách dosahují dávky PAR běžně 4500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ s maximem až 6000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Gorton et al. 2001, Williams et al. 2003), naproti tomu v polárních podmínkách jsou dávky záření nižší, ca 250 - 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, avšak kontinuální (Remias et al. 2012, Stibal et al. 2007). Různá stádia životního cyklu mohou přitom využívat odlišné strategie fotoaklimatizace. Bičíkatá stádia aktivně migrují v sněhu a vyhledávají zóny s optimální ozářeností, zatímco cysty musí dynamicky měnit svůj fotosyntetický aparát s ohledem na změny v dopadajícím záření (Kvíděrová 2009).

Ch. reticulata Luční preferuje ozářenosti nad 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, jedná se o kmen adaptovaný na vyšší ozářenosti porovnání s *Ch. pichinchae* Meandry. Její původní lokalita bylo sněžné pole exponované slunečním svitem bez stinného zákrytu na Luční hoře v Krkonoších, kde v době odběru tvořila červený sníh (cysty) (sběratel Linda Nedbalová). Ozářenost v na této lokalitě může dosáhnout až 2500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Kvíděrová 2010, Nedbalová et al. 2008), adaptace na vyšší ozářenost bude rozhodující pro přežití cyst na povrchu sněhu nebo půdy. Měření fotosyntetické aktivity na Luční hoře prokázalo, že k saturaci fotosyntetické aktivity u zoospor *Chloromonas nivalis* dochází při ozářenostech 350 – 489 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Kvíděrová 2010).

Ch. pichinchae Meandry dokáže prosperovat i relativním přitímí. Její naleziště stinné sněhové pole leží pod smrky v údolí labského meandru v Krkonoších, kde tvořila zelený sníh

(sběratel Linda Nedbalová), kde ozáření zřídka přesáhne $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ v případě zastíněné lokality v lesním porostu nebo $1500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ polozastíněné lokality (Nedbalová et al. 2008). Využití nízkých ozáření může tak představovat kompetiční výhodu oproti jiným druhům fototrofních mikroorganismů.

Zjištěné hodnoty optimální ozáření odpovídají saturačním ozářením zjištěným při

fotosyntetických měřeních. Saturační ozáření může být velmi variabilní: 106 až 489 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ u *Chloromonas nivalis* (Kvíderová 2010), 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ u *Chloromonas brevispina* (Kvíderová et al. 2005). U *Chlamydomonas nivalis* nebyla pozorována fotoinhibice ani při ozářeních značně převyšujících $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Remias et al. 2010, Williams et al. 2003). Tyto hodnoty mohou být druhově specifické, dále mohou být ovlivněny možnostmi použitých přístrojů a podmínkami v původní lokalitě. Vliv expozice svahu byl prokázán u *Chloromonas nivalis*, na jižním svahu byly saturační ozáření vyšší než na severním (Kvíderová 2010).

2) Průběh růstu – teplotní experimenty

Od počáteční koncentrace $c=10^4 \text{ b}\cdot\text{ml}^{-1}$ do stacionární fáze kultury uběhlo u všech kmenů 30 – 70 dnů. Během této doby jsem koncentraci buněk a následně průběh růstu počítala pomocí Burkerova počítacího sklíčka. Tato metoda je dosti nepřesná a orientační. U většiny kmenů se objevovaly extracelulární produkty, které držely buňky ve shlucích a tvořily tak biofilm nebo jen volně plovoucí shluky, faktor chyby v těchto případech je vysoký. Pro tyto případy je odhad fáze ukončení růstu a počátek stacionární fáze orientační. Vliv na FA by však měl být malý.

Po nasazení kultury se objevily buňky připravené na rychlé rozmnožování, bičíkovci, gamety, v zásadě menší buňky než ostatní. Okem byl pozorován tenký zelený pruh na okrajích baňky ve výšce hladiny, tvořený pohyblivými buňkami- bičíkovci. Na dně se objevil sytě zelený kal, tam se vyskytla ostatní vývojová stádia. Některé kmeny tvořily biofilm, který se pro promíchání baňek trhal a tvořil jakési vločky, což jsou shluky buněk pospojované mezibuněčnou hmotou. Dále se rychlost růstu zpomalovala, živin ubývalo, biomasa přibývala a sediment houstl. Buňky investovali do ukládání zásob spíše než do rozmnožování, bičíkatá stádia si již téměř nevyskytovala. To byl vhodný čas pro sklizeň, od zahájení kultivace uběhlo 6 týdnů až 3 měsíce.

Pěstováním v kultivátorech nastavených na konkrétní teplotu jsem si ověřila teplotní

limity všech kmenů a odlišila psychrofilní kmeny od psychrotrofních. Žádný ze psychrofilních kmenů ze sbírky CCCryo nepřežil ve 22°C. Také se mi v této teplotě nepodařilo kultivovat přírodní kmen *Ch. pichincha* meandry. I přes to jejich psychrofilní charakter nemohou určit (jako v případě zkřížených gradientů), jelikož se v kultuře ve 22°C objevovala kontaminace (*stichococcus* a bakterie). Je otázka, zdali kmen sněžných řas z labských meandrů nerostl v této teplotě právě kvůli tomuto faktoru nebo byl inhibován vlivem jiného druhu. Všechny ostatní kmeny včetně *Ch. reticulata* Luční a kmeny ze sbírek UTEX *Ch. chenangoensis* a *Ch. tughillensis* vykazovaly vitalitu v této teplotě. Hoham et al., (2008) testoval šest kmenů *Ch. tughillensis*, a jeden kmen *Ch. chenangoensis*. Kmeny byly testovány při teplotě 2,5 – 20°C. *Chloromonas tughillensis* rostla od 2,5 – 10°C a optimálně 2.5°C do 5°C *Ch. chenangoensis* rostla 2.5 do 7.5°C a optimum měla od 2.5 do 5°C. *Chloromonas tughillensis* and *Ch. chenangoensis* náleží do genetického „subkládu“ s nízkým teplotním optimem (Hoham et al., 2008). V mých pokusech oba kmeny vykazovaly vitalitu a dokázaly se množit i v 15°C a také úspěšně přečkaly teplotu 22°C. Konkrétně *Chloromonas chenangoensis* UTEX, B SNO 147 a *Chloromonas tughillensis* UTEX, 91 se vymykali od svého kládu schopností přežít i v teplotě 22°C. Pravděpodobnější je možnost, že se jednalo o kontaminaci. Dle fotografií a průběžného sledování, jsem nenacházela žádné změny v morfologii, která by naznačovala kontaminaci. Pro oba druhy byl jejich typický tvar odlišný od ostatních kmenů pěstovaných na katedře ekologie PŘ UK, proto případného kontaminanta nedokáži určit. Oba údajně psychrofilní kmeny se také od sebe navzájem morfologicky nelišily, buňky vejčitého tvaru avšak více protáhlé buňky s viditelnými od sebe výrazně oddělenými chloroplasty. V teplotách 15°C a výše byly nejčastěji ve stádiu spor s cca 20-30 dceřinými buňkami (*Ch. chenangoensis*) A 4-8 dceřiných buňek (*Ch. tughillensis*), mohlo se jednat pouze o jinou fázi životního cyklu. I analýza jejich mastných kyselin měla podobné výsledky v poměru nasycených a nenasycených mastných kyselin i délky řetězců. Domnívám se, že se jedná o tentýž neznámý kmen, se kterým jsem se jinde nesešla a o jehož původu není nic známo, s určitou pravděpodobností mohl přijít se zakoupenými kulturami ze sbírky UTEX. Tomu také nahrává fakt, že zásilka s těmito kulturami (6 kmenů) absolvovala neodborný přesun do Evropy v neklimatizovaných podmínkách.

V důsledku fenotypové aklimatizace mohou mikroorganismy přežít v nepříznivých prostředích, které vyžadují fyziologické změny. Jakmile faktor prostředí překračuje fyziologické limity, přežití závisí výlučně na genetické přizpůsobení podporovaném výskytem mutací, které poskytují odolnost a následnou selekci (Sniegowski P. D., 1995).

Pro jisté určení nové adaptace je třeba komplexní výzkum zahrnující metody jako je změna ve složení membrán, spotřeba kyslíku, aktivita fotosystému II i dalších enzymů, morfologické změny nebo specifické růstové rychlosti a generační čas s čímž souvisí počet generací. Je to poměrně nízké číslo a není podpořeno doprovodným výzkumem, takže nemohu potvrdit, zdali se vyskytla adaptační odpověď. Většina studií, které byly zaměřeny na stupni tolerance k teplotě nebo jeho vlivu na úrovni ekosystémů, spíše než na individuální schopnosti adaptace. Dlouhodobé přežití fytoplanktonu za zvýšené (snížené) teploty zahrnuje komplexní kombinaci fenotypové aklimatizace, mutace a selekce (Huertas et al, 2011).

3) Mastné kyseliny

Kmen *Chloromonas reticulata* Luční (var. červený sníh) ukázal zajímavou kombinaci faktorů (světelné záření a teplotu) kde výrazně v membránách převládaly mononenasyčené mastné kyseliny. Při teplotách 3 – 8,4°C a ozáření 34 – 124 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a zároveň $t=8,4-32^\circ\text{C}$ a $E_e=423 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, výskyt MUFA tak tvořil pomyslnou diagonálu v teplotně-světelném gradientu. Vysoký obsah MUFA, tak „ohraničoval“ optimální podmínky této sněžné řasy. V teplotě 8,4°C (při všech stupních ozáření) 18-ti uhlíkaté mononenasyčené kyseliny C18:1n7 a také C18:1n9 byly vysoce zastoupené (přes 60%), což je zároveň teplota příznivého růstu. Domnívám se, že 18-uhlíkaté mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou jsou zastoupeny v této řase zastoupeny při optimálních podmínkách více než ve stresovém prostředí (kombinace faktorů) kde se zvyšuje množství nasycených a zároveň polynenasycených mastných kyselin. DBI přitom zůstává stejný.

U *Chloromonas pichincae* Meandry byly k analýze mastných kyselin vhodné pouze vzory vypěstované v teplotách 5,7°C a 8,4°C. Jedná se o malý tepelný interval bez možnosti prokázání výsledku. Ve zbývajících teplotách během pokusu nenarostlo dostatečné množství biomasy pro analýzu FA. Vliv teplotního gradientu nebylo možno dle výsledků provedeného pokusu vyhodnotit.

Kmen z labských meandrů se od všech ostatních lišil výrazným zastoupením polynenasycených mastných kyselin (PUFA), přesahující množství nasycených a mononenasyčených ve všech teplotách. Toto bylo pozorováno též u *Chloromonas brevispiny* CCCryo 091-99 v 9°C a 15°C. Také u *Chloromonas alpiny* CCCryo 089-99 v 9°C, blíže neurčení psychrofilní zelená řasa kmene Hochgurgl ve 30°C a Furka ve 22°C a 30°C. *Chlamydomonas sp.* Gossen ve všech teplotách kromě 9°C, *Chloromonas reticulata* Vent ve 30°C, *Chloromonas reticulata* Ladové ve 3°C, údajně psychrofilní sněžná řasa

Chloromonas chenangoensis UTEX, B SNO 147 v 9-22°C. Nejpodobnější profil nasycenosti FA byl u kmene pod názvem *Chloromonas tughillensis* UTEX SNO 91. S *Chloromonas pichincae* Meandry má společné zastoupení PUFA kolem 50% a hodnoty MUFA a SAFA blízké 20% ve všech měřených teplotách. Tyto dva kmeny měly z hlediska nasycenosti stejnou strukturu membrán, která je nezávislá na teplotě (teplotní pokus) a ozáření (růst na zkřížených gradientech) a pro tyto dva kmeny poskytoval stabilní skladbu mastných kyselin v membránách. Vysoký podíl PUFA (více než 75 % všech FA) poukazoval na skutečnost, jak důležité jsou to elementy pro zajištění přežití buňky *Chloromonas brevispiny* (Russel, 1984).

