

Biologická fixace molekulárního dusíku vybranými půdními sinicemi

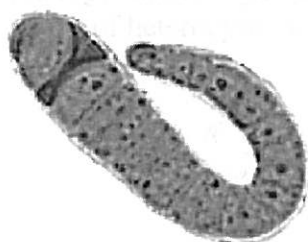
bakalářská práce 2005

Kristýna Mohlová

Školitel: Prof. Ing. Miloslav Šimek, CSc.

Konzultanti: Ing. Alena Lukešová, CSc.

Mgr. Pavel Hrouzek



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta



Bakalářská diplomová práce

MOHLOVÁ, K. (2005): Biologická fixace molekulárního dusíku vybranými půdními sinicemi.

[Biological fixation of molecular nitrogen by selected soil cyanobacteria: Bc.Thesis, in Czech] - 39p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Nitrogenase activity (NA) which reflects biological nitrogen fixation was determined in selected soil cyanobacteria from different geographical areas. NA of cyanobacteria of various morphology under light and dark conditions was compared and dependence of NA on frequency of heterocysts was analysed.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně na základě vlastních výsledků, s použitím citované literatury a s pomocí osob uvedených v poděkování.

V Českých Budějovicích 9. května 2005

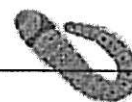
Kristýna Mohlová
Mohlová

Děkuji mnohokrát panu profesoru Šimkovi za pomoc a cenné rady při práci, za jeho ochotu, trpělivost a čas, který mi věnoval. Velký dík patří Pavlovi, který mi neskonalé pomáhal a dodával mi optimismus. Aleně Lukešové vděčím za dodávku kmenů z její skvělé sbírky. Holcám Ivě, Verunce a Elišce děkuji za měření, vážení, sušení a další a další práci, bez níž bych se neobešla. Kubovi bych chtěla moc poděkovat za pomoc se statistikou. Rodině a všem kamarádům děkuji za podporu.



Obsah

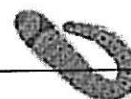
1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Sinice v ekosystému a půdě	2
2.1.1. Sinice jako speciální skupina organismů, úloha v ekosystému	2
2.1.2. Taxonomie sinic	3
2.1.3. Půdní sinice - význam fixace N ₂	4
2.2. Fixace molekulárního dusíku	5
2.2.1. Cyklus dusíku - fixace významným jevem	5
2.2.2. Biochemie fixace, nitrogenáza	8
2.2.3. Přehled fixátorů N ₂	9
2.3. Fixace dusíku a nitrogenázová aktivita u půdních sinic	10
2.3.1. Sinice jako diazotrofní organismy	10
2.3.2. Charakteristika a vlastnosti diazotrofních sinic	11
3. Materiál a metody	13
3.1. Studované kmeny sinic	13
3.1.1. Celkový přehled	13
3.1.2. Charakteristika kmenů	15
3.1.3. Kultivace kmenů a příprava pro měření	18
3.2. Stanovení nitrogenázové aktivity	18
3.2.1. Charakteristika metody	18
3.2.2. Postup při měření	19
3.3. Stanovení dalších charakteristik	20
3.3.1. Stanovení biomasy	20
3.3.2. Stanovení frekvence heterocytů	20
3.4. Statistická analýza.....	21
4. Výsledky	22
4.1. Základní informace	22
4.2. Nitrogenázová aktivita za světla	23
4.3. Nitrogenázová aktivita za tmy	26
4.4. Závislost nitrogenázové aktivity na frekvenci heterocytů	29
4.5. Shrnutí	30
5. Diskuse	31
5.1. Použití metody ARA	31
5.2. Fixace heterocytózních sinic	31
5.3. Nitrogenázová aktivita za světla	32
5.4. Nitrogenázová aktivita za tmy	34
5.5. Závislost nitrogenázové aktivity na frekvenci heterocytů	35
6. Závěry	35
7. Literatura	36



1. Úvod a cíle práce

Sinice jsou unikátní prokaryotické fotosyntetizující organizmy, které v některých typech ekosystémů (v pouštích, v polárních oblastech, na lávových polích, aj.) představují významné primární producenty. Mnohé sinice mají schopnost poutat (fixovat) vzdušný molekulární dusík (FAY et al. 1968), a tak dokáží osídlit i biotopy, kde jiné organizmy, odkázané na výživu minerálními sloučeninami dusíku, nemohou existovat. Schopnost fixace molekulárního dusíku spolu s fotoautotrofním způsobem života je tedy velkou ekologickou výhodou řady sinic. O velikosti fixace molekulárního dusíku v různých ekosystémech a různými fixátory existuje relativně mnoho informací. Poměrně málo je však známo o fixaci dusíku půdními sinicemi, což je dáno jednak praktickými a historickými důvody (pozornost se soustředila především na fixátory N_2 v agroekosystémech a v moři), jednak metodickými důvody (fixace N_2 sinicemi v půdě je relativně obtížně determinovatelná). Nevíme mnoho o rozdílech ve fixaci dusíku mezi různými druhy a morfotypy sinic ani o významu, který má biologická fixace pro zúčastněné organizmy a nepřímo pro celý ekosystém. Biologická fixace dusíku je významným procesem podílejícím se na koloběhu dusíku v biosféře a její přínos pro bilanci dusíku v polopřirozených a přirozených ekosystémech je často nedocenen. Detailnější studium problematiky může přispět k lepšímu pochopení podstaty procesů přeměn živin, dynamiky toků a cyklů prvků i interakcí mezi biotickou a abiotickou složkou přírody.

Cílem této bakalářské práce bylo (1) odhadnout velikost biologické fixace molekulárního dusíku u souboru různých kmenů půdních sinic pomocí měření nitrogenázové acetylen-etylen redukční aktivity, (2) zjistit, zda existují rozdíly ve specifické nitrogenázové aktivitě u jednotlivých morfotypů pocházejících z různých geografických oblastí, (3) zjistit, na jakých faktorech závisí specifická nitrogenázová aktivita kolonie (např. frekvence heterocytů, biomasa kolonie) a k jakým změnám nitrogenázové aktivity dochází v průběhu dne (při střídání světlo-tma apod.).



2. Literární přehled

2.1. Sinice v ekosystému a půdě

2.1.1. Sinice jako speciální skupina organismů, úloha v ekosystému

Sinice (cyanobakterie) jsou významnou skupinou jednoduchých fotosyntetizujících mikroorganismů. Sinice vznikly jako jedny z prvních organismů na Zemi, jejich fosilní záznam je znám z časného prekambrijského období (stáří asi 3,5-3,8 miliard let). V té době byly zřejmě hlavními producenty organické hmoty a výrazně se podílely na vzniku kyslíkaté atmosféry, která měla původně redukční charakter. Sinice jsou tedy zodpovědné za vznik podmínek umožňujících rozvoj vyšších rostlinných a živočišných forem. Sinice jsou vývojovým mezičlánkem spojujícím heterotrofní bakterie a zelené rostliny. Mají prokaryotní stavbu buňky, která je charakterizovaná nepřítomností pravého jádra a membránových organel jako jsou chloroplasty, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, vakuoly nebo Golgiho aparát. Buněčnou strukturou tak připomínají bakterie, avšak způsobem výživy a typem fotosyntézy se podobají eukaryotním řasám a vyšším rostlinám. Schopnost fotosyntézy mají díky přítomnosti chlorofylu *a* a fykobilinů, což jsou speciální pigmenty fungující jako světlosběrné antény. Stejně jako rostliny využívají sinice jako zdroj elektronů vodu a při fotosyntéze uvolňují kyslík. Zásobní látkou sinic je glykogen, polysacharid podobající se škrobu.

Sinice jsou kosmopolitní skupinou rozšířenou snad ve všech ekosystémech světa. Osidlují moře i sladké vody, kde tvoří významnou složku pikoplanktonu, jako vodní květy se v letním období vyskytují v jezerech a rybnících. Jsou běžnými obyvateli pobřežních zón, smáčených stěn, slaných mokřadů, vytvářejí nárostová společenstva v řekách, vyskytují se jako epifyty na stromech a epifyty nebo endolity v kamenech. Některé sinice jsou hojné v půdách. Často bývají jedinými organismy osidlujícími extrémní biotopy (horké prameny, sníh nebo povrch ledovců v polárních oblastech). Mohou žít ale i v prostředí vytvořeném člověkem (na stěnách domů, v akváriích, ve vodních nádržích, atd.). Výjimku tvoří vody a půdy s pH nižším než 5, kde se sinice vyskytují jen ojediněle (STEINBERG et al. 1998).

Sinice jsou výrazným geologickým činitelem. Významná je tvorba travertinu a stromatolitů. Sinice mají důležitou roli při biologické fixaci dusíku v biosféře, kde také vytvářejí rozmanité symbiotické vztahy. Biomasa sinic obsahuje velké množství proteinů,



čímž se sinice stávají potenciálním zdrojem živočišné i lidské potravy. Zároveň jsou vhodným modelovým organizmem pro studium základních buněčných procesů (syntézy, regulace genové exprese, buněčné diferenciaci, fixace N_2 , atd.) (FAY 1983).

2.1.2. Taxonomie sinic

Sinice zahrnují organizmy jednobuněčné i mnohobuněčné. Vyskytují se formy kokální, vláknité nebo se složitější stavbou (typy s mnohořadými vlákny). Popisy a determinace druhů je často založena na základě rozměrů vláken a přítomnosti pochev (GEITLER 1932). Problémem je, že na obě tyto charakteristiky má v různé míře vliv také prostředí. U vláknitých sinic jsou důležitým determinačním znakem heterocyty a způsob utváření akinet. Přítomnost heterocytů závisí však na koncentraci dusíkatých sloučenin v substrátu, což situaci opět komplikuje. Pro dostatečný popis a taxonomické určení je nutné sinice pozorovat jak v laboratorních kulturách, tak v přírodních podmínkách (LEE 1989). Z těchto důvodů je taxonomie sinic komplikovaným a stále diskutovaným tématem.

Dříve se skupina sinic (Cyanophyta, Cyanobacteria, Cyanoprokaryota, Blue-green algae) pokládala za rostliny a řadila se na začátek botanického systému, a to díky tomu, že stejně jako rostliny tyto organizmy zajišťují primární produkci biomasy. Dnes jsou sinice považovány za jednu z jedenácti skupin eubakterií jako sesterská větev gram pozitivních bakterií (GRAHAM & WILLCOX 2002). V minulosti se dělily do 5 řádů: Chroococcales, Chamaesiphonales, Pleurocapsales, Nostocales, Stigonematales (FRITSCH 1945, RIPPKA et al. 1979). Kokálním sinicím připadaly první tři řády rozlišované navzájem podle různých typů dělení. V současné době slučujeme všechny kokální sinice do jednoho řádu Chroococcales (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1986), který je tvořen 7 čeleděmi mnoha rodů. Diakritickým znakem řádu je jednobuněčná či koloniální stavba, nepřítomnost pravých vláken a buněčné dělení v jedné nebo více kolmých rovinách.

Druhy s pravými vlákny s fyziologickým spojením mezi buňkami nyní řadíme do třech řádů. Vláknité neheterocytózní sinice patří do řádu Oscillatoriales (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1988), který sestává ze 43 rodů. Pro sinice tohoto řádu jsou typická jednořadá vlákna. Buňky se dělí kolmo na podélnou osu vlákna. Fakulativně se u stélky vyskytuje slizový obal. Reprodukce probíhá fragmentací vláken na krátké úseky (vznikají nemotilní hormocyty nebo motilní hormogonia). Žádný rod z řádu Oscillatoriales nevytváří akinety ani heterocyty. Další dva řády se od sebe liší stavbou vlákna. Sinice řádu Nostocales



(zahrnuje 32 rodů) mají jednořadá vlákna s nepravým větvením, zatímco u druhů z řádu Stigonematales (48 rodů) nacházíme pravé větvení u mnohořadých vláken (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1989, 1990). U obou řádů se tvoří akinety i heterocyty.

2.1.3. Půdní sinice - jejich význam a výskyt

Terestrické sinice hrají důležitou roli v půdním ekosystému. Jsou jedněmi z prvotních kolonizátorů při vzniku a osidlování půdy organizmy, obohacují půdu organickou hmotou a živinami, podílí se na tvorbě humusu a zlepšují fyzikální strukturu zejména písčitých půd (MARANTHE 1972). Ve vyvinutých půdách spojují půdní částice a chrání půdu před erozí. Tuto schopnost mají díky slizovým pochvám a typickému růstu, při němž tvoří svazky vláken propojující jednotlivé půdní částice. Napomáhají také zadržování půdní vlhkosti (BOOTH 1941). Půdní sinice výrazně přispívají fixací dusíku k celkovému toku dusíku v biosféře. Diazotrofní sinice mají velký podíl na úrodnosti rýžových polí (ROGER 1995, TIWARI et al. 1991).

Protože jsou sinice fotosyntetizující organizmy, je jejich vertikální rozmístění v půdě určeno dostupností světla, a tak nejvíce druhů bývá nalézáno ve svrchních vrstvách půdy (LUKEŠOVÁ 1989).

Geografické rozšíření půdních sinic závisí na ekologii jednotlivých druhů. V pásnu tundry jsou sinice v porovnání s řasami hojně, často přítomnými druhy v těchto oblastech jsou rody *Nostoc* a *Stigonema*; zástupci řádu Oscillatoriales jsou charakteristické pro aridní oblasti, v suchých stepích převládají *Nostoc* a *Scytonema*. Sinice mají schopnost rychlého startu životních činností a zároveň jsou morfologicky a fyziologicky přizpůsobeny pro pohlcování a udržování vody, čímž získávají převahu nad jinými skupinami organizmů.

Terestrické sinice preferují půdy s neutrálním pH (LUND 1962), v kyselých substrátech se sinice vyskytují velmi zřídka. Kořeny rostlin zajišťují sinicím vhodný substrát pro přichycení, zároveň jim poskytují vodu a potřebné látky. Některé sinice mohou být potravou pro edafon, například u žížal r. *Lumbricus* byl nalezen v trávicím traktu *Nostoc calcicola* (LUKEŠOVÁ 1989).



2.2. Fixace molekulárního dusíku

2.2.1. Cyklus dusíku - význam fixace N_2

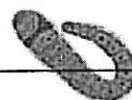
Dusík je plynný chemický prvek patřící mezi biogenní prvky, které jsou základními stavebními kameny živé hmoty. Převážná většina dusíku je obsažena v litosféře, avšak tento dusík není zapojen do globálního koloběhu. Největším aktivním zásobníkem dusíku na Zemi je atmosféra, která obsahuje kolem 78 objemových procent N_2 . Je však vázán i v řadě sloučenin (nitritech, nitrátech). Molekulární dusík je velmi málo reaktivní, protože jeho molekuly jsou tvořeny dvěma atomy vzájemně vázanými pevnou trojnou vazbou. Vzhledem k rozpustnosti prakticky všech svých anorganických solí se dusík téměř nevyskytuje v běžných horninách (výjimkou je např. chilský ledek neboli dusičnan sodný $NaNO_3$). Rozpustné dusíkaté látky byly v průběhu času spláchnuty do oceánů, aby se opět zapojily do biogeochemických cyklů.

