

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA APLIKOVANÉ EKOLOGIE



**Česká
zemědělská
univerzita
v Praze**

**Diverzita a izolace potenciálně biotechnologicky
významných kmenů sinic a řas z efemerních
sladkovodních biotopů v kontinentální Antarktidě**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. Ing. Josef Elster, CSc.

Autor práce: David Šarman

© 2023 ČZU v Praze

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

David Šarman

Aplikovaná ekologie

Název práce

Diverzita a izolace potenciálně biotechnologicky významných kmenů sinic a řas z efemerních sladkovodních biotopů v kontinentální Antarktidě

Název anglicky

Diversity and isolation of potentially biotechnologically important cyanobacteria and microalgae strains from ephemeral freshwater habitats in the continental Antarctica

Cíle práce

Cílem bakalářské práce je literární rešerše zaměřená na popis Antarktidy, především efemerních sladkovodních biotopů a adaptací sinic a řas žijících v tomto extrémním prostředí. Práce zahrnuje popis metodiky studia sinic a řas, včetně izolace experimentálních kmenů, které mohou být využity v biotechnologickém výzkumu.

Metodika

Použití odborné literatury z českých, a především ze zahraničních článků a knih. Praktické seznámení s izolací a kultivací řas a sinic v laboratorních podmínkách.

Doporučený rozsah práce

min. 30 str. textu

Klíčová slova

sinice, řasy, efemerní sladké vody, kontinentální Antarktida

Doporučené zdroje informací

1. Prošek, Pavel a kol. Antarktida. Praha: Academia, 2013. ISBN 978-80-200-2140-3.
2. Andersen Robert A. 2005. Algal Culturing Techniques. Burlington Mass: Elsevier/Academic Press, ISBN: 978-01-208-8426-1.
3. Stürmer, Karoline. Arktida a Antarktida: život ve věčném ledu. V Praze: Euromedia Group – Knižní klub, 2007. Universum (Knižní klub). ISBN 978-80-242-2019-2.
4. Ellis-Evans, J. C. (1996). Microbial diversity and function in Antarctic freshwater ecosystems. Biodiversity and Conservation, 5(11), 1395–1431. Available from <https://doi.org/10.1007/bf00051985>
5. Pandey KD, Shukla SP, Shukla PN, Giri DD, Singh JS, Singh P, Kashyap AK., 2004: Cyanobacteria in Antarctica: ecology, physiology and cold adaptation, Centre of Advance Study in Botany, Banaras Hindu University, India, Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15559974/>

Předběžný termín obhajoby

2023/24 LS – FŽP

Vedoucí práce

prof. Ing. Josef Elster, CSc.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Elektronicky schváleno dne 22. 2. 2023

prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 23. 2. 2023

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 28. 03. 2023

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „**Diverzita a izolace potenciálně biotechnologicky významných kmenů sinic a řas z efemerních sladkovodních biotopů v kontinentální Antarktidě**“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 30.3.2023

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu své bakalářské práce, panu profesorovi Josefu Elsterovi za jeho čas, cenné rady, připomínky a vstřícnost při konzultacích. Dále chci poděkovat všem lidem, kteří ve mně probudili zájem o biologii a o vědu, jako takovou.

Diverzita a izolace potenciálně biotechnologicky významných kmenů sinic a řas z efemerních sladkovodních biotopů v kontinentální Antarktidě

Abstrakt

V této práci lze nalézt mnoho informací, které se týkají řas a sinic z Antarktidy. Je zde popsána charakteristika sinic a řas v širším pojetí, ale také jsou popsány konkrétní rody a jejich biotechnologické využití. Mimo nynějších aplikací v biotechnologiích a využití fotobioreaktorů pro masovou kultivaci je zde nastíněn budoucí vývoj možného využití těchto mikroorganismů, a také je zde představen inovativní reaktor pro kultivaci přímo na Antarktidě. Antarktida jako taková je zde také představena, stejně jako vývoj tamního života v širokém časovém horizontu. Nechybí ani popis izolace a kultivace mikroorganismů, ve spojení s laboratorními pomůckami a využitelnými materiály. Dále jsou popsány stresové faktory, kterým jsou tyto organismy nuceny čelit. Nechybí ani popis adaptací, které umožňují řasám a sinicím žít v nehostinných antarktických podmínkách. V návaznosti na to, následuje popis nejrůznějších chemických látek, které produkují a které jsou stěžejní pro přežití tamních organismů. V neposlední řadě jsou popsány vybrané biotopy a některé zajímavosti, jakou je například tzv. červený sníh.

Klíčová slova: Řasy, sinice, Antarktida, biotechnologie, adaptace, izolace, kultivace, efemerní biotopy

Diversity and isolation of potentially biotechnologically important cyanobacterial and algal strains from ephemeral freshwater habitats in continental Antarctica

Abstract

Much information about algae and cyanobacteria of Antarctica can be found in this thesis. The characteristics of algae and cyanobacteria is described in general, there is also a description of specific genera and their biotechnological application. Besides the actual biotechnological application and use of photobioreactors for their cultivation there is an outline of a possible future course of protentional use of these microorganism. An innovative reactor for cultivation in Antarctica is also introduced. Antarctica itself is also introduced with the development of local life in wide time horizon. Description of isolation and cultivation of microorganism is mentioned too with suitable laboratory equipment and usable materials. Stress factors they have to face are described next. A description of adaptations which enable algae and cyanobacteria to survive in unhostile Antarctic conditions are not omitted either. Following this there is a description of various chemical substances algae and cyanobacteria produce and which are crucial for survival of local organisms. Last but not least the chosen biotopes and some interesting facts are mentions as is for example a red snow.

Keywords: Algae, cyanobacteria, Antarctica, biotechnology, adaptation, isolation, cultivation, ephemeral habitats

Obsah

1	Úvod	11
2	Cíl práce a metodika	12
2.1	Cíl práce	12
2.2	Metodika	12
3	Sinice a řasy	12
3.1	Sinice	12
3.2	Řasy	13
4	Polární oblasti jako takové	14
5	Představení Antarktidy	14
5.1	Vývoj života Antarktidy	15
5.2	Diverzita	16
5.2.1	Hojnost života	16
6	Sinice a řasy Antarktidy	17
6.1	Sněžné řasy	18
6.1.1	Červený sníh	19
6.2	Sladkovodní biotopy	20
6.2.1	Kryokonity	20
6.2.2	Jezera	20
6.2.3	Efemerní biotopy	21
6.3	Neviditelný nepřítel	22
6.4	Dva teplotní gradienty	22
7	Stres	23
7.1	Mrazový stres	23
7.2	Stres z vysychání	23
7.3	Osmotický stres	23
8	Jak se vyhnout stresu	24
8.1	Diapauza vs. klidový stav	24
8.2	Akinety	24
8.3	Hormogonium	24
8.4	Záchranná reakce řas – množení	25
9	Adaptace	25
9.1	Protektanty	25
9.1.1	Sacharidy	25
9.1.2	Polyalkoholy	26

9.1.3	Antioxidanty.....	26
9.1.4	DMSP a DMSO.....	26
9.1.5	Chaperony	27
9.2	Adaptace na nízké teploty	27
9.2.1	Nejběžnější mechanismy.....	27
9.2.2	Adsorpčně-inhibiční hypotéza	27
9.2.3	Plazmatická membrána – jak zůstat naživu	28
9.2.3.1	Propustnost membrány	28
9.2.3.2	Stabilizace viskozity	28
9.2.4	Důležité skupiny proteinů	29
9.3	Adaptace na nedostatek vody	29
9.3.1	Využití osmoprotektantů a kryoprotektantů.....	29
9.3.2	LEA proteiny.....	30
9.3.3	Produkce slizu	30
9.4	Adaptace na nedostatek světla.....	31
9.5	Adaptace pro život na skalách.....	31
9.6	Adaptace na osmotický stres	32
10	Laboratorní studium sinic a řas – příprava laboratorních podmínek.....	32
10.1	Autoklávování a mikrovlnná trouba.....	32
10.2	Jiné možnosti sterilizace.....	33
10.2.1	Sterilizace za sucha a tepla.....	33
10.2.2	Filtrace.....	34
10.2.3	Sterilizace ultrafialovým zářením	34
10.3	Sběr materiálu.....	35
10.4	Laboratorní experimentální práce.....	35
10.4.1	Pracovní vybavení	35
10.4.2	Separace organismů	37
11	Izolace sinic a řas	37
11.1	Vybrané techniky izolace	38
11.1.1	Obohacování vzorku	38
11.1.2	Agar (8.4.2).....	39
11.1.2.1	Tradiční metoda	39
11.1.2.2	Zalévání agarem.....	39
11.1.2.3	Fototaxe	39
12	Kultivace	40
12.1	Dnešní metody kultivace	40
12.2	Kultivované řasy a sinice z Antarktidy	41
12.3	Masová kultivace.....	42

12.3.1	Předpoklady pro masovou kultivaci Antarktických řas a sinic.....	43
13	Biotechnologický potenciál sinic a řas.....	43
13.1	Fotobioreaktory	43
13.1.1	Inovativní fotobioreaktor pro kultivaci řas v polárních oblastech	44
13.2	Skupiny sinic a řas využívaných v biotechnologiích	44
13.2.1	Spirulina.....	44
13.2.2	Dunaliella	45
13.2.3	Haematococcus	45
13.2.4	Aphanizomenon	46
13.2.5	Chlorella.....	46
13.3	Potenciál Antarktických řas a sinic a jejich nynější využití	47
13.4	Biopaliva.....	48
13.4.1	Budoucnost biopaliv.....	48
14	Diskuze	48
15	Závěr.....	49
16	Literatura	51
17	Seznam použitých zkratk a symbolů	54

1 Úvod

Tato bakalářská práce pojednává především o sinicích a řasách, o jejich životních strategiích, o jejich potenciálním využití v biotechnologiích a o Antarktidě. Čtenář této práce se dále dozví, jak probíhá práce se zmíněnými organismy (sterilizací materiálů počínaje a kultivací mikroorganismů konče). O všech těchto aspektech se zde píše jak samostatně, tak v souvislostech. Problematika celého tématu je velice aktuální, jelikož se lidstvo pokouší stále zkvalitňovat svou životní úroveň a zároveň dbát na životní prostředí. Jelikož jsou mikroorganismy, jako řasy a sinice, už dnes využívány ve farmacii nebo v energetickém průmyslu, mělo by se jim dostávat větší pozornosti. Na Antarktidě žije mnoho neznámých a nepopsaných kmenů těchto mikroorganismů, jejichž výzkum by potenciálně mohl přinést mnoho inovací v různých odvětvích. Motivací pro sepsání této práce byla snaha o nalezení odpovědí na některé otázky. Dají se řasy a sinice využít v biotechnologiích? Existují nějaké plány na inovaci těchto technologií? Které látky z řas a sinic jsou pro lidstvo atraktivní a využitelné? Jakými obrannými mechanismy disponují antarktické mikroorganismy a jaké látky jsou k funkčnosti těchto mechanismů nutné? Existují v antarktických sinicích a řasách látky, které u těchto organismů jinde na světě nejsou?

2 Cíl práce a metodika

2.1 Cíl práce

Cílem práce je představení historického vývoje a zlomových okamžiků ohledně problematiky izolace a kultivace řas a sinic. Dále pak popsání stresových podmínek, kterým jsou organismy žijící na Antarktidě vystaveny, a samozřejmě na popis adaptací, díky kterým tyto organismy mohou na Antarktidě žít a rozmnožovat se. Dalším cílem je zaměřit se na biotechnologický potenciál řas. Posledním cílem je napsat takový vědecký text, který je založen na faktech a aktuálních vědeckých poznatcích.

2.2 Metodika

Pro vytvoření této bakalářské práce byla použita odborná literatura z českých, a především ze zahraničních zdrojů. Informace byly čerpány jak z knih fyzických, tak elektronických, zdrojem informací bylo i četné množství vědeckých článků. Čerpáno bylo rovněž z ověřených internetových zdrojů.

3 Sinice a řasy

Ačkoli jsou řasy a sinice mnohdy pouhým lidským okem neviditelné, nemůže jim být upřena jejich významná role na planetě Zemi. Jsou zodpovědné za produkci kyslíku (vytvářejí asi polovinu kyslíku na naší planetě) a právě díky těmto organismům vznikla kyslíková atmosféra a ozonová vrstva, bez které by život na souši nebyl možný. Mohlo by o nich tedy být řečeno, že byly jedním z hybatelů vývoje a diverzifikace složitějších forem života. Jejich životní strategie je natolik úspěšná, že se dochovaly až do dnešní doby a mohou tak být zkoumány podrobněji.

3.1 Sinice

Sinice (*Cyanobacteria*) patří na rozdíl od řas mezi prokaryotické organismy. Od většiny ostatních prokaryotických organismů se liší svou schopností fotosyntetizovat (schopnost fotosyntetizovat mají také některé bakterie). Zároveň se jedná o vůbec první organismy na planetě Zemi, které disponovaly touto schopností. K fotosyntéze jim slouží chlorofyl (konkrétně chlorofyl-a). Vedle chlorofylu-a se u sinic běžně vyskytují barviva jako fykocyanin (způsobuje zbarvení do modra) a fykoerytrin (způsobuje červené zbarvení). Mezi další pigmenty, které se u sinic běžně vyskytují, by mohly být zařazeny ještě karotenoidy (například beta-karoten či astaxanthin) (Chorus et al., 2021).

Schopnost vytvářet ve svém těle chlorofyl získaly sinice již na začátku prekambria (asi před 3 miliardy let). Díky tomu mohly vázat vzdušný oxid uhličitý a syntetizovat tak organické sloučeniny. Desítky milionů let to byly jediní producenti kyslíku na Zemi. Postupem času se mnoho druhů sinic stalo symbionty některých eukaryotních organismů. To dále dopomohlo k vývoji řas či semenných rostlin. Také dokázaly osídlit všechny biotopy (včetně nehostinné Antarktidy a Arktidy), to z nich dělá jedny z neadaptabilnějších organismů (Prošek et al., 2013).

3.2 Řasy

Řasy (*Algae*) jsou podle dnešních vědeckých poznatků skupinou, která se vyvinula zhruba před 1 až 1.5 miliardou let. Stalo se tak endosymbiotickým spojením mezi protisty a fototrofními bakteriemi. Způsob vzniku takového organismu se nazývá vznik chimérický (organismus obsahuje DNA dvou a více organismů). Ačkoli jsou k dispozici stále nové poznatky, není ještě možno s jistotou říct, zda všechny řasy vznikly ze společného předka. Dříve byly řasy řazeny mezi sinice. Později se přišlo na to, že se jedná o samostatnou skupinu (Douglas et al., 2003).

Řasy jsou velmi důležité fotosyntetizující organismy na naší planetě. Vyskytují se jak v terestrických, tak i v akvatických ekosystémech. Zároveň jsou velice důležitým zdrojem potravy pro nespočet živočichů, včetně člověka. Většinou se rozmnožují nepohlavně, ale někdy dochází i k pohlavnímu rozmnožování (o tom, zda se řasy rozmnoží pohlavně nebo nepohlavně rozhodují okolní podmínky, zejména stres). Dříve byly řasy děleny do tří skupin dle převládajícího barviva na zelené, červené a hnědé. Toto dělení je ale již překonáno a dnes je zcela jiné. Některé řasy se řadí do superskupiny *Archaeplastida*, konkrétně jde o skupiny *Glaucophyta*, *Chlorophyta* a *Rhodophyta*. Jiné řasy jsou řazeny do superskupiny SAR (název je složen ze začátečních písmen skupin, ze kterých se skládá – *Stramenopila*, *Alveolata*, *Rhizaria*). Sem patří například *Phaeophyceae*, *Chrysophyceae* nebo *Dinoflagellata*. Dále jsou do řas řazeny *Euglenophyta*, které patří do superskupiny *Excavata*. Veškeré taxonomické zařazení se časem může měnit, a i v tomto případě není úplně jisté, zda zůstane v podobě, ve které je nyní (Eliáš, 2021).

