

Gradients – základní charakter prostředí a možnosti jejich modelování v laboratoři

Gradients – basic character of the environment and the possibilities of their simulation in the laboratory

Jana K v í d e r o v á & Jaromír L u k a v s k ý

Botanický ústav AVČR, Dukelská 135, 379 82 Třeboň

Abstract

In nature, organisms grow in gradients of different conditions. For biochemical, physiological and ultrastructural studies it is necessary to cultivate the organisms in strictly defined conditions. Cultivations in liquid media or on solid ones allow modelling of gradient of only one condition, usually concentration of a nutrient or a toxic chemical. Cultivation in crossed gradients of temperature and light provides various combinations of different values of temperatures and irradiances. A new unit for crossed gradients is commercially available and its properties are characterised here.

1. Gradients v přírodě

Přírozené prostředí výskytu daného organismu nebo společenstva je možné popsat pomocí vnějších podmínek, které na organismus působí. Mezi abiotické podmínky se řadí teplota, ozáření, dostupnost vody, pH, salinita nebo minerální živiny. Mezi biotické podmínky patří např. látky inhibující růst jiných organismů nebo pro komunikaci mezi nimi. Hodnota dané podmínky se postupně mění, změna může probíhat v prostoru i čase. Pro vyšší rostliny je přímo charakteristické, že jejich areály pokrývají nehomogenní či gradientovaný substrát (ODUM 1977). Pro průběh gradientu teploty a ozáření ve vodním prostředí byly vypracovány matematické modely (STRAŠKRABA & GNAUCK 1987). Organismus žije v určitém rozmezí, které nemusí zahrnovat všechny možné hodnoty. Výskyt, nebo jiná charakteristika organismu, např. růstová rychlost, je popsána křivkou, kterou uvádějí např. PEARY & CASTENHOLTZ (1964). Organismus však může do určité míry vliv gradientu kompenzovat. Kompenzace se může geneticky fixovat, potom se hovoří se o adaptaci, pokud nevychází z genomu, jedná se o aklimatizaci (ELSTER 1999).

2. Gradienty v laboratoři

Řasy mění svoji morfologii v závislosti na vnějších podmínkách. Pro podrobnější biochemické, fyziologické a strukturní analýzy je nutné pěstovat řasy v přesně definovaných podmínkách. Nelze samozřejmě sledovat všechny podmínky. I když se zaměříme na sledování určité podmínky, nemusí to být podmínka nejdůležitější. U řas se nejčastěji sleduje vliv teploty, ozáření a koncentrace živin.

Kapalná média

Při klasických kultivacích v kultivačních aparaturách o objemech 100-5000 ml je možné nastavit pouze jednu hodnotu teploty nebo ozáření (LUKAVSKÝ 1982b). Pro sledování více hodnot by bylo třeba mít více aparatur, kultivace by byla náročná na prostor a čas. Při menším počtu aparatur by se pokus protáhl na měsíce. Výhodou je získání velkého množství materiálu pro biochemické analýzy. Kultivace v kapalných médiích se proto používá pro studium vlivu chemických látek, kdy se řasa pěstuje v koncentrační řadě v živném médiu. Ve velkých objemech, cca 200 ml, vzrůstá spotřeba dané látky a pokus se výrazně prodražuje, jsou však nezbytné pro přesnější popis účinků dané látky. Jde-li jen pro určení inhibičního nebo stimulačního vlivu, např. v biotestech, postačí kultivace v sérologických destičkách. Sníží se tak spotřeba látky, plnění destiček i odčítání hodnot optické hustoty (značí se OD z anglického „optical density“) při 750 nm je navíc možné automatizovat. Kapalná rozředovací řady používali Pasteur a Lister pro izolace mikroorganismů (GILMAN 1953). V kapalných půdách lze selektovat mutantní typy v turbidostatickém selektoru podle BRYSON & SZYBASKI (1952), kde mutanta postupně přerůstá a vytlačuje původní typ.

