

Metody izolace a kultivace sinic a řas pro potřeby výuky na základních a středních školách

Veronika Kaufnerová

Abstrakt: Navzdory skutečnosti, že sinice a řasy tvoří běžnou složku vodních i terestrických společenstev, jsou tyto organismy stále opomíjené při praktické výuce biologie na základních i středních školách. V některých případech může být příčinou výuka algologické tematiky v období vegetačního klidu, kdy není možné získat vhodné přírodní vzorky. Následující text poskytuje návod na izolaci jednodruhových kultur sinic a řas z přírodních vzorků a způsob udržování těchto kultur v podmínkách škol.

Klíčová slova: řasy, sinice, BBM medium, izolace, kultivace.

Abstract: Despite the fact that cyanobacteria and algae are a common part of freshwater ecosystems, these organisms are still neglected in elementary and secondary education. The reason could be caused by planning of algological theme during late autumn and winter months. In this period is not possible to collect suitable algal field samples. The following text offers the way how to obtain an algal and cyanobacterial monospecific culture from a field sample and how to maintain a continual culture in school conditions.

Key words: Algae, Cyanobacteria, BBM medium, cultivation, isolation.

KAUFNEROVÁ, V. 2015. Metody izolace a kultivace sinic a řas pro potřeby výuky na základních a středních školách. *Arnica 4*, 1–2, 7–12. Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň. ISSN 1804-8366. Rukopis došel 5. prosince 2014; byl přijat po recenzi 17. prosince 2014.

Veronika Kaufnerová, Centrum biologie, geověd a envigogiky, Fakulta pedagogická, Západočeská univerzita v Plzni, Klatovská 51, Plzeň, 306 19, Česká republika; e-mail: vkaufner@cbg.zcu.cz

Úvod

Ke kultivaci sinicových a řasových kmenů se využívá několik typů živných médií přizpůsobených svým složením nárokům konkrétních druhů (BBM médium určené zejména pro kultivaci zelených řas např. Chlorophyceae, Trebouxiophyceae; OGM médium vhodné pro kultivaci krásivek (Desmidiaceae); Z médium či BG-11 pro zástupce sinic aj.). K poměrně snadno kultivovatelným organismům se řadí většina zelených řas. Zejména fytoplanktonní zelené řasy jsou vzhledem ke své zajímavé morfologii vhodné k praktické výuce algologie. Ze zástupců Chlorophyta jsou vhodné zelenivky (Chlorophyceae) rodů *Pediastrum*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Acutodesmus*, *Coelastrum*, *Kirchneriella* a *Chlamydomonas*. Ze skupiny spájkivých řas (Zygnematophyceae) jsou vhodné rody *Spirogyra*, *Mougeotia*, *Zygnema*, *Closterium*, *Cosmarium*, *Staurostrum*, *Micrasterias*, *Actinotaenium* a *Desmidiium*. V laboratorních podmínkách se také daří kultivovat běžné druhy sinic, např. *Dolichospermum* (= *Anabaena*), *Nostoc*, *Oscillatoria* a *Phormidium*. Jednou z možností jak zpřístupnit tyto objekty ve výuce žákům a studentům i v období vegetačního klidu je izolace vlastních monospecifických kultur a jejich dlouhodobé udržování v laboratorních (školních) podmínkách.

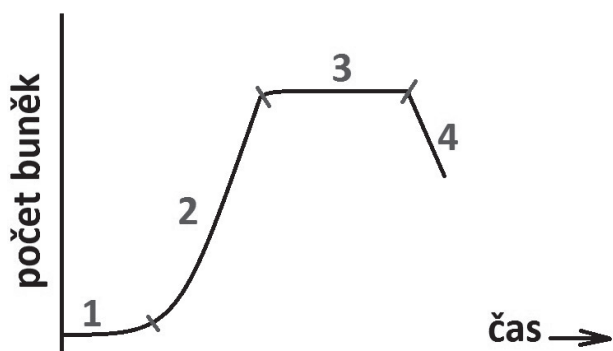
Ke kultivaci řas a sinic v laboratorních podmínkách je nezbytné dodržet základní podmínky jejich optimálního růstu. Pro široké spektrum řas zpravidla