Mikroorganismy a rostliny přijímají dusík ve formě nitrátů (NO_3^-), amonných iontů (NH_4^+) a nitritů (NO_2^-), a spíše výjimečně ve formě jednodušších dusíkatých organických sloučenin. Některé bakterie a sinice mohou asimilovat molekulární dusík (N_2) ze vzduchu.

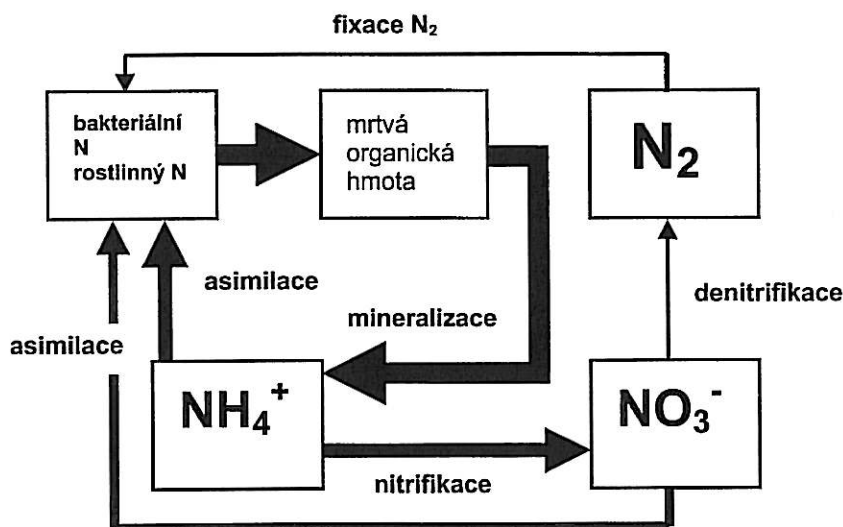
Cyklus dusíku v půdě je otevřený (propojuje půdní ekosystém s atmosférou a hydrosférou) (Obr.1). Největší podíl na přenosu dusíku mezi pedosférou a atmosférou mají N_2 , N_2O a NH_3 . Přenos mezi terestrickým a vodním ekosystémem je primárně zajištěn nitráty, amonnými ionty a organickým dusíkem.

Půda obsahuje relativně velké množství dusíku: 0,02-0,5 % z hmotnosti suché půdy. Nároky pěstovaných plodin jsou však vysoké, a proto se musí v agroekosystémech dusík do půdy dodávat v podobě hnojiv.

Velká většina půdního dusíku (až 99 %) je vázána v organických látkách, zatímco na anorganické sloučeniny připadá pouze 1-2 %. Nitrity a nitráty jsou dobře rozpustné a proto v půdě snadno pohyblivé; k jejich ztrátám dochází především vyplavováním. Amonné ionty jsou mnohem více než nitráty a nitrity v půdě vázány (negativně nabitými půdními koloidy) a z půdy se amonná forma dusíku vylučuje zejména volatilizací (při pH vyšším než 7). Dusík se dále dostává z půd působením eroze, emisemi plynů či exportem v podobě biomasy a dalších produktů. Hlavními procesy transformace dusíku v půdě jsou: mineralizace organických dusíkatých sloučenin, nitrifikace, denitrifikace, asimilace minerálních forem dusíku a fixace vzdušného N_2 . Ve většině půd jsou běžnými procesy nitrifikace a denitrifikace.



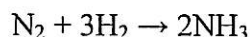
Obr.1 Hlavní procesy přeměn dusíku v suchozemském ekosystému. Mineralizace organických dusíkatých látek se také označuje termínem amonifikace, protože hlavním produktem mineralizačních reakcí je amonná forma dusíku. Tloušťka čar přibližně znázorňuje velikost přenosů N. (upraveno podle: BLACKBURN 1983; převzato z: ŠIMEK 2003)



- Nitrifikace je proces, při kterém je amoniak využíván jako zdroj energie jednou skupinou chemoautotrofních bakterií - tzv. nitrifikátory. Při nitrifikaci dochází k oxidaci amoniaku na nitrit a dále na nitrát. Nitrifikace je ovlivněná koncentrací molekulárního kyslíku a amoniaku v půdě (při poklesu koncentrace a tím dostupnosti pro nitrifikační bakterie se proces zpomaluje až zastavuje).
- K denitrifikaci, tedy redukcí oxidovaných forem dusíku v širším smyslu dochází několika způsoby. Některé mikroorganismy produkují oxid dusný (N_2O) z nitrátů za oxických podmínek (bakterie, houby, řasy) nebo konvertují nitráty na nitrity za anoxických podmínek (střeva živočichů) při nitrátové respiraci. Jiným typem redukce je disimilační nitrátová redukce na amonium bakteriemi nebo chemodenitrifikace probíhající např. v kyselých lesních půdách. Denitrifikace v užším smyslu je respirační denitrifikace, při níž slouží oxidované nitrity a nitráty jako terminální akceptory elektronů za anaerobních podmínek a jsou redukovány na plynné formy (N_2O a N_2) v buňkách celé řady bakterií a archae, např. fakultativně anaerobními bakteriemi *Psuedomonas* a *Alcaligenes*. V zaplavovaných oblastech s rýžovišti působí denitrifikace vysoké ztráty dusíku (až 60 % se uvolní do atmosféry).



- Významným jevem transformace dusíku v půdě je také fixace molekulárního dusíku, při níž je molekulární plynný dusík redukován na amoniakální formu N:



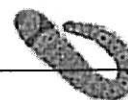
Fixace N_2 je záležitostí výhradně prokaryotních organismů. Mikroorganismy fixující dusík, tj. bakterie včetně aktinomycet a sinice, žijí volně nebo v asociacích a symbiózách s jinými mikroorganismy, s rostlinami nebo živočichy. Nesymbiotická fixace N_2 je v půdě většinou dost nízká, je totiž limitovaná především dostupností zdroje energie, částečně dochází i k inhibici fixace vysokým pO_2 nebo nadbytkem minerálního dusíku v substrátu (ŠIMEK 1993).

Asociativní a zvláště symbiotická fixace N_2 je většinou mnohem vyšší než fixace volně žijícími fixátory. Fixace N_2 je vysoká např. u leguminóz (rostlin z čeledi *Fabaceae* se symbiotickými bakteriemi r. *Rhizobium* aj. v kořenových hlízkách). Leguminózy mají velký význam jako zemědělské plodiny. Jejich produkce je víceméně nezávislá na minerálním dusíku.

Ve sladkovodních a mořských ekosystémech je dusík rovněž často limitním faktorem. Subtropické a tropické oblasti se velkou měrou podílejí na světovém mořském koloběhu dusíku, právě díky fixaci molekulárního dusíku sinicemi (r. *Trichodesmium* aj.). V mořích hraje důležitou roli dostupnost železa (pozn. množství železa v mořích slouží jako parametr pro odhad světového podílu fixace dusíku). Člověk svou činností značně ovlivňuje fixaci na pobřežích (destrukcí, eutrofizací). Vliv na fixaci N_2 v oceánech může mít oteplování či zvýšená stratifikace vodního sloupce (KARL et al. 2002).

Fixace v oceánech je zajišťována mnoha diazotrofními organismy (svědčí o tom vysoká fylogenetická diverzita níž H genů (ZEHR et al. 2001)). Někteří fixátoři nebyli však dosud objeveni.

Globální fixace molekulárního dusíku v terestrických a vodních ekosystémech je při absenci lidských zásahů téměř srovnatelná (souše: 90-130 Tg/rok, oceán: 100-200 Tg/rok). Ve skutečnosti je v suchozemských ekosystémech velikost fixace dvojnásobná vzhledem ke kultivaci leguminóz (KARL et al. 2002).



2.2.2. Biochemie fixace, nitrogenáza

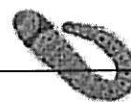
Redukce (fixace) molekulárního dusíku se uskutečňuje třemi hlavními způsoby:

- Spontánní fixace dusíku probíhá působením elektrických výbojů při bouřkách a vlivem ultrafialového záření. Vznikající oxidy dusíku jsou pak dále transformovány v atmosféře a deponovány v různých sloučeninách na povrchu Země, v suchozemských i vodních ekosystémech.
- Průmyslová fixace dusíku se využívá pro produkci HNO_3 a mnoha dusíkatých sloučenin včetně dusíkatých hnojiv z atmosférického dusíku v chemickém průmyslu. Je prováděna Haber-Boschovým procesem nebo jeho modifikacemi; průmyslová fixace N_2 je také v podstatě redukcí dusíku na amoniak pomocí vodíku.
- Biologická fixace molekulárního dusíku je proces probíhající v buňkách prokaryot – fixátorů N_2 , tzv. diazotrofů. Diazotrofní bakterie fixují dusík v atmosférických teplotách a při atmosférickém tlaku, zatímco při průmyslovém procesu je potřeba tlak 20 MPa a teplota 800°C (DILWORTH & GLENN 1991).

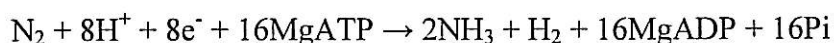
Biologická fixace dusíku je důležitým článkem koloběhu dusíku v biosféře. Byla objevena v 80. letech 19. století u leguminóz a záhy byly identifikováni vlastní fixátoři – diazotrofové. Podstatou procesu je redukce N_2 a následná asimilace dusíku do živé biomasy. Diazotrofní organizmy mají tuto schopnost díky speciálnímu enzymu nitrogenáze (ŠIMEK 1993).

Fixace dusíku je energeticky velmi náročný proces, proto dusík fixující organizmy vyvinuly mechanismy pro represi syntézy nebo potlačení funkce nitrogenázy, když je v jejich prostředí přítomen snadněji získatelný dusík v minerálních dusíkatých sloučeninách. Schopnost fixovat dusík se vyvinula u prokaryot v době existence redukční atmosféry na Zemi. S rozvojem fotosyntézy vznikala kyslíkatá atmosféra, která byla dostatečně selektivní pro diazotrofní organizmy. Některé organizmy si zachovaly schopnost fixace pouze za anaerobních nebo mikroaerobních podmínek, jiné vyvinuly speciální prostředky jak chránit nitrogenázu před kyslíkem (např. heterocyty) (FAY 1983).

Enzym nitrogenáza je tvořen dvěma proteiny, větším MoFe-proteinem (dinitrogenázou) a menším Fe-proteinem (reduktázou). Samostatně jsou proteiny nefunkční. Fe-proteiny (Proteiny 2) jsou u všech dusík fixujících organismů identické. Mají $M_r = 65000$ a obsahují 2 podjednotky a aktivní centrum s Fe_4S_4 . Přenášejí elektrony z ferredoxinu na hlavní protein. Jsou extrémně citlivé na kyslík. MoFe-proteiny (Proteiny 1) jsou tetramery o $M_r = 220$ -



240000, obsahují kofaktory složené z molybdenu a železa (FeMoco). Proteiny 1 provádí vlastní redukci molekul N_2 . Pro redukci je nutný nízký potenciál, který vzniká spojením Fe-proteinu s Mg ATP. Při redukci jsou molekuly N_2 přenášeny elektrony postupně z Fe-proteinu na MoFe-protein, vlastní redukce N_2 probíhá pak na FeMoco. Přenos jednoho elektronu probíhá ve třech krocích. Nejprve dojde ke spojení obou nitrogenázoných proteinů, pak je elektron přenesen z Fe na MoFe-protein. Nakonec proteiny disociují (během toho se hydrolyzují 2 molekuly ATP na ADP). Redukce substrátu zahrnuje: redukci Fe-proteinu, aktivaci Fe-proteinu pomocí ATP, přenos elektronů mezi proteiny nitrogenázy, vazbu substrátu na nitrogenázu, tvorbu komplexu enzym-substrát, přenos elektronů na substrát, uvolnění redukovaného produktu, ADP a fosfátu). Je to pomalý proces, který trvá asi 1s. Zdrojem ATP pro reakci jsou u heterotrofních bakterií rozkládané organické substráty nebo u sinic fotosyntéza. Jako zdroj elektronů slouží ferredoxin a flavodoxin (pro jejich redukci se elektrony získávají rozkladem organických látek nebo z vody). ATP se účastní reakce jako MgATP (na přenos 8 elektronů se spotřebuje 16 molekul MgATP):



Byly objeveny i jiné typy nitrogenáz (tzv. alternativní nitrogenázy), jejichž místem vazby a redukce není FeMoco s molybdenem, nýbrž vanadem (např. u *Azobacter chroococcum*). Nitrogenáza je kódovaná fixačními geny *nif*. Ty jsou dobře prostudovány u bakterií, ale málo známé u sinic. Například ale víme, že existuje rozdílná organizace genů u jednobuněčných a vláknitých sinic i u vegetativních buněk a heterocytů.

2.2.3. Přehled fixátorů N_2

Fixátoři dusíku jsou hojně rozšířeni, žijí volně v půdě, na povrchu rostlinných orgánů, v pletivech a buňkách rostlin, na povrchu těl půdních živočichů i v trávicích traktech organismů. Taxonomicky patří k eubakteriím a archae. Žijí samostatně nebo v symbiózách (s houbami, kapradinami, cykasy, jednoděložnými i dvouděložnými rostlinami a také v asociacích s živočichy).

Mezi heterotrofní nefotosyntetizující diazotrofy patří anaerobní archae (*Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*) a různé typy bakterií. Aerobní bakterie jsou zastoupeny např. rody *Acetobacter*, *Azomonas*, *Dexia*, *Xanthobacter*, *Frankia*,



z mikroaerobních bakterií jsou to *Methylococcus*, *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Thiobacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Beggiatoa*, fakultativně anaerobní reprezentují *Citrobacter*, *Escherichia intermedia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Vibrio* a anaerobní diazotrofní bakterií je například *Clostridium*.

Dalšími významnými fixátory jsou volně žijící fotosyntetizující autotrofové, mezi něž patří purpurové a zelené sírné bakterie a sinice. K diazotrofním purpurovým bakteriím řadíme např. r. *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Chromatium*, k zeleným pak například r. *Chlorobium*. Mezi fixující sinice patří například *Synechococcus*, *Gloeocapsa*, *Trichodesmium* a všechny heterocytózní sinice.

