

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA v ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

---

Studijní program: ZEMĚDĚLSTVÍ

Studijní obor: TRVALE UDRŽITELNÉ SYSTÉMY HOSPODAŘENÍ V KRAJINĚ

Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

## **Bakalářská práce**

# **Studium fotosyntetické reakce zelených řas na přítomnost vybraných těžkých kovů**

**Vedoucí práce:**

Doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.

**Autor práce:**

Jan Novák

**2012  
České Budějovice**



### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma fotosyntetické reakce zelených řas na přítomnost vybraných těžkých kovů jsem vypracoval samostatně s použitím pramenů a literatury, uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998Sb. V platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

.....

podpis autora

## **Poděkování:**

Děkuji doc. Ing. Janě Pexové Kalinové, PhD. za vstřícnost a trpělivost během přípravy této práce, Ing. Vítězslavu Březinovi, CSc. za odborné konzultace a metodické vedení během přípravy pokusů, paní Iloně Slepíčkové a Mgr. Tomáši Náhlíkovi za pomoc při práci v laboratoři. Dále děkuji firmě BP Medical za poskytnutí přístroje Algareact.

## Abstrakt

S nárůstem počtu obyvatel na Zemi se stále více zemědělských ploch ocitá v oblastech, které jsou zasaženy odpadními látkami. Pro posouzení dopadu jejich přítomnosti na životní prostředí je proto důležité stanovit jejich toxicitu. Cílem této práce je zhodnocení vlivu vybraných iontů těžkých kovů ( $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  a  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) na průběh fotosyntézy u modelových zástupců zelených řas (*Scenedesmus quadricauda*) prostřednictvím sledování dynamiky uvolňování kyslíku do roztoku živného média. Experimenty jednotlivými sloučeninami probíhaly při pH 7, teplotě 25°C a světle 450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . K měření byla použita sestava Algareact vyvinutá firmou BVT Technologies. K validaci metody bylo použito srovnání s růstovými křivkami *Scenedesmus quadricauda* při různých pH. Metoda měření rozpuštěného kyslíku v médiu je vhodná k měření bezprostředního účinku chemických sloučenin na fotosyntetickou aktivitu zkoumaného organismu. Metoda je omezena tekutostí měřeného roztoku. Nejvíce ovlivnilo naměřené množství kyslíku rozpuštěného v médiu  $\text{CdSO}_4$  v koncentraci 0,1 M.

**Klíčová slova:** *Scenedesmus quadricauda*, zelená řasa, těžké kovy, kyslík

## **Abstract**

With the world population growth, more and more agricultural areas fall into regions affected by waste products. Therefore it is important to determine their impact on environment toxicity. The aim of this thesis is to evaluate the effect of selected ions of heavy metals ( $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  and  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) on the process of photosynthesis in a selected green algae species (*Scenedesmus quadricauda*) by means of monitoring of dynamics of oxygen release into solution of nutrient medium. The experiments with individual compounds proceeded by pH 7, temperature  $25^\circ\text{C}$  and light  $450 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Algareact device developed by the company BVT Technologies was used for measuring. Comparison with growth curves *Scenedesmus quadricauda* by different pH was used for the validation of the method. The method of the measurement of dissolved oxygen in medium is suitable for the measurement of immediate impact of chemical compounds on photosynthetic activity of examined organism. The method is restricted by the fluidity of measured solution. The lowest quantity of oxygen dissolved in medium was measured by  $\text{CdSO}_4$  in concentration 0,1 M.

**Key words:** *Scenedesmus quadricauda*, green alga, heavy metals, oxygen

## Obsah

1. Úvod..	8
2. Cíl práce .....	9
3. Literární přehled.....	10
3.1. Řasy.....	10
3.1.1. Rod <i>Scenedesmus</i> .....	10
3.2. Fotosyntéza u eukaryotních buněk.....	11
3.2. Pronikání látek do eukaryotní buňky.....	14
3.2.1. Pasivní transport.....	14
3.2.2. Aktivní transport.....	14
3.3. Způsob příjmu kovů řasami.....	17
3.4. Působení těžkých kovů na buněčný metabolismus.....	18
3.5. Působení těžkých kovů na fotosystém.....	19
4. Materiál a metody.....	20
4.1. Řasa <i>Scenedesmus</i> .....	20
4.1. Postup přečištění a izolace buněčné kultury řasy ze smíšené kultury.....	20
4.2. Kultivace řasy.....	21
4.3. Použitý přístroj a aparatura.....	23
4.3.1. Kalibrace přístroje.....	25
4.3.2. Příprava vzorku pro pokus .....	26
4.4. Metoda stanovení rozpuštěného kyslíku.....	26
4.5 Validace metody pomocí růstových křivek.....	27
4.6. Vyhodnocení měření.....	28
5. Výsledky.....	29
6. Diskuse.....	49
7. Závěr.....	51

# 1. Úvod

Řasy, sinice a autotrofní organismy obecně se dnes stávají jednou z možností řešení energetické a potravinové soběstačnosti. Do výzkumu jsou investovány značné prostředky z veřejných i neveřejných financí.

Druhy z rodů jako je *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Trachydiscus* a mnohé další jsou často zmiňovány v odborných i popularizačních publikacích v souvislosti s úvahami o výrobě substrátu pro spalování, biomasy jako náhrady kvasitelného substrátu pro výrobu bioplynu, o tvorbě mikrobiálních společenstev široce využitelných pro trvale udržitelné biologické hospodářství aj.

Základní otázkou k rozhodnutí, nakolik jsou tyto cesty schůdné je, zda jsme schopni pochopit a využít fotosyntézu. Ta je základní reakcí, která umožňuje život na Zemi ve formě, v jaké jej známe. Zjednodušeně lze říci, že fotosyntéza je základem zemědělství a zvládneme-li jí v udržitelném stavu, bude výsledkem i udržitelné zemědělství, tedy produkce potravin v množství dostatečném pro neplýtvající subjekty. To platí i pro zdroje energie, o nichž se dnes mluví jako o alternativních zdrojích.

S nárůstem počtu obyvatel na Zemi se stále více zemědělských ploch ocitá v oblastech, které jsou zasaženy odpadními látkami. Ty se dostávají hlavně vlivem těžby, průmyslové činnosti, zemědělství a dalších činností do ovzduší, půdy i vody. Ve výsledku však v naprosté většině skončí ve vodě, kam se dostanou buď přímo spadem ze vzduchu nebo jsou tam později vyplaveny z půdy. Pro posouzení dopadu jejich přítomnosti na životní prostředí je důležité stanovit jejich vliv na probíhající fotosyntetické reakce.

Předmětem této diplomové práce je snaha přispět k pochopení prvních reakcí fotosyntézy autotrofního mikroorganismu, je – li ovlivněn solí, obecně známou jako toxickou. Výrok Paracelsa známý jako „dávka dělá z látky jed“ platný nejenom pro farmacii, dává tušit, že cesta směřující k maximálně produkujícím mikrobiálním společenstvům bude dlouhá. Základním kamenem k nim je populace autotrofních organismů produkující kyslík. Navazující populace jsou ty, které kyslík potřebují k další produkci, kterou podporují další členy společenstva ke konečnému výsledku žádanému člověkem. Tedy energii a potravě. Z tohoto důvodu se ve své práci na rozdíl od naprosté většiny prací zabývajících se toxicitou látek pro řasové kultury hodnocenou pomocí růstové křivky během kultivace za stanovených podmínek zabývám modelem měření produkce fotosyntetického kyslíku a možnými zdroji její stimulace a inhibice.



## 2. Cíl

Cílem práce je zhodnocení vlivu vybraných iontů těžkých kovů na průběh fotosyntézy u modelových zástupců zelených řas (*Scenedesmus quadricauda*) prostřednictvím sledování dynamiky uvolňování kyslíku do roztoku živného média.

## 3. Literární přehled

### 3.1 Řasy

Řasy patří do imperia Eukarya (*Eukaryota*), říše Rostliny (*Plantae*), podříše Zelené rostliny (*Viridiplantae*), oddělení Zelené řasy (*Chlorophyta*) (Kalina et al., 2005).

Řasy patří mezi eukaryotické organismy. Jejich buňka obsahuje chloroplasty. Ty pak obsahují chlorofyl „a“ a „b“ a další fotosyntetické pigmenty jako  $\beta$ -karoten, violaxantin, anteraxantin a neoxantin, zeaxantin a lutein, ve kterých probíhají fotosyntetické procesy (Kalina et al., 2005). V mitochondriích probíhá aerobní respirace. V endoplazmatickém retikulu se tvoří proteiny a lipidy a v Golgiho aparátu se tyto látky dále přetvářejí, skladují nebo se odtud transportují do dalších částí buňky. Ve vakuolách se ukládají živiny a nebezpečné nebo nepotřebné látky. Povrch buňky tvoří stěna, která slouží k udržení tvaru buňky a jako ochrana před poškozením. Její hlavní komponentou je celulóza (Campbell et al., 2008).

#### 3.1.1 Rod *Scenedesmus*

Dnes je rod *Scenedesmus* řazen do čeledi *Scenedesmaceae* (Hegewald, 1997) a je největší z řádu *Chlorococcales*, dle Hegewald & Silva (1988) obsahuje více než 1300 druhů.

Jedná se o jedny z nejběžnějších řas vodního fytoplanktonu. Lze je najít ve sladkých i slaných vodách, ale i mnoha dalších přírodních biotopech. Morfologicky jsou velice variabilní. Často v závislosti na prostředí (Trainor, 1998).

Buňky existují buď samostatně nebo v cenobiích (skupina volně spojených buněk) viz. obr. 1. Ty jsou tvořeny buňkami rovnoběžně uspořádanými podle svých delších os (Fott, 1967).

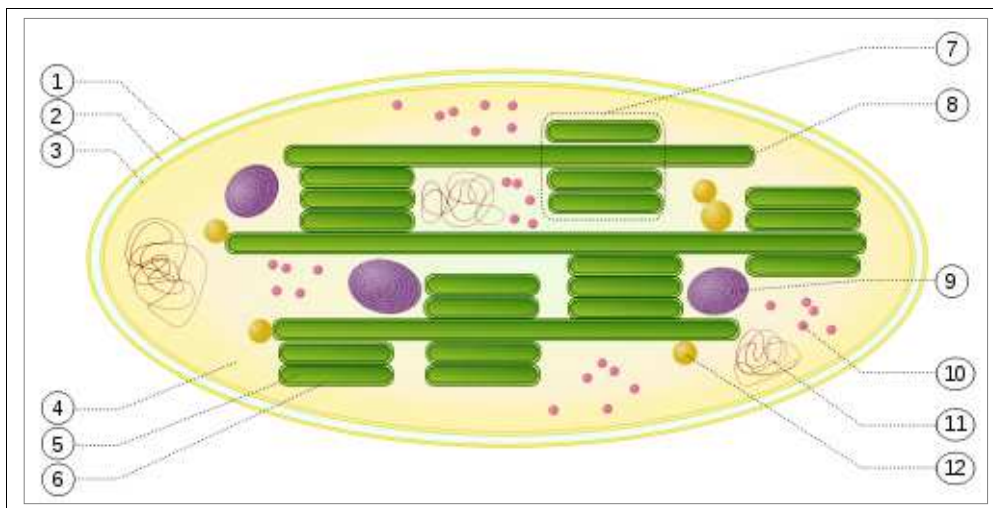


**Obr. 1** Kultura složená z dvou a čtyřbuněčných cenobií *Scenedesmus quadricauda* (Anonym, 2012 – 5)

### 3.2. Fotosyntéza u eukaryotních buněk

Řasy mají fotosystém téměř shodný s C3 rostlinami (Hall, 1999).

Fotosyntéza probíhá u eukaryotních buněk v chloroplastech (obr. 2). Přesněji, v chloroplastu přítomných tylakoidech.



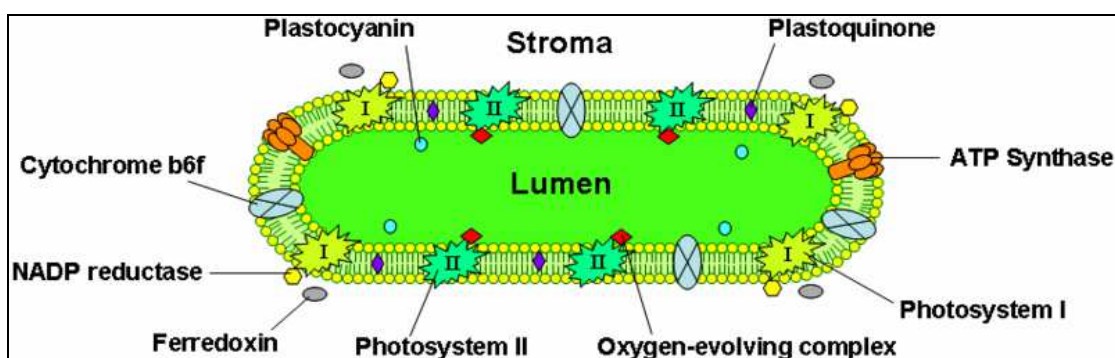
**Obr. 2** Chloroplast (Anonym, 2012 -2)

- (1) mezimembránový prostor (2) vnitřní membrána (3) vnitřního prostor, který je vyplněn vodným roztokem neboli stromou, (4) stroma, (7) shluky tylakoidů - grana.  
 (8) stromálními tylakoidy. (5) dutina tylakoidu zvaná lumen  
 (6) membrány tylakoidů, (10) ribozom, (11) DNA plastidu, (12) tukové kapénky

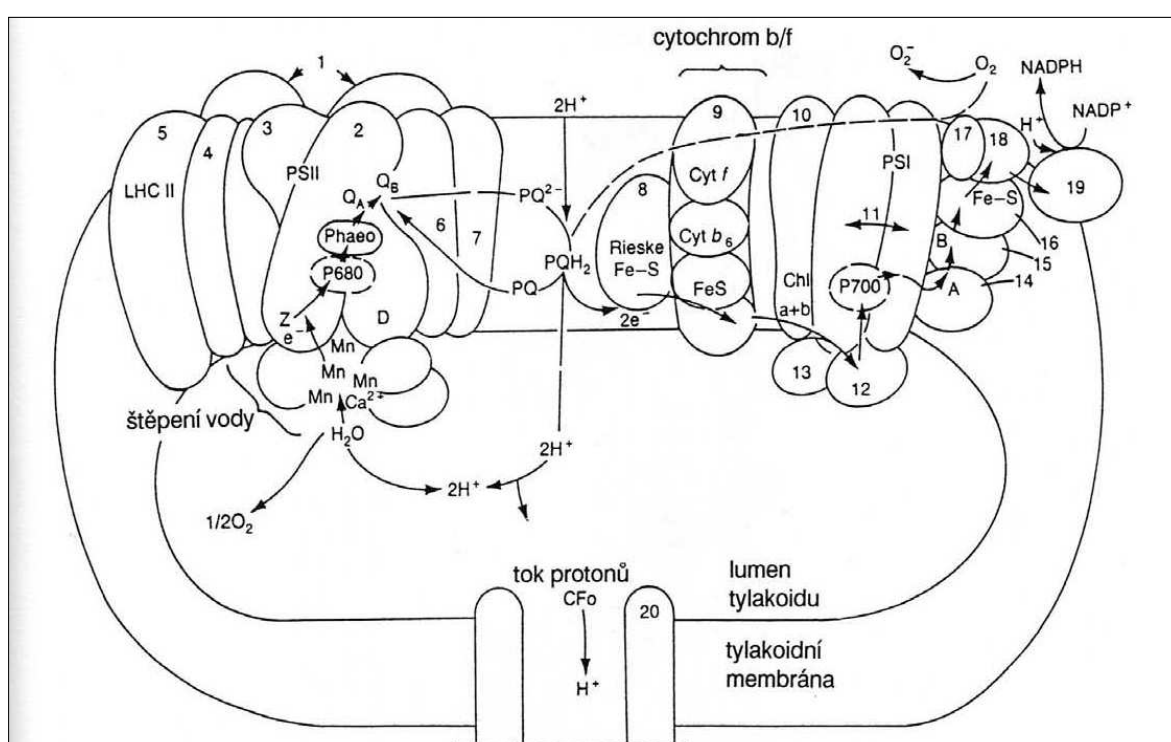
Tylakoidy jsou v chloroplastu organizovány dvojím způsobem. Buď se jedná o shluky neboli grana, do kterých jsou tylakoidy nahloučeny nebo se vyskytují samostatně. V tomto případě se jedná o tzv. stromální tylakoidy, jejichž celý povrch je omýván stromou. Poměr mezi stromálními a granálními tylakoidy závisí na podmínkách během vývoje chloroplastu. Zvláště významné je světlo (Procházka et al., 1998).

Samotná fotosyntéza probíhá v tylakoidních membránách (obr. 3 a 4). Membrány sousedící s jinou tylakoidní membránou se nazývají stěsnané. Ty, které jsou omývány stromou, jsou nestěsnané. Vzájemně se liší v obsahu pigmentoproteinových komplexů.

Jedna fotosyntetická jednotka se skládá zhruba z 300 molekul chlorofylu. 99 % z nich jsou tzv. antény, jejichž funkcí je pouze světlosběrná absorpce a předávání zachycené energie do reakčních center (Procházka et al., 1998).



**Obr. 3** Rozmístění fotosystému v tylakoidu (Anonym, 2012 - 3).



**Obr. 4** Uspořádání hlavních složek fotosystému v tylakoidní membráně podle Lawlora (1993) (Procházka et al., 1998).

1 - pigmentoproteinový komplex antény, 2 - bílkovina D1, 3 – bílkovina D2, 4 – cytochrom  $b_{559}$ , 5 – světloběrná anténa, 6 – bílkovina ( $M_t = 10000$ ), 7 – stabilizující membránová bílkovina ( $M_t = 22000$ ), 8 – Rieskeho centrum Fe-S, 9 – cytochrom  $b_6/f$  s polypeptidy, 10 – světloběrný pigmentoproteinový komplex PSI, 11 – bílkovina s navázaným feredoxinem, 18 – feredoxin, 19 – flavoprotein (Fp), 20 – membránová jednotka spřahovacího faktoru  $CF_0$ , Z, D – tyrozin na bílkovině D1 a D2.

