

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Detekce a monitoring potenciálně toxických
sinicových lipopeptidů**

Diplomová práce

Bc. Marie Bártová

Školitel: RNDr. Jan Mareš, Ph.D.

České Budějovice 2019

Bártová M. 2019. *Detekce a monitoring potenciálně toxických sinicových lipopeptidů* [Detection and monitoring of potentially toxic cyanobacterial lipopeptides. Mgr. Thesis, in Czech.] The University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, 76 pp.

Annotation

The aim of this study was to design and optimize new PCR primers for detection of potential cyanobacterial producers of cytotoxic lipopeptides puwainaphycins and minutissamides in environmental samples. Samples from two distinct localities were tested, as suggested based on preliminary data. The first set of samples consisted of cyanobacterial soil biofilms from sheep pastures affected by Alvelid illness in Norway. The other one contained samples of planktic cyanobacterial blooms from Protected Landscape Area Třeboň and its vicinity. Three different approaches were used for evaluation of the presence of cyanobacterial lipopeptide producers: microscopy, PCR with the designed primers, and liquid chromatography-mass spectrometry analysis. Results of this study confirmed the specificity of the newly designed PCR primers. The presence of producers of puwainaphycins/minutissamides was proven at both tested localities.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 8. 4. 2019.

.....

Poděkování

Své poděkování bych ráda přednostně věnovala svému školiteli Janu Marešovi za možnost podílet se na výzkumu. Dále za jeho trpělivost, obětavý přístup a cenné rady při vypracování diplomové práce. Veliké poděkování patří Kateřině Čapkové za pomoc a pohodovou atmosféru při sběru vzorků v Norsku. Stejně tak bych ráda poděkovala Kláře Řehákové za důvěru, vlídný přístup a pomoc při sběru vzorků v CHKO Třeboňsko a okolí. Také bych ráda poděkovala ostatním zaměstnancům Hydrobiologického centra v Českých Budějovicích za spolupráci a vlídný přístup. Veliké poděkování patří Pavlovi Hrouzkovi a celému laboratornímu týmu Mikrobiologického centra v Třeboni za výpomoc s analýzou vzorků. Závěrem bych ráda poděkovala rodině a kamarádům za neustálou podporu během celého období studia.

OBSAH

Úvod	1
1 Sinice	2
1.1 Výskyt sinic	2
1.2 Toxicita sinic	2
1.2.1 Hepatotoxiny	3
1.2.2 Neurotoxiny	4
1.2.3 Dráždivé a gastrointestinální toxiny.....	6
1.2.4 Cytotoxiny.....	7
1.3 Další bioaktivní sekundární metabolity sinic	7
2 Lipopeptidy.....	8
2.1. Bioaktivita lipopeptidů	9
2.2 Biosyntéza cyklických lipopeptidů.....	9
2.2.1 FAAL	9
2.2.2 NRPS.....	9
2.2.3 PKS	11
2.3 Bakteriální lipopeptidy	12
2.4 Sinicové lipopeptidy.....	13
2.4.1 Hassallidiny.....	13
2.4.2 Anabaenolysiny.....	14
2.4.3 Muscotoxiny.....	14
2.4.4 Minutissamidy.....	15
2.4.5 Puwainaphyciny	16
2.5 Alveld	18
3 Cíle práce.....	20
4 Metodika.....	21
4.1 Sběr sinicové biomasy	21
4.1.1 Enviromentální vzorky.....	21
4.1.2 Vzorky sinicových kmenů s geny/ bez genů pro syntézu PUW/MIN	21
4.2 Mikroskopování.....	22

4.3 Zpracování a příprava vzorků.....	23
4.3.1 Příprava k izolaci DNA.....	23
4.3.2 Příprava k analýze HPLC-HRMS	23
4.3.3. Analýza HPLC-HRMS.....	24
4.4 Izolace a testování kvality DNA.....	24
4.5 Design nových primerů a optimalizace vybraných PCR primerů	26
4.6 PCR testování primerů	27
4.6.1 Testování nově navržených PCR primerů na sinicových kmenech s PUW/MIN	27
4.6.2 Testování vybraných PCR primerů na enviromentálních vzorcích	27
4.6.3 Testování specificity vybraných PCR primerů	27
4.7 Gelová elektroforéza.....	28
4.8 Analýza sekvencí.....	28
5 Výsledky.....	28
5.1 Monitoring a detekce sinicových kmenů s geny pro PUW/MIN	28
5.1.1 Odběr enviromentálních vzorků na Třeboňsku.....	28
5.1.2 Odběr enviromentálních vzorků v Norsku.....	33
5.2 Molekulární analýzy.....	35
5.2.1 Testování kvality DNA izolované z environmentálních vzorků.....	35
5.2.2 Design specifických PCR primerů pro detekci genů pro syntézu PUW/MIN	36
5.2.3 Optimalizace vybraných PCR primerů	39
5.2.4 Testování vybraných PCR primerů na enviromentálních vzorcích	41
5.2.5 Testování specificity páru primerů F1	46
5.2.6 Výsledky sekvenování PCR produktů s použitím primerů F1.....	46
5.2.7 Potvrzení přítomnosti PUW/MIN v kmenech a vzorcích sinic pomocí HPLC- HRMS (analýza ve spolupráci s P. Hrouzkem, MBÚ Třeboň).....	48
6 Diskuze	50
7 Závěr.....	56
8 Literatura	57
9 Přílohy	69

Úvod

Výskyt sinic (cyanobakterií) je v dnešní době stále více sledován. Jedním z důvodů je tvorba vodního květu v eutrofních vodách, k čemuž výrazně přispívá antropogenní činnost (Sivonen, 2009). Dalším důvodem jejich celosvětového zkoumání je produkce sekundárních metabolitů, které kromě pozitivních účinků (Luesch et al. 2001) vykazují i toxikologicky významné účinky (Codd et al. 2005).

Monitoringem a detekcí sinicových potenciálně toxických látek (cyanotoxinů) v České republice, konkrétně puwainaphycinů a minutissamidů (PUW/MIN), se zabývá i předložená diplomová práce. Jde o cyklické lipopeptidy, které svými cytotoxickými účinky působí proti eukaryotním buňkám *in vitro* (Hrouzek et al. 2012). Za producenty cyanotoxinů PUW/MIN byly dříve považovány pouze terestrické sinice (půdní typy), nicméně jejich výskyt byl zaznamenán i v planktonních vzorcích stojatých vod v České republice (Zapomělová et al. 2009). Přítomnost sinicových sekundárních metabolitů jako jsou zmíněné PUW/MIN ve vodách může mít do budoucna pro člověka negativní dopad.

Kromě výskytu v České republice byla jejich přítomnost zaznamenána i v určitých oblastech v Norsku, kde se dlouhodobě vyskytuje onemocnění Alveld, smrtelně postihující ovce. Jedná se o toxické poškození jater, které se projevuje zvýšenou fotosenzitivitou (Mysterud et al. 2016). Příčiny onemocnění Alveld nejsou doposud objasněny, podle studie (Radostits a Done, 2007) však existuje možná spojitost mezi projevy onemocnění a bioaktivitou sinicových metabolitů. Proto je diplomová práce z části věnována monitoringu a detekci PUW/MIN v jedné z postižených norských oblastí.

1 Sinice

Tvoří skupinu gram-negativních, prokaryotních mikroskopických organismů. Patří mezi jedny z nejstarších organismů naší planety (Blank a Sánchez-Baracaldo, 2010). Jsou schopny oxygení fotosyntézy, díky které se významně podílely na vzniku kyslíkaté atmosféry (Schirrmeyer et al. 2015). Některé z nich také mají schopnost fixovat dusík a podílet se tak na jeho koloběhu v životním prostředí (Sivonen, 2009). Vzhledem k dlouhodobé evoluci je jejich výskyt minimálně limitován, tudíž je lze zpozorovat v širokém rozmezí stanovišť (Percival a Williams, 2014).

1.1 Výskyt sinic

Vzhledem ke své schopnosti adaptovat se, jsou sinice schopny obývat biotopy s vysokou salinitou, vysokou nebo nízkou teplotou, místa s vyšší sluneční radiací nebo střídavě vysychající stanoviště (Whitton a Potts, 2000). Tyto schopnosti dokumentuje jejich výskyt v pouštích (Lacap-Bugler et al. 2017, Whitton 2012), v symbióze např. s rostlinami a houbami, nebo v nárostech na skalách při mořském pobřeží (Vondrášková et al. 2017). Ve vodním prostředí se vyskytují v brakických, mořských i sladkých vodách, kde je lze najít u vodní hladiny, volně rozptýlené nebo přisedlé k sedimentu či jiným substrátům (Metcalf et al. 2018). Ve vodním prostředí jsou společně s řasami hlavními producenty vodního květu (Sivonen, 2009). Zajímavé je, že jak v extrémním prostředí, tak i v symbiotických konsorciích si sinice udržují svou schopnost produkce toxických sekundárních metabolitů (Círés et al. 2017, Kaasalainen et al. 2012).

1.2 Toxicita sinic

Toxicita je charakterizována jako souhrn nepříznivých účinků cizorodých látek, které poškozují organismus (Říhová Ambrožová, 2003). Sinice obecně produkují široké spektrum takových látek. Jsou to látky, které sinice pro svůj bazální metabolismus nutně nepotřebují, ale předpokládá se, že jim poskytují kompetiční výhodu. S vysokou diverzitou podmínek v prostředí souvisí i široké spektrum produkovaných sekundárních metabolitů tj. alkaloidů, terpenoidů, polyketidů, heterocyklických sloučenin a peptidů (Kultschar et al. 2018). Produkované cyanotoxiny představují nebezpečí pro zdraví lidí a celý ekosystém. Alarmující je jejich celosvětové rozšíření ve vodních zdrojích, sloužících jako zásobárny pitné vody (Leflaive a Ten-Hage 2007). V povrchových vodách, společně s řasami, dochází k jejich akumulaci za vzniku vodního květu, což negativně ovlivňuje kvalitu pitné vody (Takser

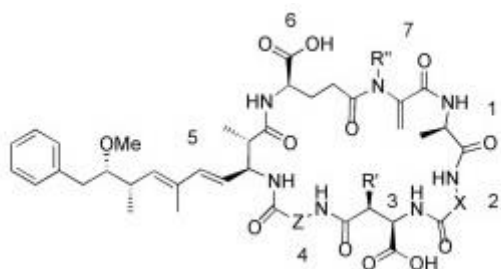
et al. 2016). Podle biologického účinku lze cyanotoxiny rozdělit na: hepatotoxiny, neurotoxiny, cytotoxiny, dráždivé a gastrointestinální toxiny (Codd et al. 2005).

1.2.1 Hepatotoxiny

Jsou to látky, které svým účinkem postihují játra. Mezi hepatotoxiny řadíme především microcystiny a nodulariny.

1.2.1.1 Microcystiny

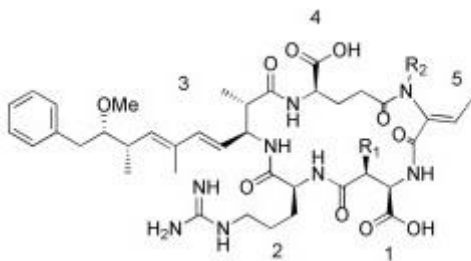
Microcystiny jsou cyklické peptidy (Obr. 1), produkované planktonními sinicemi rodu *Microcystis*, *Planktothrix*, některými zástupci rodu *Anabaena* (*Dolichospermum*). Také jsou produkovány bentickými sinicemi rodu *Oscillatoria* a *Phormidium*, které se vyskytují na dně vodních těles. Z terestrických sinic sem patří rody *Nostoc* a *Hapalosiphon*, které obývají vlhká místa v suchozemském prostředí (Dittmann et al. 2013). Z klinického hlediska jsou v určitých dávkách zdraví nebezpečné. Jejich toxicita spočívá v inhibici proteinové fosfatázy 1 a 2A, čímž dochází k narušení buněčných pochodů např. fosforylace proteinů, dělení buněk a k apoptóze (Takser et al. 2016). Klinickými projevy toxického působení microcystinů jsou podráždění kůže, zvracení, hemoragie a v konečné fázi i selhání jater a poškození centrální nervové soustavy. Mimo zmíněných toxických účinků jsou i silným tumorovým promotorem, tudíž není vyloučené ani rakovinné bujení po vyšším toxickém poškození (Gupta, 2015).



Obr. 1: Obecná struktura microcystinů (převzato z Fontanillo a Köhn, 2018).

1.2.1.2 Nodulariny

Stejně jako microcystiny jsou i nodulariny cyklické peptidy (Obr. 2), které jsou strukturou mírně odlišné. Jsou nejčastěji produkovány sinicemi rodu *Nodularia*, konkrétně druhem *Nodularia spumigena* (Humbert, 2015). Podobně jako microcystiny, i nodulariny inhibují proteinovou fosfatázu (Aráoz et al. 2010).



Obr. 2: Obecná struktura nodularinů (převzato z Fontanillo a Köhn, 2018).

Celosvětově patří microcystiny a nodulariny mezi nejčastěji se vyskytující cyanotoxiny ve vodách s vodním květem. Způsobem, kterým se nejčastěji dostává člověk do kontaktu se zmíněnými cyanotoxiny, je kontaminovaná voda. V Brazílii v roce 1996 zemřelo 76 lidí na následky intoxikace hepatotoxiny v průběhu hemodialýzy, které u pacientů vyvolaly akutní selhání jater (Azevedo et al. 2002). Udává se, že toxická dávka byla 19,5krát vyšší, než je norma pro bezpečné pití doporučená světovou zdravotnickou organizací WHO (Carmichael et al. 2001).

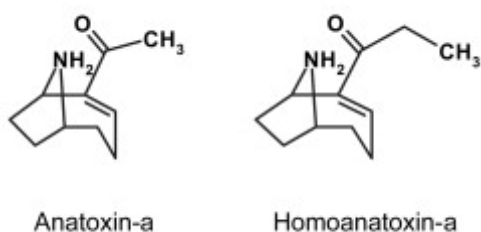
1.2.2 Neurotoxiny

Neurotoxiny jsou obecně látky, které negativně ovlivňují činnost nervové soustavy. V přírodě jsou takové látky produkovány i sinicemi. Sinicové neurotoxiny, které se objevují ve sladkých vodách, jsou zejména anatoxin-a, anatoxin-a(s) a saxitoxiny.

1.2.2.1 Anatoxin-a a homoanatoxin-a

První cyanotoxin, který byl zařazen do skupiny neurotoxinů, byl anatoxin-a (ATX-a) (Obr. 3). Je produkován převážně sinicemi rodu *Anabaena* (= *Dolichospermum*), dále pak rody *Planktothrix*, *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Cuspidothrix*, *Cylindrospermum*, *Oscillatoria* a *Phormidium* (Humbert, 2015). Poprvé byl vyizolován ze sinice *Dolichospermum flos-aquae*. Jde o látku, která dokáže napodobit neurotransmitér acetylcholin (ACh), díky kterému za normálních podmínek dochází k přenosu vzruchu v centrální i periferní nervové soustavě. Toxicita ATX-a spočívá v navázání na stejný cholinergní receptor na postsynaptické membráně nervové buňky, jako je typické pro ACh. Ve chvíli, kdy je za normálních podmínek ACh z receptoru hydrolyzován zpět, dochází k ukončení nervového signálu. Ovšem v přítomnosti ATX- a k ukončení signálu nedochází, tudíž trvalá aktivace může přejít až ve stav ohrožující život (Osswald et al. 2013).

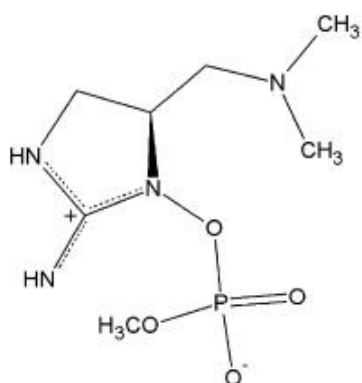
Methylovaným homologem ATX-a je homoanatoxin-a (Obr. 3). Poprvé byl vyizolován ze sinice *Oscillatoria formosa* (= *Kamptonema formosum*). Má stejný toxický účinek jako ATX-a. K intoxikaci ATX-a/homoanatoxinem-a došlo např. v Kanadě, Francii a ve Skotsku, kde s nimi přišla do kontaktu zvířata při pobřeží řek a jezer (Aráoz et al. 2010).



Obr. 3: Struktura neurotoxických alkaloidů anatoxinu-a a homoanatoxinu-a (převzato z Aráoz et al. 2010).

1.2.2.2 Anatoxin-a(s)

Anatoxin-a(s) je fosforylovaný cyklický N-hydroxyguanin (Obr. 4), produkováný sinicemi rodu *Dolichospermum*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, a *Sphaerospermopsis*. Strukturou se od ATX-a odlišuje, nicméně byl vyizolován ze stejné sinice *Dolichospermum flos-aquae* a vykazoval stejné toxické účinky. Jeho toxicita spočívá v inhibici účinku acetylcholinesterázy, která tak není schopna degradovat ACh. Následkem je neustálá aktivace cholinergního receptoru na postsynaptické membráně, která může vést stejně jako u ATX-a ke smrti (Žegura et al. 2011). Úmrtí zvířat po intoxikaci anatoxinem-a(s) byla hlášena např. v Kanadě nebo Dánsku (Aráoz et al. 2010).



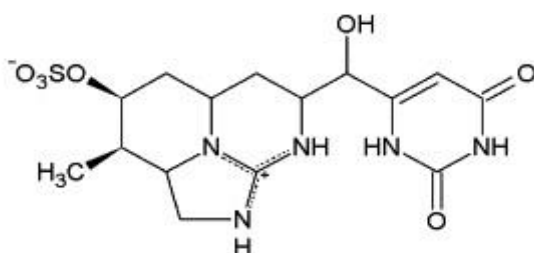
Obr. 4: Struktura anatoxinu a(s) (převzato z Žegura et al. 2011).

1.2.4 Cytotoxiny

Cytototoxiny jsou obecně látky, které způsobují nekrózu buněk. Ze sinicových cytotoxinů jsou nejznámější cylindropermopsiny.

1.2.4.1 Cylindropermopsiny

Podobně jako u většiny cyanotoxinů, jsou i cylindropermopsiny jednou z možných hrozeb pro veřejné zdraví. Strukturou se jedná o guanidinové alkaloidy (Obr. 7). Tyto sekundární metabolity, produkované několika druhy sinic, nejčastěji však *Cylindropermopsis raciborskii*, dokáží v živočišných buňkách inhibovat funkci cytochromu P450 nebo inhibovat syntézu proteinů, čímž ve výsledku dochází k nekróze buněk (Davis et al. 2014). Podle místa působení jsou postiženy např. ledviny, játra, slezina aj. orgány. Jedním z dalších nežádoucích biologických účinků cylindropermopsinů je genotoxicita, jsou tedy schopné narušit buňky až na úrovni DNA (Codd et al. 2005).



Obr. 7: Struktura cylindropermopsinu (převzato z Žegura et al. 2011).

1.3 Další bioaktivní sekundární metabolity sinic

Kromě výše zmíněné zásadní úlohy v globálním koloběhu prvků a primární produkci je pro sinice charakteristická produkce rozsáhlé palety bioaktivních chemických látek. Mnohé z nich jsou vzhledem ke svým specifickým účinkům testovány pro budoucí využití v zemědělství jako insekticidy nebo herbicidy (Rastogi a Sinha, 2009). Širokého spektra produkovaných sekundárních metabolitů je využíváno i jako zdroje nových potenciálních léčiv ve farmakologickém průmyslu. Jde především o látky antibakteriální, fungicidní, protirakovinné, protizánětlivé, imunosupresivní, antiparazitární aj. (Rajneesh et al. 2017). Antifungální aktivita byla objevena např. u sinice *Tolypothrix tjipanensis*. Tato sinice produkuje karbazoly (tjapazoly), které dokáží potlačit ústní či genitální houbové infekce, způsobené kvasinkami *Candida albicans* (Bonjouklian et al. 1991). Antiparazitární

i protinádorové účinky byly potvrzeny například u sinic rodu *Calothrix*, které díky svým pentacyklickým metabolitům dokáží *in vitro* inhibovat růst *Plasmodium falciparum* a rakovinných HeLa buněk (Rickards et al. 1999). Cesta od bioaktivního účinku *in vitro* k zavedení do klinické praxe je však velmi složitá a nákladná. V současnosti jedinou látkou vyvinutou na základě sekundárního metabolitu sinic, která je užívána v medicíně, je monomethyl auristatin E (MMAE) odvozený od dolastatinu z mořských sinic *Symploca* a *Lyngbya* (Luesch et al. 2001). Ve formě konjugátu s protilátkou je využíván při léčbě některých typů rakoviny (Younes et al. 2012). Svoji pozornost si sinice získaly také jako možný zdroj biopaliv, a to díky schopnosti rychlého růstu, nenáročnosti na okolní podmínky, pestré produkci užitečných metabolitů a relativně malému genomu, který je tak dostupnější genetickému inženýrství (Rajneesh et al. 2017). Kromě zmíněných účinků se i mezi méně známými nebo zcela novými sinicovými sekundárními metabolity vyskytují toxické látky (cyanotoxiny), které mohou u člověka vyvolat např. zvracení, kožní dráždivost, nervové poškození nebo jaterní onemocnění. Vysoká míra toxicity může způsobit i smrt (Dittmann et al. 2013).

Patrně nejvýznamnější skupinou bioaktivních sekundárních metabolitů sinic jsou látky odvozené od oligopeptidů (Dittmann et al. 2015). Část z nich je syntetizována klasicky prostřednictvím ribozomů (Sivonen et al. 2010), nicméně většinou se tvoří za pomoci dvou speciálních enzymatických komplexů tj. neribozomálních peptidových syntetáz (on-ribosomal peptide synthetases - NRPS) a polyketid-syntáz (polyketide synthases - PKS). Variabilitu produkovaných metabolitů ještě zvyšuje jejich kombinace do hybridních komplexů NRPS/PKS. Kombinací NRPS/PKS vznikají např. cyklické lipopeptidy, které jsou hlavním předmětem mé diplomové práce.

2 Lipopeptidy

Jedná se o přírodní látky, které díky svému složení mají amfipatický charakter. Jsou to nízkomolekulární oligopeptidy, k jejichž peptidovému jádru je připojen jeden nebo více lipidových konců. Dle chemického složení vykazují různou bioaktivitu (Hamley, 2015). Jsou produkovány např. bakteriemi nebo houbami. Lipopeptidy, produkované sinicemi, jsou ve vědě předmětem zkoumání již několik desetiletí, a stejně jako ostatní lipopeptidy vykazují zajímavou bioaktivitu (Swain et al. 2017).

2.1. Bioaktivita lipopeptidů

Lipopeptidy, zejména bakteriální, mají velké uplatnění v medicíně vzhledem ke svým antibakteriálním, antifungicidním, protirakovinným, protizánětlivým, imunosupresivním, antiparazitárním účinkům (Rajneesh et al. 2017). Biosyntéza lipopeptidů představuje složitou mašinerii několika enzymatických komplexů, kde se činností jednotlivých domén vytváří lipopeptidy s obrovskou variabilní strukturou. Odlišnosti ve strukturách lipopeptidů pak odpovídají jejich různorodým účinkům (Mareš et al. 2019).

2.2 Biosyntéza cyklických lipopeptidů

Pro biosyntézu bakteriálních lipopeptidů je charakteristické, že neprobíhá na ribozomech, tudíž celý mechanismus probíhá s pomocí enzymatických komplexů, včleněných do membrán těchto mikroorganismů. Jejich produkce je závislá na aktivaci volné mastné kyseliny s pomocí FAAL (fatty acyl-AMP ligase) a následně na spolupráci dvou enzymatických komplexů tj. hybridní NRPS/PKS. Činnost komplexu NRPS/PKS doplňují tzv. "tailoring domains", jejichž účinkem dochází k finálním modifikacím vznikajících lipopeptidů.

