

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

**Akumulácia a toxicita selénu v riasach  
druhu *Scenedesmus quadricauda***

doktorská dizertační práce

**Mgr. Dáša Umysová**

Školitel: RNDr. Vilém Zachleder, CSc.

Školitel-špecialista: RNDr. Kateřina Bišová, PhD.

RNDr. Milada Vítová, PhD.

Mikrobiologický ústav AV ČR, Oddělení autotrofních mikroorganismů  
Opatovický mlýn, Třeboň

České Budějovice

2011

**Doktorská dizertačná práca**

Umysová, D., 2011: Akumulácia a toxicita selénu v riasach druhu *Scenedesmus quadricauda*. [Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. Ph.D. Thesis, in Slovak.] – 78 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:** Three strains of the green alga *Scenedesmus quadricauda* were selected to be specifically resistant to the presence of high concentrations of inorganic Se. The strain SeIV was found to be resistant to high doses of selenite, the strain SeVI was resistant to selenate, and the strain Se(IV+VI) to the presence of both Se compounds. It has been shown that both the dose and chemical form of Se are the critical factors in the cellular response. In this PhD. thesis are results from experiments with the resistant strains (activity of thioredoxin reductase, content of selenium and selenomethionine, effect of sulphur deficiency).

Táto práca je súčasťou riešenia projektov financovaných grantmi GAAV č. IAA 600 200 701 a GAČR 525/09/0102.

Prehlasujem, že som túto doktorskú dizertačnú prácu vypracovala samostatne len s použitím citovanej literatúry.

Prehlasujem, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platnom znení súhlasím so zverejnením mojej dizertačnej práce, a to v neskrátenej podobe – v úprave vzniknutej vypustením vyznačených častí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou vo verejne prístupnej časti databáze STAG prevádzkovej Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jej internetových stránkach, a to so zachovaním mojho autorského práva k odovzdanému textu tejto kvalifikačnej práce. Ďalej súhlasím s tým, aby rovnakou elektronickou cestou boli v súlade s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. uverejnené posudky školiteľa a oponentov práce ako záznam o priebehu a výsledku obhajoby kvalifikačnej práce. Rovnako súhlasím s porovnaním textu mojej kvalifikačnej práce s databázou kvalifikačných prác Theses.cz prevádzkovanou Národným registrom vysokoškolských kvalifikačných prác a systémom na odhalovanie plagiátov.

V Třeboni, 1. 3. 2011

Dáša Umysová

## **Pod'akovanie**

Rada by som poďakovala môjmu školiteľovi RNDr. Vilémovi Zachlederovi CSc. za skvelý prístup a trpezlivosť. Rovnako veľká vďaka patrí aj mojej školiteľke špecialistke RNDr. Kateřine Bišovej PhD. za stálu ochotu vysvetliť mi všetko čomu som ešte nerozumela. RNDr. Milade Vítovej PhD., taktiež školiteľke špecialistke, za trpezlivosť pri oprave mojich prvých písomných prejavov. Laborantkám nášho laboratória za stály prísun čistých valcov a sterilných živných roztokov. Nakoniec by som sa rada poďakovala môjmu priateľovi a rodine, ktorí mi boli po celý čas oporou, aj keď to bolo niekedy ťažké. Bez podpory týchto ľudí by táto práca pravdepodobne nevznikla.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	1
<b>2. Literárny prehľad</b> .....	2
2.1. Modelový organizmus.....	2
2.2. Bunkový cyklus.....	3
2.3. Bunkový cyklus s násobným delením.....	4
2.4. Selén.....	6
2.5. Výskyt.....	7
2.6. Vplyv selénu na ľudský organizmus.....	8
2.7. Metabolizmus selénu a jeho zlúčeniny.....	9
2.8. Inzercia selenocysteínu do proteínov.....	10
2.9. Selenoproteíny.....	12
2.9.1 Tioredoxín reduktáza.....	12
2.10. Selén u rastlín.....	14
2.11. Selén u rias.....	15
2.12. Selén v bunkách (toxicita a pozitívny efekt).....	16
<b>3. Materiál a metódy</b> .....	17
3.1. Použitý organizmus.....	17
3.2. Kultivácie.....	17
3.3. Synchronne a nesynchronne kultúry.....	18
3.4. Meranie vzoriek na Coulter Counteri.....	18
3.5. Stanovenie commitment pointu a krivky bunkového delenia.....	19
3.6. Stanovenie sušiny.....	19
3.7. Stanovenie optickej hustoty.....	19
3.8. Stanovenie aktivity tioredoxínreduktázy.....	19
3.9. Stanovenie celkového selénu.....	20
3.10. Stanovenie selenometionínu.....	21
3.11. Mikrofotografie.....	21
<b>4. Výsledky</b> .....	22
4.1. Toxicita selénu.....	22
4.1.1 Toxicita seleničitanu.....	22
4.1.2 Toxicita selenanu.....	23
4.2. Selekcia kmeňov rezistentných voči selénu.....	25
4.2.1 Kmeň rezistentný voči seleničitanu.....	25
4.2.2 Kmeň rezistentný voči selenanu.....	28
4.2.3 Kmeň rezistentný voči oboj formám selénu.....	30
4.3. Obsah selénu v bunkách.....	31
4.4. Aktivita tioredoxín reduktázy.....	34
4.4.1 Aktivita TR u nesynchronných kultúr.....	34
4.4.2 Synchronne kultúry.....	36
4.5. Rast kultúr v živnom roztoku so zníženým obsahom síry.....	40
4.5.1 Rast divokého kmeňa v živnom roztoku so zníženým obsahom síry a v prítomnosti selénu.....	40
4.5.2 Rast kmeňa SeIV v živnom roztoku so zníženým obsahom síry a v prítomnosti selénu.....	42
4.5.3 Rast kmeňa SeVI v živnom roztoku so zníženým obsahom síry a v prítomnosti selénu.....	45
4.5.4 Rast kmeňa SeIV+VI v živnom roztoku so zníženým obsahom síry a v prítomnosti selénu.....	48

4.6.	Toxicita selénu vyjadrená hodnotou EC <sub>50</sub> .....	50
<b>5.</b>	<b>Diskusia</b> .....	<b>53</b>
5.1.	Toxicita selénu a selekcia kmeňov rezistentných voči selénu .....	54
5.2.	Množstvo celkového selénu a selenometionínu .....	56
5.3.	Aktivita tioredoxín reduktázy.....	58
5.4.	Rast kultúr v živnom roztoku so zníženým obsahom síranu.....	59
<b>6.</b>	<b>Záver</b> .....	<b>62</b>

# 1. Úvod

Svoju dizertačnú prácu som vypracovala v Laboratóriu bunkových cyklov AV ČR v Třeboni. Práca s riasami má v tomto laboratóriu vyše 40 ročnú tradíciu. Riasy *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus quadricauda*, patriace do triedy Chlorophyta, sa rozmnožujú netradičným mnohonásobným delením a sú výbornými modelovými organizmami používanými hlavne pre štúdium bunkového cyklu. *Scenedesmus quadricauda* je tiež používaný na testovanie toxicity rôznych látok, regulácie bunkového cyklu, fotosyntézy, biogenézy organel a metabolizmu. Výhodou je ľahká kultivácia a synchronizácia pomocou striedania svetelnej a tmavej fázy.

Moja dizertačná práca je zameraná na *Scenedesmus quadricauda* a akumuláciu selénu. Selén je esenciálny mikroelement potrebný v diéte mnohých organizmov vrátane človeka, avšak vo vyšších dávkach pôsobí toxicky. Cieľom práce bolo získať viac poznatkov o jeho pôsobení na riasy a akumulácii v nich.

Som rada, že som svojou prácou mohla prispieť k lepšiemu poznaniu spôsobu pôsobenia selénu na riasy rodu *Scenedesmus*.

## 2. Literárny prehľad

### 2.1. Modelový organizmus

*Scenedesmus quadricauda* (Obr. 1.) (synonymum *Desmodesmus quadricauda* (<http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php?page=sr&cb1=Algae>)) je jednobunková zelená



**Obr. 1. Materské bunky s deliacimi sa protoplasmami v 4 - a 8-bunkovom cenóbiu riasy *Scenedesmus quadricauda*.**

riasa, vyskytujúca sa v sladkých alebo brakických vodách. Patrí do kmeňa Chlorophyta a triedy Chlorophyceae rovnako ako *Chlamydomonas reinhardtii*. Bunky rodu *Scenedesmus* sú bezbičikaté, uložené v jednom rade a množia sa vegetatívne delením. Dcérske bunky pochádzajúce z delenia jednej materskej bunky sú spojené spoločnou bunkovou stenou a tvoria cenóbiium. Tvorí ho obyčajne 4 alebo 8 buniek a jeho koncové bunky majú obvykle dva ostne. Bunková stena je trojvrstvová a zabezpečuje mechanickú odolnosť buniek. Jej polysacharidová časť je tvorená

mikrofibrilárnou (celulóza, manány a xylány) a amorfnou (hemicelulózy a pektíny) zložkou. Ďalej obsahuje malé množstvo bielkovín, napríklad extenzínu, čo je glykoproteín s vysokým obsahom hydroxyprolínu. Typickú súčasť bunkovej steny tvorí látka podobná sporopolenínu, ktorý sa obvykle nachádza v bunkovej stene peľových zŕn a rôznych spór a spôsobuje jej vysokú odolnosť (<http://www.biology-online.org>, access year 2007). Jednotlivé bunky obsahujú jadro a jednoduchý miskovitý chloroplast s jedným pyrenoidom. Pyrenoid nie je oddelený membránou a jeho povrch môže byť pokrytý škrobovými zrnami (Luštinec et al., 1983). Chloroplasty obsahujú nukleoidy, ktorých počet sa počas životného cyklu zvyšuje, sú teda vedľa mitochondrií ďalším zdrojom mimojadrovej dedičnosti. Chloroplastový a mitochondriálny genóm bol sekvenovaný u iného zástupcu rodu *Scenedesmus*, u *S. obliquus*.

Rod *Scenedesmus* je súčasťou fytoplanktónu a významnou mierou sa podieľa na výžive živočíchov v rybníkoch. V jeho sušine boli dokázané vitamín B12, kyselina pantoténová, kyselina nikotínová, kyselina listová a iné (Fott, 1967).

## 2.2. Bunkový cyklus

U jednobunkových aj u mnohobunkových eukaryotov je bunkové rozmnožovanie cyklický proces rastu, ktorý zahŕňa mitózu (karyokinézu) a bunkové delenie (cytokinézu). Život bunky ohraničený dvoma deleniami je označovaný ako bunkový cyklus.

Bunkový cyklus je rozdelený na štyri fázy G1, S, G2 a M (Howard and Pelc, 1953). Fázy G1, S a G2 tvoria interfázu. Vo fáze G1 prebiehajú v bunke syntetické procesy nevyhnutné pre rast. Po dosiahnutí určitej veľkosti charakteristickej pre daný druh sa spúšťajú reprodukčné procesy ako replikácia DNA, delenie jadier a samotných buniek. Vo fáze S sa replikuje bunková DNA a po ukončení replikácie vstupuje bunka do G2 fázy, kde prebiehajú prípravné procesy nevyhnutné pre začiatok jadrového delenia. Mitotická M fáza, rozdelená na 4 cytologicky odlišiteľné štádiá (profáza, metafáza, anafáza, telofáza), predstavuje vlastné delenie, pri ktorom sa oddeľujú dcérske chromozómy, dôjde k rozdeleniu jadier a neskôr aj k rozdeleniu buniek.

Bunkový cyklus je sekvencia na sebe závislých dejov. Iniciácia neskoršej udalosti nastane iba po úspešnom ukončení predchádzajúcej udalosti. Bunkový cyklus je starostlivo kontrolovaný prechodom cez regulačné body. V týchto bodoch sa rozhoduje, či je bunka schopná pokračovať v bunkovom cykle. Kontrolné body sú označované ako „checkpoints“ alebo „restriction points“. Hoci je regulačných bodov v priebehu bunkového cyklu mnoho, dva z nich sa považujú za kľúčové. Jeden sa nachádza ku koncu G1 fázy a spúšťa reprodukčné procesy. U kvasiniek sa tento bod označuje ako „ŠTART“ a u cicavcov ako „restriction point“ (Furukawa et al., 1990; Sherlock and Rosamond, 1993). U rias, je označovaný termínom „commitment point“ (CP) (John, 1984; John, 1987). V prípade nedostatočnej veľkosti bunky, alebo poškodenia DNA je daná bunka zadržaná v G1 fáze a nie je schopná vstúpiť do S fázy. V druhom kľúčovom bode sa v G2 fáze spúšťajú procesy vedúce k jadrovému deleniu. Ak sa DNA nereplikuje, prípadne bunka nie je dost' veľká a je v nepriaznivom prostredí, tak nie je schopná vstúpiť do M fázy. Nie všetky kontrolné body upozorňujú na DNA poškodenia, či replikačné chyby. Genómová stabilita vyžaduje tiež presné rozdelenie chromozómov v mitóze. V tomto prípade je dôležitý kontrolný bod, ktorý sa vyskytuje v M fáze a kontroluje správnosť pripojenia chromozómov k mitotickému vretienku.

Riasy sú veľmi veľkou rôznorodou skupinou organizmov, v ktorej sa vyskytujú organizmy tvorené jednotlivými bunkami až po takmer diferencované stielky. Riasový



bunkový cyklus začína podobne ako u ostatných organizmov rastovou fázou G1, ktorá je nasledovaná zdvojením DNA, rozdelením jadra a cytokinézou. U rias sa vyskytujú dva základné typy bunkového delenia. Jednak bunkový cyklus typu  $C_1$ , v ktorom vznikajú z jednej materskej bunky dve dcérske. Tento cyklus sa bežne vyskytuje u väčšiny eukaryotických buniek. Častejšie sa však vyskytuje bunkový cyklus typu  $C_n$ . Jeho výsledkom býva rôzny počet dcérskych buniek. Týmto typom bunkového cyklu sa vyznačujú aj riasy *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus quadricauda* (Šetlík and Zachleder, 1984).

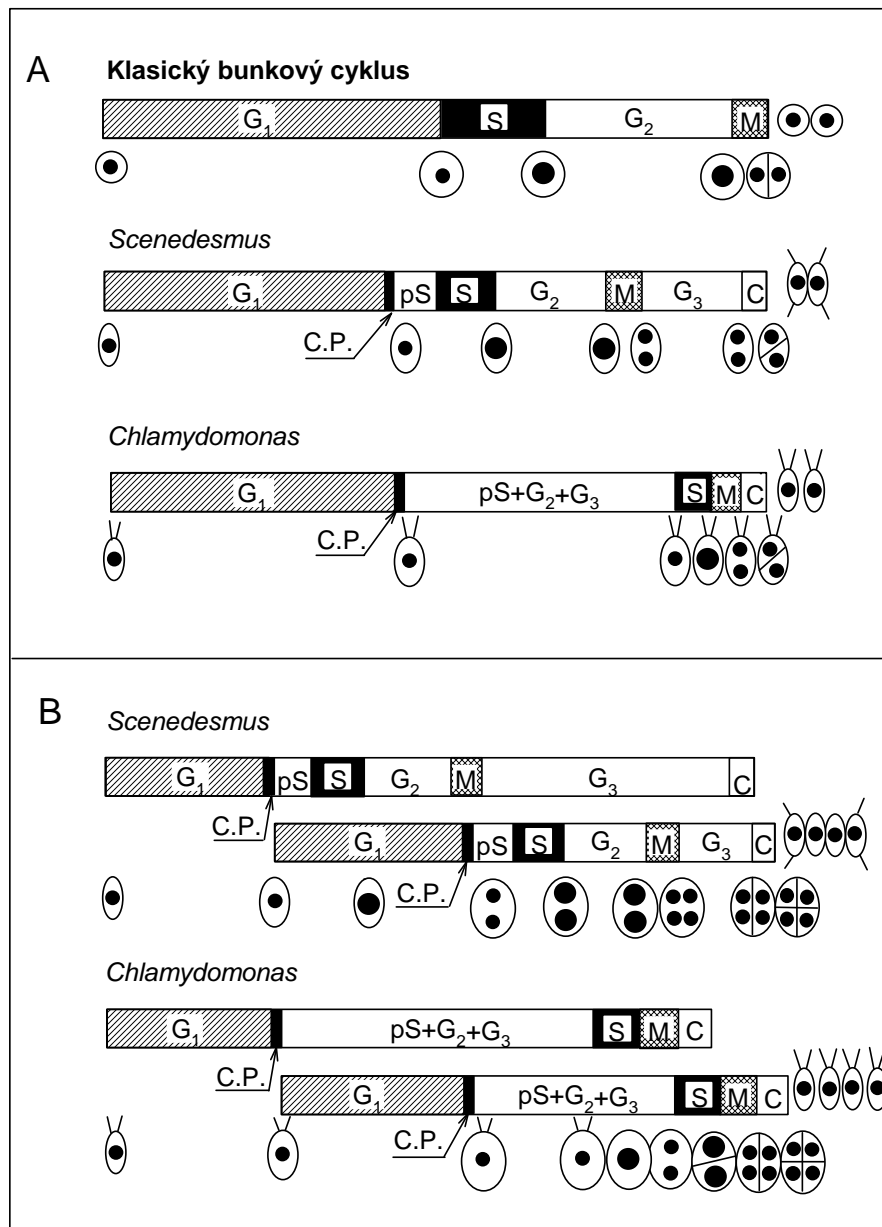
### 2.3. Bunkový cyklus s násobným delením

Počas jedného cyklu typu  $C_n$  prebehnú  $n$ -krát pochody charakteristické pre fázy G1, S, G2 a M. Cytokinéza môže byť niekedy časovo oddelená od mitózy a tento časový úsek je možné označiť ako fázu G3 (Obr. 2., časť A) (Zachleder, 1995; Zachleder et al., 1996). Pre tento typ bunkového cyklu platí, že v čase, keď v riasovej bunke prebiehajú reprodukčné deje, bunka ešte ďalej rastie a následne môže byť zahájené ďalšie delenie. V rámci jedného bunkového cyklu sa postupne spúšťa niekoľko radov reprodukčných procesov, ktoré sa navzájom prekrývajú (Šetlík et al., 1972; Zachleder, 1995; Zachleder and Šetlík, 1990; Zachleder and van den Ende, 1992).

Jedna materská bunka takto produkuje  $2^n$  dcérskych buniek, kde „ $n$ “ je celé číslo udávajúce počet delení, tj. počet radov reprodukčných procesov, ktoré prebiehajú počas jedného bunkového cyklu. Každý z týchto radov je spustený v pomyselnom bode bunkového cyklu, tzv. bode rozhodnutia (CP; „commitment point“), čo je obdoba termínu „ŠTART“ v kvasinkovom bunkovom cykle (John, 1984). To, či konkrétna bunka (resp. populácia synchronných buniek) prešla v určitom okamihu bodom rozhodnutia, je možné určiť spätne. O dosiahnutí CP totiž vypovedá schopnosť bunky rozdeliť sa, teda absolvovať všetky reprodukčné procesy bez ďalšieho dodania energie, ktorú predstavuje svetlo (Šetlík et al., 1972; Zachleder and Šetlík, 1990; Zachleder and van den Ende, 1992).

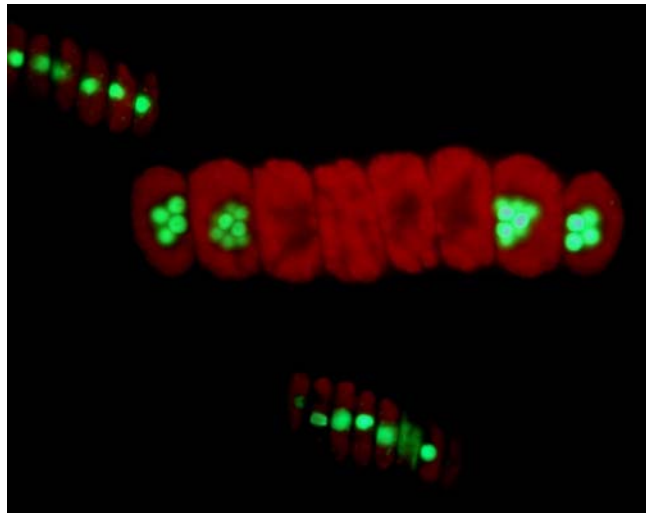
Z uvedeného popisu je zrejmé, že priebeh násobného delenia riasových buniek musí byť starostlivo regulovaný. Táto regulácia je založená na obdobných molekulárnych princípoch (Bišová et al., 2000; John et al., 1989; Tukaj et al., 1996; Zachleder, 1995) ako u delenia na 2 dcérske bunky, ktoré je preštudované napríklad u kvasiniek alebo cicavčích buniek.

Bunkový cyklus typu  $C_n$  môžeme rozčleniť na dva podtypy. Prvý je charakteristický pre riasu *Chlamydomonas reinhardtii* - typ *Chlamydomonas* (Lien and Knutsen, 1979) a druhý je



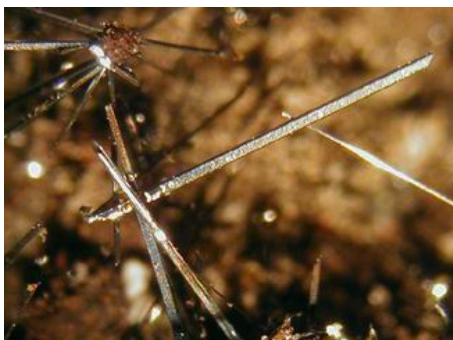
**Obr. 2. Schéma rôznych typov bunkových cyklov.** Klasický bunkový cyklus podľa Howarda, bunkový cyklus *Scenedesmus* podľa Šetlíka a *Chlamydomonas* podľa Zachledera (Howard and Pelc, 1953; Šetlík and Zachleder, 1984; Zachleder and van den Ende, 1992). Časť A zobrazuje delenie materských buniek na dve dcérske bunky a časť B na štyri dcérske bunky. Fázy bunkového cyklu sú zobrazené v rámečkoch. Schématické obrázky znázorňujú postupný rast rias počas bunkového cyklu a čierne kolieska počet jadier. Väčšie čierne kolieska naznačujú zdvojenie DNA. V časti A prebehne jedna sada reprodukčných procesov, a v časti B dve sady, ktoré sa navzájom čiastočne prekrývajú. G<sub>1</sub>: fáza, počas ktorej bunka rastie a dosiahne dostatočnú veľkosť. C.P.: štádium bunky, v ktorom sa bunka rozhoduje, či sa rozdelí. pS: prereplikačná fáza medzi commitment point a DNA replikáciou. S: fáza, počas ktorej sa DNA bunky zdvojnásobí. G<sub>2</sub>: fáza medzi ukončením replikácie DNA a mitózou typický pre riasu *Scenedesmus quadricauda* – teda typ *Scenedesmus* (Šetlík et al., 1972; Zachleder, 1983, 1995; Zachleder et al., 1996; Zachleder and Šetlík, 1990) bunky. M: fáza delenia bunkového jadra. G<sub>3</sub>: fáza medzi delením jadra a vlastným rozdelením bunky. C: rozdelenie bunky, cytokinéza.

typický pre riasu *Scenedesmus quadricauda* – teda typ *Scenedesmus* (Šetlík et al., 1972; Zachleder, 1983, 1995; Zachleder et al., 1996; Zachleder and Šetlík, 1990). Pre typ *Chlamydomonas* je charakteristické, že sa najprv postupne n-krát opakujú procesy G1 fázy a po ich ukončení prebehnú v krátkom časovom úseku procesy ďalších fáz (Obr. 2., časť B). V bunkách s bunkovým cyklom typu *Scenedesmus* prebieha v bunke s určitým časovým odstupom niekoľko postupností bunkového cyklu (Obr. 2). Fázy bunkového delenia sa navzájom prekrývajú (Šetlík and Zachleder, 1984; Zachleder and Šetlík, 1990). Počas G1 fázy bunky rastú a môžu dosiahnuť rôzny počet commitment pointov. Po každom z nich nasleduje replikácia DNA a delenie jadra, nie však delenie bunky. Počas bunkového cyklu sú bunky mnohoadrové (Obr. 3.). Po skončení jadrového delenia nasleduje delenie bunky (Šetlík and Zachleder, 1984; Zachleder et al., 2002; Zachleder and Šetlík, 1990).



**Obr. 3. Materské a dcérske cenóbiu riasy *Scenedesmus quadricauda*, červená-chloroplasty (autofluorescencia chlorofylu), zelená-jadrá (farbené SYBR Green I). Delenie buniek začína od stredu cenóbia smerom k okrajom. Z vonkajšej strany cenóbia vidíme 4-jadrové, 8-jadrové bunky, bunky s deliacimi sa chloroplastami a prostredné bunky majú už rozdelené jadrá a chloroplasty, začína cytokinéza. V spodnej časti obrázku vidíme autospóru uvoľnenú z materského cenóbia. Zväčšené 1000x.**

## 2.4. Selén



Selén je chemický prvok s protónovým číslom 34 a značkou Se. Patrí medzi nekovy, je sivej farby s kovovým odleskom. Prirodzene sa vyskytuje v anorganickej forme ako selenid, seleničitan a selenan.

Selenan (oxidačné číslo +6) je stabilný v alkalickom prostredí a rovnako aj v prítomnosti

oxidačných činidiel. Prirodzene sa vyskytuje v alkalických pôdach a vode, odkiaľ je ľahko dostupný pre rastliny. Pre svoju stabilitu a rozpustnosť je pre životné prostredie potenciálne najnebezpečnejšou formou selénu.

Seleničitan (oxidačné číslo +4) má tendenciu sa v alkalickom prostredí pomaly oxidovať na selenan, ak je prítomný kyslík. Je ľahko redukovateľný na elementárny selén veľkým počtom redukujúcich činidiel.

Najstabilnejšou formou elementárneho selénu je hustá purpurovo-šedá polokovová forma. Medzi jeho ďalšie formy patria 3 červené monoklinické polymorfné formy zložené z kruhov Se<sub>8</sub>, červený amorfný selén, ktorý vzniká kondenzáciou selénových pár na chladnom povrchu a čierny sklovitý selén, ktorý má zložitú nepravidelnú štruktúru. V pôde sa vyskytuje najčastejšie ako vo vode rozpustný selenan (rovnako ako sulfát). Najstabilnejšou oxidovanou formou sú selenany, z nich najznámejší, selenan sodný, sa získava kryštalizáciou z vodného roztoku (Barceloux, 1999). Selén je svojimi chemickými a fyzikálnymi vlastnosťami podobný síre, vyznačuje sa afinitou k ťažkým kovom, hlavne kadmiu, zlatu a ortuti (Combs and Combs, 1987).

V prvej polovici 20. storočia bol selén považovaný za toxický a nežiadúci v potrave vyšších organizmov. Jeho toxicita bola objavená v roku 1933, keď sa na západe USA priotrávili hospodárske zvieratá po konzumácii rastlín akumulujúcich selén (*Astragalus*, *Xylorrhiza*, *Oonopsis*, *Stanleya*) (Oldfield, 1987). Začiatok druhej polovice 20. storočia priniesol zmeny v chápaní selénu ako potravinového doplnku. Schwarz a Foltz zistili, že selén je esenciálny prvok a treba ho prijímať v strave v malých množstvách (Schwarz and Foltz, 1957). Ďalšie výskumy zistili jeho výskyt v enzýmoch chrániacich človeka pred oxidatívnym stresom a jeho pozitívne účinky na rôzne funkcie v ľudskom tele (Arthur et al., 2003; Combs, 2005; Ebert et al., 2006; Patrick, 2004; Rayman, 2000; Schomburg et al., 2004).

## 2.5. Výskyt

Množstvo selénu v rastlinách závisí od jeho množstva v pôde. Obsah selénu v pôde sa mení od vysokých koncentrácií až po takmer nulový obsah selénu. Medzi krajiny s vysokou koncentráciou selénu v pôde patria Čína, USA, Rusko, Austrália, severná časť Queenslandu a Venezuela. Podrobné informácie o rozšírení selénu vo svete podávajú (Brtkova and Brtko, 1996; Combs, 2001; Rayman, 2000).

Obsah selénu vo vode z verejného systému je rôzny v závislosti od krajiny. Najvyššie rozdiely boli zaznamenané v Číne, kde bol priemerný obsah selénu 54 µg Se/L. Najvyššie merané vzorky vody obsahovali 159 µg Se/L a najnižšie zistené hodnoty boli približne 5 µg Se/L (Yang et al., 1983). Niektoré vyvierajúce pramene obsahujú vysoké množstvá selénu (viac ako 100 µg Se/L).

Obsah selénu vo vzduchu je prirodzene na nízkej úrovni (asi 10 ng/m<sup>3</sup>). Priemerný človek tak za deň prijme zo vzduchu približne 0,2 µg Se, čo je zanedbateľné množstvo. Vyššie koncentrácie selénu boli zistené iba v prevádzkach pracujúcich so selénom.

Najvyššie množstvo selénu je prijímané v potrave. Tu závisí na zdroji potravy (ryby, pečienka a obličky majú vysoký obsah selénu) a na podmienkach jej prípravy (varením sa stráca asi 40% selénu) (Higgs et al., 1972).

