

Posudek oponenta na magisterskou práci Kristiny Felcmanové nazvanou „Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na regulaci fotosyntézy diazotrofních sinic“.

Magisterská práce Kristiny Felcmanové je předkládána v rozsahu 50 stran a pod vedením Prof. RNDr. Ondřeje Prášila, Ph.D. se autorka zabývala kultivací sinic *Cyanothece* sp. ATCC 51142 a *Anabaena* sp. PCC 7120 v podmínkách normální a zvýšené koncentrace CO₂ a také běžného a nulového obsahu N v kultivačním médiu. Během kultivace studovaných sinic autorka sledovala různé znaky na základě kterých popsala průběh růstu kultur a také průběh asimilace C a N .

Po formální stránce je práce členěna na 5 kapitol (úvod, metodika, výsledky, diskuze a závěr) včetně 4 stran odkazů na vědeckou literaturu.

Práce má dobře sepsanou úvodní kapitolu (14 stran), která čtenáře obeznámí s dosavadními studiiemi v oblasti diazotrofních organismů, dále pak vysvětluje evoluci sinic a jejich důležitost při fixaci atmosferického dusíku. Úvodní kapitola ještě obsahuje podrobný popis enzymu nitrogenáza, který katalizuje reakci fixace plynného dusíku. Nakolik je enzym nitrogenáza v přítomnosti molekulárního kyslíku inhibován, vytvořili se u sinic různé strategie fixace N₂, které také popisuje úvodní kapitola. V závěru úvodní kapitoly jsou popsány změny vodního prostředí na Zemi v důsledku zvyšování obsahu CO₂ v atmosféře, což hezky vysvětluje důvod a důležitost celé magisterské práce. Je ale škoda, že po úvodní kapitole nenásleduje kapitola cíle práce. Čtenář sice tuší čím se práce bude zabývat, ale i tak by cíle magisterské práce měli být srozumitelně vytýčené.

V kapitole „metodika“ (6 stran) autorka popisuje fotobioreaktor a kultivační podmínky studovaných sinic. Dále detailně popisuje použité metody sledování růstu kultur: počítání buněk, měření koncentrace chlorofylu a, C/N analýza, Acetylene reduction assay, vývoj kyslíku, termoluminiscence.

Kapitola „výsledky“ (17 stran) je rozdělená na 3 podkapitoly. Vlastní výsledky jsou popsané srozumitelně pro každou studovanou sinici zvlášť, což je přehledné, ale na druhou stranou tady chybí srovnání studovaných sinic (jak byl cíl práce porovnat růst diazotrofní sinice s heterocystou a bez ní). Na závěr jsou prezentované zajímavé výsledky z fluorescenčních měření obou studovaných sinic.

Na kapitolu „výsledky“ logicky navazuje kapitola „diskuze“ (5 stran) kde autorka vysvětluje důvod studování diazotrofních sinic *Cyanothece* sp. ATCC 51142 a *Anabaena* sp. PCC 7120 v podmínkách zvýšené koncentrace CO₂ a zamýšlí se nad naměřenými výsledky.

Práci uzavírá kapitola „závěr“ (1 strana), kde autorka stručně shrnuje získaná data a konstatuje, že zvýšená koncentrace CO₂ (900ppm) má u sinic *Cyanothece* sp. ATCC 51142 a *Anabaena* sp. PCC 7120 pěstovaných v diazotrofních podmínkách inhibiční vliv na jejich růstovou rychlost.

Práce také přináší nový poznatek k strategii fixace dusíku sinice *Cyanothece* sp. ATCC 51142, která nastává již během světelné fáze.

U studovaných sinic byl ještě pozorován noční pokles variabilní fluorescence, ke kterému docházelo v důsledku degradace aktivních PSII center (nezávisle na podmínkách diazotrofie či zvýšené koncentrace CO₂).

Dále musím ocenit, že se autorka postarala o částečné financování projektu získáním studentského grantu SGA2010/003.

Formální nedostatky:

- Chybí cíle práce.
- Některé obrázky by mohly být ve větším rozlišení.

