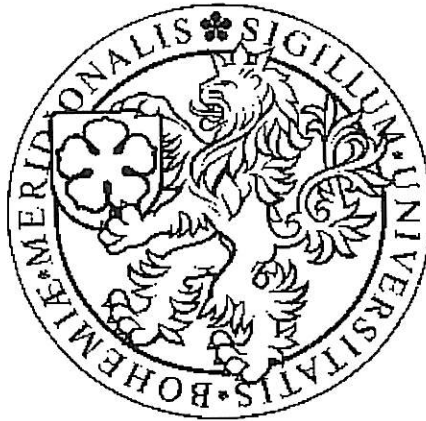


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Biologická fakulta



Magisterská práce

Kryoprezervace půdních řas a sinic,  
vyhodnocování pokusů pomocí digitální fotografie.

Tomáš Hauer

Vedoucí práce : RNDr. Jan Kaštovský, PhD.

České Budějovice, 2003

HAUER, T., 2003 : Kryoprezervace půdních řas a sinic, vyhodnocování pokusů pomocí digitální fotografie [ Cryopreservation of soil algae and cyanobacteria, experiment evaluation using digital imaging.. - MSc. thesis, in Czech] – 26p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

## Anotace :

Four methods of pre-freezing treatments, the post-freezing viability and possibility of cryopreservation was tested on 137 strains of soil algae and cyanobacteria. A new method of non-destructive algal biomass assessment is presented.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, 25.4.2003

  
.....

## Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mi při řešení této práce jakkoli pomohli. Protože by těchto lidí bylo hodně, zmíním zde jmenovitě pouze tři. Děkuji mému školiteli Dr. Janu Kaštovskému za to, že se mne ujal, za cenné rady a za pomoc, kterou mi při vypracovávání této práce poskytl. Dále děkuji Lidě Karaové za její obrovskou trpělivost a obětavost. Děkuji i Lukáši Jirkovi, který se ujal mého nápadu s obrazovou analýzou a dovedl jej do reálné podoby.

# Obsah

1. Úvod .....	1
1.1 Mrazové uchovávání čili kryoprezervace.....	1
1.2 Historie mrazového uchovávání .....	2
1.3 Kryoprotekce a kryoprotektiva.....	3
1.4 COBRA .....	4
1.5 Cíle práce.....	4
2. Materiál a metody.....	5
2.1 Materiál.....	5
2.2 Metodiky mražení.....	6
2.2.1 Kultivace.....	6
2.2.2 Mražení .....	6
2.2.3 Hodnocení životaschopnosti.....	8
2.3 Metodiky hodnocení .....	9
2.3.1 Organismy, kultivace.....	9
2.3.2 Stanovení biomasy pomocí chlorofylu .....	9
2.3.3 Obrazová analýza .....	10
2.3.4 Mikroskopické hodnocení biomasy.....	11
2.4 Zpracování dat .....	12
3. Výsledky.....	12
3.1 Obrazová analýza a srovnání jejích výsledků se stanovením množství chlorofylu ..	12
3.2 Mražení .....	13
4. Diskuse .....	19
4.1 Mražení.....	19
4.1.1 Alternativní řešení pomalého zmrazování .....	19
4.1.2 Použití desferoxaminu .....	20
4.2 Hodnocení biomasy .....	20
5. Závěr .....	21
6. Literatura .....	23
Přílohy .....	27
Příloha 1.....	28

# 1. Úvod

Po mnohá desetiletí rozvíjeli autoři vědecko-fantastické literatury myšlenku „zmrazeného života“. V přírodě se však tento jev objevuje jen zřídka a ve většině případů je zmrznutí letální. Přesto má zmrazený život a jeho uchování pro člověka zásadní význam. Hlavním cílem kryoprezervace je uchovat organismy bez morfologických změn při zachování fyziologických, biochemických a genetických vlastností pro pozdější použití. Proto se již několik desetiletí vyvíjí postupy mrazového uchovávání. Tento vývoj je těsně svázán s rozvojem techniky pro chlazení a dlouhodobé udržování nízkých teplot.

Pro mrazové uchovávání není důležité jen správně zmrazení, ale také správné rozmrazení. Pro posouzení úspěšnosti výše uvedených úkonů bylo vypracováno několik technik hodnocení životaschopnosti rozmražených materiálů. Techniky posuzování používané pro řasy a sinice jsou zmíněny v kapitole 2.2 této práce.

Tato práce je vstupní studií do mrazového uchovávání půdních řas a sinic a popisuje novou techniku nedestruktivního stanovení jejich biomasy.

## 1.1 Mrazové uchovávání čili kryoprezervace

Význam uchovávání biologických materiálů ve zmraženém stavu dnes velmi stoupá. Tento způsob skladování je méně náročný na prostor, energie i čas obsluhy, než klasické sbírky organismů a tkáňové kultury – je třeba pouze kontrolovat a případně doplňovat chladicí médium. Další výhodou uchovávání organismů ve zmraženém stavu je minimalizace změn v genomu (HARDING 1996). Tyto změny však nelze úplně vyloučit ani při uchovávání organismů ve zmraženém stavu vzhledem ke kosmickému záření. Ve zmraženém stavu však buňka potřebuje asi 10 000 let k tomu, aby zmutovala (MORRIS in LUKAVSKÝ 1999).

Kryoprezervace má také své nevýhody. Při mrznutí dochází k poškození buněk a jejich organel několika způsoby. Nejvýznamnějším a nejlépe pozorovatelným procesem je tvorba ledových krystalů. Živé buňky obsahují více než sedmdesát procent vody, proto je tvorba ledu a jím způsobené mechanické poškození buněk velmi významným faktorem ovlivňujícím jejich uchování ve zmraženém stavu. Jedinou známou výjimkou je v tomto



ohledu zelená řasa *Chlorella (Auxenochlorella) protothecoides* (DAY et al. 2002). Teplota homogenní nukleace čisté tekuté vody je zhruba  $-39^{\circ}\text{C}$  (FRANKS et al. 1987). Tato teplota platí však pouze pro čistou vodu (v buňkách s ní tedy nemůžeme počítat), navíc v biologických systémech homogenní nukleace nikdy neprobíhá (WILSON et al. 2003). Poškození je úměrné velikosti krystalů narostlých během mražení. Velikost krystalů je možné ovlivnit vyšší rychlostí odvádění tepla vznikajícího při jejich růstu (NEBESÁŘOVÁ 2002) a rychlým dosažením rekrystalizační teploty, při které se růst krystalů zastavuje a která je pro buňky kolem  $188^{\circ}\text{K}$  (NEBESÁŘOVÁ 2002). Čím rychlejší a účinnější je odvod tepla, tím menší je velikost krystalů.

Dalším významným poškozujícím faktorem jsou změny osmotických poměrů, které vznikají mimo jiné při pomalém zchlazování a vedou k poškození způsobenému fázovou separací následkem tvorby ledových krystalů (NEBESÁŘOVÁ 2002, MERYMAN et al. 1984).

Po vyjmutí kultur z tekutého dusíku může také dojít k jejich poškození hydroxylovými radikály ( $\cdot\text{OH}$ ), superoxidovými radikály ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) a aktivním kyslíkem ( $\text{O}_2^1$ ), které pravděpodobně vznikají narušením oxidativního metabolismu (BENSON 1990, CELLA et al. 1982, FULLER et al. 1988). Volné radikály jsou toxické samy o sobě a jejich účinek je ještě zesílen oxidativními reakcemi, které spouští. Atakují lipidické součásti membrán za vzniku nestabilních peroxidů lipidů, které se rozpadají na toxické aldehydicke látky jako je malonyldialdehyd nebo hydroxyl-2-nonenal (ESTERBAUER et al. 1988, BENSON et al. 1992).

Velmi důležitým momentem je i rozmrazování, při němž dochází k tvorbě ledových krystalů stejně jako při mražení. Proto je nutné zajistit dostatečný přísun tepla pro rychlé ohřátí a tím minimalizaci růstu ledových krystalů. Zároveň je třeba dodržet vhodnou teplotu média, aby nedošlo k usmrcení organismů vysokou teplotou.

V případě poškození kryozkumavek během uchovávání v kryokontejneru může být rovněž nebezpečím bakteriální kontaminace během uchování v tekutém dusíku (SNURNIKOV et al. 2002).

## 1.2 Historie mrazového uchovávání

První prací, která informovala o toleranci řas k nízké teplotě byla publikace COHN (1871), která popisovala toleranci zelené řasy *Nitella* k teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Další prací, která se

zabývá přežíváním teplotních extrémů řasami je práce Kylina (KYLIN 1917) zaměřená na mořské řasy.

Významným milníkem v historii mrazového uchovávání byla práce POLGE *et al.*(1949), ve níž jsou popsány kryoprotektivní účinky 10-20% glycerolu na sperma kura domácího. Glycerol umožnil spermím dlouhodobé přežití teploty -80°C.

Následovaly práce Lovelocka (LOVELOCK 1953, LOVELOCK 1953a) na červených krvinkách, ve kterých autor objasnil mechanismus působení glycerolu jako kryoprotektantu.

Začátkem šedesátých let minulého století byly publikovány první práce popisující zmrazení řasových buněk (HOLM-HANSEN 1963, LEIBO & JONES 1963, HWANG & HORNELAND 1965).

MAZUR (1963) zjistil, že důležitým faktorem ovlivňujícím poškození buňky je rychlost zchlazování, protože ovlivňuje transport vody přes membránu a tím nepřímo zmrazení cytosolu.