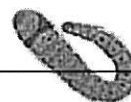
Fixátoři často vytváří asociace nebo žijí ve vztahu s jinými organizmy. Rhizosférní bakterie žijí na povrchu kořenů rostlin včetně pěstovaných plodin, r. *Azospirillum* se vyskytuje u tropické trávy *Paspalum notatum*. Některé bakterie žijí ve vztazích s termity, žížalami nebo ovcemi, žijí na povrchu těl půdních živočichů i v trávicích traktech. Rod *Rhizobium* tvoří symbiózu s leguminózami, *Frankia* je fixátorem u aktinorhizních rostlin (olše aj.). Sinice jsou dusík fixující složkou lišejníků, vyskytují se u řas, jatrovek, hlevíku r. *Anthoceros*, cykasů (MEEKS 1998), ale i angiospermálních rostlin r. *Gunnera* (SÖDERBÄCK et al. 1990). *Anabaena azolae* je symbiontem vodní kapradiny r. *Azolla*.

Významným fixátorem v mořské vodě je neheterocytózní sinice r. *Trichodesmium*. Dalšími zástupci vodních diazotrofních jsou např. r. *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, jednobuněčná *Erythrophaera marina*, neheterocytózní *Katagnymene* a fakultativně anaerobní pelagické chemotrofní bakterie *Vibrio diazotrophicus*, *Thiobacillus*, *Beggiatoa*. Dusík fixují také sinicoví endosymbionti diatomů (*Richelia intracellularis* u rozsivky r. *Rhizosolenia*), existují diazotrofní endo- i ektosymbionti bezobratlých a symbionti dinoflagelátů. Bylo zjištěno, že ve společenstvech organismů se vyskytuje tzv. syntrofie, kdy celé společenstvo, spíše než jednotlivec je schopno asimilovat dusík do své biomasy (KARL et al. 2002).

2.3. Fixace dusíku a nitrogenázová aktivita u půdních sinic

2.3.1. Sinice jako diazotrofní organizmy

Dusík je častým limitujícím faktorem (živinou) v půdě. Některé půdní sinice patří mezi diazotrofy a mají schopnost poutat molekulární dusík z atmosféry. Sinice fixují N_2 většinou v aerobních podmínkách, část asimiluje dusík v anoxickém prostředí. Mezi dusík fixujícími



sinicemi jsou jak zástupci vláknitých, tak i kokálních typů. Byla zjištěna například fixace dusíku u jednobuněčné sinice r. *Gloeotheca*. Ta je často symbiontem lišejníků, v symbiotickém vztahu ale není fixace N_2 potvrzena. Fixujícími symbionty jsou obvykle heterocytózní sinice (r. *Nostoc*, *Scytonema*). Mezi neheterocytózní sinice, které fixují dusík řadíme r. *Trichodesmium*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Phormidium*. Diazotrofní půdní sinice nesporně přispívají k bilanci dusíku v suchozemských ekosystémech a mají např. velké praktické využití při pěstování rýže. Jejich přítomnost zlepšuje úrodnost rýžovišť. Poprvé byly sinice objeveny na rýžových polích počátkem 20. století na Cejlonu a záhy byl poznán i jejich přínos pro bilanci dusíku v agroekosystémech.

2.3.2. Charakteristika a vlastnosti diazotrofních sinic

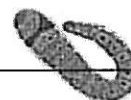
Stejně jako ostatní diazotrofové, i sinice mají enzymatický komplex nitrogenázu. Na rozdíl od heterotrofně se vyživujících organismů u nich ale probíhá fotosyntéza. Fixace N_2 a fotosyntéza jsou zdánlivě dva neslučitelné procesy, neboť kyslík uvolňovaný při fotosyntéze je silně toxický pro nitrogenázu nezbytnou pro fixaci N_2 . Proto sinice vyvinuly různé způsoby ochrany nitrogenázy před molekulárním kyslíkem, které spočívají v časové nebo prostorové separaci obou procesů.

U vláknitých sinic řádů Nostocales a Stigonematales se např. vytvářejí heterocyty. Heterocyty jsou speciální buňky morfologicky i fyziologicky se lišící od ostatních vegetativních buněk. Jejich hlavním úkolem je zajistit mikroaerobní podmínky pro nitrogenázu a dále distribuce dusíkatých sloučenin do celého organismu (GOLDEN & YOON 1998). Často jsou na vlákních rozmístěny ve víceméně pravidelných intervalech. Tvorba heterocytu je spjata s řadou změn, kterými musí buňka projít (WOLK et al. 1994). Dochází ke vzniku složitěho vrstevnatého obalu, který mj. účinně redukuje difúzi plynů. Fotosystém I zajišťující zdroj ATP a cytochromální komplexy jsou zachovány, avšak fotosystém II chybí. Heterocyty mají vysokou respirační kapacitu, dýcháním tak odstraňují přebytečný kyslík. Protože postrádají RUBISCO a neasimilují oxid uhličitý, jsou odkázány na dodávky uhlíkatých sloučenin z vegetativních buněk. Heterocyty obsahují speciální enzymy nutné pro metabolismus amoniaku z fixovaného N_2 . Pomocí glutamin syntetázy (GS) je dusík přenesen na glutamát, vzniklý glutamin je transportován do vegetativních buněk, kde je díky GOGAT (glutamin oxoglutarát aminotransferáze) zpět přeměněn na glutamát. Zralý heterocyt komunikuje s okolními buňkami polárními noduly, což jsou



póry s četnými mikroplazmodesmaty. Jimi jsou společně s glutamátem do heterocytů dodávány potřebné redukční ekvivalenty NADH. Důležitou roli hrají enzymy zajišťující syntézu a degradaci cyanofycinu. Ten má za úkol udržovat rovnováhu mezi fixací dusíku a jeho exportem ven z buňky. Proces diferenciaci heterocytů trvá 12-15 hodin a výsledná frekvence heterocytů čítá obvykle 5-10 % z celkového počtu buněk (ADAMS & DUGGAN 1999). Prostorovou separaci využívá i neheterocytózní mořská sinice r. *Trichodesmium*. Na vláknech se pouze na biochemické úrovni diferencují krátké úseky buněk tzv. diazocytů, u nichž přestává fungovat fotosyntéza a probíhá pouze dýchání. Vznikající mikroaerobní prostředí umožní expresi nitrogenázy.

Jiným způsobem oddělení fotosyntetických a fixačních procesů je časová separace. Ve vegetativních buňkách probíhá ve dne fotosyntéza, během níž se akumulují redukční ekvivalenty NADP a energie v podobě ATP. V noci pak buňky dýchají, snižují tak koncentraci kyslíku a dovolují nastartovat fixaci. Časová separace byla například pozorována u r. *Synechococcus*, *Cyanothece*, *Gloeothecae*, *Oscillatoria*, *Plectonema* a dalších.



3. Materiál a metody

3.1. Studované kmeny sinic

3.1.1. Celkový přehled

Pro všechny experimenty jsem použila kmeny půdních sinic ze sbírky Ing. Aleny Lukešové, CSc. z Ústavu půdní biologie AV ČR (Tab.1). Vybrali jsme 15 rodů sinic odlišné morfologie (kokální, vláknité heterocytózní a vláknité neheterocytózní typy (Tab.2) z různých geografických oblastí (Tab.3):

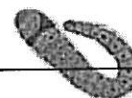
- pouště subtropického pásu (Egypt)
- mírný pás (Česká republika, Slovensko)
- tropy (Kuba, Brazílie, Mauretánie, Thajsko)
- polární oblasti (Antarktida)

Tab.2 Rozdělení kmenů podle morfologie a pracovní označení kmene (v závorce).

Kokální	Vláknité heterocytózní	Vláknité neheterocytózní
Chroococidiopsis (E Chrooc1)	Anabaena (C Anab1)	Leptolyngbya (E Lept1, E Lept2)
Chroococcus (T Chrooc1)	Aulosira (C Aul1) Calothrix (A Cal1, A Cal2, C Cal1) Fischerella (T Fisch1) Hassalia (A Has1, C Has1) Microchaete (E Micro1) Nodularia (C Nod1) Nostoc (E Nos1, E Nos2, A Nos1, A Nos2, A Nos3, A Nos4, A Nos5, C Nos1, C Nos2, C Nos3, C Nos4, T Nos1, T Nos2, T Nos3) Scytonema (E Scyt1, T Scyt1) Tolypothrix (C Tol1) Trichormus (E Trich1, C Trich1, C Trich2)	Oscillatoria (E Oscil1)

Tab. 1 Soubor kmenů použitých v experimentech s udáním lokality a roku izolace

kmen	označení kmene	stát	oblast	lokality	rok izolace	izoloval/a
<i>Chroococcidiopsis</i>	E Chrooc1	Egypt	Minia-západ	anýzové pole, jíl	2003	Lukešová
<i>Leptolyngbya a</i>	E Lept1	Egypt	Minia-západ	anýzové pole, jíl	2003	Lukešová
<i>Leptolyngbya b</i>	E Lept2	Egypt	Minia-východ	pod skálou, tvrdá půda	2003	Lukešová
<i>Microchaete</i>	E Micro1	Egypt	Minia-západ	anýzové pole, jíl	2003	Lukešová
<i>Nostoc a</i>	E Nost1	Egypt	Minia-západ	kultivovaná oblast, písek	2003	Lukešová
<i>Nostoc b</i>	E Nost2	Egypt	Minia-západ	univerzitní botanická zahrada, půda	2003	Lukešová
<i>Oscillatoria</i>	E Oscil1	Egypt	Minia-západ	univerzitní botanická zahrada, půda	2003	Lukešová
<i>Scytonema</i>	E Scyt1	Egypt	Minia	nezjištěno	2003	Lukešová
<i>Trichormus E14</i>	E Trich1	Egypt	Minia-západ	kultivovaná oblast, písek	2003	Lukešová
<i>Calothrix a</i>	A Cal1	Antarktida	King George/South Shetlands	deglaciované půdy	1996	Lukešová
<i>Calothrix b</i>	A Cal2	Antarktida	King George/South Shetlands	deglaciované půdy	1996	Lukešová
<i>Hassalia</i>	A Hasi1	Antarktida	King George/South Shetlands	deglaciované půdy	1996	Lukešová
<i>Nostoc 11b</i>	A Nos4	Antarktida	King George/South Shetlands	deglaciované půdy	1996	Lukešová
<i>Nostoc a</i>	A Nos1	Antarktida	King George/South Shetlands	deglaciované půdy	1996	Lukešová
<i>Nostoc b</i>	A Nos2	Antarktida	King George/South Shetlands	deglaciované půdy	1996	Lukešová
<i>Nostoc c</i>	A Nos3	Antarktida	King George/South Shetlands	deglaciované půdy	1996	Lukešová
<i>Nostoc SPH 24</i>	A Nos5	Antarktida	King George/South Shetlands	deglaciované půdy	1996	Lukešová
<i>Anabaena</i>	C Anab1	Slovensko	Domica	jeskyňně	2003	Lukešová
<i>Aulosira</i>	C Aul1	Česká republika	Dlouhá Ves/Chelčice	pole	1988	Lukešová
<i>Calothrix</i>	C Cal1	Česká republika	nezjištěno	nezjištěno	1996	Lukešová
<i>Hassalia</i>	C Hasi1	Česká republika	Krušné hory	slaniska	1994	Kaňan
<i>Modularia</i>	C Mod1	Česká republika	Sedlec	slané louky	1994	Lukešová
<i>Nostoc a</i>	C Nost1	Česká republika	Sokolovsko	výsypky	1996	Lukešová
<i>Nostoc b</i>	C Nost2	Česká republika	Krušné hory	lesní půda	1993	Lukešová
<i>Nostoc elipsosporum</i>	C Nost3	Česká republika	Nezamyslice	ukázané půdy	1980	Stibral
<i>Nostoc SOK</i>	C Nost4	Česká republika	Sokolovsko	výsypky	1997	Lukešová
<i>Tolypothrix</i>	C To11	Česká republika	Sokolovsko	výsypky	1995	Lukešová
<i>Trichormus M10</i>	C Trich2	Česká republika	nezjištěno	nezjištěno	1988	Lukešová
<i>Trichormus SOK</i>	C Trich1	Česká republika	Dlouhá Ves/Chelčice	vlhká louka	1988	Lukešová
<i>Fischerella</i>	T Fisch1	Kuba	nezjištěno	nezjištěno	1997	Lukešová
<i>Chroococcus</i>	T Chrooc1	Brazílie	nezjištěno	nezjištěno	1997	Lukešová
<i>Nostoc calcicola</i>	T Nost1	Kuba	Havana	nezjištěno	1989	Lukešová
<i>Nostoc Maur</i>	T Nost3	Mauretánie	nezjištěno	ryžoviště		Lukešová
<i>Nostoc Thaj</i>	T Nost2	Thajsko	nezjištěno	ryžoviště		Lukešová
<i>Scytonema</i>	T Scyt1	Kuba	nezjištěno	nezjištěno		Lukešová



Tab.3 Rozdělení sinic podle geografických oblastí – pracovní názvy kmenů

POUŠTĚ	POLÁRNÍ OBLASTI	TEMPERÁTNÍ ZÓNA	TROPY
E Chrooc1	A Cal1	C Anab1	T Fisch1
E Lept1	A Cal2	C Aul1	T Chrooc1
E Lept2	A Has1	C Cal1	T Nos1
E Micro1	A Nos1	C Has1	T Nos2
E Nos1	A Nos2	C Nod1	T Nos3
E Nos2	A Nos3	C Nos1	T Scyt1
E Oscil1	A Nos4	C Nos2	
E Scyt1	A Nos5	C Nos3	
E Trich1		C Nos4	
		C Tol1	
		C Trich1	
		C Trich2	

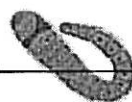
3.1.2. Charakteristika kmenů

Následující charakteristika kmenů je podle dostupné literatury (HINDÁK 1978, 2001; GEITLER 1932; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1986, 1988, 1989, 1990).

***Chroococcidiopsis* (Xenococcaceae, Chroococcales):** Jedná se o jednobuněčnou sinici. Buňky se vyskytují jednotlivě nebo ve skupinách, které jsou obaleny pevnou slizovou pochvou. Někdy bývají uspořádány do krátkých nepravidelných řad nebo do větších radiálních kolonií se zřetelně většími buňkami na okrajích. Pochva je tuhá, tenká nebo lehce ztlustlá, bezbarvá, příležitostně vrstevnatá. Buňky jsou kulovité, polokulovité, oválné nebo nepravidelné, někdy nezřetelně kyjovitého tvaru, hruškovité a polarizované (přichyceny k substrátu). Dělení probíhá ve dvou rovinách na dvě dceřiné buňky nebo později ve třech a více rovinách, při němž dochází ke vzniku tzv. baeocytů. Sinice tohoto rodu jsou důležitou složkou pouštních biotopů.

***Chroococcus* (Chroococaceae, Chroococcales):** Stejně jako předešlý kmen patří do řádu jednobuněčných sinic. Tvoří kolonie s malým počtem buněk. Slizové obaly jsou pevné, bezbarvé, někdy vrstevnaté. Buňky mají kulovitý až polokulovitý tvar. K dělení dochází ve třech rovinách ještě před dosažením původního kulovitého tvaru.