Pevné půdy

Kultivace na pevných médiích v Petriho miskách je poměrně stará mikrobiologická metoda. Za první použití pevné půdy lze považovat kultivaci bakterií na plátku vařené brambory praktikované koncem 19. století Kochem. Na pevných půdách byly nejprve pěstovány bakterie a houby, později sinice a řasy. Pro zpevnění média byla používána nejdříve želatina. Ta byla později nahrazena agarem, který není rozkládán bakteriemi. Mimo agar byl použit pro zpevnění média i polyakrylamidový gel pro bakteriální kultury (TIESLER & SEAH 1973) nebo gel kyseliny křemičité pro kultury *Nitrosomonas* a *Nitrobacter*, který poprvé úspěšně použil Winogradsky roku 1891 (také ROSLICKY 1972). Dalšími materiály pro kultivace mikroorganismů na pevném povrchu mohou být amorfni diatomit, vernikulit, blok sádry, zeleninové klíny, kusy dřeva, chemické složení však nelze přesně určit (CONDER 1969). Půdmi

řasy mohou být pěstovány na vlhkém filtračním papíru položeném na agarovém médiu (PEDENSON & SHUBERT 1992). V agarovém médiu lze dosáhnout lineárního gradientu koncentrace sledované látky nalitím šikmé vrstvy média bez látky a převrstvením druhým klínem média s gradientovanou látkou (BRYSON & SZYBASKI 1952).

Pokud použijeme k inokulaci dostatečně řídké médium, získáme kolonii-klon, která je ideální pro studium variability uvnitř populace nebo izolaci klonů (NEČAS 1977). Obří kolonie jsou očkovány tak, že tenký platinový drátek (o průměru 0,5 mm) je ponořen do husté suspenze a buňky jsou přeneseny na agar lehkým dotekem (LUKAVSKÝ 1975). Přenese se řádově tisíce-desetitisíce buněk. Očkování obřích kolonií je možné automatizovat (MASSEY & MATTONI 1965).

Pro kultivaci kolonií není potřeba zvláštní zařízení, pokud nemá studovaný organismus speciální nároky. Organismy vyžadující vyšší teploty jsou pěstovány v termostatu. Pro řasy stačí mělká dvojitá vana překrytá plexisklem, kterou je možné připojit k termostatu a vyhřívat či chladit vodou. Během kultivace bez ohřevu či chlazení se teplota sama ustálí mezi 25 a 30 °C. Použije-li se zářivkový koberec, je osvětlení homogenní. Gradientu osvětlení dosáhneme buď nerovnoměrným osvětlením, nebo postupným zastíněním homogenně osvětleného kultivačního prostoru.

Hlavním kritériem růstu je prostorový růst kolonie, který je dán výslednicí sil působících na buňky. Kolonie-klony mají po dlouhou dobu tvar rotačního paraboloidu, nezávisle na druhu organismu, liší se jen poměrem mezi průměrem a výškou. Tento tvar si uchovávají až do průměru 3 mm, poté se růst zastavuje, nebo probíhá jen po obvodu, růstová zóna je široká 0,09 mm (PIRT 1967). Limitní výška kolonií je dána difusí živin, pohybuje se kolem 0,7 mm. Staré kolonie by měly mít tvar disků, platí to však pouze pro obří kolonie, které brzy dosáhnou limitní výšky.

Růst se hodnotí podle změn v průměru kolonie buď pod mikroskopem, nebo pomocí analýzy obrazu. Pro objektivní hodnocení růstu je nutné vyloučit kompetiční vliv sousedících kolonií. Limitace CO₂ je odstraněna jeho dodáváním, kompetice probíhá jen o živiny v médiu. Pro nezávislý růst je třeba, aby do vzdálenosti 15 mm pro anorganické a 25 mm pro organické médium nebyla žádná kolonie (LUKAVSKÝ 1975).

Pomocí pěstování kolonií se sledují nejen účinky chemických látek, ale i mezibuněčné komunikace, a to i u organismů, které jsme dosud považovali za téměř výlučně jednobuněčné, - u bakterií a kvasinek (KUTHAN & PALKOVÁ 2000). Pomocí kultivace na pevných půdách byla měřena závislost rychlosti pohybu rodu *Oscillatoria* na teplotě a viskozitě prostředí (HALFEN & CASTENHOLTZ 1971) a závislost jejího shlukování na teplotě (CASTENHOLTZ 1967). Klasickým příkladem využití kultivací na pevných půdách v koncentračním gradientu je selekce a izolace mutantních či resistantních typů bakterií na antibiotika nebo pro studium fotosyntetických procesů u sinic a řas pomocí rozdílů ve fluorescenci kolonií (GARNIER 1970). Kultivace na pevných

médiích byla také využita k izolaci klonů pro studium závislosti růstu *Selenastrum capricornutum* na koncentraci mědi v médiu (BENJAMIN & KLAINE 1995).