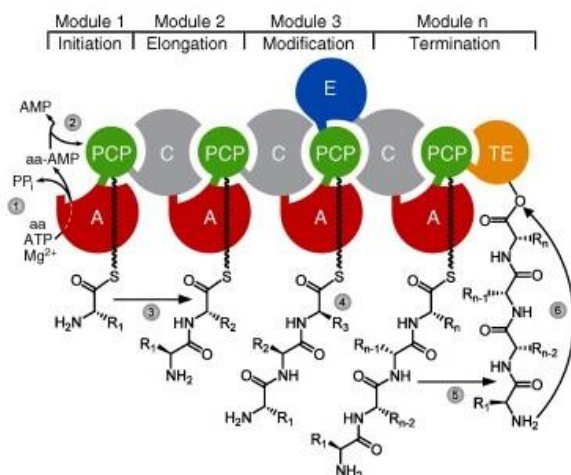
2.2.1 FAAL

U cyklických lipopeptidů jako jsou puwainaphyciny a minutissamidy dochází k propojení lipidového konce s peptidovým jádrem prostřednictvím FAAL domény (fatty acyl-AMP ligase). Biosyntéza lipopeptidu začíná v momentě, kdy FAAL rozpozná a aktivuje volnou mastnou kyselinu a předá ji na první thiolační doménu komplexu PKS/NRPS (Mareš et al. 2019).

2.2.2 NRPS

NRPS je enzymatický komplex, jehož specifická činnost je zodpovědná za tvorbu strukturně i funkčně různorodých peptidů. Celý mechanismus lze rozdělit do několika funkčních modulů viz (Obr. 8). Jak je z obrázku patrné, v každé modulové části dochází k začlenění nového monomeru. Obrovská variabilita výsledných produktů je založena na zpracování až 500 různých monomerů, mezi které patří např. proteinogenní i neproteinogenní aminokyseliny, hydroxykyseliny, nebo mastné kyseliny (Bloudoff a Schmeing, 2017).

Pro funkci celého enzymatického komplexu je důležitá přítomnost třech hlavních domén tj. adenylační - A, kondenzační - C a thiolační – T nebo také PCP (peptidyl-carrier protein), které jsou součástí každého modulu (Obr. 8). Doplnující čtvrtou doménou posledního modulu je thioesterázová doména (TE) (Strieker et al. 2010).



Obr. 8: Schéma mechanismu NRPS (převzato z Strieker et al. 2010).

K obrovské variabilitě výsledných produktů ještě přispívá možnost modifikací během syntetického procesu. Tyto modifikace jsou zprostředkovány tzv. tailoring domains. Řadíme mezi ně oxidační (Ox), aminotransferázovou (AmT), methyltransferázovou (MT), epimerizační (E) nebo cyklázovou (Cy) doménu (Hur et al. 2012).

Adenylační doména (A)

Představuje nejdůležitější část celé biosyntézy. Z obrázku (Obr. 8) je patrná její funkce při rozpoznávání nové aminokyseliny a její aktivaci pomocí AMP (adenylace). Následně dochází k navázání AK a ostatních meziproduktů na fosfopanteteinové raménko, které je součástí thiolační domény (Gulick, 2009).

Thiolační doména (PCP)

Thiolační doména je označována jako PCP (peptidyl carrier protein). Její nezbytnou složkou je fosfopanteteinové raménko, na které je pomocí thiolové vazby upevněn vznikající intermediát. Toto ohebné raménko umožňuje přesun intermediátu mezi jednotlivými katalytickými místy syntázy. V PCP doméně také obvykle dochází k interakci intermediátu s “tailoring domains“.

Kondenzační doména (C)

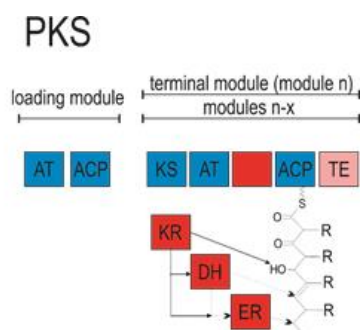
Po všech nezbytných modifikacích během syntetického procesu dochází k vytvoření peptidové vazby mezi dosavadním meziproduktem a novým monomerem, což zajišťuje kondenzační doména. (Martínez-Núñez a López, 2016).

Thioesterázová doména (TE)

Představuje cílový krok pro dokončení syntézy peptidového jádra cyklických lipopeptidů, neboť v konečné fázi uvolňuje výsledný produkt z komplexu a může též katalyzovat makrocyclizaci produktu (Hur et al. 2012).

2.2.3 PKS

Enzymatický komplex PKS je tvořen několika doménami (Obr. 9), uspořádanými do modulů (Ridley et al. 2008). Zodpovídají za výběr, spárování a zpracování intermediátu. V každém modulu je nezbytná přítomnost třech domén: acyltransferázové (AT), thiolační (též acyl-carrier protein – ACP) a β -ketoacyl syntázy (KS) (Cheng et al. 2009). Aktivitou všech zmíněných domén dochází mezi ACP a vznikajícím intermediátem k dekarboxylační Claisenově kondenzaci za vzniku β -ketoacyl-S-ACP intermediátu (Cheng et al. 2003). Přítom AT doména katalyzuje navázání monomeru (v našem případě obvykle malonyl-CoA) na ACP, vznikající intermediát je předán z ACP předchozího modulu na KS doménu, která katalyzuje kondenzační reakci s novým monomerem. Obecný mechanismus je tedy obdobný NRPS. Po Claisenově kondenzaci se mohou uplatňovat ještě doplňující domény které jsou zodpovědné za značnou strukturní variabilitu polyketidových látek. Patří sem ketoreduktáza, dehydratáza, enoylreduktáza, mooxygenáza, methyltransferáza, glykosyltransferáza, heterocykláza aj. (Ridley et al. 2008). Jejich působením dochází ke změnám na β -keto skupině (Cheng et al. 2003).



Obr. 9: Mechanismus PKS (Převzato z Kust, 2019).

V následující části záměrně oddělím sinicové lipopeptidy od ostatních bakteriálních lipopeptidů, čímž bych chtěla zdůraznit jejich podstatnou roli v životním prostředí.

2.3 Bakteriální lipopeptidy

Důvodem, proč bakterie produkují široké spektrum lipopeptidů, je např. jejich obrana, regulace plazivého růstu a vytváření biofilmu. S novými studii se výzkum zaměřil na některé konkrétní vlastnosti produkovaných lipopeptidů, zejména jejich bioaktivitu s potenciálním využitím v praxi (Reder-Christ et al. 2012). Doposud nejvíce prostudovány byly lipopeptidy produkované dvěma rody bakterií, *Bacillus* a *Pseudomonas* (Hamley, 2015).

Mezi lipopeptidy rodu *Pseudomonas*, které vykazují antibakteriální účinky patří viscosin, amphisin, tolaasin a syringomycin. Všechny 4 produkované látky se vzájemně odlišují ve struktuře peptidového jádra i délce lipidového řetězce (Hamley, 2015). Obecně potlačují gram-pozitivní bakterie, mezi které patří např. *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* nebo *Mycobacterium tuberculosis* (Reder-Christ et al. 2012). Jejich antimikrobiální účinky zapřičiňuje, tak jako u většiny bioaktivních lipopeptidů, schopnost permeabilizovat membránu buněk (Geudens et al. 2017).

Ve 40. letech 20. století byla poprvé rozpoznána antimikrobiální aktivita u lipopeptidu polymyxinu (Stansly a Schlosser, 1947), který byl produkován bakterií *Paenibacillus* (dříve *Bacillus*) *polymyxa* (Satlin a Jenkins, 2017). Od té doby patří polymyxin (colistin) mezi antibiotika (Atb) využívaná v medicíně, s antagonistickým účinkem proti gram-negativním bakteriálním infekcím (Yu et al. 2015). Mezi další zástupce lipopeptidů, které jsou produkované bakteriemi rodu *Bacillus*, patří surfactin, iturin nebo fengycin (Farace et al. 2015). Zajímavé je, že jsou surfactiny využity také např. v potravinářství (Meena a Kanwar, 2015) nebo kosmetice (Kanlayavattanakul a Lourith, 2010). V potravinářství je lze použít jako emulgátory při zpracování potravin. Díky svým specifickým účinkům jsou schopné limitovat znehodnocování jídla mikroby. V zemědělství mohou být vhodnou variantou pro alternativní náhradu chemických pesticidů, jelikož dokáží inhibovat růst šedé plísně (*Botrytis cinerea*), která postihuje rostlinnou výrobu (Toral et al. 2018).

S rostoucí rezistencí na Atb jsou lipopeptidy s antifungálním a antimikrobiálním účinkem velice vhodným zdrojem pro výzkum nových léčivých látek proti multirezistentním patogenním kmenům. Obecně známým příkladem je daptomycin. Vzniká jako fermentační produkt bakterie *Streptomyces roseosporus*. Jeho účinky jsou cílené proti gram-pozitivním

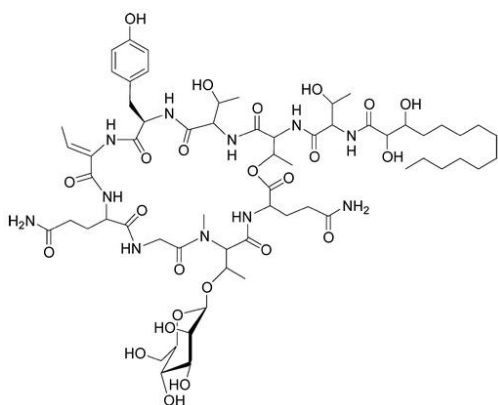
bakteriím včetně multirezistentních kmenů *Staphylococcus aureus* (MRSA). V roce 2003 byl daptomycin schválen jako první cyklický lipopeptid, který se směl použít jako Atb proti krevním a kožním bakteriálním infekcím (Meena a Kanwar, 2015).

2.4 Sinicové lipopeptidy

Také tato skupina lipopeptidů je v dnešní době hojně studována. S novými vědeckými objevy jejich důležitost stoupá a to jak z hlediska toxikologického, tak i medicínského. Některé z nich mohou v životním prostředí představovat potenciální toxiny. Svým působením jsou schopné v organismu vyvolat apoptózu buněk, a to prostřednictvím blokace signálních drah nebo změnami v aktivitě enzymů (Huang a Zimba, 2019). Kromě toxického působení lipopeptidy ze sinic mají též antimikrobiální, antifungální, protirakovinné a imunosupresivní účinky (Xue et al. 2018). Takové účinky vykazují vzhledem ke své struktuře podobně jako tomu je u ostatních bakteriálních lipopeptidů. Lipofilní část lipopeptidu zapříčiní permeabilizaci membrány buňky, čímž dochází k cytotoxickému účinku a následné depolarizaci a nekróze buňky (Galica et al. 2017). S přibývajícím množstvím rezistentních bakteriálních kmenů, které způsobují leckdy i závažná lidská onemocnění, jsou sinicové lipopeptidy ve vědě důležitým předmětem zkoumání. Patří mezi ně např. hassallidiny, anabaenolysiny, muscotoxiny, minutissamidy nebo puwainpahyciny.

2.4.1 Hassallidiny

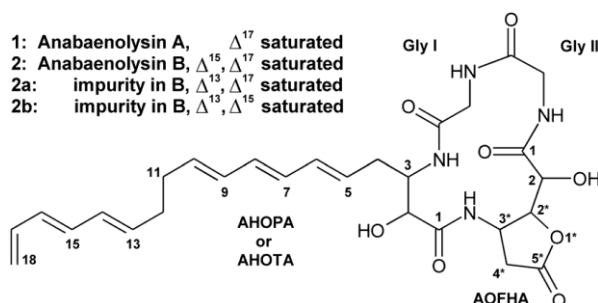
Hassallidiny patří mezi glykosylované lipopeptidy (Obr. 10), které jsou produkovány sinicemi rodu *Hassalia*, *Anabaena*, *Aphazinomenom*, *Tolypothrix* aj. (Shishido et al. 2015). Tyto poměrně široce rozšířené látky svými antifungálními účinky dokáží potlačit i některé lidské houbové patogeny, např. *C. albicans* a *Aspergillus fumigatus* (Neuhof et al. 2005). S ostatními lipopeptidy s antifungální aktivitou mají společné znaky v chemické struktuře. Obecně se jedná o peptidové jádro, tvořené osmi aminokyselinami. Dále je struktura tvořena postranním řetězcem s 2,3 dihydroxy mastnou kyselinou, a navíc se dvěma až třemi sacharidovými jednotkami (např. manózou). Bylo zjištěno, že jako jedny z mála přírodních bakteriálních látek zcela neztrácejí svoji bioaktivitu ani v lineární formě (Vestola et al. 2014). Pro využití v biomedicíně je stále zapotřebí jejich další testování.



Obr. 10: Struktura hassallidinu A (převzato z Neuhofer et al. 2005).

2.4.2 Anabaenolysiny

Jsou to cyklické sinicové lipopeptidy (Obr. 11), izolované ze sinic rodu *Anabaena*. Svou antifungální aktivitou působí proti *C. albicans*, *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. (Xue et al. 2018). Vykazují schopnost lyzovat membrány savčích buněk bez poškození mitochondrií. Anabaenolysiny cílí na cholesterol-dependentní membrány a vykazují silné hemolytické účinky (Ofstedal et al. 2012).

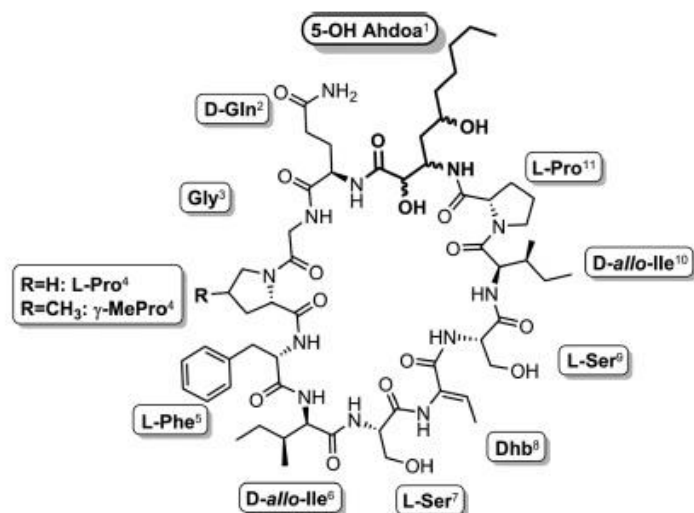


Obr. 11: Struktura anabaenolysinu A a B (převzato z Jokela et al. 2012).

2.4.3 Muscotoxiny

Stejně jako u předchozích sinicových lipopeptidů je i pro muscotoxiny charakteristická permeabilizace buněčných membrán. Muscotoxiny A, B (Obr. 12) jsou přítomny v extraktech z půdní sinice *Desmonostoc muscorum* (Cheel et al. 2018). Muscotoxin A má schopnost permeabilizovat plazmatickou membránu u lidských rakovinných HeLa buněk, čímž dochází k buněčnému usmrcení. V porovnání s anabaenolysinem A, který k narušení buněčné membrány vyžaduje přítomnost cholesterolu (Ofstedal et al. 2012), muscotoxin A touto podmínkou limitován za určitých podmínek není. Obecně se dá říci, že muscotoxin na rozdíl

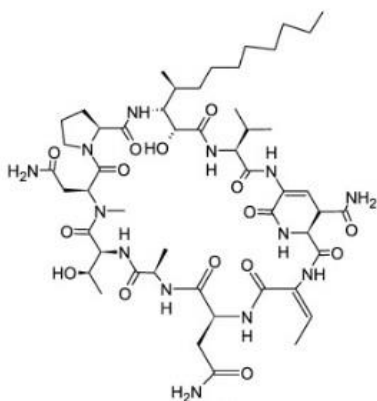
od jiných lipopeptidů nebo syntetických detergentů narušuje lipidovou dvojvrstvu tím, že snižuje její fluiditu (Tomek et al. 2015). Kromě již zmíněného nekrotického účinku muscotoxinu A proti lidským rakovinným buněčným liniím, vykazují muscotoxiny značnou antifungální aktivitu proti rostlinným patogenním houbám *Sclerotinia sclerotiorum*, tudíž by jejich bioaktivity mohlo být využito v zemědělství (Cheel et al. 2018).



Obr. 12: Struktura muscotoxinu A (R=H) a muscotoxinu B (R=CH₃) (převzato z Tomek et al. 2015).

2.4.4 Minutissamidy

Chemickým složením jde o cyklické decapeptidy (Obr. 13). Ze sinice *Anabaena minutissima* (UTEX 1613) byly izolovány 4 varianty tj. minutissamidy A, B, C, D (Nagarajan et al. 2013). Ve všech čtyřech typech je struktura peptidového jádra identická. Odlišují se pouze v lipofilním β -aminokyselinovém zbytku, kde v jednotlivých případech dochází k substituci chlorem, oxoskupinou, nebo k hydroxylaci. Nicméně taková odlišnost pak hraje důležitou roli v antiproliferativní aktivitě. Příkladem je 10x vyšší účinnost minutissamidu A v porovnání s minutissamidem B, které se liší přítomností chlóru na 12. uhlíku. Minutissamidy byly testovány jako přírodní bioaktivní látky na buněčné linii rakovinných buněk tlustého střeva (HT-29), kde jejich antiproliferativní aktivita byla potvrzena (Kang et al. 2011). Zajímavá je jejich částečná strukturní podobnost s puwainaphyciny, což je v souladu s faktem, že mají obě tyto skupiny sinicových lipopeptidů podobné vlastnosti.



Obr. 13: Struktura minutissamidu A (převzato z Vinothkumar a Parameswaran, 2013)

2.4.5 Puwainaphyciny

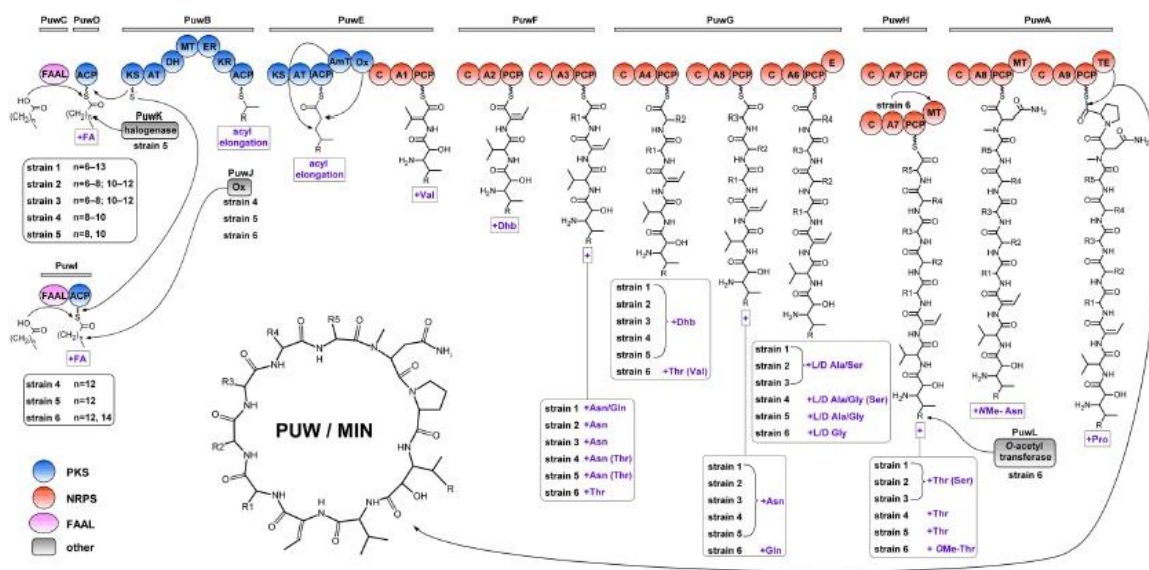
Jsou to cyklické lipopeptidy, produkované sinicemi rodu *Anabaena* a *Cylindrospermum*. Stejně jako u minutissamidů se jedná o β -aminolipopeptidy, jejichž produkce je závislá na kombinaci dvou enzymatických komplexů NRPS/PKS (viz. 2.4.5.1 biosyntéza puwainaphycinů). V nedávno publikované studii bylo zjištěno, že puwainaphyciny a minutissamidy společně tvoří širší skupinu sinicových lipopeptidů, které se sice liší v některých strukturních detailech (zejména délka řetězce mastné kyseliny), avšak mají společný původ (Mareš et al. 2019). Tato studie též přinesla poznatky o velkém množství nových variant, které vytváří strukturní kontinuum mezi puwainaphyciny a minutissamidy. V dalším textu je proto budeme považovat za souhrnnou skupinu látek puwainaphyciny/ minutissamidy (PUW/MIN).

Jednotlivé účinky PUW/MIN odpovídají jednotlivým modifikacím přidružené mastné kyseliny. Asi nejvíce prostudovanou aktivitou je cytotoxický účinek u puwainaphycinů F/G. Podle studie (Hrouzek et al. 2012) bylo zjištěno, že delším působením puwainaphycinu F/G na membrány buněk dochází k jejich disrupci a následně k influxu Ca^{2+} iontů. Na myších byla studována aktivita puwainaphycinu C, který u nich vyvolal silný inotropní účinek srdečních síní (Moore et al. 1989).

2.4.5.1 Biosyntéza PUW/MIN

Pro biosyntézu PUW/MIN je charakteristická FAAL (fatty acyl-AMP ligázová) doména, která představuje startovací jednotku celého procesu kódovanou proteinem PuwC nebo PuwI – jedná se o dva alternativní FAAL enzymy, z nichž každý je specifický pro jinou množinu mastných kyselin (Obr. 14). Její funkcí je aktivovat mastnou kyselinu procesem

adenylace. Vytvořený acyl adenylát je pak s pomocí fosfopanteteinového přenašeče převeden na ACP (acyl carrier protein) doménu, která je součástí prvního enzymatického komplexu PKS. Aktivovaná mastná kyselina je pak předána postupně dvěma elongačním biosyntetickým modulům (PuwB, PuwE), které jsou součástí PKS enzymatického komplexu. Zatímco první modul vytváří redukovaný α -methylovaný produkt, v rámci druhého z nich se uplatňují aminotransferáza a monooxygenáza za vzniku 3-amino-2-hydroxy-4-methyl-acylu. Stále v rámci enzymu PuwE je pak meziproduct předán na PCP doménu prvního NRPS modulu a prodloužen o první aminokyselinu valin. Působením NRPS enzymů PuwF, G, H, a PuwA je intermediát dále prodlužován stejným způsobem o různé aminokyseliny v závislosti na substrátových preferencích jednotlivých adenylačních domén. Obecně platí, že u všech známých variant PUW/MIN jsou konzervovány první dvě aminokyseliny (valin, dehydrobutyrát) a poslední dvě aminokyseliny (N-methylasparagin, prolin), zatímco pět aminokyselin mezi nimi je značně variabilních. V konečné fázi prostřednictvím terminální thioesterázové domény dochází k odštěpení vzniklého intermediátu, který je následně cyklizován (Mareš et al. 2014, 2019).



Obr. 14: Schéma syntézy sinicových lipopeptidů, konkrétně puwainaphycinu (převzato z Mareš et al. 2019).

2.4.5.2 Výskyt PUW/MIN v sinicích

Puwainaphyciny A-E byly vyizolovány z terestrické sinice *Anabaena sp.* BQ-16-1 (Gregson et al. 1992). Z půdní sinice *Cylindrospermum alatosporum* CCCALA 988 byly vyizolovány puwainaphyciny F/G (Hrouzek et al. 2012). Ze sinicového kmene *Anabaena sp.*

UIC 10035 byly vyizolovány MIN E-L (Kang et al. 2012) a z kmene *Anabaena minutissima* UTEX B1613 byly izolovány minutissamidy A-D (Kang et al. 2011). V nejnovější studii byly izolovány další varianty z výše uvedených kmenů a nově analyzovaných kmenů *Cylindrospermum* spp. CCALA 993, CCALA 994, *Anabaena* sp. UHCC-0399 a *Symplocastrum muelleri* NIVA-CYA 644 (Mareš et al. 2019).