***Leptolyngbya* (Pseudanabenaceae, Oscillatoriales):** Sinice variabilní skupiny, která je součástí řádu Oscillatoriales, má cylindrická vlákna s dlouhými buňkami. Pochva je tenká, a vyskytuje se fakultativně v závislosti na podmínkách prostředí. Zřídka se u této skupiny



vyskytuje nepravé větvení. Heterocyty ani akinety nejsou přítomny. Vlákna jsou často smotaná do měkkých klastrů.

***Oscillatoria* (Oscillatoriaceae, Oscillatoriales):** Vlákna má nevětvená, rovná nebo zprohýbaná, bez pochev s častými meristematickými zónami. Buňky jsou diskovitého tvaru. Netvoří akinety ani heterocyty. Vlákna se vyskytují jednotlivě nebo v povlacích.

***Anabaena* (Nostocaceae, Nostocales):** Jedná se o planktonní, bentické či půdní sinice. Vytváří nevětvená vlákna vyskytující se jednotlivě nebo tvořící amorfni shluky. Heterocyty jsou tvořeny interkalárně a jsou od sebe vzdáleny v pravidelných intervalech. Akinety vznikají interkalárně těsně vedle nebo několik buněk od heterocytů. Apikální části vláken se zužují, nevytvářejí hyalinní zakončení.

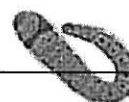
***Aulosira* (Nostocaceae, Nostocales):** Vegetativní vlákna jsou izopolární, obalena slizovou pochvou a vyskytují se samostatně či v chomáčcích. Heterocyty jsou tvořeny interkalárně. Akinety jsou menší, vznikají apoheterocyticky (vyvíjejí se z vegetativních buněk a směřují k heterocytům), poměrně nepravidelně. Fragmentací vegetativních vláken vznikají hormogonie.

***Calothrix* (Rivulariaceae, Nostocales):** U tohoto rodu jsou vlákna bipolární s bazálními či interkalárními heterocyty. Jsou obalena tenkou pevnou pochvou na koncích někdy rozšířenou. Vyskytují se jednotlivě nebo v malých skupinkách, bývají přichyceny k podkladu.

***Hassallia* (Microchaetaceae, Nostocales):** Důležitým znakem celé čeledi *Microchaetaceae* je životní cyklus, charakteristický heteropolárním vývojem a růstem hormogonií. *Hassallia* má jednostranná rozpadající se vlákna obalena pevnou tenkou pochvou. Buňky jsou obvykle diskoidální (poměr délky ku šířce výrazně menší než 1), stejné všude na vlákně. Je velmi podobná rodu *Tolypothrix* (liší se pouze krátkými postranními větvemi a tvarem buněk). Vytváří aerofytní nárosty zejména na vápencových skalách a kůře stromů.

***Microchaete* (Microchaetaceae, Nostocales):** Vytváří bipolární vlákna válcovitého tvaru, po celé délce stejně hrubá, rostoucí ve shlucích. Jsou zřídka větvená s pevnou tenkou pochvou. Heterocyty se vyskytují pouze na bázi. Podobně jako u sinic řádu Oscillatoriales a celé čeledi Microchaetaceae se na vláknech vyskytují meristematické zóny rychle se dělicích buněk.

***Nodularia* (Nostocaceae, Nostocales):** Vegetativní vlákna jsou nevětvená, tvořená krátkými a diskovitými buňkami. Vytváří interkalární a terminální heterocyty uzavřené v pochvách, na konci vegetačního období vznikají krátké řady akinet. Sinice rodu *Nodularia* jsou významnou složkou mořského planktonu, ale též nárostů v půdě či perifytonu slanisek.



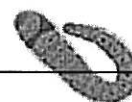
***Nostoc* (Nostocaceae, Nostocales):** Velice běžná půdní sinice, vyskytující se však též v bentosu. Zástupci tohoto rodu jsou též velmi důležitými symbionty s celou řadou organismů (mechorosty, lišejníky, r. *Gunerra*, cykasy). Vlákna jsou nevětvená izopolární pouze s jednou řadou buněk. Jsou po celé délce stejně hrubá, řetízovitá. Chybí jim meristemická zóna. K reprodukci dochází po fragmentaci celého vlákna na motilní hormogonia. *Nostoc* tvoří interkalární heterocyty uspořádané pravidelně, řidčeji se objevují heterocyty terminální. Akinety jsou v řadách a jen o málo větší než vegetativní buňky. Vlákna jsou obalena v tuhém slizu. Charakteristická je tvorba makroskopických kulovitých kolonií a povlaků.

***Scytonema* (Scytonemataceae, Nostocales):** Vlákna jsou izopolární, nepravě větvená (větvení typu S) s kulatými širšími koncovými buňkami. Boční větve vyrůstají většinou po dvou. Pochvy bývají hrubé a často zbarvené. Heterocyty jsou obdélníkovitého tvaru a tvoří se interkalárně. Tvorba akinet je fakultativní. Klíčení probíhá pomocí hormogonií. Vytváří povlaky nebo chomáčky především na povrchu půdy či v tekoucích nebo stojatých vodách.

***Tolypothrix* (Microchaetaceae, Nostocales):** Vegetativní vlákna tohoto rodu jsou tvořena čtvercovými až obdélníkovými buňkami, větvená u terminálních heterocytů (větvení typu T). Vlákna tvoří trsovité stélky. Heterocyty se tvoří interkalárně a na bázi bočních větví. Pochvy jsou přitisknuté, tuhé, často zbarvené.

***Trichormus* (Nostocaceae, Nostocales):** Byla považována za taxonomicky nejasný druh rodu *Anabaena*. Na rozdíl od něho má však akinety vnikající apoheterocyticky. Rod je velmi podobný rodu *Nostoc* a *Nodularia*. Má izopolární vlákna bez větvení. Heterocyty jsou umístěny interkalárně. Tvoří amorfní slizovité povlaky na povrchu půdy.

***Fischerella* (Fischerellaceae, Stigonematales):** Jediný studovaný zástupce řádu Stigonamatales, vláknitých sinic s pravým větvením vláken. Stélka bývá poléhavá, většinou s několika řadami nebo vzácně s jedním vláknem. Vedlejší větve jsou umístěny jednostranně, jejich buňky jsou užší a delší. Hlavní vlákno má buňky větší a kulaté. Hormogonie se tvoří na koncích bočních větví. Heterocyty vznikají interkalárně nebo laterálně podobně jako akinety. Jeví odlišnou morfologii od heterocytů a akinet sinic řádu Nostocales. *Fischerella* je aerofyt a vyskytuje se i ve stojatých vodách.



3.1.3. Kultivace kmenů a příprava pro měření

Kmeny jsem kultivovala na Petriho miskách s 1,7 % agarem živného média BG 11, což je nejběžněji používané médium pro kultivaci sinic (STANIER et al. 1971). Kultivační médium bylo upraveno tak, že neobsahovalo zdroj minerálního dusíku, tj. NaNO_3 . Nepřítomnost minerálního dusíku v substrátu totiž podněcuje tvorbu heterocytů, které hrají důležitou roli při fixaci dusíku. Poté, co na miskách narostlo dostatečné množství inokula (obvykle po 2 až 3 týdnech), byly kultury přeočkovány na misky s tužším (3 %) agarem. Kultivace probíhala v aerobních podmínkách, za permanentního osvětlení $30 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a za stálé teploty 22°C . Kmeny z polárních oblastí byly udržovány při teplotě 15°C .

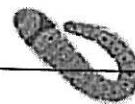
Každý kmen byl pěstován v šesti opakováních po dobu 3 až 5 týdnů. Jeden den před měřením jsem z každé misky vyřízla 2 pruhy agarů s inokulem a vložila je po jednom do tzv. lahví NTS (lahve na séra o objemu cca 130 ml). Jedna láhev zůstala osvětlená, druhou jsem 12 hodin před měřením zabalila do hliníkové fólie (alobal), abych zajistila temnostní podmínky. Lahve byly neprodyšně uzavřeny gumovou zátkou přichycenou kovovým uzávěrem.

3.2. Stanovení nitrogenázové aktivity

3.2.1. Charakteristika metody

Pro měření nitrogenázové aktivity byla použita metoda ARA (acetylene reduction activity, acetylene reduction assay) využívající nitrogenázové redukce acetylénu na etylén. Metoda spočívá v tom, že vzorek je inkubován v prostředí s acetylénem, který inhibuje redukci N_2 a zároveň saturuje enzym nitrogenázu, pomocí níž je acetylén redukován na etylén. Na počátku (acetylén obsahuje malou příměs etylénu) a na konci inkubace se stanoví množství etylénu v inkubační atmosféře plynově chromatograficky. Z nitrogenázové redukce acetylénu se může přibližně odhadnout nitrogenázová redukce N_2 .

Měření nitrogenázové aktivity je možno provádět jak *in situ*, tak v laboratorních podmínkách. K tomuto účelu se používají speciální nádoby, komory či sáčky. Obvykle je acetylén čerpán z plynových lahví. Problémem je, že takto komerčně dodávaný acetylén často obsahuje příměsi, které mohou negativně ovlivnit aktivitu nitrogenázy. Udává se, že někdy i samotný acetylén může mít vliv na nitrogenázovou aktivitu, tím může docházet ke zkreslení výsledné velikosti fixace dusíku (SILVESTER & WINSHIP 1990). Doba

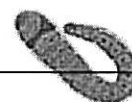


inkubace musí být proto zvolena tak, aby nedošlo k poškození vzorku, ale aby množství etylénu bylo měřitelné. Stanovením na plynovém chromatografu zjistíme nitrogenázovou redukční aktivitu acetylénu. Vzhledem k rozdílným energetickým požadavkům na redukci acetylénu a dusíku nemůžeme říct, že 1 mol redukovaného C_2H_2 odpovídá 1 molu redukovaného N_2 . Stechiometrii reakcí teoreticky odpovídá přepočítání 3:1 ($C_2H_2 : N_2$), používanější je ale převodní faktor 4:1, který bere v úvahu i redukci H_3O^+ . Liengen (1999) například zjistil, že sinice v polárních oblastech žijící v silném slizovitém gelu nebo v krustách obsahujících polysacharidy mají rozdílný difúzní koeficient pro dusík, acetylén a etylén. Jejich přepočítací koeficienty jsou nízké z důvodu nižší difúze acetylénu a etylénu. Dochází u nich také k adsorpci některého z plynů do gelové pochvy. S využitím přepočítacího poměru acetylén : dusík lze tedy převést naměřenou aktivitu nitrogenázy (redukci C_2H_2) na velikost fixace N_2 . Vzhledem k nejistotě stanovení převodního faktoru je však mnohdy vhodnější vyjadřovat schopnost fixace N_2 pouze jako velikost redukce C_2H_2 . Takto jsme postupovali i v této práci a informace o nitrogenázové aktivitě pouze nepřímo souvisejí s velikostí fixace N_2 *in situ*.

Výhodami metody ARA na rozdíl od ostatních metod studia fixace N_2 jsou citlivost, jednoduchost, levnost a dostupnost.

3.2.2. Postup při měření

1. Nejprve jsem do neprodyšně uzavřených lahví NTS (jako uzávěr byly použity gumové zátky) s měřenou kulturou sinic přidala plynotěsnou injekční stříkačkou 10 ml komerčního acetylénu. Acetylén byl během pokusu uchovávan v gumové duši.
2. Jinou plynotěsnou injekční stříkačkou jsem z lahve odebrala 1 ml atmosféry nad kulturou.
3. Na plynovém chromatografu Hewlett Packard 5890 vybaveném plamenovým ionizačním detektorem (FID) jsem změřila množství etylénu v inkubační atmosféře, tj. etylén, který se přidal jako příměs s acetylénem. Pro kalibraci přístroje jsem použila standard etylénu 171 ppm v N_2 .
4. Poté jsem nechala vzorky inkubovat po dobu 2 až 3 hodin. Vzorky byly ponechány ve stejných podmínkách jako při kultivaci.
5. Znovu jsem injekční stříkačkou odebrala 1 ml inkubační atmosféry a stejným způsobem změřila obsah etylénu na chromatografu.



6. Výstupní hodnoty z plynového chromatografu jsem dosadila do výpočetního vzorce a spočítala jsem množství etylénu v láhvi:

$$n(\text{C}_2\text{H}_4) = 0,0446 \cdot P_v \cdot V \cdot K_{st} / P_{st}$$

$n(\text{C}_2\text{H}_4)$	[nmol]	-množství etylénu v baňce
0,0446		-přepočítávací koeficient
P_v	[integrační jednotky]	-plocha píku etylénu ve vzorku
V	[ml]	-objem inkubační atmosféry baňky
K_{st}	[ppm]	-koncentrace standardu etylénu.
P_{st}	[integrační jednotky]	-plocha píku standardu

7. Nitrogenázová aktivita byla vyjádřena v $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1}$ (čerstvé biomasy). h^{-1} (v případě přepočtu výsledků na suchou biomasu je toto uvedeno v textu).

3.3. Stanovení dalších charakteristik

3.3.1. Stanovení biomasy

Biomasa sinic byla stanovována hned po měření nitrogenázové aktivity. Pomocí speciální stěrky (kopistka) jsem setřela kulturu z povrchu agarového pruhu a přenesla ji na váženku. Váženka byla vyrobena z alobalu, neboť je to materiál, který nepohlcuje vzdušnou vlhkost. Pak jsem biomasu kultury zvažila na analytických vahách s přesností na 0,00001 g (pro stanovení čerstvé biomasy). Potom byla kultura sušena po dobu 12 hodin při teplotě 90°C a znovu zvažena (pro určení sušiny).

3.3.2. Počítání frekvence heterocytů

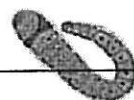
Frekvenci heterocytů jsem stanovovala pouze u sinice r. *Nostoc*. Celkem jsem měla k dispozici 12 kmenů r. *Nostoc* kultivovaných podle výše uvedených podmínek. Zhotovování preparátů a následné počítání heterocytů probíhalo až po změření nitrogenázové aktivity u těchto kmenů. Připravila jsem 6 preparátů od každého kmene (z 6 různých Petriho misek). Kultury byly mikroskopovány pomocí světelného mikroskopu Olympus CH 3. Nejčastěji jsem používala zvětšení 40x nebo 100x. Po zhodnocení stavu kultury byla pořízena



fotodokumentace. Pro vytváření fotografií jsem používala stejný světelný mikroskop Olympus CH 3 s digitální kamerou DP 10 vybavenou softwarem Olympus DP soft verze 3. Všechny preparáty byly vyfotografovány 5x až 10x. Nejlepších 5 fotografií jsem poté použila pro stanovení frekvence heterocytů. Frekvence heterocytů byla vyjádřena jako procentuální zastoupení heterocytů z celkového počtu buněk v definovaném poli mikroskopického obrazu 150 x 150 μm .