Zkřížené gradienty

Doposud se hovořilo jen o sledování gradientu jen jedné podmínky. V přírodě se však vyskytují kombinace jednotlivých podmínek. Připravovat jednotlivé varianty kombinací je časově neúnosné, proto byla vyvinuta zařízení pro zkřížené gradienty teploty a světla, která umožňují získat velké množství kombinací. Popis zařízení byl poprvé publikován v práci HALLDAL & FRENCH (1958). Princip dále použili YARISH (1976), YARISH et al. (1979), LUKAVSKÝ (1982a) nebo ALBERTANO et al. (1993). Zařízení bylo použito i pro sledování vlivu teploty a světla na růst sinic a řas, klíčení semen i migraci hmyzu.

V naší laboratoři bylo původní zařízení postupně vylepšováno. Dnes používáme verzi, kterou vyrobilo Labio, Praha (obr. 1). Zařízení se skládá ze dvou navzájem nezávislých systémů. Jeden řídí teplotu – teplotní systém, a druhý ozáření – osvětlovací systém.

Základem teplotního systému je hliníková deska o rozměrech 80x60x4 cm. Ohřívání je pomocí elektrické topné spirály, chlazení probíhá expanzí stlačených plynů přímo do termoregulačního kanálu. Chladicí a ohřívací kanály jsou na protilehlých stranách desky. Chlazení probíhá kontinuálně, přesné řízení teploty zajišťuje pulsní ohřívání na obou stranách. Výsledkem je přesný a stabilní teplotní gradient (obr. 2). Linearita gradientu při různých nastaveních teplot je charakterizována $r=0,995$ pro teploty vyšší jak 10 °C, pro nižší teploty je $r=0,944$ (obr. 3). Nejnižší teplota, která byla naměřena na desce, byla -4,5 °C, nejvyšší +45 °C. Pokud jsme nastavili chlazení i ohřívání na stejnou teplotu, byl rozdíl nejvyšší a nejnižší teploty 4,2 °C.

Osvětlovací systém tvoří 3 silné sodíkové výbojky NAV TS400 Osram. Osvětlovací systém je umístěn na držácích umožňující změnu výšky výbojek nad deskou, kolmo na gradient teploty. Gradient světla ukazují grafy na obr. 4, v prvním případě byla výška výbojek nad povrchem 18 cm, v druhém 45 cm. Zatímco v prvním případě je závislost ozáření kvadratická/exponenciální, v druhém je lineární (obr. 5). Hladkost gradientu je charakterizována $r=0,963$. Gradient může být ještě strmější, když použijeme pásový filtr z průsvitného papíru (obr. 6). Dosáhneme tak ozáření v rozmezí 40 - 1400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (10 - 250 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$). Nevýhodou je ohřev povrchu desky, rozdíly mezi maximálním a minimálním osvětlením byl 2 °C. Výbojky je možné nahradit jiným zdrojem světla, např. zářivkovými trubicemi nebo řadou žárovek, výhodnější jsou však lineární zdroje.

Kultivace řas probíhá na hliníkové desce. Řasy mohou být kultivovány v kapalném i na pevném médiu, v Petriho miskách i sérologických destičkách. Pro lepší převod tepla mezi deskou a miskou nebo destičkou je deska pokryta