platí: teplota kultivace mezi 16–27 °C, fotoperioda (den:noc) minimálně 16:8, optimálně 12:12, maximum 24:0; hodnoty pH mezi 7–9 v závislosti na preferencích konkrétních druhů (upraveno dle Samek 2013). Při teplotách pod 16 °C dochází ke zpomalení růstu a množení kultivovaných buněk. Stejně tak dlouhodobé působení příliš vysokých teplot (nad 35 °C) je pro mnohé zástupce řas letální (Samek 2013). Kultivace sinic a řas za snížených teplot (v osvětlených inkubátorech či prosvětlených lednicích) se využívá při dlouhodobém udržování kultur. Za konstantního snížení kultivační teploty dochází k poklesu rychlosti růstu a množení kmene a oddálení potřeby přeočkování kultury do nového živného média, pokud udržíme podmínky osvětlení kultury.

Některé druhy řas, např. někteří zástupci Chlorophyceae, za klidové kultivace v laboratorních podmínkách mění svoji základní morfologii. Reagují tak na změněné podmínky. U mnoha druhů řas byla prokázána fenotypová plasticita, tj. změna vnějšího vzhledu, v závislosti na změně podmínek teploty, pH, přítomnosti predátora v prostředí, na turbulencích aj. (Dobrá 2013, Bučková 2013). Fytoplanktonní druhy řas žijí v přírodě v turbulentních podmínkách, například ve vodním sloupci, jehož pohyb je způsobený mj. větrem. K udržení fytoplanktonního druhu ve svrchní (fotické) vrstvě vodního sloupce a zachování možnosti fotosyntézy a přežití je pro mnohé druhy nezbytné vytvářet takové

morfologie, které jim usnadňují nadnášení. Patří k nim tvorba prostorových kolonií, výběžků buňky či ostnů, které jsou charakteristické pro rody *Desmodesmus* a *Asterionella*. Tyto struktury mohou zároveň svého majitele ochraňovat před predací (Padisák *et al.* 2003). V průběhu kultivace však dochází k odstranění turbulence i dalších vlivů a některé druhy řas tak ztrácí důvod k tvorbě běžně známé morfologie. Právě proto je nezbytné volit pro kultivaci vhodné druhy řas, případně zajistit kultivovanému organismu optimální životní podmínky v laboratoři, například pravidelným promícháváním kultury.

Z hlediska růstu kultivovaného organismu odlišujeme několik růstových fází. První fáze růstu kultury je označována jako adaptační „lag fáze“, při které se organismus adaptuje na nové prostředí. Na ní navazuje fáze exponenciálního růstu kmene, a to do doby, než dojde k vyčerpání živin v kultivačním médiu. V této fázi (stacionární fáze) je růst zpomalen a následně dochází k postupnému odumírání buněk (obr. 1).



Obr. 1. Růstová křivka kultury (1 – lag fáze, 2 – exponenciální fáze růstu, 3 – stacionární fáze, 4 – odumírání kultury)

Udržováním kultury v exponenciální fázi přísunem nových živin, standardně přeočkováním kultury do nového živného média, je možné kultivovaný kmen dlouhodobě uchovávat (Křiša & Prášil 1989).

Potřebné vybavení laboratoře

1) Přístrojové vybavení

autokláv či tlakový hrnec, horkovzdušný sterilizátor, laboratorní váhy, mikroskop s objektivy 4× a 10×, kahan

2) Laboratorní potřeby

Erlenmayerovy baňky (různé velikosti) či zkumavky ke kultivaci řas a přípravě kultivačních roztoků, tmavé úzkohrdlé reagenční lahve k uchování zásobních roztoků, odměrné válce, kádinky, skleněné pipety (10 ml a 1 ml), plastová pipeta pro odběr bentických vzorků, planktonní síť pro odběr vzorků fytoplanktonu v terénu, plastové odběrové lahvičky, podložní skla, skleněné trubičky nebo skleněné Pasteurovy pipety

k přípravě mikropipet, kapátka, filtrační aparatura, buničitá vata, alobal

3) Chemikálie

NaNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MoO_3 nebo $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , EDTA, KOH, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, konc. H_2SO_4 , vitamín thiamin HCl (B1), vitamín H, vitamín B12, destilovaná voda

Příprava a sterilizace kultivačních médií

Pro kultivaci organismů různých skupin řas (Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Zygnematophyceae) a sinic se dobře osvědčilo Boldovo bazální médium (BBM, Bold's basal medium) definované Bischoffem & Boldem (1963). Prvním krokem v přípravě živného média je vytvoření několika zásobních roztoků živin, z nichž bude připravován finální živný roztok.