Dosud se na základě výše uvedených dat předpokládalo, že je PUW produkován téměř výhradně terestrickými sinicemi. Ve studii (Zapomělová et al. 2009) se uvádí, že by se mohly puwainaphyciny vyskytovat i ve vodním prostředí. Z výsledků vyplývalo, že je výskyt PUW A spojen s výskytem sinice *Sphaerospermopsis reniformis*, která se sporadicky vyskytuje v planktonu eutrofních vod též na území ČR.

Vzhledem k zřejmě nespecifickému cytotoxickému působení PUW/MIN proti eukaryotním buňkám je důležitý další průzkum jejich možného toxického působení včetně monitoringu a detekce v životním prostředí. Důležitost takového průzkumu potvrzuje výskyt sinice *Symplocastrum muelleri* NIVA-CYA 644 v oblastech, které jsou zasaženy onemocněním Alveld (Mysterud et al. 2016). U této sinice byly detekovány podobné biosyntetické genové klastry a produkce některých variant PUW/MIN (Mareš et al., 2019).

2.5 Alveld

Alveld je jaterní onemocnění, které postihuje ovce v západním Norsku. Podobné onemocnění se vyskytuje i na Britských ostrovech (Ford, 1964). Alveld se v těchto zemích vyskytuje už přes sto let a stále nejsou vědecky doložené pravé příčiny jeho propuknutí. Doposud bylo zjištěno, že vlivem toxického poškození jater dochází k uvolnění phylloerythrinu do krve. Výsledným klinickým projevem je fotosenzitivita způsobená reakcí slunečního záření s phylloerythrinem v kožních kapilárách (Mysterud et al. 2016).

Podle dosavadních studií je onemocnění spojováno s výskytem rostliny *Narthecium ossifragum* na horských pastvinách. Tato rostlina obsahuje saponiny, látky steroidního charakteru. Předpokládalo se, že působením saponinů v organismu dochází k vývoji zmiňovaného onemocnění. Nicméně samotný účinek saponinů nebyl prokázán jako příčina vzniku jaterní dysfunkce (Tønnesen et al. 2013). Proto se výzkum zaměřil na studium hub, vyskytujících se v těsné blízkosti s rostlinami bohatými na saponiny. Předpokládalo se, že by k toxickému poškození jater docházelo vlivem synergistického účinku těchto hub společně se

saponiny. Nicméně ani tato hypotéza, založena na spolupůsobení s jiným mikroorganismem, nebyla zatím potvrzena (Mysterud et al. 2016).

Během rozborů enviromentálních vzorků se pozornost převedla na sinice, jejichž sekundární metabolity jsou také toxické pro jejich bezprostřední okolí. Byla prokázána spojitost mezi projevem příznaků fotosenzitivity a působením sinicových metabolitů (Radostits a Done, 2007). Už podle studie (Tønnesen et al. 2013) byl v postižených oblastech potvrzen výskyt sinice *Symplocastrum muelleri*. Jak už bylo zmíněno, u sinice *Symplocastrum muelleri* NIVA-CYA 644 byly detekovány podobné biosyntetické genové klastry a produkce PUW/MIN (Mareš et al. 2019). Proto je část diplomové práce věnována problematice s onemocněním Alveld ve spojitosti s výskytem puwainaphycinů v postižených oblastech.

3 Cíle práce

Cíle diplomové práce jsou:

- Literární rešerše problematiky
- Design specifických PCR primerů pro detekci genů pro syntézu PUW/MIN
 - Optimalizace PCR protokolů
 - Testování na kmenech sinic obsahujících/neobsahujících biosyntetické geny pro PUW/MIN
 - Testování metodiky na environmentálních vzorcích
- Sběr a zpracování environmentálních vzorků sinic:
 - Monitoring PUW/MIN v planktonu rybníků na Třeboňsku
 - Monitoring PUW/MIN ve vzorcích toxigenních půdních biofilmů v Norsku
- Potvrzení přítomnosti PUW/MIN v kmenech a vzorcích sinic pomocí HPLC-HRMS (analýza ve spolupráci s P. Hrouzkem, MBÚ Třeboň)

4 Metodika

4.1 Sběr sinicové biomasy

4.1.1 Enviromentální vzorky

Pro odběr vzorků byly zvoleny lokality s podezřením na možnou přítomnost puwainaphycinů. Enviromentální vzorky byly odebírány z CHKO Třeboňsko a okolí (Obr. 15), kde byl možný výskyt puwainaphycinů zaznamenán podle studie (Zapomělová et al. 2009). Před odběrem byly na každém stanovišti zaznamenány následující údaje: datum a čas odběru, počasí a GPS souřadnice, pomocí kalibrovaného přenosného testeru Hanna 98130 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) byla změřena teplota vody, pH, konduktivita, průhlednost byla stanovena pomocí Secchiho disku. Vzorky planktonu byly na jednotlivých stanovištích odebírány pomocí planktonní sítě o průměru ok 20 µm. Pro získání co nejvyšší koncentrace biomasy se odběr planktonkou několikrát opakoval. Z každého stanoviště byly odebrány dva vzorky do sterilních plastových 50 ml centrifugačních zkumavek. Zkumavky byly pak v chladicím boxu transportovány do laboratoře.

Druhou lokalitou bylo zvoleno prostředí pastvin v západním Norsku v oblasti Møre og Romsdal (Obr. 19), kde existuje podezření na výskyt onemocnění Alveld v souvislosti s přítomností sinice *Symplocastrum muelleri*, která puwainaphyciny produkuje. Vzorky biofilmů byly odebírány do speciálních plastových pytlíčků s bezpečnostním uzávěrem, tzv. Whirl-pak (Aristotle Corp., Stamford, CT, USA). Byly zaznamenány GPS souřadnice lokalit, kde byly odběry provedeny.

4.1.2 Vzorky sinicových kmenů s geny/ bez genů pro syntézu PUW/MIN

Ze světových sbírek sinic bylo získáno 5 kmenů sinic s geny pro PUW/MIN (Tab. 1), které posloužily jako pozitivní kontrola. Dále bylo do analýzy zařazeno 22 kmenů sinic (Tab. 2), které neprodukují PUW/MIN, ale mají ve svém genomu příbuzný typ predikovaných genových klastrů pro syntézu lipopeptidů obsahujících FAAL a PKS/NRPS geny (Galica et al. 2017). Tyto kmeny posloužily jako negativní kontrola pro design co nejvíce specifických PCR primerů. Biomasa byla odebírána do sterilních mikrozskumavek (1,5 ml) s bezpečnostním uzávěrem. Sklizená biomasa byla opakovaně stáčena a vzniklý supernatant byl odebírán. Poté byla biomasa sušena v eksikátoru 4-7 dní v závislosti na množství sklizené biomasy.

Tab. 1: Seznam sinicových kmenů s geny pro PUW/MIN.

č.	sinicový kmen
1	<i>Cylindrospermum alatosporum</i> CCALA 988
2	<i>Cylindrospermum moravicum</i> CCALA 993
3	<i>Cylindrospermum alatosporum</i> CCALA 994
4	<i>Anabaena minutissima</i> UTEX B1613
5	<i>Symplocastrum muelleri</i> NIVA-CYA 644

Tab. 2: Seznam testovaných kmenů sinic, které neprodukují PUW/MIN.

č.	označení	sinicový kmen
1	SAG 42.79	<i>Chroococidiopsis thermalis</i>
2	PCC 7428	<i>Gloeocapsa</i> sp.
3	UTEX LB 1829	<i>Fischerella muscicola</i>
4	PCC 7424	<i>Cyanothece</i> sp.
5	CCALA 34	<i>Calothrix</i> sp.
6	PCC 9212	<i>Chlorogloeopsis</i>
7	SAG 22.89	<i>Crinalium epipsammum</i>
8	PCC 7601	<i>Tolypothrix</i> sp.
9	PCC 7110	<i>Scytonema hofmanni</i>
10	PCC 7126	<i>Microchaete</i> sp.
11	UTEX B482	<i>Plectonema boryanum</i>
12	UTEX B2349	<i>Scytonema hofmanni</i>
13	NIES 3754	<i>Fischerella</i> sp.
14	CCALA 39	<i>Chlorogloeopsis fritschii</i>
15	NIES 3756	<i>Nostoc</i> sp.
16	KORDI 51	<i>Rubidibacter lacunae</i>
17	PCC 7509	<i>Synechocystis</i> sp.
18	SAG 1449-3	<i>Oscillatoria</i> sp.
19	UTEX 1830	<i>Hapalosiphon welwitschii</i>
20	SAG 1410-3	<i>Calothrix parietina</i>
21	NIES 3757	<i>Stanieria</i> sp.
22	PCC 7414	<i>Fischerella</i> sp.

4.2 Mikroskopování

Po transportu do laboratoře byly enviromentální vzorky prohlíženy pomocí mikroskopu Olympus BX51 vybaveném Nomarského DIC při zvětšení 100×–400×

a dokumentovány digitálním fotoaparátem Olympus DP-72 (Olympus, Tokyo, Japonsko). Z každého odebraného enviromentálního vzorku byla připravena 2 sklíčka pro mikroskopování. Determinace sinic byla provedena podle (Komárek a Anagnostidis 1999, 2005, a Komárek, 2013) a jejich přítomnost ve vzorcích byla zaznamenána v přílohách č. 2, 3, a 4.

4.3 Zpracování a příprava vzorků

4.3.1 Příprava k izolaci DNA

Zkumavky s odebranými vzorky planktonu byly centrifugovány (Eppendorf Centrifuge 5804, Eppendorf, Hamburg, Německo) při 5000 g po dobu 15 min tak, aby se biomasa oddělila od supernatantu. Vzniklý supernatant byl opatrně slit. Zbylá část peletu byla rozdělena do několika mikrozkušavek s bezpečnostním uzávěrem pro následnou izolaci DNA/chemické analýzy. Takto připravené vzorky byly uloženy do hluboko-mrazicího boxu při teplotě -80°C. Vzorky terestrických biofilmů byly pouze rozděleny do mikrozkušavek a zmrazeny při teplotě -80 °C. Pro usnadnění narušení buněčných stěn sinic bylo před izolací kitem Macherey-Nagel (kapitola 4.4) nutné vzorky nejdříve 10x střídavě zmrazit tekutým dusíkem po dobu 1-3 min a zahřívát na termobloku (Benchmark Research Products, 65 °C, 5 min). V případě izolace DNA podle protokolu (Yilmaz et al. 2009) a izolace DNA prostřednictvím kitu (MO-BIO, Ultra clean-microbial DNA isolation kit) (kapitola 4.4), byla biomasa na základě dřívějších zkušeností školitele nejprve vysušena v eksikátoru. Poté byly zkumavky se dvěma kovovými kuličkami umístěny do laboratorního mlýnu (Mixer Mill MM200, Retsch, Haan, Německo) a biomasa rozdrvena třepáním (30 ot/s, 5 min), čímž došlo k narušení buněčných struktur a cílenému uvolnění buněčného obsahu.

4.3.2 Příprava k analýze HPLC-HRMS

Pro přípravu vzorků na analýzu vysoce účinným kapalinovým chromatografem s propojením na hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením (HPLC-HRMS) bylo nutné biomasu nejprve lyofilizovat. Vzorky, zmrazené v -80 °C byly přesunuty do kondenzační komory lyofylizátoru o teplotě -97°C a tlaku <0.025hPa. Podle vizuální kontroly, pokud byl materiál dostatečně vysušen (<48 hod), byly vzorky z lyofylizátoru použity k homogenizaci. Následně byla provedena homogenizace lyofilizované biomasy s mořským pískem a malým množstvím 70 % methanolu (MetOH). Rozmělněním biomasy bylo docíleno uvolnění intracelulárního obsahu. Výsledná hmota byla kvantitativně převedena do skleněných

zkumavek pomocí 70 % MetOH tak, aby 1 mL MetOH odpovídal 200 mg navážené hmoty lyofilizované biomasy. Homogenní suspenze se docílilo sonikací zkumavek v ultrazvukové vaně Kraintek K-6LM (Kraintek Czech, s.r.o., Hradec Králové, ČR) po dobu 10 min. Poté byly zkumavky ponechány po dobu 1 h ve stojánku při pokojové teplotě a následně byly centrifugovány v centrifuze Hettich Universal 320 (Hettich, Kirchler, Německo) 15 min při 5000 rpm. Výsledný supernatant byl převeden do skleněné vialky a uložen do hlubokomrazicího boxu. Následná analýza vzorků na HPLC-HRMS byla provedena odborným týmem Mikrobiologického ústavu v Třeboni pod vedením Dr. Pavla Hrouzka.

4.3.3. Analýza HPLC-HRMS

Vzorky byly analyzovány na přítomnost lipopeptidů PUW/MIN pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s propojením na hmotnostní spektrometr na analytické sestavě složené z kapalinového chromatografu Dionex Ultimate 3300 a hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením Bruker Impact HD. Chromatografické podmínky byly nastaveny dle metody popsané v publikaci (Urajová et al. 2016). Peptidová sekvence látky byla ověřena dle hmotnostního spektra obdrženého při nízké fragmentační energii a přítomnost β -amino mastné kyseliny byla stanovena fragmentací při energii vysoké. Vyhodnocení dat proběhlo na základě jejich porovnání s již publikovanými výsledky v práci Mareš et al. (2019).

4.4 Izolace a testování kvality DNA

Pro porovnání výtěžnosti a kvality genomové DNA byla izolace DNA v roce 2017 provedena 3 různými způsoby. V roce 2018 již byla provedena pouze metodou č. 1, která byla vyhodnocena jako nejvhodnější (Obr. 23, Obr. 24). Koncentrace izolované DNA byla naměřena ve všech vzorcích prostřednictvím zařízení Qubit® 3.0 Fluorometr (ThermoFisher Scientific, Invitrogen, Malaysia). Izolované replikáty DNA environmentálních vzorků byly smíchány pro další analýzy. Přítomnost sinicové DNA byla následně testována amplifikací genu pro 16S rRNA s použitím primerů 16S378F a 1494R (Tab. 3).

Tab. 3: Protokol PCR reakce s využitím primerů 16S378F a 1494R pro testování přítomnosti sinicové DNA ve vzorcích.

Primery	cyklus č.	počet opakování	teplota [°C]	čas [min]
16S378F	1	1	94	5
16S1494R		40	94	1
	2	40	52	1
		40	72	2
	3	1	72	10

Izolační metody:

1. Izolace pomocí kitu NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel, Düren, Německo) byla provedena podle návodu od výrobce s několika modifikacemi. Celková izolace probíhala ve zkumavkách s odebranou biomasou za účelem omezení potenciálních ztrát při převádění biomasy do zkumavek od výrobce. K biomase byly přidány mikrokuličky, které byly součástí kitu. Zkumavky byly poté krátce vortexovány (vortex Stuart, P-LAB a.s., 5 s). V dalším kroku byl použit extrakční pufr SL1. Následně byly zkumavky horizontálně vortexovány (Vortex-Genie 2, Mo BIO Laboratories®, Inc, 15 min) a centrifugovány (centrifuga HERMLE Z 233 MK-2, Hermle AG, Gosheim, Německo) při 11000 g po dobu 4 min. Pro větší výtěžek DNA z enviromentálních vzorků byl vzniklý supernatant odebrán do nových zkumavek a uchován v lednici. Celý proces byl se vzniklým peletem ještě jednou zopakován. Následující kroky odpovídají postupu uvedenému v protokolu, který je součástí kitu.

2. UltraClean Microbial DNA kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA): Izolace probíhala přesně dle protokolu, který je součástí kitu.

3. Protokol pro izolaci sinicové DNA z enviromentálních vzorků podle (Yilmaz et al. 2009): Izolace odpovídala postupu uvedenému v původní publikaci v modifikaci s použitím extrakčního xantogenát-SDS pufru s přídavkem 3 % polyvinylpyrrolidonu a precipitací DNA polyetylglykolem s přídavkem MgCl₂. Před izolací byl prášek z biomasy rehydratován v TE pufru (pH 8). Po izolaci byl pelet DNA promýván 70 % ethanolem a po vysušení na vzduchu rozpuštěn ve sterilní destilované vodě.

Vhodnost zvolené izolační metody Macherey-Nagel kit byla dále potvrzena spektrofotometricky na zařízení Nanodrop (BioSpec-nano, Schimadzu BIOTECH) kde se poměr čistoty DNA A260/A280 pohyboval v rozmezí od 1,8-2,1.

Úspěšnost izolace DNA byla dále testována pomocí rutinní amplifikace genu pro 16S rRNA. Pro amplifikaci byly použity standardní primery 16S378F (forward, specifický pro sinice) a 16S1494R (reverse, univerzální pro bakterie) podle publikace (Taton et al. 2003). PCR produkty byly zkontrolovány na 1.5 % agarózovém gelu po elektroforéze při 70 V po dobu 1 h (data nejsou uvedena).

4.5 Design nových primerů a optimalizace vybraných PCR primerů

Design PCR primerů byl proveden v programu Geneious Pro R10 (Biomatters, Auckland, Nový Zéland, www.geneious.com) pomocí modulu založeného na programu Primer3 (Untergasser et al. 2012), který umožňuje též predikci teploty tání, tvorby dimerů a vlásenkových struktur. Design vhodných primerů byl založen na konsensu sekvencí dostupných osekvenovaných biosyntetických genů pro syntézu lipopeptidů PUW/MIN u 6 konkrétních sinicových kmenů (Tab. 4). Sekvence jednotlivých homologních genů z těchto kmenů byly alignovány pomocí programu MAFFT v.7 algoritmem E-INS-i (Katoh a Standley 2013) a vzhledem k vysoké variabilitě sekvencí byly konzervované úseky vhodné pro design primerů dále hledány manuálně.

Tab. 4: Přehled sinicových kmenů s geny pro MIN/PUW s přístupovými čísly sekvencí v databázi NCBI.

č.	sinicový kmen	číslo sekvence NCBI
1	<i>Cylindrospermum alatosporum</i> CCALA 988	KM078884
2	<i>Cylindrospermum moravicum</i> CCALA 993	MH325197
3	<i>Cylindrospermum alatosporum</i> CCALA 994	MH325198
4	<i>Anabaena minutissima</i> UTEX B1613	MH325199
5	<i>Anabaena</i> sp. UHCC-0399	MH325200
6	<i>Symplocastrum muelleri</i> NIVA-CYA 644	MH325201

Optimalizace teploty annealingu u PCR primerů, vybraných pro finální testování, byla provedena v termocyleru (Mastercycler pro, Eppendorf, Hamburk, Německo). V závislosti

na designovaném primeru byl teplotní gradient nastaven individuálně, přibližně v rozsahu 50-70 °C (viz. kapitola 5.2.3). Optimalizace zahrnovala pozitivní (Tab. 1) i negativní kontroly.

4.6 PCR testování primerů

4.6.1 Testování nově navržených PCR primerů na sinicových kmenech s PUW/MIN

Testování PCR primerů probíhalo na všech uvedených sinicových kmenech s PUW/MIN (Tab.1). Sinicový kmen *Anabaena* sp. UHCC-0399 nebylo možné pro laboratorní analýzu získat. Reakční směs byla připravována v objemu 50 µl nebo 25 µl. Při objemu 50 µl obsahovala 21 µl PCR H₂O (TopBio, Praha), 25 µl Plain PP Master mixu včetně Taq polymerázy (TopBio), 1 µl forward primeru o koncentraci 10 pM (příloha č. 1), 1 µl reverse primeru o stejné koncentraci (příloha č. 1) a 2 µl DNA sinicových kmenů s PUW/MIN sloužící jako templát.

4.6.2 Testování vybraných PCR primerů na enviromentálních vzorcích

Testování na enviromentálních vzorcích vyžadovalo občasné úpravy poměru složek v reakční směsi. Vzhledem k nižším koncentracím DNA bylo její množství v jednotlivých případech zvýšeno na 2-3 µl. Za normálních okolností bylo při objemu 25 µl reakční směsi použito 12,5 µl Master mixu včetně Taq polymerázy (TopBio), 9,5 µl PCR H₂O (TopBio), 1 µl forward primeru (příloha č. 1), 1 µl reverse primeru (příloha č. 1) o koncentraci 10 pM a 1 µl DNA. Pro úplnost byla vždy zahrnuta negativní i pozitivní kontrola.

4.6.3 Testování specificity vybraných PCR primerů

Podle výsledků testování v předchozích kapitolách 4.6.1 a 4.6.2, byly vybrané PCR primery dále testovány na výběru kmenů s kompletním osekvenovaným genomem, které neprodukují PUW/MIN. Ze světových sbírek bylo získáno 22 kmenů sinic bez genů pro PUW/MIN, avšak obsahujících příbuzné PKS/NRPS genové klastry pro syntézu lipopeptidů (Tab. 2).

Zkumavky s reakční směsí byly přesunuty do termocycleru kde probíhala PCR reakce o objemu 50 µL a složení jako v kapitole 4.6.1 v předem nastaveném programu. Podle zvolených PCR primerů se v programu upravovala délka elongace, teplota i doba pro annealing nebo počet cyklů (Tab. 7), (kapitola 5.2.4).

4.7 Gelová elektroforéza

Po skončení PCR reakce v termocycleru byly jednotlivé vzorky nanесeny na 1 % agarózový gel, který byl uložen v elektroforetické aparatuře a ponořen v 2x zředěném TAE (Tris Acetate EDTA) bufferu. Vzorky byly barveny pomocí interkalační barvy SybrGreen (SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain, LONZA, Rockland ME, USA). Jako DNA marker byl zvolen ladder O'GeneRuler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Elektroforéza probíhala při napětí 80 V po dobu 50 min. Výsledné produkty elektroforézy byly vizualizovány v UV boxu (Benchtop UV Transilluminator, UVP, BioDoc-It™ Imaging System). Následně byly odpovídající PCR produkty přečištěny pomocí kitu (Stratag, Invisorb® Fragment CleanUp, Berlin) a odeslány k oboustranné Sangerově sekvenaci pomocí stejných primerů (SeqMe, s.r.o., Dobříš, Česká republika).

4.8 Analýza sekvencí

Získané chromatogramy sekvencí byly analyzovány pomocí programu SeqMan 5.06 (DNASTar Inc.) a výsledné sekvence byly uloženy ve formátu FASTA. Vlastní sekvence byly analyzovány společně se sekvencemi z databáze NCBI v programu Geneious Pro R10. Alignment sekvencí byl proveden pomocí pluginu MAFFT (viz výše) a analýza podobnosti sekvencí byla provedena na základě výpočtu párové p-distance.

