

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

Katedra fyziologie rostlin



Magisterská diplomová práce

# **Vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na regulaci fotosyntézy diazotrofních sinic**

Kristina Felcmanová, Bc.

Vedoucí práce: Ondřej Prášil, Prof., RNDr, PhD.  
Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Třeboň

České Budějovice 2011

### **Magisterská diplomová práce:**

Felcmanová K., 2011: Vliv zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na regulaci fotosyntézy diazotrofních sinic. [The influence of enhanced concentration CO<sub>2</sub> on regulation of photosynthesis in diazotrophic cyanobacteria. Mgr. Thesis, in Czech.]-50p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace:**

The rising of CO<sub>2</sub> in the atmosphere has shifted the carbonate chemistry in oceans and has influence on the phytoplankton, especially diazotrophic species. In this work we study the response of these diazotrophic species in the N-replete media and N-depleted media to the elevated concentration of CO<sub>2</sub>.

Tato práce je součástí řešení projektu financovaného grantem GAČR 206/08/1683, jehož řešitelem byl Prof., RNDr. Ondřej Prášil, PhD. (Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Třeboň), projektu financovaného grantem GA JU číslo 134/2010/P, jehož řešitelem byl Doc., Ing. Jirí Šantrůček CSc. (PřF JU, České Budějovice) a také projektu SGA2010/003, jehož řešitelem byla Bc. Kristina Felcmanová (Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Třeboň).

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že v souladu s 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové 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 výsledky obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 28.4. 2011

.....

Felcmanová Kristina

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala všem, kteří přispěli k úspěšnému dokončení mé diplomové práce, a to především mému školiteli Prof., RNDr. Ondřeji Prášilovi, PhD.; Za jeho rady, pomoc, trpělivost a čas, který mi věnoval. Dále svým kolegům na Mikrobiologickém ústavu v Třeboni za jejich ochotu, vstřícnost a za vytváření příjemného pracovního zázemí. Velký dík patří mé rodině za morální i finanční podporu po celou dobu mého studia. A samozřejmě děkuji svým nejbližším, kteří mi byli vždy oporou.

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>1</b>
1.1 Diazotofie – dosavadní studie	1
1.2 Evoluce sinic a fotosyntézy	1
1.3 Dusík	4
1.4 Enzym nitrogenáza	6
1.5 Strategie fixace dusíku	9
1.5.1 Časová separace	9
1.5.2 Prostorová separace	10
1.5.3 Speciální strategie	10
1.6 Cirkadiánní rytmy, glykogen, cyanophycin	11
1.7 CCM mechanismus	12
1.8 Globální změny a vodní prostředí - acidifikace oceánů	14
<b>2. Metodika</b>	<b>17</b>
2.1 Fotobioreaktor FMT 150	17
2.2 Modelové organismy	18
2.3 Materiál a metody	19
2.3.1 Kultivace	19
2.3.2 CO <sub>2</sub> systém	19
2.3.3 Počet buněk	20
2.3.4 Koncentrace chl <i>a</i> .	20
2.3.5 C/N analýza	21
2.3.6 Acetylene reduction assay	21
2.3.7 Vývoj kyslíku	21
2.3.8 Termoluminiscence	22
<b>3. Výsledky</b>	<b>23</b>
<b>A Metodická část</b>	<b>23</b>
3.1 Kolísání pH	23
3.2 Počty pokusů	24
<b>B Vlastní výsledky</b>	<b>23</b>
3.3 <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	25
3.3.1 Růstová rychlost, OD <sub>735</sub>	25
3.3.2 Koncentrace chl <i>a</i> .	26
3.3.3 Průměr buněk	28
3.3.4 Elementární analýza C a N	29
3.3.5 Fixace N <sub>2</sub>	29
3.3.6 Vývoj O <sub>2</sub>	31
3.4 <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	32
3.4.1 Růstová rychlost, OD <sub>735</sub>	32
3.4.2 Koncentrace chl <i>a</i> .	33
3.4.3 Elementární analýza C a N	35
3.4.4 Fixace N <sub>2</sub>	36
3.4.5 Vývoj O <sub>2</sub>	37
<b>C Noční pokles</b>	<b>38</b>
<b>4. Diskuze</b>	<b>41</b>
4.1 <i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	41
4.2 <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	43
4.3 Denní změny	45
<b>5. Závěr</b>	<b>46</b>
<b>6. Citovaná literatura</b>	<b>47</b>

## **Použité zkratky**

CA	Karbonát dehydratáza
CCM	Koncentrační mechanismus CO <sub>2</sub>
F <sub>M</sub>	Maximální fluorescence
F <sub>t</sub>	Fluorescence v daném čase
F <sub>0</sub>	Minimální fluorescence
PBS	Fykobilizómy
ppm	Parts per million
PSI (II)	Fotosystém I (II)
Q <sub>Y</sub>	Kvantový výtěžek

# 1. Úvod

## 1.1 Diazotrofie – dosavadní studie

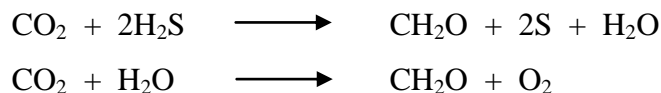
Efekt zvyšující se koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře a jeho dopad zejména na dusík fixující organismy je v posledních letech velmi diskutované téma. Většina studií na toto téma se zabývala sinicí *Trichodesmium*, která dominuje subtropickým a tropickým oligotrofním oblastem oceánů. Tato sinice je nejvíce známým a nejlépe prozkoumaným diazotrofem (Dyhrman and Haley 2005). Odhaduje se, že je zodpovědná za 50% celkové oceánské fixace dusíku (Hutchins et al. 2009). Závěry studií, které pracují s *Trichodesmiem* shodně potvrzují, že s nárůstem koncentrace CO<sub>2</sub> dochází i k nárůstu míry fixace N<sub>2</sub> a také ke zvyšování rychlosti růstu buněk (Chinnasamy et al. 2009, Hutchins et al. 2007, Levitan et al. 2007, Levitan et al. 2009). Pokud by se mohly tyto závěry aplikovat do přirozeného prostředí sinic, znamenalo by to, že tyto organismy budou mít z nových oceánských podmínek prospěch. Už nyní je ale patrné, že ne všechny dusík fixující organismy budou mít ze zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> užitek. Studie provedená na sinici *Nodularia Spumigena* naopak prokázala inhibiční účinek zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na fixaci N<sub>2</sub> a růst buněk (Czerny et al. 2009).

Nově se do popředí zájmu dostávají jednobuněčné sinice (*Cyanothece* sp., *Synechococcus* sp., *Crocospaera watsonii*), o kterých se předpokládalo, že nejsou schopné fixace dusíku. Zjistilo se však, že jsou diazotrofní a že mohou významně přispívat k fixaci dusíku ve vodním prostředí. Na těchto diazotrofech je zkoumán především způsob, jakým dokázaly skloubit proces fotosyntézy a fixace N<sub>2</sub> v jedné buňce, dále cirkadiální rytmy, transkripce fotosyntetických genů a genů pro nitrogenázu. Studie, které by se zabývaly jejich odezvou na zvýšenou koncentraci CO<sub>2</sub>, zatím nebyly provedeny.

## 1.2 Evoluce sinic a fotosyntézy

Sinice jsou prastaré prokaryotické (bezjaderné) fotosyntetické organismy. První záznamy, které potvrzují existenci bakterií na Zemi a jejich počáteční „fotosyntetické“ schopnosti, jsou datovány do období před asi 3,5 miliardami let. Během následné 0,5-1 miliardy let pak došlo k vývoji kyslík vyvíjejících prokaryotických organismů, o kterém svědčí četné fosilní záznamy (Adir 2005). Původní organismy, zelené a purpurové bakterie, si vyvinuly metabolickou dráhu, jež byla předchůdcem dnešní kyslíkové fotosyntézy. Prvotní

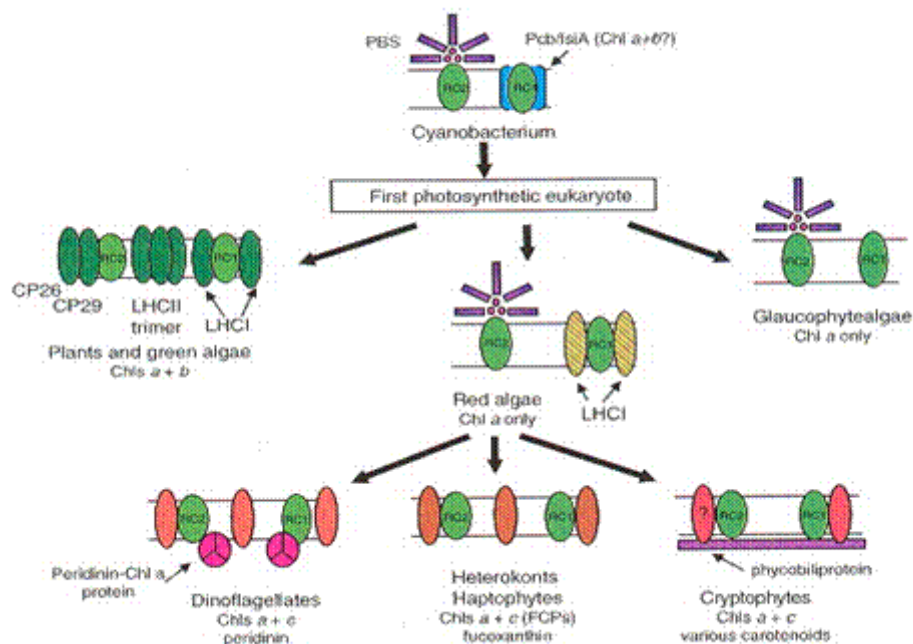
fotosyntetické reakce snad využívaly místo vody sirovodík, protože na jeho oxidaci je potřeba méně energie. Postupně došlo ke zdokonalení původní fotosyntézy a k využití vody jako donoru elektronů.



Vznik kyslík vyvíjející fotosyntézy odstartoval na Zemi rozvoj sinic. Došlo k oxidaci redukováných forem sloučenin v oceánské vodě, k lokálnímu rozvoji aerobní respirace, k přenosu O<sub>2</sub> do atmosféry a k oxidaci redukováných plynů a suchozemské kůry. V atmosféře došlo k nárůstu koncentrace kyslíku, která dosáhla dnešních 21% před 430 miliony let, poté, co nastal rozvoj vyšších rostlin na pevninách. Na počátku rozvoje Země byl CO<sub>2</sub> důležitou součástí atmosféry. Během 3 miliard let jeho koncentrace postupně klesala. CO<sub>2</sub> byl z větší části vyměněn za O<sub>2</sub>, nejprve díky aktivitě mikroorganismů, ale postupně i díky aktivitě řas a vyšších rostlin. Oxygenní fotosyntéza je nejdůležitější mechanismus pro zachycení sluneční energie na Zemi. Chemicky vázaná energie a reductanty generované při světelných reakcích jsou využívány hlavně pro fixaci CO<sub>2</sub>, ale i pro jiné procesy. Fotosyntéza je hlavním procesem cyklické přeměny uhlíku a kyslíku a také pomáhá udržovat plynné složení atmosféry (Fay 1992).

Sinice tak, jak je známe dnes, jsou tedy přímými potomky prvních organismů schopných vyvíjet kyslík. Základní buněčná organizace sinic je charakterizována přítomností intracelulárních membrán, tzv. thylakoidů, které obsahují fotosyntetické pigmenty a které vytváří fotosyntetický aparát buňky. Cytoplazma obvykle obsahuje různé druhy inkluzí.

Fotosyntetická přeměna energie v sinicích je velmi podobná reakci fotosyntézy, která probíhá u eukaryotických řas či rostlin. Zahrnuje kooperaci dvou fotosystémů, PSI a PSII, které jsou spolu propojené pomocí elektronového transportu a díky kterému spolu interagují. Hlavní rozdíl ve fotosyntetickém aparátu sinic, v porovnání se zelenými řasami a rostlinami, je v přítomnosti jedné z největších antén, tzv. fykobilizomu, který je připojen k thylakoidní membráně, respektive přímo k reakčnímu centru fotosystému II (**obr. 1.1**).



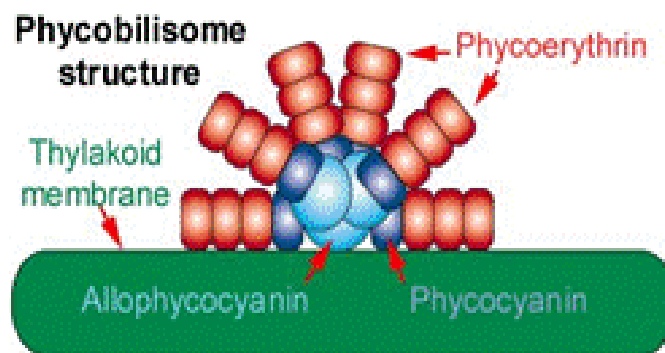
**Obr. 1.1:** Vývoj světlosběrných antén. Sinice, které daly vznik chloroplastu obsahovaly jak fykobilizomy spojené s RC PSII, tak i anténu, která mohla být spojena s PSI. Evolucí prvních fotosyntetických eukaryot vznikly: zelená linie (zelené řasy, rostliny), červená linie (červené řasy) a linie glaukofyt. Zelená linie má LHC vázící Chl a+b, červená pouze Chl a. Fykobiliproteiny se zachovaly pouze v červené linii a u glaukofyt. Jedna nebo více sekundárních endosymbioz zahrnující endosymbionta červených řas dala vznik čtyřem hlavním skupinám řas s Chl a/c v LHC (chromalveoláta). Peridin-Chl a protein byl nalezen jen u obrněnek. (obrázek z Green, 2007).

Hlavní funkcí fykobilizomů je zachytit světelnou energii v rozsahu cca 490-660 nm (Apt et al. 1995), ve kterém neabsorbují chlorofyl *a*. To umožňuje sinicím využít celé spektrum viditelného světla. Z fykobilizomů je zachycená energie přenesena na chlorofyl *a* reakčního centra. Sekundární funkcí PBS je sloužit jako pohotovostní zdroj živin v případě nedostatku dusíku, uhlíku nebo síry (Adir 2005).

Stavba PBS je tvořena dvěma podstrukturami (**obr. 1.2**): 1) jádrem (core), které se nachází blízko povrchu membrány a 2) sérií tyčovitých ramen, které vycházejí z jádra do stromálního prostoru. Obě tyto podstruktury obsahují podjednotky, které kovalentně vážou světlosběrné lineární tetrapyrolové bilinové pigmenty a přídatné podjednotky, které pigmenty postrádají, tzv. spojovací proteiny (Adir 2005). Fykobilizom obsahuje jako světlosběrné pigmenty lineární tetrapyroly, tzv. fykobiliny, které najdeme kromě sinic také u skupiny



eukaryotických řas (ruduchy, skrytěnky a glaukofyta). Fykobiliproteiny se podle spektrálních vlastností rozdělují do čtyř hlavních skupin: 1) Allofykocyanin, který se nachází v jádře (APC,  $\lambda_{\max}=650\text{nm}$ ); 2) Fykocyanin, umístěný na bázi ramen, nejbliže u jádra (PC,  $\lambda_{\max}=620\text{nm}$ ); 3) Fykoerytrin (PE,  $\lambda_{\max}=560\text{nm}$ ); 4) Fykoerytrocyanin (PEC,  $\lambda_{\max}=575\text{nm}$ ); Poslední dva fykobiliproteiny jsou uloženy v ramenech dále od jádra (Adir 2005). Toto uspořádání napomáhá účinnému přenosu zachycené světelné energie směrem k reakčnímu centru. Pokud je energie nejprve zachycena fykoerytrocyaninem, pak odtud postupuje díky energetickému gradientu směrem k jádru fykobilizomu až na allofykocyanin, který energii předává membránovým pigmentovým proteinům, které obsahují molekulu chl *a* (Fay 1992).



**Obr. 1.2:** Struktura fykobilizomu a uspořádání jednotlivých fykobiliproteinů.

Zdá se, že k evoluci fykobilizomů došlo poměrně záhy po vzniku prvních druhů sinic. PBS zvyšují účinnost zachycení záření a sinice tak byly schopné osídlit rozdílné ekologické niky (Adir 2005). Sinice jsou nejvíce zastoupené ve vodním prostředí, žijí jak ve sladkých, tak ve slaných vodách. Stejně tak je ale možné najít i druhy, které žijí např. v půdě. Sinice mohou být volně žijící i symbiotické - ty žijí ve spojení s houbami, jinými řasami, jätrovkami, kapradinami a vyššími rostlinami. V souvislosti s jejich velkou variabilitou mají různé druhy různě přizpůsobený metabolismus; existují sinice anaerobní, mikroaerobní, fakultativně anaerobní, obligátně aerobní. Některé sinice jsou chemotrofní, další fototrofní, jiné autotrofní, nebo i heterotrofní. Podobně jako jiné bakterie, mají sinice různé metabolické vlastnosti a určité druhy dokáží vázat vzdušný dusík.

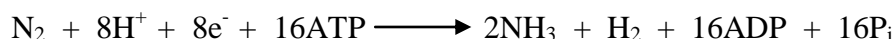
### 1.3 Dusík

Cyklus dusíku je jeden z nejdůležitějších cyklů na Zemi. Hlubokomořský nitrát byl dlouho považován za hlavní zdroj dusíku, který podporuje primární produkci oligotrofních oblastí otevřených oceánů, ale dnešní studie dokazují, že hlavní roli v podpoře oceánské produkce v oligotrofních oblastech má biologická fixace dusíku (Montoya et al. 2004). Biologická fixace dusíku je proces probíhající v určitých prokaryotických organismech. Tyto organismy, zvané diazotrofní, mají schopnost vázat atmosférický dusík a redukovat ho na molekulu amoniaku nebo oxidy dusíku. Tyto formy dusíku jsou dalšími organismy snadněji asimilovány. Tato redukce je možná jen díky přítomnosti enzymu nitrogenáza. Proces fixace plynného dusíku je důležitý pro vstup fixovaného dusíku do terestrických a mořských ekosystémů. Navíc vyvažuje nepřetržitou ztrátu vázaného dusíku v biosféře vzniklou reverzním procesem denitrifikace (Fay 1992). Dostupnost dusíku je důležitý faktor, který určuje primární produkci, a to jak v oceánech, tak v terestrických ekosystémech. Současné odhady globální fixace atmosférického dusíku ekosystémy se pohybují okolo  $195 \text{ Tg N y}^{-1}$ , s rozsahem  $100\text{--}290 \text{ Tg N y}^{-1}$  (Cleveland et al. 1997). Schopnost diazotrofů, získávat buněčný dusík z dusíku přítomného v atmosféře, je jeden z klíčových procesů v biosféře. Právě sinice přispívají k obrovské části celkové biologické produkce v tropických a subtropických oceánech. Uplatňují také významný vliv na globální cyklus živin a uhlíku tím, že dodávají dusík mořskému fytoplanktonu, který umožňuje udržovat stálou koncentraci atmosférického  $\text{CO}_2$  (Hutchins et al. 2007).