1) Zásobní roztoky hlavních živin:

- zásobní roztok dusičnanu sodného: 10 g NaNO_3 rozpuštěných ve 400 ml destilované vody;
- zásobní roztok síranu hořečnatého: 3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ rozpuštěných ve 400 ml destilované vody;
- zásobní roztok chloridu sodného: 1 g NaCl rozpuštěný ve 400 ml destilované vody;
- zásobní roztok hydrogenfosforečnanu draselného: 3 g K_2HPO_4 rozpuštěných ve 400 ml destilované vody;
- zásobní roztok dihydrogenfosforečnanu draselného: 7 g KH_2PO_4 rozpuštěných ve 400 ml destilované vody;
- zásobní roztok chloridu vápenatého: 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rozpuštěný ve 400 ml destilované vody.

Z každého ze zásobních roztoků se použije do finálního živného média 10 ml roztoku.

2) Zásobní roztok stopových prvků: V destilované vodě (cca 500 ml) se rozpustí 8,82 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,44 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,71 g MoO_3 , 1,57 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,49 g $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Roztok se doplní destilovanou vodou na celkový objem 1000 ml. MoO_3 je možné nahradit 0,2 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Ze zásobního roztoku stopových prvků se použije do finálního živného média 1 ml.

3) Zásobní roztok kyseliny borité: V destilované vodě (cca 500 ml) se rozpustí 11,42 g H_3BO_3 a doplní se destilovanou vodou do 1000 ml. Ze zásobního roztoku kyseliny borité se použije do finálního živného média 1 ml.

4) Zásobní roztok EDTA (kyselina etylendiaminotetraoctová, chelaton 3): V destilované vodě se rozpustí

50 g EDTA a 31 g KOH, roztok se doplní destilovanou vodou na celkový objem 1000 ml (stačí připravit 100 ml roztoku). Ze zásobního roztoku EDTA se použije do finálního živného média 1 ml.

5) Zásobní roztok síranu železnatého: V destilované vodě (cca 500 ml) se rozpustí 4,98 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a okyselí 1 ml koncentrované H_2SO_4 , roztok se doplní destilovanou vodou na celkový objem 1000 ml (stačí připravit 100 ml roztoku). Ze zásobního roztoku síranu železnatého se použije do finálního živného média 1 ml.

6) Půdní extrakt: Půdní extrakt obsahuje další látky, které nejsou obsaženy v základních zásobních roztocích a napomáhá tak v růstu obtížněji kultivovatelným druhům (Křísa & Prášil 1989). Přípravu půdního výluhu popsal např. Schlösser (1982). Výluh se připraví odebráním cca 50 g nehojené půdy a jejím rozpuštěním v cca 0,5 l destilované vody. Roztok se nechá sedimentovat po dobu cca 30 min., přefiltruje se a sterilizuje se v autoklávu 2× po dobu 1 hod. při teplotě 121 °C s rozestupem 24 hod. mezi jednotlivými sterilizacemi (Andersen 2005, upraveno). Sterilizací roztoku dojde k odstranění veškerých spor a zamezí se tak případné kontaminaci média houbami. Do finálního živného média se použije 10 ml takto připraveného půdního výluhu. Půdní výluh je možné při míchání živného média vynechat.

7) Roztok vitamínů (podle Andersena 2005): Některé druhy řas a sinic vyžadují ke svému růstu přítomnost vitamínů v živném médiu. V takovém případě se do živného roztoku přidávají vitamíny skupiny B (B1, B12 či vit. H = biotin), a to tak, že se v 950 ml destilované vody rozpustí 10 mg vit. B1 (thiamin HCl) a poté se do roztoku přidá 1 ml zásobního roztoku vitamínu H a 1 ml zásobního roztoku vitamínu B12 (oba zásobní roztoky vitamínu H a B12 se připravují rozpuštěním 0,1 g daného vitamínu v 1000 ml). Finální roztok vitamínů se poté doplní destilovanou vodou do 1000 ml. Ze zásobního roztoku vitamínů se použije do živného média 1 ml.