## 3.2. Pronikání látek do eukaryotní buňky

Látky přecházející z vnějšího prostředí do buněčného, musí překonat rozhraní buňky, polopropustnou cytoplazmatickou membránu, nazývanou také plazmalema. Látky se přes ní dostávají buď pasivně nebo aktivně.

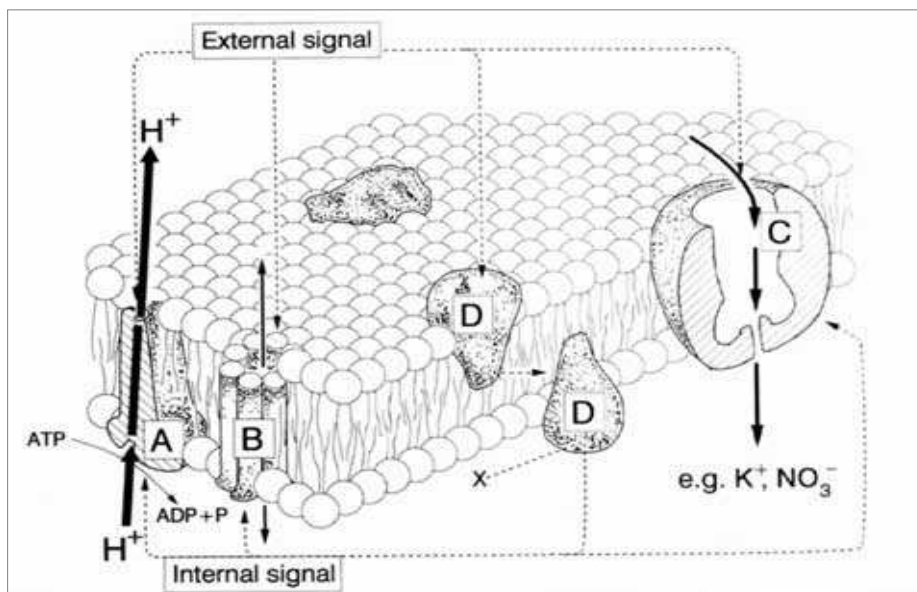
### 3.2.1. Pasivní transport:

Je výhodný z hlediska energetických nákladů.

Zde hrají roli dva jevy difúze a osmóza. **Difúze** je jev, kdy se látka z prostředí, kde má vyšší koncentraci, šíří do prostředí s nižší koncentrací tak dlouho, až se její koncentrace v obou prostředích vyrovná. **Osmóza** je specifickým projevem difúze, při němž se vyrovná koncentrace látek, které jsou naředěné v rozpouštědle na různé koncentrace a jsou odděleny polopropustnou membránou, která je prostupná pro rozpouštědlo (Procházka et al., 1998).

### 3.2.2. Aktivní transport

Látka se při něm váže na bílkovinný přenašeč, který je pro ni uzpůsoben. Ten jí na druhé straně vypustí viz. obr. 5. Jedná se o druh transportu náročný na energii, buňka ale může ovlivňovat rychlost i směr transportu. Výhodou je, že může fungovat i proti koncentračnímu spádu.

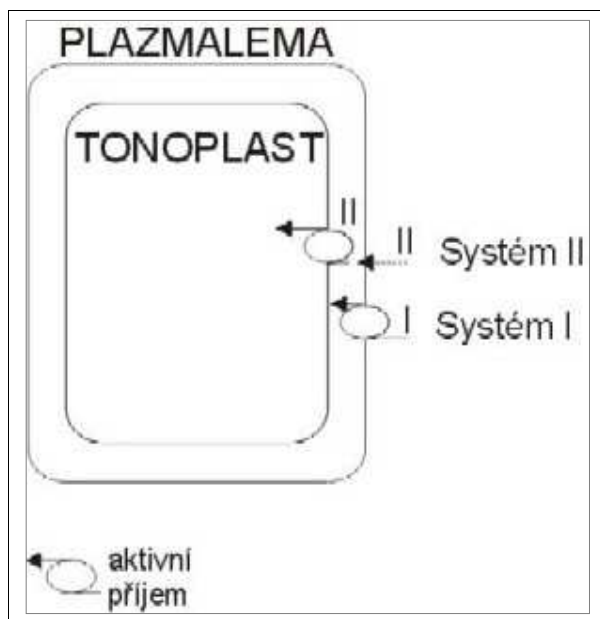


**Obr. 5** Mechanismus transportu iontů přes plazmalemmu. ( A) protonová pumpa, ( B) iontový kanál, ( C) přenašeč, ( D) spřažené proteiny pro percepci a transdukcii. (Richter, 2004 – 1)

## Systém I a systém II

V buněčných membránách jsou dva typy přenašečů bílkovinného charakteru. Pro každý iont jsou specifické v závislosti na koncentracích. Při ( $< 1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ), se uplatňuje tzv. systém I s vysokou afinitou k iontům a při koncentracích ( $> 1 \text{ mmol.l}^{-1}$ ), tzv. systém II.

V cytoplazmatické membráně jsou při nízkých koncentracích iontů v činnosti jen mechanismy systému I. Systému II funguje při vysokých koncentracích iontů, kdy je systém I odpojený. Ionty se transportují difúzí přes plazmalemu a nosič funguje v tonoplastu. Předpokládá se, že mechanismy jednoho systému fungují v jedné a druhého systému v druhé membráně (Richter, 2004 – 1) viz. obr. 6.



**Obr. 6** Funkce systému I a II. (Richter, 2004 – 1)

Živá buňka má snahu udržet si poměr mezi syntézou organických kyselin a uvolňováním  $H^+$  z buňky a tím i o udržení její elektroneutality. Regulace pH v buňce je proto přímo spojena s metabolismem, při kterém se buď produkuje nebo spotřebovává  $H^+$ . Produkty metabolismu obsahující C, H, O a N mají vždy negativní náboj, karboxylové skupiny převládají nad  $NH_3$ . Přebytek karboxylových skupin musí buňka vyrovnat anorganickými kationty, aby byla zachována elektroneutralita. Ta je potřebná, protože většina enzymů cytoplazmy má optimum pro svou aktivitu při pH mezi 6 -7. Ve vakuole je pH nižší ( 5-6). Enzymy v cytoplazmě jsou velmi citlivé, proto je kontrola pH v buňce základní podmínkou metabolismu.

Zda bude vytěsněno  $H^+$  nebo  $OH^-$  závisí na tom, jaký iont do ní vstupuje. Při vstupu  $NO_3^-$  nebo  $SO_4^{2-}$  se z buňky uvolňuje  $OH^-$  a při vstupu  $NH_4^+$   $H^+$ .

V průběhu dýchání buňky pH cytoplazmy klesá kvůli uvolňování  $H^+$ , který se dostává z mitochondrií do cytoplazmy nebo do vnějšího prostředí. Zároveň se antiportem transportuje dovnitř  $K^+$ . Turgor se zvyšuje a pH cytoplazmy roste.

Draslík  $K^+$  přijatý výměnou za  $H^+$  se buď může účastnit neutralizace kyselin nebo se může ukládat ve vakuole. Organické kyseliny jsou syntetizovány, dokud probíhá výměna vytěsněného protonu za  $K^+$  anebo než se produkty této syntézy převedou do vakuoly.



Metabolismus vysílá signály podle změny pH v buňce. Ty pak vedou k produkci  $H^+$  nebo  $OH^-$ .

Proton ( $H^+$ ) může znovu vstupovat do buňky podle jejích požadavků na neutralizaci skupin  $OH^-$ . Jedná se o tzv. recirkulaci.  $OH^-$  ionty tuto schopnost nemají (Richter, 2004 – 1).

### 3.3. Způsob příjmu kovů řasami

Jednobuněčné řasy přijímají látky skrz buněčnou stěnu pasivně nebo aktivně. Pasivní příjem se označuje termínem biosorpce, aktivní jako bioakumulace (Davis et al., 2003). K biosorpci dochází u řas dvěma způsoby: tvorbou komplexů a tak zvanou iontovou výměnou. Termín iontová výměna není přesný, protože mechanismy iontových vazeb souvisí s fyzikou (Van der Waalsovy síly) a chemií (iontové a kovalentní vazby). Jedná se tedy spíše o sorpci (Davis et al., 2003). Komplexy vznikají reakcí kationtu s aniontem a vzniklá vazba může mít charakter kovalentní nebo elektrostatický. Z celé buňky se na biosorpci podílí nejvíce buněčná stěna. To je dáno její elektrostatickou přitažlivostí a schopností tvorby komplexů (Davis et al., 2003). Buněčná stěna hraje roli do té míry, že řasy, které jí netvoří vůbec nebo jen v části svého vývojového cyklu, nepatří mezi dobré sorbenty kovů. (Lee, 1999). Buněčné stěny obsahují složky, které se v závislosti na dalších faktorech mezi které patří například pH, dávka, přítomnost vysoce afinitních látek schopných vázat kovy z prostředí na buněčném povrchu, efektivita systému příjmu a uskladnění kovu v buňce, příznivý poměr povrchu organismu k jeho objemu podílejí na schopnosti vázat kovy. Mezi nejvýznamnější komponenty patří skupiny karboxylová, hydroxylová a thiolová, přičemž karboxylová je považována za nejvýznamnější (Fourest & Volesky, 1996). Míra jejich uplatnění však závisí na dalších okolnostech. Především pH. Například při zvýšení pH (cca do hodnoty 10) karboxylová skupina není schopna vykázat maximální aktivitu a sorpci zajišťují ve větším poměru thiolové skupiny. Při dalším zvýšení pH (nad hodnotu 10) vykazuje analogicky nejvyšší aktivitu hydroxylová skupina (Davis et al., 2003). Dle Rajmani et al. (2007) je schopnost řas adsorbovat a metabolizovat stopové prvky včetně toxických kovů dána díky:

přítomnosti vysoce afinitních látek schopných vázat kovy z prostředí na buněčném povrchu

efektivnímu systému příjmu a uskladnění kovu v buňce

příznivému poměru povrchu organismu k jeho objemu

Kromě pH závisí příjem také na vlastnostech prostředí, (např. hodnota) a dávce, které jsou organismy vystaveny (Gupta et al., 2005).

### **3.4. Působení těžkých kovů na buněčný metabolismus**

Těžké kovy mohou v závislosti na dalších faktorech i v malém množství výrazně ovlivnit buněčný metabolismus následujícími způsoby:

ireverzibilním nárůstem propustnosti plazmalemy, vedoucím k úniku buněčných roztoků, jako jsou např. osmotika (zejména draslík) do prostředí

redukcí intenzity fotosyntetického elektronového transportu a fotosyntetické fixace uhlíku,

inhibicí spotřeby kyslíku při respiraci,

narušením procesů příjmu živin,

inhibicí enzymů v důsledku substituce esenciálních iontů kovů,

inhibicí syntézy proteinů,

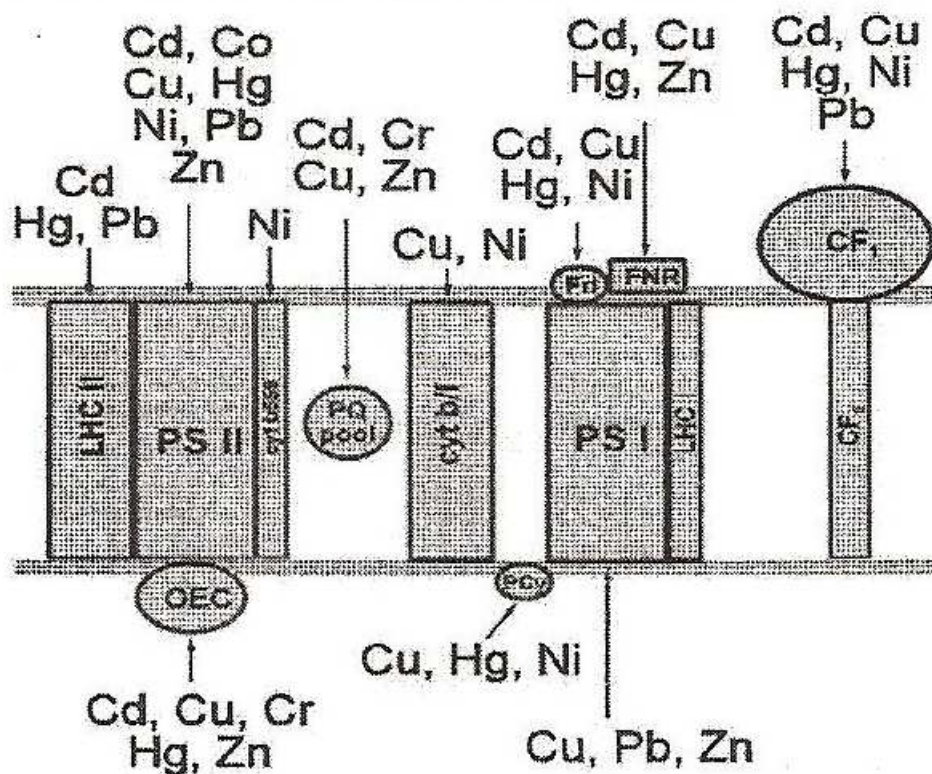
abnormálním morfologickým vývinem a ultrastrukturálními změnami

omezením pohyblivosti a ztrátou bičíků,

degradací fotosyntetických pigmentů spojenou s redukcí růstu vedoucí v krajních případech ke smrti buňky (Zavřel, 2011)

### 3.5. Působení těžkých kovů na fotosystém

Při pokusech prováděných *in vitro* na izolovaných chloroplastech nebo tylakoidních membránách, kde nebylo působení těžkých kovů ovlivněno propustností buněčných stěn a dalšími okolnostmi bylo zjištěno, že těžké kovy zasahují fotosystém v místech uvedených na obrázku 7.

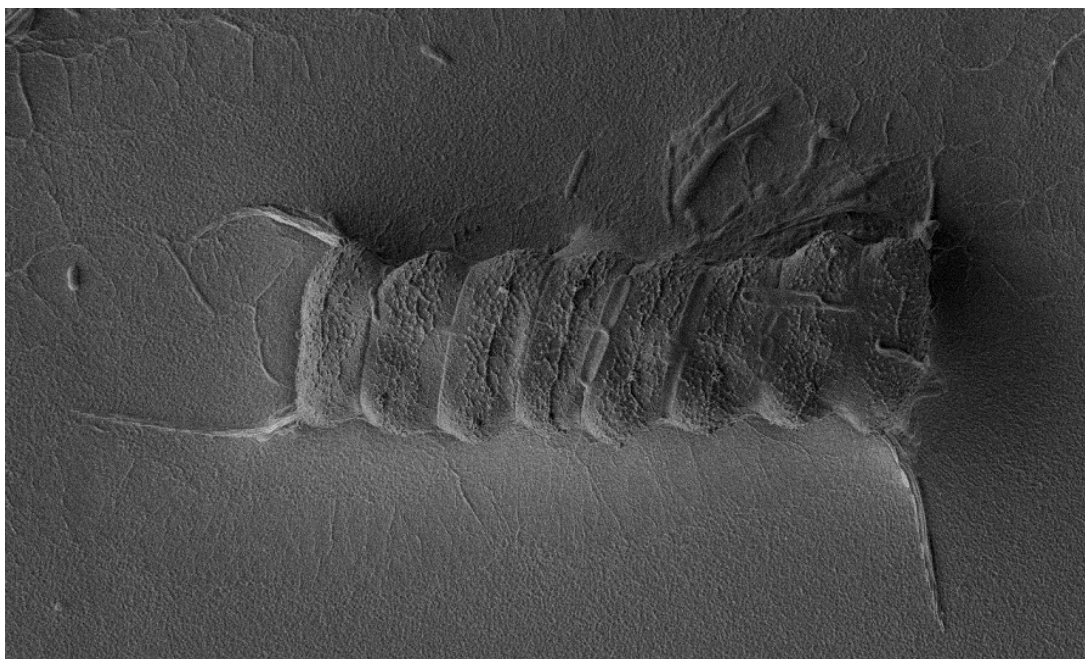


Obr. 7 Místa působení některých kovů na fotosystém (Krupa, 1995).

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Ěasa *Scenedesmus*

Ěasa *Scenedesmus quadricauda* (obr. 8) byla získána ze sbírky Mikrobiologického ústavu v Třeboni a udržovaná na Ústavu fyzikální biologie Jihočeské univerzity na Nových Hradech.



**Obr. 8** Osmibuněčné cenobium *Scenedesmus quadricauda* v elektronovém mikroskopu. (foto autor).

### 4.1. Postup přečištění a izolace buněčné kultury řasy ze smíšené kultury

K pokusům na určitém druhu řasy je jí třeba nejprve izolovat a převést jí do čisté kultury použitelné v laboratoři.

Izolace musí probíhat vždy za podmínek, kdy se je řasa schopná množit. Smíšená kultura byla umístěna v laboratoři do podmínek, kde se mohla řasa množit a ponechána 2 až 3 týdny v klidu. Před započítím izolace byla prohlédnuta voda ze vzorku. Když se v ní vyskytoval cílový druh řasy, byla voda natřena na 3% agar s médiem v Petriho misce a ve vhodných podmínkách se nechala růst. Po vytvoření zeleného povlaku byl tento z co nejmenší plochy seškrábán očkovací kličkou a mikroskopicky potvrzena přítomnost žádané řasy. Z toho místa vzorku byl odebrán opět co nejmenší vzorek, který byl opět natřen na co největší plochu agaru v Petriho misce a ponechán, aby dále rostl. Postup byl opakován tak dlouho, dokud se na misce nevyskytoval jen žádaný druh řasy.

Pokud byla kultura po dvojitým nebo trojitým natřením na Petriho misku stále čistá. Byla převedena zpět do sbírky. Toto bylo provedeno natřením očkovací kličkou na šikmý agar s příslušným médiem ve zkumavce.

Sbírka se uchovává v uzavřených zkumavkách ve stojánku za teploty 22°C, v přítmí tak, aby rostla co nejpomaleji.