Přestože sněžné řasy jsou výborným modelem pro studium membránové adaptace na nízké teploty, existuje pouze malé množství údajů, dokládajících změny ve složení mastných kyselin jako faktorů regulujících fluiditu membrán. Byla zkoumána role desaturace FA při chladovém stresu u sněžné řasy *Chlamydomonas nivalis* (Morris et al., 1979). Složení mastných kyselin v buňkách *Chlamydomonas* sp. sesbíraných na ostrově Hermit v Antarktidě popsali Bidigare et al., (1993). Autoři uvádějí vyšší poměr nenasycených FA u sněžných druhů v porovnání s temperátními druhy z rodu *Chlamydomonas*. V zelených řasách byly nalezeny MK od (14:0) do (24:1) včetně PUFA C16, C18:2n-3, C22:6n-3. Velký rozdíl byl nalezen mezi zelenými a červenými buňkami. Neobvyklé krátké a středně dlouhé řetězce polynenasycených MK potenciálně zvyšujících fluiditu membrány byly izolovány ze sněžných řas *Chloromonas brevispina* sesbíraných na Šumavě (Řezanka et al., 2008).

Očekávala jsem, že bude patrný trend zvyšování DBI (dvojných vazeb) v nízkých teplotách, protože se předpokládá, že více dvojných vazeb znamená diverzifikovanější a méně kompaktnější strukturu lipidické membrány. Následkem by byla větší fluidita membrány a tím i rychlejší metabolismus v nízkých teplotách, kde se rychlosti metabolických dějů zpomalují (Dolhi J et al, 2013, Chintalapati a kol. 2004; D'Amico a kol. 2002 ; Hughes a Dunn 1996). Tato hypotéza se v mých experimentech nepotvrdila. DBI index není pro teplotní adaptaci významným faktorem.

Obsah satureovaných mastných kyselin (SAFA), je u kmenů pěstovaných na zkřížených gradientech, *Chloromonas reticulata* Luční a *Chloromonas pichincae* Meandry, významným prvkem. U *Chloromonas reticulata* Luční reagoval na teplotní gradient hlavně při nízké ozáření 34 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Zvyšoval se z 20% na hodnotu blízkou 50%. u *Chloromonas pichincae* Meandry bylo zastoupení SAFA, MUFA a PUFA v poměru blízkém 1:1:1. Jiná situace byla v teplotních experimentech, kde u všech kmenů (včetně těch z meandrů Labe a

Luční hory) SAFA většinou nepřesáhla 20% ze všech mastných kyselin. Je zajímavé, že i přes větší výkyvy poměru MUFA a PUFA (10-90%) byl DBI u většiny kmenů zachován na stejné hodnotě. To by mohlo být vysvětleno shodným nárůstem SAFA a PUFA při poklesu MUFA a opačně.

Mononenasyčené mastné kyseliny převažovaly v nízkých teplotách (3°C a 9°C) u některých psychrotrofních i psychrofilních řas. Se zvyšující se teplotou jejich množství mělo klesající tendenci. Tuto skutečnost podporoval vzrůstající trend polynenasycených mastných kyselin (PUFA), které ve vysokých teplotách 15°C a více u psychrotrofů a nad 9°C u psychrofilů dominovaly. Toto platí pro kmeny *Chloromonas reticulata* KS4, *Chloromonas reticulata* Vent, *Chloromonas pichinchae* Meandry, *Chloromonas* sp. Abisco, Chlorophyta g. sp. Furka, Chlorophyta g. sp. Hochgurgl, *Chloromonas* sp. CCCryo 044-99, *Chloromonas alpina* CCCryo 089-99, *Chloromonas brevispina* CCCryo 091-99, *Chlamydomonas raudensis* CCCryo 125-100. U antarktické řasy naviculy UMACC 231 procentuální zastoupení nenasycených mastných kyselin také nepřinesly konzistentní trend vzhledem ke kultivační teplotě (Teoh 2004).

Řasy fixují vzdušný CO₂ pomocí sluneční energie za vzniku glukosy. Sacharidy jsou dále štěpeny na acetyl-CoA, který slouží pro syntézu mastných kyselin v chloroplastech. Mastné kyseliny jsou stavebními kameny drtivé většiny lipidů, včetně triacylglycerolů. Acetyl 11 CoA karboxylasa produkuje malonyl-CoA, základní prekurzor používaný při biosyntéze mastných kyselin. 16- nebo 18-uhlíkaté mastné kyseliny jsou tvořeny opakující se sérií reakcí, při které je prodlužován uhlíkatý řetězec o dva atomy uhlíku. Řetězová reakce je ukončena působením acyl-AKT thioesterasy. Specificita tohoto enzymu obvykle určuje konečnou délku řetězce mastné kyseliny. Vzniklé mastné kyseliny mohou být dalšími enzymatickými reakcemi buď prodlouženy, nebo desaturovány, nebo mohou probíhat obě dvě reakce (Řezanka. 2012).

Krátké řetězce mastných kyselin C₁₄ se vyskytují u psychrotrofních kryosestonních řas ve stopovém množství kolem 1%. U 5 psychrofilních řas zesbírek CCCryo (vyjma *Ch. brevispina*) se obsah C₁₄ pohybuje kolem 3-5% nezávisle na teplotě. Jde tedy o jednu z adaptací „pravých“ psychrofilů. Mastné kyseliny s 16 uhlíky v řetězci se objevují nejhojněji v nejnižší měřené teplotě 3°C u řas (*Chloromonas* sp. CCCryo 044-99, *Chloromonas alpina* CCCryo 089-99, *Chloromonas chenangoensis* UTEX B SNO 147, *Chloromonas reticulata* Ladové) 30-40%. Naopak nejvyšší procento zastoupení C₁₆ ve 30°C u řas (*Chloromonas reticulata* KS4 – zároveň i ve 3°C, Chlorophyta g. sp. Hochgurgl, *Chloromonas reticulata*

Vent). Žádný z kmenů neobsahoval největší procento výskytu C16 v teplotách svého optima růstu. *Chlamydomonas sp.* Gossen je kmen, který obsahuje nejvíce C16 FA oproti ostatním kmenům. *Chloromonas sp.* KSŽZ obsahovala C16 na vysoké úrovni (~35%) ve všech teplotách. Nejhojnější je v nasycené formě C16:0. Řezanka, Nedbalová et al (2014) zkoumali triacylglyceroly, které obsahují 16:3 a 16:4 kyseliny v molekule. Došli k závěru, že rod *Chloromonas* je významným producentem C16 PUFA většinou obsažené v TAG. Mastné kyseliny C18 jsou nejrozsáhlejší skupinou mastných kyselin v mých zkoumaných zelených řasách jak množstvím (>60%, také až 90%), tak typy. C18 se vyskytují ve formě C18:0, C18:1n9, C18:1n7, C18:2n6, C18:3n6 a C18:3n3. Množství C18 se u všech vzorků běžně pohybovalo nad 60% výskytu. Právě C18 jsou nejčastějšími mononenasyčenými mastnými kyselinami. Jej obsah přeshoval i 85% hranici (*Chloromonas reticulata* Luční, *Chloromonas reticulata* KS4, *Chloromonas reticulata* Vent 3°C, *Chloromonas pichincha* Meandry 22°C). Častý výskyt je 60-80%. C20 je zastoupena u psychrotolerantů cca 1% u psychrofilních kmenů zaujímá 2-5%. Trend zkracování délky řetězců mastných kyselin na klesající teplotě jsem nezaznamenala.

V rámci ekologického rozdělení organismů na psychrofilní a psychrotrofní (Morita 1975) jsem výrazný rozdíl v profilu mastných kyselin nezaznamenala. Dle (Dolhi, 2013, Morgan-Kisse et al. 2008) nejsou vysoce nenasycené mastné kyseliny pro fotopsychrotrofy podstatné, antarktická *Chlorella BI sp.* obsahuje hladiny nenasycených mastných kyselin, které jsou více srovnatelné s mezofilními řasami. Vysoce nenasycené mastné kyseliny v rámci fotosyntetických membrán by ale mohly být zásadní u obligátních fotoautotrofních eukaryot, jako jsou *Chlamydomonas raudensis* UWO241. (Dolhi 2013).

Biotechnologický potenciál

Řasy a sinice jsou přizpůsobené k růstu při nízkých a vysokých teplotách (psychrofilové a termofilové) a představují významnou skupinu extremofilních mikroorganismů. Mikroorganismy přizpůsobené extrémnímu chladu a teplu mají také značný potenciál v biotechnologických aplikacích. Mnoho druhů řas a sinic má schopnost produkovat značné množství TAG (např. 20 – 50 % sušiny) jako zásobní lipidy. Z toho důvodu se pozornost zaměřuje na další generaci biopaliv, např. biopaliva z řas, které jsou považovány za zdroj energie bez hlavních nevýhod spojených s 1. a 2. generací biopaliv (Řezanka 2012, Nigam a Singh 2011). Kromě toho při srovnání s konvenčními plodinami, které jsou sklízány

jednou nebo dvakrát za rok, mají řasy velmi krátký životní cyklus (v řádu dní), což umožňuje více či méně kontinuální sklizeň a značné zvýšení výnosů na čtvereční metr plochy (Schenk a kol. 2008). Vztážno na 1 m² mohou mikroskopické řasy produkovat 15–300 krát více oleje pro výrobu bionafty než tradiční plodiny. (Řezanka 2012, Hu a kol. 2008).

6 Závěr

Experimentem růstu na zkřížených gradientech a zároveň v různých teplotních podmínkách jsem stanovila teplotní optimum kmene *Chloromonas reticulata* Luční (var. červený sníh) mezi 8-20°C. Teplotní minimum je nižší než 3°C a teplotní maximum je 33°C nebo vyšší. Jedná se o psychrotrofní kmen. U kmenu *Chloromonas pichincha* Meandry je teplotní optimum blízké teplotě 9°C. Podle metody zkřížených gradientů odhaduji mezi 4 – 10°C. Maximální teplota růstu nepřesahuje 30°C. Podle těchto hodnot je *Chloromonas pichincha* psychrofilní řasa, pro ověření tohoto ekologického zařazení bude třeba provést další experimenty, především v oblasti 9 – 20°C. Obě řasy v kultivačních podmínkách potvrzují své světelné preference. Zatímco *Chloromonas reticulata* Luční, původem ze slunných plání prospívá v $423 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ prokazatelně lépe než ve $34\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Stínomilný *Chloromonas pichincha* Meandry rostl prospěšně ve všech nabídnutých ozářeních.

Změna obsahu dvojných vazeb, sledovaná pomocí indexu dvojných vazeb (DBI), nepředstavuje v teplotním gradientu významnou adaptaci. DBI u většiny testovaných kmenů, zůstával v různých teplotách na stejné hodnotě.

Prokazatelná je změna poměru mononenasyčených mastných kyselin a polynenasycených mastných kyselin. V nízkých teplotách u psychrotrofů je zastoupeno více MUFA než PUFA, a ve vysokých teplotách opačně. Přelomová teplota je u psychrotrofů mezi 9°C a 15°C, v případě psychrofilních kmenů mezi 3°C a 9°C. Sledování poměru MUFA a PUFA má přesvědčivější výsledky než index dvojných vazeb (DBI), který může mít vzestupný charakter ve zvyšujících se teplotách, avšak výsledky nejsou zcela průkazné.

Sněžné řasy obsahují vysoký podíl mastných kyselin o délce 18C, naměřené hodnoty s pohybují v řádu 50-80% ze všech zjištěných mastných kyselin. C16 jsou zastoupeny 15-35%, s tím, že větší množství se jich vyskytovalo ve 3°C nebo ve 30°C. Výskyt mastných kyselin C20 je v intervalu 1-10%. U Chlorophyta g. sp. Hochgurgl C20 dosahuje až 17%. C14 jsou napříč kmeny zastoupeny do 5%. Trend zkracování délky řetězců mastných kyselin v kultivačních podmínkách s nízkou teplotou jsem nezaznamenala.

Výrazné změny strategie složení membrán na úrovni mastných kyselin u psychrotrofních řas a pravých psychrofilů jsem nepozorovala. Profil MUFA a PUFA je obdobný. Psychrofilní kmeny v průměru obsahují více C14 než psychrotrofní, a to o dvojnásobek (2-3%). Změny se mohou odehrávat ve skladbě lipidických tříd, ty však nebyly mým sledovaným cílem.

