

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE



**Izolace a kultivace eukaryotických řas
z hydroterestrických biotopů kontinentální Antarktidy**
Isolation and cultivation of eukaryotic microalgae from
ephemeral hydro-terrestrial habitats of continental Antarctica

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Bakalant: Adéla Suchochlebová

Praha, 2024

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Adéla Suchochlebová

Aplikovaná ekologie

Název práce

Izolace a kultivace eukaryotických řas z hydroterestických biotopů kontinentální Antarktidy

Název anglicky

Isolation a cultivation of eukaryotic microalgae from ephemeral hydro-terrestrial habitats of continental Antarctica

Cíle práce

Studentka se naučí izolaci (metoda kultivace na agarových plotnách – dilution plate method) eukaryotických řas z přírodních vzorků. Po vyizolování kmenů řas (unialgal strains) se seznámí s následnou možností kultivace. Studentka se naučí posuzovat diverzitu řas ve studovaných biotopech.

Metodika

Kultivace přírodních vzorků na agarových plotnách s izolací řasových kmenů.

Doporučený rozsah práce

min. 30 str.

Klíčová slova

Eukaryotické řasy, hydroterestrické biotopy, izolace, kultivace, kontinentální Antarktida

Doporučené zdroje informací

- BORGHINI F., COLACEVICH A. & BARGAGLI R. 2010: A study of autotrophic communities in two Victoria Land lakes (Continental Antarctica) using photosynthetic pigments. *J. Limnol.*, 69(2): 333-340.
- Elster, J. and Benson E.E. 2004: Life in the Polar Terrestrial Environment a Focus on Algae and Cyanobacteria. In: B. Fuller, N. Lane and E.E. Benson, (editors) *Life In The Frozen State*. Taylor and Francis, London, pp. 111- 149
- Elster, J., Lukešová, A., Svoboda, J., Kopecký, J. & Kanda, H. 1999: Diversity and abundance of soil algae in the polar desert, Sverdrup Pass, central Ellesmere Island. *Polar Record* 35 (194): 231-254
- Elster, J. 2002: Ecological classification of terrestrial algal communities of polar environment. In: *GeoEcology of Terrestrial Oases* L. Beyer and M. Boelter (eds.). Ecological Studies, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 303-319
- Pushkareva E., Elster J. 2013: Biodiversity and ecological classification of cryptogamic soil crusts in the vicinity of Petunia Bay, Svalbard. *Czech Polar Records*, 3 (1): 7-18

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 23. 2. 2023

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 28. 08. 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Izolace a kultivace eukaryotických řas z hydroterestrických biotopů kontinentální Antarktidy 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 31.3.2024

.....

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala panu prof. Ing. Josefu Elsterovi, CSc. za možnost vypracovat tuto práci. Za poskytnuté rady a podklady pro její vypracování. Především za praktické zkušenosti v Botanickém ústavu akademie věd v Třeboni, při psaní metodické části. Dále děkuji své rodině, která mi byla během celého studia oporou a psychickou podporou.

Abstrakt

Antarktida jako nejvyšší, nejchladnější, největrnější a nejsušší kontinent na Zemi, působí zcela nepřístupným a neobyvatelným dojmem a přesto je na ní života více než dost. Současnou flóru tvoří zejména cyanobakterie (sinice), řasy, mechy a lišejníky.

U hydroterestrických biotopů je kapalná voda přítomna pouze po část roku díky sezónním cyklům tání a zamrzání a důležitou roli hraje permafrost, který v půdě vytváří bariéru zabráňující odtoku povrchové vody a vsakování do podloží. I díky tomu je na Antarktidě umožněn pestrý výskyt sinic a řas.

Tato práce je zaměřena především na řasy hydroterestrických biotopů v oblasti Antarktidy. Zde žijící řasy mají dvě životní strategie, a to forma řasových rohoží a krust a formou slizovitých shluků a želé biomasy plovoucí ve vodách.

Antarktida je cílem celé řady výzkumníků napříč celým světem a jedním z nich je i prof. Ing. Josef Elster, CSc. Ten odebral vzorky z hydroterestrických biotopů východní části kontinentální Antarktidy, Enderbyho země a Země královny Maud, zátoky Lützow-Holm a odledněných území Skallen, Skarvsnes a Langhovde, odkud byly převezeny do Botanického ústavu akademie věd v Třeboni. Tam byla provedena izolace a kultivace jednotlivých vzorků řas na agarových plotnách. Podařilo se zařadit všechny vzorky a o některé z nich rozšířit kmenovou banku. V rámci této bakalářské práce se podařilo vyizolovat vláknitou řasu *Klebsormidium* sp., *Stichococcus* sp. a *Chlorella* sp.

Klíčová slova: Eukaryotické řasy, hydroterestrické biotopy, izolace, kultivace, kontinentální Antarktida

Abstract

Antarctica, as the highest, coldest, windiest and driest continent on Earth, seems completely inaccessible and uninhabitable, and yet there is more than enough life on it. The current flora mainly consists of cyanobacteria (cyanobacteria), algae, mosses and lichens.

In hydroterrestrial habitats, liquid water is only present for part of the year due to seasonal cycles of thawing and freezing, and an important role is played by permafrost, which creates a barrier in the soil preventing surface water from draining off and seeping into the subsoil. Thanks to this, the diverse occurrence of cyanobacteria and algae is possible in Antarctica.

This work is mainly focused on algae of hydroterrestrial biotopes in the Antarctic region. The algae living here have two life strategies, namely in the form of algal mats and crusts and in the form of slime-like clumps and jelly-like biomass floating in the waters.

Antarctica is the goal of many researchers around the world, and one of them is Prof. Ing. Josef Elster, CSc. He took samples from the hydroterrestrial biotopes of the eastern part of continental Antarctica, Enderby Land and Queen Maud Land, Lützow-Holm Bay and the deglaciated areas of Skallen, Skarvsnes and Langhovde, from where they were transported to the Botanical Institute of the Academy of Sciences in Třebon. There, isolation and cultivation of individual algae samples on agar plates was carried out. It was possible to include all the samples and to expand the stem bank by some of them. As part of this bachelor thesis, it was possible to isolate the filamentous algae *Klebsormidium* sp., *Stichococcus* sp. and *Chlorella* sp.

Keywords: Eukaryotic algae, hydro-terrestrial biotopes, isolation, cultivation, continental Antarctica

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce.....	2
3. Literární rešerše.....	3
3.1 Antarktida.....	3
3.2 Hydroterestrické biotopy.....	5
3.3 Sinice a řasy.....	10
3.3.1 Taxonomie řas.....	14
3.3.2 Mikroskopické řasy.....	17
3.3.3 Makroskopické řasy.....	18
3.4 Historie izolace a kultivace řas.....	22
3.5 Kultivační média.....	24
3.5.1 Sladkovodní kultivační média.....	24
3.5.2 Mořská kultivační média.....	26
3.6 Minerální výživa řas.....	27
3.7 Sterilizace a její metody.....	27
3.8 Izolační techniky.....	30
3.8.1 Izolace jednodruhových kultur řas mikropipetou.....	30
3.8.2 Izolace jednodruhových kultur řas na agarových plotnách.....	31
3.8.3 Izolace jednodruhových kultur řas metodou ředění.....	32
3.8.4 Izolace jednodruhových kultur řas fototaxí.....	32
3.8.5 Průtoková cytometrie s tříděním buněk za účelem izolace jednodruhových kultur řas.....	32
3.9 Čištění jednodruhových kultur řas od kontaminace.....	33
3.10 Udržování kultur mikrořas.....	34
4. Metodika izolace a kultivace mikrořas.....	37

5.	Výsledky.....	47
6.	Závěr.....	50
7.	Seznam použité literatury.....	51
8.	Ostatní zdroje.....	55
9.	Seznam obrázků.....	57

1. Úvod

Řekne-li se antarktický kontinent, každý si představí nehostinné a extrémní prostředí. Navzdory této představě zde žije celá řada organismů vč. široké škály druhů řas. Ty můžeme nalézt ve všech prostředích, která Antarktida nabízí, např. v jezerech, hydroterestrických biotopech nebo na sněhu. Řada druhů řas dosud není popsána. Snahou vědců je tyto druhy rozpoznat a rozklíčovat, jak se dokázaly vyrovnat s tak extrémním prostředím, které na Antarktidě panuje.

Bakalářská práce je zaměřena na výzkum vedoucí k identifikaci nových druhů řas, jejich rozmnožování a získávání dalších informací z odebraných vzorků o tom, co umožnilo daným řasám žít v extrémních podmínkách Antarktidy.

První část bakalářské práce je věnována literární rešerši. Informuje o technikách, které vědci využívají při své práci, a jednotlivých důležitých krocích vedoucích k dosažení správného výsledku. Technik izolace a kultivace je mnoho, zde jsou přiblíženy jen některé z nich. Dále popisuje informace o řasách a samotné Antarktidě.

V metodické části je popsán postup práce, kterému jsem měla možnost přihlížet a aktivně se ho účastnit. Jedná se o práci s konkrétními vzorky sebranými v Antarktidě. Tato bakalářská práce je zaměřena primárně na mikroskopické řasy.

2. Cíle práce

Cílem teoretické části práce bylo představit Antarktidu coby jedinečný kontinent, hydroterestrické biotopy, řasy - od jejich vzniku, druhové pestrosti vč. jejich ne zcela jednoduché taxonomie a dále představení způsobů izolace a kultivace, druhů živných médií a základních pravidel laboratorních prací. Dále se práce věnovala zejména mikrořasám.

V praktické části práce jsem se naučila izolovat a kultivovat eukaryotické řasy z přírodních vzorků odebraných v hydroterestrických biotopech Antarktidy prof. Elsterem a naučila se posuzovat diverzitu řas v biotopech, ze kterých byly vzorky odebrány.

3. Literární rešerše

3.1 Antarktida

Název Antarktida pochází z francouzského slova „antarktique“ a z latinského „antarcticus“. Latinský název je odvozen ze dvou řeckých slov (anti-, arktikos = medvěd, severní) znamenajících „naproti Arktidě“ nebo též „naproti severu“. Společně s Austrálií jsou to jediné kontinenty, které leží zcela na jižní polokouli. (wikipedia)

Antarktický kontinent se rozkládá na jižním pólu Země a společně s šelfovými ledovci a Jižním oceánem tvoří tzv. Antarktickou oblast. Její hranicí je antarktická konvergence (též antarktická oceánská konvergence), což je cirkumpolární mořský pás, ve kterém se mísí studené vody Jižního oceánu s teplejšími vodami Atlantského, Indického i Tichého oceánu. Tato konvergence vytváří hranici i pro řadu mořských organismů, včetně živočichů (ryb, korýšů, atp.). Vymezení antarktické konvergence není přesně dané a hranice se mění sezónně v návaznosti na větrné a mořské proudy. Sladké vody z tajících ledovců, které se promíchávají s vodami na dně Jižního oceánu, vynáší chemické prvky (minerální látky – makroprvky) nutné pro výživu planktonu a následně krillu (drobní korýši žijící v oceánech a mořích) a do této hloubky přináší kyslík. Bez husté, na kyslík bohaté vody klesající poblíž Antarktidy by měl hluboký oceán velmi nízkou hladinu kyslíku. (Rintoul a Church, 2002; wikipedia)

Rozloha kontinentu činí téměř 14 mil. km². Antarktida je nejvyšší (průměrná nadmořská výška je 2500 m n.m.), nejchladnější, největrnější a nejsušší kontinent na Zemi, v podstatě se jedná o polární poušť s velmi malým množstvím srážek ve formě sněhu. Množství vody, která dopadá na centrální zaledněnou část, je srovnatelné s vlhkostí, která dopadá na horké pouště světa. Větry proudí po pobřežních svazích pod vlivem gravitace, rychlosti těchto katabatických větrů byly zaznamenány až 327 km za hodinu. Nejnižší teplota, jaká kdy byla na Zemi zaznamenána, byla -89,2 °C ve Vostoku (ruská stanice), v australské antarktické oblasti, v roce 1983.

Východní Antarktida je chladnější než západní Antarktida díky vyšší nadmořské výšce, nejmírnější podnebí má Antarktický poloostrov. Vyšší teploty se

vyskytují v lednu podél pobřeží a v průměru mírně pod bodem mrazu, léto je charakterizováno polárním dnem (dopadá zde více slunečního záření než je ve stejném období na rovníku) a zima přináší nepřetržitou tmu.

Pomyslnou hranicí rozdělující kontinent na západní a východní část je Transatlantické pohoří o délce cca 3 000 km a šířce mezi 200 – 600 km, které je tvořeno mnoha pohořími. Nejvyšším vrcholem tohoto pohoří je Mt. Kirkpatrick s výškou 4 528 m n. m., nacházející se v pohoří královny Alexandry. Nejvyšším vrcholem Antarktidy je hora Vinson Massif s výškou 4 897 m n. m., která se nachází v Ellsworthově pohoří. Nejnižší známý pevninský bod v Antarktidě se skrývá v ledovci Denman (více než 3 500 m p. m.). Na ledovci se nachází dosud nejhlubší led, který byl objeven a nejnižší pevninský bod, který není pod oceánskou vodou. (The World Factbook; Fakt files)

Ledovcová vrstva Antarktidy tvoří 90 % celosvětové zásoby vody. Pod touto masou ledu bylo objeveno mnoho podledovcových jezer. Největším z nich je Vostok nacházející se na východní polovině kontinentu s plochou 15 690 km². Objem vody je odhadován na 5 400 km³. Na západní polovině je nejvíce známé podledovcové jezero Ellsworth s objemem cca 1,4 km³.

Na první pohled se Antarktida může zdát jako tvarově poměrně jednoduchý kontinent. Tato skutečnost však neplatí o oblasti Antarktického poloostrova, jehož pobřeží je členité a obklopené velkým množstvím ostrovů různých velikostí. Největší ostrov nese název Alexandrův, nachází se v Bellinghausenově moři a má rozlohu 49 070 km².

V době, kdy byla Antarktida součástí pevninského bloku Gondwana, měla zcela jinou podobu a nacházela se v nižších zeměpisných šířkách. Díky této poloze se jednalo o kontinent s vysokou biologickou diverzitou, bohatší vegetací s výskytem zvěře. Postupně s ústupem kontinentu do chladnějších šířek až do své aktuální pozice docházelo k zalednění, k ústupu a následnému vymizení vegetace a živočichů. Důkazy o životě v minulosti existují v podobě fosilií, byly objeveny otisky listů kapradin, zkamenělé kmeny stromů nebo pozůstatky druhohorních živočichů.

Dnešní flóru obývající Antarktidu tvoří zejména cyanobakterie (sinice), řasy, mechy a lišejníky, které se sem dopravily samovolně vzduchem, vodou z moře, přenosem lidmi, ptáky atp. Některé zde mohly přežít z období Gondwany. Jejich

přesný počet není znám, jelikož doposud došlo k prozkoumání jen malé plochy kontinentu.

V Antarktidě se nevyskytuje žádný druh živočicha trvale obývajícího souš, ale žije zde řada živočichů vázaných na moře. Zastoupení zde našli obratlovci i bezobratlí. Z obratlovců zde žije například tučňák císařský (*Aptenodytes forsteri*), rypouš sloní (*Mirounga leonina*), chaluha velká (*Stercorarius skua*), albatros stěhovavý (*Diomedea exulans*). Druhou zmíněnou skupinu zastupují roztoči (*Acari*), chvostoskoci (*Collembola*), dvoukřídli hmyz (*Diptera*), hlístice (*Nematoda*), želvušky (*Tardigrada*) a vířníci (*Rotifera*).

