

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Taxonomická identifikace producentů toxických lipopeptidů ve
vodním květu sinic**

Bakalářská práce

Artem Kriuchkov

Školitel: RNDr. Jan Mareš, Ph.D.

České Budějovice 2021



Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Kriuchkov, A., 2021: Taxonomická identifikace producentů toxických lipopeptidů ve vodním květu sinic. [Taxonomic identification of toxic lipopeptide producers in cyanobacterial bloom. Bc. Thesis, in Czech.] – 61 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Selected potential producers of cytotoxic lipopeptides puwainaphycins isolated from samples of freshwater cyanobacterial blooms in the Czech Republic were tested. *Aphanizomenon gracile*, a common component of phytoplankton communities in temperate regions, was confirmed as one of the puwainaphycin producers. The presence of these bioactive cyanobacterial secondary metabolites in phytoplankton presents a potential health concern for humans and should be monitored in future.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 9. 4. 2021.

.....

Podpis studenta

Poděkování

Své poděkování bych rád věnoval svému školiteli Janu Marešovi za možnost podílet se na této studii. Velice děkuji za jeho trpělivost a neocenitelné rady při vypracování bakalářské práce. Další poděkování patří Kateřině Čapkové, Lence Štenclové a Kláře Řehákové za pomoc a pohodovou atmosféru při práci. Také bych rád poděkoval ostatním zaměstnancům Hydrobiologického ústavu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích za spolupráci a trpělivý přístup. Na závěr bych rád poděkoval rodině a kamarádům za neustálou podporu během celého období studia.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Sinice.....	1
1.1.1 Výskyt, diverzita a význam sinic.....	1
1.1.2 Vodní květy sinic a jejich toxicita.....	2
1.2 Lipopeptidy.....	4
1.2.1 Bioaktivita lipopeptidů.....	4
1.2.2 Biosyntéza cyklických lipopeptidů.....	4
1.2.2.1 Fatty acyl-AMP ligase (FAAL).....	5
1.2.2.2 NRPS.....	5
1.2.2.2a Reakční cyklus peptidylového přenašeče a adenylační domény..	6
1.2.2.2b Kondenzační a thioesterázové domény.....	7
1.2.2.3 PKS.....	7
1.2.2.4 Sinicové lipopeptidy.....	8
1.2.2.4a Hassallidiny.....	9
1.2.2.4b Anabaenolysiny.....	9
1.2.2.4c Muscotoxiny.....	10
1.2.2.4d Minutissamidy.....	11
1.2.2.4e Puwainaphyciny.....	12
1.3 Metody detekce cyanotoxinů a jejich producentů.....	15
1.3.1 Specifické PCR primery pro detekci producentů puwainaphycinů.....	15
1.3.2 HPLC-HRMS/MS analýza.....	15
2. Cíle práce.....	17
3. Metodika.....	18
3.1 Odběr vzorků.....	18
3.2 Zpracování a příprava vzorků.....	18
3.2.1 Mikroskopický rozbor.....	18
3.2.2 Izolace jednotlivých vláken a kolonií sinic.....	18
3.2.3 Amplifikace celého genomu.....	19
3.2.4 PCR testování vzorků.....	19
3.2.5 Přečištění PCR produktů a sekvenace.....	20

3.2.6 Získání sekvence genu pro 16S rRNA a 16S-23S ITS úseku rRNA.....	20
3.2.7. Alignment a analýza podobnosti sekvencí.....	21
3.2.8. Fylogenetická analýza.....	22
4. Výsledky.....	23
4.1 Rok 2019.....	23
4.1.1 Odběr vzorků sinicové biomasy.....	23
4.1.2 Mikroskopování vzorků a izolace potencialních producentů puwainaphycinu	24
4.1.3 Amplifikace genomu (MDA) a PCR genu <i>puwF</i>	26
4.1.4 Sekvence genu <i>puwF</i>	27
4.1.5 Sekvence úseku genu pro 16S rRNA a 16S-23S ITS rRNA.....	27
4.2 Rok 2020.....	29
4.2.1 Odběr vzorků.....	29
4.2.2 Mikroskopování vzorků a izolace potencialních producentů	30
4.2.3 Amplifikace genomu (MDA) a PCR genu <i>puwF</i>	32
4.2.4 Sekvence genu <i>puwF</i>	36
4.2.5 Sekvence genu pro 16S rRNA a navazujícího 16S-23S ITS úseku	36
4.2.6 Sestavení fylogenetických stromů.....	36
5. Diskuze.....	39
6. Závěr.....	43
7. Seznam literatury.....	44
8. Přílohy.....	57

1. Úvod

1.1 Sinice

Sinice, dříve známé jako modrozelené řasy, představují oddělení gramnegativních bakterií schopných fotosyntézy doprovázené uvolňováním kyslíku. Díky těmto organismům se v historii Země změnilo kvalitativní složení zemské atmosféry, v níž se postupně akumuloval kyslík a klesalo množství oxidu uhličitého. Jsou to často jednobuněčné organismy, mohou ale vytvářet kolonie a vlákna. Někteří vláknití zástupci mají buňky známé jako heterocyty, které se specializují na fixaci dusíku, a akinety, které pomáhají buňce přežít nepříznivé podmínky (Whitton, 2000).

1.1.1 Výskyt, diverzita a význam sinic

Sinice jsou velmi rozmanité; zřejmě patřily mezi jedny z prvních průkopnických organismů na Zemi, a dodnes díky své schopnosti adaptace osidlují širokou škálu stanovišť napříč všemi zeměpisnými šířkami (Komárek, 2002). Nejsou rozšířeny pouze v běžných sladkovodních, mořských a suchozemských ekosystémech, ale také na extrémních stanovištích jako jsou horké prameny, hypersalinní lokality, mrazivá prostředí a pouště (Fogg et al. 1975; Perera et al. 2018; Pushkareva et al. 2018). Často žijí ve spojení s jinými organismy tvořícími mikrobiální nárosty, biofilmy a bentické komunity – podobná společenstva jsou převládajícími a někdy jedinými formami života nalezenými na určitých extrémních stanovištích (Hauer et al. 2015). Zkamenělé stromatolity vzniklé asi před 3,4 miliardami let byly také vytvořeny mikrobiálním společenstvem s možným výskytem sinic jako jejich autotrofní složkou (Schopf et al. 2002). Různé druhy sinic vykazují rozdílné adaptace na podmínky panující v místě jejich výskytu. Například početná populace pikosinic rodu *Prochlorococcus* v oligotrofních oceánech si nemohou dovolit udržovat velký genom a velké složité buňky, protože zde mají málo živin. Pomocí horizontálního přenosu genomového materiálu za přispění cyanofágů podléhají zrychlené evoluci některých částí genomu (Johnson et al. 2006). Endolitický zástupce rodu *Chroococcidiopsis* žijící jako jediný obyvatel v extrémně nehostinném prostředí pouště Atacama poskytuje nový model pro astrobiologii (Friedmann, 1982; Wierzchos et al. 2015).

Po zavedení sekvenování genu pro 16S rRNA byly překvapivě podobné morfotypy sinic nalezeny ve vzdálených pozicích ve fylogenetických stromech. Proto jsou v současnosti molekulární data považována za základní kritérium pro sinicovou taxonomii, cílem moderní (polyfázické) systematiky je ale vytvořit komplexní fylogenetický systém sinic v kombinaci se znalostmi jejich morfologie, fyziologie a biochemie (Komárek, 2006). Základem pro klasifikaci

rodů je obvykle monofyletická pozice ve fylogenetickém stromu z genu pro 16S rRNA (Johansen a Casamatta 2005), zatímco klasifikace druhů vychází (kromě morfologických, ekologických a jiných parametrů) především z fylogeneze a nepodobnosti (p-distance) sekvence rRNA ITS regionu a z jeho předpokládané sekundární struktury (Osorio-Santos et al. 2014). Klasifikace do vyšších taxonomických kategorií jako jsou čeledi nebo řády je dosud převážně založená na morfologii a vzhledem k nízké vypovídající hodnotě 16S rRNA genu na této fylogenetické úrovni vyžaduje použití multilokusové analýzy (Komárek et al. 2014). U některých skupin jako jsou tenké vláknité sinice podobné rodu *Leptolyngbya* již započala i polyfázická revize čeledi (Mai et al. 2018), mezi řády je molekulárně podpořena zejména pozice heterocytózních sinic (Nostocales) a dále několika menších izolovaných skupin (Gloeobacterales, Spirulinales, Chroococcidiopsidales – Mareš 2018). Kromě významu v globálních biogeochemických cyklech a evoluci života na Zemi mají sinice i v současnosti praktický význam pro člověka. V současné době člověk využívá sinice například jako zdroj potravy, potravních doplňků (Gantar, 2008), potenciální zdroj energie (Liu et al., 2020) a materiálů (Gomes Gradissimo et al. 2020). Některé z těchto organismů žijící v symbiotických systémech, například s vodní kapradinou r. *Azolla*, jsou využívány jako biologická hnojiva při pěstování rýže (Jochum et al. 2018). Několik druhů bylo zkoumáno pro jejich schopnost velmi efektivně asimilovat solární energii (Zhou et al. 2016). Navíc jejich relativně jednoduchá genomická struktura umožňuje vytvoření kmenů, které produkují biopaliva, pomocí genetického inženýrství (Qiao et al. 2020). Určité druhy sinic extrémně akumulují biomasu v eutrofních vodách (silný vegetační zákal, pro který se vžilo označení vodní květ) a většina z těchto kmenů produkuje toxické látky (cyanotoxiny), které jsou škodlivé a někdy fatální pro zvířata a lidi (Carmichael et al. 2001) – tato problematika je rozvedena v dalších kapitolách.

1.1.2 Vodní květy sinic a jejich toxicita

Vodní květ sinic je přírodní jev způsobený nadměrným namnožením sinic ve vodách (Dong, 2016). Také je možné říci, že produkce vodního květu je spontánní nouzová reakce ekosystému na nadměrné množství živin, které jsou sinicemi aktivně absorbovány. Po dosažení kritického stadia však extrémně husté populace sinic odumírají a v tomto procesu opět uvolňují absorbované živiny a také akumulované sekundární metabolity, což významně ovlivňuje kvalitu původního vodního prostředí a přežití vodních organismů (Yu et al. 2013).

Ačkoli sinice mají pozitivní vliv na globální biologickou rozmanitost a prostředí, zejména díky schopnosti fixace uhlíku a dusíku, také způsobují závažné problémy ve sladkovodních ekosystémech a při přípravě pitné vody svou produkcí toxinů (Carmichael, 1994). Výše zmíněný

vodní květ ve znečištěných eutrofních vodách formují rody jako například *Microcystis*, *Planktothrix*, *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermopsis* a *Nodularia*, které patří mezi nejlépe známé producenty cyanotoxinů (Kaebernick a Neilan, 2001; Osswald et al. 2007; Fastner et al. 2007; Bláhová et al. 2009; Luc et al. 2009; Sinclair, 2008). Mnoho takových toxinů bylo pojmenováno podle některých z těchto rodů, například microcystin podle *Microcystis*, anatoxiny podle *Anabaena*, ačkoli produkce takových toxinů se neomezuje pouze na tyto rody, ale probíhá i v řadě ostatních zástupců (Kust et al. 2020). Jaké faktory vyvolávají produkci toxinů není obecně příliš známo, ale často se spekuluje, že produkce toxinů se vyskytuje převážně za účelem obrany a / nebo eliminace konkurence o zdroje. Je však také možné, že primární funkce cyanotoxinů nesouvisí s jejich toxickými vlastnostmi (Ouellette, 2003; Bar-Yosef et al. 2010). Vzhledem k tomu, že metabolické náklady na produkci jsou enormní, zdá se, že tyto sloučeniny mají důležitou biologickou funkci. Například nedávné studie zkoumající produkci microcystinů našly úzké vazby mezi těmito sloučeninami a určitými fyziologickými funkcemi, které lze považovat za součást primárního metabolismu buňky – konkrétně ochrana fotosyntetického enzymu RuBisCO (Barchewitz et al. 2019). Spekuluje se o řadě dalších fyziologických rolích pro cyanotoxiny, jako je buněčná signalizace, příjem živin, vylučování železa, udržování homeostázy a ochrana před oxidačním stresem (Neilan et al. 2013). Z chemického hlediska můžeme toxiny produkované cyanotoky klasifikovat zejména jako rozmanité druhy peptidů (včetně lipopeptidů) a alkaloidů. Z toxikologického hlediska cyanotoxiny rozlišujeme především na hepatotoxiny, neurotoxiny a cytotoxiny (Merel et al. 2013).

Přepokládá se, že nejdůležitější skupinou bioaktivních sekundárních sinicových metabolitů jsou látky, které jsou odvozené od oligopeptidů (Welker a Döhren 2006). Mezi tyto látky řadíme sloučeniny syntetizované ribozomálně (Martins, 2015) nebo neribozomálně (Dittmann et al. 2012), tzn. pomocí speciálních enzymatických komplexů bez účasti ribozomu. Jedná se o komplexy neribozomálních peptidových syntetáz (non-ribosomal peptide synthetases – NRPS) a polyketid-syntáz (polyketide synthases – PKS). Produkty NRPS/PKS biosyntetických genových klastrů se vyznačují obzvláště vysokou variabilitou díky kombinaci obou enzymových mechanismů, přítomnosti dalších modifikujících enzymů (tailoring enzymes) a také díky schopnosti NRPS enzymů přijímat rozsáhlý repertoár neproteinogenních aminokyselin. Jednou z významných skupin cytotoxických produktů NRPS/PKS drah u sinic jsou lipopeptidy, například puwainaphyciny a minutissamidy (podrobněji viz níže). Sinice, které produkují tyto cyklické lipopeptidy jsou hlavním předmětem zájmu mé bakalářské práce.

1.2 Lipopeptidy

Jsou to biologicky aktivní látky, tvořené lineárním nebo cyklickým oligopeptidem obsahující lipofilní uhlovodíkový řetězec na N-konci peptidu. Schopnost produkovat lipopeptidy mají bakterie včetně sinic a houby (Kanwar, 2015; Du et al. 2019). V případě bakteriálních lipopeptidů se velmi často jedná o přírodní antibiotika a biosurfaktanty (Raaijmakers et al. 2010). Sinicové lipopeptidy také vykazují zajímavou bioaktivitu, proto jsou objektem vědeckého zájmu již několik desetiletí (Xue et al. 2018).

1.2.1 Bioaktivita lipopeptidů

Lipopeptidy, ve většině případů bakteriální, jsou důležitou skupinou sekundárních metabolitů s velkým farmaceutickým potenciálem jako antibakteriální, antifungální, protinádorové a antivirové látky. Obecně se svou aktivitou řadí převážně mezi cytotoxiny. Mezi nejlépe prozkoumané bakteriální lipopeptidy patří například iturin, surfactin (Zhao et al. 2017) a daptomycin (Heidary et al. 2018). Působením lipopeptidů obecně nejčastěji dochází k narušení plasmatické membrány v důsledku amfifilního charakteru lipopeptidů. Tyto sloučeniny mají na konci mastnou kyselinu, která se může zanořit do membrány. Jednotlivé molekuly lipopeptidů nebo jejich micelární struktury následně mohou tvořit póry v membránách, kudy pak unikají vápenaté ionty. Například, v práci Aranda et al. (2005) autoři prokázali, že iturin A způsobuje hemolýzu lidských erytrocytů. Naopak daptomycin efektivně působí proti patogenním grampozitivním bakteriím a je využíván jako antibiotikum v klinické praxi (Vilhena et al. 2012).

1.2.2 Biosyntéza cyklických lipopeptidů

Pro syntézu lipopeptidů buňka používá enzymatické komplexy NRPS/PKS, přičemž se aktivitou jednotlivých katalytických domén vytváří lipopeptidy s obrovskou strukturální variabilitou (Mareš et al. 2019). Počátek jejich biosyntézy je vázán na aktivaci volné mastné kyseliny, nejčastěji pomocí enzymatické domény FAAL (fatty acyl-AMP ligase) a teprve následně na spolupůsobení dvou výše uvedených enzymatických komplexů, tj. hybridní NRPS/PKS (Mareš et al. 2014, 2019).

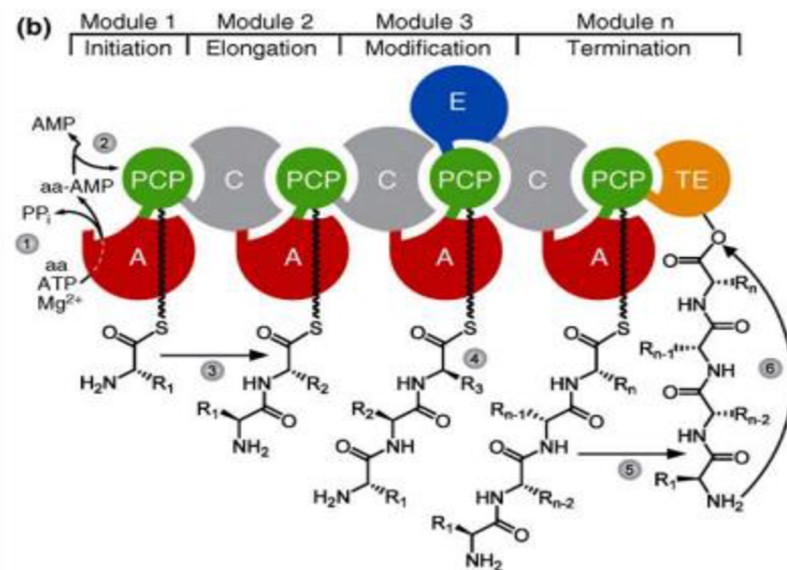
1.2.2.1 Fatty acyl-AMP ligase (FAAL)

Bakteriální enzymy FAAL pocházejí z bazálního buněčného metabolismu a pravděpodobně se vyvinuly z acyl-koenzym A (CoA) ligáz (FACL) (Liu et al. 2013). FAAL enzymy, kromě syntézy lipopeptidů, hrají také důležitou roli při produkci jiných metabolitů, jako například olefinů. Přesný mechanismus vazby na substrát používaný FAAL byl experimentálně prokázán u *Mycobacterium tuberculosis* pomocí několika homologních FAAL enzymů a substrátu (mastných kyselin) jako modelů (Goyal et al. 2012). Biosyntéza puwainaphycinů je příkladem působení FAAL u sinic (Mareš et al. 2014). FAAL zde působí jako startovní modul biosyntézy, která začíná aktivací mastné kyseliny a jejím připojením na multienzymový komplex PKS/NRPS. Konkrétně tento enzym provádí selektivní adenylaci (kovalentní připojení AMP) určité mastné kyseliny, dále váže tento aktivovaný adenylát mastné kyseliny a přenáší jej na fosfopantetheinové rameno acylového nosného proteinu (ACP), který je součástí PKS, pro následující zpracování (Mareš et al. 2014). Analogicky probíhá iniciace biosyntézy řady dalších lipopeptidů u sinic i ostatních bakterií, např. iturinů (Tsuge et al. 2001).

