

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

PEDAGOGICKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOLOGIE

**Stanovení optimálních podmínek pro růst  
buněk a akumulaci zásobních lipidů řasy  
*Trachydiscus minutus***

Bakalářská práce

Kamila Ondrejmišková

Vedoucí práce: RNDr. Milada Vítová, Ph.D.

České Budějovice 2015

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Pedagogickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledky obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Nových Hradech dne

.....

Kamila Ondrejmišková

## **Poděkování**

Děkuji RNDr. Miladě Vítové Ph.D. za odborné vedení, ochotu a čas při psaní mé bakalářské práce. Dále chci také poděkovat pracovnímu týmu Laboratoře buněčných cyklů řas na Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Třeboni za poskytnutí prostoru při vypracovávání laboratorních činností a rovněž potřebných materiálů

A v neposlední řadě děkuji své rodině za trpělivost a podporu během studia.

## **Anotace**

Řasy se stávají strategickým zdrojem pohonných hmot, potravin, surovin a biologicky aktivních látek. Řasové lipidy patří mezi nejslibnější potenciální produkty.

Žlutozelená řasa *Trachydiscus minutus* (třída Eustigmatophyceae) je jednobuněčná sladkovodní řasa hromadící lipidy jako zásobní látky.

Byl studován vliv různých růstových médií, teploty a intenzity světla na růst a akumulaci zásobních lipidů řasy *Trachydiscus minutus*. Byly stanoveny optimální růstové podmínky. Zásobní lipidy byly kvantitativně stanoveny fluorometricky. Akumulace lipidů byla sledována pomocí fluorescenční mikroskopie.

**Klíčová slova:** zelené řasy; *Trachydiscus minutus*; růstové podmínky; lipidy; zásobní látky

## **Annotation**

Algae are becoming a strategic source of fuels, food, feedstocks, and biologically active compounds. Algal lipids are among the most promising potential products.

The yellow-green alga *Trachydiscus minutus* (class Eustigmatophyceae) is unicellular freshwater alga accumulating lipids as its storage reserves.

The influence of various growth media, temperature and light intensity on the growth and accumulation of storage lipids of alga *Trachydiscus minutus* was studied. The optimal growth conditions were determined. Storage lipids were quantitatively determined fluorometrically. Accumulation of lipids was monitored by fluorescence microscopy.

**Key words:** Green algae; *Trachydiscus minutus*; growth conditions; lipids; storage reserves

# Obsah

1. ÚVOD .....	1
1.1. Cíle práce: .....	2
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	3
2.1. Charakteristika řas .....	3
2.2 Výskyt .....	3
2.3 Obecné znaky .....	4
2.3.1. Buňka řas .....	4
2.3.2. Typy stélek .....	6
2.3.3. Rozmnožování řas .....	8
2.4. Systém řas .....	9
2.4.1. Jednotlivé kmeny .....	11
2.4.2. Význam řas .....	16
2.5. Experimentální organizmus <i>Trachydiscus minutus</i> .....	18
2.6. Lipidy .....	21
3. MATERIÁL A METODY .....	23
3.1. Stanovení optimální teploty .....	23
3.2. Stanovení optimální intenzity světla .....	24
3.3. Stanovení optimálního média .....	24
3.3.1. Příprava jednotlivých médií .....	26
3.4. Akumulace zásobních lipidů .....	30
3.5. Mikroskopie .....	30
4. VÝSLEDKY .....	31
4.1. Teplota .....	31
4.2. Intenzita světla .....	32
4.3. Složení média .....	33
4.4. Akumulace lipidů .....	35
5. DISKUZE .....	37
6. ZÁVĚR .....	40
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	41
8. SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK .....	44
9. SEZNAM A ZDROJE OBRÁZKŮ .....	45

# 1. ÚVOD

První zmínky o řasách a jejich významu pro člověka najdeme v dochovaných záznamech národů obývajících mořská pobřeží a sahají před náš letopočet. Již ve staré Číně se využívaly kolonie řas rodu *Nostoc* a *Hydrodictyon* k potravě. Čínští lékaři znali chaluhy z rodu *Laminaria* a užívali je k léčení. Řasy byly známé také ve starém Římě, pod jménem *fucus* se zde připravoval kosmetický přípravek z chaluhy.

Podstatně větší zájem o řasy lze zaznamenat v 19. století, kdy byla poznána a popsána většina rodů a druhů rostlin. Druhá polovina 19. století je obdobím největšího rozvoje přírodních věd, jako jsou fyzika, chemie, geologie. Rozkvět těchto vědních oborů přináší nové metodické přístupy a z tohoto hlediska jsou významné práce zabývající se cytologií, morfologií a ontogenezí řas.

V současné době je mnoho algologických studií věnováno hospodářskému využití řas, ať už se jedná o zpracování přírodních porostů mořských řas, nebo o jejich umělé pěstování. Mořské řasy jsou velmi cenným zdrojem různých surovin: albínových kyselin, agaru, karagenu, atd. V Japonsku se například pěstují k přípravě pokrmů, v mnohých státech se hromadně kultivují sladkovodní jednobuněčné řasy z rodu *Chlorella* a *Scenedesmus* (Urban a Kalina, 1980).

Řasy ke svému růstu a rozmnožování potřebují vodu, světlo a malé množství živin. Čím více ale roste biomasa, tím řasy spotřebovávají více živin a pokud je vyčerpají, dojde k útlumu jejich růstu. Dalším rozhodujícím faktorem pro růst je teplota a množství světla.

Ve své bakalářské práci se zaměřuji na stanovení optimálních podmínek pro růst sladkovodní mikrořasy *Trachydiscus minutus*, která dokáže produkovat oleje s vysokým obsahem vícenenasycených mastných kyselin, jež jsou důležitou složkou potravy a zdrojem energie pro lidské tělo. Nenasycené mastné kyseliny se podílejí na mnoha metabolických procesech, lidské tělo však není schopno si je samo vyrobit, proto je musíme přijímat ve stravě.

Podstatnou částí mé bakalářské práce je zařazení řasy *Trachydiscus minutus* do systematiky řas. Systematika řas studuje podobnosti mezi organizmy a jejich vývojové vztahy. Je založena na mnoha pravidlech, například na kombinaci fotosyntetických barviv, stavbě stélky, způsobu rozmnožování, atd.

Vytvoření ucelené zjednodušené systematiky řas může být vhodné pro výukové metody nejen pro žáky středních a vysokých škol s biologickým zaměřením, ale také pro rychlou orientaci ve světě řas.

### **1.1. Cíle práce:**

- všeobecná charakteristika a systematika řas, zařazení řasy *Trachydiscus minutus* do tohoto systému
- stanovení optimálních podmínek pro růst řasy *Trachydiscus minutus*



## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Charakteristika řas

Řasy jsou nejjednodušší rostlinné organizmy. Dříve byly řazeny spolu s houbami a lišejníky mezi nižší, vývojově starší rostliny. V současné době bylo od tohoto systému upuštěno, takže pojem nižší rostliny je identický s pojmem řasy. Jedná se o nejednotnou a zároveň pestrou skupinu rostlin, která nemá společného předka. Jsou to typické vodní rostliny, představují předchůdce rostlin vyšších, suchozemských. Jejich tělo není rozlišeno na kořen, stonek a listy, ale je tvořeno tzv. stélkou, kde nejsou přítomna vodivá pletiva. Mezi řasy patří tři vývojové větve, červená, hnědá a zelená, mezi něž je rozřazeno několik tříd (Kysilka, 2005).

Řasy jsou jednobuněčné i mnohobuněčné eukaryotní organizmy, které uskutečňují fotosyntézu spojenou s uvolňováním molekulového kyslíku. Tyto procesy se dějí v chloroplastech. Mnohé řasy mají strukturu podobnou rostlinám, jejich rozměry jsou velmi rozdílné, od mikroskopických po makroskopické hnědé a červené řasy, které dosahují délky až 50 metrů.

### 2.2 Výskyt

Řasy jsou většinou vodní organizmy, žijící ve sladkých vodách nebo mořích, ale i ve vlhkém prostředí na souši. Ve vodním prostředí žijí volně anebo v symbióze s bezobratlými (korálnatci, houbovci, červovci), a to hlavně v mořích. Mořské řasy jsou důležité v oběhu látek v přírodě, jejich celková biomasa se považuje za rovnocennou se suchozemskými rostlinami, pokud ne vyšší. V povrchových vrstvách moří a oceánů žijí nejvíce jednobuněčné řasy (rozsivky, obrněnky) jako složka planktonu. Makroskopické chaluhy žijí přichycené na skalách pobřežních vod.

Řasy jsou hlavními producenty organických látek ve vodním prostředí, a to i přes to, že žijí jen do hloubek, kam proniká světlo využitelné pro fotosyntézu. I když faktory ovlivňující růst řas ve sladkých a slaných vodách jsou podobné, organizmy v těchto dvou prostředích jsou odlišné a ten samý druh se nemůže vyskytovat ve sladkých i ve slaných vodách. Ve vodním prostředí jsou dvě základní oblasti výskytu řas:

- a) bentos - zde jsou dvě rozdílné životní formy
- připoutaná a nepohyblivá – tyto druhy rostou na povrchu skal a kamenů, rostlinách a živočiších
  - nepřipoutané a pohyblivé – udržují se na povrchu, pohybují se, nebo tvoří vločkovitá seskupení
- b) plankton - nemá takovou rozmanitost forem organismů jako bentos, jsou zde zástupci bičíkovců, kteří v klidných podmínkách migrují, jiné typy sedimentují a v suspenzi je udržuje pouze pohyb vody (Tölgyessy a kol., 1984).

## 2.3 Obecné znaky

Řasy mají několik společných znaků. Jsou to autotrofní organizmy, které přeměňují oxid uhličitý s využitím sluneční energie za účasti rostlinných barviv (chlorofylu) ve složitě (organické) látky. Tomuto jevu se říká fotosyntéza.

Řasy nejsou vývojově jednotnou skupinou, zahrnují několik samostatných vývojových linií, které se dělí na kmeny a další nižší stupně. Tímto tříděním se zabývá systematika řas, je založena především na podobnosti a rozdílech v kombinaci fotosyntetických barviv, asimilačních produktů, organizaci stélky, počtu a uspořádání bičíků a na způsobu rozmnožování (Musilová J., 2009).

### 2.3.1. Buňka řas

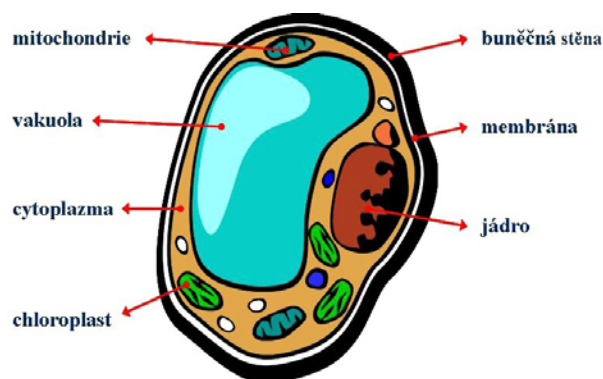
Stavební jednotkou je eukaryotická buňka (z řeckého „eu-karyon“ - pravé jádro, je dobře odděleno od svého okolí) ohraničená buněčnou stěnou, která je tvořena hlavně celulózou a hemicelulózou. Vyznačuje se větší složitostí a velikostí oproti buňce prokaryotické, která je buňkou primitivní. Základní stavbu řasové buňky popisuje obr. 1.

- **cytoplazmatická membrána:** ohraničuje buňku, zajišťuje příjem látek do buňky a výdej látek z buňky ven, obklopuje cytoplazmu (vnitřní prostředí buňky)

- **buněčná stěna:** pevný propustný obal nad cytoplazmatickou membránou, chrání buňku
- **jádro:** je vždy přítomné, ohraničené dvojitou membránou, je zde uložena genetická informace a řídí buňku
- **chloroplasty:** jsou to plastidy v cytoplazmě, obsahují zelené barvivo chlorofyl, probíhá v nich fotosyntéza
- **vakuola:** drobný nebo větší útvar v buňce ohraničený membránou, obsahuje vodu a v ní rozpuštěné cukry a soli, slouží jako zásobárna látek, které jsou rozpustné ve vodě
- **mitochondrie:** drobná tělíska v cytoplazmě buňky zajišťující metabolismus neboli přeměnu látek, buněčné dýchání a také zajišťující zásobní škrob (Hudek F., 2009).

**Plastidy** jsou organely v cytoplazmě rostlinných buněk a řas. Jejich funkce je různá, může v nich probíhat fotosyntéza, mohou být zásobní organelou nebo organelou zodpovědnou za zbarvení buňky. Podle obsahu převažujících barviv se rozeznávají: chloroplasty (zelené), chromoplasty (žluté až červené) a leukoplasty (bezbarvé, bílé). Podle obsahu zásobních látek se rozlišují: amyloplasty (škrob), proteinoplasty (bílkoviny) a oleoplasty (tuky). Plastidy se mohou měnit z jednoho typu na druhý, například chloroplasty v chromoplasty.

(Encyklopedie Co je co, 1999)



**Obr. 1** Morfologie buňky řas (Hudek, 2009).

### 2.3.2. Typy stélek

Tělo řas tvoří jednobuněčná nebo mnohobuněčná stélka (*thallus*). Bývá různě diferencována, od nejjednodušších jednobuněčných typů až po morfologicky i funkčně výrazně rozlišené stélky, které napodobují tělo vyšších rostlin. U stélkatých rostlin však chybějí cévní svazky. Řasy vykazují určité zákonitosti ve stavbě stélky, takzvané organizační stupně ve vývoji stélky nezávisle na systematickém zařazení řas do jednotlivých tříd. Mezi vývojové stupně stélky patří:

#### **Monadoidní (bičíkatá) stélka**

je jednobuněčná, jednojaderná s bičíky, nejčastěji má tvar kapky, tělo je kryté pelikulou, celulózní buněčnou stěnou, nebo je nahé. Pokud se v buňce nachází plastid, je zde přítomna i světločivná skvrna (stigma). Sladkovodní druhy s touto stélkou obsahují pulzující vakuolu.