Rozdíly ve velikosti řas jsou obrovské. Od jednobuněčných mikroskopických řas až po ty makroskopické (například řasy rodu *Phaeophyceae* dosahují velikosti až několik desítek metrů) (Wijesekara et al., 2010).

4 Polární oblasti jako takové

Polární oblasti jsou nejextrémnějšími oblastmi na naší planetě Zemi. Jedná se o oblasti ležící za polárním kruhem. Konkrétně jde o oblast Arktidy a Antarktidy. Podmínky pro život člověka v těchto oblastech jsou přinejmenším nehostinné. Přežití bez speciální výstroje je takřka nemožné (Stürmer, 2007).

Jak se do těchto polárních oblastí dostanou řasy a sinice? Pokud je řeč o nepůvodních druzích, tedy o druzích, které se sem dostaly transportem zvenčí – existují dvě možnosti. Buďto se sem dostaly pomocí vzduchu nebo pomocí mořských proudů. Samozřejmě sinice i řasy využívají obě tyto varianty. Pokud jde však o přenos na dlouhé vzdálenosti (například mezi kontinenty) situace může být značně nepříjemná. Je-li v takovém případě přenosným médiem organismu voda, znamená to pro přenášené organismy vysoké riziko úhynu v důsledku predace. Predační tlak je na tyto organismy vyvíjen po celou dobu transportu – čím je cesta delší, tím víc se snižuje šance na dosažení polárních oblastí. V případě, že je tímto médiem vzduch, tak se podmínky mění. Stresu ale není méně, pouze je vyvíjen na mikroorganismy jiným způsobem. Hlavním nepřítelem nyní není predace, ale ultrafialové světlo. Většina mikroorganismů takto náročnou cestu nezvládne, přežijí pouze ti nejodolnější jedinci. Pokud se sinicím či řasám podaří dostat až do polárních oblastí, stále nemají vyhráno. Musí se efektivně adaptovat na lokální podmínky, což nemusí být vždy jednoduchý úkol (Prošek et. al., 2013).

5 Představení Antarktidy

Antarktida je nejchladnějším kontinentem naší planety. Vyskytuje se zde zhruba 90% veškerého ledu na Zemi. Vnitrozemský ledovec zaujímá plochu téměř 12 000 000 km². Zbytek území tvoří především ledovcové šelfy a skalní výchozy či hory (asi 2 000 000 km²) (Swithinbank, 1988).

Antarktida byla dříve považována za ledovou pustou, část pevniny bez života nebo jen s jednoduchými a druhově chudými společenstvy. Dnes je však známo, že se zde život vyskytuje v mnohem komplexnějších a složitějších strukturách. Výzkum zde stále probíhá a přináší nové poznatky a objevy. Vědci při svých výzkumech dokázali najít například jezera, která se skrývala pod ledem. Dnes už se ví, že tato jezera i jiné zdejší biotopy jsou vhodným prostředím pro mnohé druhy mikroorganismů. Pravdou však zůstává, že je pro vědce stále velmi obtížné provádět výzkum ve vnitrozemí Antarktidy. Jako možná inovace se jeví vyvinout speciálně navržená vozidla pro transport na velké vzdálenosti v těchto nehostinných podmínkách. Dalším možným

řešením by byla výstavba výzkumné stanice přímo ve vnitrozemí nebo alespoň blízko něj (Kennicutt et al., 2014).

Antarktida je také důležitá z pohledu sladké vody. Té se zde vyskytuje okolo 70% z celkových zásob planety. Další zajímavostí je, že Antarktida je také jedno z nejlepších míst na pozorování a zkoumání vesmíru. To je dáno její stabilně suchou a studenou atmosférou (Kennicutt et al., 2014).

Důležité je rovněž podotknout, že Antarktida se v posledních letech stala významným předmětem ochrany a výzkumu. Dokonce byl uspořádán sraz světových odborníků, kteří diskutovali o hlavních bodech ochrany antarktického kontinentu. K tomu je samozřejmě zapotřebí mezinárodní spolupráce, finance a nejmodernější technologie. Není překvapením, že nejsložitější z těchto bodů jsou finance. Mnohokrát se stalo, že projekty na Antarktidě byly zpožděné, přerušené nebo dokonce neproběhly vůbec (Kennicutt et al., 2014).

5.1 Vývoj života Antarktidy

Antarktida nebyla vždy tak chladnou a nehostinnou krajinou, jakou je dnes. Před několika desítkami miliony let byla zalesněná, byla zde hojná bylinná vegetace a také přítomnost velkých obratlovců či plazů. Velká změna nastala začátkem mezozoika (asi před 250 miliony let). Z původně chladnějšího a vlhčího podnebí se pomalu stávalo sušší a teplejší – podnebí podobné dnešním subtropům. Tato změna zapříčinila střídání druhů, které tuto oblast osidlovaly. Rostliny rodu *Glossopteris* (do té doby dominující) byly nahrazeny rostlinami odolnějšími proti teplu a suchu – jednalo se především o cykasy či jehličnany. Tyto jehličnaté stromy byly typické pro celé mezozoikum. I když nutno podotknout, že na úplném konci tohoto období došlo ještě k masivnímu rozmachu krytosemenných rostlin (*Magnoliophyta*). To se stalo v době, kdy Antarktida byla ještě stále součástí superkontinentu Gondwany. Jelikož se nacházela v centrální části, předpokládá se, že byla místem vzniku mnoha nových druhů (především krytosemenných rostlin). Na začátku kenozoika, konkrétně v eocénu (období před 56 až 40 miliony let) se začalo opět ochlazovat. To vedlo k postupnému vytlačování teplomilných druhů, k řidnutí lesní vegetace a k nástupu dominance tundrových vegetací s příměsí chladnomilných dřevin, jako je například pabuk (*Nothofagus*). Další výrazné ochlazení přišlo zhruba před 34 miliony lety v oligocénu. Avšak ochlazení, které mělo za následek vyhynutí většiny života na Antarktidě, přišlo až v miocénu asi před 14 miliony lety. Od té doby proběhlo několik teplejších period, ale nic nenasvědčuje tomu, že by během nich docházelo k obnově bývalých společenstev. Dnes jsou na Antarktidě stále nepříznivé podmínky pro život. Přesto zde

se svou životní strategií přežívají mnohé druhy řas, sinic, mechů, lišejníků či bakterií. Byly sem transportovány mořskými či vzdušnými proudy především ve formě výtrusů. Avšak jen část druhů byla schopna odolat drsným podmínkám Antarktidy a přežít. Tyto formy života asimilující oxid uhličitý začaly tvořit velké biomasy a postupně zde umožnily život i jiným než autotrofním organismům (Prošek et al., 2013).

Jak to, že jsou si vědci jisti, že v dobách dávno minulých byla Antarktida plná života? Je to z toho důvodu, že bylo objeveno dostatečné množství paleontologických nálezů, které přítomnost těchto druhů potvrzují. Veškeré nálezy jsou z míst, která nejsou trvale zaledněná. To v celkovém počtu není velké procento z plochy Antarktidy. Tento fakt nutí vědce domnívat se, že s postupným odtáváním ledu bude objeveno velké množství nových fosilních nálezů – tudíž i nových, již vyhynulých druhů (Prošek et al., 2013).

5.2 Diverzita

Biodiverzita Antarktidy je větší a komplexnější, než by se mohlo zdát. Hlavním prediktorem biodiverzity je dostupnost energie ve všech formách. O většině míst na Antarktidě platí, že jsou zde podmínky suché, studené a oligotrofní (s nízkým množstvím dostupných živin). Nicméně se zde vyskytují i sladkovodní biotopy nebo eutrofizovaná místa (s velkým množstvím živin) v důsledku výskytu tučňáků či tuleňů (Chown et al., 2015).

5.2.1 Hojnost života

Jaký je přesný počet druhů na Antarktidě prozatím, není známo. Je to především tím, že velká část Antarktidy zůstává stále detailněji neprozkoumána. Avšak něco se už ví. Například to, že z cévnatých rostlin se zde vyskytují pouze dva druhy – *Colobanthus quitensis* (*Caryophyllaceae*) a *Deschampsia antarctica* (*Poaceae*). Druhovú pestrost mechů (*Bryophyta*) je mnohem větší. Zatím bylo nalezeno 104 druhů. Co se týče játrovek (*Marchantiophyta*), prozatím se ví o 27 druzích. Větší počty druhů mohou být nalezeny u hub, lišejníků nebo i terestrických řas. Lišejníků (*Lichens*) bylo doposud nalezeno 380 různých druhů. U hub (*Fungi*) si vědci stále nejsou jisti, ale předpokládají podobná čísla jako u lišejníků. Druhů terestrických řas se nyní odhaduje kolem 700-1000 druhů, a i u sinic se předpokládají podobná čísla (Prošek et al., 2013).

Co se živočichů týče, tak na Antarktidě nežijí plazi, obojživelníci ani obratlovci. Našly by se zde desítky druhů bezobratlých – ti však nejsou předmětem této práce, tudíž nebudou blíže rozváděny. Je však nutné poznamenat, že pro bezobratlé živočichy

jsou potravou především právě sinice a řasy. Celková hojnost života není na Antarktidě rovnoměrně rozprostřena. Nejvíce života lze nalézt na místě, které je nejméně extrémní – na severozápadní části Antarktického poloostrova. Na izolovaných oblastech, jako je například Transantarktické pohoří lze nalézt také některé druhy. Jedná se však především o druhy endemické (druhy, které se zde vyvinuly a nikde jinde na světě se nevyskytují) (Prošek et al., 2013).

Výzkum samozřejmě stále probíhá. Stále jsou objevovány nové druhy. Vzorky se zpracovávají v nejrůznějších centrech a univerzitách pod dohledem odborníků. V dnešní době se dělají především molekulární analýzy, kvůli přesnějšímu taxonomickému zařazení (Prošek et al., 2013).

Není pochyb o tom, že se na Antarktidě vyskytuje několik autochtonních (původních) druhů. Většinu druhů sem však přivedly a stále přivádějí mořské či vzdušné proudy. Všechny nově přichozí druhy jsou nuceny se velmi rychle adaptovat na nízké teploty. V tom mají výhodu rychle rostoucí mikroorganismy nebo mikroorganismy s krátkým životním cyklem. Nejdokonalejší adaptace se projevily u jednoduchých sinic. Nutno podotknout, že molekulární analýza potvrdila vysokou míru odlišnosti v genotypech antarktických řas a sinic v porovnání s řasami a sinicemi z jiných oblastí (Prošek et al., 2013).

6 Sinice a řasy Antarktidy

Antarktické sinice a řasy se od těch ostatních liší svou schopností využít extrémní podmínky ve svůj prospěch. Nejenže osídlily kontinent, o kterém se dříve myslelo, že je bez života, ale dokázaly zde vytvořit stabilní a komplexní společenstva. Také si dokázaly efektivně přerozdělit niky (od jezerních biotopů až po ty skalní). Díky charakteristicky nekomfortním antarktickým podmínkám jsou takřka chráněny před invazivními druhy, které tyto nehostinné oblasti nejsou schopny osídlit.

Zdá se, že pro udržení života a stávající diverzity v Antarktidě, hraje hlavní roli přítomnost sinic, jež jsou schopny vázat uhlík nebo dusík. Díky této fixaci se stává dostupným i pro mnohé jiné organismy (Pandey et al., 2004).

Sinice i řasy obývající Antarktidu bývají označovány jako psychrofilní druhy (druhy, kterým vyhovují nízké teploty). Pravdou však zůstává, že jen část z těchto druhů je čistě psychrofilní povahy. Pro ostatní druhy je používán termín psychrotolerantní (druhy, kterým nízké teploty nevadí), jelikož jim vyhovují i teploty

vysoko nad bodem mrazu. Zároveň dokážou při vyšších teplotách stále růst, kdežto psychrofilní druhy vyžadují pro svůj růst teploty nižší (Pandey et al., 2004).

Mezi sinice, které je možno na Antarktidě najít, patří někteří zástupci z řádu *Nostocales* (*Calothrix gypsophila*, *Anabaena cylindrica*, *Nostoc commune*, *Nostoc longistaffi*), *Oscillatoriales* (*Lyngbya martensian*, *Phormidium frigidum*) nebo *Synechococcales* (*Synechococcus aeruginosus*) (Wharton et al., 1983).

Mezi řasy, které je zde možno spatřit, patří zástupci z řádu *Chlamydomonadales* (*Chlamydomonas subcaudata*, *Chlorococcum* sp.) (Wharton et al., 1983) či z řádu *Bryopsidales* (*Chaemosiphon subglobosus*) (Pandey et al., 2004). Dále se zde objevují zástupci rozsivek z řádu *Naviculales* (*Navicula cryptocephala*, *Navicula gausii*, *Navicula shackletoni*, *Pinnularia cymatopleura*) nebo *Bacillariales* (*Nitzschia angustata*) (Wharton et al., 1983).

6.1 Sněžné řasy

Řasy žijící ve sněhu tvoří jiná společenstva než například společenstva uvnitř kryokonitů. Liší se druhovým složením, biomasou i ekologickými vlastnostmi. Společenstva sněžných řas jsou tvořena především pohyblivými bičíkovci rodu *Chlamydomonas* či *Chloromonas* a nepohyblivými řasami rodu *Koliella* či *Raphidonema*, ojediněle i sinicemi nebo bičíkovci ze třídy *Chrysophyceae*. Všechny tyto organismy jsou významně vystavovány slunečnímu záření, tudíž se musejí bránit negativním účinkům. K tomu využívají různé pigmenty. V závislosti na tom, jaký pigment je organismy využíván, získávají organismy specifické zbarvení a vznikají tak jevy, jakým může být „červený sníh“. Pigment nemusí být ale vždy červený. Řasy jsou často zbarveny do hnědé, žluté i černé barvy. Společenstvo takto zbarvených řas se nazývá „kryoseston“. V kryosestonu mohou být nalezeny i další organismy. Například houby, bakterie nebo také zooplankton. Celkové plochy kryosestonu na Antarktidě rozhodně nejsou zanedbatelné, naopak jsou velmi důležitou složkou tamějšího ekosystému (Prošek et al., 2013).

Společenstva kryokonitů a společenstva sněžných řas se z pravidla nepotkávají v prostoru. Ovšem existuje několik případů, kdy k tomuto střetu přece jen dojde. Jedním z takových případů je přítomnost hnízdiště tučňáků, které má přímý efekt na střet těchto dvou společenstev. Exkrementy těchto nelétavých ptáků mají pozitivní vliv na růst biomasy řas a sinic. Také dochází k přímému přenosu mikroorganismů pohybem ptáků. Tento zajímavý jev může být pozorován hlavně v oblasti západního pobřeží Antarktického poloostrova. Vědci dokázali, že zdejší druhové bohatství

převyšuje biodiverzitu Arktidy či horských oblastí. Celkové počty druhů těchto mikroorganismů jsou zde ovlivněny především mírou eutrofizace, množstvím solí a pobřežní faunou (Prošek et al., 2013).

Co se eutrofizace týče, tak největší podíl na ní mají exkrementy tučňáků. Ty totiž obsahují velké množství fosforu a dávají tak vzniknout zajímavému biotopu. Tomuto biotopu se říká ornitogenní půda. Řasám i sinicím se zde opravdu daří a vznikají zde velká společenství těchto mikroorganismů. Masově se zde vyskytuje například řasa *Prasiola antarctica* nebo sinice *Phormidium attenuatum* (Prošek et al., 2013).

