

**Jihočeská univerzita České Budějovice
Biologická fakulta**



Ekofyziologie dvou druhů rodu *Tribonema* a společenstev perifytonu dočasných tůní

Magisterská diplomová práce

Kateřina Machová

Školitel: Josef Elster

České Budějovice 2004

Machová, K., 2004: Ekofyziologie dvou druhů rodu *Tribonema* a společenstev perifytonu dočasných tůní. [Ecophysiology of two strains of *Tribonema* and periphyton communities of seasonal pools. – MSc. Thesis, in Czech] - 37 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

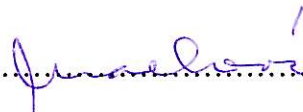
Anotace:

Strains of *Tribonema* were isolated from periphyton samples of seasonal pools in floodplain area of the Lužnice River. During spring flood periphyton communities produce high biomass in the environment of low temperature (0-17°C) and limited irradiance. These isolated strains were tested for their ecophysiological characteristics (rate of photosynthesis and dark respiration, forms of inorganic carbon used in photosynthesis, optimal growth conditions, tolerance to dessication and freezing). In addition, also natural samples of periphyton collected in the same locality were tested (rate of photosynthesis and dark respiration, forms of inorganic carbon used in photosynthesis, tolerance to dessication and freezing). Three methods of algal biomass evaluation were used and compared.

Tato práce byla financována z grantů: 526/00/1442 (GAČR), KONTAKT – ME 576 (MŠMT), QLRT – 2000 – 01645 (COBRA – EU)

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

V Českých Budějovicích 29.4.2004

..........

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mnoha lidem, bez nichž by tato práce nebyla. Svému školiteli Josefu Elsterovi, za možnost tuto práce dělat, za vedení, cenné rady a zajímavé diskuse, Luboši Adamcovi za cenné rady a zasvěcení do světa měření fotosyntézy, profesoru Komárkovi za podporu mé práce, Haně Čížkové za rady ohledně fotosyntézy, Ondřeji Prášilovi za rady ohledně fluorescence, Kláře Kaštovské za přečtení těchto stránek a milé povídání ve chvílích, kdy mi bylo úzko, „Maruškám“ se Sbírkou v Třeboni za pracovní zázemí a splnění všech mých šílených požadavků, Janě Kvíderové za rady a pochopení, Daně Švehlové za úsměv a podporu, Janě Šnokhousevé za sílu, radost a pohodu, kterou mi dodávala při mé práci, všem blízkým, rodičům a přátelům, za jejich podporu, pochopení, blízkost a tak za všechno, že je mám. Všem vám moc děkuji.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Chladnomilné organismy	1
1.2 Xanthophyceae – Tribonematales – Tribonemataceae.....	3
1.3 Prostředí dočasných tůní	4
1.4 Cíle práce	5
2. Materiál a metodika	6
2.1 Použité kmeny.....	6
2.2 Měření rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace.....	8
2.3 Stanovení obsahu chlorofylu a.....	10
2.4 Stanovení pH – alkalizační pokusy	10
2.5 Zmrazování a vysychání	12
2.6 Zkřížené gradienty	13
2.7 Stanovení biomasy pomocí digitální fotografie	13
2.8 Měření fluorescence chlorofylu	13
2.9 Zpracování dat	14
3. Výsledky	15
3.1 Závislost rychlosti fotosyntézy a respirace na teplotě pro kmeny Tribonema	15
3.2 Hodnocení růstu řas na zkřížených gradientech.....	16
3.3 Závislost rychlosti fotosyntézy na ozáření pro kmeny Tribonema.....	20
3.4 Závislost rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace na teplotě pro obě přírodní společenstva	21
3.5 Výsledky alkalizačních pokusů.....	23
3.6 Zmrazování a vysychání	24
3.6.1 Výsledky zmrazování a vysychání kmenů Tribonema	24
3.6.2 Výsledky zmrazování a vysychání přírodních společenstev	26
4. Diskuse	28
4.1 Měření rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace v závislosti na teplotě pro kmeny Tribonema....	28
4.2 Kultivace na zkřížených gradientech	28
4.3 Měření rychlosti fotosyntézy v závislosti na ozáření	29
4.4 Měření rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace v závislosti na teplotě pro přírodní společenstva	30
4.5 Výsledky alkalizačních pokusů.....	31
4.6 Vymrzání a vysychání.....	31
4.7 Hodnocení biomasy pomocí nedestruktivních metod	32
5. Závěr	33
6. Literatura	34

1. Úvod

1.1 Chladnomilné organismy

Schopnost přežívat v nízkých teplotách mohou mít organismy jak psychrofilní, tak psychrotrofní. Psychrotrofové dokáží žít při nízkých teplotách, ale jejich růstové optimum se nachází nad teplotou 15°C. Naopak psychrofilové jsou na nízké teploty adaptováni, optimum pro jejich růst končí při teplotách 15°C (DEMING 2002).

Nízká teplota ovlivňuje biologickou aktivitu na mnoha úrovních: změnou rychlosti biochemických reakcí, posunem stability některých buněčných komponentů a schopností snášet poškození způsobená vymrzáním. Primární reakcí organismů na nízké teploty je snížení rychlosti metabolismu popsané Arrheniovou rovnicí. Nízké teploty indukují konformační změny proteinových enzymů, které mění jejich katalytické schopnosti, změny ve struktuře biologických membrán jsou též odezvou na nízkou teplotu.

Buněčná membrána se skládá z fluidní lipidové dvojvrstvy, do které nebo ke které jsou připojeny bílkoviny zodpovědné za buněčný transport, fosforylaci a další metabolické funkce. Fluidita membrány je důležitá pro správné fungování membránových proteinů. Vlivem nízké teploty dochází k tuhnutí membrány, které ale vlivem různého lipidického složení na různých místech membrány neprobíhá naráz. Proteiny se proto mohou soustřeďovat do míst, kde je ještě membrána fluidní. Teplota tuhnutí membrány závisí na složení mastných kyselin. Při nízkých teplotách dochází ke zvýšení podílu nenasycených mastných kyselin, ke vkládání polárních skupin, zkracování řetězců mastných kyselin (KIRST & WIENCKE 1995). Vyšší podíl nenasycených mastných kyselin snižuje teplotu tuhnutí membrány (VINCENT 1988).

Nízká teplota má dále vliv na různé enzymy, u nichž může docházet ke konformačním změnám, např. na bílkovinnou složku bičků, která depolymerizuje. Krátkodobá aklimace na nízké teploty zahrnuje kompenzační změny v aktivitě enzymů buď změnou koncentrace daného enzymu, aby se vykompenzovala jeho nižší aktivita, nebo jeho nahrazením. Tato syntéza je však velmi energeticky náročná a je vhodná jen krátkodobě (KIRST & WIENCKE 1995). Další možností je změna vnitrobuněčných podmínek, které mají vliv na funkci enzymů, např. změna pH.

Dalším stresovým faktorem je vymrzání. Během poklesu teploty dochází v buňkách nejdříve k procesu zvanému "supercooling". Přitom je buňka zmrazena k teplotě až -40°C, ale tento pokles teploty nemá negativní vliv na její stavbu, nedochází k tvorbě ledových krystalů. Při dalším poklesu teploty již dochází ke zmrznutí buněčného obsahu. Navíc se

zvyšuje koncentrace látek v okolním prostředí a to působí osmotickým tlakem na buňku, z níž uniká voda a tvoří ledové krystaly mimo buňku, dochází k vysychání buněčného obsahu. Dále dochází k rozpouštění některých sloučenin, které unikají z buňky, a ke změnám pH. Pro buňky je letální, pokud se uvnitř vytvoří velké ledové krystaly, které mají disruptivní účinky (VINCENT 1988). Schopnost organismů přežít vymrzání závisí především na rychlosti poklesu teploty, na nejnižší dosažené teplotě a na rychlosti následného oteplování. Je mnoho možných strategií, jak nejlépe přežít vymrzání:

- Vytváření slizových obalů kolem buněk, aby se zabránilo tvorbě nebo alespoň oddálilo místo vzniku ledových krystalů.
- Vytvoření spor.
- Zvýšení koncentrace buněčného obsahu, hlavně cukrů a cukerných alkoholů.
- Zvýšení propustnosti membrány pro vodu, která zabrání tvorbě ledových krystalů uvnitř buňky.
- Změny ve složení lipidických membrán.

S vymrzáním úzce souvisí i vysychání. Schopnost přežít vysychání závisí na rychlosti vysychání a opětovného zavodnění buněk (VINCENT 1988). U sinic se zdá, že tvorba slizových obalů může pomáhat buňkám při vysychání, neboť snižuje rychlost ztráty vody.

U některých fyziologicky významných procesů nehraje teplota tak významnou roli, pokud existuje jiný limitující faktor. Například při nízké ozáření není fotosyntéza limitována teplotou, ale právě nedostatkem světla (VINCENT 1988). Fototrofní organismy se tak musely adaptovat na zastínění, které je v polárních oblastech spojeno s nízkou intenzitou dopadajícího záření během polárního dne, v temperátních oblastech s krátkým dnem. Mechanismů je opět několik:

- Fotosyntéza je saturována při nižších ozářeních.
- V buňkách je vyšší obsah pigmentů, které napomáhají zachycování fotosynteticky aktivního záření.
- Malá velikost buněk – menší buňky lépe a efektivněji zachycují dopadající záření.

Aklimace fotosyntézy na nízké teploty zahrnuje produkci a aktivaci nových enzymů nebo modifikaci enzymové výbavy buňky. Aktivita enzymu Rubisko je úzce spjata se změnami fotosyntézy. Rychlosti respirace a fotosyntézy reagují na změny teploty různě. Při nízkých teplotách rychlost růstu a respirace klesá relativně rychleji vzhledem k rychlosti fotosyntézy, koeficient Q_{10} je vyšší pro temnostní respiraci než pro hrubou fotosyntézu. Proto i malá změna teploty může ovlivnit růst organismu změnou rychlosti respirace. Zdá se, že

rychlost fotosyntézy je méně citlivá k nízkým teplotám než respirace, což umožňuje čistou produkci i při nízkých teplotách (SAKSHAUG & SLAGSTAD 1991).

1.2 Xanthophyceae – Tribonematales – Tribonemataceae

Třída **Xanthophyceae** patří do oddělení **Heterokontophyta**. Organismy patřící do této třídy se vyznačují těmito společnými znaky:

- Stavba stélky od monodoidní, přes kokální, trichální až po sifonální.
- Barva chromatoforů je ostře zelená, světle zelená až žlutozelená, chromatofory obsahují chlorofyl *a*, v malé míře chlorofyl *c*₁ a *c*₂, β-karoten, vaucheriaxanthin, heteroxanthin, diadinoxanthin a diatoxanthin. Chromatofory jsou obklopeny membránou endoplazmatického retikula.
- Zásobní látkou je vždy chrysolaminarin (polysacharid) a olej.
- Stavba pohyblivých stádií (zoospor nebo vegetativních buněk) se vyznačuje bilaterální souměrností a přítomností dvou nestejnocenných bičíků. Ty se nachází blízko apikálního konce buňky. Delší bičík směřuje dopředu a má na povrchu mastigonemata, kratší bičík směřuje dozadu a je holý. Na bičíkový aparát navazuje stigma, které je v zanořeno v chloroplastu.
- Vytváří trvalá stádia – cysty, které vznikají endogenně a jejich stěna je tvořena dvěma nestejnocennými částmi a impregnována křemíkem.
- Buněčná stěna je často dvoudílná.

V rámci této třídy je několik řádů, z nichž řád **Tribonematales** zahrnuje vláknité typy. Vlákna jsou buď jednoduchá nebo větvená, všechny buňky ve vlákně jsou stejnocenné, pouze u typů přichycených k podkladu je koncová buňka přeměněna v jakýsi terčík. Buňky ve vlákně jsou seřazeny za sebou, mají cylindrický nebo mírně soudečkovitý tvar. Buněčná stěna je buď jednodílná nebo dvoudílná – části jsou buď stejnocenné nebo nestejnocenné. V buňkách je jeden nebo více chromatoforů, které jsou nástěnné a různého tvaru, pyrenoidy se většinou nevyskytují. Buňky jsou většinou jednojaderné, vícejaderné mohou být během vzniku zoospor. Zásobní látkou je olej a tuk, kterých je v buňkách velké množství. K rozmnožování dochází pomocí zoospor nebo aplanospor, typické je příčné dělení buněk ve vlákně.

Čleď **Tribonemataceae** tvoří řasy s jednoduchými nevětvenými vlákny bez slizových obalů, která jsou buď volná nebo přichycená k podkladu, odkud se mohou odlomit. Buňky jsou buď srostlé a tvoří pravé buněčné spoje, nebo jsou mezi nimi úzká spojení. Vlákna jsou

většinou krátká, rozpadavá. Buněčná stěna je dvoudílná, někdy je zřetelně diferencovaná a už na vegetativních vláknech se objevují H-kusy. Typické je příčné dělení buněk, kterým dochází k růstu vlákna, dále se rozmnožují pomocí zoospor a aplanospor, také tvoří trvalá stádia jako jsou cysty a akinety. Mohou se rozmnožovat i rozlomením vlákna. Do této čeledi patří rody: *Brachynema*, *Bumilleria*, *Heterotrichella*, *Tribonema*, *Xanthonema*, (ETTL 1978, HOEK, MANN & JAHNS 1995).

1.3 Prostředí dočasných tůní

Záplavová území řek jsou označována jako vysoce specializovaný ekosystém, který má charakter ekotonu – přechodu mezi terrestrickým a mokřadním systémem (HOLLAND ET AL. 1991). Pro takovýto ekosystém je charakteristická vysoká produktivita a otevřený tok látek a energie. Nadměrný rozvoj fyto bentosu a vysoký výskyt sinic a řas v systému dočasněho zaplavení nivy a sezónního vytváření systémů mělkých mokřadů reprezentuje jeden z nejdůležitějších regulačních faktorů ovlivňujících tok látek a energie v těchto specifických biotopech, v nichž je nízká teplota významnou ekologickou charakteristikou (ELSTER ET AL. 2002). Nízká teplota záplavové vody a zmrzlý půdní profil v předjarním období předurčují charakter vznikajících mělkých mokřadů a jejich mikrovegetaci (Obr.1).

Obr.1: Jarní záplava na horní Lužnici



Záplavy často přichází v období vegetačního klidu a nejvýznamnější složkou těchto systémů jsou řasy a sinice, jejichž rozvoj není ovlivněn konkurencí cévnatých rostlin o dostupné světlo a živiny obsažené v záplavové vodě. K velkému rozvoji sinic a řas v prostředí dočasných tůní a mokřadů dochází díky celé řadě jejich biologických, tzv. ruderalních vlastností, kterými jsou schopnost přetrvávat vysychání a vymrzání, rychlý růst a rychlé šíření spor, rychlá aklimatizace – adaptace na nízké teploty, atd. (ELSTER ET AL. 2002, HAWES ET HOWARD-WILLIAMS 1998). Dalším významným faktorem je nepřítomnost nebo zanedbatelná míra žracího tlaku zoobentosu. Bylo prokázáno, že sinice a řasy, které osidlují toto prostředí, jsou adaptovány nebo aklimatizovány na nízké teploty, přičemž optimální teplota pro jejich růst často přesahuje 20°C; v prostředí dočasných tůní se tedy vyskytují v teplotně značně suboptimálních podmínkách (KIRST & WIENCKE 1995, ELSTER ET AL. 2001).

