

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Ústav akvakultury a ochrany vod

Bakalářská práce

Rychlost růstu dominantních rybníčních sinic

Autor: Petra Syslová

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Otakar Strunecký, PhD

Konzultant bakalářské práce: RNDr. David Kaftan, PhD

Studijní program a obor: B1601, Ekologie a životní prostředí, Ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: Třetí

České Budějovice, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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 dne:

Podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Mgr. Otakaru Struneckému, PhD za odborné vedení při zpracování práce, za pomoc při shromažďování výsledků, za ochotu při konzultacích a za poskytování rad, námětů a připomínek. Dále bych chtěla poděkovat svým blízkým a spolužačkám, které mě neustále při práci povzbuzovali.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Petra SYSLOVÁ
Osobní číslo: V17B050P
Studijní program: B1601 Ekologie a ochrana prostředí
Studijní obor: Ochrana vod
Téma práce: Rychlost růstu dominantních rybníčních sinic
Zadávací katedra: Ústav akvakultury a ochrany vod

Zásady pro vypracování

Cílem práce je stanovit míru růstu neteoretických sinic rybníčního fytoplanktonu. Výsledky budou sloužit ke stanovení růstového potenciálu sinic v rybnících a studentka se jejich pomocí pokusí vysvětlit pozorovanou abundanci sinic v jarním a letním období. Pro růstové experimenty budou použity kmeny rodů *Planktothrix*, *Arthrospira*, *Microcystis* nebo *Cyanobium*. Na již kultivovaných kmenech bude studentka měřit přírůstek biomasy za různých podmínek. Zaměří se primárně na rychlost růstu za různých kultivačních teplot, gradientu koncentrace fosforu v médiu a v gradientu osvětlení. Alternativně bude měřit primární produkci jako produkci kyslíku při různých teplotách a konstantního osvětlení. Z naměřených hodnot absorbance a hmotnosti sušiny studovaných kmenů budou sestrojeny růstové křivky a stanovena světelná a teplotní optima pro studované dominantní druhy vodních květů.

Získané výsledky pak studentka dále vyhodnotí pomocí počítačového SW (např. Statistica, Surfer, MS Office) a srovná s informacemi z dostupné literatury. Výsledky pomohou vytvořit doporučení pro další management rybníků, např. aeraci nebo dokrmování rybií obsádky.

Rozsah pracovní zprávy: 30-50 stran textu
Rozsah grafických prací: 10-30 tabulek a grafů
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- Alcaman ME, Alcorta J, Bergman B, Vasquez M, Polz M, Diez B (2017) Physiological and gene expression responses to nitrogen regimes and temperatures in *Mastigocladus* sp. strain CHP1, a predominant thermotolerant cyanobacterium of hot springs. *Syst Appl Microbiol* 40:102-113. doi:10.1016/j.syapm.2016.11.007
- Allewalt JP, Bateson MM, Revsbech NP, Slack K, Ward DM (2006) Effect of temperature and light on growth of and photosynthesis by *Synechococcus* isolates typical of those predominating in the octopus spring microbial mat community of Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* 72:544-550. doi:10.1128/AEM.72.1.544-550.2006
- Hindák F, Kviderová J, Lukavský J (2013) Growth characteristics of selected thermophilic strains of cyanobacteria using crossed gradients of temperature and light. *Biologia* 68. doi:10.2478/s11756-013-0215-1
- Inoue N, Taira Y, Emi T, Yamane Y, Kashino Y, Koike H, Satoh K (2001) Acclimation to the growth temperature and the high-temperature effects on photosystem II and plasma membranes in a mesophilic cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol* 42:1140-1148. doi:10.1093/pcp/pce147
- Leao PN, Engene N, Antunes A, Gerwick WH, Vasconcelos V (2012) The chemical ecology of cyanobacteria. *Nat Prod Rep* 29:372-391. doi:10.1039/c2np00075j
- Lürling M, Eshetu F, Faassen EJ, Kosten S, Huszar VLM (2013) Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biol* 58:552-559. doi:10.1111/j.1365-2427.2012.02866.x
- Romo S, Becares E (1992) Preservation of Filamentous Cyanobacteria Cultures (*Pseudanabaena-Galeata* Bocher and *Geitlerinema-Amphibium* (Ag Ex Gom) Anagn under Low-Temperatures. *Journal of Microbiological Methods* 16:85-89.
- Ryan CN, Thomas MK, Litchman E (2017) The effects of phosphorus and temperature on the competitive success of an invasive cyanobacterium. *Aquatic Ecology* 51:463-472. doi:10.1007/s10452-017-9629-0
- Sabour B, Sbiyyaa B, Loudiki M, Oudra B, Belkoura M, Vasconcelos V (2009) Effect of light and temperature on the population dynamics of two toxic

bloom forming Cyanobacteria – *Microcystis ichthyoblabe* and *Anabaena aphanizomenoides*. Chem Ecol 25:277-284. doi:10.1080/02757540903062525
Whitton BA (2012) Ecology of cyanobacteria II : their diversity in space and time. Springer, New York
Whitton BA, Potts M (2000) The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. Kluwer Academic Publishers Netherlands:632.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Otakar Strunecký, Ph.D.**
Ústav akvakultury a ochrany vod
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. David Kaftan, Ph.D.**
Katedra experimentální biologie rostlin
Datum zadání bakalářské práce: **11. ledna 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. května 2020**

V Českých Budějovicích dne 25. února 2019


prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
389 25 Vodňany (2)


doc. Ing. Jan Mráz, Ph.D.
ředitel

Obsah

1	Úvod	8
2	Literární přehled	9
2.1	<i>Obecně o sinicích</i>	9
2.2	<i>Kultivační systémy</i>	10
2.2.1	Kontinuální kultivace	10
2.2.2	Statická kultivace	12
2.3	<i>Růstová rychlost</i>	13
2.4	<i>Růstová křivka</i>	15
2.5	<i>Růst sinic ovlivňují</i>	17
2.5.1	Světlo	17
2.5.2	Fosfor	20
2.5.3	Dusík	21
2.5.4	Teplota	22
2.6	<i>Kompetice o živiny</i>	23
3	Materiál a metodika	25
3.1	<i>Vzorky</i>	25
3.2	<i>Příprava média</i>	25
3.3	<i>Kultivace</i>	28
3.4	<i>Měření</i>	29
4	Výsledky	31
4.1	<i>První část pokusu</i>	31
4.2	<i>Druhá část pokusu</i>	34
4.3	<i>Třetí část pokusu</i>	36
5	Diskuze	39
6	Závěr	43
7	Seznam použité literatury	44
8	Seznam příloh	49

9	Přílohy	51
10	Abstrakt	62
11	Abstract	63

1 Úvod

Sinice si svoji pozornost získaly díky negativním účinkům, které způsobují ve vodních dílech. Jejich značně hustá populace dokáže zhoršit kvalitu vody rozsáhlým růstem. S tímto stavem souvisí pojem eutrofizace neboli nadbytečné množství živin. Do vodních děl se živiny, především ve formě dusíku a fosforu, dostávají nejvíce přítokem. A protože dusík a fosfor, kterých je ve vodních dílech dostatek, jsou pro sinice nejdůležitější potravní složkou, vzniká obrovský nárůst sinic. Ovšem sinice mají i pozitivní vlastnosti. V budoucnosti se mohou například využít na výrobu biopaliva.

Především druhy *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* a *Planktothrix* vytvářejí podle stupně eutrofizace na hladině vodní květy, které snižují průchod světla do větších hloubek. Sinice uvolňují toxické látky, z nichž nejnebezpečnější jsou anatoxiny, které produkuje *Anabaena flos-aquae* (Kalina, 1994). Přítomnost sinic způsobuje snížené koncentrace kyslíku během noci díky jejich dýchání a rozkladu jejich biomasy, při které dochází k hnilobným procesům. Ve vodních dílech tak dochází ke zhoršení podmínek pro ostatní živé organismy a v nejhorším případech může docházet k jejich úhynům.

První náznaky přítomnosti vodních květů se v našich podmínkách začínají objevovat koncem jara. Sinice dosahují nejvyšší koncentrace během letního období. Jsou velmi odolné a schopné se adaptovat na nové podmínky, a tak je způsob jejich odstranění složitější.

Dle stavby stélky se sinice dělí do čtyř řádů. Řád *Chroococcales* se vyznačuje jednobuněčnými sinicemi s kulovitými, elipsoidními nebo vejčitými buňkami. Řadí se sem např. rody *Synechococcus* a *Chroococciopsis*. Do řádu *Oscillatoriales* se řadí vláknité, nevětvené sinice bez heterocytů, např. *Limnothrix redekei*, *Trichodesmium* a *Arthrospira*. Řád *Nostocales* má vlákna nevětvená, izopolární, heteropolární, přímá nebo zprohýbaná. Řadí se sem rod *Nodularia* či *Nostoc*. Posledním řádem je řád *Stigonematales*, do kterého jsou řazeny sinice s vlákny s jednou nebo několika řadami buněk, např. *Mastigocladus laminosus*.

Cílem mé práce bylo stanovit míru růstu sinic z rybníků tak, aby výsledky sloužily ke stanovení jejich růstového potenciálu v rybnících. Pro růstový experiment byly použity již kultivované kmeny *Cyanobium gracile* A1 a *Synechocystis* sp. PCC7509. Zaměřila jsem se na hodnoty růstu a gradient koncentrace fosforu v médiu.

2 Literární přehled

2.1 Obecně o sinicích

Sinice neboli cyanobakterie jsou prokaryotní mikroorganismy (Šejnohová a Maršálek, 2005), které patří mezi evolučně nejstarší organismy. Byly objeveny mikrofosílie, jejichž stáří se odhaduje na 3,5 miliardy let. Důvodem jejich evoluční vytrvalosti je úspěšná kombinace účinných metabolických cest. Patří do skupiny organismů, kteří mají schopnost kyslíkové fotosyntézy, umějí současně dýchat a některé druhy zdařile fixují dusík. Sinice tak dokáží přežít a žít v široké škále podmínek prostředí (Vermaas, 2001).

Z hlediska morfologie jsou sinice velmi různorodé. Vyskytují se buď ve formě vláknité, např. *Anabaena* nebo jako jednobuněčné (kokální), např. *Chroococcus* (Stiborová, 2017). Vláknité sinice mají vnitřní strukturu podobnou jednobuněčným formám, rozdílem je pouze v uspořádání thylakoidů v buňce. Buňky jsou uspořádány do tzv. trichomů vytvářející jednu funkční skupinu. Okolní buňky ve vlákně jsou spojeny póry a drobnými kanálky tzv. mikroplassmodesmaty, které jsou uloženy v buněčných stěnách. Jednobuněčné sinice mají kulovitý, tyčovitý, oválný nebo nepravidelný tvar. Nevytvářejí pravá vlákna, kde jsou propojeny sousední buňky, ale shlukují se do pseudovláken (Whitton a Potts, 2002).

Nejčastěji se ve sladkovodních vodách vyskytuje rod *Microcystis* a vláknité typy *Anabaena*, *Planktothrix* nebo *Aphanizomenon* (Šejnohová a Maršálek, 2005). *Microcystis* ve vodách dominuje v období od června do září, kdežto sinice rodu *Planktothrix* dominují od září do listopadu (Kroupová, 2015). *Aphanizomenon* dokáže kvést po celý rok, protože jeho optimální teplota je od 16 do 22° C (Degerholm a kol., 2006).

Sinice dokážou dosáhnout velmi početných populací, i když byly původně ve vodním sloupci přítomny v nízké koncentraci. Je to důsledkem vývoje plovoucích květů, které soustředí všechny vznášející se buňky do tenké hladinové vrstvy (Huisman a Hulot, 2005). Aby mohl vzniknout sinicový květ, je potřeba dlouhý retenční čas vody, při kterém je nízká rychlost proplachování, tzn. měsíce zdržení vody (Hudnell, 2008). Proto ve vodě s krátkými retenčními časy sinice nekvětou (Bartram a Chorus, 1999).

Hlavním determinantem vývoje povrchových květů sinic je především vertikální míchání (Huisman a Hulot, 2005), jelikož homogenizuje distribuci buněk, teplo, metabolity a usnadňuje přenos plynů. Taktéž je důležitý určitý stupeň turbulence,

zejména při produkci, aby se podpořila cirkulace sinicových buněk z temnoty do světelné zóny (Mata a kol., 2010).

Sinice vyžadují světlo pro fotosyntézu, ovšem jejich buněčné složky mají vyšší hustotou, než je voda. Aby se sinice mohly zachytávat ve vodním sloupci co nejvíce světla, využívají plyné váčky, tzv. aerotopy. (Huisman a Hulot, 2005). Aerotopy mají válcovitou sktrukturu a jsou naplněné plyny, které umožňují regulaci vztlaku. Jejich funkcí je umožnit sinicím, upravit si vertikální polohu ve vodním sloupci. Sinice využívají environmentální podněty pro nalezení optimální polohy, vhodného místa pro přežití a růst. Takovým podmětem může být např. již zmíněné světlo (Bartram a Chorus, 1999).

2.2 Kultivační systémy

Při kultivaci jsou sinice ovlivňovány prostředím, jelikož podmínky prostředí jsou pro rychlost dělení důležitým faktorem. Vzniká tak systém, který je buď otevřený, tzv. kontinuální kultivace, nebo uzavřený, tzv. statická kultivace (Doležálková, 2010).

2.2.1 Kontinuální kultivace

2.2.1.1 Chemostat

Chemostat je bioreaktor, ve kterém probíhají biochemické a biologické procesy. Jedná o kultivační nádobu mající jeden odtok a jeden přítok, lze vidět na obr. 1. Odtok slouží pro odvod buněk, vyčerpaného média a odpadních látek (Roubalová, 2018). Bývá kontrolován pomocí sifónu (Hájková, 2007). Přítok je využíván pro přísun média ze zásobníku. V chemostatu je zaručen stálý kultivační objem kontinuálním přísunem čerstvého média a současného odtoku média obohaceného o živé buňky a buněčný odpad (Roubalová, 2018).

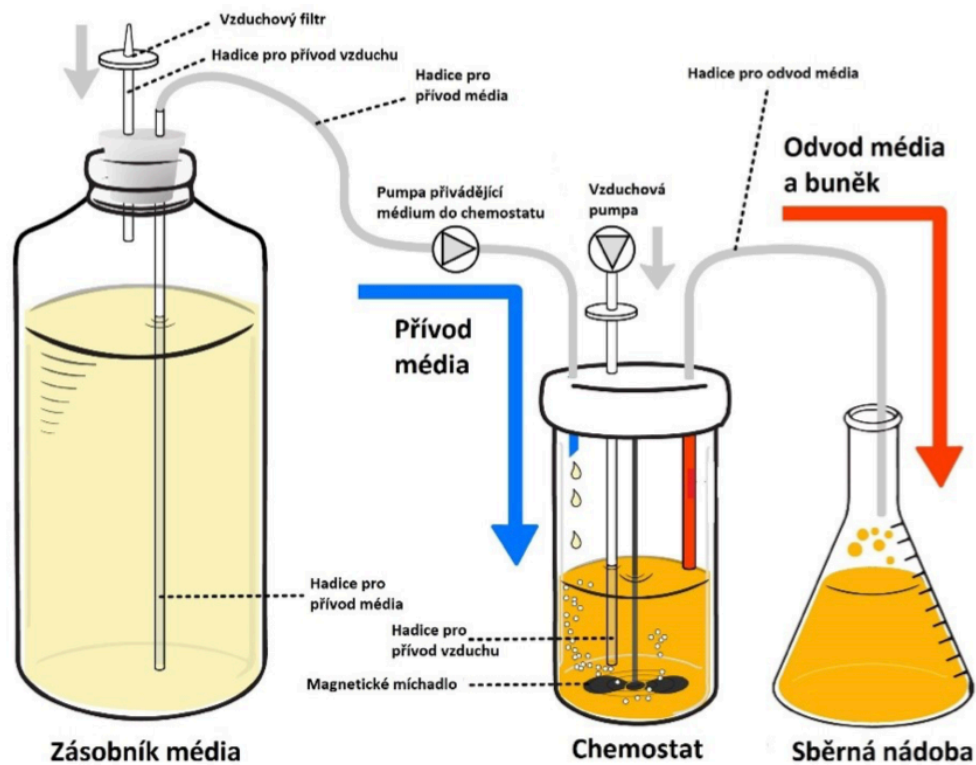
Chemostat má různá zařízení pro aeraci kultury a ochranu před kontaminací. Rychlost buněčného dělení může být měněna úpravou rychlosti odtoku. Ovšem rovnováha v chemostatu bude docílena v momentě, kdy počet nově vzniklých buněk dělením bude odpovídat počtu buněk v odtoku. Pokud dojde ke změně rychlosti průtoku, změní se koncentrace živin v samotném chemostatu a tak i rychlost množení buněk (Hájková, 2007).

Pro výpočet rychlosti růstu biomasy se u chemostatu využívá Monodovy rovnice. Ta popisuje pokles růstové rychlosti s poklesem koncentrace substrátu (Hanika, 1997).

Znění Monodovy rovnice:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}$$

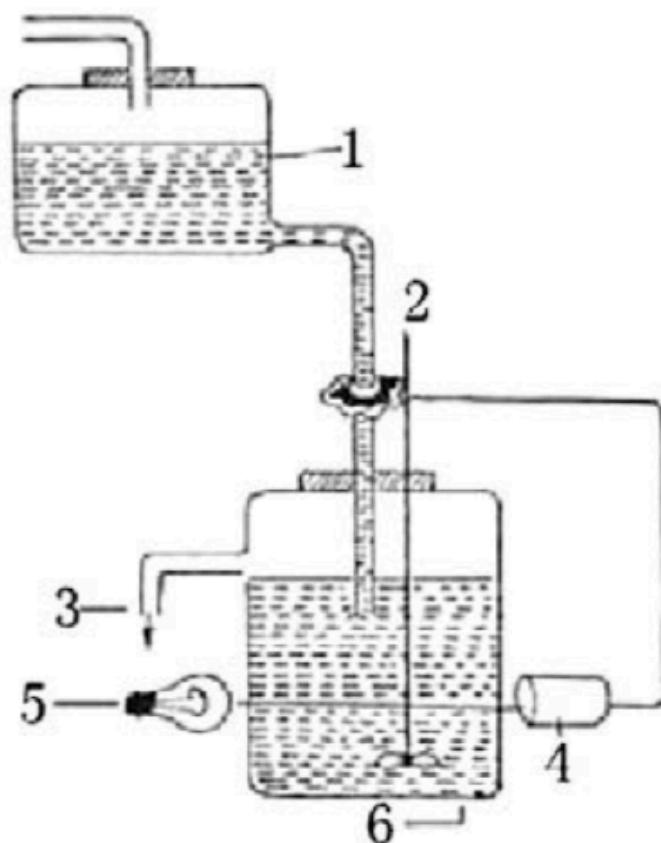
kde μ je specifická růstová rychlost, μ_{max} je nejvyšší specifická rychlost růstu, S je koncentrace substrátu, K_S je Monodova konstanta. Pro danou buňku a dané médium je μ veličina proměnná, která je závislá na koncentraci živin (Monod., 1949).



Obr. 1: Schématické znázornění chemostatu (Roubalová, 2018).

2.2.1.2 Turbidostat

Turbidostat je zařízení udržující konstantní turbiditu kultury pomocí fotobuňky, která reguluje přítok živin negativní zpětnou vazbou. Rychlost přítoku čerstvého média je řízena regulačním čínidlem, kterým je rychlost růstu buněk (Hájková, 2007). Pokud koncentrace rostoucích buněk překročí nastavenou koncentraci, otevře se přítok čerstvého média a výpust pro odtok buněk, viz obr. 2. Aktuální koncentrace buněk se začne snižovat až na nastavenou hodnotu, na které se přítok i odtok zastaví (Kaprálek, 1986). Pokud by nastal pokles buněk na spodní nastavenou hranici, dochází k zastavení nebo zpomalení průtoku. Buňky tak následně narůstají na původní hustotu. Živiny jsou v nadbytečném množství a žádná není limitující (Hájková, 2007).

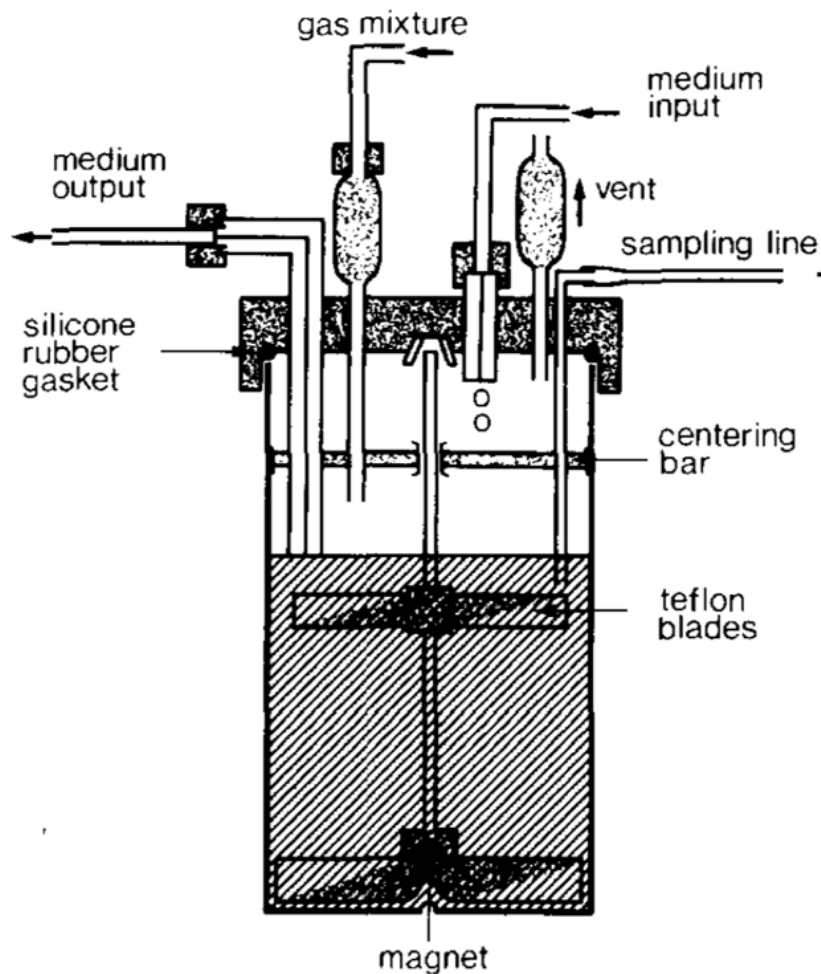


Obr. 2: Schématické znázornění turbidostatu. (1) Zásobník sterilního média, (2) ventil regulující tok média, (3) výpust pro použité médium, (4) fotočlánek, (5) zdroj světla, (6) turbidostat (Zhao, 2010).

2.2.2 Statická kultivace

2.2.2.1 Cytostat

Cytostat je uzavřený systém, ve kterém jsou buňky monitorovány a řízeny automatickým průtokovým cytometrem. Cytometr pracuje na základě stanovení koncentrace buněk a distribuci vlastností jednotlivých buněk rostoucí buněčné populace. Kultivační médium má přesně definované složení, protože produkty buněčného růstu nejsou přítomny ve významném množství (Kacmar a kol., 2006). Vlastnosti a složení prostředí v cytostatu se mění činností bakterií. Hlavními faktory limitující růst buněk jsou fyzikálně-chemické změny, vyčerpání živin a hromadění odpadních metabolitů (Sedlářová, 2010). Na obr. 3 je popsán cytostat s možností přidání plyné směsi bez cytometru.



Obr. 3: Schéma cytostatu s plynnou směsí (Groth, S. F. D. S., 1983).

2.3 Růstová rychlost

Růst populace je definován jako zvyšování počtu jednotlivých mikroorganismů. Ve statické kultivaci roste populace sinic exponenciálně jen několik málo generací. Brzy nastává stacionární fáze pro nedostatek živin. Oproti tomu v kontinuální kultivaci s nepřetržitým přísunem živin si populace sinic exponenciální růst udrží do doby dle potřeby výzkumu. Dochází tak k manipulaci s růstem populace. Růst se může zpomalit či zastavit dle potřeby (Pazlarová, 2018).