Dusík je prvek pro organismy nepostradatelný. Je to hlavní součást mnoha metabolitů a molekul (aminokyseliny, proteiny, nukleové kyseliny, hem, močovina). Největším zdrojem dusíku na Zemi je atmosféra (78%). Ačkoliv je plynný dusík nejhojnější formou, pro většinu organismů zůstává nedostupný. Výjimku tvoří právě diazotrofní mikroorganismy, které si vytvořily mechanismy pro fixaci atmosférického dusíku, viz níže. Většina organismů získává dusík z anorganických (nitrát, nitrit, amoniak) nebo organických (močovina, aminokyseliny) sloučenin dusíku. Tyto sloučeniny se však vyskytují v nízkých koncentracích a proto je koncentrace dusíku limitujícím faktorem pro růst organismů.

Plynný dusík ( $\text{N}_2$ ) je velmi stabilní molekula odolná proti rozštěpení, a to díky trojně vazbě mezi atomy dusíku. Proto fixace a redukce atmosférického dusíku vyžaduje značné množství energie (na jednu redukci  $\text{N}_2$  je potřeba 16 molekul ATP a 8 elektronů, viz reakce níže).

Stechiometrie biologické fixace dusíku (Zehr and Paerl 2008):



Tato reakce je katalyzována enzymem nitrogenáza. Kromě redukce  $\text{N}_2$ , dokáže tento enzym redukovat i látky analogické dusíku, např. acetylen, hydrogen azid, hydrogen kyanid nebo oxidy dusíku (tedy ty, které v molekule mají trojnou vazbu). Z těchto látek je důležitý acetylen, jenž je redukován na etylen. Obě tyto látky lze totiž detekovat na plynovém chromatografu a toho se využívá pro odhad aktivity nitrogenázy, v metodě nazývané „acetylene reduction assay“ (Fay 1992, Zehr and Paerl 2008), viz **kap. 2.3.6**.

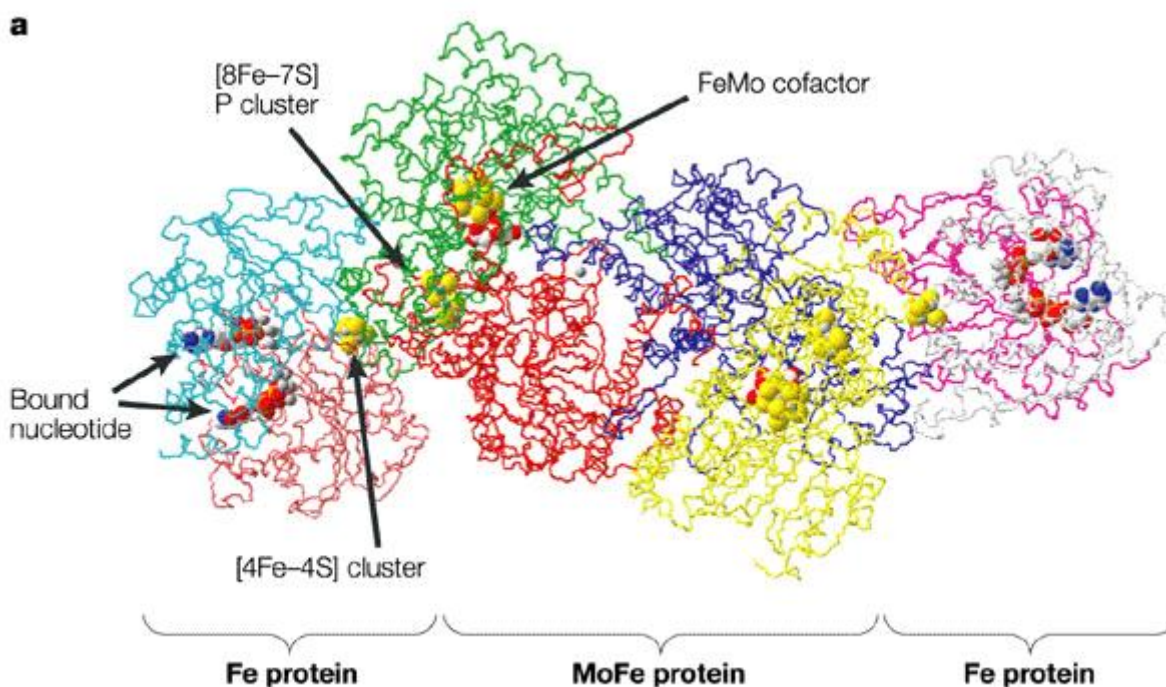
Všechny diazotrofní organismy jsou schopné asimilovat amoniak nebo jiné formy vázaného dusíku (nitrát, močovina, aminokyseliny, atd.) a syntetizovat nitrogenázu jen v případě, že v jejich okolí (v médiu) chybí zdroje dusíku (Fay 1992).

## 1.4 Enzym nitrogenáza

Nitrogenáza je unikátní a evolučně velmi starý enzymatický systém. Hlavní funkcí tohoto enzymu je vázat vzdušný dusík a redukovat jej na amoniak, který je poté zabudován do glutaminu. Tento mechanismus se vyvinul u různých skupin organismů, ale pouze v rámci prokaryot. U eukaryot tento enzym kódován není. Podle fylogenetických analýz jsou veškeré známé varianty enzymu nitrogenázy odvozeny z jednoho předka a katalytická podjednotka enzymu naznačuje, že enzym existoval již před vznikem kyslíkaté atmosféry na Zemi. V mnoha diazotrofech tvoří nitrogenáza cca 10% ze všech buněčných proteinů (Berman-Frank et al. 2003).

Enzym nitrogenáza se skládá ze dvou proteinů – dinitrogenázy a dinitrogenázy reductázy – které od sebe mohou volně disociovat (**obr. 1.3**). Dinitrogenáza (MoFe protein;  $M_r=200-240\text{kDa}$ ) je složena ze dvou párů rozdílných podjednotek  $2\alpha$  a  $2\beta$ . Tyto podjednotky jsou kódovány *nifD* a *nifK* geny (Sherman et al. 1998). Dinitrogenáza obsahuje čtyři (4Fe-4S) clustry (P clustry) a dvě molekuly MoFe-kofaktoru (FeMoCo centrum). Dochází zde k navázání substrátu a je hlavním proteinem provádějícím vlastní redukci (Sherman et al. 1998). Některé organismy syntetizují alternativní dinitrogenázu, která místo molybdenu obsahuje vanad nebo železo. Tyto alternativní nitrogenázy jsou však vzácné a nacházejí se jen u diazotrofních organismů s heterocysty (Berman-Frank et al. 2003). Vanad byl prokázán jen u sinice *Anabaena variabilis* a *Anabaena azotica* (Zehr and Paerl 2008). Organismy schopné

syntézy alternativní nitrogenázy vlastní i klasickou nitrogenázu obsahující Mo a alternativní nitrogenázu syntetizují jen v podmínkách nedostatku molybdenu (Stal et al. 2008). Navíc katalická účinnost alternativních nitrogenáz je nižší než u těch klasických, a to až 1,5krát (Berman-Frank et al. 2003). Dinitrogenáza reduktáza (Fe protein; Mr=57-72) je dimer složený ze dvou identických podjednotek s jedním (4Fe-4S) clusterem a je kódována *nifH* geny (Falcón et al. 2004). Fe protein slouží jako specifický reduktant dinitrogenázy, váže ATP (Sherman et al. 1998) a přenáší elektrony na hlavní protein. Tato podjednotka je extrémně citlivá na kyslík, který způsobuje její inhibici. Inaktivovány jsou přímo 4Fe-4S a P clustery.



**Obr. 1.3:** Struktura enzymu nitrogenázy (internetový zdroj 1.1).

Fixace vzdušného dusíku je regulována na úrovni syntézy a aktivity nitrogenázy. Syntéza enzymu je navíc pod úzkou metabolickou kontrolou (Gallon 1992). Více než 17 *nif* genů bylo identifikováno v bakterii *Klebsiella pneumoniae*. Tři z nich, strukturální geny *nifHDK*, kódují komponenty nitrogenázového komplexu. Tyto geny jsou v jednotlivých kopiích přítomny v bakteriálním genomu (Zehr and Paerl 2008, Fay 1992), a spolu s produkty jejich asociovaných genů jsou pod pevnou regulovanou kontrolou (Sherman et al. 1998). Ve většině případů spolu sousedí a exprimují se jako jeden operon. Množství transkriptů jednotlivých genů se může lišit v důsledku četných startovních míst na transkriptu nebo v důsledku

zpracování RNA. To má důležitost pro stanovení aktivity diazotrofů pomocí *nifH* nebo *nifD* genové exprese v oceánech a dalších ekosystémech (Zehr and Paerl 2008).

Enzym nitrogenáza je v přítomnosti molekulárního kyslíku a reaktivních kyslíkových sloučenin nevratně inhibován. Kyslík nejenže ovlivňuje strukturu proteinu, ale také inhibuje jeho samotnou syntézu. Tato represe může být buď přechodná, nebo trvalá. Zvyšování koncentrace kyslíku v atmosféře a oxygenní stres způsobil u diazotrofních organismů vývin široké škály mechanismů, které zabraňují inhibici nitrogenázy. Ve většině mikroorganismů může být ve stejný čas aktivních více mechanismů najednou. Mechanismy zahrnují (Sherman et al. 1998; Gallon 1992): (a) únik z kyslíkatého prostředí. Striktně anaerobní sinice, jako jsou fotosyntetické sirmé bakterie (*Chlorobium*, *Chromatium*) nerostou v přítomnosti kyslíku, ať už jsou schopné fixovat dusík nebo ne. Podobnou strategii najdeme u sinice *Klebsiella pneumoniae* a purpurových fotosyntetických bakterií (*Rhodobacter capsulatus*), jež mohou růst v přítomnosti kyslíku, avšak fixovat dusík mohou, jen pokud žijí v anaerobním nebo mikroaerobním prostředí; (b) kontrola difuze kyslíku. Specializované buňky zvané heterocysty se speciální stavbou buněčné stěny viz níže, **kap. 1.5.2**; (c) spotřeba kyslíku metabolickou cestou. Jakákoli metabolická reakce, která sníží intracelulární koncentraci kyslíku, ulehčuje fixaci  $N_2$ . Příkladem je spotřeba kyslíku dýcháním, které navíc generuje ATP.; (d) změna konformace (e) kovalentní modifikace. V mnoha diazotrofech je aktivita nitrogenázy pravděpodobně regulována reversibilní kovalentní ADP-ribosylací Fe proteinu. Pokud dojde k jeho ribosylaci, Fe protein se nemůže navázat na MoFe protein a ve výsledku je fixace  $N_2$  inhibována; (f) trvalá syntéza nitrogenázy. Diazotrofní sinice jsou schopné si udržet konstantní úroveň aktivní nitrogenázy uvnitř buněk tím, že vyrovnávají množství enzymu inaktivovaného kyslíkem stejným množstvím nově nasyntetizovaného, aktivního enzymu.; (g) prostorová separace.

V mnoha diazotrofech má kyslík na fixaci dusíku přínosný efekt. Jako terminální elektronový akceptor v procesu aerobní respirace, přítomnost  $O_2$  stimuluje oxidativní fosforylaci a tím zdroj ATP pro syntézu a aktivitu nitrogenázy. Jaké je ale optimum koncentrace kyslíku není jisté. Některé druhy sinic vykazují značně vyšší toleranci než jiné druhy. Za jistých podmínek se může situace změnit a nitrogenáza dokáže kyslík redukovat. Stane se tak, pokud je koncentrace nitrogenázy 4krát vyšší než  $O_2$  (Gallon 1992).

Úroveň odolnosti a měnící se mechanismy ochrany nitrogenázy měly vliv na separaci a vznik různých nik. Sinice se nacházejí jak v anaerobním sedimentu, tak v pelagických vodách bohatých na kyslík. Z fylogenetických stromů vytvořených podle fosilních rekonstrukcí a využívajících funkční geny zahrnuté do fixace dusíku (především gen *nifH*)

vyplývá, že veškeré adaptace se vyvinuly z anaerobních diazotrofních organismů (*Phormidium*, *Lyngbya lagerheimii*, *Pseudanabaena* PCC7403), (Berman-Frank et al. 2003). Sinice jsou jedinými dusík fixujícími organismy, které produkují kyslík jako vedlejší produkt fotosyntézy a které musí skloubit mechanismy oxygenní fotosyntézy a na kyslík citlivé fixace dusíku uvnitř jedné či více buněk. Tyto strategie lze rozlišit na dva hlavní způsoby adaptace, a to na prostorovou separaci, kdy fixace dusíku a fotosyntéza probíhá současně, ale v jiných buňkách, a časovou separaci, kdy fixace dusíku a fotosyntéza probíhá v jiném časovém intervalu.

## 1.5 Strategie fixace dusíku

### 1.5.1 Časová separace

Časová separace byla pozorována u sinic, které nejsou schopné si vytvořit heterocysty. Mohou být jak vláknité (*Lyngbya*, *Symploca*), tak jednobuněčné (*Crocospaera*, *Cyanothece*, *Gloeothece*, *Synechocystis* sp.). Tyto organismy fixují dusík pouze v noci a nitrogenáza je obsažena ve všech buňkách (**obr. 1.4**). Protože neobsahují diferenciované buňky podobné heterocystům, (viz níže), obecně se myslelo, že takové organismy nejsou schopné fixace dusíku (Bergman et al. 1997). Fixace dusíku zde probíhá ve vegetativních buňkách, které si na rozdíl od heterocystů ponechaly Rubisco a fykobiliproteiny, schopnost růstu a dělení. V přítomnosti amoniaku jsou schopné navrátit svůj metabolismus do původního „nediazotrofního“ stavu (Berman-Frank et al. 2003).

Jednobuněčné formy jsou schopné fixace dusíku jak v aerobních podmínkách (poprvé bylo zaznamenáno u sinice *Gloeothece* a *Apanothece pallida*), tak v anoxických podmínkách (*Synechococcus*, *Chroococcidiopsis*, *Dermocarpa*, apod.), (Bergman et al. 1997). V dnešní době se tyto sinice dostávají do popředí vědeckého zájmu, protože představují podstatnou část fixace mořského dusíku v tropických oceánech (Dyhrman et al. 2006, Montoya et al. 2004, Stal 2003, Taniuchi et al. 2008). Díky molekulární biologii, pomocí které se vyhodnotila exprese genu *nifH*, došlo k identifikaci dvou typů sekvencí genů *nifH*, podle kterých se jednobuněčné sinice rozdělují do dvou skupin – A a B. Skupina A je blízká skupině *Cyanothece*, zatímco skupina B je více podobná sinici *Crocospaera watsonii* WH 8501 (Dyhrman et al. 2006).

Vláknité sinice fixují dusík v aerobních podmínkách (*Trichodesmium*, *Oscillatoria* sp., *Lyngbya majuscula*) a také v mikro-oxickém a anoxickém prostředí (*Phormidium foveolarum*, *Plectonema boryanum*), (Bergman et al. 1997).

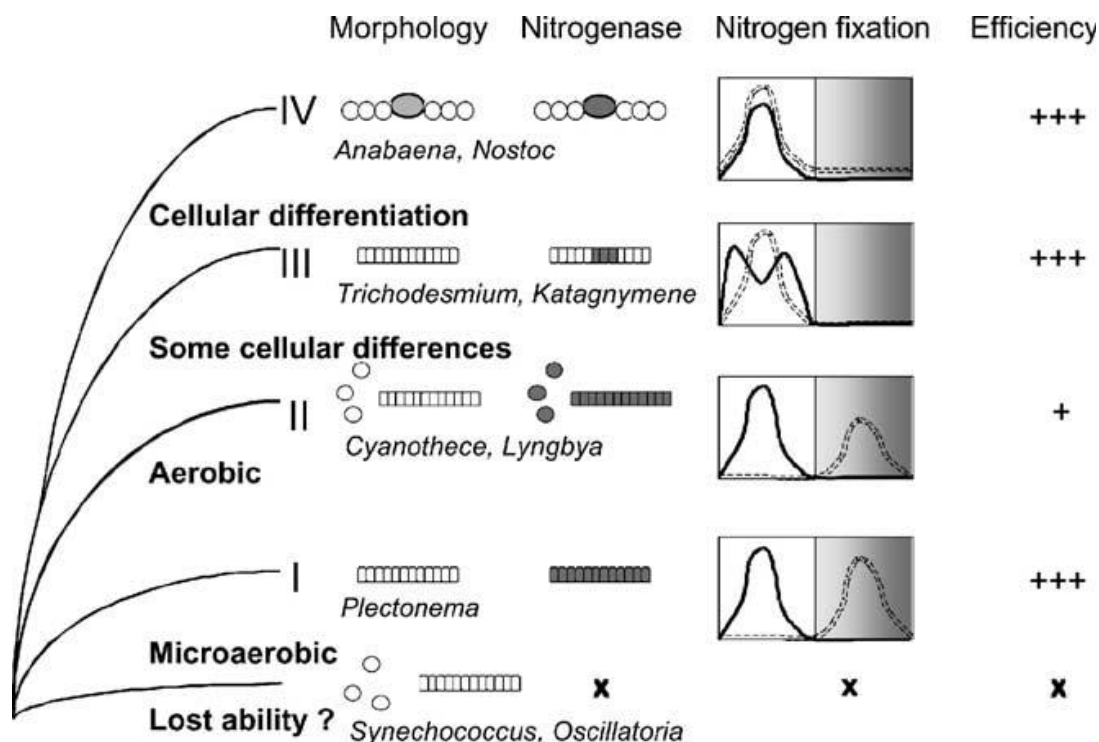
### 1.5.2 Prostorová separace

Příkladem prostorové separace je vznik specializovaných buněk, tzv. heterocystů, u některých diazotrofních organismů (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*). Tyto diferenciované buňky, vzniklé z vegetativních buněk, poskytují vhodné prostředí pro fungování nitrogenázy (**obr. 1.4**). Nejsou fotosynteticky aktivní, nefixují CO<sub>2</sub> ani neprodukují O<sub>2</sub>, zvyšují příjem kyslíku a ztratily schopnost dělení (Berman-Frank et al 2003). Metabolické změny doprovázející vznik heterocystů jsou nevratné a v přítomnosti amoniaku se nediferencují zpět na vegetativní buňky, jako je tomu v případě sinic bez heterocystů. Na povrchu heterocystů je silná buněčná stěna tvořená glykolipidy, která zabraňuje difuzi kyslíku a tím uvnitř udržuje anoxické prostředí, ideální pro nitrogenázu (Bergman et al. 1997). Navíc byla v buněčné stěně heterocystů i vegetativních buněk zjištěna přítomnost membránově vázané mangan-superoxid dismutázy (MnSOD), která chrání jak fotosyntetický aparát, tak nitrogenázu před oxidativním poškozením (Zhao et al. 2007). Z výsledků práce Zhao et al. 2007 vyplývá, že reaktivní sloučeniny kyslíku produkované v heterocystech způsobují inaktivaci nitrogenázy v případě, že MnSOD chybí. Zástupci sinic vlastních heterocysty jsou především terestriční. Dále obývají sladké vody, pobřežní vody eutrofní nebo brakické (např. Baltské moře), vyskytují se i jako epyfity a symbionti. Velmi málo druhů se nachází na otevřených oceánech.