Selén sa prirodzene vyskytuje v orechoch, cereáliách, mäse (hlavne ryby a vnútornosti), vajciach, uhorkách, brokolici, cesnaku a cibuli (Suzuki, 2005). Všeobecne je obsah selénu v zelenine a ovocí veľmi nízky, záleží však na pôde, z ktorej pochádzajú.

## **2.6. Vplyv selénu na ľudský organizmus**

Ako bolo povedané vyššie, selén je esenciálny prvok pre všetky cicavce. V osemdesiatych rokoch bola doporučená denná dávka 50 - 70 µg na deň, ale znížila sa na dávku 50-55 µg na deň pre dospelého človeka (Tapiero et al., 2003; Whanger, 2004). Pri dávke 400 µg/deň nebol pozorovaný žiaden nepriaznivý efekt, až dávky 3200 - 5000 µg mali za následok otravu selénom (selenózu). Jej prejavy sú lámavosť a deformácie nechťov, cesnakový zápach z úst (vylučuje sa dimetylselenid), vypadávanie vlasov, zažívacie problémy, nervové poruchy, zdurená a sčervenaná pokožka na rukách, pľuzgiere na nohách a rozklad zubov (Koller and Exon, 1986; Letavayova et al., 2006).

Chronická selenóza sa vyskytla v USA v rokoch 1983 - 1984, kde sa 13 ľudí otrávil voľne predajným preparátom obsahujúcim 25 mg seleničitanu sodného a 4 - 5 mg elementárneho selénu v jednej tabletky. Tabletky obsahovala 182 krát vyššie množstvo selénu ako bolo uvedené na obale (Fan, 1990).

Druhým extrémom je nedostatok selénu, ktorý vyvoláva Keshanovu a Kashin - Beckovu chorobu. Selénová deficiencia bola po prvý krát zistená v Číne, tzv. Keshanova choroba, čo je kardiomyopatia vyvolaná nízkou hladinou selénu v krvi. Medzi klinické

prejavy Keshanovej choroby patrí nízka hladina selénu v tele, nízka aktivita glutatión peroxidázy a akútne alebo chronické zlyhanie srdca (Yang et al., 1983). Príjem menej ako 11  $\mu\text{g}$  selénu na deň sa považuje za nedostačujúci (Whanger, 2004). Za optimálny sa považuje príjem 1  $\mu\text{g}$  selénu na 1kg hmotnosti (Chovancová and Lesný, 2006). Obyvatelia Českej a Slovenskej Republiky majú dlhodobo nízky príjem selénu v potrave (Kvicala et al., 1995). Optimálnu hodnotu nad 100  $\mu\text{g}$  nedosahoval ani jeden človek z vyšetreného súboru osôb (Kadrabova et al., 1997). Príčinou je nízka hladina selénu v pôde (Chovancová and Lesný, 2006). Príčinou tohto nedostatku je kyslosť pôdy, ktorá obsahuje veľa organických látok a oxidov železa. Tie viažu selén do zlúčenín s malou biologickou dostupnosťou. V niektorých oblastiach je deficit spôsobený väzbou selénu na humínové kyseliny.

Kashin-Beckova choroba je tiež označovaná ako „big joint disease“, je to chronická osteoartropatia, ktorou trpia asi 2 milióny ľudí, hlavne v nedostupných horských oblastiach Číny, v ktorých sa ľudia živia jednostrannou stravou.

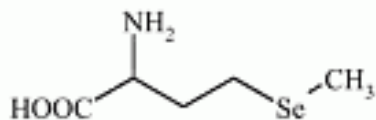
Obom chorobám sa dá predchádzať prídávaním selénu do potravy (zníženie výskytu Kashin-Beckovho syndrómu z 39,6% v roku 1983 na 10,7% v roku 1986) (Ge and Yang, 1993).

Nedostatok selénu sa v našich podmienkach neprejavuje uvedenými chorobami, ale má za následok zvýšenú pravdepodobnosť potratu v prvom trimestri tehotenstva (Barrington et al., 1996), zníženú mobilitu spermií, v dôsledku zvýšenej lámavosti bičička a tým zníženú možnosť oplodnenia vajíčka (Scott et al., 1998). Vyvoláva depresie, stavy úzkosti a negatívnu náladu (Rayman, 2000), negatívne ovplyvňuje imunitu (Spallholz et al., 1990).

Tento esenciálny prvok má protirakovinové účinky, hlavne pri rakovine prostaty, hrubého čreva a pľúc, pomáha hojiť a predchádzať zápalovým ochoreniam ako sú reumatoidná artritída, akútna pankreatitída a astma (Knekt et al., 2000; McCloy, 1998; Rayman, 2000). In vitro je účinným inhibítorom replikácie HIV vírusu (Sappey et al., 1994).

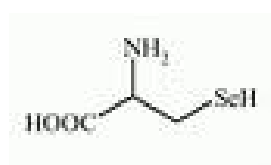
## **2.7. Metabolizmus selénu a jeho zlúčeniny**

Selén sa v proteínoch vyskytuje v troch formách ako selenometionín, selenocysteín a ako disociovatelný kofaktor, vkladajúci sa posttranslačne. Proteíny so selénom viazaným ako kofaktorom sú ojedinelé a vyskytujú sa len u niektorých baktérií v enzýmoch obsahujúcich molybdén. Selén môže byť do proteínov vkladajúci sa posttranslačne ako selenometionín alebo ko-translačne ako selenocysteín.



**Selenometionín** je hlavná forma selénu prijímaného v potrave, bol identifikovaný v rozmedzí rokov 1950 - 1960 (Schrauzer, 2000). Vyskytuje sa v dvoch izomérnych formách, D, L-selenometionín. V prírode sa vyskytuje len L forma a D formu je možné pripraviť syntézou. Selenometionín je vkladávaný do proteínov nešpecificky, nahrádza v nich metionín. Je to spôsobené podobnosťou aminokyselín, selén v selenometioníne namiesto síry v metioníne (Hatfield and Gladyshev, 2002).

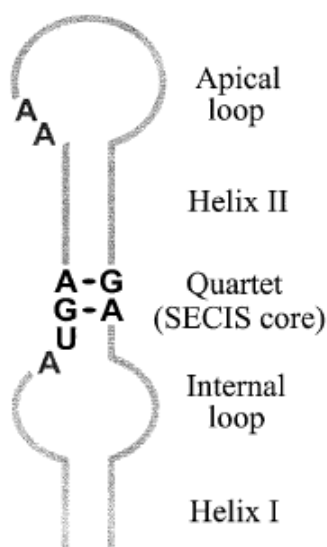
Vyššie živočíchy, vrátane človeka nevedia selenometionín syntetizovať. Zistilo sa, že ho dokážu produkovať *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, baktérie v časti žalúdka hovädzieho dobytku a riasy, rastúce v živnom roztoku s obsahom selénu (Schrauzer, 2000). Rastliny môžu obsahovať až 50 % selénu vo forme selenometionínu viazaného v proteínoch (Schrauzer, 2000). Najviac absorbujú anorganický selén vo forme selenanov, pretože je viac rozpustný v pôdnom roztoku, v menšej miere aj vo forme seleničitanov (Sunde, 1990).



**Selenocysteín** je jediná zlúčenina selénu, ktorá je súčasťou účinných selenoenzýmov, do ktorých je vkladaná počas translácie ako 21. aminokyselina. Vyskytuje sa predovšetkým v živočíšnych potravinách a v rastlinách, ktoré majú schopnosť kumulovať vysoké množstvá selénu (Hartikainen, 2005).

## 2.8. Inercia selenocysteínu do proteínov

Kým selenometionín je vkladávaný posttranslačne, selenocysteín je zabudovávaný do proteínu v priebehu translácie. Prijatý organický selén je prevedený na selenid, ktorý je

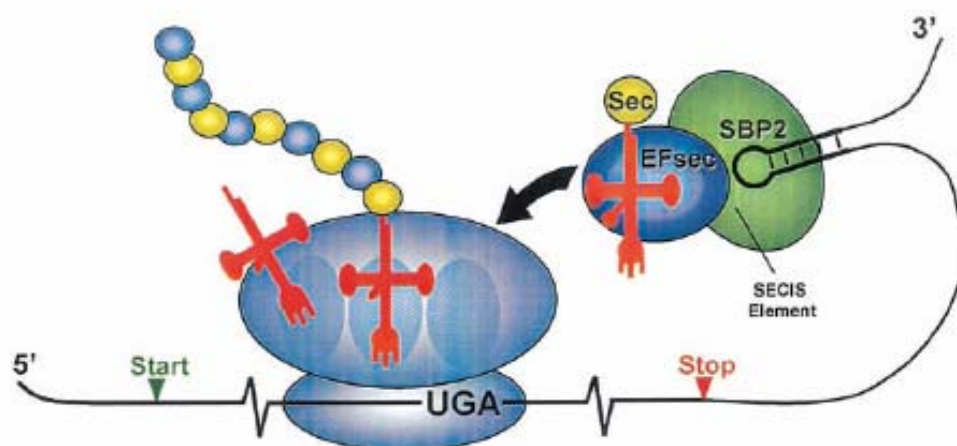


špecifickým selenoenzýmom, selenofosfátsyntetázou fosforylovaný na monoselenofosfát. Tento makroergický intermediát je použitý na selenizáciu serin-tRNA, a tá sa potom viaže na triplet UGA. Vkladanie selenocysteínu do proteínov sa uskutočňuje pomocou UGA kodónu v mRNA (Obr. 4.). Zvláštnosťou je, že obvykle je to STOP kodón a znamená ukončenie syntézy proteínu (Hatfield and Gladyshev, 2002). Na vkladaní selenocysteínu do proteínu sa podieľajú viaceré faktory, z nich najdôležitejšie sú – SECIS

element (Selenocysteine Insertion Sequence), SECIS viažuci proteín 2 (SBP2), špecifický elongačný faktor pre selenocysteín (EFsec) a selenocysteyl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>, ktoré tvoria selenozóm. V tomto unikátnom systéme je kľúčovou molekulou selenocysteyl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>, ktorá je esenciálna pre biosyntézu selenocysteínu a pre jeho vloženie do proteínu.

**Selenocysteyl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>** je najskôr aminoacylovaná serínom pomocou seryl-tRNA syntetázy a serín je premenený na selenocysteín, ako donor slúži monoselenofosfát (Romero et al., 2005). Od ostatných t-RNA sa líši dĺžkou variabilného ramena, 13 nukleotidov namiesto 12 a relatívne malým počtom (4) modifikovaných nukleotidov (15-17 u ostatných t-RNA) (Hatfield and Gladyshev, 2002).

**SECIS element** sa nachádza v 3' neprekladanej oblasti všetkých selenoproteínových génov (Low and Berry, 1996). Sekvencia SECIS elementu obsahuje apikálnu slučku s adenzínmi, helix I a II, kvartet a vnútornú slučku. Jadrom eukaryotického SECIS elementu je kvartet, lokalizovaný medzi helixom II a apikálnou slučkou, tvorený štyrmi bázami nespárovanými Watson-Crickovým párovaním (Walczak et al., 1996). Kvartet SECIS elementu je viazaný s SBP2, ktorý zaisťuje spojenie so špecifickým elongačným faktorom, EFsec a ribozómom (Copeland et al., 2001). RNA väzobná doména bola identifikovaná na C-terminálnom konci sekvencie pre SBP2 (Hatfield and Gladyshev, 2002). Okrem väzby so SECIS elementom a ribozómom, sa SBP2 viaže na Sec tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> a vkladá selenocysteín do predlžujúceho sa reťazca peptidu ako odpoveď na UGA kodón.



**Obr. 4. Mechanizmus vkladania selenocysteínu u eukaryotov.** Selenocysteyl-tRNA (červený so žltým selenocysteínom) je naviazaný v komplexe s EFsec (modrý), SBP2 (zelený) a SECIS elementom (čierna slučka). Komplex je pripravený na vloženie selenocysteínu do A miesta predlžujúceho sa peptidu (žlté a modré guľičky). Podľa Hatfielda (Hatfield and Gladyshev, 2002).



## 2.9. Selenoproteíny

Selenoproteíny narozdiel od selén obsahujúcich proteínov majú v molekule zabudovaný selén vo forme selenocysteínu v aktívnom mieste selenoproteínu. Primárnou funkciou bakteriálnych selenoproteínov sú katabolické procesy a selén je využívaný ako katalyzátor v redoxných reakciách (Stadtman, 1996). Naopak u eukaryotov sú selenoproteíny charakterizované v anabolických a antioxidačných reakciách. Tieto výsledky naznačujú rozličný pôvod prokaryotických a eukaryotických selenoproteínov (Gladyshev and Kryukov, 2001).

Väčšina doteraz nájdených selenoproteínov bola identifikovaná v zvieratách. Rastliny a kvasinky neobsahujú selenoproteíny. Prekvapujúco boli detekované selenoproteíny u riasy *Chlamydomonas reinhardtii*, jeden z nich, metionín-S-sulfoxid reductáza, je špecifický pre túto riasu. Celkovo bolo nájdených 12 selenoproteínov v proteóme riasy *Ch. reinhardtii* (Grossman et al., 2007; Novoselov et al., 2002).

Väčšina eukaryotických selenoproteínov môže byť rozdelená do dvoch skupín podľa pozície selenocysteínu v proteíne. Jedna skupina selenoproteínov obsahuje selenocystein na N-terminálnom konci krátkej domény (80 - 250 aminokyselinových zvyškov) (Tapiero et al., 2003). Patria do nej proteíny, v ktorých sa vyskytujú motívy  $\alpha$ -helixu a  $\beta$ -skladaných listov ako glutatión peroxidáza, selenoproteíny W, T, M a P. Do druhej skupiny, ktorá je menej početná, zaradíme proteíny so selenocysteínom situovaným na C-terminálnom konci, napríklad G-rich proteín z *Drosophila melanogaster* a tioredoxín reductázu (Hatfield and Gladyshev, 2002; Tapiero et al., 2003).

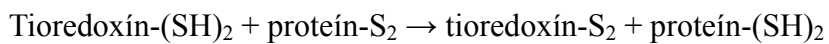
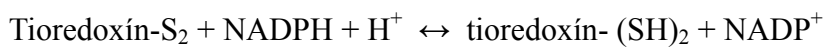
Doteraz bolo identifikovaných 25 selenoproteínov. Medzi ne patria glutatión peroxidáza, tioredoxín reductáza, iodothyronin deiodináza, selenofosfát syntetáza 2, selenoproteíny H, I, K, M a Sep 15, N, O, P, R, S, T, V, W, selenoproteíny v mužských pohlavných orgánoch a spermiách (Sunde, 1990).

Niektoré organizmy neobsahujú selenoproteíny, ale proteíny, ktoré majú selenocystein v molekule nahradený menej reaktívnym cysteínom (Fu et al., 2002; Novoselov et al., 2002).

### 2.9.1 Tioredoxín reductáza

Selenoproteín tioredoxín reductáza je proteín redukujúci tioredoxín. Tioredoxíny môžu byť v bunke redukované viacerými reductázami, čo závisí na ich vnútrobunkovej lokalizácii.

V cytosole a v mitochondriách sú redukované pomocou NADPH cez NADPH tioredoxín reduktázu (NTR), ktorá je prítomná v týchto častiach bunky. NTR je prítomná od baktérii až k cicavcom v dvoch formách. Prvá, s nízkou molekulovou hmotnosťou, bola nájdená v baktériách, kvasinkách a rastlinách. Cicavce majú v bunke prítomný homodimér NTR, ktorý má vyššiu molekulovú hmotnosť, 55kDa (Hanikenne et al., 2009). Jedna zo 4 NTR nájdená u *Ch. reinhardtii* obsahuje v molekule selenocysteínový zvyšok (Kryukov et al., 2003; Novoselov et al., 2002). Táto NTR bola nájdená aj u *Osteococcus*, ale nie u rastlín (Meyer et al., 2006). Tioredoxín reduktáza katalyzuje redukcii tioredoxínu za pomoci NADPH ako vodíkového donora.



V chloroplastoch sú tioredoxíny redukované pomocou svetla cez fotosynteticky redukovaný feredoxín a feredoxín tioredoxín reduktázu (FTR). FTR je heterodimerický Fe-S enzým tvorený katalytickou a variabilnou podjednotkou, ktorej hmotnosť sa líši od jedného organizmu k druhému. Trioredoxín reduktáza nemusí vždy obsahovať selén v molekule, ten môže byť nahradený sírou. Niektorí autori uvádzajú, že TR vytvára aktívny selenid pre následnú syntézu selenoproteínov a je nevyhnutným enzýmom pri ochrane buniek voči toxickému pôsobeniu selénu (Crosley et al., 2007; Madeja et al., 2005).

Tioredoxín je oxidoredukčný proteín prítomný vo všetkých organizmoch a je esenciálny pre cicavce. Tioredoxín reguluje enzýmy a transkripčné faktory, slúži ako donor vodíka pre ribonukleotid reduktázu, ktorá je esenciálna pre syntézu DNA, tioredoxín peroxidázu, ktorá mení peroxid vodíka na vodu (Reichard, 1993; Roy et al., 2005). Pre tioredoxín je charakteristické aktívne miesto disulfid/ditiol a konzervovaná sekvencia –Trp-Cys-Gly-Pro-Cys (Eklund et al., 1991; Holmgren, 1985, 1989).

Tioredoxín stimuluje proliferáciu normálnych aj nádorových buniek a vo vysokej koncentrácii je prítomný v nádorových bunkách. Zvýšená aktivita tioredoxínu môže hrať dôležitú úlohu v prevencii niektorých druhov rakoviny (Holmgren and Björnstedt, 1995).

V genóme riasy *Ch. reinhardtii* boli identifikované tioredoxíny m, f, x, y, h a o (Hanikenne et al., 2009).

## 2.10. Selén u rastlín

Rastliny podľa schopnosti akumulovať selén môžeme rozdeliť na akumulátory, neakumulátory a selén tolerantné druhy. Medzi akumulátory selénu patria rastliny schopné zhromaždiť vo svojich pletivách niekoľko stoviek až tisícok miligramov selénu na kg suchej hmotnosti rastliny. Patria medzi ne druhy *Astragalus*, *Stanleya*, *Morida*, *Neptunia* a ďalšie. Selén tolerantné druhy sú schopné rásť na pôde s vysokým obsahom selénu, ale nemajú príliš zvýšený obsah selénu v pletivách (*Astragalus bisulcatus*, *Atriplex nuttalli*) (Banuelos et al., 1997; Huang and Wu, 1991; Parker et al., 1991). Medzi neakumulátory selénu patrí väčšina ostatných rastlín.

Selén je prijímaný rastlinami procesom aktívneho transportu do koreňov (Brown and Shrift, 1982). Selenan konkuruje síranu v absorpcii do koreňa a oba anióny sú prijímané síranovým transportérom v plazmatickej membráne koreňa (Arvy, 1993; Breton and Surdinkerjan, 1977; Clarkson and Luttge, 1991). Smith a kol. zistili, že existujú dve triedy sulfátových transportérov, vysokoafinitná trieda sa nachádza v koreňoch a nízkoafinitná vo výhonkoch aj koreňoch a pravdepodobne zodpovedá za transport síry bunkou (Smith et al., 1997; Smith et al., 1995). Selenan je na rozdiel od seleničitanu alebo organického selénu oveľa ľahšie transportovateľný z pôdy (Terry et al., 2000). Tiež v rastlinách (listoch a výhonkoch) je selenan akumulovaný vo väčšom množstve ako seleničitan. Jedno z možných vysvetlení je, že seleničitan je premenený na organickú formu selénu a je spotrebovaný ešte v koreňoch (Zayed et al., 1998). Rozdiely v uskladnení selénu boli zistené aj medzi rastlinami akumulujúcimi a neakumulujúcimi selén. Počas skorých vegetatívnych štádií rastu akumulátory selénu zhromažďujú selén v mladých listoch, avšak počas reprodukčnej fázy rastu sa selén presúva do semien a redukuje sa tak jeho obsah v listoch (Terry et al., 2000). Rastliny neakumulujúce selén, ho zhromažďujú v semenách a koreňoch (Beath, 1937). Distribúcia selénu v rastline závisí nielen na forme a koncentrácií selénu, ale aj na koncentrácií ostatných látok, hlavne sulfátov v okolitom prostredí.

Ako som spomínala, selenan je absorbovaný z pôdy pomocou síranového prenášača v koreňoch, odkiaľ je transportovaný xylémom do listov. Bez chemickej modifikácie vstupuje do chloroplastu, kde je metabolizovaný enzýmom ATP sulfurylázou na adenozínfosfoselenan a následne môže byť postupne redukovaný až na selenol (Anderson, 1993, 1983; Dilworth and Bandurski, 1977). Z medziproduktov tohto cyklu vznikajú selenocysteín a následne selenometionín, ktoré sa zabudovávajú do proteínov. V rastlinách ako aj v hubách zatiaľ

nebola dokázaná prítomnosť selenoproteínov, ale len selén obsahujúcich proteínov (Fu et al., 2002).

Rastliny rovnako ako riasy uvoľňujú časť selénu ako metylované selenidy do ovzdušia (Vašková, 2006).

## 2.11. Selén u rias

V riasach je obsah selénu analyzovaný hlavne z hľadiska ekológie. Obsah selénu v riasach je ovplyvnený jeho obsahom v okolitom prostredí. Vo vode sa prirodzene vyskytuje malé množstvo selénu a to vo forme selenanu na povrchu vody a vo forme seleničitanu, ktorého množstvo vzrastá s jeho hĺbkou (merané v Indickom oceáne) (Hattori, 1999). O to väčší problém nastáva ak sa táto nepatrná koncentrácia zvýši napríklad haváriou (Kesterson v Kalifornii) alebo iným znečistením prostredia. K riasam odolnejším voči znečisteniu prostredia selénom patria niektorí zástupcovia kmeňov Prymnesiophyta, Prasinophyta a Dinophyta, k menej odolnejším riasy z kmeňa Chlorophyta (Baines and Fisher, 2001).

Nízke koncentrácie selénu stimulujú rast rôznych druhov rias *Peridinium cinctum* fa. *westii* (Dinophyta) (Lindstrom and Rodhe, 1978), *Chrysochromulina breviturrita* (Prymnesiophyta) (Wehr and Brown, 1985), *Thalassiosira pseudonana* (Diatoma) (Price et al., 1987). Pri vyššej koncentrácii seleničitanu v živnom roztoku u riasy *Chlamydomonas reinhardtii* bolo zistené ako prvé poškodenie ultraštruktúry chloroplastov a následne negatívne ovplyvnenie fotosyntézy (Geoffroy et al., 2007; Morlon et al., 2005). Poškodenie chloroplastov nie je prekvapujúce, pretože tu vzniká selenocysteín, ktorý môže pôsobiť toxicky (Pilon-Smits et al., 2002).

Zvýšenou koncentráciou selénu v živnom roztoku sa mení metabolizmus škrobu (Morlon et al., 2006). Jeho množstvo sa môže znížiť (Irmer et al., 1986) alebo zvýšiť (Nishikawa et al., 2003; Wong et al., 1994). Bunky rias vystavených selénu sa vyznačujú inhibíciou rastu, narušením bunkových štruktúr a vznikajú v nich elektrónodenné organely nedefinovateľného tvaru (Morlon et al., 2005). Pri druhu *Chlorella zofingiensis* bola zistená prítomnosť proteínov odolných voči varu a zvýšená aktivita antioxidantných enzýmov, ktoré sú pravdepodobne jedným z mechanizmov tolerancie voči selénu (Pelah and Cohen, 2005).

## 2.12. Selén v bunkách (toxicita a pozitívny efekt)

Selenoproteíny pôsobia na bunky pozitívne hlavne vďaka antioxidantnej funkcii enzýmov, glutatión peroxidáza redukuje peroxid vodíka, lipidy a fosfolipidy peroxidov, tioredoxín reduktáza pomáha regenerovať antioxidantný systém, a tým obnovuje vnútorný redoxný potenciál bunky (Rayman, 2000).

Avšak ak je selén v nadbytku, môžu vznikať voľné radikály ako  $\text{H}_2\text{O}_2^\cdot$  a  $\text{O}_2^\cdot$ , ktoré sú hlavným dôvodom toxicity selénu napríklad u *Salmonella typhimurium* (reakcie seleničitanu s tiolmi v bunke za vzniku voľných radikálov) (Kramer and Ames, 1988). Vznik voľných radikálov vytvorených selénovými zlúčeninami, bol prvý krát publikovaný v roku 1989 Sekom et al., ktorý dokázal vznik voľného superoxidového radikálu  $\text{O}_2^\cdot$  - a elementárneho selénu, následne viazaného v selenodiglutatióne, oxidáciou glutatiónu seleničitanom sodným (Seko and Imura, 1996). Superoxidový radikál má sám o sebe malú reaktivitu a toxicitu, avšak dáva vznik druhotným oxidačným produktom. Dismutáciou superoxidového radikálu vzniká peroxid vodíka, z ktorého Fentonovou reakciou vzniká radikál hydroxylový ( $\text{OH}^\cdot$ ). Tento radikál je veľmi reaktívny a poškodzuje DNA, najcitlivejšie k jeho pôsobeniu sú C5-C6 dvojité väzby na pyrimidínoch a atómy uhlíkov C4, C5 a C8 purínov. Hlavným produktom takého oxidačného pôsobenia je 8-oxo-guanín, ktorého dôsledkom sú zámery báz.

Ako ostatné oxidačné zlúčeniny, aj seleničitan in vitro inhibuje väzbu niektorých transkripčných faktorov na DNA v cicavčích bunkách (Handel et al., 1995; Kim and Combs, 1997; Spyrou et al., 1995). V cicavčích bunkách blokuje zvýšená koncentrácia seleničitanu bunkový cyklus vo fáze S/G2-M (Sinha et al., 1996). Táto blokácia môže vznikať kvôli poškodeniu DNA, jej jednoduchým zlomom, chomozómovým zlomom prípadne poškodeniu deliaceho vretienka (Biswas et al., 1997; Lu et al., 1994). Poškodenie DNA je pravdepodobne dôvod, prečo na liečbu seleničitanom reagujú citlivejšie bunky rakovinové (Pinson et al., 2000). Koncentrácia seleničitanu pôsobiaci toxicky na rôzne bunky je rôzna. Pre bunky kvasiniek je to koncentrácia v mM a pre bunky cicavcov niekoľko  $\mu\text{M}$ . Dôvodom tejto odlišnosti je fakt, že seleničitan, rovnako ako sulfid je transportovaný do cicavčích buniek účinnejšie ako do kvasiniek (Stratford, 1986).

## 3. Materiál a metódy

### 3.1. Použitý organizmus

Kultúru chlorokokálnej riasy *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. Kmeň Greifswald/15 sme získali zo Zbierky autotrofných organizmov Botanického ústavu AV ČR v Třeboni.

### 3.2. Kultivácie

Riasy boli kultivované v tekutom živnom médiu (Zachleder and Šetlík, 1982), ktorého zloženie uvádzam v tabuľke 1. Suspenzia bola prevzdušňovaná zmesou vzduchu s 2 % CO<sub>2</sub> (v/v) pri 30 °C v temperovanom fotobioreaktore. Fotobioreaktor bol z jednej strany osvetlený

Prvok	Koncentrácia	Zlúčenina	Koncentrácia	
	mg/L		mg/L	mol/L
N	559,7	KNO <sub>3</sub>	4042	1.10 <sup>-2</sup>
K	1559,3			
P	77,5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	840	2,5.10 <sup>-3</sup>
K	97,5			
Mg	97,5	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	988	4.10 <sup>-3</sup>
S	128			
Fe	2,8	chelatonát železito- sodný	18	2,5.10 <sup>-5</sup>
Ca	2,005	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10,96	2,5.10 <sup>-5</sup>
B	0,54	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,09	2,5.10 <sup>-5</sup>
Mn	0,3	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,18	2,5.10 <sup>-6</sup>
Co	0,295	CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,4	2,5.10 <sup>-6</sup>
Cu	0318	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,24	2,5.10 <sup>-6</sup>
Zn	0,327	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,43	2,5.10 <sup>-6</sup>
Mo	0,48	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,84	2,5.10 <sup>-6</sup>

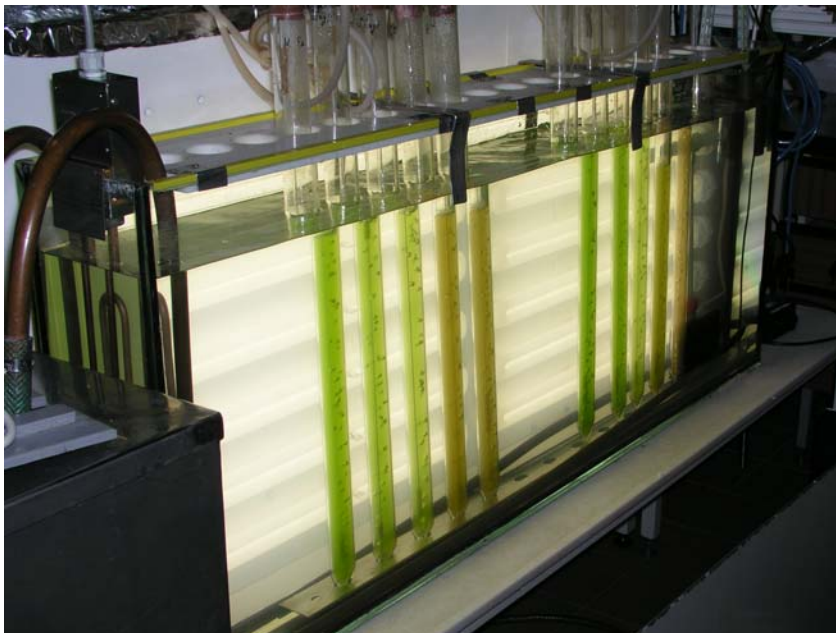
Tab. 1: Zloženie živného roztoku

žiarivkami (Osram DULUX L, 55 W/840, Taliansko). Ožiarenosť na povrchu kultivačných nádob bola približne  $100 \text{ W/m}^2$  fotosynteticky aktívneho žiarenia (400 - 720 nm).