1.2.2.2 NRPS

Jak již bylo uvedeno, NRPS jsou velké multimodulární biokatalyzátory, které jsou buňkami využívány k syntéze strukturně a funkčně různorodých peptidů, které mají velké uplatnění mj. v medicíně. Během syntézy neribozomálních peptidů, katalytická doména NRPS vybere, aktivuje nebo upraví meziprodukty kovalentní reakcí tak, aby kontrolovala prodloužení řetězce a nakonec uvolnění výsledného produktu.

Aby komplex neribozomální peptidové syntetázy fungoval správně, je esenciální aktivita tří domén: adenylační - A, kondenzační - C a thiolační – T nebo také PCP (peptidyl-carrier protein), které jsou nezbytnou součástí každého modulu (obr. 6). U posledního modulu je thioesterázová doména (TE), která vystupuje jako doplňující doména (Strieker et al. 2010).



Obr. 6 Struktura NRPS (převzato z Strieker et al. 2010).

1.2.2.2a Reakční cyklus peptidylového přenašeče a adenylační domény

Adenylační doména (A doména) je funkční podjednotkou enzymu, která je vysoce selektivní vůči monomerním stavební blokům NRP (tj. různé aminokyseliny a jejich modifikace). Kód (sekvenční motiv), který zajišťuje specifitu A domény, se skládá z 10 aminokyselin, které se podílejí na vazbě vybrané aminokyseliny v substrátové kapse enzymu. Každá A doména obsahuje velkou N-terminální doménu a malou C-terminální subdoménu, které jsou sprovázány krátkou peptidovou spojkou (5–10 aminokyselin). Tato organizace A domén je vysoce konzervativní i v jiných adenylát generujících enzymech, jako je acetyl-CoA syntáza nebo luciferáza světlušek (Gulick, 2009). Enzymatický cyklus začíná otevřenou konformací domény A, při které se subdoména A odvrátí od aktivního místa, aby tato struktura byla schopna vázat aminokyseliny a ATP. Po ukotvení substrátu (aminokyselina, Mg^{2+} a ATP), vzniká adenylační meziprodukt. Štěpení fosfoesterové vazby se současným aminoacylem, tvorba adenylátu a uvolňování pyrofosfátu následně vede k uzavřené konformaci. V tomto stavu je aminoacyl-AMP chráněn před rozpouštědlem. Pak je aktivovaná aminokyselina přenesena na peptidylový přenašeč (PCP=T-doména), na který se váže thioesterovou kovalentní vazbou (thiolační reakce). Proces je doprovázen otočením A domény zpět do otevřené konformace. Po obnovení PCP, po předání intermediátu ke kondenzaci nebo uvolnění z enzymového komplexu, thiolačně-adenylační cyklus začíná znovu (Strieker et al. 2010).

1.2.2.2b Kondenzační a thioesterázové domény

Biosyntetický cyklus je zakončen kondenzační doménou (C). C-doména každého NRPS modulu katalyzuje tvorbu peptidové vazby mezi C-koncem vznikajícího peptidu (dodaného T-doménou předchozího modulu) a aminoskupinou nově zabudované aminokyseliny (Strieker et al. 2010).

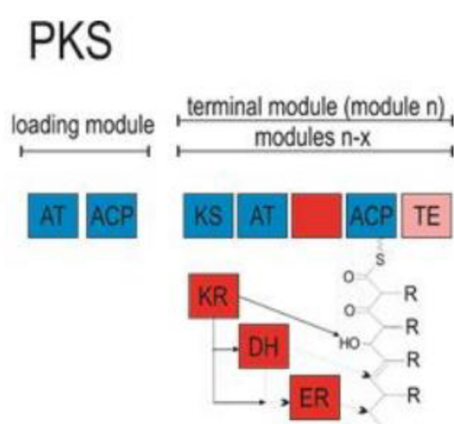
Thioesterázové domény jsou někdy připojeny k adenylačním a thiolačním biosyntetickým doménám jako terminální domény pro celou neribozomální syntetickou dráhu a jsou také často zodpovědné za finální cyklizaci sekundárních metabolitů. Uvolňování produktu se dosahuje dvěma samostatnými reakcemi: tvorbou acylového meziprojektu následovanou nukleofilní kondenzační reakcí s vodou nebo některou funkční skupinou samotného peptidu. Zatímco reakce s vodou vede k formování lineárního peptidu, reakce vlastních postranních skupin peptidu nebo postranních řetězců vede k cyklizaci a tvorbě cyklických peptidů (Strieker et al. 2010).

1.2.2.3 PKS

Polyketidové syntázy (PKS) (obr. 7) jsou multifunkční enzymy odpovědné za biosyntézu mnoha bioproduktů (např. erythromycin) (Keatinge-Clay, 2008). PKS jsou klasifikovány do tří typů: PKS typu I jsou velké multifunkční proteiny složené z několika funkčních domén a nacházejí se v bakteriích i plísních, PKS typu II jsou tvořeny samostatnými katalytickými doménami a typicky se nacházejí v bakteriích, PKS typu III jsou jednodušší enzymy, které katalyzují tvorbu produktu v jednom aktivním místě, zejména v rostlinách a bakteriích. PKS typu I se dále dělí na iterativní a modulární PKS. Zatímco iterativní PKS katalyzuje cykly prodloužení řetězce s použitím stejné sady enzymatických domén, v rámci modulární PKS je tvořící se polyketidový řetězec směřován z jednoho modulu do druhého tak, že každý modul typicky katalyzuje pouze jeden cyklus prodloužení. Iterativní PKS typu I se primárně vyskytují u hub, zatímco modulární PKS převažuje u bakterií včetně sinic (Nivina et al. 2019).

Každý modul obsahuje sadu různých domén k provádění chemické transformace monomeru během jeho začlenění. Výsledné metabolity se skládají z polyketidových řetězců pomocí Claisenovy kondenzační reakce, která vytváří kovalentní vazbu mezi dvěma thioesterovými uhlíky. Mechanismus biosyntetického cyklu připomíná průběh reakcí NRPS, startovacími jednotkami jsou však nejčastěji acetyl CoA, propionyl CoA nebo složitější acyl-koenzymy A, a elongačním monomerem je zejména malonyl-CoA (Musiol et al. 2012). Základními doménami každého PKS jsou: acetyltransferáza (AT) - doména odpovědná za aktivaci a přenos stavebních bloků vázaných původně na CoA na doménu acylového nosného proteinu (ACP), která pomocí

kondenzace kovalentně thioesterovou vazbou váže acylovou jednotku, jež se tak stává dostupnou pro keto-syntázu (KS), doménu odpovědnou za tvorbu C-C vazby a prodloužení vznikajícího řetězce. Funkčně tak zhruba AT doména u PKS odpovídá A doméně u NRPS a podobně ACP doména má shodnou funkci s PCP doménou a KS doména analogickou funkci k C doméně. Obvyklou součástí aparátu pro syntézu polyketidů jsou další domény, odpovědné za existenci široké rozmanitosti syntetizovaných přírodních produktů, např. metyltransferázy (MT), odpovědné za methylyaci řetězce, KR domény odpovědné za redukci keto-skupin na hydroxy-skupiny, oxygenázy odpovědné za připojení dalších hydroxy-skupin, aj. Výsledný produkt je obvykle uvolněn stejně jako u NRPS pomocí thioesterázové domény (TE) (Dutta et al. 2014).



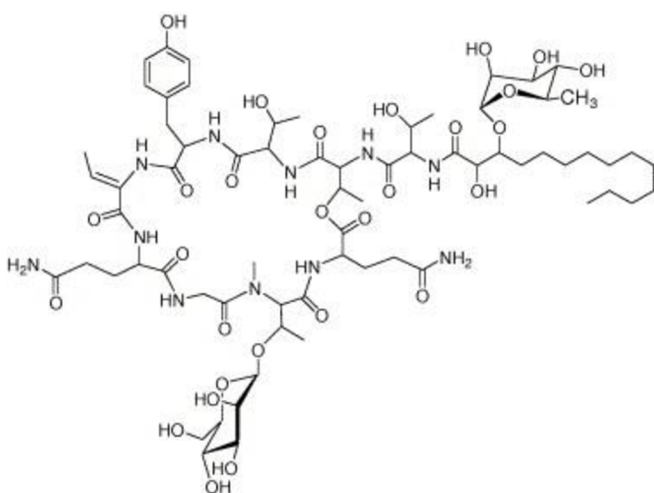
Obr. 7 (Převzato z Kust, 2019)

1.2.2.4 Sinicové lipopeptidy

V poslední době je tato skupina objektem mnoha studií (Nagarajan et al. 2012; Swain et al. 2017). Svými účinky a strukturou jsou sinicové lipopeptidy podobné ostatním bakteriálním lipopeptidům (viz. kapitola 2.1). Kvůli přibývajícimu množství bakteriálních kmenů rezistentních k antibiotikům (ale i houbových patogenů), které mohou způsobit těžká lidská onemocnění, jsou i sinicové lipopeptidy objektem zkoumání vědců. Na základě nedávných objevů jsou sinicové lipopeptidy považovány za slibné z medicínského hlediska jako antifungální (Shishido et al. 2015), antimikrobiální a potenciálně protirakovinné látky (Iwasaki et al. 2014). Existuje hypotéza, že i v přírodě mohou představovat potenciálně nebezpečné toxiny (Bártová, 2019). Důvod, proč sinice syntetizují takové látky, dosud není úplně jasný, ale svým působením jsou schopné vyvolat nekrózu buněk. Mezi sinicové lipopeptidy řadíme např. hassallidiny, anabaenolysiny, muscotoxiny, minutissamidy a puwainaphyciny (Merel et al. 2013).

1.2.2.4a Hassallidiny

Hassallidiny (obr. 8) jsou glykosylované cyklické lipopeptidy, produkované sinicemi, s antifungálními účinky. Obecná struktura hassallidinu sestává z peptidového kruhu s osmi aminokyselinami s bočními řetězci tvořenými jednou další aminokyselinou, mastnou kyselinou a až třemi cukernými skupinami. Hassallidiny jsou poměrně široce rozšířené, byly nalezeny u sinic z rodů *Hassallia*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nostoc*, *Planktothrix* a *Tolypothrix* (Vestola et al. 2014). Hassallidiny mají protiplísňové účinky proti známým lidským patogenním houbám jako *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium* sp. (Neuhof et al. 2005; Vestola et al. 2014). Navíc je známa aktivita proti lidské leukemii T buněk *in vitro* (Jurkat ATCC-TIB-152) (Neuhof et al. 2005). Hassallidiny jsou v sinicích syntetizovány neribozomální peptidovou biosyntézou.

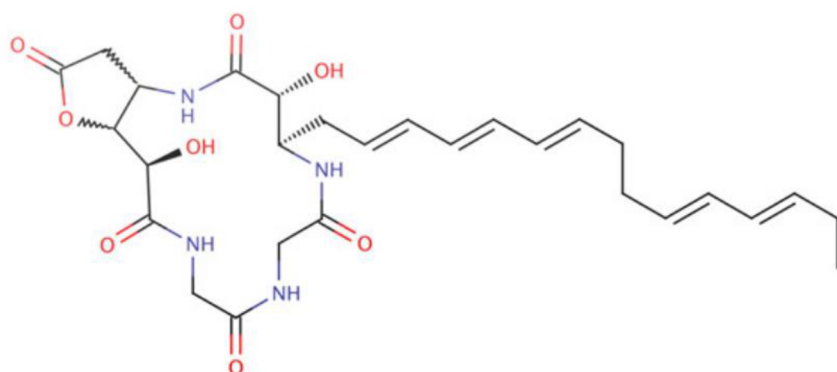


Obr. 8 Struktura hassallidinu (převzato z Neuhof et al. 2005)

1.2.2.4b Anabaenolysiny

Anabaenolysiny jsou lipopeptidy produkované sinicemi rodu *Anabaena* se silnou cytolytickou aktivitou (Oftedal et al. 2012). Studium anabaenolysinů odhalilo, že sestávají ze dvou glycinů, 2-(3-amino-5-oxytetrahydrofuran-2-yl)-2-hydroxyoctové kyseliny a 18 uhlíků dlouhé nenasycené α -hydroxy- β -aminokarboxylové kyseliny (obr. 9). Je známo, že zástupci rodu *Anabaena* mohou vyrábět 10 variant anabaenolysinů, které se liší délkou methylenového řetězce a stupněm nenasycení hydroxyamino mastné kyseliny. Anabaenolysiny jsou schopné permeabilizovat buňky savců útokem na cholesterol-dependentní membrány bez poškození mitochondrií a vykazují velkou hemolytickou účinnost (Jokela et al. 2012). Biosyntetický aparát pro anabaenolysiny se skládá z hybridního NRPS / PKS a jedné nebo dvou desaturáz mastných

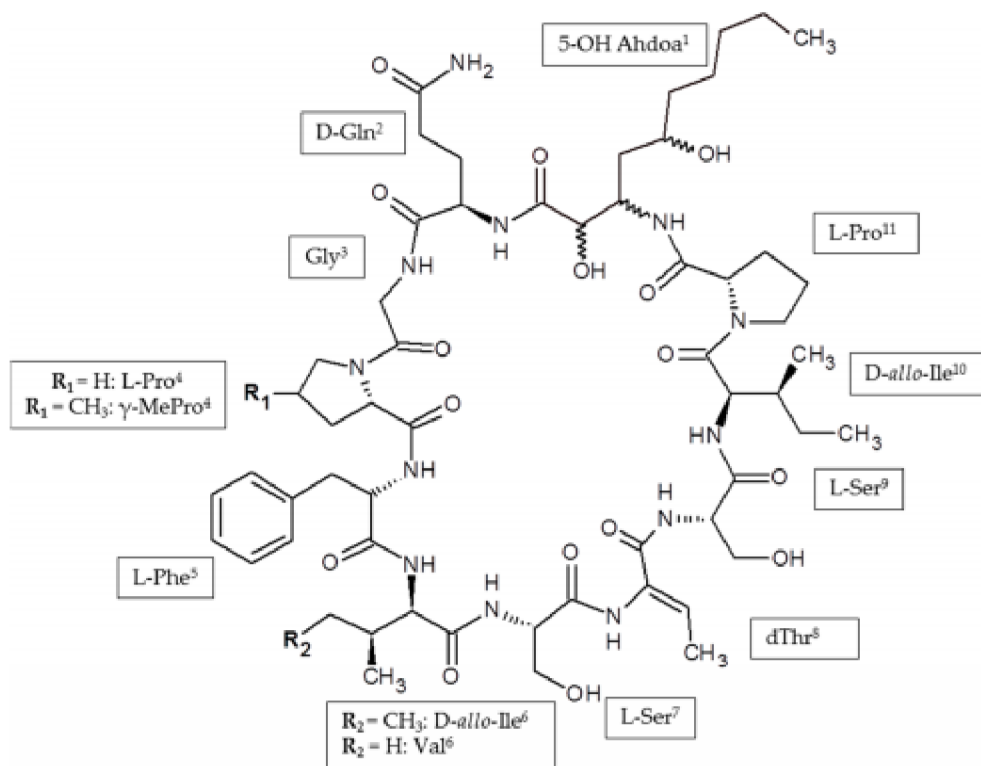
kyselin. Způsob začlenění řetězce mastné kyseliny do anabaenolysinu je nejasný (nebyl zde identifikován gen pro FAAL).



Obr. 9 Struktura anabaenolysinu A (převzato z Jokela et al. 2012).

1.2.2.4c Muscotoxiny

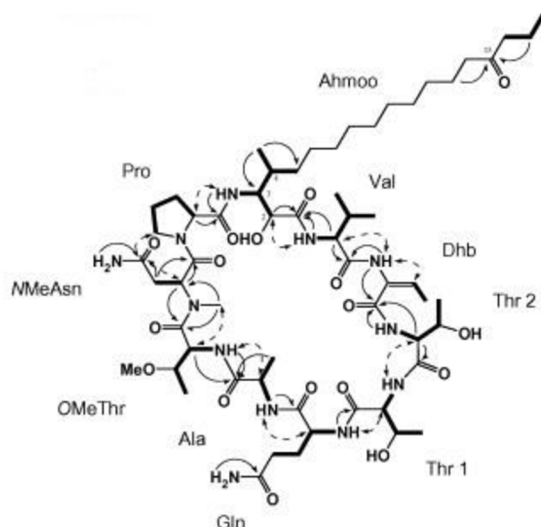
Muscotoxiny (obr. 10) představují další skupinu sinicových lipopeptidů, které však dosud byly nalezeny pouze v jediném kmeni půdní sinice *Desmonostoc muscorum* CCALA 125. Pro muscotoxiny je charakteristický způsob permeabilizace buněčných membrán, kdy, na rozdíl od jiných lipopeptidů, dochází k narušení lipidové dvojvrstvy snížením její fluidity (Tomek et al. 2015). Muscotoxin A má schopnost permeabilizovat plazmatickou membránu např. u lidských rakovinných HeLa buněk, čímž dochází k buněčnému usmrcení (Cheel et al. 2018). Muscotoxiny také vykazují značnou antifungální aktivitu proti fytopatogenním houbám jako je *Sclerotinia sclerotiorum*; tato bioaktivita by mohla být využita v zemědělství (Cheel et al. 2018). Biosyntéza muscotoxinů je dosud předmětem vědeckého zkoumání.



Obr. 10 Struktura muscotoxinu (převzato z Cheel et al. 2018).

1.2.2.4d Minutissamidy

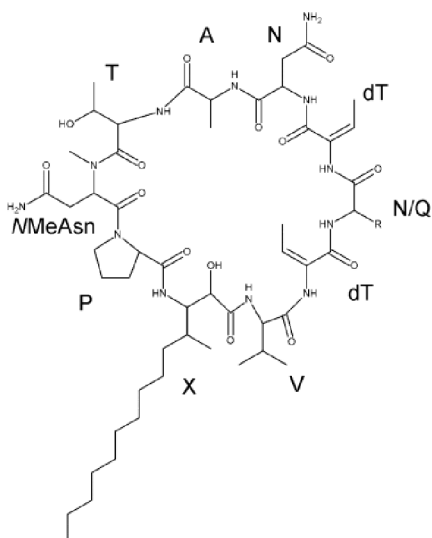
Jsou to cyklické lipodekapeptidy, které zahrnují zbytek mastné β -aminokyseliny, pomocí které dochází k uzavření oligopeptidového cyklu (obr.11). Minutissamidy byly poprvé nalezeny v kultuře sinice *Anabaena minutissima* UTEX 1613 (Kang et al. 2011) a později v dalších kmenech r. *Anabaena* a *Cylindrospermum* (Kang et al. 2012, Mareš et al. 2019). Celkem bylo popsáno 12 strukturálních variant minutissamidů (A-L). Minutissamidy E-L vykazovaly antiproliferativní aktivitu proti buňkám melanomu (MDA-MB-435) a proti rakovinným buňkám tlustého střeva (HT-29) (Kang et al. 2012).



Obr.11 Struktura minutissamidu E (převzato z Kang et al. 2012).