7 Literární zdroje

- ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, (2004): Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky, český překlad: Esparo publishing, 348 – 356, 134 – 154
- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J, RAFF M., ROBERTS K., WALTER P (2008): Molecular biology of the cell, 5th edition: Biochemistry and Molecular Biology Education Volume 36, Issue 4, pages 317–318
- ANESIO, A. M., HODSON, A. J., FRITZ, A., PSENNER, R., and SATTLER, B. (2009): High microbial activity on glaciers: importance to the global carbon cycle: *Global Change Biol.* 15, 955–960
- BIGOGNO CH. (2002): Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa* the richest plant source of arachidonic acid: *Phytochemistry* 60 497–503
- BLIGHT E.G, DYER W. J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification: *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8): 911-917, 10.1139/o59-099
- BOWMAN JP, McCAMMON S, BROWN M, (1997): Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice: *Applied and Environmental Microbiology*, 63:3068 – 3078
- DOLHI J. M., DENIS P. MAXWELL & R. M. MORGAN-KISS (2013): Review: the Antarctic *Chlamydomonas raudensis*: an emerging model for cold adaptation of photosynthesis: *Extremophiles* 17:711-722
- FELLER G, GERDAY CH, (2003): Psychrophilic enzymes: Hot topic in cold adaptation: *Nature Reviews Microbiology*, 1:200 – 208
- GERDAY C, GLANDSDORFF N. (2007): *Physiology and biochemistry of extremophiles*: Asm Press, Washington, 429 p.
- GOMBOS, Z., KANERVO E., TSVETKOVA N., SAKAMOTO T., ARO E. M., MURATA N. (1997): Genetic enhancement of the ability to tolerate photoinhibition by introduction of unsaturated bonds into membrane glycerolipids: *Plant Physiol.* 115:551-559.
- HALLDAL .P. & FRENCH C. S. (1958): Algal growth in the crossed gradients of light and t

- emperature: *Physiol. Plant.* 11: 401-420
- HOHAM, R.W. & MULLET, J.E. (1978): *Chloromonas nivalis* (Chod.) Hoh. & Mull. comb. nov., and additional comments on the snow alga, *Scotiella*: *Phycologia* 17(1), 106-107
- HOHAM RW, (1992): Environmental influences on snow algal microbes: Proceedings of the 60th Annual Western Snow Conference, pp. 78 – 83
- HOHAM, R. W., BONOME, T. A., MARTIN, C. W., and LEEBENS-MACK, J. H. (2002): A combined 18S rDNA and rbcL phylogenetic analysis of *Chloromonas* and *Chlamydomonas* (Chlorophyceae, Volvocales) emphasizing snow and other coldtemperature habitats: *J. Phycol.* 38, 1051–1064.
- CHINTALATAPI S, KIRAN MD, SHIVAJI S, (2004): Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation: *Cellular and Molecular Biology*, 50:631 – 642
- J. Černý, PĚFUK, 2012/2013: PŘEDNÁŠKY BIOLOGIE BUŇKY
- KANERVO, E., TASAKA Y., MURATA N., and ARO E. M. (1997): Membrane lipid unsaturation modulates processing of the photosystem II reaction-center protein D1 at low temperatures: *Plant Physiol.* 114:841-849.
- KAINZ M, LUCOTTE M, PARRISH C.C. (2002): Methyl mercury in zooplankton—the role of size, habitat, and food quality: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59: 1606–1615
- KOMAREK J, NEDBALOVA L, (2007): Green cryosestic algae, In: Seckbach J (ed): *Algae and Cyanobacteria in Extreme Enviroments*: Springer, 321 – 342
- KVÍDEROVÁ, J., LUKAVSKÝ, J. (2001): A new unit for crossed gradients of temperature and light. In: Elster, J., Seckbach, J., Vincent, W. F. and Lhotský, O. (eds.): *Algae and extreme environments*. Cramer, Stuttgart, pp. 541-550.
- LEE J, PARK K, PARK S, PARK H, SONG Y, KANG S, KIM H, (2010): An extracellular Ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast: *Cryobiology*, 60:222 – 228
- LEYA, T., RAHN, A., LUTZ, C., and REMIAS, D. (2009): Response of arctic snow and permafrost algae to high light and nitrogen stress by changes in pigment composition and applied aspects for biotechnology: *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 432–443
- LIKEŠ, J., LAGA, J. (1978): Kriteria pro odlehlá pozorování [Criteria for outliers]. In:

- Likeš, J., Laga, J. (eds.): Základní statistické tabulky [Basic statistical tables]: SNTL, Prague, pp. 42, 182-185.
- MATSUZAKI R, NAKADA R, HARA Y, NOZAKI H, (2013): Description of *Chloromonas kasaiae* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyceae), based on comparative electron microscopy and molecular data: *Phycologia* 52(3): 239-245
- MORGAN-KISS et al., (2006): Adaptation and Acclimation of Photosynthetic Microorganisms to Permanently Cold Environments: *Microbiol Mol Biol Rev. Mar*; 70(1): 222–252
- MORGAN-KISS RM, IVANOV A, MODLA S, CYZMMEK K, HUNER NPA, PRISCU JC, HANSON TE (2008) Identity and phylogeny of a new psychrophilic eukaryotic green alga, *Chlorella* sp. strain BI isolated from a transitory pond near Bratina Island, Antarctica. *Extremophiles* 12:701–711
- NEDBALOVÁ L., LUKAVSKÝ J, (2007): Když sníh zčervená, aneb co (ne)víme o sněžných řasách: časopis Živa, str 104-107
- PRATOOMYOT J., PIYAWAN S., NOIRAKSAR T. (2005): Fatty acids composition of 10 microalgal species: *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 27:1179-1187
- Pröschold T., Marin B., Schlösser U.G., Melkonian M. (2001): Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chloromonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chloromonas Ehrenberg* and *Chloromonas Gobi*, and Description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gem. nov.: *Protist*, Vol 152: 265-300
- RAYMOND JA, JANECH MG, FRITSEN CH, (2009): Novel ice-binding proteins from a psychrophilic antarctic alga (Chlamydomonadaceae, Chlorophyceae): *Journal of Phycology*, 45:130 – 136
- REAY, D. S., NEDWELL D. B., PRIDDLE J., J. C. ELLIS-EVANS, (1999): Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake: reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria: *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2577-2584
- REMIAS D., KARSTEN U., LUETZ C., (2010): Physiological and morphological processes in the Alpine snow alga *Chloromonas nivalis* (Chlorophyceae) during cyst formation: *Protoplasma* 243, 1-4, pages 73-86
- RUSSELL, N. J. (1997): Psychrophilic bacteria-molecular adaptations of membrane lipids: *Comp. Biochem. Physiol.* 118A:489-493.

- SIDDIQUI KS, CAVICCHIOLI R, (2006): Cold-adapted enzymes: School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, The University of New South Wales, Sydney, rev. 403 – 423
- Spijkerman Elly, Alexander Wacker, Guntram Weithoff and Thomas Leya (2012):Elemental and fatty acid composition of snow algae in Arctic habitats: FRONTIERS IN MICROBIOLOGY 3, 30:380
- Subczynski W, Markowska E, Gruszecki W, Siewewiesiuk J, (1992): Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes a spil-label study: Biochimica et Biophysica Acta, 1105:97-108
- TAKEUCHI, N., ISHIDA, Y., and LI, Z. (2011): Microscopic analyses of insoluble particles in an ice core of Ürümqi Glacier No. 1: quantification of mineral and organic particles. J. Earth Sci. 22, 431–440
- Teoh M. L., Chu W. L., Marchand H., Hang S. M. (2004): Influence of culture temperature on the growth, Biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic mircoalgae: JOURNAL OF APPLIED PHYCOLOGY 16: 6, pages 421-430

www.compoundsearch.com - obrázky Fatty acids

8 Přílohy

Tab. 5: Seznam sledovaných kmenů

*nepublikovaná data - (Procházková & Nedbalová, in prep.)

Clade "SA" podle (Matsuzaki et al., 2013, 2014)

Oznaceni kladu (vývojové větve) "A1", "A2", "B", "C" vychází z práce autorů (Hoham et al, 2002)

klady "Moewusii", "Stephanosphaera", "Chloromonas augustae" byly provizorně pojmenovány podle reprezentativního taxonu podle (Pröschold et al,2001).

Poradí	Oblast	Lokalita	Rod	Nadm. výška [m.n.m.]	Sořatel	Datum sběru	Střika	Teplota	Použité názvy v textu
1.	KrátkýSvěžník	na částečně vl.	<i>Chloromonas reticulata</i>		Nedbalová		Biologie, PF UK		<i>Chloromonas reticulata</i> IS4
2.	Norway	Tromsø	<i>Chloromonas reticulata</i>		Nedbalová		Biologie, PF UK		<i>Chloromonas reticulata</i> Tromsø
3.	Čtyřlák Alpy	Vent	<i>Chloromonas reticulata</i>	2300	Nedbalová	4.3.2015	Biologie, PF UK		<i>Chloromonas reticulata</i> Vent
4.	Vysoké Tetry	Lac de l'écluse	<i>Chloromonas reticulata</i>	2057	Nedbalová	5.2.2002	Biologie, PF UK		<i>Chloromonas reticulata</i> Lac de l'écluse
5.	Křibovské	Ladní hora č. smltě	<i>Chloromonas reticulata</i>	1490	Nedbalová	6.13.2002	Biologie, PF UK		<i>Chloromonas reticulata</i> Ladní
6.	Křibovské	Meadry	<i>Chloromonas plectinifera</i> sp. nov. "SA"-clade, A2"-clade"		Nedbalová		Biologie, PF UK		<i>Chloromonas plectinifera</i> Meadry
7.	Švédsko	Ålisco	<i>Chloromonas</i> , " <i>Chloromonas augustae</i> -clade" clade "A1"		Nedbalová		Biologie, PF UK		<i>Chloromonas</i> Ålisco
8.	KrátkýSvěžník	Štětčická	<i>Chloromonas</i> sp.		Nedbalová		Biologie, PF UK		<i>Chloromonas</i> sp. KŠŽ
9.	USA, New York	Hamilton	<i>Chloromonas chloromonas</i>	590	Hoham	4.9.2000	UTEX 183021-7		<i>Chloromonas chloromonas</i> JIBA BSN2 1-7
10.	Wytekliv e GulfState Park	New York, USA	<i>Chloromonas typhlophila</i>	361	Hoham	4.15.1988	UTEX 18091		<i>Chloromonas typhlophila</i> UTEX18091
11.	Švýcarské Alpy	Grossglockner	<i>Chloromonas</i> sp. (<i>Chloromonas</i> -clade "clade" "C")	2495	Nedbalová	5.8.2002	Biologie, PF UK		<i>Chloromonas</i> sp. Grossglockner
12.	Umenské Alpy	Finkpass	<i>Chlorophyta</i> sp. (<i>Stephanosphaera</i> -clade, clade "C")	2451	Nedbalová	6.23.2005	Biologie, PF UK		<i>Chlorophyta</i> sp. Finkpass
13.	Čtyřlák Alpy	Hechtgrub	<i>Chlorophyta</i> sp., blíže neurčeno, volně přináší PCR	2200	Nedbalová	5.9.2002	Biologie, PF UK		<i>Chlorophyta</i> sp. Hechtgrub
14.	Švédsko	Rauschholmyra	<i>Chloromonas</i> sp.		Hoham at Muller	1978	CCCrp, 004-99	Tmax = -13°C T opt = -5°C	<i>Chloromonas</i> sp. Rauschholmyra CC004-99
15.	Švédsko	Lilleholcelijorden	<i>Chloromonas</i> sp.		Ley	1999	CCCrp, 044-99	Tmax = -14°C T opt = 7°C	<i>Chloromonas</i> sp. CC044-99
16.	Švédsko	Rauddjorden	<i>Chloromonas</i> sp.		Wille	1903	CCCrp, 089-99	Tmax = -9°C T opt = -3°C	<i>Chloromonas</i> sp. CC089-99
17.	Švédsko	Rauddjorden	<i>Chloromonas</i> sp.		Hoham	1979	CCCrp, 091-99	Tmax = -15°C T opt = -8°C	<i>Chloromonas</i> sp. CC091-99
18.	Švédsko	Lilleholcelijorden	<i>Chloromonas</i> sp.		Kordhövleir Paascher	1927	CCCrp, 020-99	Tmax = -9°C T opt = -5°C	<i>Chloromonas</i> sp. Lilleholcelijorden CC020-99
19.	Čiž Antarktika	Taylor Valley	<i>Chloromonas</i> sp.		DEI	1976	CCCrp, 125-00	Tmax = -17°C T opt = -7°C	<i>Chloromonas</i> sp. Taylor Valley CC0125-00

Tab.6: Morfologický charakter kmenů testovaných na zkřížených gradientech, foceno při sklizni