3.4. Statistická analýza

Data jsem zpracovávala pomocí programu Statistica for Windows 6. (STATSOFT INC. 2001). Pro porovnání průměrných hodnot nitrogenázové aktivity mezi geografickými oblastmi a sinicemi s různou morfologií byla použita jednocestná analýza variance následovaná Tukeyho testem. Grafické znázornění bylo provedeno pomocí „Box and whisker plots“ (s mediánem, 75 % kvantily, minimem a maximem). Závislost nitrogenázové aktivity na frekvenci heterocytů a biomase kolonie jsem testovala s využitím lineární regrese. K vizualizace těchto dat byl použit program R 2.01 (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2004).



4. Výsledky

4.1. Základní informace

Byla měřena schopnost biologické fixace molekulárního dusíku prostřednictvím stanovení nitrogenázové aktivity (NA) - redukce acetylénu nitrogenázou (HARDY et al. 1973) u souboru 35 různých kmenů půdních sinic. Ve výběru byly obsaženy kokální, vláknité heterocytózní a vláknité neheterocytózní typy sinic. Heterocytózní sinice byly rozděleny podle podobnosti do několika skupin morfotypů (Tab.4):

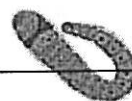
Tab.4 Rozdělení studovaných sinic podle morfotypů

Rody sinic	Skupina
Nostoc/Trichormus/Nodularia/Anabaena/Aulosira	skupina Nostoc
Tolypothrix/Calothrix/Microchaete/Hassallia	skupina Tolypothrix
Scytonema	skupina Scytonema
Fischerella	skupina Fischerella

Ve výběru byly zastoupeny čtyři hlavní geografické oblasti původu a výskytu sinic (pouště subtropického pásu, tropy, temperátní zóna a polární oblasti), jejichž výběry byly poměrně rovnocenné. Byla zjišťována NA za světla a za tmy. Pokles NA za tmy byl vyjádřen v procentech NA za světla. Byla vynesena závislost NA na biomase kultury a u sinic r. *Nostoc* byla určována závislost NA na frekvenci heterocytů.

U kokálních zástupců sinic *Chroococciopsis* (EChrooc1), *Chroococcus* (TChrooc1) ani u vláknitých rodů bez heterocytů (*Oscillatoria* (EOscil1), *Leptolyngbya* (ELept1, ELept2) nebyla naměřena žádná nitrogenázová aktivita. U všech heterocytózních sinic byla zjištěna aktivita nitrogenázy za světla. Za tmy však měly aktivní nitrogenázu jen některé kmeny (tropické - *Scytonema* (TScyt1), *Fischerella* (TFisch1), *Nostoc* (TNos3), temperátní - *Nostoc* (CNos3, CNos4), *Tolypothrix* (CTol1), *Aulosira* (CAul1), *Hassalia* (CHas1), *Calothrix* (CCal1), polární - *Nostoc* (ANos4), pouštní - *Nostoc* (ENos1, ENos2), *Trichormus* (ETrich1), *Microchaete* (EMicro1), *Scytonema* (EScyt1).

Před vlastním studiem nitrogenázové aktivity vybraných sinic byla provedena řada pilotních experimentů, jejichž cílem bylo důkladné zvládnutí potřebných metod: kultivace sinic, příprava kultur pro měření, měření nitrogenázové aktivity a stanovení biomasy. Výsledky těchto experimentů jsem do práce nezařadila, protože většinou nebyly prováděny



s dostatečným počtem opakování. V následných experimentech bylo použito vždy 6 opakování téže kultury a pokusné varianty; přesto byla variabilita výsledků značná. V důsledku poněkud odlišného pokusného uspořádání nemohla být do statistických analýz zahrnuta měření NA u pouštních kmenů z Egypta.

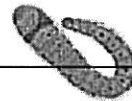
4.2. Nitrogenázová aktivita za světla

Veškeré heterocytózní sinice testované v experimentech vykazovaly pozitivní nitrogenázovou aktivitu za světla. Byla provedena statistická analýza, v níž byly analýzou variance hodnoceny kmeny různých geografických oblastí odlišných morfotypů. Analýza ukázala, že vliv na NA za světla má z největší části morfotyp sinice ($F = 20,26$; $p < 0,001$), rovněž byl průkazný vliv interakce morfotypu a oblasti ($F = 21,13$; $p < 0,001$). To znamená, že vezmeme-li dva kmeny stejného morfotypu (např. *Nostoc* a *Trichormus*) z jedné oblasti (např. temperátní zóny), budou si tyto kmeny podobnější svou NA než dva kmeny stejného morfotypu z odlišných geografických oblastí (např. temperátní zóna, polární oblasti).

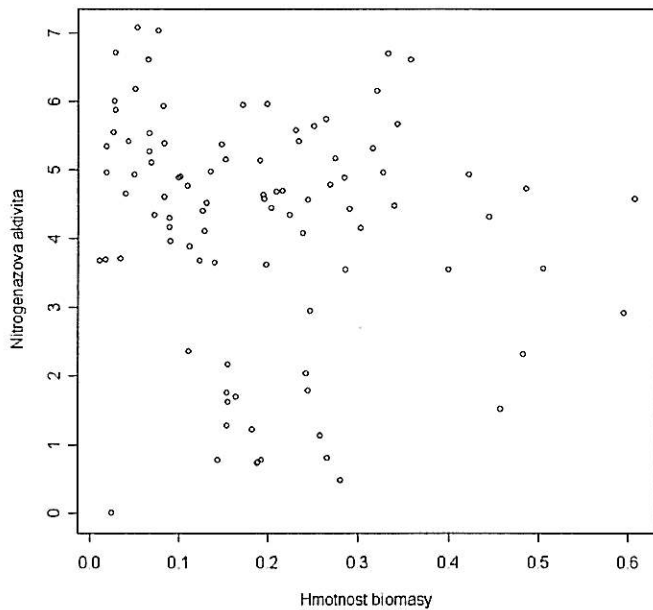
Nitrogenázová aktivita za světla nabývala hodnot 3,0 - 1445,7 nmol C_2H_4 $g^{-1} \cdot h^{-1}$. (nezahrneme-li pouštní egyptské kmeny, jejichž NA dosahovala velikosti 1391,2 - 7773,8 nmol C_2H_4 $g^{-1} \cdot h^{-1}$). Největší rozpětí naměřených hodnot kmenů z určité oblasti bylo zaznamenáno u NA polárních sinic 3,0 - 1445,7 nmol C_2H_4 $g^{-1} \cdot h^{-1}$. Nejvyšší NA u antarktických sinic byla naměřena u kmene r. *Hassalia* (AHas1), naopak nejnižší NA byla zjištěna u polárního r. *Nostoc* (ANos3). Nitrogenázová aktivita tropických kmenů se pohybovala mezi 79,2 - 462,8 nmol C_2H_4 $g^{-1} \cdot h^{-1}$ a u sinic mírného pásu byla naměřena NA v rozsahu 22,9 - 734,6 nmol C_2H_4 $g^{-1} \cdot h^{-1}$.

Byla zjišťována závislost nitrogenázové aktivity na množství biomasy (Obr.2, Obr.3). Výsledky jsou poněkud překvapivé, neboť analýza ukázala, že NA sinic typu *Tolypothrix* je na biomase kvadraticky závislá ($F = 7,79$; $p < 0,01$), zatímco u morfotypu *Nostoc* nebyla prokázána žádná závislost NA na biomase ($F = 2,07$; $p > 0,1$).

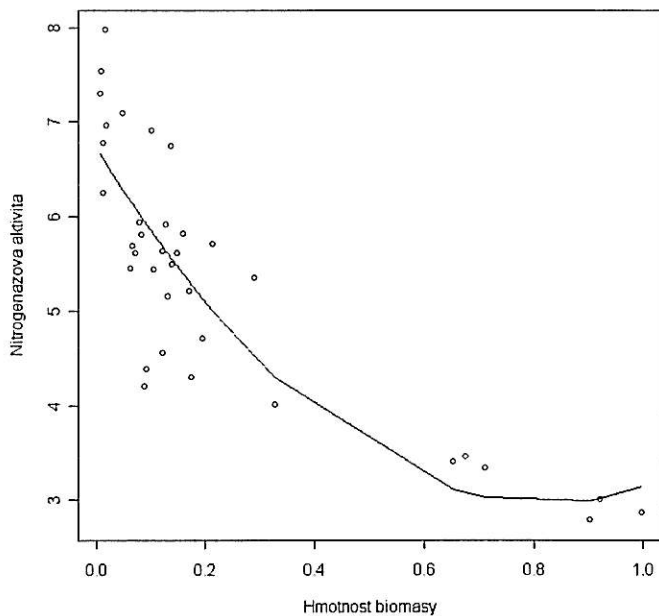
Následně byla porovnávána NA za světla u sinic z různých geografických oblastí (Obr.4, Obr.5). S použitím obecného lineárního modelu byl testován vliv oblasti na NA za světla. Pomocí analýzy variance (biomasa byla zadána jako kovariáta) nebyl vliv prokázán u morfotypu *Tolypothrix*. Naopak NA sinic morfotypu *Nostoc* byla signifikantně ovlivněna oblastí původu kmene ($F = 17,36$; $p < 0,01$). Tukeyho test ukázal, že se liší velikost NA sinic z polárních oblastí od NA kmenů ostatních oblastí (temperátu ($p < 0,001$) a tropů ($p < 0,01$)).



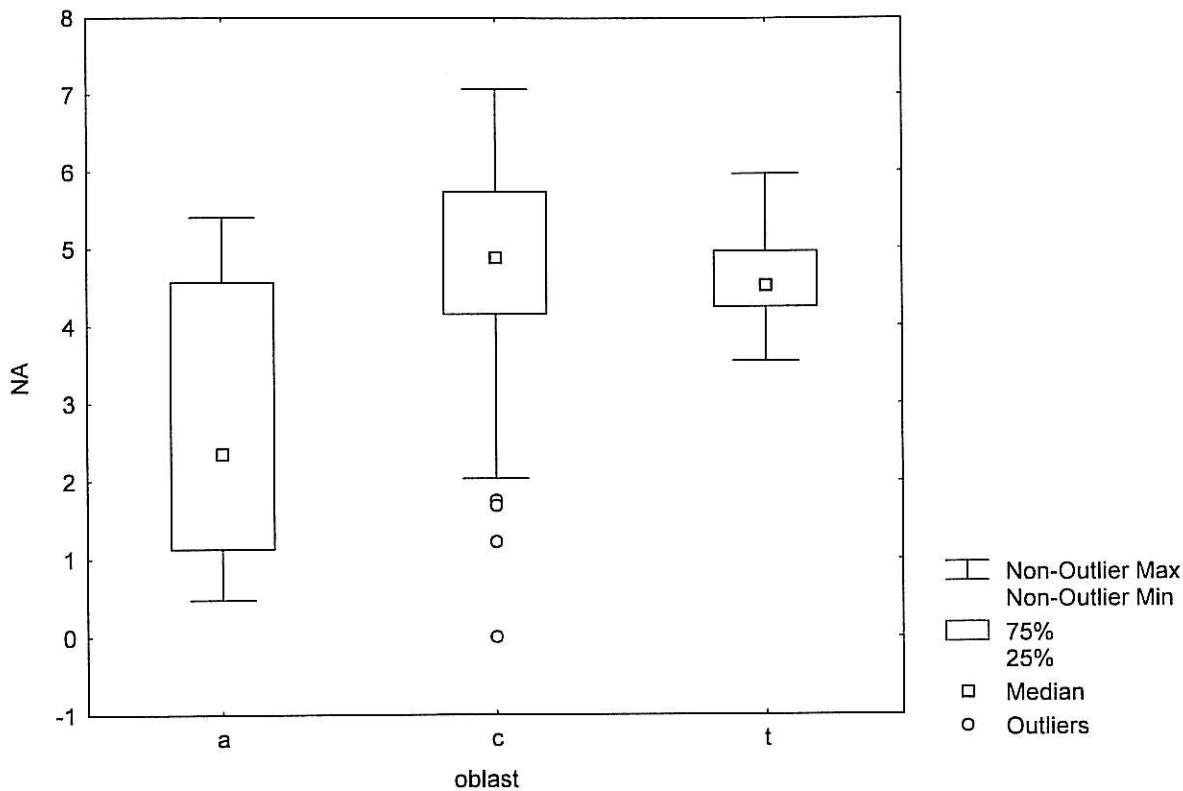
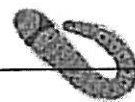
Byl zjišťován rozdíl ve velikosti NA za světla mezi sinicemi morfotypu *Nostoc* a *Tolypothrix* (Obr.6). Byla prokázána významná odlišnost v míře NA za světla mezi oběma morfotypy ($F = 21,35$; $p < 0,001$).



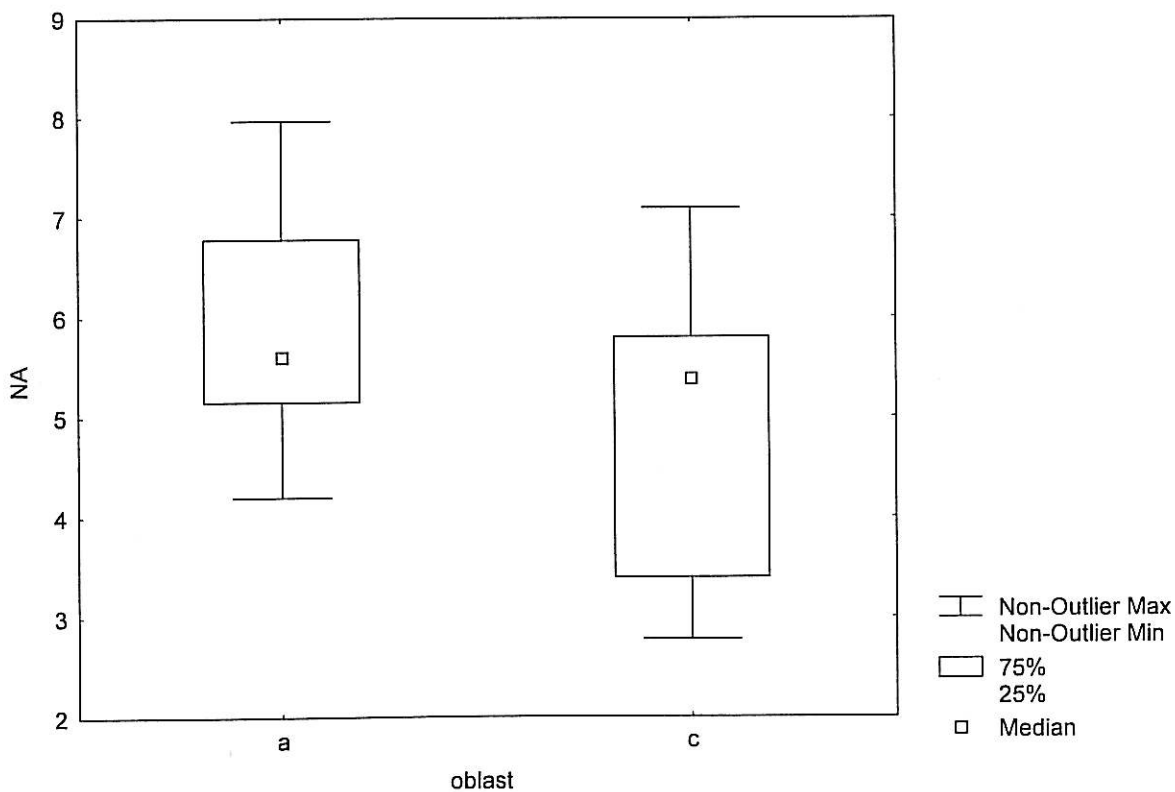
Obr.2 Závislost nitrogenázové aktivity za světla na biomase sinic morfotypu *Nostoc* (nitrogenázová aktivita je uvedena v $\ln \text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, čerstvá biomasa v gramech).



