

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

# **Je zooplankton schopen žít se pikoplanktonními sinicemi?**

Bakalářská práce

**Miroslava Švecová**

Školitelka: RNDr. Jitka Jezberová, Ph.D.

České Budějovice 2019

Švecová, M., 2019: Je zooplankton schopen živit se pikoplanktonními sinicemi? [Is zooplankton able to feed on picocyanobacteria? Bc. Thesis, in Czech.] – 35 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

Cílem bakalářské práce je nahlédnout do složení vod a zaměřit se na zkoumání pikoplanktonních sinic. V teoretické části dochází především k seznamování se s ekologií, morfologií, druhovou rozmanitostí a rozšířením těchto organismů. Významná část bakalářské práce se věnuje konzumaci pikoplanktonních sinic zooplanktonem v různých oblastech. Praktická část zjišťuje růstové křivky pikoplanktonních sinic prováděných na 6 různých kulturách pěstovaných ve 2 kultivačních médiích po dobu 84 dní. Po celou dobu přitom dochází k pravidelným odběrům jednotlivých vzorků. Výzkum přináší zajímavé výsledky o růstu pikoplanktonních sinic v závislosti na pozorovaném čase, pěstovaném médiu i typu kultury.

The aim of the bachelor thesis is to look into the composition of waters and focus on the investigation of picocyanobacteria. Theoretical part mainly covers ecology, morphology, species diversity and distribution of these organisms. A significant part of the bachelor thesis also deals with the consumption of picocyanobacteria by zooplankton in various areas. The practical part contains research of growth curve of picocyanobacteria performed on six different cultures grown in two cultivation media for 84 days. During this period, individual samples were taken regularly. The research displays interesting results about growth of picocyanobacteria in dependence on observed time, cultivated medium and type of culture.

## **Klíčová slova:**

Pikoplanktonní sinice, pikoplankton, zooplankton, růstová křivka, fykobiliny

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

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

V Českých Budějovicích dne 10. 12. 2019

.....  
Miroslava Švecová

## **Poděkování**

Největší poděkování patří vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Jitce Jezberové Ph.D. za její ochotu, užitečné rady a veškerou pomoc, kdykoli jsem ji potřebovala. Za cenné rady děkuji i panu profesorovi RNDr. Jaroslavu Vrbovi CSc. Dále bych ráda poděkovala Biologickému centru Akademie věd České republiky za možnost zrealizovat svůj výzkum v laboratořích na Hydrobiologickém ústavu. V neposlední řadě moc děkuji své rodině za podporu.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Literární rešerše .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Co jsou pikoplanktonní sinice.....</b>	<b>8</b>
2.1.1	Nároky pikoplanktonních sinic na prostředí.....	8
2.1.2	Ekologie pikoplanktonních sinic .....	8
2.1.3	Morfologická variabilita a taxonomie .....	9
2.1.4	Funkce v ekosystému .....	9
2.1.5	Fotosyntetické pigmenty pikoplanktonu .....	11
<b>2.2</b>	<b>Pikoplanktonní sinice ve sladkých vodách, mořích a oceánech.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3</b>	<b>Konzumace pikoplanktonních sinic zooplanktonem .....</b>	<b>13</b>
2.3.1	Konzumace nálevníky a bičíkovci .....	14
2.3.2	Konzumace vířníky a perloočkami.....	16
2.3.3	Konzumace nálevníkem <i>Mesodinium rubrum</i> .....	16
2.3.4	Princip příjmu potravy a trávení.....	17
2.3.5	Vliv přítomnosti predátora a typu fykobiliproteinu .....	18
2.3.6	Sdružování sinic s bičíkovci a řasami .....	18
<b>3</b>	<b>Materiály a metody .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Růstová křivka pikoplanktonních sinic .....</b>	<b>19</b>
3.1.1	Příprava kultur.....	19
3.1.2	Odběry vzorků .....	19
3.1.3	Způsoby vyhodnocení .....	20
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Výsledky z průtokového cytometru.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>Porovnání výsledků z průtokového cytometru a mikroskopu.....</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>Diskuze a závěr .....</b>	<b>23</b>
<b>I.</b>	<b>Seznam použitých zdrojů.....</b>	<b>25</b>
<b>II.</b>	<b>Seznam tabulek a obrázků .....</b>	<b>0</b>

# 1 Úvod

Voda je základ života a bez vody se nedá žít. Je nesmírně důležité chránit si naše zásoby vody, studovat je a rozumět procesům a organismům v nich se vyskytujícím.

Cílem této práce je nahlédnout do složení vod a zaměřit své pozorování na pikoplanktonní sinice, které mohou hrát ve vodním světě podstatnou roli. Nejprve je ale potřeba se obecně seznámit s těmito organismy, což zahrnuje kapitola „co jsou pikoplanktonní sinice“. Zde je shrnuto, jak vypadají, jakých velikostí dosahují a kde žijí. Zabývám se zde i složitým dělením planktonu a rozlišením jednotlivých rodů pikoplanktonních sinic. Dále také zmiňuji dva typy fotosyntetických pigmentů pro ně charakteristických. Na tuto úvodní kapitolu plynule navazuji kapitolou „pikoplanktonní sinice ve sladkých vodách, mořích a oceánech“, kde se zabývám složením vod a popisu důležitých rodů pikoplanktonních sinic. Poslední kapitola teoretické části nese název „žraní pikoplanktonních sinic zooplanktonem“. Tato kapitola obsahuje stručný přehled skupin zooplanktonu a dále doposud známé zjištění o tom, zda je zooplankton schopen žít se pikoplanktonními sinicemi či nikoliv.

Na již zmíněnou teoretickou část plynule navazuje i část praktická. Zde se zabývám růstovým pokusem. Cílem tohoto pokusu je zjistit, za jak dlouhou dobu pikoplanktonní sinice vyrostou a vytvořit tak jejich růstovou křivku. Toto zjištění bude užitečné v jakýchkoli dalších pokusech se sinicemi, protože budeme znát čas potřebný na napěstování jednotlivých kultur.

Hlavním důvodem pro psaní této práce je zájem o nahlédnutí do vodních ekosystémů a porozumění jejich vnitřních interakcí. Voda jako taková je odjakživa nepostradatelnou součástí života nás všech. Využíváme ji dnes a denně, aniž bychom porozuměli mnoha jejím vlastnostem. Tato práce se zabývá především pikoplanktonními sinicemi, jejich ekologií, taxonomií a funkcí v ekosystému.

## 2 Literární rešerše

### 2.1 Co jsou pikoplanktonní sinice

Sinice (Cyanobacteria) jsou velmi drobné a velmi jednoduché autotrofní prokaryotické organismy. Jsou evolučně schopné žít téměř ve všech biotopech na zemské kouli. Sinice dosahují většinou velikosti 0,5-10  $\mu\text{m}$ , zatímco pikoplanktonní sinice (picocyanobacteria) dosahují velikosti pouze v rozmezí 0,5-2  $\mu\text{m}$ . Jsou to jednobuněčné organismy, které žijí volně nebo v koloniích. Jejich hlavními fotosyntetickými pigmenty jsou fykocyanin (PC), fykoerythrin (PE) a Chlorophyl *a*. Pomocí fotosyntézy vytvářejí kyslík. Rozmnožují se nepohlavně (Callieri et al., 2012).

#### 2.1.1 Nároky pikoplanktonních sinic na prostředí

Nejdůležitějšími faktory pro život pikoplanktonních sinic ve vodních ekosystémech jsou světlo a živiny. Pikoplanktonní sinice jsou zdrojem kyslíku a spolu s řasami, nezelenými organismy a ostatními živočichy kyslík zároveň i spotřebovávají. Množství kyslíku závisí i na druhu sinic, osvětlení a dostupnosti živin. Zdroje kyslíku jsou pouze v horní vrstvě tzv. epilimniu, zatímco ve spodní vrstvě tzv. hypolimniu probíhá respirace – spotřeba kyslíku. V důsledku rozpadu organických látek se v hypolimniu vyskytuje oxid uhličitý. Autotrofní organismy si o oxid uhličitý konkurují a využívají ho jako zdroj uhlíku. Za vysokého pH je pro ně nedostupný.

#### 2.1.2 Ekologie pikoplanktonních sinic

Pikoplanktonní sinice žijí jak ve sladkovodním, tak v mořském planktonu po celém světě za různých podmínek, včetně těch nejextrémnějších (např. Arktická a Antarktická jezera, oligotrofní oceány, termální prameny, atd. (Callieri et al., 2012)) s výjimkou extrémně kyselých lokalit. U nás běžně obydlují oligotrofní, mezotrofní i eutrofní přehrady a jezera i hypertrofní rybníky.

Sezónní vývoj pikoplanktonních sinic v jednotlivých jezerech závisí především na abiotických faktorech jezera. V mírných oblastech lze pozorovat model, jež má 2 vrcholy – pozdější jarní a pozdější letní. Jarní vrcholy jsou běžné u mělkých, eutrofních, hypertrofních nebo dystrofních jezer (Callieri et al., 2012).

V oligotrofních jezerech se vyskytují především jednobuněčné pikoplanktonní sinice, které vyhledávají hlubší a studenější prostředí, zatímco eutrofní jezera obydí spíše kolonie, kterým se daří v teplejších a mělčích jezerech (Komárková, 2002b). Mikrokolonie se vyskytují především ve sladkovodních jezerech od léta do podzimu. Koloniální pikoplanktonní sinice jsou součástí vodních květů, ale neprodukují toxiny (Komárková, 2002a; Komárková & Šimek, 2003).

### 2.1.3 Morfologická variabilita a taxonomie

Během změny ročního období lze pozorovat i zastoupení různých tvarů pikoplanktonních sinic. Na jaře jsou přítomny především jednobuněčné kulaté pikoplanktonní sinice, ke konci léta a na podzim potom podlouhlejší tyčky. Dle morfologie jsou rozděleny na jednobuněčné, kam patří kulaté i podlouhlejší pikoplanktonní sinice, a dále na kolonie. Mikrokolonie se pohybují ve velikost 5-50 buněk (Komárková, 2002a; Callieri et al., 2012).

Koloniální pikoplanktonní sinice se běžně vyskytují v jezerech s vyšší trofíí. Jejich buňky se obvykle velikostně pohybují v rozmezí 0,5-3  $\mu\text{m}$ . Jejich tvar je kulatý, podlouhlejší nebo vejcovitý. Buňky tvoří různé struktury. Mohou se vyskytovat zcela volně, nahuštěné u sebe nebo tvořit pseudofilamenta, popřípadě jiné síťovité struktury. Buňky koloniální pikoplanktonní sinice *Snowella* jsou připojeny k slizovým stonkům, které se nacházejí uprostřed kolonie (Jezberová, 2006; Callieri et al., 2012).

Rozdělení pikoplanktonu rozlišujeme na úrovni rodů a druhů. Rody jednobuněčných prokaryotních pikoplanktonních sinic jsou *Cyanobium*, *Cyanothece diane/cedrorum* a *Synechococcus*, mezi koloniální pikoplanktonní sinice patří *Aphanocapsa*, *Aphanothece (Anathece)*, *Coelosphaerium*, *Cyanodictyon*, *Chroococcus*, *Merismopedia*, *Snowella* a *Tetrarcus*. Eukaryotní pikoplankton reprezentují řasy *Chlorella*, *Cyclotella* a *Stephanodiscus*. (Callieri et al., 2002).