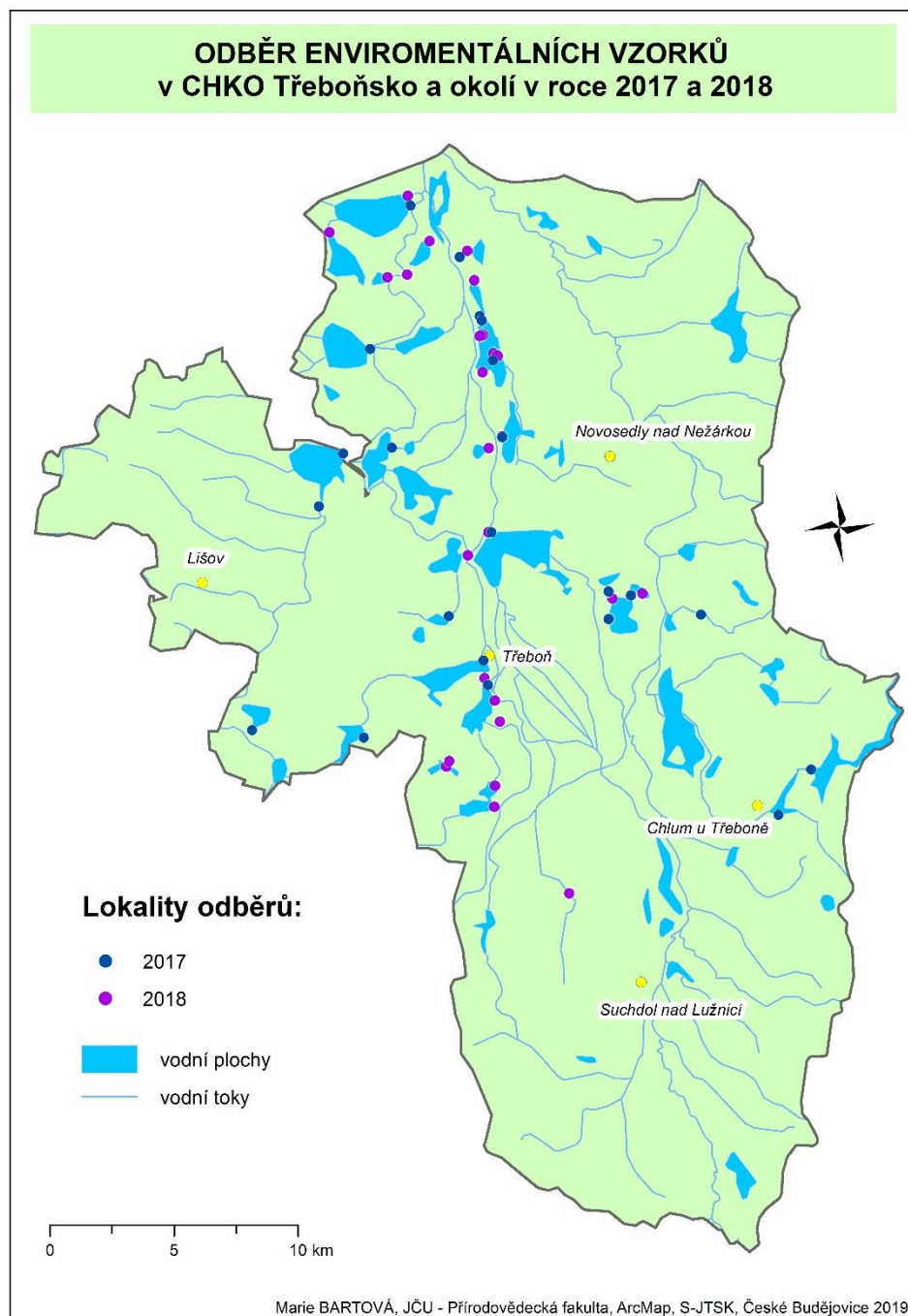
5 Výsledky

5.1 Monitoring a detekce sinicových kmenů s geny pro PUW/MIN

5.1.1 Odběr enviromentálních vzorků na Třeboňsku

Terénní sběr na Třeboňsku byl proveden na základě předchozího monitoringu s výskytem sinice *Sphaerospermopsis reniformis* v podobném regionu (Zapomělová et al. 2009). Odběry planktonu byly provedeny v letních měsících v roce 2017 ze 22 lokalit a následně v roce 2018 ze 35 lokalit ve spolupráci s RNDr. Kateřinou Čapkovou, Ph.D., RNDr. Klárou Řehákovou, Ph.D. a vedoucím diplomové práce RNDr. Janem Marešem, Ph.D. Lokality terénních odběrů jsou znázorněny na mapě podle GPS souřadnic (Obr. 15), kde jsou odběry odlišně vyznačené v závislosti na roce, ve kterém byly odebrány. V následující tabulce (Tab. 5) jsou zaznamenány naměřené vlastnosti vody, GPS souřadnice místa odběru, datum a

čas odběru a aktuální počasí při odběrech v roce 2017. Pro rok 2018 jsou údaje zaznamenány v tabulce (Tab. 6).



Obr. 15: Mapa odběrů v CHKO Třeboňsko a okolí v roce 2017 a 2018.

Tab. 5: Vlastnosti vody při odběrech v CHKO Třeboňsko a okolí 2017.

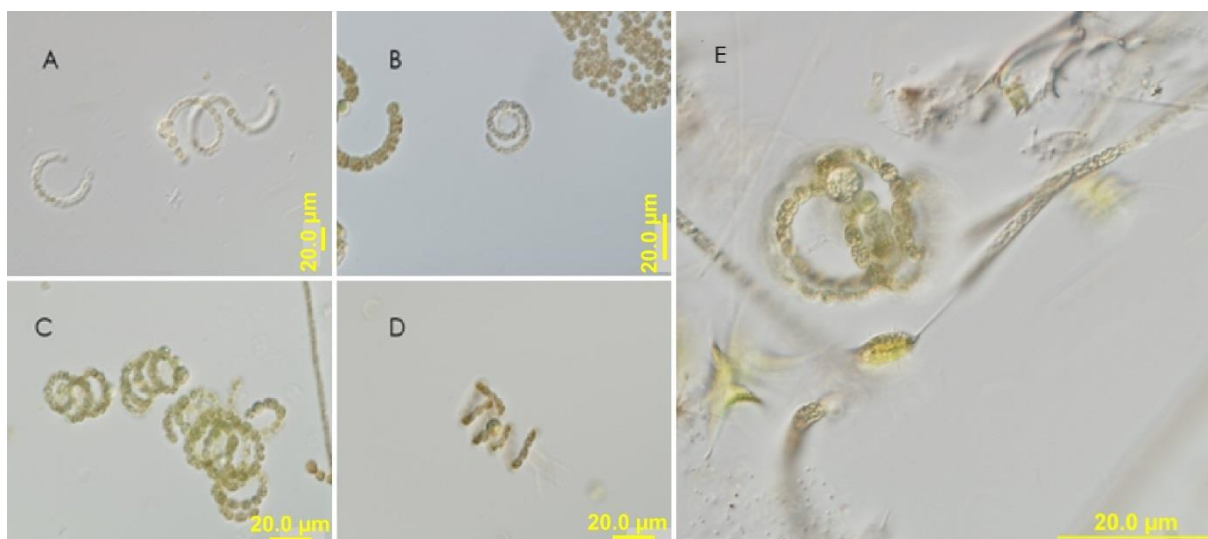
č.	datum	čas	počasí	lokalita- rybníky	GPS	pH	T [°C]	vodivost [μS/cm]	Secchi [cm]
1	13.9.	10:32	jasno	Záblatský	49°06'29.6"N 14°40'58.6"E	7,3	14,5	280	10
2	30.8.	9:00	jasno	Břilický	49°00'56.9"N 14°44'44.0"E	6,2	20,5	381	18
3	31.8.	11:15	jasno	Starý vdovec	49°01'56.5"N 14°49'51.7"E	7,9	21,2	178	20
4	14.9.	10:00	jasno	Staňkov	48°58'40.3"N 14°57'16.4"E	6,8	17,7	110	95
5	29.8.	10:56	jasno	Dvořiště	49°04'09.3"N 14°40'33.0"E	8,1	22,1	286	29
6	13.9.	10:20	jasno	Horusický	49°09'42.2"N 14°41'40.4"E	7,1	13,7	321	20
7	14.9.	10:30	jasno	Hejtman	48°57'36.1"N 14°56'23.9"E	6,9	17,2	103	50> dno
8	7.8.	11:00	jasno	Opatovický	48°59'34.5"N 14°46'19.0"E	9,5	24,5	215	23
9	17.8.	10:00	jasno	Nový stříbřecký	49°01'42.3"N 14°52'59.9"E	8,4	23,5	232	25
10	20.7.	9:36	jasno	Pešák	49°07'25.2"N 14°44'31.2"E	9,3	23,8	494	25
11	13.9.	9:44	oblačno	Láska	49°06'35.8"N 14°45'03.6"E	6,2	14,9	220	15
12	20.7.	11:00	oblačno	Miletínský potok	49°02'57.0"N 14°39'59.0"E	7,9	24,3	420	25
13	13.9.	11:02	jasno	Kocliřov	49°04'25.4"N 14°42'07.4"E	7,4	15,4	273	30
14	18.8.	10:45	jasno	Potčšil	49°08'44.0"N 14°43'30.9"E	8,3	24,7	178	10
15	31.8.	12:00	jasno	Ženich	49°01'20.6"N 14°49'59.3"E	8,6	24,3	182	16
16	18.8.	9:00	jasno	Rožmberk	49°02'53.0"N 14°45'45.8"E	9,8	25,0	207	12
17	7.8.	9:30	jasno	Vlkovický	48°57'55.5"N 14°38'47.2"E	8,4	21,1	350	26
18	29.8.	9:00	jasno	Pešák II	49°07'31.1"N 14°44'26.0"E	6,2	21,7	180	20
19	30.8.	8:00	jasno	Spolský	48°58'05.2"N 14°42'28.4"E	7,5	20,3	224	26
20	20.7.	12:30	jasno	Vyšehrad	49°01'55.1"N 14°50'37.2"E	9,4	25,4	225	40
21	29.8.	8:10	jasno	Krajina	49°08'44.0"N 14°43'30.9"E	5,6	20,2	190	8
22	17.8.	8:30	mlha	Svět	49°00'05.6"N 14°46'03.7"E	9,4	22,5	247	31

Tab. 6: Vlastnosti vody CHKO Třeboňsko a okolí 2018.

č.	datum	čas	počasí	lokality-rybníky	GPS	pH	T [°C]	vodivost [μS/cm]	Secchi [cm]
1	9.7.2018	9:00	polojasno	Výskok	48°57'12.7"N 14°40'08.9"E	10,2	22,0	250	0
2	9.7.2018	9:20	polojasno	Spolský	48°58'23.3"N 14°42'15.5"E	9,2	21,5	195	40
3	9.7.2018	10:00	jasno	Hůrky	48°57'49.3"N 14°45'23.0"E	8,8	24,0	212	25
4	9.7.2018	10:15	jasno	Děkanec	48°57'41.1"N 14°45'18.6"E	8,4	22,7	147	15
5	9.7.2018	11:00	jasno	Opatovický	48°59'15.7"N 14°46'36.7"E	8,3	23,7	185	15
6	9.7.2018	13:00	zataženo	Chodec	48°58'49.2"N 14°46'52.0"E	8,7	24,8	153	30
7	9.7.2018	13:17	zataženo	Ruda	48°56'58.0"N 14°47'03.9"E	9,2	27,0	122	10
8	9.7.2018	13:40	zataženo	Jamský	48°57'25.4"N 14°46'59.7"E	8,7	24,0	178	10
9	9.7.2018	14:10	oblačno	Nový u Čepu	48°55'18.6"N 14°49'53.4"E	9,0	25,0	112	10
10	10.7.2019	9:00	zataženo	Starý vdovec	49°01'56.5"N 14°49'51.7"E	9,1	22,0	154	15
11	10.7.2018	9:15	zataženo	Vyšehrad	49°01'55.2"N 14°50'37.0"E	8,8	21,8	160	25
12	10.7.2018	9:40	polojasno	Stolec	49°01'59.5"N 14°50'59.5"E	8,6	21,6	154	15
13	10.7.2018	10:00	zataženo	Nový vdovec	49°01'48.0"N 14°50'01.2"E	8,5	22,1	167	35
14	10.7.2018	10:30	deštivo	Ženich	49°01'20.6"N 14°49'59.3"E	8,3	22,0	175	40
15	11.7.2018	9:30	zataženo	Svět	48°59'42.8"N 14°46'10.6"E	10,0	21,0	181	40
16	11.7.2018	10:10	zataženo	Káňov	49°02'19.1"N 14°45'06.0"E	9,0	21,0	262	30
17	11.7.2018	10:30	zataženo	Rožmberk	49°02'52.3"N 14°45'40.2"E	9,3	21,0	171	15
18	11.7.2018	12:45	zataženo	Ponědraž	49°07'14.5"N 14°43'07.0"E	8,9	22,6	360	15
19	11.7.2018	13:00	polojasno	Naděje	49°07'05.3"N 14°44'31.5"E	9,3	21,7	174	0
20	11.7.2018	13:30	polojasno	Rod	49°07'06.9"N 14°44'37.7"E	9,4	22,0	179	0
21	11.7.2018	14:00	zataženo	Víra	49°06'18.4"N 14°44'46.4"E	9,3	21,0	181	15
22	11.7.2018	15:15	deštivo	Pešák	49°07'25.9"N 14°44'31.1"E	9,3	21,7	176	25
23	11.7.2018	14:50	zataženo	Černičný	49°04'41.5"N 14°45'18.9"E	9,1	20,0	253	20
24	11.7.2018	15:30	polojasno	Potěšil	49°04'58.7"N 14°45'42.2"E	9,5	21,0	155	10
25	12.7.2018	9:00	polojasno	Strakatý	49°06'42.4"N 14°45'11.9"E	8,7	19,3	160	20
26	12.7.2018	9:15	polojasno	Láska	49°06'44.9"N 14°45'03.2"E	8,9	19,0	162	10
27	12.7.2018	9:50	jasno	Ponědražka	49°08'12.1"N 14°41'52.3"E	8,6	20,7	294	20
28	12.7.2018	10:15	jasno	Hliníř	49°08'05.2"N 14°41'14.1"E	8,6	19,7	286	25
29	12.7.2018	10:30	polojasno	Bošilecký	49°08'53.5"N 14°39'07.8"E	8,3	20,8	298	25
30	12.7.2018	10:45	zataženo	Švarcenberk	49°08'59.6"N 14°42'27.6"E	8,7	21,0	172	30
31	12.7.2018	11:00	zataženo	Horusický	49°09'54.3"N 14°41'32.8"E	8,4	22,2	334	20
32	12.7.2018	12:30	zataženo	Vlkovský	49°08'53.4"N 14°43'44.4"E	9,0	21,5	217	10
33	12.7.2018	13:00	zataženo	Krajina	49°08'44.0"N 14°43'30.9"E	9,0	20,0	154	10
34	12.7.2018	13:15	zataženo	Nový rybník	49°08'16.5"N 14°44'06.0"E	8,6	20,0	185	15
35	31.8.2018	10:30	polojasno	Opatovický	48°59'15.7"N 14°46'36.7"E	10,2	19,0	214	15

5.1.1.1 Výsledky mikroskopování enviromentálních vzorků z Třeboňska

V roce 2017 byly vzorky odebrány ze 22 lokalit. Ze 22 terénních odběrů se ve 5 z nich potvrdil výskyt sinice *Sphaerospermopsis reniformis* (Obr. 16). Tento druh byl identifikován v rybnících Pešák (Obr. 18), Vyšehrad, Potěšil, Rožmberk a Starý vdovec. V lokalitě Spolský rybník byl mikroskopicky potvrzen výskyt *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (Obr. 17). U všech odebraných vzorků byly determinovány i ostatní přítomné druhy sinic (příloha č. 2).



Obr. 16: Snímky *Sphaerospermopsis reniformis* ze vzorků rybníků: A) Pešák, B) Vyšehrad, C) Rožmberk, D) Potěšil 2017, E) Starý vdovec.



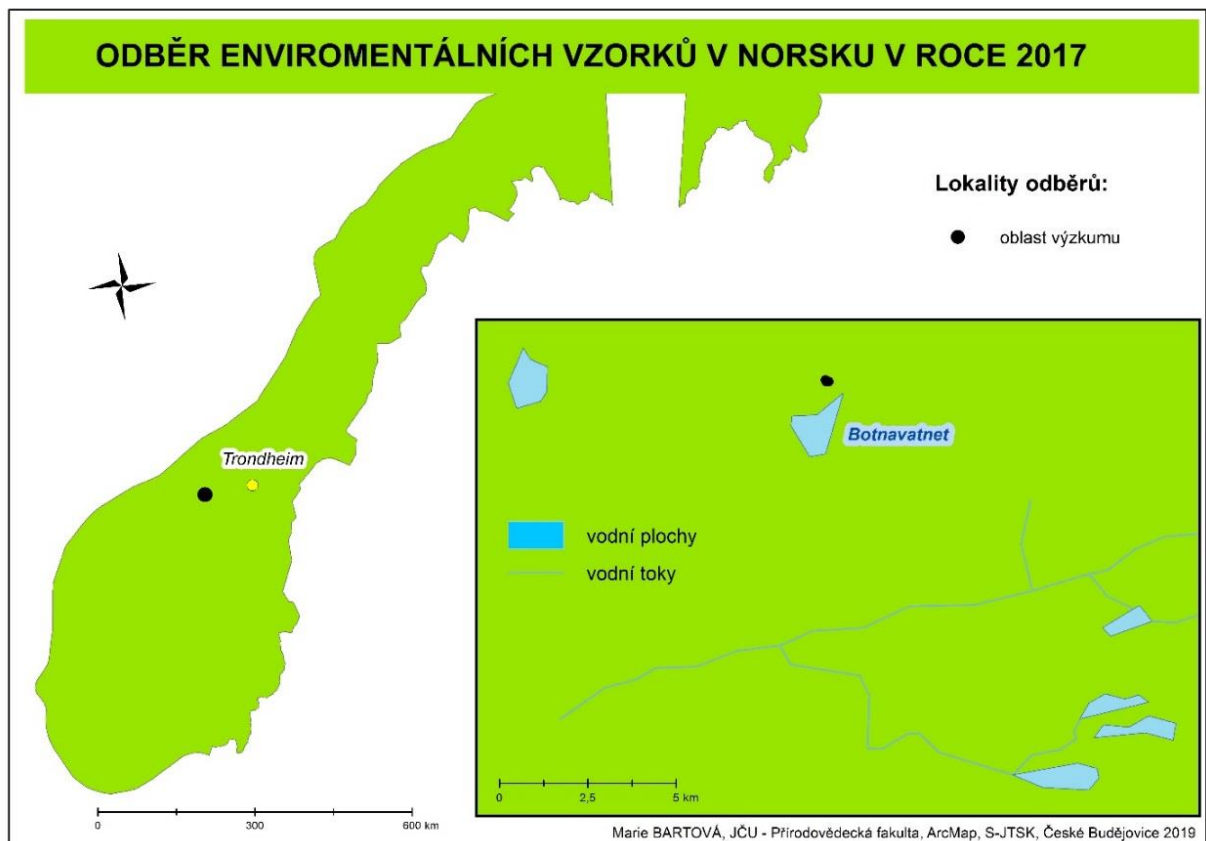
Obr. 17: Snímek *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* ze vzorku rybníku Spolský.



Obr. 18: Rybník Pešák, terénní odběr v roce 2017.

5.1.2 Odběr enviromentálních vzorků v Norsku

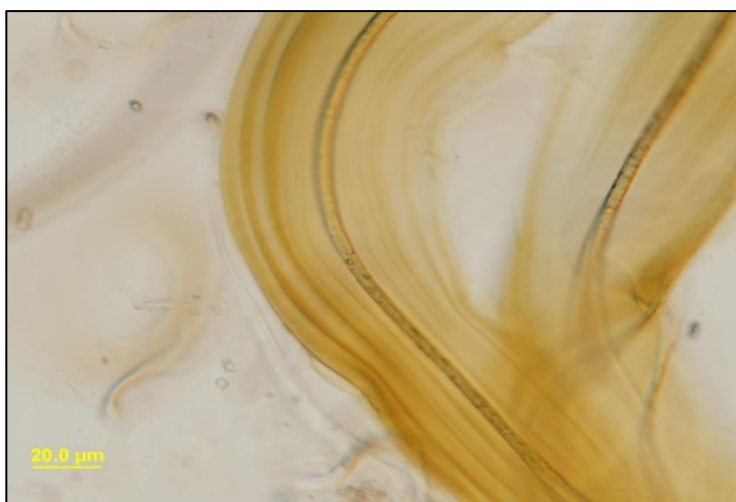
Odběry byly provedeny v říjnu v roce 2017. Lokality pro odběr byly vytipovány dle výskytu onemocnění Alveld (I. Mysterud, osobní sdělení). Na obrázku (Obr. 19) jsou pomocí GPS souřadnic vyznačeny dvě lokality, ze kterých bylo odebráno celkem 24 vzorků.



Obr. 19: Mapa odběrů v Norsku v roce 2017.

5.1.2.1 Výsledky mikroskopování enviromentálních vzorků z Norska

Po mikroskopickém rozboru bylo pro další analýzy pracováno s 20 vzorky z původních 24. Vyřazené vzorky neobsahovaly sinicové zástupce. Z vybraných vzorků byl ve 14 z nich potvrzen výskyt sinice *Symplocastrum muelleri* (příloha č. 4). Přítomnost *Symplocastrum muelleri* ve vzorcích je potvrzena na fotografii (Obr. 20). Strukturou se jednalo o gelové slizy (Obr. 21). Pro úplnost bylo ve všech vybraných vzorcích z norské odběrové oblasti (Obr. 22) determinováno celkové zastoupení sinic (příloha č. 4).



Obr. 20: Snímek *Symplocastrum muelleri*, z enviromentálních vzorků, Norsko 2017.



Obr. 21: Vyznačení odebrané biomasy se *Symplocastrum muelleri*, terénní sběr Norsko 2017.

Foto RNDr. Kateřina Čapková, Ph.D.

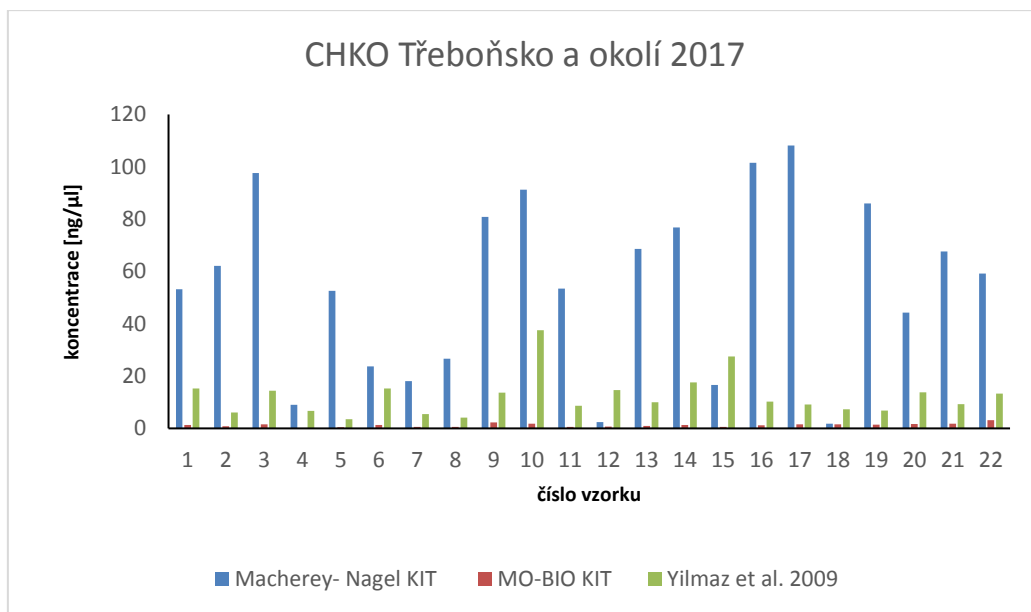


Obr 22: Terén, kde byly vzorky odebírány, Norsko 2017.

5.2 Molekulární analýzy

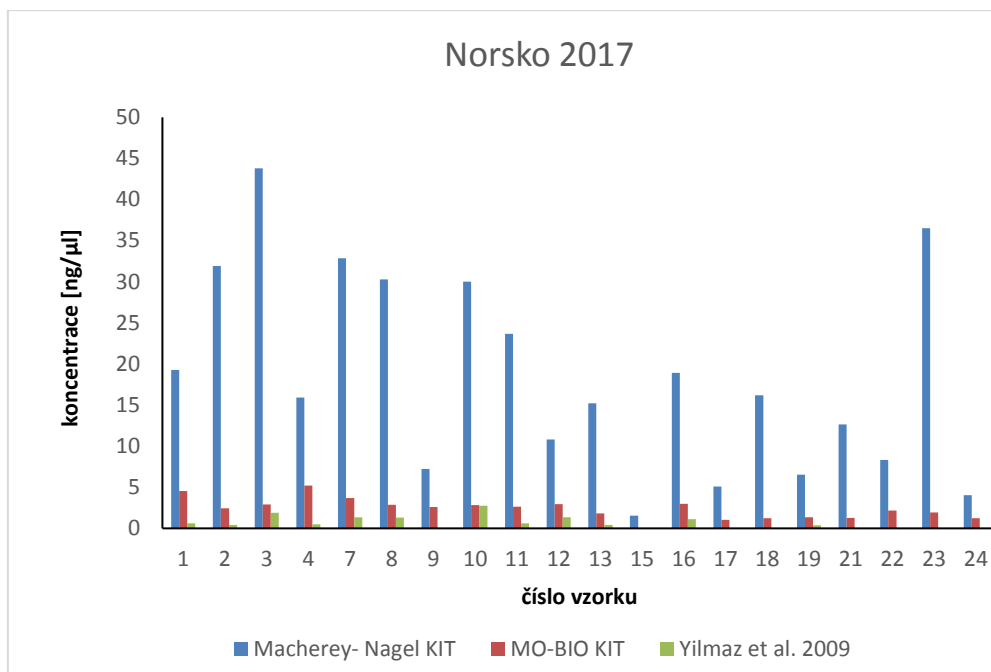
5.2.1 Testování kvality DNA izolované z environmentálních vzorků

Porovnáním 3 izolačních metod DNA (kapitola 4.4) bylo zjištěno, že nejvhodnější izolační metodou pro získání DNA z environmentálních vzorků, byla metoda č. 1 kit NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Na následujících obrázcích (Obr. 23 a obr. 24) jsou znázorněny zprůměrované hodnoty koncentrací DNA, obdržené slitím replikátů DNA od každého environmentálního vzorku.