Práce HELLIOT & MORTAIN-BERTRAND (1999) rovněž popisuje kryoprotektivní účinky zvýšené koncentrace autochtonního prolinu na buňky zelené řasy *Dunaliella salina*.

Kvalitní a ucelený přehled o historii a metodách mrazového uchovávání řas podává práce TAYLOR & FLETCHER (1999).

### **1.3 Kryoprotekce a kryoprotektiva**

V současné době jsou používány dvě základní strategie ochrany zpracovávaného materiálu před účinky nízkých teplot, tedy primárně poškozením růstem ledových krystalů (DUMET *et al.*2000). První z nich spočívá v odstranění maximálního množství volné vody z buněk, druhá v přidání látek zamezujících růstu ledových krystalů - kryoprotektiv.

Kryoprotektiva snižují teplotu homogenní nukleace, zvyšují rekrystalizační teplotu a snižují množství volné vody v systému. Dále zvyšují koncentraci cytosolu, což do určité míry eliminuje osmotický tok vody z buňky při mražení a tedy osmotické poškození.

Kryoprotektivum musí mít některé důležité vlastnosti. Musí být rozpustné ve vodě, musí v ní zůstat rozpuštěné i při nízkých teplotách a nesmí být příliš toxické při používaných koncentracích. V současné době se jako kryoprotektiva používají následující látky: dimetylsulfoxid (DMSO), etylenglykol, glycerol, metanol, které pronikají do buněk

(BENSON 2002, NEBESÁŘOVÁ 2002, TANAKA et al. 2001). Jako ochrana proti poškození působením nízkých teplot mohou sloužit i látky autochtonního původu, např. prolin (HELLIOT & MORTAIN-BERTRAND 1999).

Nejběžněji používané kryoprotektanty DMSO a metanol jsou toxické. Proto se aplikují krátce před zmrazením vzorku a zředěné – DMSO 5%, metanol 3M. Po rozmrazení a roztátí posledních ledových krystalů je třeba vzorek urychleně kryoprotektantu zbavit nebo jej dostatečně zředit (např. vysetím na agarovou plotnu).

## **1.4 COBRA**

Předkládaná práce vznikla při spolupráci na grantu EU No. QLRI-CT-2001-01645 COBRA („The Conservation of a vital European Scientific and Biotechnological resources: MicroAlgae and Cyanobacteria“). Na projektu spolupracují evropské sbírky řas a sinic a další pracoviště provádějící fyziologické výzkumy na řasách a sinicích. Cílem podsektory č. I. projektu je vytvoření „Evropského centra biologických zdrojů“ vyhrazeného uchovávání mikroskopických řas a sinic. Centrum bude vybudováno na základě existujících evropských sbírek za využití nejmodernějších metodik uchovávání a poznatků v oboru informačních technologií. Cestou k vytčenému cíli je úspěšné zamrazení všech, nebo alespoň většiny kmenů organismů v zúčastněných sbírkách. Kritériem pro označení zamrazení za úspěšné je dosažení 60% životaschopnosti (viability) ve srovnání s kontrolou.

## **1.5 Cíle práce**

Tato práce byla vypracována v rámci projektu COBRA (viz. bod 1.4). Cíle práce jsou následující:

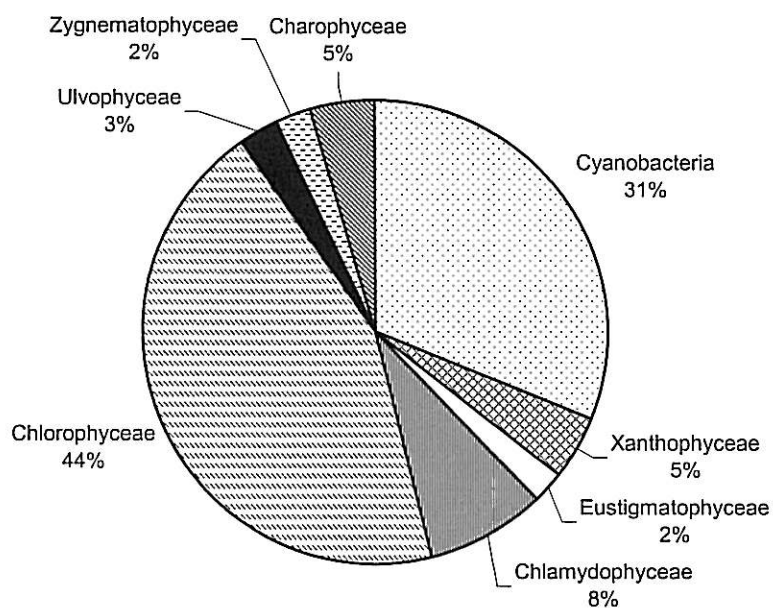
- Úspěšné zamrazení části sbírky půdních řas Ústavu půdní biologie AV ČR a v rámci tohoto úkolu vyzkoušet vhodnost různých postupů zmrazování a přísad kryoprotektiv.
- Vyvinout nedestruktivní metodiku hodnocení biomasy řas a sinic v kultuře za použití obrazové analýzy. Zjistit optimální typ analýzy pro sinice a řasy a podle výsledků optimalizovat metodu. Srovnat výsledky nedestruktivního stanovení

biomasy řas a sinic v kultuře získané pomocí obrazové analýzy a výsledky standardně používané metody stanovení koncentrace chlorofylu (LORENZEN 1967).

## 2. Materiál a metody

### 2.1 Materiál

V průběhu let 2002 a 2003 bylo testováno 137 kmenů půdních řas a sinic ze sbírky Ústavu půdní biologie AV ČR v Českých Budějovicích. Poměr jednotlivých taxonomických skupin ukazuje graf 1.



Graf 1: Poměr jednotlivých taxonomických skupin použitých v této práci.

Spektrum kmenů bylo vybráno tak, aby odrazilo pokud možno kompletní škálu taxonů sinic a řas, vyskytujících se v půdě. Zastoupeny nejsou pouze rozsivky, které se sice v půdě v menší míře vyskytují, ale jejich kultivace je velmi obtížná a proto se ve sbírce ÚPB nevyskytují.

Jedním z možných faktorů, ovlivňujících odolnost vůči zmrazení, jsou i klimatické poměry místa původu organismu. Proto jsou do testovaných kmenů zařazeny nejen sinice a řasy z temperátních oblastí, ale také několik subtropických, tropických a polárních

organismů. Do zvláštní kategorie byly zařazeny čtyři kmeny pocházející z Jamalo-Nenetského autonomního okruhu na severozápadní Sibiři se silně kontinentálním klimatem – zimní teplotní minima dosahují  $-60^{\circ}\text{C}$ , letní maxima plus  $35^{\circ}\text{C}$  (SELIGMAN 2003).

## 2.2 Metodiky mražení

### 2.2.1 Kultivace

Organismy pro všechny pokusy byly pěstovány na Petriho miskách na pevných agarových půdách s médiem BBM vhodným pro půdní sinice a řasy dle BISCHOFF et al.

(1963)

Kultivace probíhala deset dní při teplotě  $22^{\circ}\text{C}$  a osvětlení  $22 \mu\text{mol. fotonů.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , realizovaném zářivkami o spektrální teplotě  $4500\text{K}$ . První den kultivace byly misky kvůli zamezení poškození čerstvě naočkovaných kultur příliš intenzivním zářením zakryty jedním listem filtračního papíru.

### 2.2.2 Mražení

Standardní metoda jak převedení sbírky mikroorganismů do zmrazeného stavu je technicky náročný proces (BENSON 2002). K suspenzi řas nebo sinic se přidá kryoprotektivum a zmrazí se z pokojové teploty do teploty  $-40^{\circ}\text{C}$  rychlostí  $10^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ . V rozmezí teplot  $-40^{\circ}\text{C}$  až  $-50^{\circ}\text{C}$  probíhá zchlazování rychlostí  $0,3^{\circ}\text{C.min}^{-1}$  (tzv. „two step cooling“ DAY 1999). Toto pomalé zmražení je umožněno řízeným připouštěním tekutého dusíku ze zásobní do mrazicí nádoby a to např. přístrojem PLANER Kryo 360 (Planer Inc., Sunbury, UK). Následně je materiál přemístěn do uchovávacího tanku s tekutým dusíkem ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Tato procedura je samozřejmě dosti nákladná, prostorově i finančně ( nejen pořizovací cena přístroje, ale také jeho provoz). Protože ale půdní mikroorganismy bývají v přírodě často vystaveny podobným stresům, rozhodli jsme se vyzkoušet, jestli není možno uchovávat v tekutém dusíku alespoň část z nich i bez pomalého řízeného zmrazování.

Nejprve je nutno biomasu napěstovat v dostatečném množství. Tomu v podstatě odpovídá plně narostlá agarová plotna na Petriho misce o průměru 90 mm na jeden pokus.

Biomasa byla smyta do tekutého média BBM (BISCHOFF et al. 1963), zhomogenizována a rozdělena na poměrné části, podle počtu testovaných metodik. Jedna část byla použita jako kontrola - viz dále bod 2.2.3. Zbývající části byly použity na několik typů postupů, jak jednotlivé kmeny mrazit. Kvůli snažší identifikaci kryoampulí v nosičích se používají barevně odlišná víčka, jednotlivé „treatments“ jsme tedy označovali podle užitých barev.