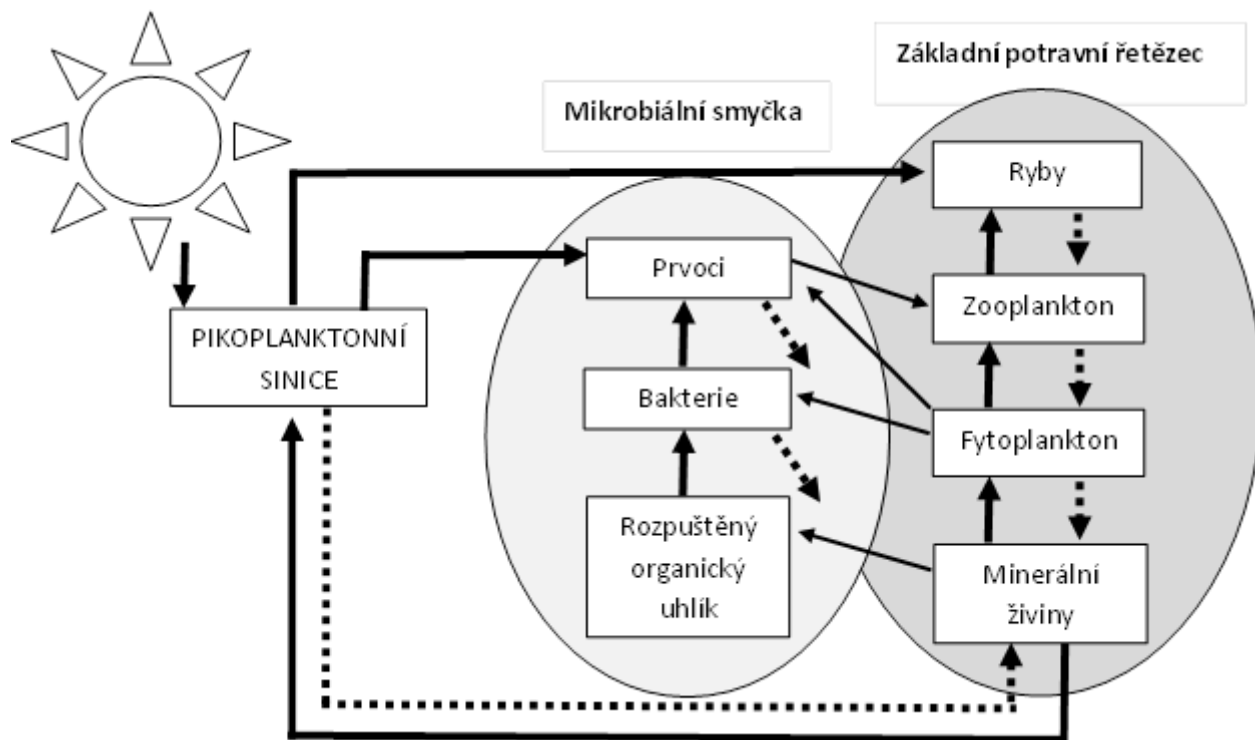
### 2.1.4 Funkce v ekosystému

Podle druhového složení se plankton dělí do 3 skupin: fytoplankton, bakterioplankton a zooplankton. Pikoplanktonní sinice se řadí do skupiny fytoplanktonu. Dělení planktonu podle jeho velikosti se v literatuře výrazně liší. Nejzákladnější skupiny představují makroplankton (200-2000  $\mu\text{m}$ ), mikroplankton (20-200  $\mu\text{m}$ ), nanoplankton (2-20  $\mu\text{m}$ ) (B.H., Dussart, 1964), pikoplankton (0,2-2  $\mu\text{m}$ ) a femtoplankton (0,02-0,2  $\mu\text{m}$ )



(Sieburth et al., 1978). V literatuře lze nalézt i net plankton a ultraplankton (Sicko-goad & Stoermer, 1984).

Pikoplanktonní sinice jsou důležitou součástí mikrobiální smyčky (**Obr. 1**) jak v oligotrofních, tak v eutrofních jezerech (Callieri et al., 2002). Jejím principem je koloběh látek. Organické látky, které jsou uvolňovány z organismů, využívají bakterie nebo sinice, které jsou dále požírány prvoky (heterotrofními bičíkovci, mixotrofními bičíkovci a nálevníky). Prvoky konzumuje zooplankton, což jsou převážně perloočky, naupliová stádia klanonožců (buchanek a vznášivek) a vířníci (Jürgens & Matz, 2002; Salcher et al., 2005). Potravou perlooček (*Cladocera*) a klanonožců (*Copepoda*), jsou často i přímo heterotrofní bičíkovci (Jumars et al., 1989). Celkově se uhlík a další živiny dostávají přes zooplankton až do ryb (Sommer et al., 2012). V procesech dekompozice se minerální živiny navracejí zpět k autotrofům. Zvýšení produkce uhlíku pikoplanktonními sinicemi má tedy podstatný vliv na ostatní organismy. Prostřednictvím prvoků uhlík putuje k mesozooplanktonu. *Daphnia* je důležitým predátorem prvoků, vířníků i pikoplanktonních sinic (Callieri et al., 2002).



**Obr. 1:** Mikrobiální smyčka (zdroj: vlastní tvorba)

### 2.1.5 Fotosyntetické pigmenty pikoplanktonu

Pikoplankton zahrnuje autotrofní a heterotrofní organismy. Autotrofní organismy se vyznačují výskytem fotosyntetických pigmentů a schopností autofluorescence. Heterotrofní pikoplankton představují bakterie. Autotrofní pikoplankton reprezentují fototrofní bakterie, pikoplanktonní sinice a eukaryotní pikoplankton. Prokaryotní pikoplankton většinou převládá nad tím eukaryotním (Callieri et al., 2002).

Pikoplanktonní sinice jsou součástí prokaryotického autotrofního pikoplanktonu a dokáží syntetizovat chlorofyl *a* a fykobiliny - fykocyanin (PC) a fykoerytrin (PE) (Whitton & Potts, 1982). Autofluorescence fykobilinů můžeme využít při metodách detekce pikoplanktonních sinic, jako např. fluorescenční mikroskopie či průtoková cytometrie. Pomocí autofluorescence lze sinice klasifikovat na dva buněčné typy: (i) červeně fluorescentní buňky bohaté na fykocyanin (PC-rich) a (ii) žlutě-fluorescentní buňky obsahující fykoerytrin (PE-rich). Pikoplanktonní sinice s fykoerytrinem absorbují zelené světlo při ~560 nm, zatímco fykocyanin při ~625nm absorbuje oranžovo-červené světlo. Pikoplanktonním sinicím obsahujícím fykoerytrin se daří především v hlubších a čistších jezerech. Naopak v mělkých a zakalených jezerech s vyšší trofíí se daří buňkám s fykocyaninem (Callieri et al., 2012).

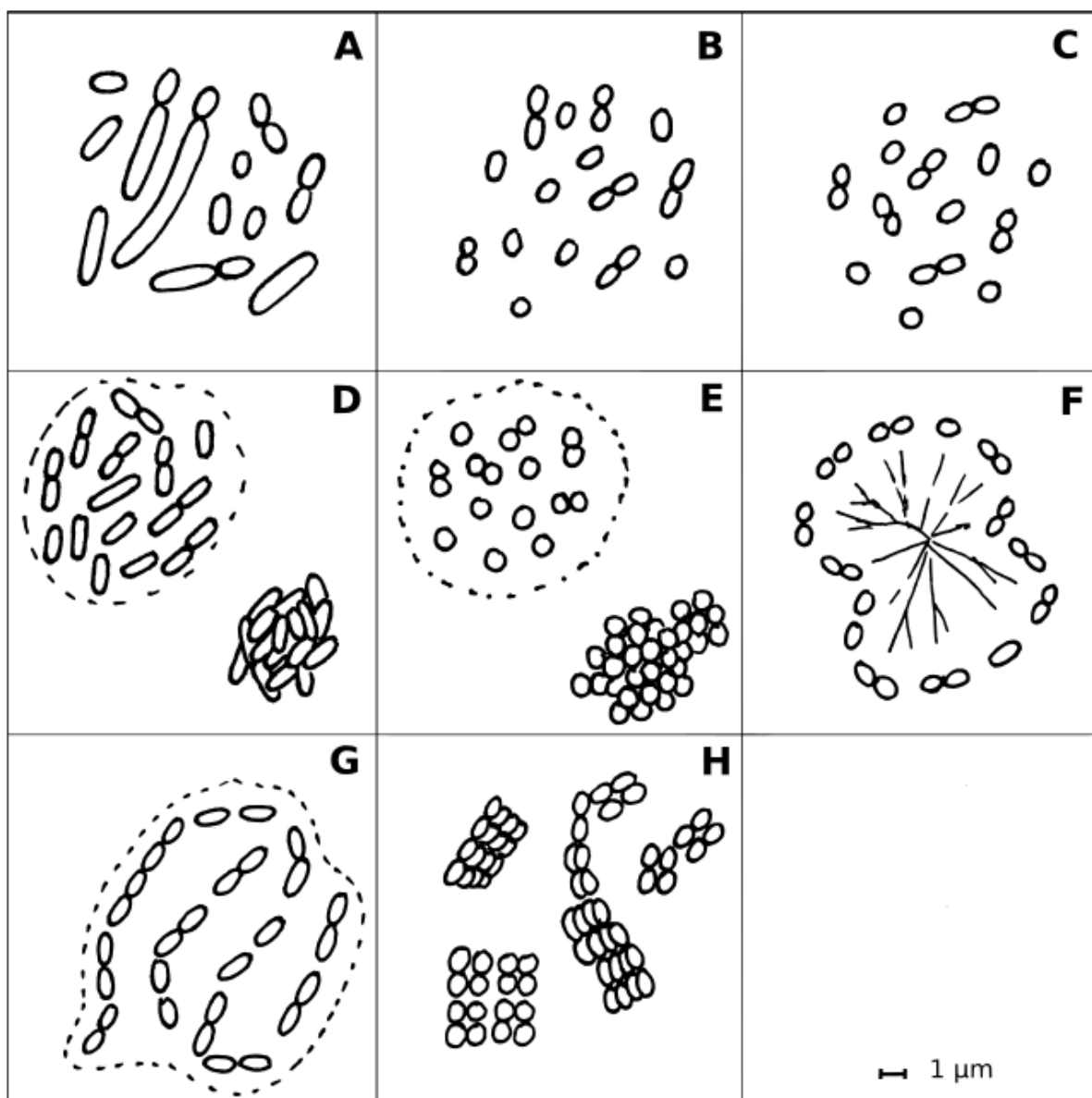
## 2.2 Pikoplanktonní sinice ve sladkých vodách, mořích a oceánech

Pikoplanktonní sinice jsou rozmanitější ve sladkých, než v mořských vodách. Z řádu Chroococcales nejvíce převládá rod *Synechococcus* (**Obr. 2A**). Jedná se o kulatou nebo tyčkovitou jednobuněčnou sinici žijící samostatně nebo v koloniích ve sladké i slané vodě. Součástí její buněčné stěny je peptinoglykanová vrstva a vnější membrána je tvořena z lipopolysacharidů. Na povrchu buněk mikrokolonií je glykoproteiny tvořená S-vrstva s póry (Callieri, 2016). *Synechococcus* obývá jezera i oceány a je schopen přežít v extrémních teplotách vody. Jeho buňky obsahují fykoerytrin a fykocyanin. U červeného mořského druhu *Synechococcus* byly navíc objeveny pigmenty fykoerythrobilin (PEB) a fykourobilin (PUB). Sladkovodní druhy mají obvykle méně fykoerytrinu. Přítomnost různých pigmentů udává výskyt těchto pikoplanktonních sinic v odlišných hloubkách jezer a oceánů a umožňuje jim tak větší variabilitu výskytu. V biochemických cyklech oligotrofních systémů hrají pikoplanktonní sinice velkou roli. Fixují velké množství oxidu uhličitého (Callieri, 2017).

