

Ivan Šetlík:

Odolnost termálních sinic ke zmrazení kapalným vzduchem.

Katedra fyziologie rostlin University Karlovy.

Při studiu termálních sinic prováděném na ústavu pro fyziologii rostlin University Karlovy pod vedením prof. Dr. S. Práta bylo zjištěno, že tyto organismy snášejí dobře kolísání teploty nejen v okolí teplot fyziologických (mezi 0° a 55 °C), nýbrž že se vyznačují také vysokou resistencí vůči velice nízkým teplotám. Z dosud publikovaných výsledků (4) vyplynuly dvě otázky. Předně, jak dlouho snesou termální sinice ochlazení na tak nízkou teplotu jako je teplota kapalného vzduchu. Za druhé, snesou-li tyto organismy přechod z laboratorní teploty do teploty kapalného vzduchu vícekrát, nebo zda budou opakovaným zmrazováním poškozeny. Na návrh prof. Dr. S. Práta pokusil jsem se zodpovědět tyto otázky.

Methodika byla podobná jako v práci Práta, Lhotského a Pospíšila (4). Na rozdíl od většiny ostatních prací, při nichž byl sledován vliv velmi nízkých teplot na různé organismy, bylo zde experimentováno s rostoucími a plně hydratovanými kulturami sinic a řas; také možnost přežití kultury prostřednictvím spor byla vyloučena. Kromě toho se zmrazené organismy navracely k normální teplotě velmi rychle, rychleji, než v kterémkoliv z obdobných pokusů (2, 3); vzorky ve svém obalu byly po vyjmutí z kapalného vzduchu ponechány při laboratorní teplotě, takže rozmrzly během pěti až deseti minut.

Pracoval jsem s kulturami termálních sinic (*Chroococcus*, *Mastigocladus*, *Oscillatoria*, *Phormidium* a *Symploca*) izolovanými prof. Dr. Prátem a Dr. F. Pospíšilem z horkých pramenů v Piešťanech, v Karlových Varech a na Islandě. Pro srovnání jsem zmrazoval také některé sinice mesofilní (*Nostoc* sp. a *Anabaena*), některé druhy rodu *Chlorella* (*Chl. vulgaris*, *Chl. pyrenoidosa* a *Chlorella* sp.), a ještě sinice rodů *Phormidium*, *Tolypothrix* a *Myxosarcina*.

Jako obalu pro řasy, které byly ponořovány do kapalného vzduchu, jsem užíval jednak mlynářského hedvábí č. 20, jednak jsem řasy zabalené v mlynářském hedvábí balil ještě do hliníkové folie. V prvním případě pronikal tedy kapalným vzduchem snadno ke zmrazovanému materiálu a působil na něj i bezprostředně, nejen nízkou teplotou. U vzorků obalených v aluminiové folii pronikal kapalným vzduchem k sinici nebo k řase jistě obtížněji a organismus dokonale promrzl dříve než přišel ve styk přímo s kapalným vzduchem. Při kontinuálním zmrazení po 28 dní projevil se u některých vzorků obalených pouze v mlynářském hedvábí přímý účinek kapalného vzduchu, a to tak, že část vláken zcela zbělela. Při přerušovaném zmrazování byly sinice zmrazeny vždy asi 20 hodin a potom byly čtyři hodiny ponechány rozmrzlé při laboratorní teplotě. *Mastigocladus*, *Symploca*, *Chroococcus* a *Oscillatoria* byly přerušovaně zmrazovány dvojím způsobem. Předně tak, že mezi jednotlivými zmrazeními byly udržovány jen ve vlhké atmosféře. V druhém případě byly

řasy a sinice (zabalené do mlynářského hedvábí) namočený vždy po rozmrznutí do piešťanské minerální vody, aby bylo zaručeno, že nemohly vyschnout. Kapalný vzduch totiž vysušuje materiál, když se při rozmrazování prudce odpařuje. Vzhledem k tomu, že při přerušovaném zmrazování byly organismy jen poměrně krátkou dobu při laboratorní teplotě, a to v podmínkách nepříznivých pro růst termálních organismů, můžeme předpokládat, že to byly prakticky tytéž buňky, které prošly celou řadou zmrazení. Výsledky pokusů obou serií se dají shrnout do tabulky uvedené na str. 414.