1.4 Cíle práce

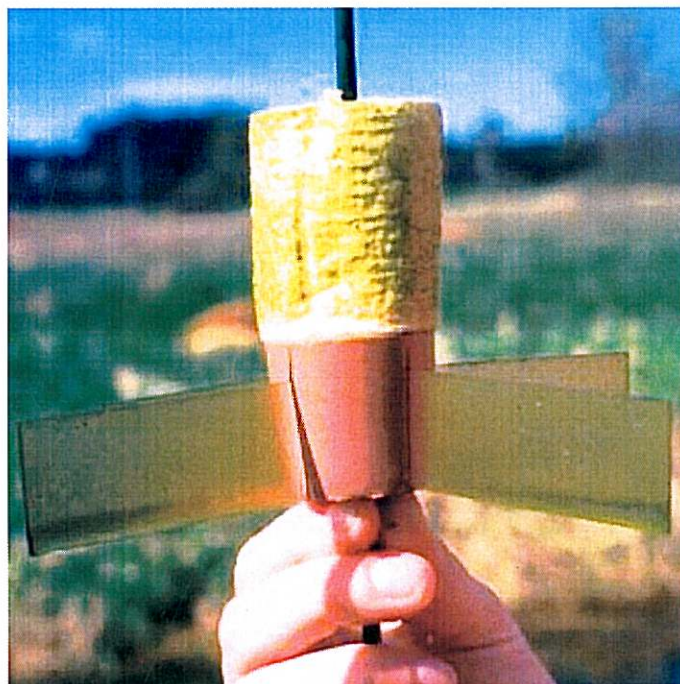
Cílem této práce bylo objasnit ekofyziologické charakteristiky (rychlost fotosyntézy a temnostní respirace v závislosti na teplotě a ozáření, optimální růstové podmínky, schopnost vyrovnat se se stresem vysychání a vymrzání) dvou druhů *Tribonema* a přírodních společenstev perifytonu s ohledem na prostředí chladných vod dočasných tůní, ze kterých byly vyizolovány.

2. Materiál a metody

2.1 Použité kmeny

Pro svou magisterskou práci jsem si vybrala dva kmeny rodu *Tribonema* ze skupiny Xanthophyceae. Tyto kmeny byly vyizolovány během mé bakalářské práce. Byly předkultivovány na umělých nosičích v dočasných tůních na horním toku řeky Lužnice během jarní záplavy v roce 2001. Tato záplava trvala od poloviny února do konce května. Během této doby se teplota vody v řece a pěti vzniklých tůních pohybovala od 3 do 15°C. V polovině února byly na této lokalitě nainstalovány do pěti vzniklých tůní a řeky umělé nosiče (síťky a sklíčka) na předkultivaci řas (Obr.2, 3). Na kovových plovácích byly umístěny síťky o rozměrech 10x10 cm. Stejně síťky byly zapíchnány do dna tůní pomocí obloukovitých drátů. Podložní sklíčka byla umístěna do velkých gumových zátek, na nichž pak byla zapíchnuta pomocí drátu do dna tůně, nebo se vznášela na hladině na polystyrenovém plováku (MACHOVÁ 2002). Každé dva týdny od počátku záplavy, která trvala od poloviny března do konce května byly síťky a sklíčka na lokalitě obměňovány.

Obr. 2,3: Předkultivace sinic a řas na lokalitě horní Lužnice



V laboratoři byly kultivovány a izolovány jednotlivé kmeny sinic a řas (Obr.4, 5). Ze širokého spektra vyizolovaných kmenů z několika skupin byly pro další práci vybrány dva kmeny z rodu *Tribonema*.

Obr. 4, 5: Laboratorní kultivace a izolace kmenů



Tribonema fonticolum (Ettl 1957) vytváří jednotlivá nevětvená vlákna (Obr.6), která jsou široká 5-8 μm , hrubá, v médiu vytváří chuchvalce. Buňky jsou isodiametrické až obdélníkovité, dlouhé 5-10 μm , obsahují jeden velký nástěnný chromatofor – páskovitý až žlábkovitý. Tento kmen byl vyizolován ze vzorku z 12. března 2001, kdy teplota vody, ze které byly řasy a sinice odebrány, byla 2°C.

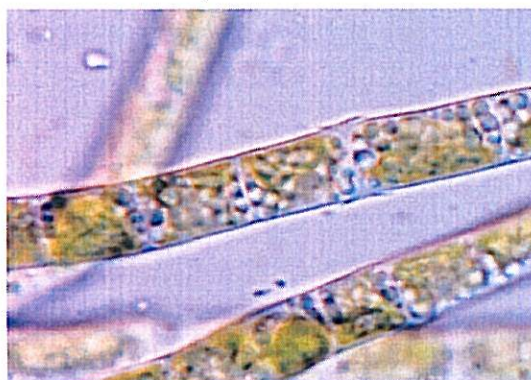
Tribonema monochloron (Pascher et Geitler 1925) tvoří krátká tenká vlákna, široká 3-4 μm , jemná, v médiu tvoří shluky, které se ale velmi snadno roztřepají (Obr.7). Buňky jsou obdélníkovité, dlouhé 8-12 μm , s jedním nástěnným korýtkovitým chromatoforem, který je často nepravidelně laločnatý. Tento kmen byl vyizolován ze vzorku z 26. března 2001, kdy teplota vody byla 6°C.

Po vyizolování byly kmeny kultivovány při teplotě 12°C v kultivační osvětlené lednici se světelným cyklem dvanácti hodin záření PAR a osmi hodin záření UV/B. *Tribonema fonticolum* byla kultivována na agaru BG11 (STANIER, KUNISAWA, MANDEL & COHEN-BAZIRE 1971), *Tribonema monochloron* na agaru BG11 a v médiu Z (ZEHNDER 1961). U obou kmenů byla měřena rychlost fotosyntézy a temnostní respirace a s kmeny byly prováděny zmrazovací pokusy.

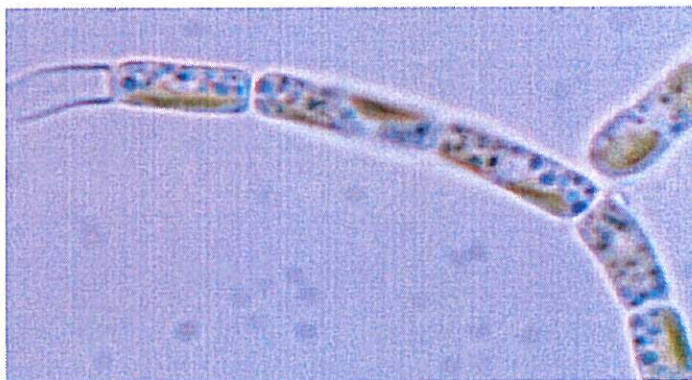
Pro srovnání byly pro měření fotosyntézy a při zmrazovacích pokusech použity vzorky přírodních společenstev sinic a řas. Tato společenstva byla získána na stejné lokalitě stejnou metodou předkultivace během jarní záplavy v roce 2003. Jeden vzorek byl odebrán z vody o

teplotě 3°C na konci března, druhý byl odebrán v polovině května z vody teplé 17°C. Nárosty sinic a řas byly šetrně seškrabány ze sítěk a sklíček a smyty do pracovního roztoku pro fotosyntézu. Ihned poté byla provedena měření fotosyntézy a zmrazovací pokusy. Část vzorků byla fixována formalínem pro pozdější pozorování druhového složení pomocí světelného mikroskopu Olympus (BX 60) (HINDÁK ET AL. 1978). Březnový vzorek tvořily: *Fragillaria* sp., *Cymbella* sp., *Tribonema* sp., *Stigeoclonium* sp. V květnovém vzorku byly nalezeny: *Pseudanabaena galeata*, *Fragillaria* sp., *Tribonema* sp., *Phacus* sp., *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorococcum* sp., *Stigeoclonium* sp.

Obr.6: *Tribonema fonticolum*



Obr.7: *Tribonema monochloron*



2.2 Měření rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace

Fotosyntéza a temnostní respirace byly měřeny v míchané chlazené komůrce (kryostat s aktivním chlazením – model 12104-05, Cole – Parmer Instrument co., USA) o objemu 8,2 ml pomocí kyslíkového čidla Clarkova typu (Labio, Praha) (Obr.8). Komůrka byla během měření neustále magneticky míchána. Průběh rychlosti respirace a fotosyntézy byl zaznamenáván na lineární dvoukanálový zapisovač (TZ 4200, Laboratorní přístroje Praha). Při každé změně teploty byla provedena kalibrace kyslíkového čidla, při níž bylo čidlo ponořeno do komůrky s destilovanou vodou. Komůrka byla probublávána vzduchem do té doby, než se nasýtila kyslíkem. Zapisovač byl pak zkalibrován na 80 dílků na zapisovacím papíře. Před měřením byly přírodní vzorky řas a kmen *Tribonema monochloron* zcentrifugovány (3000 otáček/min, 4°C, 15 minut) a poté rozsuspendovány do pracovního roztoku (0,88mM NaHCO₃+0,05mM KCl). U kmene *Tribonema fonticolum* byl před každým měřením nabrán pinzetou chuchvalec, několikrát propláchnut v pracovním roztoku a poté byl přenesen do měřicí komůrky s pracovním roztokem. Na počátku měření bylo nastaveno pH suspenze v komůrce na hodnotu 6,92, což odpovídá koncentraci 25 mmol CO₂. Tato koncentrace je dostatečná, aby fotosyntéza nebyla během měření limitována nedostatkem

CO₂. Zdrojem světla byla halogenová lampa, světelný proud byl homogenizován clonou z mléčného skla umístěnou před komůrkou. Pro určení intenzity světla při kalibraci byl použit luxmetr. Během měření byly zásobní kultury řas uchovávány v minifytotronu o ozáření 310 $\mu\text{mol kvant m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při teplotě 14°C. Po každém měření byla suspenze řas z komůrky vymyta destilovanou vodou a bylo stanoveno množství chlorofylu *a*.

Pro zjištění průběhu rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace v závislosti na teplotě byly tyto veličiny měřeny při různých teplotách - 3 °C, 8 °C, 14 °C, 20 °C, 26 °C, $\pm 0,5^\circ\text{C}$ za konstantní ozáření 300 $\mu\text{mol kvant m}^{-2}\text{s}^{-1}$. U každého vzorku byla nejprve měřena rychlost temnostní respirace, při níž byla komůrka zakryta černou látkou po dobu 20 minut. Poté byla látka sejmuta, rozsvíceno světlo a rychlost fotosyntézy byla měřena opět 20 minut. Po tomto měření byl vzorek z komůrky vymyt destilovanou vodou a do komůrky byl nalit nový vzorek na měření. Při každé teplotě bylo měření čtyřikrát opakováno, pokaždé s novým vzorkem suspenze řas. Závislost rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace byla měřena pro oba druhy *Tribonema* a pro obě přírodní společenstva.

Závislost rychlosti fotosyntézy na ozáření byla měřena jen pro kmeny *Tribonema* při různých intenzitách ozáření (0, 20, 80, 300, 600, 1000, 1500 $\mu\text{mol kvant m}^{-2} \text{s}^{-1}$), navíc ve třech teplotách. Pro řasu *Tribonema fonticolum* při teplotách 3°C, 14°C, 26°, pro *Tribonema monochloron* při teplotách 3°C, 14°C a 20°C. Nejvyšší teploty se lišily, neboť byly vybrány podle nejvyšší naměřené rychlosti fotosyntézy v předchozím měření.

Obr.8: Aparatura pro měření rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace



2.3 Stanovení obsahu chlorofylu *a*

U jednotlivých vzorků po měření fotosyntézy byl stanoven obsah chlorofylu *a* (PECHAR 1987). Vzorky byly zfiltrány přes skleněné filtry (Whatman GF/C), které byly vysušeny filtračním papírem a ve skleněných uzavíratelných zkumavkách uloženy do mrazáku. Před měřením se do zkumavek doplnilo 7,2 ml extrakční směsi (aceton:methanol v poměru 5:1) a vzorek se nechal 1 hodinu extrahovat ve tmě. Poté byly filtry rozdrceny, na dvě minuty dány do vodní lázně o teplotě 65°C, pak schlazeny. Po následné centrifugaci (3000 otáček/min, 4°C, 15 minut) byla měřena absorbance vzorků při 664 nm na spektrofotometru (SPEKOL 210, Labo Praha) a obsah chlorofylu *a* byl stanoven podle vzorce

$$\text{chl } a = 11,9 * A_{664} * 7,2 / V * d$$

A_{664} – absorbance při 664 nm

V – objem vzorku (8,2 ml)

d – optická vzdálenost

2.4 Stanovení pH – alkalizační pokusy

Pro stanovení, jakou formu CO₂ využívají řasy pro fotosyntézu, byly použity alkalizační pokusy (ALLEN & SPENCE 1981, MABERLY & SPENCE 1983, MABERLY 1983). Jejich princip je založen na skutečnosti, že jakýkoli úbytek uhlíku z roztoku způsobený fotosyntetizujícím organismem vede ke zvýšení pH. Pokud je odebrán CO₂* (zahrnuje volný CO₂, rozpuštěný CO₂ a H₂CO₃), kyselost roztoku klesá s klesající koncentrací kyseliny uhličitě a zvyšuje se pH; pokud je odebrán HCO₃⁻, zvyšuje se koncentrace OH⁻ a při zachované alkalitě roste pH. Toto zvyšování pH posunuje rovnováhu rozpuštěných forem uhlíku ve vodě a v uzavřeném systému za neměnicí se alkality se snižuje celkový obsah uhlíku a mění se dostupnost jeho jednotlivých forem (MABERLY & SPENCE 1983).

Do pěti skleněných lahvíček o objemu 10 ml byla nalita suspenze řas v pracovním roztoku. Bylo změřeno počáteční pH pomocí kombinované pH elektrody při teplotě 20°C. Poté byly lahvičky umístěny do minifytotronu o ozáření 310 μmol kvant m⁻² s⁻¹ při teplotě 14°C. Konečné pH bylo měřeno po šesti hodinách opět při teplotě 20°C. Během této doby byly lahvičky několikrát otočeny dnem vzhůru, aby došlo k promíchání. Z konečného pH byla vypočítána koncentrace CO₂ a HCO₃⁻ podle vzorce (HELDER 1988)

$$t = T[^\circ\text{C}] + 273,15 \Rightarrow [\text{K}]$$

$$k = e^{-13847/t + 148,9802 - 23,652 * \ln(T)}$$

$$k_1 = e^{-14554,21/t + 290,9097 - 45,0575 * \ln(T)}$$

$$k_2 = e^{-11843,79/t + 207,6548 - 33,6485 * \ln(T)}$$

$$a = \text{alkalita} / 1000 \quad h = e^{-\text{pH} * \ln(10)} \quad d = h^2 + h * k_1 + k_1 * k_2$$

$$c_{\text{total}} = \frac{(a - k/h + h) * d * 1000}{h * k_1 + 2 * k_1 * k_2}$$

$$c_{\text{CO}_2} = \frac{(h)^2 * c_{\text{total}}}{d}$$

$$c_{\text{HCO}_3^-} = \frac{k_1 * h * c_{\text{total}}}{d}$$

$$c_{\text{CO}_3^{2-}} = \frac{k_1 * k_2 * c_{\text{total}}}{d}$$

c_{total} - celkový obsah uhlíku

c_{CO_2} - koncentrace CO_2

$c_{\text{HCO}_3^-}$ - koncentrace HCO_3^-

$c_{\text{CO}_3^{2-}}$ - koncentrace CO_3^{2-}

Podle těchto koncentrací bylo usuzováno, jakou formu uhlíku řasa využívá pro fotosyntézu.