*Prochlorococcus* (**Obr. 2C**) je další významnou jednobuněčnou pikoplanktonní sinicí z řádu Chroococcales dosahující velikosti 0,5-0,8  $\mu\text{m}$ . Vyskytuje se především v oligotrofních, výhradně mořských vodách v hloubce 100-200 m. Je jedním z nejhojnějších fotosyntetických organismů v oceánu. Ve svých buňkách obsahuje chlorofyl *a*, a také méně obvyklý chlorofyl *b*. Ve vodách s dostatkem světla se kmeny této pikoplanktonní sinice označují jako „high light“, při nedostatku světla potom jako „low light“ (Partensky et al., 1999).

Zatímco se *Prochlorococcus* vyskytuje pouze v mořských vodách, *Cyanobium* (**Obr. 2B**) převládá ve vodách sladkovodních. Mikrokolonie *Cyanobia* obsahují velké množství fykocyaninu (Callieri et al., 2002). *Cyanobium* vytváří různé typy buněk a kolonií. Řadíme k ní pikoplanktonní sinice: *Aphanothece* (*Anathece*), *Aphanocapsa*, *Cyanodictyon*, *Snowella* a *Merismopedia*.

- *Aphanothece* (**Obr. 2D**), nově přejmenovaná na *Anathece* (Komárek et al., 2014) je oválná až tyčkovitá pikoplanktonní sinice vyskytující se po 2 buňkách a tvořící kolonie ve stojaté vodě, půdách nebo na vlhkých skalách.
- *Aphanocapsa* (**Obr. 2E**) vytváří nepravidelné kolonie s kulatými, na sobě nahuštěnými buňkami. Vyskytují se ve sladkovodních a čistých vodách v doprovodu bezbarvého slizu. Buněčné dělení se uskutečňuje ve 2 kolmých rovinách a dochází k rychlému oddělení dceřiných buněk. Před započítím dalšího dělení musí dceřiné buňky dorůst do původní velikosti.
- Koloniální a sladkovodní *Cyanodictyon* (**Obr. 2G**) se skládá z po sobě jdoucích buněk těsně u sebe a vytváří tak řetízky, které mohou být doprovázeny slizem.
- Buňky pikoplanktonní sinice *Snowella* (**Obr. 2F**) jsou připojeny k slizovým stonkům. Tyto stonky jsou umístěny uprostřed její kolonie. Svým tvarem pak kolonie připomíná sněhovou vločku.
- *Merismopedia* (**Obr. 2H**) se skládá ze 4 placatých, na sebe nalepených vejcovitých či kulovitých buněk. Tvoří slizem obalené kolonie do pravého úhlu. Dělí se ve 2 směrech, čímž vytváří specifickou mřížku.



**Obr. 2:** Ukázka pikoplanktonních sinic (zdroj: Jezberová, nepublikováno)

A-*Synechococcus*, B-*Cyanobium*, C-*Prochlorococcus*, D-*Aphanothece* (*Anathece*),  
E- *Aphanocapsa*, F- *Snowella*, G- *Cyanodictyon*, H- *Merismopedia*

### 2.3 Konzumace pikoplanktonních sinic zooplanktonem

Zooplankton zahrnuje jak drobné jednobuněčné organismy (protozooplankton), tak i kolonie mořských a sladkovodních organismů o různých velikostech. Protozooplankton zahrnuje prvoky (*Protozoa*), zejména drobné bičíkovce a nálevníky. Mezi mořský makrozooplankton patří především klanonožci (*Copepoda*), zatímco sladkovodní reprezentují 3 důležité skupiny: klanonožci (*Copepoda*), perloočky (*Cladocera*) a vířníci (*Rotifera*). Do skupiny

klanonožců dále řadíme buchanky (*Cyclopoidea*), vznášivky (*Calanoida*) a plazivky (*Harpacticoida*). Spolu s těmito hlavními skupinami se v zooplanktonu vyskytují ještě další větší organismy, jako například planktonní ploštěnky, planktonní larvy hmyzu či pelagické larvy ryb.

### 2.3.1 Konzumace nálevníky a bičíkovci

Interakcemi mezi nálevníky (ciliates) a bičíkovci (HNF; heterotrophic nanoflagellates) s pikoplanktonem se hojně věnuje Šimek et al. (1995, 1996, 1997, 1998, 2019). V eutrofní nádrži Římov bylo pozorováno žraní pikoplanktonních sinic nálevníky. Největší žrací rychlost jak pikoplanktonních sinic, tak i bakterií byla zaznamenána u komplexu *Vorticella aquadulcis*. Dominantním požíračem byla i hojně se vyskytující *Halteria grandinella*. Malou žrací rychlost naopak prokázala *Cyrtolophosis mucicola* a dále *Cinetochilum margaritaceum*. Ukázalo se, že většina nálevníků dává přednost konzumaci pikoplanktonních sinic (Šimek et al., 1995; Šimek et al., 2019).

V oligomezotrofním jezeře Piburger, ležícím v Rakousku, zkoumali vztahy mezi prvoky a pikoplanktonem. Výzkum byl zaměřen na srovnání dvou hloubek, epilimnion a metalimnion, lišící se především dostupností světla a teplotou. I přes jeho nižší teplotu a horší světelné podmínky se větší množství pikoplanktonu objevilo v metalimniu. Na začátku výzkumu se bičíkovci skládali nejvíce z choanoflagelátů, méně bylo chrysomonád a nejmenší skupinu tvořili bodonidé. V průběhu experimentu ale došlo k velkým změnám. Choanoflagelátů několika násobně ubylo, naopak chrysomonád i bodonidů přibývalo. Tyto změny měly podstatný vliv na konzumaci pikoplanktonních sinic. Bylo zjištěno, že fluorescenčně označené pikoplanktonní sinice byly nálevníky i bičíkovci žrány více než fluorescenčně označené bakterie. Pikoplanktonní sinice měly v průměru i větší buňky (Šimek et al., 1996).

Pikoplankton podporuje růst bičíkovců, avšak za přítomnosti bakterií je růst efektivnější (Šimek et al., 1997). Podobný výzkum probíhal i v epilimniu a metalimniu eutrofní nádrže Římov. Heterotrofní bičíkovci zde zkonsumovali přibližně 70-85 % produkce bakterioplanktonu a pikoplanktonu. Bylo zjištěno, že na žraní pikoplanktonu se nejvíce podíleli choanoflageláti, chrysomonády a bodonidé. Žraní ostatních skupin bylo zanedbatelné. Mezi nálevníky ve žraní dominovali *Halteria grandinella* a *Strobilidium hexakinetum*. Rychlost vyčištění (clearance rate) autotrofního pikoplanktonu nálevníky a bičíkovci byla daleko vyšší než rychlost vyčištění bakterií.

Další výzkum, který se zabývá otázkou, zda nálevníci přežijí na potravě ve formě pikoplanktonu, byl prováděn ve 2 odlišných vodních ekosystémech. Prvním vodním ekosystémem byla eutrofní nádrž Římov, druhý výzkum se prováděl v oligomezotrofním jezeře Piburger. Autotrofní pikoplankton v obou vodních ekosystémech obsahoval pikoplanktonní sinici *Synechococcus*. V eutrofní nádrži Římov byla navíc obsažena i řasa *Microcystis incetra*. Nálevníci byli rozděleni do tří skupin podle míry žraní. Nejúčinnějšími požírači byly druhy ze skupin *Oligotrichia*, *Vorticella* a *Cyclidium* sp. Méně účinnými požírači se stali *Cinetochilum margaritaceum*, *Cyrtolophosis mucicola*, *Pelagostrombidium fallax* a *Coleps* spp. Do třetí, nejméně účinné skupiny patří rody *Urotricha* a *Balanion*. Dle výzkumu se nálevníci stali důležitými požírači řas a pikoplanktonní sinice především potencionálním zdrojem uhlíku. Studie dokazuje, že došlo nejen k požití, ale i k trávení pikoplanktonu nálevníky. Buňky pikoplanktonu byly nalezeny ve vakuolách *H. grandinella*, *P. viridis* a *S. hexakinetum* a to v odlišných stupních natrávení (Šimek et al., 1996).

Reakce pikoplanktonních sinic jako obrana proti žraní prvoky zkoumali Jezberová & Komárková (2007). Zjistili zde, že některé pikoplanktonní sinice rodu *Cyanobium* jsou schopny tvořit kolonie pomocí speciálních slizových sloupků.

Pokusy s příjmem pikoplanktonních sinic jako potravy zkoumá také Callieri et al. (2002, 2004, 2006). Callieri, et al. (2002) zkoumali konzumaci pikoplanktonních sinic nálevníky a bičíkovci. Zjistili, že pro nálevníky je nejúčinnějším konzumentem pikoplanktonních sinic skupina *Peritricha*, zejména druhy rodů *Vorticella*, *Epistylis* a *Carchesium* a drobné druhy ze skupin *Oligotrichia* (zejména rod *Rimostrombidium*) a *Stichotrichia* (rody *Halteria* a *Pelagohalteria*). Obecně větší buňky nálevníků přijímají o 1-2 řády větší počty buněk pikoplanktonních sinic za hodinu než bičíkovci. Rychlost příjmu potravy (grazing rate) ale také závisí na velikosti buněk pikoplanktonních sinic. Větší buňky jsou přijímány obtížněji. Trávicí rychlost (ingestion rate) se ukázala být větší pro bičíkovce.

Na jaře pikoplanktonní sinice tvoří spíše jednobuněčné, kulaté buňky, zatímco v pozdějším létě a na podzim dochází k tvorbě větších a podlouhlejších buněk tyčkovitého tvaru. Testování žraní pikoplanktonních sinic nálevníky a bičíkovci probíhalo od dubna do září. V dubnu a v srpnu docházelo u bičíkovců k rozdílu rychlosti příjmu buněk ráno a odpoledne. U nálevníků se rychlosti příjmu ráno lišili od odpoledních rychlostí pouze v srpnu. Jak nálevníci, tak i bičíkovci na jaře prokazovali větší tzv. čistící rychlost (clearance rate, rychlost vyčištění), než tomu bylo v létě. Čistící rychlosti tedy za pozorované období klesaly (Callieri et al., 2002).

### 2.3.2 Konzumace vířníky a perloočkami

Filtrační rychlost zooplanktonu obvykle těsně souvisí s dostupností a množstvím vhodné velikosti potravních částic. Pokud je potravy méně, jejich filtrační rychlost se zvýší. Požití buněk sinic či řas se liší v závislosti na kombinacích těchto dvou typů potravy. Studie dokazují, že zooplankton konzumuje velké množství sinic v případě, že jsou jim nabídnuty jako samostatná potrava. Stále není objasněné úplné strávení sinic zooplanktonem (Morales et al., 2014).