6.1.1 Červený sníh

Jedním z antarktických fenoménů je bezesporu červený sníh či červeně zbarvená voda. Na první pohled by se mohlo zdát, že se jedná o masivní kaluž krve, ale není tomu tak. Za červenou barvu sněhu, či vody jsou zodpovědné řasy. Velké množství řas je typicky zelené. Za zelenou barvu je zodpovědná vysoká koncentrace chlorofylu. Jedná se o zelené barvivo, které je nutné k fotosyntéze. Za krvavě červenou barvu některých řas je zodpovědné jiné barvivo – astaxanthin. Jedná se o červené barvivo, které patří mezi karotenoidy. Astaxanthin se vyskytuje například u trvalých stádií řas rodu *Chlamydomonas*. Trvalými stádii jsou myšleny spory, které neprovádějí fotosyntézu. Důvod, proč některé řasy zůstávají v trvalých stádiích, je prostý. Astaxanthin funguje jako ochranná vrstva a předchází negativním vlivům ultrafialového záření na spory. Toto záření by mohlo organismy značně poškodit. Jak ale astaxanthin a jiné karotenoidy přesně fungují? Aby bylo možno odpovědět na tuto otázku, je nutno si uvědomit, co je na ultrafialovém záření vlastně tak nebezpečné. Při vysokých dávkách ultrafialového záření vznikají volné radikály, což je specifický typ chemické vazby. Těmto volným radikálům však chybí jeden elektron, a tak se ho pokoušejí někde získat – přesněji řečeno ho chtějí získat právě od spor. Pokud by tyto volné radikály opravdu získaly elektron od spory, znamenalo by to rozpad jiné chemické vazby uvnitř buňky. To by znamenalo poškození nebo dokonce zničení této buňky. Karotenoidy, jako je například již zmíněný astaxanthin, slouží jako ochrana před tímto jevem. Jsou totiž schopny tyto volné radikály zachytit a zabránit tak fatálnímu poškození buněk. Znamená to tedy, že spory jsou před ultrafialovým zářením lépe chráněny než vegetativní buňky (Stürmer, 2007).

Někteří farmakologové věří, že pochopení těchto obranných mechanismů proti negativním účinkům slunečního záření, by mohlo přispět k vývoji efektivní ochrany i pro člověka (Stürmer, 2007).

6.2 Sladkovodní biotopy

Na Antarktidě se vyskytuje mnoho sladkovodních biotopů, za což může přítomnost ledovců, které jsou tvořeny sladkou vodou. Tyto biotopy by mohly být rozděleny do několika skupin podle jejich vlastností. Každý z nich totiž funguje trochu jinak, takže i organismy v nich žijící se musely adaptovat různě.

Pokud by byla vynaložena snaha najít nějaký vztah mezi počtem druhů a množstvím rozpuštěných látek ve vodě, dospělo by se k závěru, že existuje. Sladkovodní biotopy Antarktidy bývají zpravidla silně oligotrofní. Na tento stav jsou zdejší organismy adaptovány. Pokud se však rapidně zvýší množství rozpuštěných látek, může to velmi ovlivnit biodiverzitu. Ta zpravidla klesá, jelikož se většinou najde druh, který tohoto faktoru dokáže využít ve svůj prospěch lépe než ostatní druhy. V nejkrajnějších případech může dojít k dominanci jediného druhu (Ellis-Evans, 1996).

6.2.1 Kryokonity

Kryokonity jsou nepříliš hluboké nádržky, plněné sladkou vodou z ledovců. Často tvoří komplexněji propojené soustavy. Není to ale pouze voda, která se v těchto prohlubních nachází. Na dně se totiž usazuje tmavý sediment. Ten je důležitý zejména pro zvětšování nádržek – absorbuje větší množství slunečního záření, tudíž má přirozeně větší teplotu, než cokoli v okolí – to zajistí tání v bezprostřední blízkosti. Transportním médiem tohoto sedimentu je především tekoucí voda, ale může jít i o přenos větrem. Toto propojené prostředí je vhodným biotopem pro přežívání některých druhů řas a sinic, k čemuž se váže také výskyt některých hub a bakterií. Těmito biotopy Antarktida úplně neoplývá, dají se nalézt spíše v pobřežních částech (Prošek et al., 2013).

6.2.2 Jezera

Antarktická jezera jsou jezera ledovcová. Pro většinu jezer platí, že mají něco společného – trvale nízkou teplotu a dlouhé období zamrznutí. Najdou se ale i výjimky, jakými jsou buďto mělká a teplejší pobřežní jezírka, často s lehce brakickou vodou (voda s mírnou koncentrací solí) nebo se jedná o jezera, která jsou silně eutrofizovaná díky okolní přítomnosti tučňáků či některých mořských savců. Bližší charakteristiku, zejména složení biocenózy těchto jezer udává substrát, který se vyskytuje na dně onoho jezera. Dále může být společenstvo ovlivněno charakteristikou břehových částí nebo také délkou zamrznutí jezera. Jezerní biotopy jsou velmi vyhovujícím typem prostředí pro mikroorganismy. Nejvíce se zde daří sinicím, které vytvářejí vrstevnaté povlaky na dně. Společenstvo je již tradičně obohaceno i o řasy, ale nevyskytují se zde

v takové míře a v některých jezerech mohou i úplně chybět. Na konci vegetačního období dochází k odtržení povlaku, tedy celého společenstva, ode dna a je vyneseno k hladině (Prošek et al., 2013).

V malých hloubkách jsou většinou nalezeny různé druhy z rodů *Phormidium* a *Leptolyngbya*, spodní vrstvy mají diverzitu větší. Uplatňuje se tu například nápadný antarktický endemit *Oscillatoria koettlitzii* i některé vzácnější heterocytózní druhy sinic, jako je *Nodularia quadrata* (Prošek et al., 2013).

Společenstva sinic vznikají i v trvale zmrzlých jezerech. V období, kdy led není pokryt sněhovou pokrývkou, světlo proniká až na dno jezer a sinice tak mohou fotosyntetizovat, a produkovat tak dostatečné množství kyslíku (Prošek et al., 2013).

Na dně těchto jezer se vyvíjejí silné vrstvy sinice *Leptolyngbya antarctica* s několika málo přimíšenými druhy (*Pseudanabaena frigida*, *Nostoc antarcticus*) a tvoří zde kónické, vzpřímené útvary, složené ze svazků vláken dominantní sinice (Prošek et al., 2013).

6.2.3 Efemerní biotopy

Velmi zajímavým biotopem jsou efemerní toky a louže či mělká jezírka neboli periodické potůčky a louže či mělká jezírka, vytékající především z ledovců. Efemerním biotopem je myšlen takový biotop, který periodicky mění svůj charakter. V tomto konkrétním případě je charakterem myšleno skupenství, ve kterém se zde vyskytuje voda (střídá se skupenství kapalné se skupenstvím pevným). Společenstva sinic a řas jsou zde velmi pestrá. Jejich druhové složení a celková biomasa se mění v závislosti na množství vody, které se mění v průběhu dne i období. Dalšími faktory, které ovlivňují tamější život, jsou například teplota vody, množství rozpuštěných látek nebo typ substrátu (Prošek, et al. 2013).

Efemerní toky jsou tekoucí pouze v době antarktického léta. Jakmile přijde chladnější perioda a teplota je nižší než 0°C, toky zamrzají. Pokud je tok dostatečně dlouhý, může se u něj objevit i zonální rozdělení tohoto biotopu. Efemerní toky bývají často rozdělené nejen prostorově, ale také časově. Na začátku vegetačního období se nejvíce daří rozsivkám, avšak postupně se do dominantních pozic dostávají některé druhy sinic a jiných řas (Komárek, et al. 2008).

Typickými druhy v rychle tekoucích úsecích potoků jsou řasy rodu *Klebsormidium*, sinice *Chamaesiphon austro-polonicus*, *Leptolyngbya fritschiana*

nebo kosmopolitní *Phormidium autumnale*. V dolních úsecích potoků se na kamenech vyskytuje sinice *Phormidesmis priestleyi*, která tvoří charakteristické oranžové povlaky (Prošek, et al. 2013).

6.3 Neviditelný nepřítel

Je známo, že vrstva ozonu ve stratosféře absorbuje UV záření škodlivé pro organismy naší planety. Nad Antarktidou ale vznikla tzv. ozonová anomálie. Koncentrace ozonu je zde o 30% až 70% nižší, než by měla být. Tato anomálie však nezůstává nad Antarktidou po celou dobu, má totiž periodický a stabilní pohyb, ale Antarktida je jí nejvíce postižená. UV záření dělíme na tři typy (UV-A, UV-B, UV-C). UV-C by mělo fatální dopad na živé organismy, naštěstí je zcela absorbováno v atmosféře. UV-A sice proniká až k povrchu Země, ale je neškodné. Problém nastává až se zářením UV-B. Kvůli ozonové anomálii se zemskému povrchu dostane větší množství tohoto nebezpečného záření, což může mít do budoucna neblahý vliv na biocenózu jižního pólu. Nebezpečí UV-B záření spočívá hlavně v tom, že dokáže ničit organické látky včetně bílkovin. Ani většina vodních mikroorganismů se těmto negativním vlivům nevyhne. Dokáže proniknout i do několika desítek metrů a ničit tak i například rybí jikry, což může mít vliv na celý potravní řetězec (Prošek, et al. 2013).

UV-B záření má negativní vliv již na jednobuněčné organismy, u nichž poškozují nebo zcela ničí molekuly přenášející v buněčných jádrech genetickou informaci, poškozují buněčné organely a mění v buňkách osmotický tlak (Prošek, et al. 2013).

UV záření má svůj primární smrtící účinek při vlnových délkách 260 nanometrů a vytváří kovalentní vazby mezi sousedními thyminy v DNA. Tyto thyminové dimery následně způsobují chyby v replikaci DNA, které způsobují potenciálně smrtící mutace (Andersen, 2005).

6.4 Dva teplotní gradienty

Ačkoli by nejspíše mohlo být předpokládáno, že je Antarktida vždy a stále ledová, není tomu tak. Dalo by se říct, že z pohledu teploty jsou zde rozlišovány dva základní typy prostředí. Tím prvním typem je prostředí se stále nízkou teplotou. Nedochozí zde k náhlým výkyvům teploty, jedná se o stabilně studené prostředí. Takové stanoviště lze nalézt například ve sněhu nebo v ledovcích. Dále by mohlo jít o stále zamrzlá jezera. Organismy, kterým vyhovuje tento typ prostředí, označujeme jako psychrofilní. Většinou potřebují ke svému růstu teploty nižší než 0°C. Některé druhy lokálních rozsivek jsou schopny růstu jen ve velmi malém teplotním rozmezí

(od -3°C do 3°C). Pokud by se například během vegetačního období rapidně zvedla teplota, mělo by to na tyto organismy devastující účinky. Druhým typem prostředí jsou stanoviště, kde dochází k velkým periodickým teplotním rozdílům. Teploty se zde mění v průběhu roku, ale může jít i o teplotní změny v řádu dne. V zimních obdobích zde mohou být teploty až -50°C , zatímco v obdobích letních se teplota může vyšplhat až na neuvěřitelných 20°C . Podobné, i když ne tolik extrémní rozdíly v teplotách, mohou nastávat i v průběhu jediného dne. Příkladem takového stanoviště může být mělký mokřad či skála s výskytem endolitických řas a sinic (žijí v pórech hornin). Organismy, kterým takové extrémní kolísání teplot vyhovuje, nazývají organismy psychrotrofními (Prošek, et al. 2013).

7 Stres

Buňky řas i sinic nebo jejich orgány mohou být silně negativně ovlivněny okolními podmínkami. Stresových podmínek na Antarktidě není málo a v některých případech mohou být smrtelné. Často se stává, že jeden abiotický stres je doprovázen jiným. V této kapitole budou tyto stesy odděleny a charakterizovány (Jimel, 2020).

7.1 Mrazový stres

K tomuto stresu dochází, jakmile je okolní teplota menší než 0°C . Jako jeden z efektů tohoto jevu zde vystupuje nedostatek vody v kapalném skupenství. Mráz s sebou ale přináší ještě jiná úskalí. Dochází k tvorbě ledových krystalů v blízkosti mikroorganismů, nebo dokonce v jejich tělech, což může mít smrtící účinky (Jimel, 2020).

7.2 Stres z vysychání

Pokud se mikroorganismus nachází na místě, kde dlouhodobě není přítomná voda v kapalném skupenství, může to mít bez potřebných adaptací fatální dopad na jeho životaschopnost. Voda je základní předpoklad pro život. Není tedy divu, že ani většina biochemických reakcí nutných k životu buněk, neproběhne bez přítomnosti vody. Jednou z nejúčinnějších metod, jak se tomuto stresu mikroorganismy naučily bránit, je tvorba slizu, jehož hlavní funkcí je udržet vlhkost v blízkosti buňky (Jimel, 2020).

7.3 Osmotický stres

Tento stres je většinou podmíněn mrazovým stresem, neboť tam, kde se vyskytují a vznikají krystalky ledu, dochází ke změně osmolarity. V důsledku zvýšení nebo snížení osmolarity v okolí buněk dochází většinou k odčerpávání vody z buněk do okolního prostředí. Osmotickou nerovnováhu může způsobit také solný stres.

Hromadění solí v buňce způsobuje iontovou nerovnováhu a buňka tak často přijímá ještě další ionty z okolí (Jimel, 2020).

8 Jak se vyhnout stresu

Ačkoli si řasy i sinice vyvinuly mnoho strategií, jak odolat stresovým podmínkám, zůstává nejlepší strategií vyhnout se stresu úplně. Mnoho těchto mikroorganismů má za různých podmínek různé morfologické vlastnosti. Některé z nich slouží k dormanci, což je velice efektivní způsob, jak se vyhnout stresu (Jimel, 2020).

8.1 Diapauza vs. klidový stav

Diapauza i klidový stav popisují děje, během kterých dojde ke snížení metabolických i růstových procesů. Nejedná se však o synonyma. Zatímco diapauza je řízena endogenními procesy (podmíněno vnitřními faktory), klidový stav je řízen procesy exogenními (podmíněno vnějšími faktory). Dalším důležitým rozdílem je to, že klidové stádium se může velmi rychle po odeznění nepříznivých podmínek navrátit do původního stavu. U diapauzy se obvykle do původního stavu organismus dostane se zpožděním. U obou těchto dormativních procesů dochází často k morfologické změně mikroorganismů, ale není to podmínkou. Častěji k těmto změnám dochází během klidového stavu než u diapauzy (Jimel, 2020).

8.2 Akinety

Pokud se sinice dostane do dormativní fáze, často vznikají v řetězci heterocytů i speciální buňky zvané akinety (u řas zastupují funkci akinet různé typy spor charakteristické pro danou skupinu, například zygospory či aplanospory). Akineta neboli arthrospora má několikanásobně tlustší buněčnou stěnu než vegetativní buňka nebo heterocyty a má v sobě nahromaděné velké množství zásobních látek. Bývají z pravidla viditelně větší a průhledné. Při přechodu do tohoto stavu dochází hned k několika procesům. Jedním z nich je, že se mnohé mikroorganismy zkracují a nabírají na hmotnosti. Dále dochází k úbytku chlorofylu a reprodukční schopnosti jsou omezeny na minimum. Tvorba akinet je samozřejmě něčím podmíněna. Může se jednat o dlouhodobý nedostatek světla, vody, síranů či dusičnanů nebo naopak o přítomnost fosfátů. Jelikož je tvorba akinet energeticky velmi náročná, vyskytuje se jen u některých rodů a tříd polárních sinic (například *Nostoc sp.*) (Jimel, 2020).