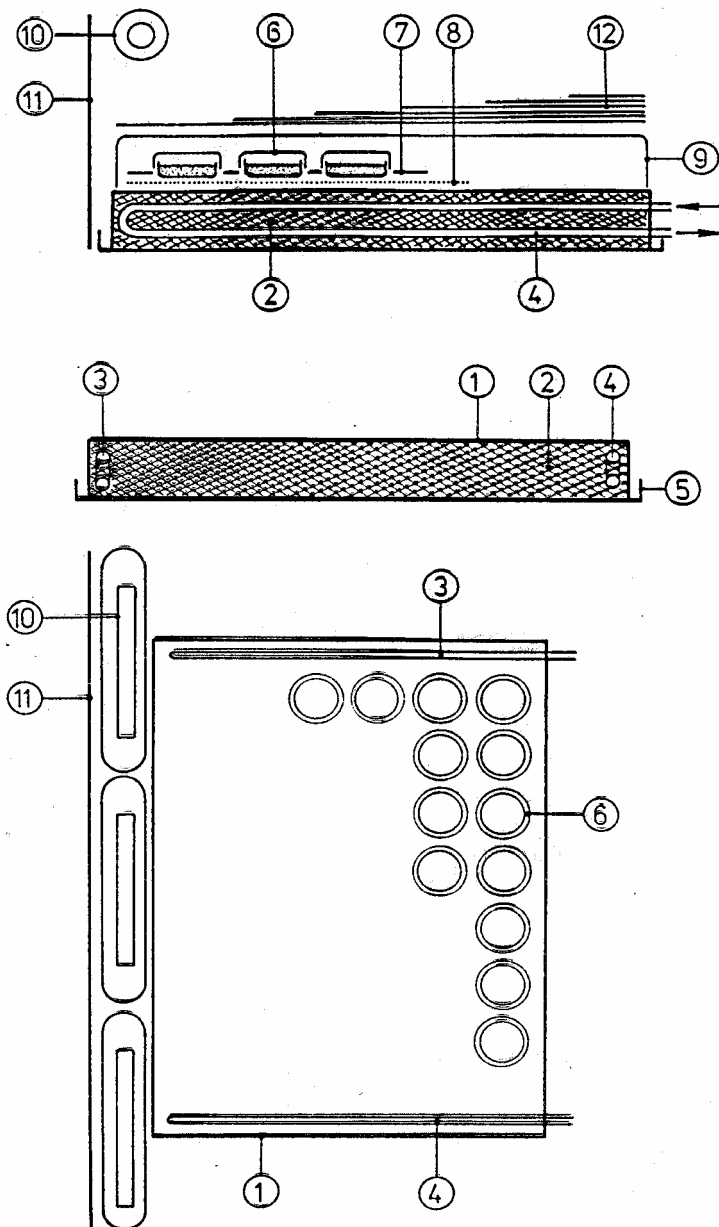
gázou nasycenou vodou. U Petriho misek s kapalným i pevným médiem je převod tepla dobrý, rozdíl teplot mezi deskou a povrchem agaru nepřesahuje pro vrstvu agaru 4 mm při maximálním osvětlení 2,5 °C, při minimálním se teplota nelišila. U sérologických destiček byl rozdíl mezi teplotou na povrchu kapalného média a povrchem desky 3 °C, i když deska nebyla osvětlena. Při maximálním osvětlení rozdíl dosáhl 5 °C, při minimálním 2 °C. Během kultivace jsou Petriho misky či sérologické destičky překryty víkem z plexiskla, aby se zabránilo vysychání agaru nebo výparu kapalného média. Víko také umožňuje sytit kultivační prostor CO₂ (2% objemová).

Při kultivacích na pevných médiích můžeme ke zkříženým gradientům teploty a světla přidat třetí gradient - koncentraci živin nebo toxických látek v misce. Dalším rozměrem je čas, pro jednotlivé kolonie i jamky můžeme proměřovat individuální růstové křivky. Tím se počet sledovaných variant a kombinací zvyšuje na stovky, což je v ekologii jistě vítané.

