



Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta životního
prostředí**

Izolace a kultivace sinic (cyanobakterií) žijících na dně jezer v kontinentální Antarktidě

Jana Blažková

Bakalářská práce

**Katedra ekologie
Fakulta životního prostředí
Česká zemědělská univerzita v Praze**

Vedoucí práce: prof. Ing. Josef Elster, CSc.

Datum: 31. 3. 2023

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jana Blažková

Aplikovaná ekologie

Název práce

Izolace a kultivace sinic (cyanobakterii) žijících na dně jezer v kontinentální Antarktidě

Název anglicky

Isolation and cultivation of cyanobacteria from the bottom of lakes in continental Antarctica

Cíle práce

Hlavním cílem bakalářské práce bude získání kmenů (izolace na agarových plotnách) sinic žijících na dně antarktických jezer a literární rešerše cyanobakterii kontinentální Antarktidy.

Metodika

Izolace kmenů sinic na agarových plotnách, studium diverzity sinic antarktických jezer

Doporučený rozsah práce

min. 30 str.

Klíčová slova

Sinice – cyanobakterie, kontinentální Antarktida, jezera

Doporučené zdroje informací

- Elster, J. & Kvíderová, J. 2015: Cyanobacteria. In: Encyclopedia of Astrobiology. M. Gargaud, W. Irvine, (eds). The second modified edition, Springer 394-397.
- Komárek, J., Elster, J., and Komárek, O. 2008: Diversity of cyanobacterial microflora of the northern part of James Ross Island, NW Weddell Sea, Antarctica. *Polar Biology* 31: 853-865.
- Kvíderová, J., Elster, J., Komárek, J. 2019: Ecophysiology of cyanobacteria in the polar regions. In: Mishra, A.K., Tiwari, D.N., Rai, A.N. (eds.) *Cyanobacteria: from basic science to applications*. Academic Press, 277-302.
- Singh, S. M. & Elster, J. 2007: Cyanobacteria in Antarctic Lake Environment: an Mini-Review. *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, J. Seckbach, (ed.). – Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 302-320.

Předběžný termín obhajoby

2023/24 LS – FŽP

Vedoucí práce

prof. Ing. Josef Elster, CSc.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Elektronicky schváleno dne 22. 2. 2023

prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 24. 2. 2023

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 12. 03. 2023

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: „Izolace a kultivace sinic (cyanobakterií) žijících na dně jezer v kontinentální Antarktidě“ vypracovala samostatně a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědoma, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědoma, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne 31. 3. 2023

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce prof. Ing. Josefu Elsterovi, CSc. za odborné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích. Děkuji Doc., MSc. Oleksandru Brenovi, Ph.D. za cenné rady a trpělivost při konzultacích postupu práce. Chtěla bych poděkovat Mgr. Anastasii Kolomiets za odborné mikrobiologické rady. V neposlední řadě děkuji Petře Setničkové, Ing. Radovanu Blažkovi a Ing. Jáchymu Vekrbauerovi.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá metodikou postupu izolace a kultivace sinic a studiem diverzity sinic. Je dělena na literární rešerši a praktickou část. První část literární rešerše je zaměřena na Antarktidu jako celek, dále na její terestrické, hydro-terestrické, ale především limnické (jezerní) ekosystémy. Dále shrnuje téma sinic a je zakončena kapitolou o izolaci a kultivaci sinic.

Druhá praktická část bakalářské práce je realizace postupu izolace a kultivace sinic. Metodika je nejvytíženější částí práce, obsahuje detailní postup laboratorní práce. Kromě detailního slovního popisu je metodika zpracována fotografickou dokumentací. Výsledky obsahují jednoduché schéma postupu.

Klíčová slova: sinice (cyanobakterie), jezera, kontinentální Antarktida, izolace sinic

Abstract

The bachelor's thesis deals with the methodology of isolating and cultivating cyanobacteria, as well as studying the diversity of cyanobacteria. It is divided into a literature review and a practical part. The first part, which is a literature review, focuses on Antarctica as an ice continent, including its terrestrial, hydro-terrestrial, and limnetic ecosystems. It also provides a summary of the topic of cyanobacteria and concludes a chapter on the isolation and cultivation of cyanobacteria.

The second practical part of the thesis involves implementing the process of isolating and cultivating cyanobacteria. This detailed methodology section contains a thorough description of the laboratory work, along with photographic documentation. The results contain a simple flowchart.

Keywords: cyanobacteria, lakes, continental Antarctica, isolation of cyanobacteria

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Antarktida	3
3.2	Sladkovodní biotopy Antarktity	4
3.2.1	Klasifikace biotopů	4
3.3	Jezera Antarktity	7
3.3.1	Klasifikace jezer dle původu jezerní pánve	7
3.3.2	Biota v antarktických jezerech	8
3.3.3	Biotopy antarktických jezer	9
3.3.4	Jezera Země královny Maud	10
3.3.5	Japonská stanice Syowa	11
3.3.6	Odebrání biologických vzorků z antarktických jezer	13
3.4	Sinice (cyanobakterie)	13
3.4.1	Sinice	14
3.4.2	Morfologie buněk sinic	15
3.4.3	Strukturní komponenty	16
3.4.4	Specializované struktury	16
3.4.5	Rozmnožování	17
3.4.6	Taxonomický systém	17
3.5	Sinice v Antarktidě	18
3.5.1	Sinice v jezerech Antarktity	20
3.6	Izolace a kultivace sinic	22
3.6.1	Sterilizace a sterilní techniky	22
3.6.2	Tradiční techniky izolace sinic	24
4	Metodika	26
4.1	Úvod do metodiky	26
4.2	Izolace a kultivace vzorků	27
4.3	Přímá mikroskopie	33
4.4	Přeočkování sinice	35
5	Výsledky	38
5.1	Izolace a kultivace sinic	38
5.2	Doba růstu sinice	40

5.3	Výsledky literární rešerše	41
6	Diskuse	42
7	Závěr	45

1 Úvod

Antarktida je považována za extrémní polární prostředí. Přes nepříznivost tohoto prostředí lze v ekosystémech najít kromě jiných fotosyntetizujících organismů právě sinice. Sinice nalezneme na Antarktidě ve více ekosystémech, a to jak terestrických, hydro-terestrických, tak limnických (jezerních). Jedním z limitujících faktorů u terestrických typů ekosystémů je zdroj vody, který je dostupný jen část roku. Sinice jsou adaptovány na extrémní podmínky životního prostředí. Bakalářská práce se soustředí především na skutečnosti související s klasifikací limnických ekosystémů, ale také na klasifikaci jako celek pro úplnost a porozumění ekosystémů a diverzity celého ekosystému. Na rozdíl od terestrických ekosystémů, kde je voda limitujícím zdrojem, řadíme k limnickým ekosystémům jezera, která nepromrzají až ke dnu a mají vodu dostupnou po celý rok. Tato jezera se nachází v odledněných lokacích po ústupu ledovců. Na dně některých jezer se nachází mikrobiální rohože, kde se vyskytují kromě jiných organismů také sinice, které jsou zde hlavními primárními producenty.

Literární rešerše dále navazuje na představení sinic. Poslední část práce se týká izolace a kultivace sinic, tato kapitola představuje následnou praktickou část práce, která vychází z dostupných literárních zdrojů.

V praktické části práce byly zkoumány vzorky z lokalit ze Země královny Maud, oblasti, která je lokalizovaná na východě Antarktidy. Zpracovávané vzorky byly odebrány v letech 2018 a 2019 během léta na expedici JARE60 – Japanese Antarctic Research Expedition, profesorem Ing. Josefem Elsterem, CSc. Metodika izolace a kultivace sinic (cyanobakterií) z této expedice představuje nejvytíženější část práce. Izolace a kultivace probíhala v Botanickém ústavu AV ČR, v. v. i., Dukelská 135, 379 01 Třeboň. V této části jsou popsány jednotlivé kroky tak, aby samotná izolace byla lehce replikovatelná.

2 Cíl práce

Bakalářská práce na téma Izolace a kultivace sinic (cyanobakterií) žijících na dně jezer v kontinentální Antarktidě se bude skládat ze dvou částí. Hlavním cílem bakalářské práce bude získání kmenů (izolace na agarových plotnách) sinic žijících na dně antarktických jezer a literární rešerše cyanobakterií kontinentální Antarktidy.

První část práce zahrnuje literární rešerši, kde nejdříve představím kontinentální Antarktidu, její přírodní podmínky a podnebí. Dále s tématem spojená charakteristika sladkovodního prostředí v Antarktidě a limnického prostředí jezer Antarktidy. Sinice na Antarktidě, definice sinic, jejich popis, stavba buňky a taxonomický systém. Dále studiem sinic zmíněných ve vlastní části. Největší část literární rešerše zahrnuje kapitolu o izolaci a kultivaci sinic.

Druhá část bakalářské práce popisuje jednotlivé kroky izolace a kultivace studovaných sinic. Jednotlivé kroky zdokumentuji fotografiemi.

3 Literární rešerše

3.1 Antarktída

Antarktický kontinent je oblast, do které spadá jak samotný kontinent, tak šelfové ledovce i Jižní oceán. Jedná se o čtvrtý největší kontinent světa o rozloze 13,830 milionů km². Rozměry se ve zdrojích liší, ale publikace (Prošek et al., 2013) se přiklání k údajům z British Antarctic Survey. Pro představu a porovnání je Evropa menší, její rozloha je 10,53 milionů km². Nezaledněná část Antarktidy zabírá pouze 44 890 km². V moři se nachází v odhadu asi 40 km široký pruh, který je přirozenou hranicí této popisované oblasti. Nazýváme ho antarktická konvergence, nepřesně antarktická polární fronta. Nachází se mezi 48° a 61° jižní šířky. Antarktická konvergence sousedí s vodami Tichého, Atlantského a Indického oceánu. Sousedící oceány mají vodu teplejší a slanější, stýkají se s vodou poměrně sladkou a studenou. Změna teploty mezi oceány se pohybuje mezi 1–5 °C. Tato linie od sebe odděluje dva rozdílné biologické a hydrologické systémy, v nichž se vyskytují různá klimatická podnebí. Subantarktída je vnější vymezení v antarktické zóně konvergence. Z hlediska biogeografického i klimatického se jedná o část antarktické oblasti, která se vyznačuje chladným a mírným oceánským klimatem, přičemž po dobu šesti měsíců v roce jsou průměrné měsíční teploty kladné a roční srážkové úhrny nad 900 mm. V důsledku toho se v této oblasti nenacházejí stromy, ale nachází se zde dřevnaté byliny, polokeře a výtrusné rostliny. (Prošek et al., 2013; S. Peck, 2018)

Přímořská Antarktída je podoblastí Subantarktidy. Klima je zde humidní oceánské. Teplota v průměru přesahuje po dobu jednoho až čtyř měsíců 0 °C. Roční úhrnné srážky se pohybují mezi 350–500 mm vodního ekvivalentu. Na tomto území se vyskytují dvě cévnaté rostliny v kontrastu s druhově bohatě rozmanitými společenstvy lišejníků a mechorostů. (Prošek et al., 2013)

Kontinentální Antarktída je část pevniny, do které patří i pobřeží Antarktického poloostrova a jižní část ostrova Alexandrova. Zdejší klima je popisováno jako drsné. Během dvanácti měsíců je průměrná teplota záporná. Roční úhrn je v průměru do 150 mm. (Prošek et al., 2013)

Západní příhon je největší mořský proud na Zemi. Jedná se o Antarktický cirkumpolární proud, který má délku 20 000 km. Transportováno je zde až 135 milionů m³ vody za sekundu. Pohání jej západní vítr okolo 50° jižní šířky. Jedná se o důležitou část, která ovlivňuje klimatický systém celé planety. Západní příhon vznikl po oddělení Antarktického poloostrova od Jižní Ameriky. Poté došlo

k zalednění Antarktidy a ochlazování planety během neogénu a kvartéru. Proud odděluje antarktický kontinent od teplejších vod mírných šířek planety. Funguje jako tepelná izolace Antarktidy. (Prošek et al., 2013)

Nejvyšší vrchol kontinentu je Mt. Vinson. 4892 m n. m. Dalším důležitým místem jsou jižní póly. Jižní pól se nachází ve výšce 2835 m n. m. Jižní magnetický pól nemá stálou polohu. Jde o místo na jižní polokouli, kde jsou indukční čáry kolmé k Zemi. V průběhu roku se magnetický pól posouvá. Průměr posunu je 12,5 km k severo-severozápadu. Jižní geomagnetický pól se také posouvá v průběhu roku v průměru o 2–3 km k jiho-jihozápadu. Oproti magnetickému pólu si lze geomagnetický pól představit jako osu s pomocí jednoduchého dipólu umístěném v geometrickém středu Země. Osa je odkloněna od osy rotace a protíná se se severním geomagnetickým pólem. (McElhinny, McFadden, 1998; Prošek et al., 2013; Wikipedie, 2023)

V Antarktidě se nenachází vodoteče. Na místech, kde se v letních měsících vyskytují teploty nad 0 °C se nachází krátké, ve většině ledovcové potoky. Na místech odledněných také s průměrnými teplotami v letních měsících nad 0 °C se nachází potoky ze sněžníků nebo kamenných ledovců. Na těchto místech se vyskytují různé typy jezer jako např. karová, morénová nebo jezera příbřežní. (Prošek et al., 2013)

3.2 Sladkovodní biotopy Antarktidy

Klimatické podmínky ovlivňují funkčnost ekosystému, jsou tak vnějšími faktory, které mění ekosystémy v průběhu roku. Mikroklima je zóna mezi substrátem a atmosférou, kde probíhá výměna energie. Organismus je tímto mikroklimatem přímo ovlivňován. V polárních ekosystémech jsou tyto výměny důležité pro pochopení ekosystému, ve kterém se nachází život. Voda je tepelným výměníkem, který svou přítomností či absencí přímo ovlivňuje koloběh dění. Polární ekosystémy jsou vymezeny přítomností permafrostu, který zamezuje distribuci vody. Důvodem je již popsaná důležitost vody jako zdroje, který přímo ovlivňuje organismy v těchto biotopech. (Elster, 2002)

3.2.1 Klasifikace biotopů

Modifikovaná ekologická klasifikace sladkovodních ekosystémů nejdříve popisuje dva hlavní faktory klasifikace. Prvním faktorem je vodní gradient, který se reflektuje lokálním klimatem, jako absence či přítomnost vody. Druhým faktorem je věk, který determinuje stádium rozvoje řas a sinic. (Elster, 2002)

Tento klasifikační systém je založen na absenci či přítomnosti vody. Ve sladkovodních biotopech, kde dochází k drastické změně ročního období, kdy jsou v oblastech dlouhé zimy a krátká léta, je přímá souvislost mezi ročním obdobím a stavem biotopu. Přítomnost permafrostu zabraňuje roztáté vodě na povrchu, aby pronikla do půdy. Mnoho lotických (tekoucí voda) a lentických (stojatá voda) sladkovodních biotopů je tak vytvořeno v létě. Tyto biotopy dávají příležitost nejen sinicím, ale i dalším organismům pro jejich rozšíření. V tomto časovém období je diverzita velmi rozsáhlá. V terestrických systémech voda odtéká velmi rychle. Výsledkem je, že voda v terénu také velmi rychle vyschne. Do této kategorie patří i mokřadní systémy, které vznikají v terénních depresích, kde se v půdě voda nashromáždí. Vytváří tak ekosystém, který obývají kromě sinic i jiné organismy. Zdrojem vody je tající sníh a led, které zásobují sladkovodní ekosystémy. V limnických systémech, kam patří i antarktická jezera, jsou touto tavnou vodou zásobována. Voda v terestrickém systému je dostupná jen po velmi krátké období (několik dní), kdežto v hydro-terestrickém systému je přístupná po většinu letního období. (Elster, 2002; Elster et al., 2023)