8.3 Hormogonium

Hormogonia jsou typická pro sinice, řasy je nevytvářejí. Jedná se o vlákna, která se od mateřských buněk oddělují fragmentací. To podporuje nejen přežití, ale také

kolonizaci nových území. Další odlišností je to, že se u nich neprojevuje diferenciaci buněk. Tvorba hormogonií je nejspíše podmíněna absencí živin nebo světla v okolí mikroorganismů. Může se však jednat i o jiné faktory, které nyní nejsou známy (Jimel, 2020).

8.4 Záchranná reakce řas – množení

Některé druhy řas produkují asexuálním rozmnožením různé typy spor (například aplanospor nebo partenospor). Tyto typy buněk jsou odolné vůči nepříznivým prostředím a dokážou se šířit do okolí pomocí vodních proudů (v případě, že byly produkovány ve vodě) nebo pomocí větru (v suchých podmínkách). Tímto způsobem se některé organismy množí během stresových podmínek, aby zajistily přežití populace (Jimel, 2020).

9 Adaptace

Ačkoli mezi adaptace polárních sinic a řas na nepříznivé podmínky jistě patří tvorba hormogonií, akinet nebo množení a následný rozptyl (viz předchozí kapitola), tato kapitola bude zaměřena pouze na produkci protektantů. Tvorba protektantů může být odlišena od ostatních obranných mechanismů, jelikož se jedná o velmi odlišnou adaptaci a strategii. U mechanismů popsanych v předchozí kapitole se jedná především o vyvolání pasivních stavů či rozptyl. U využití protektantů jde o syntézu látek, které zajistí následný aktivní chod organismů. Dále budou specifitěji popsány adaptace na konkrétní stresy.

9.1 Protektanty

Některé adaptace řas a sinic nejsou natolik specifické, aby bylo možno určit konkrétní stres, kvůli kterému vznikly. Tyto obecné adaptace vznikly spíše jako odpověď na různé kombinace negativních vlivů okolí. Obecně by se dalo říct, že takřka všechny druhy polárních řas a sinic produkují na obranu proti stresu různé látky, které souhrnně nazýváme kryoprotektanty a osmoprotektanty. Tyto látky zvyšují šance na přežití nejrůznějšími způsoby. Od schopnosti hromadit v buňkách živiny až po zabránění tvorby intracelulárního ledu. Patří sem široká škála látek, jako jsou například sacharidy, antioxidanty, aminokyseliny nebo polyalkoholy. Některé skupiny, konkrétní látky i jejich funkce budou nyní popsány blíže (Jimel, 2020).

9.1.1 Sacharidy

Mnohé řasy a sinice využívají především trehalózu a sacharózu. Tyto sacharidy jsou řazeny do skupiny neredukujících disacharidů. Trehalóza se skládá ze dvou molekul glukózy, sacharóza z jedné molekuly glukózy a jedné molekuly fruktózy.

Nejzásadnější funkcí těchto disacharidů v tělech řas a sinic je nedopustit destabilizaci membrán nebo proteinů. K destabilizaci by mohlo dojít za nejrůznějších podmínek (například během osmotického stresu). Trehalóza se dokonce uplatnila jako aparát chránící DNA. Dle některých odborníků patří tyto dva disacharidy k těm vůbec energeticky nejnáročnějším na syntézu. K jejich syntéze je potřeba asi 109 molekul adenosintrifosfátu, které se přemění na adenosindifosfát (tato přeměna je zdroj energie) (Jimel, 2020).

9.1.2 Polyalkoholy

Polyalkoholy se vyskytují především v řasách, ale nechybí ani u některých sinic. Do skupiny polyalkoholů mohou být zařazeny látky jako glycerol, sorbitol, mannitol nebo inositol. Jejich hromadění v buňkách způsobuje stabilizaci osmotického tlaku (snižují ho). Také udržují vodu a snižují bod tuhnutí v buňkách. V červených řasách se často jako osmoprotektanty vyskytují 2- α -O-D-galactopyranosil glycerol. Ten svou funkcí připomíná glukosylglycerol využívaný sinicemi. Červené řasy si vytváří 2- α -O-D-galactopyranosil glycerol biosyntézou pomocí fotosyntézy. Stejným způsobem si hnědé řasy vytváří mannitol. Mannitol funguje také jako antioxidant (Jimel, 2020).

9.1.3 Antioxidanty

Jedná se o látky, které eliminují negativní vliv volných kyslíkových radikálů. Brání jejich vzniku nebo způsobí, že vzniklý radikál bude málo reaktivní či nereaktivní. Tyto radikály mohou být v malých koncentracích prospěšné, ale je-li jich příliš mnoho, fungují toxicky. Mohou narušovat tkáň, DNA, proteiny nebo lipidy a být tak smrtící. Tvorba těchto volných kyslíkových radikálů je podmíněna více faktory. Jedním z nich je abiotický stres, dále třeba ionizující nebo kosmické záření. Tudíž se dá říct, že pro řasy i sinice bylo v podstatě nutností přijít s efektivní obranou – s antioxidanty. Ty by mohly být rozděleny do dvou hlavních skupin. Enzymatické antioxidanty a neenzymatické antioxidanty. Enzymatické antioxidanty využívají proteinových enzymů, jako jsou peroxidáza, superoxiddismutáza nebo kataláza. Neenzymatické antioxidanty využívají neproteinové molekuly, jako jsou karotenoidy, tokoferoly, fenolové sloučeniny nebo fykobiliproteiny. Zvýšení množství volných radikálů kyslíku způsobí oxidativní stres (Jimel, 2020).

9.1.4 DMSP a DMSO

Mezi kryoprotektanty mohou být zařazeny také některé sloučeniny síry. Patří sem zejména dimethylsulfoniopropionát (DMSP) a dimethylsulfoxid (DMSO). DMSP může být nalezeno u některých řas a ve výjimečných případech i u sinic. Tato síranová organická sloučenina stimuluje produkci některých enzymů a udržuje jejich funkčnost.

DMSO na rozdíl od DMSP funguje extracelulárně. Některé studie přišly s informací, že vytváří vodíkové vazby s molekulami vody, a brání tak vzniku extracelulárního ledu. Nutno podotknout, že ve vysokých koncentracích může být pro mikroorganismy toxický (Jimel, 2020).

9.1.5 Chaperony

Chaperony jsou proteiny, jejichž hlavní funkce je opravovat struktury proteinů, které nejsou přirozené. Také brání jejich agregaci, která by opět způsobila nefunkčnost proteinů. K aktivaci těchto speciálních proteinů funguje výrazná změna teploty nebo osmotického tlaku. Mezi nejznámější chaperony se řadí heat shock proteiny. Tyto proteiny byly nalezeny u mnohých polárních řas, ale u sinic doposud ne (Jimel, 2020).

9.2 Adaptace na nízké teploty

Nízké teploty zůstávají v polárních oblastech primárním zdrojem stresu. Tamější organismy se s touto nepřízní snaží vypořádat především produkcí aminokyselin, proteinů či enzymů. Tyto látky způsobují změny ve fyzikálních a chemických vlastnostech buněk nebo jejich těsném okolí, díky kterým mohou dále přežít.

9.2.1 Nejběžnější mechanismy

Obecně platí, že veškeré organismy žijící v polárních oblastech musejí být dobře adaptovány na extrémně nízké teploty. Některé organismy tyto nízké teploty pro svůj život přímo vyžadují. Zajímavou adaptací je například produkce aminokyselin, jako je například prolin. Tuto adaptaci si vyvinuly některé druhy řas. Za velmi nízkých teplot zvyšují produkci prolinu několikanásobně. Prolin pak změní vnitřní prostředí buňky. Konkrétně změní bod mrazu uvnitř buňky z 0°C až na -20°C (Stürmer, 2007).

Vedle aminokyselin se také uplatňují nasycené mastné kyseliny. Větší koncentrace těchto kyselin mohou bránit tuhnutí v buňce. Dále dochází ke snížení metabolických a fyziologických dějů (Prošek, et al. 2013).

9.2.2 Adsorpčně-inhibiční hypotéza

V oblastech, kde je teplota často pod bodem mrazu, je možno setkat se s jevem zvaným krystalizace uvnitř buněk. V praxi to znamená změnu v krystalické struktuře, v tomto případě ve struktuře ledu. Tento jev způsobuje změny v osmotickém tlaku a může změnit strukturu buněk. To může mít ničivé účinky. Některé organismy si proto vyvinuly zajímavou metodu, jak této nepříjemné situaci předejít. Využívají tzv. ice-binding proteiny. Tyto proteiny brání krystalizaci ledu. Jsou adsorbovány na povrchu ledových krystalů a zamezují tak přítoku další vody. To inhibuje další růst těchto krystalů a vnitřní prostředí buňky je tak stabilizováno. Tento jev byl pozorován

například u řas z řádu *Chlamydomonadales*, také u některých rozsivek (například *Navicula glaciei*) nebo u bakterií rodu *Colwellia*. Vyskytují se ale i u hub, protist, a dokonce i živočichů (Jimel, 2020).

9.2.3 Plazmatická membrána – jak zůstat naživu

Bez funkčnosti plazmatických membrán by asi žádné buňky nemohly dále fungovat. Jejich hlavním úkolem je rozdělování dvou odlišných prostředí uvnitř buněk a vně buňky. Zároveň slouží k výměně látek mezi těmito prostředími. Podílejí se také na fotosyntéze či dýchání. Jejich funkčnost může být však narušena různými stresy, a proto se musely mikroorganismy této nepříjemné situaci přizpůsobit (Jimel, 2020).

9.2.3.1 Propustnost membrány

Ohledně propustnosti membrány hraje velmi důležitou roli poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin. Nenasycené mastné kyseliny v lipidové dvojvrstvě mají mezi sebou dvojnou vazbu. To znamená, že je energeticky náročnější tuto vazbu roztrhnout, než je tomu u nasycených mastných kyselin (ty jsou totiž propojeny slabší jednoduchou vazbou). Roztrhnutí vazby způsobí to, že je transport mezi vnějším a vnitřním prostředím snadnější. Jelikož energie, využívaná k roztrhnutí těchto vazeb je často energie tepelná, existuje vztah mezi poměrem těchto kyselin a okolní teplotou. Čím, větší je okolní teplota, tím snadnější je roztrhnutí těchto vazeb. Zároveň platí, že čím více se v lipidové dvojvrstvě objevuje nenasycených mastných kyselin, tím více je třeba dodat energie pro její narušení (Muranushi et al., 1981). Aby nedošlo k nedostatečné propustnosti vody a živin do buňky, tak mnohé řasy a sinice využívají akvaporiny. Jedná se o proteiny, které udržují stabilní propustnost. Díky tomu mohou buňky dále korigovat přísun iontů a udržovat si tak stabilní vnitřní prostředí. Sinice a řasy jsou také dle potřeby schopny aktivně měnit poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin využitím enzymu desaturázy. Jeho funkce bude podrobněji popsána v následující kapitole (Jimel, 2020).

9.2.3.2 Stabilizace viskozity

Jelikož teplota okolí má velký vliv na viskozitu, jsou mikroorganismy nuceny tyto změny kompenzovat. To zařizují změnou ve struktuře a složení lipidové dvojvrstvy. Tato dvojvrstva se skládá z lipidů a z proteinů. U mikroorganismů se v největších koncentracích vyskytují glycerol-acylové lipidy. Ty se často vážou na aminy nebo alkoholy, které mají velký vliv na vlastnosti membrán. Jejich poměr a prostorové rozmístění určuje, jak moc se bude viskozita měnit. Pokud by se tento poměr a struktura nezměnily, mohlo by dojít ke ztrátě funkčnosti membrán. Některé látky by nemusely být schopny projít skrze membránu, a to by bylo fatální. Změnit

tekutost se dá ale více způsoby. Dalším velmi častým způsobem je využití enzymu desaturázy, který katalyzuje proces zvaný desaturace. Desaturáza je schopna změnit stupeň nasycení mastných kyselin. Jejím hlavním úkolem je přenést dva atomy vodíku z mastné kyseliny na molekulu kyslíku. Tímto procesem vznikne molekula vody a mastná kyselina s dvojitou vazbou. Jedná se o další autoregulační mechanismus, jehož výsledkem je zvýšení viskozity v buňce. Mnohé sinice využívají ke stabilizaci viskozity organické molekuly zvané hopanoidy. Ty se vážou na hydrofilní část fosfolipidů, což vede ke snížení jejich mobility a ke zvýšení viskozity (Jimel, 2020).

9.2.4 Důležité skupiny proteinů

Jako velmi důležité proteiny v souvislosti přežití nízkých teplot se jeví tzv. cold shock proteins (CSPs) a cold acclimation proteins (CAPs). Tyto proteiny jsou produkovány spíše řasami než sinicemi. Obě tyto skupiny proteinů fungují velmi podobně a to tak, že se vážou na nukleové kyseliny a podporují tak transkripci, translaci nebo produkci bílkovin. Také podporují buněčný růst. Hlavním rozdílem mezi těmito proteiny je ten, že CSPs jsou produkovány během náhlého poklesu teploty, zatímco CAPs jsou produkovány kontinuálně (Jimel, 2020).

9.3 Adaptace na nedostatek vody

Organismy žijící na Antarktidě se musejí vypořádat s další nepříjemnou vlastností těchto končin. Jedná se o dlouhodobý nedostatek kapalné vody. Nejen že je zamezen přísun vody, ale také voda uvnitř buněk organismů se vytrácí – za to může vymrzání a výpar. Díky schopnosti místních organismů přežít tyto podmínky je řadíme mezi poikilohydrické organismy. Klíčem k přežití ovšem není pouze vydržet živý během stresového období s nedostatkem vody, nýbrž také maximalizovat schopnost využít období příznivé. Je logické, že za nepříznivých podmínek se organismus snaží být v klidovém stádiu a neplýtvat tak energií, tudíž i růst je pozastaven. V momentě, kdy se okolní podmínky mění a objeví se kapalná voda, tak se mění i chování místních organismů. Po zvlhčení nastartují své metabolické funkce a vše se rázem probouzí k životu (Prošek, et al. 2013).

9.3.1 Využití osmoprotektantů a kryoprotektantů

Mezi látky, které pomáhají mikroorganismům přežít období s nedostatkem vody, řadíme i některé kryoprotektanty a osmoprotektanty. Mezi tyto protektanty lze zařadit některé aminokyseliny a jejich deriváty, cukry, sulfátové estery, peptidy, terciární sulfoniové sloučeniny nebo N-acetylované aminokyseliny. Řasy obsahují větší diverzitu těchto látek než sinice. Sinice obsahují především glukosylglycerol,

prolin, sacharózu nebo trehalózu. Nejvíce odolné proti nízkým teplotám jsou organismy, které obsahují glycerol (Jimel, 2020).

9.3.2 LEA proteiny

Během stresového období pomáhá chránit řasy a sinice také rozmanitá rodina proteinů, tzv. LEA proteiny (Late Embryogenesis Abundant). Přesný český ekvivalent pro termín „LEA“ není, ale dal by se přeložit jako „hojné pozdně embryonální proteiny“. Hlavním úkolem LEA proteinů je podpořit funkce enzymů během stresového období z nedostatku vody. Jedním z takových enzymů je citrátsyntáza, která je důležitá pro funkčnost Krebsova cyklu. Bez něj by buňka nemohla přežít. LEA proteiny nemají společnou strukturu, a tak jsou kategorizovány do několika skupin, které sdílejí podobnou kódovací sekvenci. Zpravidla jsou však tyto proteiny hydrofilní a obsahují většinou polární aminokyseliny (některé LEA proteiny však obsahují nepolární aminokyseliny) (Jimel, 2020).