1.2.2.4e Puwainaphyciny

Puwainaphyciny jako skupinu látek na základě struktury nelze jednoznačně odlišit od minutissamidů, obě skupiny jsou totiž cyklické lipodekapeptidy obsahující 3-amino-2-hydroxy-4-methyl-mastnou kyselinu a 2 konzervované aminokyseliny sousedící z každé strany mastné kyseliny – Val a Dhb (dehydromáselná kyselina) tvoří peptidový řetězec přímo navazující na mastnou aminokyselinu, zatímco Pro a NMeAsn (*N*-methylasparagin) jsou v části řetězce uzavírající peptidový cyklus. (obr. 12). Puwainaphyciny byly původně izolovány z různých půdních kmenů rodů *Cylindrospermum*, *Anabaena* a *Symplocastrum* (Gregson et al. 1992, Hrouzek et al. 2012, Mareš et al. 2019). Dosud se předpokládalo, že puwainaphyciny produkují výhradně půdní rody sinic, ale v diplomové práci M. Bártové (Bártová, 2019) byla potvrzena přítomnost puwainaphycinů ve studovaných vzorcích vodního květu sinic z planktonu rybníků na území CHKO Třeboňsko. Produkce puwainaphycinů (a minutissamidů) je výsledek spolupůsobení dvou enzymatických komplexů – NRPS a PKS. Jelikož identifikace producentů puwainaphycinů je hlavním objektem výzkumu této bakalářské práce, a v první fázi probíhala na základě detekce biosyntetických genů pro puwainaphycin metodou PCR, v dalším textu bude probrána syntéza puwainaphycinů detailně. Puwainaphyciny ovlivňují buněčnou proliferaci a životoschopnost různých lidských buněčných linií a působí též antifungálně (Hrouzek et al. 2012, Mareš et al. 2019). Zejména puwainaphycin F indukuje přítok vápníku (Ca^{2+}) do buněk HeLa v návaznosti na permeabilizaci plazmatické membrány (Hrouzek et al. 2012). Studie provedená na buněčném modelu Caco2 střevní epitelové bariéry prokázala též disruptivní a zánětlivé reakce na přítomnost puwainaphycinů a minutissamidů (Hrouzek et al. 2020).



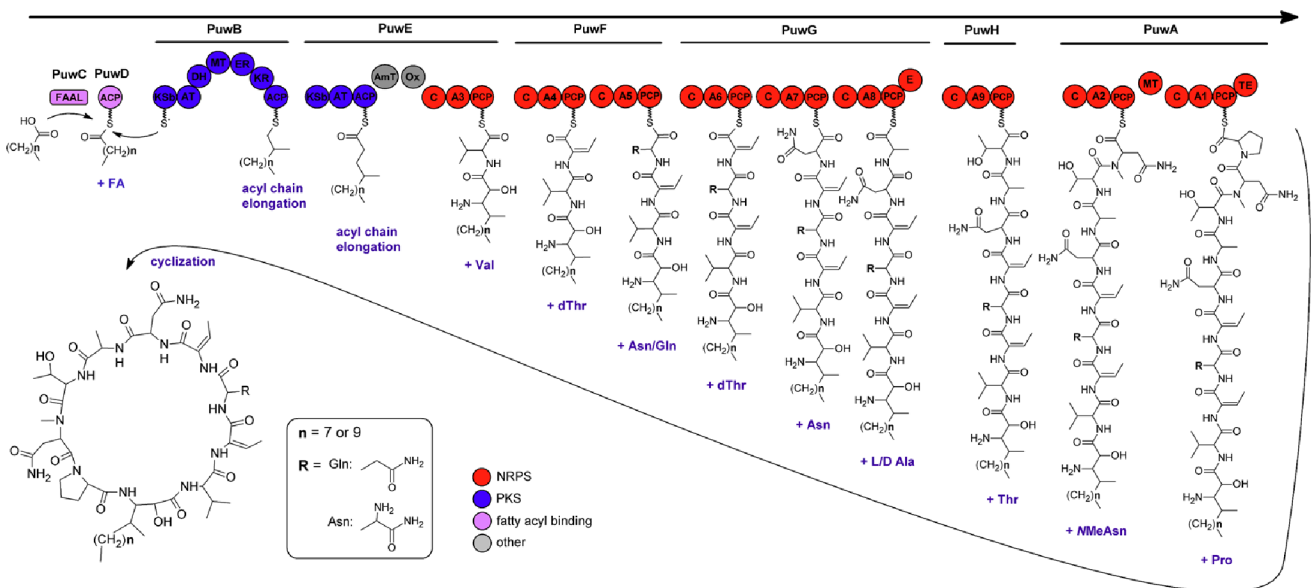
Obr. 12 Struktura puwainaphycinu F (převzato z Hrouzek et al. 2012).

Biosyntéza puwainaphycinů

Na základě výsledků studie Mareš et al. (2019) se zdá pravděpodobné, že PuwC/D a PuwI představují dva alternativní spouštěcí moduly (FAAL) schopné iniciovat biosyntézu puwainaphycinů/minutesamidů. Podobná situace byla dříve popsána pro alternativní spouštěcí moduly NRPS v syntetáze anabaenopeptinu (Rouhiainen et al. 2010). Biosyntéza puwainaphycinu tedy začíná produktem genu *puwC* nebo *puwI* (obr. 13). Tento protein obsahuje konzervovanou katalytickou doménu typickou pro FAAL. Po adenylaci mastné kyseliny následuje její ligace (obr. 13) na první acyl carrier protein (ACP) kódovaný *puwD* nebo *puwI*, intermediát je pak předán přímo do PKS (obr. 13). První modul PKS (kódovaný *puwB*) obsahuje sekvenci domén acyltransferázy, dehydratázy, methyltransferázy, enoylreduktázy a ketoreduktázy. Výsledkem společného působení těchto domén je α -methylovaný produkt (obr. 13). Dalším enzymem (PuwE) je specifický hybrid obsahující jeden PKS modul, aminotransferázovou a monooxygenázovou doménu a koncový modul NRPS. Modul PKS slouží k prodloužení acylového řetězce. Aminotransferáza a monooxygenáza umístěné mezi PKS a NRPS moduly katalyzují modifikaci řetězce na 3-amino-2-hydroxy-4-methyl-acyl typický pro tuto skupinu lipopeptidů (obr. 13). Terminální modul NRPS zahrnuje valin aktivující doménu. Následně se meziproduct přenesse na jiný enzym NRPS (PuwF), obsahující dva moduly, přičemž každý přidává jednu aminokyselinu-dehydrothreonin a asparagin / glutamin. Dále následuje katalýza proteinem PuwG, který obsahuje tři moduly NRPS. První dva moduly aktivují asparagin a alanin. Poslední modul PuwG zahrnuje epimerizační doménu konzistentní s výskytem obou optických izomerů (L/D-alanin) v molekulách puwainaphycinu. Přídavek threoninu, dalšího

člena oligopeptidového kruhu, je katalyzován proteinem PuwH (Obr. 13), který obsahuje jeden modul NRPS. Posledním enzymem podílejícím se na prodloužení peptidylu je PuwA. Ten obsahuje dva moduly NRPS, první má za úkol aktivaci asparaginu. Předpokládá se, že druhý modul začlení do koncové části peptidu prolin a obsahuje též terminální thioesterázovou doménu. Tato doména odštěpí hotový řetězec puwainaphycinu z peptidyl-nosného proteinu, a provede jeho cyklizaci (Mareš et al. 2019).

Jak bylo již zmíněno, studie Mareš et al. (2019) předpokládá, že existuje startovací jednotka typu II (PuwI) skládající se z FAAL enzymu spojeného s ACP. Kmeny druhů *Cylindrospermum* spp., *Anabaena* spp. a *Symplocastrum muelleri* ve svých biosyntetických genových klastrech různě kombinují přítomnost předpokládané startovací jednotky typu I (PuwC) i typu II (PuwI). Oba enzymy jsou schopny aktivovat více než jednu mastnou kyselinu, množiny preferovaných substrátů se však vzájemně liší délkou řetězce mastné kyseliny. Také se předpokládá, že dráha započatá PuwI využívá enzym PuwJ, který je zodpovědný za hydroxylaci zbytku mastné kyseliny. Další protein spojený se startovací jednotkou II je PuwK, který je zodpovědný za halogenaci (chlorinaci) řetězce mastné kyseliny.



Obr. 13 Biosyntéza puwainaphycinů (převzato z Mareš et al. 2014).

1.3 Metody detekce cyanotoxinů a jejich producentů

Cyanotoxiny, podobně jako ostatní nízkomolekulární látky jsou obvykle detekovány analyticky v extraktech z přírodních vzorků nebo kultur sinic, nejčastěji pomocí kapalinové chromatografie (liquid chromatography – LC) s napojením na hmotnostní spektrometrii (mass spectrometry – MS) (Maizels, 2004; Massey et al. 2020). V případě inhibitorů protein fosfatáz (microcystiny, nodulariny) existují též imunologické a enzymatické testy (Carmichael, 1999). Hojně využívanou nepřímou metodou je pak detekce vybraných genů pro syntézu cyanotoxinů pomocí molekulárních metod (PCR, qPCR), která ukáže na přítomnost producentů cyanotoxinů ve studovaném vzorku. Specifické PCR primery a protokoly byly vytvořeny především pro hojně studované toxiny jako jsou microcystiny, nodulariny, cylindrospermopsiny, saxitoxiny (Baker et al. 2013), nebo anatoxiny-a (Legrand et al. 2016). Tuto citlivou metodu je možné použít pro detekci cílových genů dokonce u jednotlivých vláken či kolonií planktonních sinic (Lara et al. 2013). Jak již bylo zmíněno, puwainaphyciny byly původně vyizolovány z půdních rodů sinic *Anabaena* a *Cylindrospermum*, ale jejich výskyt byl náhodně zaznamenán pomocí HPLC-MS i v planktonních vzorcích stojatých vod v České Republice (Zapomělová et al. 2009) a následně potvrzen ve vzorcích vodního květu z CHKO Třeboňsko (Bártová, 2019) také pomocí PCR. Jelikož přítomnost puwainaphycinů ve vodách může mít do budoucna pro člověka negativní dopad, je důležité zavést spolehlivé metody, které mohou pomoci při detekci těchto potenciálních cyanotoxinů.

1.3.1 Specifické PCR primery pro detekci producentů puwainaphycinů

Dané primery a optimalizovaný PCR protokol jsou výsledkem diplomové práce (Bártová, 2019) a jejich specifická byla ověřena kromě šesti puwainaphycin/minutissamid produkujících kmenů též na souboru 22 sinicových kmenů, které obsahují v genomu biosyntetické genové klastry pro jiné lipopeptidy, avšak chybí u nich geny pro puwainaphyciny (tyto kmény sloužily jako negativní kontrola). Vybraný pár primerů je schopen amplifikovat přibližně 550 bp dlouhý úsek genu *puwF*, který je součástí NRPS genů v klastru pro syntézu puwainaphycinu.

1.3.2 HPLC-HRMS/MS detekce puwainaphycinů

HPLC je chromatografická metoda umožňující rozdělit extrakt na jednotlivé látky na základě afinity analyzovaných molekul ke stacionární fázi uložené v chromatografické koloně. Velmi častou aplikací je přímé spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (HRMS). Kombinace kapalinové chromatografie s elektrosprejovou hmotnostní spektrometrií byla zkoumána jako nástroj pro analýzu nejrůznějších toxinů produkovaných sinicemi.

Zkoumané toxiny zahrnovaly např. saxitoxin, anatoxin-a, cylindrospermopsin a microcystiny (Dell'Aversano et al. 2004; Puddick et al. 2015). S využitím této metody také studie Urajová et al. (2016) experimentálně potvrdila, že kmeny *Cylindrospermum alatosporum* a *Anabaena* sp. jsou zodpovědné za produkci puwainaphycinů F a anabaenolysinů A. Autoři k tomu využili kombinace vysoké fragmentační energie při MS analýze, díky které odštěpili z látky diagnostický fragment mastné kyseliny, a paralelní analýzy při nižší fragmentační energii, která jim umožnila stanovit aminokyselinovou sekvenci peptidové části látky.

2. Cíle práce

Cíle této bakalářské práce jsou:

- Literární rešerše problematiky potenciálně toxických sinicových lipopeptidů se zaměřením na puwainaphyciny.
- Detekce producentů puwainaphycinů ve vlastnoručně odebraných vzorcích planktonu pomocí PCR.
- Taxonomická identifikace těchto producentů pomocí analýzy jednotlivých sinicových vláken a kolonií.

3. Metodika

3.1 Odběr vzorků

Podle studie Bártová (2019), která se zabývala hledáním potenciálně toxických lipopeptidů ve vzorcích vodního květu v CHKO Třeboňsko a okolí, byly zvoleny pro můj výzkum rybníky, kde bylo detekováno v letech 2017-2018 největší množství puwainaphycinů. Před odběrem byly na každém stanovišti zaznamenány následující údaje: datum a čas odběru, počasí a GPS souřadnice, pomocí kalibrovaného přenosného testeru Hanna 98130 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) byla změřena teplota vody, pH, a konduktivita, a průhlednost pomocí Secchiho disku. Vzorky planktonu byly na jednotlivých stanovištích odebírány pomocí planktonní sítky o průměru ok 20 μm . Pro získání co nejvyšší koncentrace biomasy se odběr planktonkou opakoval pětkrát. Z každého stanoviště byly odebrány tři vzorky do sterilních plastových 50 ml centrifugačních zkumavek. Zkumavky byly pak v chladicím boxu transportovány do laboratoře. Dvě zkumavky s odebranými vzorky planktonu byly centrifugovány (Eppendorf Centrifuge 5804, Eppendorf, Hamburg, Německo) při 5000 g po dobu 15 min tak, aby se biomasa oddělila od supernatantu. Vzniklý supernatant byl opatrně slit. Dále byly tyto vzorky uloženy do hlubokomrazicího boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro následnou analýzu pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie s propojením na hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením (HPCL-HRMS), kterou prováděli pracovníci centra ALGATECH (Mikrobiologický ústav AVČR) v Třeboni. Poslední vzorek posloužil k mikroskopickému rozboru a izolaci sinic pro molekulární analýzu.

3.2 Zpracování a příprava vzorků

3.2.1 Mikroskopický rozbor

Po transportu do laboratoře byly environmentální vzorky prohlíženy pomocí mikroskopu Olympus BX51 vybaveném Nomarského DIC při zvětšení $100\times-400\times$ a dokumentovány digitálním fotoaparátem Olympus DP-72 (Olympus, Tokyo, Japonsko). Determinace sinic byla provedena podle příručky Kaštovský et al. (2018) a jejich přítomnost ve vzorcích byla zaznamenána do tabulek (příloha č.1 a č.2)

3.2.2 Izolace jednotlivých vláken a kolonií sinic

Z taxonů sinic nalezených pod mikroskopem byli vybráni možní kandidáti na producenty puwainaphycinu na základě jejich dominantního výskytu ve vzorcích planktonu pozitivních na přítomnost puwainaphycinů v předchozí studii Bártová (2019). Izolace byla provedena s

použitím invertovaného mikroskopu Olympus IX71 (Olympus, Tokyo, Japonsko) vybaveném Nomarského DIC při zvětšení 200×-400×. Jednotlivá vlákna nebo kolonie sinic byla separována pomocí skleněné mikrokapiláry za sterilních podmínek podle dříve publikované metody (Mareš et al. 2015), opakovaně (desetkrát) omývána v TE pufru (pH 7,8) a nakonec uložena s kapkou tohoto pufru do připravené PCR zkumavky o objemu 0,2 ml a zmražena (-20 °C). Jednotlivě separované kolonie či vlákna byly též fotograficky dokumentovány digitálním fotoaparátem Olympus DP-72 (Olympus, Tokyo, Japonsko).

3.2.3 Amplifikace celého genomu

Amplifikace celého genomu byla provedena metodou multiple-displacement amplification (MDA) pomocí kitu REPLI-g Mini Kit od výrobce Qiagen (Hilden, Německo) podle návodu od výrobce. Po amplifikaci při 30 °C po dobu 16 hodin byla polymeráza inaktivována při 65 °C po dobu 5 min. Úspěšnost MDA a negativní kontrolní vzorek byly ověřeny gelovou elektroforézou. Gel byl připraven s použitím TAE pufru s 1,5% agarosou. Do první jamky bylo přidáno 14 µl ladderu (O'GeneRuler; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), následně do každé jámky přeneseno 8 µl vzorku, barvení proběhlo interkalačním barvivem SybrGreen (SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain, LONZA, Rockland ME, USA) dle návodu výrobce. Elektroforéza probíhala po dobu 1,5 hod při napětí 80 V. Produkty po elektroforéze byly následně vizualizovány pomocí UV a vyfoceny.

3.2.4 PCR testování vzorků

Úspěšně naamplifikované MDA produkty byly použity jako templát pro PCR s využitím primerů pmFF a pmFR podle protokolu optimalizovaného v práci Bártová (2019) pro zjištění možné přítomnosti genu *puwF* z biosyntetického genového klastru puwainaphycinu. Ve flow-boxu, který byl předem sterilizován UV světlem, byl nejprve namíchan master mix obsahující pro každý vzorek 25 µl pufru s polymerázou Plain PP Master Mix (Top Bio, Praha), 1 uL každého z primerů o koncentraci 10 µM a 23 µl sterilní vody. Do PCR zkumavek bylo následně přeneseno 49 µl master mixu a 1 µl templátové DNA. Poté byly vzorky zvortexovány (VortexGenie 2, Mo BIO Laboratories®, Inc), krátce stočeny na stolní mikrocentrifuze a vloženy do termocykleru Eppendorf Mastercycler Pro (Eppendorf, Hamburg, Německo) se zvoleným programem vhodným pro dané primery (Tab. 1).

Tab 1: Program do termocykleru pro PCR s primery pmFF a pmFR.

cyklus č.	počet opakování	teplota [°C]	čas [min]
1	1	94	5
2	35	94	0,75
	35	56	0,75
	35	72	0,75
3	1	72	10

Po zakončení PCR reakce v termocykleru byly vzorky podrobeny elektroforéze stejným postupem jako výše a následně vizualizovány pomocí UV a vyfoceny.

3.2.5 Přečištění PCR produktů a sekvenace

Pozitivní vzorky po PCR byly přečištěny pomocí kitu Monarch Nucleic Acid Purification od výrobce New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA). Po přečištění byly vzorky s PCR produkty odeslány do společnosti SeqMe (Dobříš, Česká Republika) k sekvenování Sangerovou metodou z obou stran pomocí stejných primerů, které byly použity při PCR. Surová data ze sekvenátoru byla složena v programu Geneious Prime (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). Na základě analýzy získaných sekvencí v programu BLAST (NCBI) byla zjištěna příbuznost získaných PCR produktů ke známým sekvencím genu *puwF*.

3.2.6 Získání sekvence genu pro 16S rRNA a 16S-23S ITS úseku rRNA

Abychom mohli určit fylogenetickou pozici sinic, jejichž vlákna byla vyizolována, byla zvolena metoda PCR a klonování k získání částečné sekvence genu pro 16S rRNA a kompletní sekvence úseku 16S-23S ITS rRNA. Klonování bylo nezbytné z důvodu přítomnosti několika odlišných kopií rRNA operonu ve studovaných genomech. Amplifikace tohoto úseku byla provedena ze stejných vzorků jako amplifikace genu *puwF*, s použitím PCR protokolu podle Boyer et al. (2001) a primerů 16S378F a 23S30R (Taton et al. 2003). PCR protokol zahrnoval inkubační kroky uvedené v Tab. 2. Následné klonování probíhalo s využitím kitu pGEM-T-Easy od výrobce Promega (Madison, Wisconsin, USA) podle příloženého manuálu. Kolonie *E. coli* obsahující plazmid s požadovaným insertem byly převedeny do 3 ml kultury a pěstovány na třepačce VWR 89027-702 (VWR, Pennsylvania, USA) přes noc (LB médium, 37 °C, 200 rpm).