#### **4.2. Kultivace řasy**

Po celou dobu kultivace bylo využíváno médium podle Simmera a Šetlíka. Pro přípravu média se používají zásobní roztoky ve složení:

1. zásobní roztok  $\text{KNO}_3$  – 202,1 g.

Chelatonát  $\text{Fe}^{+}$  - 1,85 g.

$\text{CaCl}_2$  - 1,55 g.

2. zásobní roztok

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 98,8 g.

3. zásobní roztok

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 34 g.

4. zásobní roztok - Mikroelementy

$\text{H}_3\text{BO}_3$  - 3,086 g.

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{SO}_4$  -1,18 g.

CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 1,4 g.

CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O - 1,24 g.

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 1,43 g.

5. zásobní roztok

(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O - 1,84 g.

Do destilované vody bylo přidáno na 1 litr média 10 ml zásobního roztoku č. 1, 2 a 3. Ze zásobních roztoků 4 a 5 byl přidán vždy 1 ml. Nakonec bylo po sterilizaci upraveno pomocí 1 M KOH pH na 6,9.

### **Příprava kultivačního média**

Láhev byla naplněna vodou tak, aby byl po přidání zásobních roztoku objem média 1 litr. Pak byla uzavřena a označena. Nakonec byla přiložena indikátorová páska. Ta se používá jako kontrola podmínek sterilizace. Za dostatečnou dobu lze považovat sterilizaci autoklávováním po dobu 20 minut při teplotě 124°C. Po vychladnutí média bylo v laminárním boxu upraveno pH 1M roztokem KOH. Při další manipulaci s médiem byla vždy dodržena zásada, že veškerá manipulace s otevřenou lahví se provádí jen v laminárním boxu a při nalévání se hrdlo láhve nesmí dotýkat nádob, do kterých medium naléváme. Tím se zabraňuje případné kontaminaci média řasou.

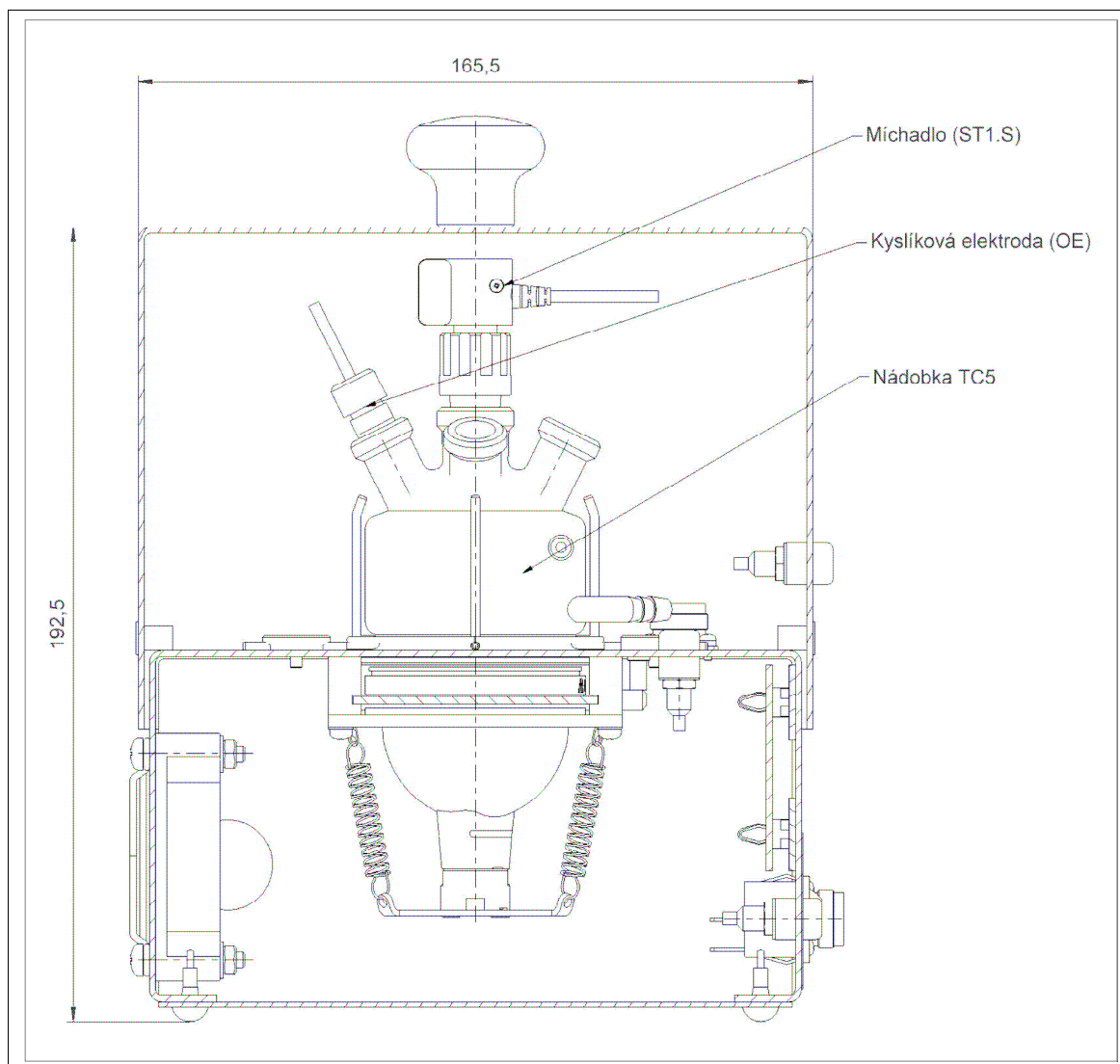
### **Vlastní kultivace řas**

Samotná kultivace řas pro pokusy probíhala ve speciální laboratoři UFB JCU v Nových Hradech. V místnosti byla pomocí klimatizace udržována teplota 22°C.

Ze šikmého agaru byla kultura po seškrábání očkovací kličkou a umístěna do tekutého média, kde byla dále pěstována v kultivačním stole v Erlenmeyerových baňkách o obsahu 100 ml naplněných 50 ml média. Kultury byly stále promíchávány frekvencí 150 rpm. Osvětlení bylo shora pomocí zářivek rovnoměrně rozložených nad plochou stolu. Světla svítla nepřetržitě. V místě, kde byla třepána kultura, byla intenzita osvětlení 20 umol. Kultivace probíhala vždy tak dlouho, až naměřená hodnota optické density ( dále jen OD) přesáhla hodnotu 4,8.

### 4.3. Použitý přístroj a aparatura

Pro měření obsahu rozpuštěného kyslíku v médiu byla použita aparatura Algareact, vyvinutá firmou BVT Technologies.



**Obr. 9** Analyzátor růstu řas – řez aparaturou. (Anonym, 2012 – 4)

Aparatura se skládá z cely s dvojitým pláštěm. Ten je přizpůsoben pro připojení zdroje média, které udržuje teplotu nastavenou podle podmínek pokusu. Cela je zespodu osvětlena halogenovou žárovkou umístěnou v reflektoru. Mezi celou a reflektorem je



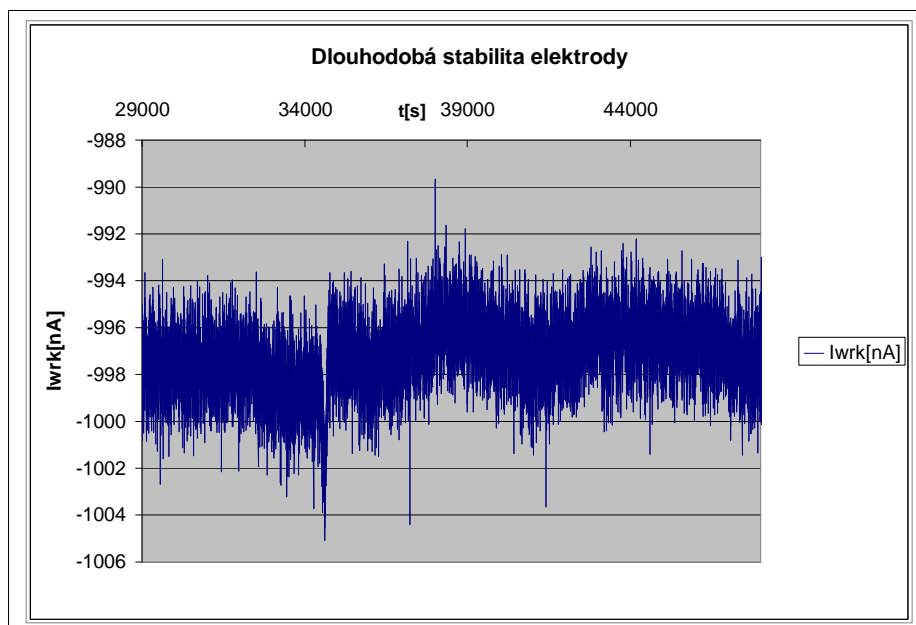
pohyblivá planžeta s otvory se závitem pro upevnění světelných filtrů. To umožňuje měnit kvalitu světla i jeho intenzitu viz. obr. 9 a obr. 10.



**Obr. 10** Sestava Algareact (Anonym, 2012 – 4)

Uvnitř cely je umístěna elektroda OE1. Míchadlem ve tvaru komolého kužele je na ní hnána měřená kultura. Elektroda má membránu selektivně propustnou pro kyslík. Vnitřek elektrody je tvořen platinovým drátkem zalitým ve skle. Ten dosahuje až k membráně. Konec drátku je volný. Kolem je ve spirále navinuta referenční elektroda ze stříbrného drátku. Elektroda ani během pokusů prováděných v řádu dní nemění své nastavení viz. obr. 11.





**Obr. 11** Stabilita elektrody OE 1. (Anonym, 2012 – 6)

Po spuštění Algareactu byla vždy zapnuta regulace teploty, která byla prováděna pomocí externího kryostatu o výkonu 2 kW. Ten hnal chladící médium do dvojitého pláště cely. Cela byla zespondu osvětlena halogenovou žárovkou. Intenzita a barva světla byla regulována pomocí filtrů připevněných do pohyblivé planžety pod celou. Na přístroji byl nastaven příslušný filtr a zadány podmínky, za kterých pokus probíhal. V tomto případě byl přístroj nastaven tak, že byl vzorek po vložení 1200 s ve tmě. Pak 2400 s osvětlen světlem o intenzitě cca 450 umol. Po této době se opět zhaslo světlo a vzorek zůstal na 1200 s ve tmě. Pak byl znovu osvětlen na 2400 s. Přidávání jakýchkoliv látek ke vzorku a úprava pH bylo vždy prováděno před nadávkováním řasové kultury do cely za stálého míchání. Dávkování vzorku i dalších látek jsem prováděl pomocí nastavitelné pipety od firem Biohit nebo Eppendorf.

#### 4.3.1. Kalibrace přístroje

Před započítím pokusů bylo vždy kontrolováno jeho nastavení. Cela aparatury byla po zapnutí naplněna 10 ml destilované vody. Poté, co dosáhla teplota přednastavených 25°C, bylo spuštěno míchání a záznam. Po 5 minutách byl záznam zastaven a přečtena hodnota kyslíku rozpuštěného ve vodě. Pokud byla v rozmezí 8,2 – 8,3 mg/l, nebylo nastavení dále upravováno. Byla – li mimo uvedené rozmezí, byl přístroj znovu nakalibrován.

Při kalibraci byla cela naplněna 10 ml destilované vody a po dosažení přednastavené teploty bylo spuštěno míchání. Hodnota na výstupu elektrody byla sledována na grafu řídicího software. Jakmile křivka přestala klesat nebo stoupat, bylo měření ukončeno a přistoupeno k samotné kalibraci. Na jejím počátku bylo spuštěno míchání a záznam. Po cca třech minutách bylo z míchané náplně odsáto 8 ml a dolito 10 ml nasyceného roztoku siřičitanu sodného. Tím byl odstraněn veškerý rozpuštěný kyslík. Jakmile hodnota na výstupu kyslíkové elektrody přestala klesat, bylo měření zastaveno, uloženo a výsledek zpracován pomocí software přístroje. Tak byla získána kalibrační konstanta.

#### **4.3.2. Příprava vzorku pro pokus**

Kultura v Erlenmayerově baňce byla vždy otevřena v laminárním boxu a byl z ní odebrán vzorek ke změření optické density (dále jen OD) přístrojem Densilameter III, který udává hodnoty v jednotkách Mac Farland. Pro vlastní experiment byla užitá kultura o OD mezi 4,8 – 5,2.

#### **4.4. Metoda stanovení rozpuštěného kyslíku**

Metoda je založena na měření množství kyslíku rozpuštěného v médiu, které je ukazatelem fotosyntetické aktivity. Vzorek proudí pomocí otáčejícího se konického míchadla na membránu kyslíkové elektrody. Data z ní jsou předávána do počítače ve vzorkovacích intervalech, kde jsou dále zpracovávána programem v reálném čase. Výhodou metody je její rychlost. Z kultury není potřeba během pokusu odebírat vzorky ani do ní jinak zasahovat. Pomocí posuvné planžety osazené sadou výměnných světelných filtrů lze nastavit i intenzitu a barvu osvětlení. Halogenová žárovka, která slouží jako zdroj osvětlení, není regulována. Nemění tudíž teplotu ani intenzitu světla. Teplotu, za které pokus probíhá, udržuje termostat s přesností 0,1 °C.

Pokusy byly prováděny se sloučeninami  $K_2Cr_2O_7$ ,  $CdSO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $CoSO_4$  a  $ZnSO_4$  přidávanými těsně před započítáním měření do odměřeného množství řasové kultury v koncentracích 0,1 M, 0,01 M a 0,001 M.

Po ověření čistoty kultury v mikroskopu a její optické density v přístroji Densilameter III, byla OD kultury v Erlenmayerově baňce upravena doředěním médiem

na hodnotu mezi 4,8 a 5,2, pokud jí přesahovala. Když byla hodnota OD pod 4,8, nebyla kultura použita. U vzorků pro pokusy s koncentrací 0,1 M byla OD ponechána o 10 % vyšší, protože množství roztoku s těžkým kovem zvětšovalo objem vzorku o 1/10.

Kultura z Erlenmayerovy baňky byla napipetována do kádinky o velikosti 50 ml, kde k ní bylo přidáno odpovídající množství 0,5 M nebo 1 M roztoku zkoušené sloučeniny tak, aby výsledná koncentrace dosáhla 0,1 , 0,01 nebo 0,001 M. V případě, že bylo nutno upravovat pH, bylo toto provedeno roztokem 10 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  nebo 3 M KOH. U koncentrace 0,1 M bylo k již potřeba k vyrovnaní pH nezanedbatelné množství roztoku KOH. Vyrovnaní pH bylo tedy provedeno poprvé na vzorku, který odpovídal vzorku se kterým se provádělo měření, ale bylo vyzkoušeno, kolik roztoku je třeba k úpravě na požadované pH. Pak bylo množství kultury o tento objem zmenšeno.

Upravený vzorek byl ihned umístěn do cely Algareactu nastaveného popsáním způsobem a spuštěno měření. Po jeho skončení byl výsledek uložen do textového souboru a následně v software přístroje exportován do formátu .xls.

#### **4.5. Validace metody pomocí růstových křivek**

K ověření, zda lze k měření rozpuštěného kyslíku přistoupit jako k metodě, která ukazuje na skutečnou biologickou aktivitu řasy, bylo provedeno porovnání s růstovými křivkami při pH 5, 6, 7, 8 a 9, které patří mezi jednu z nejpoužívanějších metod. Při stejných hodnotách pak bylo v Algareactu měřeno množství kyslíku rozpuštěného v médiu.

K nasazení pokusu byla použita stejná kultura a stejné médium, jako při pokusech s měřením kyslíku. V kultuře bylo upraveno pH na hodnotu, která byla použita při konkrétním pokusu. Pak bylo upraveno na stejnou hodnotu pH média. V Bürkerově komůrce bylo spočítáno množství buněk v kultuře. Z výsledku bylo vypočítáno množství, které je potřebné přidat do média, aby počet buněk dosáhl 30000 na 1 ml. Následně byl vzorek v množství 1,5 ml napipetován do desky s 25 jamkami o objemu 1,8 ml a ponechán na stejném světle a při stejné teplotě jako kultura pěstovaná k pokusům. Buňky byly počítány vždy po 48, 120 a 168 hodinách.

## 4.6. Vyhodnocení měření

Měření sestávalo ze dvou těsně po sobě následujících period. Každá o délce 3600 s. Perioda začínala vždy temnou fází, která trvala 1200 s. Pak se rozsvítil zdroj světla na 2400 s. Každé měření bylo třikrát opakováno. Vždy byl použit nový vzorek. Z opakování byl vytvořen aritmetický průměr a ten použit pro další vyhodnocování.

V každé periodě ( tomto případě ve dvou) byla nalezena ve světelné fázi maximální hodnota, kterou produkce kyslíku dosáhla. Od ní byla odečtena hodnota minimální z temnotní fáze periody. Při teplotě 25°C se jednalo vždy o hodnotu blízkou 8,2 mg/l. Jedná se o přirozené nasycení vody kyslíkem při této teplotě.

U každého měření bylo v rozmezí 1000 až 1200 s nalezeno minimum. Pokud byla hodnocena druhá světelná perioda, bylo minimum nalezeno v rozmezí 3600 až 4800 s a toto odečítáno od výsledků získaných ve druhé světelné fázi.