### 1.5.3. Speciální strategie

Speciální mechanismus, který kombinuje předchozí dvě adaptace, byl nalezen v sinici *Trichodesmium*. Tato mořská vláknitá sinice nemá schopnost tvorby specializovaných buněk pro uchování nitrogenázy. Enzym se nachází v každé buňce ve vláknu ve formě malých kompartmentů (**obr. 1.4**). Mechanismus ochrany nitrogenázy je komplex interakcí mezi prostorovou a časovou separací, na kterém se podílejí cirkadiánní rytmy a řízené odpojování fykobilisomových antén pro zmenšení fotosyntetické aktivity v čase fixace N<sub>2</sub>. Ty kontrolují transkripci nitrogenázy a expresi fotosyntetických genů, které jsou nezbytné pro aktivaci fotosystémů I a II. Časová separace hraje důležitou roli jak u genů, tak mezi procesy

fotosyntézy a fixace dusíku. Nejvyšší míry fixace dusíku je u této sinice dosaženo v čase nejvyšší intenzity světla, kdy nastává pokles hrubé fotosyntetické produkce. Zároveň dochází ke zvýšení spotřeby O<sub>2</sub> (Berman-Frank et al. 2003).



**Obr. 1.4:** Morfologické adaptace umožňující sinicím fixaci dusíku. Buňky zvýrazněné šedou barvou znázorňují lokalizaci nitrogenázy a černá plná křivka v grafech označuje míru fixace dusíku. Proces fotosyntézy je symbolizován dvojitou přerušovanou křivkou. Některé sinice schopnost fixace N<sub>2</sub> ztratily (spodní část). Jiné sinice (např. *Plectonema*) jsou schopné fixovat N<sub>2</sub> jen v mikro-aerobních podmínkách (I), další pak fixují dusík během temnotní fáze, pokud žijí v periodických podmínkách světlo/tma (II). U dvou skupin se vyskytuje buněčná specializace (III a IV). Skupina III fixuje N<sub>2</sub> během světelné fáze a nitrogenáza se v buňkách vyskytuje ve formě malých frakcí. Skupina IV zahrnuje všechny sinice tvořící heterocysty, ve kterých se nachází nitrogenáza a ve kterých dochází k fixaci N<sub>2</sub>, a to během světelné fáze.

## 1.6 Cirkadiánní rytmy, glykogen, cyanophycin

Významným objevem u prokaryot bylo zjištění výskytu cirkadiánních rytmů, které jsou velmi podobné těm, které mají eukaryota. Tyto rytmy si ponechávají charakteristické rysy: v konstantních podmínkách volně běží s danou periodou, jejich fáze jsou dány světlem nebo tmou a projevují teplotní kompenzaci. Tyto cirkadiánní rytmy byly pozorovány v sinicích



*Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechococcus* RF-1 a *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (Sherman et al. 1998) a je jimi ovlivněna především exprese a transkripce genů, které se účastní procesů fixace dusíku a fotosyntézy.

Buňky fixující vzdušný dusík jsou vyplněny velkými granulemi, které obsahují karbohydráty ve formě glykogenu. Bylo zjištěno, že množství těchto granulí vykazuje cirkadiální oscilaci. Formují se v průběhu dne, během procesu fotosyntézy, kdy jejich množství v buňce stoupá. Nejvyššího počtu dosahují na počátku temnotní fáze a poté velmi rychle mizí. Tento výsledek, ke kterému došel Sherman et al. 1998, naznačuje, že glykogen by mohl být využíván jako substrát pro respiraci.

V buňkách, které obsahují nitrogenázu, byla nalezena ještě jedna sloučenina, jež stejně jako granule glykogenu vykazuje každodenní oscilaci, a to jak v akumulaci, tak i v lokalizaci. Jedná se o cyanophycin. Je to neribozomálně syntetizovaný polymer, který slouží k ukládání dusíku. Tato sloučenina je složena z aminokyselin, a to zejména z asparaginu a argininu. Cyanophycin se hromadí v buňkách, které trpí nedostatkem specifických makro- a mikroprvků. Naopak jeho koncentrace klesá, pokud buňka nemá dostatek dusíku. V době, kdy je aktivita nitrogenázy nejvyšší, začíná se cyanophycin akumulovat a vytváří malé až střední granule uvnitř cytoplazmy. Po zbytek temnotní fáze se zvětšují a jejich počet narůstá. Během světelné fáze se počet cyanophycinových granulí začíná snižovat. Na jejím počátku jsou velmi nápadné, ovšem mizí, když je cyanophycin zužitkován. Z tohoto pozorování byla odvozena hypotéza, že tento polymer může hrát klíčovou roli v ukládání a využívání dusíku v diazotrofních sinicích (Sherman et al. 1998).

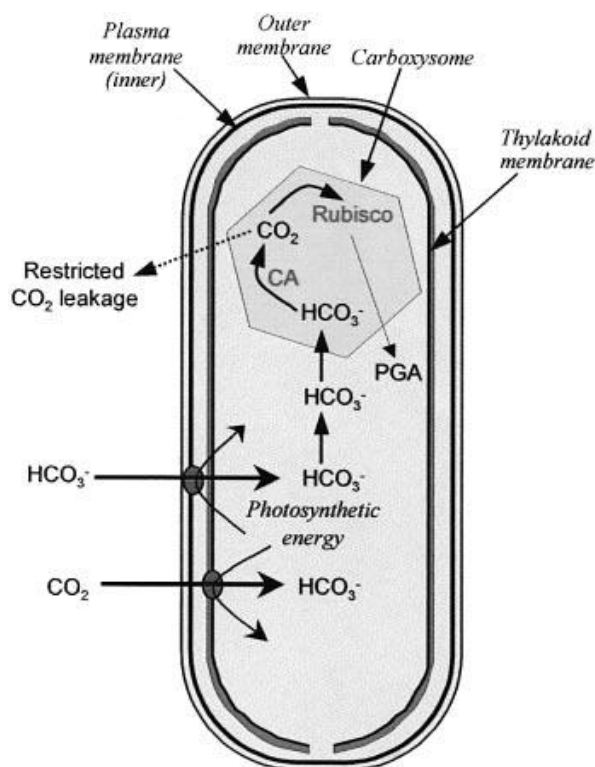
## 1.7 CCM mechanismus

Změna plynného složení zemské atmosféry měla také obrovský vliv na vývin strategií, jak efektivně získat anorganický uhlík (C<sub>i</sub>) pro fotosyntézu. Úroveň koncentrace atmosférického CO<sub>2</sub> v období, kdy došlo ke vzniku sinic, byla pravděpodobně 100krát větší než dnes. Tyto podmínky společně s nízkou koncentrací O<sub>2</sub> znamenaly, že původní prokaryota nepotřebovala pro dosažení efektivní fotosyntézy žádný energeticky náročný mechanismus pro koncentraci uhlíku (Carbon Concentrating Mechanism – CCM). K rozvoji CCM došlo až se snížením koncentrace CO<sub>2</sub> a zvýšením množství kyslíku v atmosféře, což způsobilo, že CO<sub>2</sub> se stalo limitujícím zdrojem pro fotosyntézu a došlo také ke zvýšení oxygenázové aktivity Rubisca (Badger and Price 2002, Giordano et al. 2005).

Sinice si tedy vytvořily koncentrační mechanismus  $\text{CO}_2$  (CCM) pro zlepšení karboxylace jejich doposud relativně neúčinného Rubisca. CCM je nejspíše nejefektivnější mechanismus řešení tohoto problému. V okolí aktivního místa Rubisca totiž dokáže zvýšit koncentraci  $\text{CO}_2$  až 1000krát (Badger and Price 2002). Nejdůležitější součástí mechanismu CCM u prokaryot je karboxyzom (**obr. 1.5**), proteinový mikrokompartment v buňce s bílkovinným obalem, který obsahuje Rubisco společně s karbonát dehydratázou (CA). Tento enzym je jedním z nejrychlejších známých enzymů a jeho funkcí je přeměnit nahromaděný  $\text{HCO}_3^-$  na  $\text{CO}_2$ .

Uhlík se z vodního prostředí do buňky dostává buď ve formě  $\text{HCO}_3^-$  nebo ve formě  $\text{CO}_2$ .  $\text{HCO}_3^-$  dovnitř vstupuje přes cytoplazmatickou membránu pomocí přenašečů za spotřeby ATP. Naopak  $\text{CO}_2$ , protože nemá náboj, prochází přes CM pasivně, difuzí. Uvnitř buňky, v cytosolu, je přeměněn na  $\text{HCO}_3^-$ , a ten je dopraven do karboxyzomu, kde je pomocí enzymu karbonát dehydratáza přeměněn na  $\text{CO}_2$ . Tvorba  $\text{CO}_2$  spřaženého se sníženou difuzí odtoku z karboxyzomu, pravděpodobně vyvolanou bílkovinným obalem karboxyzomu, vede ke zvýšení koncentrace  $\text{CO}_2$  okolo aktivního místa na Rubisco (Smith and Ferry 2000). Substrát karboxyzomu,  $\text{HCO}_3^-$ , je akumulován v cytosolu pomocí mnoha aktivních  $\text{CO}_2$  a  $\text{HCO}_3^-$  přenašečů. Ty jsou lokalizovány na plazmatické i thylakoidní membráně (Badger and Price 2002). Zvýšení koncentrace  $\text{CO}_2$  v blízkosti Rubisca zvyšuje karboxylázovou aktivitu enzymu a minimalizuje ztráty způsobené oxygenázovou činností Rubisca.

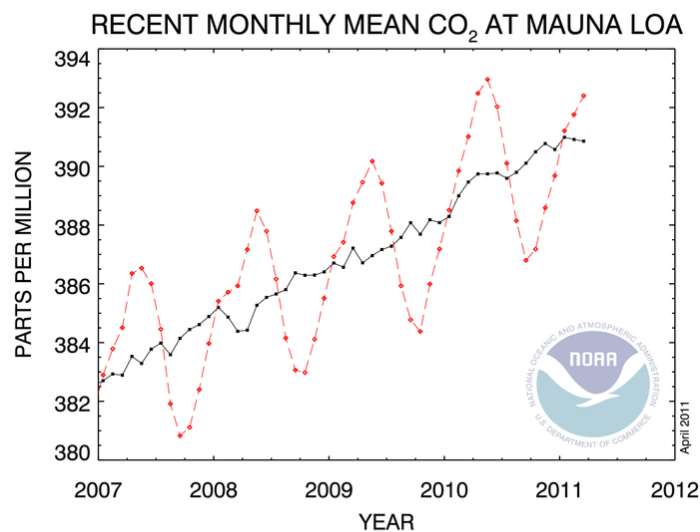
Zvýšení koncentrace  $\text{CO}_2$  v místě karboxylace má biologický význam: 1) aktivuje Rubisco; 2) kompenzuje relativně nízkou afinitu enzymu k  $\text{CO}_2$ , snižuje inhibici fotosyntézy kompeticí o kyslík a tím také snižuje fotorespiraci a kompenzační bod  $\text{CO}_2$ ; 3) silné transmembránové toky  $\text{C}_i$  mohou mít roli v disipaci přebytečné světelné energie a v udržení vnitřního pH. Jakýkoliv faktor, který ovlivní rovnováhu mezi vnějšími a vnitřními toky anorganického uhlíku významně změní úroveň vnitřního  $\text{C}_i$  poolu a tím i míru karboxylace (Kaplan and Reinhold 1999).



**Obr. 1.5:** Model transportu anorganického uhlíku a akumulace CO<sub>2</sub> v buňkách sinic (Giordano et al. 2005).

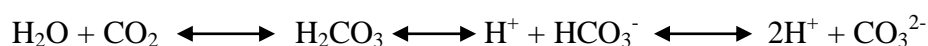
## 1.8 Globální změny a vodní prostředí - acidifikace oceánů

Klíčové druhy fytoplanktonu přispívající k primární produkci oceánů a globálnímu biogeochemickému cyklu prvků mohou být přímo i nepřímo významně ovlivněny antropogenním zvýšením koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře; 1) přímo - zvýšenou dostupností CO<sub>2</sub>, acidifikací mořské vody v důsledku posunu rovnováhy rozpuštěných forem anorganického uhlíku v mořské vodě, 2) nepřímo - zvýšením teploty vody a s tím spojenou limitací živinami (Levitan et al 2010). Dnes je koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře 390ppm (**obr. 1.6**).



**Obr. 1.6:** V grafu jsou vyneseny průměrné měsíční koncentrace CO<sub>2</sub> měřené na havajské stanici Mauna Loa (internetový zdroj 1.2).

Povrch oceánu nyní absorbuje až ¼ CO<sub>2</sub> emitovaného do atmosféry v důsledku lidské aktivity (Czerny et al 2009, Feely et al 2009). Antropogenní vzrůst koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře zvyšuje množství rozpuštěného CO<sub>2</sub> ve vodě (Levitan et al 2007). Jak se CO<sub>2</sub> rozpouští v mořské vodě, reaguje s ní za vzniku kyseliny uhličitě. Ta se následně rozpadá na proton a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, který se dále štěpí na dva protony a CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>:



Předpokládá se, že v roce 2100 dosáhne koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře 750-1000ppm. Takovýto posun bude mít významný vliv na množství rozpouštěného CO<sub>2</sub> ve vodě a změny v dostupnosti anorganického uhlíku. Dojde k posunu v rovnováze mezi CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> tak, že koncentrace HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> se zvýší, zatímco koncentrace CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> se sníží (Beardall et al 2009). Dojde tedy ke snížení pH a tím se zvýší kyselost v oceánech. Zatímco dnes je průměrné pH povrchové vrstvy oceánu 8,1, tak v roce 2100 by pH mohlo poklesnout na 7,8. Předpokládá se, že některé fotosyntetické organismy by z těchto podmínek mohly mít prospěch. A to zejména ty druhy, které jsou schopné CO<sub>2</sub> přijímat jen difuzí, ale i druhy využívající mechanismu aktivního příjmu HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> nebo CO<sub>2</sub> cestou CCM, neboť se jim sníží energetické nároky na transport anorganického uhlíku do buněk (Beardall et al 2009).

Oceánský cyklus uhlíku je úzce spjat s cykly dalších důležitých prvků, jako je dusík, fosfor a křemík. Je pravděpodobné, že obohacování oceánu o antropogenní CO<sub>2</sub> a následné okyselení bude mít obrovské důsledky pro biogeochemické cykly prvků. Příkladem je cyklus dusíku, který může na zvýšenou koncentraci CO<sub>2</sub> reagovat zvyšující se globální fixací dusíku i zvyšující se denitrifikací, zatímco proces nitrifikace by mohl být redukován (Hutchins et al. 2009). Odhad budoucí situace je ale komplikovaný, neboť současně s nárůstem koncentrace CO<sub>2</sub> dojde pravděpodobně i ke zvýšení teploty povrchové vrstvy oceánů a tím i ke zvýšení stratifikace (a tedy ke snížení promíchávání). Tím bude horní fotická vrstva ochuzena o živiny. Rozloha oligotrofních, na živiny chudých oblastí oceánů se tím zvětší a zvýší se význam diazotrofie jako zdroje nového dusíku pro tamní ekosystémy.

## 2. Metodika

V mých experimentech v této práci jsem pro růst a sledování diazotrofních sinic používala fotobioreaktory FMT 150 od firmy PSI (Photon System Instrument, Brno). Jednalo se o standardní systém s kyvetou o objemu 300ml a o nový přístroj s kyvetou o objemu 1000ml, který jsme vyvinuli společně s firmou v rámci projektu Norské fondy „How will climate change affect aquatic photosynthetic production?“. Tyto přístroje fungují jako uzavřené systémy, ve kterých lze sledovat změny fyziologie buněk.

### 2.1 Fotobioreaktor FMT 150

Součástí fotobioreaktoru (**obr. 2.1, 2.2**) je kyveta o objemu 1l, respektive 300ml, do které

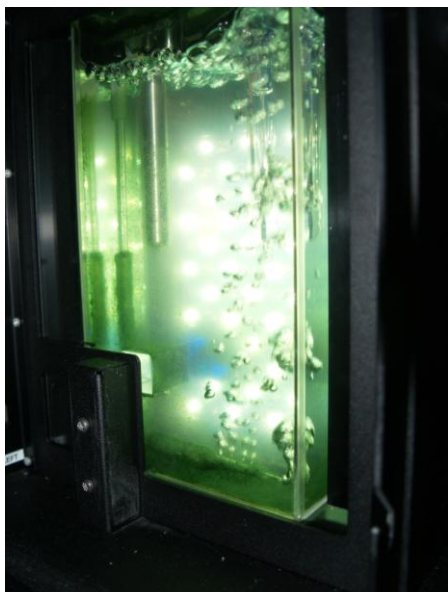


byla ve sterilním prostředí přenesena předpěstovaná kultura buněk. Do kyvety bylo zavedeno bubláni vzduchu, respektive bubláni se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (900ppm). Dále byly uvnitř umístěny dvě elektrody pro měření pH, teploty a množství vyprodukovaného kyslíku. V prostoru před a za kyvetou je zabudován panel s bílými LED diodami. Stálost teploty zajišťovala zabudovaná termoregulace.

**Obr. 2.1:** Fotobioreaktor FMT 150 (firma PSI, Brno).

Pro zdokonalení vlastností kyvety byl její vnitřek potažen teflonem (dílny Mikrobiologického ústavu v Třeboni), který zabraňuje korozi a tím i uvolňování nevhodných látek do média s kulturou, které by mohly negativně ovlivnit výsledky měření.

