

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Biologická fakulta



Bakalářská práce

**Odolnost půdních řas z různých  
geografických oblastí k hlubokému  
zmrazení**

Jakub Žárský

Vedoucí práce: RNDr. Jan Kaštovský, PhD.

Konzultanti: Ing. Alena Lukešová, CSc.

Mgr. Pavel Hrouzek

České Budějovice, 2005

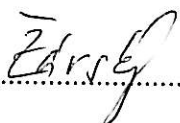
ŽÁRSKÝ, J., 2005: Odolnost půdních řas z různých geografických oblastí k hlubokému zmrazení. [Resistance of soil algae from different geographic regions to deep freezing. – Bc. thesis, in Czech] – 28 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## Anotace:

The survival of deep freezing in liquid nitrogen was tested on 27 strains of eucaryotic algae from polar and tropical regions. An attempt to isolate algal strains from soil samples was realized.

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

V Českých Budějovicích, 9. 5. 2005

.....  


## Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří mi při řešení této práce jakkoli pomohli. Protože je těchto lidí hodně, budu jmenovat pouze tři. Děkuji mému školiteli Janu Kaštovskému za to, že se mne ujal, za cenné rady a pomoc, kterou mi při vypracování této práce poskytl. Dále děkuji Aleně Lukešové za její trpělivost, obětavost a metodické i materiální zázemí, které mi pro práci poskytla. Na konec chci poděkovat Pavlu Hrouzkovi za motivující rady a obětavou pomoc při zpracování výsledků.

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	1
1.1 Kryoprezervace .....	1
1.2 Využití kryoprezervace .....	1
1.3 Negativní vliv mrazu na buňky .....	2
1.3.1 Osmotický stres .....	2
1.3.2 Mechanický stres .....	2
1.3.3 Chemický stres .....	3
1.4 Způsoby, kterými se zvyšuje efektivita kryoprezervace .....	3
1.4.1 Kryoprotektanty .....	4
1.4.2 Dynamika zamrazení .....	4
1.5. Metody měření viability .....	4
1.5.1 Fluorescein diacetát .....	5
1.5.2 Colony forming units (CFU) .....	5
1.6. Význam poznatků o kryoprezervaci při studiu organismů v přírodě .....	6
1.7 Cíle práce .....	7
<b>2 Materiál</b> .....	7
2.1 Kmeny ze sbírky .....	7
2.2 Vlastní izoláty .....	7
<b>3 Metodika</b> .....	8
3.1 Odběr a uchování půdních vzorků .....	8
3.2 Čištění kmenů .....	9

3.3 Kultivace .....	9
3.4 Příprava suspense .....	10
3.5 Metodika zamrazení .....	10
3.6 Metodika měření viability pomocí barvení FDA .....	10
3.7 Měření viability metodou CFU .....	11
3.7.1 Měření density suspense .....	11
3.7.2 Ředící řady a vyhodnocení .....	11
3.8 Statistické zpracování dat .....	12
<b>4 Výsledky .....</b>	<b>13</b>
4.1 Testování schopnosti přežít hluboké zmrznutí .....	13
4.1.1 Srovnání kmenů z polární a tropické oblasti v rámci jednotlivých rodů .....	14
4.1.2 Srovnání rozdílů v přežívání mezi rody .....	18
4.1.3 Testování vlivu dalších parametrů kultur na přežívání .....	19
4.2 Izolace z půdních vzorků .....	21
<b>5 Diskuse .....</b>	<b>21</b>
5.1 Mrazení .....	21
5.2 Měření viability .....	23
5.3 Statistické vyhodnocení .....	23
5.4 Izolace kmenů z půd .....	24
<b>6 Závěr .....</b>	<b>24</b>
<b>7 Literatura .....</b>	<b>26</b>



# 1 Úvod

Tato práce se zabývá schopností eukaryontních půdních řas přežít hluboké zmrazení v tekutém dusíku (-196°C) a srovnáním této schopnosti u kmenů izolovaných z půd tropických a polárních oblastí.

Jak otázky kladené v této práci, tak i její metodika se vztahují k rozsáhlému a všestranně biologicky zajímavému tématu kryoprezervace.

## 1.1 Kryoprezervace

Kryoprezervací se rozumí dlouhodobé uchování buněčných suspensí, tkání či orgánů v hluboce zmrzlém stavu. Teplota, pod kterou se zastavují všechny biochemické pochody v buňce a pod níž lze mluvit o kryoprezervaci v pravém slova smyslu, je -40 °C (TAYLOR & FLETCHER 1999).

Pravděpodobně nejpobulárnějším případem kryoprezervace se stalo úspěšné dlouhodobé uchování šavlozubé veverka, zamrzlé v ledovém masivu, v animovaném filmu Ice Age (WEDGE & SALDANHA 2002). Ve skutečnosti se však daří uchovávat životaschopné biologické materiály maximálně do úrovně organizační složitosti semen rostlin či jejich dělivých pletiv a orgánů vegetativního rozmnožování (WALTERS et al. 2004, KIM et al. 2002) nebo blastul obratlovců včetně lidských (HUANG et al. 2005). Nejběžnější materiály, k jejichž uchování se využívá kryoprezervace, zahrnují především jednobuněčné mikroorganismy jako bakterie, kvasinky (BOND 1995), sinice, řasy (BODAS et al. 1995) a gamety a kmenové buňky či blastocysty mnohobuněčných organismů (TIER et al. 2005). Vysoce diferencované orgány a tkáně kvůli jejich vysoké komplexitě vztahů mezi buňkami kryoprezervovat nelze, protože již velmi malý pokles viability buněk vážně naruší funkční integritu orgánu či tkáně.

## 1.2 Využití kryoprezervace

Kryoprezervace nabízí jednoduchý a praktický způsob dlouhodobého uchování životaschopného biologického materiálu. Na rozdíl od uchovávání buněk za kultivačních podmínek, které je pracné i nákladné, stačí skladovat dostatečné množství inokula, které lze v případě potřeby rozmrazit a kultivovat do požadovaného množství.

Uchování DNA přímo ve zmrazených buňkách se zdá být bezpečnější z hlediska jejího poškození (HARDING 2004). Existuje však studie frekvence mutací určitých úseků mitochondriální DNA blastomer zebřičky (*Danio rerio*) uvádějící průkazně vyšší frekvenci mutací u blastomer zamražených než u blastomer uchovaných v identickém médiu

při pokojové teplotě (KOPEIKA et al. 2005). Ukazuje se tedy, že hluboké zamrazení může pravděpodobně mít mutagenní účinek. Avšak v porovnání se změnami, ke kterým v kulturách dochází při dlouhodobé kultivaci, jsou případné mutace vzniklé při kryoprezervaci zanedbatelné.

### 1.3 Negativní vliv mrazu na buňky

Nízká teplota ovlivňuje buňku přímo či nepřímo v mnoha směrech. Znamená pro ni jak stres spojený se samotným poklesem teploty, tedy především narušení redoxního transportu elektronů v mitochondriích a celkové zpomalení a dezintegrace metabolismu (PETRENKO 1990, SHERMAN 1972), tak při zamrznání i ztrátu vody v tekuté fázi (osmotický stres) a mechanický stres spojený s tvorbou ledových krystalů vně buněk nebo v cytoplasmě. Spolupůsobení ztráty vody a tvorby krystalů ledu shrnuje v tzv. hypotéze dvou faktorů MAZUR et al. (1972).

#### 1.3.1 Osmotický stres

Tvorba krystalů v okolním médiu probíhá dříve než v buňce, je v něm totiž, v porovnání s vnitřním prostředím buňky, výrazně nižší koncentrace rozpuštěných látek. Během tvorby krystalické mřížky, při které mají molekuly vody tendenci vázat se kvůli svým geometrickým vlastnostem snáze s jinými molekulami vody než s molekulami rozpuštěných látek, dochází k vytěšňování rozpuštěných látek mimo krystaly. Tím dochází ke zvyšování koncentrace těchto látek v tekuté fázi média přímo úměrně s jejím úbytkem (tvorbou krystalů). V této fázi jsou tedy buňky vystaveny značnému osmotickému stresu, dochází u nich ke ztrátě vody a zmenšení objemu (HARMISON et al. 1998, RAYMOND & KNIGHT 2003).

#### 1.3.2 Mechanický stres

Další faktor, který výrazně ovlivňuje přežití buňky při zamrznutí, je velikost tvořících se krystalů, která je tím větší, čím déle trvá zamrznání. Krystaly způsobují poškození cytoplasmatické membrány, případně i mitochondriálních nebo chloroplastových membrán.

K růstu krystalů s letálními následky pro buňku může rovněž dojít během pomalého rozmrazání. V této souvislosti je zajímavé uvést příklad aktivity IBP proteinů (ice-binding proteins) zkoumaných ve studii, kterou provedli RAYMOND & KNIGHT (2003) na antarktických rozsivkách z ledových ker. Tyto extracelulárně vylučované proteiny mají výraznou schopnost vázat se na vznikající ledové krystaly a bránit jejich dalšímu zvětšování.

Autoři měřili viabilitu rozsivek po dvacetihodinovém cyklu zmrznutí a rozmrznutí (nejnižší teplota v něm dosáhla  $-5^{\circ}\text{C}$ ) a zjistili, že v přítomnosti IBP proteinů byla o 15-29 % vyšší. Následný výzkum ukázal, že IBP izolované z *Navicula glaciei* mají schopnost výrazně snížit poškození erytrocytů při mrazení (KANG & RAYMOND 2004).

Rychlost vzniku intracelulárního ledu je výrazně ovlivněna kontaktem jednotlivých buněk a kontaktem buněk s pevnými povrchy, jsou-li fixovány. Buňky v suspensi, kde jsou tyto interakce omezeny na minimum, přežívají lépe než při jiných experimentálních uspořádáních (ACKER et al. 1999).

### 1.3.3 Chemický stres

Velmi důležitý a často podceňovaný faktor, působící negativně na životaschopnost buněk, je uvolňování toxických látek z mrtvých buněk, které při vyšší densitě suspence mohou letálně působit i na přeživší buňky (BRAND & DILLER 2004).

Při rozmrznání buněk dochází k dezintegraci metabolických aktivit různých enzymů, dochází tak k uvolňování chemických radikálů a tím k poškození buňky.

Srovnáním antioxidační aktivity a schopnosti přežít zmrazení u *Euglena gracilis* a *Haematococcus pluvialis* bylo zjištěno, že *Haematococcus pluvialis*, jakožto druh velmi odolný vůči vymrznutí, má výrazně lépe koordinovanou antioxidační odpověď metabolismu na zmrazení. Zvláštní důraz byl kladen na souhru aktivit superoxid dismutázy a glutathion reductázy. Tato koordinace enzymových aktivit má značný vliv na schopnost buněk přežít zmrazení (FLECK et al. 2003).