#### **Rhizopodová (améboidní) stélka**

je jednobuněčná, jednojaderná nebo mnohojaderná, měňavkovitá stélka řas. Vyskytuje se v třídách Chrysophyceae a Xantophyceae. Pohyb je možný pomocí panožek, povrch buňky je krytý periplastem (plazmatická membrána s mikrotubuly). U sladkovodních řas jsou v cytoplazmě pulzující vakuoly a v plastidech stigma.

#### **Kokální stélka**

je jednobuněčná, jednojaderná, nepohyblivá, povrch kryje silná buněčná stěna, má různý tvar. U tohoto typu se nevyskytují pulzující vakuoly ani stigma.

#### **Kapsální stélka**

je odvozena od stélky monadoidní. Je jednobuněčná a jednojaderná, na povrchu kapsální stélky je slizovitý obal. Sladkovodní druhy řas obsahují pulzující vakuoly, v plastidu bývá stigma. Tato stélka má nepohyblivé, bičíkům podobné útvary, tzv. *pseudocilie*.

#### **Trichální stélka**

je vláknitá, mnohobuněčná, složená z jednojaderných buněk s buněčnou stěnou. Vlákna mohou být nevětvená nebo větvená a přichycena k ponořeným předmětům.

### Heterotrichální stélka

je odvozena od trichální - vláknitá, větvená stélka s funkčně i morfologicky rozlišnými hlavními vlákny a postranními větévkami, poléhavá nebo vzpřímená.

### Sifonkladální stélka

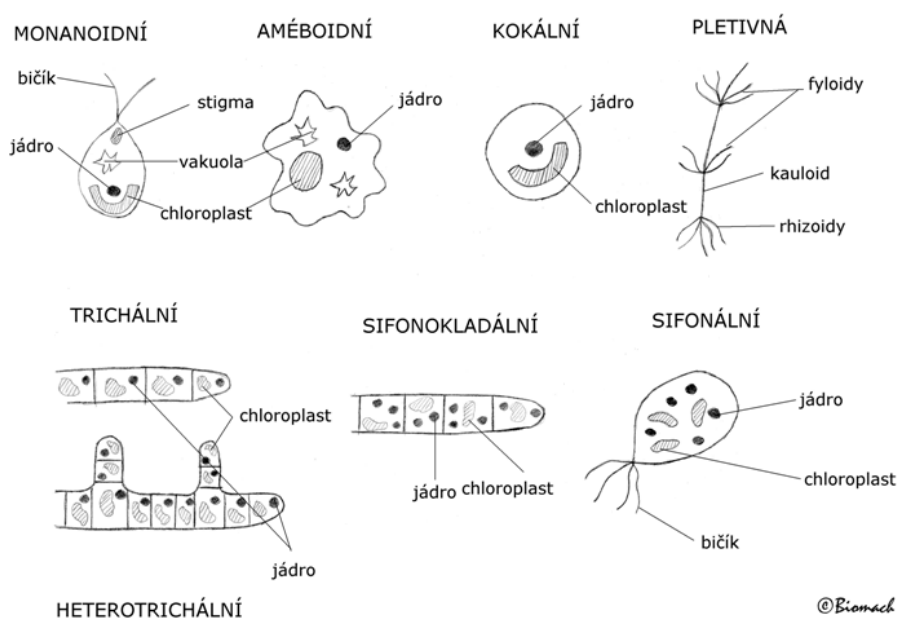
bývá vláknitá nebo vakovitá, větvená nebo jednoduchá, mnohobuněčná, mnohojaderná a s buněčnou stěnou. Její buňky jsou odděleny přehrádkou, často se síťovitým chloroplastem s četnými pyrenoidy (bílkovinná tělíska tvořená enzymem Rubisco - ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa - se škrobovou pochvou v chloroplastech, jsou střediskem fixace oxidu uhličitého v temné fázi fotosyntézy) a mohutnou středovou vakuolou (např. žabí vlas).

### Sifonální (trubicovitá) stélka

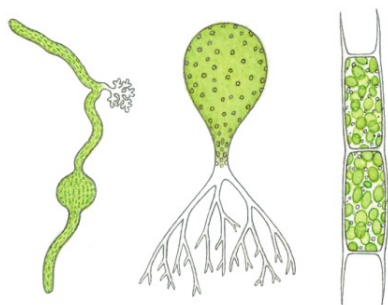
je vláknitá nebo vakovitá, tvořená jedinou makroskopickou, mnohojadernou buňkou s buněčnou stěnou. V buňce je obvykle mohutná středová vakuola.

### Pletivná stélka

je odvozená od stélky trichální nebo heterotrichální, vždy mnohobuněčná. Pletivná stélka je tvořená kauloidem (lodyžka), rozlišeným v delší buňky článkové a kratší buňky uzlinové. Z uzlin vznikají přesleny bočních větví fyloidy (postranní lodyžky, napodobují lístky), k podkladu přirůstá pomocí rhizoidů (přichytná vlákna, mají funkci kořene) (Urban a Kalina, 1980). Přehled typů stélek je znázorněno na obr. 2, 3 a 4.



Obr. 2 Typy stélek řas s popisem základní morfologie (Macháček, 2005).



**Obr. 3 Typy kapsální stélky**, zleva zástupci rodů posypanka (*Vaucheria*), vakovka (*Botrydium*), vláknitá žabnice (*Tribonema*) (Leccos, 2005).



**Obr. 4 Pletivná stélka parožnatky**, zástupce rodu *Chara*, rhizoidy (kořínky) je přichycená ke dnu stojatých vod, přeslenovitě větvená, až 90 cm dlouhá - (Leccos, 2005).

### 2.3.3. Rozmnožování řas

Jednou ze základních vlastností organismů je schopnost rozmnožování. Rozmnožování řas se vyznačuje velkou rozmanitostí. Řasy se rozmnožují nepohlavně výtrusy (spory), popřípadě buněčným dělením. Výtrusy jsou buď pohyblivé, jednobuněčné s bičíkem (zoospory), nebo nepohyblivé bez bičíku (aplanospory). Zoospory i aplanospory vznikají uvnitř mateřské buňky a prasknutím této buňky se dostávají do okolí. Tím vznikají noví jedinci.

Některé řasy se dokážou také rozmnožovat pohlavním způsobem. Nový jedinec vzniká splynutím dvou pohlavních buněk – gamet (samčí a samičí), vznikajících v pohlavních orgánech - gametangiích. Dochází ke splynutí haploidních samčích a samičích buněk za vzniku diploidní buňky - zygoty. Splynutí gamet za vzniku zygoty probíhá různými typy:

- izogamie = gamety jsou stejné vzhledem i velikostí, liší se geneticky
- anizogamie = obě gamety se liší především velikostí, samčí je menší
- oogamie = samičí buňka (oosféra) je větší a nepohyblivá, samčí gameta (spermatozoid) je malá pohyblivá buňka s bičíky

Dále může docházet ke střídání pohlavní generace – gametofytu (buňky jsou haploidní) a nepohlavní generace – sporofytu (buňky jsou diploidní). Tento jev se nazývá rodozměna. Sporofyt je samostatnou rostlinou, žije nezávisle na gametofytu.

## 2.4. Systém řas

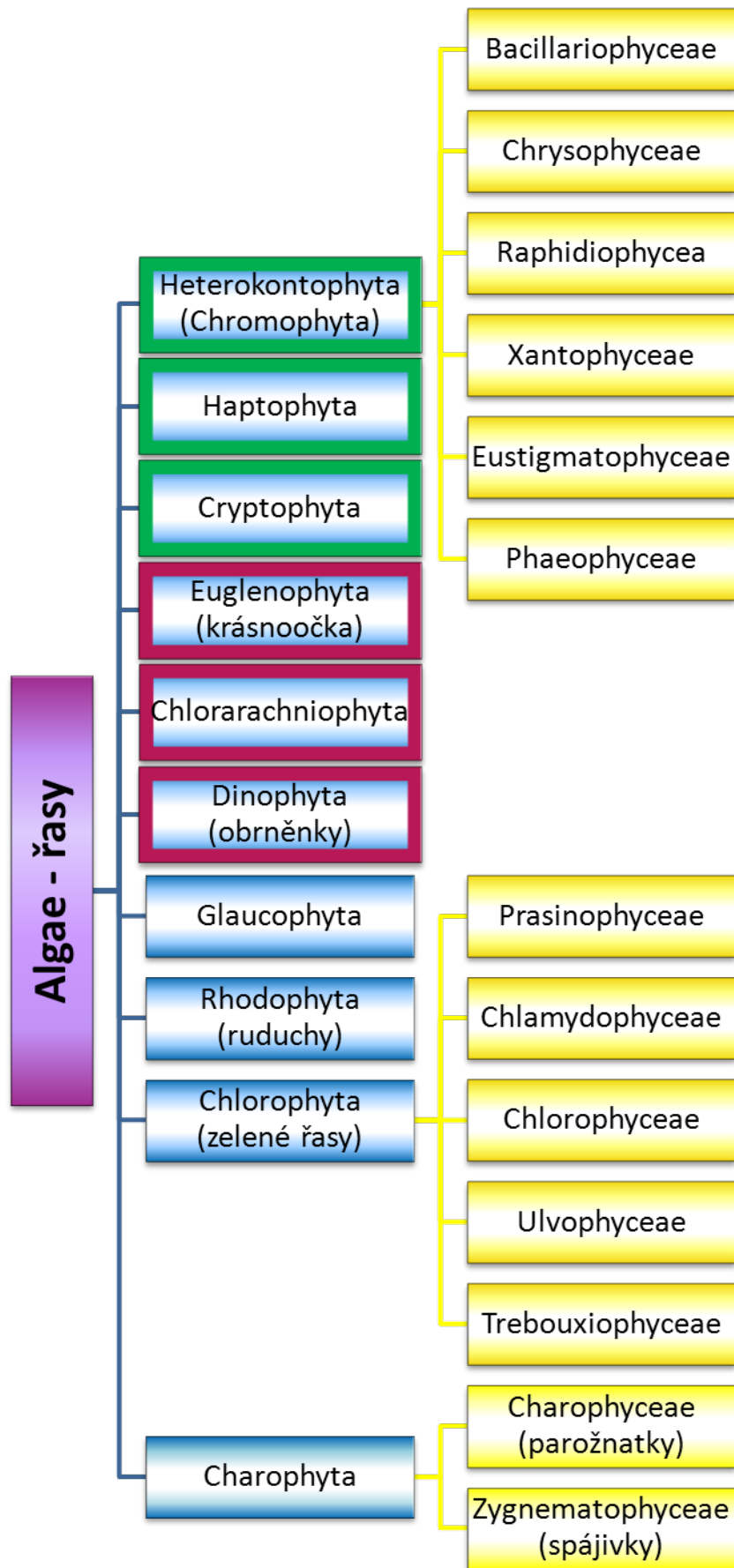
Původní systém měl tři vývojové větve, které se vyznačují rozdílným obsahem barviv:

- červená větev - barviva: chlorofyl *a + d*, betakaroten, fykoerytrin, fykocyanin
- hnědá větev - barviva: chlorofyl *a + c*, betakaroten, fukoxanthin, xantofyly
- zelená větev - barviva: chlorofyl *a + b*, karoteny, xantofyly

Současný systém je poněkud složitější, řasy se třídí do samostatných kmenů:

- Chlorophyta – zelené řasy
- Heterokontophyta – hnědé řasy
- Rhodophyta – ruduchy
- Cryptophyta – skrytěnky
- Dinophyta - obrněnky
- Euglenophyta – krásnoočka
- Glaucophyta
- Haptophyta
- Chlorarachniophyta

a dále se v těchto kmenech rozlišují třídy, jejich řády, čeledě, rody a druhy. K těmto účelům se sestavují „fylogenetické stromy“, jako je vyobrazeno na obr. 5, na základě historického vývoje a příbuznosti organizmů (Macháček T., 2005).



Obr. 5 Fylogenetický strom: ■ podříše, ■ kmen, ■ říše Chromista, ■ říše Protozoa, ■ třída



### 2.4.1. Jednotlivé kmeny

#### Chlorophyta – zelené řasy

Zelené řasy jsou rozsáhlá skupina, najdeme ji ve všech biotopech. Obsahuje fotosyntetické pigmenty, což jsou chlorofyl  $a + b$ , dále alfa a beta karoten. Zásobní látkou těchto řas je škrob. Buněčná stěna je většinou celulózni, mají sudý počet bičíků a chloroplasty se dvěma membránami. Rozmnožují se jak nepohlavně (schizotomie, fytotomie – tvorba příčné přehrádky a rozdělení buněk), tak i pohlavně (různé varianty, izogamie, oogamie i anizogamie). Mají různé typy stélek od jednobuněčných mikroskopických až po makroskopické.

V systému zelených řas je několik tříd:

třída Prasinophyceae – jsou bičíkovci s 1, 2 nebo 4 stejně dlouhými bičíky, produkují celulózni šupinky, které pokrývají povrch buňky i bičíků

třída Chlamydomphyceae - převládají zde bičíkovci, jejich buněčná stěna se označuje jako tzv. chlamys (odtud také pochází jejich název) a jsou převážně sladkovodní. Mezi zástupce této třídy patří *Chlamydomonas*, *Volvox*, *Eudorina elegans*, *Haematococcus pluvialis*

třída Chlorophyceae – v této třídě se vyskytují bičíkatá stadia bez obalu, nebo nebičíkatá stadia, která mají velmi pevnou buněčnou stěnu. K jejich zástupcům se řadí *Dunaliella*, *Oocystis*, *Scenedesmus*

třída Trebouxiophyceae – zástupci jsou *Botryococcus*, *Stichococcus*, *Trebouxia*

třída Ulvophyceae – tvarově rozmanité, mají vláknité, nebo sifonální stélky. Jsou největší ze zelených řas. Mezi zástupce patří *Ulothrix*, *Ulva*, *Acetabularia*, *Caulerpa* (Přírodovědecká fakulta JU, 2003).