3.2.1.1 Terestrické ekosystémy

Jsou definovány jako prostředí, kde je voda v tekutém skupenství k nalezení jen po velmi krátkou časovou periodu, a to během tání. V tomto prostředí se kapalná voda nalezne ve formě adsorpční a kapilární půdní vody. Limitujícím faktorem je tedy zdroj vody. (Elster, 2002)

3.2.1.2 Hydro-terestrické ekosystémy

Hydro-terestrické ekosystémy jsou systémy, kde je voda v tekutém skupenství dostupná většinu léta, příkladem jsou mělké mokřady. Řadíme sem jak lotické, tak lentické ekosystémy. Podle přítomnosti tekuté vody se odvíjí jejich životnost. S přítomností tekuté vody jsou v systémech i přítomny živiny, minerální látky a fauna. Voda jako faktor ovlivňuje ekologickou charakteristiku prostředí. V druhé polovině léta ekosystém vyschne. S příchodem zimy ekosystém zamrzá. (Elster, 2002)

3.2.1.3 Limnické (jezerní) ekosystémy

Jsou definovány jako systémy, kde je voda v tekutém skupenství přítomna po celý rok. Do tohoto typu ekosystému řadíme hluboká sladkovodní jezera, která mají limnický charakter. Některá z nich mohou existovat velmi dlouho, a to až po desetitisíce let. (Elster, 2002; Elster et al., 2023)

Do hydro-terestrických prostředí patří biotopy, kdy jejich prostředí je nestabilní a extrémní. Mohou zde žít různé druhy sinic a řas s různým množstvím biomasy. Přítomnost těchto sinic a řas je ovlivněna faktory prostředí jako jsou živiny, salinita, pH vody nebo přirozené disturbance sedimentu nebo eroze. Dominantní jsou sinice. Komunity existují v nejvyšších i nejnižších zeměpisných šířkách pod podmínkou, že tekutá voda bude dostupná alespoň část roku. Distribuce, abundance organismů a jejich diverzita je závislá na charakteristice mikrohabitatu, s horšími podmínkami pro život klesá abundance a diverzita. (Elster, 2002)

Řasové a sinicové koberce a krusty

Řasové koberce a krusty jsou kohezní filmy a jiné struktury, které v dominantní většině produkují sinice a v menším měřítku eukaryotní řasy. Sinice mají ekologickou výhodu, protože jsou lépe adoptovány na stres vysycháním a vymrzáním. Rezistence vůči stresu jim umožňuje rychlé obnovení metabolických procesů. Současně sinice produkují v tomto prostředí biomasu, která je větší než následná dekompozice. To má za následek akumulaci organického uhlíku v prostředí, které je chudé na živiny. Sinicové a řasové bentické rohože stabilizují částice sedimentu tím, že je spojují dohromady. Podobné shluky se vyskytují i na povrchu půdy jako biologické půdní krusty. Některé druhy sinic těchto rohoží mají optimální teplotu pro svůj růst 15–25 °C. Rostou zde v suboptimálních podmínkách, i když se povrch rohoží dokáže zahřívat na tyto vysoké teploty. Některé druhy sinic, které mají takto rozsáhlé teplotní optimum, mohou být dokonce endemické pro Antarktidu. (Elster, 2002)

Slizové shluky a rosolovitá biomasa vznášející se ve vodě

Shluky se nacházejí přichycené ke dnu. Jsou produkovány jak prokaryotickými, tak eukaryotickými fotosyntetizujícími mikroorganismy. (Elster, 2002)

Struktura společenstva v sinicových rohožích

Řasové a sinicové rohože s krusty mají převahu sinic a produkují biomasu *Chroococcales* - *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Gloeocapsa*, *Gloeocapsopsis*; *Oscillatoriales* - *Leptolynghya*, *Lynghya*, *Schizothrix*, *Phormidium*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*; *Nostocales* - *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Calothrix*, *Dichothrix* a *Nostoc*. Bentické rohože se skládají z *Phormidium* a *Nostoc* spolu s trichomy *Leptolynghya*. V prostředí, kde dochází k prosakování vodních toků, jsou společenstva *Gloeocapsa*, *Schizothrix*, *Dichothrix* a *Scytonema*, s trichomy *Leptolynghya*. (Elster, 2002)

3.3 Jezera Antarktidy

V Antarktidě najdeme nejrozmanitější škálu jezer na planetě. Abiotické faktory často definují jezera polárních oblastí. Těmito faktory mohou být dlouhé zamrznutí, velmi nízká teplota vody a extrémní fluktuace solární energie v důsledku polárních dnů a polárních nocí. (Singh, Elster, 2007; Laybourn-Parry, Wadham, 2014)

V odledněných oblastech jsou jezera sladkovodní, brakická a hypersalinní. U jezer, která jsou nebo v minulosti byly v kontaktu s mořem, se nachází vrstvy sladké a slané vody, jde například o jezera přílivová nebo jezera ledovcová šelfová. Pod kontinentálním ledovým příkrovem se nachází rozsáhlá síť subglaciálních jezer. (Laybourn-Parry, Wadham, 2014)

Jezera jsou z velké části chudé na biodiverzitu, jsou charakterizované zkrácenými mikrobiálně dominantními potravními řetězci. Jezera nejen Antarktidy, ale i Arktidy jsou ukazatelem lokální i globální změny klimatu. (Laybourn-Parry, Wadham, 2014)

Polární limnologie je ovlivněna přítomností ledovců. Například subglaciální jezera, se nacházejí především v Antarktidě pod vrstvou ledu, která v některých případech může dosahovat až 4 km. Příkladem je jezero Vostok. (Laybourn-Parry, Wadham, 2014)

3.3.1 Klasifikace jezer dle původu jezerní pánve

Klasifikace jezer není ustálená. Jezera tak lze klasifikovat podle několika kritérií. Kritéria mohou být hydrologická, morfometrická, biologická atd. (Netopil, 1981) Podle toho, na jaké účely je klasifikace určena, jsou členěna i jezera. Nejčastěji jsou jezera klasifikována dle původu jezerní pánve. Záleží na faktorech, které při vzniku jezera rozhodovaly. Těchto faktorů ovlivňující vznik je více. Jedná se o faktory dynamické, geologické složení, tak i geomorfologické procesy. (Čepová, 2013)

3.3.1.1 Jezera fluviální

Tato jezera přímo ovlivňuje činnost vody. Ve většině případů se fluviální jezera nachází v říční nivě, ve středním či dolním toku. (Čepová, 2013)

3.3.1.2 Jezera ledovcová (glaciální)

Jedná se o nejčastěji se vyskytující jezera na planetě. Vznikla po posledním období zalednění při ústupu ledovců. Jsou tvořena horským ledovcem nebo pevninským ledovcem. Vznikají čtyřmi způsoby, a to ledovou bariérou, glaciální erozí, glaciálními nánosy nebo kombinací glaciální aktivity s jinými fyzicko-geografickými procesy. V polárních oblastech se dělí do subtypů. Jezera vzniklá ledovou bariérou, jezera hrazená glaciálními nánosy či glaciální erozí. Dále potom vznikají kombinací těchto procesů s glaciální aktivitou. (Čepová, 2013)

3.3.1.3 Jezera závislá na existenci ledovců (proglaciální)

Tento druh jezer je závislý na přítomnosti ledovce. Vytváří se v blízkosti ledovce, příkrovech, depresích nebo vedle morén. V tomto typu nedochází k odvodnění. Vznikají jezera přehrazená nebo zásobována ledovcovou vodou. Jezera proglaciální rozlišujeme do subtypů na jezera vzniklá ledovou bariérou, jezera epiglaciální, supraglaciální a epišelfová jezera. Jezera vzniklá ledovou bariérou vznikají přehrazením ledovce za ledovcového pukání. Epiglaciální jezera zásobuje voda z ledovců. Supraglaciální jezera se nachází na vrcholu samotného ledovce. Epišelfová jezera se vyskytují na bazi šelfového ledovce a jsou propojená s oceánem. (Čepová, 2013)

3.3.1.4 Jezera postglaciální

Postglaciální jezera vznikají po kontinentálním a místním horském zalednění po ledovcové erozi a depozici. Pod tuto kategorii patří jezera karová a jezera kotlíková. (Čepová, 2013)

3.3.1.5 Jezera termokrasová

Jejich existence je vázána na přítomnost permafrostu. Dochází k degradaci ledových klínů a poklesu povrchu. Jezero je zásobováno vodou z tajícího permafrostu. (Čepová, 2013)

3.3.2 Biota v antarktických jezerech

V antarktických jezerech je konstantně nízká teplota. Jsou zde nízké meziroční úrovně fotosynteticky aktivní radiace (FAR) a minimální přísun živin. V důsledku působení těchto faktorů na organismy se zkracuje potravní pyramida. V jezerech se nenachází ryby jakožto konzumenti vyššího řádu. Je zde také nízká

přítomnost bezobratlých a planktonu. V jezerech dominují prokaryotické a eukaryotické mikroorganismy. Vyskytují se tu *Archaea*, *Bacteria*, *Algae* a *Protozoa*. Bentos jezer je dominován sinicovými rohoži, ale existují i jezera kde dominují mechy. (Laybourn-Parry, Wadham, 2014)

Důležitost cyanobakterií byla pochopena až v kolem roku 1980. V předchozích studiích se používaly sítě, které zachytily pouze fytoplankton a zooplankton. V těchto letech začalo být k dispozici fluorochromové barvení, a to 4',6-diamidino-2-fenylyndol. Obarvené cyanobakterie se následně daly počítat pod epifluorescentním mikroskopem. V této době se očkovaly agarové plotny, ale spočtení jedinci za použití této metody byli nižší než realita. Odhad je takový že kolem 2 – 3 % bakterií bylo kulturabilních za použití tehdejší technologií pro kultivaci. Dnes jsou vodní potravní řetězce považovány za komplexní systém mikroorganismů a vyšších organismů. Mikroorganismy jsou stěžejní jednotkou v biogeochemickém cyklu uhlíku a dalších elementů. (Laybourn-Parry, Wadham, 2014)

3.3.3 Biotopy antarktických jezer

Existují tři biotopy v polárních jezerech, a to pelagický biotop, bentický biotop a ledová pokrývka. Do nedávna nebyla ledová pokrývka považována za biotop. Studie v alpských jezerech ale dokázala, že v ledové pokrývce je komplexní mikrobiologické společenství. (Laybourn-Parry, Wadham, 2014)

Roční led na antarktických jezerech může dosáhnout tloušťky až 2 metrů. Trvalý led na jezerech dosahuje tloušťky až 6 metrů. Obsahuje sediment, který je do jezera zanesen z okolí. Sediment je tmavší než okolí, tím absorbuje energii ze slunce. Části ledu se sedimentem rychleji tají a vytvoří vrstvu agregátních plátů a roztáté vody. Tyto agregáty obsahují komunity sinic. Příklady sinic jsou *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Scytonema* a *Synechococcus*. Jen málo eukaryot kolonizuje led. Ledová pokrývka tvoří dynamickou rovnováhu mezi sestupným pohybem sedimentu jako výsledek tání během léta a vzestupným pohybem ledu v důsledku ablace na povrchu a zmrznutím vně ledové vrstvy. V průběhu léta je voda v tekutém skupenství přítomna okolo 150 dní. Voda v tekutém skupenství je kolonizována mikrobiálními organismy. Sinice dominují biomase víceletých (perineálních) ledových pokrývek. Na ledovcích, které na povrchu v letním období tají, a kde se vyskytuje celá řada různých vodních biotopů, např. kryokonitů, které jsou především osidlovány sinicemi. (Laybourn-Parry, Wadham, 2014; Segawa et al., 2017)

Fotosynteticky aktivní záření (FAR) klesá s hloubkou exponenciálně. V jednoletém ledu, který je transparentní, není klesání záření tak prudké. Okolo 18 %

až 25 % povrchové radiace bylo transmitováno do hloubky 2–4 m vodního sloupce v průběhu roku. Studie na víceletém ledu ukázaly, že jen 1,34 % až 2,73 % FAR proniká pod led. (Fragoso et al., 2014; Laybourn-Parry, Wadham, 2014; Kumar et al., 2015)

Bentické společenstva antarktických jezer mají extenzivní růst sinicových, řasových a mechových rohoží. V některých případech je v jezerech přítomná komplexní morfologie pilířů. Řasové rohože jsou složeny z vláknitých sinic jako například *Oscillatoria* a *Leptolyngbya*, dále je třeba možné nalézt například rozsivky. (Imura et al., 1999; Laybourn-Parry, Wadham, 2014)

3.3.4 Jezera Země královny Maud

Lokalita se nachází ve východní části Antarktidy. Vzorky v praktické části bakalářské práce pochází právě z této oblasti. V letech 2018 a 2019 se konala do této oblasti expedice Japanese Antarctic Research Expedition (JARE60), a to v letních měsících. Nejteplejším měsícem je v této oblasti leden, kdy se teplota pohybuje okolo $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Pushkareva et al., 2023)



Obrázek 1: Jezero Naga Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)

Odborná literatura (Lepparanta et al., 2020) se věnovala studii jezer v této části Antarktidy, konkrétně v západní části Vestfjella. V této části byl klasifikován



Obrázek 2: Jezero Kumugata Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)

výskyt třech hlavních jezer, a to supraglaciální jezera, nunatak jezera a epiglaciální jezera. Nunatak jezera lze dále rozdělit do dvou kategorií, kde v prvním případě je zdrojem vody taní ledovce a v druhém tající sněh v letním období. Teplota jezer je závislá na faktorech jako solární radiace a sublimace. S tím souvisí i limnologická kvalita, kde jezera supraglaciální jsou ultraoligotrofní (velmi slabě úživné až neúživné vody) až po hypertrofní (vysoce úživné) nunatak jezera. Autoři (Lepparanta et al., 2020) dále navrhují, že tato tři jezera jsou běžné v blízkosti nunataků v západní i severní části Země královny Maud.

3.3.5 Japonská stanice Syowa

Syowa je japonská polární výzkumná stanice, která se nachází na East Ongul Island v Zemi královny Maud v Antarktidě.