## 1.4 Způsoby, kterými se zvyšuje efektivita kryoprezervace

Hlavním problémem, který kryoprezervaci některých materiálů ztěžuje (nebo dokonce znemožňuje), je vysoká citlivost k zamrazení. Ve všech skupinách organismů existují organismy, které kryoprezervací uchovávat nelze. Řadu dalších však ve zmrazeném stavu lze uchovávat, pokud byl použit speciální režim zamrazení nebo některý z široké škály kryoprotektantů.

## 1.4.1 Kryoprotektanty

Kryoprotektanty jsou v obecném smyslu látky pomáhající buňkám přežít zamrznutí. Kryoprotektantů existuje široká škála. Pouze menší část z nich však našla obecné využití. Mezi nejčastěji používanými a zároveň nejúčinnějšími kryoprotektivy jsou například: dimethylsulfid, methanol, ethylenglykol, propylenglykol, serum albumin a sladový výtažek.

Kryoprotektiva lze klasifikovat podle rychlosti, kterou pronikají buněčnou stěnou. Mezi rychlá patří například methanol, mezi pomalá glycerol. Některá kryoprotektiva (jde zejména o velké molekuly polysacharidů nebo bílkovin) působí extracelulárně nebo pronikají pouze buněčnou stěnou, ne však cytoplasmatickou membránou. Podrobné shrnutí problematiky kryoprotektiv v mikrobiologii podává HUBÁLEK (2003).

Kuriózním případem kryoprotektiva je použití cenobií *Volvox globator* pro kryoprezervaci lidských spermií. Spermie byly mikromanipulační metodou injikovány do nitra cenobia a zamrazeny. Nejméně 60% spermií mělo po rozmrazení zachovanou motilitu (JUST et al. 2004).

## 1.4.2 Dynamika zmrazení

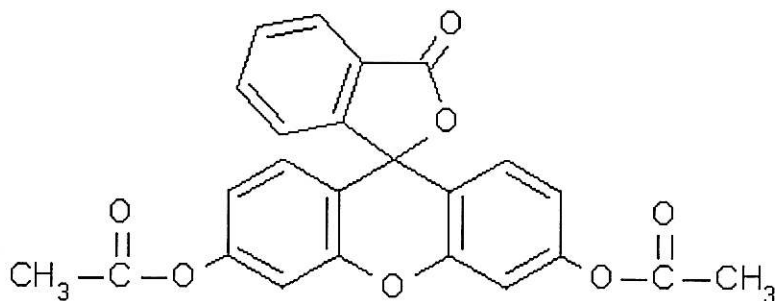
Pro úspěšnou kryoprezervaci je velmi důležitá rychlost, jakou zamrazení probíhá. Existují v podstatě dva základní přístupy, od kterých se odvozují další. Při pomalém mrazení postupně roste osmotický potenciál tekuté fáze média a buňka má čas na něj reagovat ztrátou vody, což pro ni sice znamená stres, vyhne se tak ale tvorbě intracelulárního ledu. Při velmi rychlém zmrazení dochází k tvorbě intracelulárního ledu, krystaly jsou však tím menší, čím rychlejší je zmrazení. S poklesem velikosti krystalů klesá riziko, že dojde k porušení cytoplasmatické membrány a membrán kompartmentů buňky (DAY 2004).

## 1.5 Metody měření viability

Pro vyhodnocení pokusů, které mají za cíl zjistit vliv zmrazení na buňky, je velmi důležité stanovení viability. Pro zjištění poměru živých a mrtvých buněk v suspensi je používáno široké spektrum metod, které se liší kritérii, kterými je vymezena životaschopnost buňky, a mohou tedy podávat odlišné výsledky. Z tohoto důvodu v této práci byly použity metody dvě.

### 1.5.1 Fluorescein diacetát

V současnosti se používá řada barviv, která se k buněčné suspensi přidají v nonfluorescentní formě, která reaguje s některou látkou, charakteristickou pro aktivní životní procesy v buňce (zpravidla jde o určitý typ enzymu), na fluorescentní produkt, který tak označí živé buňky. Jedním z běžně používaných barviv tohoto typu je fluorescein diacetát (FDA).



Obr.1: Molekula fluorescein diacetátu (FDA, sumární vzorec:  $C_{24}H_{16}O_7$ ). Odštěpením obou acetátů přechází na fluorescentní formu.

FDA reaguje s esterázami přítomnými v buňkách i v okolním médiu a po odštěpení acetátů se projeví ve fluorescenčním mikroskopu zářivě žlutozelenou barvou. V buňkách s intaktní cytoplasmatickou membránou se barvivo hromadí a jsou tak zvýrazněné vedle buněk, které mají membránu narušenu (AMANO et al. 2003).

Výhody měření viability s pomocí FDA tkví především v jednoduchosti provedení. Změření jednoho vzorku trvá řádově minuty a obarvené preparáty lze fotografovat. Hlavní nevýhodou (kromě ceny barviva a nutnosti použít fluorescenční mikroskop) je to, že nefunguje na všechny taxony řas. Pro každý kmen je tedy třeba testovat důvěryhodnost dat, která metoda dává, nějakou další metodou. Fotografie je ztížena tím, že barvivo se ve fluorescenčním osvětlení rychle rozkládá a je nutno fotografovat rychle. Podle CLARKE et al. (2001) mohou výsledek měření ovlivnit i určité složky média.

### 1.5.2 Colony forming units (CFU)

Jde o klasickou a - před příchodem fluorescentních barviv - široce používanou metodu pro stanovení viability v mikrobiologii. Kritériem viability buňky je zde schopnost buněk se dělit a vytvořit kolonii. Princip metody spočívá ve stanovení density suspence a její zředění o určitý počet řádů tak, aby ve výsledné suspensi byla densita buněk řádově v desítkách buněk na ml.



Přesně stanovený objem takto zředěné suspence je pak vyset na agarovou plotnu a po kultivaci se porovnává počet vyrostlých kolonií s teoretickým počtem vysetých buněk.

Hlavní výhodou této metody je logické kritérium viability: schopnost dělit se a utvořit kolonii. Jsou tak vyřazeny buňky, které by sice při měření jinou metodou mohly vykazovat charakteristiky vlastní živým buňkám, byly by však už v natolik špatné kondici, že by nebyly schopné dělení.

Metodu lze aplikovat na široké spektrum druhů řas. Základními předpoklady pro její použití jsou: možnost kultivace daného kmenu a kvalitní suspence, kde buňky netvoří shluky (kolonie by pak nevznikala z jedné buňky). Problematické jsou vláknité druhy a druhy tvořící balíčky buněk nebo jakkoli jinak agregované. Po praktické stránce je metoda náročná na provedení (přesné ředící řady, zachování sterility práce) a časově náročná vzhledem k délce kultivace, nutné pro tvorbu kolonií. Ta se může pohybovat i v řádu týdnů. Metoda je velmi náchylná k chybám v provedení. Chyba v kterémkoli kroku ředění suspence může výslednou koncentraci buněk v inokulu změnit i o řády.

## 1.6. Význam poznatků o kryoprezervaci při studiu organismů v přírodě

V současné době je známo, že v oblastech permafrostu jsou ve velkých hloubkách sedimentů zamrzlá společenstva viabilních organismů (GILICHINSKY et al. 1992). Životoschopné mikroorganismy jsou i hluboko pod povrchem ledovců (SKIDMORE et al. 2000). S věkem zamrzlých životoschopných společenstev mikroorganismů se mění jejich složení, přičemž většina eukaryotních organismů přežívá maximálně do tisíců let. Viabilní spory hub a aktinomycety se však podařilo izolovat i z antarktického permafrostu starého až 3 miliony let (KOCHKINA et al. 2001).

Tato problematika je v současnosti velmi populární vzhledem k tomu, že podobně si lze představit případné uchování živých organismů (nebo alespoň stop jejich dřívější existence) např. v podmínkách Marsu. I pro ekosystém Země je však tato skutečnost důležitá, protože v této formě mohou organismy přežívat i tisíce nebo miliony let, vytržené z kontextu ekosystému „venku“, a jde pravděpodobně o vůbec nejstarší živé organismy na Zemi.

## 1.7 Cíle práce

Hlavní cíle práce jsou tyto: Shromáždit dostupnou literaturu, týkající se tématu kryoprezervace řas, a další související problematiky, např. měření viability buněk. Dále zjistit zda existují rozdíly v přežívání hlubokého zamrazení u tropických a polárních kmenů půdních řas. Především tedy sestavit porovnatelné sady kmenů ze sbírek, jejichž původ leží v polární a v tropické oblasti, kultivace těchto kmenů, zamrazení v tekutém dusíku a srovnání jejich viabilit před a po zamrazení. Následně zhodnotit, zda existují rozdíly mezi řasami z obou uvedených oblastí v jejich schopnosti vymrznutí přežít. Dále izolovat kmene půdních řas z dodaných půdních vzorků a srovnání jejich schopnosti přežít hluboké zmrazení se srovnatelnými kmeny ze sbírek, které jsou již po dlouhou dobu kultivovány za standardních podmínek a nejsou vystavovány zátěži, kterou podstupují řasy žijící v přírodě.

## 2 Materiál

### 2.1 Kmeny ze sbírky

Většina kmenů použitých k mrazení pochází ze sbírky půdních řas Ústavu půdní biologie Akademie věd ČR, spravované Alenou Lukešovou. Půdní vzorky, z kterých byly izolovány polární kmene řas, v Antarktidě nasbíral a dovezl Josef Ester. Izolaci a determinaci kmenů provedla Alena Lukešová. Polárních kmenů bylo vybráno celkem 17, zahrnujících 6 rodů.

Tropická sada kmenů půdních řas pochází rovněž ze sbírky Aleny Lukešové a jejich původ je v Brazílii, odkud půdní vzorky dovezl prof. Jiří Komárek. Izolaci a determinaci kmenů provedla rovněž Alena Lukešová. Bylo z nich vybráno 10 kmenů, zahrnujících 6 rodů.

Kódy, specifikující konkrétní kmene jsou uvedeny v tabulce výsledků (Tab. 1).