<i>Chloromonas reticulata</i> Luční							
Poloha na gradientu	teplota [°C]	ozáření [$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s.}^{-1}$]	Morfologie				
			trvalé b. kulaté	trvalé b. oválné	Spory (2 dceřinné b.)	Spory (4 a více dceřinných b.)	bičíkovci
A1L	3	34		10%			90%
B1L	5,7	34		99%			
C1L	8,4	34		99%			
D1L	20,7	34		85%			
E1L	32,4	34		30%		50%	20%
A3L	3	124		99%			99%
B3L	5,7	124		20%			80%
C3L	8,4	124					99%
D3L	20,7	124	95%				
E3L	32,4	124	90%				10%
A5L	3	423	10%				80%
B5L	5,7	423	30%				70%
C5L	8,4	423	80%				20%
D5L	20,7	423	97%				
E5L	32,4	423				40%	60%

<i>Chloromonas pichincha</i> Meandry							
Poloha na gradientu	teplota [°C]	ozáření [$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s.}^{-1}$]	Morfologie				
			trvalé b. kulaté	trvalé b. oválné	Spory (2 dceřinné b.)	Spory (4 a více dceřinných b.)	bičíkovci
B1M	5,7	34	99%				
C1M	8,4	34	10%				20%
B2M	5,7	70	40%	30%			70%
C2M	8,4	70		50%			30%
B3M	5,7	124	10%				50%
C3M	8,4	124		30%			70%
B4M	5,7	222	10%	80%	10%		20%
C4M	8,4	222	20%	80%			60%
B5M	5,7	423	5%	90%			
C5M	8,4	423		90%			3%

Tab.7: Tabulka průběhu růstu a morfologického tvaru sklízených buněk teplotního pokusu

Experiment	Věk	Doba	Doba	Sklizeň		Výnos		Výnos		Výnos	Výnos
				1. sklizeň	2. sklizeň	1. sklizeň	2. sklizeň	1. sklizeň	2. sklizeň		
1	1	0	24.1.2008	0.071177	0.052616	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		1	0.041922	0.041922	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		2	0.083844	0.083844	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		3	0.125766	0.125766	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		4	0.167688	0.167688	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		5	0.209610	0.209610	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		6	0.251532	0.251532	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		7	0.293454	0.293454	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		8	0.335376	0.335376	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		9	0.377298	0.377298	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2	1	0	0.041922	0.041922	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		1	0.083844	0.083844	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		2	0.125766	0.125766	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		3	0.167688	0.167688	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		4	0.209610	0.209610	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		5	0.251532	0.251532	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		6	0.293454	0.293454	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		7	0.335376	0.335376	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		8	0.377298	0.377298	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		9	0.419220	0.419220	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
3	1	0	0.041922	0.041922	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		1	0.083844	0.083844	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		2	0.125766	0.125766	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		3	0.167688	0.167688	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		4	0.209610	0.209610	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		5	0.251532	0.251532	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		6	0.293454	0.293454	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		7	0.335376	0.335376	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		8	0.377298	0.377298	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		9	0.419220	0.419220	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
4	1	0	0.041922	0.041922	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		1	0.083844	0.083844	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		2	0.125766	0.125766	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		3	0.167688	0.167688	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		4	0.209610	0.209610	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		5	0.251532	0.251532	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		6	0.293454	0.293454	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		7	0.335376	0.335376	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		8	0.377298	0.377298	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
		9	0.419220	0.419220	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tab. 8: Průběh růstu a specifická růstová rychlost v teplotním experimentu

Č. kmene	Vzorek	Kmen	Teplota [°C]	Doba kultivace [d]	Specifická rychlost růstu μ [d ⁻¹]	Doba zdvojení td [t]	Počet generací
1	1	<i>Chloromonas reticulata</i> KS4	3°C	59	0,42	1,66	35,59
	2	<i>Chloromonas reticulata</i> KS4	9°C	70	0,67	1,04	67,56
	3	<i>Chloromonas reticulata</i> KS4	15°C	52	0,37	1,87	27,82
	4	<i>Chloromonas reticulata</i> KS4	22°C	37	0,39	1,78	20,80
2	5	<i>Chloromonas reticulata</i> Tromso	3°C	59	0,51	1,37	43,08
	6	<i>Chloromonas reticulata</i> Tromso	9°C	70	0,65	1,07	65,19
	7	<i>Chloromonas reticulata</i> Tromso	15°C	50	0,48	1,43	34,90
	8	<i>Chloromonas reticulata</i> Tromso	22°C	37	0,36	1,95	18,98
	9	<i>Chloromonas reticulata</i> Tromso	30°C		-	-	-
3	10	<i>Chloromonas reticulata</i> Vent	3°C	59	0,44	1,59	37,18
	11	<i>Chloromonas reticulata</i> Vent	9°C	70	0,46	1,51	46,34
	12	<i>Chloromonas reticulata</i> Vent	15°C	50	0,49	1,42	35,17
	13	<i>Chloromonas reticulata</i> Vent	22°C	37	0,59	-	-
	14	<i>Chloromonas reticulata</i> Vent	30°C	54	0,61	1,14	47,35
4	15	<i>Chloromonas reticulata</i> Ladové	3°C	59	0,55	1,27	46,48
	16	<i>Chloromonas reticulata</i> Ladové	9°C	70	0,63	1,10	63,72
	17	<i>Chloromonas reticulata</i> Ladové	15°C	50	0,39	1,78	28,11
	18	<i>Chloromonas reticulata</i> Ladové	22°C	37	0,37	1,87	19,75
5	19	<i>Chloromonas reticulata</i> Luční	3°C	59	0,49	1,42	41,54
	20	<i>Chloromonas reticulata</i> Luční	9°C	51	0,53	1,31	38,93
	21	<i>Chloromonas reticulata</i> Luční	15°C	45	0,68	1,01	44,40
	22	<i>Chloromonas reticulata</i> Luční	22°C	37	0,43	1,63	22,73
6	23	<i>Chloromonas pichincae</i> Meandry	3°C	59	0,23	3,05	19,36
	24	<i>Chloromonas pichincae</i> Meandry	9°C	51	0,60	1,16	44,09
	25	<i>Chloromonas pichincae</i> Meandry	15°C	50	0,42	1,65	30,33
7	26	<i>Chloromonas</i> sp. Abisco	3°C	59	0,36	1,95	30,29
	27	<i>Chloromonas</i> sp. Abisco	9°C	57	0,57	1,21	47,13
	28	<i>Chloromonas</i> sp. Abisco	15°C	50	0,42	1,67	29,96
	29	<i>Chloromonas</i> sp. Abisco	22°C	37	0,37	1,89	19,61
	30	<i>Chloromonas</i> sp. Abisco	30°C	54	0,37	1,88	28,66
8	31	<i>Chloromonas</i> sp. KSŽŽ	3°C	59	0,47	1,47	40,20
	32	<i>Chloromonas</i> sp. KSŽŽ	9°C	70	0,48	1,44	48,49
	33	<i>Chloromonas</i> sp. KSŽŽ	15°C	50	0,58	1,20	41,81
	34	<i>Chloromonas</i> sp. KSŽŽ	22°C	50	0,52	1,33	37,49
9	35	<i>Chloromonas chenangoensis</i> UTEX B SNO 147	3°C	65	0,42	1,63	33,21
	36	<i>Chloromonas chenangoensis</i> UTEX B SNO 147	9°C	59	0,46	1,66	39,13
	37	<i>Chloromonas chenangoensis</i> UTEX B SNO 147	15°C	50	0,49	2,72	21,72
	38	<i>Chloromonas chenangoensis</i> UTEX B SNO 147	22°C	45	0,43	1,40	35,64
10	39	<i>Chloromonas tughillensis</i> UTEX 91	3°C	59	0,29	2,36	19,04
	40	<i>Chloromonas tughillensis</i> UTEX 91	9°C	50	0,22	3,19	18,48
	41	<i>Chloromonas tughillensis</i> UTEX 91	15°C	50	0,38	1,83	27,29
	42	<i>Chloromonas tughillensis</i> UTEX 91	22°C	48	0,29	2,41	20,73
11	43	<i>Chlamydomonas</i> sp. Gossen	3°C	70	0,26	2,63	18,22
	44	<i>Chlamydomonas</i> sp. Gossen	9°C	66	0,51	1,35	52,01
	45	<i>Chlamydomonas</i> sp. Gossen	15°C	50	0,42	1,64	40,33
	46	<i>Chlamydomonas</i> sp. Gossen	22°C	50	0,36	1,91	26,25
	47	<i>Chlamydomonas</i> sp. Gossen	30°C	54	0,35	1,97	25,36
12	48	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Furka	3°C	59	0,36	1,94	27,86
	49	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Furka	9°C	70	0,41	1,70	34,71
	50	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Furka	15°C	50	0,47	1,48	47,21
	51	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Furka	22°C	37	0,50	1,38	36,22
	52	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Furka	30°C	54	0,44	1,59	23,28
13	53	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Hochgurgl	3°C	59	0,49	1,41	38,39
	54	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Hochgurgl	9°C	70	0,45	1,55	38,04
	55	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Hochgurgl	15°C	50	0,53	1,30	53,71
	56	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Hochgurgl	22°C	70	0,29	2,43	20,58
	57	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Hochgurgl	30°C	59	0,38	1,85	37,92
14	58	<i>Chloromonas nivalis</i> CCCryo 004-99	3°C	60	0,36	1,92	31,19
	59	<i>Chloromonas nivalis</i> CCCryo 004-99	9°C	45	0,50	1,38	32,61
	60	<i>Chloromonas nivalis</i> CCCryo 004-99	15°C	50	0,58	1,19	41,88
15	61	<i>Chloromonas</i> sp. CCCryo, 044-99	3°C	60	0,40	1,72	34,83
	62	<i>Chloromonas</i> sp. CCCryo 044-99	9°C	45	0,67	1,04	43,46
	63	<i>Chloromonas</i> sp. CCCryo 044-99	15°C	50	0,63	1,11	45,11
16	64	<i>Chloromonas alpina</i> CCCryo 089-99	3°C	60	0,41	1,69	35,44
	65	<i>Chloromonas alpina</i> CCCryo 089-99	9°C	50	0,64	1,09	45,95
	66	<i>Chloromonas alpina</i> CCCryo 089-99	15°C	52	0,52	1,34	38,88
17	67	<i>Chloromonas brevispina</i> CCCryo 091-99	3°C	60	0,36	1,94	30,92
	68	<i>Chloromonas brevispina</i> CCCryo 091-99	9°C	59	0,66	1,05	56,03
	69	<i>Chloromonas brevispina</i> CCCryo 091-99	15°C	50	0,47	1,49	33,61
18	70	<i>Chlamydomonas platystigma</i> CCCryo 020-99	3°C	60	0,36	1,95	30,77
	71	<i>Chlamydomonas platystigma</i> CCCryo 020-99	9°C	45	0,54	1,28	35,06
	72	<i>Chlamydomonas platystigma</i> CCCryo 020-99	15°C	50	0,60	1,16	43,23
19	73	<i>Chlamydomonas raudensis</i> CCCryo 125-100	3°C	60	0,34	2,05	29,29
	74	<i>Chlamydomonas raudensis</i> CCCryo 125-100	9°C	45	0,45	1,55	29,01
	75	<i>Chlamydomonas raudensis</i> CCCryo 125-100	15°C	50	0,48	1,44	34,76