#### Charophyta

Kmen Charophyta je skupina zelených řas a patrně nejbližší příbuzný vyšších zelených rostlin. Zde se mezi fotosyntetické pigmenty řadí chlorofyl  $a + b$  a beta karoten. Zásobní látkou těchto řas je především škrob, obsahují však také doplňkové zásobní látky jako je volutin (polyfosfátová zrna), nebo sacharidy. Buněčná stěna je celulózni, mají sudý počet bičíků (2 nebo 4). Jejich zástupci mají všechny druhy stélek a různé typy pohlavního i nepohlavního rozmnožování.

třída Zygnematophyceae (spájkivky) – jsou sladkovodní, v buňce se nachází mohutný chloroplast. Mají specifický způsob pohlavního rozmnožování, nazývá se konjugace neboli spájení. K zástupcům se řadí *Spirogyra*, *Zygnema*, *Mougeotia*, *Closterium*, *Micrasterias*

třída Charophyceae – morfologicky různorodé, kokální i vláknité typy. Zástupci jsou *Coleochaete*, *Chara* (Urban a Kalina, 1980).

### **Heterokontophyta – hnědé řasy**

Kmen Heterokontophyta je velká, přirozená skupina řas. Kombinaci fotosyntetických barviv tvoří zejména chlorofyl *a*, chlorofyl *c*, fukoxantin a  $\beta$ -karoten. Zásobní látka je chrysolaminaran nebo olej. Bičíkatá stádia mají dva nestejně dlouhé (heterokontní) bičíky. Patří sem sedm tříd, z nichž nejdůležitější jsou pro sladkovodní biotopy zlativky - Chrysophyceae, rozsivky – Bacillariophyceae a různobrvky - Xantophyceae. Třídy chaluhy - Phaeophyceae a Haptophyceae naopak obývají moře. Zbývající třídy jsou Raphidophyceae, Eustigmatophyceae (Urban a Kalina, 1980).

třída Chrysophyceae - Zlativky – jsou to bičíkovci nebo měňavky, živí se autotrofně nebo mixotrofně. Hnědé barvivo fukoxantin způsobuje jejich hnědé zbarvení. Buňku chrání křemičité šupiny, některé mají schránku z oxidu křemičitého. Rozmnožují se dělením, nepříznivá období přečkávají v podobě křemitých cyst lahvovitého tvaru. Při přemnožení způsobují hnědé zbarvení vody a zhoršují její chuť. Jejich zástupci jsou *Dinobryon*, *Sunata* (Urban a Kalina, 1980).

třída Bacillariophyceae - Rozsivky – jsou jednobuněčné drobné řasy s křemičitou schránkou ze dvou polovin, které do sebe zapadají jako víčko a dno krabičky. Menší část se nazývá hypothéka, větší epithéka. Každá polovina je složena ze dna (valva) a obručovitého okraje (pleura). Rozmnožují se nepohlavně dělením, kdy se obě části schránky oddálí, obsah se rozdělí a každé ze dvou dceřiných buněk zůstane jedna polovina schránky. Ta se stává epitékou a k ní se vytváří druhá, vždy menší část schránky. Tím se část populace rozsivek zmenšuje. Po dosažení minimální velikosti dojde k pohlavnímu rozmnožování (neboli smrti buňky). Při něm jsou odvrženy obě části schránky a obsah buněk se přemění v gamety. Po splynutí pohlavních buněk vzniká auxospora – velká kulovitá buňka, jejím účelem je obnovit

původní (maximální) velikost schránek. Jsou dobrými indikátory čistoty vod a jejich fosilní sedimenty z odumřelých skořápek (křemelina, diatomit) mají mnohostranné využití v průmyslu (filtrační materiál, abraziva do zubních past). Mezi jejich zástupce se řadí rody *Navicula*, *Asterionella*, *Cymbella* (Fott B., 1967).

třída Xantophyceae – Různobrvky – se vyznačují obrovskou rozmanitostí tvarů a typů stélek. Vyskytují se zde jednobuněčné, vláknité i trubicovité řasy, některé tvarově připomínají druhy z kmenu zelených řas. Z barviv hnědých řas jim chybí fukoxantin, proto je jejich barva zelená. Buněčná stěna je dvoudílná, složená z částí ve tvaru písmene H (tzv. H – kusy). Rozmnožování se děje převážně zoosporami. Vyskytují se v tekoucích i stojatých vodách, v půdě i v moři. Typickými zástupci jsou řasy rodu *Tribonema*, *Vaucheria* (Fott B., 1967).

třída Phaeophyceae – Chalupy – neboli zástupci mořských řas žijící přisedle. Mají mnohobuněčné stélky, mikroskopické vláknité rozvětvené nebo pletivé, které u některých zástupců dosahují až několika metrů. Ve stélkách se hromadí jód. Množí se vegetativně rozpadem stélky, nepohlavně zoosporami i pohlavně. Chalupy se využívají jako krmivo, hnojivo, potravina, k získávání jódu. Mezi zástupce se řadí Chalupa bublinatá a *Sargassum* (Urban a Kalina, 1980).

třída Haptophyceae - jsou drobní bičíkovci se zvápenatělými šupinami, tvořící významný podíl mořského fytoplanktonu. Jejich přemnožením vznikají bílé skvrny na moři, které označujeme jako “white water” (bílá voda). Mají dva bičíky a haptonemu. Haptonema je organela podobná bičíku, ale neslouží k pohybu, ale k fagotrofii, k rychlým změnám pohybu nebo k přichycení (Urban a Kalina, 1980).

třída Raphidophyceae – Chloromonády - zeleně zbarvení jednobuněční bičíkovci zvláštního tvaru i vnitřní stavby. Mezi chloroplasty mají vymrštělná tělíška, rozmnožují se nepohlavně. Vyskytují se ve sladkých i slaných vodách, mořské druhy občas vytvářejí toxické vodní květy, např. zástupci rodů *Gonyostomum*, *Vacuolaria*, *Merotricha* (Přírodovědecká fakulta JU, 2003).

třída Eustigmatophyceae – tato třída byla ustanovena vyčleněním z třídy Xantophyceae v roce 1971 anglickými algology Hibberdem a Leedalem. Zástupci Eustigmatophyceae jsou třídě Xantophyceae na první pohled velice

podobné. Důvodem pro vyčlenění byly podstatné rozdíly v submikroskopické stavbě buňky. V buňce je pouze jeden chloroplast se čtyřmi membránami, mimo chloroplast je umístěno stigma a také pyrenoid, ten je na chloroplast napojen tenkou stopkou. Zoosporám chybí stigma i pyrenoid, chloroplast nemají spojený s jádrem a mají pouze jeden opéřený bičík. Jejich fotosyntetickými barvami jsou chlorofyl *a*,  $\beta$ -karoten a violaxantin, tato kombinace dává jejich zástupcům žlutozelené zbarvení. Chlorofyl *b* a *c* zcela chybí. Zásobními látkami jsou chylolaminaran a lipidy. Rozmnožují se nepohlavně zoosporami, nebo častěji autosporami. Pohlavní rozmnožování nebylo pozorováno (Urban a Kalina, 1980).

### **Rhodophyta – Ruduchy**

Ruduchy jsou řasy s jednobuněčnou, častěji však vláknitou až pletivnou stélkou, nevyskytují se u nich bičíkatá stadia. Barviva tvoří hlavně chlorofyl *a*, chlorofyl *d*,  $\beta$ -karoten a ve vodě rozpustné fykobiliny, jejich barva je od modrozelené po červenou. Zásobní látkou je florideový škrob ( $\alpha$ -1, 4-polyglukan). Buněčná stěna je dvouvrstevná, vnější vrstva v horké vodě rosolovatí a získává se z ní agar. Stélky mohou být zpevněny (inkrustovány) také uhličitanem vápenatým. Rozmnožování je složité, s rodozměnou (střídání gametofytu a sporofytu). Ruduchy žijí hlavně v moři, jsou přisedlé a obývají všechny oceány. Díky přítomnosti fykobilinů dovedou využívat k fotosyntéze i nepatrné množství světla, proto jsou častými obyvateli větších hloubek. Zvápenatělé stélky se podílí na tvorbě korálových útesů. Ruduchy žijí v čistých horských potocích. K sladkovodním zástupcům patří rody *Batrachospermum*, *Audouinella*, *Lemanea* (Fott B., 1967).

### **Cryptophyta – Skrytěnky**

Skrytěnky jsou bičíkovci se zploštělým tělem a dvěma nestejně dlouhými bičíky. Na břišní straně se nachází vakovitý jícen s vymrštitelnými tělísky (ejektozómy), dva chloroplasty obsahují hlavně chlorofyl *a* a chlorofyl *c*. Buňka je pokryta periplastem, pod nímž jsou uloženy speciální - hexagonální destičky. Obsahují také červené stigma a pyrenoid. Buňky se rozmnožují podélným dělením. Skrytěnky se vyskytují hlavně v planktonu sladkých, stojatých vod (tůň, rybníky), některé žijí v mořích. Produkují toxiny. Zástupcem je řasa rodu *Cryptomonas* (Urban a Kalina, 1980).

## **Dinophyta – Obrněnky**

Obrněnky jsou bičíkovci se specifickou morfologií. Asi polovina zástupců je bezbarvá, živí se dravě nebo paraziticky. Barevní zástupci mají smíšenou výživu. Mají dva bičíky různé délky a funkce. Z pigmentů obsahují chlorofyl *a*, chlorofyl *c*,  $\beta$ -karoten a specifický peridinin. Tělo je kryto pancířem, buňky obsahují charakteristické jádro – dinokaryon (má 10x více DNA, než u ostatních eukaryot). Buňka obrněnek se skládá ze dvou částí: horní epikón a spodní hypokón. Někteří zástupci jsou schopni světélkování – bioluminiscence. Obrněnky se rozmnožují prostým dělením, ale i pohlavně. Spolu s rozsivkami tvoří hlavní součást mořského rostlinného planktonu. Při pobřeží se však mohou přemnožit a vytvořit vegetační zabarvení vody, jemuž říkáme “red tide” (rudý příliv). Produkují slizy a toxiny (saxitoxin) a tím způsobí úhyn ryb nebo jiných mořských živočichů. Sladkovodní druhy tyto potíže nezpůsobují. K obrněnkám náleží rody *Peridinium* a *Ceratium* (Urban a Kalina, 1980).

## **Euglenophyta – Krásnoočka**

Krásnoočka mají oválné vřetenovité nebo vakovité tělo. Buňka má v přední části lahvovitou vchlípeninu (ampulu), z níž vychází většinou jeden bičík (druhý je zakrnělý). Fotosyntetická barviva tvoří chlorofyl *a*, chlorofyl *b*,  $\beta$ -karoten, zásobní látkou je paramylon ( $\beta$ -1,3-polyglukan). Buňku kryje pružná nebo pevná pelikula (složena z bílkovinných proužků), nebo slizovitá schránka. Druhy s pružnou pelikulou mohou měnit tvar těla. Dobře viditelná světločivná skvrna je červená, není součástí chloroplastu, ale je samostatnou organelou. Bezbarvé druhy se živí dravě, k tomu jsou vybaveny aparátem pro přichycení pevné potravy (faryngeální aparát). Rozmnožují se dělením, pohlavní rozmnožování nebylo pozorováno. Vyskytují se v silně znečištěných vodách, jako jsou návesní rybníky, kaluže. Nejznámějším rodem je *Euglena* (Fott B., 1967).

## **Glaucophyta**

Tento kmen se vyznačuje nejednotností vnitřních struktur buněk. Hlavním společným znakem je endosymbióza se sinicí, kterou nesou v sobě - tzv. cyanela. Buňka sinice nahrazuje chloroplast. Cyanely se ale poněkud liší od chloroplastů i od sinic. Od chloroplastů se liší tím, že mají peptidoglykanovou stěnu jako sinice a i jejich vnitřní uspořádání je podobné spíše sinicím (thylakoidy, karboxyzómy).

Pigmenty jsou skoro stejné jako u sinic, obsahují chlorofyl *a*, zásobní látkou je škrob. Zástupcem je *Glaucocystis* (Přírodovědecká fakulta JU, 2003)

### **Chlorarachniophyta**

Jsou to améboidní prvoci propojení dlouhými filopodii do síťovitých plazmodií. Mají 4-8 chloroplastů s pyrenoidem, obsahují chlorofyl *a* a hlavně *b*. Složení karotenoidů není známo. Chloroplasty získaly sekundární endosymbiózou zelené řasy, mají čtyři obalné membrány a je zde stále viditelné redukované jádro zelené řasy. Zásobní látkou je chrysolaminaran ( $\beta$ -1,3-glukan). Zástupcem této skupiny je *Chlorarachnion* (Přírodovědecká fakulta JU, 2003).

## **2.4.2. Význam řas**

### Producenti organické hmoty a kyslíku

Řasy jsou producenti živé organické hmoty a kyslíku při fotosyntéze díky asimilačním barvivům. Jako producenti organické hmoty stojí na začátku potravního řetězce. Tvoří součást perifytonu (mnohobuněčné stélky), což je nárost, neboli společenstvo vodních organismů (rostlin a živočichů), žijících přisedle na předmětech ponořených do vody, obrůstají jezy a tvoří souvislé porosty. Rovněž tvoří součást fytoplanktonu, což jsou drobné rostliny vznášející se ve vodě nebo pasivně unášené vodním proudem a slouží jako potrava pro malé vodní živočichy. Fytoplankton má jednobuněčné stélky.

Některé druhy řas vytvářejí toxiny, které se dostávají do vody. Tyto toxiny jsou nebezpečné při přemnožení řas, mohou nejen zrušit biologickou rovnováhu vodstva a vyvolat hromadný úhyn dalších organismů, ale i ohrozit zdraví lidí, dostanou-li se např. do rybiho masa (Šesták Z., 1999).

### Doplňěk stravy

Mořské řasy v sobě ukrývají ohromné množství aktivních látek, obsahují v sobě až padesátitisícový násobek výživných látek obsažených v moři a ve svých tkáních mají tisíckrát více jódu, stokrát více vápníku a desetkrát více hořčíku a mědi než pozemské rostliny. V současné době upoutávají největší pozornost ty druhy řas, které jsou využitelné jako potravní doplněk. Průmyslově se dnes produkuje červená

slanovodní řasa *Dunaliella*, zelená sladkovodní řasa *Chlorella*, a dva druhy sinic – *Arthrospira* (dříve *Spirulina*) a *Haematococcus*.