Vířníci představují spíše menší zooplankton, tudíž úměrně tomu přefiltrují menší množství vody než perloočky. Konzumace sinic a filtrační rychlost zooplanktonu byla pozorována u různých druhů perlooček a vířníků s různou velikostí těla. Pro srovnání preference potravy byly v pokusech zooplanktonu podávány sinice i řasy v různých poměrech. Jednobuněčné sinice jsou zooplanktonem pravděpodobně lépe filtrovány, ale některé mohou být pro zooplankton toxické, obtížně stravitelné nebo málo výživné (Morales et al., 2014).

Žrací pokusy se provádějí za přítomnosti nejrozličnějších druhů zooplanktonu. Jedním z hlavních druhů je hrotnatka štíhlá (*Daphnia hyalina*), která byla použita v pokusu s pikosinicí *Synechococcus*. Pikosinice *Synechococcus* byla přidána do přefiltrované jezerní vody, která byla zbavena většího planktonu a obsahovala pouze bakterie a pikosinice. Testovala se reakce pikoplanktonní sinice *Synechococcus* na přítomnost či nepřítomnost hrotnatky. V pokusech s hrotnatkou docházelo ke snížení biomasy pikoplanktonní sinice, ale zároveň se produkce buněk pikoplanktonních sinic pod tlakem hrotnatky zvyšovala. Množství rozpuštěného organického uhlíku se nezměnilo, vylučování organického uhlíku bylo vyšší v kontrolách než ve vzorcích s hrotnatkou (Callieri et al., 2004).

### 2.3.3 Konzumace nálevníkem *Mesodinium rubrum*

Dalším predátorem pikoplanktonních sinic je mixotrofní nálevník *Mesodinium rubrum*. Yoo, et al. (2015) zkoumali schopnost *Mesodinium rubrum* požírat buňky *Synechococcus*. Ve svém výzkumu se zaměřovali na to, zda je nálevník vůbec schopen požírat pikoplanktonní sinice a dále měřili jeho rychlost příjmu potravy (grazing rate). Výzkum potvrdil požití buněk pikoplanktonní sinice *Synechococcus*. Rychlost příjmu potravy nálevníka stoupala se zvyšujícím se množstvím buněk *Synechococcus* a je s největší pravděpodobností ovlivňována velikostí samotného predátora.

Zaměříme-li se na složení potravy *Mesodinium rubrum*, neprospívá mu potrava ve formě samotného *Synechococcus* či samotných heterotrofních bakterií. Sinice daleko lépe fungují pouze jako doplňkový zdroj potravy. *Mesodinium rubrum* svou kořist využívá především jako zdroj živin, uhlíku a energie. V mořských ekosystémech může tvořit masivní vodní květy, které tvoří červené přílivy (red tides) při pobřeží. V porovnání s ostatními „red tide“ organismy bylo požívání *Synechococcus* nižší. (Yoo et al., 2015).

#### 2.3.4 Princip příjmu potravy a trávení

Šimek & Dolan (1997) se zabývali obsahem střeva a procesy požití a trávení. V této studii byl zkoumán proces požití a rychlost zpracování různých částic nálevníkem *Strombidium sulcatum*. Jednotlivé složky obsahovaly fluorescenční mikrosféry (FMS), teplem zabitě a fluorescenčně označené buňky *Synechococcus*, živý *Synechococcus* a *Isochrysis galbana*. Trávení složek bylo pozorováno na základě změn obsahu buněk. Došlo ke zjištění, že mezi jednotlivými složkami nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v rychlosti zmizení buněk. Vzhledem k tomu, že se rychlost zmizení mezi jednotlivými složkami příliš neměnila, bylo by pravděpodobně možné využít obsah střeva ke zjištění rychlosti žraní.

Trávení bylo sledováno také u heterotrofního bičíkovce *Bodo saltans*. Jeho kořistí byla pikoplanktonní sinice *Synechococcus* a fluorescenční mikročástice (mikrosféry; FMS). Studie dokázala, že trávicí rychlost byla konstantní a obsah potravní vakuoly exponenciálně klesal. Požití buněk pikoplanktonní sinice *Synechococcus* bylo podobné v buňkách s různou fází jejich růstu a stejně tak i za přítomnosti/nepřítomnosti fluorescenčních mikročástic. Nižší rychlost požití mikročástic se ukázala být za přítomnosti pikoplanktonní sinice *Synechococcus* v pozdní exponenciální fázi (Šimek & Dolan, 1998).

Motwani & Gorokhova (2013) je další studií zabývající se pikoplanktonními sinicemi jako potravou pro zooplankton. Studie dokazuje přítomnost pikoplanktonní sinice *Synechococcus* ve střevech perlooček (*Cladocera*), vířníků (*Rotifera*) i larev klanonožců (*Copepoda*). Příjem pikoplanktonních sinic je závislý na jejich velikosti. Pro větší zooplankton s větší vzdáleností filtračních brv může být nemožné pozřít jednobuněčnou pikoplanktonní sinici, protože nedojde k zachycení na filtračním aparátu, a tudíž konzumuje pouze jejich kolonie. Zooplankton tedy limituje velikost kořisti, typ jeho filtračního aparátu, ale také množství dostupných zdrojů potravy. Spekuluje se o tom, že v těchto případech zooplankton sníží své energetické výdaje, přizpůsobí filtrační aparát na malou kořist, či přejde na jiný alternativní typ kořisti o vhodné velikosti.



### 2.3.5 Vliv přítomnosti predátora a typu fykobiliproteinu

*Synechococcus* patří mezi velmi rozšířené jednobuněčné pikoplanktonní sinice tvořící mikrokolonie. Callieri, et al. (2016) studovali tvorbu mikrokolonií této pikoplanktonní sinice v závislosti na přítomnosti dvou typů fykobiliproteinů. Na pikoplanktonní sinici přítomný působil žrací tlak mixotrofního bičíkovce *Poteroiochromonas sp.*. Kultury obsahovaly buď jeden z fykobiliproteinů (PC-fykocyanin, PE-fykoerytrin) nebo oba zároveň. V kulturách s PC nebyl pozorován žádný rozdíl, což znamená, že se mikrokolonie jako obrana proti predátorům netvořily. V kultuře s PC a PE docházelo k tvorbě kolonií. Z toho plyne, že docházelo k odlišným reakcím *Synechococcus* podle typu fykobiliproteinů (Callieri et al., 2016).

### 2.3.6 Sdružování sinic s bičíkovci a řasami

Callieri, et al. (2006) zkoumali sdružování pikoplanktonní sinice *Synechococcus*, mixotrofních bičíkovců a řas ve vzorcích odebraných z jezera Lago Maggiore. Komplikace v definování jednotlivých skupin se objevovaly zejména kvůli nedostatku informací o rozšíření a ekologii *Synechococcus*. Výsledky pokusu prokázaly rozdělení do různých skupin. První zahrnuje pikoplanktonní sinici *Synechococcus* spolu s mixotrofními bičíkovci, obzvláště docházelo ke spojení *Synechococcus* s *Ceratium hirundinella*. Vzhledem k tomu, že se zastoupení *Synechococcus* i *Ceratium hirundinella* nápadně shodovalo během celého jejich výskytu, jejich vztah připomíná interakci mezi kořistí a predátorem. V květnu u obou skupin docházelo k nárůstu počtů, v srpnu a září naopak k jejich úbytku.

Další skupina podle výsledků zahrnuje rozsivky a sinice. V různých vodních ekosystémech se také objevila spojení *Synechococcusu* s řasou *Chlorella minutissima*, obě o podobné velikosti. Výzkum dále potvrzuje přítomnost *Synechococcusu* ve vakuolách mixotrofních bičíkovců, což nepřímo potvrzuje jejich konzumaci (Callieri et al., 2006).

## 3 Materiály a metody

### 3.1 Růstová křivka pikoplanktonních sinic

#### 3.1.1 Příprava kultur

K pokusu bylo vybráno 6 kultur pikoplanktonních sinic (**Obr. 3, 4, 5**), které jsou součástí naší sbírky autotrofních organismů (Jezberová, BC AVČR – HBÚ) a pocházejí z odlišných lokalit (**Tab. I**). Všechny tyto kultury byly s pomocí automatické mikropipety a příslušné špičky naočkovány do 50 ml nového média v erlenmeyerových baňkách. Byla použita 2 běžně používaná kultivační média, BG11 (Stanier et al., 1971) a WC (Guillard & Lorenzen, 1972), která se výrazně liší svým chemickým složením (**Tab. II**). BG11 je vysoce koncentrované čistě minerální médium sestavené k dlouhodobému uchování sinic ve sbírkách kultur. Médium WC je jemnější, obohacené vitamíny a bylo primárně namícháno pro kultivaci žlutozelených řas (Xantofyceae). Přidané množství jednotlivých kultur pikoplanktonních sinic se mezi variantami lišilo a bylo vypočítáno na základě jejich hustoty tak, aby koncentrace výsledného roztoku byla pro všechny varianty co nejvíce podobná. Koncentrace kultur HEJTM1B4 a SYNCOC RED byla  $4 \times 10^5$  b/ml. Všechny ostatní kultury měly koncentraci  $5,3 \times 10^5$  b/ml. Takto připravené baňky byly po celou dobu pokusu uchovávány v kultivační místnosti na umělém světle při intenzitě v průměru  $22,23 \mu\text{mol fotonů}/\text{m}^2/\text{s}$ . Intenzita světla se pohybovala v rozmezí  $13,7\text{--}32,6 \mu\text{mol fotonů}/\text{m}^2/\text{s}$ . Světelný režim v kultivacích byl nastaven na 16 hodin světla a 8 hodin tmy. Kultury zde byly pěstovány při teplotě  $19^\circ\text{C}$ .

#### 3.1.2 Odběry vzorků

Prvních 5 dní pokusu docházelo k pravidelným odběrům každý den kolem 16 hodiny. Následující týden docházelo k odběrům každý druhý den a poté byly vzorky odebrány ještě 5x a to jednou za týden. Poslední odběr proběhl po více jak měsíci. Odebírání vzorků probíhalo sterilně ve flow boxu do předem popsanych mikrozkuavek. Z jednotlivých erlenmeyerových baněk byl odebrán 1 ml mikropipetou s příslušnou špičkou a obsah byl vypuštěn do zkumavek s objemem 2 ml. Vzhledem k tomu, že se pokus prováděl na 6 kulturách, které byly pěstovány ve dvou médiích, každý den odběru bylo získáno 12 mikrozkuavek. Do každé mikrozkuavky bylo v digestoři pomocí další mikropipety a příslušné špičky přidáno ještě 50  $\mu\text{l}$  formaldehydu na usmrcení kultury, tak aby bylo

dosaženo finální koncentrace formaldehydu 2%. Takto připravené vzorky byly uchovány v temnu v lednici do doby jejich zpracování.

### 3.1.3 Způsoby vyhodnocení

K vyhodnocení růstového pokusu byl použit průtokový cytometr CytoFlex S (Backman Coulter), který dokáže detailně počítat a analyzovat jednotlivé buňky na základě pigmentů. Do připravené 96 jamkové destičky byly postupně pomocí mikropipety a příslušné špičky napipetovány vzorky výzkumu (**Obr. 6**). Před samotným pipetováním byly vzorky ještě důkladně promíchány na vortexu, aby došlo k rovnoměrnému rozložení buněk v celé zkumavce. Do každé jamky bylo napipetováno 200  $\mu$ l vzorku. Více koncentrované vzorky byly naředěny destilovanou vodou dle potřeby. Do posledních jamek každé destičky bylo nutné napipetovat 3x cleaning solution a 5x destilovanou vodu z důvodu následného čištění průtokového cytometru. Takto připravená destička byla vložena do průtokového cytometru pro vyhodnocení. Výsledné grafy byly vytvořeny v GraphPad Prism 5.