3.3.5.1 Jezera oblasti McMurdo Dry Valleys

Dufek Massif je skalnatý, z velké části zasněžený masiv 43 km dlouhý. Nachází se v severní části pohoří Pensacola. Nachází se zde sinicové rohože, a to jak na dně jezer, tak i terestriálních habitatech. (Hodgson et al., 2010; USGS science for changing a world, 2022)



Obrázek 3: Jezero Kikuno Ike (Skarvnes) č.3 (Elster, 2019)

McMurdo Dry Valleys je to unikátní systém prohloubených údolí o rozloze 53 km². Jedná se o největší systém údolí bez ledu. Je to ojedinělá oblast s 65 geomorfologickými záznamy glaciální historie ledového příkrovu, včetně důkazů až sedmi různých fází zalednění. V údolí se nachází proglaciální jezera. Region této části je studený a suchý, přesto se v těchto jezerech nachází biota ve formě rohoží sinic, které rostou jako foliózní shluky. (Hodgson et al., 2010)

Na místech bez ledu se nachází vyschlé prameny. Mikrobiální analýza kultur v půdě našla měřitelné množství životaschopných aerobních heterotrofických organismů včetně gramnegativních bakterií. (Hodgson et al., 2010)

Na místech odledněných se nachází vyschlé mělké mokřady. Dalším typem jezer je Folidas jezero. Jde o bývalé proglaciální jezero, které bylo promrzlé až na dno. Ve studii (Hodgson et al., 2010) se zabývali aktivně rostoucí sinicovou rohoží na dně litorálu. Bublínky kyslíku na povrchu a pod ledem naznačovaly, že sinice fotosyntetizovaly. Vzorek obsahoval červenooranžové shluky sinic, která byla 20 metrů od břehu. (Hodgson et al., 2010)



Obrázek 4: Jezero Bosatsu Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)

3.3.6 Odebrání biologických vzorků z antarktických jezer

Při odebrání vzorků se dbá na to, aby jezero nebylo kontaminováno. Odebírání vzorků se provádí podle protokolu „Management Plan for 214 Antarctic Specially Protected Area“. Vybavení je před použitím sterilizováno. Vzorky se dávají do sterilních nádob. Biologický materiál z bentosu i litorálu se sbírá manuálně. Vzorky, které se dále zkoumají pod mikroskopem, jsou prezervovány v jodovém či etanolovém roztoku. Pro molekulární analýzu se vzorky mrazí. (Hodgson et al., 2010)

3.4 Sinice (cyanobakterie)

Sinice (cyanobakterie) jsou jediné prokaryota s oxygenní fotosyntézou. Kvantitativně patří mezi nejvýznamnější organismy, které se kdy na naší planetě vyvinuly. Z endosymbioticky žijící sinice vznikly plastidy, organely chloroplastu fotosyntetizujících eukaryot. S rozvojem oxygenní fotosyntézy se atmosféra a oceány Země mohly začít okysličovat. Sinice představují drtivou většinu veškeré primární produkce na Zemi. (Eliáš, 2009; Demoulin et al., 2019)



Obrázek 5: Odběr vzorků z jezera Nyorai Ike (Elster, 2019)



Obrázek 6: Odběr vzorků z jezera Dairi Ike (Skallen) (Elster, 2019)

3.4.1 Sinice

Cyanobakterie jsou fotosyntetická prokaryota, které se vyskytují ve většině osvětleného prostředí. Odhad její globální vlhké biomasy je tisíc milionů tun. Všechny

sinice syntetizují chlorofyl. Kyslík vzniká během fotosyntézy, kdy typickým dárcelem elektronů je voda. Většina má namodralou barvu, která se vyskytuje díky produkci fykobilinového pigmentu fykocyaninu. Dále může být přítomný červený doplňkový pigment fykoerytrin. Některé rody neprodukují žádný ze zmíněných, ale tvoří doplňkové pigmenty. Některé tyto typy jsou velice důležitou součástí planktonu oceánu. (Whitton, Potts, 2012; Sánchez-Baracaldo et al., 2022)

Sinice žijí v různém prostředí. Oproti eukaryotickým řasám preferují teplotu o 7 °C vyšší, proto jsou často úspěšnější v teplejších oblastech. Jsou jedni z neúspěšnějších organismů ve slané vodě. Terestrické formy jsou schopny tolerovat UV záření. Planktonní formy umí fotosyntetizovat při nízkých počtech fotonů v prostředí. Jsou schopni použít sulfan, sirovodík H₂S, jako donor elektronu. Dále redukce CO₂ probíhá při nízkých koncentracích uhlíku. (Whitton, Potts, 2012)

Konkurenční výhoda je schopnost sinic fixovat dusík N₂, a to pomocí heterocytů, které se vyskytují u sinic *Nostocales* a *Stigonematales*. V heterocytech je uložen enzymatický komplex nitrogenáza. Ten přeměňuje dusík na glutamin, který je dále spotřebováván. (Whitton, Potts, 2012)

3.4.2 Morfologie buněk sinic

Cyanobakterie jako prokaryota jsou klasifikována podle jejich buněčné struktury. Jsou větší a propracovanější než buňka bakterie. Typická velikost se pohybuje mezi 1–10 μm. Pro porovnání to je jedna desetina až jedna dvacetina velikosti eukaryotické buňky. Jednotlivé morfologické skupiny mohou být jednobuněčné sférické a cylindrické morfologie, jednoduché a komplexní mnohobuněčné vláknité formy a koloniální formace. Buněčná struktura zahrnuje vnější buněčný obal (obálku) s peptidoglykanovou buněčnou stěnou. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie lze zobrazit buněčné ultrastruktury. Také lze použít například elektronovou mikroskopii. Díky těmto zobrazovacím metodám můžeme pozorovat značnou variabilitu mezi druhy sinic. Co se týče genetického materiálu nebo nukleoidu, tak oblast obsahuje holou kruhovou DNA. Ribozomy jsou rozptýleny po cytoplazmě. Sinice obsahují fotosyntetické organely. Samotná fotosyntéza je možná prostřednictvím souboru fotosyntetických komplexů a molekul uložených ve specializovaných buněčných membránách. Jedná se o tylakoidní membrány, které mají fotosyntetický aparát. Tento aparát fykobilizomů umožňuje sběr světla. Buňka obsahuje dále i zásobní inkluze. Tyto zásobní inkluze mohou sloužit jako metabolické produkty při nepříznivých podmínkách nebo stresu. (Waditee-Sirisattha, Kageyama, 2022)

3.4.3 Strukturní komponenty

Vnější části buňky se skládají ze slizové vrstvy a buněčné stěny. Slizová vrstva chrání buňku před škodlivými faktory prostředí. Obal zajišťuje ochranu vůči okolnímu stresu z okolního prostředí a slouží jako protekce před teplotním stresem, UV zářením a vysušením. (Waditee-Sirisattha, Kageyama, 2022)

Buněčná stěna leží pod slizovou vrstvou. Skládá se ze dvou až tří vrstev. Vnitřní vrstva buněčné stěny leží vedle plasmové membrány. Některé sinice mají s-vrstvu, krystalickou proteinovou vrstvu, pokrývající celý povrch buňky, která se jeví jako důležitá pro pohyblivost vlákna. Plasmatická membrána, selektivně propustná membrána, která uzavírá cytoplasmu. Na periferii cytoplazmy jsou tylakoidní membrány. Ty obsahují fotosyntetické pigmenty, který nazýváme fykobiliproteiny. U některých sinic jsou přítomny pseudovakuoly. Všechny vzduchové vakuoly mají submikroskopické jednotky nazývané plynové vezikuly. Tyto plynové vezikuly dovolují sinicím využívat vztlaku. Díky těmto jednotkám se dokážou přesunout ve vodním sloupci. To jim umožňuje využít optimální pozici pro nejlepší přísun světla a podmínek pro přísun živin. (Waditee-Sirisattha, Kageyama, 2022)

3.4.4 Specializované struktury

Vláknité sinice jsou schopné buněčné diferenciaci. Tato vlastnost je u prokaryot unikátní. Formulují specializované struktury vystavující funkční buněčnou diferenciaci. (Waditee-Sirisattha, Kageyama, 2022)

3.4.4.1 Akinety

Většina vláknitých sinic má možnost tvorby vytrvalých buněčných forem. V průběhu vegetace se připravují na nepříznivé podmínky tvorbou dormantních stádií. Jsou to struktury, které slouží jako reakce na nepříznivé podmínky. Akinety jsou větší než vegetativní buňka se silnou stěnou. V případě, že se navrátí příznivé podmínky, vyprodukují nová vlákna. Jsou to buňky klidového stádia. V těchto buňkách se nachází velké množství živin. Akinety jsou také buňkami reprodukčními. V jezerních sedimentech dokážou zůstat v dormanci v nepříznivých podmínkách. (Waditee-Sirisattha, Kageyama, 2022)

3.4.4.2 Hormogonie

Vláknité sinice se pravidelně rozmnožují fragmentací svých vláken neboli trichomů. Někdy v pravidelných i nepravidelných intervalech vytváří kratší tri-

chomy, které se v průměru sestávají z 5 až 15 buněk. Tyto krátké trichomy nazýváme hormogonie. Projevují klouzavou pohyblivost a mohou se vyvinout v nová vlákna plné délky. (Waditee-Sirisattha, Kageyama, 2022)

3.4.4.3 Heterocysty

Heterocysty jsou specializované buňky fixující dusík. Produkují je některé vláknité sinice (především ze skupiny *Nostocales* a *Stigomotales*) při nedostatku dusíku. Jedná se o modifikované vegetativní buňky. Jsou také nejvíce distinktivní. Mají tlustou buněčnou stěnu, světle žlutou barvu. Heterocysty nemají fotosyntetický aparát. Jejich primární funkcí je anaerobní fixace atmosférického dusíku. Tato fixace probíhá z N_2 ze vzduchu pomocí enzymu nitrogenázy. Tím poskytují ostatním buňkám ve vláknu dusík pro biosyntézu. (Waditee-Sirisattha, Kageyama, 2022)

3.4.5 Rozmnožování

Sinice se rozmnožují pouze nepohlavně. Většina sinic se rozmnožuje binárním dělením. Některé jednobuněčné sinice mohou produkovat různé typy iniciálních buněk, které se liší od mateřské buňky svým tvarem. Vznikají baeocyty a exocyty, které se liší od mateřské buňky svou velikostí, tvarem a postupným vícenásobným štěpením. Následně se uvolňují od mateřské buňky do prostředí. Vláknité sinice produkují krátká pohyblivá vlákna viz hormogonie. Například *Nostocales*, za nepříznivých podmínek produkují akinety viz akinety. (Waditee-Sirisattha, Kageyama, 2022)

3.4.6 Taxonomický systém

V současné době je nejvíce populární polyfázický přístup. Základní kritérium je fylogeneze konzervace proteinů s uspořádáním tylakoidů a zda tvoří heterocysty. Tento přístup zahrnuje osm řádů cyanobakterií, a to *Gloeobacterales*, *Synechococcales*, *Spirulinales*, *Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Oscillatoriales*, *Chroococciopsidales* a *Nostocales*. Tímto systémem dokázal rozeznat čtyři nové řády, a to *Gloeobacterales*, *Synechococcales*, *Spirulinales* a *Chroococciopsidales*. (Komárek et al., 2014; Waditee-Sirisattha, Kageyama, 2022)

3.5 Sinice v Antarktidě

Sinice jsou dominantní biota, a to jak ve vodním, tak terestrickém prostředí polárních ekosystémů. Antarktida má suché a chladné prostředí, a do nedávna bylo známo, že polární pouště nemají téměř žádný život. Při bližších studiích, byly objeveny stanoviště, kde se nacházely mikroby. Těmito místy byl sníh, led, obnažená půda, pískovce a jezera. Diverzitu většiny Antarktidy tvoří prokaryota.



Obrázek 7: Vzorek narostu na dně jezera Bosatsu Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)

Sinice jsou jednou z nejdůležitějších prokaryot, jelikož mají schopnost fixovat uhlík prostřednictvím fotosyntézy. Sinice se adaptovaly a aklimatizovaly na teplotu, zmrazení a rozmrazení. Mají fotoprotektivní schopnost i schopnost získání světla pro fotosyntézu.



Obrázek 8: Vzorek dna nárostu z jezera Naga Ike (Elster, 2019)

Jen několik z nich bylo považováno za skutečné psychrofilny. Klasifikace se dělí na psychrotolerantní nebo psychrotrofní, vzhledem ke schopnosti metabolizovat blízko 0 °C, ale také optimum pro jejich růst je typicky nad 15 °C. Ve vysoce divergentních extrémních prostředích se vyskytuje například *Nostoc*, *Leptolyngbya*, *Phormidium* a *Oscillatoria*. (Hodgson et al., 2010; Singh, Elster, 2007)

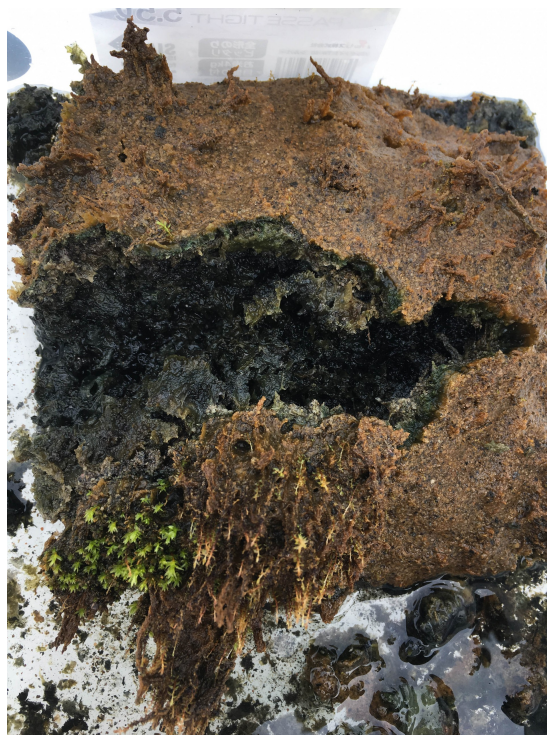


Obrázek 9: Nárůst ze dna jezera Nyorai Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)

Využívají mnoha biochemických adaptací pro přežití v limnických, hydro-terestrických i terestrických biotopech. Vyskytují se víceméně ve všech třech prostředích. Jednotlivé biotopy při bližším zkoumání obsahují společné druhy sinic. Diverzita sinic není limitována vodním nebo terestrickým prostředím. Vodní druh dokáže kolonizovat okolní terestrické niky a naopak. (Hodgson et al., 2010; Pessi et al., 2018)

Ve studii (Hodgson et al., 2010) zkoumali permanentní vodní útvary, sinicové rohože a krusty, vyskytující se na dně jezer, kde aktivně fotosyntetizovaly. Na probíhající fotosyntézu poukazovaly bublinky kyslíku. Jezera měly vyšší koncentrace rozpuštěného O₂. Díky tomu se mikrobiální rohože rostoucí na dně pomocí vztlaku oddělily od dna a začaly se vznášet. Útvary přimrzaly k spodní části ledu jezera. Poté postupně promrzaly ledním profilem až na horní část ledu. Tyto promrzlé shluky sinic se rozpadaly a byly odfoukávány na pobřeží nebo dále do okolního prostředí. (Hodgson et al., 2010)

Sinice se vyskytovaly i na exponovaných terestrických místech, zejména na okra-



Obrázek 10: Nárůst sinic na mechorostech na dně jezera Hotoke Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)

jích skal a větších kamenů ve hloubce alespoň 10–15 cm. Shluky byly suché, v blízkosti tajícího ledu vlhké. (Hodgson et al., 2010)

3.5.1 Sinice v jezerech Antarktidy

Sinice v jezerech Antarktidy jsou adaptované a aklimatizované na prostředí v jezerech. Pomocí DNA analýzy částicového organického uhlíku POC a distribuce sekvence DNA lze sledovat jejich distribuce antarktických biotopů. Sinicové rohože jsou primárním zdrojem organického uhlíku, který podporuje současný metabolismus půdy. Potoky a jezera, která jsou sinicemi kolonizována, jsou inokulem pro život podporující antarktickou polární poušť. Proto byly navrženy tři kategorie typů antarktických stanovišť a to limnické, hydro-terestrické a terestrické, jak je již zmíněno podrobně v kapitole o terestrickém a sladkovodním prostředí Antarktidy. (Taton et al., 2006; Singh, Elster, 2007)

