

Mikroskopická identifikace gramnegativních bakterií - cyanobakterií

Cíl, teorie

- a) seznámit se gramnegativními bakteriemi - cyanobakteriemi
- b) U vybraných kultur (ze sbírky z PŘF UK) bez znalosti kultur, proveďte identifikaci a zařazení, určít tvar, velikost buněk a barvu sinic
- c) Proveďte vlastní odběr z přírodního prostředí zkuste identifikovat a taxonomicky zařadit cyanobakterie, určít tvar, velikost buněk a barvu sinic

Cyanobakterie/sinice

Sinice tvoří jedinečnou skupinu gramnegativních bakterií – autotrofní prokaryotní organismy schopné fotosyntézy. DNA je v buňkách sinic uložena volně v cytoplazmě, ribozómy 70S, zásobní látky – sinicový škrob, volutin, někteří zástupci mají plynové měchýřky (tzv. aerotypy). Hlavní fotosyntetický pigment - chlorofyl *a* – thylakoidy – fotosyntéza s PS I a PS II. PS II – fotolýza vody – uvolňuje se kyslík – oxygenní fotosyntéza. Vznik kyslíkové atmosféry na Zemi. Fykobilizomy – světlosběrné antény. Některé schopnost fixace vzdušného dusíku – heterocyty (ne heterocysty!). Produkce sekundárních metabolitů – cyanotoxinů. Toxičtější než kurare! Sinice obsahují **fotosyntetické pigmenty** (chlorofyl *a*, modré fykocyaniny a červené fykoerythrin, souborně nazývané fykobiliny a karotenoidy). Jejich vzájemný poměr je závislý na osvětlení a výživě a určuje výsledné zbarvení, které přechází širokou škálou odstínů od olivově zelené, přes šedomodrou, červenofialovou, temně zelenomodrou až po černou barvu. Sinice mohou mít buňky či kolonie buněk obklopené slizem, pohyb. Sinice obsahují silné toxiny, **cyanotoxiny** (např. mikrocystiny), které na člověka působí alergeně, neurotoxicky a hepatotoxicky. Sinice jsou velmi dobře pozorovatelné pomocí optické mikroskopie. U některých druhů sinic najdeme specializované buňky **heterocyty** – tlustostěnné buňky, které slouží k fixaci vzdušného dusíku. Dalším odlišným typem velkých „buněk“ jsou **akinetety** – vznik z jedné nebo více vegetativních buněk, větší než heterocyty. Akinety slouží k přežití v nepříznivých podmínkách, přes zimu. Výskyt – jen u některých druhů sinic. Speciálním typem vlákn se dá označit tzv. **hormogonium**, mn.č. hormogonie jedná se o pohyblivá slizem spojená vlákna z buněk, které vytváří některé sinice z čeledi Nostocaceae, kterými se mohou množit. Jako vodní květ označujeme nápadné zelené zbarvení vod, způsobené přemnožením mikroorganismů ve vodě, zejména se jedná o sinice. Nejčastěji se vyskytuje koncem léta v srpnu a září, ale díky současným klimatickým změnám je možné se s ním setkat již od června. Hlavní zástupci sinic ve vodním květu jsou rody ***Microcystis*, *Aphanizomenon* a *Anabaena***. Vodní květ je spojený s tzv. **eutrofizací vod**, procesem obohacování vod o živiny, především dusík a fosfor.

Materiál, laboratorní sklo a plast, použité přístroje a další:

kultury cyanobakterií, odběry vzorků z přírodního prostředí, pipety, mikroskopická sklíčka, preparační soupravy, destilovaná voda, minicentrifuga, eppendorf zkumavky, optický mikroskop, software na snímání mikrofotografií QuickPHOTO a cellSens .

Vlastní pracovní postup

- a) Z předložených kultur (alespoň 5 sbírkových kultur) ze sbírky (bez znalosti konkrétní kultury) připravíme mikroskopické preparáty, provedeme nasnímání mikrofotografií. U jednotlivých preparátů provedeme návrh taxonomického zařazení podle charakteristických znaků.
- b) Z vlastních vzorků z přírodních zdrojů (bez znalosti konkrétní kultury) připravíme mikroskopické preparáty, ve kterých najdeme alespoň (5 druhů sinic). Pokud nebudeme úspěšní a ve vlastních vzorcích nenajdeme sinice, dostaneme vzorky z přírodních míst se sinicemi.
- c) Provedeme přípravu vitálních preparátů a provedeme výběr a nasnímání vybraných zorných polí. U jednotlivých druhů sinic provedeme návrh taxonomického zařazení podle charakteristických znaků.
- d) Pomocí minicentrifugy a centrifugace můžeme provést přípravu vzorků ze sedimentu.
- e) Pomocí softwaru provedeme proměření velikostí buněk v preparátech a porovnáme jednotlivé druhy.
- f) Všechny údaje zaznamenáme do protokolu formou tabulky.

Číslo vzorku	Určení cyanobakterie	Typ stélky (kokální/vláknitá)	Barva stélky	Velikost buněk [μm]

Získané výsledky a vyhodnocení

Do protokolu, do tabulky, popíšeme, jaké druhy a rody cyanobakterií jsme získali a pozorovali, jaký tvar, barvu mají kultury sinic, jakou velikost buněk jsme u jednotlivých cyanobakterií naměřili. Popíšeme postup vlastní identifikace cyanobakterií, podle jakého klíče jsme určovali.

Diskuse a závěr

Zjistíme, jak proběhla identifikace cyanobakterií u dalších studentů ve skupině, provedeme diskusi a popíšeme závěr.