Software fotobioreaktoru, na jehož rozvoji a jeho následném zdokonalení jsme se také podíleli, umožňuje kontinuální sledování kultury, kontinuální měření základních fluorescenčních parametrů ( $Q_Y$ ,  $F_t$ ,  $F_M$ ), měření optické hustoty při 730nm a při 680nm, měření pH, množství kyslíku a aktuální teploty. Software byl navržen tak, aby bylo možné co neoptimálněji simulovat podmínky přirozeného prostředí sinic. Upravili jsme software způsobem, aby řídil osvětlení tak, že vedle kontinuální intenzity lze simulovat denní průběh záření. Intenzita světla se mění sinusově, kdy na počátku a konci fotoperiody na kulturu dopadá minimální záření, zatímco v pravé poledne je intenzita záření nejvyšší.

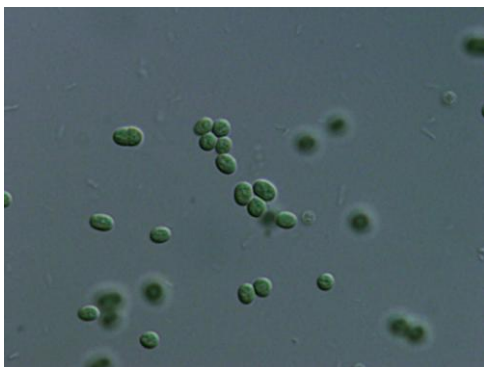


**Obr. 2.2:** Detail kyvety fotobioreaktoru.

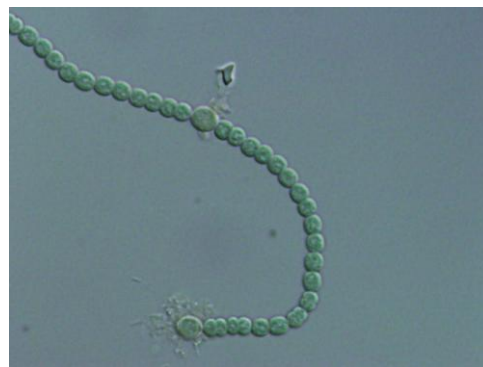
## 2.2 Modelové organismy

Kultury diazotrofních sinic použité v této práci byly vybrány v závislosti na jejich strategii fixace dusíku (viz **kap. 1.5**). Jako modelový organismus jednobuněčných sinic byla vybrána *Cyanothece* sp. ATCC 51142 (**obr. 2.3 A**), která procesy fixace dusíku a fotosyntézy odděluje v čase. Pro vláknité sinice tvořící heterocysty byla jako zástupce zvolena *Anabaena* sp. PCC 7120 (**obr. 2.3 B**), která oba zmíněné procesy oddělila prostorově.

**A**



**B**



**Obr. 2.3 A-B:** (A) Jednobuněčná sinice *Cyanothece* sp. ATCC 51142, (B) vláknitá sinice *Anabaena* sp. PCC 7120.

## 2.3 Materiál a metody

### 2.3.1 Kultivace

Kulturu *Cyanothece* sp. ATCC 51142 jsme získali z laboratoře doc. Nedbala (USBE AVČR Nové Hrady). Zásobní kultura č. 1 byla pěstována v mediu ASP2 při teplotě 30°C v režimu 12:12 (L:D) s minimální intenzitou záření 12  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a s maximem intenzity záření 126  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Bublána byla vzduchem. Zásobní kultura č. 2 byla pěstována při stejných podmínkách, avšak bublána byla vzduchem obohaceným o CO<sub>2</sub> (900 ppm), což mělo za cíl simulovat pravděpodobné podmínky budoucí zemské atmosféry. Z těchto kultur byly vytvořeny 4 varianty experimentů, viz **tabulka 2.1**.

**Tab. 2.1:** Přehled vytvořených experimentů. Medium ASP2 (BG11) -N je ochuzeno o nitráty.

Varianta č.	Medium	Plyn
1	+N	Vzduch
2	-N	Vzduch
3	+N	CO <sub>2</sub>
4	-N	CO <sub>2</sub>

Kultura sinice *Anabaena* sp. PCC 7120 byla získána z laboratoře prof. G.Hausky (Univerzita v Řezně, Německo). Stejně jako u předchozí kultury, byly kultivovány dvě zásobní kultury, které byly bublány vzduchem, respektive vzduchem se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (900ppm). Kultury byly pěstovány v mediu BG11 při 28°C v režimu 12:12 (L:D) s minimální intenzitou záření 12  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  a s maximem intenzity záření 126  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Varianty experimentů viz **tabulka 2.1**.

### 2.3.2. CO<sub>2</sub> systém

Modul pro přípravu vzduchu o dané koncentraci CO<sub>2</sub> (900ppm) byl tvořen skleněnou trubicí o délce 2 m a průměru 5 cm naplněnou Warburgovým pufrem č.9 o koncentraci 0,3M. Vzduch byl vháněn pod tlakem do spodní části svisle umístěné trubice, kde po průchodu tryskou tvořila proud drobných bublin, přes jejichž relativně velký povrch dochází k rychlé difúzi CO<sub>2</sub> mezi probublávaným vzduchem a pufrem. Warburgův pufr je tvořen dvojicí uhličitanů Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a NaHCO<sub>3</sub>, v našem případě o koncentraci 0,3M a počátečním poměru Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a



NaHCO<sub>3</sub> 45:255. Vzduch probublávaný pufrem o tomto složení měl počáteční koncentraci CO<sub>2</sub> zhruba 800 ppm. Ta byla před vstupem do bioreaktoru měřena infračerveným analyzátozem CO<sub>2</sub> S151 (firma Quibit systems) a průběžně upravována přidáváním NaHCO<sub>3</sub> na požadovanou koncentraci. Vzduch pro variantu neobohacenou CO<sub>2</sub> byl probubláván přes destilovanou vodu.

### 2.3.3 Počet buněk

Pro zjištění počtu buněk v 1ml jednobuněčné sinice *Cyanothece* sp. ATCC 51142 bylo využíváno přístroje Coulter Counter, Multisizer 3 (Beckman USA). Počty buněk byly měřeny každý den v čas, kdy byla kultura ve fázi pravého poledne, dopadala na ni tedy maximální nastavená intenzita záření.

Pro počítání buněk u sinice *Anabaena* sp. PCC 7120 jsem musela použít jinou metodu, protože Coulter Counter nedokáže počítat vláknité sinice. Počítala jsem jednotlivé buňky ve vlákních. Počítání jsem prováděla pod mikroskopem (Olympus BX 41) v Bürkerově komůrce, v době, kdy kultura byla ve fázi pravého poledne. Bürkerova komůrka je čtverec rozdělený na několik menších čtverců. Spočítala jsem buňky z náhodně vybraných 16ti čtverců a pro zjištění počtu buněk v 1 ml jsem použila následující vzorec:

$$[\text{Počet buněk}/(\text{Počet čtverců} \cdot \text{obsah čtverce}) \cdot \text{objem čtverce}] \cdot 1000$$

Růstovou rychlost kultur jsem vypočítala podle vzorce (Wood et al. 2005):

$$r = [\ln(N_0 - N_t)] / \Delta t$$

### 2.3.4 Koncentrace chl *a*

Buňky byly v každém experimentu filtrovány přes GF3 filtry (Whatman, USA), extrahovány v 80% acetonu a uskladněny ve tmě po dobu 2 hod při teplotě -20°C. Filtry s buňkami byly poté rozdrceny homogenizérem (firma Glas-Col) a suspenze byla stočena v centrifuze 5804R (firma Eppendorf) při 10000 ot/min po dobu 15 min při 4°C. Při centrifugaci dojde k oddělení peletu (sedimentu) a supernatantu, který byl odebrán a následně proměřen ve spektrofotometru UV 500 (firma ChromSpec) při vlnových délkách 350-800 nm. Koncentrace chl *a* byla stanovena dle vzorce (Porra et al. 1989):

$$\text{Chl}a = 12,25A_{663,5} - 2,55A_{646,5}$$

### 2.3.5 C/N analýza

Buňky byly zachyceny na GF/F filtrech (Whatman, USA), které se před použitím vyžihaly v keramické peci (firma Elektrické pece Svoboda) při 450°C po dobu 3 hod. Filtry s buňkami se poté v Petriho misce nechaly 2 hod sušit při teplotě 105°C a následně byly ve sterilním prostředí zabaleny do cínových kapslí a zanalyzovány na přístroji CHNS Elemental Analyzer vario MICRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany), (katedra Biologie ekosystémů, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity).

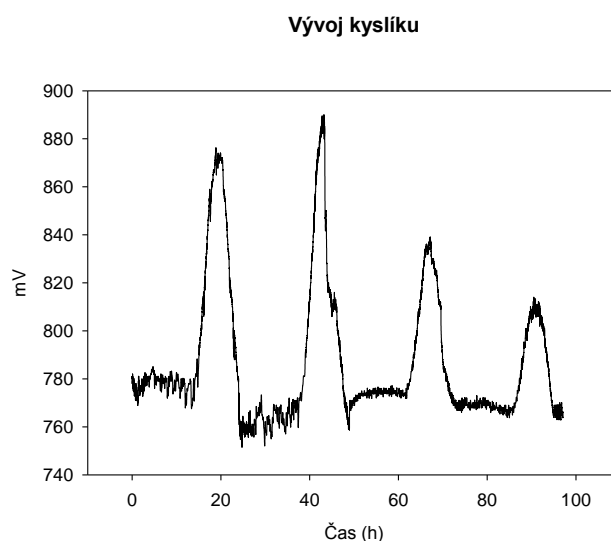
### 2.3.6 Acetylene reduction assay

Tato metoda měření fixace dusíku je založena na analogii mezi molekulami vzdušného dusíku a acetylenem, viz **kap. 1.3**. Do viálky k 15 ml kultury se pomocí plynotěsné injekční stříkačky vstříklo 10ml acetylenem. Vzorky se nechaly 2hod inkubovat ve vodní lázni při růstové teplotě kultury. Vzorky se sinicí *Cyanothece* sp. ATCC 51142 byly inkubovány v době temnotní fáze, zatímco vzorky se sinicí *Anabaena* sp. PCC 7120 se inkubovaly během světelné fáze. Po inkubaci byly z viálek odebrány 4 ml plynu, které byly vstříknuty do zkumavek s nasyceným NaCl, který bránil případnému úniku plynu přes perforované víčko zkumavky. Vzorky byly analyzovány na plynovém chromatografu HP 5890 Series II (Hewlett Packard), (Biologické centrum AV ČR, v.v.i. – Ústav půdní biologie), který určil, jaké množství acetylenem se přeměnilo v etylen. Protože acetylen obsahuje stopová množství etylenem, bylo třeba vzorky plynu z viálek s kulturou odebírat před inkubací, v čase T 0 hod, a poté po inkubaci, v čase T 2 hod. Rozdílem naměřených hodnot etylenem z GC jsem získala pravé hodnoty přeměněného etylenem, které se pro správnou prezentaci výsledků vztáhly na množství chlorofylu v buňce.

### 2.3.7 Vývoj kyslíku

Množství vyvíjeného kyslíku buňkami ve fotobioreaktoru bylo měřeno cca každou 1 minutu kyslíkovou elektrodou zavedenou dovnitř kyvety. Záznam získaný z kontinuálního měření (**graf 2.1**) byl ve formě hrubých dat (mV). Abychom získali informaci o množství vyvinutého O<sub>2</sub>, museli jsme tato data dále přepočítat na μmol O<sub>2</sub>. Do tohoto výpočtu bylo třeba zahrnout kalibraci a rozpustnost kyslíku ve vodě o dané salinitě při dané teplotě. Vzhledem k tomu, že jde o otevřený dynamický systém (kontinuální bublání, výměna plynů s okolím), tak jsme

získané hodnoty vyjádřili jako odchylku od rovnovážné hodnoty koncentrace  $O_2$ , která odpovídá koncentraci  $O_2$  v mediu, při bublání a výměně plynů s okolím.



**Graf 2.1:** Neupravený záznam množství vývoje kyslíku kulturou *Anabaena* sp. PCC 7120 ve fotobioreaktoru.

### 2.3.8 Termoluminiscence

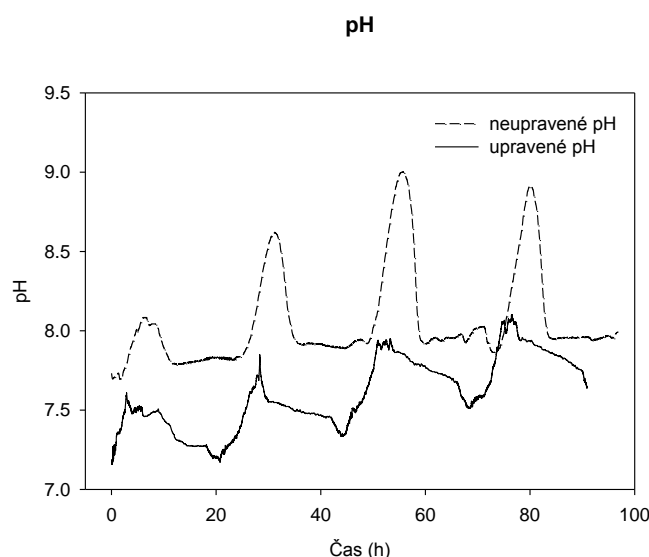
Metoda termoluminiscence byla měřena na speciálním přístroji od firmy PSI Brno. Pro vzorek byly filtrovány 2 ml suspenze buněk přes membránové filtry (Pragopor). Filtr s buňkami se vložil do přístroje a byl proměřován dle námi sestaveného protokolu. Protokol začínal dvouminutovou tmou. Vzorek byl temnotně adaptován při jeho růstové teplotě, a poté byl prudce ochlazen na teplotu  $0^{\circ}C$ . Během zchlazení byl vystaven dvěma krátkým zábleskům a poté byl ohříván na teplotu  $65^{\circ}C$ , rychlostí  $0,5^{\circ}C/s$ . Během lineárního ohřevu došlo k uvolnění zachycené energie, která byla měřena ve formě luminiscence.

## 3. Výsledky

### A. Metodická část

#### 3.1 Kolísání pH

Během prvních experimentů ve fotobioreaktoru jsme se potýkali s kolísáním hodnot pH. Ke změnám pH docházelo díky fotosyntetické a respirační aktivitě suspenze buně ve světelné a temnotní fázi, a to především u kultury *Anabaena* sp. PCC 7120, která byla pěstována v médiu BG11, jenž má nízkou salinitu a není pufováno karbonátovým systémem tolik, jako média nahrazující mořskou vodu. Kolísání pH bylo tedy způsobeno dvěma faktory: 1) nízkou pufovací kapacitou média; 2) množstvím rozpuštěného CO<sub>2</sub> v kultuře. Změny hodnot pH ve fotobioreaktoru vykazovaly rapidní nárůst především během světelné fáze, jak se rozpuštěný CO<sub>2</sub> spotřebovával ve fotosyntéze. Během jednoho 24ti hodinového cyklu kultura *Anabaena* sp. PCC 7120 vykazovala změnu až o jednotku pH (**graf 3.1**). Abychom snížili nárůst pH během světelné fáze, zkoušeli jsme přikapávat ke kultuře 50 µl 2% kyseliny mravenčí, aby došlo k okyselení média. Po přidání kyseliny se pH kultury poměrně rychle snížilo na požadované hodnoty, ale během několika minut došlo znovu k jeho nárůstu. Nedbal et al. 2008 dokázali ve svých experimentech regulovat pH pomocí střídavého bublání vzduchu a 2% CO<sub>2</sub>. My jsme však této metody využít nemohli, kvůli potřebě porovnat odezvy buněk, které byly pěstovány pod nynější koncentrací CO<sub>2</sub> a pod zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub> (900ppm). Výsledného efektu jsme tedy dosáhli až regulací bublání. Zvýšením průtoku vzduchu kulturou jsme dokázali nárůst pH v začátku světelné fáze zastavit a postupně jej i snížit (**graf 3.1**). Tento způsob byl pak používán i při dalších pokusech.



**Graf 3.1:** Záznam pH z fotobioreaktoru, ve kterém byla pěstována sinice *Anabaena* sp. PCC 7120 při standardním průtoku vzduchu - neupravované pH (přerušovaná křivka) a při pH upraveném zvýšeným průtokem vzduchu (plná křivka).

### 3.2 Počty pokusů

V další části práce uvádím výsledky vlastních experimentů. Pro přehlednost zde uvádím počet opakování jednotlivých pokusů (biologická opakování, tedy pokusy s různými kulturami). Každá získaná hodnota byla vždy průměrem ze tří měření (tří odebraných vzorků) z dané kultury.

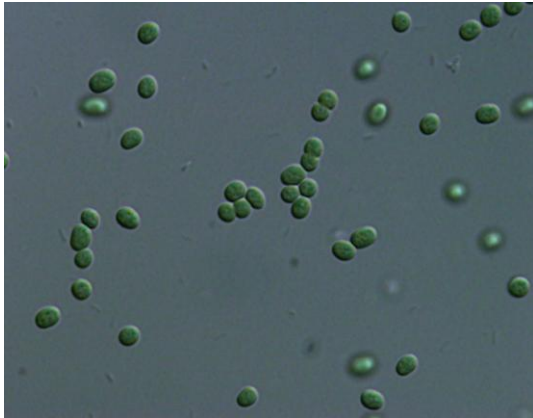
**Tab 3.1:** Přehled provedených pokusů.

<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	Počet pokusů			
	Týdenní fixace N <sub>2</sub>	12hod fixace N <sub>2</sub>	Koncentrace chl <i>a</i>	C/N
LC+	-	-	3	1
HC+	-	-	3	1
LC-	2	2	2	1
HC-	1	1	2	1
<b><i>Anabaena</i> sp. PCC 7120</b>				
LC+	-	-	4	3
HC+	-	-	2	1
LC-	3	1	4	3
HC-	1	1	2	1

## B. Vlastní výsledky

### 3.3 *Cyanothece* sp. ATCC 51142

*Cyanothece* sp. ATCC 51142 je jednobuněčná sinice (**obr. 3.1**) o velikosti buněk cca 3 $\mu$ m, fixující dusík během temnotní fáze. Základní zásobní kultura *Cyanothece* sp. ATCC 51142



byla pěstována na plnohodnotném mořském médiu ASP2 a byla bublána vzduchem (kultura označená LC+: **Low Carbon** + nitrogen). Odvozená zásobní kultura byla bublána vzduchem obohaceným o CO<sub>2</sub> (900ppm). Tato kultura byla před vlastními experimenty 14 dní adaptována na zvýšenou koncentraci CO<sub>2</sub> (kultura HC+ : **High Carbon** + nitrogen).

**Obr. 3.1:** *Cyanothece* sp. ATCC 51142.

Experimenty pro sledování buněk v bezdusíkatém médiu, ASP2-N, byly zahájeny přenesením buněk z plnohodnotného média na bezdusíkaté. Tyto kultury jsou dále označeny jako LC- a HC-.