Z jednoduchých mrazících technik (označených jako řada pokusů Cobra - C) jsme používali tři varianty:

- Varianta **R** („red“) – materiál byl bez kryoprotektiv rovnou umístěn do tekutého dusíku. V rámci této varianty byla posléze testována i varianta Rb, kdy byl přidán ke vzorkům desferoxamin mesylát, který chrání buňky před poškozením volnými radikály.

- Varianta **Y** („yellow“) – k mražení byla použita komerčně vyráběná speciální plastová nádobka NALGENE Cryo 1°C Freezing Container „Mr. Frosty“ (Nalgene Nunc Intern., USA), do jejíhož obalu se vlije isopropanol. Celá nádobka se umístí do mrazničky. Isopropanol slouží jako teplotní „pufr“ – teplota postupně a pravidelně klesne o 1 °C za minutu. Po hodině expozice se nádobka vyjme a zmražené vzorky se umístí do tekutého dusíku. V podstatě se jedná o primitivní napodobení standardní mrazící metodiky pomocí přístroje PLANER Kryo 360

- Varianta **G** („green“) – materiál byl přímo umístěn do tekutého dusíku, ale byl použit 5% DMSO jako kryoprotektivum. I v tomto případě byla testována metoda Gb, s přídavkem desferoxamin mesylátu.

Při pokusech řady Cobra byly kryoampule upevněny na nosiče a následně v kontejnerech ponořeny do Dewarovy nádoby MVC naplněné tekutým dusíkem. Po sedmi dnech byly nosiče s kryoampulemi vyjmuty a ihned ponořeny do vodní lázně o teplotě 40°C, aby bylo dosaženo rychlého roztání ledu v buňkách a nedošlo k růstu ledových krystalů.

Kmeny, které se nám nepovedlo zamrazit žádnou ze zmíněných metodik v řadě Cobra, jsme pomocí přístroje PLANER Kryo 360 v Botanickém ústavu AV ČR v Třeboni podrobili standardní metodice (protokol z průběhu mražení viz příloha 1). Tato řada pokusů byla označena jako Naja -N. V tomto případě jsme testovali dvě varianty:

- varianta **B** („blue“) – jako kryoprotektivum byl použit 5% DMSO
- varianta **W** („white“) - jako kryoprotektivum byl použit 3 M metanol

Obě varianty pokusů Naja byly po proběhnutí standardního protokolu ihned umístěny do velkých zásobních kontejnerů s tekutým dusíkem a po sedmi dnech vyjmuty. Rozmrazeny byly opět ve vodní lázni o teplotě 40 °C.

### 2.2.3 Hodnocení životaschopnosti

Jestli organismus přežil zamrazení v životaschopném stavu, bylo hodnoceno na základě schopnosti následného růstu.

Na Petriho misky o průměru 60 mm bylo nejprve inokulováno 400  $\mu$ l zhomogenizovaného vzorku, ve dvou opakováních. Tato kontrola byla kultivována po dobu sedmi dnů ve standardních podmínkách – viz kap. 2.2.1. Pak byla její biomasa vyhodnocena. Vlastní pokusy byly po sedmi dnech expozice v tekutém dusíku vyjmuty, rozmrazeny a inokulovány na Petriho misky ( $\varnothing$  60mm), rovněž ve dvou opakováních. Po sedmi dnech růstu byly vyhodnoceny i ony.

Z opakování byl vytvořen aritmetický průměr. Průměr z obou kontrol byl brán jako 100%, pokud průměr opakování z treatmentů přesahoval 60% , bylo zmrazení hodnoceno jako úspěšné (dle metodiky projektu COBRA).

Problematický je ovšem přístup k hodnocení biomasy. Nejpřesnější způsoby hodnocení jsou založeny na počtu (event. rozměrech) jednotlivých buněk a jsou z tohoto důvodu buď velice náročné časově (počítání „biovolume“ - NEDOMA et al. 2001) nebo vyžadují komplikovanou a drahou techniku („flow cytometry“ - např. YENTSCH & HORAN 1989, LEE et al. 2002). Navíc v případě hodnocení úspěchu zamrazení nepotřebujeme znát tak přesné číslo. Jako nejvhodnější se tedy jeví nepřímé metody stanovení biomasy, z nichž je nejčastěji používané stanovení množství chlorofylu dle metodiky LORENZEN (1967). Pro hodnocení narostlé biomasy byla v této práci použita metoda využívající program NAJA Image Analysis (JIRKA & HAUER 2003) popsaná v bodě 2.3.3 této práce.



## 2.3 Metodiky hodnocení

### 2.3.1 Organismy, kultivace

Pro srovnání výsledků chlorofyl x NAJA byly použity organismy lišící se složením pigmentů. Byly to:

- *Trichormus variabilis* (KÜTZ.) KOMÁREK et ANAGNOSTIDIS (Cyanobacteria), kmen ISB 13 - izolován r. 1988 z vlhčí louky (resp. asi 14 let opuštěného pole) v jižních Čechách, poblíž vesnice Dlouhá Ves
- *Botrydiopsis cf. intercedens* PASCHER (Xanthophyceae), kmen ISB 80 - izolováno r. 2000 z louky na Hlincově Hoře u Č. Budějovic, z popela (resp. vypáleného strniště)
- *Chlorella vulgaris* BEIJ. (Trebouxiophyceae), ISB40 - Malacky, izolováno říjen 1992, z popela 0-1 cm z povrchu dva měsíce po neřízeném požáru borového lesa, kdy prohořelo vše včetně humusové vrstvy,

Biomasa organismů pro tento test byla nejdříve napěstována na pevné agarové půdě a médiu BBM. Následně byla převedena do sterilního <sup>skleněného</sup> média BBM. Takto připravené inokulum bylo rozděleno na 6 Petriho misek o průměru 60mm s agarovými plotnami s médiem BBM v objemu 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 300 $\mu$ l, 400 $\mu$ l, 500 $\mu$ l, a 600 $\mu$ l. Každý objem inokula byl testován v pěti opakováních. Organismy pak byly kultivovány deset dní za podmínek popsaných v bodě 2.2.1.

### 2.3.2 Stanovení biomasy pomocí chlorofylu

Metodika stanovení chlorofylu vychází z publikace LORENZEN (1967). Biomasa byla s misek kvantitativně převedena do destilované vody. Získaná suspenze byla následně přefiltrována přes skleněný filtr WHATMAN GF/C. Filtry s biomasou byly předsušeny a v uzavřených nádobách se silikagelem uloženy do mrazničky pro uchování do zpracování. Před zpracováním byly filtry rozmělněny ve třecí misce s 90% acetonem. Po rozetření byla suspenze převedena do zkumavek a objem byl doplněn na 8 ml. Zkumavky byly před měřením přes noc ponechány v chladničce. Následující den byla suspenze profiltrována



přes membránový filtr a doplněna acetonem na objem 12 ml. Absorbance byla měřena na spektrofotometru BECKMAN DU 150. Množství chlorofylu *a* bylo vypočítáno rovnicí:

$$C_{chl\_a}[\mu g] = 26,7 \cdot [(A_0 - A_z) - (A_{0ac} - A_{zac})] \cdot v/(V \cdot d)$$

kde  $A_0$  = absorbance při 663 nm,  $A_z$  = absorbance při 720 nm,  $A_{0ac}$  = absorbance při 663 nm po okyselení,  $A_{zac}$  = absorbance při 720 nm po okyselení,  $v$  = objem extraktu v ml,  $V$  = objem přefiltrované vody (zde vždy rovno jedné),  $d$  = délka kyvety

*Chlorella vulgaris* musela být kultivována pouze po dobu šesti dní kvůli zamezení přílišného nárůstu biomasy, který by komplikoval stanovení koncentrace chlorofylu.

I tato metodika má ale své nevýhody. Jednak je také poměrně náročná na čas a jako již dříve popisované metodiky počítání buněk je to v podstatě destruktivní metoda, veškerý vzorek je jí definitivně zlikvidován.

### 2.3.3 Obrazová analýza

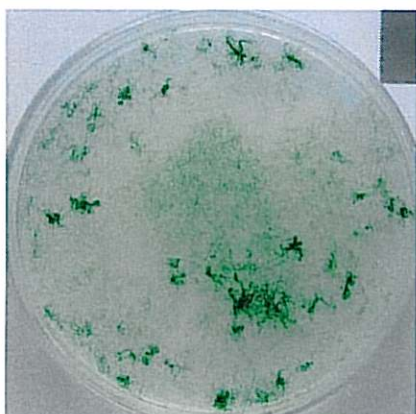
Nasnímání misek bylo provedeno před stanovením biomasy metodou chlorofylu.

Snímání misek bylo prováděno dvěma metodami. Pokusy C1 – C7 byly snímány na deskovém skeneru HP ScanJet 5470c při rozlišení 600 bodů na palec (dpi) bez korekční šedé.