Literatura

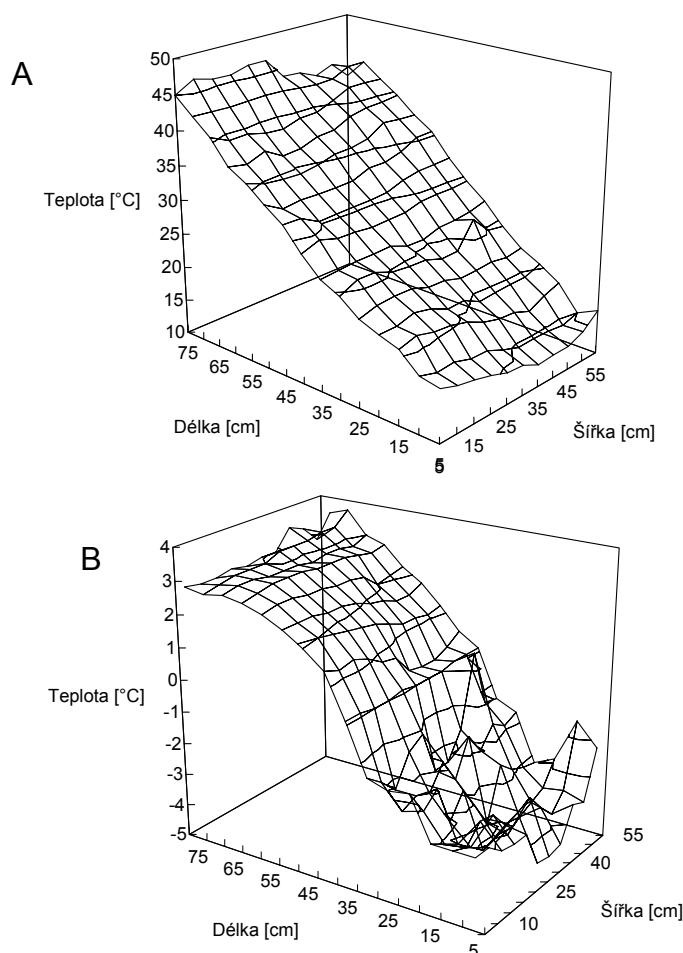
- ALBERTANO, P.; KOVÁČIK, L. & GARDAVSKÝ, A. (1994): Cross-gradient cultures of filamentous cyanophytes. - *Giorn. Bot. Ital.* 127: 855-856.
- BENJAMIN, R.B. & KLAINE, S.J. (1995): Fitness trade-offs of *Selenastrum capricornutum* strains selected for rapid growth on copper-spiked solidified nutrient medium. - *Environmental Toxicology and Chemistry* 14 (10): 1789-1798.
- BRYSON, V. & SZYBALDKI, W. (1952): Microbial selection II. - *Science* 116: 45-51.
- CASTENHOLTZ, R.W. (1967): Aggregation in a thermophilic *Oscillatoria*. - *Nature* 215: 1285-1286.
- CONDER, R.C. (1969): Solid and solidified growth media in microbiology. - In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W. (eds.): *Methods in microbiology* 1: 427-454. Acad. Press, London.
- ELSTER, J. (1999): Algal versatility in various extreme environments. - In: SECKBACH, J. (ed.): *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London. 215-227.
- GARNIER, J. (1970): Screening and selection of unicellular green algae mutants for the study of the photosynthetic mechanism. - *Proc. IBP/PP Technical Meeting, Třeboň 14-21 Sept. 1969, Wageningen*, 543-549.
- GILMAN, J.C. (1953): The pure culture in taxonomy. - *Mycologia* 45 (1): 1-6.
- HALLDAL, P. & FRENCH, C.S. (1958): Algal growth in crossed gradients of light intensity and temperature. - *Physiol. Plantarum* 11: 401-420.
- HALFEN, L.N. & CASTENHOLTZ, R.W. (1971): Gliding motility in the blue-green alga *Oscillatoria princeps*. - *Journal of Phycology* 7 (2): 133-145.
- KUTHAN, M. & PALKOVÁ, Z. (2000): Úspěch spočívá v komunikaci. - *Živa* 84 (1): 5-8.
- LUKAVSKÝ, J. (1974): Controlled cultivation of algae on agar plates. - *Arch. Hydrobiol./Suppl.* 46, *Algological Studies* 10: 90-104.
- LUKAVSKÝ, J. (1975): Analysis of growth rates of algae by cultivation on solid media. - *Arch. Hydrobiol./Suppl.* 49, *Algological Studies* 14: 105-136.
- LUKAVSKÝ, J. (1982a): Cultivation of chlorococcal algae in crossed gradients of temperature and light. - *Arch. Hydrobiol./Suppl.* 60,4, *Algological Studies* 29: 517-528.
- LUKAVSKÝ, J. (1982b): Building block equipment for laboratory cultivation of algae. - *Arch. Hydrobiol./Suppl.* 63, *Algol. Stud.* 31: 221-231.