Záložné kultúry boli udržiavané na Petriho miskách v živnom médiu spevnenom 2 % agarom (Sigma-Aldrich, Česká Republika) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.3. Synchronne a nesynchronne kultúry

V závislosti na kultivačných podmienkach, hlavne na ožiarivosti kultúry sa materské bunky riasy *Scenedesmus quadricauda* delia na 4 alebo 8 dcérskych buniek tvoriacich



cenóbia. Na prípravu synchronných kultúr rástli kultúry bez riedenia celý cyklus, riedili sa až na začiatku svetelnej fázy na približnú hustotu  $10^{-6}$  buniek/ml. Kultúry boli synchronizované striedaním svetelnej a tmavej fázy. Ak nie je uvedené inak, bol použitý svetelný režim 14 hodín svetla a 10

hodín tmy. Kultúra bola zatemňovaná v čase, keď 10 % materských buniek začalo uvoľňovať dcérske bunky. Tmavá fáza bola ukončená, keď sa uvoľnili dcérske bunky z materských. Synchronna kultúra bola použitá ako inokulum pre ďalšie experimenty. Nesynchronne kultúry boli kultivované bez striedania svetelnej a tmavej fázy, na stálom svetle.

### 3.4. Meranie vzoriek na Coulter Counteri

Vzorky boli uchovávané (fixované) v 0,2 % (v/v) glutaraldehyde. Počet buniek a ich veľkosť boli merané na Coulter Multisizer II (Coulter Corporation, Florida, USA) použitím izotonického roztoku ako elektrolytu.

### 3.5. Stanovenie commitment pointu a krivky bunkového delenia

Bunka, ktorá prešla commitment pointom je schopná dokončiť bunkový cyklus, teda rozdeliť sa, bez ďalšieho dodania energie, ktorú v našom prípade predstavuje svetlo. Na zistenie či a koľko commitment pointov dosiahli bunky v kultúre sme odoberali vzorky v hodinových intervaloch. 1 ml kultúry sa rozotrel po miske obsahujúcej médium s 1,5 % agarom a misky sa kultivovali v tme pri 30 °C. Z buniek, ktoré dosiahli commitment point sa formovali kolónie dcérskych buniek. Počet dcérskych buniek v kolónii indikoval počet commitment pointov dosiahnutých materskou bunkou (Umen and Goodenough, 2001; Zachleder and van den Ende, 1992). Počet materských buniek deliacich sa na 4, 8 dcérskych buniek bol zistený pozorovaním v svetelnom mikroskope. Krivky boli vynesené ako počet buniek, ktoré dosiahli commitment point, v percentách, v čase.

### 3.6. Stanovenie sušiny

Čisté a označené mikroskúmvky sa sušili minimálne 12 hodín v sušiarňi so zapnutým ventilátorom pri 105 °C. Následne sa vložili do exsikátoru a postupne odvážili na analytických váhach s presnosťou na 4 desatinné miesta ( $m_{prázdna}$ ). Napipetovali sa 2 ml suspenzie, ktoré sa odstredili pri 5000 rpm 3 minúty (Janetzki K24, VEB Zentrifugenbau Engelsdorf, Nemecko) a supernatant sa odsal. Znovu sa sušili pri 105 °C minimálne 12 hodín a odvážili ( $m_{plná}$ ). Suchá hmotnosť sa stanovila podľa vzorca:

$$DW(g.l^{-1}) = \frac{m_{plná}(g) - m_{prázdna}(g)}{0,002(l)}$$

### 3.7. Stanovenie optickej hustoty

Optická hustota bola meraná spektrofotometricky prístrojom značky Specol 11 (Zeiss, Nemecko) pri 750 nm v 0,501 cm kyvetách.

### 3.8. Stanovenie aktivity tioredoxínreduktázy

Aktivitu tioredoxínreduktázy (TR) sme stanovovali podľa Holmgrena a Björnstedta (Holmgren and Björnstedt, 1995). Bunky boli centrifugované 5 min pri 4000 rpm, premyté pufrom A [50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5] a dezintegrované vortexovaním 6 min so



zirkóniovými guľičkami (priemer 0,7 µm, Biospec, USA) v roztoku pufru A a 100x riedenom roztoku proteázových inhibítorov (4-2-aminoetyl)benzenesulfonyl fluoride, 1,10 fenantolín, pepstanín A, leupeptín, bestatín, E-64) (Sigma-Aldrich, Česká Republika) v pomere 2:1. Extrakt bol centrifugovaný 15 min pri 13 000 rpm a supernatant zamrazený v tekutom dusíku a skladovaný pri -20 °C. Extrakt z buniek (10 µl) bol zmiešaný so 490 µl pufru A obsahujúceho Trx (Escherichia coli, Sigma-Aldrich, Česká Republika), 500 µg/ml inzulínu (hovädzí pankreas, Sigma-Aldrich, Česká Republika) a 200 µM NADPH (Calbiochem, USA). Zmes bola inkubovaná 20 min pri 37 °C. Reakciu sme zastavili pridaním 500 µL guanidín hydrochloridu (Sigma-Aldrich, Česká Republika) obsahujúceho 1 mM 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoovej kyseliny) (DTNB, Sigma-Aldrich, Česká Republika). Produktom reakcie je 5-tionitrobenzoová kyselina (TNB), ktorá má žltú farbu a maximum absorpcie pri 412 nm. Zvýšenie absorpcie sme merali spektrofotometricky pri 412 nm v titračnej doštičke použitím TEACAN (Schoeller, Rakúsko).



Reakcia bez bunkového extraktu a reakcia s čistou TR (E.coli, Sigma-Aldrich, Česká Republika) namiesto bunkového extraktu boli použité ako negatívna a pozitívna kontrola.

### **3.9. Stanovenie celkového selénu**

Selén bol pridávaný ako seleničitan Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> a/alebo ako selenan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na začiatku kultivácie v koncentráciách (10 – 400 mg selénu na liter média).

Zmes kyseliny dusičnej (65 %, p.a., Merck Darmstadt, Nemecko) s peroxidom vodíka (30%, Analpure, Analytika Praha, Česká Republika) bola použitá na rozklad vzoriek biomasy. Vzorka (0,1 g) bola rozložená 4 ml kyseliny dusičnej a 2 ml peroxidu vodíka pri 190 °C v PTFE nádobke v uzavretom mikrovlnom systéme (Berghof, Nemecko). Po odparení prebytočnej kyseliny, v rovnakom mikrovlnom systéme, bol výsledný roztok prenesený do odmernej fľaše (100 ml) a doplnený vodou (18,2 MΩ merného odporu, Millipore Simplicity, Bedford, MA).

Na analýzu vzoriek bol použitý hmotnostný spektrometer s indukčne viazanou plazmou Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Japonsko).

Aby sme predišli polyatomickým interferenciám, tak sa merali izotopy selénu s číslom 77 a 82.

### **3.10. Stanovenie selenometionínu**

Hydrolyza kyselinou metánsulfónovou bola použitá na stanovenie celkového obsahu SeMet v biomase (Wrobel et al., 2003). 100 mg suchej biomasy bolo zmiešaných s 10 ml kyseliny metánsulfónovej (4 mol/L, Sigma-Aldrich, Česká Republika) a 0,2 ml 2-merkaptóetanolu (Fluka, Česká Republika). Zmes bola varená 16 hodín pod refluxom. Výsledný roztok bol doplnený deionizovanou vodou do 100 ml a prefiltrovaný cez 0,45 µm filter striekačky (obnovená celulóza) a použitý na chromatografickú analýzu.

Na oddelenie zlúčenín selénu bola použitá aniónová výmenná chromatografia s ICP-MS detekciou. Základná aniónová kolóna Hamilton PRP-X100 (4,6x150mm+4,6x25mm guard column, Hamilton Company, Nevada) ovládaná v izokratickom móde s octanom amónnym/metanolom v mobilnej fáze [pH 5,0, 40 mM, 1 %V/V metanol, 0,6 ml/min] pri 25 °C. Zlúčeniny selénu boli stanovené použitím jeho izotopov s číslami 77 a 82. Pre kalibráciu bol použitý roztok selenometionínu v kyseline metánsulfónovej (>99 %, Sigma-Aldrich, Česká Republika).

### **3.11. Mikrofotografie**

Pre zhotovenie mikrofotografii bola použitá digitálna kamera CCD (F-View II) pripojená k mikroskopu BX51 (Olympus, Japonsko).

## 4. Výsledky

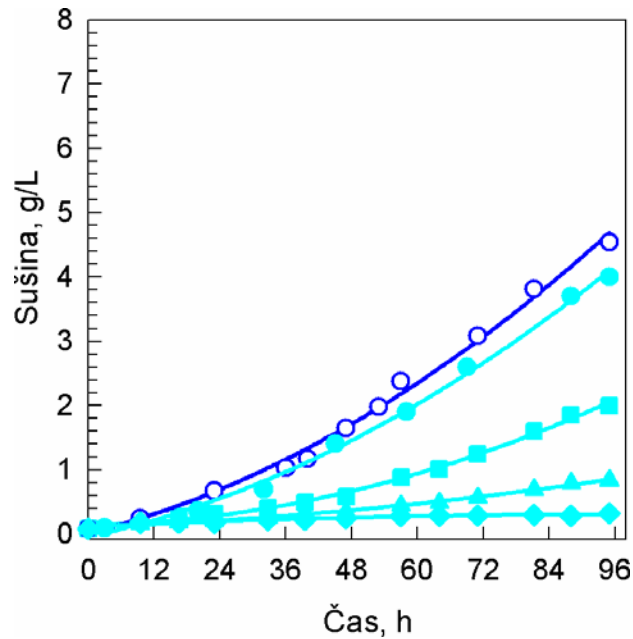
### 4.1. Toxicita selénu

#### 4.1.1 Toxicita seleničitanu

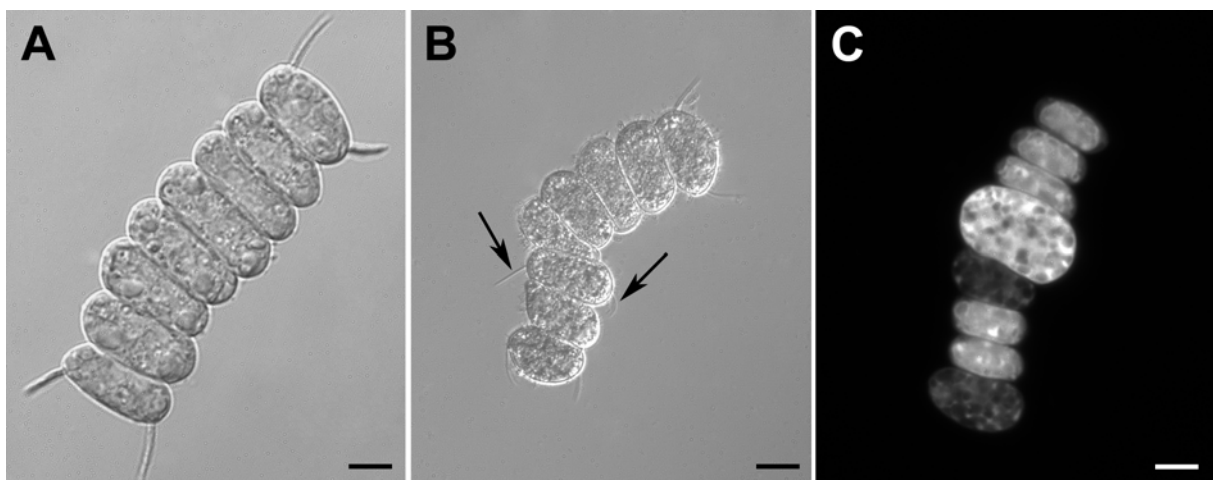
Bol testovaný vplyv selénu na divoký kmeň *Scenedesmus quadricauda*. Pokusnou kultúrou bola nesynchronná kultúra riasy *S. quadricauda*, ktorá rástla pri trvalom svetle, prevzdušňovaná bola zmesou vzduchu s 2 % CO<sub>2</sub> (v/v), intenzita svetla dosahovala 566,9 μmol/(m<sup>2</sup>/s) a teplota 30 °C.

**Divoký kmeň** riasy *S. quadricauda* prirodzene znáša nízke koncentrácie selénu (do 5 mg Se/L živného roztoku), či už vo forme seleničitanu alebo selenanu. Na obrázku 6 sú znázornené rastové krivky divokého kmeňa kultivovaného pri rôznych koncentráciách seleničitanu v živnom roztoku, je zjavné, že zvyšovanie množstva seleničitanu spôsobuje znižovanie rýchlosti rastu kultúr. Kontrolná nesynchronná kultúra riasy *S. quadricauda* rástla bez seleničitanu pridaného do živného roztoku (krivka ○) a dosiahla suchú hmotnosť 4,5 g/L po 96 hodinách kultivácie. Už koncentrácia seleničitanu 5 mg Se/L živného roztoku (krivka ●) spôsobuje spomalenie rastu a na konci kultivácie dosiahla kultúra koncentráciu sušiny 4 g/L. Kultúra, rastúca v živnom roztoku s koncentráciou seleničitanu 10 mg Se/L (krivka ■), dosahovala polovičnú rýchlosť rastu v porovnaní s kontrolnou kultúrou. Kultúra pestovaná kultivovaná v živnom roztoku s 50 mg Se/L v podobe seleničitanu, rástla veľmi pomaly (krivka ▲). Kultúra, do živného roztoku ktorej bol pridaný seleničitan v koncentrácii 100 mg Se/L (krivka ◆), nedosahovala takmer žiadny nárast sušiny (0,323 g/L).

Toxicita seleničitanu na bunky divokého kmeňa je viditeľná na obrázku číslo 7. V časti A je na mikrofotografii zachytené osembunkové cenóbiom kontrolnej kultúry divokého kmeňa riasy *S. quadricauda*. Časť B znázorňuje cenóbiom po pridaní seleničitanu v koncentrácii 50 mg Se/L živného roztoku. Cenóbia v kultúre boli deformované a vykazovali rôzne malformácie. Namiesto dvoch ostňov na každej koncovej bunke mali ostne vyrastajúce z rôznych buniek cenóbia a ich počet bol taktiež rôzny (Obr. 7B, ostne označené šipkami). Na tretej fotografii z fluorescenčného mikroskopu (signál je autofluorescencia chlorofylu) je zachytené cenóbiom rastúce v živnom roztoku s koncentráciou seleničitanu 100 mg Se/L živného roztoku. Najväčšia bunka v strede cenóbia je vitálna a rastie, aj pri tejto (pre divoký kmeň) vysokej koncentrácii selénu, avšak nie je schopná rozdeliť sa. Päť buniek s nižšou autofluorescenciou takmer vôbec nerástlo. Dve najtmavšie bunky v cenóbiu sú mŕtve.



**Obr. 6:** Vplyv seleničitanu sodného na kultúry divokého kmeňa riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra **divokého kmeňa** riasy *S. quadricauda* po pridaní **seleničitanu** sodného do živného roztoku v koncentrácii 5 mg (●), 10 mg (■), 50 mg (▲) a 100 mg (◆) Se/L. Kontrolná kultúra bez prídavku selénu v živnom roztoku (○).

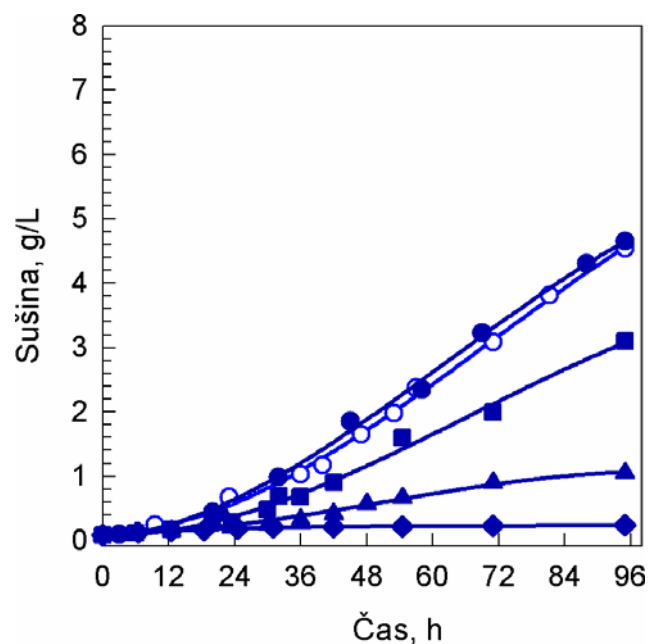


**Obr. 7:** Osembunkové cenóbiáa riasy *S. quadricauda* po pôsobení **seleničitanu**. Mikrofotografie zo svetelného mikroskopu. Nomarského kontrast (A, B) a autoflorescencia chlorofylu (C). Mierka je 10  $\mu$ m.

#### 4.1.2 Toxicita selenanu

Následne bolo testované pôsobenie **selenanu** na nesynchronne kultúry **divokého kmeňa** riasy *S. quadricauda* (Obr. 8). Podmienky boli rovnaké ako v predchádzajúcom pokuse. V nasledujúcom grafe sú znázornené rastové krivky divokého kmeňa pestovaného

kultivovaného pri rôznych koncentráciách selenanu v živnom roztoku. Selén aplikovaný v podobe selenanu v množstve 5 mg Se/L živného roztoku vôbec nespomalil rast kultúry, naopak ho mierne stimuloval (krivka ●). Na konci kultivácie dosiahla kultúra koncentráciu sušiny 4,65 g/L, čo je porovnateľné s kultúrou rastúcou bez Se v živnom roztoku (krivka ○). Pridanie dvojnásobného množstva selenanu, teda 10 mg Se/L živného roztoku, znamenalo spomalenie rastu kultúry o jednu tretinu v porovnaní s kontrolnou kultúrou (krivka ■). Koncentrácia sušiny kultúry na konci kultivácie bola 3,1 g/L. Následne boli testované vyššie koncentrácie selenanu. Výraznejšie spomalenie bolo zaznamenané po pridaní selenanu v koncentrácii 50 mg Se/L (krivka ▲). Po pridaní selenanu v koncentrácii 100 mg Se/L živného roztoku nezaznamenala suspenzia takmer žiadny nárast koncentrácie sušiny a preživali len niektoré bunky (krivka ◆). Pri porovnaní oboch grafov (Obr. 6 a 8) môžeme vidieť, že účinok seleničitanu na divoký kmeň *S. quadricauda* bol toxickejší než účinok selenanu.

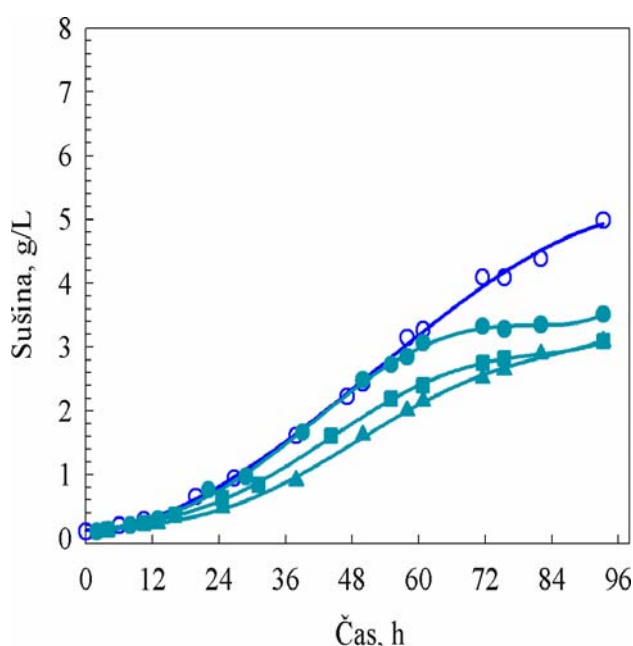


**Obr. 8:** Vplyv selenanu sodného na kultúry divokého kmeňa riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra **divokého kmeňa** riasy *S. quadricauda* po pridaní **selenanu** sodného do živného roztoku v koncentrácii 5 mg (●), 10 mg (■), 50 mg (▲) a 100 mg (◆) Se/L. Kontrolná kultúra bez prídavku selénu v živnom roztoku (○).

## 4.2. Selekcia kmeňov rezistentných voči selénu

### 4.2.1 Kmeň rezistentný voči seleničitanu

Kultúra divokého kmeňa riasy *S. quadricauda* bola kultivovaná v živnom roztoku s nízkymi koncentraciami seleničitanu, ktoré sa postupne zvyšovali, keď sa na ne kultúra adaptovala. Počiatočná koncentrácia 0,1 mg Se/L živného roztoku bola postupne zvyšovaná až na 400 mg Se/L živného roztoku. Postupnou selekciou sa podarilo získať kmeň **Se20**, ktorý v porovnaní s kultúrami divokého kmeňa znáša vyššie koncentrácie seleničitanu pridané do živného roztoku, ako je zrejmé z grafu (Obr. 9).

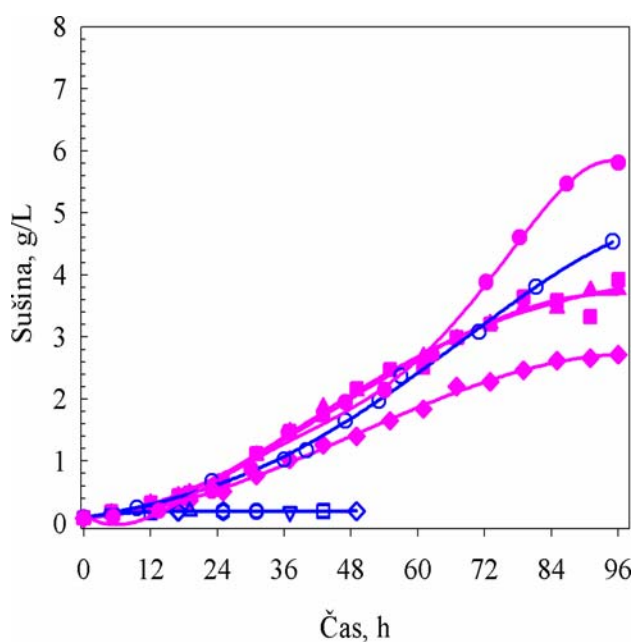


**Obr. 9:** Vplyv seleničitanu sodného na kultúry kmeňa Se20 riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa Se20 riasy *S. quadricauda* po pridaní seleničitanu sodného do živného roztoku v koncentracii 100 mg (●), 200 mg (■) a 400 mg (▲) Se/L. Kontrolná kultúra kmeňa Se20 bez prídavku selénu v živnom roztoku (○).

V grafe sú zobrazené rastové krivky kmeňa Se20 pestovaného kultivovaného pri rôznych koncentraciách seleničitanu v živnom roztoku. Rast kultúry kmeňa Se20 so 100 mg Se/L živného roztoku (krivka ●), bol prvé dva dni totožný s rastom kontrolnej kultúry kmeňa Se20 bez selénu v živnom roztoku (krivka ○). Počas ďalšej kultivácie sa rast kultúry spomalil, kultúra po 96 hodinách kultivácie dosiahla koncentráciu sušiny 3,51 g/L. Rast kultúry po pridaní vyššieho množstva seleničitanu (200 mg Se/L živného roztoku, krivka ■) sa spomalil v porovnaní s nižšou koncentraciou seleničitanu v živnom roztoku. Kultúra, rastúca v živnom roztoku so seleničitanom, v koncentracii 400 mg Se/L živného roztoku

(krivka ▲), zaznamenala mierne spomalenie rastu oproti kultúre rastúcej v živnom roztoku s 200 mg Se/L. Na konci kultivácie bol prírastok oboch kultúr rastúcich v živnom roztoku s vyššou koncentráciou selénu, teda 200 a 400 mg Se/L, rovnaký (3,09 g/L). V porovnaní s divokým kmeňom je kmeň Se20 odolnejší voči seleničitanu pridanému do živného roztoku (porovnaj koncentráciu 100 mg Se/L pri divokom kmeni a koncentráciu 400 mg Se/L pri kmeni Se20).

Po ďalšej stabilizácii kmeňa rastom pod selekčným tlakom, bol kmeň uložený v zbierke a premenovaný na **SeIV** a následne bol patentovaný. Patent číslo PV 2007-765 (Z7560) (Doušková et al., 2007a). Tento kmeň je rezistentný voči vysokým dávkam **seleničitanu sodného** pridávaného do živného roztoku (Obr. 10). Graf vyjadruje priebeh rastových kriviek. V živnom roztoku rástla kultúra divokého kmeňa (krivka ○) pomalšie ako kultúra rezistentného kmeňa **SeIV** (krivka ●). Po pridaní seleničitanu v koncentráciách 100, 200 a 400 mg Se/L do živných roztokov kultúr divokého kmeňa sa ich rast zastavil a po 48 hodinách pôsobil seleničitan v živnom roztoku letálne (krivky □, △, ◇).

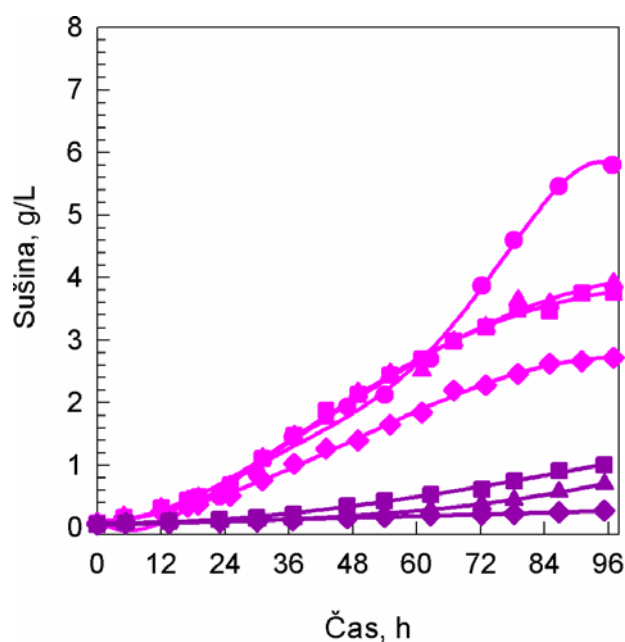


**Obr. 10: Vplyv seleničitanu sodného na kultúry divokého kmeňa a kmeňa **SeIV** riasy *S. quadricauda*.** Nesynchronná kultúra kmeňa **SeIV** riasy *S. quadricauda* bez prídavku selénu v živnom roztoku (●) a po pridaní **seleničitanu sodného** do živného roztoku v koncentracii 100 mg (■), 200 mg (▲) a 400 mg (◆) Se/L. Kontrolná kultúra divokého kmeňa riasy *S. quadricauda* bez prídavku selénu v živnom roztoku (○), so seleničitanom v koncentracii 100 mg (□), 200 mg (△) a 400 mg (◇) Se/L.

Rast kultúr rezistentného kmeňa **SeIV** po pridaní seleničitanu v koncentracii 100 a 200 mg Se/L živného roztoku bol prakticky rovnaký (krivky ■, ▲). Obe kultúry dosiahli

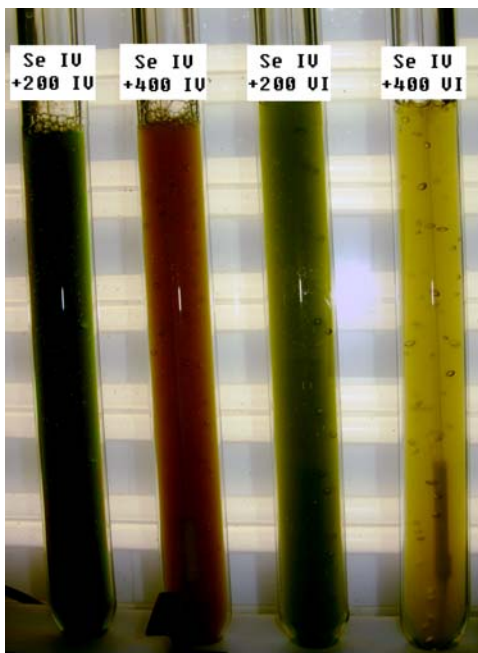
koncentráciu sušiny približne 3,8 g/L. Rast kultúry v živnom roztoku s najvyššou testovanou koncentráciou seleničitanu, 400 mg Se/L, zaznamenal mierne spomalenie (krivka ◆) oproti kultúram rastúcim v živnom roztoku s menším nižším množstvom seleničitanu. Kmeň **SeIV** je teda schopný rásť v živnom roztoku so seleničitanom v koncentrácii 400 mg Se/L (Obr. 10 a Obr. 12).