3.2 Hydroterestrické biotopy

Polární suchozemské ekosystémy se liší od ekosystémů mírných oblastí zejména přítomností permafrostu. Permafrost je hornina, zvětralina nebo půda, jejíž teplota je po dobu dvou či více let pod bodem mrazu. Voda v takové půdě je zmrzlá a spolu s částicemi písku, půdy a kamení tvoří tvrdou krustu, která kromě jiného neumožňuje výměnu plynů a minerálních látek mezi hlubší zmrzlou vrstvou a povrchovou vrstvou půdy. Permafrost omezuje podpovrchový systém na aktivní vrstvu a omezuje migraci vody do hlubších vrstev půdy. Tloušťka aktivní vrstvy závisí na solární tepelné bilanci a i tenké povrchové vrstvy řas mohou ovlivnit výměnu tepla v hloubkách, kde se permafrost vyskytuje. (Elster, 2002; Elster, Ditrich a kol., 2023)

Bez vody není život a v případě suchozemských polárních ekosystémů to platí dvojnásob (požadavky na vláhu předcházejí požadavkům na minerální živiny, které předcházejí požadavkům na vyšší teplotu). Polární suchozemské biotopy lze ve vztahu k dostupnosti kapalné vody rozdělit do tří skupin na jezerní, hydroterestrické a suchozemské. Voda v kapalném stavu je v jezerním biotopu přístupná po celý rok, v případě hydroterestrického biotopu je voda přítomna pouze po letní část roku (sezónní cykly tání a zamrzání), v případě suchozemského biotopu je voda k dispozici nárazově. Hlavním zdrojem kapalné vody v hydroterestrických biotopech jsou ledovce a sněhová pole (tání), přičemž, jak již bylo zmíněno výše, důležitou roli hraje permafrost. (Elster, 2002)

U hydroterestrických biotopů se jedná o lotické (tekoucí), lentické (stojaté),

přechodně mělké sladkovodní nebo brakické mokřady, zamokřené půdy, mělká jezera, tůně, periodicky zaplavovaná území atp. Jednotlivé typy se odlišují délkou svého trvání, trofií (obsahem dostupných minerálních živin), obsahem unášených minerálních částic a řadou dalších ekologických charakteristik. (Elster, Ditrich a kol., 2023)

Jak již bylo zmíněno, základní rozdíl mezi hydroterestrickými a jezerními oblastmi v polárních oblastech je ten, že hydroterestrické oblasti během zimy vymrzají a vysychají, až na dno, zatímco většina jezer nikoli. Řada ekologických studií zaznamenala sezónní, denní i celoroční kolísání teplot a změny přechodů stavu vody ve všech typech polárních hydroterestrických biotopů. V polárních oblastech se letní teploty vody obvykle pohybují od 0 - 8 - 10 °C. Denní teplota vzduchu může klesnout pod 0 °C, což vede k povrchovému mrazu, ale teploty mokřadního dna klesají pod bod mrazu jen výjimečně. Tyto výrazné denní špičky se objevují hlavně na začátku a na konci letní sezóny. Větší mokřady bývají teplejší, teplotně stabilnější a v zimě zamrzlé. Mokřady pokryté sněhem však často vykazují minimální teplotu pouze -4 °C (zatímco teploty vzduchu mohou klesnout). Hromadění sněhu a ledu nabízí půdnímu prostředí velmi účinnou izolaci. Naproti tomu místa bez sněhu a ledu zamrzají a teploty mohou klesnout až na velmi nízké teploty (v oblastech kontinentální Antarktidy až -40 °C). (Elster a Benson, 2004)



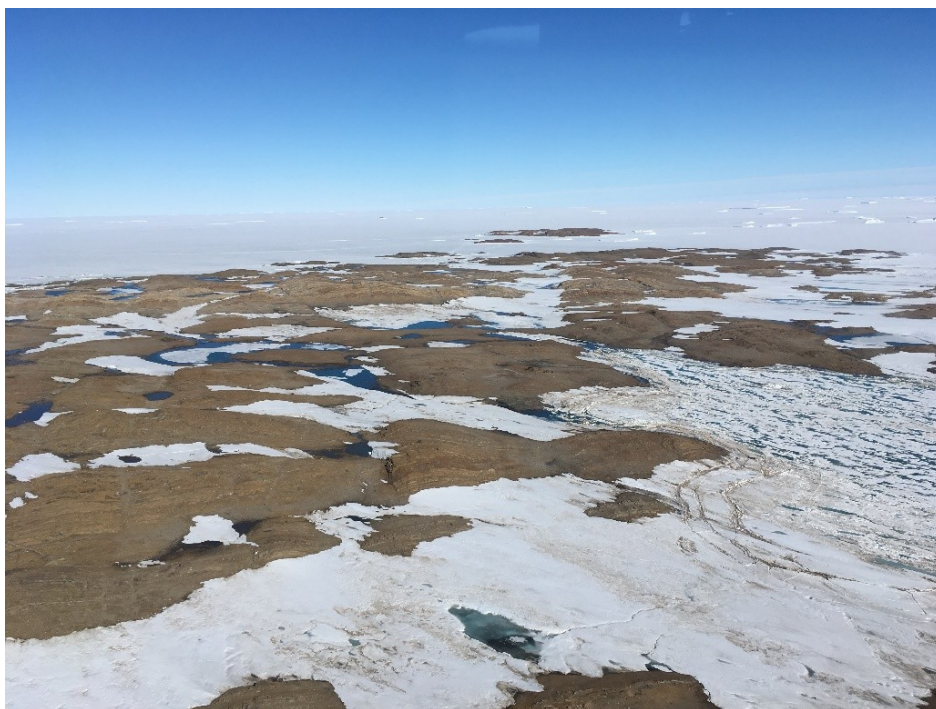
Obrázek 1 - Mělká jezera (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 2 - Mělká louže (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 3 - Mělký potok (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 4 - Mozaika mělkých mokřadů na začátku léta (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 5 - Odledněná krajina kontinentální Antarktidy s mělkými jezery (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 6 - Odledněná krajina s mělkými mokřady (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 7 - Potůček s meteostanicí (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 8 - Seepage pod sněhovým polem (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 9 - Systém mělkých louží (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

3.3 Sinice a řasy

Sinice (cyanobakterie) jsou velmi starou skupinou bakterií a nejstarší formou života na Zemi. Jejich existence se odhaduje na 3,5 mld let. Jedná se o nejstarší fotoautotrofní organismy na Zemi. Sinice umí provádět fotosyntézu – biochemický

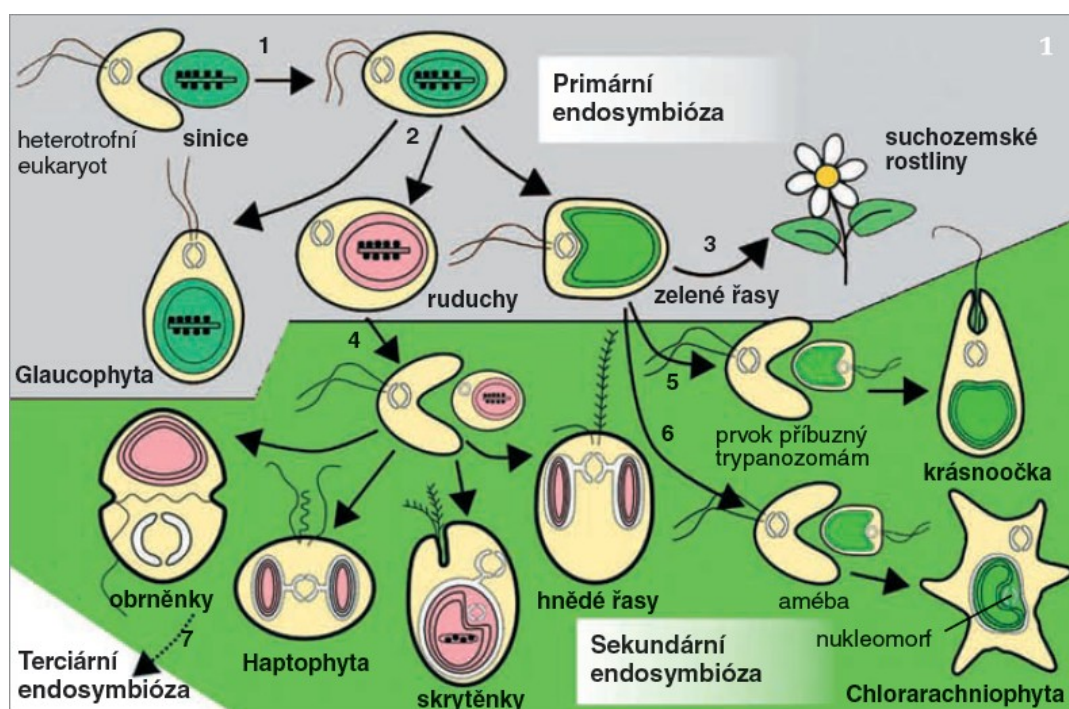
proces, při kterém přijatá energie slunečního záření slouží k syntéze organických látek (cukrů) z vody a oxidu uhličitého, vedlejším produktem fotosyntézy je kyslík. Zhruba před 2,5 mld let s vyšší intenzitou vulkanické činnosti došlo ke zvýšení obsahu oxidu uhličitého v ovzduší a v souvislosti s tím nastal rozmach sinic. Díky jejich fotosyntetické činnosti se postupně začal zvyšovat obsah kyslíku v atmosféře a v návaznosti na to docházelo k rozmachu života na Zemi. Dominance sinic trvala až do počátku kambria (před cca 600 milióny lety).

Buňky sinic jsou prokaryotické. V thylakoidech (plochý váček s fotosyntetickým aparátem) je obsažen pigment jako chlorofyl, alfa i beta karoten, xanthofyly. Na povrchu thylakoidálního váčku jsou fykobilizomy, které obsahují specifická barviva fykoerytrin, fykocyanin, allofykocyanin, díky čemuž mají sinice hnědou, zelenou až modrozelenou barvu. Škála současného výskytu sinic je poměrně široká, jsou ve sladkých i slaných vodách, na skalních stěnách, kamenech nebo v půdě. Díky své bakteriální podstatě jsou sinice velmi dobře adaptabilní a umí dlouhodobě přečkávat nepříznivé podmínky, např. pohyblivé sinice se přemístí do příznivější části biotopu, tvorba ochranného slizu, tvorba kolonií, tvorba heterocyst, tvorba silnostěnných cyst, tvorba akinet (klidová, nepohyblivá stádia). Sinice v ekosystému hrají důležitou roli, neboť dokáží fixovat vzdušný dusík, který zabudovávají do molekul organických látek a převádět ho do forem, které jsou schopné přijímat i další organismy. Představují také zdroj potravy pro plankton, ryby a další organismy.

Sinice společně s prvky daly vzniknout „primárním“ eukaryotickým řasám. Jednobuněčný eukaryotní heterotrofní organismus pozřel sinici (fagocytóza) a jejich následnou koevolucí vznikly eukaryotické fotosyntetické řasy. Tento počín se datuje přibližně 0,8 – 1 mld let nazpět. Na rozdíl od sinic mají řasy pevnou buněčnou stěnu a buňka obsahuje jádro (nukleus).(www.sinicearasy.cz; wikipedie)

Řasy podobně jako sinice umí provádět fotosyntézu, na rozdíl od sinic u řas probíhá v chloroplastech. Řasy nemají jediného společného předka (vzniklého primární endosymbiózou), neboť endosymbióza se v evoluci řas zopakovala ještě několikrát a to tak, že nebyla pohlcena sinice, ale jiná řasa. Endosymbiotické děje nám tedy ukazují jasný postup evoluce a že organismy, které dnes označujeme souhrnně jako řasy, neměly společného předka. Nastalo několik na sobě nezávislých evolučních událostí se stejným výsledkem – vznikem fotosyntetického organismu.

Při sekundární endosymbióze (blíže viz obrázek 1), která proběhla v evoluci minimálně třikrát, vznikly ostatní řasové skupiny. Pohlcením ruduchy získaly své chloroplasty hnědé řasy (Ochromphyta, Stramenopila, někdy také Chromophyta), skrytěnky (Cryptophyta), obrněnky (Dinophyta) a Haptophyta. K pohlcení zelené řasy došlo dvakrát nezávisle na sobě, pozření prvokem příbuzným současným trypanozomám (krásnoočka - Euglenophyta), podruhé měňavkou (skupina Chlorarachniophyta). Chlorarachniophyta jsou měňavkovité nebo bičíkaté mikroorganismy schopné fotosyntézy, ale současně aktivně loví bakterie, drobné bičíkovce a eukaryotní řasy. (Juráň a Kaštovský, 2016)



Obrázek 10 – Primární, sekundární a terciární endosymbióza (zdroj: Josef Juráň, Jan Kaštovský
K výuce Nový pohled na systém řas a jak ho učít?)

Řasy najdeme ve sladké i slané vodě, ve vzduchu, suchozemské formy jsou malé, nenápadné a nejvíce se vyskytují ve vlhkých tropických oblastech (řasy nepřežijí v suchém prostředí). Z hlediska morfologie jsou řasy velmi rozmanité organismy, jsou jednobuněčné i mnohobuněčné, kokální (jednotlivé buňky nebo kolonie), některé mohou být uloženy ve výrazné slizové pochvě (kapsální stélka), vláknité a sifonální řasy, jsou to bičíkovci a také rhizopodiální (měňavkovité) buňky. (www.sinicearasy.cz; wikipedia)

Řasy se dokáží poměrně rychle adaptovat svému prostředí. Tato skutečnost vedla k tomu, že dnes existuje bohatá diverzita této rostlinné skupiny. Jejich šíření

probíhá po celé planetě mnoha různými způsoby (větrem, vodou, ulpěním na vznášených částech např. půdy, částech rostlin, na tělech živočichů), ale ne všechny druhy dokáží přežít v jakémkoliv prostředí. Ve vodním prostředí řasy dokáží rychle vytvářet nové generace (pohlavním i nepohlavním rozmnožováním) a tím kolonizovat území.

Krátký životní cyklus řas je velkou měrou ovlivněn sezónností, respektive změnou podmínek, ve kterých mohou plně fungovat. V polárních oblastech, kde se střídá polární den a polární noc, musí dostatečně využít období léta a naakumulovat dostatek energie na období zimy. V zimním období často narazíme na biomasy řas, které obsahují zvýšené množství cukrů, tuků a dalších zásobních látek.

Kosmopolitní druhy řas obývají velká území, téměř celý svět. Jedná se o natolik extrémní prostředí, že k přežití nemají potřebné vlastnosti. Endemit je takový organismus, který se vyskytuje na určitém omezeném území, většinou se specifickými životními podmínkami, na které je adaptován. Endemické řasy mají geneticky zafixované vlastnosti a díky tomu v Antarktidě přežijí. Dokázaly se v průběhu období, kdy kontinent Antarktida sestupoval z nižších zeměpisných šířek do vyšších, postupně adaptovat na extrémní podmínky na přicházející polární prostředí. Polární oblasti jsou díky tomu zásobárnou adaptací na extrémní podmínky.

Řasy žijící v hydroterestrickém prostředí mají dvě životní strategie - produkují makroskopicky viditelné porosty řas (řasové rohože a krusty a slizovité shluky a želé biomasa plovoucí ve vodách). Do kategorie hydroterestrického prostředí dále patří kryofilní řasy rostoucí mezi ledovými krystalky v povrchových vrstvách tajícího sněhu a řasy vyskytující se v tzv. kryokonitových dírách a/nebo supraglaciálních tůních na povrchu tajících ledových čepic. Všechny výše uvedené kategorie řas v hydroterestrickém prostředí přímo ovlivňují ekosystém polárních půd. (Elster, 2002)

Pokud je získán vzorek vyizolovaný jednodruhový kmen a z něj analyzujeme část genomu, který je charakteristický pro určitou skupinu organismů a porovnáme tyto informace s informacemi v celosvětové genové bance, lze snadno ověřit, zda se jedná o druh kosmopolitní, který v polární oblasti nedokáže přežít nebo druh endemický, který je schopen konkrétní lokalitu a konkrétní extrémní prostředí obývat. U výzkumů endemických žijících organismů v polárních oblastech je cílem

zjistit, jaké adaptace, morfologie a geny mají, aby mohli v tak extrémním prostředí přežít.