- MASSEY, R.L. & MATTONI, R.H.T. (1965): New technique for mass assays of physiological characteristic of unicellular algae. *Appl. Microbiol.* 13: 798-800.
- NEČAS, J. (1977): Mutační změny na koloniích řas rostoucích na zpevněných médiích. - *Biologické listy* 42 (3): 197-215.
- ODUM, E.P. (1977): *Základy ekologie*. - Academia, Praha. pp 736.
- PEARY, J.A. & CASTENHOLTZ, R.W. (1964): Temperature strains of a thermophilic blue-green alga. - *Nature* 202: 720-721.
- PEDENSON, C.L. & SHUBERT, L.E. (1992): Use of membrane filters for soil algal bioassays. - *Journal of Applied Phycology* 4: 49-56.
- PIRT, S.J. (1967): A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi. - *J. Gen. Microbiol.* 47: 181-197.
- ROSLICKY, E.B. (1972): Reliable procedure for silica gel preparation. - *Appl. Microbiol.* 24: 844-845.
- STRAŠKRABA, M. & GNAUCK (1987): *Freshwater ecosystem: Modelling and simulation*. - Developments in environmental modelling 8, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 125 pp.
- TIESLER, E. & SEAH, K.C. (1973): Polacrylamidgel (PAA) als Trägersubstranz von bakteriologischen Nährböden. - *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abr. Orig. A* 224: 247-252.
- YARISH, CH. (1976): Polymorphism of selected marine Chaetophoraceae (Chlorophyta). - *Br. Phycol. J.* 11: 29-38.
- YARISH, CH.; LEE, K. & EDWARDS, P. (1979): An improved apparatus for the culture of algae under varying regimes of temperature and light intensity. - *Botanica marina* 22: 395-397.



Obr. 1: Schéma zařízení pro zkřížené gradienty teploty a světla podle LUKAVSKÝ, J. (1982a). 1 – Silná hliníková deska, 2 – pěnový polyuretan nasycený vodou nebo hliník, 3,4 – ohřívací a chladící kanály, 5 – okap, 6 – Petriho miska, 7 – polyethylenová folie s otvory pro misky, 8 – gáza nasycená vodou nebo tenká vrstva glycerinu, 9 – průhledné víko, 10 – zdroj světla, 11 – zrcadlo, 12 – pásový filtr (pásky průsvitného papíru).

Fig. 1: Scheme of a device for crossed gradients of temperature and light according to LUKAVSKÝ (1982a)