9.3.3 Produkce slizu

Řada mikroorganismů, včetně mnohých antarktických řas a sinic si vyvinula schopnost produkovat sliz. Pro tvorbu tohoto slizu využívají exopolymerní látky (EPS), které jsou řazeny mezi organické ligandy. Sliz se v některých případech zachytí z venku na buněčné stěně a vzniká tak slizová pochva. V jiných případech je volně produkován do okolí buňky. Hlavní funkcí tohoto slizu je udržování vlhkosti v těsné blízkosti buňky. Jinou, neméně důležitou funkcí je, že sliz brání tvorbě intracelulárního ledu. Také je známo, že napomáhá přichycení k sedimentu (Jimel, 2020).

Exopolymerní látky (EPS), které jsou využívány polárními řasami a sinicemi, jsou takřka vždy amfifilní (molekula má dvě části, které mají protichůdný charakter). Znamená to, že část je hydrofilní (za to je zodpovědná kyselina uronová) a část hydrofobní (tato část je většinou tvořena rhamnózou či fukózou). Díky tomu dokážou přilnout k sedimentu a neodlepit se a zároveň akumulovat potřebné množství vody a minerálních látek v buňce. Rhamnóza, fukóza a kyselina uronová se v EPS vyskytují takřka vždy. Další látky, které se v EPS dají často objevit, jsou glukóza, galaktóza, xylóza, ribóza, arabinóza či kyselina glukuronová (Jimel, 2020).

Dále bylo potvrzeno, že při dlouhodobém vysychání jsou mikroorganismy více zatíženy působením UV-B zářením. Na to reagují například zvýšenou produkcí EPS, a to až trojnásobně (Jimel, 2020).

9.4 Adaptace na nedostatek světla

Některé druhy řas žijí pod povrchem, pod povrchem půdy, v hloubkách nebo v ledu. Mohou se nacházet i v hloubce několik desítek centimetrů. To by se mohlo na první pohled zdát jako problém, jelikož množství světla, které k nim je schopno proniknout s hloubkou, klesá. K tomu všemu je led většinou pokryt sněhovou pokrývkou a sníh světlo odráží. Řasy vyřešily tuto nepříznivou situaci tak, že za nedostatku světla zvyšují množství chlorofylu v buňce. Díky tomu zachytí větší množství světla. Další adaptací na zisk světla v těchto nepříznivých podmínkách je vylučování sloučenin, které dokážou měnit vlastnosti okolního ledu. Tyto sloučeniny (například glycerol nebo DMSO) změni optické vlastnosti ledových krystalů v těsné blízkosti řas. U krystalů dojde ke zdrsnění povrchu, a tak dojde k většímu rozptylu světla (Stürmer, 2007).

9.5 Adaptace pro život na skalách

Některé druhy řas a sinic, ale samozřejmě také druhy mikroskopických hub či bakterií si pro svůj životní biotop vybraly skalní výchozy. Konkrétně jsou tím myšleny dutiny nebo póry hornin, ze kterých se skála skládá. Výhodou takových míst je to, že absorbují sluneční záření a zvyšují tak svou teplotu, což umožní tání okolní ledové krusty. Díky tomuto jednoduchému mechanismu dojde ke zvlhčení míst osídlených mikroorganismy i během teplot pod bodem mrazu. Organismy, které využívají takovýto způsob života, označujeme jako endolitické (Prošek, et al. 2013).

*„Ke zvláště pozoruhodným zástupcům těchto endolitických organismů patří sinice rodu *Chroococcidiopsis*, které několik milimetrů pod povrchem pískovcových skal vytvářejí souvislou modrozelenou vrstvu“ (Prošek, et al. 2013).*

Jiným skalním biotopem jsou periodicky smáčené skalní stěny. Voda, která tyto stěny smáčí, je ledovcového původu. Její teplota z pravidla nedosahuje ani 4°C a při kontaktu se skálou může rychle zamrznat. Pokud tato situace nastane, okolní podmínky se velmi rychle mění a sinice či řasy jsou nuceny reagovat. Typickou reakcí na prudký pokles okolní teploty je přechod do klidových stádií. V momentě, kdy se teplota opět zvedne, dochází k přechodu do stádia aktivní fotosyntézy (Prošek, et al. 2013).

„Je zajímavé, že z typických endemických druhů těchto biocenóz patří většina k složitějším, heterocytózním typům, u kterých je tentýž druh schopen vytvářet několik rozdílných typů buněk“ (Prošek, et al. 2013).

9.6 Adaptace na osmotický stres

Osmotický stres je způsobený rozdílným množstvím vody, anorganických solí a organických látek mezi vnitřním a vnějším prostředím buňky. Tento rozdíl se snaží mikroorganismy kompenzovat produkcí osmoprotektantů, které stabilizují tyto rozdíly. Děje se tak především akumulací živin z vnějšího prostředí a následnému zabránění poškození proteinů nutných k přežití (Jimel, 2020).

„Řasy a sinice se brání osmotickému stresu především aminokyselinami. Mezi tyto aminokyseliny patří prolin, alanin, glycin a glutamát, široce známé pro svou akumulaci v řasách a tato akumulace tenduje k pozitivní korelaci s odolností proti osmotickému stresu. Prolin se zdá být nejrozšířenější aminokyselinou působící jako osmolyt, je považován za přítomný zejména v některých řasách (například v mnohých rozsivkách). Zajímavé je, že je také vzácným příkladem osmolytu, který je dále metabolicky aktivní. Jeho význam překračuje jeho funkci jako osmolytu - je také schopen stabilizovat DNA a zlepšit integritu membrán a enzymů, což je ohroženo v silně slaném prostředí“ (Jimel, 2020).

10 Laboratorní studium sinic a řas – příprava laboratorních podmínek

Sterilizace používaných materiálů a kultivačních médií je nezbytná pro úspěch jak izolace, tak kultivace jednotlivých mikroorganismů. Bez tohoto opatření by mohlo dojít k řadě komplikací a výzkum by skončil neúspěchem. Aby se vědci vyvarovali těchto situací, využívají různé přístroje a pomůcky, které budou nyní blíže popsány.

10.1 Autoklávování a mikrovlnná trouba

Autokláv je přístroj, ve kterém je vysoký tlak páry, který sterilizuje materiály odolné vůči vysoké teplotě. Teplota uvnitř autoklávu je okolo 120°C. Délku autoklávování předurčuje to, jaký materiál je potřeba sterilizovat a kolik ho je. Někdy stačí pár desítek minut, jindy hodiny. Pokud jsou dodržovány předem stanovené pokyny, je autokláv schopen zničit i plísně a jejich spory. U sterilizace kapalin je nutno ponechat zhruba jednu čtvrtinu celkového objemu nádoby prázdnou. To kvůli případnému probublávání a výparu. Víko autoklávu by také nemělo být úplně utažené. Je to opatření, které v případě nárůstu tlaku zamezí roztrhnutí přístroje. Po dokončení procesu je nutné počkat, až klesne vnitřní teplota pod 100°C. Teprve poté může být autokláv otevřen. Materiály bývají po autoklávování vlhké, a je proto důležité nechat je usušit. To se provádí přenosem do sušárny, kde je pro schnutí vhodná teplota zhruba

150°C. Autoklávování patří mezi vůbec nejoblíbenější a nejefektivnější metody sterilizace (Andersen, 2005).

Sterilizace pomocí mikrovlnné trouby je podstatně rychlejší, než metoda sterilizace za sucha a tepla. Již v roce 1988 byla zveřejněna vědecká práce, ze které vyplývalo, že veškeré mikroorganismy jsou usmrceny do 10 minut. Dnes se často používá přerušovaná technika „2-1-2“. To znamená, že materiál určený ke sterilizaci je vložen do mikrovlnné trouby nejprve na 2 minuty, pak na minutu, a nakonec ještě jednou na 2 minuty. Intervalová pauza mezi jednotlivými etapami je standardně 30 minut. Výkon trouby by měl být kolem 600w. Pro zmaximalizování efektivity je dobré, když je trouba vybavena otočným stolcem, na který materiál položíme (Andersen, 2005).

Obě tyto metody se jeví jako vysoce praktické pro sterilizaci kultivačních médií. V případě, že je objem tohoto média do 1.5 litru, bývá ke sterilizaci využita mikrovlnná trouba. Pro větší objemy se zpravidla využívá autoklávování. Pokud by se po celém procesu objevily například sraženiny nebo by se barva média změnila, nemusí být médium již vhodné pro další kultivaci (Andersen, 2005).

10.2 Jiné možnosti sterilizace

Vedle sterilizace autoklávováním nebo mikrovlnnou troubou existuje řada dalších technik, které se běžně užívají. Různé metody mají různé výhody a nevýhody, proto je nutné rozmyslet si která je pro konkrétní účel nejvhodnější. Odlišnosti jsou především v délce sterilizačního procesu či účinnosti sterilizace. Také se rozhoduje podle typu a množství látek, které mají být sterilizovány.

10.2.1 Sterilizace za sucha a tepla

Pro tuto metodu se používá především horkovzdušná trouba. Tato metoda dokáže odstranit zbytky nežádoucích látek, které by mohly na nádobách či pipetách zůstat, například po autoklávování. Je účinnější než autoklávování, jelikož zahřívání trvá delší dobu a je dosaženo vyšších teplot. Ve většině případů stačí zahřátí na 150°C, ovšem není tomu tak vždy. Někdy je nutné teplotu zvýšit až na 250°C. Zpravidla je sterilizovaný materiál ponechán těmto teplotám po dobu 3 až 5 hodin. Aby nedocházelo k poškození sterilizovaných materiálů, měly by být v troubě kryty například hliníkovou folií. Další podmínkou je, že materiál musí být suchý. Po několikahodinovém působení trouby na materiál nesmí být materiál rovnou vyzvednut. Je nezbytné, aby teplota uvnitř trouby klesla alespoň na 60°C. Pokud by byla trouba otevřena během vyšších teplot, mohl by být materiál poškozen rychlou a

příliš razantní změnou teploty. Ještě je třeba si uvědomit, že ne každá horkovzdušná trouba je vybavena ventilátorem. Pokud ventilátor chybí, může dojít k nerovnoměrně rozloženým teplotám uvnitř trouby. Místa, kde teplota dosahuje větších teplot, než jsou ty požadované, mohou mít fatální dopad na materiál (Andersen, 2005).

10.2.2 Filtrace

Filtrace je využívána u sterilizace materiálů, které jsou teplotně nestabilní. To mohou být těkavé složky v kapalinách (například organické sloučeniny) nebo vitamíny. Tato metoda je velmi rychlá v případě, že sterilizovaný materiál bude v malém množství. Proto se často využívá u sterilizace kultivačního média. Velikost oček ve filtrech by měla být menší než 0.2 mm. Přesto se může stát, že filtr nezachytí některé mikroorganismy, především viry. Ovšem i někteří bičíkovci jsou schopni filtry projít. Dokážou se protlačit i otvorem menším, než jsou oni sami. V případě, že by byl materiál silně viskózní nebo obsahoval suspendované částice, musí dojít k předfiltraci. Ta se provádí za použití membránového filtru s očky s průměrem 1 mm. Tyto membránové filtry pak mohou být sterilizovány v autoklávu. Filtry existují jednorázové i na opakované použití. Mezi nejčastěji používané materiály, ze kterých se filtrační zařízení skládá, patří sklo. Takovýto přístroj musí být po každém použití sterilizován. Opět bude využito autoklávování. Nicméně filtr je nutné zabalit do hliníkové folie. Po autoklávování je třeba sterilizovaný materiál nechat vysušit v sušárně za teploty 120°C (Andersen, 2005).

10.2.3 Sterilizace ultrafialovým zářením

Sterilizace za využití ultrafialového záření se využívá často pro sterilizaci kultivačních nádob nebo stolů. Je třeba brát v úvahu, že během vyzařování UV záření je vytvářen ozon, který někteří lidé snášejí těžce. Proto je dobré zamyslet se, jestli je tato metoda pro konkrétního jedince vhodná. Jelikož je UV záření škodlivé živým organismům, musí být pověřená osoba dobře chráněna před jeho vlivy. Nežádoucím účinkům se dá zabránit dodržováním jistých norem. Mezi tyto normy patří například použití ochranného oděvu, brýlí nebo rukavic. Dále je třeba minimalizovat čas vystavení se záření nebo použití ochranného skla či folie. Vlnová délka UV lamp, které se ke sterilizaci používají, bývá 240 až 280 nanometrů (nejničivější účinky UV záření z celého jeho spektra). Energie, kterou žárovky produkují, se může velmi lišit podle toho, co je předmětem sterilizace. Pro sterilizaci vody se používají vysokoenergetické žárovky s energetickou vydatností až 50 000 mikrowatt sekund na centimetr čtvereční. Pokud by množství vody bylo velké, je nutno zařídit promíchávání vody. Záření totiž do vod neproniká rovnoměrně. Se vzdáleností od zdroje účinek klesá a mohlo by dojít k neúplné sterilizaci. Nízkoenergetické žárovky s vydatností běžně 40 až 1000

mikrowatt sekund na centimetr čtvereční, se dají použít například pro sterilizace stolů (Andersen, 2005).

10.3 Sběr materiálu

Je potřeba si uvědomit, že je velký rozdíl mezi izolací již dobře známého a často zkoumaného druhu a mezi izolací druhů méně známých či úplně nových. V případě neznámých druhů se musí pracovat obezřetně a někdy je zapotřebí zapojit i vlastní kreativitu. Pokud je vynaložena snaha izolovat druhy velmi citlivé na změnu prostředí, je dobré odebrat se vzorkem i část jejího biotopu (například mořské sinice či řasy vložíme do nádoby s vodou, ve které se nachází). Sice bude náročnější odebrat konkrétní druh a separovat ho od ostatních, ale alespoň zůstane živý (Andersen, 2005).

Odebrané vzorky také často obsahují drobný zooplankton, který se živí zkoumanými mikroorganismy. Proto je zapotřebí zbavit se těchto malých živočichů pomocí filtrace. K filtraci jsou využívány například planktonní sítě. Průměr jejich oček se může lišit v závislosti na velikosti zooplanktonu a zkoumaným objektem. Je logické, že aby byla filtrace k něčemu platná, je třeba využít planktonní síť s takovými očky, aby zároveň zachytila zooplankton a propustila řasu či sinici (Andersen, 2005).

Při izolaci hraje důležitou roli také čas. Druh od druhu se liší tím, jak dlouho po odběru dokáže přežít. Některé druhy mohou umírat v rámci několika hodin, a proto je důležité je včas separovat a dopřát jim vhodné podmínky pro další přežívání. U některých druhů se může objevit jiný problém. Místo rychlého jednání je potřeba naopak trpělivost. U některých organismů se totiž může na první pohled zdát, že se v odebraném vzorku vůbec nevyskytují, a proto je třeba dodat jim dostatek času na to, aby se rozmnožily. Doba, kterou potřebují ke svému dostatečnému zmnožení, je v rozmezí dní až několika měsíců. Tento čas tráví v inkubátoru s pro ně vhodnými podmínkami (Andersen, 2005).

10.4 Laboratorní experimentální práce

10.4.1 Pracovní vybavení

Během procesu izolace i kultivace je potřeba využít různé přístroje či nástroje, které umožní pracovat a manipulovat s mikroorganismy. Mezi takové přístroje patří mikroskop, pipety, filtry, síta či skleněné a plastové nádoby. Mikroskop umožňuje mnohem bližší pohled na zkoumané objekty. Často se používá zvětšení 80x, ale záleží na tom, s jak velkými objekty se pracuje. Bez správného osvětlení by však vzorek nemohl být studován, proto je nutný také zdroj světla. Jako velmi zajímavý se jeví inverzní mikroskop, který využívá technologii epifluorescenčního osvětlení. Některé

druhy jsou totiž fluorescenční, a proto mohou být snadno objeveny. Co během používání mikroskopu nesmí nikdy chybět, je podložní a krycí sklíčko. Mezi stolek mikroskopu a objektiv je nutné umístit podložní sklíčko, které se zde uchytlí pomocí speciálního držáku. Na podložní sklíčko se umístí vlhký vzorek (na podložní sklíčko se nejprve dá kapka vody a do té se umístí vzorek). Ten je následně přikryt krycím sklíčkem a teprve poté mohou být objekty pozorovány. Ačkoli díky mikroskopu se často podaří objevit to, co je hledáno, neznamená to nutně úspěch. Je totiž potřeba buňku vyjmout ze vzorku, což někdy může být značně obtížné. K tomu se využívají především mikropipety. Dříve se používaly nejčastěji skleněné mikropipety, avšak dnes se stále více místo skla používá jako materiál plast. To platí i pro jiné příslušenství (Andersen, 2005).

