



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Přehled metod pro kvantifikaci biomasy planktonních cyanobakterií (sinic)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Biomasa?

- Je např. koncentrace chlorofylu-a parametrem biomasy sinic?
- Vztah biomasa vs. obsah fotosynt. pigmentů
- Co vlastně stanovujeme?
- Srovnatelnost?



Kvantifikace fytoplanktonu

Počty organismů

- Mikroskopie
- Analýza obrazu
- Průtoková cytometrie

Koncentrace pigmentů

- Spektrofotometrie
- Fluorometrie
- Chromatografie

Molekulárně biologické metody



1. Mikroskopické analýzy

- Identifikace taxonů
- Počty buněk / ml



Foto: Kubíček (CCT), pózuje Haňulka (CCT)



Mikroskopické analýzy

Výhody:

- Podrobná identifikace druhů

Nevýhody

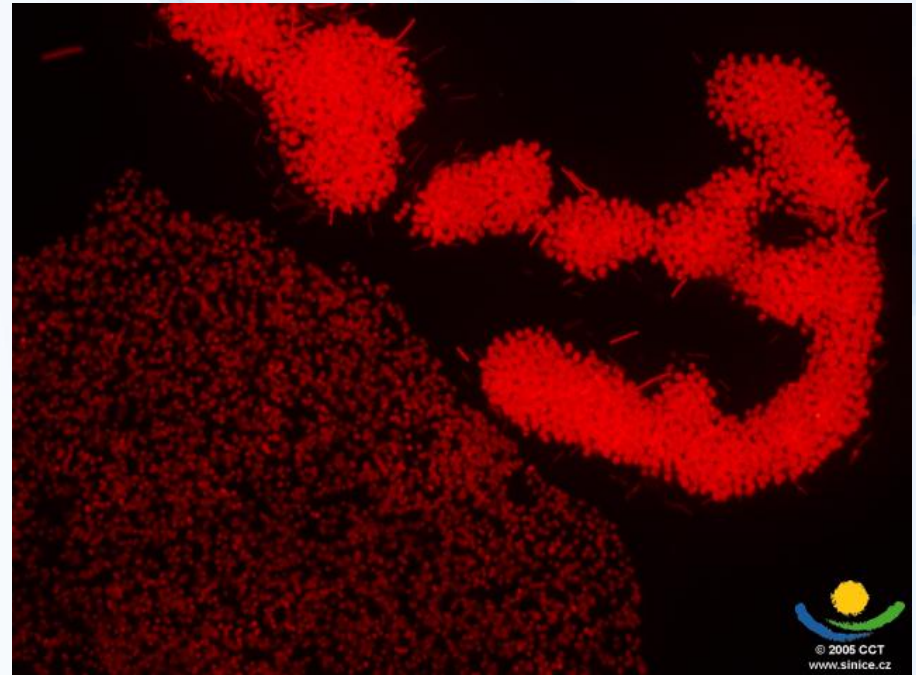
- Náročnost na čas a lidské zdroje
- Statistická chyba při počítání, variabilita
- Přehlédnutí pikocyanobakterií