*Arthrospira* využívali jako potravinu již Aztékové, dnes je považována se považuje za přírodní zdroj proteinů, antioxidantů, karotenoidů, nenasycených mastných kyselin a dalších látek. *Chlorella* se svým vysokým obsahem chlorofylu má významné regenerační schopnosti. Vnitřně působí řasy (jako potravinové doplňky) proti nedostatku organických složek nebo minerálů, stimulují metabolismus, posilují obranyschopnost a dodávají vitální energii (Apro Delta, 2006).

### Řasy jako zdroj léčiv

Podíváme-li se podrobně na lékopisy, můžeme tam najít tyto drogy: karagen, který slouží jako zahušťovací prostředek pro výrobu mastí, nebo název agar-agar, což je prostředek proti zácpě. Je nestravitelný a přidává se jako účinná látka do projímadel.

Řasy jsou bohatým a rozmanitým zdrojem farmakologicky účinných přírodních produktů a doplňků výživy. Hlavními produkty, které jsou v současné době uváděny na trh nebo se zvažuje jejich využití pro zdraví lidí a zvířat, jsou karotenoidy, fykobiliny, mastné kyseliny, polysacharidy, vitamíny, a steroly (tukové látky rostlinné povahy, svojí strukturou se podobají cholesterolu, zabraňují vstřebávání cholesterolu ze zažívacího traktu).

Je stále větší zájem o využití řas pro výrobu antibiotik a farmakologicky účinných látek. Existuje celá řada farmaceutických produktů získaných z mořských řas. Některé z nich obsahují například antimikrobiální látky, antivirotika, antimykotika, mají ochranné účinky na nervový systém, léčivé proteiny (Vítek L., 2010).

### Čištění odpadních vod

Samočištění vody je v přírodě přirozený proces, kdy za pomoci bakterií, sedimentace a vzdušného kyslíku jsou organické látky mineralizovány a rozkládány na anorganické látky. Zde hrají velkou roli při mineralizaci řasy na dně a na ponořených rostlinách. Se zvyšováním množství odpadních vod v závislosti

s rostoucím průmyslem a zvětšováním lidských sídlišť však nestačí pouhé samočištění, příroda by to sama nezvládla. Proto se přistupuje k umělému čištění odpadních vod v biologických čistírnách (Fott B., 1967).

Mikroskopické řasy rostou v odpadních vodách symbioticky s bakteriemi. Bakterie rozkládají organický materiál na minerální látky a CO<sub>2</sub>, které řasy ke svému růstu potřebují. Řasy zpětně uvolňují kyslík potřebný pro bakterie k oxidaci organického materiálu. Další produkt fotosyntézy - vodík - je využit k zabudování uhlíku a minerálních látek do buněk řas. Výsledkem je intenzivní narůst řasové biomasy, která se samovolným vysrážením oddělí od tekuté fáze. Tuto biomasu lze využít jako krmivo nebo zpracovat např. na bioplyn (Kotrbaček V., 2006).

## 2.5. Experimentální organizmus *Trachydiscus minutus*

Žlutozelená řasa *Trachydiscus minutus* byla dříve řazena do třídy Xantophyceae. Po podrobnějším zkoumání její morfologie, životního cyklu, pigmentového složení bylo zjištěno, že tyto znaky jsou odlišné od skupiny Xantophyceae a proto byla řasa *Trachydiscus minutus* zařazena do skupiny Eustigmatophyceae.

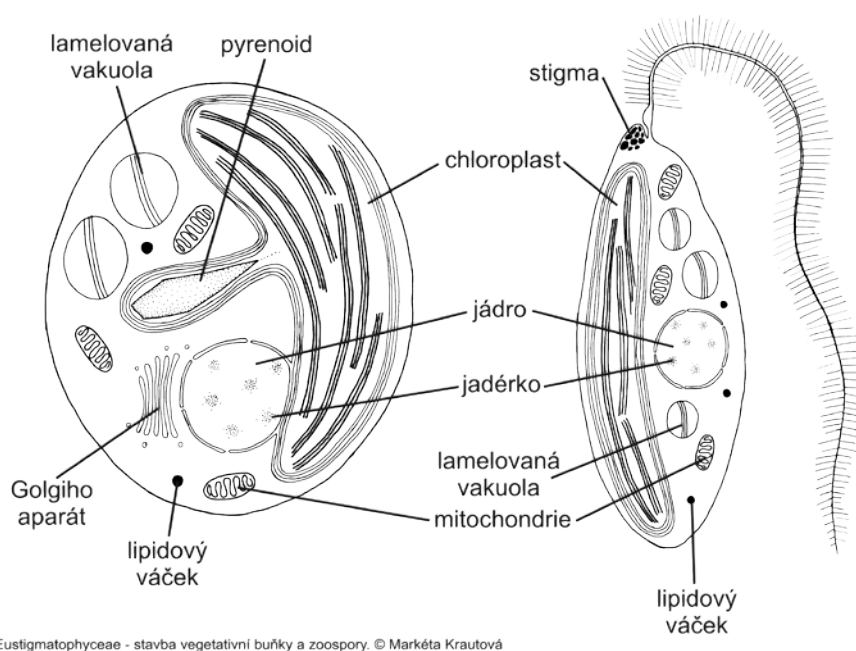
*Trachydiscus minutus* byl poprvé objeven v rybníčku pařížské botanické zahrady (Bourrelly, 1951) a poté v také ve fytoplanktonu z několika dalších lokalit ve Francii. V poslední době se tato řasa objevuje také v bažinaté rezervaci Srebarna v Bulharsku (Stoyneva, 1998), nebo v subtropickém jezeře v Argentině. V České republice byl nalezen v září 2005 ve fytoplanktonu jedné z chladících věží jaderné elektrárny Temelín. Zřídka se objevuje také ve fytoplanktonu v třeboňském rybníku Svět v měsících březnu až dubnu. Z toho můžeme usuzovat, že *Trachydiscus minutus* je poměrně rozšířená sladkovodní řasa od mírného pásu po subtropický, ve fytoplanktonu má však menší zastoupení (Lukavský J., 2012).

Jedním z důvodů, proč řasa *Trachydiscus minutus* nebyla detailně studována před 21. stoletím je fakt, že se snadno, z hlediska morfologie, může zaměnit se zelenou řasou rodu *Chlorella* (Alexandrov S.D. a kol., 2014). *Trachydiscus minutus* byl zkoumán fylogenetickou analýzou pomocí genu 18S rRNA (nejčastěji používaný gen pro studium příbuznosti organizmů). Všechny výsledky ukázaly, že



*Trachydiscus minutus* nepatří do třídy Xantophyceae, ale je členem „nové“ linie Eustigmatophyceae (Příbyl a kol., 2012).

Stélka je jednobuněčná, chloroplasty nejsou spojené s jádrem a v buňce jsou přítomny lamelované vakuoly, což je charakteristické pro třídu Eustigmatophyceae, kam se *Trachydiscus minutus* zařazuje, na rozdíl od třídy Xantophyceae. Buňky obsahují lipidy, které jsou snadno pozorovatelné ve světelném mikroskopu jako velké oranžové tělísko. K fotosyntetickým pigmentům této řasy patří převládající karotenoid violaxantin, dále vaucheriaxantin,  $\beta$ -karoten, zeaxantin a neoxantin. Z chlorofylů je přítomen pouze chlorofyl *a*, zatímco chlorofyl *b* a chlorofyl *c* zcela chybí (Lukavský J., 2012).



**Obr. 6.: Eustigmatophyceae** – stavba vegetativní buňky (vlevo) a zoospory (vpravo) (Krautová, 2003).

Hlavní rozdíly mezi třídami Eustigmatophyceae a Xantophyceae jsou uvedeny v tab. 1.

Životní cyklus tohoto organismu je jednoduchý, probíhá dělením mateřských buněk a za standardních podmínek netvoří zoospory. Zoospory se však tvoří ve tmě a to v závislosti na teplotě. Při nízké teplotě neklesající pod 15 °C byla tvorba zoospor vyšší, při vzrůstající teplotě se tvorba zoospor snižuje a při teplotě 28 °C se zoospory téměř netvoří. Optimální teplota pro tvorbu zoospor byla stanovena na 20 °C. Jakmile se však *Trachydiscus minutus* opět vystaví světlu, produkce zoospor

klesne. Zoospory mají jeden bičík, pokud se vystaví světlu, bičík odhodí a zaoblí se (Příbyl a kol., 2012). Zoospory této řasy mají, na rozdíl od vegetativní buňky, stigma (světločivnou skvrnu), které je umístěno mimo chloroplast, tzv. pravé stigma (viz. obr. 6). Odtud také pochází název třídy Eustigmatophyceae.

**Tab. 1:** Srovnání rozdílů tříd Eustigmatophyceae a Xantophyceae.

Srovnání tříd Eustigmatophyceae a Xantophyceae		
Třída	Eustigmatophyceae	Xantophyceae
Rozmnožování	Nepohlavní: autospory, zoospory ve tmě Zoospory: 1 pěřivý bičík	Nepohlavní: prosté dělení, autoapory, zoospory Zoospory: 2 různé bičíky Pohlavní
Pigmenty	Chlorofyl <i>a</i> , $\beta$ -karoten, violaxantin	Chlorofyl <i>a</i> a <i>c</i> , $\beta$ -karoten, vaucherixantin
Zásobní látky	chrysolaminaran, olej	chrysolaminaran, olej

Zásobními látkami řasy *Trachydiscus minutus* jsou chrysolaminaran a lipidy (oleje). Lipidům je věnována kapitola 2.7.

Jako u každého živého organismu, tak i u řasy *Trachydiscus minutus*, ovlivňuje teplota a světlo její růst, rozmnožování a obsah metabolických látek jako jsou proteiny, cukry, lipidy. *Trachydiscus minutus* má teplotní toleranci mezi 20°C až 32°C, při tomto rozmezí dochází jen k mírným změnám biochemického složení. Pokud je vystaven extrémním teplotám – pod 15°C a nad 40°C, klesne obsah chlorofylu a enzymu Rubisco, zpomalí se růst buněk, sníží se obsah sacharidů, obsah proteinů zůstává stejný, ale zvýší se obsah lipidů.

Také obranný systém *Trachydiscus minutus* je regulován rozdílně v reakci na extrémní teploty (15°C a 40°C):

při 15°C všechny enzymy, které produkuje:

- SOD- superdioxid dismutázy
- CAT- kataláza
- POD- peroxidáza

jsou potlačeny mimo:

- GR- glutathion reduktázy

při 40°C se prudce zvyšuje aktivita enzymů:

- SOD
- CAT
- proteázy a polypeptidy jsou nadměrně

vylučovány

kleslá aktivita:

- GR
- POD

Všechny tyto stresové odpovědi na teplotu jsou znásobeny vlivem intenzity světla (Gigova a kol., 2012).

## 2.6. Lipidy

Lipidy jsou látky rostlinného, živočišného i mikrobiálního původu, nacházejí se v buněčných membránách a nervových tkáních. Někdy se pro lipidy používá název „tuky“, to však není přesné, protože tuky představují pouze jednu z podskupin lipidů. Lipidy jsou pevné i kapalné, jsou nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v organických rozpouštědlech, jako je etanol, éter nebo chloroform. Po chemické stránce jsou lipidy estery vyšších mastných kyselin a alkoholů nebo jejich derivátů (Hanahan D.J. a kol., 1964).

Lipidy jsou důležité pro fungování organismů. Tvoří součást biologických membrán, mají ochrannou funkci, jako je tepelná izolace, ochrana orgánů. Dále mají regulační funkci – ovlivňují množství hormonů, vitamínů A, D, E, K a rovněž slouží jako zdroj a zásobárna energie v organizmech. Dokonce jsou lipidy větším zdrojem energie, než sacharidy a nelze je nahradit jinými živinami (MZ ČR, 2014).

Lipidy jsou tedy složeny z esenciálních mastných kyselin, které jsou důležité pro zdraví, vývoj organismu a tělo je musí přijímat v potravě. Mastné kyseliny se dělí na nasycené a nenasycené. Zdraví škodlivé jsou nasycené mastné kyseliny, které zvyšují cholesterol i množství ukládaného tuku v těle a tím se rovněž zvyšuje riziko onemocnění cév a srdce. Nasycené mastné kyseliny se vyskytují převážně v živočišné stravě, jako je mléko, máslo, maso a živočišné tuky, v rostlinné stravě je najdeme v kokosovém, palmovém oleji a v kakaovém másle.

Nenasycené mastné kyseliny jsou pro zdraví naopak příznivé. Najdeme je v rostlinných olejích, rybách a také v řasách. Nenasycené mastné kyseliny snižují riziko onemocnění cév a srdce, hrají významnou roli v prevenci zánětů kloubů a cukrovky (Flanderková M., 2012).

Z hlediska výživy se v současné době věnuje velká pozornost výzkumu produkce nenasycených mastných kyselin v řasách. Takzvané omega-3 a omega-6 nenasycené mastné kyseliny jsou nezbytné pro funkci organismu, tělo si je nedovede samo vytvořit a musí být přijímány ve stravě. Často jsou tyto kyseliny označovány PUFA (Poly Unsaturated Fatty Acids = polynenasycené mastné kyseliny).

Typy omega-3 mastných kyselin:

- ALA ( $\alpha$  – linolenová kyselina), kterou vykazují zelené řasy
- EPA (eikosapentaenová kyselina), najdeme ji u červených a hnědých řas
- DHA (dokosahexaenová kyselina), v některých mořských řasách

Typy omega-6 mastných kyselin:

- AA (kyselina arachidonová) – v červených a hnědých řasách
- GLA ( $\gamma$ -linolenová kyselina) – výskyt u řasy rodu *Spirulina* (Valoušková S., 2008).