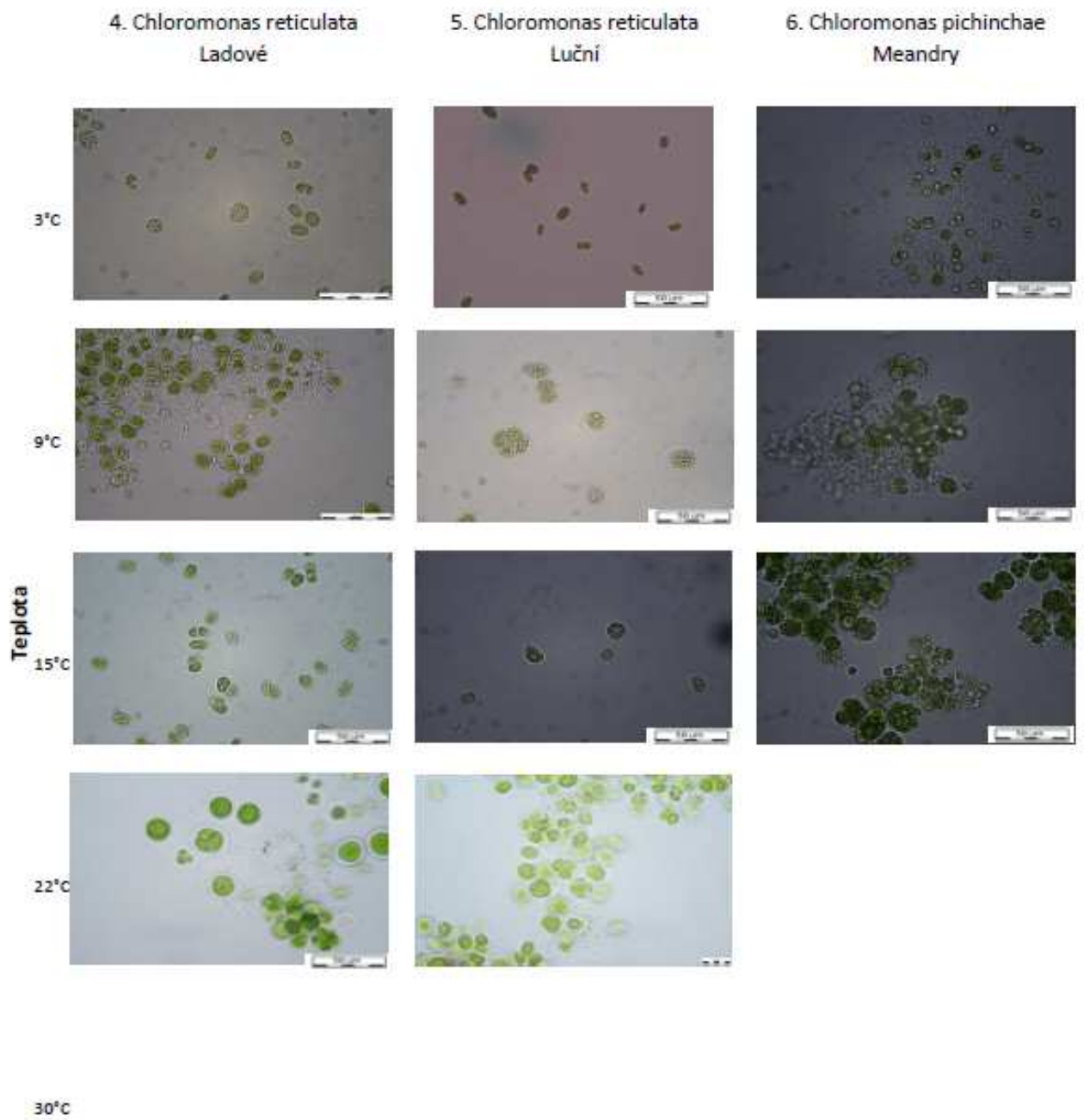
Tab.9: Morfologický charakter sledovaných kmenů, foceno v době sklizně

Č. kmene	Vzorek	Kmen	Teplota [°C]	Doba kultivace [d]	Specifická rychlost růstu μ [d ⁻¹]	Doba zrajejší td [q]	Počet generací	Morfologie					poznámky	
								trvalé b. kulaté	trvalé b. oválné	Spory (Zkrcenné b)	Spory (4 a více dceřinných b.)	bičkovci		
1	1	<i>Chloromonas reticulata</i> KS4	3°C	59	0,418167466	1,657582757	35,59399961		15%		20%	65%	ze spor se přímo pod mikroskopem lihnou bičkovci během 1 minuty	
	2	<i>Chloromonas reticulata</i> KS4	9°C	70	0,668995554	1,036101326	67,56099974	20%		30%	25%	5%		
	3	<i>Chloromonas reticulata</i> KS4	15°C	52	0,370768396	1,869488307	27,81509775			73%	15%	5%		
	4	<i>Chloromonas reticulata</i> KS4	22°C	37	0,389646683	1,778912053	20,79922947	10%		80%	6%	2%		
	5	<i>Chloromonas reticulata</i> Tromso	3°C	59	0,506157451	1,369429967	43,08361978		99%					tvoří shluky
	6	<i>Chloromonas reticulata</i> Tromso	9°C	70	0,645556675	1,073720105	65,19389892		70%			30%		
	7	<i>Chloromonas reticulata</i> Tromso	15°C	50	0,483808624	1,432688765	34,89941515			70%	15%	15%		
	8	<i>Chloromonas reticulata</i> Tromso	22°C	37	0,355501581	1,949772425	18,97657363	77%		20%		3%		
	9	<i>Chloromonas reticulata</i> Tromso	30°C		-	-	-	85%			5%	15%		
3	10	<i>Chloromonas reticulata</i> Vent	3°C	59	0,436811563	1,586833408	37,18096664				15%		malé kulaté b	
	11	<i>Chloromonas reticulata</i> Vent	9°C	70	0,458911475	1,510415883	46,34485162	90%	7%			3%		
	12	<i>Chloromonas reticulata</i> Vent	15°C	50	0,48755363	1,421683971	35,16956602	80%				20%		
	13	<i>Chloromonas reticulata</i> Vent	22°C	37	0,58527196	-	-	49%			50%	1%		
	14	<i>Chloromonas reticulata</i> Vent	30°C	54	0,607725976	1,140558751	47,34521562	95%				4%		malinkaté b
	15	<i>Chloromonas reticulata</i> Ladavé	3°C	59	0,546019303	1,26945545	46,47602113		90%			10%		
4	16	<i>Chloromonas reticulata</i> Ladavé	9°C	70	0,630924786	1,098620938	63,7162442			20%	40%	40%		
	17	<i>Chloromonas reticulata</i> Ladavé	15°C	50	0,389646683	1,778912053	28,10706685	50%		40%	10%	40%		
	18	<i>Chloromonas reticulata</i> Ladavé	22°C	37	0,369998473	1,873378488	19,75041362	95%		2%		3%		
	19	<i>Chloromonas reticulata</i> Lužní	3°C	59	0,487987732	1,420419276	41,53703135							
	20	<i>Chloromonas reticulata</i> Lužní	9°C	51	0,529081123	1,310096223	38,92848391							
	21	<i>Chloromonas reticulata</i> Lužní	15°C	45	0,683935412	1,01346977	44,40196032							
22	22	<i>Chloromonas pichlicheae</i> Meandry	22°C	37	0,425061143	1,627636596	22,73234706	25%	25%	15%	35%			
	23	<i>Chloromonas pichlicheae</i> Meandry	3°C	59	0,2748186	1,047047349	19,36303016							
	24	<i>Chloromonas pichlicheae</i> Meandry	9°C	51	0,599253166	1,156680504	44,09151809			10%				
25	25	<i>Chloromonas pichlicheae</i> Meandry	15°C	50	0,420461613	1,648538556	30,3298942		50%		40%			
	26	<i>Chloromonas</i> sp. Abisko	3°C	59	0,355801655	1,948128041	30,28548368							
	27	<i>Chloromonas</i> sp. Abisko	9°C	57	0,573173903	1,209313921	47,13416344	95%					biofilm	
28	28	<i>Chloromonas</i> sp. Abisko	15°C	50	0,415325429	1,668925455	29,95939684		50%	50%				
	29	<i>Chloromonas</i> sp. Abisko	22°C	37	0,367325746	1,887009522	19,6077442	99%						
	30	<i>Chloromonas</i> sp. Abisko	30°C	54	0,367835018	1,884396936	28,65638283	90%				10%		
8	31	<i>Chloromonas</i> sp. KSZ2	3°C	59	0,472330276	1,467505295	40,20428423				20%	60%	ze spor se přímo pod mikroskopem lihnou bičkovci během 1 minuty shluky	
	32	<i>Chloromonas</i> sp. KSZ2	9°C	70	0,48014113	1,443632168	48,48880592	80%		5%	15%	10%		
	33	<i>Chloromonas</i> sp. KSZ2	15°C	50	0,579653368	1,195796003	41,81315196	10%		60%	20%	10%		
	34	<i>Chloromonas</i> sp. KSZ2	22°C	50	0,519689226	1,333772465	37,48765348	70%	20%	5%	5%	10%		
	35	<i>Chloromonas chenangoensis</i> UTEX B SNO 147	3°C	65	0,417275651	1,626124813	33,20778304	99%						
9	36	<i>Chloromonas chenangoensis</i> UTEX B SNO 147	9°C	59	0,460963974	1,661125395	39,13008931	85%		3%	2%	10%		
	37	<i>Chloromonas chenangoensis</i> UTEX B SNO 147	15°C	50	0,494069319	2,716685958	21,71763719	10%	10%	5%	70%	5%		
10	38	<i>Chloromonas chenangoensis</i> UTEX B SNO 147	22°C	45	0,434958514	1,402935083	35,63956781					3%	mnoho mrtvých b (30%), biofilm, bičkovci malí kulati zbarvení dohnědá	
	39	<i>Chloromonas fughillensis</i> UTEX 91	3°C	59	0,293344114	2,362914907	19,04427589							
	40	<i>Chloromonas fughillensis</i> UTEX 91	9°C	50	0,217088366	3,192926428	18,47834622		50%			50%		
	41	<i>Chloromonas fughillensis</i> UTEX 91	15°C	50	0,378387867	1,83184304	27,29491496							
	42	<i>Chloromonas fughillensis</i> UTEX 91	22°C	48	0,287424257	2,415596211	20,73315581		20%		79%	1%		
	43	<i>Chlamydomonas</i> sp. Gossen	3°C	70	0,263105877	2,634488035	18,21991413							
	44	<i>Chlamydomonas</i> sp. Gossen	9°C	66	0,51499984	1,345917273	52,0091401							
	45	<i>Chlamydomonas</i> sp. Gossen	15°C	50	0,423586457	1,636377107	40,3380013							
	46	<i>Chlamydomonas</i> sp. Gossen	22°C	50	0,363844663	1,905063483	26,2484454				3%			
	47	<i>Chlamydomonas</i> sp. Gossen	30°C	54	0,351568669	1,971584051	25,36031876				53%	2%		
12	48	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Furka	3°C	59	0,3575509	1,938597218	27,85519318				3%	10%		
	49	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Furka	9°C	70	0,407728528	1,700021298	34,70544756					5%		
	50	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Furka	15°C	50	0,467468377	1,482768063	47,20900169			30%		10%		
	51	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Furka	22°C	37	0,502071349	1,380575055	36,21679229	99%						
	52	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Furka	30°C	54	0,436193288	1,589060781	23,28419432				80%	20%		
	53	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Hochgurgl	3°C	59	0,492795616	1,406561176	38,39150471	99%						
13	54	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Hochgurgl	9°C	70	0,446897799	1,551019454	38,03949708			95%		2%	často prázdné b. stěny	
	55	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Hochgurgl	15°C	50	0,531867375	1,303233124	53,71256971	95%	5%					
	56	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Hochgurgl	22°C	70	0,285319998	2,429367674	20,58148733	99%				1%		
	57	<i>Chlorophyta</i> g. sp. Hochgurgl	30°C	59	0,375473025	1,846063857	37,91851497	5%	15%		2%	80%		
14	58	<i>Chloromonas nivalis</i> CCCryo 004-99	3°C	60	0,360264421	1,923984975	31,18527471	90%					malé b v biofilmu	
	59	<i>Chloromonas nivalis</i> CCCryo 004-99	9°C	45	0,502244262	1,380099749	32,6063388							
	60	<i>Chloromonas nivalis</i> CCCryo 004-99	15°C	50	0,580514549	1,194022065	41,87527306	60%		40%				
15	61	<i>Chloromonas</i> sp. CCCryo 044-99	3°C	60	0,402372949	1,722648558	34,8300875		85%				syté zelené poločedě rozpadající se b	
	62	<i>Chloromonas</i> sp. CCCryo 044-99	9°C	45	0,669356665	1,03554236	43,45548937	90%			5%	1%		
	63	<i>Chloromonas</i> sp. CCCryo 044-99	15°C	50	0,625420797	1,108289306	45,11457408	98%						
16	64	<i>Chloromonas alpina</i> CCCryo 089-99	3°C	60	0,409416262	1,693013307	35,43976869	70%	30%				40% prázdné b. stěny	
	65	<i>Chloromonas alpina</i> CCCryo 089-99	9°C	50	0,636949209	1,08822991	45,94617325	60%						
	66	<i>Chloromonas alpina</i> CCCryo 089-99	15°C	52	0,518283109	1,33739103	38,88167247	99%						
17	67	<i>Chloromonas brevispina</i> CCCryo 091-99	3°C	60	0,35715777	1,940731067	30,91618464	5%	85%			10%	pod mikroskopem právě se lihnoucí bičkovci, hrdě kulati, omezená polybičkovci ve sliz	
	68	<i>Chloromonas brevispina</i> CCCryo 091-99	9°C	59	0,6581974	1,053099238	56,0251094		10%	50%	28%	2%		
	69	<i>Chloromonas brevispina</i> CCCryo 091-99	15°C	50	0,465921807	1,48768993	33,60915403	99%						
18	70	<i>Chlamydomonas platystigma</i> CCCryo 020-99	3°C	60	0,355495732	1,949804505	30,77231581	3%	85%			10%	bakterie 50% velice malé b. Bakterie, kulaté b 5% velké, ostatní 5x menší	
	71	<i>Chlamydomonas platystigma</i> CCCryo 020-99	9°C	45	0,540071996	1,283434775	35,06216357	95%						
	72	<i>Chlamydomonas platystigma</i> CCCryo 020-99	15°C	50	0,599253166	1,156680504	43,22697852	99%						
19	73	<i>Chlamydomonas roudensis</i> CCCryo 125-100	3°C	60	0,338360848	2,04854282	29,28909105	20%	80%				kulaté veikA, ostatní 5x menší	
	74	<i>Chlamydomonas roudensis</i> CCCryo 125-100	9°C	45	0,446815853	1,551303911	29,0078557							
75	<i>Chlamydomonas roudensis</i> CCCryo 125-100	15°C	50	0,481916431	1,438314065	34,76292224				20%	80%			