Obr. 23: Porovnání výtěžnosti izolačních metod DNA u vzorků* z CHKO Třeboňsko a okolí 2017, měřeno fluorimetricky na zařízení Qubit.

* Číslo vzorku viz. (Tab. 5).



Obr. 24: Porovnání výtěžnosti izolačních metod DNA u vzorků[†] z Norska 2017, měřeno fluorometricky na zařízení Qubit.

Přítomnost DNA ze sinic byla pomocí PCR potvrzena téměř ve všech vzorcích. U vzorků odebraných z CHKO Třeboňsko a okolí byla sinicová DNA zaznamenána u všech testovaných odběrů. U norských vzorků se její výskyt nepotvrdil v 5 vzorcích 3, 11, 13, 21 a 23. Absenci sinicové DNA potvrdily i negativní výsledky PCR reakcí s navrženými primery pro detekci sinic s geny PUW/MIN (Obr. 37).

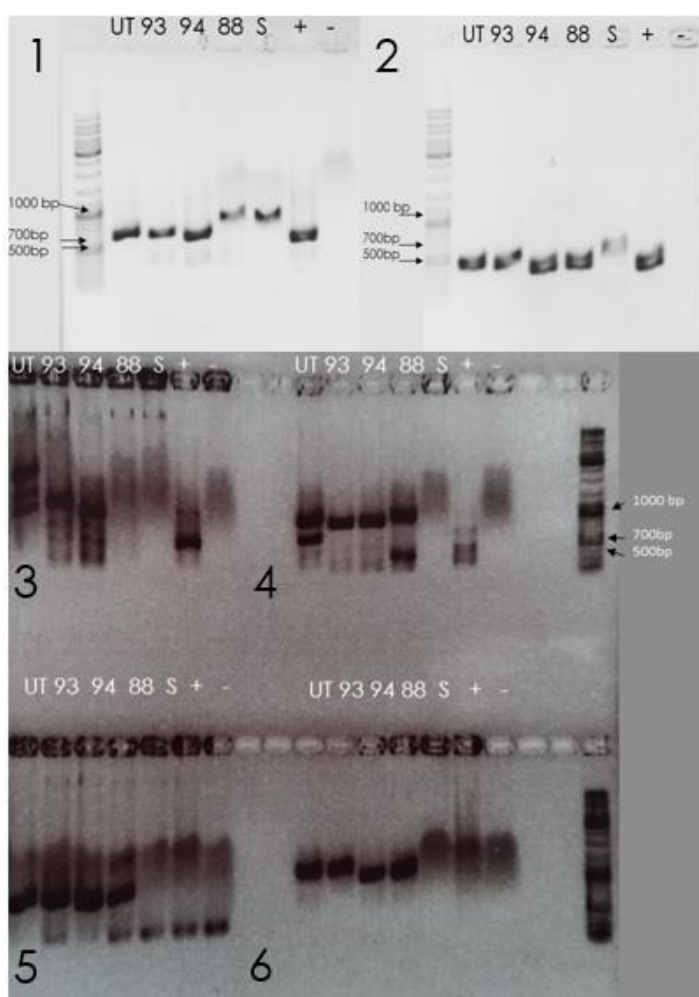
5.2.2 Design specifických PCR primerů pro detekci genů pro syntézu PUW/MIN

Celkově bylo v programu Geneious navrženo 13 párů PCR primerů (příloha č. 1). Všechny navržené primery byly testovány na kmenech sinic s geny pro PUW/MIN (Obr. 25, 26, 27). Pro další testování byly vybrány páry primerů pod označením A1, A2, B1 a F1 (jedná se vždy o pár primerů forward a reverse, např. A1 = A1f+A1r), které vykazovaly pozitivní výsledky u všech uvedených sinicových kmenů s geny pro PUW/MIN. Primery F3 nebyly vybrány pro další testování vzhledem ke krátké délce produktu a slabší amplifikaci. Protokol PCR reakce je zaznamenán v následující tabulce (Tab. 7). V popisu gelů u všech obrázků UT = UTEX B1613, 93 = CCALA 993, 94 = CCALA 994, 88 = CCALA 988, S = NIVA-CYA 644, + - pozitivní kontrola, - negativní kontrola.

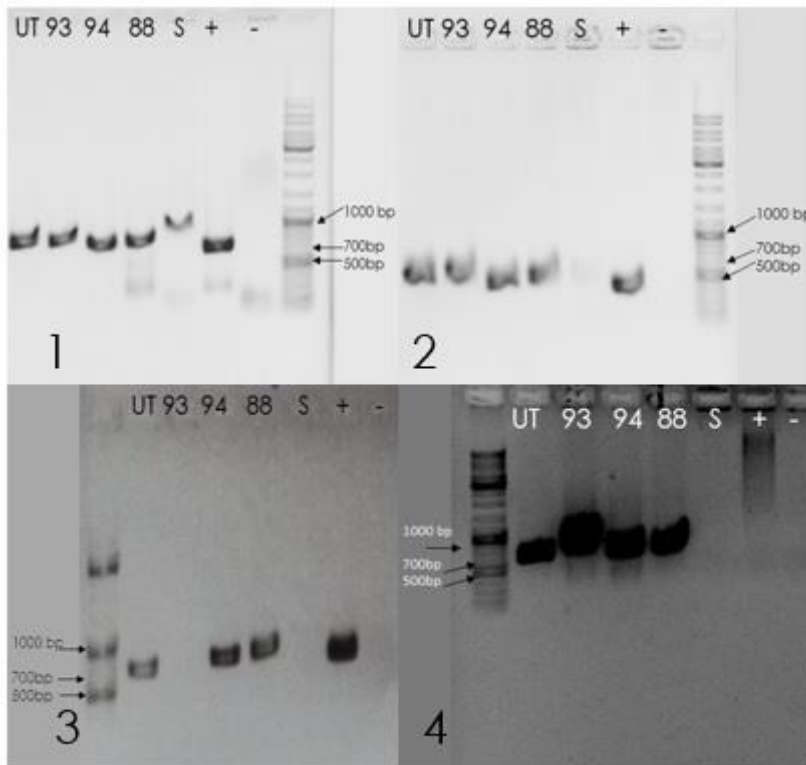
[†] Číslo vzorku (příloha č. 4).

Tab. 7: Protokol PCR reakce při testování primerů na sinicových kmenech s geny pro PUW/MIN.

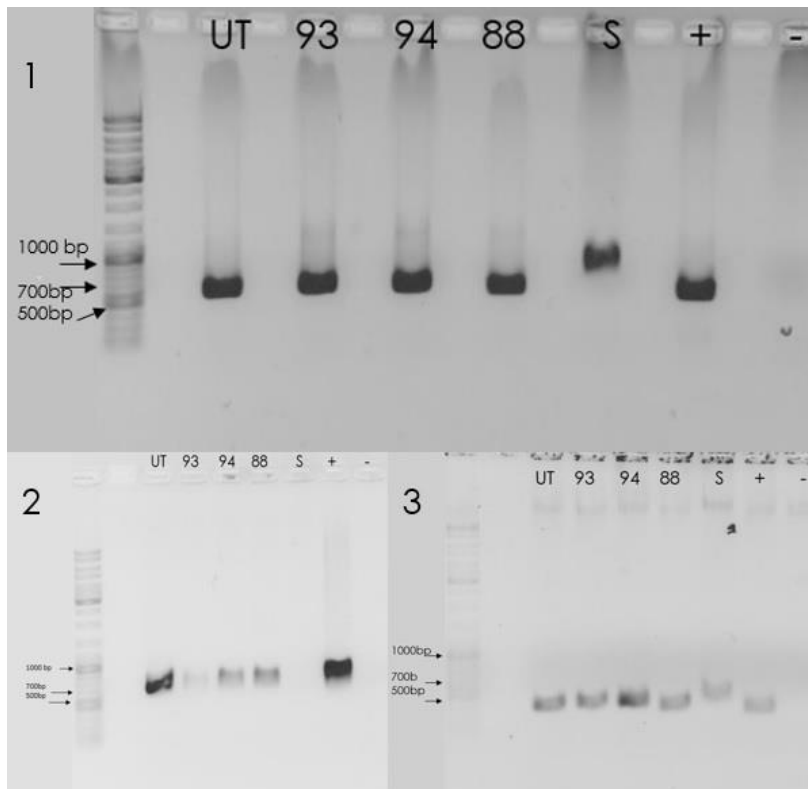
Primery	cyklus č.	počet opakování	teplota [°C]	čas [min]
A1, A2 ,A3	1	1	95	5
B1, B2, C1		30	95	1
E1, E2	2	30	57	0,75
H1, H2		30	72	0,75
F1, F2, F3	3	1	72	10



Obr. 25: Testování PCR primerů na sinicových kmenech s PUW/MIN. 1-A1; 2-A2; 3-A3; 4-B2; 5-C1; 6-H2.



Obr. 26: Testování PCR primerů na sinicových kmenech s PUW/MIN. 1-B1; 2-E1; 3-E2; 4-H1.



Obr. 27: Testování PCR primerů na sinicových kmenech s PUW/MIN. 1-F1; 2-F2; 3-F3.

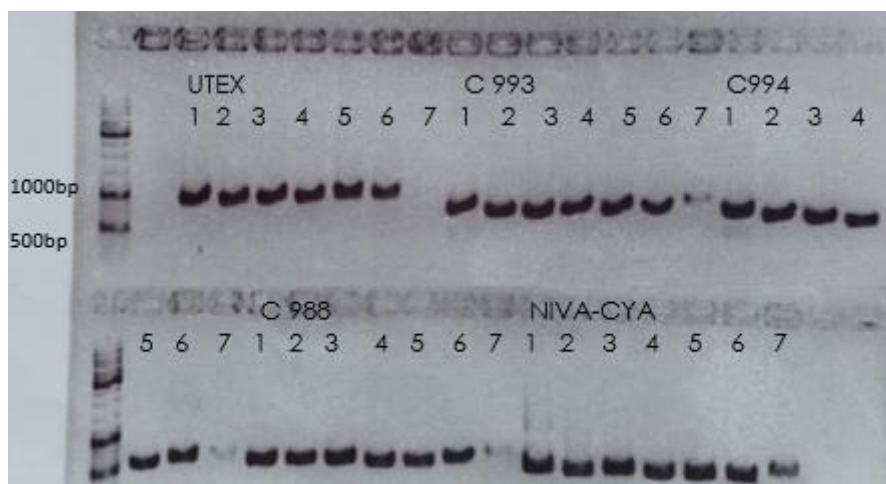
5.2.3 Optimalizace vybraných PCR primerů

Teplota annealingu vybraných PCR primerů byla optimalizována podle následujícího protokolu (Tab. 8). V popisu gelů u všech obrázků UTEX = UTEX B 1613, C 993 = CCALA 993, C 994 = CCALA 994, C 988 = CCALA 988 a NIVA-CYA = NIVA-CYA 644.

Tab. 8: Protokol optimalizace teploty pro primery A1, A2, B1 a F1.

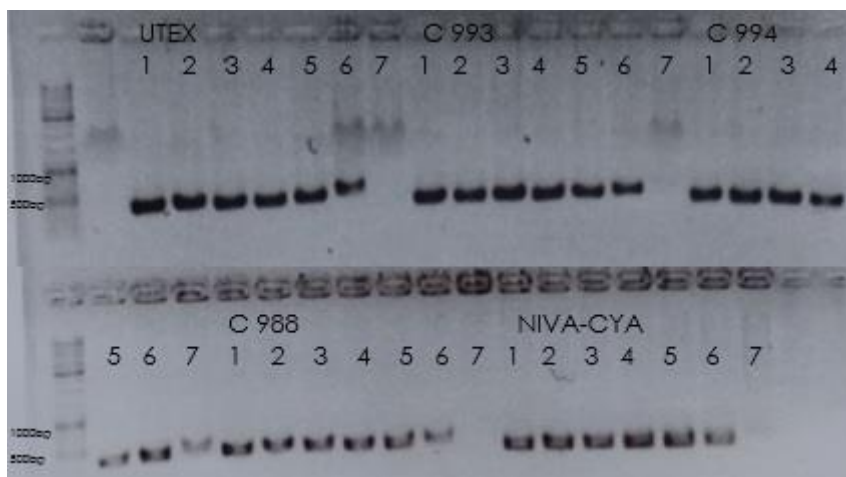
Primery	cyklus č.	počet opakování	teplota [°C]	čas [min]
A1	1	1	94	5
A2	2	35	94	0,75
B1			gradient	
F1	3	1	72	10
			72	

V následujícím obrázku (Obr. 28) je zaznamenán výsledný gel optimalizace primerů A1, kde byl gradient step v rozmezí teplot 50,2 – 64 °C.



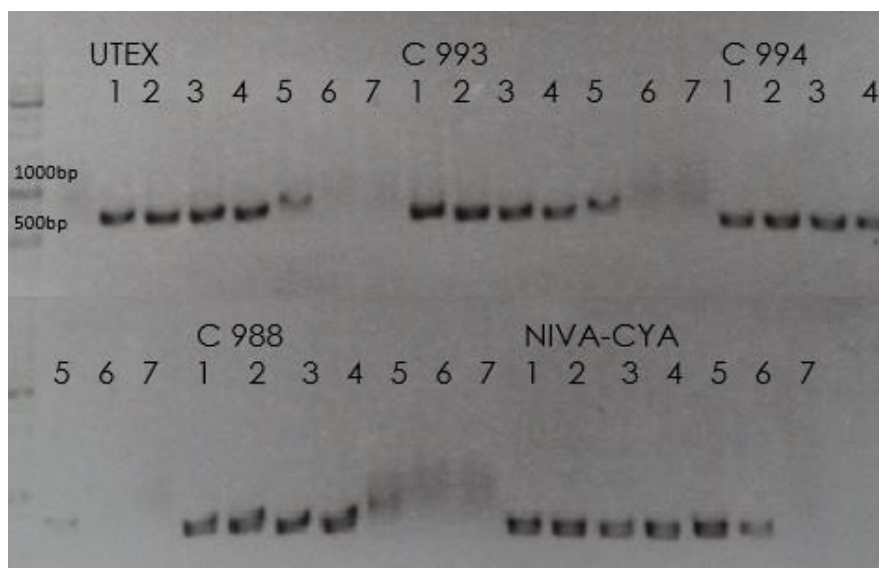
Obr. 28: Optimalizace teploty annealingu primerů A1: 1) 50,2 °C; 2) 54,3 °C; 3) 56 °C; 4) 58 °C; 5) 60 °C; 6) 62 °C; 7) 64 °C.

Na obrázku (Obr. 29) je znázorněn gel s průběhem optimalizace u primerů A2. Zde byl gradient step v rozmezí teplot 50,2 – 64 °C.



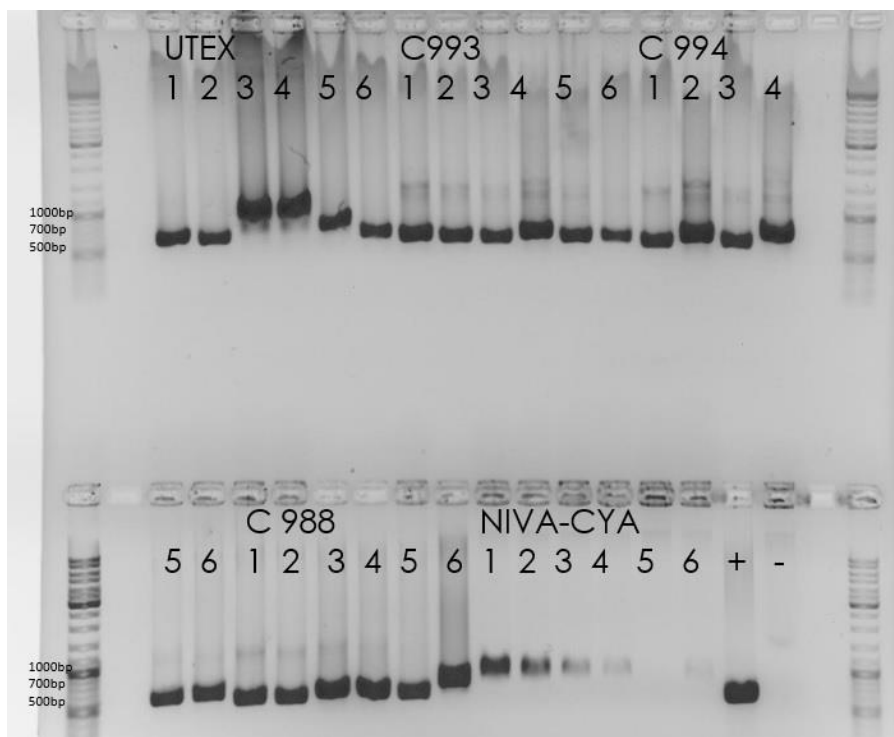
Obr. 29: Optimalizace teploty annealingu primerů A2: 1) 50,2 °C; 2) 54,3 °C; 3) 56 °C; 4) 58 °C; 5) 60 °C; 6) 62 °C; 7) 64 °C.

Na obrázku (Obr. 30) je znázorněn výsledek optimalizace primerů B1, kde byl gradient step v rozmezí teplot 50,3 – 70 °C.



Obr. 30: Optimalizace teploty annealingu primerů B1: 1) 50,3 °C; 2) 55,7 °C; 3) 61 °C; 4) 63,7 °C; 5) 66,1 °C; 6) 68 °C; 7) 70 °C.

Obrázek (Obr. 31) znázorňuje průběh optimalizace primerů F1, kde byl gradient step v rozmezí teplot 55,1 – 60,4 °C.



Obr. 31: Optimalizace teploty annealingu primerů F1: 1) 55,1 °C; 2) 56,2 °C; 3) 57,8 °C; 4) 58,7 °C; 5) 59,6 °C; 6) 60,4 °C.

Teploty u všech vybraných primerů byly optimalizovány na teplotu uvedenou v následující tabulce (Tab. 9).

Tab. 9: Optimalizovaná teplota annealingu u vybraných PCR primerů.

	annealing-T [°C]
A1	62
A2	62
B1	63
F1	56

5.2.4 Testování vybraných PCR primerů na enviromentálních vzorcích

PCR reakce probíhala podle protokolu, zobrazeném v následující tabulce (Tab. 10).

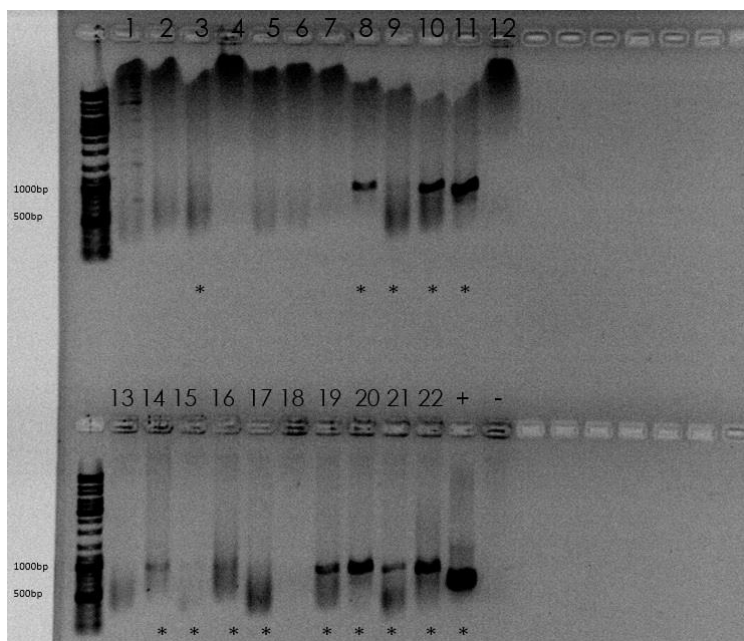
Tab. 10: Protokol PCR s vybranými páry primerů A1, A2, B1, F1 na environmentálních vzorcích.

Primery	cyklus č.	počet opakování	teplota [°C]	čas [min]
A1, A2	1	1	94	5
	2	35	94	0,75
		35	62	0,75
		35	72	0,75
3	1	72	10	
Primery	cyklus č.	počet opakování	teplota [°C]	čas [min]
B1	1	1	94	5
	2	35	94	0,75
		35	63	0,75
		35	72	0,75
3	1	72	10	
Primery	cyklus č.	počet opakování	teplota [°C]	čas [min]
F1	1	1	94	5
	2	35	94	0,75
		35	56	0,75
		35	72	0,75
3	1	72	10	

5.2.4.1 CHKO Třeboňsko a okolí 2017

Celkově bylo v roce 2017 testováno 22 vzorků z Třeboňska (příloha č. 2).

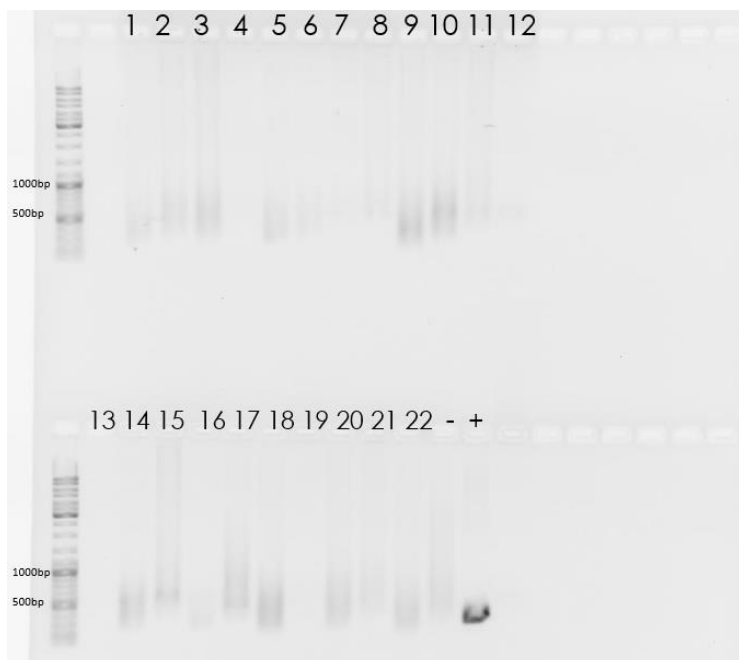
Výsledky s využitím primerů A1 jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 32).



Obr. 32: PCR s primery A1, Třeboňsko 2017. *

Přítomnost sinic s genem *puwA* v označených vzorcích (Obr. 32) byla po osekvenování potvrzena v rybnících s čísly 3, 8, 10, 11, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 (příloha č. 2).

Výsledky s využitím primerů A2 jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 33).