Pro měření rychlosti růstu se v laboratoři využívá inokulace. Její princip spočívá v přenosu malého množství buněk do nového kultivačního média, to vede k růstu a zvýšení koncentrace buněk. Koncentraci buněk lze měřit více způsoby, např. se počítá počet buněk, stanovuje hmotnost sušiny nebo celkový objem buněk. Míra zvýšení

koncentrace buněk se vyjadřuje měrnou mírou růstu nebo jako μ , které se vypočítá podle vzorce:

$$\mu = \frac{1}{x} \times \frac{dx}{dt}$$

kde x představuje koncentraci buněk (Vonshak, 1985). Tedy μ je definováno jako množství buněk, které jsou vytvořeny jednotkou kultury za jednotku času, značeno d^{-1} (Klaban, 2005). Pro srovnání mikrobiálního růstu s využitím substrátu se nejčastěji využívá již zmíněná Monodova rovnice (Monod., 1949).

Pokud se μ rovná specifické míře úmrtnosti, nazývá se tento stav kritickou dostupností živin, značeno jako R^* . K převýšení růstu a zvýšení populace sinic dochází v okamžiku, kdy dostupnost živin překročí úroveň R^* . Rostoucí populace spotřebovává stále více živin, jenomže jejich dostupnost se snižuje až jsou úplně vyčerpány na úroveň R^* . V tuto chvíli se populace sinic stabilizuje a specifická růstová rychlost se rovná specifické míře úmrtnosti. V homogenním prostředí vítězí ve vzájemné konkurenci druh s nejnižší hodnotou R^* . Tedy druh, který dokáže přežít na nejnižší úrovni. R^* pravidlo platí pouze za ideálních podmínek. Odchylky mohou být způsobeny např. nedokonalým promícháním vodního sloupce (Huisman a Hulot, 2005).

Svoji biomasu dokážou sinice zdvojnásobit během 24 hodin nebo v průběhu exponenciální fáze za 3,5 hodiny (Mata a kol, 2010). Jak bylo řečeno výše, růstem populace se rozumí zvyšování počtu buněk sinic způsobené jejich množením. Tedy dochází k dělení mateřské buňky na dvě buňky dceřiné neboli k buněčnému cyklu (Doležálková, 2010). Délku trvání buněčného cyklu označuje pojem generační čas (Reynolds, 2006). Např. sinice *Synechococcus* má generační čas 5 až 6 hodin a lze jej řídit změnou teploty nebo změnou světelného toku (Kondo a kol. 1997).

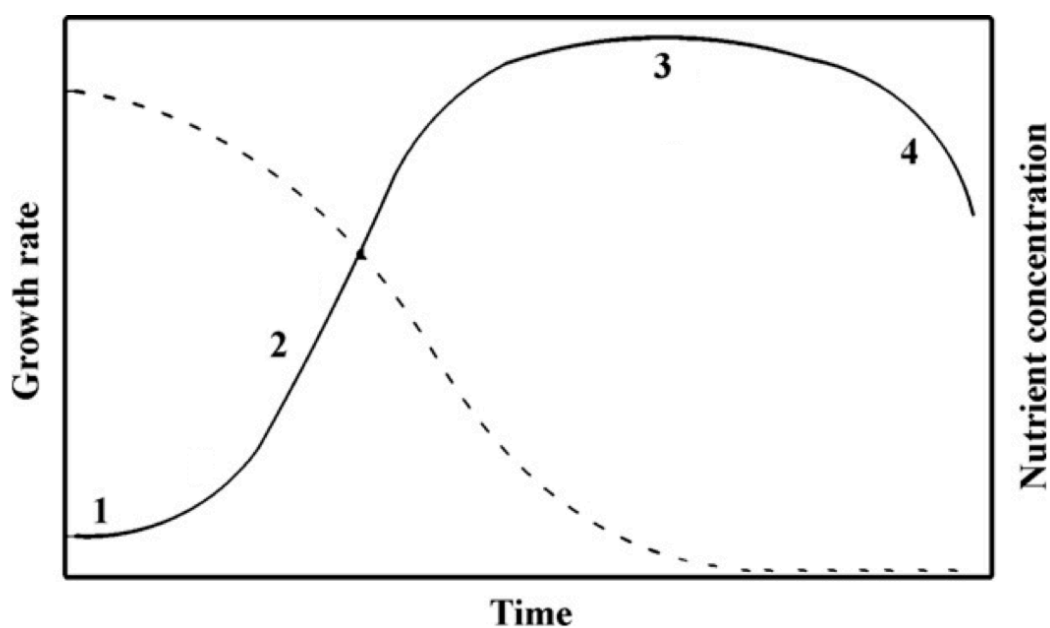
Mnoho druhů řas má vyšší μ než sinice. Při teplotě 20 °C a nasycení světlem dosahují planktonní sinice 0,3 – 1,4 zdvojnásobení za den. Zatímco rozsivky dosahují 0,8 – 1,9 zdvojnásobení za den (Bartram a Chorus, 1999). Pokud se teplota zvýší o 10 °C, zrychlí se μ u sinic na 1 – 4 za den. Ale např. u *Microcystis aeruginosa* se μ pohybuje od 4 do 9 za den, což je ze všech druhů fytoplanktonu nejvyšší hodnota (Berg a Sutula, 2015). Sinice rodu *Cyanobium sp.* mají μ 1,16 d^{-1} (Yamagishi a kol., 2016). Rod *Planktothrix rubescens* vykazuje μ 0,123 d^{-1} (Bright a Walsby, 2000). V tab. 1 je uvedena závislost μ na teplotě, které je popsána v této práci později.

Tab. 1: Růst rodu *Oscillatoria agardhii* při různých teplotách. Lze vyčíst, že pro *Oscillatoria agardhii* je optimální teplota 23 – 25 °C (Ahlgren, 1978).

Assay no	Reactor no	Temp. (°C)	Days with exponential growth	$\hat{\mu}$ (d ⁻¹)	n	r
5b	1	24–25	2–6	0.561	5	0.9979
7	1	27–28	1–4	0.591	6	0.9998
	2	27–28	1–3	0.491	4	0.9995
8	1	22–23	1–4	0.567	6	0.9987
9	1	12–13	1–8	0.277	7	0.9989
	2	12–13	4–8	0.254	4	0.9996
10	1	16–17	1–4	0.450	4	0.9986
	2	16–17	0–5	0.440	6	0.9991
11	1	20–21	2–4	0.543	3	1.0000
	2	20–21	2–4	0.534	3	1.0000

2.4 Růstová křivka

Sinice pěstované ve statické kultivaci, do které nejsou přidávány žádné živiny a odpadní produkty nejsou odstraněny, se řídí opakovatelným růstovým vzorcem označovaný jako růstová křivka (Parker a kol., 2016). Obr. 4 zobrazuje růstovou křivku sinic (plná čára), na které lze vypočítat čtyři definované růstové fáze, a křivku znázorňující vyčerpání živin během stacionární fáze a dál.



Obr. 4.: Znárodnění růstové rychlosti sinic ve vsádkové kultuře (plná čára) a koncentrace živin (přerušovaná čára) (Mata a kol, 2010).

Fáze první je lag fáze, fyziologicky označována jako přechodné období. Je definována jako interval mezi inokulací sinicové kultury a dobou počátku její maximální růstové rychlosti. Buňky se přizpůsobují svému novému prostředí a jejich počet se nemění. Zvětšují se a jsou metabolicky aktivní, syntetizují proteiny potřebné k růstu v médiu. Doba trvání lag fáze závisí na druhu a genetickém složení sinic, složení média a velikosti původního inokula (Robinson a kol., 1998).

Druhou fází je fáze exponenciálního růstu, známá také jako logaritmická fáze nebo jako geometrický růst populace (Reece a kol, 2011). Rychlost dělení je v této fázi konstantní (Doležálková, 2010). Buňky se aktivně dělí binárním štěpením a jejich počet exponenciálně roste (Mata a kol, 2010), tento proces lze vyjádřit vzorcem:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

kde x představuje koncentraci buněk a t čas, hodnotou μ je počet buněk za jednotku času. Střední doba zdvojení (t_d) nebo též doba generování (g) lze stanovit takto:

$$g = t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \text{ (Vonshak, 1985).}$$

Čím je doba zdvojení kratší, tím je specifická růstová rychlost větší (Huesemann a kol., 2003). Označením μ_{\max} se označuje maximální rychlost růstu pro daný druh. Rovnice pro exponenciální růst populace je

$$\mu_{\max} N = \frac{dN}{dt}$$

kde N představuje velikost populace a t představuje časový interval. Větší populace má více narození a úmrtí než populace menší, které rostou stejnou rychlostí (Reece a kol, 2011). V této fázi může dojít k předčasnému zhroucení populace (Mata a kol, 2010).

Třetí fází je stacionární růstová fáze. Počet buněk je v populaci konstantní, tzn. že počet nových buněk vytvořených dělením buněk je roven počtu umírajících buněk. Hromadí se odpadní produkty a živiny se postupně úplně spotřebují. Postupné odbourávání kyslíku začíná omezovat růst aerobních buněk. Tyto nepříznivé podmínky zpomalují, a nakonec zastavují růst populace. Buňky přecházejí na metodu přežití (Parker a kol., 2016). Populace buněk se rozdělí na subpopulace a jednotlivé buňky se mohou nepříznivým podmínkám prostředí přizpůsobovat rozdílně. Může dojít např. k adaptivní mutanogenezi nebo opětovné iniciaci růstu. Celá populace má tak zvýšené riziko přežití limitujících podmínek (Motlová, 2009).

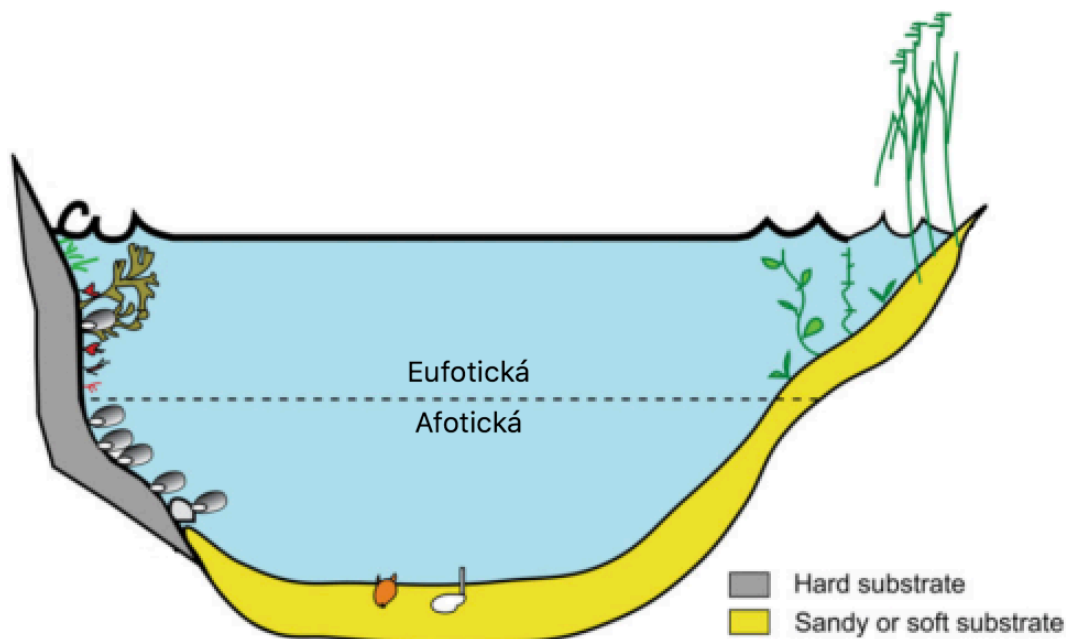
Čtvrtou a poslední fází je fáze poklesu nebo také označována jako fáze úmrtí či útlumu. V kultivačním médiu se hromadí toxický odpad a všechny živiny jsou vyčerpány. Úmrtnost buněk se zvětšuje. Brzy počet umírajících buněk převyšuje počet dělících se buněk, což má za následek exponenciální pokles počtu buněk (Parker a kol., 2016).

2.5 Růst sinic ovlivňují

Růst sinic ovlivňují abiotické faktory, jako je světlo, koncentrace živin, teplota, O_2 , CO_2 , pH, i faktory biotické, kam se řadí patogeny a konkurence s jinými sinicemi. Provozní faktory, např. hloubka, se rovněž podílejí na růstu sinic (Mata a kol., 2010).

2.5.1 Světlo

Světlo je hlavním zdrojem energie ve vodních systémech a je variabilní v čase i prostoru (Litchman, 2003). Liší se v dané hloubce množstvím i kvalitou (Whitton, 2012). S rostoucí hloubkou se množství světla zmenšuje. Vznikají tak dvě zóny, viz obr. 5. Horní vrstva s převládající fotosyntetickou produkcí, nazývaná jako eufotická zóna a spodní afotická zóna, ve které převládá rozklad organické hmoty (Kalff, 2002).



Obr. 5: Rozdělení vodního díla na zónu eufotickou a afotickou. Upraveno (Snoeijs-Leijonmalm a kol., 2017).

Sinice se řadí mezi organismy, které jsou schopny oxygení fotosyntetické reakce. Chytají energii ze slunečního záření, kterou následně využívají k příjmu živin a buněčnému metabolismu podporující růst buněk (Whitton, 2012). K zachytávání světla

sinice používají fytsyntetické pigmenty. V thylakoidech mají uloženy Chlorofyl *a* a fykobilizomy, které obsahují dva hlavní pigmenty: fykocyanin a allofykocyanin (Pisciotta a kol., 2010).

Fotosyntetická reakce je u sinic primárně poháněna červeným a modrým světlem. Pod modrým světlem je fotosynteza účinnější než pod světlem červeným, protože modré světlo má nejvíce energie (Pisciotta a kol., 2010). Absorpci světla vodou ovlivňuje jeho vlnová délka a je v pořadí: červená a oranžová > fialová > žlutá, zelená a modrá. Spektrum se mění s větší hloubkou (Boyd, 2019). Sinice jsou schopné tzv. chromatické adaptace, kdy rychle reagují na změnu spektrálního složení světla. Proto dokážou přežít i v podmínkách, kde by ostatní organismy nepřežily (Štangelová, 2013).

2.5.1.1 Turbidita

Zákal vody způsobují organické nebo anorganické látky, tudíž lze zákal definovat jako snížení průhlednosti vody nerozpuštěnými látkami. Nejčastěji je zákal vody způsobován jílovými materiály, hydratovanými oxidy kovů nebo planktonem (Janča, 2013). V zakalených vodách dochází ke snížení fotosyntetické činnosti, absorbování všech vlnových délek světla a k omezení růstu rostlin ve vodním sloupci. Pro měření zákalu v přírodních vodách se využívá měření hloubky vymizením Secchiho disku o průměru 20 cm nebo pomocí nefelometrie, při které se stanovuje množství světla odraženého pod úhlem 90 ° od vzorku vody (Boyd, 2019).

Pojmem turbidita se označují stupně zákalu. Turbiditu lze měřit pomocí fotometru nebo spektrofotometrem. Na vlastnostech absorbujícího prostředí je závislost intenzity prošlého záření exponenciální:

$$I_t = I_0 \exp(-\tau L)$$

kde I_t = intenzita prošlého záření, I_0 = intenzita světelného zdroje, τ = turbiditní koeficient, L = světelná dráha kyvetou (Štern, 2006).

2.5.1.2 Vliv trofie na průchod světla vodním sloupcem

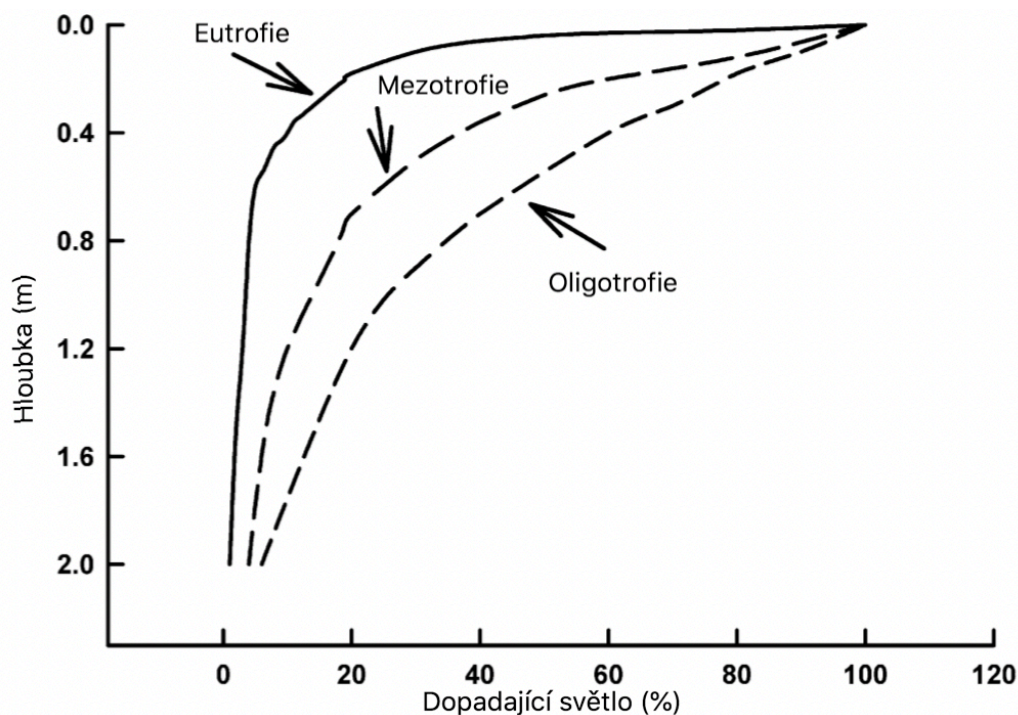
Stav hydrochemického režimu vodního díla charakterizuje pojem trofie, též známá jako úživnost. Mezi faktory ovlivňující úživnost vodního díla se řadí množství živin, charakter lokality a management vodního ekosystému. Vody jezerní lze dělit dle přirozené produkce a dle obsahu živin. Dle obsahu živin se rozlišují druhy vod oligotrofní, mezotrofní, eutrofní a hypertrofní vody (Strnadová, 2015). Klíčovými parametry při hodnocení úrovně trofie jsou celkový fosfor (P), chlorofyl (Chl)

a průhlednost vody. V tab. 2 jsou uvedeny jednotlivé vztahy mezi indexem trofického stavu (TSI), Chl, P, hloubkou měřenou Secchiho diskem (SD) a trofickou třídou.

Tab. 2: Klasifikace trofických úrovní (Carlson a Simpson, 1996).

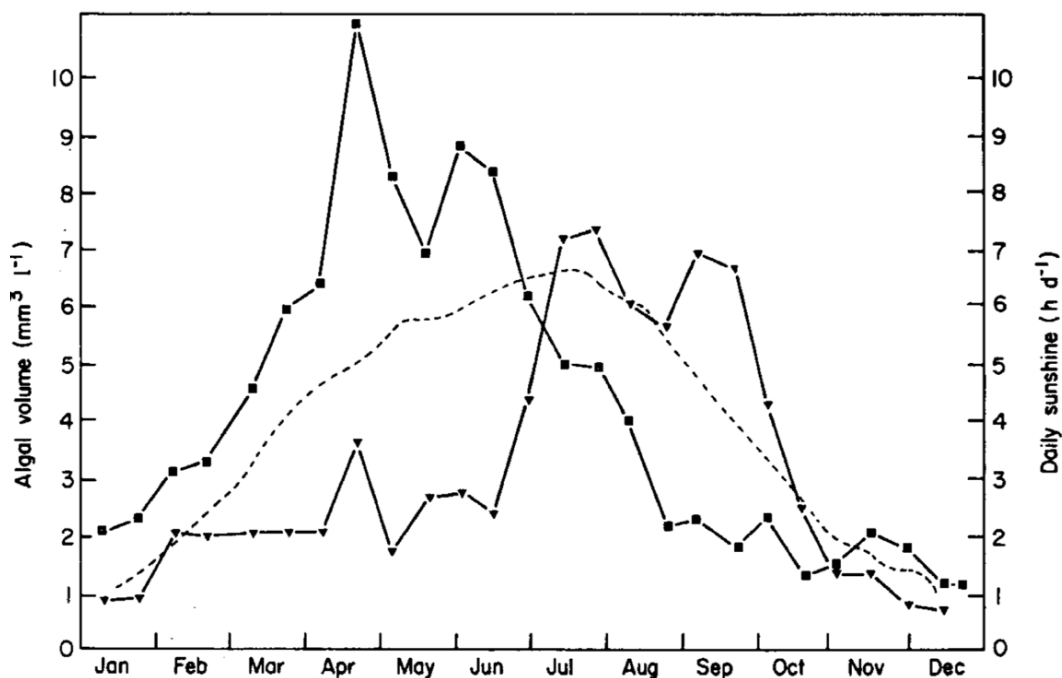
TSI	Chl	P	SD	Trophic Class
< 30–40	0–2.6	0–12	> 8–4	Oligotrophic
40–50	2.6–20	12–24	4–2	Mesotrophic
50–70	20–56	24–96	2–0.5	Eutrophic
70–100+	56–155+	96–384+	0.5– < 0.25	Hypereutrophic

Rychlost růstu sinic je závislá na jejich hustotě, protože snižuje průchod světla do vodního sloupce. Dochází tak k vzájemnému zastínění (Moreno a kol., 2003). Na obr. 6 jsou zobrazeny tři rybníky, každý s jinou trofíí. Lze říci, že v eutrofním rybníce s hustou populací sinic proniká světlo jen do několika desítek centimetrů pod hladinu, kdežto v oligotrofním rybníce proniká světlo až na samotné dno. Tudíž můžeme předpokládat, že v eutrofním rybníce bude hustá populace sinic a díky nedostatku světla ostatní organismy vymřou (Boyd, 2019).



Obr. 6: Průnik světla do vodních útvarů s různým množstvím planktonu. Upraveno, (Boyd, 2019).

Existuje optimální hodnota buněčné populace neboli optimální hustota buněk pro dané množství světla, které zajišťuje vyšší rychlost produkce, tudíž dochází k nejvyšší fotosyntetické činnosti. Pro zjištění optimální hustoty buněk se využívá analýza hustoty buněk na produktivitu biomasy (Moreno a kol., 2003). Na obr. 7 je zaznamenán průměrný rozvoj dvou kultur, *Limnothrix redekei* a *Planktothrix agardhii*, s průměrnou denní dobou slunečního svitu v období 1970 – 1974. *Limnothrix redekei* vykazuje nejvyšší rozvoj v dubnu, zatímco *Planktothrix agardhii* vykazuje nejvyšší rozvoj v červenci, který je měsícem s nejvíce slunečních hodin (Foy a kol. 1976).



Obr. 7: Průměrné sezónní změny *Planktothrix agardhii* (▼) a *Limnothrix redekei* (■) s průměrnými denními hodinami slunečního svitu (---) zaznamenané v jezeru Lough Neagh v období 1970-1974 (Foy a kol. 1976).

2.5.2 Fosfor

Růst sinic je ve vodních ekosystémech omezen množstvím P (Whitton, 2012). P je biogenní prvek, který společně s dusíkem a uhlíkem ovlivňuje primární produkce sinic. Poměr těchto prvků C:N:P potřebný pro optimální růst organismů je 106:16:1, nicméně je P limitujícím a klíčovým prvkem pro růst sinic. Čím je koncentrace fosforu v povrchových vodách vyšší, tím se vytváří větší produkce sinic (Weiperová, 2011).

P se do půd dostává jako součást průmyslových hnojiv. Ovšem, při jejich aplikaci přechází do forem, které nejsou pro rostliny dostupné. Většina aplikovaného P tak zůstane na místě aplikace, tedy v ornici. Pokud nastanou erozní smyvy, dochází k odplavování

nejjemnějších půdních částic, na nichž je P sorbován. P je tak transportován převážně povrchovými vodami do vodních děl (Voplakal, 2001). Navíc se koncentrace P zvyšuje i lidskou činností, vylučováním. Toto zvyšování má za následek eutrofizaci (Correll, 1998). Průměrné letní koncentrace celkového P nad $70 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ dávají 80% pravděpodobnost fytoplanktonu, kterému dominují sinice (Downing a kol., 2001).