Ako bolo ukázané v predchádzajúcom grafe, kmeň **SeIV** je rezistentný voči vysokým množstvám seleničitanu v živnom roztoku. Následné testy však ukázali, že jeho rezistencia sa nevzťahuje na druhú testovanú zlúčeninu selénu, teda **selenan sodný** (Obr. 11). V grafe sú zobrazené rastové krivky kmeňa **SeIV**. Kultúra kmeňa **SeIV** s najnižšou použitou dávkou selenanu v živnom roztoku, 100 mg Se/L (krivka ■), zaznamenala nárast koncentrácie sušiny len na hodnotu 1 g/L po 96 hodinách kultivácie. V porovnaní s tou istou kultúrou rastúcou v živnom roztoku s rovnakým množstvom selénu, ale vo forme seleničitanu je táto hodnota veľmi nízka (porovnaj s krivkou ■, hodnota 3,76 g/L). Vyššia dávka selenanu, 200 mg Se/L živného roztoku, spôsobila výrazné spomalenie rastu (krivka ▲, Obr. 11 a Obr. 12). Dávkou 400 mg Se/L živného roztoku môžeme považovať za letálnu (krivka ◆, Obr. 11 a Obr. 12).



**Obr. 11: Vplyv seleničitanu sodného a selenanu sodného na kultúry kmeňa **SeIV** riasy *S. quadricauda*.** Nesynchronná kultúra kmeňa **SeIV** riasy *S. quadricauda* bez prídavku selénu v živnom roztoku (●) a po pridaní **seleničitanu sodného** do živného roztoku v koncentrácii 100 mg (■), 200 mg (▲) a 400 mg (◆) Se/L. Kultúra kmeňa **SeIV** riasy *S. quadricauda* so **selenanom sodným** pridaným do živného roztoku v koncentrácii 100 mg (■), 200 mg (▲) a 400 mg (◆) Se/L.

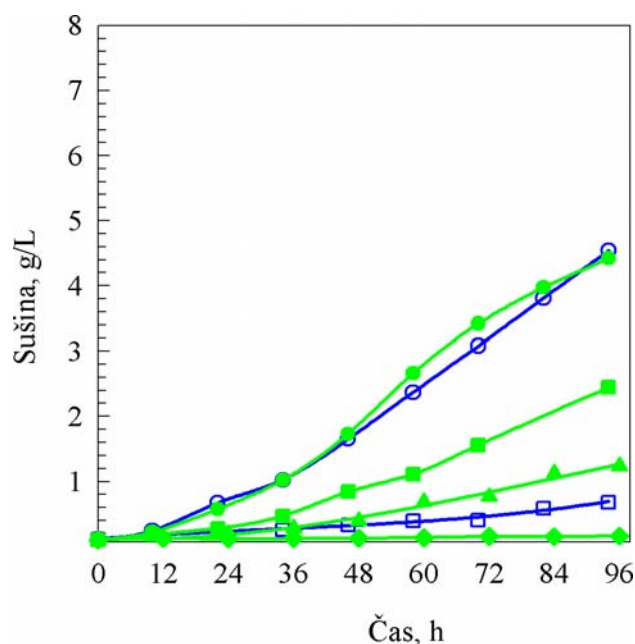




**Obr. 12:** Kultúry kmeňa **SeIV** riasy *S. quadricauda* po pridaní seleničitanu sodného alebo selenanu sodného v koncentrácii 200, resp. 400 mg Se/L do živného roztoku. Koncentrácia 200 mg Se/L, pridaného ako seleničitan, čiastočne spomalila rast kultúry. Po pridaní vyššej koncentrácie seleničitanu do živného roztoku kultúra rapídne spomalila svoj rast a dosiahla nižšiu hustotu. Po pridaní selenanu, v koncentrácii 200 resp. 400 mg Se/L živného roztoku, kultúry spomalili, resp. zastavili svoj rast. Pri vyššej koncentrácii seleničitanu je viditeľné červené sfarbenie kultúry.

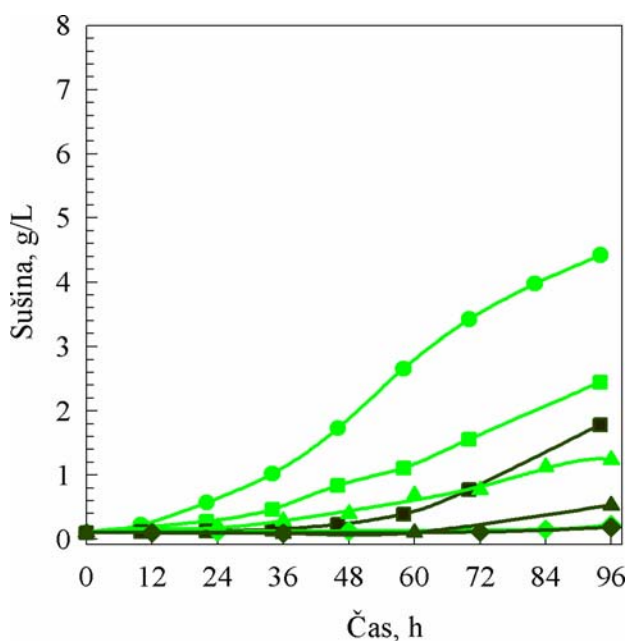
#### 4.2.2 Kmeň rezistentný voči selenanu

Odolnosť vyselektovaného kmeňa **SeIV** voči selenanu je veľmi nízka, preto sa v selekcii pokračovalo. Do živného roztoku divokého kmeňa bol pridávaný **selenan sodný** v postupne sa zvyšujúcich koncentráciách. Selekciou získaný kmeň dostal názov **SeVI** a je odolný voči vyšším koncentráciám selenanu v porovnaní s divokým kmeňom riasy *S. quadricauda* (Obr. 13). Je patentovaný pod číslom PV 2007-766 (Z7561) (Doušková et al., 2007c). Grafom je vyjadrený nárast koncentrácie sušiny v čase. Kultúra kmeňa **SeVI** v živnom roztoku bez selénu rastie rovnako rýchlo ako kontrolná kultúra divokého kmeňa riasy *S. quadricauda* (krivky ● a ○). Po pridaní selenanu, v koncentrácii 100 mg Se/L, (krivka ■) testovaná kultúra kmeňa **SeVI** spomalila svoj rast približne o polovicu a koncentrácia sušiny po 96 hodinách kultivácie bola 2,44 g/L. Oproti tomu kultúra divokého kmeňa v živnom roztoku s rovnakou koncentráciou selenanu dosiahla koncentráciu sušiny len 0,68 g/L (krivka □). Po zdvojnásobení množstva selenanu pridaného do živného roztoku spomalil kmeň **SeVI** rýchlosť svojho rastu približne na polovicu v porovnaní s rýchlosťou rastu v živnom roztoku so 100 mg Se/L (krivka ▲). Taktiež koncentrácia sušiny dosiahla polovičnú hodnotu, 1,2 g/L. Pri najvyššej testovanej koncentrácii selenanu, 400 mg Se/L, nebol zaznamenaný takmer žiadny nárast koncentrácie sušiny (krivka ◆). Hodnota 0,1 g/L na začiatku kultivácie sa po 96 hodinách kultivácie zmenila na hodnotu 0,23 g/L. Túto vysokú koncentráciu selenanu pridaného do živného roztoku prežili len niektoré bunky kultúry kmeňa **SeVI** (Obr. 15).

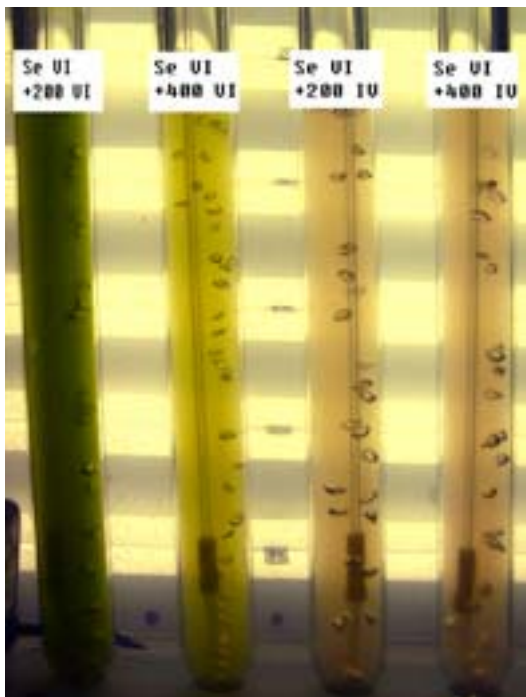


**Obr. 13:** Vplyv selenanu sodného na kultúry divokého kmeňa a kmeňa **SeVI** riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa **SeVI** riasy *S. quadricauda* bez prídavku selénu v živnom roztoku (●) a po pridaní **selenanu sodného** do živného roztoku v koncentrácii 100 mg (■), 200mg (▲) a 400 mg (◆) Se/L. Kontrolná kultúra divokého kmeňa riasy *S. quadricauda* bez prídavku selénu v živnom roztoku (○), so selenanom v koncentrácii 100 mg Se/L (□).

Kmeň **SeVI** bol testovaný na odolnosť voči **seleničitanu sodnému** (Obr. 14). Graf zobrazuje nárast koncentrácie sušiny v čase. Po pridaní seleničitanu do živného roztoku v koncentrácii 100 mg Se/L (krivka ■), sa rast výrazne spomalil oproti kontrolnej kultúre kmeňa **SeVI** kultivovanej v živnom roztoku bez selénu (krivka ●) a mierne spomalil oproti kultúre kultivovanej v živnom roztoku so selenanom v rovnakej koncentrácii selénu (krivka ■). Po zvýšení množstva seleničitanu v živnom roztoku na 200 mg Se/L (krivka ▲) sa rast kultúry prakticky zastavil a kultúra dosiahla koncentráciu sušiny len 0,38 g/L za 96 hodín.



**Obr. 14:** Vplyv selenanu sodného a seleničitanu sodného na kultúry kmeňa **SeVI** riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa **SeVI** riasy *S. quadricauda* bez prídavku selénu v živnom roztoku (●) a po pridaní **selenanu sodného** do živného roztoku v koncentrácii 100 mg (■), 200mg (▲) a 400 mg (◆) Se/L, prípadne seleničitanu sodného v koncentrácii 100 mg (■), 200mg (▲) a 400 mg (◆) Se/L.

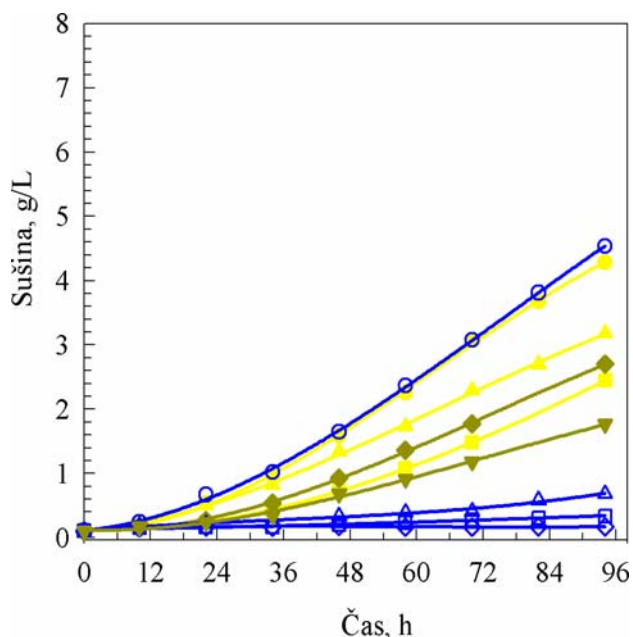


Obr. 15: Kultúry kmeňa **SeVI** po pridaní selenanu sodného alebo seleničitanu sodného v koncentrácii 200, resp. 400 mg Se/L do živného roztoku. Je viditeľný vplyv vysokej koncentrácie selenanu (400 mg Se/L), kultúra mala nižšiu rastovú rýchlosť a dosahovala menšiu hustotu ako kultúra kmeňa **SeVI** s nižšou dávkou selenanu v živnom roztoku. Po pridaní seleničitanu, v koncentrácii 200, resp. 400 mg Se/L živného roztoku kultúry zastavili svoj rast.

#### 4.2.3 Kmeň rezistentný voči obom formám selénu

Posledným vyselektovaným kmeňom rezistentným voči vysokým dávkam selénu v živnom roztoku je kombinovaný kmeň **SeIV+VI**. Je odolný voči selénu pridanému do živného roztoku vo forme seleničitanu aj selenanu. Kmeň je patentovaný pod číslom PV 2007-764 (Z7559) (Doušková et al., 2007b). Kultúra kmeňa **SeIV+VI** po kultivácii v živnom roztoku bez selénu rástla rovnako ako kontrolná kultúra divokého kmeňa (Obr. 16, krivky ● a ○). Po pridaní **selenanu** v koncentrácii 100 mg Se/L živného roztoku sa rast kultúry kmeňa **SeIV+VI** spomalil (krivka ▲). Avšak, v porovnaní s divokým kmeňom rastúcim v rovnakom živnom roztoku dosiahla kultúra kmeňa **SeIV+VI** vyššiu koncentráciu sušiny (porovnaj krivky ▲ a △, resp. koncentrácie sušiny 3,1 g/L a 0,6 g/L). Výraznejšie spomalenie rastu zaznamenala kultúra kmeňa **SeIV+VI** po pridaní kombinácie **seleničitanu** so **selenanom** do živného roztoku v koncentrácii 100 mg Se/L, tzn. 50 mg Se vo forme seleničitanu a 50 mg vo forme selenanu (krivka ◆). Ešte výraznejšie sa spomalil rast kultúry po pridaní **seleničitanu** do živného roztoku v koncentrácii 100 mg Se/L (krivka ■). Najpomalšie rástla kultúra v živnom roztoku s najvyššou koncentráciou selénu, 200 mg Se/L, pridaného ako seleničitan (100 mg Se/L) a selenan (100 mg Se/L) (krivka ▼). Po pridaní najvyššieho testovaného

množstva selénu do živného roztoku kultúra nezaznamenala zastavenie rastu, ako pri predchádzajúcich pokusoch, ale len spomalila svoj rast.



**Obr. 16:** Vplyv seleničitanu sodného a selenanu sodného na kultúry divokého kmeňa a kmeňa **SeIV+VI** riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa **SeIV+VI** riasy *S. quadricauda* bez prídavku selénu v živnom roztoku (●) po pridaní **seleničitanu sodného** (■), resp. **selenanu sodného** (▲) do živného roztoku v koncentrácii 100 mg Se/L a po pridaní selénu v kombinácii **seleničitan** a **selenan** v koncentrácii 50+50 mg (◆) resp. 100+100 mg (▼) Se/L živného roztoku.

Kontrolná kultúra divokého kmeňa riasy *S. quadricauda* bez prídavku selénu v živnom roztoku (○), so seleničitanom sodným v koncentrácii 100 mg (□), so selenanom sodným v koncentrácii 100 mg (△) a v ich kombinácii 50+50 mg (◇) Se/L živného roztoku.

### 4.3. Obsah selénu v bunkách

V nasledujúcich pokusoch sa bližšie charakterizovali získané kmene riasy *S. quadricauda*. Stanovovalo sa množstvo celkového selénu a množstvo selenometionínu viazaného v bunkách všetkých troch vyselektovaných kmeňov a divokého typu (Obr. 17). Obsah Se bol stanovovaný metódou ICP MS a obsah selenometionínu metódou HPLC-ICP-MS popísanými v kapitole Materiál a metódy. Pokusnou kultúrou bola nesynchronná kultúra riasy *S. quadricauda*, ktorá rástla pri trvalom svetle, prebublávaná bola zmesou vzduchu s 2% CO<sub>2</sub> (v/v) a intenzita svetla dosahovala 566,9 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (5 V). Selén bol pridávaný do živného roztoku vo forme seleničitanu alebo selenanu v koncentrácii 20, resp. 50 mg Se/L. Pri testovaní divokého kmeňa bola použitá koncentrácia 10 mg Se/L, vzhľadom na toxicitu

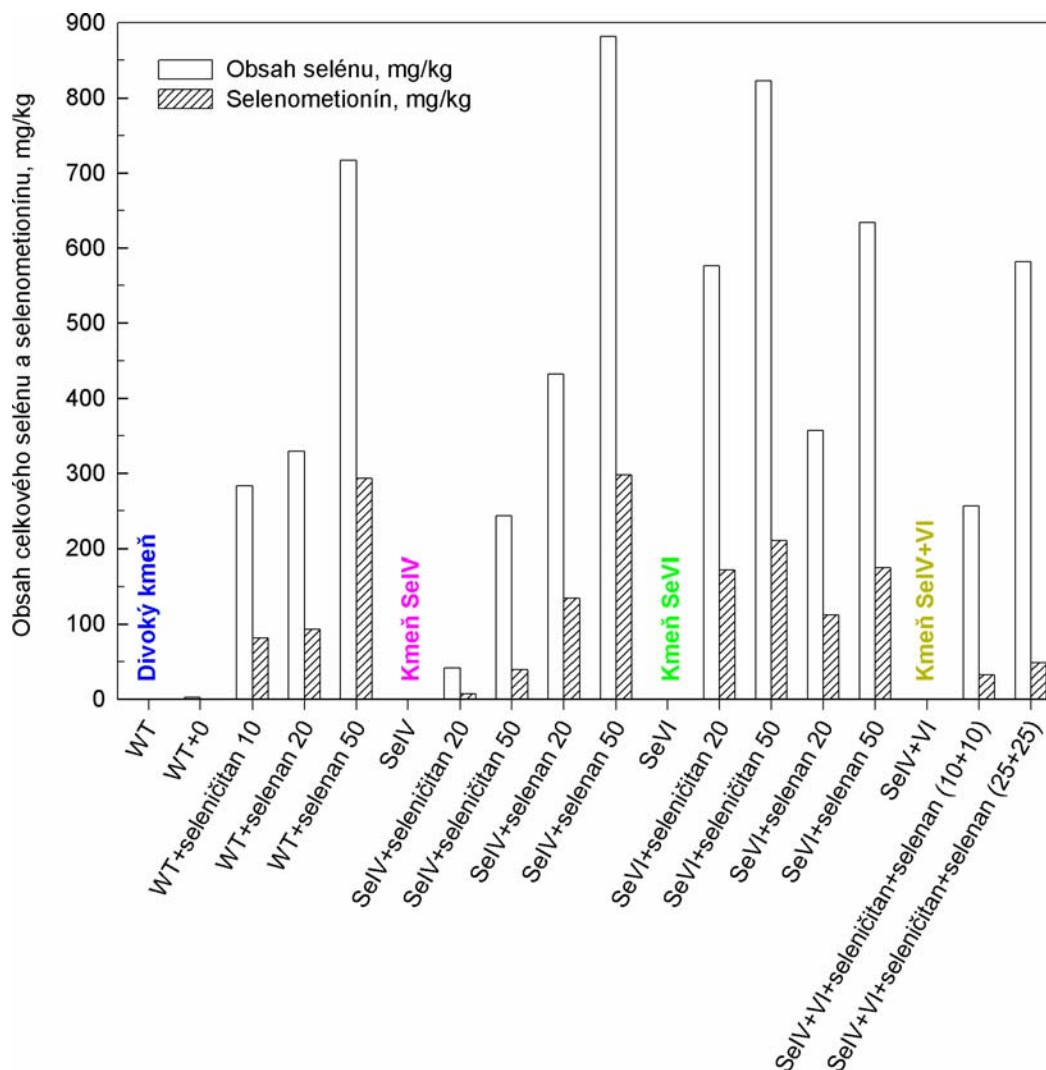
seleničitanu. Pri vyšších koncentráciách seleničitanu nebolo možné získať dostatok biomasy na potrebné analýzy.

Kultúra **divokého kmeňa** kultivovaná v živnom roztoku bez prídavku selénu neobsahovala v bunkách detekovateľné množstvo selénu. Po pridaní seleničitanu v koncentrácii 10 mg Se/L sa obsah celkového selénu v bunkách zvýšil na takmer 283 mg/kg a obsah selenometionínu na 81,7 mg/kg. Pri vyššej koncentrácii selenanu kultúra nerástla tak dobre, aby bolo možné získať dostatočné množstvo vzoriek na analýzy. Postupným zvyšovaním množstva selenanu v živnom roztoku sa zvýšil celkový obsah selénu ako aj obsah selenometionínu v bunkách divokého kmeňa. Zvýšením množstva selenanu z 20 mg Se/L na 50 mg Se/L stúpol obsah selenometionínu viac ako dvojnásobne, na 293 mg/kg a obsah selénu sa zvýšil z 329 mg/kg na 717 mg/kg.

Kmeň **SeIV** obsahoval po kultivácii v živnom roztoku s obsahom seleničitanu v koncentrácii 20 mg Se/L veľmi nízke množstvo celkového selénu (41 mg/kg) a takmer žiadny selenometionín naviazaný v bunkách (7 mg/kg). Množstvo celkového selénu ako aj obsah selenometionínu v bunkách kmeňa **SeIV** sa zvýšil po zvýšení koncentrácie seleničitanu na 50 mg Se/L pridaného do živného roztoku. Aj napriek tomu bolo množstvo celkového selénu ako aj množstvo selenometionínu naviazaného v bunkách nízke (243 mg/kg, resp. 39 mg/kg). Prudké zvýšenie celkového obsahu selénu ako aj selenometionínu zaznamenala kultúra kmeňa **SeIV** po kultivácii v živnom roztoku so zvyšujúcim sa obsahom selenanu. Po zvýšení množstva selenanu pridaného do živného roztoku z 20 na 50 mg Se/L stúplo množstvo celkového selénu v bunkách kmeňa **SeIV** z 432 mg/kg na 882 mg/kg. Obsah selenometionínu sa zvýšil viac ako dvojnásobne, z množstva 134 mg/kg na 298 mg/kg. Pri tejto koncentrácii selenanu bolo zaznamenané najvyššie množstvo selenometionínu ako aj celkového selénu akumulovaného v bunkách kmeňa **SeIV**.

Kultúry kmeňa **SeVI** kultivované v živnom roztoku s najvyšším množstvom selenanu (50 mg Se/L) alebo s najnižším množstvom seleničitanu (20 mg Se/L) dosiahli takmer rovnaké množstvá selenometionínu naviazaného v bunkách (172 a 175 mg/kg). Najvyššie množstvo selenometionínu naviazaného v bunkách bolo stanovené v bunkách rastúcich v živnom roztoku s pridaným seleničitanom v koncentrácii 50 mg Se/L. Množstvo celkového selénu sa zvyšovalo spolu so zvyšujúcim sa množstvom selénu v živnom roztoku. Po pridaní seleničitanu v koncentrácii 20 mg Se/L bolo celkové množstvo selénu v bunkách 576 mg/kg a po zvýšení množstva seleničitanu na 50 mg Se/L stúplo na 823 mg/kg. Po rovnakom zvýšení selenanu v živnom roztoku sa zvýšil celkový obsah selénu z 357 mg/kg na 634 mg/kg.

Množstvo selenometionínu ako aj celkového selénu sa u kombinovaného kmeňa **SeIV+VI** zvyšovalo spolu so zvyšujúcou sa koncentráciou selénu v živnom roztoku. Množstvo selenometionínu bolo pri oboch porovnávaných koncentráciách, 20 a 50 mg Se/L pridaného ako kombinácia seleničitanu a selenanu, nízke, dosiahlo hodnotu 32 mg/kg resp. 48 mg/kg.



**Obr. 17: Obsah celkového selénu a obsah selenometionínu, v mg na kg hmotnosti sušiny, stanovený v nesynchronných kultúrach riasy *S. quadricauda*.** Boli použité vyselektované kmene a divoký kmeň. **Divoký kmeň** bol kultivovaný v živnom roztoku so seleničitanom alebo selenanom v koncentracii 10, resp. 20 a 50 mg Se/L. Kmene **SeIV** a **SeVI** boli kultivované v živných roztokoch so seleničitanom alebo selenanom v koncentracii 20 a 50 mg Se/L. Kombinovaný kmeň **SeIV+VI** bol kultivovaný v živnom roztoku, do ktorého bol pridaný seleničitan spolu so selenanom v koncentracii 20 a 50 mg Se/L, resp. 10+10 a 25+25 mg Se/L.



## 4.4. Aktivita tioredoxín reduktázy

### 4.4.1 Aktivita TR u nesynchronných kultúr

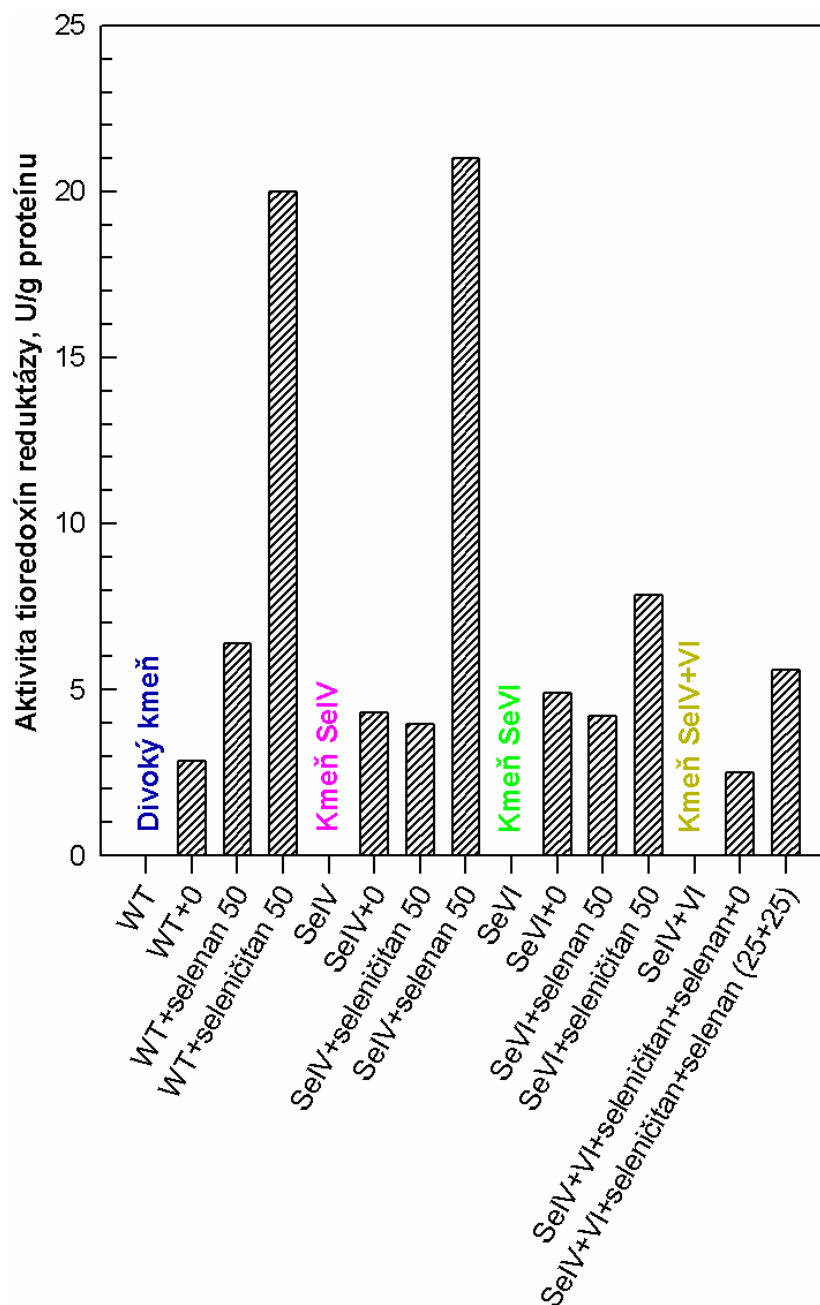
V nasledujúcich pokusoch bola zisťovaná aktivita TR v bunkách kultivovaných bez selénu ako aj so selénom v živnom roztoku vo všetkých vyššie spomínaných kmeňoch riasy *S. quadricauda* (Obr. 18). Aktivita TR bola stanovená enzymatickou esejou. Pokusnými kultúrami boli kultúry divokého kmeňa a kmeňov rezistentných voči selénu rastúce 12 hodín pri trvalom svetle intenzity  $566,9 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (5 V) a boli prebublávané zmesou vzduchu s 2 % CO<sub>2</sub> (v/v). Aktivita TR je vyjadrená v U/g proteínu, kde 1U je definovaná ako množstvo enzýmu, ktoré spôsobí zmenu absorbancie o 1 pri 412 nm a použítí 200  $\mu\text{M}$  NADPH za minútu.