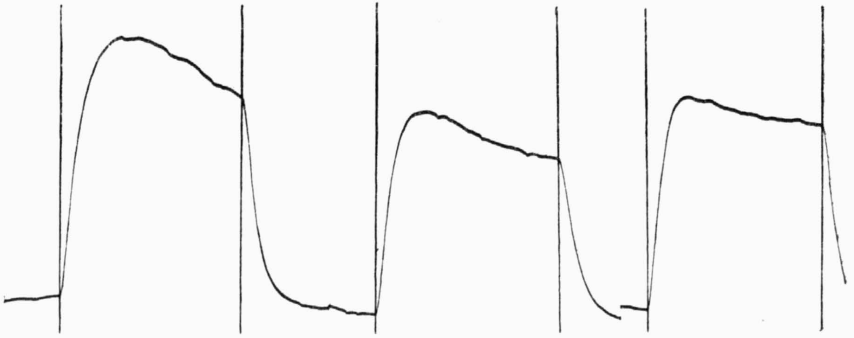
Kromě pokusů, které jsou zachyceny v tabulce, zmrazoval jsem v serii z r. 1950 také jeden kmen rodu *Mastigocladus* tak, že vzorky byly půl hodiny v tekutém vzduchu a jednu hodinu při laboratorní teplotě. Tímto způsobem proběhlo všech dvacet zmrazení velmi rychle za sebou (s jedním přerušením v noci). Výsledek se nelišil od přerušovaného zmrazování, jehož jsem používal obvykle: *Mastigocladus* snesl všech dvacet zmrazení.

Je zajímavé, že vzorky máčené mezi jednotlivými zmrazeními do piešťanské vody byly méně odolné, než vzorky udržované pouze ve vlhké atmosféře, i když přišly do styku s roztokem až po úplném rozmrznutí. Tento zjev by mohl svědčit pro názor, že je to vlastně hydratace a ne rozmrazování, která rozhoduje o poškození organismu nízkou teplotou.