Celkový P je obsažen ve vodách jako: nerozpuštěný organicky vázaný, nerozpuštěný anorganicky vázaný, rozpuštěný organicky vázaný nebo rozpuštěný anorganicky vázaný (např. orthofosforečnany). Pro sinice je důležitý P v rozpuštěné orthofosforečnanové formě, kterou přijímají a zabudovávají do biomasy (Weiperová, 2011). Biologicky dostupný P lze definovat jako součet okamžitě dostupného P (P_i) a P vázaného na nerozpuštěných látkách, který lze transformovat přirozeně se vyskytujícími fyzikálními (desorpce), chemickými (rozpuštění) nebo biologickými procesy (enzymatická degradace) (Huisman a Hulot, 2005).

2.5.3 Dusík

Sinice mohou pro svůj růst využívat několik zdrojů dusíku (N) včetně amoniaku, dusičnanů a dusitanů. Ovšem nejvíce upřednostňují absorpci NH_4^+ (Chaffin a Bridgeman, 2014). Určité skupiny sinic umějí fixovat i atmosférický N (N_2) (Whitton, 2012), např. rod *Trichodesmium*, který se vyskytuje v oligotrofních oceánech (Capone a kol., 2005). Proces, při kterém jsou sinice schopné přeměnit N_2 na NH_4^+ se nazývá biologická fixace dusíku (Bauersachs a kol., 2009).

Fixace N_2 je zprostředkovává enzymem zvaným nitrogenáza (Kučerová, 2007). Nitrogenáza je dvousložkový systém složený z proteinu MoFe, nazýván dinitrogenáza, a elektronovým donorem proteinu Fe, zvaného dinitrogenázová reduktáza. Protein MoFe obsahuje dva kovové shluky: kofektor železo-molybdenový (FeMo-co) (Hoffman a kol., 2009). Vyskytují se i nitrogenázy bez obsahu molybdenu (Mo), tzv. alternativní nitrogenázy. Např. u bakterie *Azotobacter chroococcum* byla poprvé prokázána fixace N_2 bez přítomnosti Mo. Existují dva typy alternativních nitrogenáz, u kterých je Mo nahrazen vanadem (V) nebo železem (Fe). Tyto typy se vyskytují v prostředí, ve kterém jsou mikroorganismy limitovány Mo, např. kyselé půdy s vysokým obsahem oxidů železa (Chmelík, 2009).

Fixace N_2 nastává pouze v anaerobních podmínkách. Za aerobních podmínek je nitrogenáza inhibována přítomností kyslíku (Kučerová, 2007). Anaerobní prostředí

poskytují heterocyty, diferencované buňky s vnitřním anaerobním prostředím z důsledku dýchání, což umožňuje kyslíkově senzitivnímu procesu fixovat dusík (Böhme, 1998). Kyslík (O₂) obtížně difunduje, protože buněčná stěna heterocytu se skládá z obalu, který je složen z vnitřní glykolipidové vrstvy a vnější polysacharidové vrstvy (Moslavac a kol, 2007). Samotná buněčná stěna zahrnuje dvě membrány, plazmatickou membránu a vnější membránu a vrstvu peptidoglykanovou, která je silnější než v jiných bakteriích (Kumar a kol., 2010). Nedostatek O₂ v heterocytu zabraňuje v činnosti fotolýzy vody či fixovat oxid uhličitý (CO₂) (Tel-Or a Stewart, 1977). Od vegetativních buněk se heterocysty obvykle liší větším a zaoblenějším tvarem, sníženou pigmentací a silnějšími obaly buněk (Kumar a kol., 2010).

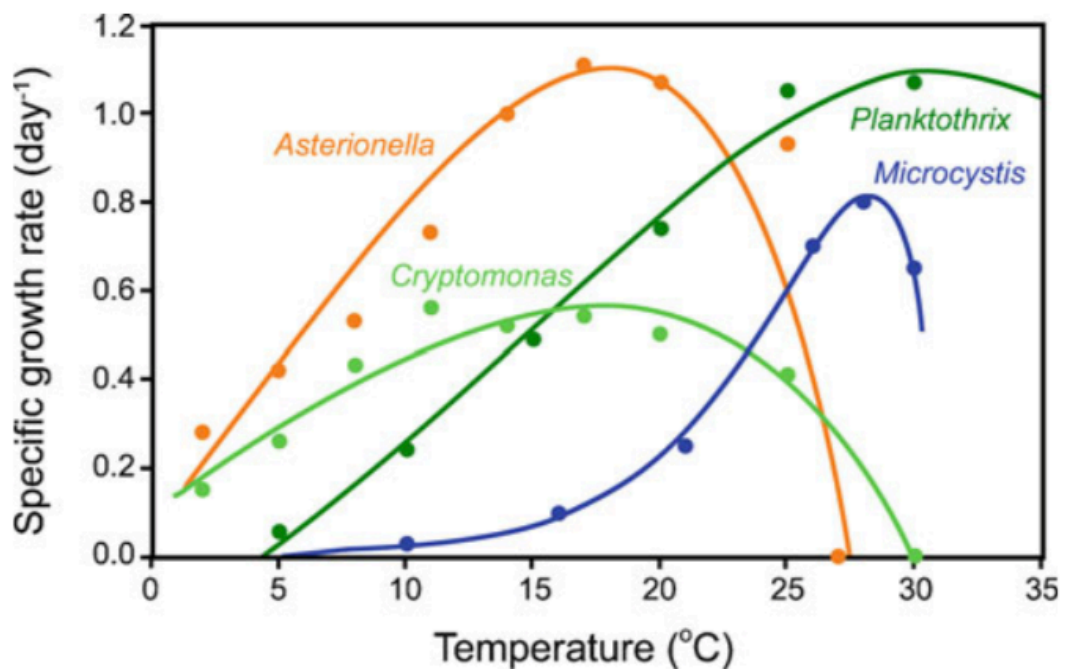
2.5.4 Teplota

Sinice obvykle vykazují nižší růstovou rychlost při nižších teplotách, a naopak vyšší růstovou rychlost při vyšších teplotách (Berg a Sutula, 2015). Optimální teplota pro růst většiny sinic je relativně při vysokých teplotách, obvykle nad 25 °C (Whitton, 2012), což je uvedeno na obr. 8. Mořské sinice mají optimální růstové teploty v rozmezí 20 – 27,5 °C (Berg a Sutula, 2015). Příkladem je sinice rodu *Trichodesmium*, která má optimální teplotu pro svůj růst při 27 °C. Tyto sinice jsou schopné přežít i při teplotě 17 °C, ovšem nejsou schopné růstu (Stal, 2009).

Species	T _{min} (°C)	T _{opt} (°C)	μ _{max} (day ⁻¹)	PAR	Notes and reference
<i>Microcystis</i> sp	10.5–13.5	28.8–30.5	0.25–0.30	<35	Kruger & Eloff (1978)
<i>M. aeruginosa</i>	10	27.5	0.8	102	Nicklisch & Kohl (1983)
<i>Microcystis</i> sp	13	—	—	—	Kappers (1984)
<i>M. aeruginosa</i>	—	32	0.59	75	Watanabe & Oishi (1985)
<i>M. aeruginosa</i>	—	32	0.81	200	Van der Westhuizen & Eloff (1985)
<i>Anabaena oscillarioides</i>	—	28	0.8	105	Vincent & Silvester (1979)
<i>A. spiroides</i>	—	24	0.9	48	Seki et al (1981)
<i>A. variabilis</i>	<10	35	1.1	500	Collins & Boylen (1982)
<i>Anabaena</i> spp	16–17	—	—	—	Stulp et al (1984)
<i>Aphanizomenon flos aquae</i>	<13	28	1.2	220	Uehlinger (1981)
<i>O. agardhu</i>	<12	23–25	0.59	37	Ahlgren (1978)
<i>O. agardhu</i>	—	>19	—	—	natural population Persson (1981)
<i>O. agardhu</i>	5	≥30	—	—	Post et al (1985)
<i>Anabaena flos aquae</i>	—	18	—	—	natural populations
<i>Aphanizomenon flos aquae</i>	—	15	—	—	Foy et al (1976)
<i>O. agardhu</i>	—	10	—	—	natural populations
<i>O. redekei</i>	—	6	—	—	Foy et al (1976)
<i>Microcystis</i>	15	25	0.50	120	isolates from
<i>Anabaena</i>	<10	25	0.40	120	Lake Mendota
<i>Aphanizomenon</i>	<10	25	0.18	120	Konopka & Brock (1978)
<i>Microcystis</i>	10	30–35	—	36	Imamura (1981)
<i>Anabaena</i>	10	25	—	36	Imamura (1981)
<i>Aphanizomenon</i>	<10	25	—	36	Imamura (1981)
<i>Anabaena</i>	15	30	—	—	Novak & Brune (1985)
<i>Oscillatoria</i>	<15	27	—	—	Novak & Brune (1985)

Obr. 8: Přehled teplotního optima pro růst sinic. T_{min} označuje, kdy organismus přestal růst. T_{opt} označuje teplotu, při které byla pozorována maximální růstová rychlost (μ_{max}). Fotosynteticky dostupné záření označeno jako PAR v μE m² s⁻¹ (Robarts a Zohary, 2010).

Termofilní sinice např. *Synechococcus bigranulatus*, *Chroococciopsis thermalis*, nebo *Hapalosiphon fontinalis* mají růstová optima od 45 – 50 °C nebo vyšší. Dokážou se přizpůsobit teplotám od 40 až do 70 °C (Hindák a kol., 2013). Teplomilné druhy, jakými jsou např. *Microcystis aeruginosa* a *Planktothrix agardhii*, dominují během období, při kterém je zvýšená teplota (Whitton, 2012), viz obr. 9.



Obr. 9: Teplotní závislost na specifické růstové rychlosti *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii*, *Asterionella formosa* a *Cryptomonas marssonii* (Whitton, 2012).

Při vysokých letních teplotách dochází ve vodním ekosystému ke snížení vertikálního turbulentního míchání a ke zvýšení stability vodního sloupce. Tento jev dává konkurenční výhodu vznášejícím se sinicím (Whitton, 2012). Tudiž můžeme očekávat, že pokud se bude teplota zvyšovat vlivem globálního oteplování a změnou klimatu, sinice budou stále konkurenceschopnější vůči ostatním druhům fytoplanktonu (Berg a Sutula, 2015).

2.6 Kompetice o živiny

Druhy fytoplanktonu konzumující stejné živiny, snižují jejich dostupnost jak pro sebe, tak i pro ostatní druhy. Konkurence o dostupné zdroje ovlivňuje druhové složení fytoplanktonu ve vodách (Huisman a Hulot, 2005). Sinice vstupují do kompetice s ostatními organismy o limitující zdroje. Ve vodním prostředí se především jedná o fosfor. V prostředí s dostatečným množstvím organického uhlíku, dokážou být bakterie ve využívání fosforu výkonnější než sinice a řasy (Sigeo, 2005). Pokud se uvolňují

fotosyntetické metabolity fytoplanktonu, podporuje se kompetitivní aktivita bakterií dostatkem uhlíku. Metabolismus jednoho organismu tak dokáže zvyšovat růst jiného organismu (Kučerová, 2007).

Bakteriální degradace odumřelých buněk fytoplanktonu vede k mineralizaci sloučenin fosforu a dusíku, tak se uvolňují rozpustnější živiny pro sinice a řasy. Konkurence bakterií v kompetici je závislá na jejich fyziologickém stavu a na množství živin. Bakterie působí na sinice inhibičními až lytickými mechanizmy. Sinice na bakterie působí nepřímými vlivy pomocí produkci alelopatických a antibiotických látek (Sigeo, 2005).

V kompetici o světlo jsou sinice úspěšné především v eutrofních vodních nádržích, kde vytvářejí vodní květy tlumící průchod světla do vodního sloupce. Při kolísajícím světelném režimu je snažší soužití dvou druhů, než při podmínkách vedoucí ke konkurenčnímu vyloučení jednoho druhu (Litchman, 2003).

3 Materiál a metodika

3.1 Vzorky

Při pokusu jsem pracovala se sinicemi kmenů *Cyanobium gracile* A1 (*C. gracile*) a *Synechocystis* sp. PCC7509 (*Synechocystis*), které byly již kultivovány v kultivačních lahvích o objemu 75 ml v médiu BG11 za normálního denního světelného režimu, při teplotě 21 °C. Kmen *C. gracile* se zvolil proto, že vytváří homogenní suspenzi, kdežto kmen *Synechocystis* vytváří shluky. Mohla jsem tak porovnat dva rozdílné kmeny. Odběry vzorků kmenů probíhaly pomocí pipety.

3.2 Příprava média

Pro první část pokusu jsem použila jako základ Z médium bez složek obsahujících P a také dvě různé koncentrace P. Složení Z média viz tab. 3, 4 a 5, následně se doplňuje do 1 l destilovaná voda. Z média obsahující P jsem namíchala pomocí K_2HPO_4 . Do první lahvičky s namíchaným Z médiem bez P jsem přidala K_2HPO_4 v takovém množství, aby se vytvořila finální koncentrace o $8 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$. Do druhé lahvičky se Z médiem bez P jsem přidala tolik K_2HPO_4 , aby se vytvořila finální koncentrace o $16 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$. Na obr. 10 si lze všimnout tří různých lahviček s médiem a kultivační destičky umístěné v laminárním boxu, kde kultivace probíhala.

Tab. 3: Tabulka pro namíchání Z média (Staub, 1961).

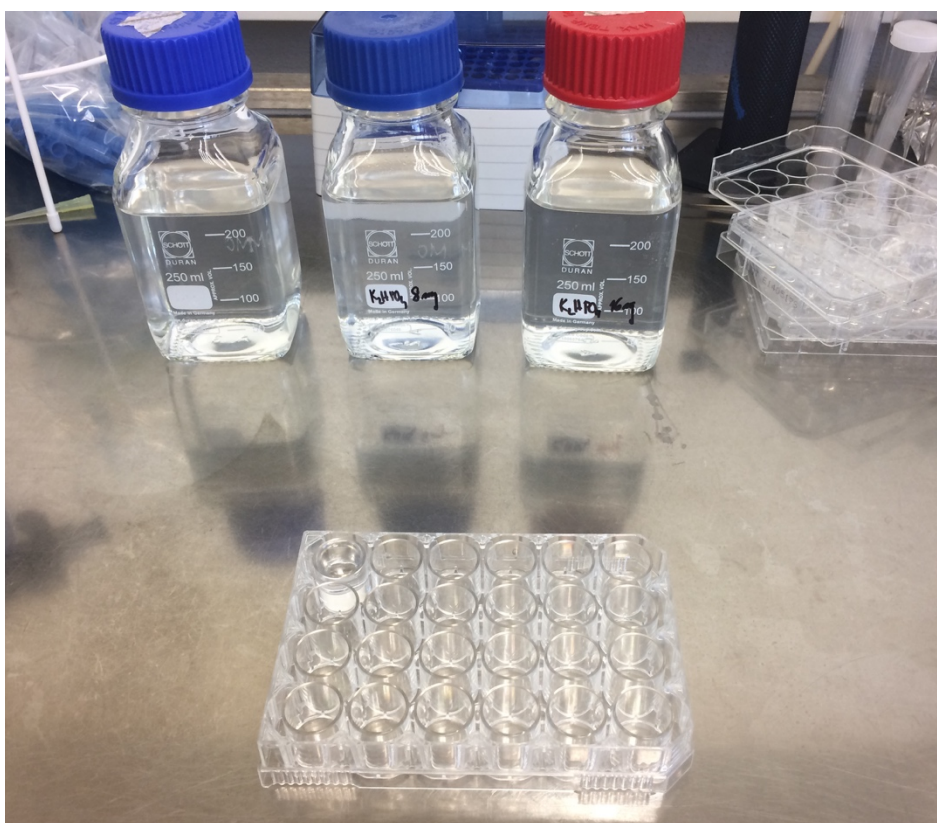
Chemické látky	Zásobní roztok ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$)	Použité množství (do 1 litru)
NaNO_3	46,7	10 ml
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	5,9	10 ml
K_2HPO_4	3,1	10 ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,5	10 ml
Na_2CO_3	2,1	10 ml
Fe-EDTA roztok	viz tab.	0,2 ml
Roztok stopových kovů	viz tab.	0,08 ml

Tab. 4: Tabulka pro namíchání Fe-EDTA roztoku (Staub, 1961).

Chemické látky	Použité množství
HCL (35%)	2,2 ml
dH_2O	250 ml
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,5 g
Na_2EDTA	4,65 g

Tab. 5: Tabulka pro namíchání roztoku s obsahem stopových kovů (Staub, 1961).

Chemické látky	Použité množství (do 100 ml)
H_3BO_3	0,31 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,223 g
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,003 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0088 g
KBr	0,0119 g
KI	0,0083 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0287 g
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0154 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0146 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0125 g
$\text{NiSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0198 g
$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,0037 g
$\text{V}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0035 g
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$	0,0474 g



Obr. 10: Pipetování tří médií do kultivační destičky.

Pro druhou část pokusu jsem použila opět Z médium bez složek obsahující P, ovšem tentokrát jsem do něj přidala KH_2PO_4 v množství, aby se utvořila finální koncentrace o $30 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$. Pomocí ředění jsem si vytvořila 7 médií s různými koncentracemi P, viz tab. 6.

Tab. 6: Koncentrace P v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ v médiu v jednotlivých lahvičkách.

Číslo lahvičky	Koncentrace P v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ v médiu
1	0,06
2	0,12
3	0,23
4	0,46
5	0,93
6	1,875
7	7,5
8	30

Pro pipetování médií do kultivačních destiček jsem si vytvořila tabulky, tab. 7 a tab. 8. Koncentrace jednotlivých médií jsem pipetovala do sloupců od nejnižší ($0,06 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$) po nejvyšší ($30 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$). V kultivační destičce Thermo Scientific NunclonTMDelta Surface 96 Well jsem do posledních čtyř sloupců pipetovala jen samotná média bez kultury, abych získala hodnoty ke standardu.

Tab. 7: Pipetování kultivační destičky Thermo Scientific NunclonTMDelta Surface 96 Well.

96 well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	1	3	5	7
B	1	2	3	4	5	6	7	8	1	3	5	7
C	1	2	3	4	5	6	7	8	1	3	5	7
D	1	2	3	4	5	6	7	8	1	3	5	7
E	1	2	3	4	5	6	7	8	2	4	6	8
F	1	2	3	4	5	6	7	8	2	4	6	8
G	1	2	3	4	5	6	7	8	2	4	6	8
H	1	2	3	4	5	6	7	8	2	4	6	8

Tab. 8: Pipetování kultivační destičky Cellstar 48 Well Cell Culture Plate.

48 well	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	2	3	4	5	6	7	8
B	1	2	3	4	5	6	7	8
C	1	2	3	4	5	6	7	8
D	1	2	3	4	5	6	7	8
E	1	2	3	4	5	6	7	8
F	1	2	3	4	5	6	7	8

Pro třetí část pokusu, jsem použila stejná média jako při druhé části pokusu, jen místo 30 mg P · l⁻¹ jsem použila 15 mg P · l⁻¹ v médiu.

3.3 Kultivace

V první části svého pokusu jsem zjišťovala, která z kultivačních destiček bude pro samotný pokus nejvhodnější. Zároveň jsem porovnávala jednotlivé kmeny mezi sebou. V tab. 9 jsou popsány použité kultivační destičky, do nichž byl pipetován určitý objem média a vzorku. Kultivační destičky se vzorky kmenů byly umístěny na horizontální třepačku při teplotě 21 °C. Jednotlivé plně kultivační destičky si lze prohlédnout v přílohách 1 – 7.

Tab. 9: Tabulka pro první část pokusu. Procentuálně tvořilo množství kultury s médiem polovinu jednotlivých baněk.

Název destičky	Označení	Celkový objem	Množství média	Množství vzorku
Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well	Plate 1	350 µl	158 µl	17,5 µl
Cellstar 48 Well Cell Culture Plate	Plate 2	1500 µl	675 µl	75 µl
Iwaki Microplate with Lid 24 Well	Plate 3	3000 µl	1350 µl	150 µl
Tpp Zellkultur Testplatte 12 Well	Plate 4	5500 µl	2475 µl	275 µl
Tpp Zellkultur Testplatte 12 Well	Plate 5	5500 µl	2475 µl	275 µl
Tpp Zellkultur Testplatte 6 Well	Plate 6	13000 µl	5850 µl	650 µl
Tpp Zellkultur Testplatte 6 Well	Plate 7	13000 µl	5850 µl	650 µl

Při druhé části pokusu jsem se zaměřila na samotný růst kmene *C. gracile*, jelikož se ukázal jako vhodnější kmen. Na rozdíl od kmene *Synechocystis* nevytvářel shluky, a tak bylo měření přesnější. Pro kultivaci kmene *C. gracile* jsem zvolila kultivační destičky typu Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well, označeno jako Plate

10 a Cellstar 48 Well Cell Culture Plate, označeno jako Plate 11. Při pipetování jsem se řídila tab. 7 a 8.

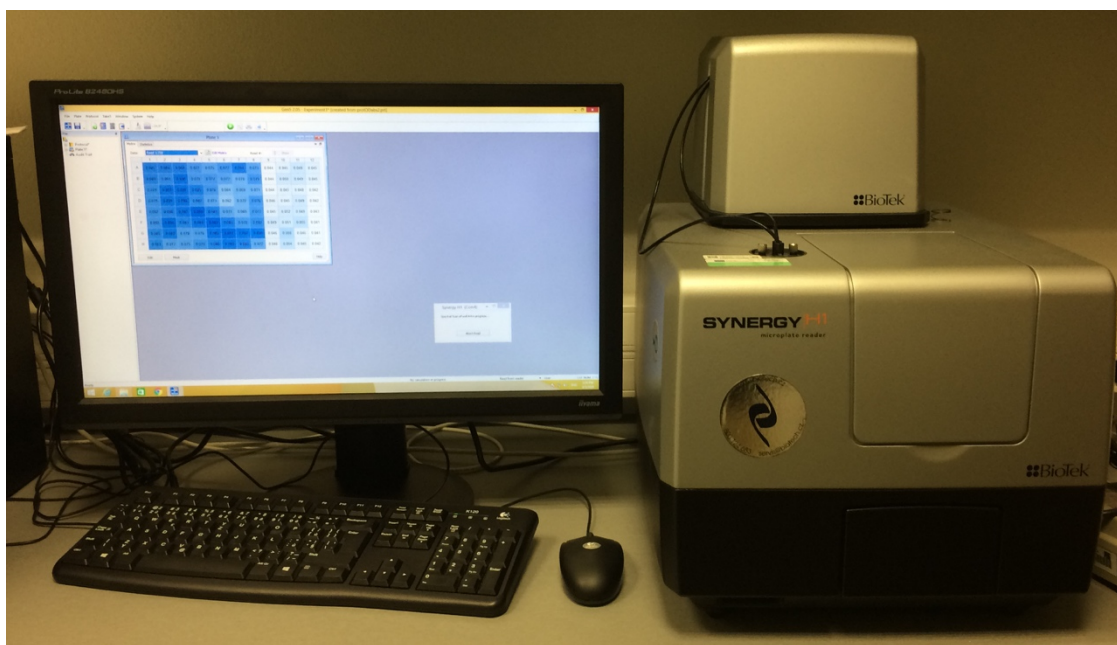
V poslední části pokusu jsem pracovala s kultivačními destičkami Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well, označeno jako Plate 20 a Cellstar 48 Well Cell Culture Plate, označeno jako Plate 21. Ovšem tentokrát jsem změnila jednotlivé objemy média a vzorku v kultivačních destičkách, viz tab. 10.

Tab. 10: Tabulka pro třetí část pokusu.

Název destičky	Označení	Celkový objem	Množství média	Množství vzorku
Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well	Plate 20	350 μ l	190 μ l	100 μ l
Cellstar 48 Well Cell Culture Plate	Plate 21	1500 μ l	825 μ l	500 μ l

3.4 Měření

Pro měření jsem využila spektrofotometr Synergy H1 Microplate Reader, viz obr. 11, značky Biotek, který měřil fluorescenci kultivačních destiček mezi vlnovými délkami 405 – 750 nm a absorbanci v jednotlivých jamkách při vlnové délce 750 nm. V programu Gen5 verze 2.05 jsem získala hodnoty, které jsem si exportovala do programu Microsoft Excel. Měření probíhalo při teplotách 23 – 24 °C.