*Trachydiscus minutus* je novým zdrojem PUFA, zvláště EPA. V laboratorních podmínkách mohou být tyto lipidy navýšeny až o 39% z původního množství, pokud tuto řasu vystavíme „hladovění“ tzn., odebereme jí jednu z živin – dusík, fosfor nebo síru. Ke zvýšení produkce lipidů také dojde při vystavení této řasy extrémním teplotám (Lukavský J., 2012), jak bylo zmíněno výše v části 2.6.

### 3. MATERIÁL A METODY

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo stanovení optimálních podmínek pro růst řasy *Trachydiscus minutus* (Bourr.) Ettl, kmen Lukavský a Příbyl 2005/1. V rámci bakalářské práce byla použita řasa, která byla původně získána ze Sbírký autotrofních organismů CCALA (*Culture Collection of Autotrophic Organisms*) Botanického ústavu České akademie věd v Třeboni.

Řasa byla kultivována v tekutém médiu. Veškeré kultivace řas byly prováděny v jednoduchých aparaturách sestavených z 3 malých kultivačních akvárií. Každé kultivační akvárium mělo osm 100 ml skleněných válečků (ve kterých byla řasa kultivována) opatřených gumovými zátkami, vzduchováním, které bylo zajištěno akvariijním motůrkem s připojenými hadičkami. Aby nedocházelo ke kontaminaci nesterilním přiváděným vzduchem, bylo vzduchování doplněno filtry Millex FG50 (Millipore, Německo). Ukázka této kultivační aparatury je znázorněna v obrazové příloze 1., 2. a 3.

Řasa *Trachydiscus minutus* byla před každou kultivací naředěna z mateřské kultury médiem (minerální živný roztok) na určitou optickou hustotu OD (optical density). Tato počáteční hustota byla změřena na ručním přístroji AquaPen AP-100 (Photon Systems Instruments, ČR).

Praktická část bakalářské práce s badatelským zaměřením byla po vzoru ostatních vědeckých prací rozdělena na dílčí části – v jednotlivých částech byly postupně stanoveny růstové podmínky.

#### 3.1. Stanovení optimální teploty

Teplota je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících růst řas. Jak bylo již zmíněno v části 2.6. *Trachydiscus minutus* roste v rozmezí 15-40 °C. Při první sérii pokusů byla zjištěna optimální teplota [°C], kdy produkce biomasy byla nejvyšší. *Trachydiscus minutus* se v tomto případě kultivoval v Z-médiu (původní doporučené médium vyznačené na etiketě původu řasy). Akvária s kultivačními válečky byla naplněna vodou a temperována při třech různých teplotách 17 °C, 23 °C a 29 °C. Stálá teplota byla zajištěna průtokovým termostatem Haake SC150-S5P (Thermo Fisher Scientific, USA). Byly použity panely diodových světél (Photon Systems Instruments, ČR), jejich intenzita byla náhodně vybrána. V této fázi pokusu intenzity

světla činily  $7 \mu\text{E} - 480 \mu\text{E}$  (mikroEinstein =  $\mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ ). Toho bylo docíleno zešíkmením panelu světelných vlniček vůči kultivačním akváriím. Množství světla bylo měřeno ručním přístrojem Li-cor (LI-189, LI-COR, USA).

### 3.2. Stanovení optimální intenzity světla

Ve druhé části pokusů bylo zjišťováno, jaký vliv má intenzita světla na růst řasy *Trachydiscus minutus*. Opět byla použita stejná kultivační aparatura s tím rozdílem, že byla využita pouze dvě kultivační akvária, poněvadž již byla známa optimální kultivační teplota z předchozí části pokusu. Využilo se také údajů o přibližných intenzitách světla z předchozího pokusu, které původně činily  $7 \mu\text{E} - 480 \mu\text{E}$ .

Tato dvě kultivační akvária s celkem šestnácti 100 ml válečky a nařaděným kmenem *Trachydiscus minutus* byla vystavena různým intenzitám světla. Toho se docílilo jednoduchým pootočením (zešíkmením) diodových panelů vůči kultivačním akváriím, nebo pootočením kultivačních akvárií vůči pevně ukotveným diodovým panelům. Tím bylo dosaženo plynulé snižování intenzity dopadajícího světla na kultivační válečky. Oba způsoby jsou viditelné na obrázcích v obrazové příloze 1., 2. a 3 v kapitole 10. Množství světla bylo změřeno ručním přístrojem Li-cor. Rozmezí intenzity světla a jednotlivé hodnoty jsou vyjádřeny na obr. 8.

### 3.3. Stanovení optimálního média

V další, třetí fázi pokusu byla použita různá média svým složením živin velmi podobná, obsahem jednotlivých složek se však lišila, nebo byla o některé složky obohacena, či ochuzena. Porovnání složení jednotlivých médií je shrnuto v tab. 3.

Z předchozích dvou pokusů byly použity jako faktory pro růst řasy – optimální teplota a optimální množství světla. Zde bylo využito celé kultivační aparatury, tzn. všechna tři kultivační akvária. Kmen *Trachydiscus minutus* byl opět nařaděn, ale pokaždé odlišnými médii:

- první akvárium > Z-médium (Zehner a Staub 1961)
- druhé akvárium > 1/2 SŠ (Zachleder a Šetlík, 1982)
- třetí akvárium > BBM (Bischoff a Bold 1963)

Aby bylo využito všech 8 válečků v kultivačním akváriu, bylo provedeno ředění jednotlivých médií podle následující tab. 2.

**Tab. 2:** Poměry ředění jednotlivých médií s destilovanou vodou a řasou *Trachydiscus minutus*.

<b>Ředění médií</b>	<b>1+2 bez ředě ní</b>	<b>3+4 75%</b>	<b>5+6 50%</b>	<b>7+8 25%</b>	
<i>Trachydiscus minutus</i>	20	20	20	20	ml
<b>Médium (Z-médium, BBM, 1/2 SŠ)</b>	60	40	30	20	ml
<b>Destilovaná voda</b>	0	20	30	40	ml

### 3.3.1. Příprava jednotlivých médií

***BBM*** – (Bischoff a Bold 1963)

Příprava média:

	Zásobní roztok	na 1000 ml
<b>1</b>	MIX	10 ml
<b>2</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 ml
<b>3</b>	EDTA	1 ml
<b>4</b>	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 ml
<b>5</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> + mikroelementy	1 ml

Zásobní roztoky:

<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>	
Chemikálie	g/100 ml	Chemikálie	g/100 ml	Chemikálie	g/100 ml	Chemikálie	g/100 ml
NaNO <sub>3</sub>	2,5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,75	Na <sub>2</sub> -EDTA (chelaton 3)	5	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 + 100 µl
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,75	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,75	+ KOH	+3,1		
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25						
NaCl	0,25						

<b>5</b>	
Chemikálie	g/100 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,142
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,882
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,144
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,242
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,157
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,049

Roztok č. 5 nesterilizovat, pouze sterilizovat filtrací!!!!

Příprava médií i zásobních roztoků do destilované vody.



## **Z – médium** (Zehner & Staub 1961)

### Příprava média

	<b>Zásobní roztok</b>	<b>na 1000 ml</b>
<b>1</b>	NaNO <sub>3</sub>	10 ml
<b>2</b>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 ml
<b>3</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 ml
<b>4</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 ml
<b>5</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10 ml
<b>6</b>	Fe-EDTA	0,2 ml
<b>7</b>	Gaffron roztok	0,08 ml

### Zásobní roztoky:

	<b>Chemikálie</b>	<b>g/100 ml</b>
<b>1</b>	NaNO <sub>3</sub>	4,67
<b>2</b>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,59
<b>3</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,31
<b>4</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25
<b>5</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,21
<b>6</b>	<b>Fe-EDTA</b> HCL 35% FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> -EDTA	0,88 ml 1,8 1,86
<b>7</b>	<b>Gaffron roztok</b> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> WO <sub>3</sub> ·2H <sub>2</sub> O (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O KBr KI ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O NiSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·16H <sub>2</sub> O Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·24H <sub>2</sub> O	0,31 0,223 0,003 0,0088 0,0119 0,0083 0,0287 0,0154 0,0146 0,0125 0,0198 0,0037 0,0035 0,0474

Roztoky č. 6 a 7 přidat po sterilizaci!!!

Příprava médií i zásobních roztoků do destilované vody.

## **1/2 SŠ – médium** (Simmer – Šetlík)

### Příprava média

	<b>Zásobní roztok</b>	<b>na 1000 ml</b>
<b>1</b>	Mikroelementy	1 ml
<b>2</b>	KNO <sub>3</sub>	10 ml
<b>3</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 ml
<b>4</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3 ml
<b>5</b>	Chelatonát Fe <sup>3+</sup> - Na <sup>-</sup>	1 ml
<b>6</b>	CaCl <sub>2</sub>	0,2 ml
<b>7</b>	KOH	0,4 ml

### Zásobní roztoky:

	<b>Chemikálie</b>	<b>g/100 ml</b>
<b>1</b>	<b><u>Mikroelementy</u></b> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O nebo CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	 0,309 0,120 0,0141 0,120 0,127 0,143 0,184
<b>2</b>	KNO <sub>3</sub>	20,21
<b>3</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,00
<b>4</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	32,94
<b>5</b>	Chelatonát Fe <sup>3+</sup> - Na <sup>-</sup>	1,85
<b>6</b>	CaCl <sub>2</sub>	3,94
<b>7</b>	KOH	12,00

Roztoky č.1 a č.5 přefiltrovat, ostatní vysterilizovat při 105°C/30min. kromě KOH.

Příprava médií i zásobních roztoků do destilované vody.

**Tab. 3:** Porovnání obsahů jednotlivých živin v médiích.

<b>Makroelementy</b>	<b>Z-médium [g/100 ml]</b>	<b>1/2 SŠ [g/100 ml]</b>	<b>BBM [g/100 ml]</b>
NaNO <sub>3</sub>	4,67	-	2,5
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,59	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,31	-	0,75
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25	32,94	0,75
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,21	-	-
<b>Fe-EDTA</b>			
HCL 35%	0,88 ml/100 ml	-	-
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,8	-	-
Na <sub>2</sub> -EDTA	1,86	-	5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	5,22	0,25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	17,00	1,75
+ KOH	-	12,00	3,1
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	100 µl/10 ml
KNO <sub>3</sub>	-	20,21	-
Chelatonát Fe <sup>3+</sup> - Na <sup>-</sup> = Fe-Na-EDTA	-	1,85	-
NaCl	-	-	0,25
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	-	0,5
<b>Mikroelementy</b>	<b>Z-médium</b>	<b>1/2 SŠ</b>	<b>BBM</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,31	0,309	1,142
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,223	0,120	-
Na <sub>2</sub> WO <sub>3</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,003	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,0088	0,184	-
KBr	0,0119	-	-
KI	0,0083	-	-
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0287	0,143	0,882
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,0154	-	-
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0125	0,127	0,157
NiSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0198	-	-
Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0037	-	-
V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·16H <sub>2</sub> O	0,0035	-	-
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·24H <sub>2</sub> O	0,0474	-	-
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-	0,144
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	-	0,242
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0146	-	0,049
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	0,141	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-	-

### 3.4. Akumulace zásobních lipidů

V závěrečné sérii pokusů bylo zjišťováno, za jakých podmínek dochází k největší akumulaci zásobních lipidů v buňkách *Trachydiscus minutus*. Bylo použito kompletní aparatury, tzn. tři temperovaná kultivační akvária, panely diodových světel, vzduchování. V tomto pokusu se využilo již získaných hodnot. Použilo se médium a intenzity světla, které se ukázaly jako neoptimálnější pro růst tohoto druhu řasy v předchozích dílčích pokusech. Z tohoto důvodu se nemuselo využívat všech kultivačních válečků, ale pouze dva v každém kultivačním akváriu pro danou teplotu.

Akumulaci zásobních lipidů nejvíc ovlivňuje teplota, proto byla kultivační akvária vystavena působení tří teplot, stejným jako bylo uvedeno v části 3.1.

V průběhu kultivace bylo odebíráno 100  $\mu$ l vzorku do mikrotitrační destičky, dále byly tyto vzorky obarveny 3  $\mu$ l Nilské červeně a po 15 minutách působení Nilské červeně se vzorky změřily na přístroji TECAN Infinite F200 (TECAN, Rakousko) při použitých filtrech: excitace 485 nm, emise 590 nm.

### 3.5. Mikroskopie

Snímky z fluorescenční mikroskopie byly pořizovány pomocí kamery DP72 na mikroskopu BX51 (Olympus, Japonsko).

Pro zobrazení zásobních olejů obarvených Nilskou červení v buňkách řas byla použita kombinace filtrů s označením U-MNUA2 (excitace 360-370 nm, emise 420-460 nm).

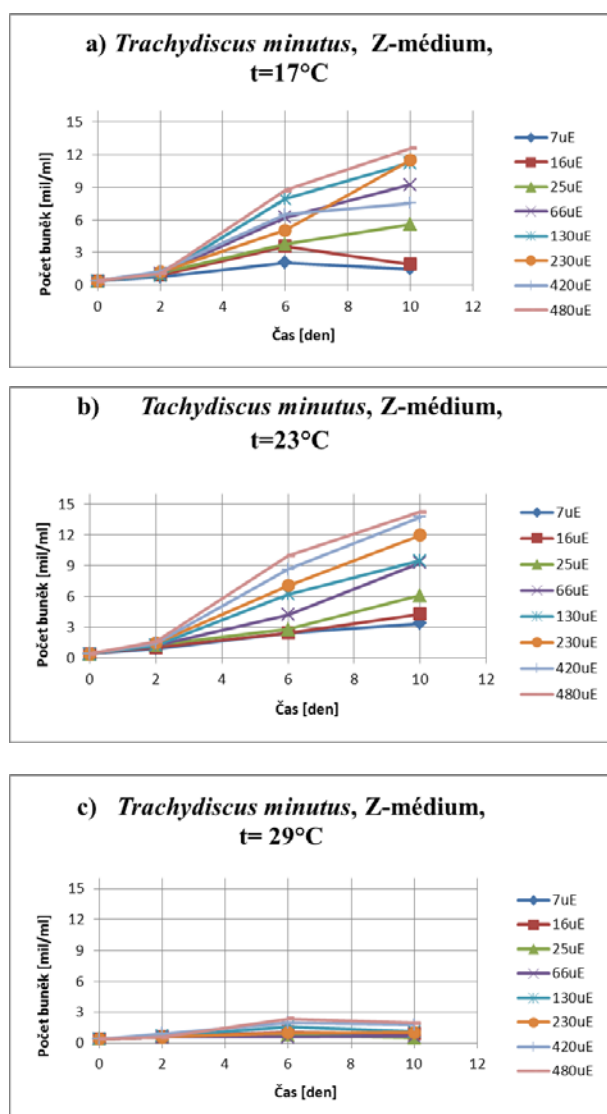
Morfologie buňky byla sledována ve viditelném procházejícím světle.