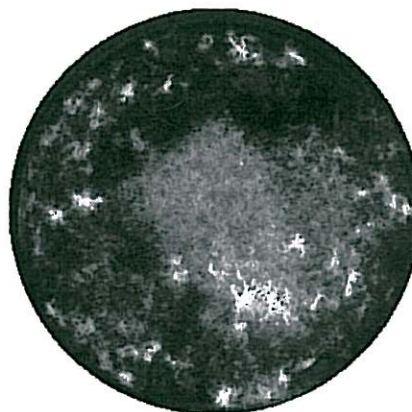
Další pokusy byly nasnímány v laminárním boxu digitálním fotoaparátem OLYMPUS Camedia C700-UZ umístěným na stativu v rozlišení 1600 x 1200 obrazových bodů. Jako zdroj světla byly použity zářivky o spektrální teplotě 4500K. Snímky byly ukládány ve formátu TIFF. Jako pozadí byla použita bílá deska s referenčním čtvercem padesátiprocentní šedé barvy. Po přenesení do počítače byly snímky oříznuty a referenční čtverce rozmazány v grafickém programu GIMP (MATTIS et al.2002). Analýza byla provedena v programu NAJA Image Analysis verze 0.6 (JIRKA & HAUER 2003), který byl ve spolupráci s programátorem vytvořen. Program provádí rozložení RGB obrazu na složky: odstín, sytost a světlost. Ve vybrané složce spočítá obrazové body pro jednotlivé stupně šedi a provede korekci na střední hodnotu podle referenčního čtverce, což minimalizuje případné nepřesnosti způsobené např. změnou délky expozice. Součty násobí koeficientem, který je roven stupni šedi, dodávajícím váhu jednotlivým hodnotám tak, aby vyšší hustoty biomasy byly dostatečně odlišeny od nižších (zdrojový kód programu a jeho

distribuce pro 32 bitová Windows je na přiloženém disku CD-ROM a na <http://www.sisnicearasy.cz/NAJA/> ).

Bylo testováno hodnocení za použití složek: sytost, invertovaná světlost a kombinace sytost a invertovaná světlost. Pro ilustraci uvádím zdrojový obrázek, který je hodnocen (obr. 1a) a jeho variantu, se kterou pracuje analýza obrazu (obr. 1b).



1a



1b

Obr. 1: Zdrojový obraz pro analýzu (1a) s referenční šedou v pravém horním rohu a složka sytost, se kterou pracuje analýza (1b).

#### 2.3.4 Mikroskopické hodnocení biomasy

Byly otestovány i mikroskopické metody hodnocení životnosti pod fluorescenčním mikroskopem. Jak vlastní fluorescence, tak zvýrazňující barvení (FDA- HARDING & BENSON 1995, Evansova modř SAGA et al. 1987) se ale ukázalo velmi brzy jako nevhodná metodika pro tento typ pokusů. Všechny tyto metody jsou vhodné spíše pro velký počet zásahů, hodnocených na jednom organismu, než pro relativně malý počet zásahů, ale na velkém množství organismů. Každý z organismů totiž reaguje na fluorescenci a barvení poněkud odlišně a celkové hodnocení je pak značně subjektivní.

## **2.4 Zpracování dat**

Srovnání výsledků podaných programem NAJA Image Analysis a jejich přepočty na procenta bylo provedeno v programu MS Excel 2000 a XP (Microsoft corp., Redmond, USA).

Pro porovnání výsledků získaných programem NAJA Image Analysis a standardní metodou stanovení množství chlorofylu *a* dle LORENZEN (1967) bylo použito zjištění korelace (LEPŠ 1996). Pro další testy pak jednocestná analýza variance a Tukeyho HSD test (LEPŠ 1996). Všechny statistické analýzy byly prováděny v programu STATISTICA ver. 5.5 (Statsoft, Inc., Tulsa, USA).

## **3. Výsledky**

### **3.1 Obrazová analýza a srovnání jejích výsledků se stanovením množství chlorofylu**

Pro potřeby projektu byl ve spolupráci s programátorem vytvořen program NAJA Image Analysis (JIRKA & HAUER 2003). Program je k dispozici na přiloženém disku CD-ROM jako distribuce pro 32 bitová Windows a jako zdrojový kód pro kompilaci pro jakýkoli systém. Aktuální verze programu a návod jsou dostupné na <http://www.sinicearasy.cz/NAJA/>.

Byly porovnány výsledky analýz získané výše uvedeným programem při použití komponent obrazu sytosti, invertované světlosti a jejich kombinace s výsledky standardního stanovení koncentrace chlorofylu (LORENZEN 1967). Bylo zjištěno, že výsledky pro samotnou světlost jsou s koncentrací chlorofylu velmi málo korelovány (vždy pod  $r = 0,48993$ ,  $p < 0,05$ ). Sytost a součet sytosti s invertovanou světlostí podávaly velmi podobné výsledky (vzájemná korelace  $r > 0,96$ ,  $p < 0,05$ ; korelace s chlorofylem je pro saturaci uvedena níže).

Výsledky srovnání hodnot získaných stanovením chlorofylu (LORENZEN 1967) a obrazovou analýzou:

- *Trichormus variabilis* kmen ISB13  $r = 0,86$ ,  $p < 0.05$
- *Botrydiopsis cf. intercedens* kmen ISB 80  $r = 0,95$ ,  $p < 0.05$
- *Chlorella vulgaris* kmen ISB 40  $r = 0,92$ ,  $p < 0.05$

Stanovení biomasy za použití programu NAJA Image Analysis považují, vzhledem k výše uvedeným výsledkům, za dostatečně přesné, a proto jsem jej použil v další části práce.

### 3.2 Mražení

Z celkem 138 vybraných kmenů bylo úspěšně zamrazeno metodou R 72 kmenů, metodou G 45 kmenů, metodou B 9 kmenů a metodou W 12 kmenů. 45 kmenů se nepodařilo úspěšně zamrazit žádnou z testovaných metod.

Metoda Y byla testována na několika kmenech a pro neuspokojivé výsledky byla opuštěna.

Variety rychlého mražení s přidavkem desferoxaminu (DFOM) nepodávaly lepší výsledky (one-way ANOVA  $F = 0,0207$ ,  $p = 0,8865$ ) než varianty bez něj a proto bylo od použití DFOM dočasně upuštěno.

Vliv místa původu kmenu na životaschopnost po zmrazení a rozmrazení není statisticky průkazný (one-way ANOVA  $F = 0,787731$ ,  $p = 0,502906$ ).

Tabulka 1 uvádí přehled testovaných kmenů a výsledky mražení jednotlivými metodami.

<b>Cyanobacteria</b>	ISB	Lo	R%	G%	B%	W%
<i>Anabaena torulosa</i> (CARM.) LAGERH.	59	M	75,42	47,14	-	-
<i>Aulosira terrestris</i> SUBBA RAJU	2	M	86,40	0,00	-	-
<i>Calothrix</i> sp.	3	M	88,82	76,11	-	-
<i>Cyanosarcina</i> sp.	4	A	203,85	-	-	-
<i>Cyanothece</i> sp.	179	M	92,48	-	-	-
<i>Cylindrospermum cf. licheniforme</i> (BORY) KÜTZ.	180	M	73,62	-	-	-
<i>Hassallia</i> sp.	106	M	131,97	-	-	-
<i>Hassallia</i> sp.	98	M	106,18	-	-	-
<i>Chroococcus</i> sp.	7	A	120,45	-	-	-
<i>Chroococcus</i> sp.	181	A	83,71	-	-	-
<i>Leptolyngbya</i> sp.	107	M	87,15	-	-	-
<i>Nodularia harveyana</i> THUR.	110	M	91,02	-	-	-
<i>Nodularia</i> sp.	102	M	97,94	-	-	-