Obr. 11: Spektrofotometr se spuštěným programem Gen5.

Ze získaných hodnot mě především zajímala data naměřeného OD₇₅₀, pro tvorbu grafů růstových křivek, viz tab. 11. Z každého měření jsem tak získala data, ze kterých jsem následně vypočítala průměrné hodnoty růstu kmenů v jednotlivých koncentracích P i v jednotlivých destičkách. Při třetí části pokusu, jsem po změření ve spektrofotometru vždy kultivační destičky zvažila na váze Kern laboratorní váha EMB 1000-2, abych zjistila, kolik média se vypařilo.

Tab. 11: Tabulka z programu Microsoft Excel s naměřenými hodnotami při OD₇₅₀ destičky s označením Plate 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,059	0,051	0,052	0,045	0,052	0,058	0,047	0,06	0,05	0,05	0,049	0,051	Read 1:750
B	0,061	0,059	0,055	0,042	0,054	0,055	0,049	0,047	0,046	0,048	0,042	0,049	Read 1:750
C	0,074	0,064	0,051	0,069	0,05	0,053	0,046	0,05	0,044	0,048	0,048	0,051	Read 1:750
D	0,049	0,056	0,056	0,055	0,056	0,049	0,048	0,048	0,048	0,049	0,048	0,051	Read 1:750
E	0,073	0,042	0,061	0,059	0,053	0,049	0,047	0,048	0,068	0,049	0,05	0,05	Read 1:750
F	0,046	0,047	0,06	0,063	0,059	0,06	0,047	0,049	0,044	0,049	0,051	0,049	Read 1:750
G	0,078	0,056	0,051	0,074	0,064	0,054	0,051	0,044	0,053	0,05	0,05	0,049	Read 1:750
H	0,063	0,06	0,083	0,054	0,047	0,058	0,046	0,046	0,046	0,048	0,049	0,048	Read 1:750

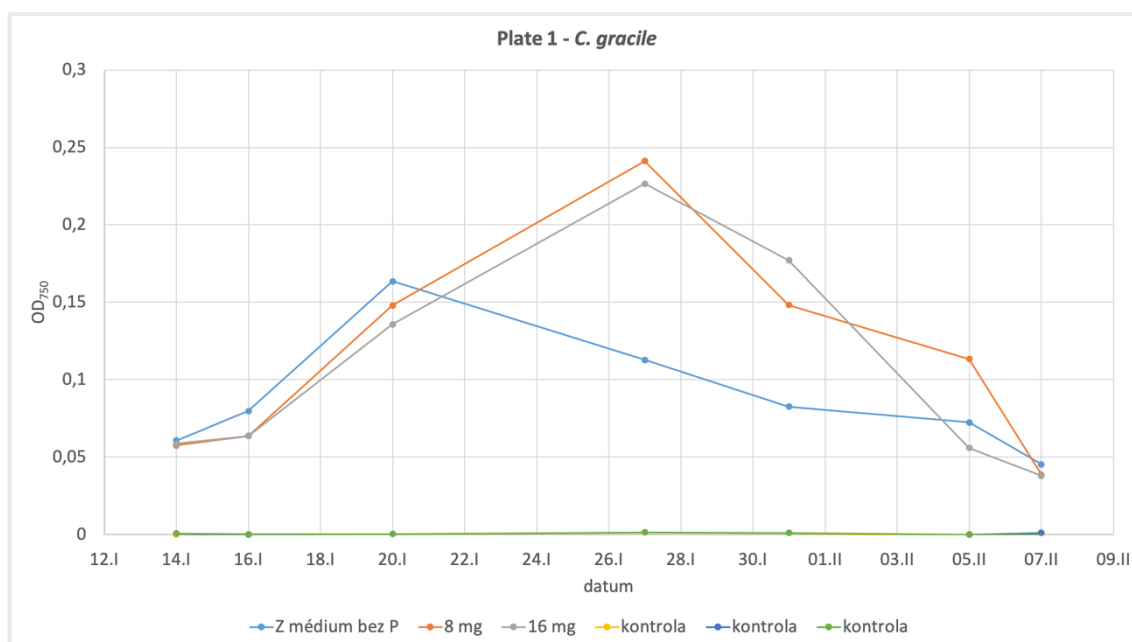
4 Výsledky

Následující grafy zobrazují růstové křivky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis* v jednotlivých kultivačních destičkách s různými koncentracemi P. Osa X zobrazuje růstové hodnoty. Osa Y zobrazuje počet dní kultivace.

4.1 První část pokusu

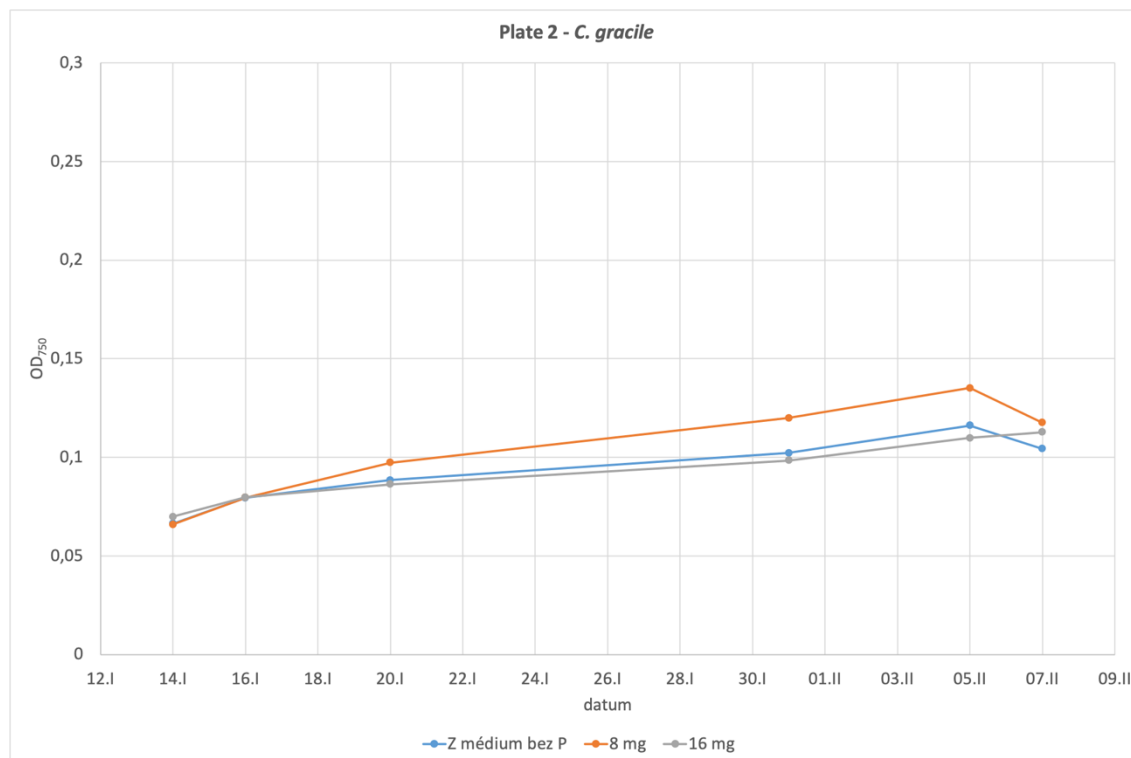
V prvních dnech pokusu došlo k přesunu kultivačních destiček společně se třepačkou. Ovšem během toho přesunu se jednotlivé jamky v kultivačních destičkách přelily. Výsledky růstu kmenů *C. gracile* a *Synechocystis* byly tudíž nepřesné a použila jsem je jen pro výběr vhodných kultivačních destiček pro druhou a třetí část pokusu.

Na grafu 1 jsou znázorněny růstové křivky kmenu *C. gracile* v jednotlivých koncentracích P v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well. Jednotlivá média jsem pipetovala dvakrát. Ze získaných výsledků jsem spočítala průměrné hodnoty, které byly dosazeny do grafu 1. Z grafu 1 lze konstatovat, že nejnižších hodnot růstu dosáhl kmen *C. gracile* v Z médiu bez složek obsahující P. Oproti tomu v médiu o koncentraci $8 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ dosáhl kmen nejvyšších hodnot růstu.



Graf 1: Růstové křivky kmenu *C. gracile* v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well.

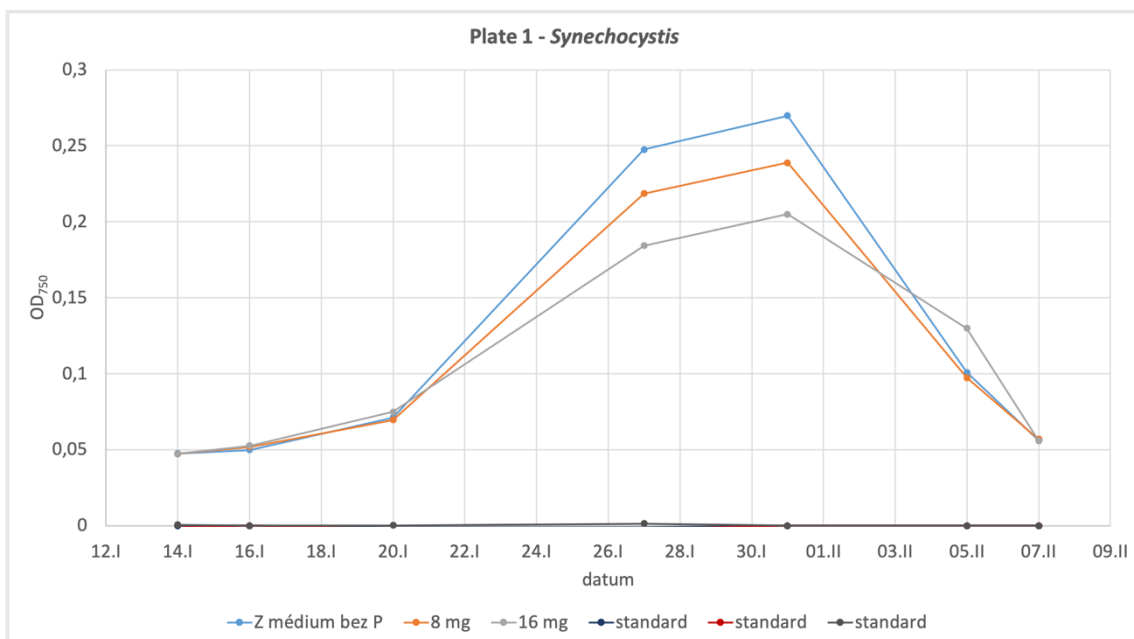
Na grafu 2 jsou znázorněny růstové křivky kmenu *C. gracile* v jednotlivých koncentracích P v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate. Zde se vytvořily nejlepší podmínky pro růst v médiu s $8 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$. Nižší hodnoty růstu vykazovalo Z médium bez složek obsahující P a médium se $16 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$.



Graf 2: Růstové křivky kmenu *C. gracile* v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate.

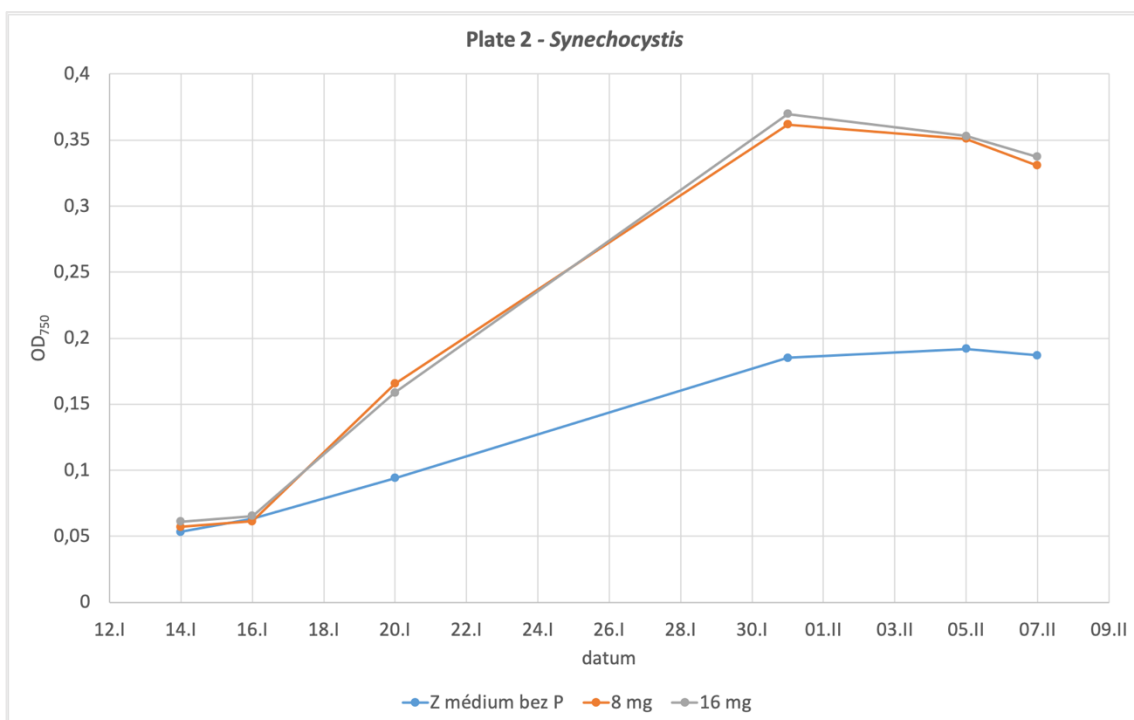
Z porovnání grafu 1 s grafem 2 lze vyvodit, že v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well jsou hodnoty růstu kmenu *C. gracile* vyšší než v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate. V kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate vykazuje kmen *C. gracile* nejvyšších hodnoty růstu v prostředí s $8 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$, což je koncentrace, která vykazuje nejvyšší hodnoty růstu i v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well.

Na grafu 3 jsou znázorněny růstové křivky kmenu *Synechocystis* v jednotlivých koncentracích P v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well. Z grafu lze vyčíst, že nejlepší podmínky pro růst kmenu *Synechocystis* vytvořilo Z médium bez složek obsahující P. Nejhůře dopadlo médium se $16 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$, kde nebyly hodnoty růstu kmene tak vysoké.



Graf 3: Růstové křivky kmenu *Synechocystis* v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™ Delta Surface 96 Well.

Na grafu 4 jsou znázorněny růstové křivky kmenu *Synechocystis* v jednotlivých koncentracích P v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate. Kultura vykazovala nejmenší hodnoty růstu v Z médiu bez složek obsahující P. V médiu se 16 mg $P \cdot l^{-1}$ i s 8 mg $P \cdot l^{-1}$ byly naopak hodnoty růstu velmi podobné, nejvyšší.



Graf 4: Růstové křivky kmenu *Synechocystis* v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate.

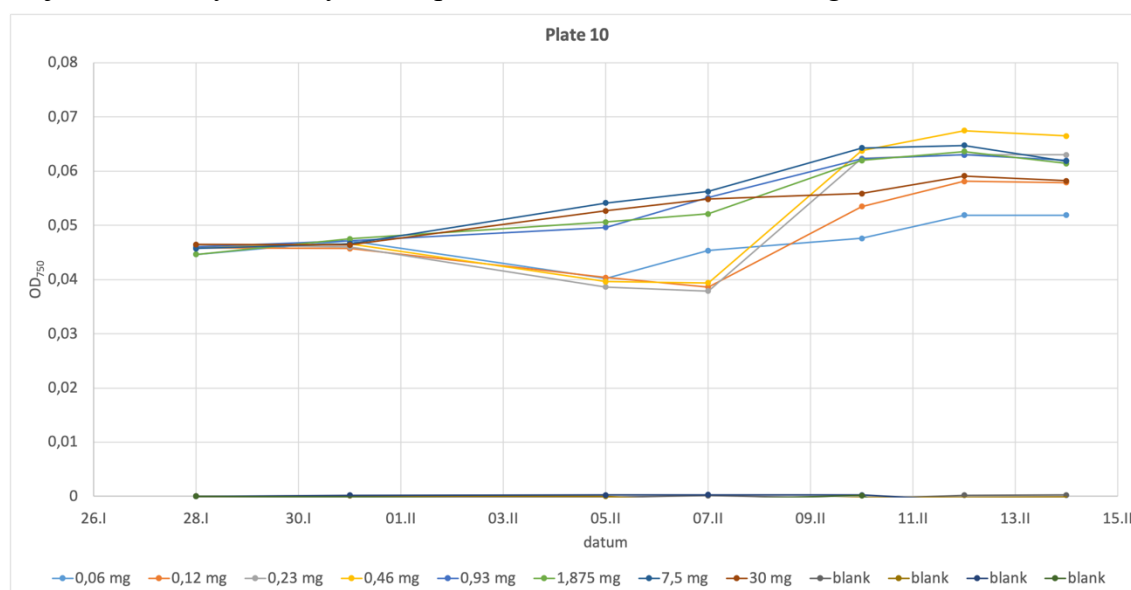
Při porovnání grafu 1 s grafem 2 lze konstatovat, že kmen *Synechocystis* má vyšší hodnoty růstu v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate než v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well. Ovšem v prostředí se Z médiem bez složek obsahující P dosahuje kmen *Synechocystis* vyšších hodnot růstu v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well.

Kmeny *C. gracile* a *Synechocystis* vykazovaly největších hodnot růstu v kultivačních destičkách Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well a Cellstar 48 Well Cell Culture Plate, viz přílohy 8 – 14. Proto jsem s nimi pracovala i v následujících částech experimentu.

4.2 Druhá část pokusu

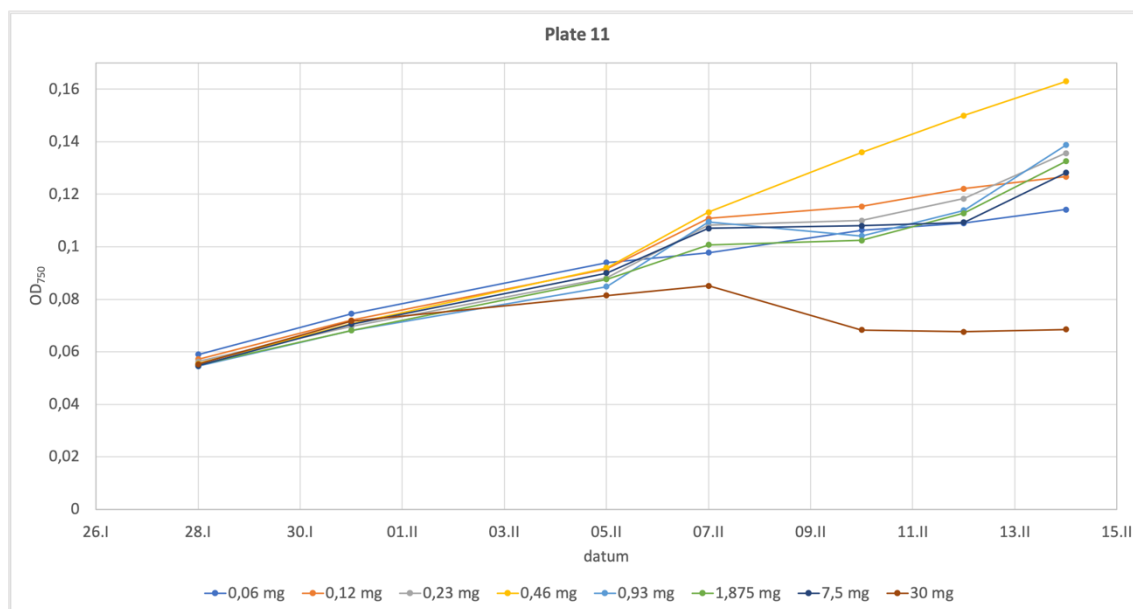
Do kultivačních destiček Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well a Cellstar 48 Well Cell Culture Plate jsem pipetovala jen kmen *C. gracile*, jelikož kmen *Synechocystis* vytvářel shluky, které by mohly způsobovat spíše nepřesné měření.

Na grafu 5 jsou znázorněny růstové křivky kmenu *C. gracile* v jednotlivých koncentracích P v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well. Kmenu *C. gracile* vyhovovaly všechny podmínky vytvořené jednotlivými médii. Nejvyšších hodnot růstu dosáhl kmen *C. gracile* v období od 10.2. – 12.2.2020. Nejlepší prostředí pro kmen *C. gracile* vykazovalo médium o koncentraci 0,46 mg P · l⁻¹. Nejnižší hodnoty růstu vytvořilo prostředí o koncentraci 0,06 mg P · l⁻¹.



Graf 5: Růstové křivky kmene *C. gracile* v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well.

Na grafu 6 jsou znázorněny růstové křivky kmene *C. gracile* v jednotlivých koncentracích P v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate. Z grafu je patrné, že nejvyšší hodnoty růstu dosahoval kmen *C. gracile* v médiu o koncentraci 0,46 mg P · l⁻¹. Naopak nejnižší růstové hodnoty byly v médiu o nejvyšší koncentraci, 30 mg P · l⁻¹.



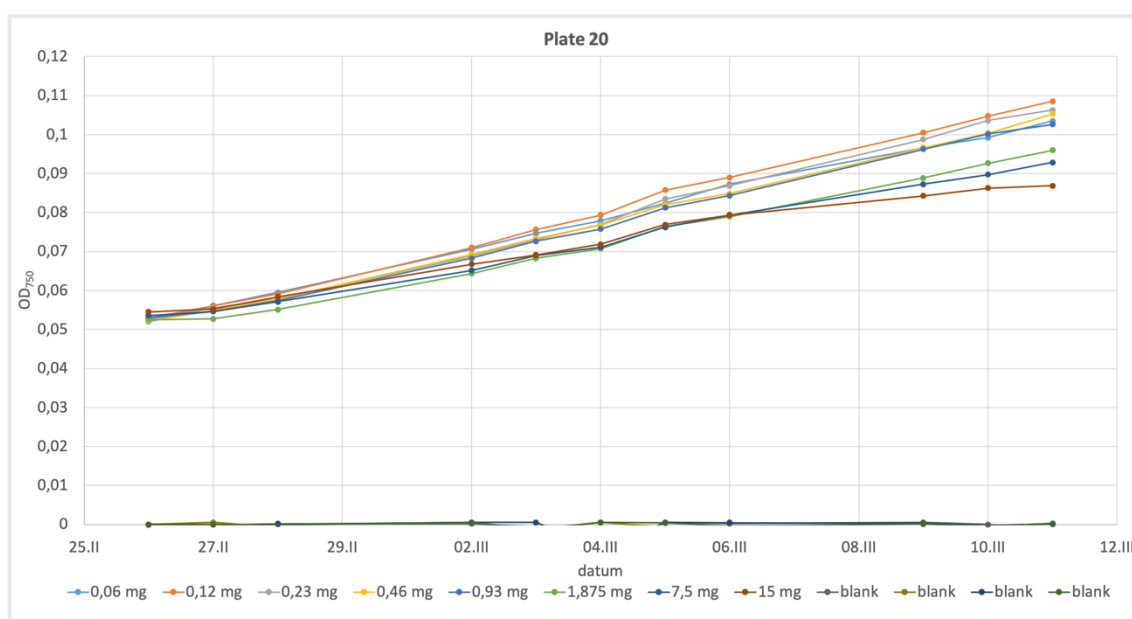
Graf 6: Růstové křivky kmene *C. gracile* v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate.

Při porovnání grafu 5 s grafem 6 lze říci, že v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate dosahoval kmen *C. gracile* vyšších hodnot růstu než v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well, ve které byly nejnižší hodnoty růstu v médiu o koncentraci 0,06 mg P · l⁻¹. V kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate byly nejnižší hodnoty růstu v médiu o koncentraci 30 mg P · l⁻¹. V obou kultivačních destičkách měl kmen *C. gracile* nejvyšší hodnoty růstu v médiu o koncentraci 0,46 mg P · l⁻¹. V příloze 15 – 18 jsou zobrazeny výsledky kultivačních destiček Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well a Cellstar 48 Well Cell Culture Plate.