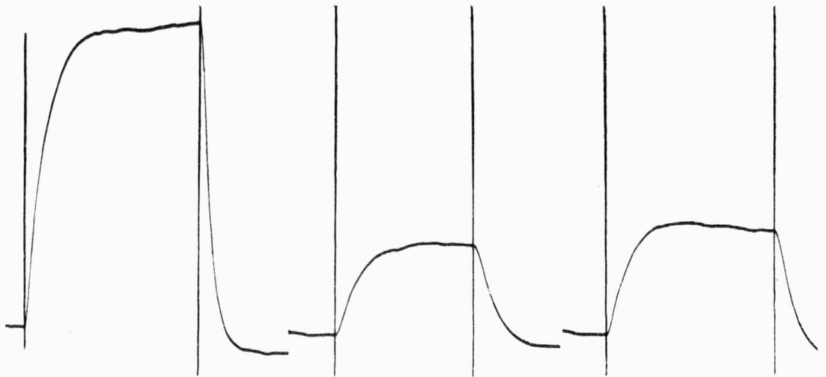
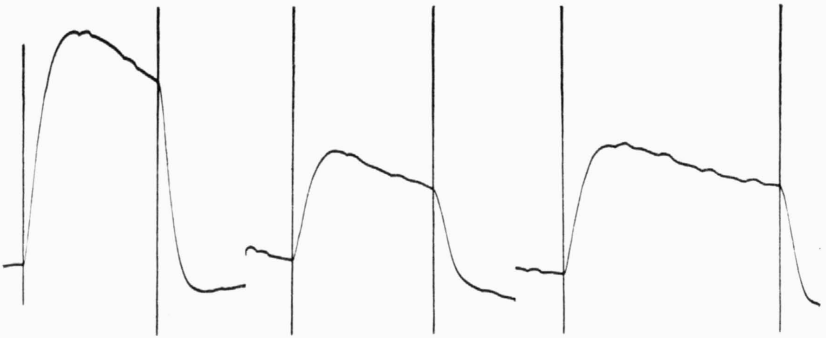
V serii pokusů z r. 1951 jsem také sledoval vliv zmrazení na metabolickou aktivitu sinic a za její měřítko mně sloužila intensita fotosynthesy. K měření intenzity produkce kyslíku jsem použil speciální polarografické techniky, kterou vypracovali Blinks a Skow (1); tuto metodu v pozměněné formě popisují podrobně v jiné práci (5). Má tu výhodu, že je možno stanovit okamžitou intensitu fotosynthesy v kterémkoliv okamžiku a tedy také velmi brzo po zmrazení. Její nevýhoda je v tom, že při daném uspořádání není možno naprosto spolehlivě srovnat dvě oddělená měření po stránce kvantitativní. Pro přibližné kvantitativní hodnocení však zcela vyhovuje. Vliv zmrazení na intensitu fotosynthesy jsem stanovil jednak pro krátkodobé zmrazení (5 minut), jednak pro zmrazení trvajících 4 týdny. V obou případech se fotosynthetická aktivita u zmrazených organismů obnovuje asi okamžitě po rozmrznutí tkáně, neboť fotosynthesu můžeme stanovit už v nejkratším čase potřebném pro rozmrznutí a přenesení sinice do přístroje. Při krátkodobém zmrazení jsem stanovil fotosynthetickou aktivitu před zmrazením i po zmrazení, při dlouhodobém zmrazení jen po zmrazení. Z pokusů s krátkodobým zmrazením vyplývá, že fotosynthesa se obnovuje se sníženou intenzitou, která se nezvýší ani po hodinovém pobytu při 42 °C, což je asi optimální teplota pro růst použitých sinic. Jak jsem již upozornil, není možno hodnotit výsledky přesně kvantitativně vzhledem k tomu, že se blanka sinice nedá přiložit na elektrodu vždy přesně stejným způsobem. Přesto však je možno pozorovat zřetelné rozdíly mezi jednotlivými rody: intensita fotosynthesy u rodu *Mastigocladus* byla po zmrazení snížena asi na jednu třetinu (průměr ze tří měření), u rodu *Oscillatoria* asi na jednu polovinu (průměr ze dvou měření) a u rodu *Symploca* asi na dvě třetiny hodnoty pro intensitu fotosynthesy před zmrazením (průměr ze dvou měření). Příklady záznamů intenzity fotosynthesy před zmrazením a po zmrazení jsou na obr. 1 až 3.

Po krátkodobém zmrazení se tedy objevila fotosynthesa u všech tří zkoumaných organismů. Naproti tomu po dvacetiosmidenním zmrazení objevila se produkce kyslíku jen u rodů *Symploca* a *Oscillatoria*, zatím co u rodu *Mastigocladus* jsem mohl pozorovat fotooxydaci, která je znakem hlubokého

porušení fotosyntetického aparátu. Byl to jistě jen výjimečný případ, kdy kmen rodu *Mastigocladus* byl nízkou teplotou usmrčen a po přeočkování dále nerostl. V jiných případech byl *Mastigocladus* stejně resistantní jako *Symploca*.



Obr. 1.



Obr. 1—3.

(Vysvětlení na str. 415.)

Pokusy, o nichž zde podávám zprávu, byly prováděny ve výzkumném ústavu agrochemické technologie v Bratislavě. Považuji za milou povinnost poděkovati co nejupřímněji ředitelství tohoto ústavu, jmenovitě prof. Dr. P. Němcovi a Ing. J. Furdíkovi, kteří mně jejich provádění umožnili a s velkým zájmem a ochotou vyšli ve všem vstříc.