V Botanickém ústavu AV ČR v Třeboni mi díky tamějším pracovníkům, bylo umožněno pozorovat celý tento postup. Byl jsem seznámen s některými pracovními pomůckami, a dokonce i se samotným pozorováním antarktických mikroorganismů.

Co se týče sít, existuje několik možných variant. Síta jsou často z nerezové oceli či z nylonu. Velikost ok těchto sít se pohybuje v řádech desetin milimetrů. O něco menší velikost oček k separaci nejmenších objektů mají membránové filtry. Některé tyto filtry využívají organická vlákna, která mohou mít různě velké póry (od 0.01 až po 0.45 mm). Póry o velikosti menší než 0.02 mm jsou dokonce schopny zachytit viry. Druhým typem membránového filtru je tenký polykarbonátový list s kulovitými a nerovnoměrně rozloženými póry. Tento typ filtru je velmi oblíbený k oddělení zkoumaného objektu od ostatních částic a mikroorganismů (Andersen, 2005).

Jak už bylo řečeno, plast začíná být stále více používaným materiálem. Přesto se však stále používají i skleněné pomůcky (například skleněné pipety nebo zkumavky). Mezi výhody pomůcek z plastových materiálů určených k izolaci nebo kultivaci mikroorganismů patří, že se dodávají již sterilizované. Ovšem někdy se může stát, že jsou nějakým způsobem kontaminované, ale to je rarita. Jinou inovací je, že tyto nádoby vyrobené z plastu jsou potaženy růstovými látkami, a usnadňují tak následnou kultivaci. Dnes je možno setkat se například s plastovými zkumavkami, pipetami nebo Petriho miskami (Andersen, 2005).

Veškeré materiály a pomůcky, o kterých se ví, že budou potřeba, by měly být před celým procesem sterilizovány, a připraveny tak k použití. K uchování sterilizovaných pomůcek slouží například speciální skříně, u kterých nehrozí kontakt s prachovými ani jinými částicemi. Nemělo by se však zapomenout sterilizovat i

zdanlivě neškodné předměty, jako jsou například lepící štítky určené k pozdější identifikaci vzorků (Andersen, 2005).

V momentě, kdy je zkoumaný vzorek izolován, je potřeba ho umístit do inkubátoru, který funguje jako růstová komora. Aby mikroorganismus rostl a množil se, potřebuje vhodné podmínky (teplota, světlo, živiny atd.), tudíž je nutné znát nároky zkoumaného mikroorganismu. Jako zdroj světla se často používá studené bílé fluorescenční světlo. Žárovky, ve kterých je žhavá nit, jsou pro tyto účely nevhodné. Dále je nutné dát si pozor na to, zda izolované organismy nepotřebují střídání světla a tmy. Pokud ano, je třeba světlo nastavit na automatické rozsvícení a zhasínání podle toho, kolik hodin jsou v přirozeném prostředí na světle a ve tmě (Andersen, 2005).

10.4.2 Separace organismů

Asi nejběžnějším nástrojem k separaci buněk je Pasteurova pipeta. Nutné je zahřát její špičku plamenem, aby došlo ke sterilizaci a bylo tak možné bezpečně odebrat mikroorganismus. Někteří lidé hrot pipety po zahřátí lehce ohnou malými kleštěmi. To ale nutné není, záleží na tom, zda to pracovníkovi vyhovuje, nebo ne. Výhodou zakřivené pipety je to, že usnadňuje vyjmutí buněk z hlubokých nádob. Aby bylo možno buňku vůbec identifikovat a najít, je samozřejmě celou dobu využíván mikroskop. V momentě, kdy se podaří buňku pipetou získat, je třeba ji vložit do předem připravené sterilní kapky vody. Těchto kapek je třeba připravit několik a umístit je na různá podložní sklička. Zda bude použita voda slaná nebo sladká záleží na druhu, který má být separován. To se dělá z toho důvodu, že se s největší pravděpodobností podařilo vyjmout i nechtěné mikroorganismy. Následně je nutno pokusit se opět separovat jedinou buňku ze sterilní kapky vody a vložit ji do další kapky. Tento proces je opakován, dokud není jisté, že je buňka opravdu jediná zbylá. Teprve poté je možno vložit ji do kultivačního média. Často se stává, že buňka je v důsledku opakované manipulace zničena a celý proces musí být opakován s jinou buňkou (Andersen, 2005).

11 Izolace sinic a řas

Důvodů, proč dochází k izolaci řas a sinic, je hned několik. Cílem není pouze porozumět těmto organismům z hlediska ekologického či fyziologického a rozšířit tak biologické znalosti lidstva, ale také pochopit, jak mohou být využity ku prospěchu lidí. Díky izolaci je možno tyto organismy podrobněji prozkoumat a zjistit, jaké látky obsahují a jak se mohou dále využít. Je známo, že mnoho těchto látek se již dnes využívá v potravinářském, farmaceutickém, kosmetickém nebo energetickém průmyslu (například proteiny, barviva, aminokyseliny atd.). Znalosti o jejich způsobu

života umožňují jejich masovou kultivaci a výrobu nejrůznějších produktů z nich (léčiva, biopaliva, doplňky stravy atd.).

Aby došlo ke správné izolaci řas a sinic, je nutno snažit se co nejvěrohodněji napodobit jejich přirozené životní podmínky. Základními parametry pro napodobení těchto podmínek jsou vlhkost, teplota, salinita, pH, tlak, množství světla nebo množství živin. Z čím extrémnějších stanovišť tyto organismy pocházejí, tím citlivěji reagují na změnu prostředí, ve kterém se nacházejí. Také je důležité si uvědomit, že každá skupina mikroorganismů má svoje specifické požadavky na chemické látky (například rozsivky vyžadují příjem křemíku, což jiné skupiny nepotřebují). Neméně důležitým faktorem (stejně jako v případě kultivace) je zařídit sterilní prostředí bez možnosti kontaminace. To je o to více důležité v případě, že jsou zkoumány nové druhy. Kontaminované látky by mohly být totiž vnímány jako původní a přirozené mikroorganismům. Kdyby organismus zahynul v důsledku takové kontaminace, nemuselo by se vůbec přijít na to, co způsobilo jeho uhynutí. Sterilizována by tak měla být každá pomůcka, která přijde do kontaktu se zkoumaným materiálem (například jehly, pipety, agar nebo Petriho misky) (Andersen, 2005).

11.1 Vybrané techniky izolace

V následující kapitole budou popsány některé vybrané techniky izolace, které jsou stále hojně praktikovány a nejspíše ještě dlouho praktikovány budou. Bude se jednat spíše o představení těch neaplikovanějších metod, které vedou k úspěšné izolaci (používané materiály, vybavení i samotná separace jsou podrobněji popsány výše).

11.1.1 Obohacování vzorku

Pokud je využíván odebraný vzorek, ve kterém se vyskytuje více než jeden druh organismu a je snaha získat jeden konkrétní, který se zde vyskytuje v malé míře, je potřeba mu pomoci množit se, aby mohl být následně separován. To se dělá tak, že do vzorku jsou přidány některé nutrienty (dusičnany, fosfáty atd.) nebo látky jako amoniak, železo či křemík. Jako jiné možné řešení je inhibovat růst ostatních mikroorganismů, například přidáním některého kovu, který je pro ně toxický a zároveň nevádí zkoumanému objektu. Pokud by kandidátem na izolaci byla osmotrofní řasa, může být přidána močovina nebo extrakt z kvasnic. Nemělo by se však jednat o velké množství, nýbrž tyto látky podporují také růst bakterií. Ovšem existují také případy, kdy je výskyt bakterií vhodný. Rozkládají totiž některé organické látky na látky, které jsou pro řasy přínosné. Jako velmi efektivní způsob obohacování je, když je možno vzorek rozdělit do několika separovaných menších vzorků a do každého přidat různé

látky. Může být tak zjištěno, jaké látky prospívají nebo naopak škodí zkoumanému objektu. Pokud se podaří aplikovat tu správnou cestu, která vede k růstu tohoto objektu, může být izolován a připraven k následné kultivaci (Andersen, 2005).

11.1.2 Agar (8.4.2)

Agar byl poprvé používán v Japonsku v roce 1658 a do Evropy se dostal až v roce 1859 (Armisen et al., 2009). Je řazen mezi polysacharidy, které se vyrábí z mořských řas. Nejhojněji využívanými rody pro výrobu agarů jsou *Gracilaria*, *Polycavernosa*, *Gracilariopsis* (Oliveira et al., 2000).

11.1.2.1 Tradiční metoda

Pro využití této metody je nutno si nejprve uvědomit, jestli řasa či sinice, která má být izolována, je vůbec schopná na agaru žít. Mnoho druhů to dokáže, ale spoustu jiných ne, tudíž tato metoda není univerzální. Bohužel na agaru velmi prosperují i bakterie a houby, proto je nutné kontrolovat stav nádoby pečlivěji. Mimo jiné se tato metoda používá také pro izolaci bakterií. Po agarové destičce je třeba rozetřít vzorek a následně ho ponechat v inkubátoru po dobu několika dní až týdnů. Poté následuje vyjmutí z inkubátoru a následná separace žádané buňky. Většinou vznikne kolonie a odebrání objektu by mělo být jednodušší (Andersen, 2005).

11.1.2.2 Zalévání agarem

Dnes již víme, že některé druhy řas a sinic jen těžko rostou na agaru, ale dokážou žít v něm. Proto se v určitých případech jeví jako správný krok použít metodu zalévání vzorku agarem. Vzorek se nejprve smíchá s chladným agarem a poté se nalije do Petriho misek. Následně je nutné misku i s agarem zchladit, aby agar ztuhl. Potom je třeba umístit agar do inkubátoru s vhodným světelným zdrojem a nechat buňky růst. Když se vytvoří kolonie, mohou být jednotlivé buňky vyjmuty pipetou a vloženy do kultivačního média (Andersen, 2005).

11.1.2.3 Fototaxe

Velmi zajímavým způsobem je také využití fototaxe. Jak už název napovídá, jedná se o využití světla, samozřejmě za využití agaru a Petriho misky. Jelikož fototaxe znamená orientovaný pohyb organismu za zdrojem světla, uplatní se tato metoda pouze v případě, že je předmětem výzkumu bičíkatá forma řasy. Úplně nejefektivnější je tato metoda v případě, že se ve vzorku vyskytuje pouze jediný druh bičíkaté řasy a ostatní formy života jsou bezbičíkaté. Směr pohybu řas určuje především intenzita osvětlení. Za normálních podmínek by se řasy měly pohybovat ke světlu. Ovšem pokud je intenzita příliš velká, pohybují se směrem od něj. Po nějaké době (opět v řádu hodin až dní) se řasy dostanou na jeden nebo druhý konec Petriho misky. V tomto

momentě už stačí vzít mikropipetu, odebrat buňku a vložit ji do kultivačního média (Andersen, 2005).

12 Kultivace

Kultivace probíhá v laboratorních podmínkách za využití chladících zařízení a sterilních materiálů, jako je například agar nebo Petriho miska. Celému procesu předchází proces izolování konkrétních jedinců, bez toho by nebylo možné čistou kulturu vypěstovat.

12.1 Dnešní metody kultivace

Způsob kultivace, který bude nyní popsán, se jeví jako vysoce inovativní z pohledu kultivace mikroorganismů. Nejenže je úsporný jak z hlediska energie a prostoru, ale také umožňuje efektivnější kultivaci z pohledu vyprodukované biomasy.

Metoda je založena na využívání podpůrného materiálu, který zde hraje zásadní roli. Organismy totiž rostou na povrchu tohoto materiálu jako biofilm. Nejsou tak rozptýleny po celé kultivační nádobě, což na konci celého procesu velmi usnadní jejich vyjmutí (Zhuang et al., 2018).

Rozlišuje se vnitřní a vnější stranu biofilmu. Ta část biofilmu, která je blíže (těsně) podpůrnému materiálu, se nazývá strana vnitřní. Část dále od podpůrného materiálu (pozdější nánosy) je označována jako strana vnější. Světlo by mělo být namířené na vnější stranu biofilmu. Ovšem v případě, že je podpůrný materiál průhledný (například sklo), může být světlo poskytováno z vnitřní strany nebo využito oboustranného osvětlení. Světlo, stejně jako živiny, voda nebo přístup k oxidu uhličitému je zásadní pro celý proces. Co se živin týče, měly by být mikroorganismů dodávány především dusík a fosfor. Jako velmi efektivní zdroj dusíku se osvědčil dusičnan draselný a dusičnan sodný (Zhuang et al., 2018).

Jako podpůrné materiály používané k přichycení řas a sinic se díky svému vysoce hydrofilnímu charakteru osvědčily především polykarbonátové membrány, juta nebo bavlna. Pokud je ale podpůrné médium situováno horizontálně, zdá se být jako vhodný materiál také sklo (Zhuang et al., 2018).

Dle orientace nosného materiálu by mohl být kultivační systém rozdělen na vertikální, horizontální nebo rotační. Podle polohy se dá systém rozdělit na ponorný a poloponorný. U ponorných systémů nikdy nedojde k dehydrataci mikroorganismů, ale mohla by se projevit neefektivita ve výměně oxidu uhličitého a kyslíku. Ze všech

možných kombinací systémů se zdá být nejefektivnější poloponorný rotační systém. To je dáno tím, že neponořená část má snazší přístup k oxidu uhličitému, a dochází tak k efektivní výměně plynů. A jelikož je systém otočný, nedojde k vyschnutí mikroorganismů. Ty zůstávají vlhké díky předchozí ponořené periodě. V momentě, kdy se dostanou z neponořeného do ponořeného stavu, mohou vstřebat živiny nutné pro jejich růst a životaschopnost (Zhuang et al., 2018).

Když je vyprodukován dostatek biomasy, může být mechanicky vyjmut, jelikož je akumulován na podpůrném médiu. Tento způsob odebrání biomasy je energeticky úspornější než u jiných metod. Nemusí být využívána často aplikovaná filtrace, nákladná na energii. Úspora však nespočívá jen v energii, ale také v prostoru, jelikož produkce biomasy je vysoká (Zhuang et al., 2018).

12.2 Kultivované řasy a sinice z Antarktidy

Pro maximální využití řas a sinic v biotechnologiích je nutné poznat, jaké jsou nejideálnější podmínky k jejich růstu. To je důvodem proč se dělají experimenty s jejich kultivací. Mezi zkoumané parametry patří především množství světelné energie, teplota, pH, provzdušnění nebo množství živin.

V České republice došlo ke kultivaci antarktické řasy *Chlorella mirabilis*. Kultivace probíhaly za různých podmínek (ve venkovním/vnitřním prostředí a lišilo se i množství dodávaných živin). Cílem bylo získat informace o tom, za jakých podmínek bude tato řasa produkovat největší množství požadovaných látek (polynenasycených kyselin, enzymů atd.) a jaké podmínky jsou nejideálnější pro její růst (Shukla et al., 2013).