4.3 Třetí část pokusu

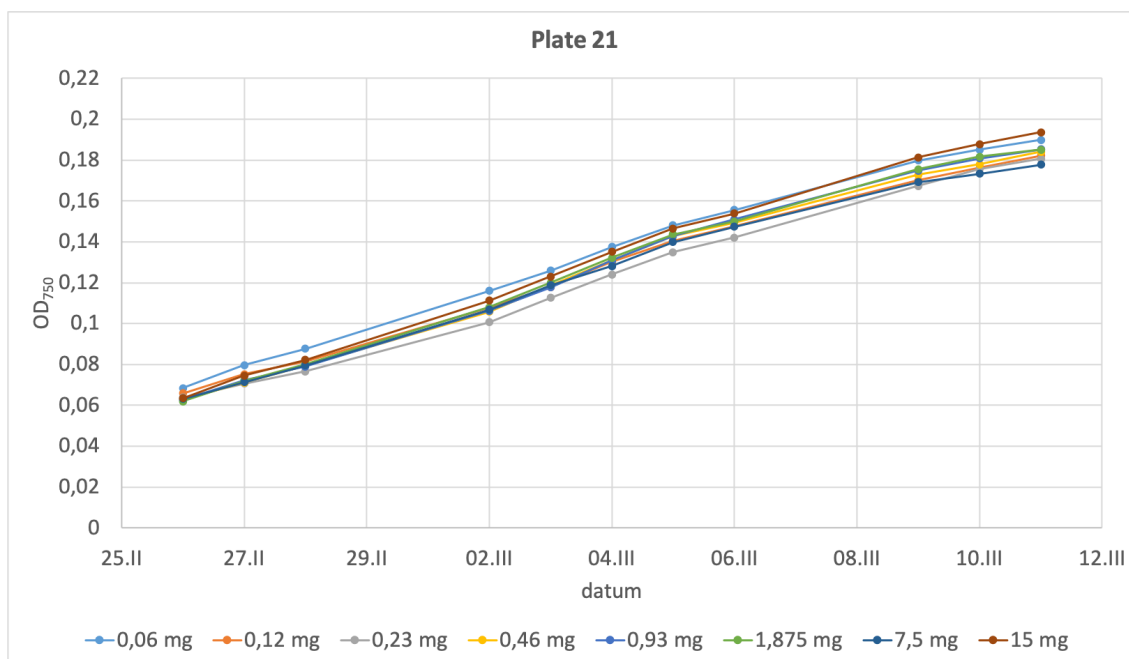
Tato část pokusu proběhla jako kontrola pokusu části druhé. Do kultivačních destiček Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well a Cellstar 48 Well Cell Culture Plate jsem pipetovala kmen *C. gracile*.

Na grafu 7 jsou znázorněny růstové křivky kmene *C. gracile* v jednotlivých koncentracích P v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well. Nejvyšší hodnoty růstu dosahoval kmen *C. gracile* v médiu o koncentraci $0,12 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$. Nejnižší hodnoty růstu vykazovala nejvyšší koncentrace P v médiu, $15 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$.



Graf 7: Růstové křivky kmene *C. gracile* v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well.

Na grafu 8 jsou znázorněny růstové křivky kmene *C. gracile* v jednotlivých koncentracích P v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate. Z grafu lze konstatovat, že všechny koncentrace P vytvořily prostředí vhodné pro růst kmene *C. gracile*. Nejvyšších hodnot růstu dosahoval kmen *C. gracile* v médiu o nejvyšší koncentraci, $15 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$. Naopak nejnižší hodnoty růstu byly naměřeny v médiu o koncentraci $7,5 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$.



Graf 8: Růstové křivky kmene *C. gracile* v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate.

Při porovnání grafu 7 s grafem 8 lze říci, že v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate jsou růstové křivky velmi podobné, zatímco v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well byly růstové křivky více rozdílné. Také v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate jsou hodnoty růstu vyšší než v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well. V kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well byly nejvyšší hodnoty růstu v médiu o koncentraci $0,12 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$, zatímco v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate byly nejvyšší hodnoty růstu v médiu o koncentraci $15 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$. V přílohách 19 – 22 si lze prohlédnout výsledky kultivačních destiček Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well a Cellstar 48 Well Cell Culture Plate.

Po prvním dni kultivace až do předposledního dne měření (27.2. – 10.3.2020) jsem kultivační destičky vždy po změření ve spektrofotometru zvažila. Z tab. 9 lze vyčíst, že průměrná hodnota vypaření média za den v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well byla $0,804 \text{ g}$. V kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate byla průměrná hodnota vypaření média $1,173 \text{ g}$. Jelikož 5.3. bylo přidáno médium do kultivační destičky Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well jsou data následující dny vyšší, než by se očekávalo. Z dat lze dále konstatovat, že se médium v jednotlivé dny podobně vypařovalo.

Tab. 9: Váha kultivačních destiček

Data měření	Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well	Cellstar 48 Well Cell Culture Plate.
27.2.	79,14 g	117,73 g
28.2.	77,65 g	116,55 g
2.3.	74,96 g	114,31 g
3.3.	73,77 g	113,36 g
4.3	72,52 g	112,55 g
5.3.	71,42 g	111,78 g
6.3	75,32 g	111,19 g
9.3.	73,43 g	109,28 g
10.3.	72,71 g	108,35 g

5 Diskuze

Pojem eutrofizace označuje proces obohacování vody o živiny vedoucí k rozvoji primární produkce organické hmoty řasami a sinicemi. Rybníky se tak z oligotrofních a mezotrofních stávají eutrofní až hypertrofní. Mají dostatek až nadbytek živin, zejména P a N, které se do vod dostávají především antropogenní činností. Hlavně v létě, kdy jsou teploty vysoké a je dostatek slunečního svitu, lze pozorovat obrovský rozvoj sinic tvořící vodní květ. Sinice svojí přítomností zhoršují kvalitu vody rozsáhlým růstem, uvolňováním toxických látek, zejména *Anabaena Flos-aquae* (Kalina, 1994), zvyšujícím pH a může docházet až ke kyslíkovým deficitům (Weiperová, 2011). Jejich přítomnost v rybníce je proto velmi nežádaná. Ve své bakalářské práci se zabývám růstovým potenciálem sinic v různých koncentracích fosforu, který je považován za limitující a klíčový prvek pro jejich růst. Z výsledků stanovuji růstový potenciál sinic v rybnících.

V experimentu byly použity již kultivované kmeny *Cyanobium gracile* A1 (*C. gracile*) a *Synechocystis* sp. PCC7509 (*Synechocystis*). Jako médium bylo zvoleno Z médium. Na výběru kultivačního média závisí, jelikož má přímý vliv na buněčný růst (Henrard, a kol., 2015). Z médium má dostatek živin pro dlouhodobou kultivaci podobně jako médium BG 11 (Ernst a kol., 2005). Ovšem pro experiment bylo Z médium namícháno bez složek obsahující P, abych mohla na tomto limitujícím prvku pozorovat závislost vybraných sinic na jejich růstu. Pro kultivaci byly vybrány různé kultivační destičky, viz tab. 9, které se vkládaly do spektrofotometru. Ten měřil kultivační destičky v rozpětí vlnových délek 405 – 750 nm a absorbanci při vlnové délce 750 nm. Výsledné hodnoty měření při vlnové délce OD₇₅₀ jsem vložila do grafů, viz grafy 1 – 8, a získala tak růstové křivky v jednotlivých koncentracích P.

Během první části experimentu došlo k promíchání jednotlivých jamek v testovaných kultivačních destičkách. Tudiž výsledky hodnot růstu nejsou přesné ke stanovení konečných růstových potenciálů a byly využity jen pro výběr vhodných kultivačních destiček pro další části experimentu. Nejvyšší hodnoty růstu z vybraných kultivačních destiček měly Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well a Cellstar 48 Well Cell Culture Plate, viz přílohy 1 – 9. V těchto kultivačních destičkách vytvářel kmen *C. gracile* homogenní suspenzi (Hodáčová, 2011) a měření tak bylo přesnější, na rozdíl od kmene *Synechocystis*, který vytvářel v kultivačních destičkách s nižším počtem jamek větší shluky, díky nimž docházelo k nepřesnému měření. Proto jsem v dalších částech pokusu pracovala jen s kmenem *C. gracile*.

Při porovnání růstových hodnot během exponenciální fáze v jednotlivých koncentracích P v médiu z první části pokusu, vykazoval kmen *C. gracile* nejrychlejšího růstu v médiu, v němž neměl být přítomen P. Bylo to způsobeno chybou, která je popsána v odstavci výše. Z grafů 1 a 2 si lze všimnout, že exponenciální fáze v tomto médiu neměly dlouhého trvání a brzy docházelo k inhibici růstu. Naopak média o koncentraci 8 a 16 mg P · l⁻¹ měly exponenciální fáze delšího trvání, a i růstové hodnoty dosahovaly vyšších hodnot. V těchto dvou koncentracích byly naměřeny podobné růstové hodnoty jako ve výzkumu Belykh, a kol. (2011), kde byl kmen *C. gracile* kultivován v médiu Z-8.

Podle experimentu Burut-Archanai a kol. (2013), vykazuje kmen *Synechocystis* vysoký potenciál v odstraňování P vodě. Čemuž odpovídají výsledky z grafu 4, kde je růstová křivka média bez složek obsahující P nízká. Oproti tomu v grafu 3 si lze všimnout růstové křivky téže koncentrace P, která dosáhla velmi vysokých hodnot. To mohlo být způsobeno stejnou chybou, která je popsána výše. Nejvyšších růstových hodnot vykazovalo médium o koncentraci 8 mg P · l⁻¹. Přijatelné podmínky pro růst vytvořilo i médium o koncentraci 16 mg P · l⁻¹, jenž vykazovalo podobných, vysokých růstových hodnot, viz graf 3 a 4.

Ve druhé i třetí části experimentu byly vyšší hodnoty růstu sinic v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate než v kultivační destičce Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well, viz přílohy 15 – 22. Může to být výsledkem rozdílu celkového objemu jamek v kultivačních destičkách či dostupným prostorem pro sinice. Zároveň ve třetí části experimentu byly naměřeny v kultivační destičce Cellstar 48 Well Cell Culture Plate vyšší hodnoty růstu než ve druhé části experimentu. Kultivační destička Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well vykazovala na rozdíl od výsledků ze druhé části experimentu pouze exponenciální hodnoty růstu. To je možné vysvětlit přesnějším nabíráním kultury při pipetování. Ve třetí části experimentu vykazovaly obě kultivační destičky během 16 dní exponenciální růst. Což byla nejdelší doba, při které sinice neustále rostly.

V rybnících je hlavním zdrojem P přísun z povodí. U fosforečnanů, které jsou ve vodě sorbovány na sedimentech dna, může za určitých podmínek dojít k uvolnění do kapalné fáze. Tak se zvyšuje koncentrace P ve vodě (Kryštofová, 2012). V českých vodách se koncentrace fosforečnanů pohybuje v rozmezí 1 – 300 mg P · l⁻¹. Pravděpodobnost eutrofizace se připouští při 0,03 mg P · l⁻¹ rozpuštěného P nebo 0,1 mg P · l⁻¹ celkového P (Kotula, 2011). Ve svém pokusu jsem pracovala s devíti různými koncentracemi P

(po vyloučení Z média bez složek obsahující P, 8 a 16 mg P · l⁻¹), ze kterých určíme nejrizikovější koncentraci P pro rozvoj sinic.

V rybnících dochází k masovému rozvoji sinic již při koncentraci 0,01 mg P · l⁻¹ (Drápalová, 2017). Koupací vody musejí splňovat přípustnou hodnotu dokonce 0,05 mg P · l⁻¹ (Freidinger, 2016). Médium, které obsahovalo nejnižší koncentraci P mělo koncentraci 0,06 mg P · l⁻¹ a vykazovalo druhé nejnižší růstové hodnoty, viz grafy 5 – 8. Velmi podobné výsledky mělo i médium o koncentraci 7,5 mg P · l⁻¹. Tudíž se dá očekávat, že při podobných koncentracích budou sinice v rybníce růst velmi pomalu ve srovnání s ostatními koncentracemi P.

Médium s druhou nejvyšší použitou koncentrací P, o koncentraci 15 mg P · l⁻¹, vytvořilo pro sinice nejideálnější prostředí, a tak dosáhly nejvyšších růstových hodnot. A to i přestože měly sinice v jamkách s nejnižším objemem nejnižší růstovou křivku, viz graf 7. Což může být vysvětleno tak, že velikost plochy a objemu má vliv na růst sinic (Pernicová, 2006). Na grafu 8 si lze všimnout, že nejvyšších růstových hodnot dosáhlo právě toto médium o vysoké koncentraci P. Tudíž lze očekávat, že rybník s vysokou koncentrací P, 15 mg · l⁻¹, vytvoří velmi ideální prostředí pro sinice.

Médium o koncentraci 0,12 mg P · l⁻¹ dosáhlo jen o málo nižších růstových hodnot než médium o koncentraci 1,875 mg P · l⁻¹, viz grafy 5 – 8. Mezi těmito koncentracemi P se pohybují naměřené hodnoty P při vypouštění rybníků nacházející se na území CHKO Třeboň. Během výlovů nastává znečištění recipientu především P, zvláště pokud se jedná o rybníky s intenzivním chovem ryb (Freidinger, 2016). P se totiž váže na pevné částice, které sedimentují na dno. Při výlovu dochází ke snížení vodní hladiny a k intenzivnímu pohybu ryb v lovišti. Tyto dva děje způsobují víření usazeného sedimentu, který následně odtéká z nádrže (Mikšíková a kol., 2012).

V rybníce je přirozená schopnost retence P závislá především na době zdržení vody v dané vodní nádrži. V praxi to znamená zadržet 25 – 65% P, který do rybníků přitéká. U menších rybníků jsou to desítky až stovky kg P za rok, u větších tuny P za rok (Baxa a kol., 2017). Růstová křivka média o koncentraci 0,23 mg P · l⁻¹ má podobné hodnoty jako křivka o koncentraci 0,93 mg P · l⁻¹, viz grafy 5 – 8. Obě vykazují, že prostředí s takovými koncentracemi P je pro sinice přijatelné a v rybníce lze tak očekávat jejich rychlejší růst. Navíc médium o koncentraci 0,23 mg P · l⁻¹, má blízkou koncentraci P, která byla naměřena v epilimniu Horusického rybníka, 0,25 mg P · l⁻¹ (Baxa a kol., 2017)

a dokonce stejnou, která byla naměřena rybníku Rožmberk. Ten by měl být schopen zadržet 31% vstupujícího P (Duras a Potužák, 2012).

Vzhledem ke globálnímu oteplování, zvýšená teplota způsobuje dřívější jarní míchání rybníka, a tudíž delší vegetační období pro sinice (Kroupová, 2015). V rybnících na jaře dominují rozsivky a zelené řasy. V červnu dominanci získávají *Anabaena sigmoides*. Během léta je největší rozvoj *Pseudanabaena*, *Geitlerinema*, *Phormidium*, *Aphanocapsa*, *Aphanizomenon klebahnii* a *Microcystis aeruginosa*, která dominuje až do zří, kdy nastává rozvoj *Microcystis wesenbergii*, *Phormidium* a *Leptolyngbya* (Hlaváčová, 2006., Boráňová, 2012). Dá se očekávat, že během teplého léta a při koncentraci okolo $0,46 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ bude v rybnících velmi vysoký nárůst sinic. Jelikož médium o této koncentraci vykazovalo nejvhodnější podmínky pro růst po koncentraci $15 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ a ve druhé i třetí části pokusu mělo růstové křivky mezi nejvyššími hodnotami, viz grafy 5 – 8.

Médium o nejvyšší koncentraci, $30 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$, vykazovalo nejnižší růstové hodnoty. A to dokonce o více než polovinu, ve srovnání s ostatními koncentracemi, viz grafy 5 a 6. Lze říci, že tak vysoká koncentrace P se stala pro sinice. letální. Ovšem dle Parrish (2014) je považován právě P za primární prvek pro zvyšování koncentrace sinic v rybníce, zvláště pokud je teplota nad $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Kultivace probíhala při teplotě $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Je tedy možné, že v médiu došlo k vyčerpání dusíku či růst ovlivnil jiný faktor nebo byla skutečně koncentrace P až moc vysoká.

Při porovnání výsledků z druhého a třetího pokusu si lze všimnout menších rozdílů růstových křivek jednotlivých koncentracích P, viz grafy 5 – 8. Na začátku druhé části pokusu si lze na grafu 5 všimnout poklesu růstových hodnot v médiích o koncentracích $0,06$; $0,12$; $0,23$; $0,46 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$, oproti grafům 6, 7 a 8. Taktéž si lze všimnout růstové křivky média o koncentraci $0,46 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$, která při druhé části pokusu dosahovala nejvyšších hodnot, na rozdíl od třetí části pokusu. To mohlo být způsobeno nepřesným pipetováním kultury.

V poslední části pokusu jsem měla zaměřit na růst rodu *C. gracile* za různých světelných a teplotních podmínkách. Bohužel vzhledem k vývoji s onemocněním Covid – 19 nebylo měření možné.

6 Závěr

P se jako limitující živina pro růst rybníčních sinic *Cyanobium gracile* Al a *Synechocystis* sp. PCC7509 osvědčil. Při nižších koncentracích P v prostředí, např. při koncentraci $0,06 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$, kterou lze naměřit ve vodních tocích, je růst sinic pomalejší než při vyšších koncentracích, např. při koncentraci $0,46 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$. Ovšem vysoké koncentrace P nejsou dle očekávání pro sinice vyhovující. Nejvyšší použitá koncentrace, $30 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$, vyvolala inhibici růstu. Pokud tedy dojde v rybníku k navýšení fosforu na přibližně podobnou hodnotu, měly by sinice růst velmi málo a pomalu. Nicméně v současném stavu mají rybníky koncentraci P v desetinách $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. To je pro sinice vyhovující prostředí. Pokud v rybníce nastanou podobné koncentrace P jako jsou $0,06$ a $7,5 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$, lze očekávat nižší nárůst sinic než při koncentracích $0,12$ a $1,875 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$. Při koncentracích $0,23$ a $0,93 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$ vykazují sinice jen o málo vyšší růst než u předchozích koncentrací P. Jestliže se v rybnících navýší současná koncentrace P o dvakrát víc, na koncentraci $0,46 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$, lze předpokládat, že sinice budou mít ideální podmínky pro růst. Ovšem nejlépe sinicím vyhovovala koncentrace $15 \text{ mg P} \cdot \text{l}^{-1}$. Při tak vysoké koncentraci sinice vykazovaly nejvyšší růst. Ta se však v rybnících prozatím nevyskytuje. Rybníkáři se zemědělci sice neustále navyšují koncentrace P ve vodách, ale v poslední době se vytváří různá opatření, aby se přísun P do vod zamezil. Vznikají proti erozní opatření, retenční nádrže, které mají zabránit P vniku do recipientu a mnoho dalších opatření.

7 Seznam použité literatury

- Ahlgren, G., 1978. Growth of *Oscillatoria agardhii* in chemostat culture 2. Dependence of growth constants on temperature. Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilungen, 21(1), s. 88-102.
- Bauersachs, T., Schouten, S., Compaoré, J., Wollenzien, U., Stal, L. J., Sinninghe Damsteé, J. S., 2009. Nitrogen isotopic fractionation associated with growth on dinitrogen gas and nitrate by cyanobacteria. Limnology and oceanography, 54(4), s. 1403–1411.
- Baxa, M., Baxová Chmelová I., Benedová, Z., Duras, J., Hrubec, R., Kröpfelová, L., Novotný, O., Pokorný, J., Potužák, J., Svoboda, T., Šulcová, J., 2017. Technologický postup recyklace živin z rybníčních sedimentů s využitím sacího bagru, integrované stanice pro dávkování flokulantu a geotextilních vaků pro lokální aplikaci v mikropovodí. ENKI o.p.s. Třeboň, Třeboň, 51 s.
- Belykh, O. I., Tikhonova, I. V., Sorokovikova, Y. G., Sherbakova, T. A., Kureishevich-Lishchuk, A., 2011. Picoplankton Cyanoprokaryota of Genera *Synechococcus Nägeli* and *Cyanobium Rippka* et Cohen-Baz. from Lake Baikal (Russia). International Journal on Algae, 13(2), s 149-163.
- Berg, M., Sutula, M., 2015. Factors affecting the growth of cyanobacteria with special emphasis on the Sacramento-San Joaquin Delta. Southern California Coastal Water Research Project Technical Report, 869, 100 s.
- Böhme, H., 1998. Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. Trends in Plant Science, 3(9), s. 346-351.
- Boráňová, K., 2012. Perifytické sinice inundační zóny řeky Moravy. Olomouc, Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Petr Hašler.
- Boyd, C. E., 2019. Water quality: an introduction. 3rd ed. Springer, Auburn, 440 s.
- Bright, D. I., Walsby, A. E., 2000. The daily integral of growth by *Planktothrix rubescens* calculated from growth rate in culture and irradiance in Lake Zürich. The New Phytologist, 146(2), s. 301-316.
- Burut-Archanaí, S., Eaton-Rye, J. J., Incharoensakdi, A., Powtongsook, S., 2013. Phosphorus removal in a closed recirculating aquaculture system using the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain lacking the SphU regulator of the Pho regulon. Biochemical engineering journal, 74, s. 69-75.
- Capone, D. G., Burns, J. A., Montoya, J. P., Subramaniam, A., Mahaffey, C., Gunderson, T., Michaels A. F., Carpenter, E. J., 2005. Nitrogen fixation by *Trichodesmium spp.*: An important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 19(2).
- Carlson R.E., Simpson J., 1996. A Coordinator's Guide to Volunteer Lake Monitoring Methods. North American Lake Management Society, Madison, 96 s.
- Correll, D. L., 1998. The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. Journal of environmental quality. 27(2), s. 261-266.
- Degerholm, J., Gunderson, K., Bergman, B., Söderbäck, E., 2006. Phosphorus-limited growth dynamics in two Baltic Sea cyanobacteria, *Nodularia* sp. and *Aphanizomenon* sp. FEMS microbiology ecology, 58(3), s. 323-332.
- Doležalková, I., 2010. Účinky vybraných monoacylglycerolů na růst bakterií a mikroskopických vláknitých hub. Brno, Rigózní práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Leona Buňková.
- Downing, J. A., Watson, S. B., Mccauley, E., 2001. Predicting Cyanobacteria dominance in lakes, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 58(10), s. 1905–1908.

- Drápalová, J., 2017. Problematika likvidace sinic na vybrané vodní nádrži. Brno, bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta. Vedoucí práce Petra Oppeltová.
- Duras, J., Potužák, J., 2012. Látková bilance fosforu v produkčních a rekreačních rybnících. *Vodní hospodářství*, 6(2012), s. 14-20.
- Ernst, A., Deicher, M., Herman, P. M., Wollenzien, U. I., 2005. Nitrate and phosphate affect cultivability of cyanobacteria from environments with low nutrient levels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6), s. 3379-3383.
- Foy, R. H., Gibson, C. E., Smith, R. V., 1976. The influence of daylength, light intensity and temperature on the growth rates of planktonic blue-green algae. *British phycological journal*, 11(2), s. 151-163.
- Freidinger, J., 2016. Kvalita vody odtékající z rybníků v průběhu vypouštění a výlovu se zřetelem na bilanci fosforu a nerozpuštěných látek. České Budějovice, Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce Zdeněk Adámek.
- Groth, S. F. D. S., 1983. Automated production of monoclonal antibodies in a cytostat. *Journal of immunological methods*, 57(1-3), s. 121-136.
- Hájková, Z., 2007. Metabolická zdatnost a genová exprese u populace erytromycin rezistentních buněk *Escherichia coli* rostoucích v kontinuální kultuře v přítomnosti a nepřítomnosti antibiotika. Praha, Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Jaroslav Weiser.
- Hanika, J., 1997. Vícefázové reaktory. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 128 s.
- Henrard, A. A., Rosa, G. M., Moraes, L., Morais, M. G., Costa, J. A. V., 2015. The cultivation of microalgae *Cyanobium sp.* and *Chlorella sp.* in different culture media and stirring setting. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 9, s. 1431-1439.
- Hindák, F., Kviderová, J., Lukavský, J., 2013. Growth characteristics of selected thermophilic strains of cyanobacteria using crossed gradients of temperature and light. *Biologia*, 68(5), s. 830–837.
- Hlaváčová, L., 2006. Faktory spojené s rozvojem sinice rodu *Microcystis* na Brněnské přehradě. Brno, Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Blahoslav Maršálek.
- Hodáčová, A., 2011. Sinice spojené se stromatolitovými biofilmy v německém potoce Westerhöfer. Praha, Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecké fakulta. Vedoucí práce Marek Eliáš.
- Hoffman, B. M., Dean, D. R., Seefeldt, L. C., 2009. Climbing nitrogenase: toward a mechanism of enzymatic nitrogen fixation. *Accounts of chemical research*, 42(5), s. 609–619.
- Hudnell, H. K. ed., 2008. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs, Vol. 619. Springer Science and Business Media, New York, 956 s.
- Huesemann, M. H., Bartha, R., Hausmann, T. S., Benemann, J. R., 2003. An innovative approach for screening marine microalgae for maximum flue gas CO₂ biofixation potential. *Proceedings of the Second Annual Conference on Carbon Sequestration*, Alexandria.
- Huisman, J., Hulot, F. D., 2005. Population dynamics of harmful cyanobacteria. *Harmful cyanobacteria*. Springer, Dordrecht, 241 s.
- Chaffin, J. D., Bridgeman, T. B., 2014. Organic and inorganic nitrogen utilization by nitrogen-stressed cyanobacteria during bloom conditions. *Journal of applied phycology*, 26(1), s. 299–309.
- Chmelík, D., 2009. Azotobacter a nesymbiotická fixace molekulového dusíku. Brno, Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Miroslav Němec.
- Janča, Š., 2013. Zákal vody ve vodovodních sítích. Brno, Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta stavební. Vedoucí práce Jan Ručka.