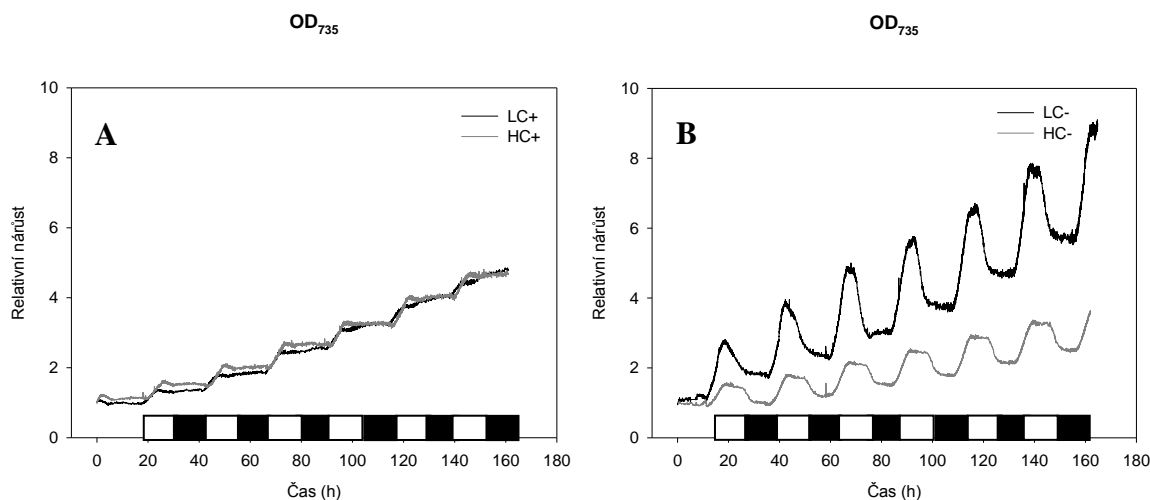
#### 3.3.1 Růstová rychlost, OD<sub>735</sub>

Srovnáním růstových rychlostí *Cyanothece* pěstované v dusíkatém médiu (kultury LC+ a HC+) bylo zjištěno, že kultura HC+ vykazovala nepatrně vyšší růstovou rychlost (**tab. 3.2**). Tyto výsledky byly potvrzeny kontinuálním měřením optické hustoty při 735nm ve fotobioreaktoru (**graf 3.2A**). Ze záznamu je zřejmé, že nárůst OD obou kultur se významně neliší.

Výpočtem růstové rychlosti u kultur LC- a HC- bylo zjištěno, že kontrolní kultura LC- rostla 1.6x rychleji, než kultura HC- (**tab. 3.2**). Tento výsledek koreluje s daty optické hustoty získané pomocí fotobioreaktoru (**graf 3.2B**).

**Tabulka 3.2:** Růstová rychlost ( $\text{den}^{-1}$ ). Porovnání růstové rychlosti buněk mezi kulturami LC+, LC-, HC+, HC-.

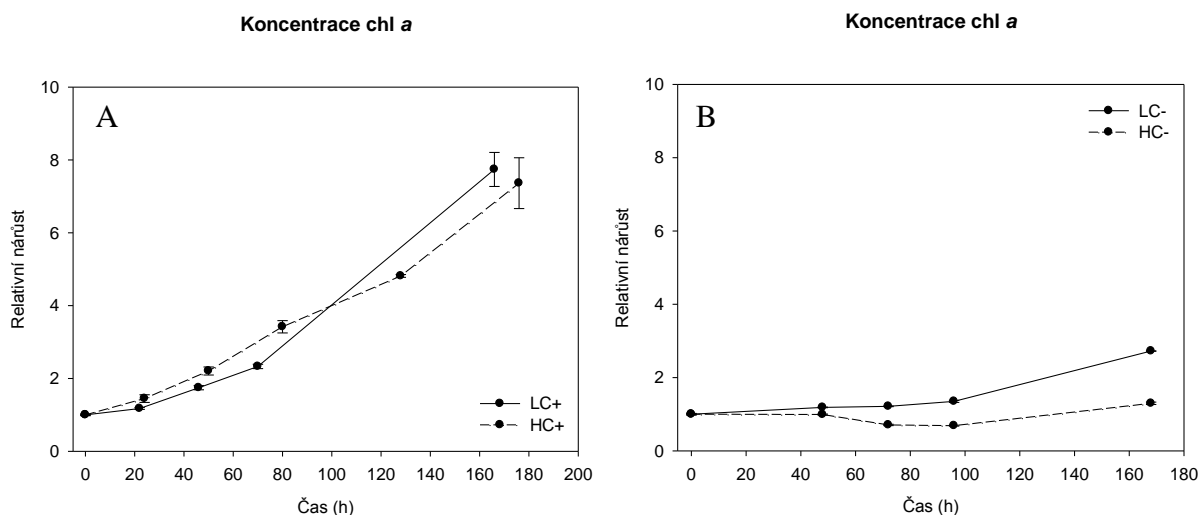
	$r \text{ (d}^{-1}\text{)}$	
	+N	-N
<b>LC</b>	$0,25 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,01$
<b>HC</b>	$0,26 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$



**Graf 3.2 A-B:** Kontinuální záznamy optické hustoty při 735nm (OD 735) měřené uvnitř fotobioreaktoru. Porovnání záznamů měření kultur LC+ a HC+ (A) a kultur LC- a HC- (B), byly pro porovnání vztaheny na počáteční hodnotu. Varianty LC+ a HC+ měly přibližně stejný nárůst OD 735 (A), zatímco varianta LC- vykazovala vyšší OD 735, než varianta HC- (B).

### 3.3.2 Koncentrace chl *a*

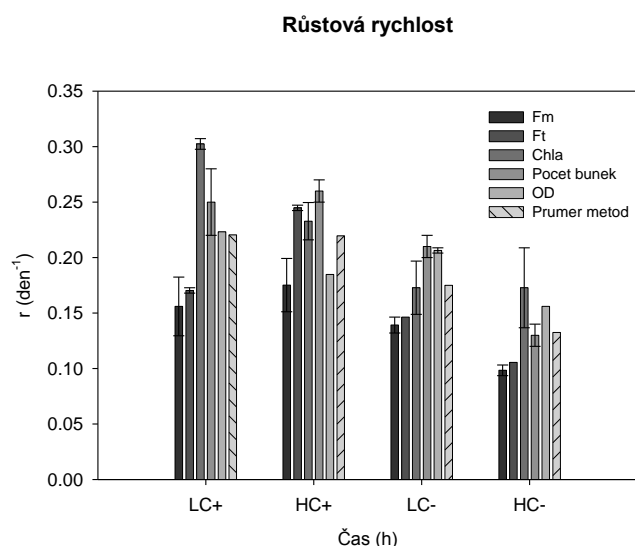
Růst kultury byl doprovázen i zvyšováním koncentrace chlorofylu *a*. Stejně tak, jako nebyl pozorován výraznější rozdíl v růstové rychlosti kultur LC+ a HC+, nebyl zjištěn ani výraznější rozdíl v rychlosti syntézy chlorofylu *a* mezi těmito kulturami (**graf 3.3A**). Zvyšování koncentrace chlorofylu se po přenesení do bezdusíkatého media zastavilo a pokračovalo až po aktivaci nitrogenázy. U kultur LC- byl zjištěn jak rychlejší růst, tak i rychlejší syntéza chlorofylu *a* v porovnání s kulturou HC- (**graf 3.3B**).



**Graf 3.3 A-B:** Koncentrace chl *a* variant LC+ a HC+ (**A**) a variant LC- a HC- (**B**) v závislosti na čase. Pro porovnání nárůstu koncentrace chl *a* byly hodnoty vztaženy na počáteční hodnotu měření. (**A**) Kultury HC+ vykazovaly první 3 dny nepatrně rychlejší syntézu chl *a* než LC+. (**B**) Kultury LC- vykazovaly stálý růst koncentrace chl *a*, zatímco koncentrace chl *a* kultur HC- první 4 dny nerostla, dokonce došlo k jejímu poklesu.

Z výše uvedených dat (počet buněk,  $OD_{735}$ , chl *a*) a z fluorescenčních dat, které byly naměřeny fotobioreaktorem ( $F_M$ ,  $F_t$ ), jsme fitováním (exponenciální růst, program SigmaPlot, USA) vypočetli růstové rychlosti (**graf 3.4**). Z grafu je patrné, že růstové rychlosti vypočítané z fluorescenčních dat a z počtu buněk korelují s výsledky, které potvrzují nepatrně rychlejší růst kultury HC+. Naopak růstové rychlosti získané z dat chl *a* a OD vyšší růstovou rychlost kultury HC+ nepotvrdily, což souhlasí i s grafy **3.3 A** a **3.2 A**. Celkový průměr růstové rychlosti kultur LC+ a HC+ vypočítaný z uvedených parametrů se významně neliší. Nafitované růstové rychlosti výše uvedených dat potvrdily rychlejší růst u kultury LC-. Celkový průměr růstové rychlosti byl tudíž vyšší u varianty LC-.

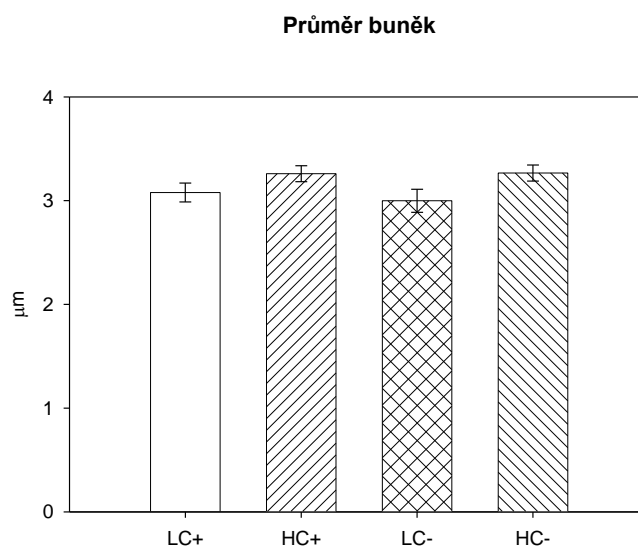




**Graf 3.4:** Porovnání růstových rychlostí získaných na základě měření různých paramterů:  $F_M$ ,  $F_t$ , chl  $a$ , počtu buněk nebo  $OD_{735}$ . Celkový průměr růstových rychlostí spočítaný z těchto různých dat se pro varianty LC+ a HC+ významně neliší. Porovnání růstových rychlostí všech parametrů variant diazotrofních kultur LC- a HC- vykazuje vyšší rychlost růstu u kultury LC-.

### 3.3.3 Průměr buněk

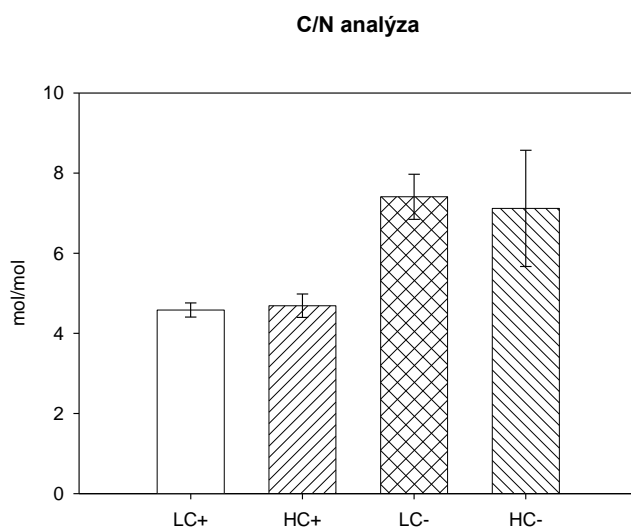
Průměr buněk *Cyanothece* byl měřen pomocí přístroje Beckman Coulter counter. Z výsledků jsme zjistili, že u variant HC+ a HC- byl průměr buněk vyšší, než u variant LC+ a LC- (**graf 3.5**). U kultur HC se průměr buněk pohyboval okolo  $3,3\mu\text{m}$ , zatímco u kultur LC okolo  $2,9\mu\text{m}$ .



**Graf 3.5:** Průměr buněk variant LC+ a HC+ a buněk variant LC- a HC-. Varianty HC+ a HC- vykazovaly o 4 desetiny  $\mu\text{m}$  vyšší průměr buněk.

### 3.3.4 Elementární analýza C a N

Použili jsme metodu stanovení obsahu prvků C a N v sušině ke zjištění metabolického stavu kultur. Z výsledků můžeme zjistit celkový molární poměr mezi C a N v sušině (**graf 3.6**). Výsledky ukazují, že tento poměr výrazně závisel na dostupnosti dusíku v médiu. U kultur LC+ a HC+ byl poměr C/N ~ 4,5, zatímco pro kultury LC- a HC-, za limitace dusíkem byl poměr C/N ~ 7, viz **graf 3.6**. Toto odráží a dokazuje limitaci růstu nedostatkem N u buněk v diazotrofním režimu, kde je poměr C ku N vyšší. Srovnání variant LC- a HC- ale výrazné rozdíly nepřineslo.

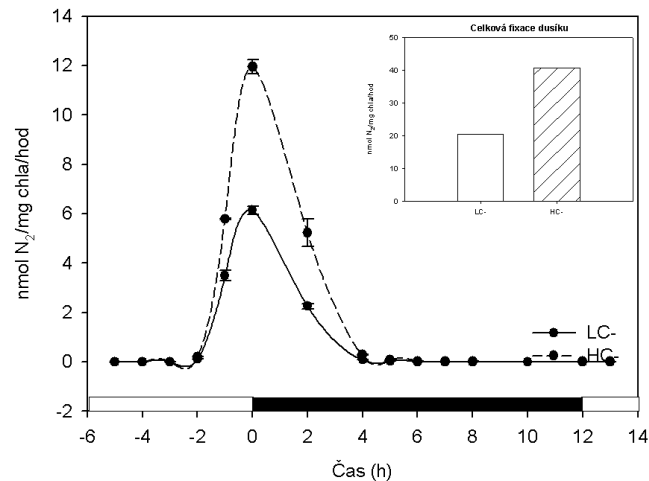


**Graf 3.6:** Porovnání C/N analýz mezi kulturami LC+ a HC+ a kulturami LC- a HC-.

### 3.3.5 Fixace N<sub>2</sub>

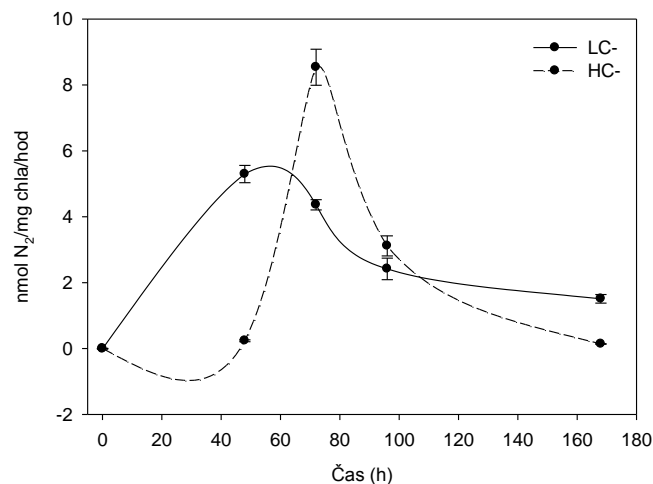
Jednobuněčná sinice *Cyanothece* sp. ATCC 51142 fixuje dusík pouze v nepřítomnosti zdroje dusíku a během temnotní fáze denní periody. V grafu **3.7** je vyneseno množství dusíku fixovaného buňkami během 12ti hodinového cyklu (0 hodin odpovídá počátku temnotní fáze). Měření této noční fixace bylo prováděno vždy šestý den od přenesení buněk do média bez dusíku. V grafu **3.8** je zaznamenán růst fixace dusíku během týdenní adaptace na bezdusíkaté prostředí. Tento týdenní průběh byl měřen každý den v čase D0 (v době vypnutí světla), kdy buňky vykazovaly z celého denního cyklu nejvyšší míru fixace dusíku.

### Noční fixace N<sub>2</sub>



**Graf 3.7:** Průběh fixace dusíku měřené v 12ti hodinovém cyklu během temnotní fáze (její začátek je v čase 0 hod). Porovnání míry fixace mezi kulturami LC- a HC-. Buňky sinice *Cyanothece* sp. ATCC 51142 začínají fixovat dusík ještě v době stmívání, cca 2hod před vypnutím světla. Maximální míra fixace dusíku nastává na samém počátku temnotní fáze (v době vypnutí světla). S postupující temnotní fází klesá množství fixovaného dusíku. Buňky kultury HC- vykazovaly v době maximální míry fixace N<sub>2</sub> 2krát vyšší míru fixace než buňky kultur LC-, viz graf celkové fixace dusíku v pravém horním rohu tohoto grafu.

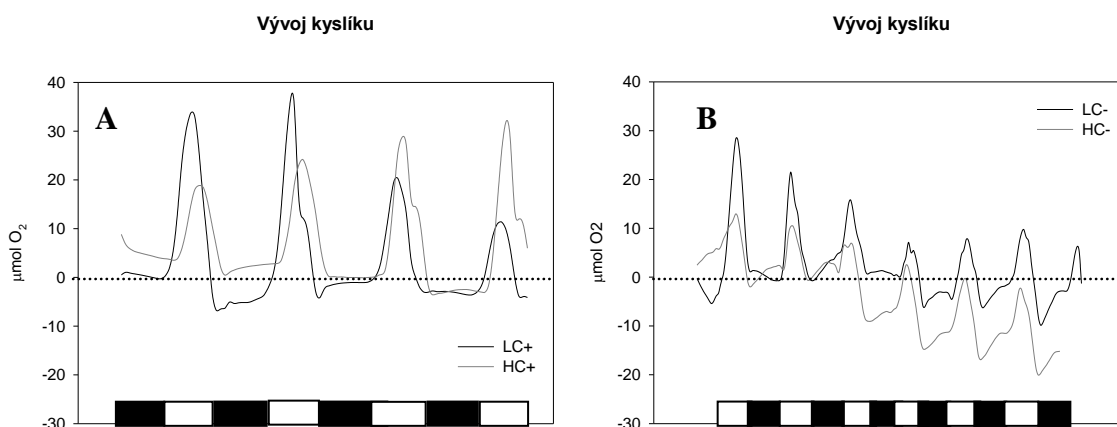
### Týdenní fixace N<sub>2</sub>



**Graf 3.8:** Týdenní záznam množství fixovaného dusíku buňkami sinice *Cyanothece* sp. ATCC 51142. V grafu je vynesena míra fixace dusíku kulturou LC- (plná křivka) a HC- (přerušovaná křivka) po přenesení z plnohodnotného média na medium bezdusíkaté, ke kterému došlo v čase t = 0 hod. Kultura LC- vykazovala velmi rychlou adaptaci na diazotrofní podmínky, během 48 hodin již byla schopná fixovat dusík. Naopak kultura HC- tak rychlý nástup fixace neměla, po 48 hodinách fixovala jen malé množství dusíku. Za dalších 24 hodin však došlo ke zvýšení míry fixace téměř na dvojnásobek.