Co se týká řas rostoucích ve vnitřním prostředí, rychlost jejich růstu byla poměrně nízká. Nejrychlejší růst byl pozorován u vzorků s velkou dávkou živin. Nejmenší rychlost růstu byla měřena u vzorku bez přidaných živin. Bylo také zjištěno, že u těchto vnitřních systémů nejvíce zrychlilo růst *Chlorelly* přidání glycerolu (Shukla et al., 2013).

Kultivace řas venku byla doprovázena poměrně stabilními podmínkami (až na teplotu a vlhkost vzduchu). Rychlost růstu venkovní kultury byla větší než u té vnitřní. Mezi důvody, proč venkovní kultivace byla úspěšnější než ta vnitřní, patří například zvýšená venkovní teplota během světlé periody. Avšak rozhodujícím faktorem byla energetická vydatnost záření, kterému byly organismy vystaveny. U řas kultivovaných

uvnitř činila tato vydatnost 1382 wattů na metr čtvereční. Řasám kultivovaných venku byla dodávána světelná energie 2x až 8x větší (Shukla et al., 2013).

Co se týká mastných kyselin, bylo zjištěno, že v případech přidání glycerolu došlo ke zvýšení obsahu kyseliny linolové (tato kyselina je nyní hlavním důvodem pro snahu masově kultivovat *Chlorella mirabilis*). Největší podíl kyselin tvořila kyselina olejová a v menším množství byla nalezena i kyselina palmitová a kyselina myristová (Shukla et al., 2013).

Po analýze všech výsledků je zřejmé, že *Chlorella* se vyplatí masově kultivovat ve venkovních systémech. Pravděpodobně bude tento trend platit i pro mnoho dalších antarktických mikroorganismů (Shukla et al., 2013).

Mezi další kultivované řasy z Antarktidy patří *Prasiola crista* (Šabacká et al., 2006), *Macrochloris rubrioleum* či *Zygnema sp.* Ze sinic byly kultivovány například *Hassalia antarctica* nebo *Nostoc commune* (Dufková et al., 2019).

12.3 Masová kultivace

V roce 1919 se o téma masové produkce zajímal Otto Heinrich Warburg. Ten začal s masovou produkcí sladkovodní jednobuněčné řasy (*Chlorella*). Vytvoření velkých kultur *Chlorelly* chtěli ale i jiní vědci. V roce 1944 se podařilo dvěma americkým vědcům postavit přístroj pro pěstování kultur *Chlorelly*. Využit byl fotometrický systém, který ředil suspenzi tak, aby udržovala velikost růstu populace na určité hodnotě. V roce 1938 se Ketchum a Redfield rozhodli ve velkém chovat rozsivky. Principiálně se jednalo o jednoduchou metodu, která se uplatňuje dodnes. Ve velké nádobě nechali rozsivky množit se, a když jich bylo dost, část odebrali. Odebranou část využívali pro různé chemické analýzy, zatímco zbytek se mohl dále množit. Dnes se tato metoda využívá běžně. Vyprodukovaná biomasa řas slouží jako potrava pro mořské živočichy. V roce 1948 německý algolog Witsch zahájil program na velkoprodukcí *Chlorelly*. Tento i další projekty byly nadále podporovány. K pěstování docházelo především v laboratořích, ale také ve sklenících (Andersen, 2005).

Japonští vědci v polovině padesátých let přišli s technikou synchronní kultivace. Tato metoda spočívá v koordinaci životních cyklů buněk řas (Andersen, 2005).

12.3.1 Předpoklady pro masovou kultivaci Antarktických řas a sinic

Aby došlo k masové kultivaci antarktických řas či sinic, musejí splňovat určité požadavky. Mezi tyto požadavky patří tolerance vůči nízkým teplotám, vysoká rychlost růstu v teplotním rozmezí od 0°C do 10°C, alespoň dočasnou toleranci vůči vyšším teplotám (teplota okolo 20°C) a minimální požadavky na přísun živin.

Masová kultivace antarktických mikroorganismů by se dle vědců měla provozovat přímo na Antarktidě. K tomu je ale potřeba vyvinout speciální fotobioreaktor, který by byl schopen tamní drsné podmínky vydržet bez poškození. Takový reaktor by se měl skládat z několika komponentů na sobě nezávislých (v případě poškození by se tak nemusel stavět nový reaktor, ale poškozená část by byla nahrazena novou). Měl by být připojen k meteorologické stanici (kvůli měření klimatických hodnot, jakými jsou rychlost/teplota vzduchu či vlhkost) a zároveň k fluorometru (kvůli zaznamenávání fyziologického stavu kultury) (Kvíděrová et al., 2017).

13 Biotechnologický potenciál sinic a řas

Některé druhy řas a sinic obsahují látky, které lidská společnost může řádně využít ve svůj prospěch. Nicméně produkují také nežádoucí až toxické látky, a proto je třeba dobře zvážit, které druhy budou kultivovány a využívány (Borowitzka, 1992).

13.1 Fotobioreaktory

Pokud lidé chtějí řasy a sinice (nebo látky z nich) využívat pro svou potřebu, znamená to, že musejí být masově kultivovány, aby dosáhly určité (pro nás produkční) biomasy. K tomu slouží využití fotobioreaktorů. Ty mohou mít různý tvar a trochu odlišný systém. Takový fotobioreaktor je možno si představit například jako průhledný a dutý solární panel, který je vyplněn vodou obohacenou o živiny společně s řasami nebo sinicemi. Slunce jako zdroj světelného záření dodává organismům dostatek energie na to, aby se mohly efektivně množit a dosáhly tak požadované biomasy. Fotobioreaktory mohou mít i trubkovitý charakter, který funguje na velmi podobném principu. Množství sluneční energie se však v průběhu roku může měnit a v některých obdobích může být nedostatečná. Tudiž je nutné pro další kultivaci a vytvoření velké biomasy použít kryté systémy. Ty fungují v podstatě stejně, jen s tím rozdílem, že zdrojem světla je umělé osvětlení. To může být v některých případech dokonce efektivnější než přirozený zdroj světla. Někdy se totiž stává, že sluneční svit poskytuje řasám víc energie, než je potřeba. To má za následek zbrzdění populačního růstu nebo i jeho zastavení. Výhodou uzavřených systémů je to, že intenzita světla může být libovolně nastavována, a tak je dosaženo maximální produkce. Nevýhodou je, že za

tuto energii je třeba platit, zatímco sluneční energie je zdarma (Grobbelaar et al., 2004).

13.1.1 Inovativní fotobioreaktor pro kultivaci řas v polárních oblastech

Jako inovativní novinka v oblasti kultivace řas a sinic se zdá být sestavení rotačního deskového fotobioreaktoru. Na tomto vylepšeném typu fotobioreaktoru pracuje hned několik institucí (České vysoké učení technické v Praze, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích a Botanický ústav AV ČR). Tento reaktor je navržen pro kultivaci mikroorganismů v polárních oblastech, ale dalo by se ho využít takřka kdekoli.

Jelikož se během dne mění poloha Slunce, mění se i množství energie dopadajícího na reaktor. K tomu všemu je nutno si uvědomit, že v kultivačním médiu dochází k rozptylu světla a mohou tak vznikat tzv. tmavé zóny (místa, kam nedopadá světlo). To zapříčiní nedostatečný příjem energie mikroorganismů vyskytujících se v těchto místech, a jejich růst je tak omezen. Tento nový typ reaktoru by měl být však schopen zmaximalizovat využití světelné energie ze Slunce, právě díky své schopnosti rotovat (nedocházelo by tak k vzniku tmavých zón). Měl by být schopen neustále udržovat svou pozici kolmo na zdroj světla, čímž by došlo k největšímu možnému využití energie ze světelného záření. Výsledkem by měl být rychlejší a celkově účinnější proces kultivace.¹

13.2 Skupiny sinic a řas využívaných v biotechnologiích

Mnoho rodů řas a sinic se díky svému obsahu pro lidi atraktivních látek (proteiny, barviva, aminokyseliny atd.) pěstuje ve velkém, a jejich využití lze nalézt ve farmacii a potravinářství (dále také v energetice nebo kosmetických přípravcích). Tato kapitola je zaměřena na vybrané rody řas a sinic, pro které lidstvo našlo široké spektrum využití napříč průmyslovými odvětvími.

13.2.1 Spirulina

Jedním z hlavních využití této sinice je výroba potravinářských barviv nebo doplňků stravy. Hlavními producenty těchto výrobků jsou USA, Čína, Barma nebo Thajsko a celoročně se tak vyprodukuje okolo 3 000 tun tohoto rodu sinice. Mezi užitečné látky, které v sobě *Spirulina* obsahuje, patří omega 6 mastná kyselina, vitamin E, beta-karoten, fykocyanin či některé minerály. Z její celkové hmotnosti představují

¹ Rotary plate reactor and automated rotary system 2022, Ministry of the Interior of the Czech Republic, ID of agreement: 18623339, ID: 20018651, USB, IB CAS and Technical University in Prague, registration number: 016_22

až ze 70 % proteiny. Konzumace této sinice má za následek snížení krevního tlaku a také pomáhá při léčbě cukrovky. Dále se uplatnila při léčbě psychických onemocnění jako je porucha pozornosti nebo dokonce deprese. Ovlivňuje také střevní mikroflóru tím, že se díky ní lépe daří bakteriím rodu *Lactobacillus*, což má za následek lepší trávicí schopnost (Bishop et al., 2012).

Rizikem může být přítomnost cizího toxického druhu ve fotobioreaktorech, ve kterých se pěstuje. U některých lidí způsobuje alergickou reakci a u jiných se po konzumaci projevila i nespavost nebo zvracení. Další problém by mohl nastat při kontaminaci škodlivými prvky, jakým je například rtuť. Rod *Spirulina* je totiž dobrým bioakumulátorem a tyto prvky by se tak dostaly dále do produktů určených ke konzumaci (Bishop et al., 2012).

13.2.2 *Dunaliella*

Dunaliella je pěstována nejen kvůli svému poměrně vysokému obsahu proteinů, ale hlavně kvůli obsahu karotenoidových barviv, zejména beta-karotenu (až 14 % hmotnosti). V podstatně menším množství se u ní vyskytují barviva lutein nebo alfa-karoten. Tyto karotenoidy dokážou obnovovat aktivitu enzymů. Jelikož je vysoce tolerantní proti solnému stresu, může být kultivována ve slané vodě s obsahem soli až 100 g NaCl/l. To se jeví jako výhodné, jelikož je tak v podstatě eliminována kontaminace jinými organismy, které takto tolerantní nejsou. Hlavními producenty sušiny z tohoto rodu řasy je opět USA a Čína, ale také Izrael nebo Austrálie. Celková produkce je odhadována na 1 200 tun ročně. I když je *Dunaliella* dobrým zdrojem beta-karotenu, stále je zhruba 90 % této látky na trhu vyráběna synteticky. Podle nedávných studií, dokáže beta-karoten inhibovat vznik nádorových onemocnění či rakoviny. To je zapříčiněno jeho antioxidantním charakterem, který dokáže neutralizovat škodlivé volné radikály (Bishop et al., 2012).

13.2.3 *Haematococcus*

U řas rodu *Haematococcus*, na rozdíl od většiny ostatních řas či sinic, je snaha o to, aby se dostaly do klidového stádia. V klidovém stádiu totiž produkují barvivo astaxanthin (to tvoří až 3 % jejich celkové hmotnosti). Astaxanthin je využíván v kosmetickém, potravinářském i farmaceutickém průmyslu. Ročně je celosvětově vyprodukováno několik desítek až stovek tun astaxanthinu z této řasy. Na trhu je však zhruba 95 % této látky ze syntetické výroby. Ačkoliv obsahuje i vitamíny nebo minerály, nejatraktivnější pro trh je stále astaxanthin. Není to však překvapením, uvážíme-li, že jeho antioxidační účinek je 10x větší, než je tomu u beta-karotenu. Tudíž je ještě účinnější v prevenci proti nádorům či rakovině. Jeho přítomnost

v lidském těle dále zlepšuje zrak, snižuje krevní tlak a podporuje funkce imunitního systému. Využití astaxanthinu se uplatňuje i při léčbě Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby. Astaxanthin má obrovský potenciál jako léčivo, což je ještě podpořeno faktem, že doposud nebyly zaznamenány ani zdokumentovány žádné negativní účinky či zdravotní potíže po jeho konzumaci (Bishop et al., 2012).

13.2.4 Aphanizomenon

Dalšími organismy, které se hojně pěstují pro potravinářské a farmaceutické účely, jsou sinice rodu *Aphanizomenon*. Nejvíce této sinice je vyprodukováno severoamerickými společnostmi a roční celosvětová produkce je odhadována na 500 tun. Tato sinice je pěstována především pro její využití ve farmacii, jelikož látky v ní obsažené inhibují artritidu, kožní nemoci nebo dokonce některé duševní problémy. Těmito látkami jsou především polynenasycené mastné kyseliny, jako omega 3 a omega 6. Také obsahuje barvivo C-fykocyanin, což je barvivo, které stejně jako beta-karoten funguje jako antioxidant. Některé studie tvrdí, že konzumace této sinice zlepšuje u lidí koncentraci a pozornost (Bishop et al., 2012).

Rizikem u pěstování a následné konzumaci tohoto rodu sinic je fakt, že společně s ní se často vyskytuje rod *Anabaena*, který může produkovat různé toxické látky. Riziko spojené čistě s konzumací rodu *Aphanizomenon* však studie neprokázaly, a je tak dále masově pěstována pro své pozitivní účinky. Výjimkou může být však druh *Aphanizomenon flos-aquae*, který za určitých podmínek může produkovat některé neurotoxiny, jako je například anatoxin (Bishop et al., 2012).

13.2.5 Chlorella

V potravinářství se uplatňuje využití zelené řasy *Chlorelly*, jelikož obsahuje vysoké množství prospěšných látek (je tvořena až ze 70 % proteiny). Tyto proteiny obsahují mnoho esenciálních aminokyselin, které si člověk nedokáže sám vytvořit. Mimo jiné obsahuje i další zdravé prospěšné látky, kterými jsou vitamíny (například B12), minerály nebo barvivo lutein, které efektivně brání vzniku kataraktu (očnímu onemocnění). Mezi další přednosti této řasy patří její rychlý růst, který nám tak dovoluje masovou produkci v kratším časovém horizontu. Ročně je vyprodukováno asi 2 500 tun suché *Chlorelly*, za což mohou především stát USA a Čína. Nejčastěji se *Chlorella* konzumuje jako doplněk stravy (Bishop et al., 2012).

Ačkoli je *Chlorella* využívána hlavně v potravinářském průmyslu, není od věci zmínit i její potenciál ve farmacii. Bylo totiž zjištěno, že užívání *Chlorelly* má

antibakteriální či protizánětlivé účinky. Zároveň snižuje hladinu cholesterolu a krevního tlaku (Bishop et al., 2012).

Bohužel s použitím a konzumací *Chlorelly* se pojí také potenciální neblahé účinky. Bylo zjištěno, že u některých lidí způsobuje alergickou reakci, byli tak nuceni s konzumací přestat (Bishop et al., 2012).

13.3 Potenciál Antarktických řas a sinic a jejich nynější využití

Potenciál řas a sinic z Antarktidy pro biotechnologické využití je předurčen zejména jejich adaptacemi na toto prostředí. Tyto adaptace jsou výsledným projevem produkce některých látek, které mohou být řádně využity lidmi (karotenoidy, UV-absorbující látky nebo polynenasycené mastné kyseliny). Dosud se masově pěstují teplomilné a tropické řasy a sinice, oproti tomu masová kultivace těchto mikroorganismů s polárních oblastí je v podstatě rarita (Kvíderová et al., 2017).