2.5 Zmrazování a vysychání

Přírodní vzorky a oba kmeny *Tribonema* byly zmrazovány podle několika zmrazovacích protokolů (Tab.1). Při zmrazování byly malé objemy suspenzí řas (300 µl) napipetovány do speciálních zkumavek – kryovials. Jednotlivé vzorky byly zmrazovány při -4°C, -40°C, -100°C (Planer controlled rate freezer -Kryo560-16) a přímo v tekutém dusíku. Při zmrazování v tekutém dusíku byly vzorky přímo vloženy do tekutého dusíku a ponechány dvě hodiny. Poté byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 40°C. Při zmrazování do -4°C, -40°C, -100°C byl každý vzorek postupně schlazen k požadované teplotě, kde byl ponechán po dobu pěti minut. Poté byl rozmražen ve vodní lázni teplé 40°C. Každý vzorek byl takto třikrát zmražen a rozmražen. Po zmrazování byly vzorky naočkovány na agarové plotny s agarem Z a kultivovány 7 až 9 dní při teplotě 20°C. Po kultivaci byly vyhodnocovány změny morfologie způsobené zmrazováním, růst a dělení buněk a stanovena vitalita (LUKAVSKÝ 1974, 1975) – ve světelném mikroskopu byly počítány mrtvé a živé buňky a vitalita byla stanovena podle vzorce

$$V = (B_z \times 100) / (B_m + B_z)$$

B_z – živé buňky ve vlákně

B_m – mrtvé buňky ve vlákně

Kromě schopnosti přežít vymrzání byly vzorky testovány na schopnost přežít vysychání. Opět v kryovials vysychaly osm dní buď v desikátoru při pokojové teplotě nebo v lednici při teplotě 4°C. Metoda kultivace a stanovení vitality byly stejné jako po zmrazování.

Tab.1: Zmrazovací protokoly a vysychání

Počáteční teplota	Doba poklesu k pokusné teplotě	Pokusná teplota	Doba setrvání v pokusné teplotě	Počet opakování pro jeden vzorek
20°C	6 minut	- 4°C	5 minut	3
20°C	13 minut	- 40°C	5 minut	3
20°C	19 minut	- 100°C	5 minut	3
20°C		- 198,6°C	2 hodiny	1
20°C		4°C	8 dní	1
20°C		20°C	8 dní	1

2.6 Zkřížené gradienty

Růst řas v závislosti na teplotě byl měřen na zkřížených gradientech (KVÍDEROVÁ & LUKAVSKÝ 2001). Na hliníkové desce, jejíž teplota je temperována pomocí systému chladících a ohřívacích kanálků, vzniká ve směru delší strany desky teplotní gradient podle vlastní potřeby experimentu. Deska je shora ozářena šesti podélně uspořádanými zářivkami o výkonu 7W. Při pokusu byly tři zářivky rozsvíceny, tři zhasnuty. Na desce s navlhčenou gázou (pro lepší přenos tepla) bylo rozmístěno 45 petriho misek (v uspořádání 5 x 9) o průměru 9 cm s agarem Z. Do každé misky byl napipetován 1 ml suspenze řas a rozetřen. Pro stanovení počáteční biomasy byl stanoven obsah chlorofylu *a* pro tři vzorky suspenze o objemu 1 ml. Kultivace na zkřížených gradientech probíhala při teplotách od 2°C do 35°C a ozářenostech mezi 14 a 27 $\mu\text{mol kvant m}^{-2}\text{s}^{-1}$ po dobu třinácti dnů. Pro zjištění průběhu růstu byly vybrány dvě nedestruktivní metody: 1) vzorky byly foceny digitálním fotoaparátem a analyzovány pomocí programu NAJA Image Analysis (JIRKA & HAUER 2003) a 2) byla měřena fluorescence chlorofylu. Po dokončení kultivace byly nárosty řas smyty destilovanou vodou a stanoven obsah chlorofylu *a*.

Bylo zjišťováno, jestli existuje korelace mezi obsahem chlorofylu a výsledky analýz NAJA a mezi fluorescencí a obsahem chlorofylu, tedy jestli mohou tyto metody zastoupit stanovení chlorofylu.

2.7 Stanovení biomasy pomocí digitální fotografie

Pro zjištění průběhu růstu řas na petriho miskách během kultivace na zkřížených gradientech byla použita nedestruktivní metoda popsána v práci HAUERA (2003). Petriho misky byly nafoceny ve sterilním boxu digitálním fotoaparátem Olympus C-5050 ve formátu TIFF v rozlišení 1600x1200 obrazových bodů, při focení byly umístěny na bílé ploše s referenčním čtvercem padesátiprocentní šedé barvy. Obrázky byly dále upraveny v programu GIMP a poté analyzovány v programu NAJA Image Analysis.

2.8 Měření fluorescence chlorofylu

Pro zjištění průběhu růstu na zkřížených gradientech byla použita nedestruktivní metoda měření fluorescence chlorofylu. Měření byla prováděna na přístroji FluorCam 700 MF, verze 3.013 (PSI, Brno), který umožňuje pomocí citlivé CCD kamery sledovat základní fluorescenční parametry s dvojrozměrným rozlišením. Vzorky (petriho misky) byly umístěny v měřicí komoře, která je ozařována dvěma panely oranžových LED diod, které vyzařují

měřicí záblesky a aktinické světlo. Záblesky saturačního světla jsou pak vyzařovány halogenovou lampou (250W), která je vybavena clonou. Florescenční signál je detekován CCD kamerou.

Pro měření fluorescence byla použita pomalá (Kautského) indukční kinetika fluorescence (KAUTSKY & HIRSCH 1934). Jednotlivé petriho misky s nárosty řas byly nejprve na deset minut umístěny do tmy. Poté byly dány do měřicí komory přístroje. Slabým měřicím světlem byl určen počáteční fluorescenční výtěžek ve tmě (F_0). Silný záblesk saturačního světla způsobil maximální zvýšení fluorescenčního výtěžku (F_m). Dále následoval záznam změn fluorescence při zapnutí aktinického světla (Tab.2). Ze získaných parametrů F_m a F_0 byla vypočítána variabilní fluorescence ($F_v = F_m - F_0$) a dále maximální výtěžek primárních fotochemických procesů PSII ($= F_v / F_m$). Tato veličina byla využita pro získání informace o stavu nárostu. Pokud je $F_v/F_m < 0,6$, značí to nějaký stres nebo nedobrá stav nárostu. Pokud je $F_v/F_m > 0,6$, jsou podmínky pro růst a stav nárostu optimální (Prášil – ústní sdělení). K popisu průběhu růstu kmenů řas na zkřížených gradientech byl využit parametr F_0 .

Tab.2: F_0 , F_m a Kautského efekt - protokol pro měření fluorescence

Základní parametry		Temnostní pauza po měření F_m	
Citlivost [%]	20	Délka temnostní pauzy [s]	40
Elektronická záklopka [0-2]	1	Každý n-tý obraz	50
Optický rámeček [s]	3,36		
		Kautského indukce	
Měření F_0		Expozice aktinického záření [s]	150
Délka měření F_0 [s]	10	Intenzita aktinického záření [%]	30
Každý n-tý obraz	25	Každý n-tý obraz	5
		Temnostní pauza po Kautského indukci	
Měření F_m		Relaxační interval [s]	10
Délka trvání pulsu [ms]	1600	Každý n-tý obraz	50
Intenzita pulsu [%]	50		

2.9 Zpracování dat

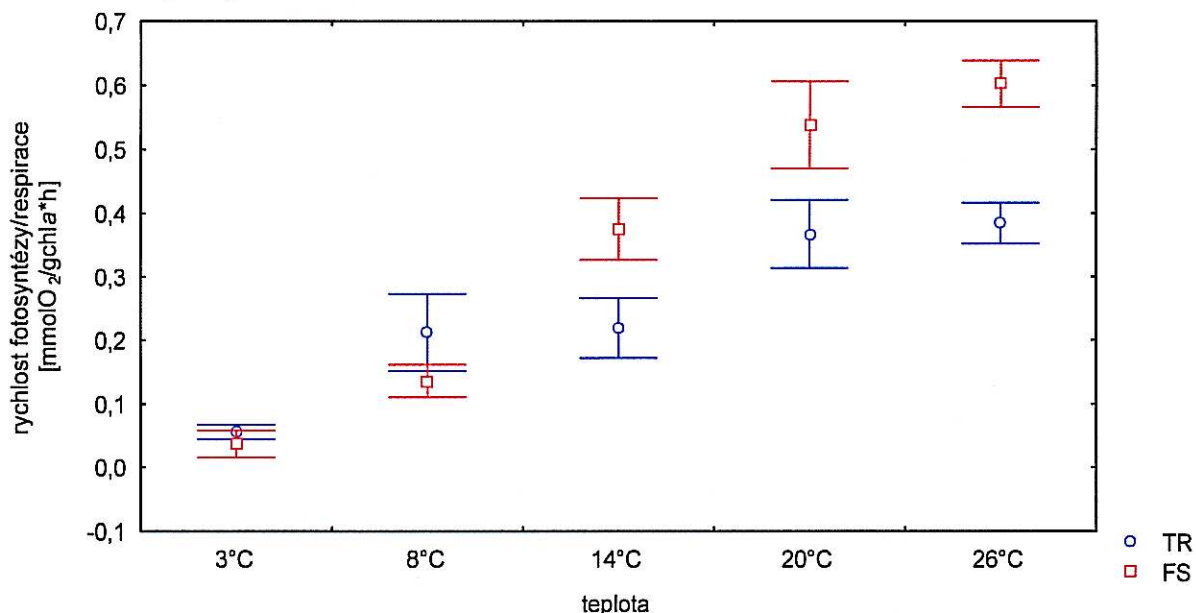
Digitální fotografie po převedení do počítače byly nejprve zpracovány v grafickém programu GIMP (MATTIS ET AL. 2002) a poté hodnoceny v programu NAJA Image Analysis (JIRKA & HAUER 2003). Zpracování tabulek bylo provedeno v programu MS Excel 2001 (Microsoft corp., Redmond, USA). Grafy a porovnání výsledků získaných pomocí digitální fotografie, měření fluorescence a stanovení konečného obsahu chlorofylu – zjištění korelace – byly zpracovány v programu STATISTICA, ver. 6.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, USA).

3. Výsledky

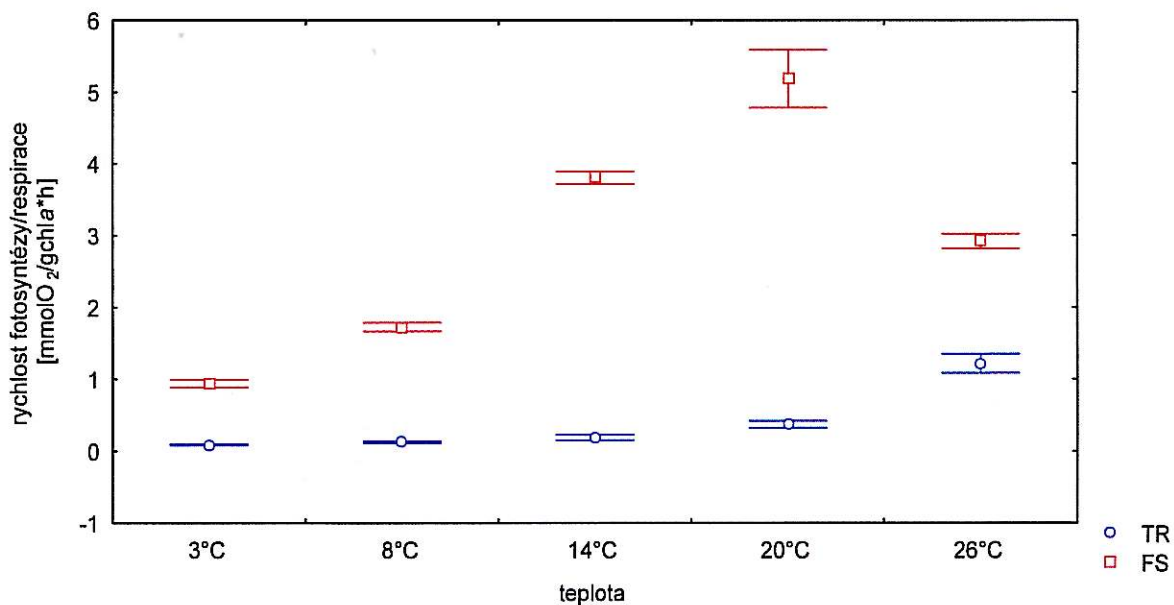
3.1 Závislost rychlosti fotosyntézy a respirace na teplotě pro kmeny *Tribonema*

Rychlost fotosyntézy (FS) i temnostní respirace (TR) pro kmen *Tribonema fonticolum* rostla se zvyšující se teplotou (Graf 1). Při nízkých teplotách byla rychlost fotosyntézy nižší než rychlost respirace, při vyšších ji převyšovala. Nejvyšší rychlosti fotosyntézy dosahovala při 26°C – 0,6 mmol O₂ g chla⁻¹ h⁻¹.