Aktivita TR **divokého kmeňa** riasy *S. quadricauda* v živnom roztoku bez pridaného selénu bola nízka (2,9 U/g) v porovnaní s aktivitou TR kultúry divokého kmeňa rastúcej v živnom roztoku so selenanom v koncentrácii 50 mg Se/L (6,4 U/g). Aktivita TR prudko stúpla po vystavení kultúry divokého kmeňa rovnakej koncentrácii seleničitanu až na hodnotu 20 U/g.

Aktivita TR kmeňa **SeIV** po pridaní seleničitanu v koncentrácii 50 mg Se/L je porovnateľná s aktivitou TR buniek tohto kmeňa, ktoré neboli vystavené selénu. Výrazné zvýšenie, na hodnotu 21 U/g, nastalo po pridaní rovnakého množstva selénu v podobe selenanu do živného roztoku.

Pri kmeni **SeVI** bola mierne zvýšená aktivita TR kultúry rastúcej v živnom roztoku bez selénu oproti kultúre rastúcej v živnom roztoku so selenanom v koncentrácii 50 mg Se/L (porovnaj hodnoty 4,9 a 4,2 U/g). Najvyššia aktivita TR tohto kmeňa bola zaznamenaná u kultúry rastúcej v živnom roztoku so seleničitanom v rovnakej koncentrácii. Dosiahla hodnotu 7,9 U/g.

Aktivita TR kombinovaného kmeňa **SeIV+VI**, bez selénu v živnom roztoku dosiahla hodnoty porovnateľné s kultúrou divokého kmeňa (hodnota 2,5 resp. 2,9 U/g). Kombinovaný kmeň vykazoval mierne zvýšenú aktivitu TR po pridaní selénu v koncentrácii 50 mg/L (25+25 mg Se/L seleničitan a selenan). Aktivita TR dosiahla hodnotu 5,6 U/g.



**Obr. 18:** Aktivita trioredoxín reduktázy stanovená u **nesynchronných kultúr divokého a selén rezistentných kmeňov riasy *S. quadricauda***. Selén bol pridávaný ku kultúram **divokého, SeIV a SeVI** kmeňa, v koncentráciách 50 mg/L buď vo forme seleničitanu alebo selenanu. Kultúra kombinovaného kmeňa **SeIV+VI** bola kultivovaná v živnom roztoku s koncentráciou 50 mg Se/L, pridávaného ako kombinácia seleničitanu a selenanu (25+25) mg Se/L.



## 4.4.2 Synchronne kultúry

### 4.4.2.1 Priebeh bunkového cyklu

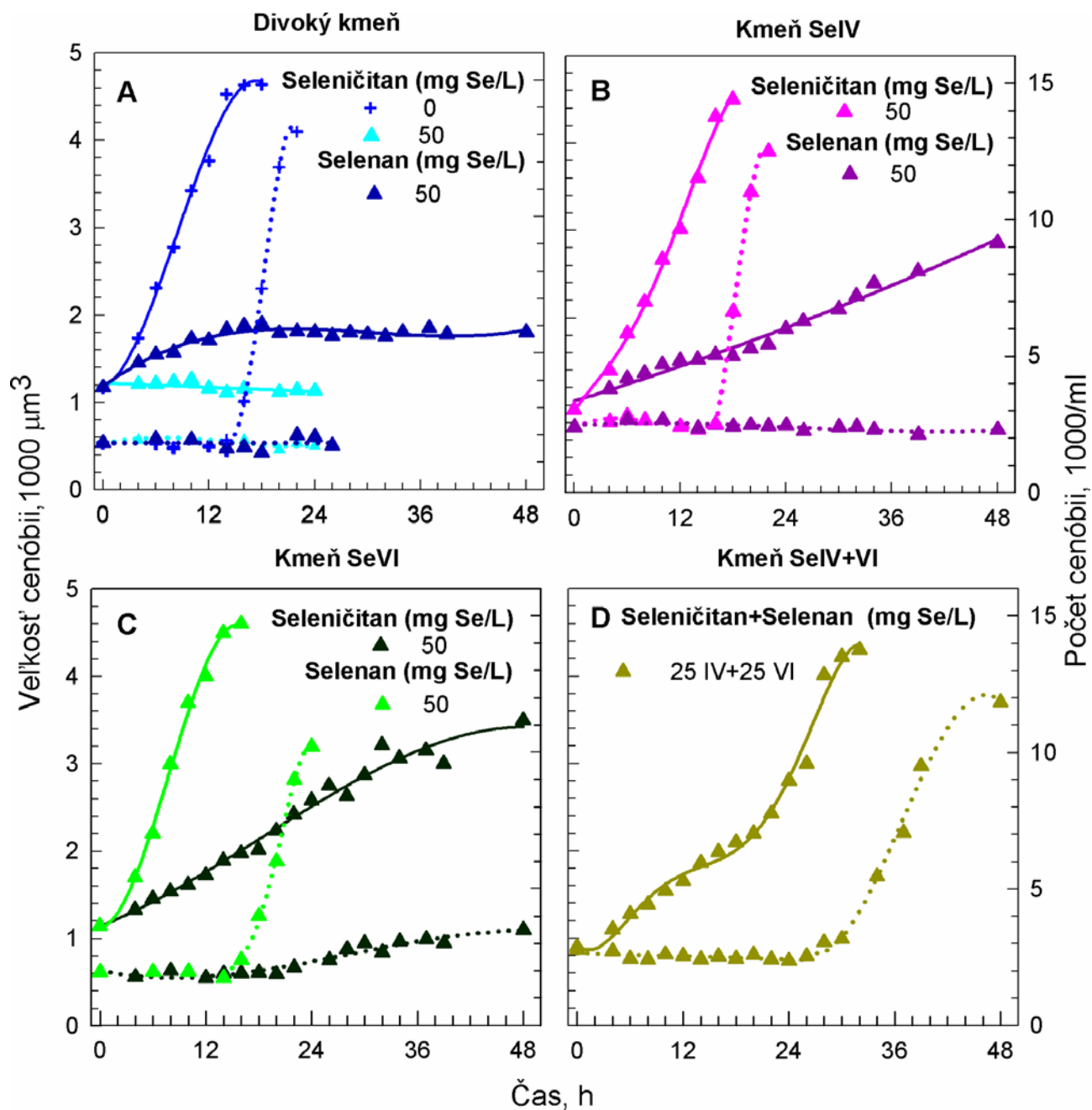
Kultúry boli synchronizované striedaním svetelnej a tmavej fázy (14/10 hod) a následne boli kultivované na trvalom svetle. Nasledujúci graf (Obr. 19) vyjadruje priebeh bunkového cyklu jednotlivých synchronných kultúr. Veľkosť cenóbie vyjadruje rast buniek počas bunkového cyklu a zvýšenie počtu cenóbie zase delenie buniek.

V časti A (Obr. 19) je zachytené pôsobenie selénu na synchronne kultúry **divokého kmeňa** riasy *S. quadricauda* po pridaní seleničitanu alebo selenanu v koncentrácii 50 mg Se/L. Cenóbia kultúry divokého kmeňa v živnom roztoku bez selénu rástli až po 14. hodinu cyklu (+, plná krivka) a následne v 15. hodine cyklu začal stúpať počet cenóbie, čo vyjadruje, že sa bunky začali deliť (+, prerušovaná krivka). Kultúry rastúce v živnom roztoku so selenanom v koncentrácii 50 mg Se/L mierne zväčšili svoju veľkosť a zastavili svoj rast (▲, plná krivka), kultúra nebola schopná delenia (▲, prerušovaná krivka). Kultúra s rovnakou koncentráciou selénu, pridaného do živného roztoku ako seleničitan, nerástla (▲, plná krivka) a preto sa jej bunky neboli schopné ani rozdeliť (▲, prerušovaná krivka).

Kultúra kmeňa rezistentného voči seleničitanu, **SeIV** (Obr. 19, časť B), kultivovaná v živnom roztoku so seleničitanom, v koncentrácii 50 mg Se/L, rástla (▲, plná krivka) a následne sa v 16. hodine cyklu rozdelila (▲, prerušovaná krivka). Po pridaní selenanu v rovnakej koncentrácii kultúra rástla (▲, plná krivka), avšak nebola schopná delenia (▲, prerušovaná krivka).

V časti C je zachytený rast kultúry kmeňa **SeVI** po pridaní selenanu do živného roztoku v koncentrácii 50 mg Se/L média. Kultúra rástla (▲, plná krivka) a následne sa rozdelila (▲, prerušovaná krivka). Po pridaní seleničitanu do živného roztoku bunky rástli (▲, plná krivka), ale len malá časť sa ich rozdelila (▲, prerušovaná krivka). Delenie bolo posunuté, bunky sa začali deliť v 18.-20. hodine cyklu.

V časti D je zobrazená kultivácia synchronnej kultúry kombinovaného kmeňa **SeIV+VI**. Cenóbia kmeňa **SeIV+VI** rástli (▲, plná krivka) v živnom roztoku so seleničitanom a selenanom v koncentrácii 50 mg Se/L, resp. 25+25 mg Se/L a následne sa rozdelili (▲, prerušovaná krivka). Ich cyklus bol však predĺžený na viac ako 24 hodín.



Obr. 19: Zmeny vo veľkosti (plné krivky) a počte (prerušované krivky) cenóbie počas bunkového cyklu synchronných kultúr divokého kmeňa (časť A), kmeňa rezistentného voči seleničitanu SeIV (časť B), selenanu SeVI (časť C) a kombinovaného kmeňa SeIV+VI (časť D). Všetky kultúry boli kultivované v živných roztokoch so seleničitanom alebo selenanom, prípadne kombinácii oboch foriem selénu v koncentrácii 50 mg Se/L.

#### 4.4.2.2 Aktivita TR u synchronných kultúr

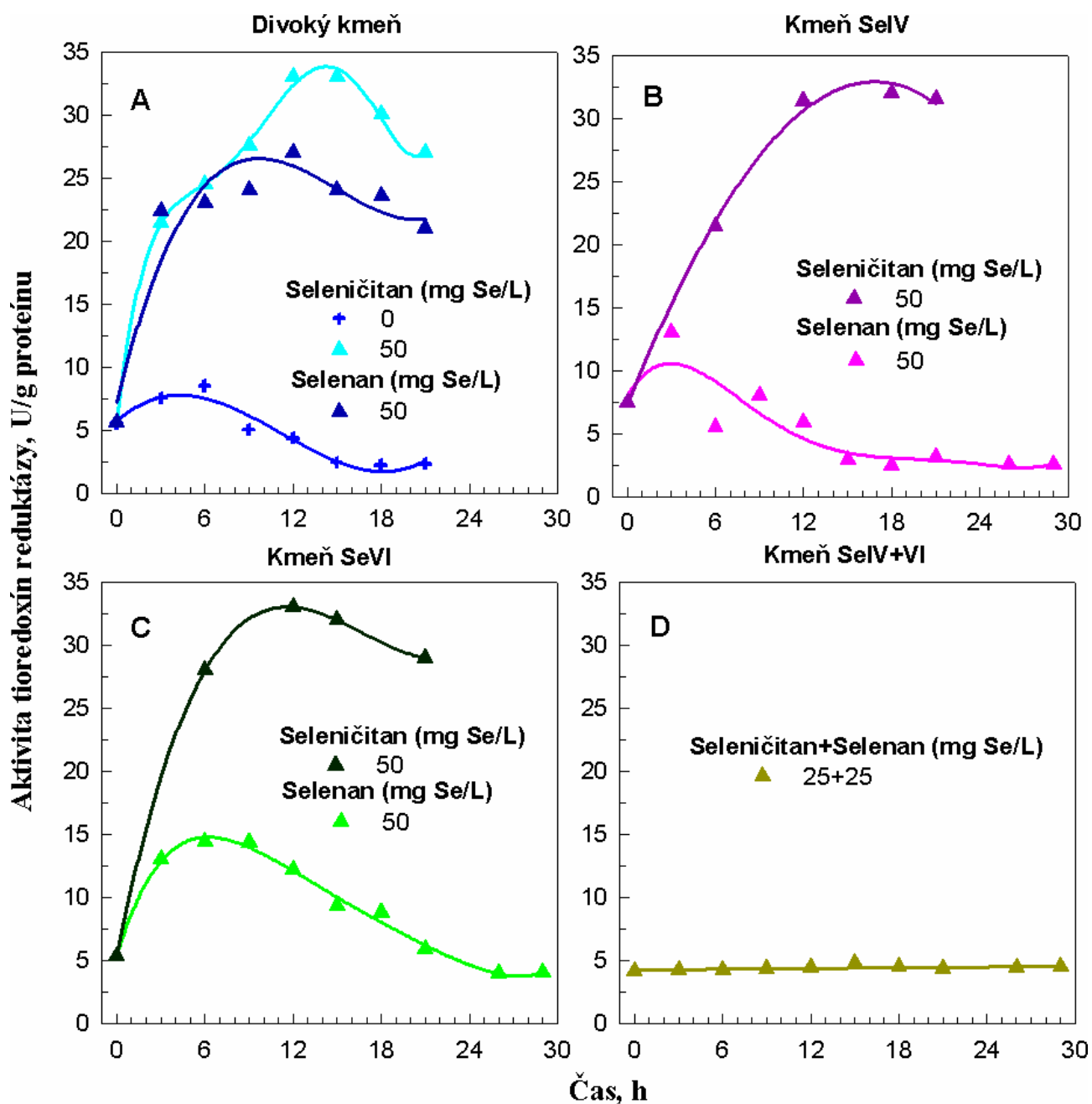
Rovnako ako u nesynchronných kultúr bola aktivita TR stanovovaná aj u synchronných kultúr. Aktivita TR bola stanovená enzymatickou esejou. Testované boli všetky kultúry *S. quadricauda* synchronizované striedaním svetelnej a tmavej fázy (14/10 hod) a následne boli kultivované na trvalom svetle.

Kultúry **divokého kmeňa** (Obr. 20, časť A) mali na začiatku kultivácie rovnakú aktivitu TR bez ohľadu na to, či bol do živného roztoku pridaný selén alebo nie. Aktivita TR divokého kmeňa neovplyvnená selénom zaznamenala mierny nárast, na hodnotu 5,8 U/g, a následne pokles pod hodnotu získanú na začiatku kultivácie, 2,3 U/g (krivka +). Po dvoch hodinách kultivácie v živnom roztoku s pridaným selénom sa aktivita TR prudko zvýšila v porovnaní s aktivitou TR kultúry divokého kmeňa rastúcej v živnom roztoku bez selénu (krivky ▲ a ▲). Počas ďalšej kultivácie sa aktivita kultúr rastúcich v živných roztokoch so selénom, v koncentrácii 50 mg Se/L, zvyšovala. Maximum dosiahla v 12., príp. 14. hodine cyklu v závislosti na forme selénu pridaného do živného roztoku. Kultúra divokého kmeňa rastúca v živnom roztoku so seleničitanom v koncentrácii 50 mg Se/L dosiahla maximum (33 U/g) neskôr, teda v 14. hodine cyklu (krivka ▲).

Kmeň rezistentný voči seleničitanu, **SeIV**, (Obr. 20, časť B), rastúci v živnom roztoku s 50 mg Se/L pridaného ako seleničitan, mal na začiatku kultivácie aktivitu TR mierne zvýšenú a následne poklesla (krivka ▲). Prudké zvýšenie aktivity TR, na hodnotu 32 U/g, bolo zaznamenané pri koncentrácii 50 mg Se/L pridaného ako selenan (krivka ▲).

Podobná situácia sa opakovala aj pri kmeni **SeVI** rezistentnému voči na selenanu (Obr. 20, časť C). Prudké zvýšenie aktivity, na hodnotu 33 U/g bolo zaznamenané po kultivácii v živnom roztoku so seleničitanom v koncentrácii 50 mg Se/L v 12. hodine cyklu (krivka ▲). Selén pridaný do živného roztoku ako selenan vyvolal mierne zvýšenie aktivity TR synchronnej kultúry kmeňa **SeVI** (krivka ▲). Následne aktivita TR klesla pod hodnotu dosiahnutú na začiatku kultivácie, na 4,1 U/g.

Kultúra kombinovaného kmeňa **SeIV+VI** nevykazovala žiadnu zmenu aktivity počas celej doby kultivácie v živnom roztoku s 25 mg Se/L, pridaného ako seleničitan, a 25 mg Se/L, pridaného ako selenan (krivka ▲). Hodnota aktivity TR dosiahnutá kombinovaným kmeňom bola v rozmedzí 4,2 - 4,8 U/g počas celej doby kultivácie.

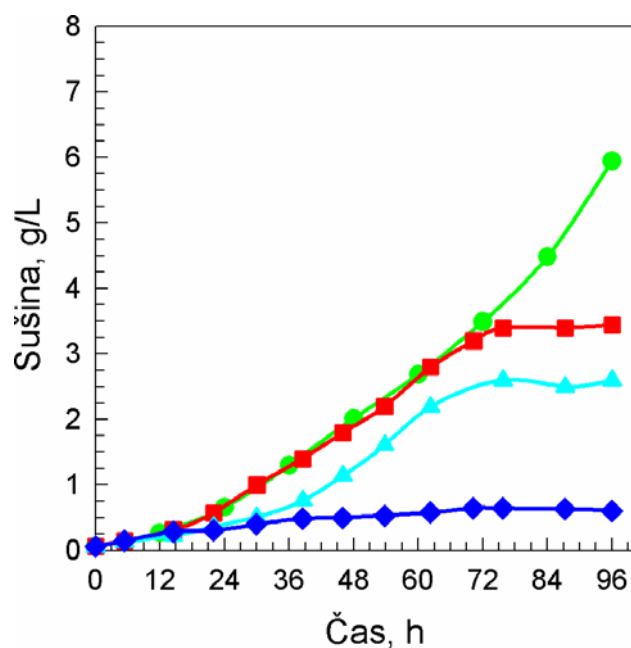


Obr. 20: Aktivita trioredoxín reduktázy stanovená u **synchrónnych kultúr divokého a selén rezistentných kmeňov riasy *S. quadricauda***. Selén bol pridávaný ku kultúram **divokého, SeIV** a **SeVI** kmeňa, v koncentráciách 50 mg Se/L buď vo forme seleničitanu alebo selenanu. Kultúra kombinovaného kmeňa **SeIV+VI** bola kultivovaná v živnom roztoku s koncentráciou 50 mg Se/L, pridaného ako kombinácia seleničitanu a selenanu (25+25) mg Se/L.

## 4.5. Rast kultúr v živnom roztoku so zníženým obsahom síry

### 4.5.1 Rast divokého kmeňa v živnom roztoku so zníženým obsahom síry a v prítomnosti selénu

Vzhľadom na chemickú podobnosť molekuly síry a selénu bola testovaná hypotéza, či pri zníženom množstve síry v médiu prijímajú riasy vyššie množstvá selénu do buniek a či je rast ovplyvnený neprítomnosťou síry a prítomnosťou selénu v médiu. V nasledujúcich pokusoch bolo znížené množstvo síranu horečnatého pridávaného do média na 1/10 ( $400 \mu\text{M SO}_4^{2-}$ ), 1/100 ( $40 \mu\text{M SO}_4^{2-}$ ) a 1/1000 ( $4 \mu\text{M SO}_4^{2-}$ ) z pôvodného množstva síry ( $4000 \mu\text{M SO}_4^{2-}$ ). Horčík pridávaný pôvodne do média ako síran horečnatý bol nahradený chloridom horečnatým pridávaným do média v rovnakej koncentrácii ako v štandardnom živnom roztoku „ $\frac{1}{2}$  ŠS“, ktorého zloženie je uvedené v kapitole Materiál a metódy.

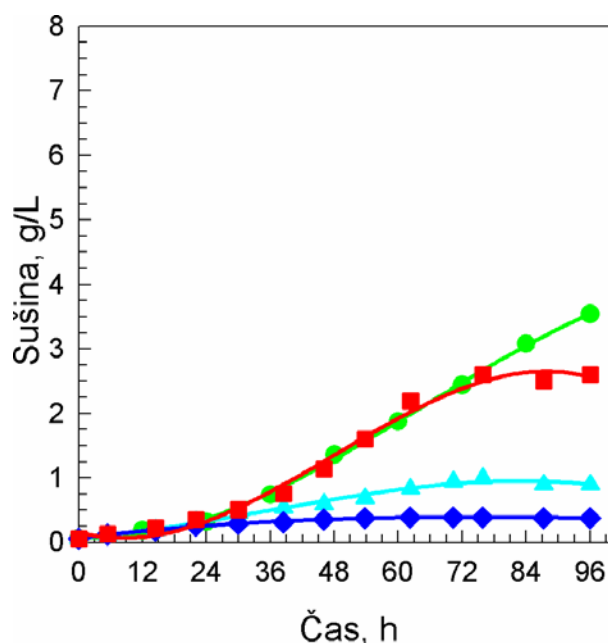


**Obr. 21:** Vplyv znižujúceho sa množstva síranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) v živnom roztoku na kultúry divokého kmeňa riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra divokého kmeňa riasy *S. quadricauda* v kontrolnom živnom roztoku,  $4000 \mu\text{M SO}_4^{2-}$  (●), v roztoku s koncentráciou síry  $400 \mu\text{M}$  (■),  $40 \mu\text{M}$  (▲) a  $4 \mu\text{M}$  (◆)  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Najskôr bol testovaný vplyv nedostatku síry na divoký kmeň riasy *S. quadricauda*. V grafe (Obr. 21) je znázornený nárast koncentrácie sušiny v čase. Kultúry divokého kmeňa rastúce v živnom roztoku so síranom v koncentrácii  $4000 \mu\text{M}$  a  $400 \mu\text{M}$  (krivky ● a ■) neboli ovplyvnené nedostatkom síry. Kultúra rastúca v živnom roztoku s nižšou koncentráciou síry skôr vstúpila do stacionárnej fázy rastu (krivka ■, od 72 hodiny kultivácie). Koncentrácia  $40 \mu\text{M SO}_4^{2-}$  (krivka ▲) ovplyvnila rast riasovej kultúry, kultúra

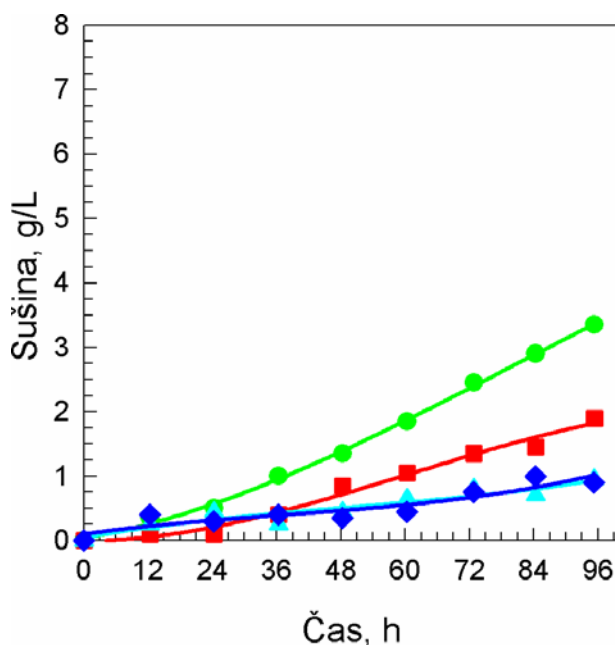
rástla pomalšie a po 72 hodinách dosiahla stacionárnu fázu rastu. Najnižšia použitá koncentrácia síry, 4  $\mu\text{M SO}_4^{2-}$  (krivka  $\blacklozenge$ ) zastavila rast kultúry.

V nasledujúcom pokuse bol do živného roztoku všetkých kultúr pridaný **seleničitan sodný** v koncentrácii 10 mg Se/L. Táto nízka koncentrácia je veľmi dobre znášaná **divokým kmeňom**. Na obrázku 22 sú znázornené rastové krivky divokého kmeňa. Pridanie seleničitanu do živného roztoku spôsobilo aj pri najvyššej použitej koncentrácii síry (krivka  $\bullet$ ) spomalenie rastu kultúry v porovnaní s kultúrou rastúcou bez pridania selénu do živného roztoku (krivka  $\bullet$ , Obr. 21). Kultúra kultivovaná v živnom roztoku so seleničitanom dosiahla koncentráciu sušiny 3,5 g/L, čo je nižšia hodnota v porovnaní s kultúrou rastúcou bez pridania seleničitanu do živného roztoku, 5,9 g/L. Takmer žiadny vplyv selénu nebol zaznamenaný aj pri koncentrácii 400  $\mu\text{M SO}_4^{2-}$  (krivka  $\blacksquare$ ). Kultúra rastúca so seleničitanom v živnom roztoku dosiahla stacionárnu fázu rastu po 72 hodinách kultivácie, rovnako ako aj kultúra bez pridania seleničitanu do živného roztoku (krivka  $\blacksquare$ , Obr. 21). Po následnom znížení množstva síry v živnom roztoku na 40  $\mu\text{M SO}_4^{2-}$  (krivka  $\blacktriangle$ ) sa prudko spomalil rast kultúry v porovnaní s kultúrou s rovnakým množstvom síry a bez pridania seleničitanu (krivka  $\blacktriangle$ , Obr. 21). Živný roztok obsahujúci tisícinu z pôvodného množstva síry a s prídavkom seleničitanu bol pre kultúru letálny (krivka  $\blacklozenge$ ). Kultúra zaznamenala minimálny nárast sušiny. Koncentrácia sušiny dosiahla hodnotu 0,35 g/L.



**Obr. 22:** Vplyv znižujúceho sa množstva síranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) v prítomnosti **seleničitanu sodného** (10 mg Se/L) v živnom roztoku na kultúry **divokého kmeňa riasy** *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra divokého kmeňa riasy *S. quadricauda* v kontrolnom živnom roztoku, 4000  $\mu\text{M SO}_4^{2-}$  (●), a v živnom roztoku s koncentráciou síry 400  $\mu\text{M}$  (■), 40  $\mu\text{M}$  (▲) a 4  $\mu\text{M}$  (◆)  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Nasledujúci graf (Obr. 23) zachytáva rast kultúr ovplyvnených jednak nedostatkom síry v živnom roztoku a jednak pridaním **selenanu sodného** v koncentrácii 10 mg Se/L do živného roztoku. **Divoký kmeň** znáša pridanie tohto nízkeho množstva selenanu veľmi dobre. V grafe je zobrazený nárast koncentrácie sušiny v čase. Kultúra rastúca na najvyššom množstve síry (4000  $\mu\text{M}$ , krivka ●) pridanom do živného roztoku rástla plynulo počas celej doby kultivácie a dosiahla koncentráciu sušiny 3,5 g/L. Zníženie množstva síry (400  $\mu\text{M}$ ) v živnom roztoku spôsobilo spomalenie rastu kultúry takmer o polovicu (krivka ■) v porovnaní s kultúrou rastúcou v živnom roztoku s pôvodným množstvom síry. Koncentrácia sušiny dosiahla hodnotu 1,9 g/L po 96 hodinách kultivácie. S následným znížením množstva síry (40 a 4  $\mu\text{M}$ , krivky ▲ a ◆) v živnom roztoku sa rast kultúr spomalil. Kultúry mali rovnaký priebeh rastu a dosiahli koncentráciu sušiny 0,95 resp. 0,9 g/L.



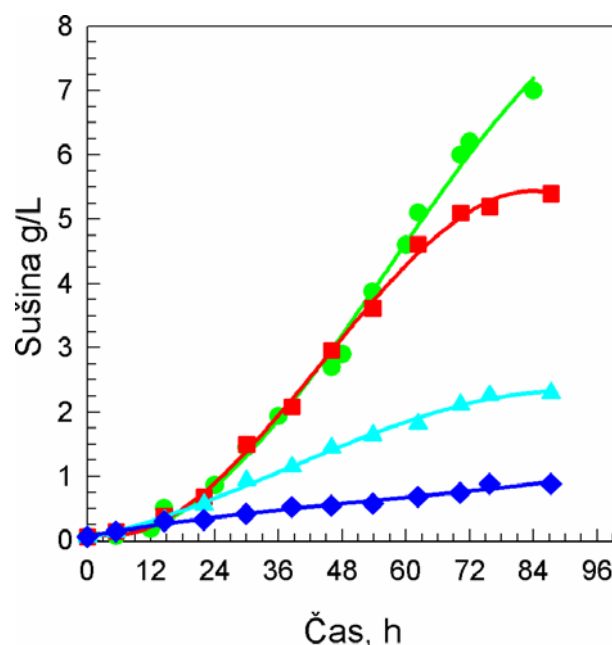
**Obr. 23:** Vplyv znižujúceho sa množstva síranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) v prítomnosti **selenanu sodného** (10 mg Se/L) v živnom roztoku na kultúry **divokého kmeňa riasy** *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra divokého kmeňa riasy *S. quadricauda* v kontrolnom živnom roztoku, 4000  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  (●), a v živnom roztoku s koncentráciou síry 400  $\mu\text{M}$  (■), 40  $\mu\text{M}$  (▲) a 4  $\mu\text{M}$  (◆)  $\text{SO}_4^{2-}$ .