	ISB	Lo	R%	G%	B%	W%
<i>Nostoc calcicola</i> BRÉB. in MENEGH.	84	M	212,26	-	-	-
<i>Nostoc calcicola</i> BRÉB. in MENEGH.	96	M	80,03	-	-	-
<i>Nostoc calcicola</i> BRÉB. in MENEGH.	114	T	99,94	58,68	-	-
<i>Nostoc cf. edaphicum</i> KONDRATEVA	95	A	53,65	-	-	-
<i>Nostoc cf. edaphicum</i> KONDRATEVA	108	M	70,16	-	-	-
<i>Nostoc edaphicum</i> KONDRATEVA	101	M	129,64	-	-	-
<i>Nostoc ellipso sporum</i> RABEHN.	105	M	78,77	-	-	-
<i>Nostoc muscorum</i> AGARDH	99	M	108,69	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp.	92	M	102,64	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp.	93	M	115,00	-	-	-
<i>Nostoc cf. edaphicum</i> KONDRATEVA	100	T	188,50	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp.	103	M	61,13	-	-	-
<i>Nostoc</i> sp.	112	T	114,32	63,54	-	-
<i>Nostoc</i> sp.	118	T	131,71	122,28	-	-
<i>Phormidium cf. autumnale</i> (AGARDH) GOMONT	97	A	285,16	-	-	-
<i>Phormidium autumnale</i> (AGARDH) GOMONT	109	T	104,18	-	-	-
<i>Phormidium</i> sp.	116	M	131,71	122,28	-	-
<i>Phormidium</i> sp.	117	M	240,67	244,56	-	-
<i>Phormidium</i> sp.	119	T	76,18	0,00	-	-
<i>Phormidium</i> sp.	115	M	230,24	253,73	-	-
<i>Phormidium</i> sp.	120	M	113,73	102,86	-	-
<i>Pseudophormidium hollerbachianum</i> (ELENKIN) ANAGNOSTIDIS	94	M	113,39	-	-	-
<i>Pseudophormidium</i> sp.	104	M	48,36	-	-	-
<i>Scytonema</i> sp. II	90	M	99,96	-	-	-
<i>Scytonema</i> cf.	12	M	134,54	120,06	-	-
<i>Scytonema</i> sp. I	91	M	135,87	-	-	-
<i>Schizothrix</i> sp.	111	M	156,85	-	-	-
<i>Tolypothrix</i> sp.	113	M	130,02	129,50	-	-
<i>Trichormus variabilis</i> (KÜTZ.) KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS	13	M	0	229,65	-	-
<b>Xanthophyceae</b>						
<i>Botrydiopsis cf. intercedens</i> PASCHER	121	M	0,00	0,00	-	-
<i>Botrydiopsis cf. intercedens</i> PASCHER	188	M	64,89	60,63	51,95	56,33
<i>Bumilleriopsis pyrenoidosa</i> (DEASON et BOLD) Ettl	15	S	43,31	55,09	10,24	11,79
<i>Heterococcus</i> sp.	122	M	0,00	94,34	-	-
<i>Xanthonema bristolianum</i> (PASCHER) SILVA	18	M	22,08	83,82	71,02	65,46
<i>Xanthonema debile</i> (VISCHER) SILVA	19	M	0,00	41,06	-	-
<b>Eustigmatophyceae</b>						
<i>Eustigmatos magnus</i> (J.B. PETERSEN) HIBBERD	20	M	0,00	0,00	-	-
<i>Monodopsis subterranea</i> (J.B. PETERSEN) HIBBERD	21	M	0,00	0,00	4,57	16,30
<i>Pseudocharaciopsis ovalis</i> (CHODAT) HIBBERD	22	M	0,00	0,00	-	-
<b>Chlamydomphyceae</b>						
<i>Actinochloris</i> sp.	23	M	49,62	49,96	-	-
<i>Haematococcus pluvialis</i> FLOT. em. WILLE	24	M	86,15	88,54	-	-
<i>Chlamydomonas</i> sp.	123	M	0,00	0,00	-	-
<i>Chlorococcum</i> sp.	124	S	0,00	0,00	-	-
<i>Chloromonas rosae</i> (ETTL H. & O.) Ettl	27	M	0,00	0,00	-	-
<i>Tetracystis</i> sp.	125	M	78,02	0,00	-	-
<i>Chlamydomonas</i> sp.	197	M	-	-	0,00	78,73
<i>Chlamydomonas</i> sp.	198	M	-	-	18,47	77,91
<i>Chlamydomonas gloeogama</i> KORŠIKOV in PASCHER	199	M	-	-	25,53	84,30

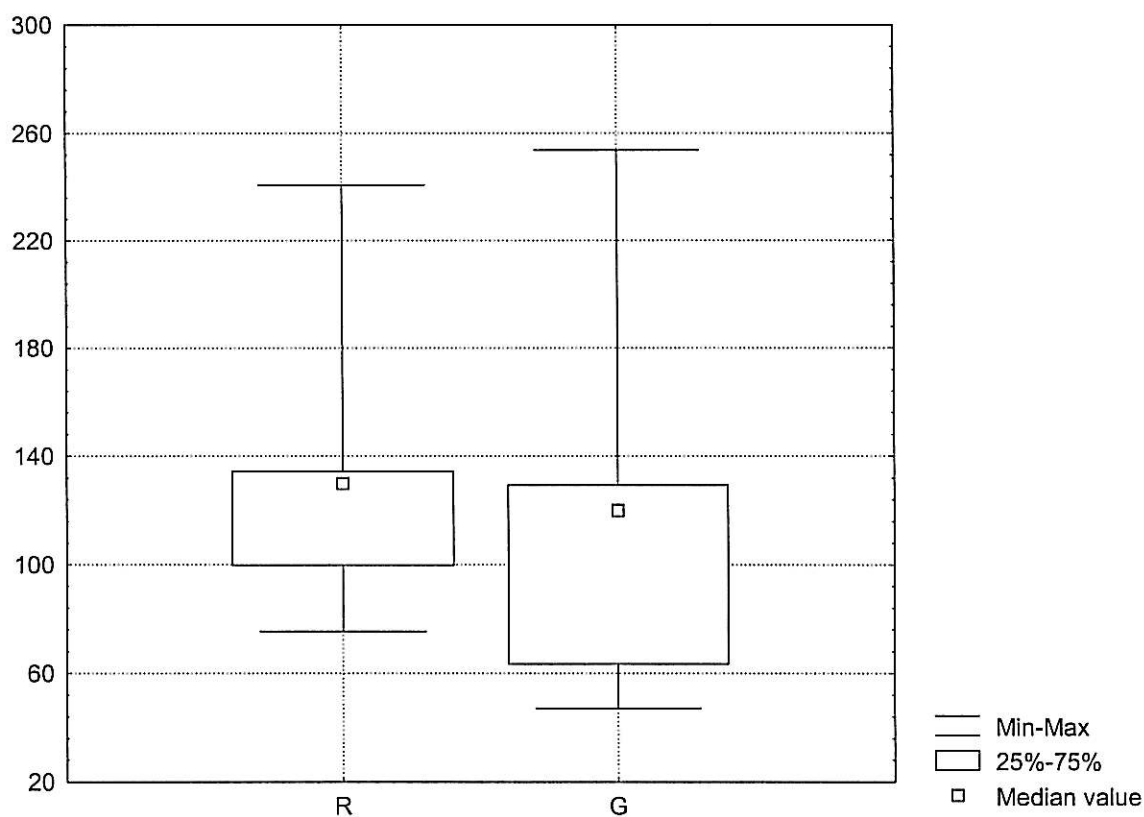


	ISB	Lo	R%	G%	B%	W%
<i>Chlamydomonas</i> sp.	200	M	-	-	0,00	96,35
<i>Chlamydomonas</i> cf. <i>macrostellata</i> LUND	201	M	-	-	7,71	66,24
<b>Chlorophyceae</b>						
<i>Bracteacoccus</i> cf.	85	M	114,10	94,75	-	-
<i>Bracteacoccus</i> sp.	126	M	29,44	33,55	-	-
<i>Bracteacoccus</i> sp.	86	M	80,91	103,38	-	-
<i>Coccolobos</i> cf.	30	M	60,53	71,29	-	-
<i>Coccolobos</i> sp.	184	M	39,07	12,03	6,26	8,79
<i>Coccomyxa</i> sp.	31	M	113,85	70,89	-	-
<i>Coenochloris</i> sp.	32	M	141,71	0,00	-	-
<i>Coenochloris</i> sp.	87	M	28,42	20,70	-	-
<i>Ettlia alveolaris</i> (BOLD) Ettl et GARTNER	167	S	0,00	109,00	31,11	26,95
<i>Ettlia alveolaris</i> (BOLD) Ettl et GARTNER	175	M	59,68	54,67	-	-
<i>Ettlia alveolaris</i> (BOLD) Ettl et GARTNER	185	M	63,37	66,72	-	-
<i>Ettlia alveolaris</i> (BOLD) Ettl et GARTNER	62	M	0,00	78,39	21,80	11,39
<i>Fernandinella alpina</i> CHODAT	35	M	0,00	69,97	0,00	0,00
<i>Follicularia</i> sp.	57	T	0,00	62,80	71,87	62,59
<i>Follicularia ettliae</i> LUKEŠOVÁ	150	M	-	-	76,11	76
<i>Follicularia komarekii</i> LUKEŠOVÁ	151	M	-	-	41,83	52,81
<i>Follicularia texensis</i> (BISCHOFF et BOLD) Ettl et KOMÁREK	157	M	112,34	30,90	-	-
<i>Geminella</i> sp.	159	M	0,00	50,60	30,09	26,07
<i>Geminella</i> cf.	183	M	10,57	12,77	3,72	33,69
<i>Geminella terricola</i> J.B. PETERSEN	36	M	110,94	90,52	-	-
<i>Hormidiella attenuata</i> LOKHORST	83	T	0,00	0,00	-	-
<i>Characium</i> cf. <i>pseudopyriforme</i>	165	M	131,93	106,22	64,41	42,70
<i>Chlorella ellipsoidea</i> GERNECK	128	M	66,97	45,10	-	-
<i>Chlorella fusca</i> SHIHIRA et KRAUSS	178	A	73,15	79,89	-	-
<i>Chlorella mirabilis</i> ANDREEVA	68	A	70,23	62,98	40,34	24,57
<i>Chlorella vulgaris</i> BEIJ.	40	M	141,29	124,56	-	-
<i>Chlorella vulgaris</i> BEIJ.	129	M	0,00	88,18	-	-
<i>Chlorolobion</i> sp.	41	M	106,26	125,12	-	-
<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	202	M	-	-	104,51	47,26
<i>Chlorosarcinopsis</i> sp.	203	T	-	-	19,84	0,00
<i>Chlorosarcinopsis minuta</i> GROOVER et BOLD	160	M	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Chlorosarcinopsis minuta</i> GROOVER et BOLD	161	M	0,00	0,00	28,13	31,50
<i>Chlorosarcinopsis minuta</i> GROOVER et BOLD	174	M	6,95	8,13	16,74	14,05
<i>Chlorosarcinopsis minuta</i> GROOVER et BOLD	186	M	0,00	0,00	9,79	6,42
<i>Chlorotetraedron polymorphum</i> (MAC ENTEE et al.) MAC ENTEE et al.	42	T	0,00	0,00	0	107,23
<i>Jaagiella</i> sp.	66	M	54,30	50,18	-	-
<i>Leptosira</i> sp.	89	M	93,41	87,23	-	-
<i>Leptosira</i> sp.	130	M	84,86	171,27	-	-
<i>Monoraphidium</i> sp.	191	M	95,56	137,02	-	-
<i>Myrmecia irregularis</i> (J.B. PETERSEN) Ettl et GARTNER	64	A	69,00	63,25	-	-
<i>Myrmecia</i> sp.	60	M	60,67	65,76	21,64	17,71
<i>Neochloris conjuncta</i> ARCHIBALD	153	T	0,00	24,62	27,94	31,46
<i>Neochloris terrestris</i> HERNDON	192	M	0,00	0,00	-	-
<i>Planophila terrestris</i> GROOVER et HOFSTETTER	65	M	0,00	0,00	-	-
<i>Planophila terrestris</i> GROOVER et HOFSTETTER	158	M	0,00	0,00	-	-
<i>Prasiola crispa</i> ssp. <i>antarctica</i> KNEBEL	44	A	94,16	0,00	-	-
<i>Protosiphon botryoides</i> KLEBS	47	M	9,98	8,15	13,89	13,01
<i>Protosiphon botryoides</i> KLEBS	67	M	0,00	0,00	-	-
<i>Protosiphon botryoides</i> KLEBS	164	T	0	0	17,14	7,29