- Kacmar, J., Gilbert, A., Cockrell, J., Srienc, F., 2006. The cyostat: A new way to study cell physiology in a precisely defined environment. *Journal of biotechnology*, 126(2), s. 163-172.
- Kalff, J., 2002. *Limnology: inland water ecosystems*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 592 s.
- Kalina, T., 1994. *Systém a vývoj sinic a řas: skripta pro posluchače Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy*. Karolinum, Praha, 165 s.
- Kaprálek, F., 1986. *Fyziologie bakterií*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 605 s.
- Klaban, V., 2005. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*, Praha: Nakladatelství Galén, 654 s.
- Kondo, T., Mori, T., Lebedeva, N. V., Aoki, S., Ishiura, M., Golden, S. S., 1997. Circadian rhythms in rapidly dividing cyanobacteria. *Science*, 275(5297), s. 224-227.
- Kotula, P., 2011. Fosfor – limitující prvek eutrofizace. Ostrava, bakalářská práce. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. Hornicko-geologická fakulta. Vedoucí práce Hana Škrobánková.
- Kroupová, K., 2015. Vliv rybářského obhospodařování rybníků, zemědělské činnosti v povodích a změn klimatu na druhové složení vodních květů sinic. Praha, Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Evžen Stuchlík.
- Kryštofová, K., (2012). Technologické možnosti odstraňování sinic a řas. Ostrava, Bakalářská práce. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava. Hornicko-geologická fakulta. Vedoucí práce Hana Škrobánková.
- Kučerová, J., 2007. Bakterie asociované se sinicemi vodního květu. Brno, Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Blahoslav Maršálek.
- Kumar, K., Mella-Herrera, R. A., Golden, J. W., 2010. Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(4), s. 1-19.
- Litchman, E., 2003. Competition and coexistence of phytoplankton under fluctuating light: experiments with two cyanobacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 31(3), s. 241-248.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*. 14(1), s. 217-232.
- Mikšíková, K., Dostál, T., Vrána, K., Rosendorf, P., 2012. Transport sedimentu a fosforu při výlovu malých vodních nádrží. *Vodní hospodářství* (6), s. 203-208
- Monod, J., 1949. The growth of bacterial cultures. *Annual review of microbiology*, 3(1), s. 371-394.
- Moreno, J., Vargas, M. A., Rodríguez, H., Rivas, J., Guerrero, M. G., 2003. Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena sp. ATCC 33047*. *Biomolecular engineering*, 20(4-6), s. 191-197.
- Moslavac, S., Reisinger, V., Berg, M., Mirus, O., Vosyka, O., Plösch, M., Flores, E., Eichacker, L. A., Schleiff, E., 2007. The proteome of the heterocyst cell wall in *Anabaena sp. PCC 7120*. *Biological chemistry*, 388(8), 823-829.
- Motlová, L., 2009. Stacionární fáze růstu *Bacillus subtilis*. Praha, Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Ivo Konopásek.
- Parker, N., Schneegurt, M., Tu, A.T, Lister, P., Forster B.M., 2016. How Microbes Grow [online]. Opentextbc [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <https://opentextbc.ca/microbiologyopenstax/chapter/how-microbes-grow/>
- Parrish, J., 2014. The role of nitrogen and phosphorus in the growth, toxicity, and distribution of the toxic cyanobacteria, *Microcystis Aeruginosa*. Master's Projects and Capstones.
- Pazlarová, J., 2018. Mikrobiologické zkoumání potravin [online]. In: old-biomikro.vscht.cz [cit. 2020-03-11]. Dostupné z: http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/pm/Mikrobiologicke_zkoumani_potravin.pdf
- Pernicová, H., 2006. Ekotoxicita komplexních vzorků vodních květů sinic. Brno, Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Luděk Bláha.

- Pisciotta, J. M., Zou, Y., Baskakov, I. V., 2010. Light-dependent electrogenic activity of Cyanobacteria. *Plos one*. 5(5), s. 1-10.
- Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Jackson, R. B., 2011. *Campbell biology*, 9th ed, Pearson, Boston, 1464 s.
- Reynolds, C. S., 2006. *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press, Lancaster, 535 s.
- Robarts, R. D., Zohary, T., 1987. Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria. *New Zealand journal of marine and freshwater research*, 21(3), s. 391-399.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M., 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 44(1-2), 83-92.
- Roubalová, J., 2018. Optimalizace metodiky vedoucí k hodnocení citlivosti biofilm formujících mikrobiálních agens vůči látkám s antimikrobním potenciálem. Hradec Králové, Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Klára Konečná.
- Sedlářová M., 2010. Materiály k přednáškám z mikrobiologie. In: old.botany.upol [online].
- Sigeo, D. C., 2005. *Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*. John Wiley & Sons, Chichester, 524 s.
- Snoeijs-Leijonmalm, P., Schubert, H., Radziejewska, T., ed, 2017. *Biological oceanography of the Baltic Sea*. Springer Science & Business Media, Dordrecht, 683 s.
- Stal, L. J., 2009. Is the distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria in the oceans related to temperature? *Environmental microbiology*. 11(7), s. 1632–1645.
- Staub, R., 1961. Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie*, 23(1), s. 82-198.
- Stiborová, K., 2017. Druhová diverzita a morfologická variabilita subtropických sinic. Olomouc, Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Petra Hašler.
- Strnadová, J., 2015. Chemismus rybníčních vod ČR – dlouhodobý vývoj chemismu rybníčních vod – efekt eutrofizace. České Budějovice, Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce Pavel Ondr.
- Šejnohová, L., Maršálek, B., 2005. Pohled do mikroskopického světa sinic. *Živa*. 53(2), s. 105-108.
- Štangelová, P., 2013. Monitorování výskytu sinic na vodním díle Seč pomocí analytických metod. Praha, Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Eva Tesařová.
- Bartram, J., Chorus, I., 1999. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. CRC Press, New York, 440 s.
- Štern, P., 2006. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*, 14(35), s. 146-151.
- Tel-Or, E., Stewart, W. D. P., 1977. Photosynthetic components and activities of nitrogen-fixing isolated heterocysts of *Anabaena cylindrica*. *Biological Sciences*, 198(1130), s. 61–86.
- Vermaas, W. F.J., 2001. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley and Sons, Chichester.
- Vonshak, A., 1985. *Micro-algae: laboratory growth techniques and outdoor biomass production. Techniques in bioproductivity and photosynthesis*. Pergamon, Oxford, s. 188-200.
- Voplakal, K. Fosfor v půdě. In: uroda.cz [online]. 5. 1. 2001 [cit. 13.04.2020]. Dostupné z: <https://www.uroda.cz/fosfor-v-pude/>

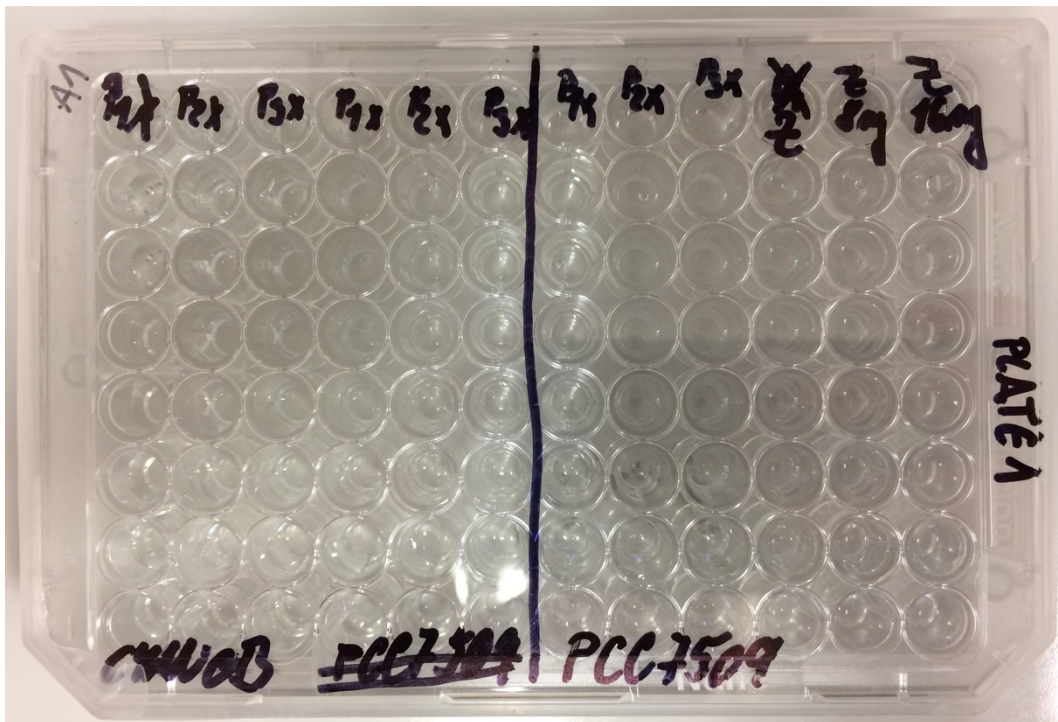
- Weiperová L., 2011. Sinice jako bioindikátory eutrofizace vod. Ostrava, Bakalářská práce. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava. Hornicko-geologická fakulta. Vedoucí práce Hana Vojtková.
- Whitton, B. A., ed., 2012. The ecology of cyanobacteria II: their diversity in time and space. Springer Science and Business Media, New York, 760 s.
- Whitton, B. A., Potts, M., ed., 2002. The ecology of the cyanobacteria: their diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers, Boston, 669 s.
- Yamagishi, T., Katsumata, M., Yamaguchi, H., Shimura, Y., Kawachi, M., Koshikawa, H., Horie, Y., Tatarazako, N., 2016. Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the marine cyanobacterium *Cyanobium sp.(NIES-981)*. *Ecotoxicology*, 25(10), s. 1751 – 1758.
- Zhao, Z., Wang T., Chen L., 2010. Dynamic analysis of a turbidostat model with the feedback control. *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, 15(4), s. 1028 – 1035.

8 Seznam příloh

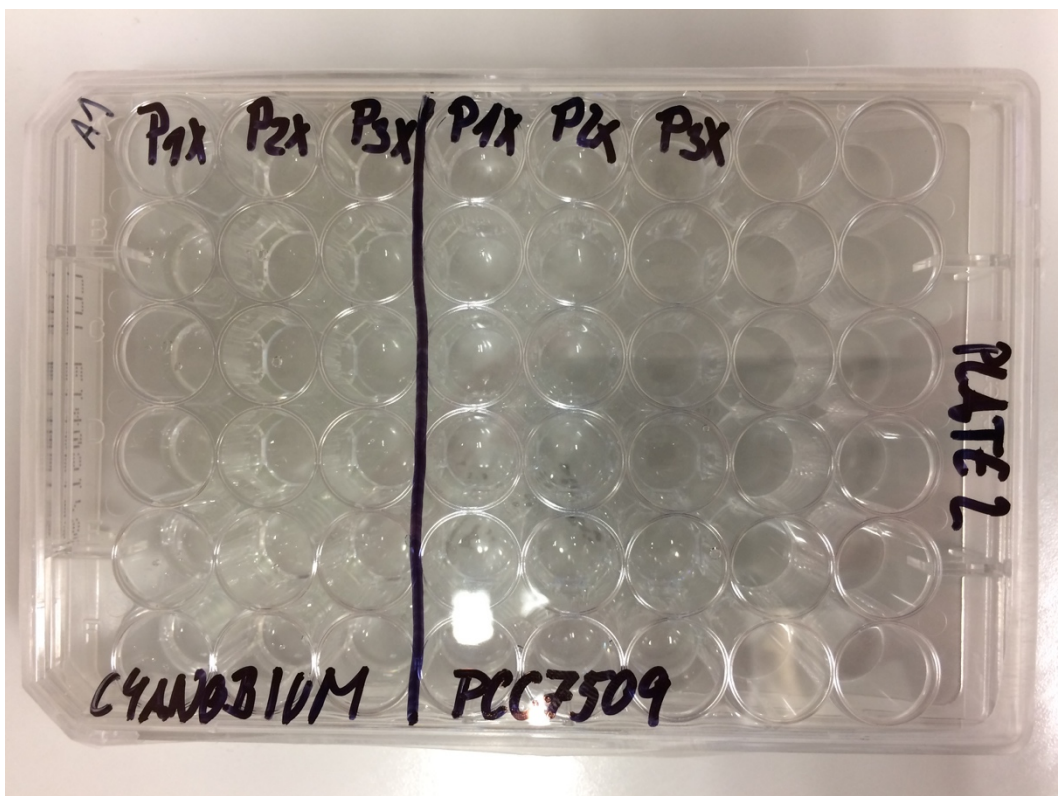
- Příloha 1: Kultivační destička Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.
- Příloha 2: Kultivační destička Cellstar 48 Well Cell Culture Plate se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.
- Příloha 3: Kultivační destička Iwaki Microplate with Lid 24 Well se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.
- Příloha 4: Kultivační destička Tpp Zellkultur Testplatte 12 Well se vzorky kmene *C. gracile*
- Příloha 5: Kultivační destička Tpp Zellkultur Testplatte 12 Well se vzorky kmene *Synechocystis*.
- Příloha 6: Kultivační destička Tpp Zellkultur Testplatte 6 Well se vzorky kmene *C. gracile*
- Příloha 7: Kultivační destička Tpp Zellkultur Testplatte 6 Well se vzorky kmene *Synechocystis*.
- Příloha 8: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.
- Příloha 9: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Cellstar 48 Well Cell Culture Plate se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.
- Příloha 10: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Iwaki Microplate with Lid 24 Well se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.
- Příloha 11: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Tpp Zellkultur Testplatte 12 Well se vzorky kmene *C. gracile*
- Příloha 12: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Tpp Zellkultur Testplatte 12 Well se vzorky kmene *Synechocystis*.
- Příloha 13: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Tpp Zellkultur Testplatte 6 Well se vzorky kmene *C. gracile*
- Příloha 14: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Tpp Zellkultur Testplatte 6 Well se vzorky kmene *Synechocystis*.
- Příloha 15: Kultivační destička Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well ve druhé části pokusu se vzorky kmene *C. gracile*
- Příloha 16: Výsledek druhé části pokusu kultivační destičky Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well se vzorky kmene *C. gracile*

- Příloha 17: Kultivační destička Cellstar 48 Well Cell Culture Plate ve druhé části pokusu se vzorky kmene *C. gracile*
- Příloha 18: Výsledek druhé části pokusu kultivační destičky Cellstar 48 Well Cell Culture Plate se vzorky kmene *C. gracile*
- Příloha 19: Kultivační destička Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well ve třetí části pokusu se vzorky kmene *C. gracile*
- Příloha 20: Výsledek třetí části pokusu kultivační destičky Cellstar 48 Well Cell Culture Plate se vzorky kmene *C. gracile*
- Příloha 21: Kultivační destička Cellstar 48 Well Cell Culture Plate ve třetí části pokusu se vzorky kmene *C. gracile*
- Příloha 22: Výsledek třetí části pokusu kultivační destičky Cellstar 48 Well Cell Culture Plate se vzorky kmene *C. gracile*

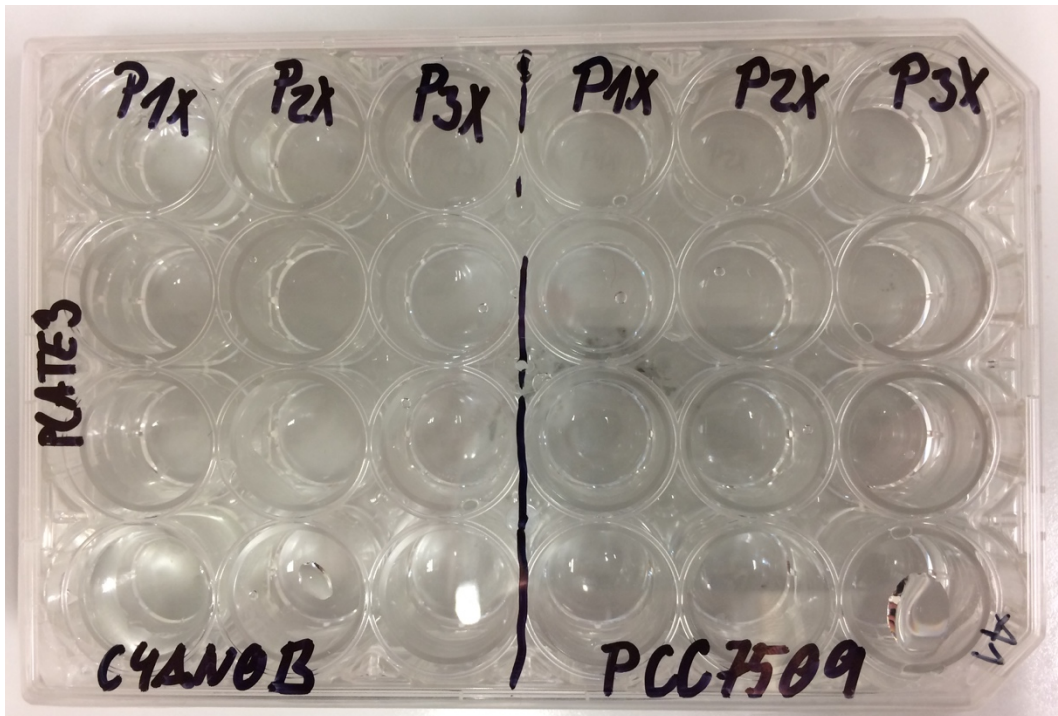
9 Přílohy



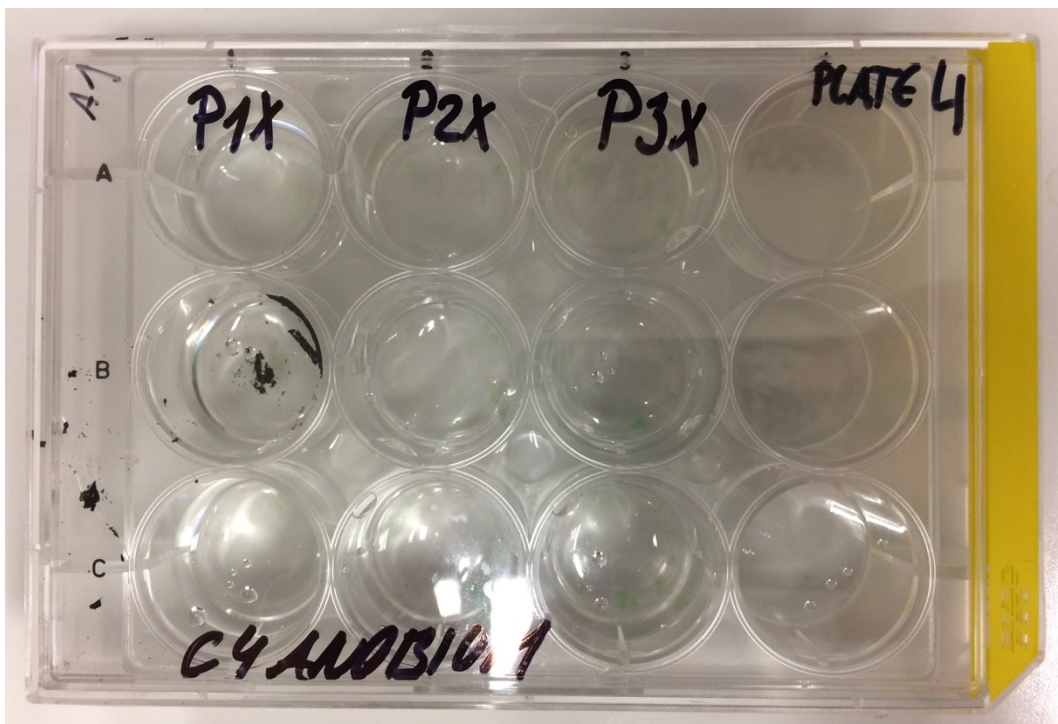
Příloha 1: Kultivační destička Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.



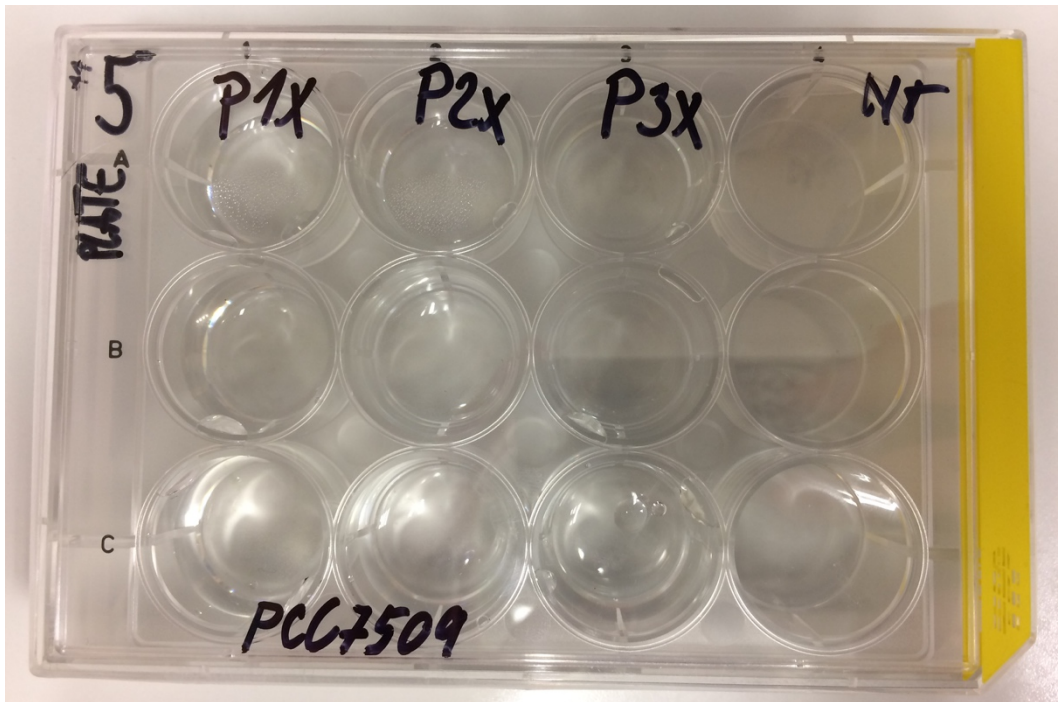
Příloha 2: Kultivační destička Cellstar 48 Well Cell Culture Plate se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.