Živné médium se připravuje ve velké kádince či Erlenmayerově baňce (min. objem 1,5 l). Nádoba se naplní cca 500 ml destilované vody a postupně se přidávají výše uvedená množství jednotlivých zásobních roztoků, půdní extrakt (popř. roztok vitamínů), následně se doplní destilovanou vodou na celkový objem 1000 ml.

Finální kultivační médium je potřeba naplnit do kultivačních nádob, kterými jsou horkým vzduchem sterilizované zkumavky či Erlenmayerovy baňky. Nádoby se uzavřou víčkem z alobalu. Takto připravené kultivační médium je nezbytné před naočkováním kultury sterilizovat. Standardní sterilizace se provádí v k tomu určených přístrojích, nejlépe v autoklávu, za teploty 121 °C po dobu 20 minut. Přístroj lze nahradit běžným tlakovým hrncem.

Boldovo bazální médium se často využívá v modifikacích 2N BBM či 3N BBM. V těchto případech se jedná o dvojnásobné (2N BBM, 20 ml NaNO_3) či trojnásobné (3N BBM, 30 ml NaNO_3) množství zásobního roztoku NaNO_3 přidaného do finálního živného média. Tyto verze se využívají zejména pro kultivaci zelených řas. Dusíkem obohacené BBM médium je také možné využít pro kultivaci některých sinic. V základní verzi živného média lze kultivovat některé zástupce krásivek.

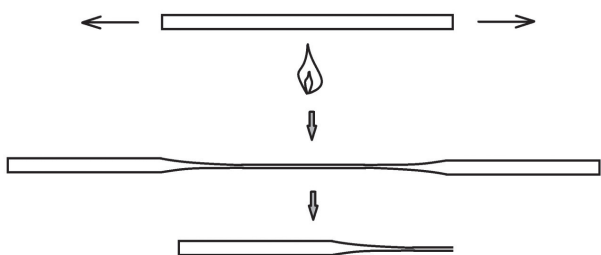
Metodika odběru přírodních vzorků

Pro izolaci jednodruhové kultury je nezbytný sběr směsného přírodního vzorku. K izolaci lze využít jak vzorky bentosu, tak vzorky fytoplanktonu. Odběr bentických vzorků provádíme odsátím sedimentu pomocí plastové pipety. Pro odběr vzorku fytoplanktonu je vhodné použít planktonní síť s průměrem ok 20 či 40 μm . Planktonní síť lze nahradit plastovou PET lahví (1,5 l), kterou se odebere povrchová vrstva vodního sloupce. Následnou sedimentací a centrifugací jejího obsahu je možné získat vzorky fytoplanktonu. Jedná se o zdlouhavý postup, který není vždy efektivní. Vhodný je v případě silného vegetačního zákalu či vodního květu. Takto odebrané vzorky je potřeba v co nejkratší době využít k izolaci buněk.

Co nejdříve po odběru je nezbytné umístit přírodní vzorek až do doby jeho zpracování do chladu. Tímto se zamezí snížení rozpustnosti plynů ve vzorku a změně pH (Křísa & Prášil 1989).

Metodika izolace buněk sinic a řas ze směsných přírodních vzorků

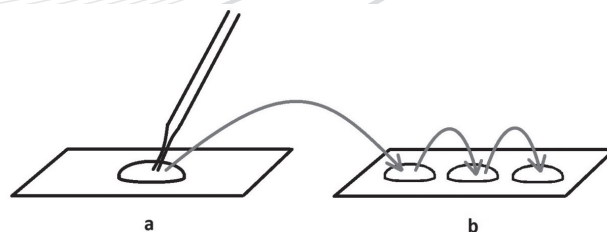
Před sto lety navrhl Barber (1914) techniku izolace mikroorganismů pomocí skleněné kapiláry. S její pomocí je možné vychytávat z přírodního vzorku jednotlivé buňky (kolonie či cenobia). K výrobě mikropipety lze využít skleněné trubičky o vnitřním průměru 4–5 μm . Vhodná délka trubičky pro výrobu dvou mikropipet je 20 cm. Střed trubičky je potřeba zahřát nad plamenem. Po natavení skla trubičky po celém jejím obvodu se prudkým roztážením obou konců trubičky vytáhne tenká kapilára (obr. 2). Příprava mikropipety