Graf 1: *Tribonema fonticolum* – závislost rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace na teplotě (průměrné hodnoty ± SE)



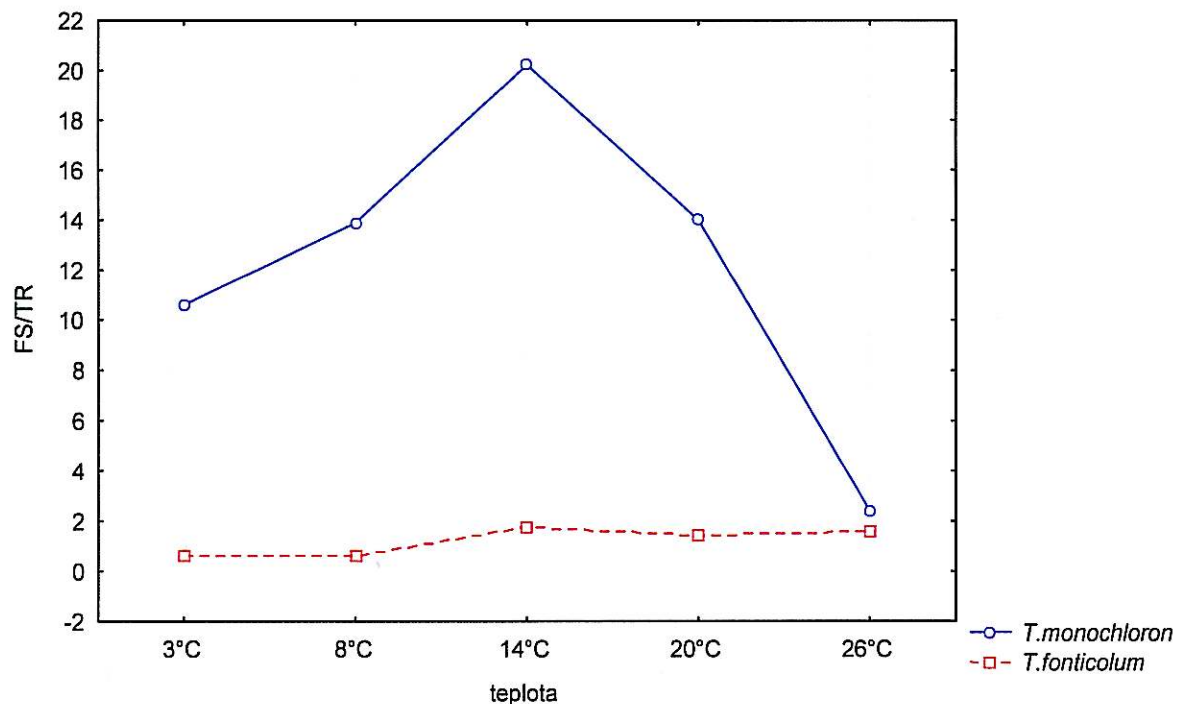
Graf 2: *Tribonema monochloron* – závislost rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace na teplotě (průměrné hodnoty ± SE)



Rychlost fotosyntézy pro kmen *Tribonema monochloron* byla při všech teplotách vyšší než rychlost temnostní respirace (Graf 2). Rychlost temnostní respirace stoupala se vzrůstající teplotou, totéž platilo i pro rychlost fotosyntézy, u které ale při 26°C došlo k poklesu. Hodnoty rychlosti fotosyntézy byly u kmene *Tribonema monochloron* přibližně desetkrát vyšší než u kmene *Tribonema fonticolum*, zatímco hodnoty pro temnostní respiraci byly pro oba kmeny podobné.

Z grafu poměrů rychlostí fotosyntézy a temnostní respirace pro oba kmeny *Tribonema* vyplývá, že tento poměr nabýval nejvyšší hodnoty u obou kmenů při teplotě 14°C (Graf 3). Hodnoty poměrů byly pro kmen *Tribonema monochloron* desetkrát vyšší než pro kmen *Tribonema fonticolum*.

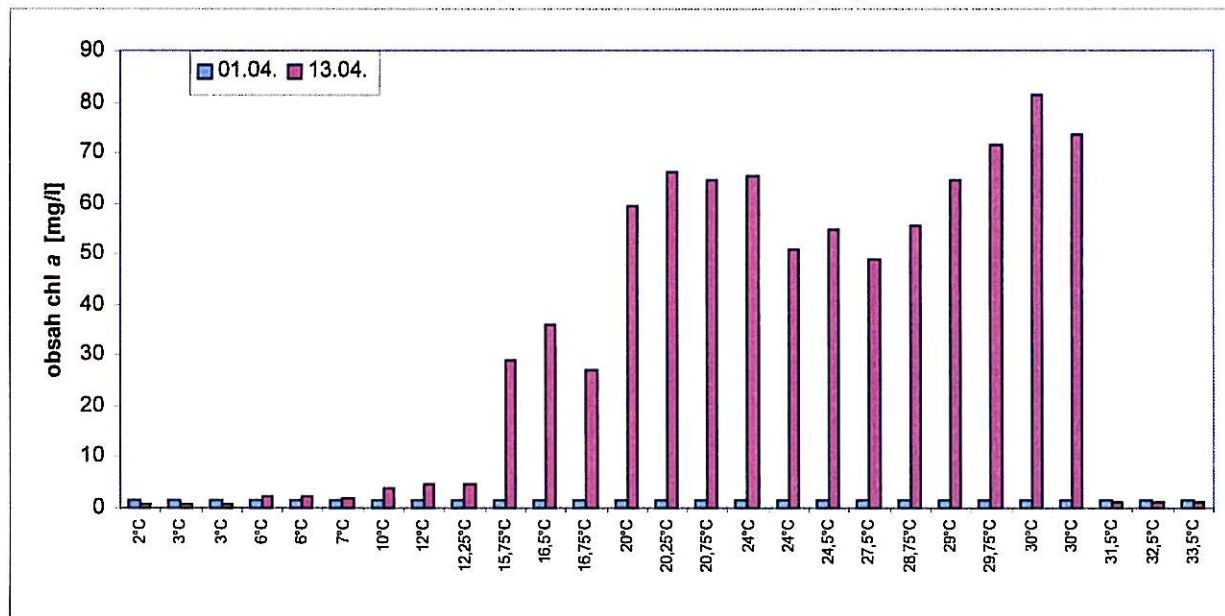
Graf 3: Graf poměrů mezi rychlostmi fotosyntézy a respirace pro oba kmeny *Tribonema*



3.2 Hodnocení růstu řas na zkřížených gradientech

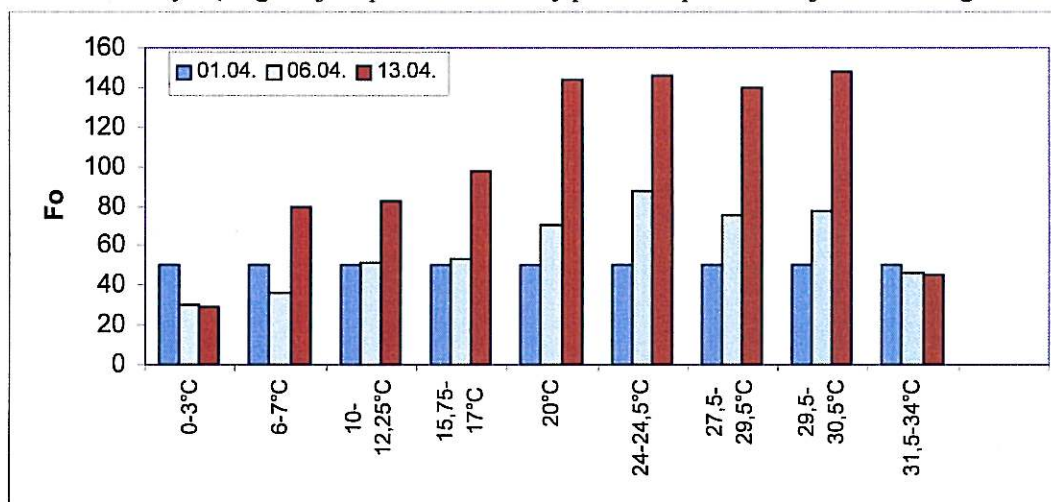
Teplota, při které byla kultivována *Tribonema fonticolum* na zkřížených gradientech byla 0 až 34°C. Nejvyšší biomasa (obsah chlorofylu *a*) byla na konci kultivace při teplotách 20 až 30°C, obsah chlorofylu *a* se při těchto teplotách pohyboval od 49 do 66,25 mg/l (Graf 4). Při teplotách nižších než 12°C byly nárosty minimální, při teplotách nižších než 6°C a vyšších než 30°C došlo k úbytku počáteční biomasy. Při vysokých teplotách došlo k uhynutí buněk a k vytvoření akinet.

Graf 4 : *Tribonema fonticolum* - nárůst biomasy během kultivace na zkřížených gradientech



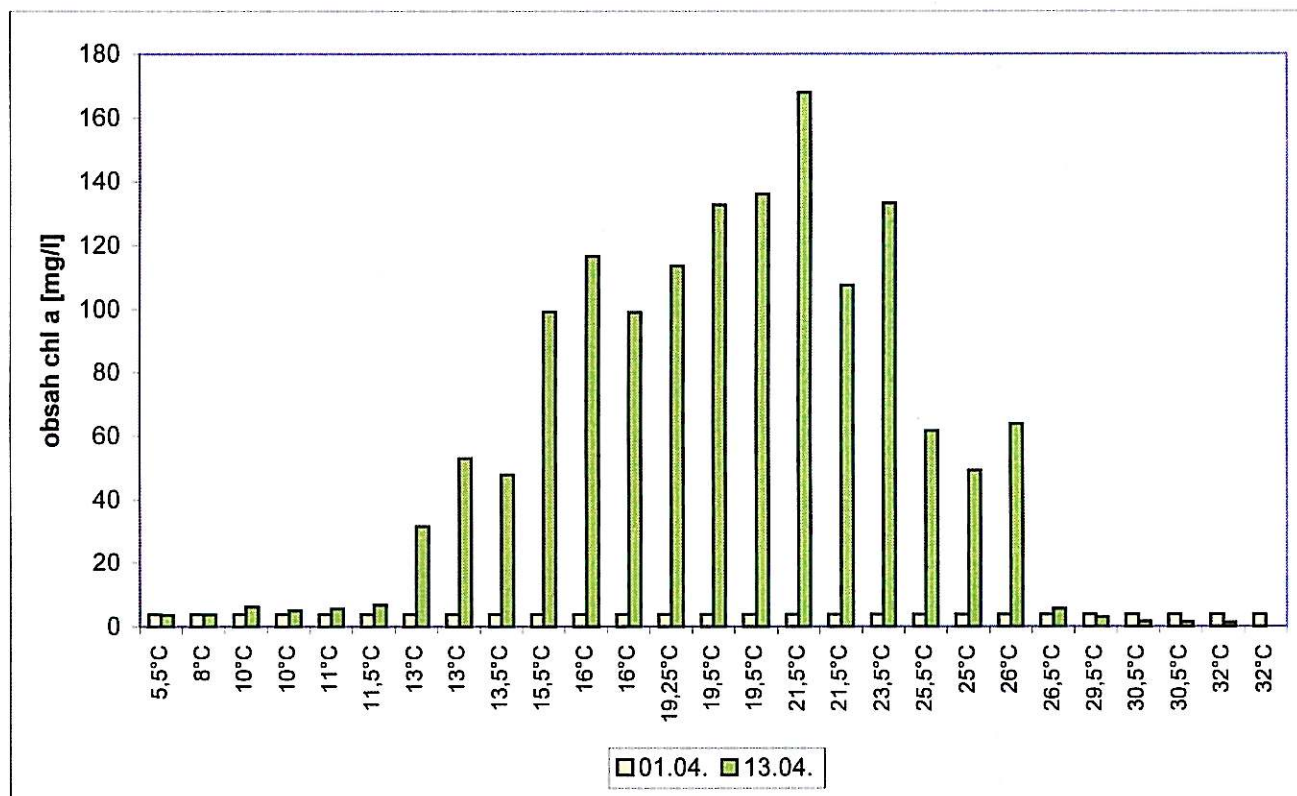
Růst v jednotlivých řadách petriho misek na ploše zkřížených gradientů znázorňuje graf 5. Při teplotách od 0 do 3°C došlo během kultivace k pozvolnému poklesu biomasy, nedošlo k žádnému nárůstu. Při teplotách od 6 do 7°C došlo v první polovině kultivace k mírnému poklesu biomasy, ale v druhé polovině došlo k nárůstu, takže koncový obsah chlorofylu *a* byl vyšší než počáteční. Na miskách, kde se byla teplota od 10 do 17°C, byl nárůst biomasy v první polovině kultivace jen velmi malý, v druhé polovině došlo k prudkému růstu. Při teplotách od 20°C do 30,5°C byl v první polovině kultivace růst pomalejší, ve druhé došlo k prudkému nárůstu. Teploty 31,5 do 34°C byly pro růst příliš vysoké, došlo k poklesu biomasy, úhynu vláken a tvorbě akinet.

Graf 5: *Tribonema fonticolum* – průběh růstu na zkřížených gradientech vyjádřený pomocí fluorescence chlorofylu (v grafu jsou průměrné hodnoty pro všech pět misek v jedné řadě na gradientech)



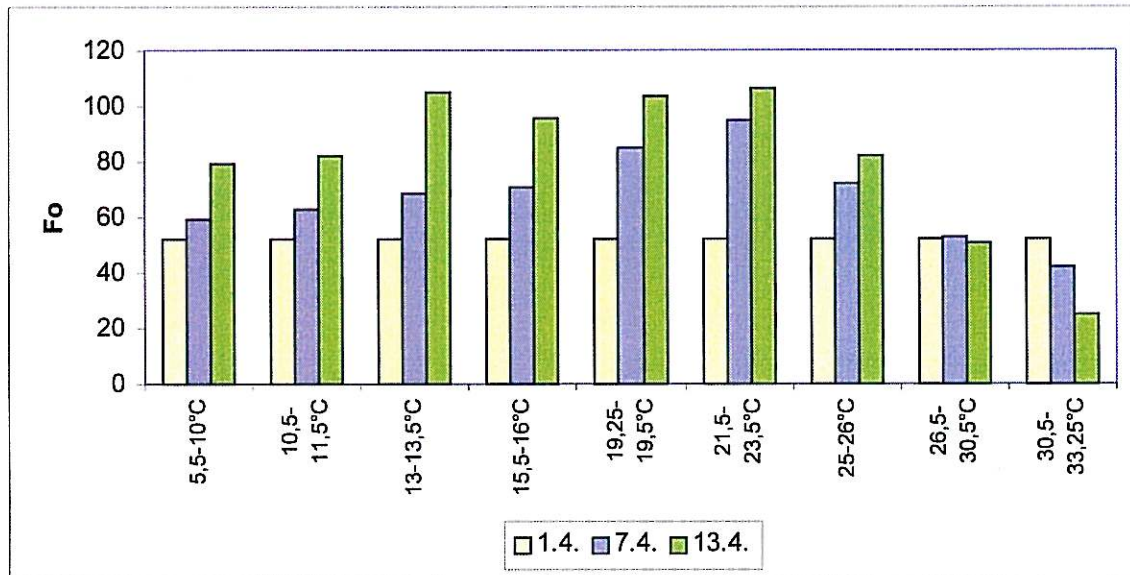
Tribonema monochloron byla kultivována při teplotách 5,5 až 33,25°C. Nejvyšší biomasy dosáhla při teplotách 15,5 až 23,5°C (Graf 6), koncový obsah chlorofylu *a* při těchto teplotách se pohyboval od 98 do 168 mg/l. Při teplotách nižších než 10°C byl nárůst minimální, při vyšších než 26°C došlo během kultivace k úbytku počátečního obsahu chlorofylu. Při těchto vyšších teplotách došlo k vytvoření akinet.