V každé světelné fázi byla vždy nalezena maximální hodnota a od ní odečteno příslušné minimum

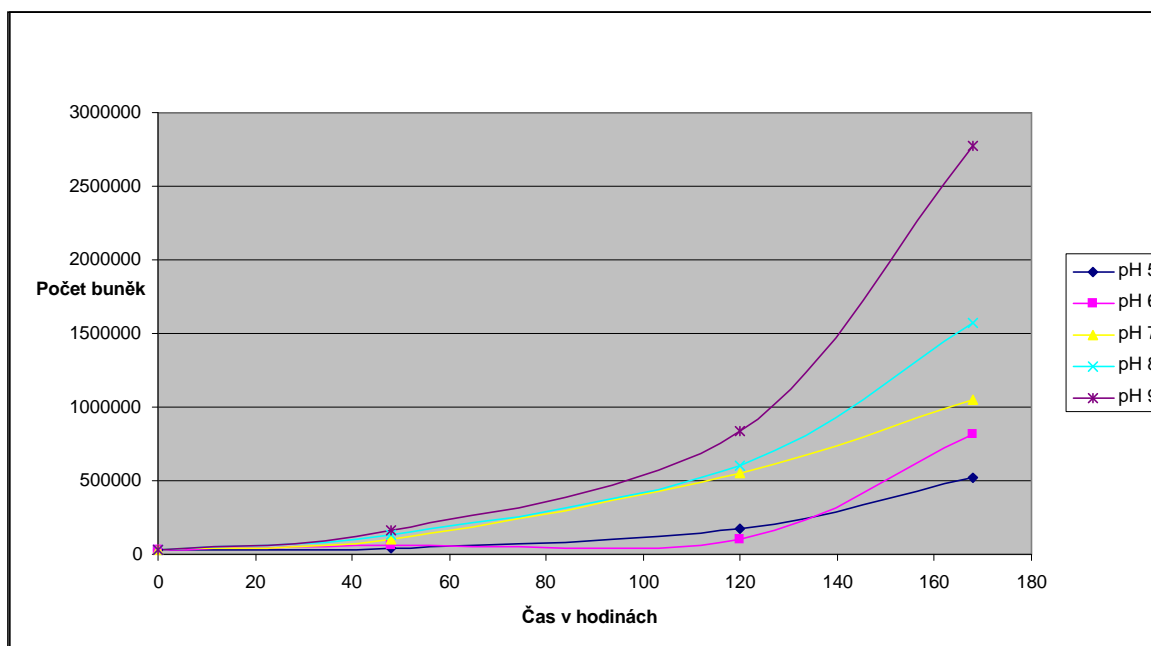
Z hodnot příslušné světelné fáze byl vypočítán průměr a od něj byla odečteno příslušné minimum.

Všechny hodnoty po odečtení minima z každé periody byly sečteny. Nejprve zvlášť pro 1. periodu a 2. periodu, pak byly obě hodnoty.

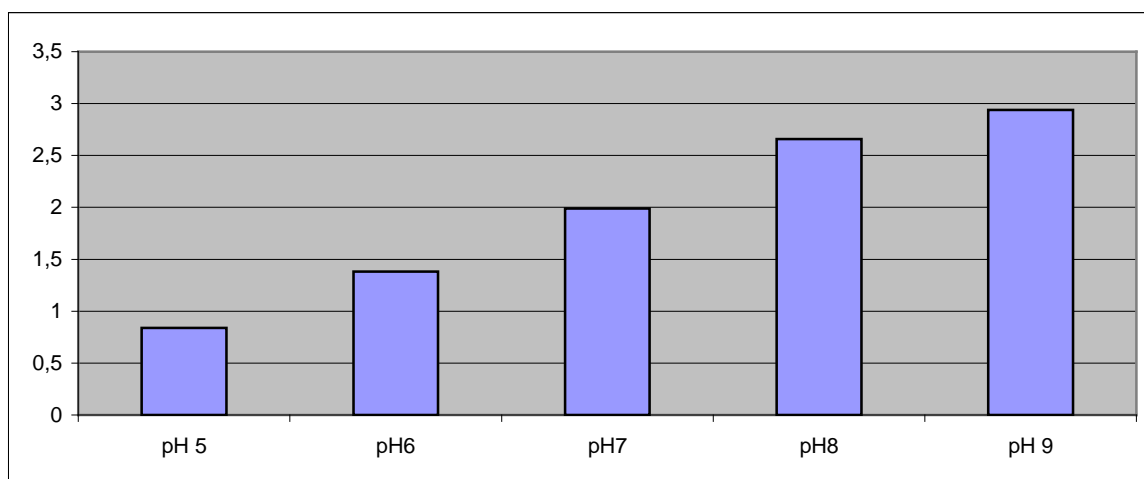
Průměrná produkce kyslíku v jednom měření ve světelné fázi vznikla sečtením všech hodnot kyslíku po odečtení minima a tato hodnota byla vydělena jejich počtem.

## 5. Výsledky

### Validace metody



**Obr. 12** Růstová křivka *Scenedesmus quadricauda* při různých pH.

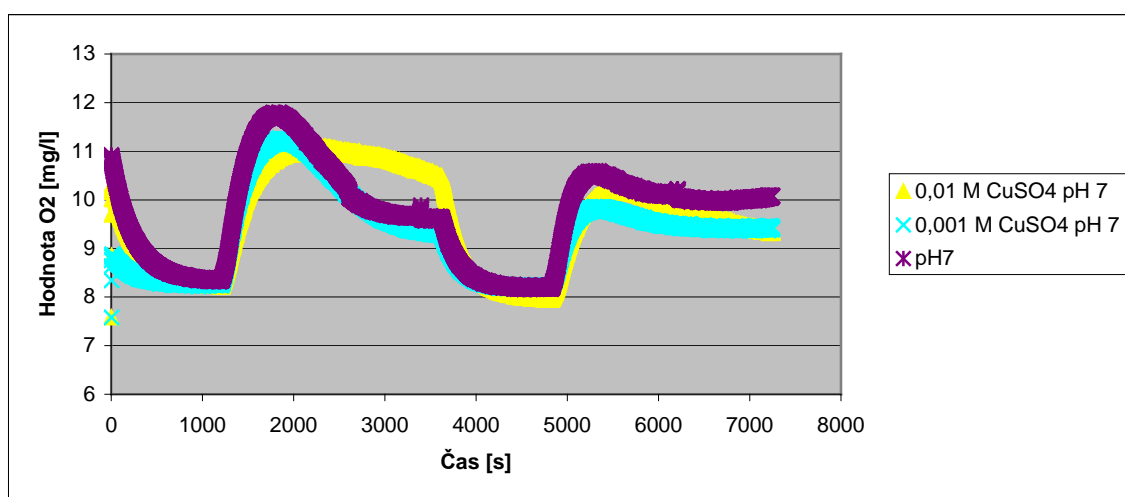


**Obr. 13** Průměrná produkce kyslíku *Scenedesmus quadricauda* v jednom měření ve světelné fázi při různých pH

Pořadí vzorků při obou použitých metodách bylo stejné viz. obr. 12 a 13. Čím vyšší bylo naměřené množství rozpuštěného kyslíku v jednom měření, tím větší byl i růst kultury při růstových křivkách. Tímto způsobem byla metoda validována.

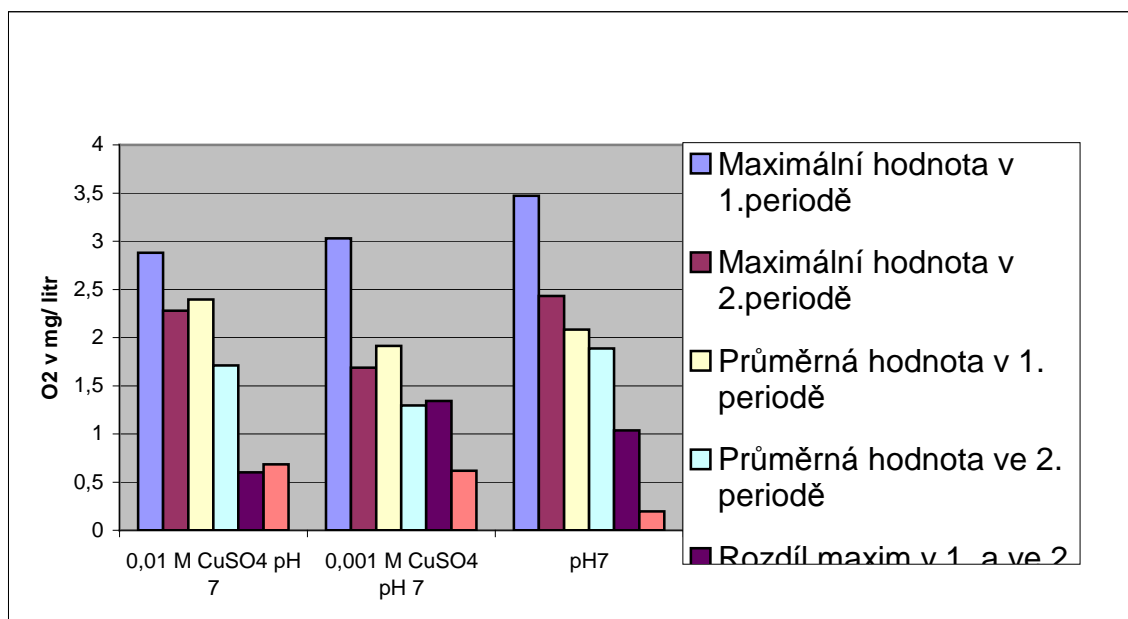
## Vyhodnocení jednotlivých sledovaných látek při různých koncentracích

### CuSO<sub>4</sub>



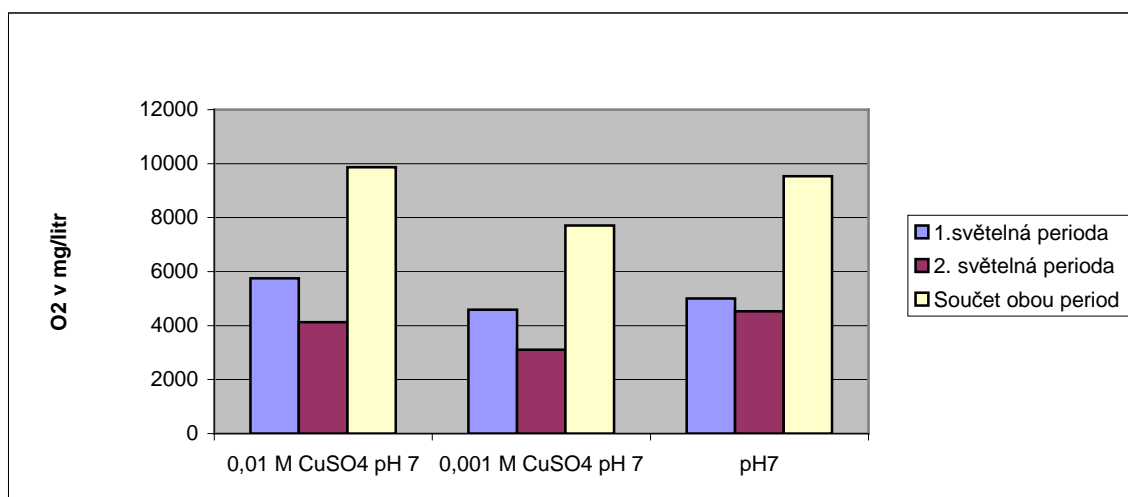
**Obr. 14** Porovnání obsahu kyslíku rozpuštěného v médiu při různých koncentracích CuSO<sub>4</sub> při pH 7.

U obou koncentrací je proti kontrole patrná změna tvaru křivky. Nejvíce se tvar mění u koncentrace 0,01 M v první periodě viz. obr. 14.



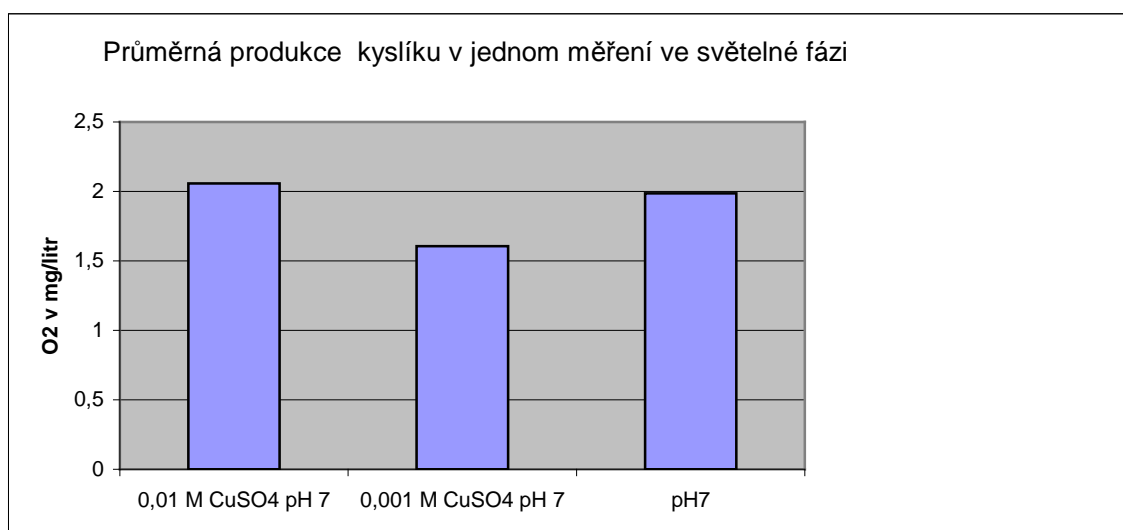
**Obr. 15** Sledované charakteristiky křivek O<sub>2</sub> rozpuštěného v médiu u sloučeniny CuSO<sub>4</sub> při pH 7.

Nevyšších maxim dosáhl vzorek v obou periodách při pH 7. Nejvyšší průměrná hodnota byla u 0,01 M CuSO<sub>4</sub> v první periodě viz. obr. 15.



**Obr. 16** Součet všech měření ve světelných fázích po odečtení přirozené hladiny rozpuštěného kyslíku.

Největší byl součet u všech měření a průměrná produkce kyslíku v jednom měření u 0,01 M CuSO<sub>4</sub> viz. obr. 16.



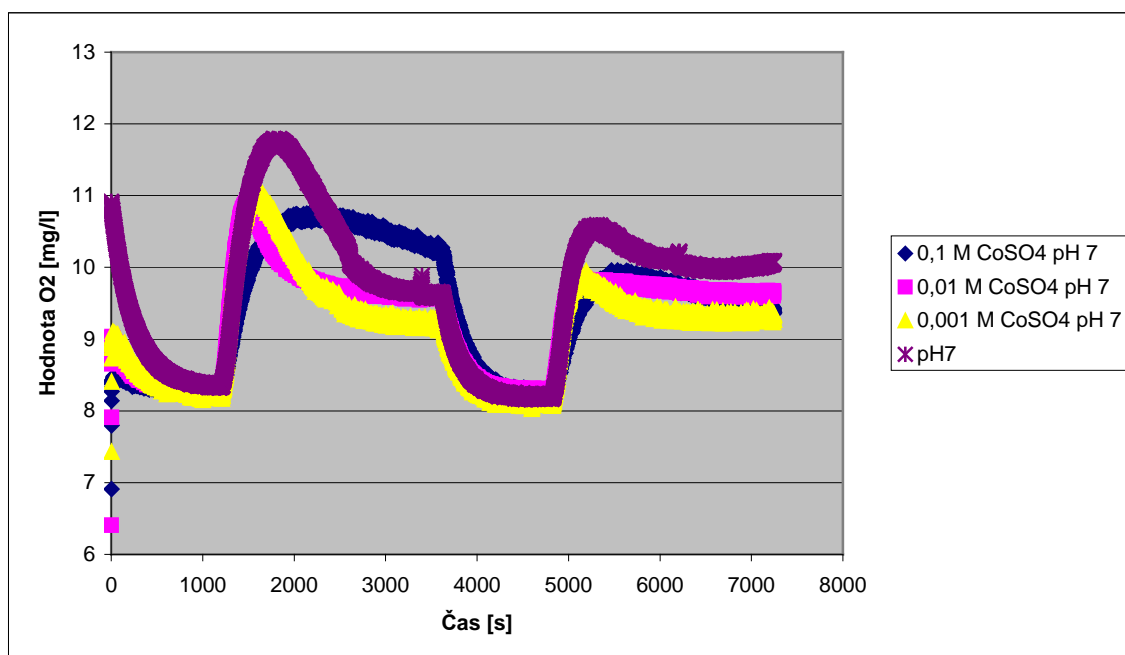
**Obr. 17** Průměrná produkce kyslíku v jednom měření ve světelné fázi.

Nejvyšší průměrná produkce kyslíku v jednom měření byla u 0,01 M CuSO<sub>4</sub> viz. obr. 17.

Účinek CuSO<sub>4</sub> je patrný jak na tvaru křivky v průběhu měření, tak na množství rozpuštěného kyslíku. Nejvýraznější projev byl u 0,01 M CuSO<sub>4</sub>. Měření 0,1 M CuSO<sub>4</sub> nebylo vyhodnoceno, protože látka v tak vysoké koncentraci po úpravě pH ucpávala membránu a nebylo možné získat hodnotitelná data.