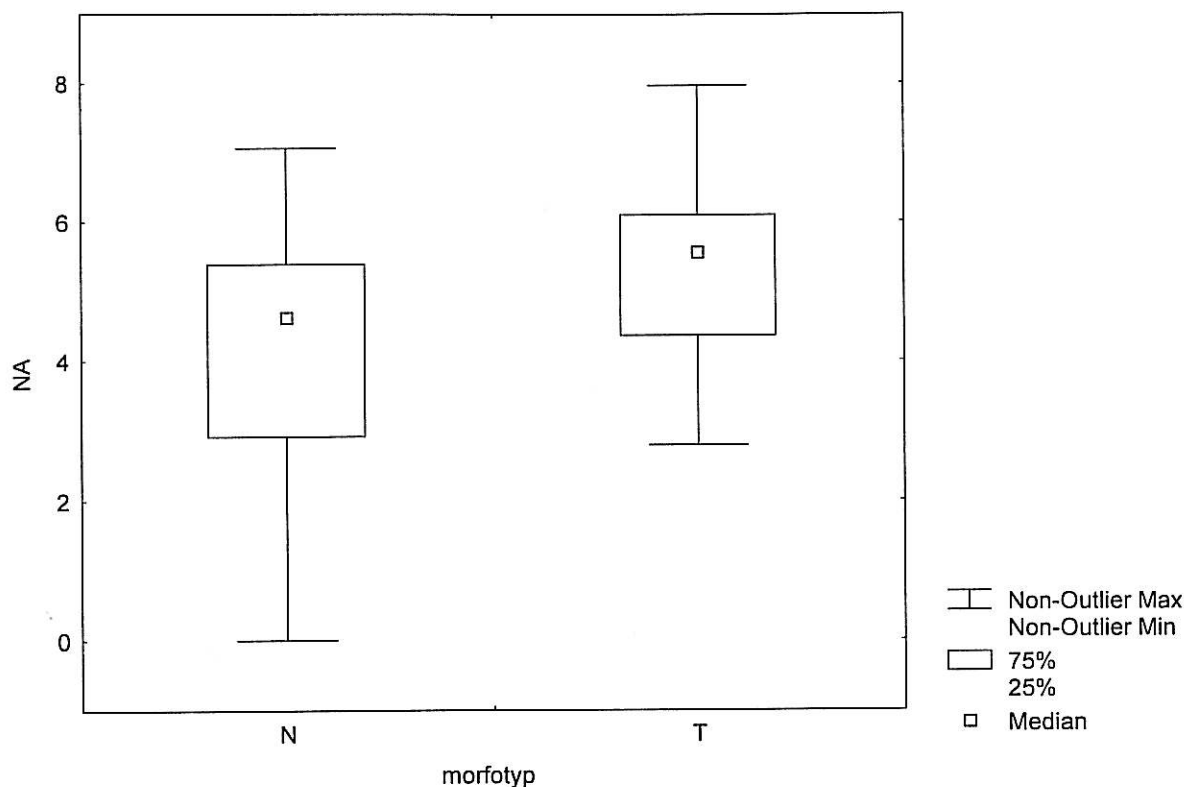
Obr.3 Závislost nitrogenázové aktivity za světla na biomase sinic morfotypu *Tolypothrix* (nitrogenázová aktivita je uvedena v $\ln \text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, čerstvá biomasa v gramech).



Obr.4 Nitrogenázová aktivita za světla sinic morfortypu *Nostoc* z různých oblastí: a – polární kmeny, c – temperátní kmeny, t – tropické kmeny (nitrogenázová aktivita je uvedena v $\ln \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).



Obr.5 Nitrogenázová aktivita za světla sinic morfortypu *Tolypothrix* z různých oblastí: a – polární kmeny, c – temperátní kmeny (nitrogenázová aktivita je uvedena v $\ln \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).



Obr.6 Nitrogenázová aktivita za světla sinic morfortypů *Nostoc* (N) a *Tolypothrix* (T) (nitrogenázová aktivita je uvedena v $\ln \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

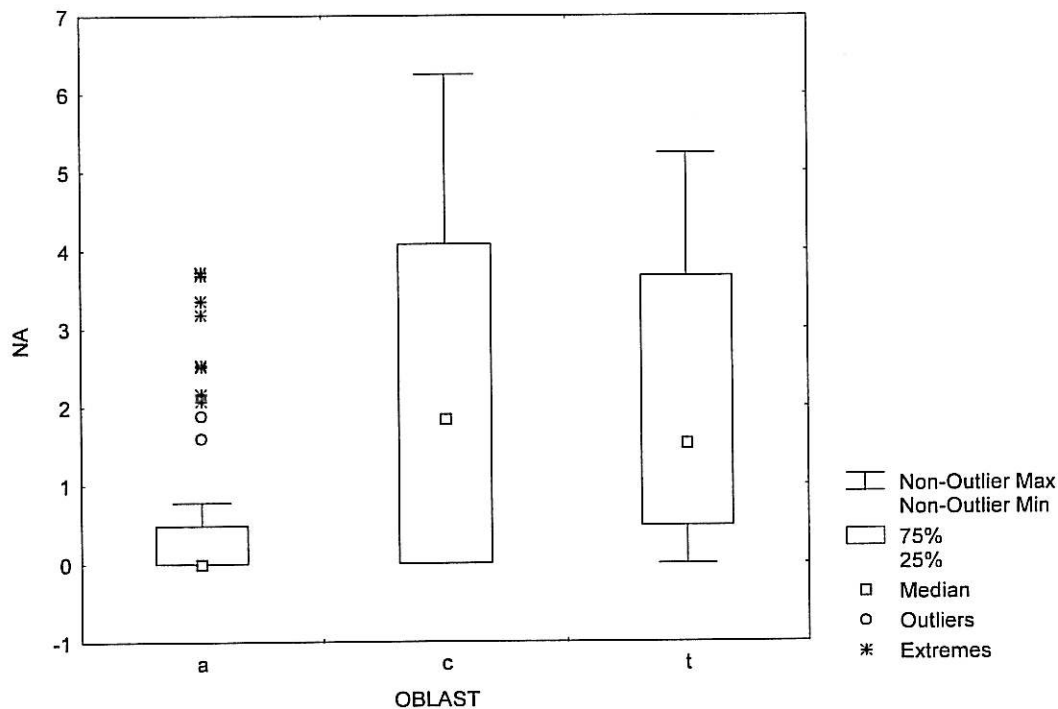
4.3. Nitrogenázová aktivita za tmy

Měřitelná NA za tmy byla zjištěna pouze u heterocytózních sinic (Obr.8-11). Průměrné hodnoty naměřené NA se pohybovaly mezi 0 - 282,2 $\text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (v hodnocení nejsou zahrnuty egyptské kmeny). Polární kmeny měly NA za tmy celkově nízkou (0 - 17,2 $\text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), tropické (0 - 101,5 $\text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) a temperátní kmeny vyšší (0 - 282,2 $\text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) a pouštní sinice nejvyšší (49,2 - 1975,7 $\text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Absolutně nejvyšší NA za tmy (kromě pouštních kmenů) vykázal jeden kmen z mírného pásu r. *Tolypothrix* (CTol1; 282,2 $\text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), zatímco několik kmenů studovaných sinic (např. *Nodularia* (CNod1), *Nostoc* (ANos1-3,5; CNos1,2; TNos1,2), *Calothrix* (ACal1,2), *Trichormus* (CTrich1,2), *Anabaena* (CANab1), *Hassalia* (AHas1) nemělo žádnou NA.

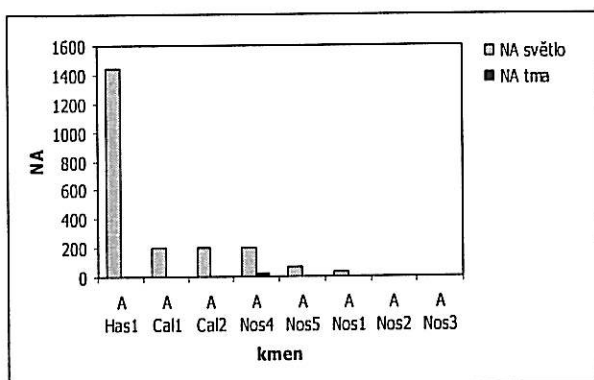
Opět byly porovnávány hodnoty NA za tmy mezi sinicemi z různých geografických oblastí (Obr.7). Byl použit obecný lineární model a pro analýzu variance byly jako kovariáty počítány biomasa a morfortyp sinic. Ze statistického vyhodnocení je zřejmé, že na činnost nitrogenázy ve tmě má signifikantní vliv oblast, ze které sinice pochází ($F = 22,11$; $p <$



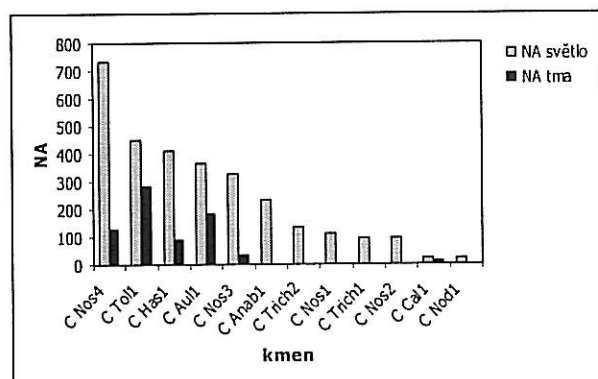
0,001). Oblast ovlivňuje nitrogenázovou aktivitu do takové míry, že vliv ostatních faktorů (morfotypu) je neprůkazný ($F = 0,48$; $p > 0,1$). Prokazatelný vliv na NA má interakce oblasti a morfotypu ($F = 18,11$; $p < 0,001$). Jak je uvedeno v tabulce 5, téměř všechny antarktické kmeny sinic přestanou ve tmě fixovat úplně. Jiná situace je u kmenů z temperátní zóny a z tropů, u nichž dochází v noci k poklesu činnosti nitrogenázy, snížení ale není tak výrazné. Pomocí Tukeyho testu byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi kmeny polárních oblastí a mírného pásu ($p < 0,001$) a zároveň polárních oblastí a tropů ($p < 0,01$).



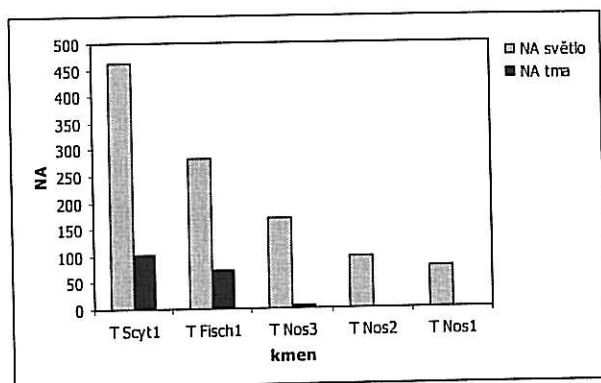
Obr.7 Nitrogenázová aktivita za tmy sinic morfotypu Nostoc a Tolypothrix z různých oblastí: a – polární kmeny, c – temperátní kmeny, t – tropické kmeny (nitrogenázová aktivita je uvedena v $\ln \text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)



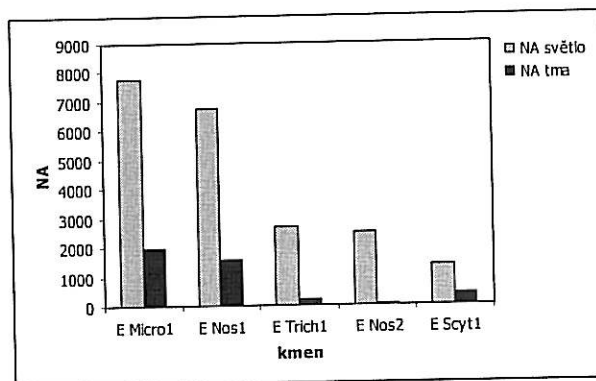
Obr.8 Nitrogenázová aktivita za světla a za tmy u polárních kmenů sinic (nitrogenázová aktivita je uvedena v $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; označení kmenů viz Tab.5)



Obr.9 Nitrogenázová aktivita za světla a za tmy u sinic z temperátní zóny (nitrogenázová aktivita je uvedena v $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; označení kmenů viz Tab.5)



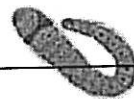
Obr.10 Nitrogenázová aktivita za světla a za tmy u tropických kmenů sinic (nitrogenázová aktivita je uvedena v $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; označení kmenů viz Tab.5)



Obr.11 Nitrogenázová aktivita za světla a za tmy u kmenů sinic z egyptských pouští (nitrogenázová aktivita je uvedena v $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; označení kmenů viz Tab.5)

Tab.5 Nitrogenázová aktivita za světla a za tmy u studovaných kmenů sinic (nitrogenázová aktivita je uvedena v $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ a relativně jako pokles NA za tmy v procentech).

kmen	NA světlo	NA tma	pokles %
A Cal1	201,6	0,0	100,0
A Cal2	200,8	0,0	100,0
A Has1	1445,7	0,0	100,0
A Nos1	36,3	0,0	100,0
A Nos2	3,9	0,0	100,0
A Nos3	3,0	0,0	100,0
A Nos4	197,0	17,2	91,2
A Nos5	62,0	0,0	100,0
C Anab1	235,8	0,0	100,0
C Aul1	368,3	184,8	49,8
C Cal1	22,9	12,7	44,7
C Has1	410,5	89,2	78,3
C Nod1	22,9	0,0	100,0
C Nos1	109,5	0,0	100,0
C Nos2	94,4	0,0	100,0
C Nos3	327,2	30,7	90,6
C Nos4	734,6	125,3	82,9
C Tol1	451,3	282,2	37,5
C Trich1	96,1	0,0	100,0
C Trich2	133,5	0,0	100,0
E Micro1	7773,8	1975,7	74,6
E Nos1	6758,0	1559,9	76,9
E Nos2	2473,0	49,2	98,0
E Scyt1	1391,2	407,7	70,7
E Trich1	2707,2	183,0	93,2
T Fisch1	282,4	73,3	74,1
T Nos1	79,2	0,0	100,0
T Nos2	95,5	0,0	100,0
T Nos3	169,6	5,9	96,5
T Scyt1	462,8	101,5	78,1