Kultury byly sklizeny a plazmid vyizolován pomocí kitu NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel, Düren, Německo) podle návodu výrobce. Plazmidy byly připraveny k sekvenaci a odeslány do společnosti SeqMe (Dobříš, Česká Republika) na Sangerovo sekvenování pomocí univerzálních plazmidových primerů T7 a SP6 a vnitřního primeru cyano6r (Mareš et al. 2013). Po obdržení výsledků byly sekvence opět skládány pomocí programu Geneious Prime (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) a úspěšnost sekvenace ověřena pomocí programu BLAST. Pro další analýzy byly použity pouze vzorky, u kterých se zdařilo osekvenovat alespoň 2 klony, přičemž všechny klony byly přiřazeny ke stejnému taxonu (na základě BLAST). Ostatní vzorky, u kterých byla získána pouze sekvence jednoho klonu nebo klony obsahovaly sekvence různých druhů, nebyly považovány za průkazné.

Tab 1: Program do termocyklieru pro PCR s primery 16S378F a 23S30R.

cyklus č.	počet opakování	teplota [°C]	čas [min]
1	1	94	5
2	38	94	1
	38	54	1
	38	72	1,5
3	1	72	10

3.2.7. Alignment a analýza podobnosti sekvencí

Alignment získaných nukleotidových sekvencí (*puwF*, gen pro 16S rRNA a ITS úsek) byl prováděn pomocí algoritmu MAFFT v. 7 (Katoš a Standley, 2013) v programu Geneious Prime, přičemž bylo vždy použito základní nastavení algoritmu. Do alignmentu genu *puwF* byly zahrnuty pouze sekvence získané v této práci a sekvence získané v práci Bártová (2019), aby bylo možné zjistit jejich vzájemnou podobnost. Sekvence genu pro 16S rRNA pro fylogenetickou analýzu byly alignovány společně s nejbližšími sekvencemi z databáze NCBI (na základě BLAST analýzy), všemi sekvencemi *Aphanizomenon gracile* přítomnými v databázi NCBI a delšími než 1000 bp, dalšími vybranými sekvencemi heterocytózních sinic na základě literatury (Kust et al. 2015, Kozlíková-Zapomělová et al. 2016) a outgroup sekvencemi neheterocytózních

sinic (*Gloeobacter violaceus* PCC 7421, *Trichodesmium erythraeum* IMS-101). Alignment pro fylogenetickou analýzu celého úseku 16S+ITS rRNA byl vytvořen z podskupiny sekvencí předchozího alignmentu tak, že do něho byly zahrnuty pouze sekvence ze skupiny *Dolichospermum/Aphanizomenon* obsahující celý tento úsek a vlastní sekvence. Poslední alignment obsahoval pouze sekvence ITS úseku *A. gracile* pro analýzu jejich podobnosti. Nekvalitní sekvence a sekvence kontaminant (*Planktothrix agardhii* a *Cuspidothrix issatschenkoii*) nebyli použity pro fylogenetickou analýzu. Výsledný alignment byl následně manuálně zkontrolován a byly vymazány nejednoznačně alignované pozice s gapy a úseky na začátku a konci alignmentu, kde chyběly data u většiny sekvencí. Podobnosti sekvencí byly vypočteny jako jejich párová p-distance v programu Geneious Prime.

3.2.8. Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza sekvencí genu pro 16S rRNA a spojeného alignmentu 16S+ITS rRNA byla provedena z vytvořených alignmentů metodou Maximum Likelihood pomocí RaxML v. 8 (Stamatakis, 2014) v programu Geneious Prime. Při analýze byl aplikován substituční model GTR+I+G a pro stanovení podpory větví bylo provedeno 1000 bootstrapových pseudoreplikací.

4. Výsledky

4.1 Rok 2019

4.1.1 Odběr vzorků sinicové biomasy

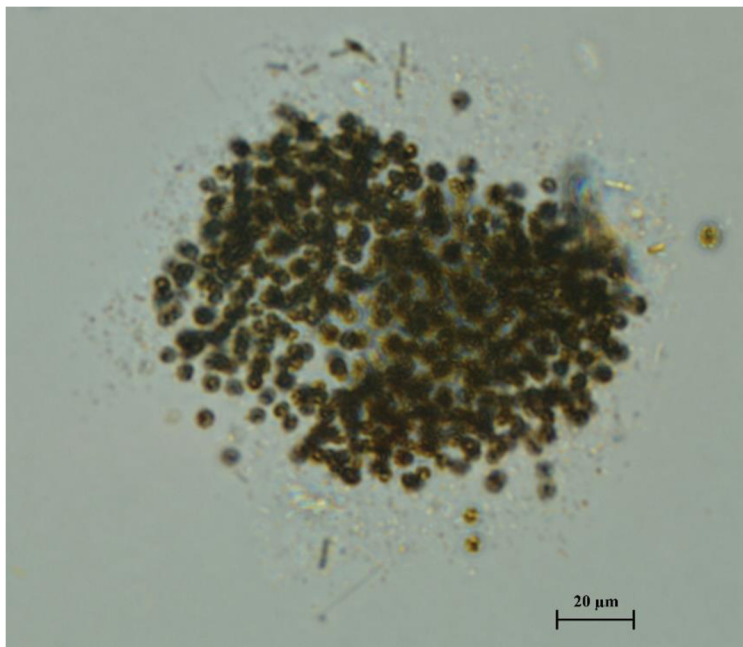
Terénní sběr na Třeboňsku byl proveden na základě předchozí studie Bártová (2019), která se zábyvala hledáním potenciálně toxických lipopeptidů ve vzorcích vodního květu. Odběry byly provedeny v období mezi červencem a zařím 2019 celkem na 5 lokalitách. V následující tabulce (Tab. 3) jsou zaznamenány naměřené vlastnosti vody, GPS souřadnice místa odběru, datum a čas odběru a aktuální počasí při odběrech v roce 2019. Odběry byly prováděny opakovaně, což je také zaznamenáno v Tab. 3.

Tab. 3: Parametry odběrových lokalit v roce 2019.

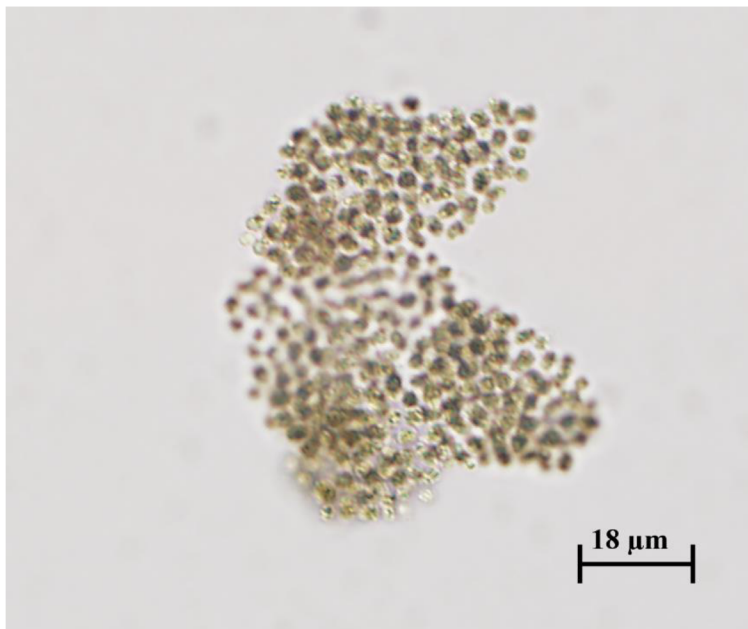
datum	čas	počasí	rybník	GPS	pH	teplota [°C]	vodivost [μS/cm]	Secchi [cm]
15.07	10:30	jasno	Láska	49°06'32.1"N 14°44'48.2"E	8.8	19	307	15
15.07	10:00	jasno	Naděje	49°07'01.3"N 14°44'27.1"E	9.4	22,7	142	15
08.07	10:00	jasno	Opatovický r.	48°59'12.2"N 14°46'41.1"E	8.3	23,5	215	20
08.07	9:00	jsano	Rožmberk	49°02'53.6"N 14°45'50.5"E	9.3	22,7	175	15
08.07	9:30	jasno	Svět	48°59'53.1"N 14°46'22.4"E	9.4	21,6	183	15
16.08	11:45	jasno	Láska	49°06'26.7"N 14°45'00.4"E	7.2	19,5	302	20
16.08	11:15	jasno	Naděje	49°07'05.9"N 14°44'41.4"E	8.4	22,4	144	15
13.08	10:45	zataženo	Opatovický r.	48°59'35.7"N 14°46'16.5"E	9.5	20	220	15
13.08	10:15	zataženo	Svět	48°59'43.5"N 14°46'11.1"E	9.1	21,2	179	15
07.09	12:00	jasno	Láska	49°06'45.7"N 14°45'00.4"E	7.6	19	298	20
07.09	11:30	jasno	Naděje	49°07'07.6"N 14°45'02.3"E	7.2	19,4	137	15
18.09	10:00	jasno	Opatovický r.	48°59'16.4"N 14°46'35.8"E	9.4	19,1	220	20
18.09	9:45	jasno	Svět	49°00'06.5"N 14°45'57.8"E	9.7	19,8	186	20

4.1.2 Mikroskopování vzorků a izolace potencialních producentů puwainaphycinu

Každý vzorek z 5 lokalit byl následně podroben mikroskopickému rozboru. U všech odebraných vzorků byly determinovány přítomné druhy sinic a zaznamenány do přílohy č. 1. Nejčastěji se vyskytovaly sinice rodu *Microcystis* (Obr. 14-16), *Planktothrix* a *Aphanizomenon*.



Obr.14 *M. aeruginosa* z rybníka Svět.



Obr.15 *M. ichthyoblabe* z rybníka Láska.

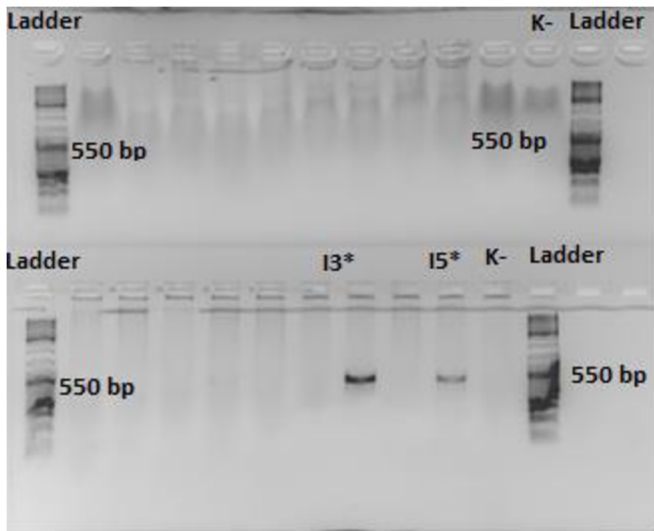


Obr. 16 *M. wesenbergii* z Opatovického rybníka.

Za nejvhodnější kandidáty na základě předchozích údajů (Bártová 2019) a aktuálního složení vzorků byly považovány sinice rodu *Microcystis* (*M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. wesenbergii*). Jednotlivé kolonie těchto druhů byly vyizolovány pro analýzu MDA, PCR pro gen *puwF* a, v případě pozitivního výsledku, sekvenaci genomového úseku pro 16S rRNA+ITS. Celkem bylo izolováno 25 kolonií *M. aeruginosa*, 25 kolonií *M. ichthyoblabe* a 10 kolonií *M. wesenbergii*.

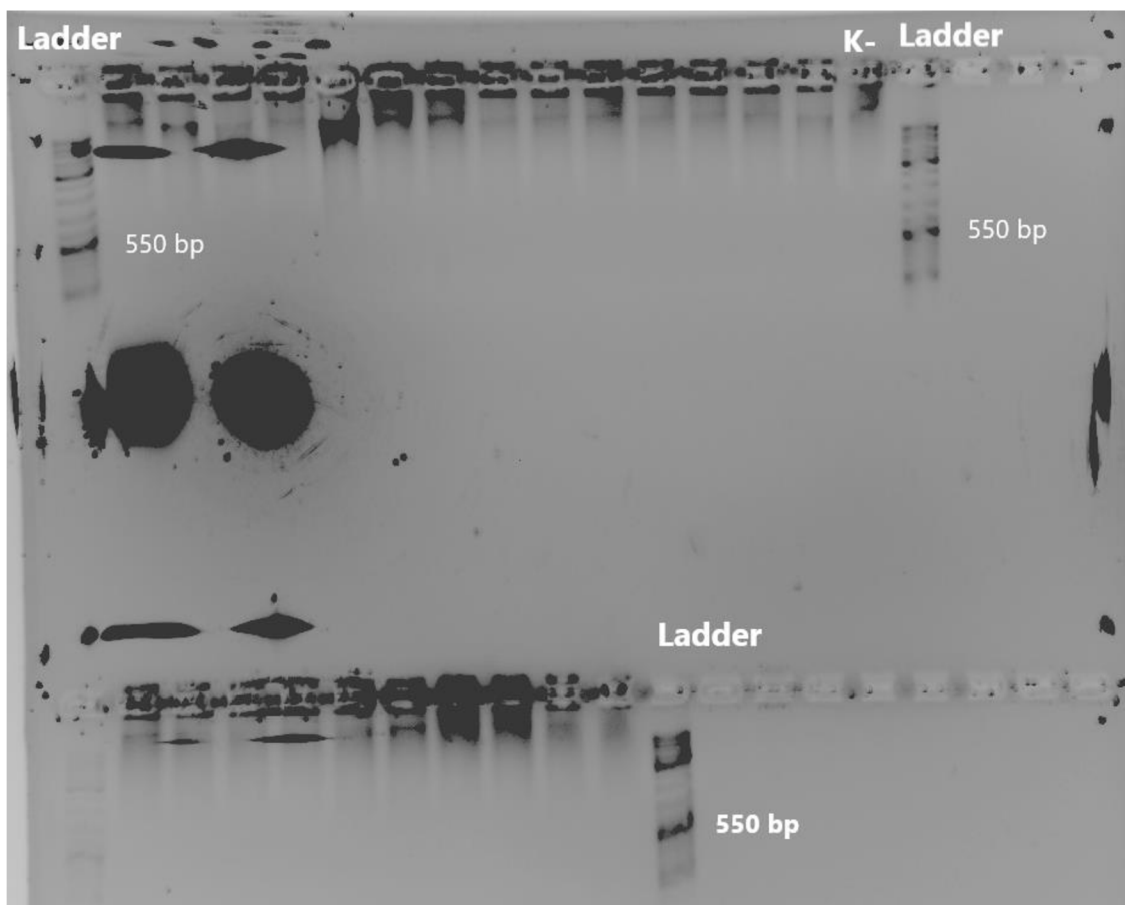
4.1.3 Amplifikace genomu (MDA) a PCR genu *puwF*

Amplifikací genomu jsme úspěšně zvýšili množství DNA u všech izolovaných vzorků, což bylo potvrzeno gelovou elektroforézou. Dále byla u každého vzorku provedena PCR genu *puwF*. Z 60 testovaných vzorků pouze 2 prokázaly pozitivní výsledek (Obr.17).



Obr. 17 Výsledek PCR pro gen *puwF* u vzorků kolonií rodu *Microcystis*. Vzorky *M. ichthyoblabe* (dole) a *M. aeruginosa* (nahore) z Opatovického rybníka, 11.07.2019. Vzorky I3* a I5* obsahovaly PCR produkt o očekávané délce.

Ostatní vzorky prokázaly negativní výsledek – nebyl zde zaznamenán PCR produkt o očekávané délce. (Obr. 18).



Obr. 18 Výsledek PCR pro gen *puwF* u vzorků kolonií rodu *Microcystis*. Vzorky *M. wesenbergii* (nahore) a *M. aeruginosa* (dole) z rybníka Naděje, 12.10.2019.

4.1.4 Sekvence genu *puwF*

Pozitivní vzorky *M. ichthyoblabe* z Opatovického rybníka byly úspěšně osekvenovány. Na základě analýzy pomocí BLAST byla potvrzena blízká příbuznost získaných sekvencí ke genu *puwF* ze známých půdních producentů puwainaphycinu. Nejbližší příbuznou sekvencí z databáze NCBI byla sekvence genu *puwF* z kmene *Anabaena sp.* UHCC-0399 (MH325200.1, 89.37% podobnost).

4.1.5 Sekvence úseku genu pro 16S rRNA a 16S-23S ITS rRNA

PuwF-pozitivní vzorky získané z kolonií *M. ichthyoblabe* z Opatovického rybníka byly podrobeny amplifikaci genomového úseku pro 16S rRNA a 16S-23S ITS, klonování a sekvenaci zaklonovaných insertů. Získané sekvence však na základě analýzy pomocí BLAST nebyly

příbuzné sekvencím rodu *Microcystis*. Jednotlivé klony obsahovaly sekvence jiných druhů sinic, nejčastěji *Aphanizomenon gracile* (4 klony), dále také *Cuspidothrix issatschenkoi* (3 klony), *Dolichospermum viguieri* (2 klony), *Dolichospermum flos-aquae* (2 klony) a *Planktothrix agardhii* (3 klony). Potenciální producent puwainaphycinu tak nemohl být na základě výsledků určen, tyto výsledky poukazovaly na pravděpodobnou kontaminaci vzorků kolonií *Microcystis* výše uvedenými druhy sinic (viz též Diskuze).