Tab.10: Profil mastných kyselin u kmenů v teplotním experimentu

Č. kmene	Vzorek	Kmen	Teplota [°C]	Lipidy sušiny [%]	Nasycenost FA				dvajných vazeb DBI	Délka řetězce			
					SAFA [%]	MUFA [%]	PUFA [%]	UFA [%]		C14	C16	C18	C20
1	1	Chloromonas reticulata KS4	3	27,94	11,21	1,63	59,35	60,98	1,79	0,26	32,70	66,97	0,06
	2	Chloromonas reticulata KS4	9	26,86	5,32	62,07	22,64	84,71	1,30	0,10	11,49	88,37	0,04
	3	Chloromonas reticulata KS4	15	1,26	11,52	2,36	61,49	63,85	1,85	0,33	32,56	66,83	0,28
	4	Chloromonas reticulata KS4	22	25,77	5,86	50,39	33,24	83,63	1,48	0,13	13,82	86,00	0,05
2	5	Chloromonas reticulata Tromso	3	20,19	10,26	2,01	59,98	61,99	1,78	0,37	33,32	66,12	0,19
	6	Chloromonas reticulata Tromso	9	21,28	4,87	61,41	25,25	86,67	1,37	0,21	11,46	88,26	0,07
	7	Chloromonas reticulata Tromso	15	9,35	5,78	47,25	33,50	80,75	1,45	0,39	17,75	80,63	1,23
	8	Chloromonas reticulata Tromso	22	63,86	4,14	68,88	15,47	84,35	1,11	0,50	14,62	84,68	0,20
	9	Chloromonas reticulata Tromso	30	-	2,87	19,04	47,64	66,68	1,65	0,43	37,87	53,87	3,41
3	10	Chloromonas reticulata Vent	3	28,34	4,72	69,68	18,86	88,54	1,25	0,09	9,79	90,08	0,04
	11	Chloromonas reticulata Vent	9	19,43	4,23	30,45	49,12	79,57	1,69	0,26	27,07	72,61	0,06
	12	Chloromonas reticulata Vent	15	30,58	6,77	42,81	37,15	79,97	1,48	0,35	18,54	80,02	1,09
	13	Chloromonas reticulata Vent	22	59,72	11,42	46,18	27,22	73,40	1,14	0,71	19,36	79,45	0,47
	14	Chloromonas reticulata Vent	30	-	2,61	10,86	63,19	74,05	1,58	0,82	41,92	56,13	0,11
4	15	Chloromonas reticulata Ladové	3	4,55	14,67	0,70	58,20	58,90	1,76	0,18	31,97	67,76	0,10
	16	Chloromonas reticulata Ladové	9	24,68	5,63	55,17	27,23	82,40	1,37	0,36	14,36	83,96	1,33
	17	Chloromonas reticulata Ladové	15	13,29	9,48	31,35	43,93	75,28	1,63	0,27	19,81	79,51	0,41
	18	Chloromonas reticulata Ladové	22	40,17	9,34	36,88	37,50	74,39	1,43	0,66	22,41	76,47	0,46
5	19	Chloromonas reticulata Luční	3	7,87	10,18	42,46	34,19	76,65	1,43	0,19	16,71	83,03	0,07
	20	Chloromonas reticulata Luční	9	18,26	6,72	53,69	29,01	82,70	1,40	0,13	13,27	86,46	0,14
	21	Chloromonas reticulata Luční	15	16,93	8,03	33,31	43,74	77,05	1,65	0,15	18,93	80,82	0,09
	22	Chloromonas reticulata Luční	22	74,37	6,86	46,75	35,43	82,18	1,51	0,14	13,92	85,89	0,05
6	23	Chloromonas pichincae Meandry	3	13,36	14,21	13,80	49,60	63,39	1,59	0,96	28,71	67,97	2,35
	24	Chloromonas pichincae Meandry	9	5,99	14,56	16,76	47,28	64,04	1,54	0,42	27,45	67,68	4,44
	25	Chloromonas pichincae Meandry	15	7,60	18,05	15,03	49,08	64,11	1,58	0,40	24,17	69,50	5,93
7	26	Chloromonas sp. Abisco	3	-	13,60	25,80	36,80	62,60	1,15	1,40	44,41	52,44	0,48
	27	Chloromonas sp. Abisco	9	12,11	4,98	30,66	39,84	70,50	1,40	1,65	27,51	59,05	11,79
	28	Chloromonas sp. Abisco	15	3,64	13,49	35,06	32,61	67,66	1,34	1,50	22,97	62,86	12,67
	29	Chloromonas sp. Abisco	22	15,63	8,29	19,60	52,02	71,62	1,53	1,27	26,52	63,66	8,55
	30	Chloromonas sp. Abisco	30	-	5,54	21,83	41,21	63,04	1,42	0,55	35,45	58,19	2,20
8	31	Chloromonas sp. KSZZ	3	-	0,89	13,54	41,44	54,98	1,24	0,23	31,34	66,30	2,13
	32	Chloromonas sp. KSZZ	9	34,21	7,26	28,94	35,98	64,92	1,25	0,26	33,49	64,14	2,12
	33	Chloromonas sp. KSZZ	15	30,81	6,02	27,48	36,51	63,99	1,34	2,80	25,41	70,01	1,78
	34	Chloromonas sp. KSZZ	22	17,93	12,69	26,11	40,71	66,82	1,47	0,38	26,94	68,83	3,85
9	35	Chloromonas chenangoensis UTEX, B SNO 147	3	28,80	2,78	38,36	12,20	50,56	0,71	0,46	47,89	50,91	0,74
	36	Chloromonas chenangoensis UTEX, B SNO 147	9	6,56	12,92	22,25	41,95	64,19	1,38	0,42	30,07	66,37	3,13
	37	Chloromonas chenangoensis UTEX, B SNO 147	15	12,74	11,29	23,01	42,46	65,47	1,41	0,49	29,25	63,58	6,69
	38	Chloromonas chenangoensis UTEX, B SNO 147	22	21,18	9,61	21,96	39,95	61,92	1,30	0,54	34,39	62,03	3,04
10	39	Chloromonas tughillensis UTEX, 91	3	8,49	21,93	14,29	51,57	65,87	1,68	0,35	18,71	75,47	5,46
	41	Chloromonas tughillensis UTEX, 91	15	18,25	19,41	13,12	48,52	61,64	1,55	0,29	23,05	70,65	6,01
	42	Chloromonas tughillensis UTEX, 91	22	-	7,53	18,14	54,79	72,93	1,61	0,40	26,39	70,82	2,40
11	43	Chlamydomonas sp. Gossen	3	14,55	18,49	12,76	54,81	67,56	1,71	22,46	73,92	3,37	0,00
	44	Chlamydomonas sp. Gossen	9	34,22	5,77	14,79	11,61	26,40	0,44	68,34	29,56	1,20	0,00
	45	Chlamydomonas sp. Gossen	15	11,25	10,96	25,40	40,07	65,47	1,37	29,78	67,81	2,16	0,00
	46	Chlamydomonas sp. Gossen	22	18,18	11,27	22,79	48,58	71,37	1,51	25,25	72,06	2,33	0,00
	47	Chlamydomonas sp. Gossen	30	-	2,09	22,36	39,43	61,79	1,48	35,82	52,80	4,76	0,00
12	48	Chlorophyta g. sp. Furka	3	36,46	8,24	36,83	43,39	80,22	1,49	0,30	17,22	80,74	1,73
	49	Chlorophyta g. sp. Furka	9	32,01	4,85	41,49	17,51	59,00	0,88	1,02	38,24	59,18	1,56
	50	Chlorophyta g. sp. Furka	15	13,32	6,68	54,09	28,69	82,78	1,31	0,33	15,20	82,80	1,68
	51	Chlorophyta g. sp. Furka	22	27,59	16,23	19,60	48,10	67,70	1,37	2,00	23,02	71,70	3,08
	52	Chlorophyta g. sp. Furka	30	-	0,36	18,79	52,90	71,69	1,50	0,36	44,21	53,87	0,07
13	53	Chlorophyta g. sp. Hochgurgl	3	26,67	3,54	38,30	40,83	79,13	1,41	1,03	20,81	71,30	6,86
	54	Chlorophyta g. sp. Hochgurgl	9	25,89	4,97	51,82	25,06	76,88	1,22	1,50	21,27	62,79	14,44
	55	Chlorophyta g. sp. Hochgurgl	15	18,98	3,41	39,67	42,07	81,74	1,48	0,89	17,75	73,40	7,95
	56	Chlorophyta g. sp. Hochgurgl	22	27,16	5,25	39,32	42,54	81,86	1,45	1,00	15,83	72,22	10,94
	57	Chlorophyta g. sp. Hochgurgl	30	-	2,37	21,18	39,97	61,15	1,57	0,58	34,36	51,83	5,98
14	58	Chloromonas nivalis CCCryo, 004-99	3	14,78	11,88	32,07	35,72	67,79	1,41	3,50	24,94	71,43	0,12
	59	Chloromonas nivalis CCCryo, 004-99	9	16,71	21,68	29,43	40,23	69,66	1,43	2,71	14,91	77,70	4,69
	60	Chloromonas nivalis CCCryo, 004-99	15	8,37	16,48	28,08	35,02	63,10	1,32	3,64	27,93	65,03	3,40
15	61	Chloromonas sp. CCCryo, 044-99	3	8,28	12,61	41,90	20,02	61,92	0,96	4,98	43,11	48,24	3,66
	62	Chloromonas sp. CCCryo, 044-99	9	5,27	7,55	41,32	13,74	55,06	0,79	2,38	41,32	54,31	2,00
	63	Chloromonas sp. CCCryo, 044-99	15	7,01	19,05	26,91	37,42	64,33	1,36	3,42	22,98	69,39	4,22
16	64	Chloromonas alpina CCCryo, 089-99	3	5,92	12,78	41,15	19,24	60,40	0,94	3,78	38,67	52,83	4,72
	65	Chloromonas alpina CCCryo, 089-99	9	12,11	24,80	24,42	39,31	63,73	1,41	3,66	17,49	72,92	5,94
	66	Chloromonas alpina CCCryo, 089-99	15	5,73	18,35	27,66	33,97	61,63	1,29	3,75	28,13	63,10	5,08
17	67	Chloromonas brevispina CCCryo, 091-99	3	13,73	7,15	36,58	35,05	71,63	1,33	0,86	24,24	69,43	5,42
	68	Chloromonas brevispina CCCryo, 091-99	9	23,25	12,18	24,21	43,85	68,06	1,44	0,23	25,91	70,49	3,36
	69	Chloromonas brevispina CCCryo, 091-99	15	17,53	10,70	21,50	41,63	63,13	1,34	0,31	31,00	64,60	4,09
18	70	Chlamydomonas platystigma CCCryo, 020-99	3	3,19	14,49	36,76	23,19	59,95	1,02	5,10	34,76	54,46	5,68
	71	Chlamydomonas platystigma CCCryo, 020-99	9	18,12	10,60	45,51	28,41	73,92	1,22	2,42	24,40	71,77	1,41
	72	Chlamydomonas platystigma CCCryo, 020-99	15	2,78	10,31	44,33	19,00	63,33	0,99	3,53	38,61	55,70	2,16
19	73	Chlamydomonas raudensis CCCryo, 125-100	3	8,80	16,16	39,35	26,05	65,40	1,10	5,51	26,21	61,79	6,49
	74	Chlamydomonas raudensis CCCryo, 125-100	9	12,02	27,20	24,54	38,03	62,57	1,37	4,18	14,99	73,04	7,79