#### 4.5.2 Rast kmeňa **SeIV** v živnom roztoku so zníženým obsahom síry a v prítomnosti selénu

Rast kmeňa **SeIV** bez prítomnosti selénu v živnom roztoku so zníženým obsahom síry je zobrazený na obrázku 24. Kultúry boli najskôr testované na vplyv nedostatku síry v živnom

roztoku. Na obrázku 24 sú znázornené rastové krivky kmeňa **SeIV**. Kultúra rastúca v živnom roztoku s najvyšším množstvom síry (4000  $\mu\text{M}$ ) nedosiahla počas kultivácie stacionárnu fázu rastu (krivka ●). Koncentrácia sušiny po 84 hodinách kultivácie bola 7 g/L. Táto koncentrácia je vyššia ako koncentrácia sušiny, ktorú dosiahla kultúra divokého kmeňa po kultivácii v rovnakom živnom roztoku, 5,9 g/L (porovnaj krivky ● z obrázkov 21. a 24.). Kultúra kultivovaná v živnom roztoku s 400  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  dosiahla stacionárnu fázu po 60 hodinách kultivácie (krivka ■). V porovnaní s kultúrou divokého kmeňa dosiahla kultúra **SeIV** stacionárnu fázu rastu skôr (porovnaj krivky ■ z obrázkov 21. a 24.). Avšak koncentrácia sušiny kmeňa **SeIV** bola vyššia, 5,4 g/L, ako koncentrácia sušiny divokého kmeňa, 3,45 g/L, po 96 hodinách kultivácie.

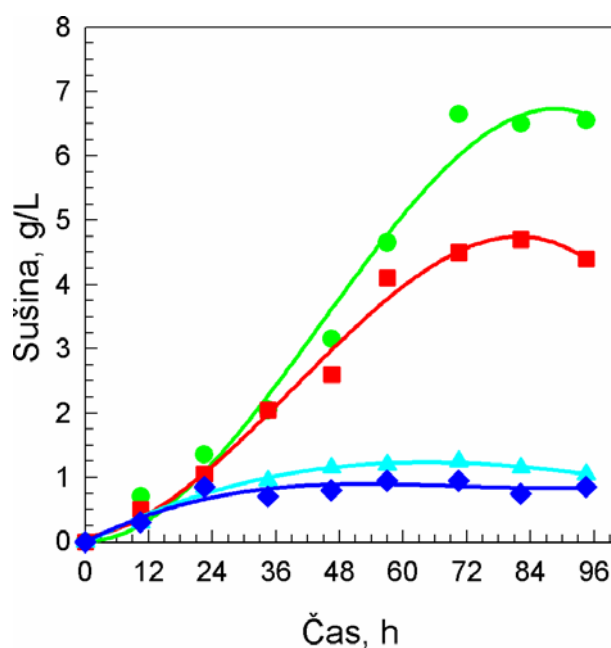
Ďalším znížením množstva síry v živnom roztoku na 40  $\mu\text{M}$  sa prudko spomalil rast kultúry (krivka ▲). Koncentrácia sušiny bola 2,3 g/L, čo je nižšia hodnota v porovnaní s divokým kmeňom rastúcim v rovnakom živnom roztoku (hodnota 2,6 g/L, krivka ▲, obrázok 21.). Najnižšia koncentrácia síry (4  $\mu\text{M}$ ) v živnom roztoku spomalila rast kultúry kmeňa **SeIV** (krivka ◆). V porovnaní s divokým kmeňom bola u kultúr rastúcich pri najnižšej testovanej koncentrácii síry (4  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$ ) kmeňa **SeIV** zaznamenaná vyššia koncentrácia sušiny.



**Obr. 24:** Vplyv znižujúceho sa množstva síranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) v živnom roztoku na kultúry kmeňa **SeIV** riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa **SeIV** riasy *S. quadricauda* v kontrolnom živnom roztoku, 4000  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  (●), a v živnom roztoku s koncentráciou síry 400  $\mu\text{M}$  (■), 40  $\mu\text{M}$  (▲) a 4  $\mu\text{M}$  (◆)  $\text{SO}_4^{2-}$ .



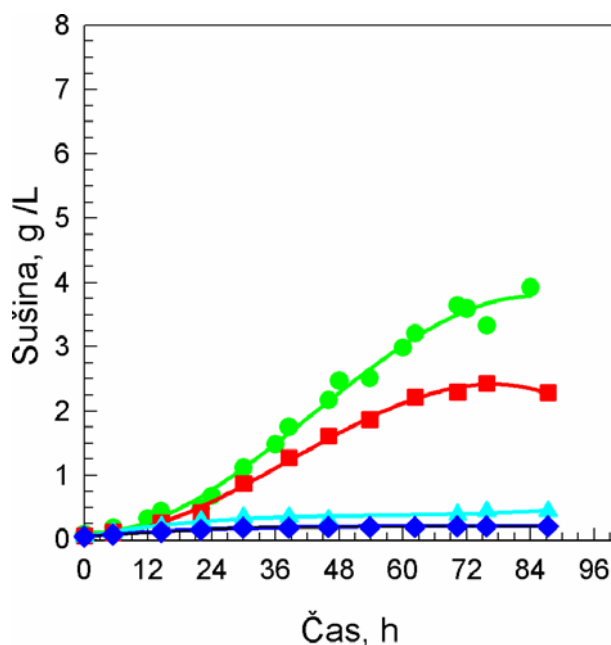
Nasledujúci graf znázorňuje nárast koncentrácie sušiny v čase (Obr. 25). Do živného roztoku všetkých testovaných kultúr bol pridaný **seleničitan sodný** v koncentrácii 100 mg Se/L. Vybraná koncentrácia seleničitanu je veľmi dobre znášaná kultúrami kmeňa **SeIV**. Kultúra rastúca v živnom roztoku s najvyšším množstvom síry (4000  $\mu\text{M}$ ) rástla plynulo počas celej doby kultivácie (krivka ●). Stacionárnu fázu rastu dosiahla po 84 hodinách kultivácie, na rozdiel od kultúry kultivovanej v živnom roztoku s rovnakým množstvom síry, ale bez selénu v roztoku (krivka ●, obrázok 24.). Pokles rýchlosti rastu kultúry oproti kultúre (krivka ■, obrázok 24.), rastúcej v živnom roztoku s 4000  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$ , bol zaznamenaný pri kultúre rastúcej v roztoku s rovnakým množstvom síry, ale so seleničitanom pridaným do roztoku (krivka ■). Obe kultúry s nízkym množstvom síry v živnom roztoku (40 a 4  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$ ) rástli približne rovnako počas celej doby kultivácie (krivky ▲ a ◆). Koncentrácia sušiny bola u oboch kultúr nižšia v porovnaní s kultúrami rastúcimi v živnom roztoku s rovnakým množstvom síry, ale bez selénu (porovnaj krivky ▲ a ◆, z obrázkov 24. a 25.).



**Obr. 25:** Vplyv znižujúceho sa množstva síranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) v prítomnosti **seleničitanu sodného** (100 mg Se/L) v živnom roztoku na kultúry kmeňa **SeIV** riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa **SeIV** riasy *S. quadricauda* v kontrolnom živnom roztoku, 4000  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  (●), a v živnom roztoku s koncentráciou síry 400  $\mu\text{M}$  (■), 40  $\mu\text{M}$  (▲) a 4  $\mu\text{M}$  (◆)  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Graf (Obr. 26) znázorňuje rastové krivky kmeňa **SeIV**. Kultúry kmeňa **SeIV** rástli v živnom roztoku obsahujúcom **seleničitan sodný** v koncentrácii 200 mg Se/L. Kultúra

rastúca pri najvyššom množstve síry (4000  $\mu\text{M}$ ) a seleničitanu (200 mg Se/L) v živnom roztoku rástla pomalšie (krivka ●) ako kultúry rastúce pri rovnakej koncentrácii síry s nižším množstvom seleničitanu alebo bez selénu v živnom roztoku (porovnaj krivky ● z obrázkov 24., 25. a 26.). Kultúra rastúca s najvyšším množstvom seleničitanu v živnom roztoku dosiahla koncentráciu sušiny 3,9 g/L v porovnaní s 7 g/L a 6,5 g/L (hodnota sušiny bez selénu v živnom roztoku resp. so seleničitanom v koncentrácii 100 mg Se/L). V porovnaní s kultúrou rastúcou v živnom roztoku s 4000  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  (krivka ● a hodnota 3,9 g/L) bol zaznamenaný nižší nárast koncentrácie sušiny (2,2 g/L) po kultivácii v živnom roztoku s množstvom síry 400  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  (krivka ■). Kultúry, kultivované v živnom roztoku s nižšími množstvami síry (40  $\mu\text{M}$  a 4  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$ ) dosiahli veľmi nízke hodnoty koncentrácie sušiny 0,43 g/L a 0,22 g/L (krivky ▲ a ◆). Takmer nerástli počas celej doby kultivácie. Prírastok ich hmotnosti je zanedbateľný.

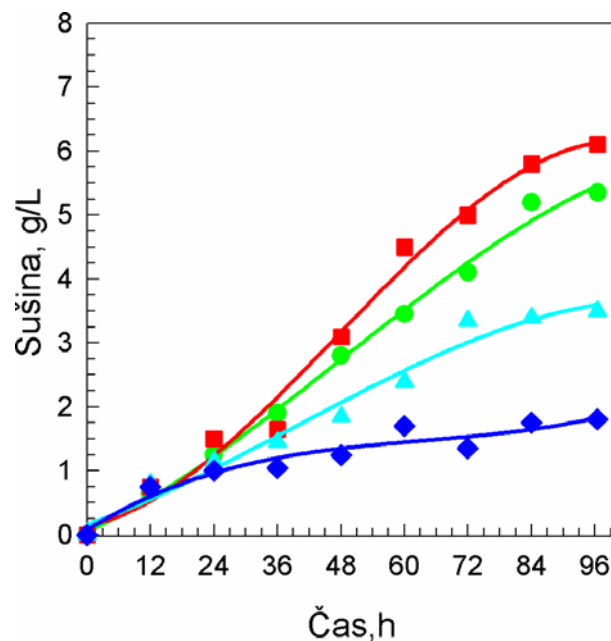


**Obr. 26:** Vplyv znižujúceho sa množstva síranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) v prítomnosti seleničitanu sodného (200 mg Se/L) v živnom roztoku na kultúry kmeňa SeIV riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa SeIV riasy *S. quadricauda* v kontrolnom živnom roztoku, 4000  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  (●), a v živnom roztoku s koncentráciou síry 400  $\mu\text{M}$  (■), 40  $\mu\text{M}$  (▲) a 4  $\mu\text{M}$  (◆)  $\text{SO}_4^{2-}$ .

#### 4.5.3 Rast kmeňa SeVI v živnom roztoku so zníženým obsahom síry a v prítomnosti selénu

Na grafe sú zachytené rastové krivky kmeňa SeVI kultivovaného v živných roztokoch bez selénu a s postupne sa znižujúcim množstvom síry (Obr. 27). Nárast koncentrácie sušiny

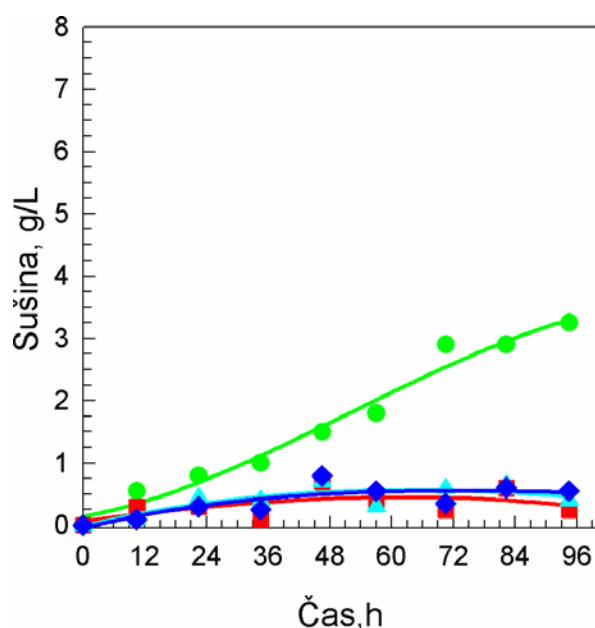
kmeňa **SeVI** s  $400 \mu\text{M SO}_4^{2-}$  v živnom roztoku (krivka ■) bol vyšší ako nárast koncentrácie sušiny rastúcej v živnom roztoku s  $4000 \mu\text{M SO}_4^{2-}$  (krivka ●). Po 96 hodinách kultivácie v živnom roztoku s  $400 \mu\text{M}$  síry dosiahla sušina koncentráciu  $6,1 \text{ g/L}$  resp.  $5,35 \text{ g/L}$  v roztoku s najvyšším množstvom síry ( $4000 \mu\text{M}$ ). Kultúra v živnom roztoku, v ktorom bolo najvyššie množstvo síry dosiahla najnižšiu koncentráciu sušiny v porovnaní s kultúrou divokého kmeňa a kmeňa **SeIV** (porovnaj krivky ● z obrázkov 21., 24. a 27.). Na rozdiel od kultúry rastúcej v živnom roztoku s nižším množstvom síry, ktorá dosiahla najvyššiu koncentráciu sušiny v porovnaní s kultúrami divokého kmeňa a kmeňa **SeIV** (porovnaj krivky ■ z obrázkov 21., 24. a 27.). Po ďalšom znížení množstva síry v živnom roztoku bolo zaznamenané spomalenie rastu kultúry (krivka ▲) a kultúra dosiahla koncentráciu sušiny  $3,5 \text{ g/L}$ . Kultúra kultivovaná v živnom roztoku s najnižším testovaným množstvom síry ( $4 \mu\text{M}$  a krivka ◆) spomalila svoj rast v porovnaní s kultúrami kmeňa **SeVI** rastúcimi v roztokoch s vyšším množstvom síry. Koncentrácia sušiny, ktorú dosiahla táto kultúra bola najvyššia v porovnaní s kultúrami divokého kmeňa a kmeňa **SeIV** rastúcimi v rovnakom živnom roztoku (porovnaj krivky ◆ z obrázkov 21., 24. a 27.).



**Obr. 27:** Vplyv znižujúceho sa množstva síranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) v živnom roztoku na kultúry kmeňa **SeVI** riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa **SeVI** riasy *S. quadricauda* v kontrolnom živnom roztoku,  $4000 \mu\text{M SO}_4^{2-}$  (●), a v živnom roztoku s koncentráciou síry  $400 \mu\text{M}$  (■),  $40 \mu\text{M}$  (▲) a  $4 \mu\text{M}$  (◆)  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Po pridaní **selenanu sodného** do živného roztoku v koncentrácii  $100 \text{ mg Se/L}$  sa rast všetkých testovaných kultúr kmeňa **SeVI** spomalil, pri niektorých koncentráciách síry sa zastavil (Obr. 28). Ich rast je vyjadrený grafom znázorňujúcim nárast koncentrácie sušiny

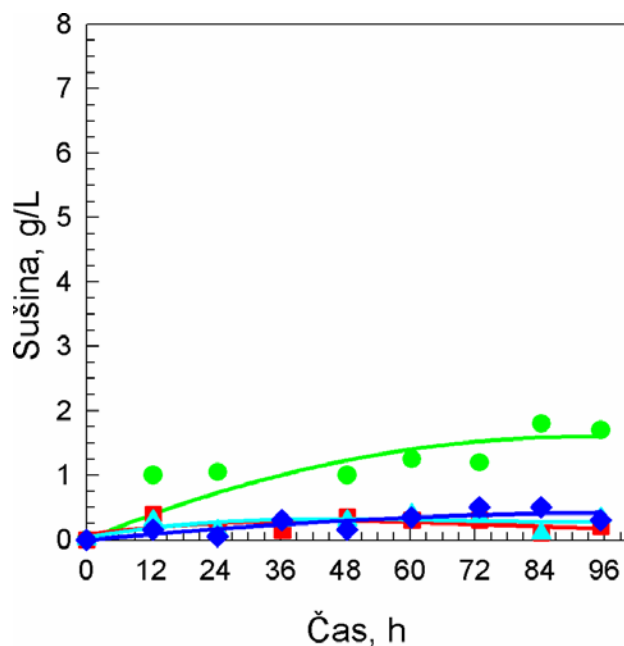
v čase. Viditeľný nárast sušiny dosiahla len kultúra kultivovaná v živnom roztoku obsahujúcom  $4000 \mu\text{M SO}_4^{2-}$  (krivka ●). Koncentrácia sušiny po 96 hodinách kultivácie bola  $3,25 \text{ g/L}$ . Avšak táto hodnota je polovičná v porovnaní s nárastom koncentrácie sušiny ( $6,5 \text{ g/L}$ ) kmeňa **SeIV** s rovnakou koncentráciou seleničitanu v živnom roztoku (porovnaj krivky ● z obrázkov 25. a 28.). Po znížení množstva síry v živnom roztoku sa rast kultúr zastavil (krivky ■, ▲ a ◆) a kultúry nezaznamenali takmer žiaden nárast koncentrácie sušiny  $0,25$ ;  $0,44$  a  $0,55 \text{ g/L}$ . V porovnaní s kultúrami kmeňa **SeIV** rastúcimi v živnom roztoku s rovnakým množstvom síry a selénu, v podobe seleničitanu, sú získané hodnoty sušiny veľmi nízke (porovnaj krivky ■, ▲ a ◆ z obrázkov 25. a 28.).



**Obr. 28:** Vplyv znižujúceho sa množstva síranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) v prítomnosti selenanu sodného ( $100 \text{ mg Se/L}$ ) v živnom roztoku na kultúry kmeňa **SeVI** riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa **SeVI** riasy *S. quadricauda* v kontrolnom živnom roztoku,  $4000 \mu\text{M SO}_4^{2-}$  (●), a v živných roztokoch s koncentráciou síry  $400 \mu\text{M}$  (■),  $40 \mu\text{M}$  (▲) a  $4 \mu\text{M}$  (◆)  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Graf (Obr. 29) zobrazuje nárast koncentrácie sušiny v čase. Zvolená koncentrácia selenanu sodného ( $200 \text{ mg Se/L}$  živného roztoku) pôsobila na kultúry kmeňa **SeVI** toxicky. Táto koncentrácia bola vybraná ako porovnávacía k rovnakej koncentrácii seleničitanu, ktorý bol testovaný na kmeni **SeIV**. Kultúra rastúca v živnom roztoku s najvyšším množstvom síry rástla veľmi slabo (krivka ●). V porovnaní s kultúrou kmeňa **SeIV**, v živnom roztoku ktorej bolo rovnaké množstvo síry a selénu vo forme seleničitanu (krivka ●, obrázok 26.), bol rast kultúry pomalý a kultúra dosiahla koncentráciu sušiny len  $1,7 \text{ g/L}$ , resp.  $3,9 \text{ g/L}$  (kultúra **SeVI** vs. **SeIV**). Nižšie koncentrácie síry (krivky ■, ▲ a ◆), v kombinácii s uvedenou

koncentraciou selenanu, pôsobili na bunky testovaných kultúr letálne. Kultúry takmer nerástli a ich sušina dosiahla koncentráciu 0,2; 0,35 a 0,3 g/L.



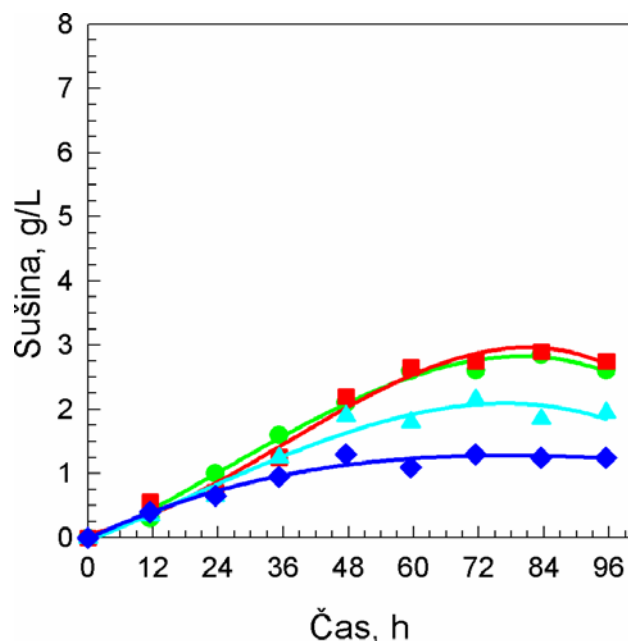
**Obr. 29:** Vplyv znižujúceho sa množstva síranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) v prítomnosti selenanu sodného (200 mg Se/L) v živnom roztoku na kultúry kmeňa **SeVI** riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa **SeVI** riasy *S. quadricauda* v kontrolnom živnom roztoku, 4000  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  (●), a v živných roztokoch s koncentraciou síry 400  $\mu\text{M}$  (■), 40  $\mu\text{M}$  (▲) a 4  $\mu\text{M}$  (◆)  $\text{SO}_4^{2-}$ .

#### 4.5.4 Rast kmeňa **SeIV+VI** v živnom roztoku so zníženým obsahom síry a v prítomnosti selénu

Nasledujúci graf (Obr. 30) zobrazuje vplyv zníženého množstva síry v živnom roztoku kultúr kombinovaného kmeňa **SeIV+VI** riasy *S. quadricauda*. Graf zobrazuje nárast koncentrácie sušiny v čase. Kultúra, v živnom roztoku ktorej bolo najvyššie použité množstvo síry, rástla plynulo až do 84 hodiny kultivácie a následne sa jej rast zastavil (krivka ●). Najvyššia dosiahnutá koncentrácia sušiny bola 2,85 g/L. Krivka ■ vyjadruje rast kultúry s 400  $\mu\text{M}$  množstvom síry v živnom roztoku a je prakticky rovnaká ako krivka s 4000  $\mu\text{M}$  množstvom síry. Koncentrácia sušiny (2,9 g/L) bola takmer rovnaká v porovnaní s predchádzajúcou kultúrou. Spomalenie rastu kultúry bolo zaznamenané v živnom roztoku s 40  $\mu\text{M}$  množstvom síry, kultúra mala maximálnu koncentráciu sušiny 2,15 g/L v 72. hodine kultivácie (krivky ▲), ktorá do konca kultivácie klesla. Ďalšie spomalenie rastu bolo

zaznamenané po znížení množstva síry v živnom roztoku na 4  $\mu\text{M}$  (krivky  $\blacklozenge$ ). Maximálna koncentrácia biomasy bola 1,3 g/L.

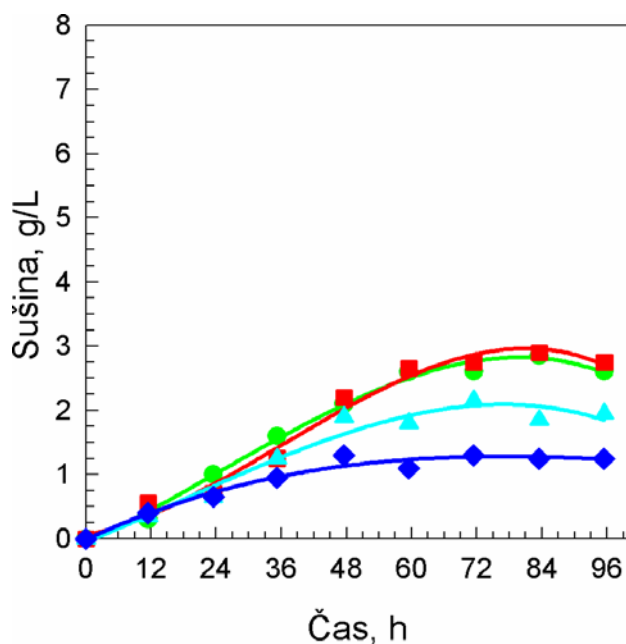
Rast všetkých zobrazených kultúr mal podobný priebeh. Maximum koncentrácie sušiny dosiahli obe kultúry v živnom roztoku s vyšším množstvom síry po 84 hodinách kultivácie a kultúry s nižším množstvom síry po 72 hodinách kultivácie.



**Obr. 30:** Vplyv znižujúceho sa množstva síranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) v živnom roztoku na kultúry kmeňa **SeIV+VI** riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa **SeIV+VI** riasy *S. quadricauda* v kontrolnom živnom roztoku, 4000  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  (●), a v živných roztokoch s koncentráciou síry 400  $\mu\text{M}$  (■), 40  $\mu\text{M}$  (▲) a 4  $\mu\text{M}$  (◆)  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Na obrázku 31 sú znázornené rastové krivky kombinovaného kmeňa **SeIV+VI** kultivovaného v živných roztokoch so znižujúcim sa množstvom síry. Rast kultúr bol ovplyvnený pridaním **seleničitanu** a **selenanu sodného** v koncentrácii 100+100 mg Se/L do živného roztoku. Vplyv zvolenej koncentrácie selénu je viditeľný už pri kultúre rastúcej v živnom roztoku s najvyšším použitým množstvom síry (krivka ●). Kultúra rástla plynulo počas celej doby kultivácie a maximálnu koncentráciu sušiny, 2,8 g/L, dosiahla v 84 hodine cyklu. Porovnateľnú koncentráciu sušiny dosiahla kultúra kultivovaná s rovnakým množstvom síry, ale bez selénu v živnom roztoku (porovnaj krivky ● z obrázkov 30 a 31). Kultúra, v živnom roztoku ktorej bolo nižšie množstvo síry, zaznamenala mierny nárast koncentrácie sušiny na 0,6 g/L (krivka ■).

Na ostatné kultúry s nižším množstvom síry v živných roztokoch pôsobila kombinácia selénu a síry letálne (krivky ▲ a ◆). Koncentráciu sušiny dosiahli veľmi nízku, len 0,3 g/L.



**Obr. 31:** Vplyv znižujúceho sa množstva síranu horečnatého ( $\text{MgSO}_4$ ) v prítomnosti seleničitanu a selenanu sodného (100+100 mg Se/L) v živnom roztoku na kultúry kmeňa **SeIV+VI** riasy *S. quadricauda*. Nesynchronná kultúra kmeňa **SeIV+VI** riasy *S. quadricauda* v kontrolnom živnom roztoku, 4000  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  (●), a v živných roztokoch s koncentráciou síry 400  $\mu\text{M}$  (■), 40  $\mu\text{M}$  (▲) a 4  $\mu\text{M}$  (◆)  $\text{SO}_4^{2-}$ .

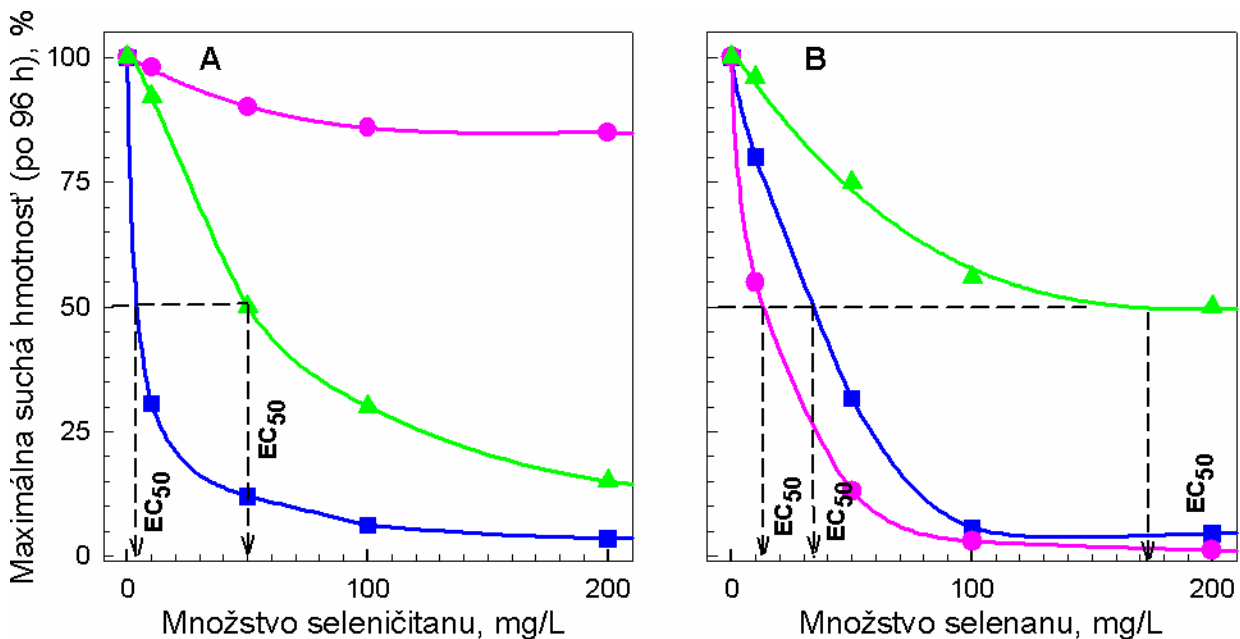
#### 4.6. Toxicita selénu vyjadrená hodnotou $\text{EC}_{50}$

Pokusné kultúry riasy *S. quadricauda* boli synchronizované striedaním svetelnej a tmavej fázy (14/10), prebublávané zmesou vzduchu s 2 %  $\text{CO}_2$  (v/v) a intenzita svetla dosahovala  $566,9 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (5V).

