

Metody sběru a výzkumu sinic a řas

- živý výchozí materiál (u bezblanných bičíkovců a jednobuněčných řas nezbytný)
- ideální je převedení do kultury (další fyziologický a ekologický výzkum)
- fixovaný materiál v některých případech lepší (rozsivky)

Sběr v přírodě

Nárosty seškrabujeme lžící nebo použijeme pinzetu (větší vláknité řasy), osvědčilo se i setření houbičkou na nádobí a její vymačkání do vody. Z rostlin odebíráme je část s nárostem do lahviček naplněných cca do $\frac{1}{4}$ vodou.

Planktonní řasy se odebírají planktonní sítí (velikost ok cca 50 μm) nebo filtrují přes fosforbronzové sítě. Menší organizmy, které projdou sítí zjišťujeme sedimentací.

Zahuštění fytoplanktonu

- centrifugace – centrifugační zkumavky zakončené do kuželu, mohou být poškozeny některé citlivé organizmy (např. zlativky), některé špatně sedimentují (např. sinice s aerotopy). Zjišťování biomasy je nepřesné.
- ultrafiltrační zařízení dle Marvana - využívají se speciální filtry o porozitě 0,8-0,9 μm , vhodnější pro citlivější organizmy, přesnější zjištění biomasy

Barvení preparátů

Vitální barviva k rozlišení některých organel (neutrální červeň, brilantkresylová modř, toluidinová modř, methylenová modř, chrysoidin aj. v koncentracích 1:1.10⁵ až 1:5.10³).

Gentiánová violet' barví sliz i bakterie v něm žijící, čínská tuš je nejspolehlivější barvivo na sliz (ukáže i nepatrná množství slizu).

Hematoxylin dle Heidenhaina s doplňkem oranže G v hřebíčkovém oleji – cytologické výzkumy, dobré i kyselý fuchsin S dle Altmanna, safranin se světlou zelení a různými anilinovými barvivy (alizarin, viridin).

Fixace řas

Formaldehyd (4%) – univerzální fixáž, rychle usmrcuje a dobře zachovává tvar protoplastu. K dlouhodobé konzervaci se používá směs 6 dílů vody, 3 díly ethylalkoholu, 1 díl formaldehydu a 0,5 až 1 díl glycerolu. Při odpaření vody a lihu zůstanou řasy v glycerolu.

Kyselina osmičelá (0,1% roztok) – nejlepší fixační prostředek, vyjasňuje tvary buněčných organel

Lugolův roztok (1% roztok KI ve vodě + stejné množství krystalického jódu) – vhodné pro diagnostické účely a zachování bičíků. Barví škrob, chromatofory i plazmu. Jod vyprchává fixáž se musí obnovovat cca po 3-6 měsících. K určení malých množství škrobu je vhodnější použít krystalický jod v roztoku chloralhydrátu.

KOH (4% roztok) – k rozpuštění paramylonových zrn v případě kdy zakrývají další buněčné organely

Johansenova fixáž (2g KI, 1g jodu, 4 ml ledové kyseliny octové, 24 ml 40% formaldehydu, 400 ml destilované vody) – pro fixaci bičíkovců, po fixaci se objekty promývají 10, 20, 30-70% alkoholem v němž potom zůstávají.

Culactol (směs CuCl_2 0,2 g v 50 g H_2O a octan měďnatý 0,2 g v 45 g H_2O , po rozpuštění se přidá 5g laktofenolu. Laktofenol se připraví z 20 g krystalického fenolu, 20g kyseliny mléčné, 40g glycerolu a 20g H_2O . Vhodné uzavírací médium, ne pro sinice.

Glycerol – nejjednodušší uzavírací médium, preparáty dlouho vydrží, nutné orámovat, řasy musí být nejdříve odvodněny (do řídkého glycerolu a počkat na odpaření vody)

Navašinoва fixáž (10 ml 1% roztoku CrO_3 , 1 ml 40% formaldehydu a 1 ml ledové kyseliny octové) – pro získání celkového cytologického obrazu buňky (uložení organel). Pro fixaci jemných řas ředit.

Nigrosin (5% roztok) – podrobnosti povrchové struktury řas

Křemičité schránky – čisté vzorky stačí žíhat, znečištěnější vařit s kyselinou dusičnou a sírovou. Vhodný postup je použití peroxidu vodíku, následná centrifugace a zalití do světlolomného média (hyrax, pleurax, naphrax).

Kultivace

Příznivý růst kultury zajistí médium s dobrou vodou (bez mědi, chloru, toxických látek apod.) dobrý zdroj uhlíku, biogenů, stopových prvků a růstových látek. Některé řasy se nedaří kultivovat (velké sladkovodní rozsivky, řasy proudících vod). Důležitý je vitamin B_{12} , který zvláště bičíkovci neumí syntetizovat.