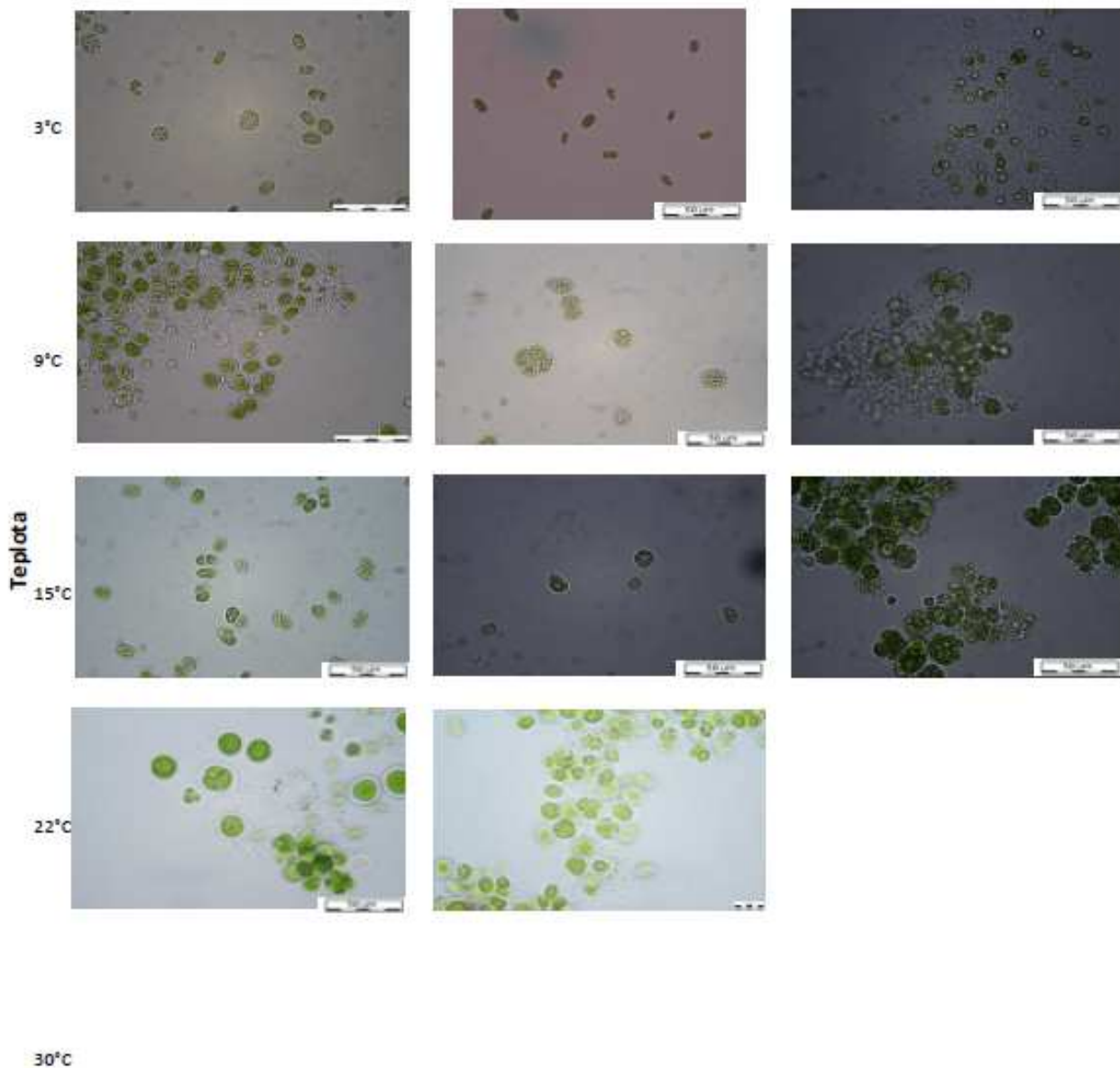
Obr. 42: Fotografie kultur při sklizni teplotního experimentu



4. *Chloromonas reticulata*
Ladové

5. *Chloromonas reticulata*
Luční

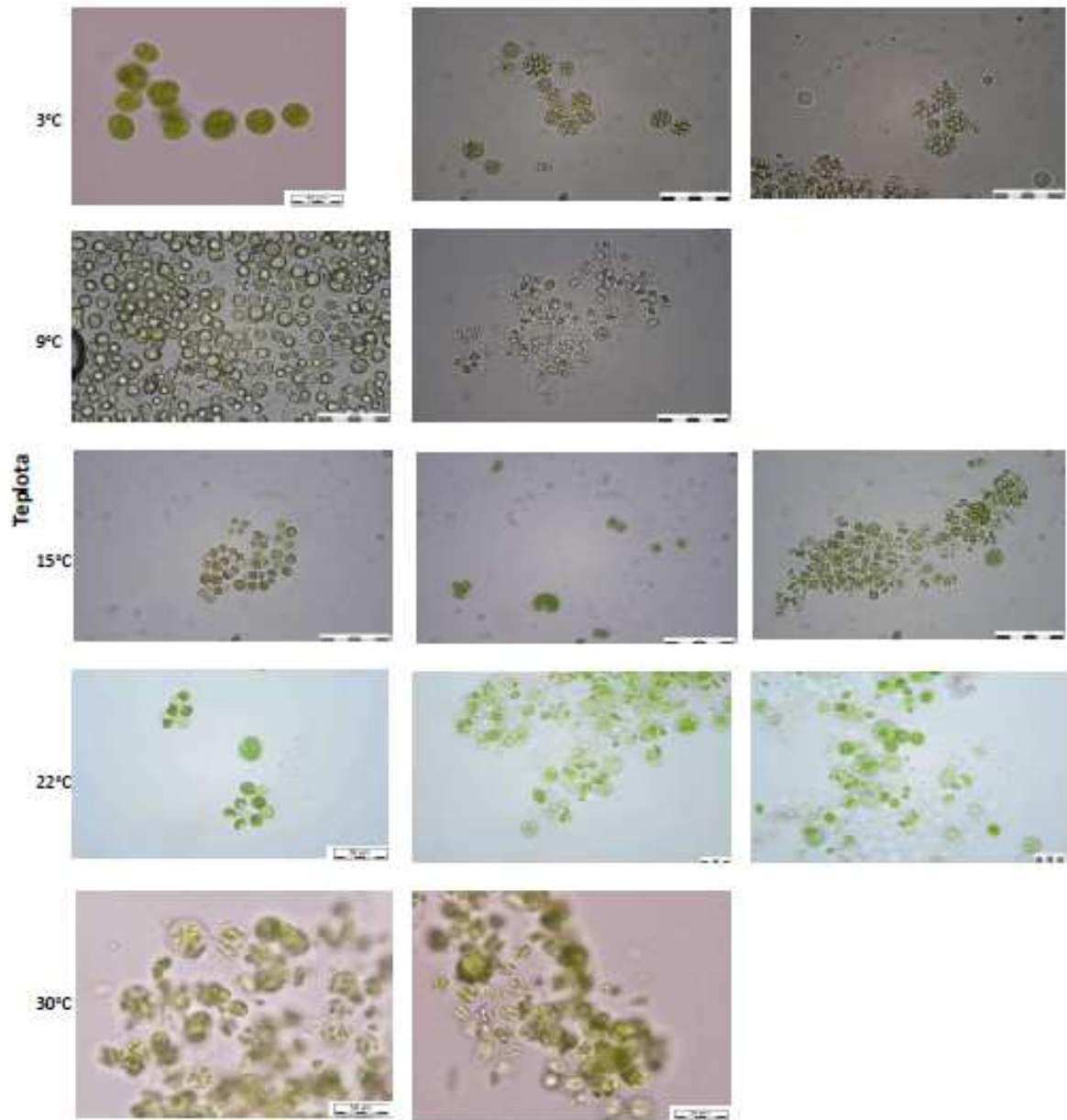
6. *Chloromonas pichincha*
Meandry



7. *Chloromonas* sp. Abisco

8. *Chloromonas* sp. KSZZ

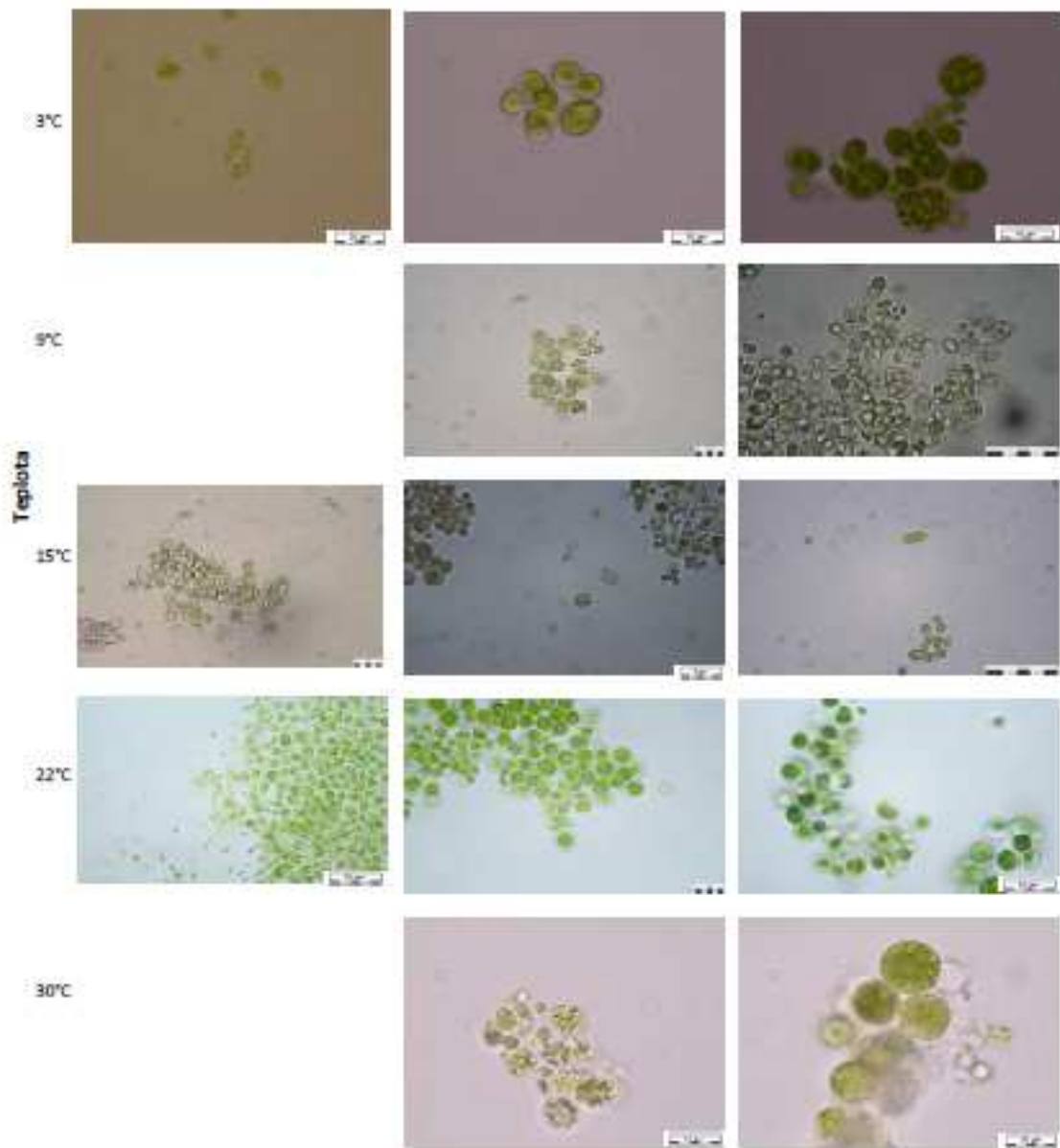
9. *Chloromonas* *chenangoensis*
UTEX, B SNO 147