Pre porovnanie efektu selénových zlúčenín s rôznym oxidačným číslom selénu na riasové kultúry bola stanovovaná hodnota efektívnej koncentrácie ( $\text{EC}_{50}$ ).  $\text{EC}_{50}$  je koncentrácia látky, ktorá predstavuje 50% jej maximálneho účinku.

Kultúry **divokého kmeňa** riasy *S. quadricauda* vykazujú vysokú citlivosť k seleničitanu. Hodnota  $\text{EC}_{50}$  bola približne 50  $\mu\text{mol}$  Se/L pridávaného do živného roztoku vo forme seleničitanu (Obr. 32 A, krivka ■). Koncentrácia 100 mg Se/L pridávaná vo forme seleničitanu pôsobila letálne na divoký kmeň. Kmeň **SeIV**, rezistentný voči seleničitanu, rástol normálne aj pri koncentrácii 200 mg Se/L pridanej vo forme seleničitanu (Obr. 32 A, krivka ●, Tab. 2). Kmeň **SeVI**, rezistentný voči selenanu, rástol pomaly v živnom roztoku so seleničitanom v koncentrácii 100 mg Se/L (Obr. 32 A, krivka ▲). Seleničitan v živnom

roztoku bol menej toxický pre kmeň **SeVI** v porovnaní s divokým kmeňom (Obr. 32 A a Tab. 2, porovnaj hodnotu  $EC_{50}$  50 resp. 632  $\mu\text{mol Se/L}$ ).



**Obr. 32: Rozdiel v odpovedi synchronných kultúr divokého kmeňa riasy *S. quadricauda* a kmeňov **SeIV** a **SeVI** na rôzne koncentrácie seleničitanu a selenanu (0-200mg Se/L) a ich maximálna suchá hmotnosť.** Po 96 hodinách rastu buniek v živnom roztoku so seleničitanom resp. selenanom bola meraná maximálna suchá hmotnosť. Synchronná kultúra divokého kmeňa (■) a kmeňov **SeIV** (●) a **SeVI** (▲) riasy *S. quadricauda* pridaní selenanu sodného príp. seleničitanu sodného do živného roztoku v koncentracii 100 resp. 200 mg Se/L.

Po pridaní selenanu v koncentracii 100 mg Se/L do živného roztoku dosiahli kultúry **divokého kmeňa** vyššiu hodnotu  $EC_{50}$  (Obr. 32 B, krivka ■) v porovnaní s rovnakou koncentraciou seleničitanu v živnom roztoku (Obr. 32 A, krivka ■). Kmeň **SeIV** rástol pomalšie ako divoký kmeň. Hodnota  $EC_{50}$  dosiahla hodnotu približne 151  $\mu\text{mol Se/L}$  pridaného vo forme seleničitanu (Obr. 32 B, krivka ●, Tab. 2). Selén pridaný vo forme selenanu v koncentracii 100 mg Se/L a vyššej pôsobil letálne na divoký kmeň a rovnako ako aj na kmeň **SeIV** (Obr. 32 B, krivky ■ a ●). Kmeň **SeVI** dosiahol hladinu  $EC_{50}$  2270  $\mu\text{mol Se/L}$  v prípade, keď bol do živného roztoku pridaný selenan (Obr. 32 B, krivka ▲).



Druhy, kmene	EC <sub>50</sub>				Referencie
	Seleničitan		Selenan		
	mg/L	μmol/L	mg/L	μmol/L	
<i>Scenedesmus quadricauda</i> , <b>divoký kmeň</b>	4,000	50,000	12,000	151,000	V tejto práci
<i>Scenedesmus quadricauda</i> , <b>kmeň SeIV</b>	300,000	3800,000	33,000	417,000	V tejto práci
<i>Scenedesmus quadricauda</i> , <b>kmeň SeVI</b>	50,000	632,000	180,000	2270,000	V tejto práci
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			0,032	0,400	Fournier et al., 2010
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			0,245	40546,000	Fournier et al., 2010
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6,300	80,000			Morlon, 2005
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			0,355	4,500	Geoffroy et al., 2007
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>			0,790	10,000	Bennet, 1988

**Tab. 2:** Hodnoty EC<sub>50</sub> vyjadrené ako koncentrácia selénu (v mg/L a μmol/L) stanovená pre rôzne druhy rias, ktoré rástli v prítomnosti seleničitanu príp. selenanu.

## 5. Diskusia

Selén je dôležitý mikroelement, pôsobiaci na bunky nášho tela ako silný antioxidant. Je prirodzene prijímaný našim organizmom v potrave. Avšak v potrave ho nie je dostatok (Kvicala et al., 1995; Kvíčala et al., 1996).

Naším zámerom bolo vyselektovať kmeň schopný akumulovať vysoké množstvá selénu vo forme selenometionínu, ktorý by následne mohol slúžiť ako potravinový doplnok. Avšak v priebehu experimentov sa zistilo, že vyselektované kmene sú síce schopné rásť v živnom roztoku s vysokým množstvom selénu, ale neakumulujú ho vo zvýšenej miere vo svojich bunkách. Predpokladáme ich využitie ako modelových organizmov pri testovaní mechanizmu toxicity selénu na bunky.

Postupným zvyšovaním množstva selénu v živnom roztoku sme vyselektovali tri kmene odolné voči zvýšenému množstvu selénu vo forme seleničitanu, selenanu, alebo voči kombinácii oboch nami testovaných zlúčenín. Každý z kmeňov má iný mechanizmus rezistencie voči selénu.

Bunky kmeňa **SeIV** obsahovali veľmi malé množstvo selénu po kultivácii v živnom roztoku so seleničitanom. Tento výsledok naznačuje, že rezistencia tohto kmeňa je spôsobená vylúčením selénu, čo pravdepodobne súvisí s downreguláciou síranového prenášača. Naopak, kmeň **SeVI** akumuluje vo svojich bunkách relatívne veľké množstvo selénu po kultivácii v živnom roztoku so selenanom (Obr. 17). Z toho vyplýva, že mechanizmus rezistencie je spôsobený skôr nejakým vnútorným mechanizmom znižujúcim toxicitu selénu. Tretí kmeň, rezistentný voči obojomi nami testovaným formám selénu, **SeIV+VI**, akumuloval vo svojich bunkách veľmi nízke množstvo selenometionínu. Z toho usudzujeme, že v jeho bunkách sa zmenil mechanizmus zodpovedný za premenu selénu na jeho organickú formu - selenometionín (Umysová et al., 2009).

Transport selénu bol preskúmaný u Haptophyta druhu *Emiliana huxleyi*, kde bol seleničitan použitý ako substrát a jeho absorpcia do bunky prebiehala pomocou aktívneho transportu vyžadujúceho ATP (Obata et al., 2004).

## 5.1. Toxicita selénu a selekcia kmeňov rezistentných voči selénu

Z literatúry nie je známy žiadny adaptačný mechanizmus buniek riasy *Chlamydomonas reinhardtii* voči selénu. Rovnaká miera toxicity bola zistená u buniek predošetrených selénom ako u buniek priamo vystavených vyšším dávkam selénu. Bolo zistené, že prvou organelou poškodenou toxickým účinkom selénu je chloroplast, a to rovnako tylakoidy ako aj stróma (Morlon et al., 2006). Toto tvrdenie bolo podporené zistením, že seleničitan dokáže inhibovať fotosyntézu vyšších rastlín ako aj fytoplanktónu (Sielicki and Burnham, 1973; Pilon-Smits et al., 2002).

Pri vyšších koncentráciách selénu v živnom roztoku *Chlamydomonas reinhardtii* sa zvyšuje množstvo škrobových zŕn a vznikajú elektróndenzné granuly obsahujúce selén, vápnik a fosfor (Floriani, 2005; Morlon et al., 2006). U *C. reinhardtii* boli zistené dva transportné systémy pre selén. Špecifický systém, nasýtený už pri nízkych koncentráciách selénu v prostredí a nešpecifický systém, pomocou ktorého sa zvyšuje nielen množstvo selénu v bunke, ale aj množstvo vápnika a fosforu (Morlon et al., 2006). V rastlinách a v cyanobaktériách boli nájdené dva systémy pre príjem selénu do bunky, jeden pre selenan a druhý pre seleničitan (Gouget et al., 2005; Terry et al., 2000). Selenan je akumulovaný v rastlinách proti svojmu elektrochemickému gradiendu v procese aktívneho transportu (Brown and Shrift, 1982). Príjem selenanu závisí od rýchlosti naviazania selénu na síranový prenášač v plazmatickej membráne buniek koreňa. Selén a síra súťažia o tento síranový prenášač nielen v rastlinách (Clarkson and Lutttge, 1991), ale aj v bunkách *Synechocystis* sp. (Gouget et al., 2005), v kvasinkách (Crosley et al., 2007; Cherest et al., 1997) a u *Escherichia coli* (Lindblow-Kull et al., 1985). Mechanizmus príjmu seleničitanu bunkou nie dostatočne preštudovaný (Arvy, 1993; Li et al., 2008). Avšak u *Emiliana huxleyi* bol zistený aktívny transport seleničitanu do bunky (Obata et al., 2004). U *Escherichia coli* bolo zistené, že seleničitan je prenášaný odlišným prenášačom ako selenan a síran (Lindblow-Kull et al., 1985). Rastliny pšenice čiastočne prijímajú seleničitan pomocou fosfátových prenášačov (Li et al., 2008).

Tak ako sú odlišné mechanizmy príjmu seleničitanu a selenanu bunkou, rovnako je odlišný ich transport a následné využitie. Selenan je prijímaný rovnakou cestou ako síran, následne je redukovaný a vytvorí sa z neho SeCys a SeMet. Seleničitan je redukovaný na selenid, z ktorého sa následne formujú aminokyseliny (Anderson, 1983).

Citlivosť rias k rôznym prvkom je druhovo špecifická. Napríklad koncentrácia selenanu inhibujúca rast sa môže líšiť až o tri rády v závislosti od testovaného druhu (Wheeler et al., 1982). Navyše fytoplanktón vo voľnej prírode môže byť citlivejší v porovnaní s jednotlivými druhmi rastúcimi pri optimálnych podmienkach v laboratóriách (Riedel et al., 1996). Rôzne druhy rias majú rozdielnu citlivosť voči rôznym formám selénu. Pre riasy *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus subspicatus* a *Chlorella vulgaris* je toxickejší seleničitan a pre riasy *Pseudokirchneriella subcapitata* je toxickejší selenan (Pastierova et al., 2009).

Na základe našich výsledkov sme zistili, že seleničitan je toxickejší ako selenan a spôsobuje zastavenie rastu riasy *S. quadricauda*. Už koncentrácia 10 mg Se/L spôsobovala spomalenie rastu kultúr divokého kmeňa. Môže to byť spôsobené rýchlejšou premenou seleničitanu na aminokyseliny v bunke (Zayed et al., 1998). Opačné výsledky, teda, že selenan je toxickejší ako seleničitan, získali autori pri štúdiu 5 druhov tráv (Wu et al., 1988). Rastlina v prítomnosti seleničitanu a zároveň aj selenanu uprednostní selenan a tým môže byť spôsobený jeho toxický účinok (Arvy, 1993; de Souza et al., 1998; Zayed et al., 1998).

Pri testovaní *Chlamydomonas reinhardtii* používali autori seleničitan v koncentrácii 0,8; 4; 8 a 40 mg Se/L. Najvyššia koncentrácia seleničitanu pôsobila toxicky na riasy tohto druhu (Morlon et al., 2005). Rast riasy druhu *Spirulina platensis* je naopak touto koncentráciou seleničitanu stimulovaný (Li et al., 2003). Riasy druhu *Chlorella zofingiensis* dokážu prežívať v živnom roztoku so seleničitanom v koncentrácii 45,65 mg Se/L a produkovať špeciálne termostabilné proteíny, superoxid dismutázu a glutatión peroxidázu závislú na seléne. Práve tieto proteíny pravdepodobne zaisťujú toleranciu buniek voči selénu (Pelah and Cohen, 2005). Nízka koncentrácia selénu (2 mg/L) vo forme selenanu zvýšila množstvo biomasy ako aj celkovú antioxidačnú schopnosť v semenách redkvičky (Domokos-Szabolocsy et al., 2006).

Rast **divokého kmeňa** riasy *S. quadricauda* bol spomalený približne o polovicu pridaním seleničitanu do živného roztoku v koncentrácii 10 mg Se/L v porovnaní s kontrolnou kultúrou bez selénu v živnom roztoku. Oproti tomu rast kmeňa **SeIV**, ktorý je rezistentný voči seleničitanu, zaznamenal rovnaké spomalenie až po pridaní seleničitanu v koncentrácii 400 mg Se/L. Kmeň **SeVI** a kombinovaný kmeň **SeIV+VI** spomalili svoj rast po pridaní seleničitanu v koncentrácii 100 mg Se/L .

Do živného roztoku riasy *Dunaliella salina* bol pridaný selenan v najvyššej koncentrácii 5 a 10 mg Se/L a autori pozorovali toxický vplyv selénu. Bunky neboli schopné prežiť ani po prenesení do roztoku bez selénu (Reunova et al., 2007).

U riasy *C. reinhardtii* bola toxická koncentrácia 0,73 mg Se/L (9,3  $\mu$ M), pridaného ako selenan a už koncentrácia 0,18 mg Se/L (2,4  $\mu$ M) spôsobovala inhibíciu rastu kultúr

(Geoffroy et al., 2007). Pre druh *Chlorella* sp. je hodnota  $IC_{50}$  1,01 mg Se/L (12,8  $\mu$ M) a pre druh *Scenedesmus obliquus* je 15,8 mg Se/L (0,2 mmol/L) (Geoffroy et al., 2007; Issa and Adam, 1999). Naše výsledky ukazujú spomalenie rastu **divokého kmeňa** riasy *S. quadricauda* po pridaní selenanu už v koncentrácii 10 mg Se/L živného roztoku. Kmeň **SeVI**, rezistentný voči selenanu, zaznamenal mierne spomalenie rastu pri koncentrácii 100 mg Se/L oproti kontrolnej kultúre bez selénu v živnom roztoku, avšak bol schopný prežívať v živnom roztoku s koncentráciou selenanu až 200 mg Se/L, po dobu 96 hodín. Rýchlosť rastu kombinovaného kmeňa **SeIV+VI** zaznamenala spomalenie po pridaní selenanu, v koncentrácii 100 mg Se/L, do živného roztoku. Po pridaní rovnakej koncentrácie selenanu do živného roztoku kultúry **SeIV**, rezistentnej voči seleničitanu, sa rast kultúry rapídne spomalil.

Počas kultivácie v živnom roztoku so selénom, rovnako aj pri následnom uchovávaní kultúr na Petriho miskách, získavali niektoré kultúry *Scenedesmus quadricauda* červené sfarbenie. Z literatúry je známe, že toto sfarbenie je spôsobené redukciou seleničitanu na elementárny selén  $Se^0$ . Vznik elementárneho selénu bol v kultúrach *S. quadricauda* skutočne dokázaný. Tento jav bol tiež pozorovaný u *Escherichia coli* a *Spirulina platensis* (Li et al., 2003; Turner et al., 1998).

## 5.2. Množstvo celkového selénu a selenometionínu

Akumulácia selénu závisí od schopnosti organizmu prijímať selén do bunky, ako aj od množstva a formy selénu v okolitom prostredí. Niektoré riasy sú schopné akumulovať selén vo svojich bunkách, napriek jeho nedostatku vo vode (Baines and Fisher, 2001). Morská voda obsahuje nízke množstvá selénu, 1,7 nM, rovnako ako voda jazier a riek, ktorá obsahuje 0,13 - 2,5  $nmol.L^{-1}$  (Fournier et al., 2010; Libes, 1992). Riasy z kmeňa Chlorophyta sú najmenej odolné voči zvýšenej koncentrácii selénu v prostredí (Baines and Fisher, 2001). Článkov zaoberajúcich sa množstvom selénu v bunkách rias je veľmi málo. Niektoré selénové zlúčeniny (dimetylselenopropionát, Se-allylselenocysteín, selenometionín) boli identifikované u riasy *Chlorella vulgaris* z kmeňa Chlorophyta (Larsen et al., 2001). V bunkách riasy *Chlorella* kultivovaných so seleničitanom a selenanom v živnom roztoku bol selenometionín prítomný v nízkych koncentráciách rádovo v ng/g (Neumann et al., 2003). Po kultivácii buniek v živnom roztoku so seleničitanom obsahovali bunky 39 %, a po kultivácii so selenanom 24 % akumulovaného selénu (Neumann et al., 2003). Frakcionáciou buniek riasy

*Spirulina platensis* bolo zistené množstvo selénu viazané v bunkách. Kultivácia tejto riasy v živnom roztoku so seleničitanom v koncentrácii 40 mg Se/L stimulovala rast. Autori zistili, že anorganický selén pridaný do živného roztoku je premenený na organickú formu selénu. *Spirulina* obsahovala 85,1 % organicky viazaného selénu z celkového množstva selénu a z toho 25,2 % tvorila frakcia selénu rozpustného vo vode (Li et al., 2003). V rastlinách môžu akumulátory obsahovať selén v množstve 4000 mg Se/kg bez negatívnych vplyvov (Shrift, 1969). Tieto množstvá však kolíšu s vekom rastliny (mladšie rastliny sú citlivejšie voči selénu) (Terry et al., 2000).

Všetky kmene riasy *S. quadricauda* rastúce bez prídavku selénu v živnom roztoku neobsahovali takmer žiaden selén. Zvyšovaním množstva seleničitanu a selenanu v živnom roztoku sa v závislosti na dávke zvyšoval aj obsah selénu a selenometionínu v bunkách **divokého kmeňa** riasy *S. quadricauda*. V prítomnosti selenanu v koncentrácii 50 mg Se/L, bol obsah selenometionínu 293 mg/kg.

V bunkách kmeňa **SeIV**, rezistentného voči seleničitanu, bol v prítomnosti seleničitanu (20 resp. 50 mg Se/L) v živnom roztoku celkový obsah selénu (41 a 240 mg/kg) ako aj obsah selenometionínu (7 a 39 mg/kg) nízky. Obsah celkového selénu a selenometionínu sa zvýšil po zvýšení množstva seleničitanu v živnom roztoku. Naopak, v prítomnosti selenanu (20 resp. 50 mg Se/L) bol obsah celkového selénu vysoký, 432 a 882 mg/kg. Z našich výsledkov vyplýva, že pravdepodobným mechanizmom rezistencie voči selénu u kmeňa **SeIV** je jeho vylúčenie z bunky. Množstvo celkového selénu ako aj selenometionínu bolo podobné ako u divokého kmeňa po kultivácii so selenanom v živnom roztoku, čo je pravdepodobne spôsobené nedostatočnou znášanlivosťou selenanu a tiež to znamená rozdielny mechanizmus prijímania seleničitanu a selenanu bunkami kmeňa **SeIV** riasy *S. quadricauda*.

V prítomnosti selenanu (20 resp. 50 mg Se/L) v živnom roztoku kultúr kmeňa **SeVI**, rezistentného voči selenanu, bol zaznamenaný mierny nárast v množstve celkového selénu (357 a 634 mg/kg) a aj v množstve selenometionínu (112 a 175 mg/kg) v bunkách. V prítomnosti seleničitanu sa zvýšil obsah celkového selénu (576 a 823 mg/kg) ako aj obsah selenometionínu (172 a 210 mg/kg). Nezaznamenali sme žiadny markantný rozdiel v obsahu selénu a selenometionínu kmeňa **SeVI** v porovnaní s divokým kmeňom, čo naznačuje že tolerančným mechanizmom tohto kmeňa nie je vylúčenie selénu z bunky, ale nejaký vnútorný mechanizmus detoxikácie a izolovania selénu v bunke.

Množstvo celkového selénu v bunkách kombinovaného kmeňa **SeIV+VI** bolo porovnateľné s obsahom selénu v testovaných kmeňoch riasy *S. quadricauda*. Kombinovaný

kmeň **SeIV+VI** obsahoval neočakávane nízke množstvo selenometionínu, maximálne 49 mg/kg, čo naznačuje zmenu v mechanizme spracovania selénu bunkou.

Naše výsledky ukazujú, že zvýšenie množstva selenometionínu v bunkách je priamo úmerné toxicite danej formy selénu. Čiže kmeň rezistentný voči seleničitanu obsahoval vyššie množstvá celkového selénu a selenometionínu po kultivácii v živnom roztoku so selenanom a naopak. Množstvo selénu a selenometionínu v biomase rias bolo závislé na forme selénovej zlúčeniny a tiež na jej množstve. Podľa našich výsledkov je obsah selenometionínu (29 % a 41 %) u riasy *S. quadricauda* po kultivácii so seleničitanom alebo selenanom porovnateľný s obsahom zisteným v bunkách riasy *Chlorella* (24 % a 39 %) (Neumann et al., 2003).

### **5.3. Aktivita tioredoxín reduktázy**

Enzým tioredoxín reduktáza (TR) je jedným zo selenoenzýmov, ktoré v bunkách zabezpečujú oxidačno-redukčné procesy. Má významnú úlohu v ochrane buniek pred toxickým pôsobením selénu. Existujú tri rôzne spôsoby ochrany. Prvým je priama redukcia a detoxifikácia hydroperoxidov vrátane peroxidov lipidov a peroxidu vodíka (Björnstedt et al., 1995). Druhý mechanizmus zahŕňa redukciu tioredoxínu a regeneráciu antioxidantov ako je ubiquinón (Xia et al., 2003). Tretím, pravdepodobne najvýznamnejším spôsobom je obnova vnútrobunkových tiolov (stratených oxidáciou) a redukcia seleničitanu na elementárny selén s nižšou toxicitou pre bunky (Björnstedt et al., 1992; Kumar et al., 1992).

Naše výsledky naznačujú, že aktivita TR je ovplyvnená prítomnosťou selénu a to v závislosti na množstve, a rovnako aj na forme selénu pridaného do živného roztoku. Vyššiu aktivitu TR sme zistili po pridaní, pre daný kmeň, toxickejšej formy selénu. Tieto zistenia znamenajú, že zvýšená aktivita TR buniek rias je reakciou na toxické pôsobenie selénu v bunke. Rovnaké výsledky dosiahli autori v testoch robených na cicavčích bunkách. Zvýšenie resistencie voči cytotoxicite selénu bolo sprevádzané zvýšením aktivity TR (El-Sayed et al., 2006; Madeja et al., 2005). Autori usudzujú, že vysoká aktivita TR a možnosť zvýšiť expresiu TR je rozhodujúcim mechanizmom prežívania buniek v podmienkach toxického pôsobenia selénu.

V cicavčích bunkách (HEK), v ktorých bola overexprimovaná TR bola sledovaná aktivita TR. Zvýšenú aktivitu TR zaznamenali autori v kontrolných ako aj v seleničitanom predošetrených bunkách rastúcich v živnom roztoku so seleničitanom (Madeja et al., 2005).

Rovnako, zvýšenie aktivity zaznamenali autori po pridaní seleničitanu do živného roztoku u buniek MCF-7 bunky prsného karcinómu, HT-29 bunky karcinómu čreva, A549 bunky pľúcneho karcinómu. V bunkových líniách Jurkat a HL-60 (leukémia) nebola ovplyvnená aktivita TR (Gallegos et al., 1997).

Naopak zníženie aktivity TR zaznamenali autori po znížení množstva selénu v potrave potkanov (Crosley et al., 2007). Rovnako v cicavčích bunkách bolo znížené množstvo aktivity TR, napriek zvýšenému množstvu mRNA všetkých TR v testovaných rakovinových bunkách (Selenium et al., 2010). Se-metylselenocysteín a ani kyselina selénová nemali vplyv na aktivitu TR u potkanov, avšak v in vitro pokuse preukázali metylované formy selénu (dimetyldiselenid alebo dimetyl selenenylsulfid) 60 % inhibíciu TR. Autori preto upozorňujú, že zvýšené množstvo selénu prijímaného bunkou nemusí mať vždy za následok zvýšenú aktivitu TR (Ganther, 2001).

Rovnako ako v bunkách cicavcov, tak aj v bunkách riasy *S. quadricauda* je zvýšená aktivita TR prítomná v bunkách vystavených toxickým koncentráciám selénu. Môže to byť odpoveď buniek rias na toxickú koncentráciu selénu v prostredí, ale aj všeobecná reakcia na stres, bez priameho vplyvu selénu.

## **5.4. Rast kultúr v živnom roztoku so zníženým obsahom síranu**

Selén a síra sú si chemicky veľmi podobné. Oba prvky sa nachádzajú v VI. skupine periodickej sústavy prvkov. Ich oxidované formy (sírany a selenany), a nielen tie, majú podobné vlastnosti. Táto podobnosť spôsobuje neschopnosť buniek rozlišovať ich. To má výrazný efekt, ktorý môže viesť k otravám a občas až k smrti rastlín a živočíchov.

Selenan aj síran sú v rastline akumulované proti elektrochemickému gradiendu (Brown and Shrift, 1982). U *Arabidopsis thaliana* bolo zistených 14 síranových prenášačov. Rastliny s overexprimovanými génmi pre síranové prenášače majú vyššiu absorpciu selenanu ako divoké kmene (Terry et al., 2000). A naopak mutanty bez prenášačov majú nízky príjem selenanu (Shibagaki et al., 2002).

V našich pokusoch sme nahradili síran horečnatý v živnom roztoku chloridom horečnatým a sledovali sme reakciu testovaných kultúr. Znížené množstvo síry ovplyvnilo **divoký kmeň** a kmeň **SeIV** približne rovnako. So znižujúcim sa množstvom síry sa spomalil aj rast kultúr.



Pri kmeni **SeVI** dosiahla kultúra vyššiu hmotnosť sušiny so sírou v množstve 400  $\mu\text{M}$  v živnom roztoku ako v živnom roztoku so štandardným množstvom síry (4000  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$ ). Autori zistili, že na rastliny brokolice (*Brassica oleracea* kultivary cabbage a kohlrabi) a lucerny siatej (*Medicago sativa* L.), rastúce v hydroponickej kultúre takmer bez síry, pôsobilo pridanie selénu toxicky. Zvýšením množstva síry bol redukovaný príjem a transport selénu. Ale naopak po zvýšení množstva selénu sa zvýšil aj príjem a transport síry (Hajiboland and Amjad, 2008).

Po pridaní seleničitanu (10 alebo 100 a 200 mg Se/L) do živného roztoku (so zníženým obsahom síry) u kultúr **divokého** ako aj **SeIV** kmeňa sme zistili toxickejšie pôsobenie seleničitanu na divoký kmeň v porovnaní s kmeňom **SeIV**. Naopak kmeň **SeVI** po kultivácii so selenanom (100 a 200 mg Se/L) v živnom roztoku dosiahol nižšie množstvá sušiny v porovnaní s divokým kmeňom.

Zvýšenie toxicity selénu pri nedostatku síry v živnom roztoku naznačuje vzťah medzi metabolizmom síry a selénu. Selén pravdepodobne nahrádza síru v rôznych zlúčeninách. V rastlinách je toxicita selénu spôsobená inkorporáciou selenocysteínu a selenometionínu do proteínov namiesto cysteínu a metionínu. Rozdiely vo veľkosti a náboji iónov selénu a síry ovplyvňujú vlastnosti a funkcie proteínov (Terry et al., 2000).

Podobná hodnota  $\text{EC}_{50}$  a letálnej koncentrácie seleničitanu bola zistená u rias *Scenedesmus quadricauda* a *Chlamydomonas reinhardtii* (Morlon et al., 2005). Dokonca aj v prípade, keď množstvo síranu v živnom roztoku bolo 50-krát vyššie u riasy *S. quadricauda* ako u riasy *C. reinhardtii*. Tieto zistenia naznačujú, že množstvo síranu v živnom roztoku nehrá rozhodujúcu úlohu v odpovedi buniek na množstvo seleničitanu. Napriek tomu, množstvo síranu bolo kritické pre toxicitu selenanu. Extrémne nízka hladina  $\text{EC}_{50}$  (0,4  $\mu\text{mol}$  Se/L) bola zistená v živnom roztoku s koncentráciou síranu 8  $\mu\text{mol/L}$  a mierne zvýšená (3,1  $\mu\text{mol}$  Se/L) v živnom roztoku so síranom v koncentrácii 80  $\mu\text{mol/L}$  (Fournier et al., 2010). Kultúry *S. quadricauda* kultivované s 50 krát vyššou hladinou síranu v živnom roztoku boli oveľa menej zasiahnuté prítomnosťou selenanu a seleničitanu.  $\text{EC}_{50}$  bola vyššia (150 a 50  $\mu\text{mol}$  Se/L resp., tabuľka 2) ako v literatúre uvádzané hodnoty pre riasy kultivované v živnom roztoku v nižšou hladinou síranu. Tieto zistenia súhlasia so závermi (Williams et al., 1994), že zvýšením množstva síranu v živnom roztoku sa zníži toxicita selenanu u *Selenastrum capricornatum*, rovnako aj so závermi (Morlon et al., 2005), ktorá zistila, že toxicita selenanu priamo súvisí s prítomnosťou síranu v živnom roztoku. Efekt zlúčenín selénu s odlišnými oxidačnými číslami  $\text{Se}^{\text{IV}}$  a  $\text{Se}^{\text{VI}}$  bol pozorovaný u rias *Scenedesmus quadricauda*,

*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris* a *Pseudokircheriella subcapitata* (Pastierova et al., 2009). Seleničitan bol vo väčšine prípadov toxickejší ako selenan.