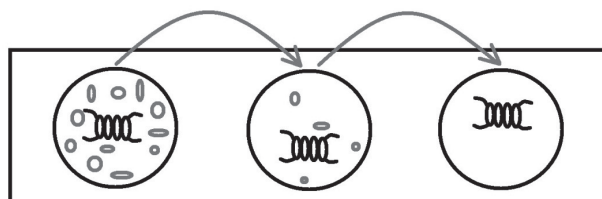
Obr. 2. Postup přípravy mikropipety zahříváním skleněné trubičky

se dokončí rozlomením kapiláry v jejím středu a zkrácením na vhodnou délku a požadovaný vnitřní průměr podle velikosti izolovaného objektu. Jako alternativu skleněné trubičky lze k vytažení mikropipety použít skleněné Pasteurovy pipety (Andersen 2005). Takto vytvořené mikropipety je potřeba před samotnou izolací sterilizovat horkým vzduchem v horkovzdušném sterilizátoru nebo autoklávu. Laboratorní materiál sterilizovaný v horkovzdušném sterilizátoru by měl být během sterilizace a nadále až do použití uzavřen v obalu z alobalu pro zamezení kontaminace.

Před zahájením samotné izolace si připravíme sterilní podložní skla, mikropipety, zkumavky či Erlenmayerovy baňky se živným médiem, sterilní skleněné pipety, mikroskop s objektivy 4× či 10×, směsný přírodní vzorek a buničitou vatu. Na podložní sklo nanese jednu až tři kapky sterilního živného média. Na další podložní sklo nanese kapku živého přírodního vzorku řas. Bez zakrytí krycím sklem umístíme sklo s přírodním vzorkem pod mikroskop a při zvětšení 4× (případně 10×) vybereme v kapce vzorku objekt, který chceme izolovat od ostatních řas. Současně při pozorování buňky v mikroskopu ponoříme mikropipetu do směsného vzorku v místě polohy požadované buňky (kolonie, cenobia) a objekt odsajeme mikropipetou. Okamžitě po ponoření mikropipety do kapky přírodního vzorku dochází k nasátí tekutiny kapilárou. Je-li mikropipeta ponořena do kapky přímo nad požadovanou buňkou, dojde k jejímu natažení do kapiláry. Obsah nasátý v kapiláře opatrně vyfoukneme do kapky živného média na druhém podložním skle. Následně jej umístíme pod mikroskop a v této kapce vyhledáme požadovaný izolovaný objekt. Poté celý proces opakujeme. Mikropipetou nasajeme vybranou izolovanou buňku a přeneseme ji do další kapky živného média. Tímto postupem dochází k postupnému čištění izolované buňky od kontaminantů, tj. od jiných řas či sinic, sedimentu apod. (obr. 3 a 4). Postup je vhodné opakovat přenesením izolovaného objektu přes cca 8 kapek živného média. Z poslední kapky živného roztoku přeneseme objekt do zkumavky či Erlenmayerovy baňky, ve které budeme řasu dále



Obr. 3. Postup izolace a promývání izolovaného jedince řadou kapek sterilního média (a – izolace jedince z přírodního vzorku pomocí skleněné mikropipety, b – promývání buňky přenášením mezi kapkami živného média)



Obr. 4. Princip postupného odstraňování kontaminantů využitím přenosu buňky skrze sérii kapek sterilního média

kultivovat. K izolaci vždy zvolíme takovou buňku (kolonii, cenobium), která je vitální a schopná se nadále rozmnožovat.

Po izolaci je nezbytné kultivační nádobu uzavřít. K tomuto je možné využít buď alobalovou zátku, kterou byla kultivační nádoba uzavřena při sterilizaci, nebo zátku z buničité vaty, která se vytvoří pevným srolováním pásku buničité vaty. Některé zkumavky určené ke kultivaci jsou opatřeny kovovými víčky, která je potřeba před použitím sterilizovat.

V případě vhodně zvoleného objektu v závislosti na teplotě kultivace, délce světelné periody a kultivovaného druhu dochází po několika týdnech k namnožení buněk. Tento stav indikuje zelené zbarvení na dně kultivační nádoby. V této fázi je potřeba zkontrolovat, zda došlo v kultivační nádobě k namnožení požadovaného kmene řasy či sinice, případně zda nedošlo ke kontaminaci kultury (např. aerofytními řasami).