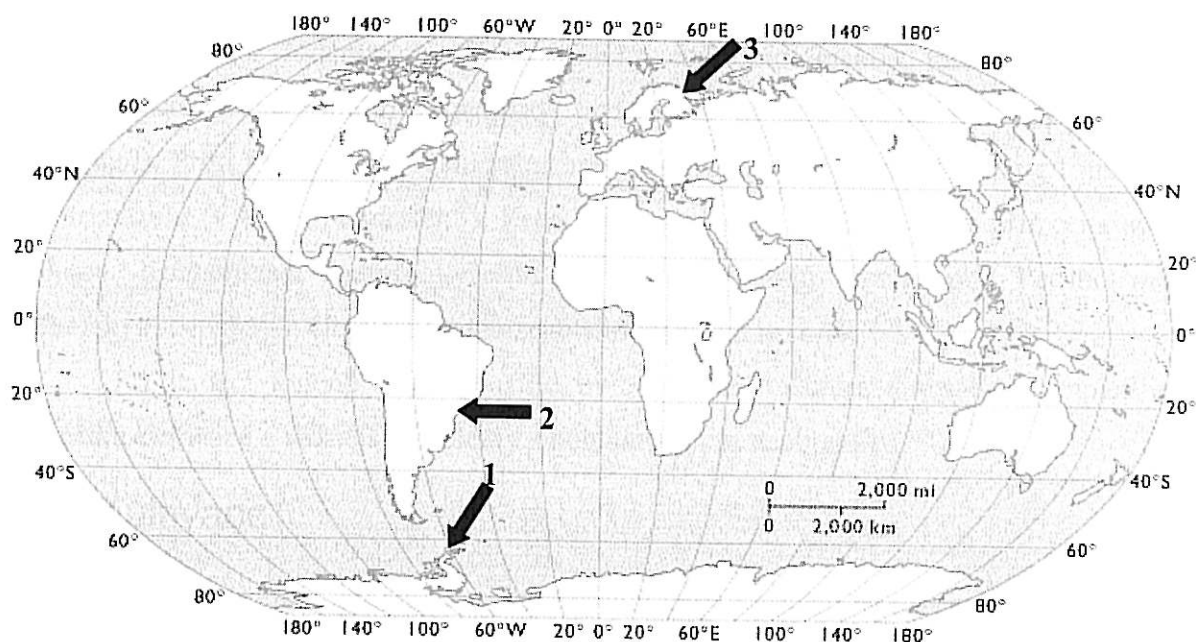
### 2.2 Vlastní izoláty

Vzhledem k tomu, že většina kmenů byla uchovávána až sedm let na šikmých agarech v lednici za stálé teploty i intenzity osvětlení, byl učiněn pokus sestavit kontrolní sadu kmenů izolovaných z poměrně čerstvě odebraných půdních vzorků, která by měla umožnit srovnání schopnosti přežít vymrzání u kmenů dlouhodobě uchovávaných ve sbírce a kmenů uchovávaných *in vitro* relativně krátkou dobu.

Odběry půdních vzorků z polární oblasti proběhly v srpnu 2004 během mezioborové exkurze BF JČU na poloostrov Kola. Větší část odběrů byla provedena v pohoří Chibiny

poblíž města Kirovsk (odběr půdy a půdních krust) a menší část z masivu Lovozerskije tundry jižně od města Revda.

Odběry vzorků z tropické oblasti provedl RNDr. Jan Kaštovský, PhD. během listopadu 2004 v okolí Sao Paulo v Brazílii poblíž měst Paraibuna a Parati.



Obr. 2: Schematická mapa světa s oblastmi odběrů půdních vzorků vyznačenými šipkami. 1 – ostrov krále Jiřího, Jižní Šetlandy; 2 – okolí Sao Paulo, Brazílie; 3 – poloostrov Kola, Rusko.

## 3 Metodika

### 3.1 Odběr a uchování půdních vzorků

Vzorky půdy sad CHIB a REV byly odebrány do sterilních Petriho misek, jejichž okraje byly slepeny prodyšnou lepenkou. Uchovány byly v chladicím boxu a po příjezdu byly vysety na zpevněné médium BBM. Sada CHIBK pochází z půdních krust, které byly v době sběru vysušené a byly uchovány při pokojové teplotě v sáčcích opatřených zapínáním zip-lock.

Vzorky půdy z Brazílie (vzorky sady BRA) byly uchovány během transportu ve šroubovacích zkumavkách a po příjezdu byla půda ihned vyseta na agarové plotny s přídavkem ampicillinu (50 mg/l média) pro eliminaci kontaminace bakteriemi.



## 3.2 Čištění kmenů

S pomalou růstovou rychlostí polárních kmenů souvisel problém kontaminací. Zprvu šlo především o masový rozvoj bakterií v nárostech, později o napadení plísněmi a roztoči.

Kvůli velmi rychlému dělení bakterií ve srovnání s řasami často selhávaly pokusy o klasickou izolaci ředěním buněk roztíráním mikrobiologickou kličkou. Pro eliminaci kontaminace prokaryotními organismy byla proto použita média s obsahem ampicilinu (50 mg/l). Proti houbovým organismům média s obsahem claforanu (100 mg/l média) nebo clotrimazolu (v krému Canesten<sup>®</sup>). Krém byl rozetřen do tenkého filmu přímo na agarovou plotnu. Kontaminaci roztoči vyřešilo pravidelné vytírání plochy pod Petriho miskami lékařským benzínem, čímž bylo zamezeno aktivní šíření roztočů.

Při izolaci kmenů řas z Brazílie bylo použito médium s obsahem ampicilinu od počátku kultivace a vážnější problémy s kontaminací se neobjevily.

## 3.3 Kultivace

Kultivace všech kmenů probíhala na sterilních Petriho miskách na médiu zpevněném agarem. Sterilizace misek i média byla prováděna v autoklávu (Medical Prestige). Bylo použito médium BBM, které se standardně používá jako základní médium pro kultivaci terestrických řas a sinic (BISCHOFF & BOLD 1963). Kmeny byly kultivovány při teplotě 17 °C za stálého osvětlení ( $FAR = 16,5 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ ). Doba kultivace se lišila u polárních a tropických řas. Důvodem byl výrazně pomalejší růst polárních řas. Doba kultivace každého kmenu před zmrazením je uvedena v tabulce výsledků. U polárních kmenů se doba pohybovala zpravidla v rozmezí (30 - 47), u tropických (20 - 27) dní.

### 3.4 Příprava suspence

Množství biomasy jednoho kmene, použité pro zamrazení, odpovídá zhruba nárůstu pokrývajícimu agarovou plotnu na Petriho misce o průměru 90 mm. Biomasa byla s povrchu agaru seškrábána vyžíhanou nerezovou špachtlí, chlazenou ve sterilním BBM, a suspendována v 5ml sterilního média ve zkumavce se šroubovacím uzávěrem (zn. NUNC™, vol. 15 ml).

Ze suspence pak byl u každého kmenu oddělen mikropipetou do zkumavek (zn. Eppendorf, objem 1500  $\mu$ l) objem 1000  $\mu$ l pro měření density buněk v suspensi a pro kontrolní měření viability metodou CFU. Do další zkumavky byl napipetován objem 200  $\mu$ l pro měření viability buněk v kontrolní suspensi pomocí barvení FDA (fluoresceindiacetát). Do dvou kryoampulí byl napipetován objem 3200  $\mu$ l (do každé 1600  $\mu$ l) pro zamrazení.

### 3.5 Metodika zamrazení

V první fázi zamrazení byly kryoampule vloženy do speciální plastové nádoby NALGENE Cryo 1°C Freezing Container „Mr. Frosty“ (Nalgene Nunc Intern., USA). Prostor mezi vnitřním a vnějším obalem byl vyplněn isopropanolem ( $C_3H_8O$ ), který zpomaluje pokles teploty obsahu na 1°C/min. Nádobka byla vložena do mrazicího boxu do teploty -40°C a po několikahodinové expozici byly kryoampule přeneseny (přímo v mrazicím boxu) do nosičů a ponořeny do tekutého dusíku. Přenesení z mrazicího boxu do kontejneru s tekutým dusíkem bylo třeba provést co nejrychleji, aby nedošlo k teplotnímu skoku, který by mohl negativně ovlivnit výslednou viabilitu mražených buněk. Kryoampule byly po týdnu vytaženy z tekutého dusíku a ihned zahřáty ve vodní lázni o teplotě 40°C. Podobně jako u mrazení, i zde je rychlost rozmrazení klíčová pro to, aby nedošlo k rychlé tvorbě krystalů v cytoplasmě buněk a k narušení buněčných membrán. (TAYLOR & FLETCHER 1999). Po rozmrazení byly kryoampule se suspensemi ponechány přibližně dvě hodiny v temnu a posléze byla analyzována jejich viabilita.

### 3.6 Metodika měření viability pomocí barvení FDA

Z měřené suspence bylo do sterilní zkumavky napipetováno 200  $\mu$ l a přidáno 15  $\mu$ l zásobního roztoku FDA (zásobní roztok byl uchováván v chladicím boxu). Po promíchání a několikaminutové inkubaci bylo z obarvené a promíchané suspence mikropipetou odebráno 20  $\mu$ l, které byly přeneseny na čisté podložní sklíčko. Preparát byl posléze (pod krycím sklíčkem 22 x 22 mm) pozorován fluorescenčním mikroskopem

(Olympus BX51, kamera: Olympus DP50). Každý preparát byl několikrát (minimálně třikrát, v závislosti na homogenitě distribuce buněk v zorném poli) vyfotografován v různých místech.

Měření viability bylo provedeno počítáním živých a mrtvých buněk (na fotografiích z obarveného preparátu) pomocí funkce „Touch Count“ v programu Olympus DP-Soft. Z údajů získaných vyhodnocením fotografií byl vzat průměr pro každý preparát.

## 3.7 Měření viability metodou CFU

### 3.7.1 Měření density suspence

Pro měření density suspence bylo odebráno 20  $\mu$ l suspence a mikroskopováno pod sklíčkem o rozměrech 18x18 nebo 22x22mm. Byly pořízeny fotografie za použití kamery Olympus DP 10 a programu Olympus DP-Soft (Soft Imaging System GmbH).

Vyhodnocení fotografií probíhalo pomocí funkce „Area/Perimeter“, kterou byla změřena skutečná plocha snímané oblasti preparátu (v  $\mu\text{m}^2$ ). Poté buňky na této ploše spočítány pomocí funkce „Touch Count“. V případě, že byla densita buněk velmi vysoká, byla plocha snímku rozdělena mřížkou (funkce „Grid“) a počítán počet buněk v několika políčkách. Z těchto čísel byl vzat průměr a vynásoben počtem políček. Vynásobením počtu buněk na snímku podílem plochy sklíčka a plochy snímané oblasti byl získán počet buněk ve 20  $\mu$ l suspence a tím i hodnota density dostatečně přesná na to, aby bylo možné stanovit počet řádů ředění.