Rychlý generační cyklus umožňuje vědcům řasy pěstovat dokonce i v umělém ekosystému a podrobně studovat vlastnosti, jak se přizpůsobit extrémním podmínkám. Zjišťuje se např., jaké látky při těchto adaptacích produkují. Při výzkumech jsou uloženy do tekutého dusíku, ve kterém se zastaví veškeré biologické procesy.

Řasy jsou fotoautotrofní, umí provádět fotosyntézu. Část energie, kterou tímto procesem vytvoří, využijí pro svůj vlastní metabolismus. Rychlost fotosyntézy se snižuje s klesající teplotou rychleji než respirace, což se na Zemi projevuje tak, že je velké množství organického uhlíku zamrznuo v permafrostu. Je to důležitý parametr, který chrání naši planetu před přehřátím.

3.3.1 Taxonomie řas

Řasy představují směs nejrůznějších skupin a jejich utřídění se v časech od Carla Linného změnilo. S objevem mikroskopu a jeho vylepšením se vědcům otevřel celý nový svět mikroorganismů, byly objevovány a vědecky popisovány nové organismy vč. sinic a řas. Čím víc nových organismů bylo objeveno, tím větší problém s jejich zařazováním - Linného systém rostlinné a živočišné říše byl překonán. Následující roky byly ve světle snahy zařadit řasy a sinice na základě morfologických znaků nebo jejich ekologie, to ale pominulo s nástupem molekulární biologie a fylogenetiky v druhé polovině 20. století. První zásadní počín učinil v roce 1981 Thomas Cavalier-Smith zavedením skupiny Chromista (početná a velmi diverzifikovaná skupina eukaryot). Do nově ustanovené eukaryotické říše spadaly některé hnědé řasy (rozsivky, zlativky, chaluhy atd.), skrytěnky nebo obrněnky. (Kaštovský a Juráň, 2016)

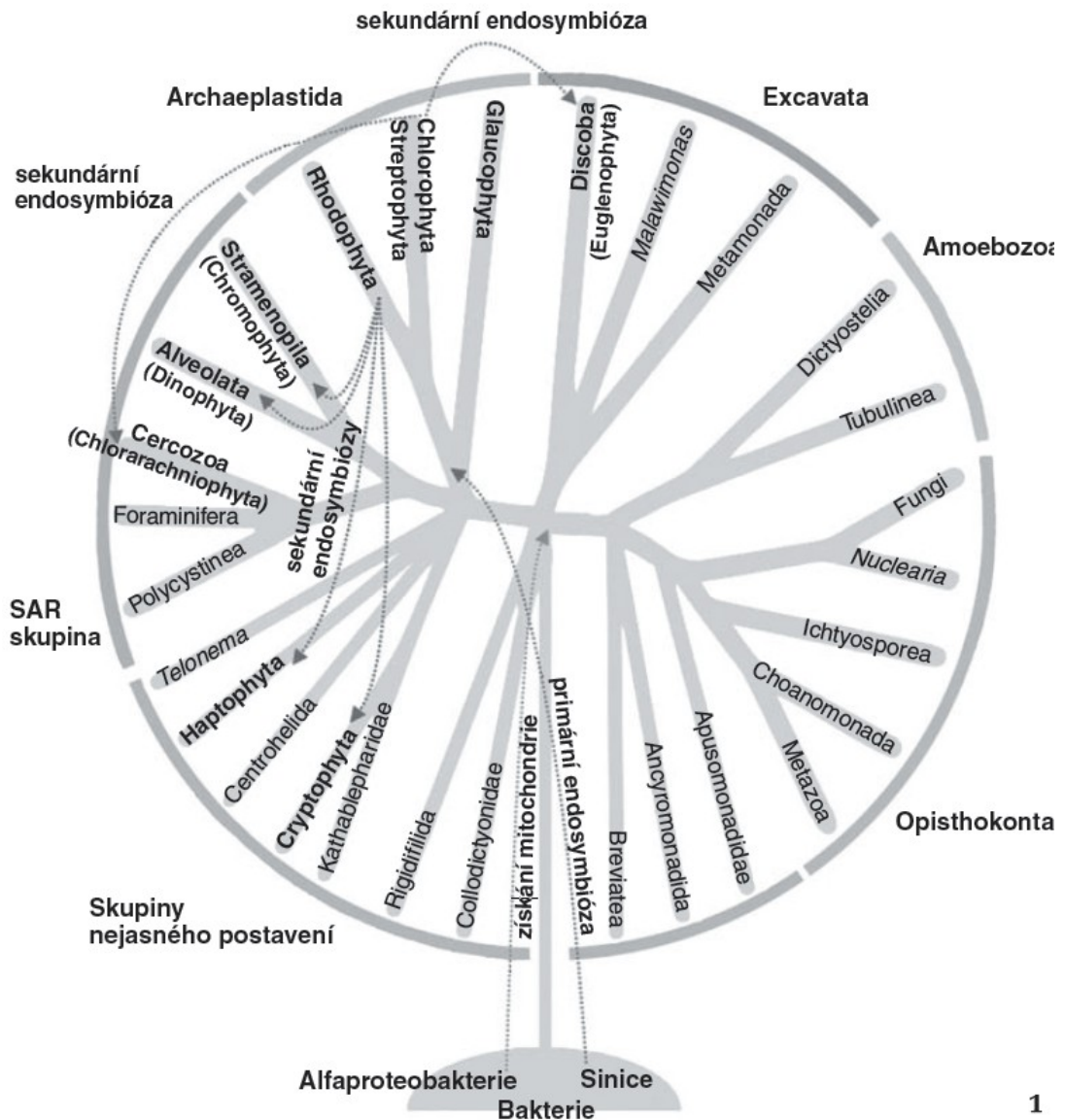
Vývoj poznání příbuzenských vztahů mezi eukaryotními organismy postupně ukazoval nejednotnost tradičních skupin (prvoci, houby, řasy), nicméně ani poslední dekáda moderních molekulárních metod dosud nepřinesla jasné odpovědi. Jeden z nejčastěji uváděných moderních pohledů na organizaci živého světa publikovaný v roce 2012 kanadským biologem Sinou Adlem a dalšími spoluautory jasně definuje několik velkých eukaryotních skupin – Opisthokonta, Amoebozoa, Excavata, Archaeplastida a SAR (kam náležejí skupiny Stramenopila, Alveolata a Rhizaria).

V tomto novém systému jsou řasy součástí tří skupin – zelené řasy, ruduchy a Glaucophyta řazené mezi rostlinné organismy ke skupině Archaeplastida, hnědé řasy společně s obrněnkami náležejí ke skupině SAR a krásnoočka jsou nejpríbuznější jiným prvokům ve skupině Excavata. U některých skupin ani moderní přístupy a analýzy, dostupnost velkého množství sekvencí DNA atd. nedokázaly uspokojivě odpovědět na příbuznost těchto taxonů s ostatními eukaryotními organismy. Z řasových skupin není dnes zcela objasněna fylogenetická pozice Haptophyta a skrytěnek. (Juráň a Kaštovský, 2016)

Začneme skupinou nejasného zařazení, kde najdeme skrytěnky (Cryptophyta) – většinou bičíkovci žijící v mořích i sladkých vodách, vysoce odolné vůči chladu. Haptophyta (nemají český název) – převážně mořští bičíkovci, kdysi řazení mezi hnědé řady pro určitou společnou některých znaků, název vychází označení třetího bičíku (haptonema), což lze volně přeložit jako tykadlo („šmátradlo“), které slouží ke zkoumání okolí buňky, při nárazu buňky na překážku se prudce stočí a tím se buňka „šklubne“ správným směrem a překážce se vyhne, dokáže buňku ukotvit k podkladu atp. SAR skupinu tvoří Stramenophila, Alveolata a Rhizaria, do každé z těchto tří větví spadá nějaká skupina řas, např. Chlorarachniophyta (mořské měňavky a bičíkovci), obrněnky (Dinophyta) – žijí zejména v moři, mnozí ze zástupců nesou na povrchu buňky sestavu celulózních destiček, které připomínají pláty brnění. Největší skupina v SAR jsou hnědé řasy (Ochromphyta, dříve Chromophyta), sem spadají jak drobné jednobuněčné organismy, tak chaluhy. Patří sem velká řada izolovaných vývojových linií jako Raphidophytes – malá skupina relativně velkých bičíkovců, typické pro lesní rybníky, na rozdíl od většiny hnědých řas nemají fukoxantin (v podstatě jsou dost zeleně zbarvení), Eustigmatophyceae je nepříliš početná skupina převážně kokálních půdních a na vzduchu žijících druhů, rovněž nemají fukoxantin a jako jediná skupina z hnědých řas nemají chlorofyl c, ale pouze a. Velmi zajímavou skupinou z hlediska evolučního jsou Tribophyceae (dříve Xanthophyceae) česky různobrvky nebo žlutozelené řasy; obsahují řasy prakticky se všemi typy stélek, od bičíkovců až po makroskopické sifonální stélky, neobsahují fukoxantin. Ostatní třídy mají všechny společné znaky hnědých řas a patří sem např. zlativky (Chrysophyceae), rozsivky a nejdůležitější třídou hnědých řas jsou chaluhy (Phaeophyceae), méně ekologicky významné řasy této skupiny jsou např. Pelagophyceae, Bolidophyceae, Pinguichrysidaceae. (Kaštovský a Juráň, 2016)

Archaeplastida představují evolučně neúspěšnější skupinu řas, druhově velmi početnou vyskytující se téměř ve všech biotopech. Z této vývojové řasy se vyvinuly suchozemské rostliny. Poměrně izolovanou linii zde tvoří Glaucophyta. Rhodophyta, ruduchy neboli červené řasy – mají nejen červené zástupce, ale i zelené, šedé, namodralé, žluté a hnědé; náleží sem převážně mořské makroskopické řasy, hospodářsky významné měkkčí mořské ruduchy, ze kterých se získává agar, ruduchy v tekoucích vodách bohatých na kyslík. Viridiplantae jsou zelené rostliny a tato skupina došla evolučně nejdál. Pravděpodobný společný předek byl zelený bičíkovec a jeho potomci dali vzniknout dvěma vývojovým liniím – Chlorophyta (sem patří většina zelených řas) a Streptophyta (zahrnuje některé řasy a všechny suchozemské rostliny). Chlorophyta jsou početně obrovská skupina se složitou evoluční historií. Důležité jsou zde tři hlavní linie zvané zkratkou UTC (Ulvophyceae, Trebouxiophyceae, Chlorophyceae). Jde skutečně o tři evoluční linie vycházející především z molekulárních znaků. Ulvophyceae zahrnují převážně mořské makroskopické řasy (např. *Ulva*, *Acetabularia*), ze sladkovodních je to třeba žabí vlas (*Cladophora*). Trebouxiophyceae jsou převážně kokální jednobuněčné řasy různých terestrických biotopů. Skupina je nazvána po řase *Trebouxia* (fykobiont - řasová složka lišejníků) a náleží sem i *Chlorella*. Druhově nejbohatší třída Chlorophyceae obsahuje řadu vláknitých a zejména kokálních a bičíkatých řas stojatých vod, např. *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Pediastrum*, *Volvox*. Streptophyta zahrnují také na své fylogenetické bázi několik drobných samostatných linií, ale důležité jsou zejména čtyři skupiny, z nichž tři patří mezi řasy. Jedná se o početně nejbohatší skupinu spájkivky (Zygnematophyceae), parožnatky (Charophyceae) a Coleochaetophyceae (bez českého názvu). (Kaštovský a Juráň, 2016)

Spájkivky se nazývají podle typu rozmnožování – spájení (konjugace). Zahrnují dva stavebně odlišné typy řas, a to jednoduchá vlákna (např. šroubatka) a jednobuněčné, většinou velmi zdobné řasy (krásivky). Poslední skupinou jsou krásnoočka (Euglenophyta), což jsou prvoci v příbuzenském vztahu k některým parazitům (trypanozomy se zelenou řasou na místě chloroplastu), v přední části těla mají jasně viditelnou červenou světločivnou skvrnu. Hojně se vyskytují i v mořích, jádrem jejich diverzity se ale stal sladkovodní plankton (zástupci rodů *Trachelomonas* a *Phacus*). (Kaštovský a Juráň, 2016)



Obrázek 11 – Vývojové vztahy skupin „nižších rostlin“ (zdroj: Kaštovský a Juráň, 2016)

3.3.2 Mikroskopické řasy

Řasy mikroskopické (mikrořasy) jsou nejen jednobuněčné, ale i koloniální a vláknité organismy vyskytující se jednotlivě, nebo vytvářejí vlákna, řetězky či kolonie. Dle příslušného druhu se jejich velikost pohybuje od jednotek (nejmenší známou mikrořasou je *Prochlorococcus*) do několika stovek mikrometrů. Pro pozorování mikrořas je zapotřebí mikroskop. Nejčastěji obývají sladkovodní a mořské biotopy, lze je nalézt jak ve vodním sloupci, tak v sedimentech, ale existuje celá řada půdních druhů. Mikrořasy tvoří podstatnou část fytoplanktonu. Biodiverzita mikrořas je obrovská, odhaduje se na 200 000 - 800 000 druhů, přičemž popsáno je zhruba 50 000 druhů. (wikipedie)

Mikrořasy nemají specializovaná pletiva nebo orgány (kořen, stonek, list). Navzdory své velikosti jsou nepostradatelným producentem kyslíku a „likvidátorem“ oxidu uhličitého (fotosyntéza) a to i ve vztahu k jejich „jednoduchosti“. Mikrořasy oproti vyšším rostlinám mají podstatně vyšší rychlost růstu díky větší účinnosti fotosyntézy, krátkým reprodukčním cyklům, jednoduché buněčné struktuře s malými nároky na vedlejší metabolické funkce a konkurenční fyziologické procesy (např. vývoj podpůrného aparátu, kvetení, tvorba plodů, atd.). Společně s bakteriemi a sinicemi tvoří základ potravního řetězce, ve kterém redistribuují energii pro další trofické úrovně v řetězci. Mikrořasy jsou rovněž zdrojem celé řady produktů jako karotenoidy, antioxidanty, mastné kyseliny, enzymy, polymery, peptidy, nebo také toxiny a steroly. I díky těmto chemickým sloučeninám jsou předmětem širokého využití ke komerčním účelům (výroba biopaliv, potravinářství, v akvakulturních technologiích, zlepšení kvality půd, atp.). (www.alga.cz; wikipedie)

3.3.3 Makroskopické řasy

Makroskopické řasy (makrořasy) jsou velké a mnohobuněčné rostlinné organismy, označované jako „mořské řasy“ nebo „chaluhy“. Tvoří větvičí se složitější vlákna a jsou dostatečně velké na to, abychom je viděli pouhým okem. Některé druhy makrořas dorůstají délky až 60 m (řád *Macrocystis*). Rozdělují se do tří skupin na červené řasy, zelené řasy a hnědé řasy. Uchycují se nejčastěji k písku, lodím, podvodním konstrukcím, skálám, útesům atp. Na rozdíl od jednoduché stavby mikrořas jsou makrořasy navenek podobné rostlinám (ačkoliv jsou od nich evolučně velmi vzdálené), mají např. thallus (stélka), stipes (stopka), čepele, listy, vzduchové měchýře.