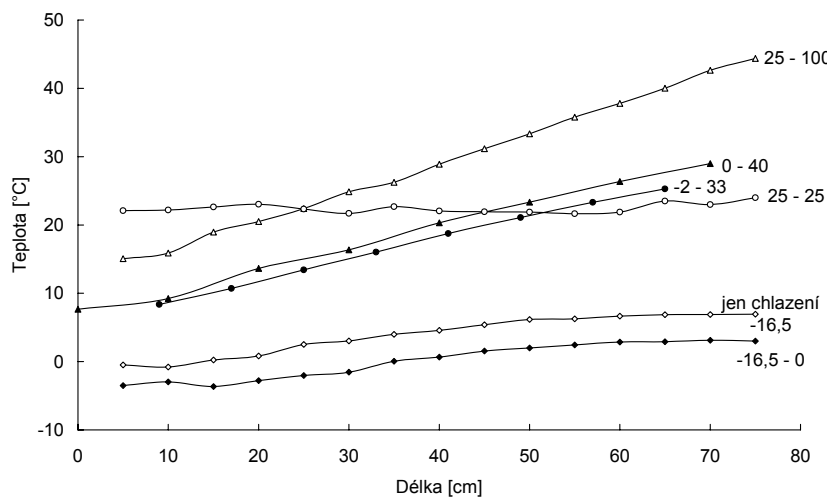


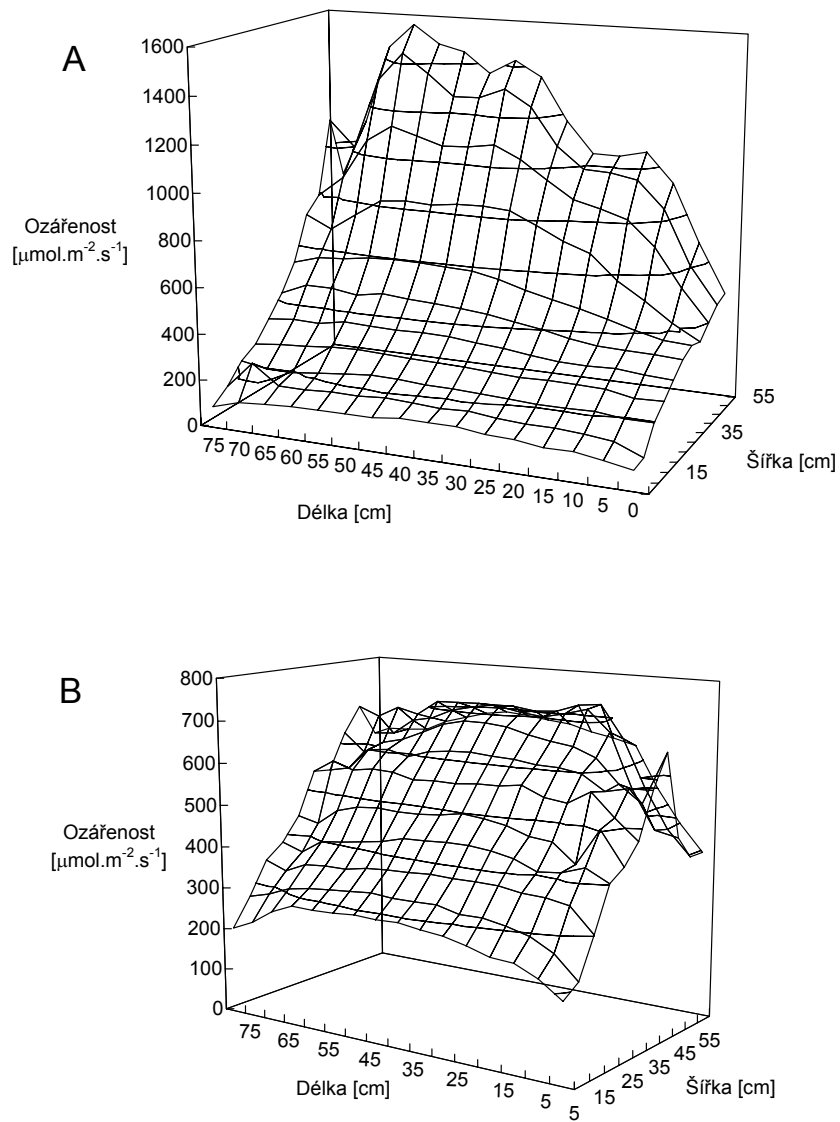
Obr. 2: Gradient teploty na kultivačním bloku při různých nastaveních chlazení a ohřívání. A – Chlazení +25 °C, ohřívání +100 °C, B – chlazení -16,5 °C, ohřívání 0 °C.

Obr. 3: Linearita gradientu teploty při různých nastaveních teplot chlazení a ohřívání. První číslo označuje nastavenou teplotu chlazení, druhé nastavenou teplotu ohřívání.

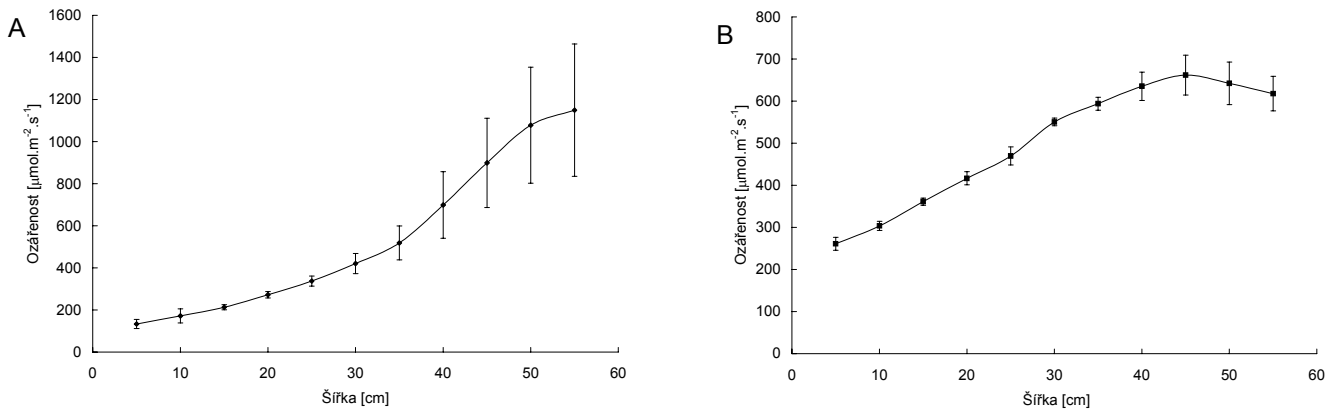
Fig. 2: Temperature gradient on the culture block at different settings of cooling and warming

Fig. 3: Linearity of temperature gradient at different setting of cooling and warming. The first number represents the set cooling temperature, the second one represents the set warming temperature.