Výzkum 31 kmenů antarktických sinic prokázal relativně vysoké množství polynenasycených mastných kyselin. Hodnoty se samozřejmě lišily kmen od kmene a největší množství bylo nalezeno u rodu *Phormidium* (druh *Phormidium pseudopristleyi* obsahoval okolo 30% kyseliny arachidonové z celkového obsahu mastných kyselin). Polynenasycené mastné kyseliny mají využití hlavně v potravinářství a farmacii (Kvíderová et al., 2017).

Především v potravinářském průmyslu se dají dobře využít i ice-binding proteiny obsažené v antarktických řasách a sinicích. Využití těchto proteinů má široké spektrum. Vyrábí se z nich například umělý sníh, přidávají se do zmrzlin a celkově mohou sloužit k lepší konzervaci potravin (brání tvorbě ledových krystalů uvnitř potravin) (Cid et al., 2016).

Dále některé sekundární metabolity sinic mají antikarcinogenní charakter a mohou se uplatnit v lékařství. Příkladem takového metabolitu je aplysiatoxin (Swain et al., 2015). Dokonce se některé druhy antarktických řas/sinic již dnes využívají v kosmetickém nebo chemickém průmyslu (například *Durvillea* sp., *Prasiola crispa* nebo *Fragilariopsis* sp.) (Kvíderová et al., 2017).

Klíčovým aspektem pro řádné využití antarktických řas a sinic se zdá být určení konkrétních rodů a druhů, které obsahují největší množství žádaných látek. Studie antarktických mikroorganismů se stále více zintenzivňuje a brzy mohou přijít průlomové objevy, které se uplatní v nových biotechnologiích (Kvíderová et al., 2017).

13.4 Biopaliva

Pro udržitelnou budoucnost lidstva je nutné pomalu se oprostít od výroby energie z vyčerpateľných zdrojů, jakými jsou uhlí, ropa nebo zemní plyn. Zajímavou a stále více studovanou alternativou je využívání přirozeného biologického procesu fotosyntézy. Během ní vzniká velké množství energie za využití Slunce jako zdroje napájení. Pouze za využití vody, oxidu uhličitého a světelné energie dokážou řasy a sinice vytvořit volnou energii. V dnešní době je možno z řas a sinic (především z řas kvůli většímu obsahu tuků) vyrábět biopaliva, konkrétně biodiesel a bioethanol. Z řas se získávají extrakcí lipidy, které jsou dále zpracovány. Biopaliva se vytvářejí také fermentací cukrů na ethanol. Tato metoda však není prováděna s řasami ani sinicemi, nýbrž s vyššími rostlinami (Angermayr et al., 2009).

Dnešní způsob výroby biopaliv funguje, avšak se stále velkými energetickými ztrátami. Bioinženýři a vědci se proto snaží najít způsob, který by tyto ztráty eliminoval (Angermayr et al., 2009).

13.4.1 Budoucnost biopaliv

Chemické reakce při výrobě biopaliv spotřebovávají velké množství získané energie a celková účinnost není tak vysoká. Jak se těchto energetických ztrát zbavit byla otázka, na kterou se alespoň teoreticky podařilo najít odpověď. Vědci chtějí změnit metabolické dráhy fotosyntetizujících mikroorganismů tak, aby nedocházelo k vytváření meziproductů. Pokoušejí se propojit metabolické dráhy fototrofních organismů s heterologní (pocházející z jiného organismu) fermentační metabolickou dráhou. Díky tomu by se katalitickými procesy mohl meziproduct přeměnit rovnou na chtěný finální produkt. Dalo by se tak říct, že by do celého procesu vstoupila sluneční energie, voda a oxid uhličitý a jako výstup by bylo biopalivo. Klíčovou rolí v celém procesu by hrál glyceraldehyd-3-fosfát. Ten vzniká jako meziproduct jak u fototrofních, tak u heterotrofních organismů. Využití je však odlišné. Zatímco u organismů provádějící fotosyntézu slouží k syntéze dalších látek (především cukrů), u heterotrofních organismů slouží k fermentaci (rozklad bez přítomnosti kyslíku) za vzniku energie. Pokud by se vědcům povedlo tyto dvě odlišné metabolické cesty propojit, tak by u pěstovaných řas a sinic namísto syntézy cukrů docházelo rovnou k fermentaci za vzniku energie (Angermayr et al., 2009).

14 Diskuze

Mezi cíle práce patřil popis adaptací a obranných mechanismů antarktických řas a sinic. Následně byla popsána jejich izolace a kultivace. K tomuto tématu také

nevyhnutelně patří popsání sterilizačních metod využívaných před samotnou izolací a kultivací. Dále byly popsány biotechnologie, které souvisejí s využitím konkrétních kmenů/rodů řas a sinic. Pozornost byla věnována také potenciálnímu využití antarktických mikroorganismů a plány pro jejich budoucí uplatnění v biotechnologiích. K využití biotechnologií se váže i kultivace ve fotobiorektorech, která byly také popsána, stejně, jako plán na konstrukci inovativního typu fotobiorektoru, navrženého ke kultivaci přímo na Antarktidě.

V této práci došlo k popsání všech výše zmíněných bodů. Jako nejdůležitější však považuji to, že z práce vyplývá, že zájem o snahu pochopit tyto mikroorganismy neupadá a stále je jim věnována pozornost. Naopak lze říct, že celá problematika využití a kultivování řas a sinic se pořád posouvá vpřed. Daří se kultivovat některé antarktické druhy, je navržený nový typ fotobiorektoru se schopností rotovat, a dokonce nic nenasvědčuje tomu, že by se vědci chtěli od výzkumu Antarktidy oprostít. To je dáno především tím, že je stále co objevovat, zejména pak nové druhy, které mohou být zároveň užitečné.

Na začátku této práce byly položeny otázky, na které jsem se snažil najít odpovědi. U některých z nich došlo k jejich zodpovězení, ovšem na jednu zásadní otázku se mi odpovědět nepodařilo. Zda existují naprosto specifické látky, které se nevyskytují nikde jinde na světě a jak je lze využít. Právě proto jsem toho názoru, že je naprosto nutné, aby výzkum na Antarktidě pokračoval a aby se našly jasné odpovědi. V praxi by to mohlo znamenat probudit větší zájem o tuto problematiku u mladších generací, které by mohly ve výzkumu pokračovat. Je třeba prozkoumat Antarktidu podrobněji, avšak s velikou opatrností, aby nedošlo k zavlečení nepůvodních druhů, nebo aby nedošlo k jinému narušení tohoto prostředí.

15 Závěr

Po zanalyzování získaných informací lze konstatovat, že antarktické sinice a řasy mají velký potenciál pro jejich aplikace v biotechnologiích. Díky mnohým specifickým látkám, které se nacházejí v jejich tělech se z těchto mikroorganismů stává významný, avšak stále neprozkoumaný předmět výzkumu. Dále je patrné, že zájem o studium těchto organismů stále roste. Důkazem je popsání nového, inovativního fotobiorektoru určeného k jejich kultivaci přímo na Antarktidě nebo otočný laboratorní kultivační systém s podpůrným médiem.

Řasy a sinice se v biotechnologiích využívají už v dnešní době. Uplatnily se na poli farmacie, energetiky, potravinářství nebo kosmetiky. Za to mohou užitečné látky obsažené v jejich tělech. Zejména se jedná o barviva (astaxanthin, beta-karoten, C-fykocyanin atd.), proteiny (ice-binding proteiny atd.) nebo vitamíny (vitamín B12, vitamín E atd.).

Dále z práce vyplývá, že řešení této problematiky jde stále kupředu. Vědci a bioinženýři se aktivně snaží o propojení metabolických cest sinic a řas s metabolickou cestou heterotrofních organismů. Pokud by se toto opravdu povedlo, znamenalo by to průlom v bioinženýrství a obrovský krok vpřed z pohledu výroby biopaliv.

Na samotném začátku této práce jsem si položil několik otázek a na některé z nich jsem dokázal odpovědět. Ovšem otázka zaměřená na látky sinic a řas, které jsou specifické pouze pro antarktické organismy a jejich následné využití zůstává nezodpovězena. Nepodařilo se mi dohledat látky, které by se nikde jinde na světě nevyskytovaly. Jsem ale přesvědčen, že takové látky existují, jelikož plně popsanych a identifikovaných kmenů z Antarktidy není mnoho. Tato myšlenka je podpořena také faktem, že vnitrozemí Antarktidy je takřka neprozkoumané. Dokud tomu tak bude, není možné tuto myšlenku vyloučit. Jsem toho názoru, že budoucí výzkum Antarktidy by měl být více zaměřen právě na tyto neprozkoumané oblasti. Vzorky z nich musejí být řádně prozkoumány. Mohlo by tak dojít nejen k objevení nových a nepopsaných druhů, ale také k objevení látek, které mohou přispět k rozvoji nových biotechnologií.

16 Literatura

- Andersen Robert A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Burlington Mass: Elsevier/Academic Press, ISBN: 978-01-208-8426-1.
- Angermayr, S. A., Hellingwerf, K. J., Lindblad, P., & Teixeira de Mattos, M. J. (2009). Energy biotechnology with cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 257–263. Available from <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.011>.
- Armisen R., Gaiatas F., 2009: *Handbook of Hydrocolloids (Second edition)*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Available from <https://doi.org/10.1533/9781845695873.82>.
- Bishop M., W., & M. Zubeck, H. (2012). Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 02(05). Available from <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000147>.
- Borowitzka, M. A. (1992). Algal biotechnology products and processes — matching science and economics. *Journal of Applied Phycology*, 4(3), 267–279. Available from <https://doi.org/10.1007/bf02161212>.
- Cid, F. P., Rilling, J. I., Graether, S. P., Bravo, L. A., Mora, M. de L. L., & Jorquera, M. A. (2016). Properties and biotechnological applications of ice-binding proteins in bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 363(11), Available from <https://10.1093/femsle/fnw099>
- Douglas, S. E., Raven, J. A., & Larkum, A. W. D. (2003). The Algae and their General Characteristics. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, 1–10. Available from https://doi.org/10.1007/978-94-007-1038-2_1
- Dufková K., Barták M., Morkusová J., Elster J., Hájek J. (2019) Screening of growth phases of Antarctic algae and cyanobacteria cultivated on agar plates by chlorophyll fluorescence imaging. *Czech Polar Reports*. Available from <https://doi.org/10.5817/CPR2019-2-15>
- Eliáš, M. (2021). Protist diversity: Novel groups enrich the algal tree of life. *Current Biology*, 31(11), R733–R735. Available from <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.025>.
- Ellis-Evans, J. C. (1996). Microbial diversity and function in Antarctic freshwater ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, 5(11), 1395–1431. Available from <https://doi.org/10.1007/bf00051985>

- Grobbelaar, J. U., & Bornman, C. H. (2004). Algal biotechnology: real opportunities for Africa. *South African Journal of Botany*, 70(1), 140–144. Available from [https://doi.org/10.1016/s0254-6299\(15\)30274-x](https://doi.org/10.1016/s0254-6299(15)30274-x)
- Chorus, I, Welker M; eds. 2021. Toxic Cyanobacteria in Water, 2nd edition. CRC Press, Boca Raton (FL), on behalf of the World Health Organization, Geneva, CH. ISBN 978-1-003-08144-9.
- Chown, S. L., Clarke, A., Fraser, C. I., Cary, S. C., Moon, K. L., & McGeoch, M. A. (2015). The changing form of Antarctic biodiversity. *Nature*, 522(7557), 431–438. Available from <https://doi.org/10.1038/nature14505>
- Jimel, Matouš. Algal and Cyanobacterial Adaptations to Low Temperature and Desiccation. Praha, 2020. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra ekologie. Vedoucí práce Elster, Josef.
- Kennicutt, M. C., Chown, S. L., Cassano, J. J., Liggett, D., Massom, R., Peck, L. S., ... Sutherland, W. J. (2014). Polar research: Six priorities for Antarctic science. *Nature*, 512(7512), 23–25. Available from <https://doi.org/10.1038/512023a>
- Komárek J. (2008): Antarktické vegetační oázy 6. Sinice a řasy. – *Živa* 6: 260-264.
- Kvíděrová, J., Shukla, S.P., Pushparaj, B., Elster, J. (2017). Perspectives of Low-Temperature Biomass Production of Polar Microalgae and Biotechnology Expansion into High Latitudes. In: Margesin, R. (eds) *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*. Springer, Cham. Available from https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0_25
- Muranushi N., Takagi N., Muranishi Sh., Sezaki H. (1981). Effect of fatty acids and monoglycerides on permeability of lipid bilayer, *Chemistry and Physics of Lipids*, Volume 28, Issue 3, 269-279, Available from [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(81\)90013-X](https://doi.org/10.1016/0009-3084(81)90013-X)
- Oliveira, E. C., Alveal, K., & Anderson, R. J. (2000). Mariculture of the Agar-Producing Gracilarioid Red Algae. *Reviews in Fisheries Science*, 8(4), 345–377. Available from <https://doi.org/10.1080/10408340308951116>.
- Pandey KD, Shukla SP, Shukla PN, Giri DD, Singh JS, Singh P, Kashyap AK., 2004: Cyanobacteria in Antarctica: ecology, physiology and cold adaptation, Centre of Advance Study in Botany, Banaras Hindu University, India, Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15559974/>
- Prošek, Pavel a kol. Antarktida. Praha: Academia, 2013. ISBN 978-80-200-2140-3.

- Shukla, S. P., Kvíderová, J., Tříška, J., & Elster, J. (2013). *Chlorella mirabilis* as a Potential Species for Biomass Production in Low-Temperature Environment. *Frontiers in Microbiology*, 4. Available from <https://doi:10.3389/fmicb.2013.00097>
- Stürmer, Karoline. *Arktida a Antarktida: život ve věčném ledu*. V Praze: Euromedia Group - Knižní klub, 2007. Universum (Knižní klub). ISBN 978-80-242-2019-2.
- Swain, S. S., Padhy, R. N., & Singh, P. K. (2015). Anticancer compounds from cyanobacterium *Lyngbya* species: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(2), 223–265. Available from <https://10.1007/s10482-015-0487-2>
- Swithinbank, Charles, 1988: United states government printing office, Washington
- Šabacká, M., & Elster, J. (2006). Response of Cyanobacteria and Algae from Antarctic Wetland Habitats to Freezing and Desiccation Stress. *Polar Biology*, 30(1), 31–37. Available from <https://doi.org/10.1007/s00300-006-0156-z>
- Wharton, R. A., Parker, B. C., & Simmons, G. M. (1983). Distribution, species composition and morphology of algal mats in Antarctic dry valley lakes. *Phycologia*, 22(4), 355–365. Available from <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-22-4-355.1>
- Wijesekara, I., Yoon, N. Y., & Kim, S.-K. (2010). Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. *BioFactors*, 36(6), 408–414. Available from <https://doi.org/10.1002/biof.114>.
- Xu, L., Weathers, P. J., Xiong, X.-R., & Liu, C.-Z. (2009). Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 178–189. Available from <https://doi.org/10.1002/elsc.200800111>
- Zhuang, L.-L., Yu, D., Zhang, J., Liu, F., Wu, Y.-H., Zhang, T.-Y., ... Hu, H.-Y. (2018). The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94, 1110–1119. Available from <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.06.006>
- Rotary plate reactor and automated rotary system 2022, Ministry of the Interior of the Czech Republic, ID of agreement: 18623339, ID: 20018651, USB, IB CAS and Technical University in Prague, registration number: 016_22

17 Seznam použitých zkratek a symbolů

DMSO - dimethylsulfoxid

DMSO - dimethylsulfoxid

CSPs - cold shock proteins

CAPs - cold acclimation proteins

LEA proteins – Late Embryogenesis Abundant proteins

EPS – Extracellular polymeric substances

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