Makrořasy jsou v mořích velkým producentem biomasy, obsahují chlorofyl, betakaroten, flukoxantin, violaxantin, zásobními látkami jsou hlavně chrysolaminaran, oleje a mannitol. Buněčné stěny obsahují celulózu a alginové látky. Jsou primárním zdrojem potravy pro celou řadu vodních živočichů a i člověkem jsou využívány ke konzumaci, výživě suchozemských zvířat, jako palivo a některé druhy chaluhy jsou např. zdrojem jódu. (wikipedie)

S ohledem na zvolené téma a cíle se tato bakalářská práce bude dále věnovat pouze mikrořasám hydroterestrických biotopů antarktického kontinentu. Pokud bude níže v textu použit termín řasa, bude se vždy jednat o mikrořasy.



Obrázek 12 - Mělké jezírko hnojené blízkým hnízdištěm tučňáka kroužkového – *Pygoscelis adeliae* (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 13 - Rozvoj řas v hnojeném jezírku tučňákem kroužkovým - *Pygoscelis adeliae* (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 14 - Jemné nárosty rozsivek na dně potoka (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 15 - Potůček s řasou Klebsormidium sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 16 - Vlákňitá řasa *Klebsormidium* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 17 - Potůček vytékající z hnízdiště tučňáka císařského – *Aptenodytes forsteri* s řasou *Prasiola* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 18 - Řasa *Prasiola* sp. rostoucí v hnízdišti tučňáka císařského - *Aptenodytes forsteri* (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 19 - Zelené vaty řasy *Zygmene* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

3.4 Historie izolace a kultivace řas

První zmínka o kultivaci řas pochází již z 19. století od německého bakteriologa Ferdinanda Cohna, kterému se podařilo udržet kulturu bičíkovce rodu

Haematococcus. Tento rod však neizoloval od jiných organismů a nepoužil kultivační médium. První pokusy kultivace řas pomocí roztoku několika anorganických solí úspěšně provedl rostlinný fyziolog Andrei Sergejevich Famintzin. Dalších velkých úspěchů dosáhl holandský mikrobiolog Martinus Willem Beijerinck, který izoloval několik druhů čistých (axenických) kultur řas bez bakterií. Beijerinck přijal bakteriologickou techniku zavedenou Robertem Kochem o 10 let dříve a smíchal vzorkovou vodu s želatinou. (Andersen a kol., 2005)

O izolování a založení axenických kultur sladkovodních a mořských rozsivek se zasloužil francouzský mikrobiolog Pierre Miquel na observatoři Paris Montsouris, Kromě toho zavedl několik nových metod, jako je použití mikropipety pro izolaci buněk řas, použití organické macerace jako organického zdroje doplňujícího minerální médium (přidavky organického výživného materiálu ve formě otrub, slámy, fragmentů trav, mechů atd.). Mezi další přispěvatele na téma kultivace řas byli německý botanik Fritz Noll a německý algolog Friedrich Oltmanns, kteří publikovali práce pojednávající o kultivaci mořských řas a převážně se zabývaly udržováním řas v dobrém stavu, spíše než izolací čistých kultur nebo ovlivněním růstu a rozmnožování. Největšího přínosu ovšem dosáhl německý botanik Georg Klebs, který jako první začal izolovat řasy na agaru. Pokusil se založit čisté (axenické) kultury vláknitých řas umístěním izolovaných zoospor na agar. Byl úspěšný v pěstování řas, ale nebyl schopen udržet své kultury bez bakterií. Želatina, používaná v předchozích mikrobiologických studiích, se ukázala jako nevyhovující, protože bakterie želatinu rozštěpily a přeměnily tak pevný substrát na kapalnou směs. O další přínos se zasloužil N. Tischutkin v Bělorusku, který kultivoval čisté kultury sinic. Harry Marshall Ward v Cambridge, doporučil agar se zředěnou kyselinou octovou s následným důkladným opláchnutím, aby se odstranily všechny soli a další nové způsoby izolace. Ward mohl být také první, kdo použil šablonu k vytvoření vzorů (vytvořených růstem řas) na pevném substrátu. (Andersen a kol., 2005)

Výzkum v oblasti kultivace pokračoval i ve 20. století. Mezi přispěvatele se zařadila také mikrobioložka Harriette Chick ve Velké Británii, která pracovala s *Chlorella pyrenoidosa*. Založila axenické kultury, které opakovaně testovala na čistotu a dospěla k závěru, že řasa preferuje čpavek před dusičnany. Švýcarský botanik a fykolog Robert Chodat během svého dlouholetého výzkumu vytvořil sbírku čítající více než 300 druhů řas v axenických kulturách. Edgar Johnson Allen,

spolu se svým spolupracovníkem Edwardem Williamem Nelsonem, významně přispěli ke kultivaci řas, včetně některých z prvních pokusů o kultivaci řas pro chov mořských živočichů. Izolovali a kultivovali kromě jiných rodů *Chaetoceros*, *Skeletonema* a *Thalassiosira*, aby krmili mořské larvy. Allen a Nelson rovněž vyrobili umělou mořskou vodu na základě molekulárních koncentrací mořské vody stanovených Van't Hoffem (1905) a také uznali důležitost železa jako stopového kovu. Pro kultivaci používali velké nádoby a brzy zjistili, že v těchto podmínkách je světlo limitujícím faktorem. Jejich činy ovlivnili dalšího badatele G. H. Drewa, který kultivoval řasu *Laminaria digitata*. (Andersen a kol., 2005)

Velký význam měl v historii kultivace řas a sinic Ernst George Pringsheim, jenž publikoval články o metodách kultivace, jeho dílem je *Pure Cultures of Algae* (Pringsheim, 1946). Byl člověkem, kterému se povedlo kultivovat sinice bez jejich kontaminace bakteriemi. Za svůj život vybudoval mnoho sbírek s kulturami řas a sinic ve Velké Británii, v Německu, v Texasu, ale i v Praze. (Andersen a kol., 2005)

3.5 Kultivační média

Řasy ke svému životu vyžadují vodní prostředí nebo přítomnost vody jako takové. Sladké i slané vody jsou bohaté na řasy a jejich distribuce závisí na selektivním působení fyzikálně-chemického prostředí a na jejich schopnosti toto prostředí kolonizovat. Kultivační média (též živná či růstová) by měla být taková, aby poskytla kultivovanému druhu optimální prostředí k růstu, někdy mohou být odvozena z analýzy původního prostředí (vody, půdy, ovzduší), některá jsou formulována po podrobném studiu požadavků kultivované řasy na živiny, stopové prvky atp., některá jsou stanovena po zvážení ekologie daného druhu atd. (Andersen a kol., 2005)

3.5.1 Sladkovodní kultivační média

Pro proces kultivace je důležité, aby vstupní chemické látky měly nejvyšší možnou kvalitu. Případná přítomnost polutantů v chemických složkách může celý výzkum znehodnotit. Ke kultivaci je nutné mít k dispozici potřebné a sterilizované vybavení (pH metr, skleněné a plastové vybavení, váhy atd.). Ze skleněného laboratorního vybavení poslouží kádinky, pipety, baňky, Petriho misky, míchací

tyčinky, nálevky a zkumavky. U skleněného nádobí je zapotřebí zvolit vhodný typ skla, vzhledem k tomu, že ne každé pro požadovaný úkon vyhovuje. Ideální je borosilikátové sklo, které je vysoce odolné vůči vodě, neutrálním a kyselým roztokům, koncentrovaným kyselinám, kyselým směsím, chlóru, bromu, jódu a organickým látkám. Jeho odolnost vůči chemikáliím je lepší než u většiny kovů a dalších materiálů. Lze rovněž použít jednorázové nebo opakovaně použitelné plasty, které jsou alternativou k nádobí ze skla. (Andersen a kol., 2005)

Zařízení pro sterilizaci patří rovněž k základnímu vybavení, nejčastěji se používá autokláv. Ten pro sterilizaci nástrojů i médií využívá vysoký tlak a vysokou teplotu. Díky vysokému tlaku a páře dojde k odstranění všech nežádoucích látek a usmrcení přítomných živých organismů, ale také ke koagulaci bílkovin, oxidaci a štěpení cukrů a k dalším tepelným změnám látek. Laboratoř by určitě měla být vybavena filtry, které se použijí pro sterilizaci látek citlivých na teplo. (Andersen a kol., 2005)

Sladkovodní prostředí je základní kultivační médium a velmi vhodné pro populace řas. Jakost vody je do jisté míry ovlivněna citlivostí řas v experimentu. Řasy s vysokou citlivostí potřebují vodu vysoké kvality. První výzkumníci používali pramenitou vodu, protože běžná kohoutková nebo destilovaná voda byla silně kontaminována kovy. V roce 1912 byl zaveden skleněný destilační přístroj pro kultivaci řas právě z důvodu vysoké toxicity kovů. V současnosti se používá destilovaná a deionizovaná voda. Tu získáme třeba použitím dvojité destilační aparatury. (Andersen a kol., 2005) Dále se jako živné médium používá agar, přírodní polysacharid s vysokou gelující schopností, získává se z červených mořských řas rodů *Gracilaria* a *Gelidium*. Agar taje při 96 °C a tuhne při 40 °C. U většiny řas není nutné agar čistit, ale pokud pracujeme s citlivými řasami, je nutné z agaru odstranit nečistoty promytím (Carmichael a Gorham, 1974; Waterbury a kol., 1986).

Poslední složkou je půda. Úspěch s roztokem půdního extraktu nebo půdním vodním médiem závisí na výběru vhodné půdy. Získat vhodný zdroj není snadné, protože ne každá půda je vhodná. Přednostně se využívá půda, která nebyla vystavena chemickému znečištění (pesticidy, hnojiva atp.). Vhodná je půda z nenarušených lesů a pastvin, které nebyly intenzivně hospodářsky či zemědělsky využívány a nebyly paseny zvířaty (Starr a Zeikus, 1993; Tompkins a kol., 1995). Vhodná též není půda s vysokým podílem jílu. Pro citlivé řasy lze použít půdu

z okolí vodních ploch, kde se vyskytují. Půda musí být odebírána nad hladinou vodních ploch, protože jezerní a rybníční sedimenty jsou často anoxické a obsahují nahromaděné toxické materiály. (Andersen a kol., 2005)

3.5.2 Mořská kultivační média

Přírodní mořská voda vykazuje ve srovnání s vodami sladkými nižší výtěžek řas. Přírodní mořská voda je komplexní médium obsahující více než 50 známých prvků a velký a proměnlivý počet organických sloučenin. Pro kulturu řas je přímé použití této vody zřídka přijatelné. Bez přidavku dalších živin a stopových prvků je výtěžek řas obvykle příliš nízký pro udržování kultury nebo laboratorní pokusy a navíc během roku je také potřeba hlídat kolísání kvality mořské vody. Pro dosažení podstatného výnosu řas je tedy nutné mořskou vodu obohacovat přidáním makroživin, vitamínů a stopových prvků. I proto se především ve vnitrozemí hojněji využívá umělá mořská voda. (Andersen a kol., 2005)

K výrobě mořského kultivačního média by měly být použity soli reagenční čistoty, organické chemikálie jako např. vitamíny, pufrů (např. Tris, glycyglycin), chelatační činidla (např. EDTA, kyselina nitrilotrioctová). Je třeba věnovat pozornost výběru dodavatele a případné změně z důvodu různého množství případných nečistot a kontaminantů. (Andersen a kol., 2005)

K přípravě média lze používat skleněné i plastové vybavení. Mezi nejžádanější vybavení patří laboratorní základ - analytické váhy, váhy s horním plněním, pH metr, magnetické míchadlo s horkou plotnou atd. Borosilikátové sklo je základ a mělo by se používat pro veškeré skleněné vybavení vč. zásobních lahví, kádinek a kultivačních zkumavek a baněk. Doporučuje se také teflon nebo plasty, protože snižují lámavost. (Andersen a kol., 2005)

U používaného vybavení se klade důraz na čistotu s přihlédnutím na experiment, který s ním chceme provádět. Jestliže chceme vše oplachovat běžnou kohoutkovou vodou, je třeba po konečném opláchnutí použít deionizační vodu. (Andersen a kol., 2005)

Zdroj mořské vody může rozhodnout o úspěchu při kultivaci určitých druhů. Oligotrofní voda z otevřeného oceánu je ideální, protože má nízký obsah živin a stopových kovů, tyto složky lze přidat v požadovaném množství do obohacovacího roztoku. Tato voda navíc obsahuje nejméně usazenin a možná i méně fytoplanktonu,

což usnadňuje filtraci. Pobřežní voda je proměnlivá v důsledku srážek a přítoků, které mohou ovlivnit obsah živin, sedimentů i snížení salinity. Mořská voda by se neměla odebírat během květu, zvláště když jsou přítomny škodlivé druhy organismů. Odebraná mořská voda se filtruje na zařízení ve velkém měřítku jako membránové filtry o průměru 147 nebo 293 mm. (Andersen a kol., 2005)

Salinitu vody lze měnit podle druhu kultivované řasy naředěním deionizovanou vodou, přidává se dříve než vitamíny nebo živiny. V opačném pořadí by došlo k jejich naředění. (Andersen a kol., 2005)

3.6 Minerální výživa řas

Správný růst fytoplanktonu je podmíněn obsahem makroživin (uhlík, dusík, fosfor, křemík) a hlavních iontů Na^+ , K^+ , Mg_2^+ , Ca_2^+ , Cl^- , SO_4^{2-}). Na růst má dále vliv přítomnost stopových prvků (železo, mangan, zinek, kobalt, měď, molybden, selen). Tyto prvky jsou velmi důležité a mnohdy limitující, nejdůležitější je železo. Jeho přítomnost, množství a přístupná forma je omezující pro růst fytoplanktonu v oceánu. (Andersen a kol., 2005)

Některé kovy jako je zinek, mangan, kobalt, mají také vliv na omezení růstu (Buma a kol., 1991; Coale, 1991), avšak větší roli hrají při celkovém složení a struktuře společenstev řas a sinic na základě jejich poměru. Jelikož druhy mají různé nároky na množství stopových kovů (Brand a kol., 1983; Sunda a Huntsman, 1995; Crawford a kol., 2003).

Zatímco v mořích je přítomnost stopových prvků důležitá pro růst mikroorganismů, ve sladkých vodách jsou považovány za méně důležité. I přes to, že bylo v několika jezerech s vysokým obsahem fosforu zjištěno, že množství železa ve vodě řídí navazování dusíku a růst řas (Wurtsbaugh a Horne, 1983; Evans a Prepas, 1997).