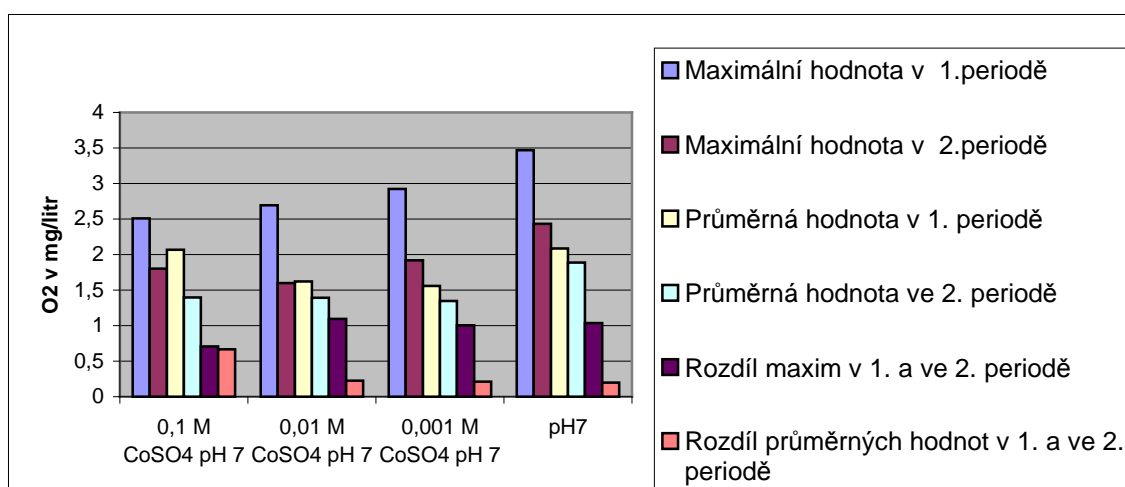


## CoSO<sub>4</sub>



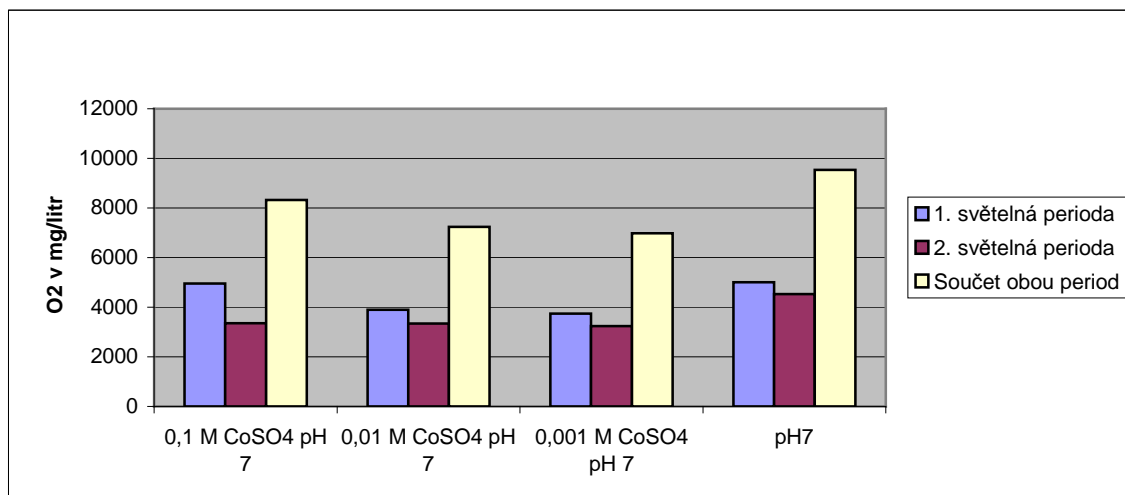
**Obr.18** Porovnání obsahu kyslíku rozpuštěného v médiu při různých koncentracích CoSO<sub>4</sub> při pH 7.

Nejvíce měnila křivka svůj tvar u koncentrace 0,1 M v první světelné periodě. Ve druhé pak u koncentrací 0,1M a 0,01 M viz. obr. 18.



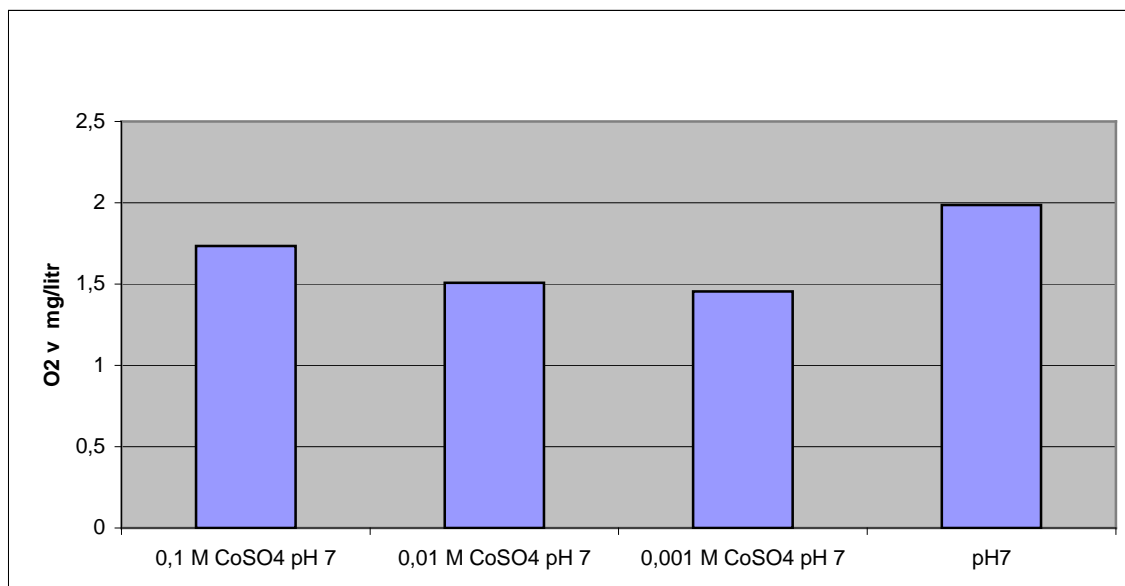
**Obr. 19** Sledované charakteristiky křivek rozpuštěného O<sub>2</sub> u sloučeniny CoSO<sub>4</sub>.

Nevyšších maxim dosáhl vzorek v obou periodách při pH 7. Stejně u tomu bylo i u průměrných hodnot viz. obr. 19.



**Obr. 20** Součet všech měření ve světelných fázích po odečtení přirozené hladiny rozpuštěného kyslíku.

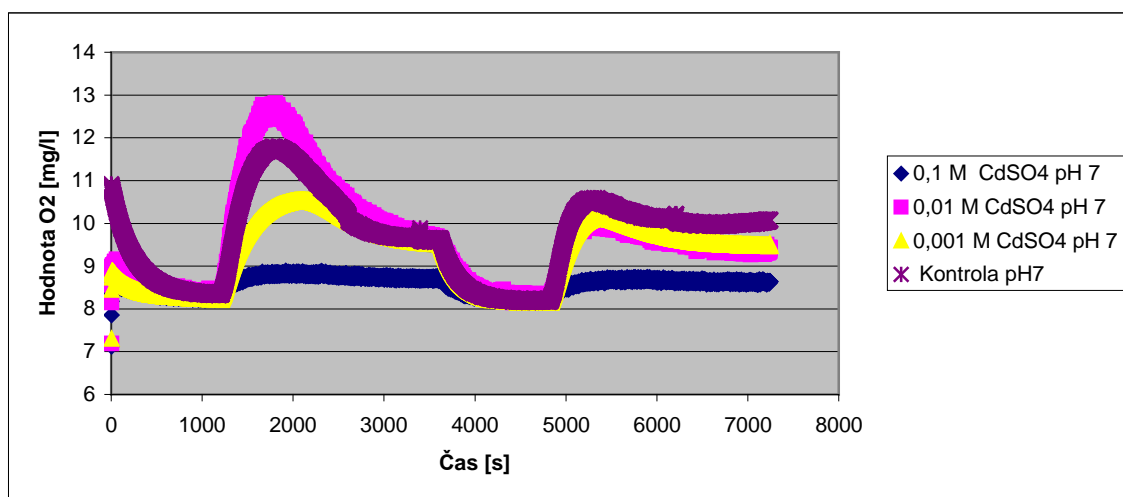
Největší součet všech měření byl u kontroly, následovala koncentrace 0,1 M. U ní byl i největší rozdíl mezi oběma periodami viz. obr. 20.



**Obr.21** Průměrná produkce kyslíku v jednom měření ve světelné fázi.

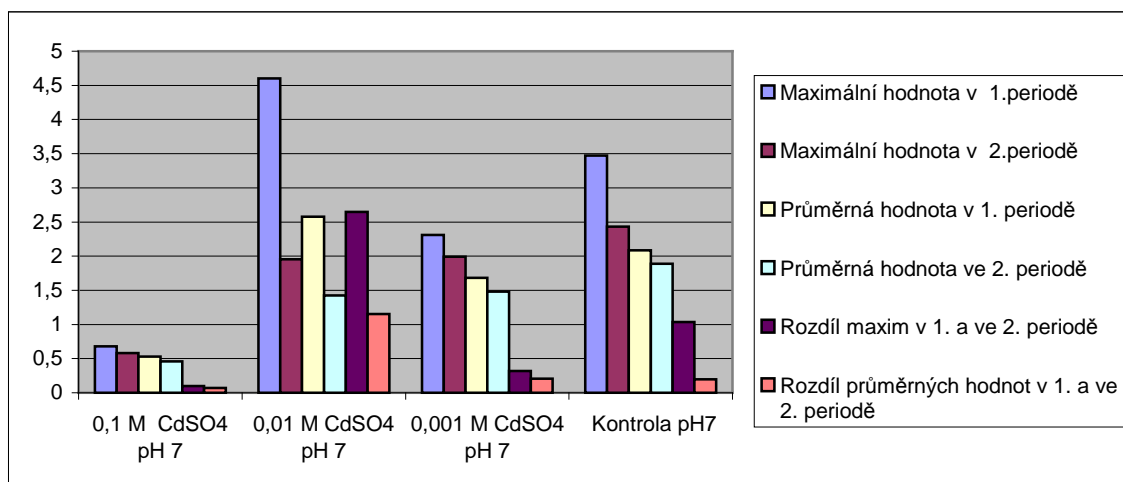
Nejvyšší průměrná produkce kyslíku v jednom měření byla u kontroly. Po kontrole následovala nejvyšší koncentrace  $\text{CoSO}_4$  za ní  $0,01 \text{ M CoSO}_4$ . Nejnižší hodnoty bylo dosaženo u  $0,001 \text{ M CoSO}_4$  viz. obr. 21.

## CdSO<sub>4</sub>



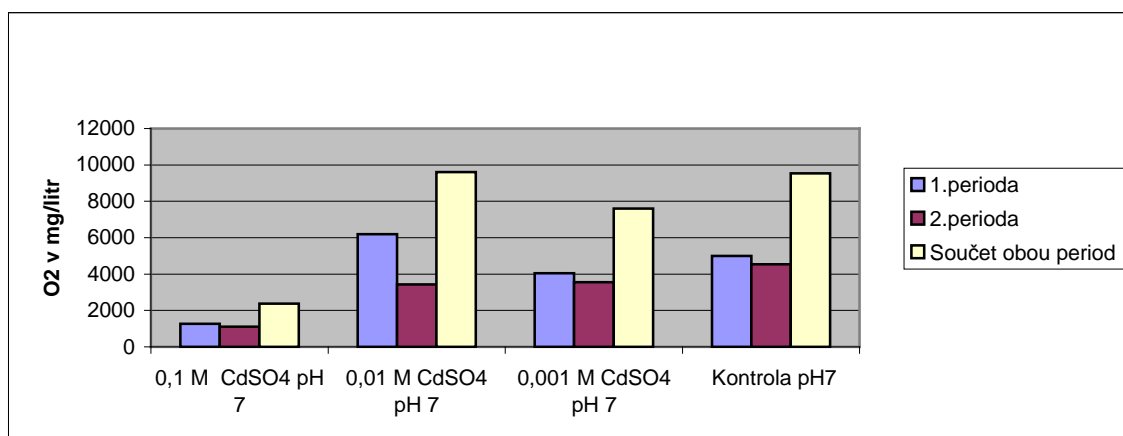
**Obr. 22** Porovnání obsahu kyslíku rozpuštěného v médiu při různých koncentracích  $\text{CdSO}_4$  při pH 7.

Nejvýrazněji se změnil tvar křivky u koncentrace  $0,1 \text{ M}$  viz. obr. 22.



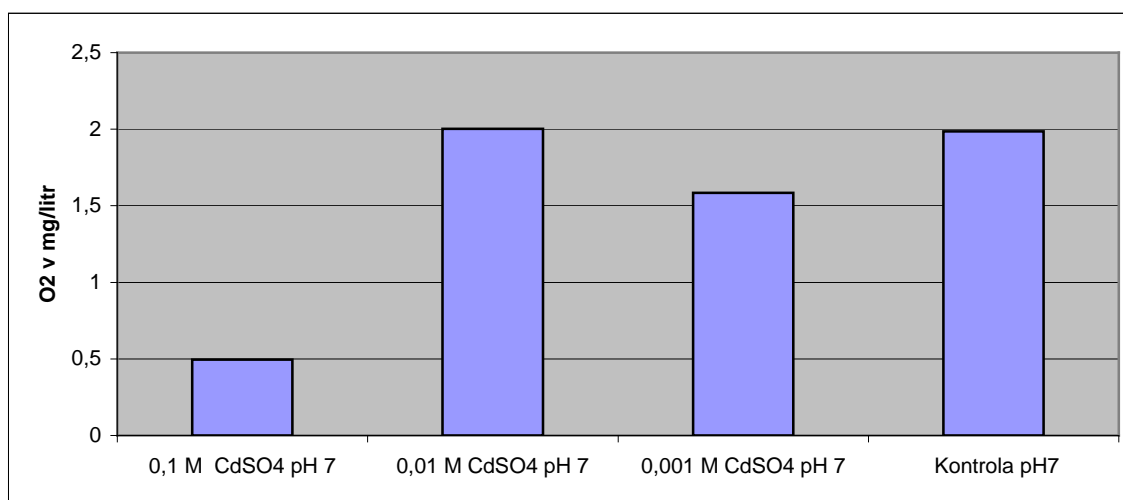
**Obr. 23** Sledované charakteristiky křivek rozpuštěného O<sub>2</sub> u sloučeniny CdSO<sub>4</sub>.

Nejvyššího maxima dosáhl v první periodě vzorek v koncentraci 0,01 M. Ve druhé bylo maximum nejvýše v kontrole. U koncentrace 0,01M byl i největší rozdíl maxim mezi první a druhou periodou viz. obr. 23.



**Obr. 24** Součet všech měření ve světelných fázích po odečtení přirozené hladiny rozpuštěného kyslíku.

Nejvyšší součet všech hodnot měření byl u koncentrace 0,01 M. Ta zároveň měla i nejvyšší rozdíl mezi oběma periodami viz. obr. 24.

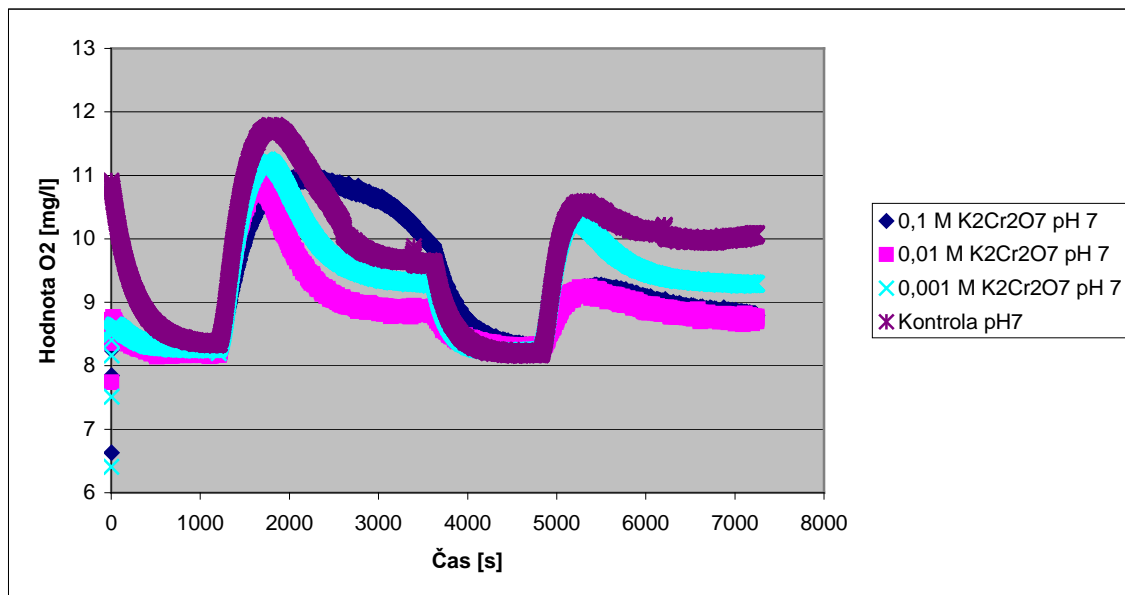


**Obr. 25** Průměrná produkce kyslíku v jednom měření ve světelné fázi.

Nejnižší produkce kyslíku v jednom měření byla u vzorku v koncentraci 0,1 M viz. obr. 25.

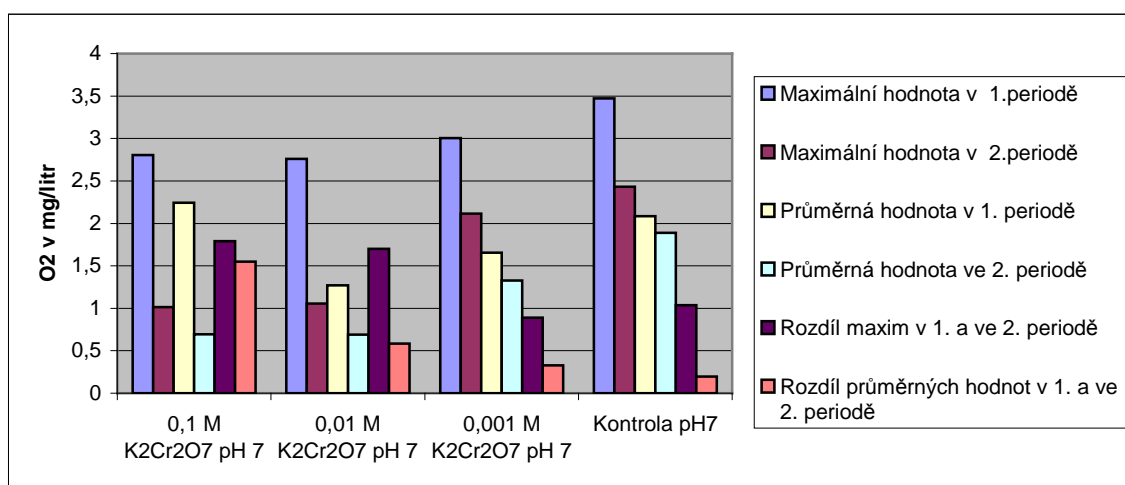
Přestože vzorek v koncentraci 0,01 M dosáhl nejvyššího maxima i průměrné hodnoty v první periodě, průměrná produkce kyslíku v jednom měření byla téměř shodná s kontrolou. Ve všech ukazatelích bylo naměřeno nejnižší množství rozpuštěného kyslíku u vzorku v koncentraci 0,1 M.