Společenstva sinic mělkých polárních mokřadů *Chroococcales* – *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Gloeocapsa*, *Gloeocapsopsis*; - *Oscillatoriales* – *Leptolyngbya*, *Lyngbya*, *Schizothrix*, *Phormidium*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*; - *Nostocales* – *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Calothrix*, *Dichothrix*, a *Nostoc*. (Elster, 2002)

Řasové rohože s krusty mají převahu sinic produkující biomasu *Chroococcales* - *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Gloeocapsa*, *Gloeocapsopsis*; *Oscillatoriales* - *Lepto-*

lynghya, *Lynghya*, *Schizothrix*, *Phormidium*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*; *Nostocales* - *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Calothrix*, *Dichothrix*, a *Nostoc*. Bentické rohože se skládají z *Phormidium* a *Nostoc*, spolu s trichomy *Leptolynghya*. V prostředí, kde dochází k prosakování vodních toků, jsou společenstva *Gloeocapsa*, *Schizothrix*, *Dichothrix* a *Scytonema* s trichomy *Leptolynghya*. (Elster, 2002)

3.6 Izolace a kultivace sinic

3.6.1 Sterilizace a sterilní techniky

Pro kultivaci sinic je nutné konkrétní druh převést do sterilního životního prostředí pomocí sterilních pomůcek. Díky sterilnímu prostředí zabráníme kontaminaci z okolního prostředí. (Frébortová, 2008)

Sterilizace je proces odstranění či usmrcení všech mikroorganismů. Sterilní techniky se sterilními nástroji minimalizují kontaminaci. Okolní vzduch obsahuje prach, spory a mikroorganismy, kterými jsou nástroje při expozici kontaminované. Je rozdíl mezi pojmem sterilizace a dezinfekce. Dezinfekce je úkon, který zabíjí nebo snižuje počet patogenních mikroorganismů v prostředí či na povrchu. Součástí sterilní techniky je umytí rukou, povrchů prostředkem před prací s kulturou. Existují různé metody sterilizace, které rozdělíme do čtyř kategorií. První kategorie je sterilizace teplem, větším než 100 °C, která je nejčastěji používána. Dále se používá elektromagnetická sterilizace tedy ultrafialové záření, gamma záření, RTG záření a mikrovlnné záření. Poslední typem sterilizace je filtrace a chemická sterilizace. (Rahn, 1945; Andersen, 2005; Block, 2001)

Pro sterilizaci instrumentů, kultivačních médií a pracovních ploch se používají fyzikální metody. Do fyzikálních metod patří sterilizace pomocí tepla, filtrace, elektromagnetických vln, UV záření. Využívá se i metod chemických, jako například za použití etanolu při dezinfekci povrchů. (Sykes et al., 1958; Sinice a řasy.cz, 2021e)

3.6.1.1 Autoklávování

Autoklávování je nejefektivnější metoda sterilizace materiálů, které jsou odolné vůči teplu. Toto metodu je také možné využít při sterilizaci tekutin. V autoklávu lze sterilizovat pomůcky a kultivační média. (Andersen, 2005)

Jedná se o hermeticky uzavřenou nádobu s dvojitým pláštěm. V přístroji se vyvíjí nasycená vodní pára při vysokém tlaku. Požadované teploty se dosáhne vytlačením vzduchu z komory zařízení. Doba sterilizace závisí na objemu sterilizované kapaliny. Jeden litr kapaliny je třeba autoklávovat 25 minut. Doba sterilizace je rovna době k dosažení 121 °C v komoře. (Frébortová, 2008)

3.6.1.2 Etanol

Etanol patří mezi alkoholy, které slouží jako dezinfekce povrchů. Při použití je jeho výhodou v rychlém schnutí. Jeho účinkem je rychlá denaturace bílkovin, která se projevuje jen v přítomnosti vody. Ničí vegetativní formy bakterií, druhy virů, ale na spory nejsou účinné. Používá se etanol ředěný. Koncentrovaný roztok má za následek konzervaci bakterií. Neúčinnější je přibližně 70% roztok. Lze použít i k dezinfekci rukou. (Vítková, 2016)

3.6.1.3 Sterilizace plamenem

Instrumenty jako například očkovací kličky, jehly, škrabky, pinzety, které sterilizujeme těsně před použitím. Sterilizace probíhá ožehnutím v plameni. K tomu se používají kahany plynové nebo lihové. Kromě instrumentů před prací se samotnými kulturami, používáme přímou sterilizaci při přípravě agarových ploten. Před nalitím agarů sterilizujeme ohněm hrdlo láhve. Pomůcky se opalují, a to nad redukční zónou v nesvítivé části oxidační zóny plamene. V této zóně je teplota plamene nejvyšší, pohybuje se kolem 1500 °C. (Frébortová, 2008; Čedíková et al., 2012; Sinice a řasy.cz, 2021e)

3.6.1.4 Laminární box

Jedná se o přístroj (flow box), kde probíhá veškerá manipulace s kulturami. V laboratořích, které pracují s mikroorganismy se jedná o nepostradatelnou část vybavení. Zařízení snižuje až znemožňuje kontaminaci buněk bakteriemi a jinými nežádoucími organismy. V boxu se udržuje vzduch v pohybu a dále jej filtruje. Před použitím se používá UV lampa, pro zneškodnění i odolnějších mikroorganismů. Základní jednotkou laminárního boxu je HEPA filtr (high efficiency particulate arrestance filter). HEPA filtr disponuje extrémně vysokou účinností zachytávání částic. Pro částice o velikosti 300 nm je jeho účinnost 99,97 %. V laminárním boxu se dále nachází ventilátor nasávající vzduch z místnosti. Podle typu proudění dělíme boxy na horizontální a vertikální. (Sinice a řasy.cz, 2021e; Chen et al., 2022)

3.6.1.5 Kultivační média

Sladké vody mají velké množství sinicové flóry. Distribuce sinic i řas ve sladké vodě závisí na mnoha faktorech. Nejen na chemicko-fyzikálních působeních, také na schopnosti organismu kolonizovat určité prostředí. Z tohoto důvodu byly vytvořeny různá kultivační média, pro izolaci a kultivaci. (Andersen, 2005)

Kultivační média poskytují výživu a další vhodné podmínky organismům, které na médiu kultivujeme. Dělí se na tekutá, pevná a bifázická. Je vhodné, když použité médium co nejvíce odpovídá podmínkám prostředí, ze kterého organismus pochází. Výběr média má pravidla. Prvním je, že celkový obsah solí by měl být určený podle původního prostředí sinice. Dalším je, že by měl obsahovat využitelný zdroj dusíku, uhlíku, fosforu, základní ionty, stopové prvky a chelatizační činidlo. Dále je třeba upravit pH a přidat případně vitamíny. (Andersen, 2005; Sinice a řasy.cz, 2021c)

3.6.1.6 Sladkovodní média

Kultivační média, která mají jasně definované složení, jsou výhodná pro reprodukovatelnost experimentů. Použité médium pro izolaci a kultivaci sinic by mělo co nejvíce odpovídat přírodním podmínkám, ze kterého sinice byla odebrána. Příklady používaných kultivačních médií je například BBM – Bold's Basal médium, často používané pro izolaci půdních sinic. Dále Chu #10 médium používané při kultivaci sinic. WC médium – Wright's Cryptophyty médium pro kultivaci některých sinic. Z8 médium je univerzální kultivačním médiem. Pro praktickou část této bakalářské práce bylo využito BG-11 médium. (Sinice a řasy.cz, 2021a)

BG-11 médium

BG-11 kultivační médium je určené pro kultivaci sinic z různých biotopů, a to jak sladkovodních, ale i půdních, termálních a mořských. Má typicky vysoký obsah dusičnanů. Lze jej připravit v bezdusíkaté formě určené pro izolaci a kultivaci heterocytózních sinic. Tyto sinice jsou schopny metabolizovat vzdušný dusík. Tato modifikovaná média nalezneme pod názvy BG-11-N nebo BG-11₀. Médium je vysoce koncentrované a může tak mít za následek změnu morfologie udržovaných kultur. (Yang et al., 2015; Sinice a řasy.cz, 2021a)

3.6.2 Tradiční techniky izolace sinic

Metody tradičních technik izolace mikrořas jsou převzaty z metod mikrobiologických a jsou modifikovány pro fotoautotrofní organismy. Klonální kultura obsahuje potomky jedné původně vyizolované buňky. Buňky v kultuře jsou identické. Jednodruhá kultura je tvořena jedním druhem organismu, organismy jsou ale geneticky rozdílné. Xenická kultura obsahuje ještě další organismy kromě zájmového organismu. Axenická kultura kromě zájmového organismu neobsahuje žádné další organismy. (Sinice a řasy.cz, 2021d)

Není možné vytvořit univerzální metodiku pro izolaci jednotlivých taxonomických skupin. Důvodem je velká druhová diverzita sinic a jimi osidlovaných biotopů. Správný výběr kultivačního média pro izolace, zředění a následnou izolaci do média zajistí úspěšnost kultivace požadované sinice. (Sinice a řasy.cz, 2021d)

3.6.2.1 Izolace na agarových plotnách

Agarové plotny disponují širokým spektrem využití pro izolaci sinic. Plotny je možné využít pro purifikaci existujících kultur. Základním principem při izolaci sinice je tzv. zředění vzorku pasážováním na povrch agarové plotny. Pasážování znamená opakované rozetření vzorku po povrchu plotny. K tomuto úkonu používáme sterilní instrumenty jako např. očkovací kličku. Po první sérii tahů na plotnu se klička opálí a navazuje dalším zředováním vzorku. Takto lze vzorek zředit např. čtyřikrát. Pro následné získání klonálních kultur se provádí reizolace. (Sinice a řasy.cz, 2021b)

Při izolaci půdních a subaerických sinic se izolace na agarovou plotnu provádí rovnoměrným nasypáním vzorku. Dále je možné na plotnu substrát rozetřít. Ve vzorcích jsou přítomné nejen sinice, ale i řasy. Ty se postupně rozrostou kolem substrátu. Po této izolaci vznikne kolonie, která lze přeočkovat na novou sterilní agarovou plotnu. (Temraleeva et al., 2016; Sinice a řasy.cz, 2021b)

4 Metodika

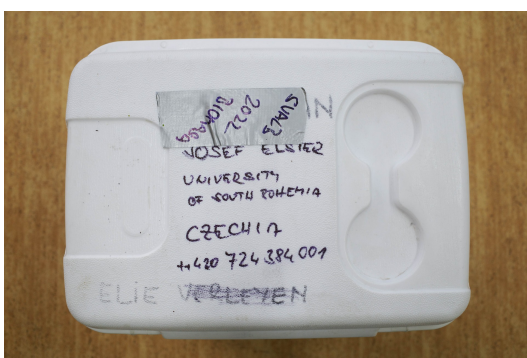
4.1 Úvod do metodiky

Metodika práce se skládá ze studia diverzity sinic antarktických jezer a izolace kmenů sinic na agarových plotnách. V této první části jsem v odborné literatuře nastudovala potřebné informace. Teoretická část shromažďování informací přesahuje do druhé části práce. Před samotnou praktickou izolací byla třeba nalézt informace o samotném postupu izolace. Největším zdrojem byla kniha *Algal Culturing Techniques*, od editora Robert A. Andersen (Andersen, 2005), která obsahem přesahuje informační kapacitu této bakalářské práce, ale sloužila jako pevný teoretický základ jednotlivých laboratorních postupů pro úspěšnou izolaci kmene. Dále jsem čerpala informace ze studií, které se ve většině případů týkaly srovnání a nejlepších postupů pro izolaci sinic. Důležitá část byla konzultace s vědeckými pracovníky, kteří dali informace do souvislostí. Za velmi praktické považuji mé návštěvy Botanického ústavu AV ČR, v. v. i. v Třeboni, kde jsem mohla sledovat práci vědeckého pracovníka se vzorky, agarovými plotnami a aktivně se zapojovat.

Druhá část metodiky se skládala z praktické části, kdy jsem pracovala se vzorky a postup dokumentovala fotografiemi. Vzorky sbíral prof. Ing. Josef Elster, CSc. Vzorky jsou ze Země královny Maud, což je část Antarktidy o rozloze 2,5 milionů km² viz literární rešerše. O samotném sběru vzorků odkazuji na literární rešerši. Odebrání vzorku se dokumentuje ve sběrovém protokolu. Tento dokument obsahuje číslo vzorku, označení na mapě, z čeho se vzorek odebral, popis niky, GPS souřadnice a popis mikroskopie obsahu. Metodika praktické části izolace a kultivace sinic ze dna jezer Antarktidy probíhala v Botanickém ústavu AV ČR, v. v. i. v Třeboni. Vzorek byl odebrán v Antarktidě, zaznamenán do sběrového protokolu, převezen do Botanického ústavu AV ČR, v. v. i. v Třeboni, kde se udržuje v zmraženém stavu.

4.2 Izolace a kultivace vzorků

Vzorek je uchováván v klasickém komerčním mrazáku za běžné teploty -19°C . V mrazáku jsou vzorky uchovávány v chladicím boxu, který je označen jménem, lokalitou a kontaktem. V označeném boxu se vzorky byly nalezeny označené vzorky, které byly izolovány. Odkud daný vzorek pochází zjistíme ze sběrového protokolu. Z mrazáku, kde vzorky byly skladovány za teploty -19°C , byly přeneseny do místnosti, kde došlo k jejich rozmrazení. Na obrázku 11 a 12 je vidět daný chladicí box, jeho označení a skladování vzorků. Chladicí box je přenosný a má odizolované stěny i víko. Udrží při přenášení vzorky v chladu, bez zbytečného kolísání teploty.



Obrázek 11: Chladicí box



Obrázek 12: Chladicí box - skladování vzorků

Z boxu byly vyjmuty vzorky (obrázky 13, 14), které byly určeny ke zpracování. Vzorky podle sběrného protokolu pocházely z lokality Skarvsnes. Byly odebrány 13. 1. 2019 prof. Ing. Josefem Elsterem, CSc. podle záznamu ve sběrném protokolu. Vzorek 103 je nově napadlý sníh, tající na hraně mezi sněhem a pískem u jezera č. 52 s GPS souřadnicemi $69^{\circ}27'22''\text{ S}$, $39^{\circ}35'0''\text{ E}$. Vzorek číslo 104 je z jezera Kumogate Ike, jehož nika byla červeno-zelená biomasa vyplavená na břehu. GPS souřadnice vzorku $69^{\circ}27'17''\text{ S}$, $39^{\circ}34'49''\text{ E}$.