Udržování kultur sinic a řas

Při dlouhodobém udržování kultury je potřebné dodávat kultivovanému kmeni dostatečný přísun živin. To je zajišťováno přeočkováním kultury do nové kultivační nádoby se sterilním živným médiem. K přeočkování je nezbytné používat sterilní pipety. Skleněné pipety je možné využívat opakovaně po omytí a sterilizaci horkým vzduchem. Pomocí pipet je odsáto přiměřené množství buněk původní kultury a následně přeneseno do nové kultivační nádoby. Za standardních kultivačních podmínek dochází k přeočkování kultury v laminárním boxu, aby došlo ke snížení možnosti

kontaminace nové kultury. Vzhledem k tomu, že laminární box nebývá standardním, ale spíše výjimečným vybavením základních a středních škol, je potřeba provádět přeočkování kultury v co nejkratším časovém úseku a kultivační nádoby nechávat odzátkované jen po dobu nezbytně nutnou pro přenos buněk. Doba, po které je potřeba kulturu přeočkovat, se odvíjí od velikosti kultivační nádoby a koncentrace buněk v ní. Obvykle jsou to týdny až měsíce.

K dlouhodobému uskladnění kultury je vhodné zvolit chladné prostředí s dostatečným přístupem světla. Vhodné jsou prosklené či osvětlené lednice bez uskladnění dalších kontaminantů. Pokud takovým vybavením škola nedisponuje, je vhodné k udržování kultur zvolit jiné prosvětlené chladné místo, např. prostor mezi křídly u dvojitých oken v období od podzimu do jara apod. V takovém případě je potřeba dát pozor na případnou kontaminaci kultury aerofytními řasami, plísněmi apod. Při vyšších (pokojových) teplotách a delší fotoperiodě se zrychluje růst řas, a je tedy nezbytné kultury častěji přeočkovávat.

Metodické poznámky

- [1] Všechny zásobní roztoky k přípravě kultivačního média lze dlouhodobě skladovat v tmavých skleněných zásobních lahvích v lednici.
- [2] Půdní extrakt lze dlouhodobě uskladňovat v mrazicím boxu. Vhodné je rozdělit roztok po 10 ml do zkumavek a v této podobě zamrazit pro pozdější použití.
- [3] Stejně jako půdní extrakt i roztok vitamínů lze dlouhodobě uchovávat zamrazený po malých dávkách (např. v 2 ml plastových zkumavkách).
- [4] Velikost kultivačních baněk je potřebné volit podle zamýšleného účelu (dlouhodobá či krátkodobá kultivace). Pro dlouhodobější kultivaci je vhodné zvolit větší nádobu, ve které bude mít kultivovaný druh po delší dobu dostatečné množství dostupných živin.
- [5] Není-li škola vybavena autoklávem, je možno sterilizaci nástrojů a kultivačních médií provést v běžném tlakovém hrnci. Horkovzdušnou troubu je taktéž možné využít ke sterilizaci kovových a skleněných nástrojů (Zikánová & Koukol 2006) po dobu min. 1 hod. při 160 °C (Hlaváčková 2008). Při sterilizaci pomocí tlakového hrnce je potřeba přizpůsobit velikost Erlenmayerových baněk velikosti tlakového hrnce.
- [6] K uskladnění kultivačních roztoků, zásobních roztoků a nádob s kultivovanými organismy není vhodné využívat chladničku s potravinami. Mohlo by dojít ke kontaminaci roztoků plísněmi.
- [7] Příklady kmenů vhodných ke kultivaci v BBM mediu (a jeho modifikacích 2N či 3N BBM):

Chlorophyceae: *Pediastrum*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Acutodesmus*, *Kirchneriella*, *Ankistrodesmus*, *Chlamydomonas*.

Zygnematophyceae: *Actinotaenium*, *Cosmarium*, *Closterium*, *Micrasterias*, *Staurostrum*, *Desmidium*, *Bambusina*, *Zygnema*, *Mougeotia*, *Spirogyra*.

Cyanobacteria: *Nostoc*, *Dolichospermum* (= *Anabaena*), *Phormidium*, *Oscillatoria*.

[8] V ČR existují sbírky kultur řas a sinic (CAUP – Sběrka kultur řas katedry botaniky PřF UK, CCALA – Sběrka kultur autotrofních organismů v Třeboni), ve kterých lze zakoupit kmeny sinic a řas. Tyto je možno dle výše popsaných instrukcí (přeočkováním) dále udržovat v kultuře bez potřeby izolace vlastních kmenů.