Graf 6: *Tribonema monochloron* - nárůst biomasy během kultivace na zkřížených gradientech



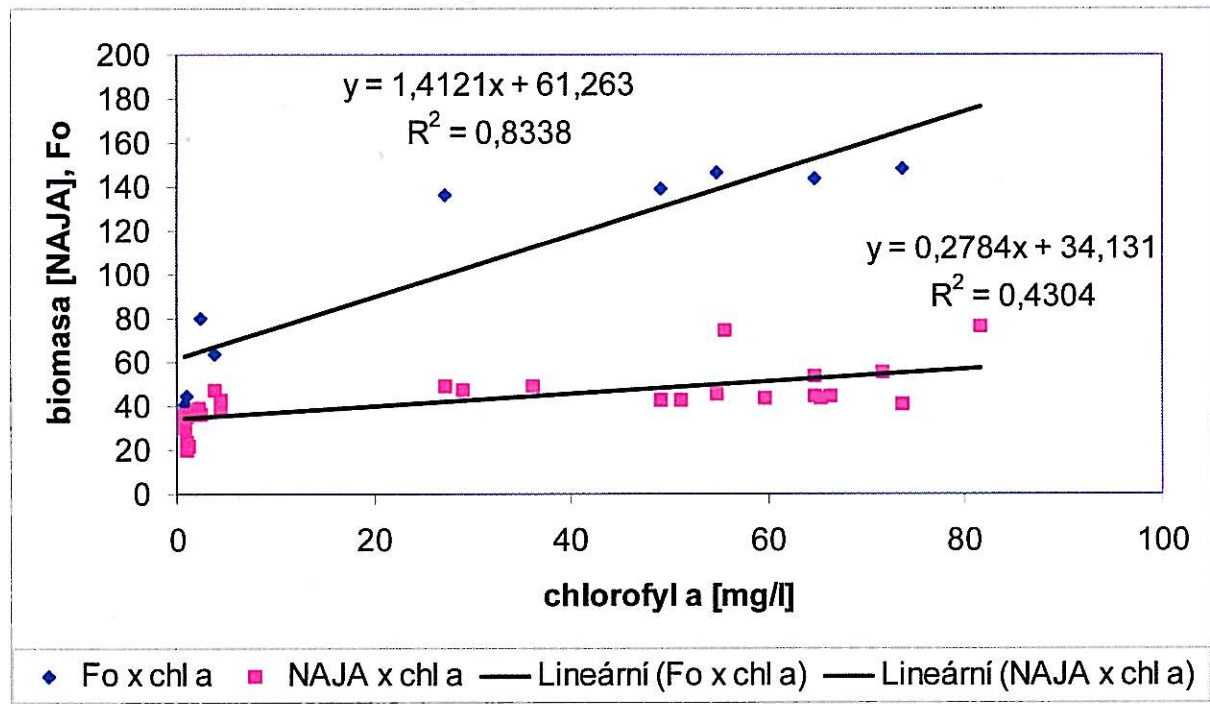
Růst v jednotlivých řadách na petriho miskách je znázorněn v grafu 7. Při teplotách od 5,5 do 10°C, došlo k pozvolnému růstu během celé kultivace, stejně tomu bylo i při teplotách 10,5 až 11,5°C. Při teplotách 13 až 16°C byl růst v první polovině kultivace pomalejší, ve druhé došlo k prudkému nárůstu. Při teplotách 19,25 až 26°C došlo k rychlému růstu v první polovině kultivace, v druhé byl růst pomalejší a nárůst menší. Při teplotách od 26,5 do 30,5°C růst stagnoval a biomasa se během kultivace příliš nezměnila. Při teplotách vyšších než 30,5°C nedošlo k nárůstu, naopak biomasy ubylo, vlákna uhynula a tvořily se akinyety.

Graf 7: *Tribonema monochloron* – průběh růstu na zkřížených gradientech vyjádřený pomocí fluorescence chlorofylu (v grafu jsou průměrné hodnoty pro všech pět misek v jedné řadě na gradientech)



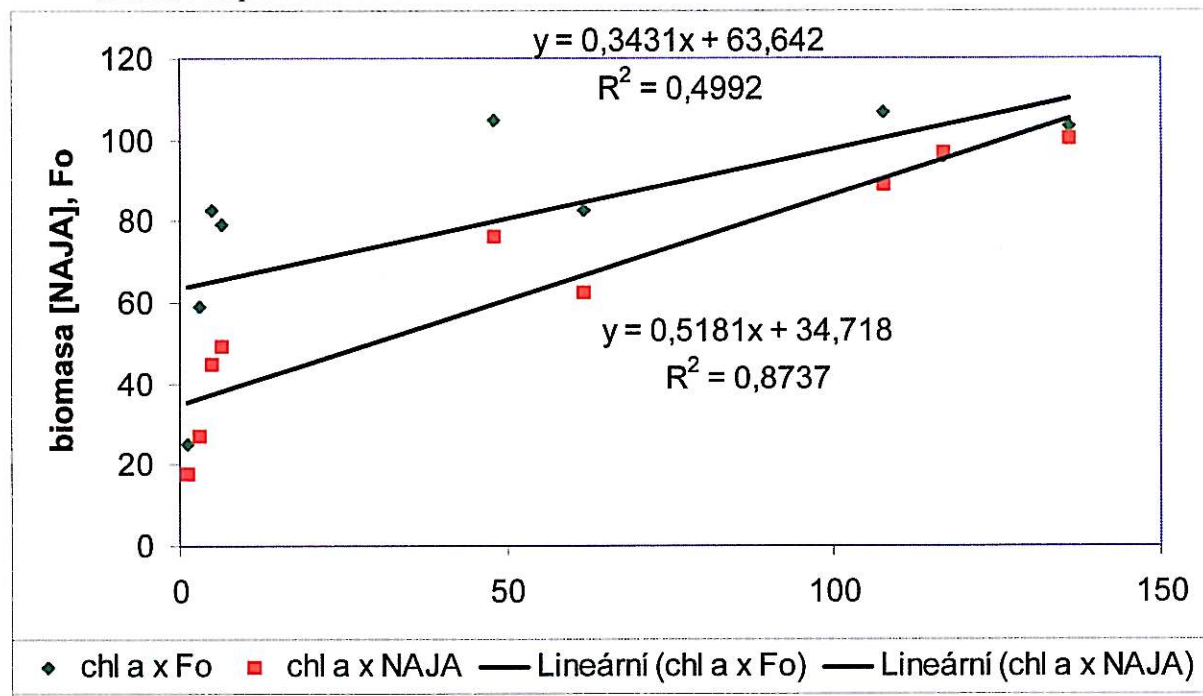
Korelační vztahy mezi; a) obsahem chlorofylu *a* a biomasou stanovenou pomocí NAJA Image Analysis; a mezi b) obsahem chlorofylu *a* a fluorescenční hodnotou Fo pro kmen *Tribonema fonticolum* ukazuje graf 8. Pro vztah mezi biomasou NAJA a chlorofylem *a* je korelační koeficient r^2 0,43 ($p < 0,05$) a pro vztah mezi Fo a chlorofylem *a* je korelační koeficient r^2 0,83 ($p < 0,05$).

Graf 8: Korelace mezi obsahem chlorofylu *a* a) biomasou stanovenou pomocí NAJA Image Analysis, b) hodnotou Fo pro kmen *Tribonema fonticolum*



Korelační vztahy mezi; a) obsahem chlorofylu *a* a biomasou stanovenou pomocí NAJA Image Analysis; a b) mezi obsahem chlorofylu *a* a fluorescenční hodnotou F_o pro kmen *Tribonema monochloron* ukazuje graf 9. Pro vztah mezi biomasou NAJA a chlorofylem *a* je korelační koeficient r^2 0,87 ($p < 0,05$) a pro vztah mezi F_o a chlorofylem *a* je korelační koeficient r^2 0,50 ($p < 0,05$).

Graf 9: Korelace mezi obsahem chlorofylu *a* a) biomasou stanovenou pomocí NAJA Image Analysis, b) hodnotou F_o pro kmen *Tribonema monochloron*

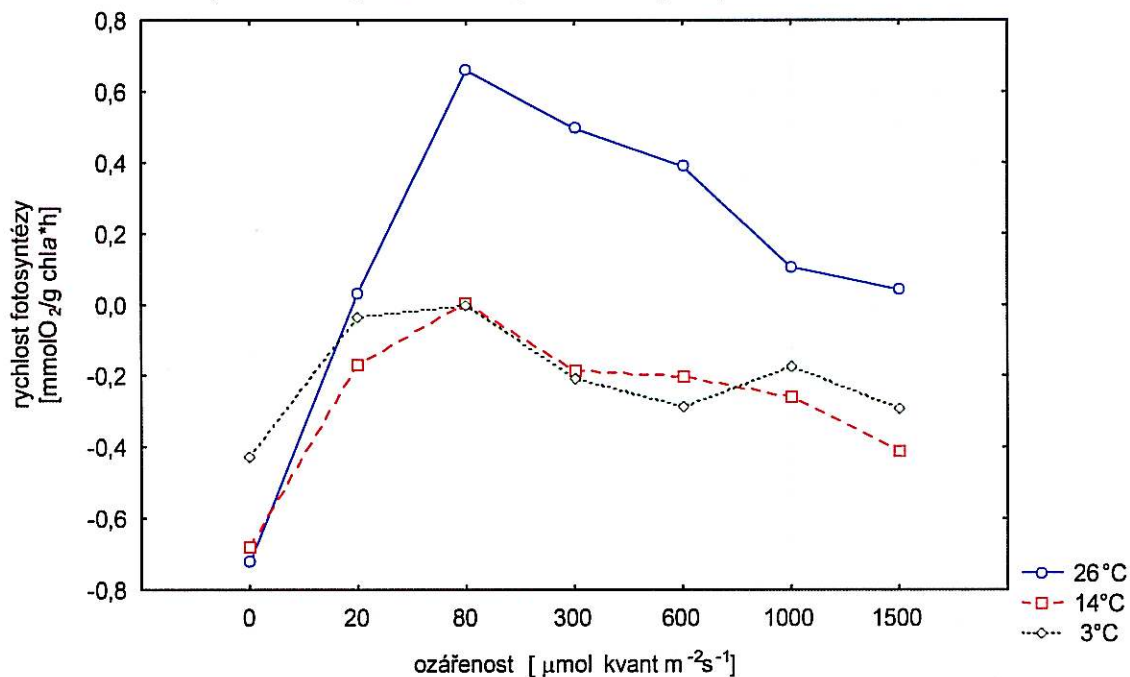


3.3 Závislost rychlosti fotosyntézy na ozáření pro kmene *Tribonema*

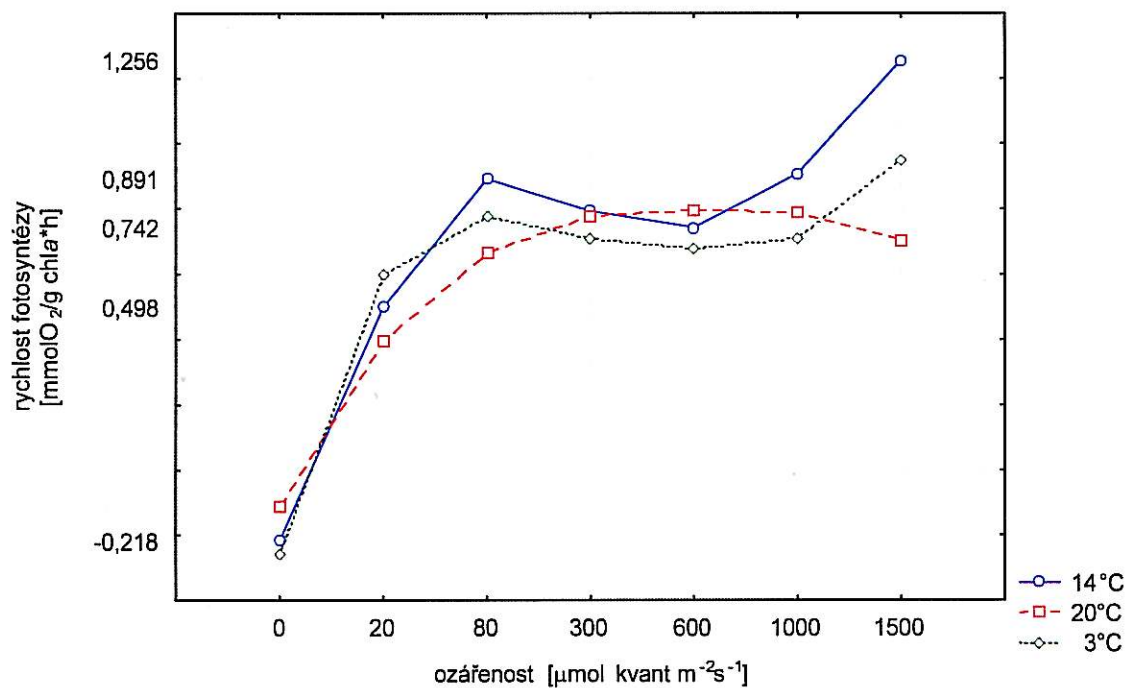
Rychlost fotosyntézy u kmene *Tribonema fonticolum* se lišila při různých teplotách. Nejvyšší rychlosti dosahovala při teplotě 26°C. Při všech teplotách se rychlost fotosyntézy zvyšovala do intenzity ozáření 80 $\mu\text{mol kvant m}^{-2}\text{s}^{-1}$, při vyšších ozářeních došlo k fotoinhibici (Graf 10). Při teplotách 3°C a 14°C byla hodnota fotosyntézy záporná, i když výsledné křivky se tvarem shodují s křivkou při 26°C.

U kmene *Tribonema monochloron* se průběh křivek lišil v závislosti na teplotě měření (Graf 11). Při teplotě 20°C rostla rychlost fotosyntézy do ozáření 300 $\mu\text{mol kvant m}^{-2}\text{s}^{-1}$, při vyšších ozářeních byla vyrovnaná a při intenzitě 1500 $\mu\text{mol kvant m}^{-2}\text{s}^{-1}$ prudce klesla. Při teplotách 3°C a 14°C rostla rychlost fotosyntézy do 80 $\mu\text{mol kvant m}^{-2}\text{s}^{-1}$, pak došlo k poklesu a prudkému růstu při intenzitách od 1000 $\mu\text{mol kvant m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Graf 10: *Tribonema fonticolum* - graf závislosti rychlosti fotosyntézy na ozáření



Graf 11: *Tribonema monochloron* – graf závislosti rychlosti fotosyntézy na ozáření