Obrázek 13: Vzorek 103, 104, Skarvsnes



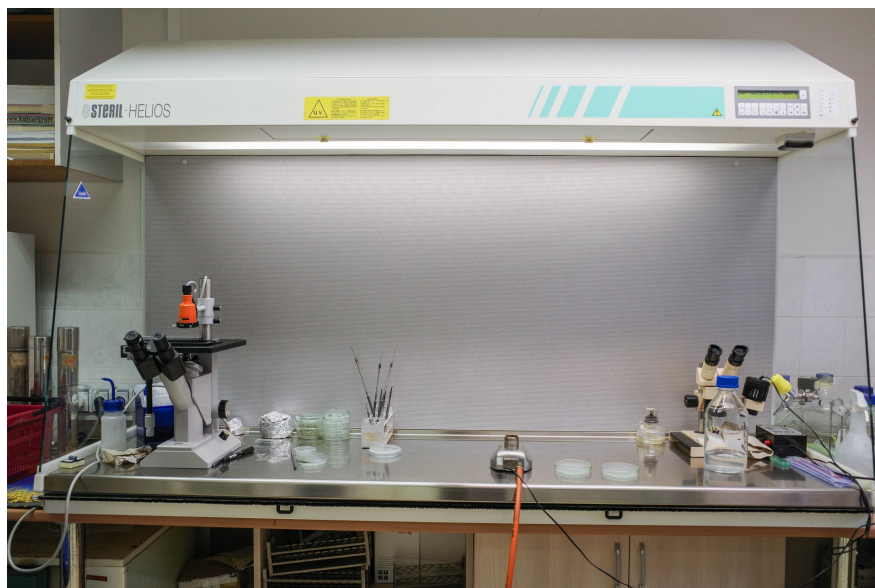
Obrázek 14: Vzorky 103, 104 jednotlivé

Následoval proces rozmrazení vzorku. Konkrétně tyto vzorky byly rozmrazeny rychle pomocí teplé vody. K procesu rozmrazení byla použita kádinka o objemu 1000 ml. Vzorky byly rozmrazeny vodou o teplotě 40 °C. Vzorky lze rozmrazit pod tekoucí vodou nebo se nechají stát v kádince. Doba rozmrazování závisí na materiálu vzorku. Vzorek ležící volně v kádince ochlazuje okolní vodu a vodu je nutné měnit. Obrázek číslo 15 ukazuje proces rozmrazení. Během rozmrazování je potřeba pootevřít víčko, aby neprasklo, ale nekontaminovat vzorek. K dalšímu postupu nakládání se vzorkem byly z lednice odebrány předem připravené agarové plotny. Agarové plotny se sterilním kultivačním médiem se předem předpřipravují ve větším množství. Předem předpřipravené agarové plotny jsou vhodné pro hladší průběh práce se vzorky. Pro zpracování vzorků se používá kultivační médium BG-11. Rozmrazené vzorky byly přeneseny do laminárního boxu, který umožňuje práci se vzorky ve sterilním prostředí bez mikroorganismů.

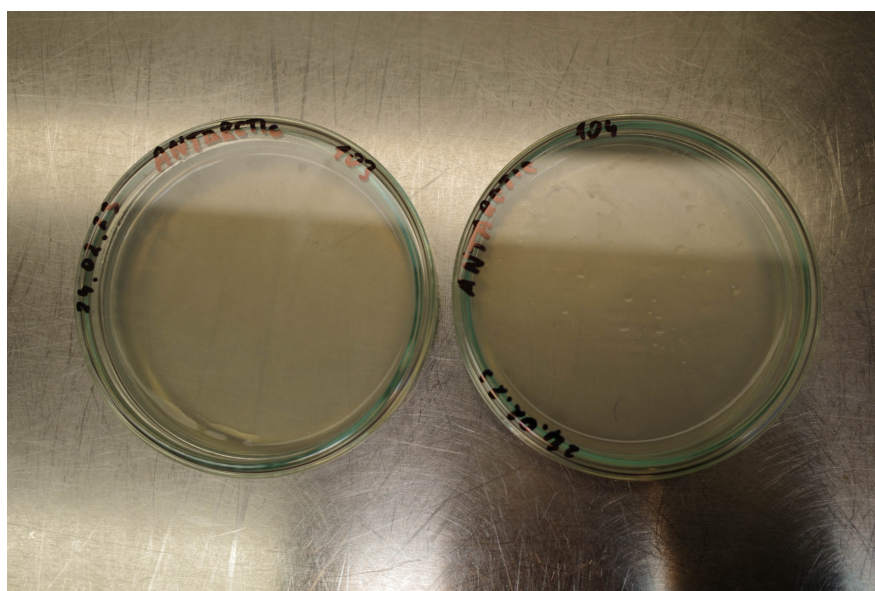


Obrázek 15: Kádinka se vzorky

Botanický ústav AV má na pracovišti více laminárních boxů. Ke zpracování vzorků 103 a 104 byl využit laminární box Steril-helios (obrázek 16), který po zapnutí disponuje vertikálním prouděním zajišťující sterilitu. Nerezová pracovní plocha stolu laminárního boxu byla vydezinfikována etanolem. Na pracovní plochu po dezinfekci byly položeny dvě agarové plotny. Jedna pro každý vzorek. Petriho misky je vhodné řádně popsat (obrázek 17). Popisují se klasickým permanentním fixem, je potřeba dávat pozor při dezinfekci s etanolem, aby se popis nesmazal. Popis obsahuje datum, polohu odkud vzorek pochází a číslo vzorku. Vzorek se popisuje na kraj menším písmem, aby nestínil na kulturu.



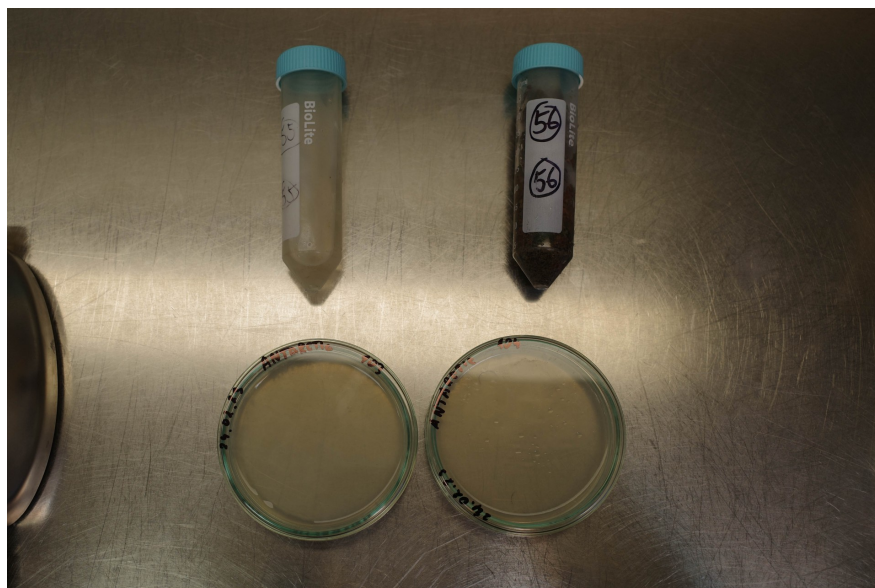
Obrázek 16: Laminární box



Obrázek 17: Popis Petriho misky

Vzorky i Petriho misky byly číselně srovnány (obrázek 18) od menšího čísla k většímu, aby nedošlo k záměně.

Dalším krokem byla příprava instrumentů, aby bylo možné sterilně rozetřít vzorek po agarové plotně. Je-li vzorkem krusta, odebraná biomasa, je možné použít špachtle, pinzety, očkovací kličky, očkovací jehly, hokejky, škrabky či jiné očkovací nástroje. Cílem je rozetření vzorku na povrch agaru, nikoliv řezání do samotného agaru. Pro pohodlné opakované roztírání po povrchu agaru je vhodné vybrat instrument dle typu biomasy vzorku. Aby bylo možné bezpečně agarovou plotnu vzorkem naočkovat, bylo potřeba instrument sterilizovat. Ke sterilizaci se běžně používá oheň (obrázek 19). Byl použit kahan laboratorního typu s radiovým bez-



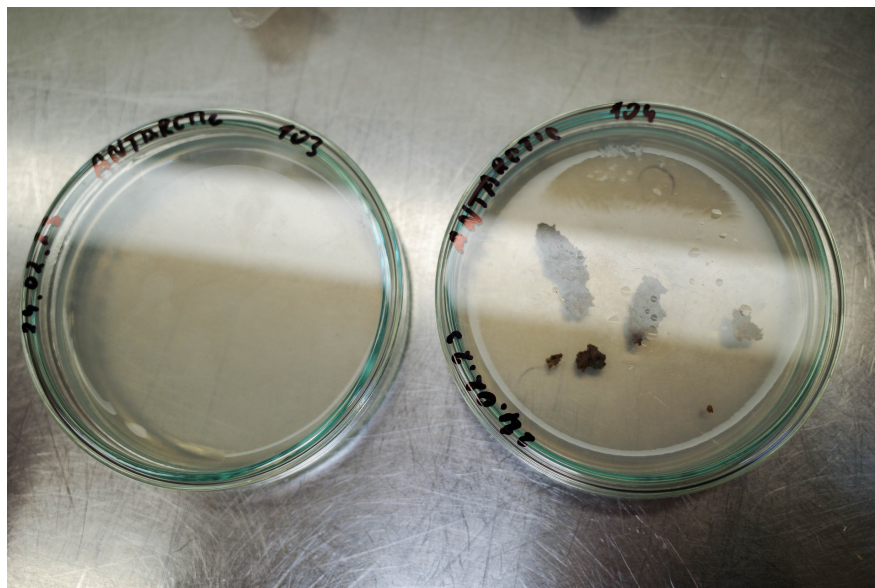
Obrázek 18: Přiřazení vzorku k Petriho misce

pečnostním systémem pro hořák s pedálem. Teplota plamene byla 1300 °C. Petriho miska byla přisunuta co nejbližší ke kahanu, aby bylo zajištěno co nejvíce sterilní prostředí při otevření Petriho misky. Dalším krokem bylo přemístit vzorek číslo 103 do popsané Petriho misky na agarové médium. Miska byla přisunuta co nejbližší hořícímu kahanu. Jelikož byl vzorek 103 roztátý sníh, stačilo vodu nalít na Petriho misku v malém množství. Pro vzorek 104 byl jako instrument vybrána anatomická pinzeta. Petriho miska pro vzorek byla přisunuta co nejbližší ke kahanu. Do plamene hořáku byla vložena špička pinzety ke sterilizaci viz obrázek číslo 19. Horká pinzeta se do vzorku nevkládá, jelikož může dojít k usmrcení organismů ve vzorku.



Obrázek 19: Laboratorní hořák

Bylo potřeba vyčkat na ustálení teploty pinzety. Ze vzorku bylo odšroubováno víčko, pinzetou odebrán vzorek, otevřena Petriho miska u kahanu, rozetřena pinzetou na agarovou plotnu. Následně byla Petriho miska uzavřena (obrázek 20). Touto aplikací byla zředěna biomasa z přírodního vzorku. Výsledné kolonie byly dále přesazovány. Výsledkem tohoto procesu byly dvě naočkované agarové plotny viz obrázek 20, které je pro růst nutné uchovávat v optimálních podmínkách.

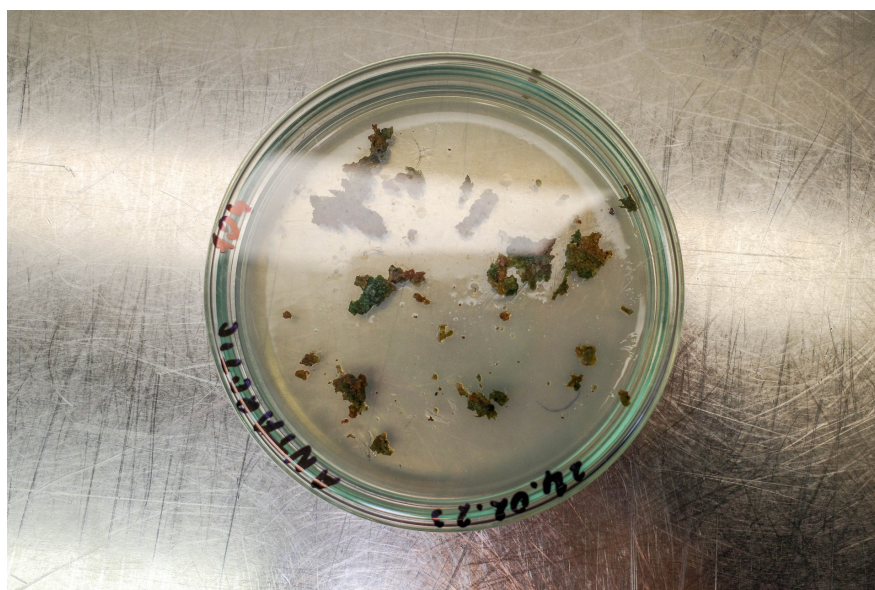


Obrázek 20: Výsledné naočkování

Jako další příklad, jak vypadá výsledné rozetření biomasy ze vzorku jiného typu biomasy, příkládám obrázek číslo 21. Kdy vzorek 124 byl odebrán 17. 1. 2019 ze Skallen z červeného potůčku, vytékajícího z mechoviště, kdy dno bylo prorostlé červeným biofilmem, naproti velkému ledovci, 69°40'46" S, 39°29'19" E.

Naočkované plotny byly odneseny do prosklené lednice, kde byly naočkované agarové plotny a dále pak již kultury udržovány ve vhodných podmínkách. Vzorky číslo 103 a 104 byly vloženy do prosklené lednice na obrázku číslo 22.

V této lednici byla teplota 10°C. V této teplotě bylo vhodné udržovat izoláty právě například z Antarktidy, ale i dalších polárních oblastí. Popisované agarové plotny v prosklené lednici byly uchovány ve stejné lednici jako například vzorky ze Svalbardu. Pro vhodný růst nebyla důležitá jen teplota, ale i dostatek světla (obrázek 23). Z literární rešerše je nejvhodnější intenzita kolem 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pro izoláty bylo zde využíváno LED zářivek. Dále se v Botanickém ústavu AV ČR, v. v. i. v Třeboni využívají kromě lednic s prosklenými dveřmi i speciální kultivační boxy, kde se dá regulovat teplota i osvětlení. Výše zmíněné izoláty, lze vložit i do inkubátoru. Lednice na fotografii 22 byla nastavena na teplotu 10,5°C.



Obrázek 21: Naočkovaná agarová plotna



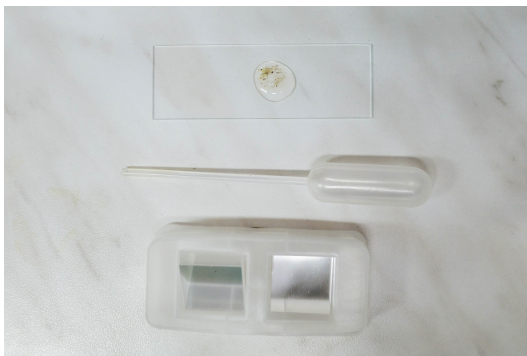
Obrázek 22: Prosklená lednice



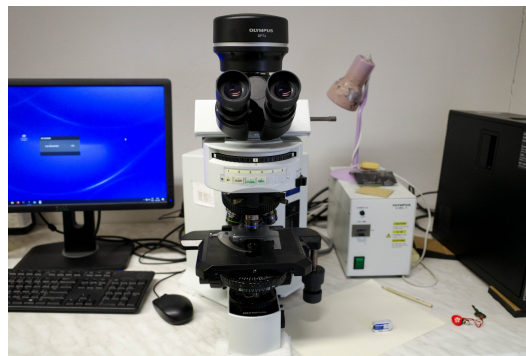
Obrázek 23: Prosklená lednice s osvětlením 1

4.3 Přímá mikroskopie

Dalším krokem je přímá mikroskopie. Ze vzorku 103 bylo pipetou na podložní sklíčko odebráno malé množství materiálu. Sklíčko bylo přiklopeno krycím sklíčkem $20 \times 20 \text{ mm}^2$ viz obrázek 24. Ze vzorku 104 bylo pinzetou odebráno malé množství materiálu, které bylo následně překryto krycím sklíčkem. Pro přímou

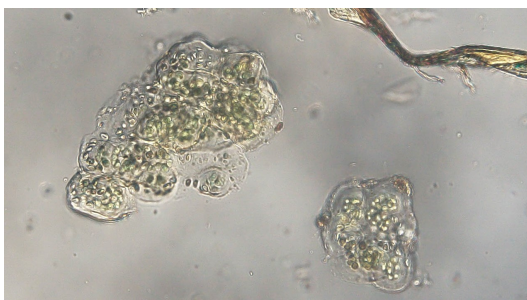


Obrázek 24: Podložní, krycí sklíčko, pipetka



Obrázek 25: Mikroskopovací stanice

mikroskopii byl použit mikroskop značky Olympus s mikroskopickou digitální kamerou DP74 (obrázek 25). Dále počítač s monitorem. Pozorovaný obraz bylo možné zobrazit a zachytit díky digitální mikroskopické kameře se software. Zachycený obraz byl použit jako dokumentace jednotlivých vzorků a použit k následnému určení druhu sinice.