<i>Pseudococcomyxa</i> sp.	182	M	78,36	74,70	-	-
<i>Pseudococcomyxa simplex</i> (MAINX) FOTT	131	M	56,05	64,49	-	-
<i>Raphidonemopsis</i> sp.	63	A	84,39	141,68	-	-
<i>Scenedesmus</i> sp.	156	M	95,93	92,73	-	-
<i>Scenedesmus</i> sp.	155	M	100,45	98,27	65,86	52,69
<i>Scotiellopsis</i> sp.	49	M	72,96	75,67	-	-
<i>Scotiellopsis</i> sp.	88	M	113,45	106,45	-	-
<i>Spongiochloris</i> cf. <i>irregularis</i> KOSTIKOV	50	M	0,00	33,45	-	-
<i>Spongiochloris irregularis</i> KOSTIKOV	187	M	19,94	32,35	15,11	11,01
<i>Spongiochloris irregularis</i> KOSTIKOV	74	M	-	-	21,57	11,66
<i>Trochiscia</i> sp.	51	A	0,00	0,00	-	-
<b>Ulvophyceae</b>						
<i>Microthamnion</i> cf. <i>strictissimum</i> RABENHORST	168	M	82,33	67,78	-	-
<i>Protoderma</i> ( <i>Pleurastrum</i> ) <i>sarcinoideum</i> (GROOVER et BOLD) TUPA	58	M	0,00	0,00	23,49	24,71
<i>Pseudendoclonium</i> cf.	76	T	129,25	137,25	-	-
<i>Pseudendoclonium</i> sp.	193	M	-	-	68,29	82,62
<i>Pseudendoclonium</i> sp.	194	M	-	-	27,11	21,85
<i>Pseudendoclonium</i> cf. <i>basiliense</i> VISCH.	132	M	0,00	0,00	-	-
<i>Trebouxia</i> sp.	82	S	98,12	105,68	-	-
<b>Zygnematophyceae</b>						
<i>Cosmarium</i> sp.	142	M	79,12	57,78	0,00	0,00
<i>Cylindrocystis brebissoni</i> MENEHINI	147	S	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Cylindrocystis crassa</i> DE BARY	133	M	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Charophyceae</b>						
<i>Chlorokybus atmophyticus</i> GEITLER	54	M	20,57	21,26	36,26	34,22
<i>Chlorokybus atmophyticus</i> GEITLER	79	M	38,81	21,52	39,97	40,67
<i>Klebsormidium bilatum</i> or <i>flaccidum</i>	61	M	12,33	55,88	0,00	0,00
<i>Klebsormidium nitens</i> (MENEH. in KÜTZ.) LOKHORST	195	M	-	-	95,69	64,06
<i>Klebsormidium flaccidum</i> (KÜTZING) SILVA, MATTOX et BLACKWELL	196	M	-	-	89,26	95,97
<i>Stichococcus bacillaris</i> NÄGELI	134	M	67,43	97,54	0,00	0,00

Tabulka 1: seznam testovaných kmenů. Ve sloupci Lokalita M - mírné klima, T - subtropy a tropy, A - Arktida a Antarktida, S - Sibiř. Hodnoty ve sloupcích R%, G%, B% a W% udávají procentuální nárůst biomasy pokusu vůči kontrole.

Z 42 kmenů sinic (Cyanobacteria) bylo úspěšně zamraženo 39 kmenů, tedy 92,5%, variantou R. Pokud bylo zamražení úspěšné ve variantě R, nebyly další metody testovány. Pouze u jedenácti kmenů byla vyzkoušena metodika G. Z těchto kmenů bylo úspěšně zamraženo devět a vždy byly úspěšné zároveň v R. Varianta R nebyla statisticky průkazně lepší než varianta G viz. graf 2 ( $F = 0,2704$ ,  $p = 0,6087$ ).



Graf 2: „Box-and-whisker plot“ analýzy variance výsledků mražení sinic pro varianty R a G. Na ose Y jsou vynesena procenta biomasy ve srovnání s kontrolou.

Všechny neúspěšně zmražené kmeny sinic se hranici úspěšnosti blížily. Z toho usuzují, že optimalizací růstových podmínek a zamrazováním kultur v optimálním fyziologickém stavu by hranice úspěšnosti nebyl problém dosáhnout.

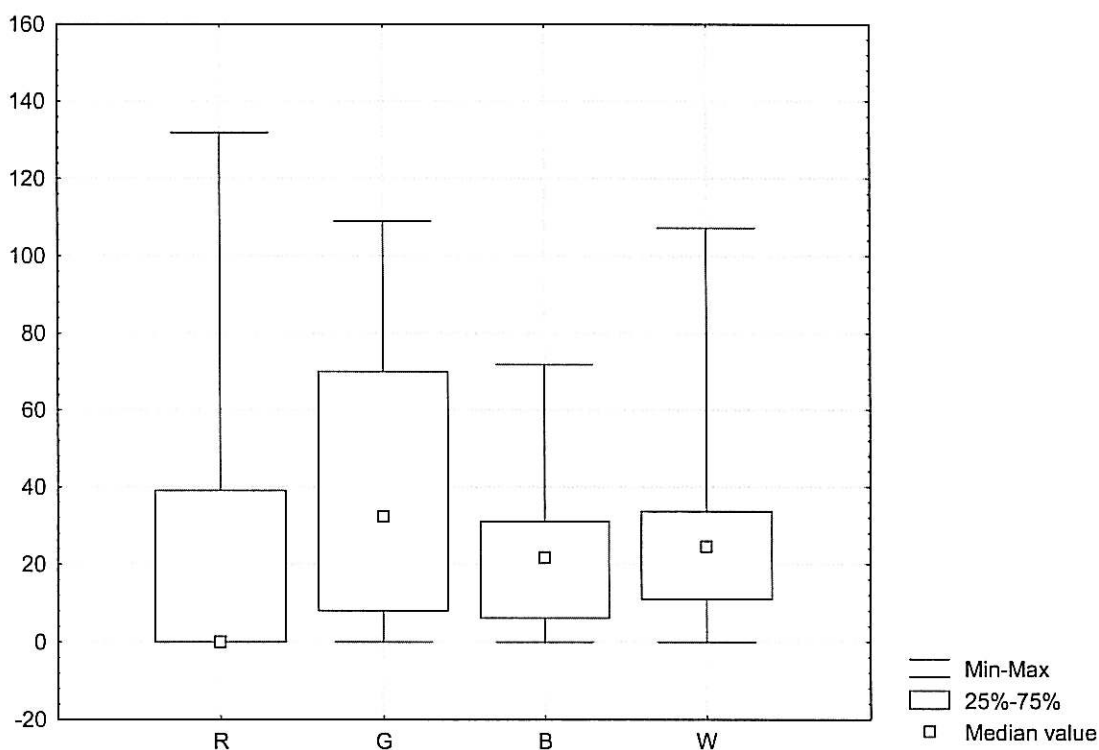
Ze šesti kmenů třídy Xanthophyceae byly celkem úspěšně zmraženy tři kmeny. Všechny metodou G, dva z nich i metodou R. Při použití pomalého zmrazování se hranici úspěšnosti přiblížil pouze kmen ISB188 jinak úspěšný při R i G. Pomalé mrazení však bylo dosud testováno pouze na dvou kmenech, testování dalších se připravuje. Ze známých výsledků nevyplývá, že by některá z variant pro tuto skupinu byla statisticky významně vhodnější než ostatní.

Ze tří kmenů třídy Eustigmatophyceae se nepodařilo úspěšně zmrazit ani jeden kmen. Při aplikaci rychlého mrazení (metody R a G) nedošlo během kultivace po rozmrazení k žádnému nárůstu biomasy. Pro kmen ISB21 bylo testováno i pomalé mrazení (metody B a W). Zde k mírnému (4,57 a 16,30 % kontroly) nárůstu biomasy došlo. Další dva kmeny z této skupiny budou na B a W teprve testovány.



Z jedenácti kmenů třídy Chlamydomonadales bylo úspěšně zmraženo šest kmenů. Z nich jeden současně metodami R a G, jeden pouze metodou R, čtyři metodou W a žádný metodou B. Vzhledem k předpokládané citlivosti k méně šetrným manipulacím (metodiky R a G), byly kmeny rodu *Chlamydomonas* testovány pouze pro metodiky B a W. Jak je vidět v tabulce 1, metodika W byla úspěšná u všech kmenů tohoto rodu. Na ostatních kmenech skupiny byly dosud testovány jen metodiky R a G.