### 3.7.2 Ředící řady a vyhodnocení

K ředění byly použity polystyrenové zkumavky o objemu 10 ml s kulatým dnem. Byly sterilizovány parami sterilizačního činidla PERSTERIL<sup>®</sup> (kyselina peroctová 36 %, PEROXIDES s.r.o.). Doba expozice sterilizačnímu činidlu byla minimálně 24 h. Do první zkumavky ředící řady bylo pomocí mikropipety přeneseno 1000  $\mu$ l sterilního média (BBM) a poté 500  $\mu$ l buněčné suspence o známé densitě. Do dalších zkumavek ředící řady bylo odpipetováno 1350  $\mu$ l sterilního média. Z první zkumavky pak bylo po důkladném promíchání (střídavé nasávání a vypouštění pipetou alespoň 10x za sebou) suspence odpipetováno 150  $\mu$ l do následující zkumavky, čímž byla suspence zředěna o jeden řád. Desetina původní suspence byla zředěna v devítinásobném objemu média. Takto ředění

pokračovalo o 4-5 řádů v závislosti na počáteční densitě suspence. Z poslední zkumavky bylo odpipetováno 1000  $\mu$ l suspence a vyseto na Petriho misku s médiem (1 % agaru), po jehož promíchání a ztuhnutí byly buňky fixovány. Teplota média nesměla přesahovat 40 °C, aby nedošlo k poškození živých buněk, a byla proto přímo v zásobní lahvi kontrolována teploměrem.

Po 20 - 30 dnech kultivace na agarových plotnách byl spočítán počet kolonií a porovnán s předpokládaným počtem vysetých buněk.

### 3.8 Statistické zpracování dat

Statistické zpracování dat bylo provedeno programem Statistica (ANON 1996). Pro hodnocení rozdílů v přežívání mezi polárními a tropickými kmeny uvnitř jednotlivých rodů byl použit dvouvýběrový t-test („t-test, independent, by groups“). Grafy, doprovázející výsledky, byly rovněž vytvořeny programem Statistica. Pro statistické vyjádření rozdílů v přežívání mezi jednotlivými rody byla použita neparametrická obdoba jednocestné analýzy variance: Kruskal-Wallisův test. Pro použití parametrické analýzy nebyly splněny předpoklady normality a homogenity variance souboru dat (LEPŠ 1996). Při hledání závislosti míry přežívání na dalších vlastnostech zamrazovaných suspensí byla použita lineární regrese („Multiple Regression“).

## 4 Výsledky

### 4.1 Testování schopnosti přežít hluboké zmrznutí

Celkem bylo zamrazeno 37 kmenů, zahrnujících 6 rodů půdních eukaryotních řas. Od každého rodu byly vybrány kmeny z polární a tropické oblasti. V tabulkách i v textu jsou rody řazeny abecedně. V grafech, které ukazují rozdíly mezi jednotlivými rody, byla zvolena škála osy Y 100% (Obr. 11). V grafech porovnávajících polární a tropické kmeny téhož rodu je škála osy Y upravena tak, aby rozdíl mezi nimi co nejlépe vynikl (Obr. 5-10). Vzhledem k analýzám, které pracují s průměry souborů dat, byl v grafech vynesena průměr jako středová hodnota.

Tab. 1: Přehled testovaných kmenů a výsledky mrazení. Údaje FDA1 vyjadřují v procentech viabilitu (měřenou metodou FDA) kontroly, FDA2 viabilitu suspence po rozmrazení a  $(FDA2/FDA1) \times 100$  je jejich poměr, vyjadřující kolik procent buněk, které byly živé před zmrazením, cyklus zmrazení – rozmrazení přežilo. Kód kmenu je označení, pod kterým je kmen uložen ve sbírce.

Název rodu	Kód kmenu	Stáří kultury [dny]	Densita suspence [10 <sup>6</sup> buněk/ ml]	FDA1 [%]	FDA2 [%]	(FDA2/ FDA1)x100 [%]	Oblast původu
<i>Bracteacoccus</i>	ANT SPH3	44	43	38,4	11,6	30,2	polární
<i>Bracteacoccus</i>	ANTII SPH16	37	154	69,9	15,8	22,6	polární
<i>Bracteacoccus</i>	ANTII SPH16	37	154	54	12,2	22,6	polární
<i>Bracteacoccus</i>	ANTII SPH22	44	42	39,3	10,5	26,7	polární
<i>Bracteacoccus</i>	BR8 30/97	10	7,5	79,00	42,00	53,1	tropická
<i>Bracteacoccus</i>	BR8 30/97	20	46	89,5	25,6	28,6	tropická
<i>Bracteacoccus</i>	BR8 30/97	27	55,2	85,1	28,3	33,2	tropická
<i>Chlamydomonas</i>	ANTII SPH19	44	18	93,4	0,0	0	polární
<i>Chlamydomonas</i>	ANTII EG/B-6	28	74,4	82	2,5	3	polární
<i>Chlamydomonas</i>	BR8 28/97	20	10,2	66,7	3,5	5,2	tropická
<i>Chlamydomonas</i>	BR8 28/97	27	14,2	63	1	1,6	tropická
<i>Chlamydomonas</i>	BR6 16/97	10	8	60,00	0,00	0	tropická
<i>Chlamydomonas</i>	BR6 16/97	20	29	60,2	1,8	3	tropická
<i>Chlamydomonas</i>	BR6 16/97	27	32,8	65,6	1,4	2,1	tropická
<i>Chlorella</i>	ANTII SPH15	22	90	87,2	26,6	30,5	polární
<i>Chlorella</i>	ANTII SPH8b	35	227	19,5	4,4	22,5	polární
<i>Chlorella</i>	ANT SPH7	17	110	98,2	17,6	17,9	polární
<i>Chlorella</i>	BR8 31/97	20	23,4	88,6	36	40,6	tropická
<i>Chlorella</i>	BR8 31/97	27	26,8	89	28,5	32	tropická
<i>Chlorella</i>	BR8 31/97	10	7,5	97,80	78,90	80,6	tropická
<i>Chlorella</i>	BR7 63/97	10	58	98,90	68,20	69	tropická
<i>Chlorella</i>	BR7 63/97	27	30,12	92	72,3	78,6	tropická
<i>Chlorella</i>	BR7 63/97	20	25,1	99	83	83,8	tropická
<i>Chlorococcum</i>	ANT II SPH4	48	12	65,3	21,8	33,4	polární

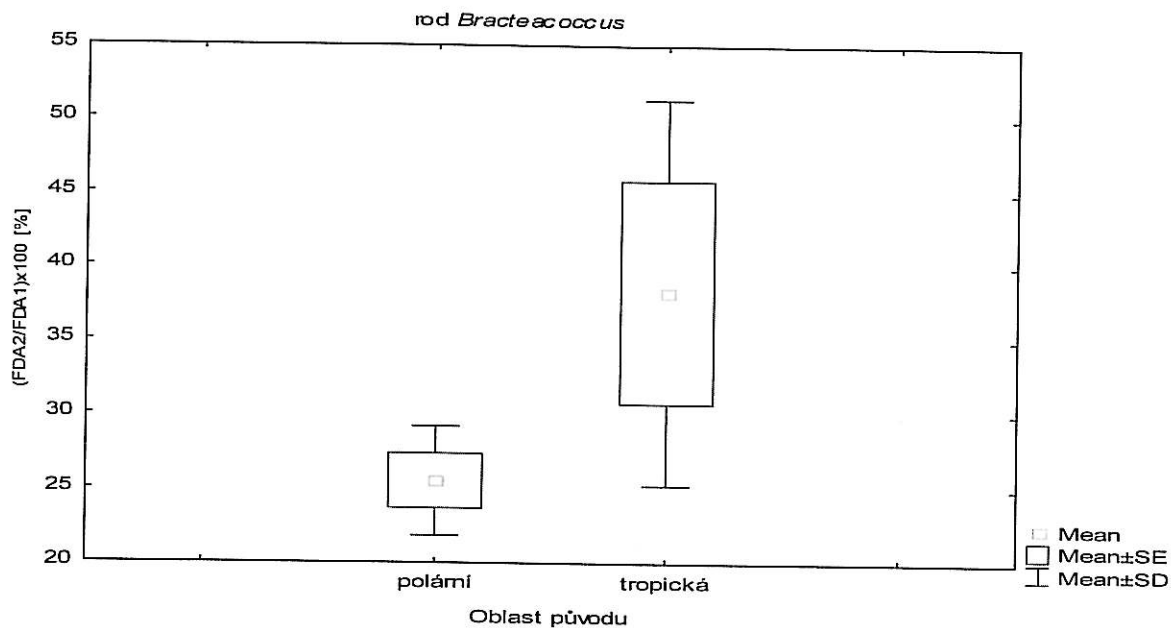


<i>Chlorococcum</i>	ANTII SPH2	48	118,5	55,7	14,4	25,8	polární
<i>Chlorococcum</i>	ANTII SPH2	77	188	52,3	28,2	5,4	polární
<i>Chlorococcum</i>	ANTII EG/A-5	31	4,6	47	6,4	13,6	polární
<i>Chlorococcum</i>	ANTII EG/A-5	29	0,5	98,5	40,0	40,6	polární
<i>Chlorococcum</i>	BR7 25/97	27	23,16	73	8,7	12	tropická
<i>Chlorococcum</i>	BR7 25/97	20	19,3	75,3	8,4	11,1	tropická
<i>Chlorococcum</i>	BR7 25/97	10	12,8	99,00	11,80	12	tropická
<i>Chlorococcum</i>	BR7 23/97	25	1,3	95	14,3	15	tropická
<i>Chlorococcum</i>	BR7 23/97	20	14	98	34	34,7	tropická
<i>Chlorococcum</i>	BR7 23/97	27	19,8	95	9,8	10,3	tropická
<i>Pseudococcomyxa</i>	ANTII SPH17	37	49	96	0,0	0	polární
<i>Pseudococcomyxa</i>	ANT SPH15	29	151	73,2	4,1	5,6	polární
<i>Pseudococcomyxa</i>	ANTII EG/B2	48	66,7	99,9	4,9	5,0	polární
<i>Pseudococcomyxa</i>	BRA2a	25	30,1	64	0	0	tropická
<i>Pseudococcomyxa</i>	BRA2a	20	21	97	0	0	tropická
<i>Pseudococcomyxa</i>	BRA2a	27	25,2	92	1,8	2	tropická
<i>Stichococcus</i>	ANT II SPH6	77	76	72,1	46,8	64,9	polární
<i>Stichococcus</i>	ANT II SPH6	38	215	98,7	57,8	58,6	polární
<i>Stichococcus</i>	ANT II SPH6	22	426	97,5	41,6	42,7	polární
<i>Stichococcus</i>	ANT EG/B5	35	76	82,6	29,4	35,6	polární
<i>Stichococcus</i>	ANT EG/B5	46	219	42	30,5	72,6	polární
<i>Stichococcus</i>	ANT EG/10s	46	127	38,9	27,2	69,9	polární
<i>Stichococcus</i>	ANT EG/10s	48	12,5	95,0	50	52,6	polární
<i>Stichococcus</i>	BR1 11/97	20	54,6	60	13,2	22	tropická
<i>Stichococcus</i>	BR1 11/97	27	64,5	61	15,6	25,5	tropická
<i>Stichococcus</i>	BR1 11/97	10	20,6	90,00	58,50	65	tropická
<i>Stichococcus</i>	BR7 35/97	10	90,7	90,80	41,00	45,15	tropická
<i>Stichococcus</i>	BR7 35/97	20	87,3	95	19	20	tropická
<i>Stichococcus</i>	BR7 35/97	27	92	92	11,6	12,6	tropická