Obrázek 26: *Nostoc*



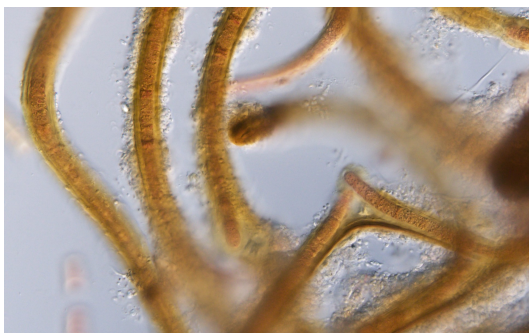
Obrázek 27: *Nostoc*

Vzorek 103 byl mikroskopován jako první. Po zapnutí softwaru na zachycení pozorovaného byl spuštěn zdroj světla a vložen preparát. Mikroskopování bylo nejdříve prováděno objektivem se zvětšením 20x a okulárem se zvětšením 10x. Výsledné zvětšení objektu bylo tedy 200x. Pro organizované hledání objektu v preparátu bylo použito makroposuvu. V případě nálezu větší hustoty bylo doostřeno mikroposuvem. V případě vzorku 103, kdy se jednalo o vzorek sněhu, se preparát jevil jako prázdný. Nálezem byl písek. Nebylo potřeba dokumentovat snímkem.

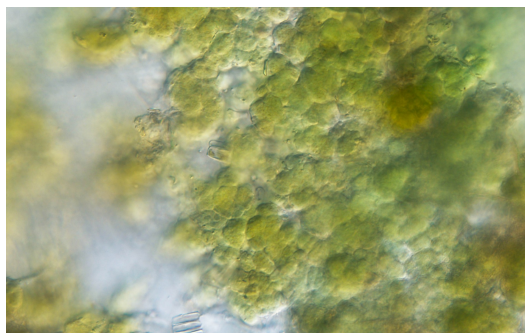
Vzorek 104 byl zkoumán stejným postupem. Mikroskopování bylo prováděno

s objektivem 20x, kdy konečné zvětšení bylo 200x. V preparátu bylo organizovaně mikroskopováno zleva doprava po liniích. V případě vzorku 104 preparát prázdný nebyl viz obrázky 26 a 27. Bylo nutné vše dokumentovat do mikroskopovacího protokolu. Na papír bylo vyplněno datum, číslo vzorku a zdokumentovány nálezy v preparátu.

Dále přikládám 6 obrázků (28, 29, 30, 31, 32, 33, 44, 45) z přímé mikroskopie, kdy byly studovány sinice ze dna jezer z jiných vzorků.



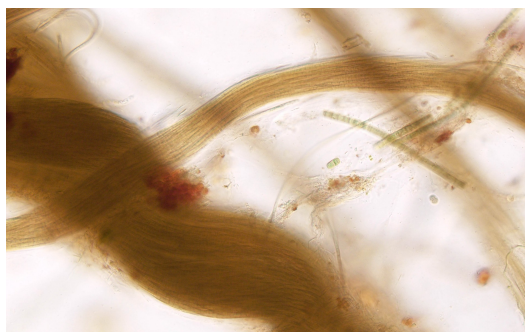
Obrázek 28: *Coleodesmium wrangelii* a zrníčka kolem vláken *Chlorogloea* sp.



Obrázek 29: *Entophysalis* sp.



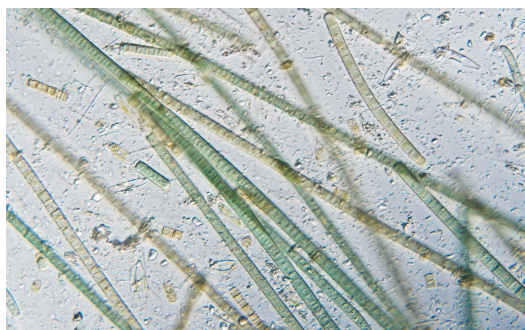
Obrázek 30: *Gloeocapsopsis* cf. *crepidinum*



Obrázek 31: *Hydrocoleum*



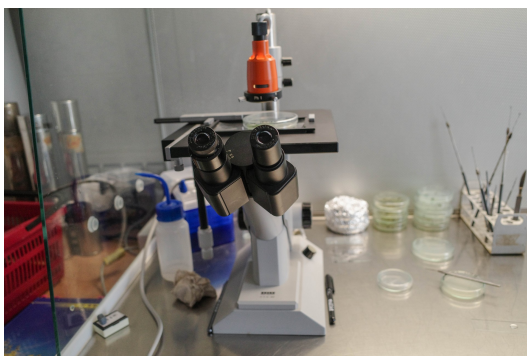
Obrázek 32: Iničiální stádium *Nostoc*



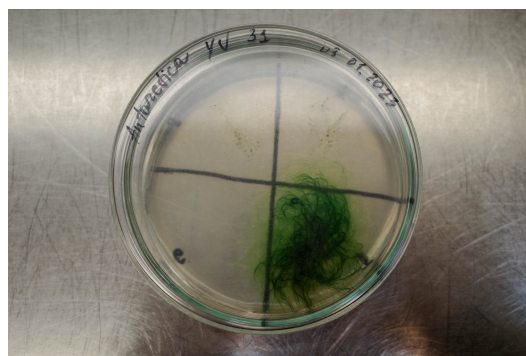
Obrázek 33: *Microcoleus*, *Oscillatoria* a rozsivky

4.4 Přeočkování sinice

Pro přeočkování kultury byl použit laminární box, obrácený mikroskop, instrument ve formě jehly, laboratorní hořák, dezinfekce a sterilní agarová plotna. Kultura byla skladována v lednici s prosklenými dveřmi s umělým osvětlením při teplotě 10 °C. Proběhlo zapnutí a dezinfekce laminárního boxu pomocí etanolu. Dále k práci byla potřeba inverzní mikroskop (obrázek 34). Oproti klasickému světelnému mikroskopu, který byl zmíněn v předchozí kapitole, byla výhoda, že nebylo potřeba použít podložní a krycí sklíčko. Kulturu lze tedy pozorovat přímo na agarové plotně v přirozenějším prostředí.



Obrázek 34: Inverzní mikroskop

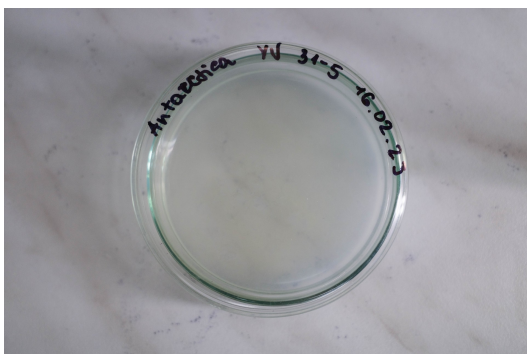


Obrázek 35: *Microcoleus*

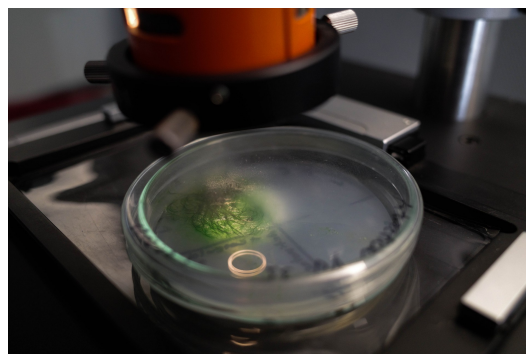
Pro přeočkování byl použit vzorek číslo 31. Tento vzorek podle sběrného protokolu byl odebrán 27. 12. 2018 v Yukidori valley. Byl odebrán na rovině, biomasa jako z jezera byla ale stará. GPS souřadnice místa sběru 69°14'32" S, 39°43'29" E. Dále byl vzorek postupem popsáním v předchozí kapitole kultivován. Na obrázku 35 je možné vidět patřičný růst sinice, která byla již přeočkována. Agarová plotna byla vložena do inverzního mikroskopu (obrázek 37). Byla připravena nová agarová plotna s řádným popisem, který zahrnuje datum, místo sběru a číslo vzorku (obrázek 36).

Nová miska byla přisunuta co nejvíce k hořícímu kahanu, aby bylo zabráněno kontaminaci. V inverzním mikroskopu byl vyhlídnut kus kultury, který byl následně přeočkován.

Dále byl pomocí kahanu sterilizován nástroj na přeočkování, který byl následně ponechán chvíli mimo plamen, aby klesla teplota nástroje. Precizně bylo odebráno vlákno sinice. Petriho miska přisunuta co nejbližší ke kahanu viz obrázek 38. Na novou agarovou plotnu byl odebraný kus mikrobiologicky rozetřen (obrázek 39). Obrázek 40 zobrazuje detail buňky čerstvě naočkovaný na agarovou plotnu. Obrázek 41 zobrazuje detail rozetření sinice na agarovou plotnu.



Obrázek 36: Popis Petriho misky



Obrázek 37: Petriho miska v inverzním mikroskopu



Obrázek 38: Sterilní agarová plotna



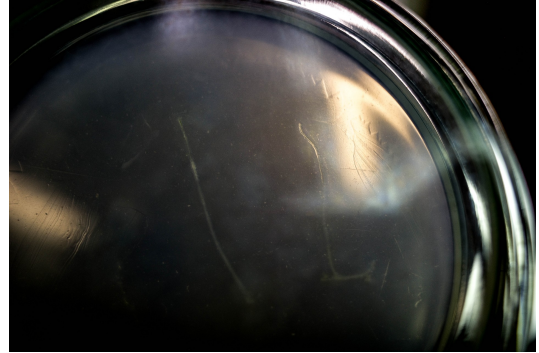
Obrázek 39: Přenesení buňky

Stejným způsobem byl odebrán vzorek na podložní sklíčko k přímé mikroskopii. Tedy v inverzním mikroskopu byl vytipován kus sinice k odebrání. Dále probíhala sterilizace nástroje ohněm. Po vychladnutí jehly byl odebrán kus na preparát, který byl následně vložen na podložní sklíčko. Na preparát byla umístěna kapka vody a byl překryt krycím sklíčkem. V tuto chvíli byl preparát připraven na přímou mikroskopii.

Přeočované agarové plotny byly přeneseny do prosklených lednic o teplotě 10 °C s LED zářivkou, kde budou do budoucna pozorovány a izolovány. Pro přímou mikroskopii bylo použito stejné vybavení zmíněné výše (34). Mikroskopie je odlišná v tom, že v tento moment je snaha přesně určit o jakou sinici se jedná a nehledají se nové organismy. V předešlém kroku jsme často naráželi na řasy, nebo jakékoliv jiné fotosyntetizující organismy. V tomto kroku se měří jednotlivé buňky a segmenty sinice. V přímé mikroskopii byl zdokumentován *Microcoleus* viz obrázky 42 a 43.



Obrázek 40: Detail buňky



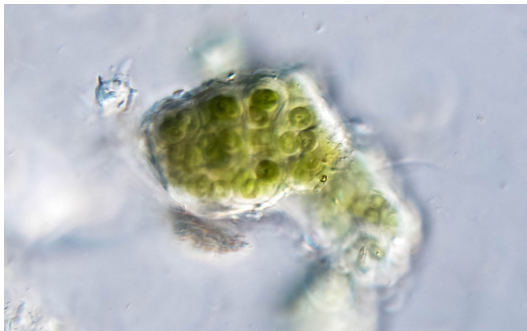
Obrázek 41: Detail pasáže



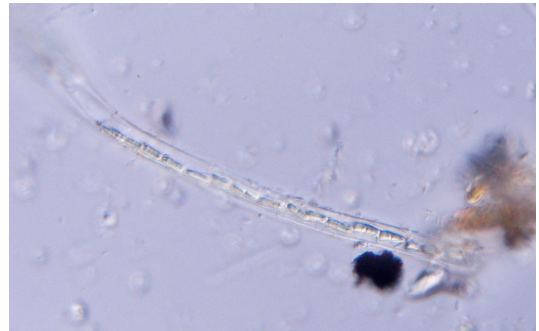
Obrázek 42: *Microcoleus*



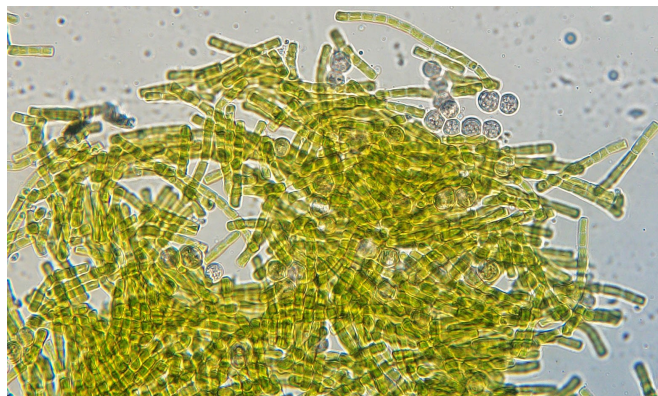
Obrázek 43: *Microcoleus*



Obrázek 44: *Nostoc*



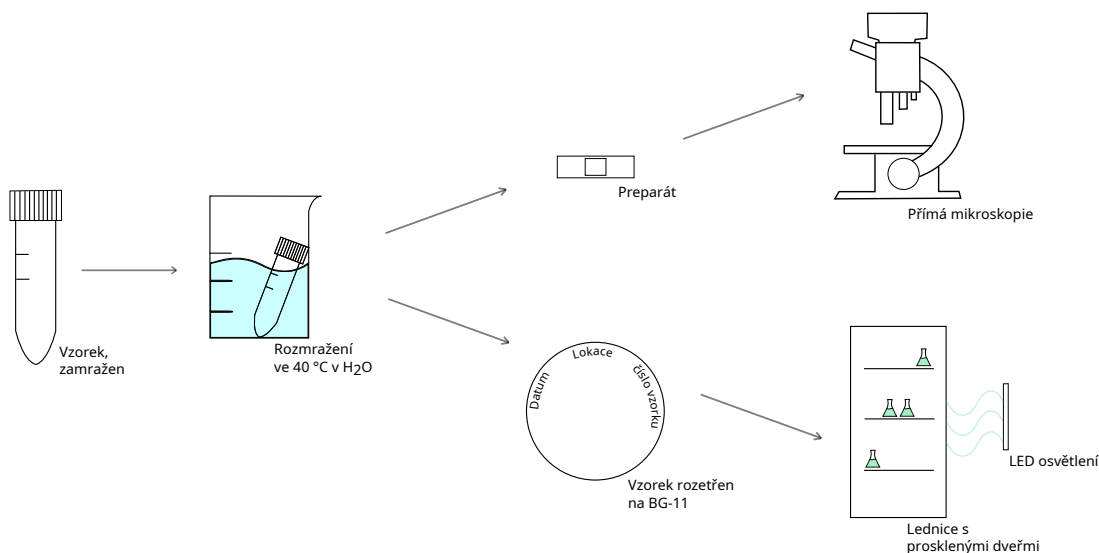
Obrázek 45: *Romeria cf. nivicola*



Obrázek 46: Řasa ve vzorku č. 103, *Stichococcus sp.*

5 Výsledky

Cílem vlastní práce bylo postupovat podle navrženého postupu a provést proces izolace a kultivace sinic na agarových plotnách. V této práci popsána metodika a její provedení úspěšně pomohlo docílit obdržení izolovaného a kultivovaného vzorku kmene sinic, který může dále sloužit jako podklad a postup pro další vědecké pracovníky.