Citovaná literatura

1. Blinks, L. R. a R. K. Skow: The time course of photosynthesis as shown by a rapid electrode method for oxygen. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 24 : 420—426, 1938.
2. Lipman, C. B.: Tolerance of liquid air temperature by sporefree and very young cultures of fungi and bacteria growing on agar media. *Bull. Torrey Bot. Club* 64 : 537—546, 1937.
3. Luyet, B. J. a P. M. Geheno: The survival of moss vitrified in liquid air and its relation to water content. *Biodynamica* 42 : 1—7, 1938.
4. Prát, S., St. Lhotský a F. Pospíšil: Resistence termálních sinic k nízkým teplotám. *Rozpravy II. třídy České akademie* 60 (20) : 1—10, 1951.
5. Šetlík, I.: Přejídné zjey ve fotosynthese, které se projevují v produkci kyslíku. *Rozpravy Československé akademie věd* 64 (3) : 1—68, 1954.

Tabulka I. — Таблица I. — Table I.

1	Serie 1950				Serie 1951			
	2	3	4	5	2	4	6	5
<i>Mastigocladus</i> †)	1,2 3 4	P, S P S P S	20 6	24 24 10 24	1	24	8	14
<i>Symploca</i> †)	1	P	20	24	2	24	4	28
<i>Oscillatoria</i> †)	1 2	P, S P		24 24	3	24	7	28
<i>Chroococcus</i> †)	1	P S	20	24 24	2	24	8	28
<i>Anabaena</i>		P	3	24		7		0
<i>Myxosarcina</i>		P		24				
<i>Phormidium</i>		P		10				
<i>Tolypothrix</i>		P		24				
<i>Nostoc</i>						0		0
<i>Chlorella vulgaris</i>						5		14
<i>Chl. pyrenoidosa</i>						5		0
<i>Chl. sp.</i> (Pieštany)						0		0

Vysvětlení k tabulce: 1 — pokusný organismus; 2 — kmen; 3 — druh obalu; P — pouze mlynářské hedvábní, S — hliníková folie; v serii 1951 byly všechny vzorky baleny pouze v mlynářském hedvábní; 4 — počet přerušovaných zmrazení; mezi jednotlivými zmrazeními vzorky uchovávané ve vlhké atmosféře; 5 — počet dní kontinuálního zmrazení; v serii 1950 odebrány vzorky pouze po 10 a 24 dnech, v serii 1951 po 14 a 28 dnech; 6 — počet přerušovaných zmrazení, mezi jednotlivými zmrazeními vzorky ponořeny do vody; †) — termální organismy.

Пояснение: 1 — организм; 2 — штамм; 3 — обертка; P — шелковый газ один, S — алюминиевый лист; в серии 1951 г. все образцы завертывались только в шелковый газ; 4 — число перенесенных повторных охлаждений; после отогревания образцы были помещены в камеру с влажным воздухом; 5 — продолжение непрерывного охлаждения: в серии 1950 г. образцы брались только после 10 и 24 дней, в серии 1951 г. после 14 и 28 дней; 6 — число повторных охлаждений; после отогревания образцы погружались в воду; †) — термальные синезеленые водоросли.

Legend to the table 1. 1 — test organism; 2 — strain; 3 — packed in; P — silk bolting cloth only, S — aluminium foil added; in the 1951 series all organisms only in silk bolting cloth envelopes; 4 — number of repeated freezings survived; when rewarmed, the organisms kept in moist air; 5 — number of days of continual cooling survived: in the 1950 series samples taken after 10 and 24 days, in the 1951 series after 14 and 28 days; 6 — number of repeated freezings survived; when rewarmed, the samples were dipped in water; †) thermal organisms.

Obrázek 1 až 3. — Příklady časových záznamů intensity fotosynthesy u sinic před zmrazením a po pěti minutách v kapalném vzduchu. Osa x: čas; osa y: intensita produkce kyslíku. Vyznačené abscissy udávají počátek a konec osvětlení. Teplota lázně 42 °C, osvětleno žárovkou 60 W ze vzdálenosti asi 15 cm. Prvá křivka na každém obrázku udává intenzitu fotosynthesy před zmrazením, druhá okamžitě po rozmrznutí a třetí hodinu po rozmrznutí (při 42 °C). 1 — *Symploca*. 2 — *Oscillatoria*. 3 — *Mastigocladus*.