Jako je pro fytoplankton omezující nízké množství stopových prvků (kovů), tak i příliš vysoká koncentrace některých prvků může být toxická. Ideálním stavem pro růst je, pokud jsou prvky ve vyrovnaném poměru a množství. Pokud je jich méně je rychlost růstu omezena, pokud více dojde k jeho inhibování. (Andersen a kol., 2005)

3.7 Sterilizace a její metody

Proces sterilizace zajišťuje aseptické podmínky. Použití sterilní techniky v kombinaci se sterilním vybavením a materiálem minimalizuje riziko kontaminace, která by vedla ke zkreslení a nepřesnosti výsledků. Sterilizace je velmi důležitá ve fykologickém výzkumu, zejména při udržování živých organismů jako izolovaných kmenů v kultuře. Sterilizace není náročný proces, je ale třeba, aby při práci se sterilním materiálem byla dodržována opatření zabráňující kontaminaci. Ošetřené vybavení lze skladovat v čistých a bezprašných nádobách, policích nebo skříních. (Andersen a kol., 2005)

Při práci s novým vybavením a laboratorním nádobím je také nutné odstranit stopy chemikálií, které na materiálu ulpěly při jeho výrobě. Nádoby se dají do lázně např. zředěné kyseliny chlorovodíkové. Po vyjmutí se několikrát opláchnou kohoutkovou vodou a poté ještě deionizovanou nebo destilovanou vodou. (Andersen a kol., 2005)

Pokud jde o čištění použitého laboratorního nádobí, tak se vloží do neutrální čistící lázně, po vyjmutí se očistí kartáčkem a houbou. Následně se opláchnou kohoutkovou vodou a poté vodou deionizovanou nebo destilovanou. (Andersen a kol., 2005)

Existují různé metody sterilizace - tepelná sterilizace, sterilizace elektromagnetickými vlnami, sterilizace pomocí filtrace a chemická sterilizace. Tepelná sterilizace je nejběžnější (oheň, autokláv, suché teplo, pasterizace atp.) a obvykle probíhá za vysokých teplot nad 100 °C. Je vhodná pro materiály, které těmto teplotám odolají, např. skleněné nádoby, kovové nástroje, hliníková fólie. Kapaliny jsou sterilizovány filtrací, kdy kapalina obsahuje křehké složky, které jsou zničeny vysokou teplotou. Elektromagnetické vlny (např. UV paprsky, gama paprsky, rentgenové záření a mikrovlny) se používají jako alternativa pro materiály, které nemohou být vystaveny vysokým teplotám (např. mnoho plastových výrobků nebo kapalin s labilní složkou). (Andersen a kol., 2005)

Známým způsobem sterilizace je **autoklávování**. Metoda používaná pro sterilizaci materiálů, které odolávají vysokým teplotám, nebo i kapalin a půd do kultivačních médií. Autokláv je silnostěnná uzavřená komora, kde se vytváří pomocí

páry teplota 121 °C. Doba pobytu kapaliny v autoklávu se liší na základě jejího objemu. Kapaliny s menším objemem budou sterilizovány kratší dobu, než kapaliny s objemem větším. Jedná se o neúčinnější proces sterilizace, při kterém se zabijí mikroorganismy, bakterie a plísně.

Další možností je **sterilizace suchým teplem** za pomoci horkovzdušné trouby. Tento způsob se používá ke konzervaci suchých materiálů, tudíž není vhodný pro tekutiny. Běžně dochází k zahřívání na teplotu 150 °C, pokud je to nutné může se teplota vyšplhat až k 250 °C.

Pro kapaliny, které nesnesou vystavení teplotám vyšším než 100 °C nebo autoklávování, se využívá **pasterizace a tyndalizace**. Obvykle se k ohřevu využívá pára bez přítomnosti tlaku. Jde o způsob zahřátí tekutého roztoku na vysokou teplotu a udržování teploty po danou dobu, po jejímž uplynutí dojde k rychlému ochlazení. Příklad: u pasterizace postupným ohříváním dochází k teplotě mezi 66 °C a 80 °C, kde se tato teplota udržuje po určitou dobu, po jejímž uplynutí dojde k prudkému ochlazení na teplotu pod 10 °C. Mořská voda se pasterizuje na 95 °C po dobu jedné hodiny. Proces tyndalizace spočívá v opakování procesu pasterizace po dobu tří dní.

Pro tekuté složky je vhodná **sterilizace pomocí filtru**. V tomto procesu lze použít velké množství filtrů, jejichž póry by měly být velké maximálně 0,2 mm. Některé filtry lze použít opakovaně, pokud jsou ošetřeny autoklávováním a následně vysušeny při teplotě 120 °C.

Dále je možné využít **sterilizace v mikrovlnné troubě**, která je rychlejší než autoklávování nebo použití suchého tepla. Časem však dochází k opotřebení mikrovlnné trouby a tím pádem také prodloužení doby sterilizace. (Keller a kol., 1988) Nebo za pomoci **ultrafialové radiace**, která je však pro člověka škodlivá, takže se musí postupovat zvláště opatrně.

K **chemické sterilizaci** se využívaly chemické látky jako etanol, ethylenoxid, fenol zejména pro materiály, které nemohly být sterilizovány teplem z důvodu nízké tolerance. Nevýhodou je, že po sterilizaci mohou zůstat chemické stopy a tyto chemikálie mohou být škodlivé pro kultivované řasy a či pro výzkumníka. Proto se postupy chemické sterilizace v laboratoři přestaly používat a přešlo se na jiné sterilizační metody. (Hamilton, 1973)

U všech způsobů sterilizace je třeba dávat pozor na bezpečnostní opatření.

V nádobách se musí nechat volný prostor, je nutné sledovat teplotu na konci sterilizace, kdy lze nádoby otevřít, aby nedošlo k rychlému ochlazení a kontaminaci okolním vzduchem. Někdy může ke kontaminaci dojít, i přes důkladný sterilní proces, bez jakýchkoli zřejmých důvodů. Pak přicházejí na řadu testy sterility, které vyhodnotí podmínky. Test spočívá ve vystavení otevřených Petriho misek, které obsahují sterilní agar, v několika postupně se prodlužujících intervalech. Poté dojde k opětovnému přiklopení krytem a misky se nechají inkubovat maximálně tři dny. Po uplynutí této doby se spočítá počet kolonií bakterií nebo plísní, který se na agaru objevil. Na základě počtu kolonií lze určit míru kontaminace prostředí.

3.8 Izolační techniky

Na počátku výzkumu je třeba mít přesnou znalost o prostředí, ve kterém se řasy přirozeně nacházejí a tyto podmínky při následné izolaci a kultivaci co nejpřesněji napodobit. Na toto je třeba klást důraz již při samotném sběru vzorku. Dalším neméně důležitým krokem je zabránit větší míře znečištění, které by ve svém důsledku mohlo způsobit ztrátu kultivovaného druhu.

Vybavení pro izolaci řas není nijak složité ani náročné. Postačí k němu mikroskop s dobrými optickými čočkami, stolek nejlépe skleněný (u plastového je větší pravděpodobnost škrábanců), dobré osvětlení. Dále vybavení na oddělení obsahu podle velikosti částic v kapalině. K tomu dobře poslouží různé filtry, síta nebo cedník. Poté správně sterilní plastové nebo skleněné nádoby a izolační skla. K inkubaci izolovaných buněk poslouží růstové komory, které musí mít světelné podmínky odpovídající potřebě izolovaných organismů.

Dobrého růstu řas v přírodním vzorku lze docílit přidávkem živiny. Velké úspěchy má např. přidávek citronové šťávy s výtažkem z citronové kůry (Droop, 1959). Přidání autoklávované rýže na již založené kultury rovněž vedlo k lepšímu růstu (Lee a Soldo, 1992). Množství přidávaného obohacujícího materiálu se liší v závislosti na daném druhu a velikosti biomasy.

3.8.1 Izolace jednodruhových kultur řas mikropipetou

Mikrořasy lze izolovat využitím několika způsobů, třeba za pomoci mikropipety. Tato metoda je snadná a rychle proveditelná a umožňuje odebrání

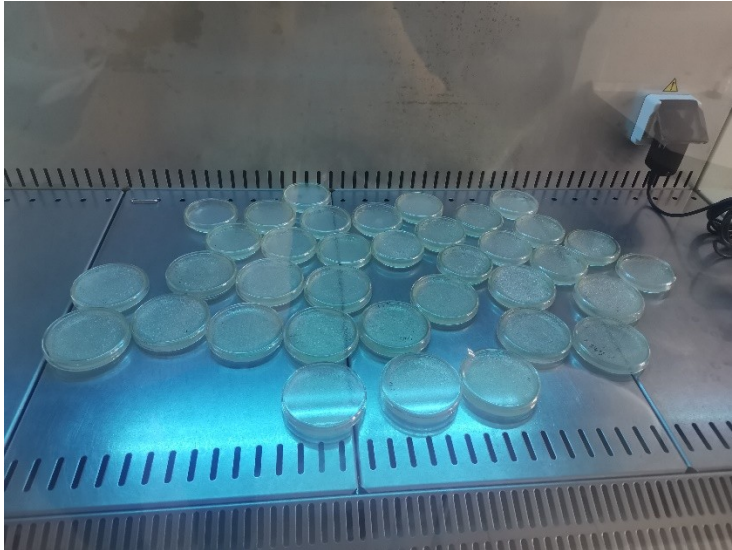
buňky ze vzorku bez jejího poškození. Buňka je přenesena do sterilní kapky, kterou se připravuje před začátkem izolace. Proces odebrání a přenesení buňky se opakuje po takovou dobu, než do kultivačního média není jistě přenesena jen jedna buňka izolovaného kmene bez dalších organismů.

3.8.2 Izolace jednodruhových kultur řas na agarových plotnách

Nejběžnější metoda izolace řas je izolace na agarových plotnách. Přenese se malé množství sebraného vzorku na agar, kde je s použitím izolační smyčky rozetřen do pásů. Tento proces se nazývá očkování. Následuje inkubace, při které je třeba zajistit vyhovující podmínky, aby se mohly vytvořit kolonie. Inkubační doba se liší v závislosti na druhu řasy. Trvá od inokulace do výskytu první kolonie buněk. (Andersen a kol., 2005)

V případě, kdy na plotně narostou kolonie více druhů řas, oddělí se přeočkováním. To se provádí tak, že pomocí izolační smyčky se přenese malé množství buněk kolonie jednoho druhu na novou sterilní agarovou plotnu. (Andersen a kol., 2005)

Některé druhy řas nejsou schopné růstu na agaru, ale rostou, pokud jsou uvnitř agaru (zapuštěné). Toho se docílí tak, že na začátku se promíchají se s dosud neztuhlým agarem, který má teplotu je o pár stupňů vyšší než teplotu tuhnutí. Pokud by byl příliš teplý, řasy by zahynuly. Směs agaru a řas se nalije do Petriho misek a nechá ztuhnout. Následuje inkubační doba, po kterou jsou udržovány správné podmínky daného druhu řasy až do vytvoření kolonií. Následuje rozdělení buněk mikropipetou a jejich údržba jinou kultivační metodou. Tato metoda se nazývá Agar Pour. (Beijerinck, 1890; Skinner, 1932; Pringsheim, 1946; Brahamsha, 1996; Toledo a Palenik, 1997)



Obrázek 20 - Čerstvě nalité agarové plotny ve sterilním prostředí

3.8.3 Izolace jednodruhových kultur řas metodou ředění

Pokud není k dispozici vybavená laboratoř, lze využít metodu ředění. Metoda ředění je nejběžnější metodou i ve velmi dobře vybavených laboratořích. Touto metodou se dá vyizolovat nejširší spektrum kmenů. Cílem je ze vzorku oddělit jen jednu buňku do jiné zkumavky nebo Petriho misky, čímž vznikne jednobuněčný izolát. Na základě pravděpodobnosti se odhadne, v jak malém objemu je jedna buňka řasy a dle toho je vzorek zředěn potřebným množstvím tekutiny (destilovaná voda, filtrovaná voda z místa odběru vzorku, mořská voda). Vypočítané množství se nalije do čisté nádoby. V případě, že není znám počet buněk ve vzorku z důvodu jeho velkého objemu nebo omezených pracovních podmínek, použije se metoda opakovaného ředění. (Kufferath, 1928/29; Droop, 1954; Thronsen, 1978)

3.8.4 Izolace jednodruhových kultur řas fototaxí

Tato metoda spočívá v umístění vzorku do nádoby se sterilním kultivačním médiem, přičemž na jeden její konec je přidán zdroj světla. Buňky se v médiu pohybují směrem ke světlu nebo od něj (dle vlastní preference). Po takovém oddělení se pomocí mikropipety přenesou jednotlivé buňky do jiné sterilní kapaliny. (Bold, 1942; Meeuse, 1963; Paasche, 1971; Guillard, 1973)

3.8.5 Průtoková cytometrie s tříděním buněk za účelem izolace jednodruhových kultur řas

Postupným vědeckým vývojem došlo k objevu modernějších postupů izolace a kultivace řas. Jednou z nich je průtoková cytometrie s tříděním buněk, která se začala používat v druhé polovině minulého století. Využívá se především pro separaci velmi malých buněk mikrořas pro následné založení nových kultur. Jejím cílem je jednotlivé buňky v tekutině počítat a analyzovat jejich vlastnosti.

Přístroj funguje na principu průtoku vody a následném oddělování kapek, které obsahují cílovou buňku. Tím, že buňku oddělíme od ostatních, se stává výrazně citlivější. Před začátkem procesu je potřeba, aby vše prošlo procesem sterilizace za pomoci filtru a autoklávu. Důvod je prostý, není žádoucí kontaminace bakteriemi nebo kontaminace křížová mezi řasami. Velikost kapek, které obsahují cílové buňky se liší v závislosti na velikosti použitých trysek. Výběr trysek se odvíjí od velikosti cílových buněk. Avšak platí, čím je kapka nebo objem vzorku menší, tím je nižší pravděpodobnost její nebo jeho kontaminace. (Melamed a kol., 1994; Shapiro, 2003)

3.9 Čištění jednodruhových kultur řas od kontaminace

Čištěním mikrořas nazýváme proces, který následuje po izolaci řas. Izolací řas získáme kmen jednoho druhu, který je případně kontaminovaný bakteriemi, prvoky nebo mikroskopickými houbami. Pokud potřebujeme aseptické kultury, to znamená jen druh řasy, bez kontaminace, tak je to proces komplikovaný. Celá řada druhů roste jen v návaznosti na přítomnost bakterií. Izolace již proběhla za využití jedné z výše zmíněných metod. Proběhla inkubační doba. Na kultivačním médiu se objevily kolonie řas nebo kolonie bakterií a plísni. Dalším krokem je čištění mikrořas. Tzn. přesun vzorku řas z původního kultivačního média do nového. Cílem izolace je získat jednu axenickou kulturu.

Při experimentech se musí pracovat s čistým a sterilním vybavením. Jedná se o laboratorní nádobí, chemické látky, médium, voda, živiny atd. K tomu, aby byla izolace provedena kvalitním způsobem, je třeba také dbát o čistotu samotných řas, aby byl k dispozici vzorek, který obsahuje pouze jeden druh organismů bez jiných

druhů a příměsí. U některých druhů se může také jednat o zvýšenou citlivost, pokud jsou samostatně oddělené. Samotná buňka je mnohem náchylnější na vlivy v prostředí a při nesprávném postupu může dojít k jejímu usmrcení.

Způsobů čištění je opět několik. Čištění **za pomoci filtrace** využívá faktu, že buňky řas jsou větší než bakterie. Filtrací dojde k jejich rozdělení, větší buňky řas se zachytí na filtru, čímž je získána axenická kultura.

Další možností čištění mikrořas je tzv. **tažení přes agar**. Tím dochází k odstranění kontaminantů. U některých řas se musí použít kyselina mléčná, když nedošlo k odstranění veškerých kontaminantů. Použití agarových ploten je nejčastější metoda čištění, ale dobré výsledky má pouze u těch řas, které jsou schopné růst v agaru nebo na jeho povrchu.

Účinné bylo rovněž **čištění odstředováním**, kde je důležité načasování, při kterém buňky sedimentují a odstředěná tekutina se nahradí sterilním médiem (Hoshaw a Rosowki, 1973). U některých organismů se před metodou odstředění použije **ošetření ultrazvukem**.

Proces čištění, jinak nazvaný purifikace, může proběhnout také **za pomoci ředící kultury** nebo **mikropipety**.

K odstranění kontaminantů a vytvoření čistých kultur lze využít i **antibiotika**. Jejich výběr je ale důležitý a je třeba si dobře promyslet, jaká, v jakém množství a na jak dlouhou dobu se použijí.