Zkumavky se vzorky obsahující počátek a střed (13. den) byly také vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympusu BX75 za použití UV záření a zeleného fluorescenčního světla (510-560 nm). Jednotlivé preparáty byly připravovány v digestoři. Na filtrační aparaturu byly nasazeny černé 0,2  $\mu$ m Nuclepore filtry a na ně jednotlivé skleněné kolonky. Do kolonek bylo po promíchání na vortexu napipetováno 0,5 ml vzorku z jednotlivých mikrozkušavek. Vzorky z konce pokusu obsahující médium BG11 byly dle potřeby ještě naředěny destilovanou vodou (1:1000) z důvodu velké hustoty buněk. Poté bylo přidáno ještě DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol dihydrochlorid) a lehkým potřepáním celé aparatury se vše promíchalo.

Následně došlo k přípravě podložního sklíčka. Po 1 minutě se vzorek odsál a kolonky se sundaly. Filtr byl přendán na podložní sklíčko a na něj byla přidána kapka imerzního oleje. Hned poté se filtr s imerzním olejem přiklopil sklíčkem krycím. Tímto byly vzorky připravené na další práci na mikroskopu. Na svrchní sklíčko vzorků byla ještě kápnuta kapka imerzního oleje pro lepší pozorování. Po zaostření mikroskopu bylo možné začít s počítáním jednotlivých buněk na počítadle. Podle hustoty vzorku docházelo k počítání buněk na celém zorném poli nebo čtvercové mřížce. U vzorků s velkou hustotou se buňky počítaly na 9 čtverců či 2 řádky uvnitř čtvercové mřížky.

## 4 Výsledky

### 4.1 Výsledky z průtokového cytometru

Údaje pořízené na průtokovém cytometru byly zpracovány a použity k vytvoření grafů pro lepší přehlednost. Grafy odhalily velice zajímavé výsledky. Většina z nich byla podobná standartní růstové křivce (**Obr. 7**) obsahující lag fázi, fázi exponenciálního růstu, fázi stacionární a degradační. Jednotlivé fáze sebou nesou i charakteristické změny v počtu buněk za pozorovaný čas. Během lag fáze zpravidla dochází k aklimatizaci buněk nikoli však k jejich nárůstu. Fáze exponenciálního růstu je charakteristická rapidním přírůstem buněk, který se ustaluje až ve fázi stacionární. V poslední – degradační fázi dochází naopak k rapidním úbytkům buněk.

Chování vybraných kultur se během pozorovaných 84 dní podstatně měnilo v závislosti na médiích BG11 a WC. Na rozdíl od kultur pěstovaných v médiu BG11, měly kultury pěstované v médiu WC po celý pozorovaný čas stejný trend. Prvních pět dní u všech kultur bez výjimky docházelo k přizpůsobování se na prostředí a jejich přírůstky byly pouze minimální (**Obr. 9A, 9C**). Exponenciální růst kultur se objevil až mezi 5. a 10. dnem u všech kultur s výjimkou PE-rich pěstovaných v BG11. Tyto dvě kultury začaly růst daleko později a to až mezi 30. a 50. dnem. Zajímavou proměnu ukázalo období mezi 11. a 13. dnem. Kultury pěstované ve WC totiž mezi těmito dny významně klesaly. Docházelo zde k poklesu o 73 % (**Obr. 8**).

PE-rich kultury na začátku pokusu rostly ve WC o 92 % lépe v exponenciální fázi než v BG11. Koncentrace pikoplanktonních sinic PE rich ve WC byla  $17,5 \times 10^6$  b/ml, zatímco v BG11 byla koncentrace PE rich buněk pouze  $1,4 \times 10^6$  b/ml (**Obr. 9C**). Maximální koncentrace ve WC nastala 11. den, zatímco v BG11 až 35. den (**Obr. 9D**). Lag fáze byla delší u BG11.

PC-rich buňky měly sice v obou médiích podobný začátek, ale dlouhodobá kultivace je v BG11 mnohem koncentrovanější než ve WC (BG11  $15 \times 10^6$  b/ml vs. WC  $2 \times 10^6$  b/ml). Z toho vyplývá, že z dlouhodobého hlediska se v BG11 kulturám bude dařit lépe. PE-rich buňky mají ve WC srovnatelný začátek s PC-rich buňkami. Pro dlouhodobou kultivaci PE-rich buněk bude vhodné pěstování v BG11, kde mají mnohem vyšší koncentraci. V médiu WC tyto buňky umírají po 80. dnech (**Obr. 10**).

Stacionární fázi lze pozorovat od 21. dne a to pouze u kultur pěstovaných ve WC. V médiu BG11 nelze stacionární fázi generalizovat. Koncentrace pikoplanktonních sinic PC-rich byla v této fázi v BG11 o 81 % vyšší než ve WC (BG11  $11,3 \times 10^6$  b/ml vs. WC  $2,1 \times 10^6$  b/ml) (**Obr. 9B**). Koncentrace PE-rich ve stacionární fázi byla v médiu BG11 o 71 % vyšší než v médiu WC (BG11  $6,6 \times 10^6$  b/ml vs. WC  $1,9 \times 10^6$  b/ml) (**Obr. 9D**).

Velikosti všech kultur byly měřeny 1. a 13. den pokusu. Kultury dosahovaly délky buněk 1,2-1,6  $\mu\text{m}$ . Délka buněk zůstala pro každý kmen konstantní a v průběhu pokusu se neměnila.

## 4.2 Porovnání výsledků z průtokového cytometru a mikroskopu

Z mikroskopických počtů i počtů získaných z průtokového cytometru byly sestaveny grafy (**Obr. 11**). Došlo zde k porovnání 1. a 13. dne. Hodnoty naměřené na průtokovém cytometru se 1. den celkem shodovaly s hodnotami z mikroskopu. Výjimkou byla kultura VÍR, jejíž hodnoty naměřené na průtokovém cytometru byly výrazně větší. K významným odlišnostem mezi výsledky z průtokového cytometru a mikroskopu docházelo především 13. den, a to u všech kultur bez výjimky. Hodnoty spočítané na mikroskopu byly mnohem vyšší ve všech pozorovaných kulturách.

## 5 Diskuze a závěr

Bakalářskou práci doprovázelo několik cílů, jež měly být objasněny. Prvním a zároveň tím úplně nejzákladnějším cílem byla literární rešerše, jejíž zjištění byla klíčová pro následující výzkum. V první části literární rešerše došlo k seznámení se s pikoplanktonními sinicemi, jejich ekologií a druhovou rozmanitostí. V této části nedocházelo k výraznějším komplikacím, protože citované články obsahují velké množství dat o pikoplanktonu. Nejasnosti se objevily až v další části práce, která se zabývala otázkou, zda je zooplankton schopen živit se pikoplanktonními sinicemi. Ačkoli bylo toto téma již hojně studované, doposud nepřineslo zcela konkrétní odpověď. Existuje sice mnoho literatury týkající se prvoků, ale literatury zabývající se korýši je výrazně méně. Práce s korýši je totiž o dost složitější, těžce se při ní nastavují sterilní podmínky a práce se i hůře opakuje.

Z literární rešerše vyplynuly zajímavé informace o důkazech konzumace pikoplanktonních sinic zooplanktonem. Jedním z hlavních a nepřehlédnutelných důkazů jsou vakuoly nálevníků, ve kterých byly nalezeny buňky pikoplanktonu v různých stupních natrávení (Šimek et al., 1996). Pikoplanktonní sinice byly nalezeny i ve střevech perlooček (*Cladocera*), vířníků (*Rotifera*) a larev klanonožců (*Copepoda*) (Motwani & Gorokhova, 2013). Ze studií dále vyplývá, že většina nálevníků dává přednost konzumaci pikoplanktonních sinic nad konzumací bakterií (Šimek et al., 1996) a rychlost vyčištění (clearance rate) pikoplanktonu je také větší než u bakterií (Šimek et al., 1997).

Zooplankton je limitován množstvím dostupných zdrojů a typem svého filtračního aparátu. U zooplanktonu s větší vzdáleností filtračních brv nemůže dojít ke konzumaci jednobuněčné pikoplanktonní sinice, což znamená, že může konzumovat pouze kolonie. Velikost kořisti souvisí i s rychlostí příjmu buněk pikoplanktonních sinic (Motwani & Gorokhova, 2013). V létě jsou buňky přijímány obtížněji než na jaře, za což nejspíš může jejich měnící se velikost (Callieri et al., 2002).

Bakalářská práce založená na rešerši byla obohacena o praktickou část, která se týká přesně definovaných podmínek růstu pikoplanktonních sinic. Doposud se totiž žádná práce nezaměřila na růstovou křivku pikoplanktonních sinic a nemáme tedy žádné konkrétní informace o rychlosti jejich růstu. Výsledek tohoto výzkumu může být užitečný v dalších pokusech s pikoplanktonními sinicemi, jelikož bude znám jejich trend a vývoj.

Růstová křivka pikoplanktonních sinic se ukázala být odlišná zejména v závislosti na typu média, ve kterém se kultury pěstují a také v závislosti na typu fykobilinu. Průběh růstu

většiny kultur byl podobný standartní růstové křivce (Vaněk, 2016). Obecně měly kultury ve WC velmi podobný průběh. Opakem tomu bylo médium BG11, ve kterém se kultury chovaly odlišně. Především PE-rich kultury v BG11 vykazovaly nevšední průběh. K nárůstu počtu jejich buněk docházelo až mezi 30. a 50. dnem, zatímco u ostatních kultur docházelo k nárůstu počtu buněk už mezi 5. a 10. dnem po aklimatizaci kultur. PE-rich kultury rostly ve WC o 92 % lépe v exponenciální fázi, než v BG11. K maximální koncentraci došlo v BG11 o 24 dní později než ve WC. Rozdílnost nástupu růstu mezi PE-rich a PC-rich kulturami v živinami bohatém médium BG11 může také vysvětlovat fakt, že PE-rich pikoplanktonní sinice se v přírodě vyskytují v oligotrofních, tedy živinami chudých jezerech, a ještě nikdy nebyly pozorovány v eutrofních systémech.

Stacionární fáze se objevila pouze ve WC médiu a to od 21. dne. V médiu BG11 ji nelze generalizovat, bylo možné pouze porovnat PE-rich s PC-rich. V BG11 byla koncentrace pikoplanktonních sinic PC-rich o 81 % vyšší než ve WC, koncentrace PE-rich v médiu BG11 byla o 71 % vyšší než v médiu WC. Dlouhodobá kultivace se ukázala být výhodnější v médiu BG11, kde dosahují kultury větší koncentrace a dlouhodobě se jim daří lépe. V médiu WC kultury umírají už po 80. dni.

Jak už bylo uvedeno, k vyhodnocování vzorků byly použity 2 metody. Vzorky se vyhodnocovaly na průtokovém cytometru a také byly jednotlivé buňky počítány pod mikroskopem. První den pokusu se výsledky z obou metod shodovaly s výjimkou kultury VÍR. Velké rozdíly se objevily až 13. den, kdy byly hodnoty v rozporu. V mikroskopu bylo totiž napočítáno mnohem více buněk, než vyhodnotil průtokový cytometr. Důvodem tohoto rozdílu může být například tvorba kolonií pikoplanktonních sinic. Dalším možným důvodem mohl být pokles fotosyntetického barviva, na jehož základě byly buňky počítány. Při mikroskopické analýze byly buňky obarveny v DAPI, což zajistilo lepší viditelnost pro počítání. V mikroskopu byly počítány i lehce svítící buňky, zatímco průtokový cytometr je mohl vyhodnotit jako jiné objekty.