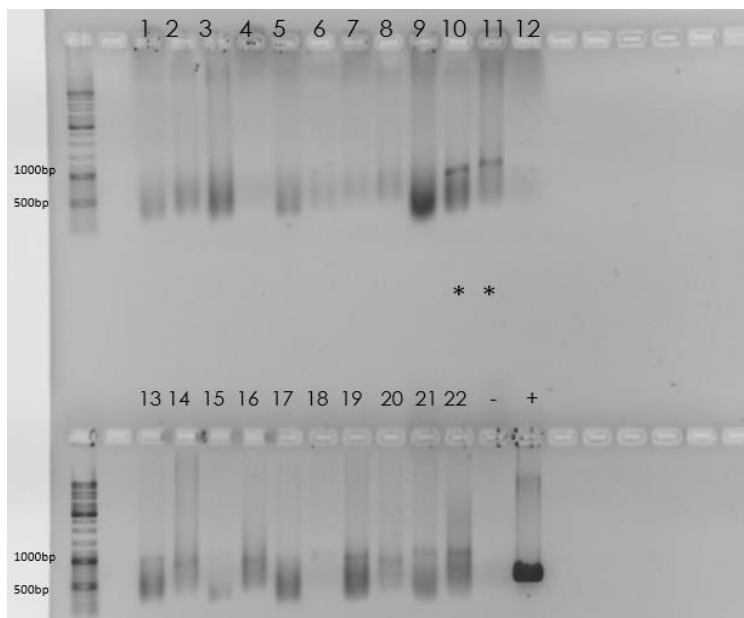


Obr. 33: PCR s primery A2, Třeboňsko 2017.

* Vzorky odeslány k osekvenování

Z obrázku (Obr. 33) je patrné, že je u primerů A2 velmi slabá amplifikace. Primery A2 nebyly dále využity pro sekvenační analýzy.

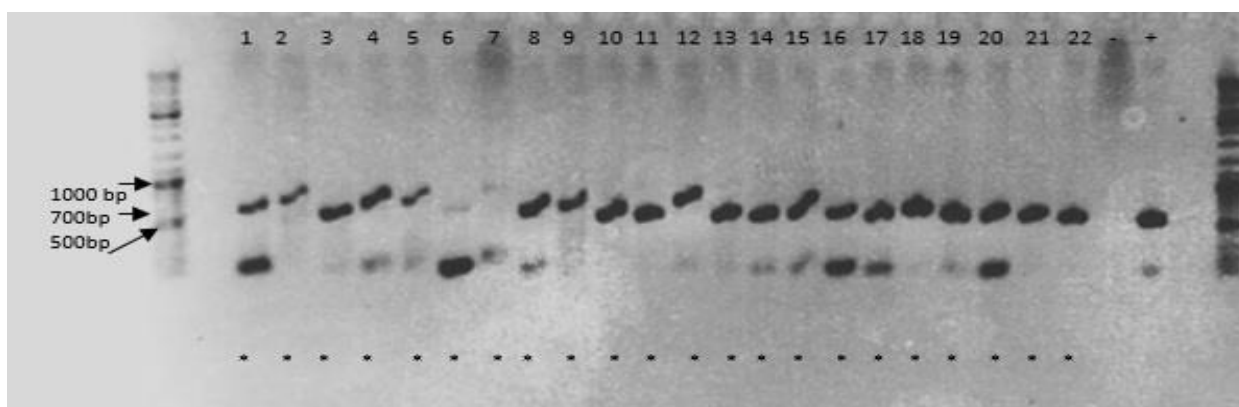
Výsledky s využitím primerů B1 jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 34).



Obr. 34: PCR s primery B1, Třeboňsko 2017.*

Vzhledem ke slabší amplifikaci primery B1, byly k osekvenování odeslány pouze vzorky 10 a 11. U obou vyznačených vzorků byla potvrzena shoda s genem *puwB*.

Na obrázku (Obr. 35) je znázorněn výsledný gel PCR reakce s primery F1.



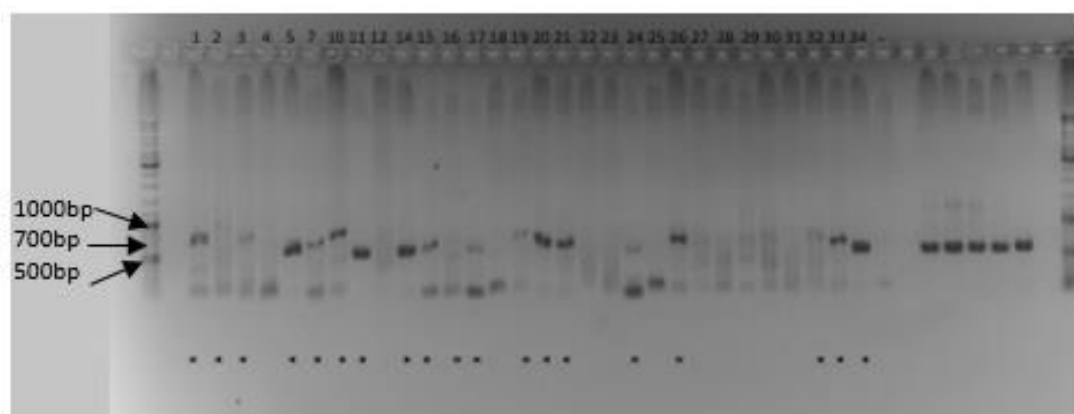
Obr. 35: PCR s primery F1, Třeboňsko 2017.*

* vzorky odeslány k osekvenování.

Výsledky s využitím primerů F1 vykazovaly přítomnost sinic s genem *puwF* ve všech zmiňovaných vzorcích (Obr. 35). Vše bylo potvrzeno výsledky ze sekvenování. Po srovnání výsledných gelů (Obr. 32, 33, 34, 35) byl pro další analýzy používán pouze pár primerů F1.

5.2.4.2 CHKO Třeboňsko a okolí 2018

V roce 2018 byly vzorky odebrány ze 34 lokalit (příloha č. 3). Přítomnost sinic s genem *puwF* ve vzorcích, podle PCR reakce s párem primerů F1, je znázorněna v následujícím obrázku (Obr. 36).



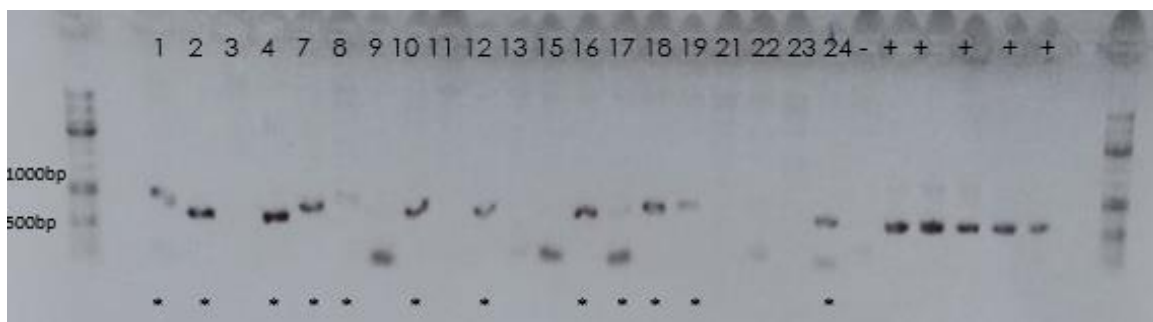
Obr. 36: PCR s párem primerů F1, Třeboňsko 2018.[‡]

Z výsledků sekvenování vyznačených PCR produktů byl potvrzen výskyt sinic s geny *puwF* ve 12 rybnících: 1, 5, 11, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 26, 33, 34 (příloha č. 3). U ostatních vzorků odeslaných k sekvenaci nebylo možné kvůli nedostatečným datům výsledné sekvence PCR produktů složit a potvrdit tak shodu s genem *puwF*.

5.2.4.3 Norsko

Celkově bylo testováno 20 enviromentálních vzorků z Norska (příloha č. 4). Výsledky s použitím páru primerů F1 jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 37).

[‡] Vzorky odeslány k osekvenování

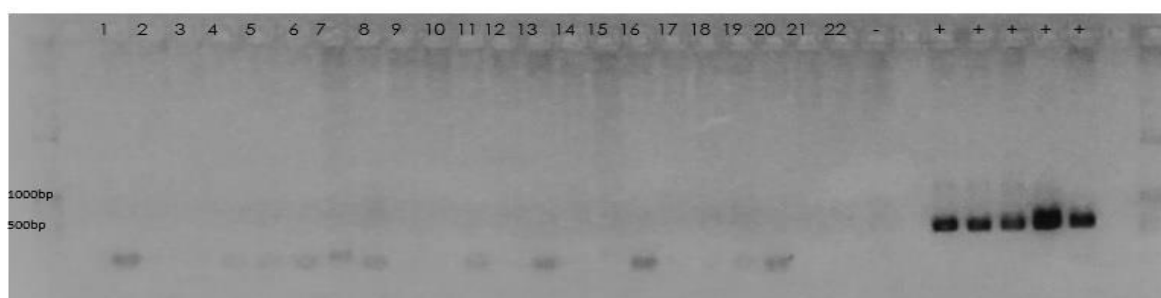


Obr. 37: PCR s primery F1, Norsko 2017. *

Z výsledků sekvenování vyznačených PCR produktů (Obr. 37) byl potvrzen výskyt sinic s geny pro PUW/MIN v 10 vzorcích.: 1, 2, 4, 7, 8, 12, 16, 17, 18, 19 (příloha č. 4). U vzorků 10 a 24 i přes pozitivní výsledek nebylo možné výsledné sekvence složit.

5.2.5 Testování specificity páru primerů F1

Specificita PCR primerů byla pro kontrolu potvrzena testováním na sinicových kmenech s kompletně osekvenovaným genomem, kde chybí geny pro PUW/MIN (Obr. 38). Testování specificity probíhalo na 22 sinicových kmenech (Tab. 2).



Obr. 38: Testování specificity PCR primerů F1 na kmenech sinic bez genu pro PUW/MIN. - negativní kontrola; + pozitivní kontroly.

5.2.6 Výsledky sekvenování PCR produktů s použitím primerů F1

5.2.6.1 CHKO Třeboňsko a okolí

V roce 2017 bylo zasláno k sekvenaci všech 22 PCR produktů získaných s použitím primerů F1 (Obr. 35). Analýza pomocí BLASTn ukázala u všech vzorků příbuznost ke známým producentům PUW/MIN. Následný alignment potvrdil homologii s částí sekvence genu *puwF* z biosyntetické dráhy PUW/MIN viz. (příloha č. 5, 6, 7). I přes slabší amplifikaci

* vzorky odeslané k sekvenování

vzorků rybníků 5-Dvořiště, 6-Horusický, 7-Hejtman, je sekvence z 96 % podobná sinicovému kmenu CCALA 993, CCALA 994. Stejnou nebo ještě vyšší podobnost (90,5-99,6 %) části sekvence genu *puwF* ke kmenům CCALA 993 a 994 vykazovaly vzorky z rybníků 10-Pešák, 18-Pešák II, 21-Krajina, 13-Koclíř, 12-Miletínský potok, 2-Břilický, 15-Ženich, 9-Stříbřecký, 16 Rožmberk, 1-Záblatský, 17-Vlkovický, 11-Láska, 4-Staňkov, 22-Svět, 3(F)-Starý vdovec. U sinic v rybnících 19- Spolský a 3(R)-Starý vdovec byla podobnost k CCALA 993 a 994 v rozmezí 81,5-85,1 %. Sekvence ze vzorků 8-Opatovický rybník a 14-Potěšil byly podobné vzorkům odebraných v roce 2018, kde se patrně jedná o jiný genový klastř pro PUW/MIN. Jejich podobnost ke kmeni CCALA 993 byla 66,9-71,2 %, avšak vzájemná podobnost sekvence byla >90% (příloha č. 8).

V roce 2018 bylo osekvenováno 19 vzorků z odebraných 34 (Obr. 36). Z výsledků sekvenování bylo možné pouze u 12 z nich složit sekvenci a potvrdit shodu s částí sekvence genu *puwF*. Pouze u jediného vzorku 14-Ženich byla podobnost ke vzorkům z roku 2017 a kmenům CCALA 993, 994 nad 90%. U ostatních ze zmíněných 12 osekvenovaných PCR produktů se jedná nejspíše o jiný typ genového klastřu pro PUW/MIN s podobností 64-70 % k sinicovým kmenům CCALA 993 a CCALA 994. Konkrétně se jedná o rybníky 33-Krajina, 19-Naděje, 34-Nový rybník, 26-Láska, 20-Rod, 15-Svět, 11-Vyšehrad, 5-Opatovický, 17-Rožmberk, 1-Výskok, 16-Káňov. Kromě vzorku 33-Krajina jsou si zmíněné vzorky společně s výše zmíněnými vzorky 14-Potěšil a 8-Opatovický z předchozího roku svou sekvencí navzájem podobné v rozmezí 90-100 %. Vzorek 33-Krajina je podobný jen z 80 % pravděpodobně kvůli hůře přečtené sekvenci.

Celkově lze na základě analýzy podobností usoudit, že se v environmetálních vzorcích v CHKO Třeboňsko a okolí vyskytují 2 hlavní skupiny genotypů potenciálních producentů PUW/MIN.

5.2.6.2 Norsko

Z analyzovaných vzorků odebraných v Norsku v roce 2017 bylo po úspěšné PCR zasláno k sekvenaci 12 vzorků z 20 (Obr. 37). Z výsledků sekvenování bylo možné pouze u 10 z nich složit sekvenci a potvrdit shodu s částí sekvence genu *puwF*. U vzorků N10 a N24 i přes viditelný proužek nebylo možné složit sekvenci kvůli nedostatečné kvalitě dat. Jedním z důvodů může být více producentů PUW/MIN ve vzorku, jejichž sekvence se překrývají. Zajímavostí byla u vzorku N19 podobnost sekvence se sinicovými kmeny CCALA 993, CCALA 994 z více než 97 %. Podobnost vykazuje i se sekvencemi rybníků z roku 2017, kde

je vzájemná shoda od 80-98 %. Vzorky N2 a N4 jsou v daném úseku identické s kmenem *Symplocastrum muelleri* (NIVA-CYA 644). U vzorku N12 vychází podobnost ke kmeni *S. muelleri* na 84 %, nicméně mikroskopicky přítomnost *Symplocastrum muelleri* (NIVA-CYA 644) nebyla potvrzena. Zde je pravděpodobný výskyt jiného producenta PUW/MIN. U vzorků N7, N8, N18 je vzájemná podobnost více než z 97 %. Nicméně podobnost s kmenem *Symplocastrum muelleri* (NIVA-CYA 644) je pouze ze 70 %. Podobně je tomu u vzorků N1 a N16, které jsou si podobné navzájem z 85 %, nicméně podobnost k sinicovým kmenům včetně *Symplocastrum muelleri* byla méně než 60 %.

5.2.7 Potvrzení přítomnosti PUW/MIN v kmenech a vzorcích sinic pomocí HPLC-HRMS (analýza ve spolupráci s P. Hrouzkem, MBÚ Třeboň)

Výsledky chemické analytické analýzy vybraných vzorků rybníků v roce 2017 a vzorků odebraných z Norska jsou uvedeny níže (Tab. 11 a 12). Analýza zbývajících vzorků odebraných z rybníků v letech 2017 a 2018 dosud probíhá a nemohla být do diplomové práce zahrnuta.

Tab. 11: Výsledky HPLC-HRMS/MS analýzy vzorků planktonu CHKO Třeboňsko a okolí z roku 2017 na obsah lipopeptidů puwainaphycinů. V pozitivních vzorcích je uvedena produkováná varianta puwainaphycinu, pokud se jedná o variantu dosud neznámou je uvedena pouze hodnota m/z odpovídající poměru hmoty a náboje.

Číslo vzorku	lokalita	Nalezená varianta puwainaphycinu
21	Krajina	Puwainaphycin A (1235.7), 1237.7
11	Láska	--
22	Svět	--
15	Ženich	Puwainaphycin A (1235.7), 1237.7, 1249.6, 1223.5
14	Potěšil	Puwainaphycin A (1235.7), 1237.7, 1249.6, 1223.5
18	Pešák II	Puwainaphycin A (1235.7), 1237.7
2	Břilický	Puwainaphycin A (1235.7), 1237.7
10	Pešák	Puwainaphycin A (1235.7), 1237.7, 1223.5
20	Vyšehrad	Puwainaphycin A (1235.7), 1237.7, 1223.5
5	Dvořiště	Puwainaphycin A (1235.7), 1237.7, 1223.5

Tab. 12: Výsledky HPLC-HRMS/MS analýzy vzorků Norska z roku 2017 na obsah lipopeptidů puwainaphycinů. V pozitivních vzorcích je uvedena produkovaná varianta puwainaphycinu, pokud se jedná o variantu dosud neznámou je uvedena pouze hodnota m/z odpovídající poměru hmoty a náboje.

Číslo vzorku- Norsko	Nalezená varianta puwainaphycinu
2	Puwainaphycin A (1235.7)
3	--
4	Puwainaphycin A (1235.7)
7	--
8	--
9	--
10	--
11	--
12	1274.7
13	--
15	1235.7 (Puwainaphycin A), Puw 1249.7
16	--
17	--
18	--
19	--
21	--
22	--
23	--
24	1235.7 (Puwainaphycin A)

6 Diskuze

Jedním z cílů předložené diplomové práce byl design nových PCR primerů pro detekci sinicových druhů s geny pro PUW/MIN v environmentálních vzorcích. Využití PCR je jednou ze základních a nejběžnějších metod pro stanovení přítomnosti producentů cyanotoxinů v prostředí. PCR protokoly pro detekci toxigenních sinic jsou běžně dostupné např. pro producenty microcystinů a nodularinů (Rantala et al. 2004, Jungblut et al. 2006), cylindrospermopsinu (Mazmouz et al. 2010), nebo anatoxinu-a (Rantala-Ylinen et al. 2011). Pro cytotoxické lipopeptidy PUW/MIN však podobná metoda dosud chyběla. Vzhledem k překvapivě vysoké variabilitě v konsensu sinicových kmenů s biosyntetickou dráhou pro PUW/MIN, byly v programu Geneious konzervované úseky, vhodné pro design primerů hledány manuálně (kapitola 4.5). Z navržených 13 primerů byly po prvotním testování na stejných sinicových kmenech s geny pro PUW/MIN vybrány 4 vhodné páry primerů tj. A1, A2, B1 a F1. Po optimalizaci byl vybrán pouze jediný pár primerů F1, který amplifikuje přibližně 550 bp dlouhý úsek genu *puwF* (jeden z NRPS genů v klastru pro syntézu PUW/MIN). Tento pár primerů vykazoval pozitivní výsledky při testování na stejných environmentálních vzorcích, jako při PCR reakci s ostatními primery A1, A2 a B1. Navíc se přítomnost genu pro PUW/MIN potvrdila i v dalších vzorcích, k čemuž u PCR reakce se zmiňovanými primery A1, A2 a B1 nedošlo (Obr. 32, 33, 34), primery F1 tedy vykazují vyšší senzitivitu. Vhodnost designovaného páru primerů potvrdil kromě výsledků sekvenování PCR produktů i test specificity, ve kterém byly primery F1 testovány na kmenech sinic s kompletně osekvenovaným genomem bez genů pro PUW/MIN, avšak obsahujících biosyntetické dráhy pro lipopeptidy (Obr. 38) predikované v publikaci Galica et al. (2017).

V souvislosti s testováním PCR primerů na environmentálních vzorcích bylo důležité zvolit vhodnou izolační metodu genomové DNA (kapitola 4.4). Jako nejvhodnější byla vybrána izolační metoda kitem NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel, Düren, Německo) vzhledem k vyšším naměřeným hodnotám koncentrace DNA (Obr. 23, 24) v porovnání s ostatními metodami. Vhodnost vybrané izolační metody byla dále potvrzena výsledky amplifikace PCR reakcí. U ostatních izolačních metod nebylo při předběžných testech dosaženo v mnoha případech pozitivních výsledků na rozdíl od vybraného izolačního kitu (kapitola 5.2.1). Tyto předběžné PCR analýzy pouze potvrdily výsledky měření koncentrace DNA a proto je v diplomové práci neuvádím.

Na základě nové detekční metody s využitím primerů F1, byla pozornost dále věnována problematice výskytu cyanobakteriálních sinicových lipopeptidů v životním prostředí. Jak už bylo v rešeršní části zmíněno, jedním z důvodů pro monitoring a detekci PUW/MIN v CHKO Třeboňsko a okolí byl již dříve zaznamenaný pravděpodobný výskyt puwainaphycinu A (PUW A) ve dvou lokalitách z této oblasti – rybníku Pešák a rybníku Vyšehrad (Zapomělová et al. 2009). Zajímavé je, že v minulosti byl tento konkrétní sekundární metabolit nalezen pouze u jediného sinicového kmene, *Anabaena* sp. BQ-16-1, který patří mezi terestrické sinice (Gregson et al. 1992). Také ostatní publikované studie našly lipopeptidy ze skupiny PUW/MIN výhradně v kmenech terestrických (půdních) sinic (Hrouzek et al. 2012, Kang et al. 2011, 2012, Mareš et al. 2019). Nedávná studie zaměřená na bioinformatickou predikci různých typů lipopeptidových genových klastrů v sinicích poukázala na jejich zvýšenou frekvenci v sinicích tvořících biofilmy (Galica et al. 2017). Výsledky studie (Zapomělová et al. 2009) nicméně naznačují, že přítomnost puwainaphycinu A může být spojena s výskytem planktonní sinice *Sphaerospermopsis reniformis*, která se sporadicky vyskytuje v planktonu eutrofních vod též na území ČR.

Monitoringem CHKO Třeboňsko a okolí v roce 2017 byla přítomnost druhu *S. reniformis* po mikroskopickém rozboru potvrzena v 5 lokalitách: rybník Pešák, Vyšehrad, Potěšil, Rožmberk a Starý vdovec. V těchto 5 lokalitách společně s rybníky Krajina, Ženich, Břilický a Dvořiště byl HPLC-HRMS analýzou potvrzen výskyt puwainaphycinu A (Tab. 11). Nicméně vzhledem k tomu, že nebyla sinice *Sphaerospermopsis reniformis* v rybnících Krajina, Ženich, Břilický a Dvořiště mikroskopicky potvrzena, je možné, že by mohl být puwainaphycin A produkován také jinými sinicovými druhy. Z výsledků PCR a sekvenční analýzy vzorků z terénních odběrů v CHKO Třeboňsko a okolí v roce 2017 a 2018 je patrné, že sekvence *puwF* tvořily dvě poměrně odlišné hlavní skupiny (přílohy č. 5–7). První z nich obsahovala většinu vzorků z r. 2017 a vzorek z rybníku Ženich z roku 2018, druhá pak většinu vzorků z r. 2018 a dva vzorky (Opatovický, Potěšil) z roku 2017. Podobnost v genu *puwF* okolo 60-70 % mezi těmito dvěma skupinami sekvencí je zhruba na úrovni podobností mezi kmeny rodů *Cylindrospermum* a *Anabaena* uvedené ve studii Mareš et al. (2019). Takový výsledek naznačuje, že se ve studovaných vzorcích planktonu patrně jednalo o nejméně dva různé producenty PUW/MIN, buď populace stejného druhu, nebo různé druhy sinic. Genotypová variabilita populací planktonních sinic co se týče genů pro toxické sekundární metabolity je známým fenoménem, např. v případě producentů microcystinů (Kurmayer et al. 2004, Lara et al. 2013).

PCR produkt genu *puwF* byl v letech 2017 a 2018 získán i z řady dalších lokalit, kde se druh *S. reniformis* nevyskytoval (Obr. 35 a 36). Z výsledků mikroskopické analýzy environmentálních vzorků CHKO Třeboňsko a okolí (přílohy č. 2 a 3) bylo po srovnání s výsledky molekulárních metod odvozeno, že by se mezi potenciální sinicové producenty PUW/MIN ze skupiny 1 (2017 + Ženich 2018) mohly řadit např. druhy *Microcystis aeruginosa* a *Woronichinia neageliana*, které byly přítomny v naprosté většině vzorků pozitivních při PCR. U druhé skupiny (2018 + Opatovický a Potešil 2018) vychází jako nejpravděpodobnější producent PUW/MIN *Microcystis ichtyoblabe*. Nicméně nelze zcela vyloučit, že nebyla *S. reniformis* mikroskopicky zachycena např. z důvodu řídkého výskytu v morfologicky dobře vyvinutých vláken v mikroskopovaném vzorku. V budoucnu bude nezbytné pokusit se o izolaci potenciálních producentů do kultury, aby byla potvrzena jejich skutečná identita.