1. Antibiotika se mohou použít jako doplněk k izolaci mikropipetou (Guillard, 1973, Hoshaw a Rowsowski, 1973). Tato metoda je poměrně náročná na čas, jelikož manipulace s buňkami není snadná, pro řasy je však šetrná.
2. Druhý způsob užití antibiotik už není tak vhodný jako předcházející. Řasy jsou vystavovány velkém množství antibiotik (Droop, 1967). Dochází ke zředění kultury řas s velmi silnou antibiotickou směsí.
3. Poslední možnost má za cíl zbavit se bakterií otěrem. Pracuje se s teorií, že na každé bakterie zabírá jiné antibiotikum. Některé jsou více odolné nebo antibiotika pouze potlačí jejich růst, ale bakterie nezahubí. Kultury řas tedy procházejí přes několik nádobek s antibiotiky za sebou. (Cottrell a Suttle, 1993).

3.10 Udržování kultur mikrořas

Pro dlouhodobé udržení kultury mikrořas je zapotřebí zachovat jim stejné podmínky prostředí, kde jsou uchovávány. Podmínky je tedy nutné pravidelně kontrolovat. Během udržování dochází k přenosům kultur do nových médií.

Samozřejmostí je použití sterilizovaných pomůcek a dodržování stanoveného postupu práce, čímž se zmírňuje riziko kontaminace nebo nesprávné označení materiálu. Ani tak nejsou vyloučena určitá rizika. Řasy v umělém prostředí vydrží kratší dobu než v přirozených podmínkách. Může docházet ke zmenšování velikosti rozsivek (Jaworski a kol., 1988), u některých druhů ke ztrátě trnů nebo ztráta složení pigmentu u některých řas (Warren a kol., 2002).

U přenosu kultur z agaru se musí postupovat velmi opatrně. Víko misek se nadzvedává jen málo, aby nedošlo ke kontaminaci vzduchem. Materiál se na agar nanáší v pruzích a rovnoměrně, aby všechny buňky měly stejné podmínky.

Přenos kultur v kapalině probíhá přemístěním malého počtu kapek původní kultury do nádoby s novým médiem. Zde je třeba dávat pozor při manipulaci s nádobou, aby nedošlo k poškození řas.

Vláknité řasy se přenášejí obdobně pipetou nebo litím. U některých je potřeba vlákna přeříznout a vložit do nového média.

U špatně přenositelných řas, které se s oblibou přichycují na stěny nádob, se používá další materiál k lepšímu přenosu. Může mít podobu přenosného substrátu nebo malých korálků, na kterých může řasa ulpívat.

Základními kameny pro dlouhodobou údržbu kultury je výběr vhodného kultivačního média, správná intenzita světla a tepla a intervaly přenosu. Pokud je zvoleno nevhodné kultivační médium, může dojít k vystresování řasy a to může vést až ke změně v její morfologii. Výběr média probíhá s ohledem na preference kultivovaných řas. Obecně je lepší manipulace s pevným médiem, ale některé druhy preferují pro svůj růst médium kapalné. Podmínky prostředí musejí být co možná nejvíce podobné těm přirozeným. Někdy při dlouhodobém udržování ovšem dochází ke změnám podmínek v kultuře v průběhu času, např. změny v hodnotách pH. Významnou roli hraje nejen výběr kultivačního média, ale i jeho kvalita a čistota, stejně jako kvalita vody a chemického materiálu.

Intenzita světla se mění podle druhu řas. Pro dlouhodobou kultivaci je lépe řasy nevystavovat velkému množství osvětlení, které by mohlo způsobit organismům stres. Podmínky je důležité kontrolovat a měnit v závislosti na kultivovaném druhu.

Přenosy na nové médium jsou důležité pro další vývoj a jejich intervaly se uzpůsobují druhu řas, kterých se kultivace týká. Při této údržbě může dojít ke změně druhu média. Nově přenesené kultury jsou citlivé, proto potřebují optimální podmínky pro začátek jejich růstu.

Obecně lze říci, že kratší intervaly přenosů mají za následek lepší prospívání kultur, jelikož za optimálních podmínek dochází k většímu rozvoji biomasy kmene. Po přemístění do suboptimálních podmínek je růst mnohonásobně zpomalen.



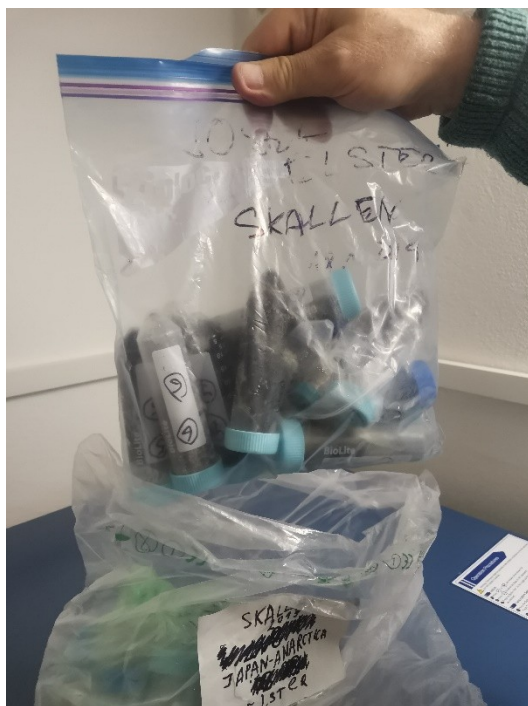
Obrázek 21 – Řasová sbírka (chladná, osvětlená místnost s kmeny na agarových plotnách nebo tekutých médiích) (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 22 – Kryoprezervační zařízení

4. Metodika izolace a kultivace mikrořas

Vzorky zkoumané v této práci byly odebrány prof. Ing. Josefem Elsterem, CSc. z hydroterestrických biotopů v antarktických oblastech Skallen, Skarvsnes a Langhovde. Všechny tři lokality si nacházejí v Zemi královny Maud. Pro bližší určení polohy je jejich společným jmenovatelem zátoka Lutzow-Holm. Skallen a Langhovde jsou ledovce, zatímco Skarvsnes území, které pokrývají skály.



Obrázek 23 – Vzorky přivezené z ledovce Skallen

Vzorky byly z Antarktidy převezeny ve sterilních plastových zkumavkách s uzávěrem, každá zkumavka byla označena číslem vzorku a vložena do průhledného uzávratelného sáčku se jménem vědce, který provedl sběr, názvem oblasti, kde byly sebrány a datem sebrání. Takto označené sáčky a zkumavky byly v chladících boxech převezeny do České republiky a v Botanickém ústavu akademie věd v Třeboni uloženy do mrazících boxů, kde se udržuje teplota mezi -40 až -60 °C.

Před zahájením jednotlivých laboratorních prací byly vzorky rozmrazovány v lednicích při teplotě 8 až 10 °C. Po rozmrazení jsem vzorky přemístila do sterilní mikroskopické místnosti. Sterilní pipetou jsem vždy odebrala kapku jednotlivého vzorku, přenesla ji na sterilní podložní sklíčko a překryla krycím sklíčkem. Přírodní vzorky jsou směsicí, z které je velmi těžké rozlišit jednotlivé druhy. Jsou morfologicky zdeformované a nedají se určit.

Po mikroskopii jsem vzorky přenesla do sterilní místnosti, kde byly dopředu připravené Petriho misky s agarovými plotny. Příprava ploten dopředu před izolací zajistí rychlejší průběh samotného procesu. Před nanesením vzorku na agar jsem Petriho misky označila datem, číslem vzorku a místem jeho sběru. Využívají se různá minerální média. V tomto případě bylo použito BG11.

Následovalo očkování na agarovou plotnu. K přenosu jsem použila očkovací

kličku a kahan. Nejdříve jsem očkovací kličku sterilizovala v plameni kahanu a nechala ji krátce vychladnout. Poté jsem kličkou nabrala vzorek ze zkumavky, přiložila k agarové plotně a rozetřela vzorek na plotnu do souvislé čáry, na každé plotně byly rozetřeny tři čáry. Veškeré pomůcky včetně zkumavky se vzorkem, agarovou plotnu a očkovací kličku jsem měla ve vzdálenosti do 30 cm od kahanu, čímž jsem zajistila minimalizaci možné kontaminace z okolního prostředí.

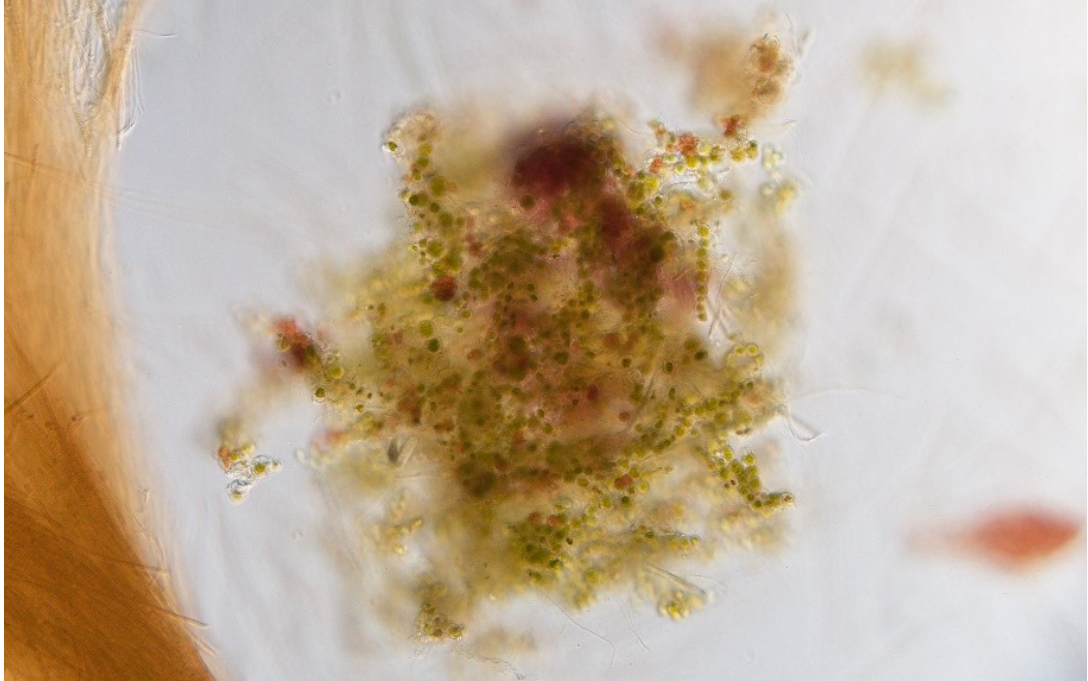
Naočkované agarové plotny jsem uložila do chladících kultivačních boxů, kde byly simulovány podmínky jejich přirozeného prostředí v Antarktidě. To znamená zajištění konkrétní teploty a světla. Teplota v kultivačním boxu se udržuje mezi 8 až 10°C a světla 50 mmol m⁻² s⁻¹. Takto uložené vzorky byly ponechány v klidu, aby nanesené kultury rostly.



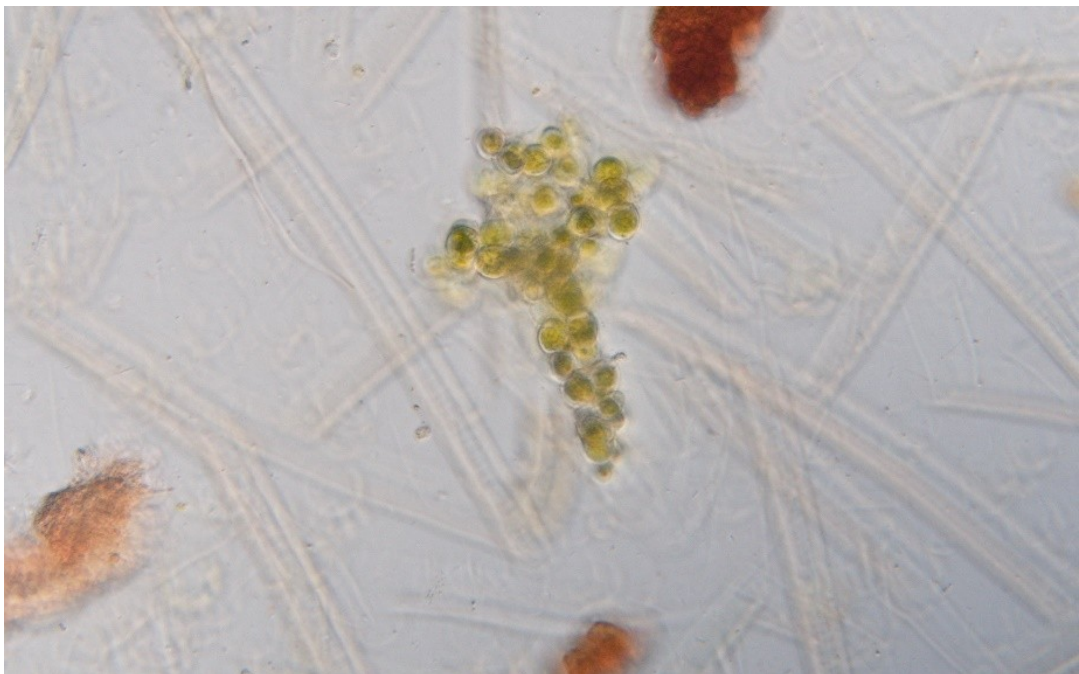
Obrázek 24 – Naočkované agarové plotny v chladícím kultivačním boxu

Jakmile se na agarových plotnách objevily první kolonie, vyjmula jsem plotny z kultivačních boxů a pozorovala je pod mikroskopem. Doba, po které se na agarových plotnách objeví první kolonie závisí na mnoha faktorech. U vzorků půdy z Antarktidy bývají první kolonie viditelné po 10 až 14 dnech. Jiné vzorky mohou být rychlejší a jiné naopak pomalejší. Při mikroskopování jsem zjišťovala, jaké druhy

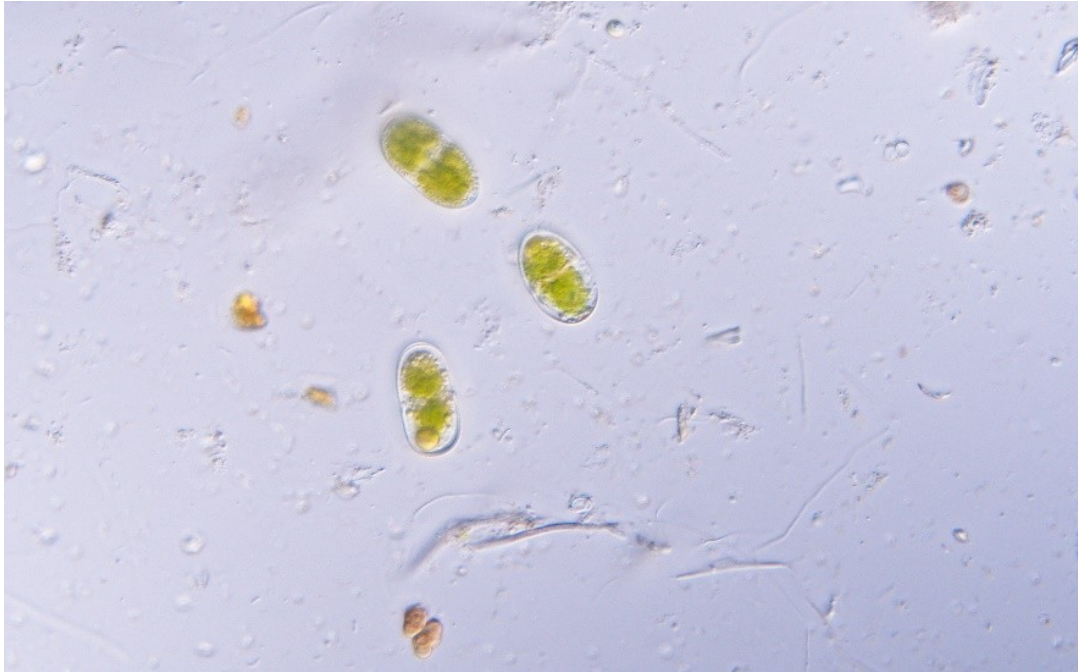
řas vzorek obsahuje, nebo zda se v něm vyskytují kontaminanty v podobě bakterií nebo plísní. Kolonie se objevily na všech agarových plotnách. Byly zde přítomné řasy, sinice i plísně.