## $K_2Cr_2O_7$



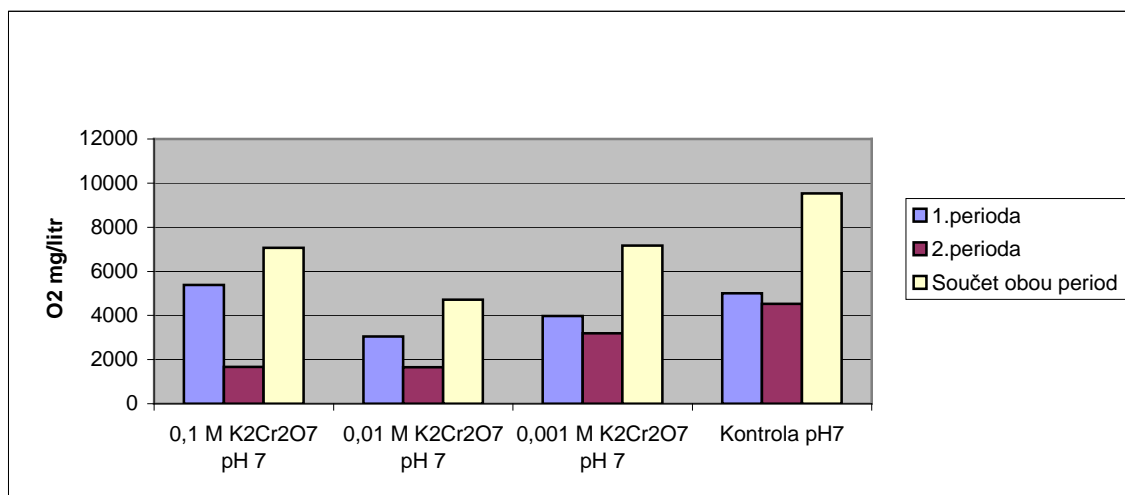
**Obr. 26** Porovnání obsahu kyslíku rozpuštěného v médiu při různých koncentracích  $K_2Cr_2O_7$  při pH 7.

Nejvíce se změnil tvar křivky u koncentrace 0,1 M v první periodě. Ve druhé periodě se téměř shodně nejvíce lišily od kontroly vzorky v koncentraci 0,1 M a 0,01 M viz. obr. 26.



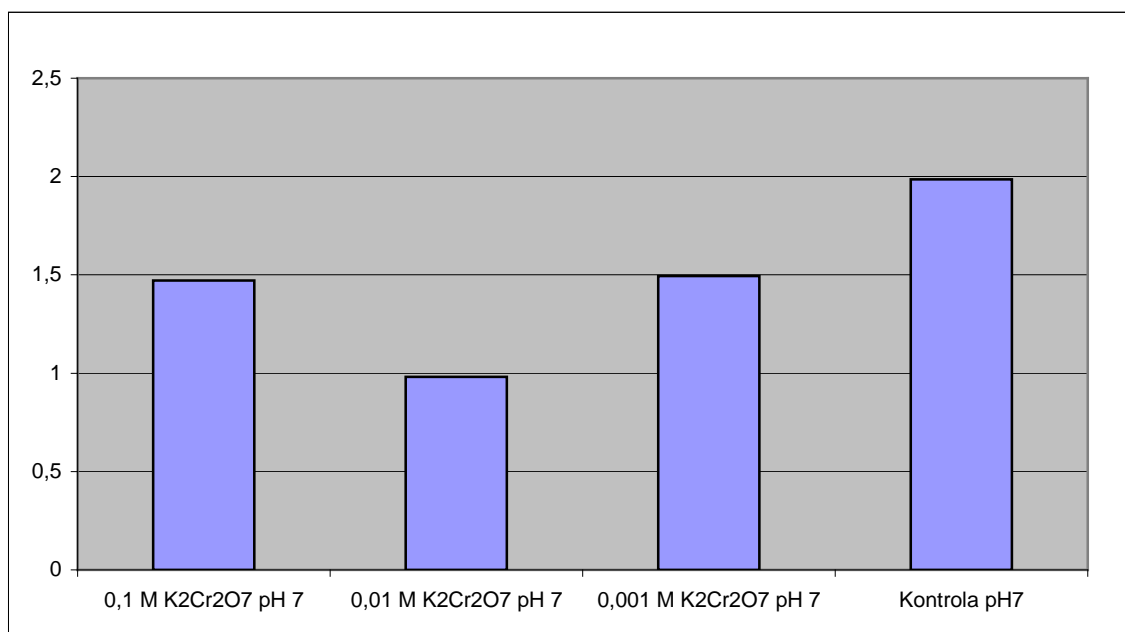
**Obr. 27** Sledované charakteristiky křivek rozpuštěného  $O_2$  u sloučeniny  $K_2Cr_2O_7$ .

U koncentrace 0,1 M  $K_2Cr_2O_7$  byla v první periodě největší průměrná produkce kyslíku. Ve druhé však byla téměř shodná s koncentrací 0,01 M, která měla průměrnou hodnotu nejnižší. Nejmenší rozdíl maxim v obou periodami byl u 0,001 M  $K_2Cr_2O_7$  viz. obr. 27.



**Obr. 28** Součet všech měření ve světelných fázích po odečtení přirozené hladiny rozpuštěného kyslíku.

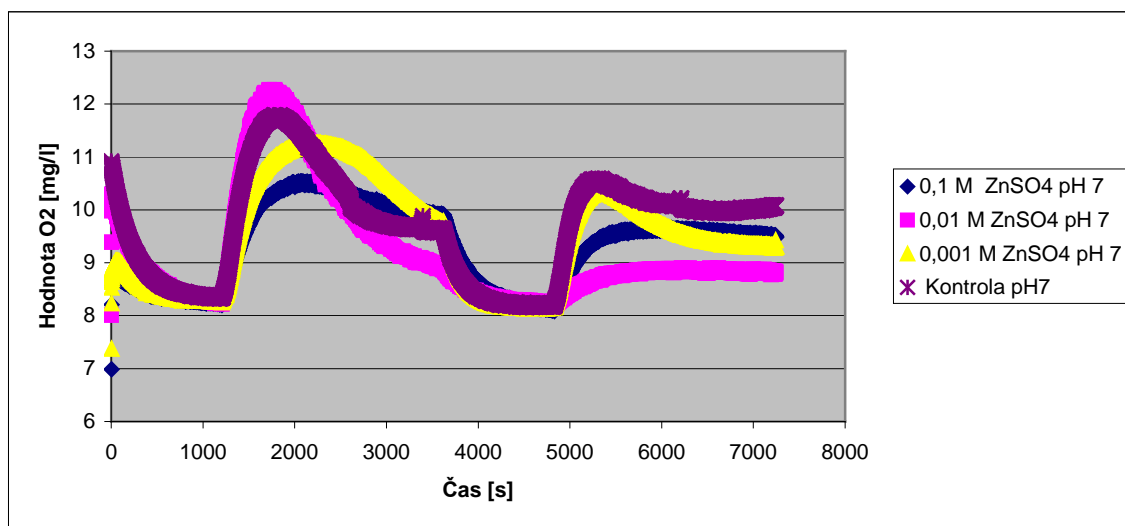
Největší byl součet u všech měření z obou period u kontroly. Nejvyšší hodnota v první periodě byla naměřena u koncentrace 0,1 M viz. obr. 28.



**Obr. 29** Průměrná produkce kyslíku v jednom měření ve světelné fázi

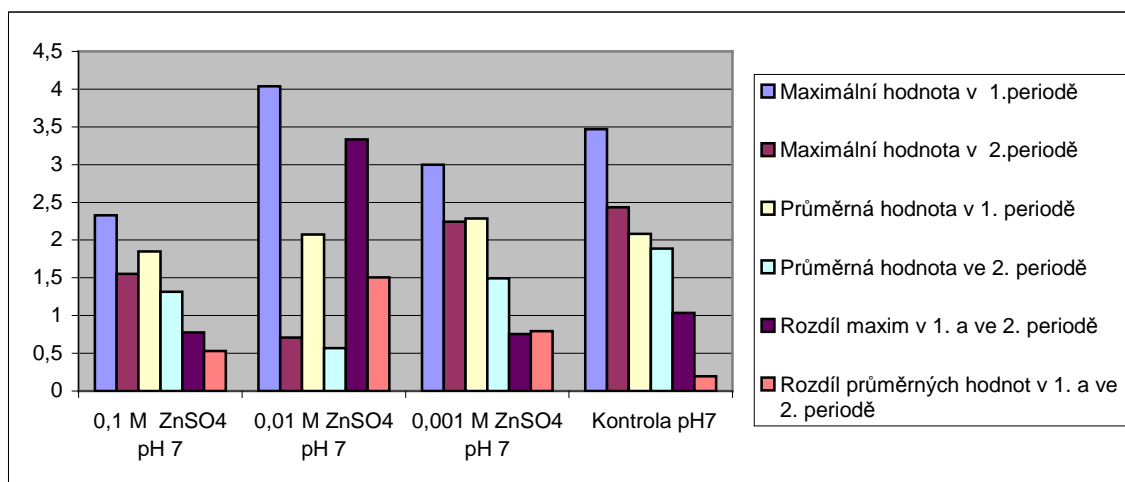
Průměrná produkce kyslíku v jednom měření byla nejvyšší u kontroly, nejnižší u 0,01 M  $K_2Cr_2O_7$  viz. obr. 29.

## ZnSO<sub>4</sub>



**Obr. 30** Porovnání obsahu kyslíku rozpuštěného v médiu při různých koncentracích  $ZnSO_4$  při pH 7.

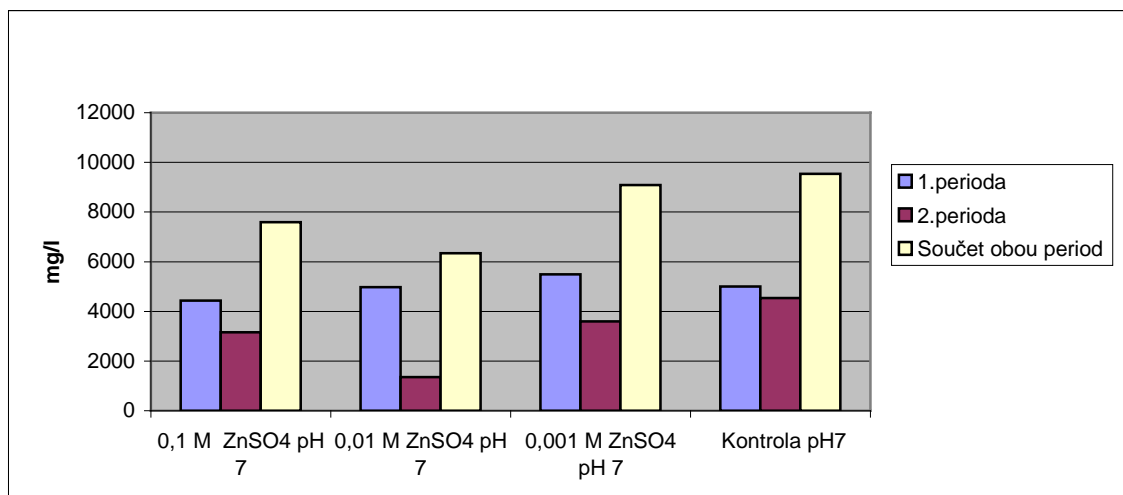
Nejvýrazněji se oproti kontrole změnil tvar křivky u koncentrace 0,1 M v první periodě a u 0,1 a 0,01 M ve druhé periodě viz. obr. 30.



**Obr. 31** Sledované charakteristiky křivek rozpuštěného  $O_2$  u sloučeniny  $ZnSO_4$ .

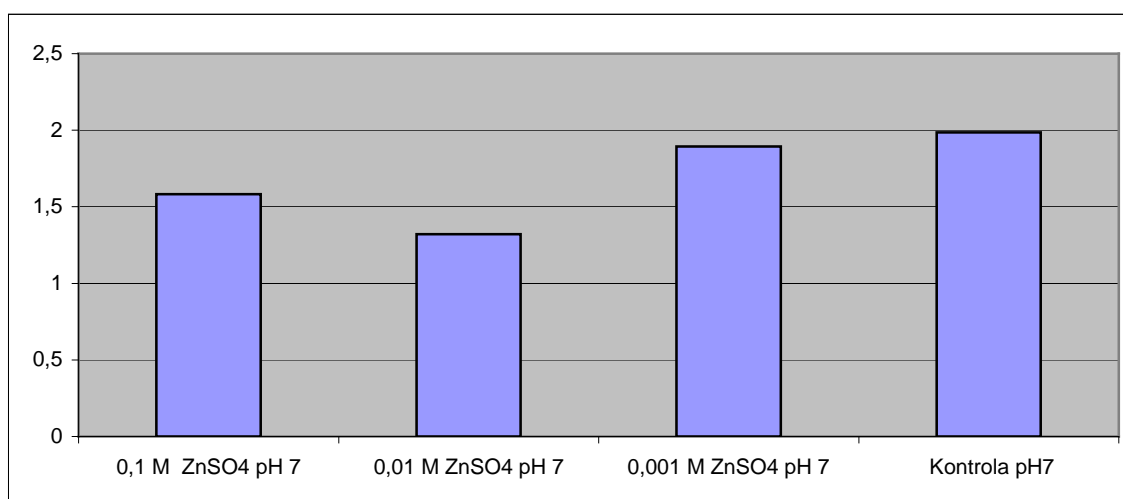


U koncentrace 0,01 M bylo v první periodě maximum výše než u kontroly. Ve druhé periodě bylo naopak nejnižší ze všech tří koncentrací viz. obr. 31.



**Obr. 32** Součet všech měření ve světelných fázích po odečtení přirozené hladiny rozpuštěného kyslíku.

Součet všech měření v první periodě byl nejvyšší u koncentrace 0,001 M. Žádný vzorek v součtu obou period nepřekročil hodnotu, které dosáhla kontrola viz. obr. 32.



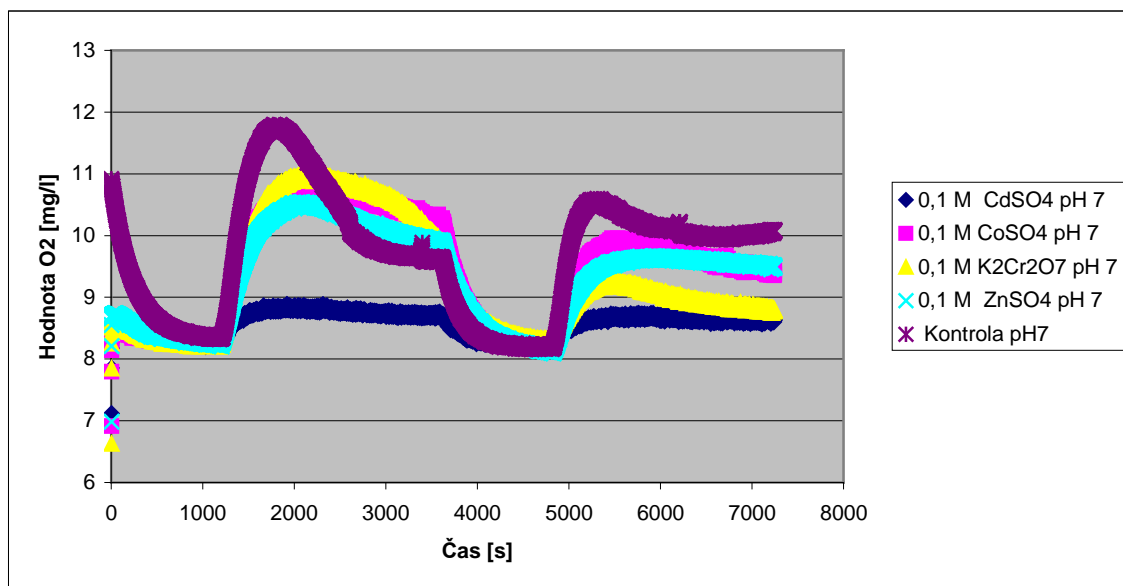
**Obr. 33** Průměrná produkce kyslíku v jednom měření ve světelné fázi

Průměrná hodnota v jednom měření byla nejnižší u koncentrace 0,01 M viz. obr. 33.

U všech koncentrací  $\text{ZnSO}_4$  se projevila jeho přítomnost na množství  $\text{O}_2$  rozpuštěném v roztoku. Nejvýraznější projev byl u koncentrace 0,01 M  $\text{ZnSO}_4$ , kde bylo maximum v první periodě nejvýše všech porovnávaných vzorků. Naopak ve druhé bylo nejnižší, stejně jako průměr.