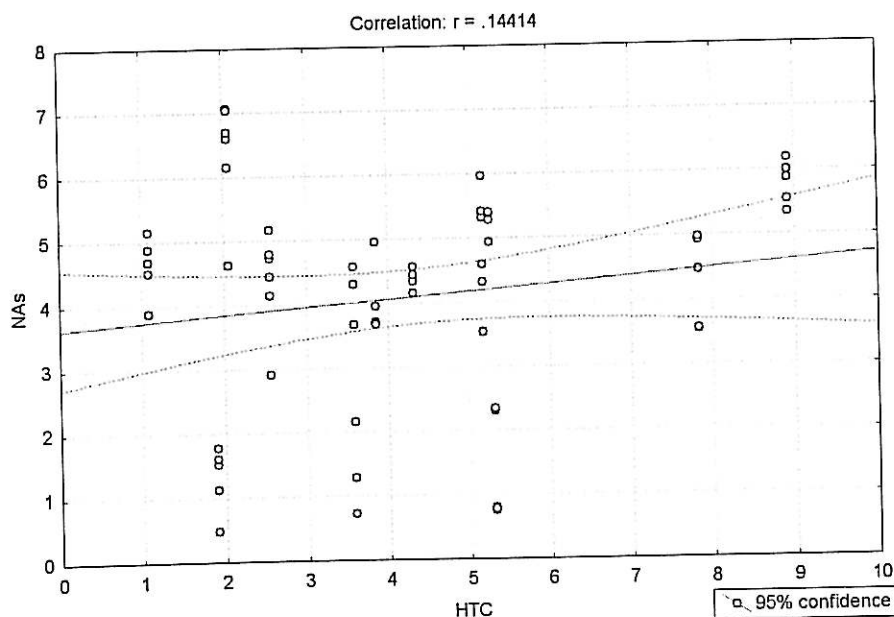
4.4. Závislost nitrogenázové aktivity na frekvenci heterocytů

Závislost nitrogenázové aktivity na frekvenci heterocytů byla zjišťována pouze u sinic r. *Nostoc*. Heterocyty byly počítány celkem u 12 kmenů, z toho u 3 tropických kmenů, 4 kmenů z temperátní zóny a 5 polárních kmenů. Množství heterocytů bylo vyjádřeno jako procentuální zastoupení v celkovém počtu buněk.

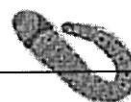
Frekvence heterocytů byly u všech kmenů podobné (1,1 - 8,9 % heterocytů), zatímco jejich nitrogenázová byla velmi variabilní (3,0 - 734,6 nmol C₂H₄ g⁻¹ · h⁻¹) (Tab.6). Závislost NA na počtu heterocytů nebyla prokázána (F= 2,43; p > 0,1) (Obr.12).

Tab.6 Nitrogenázová aktivita (NA; nmol C₂H₄ g⁻¹ · h⁻¹) a frekvence heterocytů (HTC; %) u sinic r. *Nostoc*.

Kmen	NA	HTC
A Nos1	36,3	3,6
A Nos2	3,9	5,3
A Nos3	3,0	1,9
A Nos4	197,0	5,3
A Nos5	62,0	3,9
C Nos1	109,5	1,1
C Nos2	94,4	2,6
C Nos3	327,2	8,9
C Nos4	734,6	2,1
T Nos1	79,2	4,3
T Nos2	95,5	7,8
T Nos3	169,6	5,2



Obr.12 Závislost nitrogenázové aktivity (NA; nmol C₂H₄ g⁻¹ · h⁻¹) na frekvenci heterocytů (HTC; %) u sinic r. *Nostoc*.



4.5. Shrnutí

- Měřitelná nitrogenázová aktivita (NA) byla zjištěna pouze u heterocytózních sinic.
- U všech heterocytózních sinic docházelo k poklesu NA v noci.
- Největší vliv na NA za světla měl morfotyp sinice.
- Vliv oblasti na NA za světla byl průkazný jen pro morfotyp *Nostoc*.
- NA za tmy byla z největší části ovlivněna původem kmene (oblastí).
- Morfotypy sinic se lišily v závislosti NA na biomase.
- NA sinic r. *Nostoc* nebyla závislá na frekvenci heterocytů.



5. Diskuse

5.1. Použití metody ARA

Existuje mnoho metod, jak zjistit míru biologické fixace dusíku (ŠIMEK & ŠANTRŮČKOVÁ 1993). Pro naše experimenty byla vybrána metoda nitrogenázové redukce acetylénu na etylén (ARA).

Podle některých studií může acetylén ovlivnit činnost nitrogenázy. GOBALLAR a HUANG (1992) zjistili, že vzorky preinkubované s acetylénem mají větší nitrogenázovou aktivitu než kontrola bez něj. Při delší inkubaci s acetylénem může docházet k inhibici syntézy nitrogenázy, k urychlení degradace a následně k trvalé inaktivaci nitrogenázy.

Na druhou stranu metoda ARA je snadno dostupná, finančně nenáročná a pro naše účely poměrně vhodná. Rovněž ve studované literatuře byla vždy pro determinaci NA u sinic použita (JAYSANKARI & SHANMUGASUDARAM 1984, BOTO & ROBERTSON 1990, BIRKEMOE & LIENGEN 2000).

5.2. Fixace heterocytózních sinic

Z některých literárních údajů vyplývá, že dusík fixují jak kokální sinice, tak i vláknité typy heterocytózních sinic. V našem případě (viz kapitola 4.) jsme zjistili nitrogenázovou aktivitu pouze u heterocytózních vláknitých sinic. Zdá se, že kokální sinice fixují dusík především v anaerobních podmínkách, čímž chrání svou nitrogenázu před škodlivým působením kyslíku. Anaerobní činnost nitrogenázy byla například zjištěna u kokální sinice r. *Chroococidiopsis*. Podle Fewera a spolupracovníků (FEWER et al. 2002) je *Chroococidiopsis* blízký příbuzný heterocytózních sinic a v prostředí, kde je limitovaný zdroj minerálního dusíku vytváří speciální buňky ("survival cells"), které jsou schopné fixovat dusík.

Aerobní nitrogenázová aktivita jiných jednobuněčných diazotrofních sinic (například r. *Gloeotheca*, *Synechococcus*) byla měřena především *in situ*. V laboratorních podmínkách je velmi obtížné dosáhnout podmínek, které jsou potřebné pro fixaci dusíku za přístupu vzduchu. Cirkadiální rytmus nitrogenázové aktivity kokálních sinic je ovlivněn intenzitou



světla a délkou světelné periody při kultivaci. Při permanentním osvětlení dochází k nepravidelným fluktuacím činnosti nitrogenázy (CHOU et al. 1989). To mohl být jeden z důvodů, proč nebyla NA u kokálních sinic v našich experimentech prokázána.

Neheterocytózní vláknité sinice jsou schopné fixovat dusík za aerobních i anaerobních podmínek. V anaerobním nebo mikroaerobním prostředí je nitrogenáza mnohonásobně aktivnější. Podobně jako v případě jednobuněčných sinic, při permanentním osvětlení kolísá NA neheterocytózních vláknitých sinic. Podle Gallona (GALLON 1989) u laboratorních kultur fluktuuje NA paralelně s respirací a v obrácené fázi k fotosyntéze. V případě r. *Trichodesmium* se v přírodních podmínkách tvoří v kolonii místa ("bundles") umožňující činnost nitrogenázy, nikdy však nebyla taková místa pozorována v laboratoři (BRYCECESON & FAY 1981).

5.3. Nitrogenázová aktivita za světla

Z předchozích studií je zřejmé, že na velikost NA sinic má vliv množství faktorů. NA je ovlivňována dostupností minerálního dusíku, koncentracemi vápníku a boru (GALLON 1978, EL-ZAHRAA & ZAKI 1999), světelným režimem (MULLINEAUX et al. 1981), teplotou (GALLON et al. 1993), fytohormony a jinými biologicky aktivními látkami (MARŠÁLEK et al 1991). Výrazný vliv na činnost nitrogenázy má stav kolonie - přítomnost slizových obalů, pochev a schopnost tvorby agregátů (HROUZEK et al. 2003, 2004).

V našich experimentech jsme studovali NA různých morfotypů sinic a zajímali se také o to, zda NA souvisí s původem kmenů. Výsledky měření NA za světla u kmenů z polárních, tropických a temperátních oblastí ukazují, že nejvyšší aktivitu vykazovaly rody morfotypu *Tolypothrix*: *Hassallia*, *Calothrix* a *Tolypothrix* (Obr. 8-11), což jsou sinice, které vytváří obvykle samostatná vlákna obalená tenkou pochvou. Naopak poměrně nízkou NA měly sinice morfotypu *Nostoc*: r. *Nostoc* a jemu příbuzné rody (např. *Nodularia*, *Trichormus*), které se vyskytují jako povlaky či makrokolonie na substrátu a jejich vlákna jsou často se silným slizovým obalem, který redukuje přísun světla a ovlivňuje difúzi plynů. V případě temperátního kmene r. *Nostoc* (CNos4), jehož hodnota NA byla extrémně vysoká, došlo pravděpodobně k chybě při přípravě vzorků k měření. Plynově chromatografická analýza etylénu je velmi citlivá a jakékoliv nepřesné zacházení se vzorky při experimentech se snadno může odrazit ve výsledku. Vliv oblasti na NA za světla u sinic morfotypu *Nostoc* si vysvětlujeme tak, že tvorba slizových pochev a silných obalů může být korelována

s ekologickými vlastnostmi prostředí. Produkce většího množství extracelulárních sekretů může sinicím polárních oblastí zajišťovat vyšší ochranu proti extrémním podmínkám (teplota, záření aj.), tím však zároveň snižovat fixaci N_2 .

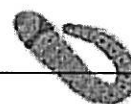
Odlišnost mezi jednotlivými morfotypy sinic nacházíme také v závislosti NA na biomase kultury. Kvadratická závislost tolypotrichoidních sinic odpovídá předchozím studiím zabývajícím se tímto tématem (HROUZEK et al. 2003). Jak již bylo zmíněno, NA sinic je velmi ovlivněna stavem kultury v době měření. Studium životního cyklu *Nostoc muscorum* podle Lazaroffa a Vishniaca (LAZAROFF & VISHNIAC 1961) dokládá množství životních stádií tohoto organismu. Rod *Nostoc* vytváří stádia nediferenciovaných buněk, motilní stádia či stádia jednotlivých vláken s terminálními a interkalárními heterocyty (ovlivněno například intenzitou světelného záření). S určitým životním stádiem souvisí i to, do jaké míry je organismus schopen fixovat molekulární dusík. Této skutečnosti dobře odpovídá vysoká variabilita v naměřených hodnotách NA pro morfotyp *Nostoc*, u něhož jsme nemohli prokázat závislost NA na biomase.

Srovnání naměřených hodnot NA s údaji v literatuře je poměrně obtížné. NA byla v našem případě stanovována na jednotku hmotnosti čerstvé biomasy kultury sinic, na rozdíl od jiných publikací, kde byla biomasa charakterizována množstvím chlorofylu nebo proteinů. NA za světla různých kmenů r. *Nostoc* změřená při našich pokusech přibližně odpovídá hodnotám NA zjištěným Hrouzkem (HROUZEK 2002) po 21 a 42 dnech kultivace (Tab.7).

Tab.7 Porovnání hodnot NA vybraných kmenů r. *Nostoc* s publikovanými výsledky (NA je vyjádřena v $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ sušiny. h}^{-1}$).

Hrouzek (2002)				Tato práce	
kmen	NA (6 dnů) $\mu\text{mol/h C}_2\text{H}_4.\text{g}$	NA (21 dnů) $\mu\text{mol/h C}_2\text{H}_4.\text{g}$	NA (42 dnů) $\mu\text{mol/h C}_2\text{H}_4.\text{g}$	kmen	NA $\mu\text{mol/h C}_2\text{H}_4.\text{g}$
<i>Nostoc musc.</i>	33,0	18,8	4,2	C- <i>Nostoc</i>	0,9
<i>Nostoc musc.</i>	40,1	2,1	6,4	C- <i>Nostoc</i>	1,4
<i>Nostoc calc.</i>	37,6	11,8	3,3	C- <i>Nostoc</i>	13,9
<i>Nostoc ellips.</i>	36,2	22,3	2,3	C- <i>Nostoc</i>	7,9

Jak je patrné z tabulky 7, mladší kultury mají obecně vyšší specifickou NA. Na základě těchto poznatků jsme museli vyloučit studované egyptské kmeny sinic ze statistické analýzy, neboť měření jejich NA probíhalo po kratší kultivační době než měření NA u ostatních kmenů. Během experimentů jsme se sice snažili maximálně optimalizovat a sjednotit



všechny podmínky, avšak pouštní kmeny rostly rychleji a vytvořily dostatečné množství inokula (odpovídající měsíc starým kulturám ostatních kmenů) už během 1-2 týdnů.

5.4. Nitrogenázová aktivita za tmy

Z výsledků vyplývá, že u všech sinic, u nichž byla naměřena nitrogenázová aktivita, docházelo k jejímu poklesu za tmy. Obecně dochází ke snížení nitrogenázové aktivity kvůli nedostatku redukčních činidel generovaných během fotosyntézy (ERNST & BÖHME 1984).

Statistické analýzy ukázaly, že na velikost NA za tmy měla největší vliv oblast, ze které byla sinice izolována. Ve většině případů temperátní a tropické kmeny snížily za tmy svou NA přibližně na 20 % aktivity za světla. Antarktické kmeny za tmy zastavily činnost nitrogenázy úplně. Domníváme se, že 100 % pokles NA je důsledkem adaptace na střídání polárního dne a noci. Během polárního dne probíhá u sinic intenzivní fotosyntéza a dochází tak k akumulaci produktů nutných pro energeticky náročnou fixaci. Naopak při polární noci je omezen přísun těchto látek a sinice si nemohou dovolit dusík fixovat. Temperátní kmeny se rovněž musejí v noci vypořádávat s nižším přísunem energie, ta je ale za cca 8-12 hodin opět načerpána obnovením fotosyntézy. U antarktických kmenů se v důsledku dlouhé absence fotosyntézy činnost nitrogenázy rychle zastaví a zbývající energie může být investována na fungování bazálního metabolismu nebo na tvorbu přežívajících diaspór.