Obrázek 25 - Baličky zelených řas – *Heteracoccus* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



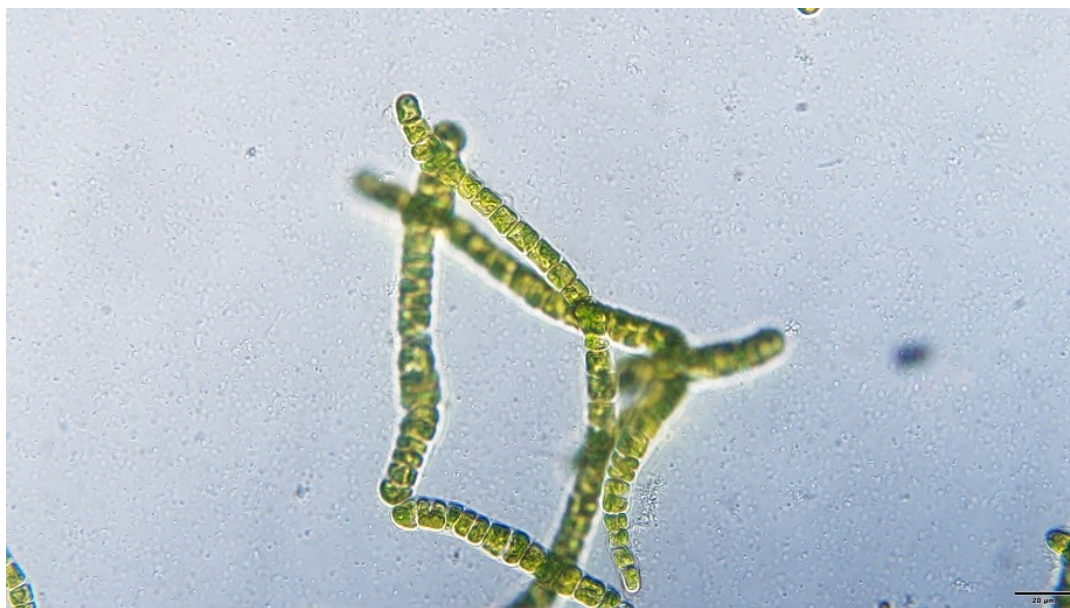
Obrázek 26 - Baličky zelených řas – *Bracteacoccus* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



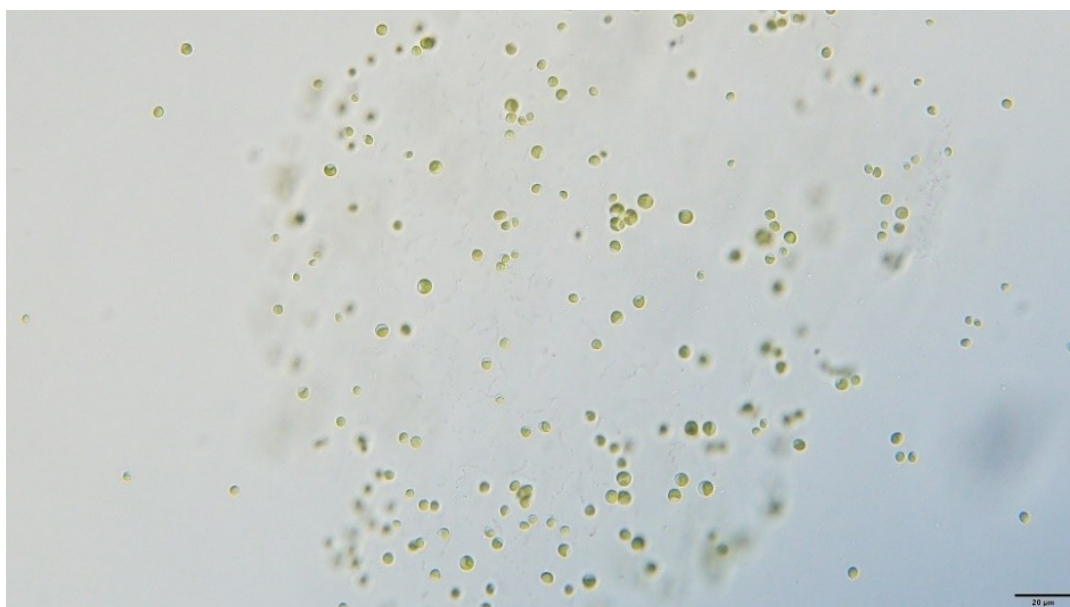
Obrázek 27 – *Cosmarium* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 28 - *Hatzschia* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 29 - *Klebsormidium* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



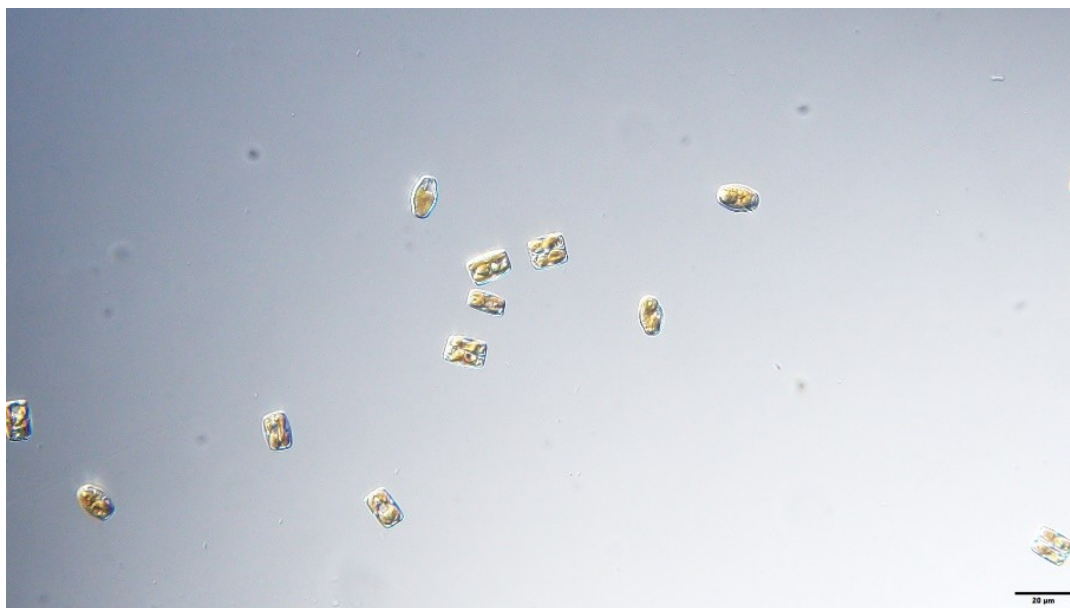
Obrázek 30 - Kmen kokální řasy – *Chlorella* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 31 - *Heterococcus* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 32 - *Stichococcus* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 33 - *Tabellaria* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 34 - *Prasiola* sp (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Po mikroskopování přišlo přeočkování na nové agarové plotny. V tomto procesu jsem odebírala pouze jeden druh řas, který jsem přenesla na nové sterilní kultivační médium. Stejně jako u počátečního očkování jsem použila kahan a očkovací kličku, navíc jsem použila očkovací jehlu, díky níž je vyšší pravděpodobnost odebrání pouze jednoho vybraného druhu. S jehlou jsem kousek vzorku přenesla na novou agarovou plotnu a rozetřela pomocí očkovací kličky. Před použitím jsem očkovací jehlu i kličku vždy ošetřila nad plamenem kahanu.

Pokud jsem si byla jistá, že agarová plotna obsahuje pouze jeden druh řas,

odebrala jsem malé množství sterilní očkovací jehlou a pomocí očkovací kličky toto množství rozetřela na šikmé sterilní kultivační médium ve zkumavce (agar). Vzorek rozetřený na šikmém agaru ve zkumavce jsem vložila do chladicího boxu s podmínkami odpovídajícími přirozeným podmínkám v Antarktidě.



Obrázek 35 – Kmeny rostoucí na šikmém kultivačním médiu

Kultivační médium obsahující viditelný kmen řas následně projde kryoprezervací, kdy je z jednotlivých buněk pomocí chemikálií odstraněna voda. Při kryoprezervaci se nejčastěji používá Metanol nebo DMSO (Dimethyl sulfoxide) v různých koncentracích a s přihlédnutím na druh kmenu, který zmrazujeme. Voda je v buňkách nežádoucí, neboť po zmrazení vytvoří krystaly, které naruší strukturu kultivované buňky a ta v důsledku této skutečnosti zahyne. Cílem tedy je, aby buňka neobsahovala žádnou volnou vodu. Vzorek, který je takto zbaven vody z buněk, je následně uložen do nádob s kapalným dusíkem o teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takto uchované vzorky řas slouží jako kmenová banka řas. Kmeny se po zmrazení nechají v kapalném dusíku na stejném kultivačním médiu a ve stejném kryoprezervačním roztoku.



Obrázek 36 – Kmeny uchované v kapalném dusíku

Pokud chceme znovu pracovat se vzorky, které již byly uloženy do kapalného dusíku, musíme je nejprve vyjmout z nádoby s kapalným dusíkem a nechat rozmraznout. Nejšetrnější způsob rozmrazení je pod tekoucí vodou (ve vodní lázni) o teplotě cca 60 °C, jen do té doby, než vzorek roztaje. Následně se s ním pracuje při pokojové teplotě. Kultivace je prováděna při teplotě mezi 8 až 10°C a ozáření 30 až 50 mmol.m⁻².s⁻¹. Takto rychle provedené rozmrazení chrání buňky před poškozením.

5. Výsledky

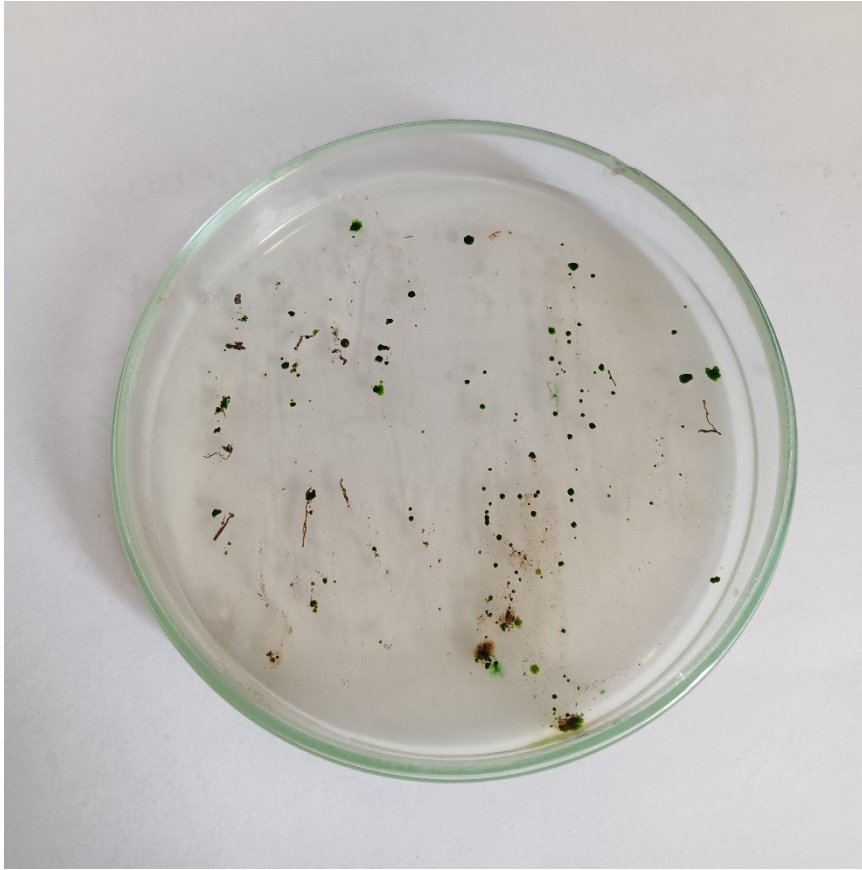
Výsledkem práce bylo izolování a následná kultivace celkem tří vzorků, z nichž bylo určeno a zařazeno pět druhů řas.

Jednalo se zejména o druhy *Klebsormidium* sp., *Stichococcus* sp. a *Chlorella* sp.

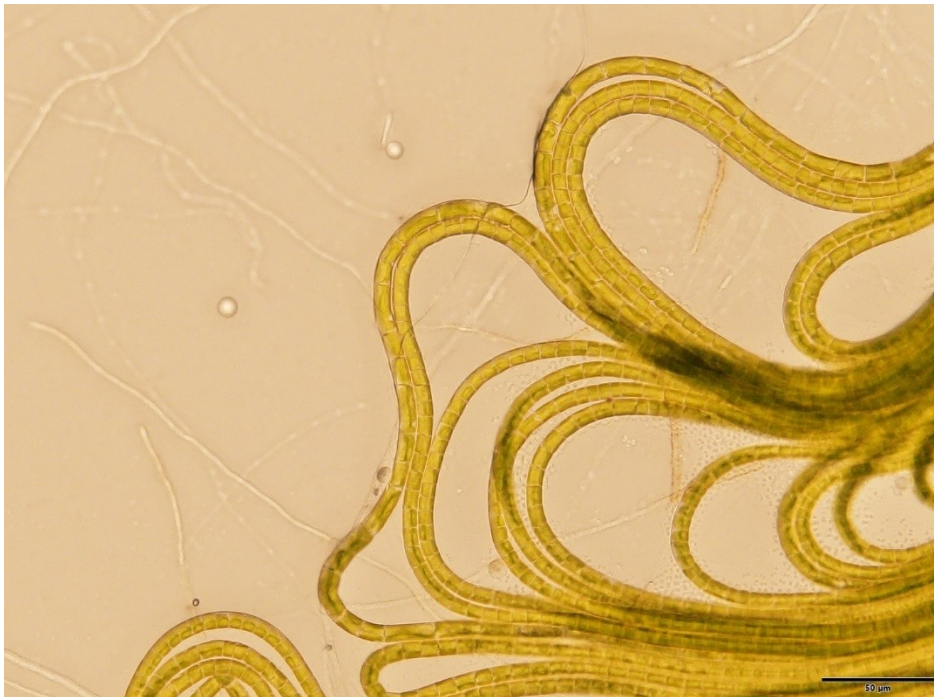
Během kultivace bylo odebráno celkem tři vzorky a umístěno do kmenové banky řas.