## 4. VÝSLEDKY

V dílčích pokusech stanovení optimálních hodnot pro růst řasy *Trachydiscus minutus* byly zjištěny tyto hodnoty:

### 4.1. Teplota

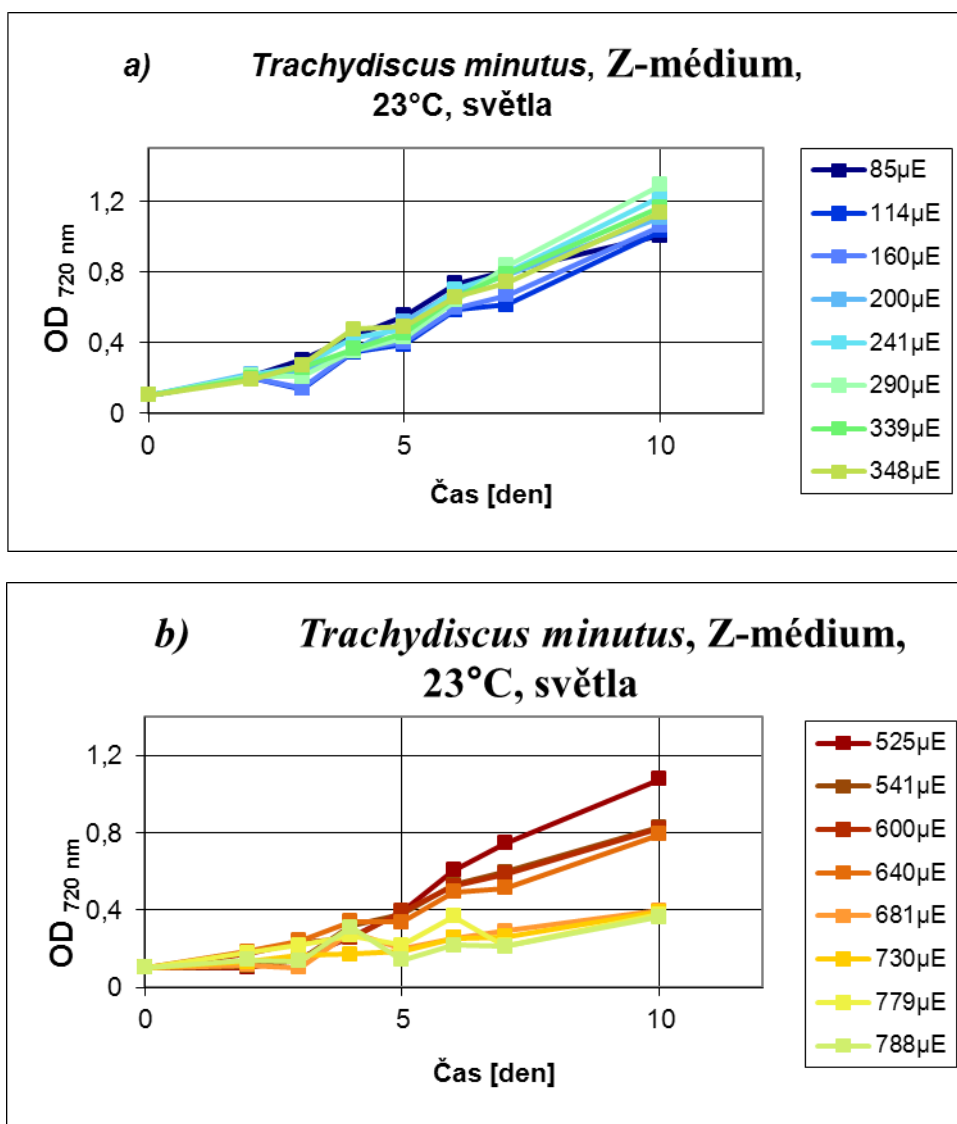
Stanovení optimální teploty bylo provedeno podle popisu v kapitole 3.1. Nejlepších růstových hodnot *Trachydiscus minutus* dosahoval při teplotě 23 °C. Při teplotách 17 °C a 29 °C nebyl nárůst biomasy tak zřetelný. Růstové křivky jednotlivých teplot jsou vyobrazeny na obr. 7.



**Obr. 7: Teplota:** Grafy znázorňují růstové křivky řasy *Trachydiscus minutus* v závislosti na teplotě a různé intenzitě světla: a) řasa temperovaná při teplotě 17 °C, b) řasa temperovaná při teplotě 23 °C, c) řasa temperovaná při teplotě 29 °C. Barevně jsou rozlišeny intenzity světla.

## 4.2. Intenzita světla

V grafech na obr. 8 je znázorněno jaké intenzitě světla byly vystaveny 100 ml válečky s řasou *Trachydiscus minutus*. Z grafů je patrné, jak *Trachydiscus minutus* reagoval na intenzitu ozáření světlem. Nejvyšší nárůst řasové biomasy odpovídal hodnotě intenzity světla 290  $\mu\text{E}$ .

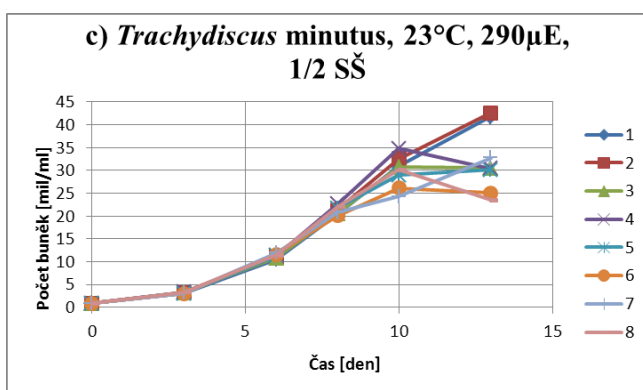
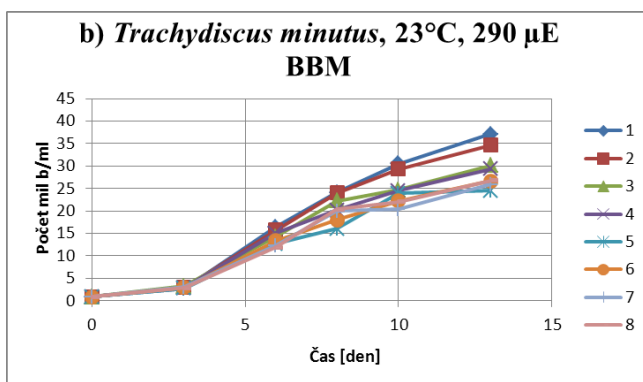
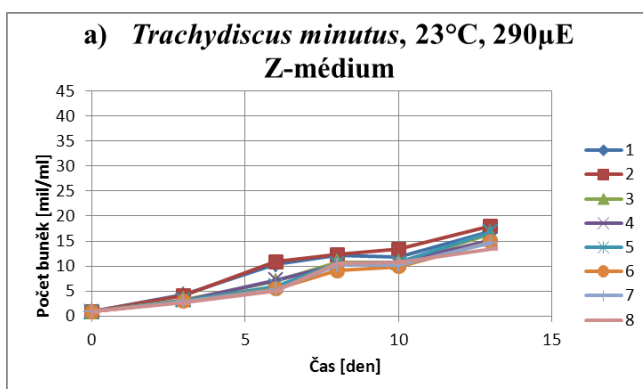


**Obr. 8: Světla:** Grafy znázorňují růstové křivky řasy *Trachydiscus minutus* při teplotě 23 °C v Z-médium v závislosti na větším rozsahu světelné intenzity, a) nižší intenzity světla 85-348  $\mu\text{E}$ , b) vyšší intenzity světla 525-788  $\mu\text{E}$ .

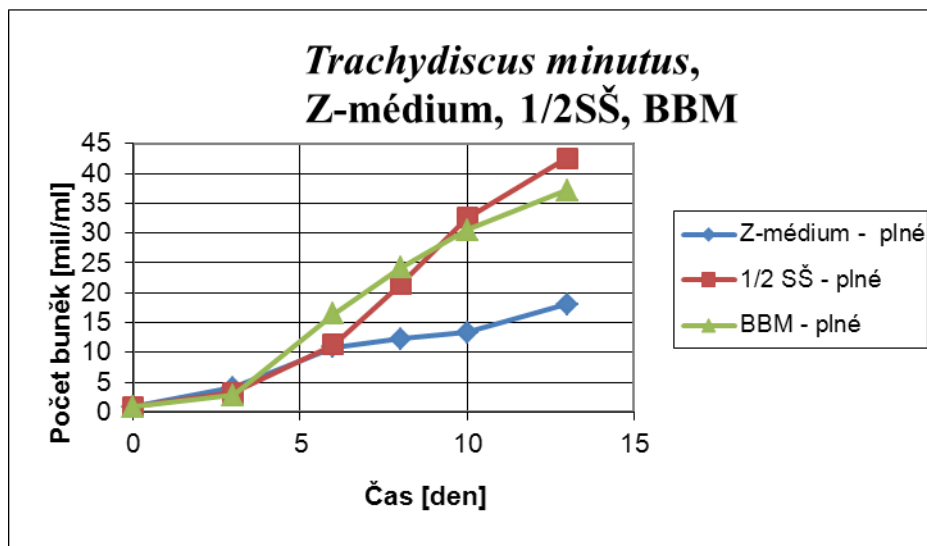
### 4.3. Složení média

V dalším dílčím pokusu bylo stanoveno, ve kterém médiu *Trachydiscus minutus* produkuje nejvíce biomasy. Z výsledků růstových křivek grafů na obr. 9 se jeví jako nejideálnější médium 1/2 SŠ. Dílčí částí tohoto pokusu bylo ovlivnění růstu řasy naředěnými médii podle tab. 2.

Souhrnné porovnání nejlepších výsledků všech tří médií a zároveň neoptimálnější ředění je znázorněno v grafu na obr. 10. Nejvyšších hodnot nárůstu biomasy bylo dosaženo u neředěného 1/2 SŠ.



**Obr. 9: Média:** Grafy znázorňují růstové křivky řasy *Trachydiscus minutus* při teplotě 23 °C, intenzitě světla 290 μE ve třech různých médiích a) Z-médium, b) BBM, c) 1/2SŠ. Barevné křivky 1-8 představují různá ředění médií s destilovanou vodou podle tab. 2.

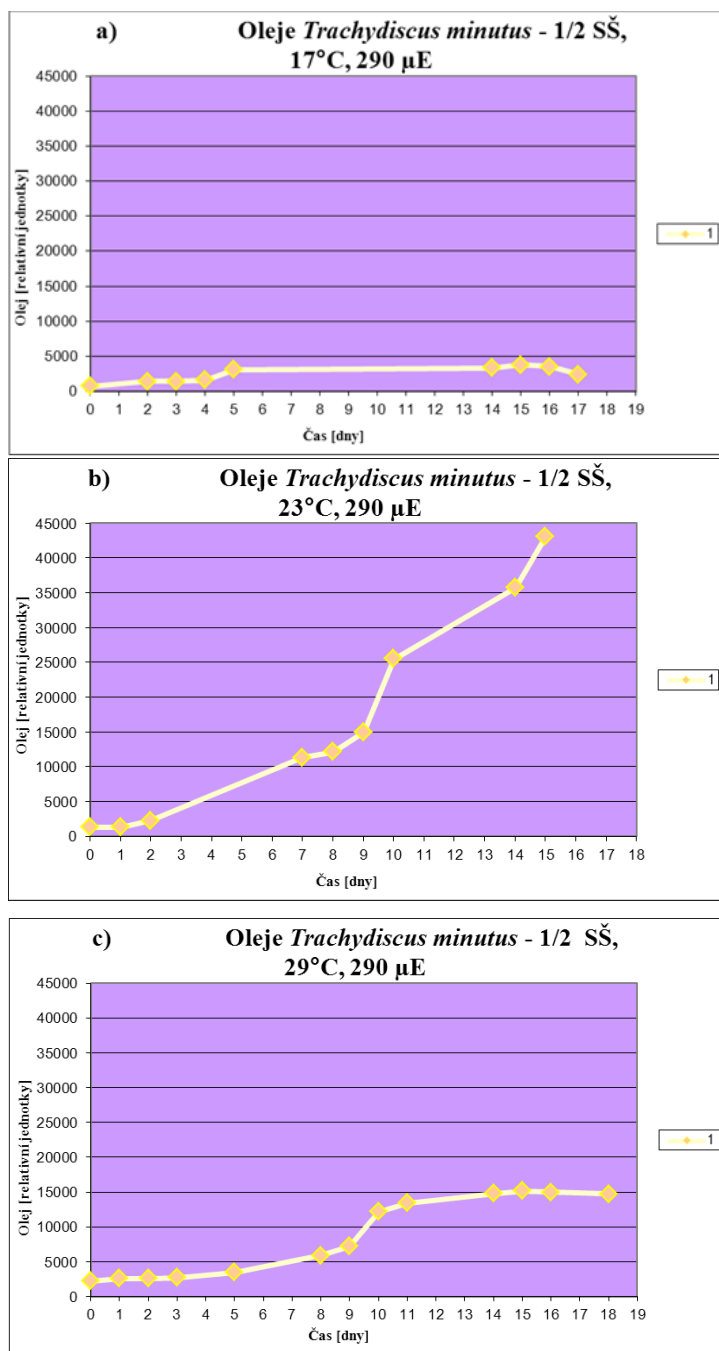


**Obr. 10: Porovnání médií:** Graf znázorňuje nejvyšší hodnoty nárůstu biomasy pro jednotlivá média. Výchozí hodnoty pocházejí z grafů na obr. 9.