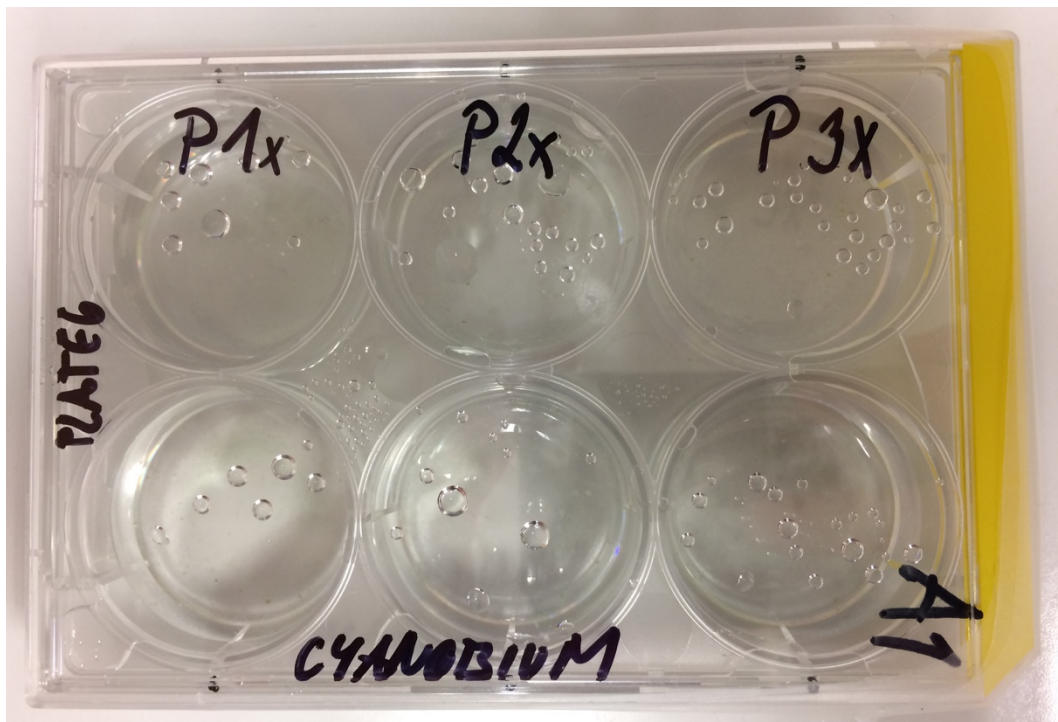
Příloha 3: Kultivační destička Iwaki Microplate with Lid 24 Well se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.



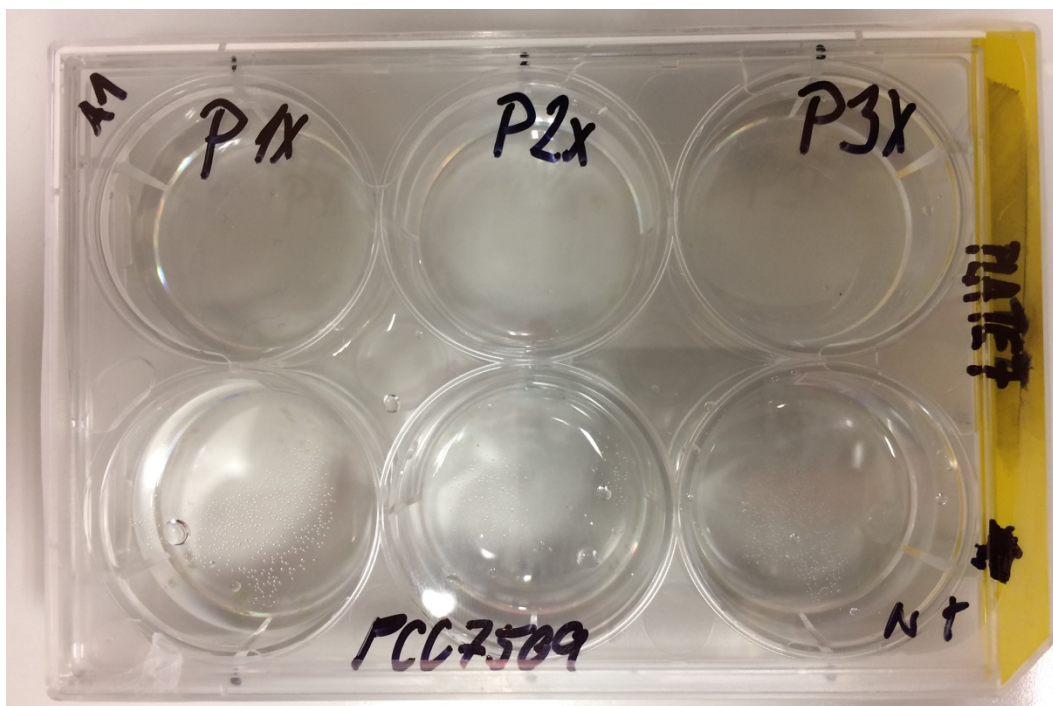
Příloha 4: Kultivační destička Tpp Zellkultur Testplatte 12 Well se vzorky kmene *C. gracile*.



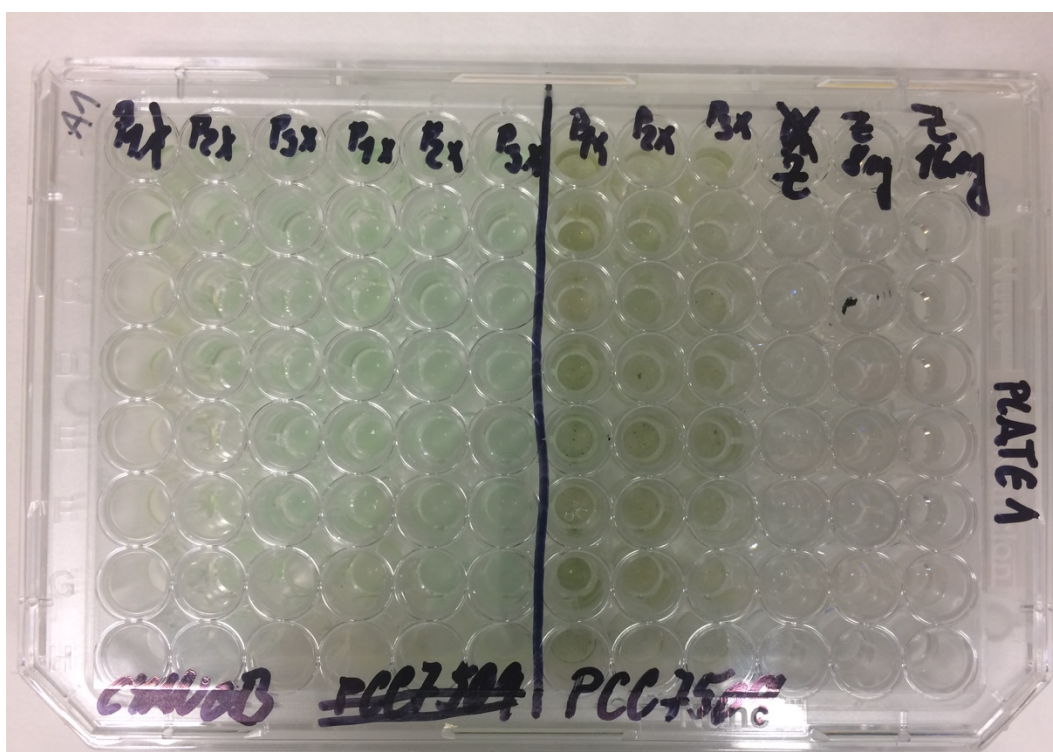
Příloha 5: Kultivační destička Tpp Zellkultur Testplatte 12 Well se vzorky kmene *Synechocystis*.



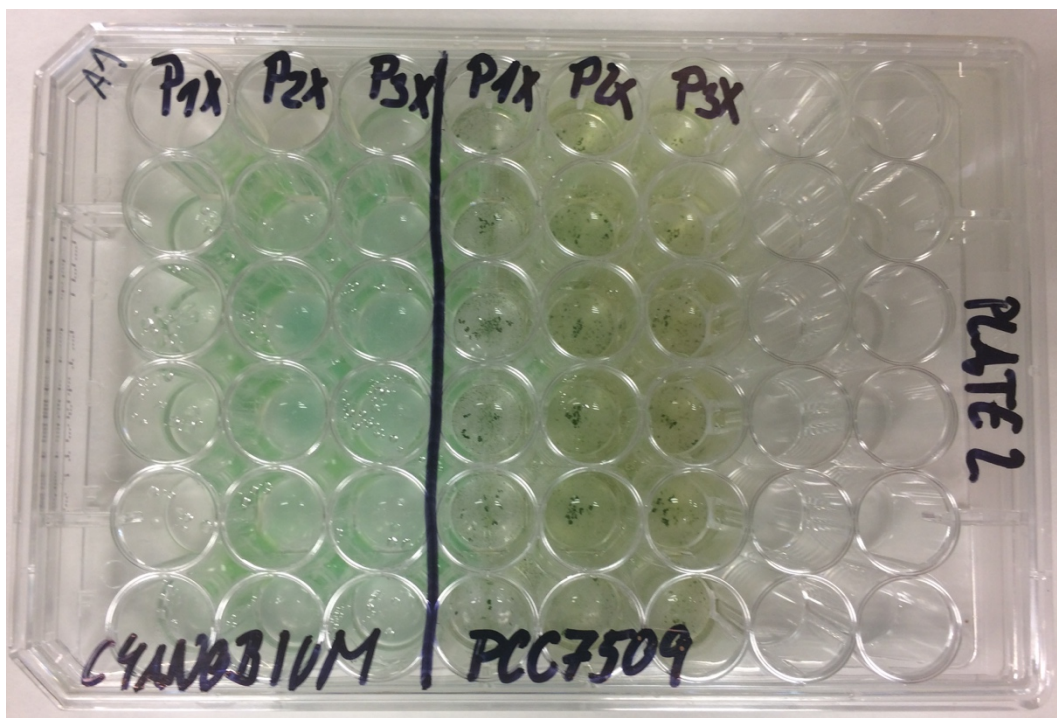
Příloha 6: Kultivační destička Tpp Zellkultur Testplatte 6 Well se vzorky kmene *C. gracile*.



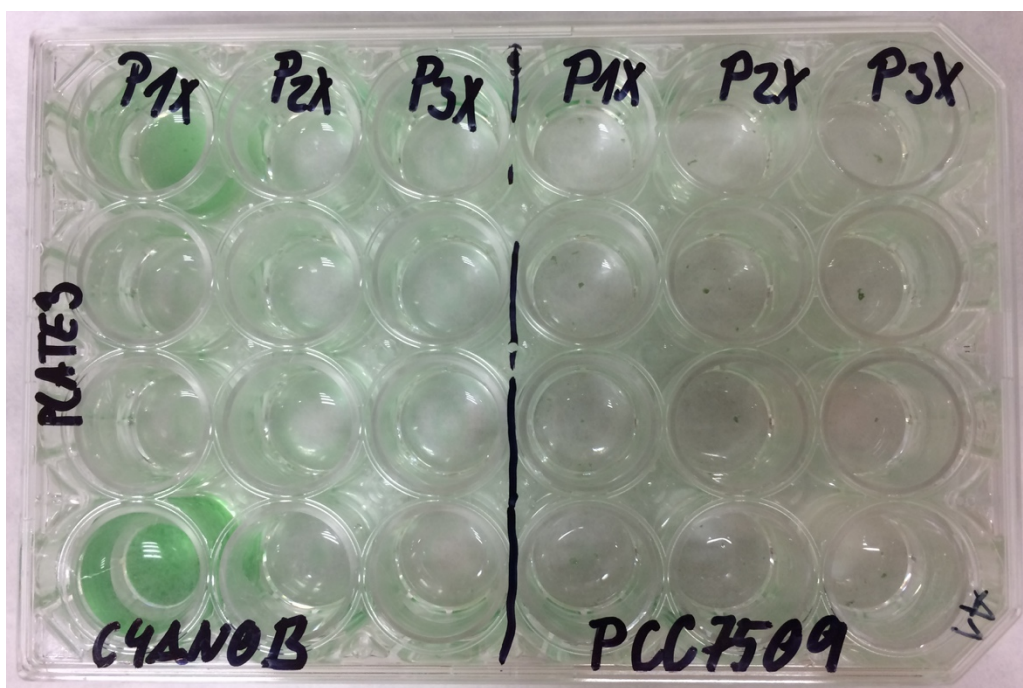
Příloha 7: Kultivační destička Tpp Zellkultur Testplatte 6 Well se vzorky kmene *Synechocystis*.



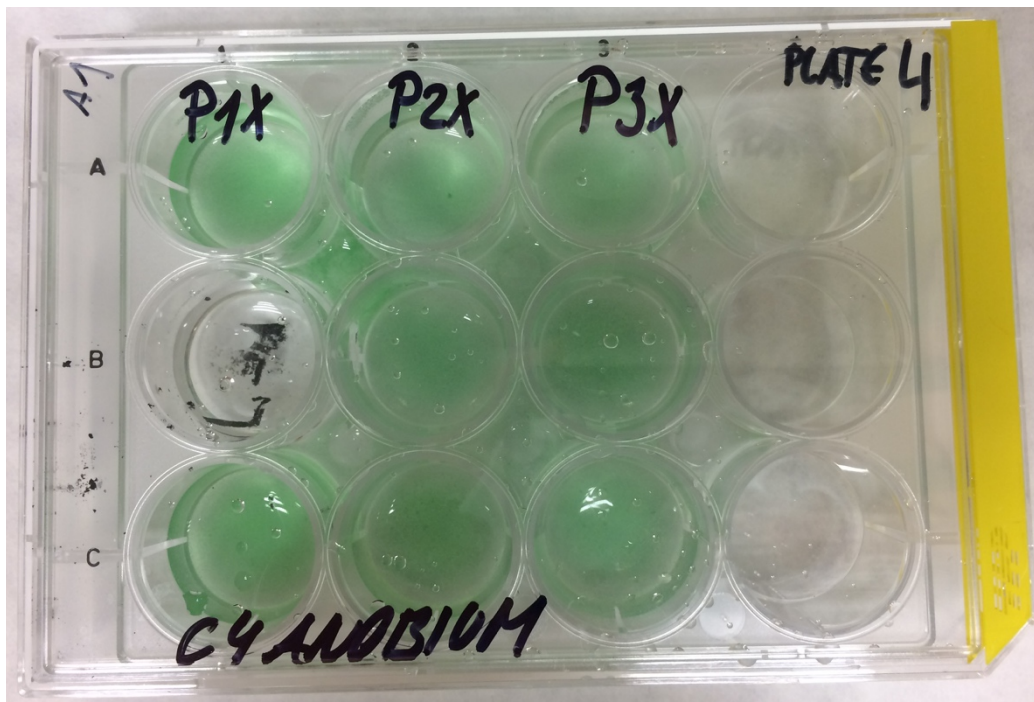
Příloha 8: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.



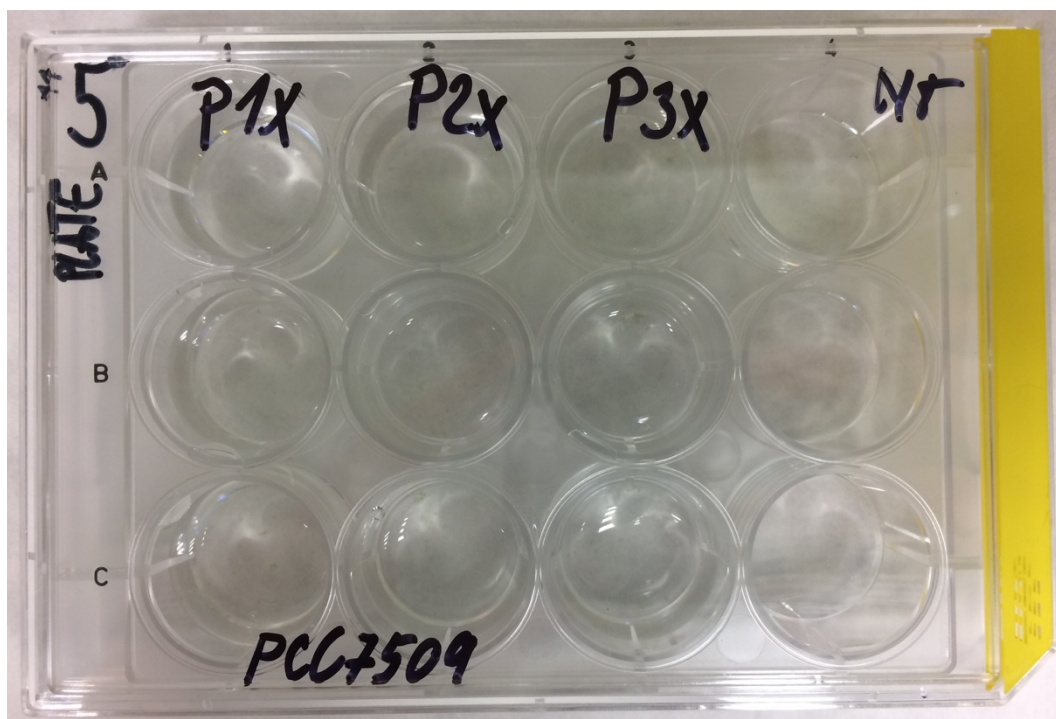
Příloha 9: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Cellstar 48 Well Cell Culture Plate se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.



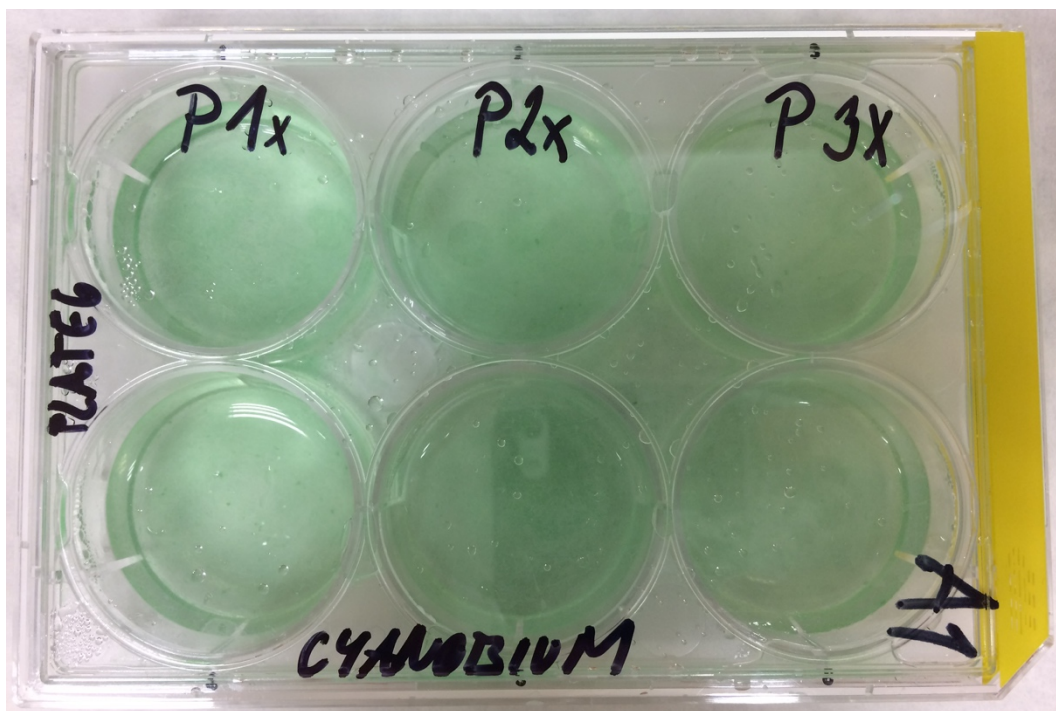
Příloha 10: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Iwaki Microplate with Lid 24 Well se vzorky kmenů *C. gracile* a *Synechocystis*.



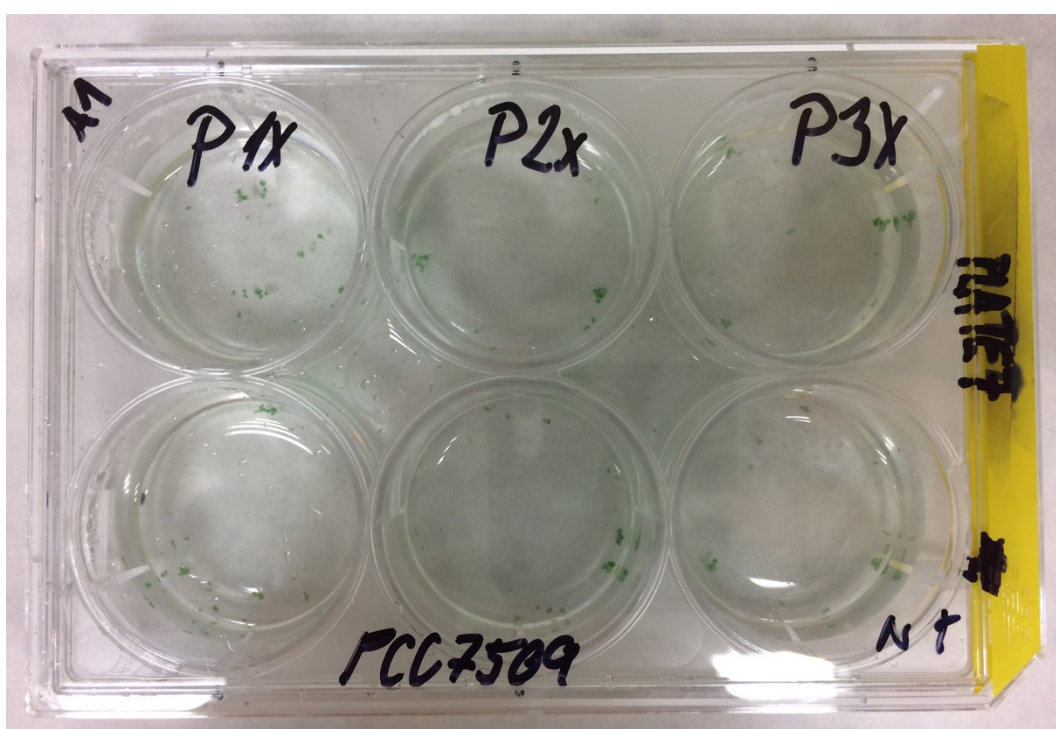
Příloha 11: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Tpp Zellkultur Testplatte 12 Well se vzorky kmene *C. gracile*.



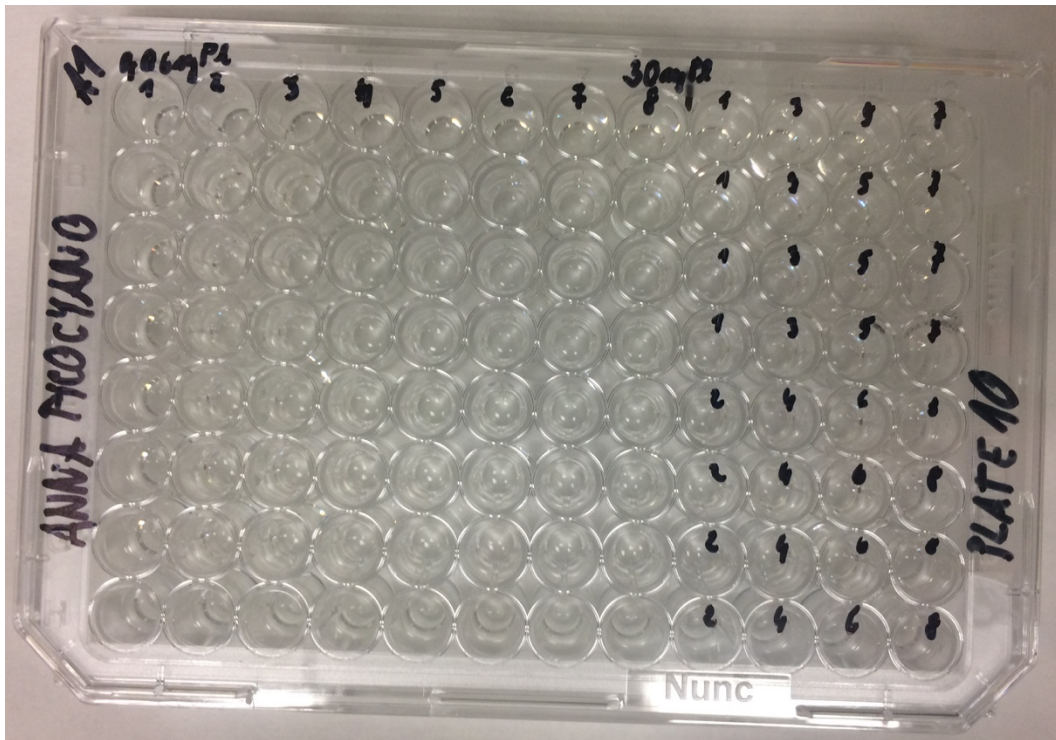
Příloha 12: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Tpp Zellkultur Testplatte 12 Well se vzorky kmene *Synechocystis*..