Při mikroskopické analýze byl dále sledován příbuzný druh *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (Zapomělová et al. 2009). Tato sinice byla dříve monitoringem zaznamenána ve střední Moravě (Horecká a Komárek, 1979). Od roku 2004 byl její výskyt zaznamenán v několika dalších lokalitách v České republice (Zapomělová et al. 2009, Kaštovský et al. 2010). Monitoringem v CHKO Třeboňsko a okolí 2017 byla mikroskopicky detekována pouze v rybníku Spolský viz. (kapitola 5.1.1.1). Z dosažených výsledků nelze potvrdit možnou souvislost s výskytem PUW/MIN, vzhledem k absenci těchto látek v rybníce Spolský (Tab. 11).

Dalším z důvodů pro detekci a monitoring PUW/MIN v životním prostředí je mnohaletý výskyt onemocnění Alveld v norských oblastech, kde dochází k intoxikaci a následnému úmrtí ovcí ze zatím neznámých příčin (Mysterud et al. 2016). Jak zmíněná studie uvádí, doposud bylo onemocnění spojováno s vyšším příjmem saponinů v potravě ovcí. Rostlina *Narthecium ossifragum* obsahuje saponiny a v místní flóře postižené oblasti je hojně zastoupena. Nicméně nebylo potvrzeno, že by příjem samotných saponinů způsobil onemocnění. Studium se tedy přesunulo na mikroorganismy, které jsou součástí tamního terénu. Ve studii (Radostits a Done, 2007) byla potvrzena souvislost mezi výskytem sinic a příznaky onemocnění. V odborném článku (Tønnesen et al. 2013) byl dokonce potvrzen výskyt sinice *Symplocastrum muelleri* v toxigenních půdních biofilmech. Kmen *S. muelleri* NIVA-CYA 644 izolovaný z těchto lokalit je producentem PUW/MIN a je známo, že tyto lipopeptidy jsou cytotoxické (Mareš et al. 2019). Proto bylo cílem monitoringu a detekce potvrzení přítomnosti sinicových zástupců s ekotoxikologickým potenciálem v jedné

z postižených oblastí (Obr. 19). Z výsledků mikroskopického rozboru byl výskyt sinice *Symplocastrum muelleri* potvrzen ve 14 z 20 analyzovaných vzorků (příloha č. 4). Molekulárními metodami byla v souvislosti s výsledky ze sekvenování detekována podobnost s geny pro PUW/MIN v 10 vzorcích ze zmíněných 14 vzorků (kapitola 5.2.4.3), u kterých byla, kromě vzorků č. 12 a 17, přítomnost *Symplocastrum muelleri* mikroskopicky potvrzena (vzorek č. 1, 2, 4, 7, 8, 16, 18, 19). Kontrolní analýzou na HPLC-HRMS na přítomnost PUW/MIN ve všech testovaných 20 vzorcích bez vzorku č. 1 (ztráta vzorku), byl výskyt PUW A zaznamenán ve 4 vzorcích (vzorky č. 2, 4, 15, 24) (Tab. 12). Zatím neznámá varianta PUW/MIN byla zaznamenána ve vzorku č. 12 (Tab. 12). Po porovnání s výsledky u ostatních detekčních metod vychází, že producentem PUW A ve vzorcích č. 2 a 4 je s největší pravděpodobností *Symplocastrum muelleri*. Tento fakt potvrzuje i 100% podobnost sekvencí PCR produktů s kmenem NIVA-CYA 644 (příloha č. 8). U vzorků (č. 1, 7, 8, 16, 18, 19), kde byla molekulárně potvrzena přítomnost genů PUW/MIN a zároveň byla potvrzena přítomnost *Symplocastrum muelleri* mikroskopicky bez pozitivních výsledků HPLC-HRMS analýzy, lze usoudit, že nemusel být daný sekundární metabolit produkován i přes přítomnost jeho producenta. Nicméně srovnáním podobností osekvenovaných PCR produktů (č. 1, 7, 8, 16, 18, 19) s kmenem NIVA-CYA 644 vychází podobnost v rozmezí pouze 58-71 % (příloha č. 8). Další výsledky molekulární metody s navrženými primery F1 navíc potvrdily přítomnost genů pro PUW/MIN ve vzorcích č. 12 a 17 (příloha č. 4). Jak už bylo výše zmíněno (Tab. 12), u vzorku č. 12 se i HPLC-HRMS analýzou potvrdila přítomnost zatím neznámé formy PUW/MIN. Podobnost osekvenovaného PCR produktu (č. 12) s kmenem NIVA-CYA 644 je v tomto případě téměř 85 %. Nicméně mikroskopicky nebyla přítomnost *Symplocastrum muelleri* zachycena. Nemůžeme tedy s jistotou tvrdit, že i v tomto případě se jedná o potenciálního producenta *Symplocastrum muelleri*. Jak z tabulky (Tab. 12) vyplývá, přítomnost PUW A byla navíc analýzou HPLC-HRMS zaznamenána u vzorků č. 24 a č. 15. Vzhledem k tomu, že u vzorku č. 15 nevyšel pozitivní výsledek u PCR reakce s primery F1 (Obr. 37) a zároveň při mikroskopickém rozboru nebyla zaznamenána přítomnost *Symplocastrum muelleri* (příloha č. 4), je možné, že výskyt PUW A přetrvával i bez přítomnosti svého producenta (viz. dále). V případě analýzy vzorku č. 24 nebylo možné složit sekvenci i přes pozitivní výsledek PCR reakce (Obr. 37), tudíž nebylo možné potvrdit podobnost s geny PUW/MIN u sinicového kmene NIVA-CYA 644.

Možným důvodem odlišné detekce u jednotlivých metod, zejména v případě vzorků biofilmů, je značná heterogenita environmentálního vzorku. Je tedy možné, že část vzorku

použitá pro extrakci DNA a pro HPLC-HRMS analýzu se vzájemně lišily složením a relativním zastoupením jednotlivých druhů sinic. Je třeba vzít v úvahu i fakt, že izolovaná DNA je směsí z různých mikroorganismů, které jsou součástí odebraného vzorku. Tato směs DNA pak může hrát důležitou roli při PCR reakci a především při sekvenování, kde může být zachyceno několik různých producentů PUW/MIN v rámci jednoho vzorku. To má za následek překrývání sekvencí a tudíž neschopnost výslednou sekvenci složit a potvrdit tak podobnost s biosyntetickou dráhou sinicových kmenů s PUW/MIN. Stejně jako u ostatních environmentálních vzorků z CHKO Třeboňska a okolí, i u vzorků Norska došlo k situacím, kdy výsledné sekvence PCR produktu nebylo možné složit. Nebylo tedy možné potvrdit příbuznost ke známým producentům PUW/MIN u všech vzniklých PCR produktů pomocí BLASTn (kapitola 5.2.6.2). Možným řešením do budoucna je vytvoření a sekvenace knihovny klonů ze získaných PCR produktů.

Dalším faktorem je značná chemická stabilita lipopeptidů ze skupiny PUW/MIN (P. Hrouzek, ústní sdělení). V některých případech může dojít k situaci, kdy produkující sinice již odumře a není mikroskopicky ve vzorku zachycena, avšak produkovaná látka je dosud přítomna. Naproti tomu u některých vzorků byl zachycen PCR produkt, ale nebyla detekována přítomnost příslušných produktů. K takové situaci může dojít vlivem podmínek v prostředí např. změnou počasí. Příkladem vlivu počasí na produkci sekundárních sinicových lipopeptidů jsou výsledky studie (Bláhová et al. 2007), kde je vyšší koncentrace microcystinů zaznamenána v období letních měsíců. Rozdílné teplotní podmínky a termíny odběrů mohly mít i v našem případě vliv na výskyt potenciálních producentů a jejich aktivitu produkce PUW/MIN. U sinicových sekundárních metabolitů je vcelku běžné, že je gen pro biosyntézu detekován (PCR metodou), ale není exprimován, tudíž pak není možné zachytit přítomnost produktů pomocí HPLC-HRMS (Kurmayer et al. 2004). Tento problém je možné z větší části eliminovat použitím real-time PCR pro detekci exprese těchto genů (Kurmayer et al. 2003).

Přítomnost sinicových sekundárních metabolitů jako jsou zmíněné puwainaphyciny a minutissamidy ve vodách může mít do budoucna pro člověka negativní dopad. Vzhledem k zřejmě nespecifickému cytotoxickému působení PUW/MIN proti eukaryotním buňkám (Hrouzek et al. 2012) je důležitý další průzkum jejich možného toxického působení včetně monitoringu a detekce v životním prostředí. Důležitost takového průzkumu potvrzuje výskyt sinice *Symplocastrum muelleri* NIVA-CYA 644 v oblastech, které jsou zasaženy onemocněním Alvelid (Mysterud et al. 2016). Zatím nelze vyloučit, že přítomnost puwainaphycinů, minutissamidů nebo jiných toxických sinicových lipopeptidů je jednou

z možných příčin onemocnění Alveld. Jednou z nepotvrzených hypotéz je právě možné spolupůsobení saponinů společně s cytotoxickým účinkem sinicových lipopeptidů. Přítomnost podobných toxických sinicových látek ve vodách pak otevírá prostor k řešení, jak zamezit intoxikaci živočichů a jak takovému problému předejít např. včasnou detekcí a monitoringem. Z výsledků diplomové práce je zřejmé, že jsou puwainaphyciny rozšířeny v planktonu eutrofních vod v ČR, kdy z 54 odebraných vzorků (odběry v roce 2017 i 2018), byla potvrzena přítomnost genu pro PUW/MIN ve 32 z nich (59 %) metodou s využitím PCR primerů F1. Ve studii (Bláhová et al. 2007) byl proveden monitoring microcystinů na území ČR, kde během roku 2004 bylo testováno 206 planktonních vzorků. U 145 z nich (70 %) byla zaznamenána měřitelná koncentrace tohoto toxinu. Byla také potvrzena pozitivní korelace mezi dominantním zastoupením *Microcystis sp.* a tomu odpovídající koncentraci microcystinů. Jak je z přílohy (příloha č. 2, 3) patrné, výskyt sinic rodu *Microcystis* byl téměř ve všech odebraných vzorcích. Zajímavá je jejich přítomnost i ve vzorcích, kde je detekována přítomnost genů PUW/MIN bez výskytu *Sphaerospermopsis reniformis* nebo *Sphaerospermopsis aphanizomenoides*. Vzhledem k tomuto zjištění nelze vyloučit hypotézu, že právě zástupci rodu *Microcystis* mohou být další potenciální producenti puwainaphycinu v našich vodách.

7 Závěr

- Vhodnou metodou pro izolaci sinicové DNA z environmentálních vzorků byla zvolena izolace kitem NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel, Düren, Německo) s několika modifikacemi.
- Pro detekci sinic s geny pro PUW/MIN byly úspěšně designovány a testovány primery F1 a byl vytvořen optimalizovaný PCR protokol.
- Pomocí PCR na environmentálních vzorcích byla potvrzena přítomnost potenciálních sinicových producentů PUW/MIN v 59 % vzorků vodních květů z CHKO Třeboňsko a okolí.
- Pomocí PCR na environmentálních vzorcích byla potvrzena hojná přítomnost potenciálních sinicových producentů PUW/MIN ve vzorcích z Norska z oblasti postižené ovčí nemocí Alveld.
- Přítomnost PUW/MIN byla potvrzena metodou HPLC-HRMS ve studovaných vzorcích z planktonu rybníků a biofilmů z Norských pastvin. Tím byla potvrzena specificita zvoleného PCR protokolu pro producenty PUW/MIN.
- Vzhledem k přítomnosti a zřejmě hojnému výskytu puwainpahycinu A v eutrofních vodách v České republice jsou průběžný monitoring a včasná detekce důležité z hlediska ochrany veřejného zdraví.

8 Literatura

ARÁOZ, Rómulo, Jordi MOLGÓ a Nicole TANDEAU DE MARSAC, 2010. Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* **56**(5), 813-828. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.07.036.

AZEVEDO, Sandra M.F.O, Wayne W CARMICHAEL, Elise M JOCHIMSEN, Kenneth L RINEHART, Sharon LAU, Glen R SHAW a Geoff K EAGLESHAM, 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*. **181-182**, 441-446. DOI: 10.1016/S0300-483X(02)00491-2. ISSN 0300483X.

BERRY, John P., 2008. Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides. *Marine Drugs*. **6**(2), 117-146. DOI: 10.3390/md20080007.

BLÁHOVÁ, Lucie, Pavel BABICA, Eliška MARŠÁLKOVÁ, Blahoslav MARŠÁLEK a Ludek BLÁHA, 2007. Concentrations and Seasonal Trends of Extracellular Microcystins in Freshwaters of the Czech Republic – Results of the National Monitoring Program. *CLEAN – Soil, Air, Water*. **35**(4), 348-354. DOI: 10.1002/clen.200700010.

BLANK, C. E. a P. SÁNCHEZ-BARACALDO, 2010. Timing of morphological and ecological innovations in the cyanobacteria: □ a key to understanding the rise in atmospheric oxygen. *Geobiology*. **8**(1), 1-23. DOI: 10.1111/j.1472-4669.2009.00220.x.

BLOUDOFF, Kristjan a T. Martin SCHMEING, 2017. Structural and functional aspects of the nonribosomal peptide synthetase condensation domain superfamily: discovery, dissection and diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **1865**(11), 1587-1604. DOI: 10.1016/j.bbapap.2017.05.010.

BONJOUKLIAN, Rosanne, Tim A. SMITKA, Larry E. DOOLIN, et al., 1991. Tjipanazoles, new antifungal agents from the blue-green alga *Tolypothrix tjipanasensis*. *Tetrahedron*. **47**(37), 7739-7750. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)81932-3.

CARMICHAEL, W W, S M AZEVEDO, J S AN, et al., 2001. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*. **109**(7), 663-668. DOI: 10.1289/ehp.01109663.

- CIRÉS, Samuel, María CASERO a Antonio QUESADA, 2017. Toxicity at the Edge of Life: A Review on Cyanobacterial Toxins from Extreme Environments. *Marine Drugs*. **15**(7). DOI: 10.3390/md15070233.
- CODD, Geoffrey A., Louise F. MORRISON a James S. METCALF, 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **203**(3), 264-272. DOI: 10.1016/j.taap.2004.02.016.
- DAVIS, Timothy W., Philip T. ORR, Gregory L. BOYER a Michele A. BURFORD, 2014. Investigating the production and release of cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin by *Cylindrospermopsis raciborskii* over a natural growth cycle. *Harmful Algae*. **31**, 18-25. DOI: 10.1016/j.hal.2013.09.007.
- DITTMANN, Elke, David P. FEWER a Brett A. NEILAN, 2013. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiology Reviews*. **37**(1), 23-43. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.12000.x.
- DITTMANN, Elke, Muriel GUGGER, Kaarina SIVONEN a David P. FEWER, 2015. Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. *Trends in Microbiology*. **23**(10), 642-652. DOI: 10.1016/j.tim.2015.07.008. ISSN 0966842X.
- FARACE, Giovanni, Olivier FERNANDEZ, Lucile JACQUENS, et al., 2015. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology*. **16**(2), 177-187. DOI: 10.1111/mpp.12170.
- FONTANILLO, Miriam a Maja KÖHN, 2018. Microcystins: Synthesis and structure–activity relationship studies toward PP1 and PP2A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **26**(6), 1118-1126. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.08.040.
- FORD, E.J.H., 1964. A Preliminary Investigation of Photosensitization in Scottish Sheep. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. **74**, 37-IN6. DOI: 10.1016/S0368-1742(64)80005-9.
- GALICA, Tomáš, Pavel HROUZEK a Jan MAREŠ 2017. Genome mining reveals high incidence of putative lipopeptide biosynthesis NRPS/PKS clusters containing fatty acyl-AMP ligase genes in biofilm-forming cyanobacteria. *Journal of Phycology*. **53**(5), 985-998. DOI: 10.1111/jpy.12555.

GEUDENS, Niels, Mehmet Nail NASIR, Jean-Marc CROWET, et al., 2017. Membrane Interactions of Natural Cyclic Lipodepsipeptides of the Viscosin Group. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1859**(3), 331-339. DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.12.013.

GREGSON, John M., Jian-Lu CHEN, Gregory M.L. PATTERSON a Richard E. MOORE, 1992. Structures of puwainaphycins A–E. *Tetrahedron*. **48**(18), 3727-3734. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)92264-1.

GULICK, Andrew M., 2009. Conformational Dynamics in the Acyl-CoA Synthetases, Adenylation Domains of Non-ribosomal Peptide Synthetases, and Firefly Luciferase. *ACS Chemical Biology*. **4**(10), 811-827. DOI: 10.1021/cb900156h.

GUPTA, Ramesh C., 2015. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents: SECOND EDITION*. 2nd ed. USA: Academic Press.

HAMLEY, Ian W., 2015. Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chemical Communications*. **51**(41), 8574-8583. DOI: 10.1039/C5CC01535A.

HORECKÁ, Marie a Jiří KOMÁREK, 1979. Taxonomic position of three planktonic blue-green algae from the genera *Aphanizomenon* and *Cylindrospermopsis*. *Preslia*. **51**, 289-312.

HROUZEK, Pavel, Marek KUZMA, Jan ČERNÝ, Petr NOVÁK, Radovan FIŠER, Petr ŠIMEK, Alena LUKEŠOVÁ a Jiří KOPECKÝ, 2012. The Cyanobacterial Cyclic Lipopeptides Puwainaphycins F/G Are Inducing Necrosis via Cell Membrane Permeabilization and Subsequent Unusual Actin Relocalization. *Chemical Research in Toxicology*. **25**(6), 1203-1211. DOI: 10.1021/tx300044t. ISSN 0893-228X.

HUANG, Shuo a Paul V. ZIMBA, 2019. Cyanobacterial bioactive metabolites—A review of their chemistry and biology. *Harmful Algae*. (83), 42-94. DOI: 10.1016/j.hal.2018.11.008.

HUMBERT, J.F., 2015. Toxins of cyanobacteria. GUPTA, Ramesh C. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents: SECOND EDITION*. 2nd. USA: Academic Press, s. 371-379. ISBN 978-0-12-800159-2.

HUR, Gene H., Christopher R. VICKERY a Michael D. BURKART, 2012. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Natural Product Reports*. **29**(10). DOI: 10.1039/c2np20025b. ISSN 0265-0568.

CHEEL, José, Jan HÁJEK, Marek KUZMA, et al., 2018. Application of HPLC Combined with Polymeric Resins and HPLC for the Separation of Cyclic Lipopeptides Muscotoxins A–C and Their Antimicrobial Activity. *Molecules*. **23**(10). DOI: 10.3390/molecules23102653.

CHENG, Y.-Q., G.-L. TANG a B. SHEN, 2003. Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**(6), 3149-3154. DOI: 10.1073/pnas.0537286100. ISSN 0027-8424.

CHENG, Yi-Qiang, Jane M. COUGHLIN, Si-Kyu LIM a Ben SHEN, 2009. Chapter 8 Type I Polyketide Synthases That Require Discrete Acyltransferases. *Complex Enzymes in Microbial Natural Product Biosynthesis, Part B: Polyketides, Aminocoumarins and Carbohydrates*. Elsevier, 2009, s. 165-186. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)04608-4.

JOKELA, Jouni, Linn OFTEDAL, Lars HERFINDAL, Perttu PERMI, Matti WAHLSTEN, Stein Ove DØSKELAND a Kaarina SIVONEN, 2012. Anabaenolysins, Novel Cytolytic Lipopeptides from Benthic *Anabaena* Cyanobacteria. *PLoS ONE*. **7**(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0041222.

JUNGBLUT, Anne-Dorothee a Brett A. NEILAN, 2006. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Archives of Microbiology*. **185**(2), 107-114. DOI: 10.1007/s00203-005-0073-5.

KAASALAINEN, U., D. P. FEWER, J. JOKELA, M. WAHLSTEN, K. SIVONEN a J. RIKKINEN, 2012. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **109**(15), 5886-5891. DOI: 10.1073/pnas.1200279109.

KANG, Hahk-Soo, Aleksej KRUNIC, Qi SHEN, Steven M. SWANSON a Jimmy ORJALA, 2011. Minutissamides A–D, Antiproliferative Cyclic Decapeptides from the Cultured Cyanobacterium *Anabaena minutissima*. *Journal of Natural Products*. **74**(7), 1597-1605. DOI: 10.1021/np2002226.

KANG, Hahk-Soo, Megan STURDY, Aleksej KRUNIC, Hyunjung KIM, Qi SHEN, Steven M. SWANSON a Jimmy ORJALA, 2012. Minutissamides E–L, antiproliferative cyclic

lipodecapeptides from the cultured freshwater cyanobacterium cf. *Anabaena* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **20**(20), 6134-6143. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.017.

KANLAYAVATTANAKUL, M. a N. LOURITH, 2010. Lipopeptides in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*. **32**(1), 1-8. DOI: 10.1111/j.1468-2494.2009.00543.x.

KAŠTOVSKÝ, Jan, Tomáš HAUER, Jan MAREŠ, et al., 2010. A review of the alien and expansive species of freshwater cyanobacteria and algae in the Czech Republic. *Biological Invasions*. **12**(10), 3599-3625. DOI: 10.1007/s10530-010-9754-3.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. 1999. Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales. In: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. & Schagerl, M. [Eds.] Süßwasserflora von Mitteleuropa. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, pp. 548.

KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. 2005. Cyanoprokaryota. 2. Oscillatoriales. In: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. & Schagerl, M. [Eds.] Süßwasserflora von Mitteleuropa. Elsevier/Spektrum, Heidelberg, 759.

KOMÁREK, J. 2013. Cyanoprokaryota -3. Teil/ 3rd Part: Heterocytous genera. In: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. & Schagerl, M. [Eds.] Süßwasserflora von Mitteleuropa. Elsevier/Spektrum, Heidelberg, pp. 1130.

KULTSCHAR, Bethan a Carole LLEWELLYN, 2018. Secondary Metabolites in Cyanobacteria. VIJAYAKUMAR, Ramasamy a Suresh S.S. RAJA, ed. Secondary Metabolites -Sources and Applications. InTech, 2018-09-05. DOI: 10.5772/intechopen.75648.

KURMAYER, R. a T. KUTZENBERGER, 2003. Application of Real-Time PCR for Quantification of Microcystin Genotypes in a Population of the Toxic Cyanobacterium *Microcystis* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(11), 6723-6730. DOI: 10.1128/AEM.69.11.6723-6730.2003.

KURMAYER, Rainer, Guntram CHRISTIANSEN, Jutta FASTNER a Thomas BORNER, 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environmental Microbiology*. **6**(8), 831-841. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00626.x.

KUST, Andreja, 2019. Polyphasic analysis and secondary metabolite patterns in unbranched heterocytous cyanobacteria with different life strategies. České Budějovice. Disertační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce Jan Mareš.

LACAP-BUGLER, Donnabella C., Kevin K. LEE, Stephen ARCHER, et al., 2017. Global Diversity of Desert Hypolithic Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*. **8**. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00867.

LARA, Y, A LAMBION, D MENZEL, GA CODD a A WILMOTTE, 2013. A cultivation-independent approach for the genetic and cyanotoxin characterization of colonial cyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology*. **69**(2), 135-143. DOI: 10.3354/ame01628.

LEFLAIVE, JOSE'PHINE a LOÏC TEN-HAGE, 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology*. **52**(2), 199-214. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2006.01689.x.

LUESCH, Hendrik, Richard E. MOORE, Valerie J. PAUL, Susan L. MOOBERRY a Thomas H. CORBETT, 2001. Isolation of Dolastatin 10 from the Marine Cyanobacterium *Symploca* Species VP642 and Total Stereochemistry and Biological Evaluation of Its Analogue Symplostatin 1. *Journal of Natural Products*. **64**(7), 907-910. DOI: 10.1021/np010049y.