Z 60 kmenů třídy Chlorophyceae bylo úspěšně zmraženo 35 kmenů. Z toho šest pouze metodou G, čtyři pouze metodou R, jeden pouze metodou B a jeden pouze metodou W. U ostatních bylo úspěšných více metodik současně. 27 kmenů se nepodařilo použitými metodami zamrazit, další metody budou zkoušeny. U 19 kmenů byly testovány všechny metodiky. Pro tyto kmeny byla spočítána analýza variance, která ukázala, že pro zamražování zástupců třídy Chlorophyceae není statisticky významně ( $F = 1,34$ ,  $p = 0,26$ ) vhodnější žádná z metod mražení (viz. také graf 3). V grafu 3 je ale patrný tendenci vyšší úspěšnosti rychlých metod mražení, zvláště pak varianty G.



Graf 3: „Box-and-whisker plot“ analýzy variance výsledků mražení kmenů z třídy Chlorophyceae pro varianty R, G, B a W. Na ose Y jsou vynesena procenta biomasy ve srovnání s kontrolou.

Ze 7 kmenů třídy Ulvophyceae byly úspěšně zmrazeny 3. Kmeny ISB 82 a ISB 168 současně metodami R a G. Kmen ISB 193 metodami B a W. Pomalé mražení nebylo pro většinu kmenů této skupinu dosud testováno.

Ze 3 kmenů třídy Zygnematophyceae se úspěšně podařilo zmrazit jen kmen ISB 142 metodou R. Pomalé mražení nebylo pro tuto skupinu dosud testováno.

Ze 6 kmenů třídy Charophyceae byly úspěšně zmrazeny 3 kmeny. 1 metodami R a G a 2 (obojí rod *Klebsormidium*) metodami B a W.

## 4. Diskuse

### 4.1 Mražení

Poměrně vysoké procento neúspěšně zamražených kmenů může být způsobeno tím, že dosud neprošly testováním na všechny výše uvedené způsoby mražení. Projekt COBRA ještě neskončil, a proto budou na těch kmenech, na nichž nebyly testovány všechny metodiky a zároveň se je nepodařilo úspěšně zmrazit, zkoušeny další metody.

Valná většina kmenů preferuje spíše mražení <sup>tvrdé</sup> pomalé nebo rychlé, nezávisle na použití kryoprotektiva či jeho typu. To ovšem neplatí pro rod *Chlamydomonas*, který ztatelně preferuje jako kryoprotektivum metanol.

Zajímavá je vysoká úspěšnost (92,5% ze zkoušených kmenů) mražení sinic ve srovnání s ostatními skupinami, u kterých úspěšnost nepřevyšuje 60%. Z tabulky 1 je také patrné, sinice po rozmražení narostou do větší biomasy než zástupci ostatních skupin. Tyto skutečnosti mohou být dány prokaryotním charakterem jejich buněk a silnou adaptabilitou.

#### 4.1.1 Alternativní řešení pomalého zmrazování

Varianta Y byla pokusem o využití jednoduchých metod, nenáročných na finanční prostředky.

Výsledky varianty Y nebyly uspokojivé. Může to být způsobeno tím, že po zchlazení <sup>-40°C</sup> na teplotu  $-30^{\circ}\text{C}$  byly kultury při přenosu do kapalného dusíku vystaveny pokojové teplotě. Stalo se tak kvůli tomu, že do nádoby „Mr. Frosty“ se nevejdou celé nosiče s kryozkumavkami a proto musely být kryozkumavky v nádobě volně uloženy a po zchlazení musely být manuálně upevněny do nosičů. Při vložení do  $\text{N}_2(\text{l})$  tedy mohlo dojít

k nadměrnému růstu ledových krystalů. Ukázalo se, že tato varianta není pro zamrazování organismů použitelná a proto od ní bylo upuštěno.

#### **4.1.2 Použití desferoxaminu**

Varianty Rb a Gb s dodaným desferoxaminem byly testovány pouze na 14 problematických kmenech. Poměrně úzké spektrum kmenů vybraných pro testování přínosu DFOM je zapříčiněno vysokou cenou této látky. V uvedených pokusech se navíc ukázalo, že přídavek DFOM životaschopnost po rozmražení statisticky významně (one-way ANOVA  $F = 0,0207$ ,  $p = 0,8865$ ) nezvyšuje. Pro další pokusy tedy bylo od použití upuštěno, hlavně kvůli finanční náročnosti. Pokud se během dalšího testování objeví kmen, na který nebude s úspěchem možno aplikovat žádnou z výše uvedených variant nelze použití DFOM vyloučit. V této fázi pokusů se však jeho aplikace jeví zbytečnou.

#### **4.2 Hodnocení biomasy**

Téměř ideální a velmi přesné hodnocení živé biomasy je možné detekcí fluorescence chlorofylu např. přístrojem Fluorcam (Photon System Instruments, Brno, ČR) nebo proudová cytometrie. Toto řešení je ale finančně dosti náročné a může být problematické jeho použití ve sterilním prostředí laminárního boxu kvůli rozměrům a poměrně složité instalaci nutné aparatury.

Dle mého názoru je hodnocení biomasy metodou obrazové analýzy v programu NAJA Image Analysis vzhledem ke srovnatelnosti s výsledky hodnocení koncentrace chlorofylu dle metodiky LORENZEN (1967) poměrně efektivní a k rychlému ~~ne~~kvantitativnímu zhodnocení biomasy na kultur na Petriho miskách postačuje. Jeho hlavní výhodou je nedestruktivnost a uchování vizuální informace o stavu kultury. Rovněž náročnost na čas, energii a chemikálie je menší.

Po menší úpravě metodiky sběru vzorků je program možno využít i pro rychlé hodnocení fytoplanktonu – v čistých vodách přesnější, v kalných vodách méně přesné. Metoda je rovněž méně náchylná na náhodné chyby vzniklé při použití standardní metody stanovení chlorofylu. Výhodou řešení je i relativně nízká cena. Po úpravě metodiky a programu by jej bylo možno použít i na přibližnou kvantifikaci biomasy v mikroskopických preparátech.

Pro hodnocení byla ze složek obrazu použita pouze sytost kvůli větší zátěži systému při kombinaci sytost + invertovaná světlost. Vzhledem k tomu, že výsledky obou metod jsou velmi podobné (viz. bod 3.1), považují použití sytosti za vhodnější.

Hodnocení kultur obrazovou analýzou prováděli také OSÓRIO et al. (2002). Použili skenování Petriho misek s kulturami a digitální zvýraznění kolonií. Dále po převedení do šedé škály spočítali pixely v určitém rozsahu této škály. V této metodě spatřují dvě hlavní úskalí. První spočívá v nastavení skeneru, který může expozici upravit pro každou miskou zvlášť a tím znesnadnit hodnocení. Druhým problémem této metodiky je, že zahrnuje pixely v rozsahu daném obsluhou a právě u kultur narostlejších, než použili autoři, existuje nebezpečí nezahrnutí slaběji narostlé biomasy nebo špatné vyhodnocení neostře ohraničených kolonií. Tato metoda je tedy, dle mého názoru, použitelná pouze na typ kolonií, které hodnotili autoři. Jistou nevýhodou této metody může být její problematické použití ve sterilním boxu.

Pro stanovení pokryvnosti řas použili obrazovou analýzu též MORCOM et al. (1998), kteří srovnávali její výsledky s výsledky aplikace Braun-Blanquetovy stupnice. Tuto metodiku založenou na trasování okrajů zájmových oblastí použili pro epifytní nárosty. Pro účely hodnocení kultur tuto metodiku nepovažují za vhodnou.

## 5. Závěr

V této práci byla popsána nová nedestruktivní metoda hodnocení biomasy kultur řas a sinic. Bylo provedeno její srovnání se standardně používanou metodikou stanovení chlorofylu *a* (LORENZEN 1967). Bylo zjištěno, že výsledky podávané oběma metodami jsou srovnatelné. Z důvodu menší časové a technické náročnosti byla tato nová metoda použita k hodnocení pokusů ve druhé části této práce.

V rámci této práce byly také zkoušeny čtyři metodiky zmrazování půdních řas a sinic – rychlé zmrazení bez kryoprotektantu (R), rychlé zmrazení s kryoprotektantem DMSO (G), pomalé řízené zamrazování s DMSO jako kryoprotektantem (B) a pomalé řízené zamrazování s metanolem jako kryoprotektantem (W). Testované kmeny pocházely ze čtyř klimaticky odlišných regionů – temperátní zóny, tropů a subtropů, Antarktidy a Arktidy a Sibíře. Nepodařilo se prokázat vliv regionu původu organismu na úspěšnost zmrazení. Z celkem 137 vybraných kmenů bylo úspěšně zamrazeno metodou R 72 kmenů, metodou G 44 kmenů, metodou B 9 kmenů a metodou W 12 kmenů. 45 kmenů se nepodařilo úspěšně zamrazit žádnou z testovaných metod. Bylo zjištěno, že pro mrazení sinic je vhodnou

metodou varinata R a pro zástupce třídy Chlorophyceae spíše rychlé zamrazování obecně, tedy metody R a G. Pro zástupce rodu *Chlamydomonas* se jako nejvhodnější jeví metodika W. Pro ostatní skupiny buď není jasně lepší žádná z uvedených metodik a nebo ještě nebyly všechny zmíněné postupy zkoušeny.