## 6. Záver

Závery práce je možné zhrnúť do niekoľkých bodov:

- Toxicita selénu pre bunky *S. quadricauda* závisí nielen na jeho dávke, ale aj na jeho forme.
- Seleničitan je toxickejší ako selenan.
- Kultivácia s oboma zlúčeninami mala za následok akumuláciu organickej formy selénu, selenometionínu.
- Zvýšená toxicita selénu bola doprevádzaná zvýšením aktivity tioredoxín reductázy.
- Toxicita selénu sa zvýšila po kultivácii v médiu so zníženým obsahom síry.
- Je pravdepodobné, že každý vyselektovaný kmeň má iný mechanizmus tolerancie voči selénu (**SeIV** - vylúčenie selénu z bunky, **SeVI** - izolácia selénu v netoxických zlúčeninách vo vnútri bunky, **SeIV+VI** – zmena metabolizmu selénu napr. redukcia asimilácie anorganickej formy selénu na organickú).

## 7. Zoznam použitej literatúry

- Anderson, J.W. (1993). Selenium interactions in sulphur metabolism. In Sulphur nutrition and assimilation in higher plants: Regulatory agricultural and environmental aspects, L.J. De Kok, Stulen, I., Rennenberg, H., Brunold, C., Rauser, W.E., ed. (Hague, SPB Academic), pp. 49-60.
- Anderson, J.W., Scarf A.R. (1983). Selenium in plant metabolism (London, Academic).
- Arthur, J.R., McKenzie, R.C., and Beckett, G.J. (2003). Selenium in the immune system. *J Nutr* 133, 1457-1459.
- Arvy, M.P. (1993). Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Experimental Botany* 44, 1083-1087.
- Baines, S.B., and Fisher, N.S. (2001). Interspecific differences in the bioconcentration of selenite by phytoplankton and their ecological implications. *Marine Ecology-Progress Series* 213, 1-12.
- Banuelos, G.S., Ajwa, H.A., Mackey, B., Wu, L., Cook, C., Akohoue, S., and Zambruzuski, S. (1997). Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium. *Journal of Environmental Quality* 26, 639-646.
- Barceloux, D.G. (1999). Selenium. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology* 37, 145-172.
- Barrington, J.W., Lindsay, P., James, D., Smith, S., and Roberts, A. (1996). Selenium deficiency and miscarriage: A possible link? *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 103, 130-132.
- Beath, O.A. (1937). The occurrence of selenium and seleniferous vegetation in Wyoming. *Wyoming Agricultural Experiment Station Bulletin* 221, 12-19.
- Bennett, W.N. (1988). Assessment of selenium toxicity in algae using turbidostat culture. *Water Research* 22, 939-942.
- Biswas, S., Talukder, G., and Sharma, A. (1997). Selenium salts and chromosome damage. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 390, 201-205.
- Bišová, K., Patočka, M., Hendrychová, J., and Zachleder, V. (2000). Activity of histone H1 kinases is coupled to the regulatory checkpoints of the cell cycle in the alga *Chlamydomonas eugametos*. Paper presented at: Ninth International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (21.-26.5.2000, Noordwijkerhout, The Netherlands).

- Björnstedt, M., Kumar, S., and Holmgren, A. (1992). Selenodiglutathione is a highly efficient oxidant of reduced thioredoxin and a substrate for mammalian thioredoxin reductase. *Journal of Biological Chemistry* 267, 8030-8034.
- Björnstedt, M., Kumar, S., and Holmgren, A. (1995). Selenite and selenoglutathione - Reactions with thioredoxin systems. In *Biothiols, Pt B*, pp. 209-219.
- Breton, A., and Surdinkerjan, Y. (1977). Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae* - biochemical and genetic study. *Journal of Bacteriology* 132, 224-232.
- Brown, T.A., and Shrift, A. (1982). Selenium-toxicity and tolerance in higher plants. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 57, 59-84.
- Brtkova, A., and Brtko, J. (1996). Selenium: metabolism and endocrines (Minireview). *Endocrinology Regulation* 30, 117-128.
- Clarkson, D.T., and Luttge, U. (1991). II. Mineral nutrition: inducible and repressible nutrient transport systems. *Progress in Botany* 52, 61-83.
- Combs, G.F. (2005). Current evidence and research needs to support a health claim for selenium and cancer prevention. *Journal of Nutrition* 135, 343-347.
- Combs, G.F., Jr. (2001). Impact of selenium and cancer-prevention findings on the nutrition-health paradigm. *Nutr Cancer* 40, 6-11.
- Combs, G.F., Jr., and Combs, S.B. (1987). Selenium effects on drug and foreign compound toxicity. *Pharmacology and Therapeutics* 33, 303-315.
- Copeland, P.R., Stepanik, V.A., and Driscoll, D.M. (2001). Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2. *Molecular and Cellular Biology* 21, 1491-1498.
- Crosley, L.K., Méplan, C., Nicol, F., Rundlöf, A.K., Arnér, E.S.J., Hesketh, J.E., and Arthur, J.R. (2007). Differential regulation of expression of cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in rat liver and kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 459, 178-188.
- de Souza, M.P., Pilon-Smits, E.A.H., Lytle, C.M., Hwang, S., Tai, J., Honma, T.S.U., Yeh, L., and Terry, N. (1998). Rate-Limiting Steps in Selenium Assimilation and Volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiology* 117, 1487-1494.
- Dilworth, G.L., and Bandurski, R.S. (1977). Activation of selenate by adenosine 5'-triphosphate sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal* 163, 521-529.
- Domokos-Szabolocsy, E., Veres, Z., Fari, M.G., Kovacs, B., and Prokisch, J. (2006). Impact of sodium-selenate on growth of radish seedlings in vitro. Paper presented at: The V<sup>th</sup>

- international symposium on in vitro culture and horticulture breeding (Debrecen, Hungary, International Society Horticultural Science).
- Doušková, I., Hlavová, M., Umysová, D., Vítová, M., and Zachleder, V. (2007a). Industrial strain *Scenedesmus quadricauda* SeIV of the green chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. Czech Patent No. 300 861
- Doušková, I., Hlavová, M., Umysová, D., Vítová, M., and Zachleder, V. (2007b). Industrial strain *Scenedesmus quadricauda* SeIV+VI of the green chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. Czech Patent No.300 809
- Doušková, I., Hlavová, M., Umysová, D., Vítová, M., and Zachleder, V. (2007c). Industrial strain *Scenedesmus quadricauda* SeVI of the green chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. Czech Patent No.300 808
- Ebert, R., Ulmer, M., Zeck, S., Meissner-Weigl, J., Schneider, D., Stopper, H., Schupp, N., Kassem, M., and Jakob, F. (2006). Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro. *Stem Cells* 24, 1226-1235.
- Eklund, H., Florence, K., and Holmgren, G.A. (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 11, 13-28.
- El-Sayed, W.M., Aboul-Fadl, T., Lamb, J.G., Roberts, J.C., and Franklin, M.R. (2006). Effect of selenium-containing compounds on hepatic chemoprotective enzymes in mice. *Toxicology* 220, 179-188.
- Fan, A., Kizer, KW (1990). Selenium: Nutritional, toxicological and clinical aspects. *Western Journal of Medicine* 153, 160-167.
- Floriani, M. (2005). Subcellular localisation of radionuclides by transmission electronic microscopy: Application to uranium, selenium and aquatic organisms. *Radioprotection* 40, 211-216.
- Fott, B. (1967). *Sinice a rasy*. Sinice a rasy, 517 p.
- Fournier, E., Adam-Guillermin, C., Potin-Gautier, M., and Pannier, F. (2010). Selenate bioaccumulation and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*: Influence of ambient sulphate ion concentration. *Aquatic Toxicology* 97, 51–57.
- Fu, L.H., Wang, X.F., Eyal, Y., She, Y.M., Donald, L.J., Standing, K.G., and Ben-Hayyim, G. (2002). A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25983-25991.

- Furukawa, Y., Piwnica-Worms, H., Ernst, T.J., Kanakura, Y., and Griffin, J.D. (1990). *cdc2* gene expression at the G1 to S transition in human T lymphocytes. *Science* 250, 805-808.
- Gallegos, A., Berggren, M., Gasdaska, J.R., and Powis, G. (1997). Mechanisms of the regulation of thioredoxin reductase activity in cancer cells by the chemopreventive agent selenium. *Cancer Research* 57, 4965-4970.
- Ganther, H.E. (2001). Selenium metabolism and mechanisms of cancer prevention. *Advances in Experimental Medical Biology* 492, 119-130.
- Ge, K., and Yang, G. (1993). The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. *American Journal of Clinical Nutrition* 57, 259-263.
- Geoffroy, L., Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L., and Garnier-Laplace, J. (2007). Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology* 83, 149-158.
- Gladyshev, V.N., and Kryukov, G.V. (2001). Evolution of selenocysteine-containing proteins: significance of identification and functional characterization of selenoproteins. *Biofactors* 14, 87-92.
- Gouget, B., Avoscan, L., Sarret, G., Collins, R., and Carriere, M. (2005). Resistance, accumulation and transformation of selenium by the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 after exposure to inorganic Se-VI or Se-IV. *Radiochimica Acta* 93, 683-689.
- Grossman, A.R., Croft, M., Gladyshev, V.N., Merchant, S.S., Posewitz, M.C., Prochnik, S., and Spalding, M.H. (2007). Novel metabolism in *Chlamydomonas* through the lens of genomics. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 190-198.
- Hajiboland, R., and Amjad, L. (2008). The effects of selenate and sulfate supply on the accumulation and volatilization of Se by cabbage, kohlrabi and alfalfa plants grown hydroponically. *Agricultural and Food Science* 17, 177-189.
- Handel, M.L., Watts, C.K.W., Defazio, A., Day, R.O., and Sutherland, R.L. (1995). Inhibition of AP-1 binding and transcription by gold and selenium involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4497-4501.
- Hanikenne, M., Merchant, S.S., and Hamel, P. (2009). Transition metal nutrition: A balance between deficiency and toxicity. In *The Chlamydomonas sourcebook, organellar and metabolic processes*, D. Stern, ed. (Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Sydney, Tokyo, Academic Press Elsevier), pp. 333-379.

- Hartikainen, H. (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18, 309-318.
- Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2002). How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Molecular and Cell Biology* 22, 3565-3576.
- Hattori, H., Kimura, M., Nakaguchi, Y., Hiraki, K. (1999). Biogeochemical study on selenium in the Indian ocean. *Kinki Daigaku Rikogakubu Kenkyu Hokoku* 35, 73-78.
- Higgs, D.J., Morris, V.C., and Levander, O.A. (1972). Effect of cooking on selenium content of foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20, 678-680.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry* 54, 237-271.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *Journal of Biological Chemistry* 264, 13963-13966.
- Holmgren, A., and Björnstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology* 252, 199-208.
- Howard, A., and Pelc, S.R. (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity Suppl* 6, 261-273.
- Huang, Z.Z., and Wu, L. (1991). Species richness and selenium accumulation of plants in soils with elevated concentration of selenium and salinity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 22, 251-266.
- Cherest, H., Davidian, J.C., Thomas, D., Benes, V., Ansorge, W., and Surdin-Kerjan, Y. (1997). Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145, 627-635.
- Chovancová, D., and Lesný, J. (2006). Súčasný stav výskytu selénu na Slovensku. *Nova Biotechnologica VI-I*, 125-135.
- Irmer, U., Wachholz, I., Schafer, H., and Lorch, D.W. (1986). Influence of lead on *Chlamydomonas reinhardtii* danegard (Volvocales, Chlorophyta) accumulation, toxicity and ultrastructural changes. *Environmental and Experimental Botany* 26, 97-105.
- Issa, A.A., and Adam, M.S. (1999). Influence of selenium on toxicity of some heavy metals in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Folia Microbiologica* 44, 406-410.
- John, P.C., Sek, F.J., and Lee, M.G. (1989). A homolog of the cell cycle control protein p34<sup>cdc2</sup> participates in the division cycle of *Chlamydomonas*, and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* 1, 1185-1193.
- John, P.C.L. (1984). Control of the cell division cycle in *Chlamydomonas*. *Microbiology Science* 1, 96-101.



- John, P.C.L. (1987). Control points in the *Chlamydomonas* cell cycle. In *Algal Development Molecular and cellular aspects*, W. Wiesnar, D.G. Robinson, and R.C. Starr, eds. (Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Springer-Verlag), pp. 9-16.
- Kadřabová, J., Madarić, A., and Ginter, E. (1997). The selenium content of selected food from the Slovak Republic. *Food Chemistry* 58, 29-32.
- Kim, J., and Combs, G.F., Jr. (1997). Effects of selenium on colonic fermentation in the rat. *Biology Trace Element Research* 56, 215-224.
- Knekt, P., Heliövaara, M., Aho, K., Alfthan, G., Marniemi, J., and Aromaa, A. (2000). Serum selenium, serum alpha-tocopherol, and the risk of rheumatoid arthritis. *Epidemiology* 11, 402-405.
- Koller, L.D., and Exon, J.H. (1986). The two faces of selenium-deficiency and toxicity--are similar in animals and man. *Canadian Journal of Veterinary Research* 50, 297-306.
- Kramer, G.F., and Ames, B.N. (1988). Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research* 201, 169-180.
- Kryukov, G.V., Castellano, S., Novoselov, S.V., Lobanov, A.V., Zehtab, O., Guigo, R., and Gladyshev, V.N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300, 1439-1443.
- Kumar, S., Björnstedt, M., and Holmgren, A. (1992). Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large nonstoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. *European Journal of Biochemistry* 207, 435-439.
- Kvicala, J., Zamrazil, V., Cerovska, J., Bednar, J., and Janda, J. (1995). Evaluation of selenium supply and status of inhabitants in three selected rural and urban regions of the Czech Republic. *Biology of Trace Element Research* 47, 365-375.
- Kvíčala, J., Zamrazil, V., Tlučhoř, B. (1996). Deficiency of selenium in inhabitants of highly polluted area of North-West Bohemia. *Therapeutic Uses of Trace Elements*. New York, Plenum Press 1996, pp. 345-350.
- Larsen, E.H., Hansen, M., Fan, T., and Vahl, M. (2001). Speciation of selenoamino acids, selenonium ions and inorganic selenium by ion exchange HPLC with mass spectrometric detection and its application to yeast and algae. *Journal Analytical Atom Spectroscopy* 16, 1403-1408.
- Letavayová, L., Vlčková, V., and Brozmanová, J. (2006). Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Toxicology* 227, 1-14.
- Li, H.F., McGrath, S.P., and Zhao, F.J. (2008). Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist* 178, 92-102.

- Li, Z.Y., Guo, S.Y., and Li, L. (2003). Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. *Bioresource Technology* 89, 171-176.
- Libes, S.M. (1992). Oceanic residence times and elemental concentrations in river water and seawater. In *An Introduction to marine biogeochemistry*, S.M. Libes, ed. (New York., John Wiley & Sons, Inc.), p. 683.
- Lien, T., and Knutsen, G. (1979). Synchronous growth of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae): a review of optimal conditions. *Journal of Phycology* 15, 191-200.
- Lindblow-Kull, C., Kull, F.J., and Shrift, A. (1985). Single transporter for sulfate, selenate, and selenite in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 163, 1267-1269.
- Lindstrom, K., and Rodhe, W. (1978). Selenium as a micronutrient for the dinoflagellate *Peridinium cinctum* fa. *westii*. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 21, 168-173.
- Low, S.C., and Berry, M.J. (1996). Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends in Biochemical Science* 21, 203-208.
- Lu, J.X., Kaeck, M., Jiang, C., Wilson, A.C., and Thompson, H.J. (1994). Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells. *Biochemical Pharmacology* 47, 1531-1535.
- Luštinec, J., Hadačová, V., Kamínek, M., and Procházka, Ž. (1983). Quantitative determination of starch, amylose, and amylopectin in plant tissues using glass fiber paper. *Analytical Biochemistry* 132, 265-271.
- Madeja, Z., Sroka, J., Nyström, C., Björkhem-Bergman, L., Nordman, T., Damdimopoulos, A., Nalvarte, I., Eriksson, L.C., Spyrou, G., Olsson, J.M., *et al.* (2005). The role of thioredoxin reductase activity in selenium-induced cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 69, 1765-1772.
- McCloy, R. (1998). Chronic pancreatitis at Manchester, UK - Focus on antioxidant therapy. *Digestion* 59, 36-48.
- Meyer, Y., Riondet, C., Constans, L., Abdelgawwad, M.R., Reichheld, J.P., and Vignols, F. (2006). Evolution of redoxin genes in the green lineage. *Photosynthesis Research* 89, 179-192.
- Morlon, H., Fortin, C., Adam, C., and Garnier-Laplace, J. (2006). Selenite transport and its inhibition in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1408-1417.

- Morlon, H., Fortin, C., Floriani, M., Adam, C., Granier-Laplace, J., and Boudou, A. (2005). Toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparison between effects at the population and sub-cellular level. *Aquatic Toxicology* 73, 65-78.
- Neumann, P.M., De Souza, M.P., Pickering, I.J., and Terry, N. (2003). Rapid microalgal metabolism of selenate to volatile dimethylselenide. *Plant* 26, 897-905.
- Nishikawa, K., Yamakoshi, Y., Uemura, I., and Tominaga, N. (2003). Ultrastructural changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) induced by heavy metals and polyphosphate metabolism. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 253-259.
- Novoselov, S.V., Rao, M., Onoshko, N.V., Zhi, H., Kryukov, G.V., Xiang, Y., Weeks, D.P., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2002). Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO Journal* 21, 3681-3693.
- Obata, T., Araie, H., and Shiraiwa, Y. (2004). Bioconcentration mechanism of selenium by a coccolithophorid *Emiliania huxleyi*. *Plant Cell Physiology* 45, 1434-1441.
- Oldfield, J.E. (1987). Two faces of selenium. *Journal of Nutrition* 117, 2002-2008.
- Parker, D.R., Page, A.L., and Thomason, D.N. (1991). Salinity and boron tolerances candidate plants for removal of selenium from soils. *Journal of Environmental Quality* 20, 157-164.
- Pastierova, J., Kramarova, Z., Molnarova, M., and Fargasova, A. (2009). Comparison of the sensitivity of four freshwater microalgae to selenate and selenite. *Fresen Environmental Bulletin* 18, 2029-2033.
- Patrick, L. (2004). Selenium biochemistry and cancer: A review of the literature. *Alternative Medicine Review* 9, 239-258.
- Pelah, D., and Cohen, E. (2005). Cellular response of *Chlorella zofingiensis* to exogenous selenium. *Plant Growth Regulation* 45, 225-232.
- Pilon-Smits, E.A., Garifullina, G.F., Abdel-Ghany, S., Kato, S., Mihara, H., Hale, K.L., Burkhead, J.L., Esaki, N., Kurihara, T., and Pilon, M. (2002). Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. *Plant Physiology* 130, 1309-1318.
- Pinson, B., Sagot, I., and Daignan-Fornier, B. (2000). Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 36, 679-687.

- Price, N.M., Thompson, P.A., and Harrison, P.J. (1987). Selenium - an essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 23, 1-9.
- Rayman, M.P. (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet* 356, 233-241.
- Reichard, P. (1993). From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* 260, 1773-1777.
- Reunova, Y.A., Aizdaicher, N.A., Khristoforova, N.K., and Reunov, A.A. (2007). Effects of selenium on growth and ultrastructure of the marine unicellular alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Russian Journal of Marine Biology* 33, 125-132.
- Riedel, G.F., Sanders, J.G., and Gilmour, C.C. (1996). Uptake, transformation, and impact of selenium in freshwater phytoplankton and bacterioplankton communities. *Aquatic Microbial Ecol* 11, 43-51.
- Romero, H., Zhang, Y., Gladyshev, V.N., and Salinas, G. (2005). Evolution of selenium utilization traits. *Genome Biology* 6, R66.
- Roy, G., Sarma, B.K., Phadnis, P.P., and Mughesh, G. (2005). Selenium-containing enzymes in mammals: Chemical perspectives. *Journal of Chemical Science* 117, 287-303.
- Sappey, C., Legrandpoels, S., Bestbelpomme, M., Favier, A., Rentier, B., and Piette, J. (1994). Stimulation of glutathione peroxidase activity decreases HIV type-1 activation after oxidative stress. *Aids Research and Human Retroviruses* 10, 1451-1461.
- Scott, R., Macpherson, A., Yates, R.W.S., Hussain, B., and Dixon, J. (1998). The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *British Journal of Urology* 82, 76-80.
- Seko, Y., and Imura, N. (1996). Active oxygen generation as a possible mechanism of selenium toxicity. Paper presented at: 6th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine (Beijing, Peoples R China).
- Selenius, M., Rundlof, A.K., Olm, E., Fernandes, A.P., and Bjornstedt, M. (2010). Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer. *Antioxidants & Redox Signaling* 12, 867-880.
- Sherlock, G., and Rosamond, J. (1993). Starting to cycle: G1 controls regulating cell division in budding yeast. *Journal of General Microbiology* 139, 2531-2541.
- Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J.P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T., and Davies, J.P. (2002). Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant Journal* 29, 475-486.

- Shrift, A. (1969). Aspects of selenium metabolism in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 20, 475-&.
- Schomburg, L., Schweizer, U., and Kohrle, J. (2004). Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cell Molecular Life Science* 61, 1988-1995.
- Schrauzer, G.N. (2000). Selenomethionine: A review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *Journal of Nutrition* 130, 1653-1656.
- Schwarz, K., and Foltz, C.M. (1957). Selenium as integral part of factor-3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society* 79, 3292-3293.
- Sielicki, M., and Burnham, J.C. (1973). The effect of selenite on the physiological and morphological properties of the blue-green alga *Phormidium luridum* var. *olivacea*. *Journal of Phycology*, 509-514.
- Sinha, R., Said, T.K., and Medina, D. (1996). Organic and inorganic selenium compounds inhibit mouse mammary cell growth in vitro by different cellular pathways. *Cancer Letters* 107, 277-284.
- Smith, F.W., Hawkesford, M.J., Ealing, P.M., Clarkson, D.T., VandenBerg, P.J., Belcher, A.R., and Warrilow, G.S. (1997). Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant Journal* 12, 875-884.
- Smith, F.W., Hawkesford, M.J., Prosser, I.M., and Clarkson, D.T. (1995). Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulfate transporter at the plasma membrane. *Molecular and General Genetics* 247, 709-715.
- Spallholz, J.E., Boylan, L.M., and Larsen, H.S. (1990). Advances in understanding selenium role in the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 587, 123-139.
- Spyrou, G., Bjornstedt, M., Kumar, S., and Holmgren, A. (1995). AP-1 DNA-binding activity is inhibited by selenite and selenodiglutation. *FEBS Letters* 368, 59-63.
- Stadtman, T.C. (1996). Selenocysteine. *Annual Review of Biochemistry* 65, 83-100.
- Stratford, M., and Rose, A. H. (1986). Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 132, 1-6.
- Sunde, R.A. (1990). Molecular biology of selenoproteins. *Annual Review of Nutrition* 10, 451-474.
- Suzuki, K.T. (2005). Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. *Journal of Health Science* 51, 107-114.

- Šetlík, I., Berková, E., Doucha, J., Kubín, Š., Vendlová, J., and Zachleder, V. (1972). The coupling of synthetic and reproduction processes in *Scenedesmus quadricauda*. *Arch Hydrobiol, Algological Studies* 7, 172-217.
- Šetlík, I., and Zachleder, V. (1984). The multiple fission cell reproductive patterns in algae. In *The Microbial Cell Cycle*, P. Nurse, and E. Streiblová, eds. (Boca Raton, Florida USA,, CRC Press Inc.), pp. 253-279.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2003). The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 57, 134-144.
- Terry, N., Zayed, A.M., de Souza, M.P., and Tarun, A.S. (2000). Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51, 401-432.
- Tukaj, Z., Kubínová, A., and Zachleder, V. (1996). Effect of irradiance on growth and reproductive processes during the cell cycle in *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 32, 624-631.
- Turner, R.J., Weiner, J.H., and Taylor, D.E. (1998). Selenium metabolism in *Escherichia coli*. *Biometals* 11, 223-227.
- Umen, J., and Goodenough, U. (2001). Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in *Chlamydomonas*. *Genes Development* 15, 1652-1661.
- Umysová, D., Vítová, M., Doušková, I., Bišová, K., Hlavová, M., Čížková, M., Doucha, J., Machát, J., and Zachleder, V. (2009). Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *BMC Plant Biology* 9,58 [doi:10.1186/1471-2229-9-58](https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-58), 1-16.
- Vašková, P. (2006). Selen v lidské výživě. In *Lékařská fakulta* (Brno, Masarykova Univerzita).
- Walczak, R., Westhof, E., Carbon, P., and Krol, A. (1996). A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs. *RNA* 2, 367-379.
- Wehr, J.D., and Brown, L.M. (1985). Selenium requirement of a bloom-forming planctonic alga from softwater and acidified lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42, 1783-1788.
- Whanger, P.D. (2004). Selenium and its relationship to cancer: an update. *British Journal of Nutrition* 91, 11-28.
- Wheeler, A.E., Zingaro, R.A., Irgolic, K., and Bottino, N.R. (1982). The effect of selenate, selenite, and sulfate on the growth of 6 unicellular marine-species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 57, 181-194.

- Williams, M.J., Ogle, R.S., Knight, A.W., and Burau, R.G. (1994). Effects of sulfate on selenate uptake and toxicity in the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Archives of Environment Contamination Toxicology* 27, 449-453.
- Wong, S.L., Nakamoto, L., and Wainwright, J.F. (1994). Identification of toxic metals in affected algal cells in assays of wastewaters. *Journal of Applied Phycology* 6, 405-414.
- Wrobel, K., Kannamkumarath, S.S., and Caruso, J.A. (2003). Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS determination of seleno-methionine in yeast and nuts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375, 133–138.
- Wu, L., Huang, Z.Z., and Burau, R.G. (1988). Selenium accumulation and selenium-salt cotolerance in 5 grass species. *Crop Science* 28, 517-522.
- Xia, L., Nordman, T., Olsson, J.M., Damdimopoulos, A., Bjorkhem-Bergman, L., Nalvarte, I., Eriksson, L.C., Arner, E.S.J., Spyrou, G., and Björnstedt, M. (2003). The mammalian cytosolic selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone - A novel mechanism for defense against oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 278, 2141-2146.
- Yang, G.Q., Wang, S.Z., Zhou, R.H., and Sun, S.Z. (1983). Endemic selenium intoxication of humans in China. *American Journal of Clinical Nutrition* 37, 872-881.
- Zachleder, V. (1983). Timing of cell cycle events under different irradiances in *Scenedesmus quadricauda*. *Progress in Cell Cycle Controls*, 219-222.
- Zachleder, V. (1995). Regulation of growth processes during the cell cycle of the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* under a DNA replication block. *Journal of Phycology* 30, 941-947.
- Zachleder, V., Bišová, K., Vítová, M., Kubín, Š., and Hendrychová, J. (2002). Variety of cell cycle patterns in the alga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta) as revealed by application of illumination regimes and inhibitors. *European Journal of Phycology* 37, 361-371.
- Zachleder, V., Kawano, S., and Kuroiwa, T. (1996). Uncoupling of chloroplast reproductive events from cell cycle division processes by 5-fluorodeoxyuridine in the alga *Scenedesmus quadricauda*. *Protoplasma* 192, 228-234.
- Zachleder, V., and Šetlík, I. (1982). Effect of irradiance on the course of RNA synthesis in the cell cycle of *Scenedesmus quadricauda*. *Biologia Plantarum* 24, 341-353.
- Zachleder, V., and Šetlík, I. (1990). Timing of events in overlapping cell reproductive sequences and their mutual interactions in the alga *Scenedesmus quadricauda*. *Journal of Cell Science* 97, 631-638.

Zachleder, V., and van den Ende, H. (1992). Cell-cycle events in the green alga *Chlamydomonas eugametos* and their control by environmental factors. *Journal of Cell Science* 102, 469-474.

Zayed, A., Lytle, C.M., and Terry, N. (1998). Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206, 284-292.

<http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php?page=sr&cb1=Algae>

<http://www.biology-online.org>, access year 2007