Stejně tak tropické sinice přizpůsobují fixaci dusíku ekologickým podmínkám prostředí. V tropech jsou kmeny vystaveny neustálým změnám přísunu vody. Dostatek vláhy bývá ve večerních hodinách a přes noc. JONES (1989) studoval tropický druh *Nostoc commune* a zjistil, že hydratovaný kmen jeví výrazně vyšší NA než suchá kolonie. Poměrně vysoké hodnoty NA za tmy byly naměřeny i u dvou našich tropických kmenů.

Nejvyšší činnost nitrogenázy za tmy (mimo egyptských pouštních kmenů) byla pozorována u temperátního kmene r. *Tolypothrix* (CT011), který rovněž dosahoval maximálních hodnot NA za světelných podmínek. Vysoká NA může v tomto případě souviset s původem kmene. Kmen CT011 byl izolován ze sokolovských výsypek, což je oblast, jejíž substrát má oligotrofní charakter. Prísun minerálního dusíku je velice omezen a kmeny jsou v takovém prostředí nuceny využívat jiné alternativy pro příjem dusíku tj. asimilovat molekulární dusík ze vzduchu. Také Hrouzek et al. (2004) dokládají vliv prostředí na míru nitrogenázové aktivity.



5.5. Závislost NA na frekvenci heterocytů

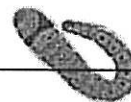
Zatímco velikost NA se u sinic r. *Nostoc* velmi lišila a pohybovala se mezi 3,0 - 734,6 nmol C₂H₄ g⁻¹ · h⁻¹, frekvence heterocytů byla u všech téměř konstantní (cca 5 %). Výsledky pokusů potvrzují předchozí studie (viz HROUZEK 2002), v nichž nebyla prokázána závislost NA na počtu heterocytů. FINDLAY et al. (1994) dokládají závislost NA na frekvenci heterocytů. Ve svém projektu se narodil od této práce věnovali studiu planktonních sinic a vztahovali celkovou NA ekosystému na společenstvo. Je zřejmé, že pokud je v prostředí víc heterocytózních sinic, kteří jsou významnějšími fixátory, pak NA koreluje s počtem heterocytů.

6. Závěry

V předložené práci jsme metodou nitrogenázové redukce acetylénu na etylén zjišťovali schopnost biologické fixace molekulárního dusíku různých morfotypů půdních sinic z několika různých geografických oblastí. Podařilo se nám změřit a prokázat nitrogenázovou aktivitu (NA) pouze u heterocytózních sinic. Právě ty jsou jedny z nejvýznamnějších fixátorů, kteří se podílejí na celkovém toku dusíku v biosféře.

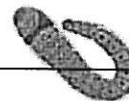
Zjistili jsme, že klíčový význam pro velikost NA za světla má morfologie sinice. Pokud se u zkoumaného kmene nevyskytují silné slizové obaly, dosahuje NA vyšších hodnot. U morfotypu *Nostoc* má na velikost NA vliv geografická oblast původu. V důsledku sníženého přísunu energie pro metabolismus dochází u všech heterocytózních sinic k poklesu NA za tmy. Velikost poklesu a velikost NA za tmy je nejvíce ovlivněna oblastí, z níž je sinice izolována. Antarktické kmeny sinic zastavují ve tmě svou NA úplně, což je pravděpodobně způsob adaptace na podmínky prostředí. Sinice tropického a mírného pásu snižují v temnostních podmínkách NA přibližně na pětinu.

Závislost NA na biomase kultury se liší mezi různými morfotypy sinic. Vynesená kvadratická závislost (NA na biomase) u morfotypu *Tolypothrix* odpovídá předchozím studiím. NA morfotypu *Nostoc* vykazuje velkou variabilitu, proto jsme nebyli schopni závislost definovat. Na základě získaného souboru dat je zřejmé, že nitrogenázová aktivita není přímo závislá na frekvenci heterocytů.

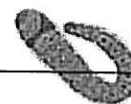


7. Literatura

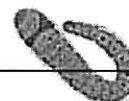
- ADAMS, D.G. & DUGGAN, P.S. (1999): Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. - *New Phytol.* 144, Transley Review No. 107: 3-33.
- BIRKEMOE, T. & LIENGEN, T. (2000): Does collembolan grazing influence nitrogen fixation by cyanobacteria in the high Arctic? - *Polar. Biol.* 23: 589-592.
- BOOTH, W.E. (1941): Algae as pioneers in plant succession and their importance in erosion control. - *Ecology* 22: 38-46.
- BOTO, K.G. & ROBERTSON, A.I. (1990): The relationship between nitrogen fixation and tidal exports of nitrogen in a tropical mangrove system. - *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 31: 531-540.
- BRYCESON, I. & FAY, P. (1981): Nitrogen fixation in *Oscillatoria (Trichodesmium) erythraea* in relation to bundle formation and trichome distribution. - *Mar. Biol.* 6: 159-166.
- DILWORTH, M.J. & GLENN, A.R. (1991): Biology and Biochemistry of nitrogen fixation: A look forward. - In: DILWORTH, M.J. & GLENN, A.R. (eds.): *Biology and Biochemistry of nitrogen fixation, Studies in plant science (1)*, p. 1-8, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, Tokyo.
- EL-ZAHRAA, F. & ZAKI, T. (1999): Effect of boron and calcium on growth and nitrogen fixation of the blue-green alga *Calothrix parietina*. - *Folia Microbiol.* 44: 201-204.
- ERNST, A. & BÖHME, H. (1984): Control of hydrogen-dependent nitrogenase activity by adenylase and electron flow in heterocysts of *Anabaena variabilis* ATCC-29413. - *Biochim. Biophys. Acta* 767: 362-368.
- FAY, P. ed. (1983): *The Blue Greens*. - *Studies in Biology* 160. - 84 pp., The Camelot Press Ltd, Southampton.
- FAY, P., STEWART, W.D.P., WALSHBY, A.E. & FOGG, G.E. (1968): Is the heterocyst the site of nitrogen fixation in blue-green algae? - *Nature* 220: 810-812.
- FEWER, D., FRIEDL, T. & BÜDEL, B. (2002): *Chroococcidiopsis* and Heterocyst-differentiating Cyanobacteria are each other's closest living relatives. - *Mol. Phyl. Evol.* 23: 82-90.
- FINDLAY, D.L., HECKY, R.E., HENDZEL, L.L., STANTON, M.P. & REGEHR, G.W. (1994): Relationship between N₂-fixation and heterocyst abundance and its relevance to the nitrogen budget of Lake 227. - *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51: 2254-2266.
- FRITSCH, F.E. (1945): *Structure and reproduction of algae, II*. - 939 pp., Cambridge University Press, Cambridge.



- GALLON, J.R. (1978): Calcium and nitrogen fixation by *Gloeocapsa*. - Environ. role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria. - Ecol. Bull. (Stockholm): 60-68.
- GALLON, J.R. (1989): The physiology and biochemistry of N₂-fixation by non-heterocystous cyanobacteria. - Phycos 28: 18-46.
- GALLON, J.R., PEDERSON, D.M. & SMITH, G.D. (1993): The effect of temperature on the sensitivity of nitrogenase to oxygen in the cyanobacteria *Anabaena cylindrica* (Lennermann) and *Gloeotheca* (Nägeli). - New Phytol. 124: 251-257.
- GEITLER, L. (1932): Cyanophyceae. - In: Rabenhorst's kryptogramen flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 14: 1-1196, Acad. Verlagsges., Leipzig.
- GOLDEN, J.W. & YOON, H. (1998): Heterocyst formation in *Anabaena*. - Cur. opin. in Microbiol. 1: 623-629.
- GRAHAM, L.E. & WILLCOX, L.W. eds. (2002): Algae. - 640 pp., Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River.
- GOBALLAR, N. & HUANG, T.C. (1992): Acetylene pre-incubation effect on the nitrogenase activity of *Synechococcus* RF-1. - J. Plant Physiol. (139): 274-278.
- HARDY, R.W.G., BURNS, R.C. & HOLSTEN, R.D. (1973): Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. - Soil Biol. Biochem. 5: 47-81.
- HINDÁK, F. ed. (1978) - Sladkovodné riasy. - 776 pp., SPN, Bratislava.
- HINDÁK, F. ed. (2001): Fotografický atlas mikroskopických siníc. - 128 pp., VEDA, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava.
- HROUZEK, P. (2002): Nitrogenázová aktivita a morfológie šesti vybraných kmenů vláknitých siníc rodu *Nostoc*. - 14 pp., BF JCU, České Budějovice.
- HROUZEK, P., ŠIMEK, M. & KOMÁREK, J. (2003): Nitrogenase activity (acetylene reduction activity) and diversity of six soil *Nostoc* strains. - Arch. Hydrobiol. Suppl. 146 (Algological studies 108): 87-101.
- HROUZEK, P., LUKEŠOVÁ, A. & ŠIMEK, M. (2004): Comparison of light and dark nitrogenase activity in selected soil cyanobacteria. - Folia Microbiol. 49: 435-440.
- CHOU, H., CHOW, T., TU, J., WANG, H., CHOU, H. & HUANG, T. (1989): Rythmic nitrogenase activity of *Synechococcus* sp. RF-1 established under various light dark cyclus. - Bot. Bull. Academia Sinica 30: 291-296.
- JAYSANKARI, N. & SHANMUGASUNDARAM, S. (1984): Nitrogen fixation by *Nostoc* strains. - Proc. Indian Acan. Sci. (Plant Sci) 94: 59-64.
- JONES, K. (1989): Interactions between desiccation and dark nitrogen fixation in tropical *Nostoc commune*. - New Phytol. 113: 1-6.



- KARL, D., MICHAELS, A., BERGMAN, B., CAPONE, D., CARPENTER E., LETELIER R., LIPSCHULTZ F., PAERL H., SIGMAN D. & STAL L. (2002): Dinitrogen fixation in the world's oceans. - *Biogeochemistry* 57:47-98.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1986): Modern approach to the classification system of cyanophytes, Chroococcales (2). - *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 73,2 (Algalogical studies 43): 157-226.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1988): Modern approach to the classification system of cyanophytes, Oscillatoriales (3). - *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 80 (Algalogical studies 50-53): 327-472.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1989): Modern approach to the classification system of cyanophytes, Nostocales (4). - *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 82,3 (Algalogical studies 56): 247-345.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1990): Modern approach to the classification system of cyanophytes, Stigonematales (5). - *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 86 (Algalogical studies 59): 1-73.
- LAZAROFF, N. & VISHNIAC, W. (1961): The effect of light on the developmental cycle of *Nostoc muscorum*, a filamentous blue-green alga. - *J. gen. Microbiol.* 25: 365-374.
- LEE, R. E. ed. (1989): *Phycology*. - 645 pp., Cambridge University Press, Cambridge.
- LIENGEN, T. (1999): Conversion factor between acetylene reduction and nitrogen fixation in free-living cyanobacteria from high arctic habitats. - *Can. J. Microbiol.* 45: 223-229.
- LUKEŠOVÁ, A. (1989): *Ekologie řas v půdách různě starých sukcesních stádií*. - 143 pp., ÚPB ČSAV, České Budějovice.
- LUND, J.W.G. (1962): Soil algae. - In: LEWIN, R.A. (ed.): *Physiology and biochemistry of algae*, p. 757-770, Academic Press, New York, London.
- MARANTHE, K.V. (1972): Role of some blue-green algae in soil aggregation. - In: DESIKACHARY, T.V. (ed.): *Taxonomy and biology of blue-green algae*, p. 328-331, University of Madras, New Delhi.
- MARŠÁLEK, B., ŠIMEK, M. & LUKEŠOVÁ, A. (1991): The effect of phytohormones on nitrogenase activity and growth of *Nostoc muscorum* Agardh. - In: POLSINELLI, M., MATERASSI, R. & VINCENZINI, M. (eds.): *Nitrogen fixation*, p. 529-530, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- MEEKS, J.C. (1998): Symbioses between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants. - *BioScience* 48: 226-276.
- MULLINEAUX, P.M., GALLON, J.R. & CHAPLIN, A.E. (1981): Acetylene reduction (nitrogen fixation) by cyanobacteria growth under alternating light-dark cycle. - *FEMS Microbiol. Lett.* 10: 245-247.



R DEVELOPMENT CORE TEAM (2004): R: A language and environment for statistical computing. - R Founding for Statistical. Computing, Vienna, Austria, viz: <http://www.R-project.org>.

STATSOFT, INC. (2001): STATISTICA (data analysis software system), version 6., viz: www.statsoft.com.

RIPPKA, R., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M. & STANIER, R.Y. (1979): Generic assignment, strain history and properties of pure cultures of cyanobacteria. - J. gen. Microbiol. 111: 1-61.

ROGER, P.A. (1995): Biological N₂-fixation and its management in wetland rice cultivation. - Fertil. Research 42: 261-276.

SILVESTER, W.B. & WINSHIP, L.J. (1990): Transient responses of nitrogenase activity to acetylene and oxygen in actinorhizal nodules and cultured *Frankia*. - Plant Physiol. 92: 480-486.

SÖDERBÄCK, E., LINDBLAD, P. & BERGMAN, B. (1990): Developmental patterns related to nitrogen fixation in the *Nostoc-Gunnera magellanica* Lam. symbiosis. - Planta 182: 355-362.

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.

STEIBERG, C.E.W., SCHAFFER, H. & BEISKER, W. (1998): Do acid-tolerant cyanobacteria exist? - Acta hydrochim. hydrobiol. 26: 13-19.

ŠIMEK, M. (1993): Nitrogenáza-unikátní enzym fixátorů N₂ - Biol. listy 58: 241-258.

ŠIMEK, M. (2003): Základy nauky o půdě. 3. Biologické procesy a cykly prvků. – 151 pp., BF JCU, České Budějovice.

ŠIMEK, M. & ŠANTRŮČKOVÁ, H. (1993): Metody studia fixace N₂. - In: Metody studia přeměn dusíku v půdě, sborník příspěvků ze semináře., p. 45-63, ÚPB AV ČR, České Budějovice.

TIWARI, D.N., KUMAR, A. & MISHRA A.K. (1991): Use of cyanobacterial diazotrophic technology in rice agriculture. - Appl. Biochem. Biotech.: 387-396.

WOLK, C.P., ERNST, A. & ELHAI, J. (1994): Heterocyst metabolism and development. - In: BRYANT, D.E. (ed.): The molecular biology of cyanobacteria, p. 509-515, Kluwer Academic Dordrecht, The Netherlands.

ZEHR, J.P., WATERBURY, J.B., TURNER, P.J., MONTOYA, J.P., OMOREGIE, E., STEWARD, G.F., HANSEN, A. & KARL, D.M. (2001): Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. - Nature 412: 635-638.