## 6. Literatura

- BENSON, E.E.(1990): Free radical damage in stored plant germplasm. – Int. Board for Plant Gen. Resources (publishers), Rome
- BENSON, E.E.(ed.)(2002): Inaugural Meeting and Technology Transfer Workshop.- University of Abertay Dundee, UK. 77p
- BENSON E.E.; LYNCH, P.T. & JONES, J.(1992): The detection of lipid peroxidation products in cryopreserved and frozen rice cells: consequences for post-thaw survival.- Plant Science **85**: 107-114
- BISCHOFF, H.W. & BOLD, H.C. (1963): Phycological Studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. – Univ. Texas Publ., **6318**: 1-95.
- CELLA, R.; COLOMBO, R.; GALLI, M.G.; NIELSEN, M.G.; ROLLO, F. & SALA, F.(1982): Freeze-preservation of rice cells: a physiological study of freeze/thawed cells. – Physiol. Plant. **55**: 279-284
- COHN, F.(1871): Das Gefrieren der Zellen von *Nitella syncarpa*.- Bot. Zeit. **29**: 723-744
- CROWE, J.H.; CARPENTER, L.M.; CROWE, L.M. & ANCHORDOGUY, T.J.(1988): Interactions of sugars with membranes. – Biochimical Biophysical Acta **947**: 367-384.
- DAY, J. G.(1999): Developing alternative Conservation Strategies for Algae Maintained in Culture Collections. – in BENSON, E. E. (ed.): Plant Conservation Biotechnology, London, 111-124 pp. - multiple phases  
✓ relevant
- DAY, J.G.; FLECK, R.A., CLARKE, K.J. & BENSON, E.E.(2002): Freeze recalcitrance in eukaryotic algae: The effects of intracellular ice.- in MĚŘIČKA, P.(ed.): Cryopreservation and safe keeping of cells and tissues. - IIR International Conference, May 13-15, 2002 Hradec Králové, CZ
- DUMET, D. & BENSON, E.E.(2000): The use of physical and biochemical studies to elucidate and redukuje cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated germplasm. – in: ENGELMANN, F. & TAKAGI, H.(eds): Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application.- JIRCAS International Agriculture Series **8**:43-56
- ESTERBAUER, H.; ZOLLNER, H. & SCHAUER, R.J.(1988): Hydroxyalkenals: Cytotoxic products of lipid peroxidation.- ISI Atlas of Science: Biochemistry 311-317.

- FRANKS, F.; DARLINGTON, J.; SCHENZ, T.; MATHIAS, S.F.; SLADE, L. & LEVINE, H.(1987): Antifreeze <sup>aktivita</sup> of antarctic fish glycoprotein and a syntetic polymer. – Nature **325**: 146-147
- FULLER, B.J.; GOWER, J.D. & GREEN, C.J.(1988): Free radical damage and organ preservation: fact or fiction. – Cryobiology **25**: 377-393
- HARDING, K.(1996): Approaches to assess the genetic stability of plants recovered from in vitro culture techniques. – in NORMAH, M.N; NARIMAH, M.K. & CLYDE, M.M.(eds): In vitro conservation. Proceedings of the International workshop in In vitro conservation of plant genetic resources.- July 4-6 1995, Kuala Lumpur, pp. 135-168, Plant biotechnology laboratory, Universiti Kebangsaan Malaysia Publication, Kuala Lumpur, Malaysia
- HARDING, K. & BENSON, E.E. (1995): Biochemical and Molecular Methods for Assessing, Damage, Recovery and Stability in Cryopreserved Plant Germplasm. – in Grout, B.(ed.): Genetic preservation of plant cells in vitro. Springer-Verlag, Germany, 11-167 pp.
- HELLIOT, B. & MORTAIN-BERTRAND, A.(1999): Accumulation of proline in *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) in response to light transition and cold adaptation. Effect on cryopreservation. - Cryo-Letters **20**: 287-296
- HOLM-HANSEN, O.(1963): Viability of blue-green and green algae after freezing. – Physiol. Pl. **16**: 530-540.
- HWANG, S.W. & HORNELAND, W.(1965): Surfoval <sup>v</sup> of algal cultures after freezing by controlled and uncontrolled cooling. – Cryobiology **1**: 305-311.
- JIRKA, L. & HAUER, T.(2003): NAJA Image Analysis. - <http://www.sinicearasy.cz/NAJA/>
- KYLIN, H.(1917): Über die Kaltresistenz der Meeresalgen. – Ber. deutsch. bot. Ges. **35**: 370-384
- LEIBO, S.P. & JONES, R.F.(1963): Effects of subzero temperatures on the unicellular red alga *Porphyridium cruentum*. – J. Cell Comp. Physiol. **62**: 295-302
- LEE, T.J; NAKANO, K. & MATSUMURA, M. (2002): A novel strategy for cyanobacterial bloom control by ultrasonic irradiation. – Water Science and Technology, **46**: (6-7) 207-215 2002
- LEPŠ, J.(1996): Biostatistika.- Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, České Budějovice, 166p.
- LORENZEN, C.J. (1967): Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: Spectrophotometric equations. - Limnology and Oceanography **12**: 343-346.

- MATTIS, P.; KIMBALL, S. & SINGH, M.(2002): The GIMP, ver. 1.2. – <http://www.gimp.org>
- MAZUR, P.(1963): Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. – *J. Gen. Physiol.* **47**: 347-369.
- MERYMAN, H.T. & WILLIAMS, R.J.(1984): Basic principles of freezing injury in plant cells: Natural tolerance and approaches to cryopreservation. - in KARTHA, K.K.(Ed.): Cryopreservation of plant cells and organs. – pp. 13-48, CRC Press, Florida.
- MORCOM, N.F.; WARD, S.A.; WOELKERLING, WM. J.(1998): Cover estimates of coralline algae (Corallinales, Rhodophyta: Braun-Blanquet vs. computer image analysis. – *Cryptogamie. Algologie* **19**(4): 303-309.
- NEDOMA, J., VRBA, J., HANZL, T. & NEDBALOVÁ, L.(2001): Quantification of pelagic filamentous microorganismus in aquatic environments using the live-intercept method. *FEMS Microbiol. Ecol.* - **38**: (1) 81-85 .
- LOVELOCK J.E.(1953): The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. – *Biochim. et Biophys. Acta* **10**: 414-426.
- - - (1953): The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. - *Biochim. et Biophys. Acta* **11**: 28-36.
- LUKAVSKÝ, J. (1999) : Biotechnologie fototrofních mikroorganismů – studijní materiál ke kurzu, nepubl.
- NEBESÁŘOVÁ, J.(2002): Elektronová mikroskopie pro biology. Multimediální učební texty - <http://limax.paru.cas.cz/lem/book/index.html>.
- OSÓRIO,H.; LARANJEIRO, C.N.; SANTOS, L.M.A. & SANTOS, M.F.(2002): First Attempts at Cryopreservation of ACOI Strains and the use of Image Analysis to assess Viability. Poster at SAG meeting in September 2002, Göttingen.
- POLGE, C.; SMITH, A.U. & PARKES, A.S.(1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. - *Nature* **164**: 666.
- SAGA, N., MACHIGUCHI, Y & SANBONSUGA, Y.(1987): Application of staining Dyes for Determination Viability of Cultured Algal Cells. – *Bull Hokkaido Reg Fish Lab*, **51**: 39-44.
- SELIGMAN, B.(2003): YANAO Facts. - <http://www.geocities.com/benselig/ynfacts.htm>.
- SNURNIKOV, A.S.; KADNIKOVA, N.G.; MARTSENYUK, V.F. & GURINA, T.M.(2002): The potential for microbiological contamination of biological materials stored in low temperature banks.- In MĚŘIČKA, P.(ed.): Cryopreservation and safe keeping of cells and tissues. - IIR International Conference, May 13-15, 2002 Hradec Králové, CZ.



- TANAKA, J.Y.; WALSH, J.R.; DILLER, K.R., BRAND, J.J. & AGGARWAL, S.J.(2001): Algae permeability to Me<sub>2</sub>SO from -3 to 23°C. *Cryobiology* **42**: 286-300.
- TAYLOR, R. & FLETCHER, R.L.(1999): Cryopreservation of eukaryotic algae – a review of methodologies.- *Journal of Applied Phycology* **10**: 481-501.
- WILSON, P.W.; HENEGHAN, A.F. & HAYMET, A.D.J.(2003): Ice nucleation in nature: supercooling point(SCP) measurements and role of the heterogenous nucleation. – *Cryobiology* **46**: 99-98.
- YENTSCH C.M., HORAN P.K. (1989): Cytometry in the aquatic sciences - Introduction. - *Cytometry*, **10**(5): 497-499 SEP 1989.

# Přílohy

# Příloha 1

## Protokol řízeného zchlazování přístrojem Planer Kryo 360

www.planer.co.uk  
MRV User Interface  
v4.13 release  
01:095.011218  
12:19 27 Mar 2003  
RUN:064-----  
SBIRKA1  
Start temp +025.0 C  
No seeding selected  
#01 -10.00 C/min to -040.0 C  
#02 -05.30 C/min to -050.0 C

Temperature (C) versus time (minutes)