#### 4.1.1 Srovnání kmenů z polární a tropické oblasti v rámci jednotlivých rodů

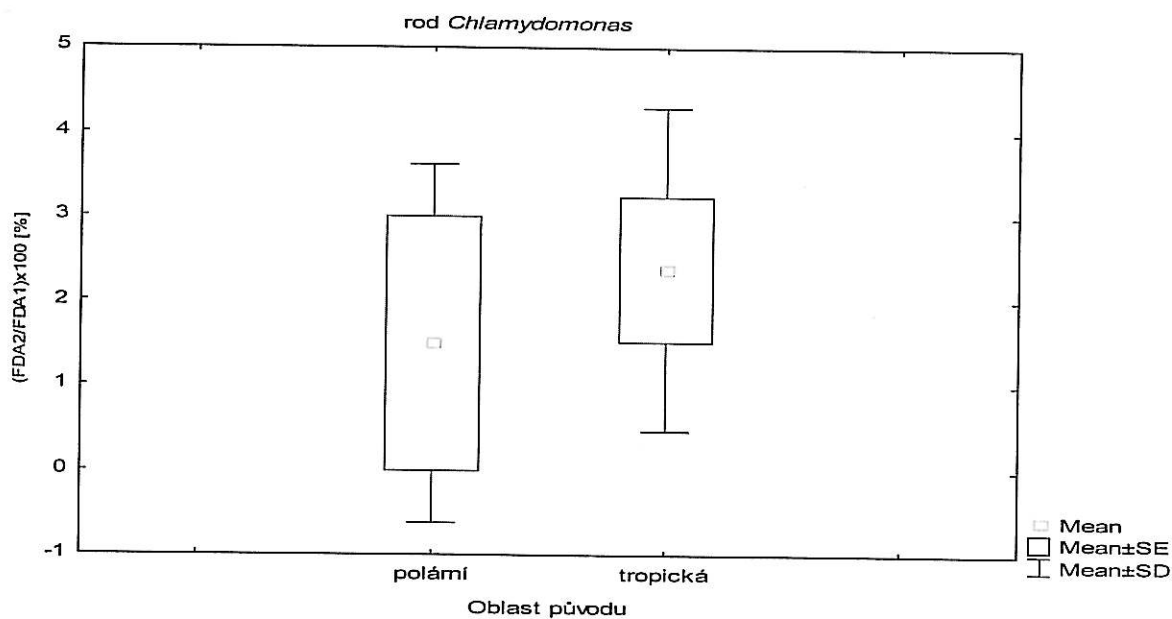
Pro statistické hodnocení rozdílů v přežívání byl použit dvouvýběrový t-test (LEPŠ 1996). Hladina významnosti pro všechny testy byla zvolena:  $\alpha = 0,05$ . Pro každý rod jsou v závorce uvedeny: dosažená hladina významnosti – p, hodnota testového kritéria - t a počet stupňů volnosti - df. Nulová hypotéza předpokládá, že mezi kmeny z obou oblastí není v přežívání rozdíl.

V rodu *Bracteacoccus* nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v přežívání mezi kmeny z tropické a polární oblasti. (t-test neprůkazný:  $p = 0,1129$ ;  $t = -1,91994$ ;  $df = 5$ ).



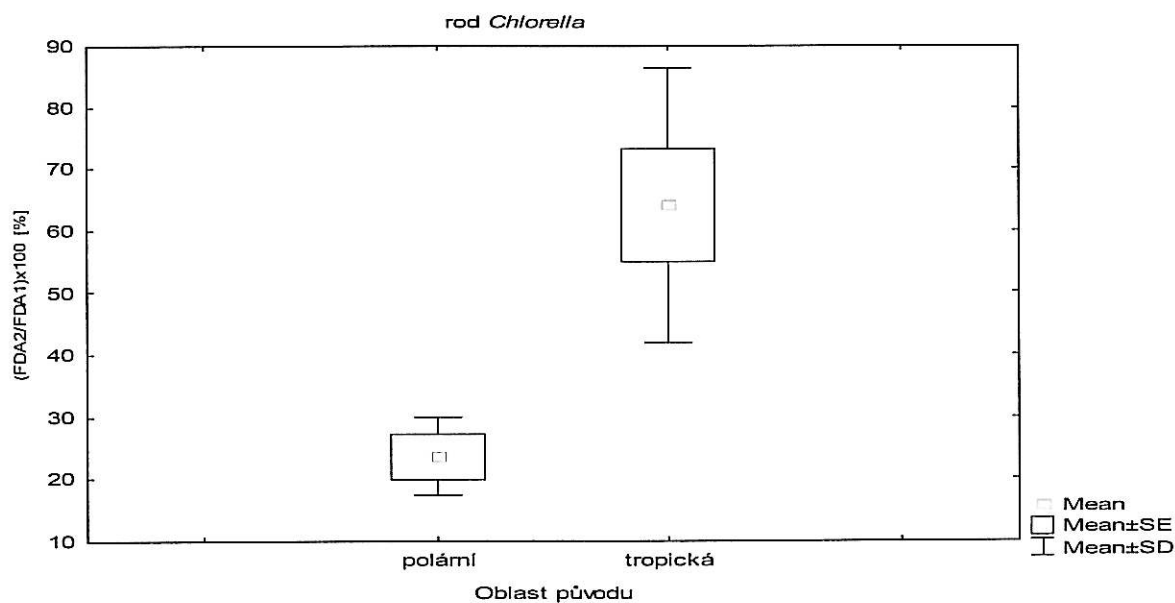
Obr. 3: Graf „Box-and-whisker plot“. Na ose Y jsou vyneseny procenta přeživších buněk, opravená o viabilitu kontroly. Stejně je rozvržení grafů Obr. 4-8.

V rodu *Chlamydomonas* nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v přežívání mezi kmeny z obou oblastí. (t-test neprůkazný:  $p = 0,61435$ ;  $t = -0,536913$ ;  $df = 5$ )



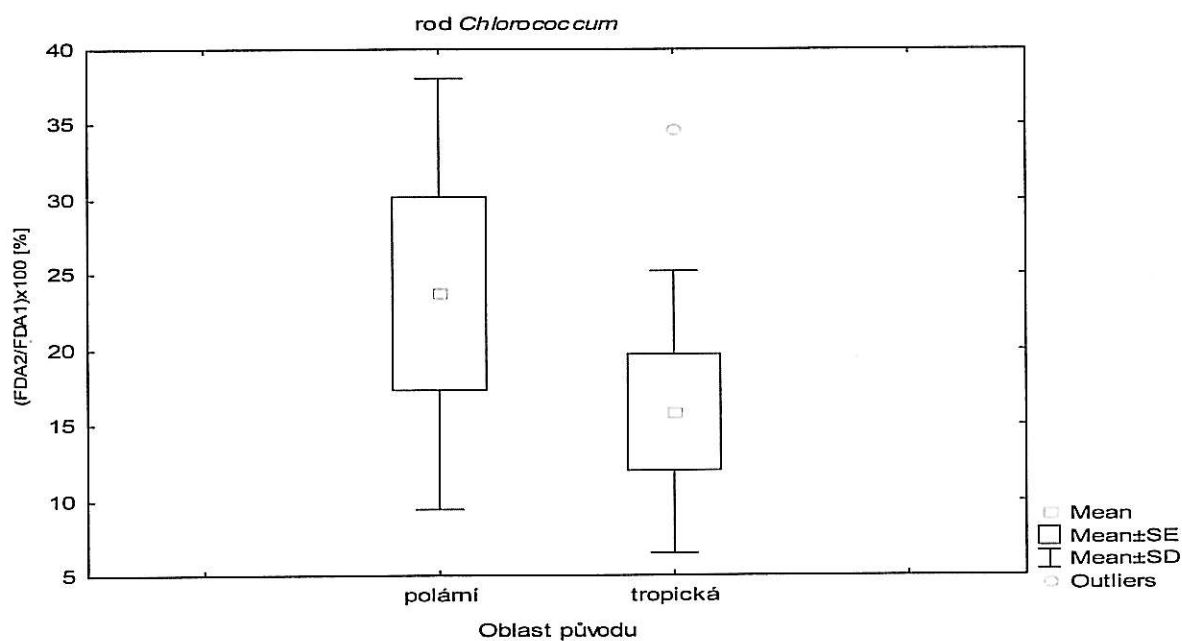
Obr. 4: Graf „Box-and-whisker plot“ procenta přežívání, vynesného proti oblasti původu.

V rodu *Chlorella* byl nalezen statisticky významný rozdíl v přežívání mezi kmeny obou oblastí (t-test průkazný:  $p = 0,02013$ ;  $t = -2,99339$ ;  $df = 7$ ).



Obr. 5: Graf „Box-and-whisker plot“ procenta přežívání, vneseného proti oblasti původu.

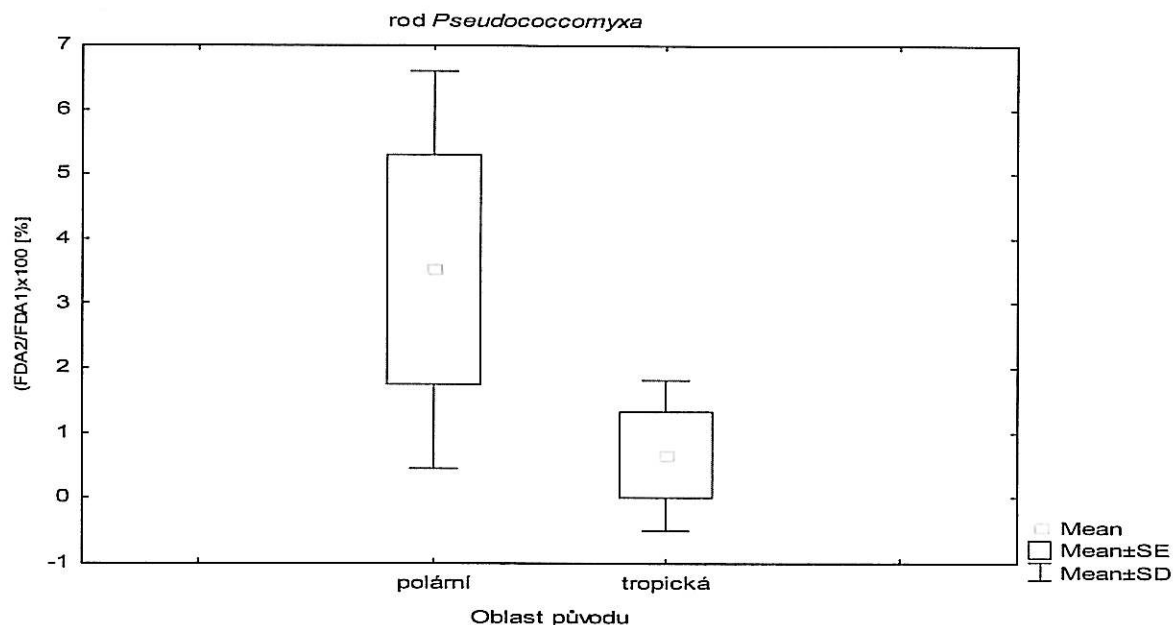
V rodu *Chlorococcum* nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v přežívání mezi kmeny z obou oblastí (t-test neprůkazný:  $p = 0,298235$ ;  $t = 1,103999$ ;  $df = 9$ ).