Jako podklad pro diskusi mám k autorce následující dotazy:

- Autorka píše, že přenesení předpěstované kultury do fotobioreaktoru bylo sterilní. Byla také zaručena sterilita během pěstování kultury v reaktoru? (bublání, měřící elektrody, odběr vzorku...)

- Snižování množství vyvinutého O₂ kulturou HC- (*Cyanothece* sp. ATCC 51142 bez N) je prezentováno jako možný důsledek nárůstu biomasy (převažuje spotřeba O₂ nad jeho vývojem). Kultura HC- při tom vykazuje nejpomalejší růst (měření OD 735). Můžete to vysvětlit?

- Ve výsledcích píšete, že zvýšená F₀ je důsledek odpojování světlosběrných antén (noční pokles fotochemické aktivity). Mohla by jste tento jev víc popsat?

Závěrem svého posudku konstatuji, že předkládaná práce splňuje kritéria kladená na magisterskou práci. Tuto práci proto **doporučuji** k obhajobě a navrhuji její ohodnocení známkou 1.

V Českých Budějovicích dne 17.5.2011


Ing. Zdeno Gardian, Ph.D.

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI

„Vliv zvýšené koncentrace CO₂ na regulaci fotosyntézy diazotrofních sinic“

Autor: Bc. Kristina Felcmanová

Diplomová práce Kristiny Felcmanové se zabývá studiem role zvýšené koncentrace CO₂ na fixaci dusíku a fotosyntézu u diazotrofních sinic. Z obsahového hlediska je diplomová práce standardně členěna (Teoretický úvod, Metodika, Výsledky, Diskuze). Teoretický úvod shrnuje problematiku diazotrofie u sinic včetně rozlišení různých strategií fixace dusíku a spojení tohoto procesu se zvýšenou koncentrací CO₂ a fotosyntézou. V metodické části jsou pak v krátkosti popsány použité experimentální metody.

V experimentální části autorka prezentuje sadu často velmi zajímavých experimentálních dat, které získala při sledování změn v asimilaci dusíku v průběhu denního cyklu diazotrofních sinic. Jako dva modelové organismy byly vybrány jednobuněčná *Cyanothece sp.* (ATCC 51142) a vláknitá *Anabaena sp.* (PCC7120). U obou těchto organismů byl sledován vliv zvýšené koncentrace uhlíku (900 ppm) na asimilaci dusíku. Vzhledem k různé strategii asimilace dusíku u těchto organismů (tzn. prostorová versus časová separace asimilace dusíku) se mi tento výběr zdá příhodný. Velká část experimentální práce autorky spočívala ve využití bioreaktoru FMT 150, který umožnil detailní charakteristiku parametrů fotosyntézy (vývoj kyslíku, fluorescence fotosystému 2), změny fyzikálních podmínek (pH, teplota, ozáření) v průběhu denního cyklu. Současně byly také odebrány vzorky pro sledování růstu počtu buněk, pro detekci fixace dusíku a pro základní analýzu poměru uhlíku a dusíku. Tento komplexní a patrně i časově náročný přístup přinesl velkou sadu dat, mnohé z nich zatím v literatuře nebyly popsány. Jako velmi zajímavý mi připadá počátek fixace dusíku už na konci světelné fáze u *Cyanothece sp.* a také zpomalený přechod na diazotrofii za zvýšené koncentrace uhlíku. V práci se ale vyskytuje také několik nejasností, nepřesností či nedotažeností (výběrem například v grafu 3.1 chybí označení světelné a temnotní fáze cyklu, u grafů 3.17 a 3.18 není zřejmé se kterým modelovým organismem byly tyto data získány, autorka nepopsala jakým způsobem získala růstové rychlosti apod.), jsou zde také některé překlepy a nepřesné překlady s angličtiny které zde nebudu uvádět. Hlavním nedostatkem diplomové práce je příliš stručný popis materiálů a metod. Například zcela chybí popis jakým způsobem byly měřeny fluorescenční parametry či vypočteny růstové rychlosti (detailně viz. Otázka 2). To může také být příčinou některých nejasných interpretací výsledků.