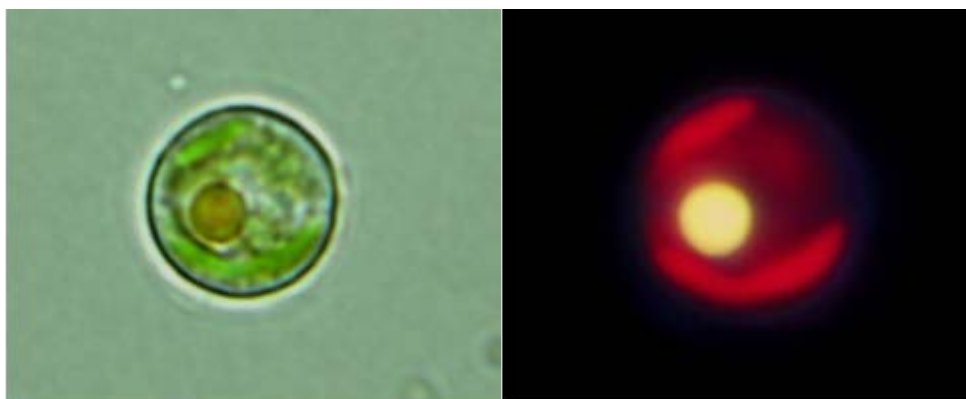
#### 4.4. Akumulace lipidů

Poslední fází experimentu bylo stanovení akumulace lipidů v buňkách řasy *Trachydiscus minutus*. Oleje byly stanoveny pomocí spektrofotometrie po obarvení Nilskou červení. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při teplotě 23 °C, jak je patrné z grafů na obr. 11.



**Obr. 11: Akumulace lipidů:** Grafy znázorňují nárůst zásobních lipidů řasy *Trachydiscus minutus* v médiu 1/2 SŠ a intenzitě světla 290 μE při různé teplotě, a) 17 °C, b) 23 °C, c) 29 °C.

Akumulace olejů v buňkách byla vizualizována pomocí fluorescenční mikroskopie. Na vzorek bylo svíceno UV světlem, obarvená olejová tělíska svítí žlutě. Červeně byla viditelná autofluorescence chlorofylu obsaženého v chloroplastu (viz. obr. 12).



**Obr. 12:** *Trachydiscus minutus*: Vlevo je buňka řasy ve světelném mikroskopu, vpravo identická buňka ve fluorescenčním mikroskopu obarvená Nilskou červení. Viditelné zelené chloroplasty podél vnitřního obvodu buňky, ve fluorescenčním mikroskopu svítí červeně. Oranžové olejové tělísko svítí ve fluorescenčním mikroskopu žlutě nebo bíle.

## 5. DISKUZE

Řasy jsou rozsáhlou skupinou rostlin vyskytující se v nejrůznějším prostředí. Nacházejí se jak ve vodě, tak na souši. Každý druh vyžaduje specifické podmínky ke svému růstu a rozmnožování. Vědeckému zkoumání je v dnešní době podrobena rozsáhlá řada druhů řas, ať už se jedná o jejich počáteční prozkoumání morfologie, metabolismu nebo životních cyklů až po konečné fáze, kdy se řasy například „učí“ adaptovat na nejrůznější životní podmínky. Cílem této práce bylo zjistit optimální podmínky pro růst sladkovodní řasy *Trachydiscus minutus* ze třídy Eustigmatophyceae a dále optimální podmínky pro akumulaci jejich zásobních lipidů, které jsou důležité pro zdravou výživu.

Stanovení optimálních podmínek pro růst řasy *Trachydiscus minutus* bylo provedeno ve třech opakováních. V každém opakování byly hodnoty měření obdobné, záviselo pouze na tom, jaká byla počáteční hustota kultury při kultivaci.

Nejdříve bylo nutné zjistit optimální teplotu, při které řasa *Trachydiscus minutus* produkuje největší množství biomasy. Optimální teplota byla podle výsledků stanovena na 23 °C. Ve vědeckých publikacích se uvádí teplotní rozsah růstu této řasy od 15 °C do 35 °C (Lukavský J., 2012). V této práci bylo zjištěno, že příliš nízké a také příliš vysoké teploty řase *Trachydiscus minutus* neprospívají. Tyto extrémy zpomalily růst biomasy, nebo se růst zcela zastavil a buňky uhynuly. Teplota 23 °C se sice blíží k nižší hranici teplotní škály uváděné v literatuře, ale z výsledků je zřejmé, že tato teplota řase zcela vyhovovala.

To dokazuje i výskyt řasy *Trachydiscus minutus* ve volné přírodě. Řasa byla poprvé nalezena v rybníčku pařížské botanické zahrady, nebo také v chladících nádržích jaderné elektrárny Temelín (Lukavský, 2012), jak je již zmíněno v kapitole 2.6. V těchto zeměpisných šířkách a obdobích, kde se zde *Trachydiscus minutus* vyskytuje, je průměrná teplota přibližně stejná výsledné experimentální teplotě v této práci, tedy okolo 23 °C.

Další zkoumanou veličinou byl nárůst biomasy řasy *Trachydiscus minutus* v závislosti na množství světla. V pokusu bylo využito velkého rozsahu intenzit světla. Tato část nevyžadovala rozdělit pokus na mnoho dílčích částí, protože byly použity panely diodových světél, které byly umístěny šikmo vůči kultivačním akváriím. V průběhu tohoto pokusu nebylo manipulováno s panely světél ani s kultivačními akvárii.

Z grafů na obr. 8 lze vyčíst, že optimální intenzita světla při teplotě 23 °C byla 290 μE. Lze říci, že nízké i vysoké intenzity světla řasy *Trachydiscus minutus* nesvědčily. Opět docházelo ke zpomalení nárůstu biomasy či úhynu buněk.

Pro stanovení optimálního média byly použity 3 typy médií – Z-médium, 1/2SŠ a BBM. Při pokusech s teplotou a světly bylo použito Z-médium, protože v tomto médiu byla řasa dodána ze sbírky CCALA Botanického ústavu v Třeboni. Z-médium je ideální pro pěstování různých druhů řas, není však velmi bohaté na živiny, hlavně mikroelementy, oproti ostatním dvěma médiím 1/2SŠ a BBM. Jednotlivá složení a porovnání obsahů jednotlivých živin (chemické složení média) je uvedeno v tab. 3.

Z grafů naměřených hodnot nárůstu biomasy bylo stanoveno jako nejvhodnější médium 1/2SŠ. V dalších dvou médiích (Z, BBM) byl nárůst biomasy také zřetelný, ale nedosahoval takových hodnot, jako u média 1/2SŠ.

Doplňkovým pokusem v této části byla snaha zjistit, zda nižší koncentrace média nějakým způsobem ovlivní nárůst biomasy řasy *Trachydiscus minutus*. Řasa byla naočkována do třech médií v různém stupni naředění destilovanou vodou (ředění uvedeno v tab. 2). V grafu na obr. 10 v části 4.1. jsou znázorněny křivky nejvyššího nárůstu biomasy v jednotlivých médiích. Nejvyššího nárůstu bylo vždy dosaženo u neředěných (plných) médiích.

Alexandrov a kol. (2014) se věnovali podrobnějšímu výzkumu ideálního média pro řasu *Trachydiscus minutus*. Porovnávali tři stejná média, která byla použita v této práci – Z-médium, 1/2 SŠ a BBM s nově vyvinutým médiem podobného složení s tím rozdílem, že obsah dusičnanu sodného ( $\text{NaNO}_3$ ) byl minimálně třikrát vyšší. Jeho množství v novém médiu činilo 20 g/100 ml.

Nové médium zvýšilo růst biomasy o 10%, maximální rychlost růstu zůstala stejná, ale doba dosažení stacionární fáze byla delší. Tento výsledek autoři připisují lepšímu složení média. Také se v této publikaci uvádí, že toto nové médium je značně levnější přepočítá-li se na produkci jednoho kilogramu biomasy. Tento pokus je však vhodný pro biotechnologické účely, kdy je nutné produkovat velké množství biomasy. Pro laboratorní výzkum je vhodnější 1/2 SŠ, protože oproti novému médiu obsahuje vysoká množství fosforečnanů, která udržují stálé pH (kyselost) v průběhu kultivace. Nové médium má tyto hodnoty nízké a potřebné pH se tak udrží maximálně pět dní na stejné hodnotě (Alexandrov S.D. a kol., 2014).

V poslední části pokusu se sledovala akumulace zásobních lipidů řasy *Trachydiscus minutus* v závislosti na teplotě 17 °C, 23 °C a 29 °C. Zde bylo použito optimálních hodnot zjištěných z předešlých pokusů, intenzita světla 290 μE a médium 1/2SŠ. Nejvyšších hodnot bylo opět dosaženo při kultivaci řasy na 23 °C.

Průběžně byly pořizovány fotografie na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX51. Na přiložených fotografiích řasy *Trachydiscus minutus* je možno rozeznat některé orgány. Je viditelný chloroplast, který je umístěn po vnitřním obvodu buňky. Také je velice zřetelné oranžové olejové tělísko (zásobní lipidy) většinou uprostřed buňky.

## 6. ZÁVĚR

Všechny cíle podle zadání této bakalářské práce byly splněny. Výsledkem práce je ucelený přehled systematiky řas a přehledná charakteristika jednotlivých tříd řas. Toto shrnutí bylo důležité nejen pro zařazení řasy *Trachydiscus minutus* do systému řas, ale také je vhodné jako pomůcka pro studenty zabývající se studiem řas.

Postupnými kroky bylo zjištěno za jakých nevhodnějších podmínek řasa *Trachydiscus minutus* dokáže růst, rozmnožovat se a akumulovat zásobní lipidy.

Základní studium řas je vhodné pro studenty gymnázií, středních a vysokých škol se zaměřením na biologii, kde si osvojí základní techniky práce v laboratoři a mohou své znalosti využít v dalším studiu či zaměstnání. V současné době je toto téma použito v rámci projektu „Otevřená věda IV“ AV ČR, kde celou sérií pokusů provázím studenta gymnázia. Byl také vytvořen poster, který bude představen na veletrhu vědy konaném v květnu 2015 v Praze.

V další práci bych chtěla navázat na tuto bakalářskou práci a zabývat se dalšími aspekty ovlivnění růstu a rozmnožování řasy *Trachydiscus minutus*.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

**Alexandrov S. D., Iliev I. I. a Petkov G. D.,** 2014: Establishment of growth conditions for cultivation of the mikroalga *Trachydiscus minutus* at laboratory scale. *Pure Appl. Bio.*, 3, str. 1-9.

**Apro Delta,** 2006: Moře, vaše zahrada krásy. Apro Delta [cit. 2014-12-08]. Dostupné z: <http://www.apodelta.cz/kosmetika-thalgo>

**Bourelly P.,** 1951: Xantophycées rares ou nouvelles. Bull. Mus. National d'hist. naturelle, 2, str. 666-672

**Encyklopedie Co je co,** 1999: Plastidy. Co je co [cit. 2014-08-25]. Dostupné z: [http://www.cojeco.cz/index.php?s\\_term=&s\\_lang=2&detail=1&id\\_desc=73271](http://www.cojeco.cz/index.php?s_term=&s_lang=2&detail=1&id_desc=73271)

**Flanderková M.,** 2012: Vliv zvýšené aplikace souboru polynenasycených mastných kyselin na úpravu hladiny cholesterolu v krvi jedince. Bakalářská práce, školitel Mgr. Jan Schuster, Ph. D. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Pedagogická fakulta, 82s.

**Fott B.,** 1967: Sinice a řasy. 2. vyd. Praha: NČSAV, 520s.

**Gigova L., Ivanova N., Gacheva G., Andreeva R. a Furnadzhieva S.,** 2012: Response of *Trachydiscus minutus* (Xantophyceae) to temperature and light. *J. Phycol*, 48, str. 85-93.

**Hanahan D. J., Gurd F. R. N. a Zabin I.,** 1964: Chemie lipidů. 1.vyd. Praha: NČSAV, 300s.

**Hudek F.,** 2009: Stavba buňky. Školní a webové informační centrum [cit. 2014-08-25]. Dostupné z: [http://vyuka.zsjarose.cz/index.php?action=lesson\\_detail&id=237](http://vyuka.zsjarose.cz/index.php?action=lesson_detail&id=237)

**Kotrbaček V.,** 2006: Řasy, jejich historie, současnost i budoucí možné využití. *Favea info* [cit. 2014-12-05]. Dostupné z: <http://www.creativeweb.cz/faveainfo/32007/rasy.html>

**Kysilka J.**, 2005: Sinice a řasy. Biotox.cz: Naturstoff [cit. 2014-09-03]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/naturstoff/biologie/default.html>

**Lukavský J.**, 2012: *Trachydiscus minutus* - A new algal EPA producer. Nova, p. 77-104.

**Macháček T.**, 2005: Biologie protist: Nižší rostliny. Biomach, výpisky z biologie [cit. 2014-09-25]. Dostupné z: <http://www.biomach.cz/biologie-protist/nizci-rostliny>.

**Musilová J.**, 2009: Vývoj a charakteristické znaky nižších rostlin. Zones.sk [cit. 2014-08-17]. Dostupné z: <http://www.zones.sk/studentske-prace/biologia/2982-vyvoj-a-charakteristicke-znaky-nizsich-rostlin/>

**MZ ČR**, 2014: Tuky ve výživě. Viscojis.cz [cit. 2015-01-27]. Dostupné z: [http://www.viscojis.cz/teens/index.php?option=com\\_content&view=article&id=139%3A130&catid=50%3Atuky-ve-vyiv&Itemid=100](http://www.viscojis.cz/teens/index.php?option=com_content&view=article&id=139%3A130&catid=50%3Atuky-ve-vyiv&Itemid=100)

**Příbyl P., Eliáš M., Cepák V., Lukavský J. a Kaštánek P.**, 2012: Zoosporogenesis, morphology, ultrastructure, pigment composition, and phylogenetic position of *Trachydiscus minutus* (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta). J. Phycol, 48, str. 231-242.