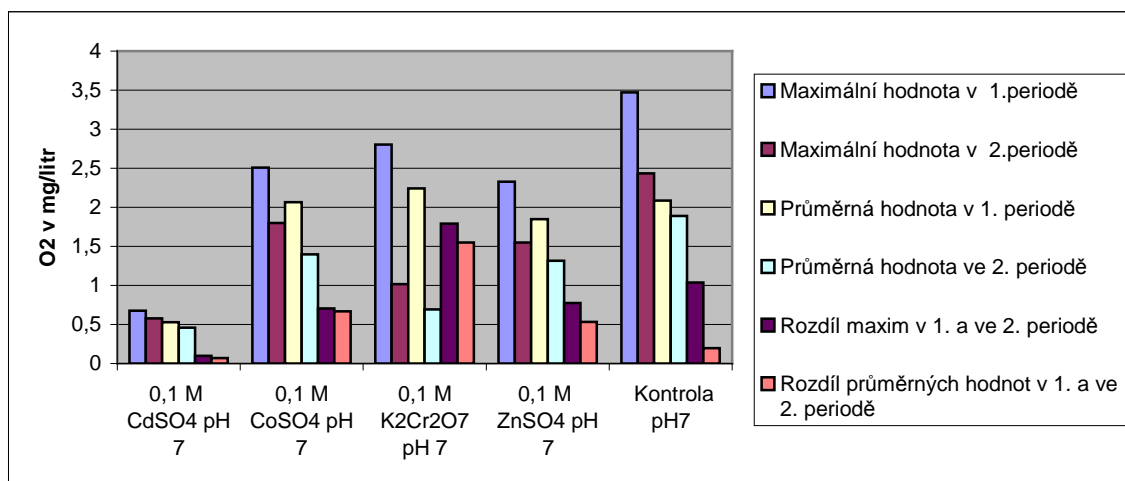
## Porovnání látek podle koncentrací

### 0,1 M



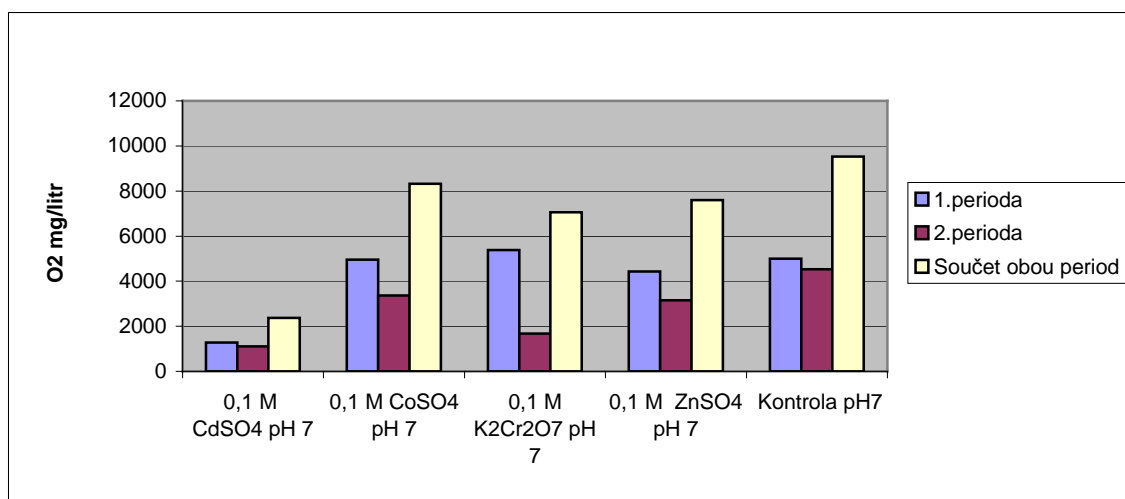
**Obr. 34** Porovnání obsahu kyslíku rozpuštěného v médiu při koncentracích 0,1 M u sledovaných sloučenin při pH 7.

U všech vzorků se oproti kontrole projevila změna tvaru křivky. Ani jedna z křivek nemá ani v první ani ve druhé periodě peak, který se objevuje u kontroly viz. obr. 34.



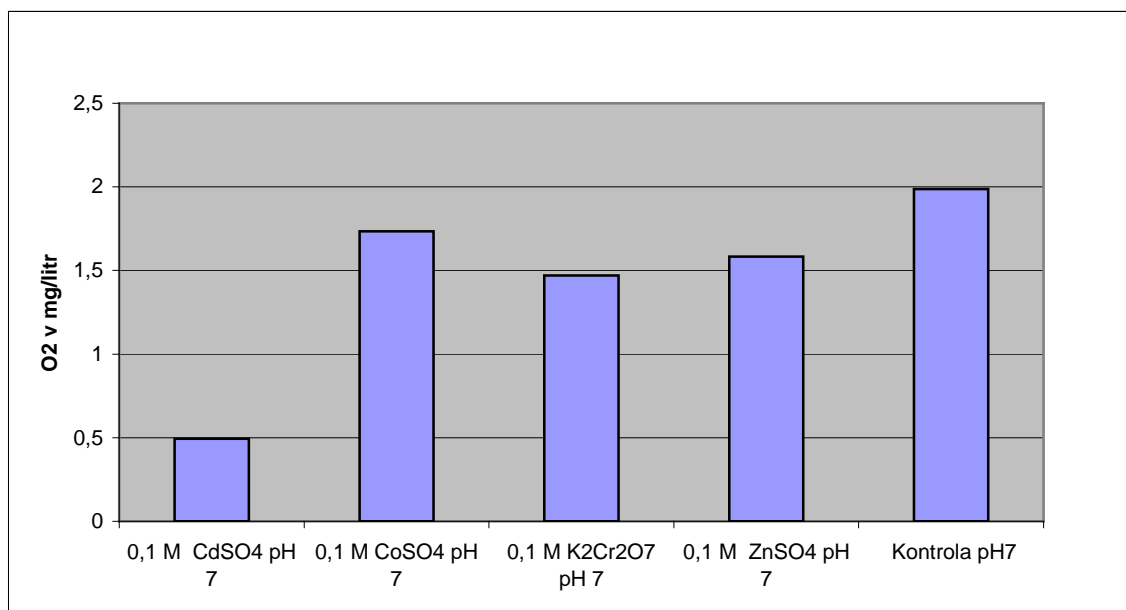
**Obr. 35** Sledované charakteristiky rozpuštěného O<sub>2</sub> u koncentrace 0,1 M.

Největší rozdíl průměrných hodnot i maxim byl u K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Ani jeden z porovnávaných vzorků nedosáhl maximální hodnoty jako kontrola. Ve všech parametrech byly naměřené hodnoty nejnižší u 0,1 M CdSO<sub>4</sub> viz. obr. 35.



**Obr. 36** Součet všech měření v jednotlivých fázích po odečtení přirozené hladiny rozpuštěného kyslíku.

Ani jeden ze vzorků nedosáhl u součtu period hodnot kontroly. V první periodě byl však součet vyšší u K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> viz. obr. 36.

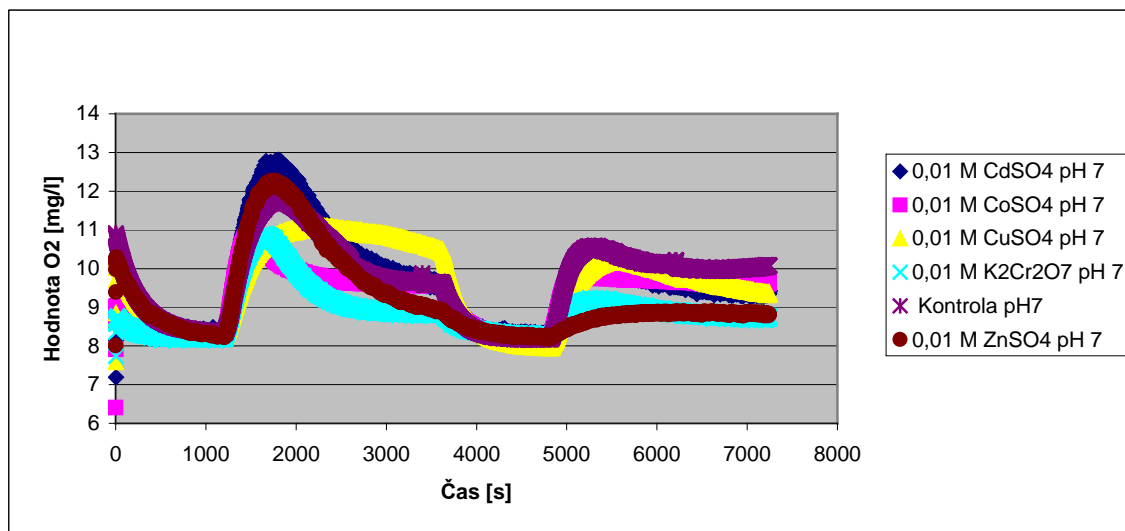


**Obr. 37** Průměrná produkce kyslíku v jednom měření ve světelné fázi.

Průměrná produkce kyslíku v jednom měření byla nejnižší u CdSO<sub>4</sub> viz. obr. 37.

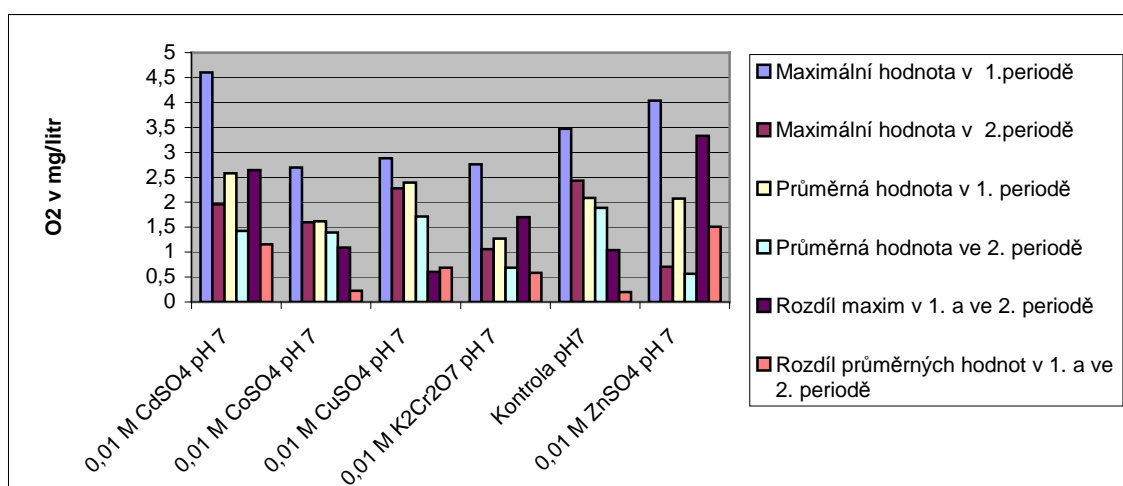
U 0,1 M koncentrace se přidání sledovaných látek na množství rozpuštěného kyslíku projevilo nejvíce u CdSO<sub>4</sub>. Nejméně u CoSO<sub>4</sub>.

## 0,01 M



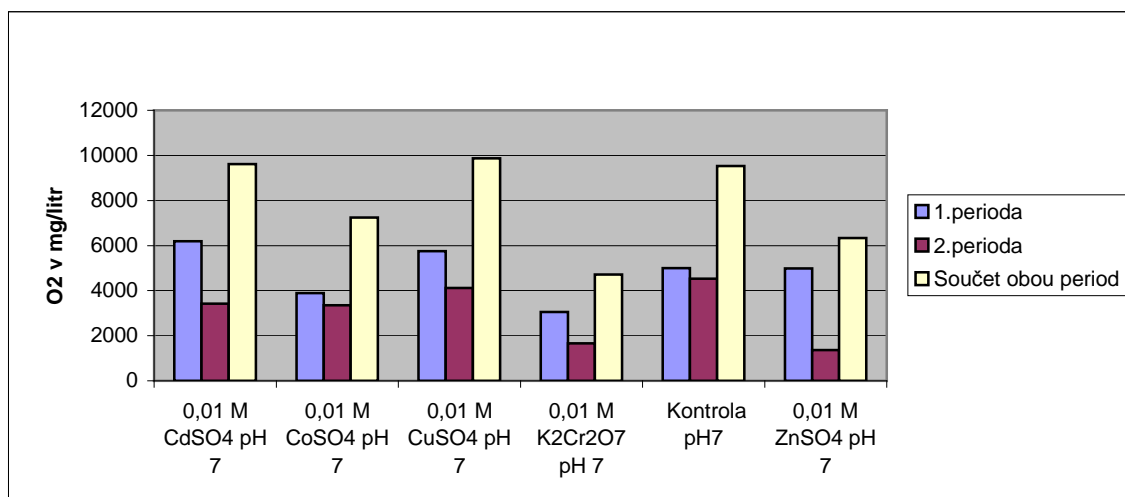
**Obr. 38** Porovnání obsahu kyslíku rozpuštěného v médiu při koncentracích 0,01 M u sledovaných sloučenin při pH 7.

Nejvíce se tvar křivky v první periodě změnil u  $\text{CuSO}_4$ , kde křivka postrádá peak typický pro kontrolu a ostatní srovnávané vzorky. Ve druhé periodě byla změna největší u  $\text{ZnSO}_4$  a  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  viz. obr. 38.



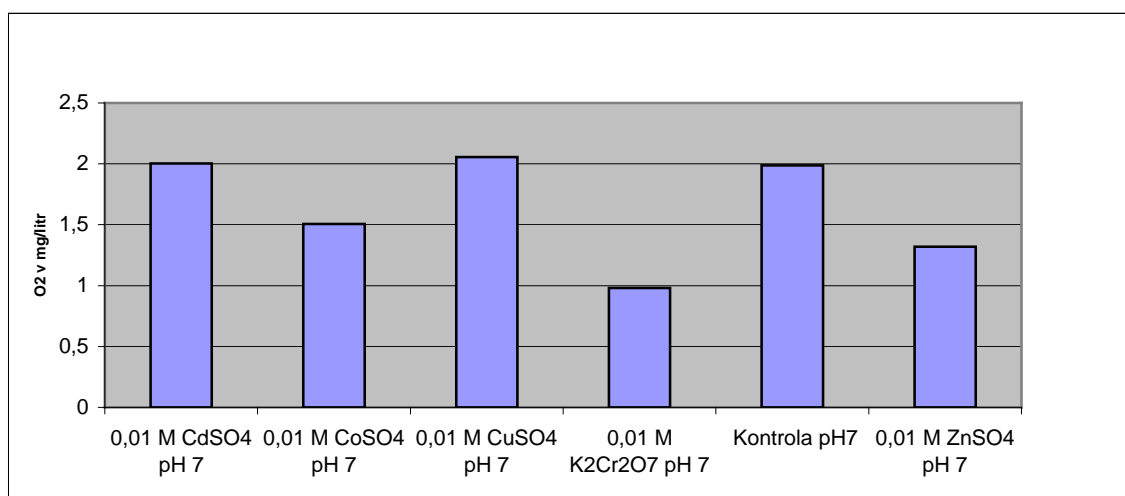
**Obr. 39** Sledované charakteristiky rozpuštěného  $\text{O}_2$  u koncentrace 0,01 M.

Oproti kontrole bylo maximum v první periodě vyšší než u kontroly u  $\text{CdSO}_4$  a  $\text{ZnSO}_4$  viz. obr. 39.



**Obr. 40** Součet všech měření v jednotlivých fázích po odečtení přirozené hladiny rozpuštěného kyslíku.

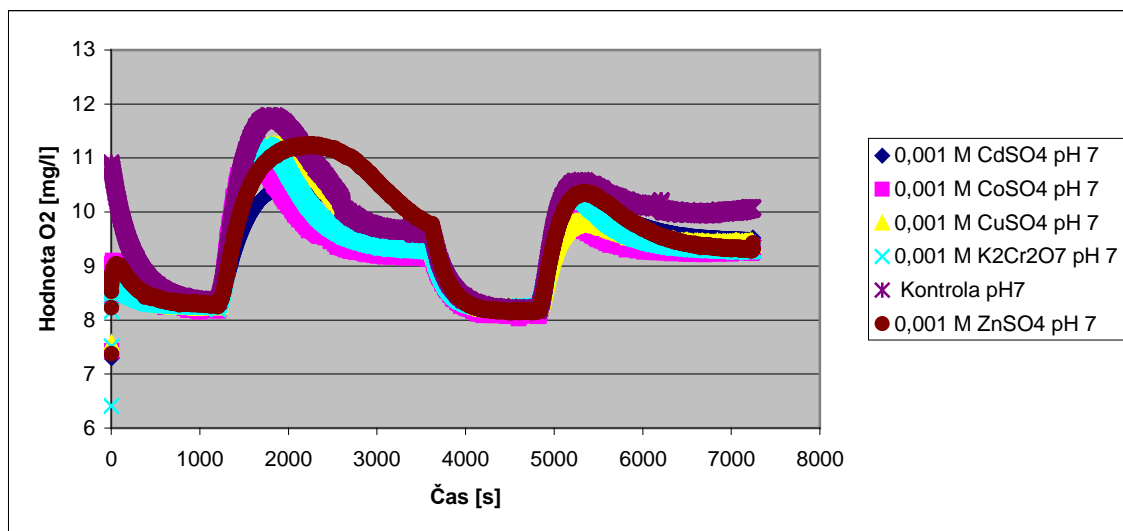
Největší byl součet všech měření v obou periodách u CuSO<sub>4</sub>, nejnižší u K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> viz. obr. 40.



**Obr. 41** Průměrná produkce kyslíku v jednom měření ve světelné fázi.

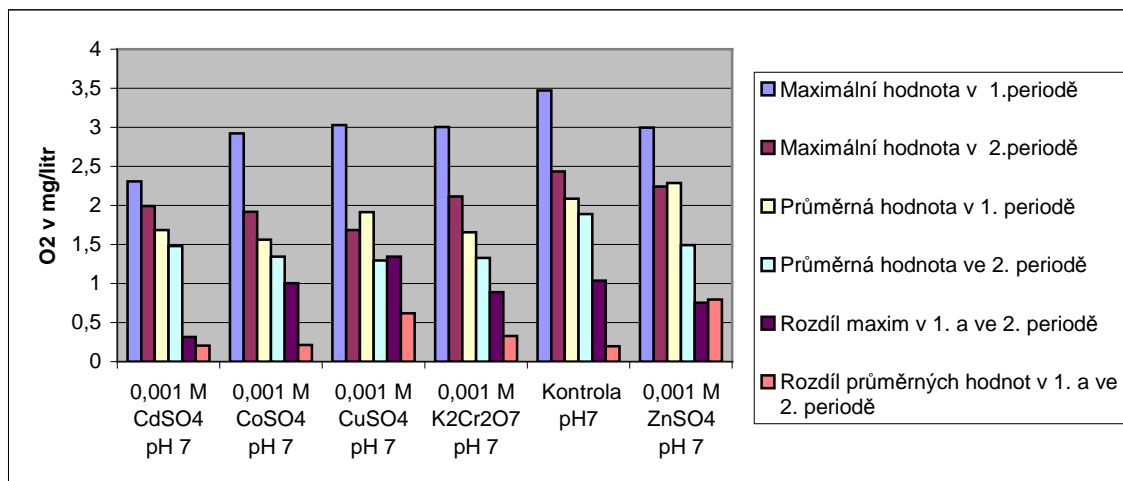
Průměrná produkce kyslíku v jednom měření byla nejvyšší u CuSO<sub>4</sub>, kde byla vyšší než kontrola. Téměř shodná s kontrolou byla hodnota u CdSO<sub>4</sub> viz. obr. 41.