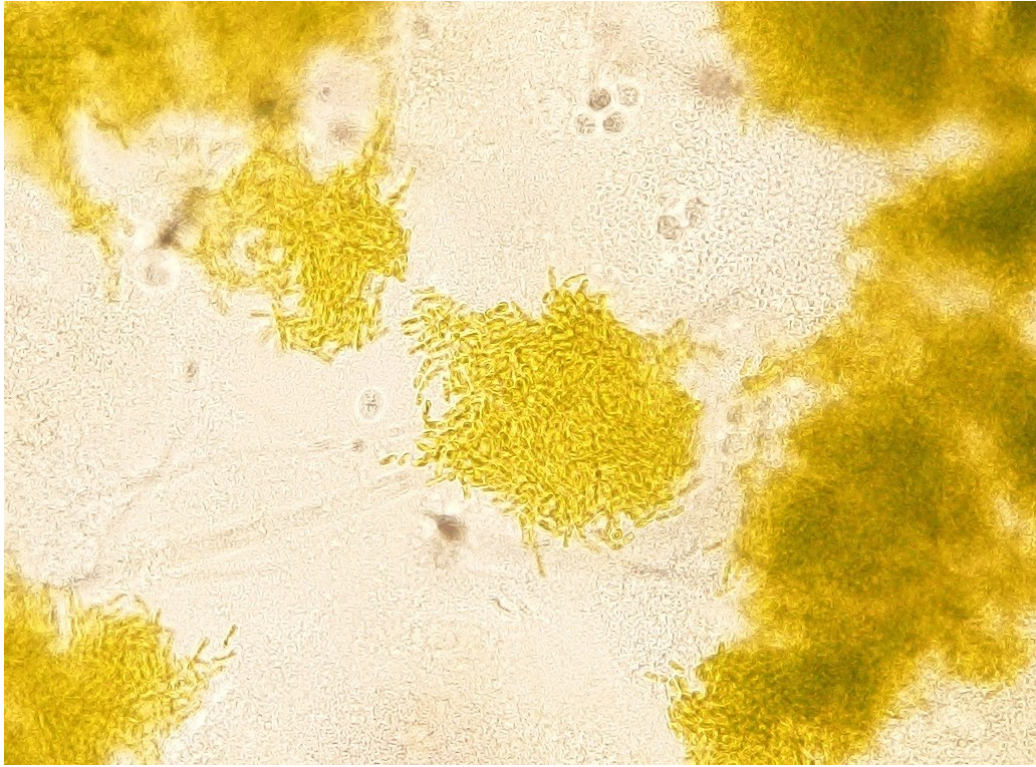
Obrázek 37 - *Klebsormidium* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 38 - Petriho miska (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 39 - *Klebsormidium* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)



Obrázek 40 - *Stichococcus* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

6. Závěr

V teoretické části práce byla představena Antarktida a hydroterestrické biotopy, jejich vznik a jedinečná specifikace.

Řasy a mikrořasy jsou fascinující organismy s neuvěřitelně širokou škálou tvarů, druhů, způsobů života, barvou a díky jejich schopnosti obývat i extrémně nehostinné oblasti si zaslouží velkou vědeckou pozornost. Řasy jako takové mají široké spektrum využití v celé řadě odvětví, tím se ale tato práce nezabývala.

Tato práce se zabývala izolací a následnou kultivací mikrořas na agarových plotnách a tyto pokusy byly úspěšné. Podařilo se určit celkem pět druhů a tři druhy uložit do kmenové banky. Tato práce přispěla zjištěnými druhy mikrořas a provedenými kultivacemi k časosběrným datům posuzujícím diverzitu řas v hydroterestrických biotopech Antarktidy.

7. Seznam použité literatury

Andersen Robert A. a kol. 2005, *Algal Culturing Techniques*, Elsevier Academic Press, ISBN: 0-12-088426-7

Beijerinck, M. W. 1890. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichengonidien und anderen niederen Algen. *Bot. Zeitung* 48:725–39, 741–54, 757–68, 781–85.

Bold, H. C. 1942. The cultivation of algae. *Bot. Rev.* 8:69–138.

Borghini F., Colacevich A. a Bargagli R. 2010: A study of autotrophic communities in two Victoria Land lakes (Continental Antarctica) using photosynthetic pigments. *J. Limnol.*, 69(2): 333-340.

Brahamsha, B. 1996. A genetic manipulation system for oceanic cyanobacteria of the genus *Synechococcus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1747–51.

Brand, L. E., Sunda, W. G. a Guillard, R. R. L. 1983. Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. *Limnol. Oceanogr.* 28:1182–98.

Buma, A. G. J., de Baar, H. J. W., Nolting, R. F., a van Bennekom, A. J. 1991. Metal enrichment experiments in the Weddell-Scotia Seas: Effects of Fe and Mn on various plankton communities. *Limnol. Oceanogr.* 36:1865–78.

Carmichael, W. W. a Gorham, P. R. 1974. An improved method for obtaining axenic clones of planktonic bluegreen algae. *J. Phycol.* 10:238–40

Coale, K. H. 1991. Effects of iron, manganese, copper, and zinc enrichments on productivity and biomass in the subarctic Pacific. *Limnol. Oceanogr.* 36:1851–64.

Cottrell, M. T. a Suttle, C. A. 1993. Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics. *J. Phycol.* 29:385–7.

Crawford, D. W. a kol. 2003. Influence of zinc and iron enrichments on phytoplankton growth in the northeastern subarctic Pacific. *Limnol. Oceanogr.* 48:1583–1600.

Droop, M. R. 1954. A note on the isolation of small marine algae and flagellates for pure culture. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 33:511–41.

Droop, M. R. 1959. Water-soluble factors in the nutrition of *Oxyrrhis marina*.

J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 38:605–20.

Droop, M. R. 1967. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. Br. Phycol. Bull. 3:295–7.

Elster, J., Lukešová, A., Svoboda, J, Kopecký, J. a Kanda, H.1999: Diversity and abundance of soil algae in the polar desert, Sverdrup Pass, central Ellesmere Island. Polar Record 35 (194): 231-254

Elster, J. 1999: Algal versatility in various extreme environments. Origin - evolution and versatility of microorganisms (Phylogeny, structure, physiology and extreme environments), J. Seckbach, (ed.). - Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 215-227.

Elster, J. 2002: Ecological classification of terrestrial algal communities of polar environment. In. GeoEcology of Terrestrial Oases L. Beyer and M. Boelter (eds.). Ecological Studies, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 303-319

Elster, J. a Benson E.E. 2004: Life in the Polar Terrestrial Environment a Focus on Algae and Cyanobacteria. In: B. Fuller, N. Lane and E.E. Benson, (editors) Life In The Frozen State. Taylor and Francis, London, pp. 111- 149

Evans, J. C. a Prepas, E. E. 1997. Relative importance of iron and molybdenum in restricting phytoplankton growth in high phosphorus saline lakes. Limnol. Oceanogr. 42:461–72.

Guillard, R. R. L. 1973. Methods for microflagellates and nannoplankton. In: Stein, J. R., ed. Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 69–85.

Hamilton, R. D. 1973. Sterilization. In: Stein, J. R., ed. Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge, 181–93.

Hoshaw, R. W. a Rosowski, J. R. 1973. Methods for microscopic algae. In: Stein, J. R., ed. Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 53–68.

Jaworski, G. H. M., Wiseman, S. W. a Reynolds, C. S. 1988. Variability in sinking rate of the freshwater diatom *Asterionella formosa*: the influence of colony morphology. Br. Phycol. J. 23:167–76.

- Kaštovský, J. a kol. 2018: Atlas sinic a řas ČR 1. powerprint, Praha, 384 s.
- Kaštovský, J. a kol. 2018: Atlas sinic a řas ČR 2. powerprint, Praha, 480 s.
- Keller, M. D., Bellows, W. K., and Guillard, R. R. L. 1988. Microwave treatment for sterilization of phytoplankton culture media. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 117:279–83.
- Kufferath, H. 1928/29. La culture des algues. *Revue Algol.* 4:127–346.
- Lee, J. J. a Soldo, A. T. 1992. *Protocols in Protozoology*. Society for Protozoology, Lawrence, Kansas (unpaginated).
- Meeuse, B. J. D. 1963. A simple method for concentrating phototactic flagellates and separating them from debris. *Arch. Mikrobiol.* 45:423–4.
- Melamed, M. R., Lindmo, T. a Mendelsohn, M. L., eds. 1994. *Flow Cytometry and Cell Sorting*. 2nd ed. Wiley-Liss, New York. 820 pp.
- Paasche, E. 1971. A simple method for establishing bacteriafree cultures of phototactic flagellates. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 33:509–11.
- Pushkareva, E., Elster J. 2013: Biodiversity and ecological classification of cryptogamic soil crusts in the vicinity of Petunia Bay, Svalbard. *Czech Polar Records*, 3 (1): 7-18
- Pushkareva, E., Elster, J., Kudoh, S., Imura, S. a Becker, B. 2024: Microbial community composition of terrestrial habitats in East Antarctica with a focus on microphototrophs. *Front. Microbiol.* 14:1323148. doi: 10.3389/fmicb.1323148
- Pringsheim, E. G. 1912: Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. *Mitt. I. Die Kultur von Algen in Agar. Beitr. Biol. Pfl.* 11: 305-34.
- Pringsheim, E. G. 1946: *Pure Cultures of Algae. Their Preparation and Maintenance*. Cambridge University Press, Cambridge, 119 pp.
- Prošek, P. a kol. 2013: *Antarktida*. Academia, Praha, 345 s.
- Shapiro, H. M. 2003. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. Wiley-Liss, New York.
- Skinner, C. E. 1932. Isolation in pure culture of green algae from soil by a simple technique. *Plant Physiol.* 7: 533–7.

Starr, R. C. a Zeikus, J. A. 1993. UTEX—The culture collection of algae at the University of Texas at Austin. *J. Phycol.* 29(2, Suppl), 106 pp.

Sunda, W. G. a Huntsman, S. A. 1995. Cobalt and zinc interreplacement in marine phytoplankton: Biological and geochemical implications. *Limnol. Oceanogr.* 40:1404–17.

Thronsdon, J. 1978. The dilution-culture method. In: Sournia, A., ed. *Phytoplankton Manual*. UNESCO, Paris, pp. 218–24.

Toledo, G. a Palenik, B. 1997. *Synechococcus* diversity in the California current as seen by RNA polymerase (*rpoC1*) gene sequences of isolated strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4298–303.

Tompkins, J., DeVille, M. M., Day, J. G. a Turner, M. F. 1995. *Culture Collection of Algae and Protozoa. Catalog of Strains*. Ambleside, UK, 204 pp.

Warren, A., Day, J. G. a Brown, S. 2002. Cultivation of protozoa and algae. In: Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., and Stezenbach, L. D., eds. *Manual of Environmental Microbiology*, ed. 2. ASM Press, Washington, D.C., pp 71–83.

Waterbury, J. B., Watson, S. W., Valois, F. W. a Franks, D. G. 1986. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. In: Platt, T., and Li, W. K. I., eds. *Photosynthetic Picoplankton*. *Can. Bull. Fish. Aquatic Sci.* 214:71–120.

Wurtsbaugh, W. A. a Horne, A. J. 1983. Iron in eutrophic Clear Lake, California: Its importance for algal nitrogen fixation and growth. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40:1419– 29.

8. Ostatní zdroje

Elster J., Ditrich O. a kolektiv autorů: 2023. Polární ekologie Svalbardu, 2023, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, dostupné na adrese: [polarni-ekologie-sval-vn-05_nf.pdf \(jcu.cz\)](https://www.jcu.cz/oblasti/ekologie-sval-vn-05_nf.pdf) [online 20.02.2024]

Wikipedie, heslo: Sinice. Dostupné z <https://cs.wikipedia.org/wiki/Sinice> [online 20.02.2024]

Wikipedie, heslo: Antarktida. Dostupné z <https://cs.wikipedia.org/wiki/Antarktida> [online 20.02.2024]

Wikipedie, heslo: Mikrořasy. Dostupné z <https://cs.wikipedia.org/wiki/Mikro%C5%99asy> [online 20.02.2024]

Wikipedie, heslo: Chalupy. Dostupné z <https://cs.wikipedia.org/wiki/Chalupy> [online 20.02.2024]

článek Mikrořasy – solární továrna v jedné buňce, www.alga.cz, Centrum Algatech dostupné z https://www.alga.cz/UserFiles/mstefanova/files/Mikro%C5%99asy_sol%C3%A1rn%C3%AD%20tov%C3%A1rna%20v%20jedin%C3%A9%20bu%C5%88ce.pdf [online 24.02.2024]

Rintoul Stephen a Church John, článek The Southern Ocean's global reach, Australian Antarctic Magazine, Issue 4 - Spring 2002, dostupné z <https://web.archive.org/web/20110316013109/http://www.antarctica.gov.au/about-antarctica/australian-antarctic-magazine/issue-4-spring-2002/the-southern-oceans-global-reach> [online 20.02.2024]

The World Factbook, <https://www.cia.gov/the-world-factbook/>, dostupné z <https://www.cia.gov/the-world-factbook/countries/antarctica/> [online 25.02.2024]

Fact files – introducing Antarctica <https://web.archive.org/web/20110312001218/http://www.antarctica.gov.au/about-antarctica/fact-files> [online 25.02.2024]

Jan Kaštovský, Tomáš Hauer, Josef Jurán a Jaroslav Kubín, www.sinicearasy.cz, 2003 - 2024 Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, dostupné z <https://www.sinicearasy.cz/skripta> [online 01.-20.02.2024]

Josef Juráň, Jan Kaštovský, Nový pohled na systém řas a jak ho učit?; Časopis Živa, sekce K výuce Vyšlo v časopise Živa 6/2016 na straně 299, dostupné z <https://ziva.avcr.cz/2016-6/novy-pohled-na-system-ras-a-jak-ho-ucit.html> [online 15.02.2024], odkaz na článek: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/novy-pohled-na-system-ras-a-jak-ho-ucit.pdf>

9. Seznam obrázků

Obrázek 20 - Mělká jezera (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 21 - Mělká louže (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 22 - Mělký potok (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 23 - Mozaika mělkých mokřadů na začátku léta (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 24 - Odledněná krajina kontinentální Antarktidy s mělkými jezery (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 25 - Odledněná krajina s mělkými mokřady (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 26 - Potůček s meteostanicí (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 27 - Seepage pod sněhovým polem (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 28 - Systém mělkých louží (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 29 - Primární, sekundární a terciární endosymbióza (zdroj: Josef Juráň, Jan Kaštovský K výuce Nový pohled na systém řas a jak ho učít?)

Obrázek 30 - Vývojové vztahy skupin „nižších rostlin“ (zdroj: Kaštovský a Juráň, 2016)

Obrázek 31 - Mělké jezírko hnojené blízkým hnízdištěm tučňáka kroužkového – *Pygoscelis adeliae* (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 32 - Rozvoj řas v hnojeném jezírku tučňákem kroužkovým - *Pygoscelis adeliae* (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 33 - Jemné nárosty rozsivek na dně potoka (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 34 - Potůček s řasou *Klebsormidium* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 35 - Vlákničitá řasa *Klebsormidium* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 36 - Potůček vytékající z hnízdiště tučňáka císařského – *Aptenodytes forsteri* s řasou *Prasiola* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

- Obrázek 37 - Řasa *Prasiola* sp. rostoucí v hnízdišti tučňáka císařského - *Aptenodytes forsteri* (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 38 - Zelené vaty řasy *Zygmene* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 20 - Čerstvě nalité agarové plotny ve sterilním prostředí
- Obrázek 21 - Řasová sbírka (chladná, osvětlená místnost s kmeny na agarových plotnách nebo tekutých médiích) (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 22 - Kryoprezervační zařízení
- Obrázek 23 - Vzorky přivezené z ledovce Skallen
- Obrázek 24 - Naočkované agarové plotny v chladícím kultivačním boxu
- Obrázek 25 - Balíčky zelených řas – *Heterococcus* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 26 - Balíčky zelených řas – *Bracteacoccus* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 27 - *Cosmarium* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 28 - *Hantzschia* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 29 - *Klebsormidium* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 30 - Kmen kokální řasy – *Chlorella* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 31 - *Heterococcus* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 32 - *Stichococcus* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 33 - *Tabellaria* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 34 - *Prasiola* sp (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 35 - Kmeny rostoucí na šikmém kultivačním médiu
- Obrázek 36 - Kmeny uchované v kapalném dusíku
- Obrázek 37 - *Klebsormidium* sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)
- Obrázek 38 - Petriho miska (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 39 - Klebsormidium sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)

Obrázek 40 - Stichococcus sp. (prof. Ing. Josef Elster, CSc.)