**Přírodovědecká fakulta JU**, 2003: Oddělení Glaucophyta: Sinice a řasy pro studenty [cit. 2014-12-04]. Dostupné z: <http://www.sinicearasy.cz/134/Glaucophyta>

**Přírodovědecká fakulta JU**, 2003: Oddělení Chlorarachniophyta. Sinice a řasy pro studenty [cit. 2014-12-04]. Dostupné z: <http://www.sinicearasy.cz/134/Chlorarachniophyta>

**Přírodovědecká fakulta JU**, 2003: Oddělení Chlorophyta. Sinice a řasy pro studenty [cit. 2014-12-04]. Dostupné z: <http://www.sinicearasy.cz/pokr/chlorophyta>

**Přírodovědecká fakulta JU**, 2003: Oddělení Raphidophyceae. Sinice a řasy pro studenty [cit. 2014-12-04]. Dostupné z: <http://www.sinicearasy.cz/134/Raphidophyceae>



**Stoyneva M.**, 1998: Checklist of algae in Srebarna reserve. Central laboratory of general ecology, Bulgaria [cit. 2015-03-12] <http://www.ecolab.bas.bg/Members/nevena/srebarna/algae>

**Šesták Z.**, 1999: Detekce přemnožení řas. *Vesmír* 78, s. 355 [cit. 2014-11-21]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/detekce-premnozeni-ras>

**Tölgyessy J., Betina V., Frank V., Fuska J., Lesný J., Moncmanová A., Palatý J., Piatrik M., Pittner P. a Prousek J.**, 1984: Chémia, biológia a toxikológia vody a ovzdušia. Bratislava: VEDA, 536s.

**Urban Z., Kalina T.**, 1980: Systém a evoluce nižších rostlin. Praha: SPN, 416s

**Valoušková S.**, 2008: Mořské a suchozemské řasy jako významný zdroj důležitých komponent lidské stravy. Diplomová práce, školitel Ing. L. Mišurcová . Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 94s.

**Vítek L.**, 2010: Stanou se řasy běžnou součástí našeho jídelníčku? *Sportvital* [cit. 2014-12-05]. Dostupné z: <http://www.sportvital.cz/zdravi/vyziva-a-zdravi/nutraceutika-a-vyzivove-doplanky/stanou-se-rasy-beznou-soucasti-naseho-jidelnicku/>

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

**Tab. 1:** Srovnání rozdílů tříd Eustigmatophyceae a Xantophyceae

**Tab. 2:** Poměry ředění jednotlivých médií s destilovanou vodou a řasou *Trachydiscus minutus*

**Tab. 3:** Porovnání obsahů jednotlivých živin v médiích

**Ondrejmišková K.,** 2015: Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Opatovický mlýn, Třeboň

## 9. SEZNAM A ZDROJE OBRÁZKŮ

### **Obr. 1 Morfologie buňky řas**

**Hudek F.**, 2009: Stavba buňky. Školní a webové informační centrum [cit. 2014-08-25]. Dostupné z: [http://vyuka.zsjarose.cz/index.php?action=lesson\\_detail&id=237](http://vyuka.zsjarose.cz/index.php?action=lesson_detail&id=237)

### **Obr. 2 Typy stélek řas s popisem základní morfologie (Macháček, 2005).**

**Macháček T.**, 2005: Biologie protist: Stavba - typy stélek. Biomach, výpisky z biologie [cit. 2014-09-25]. Dostupné z: <http://www.biomach.cz/biologie-protist/nizci-rostliny>.

### **Obr. 3 Typy kapsální stélky**

**Leccos**, 2005: Různobrvky. Leccos.com [cit. 2014-10-02]. Dostupné z: <http://leccos.com/index.php/clanky/ruznobrvky>

### **Obr. 4 Pletivná stélka parožnatky**

**Leccos**, 2005: Parožnatky. Leccos.com [cit. 2014-10-02]. Dostupné z: <http://leccos.com/index.php/clanky/paroznatky>

### **Obr. 5 Fylogenetický strom**

**Ondrejmišková K.**, 2015: Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Opatovický mlýn, Třeboň

### **Obr. 6.: Eustigmatophyceae**

**Krautová M.**, 2003: Eustigmatophyceae – stavba vegetativní buňky a zoospory. Sinice a řasy. [cit. 2014-08-05]. Dostupné z: <http://www.sinicearasy.cz/sites/default/files/Eustigmatophyceae.gif>

**Vlastní zdroje obrázků:**

**Obr. 7: Teplota**

**Obr. 8: Světla**

**Obr. 9: Média**

**Obr. 10: Porovnání médií**

**Obr. 11: Akumulace lipidů**

**Obr. 12: *Trachydiscus minutus***

**Obrazová příloha:**

**1. Kultivační zařízení během provozu**

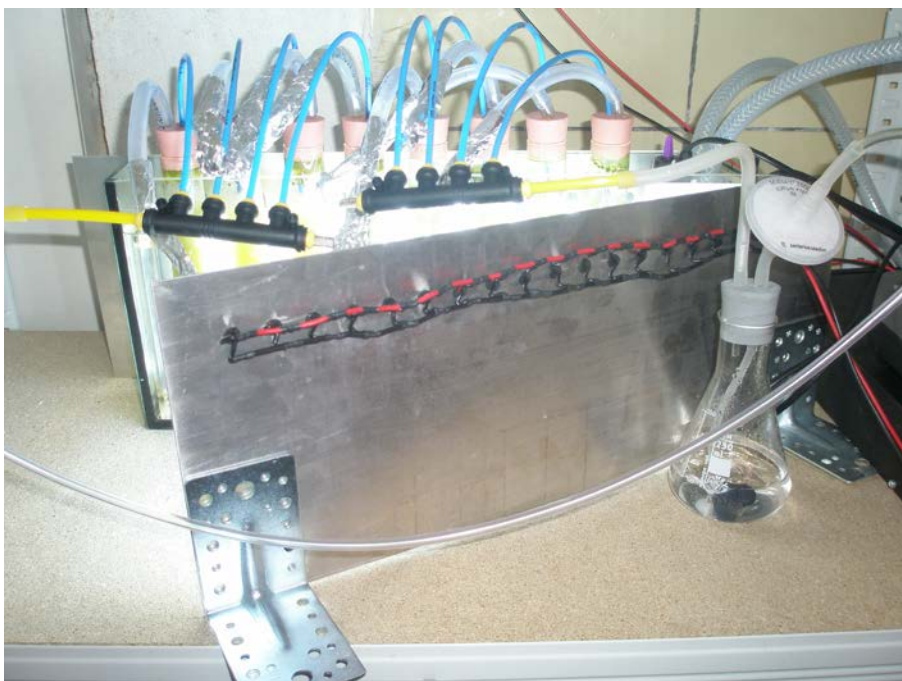
**2. Kultivační zařízení – nižší intenzita světla**

**3. Kultivační zařízení – vyšší intenzita světla**

**4. Poster „Stanovení optimálních podmínek pro růst buněk a akumulaci zásobních lipidů řasy *Trachydiscus minutus*“**

**Ondrejmišková K., 2015: Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Opatovický mlýn, Třeboň**

## 10. PŘÍLOHY



**1. Kultivační zařízení během provozu:** kultivační akvárium s osmi 100 ml válečky se vzduchováním, včetně umístěním panelu diodových světel v popředí a jeho zešíkmení vůči kultivačnímu akváriu.



**2. Kultivační zařízení – nižší světla:** kultivační akvárium s osmi 100 ml válečky se vzduchováním, panel diodových světel je umístěn za kultivačním akváriem, k docílení různé intenzity světla je pootočeno (zešíkmeno) kultivační akvárium vůči panelu světel, pravá strana je blíže světlům.



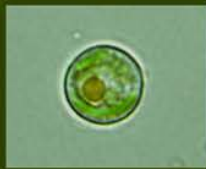
**3. Kultivační zařízení – vyšší světla:** kultivační akvárium s osmi 100 ml válečky se vzduchováním, panel diodových světél je umístěn za kultivačním akváriem, k docílení různé intenzity světél je pootočeno (zešíkmeno) kultivační akvárium vůči panelu světél, pravá strana je blíže světélům.



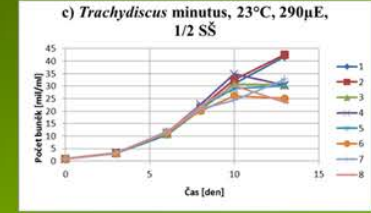
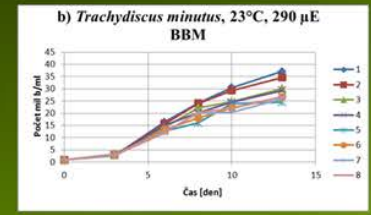
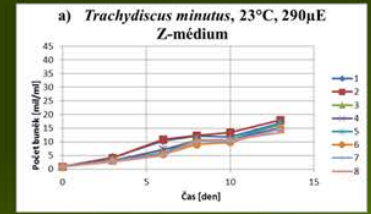
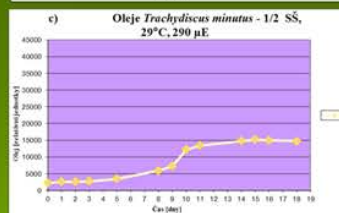
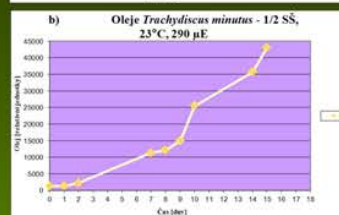
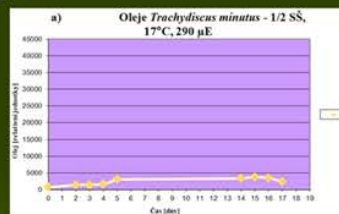
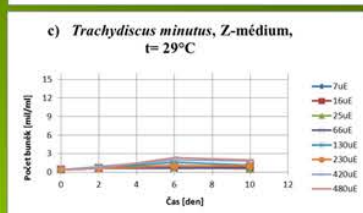
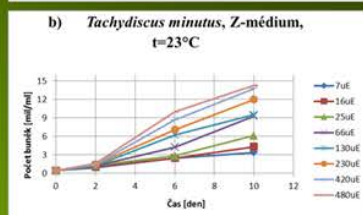
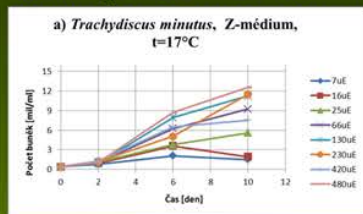
# Stanovení optimálních podmínek pro růst buněk a akumulaci zásobních lipidů řasy *Trachydiscus minutus*

Natalie Vítová, Kamila Ondrejmišková, Milada Vítová  
Laboratoř buněčných cyklů, Mikrobiologický ústav, AV ČR, 37981 Třeboň, Česká republika

## Úvod



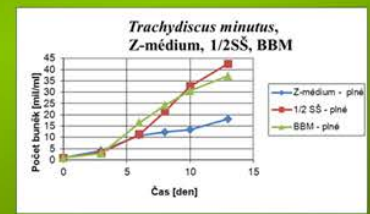
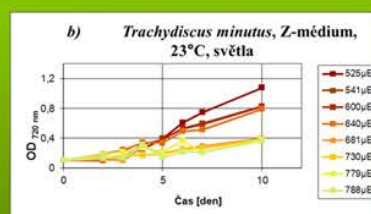
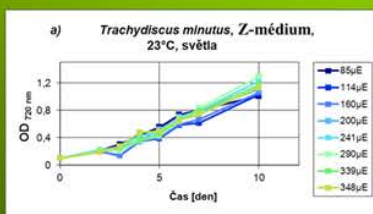
Řasy se stávají strategickým zdrojem pohonných hmot, potravin, surovin a biologicky aktivních látek. Řasové lipidy patří mezi nejslibnější potenciální produkty s širokým využitím. Žlutozelená řasa *Trachydiscus minutus* (třída Eustigmatophyceae) je jednobuněčná sladkovodní řasa hromadící lipidy jako zásobní látky. Byl studován vliv různých růstových médií, teploty a intenzity světla na růst a akumulaci zásobních lipidů řasy *Trachydiscus minutus*. Byly stanoveny optimální růstové podmínky. Zásobní lipidy byly kvantitativně stanoveny fluorimetricky. Akumulace lipidů byla sledována pomocí fluorescenční mikroskopie.



**Obr. 1: Teplota:** Grafy znázorňují růstové křivky řasy *Trachydiscus minutus* v závislosti na teplotě a různé intenzitě světla:  
a) řasa temperovaná při teplotě 17 °C,  
b) řasa temperovaná při teplotě 23 °C,  
c) řasa temperovaná při teplotě 29 °C.  
Barevně jsou rozlišeny intenzity světla.

**Obr. 5: Akumulace lipidů:** Grafy znázorňují nárůst zásobních lipidů řasy *Trachydiscus minutus* v médiu 1/2 SS a intenzitě světla 290 µE při různé teplotě. a) 17 °C, b) 23 °C, c) 29 °C.

**Obr. 3: Média:** Grafy znázorňují růstové křivky řasy *Trachydiscus minutus* při teplotě 23 °C, intenzitě světla 290 µE ve třech různých médiích a) Z-médium, b) BBM, c) 1/2SS. Barevné křivky 1-8 představují různá ředění médií s destilovanou vodou podle tab. 2.



**Obr. 2: Světla:** Grafy znázorňují růstové křivky řasy *Trachydiscus minutus* při teplotě 23 °C v Z-médiu v závislosti na větším rozsahu světelné intenzity,  
a) nižší intenzity světla 85-348 µE, b) vyšší intenzity světla 525-788 µE.

**Obr. 4: Porovnání médií:** Graf znázorňuje nejvyšší hodnoty nárůstu biomasy pro jednotlivá média. Výchozí hodnoty pocházejí z grafů na obr. 9.

vitova@alga.cz www.alga.cz