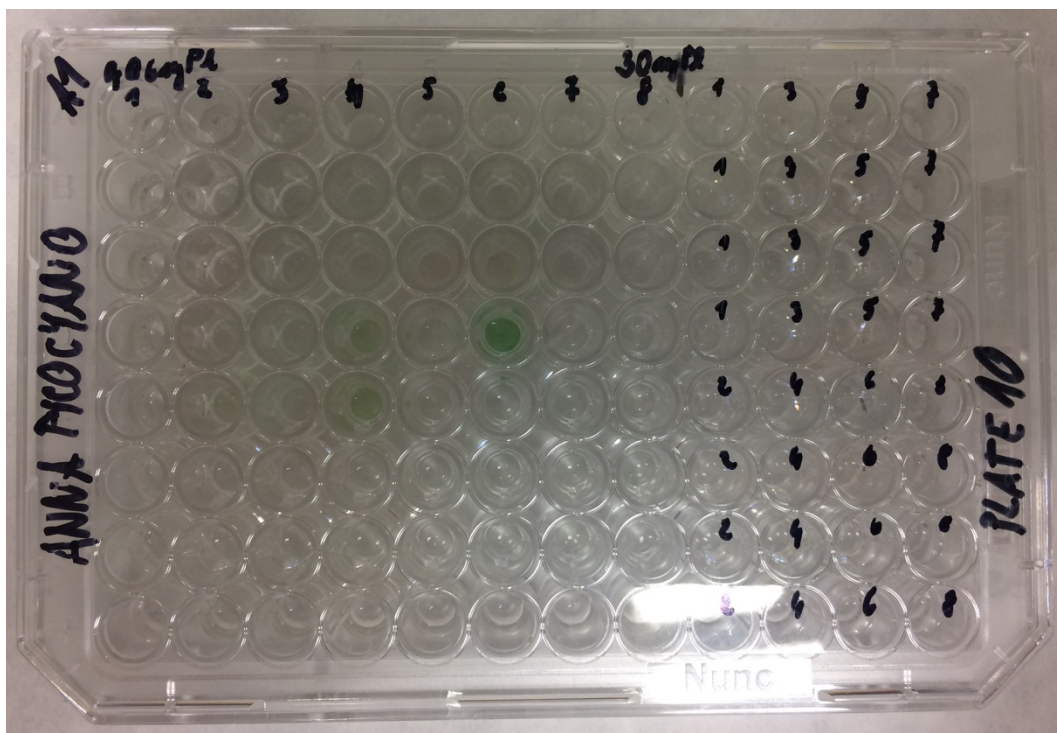
Příloha 13: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Tpp Zellkultur Testplatte 6 Well se vzorky kmene *C. gracile*.



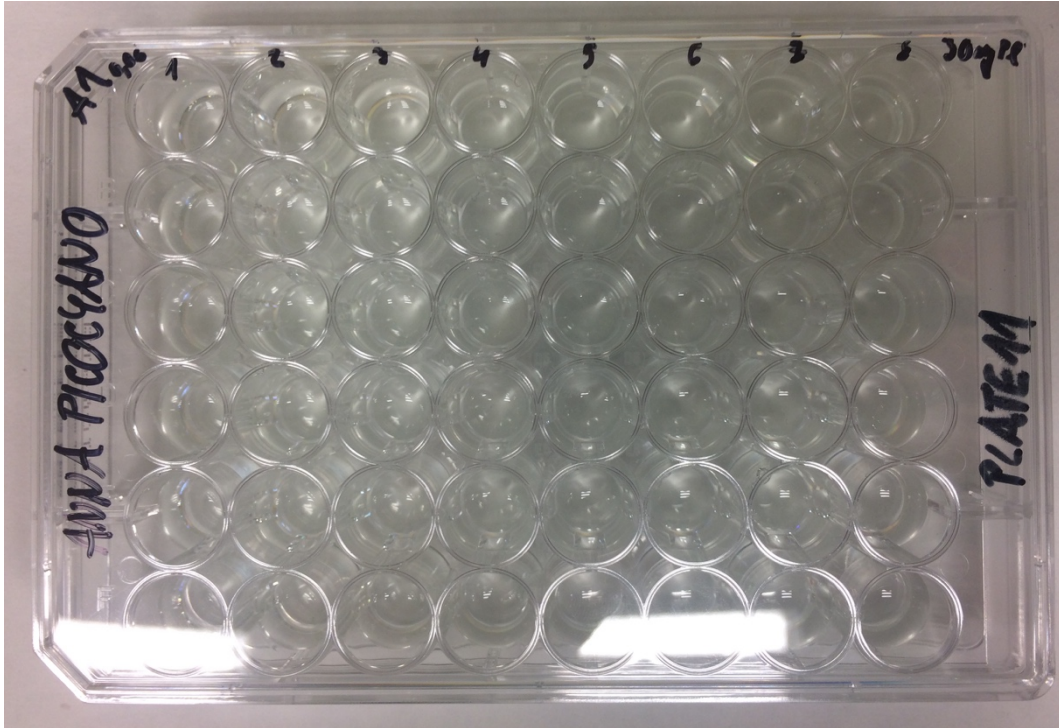
Příloha 14: Výsledek první části pokusu kultivační destičky Tpp Zellkultur Testplatte 6 Well se vzorky kmene *Synechocystis*.



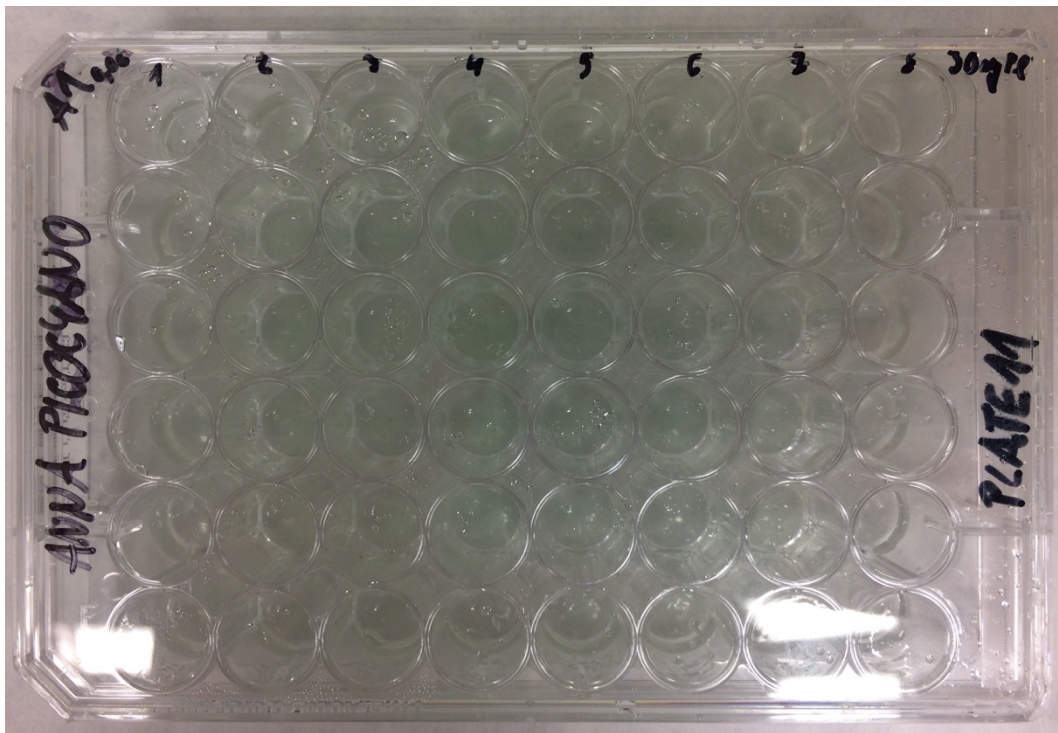
Příloha 15: Kultivační destička Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well ve druhé části pokusu se vzorky kmene *C. gracile*.



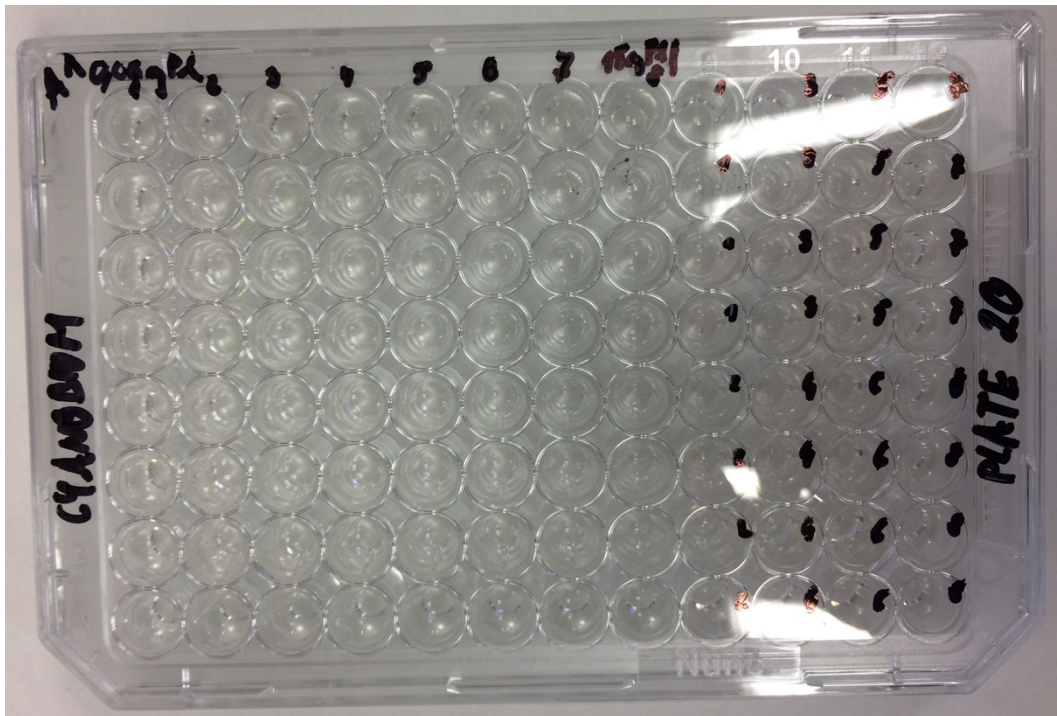
Příloha 16: Výsledek druhé části pokusu kultivační destičky Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well se vzorky kmene *C. gracile*.



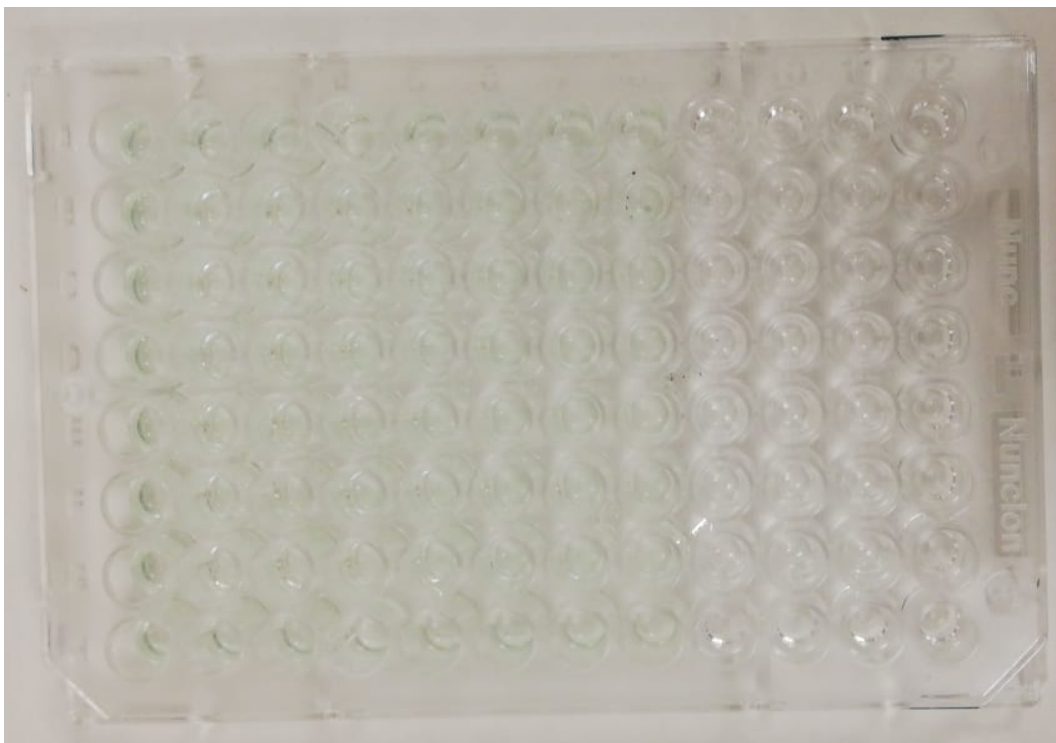
Příloha 17: Kultivační destička Cellstar 48 Well Cell Culture Plate ve druhé části pokusu se vzorky kmene *C. gracile*.



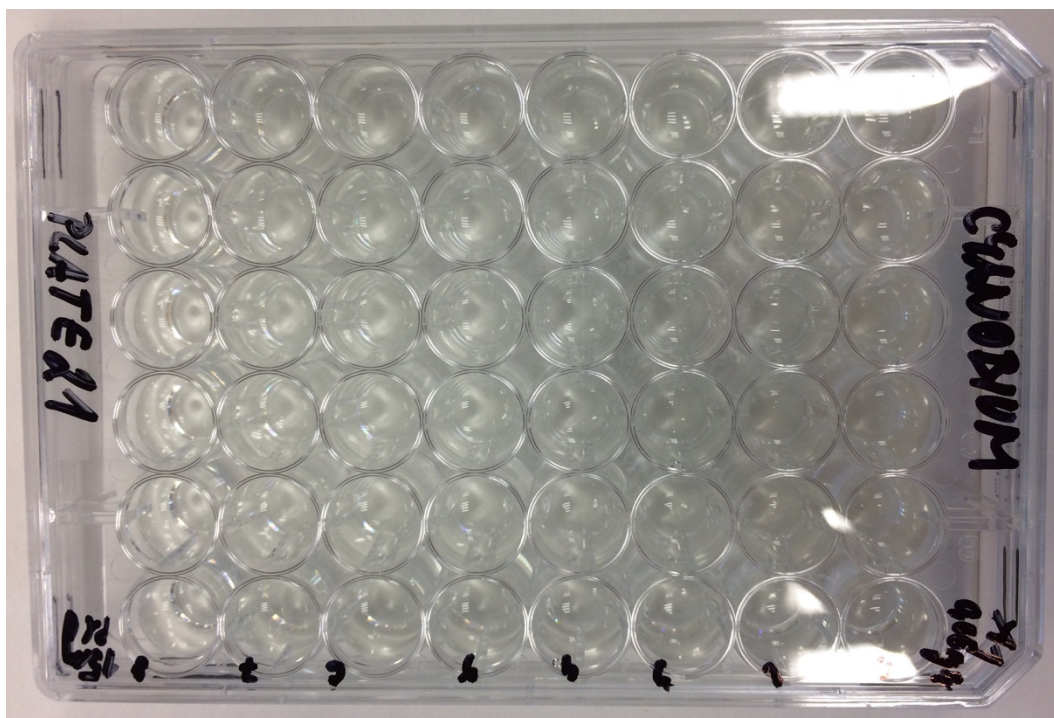
Příloha 18: Výsledek druhé části pokusu kultivační destičky Cellstar 48 Well Cell Culture Plate se vzorky kmene *C. gracile*.



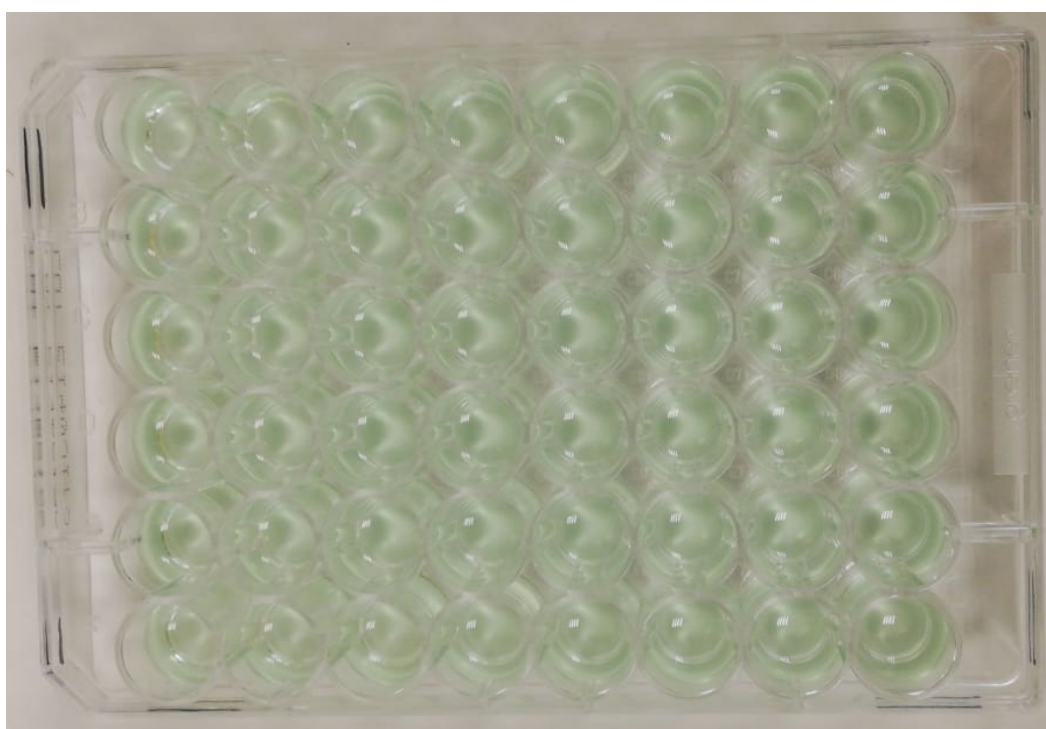
Příloha 19: Kultivační destička Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well ve třetí části pokusu se vzorky kmene *C. gracile*.



Příloha 20: Výsledek třetí části pokusu kultivační destičky Thermo Scientific Nunclon™Delta Surface 96 Well se vzorky kmene *C. gracile*.



Příloha 21: Kultivační destička Cellstar 48 Well Cell Culture Plate ve třetí části pokusu se vzorky kmene *C. gracile*.



Příloha 22: Výsledek třetí části pokusu kultivační destičky Cellstar 48 Well Cell Culture Plate se vzorky kmene *C. gracile*.

10 Abstrakt

Rychlost růstu dominantních rybníčních sinic

Bakalářská práce se zabývá stanovením růstu sinic z rybníků. Výsledky slouží ke stanovení růstového potenciálu v souvislosti s eutrofizací, tj. zvyšování koncentrací živin ve vodách. V experimentu byly použity kultivované kmeny *Cyanobium gracile* A1 (*C. gracile*) a *Synechocystis* sp. PCC7509 (*Synechocystis*). Pro stanovení jejich růstu byla využita statická kultivace v kultivačních destičkách s rozdílnými objemy jamek Thermo Scientific Nunclon™ Delta Surface 96 Well a Cellstar 48 Well Cell Culture Plate, které byly z první části pokusu vyhodnocené jako nejvhodnější. Sinice byly kultivovány v koncentracích od 0,06 do 30 mg P · l⁻¹ v Z médiu. K měření růstu byl využit spektrofotometr, nastavený pro měření fluorescence a absorpance při vlnové délce OD₇₅₀ nm. Při této vlnové délce mají sinice zanedbatelnou absorpci, a proto se pro měření biomasy využil zákal. Z jednotlivých měření se vytvořily růstové křivky, které jsou v práci zobrazeny pomocí grafů.

Z výsledků lze říci, že nejvyšší použitá koncentrace, 30 mg P · l⁻¹, způsobila inhibici růstu. Tak vysokou koncentraci P ovšem v rybnících nenaměříme. V současném stavu mají rybníky koncentraci P v desetinách mg P · l⁻¹. A takové nízké koncentrace P vytvářejí pro růst sinic vhodné prostředí. Sinice v prostředí o koncentraci 0,06 mg P · l⁻¹ vykazovaly přijatelné růstové hodnoty. Ovšem při koncentraci 0,46 mg P · l⁻¹, která je dvakrát vyšší než současná koncentrace P v rybnících, vykazovali sinice mnohem vyššího růstové hodnoty. A dokonce při koncentraci 15 mg P · l⁻¹ dosáhly sinice nejvyšších růstových hodnot. Dá se tedy očekávat, že pokud bude koncentrace P v rybnících stoupat až k hodnotám 15 mg P · l⁻¹ bude v rybníce probíhat rychlý rozvoj sinic. K takovému stavu napomáhají rybníkáři a zemědělci, kteří zvyšují koncentraci P ve vodách svým působením. Naštěstí však vznikají opatření, které mají přísun P do vod omezit.

Na závěr experimentu jsem měla měřit růstovou rychlost v gradientu osvětlení, to jsem ale vzhledem k vyhlášení uzavření vysokých škol kvůli viru COVID-19 nemohla uskutečnit.

Klíčová slova: absorpance, *Cyanobium gracile* A1, fosfor, OD₇₅₀, růstová rychlost, sinice, *Synechocystis* sp. PCC750

11 Abstract

Rychlost růstu dominantních rybníčních sinic

The bachelor thesis deals with the determination of cyanobacterial growth from ponds. The results are used to determine the growth potential in connection with eutrophication, i.e. increasing the concentrations of nutrients in water. Cultured strains of *Cyanobium gracile* A1 (*C. gracile*) and *Synechocystis* sp. PCC7509 (*Synechocystis*) were used in the experiment. To determine their growth, static cultivation was used in culture plates with different well volumes of Thermo Scientific Nunclon™ Delta Surface 96 Well and Cellstar 48 Well Cell Culture Plate, which were evaluated as the most suitable from the first part of the experiment. Cyanobacteria were cultured in concentrations from 0.06 to 30 mg P · l⁻¹ in Z medium. To measure the growth, a spectrophotometer measuring fluorescence and absorbance was set up at OD₇₅₀ nm wavelength. At this wavelength cyanobacteria have negligible absorption and therefore turbidity was used to measure biomass. Growth curves were created from individual measurements and are shown in the form of graphs.

The results show that the highest concentration used, 30 mg P · l⁻¹, caused growth inhibition. However, we will not measure such a high concentration of P in ponds. In the current state, ponds have a concentration of P in tenths of mg · l⁻¹. And such low concentrations of P create a suitable environment for the growth of cyanobacteria. Cyanobacteria in an environment with a concentration of 0.06 mg P · l⁻¹ showed acceptable growth values. However, at a concentration of 0.46 mg P · l⁻¹, which is twice the current concentration of P in ponds, cyanobacteria showed much higher growth values. And even at a concentration of 15 mg P · l⁻¹, cyanobacteria reached the highest growth values. It can therefore be expected that if the concentration of P in the ponds rises to the values of 15 mg P · l⁻¹, a rapid development of cyanobacteria will take place in the pond. This condition is contributed to by pond keepers and farmers, whose actions increase the concentration of P in the water. Fortunately, however, measures are being taken to reduce the supply of P to the waters.

At the end of the experiment, I was supposed to measure the growth rate in the lighting gradient, but due to the announcement of the closure of universities due to the COVID - 19 virus, I was not able to fulfil that.

Key words: absorbance, cyanobacteria, *Cyanobium gracile* A1, growth rate, OD₇₅₀, phosphorus, *Synechocystis* sp. PCC750