Obr. 6: Graf „Box-and-whisker plot“ procenta přežívání vneseného proti oblasti původu.

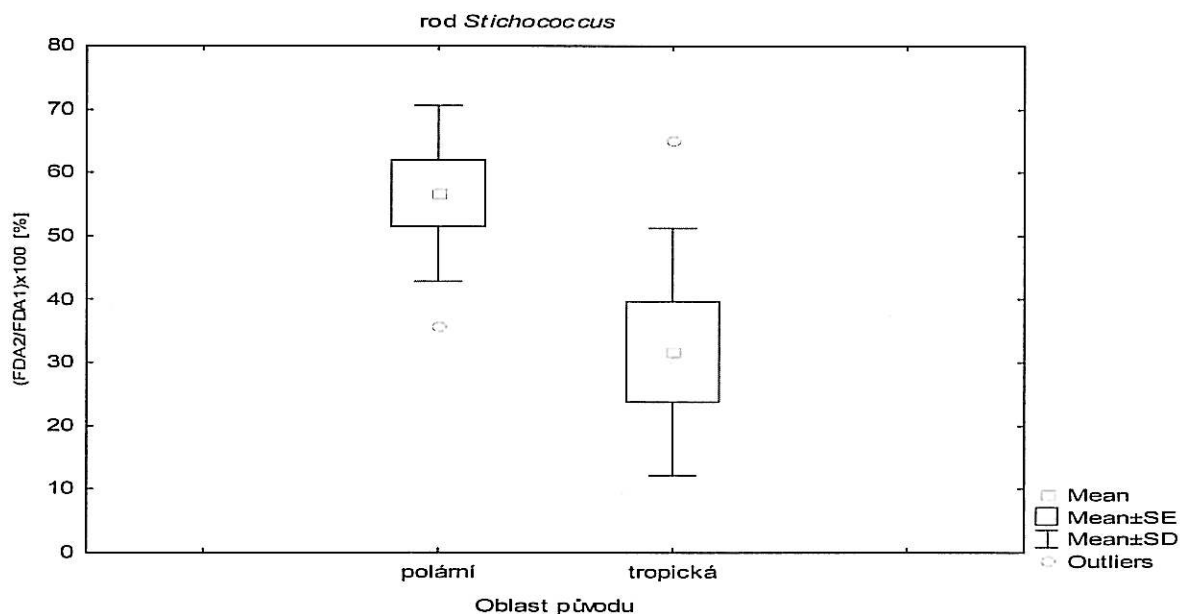


V rodu *Pseudococcomyxa* nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v přežívání mezi kmeny z obou oblastí (t-test neprůkazný:  $p = 0,205121$ ;  $t = 1,511799$ ,  $df = 4$ ).



Obr. 7: Graf „Box-and-whisker plot“ procenta přežívání, vyneseno proti oblasti původu.

V rodu *Stichococcus* byl nalezen statisticky významný rozdíl v přežívání mezi kmeny z obou oblastí (t-test průkazný:  $p = 0,021237$ ;  $t = 2,684498$ ;  $df = 11$ ).



Obr. 8: Graf „Box-and-whisker plot“ procenta přežívání vyneseno proti oblasti původu.

## 4.1.2 Srovnání rozdílů v přežívání mezi rody

Byla testována normalita rozdělení dat v rámci jednotlivých rodů (viz. Tab. 2).

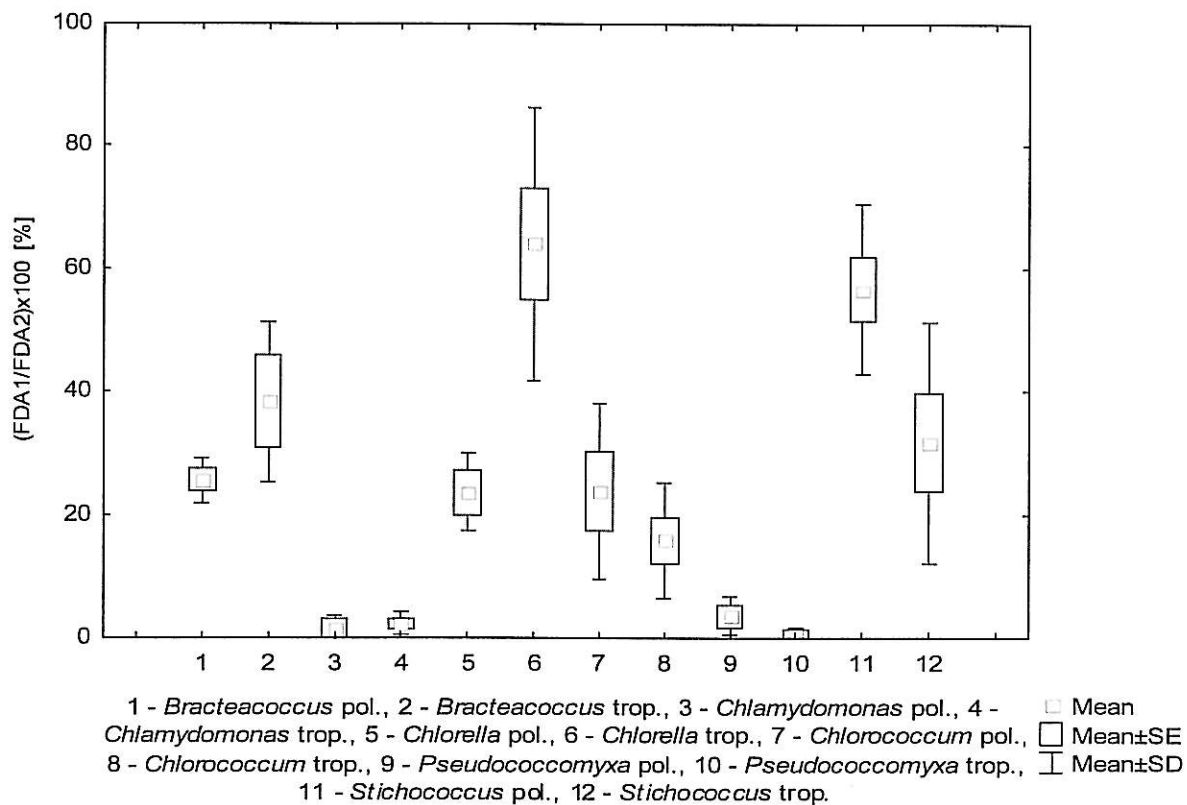
Tab. 2: V tabulce je uvedeno testové kritérium Kolmogorov-Smirnovova testu –  $d$  a parametry chí kvadrát testu. Hodnoty dosažených hladin významnosti nižších než kritická hladina významnosti ( $\alpha = 0,05$ ) jsou zvýrazněny.

Rod	$d$	$\chi^2$	df	P
Bracteacoccus	0,24451	27,6731	17	<b>0,04891</b>
Chlamydomonas	0,17495	18,93002	11	0,06236
Chlorella	0,16285	22,26573	14	0,07332
Chlorococcum	0,28129	19,99638	6	<b>0,00277</b>
Pseudococcomyxa	0,29002	35,08509	12	<b>0,00045</b>
Stichococcus	0,07676	6,46783	12	0,89069

Hodnoty přežívání u rodů *Bracteacoccus*, *Chlorococcum* a *Pseudococcomyxa* jsou statisticky významně odchylné od normality.

Dále byla testována homogenita variancí. Nulová hypotéza homogenity byla zamítnuta (test: Cochran, Hartley, Bartlett,  $df = 11$ ,  $p = 0,0002$ ).

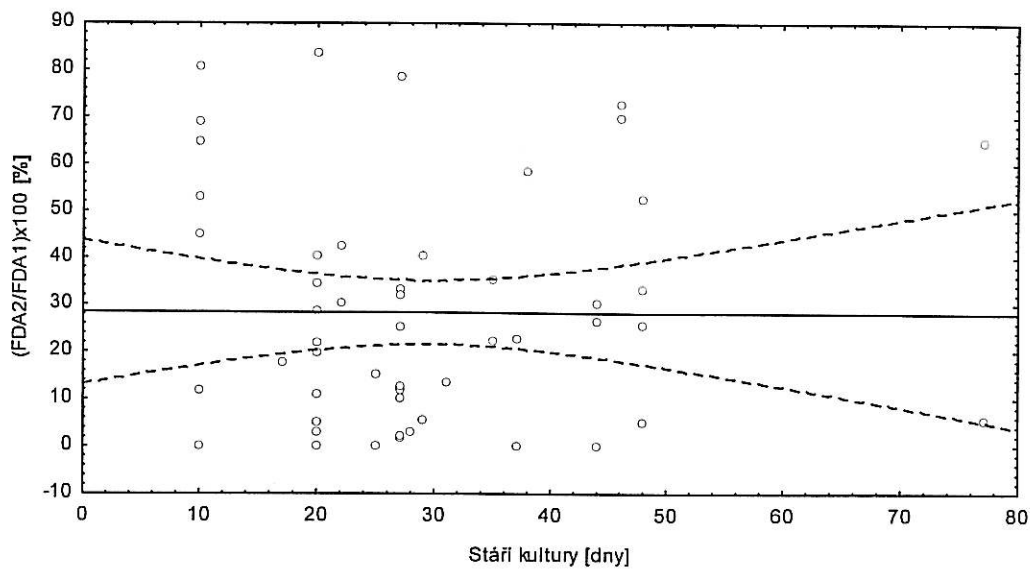
Na základě těchto zjištění byla pro analýzu rozdílů v přežívání mezi rody zvolena neparametrická obdoba jednocestné analýzy variance: Kruskal-Wallisův test (hodnota testového kritéria  $H = 42,78452$ ,  $p < 0,05$ ), jímž byla nalezena statisticky průkazná rozdílnost přežívání mezi rody.