4.2 Rok 2020

4.2.1 Odběr vzorků

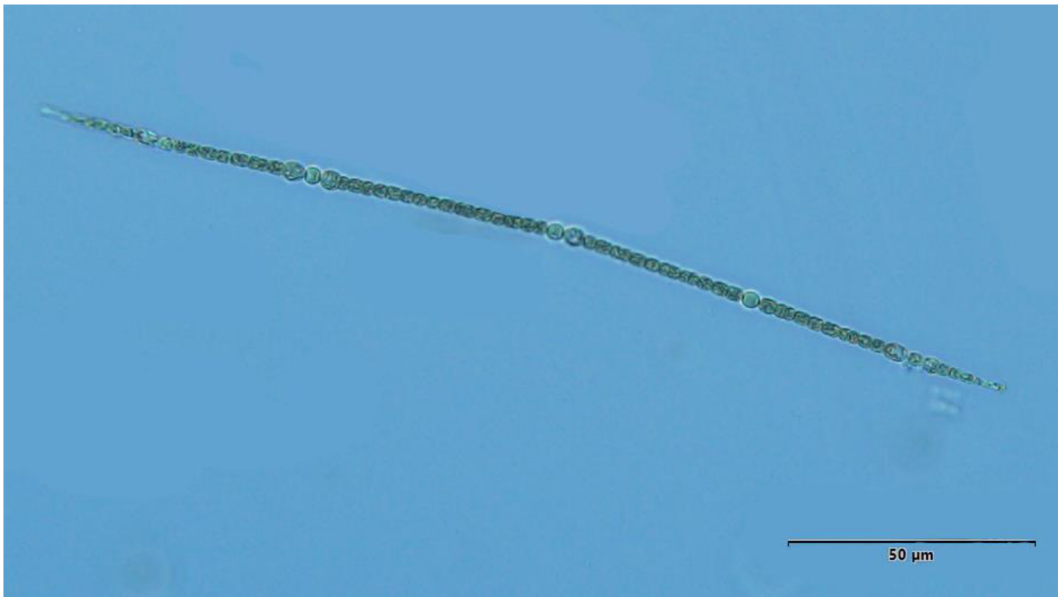
V předchozím roce nebyl mezi 60 vzorky r. *Microcystis* nalezen žádný potenciální producent puwainaphycinů. Na základě výskytu dalších hojných druhů sinic a také rozboru dvou kontaminovaných vzorků r. *Microcystis*, které byly falešně pozitivní při PCR pro gen *puwF*, jsme vytipovali nové kandidátní druhy sinic pro rok 2020: *Aphanizomenon gracile*, *Cuspidothrix issatschenkoi*, *Dolichospermum viguieri*, *Dolichospermum flosa-quae* a *Planktothrix agardii*. Na základě předchozích údajů o výskytu těchto druhů ve zvolené oblasti (Bártová 2019) bylo zvoleno 8 lokalit pro terenní odběr vzorků. V tabulce (Tab. 4) jsou zaznamenány naměřené vlastnosti vody, GPS souřadnice místa odběru, datum a čas odběru a aktuální počasí při odběrech v roce 2020. Odběry byly prováděny opět opakovaně.

Tab. 4: Vlastnosti vody při odběrech v CHKO Třeboňsko a okolí 2020.

datum	čas	počasí	rybník	GPS	pH	teplota [°C]	vodivost [μS/cm]	Secchi [cm]
05.07	11:10	jasno	Opatovický r.	48°59'12.2"N 14°46'41.1"E	8.2	22.5	206	10
05.07	10:15	jasno	Rožmberk	49°03'05.7"N 14°46'56.5"E	9.1	21.4	194	10
05.07	10:45	jasno	Svět	48°59'53.1"N 14°46'22.4"E	8.62	20.3	235	10
14.07	12:30	jasno	Láska	49°06'45.7"N 14°45'00.4"E	8.92	23.4	312	15
14.07	13:10	jasno	Naděje	49°07'05.9"N 14°44'41.4"E	9.61	22	143	15
27.07	11:00	jasno	Vyšehrad	49°01'55.1"N 14°50'37.2"E	9,5	25,6	230	45
27.07	11:45	jasno	Vyskok	48°57'11.7"N 14°39'33.6"E	10.4	24	210	30
27.07	12:30	jasno	Nový r.	49°08'16.5"N 14°44'06.0"E	8.1	20	195	20
07.08	10:45	zataženo	Opatovický r.	48°59'35.7"N 14°46'16.5"E	8.36	25	221	15
07.08	9:30	zataženo	Rožmberk	49°02'53.6"N 14°45'50.5"E	9.32	23	203	20
07.08	11:30	zataženo	Láska	49°06'45.7"N 14°45'00.4"E	8.88	21.7	314	15
07.08	12:00	zataženo	Naděje	49°07'07.6"N 14°45'02.3"E	9.43	21,6	143	15
07.08	10:10	zataženo	Svět	48°59'43.5"N 14°46'11.1"E	9.02	22.1	219	15
04.09	10:45	oblačno	Opatovický r.	48°59'16.4"N 14°46'35.8"E	8.21	19.2	223	15
04.09	10:00	oblačno	Rožmberk	49°02'53.6"N 14°45'50.5"E	8.54	20.1	214	15
04.09	11:30	oblačno	Láska	49°06'45.7"N 14°45'00.4"E	8.8	19,5	307	20

4.2.2 Mikroskopování vzorků a izolace potencialních producentů puwainaphycinu

Každý vzorek z 8 lokalit byl zmikroskopován. U všech odebraných vzorků byly determinovány přítomné druhy sinic a zaznamenány do přílohy č. 2. Dominantní složku představovaly sinice z rodů *Planktothrix*, *Aphanizomenon* a *Dolichospermum* (Obr. 19-20).



Obr. 19 *A. gracile* z rybníka Láska.



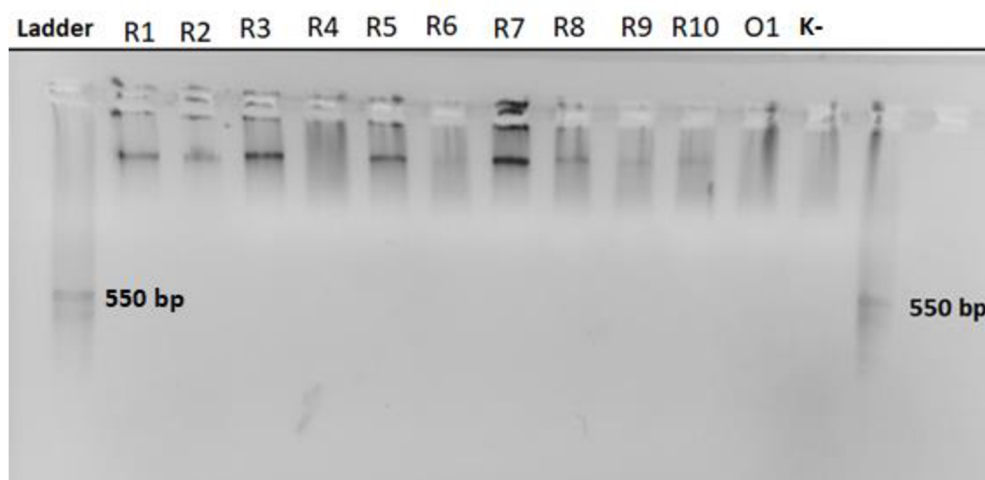
Obr. 20 *D. flos-aquae* z rybníka Rožmberk.

Po mikroskopování proběhla izolace vláken potenciálních producentů puwainaphycinů stejným způsobem jako u kolonií *Microcystis* v roce 2019: 11 vláken sinice *Planktothrix agardhii*, 40

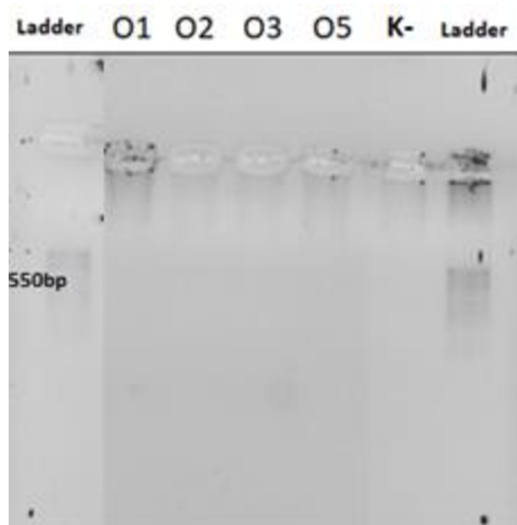
vláken *Aphanizomenon gracile*, 30 vláken *Cuspidothrix issatschenkoi*, 5 vláken *Dolichospermum flos-aquae* a 10 vláken *Dolichospermum viguieri*.

4.2.3 Amplifikace genomu (MDA) a PCR genu *puwF*

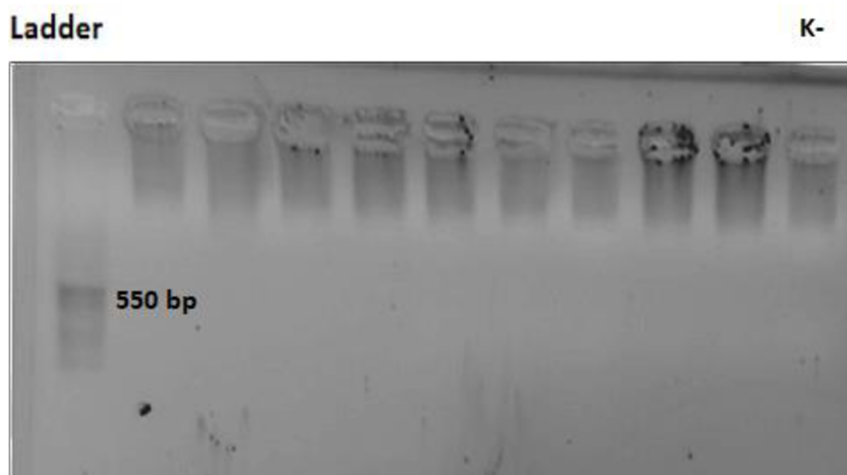
Amplifikace genomu proběhla stejně jako v předchozím roce úspěšně u všech vzorků. Následná PCR analýza neprokázala přítomnost genu *puwF* u analyzovaných vláken *P. agardhii* (Obr. 21) z Rožmberku a Opatovického rybníka, *D. flos-aquae*, ani *D. viguieri* z rybníka Láska (Obr. 22 a 23).



Obr. 21 Výsledek PCR pro gen *puwF* u vzorků vláken rodu *Planktothrix*. Vzorky *P. agardhii* z rybníka Rožmberk (R) a Opatovického rybníka (O), 16.07.2020.

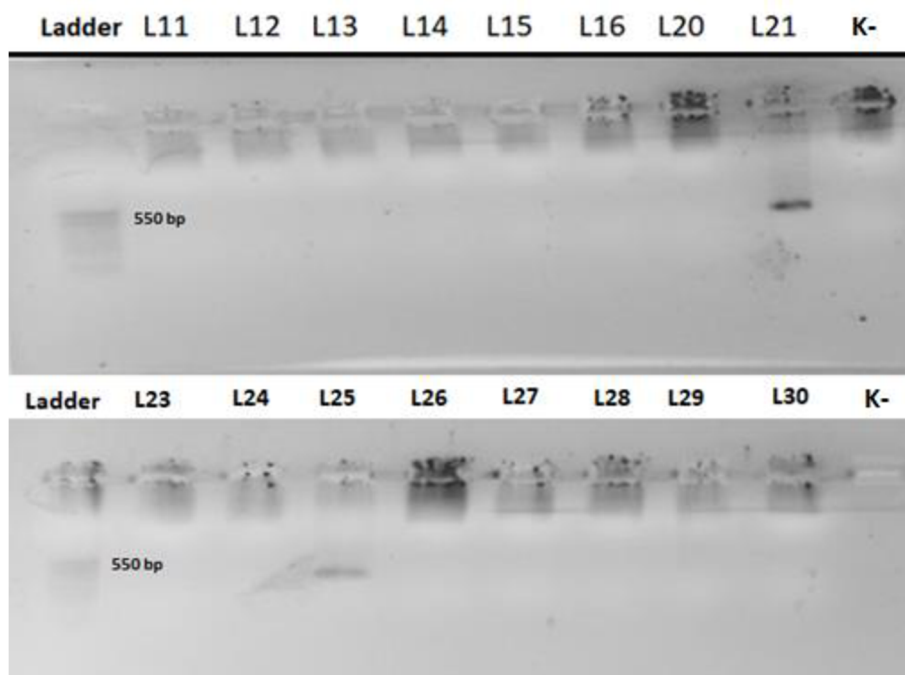


Obr. 22 Výsledek PCR pro gen *puwF* u vzorků vláken rodu *Dolichospermum*. Vzorky *D. flos-aquae* z Opatovického rybníka (O1-O5), 01.10.2020



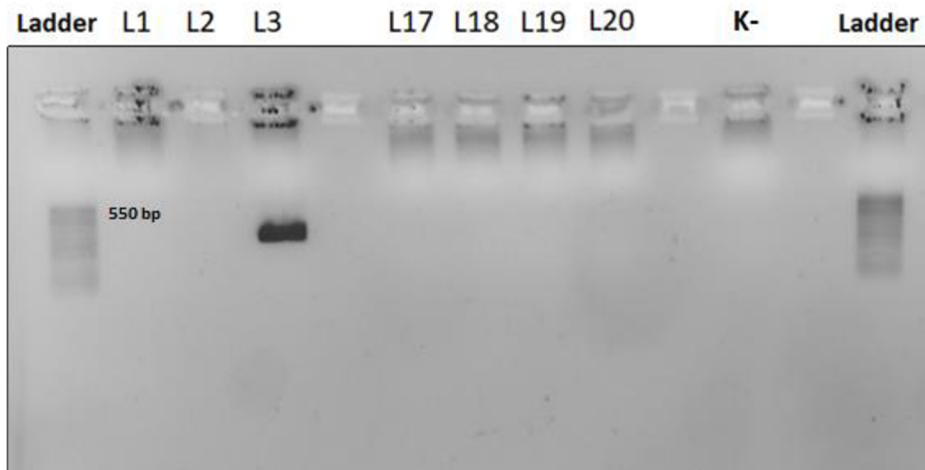
Obr. 23 Výsledek PCR pro gen *puwF* u vzorků vláken rodu *Dolichospermum*. Vzorky *D. viguieri* z rybníka Láska, 17.10.2020

Vlákná *Cuspidothrix issatschenkoi* byla vyizolována z rybníku Láska. Jak je vidět na Obr. 24, u dvou vzorků (L21 a L 25) byl získán poměrně slabý PCR produkt odpovídající délkou cílovému fragmentu *puwF*.

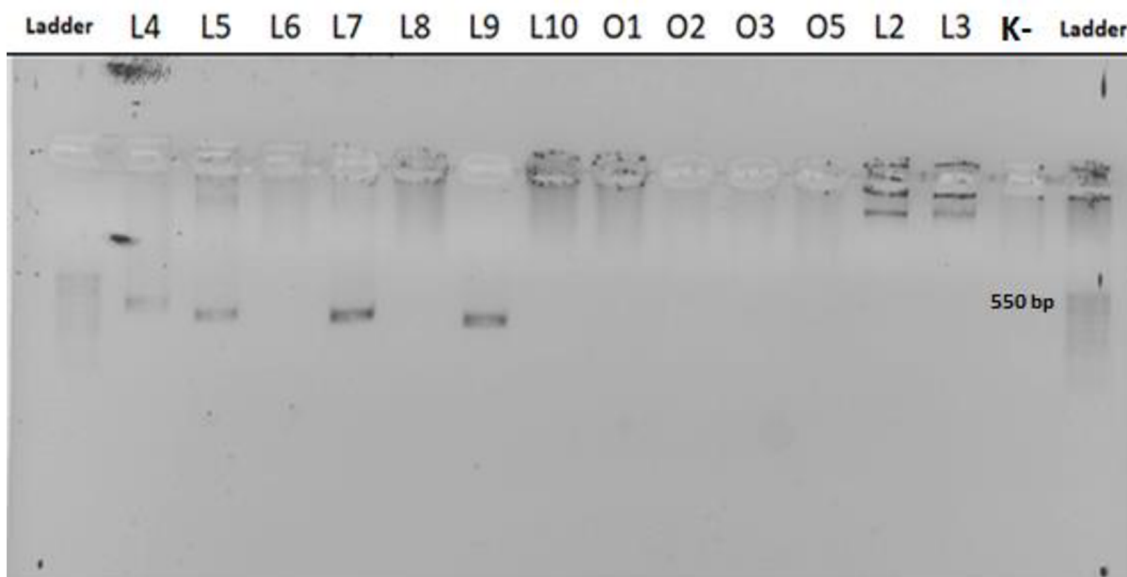


Obr. 24 Výsledek PCR pro gen *puwF* u vzorků vláken rodu *Cuspidothrix*. Vzorky *C. issatschenkoi* z rybníka Láska, 18.10.2020. Vzorky L21 a L25 obsahovaly PCR produkt o očekávané délce.

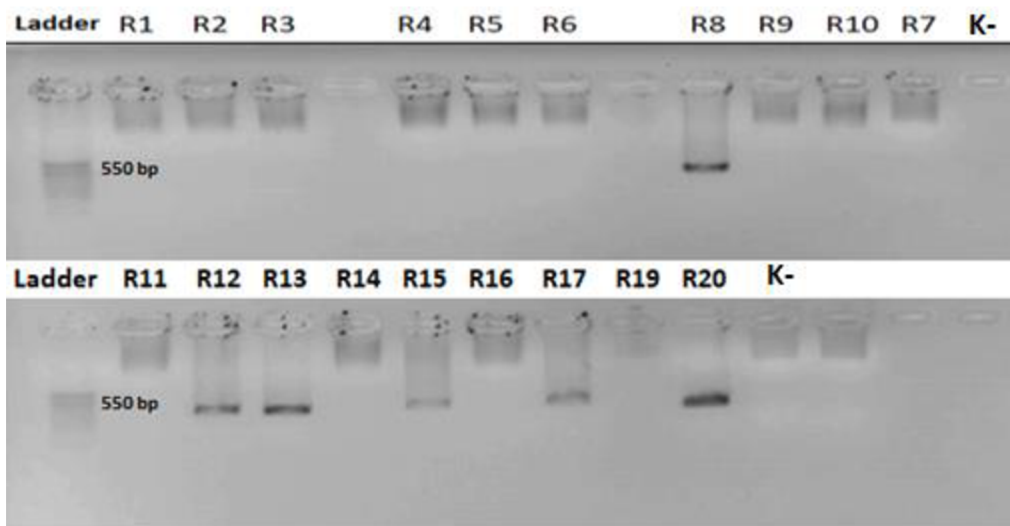
Vlákná sinice *Aphanizomenon gracile* byla izolována ze vzorků planktonu Opatovického rybníka, rybníka Láska a Rožmberk. Výsledek PCR a následné gelové elektroforézy (Obr. 25 - 28) ukázal přítomnost PCR produktu o očekávané délce u některých vláken *A. gracile* ze všech 3 studovaných rybníků.



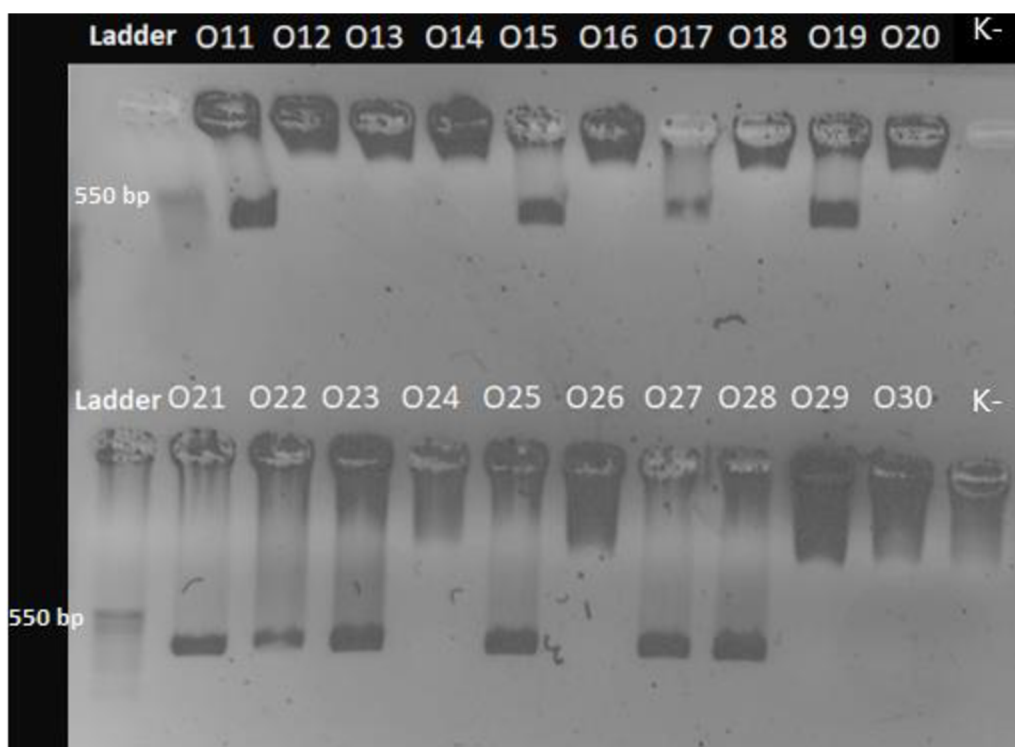
Obr. 25 Výsledek PCR pro gen *puwF* u vzorků vláken rodu *Aphanizomenon*. Vzorky *A. gracile* z rybníka Láska, 12.10.2020. Vzorek L3 obsahoval PCR produkt o očekávané délce.