Závěr

Článek přináší doporučení a návod, jak z dlouhodobého hlediska zpřístupnit sladkovodní kmeny sinic a řas pro potřeby výuky algologie na základních a středních školách, a to bez ohledu na roční období. Bohužel nikoliv všechny organismy využitelné pro výuku na školách jsou bez obtíží kultivovatelné a dlouhodobě udržitelné v laboratorních podmínkách. Takové organismy bývají citlivé na změny teploty, pH, množství živin a může se u nich projevovat fenotypová plasticita. Jiné skupiny řas, např. rozsivky, je vhodné prezentovat žákům z trvalých preparátů po odstranění živého protoplastu, aby byly bez obtíží pozorovatelné rodově specifické znaky. Postupy izolace monospecifických kultur tak, jak jsou uvedeny v předchozím textu, jsou využitelné také jako obměna tradiční náplně dvouhodinových laboratorních cvičení, a to zejména na středních školách. Studenti se tak mohou seznámit s tradičními vědeckými metodami zpracování přírodních vzorků a izolace mikroorganismů.

Literatura

- ANDERSEN, R. A. (ed.) 2005. *Algal culturing techniques*. Academic Press, San Diego. 578 s.
- BARBER, M. A. 1914. The pipette method in the isolation of single microorganisms and in the inoculation of substances into living cells. *The Philippine Journal of Science* 9(4): 307–360.
- BISCHOFF, H. W. & BOLD, H. C. 1963. *Phycological Studies V: Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species*. University of Texas Publications, Michigan. 95 s.
- BUČKOVÁ, M. 2013. *Fenotypová plasticita zelené řasy *Desmodesmus communis* vyvolaná změnami pH, teploty a množstvím živin v prostředí*. MS, Diplomová práce, Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň. 89 s.

DOBRÁ, L. 2013. *Fenotypová plasticita *Desmodesmus communis* vyvolaná vlivem turbulencí a přítomností predátorů v prostředí*. MS, Diplomová práce, Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň. 70 s.

HLAVÁČKOVÁ, M. 2008. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie se zaměřením na mediální a environmentální výchovu na SŠ*. MS, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha. 119 s.

KŘÍSA, B. & PRÁŠIL, K. 1989. *Sběr, preparace a konzervace rostlinného materiálu*. SPN, PRAHA. 229 s.

PADISÁK, J., SORÓCZKI-PINTER, E. & REZNER, S. 2003. Sinking properties of some phytoplankton shapes and the relation of form resistance to morphological diversity of plankton – an experimental study. *Hydrobiologia* 500: 243–257.

SAMEK, D. 2013. *Vliv způsobu kultivace a dezintegrace řasové biomasy na obsah a výtěžnost nutričních faktorů*. MS, Disertační práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín. 126 s.

1982. Sammlung von Algenkulturen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 95 (1): 181–276.

ZIKÁNOVÁ, B. & KOUKOL, O. 2006. Inhibiční účinek látek v zubní pastě. *Biologie, chemie, zeměpis* 15 (2): 70–73.

Summary – Isolation and cultivation methods of Cyanobacteria and Algae for education in primary and secondary schools

Cyanobacteria and algae are groups of organisms which are still neglected in education on primary and secondary schools. This paper presents possibilities how the teacher can ensure algal or cyanobacterial strains for practical education during cold period of the year.

For decades, methods of isolation and cultivation are well-known in science. Unfortunately in education those are still missing. The real barrier in the usage of these methods could be an absence of some important appliances (e. g. autoclave) necessary for sterilization. The paper proposes some alternatives usable in school conditions. The study presents some freshwater species represented mostly by chlorococcal green algae suitable for cultivation.

The strain isolation and cultivation of microorganisms are methods also exploitable in practical activities especially in secondary school.

Fig. 1. Culture growth curve (1 – lag phase, 2 – exponential growth phase, 3 – stationary phase, 4 – death (decline) phase)

Fig. 2. Preparation of a micropipette from a glass tube

Fig. 3. Steps of isolation and rinse of an algal cell in a serie of sterille medium droplets (a – cell isolation from a field sample using a glass micropipette, b – rinse of the cell in a serie of medium droplets)

Fig. 4. Sequential elimination of contaminants using cell transport through the serie of medium droplets