10. *Chloromonas tughillensis*
UTEX, SNO 91

11. *Chlamydomonas* sp.
Gossen

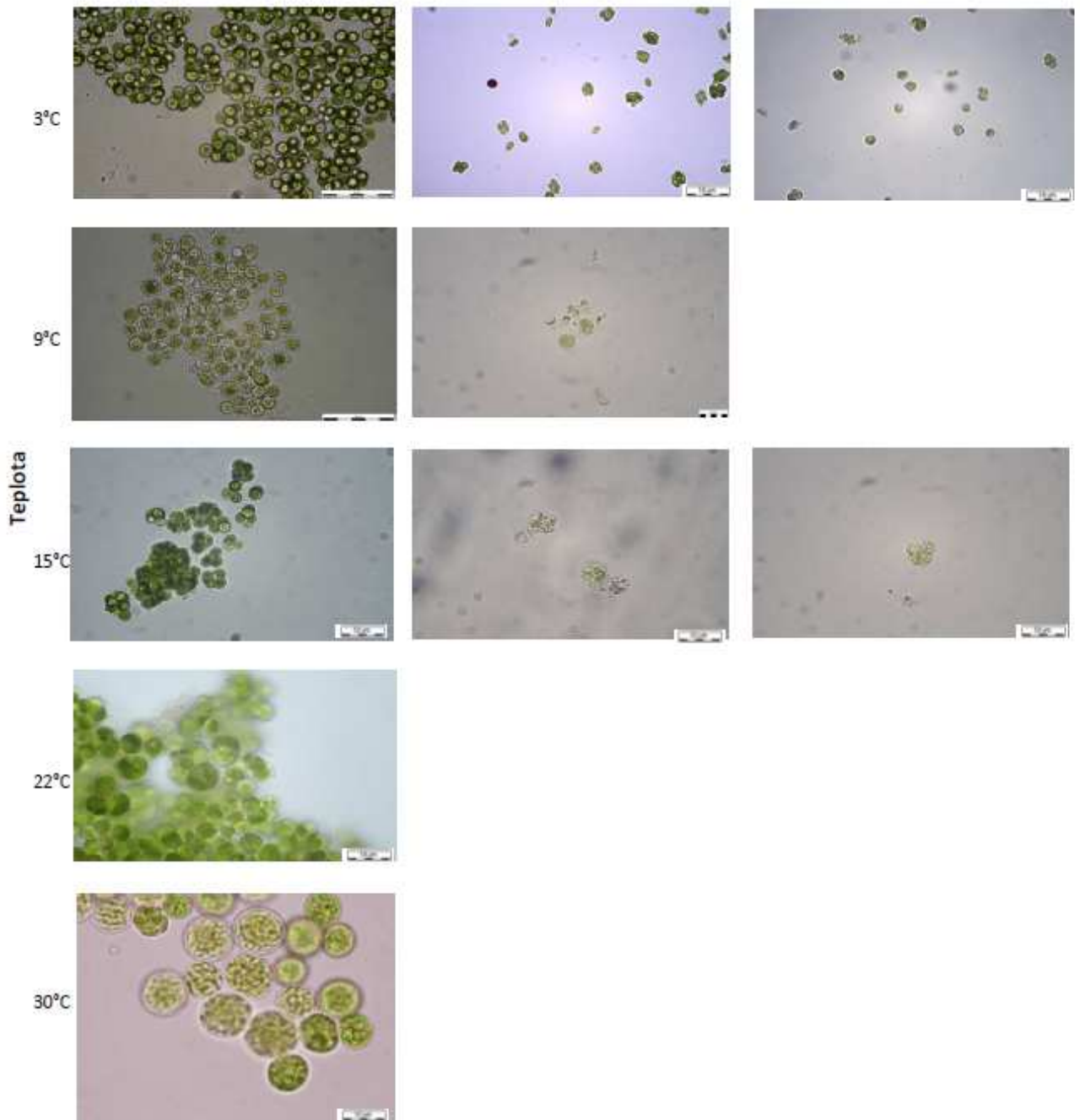
12. *Chlorophyta* g. sp. Furka



13. Chlorophyta g. sp.
Hochgurgl

14. Chloromonas nivalis CCCryo
004-99

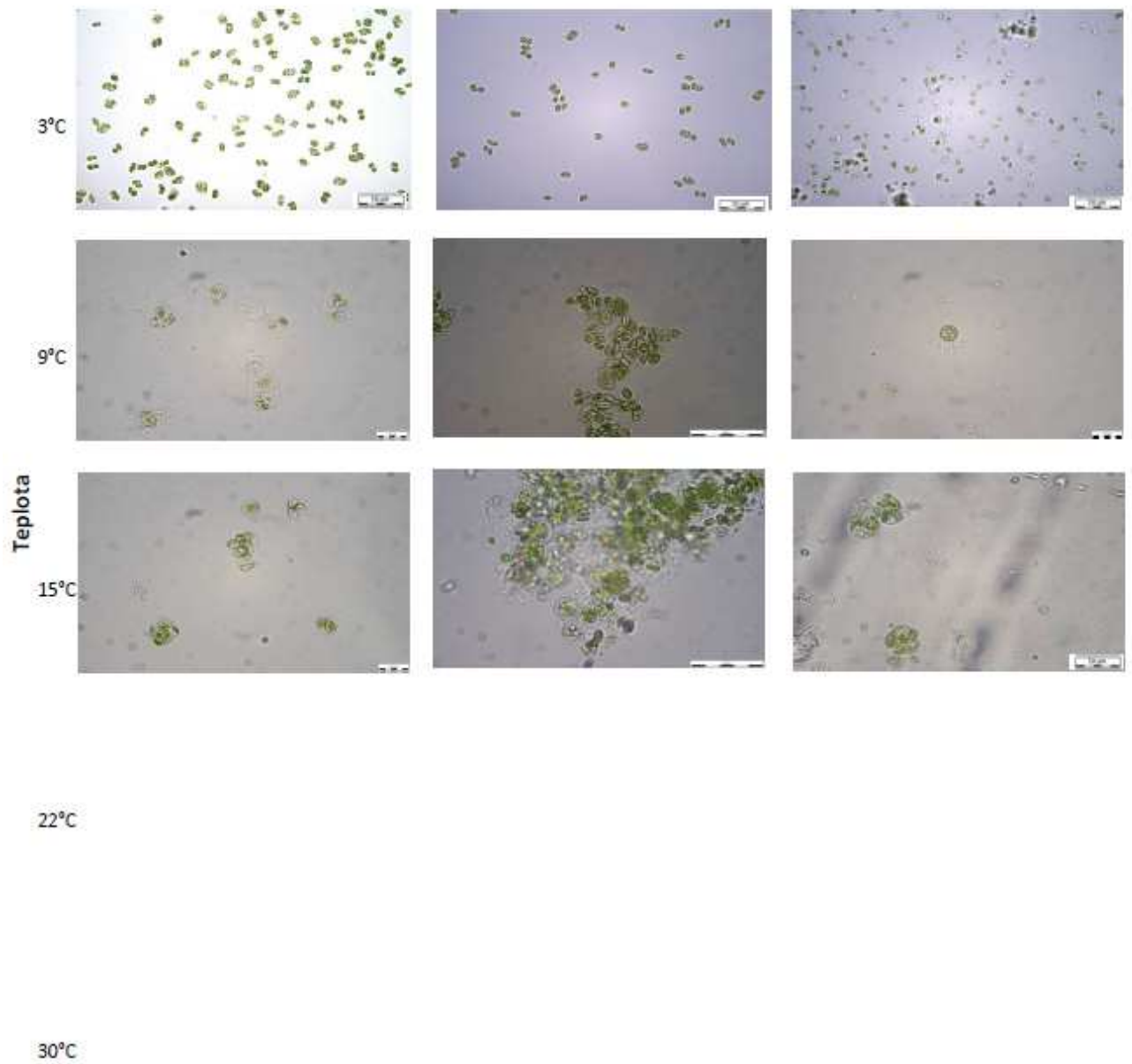
15. Chloromonas sp. CCCryo
044-99



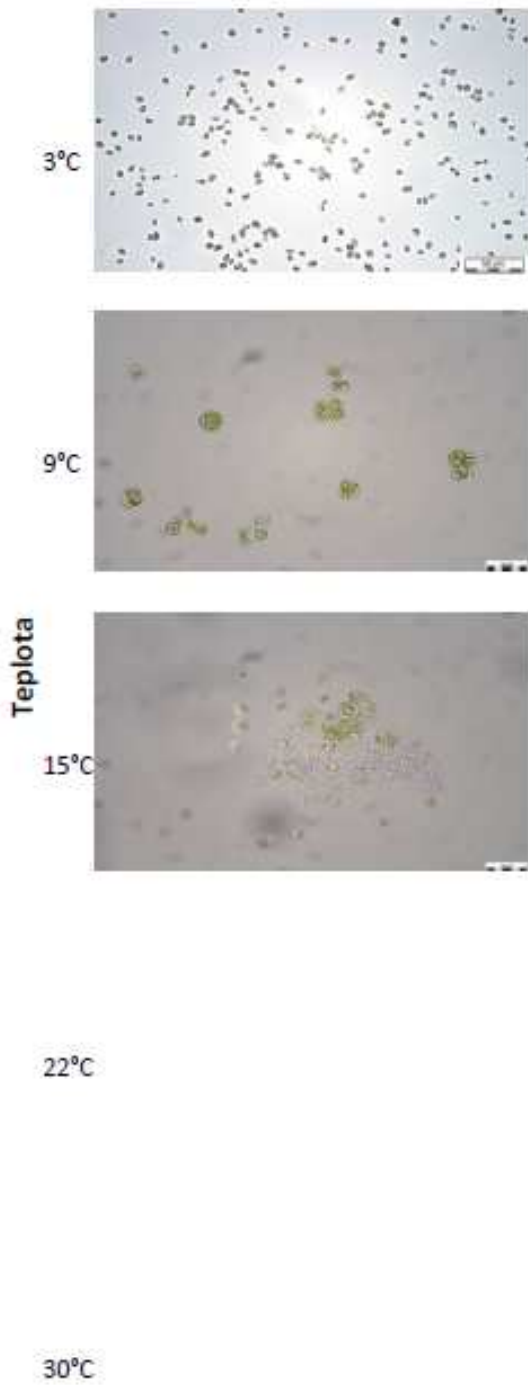
16. *Chloromonas alpina* CCCryo 089-99

17. *Chloromonas brevispina* CCCryo 091-99

18. *Chlamydomonas platystigma* CCCryo 020-99



19. *Chlamydomonas raudensis*
CCCr125-100



12. Média

BBM (Bold-Basal/Bristol Medium)

Základní médium pro kultivaci terestrických řas a sinic.

BISCHOFF, H.W. & BOLD, H.C. (1963): Phycological Studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. – Univ. Texas Publ., 6318: 1-95.

Zásobní roztoky:

1. NaNO₃.....25 g/1000 ml
2. CaCl₂.2H₂O.....5 g/1000 ml (event. 3.72 g CaCl₂.6H₂O)
3. MgSO₄.7H₂O.....7.5 g/1000 ml
4. K₂HPO₄.....7.5 g/1000 ml
5. NaCl.....2.5 g/1000 ml
6. KH₂PO₄.....17.5 g/1000 ml
7. EDTA+KOH..... tj. 5 g Chelotonu III + 3.1 g KOH /100 ml
8. FeSO₄.7H₂O.....0.498 g + H₂SO₄.....0.1 ml /100 ml
9. H₃BO₃.....1.142 g/100 ml
10. Roztok mikroprvků – do 1000 ml
- ZnSO₄.7H₂O.....8.82 g
- MnCl₂.4H₂O.....1.44 g
- MoO₃.....0.71 g (nebo Na₂MoO₄.2H₂O.....0.242 g)
- CuSO₄.5H₂O.....1.57 g
- Co(NO₃)₂.6H₂O.....0.49 g

Smícháme 10 ml každého z roztoků č. 1 – 6, 1 ml roztoků č. 7 – 10. Doplníme deionisovanou vodou na 1000 ml.

www.sinicearasy.cz

3N- BBM

Základní médium pro kultivaci terestrických řas a sinic obohacené o trojnásobné množství dusičnanů (NaNO₃) -přísada č. 1. Upravený recept je především pro kultury ze sbírek CCCryo.

Tab.11: Přehled FA vyskytujících se v zelených řasách (Obrázky www.compoundsearch.com)