Obr. 26 Výsledek PCR pro gen *puwF* u vzorků vláken rodu *Aphanizomenon*. Vzorky *A. gracile* z rybníka Láska (L2-L10), 12.10.2020. Vzorek L4, L5, L7 a L9 obsahovaly PCR produkt o očekávané délce.



Obr. 27 Výsledek PCR pro gen *puwF* u vzorků vláken rodu *Aphanizomenon*. Vzorky *A. gracile* z rybníka Rožmberk, 19.10.2020. Vzorky R8, R12, R13, R15, R17 a R20 obsahovaly PCR produkt o očekávané délce.



Obr. 28 Výsledek PCR pro gen *puwF* u vzorků vláken rodu *Aphanizomenon*. Vzorky *A. gracile* z Opatovického rybníka, 20.10.2020. Vzorky O11, O15, O17, O19, O21, O22, O23, O25, O27 a O28 obsahovaly PCR produkt o očekávané délce.

4.2.4 Sekvenace genu *puwF*

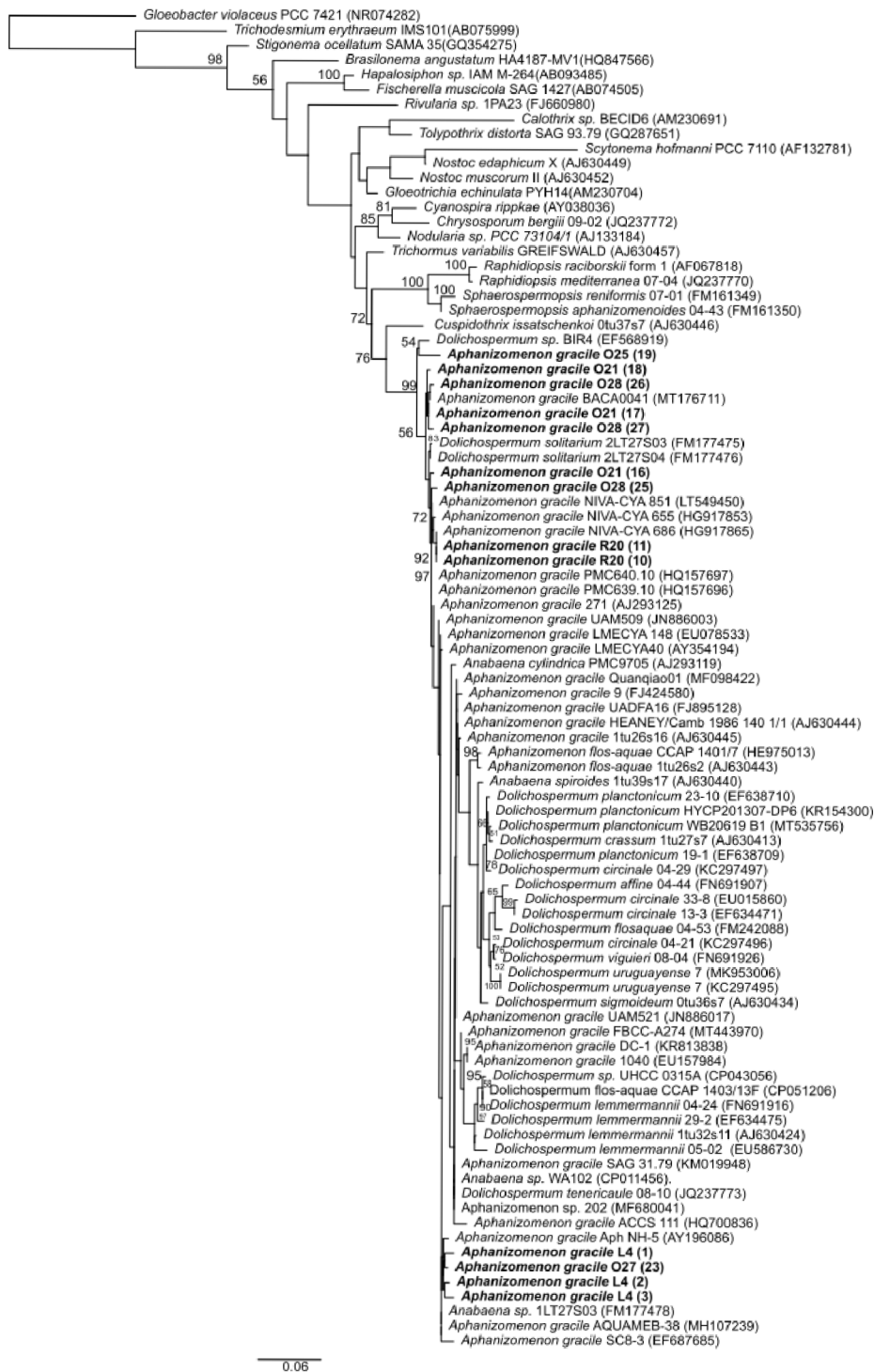
Pozitivní vzorky PCR produktů genu *puwF* z vláken *A. gracile* a *C. issatschenkoii* byly přečištěny a poslány na Sangerovo sekvenování. Získané sekvence u vzorků L21 a L25 (*C. issatschenkoii*) nebyly úspěšně složeny, protože byly příliš krátké a chromatogram obsahoval překrývající se signály – přítomnost genu *puwF* tak nebylo možné u tohoto druhu definitivně potvrdit. Podobná situace nastala také u několika vzorků vláken *A. gracile* (L3, L7, R8, R15, O15, O22). U úspěšně složených sekvencí byla na základě analýzy v programu BLAST (NCBI) potvrzena příbuznost ke známým sekvencím genu *puwF*. Jednalo se ve všech případech o vzorky vláken *A. gracile*, a to z rybníků Rožmberk (vzorky R13, R17, R20), Láska (L4, L5, L9) a Opatovický rybník (O11, O17, O11, O17, O21, O25, O27, O28) (příloha č. 5). Sekvence pozitivních PCR produktů genu *puwF* z vláken *A. gracile* a sekvence PCR produktů genu *puwF* neznámých producentů z roku 2017/18 z výzkumu Bártová (2019) byly porovnány a ve výsledku byla vytvořena tabulka podobnosti (příloha č. 4). Sekvence genu *puwF* získané z vláken *A. gracile* vykazovaly vysokou podobnost (96-100 %) k sekvencím získaným M. Bártovou z rybníků Opatovický rybník a Potěšil z roku 2017, a také z rybníků Naděje, Nový rybník, Láska, Rod, Svět, Vyšehrad, Rožmberk, Výskok a Opatovický rybník z roku 2018.

4.2.5 Sekvenace genu pro 16S rRNA a navazujícího 16S-23S ITS úseku

Vzorky *A. gracile* z rybníka Láska, Rožmberk a Opatovického rybníka, které prokazaly přítomnost genu *puwF*, byly podrobeny klonování a sekvenaci genomového úseku rRNA operonu (16S+ITS oblast), aby byla potvrzena jejich taxonomická identita pomocí fylogenetické analýzy. Analýza sekvencí pomocí BLAST (NCBI) potvrdila jejich homologii se sekvencemi rodu *Aphanizomenon* u většiny vzorků. Pro fylogenetickou analýzu byly použity pouze vzorky s konzistentními výsledky sekvenování (viz. Metody).

4.2.6 Sestavení fylogenetických stromů

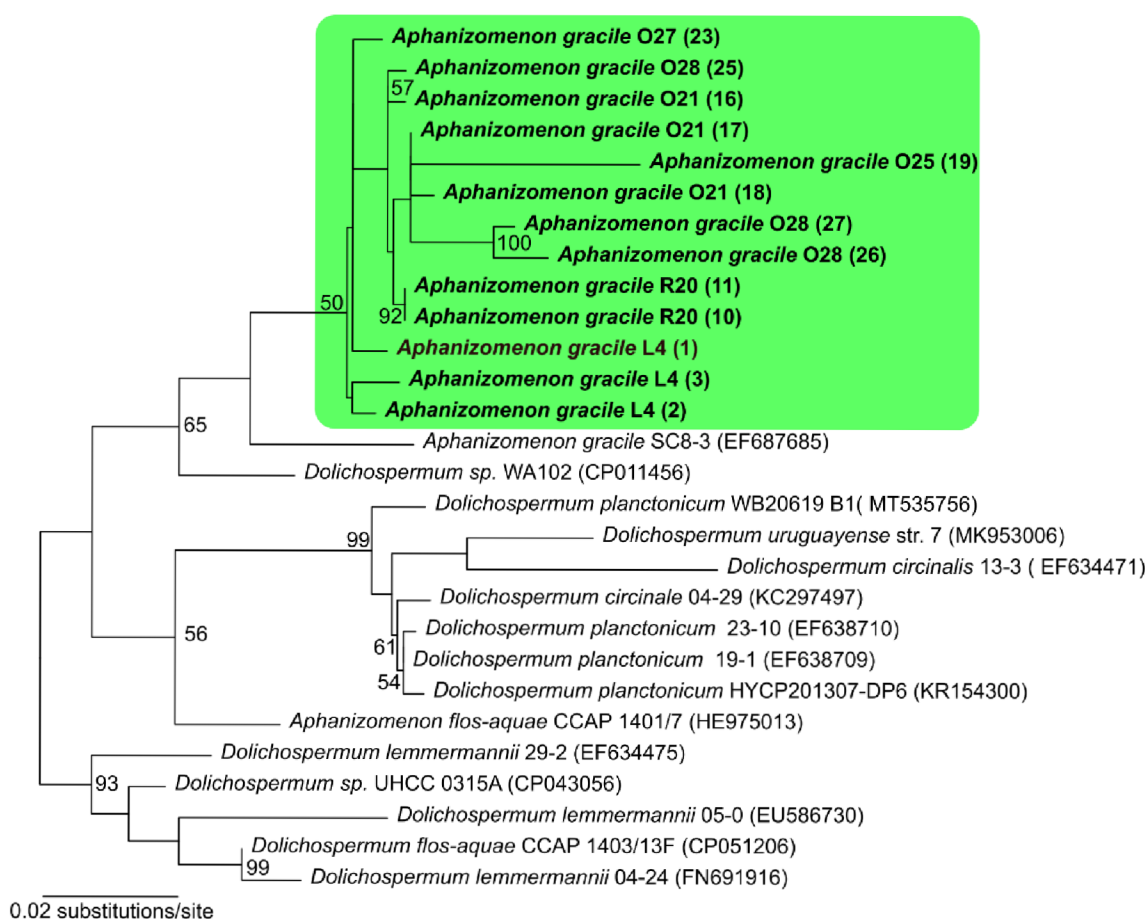
Jelikož jedním z cílů této bakalářské práce byla taxonomická identifikace neznámého producenta toxických lipopeptidů ve vodním květu sinic, byly pro zařazení získaných sekvencí na úrovni rodu a druhu sestaveny fylogenetické stromy na základě alignmentu 16S rRNA genu (Obr. 29) a 16s + ITSs rRNA oblasti (Obr. 30).



Obr. 29 Fylogenetický strom heterocytózních sinic na základě alignmentu genu pro 16S rRNA. Všechny sekvence *A. gracile* spadají do rodového klastru *Aphanizomenon/Dolichospermum*. Vypočteno metodou Maximum Likelihood, čísla poblíž uzlů uvádějí hodnotu bootstrapu >50%. O – Opatovický rybník; R – Rožmberk, L – Láska; nově získané sekvence jsou uvedeny tučným fontem.

Získané sekvence genu pro 16S rRNA bylo na základě fylogenetické analýzy možné jednoznačně zařadit do rodového klastru *Dolichospermum/Aphanizomenon*. Většina sekvencí z tohoto klastru nemohla být zařazena do následujícího stromu, protože neobsahovaly sekvenci úseku ITS (Obr. 30).

Analýza zahrnující též úsek ITS ukázala, že získané sekvence tvoří monofyletický klastr a jsou příbuzné sekvenci *A. gracile* SC8-3 z databáze NCBI.



Obr.30 Fylogenetický strom klastru *Dolichospermum/Aphanizomenon* na základě alignmentu 16S+ITS rRNA. Vypočteno metodou Maximum Likelihood, čísla poblíž uzlů uvádějí hodnotu bootstrapu >50%. O – Opatovický rybník; R – Rožmberk, L – Láska; zelený rámeček – sekvence *A. gracile* získané v této studii.

Sekvence *A. gracile* získané při výzkumu byly porovnány mezi sebou a ve výsledku byla vytvořena tabulka podobnosti na základě analýzy p-distance ITS úseku (příloha č.3). Tato tabulka ukazuje, že sekvence patří do stejného druhu (viz Diskuze), což podporuje i klastrování sekvencí ve výše uvedených fylogenetických stromech.

5. Diskuze

Jedním z cílů předložené bakalářské práce byla molekulární detekce producentů toxických lipopeptidů ve vzorcích planktonu. Použití PCR je nejběžnější a nejvhodnější metoda pro stanovení přítomnosti producentů cyanotoxinů ve vzorcích vodního květu. Protokoly pro detekci toxických microcystinů, saxitoxinů, nodularinů a cylindrospermopsinů jsou volně dostupné (Al-Tebrineh et al. 2012). Metody, které by se věnovaly detekci potenciálně toxických lipopeptidů puwainaphycinů, ale nebyly dosud publikovány. Do dnešní doby byly geny pro syntézu puwainaphycinů nalezeny jen u půdních sinic rodů *Cylindrospermum*, *Anabaena* a *Symplocastrum* (Gregson et al. 1992, Hrouzek et al. 2012, Mareš et al. 2019), ale studie Bártová (2019) a Zapomělová et al. (2009) ukázaly na přítomnost puwainaphycinů ve vzorcích planktonů z oblasti CHKO Třeboňsko. Abychom potvrdili přítomnost producentů toxických puwainaphycinů a abychom následně identifikovali konkrétního producenta těchto lipopeptidů, bylo důležité zvolit vhodnou metodu amplifikace genomické DNA z izolovaných vláken a PCR metodu z použitím vhodných primerů pro detekci genů pro syntézu sinicových lipopeptidů.

Amplifikace celého genomu byla provedena metodou multiple-displacement amplification (MDA). Tato metoda prokázala svou vysokou efektivitu například ve studiích Lara et al. (2013) a Grinberg et al. (2011). MDA metoda byla zvolena, aby bylo možné u vzorků získaných z jednotlivých kolonií nebo vláken sinic získat kompletní genomovou DNA pro další analýzy. Tím se tato práce liší od předchozího výzkumu (Bártová 2019), který se zabýval analýzou směsné DNA z celého fytoplanktonního společenstva. Proto v předchozí studii chyběla možnost rozlišit konkrétního producenta studovaných látek. Studie Zapomělová et al. (2009) se zabývala výskytem sinic *Sphaerospermopsis reniformis* a *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* na území České Republiky a navrhla možnou přítomnost puwainaphycinu v těchto druzích na základě analýzy HPLC-MS. V této studii se uvádí, že by se mohly puwainaphyciny vyskytovat ve fytoplanktonu, ale konkrétní producent nebyl potvrzen pomocí detekce genů zodpovědných za syntézu puwainaphycinu, které nebyly v té době ještě známy (Mareš et al. 2014). Analýza jednotlivých vláken/kolonií umožňuje provést morfologickou identifikaci pod mikroskopem a následně, ze stejného vlákna, získat DNA a potvrdit u něho jak výskyt sledovaného genu (*puwF*), tak fylogenetickou pozici (na základě sekvence 16S+ITS rRNA).

Pro potvrzení přítomnosti genu pro syntézu puwainaphycinů v roce 2019-2021 byla využita PCR s primery podle předchozí studie Bártová (2019), které prokázaly vysokou efektivitu a specifitu. Pomocí tohoto PCR protokolu byly odhaleny geny pro syntézu puwainaphycinů ve

vzorcích, které obsahovaly vlákna sinice *Aphanizomenon gracile* a *Cuspidothrix issatschenkoi* (Obr. 25-29). U vláken *C. issatschenkoi* se následně nezdařilo PCR produkt genu *puwF* osekvenovat (kvalita ani délka sekvencí nebyla dostatečná). Nemůžeme tedy s jistotou rozhodnout, zda by tato sinice mohla být producentem puwainaphycinů anebo se jednalo o nespecifický PCR produkt o podobné délce. Tato otázka bude jedním z předmětů navazujícího výzkumu.

Analýza sekvencí *puwF* zbývajících vzorků jasně ukázala, že sekvence získané z vláken *A. gracile* vykazovaly vysokou podobnost (96-100%) ke skupině sekvence získaných M. Bártovou (příloha č. 4). Na základě toho porovnání lze předpokládat, že se jednalo o téhož producenta, *A. gracile*. Tuto hypotézu podporuje fakt, že M. Bártová zaznamenala ve vzorcích planktonu z rybníka Rožmberk z roku 2018 a Opatovického rybníka z roku 2017 a 2018, kde byly zaznamenány velmi podobné sekvence *puwF*, předpokládaného producenta *A. gracile*. Ostatní rybníky, u kterých Bártová našla podobnou sekvenci *puwF*, však tento druh neobsahovaly. U některých z nich se vyskytoval další možný producent *C. issatschenkoi* (Potěšil, Nový rybník, Vyšehrad), často také příbuzný druh *Aphanizomenon klebahnii* (Naděje, Láska, Vyšehrad) a ve všech rybnících byly přítomny sinice z rodového klastru *Dolichospermum/Aphanizomenon*. Další výzkum by se měl zaměřit na tyto taxony a pokusit se u nich prokázat geny pro syntézu puwainaphycinů. Jelikož M. Bártová našla také druhou skupinu sekvencí *puwF* odlišnou od sekvencí získaných v této práci, dá se předpokládat, že v planktonu mohou být i méně příbuzné sinice taktéž produkující puwainaphyciny.