### 3.3.6. Vývoj O<sub>2</sub>

Množství kyslíku vyvíjeného kulturou *Cyanothece* sp. ATCC 51142 bylo zaznamenáváno kontinuálně pomocí kyslíkové elektrody ve fotobioreaktoru. Vzhledem k tomu, že kultury byly kontinuálně bublány vzduchem s CO<sub>2</sub> a že kultura není v plynotěsné kyvetě, tak tato měření nelze interpretovat stejně jako měření změny koncentrace v komůrkách na měření kyslíku. Naměřené hodnoty jsou proto vyjadřují odchylku mezi rovnovážnou, nasycenou koncentrací O<sub>2</sub> v mediu a koncentrací způsobenou fotosyntézou nebo respirací buněk v kultuře. V **grafu 3.9 A** je vynesena tato odchylka od rovnovážné hodnoty. Je zřejmé, že kultura HC+ s postupem času vyvíjela více kyslíku než kultura LC+. U kultur, které byly pěstovány v bezdusíkatém médiu, byla u obou variant zjištěna na počátku temnotní fáze významná respirace (**graf 3.9 B**), která koreluje s procesem fixace dusíku, jehož míra je nejvyšší právě na počátku temnotní fáze.

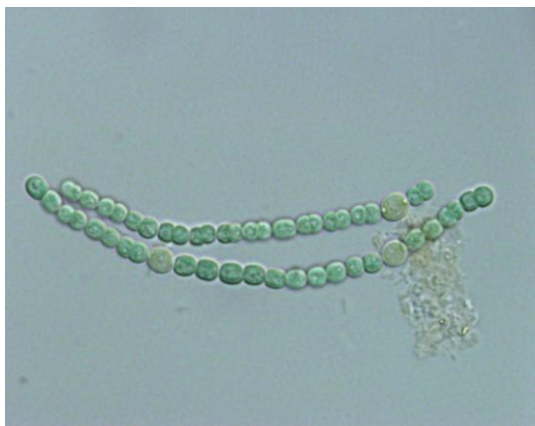


**Graf 3.9 A-B:** Záznam vývoje kyslíku kultury *Cyanothece* sp. ATCC 51142 pro varianty LC+ a HC+ (**A**) a pro varianty LC- a HC- (**B**) během světelných fází. (**A**) Kultura LC+ vykazovala na počátku experimentu vyšší vývoj množství kyslíku. Poté se však hodnoty vyvinutého O<sub>2</sub> u kultury LC+ začaly výrazně snižovat. Naopak u kultury HC+ došlo ke zvýšení vývoje O<sub>2</sub>. (**B**) Množství O<sub>2</sub> vyvinutého kulturou HC- bylo první 3 dny výrazně nižší v porovnání s kulturou LC-. Snižování množství μmol O<sub>2</sub> v kultuře HC- během experimentu mohlo být následkem nárůstu biomasy, díky čemuž v kultuře převážila spotřeba O<sub>2</sub> nad jeho vývojem.

### 3.4 *Anabaena* sp. PCC 7120

*Anabaena* sp. PCC 7120 je vláknitá sinice vytvářející v diazotrofním prostředí specializované buňky, heterocysty, kterými dokáže během světelné fáze vázat vzdušný dusík (**obr. 3.2**).

Základní zásobní kultura sinice *Anabaena* sp. PCC 7120 byla pěstována na plnohodnotném



sladkovodním médiu BG11 a byla bublána vzduchem (kultura označená LC+: **L**ow **C**arbon + nitrogen). Odvozená zásobní kultura, taktéž pěstována na médiu BG11, byla bublána vzduchem obohaceným o CO<sub>2</sub> (900ppm). Tato kultura byla před vlastními experimenty 14dní adaptována na zvýšenou koncentraci CO<sub>2</sub> (kultura HC+ : **H**igh **C**arbon + nitrogen).

**Obr.3.2:** *Anabaena* sp. PCC 7120 s vytvořenými heterocysty.

Experimenty pro sledování buněk v bezdusíkatém médiu, BG11-N, byly zahájeny přenesením buněk z plnohodnotného média na bezdusíkaté.

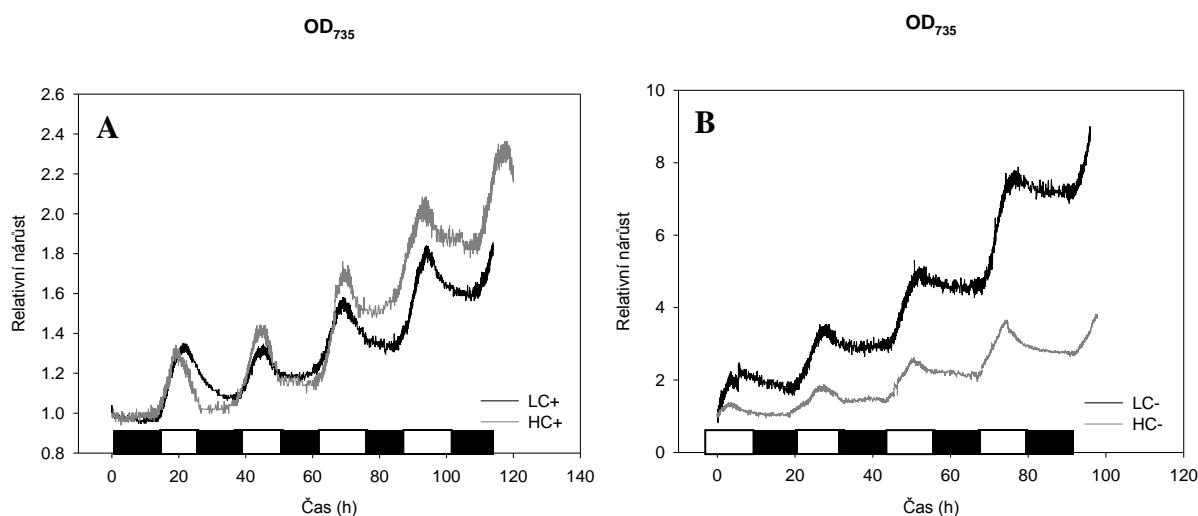
#### 3.4.1 Růstová rychlost, OD<sub>735</sub>

Výpočtem růstové rychlosti u kultur rostoucích v plnohodnotném médiu byl zjištěn rozdíl mezi rychlostí růstu kultur LC+ a HC+. Zjistili jsme, že HC+ vykazovala vyšší růstovou rychlost (**tab. 3.3**). Tyto výsledky korelovaly s kontinuálním záznamem měření optické hustoty při 735nm získané ve fotobioreaktoru (**graf 3.10 A**).

Růstové rychlosti obou kultur rostoucích v médiu bez dusíku (varianty LC- a HC-) byly zřetelně rozdílné. Bylo zjištěno, že kultura LC- rostla rychleji, než kultura HC- (**tab. 3.3**). Tyto závěry byly potvrzeny i výsledky optické hustoty, která byla kontinuálně zaznamenávána pomocí fotobioreaktoru (**graf 3.10 B**).

**Tabulka 3.3:** Růstová rychlost ( $\text{den}^{-1}$ ). Porovnání růstové rychlosti buněk v kultuře bublané vzduchem a vzduchem s přísadkou  $\text{CO}_2$ .

	$r \text{ (d}^{-1}\text{)}$	
	+N	-N
<b>LC</b>	$0,13 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01$
<b>HC</b>	$0,17 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$

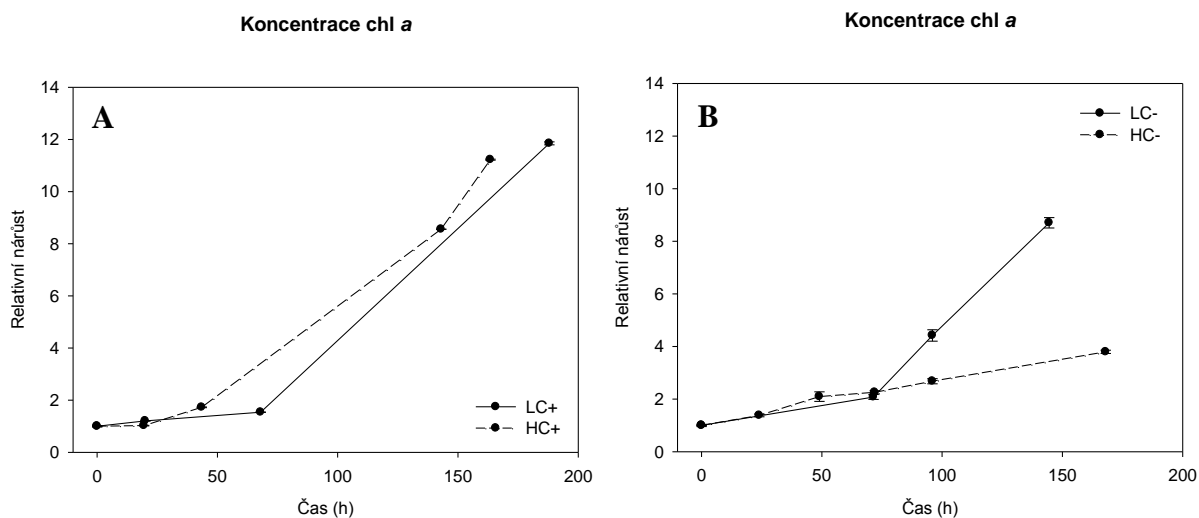


**Graf 3.10 A-B:** Kontinuální záznamy optické hustoty při 735nm měřené pomocí fotobioreaktoru. Porovnání záznamů měření kultur LC+ a HC+ (**A**) a kultur LC- a HC- (**B**), vztažené k počáteční naměřené hodnotě. (**A**) Buňky variant LC+ a HC+ měly zpočátku přibližně stejný nárůst OD, ovšem po cca 60ti hodinách kultura HC+ vykázala vyšší nárůst optické hustoty. (**B**) Naopak kultury LC- vykazovaly vyšší OD, než kultury HC- již od počátku experimentu.

### 3.4.2 Koncentrace chl *a*

Růst koncentrace chlorofylu *a* souvisí s mírou růstu kultury. Z **grafu 3.11 A** vyplývá, že množství syntetizovaného chlorofylu *a* kultur LC+ a HC+ se lišilo, ovšem jen nepatrně. U varianty experimentu HC+ se prokázala nepatrně vyšší růstová rychlost (**tab. 3.3**) i rychlejší syntéza chlorofylu *a*.

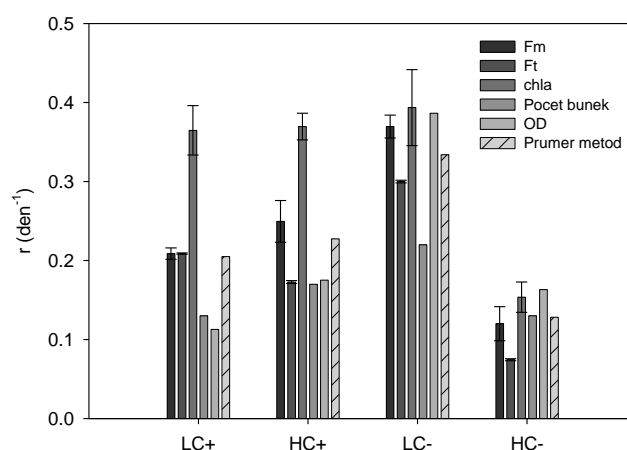
U kultur pěstovaných na bezdusíkatém médiu (LC- a HC-) byla zjištěna rychlejší syntéza chlorofylu *a* u varianty LC- (**graf 3.11 B**). Tento výsledek koreluje s vyšší růstovou rychlostí kultury LC- (**tab. 3.3**).



**Graf 3.11 A-B:** Koncentrace chl *a* variant LC+ a HC+ (**A**) a variant LC- a HC- (**B**) v závislosti na čase. Pro porovnání nárůstu koncentrace chl *a* byly hodnoty vztaženy na počáteční hodnotu měření. (**A**) Kultura HC+ vykazovala po celou dobu experimentu nepatrně vyšší koncentrace chlorofylu *a*. (**B**) U kultury HC- byla cca po 70ti hodinách pozorována výrazně vyšší rychlost syntézy chlorofylu *a*.

Z výše uvedených dat (počet buněk,  $OD_{735}$ ) a z fluorescenčních dat, které byly naměřeny fotobioreaktorem ( $F_M$ ,  $F_t$ ), jsme fitováním vypočetli růstové rychlosti (**graf 3.12**). Růstové rychlosti vypočítané z koncentrace chl *a* a se mezi kulturami LC+ a HC+ nijak nelišily, což potvrzuje graf 3.11 A. Naopak, růstové rychlosti získané z dat počtu buněk a OD vykazují rychlejší růst kultury HC+. Celkový průměr růstové rychlosti kultur LC+ a HC+ vypočítaný z uvedených parametrů se však významně nelišil. Vypočtené růstové rychlosti potvrdily rychlejší růst u kultury LC- než u HC-.

### Růstová rychlost

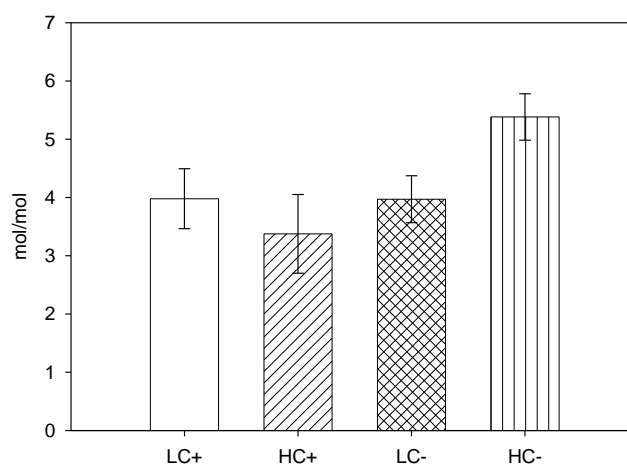


**Graf 3.12:** Porovnání růstových rychlostí spočítaných pro  $F_M$ ,  $F_t$ , chl  $a$ , počet buněk a  $OD_{735}$ . Růstová rychlost získaná z fluorescenčních parametrů a koncentrace chl  $a$  kultur HC+ a LC+ vykazovaly podobný denní nárůst. Naopak výsledky růstových rychlostí získané z počtu buněk a optické hustoty poukazují na rychlejší růst kultury HC+. Celkový průměr růstové rychlosti spočítaný z těchto dat se však pro varianty LC+ a HC+ významně neliší. Porovnání růstových rychlostí všech parametrů variant LC- a HC- vykazuje vyšší rychlost růstu kultury LC-.

### 3.4.3 Elementární analýza C a N

Stanovením obsahu prvků C a N v sušině jsme získali informaci o metabolickém stavu kultur. Z výsledků jsme zjistili celkový molární poměr mezi C a N v sušině (**graf 3.13**). Tento poměr byl odlišný pro kultury LC+ a HC+ (poměr C/N ~ 3,5) a pro kultury LC- a HC- za limitace dusíkem (poměr C/N ~ 4,5). Poměr C/N buněk rostoucích v diazotrofních podmínkách je vyšší a to dokazuje limitaci růstu v důsledku nedostatku N.

### C/N analýza

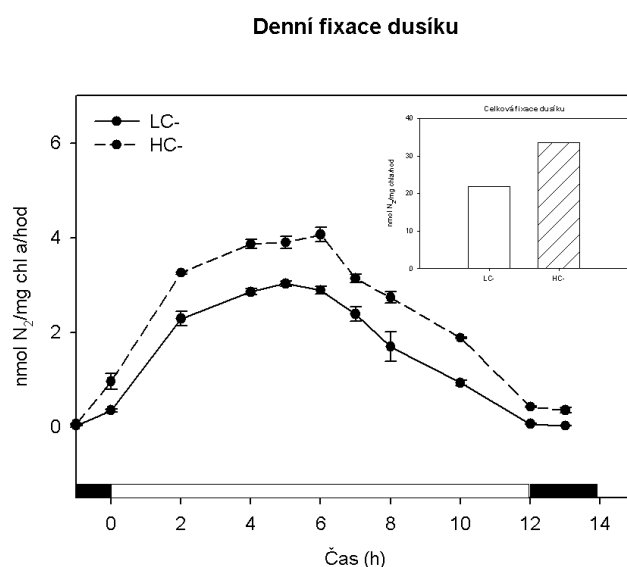


**3.13.:** Porovnání hodnot C/N mezi kulturami LC+ a HC+ a kulturami LC- a HC-.

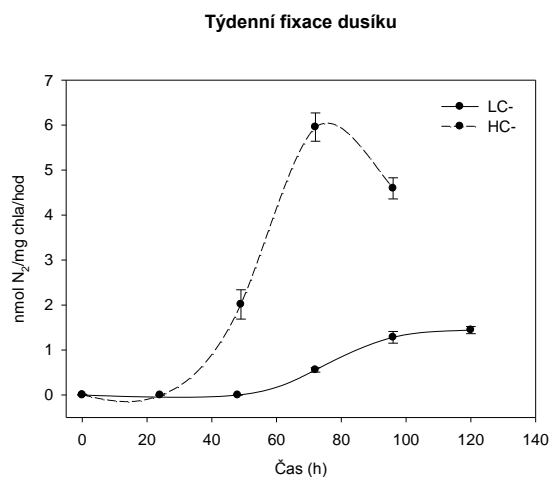


### 3.4.4. Fixace N<sub>2</sub>

Vláknitá sinice *Anabaena* sp. PCC 7120 fixuje dusík pomocí specializovaných buněk, heterocyst pouze v nepřítomnosti zdroje dusíku a během světelné fáze. V grafu 3.14 je vyneseno množství dusíku fixovaného buňkami během 12ti hodinového cyklu. Tato denní fixace dusíku byla měřena vždy šestý den od přesunu buněk média bez dusíku. V grafu 3.15 je zaznamenán růst fixace dusíku během týdenní adaptace na bezdusíkaté prostředí. Tento týdenní cyklus fixace byl měřen vždy v pravé poledne, což je doba, kdy buňky vykazovaly nejvyšší míru fixace z celého denního cyklu.