Čisté kultury (monospecifické, axenické) vyžadují nádoby s úzkým hrdlem (erlenmayerovy baňky aj.) uzavřené vatovým nebo kovovým uzávěrem. Velmi problematické udržet čistotu.

Synxenicke, nesterilní kultury běžnější, k nahromadění kultury řas je vhodné použít převařenou vodu s naleziště obohacenou živinami a upraveným stejným pH.

Řasy se pěstují nejčastěji v tekutých médiích nebo s přidáním 1,5% agaru.

A41 (modifikovaný Knoppův roztok) KNO_3 0,1g, K_2HPO_4 0,01g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,001g, výtazek z půdy, destilovaná voda 1000ml

BB (dle Bristolové v modifikace dle Bolda)

zásobní roztok A: dávkování -10 ml do 1000 ml H_2O

Příprava: do 1000 ml H_2O : NaNO_3 25 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,5 g, K_2HPO_4 7,5 g, KH_2PO_4 17,5 g, NaCl 2,5 g

zásobní roztok B: dávkování - 1 ml do 1000 ml H_2O

Příprava: do 1000 ml H_2O : EDTA - Na (Chelaton III) 5 g, KOH 3,1 g

zásobní roztok C: dávkování - 1 ml do 1000 ml H_2O

Příprava: do 1000 ml H_2O : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,498 g, H_2SO_4 0,1 ml

zásobní roztok D: dávkování - 1 ml do 1000 ml H_2O

Příprava: do 1000 ml H_2O : H_3BO_3 1,142 g

zásobní roztok E: dávkování - 1 ml do 1000 ml H_2O

Příprava: do 100 ml H_2O : $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,882 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,144 g, MoO_3 0,071 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,242 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,157 g, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,049 g

Medium Z (dle Zehndera)

V 1000 ml destilované H_2O : NaNO_3 467 mg, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 59 mg, K_2HPO_4 31 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 mg, Na_2CO_3 21 mg, Fe-EDTA roztok 10 ml, mikroelementy (dle GAFFRONA) 0,08 ml

Fe-EDTA zásobní roztok: Do 500 ml destilované H_2O : 5 ml 0,1 N roztoku $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ v 0,1 N HCl , 5 ml 0,1 N roztoku Na_2EDTA

GAFFRONOVY mikroelementy:

Do 100 ml destilované H_2O : H_3BO_3 310 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 223 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,3 mg, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8,8 mg, KBr 11,9 mg, KI 8,3 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 28,7 mg, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 15,4 mg, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 14,6 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 12,5 mg, $\text{NiSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 19,8 mg, $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,7 mg, $\text{V}_2\text{O}_4(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$ 3,5 mg, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ 47,4 mg

Pokud by byly nedostupné některé z chemikálií GAFFRONOVÝCH mikroelementů, lze je nahradit tzv. půdním výluhem (extraktem).

Půdní extrakt: 1 díl zahradní půdy nebo listovky (nebo dle lokality rašeliny) a 1 díl destilované vody vaříme 1 hodinu, druhý den opět 1 hodinu a necháme vychladnout. Oddělíme extrakt dekantací a filtrací. Rozdělíme do malých nádobek, autoklávujeme 20 minut při 1 atmosféře; uchováváme v ledniče.

Některé druhy vyžadují speciální živný roztok. Jedná se např. o **Euglena medium** pro kultivaci krásnooček: Na - acetate 10 ml 10% zás. roztoku, hovězí výluh 10 ml 10% zás. roztoku, Bacto – trypton 20 ml 10% zás. roztoku, kvasničný extrakt 20 ml 10% zás. roztoku, destilovaná H₂O 940 ml.

Vláknité řasy (Ulothrix, Cladophora) rostou lépe při použití **Gorhamova roztoku**

Do 1000 ml dest. H₂O: Na NO₃ 160 mg, K₂HPO₄ 17,5 mg, TRIS 200 mg, MgSO₄ · 7H₂O 153,6 mg, Ca Cl₂ 23 mg, Na₂SiO₃ 11,63 mg, Na₂CO₃ 20 mg, Fe³⁺-citrate 3 mg, Citrid acid 3 mg, Na₂ - EDTA 6 mg, CuSO₄ · 5H₂O 0,0156 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 0,0392 mg, CoCl₂ 0,0183 mg, MnCl₂ · 4H₂O 0,283 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0,00705 mg, půdní extrakt 2 ml.

Na agaru nabývají řasy často odlišných forem od podoby ve vodním prostředí. Při čištění kultur vypichujeme řasy na agaru, u bičíkovců využíváme pozitivní fototaxe, využíváme zygot a trvalých spor. Kultury se uchovávají při pokojové teplotě na světlém místě u okna, ale ne na přímém slunci.