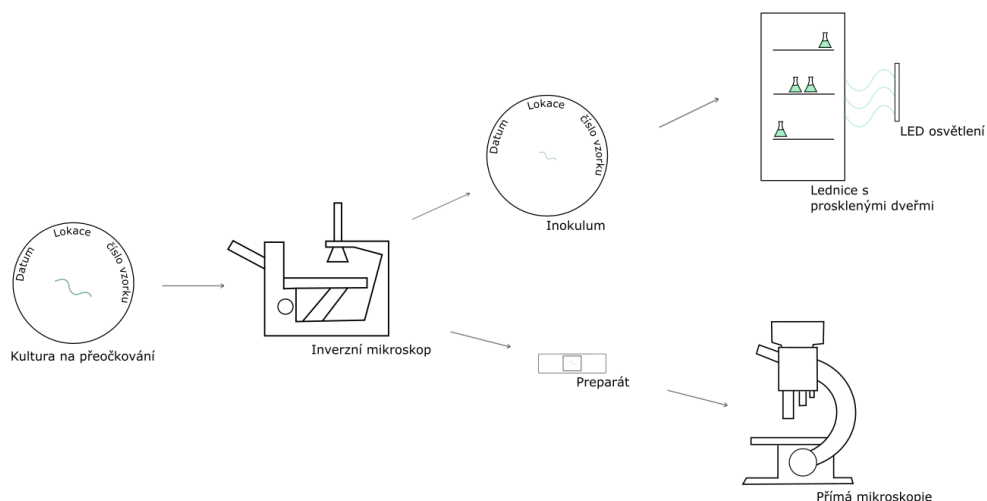


Obrázek 47: Postup izolace na agarových plotnách

5.1 Izolace a kultivace sinic

Následující schémata shrnují hlavní kroky práce při izolaci a kultivaci sinic. Schémata jsou řazena dle postupu v metodické části. První schéma 47 zobrazuje shrnutí postupu izolace sinice na agarových plotnách. Hlavními kroky při izolaci jsou rozmrazení vzorku ve vodě při 40 °C. Vzorek se na agarovou plotnu rozetře. Po rozetření biomasy na agarovou plotnu následuje uložení do lednice s prosklenými dveřmi s LED osvětlením. Dále ze vzorku připravíme preparát pro přímou mikroskopii. Výsledkem tohoto postupu jsou sinice, které se postupně rozrůstají kolem substrátu. Vznikne kolonie, kterou můžeme dále přeočkovat na čistou a sterilní agarovou plotnu a tím lze získat čistou kulturu. Přeočkování sinice zobrazuje schéma na obrázku 48.

Schéma 48 zobrazuje proces přeočkování kultury sinice. Kultury se pravidelně přeočkovávají do čerstvých kultivačních médií. Stará agarová plotna s růstem se v laminárním boxu přeočkuje za pomoci inverzního mikroskopu. Kultura se přeočkuje na novou sterilní agarovou plotnu, která se následně uloží do vhodných



Obrázek 48: Přeočkování kultury sinice

podmínek lednice s prosklenými dveřmi a umělým osvětlením. Dále se ze staré kultury připraví preparát, který je zkoumán pod přímou mikroskopii.

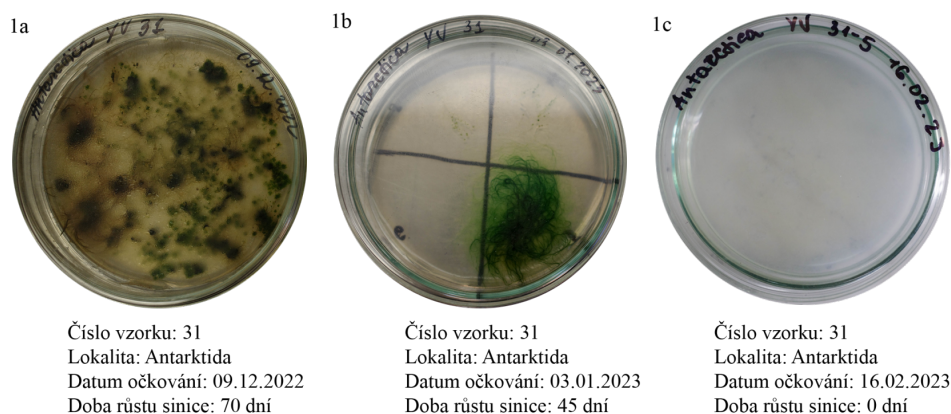
Výsledkem tohoto procesu je přeočkováná kultura, naředěný inokulát. Tento proces je potřeba replikovat, i pro údržbu kultur. Proces se opakuje v řádech měsíců. Kultura se udržuje ve zkumavkách s agarem a kovovým uzávěrem viz obrázek 49.



Obrázek 49: Udržování kultur sinic

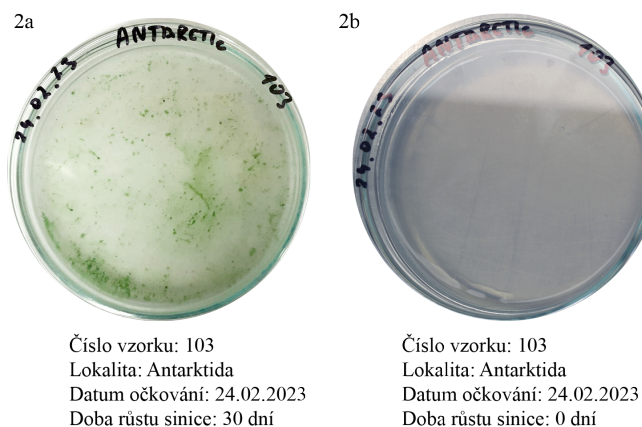
5.2 Doba růstu sinice

Obrázek číslo 50 zobrazuje, jak vypadají naočkované agarové plotny po určité době. První agarová plotna 1a na obrázku 50 zobrazuje plotnu starou 70 dní. Po 25 dnech byla přeočkována na agarovou plotnu 1b. Prostřední plotna 1b zobrazuje dobu růstu 45 dní. Pro úplnost poslední plotna 1c zobrazuje čerstvě naočkovanou agarovou plotnu. Detail přeočkování byl zdokumentován v metodice obrázkem číslo 40.



Obrázek 50: Doba růstu mezi přeočkováním sinic

Obrázek číslo 51 zobrazuje růst vzorku číslo 103 z metodické části práce. Vzorkem byl čerstvě napadený sníh. V přímé mikroskopii nebyl nalezen žádný mikroorganismus. Vzorek byl izolován dle metodiky. Po 30 dnech byl vidět růst mikroorganismu. Agarová plotna s růstem byla přeočkována na sterilní médium a byl připraven preparát pro studii v přímé mikroskopii. Vše se zdokumentovalo viz diskuze (46). Jednalo se o řasu *Stichococcus* sp.



Obrázek 51: Růst po 30 dnech, *Stichococcus* sp.

5.3 Výsledky literární rešerše

Práce se zabývala studiem diverzity sinic antarktických jezer. Pro úplnost je literární rešerše započata obecnou charakteristikou kontinentální Antarktidy. Životní prostředí kontinentální Antarktidy práce popisuje jako extrémní polární prostředí, kdy přes nepříznivost lokace nalezneme sinice v mnoha ekosystémech. Autor (Elster, 2002), klasifikuje tři ekosystémy a to terestrický, hydro-terestrický a limnický (jezerní). Práce se zabývala především ekosystémem limnickým a byla vymezena na sinice. Dále práce představila jezera Antarktidy a jejich klasifikaci dle jezerního dna. Také popsala jezerní biotu. Další kapitolou bylo představení východní části Antarktidy, a to Země královny Maud a japonskou stanici Syowa. Literární rešerše dále obsahovala charakteristiky sinic. Práce obsahuje základní informace o morfologii buněk, strukturních komponentech a specializovaných strukturách sinic. Speciálními strukturami jsou akinety, heterocyty, hormogoni. V rešerši dále byly studovány sinice v limnickém ekosystému. Poslední část práce je věnována kapitole izolace a kultivace sinic.

6 Diskuse

Hlavním cílem bakalářské práce bylo získání kmenů (izolace na agarových plotnách) sinic žijících na dně antarktických jezer a literární rešerše sinic (cyanobakterií) kontinentální Antarktidy. Tato práce přispěla k lepšímu porozumění diverzity sinic v antarktických jezerech a k izolaci a kultivaci sinic pro další výzkum.

Práce přináší mnoho poznatků o ekosystémech antarktidy, které se dělí na terestrické, hydro-terestrické a limnické (jezerní). Dále přináší poznatky o antarktických jezerech, především jejich klasifikaci dle jezerního dna, jezerní bioty a biotopu. Představuje východní část Antarktidy, konkrétně Zemi královny Maud, ze které pocházejí všechny vzorky zpracovávané v metodice. Dále práce shrnuje informace o sinicích a uvádí základní informace o morfologii buněk a strukturních komponentech.

Literární rešerši této bakalářské práce je možné rozšířit o další aspekty. Vzhledem k tomu, že se práce zaměřuje na sinice v Antarktidě, je možné provést daleko podrobnější a obsáhlejší studii diverzity sinic v jednotlivých ekosystémech. Nicméně, pokud by se práce zaměřovala na podrobnější témata, mohla by se vzdálit od cíle práce, kterým je studium diverzity sinic Antarktidy, především tedy limnického ekosystému.

Bylo by vhodné zvážit rozšíření literární rešerše o další typy organismů, které se vyskytují v antarktických jezerech. Zatímco se tato práce věnuje zejména jednomu organismu a to sinicím v limnickém prostředí, jen v tomto ekosystému se vyskytuje mnoho dalších mikroorganismů, kterými jsou například řasy. Rozšíření rešerše o tyto organismy by mohlo být přínosné pro celkové porozumění ekosystémů v antarktických jezerech.

Dalším přínosem by mohlo být důkladnější zkoumání geologického a klimatického vývoje Antarktidy, což by přispělo k většímu pochopení ekologických procesů v této oblasti. Dále se v rámci této práce řeší pouze okrajově analýza genetického materiálu sinic. Další výzkum by mohl přinést cenné informace o biodiverzitě a fylogenetických vztazích mezi druhy. Bylo by možné i zhodnotit možnosti využití sinic, jako jsou jejich bioaktivní látky, které mohou být využity v lékařství nebo farmacii. Práce by mohla přispět porovnáním antarktických jezer i s jiným životním prostředím, což by umožnilo studium adaptability sinic na extrémní podmínky.

Diskuzi nad literární rešerší lze shrnout do tří hlavních bodů. Prvním bodem je možnost rozšířit literární rešerši o detailnější studii i terestrických a hydro-

terestrických ekosystémů. Druhým bodem je zaměření se i na další organismy vyskytující se v limnických ekosystémech. Posledním bodem je zmínit i potenciál dalšího výzkumu jako je analýza genetického materiálu sinic a porovnat antarktická jezera s jinými životními prostředími.

Druhým hlavním cílem bakalářské práce bylo získání kmenů (izolace na agarových plotnách). Tomuto cíli se věnuje praktická část práce. První kapitola vlastní práce, kterou je Metodika, obsahuje postup izolace a kultivace sinic. Vzorky byly vybrány pouze dva dle sběrného protokolu a to z důvodů, aby vzorků nebylo na zpracování příliš mnoho a vše bylo možné minimalisticky zdokumentovat. Při dokumentaci práce v laboratoři nezáleželo odkud byl vzorek odebrán. Postup izolace sinice probíhá u vzorku ze dna jezera totožně. Vzorky jsou uchovány i v početnějších skupinách, kdy mohou pocházet i ze všech tří zmíněných ekosystémů. Následný postup izolace by byl pro účely nepřiměřeně rozsáhlý. Výsledkem vlastní práce je úspěšný postup izolace a kultivace.

V kapitole Výsledky, je postup shrnut dvěma schématy. Schéma č. 47 zobrazuje jednotlivé kroky izolace. Na schématu č. 48 je zobrazeno přeočkování. Lze konstatovat, že pokud se dodržují kroky izolace dle navrženého schématu výsledkem je úspěšná izolace. Lze zvažovat zda tento výsledek dokáže přispět například ke vzdělávacím účelům.

Vzorek č. 103, kterým byl sníh se jevil jako prázdný. Na rozdíl od druhého vzorku č. 104, který od pohledu obsahoval kus biomasy. Ve vzorku č. 104 byl na přímé mikroskopii studován rod *Nostoc*. Vzorek č. 103 se i na přímé mikroskopii jevil jako prázdný. Přesto byl uložen do lednice. Za 30 dní byl vidět růst viz obrázek 51. Jedná se o zelenou řasu rodu *Stichococcus sp.* obrázek (46). Nejedná se tedy o sinici oproti vzorku č. 104. Abychom mohli určit, jaký organismus se ve vzorku může vyskytovat, je potřeba správně zvolit vzorky podle sběrného protokolu.

Jednou z překážek při postupu může být výběr nevhodného média. Jak připravit agarové plotny si bylo možné vyzkoušet v Botanickém ústavu AV ČR, v. v. i. v rámci literární rešerše. Nevhodné médium může výrazně ovlivnit úspěšnost procesu. Dále sterilního prostředí má výrazný vliv na výsledek izolace. Kontaminace agarové plotny může mít za následek růst nechtěných organismů. (Andersen, 2005)

Výraznou překážkou je časová náročnost procesu, který vyžaduje pečlivost a trpělivost. Z výsledků je patrné, že přeočkování se opakuje po zhruba 30 dnech. Uchovávání vzorků v lednici má za důsledek zpomalení růstu kultury. Tímto způsobem, lze zachytit časové okno, kdy kultura není přerostlá a je možné odebrat pár buněk nebo několik trichomů na přeočkování. Lze říci, že tímto procesem

se zvýší efektivita procesu i při velkém množství naočkovaných kultur v lednici. Lednice má také sterilní aspekt.

Dostupné zdroje se zabývají spíše obecnou izolací a kultivací sinic než izolací a kultivací sinic z polárních oblastí. Práce v laboratoři vychází z postupů v mikrobiologii, kdy zdrojů je v tomto případě k dispozici mnoho a jsou i velmi podrobné. Zdroje nejen odborné literatury, ale i internetové zdroje univerzit a institucí jsou tímto tématem vytíženy. Je na zvážení zda by detailnější popis postupu nepřinesl například konzistenci při replikování postupu mezi jednotlivými experimenty a mezi různými laboratořemi. Lze zvážit zlepšení způsobu dokumentace, například kvalitnějším vybavením nebo lepšími fotografiemi. Lze zvážit možnosti automatizace některých kroků procesu. Automatizací by se zlepšila přesnost výsledků a zkrátila se doba potřebná k izolaci.