Závěrem bych ráda shrnula cíle bakalářské práce a jejich naplnění. Práce se zabývala otázkou, zda je zooplankton schopen žít se pikoplanktonními sinicemi. Na toto téma byla vypracována rozsáhlá literární rešerše, která obsahuje důležitá zjištění. V praktické části jsem se zaměřila na definici růstové křivky pro jednotlivé kmény pikoplanktonních sinic. A právě ono zjištění o růstové křivce bude velkým přínosem při následném pokračování v tomto tématu, které by mohlo být součástí práce magisterské.

## I. Seznam použitých zdrojů

DUSSART B. H., (1965): Les differentes categories de plancton. *Hydrobiologia* 26: 72-74.

CALLIERI C. (2016): Micro-players for macro-roles: Aquatic microbes in deep lakes. *Journal of limnology* 75: 191-200.

CALLIERI C. (2017): *Synechococcus* plasticity under environmental changes. *FEMS Microbiology Letters* 364(23).

CALLIERI C., AMALFITANO S., CORNO G., BERTONI R. (2016): Grazing-induced *Synechococcus* microcolony formation: experimental insights from two freshwater phylotypes. *FEMS Microbiology Ecology* 92(11).

CALLIERI C., BALSEIRO E., BERTONI R., MODENUTTI B. (2004): Picocyanobacterial photosynthetic efficiency under *Daphnia* grazing pressure. *Journal of plankton research* 26(12): 1471-1477.

CALLIERI C., CARAVATI E., MORABITO G., OGGIONI A. (2006): The unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus* and mixotrophic flagellates: evidence for a functional association in an oligotrophic, subalpine lake. *Freshwater Biology* 51: 263–273.

CALLIERI C., CRONBERG G., STOCKNER J. (2012): Freshwater Picocyanobacteria: Single Cells, Microcolonies and Colonial Forms. *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*: 229-269. Springer Publishing, ISBN 978-94-007-3854-6.

CALLIERI C., KARJALAINEN S. M., PASSONI S. (2002): Grazing by ciliates and heterotrophic nanoflagellates on picocyanobacteria in Lago Maggiore, Italy. *Journal of plankton research* 24(8): 785-796.

CALLIERI C., STOCKNER J. G. (2002): Freshwater Autotrophic Picoplankton: a review. *Journal of limnology* 61(1): 1-14.

GUILLARD R. R. L., LORENZEN C. J. (1972): Yellow-green algae with chlorophyllide. *Journal of Phycology* 8: 10-14.

JEZBEROVÁ J. (2006): Does the protozoan presence influence colony forming of picocyanobacteria? Book of extended abstracts; *Reservoir limnology and Water Quality (5th RL 2006)*: 283 – 286.



- JEZBEROVÁ J. AND KOMÁRKOVÁ J. (2007): Morphological transformation in a freshwater *Cyanobium* sp. induced by grazers. *Environmental Microbiology* 9(7): 1858–1862.
- JUMARS, P. A., PENRY D. L., BAROSS J. A., PERRY M. J., FROST B. W. (1989): Closing the microbial loop: dissolved carbon pathway to heterotrophic bacteria from incomplete ingestion, digestion and absorption in animals. *Deep-Sea Research* 36(4): 483–495.
- JÜRGENS K., MATZ C. (2002): Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 413–434.
- KOMÁREK J., KAŠTOVSKÝ J., MAREŠ J. JOHANSEN R. J. (2014): Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295–335.
- KOMÁRKOVÁ, J. (2002a): Cyanobacterial picoplankton and its colonial formation in two eutrophic canyon reservoirs (Czech Republic). *Algological Studies* 154: 605–623.
- KOMÁRKOVÁ, J. (2002b): Do cyanobacterial picoplankton exist in eutrophic reservoirs? *Verhandlungen der Internationalen Limnologie* 28: 497–500.
- KOMÁRKOVÁ J., ŠIMEK K., (2003): Unicellular and colonial formations of picoplanktic cyanobacteria under different environmental conditions and predation pressure. *Algological Studies* 109: 327–340.
- MORALES A. P., SARMA S. S. S., NANDINI S. (2014): Feeding and filtration rates of zooplankton (rotifers and cladocerans) fed toxic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*). *Journal of Environmental Biology* 35: 1013–1020.
- MOTWANI N. H., GOROKHOVA E. (2013): Mesozooplankton Grazing on Picocyanobacteria in the Baltic Sea as Inferred from Molecular Diet Analysis. *PLOS ONE* 8(11).
- PARTENSKY F., HESS W. R., VAULOT D. (1999): *Prochlorococcus*, a Marine Photosynthetic Prokaryote of Global Significance. *Microbiology and molecular biology reviews* 63(1): 106–127.
- SALCHER M. M., PERHTHALER J., PSENNER R., POSCH T. (2005): Succession of bacterial grazing defense mechanisms against protistan predators in an experimental microbial community. *Aquatic microbial ecology* 38: 215–229.

- SICKO-GOAD L., STOERMER E. F. (1984): The Need for Uniform Terminology Concerning Phytoplankton Cell Size Fractions and Examples of Picoplankton from the Laurentian Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research* 10(1): 90–93.
- SIEBURTH J. Mc. N., SMETACEK V., LENZ J. (1978): Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography* 23(6): 1256-1263.
- SOMMER U., ADRIAN R., DOMIS L. D. S., ELSER J. J., GAEDKE U., IBELINGS B., JEPPESEN E., LÜRLING M., MOLINERO J. C., MOOIJ W. M., DONK E., WINDER. M. (2012): *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43: 429-448.
- STANIER R. Y. R., KUNISAWA M., MANDEL M., COHEN-BAZIRE G. (1971): Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 35: 171-205.
- ŠIMEK K., DOLAN J. R. (1997): Processing of ingested matter in *Strombidium sulcatum*, a marine ciliate (Oligotrichida). *Limnology and Oceanography* 42(2): 393-397.
- ŠIMEK K., DOLAN J. R. (1998): Ingestion and digestion of an autotrophic picoplankter, *Synechococcus*, by a heterotrophic nanoflagellate, *Bodo saltans*. *Limnology and Oceanography* 43(7): 1740-1746.
- ŠIMEK K., GRUJČIC V., NEDOMA J., JEZBEROVÁ J., ŠORF M., MATOUŠŮ A., PECHAR L., POSCH T., BRUNI E. P., VRBA J., (2019): Microbial food webs in hypertrophic fishponds: Omnivorous ciliate taxa are major protistan bacterivores. *Limnology and Oceanography* 64: 2295–2309.
- ŠIMEK K., HARTMAN P., NEDOMA J., PERNTHALER J., SPRINGMANN D., VRBA J., PSENNER R. (1997): Community structure, picoplankton grazing and zooplankton control of heterotrophic nanoflagellates in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum. *Aquatic microbial ecology* 12: 49-63.
- ŠIMEK K., MACEK M., NEDOMA J., PSENNER R., BOBKOVA J. (1995): Ciliate Grazing on Picoplankton in a Eutrophic Reservoir During the Summer Phytoplankton Maximum: A Study at the Species and Community Level. *Limnology and Oceanography* 40(6): 1077-1090.

ŠIMEK K., MACEK M., PERN J., STRASKRABOVA V., PSENNER R. (1996): Can freshwater planktonic ciliates survive on a diet of picoplankton? *Journal of Plankton Research* 18(4): 597-613.

ŠIMEK K., PERNTHALER J., SATTLER B., SCHWARZENBACHER A., BOBKOVA J., PSENER R. (1996): Short-term changes of protozoan control on autotrophic picoplankton in an oligo-mesotrophic lake. *Journal of Plankton Research* 18(3): 443-462.

VANĚK M. (2016): Mikrobiologické zkoumání potravin: Zákonitosti růstu mikroorganismů v přírodním prostředí, vliv fyzikálních faktorů na růst mikroorganismů [online]. [cit. 2019-12-03]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/13171037-Mikrobiologicke-zkoumani-potravin-zakomitosti-rustu-mikroorganismu-v-prirodnim-prostredi-vliv-fyzikalnich-faktoru-na-rust-mikroorganismu.html>

WHITTON B. A., POTTS M. (2002): Introduction to the Cyanobacteria. *The Ecology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, ISBN 0-7923-4735-8.

YOO Y. Du, SEONG K. A., MYUNG G., KIM H. S., JEONG H. J., YIH W., PALENIK B. (2015): Ingestion of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* by the mixotrophic red tide ciliate *Mesodinium rubrum*. *Algae* 30(4): 281-290.

## II. Seznam tabulek a obrázků

### Seznam tabulek:

**Tabulka I:** Sběrka kultur

Číslo	Jméno kultury	Barva	Původ	Rok izolace	Reference
1	VÍR	zelená	přehradní nádrž Vír	2000	Jezberová & Komárková (2006)
2	HEJTM1B4	zelená	rybník Hejtman	2003	Jezberová (nepublikováno)
3	SYNCOC RED	červená	Lake Constance	1988	
4	9-2	zelená	přehradní nádrž Stanovice	2005	Jezberová (nepublikováno)
5	SYNECHOCOCCUS	červená			
6	8809	zelená	Lake Constance	1988	Ernst et al. (1991)

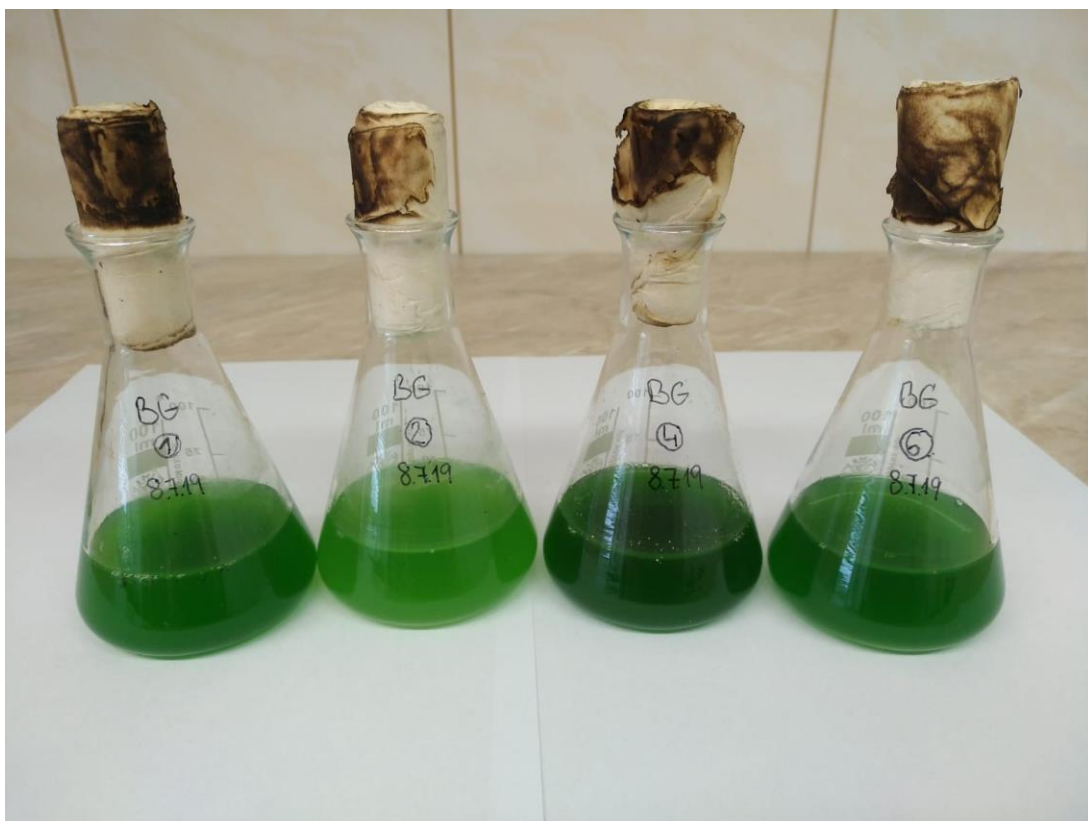
**Tabulka II:** Složení médií

BG 11 (Stanier et al., 1971)		WC (Guillard & Lorenzen, 1972)	
Zásobní roztok	g l <sup>-1</sup> média	Zásobní roztok	g l <sup>-1</sup> média
NaNO <sub>3</sub>	1,5	NaNO <sub>3</sub>	0,85
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3 H <sub>2</sub> O	0,04	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3 H <sub>2</sub> O	0,114
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,075	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,037
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,036	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,0368
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02	NaHCO <sub>3</sub>	0,0126
Kyselina citrónová		Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,0212
EDTA		Mix vitamínů	
Železito-amonný citrát		Pufr TES	
Stopa směsi kovů		Kombinované stopové prvky	