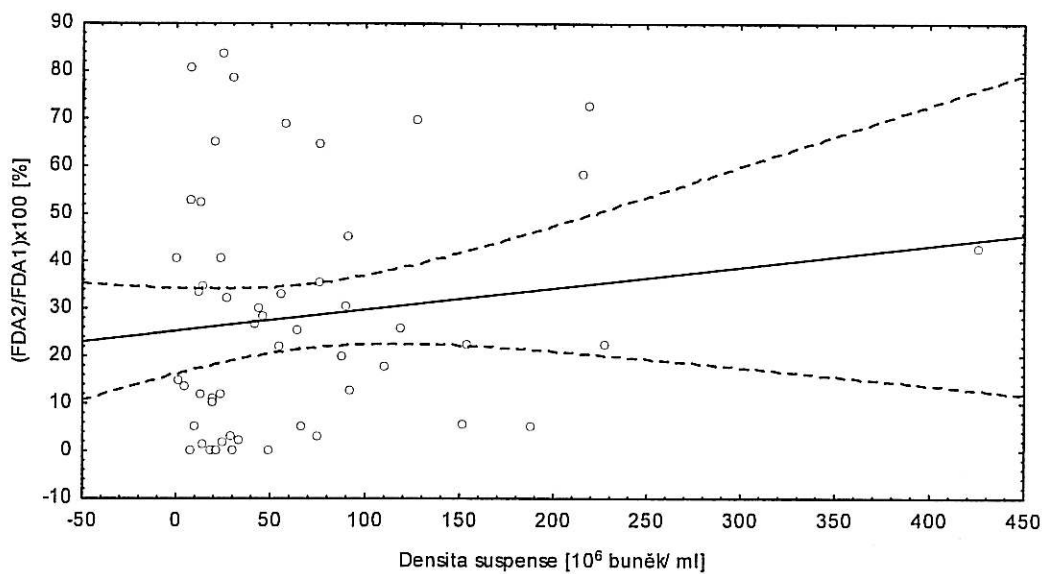
Obr. 9: Rozdíly v přežívání u různých rodů. Polární a tropické kmeny každého rodu jsou vyneseny zvlášť.

#### 4.1.3 Testování vlivu dalších parametrů kultur na přežívání

Pro testování vlivu těchto parametrů byla použita lineární regrese. Ani u stáří kultury ( $r = -0,0030$ ;  $r^2 = 0,0001$ ), ani u density suspence ( $r = 0,1433$ ;  $r^2 = 0,0205$ ) nebyl nalezen statisticky významný vliv na přežívání buněk.



Obr. 12: Vyneseno stáří kultur proti procentuálnímu vyjádření jejich přežívání. Body je proložena regresní přímka s vyznačením konfidenčního intervalu 0,95.



Obr. 13: Vynesená densita suspense proti procentuálnímu vyjádření jejich přežívání. Body je proložena regresní přímka s vyznačením konfidenčního intervalu 0,95.

## 4.2 Izolace z půdních vzorků

Celkem proběhla analýza 12 vzorků půdy z poloostrova Kola a 6 vzorků půdy z okolí Sao Paulo. Do čisté kultury se podařilo převést izoláty uvedené v tabulce.

Tab. 3: Kmeny izolované z dodaných půdních vzorků.

Název	Kód kmenu	Oblast původu
<i>Pseudococcomyxa</i>	CHIBK1b	poloostrov Kola
<i>Pseudococcomyxa</i>	CH1a	poloostrov Kola
<i>Pseudococcomyxa</i>	CHIBK4	poloostrov Kola
<i>Pseudococcomyxa</i>	CHIB	poloostrov Kola
<i>Pseudococcomyxa</i>	BRA2a	okolí Sao Paulo
<i>Chlorella reisiiglii</i>	BRA1b	okolí Sao Paulo
<i>Chlorella</i> sp.	BRA3a	okolí Sao Paulo
<i>Chlorella</i> sp.	BRA34a	okolí Sao Paulo

## 5 Diskuse

### 5.1 Mrazení

Ukázalo se, že existují rozdíly v přežívání kmenů řas, jak v rámci jednotlivých rodů mezi kmeny z polární a tropické oblasti, tak i mezi rody navzájem. Je třeba zdůraznit, že hluboké zamrazení může mít na buňky téhož kmenu více či méně odlišný vliv než vymrzání při vyšších teplotách pod bodem mrazu (TAILOR & FLETCHER 1999). Variabilita výsledků může být ovlivněna i některým krokem během zamrazování a rozmrazování. Při zamrazování byl citlivým krokem přenos z mrazicího boxu do tekutého dusíku, protože kryoampule bylo třeba před ponořením do Dewarovy nádoby zasunout do speciálního nosiče, přičemž mohlo dojít k nežádoucímu teplotnímu skoku. Ten mohl způsobit rekrystalizaci ledu v cytoplasmě buněk a snížení jejich viability po rozmrazení (HAUER 2003).

Velmi zajímavé je z hlediska interpretace vyšší přežívání tropických kmenů ve srovnání s polárními u rodů *Bracteacoccus* a *Chlorella*, patrný z grafů (Obr. 3 a 5). Statisticky významný se ukázal rozdíl pouze u rodu *Chlorella*. Podle mého názoru existují dvě možné

interpretace tohoto výsledku: kultury tropických kmenů, jak je patrné z dob kultivace mezi 10-27 dny, rostly (v porovnání s polárními kmeny) velmi rychle a je možné, že tyto kultury mohly být dynamikou svého růstu zvýhodněny a jejich regenerace po rozmrazení byla proto úspěšnější. Druhý faktor, který mohl způsobit tento rozdíl, je možná pomalejší reparace buněk polárních kmenů. Reparační fáze v temnu, která má za cíl uchránit buňky před fotooxidačním stresem po rozmrazení, byla u všech měření přibližně 2 hodiny a ne obecně doporučených 24 hodin. Vliv tohoto faktoru by však bylo nutné ověřit dalšími experimenty. U rodů *Chlamydomonas* a *Pseudococcomyxa* bylo přežívání velmi nízké a nebyly nalezeny ani statisticky významné rozdíly mezi kmeny z polární a tropické oblasti. Zejména u rodu *Pseudococcomyxa* je nízké přežívání hlubokého zamrazení překvapivé, protože jde o rod, který je v půdách polárních oblastí velmi běžný. Právě zde však lze předpokládat výrazný rozdíl mezi přežitím hlubokého zamrazení, které je ve své podstatě laboratorní unikum a vymrznutí, ke kterému v přírodě dochází poměrně běžně. Kmeny rodu *Chlorococcum* přežívaly o něco lépe a je zde patrná vyšší odolnost proti hlubokému zamrazení u polárních kmenů, statistická významnost tohoto rozdílu se však neprokázala. Výsledek testu však mohla zásadně ovlivnit hodnota extrému u tropických kmenů, který je dost vzdálený od ostatních dat z tohoto souboru (viz. obr. 6) U kmenů rodu *Stichococcus* přežívaly polární kmeny lépe, přičemž tento rozdíl se ukázal být statisticky významný. Podle kritéria úspěšnosti zamrazení, užívaného při hodnocení výsledků v projektu COBRA, které dovoluje označit zamrazení za úspěšné, dosáhne-li viabilita buněk po rozmrazení 60% viability v porovnání s kontrolou (HAUER 2003), odpovídají této hodnotě pouze hodnoty tropických kmenů rodu *Chlorella* a blíží se jí hodnoty polárních kmenů rodu *Stichococcus*, což zcela neodpovídá očekávaným hodnotám viability.

K faktorům, které mohou ovlivnit přežívání buněk, bych zde rád připojil rychlost sedimentace buněk v suspensi. V první fázi zamrazování byl totiž pokles teploty zpomalován, což má za následek to, že velká část buněk před zamrznutím média sedimentovala. Vzhledem k tomu, že byl prokázán zřejmý vliv mezibuněčných interakcí na rychlost tvorby ledu v cytoplasmě (ACKER et al. 1999), dá se předpokládat, že při tomto metodickém postupu může mít rychlost sedimentace nezanedbatelný vliv na výslednou viabilitu u kmenů, které špatně snášejí rychlý vznik intracelulárního ledu.

## 5.2 Měření viability

Při stanovení viability se podařilo provádět úspěšná měření pouze metodou FDA. Při měření metodou CFU byly nejprve problémy s udržení optimální teploty média, kterou bylo třeba udržet v rozmezí, které nepůsobilo negativně na buňky a zároveň umožnilo manipulaci s médiem v kapalném stavu. I po odstranění tohoto problému však metoda nedávala interpretovatelné výsledky. Na některých miskách nevyrostlo nic, zatímco na jiných bylo kolonií i o řád více, než byl předpokládán počet vyšetých buněk, a to i v rámci jednoho kmenu. Pravděpodobně jádro tohoto problému tkví v použití polystyrénových zkumavek pro ředící řady. Ukázalo se totiž, že jejich hydrofobní povrch skýtá možnost interakce s povrchy buněk, a ty na něm ulpívaly. Toto ulpívání však bylo pouhým okem zřetelné teprve při vyšší densitě suspence, která se v ředících řadách neobjevovala, a tento problém tak byl objeven až po delší době. Při použití skleněných zkumavek se počet kolonií sice přiblížil teoretickému počtu vyšetých buněk, chyba měření však přesto nedovolovala použít data získaná touto metodou.

Tímto byl rovněž omezen počet rodů, které mohly být srovnány v této práci, protože pro rody *Xanthonema* a *Klebsormidium*, které v této studii měly rovněž figurovat, není možné měřit viabilitu pomocí FDA.

## 5.3 Statistické vyhodnocení

Jelikož síla všech použitých statistických testů je velmi citlivá na počet pozorování, je nutné zdůraznit, že výsledky některých testů mohou z tohoto důvodu vést ke zkresleným interpretacím. Disproporce mezi počtem měření u polárních a tropických kmenů zejména u rodu *Chlamydomonas* vznikla kvůli nevydařeným experimentům, kdy byly vzorky přímo po rozmrazení vystaveny přímému slunečnímu světlu, což mělo za následek enormní pokles viability a nemožnost srovnání se vzorky, se kterými bylo nakládáno podle standardního metodického postupu. Překvapivé byly výsledky lineární regrese, protože ani u stáří kultury ani density suspence nebyl nalezen statisticky významný vliv na přežívání kultur.