MAREŠ, Jan, Jan HÁJEK, Petra URAJOVÁ, et al., 2019. Alternative Biosynthetic Starter Units Enhance the Structural Diversity of Cyanobacterial Lipopeptides. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(4), e02675-18. DOI: 10.1128/AEM.02675-18.

MAREŠ, Jan, Jan HÁJEK, Petra URAJOVÁ, Jiří KOPECKÝ, Pavel HROUZEK, 2014. A Hybrid Non-Ribosomal Peptide/Polyketide Synthetase Containing Fatty-Acyl Ligase (FAAL) Synthesizes the β -Amino Fatty Acid Lipopeptides Puwainaphycins in the Cyanobacterium *Cylindrospermum alatosporum*. PLoS ONE. 9(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0111904.

MARTÍNEZ-NÚÑEZ, Mario Alberto a Víctor Eric López y LÓPEZ, 2016. Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustainable Chemical Processes*. **4**(1). DOI: 10.1186/s40508-016-0057-6.

MAZMOUZ, R., F. CHAPUIS-HUGON, S. MANN, V. PICHON, A. MEJEAN a O. PLOUX, 2010. Biosynthesis of Cylindrospermopsin and 7-Epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. Strain PCC 6506: Identification of the *cyr* Gene Cluster and Toxin Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**(15), 4943-4949. DOI: 10.1128/AEM.00717-10.

MEENA, Khem Raj a Shamsheer S. KANWAR, 2015. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International*. **2015**, 1-9. DOI: 10.1155/2015/473050.

MEREL, Sylvain, David WALKER, Ruth CHICANA, Shane SNYDER, Estelle BAURÈS a Olivier THOMAS, 2013. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*. **59**, 303-327. DOI: 10.1016/j.envint.2013.06.013. ISSN 01604120.

METCALF, James S., Sandra Anne BANACK, James T. POWELL, Fiona J. M. TYMM, Susan J. MURCH, Larry E. BRAND a Paul Alan COX, 2018. Public health responses to toxic cyanobacterial blooms: perspectives from the 2016 Florida event. *Water Policy*. 20(5), 919-932. DOI: 10.2166/wp.2018.012.

MOORE, Richard E., Volker BORNEMANN, Walter P. NIEMCZURA, John M. GREGSON, Jian Lu CHEN, Ted R. NORTON, Gregory M. L. PATTERSON a Gregory L. HELMS, 1989. Puwainaphycin C, a cardioactive cyclic peptide from the blue-green alga *Anabaena* BQ-16-1. Use of two-dimensional carbon-13-carbon-13 and carbon-13-nitrogen-15 correlation spectroscopy in sequencing the amino acid units. *Journal of the American Chemical Society*. **111**(16), 6128-6132. DOI: 10.1021/ja00198a021.

MYSTERUD, Ivar, Gry KOLLER, Klaus HØILAND, Tor CARLSEN a Arild SLETTEN, 2016. The lamb disease alveld: Search for fungi and bacteria on *Narthecium ossifragum* foliage and roots. *Small Ruminant Research*. **136**, 179-186. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2016.01.025.

NAGARAJAN, M., V. MARUTHANAYAGAM a M. SUNDARARAMAN, 2013. SAR analysis and bioactive potentials of freshwater and terrestrial cyanobacterial compounds: a review. *Journal of Applied Toxicology*. **33**(5), 313-349. DOI: 10.1002/jat.2833.

NEUHOF, Torsten, Peter SCHMIEDER, Karina PREUSSEL, Ralf DIECKMANN, Huong PHAM, Franz BARTL a Hans VON DÖHREN, 2005. Hassallidin A, a Glycosylated Lipopeptide with Antifungal Activity from the Cyanobacterium *Hassallia* sp. *Journal of Natural Products*. **68**(5), 695-700. DOI: 10.1021/np049671r.

OFTEDAL, Linn, Lene MYHREN, Jouni JOKELA, Gro GAUSDAL, Kaarina SIVONEN, Stein Ove DØSKELAND a Lars HERFINDAL, 2012. The lipopeptide toxins anabaenolysin

A and B target biological membranes in a cholesterol-dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1818**(12), 3000-3009. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.07.015.

OSSWALD, Joana, António Paulo CARVALHO, Laura GUIMARÃES a Lúcia GUILHERMINO, 2013. Toxic effects of pure anatoxin-a on biomarkers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Toxicon*. **70**, 162-169. DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.04.014.

PATOČKA, Jiří, 2004. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0608-3.

PERCIVAL, Steven L. a David W. WILLIAMS, 2014. Cyanobacteria. *Microbiology of Waterborne Diseases*. Elsevier, 2014, s. 79-88. DOI: 10.1016/B978-0-12-415846-7.00005-6.

RADOSTITS, O. M. a Stanley H. DONE, 2007. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses*. 10th ed. New York: Elsevier Saunders. ISBN 0702027774.

RAJNEESH, Shailendra P. SINGH, Jainendra PATHAK a Rajeshwer P. SINHA, 2017. Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **69**, 578-595. DOI: 10.1016/j.rser.2016.11.110.

RANTALA, A., D. P. FEWER, M. HISBERGUES, L. ROUHIAINEN, J. VAITOMAA, T. BORNER a K. SIVONEN, 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**(2), 568-573. DOI: 10.1073/pnas.0304489101.

RANTALA-YLINEN, Anne, Suvi KÄNÄ, Hao WANG, et al., 2011. Anatoxin-a Synthetase Gene Cluster of the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain 37 and Molecular Methods To Detect Potential Producers. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**(20), 7271-7278. DOI: 10.1128/AEM.06022-11.

RASTOGI, Rajesh P. a Rajeshwar P. SINHA, 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. **27**(4), 521-539. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.009.

REDER-CHRIST, Katrin, Yvonne SCHMIDT, Marius DÖRR, Hans-Georg SAHL, Michaele JOSTEN, Jos M. RAAIJMAKERS, Harald GROSS a Gerd BENDAS, 2012. Model membrane

studies for characterization of different antibiotic activities of lipopeptides from *Pseudomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1818**(3), 566-573. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.08.007.

RICKARDS, Rodney W., Jennifer M. ROTHSCILD, Anthony C. WILLIS, Nola M. DE CHAZAL, Julie KIRK, Kiaran KIRK, Kevin J. SALIBA a Geoffrey D. SMITH, 1999. Calothrixins A and B, novel pentacyclic metabolites from *Calothrix* cyanobacteria with potent activity against malaria parasites and human cancer cells. *Tetrahedron*. **55**(47), 13513-13520. DOI: 10.1016/S0040-4020(99)00833-9.

RIDLEY, C. P., H. Y. LEE a C. KHOSLA, 2008. Evolution of polyketide synthases in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**(12), 4595-4600. DOI: 10.1073/pnas.0710107105.

ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana, 2003. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 80-7080-521-8.

SATLIN, Michael J. a Stephen G. JENKINS, 2017. Polymyxins. *Infectious Diseases*. Elsevier, 2017, 1285-1288.e2. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00151-9.

SHISHIDO, Tânia, Anu HUMISTO, Jouni JOKELA, et al., 2015. Antifungal Compounds from Cyanobacteria. *Marine Drugs*. **13**(4), 2124-2140. DOI: 10.3390/md13042124.

SCHIRRMEISTER, Bettina E., Muriel GUGGER, Philip C. J. DONOGHUE a Andrew SMITH, 2015. Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. *Palaeontology*. **58**(5), 769-785. DOI: 10.1111/pala.12178.

SIVONEN, K., 2009. Cyanobacterial toxins, in *The Encyclopedia of Microbiology*, 3rd Edn, eds Schaechter M., editor. (Oxford: Academic;), 290–307.

SIVONEN, Kaarina, Niina LEIKOSKI, David P. FEWER a Jouni JOKELA, 2010. Cyanobactins—ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **86**(5), 1213-1225. DOI: 10.1007/s00253-010-2482-x.

STANSLY, P. G. a M.E. SCHLOSSER, 1947. Studies on Polymyxin: Isolation and Identification of *Bacillus polymyxa* and Differentiation of Polymyxin from Certain Known Antibiotics. *Journal of bacteriology*. 1947, **54**(5), 549-556.

STRIEKER, Matthias, Alan TANOVIĆ a Mohamed A MARAHIEL, 2010. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*. **20**(2), 234-240. DOI: 10.1016/j.sbi.2010.01.009.

SWAIN, Shasank S., Sudhir K. PAIDSETTY a Rabindra N. PADHY, 2017. Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **90**, 760-776. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.04.030.

TAKSER, Larissa, Nora BENACHOUR, Barry HUSK, Hubert CABANA a Denis GRIS, 2016. Cyanotoxins at low doses induce apoptosis and inflammatory effects in murine brain cells: Potential implications for neurodegenerative diseases. *Toxicology Reports*. **3**, 180-189. DOI: 10.1016/j.toxrep.2015.12.008.

TATON, A., S. GRUBISIC, E. BRAMBILLA, R. DE WIT a A. WILMOTTE, 2003. Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(9), 5157-5169. DOI: 10.1128/AEM.69.9.5157-5169.2003.

TOMEK, Petr, Pavel HROUZEK, Marek KUZMA, et al., 2015. Cytotoxic Lipopeptide Muscotoxin A, Isolated from Soil Cyanobacterium *Desmonostoc muscorum* , Permeabilizes Phospholipid Membranes by Reducing Their Fluidity. *Chemical Research in Toxicology*. **28**(2), 216-224. DOI: 10.1021/tx500382b.

TØNNESEN, Hanne Hjorth, Ivar MYSTERUD, Jan KARLSEN, Olav M. SKULBERG, Carl M.M. LAANE a Trond SCHUMACHER, 2013. Identification of singlet oxygen photosensitizes in lambs drinking water in an alveld risk area in West Norway. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **119**, 37-45. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.12.003.

TORAL, Laura, Miguel RODRÍGUEZ, Victoria BÉJAR a Inmaculada SAMPEDRO, 2018. Antifungal Activity of Lipopeptides From *Bacillus* XT1 CECT 8661 Against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*. **9**. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01315.

UNTERGASSER, Andreas, Ioana CUTCUTACHE, Triinu KORESSAAR, Jian YE, Brant C. FAIRCLOTH, Mairo REMM a Steven G. ROZEN, 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. **40**(15), e115-e115. DOI: 10.1093/nar/gks596.

VESTOLA, J., T. K. SHISHIDO, J. JOKELA, et al., 2014. Hassallidins, antifungal glycolipopeptides, are widespread among cyanobacteria and are the end-product of a nonribosomal pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **111**(18), E1909-E1917. DOI: 10.1073/pnas.1320913111.

VINOTHKUMAR, Saradavey a P.S. PARAMESWARAN, 2013. Recent advances in marine drug research. *Biotechnology Advances*. **31**(8), 1826-1845. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.02.006.

VONDRÁŠKOVÁ, Alžběta, Pavel FIBICH, Jan LEPŠ a Jan KAŠTOVSKÝ, 2017. Determinants of cyanobacterial species composition in the splash zone of two Croatian islands. *European Journal of Phycology*. **52**(2), 179-187. DOI: 10.1080/09670262.2016.1246673.

WHITTON, Brian A. a Malcolm POTTS, 2000. *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Boston: Kluwer Academic. ISBN 9780792347354.

WHITTON, Brian A., ed., 2012. *Ecology of Cyanobacteria II*. Dordrecht: Springer Netherlands. DOI: 10.1007/978-94-007-3855-3.

XUE, Yun, Pengchao ZHAO, Chunshan QUAN, et al., 2018. Cyanobacteria-derived peptide antibiotics discovered since 2000. *Peptides*. **107**, 17-24. DOI: 10.1016/j.peptides.2018.08.002.

YILMAZ, Mete, Edward J. PHILIPS a Daniel TILLET, 2009. Improved methods for the isolation of cyanobacterial DNA from environmental samples. *Journal of Phycology*. **45**(2), 517-521. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2009.00651.x.

YOUNES, Anas, Ajay K. GOPAL, Scott E. SMITH, et al., 2012. Results of a Pivotal Phase II Study of Brentuximab Vedotin for Patients With Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. **30**(18), 2183-2189. DOI: 10.1200/JCO.2011.38.0410.

YU, Zhiliang, Wangrong QIN, Jianxun LIN, Shisong FANG a Juanping QIU, 2015. Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. *BioMed Research International*. **2015**, 1-11. DOI: 10.1155/2015/679109.

ZAPOMĚLOVÁ, Eliška, Jitka JEZBEROVÁ, Pavel HROUZEK, Daniel HISEM, Klára ŘEHÁKOVÁ a Jaroslava KOMÁRKOVÁ, 2009. Polyphasic characterization of three strains of *Anabaena reniformis* and *Aphanizomenon aphanizomenoides* (cyanobacteria) and their

reclassification to *Sphaerospermum* gen. nov. (incl. *Anabaena kisseleviana*). *Journal of Phycology*. **45**(6), 1363-1373. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2009.00758.x.

ŽEGURA, Bojana, Alja ŠTRASER a Metka FILIPIČ, 2011. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. **727**(1-2), 16-41. DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.01.002.

9 Přílohy

Příloha č. 1: Sekvence designovaných PCR primerů.*

Primer	Gen PUW	Sekvence primeru (5'→3')	T _m [°C]	bp
A1 F		AAGCCGCGCACCTTCAC	61,1	
A1 R	<i>puwA</i>	CSCCGGTGAGTTTTGATGT	57,7-58,8	661
A2 F		GCACCGCCAGCTTTGAKAATC	60,3-62,5	
A2 R	<i>puwA</i>	GGATGTACCCTTTGAGCAA	54,8	632
A3 F		CCCCATYGACCAACCATCA	57,3-59,4	
A3 R	<i>puwA</i>	AGTCGGACWGTGAGTTTTGT	57	738
B1 F		GCCGAGTTAACWTTATTGGGG	57	
B1 R	<i>puwB</i>	ACGGCTGCTTGATATCCC	56,8	683
B2 F		CAACAACAAACMTGGGAACGCTT	61-62,5	
B2 R	<i>puwB</i>	GCTAAATAATCCACCARTGCCG	58,1-59,7	749
C1 F		GGTGAAATYTGGGTATCTGGTG	57,3-58,5	
C1 R	<i>puwC</i>	TGAATTTTGCCRCTGGATGT	55,8-58,7	470
E1 F		AAACAGTGCCAAMCAGAAAA	54,4-56,3	
E1 R	<i>puwE</i>	CGYACCCCTTCCATCAA	52,7-56,7	519
E2 F		AGCTTGTAYTATTTCCGGCAACTA	56,3-57,9	
E2 R	<i>puwE</i>	ACCCATTTCTCCRGCTTTGATATA	57,7-59,9	552
F1 F		GATGCACCMCCMHRRTTAGAACT	56,6-64,1	
F1 R	<i>puwF</i>	CATCGACARRGTTAWATCAAAC	51,5-55,7	558
F2 F		TTKAGTTTCCAYCATGC	46,3-52,0	
F2 R	<i>puwF</i>	TTTCTCCRTCWGCATYTTC	50,9-54,9	464
F3 F		TGGCAGCAGATWAAYA	47,9-51,8	
F3 R	<i>puwF</i>	GCCCAATCTTTRAAGGA	48,3-51,2	335
H1 F		CGCTGTTTGTKTGGGAAAA	55,0-57,0	
H1 R	<i>puwH</i>	ATTCMCCACTGTAGCGACT	56,1-58,0	624
H2 F		AGTCGCTACAGTGGKGAAT	56,1-58,0	
H2 R	<i>puwH</i>	TCTGGGTCAAGRGGGAGATA	56,5-59,0	848

* vybrané PCR primery

Příloha č. 4: Seznam sinicových druhů ve vzorcích Norsko 2017. ¹: 0

Norsko 2017	<i>Symplocastrum muelleri</i>	<i>Gloeocapsopsis magma</i>	<i>Scytonema sp.</i>	<i>Stigonema sp.</i>	<i>Stigonema cf. hormoides</i>	<i>Schizothrix sp.</i>	<i>Schizothrix fuscescens</i>	<i>Stigonema cf. ocellatum</i>	<i>Hapalosiphon pumilus</i>	<i>Gleocapsa sp.</i>	<i>Rhabdoderma sp.</i>	<i>Chroococcus obliteratus</i>	<i>Gloeothece sp.</i>	<i>Chroococcus turgidus</i>	<i>Merismopedia angularis</i>	<i>Phormidium sp.</i>	<i>Stigonema (polyseriální)</i>	<i>Stigonema tomentosum</i>	<i>Scytonema cf. mirabile</i>	<i>Leptolyngbya sp.</i>	<i>Chlorogloea sp.</i>	<i>Calothrix sp.</i>	<i>Stigonema mirabile</i>
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
11	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
12	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
13	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
16	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0
17	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
19	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
21	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
22	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
24	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹ Přítomen

⁰ Nepřítomen

vzorky odeslané k osekvenování

Příloha č. 4: Alignment získaných sekvencí genu *puwF* z environmentálních vzorků ve srovnání se známými producenty PUW/MIN. 988 - CCALA 988; 993 - CCALA 993; 994 - CCALA 994; UTEX - UTEX B1613; UHCC - UHCC-0399; NIVA - NIVA-CYA 644; R - vzorky z planktonu rybníků; N - vzorky biofilmů z Norska, 17 - vzorky odebrané v roce 2017; 18 - vzorky odebrané v roce 2018. U vzorku 3R17 se sekvence získaná forward (F) a reverse (R) primerem lišily.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180
1. 988	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTCC	CATAGAGTTAACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAAGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGTCA	GCTTATTACATCGTTACAGCG												
2. 993	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTCC	CATAGAGTTAACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAAGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGTCA	GCTTATTACATCGTTACAGCG												
3. 994	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTCC	CATAGAGTTAACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAAGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGTCA	GCTTATTACATCGTTACAGCG												
4. UTEX	CCCTACAGCAGACCCCGCCAGCAATTCAG	CGGGTAGTAGTCGAGAGTTTCCCTTACC	TCTGGAATTGACCGAACTCAATCGCCTA	AGTCAGAAAGTTTGGGGTGACGCTGTT	CAAGTTTGAAGCAGCGTTTGTCACTT	ACTGCATCGTTACAGGTG												
5. UHCC	CCCCACGACAGACCCCGCCAGCAATTC	CGGGTAGTAGTCGAGAGTTTCCCTTACC	TCTGGAATTGACCGAACTCAATCGCCTA	AGTCAGAAAGTTTGGGGTGACGCTGTT	CAAGTTTGAAGCAGCGTTTGTCACTT	ACTGCATCGTTACAGGTG												
6. 10R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
7. 18R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
8. 21R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
9. 13R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
10. 12R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
11. 21R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
12. 15R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
13. 9R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
14. 16R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
15. 1R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
16. 5R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
17. 6R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
18. 7R17																		
19. 17R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
20. 14R18	RCCKACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
21. 4R17	ANCTACAGATAGACCCNGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
22. 11R17		CGTCAGCAKTCNNARNCCCTTC	CGWGTARCMGTCKNAGTTTCTATTACC															
23. 22R17																		
24. 32R17																		
25. 20R17																		
26. 19R17	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
27. 33R17	ACCTACAGGTTGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
28. 20R17	ACCCNAGATTGAAACCCGKTCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
29. 33R18																		
30. 14R17	ACCCACAGATAAACCCCGTCCGATGWCAG	AGAGGCGATCGCTTGGMKTCCATTTTGGG	AAAGAMTTGAGTGAACAACCTAAWSKTCT	AGTCARCAARTCRGGARTYACYTITA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
31. 19R18	ACCCACGATAAACCCCGTCCGCTGTACAG	AGAGGCGATCGCTTGGCTTCCATCTTGGG	AAAGACTTGAAGTGAACAACCTAAWTGTT	CTCAGYCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
32. 34R18	ACCCACGATAAACCCCGTCCGCTGTACAG	AGAGGCGATCGCTTGGCTTCCATCTTGGG	AAAGACTTGAAGTGAACAACCTAAWTGTT	CTCAGYCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
33. 26R18	ACCCACGATAAACCCCGTCCGCTGTACAG	AGAGGCGATCGCTTGGCTTCCATCTTGGG	AAAGACTTGAAGTGAACAACCTAAWTGTT	CTCAGYCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
34. 20R18	ACCCACGATAAACCCCGTCCGCTGTACAG	AGAGGCGATCGCTTGGCTTCCATCTTGGG	AAAGACTTGAAGTGAACAACCTAAWTGTT	CTCAGYCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
35. 15R18	ACCCACGATAAACCCCGTCCGCTGTACAG	AGAGGCGATCGCTTGGCTTCCATCTTGGG	AAAGACTTGAAGTGAACAACCTAAWTGTT	CTCAGYCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
36. 11R18	ACCCACGATAAACCCCGTCCGCTGTACAG	AGAGGCGATCGCTTGGCTTCCATCTTGGG	AAAGACTTGAAGTGAACAACCTAAWTGTT	CTCAGYCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
37. 8R17	ACCCACGATAAACCCCGTCCGCTGTACAG	AGAGGCGATCGCTTGGCTTCCATCTTGGG	AAAGACTTGAAGTGAACAACCTAAWTGTT	CTCAGYCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
38. 5R18	ACCCACGATAAACCCCGTCCGCTGTACAG	AGAGGCGATCGCTTGGCTTCCATCTTGGG	AAAGACTTGAAGTGAACAACCTAAWTGTT	CTCAGYCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
39. 17R18	ACCCACGATAAACCCCGTCCGCTGTACAG	AGAGGCGATCGCTTGGCTTCCATCTTGGG	AAAGACTTGAAGTGAACAACCTAAWTGTT	CTCAGYCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
40. 1R18	ACCCACGATAAACCCCGTCCGCTGTACAG	AGAGGCGATCGCTTGGCTTCCATCTTGGG	AAAGACTTGAAGTGAACAACCTAAWTGTT	CTCAGYCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
41. 16R18																		
42. NIVA	ACCAAACAGACAAACCGCTCCGCTGCTATT	CAAGGTAGCAGTATTTGAGAAGCGATTCCG	CCTAACTTGAAGTGAAGAACTTAAAGCTTT	CTCACAAGGTCGGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
43. 2N	ACCAAACAGACAAACCGCTCCGCTGCTATT	CAAGGTAGCAGTATTTGAGAAGCGATTCCG	CCTAACTTGAAGTGAAGAACTTAAAGCTTT	CTCACAAGGTCGGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
44. 4N	ACCAAACAGACAAACCGCTCCGCTGCTATT	CAAGGTAGCAGTATTTGAGAAGCGATTCCG	CCTAACTTGAAGTGAAGAACTTAAAGCTTT	CTCACAAGGTCGGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
45. 12N	ACCAAACAGACAAACCGCTCCGCTGCTATT	CAAGGTAGCAGTATTTGAGAAGCGATTCCG	CCTAACTTGAAGTGAAGAACTTAAAGCTTT	CTCACAAGGTCGGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
46. 7N	CCCCACTGACAAAACCGCTCCGCTGATGAC	TCAGTATTTGAGTGAACAACCTTAAATGTT	CTCAGCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG													
47. 8N																		
48. 18N	CCCCACTGACAAAACCGCTCCGCTGATGAC	TCAGTATTTGAGTGAACAACCTTAAATGTT	CTCAGCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG													
49. 19N	ACCTACAGATAGACCCCGTCCAGCAATTC	CGGGTAGCAGTCGAGAGTTTCTGCTTACC	CCTAGAATTGACAGAAAACTCAAACGCCTA	AGTCAGCAATCAGGAGTCACTCTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG												
50. 17N	ACCCTAYGACCCAGCCGCAAGAGTCAAACT	TCAGTATTTGAGTGAACAACCTTAAATGTT	CTCAGCAACAGTCGGGAACCTCTTA	TTTATGACTCTCGAAGCAGCGTTTGT	CACTTATTACATCGTTACAGCG													
51. 16N																		
52. 1N	SCCAAACSGACTATCCCCTCCAGCCAYTCA	AACTTAACTTAACTAACTAACTAACTAACT	AACTAACTAACTAACTAACTAACTAACT	AACTAACTAACTAACTAACTAACTAACT	AACTAACTAACTAACTAACTAACTAACT	AACTAACTAACTAACTAACTAACTAACT												