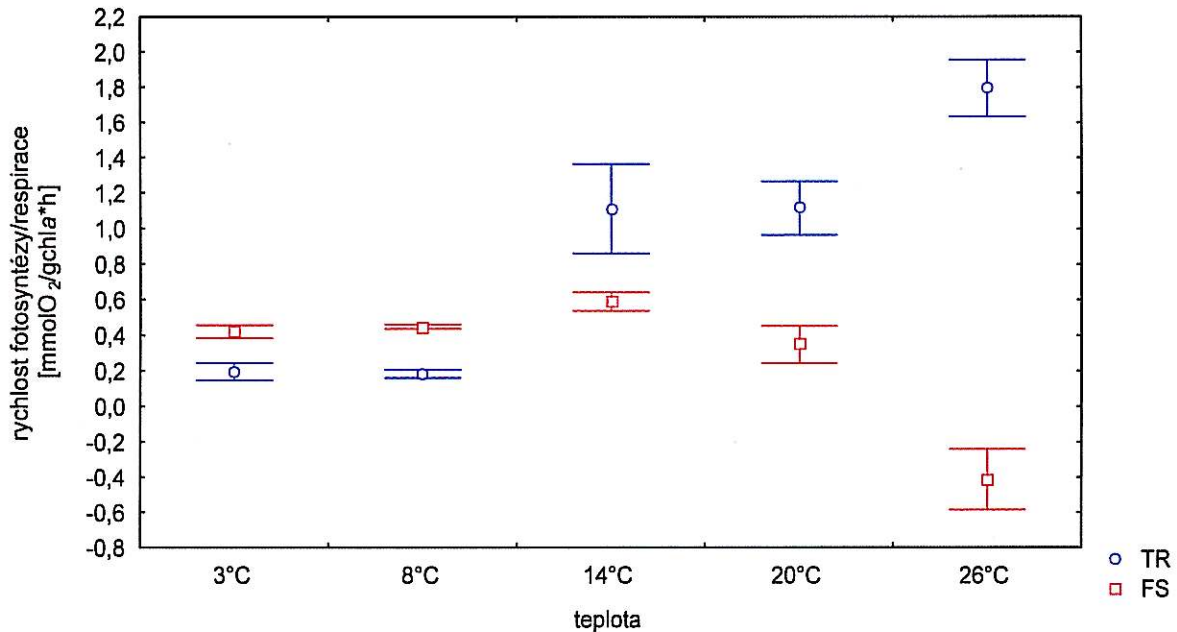


3.4 Závislost rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace na teplotě pro obě přírodní společenstva

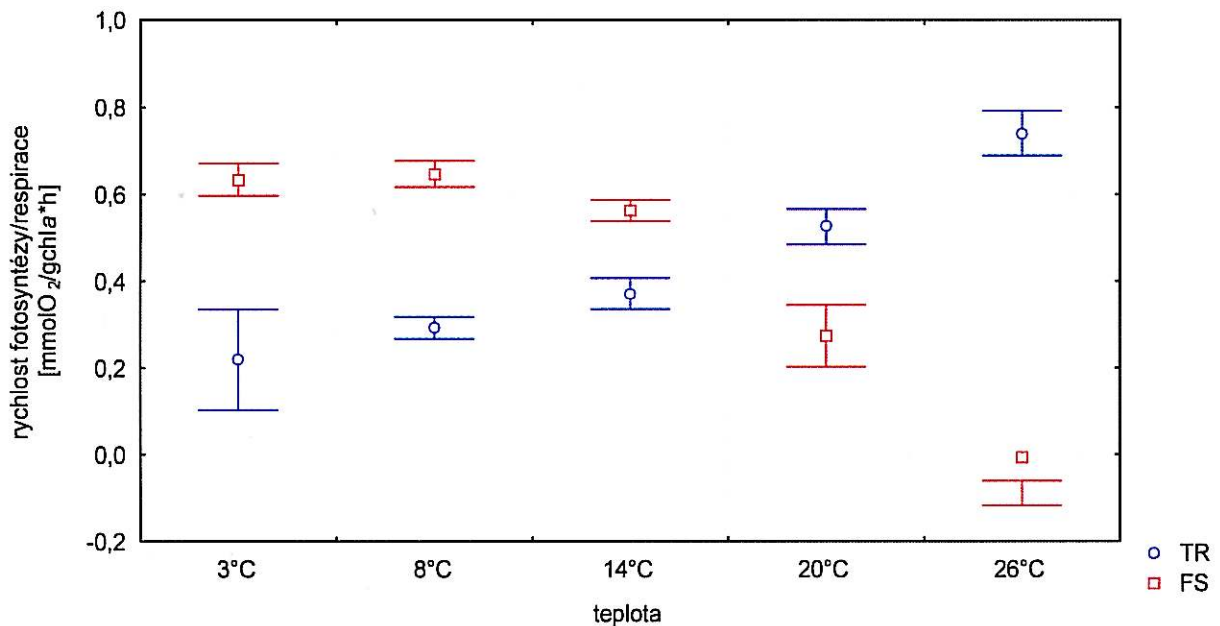
U přírodního vzorku předkultivovaného ve druhé polovině března, kdy teplota vody v době odběru byla 3°C, byla rychlost fotosyntézy vyšší než rychlost respirace pouze při nízkých teplotách (Graf 12). Se zvyšující se teplotou rychlost fotosyntézy stoupala, ale jen do

teploty 14°C, kdy ji již převyšovala rychlost temnostní respirace, pak došlo k poklesu. Při těchto vyšších teplotách byla rychlost fotosyntézy nižší než rychlost temnostní respirace. Při teplotě 26°C byla fotosyntéza záporná.

Graf 12: Závislost fotosyntézy a temnostní respirace na teplotě pro přírodní vzorek předkultivovaný v březnu při teplotě 3°C (průměrné hodnoty±SE)



Graf 13: Závislost fotosyntézy a temnostní respirace na teplotě pro přírodní vzorek předkultivovaný na začátku května při teplotě 17°C (průměrné hodnoty±SE)

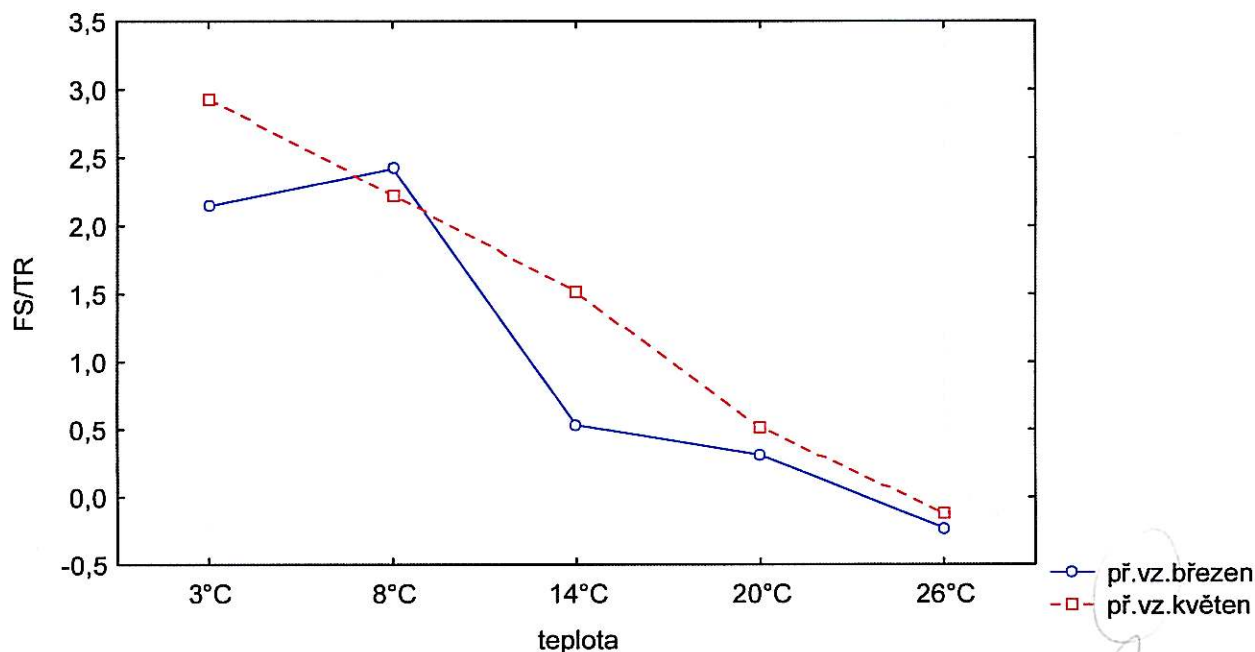


U přírodního společenstva předkultivovaného v první polovině května a odebíraného při teplotě vody 17°C došlo se zvyšující se teplotou k poklesu rychlosti fotosyntézy, naopak

rychlost respirace s rostoucí teplotou rostla (Graf 13). Rychlost fotosyntézy byla vyšší při nízkých teplotách (3°C, 8°C, 14°C), při vyšších ji převyšovala rychlost respirace.

Hodnota poměrů mezi rychlostí fotosyntézy a respirace byla u přírodního vzorku z konce března nejvyšší při 8°C, u přírodního vzorku ze začátku května při 3°C (Graf 14). Při vyšších teplotách hodnoty poměrů klesali.

Graf 14: Graf poměrů rychlostí fotosyntézy a temnostní respirace pro oba přírodní vzorky



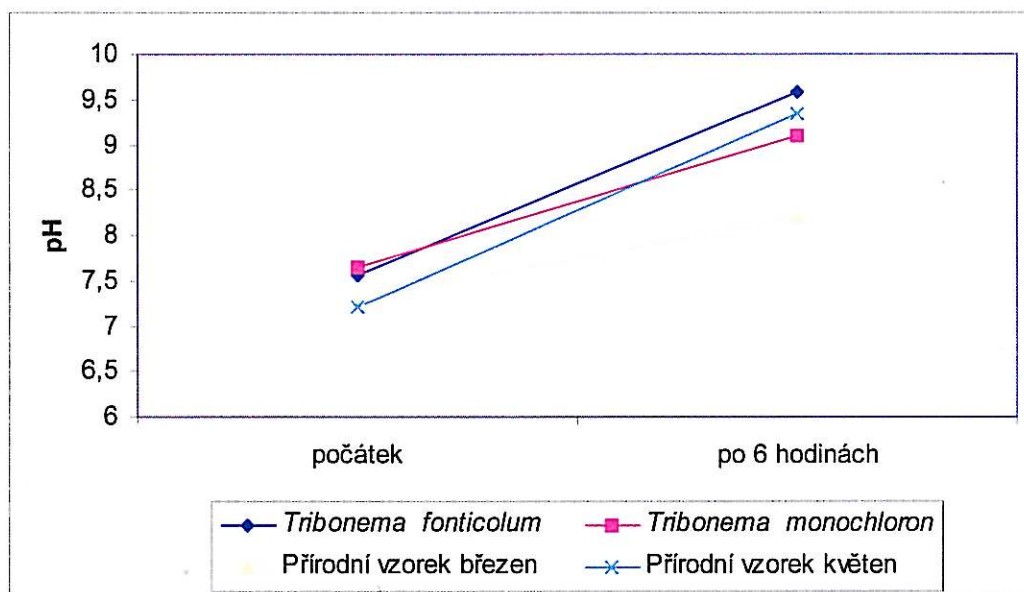
3.5 Výsledky alkalizačních pokusů

Z výsledného pH všech vzorků po šesti hodinách byla vypočtena konečná koncentrace celkového uhlíku, kompenzační body pro CO_2^* a HCO_3^- (Tab.3). Z těchto hodnot vyplývá, že oba přírodní vzorky i oba rody *Tribonema* využívají pro fotosyntézu hlavně CO_2 , přičemž společenstva v březnovém přírodním vzorku jsou jeho striktním konzumentem. U květnového vzorku a obou druhů *Tribonema* může být v malé míře využíván HCO_3^- , zvláště při vyšší teplotě. Konečné pH je nejnižší u březnového přírodního vzorku, u zbylých vzorků jsou koncové hodnoty podobné (Graf 15).

Tab.4: Výsledky alkalizačních pokusů

	<i>Tribonema fonticulum</i>	<i>Tribonema monochloron</i>	Přírodní vzorek březem	Přírodní vzorek květen
	počáteční průměrné pH	7,55	7,65	7,3
počáteční celkový obsah C [mmol/l]	0,938222	0,925492	0,985563	1,078504
počáteční koncentrace CO ₂ * [mmol/l]	0,059737	0,047411	0,106382	0,143164
počáteční koncentrace HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	0,877183	0,876443	0,878448	0,934722
průměrné pH po 6 hodinách	9,58	9,09	8,2	9,35
celkový obsah C (c _T) [mmol/l]	0,751576	0,832539	0,886405	0,84903
kompensační bod CO ₂ * [mmol/l]	0,000412	0,001552	0,013225	0,000837
kompensační bod HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	0,648057	0,790299	0,867427	0,775536
c _T /alkalita	0,854	0,946	1,007	0,907

Graf 15: Změny pH při alkalizačních pokusech



3.6 Zmrazování a vysychání kmenů

3.6.1 Výsledky zmrazování a vysychání kmenů *Tribonema*

Oba druhy rodu *Tribonema* byly podrobeny několika zmrazovacím pokusům. Schopnost přežít tyto stresové podmínky byla různá (Tab.4).

Tab.4: Výsledky zmrazovacích pokusů a vysychání pro kmeny *Tribonema*

	kontrola	-4°C	-40°C	-100°C	tekutý N	vysychání 4°C	vysychání 20°C
<i>Tribonema fonticulum</i>	100%	100%	3,40%	4,10%	76,80%	81%	83%
<i>Tribonema monochloron</i>	100%	100%	49%	40%	88%	0,00%	0,00%

Kmen *Tribonema monochloron* přežívá zmrazování lépe než kmen *Tribonema fonticulum*, jeho vitalita je při všech pokusech vyšší než 40%. Oba kmeny *Tribonema* nejlépe přežily zmrazování do -4°C . Vitalita po tomto zmrazení byla shodná s kontrolou, tedy 100%. Při nižších teplotách se vitalita obou kmenů snižovala (Graf 16).

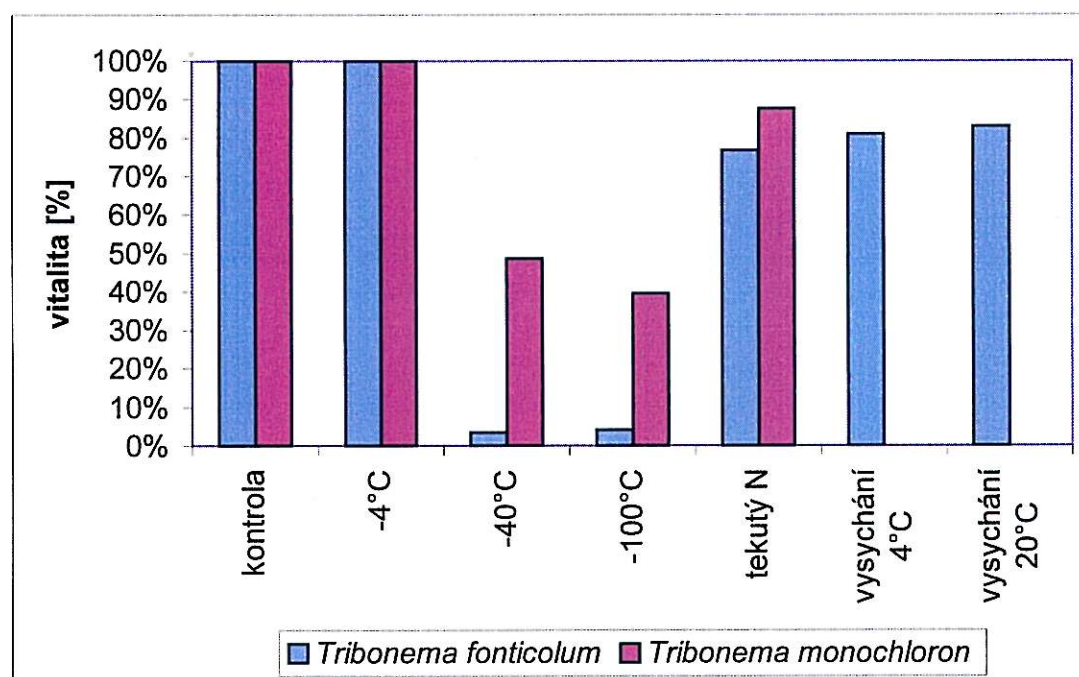
Kmen *Tribonema fonticulum* nejlépe přežil zmrazování do -4°C a přímo do tekutého dusíku. Po těchto pokusech byly nárosty zelená, stejně jako vlákna a chromatofory, čemuž odpovídá i zjištěná vitalita. Při nižších zmrazovacích teplotách vitalita rapidně klesla a pohybovala se do 5%. Nárosty při kultivaci po zmrazení při teplotách -40°C a -100°C byly žluté až bílé, chromatofory byly hnědé, zmenšené. Buňky v těchto vláknech nepřežily pokus. Zelená vlákna se vyskytovala výjimečně. Nedocházelo ke změnám rozměrů vláken (Tab.5).