## Seznam obrázků:



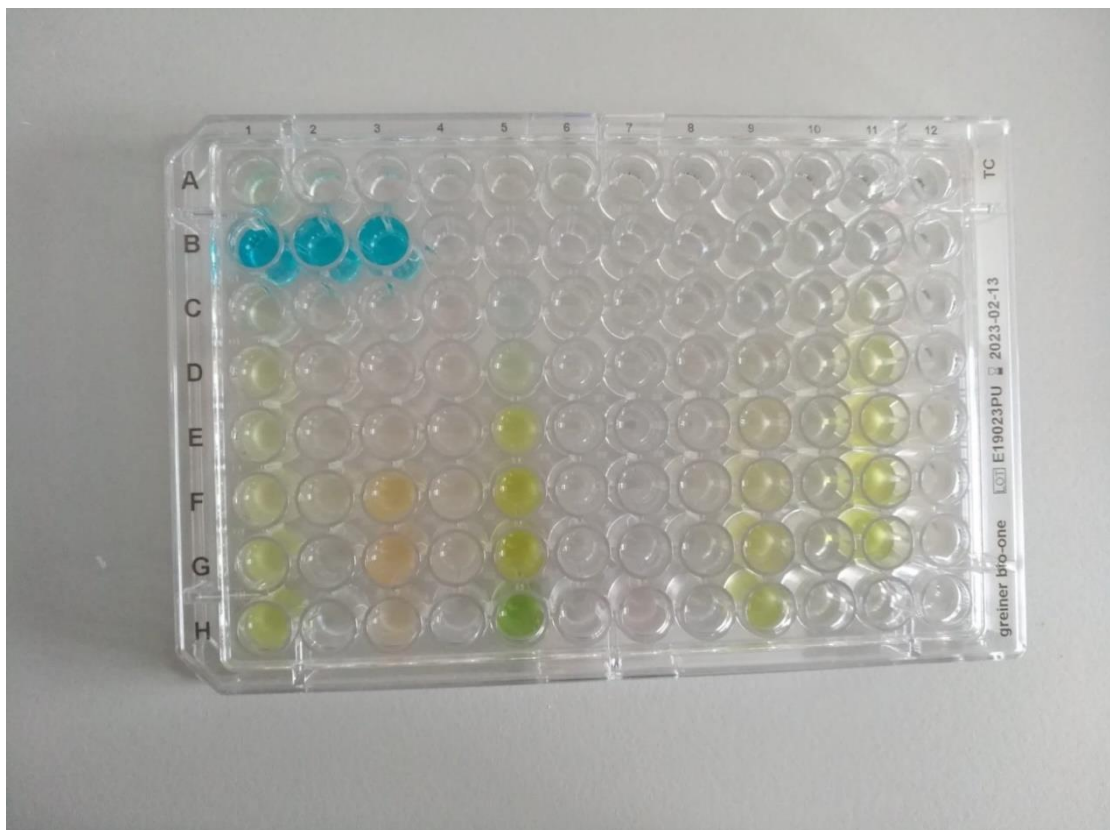
**Obrázek 3:** Kultury 1-6 pěstované ve WC



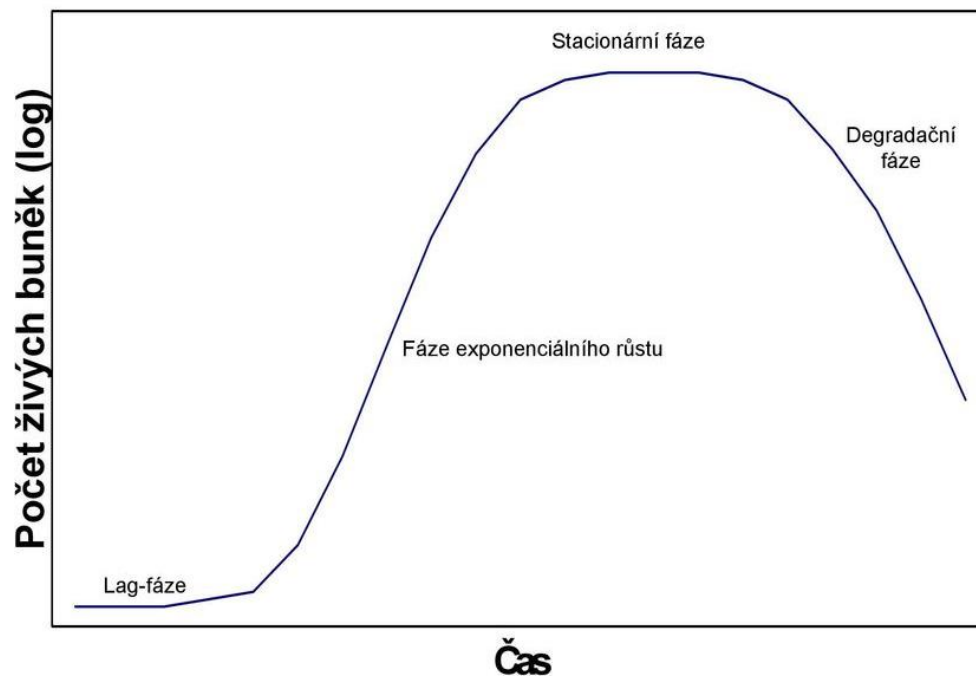
**Obrázek 4:** Kultury 1, 2, 4, 6 pěstované v BG11 (PC-rich)



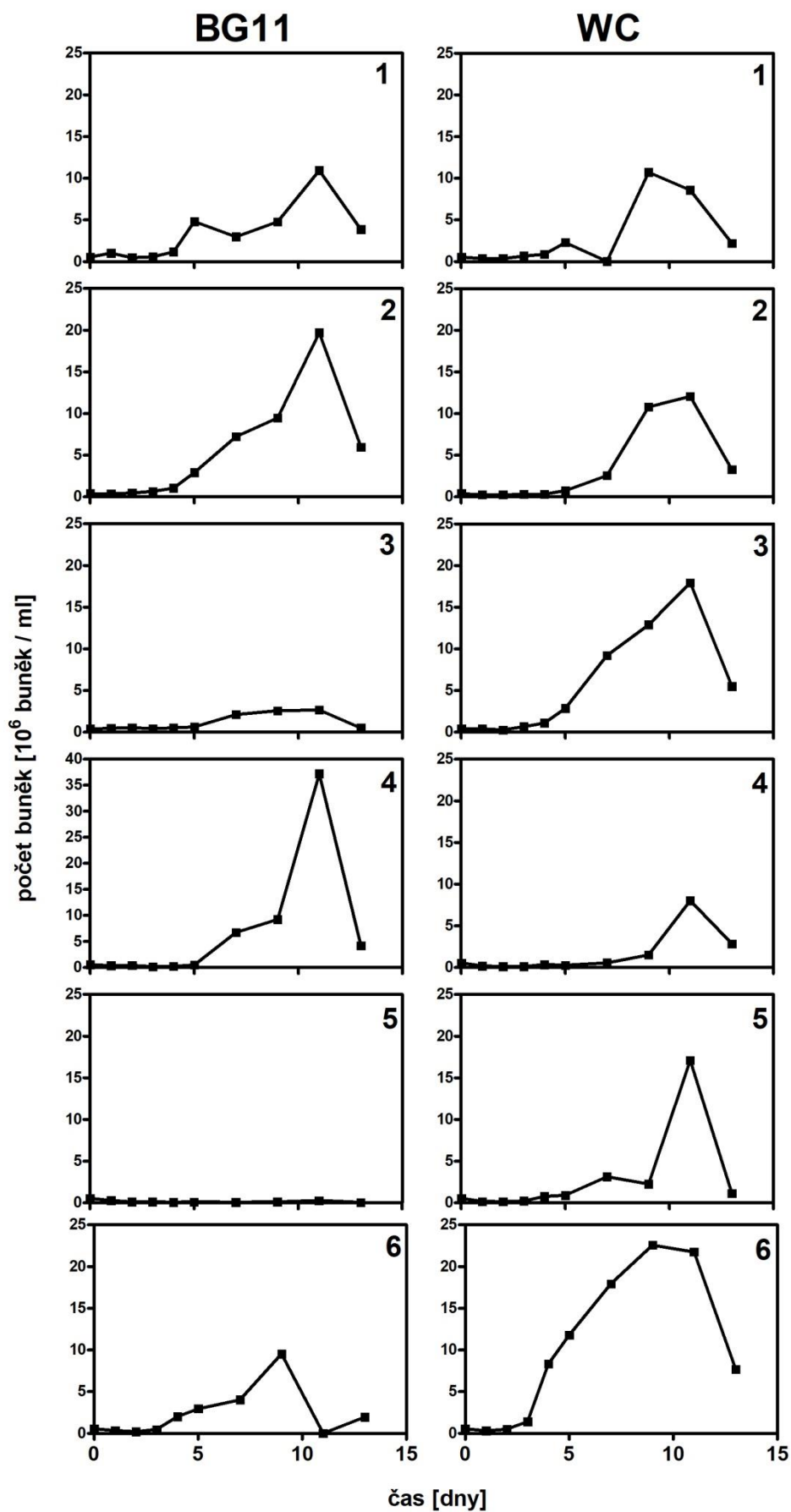
**Obrázek 5:** Kultury 3, 6 pěstované v BG11 (PE-rich)