Přestože BRAND & DILLER (2004) uvádějí, že vyšší densita suspence může, zvláště u kmenů, které špatně přežívají už samotný cyklus zamrazení a rozmrazení, výrazně negativně ovlivnit výslednou viabilitu, nepodařilo se nám tento vliv potvrdit. Densita, kterou měli autoři na mysli, byla však řádově vyšší než nejvyšší hodnoty, kterých density suspensí v této práci dosahovaly. Mnohem překvapivější je fakt, že se nepodařilo nalézt negativní ovlivnění



výsledné viability stářím kultury, přestože tento vliv byl často pozorován (LUKEŠOVÁ, nepubl.). Ukazuje se, že vlivy, které působí na buňky v suspensi (a to jak aktuálně působící, tak i předchozí vývoj dané kultury), mají natolik komplexní povahu, že jejich oddělená analýza a interpretace je velmi obtížná.

## 5.4 Izolace kmenů z půd

Spektrum taxonů izolovaných z půdních vzorků z poloostrova Kola i z okolí Sao Paulo bylo velmi omezené. Dokonce natolik, že je přehnané hovořit o spektru. Původní záměr sestavit z těchto izolátů sady kmenů, srovnatelné s kmeny ze sbírky, tak nebyl uskutečnitelný.

Půdy z poloostrova Kola byly celkově na řasy velmi chudé a při izolacích se objevovaly soliterně rostoucí kolonie, z čehož bylo možno usoudit na velmi řídkou distribuci viabilních buněk v půdních vzorcích. Nebyl zde výrazný rozdíl mezi vzorky z vysušených půdních krust a mezi vzorky vlhké půdy, přestože obě sady vzorků byly skladovány odlišnou metodikou a dal by se čekat i určitý rozdíl v druzích zastoupených v nativních vzorcích.

Půdní vzorky z Brazílie byly na řasy naopak velmi bohaté a během jejich kultivace na agarových plotnách se rychle vytvořil souvislý řasový nárost. Za takovéto situace bylo velmi pravděpodobné, že zde mohla hrát výraznou roli kompetice mezi taxony charakteristickými dynamickým růstem jako *Pseudococcomyxa simplex* a *Chlorella* sp. a taxony pomaleji rostoucími, které tak mohly být potlačeny. Zmrazeny byly pouze 3 kmeny rodu *Pseudococcomyxa*, z nichž jeden byl použit jako tropický zástupce tohoto rodu ve výsledcích (kód kmenu: BRA2a). Další dva kmeny se svou mírou přežívání neodlišovaly, přesněji: přežívaly stejně špatně jako kmeny ze sbírek.

## 6 Závěr

V této práci byl testován vliv hlubokého zmrazení na přežívání kultur půdních řas. K zhodnocení míry jejich přežívání byla použita metoda měření viability pomocí barvení buněčné suspence fluorescein diacetátem. Byl rovněž proveden pokus o měření viability pomocí metody CFU (colony forming units). Touto metodou se však nepodařilo získat kvalitní výsledky, porovnatelné s výsledky získanými první metodou.

Statistickou analýzou se rozdíl v přežívání mezi polárními a tropickými kmeny podařil prokázat pouze u dvou rodů ze šesti (*Chlorella*, *Stichococcus*). U rodu *Chlorella* navíc lépe přežívaly kmeny původem z tropické oblasti, přičemž tento trend byl patrný i u rodu *Bracteacoccus*, i když v tomto případě nešlo o rozdíl statisticky významný. Přestože tedy lze



konstatovat, že mezi polárními a tropickými kmeny rodů, zkoumaných v této studii, rozdíly v přežívání existují, nepodařilo se v těchto rozdílech najít jednoznačný trend.

Při hledání závislosti přežívání kultur na jejich dalších parametrech, jako je stáří kultury nebo densita zamrazované suspense, nebyla nalezena statisticky významná závislost, přestože minimálně v případě stáří kultury se taková závislost dala předpokládat. Ukazuje se, že vlivy, které se podílejí na výsledné viabilitě zamrazované suspense řas, působí natolik komplexně, že je velmi obtížné je analyzovat. Nehledě na to, že mezi nimi pravděpodobně figuruje i určitý vliv náhody. Přesto je zřejmé, že tato oblast představuje velmi zajímavý prostor pro další výzkum.

## 7 Literatura

- ACKER, J. P.; LARESE, A.; YANG, H.; PETRENKO, A.; MCGANN, L. E. (1999) – Intracellular ice formation is affected by cell interactions. – *Cryobiology* 38: 363 – 371.
- AMANO, T.; HIRASAWA, K.; O'DONHUE, M. J.; PERNOLLE, J. C.; SHIOI, Y. (2003) – A versatile assay for the accurate, time resolved determination of cellular viability. – *Analytical Biochemistry* 314 (1): 1 – 7.
- ANON. (1996) – Statistica for Windows. (Computer program manual). Stat Soft, Tulsa OK.
- BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. (1963) - Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species - *Phycological Studies* 4 (University of Tex. Publ.): 1 – 95.
- BODAS, K.; BRENNING, C.; DILLER, K. R.; BRAND, J. J. (1995) – Cryopreservation of Blue-green and Eukaryotic Algae in the Culture Collection at the University of Texas at Austin. – *CryoLetters* 16 (5): 267 – 274.
- BOND, CH. J. (1995) - Cryopreservation of yeast cultures. – *Methods in Molecular Biology* 38: 39 – 47.
- BRAND, J. J.; DILLER, K. R. (2004) – Application and theory of algal cryopreservation. – *Nova Hedwigia* 79 (1-2): 175 – 189.
- CLARKE, J. M.; GILLINGS, M. R.; ALTAVILLA, N.; BEATTIE, A. J. (2001) – Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. – *Journal of Microbiological Methods* 46 (3): 261 – 267.
- DAY, J. G. (2004) – Cryopreservation: fundamentals, mechanisms of damage on freezing/thawing and application in culture collections. – *Nova Hedwigia* 79 (1-2): 191 – 205.
- FLECK, R. A.; BENSON, E. E.; BREMNER, D. H.; DAY, J. G. (2003) – A comparative study of antioxidant protection in cryopreserved unicellular algae *Euglena gracilis* and *Haematococcus pluvialis*. – *CryoLetters* 24 (4): 213 – 228.
- GILICHINSKY, D. A.; VOROBYOVA, E. A.; EROKHINA, L. G.; FYODOROV-DAYVDOV, D. G.; CHAIKOVSKAYA, N. R. (1992) – Long-term preservation of microbial ecosystems in permafrost. – *Advances in Space Research* 12 (4): 255 – 263.
- HARDING, K. (2004) – Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review. – *CryoLetters* 25 (1): 3 – 22.
- HARMISON, H. R.; DILLER, K. R.; WALSH, J. R.; NEILS, C. M.; BRAND, J. J. (1998) – Measurement of cell volume loss in the liquid region preceding and advancing

- phase change interface. – *Annals of The New York Academy of Science* 858: 276 – 283.
- HAUER, T. (2003) – Kryoprezervace půdních řas a sinic, vyhodnocování pokusů pomocí digitální fotografie. – Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, České Budějovice. – 26p.
- HUANG, C. C.; LEE, T. H.; CHEN, S. U.; CHEN, H. H.; CHENG, T. C.; LIU, C. H.; YANG, Y. S.; LEE, M. S. (2005) – Successful pregnancy following blastocysts cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. – *Human Reproduction* 20 (1) : 122 – 128.
- HUBÁLEK, Z. (2003) – Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. – *Cryobiology* 46: 205 – 229.
- JUST, A.; GRUBER, I.; WÖBER, M.; LAHODNY, J.; OBRUCA, A.; STROHMER, H. (2004) – Novel method for the cryopreservation of testicular sperm and ejaculated spermatozoa from patients with severe oligospermia: a pilot study. – *Fertility and Sterility* 82 (2): 445 – 447.
- KANG, J.; RAYMOND, J. A. (2004) – Reduction of freeze-thaw-induced hemolysis of red blood cells by an algal ice-binding protein. – *CryoLetters* 25 (5): 307 – 310.
- KIM, H.; CHA, Y.; BAEK, H.; CHO, E.; CHAE, Y.; ENGELMANN, F. (2002) – Cryopreservation of tea (*Camellia sinensis*) seeds and embryonic axes. – *CryoLetters* 23 (4): 209 – 216.
- KOCHKINA, G. A.; IVANUSHKINA, N. E.; KARASEV, S. G.; GAVRISH, E. Y.; GURINA, L. V.; EVTUSHENKO, L. I.; SPIRINA, E. V.; VOROB'eva, E. A.; GILICHINSKY, D. A.; OZERSKAYA, S. M. (2001) – Survival of micromycetes and actinobacteria under conditions of long-term natural cryopreservation. – *Microbiology* 70 (3): 356 – 364.
- KOPEIKA, J.; ZHANG, T. T.; RAWSON, D. M.; ELGAR, G. (2005) – Effect of cryopreservation on mitochondrial DNA of zebrafish (*Danio rerio*) blastomere cells. – *Mutation Research* 570 (1): 49 – 61.
- LEPŠ, J. (1996) – Biostatistika. - Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, České Budějovice. - 166p.
- LUKEŠOVÁ, A. – Ústní sdělení, nepublikováno.
- MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; CHU, E. H. Y. (1972) – A two-factor hypothesis of freezing injury: Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. – *Experimental Cell Research* 71 (2): 345 – 355.

- PETRENKO, A. Y. (1992) - A mechanism of latent cryoinjury and reparation of mitochondria. – *Cryobiology* 29 (1): 144 – 152.
- RAYMOND, J. A.; KNIGHT, CH. A. (2003) – Ice binding, recrystallization inhibition, and cryoprotective properties of ice-active substances associated with Antarctic sea ice diatoms. – *Cryobiology* 46 (2): 174 – 181.
- SHERMAN, J. K. (1972) – Comparison of *in vitro* and *in situ* ultrastructural cryoinjury and cryoprotection of mitochondria. – *Cryobiology* 9 (2): 112 – 122.
- SKIDMORE, M. L.; FOGHT, J. M.; SHARP, M. J. (2000) – Microbial life beneath a high arctic glacier. – *Applied and Environmental Microbiology* 66 (8): 3214 – 3220.
- TAYLOR, R.; FLETCHER, R. (1999) – Cryopreservation of eucaryotic algae – a review of methodologies. – *Journal of Applied Phycology* 10: 481 – 501.
- TJER, G. CH.; CHIU, T. T.; CHEUNG, L.; LOK, I. H.; HAINES, CH. J. (2005) – Birth of a healthy baby after transfer of blastocysts derived from cryopreserved human oocytes fertilized with frozen spermatozoa. – *Fertility and Sterility* 83 (5): 1547 – 1549.
- WALTERS, CH.; WHEELER, L.; STANWOOD, P. C. (2004) – Longevity of cryogenically stored seeds. – *Cryobiology* 48 (3): 229 – 244.
- WEDGE, CH.; SALDANHA, C. (2002) – Ice Age (animated film). – 20th Century Fox™.