Vitalita kmene *Tribonema monochloron* byla nejvyšší při -4°C , při zmrazení přímo v tekutém dusíku dosahovala 88%. Nárosty při kultivaci byly zelená, vlákna měla normální rozměry, zelené chromatofory. Nejnižší vitalita byla při -100°C (40%). Nárosty při kultivaci po tomto zmrazení (stejně jako po zmrazení do -40°C) byly nezelené, tvořila je bezbarvá a zelená vlákna (Tab.5).

Vysychání nejlépe přežívala *Tribonema fonticulum*, která oba typy pokusů přežila s vitalitou nad 80%. Naopak *Tribonema monochloron* vysychání nepřežila.

Oba kmeny rodu *Tribonema* vytvářely při zmrazování (kromě tekutého dusíku) akinety (Obr.4). Tato klidová stádia jim pomáhají přežít nepříznivé podmínky.

Graf 16: Vitalita kmenů *Tribonema* po zmrazování a vysychání



Tab.4: Změny morfologie vláken kmenů *Tribonema* po zmrazování

Tribonema fonticolum

	šířka vláknů	délka buňky	barva nárostu	barva vláken	barva chromatoforů	tvár chromatoforů
kontrola	7,29	6,075-12,15	zelená	zelená	zelená	páskovité
- 4°C	6,075-8,505	9,72-13,365	zelená	zelená	zelená	páskovité
-40°C	6,075-7,29	4,86-8,505	nažloutlá bezbarvá	bezbarvá (málo zelených)	nezelená	kulaté, sražené
-100°C	4,86-8,505	4,86-7,29	bezbarvá	bezbarvá (málo zelených)	nezelená	kulaté, sražené
tekutý N	7,29	4,86-12,15	zelená	zelená i bezbarvá	zelená	páskovité

Tribonema monochloron

	šířka vláknů	délka buňky	barva nárostu	barva vláken	barva chromatoforů
kontrola	3,645-4,86	7,29-14,58	sv.zelená	zelená	zelená
-4°C	3,645-4,86	9,72-14,58	sv.zelená	zelená	zelená
- 40°C	3,645-4,86	7,29-12,15	bezbarvé	zelená	zelená
-100°C	2,43-4,86	7,29-12,15	bezbarvé	zelená+bezbarvá	zelená+nezelená
tekutý N	2,43-4,86	7,29-14,58	sv.zelená	zelená	zelená

3.6.2 Výsledky zmrazování a vysychání přírodních společenstev

Vitalita po zmrazení obou přírodních společenstev byla shodná s kontrolou pouze při zmrazování do -4°C , při nižších teplotách klesala (Tab.6).

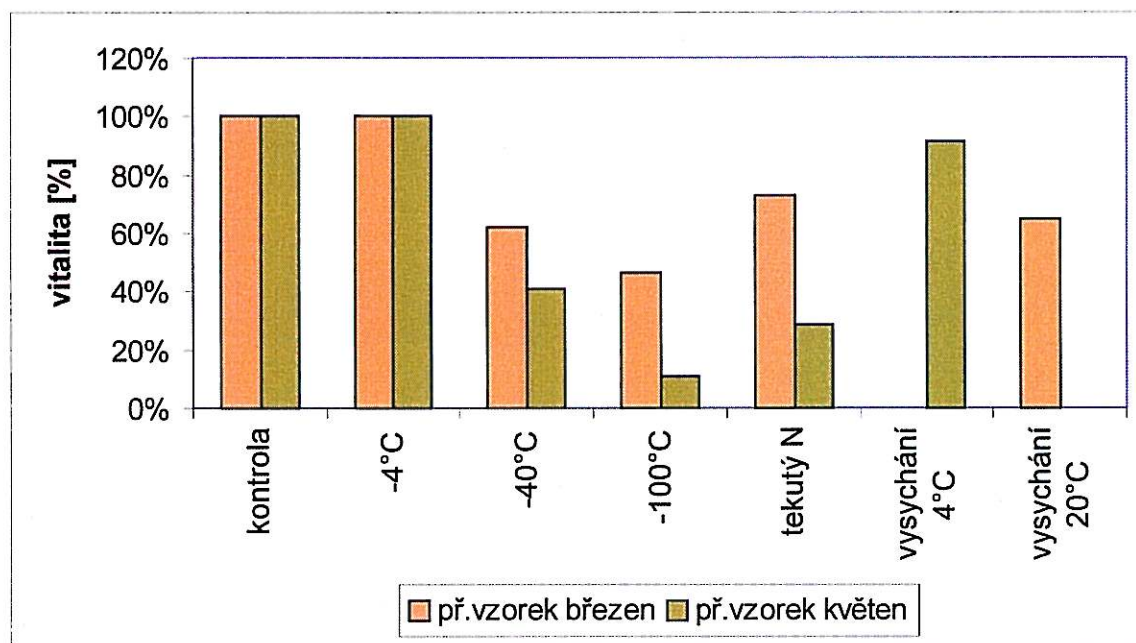
Tab.6: Výsledky zmrazovacích pokusů a vysychání

	kontrola	-4°C	-40°C	-100°C	tekutý N	vysychání 4°C	vysychání 20°C
př.vzorek březen	100%	100%	61,90%	46,32%	73%	0%	64,90%
př.vzorek květen	100%	100%	41,13%	10,73%	28,30%	91,67%	0%

Březnové přírodní společenstvo nejlépe přežilo zmrazování do -4°C a do tekutého dusíku. Při -40°C a -100°C byla vitalita nižší, přesto dosahovala více než 45%. Vysychání přežilo toto společenstvo pouze při 20°C . Celkově byla vitalita po zmrazování vyšší u březnového vzorku než u květnového (Graf 17).

Květnové přírodní společenstvo mělo nejvyšší vitalitu po zmrazování do -4°C , při nižších teplotách byla vitalita nižší (Graf 17). Nejhůře přežilo zmrazování do -100°C . Velmi vysoká vitalita byla stanovena po vysychání při 4°C , kdy přežilo 91,67% buněk. Naopak při vysychání při 20°C byla vitalita nulová.

Graf 17: Výsledky zmrazování a vysychání pro přírodní společenstva



4. Diskuse

4.1 Měření rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace v závislosti na teplotě pro kmeny

Tribonema

Z poměrů fotosyntézy a temnostní respirace vyplývá, že rychlost fotosyntézy je u kmene *Tribonema monochloron* při všech teplotách mnohonásobně vyšší. Oba kmeny mají nejvyšší hodnotu poměru rychlosti fotosyntézy a temnostní respirace při 14°C. U *Tribonema monochloron* je tato hodnota nejvyšší, při vyšších i nižších teplotách jsou hodnoty poměrů nižší, zatímco u *Tribonema fonticolum* jsou hodnoty při dalších vyšších teplotách velmi blízké hodnotě při 14°C.

U kmene *Tribonema fonticolum* byla při nízkých teplotách fotosyntéza nižší než respirace, pro fotosyntézu byly optimální teploty vyšší než 14°C. Jedná se tedy o pomalu rostoucí druh (K- strategie), který se v chladném prostředí na počátku záplavy významně nepodílí na produkci biomasy, je spíše doprovodným druhem.

U kmene *Tribonema monochloron* nabývala fotosyntéza i při nízkých teplotách poměrně vysokých hodnot. Rychlost fotosyntézy stoupala do 20°C, při vyšších teplotách zřejmě dochází k inhibici fotosyntézy vlivem vysoké teploty. Hodnoty respirace jsou po celou dobu nízké, vzrůstají až při teplotě, při které dochází k poklesu fotosyntézy. Jedná se o rychle rostoucí, invazivní druh, který se pravděpodobně velkou měrou podílí na produkci biomasy v chladném prostředí tůní. Jeho životní strategie (r –strategie) pravděpodobně předurčuje jeho ekologickou důležitost.

Závislost fotosyntézy na teplotě byla měřena na druhu *Cladophora fracta*, který byl vyizolován z eutrofních rybníků na Třeboňsku, během svého největšího rozvoje v červenci a srpnu (EISELTOVÁ & POKORNÝ 1994). Pro tuto závislost vyšly podobné křivky jako pro kmen *Tribonema monochloron* – nejvyšší hodnoty rychlosti fotosyntézy byly naměřeny v rozmezí 16 až 22°C, při vyšších teplotách došlo k poklesu. I při nízkých teplotách byla fotosyntéza relativně vysoká. Hodnoty rychlosti fotosyntézy bohužel nelze srovnat, neboť v obou případech byly měřeny v jiných jednotkách, lze srovnat jen trend křivek, který kmeny vykazovaly.

4.2 Kultivace na zkřížených gradientech

Pro oba kmeny *Tribonema* je optimální teplota pro růst vyšší než teplota, při které byly vyizolovány a následně kultivovány.

Pro kmen *Tribonema fonticolum* vychází optimální růstová teplota mezi 20 a 30°C. Tyto hodnoty se shodují s optimálními teplotami naměřenými pro rychlost fotosyntézy. Zdá se, že tyto hodnoty potvrzují, že tento kmen při nízkých teplotách sice roste, ale jen velmi pomalu a jeho růst je optimální při vyšších teplotách. Při kultivaci při nižších teplotách došlo v první polovině kultivace nejprve k poklesu biomasy a poté následoval rychlý růst v druhé polovině. Tento pokles si vysvětlují aklimací na nízkou teplotu, neboť kultura byla od vyizolování kultivována při teplotě 12°C a teplota 0 až 6°C pro ni představovala suboptimální podmínky. Při teplotách vyšších než 30°C došlo k uhynutí buněk a k tvorbě akinet.

Pro kmen *Tribonema monochloron* vychází po kultivaci nižší optimální teploty pro růst (15,5 až 23,5°C) než u kmene *Tribonema fonticolum*. Tyto hodnoty odpovídají hodnotám teplot, při kterých byla naměřena nejvyšší rychlost fotosyntézy. Kmen neroste při teplotách nižších než 6°C, při teplotách vyšších než 26°C dochází k úhynu buněk a ke tvorbě akinet.

Neboť je málo dat ohledně sladkovodních mokřadů, je obtížné hledat srovnání. U mořských sinic a řas však platí podobné závislosti jako u kmenů *Tribonema*. U některých antarktických mořských druhů (*Gigartina skottsbergii*, *Phyllophora antarctica*) byla naměřena širší teplotní optima pro růst, optimální růstové podmínky jsou mezi 10 a 20°C (WIENCKE ET AL. 1993). Mnohé arktické mořské druhy, např. endemité druh *Laminaria solidungula*, rostou při teplotách až 16°C a přežívají i při teplotách 18°C (TOM DIECK 1992). Mnoho arktických druhů roste v mírném pásu, jejich optima jsou při teplotách 10 až 15°C, ale rostou až do 20°C (BOLTON & LÜNING 1982, TOM DIECK 1992).

Při stabilně nízkých teplotách mají organismy nízké optimální teploty – do 10°C. Naopak vysoce nestabilní prostředí vede k selekci organismů se širokou tolerancí na chemické a fyzikální výkyvy, včetně teploty (VINCENT & HOWARD-WILLIAMS 1989).

4.3 Měření rychlosti fotosyntézy v závislosti na ozáření

Pro kmen *Tribonema fonticolum* se křivky závislosti fotosyntézy lišily podle teploty, při které byla tato závislost měřena. Z křivky při 26°C, což byla teplota, při které byla naměřena nejvyšší rychlost fotosyntézy, lze usuzovat, že tento druh je stínomilný, neboť rychlost fotosyntézy roste do ozáření 80 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, pak dochází k poklesu, zřejmě v důsledku fotoinhibice. Křivky při teplotách 3 a 14°C vychází v záporných hodnotách, jejich tvar se však shoduje s křivkou při 26°C. Záporné hodnoty naměřené při 3°C se shodují s hodnotami naměřenými při měření závislosti rychlosti fotosyntézy na teplotě. Při tomto měření při 3°C

byla rychlost fotosyntézy menší než rychlost temnostní respirace, ze součtu hodnot pak vychází záporné hodnoty pro čistou fotosyntézu při měření závislosti na ozáření.

Všechny kultury obsahují bakteriální složku neznámého objemu, která způsobuje chybu při měření, kterou při použité metodice nelze odstranit, navíc bakterie jsou nezbytné pro růst většiny kultur řas.

U kmene *Tribonema monochloron* mají křivky při všech teplotách podobný tvar. Do ozáření $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mají podobný charakter jako křivky *Tribonema fonticolum* při 26°C - největší rychlost fotosyntézy je při $80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - a je možno podle této části křivek říci, že se jedná také o druh stínomilný. Nárůst rychlosti fotosyntézy při vyšších ozářeních neumím vysvětlit.

U nárostů *Cladophora fracta* byla také měřena závislost rychlosti fotosyntézy na ozáření (EISELTOVÁ & POKORNÝ 1994). U vzorků odebraných z hladiny došlo k nasycení fotosyntézy ozářeními při $460 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, u vzorků odebraných ze dna rybníka byla fotosyntéza saturována při $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.4 Měření rychlosti fotosyntézy v závislosti na teplotě pro přírodní společenstva

Z křivky hodnot rychlostí fotosyntézy a temnostní respirace pro společenstvo předkultivované v druhé polovině března (teplota 3°C), kdy je rychlost fotosyntézy vyšší než rychlost respirace pouze při nízkých teplotách (3 a 8°C), se zdá, že toto společenstvo je dobře adaptováno na život v nízkých teplotách. Při vyšších teplotách došlo k nárůstu hodnot temnostní respirace. Možným vysvětlením může být zvýšená respirace bakterií, jejichž přítomnost ve vzorku nelze vyloučit – organická biomasa z odebraná z tůní obsahovala jistě velké inokulum bakterií, jejichž rozvoj mohli nastartovat příznivé podmínky při měření. Nejvyšší poměr rychlostí fotosyntézy a temnostní respirace byl při 8°C , potom jeho hodnoty klesaly, což také poukazuje na adaptaci na nízkou teplotu.

U křivek rychlostí fotosyntézy a temnostní respirace květnového přírodního společenstva (teplota vody 17°C), došlo k posunu k vyšším teplotám u hodnot rychlostí fotosyntézy převyšujících hodnoty temnostní respirace. Rychlost fotosyntézy je vyšší než rychlost temnostní respirace do 14°C , pak nastává její pokles a roste rychlost temnostní respirace. Poměr rychlostí fotosyntézy a temnostní respirace je nejvyšší při 3°C , pak dochází se vzrůstající teplotou k jeho poklesu. Zdá se, že toto společenstvo je dobře adaptované na nízké teploty, ve kterých se vyskytuje. Zvýšenou rychlost temnostní respirace je možné vysvětlit respirací bakterií nebo respirací dalších druhů ve společenstvu.