## 0,001 M



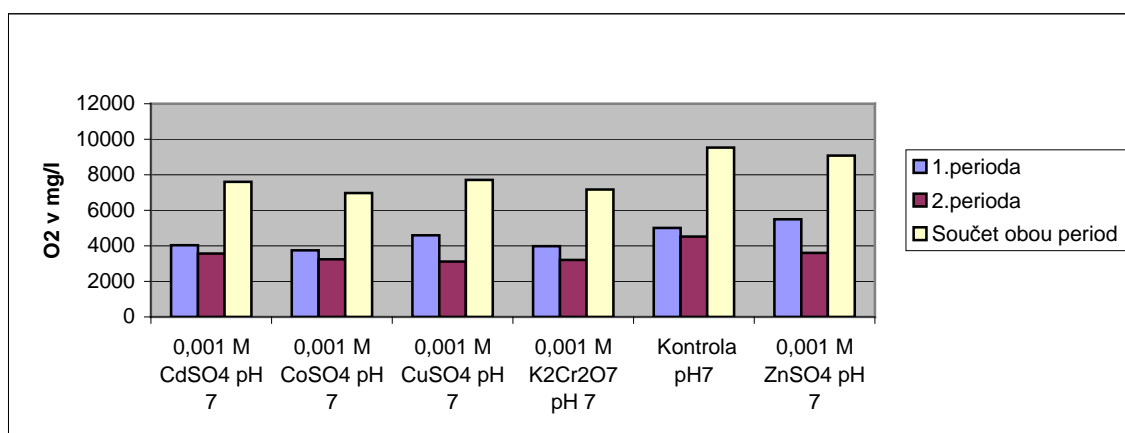
**Obr. 42** Porovnání obsahu kyslíku rozpuštěného v médiu při koncentracích 0,001 M u sledovaných sloučenin při pH 7.

V první periodě se nejvíce změnil tvar křivky u  $\text{CdSO}_4$  a  $\text{ZnSO}_4$ , kdy se nevytvořil peak tak, jako u ostatních vzorků a u kontroly viz. obr. 42.



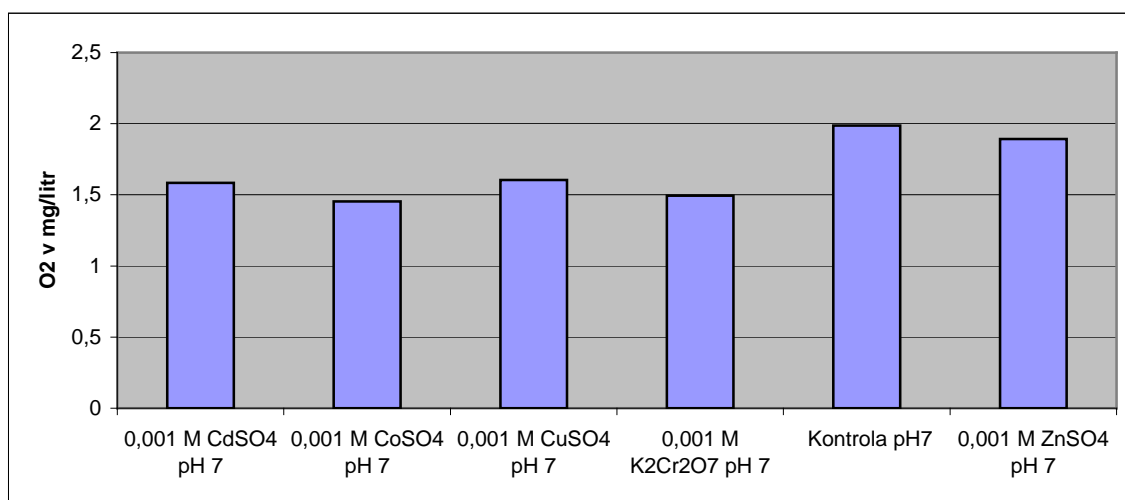
**Obr. 43** Sledované charakteristiky rozpuštěného  $\text{O}_2$  u koncentrace 0,001 M.

Nejvyšší maximální hodnoty v první i ve druhé periodě dosáhla kontrola. Nejnižší maximum v první periodě bylo naměřeno u  $\text{CdSO}_4$ . Ve druhé u  $\text{CuSO}_4$  viz. obr. 43.



**Obr. 44** Součet všech měření v jednotlivých fázích po odečtení přirozené hladiny rozpuštěného kyslíku.

Pouze součet v první periodě u ZnSO<sub>4</sub> je vyšší než u kontroly. Jinak dosahovala nejvyšších hodnot vždy kontrola viz. obr. 44.



**Obr. 45** Průměrná produkce kyslíku v jednom měření ve světelné fázi.

U ZnSO<sub>4</sub> se blížila kontrole i průměrná produkce kyslíku v jednom měření. U všech ostatních látek byla nižší a sloučeniny se lišily jen málo viz. obr. 45.



## 6. Diskuse

Použití metody měření kyslíku rozpuštěného v médiu je omezeno tekutostí měřeného roztoku. Toto se projevilo u 0,1 M  $\text{CuSO}_4$ , kdy je po úpravě pH koncentrace látek v roztoku již tak vysoká, že ucpává membránu elektrody a nelze tudíž dosáhnout relevantního výsledku.

Výhodou použité metody je její rychlost, získávání údajů v reálném čase a relativně malé množství použitého vzorku. K bezproblémovému měření postačí kolem 10 ml. U kultur, u kterých bylo změněno pouze pH lze již po 2 hodinách měření obsahu rozpuštěného kyslíku zjistit optimální pH. Toto se projevilo v porovnání s růstovou křivkou. Použitý kmen *Scenedesmus quadricauda* má dle výsledků provedených pokusů životní optimum kolem pH 9 viz. obr. 12 a obr. 13. Přestože byl růst kultury při tomto pH nejvyšší, pro experimenty bylo použito pH 7, protože se nejvíce přibližuje pH vod v ČR.

Přidání všech sledovaných těžkých kovů k měřenému vzorku se projevilo na množství rozpuštěného kyslíku v médiu. Přidání 0,01 M  $\text{CdSO}_4$  a 0,01 M  $\text{ZnSO}_4$  se projevilo v první periodě zvýšením maximální hodnoty rozpuštěného kyslíku. V druhé periodě maximum již nepřesahovalo maximum u kontroly. Stimulační efekt se tedy projevoval jen během první hodiny po přidání.

Lukavský (2001) popisuje stimulační efekt Zn při koncentracích 0,1 M a 0,01 M na *Scenedesmus quadricauda* u pokusů prováděných metodou růstových křivek. U mnou testovaných koncentrací se projevil pouze u 0,01 M  $\text{ZnSO}_4$ . Zinek tedy může působit na metabolismus buňky jinde než ve fotosyntetickém aparátu. Lukavský (2001) dále ve své práci uvádí následující pořadí toxicity kovů  $\text{Cd} > \text{Co} > \text{Cr} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Ni} > \text{Zn} > \text{Al} > \text{Fe}$ . Ne se všemi kovy z této řady bylo experimentováno, avšak u 0,1 M  $\text{CdSO}_4$  bylo naměřeno nejnižší množství rozpuštěného kyslíku ze všech sledovaných látek ve všech koncentracích. Dále se pořadí látek měnilo podle toho, s jakou koncentrací bylo experimentováno.

Lukavský (2001) ve své práci popsal *Scenedesmus quadricauda* jako řasu relativně odolnou vůči působení těžkých kovů. To se během experimentů potvrdilo. Zvláště u koncentrací sloučenin 0,001 M byl rozdíl v průměrné hodnotě kyslíku na jedno měření maximálně kolem 0,5 mg/litr. To je méně, než rozdíl naměřený při změně pH ze 6 na 7.

Vliv látek na řasu je dán nejen citlivostí jejího fotosyntetického aparátu, ale také schopností absorbovat látku, jejíž účinky jsou zkoumány. Center (1996) uvádí, že pokud látka do řasy nepronikne, účinek se neprojeví. Některé látky obsažené v médiu, jako je EDTA a další, mohou vázat kovy a snižovat tak jejich dostupnost. To se pak projeví i na jejich toxicitě.

Měření rozpuštěného kyslíku v médiu vypovídá podobně jako fluorescence jen o aktivitě fotosyntetického aparátu. Nepostihuje kyslík, který zůstane v buňce. Neříká také nic o mechanismech, kterými se řasa vyrovnává s působením těžkých kovů ani jiných toxických látek.

## 7. Závěr

Při pokusech se sloučeninami těžkých kovů na kultuře *Scenedesmus quadricauda* se ukázalo měření rozpuštěného kyslíku v médiu jako možná cesta, jak měřit bezprostřední účinek sloučenin na fotosyntetickou aktivitu zkoumaného organismu. Metoda je omezena tekutostí měřeného roztoku. Při překročení určité meze začne roztok ucpávat membránu.

Výhodou použité metody je její rychlost, získávání údajů v reálném čase a relativně malé množství použitého vzorku. U kultur, u kterých bylo změněno pouze pH lze již po 2 hodinách měření obsahu kyslíku rozpuštěného v médiu zjistit optimální pH.

Metoda je vhodná i pro studium dlouhodobějšího působení na fotosyntetický aparát. Lze přesně určit, kdy a jakou měrou je uvolňování kyslíku do média ovlivněno.

Řasa *Scenedesmus quadricauda* má při provádění tohoto typu pokusů své výhody, jako je snadná kultivace a typická morfologie, ale i své nevýhody, mezi které patří její relativní odolnost vůči působení těžkých kovů.

Přidání všech testovaných sloučenin těžkých kovů ( $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  a  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) do vzorku způsobilo změnu obsahu kyslíku rozpuštěného v médiu. Nejvýraznější pokles naměřených hodnot byl zjištěn u 0,1 M  $\text{CdSO}_4$ . Při kultivaci při pH 7 v médiu podle Simmera a Šetlíka je na něj řasa nejcitlivější ze všech testovaných koncentrací u všech srovnávaných sloučenin.

Pořadí látek podle stupně inhibice produkce kyslíku bylo následující:

Pro koncentraci 0,1 M

$\text{CdSO}_4 > \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 > \text{ZnSO}_4 > \text{CoSO}_4 > \text{kontrola}$ .

Pro koncentraci 0,01 M

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 > \text{ZnSO}_4 > \text{CoSO}_4 > \text{kontrola} > \text{CdSO}_4 > \text{CuSO}_4$

Pro koncentraci 0,001M

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 > \text{CoSO}_4 > \text{CdSO}_4, \text{CuSO}_4$  (rozdíl mezi oběma látkami je nepatrný)  $> \text{ZnSO}_4 > \text{kontrola}$

Nejvýraznější byly rozdíly při přidání sledovaných sloučenin ke vzorku v koncentraci 0,01 M. Nejméně se projevovaly u koncentrace 0,001 M.

U testovaných sloučenin v koncentrací 0,001 M a menších by bylo vhodné zvolit citlivější řasu či jiný autotrofní organismus a prodloužit délku pokusu.

## 8. Seznam literatury

**Campbell N.A., Reece J.B., Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S.A., Minorsky P.V., Jackson R.B. (2008):** Biology 8th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings,

**Backor M., Dzubaj A. (2004):** Short-term and chronic effects of copper, zinc and mercury on the chlorophyll content of four lichen photobionts and related alga. Journal of the Hattori Botanical Laboratory 95: 271 – 284

**Bascik-Remisiewicz A., Tukaj Z (2002):** Toxicity of inorganic cadmium salts to the microalga *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta) with respect to medium composition, pH and CO<sub>2</sub> concentration. Acta Physiologiae Plantarum 24: 59 – 65

**Bassi M., Corradi M. G., Favali M. (1990):** Effects of chromium in freshwater algae and macrophytes, Plants for Toxicity Assessment 1091: 204-224

**Baszynski T. (1986a):** Heavy metals as factors affecting photosynthetic apparatus activity. Folia Physiology Cytology Genetics 1: 7-21.

**Baszynski T. (1986b):** Interference of Cd<sup>2+</sup> in functioning of the photosynthetic apparatus in higher plants Acta Societatis Botanicorum Poloniae 55: 291-304

**Cepák V., Furnadzieva S., Lukavský J. ( 2001):** Toxicita těžkých kovů na řasy Czech Phycology 1: 87-91.

**Conway K., Trainor F. R. (1972):** *Scenedesmus* morphology and flotation. Journal of Phycology 8: 138 – 143

**Foote C. S. (1991):** Definition of Type-I and type-II photosynthesized oxidation. Photochemistry and Photobiology 54, 659 - 659.

**Fott B. (1967):** *Phlyctidium scenedesmi* spec. nova, a new chytrid destroying mass cultures of algae. Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie 7: 97 – 102

**Fourest E., Volesky B. (1997):** Alginate properties and heavy metal biosorption by marine algae. Water Research 31: 3082 – 3088

**Genter R. B. (1996):** Ecotoxicology of inorganic stress to algae. In: Stevenson RJ, Bothwell ML, Lowe RL, eds. Algal Ecology. San Diego, USA: Academic Press, pp. 403-468.

**Gibson C. E. (1972):** The algicidal effect of copper on a green and blue-green alga and some ecological implications. Journal of Applied Ecology 9: 513 – 518

**Guang-Jie Zhou, Fu-Qiang Peng, Li-Juan Zhang, Guang-Guo Ying ( 2012):** Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*, Environmental Science and Pollution Research

**Gupta A., Rai V., Bagdwal N., Goel R. (2005):** In situ characterization of mercury-resistant growth-promoting fluorescent pseudomonads. Microbiological research 4: 385 — 388

**Hall D.O., Rao K.K. (1999):** Photosynthesis, Sixth edition. vyd. Cambridge University Press.

**Hegewald E. (1997):** Taxonomy and phylogeny of *Scenedesmus*. - Algae (Korean Journal of Phycology) 12: 235-246

**Hegewald E. Silva P. (1988):** Annotated catalogue of *Scenedesmus* and nomenclaturally related genera including original descriptions and figures. - Bibliotheca Phycologia 80: 1- 587

**Kalina T., Váňa J. (2005):** Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. vyd. Karolinum Praha.

**Kindl H., Wöber B. (1975):** Biochemie der Pflanzen. vyd. Springer-Verlag.

**Krupa Z., Baszynski T. (1995):** Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus-direct and indirect effects on light and dark reactions. Acta Physiologiae Plantarum 2: 177-190.

**Lawlor D.W. (1993):** Photosynthesis: Molecular, Physiological, and Environmental Processes vyd. Longman Scientific & Technical Harlow, Essex, England and New York.

**Peterson H., Healey P., Wagemann R. (1985):** Metal toxicity to algae: A Highly pH Dependent Phenomen. Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science 41: 974-979.

**Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998):** Fyziologie rostlin. vyd. Academia Praha.

**Round F. E. (1965):** The biology of the algae vyd. Edward Arnold London 1965

**Rozsypal S. (2003):** Nový přehled biologie. 1. vyd. Praha: Scientia.

**Trainor F. R. (1998):** Biological Aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae) - phenotypic plasticity. J. Cramer, Berlin.

**Van Assche F. Clijsters H. (1985):** Inhibition of photosynthesis by heavy metals. Photosynthesis Research 7: 31-40.

**Zavřel T. ( 2011):** Srovnání vlivu polycyklických aromatických uhlovodíků a toxických kovů na růst a primární produkci vybraných druhů řas. Diplomová práce. Masarykova univerzita Brno.

**Richter 2004 - 1:** Mechanismus příjmu a transportu látek v rostlině, Ústav agrochemie a výživy rostlin, MZLU v Brně [online], [ cit. 2011-12-10]. Dostupné na WWW:<[http://web2.mendelu.cz/af\\_221\\_multitext/vyziva\\_rostlin/html/prijem\\_zivin/transport\\_kratky.htm](http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/prijem_zivin/transport_kratky.htm)>

**Anonym 2011 - 1:** Turgor, Wikipedie, Otevřená encyklopedie [online],  
[ cit. 2011-12-10]. Dostupné na WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Turgor>>

**Anonym 2012 - 1:** Protonová pumpa, Wikipedie, Otevřená encyklopedie [online],  
[ cit. 2012-02-25]. Dostupné na WWW:  
<[http://cs.wikipedia.org/wiki/Protonov%C3%A1\\_pumpa](http://cs.wikipedia.org/wiki/Protonov%C3%A1_pumpa)>

**Anonym 2012 - 2:** Thylakoid, Wikipedie, Otevřená encyklopedie [online],  
[ cit. 2012-02-25]. Dostupné na WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Thylakoid>>

**Anonym 2012 - 3:** Chloroplast, Wikipedie, Otevřená encyklopedie [online],  
[ cit. 2012-02-25]. Dostupné na WWW:<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Chloroplast>>

**Anonym 2012 - 4:** Algareact, BVT Technologies, firemní stránky [online],  
[ cit. 2012-02-25]. Dostupné na WWW:< [http://www.bvt.cz/\\_ftp/Miscellaneous/AGA1.pdf](http://www.bvt.cz/_ftp/Miscellaneous/AGA1.pdf)>

**Anonym 2012 – 5:** *Scenedesmus quadricauda*, Botanický ústav AV ČR v.v.i, Úsek ekologie rostlin encyklopedie [online], [ cit. 2012-02-25]. Dostupné na WWW:  
<<http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php?page=sr&cb1=Algae>>

**Anonym 2012 - 6:** Algareact, BVT Technologies, firemní stránky [online],  
[ cit. 2012-03-25]. Dostupné na WWW:  
< <http://www.bvt.cz/home/products/miscellaneous>>