7 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo studium diverzity sinic a izolace a kultivace sinic na agarových plotnách. Podle nastavení těchto cílů se práce rozdělila do dvou dílčích částí. V první části bylo pomocí literární rešerše shrnuto podnebí, a přírodní podmínky Antarktidy. Na obecné představení navazuje obecná klasifikace ekosystému Antarktidy, kde jsou ekosystémy rozděleny na terestrické, hydro-terestrické a limnické (jezerní). Práce pokračuje představením klasifikace jezer dle původu jezerního dna. Dále práce řeší sinice jako celek. Rešerše pokračuje kapitolou o sinicích v Antarktidě. Na sinice navazuje kapitola o samotné izolaci a kultivaci. V této kapitole byla shrnuta rešerše laboratorní práce. Se zaměřením práce byl kladen důraz uvádět řasy jen do celistvosti myšlenky a spíše se soustředit jen na sinice. Studium diverzity, organismů a jejich výskyt spolu těsně souvisí, proto kapitoly obsahují i zmínky jiných organismů, aby byly sinice zařazeny do funkčního celku.

Literární rešerše práce přímo souvisí s praktickou částí. Ke splnění cíle izolace a kultivace sinice, byl dbán důraz na rešerši laboratorní práce. Na rešerši navazovaly návštěvy Botanického ústavu AV ČR, v. v. i. v Třeboni, kde se postupy daly do souvislostí s literární rešerší. V metodice je popsána izolace a kultivace sinic v jednotlivých krocích. Vše bylo zdokumentováno fotografiemi. Tato část práce je rozdělena do tří kategorií. První kategorií je popis izolace a kultivace sinice. Vzorek byl rozmrazen, následně rozetřen na agarovou plotnu a připraven preparát. Agarová plotna byla udržována před dalším přeočkováním v lednici. Preparát byl zkoumán pod přímou mikroskopii. Výsledkem práce je úspěšný postup izolace. V kapitole Výsledky byl postup práce shrnut schémata 47 a 48. Ve výsledcích je zobrazeno uchování kultur a doba růstu sinice.

Z výsledků práce lze zopakovat postup izolace a kultivace sinice. Dokumentace a popis jsou detailní a lze izolaci a kultivaci replikovat. Časově nejnáročnější v procesu je doba růstu sinice mezi přeočkováními. V kapitole Výsledky jsou zobrazeny agarové plotny v různých fázích růstu. Ty jsou zobrazeny na obrázcích 50 a 51. Druhou velmi časově náročnou částí práce je přímá mikroskopie, která byla zdokumentována větším množstvím obrázků (28, 29, 30). Tato práce systematicky prezentuje proces izolace v ucelené formě.

Odborné publikace

- ANDERSEN, Robert A, 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier. ISBN 0-12-088426-7.
- BLOCK, Seymour Stanton, 2001. *Disinfection, sterilization, and preservation*. Lippincott Williams & Wilkins.
- DEMOULIN, Catherine F, LARA, Yannick J, CORNET, Luc, FRANÇOIS, Camille, BAURAIN, Denis, WILMOTTE, Annick, JAVAUX, Emmanuelle J, 2019. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. *Free Radical Biology and Medicine*. Roč. 140, s. 206–223.
- ELIÁŠ, Marek, 2009. Vznik fotosyntetizujících eukaryot ve světle srovnávací genomiky/Origin of Photosynthetic Eukaryotes in the Light of Comparative Genomics [online] [cit. 2022-12-18]. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/vznik-fotosyntetizujicich-eukaryot-ve-svetle-srovn.pdf>.
- ELSTER, Josef, 2002. Ecological Classification of Terrestrial Algal Communities in Polar Environments. In: *Geoecology of Antarctic Ice-Free Coastal Landscapes*. Ed. BEYER, Lothar, BÖLTER, Manfred. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 303–326. ISBN 978-3-642-56318-8. Dostupné z DOI: 10.1007/978-3-642-56318-8_17.
- ELSTER, Josef, NEDBALOVÁ, Linda, DEVETTER, Miloslav, 2023. *Polární ekologie Svalbardu*. Univerzita Palackého v Olomouci. nepublikováno.
- FRAGOSO, Glaucia M, NEALE, Patrick J, KANA, Todd M, PRITCHARD, Alicia L, 2014. Kinetics of Photosynthetic Response to Ultraviolet and Photosynthetically Active Radiation in *Synechococcus* WH 8102 (CYANOBACTERIA). *Photochemistry and photobiology*. Roč. 90, č. 3, s. 522–532.
- FRÉBORTOVÁ, Jitka, 2008. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Univerzita Palackého v Olomouci.
- HODGSON, Dominic A, CONVEY, Peter, VERLEYEN, Elie, VYVERMAN, Wim, MCINNES, Sandra J, SANDS, Chester J, FERNÁNDEZ-CARAZO, Rafael, WILMOTTE, Annick, DE WEVER, Aaike, PEETERS, Karolien et al., 2010. The limnology and biology of the Dufek Massif, Transantarctic Mountains 82 South. *Polar Science*. Roč. 4, č. 2, s. 197–214.
- CHEN, Chiu-Fan, HSU, Chun-Hsiang, CHANG, Yu-Jung, LEE, Chao-Hsien, LEE, David Lin, 2022. Efficacy of HEPA Air Cleaner on Improving Indoor Particulate Matter 2.5 Concentration. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Roč. 19, č. 18.

- IMURA, Satoshi, BANDO, Tadashi, SAITO, Shoichi, SETO, Koji, KANDA, Hiroshi, 1999. Benthic moss pillars in Antarctic lakes. *Polar Biology*. Roč. 22, s. 137–140.
- KOMÁREK, Jiří, KAŠTOVSKÝ, J, MAREŠ, J, JOHANSEN, Jeffrey R, 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*. Roč. 86, č. 4, s. 295–335.
- KUMAR, Jitendra, SINGH, Vijay Pratap, PRASAD, Sheo Mohan, 2015. NaCl-induced physiological and biochemical changes in two cyanobacteria *Nostoc muscorum* and *Phormidium foveolarum* acclimatized to different photosynthetically active radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Roč. 151, s. 221–232.
- LAYBOURN-PARRY, Johanna, WADHAM, Jemma L, 2014. *Antarctic lakes*. Oxford University Press. ISBN 978-0-19-967049-9.
- LEPPARANTA, Matti, LUTTINEN, A.V., ARVOLA, Lauri, 2020. Physics and geochemistry of lakes in Vestfjella, Dronning Maud Land. *Antarctic Science*.
- MCELHINNY, MW, MCFADDEN, Phillip L, 1998. *The magnetic field of the earth: paleomagnetism, the core, and the deep mantle*. Sv. 63. Academic Press.
- NETOPIL, Rostislav, 1981. *Fyzická geografie*. Státní pedagogické nakladatelství.
- PESSI, Igor S, LARA, Yannick, DURIEU, Benoit, MAALOUF, Pedro de C, VERLEYEN, Elie, WILMOTTE, Annick, 2018. Community structure and distribution of benthic cyanobacteria in Antarctic lacustrine microbial mats. *FEMS Microbiology Ecology*. Roč. 94, č. 5. ISSN 0168-6496. Dostupné z DOI: 10.1093/femsec/fiy042. fiy042.
- PROŠEK ET AL., 2013. *Antarktida*. Academia. ISBN 9788020021403.
- PUSHKAREVA, Ekaterina, ELSTER, Josef, KUDOH, Sakae, IMURA, Satoshi, BECKER, Burkhard, 2023. Community composition of terrestrial habitats in east Antarctica with a focus on microbial phototrophs. *FEMS Microbiology Ecology*. nepublikováno.
- RAHN, Otto, 1945. Physical methods of sterilization of microorganisms. *Bacteriological reviews*. Roč. 9, č. 1.
- S. PECK, Lloyd, 2018. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 2018. ISBN 978-0-429-45445-5.
- SÁNCHEZ-BARACALDO, Patricia, BIANCHINI, Giorgio, WILSON, Jamie D, KNOLL, Andrew H, 2022. Cyanobacteria and biogeochemical cycles through Earth history. *Trends in Microbiology*. Roč. 30, č. 2, s. 143–157.

- SEGAWA, Takahiro, YONEZAWA, Takahiro, EDWARDS, Arwyn, AKIYOSHI, Ayumi, TANAKA, Sota, UETAKE, Jun, IRVINE-FYNN, Tristram, FUKUI, Kotaro, LI, Zhongqin, TAKEUCHI, Nozomu, 2017. Biogeography of cryococcal forming cyanobacteria on polar and Asian glaciers. *Journal of biogeography*. Roč. 44, č. 12, s. 2849–2861.
- SINGH, Shiv M., ELSTER, Josef, 2007. Cyanobacteria in Antarctic lake environments: a mini-review. *Algae and cyanobacteria in extreme environments*, s. 303–320.
- SYKES, George et al., 1958. Disinfection and sterilization. *Disinfection and sterilization*.
- TATON, Arnaud, GRUBISIC, Stana, BALTHASART, Pierre, HODGSON, Dominic A., LAYBOURN-PARRY, Johanna, WILMOTTE, Annick, 2006. Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *FEMS Microbiology Ecology*. Roč. 57, č. 2, s. 272–289. ISSN 0168-6496. Dostupné z DOI: 10.1111/j.1574-6941.2006.00110.x.
- TEMRALEEVA, AD, DRONOVA, SA, MOSKALENKO, SV, DIDOVICH, SV, 2016. Modern methods for isolation, purification, and cultivation of soil cyanobacteria. *Microbiology*. Roč. 85, s. 389–399.
- WADITEE-SIRISATTHA, Rungaroon, KAGEYAMA, Hakuto, 2022. Cyanobacterial cells. In: *Cyanobacterial Physiology*. Elsevier, s. 3–16.
- WHITTON, Brian A, POTTS, Malcolm, 2012. Introduction to the cyanobacteria. *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*, s. 1–13.
- YANG, Chih-Chun, WEN, Rex C, SHEN, Claire R, YAO, Da-Jeng, 2015. Using a microfluidic gradient generator to characterize BG-11 medium for the growth of cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Micromachines*. Roč. 6, č. 11, s. 1755–1767.

Internetové zdroje

ČEDÍKOVÁ, Miroslava, KRAKOROVÁ, K, MIKLÍKOVÁ, M, HRONOVÁ, M, BALANDOVÁ, A, PITULE, P, KRÁLÍČKOVÁ, M, 2012. On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů. *Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze*.

SINICE A ŘASY.CZ, 2021a. *Definovaná sladkovodní média* [online]. Algologická laboratoř, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <https://www.sinicearasy.cz/skripta/algologick%C3%A9-kultiva%C4%8Dn%C3%AD-techniky/kultiva%C4%8Dn%C3%AD-m%C3%A9dia/definovan%C3%A1-sladkovodn%C3%AD-m%C3%A9dia>.

SINICE A ŘASY.CZ, 2021b. *Izolace na agarových plotnách* [online]. Algologická laboratoř, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <https://www.sinicearasy.cz/skripta/algologick%C3%A9-kultiva%C4%8Dn%C3%AD-techniky/tradi%C4%8Dn%C3%AD-metody-izolace-mikro%C5%99as/izolace-na-agarov%C3%BDch-plotn%C3%A1ch>.

SINICE A ŘASY.CZ, 2021c. *Kultivační média* [online]. Algologická laboratoř, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <https://www.sinicearasy.cz/skripta/algologick%C3%A9-kultiva%C4%8Dn%C3%AD-techniky/kultiva%C4%8Dn%C3%AD-m%C3%A9dia>.

SINICE A ŘASY.CZ, 2021d. *Tradiční metody izolace mikrořas* [online]. Algologická laboratoř, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <https://www.sinicearasy.cz/skripta/algologick%C3%A9-kultiva%C4%8Dn%C3%AD-techniky/tradi%C4%8Dn%C3%AD-metody-izolace-mikro%C5%99as>.

SINICE A ŘASY.CZ, 2021e. *Základy sterilní práce* [online]. Algologická laboratoř, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích [cit. 2023-02-20]. Dostupné z: <https://www.sinicearasy.cz/skripta/algologick%C3%A9-kultiva%C4%8Dn%C3%AD-techniky/z%C3%A1klady-steriln%C3%AD-pr%C3%A1ce>.

USGS SCIENCE FOR CHANGING A WORLD, 2022. *Antarctica Detail*. Dostupné také z: https://web.archive.org/web/20200802063913/https://geonames.usgs.gov/apex/f?p=gnispq:5:::N0::P5_ANTAR_ID:4141.

WIKIPEDIE, 2023. *Jižní magnetický pól* - *Wikipedie: Otevřená encyklopedie* [online]. [cit. 2023-02-26]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Ji%C5%BEn%C3%AD_magnetick%C3%BD_p%C3%B3l&oldid=22545250.

Ostatní zdroje

- ČEPOVÁ, Denisa, 2013. *Jezerní ekosystémy vybrané oblasti souostroví Špicberky*. Univerzita Palackého v Olomouci, Katedra Regionální geografie.
- VÍTKOVÁ, Ivana, 2016. Antibakteriální účinky dezinfekčních přípravků. Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta.

Seznam obrázků

1	Jezero Naga Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)	10
2	Jezero Kumugata Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)	11
3	Jezero Kikuno Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)	12
4	Jezero Bosatsu Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)	13
5	Odběr vzorků z jezera Nyorai Ike (Elster, 2019)	14
6	Odběr vzorků z jezera Dairi Ike (Skallen) (Elster, 2019)	14
7	Vzorek narostu na dně jezera Bosatsu Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)	18
8	Vzorek dna nárostu z jezera Naga Ike (Elster, 2019)	18
9	Nárost ze dna jezera Nyorai Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)	19
10	Nárost sinic na mechorostech na dně jezera Hotoke Ike (Skarvnes) (Elster, 2019)	20
11	Chladicí box	27
12	Chladicí box - skladování vzorků	27
13	Vzorek 103, 104, Skarvnes	27
14	Vzorky 103, 104 jednotlivé	27
15	Kádinka se vzorky	28
16	Laminární box	29
17	Popis Petriho misky	29
18	Přiřazení vzorku k Petriho misce	30
19	Laboratorní hořák	30
20	Výsledné naočkování	31
21	Naočkováná agarová plotna	32
22	Prosklená lednice	32
23	Prosklená lednice s osvětlením 1	32
24	Podložní, krycí sklíčko, pipetka	33
25	Mikroskopovací stanice	33
26	<i>Nostoc</i>	33
27	<i>Nostoc</i>	33
28	<i>Coleodesmium wrangelii</i> a zrníčka kolem vláken <i>Chlorogloea sp.</i> .	34
29	<i>Entophysalis sp.</i>	34
30	<i>Gloeocapsopsis cf. crepidinum</i>	34
31	<i>Hydrocoleum</i>	34
32	Iniciální stádium <i>Nostoc</i>	34
33	<i>Microcoleus</i> , <i>Oscillatoria</i> a rozsivky	34
34	Inverzní mikroskop	35
35	<i>Microcoleus</i>	35

36	Popis Petriho misky	36
37	Petriho miska v inverzním mikroskopu	36
38	Sterilní agarová plotna	36
39	Přenesení buňky	36
40	Detail buňky	37
41	Detail pasáže	37
42	<i>Microcoleus</i>	37
43	<i>Microcoleus</i>	37
44	<i>Nostoc</i>	37
45	<i>Romeria cf. nivicola</i>	37
46	Řasa ve vzorku č. 103, <i>Stichococcus sp.</i>	37
47	Postup izolace na agarových plotnách	38
48	Přeočkování kultury sinice	39
49	Udržování kultur sinic	39
50	Doba růstu mezi přeočkováním sinic	40
51	Růst po 30 dnech, <i>Stichococcus sp.</i>	40