**Obrázek 6:** Napipetovaná destička připravená na analýzu průtokovým cytometrem

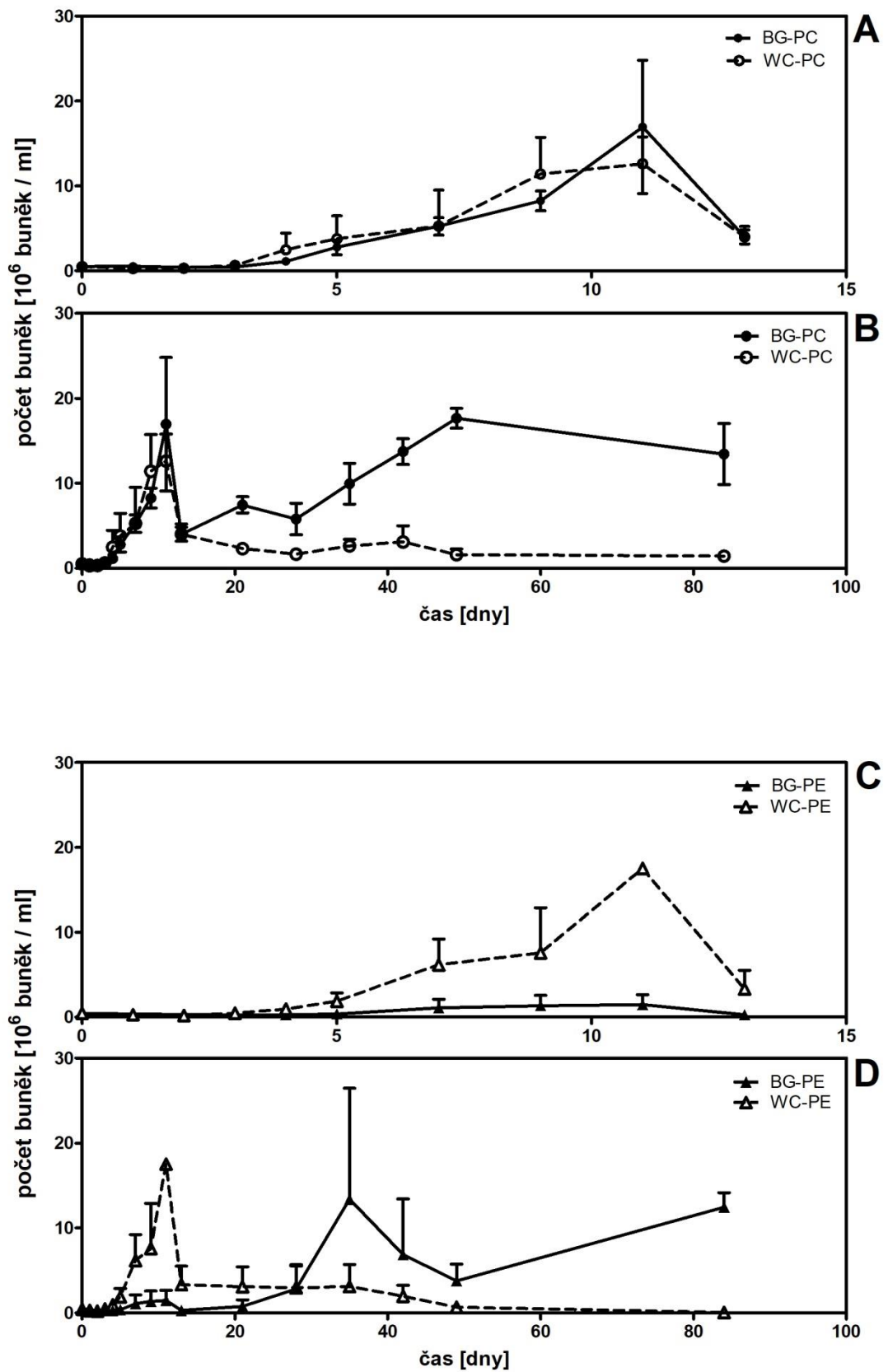


**Obrázek 7:** Standartní růstová křivka (Vaněk, 2016)

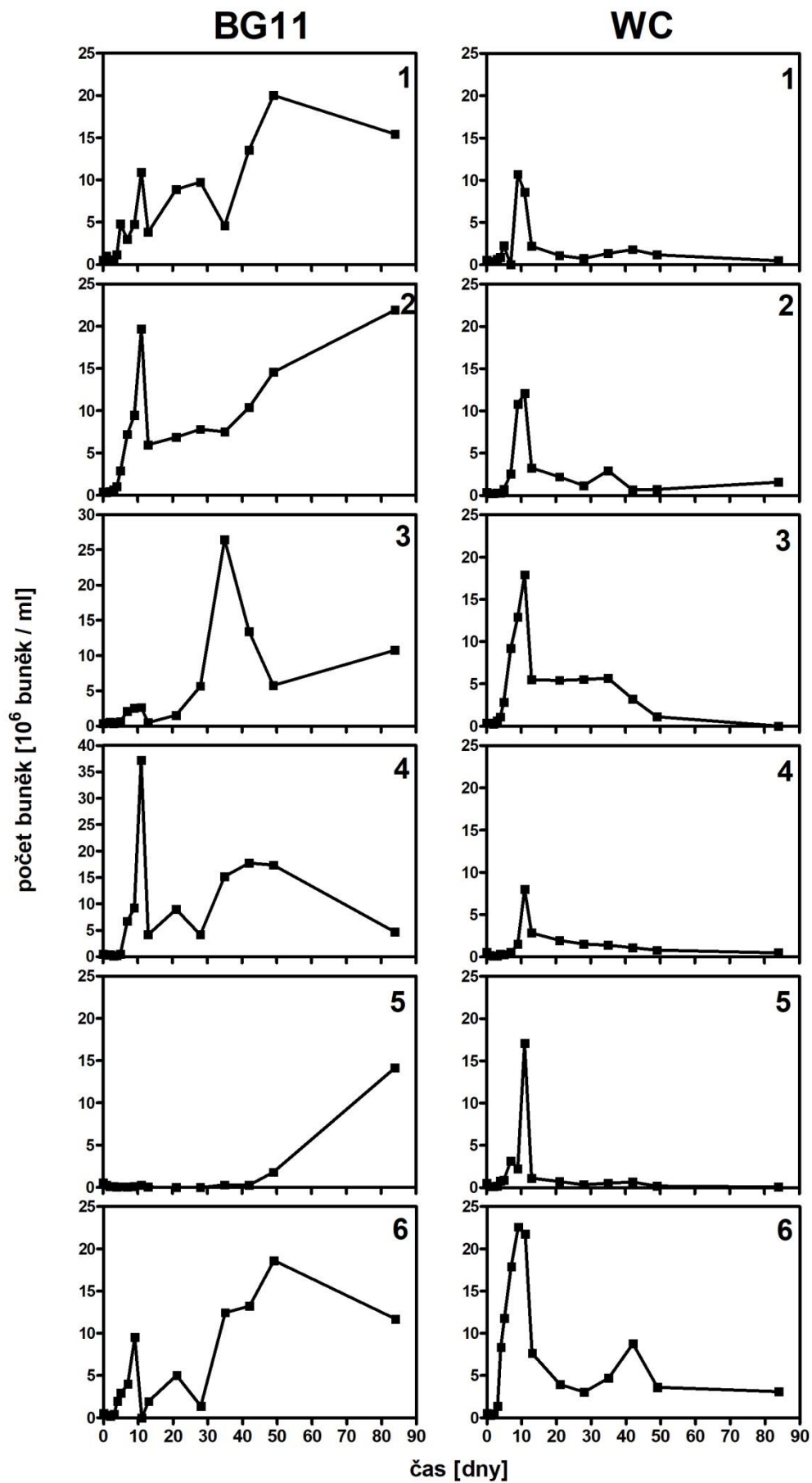


**Obrázek 8:** Grafy růstových křivek 6 kultur pikoplanktonních sinic v počáteční fázi růstu (0-15 den) ve 2 kultivačních médiích BG11 a WC

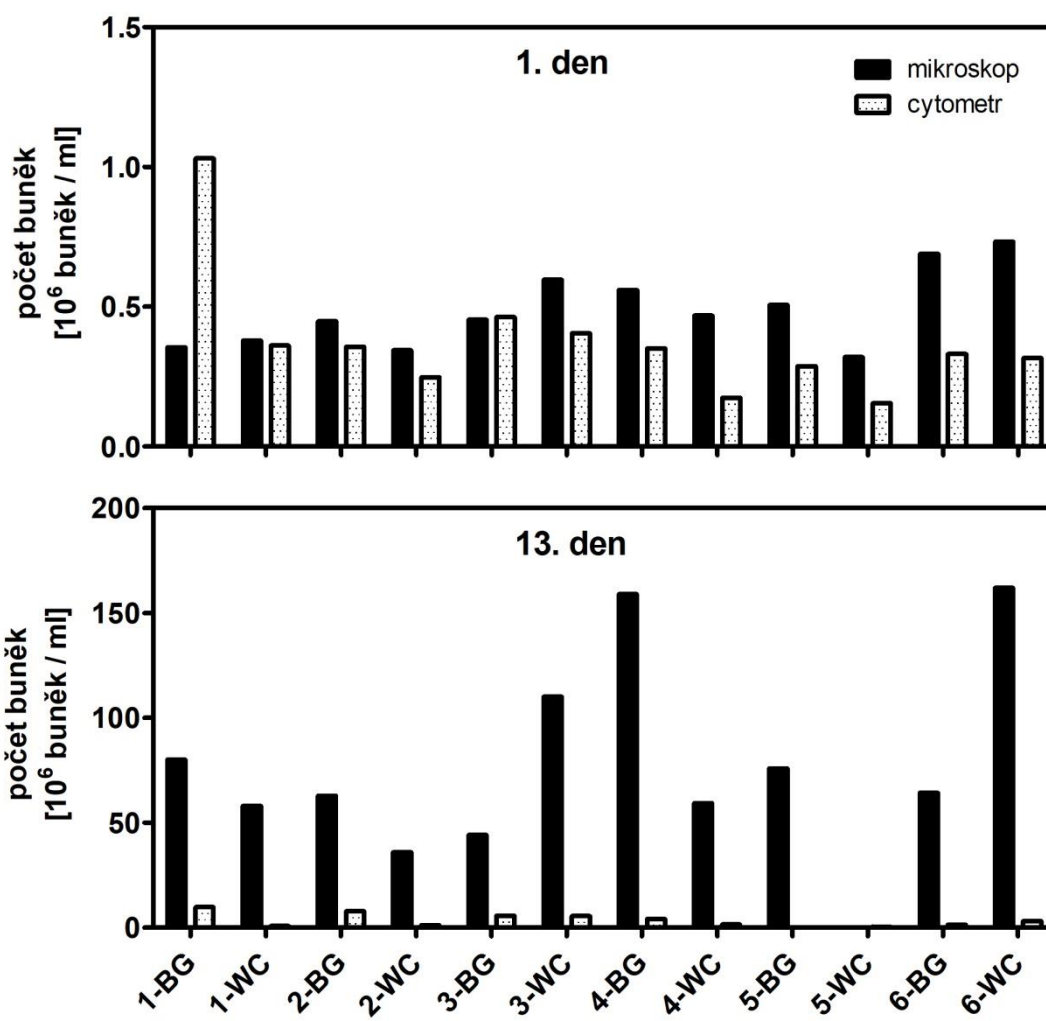




**Obrázek 9:** Srovnání růstu PE-rich a PC-rich pikoplanktonních sinic na počátku růstové křivky (0-15 den; A, C) a během 84 dnů (B, D)



**Obrázek 10:** Grafy růstových křivek 6 kultur pikoplanktonních sinic ve 2 kultivačních médiích BG11 a WC po dobu 84 dnů



**Obrázek 11:** Srovnání výsledků počtů buněk z mikroskopu a průtokového cytometru u 6 kultur pikoplanktonních sinic pěstovaných ve dvou kultivačních médiích, BG11 a WC. Horní graf - 1. den experimentu, dolní graf - 13. den experimentu.