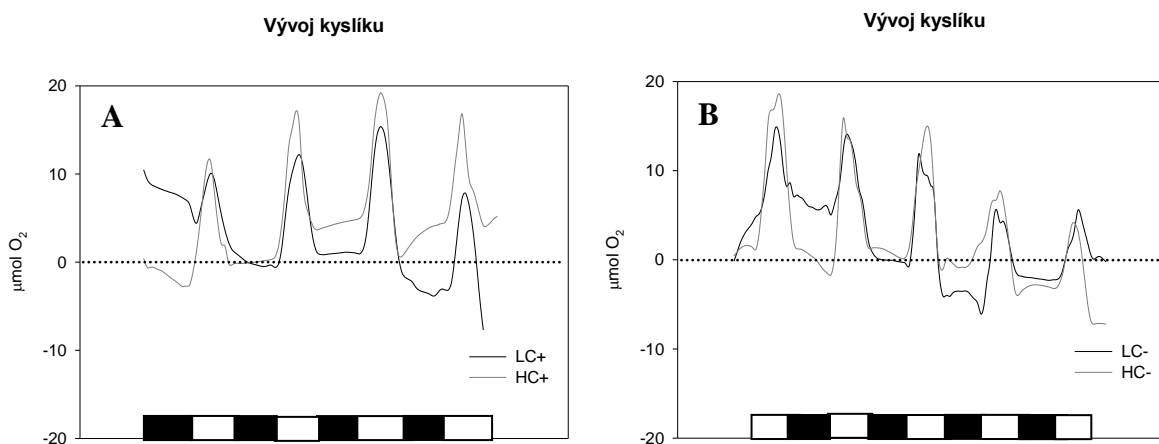
**Graf 3.14:** Průběh fixace dusíku u sinice *Anabaena* sp. PCC 7120 měřené v 12ti hodinovém cyklu během světelné fáze (0-12 hod). Porovnání míry fixace mezi kulturami LC- a HC-. Heterocysty kultury LC- začaly nepatrně fixovat dusík již v době zapnutí světla. Míra fixace během dne stoupala, až dosáhla svého maxima, které nastalo v poledne. Poté se hodnoty fixace dusíku začaly postupně snižovat, až došlo k jejímu vymizení v čase vypnutí světla. Průběh fixace dusíku u kultury HC- měl obdobný průběh jako u kultury LC-, avšak hodnoty nafiloxovaného dusíku byly cca 1,5krát vyšší, viz graf celkové fixace dusíku v pravém horním rohu tohoto grafu.



**Graf 3.15:** Týdenní záznam množství fixovaného dusíku buňkami sinice *Anabaena* sp. PCC 7120. V grafu je vynesena míra fixace dusíku kulturou LC- a HC- po přenesení z plnohodnotného média na medium bezdusíkaté. Kultura LC- začíná fixovat dusík po 48hodinách v diazotrofním prostředí. Kultura HC- se adaptovala rychleji, schopnost fixace dusíku se zde projevila již po 24hodinách.

### 3.4.5 Vývoj kyslíku

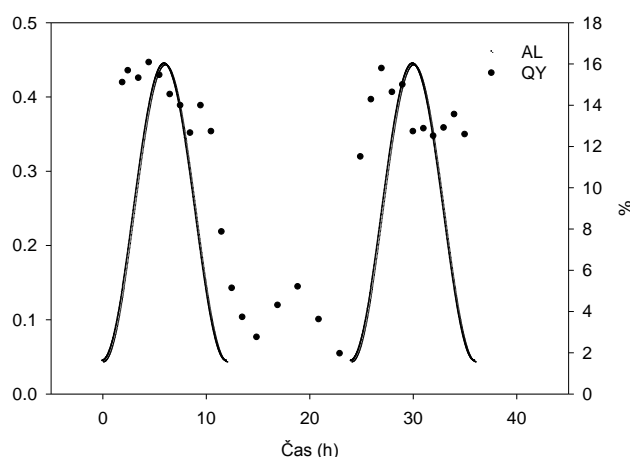
Množství kyslíku vyvíjeného kulturou *Anabaena* sp. PCC 7120 bylo zaznamenáváno kontinuálně pomocí fotobioreaktoru. Bylo zjištěno, že kultura HC+ vyvíjela během experimentu více O<sub>2</sub> než kultura LC+. Kultury LC- a HC- vykazovaly srovnatelné hodnoty množství vývoje O<sub>2</sub>.



**Graf 3.16:** Záznam vývoje kyslíku kultury *Anabaena* sp. PCC 7120 pro varianty LC+ a HC+ (A) a pro varianty LC- a HC- (B) během světelných fází. (A) Kultura HC+ vykazovala během experimentu vyšší hodnoty vývoje O<sub>2</sub> v porovnání s kulturou LC+. (B) Mezi kulturami LC- a HC- nebyl pozorován tak výrazný rozdíl jako mezi kulturami pěstovanými na dusíkatém médiu.

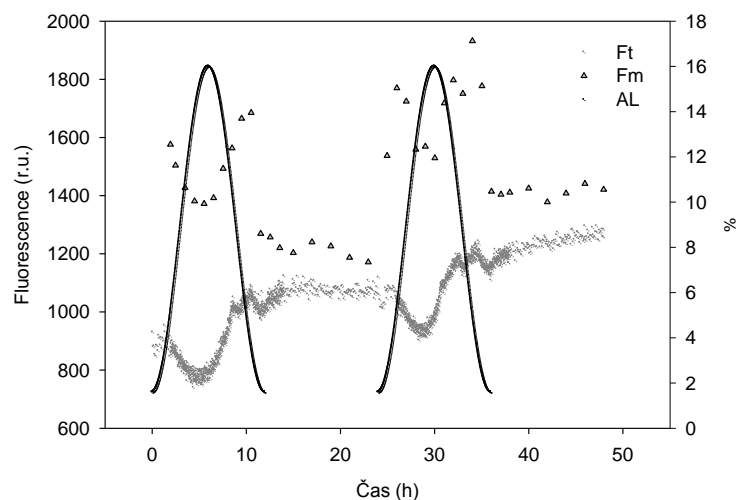
## C. Noční pokles

Díky kontinuálnímu měření fluorescenčních parametrů kultury ve fotobioreaktoru jsme zjistili nezvyklý trend ve změnách hodnot kvantového výtěžku fotochemie fotosystému II ( $Q_y = F_v'/F_m'$ , **graf 3.17**). Zatímco u eukaryotních řas se běžně pozoruje pokles  $Q_y$  pouze při nadměrném ozáření uprostřed denní fáze, u pěstovaných sinic jsme pozorovali výrazný pokles fotochemické aktivity i v noci, po zhasnutí světla. Tento pokles byl pozorován u obou organismů a nezávisel na zdroji dusíku nebo koncentraci  $CO_2$ .



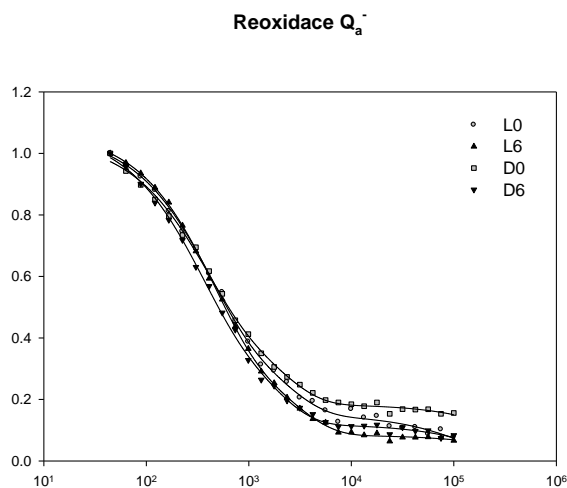
**Graf 3.17:** Záznam změn kvantového výtěžku variabilní fluorescence  $Q_y = F_v'/F_m'$  v závislosti na čase a intenzitě ozáření získané pomocí fotobioreaktoru.

Kvantový výtěžek nebyl jediným fluorescenčním parametrem, který se měnil s intenzitou záření. Změny byly pozorovány i u parametrů  $F_0$  ( $F_t$ ) a  $F_M$ . Během temnotní fáze docházelo k poklesu maximální fluorescence a k nárůstu minimální fluorescence (**graf 3.18**).



**Graf 3.18:** Záznam změn fluorescenčních parametrů  $F_M$  a  $F_t$  v závislosti na čase a intenzitě záření měřené ve fotobioreaktoru.

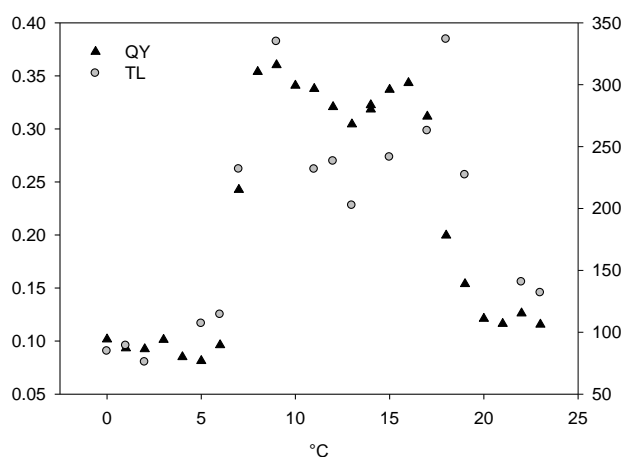
Protože tento jev není dostatečně v literatuře popsán, pokusili jsme se zjistit mechanismus, který jej může vyvolávat. Jednou z možností bylo, že pokles variabilní fluorescence je jen zdánlivý a je u sinic způsoben přeredukováním akceptorové strany (plastochinonového poolu) ve tmě. Druhou možností je, že množství aktivních fotosystémů II se u těchto sinic skutečně v noci výrazně zmenšuje. Proto jsme v temnotní fázi měřili stavy reoxidace  $Q_a^-$  (graf 3.19) a stavy rekombinace mezi akceptorovou a donorovou stranou fotosystému II pomocí metody temoluminiscence.



**Graf 3.19:** Kinetika reoxidace primárního akceptoru PSII  $Q_a^-$  u celých buněk *Cyanothece* sp. ATCC 51142 měřená každých 6 hodin během denního cyklu: uprostřed temnotní fáze (o půlnoci), při vypnutí světla, v poledne a po zapnutí světla. Reoxidace byla měřena jako pokles variabilní fluorescence po osvětlení krátkým, jednoobrátkovým zábleskem, hodnoty jsou normalizované na maximum (50  $\mu$ sec po záblesku).

Měření kinetiky reoxidace Qa- neukázalo výrazné zpomalení rychlosti přenosu elektornů na akceptorové straně PSII, které by mohlo vysvětlit výrazný pokles variabilní fluorescence. V noci se mírně zvyšuje amplituda nejpomalejší fáze reoxidace. Toto ale nemůže vysvětlit pozorovaný výrazný pokles  $F_M$  (**graf 3.18**).

Měření termoluminiscence (TL) odhalilo, že pokles kvantového výtěžku během temnotní fáze spíše souvisí s degradací aktivních PSII center a jen částečně s přeredukováním plastochinonového poolu. Pozorovali jsme totiž výrazný pokles intenzity rekombinace v PSII, který se shoduje s pozorovaným poklesem  $Q_y$  po vypnutí světla (**obr. 3.17**). Intenzita rekombinace je přímo úměrná množství aktivních reakčních center PSII. Vedle toho dochází ale i ke změnám tvaru TL signálu – v noci se mírně zvyšuje luminiscenční signál pocházející z rekombinace z plastochinonového poolu. Jde tedy o zajímavou adaptaci fotofyziologie PSII u těchto sinic, která je pravděpodobně určována cirkadiánními rytmy.



**Graf 3.20:** Korelace mezi intenzitou TL a  $Q_y$  z bioreaktoru pro sinici *Cyanotheca* sp. ATCC51142 pěstované za podmínek LC+. Pokles fotochemické aktivity tedy souvisí především s degradací aktivních PSII center, přeredukováním akceptorové strany PSII a vzhledem k tomu, že jsme pozorovali i zvýšení  $F_o$ , patrně dochází i k odpojování světlosběrných antén.

## 4. Diskuze

Zvyšující se koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře a její důsledky na biologické procesy na Zemi jsou hojně diskutovaná témata. Oxid uhličitý je významným skleníkovým plynem díky svým schopnostem propouštět sluneční záření a absorbovat tepelné záření odražené od povrchu Země. Oxid uhličitý přispívá k přirozenému skleníkovému efektu na Zemi. Lidskou činností se však do atmosféry každým rokem dostává cca 7-10 Gt CO<sub>2</sub> a tak se postupně zvyšuje koncentrace CO<sub>2</sub> v atmosféře. Tím se zesiluje skleníkový efekt, který v konečném důsledku podporuje globální oteplování.

V posledním desetiletí se mnohé studie soustředí na dopad zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> na posun uhlíkové rovnováhy v oceánech a na fytoplankton, a to zejména na diazotrofní druhy, které jsou významným článkem koloběhu dusíku a uhlíku v oceánech. Většina studií se týká mořské sinice *Trichodesmium* IMS 101, která byla považována za významný prvek oceánské biosféry, jenž zodpovídá za podstatnou část oceánské primární produkce a jenž je důležitou součástí cyklu dusíku (Webb et al. 2001).

V této práci jsme se soustředili na kultury diazotrofních sinic *Cyanothece* sp. ATCC 51142 a *Anabaena* sp. PCC 7120, které jsme vystavili podmínkám zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> (900ppm). Tato koncentrace CO<sub>2</sub> měla simulovat podmínky, které by mohly nastat na Zemi zhruba za 100 let. Cílem bylo porovnat reakce buněk pěstovaných za zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> s fyziologií a morfologií buněk sinic rostoucích za současné koncentrace CO<sub>2</sub> (390ppm). Efekt CO<sub>2</sub> jsme zkoumali na buňkách rostoucích v plnohodnotném, respektive bezdusíkatém médiu.

### 4.1 *Cyanothece* sp. ATCC 51142

Varianta jednobuněčné sinice *Cyanothece* sp. ATCC 51142, LC+, byla porovnáována s variantou HC+, a varianta LC- byla porovnáována s variantou HC-. Očekávali jsme, že buňky variant HC+ a HC- budou více prosperovat (rychlejší nárůst biomasy, rychlejší syntéza chl *a*, vyšší poměr C/N, u varianty HC- vyšší míra fixace dusíku). Toto se potvrdilo pouze u kultury HC+. Zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> ve vodě přináší řasám výhodu v podobě snadnější difúze CO<sub>2</sub> z vodního prostředí do buňky. Část uhlíku se tedy do buňky dostane pasivně a díky tomu sinice nemusí věnovat tolik energie do aktivního přenosu HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> do buňky. V důsledku toho se může ušetřená energie přerozdělit do procesů růstu, syntézy chl *a*, apod. (Levitan et al.

2007). Porovnání výsledků kultur LC+ a HC+ tuto teorii potvrzují, ačkoliv rozdíl v rychlosti růstu a syntéze chl *a* není natolik výrazný, jako tomu bylo u práce Levitan et al 2007, která byla založena na experimentech s diazotrofní sinicí *Trichodesmium* IMS101.

Výsledky kultur pěstovaných na bezdusíkatém médiu LC- a HC-, hypotézu o přerozdělení ušetřené energie nepotvrdily. Naopak, kultury HC- vykazovaly celkové snížení růstové rychlosti i snížení syntézy chl *a* v porovnání s kulturou LC-.

Při takové redukci procesů by se dala očekávat i redukce v míře fixace N<sub>2</sub>. Avšak po adaptaci na bezdusíkaté prostředí dokázaly kultury HC- nafixovat více N<sub>2</sub> (**graf 3.7, 3.8**). Buňky variant LC- po přesunu do média bez zdroje dusíku zareagovaly na toto prostředí poměrně rychle a během 24 hodin byly schopné začít syntetizovat enzym nitrogenázu a fixovat dusík (Schneegurt et al. 1994), zatímco u buněk variant HC- takto rychlá adaptace nenastala. Aktivita nitrogenázy se projevila sice až po 48 hodinách, ale dalších během 24hodin se dokázala zvýšit 8krát (**graf 3.8**).

Protože *Cyanothece* sp. ATCC 51142 je jednobuněčná sinice, předpokládali jsme, že k fixaci dusíku bude docházet v průběhu noci a maximální míra fixace N<sub>2</sub> se bude pohybovat v čase kolem půlnoci. Studie, které se fixací dusíku na této sinici zabývaly, došly k závěru, že tento proces je striktně omezen na temnotní fázi, pokud je *Cyanothece* sp. ATCC 51142 pěstována v podmínkách střídající se temnotní a světelné fáze v režimu 12:12 (L:D), (Schneegurt et al. 1994, Sherman et al. 1998, Reddy et al. 1993). Z našich výsledků ale vyplývá, že nástup fixace nastává již na konci světelné fáze, a to hodinu před vypnutím světel, při intenzitě záření 12  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , kdy jsme naměřili nezanedbatelný výtěžek 3,49 nmol N<sub>2</sub>/mg chla/hod. Maximální míra fixace dusíku byla naměřena na počátku temnotní fáze, v čase D0 (při vypnutí světel). Poté se množství fixovaného dusíku začalo snižovat. Poslední průkazná hodnota nafixovaného N<sub>2</sub> byla naměřena v čase D4 (čtvrtou hodinu temnotní fáze). Tento průběh fixace N<sub>2</sub> byl potvrzen experimentem na kultuře HC-. Navíc jsme zjistili, že množství fixovaného dusíku kulturou HC- bylo během 12ti hodinového cyklu 2krát větší než u kultury LC- (**graf 3.7**). Z těchto výsledků se zdá, že buňky kultur HC- věnují po přenesení do prostředí bez zdroje dusíku většinu své energie do syntézy nitrogenázy a fixace vzdušného dusíku, na úkor rychlosti růstu a zpočátku i na úkor pomalejší syntézy chlorofylu *a*. Ta se ale začíná čtvrtý den zvyšovat, což patrně souvisí se snížením míry fixace N<sub>2</sub> ve stejnou dobu, a to by mohlo indikovat plnou adaptaci kultury na diazotrofní podmínky. V dalších pokusech bude třeba potvrdit, zda se rychlost růstu a fixace dusíku v podmínkách LC- a HC- změní pokud budou kultury v diazotrofním režimu pěstovány delší dobu.