Studované genomy obsahují několik odlišných kopií rRNA operonu, a proto bylo nezbytným krokem pro sekvenaci 16S+ITS rRNA úseku klonování PCR produktů do plazmidu. Do plazmidu byly zaklonovány všechny vzorky, u kterých se potvrdila přítomnost genu *puwF* (příloha č. 5). Z důvodu možné kontaminace v průběhu izolace jednotlivých vláken a klonování PCR produktů se u některých vzorků nezdařilo získat alespoň 2-3 klony s konzistentní sekvencí 16S rRNA (L5, L9, R12, R13, R17- 1; R20, O27- 2; O11, O17, O19- 0) a nebyly tak zařazeny do fylogenetické analýzy. Nedostatečná separace jednotlivých vláken či kolonií sinic z environmentálních vzorků, nedostatečná dezinfekce pracovního prostoru a pomůcek anebo kontaminace chemikálií pro PCR byly možným zdrojem těchto problémů, které by měly být v navazující práci odstraněny pečlivější prací v laboratoři. Na druhou stranu, díky neúplné separaci kolonií *Microcystis* při prvních pokusech o izolaci kolonií v roce 2019 jsme získali po klonování data, která nás navedla na stopu skutečného producenta puwainaphycinů (*A. gracile*).

Nevětvené heterocytózní planktonní sinice se symetrickými izopolárními vlákny byly dříve řazeny do rodu *Anabaena*, ale na základě přítomnosti aerotopů v buňkách a fylogenetické pozice byly odděleny do zvláštního rodu *Dolichospermum* (Wacklin et al. (2009). Ukázalo se však, že do stejného fylogenetického klastru spadá také většina izolátů morfologicky definovaného rodu *Aphanizomenon*. Některé další planktonní druhy r. *Anabaena* byly později pomocí polyfázické taxonomické analýzy odděleny do dalších rodů jako je *Sphaerospermopsis* (Zapomělová et al. 2009) a *Chrysoosporum* (Zapomělová et al. 2012). Z Obr. 30 je zřejmé, že veškeré sekvence *A. gracile* zahrnuté do 16S rRNA fylogenetického stromu, ať už nově získané nebo převzaté z NCBI, patří do stejného rodového klastru *Dolichospermum/Aphanizomenon*. Přestože fylogenetická informace získaná na základě tohoto genu není dostatečná pro přesné rozlišení druhů uvnitř tohoto klastru, sekvence *A. gracile* získané v této práci klastrovaly velmi blízko některým sekvencím *A. gracile* z NCBI (Obr. 30). S ohledem na výše uvedené výsledky můžeme usuzovat, že sekvence získané v průběhu této studie jednoznačně patří do rodového klastru *Dolichospermum/ Aphanizomenon* a strom podporuje jejich předchozí identifikaci na základě morfologie vláken jako *A. gracile*. V dalším 16S+ITS rRNA stromu (Obr. 31) lze dobře vidět, že studované sekvence vytváří monofyletický klastr v rámci rodů *Dolichospermum/ Aphanizomenon*. Výpočet podobností rRNA ITS sekvencí osekvenovaných vzorků (příloha č. 3), ukazuje, že získané sekvence měly podobnost v rozmezí 97-100 % (p-distance 0-3 %). V současné taxonomii sinic jsou takto nízké hodnoty p-distance v ITS úseku obvykle považovány za další silný podpůrný důkaz příslušnosti ke stejnému druhu (např. Osorio-Santos et al. 2014, Mareš et al. 2019). Na základě polyfázického taxonomického hodnocení pomocí morfologie a sekvence genu pro 16S rRNA a navazujícího úseku ITS tedy můžeme jednoznačně identifikovat studovaná vlákna sinic jako *A. gracile*.

Aphanizomenon gracile je celosvětově rozšířený sladkovodní druh sinice (Komárek et al. 2013). Je to známý producent cylindrospermopsinů (Kokocinski et al. 2013) a saxitoxinů (Yilmaz et al. 2018), ale dosud nebyl považován za producenta cytotoxických puwainaphycinů (Gregson et al. 1992, Hrouzek et al. 2012, Mareš et al. 2019). Přítomnost puwainaphycinů ve sladkých vodách může mít do budoucna pro člověka negativní dopad. Puwainaphyciny vykazují nescifické cytotoxické působení proti eukaryotním buňkám (Hrouzek et al. 2012), proto je důležitý další průzkum jejich možného toxického působení včetně monitoringu a detekce v životním prostředí. Je také zajímavé, že hlavní varianty puwainaphycinu nalezené ve vzorcích sinic z CHKO Třeboňsko (Bártová 2019), kde se jako producent vyskytoval *A. gracile*, jsou stejné jako u kmene *Symplocastrum muelleri* NIVA-CYA 644. Tento kmen byl izolován ze

sinicových biofilmů v Norsku (Mysterud et al. 2016) a existuje hypotéza, že jím produkované puwainaphyciny by mohly hrát roli ve smrtelném onemocnění ovcí nazývaném Alveld (Mareš et al. 2019). Pro další studium těchto souvislostí bude nezbytné izolovat čisté kmeny *A. gracile* ze studovaných lokalit a potvrdit u nich produkci konkrétních variant puwainaphycinu pomocí HPLC-MS.

Jak již bylo zmíněno, studie Bártová 2019 objevila dva typy sekvencí genu *puwF* na studovaných lokalitách, ale současná studie potvrdila identitu pouze jednoho producenta. Skutečný rozsah schopnosti produkovat puwainaphyciny u planktonních sinic tak zůstává otázkou. Analogicky například u microcystinů jsou i po mnoha letech výzkumu stále nacházeny noví producenti a nové varianty toxinu z nečekaných prostředí (Kust et al. 2018). Proto se jako následující krok ve výzkumu nabízí pokračování v hledání dalších producentů puwainaphycinů ve vodních květech sinic. Dalším důležitým krokem bude analyticky potvrdit, že *Aphanizomenon gracile* (popřípadě další druhy) produkuje puwainaphycin. Dosáhnout tohoto cíle je možné izolací kmene *A. gracile* do laboratorní kultury a jeho následná analýza např. metodami HPLC-HRMS. Stále také není známo, jaká je skutečná koncentrace puwainaphycinů ve vodě v průběhu sezóny vodního květu. Pro další monitoring bude zásadní, zda se puwainaphyciny v biomase sinic a ve volné vodě vyskytují v nebezpečných koncentracích, jako je tomu u některých z ostatních cyanotoxinů (Nishiwaki-Matsushima et al. 1992; Wood et al. 2007; Clark et al. 1999).

6. Závěr

- Pomocí PCR byla detekována přítomnost producentů puwainaphycinů ve vlastnoručně odebraných vzorcích planktonu.
- Pomocí analýzy jednotlivých sinicových vláken a kolonií polyfázickým přístupem byl taxonomicky identifikován pravděpodobný producent toxických lipopeptidů jako *Aphanizomenon gracile*.
- Vzhledem k výskytu puwainaphycinů a jejich sinicových producentů v eutrofních vodách v České republice lze z hlediska ochrany zdraví preventivně doporučit průběžný monitoring výskytu puwainaphycinů ve vodním květu sinic.

7. Seznam literatury

1. Al-Tebrineh, J., Pearson, L. A., Yasar, S. A., Neilan, B. A. (2012). A multiplex qPCR targeting hepato- and neurotoxic cyanobacteria of global significance. *Harmful Algae*, 15, 19–25.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.11.001>
2. Aranda, F. J., Teruel, J. A., Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1713(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>
3. Baker, L., Sendall, B. C., Gasser, R. B., Menjivar, T., Neilan, B. A., Jex, A. R. (2013). Rapid, multiplex-tandem PCR assay for automated detection and differentiation of toxigenic cyanobacterial blooms. *Molecular and Cellular Probes*, 27(5–6), 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2013.07.001>
4. Barchewitz, T., Guljamow, A., Meissner, S., Timm, S., Henneberg, M., Baumann, O., Dittmann, E. (2019). Non-canonical localization of RubisCO under high-light conditions in the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology*, 21(12), 4836–4851. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14837>
5. Bártová, M. (2019). Detekce a monitoring potenciálně toxických sinicových lipopeptidů. Č. Budějovice, diplomová práce (Mgr.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta
6. Bar-Yosef, Y., Sukenik, A., Hadas, O., Viner-Mozzini, Y., Kaplan, A. (2010). Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. *Current Biology*, 20(17), 1557–1561. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.07.032>
7. Bláhová, L., Oravec, M., Maršálek, B., Šejnohová, L., Šimek, Z., Bláha, L. (2009). The first occurrence of the cyanobacterial alkaloid toxin cylindrospermopsin in the Czech Republic as determined by immunochemical and LC/MS methods. *Toxicon*, 53(5), 519–524. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.014>
8. Boyer, S. L., Flechtner, V. R., Johansen, J. R. (2001). Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 18(6), 1057–1069.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003877>

9. Carmichael, W.W, Azevedo, S.M, An, J.S, Molica, R.J, Jochimsen, E.M, Lau, S., Rinehart, K.L, Shaw, G.R, Eaglesham, G.K. (2001). Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives.*;109(7):663-8. doi: 10.1289/ehp.01109663.
10. Carmichael, W. W (1994). The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*, 270, 78–86. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0194-78>
11. Carmichael, W. W. and An, J. (1999). Using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and a protein phosphatase inhibition assay (PPIA) for the detection of microcystins and nodularins. *Natural Toxins*, 7(6), 377–385. [https://doi.org/10.1002/1522-7189\(199911/12\)7:6<377::aid-nt80>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/1522-7189(199911/12)7:6<377::aid-nt80>3.0.co;2-8)
12. Clark, R. F., Williams, S. R., Nordt, S. P., Manoguerra, A. S. (1999). A review of selected seafood poisonings. *Undersea & Hyperbaric Medicine: Journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc*, 26(3), 175–184.
13. Dell'Aversano, C., Eaglesham, G. K., Quilliam, M. A. (2004). Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1028(1), 155–164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.083>
14. Dittmann, E., Fewer, D. P., Neilan, B. A. (2012). Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 23–43. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.12000.x>
15. Dong, X., Zeng, S., Bai, F., Li, D., He, M. (2016). Extracellular microcystin prediction based on toxigenic *Microcystis* detection in a eutrophic lake. *Scientific Reports*, 6(1), 20886. <https://doi.org/10.1038/srep20886>
16. Du, X., Liu, H., Yuan, L., Wang, Y., Ma, Y., Wang, R., Zhang, H. (2019). The Diversity of Cyanobacterial Toxins on Structural Characterization, Distribution and Identification: A Systematic Review. *Toxins*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/toxins11090530>
17. Dutta, S., Whicher, J. R., Hansen, D. A., Hale, W. A., Chemler, J. A., Congdon, G. R., Skiniotis, G. (2014). Structure of a modular polyketide synthase. *Nature*, 510(7506), 512–517. <https://doi.org/10.1038/nature13423>
18. Fastner, J., Rucker, J., Stuken, A., Preussel, K., Nixdorf, B., Chorus, I., Wiedner, C. (2007). Occurrence of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in northeast Germany. *Environmental Toxicology*, 22(1), 26–32. <https://doi.org/10.1002/tox.20230>

19. Fogg G. E., Schwartz, W., Stewart W. D. P., Fay P. and Walsby A. E. (1975). The Blue-Green Algae. VII. Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie, 15(1), 68. <https://doi.org/10.1002/jobm.19750150115>
20. Friedmann, E. I. (1982). Endolithic Microorganisms in the Antarctic Cold Desert. Science, 215(4536), 1045–1053. <https://doi.org/10.1126/science.215.4536.1045>
21. Gantar, M., Svirčev, Z. (2008). Microalgae and cyanobacteria: Food for thought. Journal of Phycology, 44, 260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00469.x>
22. Gomes, G. D., Pereira, X. L., Valadares, S. A. (2020). Cyanobacterial Polyhydroxyalkanoates: A Sustainable Alternative in Circular Economy. Molecules, 25(18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184331>
23. Goyal, A., Verma, P., Anandhakrishnan, M., Gokhale, R. S., Sankaranarayanan, R. (2012). Molecular Basis of the Functional Divergence of Fatty Acyl-AMP Ligase Biosynthetic Enzymes of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Molecular Biology, 416(2), 221–238. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.12.031>
24. Gregson, J. M., Chen, J.-L., Patterson, G. M. L., Moore, R. E. (1992). Structures of puwainaphycins A–E. Tetrahedron, 48(18), 3727–3734. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)92264-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)92264-1)
25. Gulick, A. M. (2009). Conformational Dynamics in the Acyl-CoA Synthetases, Adenylation Domains of Non-ribosomal Peptide Synthetases, and Firefly Luciferase. ACS Chemical Biology, 4(10), 811–827. <https://doi.org/10.1021/cb900156h>
26. Hauer, T., Mühlsteinová, R., Bohunická, M., Kaštovský, J., Mareš, J. (2015). Diversity of cyanobacteria on rock surfaces. Biodiversity and Conservation, 24(4), 759–779. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0890-z>
27. Heidary, M., Khosravi, A. D., Khoshnood, S., Nasiri, M. J., Soleimani, S., Goudarzi, M. (2018). Daptomycin. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 73(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx349>
28. Hrouzek, P., Kuzma, M., Černý, J., Novák, P., Fišer, R., Šimek, P., Kopecký, J. (2012). The Cyanobacterial Cyclic Lipopeptides Puwainaphycins F/G Are Inducing Necrosis via Cell Membrane Permeabilization and Subsequent Unusual Actin

- Relocalization. *Chemical Research in Toxicology*, 25(6), 1203–1211.
<https://doi.org/10.1021/tx300044t>
29. Cheel, J., Hájek, J., Kuzma, M., Saurav, K., Smýkalová, I., Ondráčková, E., Hrouzek, P. (2018). Application of HPLCC Combined with Polymeric Resins and HPLC for the Separation of Cyclic Lipopeptides Muscotoxins A–C and Their Antimicrobial Activity. *Molecules*, 23(10).
<https://doi.org/10.3390/molecules23102653>
30. Iwasaki, A., Ohno, O., Sumimoto, S., Suda, S., Suenaga, K. (2014). Kurahyne, an acetylene-containing lipopeptide from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp. *The Royal Society of Chemistry Advances* 4(25), 12840–12843.
<https://doi.org/10.1039/C4RA00132J>
31. Johansen, J., Casamatta, D. (2005). Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. *Algological Studies*, 117, 71–93.
<https://doi.org/10.1127/1864-1318/2005/0117-0071>
32. Johnson, I. Z., Zinser, E. R., Coe, A., McNulty, N. P., Malcolm E. Woodward S., Chisholm, S. M. (2006). Niche partitioning among *Prochlorococcus* ecotypes along ocean-scale environmental gradients. *Science* 311: 1737–1740.
<https://doi.org/10.1126/science.1118052>
33. Jochum, M., Moncayo, L. P., Jo, Y.-K. (2018). Microalgal cultivation for biofertilization in rice plants using a vertical semi-closed airlift photobioreactor. *PLoS One*, 13(9), e0203456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203456>
34. Jokela, J., Oftedal, L., Herfindal, L., Permi, P., Wahlsten, M., Døskeland, S. O., Sivonen, K. (2012). Anabaenolysins, novel cytolytic lipopeptides from benthic *Anabaena* cyanobacteria. *PLoS One*, 7(7), e41222.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041222>
35. Kaebernick, M. and Neilan, B.A (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiol Ecol.* 35(1):1-9. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00782.x. PMID: 11248384.
36. Kang, H.-S., Kronic, A., Shen, Q., Swanson, S., Orjala, J. (2011). Minutissamides A-D, Antiproliferative Cyclic Dcapeptides from the Cultured Cyanobacterium *Anabaena minutissima*. *Journal of Natural Products*, 74, 1597–1605.
<https://doi.org/10.1021/np2002226>
37. Kang, H.-S., Sturdy, M., Kronic, A., Kim, H., Shen, Q., Swanson, S. M., Orjala, J. (2012). Minutissamides E–L, antiproliferative cyclic lipodecapeptides from the

- cultured freshwater cyanobacterium cf. *Anabaena* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(20), 6134–6143.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.08.017>
38. Kanwar, S. and Meena, K. (2015). Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>
 39. Kaštovský, J., Hauer, T., Geriš, R., Chattová, B., Juráň, J., Lepšová-Skácelová, O., Pitelková, P., Pusztai, M., Škaloud, P., Šťastný, J., Čapková, K., Bohunická, M., Mühlsteinová, R. (2018): *Atlas sinic a řas ČR 1*. Powerprint, Praha, 384 s.
 40. Katoh, K. and Standley, D. (2013). Katoh K, Standley DM.. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30: 772-780. *Molecular Biology and Evolution*, 30. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
 41. Keatinge-Clay, A. (2008). Crystal structure of the erythromycin polyketide synthase dehydratase. *Journal of Molecular Biology*, 384(4), 941–953. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.084>
 42. Kokocinski, M., Mankiewicz-Boczek, J., Jurczak, T., Spoo, L., Meriluoto, J., Rejmonczyk, E., Savela, H., Vehniäinen, M., Pawelczyk, J., Soininen, J. (2013). *Aphanizomenon gracile* (Nostocales), a cylindrospermopsin-producing cyanobacterium in Polish lakes. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1426-7>
 43. Komárek, J. (2002). Areas of distribution in Cyanobacteria; specificity of the cyanoprokaryotic microflora in the Mediterranean regio.
 44. Komárek, J. (2006). Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. *Algae*, 21, 349–375. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2006.21.4.349>
 45. Komárek, J. Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L., Schagerl, M. (2013). Cyanoprokaryota - 3. Teil / 3rd part: Heterocytous Genera. *Süswasserflora von Mitteleuropa (Freshwater Flora of Central Europe)*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 1130 pp.
 46. Komárek, J., Kaštovský, J., Mares, J., Johansen, J. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 86, 295–335.

47. Kust, A. (2019). Polyphasic analysis and secondary metabolite patterns in unbranched heterocytous cyanobacteria with different life strategies. České Budějovice. Disertační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
48. Kust, A., Kozlíková, E., Mareš, J., Řeháková, K. (2015). A detailed morphological, phylogenetic and ecophysiological analysis of four benthic *Anabaena* (Nostocales, Cyanobacteria) strains confirms deep heterogeneity within the genus. *Fottea*, 15, 191–202. <https://doi.org/10.5507/fot.2015.019>
49. Kust, A., Méjean, A., Ploux, O. (2020). Biosynthesis of Anatoxins in Cyanobacteria: Identification of the Carboxy-anatoxins as the Penultimate Biosynthetic Intermediates. *Journal of Natural Products*, 83(1), 142–151. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01121>
50. Kust, A., Řeháková, K., Vrba, J., Maicher, V., Mareš, J., Hrouzek, P., Saurav, K. (2020). Insight into Unprecedented Diversity of Cyanopeptides in Eutrophic Ponds Using an MS/MS Networking Approach. *Toxins*, 12(9), 561. <https://doi.org/10.3390/toxins12090561>
51. Kust, A., Urajová, P., Hrouzek, P., Vu, D. L., Čapková, K., Štenclová, L., Řeháková, K., Kozlíková-Zapomělová, E., Lepšová-Skácelová, O., Lukešová, A., & Mareš, J. (2018). A new microcystin producing *Nostoc* strain discovered in broad toxicological screening of non-planktic Nostocaceae (cyanobacteria). *Toxicon*, 150, 66–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.05.007>
52. Lara, Y., Lambion, A., Menzel, D., Codd, G. A., Wilmutte, A. (2013). A cultivation-independent approach for the genetic and cyanotoxin characterization of colonial cyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 69(2), 135-143. <https://doi.org/10.3354/ame01628>
53. Legrand, B., Lesobre, J., Colombet, J., Latour, D., Sabart, M. (2016). Molecular tools to detect anatoxin-a genes in aquatic ecosystems: Toward a new nested PCR-based method. *Harmful Algae*, 58, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.07.002>
54. Liu, Z., Ioerger, T.R., Wang, F., Sacchettini, J.C. (2013). Structures of *Mycobacterium tuberculosis* FadD10 protein reveal a new type of adenylate forming enzyme. *J Biol Chem* 288:18473–18483. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.466912>.