4.5 Výsledky alkalizačních pokusů

Z výsledných hodnot pH a koncentrací jednotlivých složek rozpuštěného uhlíku se dá usuzovat, že oba kmeny *Tribonema* i obě přírodní společenstva pro fotosyntézu využívají hlavně CO₂. Podle MABERLYHO & SPENCE (1983) by podle koeficientů podílu celkového obsahu uhlíku (c_T) a alkality, které pro tyto vzorky mají hodnoty od 0,854 do 1,007, měly oba druhy *Tribonema* i obě přírodní společenstva výhradně využívat CO₂. Částečné využívání HCO₃⁻ připouští hodnocení podle konečného pH (ADAMEC 2003). Pokud výsledné pH dosahuje hodnot 8,3 až 9,2, je organismus striktním konzumentem CO₂. Pokud jsou vyšší než 9,5, pak je schopen využívat i HCO₃⁻. V našem případě, konečné pH *Tribonema monochloron* a březnového přírodního společenstva dosahuje hodnot 8,2, resp. 9,09. U těchto by se tedy dalo říci, že využívají striktně CO₂. U *Tribonema fonticolum* a květnového přírodního společenstva bylo konečné pH vyšší (9,58, resp. 9,35) u těchto by se dalo usuzovat, že v malé míře jsou schopni využívat i HCO₃⁻.

Využívání CO₂ je méně náročné na energii a je možné i při nižší ozáření. Naopak při vyšší konkurenci a vyšších teplotách, kdy v prostředí v důsledku fotosyntézy dochází k růstu pH a vyčerpání CO₂, se vyplatí schopnost využívat HCO₃⁻ (ADAMEC 2003). V chladných vodách tůň na počátku záplavy, kdy je menší konkurence a nižší ozáření v důsledku krátkého dne, zřejmě řasám stačí schopnost fixovat pouze CO₂, jak o tom svědčí hodnoty pro *Tribonema monochloron* a březnové přírodní společenstvo, které HCO₃⁻ zřejmě využívat nedokážou. Při vyšších teplotách, při kterých rostlo květnové přírodní společenstvo a které jsou optimální pro růst *Tribonema fonticolum*, se pak vyplatí schopnost využívat HCO₃⁻, neboť je větší konkurence o zdroje uhlíku pro fotosyntézu.

4.6 Vymrzání a vysychání

Oba kmeny *Tribonema* i obě přírodní společenstva nejlépe přežily zmrazování do -4°C. Na tuto teplotu mohou být adaptovány ze svého přirozeného prostředí, neboť v průběhu záplavy může dojít k poklesu teploty a zamrznání tůň. Se snižující se teplotou vitalita klesá, řasy vzhledem k výskytu v mírném pásmu nemohou být na tyto teploty adaptované. Stejně zmrazovací pokusy prováděl STIBAL (2004) se sněžnými druhy *Raphidonema sempervirens* a *Raphidonema nivale*. Vitalita těchto druhů byla také nejvyšší při zmrazování do -4°C, při nižších teplotách klesala.

Oba druhy *Tribonema* vytvářely při zmrazovacích pokusech akinety. Jejich tvorba odpovídá nestálosti prostředí, ve kterém se vyskytují, kdy k vymrznutí může dojít.

Tvorba akinet byla pozorována u druhu *Tribonema bombycinum* (NAGAO, ARAKAWA, TAKEZAWA, YOSHIDA & FUJIKAWA 1999), která byla vyizolována z podobného prostředí (ze v zimě zamrzajícího rybníčku). Tvorba akinet byla experimentálně navozena nízkými teplotami (zmrazováním), v důsledku vysychání, nedostatku živin nebo některých důležitých prvků (S, N).

4.7 Hodnocení biomasy pomocí nedestruktivních metod

V rámci experimentální práce byly testovány různé metody stanovení biomasy – stanovení chlorofylu *a*, stanovení biomasy pomocí programu NAJA Image Analysis a měření fluorescence chlorofylu. Z málo dat vyšla vysoká statistická závislost, ale v důsledku toho, že práce nebyla zaměřena na přesné stanovení této závislosti, vznikly některé chyby. Řešením by bylo získání více dat a úpravou metodiky měření (použití stativu při focení). Pro využití a možnou záměnu výsledků by bylo potřeba získání více dat za standardních podmínek měření, pak budou moci být výsledky zaměnitelné.

5. Závěr

Vybrané druhy *Tribonema* jsou psychrotrofní organismy s teplotními optimy vyššími než 10°C. *Tribonema monochloron* je druhem rychle rostoucím i při nízkých teplotách, invazivním, podílejícím se velkou měrou na produkci řasové biomasy tůní v chladném období roku. Má menší buňky s relativně větším chromatoforem, takže zřejmě lépe využívá sluneční záření. Naopak *Tribonema fonticolum* je druhem rostoucím pomalu v nízkých teplotách, jeho optima jsou při vyšších teplotách. Má větší buňky s malým chromatoforem a pravděpodobně méně využívá sluneční záření. Oba druhy jsou konzumenty převážně CO₂, což v prostředí jejich výskytu je výhodné. Rozkladem biomasy vzniká velké množství CO₂, navíc funguje velmi dobře i výměna s atmosférou. Oba druhy jsou stínomilné, což odpovídá jejich výskytu v předjaří roku. Nepříznivé podmínky (nízké a vysoké teploty) přežívají v trvalých stádiích (akinety), které jsou dobře adaptované na vymrzání a vysychání. Studie prokázala ekofyziologické vlastnosti druhů řas osidlujících chladné biotopy během předjarní a jarní záplavy v úseku horního toku řeky Lužnice.

6. Literatura

- ADAMEC, L. (2003) : Fotosyntéza a výměna plynů u ponořených vodních rostlin – I. Fyziologické adaptace k příjmu uhlíku. – Živa 1: 59-61
- ADAMEC, L., ONDOK, J.P. (1992): Water alkalization due to photosynthesis of aquatic plants: the dependence on total alkalinity. – Aquatic Botany 43: 93-98
- ALLEN, E.D., SPENCE, D.H.N. (1981): The differential ability of aquatic plants to utilize the inorganic carbon supply in freshwaters. – New Phytologist 87: 269-283
- BOLTON, J., LÜNING, K. (1982): Optimal growth and maximal survival temperatures of Atlantic *Laminaria* species (Phaeophyta) in culture. – Mar. Biol. (Berl.) 66: 89-94
- BUNT, J. S. (1968): Some characteristics of microalgae isolated from antarctic sea ice. – Antarct. Res. Ser. 1: 27-31
- CAVICCHOLI, R., SIDDIQUI, K.S., ANREWS, D., SOWERS, K.R. (2002): Low temperature extremophiles and their applications. – Current Opinion in Biotechnology, Vol 13 (3): 253-261
- DEMING, J.W. (2002): Psychrophiles and polar regions. – Current Opinion in Biotechnology, Vol 5 (3): 301-309
- DIJKMAN, N., KAFTAN, D., TRTÍLEK, M., NEDBAL, L. (1999): Measurements of phytoplankton of sub-nanomolar chlorophyll concentrations by a modified double-modulation fluorometer. – Photosynthetica 37 (2): 249-254
- EISELTOVÁ, M., POKORNÝ, J. (1994): Filamentous algae in fish ponds of the Třeboň Biosphere Reserve – ecophysiological study. – Vegetatio 113: 155-170
- ELSTER, J., BENSON, E. (2004): Life in the polar terrestrial environment with a focus on algae and cyanobacteria. – In: FULLER, B., LANE, N., BENSON, E. (Eds.): Life in the frozen state. – Taylor & Francis, Londýn, 111-150
- ELSTER, J., FRANCÍRKOVÁ, T., KYLBERGEROVÁ, M. (2002): Ekologie fyto-bentosu dočasných tůň Horní Lužnice. – In: PAPÁČEK, M. (ed): Biodiverzita a přírodní podmínky Novohradských hor. - Jihočeská univerzita a Entomologický ústav AV ČR, 10.-11.1.2002: 123-130
- ELSTER, J., SVOBODA, J., KANDA, H. (2001): Controlled environment platform used in temperature manipulation study of a stream periphyton in the Ny-Ålesund, Svalbard. – In: ELSTER, J., SECKBACH, J., VINCENT, W., LHOTSKÝ, O. (Eds): Proceedings of International conference – Algae and Extreme Environments – Ecology and Physiology. – Nowa Hedwigia, Beihaft 123: 373-386
- ETTL, H. (1978): Süßwasserflora von Mitteleuropa - Xanthophyceae, 1. Teil. – VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. – 530 p.

- ETTL, H., GÄRTNER, G. (1995): Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. – VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. – 721 p.
- FINLAY, B. J., MABERLY, S. C., ESTEBAN, G. F. (1996): Spectacular abundance of ciliates in anoxic pond water: contribution of symbiont photosynthesis to host respiratory oxygen requirements. – *FEMS Microbiology Ecology* 20: 229-235
- FUJITA, Y., OHKI, K., MURAKAMI, A. (2001): Acclimation of photosynthetic light energy conversion to the light environments. – In: RAI, L.C., GAUR, J.P. (Eds.): *Algal Adaptation to Environmental Stresses – Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms*. – Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York.: 135-171
- GILBERT, M., DOMIN, A., BECKER, A., WILHELM, C. (2000): Estimation of primary productivity by chlorophyll *a* *in vivo* fluorescence in freshwater phytoplankton. – *Photosynthetica* 38 (1): 111-126
- HÁJEK, J., BARTÁK, M., GLOSER, J. (2001): Effects of thallus temperature and hydration on photosynthetic parameters of *Cetraria islandica* from contrasting habitats. – *Photosynthetica* 39 (3): 427-435
- HAUER, T. (2003) : Kryoprezervace půdních řas a sinic, vyhodnocování pokusů pomocí digitální fotografie. – magisterská práce, Biologická fakulta JU, 26 p.
- HAWES, I., HOWARD-WILLIAMS, C. (1998): Primary production processes in streams of the McMurdo Dry valleys, Antarctica. – In: PRISCU, J.C. (ed): *Ecosystems dynamics in a polar desert*. – The American Geophysical Union, Washington, Antarctic Research Series, Vol. 72. – 129-140
- HELDER, R.J. (1988): A quantitative approach to the inorganic carbon system in aqueous media used in biological research: dilute solution isolated from the atmosphere. – *Plant Cell Environ.* 11: 211-230
- HINDÁK, F., CYRUS, Z., MARVAN, P., JAVORNICKÝ, P., KOMÁREK, J., ETTL, H., ROSA, K., SLÁDEČKOVÁ, A., POPOVSKÝ, J., PUNČOCHÁŘOVÁ, M., LHOTSKÝ, O. (1978): *Sladkovodné riasy*. – Slovenské pedagogické nakladateľ'stvo, Bratislava, 726 p.
- HOEK, C. VAN DEN, MANN, D.G., JAHNS, H.M. (1995): *Algae – An introduction to phycology*. – Cambridge University Press, Cambridge. – 623 p.
- HOLLAND, M. M., RISSER, P. G., NAIMAN, R.J. (1991): *Ecotones. The role of landscape boundaries in the management and restoration of changing environments*. – Chapman and Hall, New York, 142 p.
- KAUTSKY, H., HIRSCH, A. (1934): Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. I. Das Fluoreszenzverhalten grüner Pflanzen. – *Biochem. Z.* 274: 423-434
- KIRST, G. O., WIENCKE, CH. (1995): Review – Ecophysiology of polar algae. – *Journal of Phycology* 31: 181-199
- KVÍDEROVÁ, J., LUKAVSKÝ, J. (2001): A new unit for crossed gradients of temperature and

- light. – Nova Hedwigia, Beihaft 123: 541-550
- LAMBERS, H. (1985): Respiration in intact plants and tissues: Its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organisms. – In: DOUCE, R., DAY, D.A. (Eds.): Higher plant cell respiration. – Encyclopedia of Plant physiology, New Series, Springer, Berlín, Vol 18: 418-473
- MABERLY, S. C., SPENCE, D. H. N. (1983): Photosynthetic inorganic carbon use by freshwater plants. – Journal of Ecology (1983), 73: 705-724
- MACHOVÁ, K. (2002): Chladnomilné sinice a řasy dočasných tůní Horní Lužnice. – bakalářská práce, Biologická fakulta JU, 49 p.
- MATTIS, P., KIMBALL, S., SINGH, M. (2002): The GIMPm ver. 1.2. – <http://www.gimp.org>
- NAGAO, M., ARAKAWA, K., TAKEZAWA, D., YOSHIDA, S., FUJIKAWA, S. (1999): Akinete formation in *Tribonema bombycinum* Derbes et Solier (Xanthophyceae) in relation to freezing tolerance. – J. Plant Res. 112: 163-174
- LUKAVSKÝ, J. (1974): Controlled cultivation of algae on Agar plates. – Arch Hydrobiolog / Algol Stud 10: 90-104
- LUKAVSKÝ, J. (1975): Analysis of growth rate of algae by cultivation on solid media. – Arch Hydrobiol / Algol Stud 14: 105-136
- PECHAR, L. (1987): Use of acetone:methanol mixture for the extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll-a in phytoplankton. – Algological Studies 46 - Arch. Hydrobiol. Suppl. 78, 1: 99-117
- PESHEK, G. A., ZODER, R. (2001): Temperature stress and basic bioenergetic strategies for stress defence. – In: RAI, L.C., GAUR, J.P. (Eds.): Algal Adaptation to Environmental Stresses - Physiological, Biochemical and Molecular Mechanisms. – Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York.: 135-171
- PEŠLOVÁ, J., POKORNÝ, J., KOMÁREK, J. (1990): Adaptation of 21 microalgae species to low level of molecular CO₂. – Algological Studies 59: 97-109
- ROHÁČEK, K. (2002): Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. – Photosynthetica 40 (1): 13-29
- SAKSHAUG, E., SLAGSTAD, D. (1991): Light and productivity of plankton in polar marine ecosystems: a physiological view. – In: SAKSHAUG, E., HOPKINS, C.C.E., ORITSLAND, N.A. (Eds.): Proceedings of the Pro Mare Symposium on Polar Marine Ecology. – Polar Res. 10: 69-85
- STANIER, R. Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M., COHEN-BAZIRE, G. (1971): Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). – Bacteriol. Rev. 35: 171-205
- STIBAL, M. (2004): Comparison of Life Strategies in Two Green Algae from Snow and Soil

- of the Polar Regions. – magisterská práce, Biologická fakulta JU, 28 p.
- ŠERÁK, L. (1984): On the electrochemical measurement of dissolved oxygen in water. – *The Science of the Total Environment*, 37 (1984): 107-111
- TOM DIECK, I. (1992): North Pacific and North Atlantic digitate *Laminaria* species (Phaeophyta): hybridization experiments and temperature responses. – *Phycologia* 31: 147-163
- VINCENT, W. F. (1988): *Microbial ecosystems of Antarctica*. – Cambridge University Press, Cambridge, 304 p.
- VINCENT, W.F., HOWARD-WILLIAMS, C. (1989): Microbial communities in Southern Victoria Land streams (Antarctica) II. The effects of low temperature. – *Hydrobiologia* 172: 39-49
- WIENCKE, C., RAHMEL, J., KARSTEN, U., WEYKAM, G., KIRST, G.O. (1993): Photosynthesis of marine macroalgae from Antarctica: light and temperature requirements. – *Bot. Acta* 106: 78-87
- ZEHNDER IN STAUB R. (1961): Ernährungphysiologisch – autökologische Untersuchung an den planktonischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. – *Schweiz. Z. Hydrol.* 23: 82-198