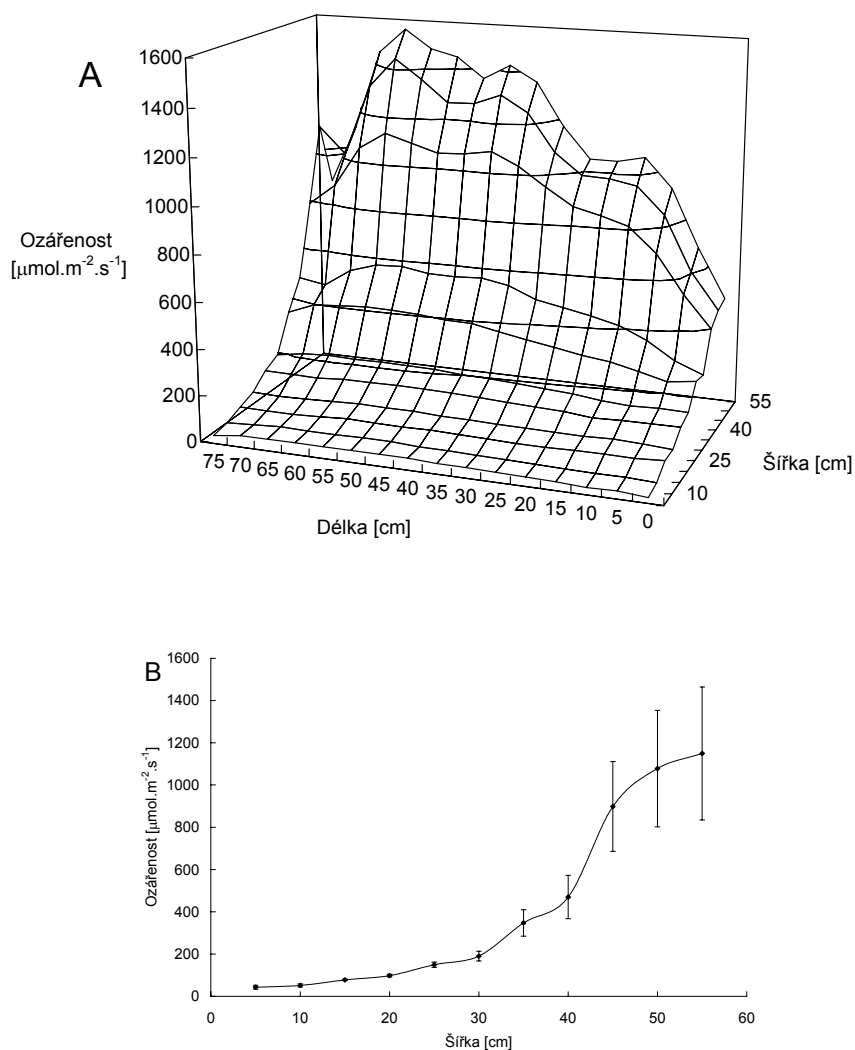




Obr. 4: Gradient světla při výšce zdroje světla nad kultivačním blokem 18 cm (A) a 45 cm (B).



Obr. 5: Průběh gradientu světla při výšce zdroje světla 18 cm (A) a 45 cm (B).



Obr. 6: Gradient světla při použití pásového filtru a výšce zdroje světla nad kultivačním blokem 18 cm (A) a jeho průběh (B)

Fig. 4: Light gradient on the culture block with the light source 18 cm high (A) and 45 cm high (B)

Fig. 5: Course of light gradient with the light source 18 cm high (A) and 45 cm high (B)

Fig. 6: Light gradient on the culture block with using the paper filters (A – the light source 18 cm high, B – course of light gradient)