K předloženému textu práce mám několik poznámek a dotazů:

(1) Autorka vysvětlila pozorované výrazné snížení růstu za zvýšené koncentrace CO₂ u *Anabaena sp.* (u bezdusíkatého média) jako efekt acidifikace prostředí vlivem zvýšeného CO₂. Je toto opravdu jediný důvod pro inhibici růstu buněk? Proč se tento efekt nepotvrdil u dusíkatého média se stejně zvýšeným CO₂? Obecně, s jakými fyziologickými změnami pH by si dokázal dle vás kmen *Anabaeny* PCC7120 poradit?

(2) V části „Metodika“ bohužel není popsán způsob získávání parametrů variabilní fluorescence v průběhu denního cyklu. Proto bych se rád zeptal na následující dvě podotázky které by mohli vysvětlit některé nejasné interpretace výsledků:

(A) Jaké excitační světlo bylo použito pro detekci fluorescence? Jednalo se o světlo absorbované chlorofyly nebo fykobilisomy? Byla při měření F_t , F_m a Q_y detekována pouze chlorofylová fluorescence? Znalost těchto parametrů je důležitá pro interpretaci některých výsledků; proto například není jasné zda pozorované parametry jako například růstová rychlost v grafu 3.4 nebo hodnota F_t (v grafech 3.12, 3.17, 3.18) odrážejí nárůst fluorescence chlorofylů nebo fykobilisomů.

(B) V grafu 3.4 je prezentována růstová rychlost, spočtená na základě koncentrace chlorofylů – spektroskopicky tato hodnota mezi variantami LC+ a HC+ poklesla u *Cyanothece ATCC 51142*. Naopak stejný růstový parametr spočtený na základě změny F_t (tzn. fluorescence) vykazoval nárůst mezi těmito variantami. Může autorka vysvětlit tento rozpor? Charakterizuje v tomto případě rychlejší nárůst růstové rychlosti spočtený z fluorescence (F_t) mezi variantami LC+ a HC+ přírůstek fykobilisomů nebo chlorofylů?

(3) Je prezentovaný noční pokles kvantového výtěžku fotochemie PSII (Q_y) opravdu způsoben degradací aktivních fotosystémů II? Nedá se tento výsledek alternativně vysvětlit i zmenšením velikosti antén fotosystému II (odpojení fykobilisomů, stavové přechody) a k následnému poklesu maximální fluorescence F_m ve tmě? Dal by se měřící protokol bioreaktoru adaptovat tak aby se tento jev dal eliminovat a mohly se tak jednodušeji porovnávat hodnoty fluorescence ve dne a v noci?

(4) Z poklesu koncentrace kyslíku před koncem světelné fáze a na začátku temnotní fáze cyklu byla vyvozena stimulace respirace v diazotrofní kultuře jednobuněčné *Cyanothece*. Jaký typ respirace autorka předpokládá že se účastní pozorovaného poklesu koncentrace kyslíku? Lze považovat tento proces (respiraci? fotorespiraci? chlororespiraci?) za nepostradatelný pro pozorovanou fixaci dusíku už na konci světelné fáze kdy je ještě funkční fotosyntéza?

(5) Čím si autorka vysvětluje opožděný start fixace dusíku u varianty se zvýšeným uhlíkem (viz grafu 3.8) u jednobuněčné *Cyanothece ATCC 51142* a opačný trend u vláknité *Anabaena PCC7120* (viz graf 3.15); dá se tento trend zobecnit pro všechny jednobuněčné a vláknité diazotrophy? Je z literatury známo čím je řízen (kontrolován) start a naopak i ukončení fixace dusíku?

Přes výše uvedené námitky a nepřesnosti považuji předloženou práci za velmi kvalitní a obecně přínosnou. Vzhledem k tomuto **hodnotím práci Kristiny Fermanové jako výbornou a doporučuji ji k obhajobě** na Přírodovědecké fakultě Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích.

V Třeboni 19.5. 2011



Radek Kaňa