55. Liu, D., Liberton, M., Hendry, J. I., Aminian-Dehkordi, J., Maranas, C. D., Pakrasi, H. B. (2020). Engineering biology approaches for food and nutrient production by cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 67, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.09.011>
56. Luc, B., Lengronne, M., Bormans, M., Fastner, J. (2009). First Occurrence of *Cylindrospermopsin* in Freshwater in France. *Environmental Toxicology*, 24, 415–420. <https://doi.org/10.1002/tox.20439>
57. Mai, T., Johansen, J., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Martin, M. (2018). Revision of the *Synechococcales* (Cyanobacteria) through recognition of four families including *Oculatellaceae* fam. nov. and *Trichocoleaceae* fam. nov. and six new genera containing 14 species. *Phytotaxa*, 365, 1–59.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.365.1.1>
58. Maizels, M. and Budde, W. (2004). A LC/MS Method for the Determination of Cyanobacteria Toxins in Water. *Analytical Chemistry*, 76, 1342–1351.
<https://doi.org/10.1021/ac035118n>
59. Mareš, J. (2018). Multilocus and SSU rRNA gene phylogenetic analyses of available cyanobacterial genomes, and their relation to the current taxonomic system. *Hydrobiologia*, 811. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3373-2>
60. Mareš, J., Hájek, J., Urajová, P., Kopecký, J., Hrouzek, P. (2014). A Hybrid Non-Ribosomal Peptide/Polyketide Synthetase Containing Fatty-Acyl Ligase (FAAL) Synthesizes the β -Amino Fatty Acid Lipopeptides Puwainaphycins in the Cyanobacterium *Cylindrospermum alatosporum*. *PLOS ONE*, 9(11), 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111904>
61. Mareš, J., Hájek, J., Urajová, P., Kust, A., Jokela, J., Saurav, K., Hrouzek, P. (2019). Alternative Biosynthetic Starter Units Enhance the Structural Diversity of Cyanobacterial Lipopeptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 85.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02675-18>
62. Mareš, J., Hrouzek, P., Kaňa, R., Ventura, S., Strunecký, O., Komárek, J. (2013). The Primitive Thylakoid-Less Cyanobacterium *Gloeobacter* Is a Common Rock-Dwelling Organism. *PLOS ONE*, 8(6), 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066323>
63. Mareš, J., Lara, Y., Dadáková, I., Hauer, T., Uher, B., Wilmotte, A., Kaštovský, J. (2015). Phylogenetic analysis of cultivation-resistant terrestrial cyanobacteria with massive sheaths (*Stigonema* spp. and *Petalonema alatum*, Nostocales,

- Cyanobacteria) using single-cell and filament sequencing of environmental samples. *Journal of Phycology*, 51: 288-297. <https://doi.org/10.1111/jpy.12273>
64. Mareš, J., Johansen, J.R., Hauer, T., Zima, J., Jr., Ventura, S., Cuzman, O., Tiribilli, B. and Kaštovský, J. (2019), Taxonomic resolution of the genus *Cyanothece* (Chroococcales, Cyanobacteria), with a treatment on *Gloeothece* and three new genera, *Crocospaera*, *Rippkaea*, and *Zehria*. *Journal of Phycology*, 55: 578-610. <https://doi.org/10.1111/jpy.12853>
65. Martins, J. and Vasconcelos, V. (2015). Cyanobactins from Cyanobacteria: Current Genetic and Chemical State of Knowledge. *Marine Drugs*, 13(11), 6910–6946. <https://doi.org/10.3390/md13116910>
66. Massey, I.Y.; Wu, P.; Wei, J.; Luo, J.; Ding, P.; Wei, H.; Yang, F. (2020). A Mini-Review on Detection Methods of Microcystins. *Toxins*, 12, 641.
67. Kanwar, S. and Meena, K. (2015). Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>
68. Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, 59, 303–327. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>
69. Musiol, E. M. and Weber, T. (2012). Discrete acyltransferases involved in polyketide biosynthesis. *Med. Chem. Commun.*, 3(8), 871–886. <https://doi.org/10.1039/C2MD20048A>
70. Mysterud, I., Koller, G., Høiland, K., Carlsen, T., Sletten, A. (2016). The lamb disease alveld: Search for fungi and bacteria on *Narthecium ossifragum* foliage and roots. *Small Ruminant Research*, 136, 179–186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.025>
71. Nagarajan, M., Maruthanayagam, V., Sundararaman, M. (2012). A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. *Journal of Applied Toxicology* 32(3), 153–185. <https://doi.org/10.1002/jat.1717>
72. Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C., Dittmann, E. (2013). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1239–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x>

73. Nivina, A., Yuet, K. P., Hsu, J., Khosla, C. (2019). Evolution and Diversity of Assembly-Line Polyketide Synthases. *Chemical Reviews*, 119(24), 12524–12547. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00525>
74. Oftedal, L., Myhren, L., Jokela, J., Gausdal, G., Sivonen, K., Døskeland, S. O., Herfindal, L. (2012). The lipopeptide toxins anabaenolysin A and B target biological membranes in a cholesterol-dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1818(12), 3000–3009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.07.015>
75. Osorio-Santos, K., Pietrasiak, N., Bohunická, M., Miscoe, L. H., Kováčik, L., Martin, M. P., Johansen, J. R. (2014). Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *European Journal of Phycology*, 49(4), 450–470. <https://doi.org/10.1080/09670262.2014.976843>
76. Osswald, J., Rellán, S., Gago, A., Vasconcelos, V. (2007). Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment International*, 33(8), 1070–1089. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.06.003>
77. Ouellette, A.J. and Wilhelm, S.W. (2003), Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1: 359-366. doi:10.1890/1540-9295(2003)001[0359:TCTEMT]2.0.CO;2
78. Perera, I., Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., Naidu, R., Megharaj, M. (2018). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria in desert soils: an underexplored microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(17), 7351–7363. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9192-1>
79. Puddick, J., Prinsep, M.R., Wood, S.A., Cary, S.C., Hamilton, D.P., Holland, P.T. (2015). Further Characterization of Glycine-Containing Microcystins from the McMurdo Dry Valleys of Antarctica. *Toxins*, 7, 493-515. <https://doi.org/10.3390/toxins7020493>
80. Pushkareva, E., Pessi, I. S., Namsaraev, Z., Mano, M.-J., Elster, J., Wilmotte, A. (2018). Cyanobacteria inhabiting biological soil crusts of a polar desert: Sør Rondane Mountains, Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology*, 41(4), 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.01.006>

81. Qiao, Y., Wang, W., Lu, X. (2020). Engineering cyanobacteria as cell factories for direct trehalose production from CO₂. *Metabolic Engineering*, 62, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.08.014>
82. Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
83. Rouhiainen, L., Jokela, J., Fewer, D. P., Urmann, M., Sivonen, K. (2010). Two alternative starter modules for the non-ribosomal biosynthesis of specific anabaenopeptin variants in *Anabaena* (Cyanobacteria). *Chemistry & Biology*, 17(3), 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.01.017>
84. Shishido, T. K., Jokela, J., Kolehmainen, C.-T., Fewer, D. P., Wahlsten, M., Wang, H., Sivonen, K. (2015). Antifungal activity improved by coproduction of cyclodextrins and anabaenolysins in Cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44), 13669–13674. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510432112>
85. Schopf, J. W., Kudryavtsev, A. B., Agresti, D. G., Wdowiak, T. J., Czaja, A. D. (2002). Laser-Raman imagery of Earth's earliest fossils. *Nature*, 416(6876), 73–76. <https://doi.org/10.1038/416073a>
86. Sinclair, J. L., Hall, S., Berkman, J. A. H., Boyer, G., Burkholder, J., Burns, J., Walker, S. (2008). Occurrence of Cyanobacterial Harmful Algal Blooms Workgroup report. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 619, pp. 45–103. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_3
87. Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
88. Strieker, M., Tanović, A., Marahiel, M. A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(2), 234–240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.01.009>
89. Swain, S. S., Paidasetty, S. K., Padhy, R. N. (2017). Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 90, 760–776. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.030>
90. Neuhof, T., Schmieder, P., Preussel, K., Dieckmann, R., Pham, H., Bartl, F., von Döhren, H. (2005). Hassallidin A, a glycosylated lipopeptide with antifungal

- activity from the cyanobacterium *Hassallia* sp. *Journal of Natural Products*, 68(5), 695–700. <https://doi.org/10.1021/np049671r>
91. Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Fujiki, H. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 118(6), 420–424. <https://doi.org/10.1007/BF01629424>
92. Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R., Wilmotte, A. (2003). Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5157–5169. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5157-5169.2003>
93. Tomek, P., Hrouzek, P., Kuzma, M., Sýkora, J., Fišer, R., Cerný, J., Kopecký, J. (2015). Cytotoxic Lipopeptide Muscotoxin A, Isolated from Soil Cyanobacterium *Desmonostoc muscorum*, Permeabilizes Phospholipid Membranes by Reducing Their Fluidity. *Chemical Research in Toxicology*, 28. <https://doi.org/10.1021/tx500382b>
94. Tsuge, K., Akiyama, T., Shoda, M. (2001). Cloning, Sequencing, and Characterization of the Iturin A Operon. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6265–6273. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6265-6273.2001>
95. Urajová, P., Hájek, J., Wahlsten, M., Jokela, J., Galica, T., Fewer, D. P., Hrouzek, P. (2016). A liquid chromatography–mass spectrometric method for the detection of cyclic β -amino fatty acid lipopeptides. *Journal of Chromatography A*, 1438, 76–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.013>
96. Vašíček, O., Hájek, J., Bláhová, L., Hrouzek, P., Babica, P., Kubala, L., Šindlerová, L. (2020). Cyanobacterial lipopeptides puwainaphycins and minutissamides induce disruptive and pro-inflammatory processes in Caco-2 human intestinal barrier model. *Harmful Algae*, 96, 101849. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101849>
97. Vestola, J., Shishido, T. K., Jokela, J., Fewer, D. P., Aitio, O., Permi, P., Sivonen, K. (2014). Hassallidins, antifungal glycolipopeptides, are widespread among cyanobacteria and are the end-product of a nonribosomal pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(18), E1909-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320913111>

98. Vilhena, C. and Bettencourt, A. (2012). Daptomycin: A Review of Properties, Clinical Use, Drug Delivery and Resistance. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, 202–209. <https://doi.org/10.2174/1389557511209030202>
99. Wacklin, P., Hoffmann, L., Komárek, J. (2009). Nomenclatural validation of the genetically revised cyanobacterial genus *Dolichospermum* (RALFS ex BORNET et FLAHAULT) comb. nova. *Fottea*, 9(1), 59–64. doi: 10.5507/fot.2009.005
100. Welker, M. and Döhren, H. (2006). Cyanobacterial peptides — Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 530–563. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x>
101. Whitton, B. and Potts, M. (2000). Introduction to the cyanobacteria, in the *Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space 1 vyd.*: Springer, Dordrecht, 1–9. <https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7>
102. Wierzechos, J., Davila, A., Hawes, I., Araya, J., Gelsinger, D., Diruggiero, J., Ascaso, C., (2015). In situ metabolism in halite endolithic microbial communities of the hyperarid Atacama Desert. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01035>
103. Wood, S. A., Selwood, A. I., Rueckert, A., Holland, P. T., Milne, J. R., Smith, K. F., Cary, C. S. (2007). First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon*, 50(2), 292–301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.025>
104. Xue, Y., Zhao, P., Quan, C., Zhao, Z., Gao, W., Li, J., Li, P. (2018). Cyanobacteria-derived peptide antibiotics discovered since 2000. *Peptides*, 107, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.08.002>
105. Yilmaz, M., Foss, A., Selwood, A., Özen, M., Boundy, M. (2018). Paralytic shellfish toxin producing *Aphanizomenon gracile* strains isolated from Lake Iznik, Turkey. *Toxicon*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.028>
106. Yu, J., Li, Y., Liu, X., Li, K., Chen, F., Gulati, R., Liu, Z. (2013). The fate of cyanobacterial detritus in the food web of Lake Taihu: a mesocosm study using ¹³C and ¹⁵N labeling. *Hydrobiologia*, 710(1), 39–46. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1205-y>
107. Zapomělová, E., Jezberová J., Hrouzek P., Hisem D., Řeháková K., Komárková J., 2009. Polyphasic characterization of three strains of *Anabaena reniformis* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (cyanobacteria) and their reclassification to

- Sphaerospermum* gen. nov. (incl. *Anabaena kisseleviana*). Journal of Phycology. 45(6), 1363-1373. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2009.00758.x
108. Zapomělová, E., Skácelová, O., Pumann, P., Kopp, R., Janeček, E. (2012). Biogeographically interesting planktonic Nostocales (Cyanobacteria) in the Czech Republic and their polyphasic evaluation resulting in taxonomic revisions of *Anabaena bergii* Ostenfeld 1908 (*Chrysoosporum* gen. nov.) and *A. tenericaulis* Nygaard 1949 (*Dolichospermum tenericaule* comb. nova). Hydrobiologia, 698(1), 353–365. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1034-z>
109. Zapomělová-Kozlíková, E., Chatchawan, T., Kaštovský, J., Komárek, J. (2016). Phylogenetic and taxonomic position of the genus *Wollea* (compared with *Anabaena* sensu stricto), and description of *Wollea salina* sp. nova (Cyanobacteria). Fottea, 16, 43–55. <https://doi.org/10.5507/fot.2015.026>
110. Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 101(15), 5951–5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>
111. Zhou, J., Zhu, T., Cai, Z., Li, Y. (2016). From cyanochemicals to cyanofactories: a review and perspective. Microbial Cell Factories, 15, 2. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0405-3>

8. Přílohy

Příloha č. 1: Seznam sinicových druhů ve vzorcích CHKO Třeboňsko a okolí v roce 2019.

	Láska 15.07	Naděje 15.07	Opatovický r. 08.07	Rožmberk 08.07	Svět 08.07	Láska 16.0	Naděje 16.08	Opatovický r. 13.08	Svět 13.08	Láska 07.09	Naděje 07.09	Opatovický r. 18.09	Svět 18.09
<i>Anabaenopsis circularis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aphanizomenon klebahnii</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Aphanizomenon gracile</i>	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
<i>Aphanocapsa conferta</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Arthrospira sp.</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
<i>Coelomoron pusillum</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
<i>Raphidiopsis raciborskii</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dolichospermum compactum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dolichospermum crassum</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0
<i>Dolichospermum planctonicum</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dolichospermum viguieri</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Limnococcus limneticus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Limnothrix redekei</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Microcystis flos-aquae</i>	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0
<i>Microcystis ichthyoblabe</i>	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Microcystis wesenbergii</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Planktothrix agardhii</i>	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
<i>Snowella litoralis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Woronichinia naegeliana</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1 - přítomen

0 - nepřítomen

Příloha č. 2: Seznam sinicových druhů ve vzorcích CHKO Třeboňsko a okolí v roce 2020.

	Opatovický r. 05.07	Rožmberk 05.07	Svět 05.07	Láska 14.07	Naděje 14.07	Vyšehrad	Vyskok	Nový r.	Opatovický r. 07.08	Rožmberk 07.08	Láska 07.08	Naděje 07.08	Svět 07.08	Opatovický r. 04.09	Rožmberk 04.09	Láska 04.09
<i>Aphanizomenon klebahnii</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
<i>Aphanizomenon gracile</i>	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
<i>Aphanocapsa incerta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Arthrospira sp.</i>	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Coelomonon pusillum</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Cuspidothrix issatschenkoi</i>	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
<i>Raphidiopsis raciborskii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Dolichospermum circinale</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dolichospermum compactum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Dolichospermum crassum</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
<i>Dolichospermum lemmermannii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Dolichospermum planctonicum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
<i>Dolichospermum viguieri</i>	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
<i>Limnothrix redekei</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
<i>Microcystis flos-aquae</i>	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>Microcystis ichthyoblabe</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Microcystis wesenbergii</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
<i>Planktothrix agardhii</i>	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
<i>Pseudanabaena limnetica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Woronichinia naegeliana</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1

1 - přítomen

0 - nepřítomen

Příloha č. 3: Podobnost (v % = 100 – p-distance) osekvenovaných úseků rRNA ITS regionu u *A.gracile*.

	R20	O28	R13	R17	O25	L5	L4	O19	L9	R12	O17	O11	O21	O27
R20		99.2	98.5	99.4	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.6	99.06	98.3	98.1	97.2
O28	99.2		98.4	99.5	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.7	99.2	98.3	98.38	97.3
R13	98.5	98.4		98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.8	98.3	98.3	97.8	97.3
R17	99.4	99.5	98.6		100	100	100	100	100	99.7	99.6	98.3	98.4	97.2
O25	99.3	99.4	98.6	100		100	100	100	100	99.7	99.6	98.3	98.4	97.3
L5	99.3	99.4	98.6	100	100		100	100	100	99.7	99.6	98.3	98.4	97.3
L4	99.3	99.4	98.6	100	100	100		100	100	99.7	99.6	98.3	98.4	97.3
O19	99.3	99.4	98.6	100	100	100	100		100	99.7	99.6	98.3	98.4	97.3
L9	99.3	99.4	98.6	100	100	100	100	100		99.7	99.6	98.3	98.4	97.3
R12	99.6	99.7	98.8	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7		99.4	98.3	99.1	97.5
O17	99	99.2	98.3	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.4		98.3	98.2	97
O11	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3		98.3	98
O21	98.1	98.3	97.8	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	99.1	98.2	98.3		97
O27	97.2	97.3	97.3	97.2	97.3	97.3	97.3	97.3	97.3	97.5	97	98	97	

97-97.99 %; 98-98.99%; 99-99.99 %; 100 %

Příloha č. 5: Výsledek analýzy BLASTn získaných sekvencí *puwF*. Ke vzorkům je uvedena nejlépe skórující sekvence z databáze NR a její identita k vložené sekvenci.

Vzorek*	Nejbližší sekvence z databáze NCBI	Identita (%)
L4	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	89.39
L5	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	89.39
L9	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	89.35
R12	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	88.13
R13	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	87.62
R17	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	88.89
R20	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	88.32
O11	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	88
O17	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	88.27
O19	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	89.35
O21	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	86.58
O25	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>Puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	89.39
O27	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>Puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	85.65
O28	<i>Anabaena sp.</i> UHCC-0399 <i>Puw.</i> and min. lipopeptide gene cluster	88.27

*vzorky L3, L7, L 21, L 25, R8, R15, O15 a O 22 se nezdařilo osekvenovat.