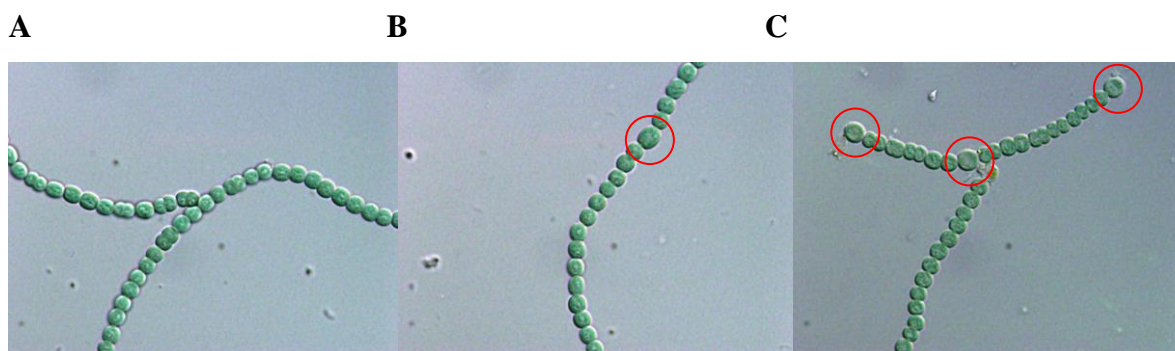
## 4.2 *Anabaena* sp. ATCC 51142

I u *Anabaeny* jsme porovnávali odezvu buněk mezi variantami LC+ a HC+ a také mezi variantami LC- a HC-. Z růstové rychlosti vypočítané z počtu buněk je patrné, že kultura HC+ ze zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub> profitovala. Hodnoty optické hustoty měřené ve fotobioreaktoru potvrdily vyšší růstovou rychlost, nárůst biomasy se u kultury HC+ zvýšil. Zároveň u buněk této varianty došlo nepatrně ke zvýšení syntézy chlorofylu. Tyto výsledky byly potvrzeny vypočtením růstových rychlostí z těchto měření a také z měření parametrů variabilní fluorescence chlorofylu (**graf 3.13**). Pravděpodobně se tak stalo díky zvýšené koncentraci CO<sub>2</sub> a díky jeho snadné difuzi do buňky, a zbývající energie mohla být v těchto buňkách realokována do dalších metabolických procesů (Levitan et al. 2007, Levitan et al. 2010).

Naopak, výsledky variant LC- a HC- vykazaly výrazné snížení růstu a inhibici metabolických procesů u buněk HC- (podobně jako u sinice *Cyanothece* sp. ATCC 51142). Tento efekt může být u buněk sinice *Anabaena* sp. PCC 7120 způsoben kyselejším pH, v důsledku zvýšeného CO<sub>2</sub>, což pro tyto buňky může být stresujícím faktorem. Sladkovodní médium BG11, ve kterém byla sinice *Anabaena* sp. PCC 7120 pěstována, nemá dostatečnou pufrací kapacitu, a proto se s vyšším množstvím rozpuštěného CO<sub>2</sub> ve vodě pH snadněji posune do kyselé oblasti. Podobným způsobem (redukcí růstové rychlosti) reagovala na acidifikaci a nasycení CO<sub>2</sub> sinice *Nodularia spumigena*, která je morfologicky a fyziologicky podobná sinici *Anabaena* sp. PCC 7120 (Czerny et al. 2009). Sinice *Nodularia spumigena* reagovala na zvýšenou koncentraci CO<sub>2</sub> také redukcí fixace dusíku, což se v našich experimentech neprokázalo. Naopak, varianta HC- vykazovala vyšší míru fixace dusíku (**graf 3.15, 3.16**).

Po přesunu buněk variant LC- a HC- do média bez dusíku se tyto varianty začaly adaptovat na diazotrofní prostředí. Doba adaptace závisí na rychlosti formování heterocystů ve vlákních mezi vegetativními buňkami a s tím zároveň souvisí i rychlost syntézy nitrogenázy v heterocystech. Kultura LC- se na diazotrofii adaptovala po dobu 48 hodin, poté začala fixovat N<sub>2</sub> (Ferimazova et al., 2010: Regulation of photosynthesis during heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 investigated by chlorophyll fluorescence kinetic microscopy), (**obr. 4.1 A-C**).



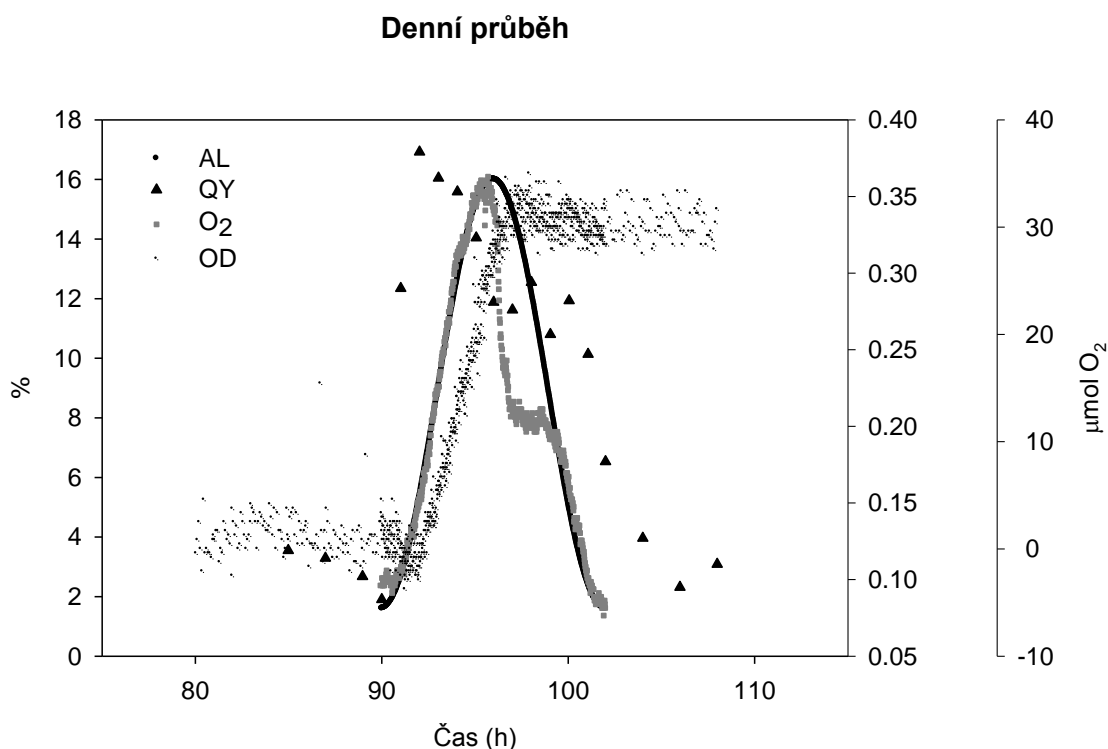


**Obr. 4.1 A-C:** Vývoj heterocystů v sinici *Anabaena* sp. PCC 7120 během adaptace na diazotrofii. Sledováno na kultuře LC-. (A) Vlákno buněk po přenesení kultury do média bez dusíku, v čase  $t = 0\text{h}$ . Ve vláknech se nacházejí pouze vegetativní buňky. (B) Sinice v čase  $t = 24\text{h}$ . Ve vláknech se začínají diferencovat první heterocysty, viz červeně ohraničená buňka. (C) Buňky sinice v čase  $t = 50\text{h}$ . Ve vláknech jsou vytvořeny plně fungující heterocysty, viz červeně ohraničené buňky.

Kultura HC- reagovala na bezdusíkaté prostředí rychleji, enzym nitrogenázu byla schopná nasyntetizovat již během 24 hodin (**graf 3.16**). Protože je nitrogenáza prostorově oddělena od fotosynteticky aktivních buněk, může tato sinice využít k fixaci  $\text{N}_2$  světelnou periodu celého dne. Naše experimenty dokázaly, že k zahájení fixace dusíku dochází hned na počátku světelné fáze, v čase L0 při intenzitě záření  $12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Množství fixovaného dusíku stoupá až do maximální míry fixace, která byla naměřena v poledne, v čase L5, respektive L6, při intenzitě záření  $126 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Poté dochází k postupnému snižování až úplnému vymizení fixace  $\text{N}_2$ , a to v čase L12, při intenzitě záření  $12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Tento denní vzor pro průběh fixace  $\text{N}_2$  byl zjištěn i u buněk variant HC-. Navíc u byla u této kultury prokázána vyšší míra fixace  $\text{N}_2$  (Chinnasamy et al. 2009). Celkové množství nafixovaného dusíku během jednoho 12ti hodinového cyklu kultury HC- bylo 1,5krát vyšší než u kultury LC- (**graf 3.15**). Proces fixace dusíku je náročný proces a vyžaduje značné investice energie ve formě 16 ATP a 8 elektronů pro redukci jedné molekuly  $\text{N}_2$  na  $\text{NH}_3$ . Obecně se předpokládá, že zvýšená fixace dusíku za zvýšené koncentrace  $\text{CO}_2$  může být nepřímým efektem, který vyplývá ze zmírnění uhlíkové limitace v buňce (Hutchins et al. 2007).

### 4.3 Denní změny

Kontinuální záznamy naměřených parametrů z fotobioreaktoru umožňují sledovat denní změny s velkým časovým rozlišením. Jako příklad lze uvést jeden 24 hodinový cyklus sinice *Cyanothece* sp. Pěstované za podmínek HC- (**graf 4.1**). Z tohoto grafu je patrná závislost kvantového výtěžku, množství vyvinutého kyslíku a optické hustoty (biomasy) na intenzitě záření. Záznam optické hustoty (**graf 3.2 B**) ukázal kinetiku nárůstu biomasy během denní periody a naopak úbytek biomasy během temnotní fáze. Trend zvyšujícího se OD se zvyšující se intenzitou záření by mohl být způsoben možným zvětšováním objemu buněk jako příprava na dělení a také buněčným dělením. Závislost změny množství  $O_2$  na intenzitě záření je dána fotosyntetickým vývinem  $O_2$ . Rychlost fotosyntézy je přímo úměrná intenzitě světla; se zvyšující se intenzitou se zvyšuje i rychlost procesu fotosyntézy. Kvantový výtěžek fotochemie v PSII klesá během dne (relativní minimum v poledne, fotoinhibice) a především v noci – tento je pravděpodobně způsoben degradací aktivních PSII center.



**Graf 4.1:** Záznam 24 hodinového cyklu sinice *Cyanothece* sp. ATCC 51142 ve fotobioreaktoru. V grafu je vynesena intenzita záření (AL - actinic light; černá křivka, levá osa), optická hustota (tečkovaná křivka, pravá osa), kvantový výtěžek (trojúhelníkové body, pravá osa) a kyslík (šedá křivka, vedlejší pravá osa) v závislosti na čase. Hodnoty optické hustoty, kvantového výtěžku a míra vývoje kyslíku vykazovaly změny v závislosti na intenzitě záření.

## 5. Závěr

1. Zjistili jsme, že zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> (900ppm) má u sinic *Cyanothece* sp. ATCC 51142 a *Anabaena* sp. PCC 7120 pěstovaných v diazotrofních podmínkách inhibiční vliv na jejich růstovou rychlost. Tyto naše závěry se shodují se závěry práce Czerny et al. 2009. Naopak jsme ale také dokázali, že zvýšená koncentrace CO<sub>2</sub> měla pozitivní vliv na míru fixace dusíku, což potvrzuje závěry prací (Chinnasamy et al. 2009, Hutchins et al. 2007, Levitan et al. 2007, Levitan et al. 2010).
2. Nový poznatek této práce se týká strategie fixace dusíku sinice *Cyanothece* sp. ATCC 51142. Obecně se předpokládá, že jako jednobuněčná sinice fixuje dusík jen během temnotní fáze, avšak v našich experimentech jsme dokázali, že tento proces nastává již během světelné fáze.
3. Studium nočního poklesu variabilní fluorescence sledovaného u sinice *Cyanothece* sp. ATCC 51142 a *Anabaena* sp. PCC 7120, nezávisle na podmínkách diazotrofie či zvýšené koncentrace CO<sub>2</sub>, jsme zjistili že během tohoto procesu dochází k degradaci aktivních PSII center.

## 6. Citovaná literatura:

- Adir N (2005) Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynthesis Research* **85**: 15-32
- Apt KE, Collier JL, Grossmann AR (1995) Evolution of Phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology* **248**: 79-96
- Badger MR, Price GD (2002) CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany* **54** (383): 609-622
- Beardall J, Stojkovic S, Larsen S (2009) Living in a high CO<sub>2</sub> world: impacts of global climate change on marine phytoplankton. *Plant Ecology and Diversity* 2(2): 191-205
- Bergman B, Gallon JR, Rai AN, Stal LJ (1997) N<sub>2</sub> Fixation by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **19**: 139-185
- Berman-Frank I, Lundgren P, Falkowski P (2003) Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology* **154**: 157-164
- Cleveland CC, Townsend RA, Schimel DS, Fisher H, Howarth RW, Hedin LO, Perakis SS, Latty EF, Von Fischer JC, Elseroad A, Wasson MF (1997) Global Patterns of Terrestrial Biological Nitrogen (N<sub>2</sub>) Fixation in Natural Ecosystems. *Global Biogeochem. Cycles*, **13**(2): 623-645
- Chinnasamy S, Ramakrishnan B, Bhatangar A, Goral SK, Das KC (2009) Karbon and Nitrogen Fixation under Elevated CO<sub>2</sub> and Temperature. *Journal of Freshwater Ecology* (24) 4: 587-596
- Czerny J, Barcelos e Ramos J, Riebessell U (2009) Influence of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on cell division and nitrogen fixation rates in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Biogeosciences Discussions* **6**: 4279-4304
- Dyhrman ST, Haley ST (2006) Phosphorus scavenging in the Unicellular Marine Diazotroph *Crocospaera watsonii*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1452-1458
- Falcón IL, Carpenter EJ, Cipriano F, Bergman B, Capone DG (2004) N<sub>2</sub> Fixation by Unicellular Bacterioplankton from the Atlantic and Pacific Oceans: Phylogeny and In Situ Rates. *Applied and Environmental Microbiology* **70** (2): 765-770

- Fay P (1992) Oxygen Relations of Nitrogen Fixation in Cyanobacteria. *Microbiological Reviews* **56** (2): 340-373
- Feely RA, Doney SC, Cooley SR (2009) Ocean Acidification: Present Conditions and Future Changes in a High-CO<sub>2</sub> World. *Oceanography* **22** (4): 36-47
- Gallon JR (1992) Reconciling the incompatible: N<sub>2</sub> fixation and O<sub>2</sub>. *New phytologist* **122**: 571-609
- Giordano M, Beardall J, Raven JA (2005) CO<sub>2</sub> Concentrating Mechanisms in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. *Annual Review of Plant Physiology* **56**: 99-131
- Green BR (2007) Evolution of Light-Harvesting Antennas in an Oxygen World. In: Falkowski GP, Knoll AH (2007): *Evolution of Primary Producers in the Sea*: 37-53
- Hutchins DA, Fu FX, Zhang Y, Warner ME, Feng Y, Portune K, Bernhardt PW, Mulholland MR (2007) CO<sub>2</sub> control of *Trichodesmium* N<sub>2</sub> fixation, photosynthesis, growth rates, and elemental ratios: Implications for past, present, and future ocean biogeochemistry. *Limnology and oceanography* **52**: 1293-1304
- Hutchins DA, Mulholland MR, Fu FX (2009) Nutrient Cycles and Marine Microbes in a CO<sub>2</sub>-Enriched Ocean. *Oceanography* **22** (4): 128-145
- Kaplan A, Reinhold L (1999) CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 539-570
- Levitan O, Brown CHM, Sudhaus S, Campbell D, LaRoche J, Berman-Frank I (2010) Regulation of nitrogen metabolism in the marine diazotroph *Trichodesmium* IMS101 under varying temperatures and atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. *Environmental microbiology* **12**(7): 1899-1912
- Montoya JP, Holl CM, Zehr JP, Hansen A, Villareal TA, Capone DG (2004) High rates of N<sub>2</sub> fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* **430**: 1027-1031
- Nedbal L, Trtílek M, Červený J, Komárek O, Pakrasi HB (2008) A Photobioreactor System for Precision Cultivation of Photoautotrophic Microorganisms and for High-Content Analysis of suspension Dynamics. *Biotechnology and Bioengineering* **100** (5): 902-910

- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. *Biochim Biophys Acta* **975**: 384-394
- Reddy KJ, Haskell B, Sherman DM, Sherman LA (1993) Unicellular, Aerobic Nitrogen-Fixing Cyanobacteria of the Genus *Cyanothece*. *Journal of Bacteriology* **175** (5): 1284-1292
- Schneegurt MA, Sherman DM, Nayar S, Sherman LA (1994) Oscillating Behavior of Carbohydrate Granule Formation and Dinitrogen Fixation in the Cyanobacterium *Cyanothece* sp. Strain ATCC 51142. *Journal of Bacteriology* **176** (6): 1586-1597
- Sherman LA, Meunier P, Colón-López MS (1998) Diurnal rhythms in metabolism: A day in the life of a unicellular, diazotrophic cyanobacterium. *Photosynthesis research* **58**: 25-42
- Smith KS, Ferry JG (2000) Procaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 335-366
- Stal LJ (2003) Smart modeling of unusual cyanobacteria – an enigma solved?. *New Phytologist* **160**: 455-462
- Stal LJ, Zehr JP (2008) Cyanobacterial Nitrogen Fixation in the Ocean: Diversity, Regulation, and Ecology. In: *Microbial Ecology of the Oceans*, Second edition. Wiley
- Taniuchi Y, Yoshikawa S, Maeda S, Tatsuo O, Ohki K (2008) Diazotrophy under continuous light in a marine unicellular diazotrophic cyanobacterium, *Gloeotheca* sp.68DGA. *Microbiology* **154**: 1859-1865
- Webb EA, Moffett JW, Waterbury JB (2001) Iron Stress in Open-Ocean Cyanobacteria (*Synechococcus*, *Trichodesmium*, and *Crocospaera* spp.): Identification of the IdiA Protein. *Applied and Environmental Microbiology* (**67**) 12: 5444-5452
- Wood AM, Everroad RC, Wingard LM (2005) Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures. In: Andersen A (2005) *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press: 269-285
- Zehr JP, Paerl HW (2008) Molecular ecological aspects of nitrogen fixation in the marine environment. In: *Microbial Ecology of the Oceans*, Second edition. Wiley

Zhao W, Guo Q, Zhao J (2007) A Membrane-Associated Mn-Superoxidase Dismutase Protects the Photosynthetic Apparatus and Nitrogenase from Oxidative Damage in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Plant Cell Physiology* 48(4): 563-572

**Poster:**

Ferimazova N, Šetlíková E, Küpper H, Felcmanová K, Hošková B, Maldener I, Hauska G, Šetlík I, Prášil O (2010) Regulation of photosynthesis during heterocyst differentiation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 investigated by chlorophyll fluorescence kinetic microscopy.

**Internetové zdroje:**

1.1 [http://www.nature.com/.../n8/fig\\_tab/nrmicro954\\_F1.html](http://www.nature.com/.../n8/fig_tab/nrmicro954_F1.html) (stav ke dni 29. 4. 2009)

1.2 <http://gnosis9.net/koncentrace.php> (stav ke dni 14. 4. 2011)