Фиг. 1—3. Примеры записей интенсивности фотосинтеза, полученных полярографическим методом (1, 5). Первая кривая на рисунке показывает ход фотосинтеза перед охлаждением, вторая непосредственно после отогревания и третья 1 час после извлечения из жидкого воздуха. По оси абсцисс — время. По оси ординат — скорость выделения кислорода. Температура 42 °C. Освещение: 60-ваттовая лампа накаливания на расстоянии 15 см. Вертикальные линии обозначают начало и конец освещения. Фиг. 1 — *Symploca*. Фиг. 2 — *Oscillatoria*. Фиг. 3 — *Mastigocladus*.

Fig. 1—3. Time curves of photosynthesis of blue green algae before and after exposure to liquid air (original polarographic records) (1, 5). Abscissas: time; Ordinates: intensity of oxygen production. Temperature of the bath: 42 °C. Illuminated by a 60-watt bulb in a distance of 15 cm. First curve on every figure shows the intensity of photosynthesis before immersion in liquid air, second record was taken immediately after rewarming of the alga and the third 1 hour later (the rewarmed organism kept meanwhile at the temperature of its life optimum, i. e. 42 °C). Fig. 1 — *Symploca*. Fig. 2 — *Oscillatoria*. Fig. 3 — *Mastigocladus*.

И. Шетлик:

Устойчивость термальных синезеленых водорослей к температуре жидкого воздуха.

Настоящая работа была исполнена под руководством проф. Прата, как продолжение опытов совершенных прежде в его лаборатории.

Путем погружения в жидкий воздух я охлаждал разные виды водорослей и синезеленых водорослей (в том числе и некоторые термальные виды) а именно во влажном состоянии, т. е. с нормальным содержанием воды. Главной целью работы было установить стойкость этих организмов к длительному или повторному глубокому охлаждению.

Водоросли и синезеленые водоросли погружались в жидкий воздух в обертках разного вида: одна группа образцов завертывалась только в шелковый газ, у другой прибавлялась еще обертка из алюминиевого листа. После извлечения из жидкого воздуха образцы переносились на питательную среду с агаром и изучалась их жизнеспособность после глубокого охлаждения. Результаты опытов приведены в таблице 1.

У некоторых синезеленых водорослей я также определил, при помощи полярографического метода, энергию фотосинтеза до охлаждения и после пребывания в жидком воздухе (фиг. 1—3).

В общем результаты моих опытов хорошо согласуются с этими установленными в работе Прата, Лыготского и Поспишила (4). Особого внимания заслуживают следующие факты:

Некоторые изучаемые организмы — в том числе все термальные синезеленые водоросли — сохраняют жизнеспособность даже и после длительного глубокого охлаждения (28 дней). Они переносят дальше повторное охлаждение и отогревание — изучено было 24 повторений.

Фотосинтез синезеленых водорослей возобновляется непосредственно после отогревания, с несколько пониженной энергией.

I. Šetlík:

Resistance of thermal blue green algae to liquid air temperature.

Encouraged by professor Dr S. Prát I have accomplished some experiments concerning the resistance of lower plants to extremely low temperatures. Their aim was to answer some questions arising from earlier work performed in professor Prát's laboratory (4).

Algae and blue green algae partly originating from thermal springs and cultivated on agar media, were cooled with their full water content by immersion in liquid air. The samples were cooled in envelopes made from silk bolting-cloth; these were, in some cases, covered with aluminium foil more.

The survival of the algae was tested by inoculating the cooled samples after rewarming on agar media. The results of the survival experiments are summarized in table 1. Furthermore, in some cases, the influence of freezing by liquid air on photosynthesis of blue green algae was estimated by means of a modified polarographic technique (see fig. 1—3).

On the whole, my results are in concordance with conclusions drawn from earlier experiments; the following facts are worth to mention:

1. Some of the organisms studied (including all thermal blue green algae), survive a continual immersion in liquid air even for the longest period tested, i. e. 28 days.

2. They survive further many alternate freezings and thawings (the operation was repeated 24 times).

3. With thermal blue green algae photosynthesis was observed immediately after the samples had thawed; the intensity of the process however was something lowered. The photosynthetic activity of other algae after rewarming was not examined.