Mikroskopické analýzy

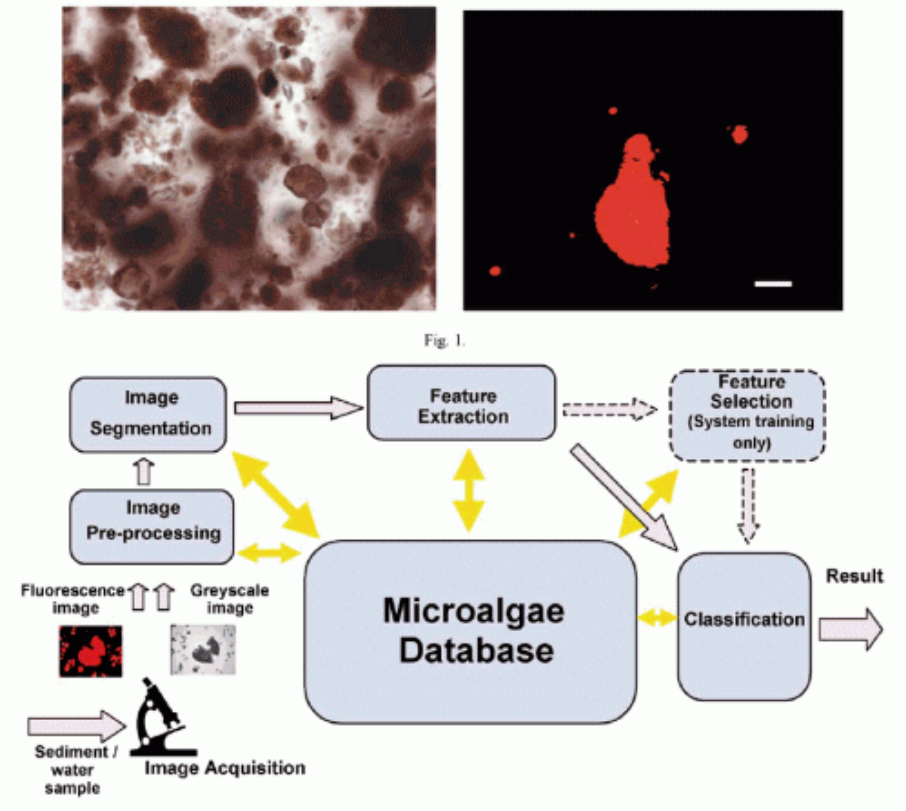
Fluorescenční mikroskop

- Odlišení sinic od řas
- ... a léta praxe



Analýza obrazu

- Softwarová analýza mikroskopických snímků
- Fluorescence
- Objemová biomasa různých skupin
- Kombinace s průtokovou cytometrií – FlowCAM

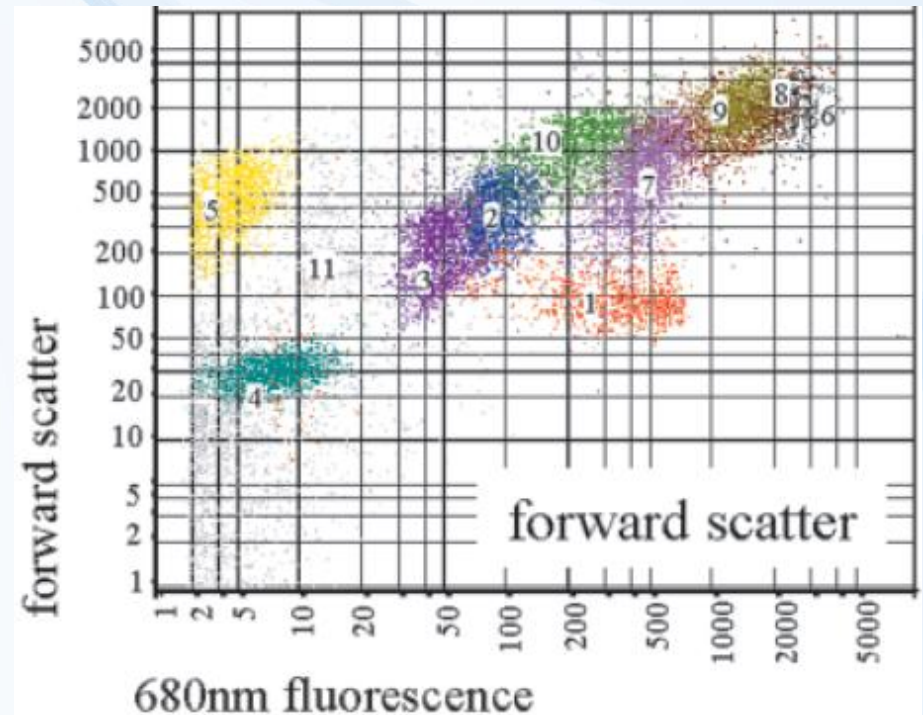


Zdroj: Walker et al. (2002) Journal of Microbiological Methods 51, 149–162



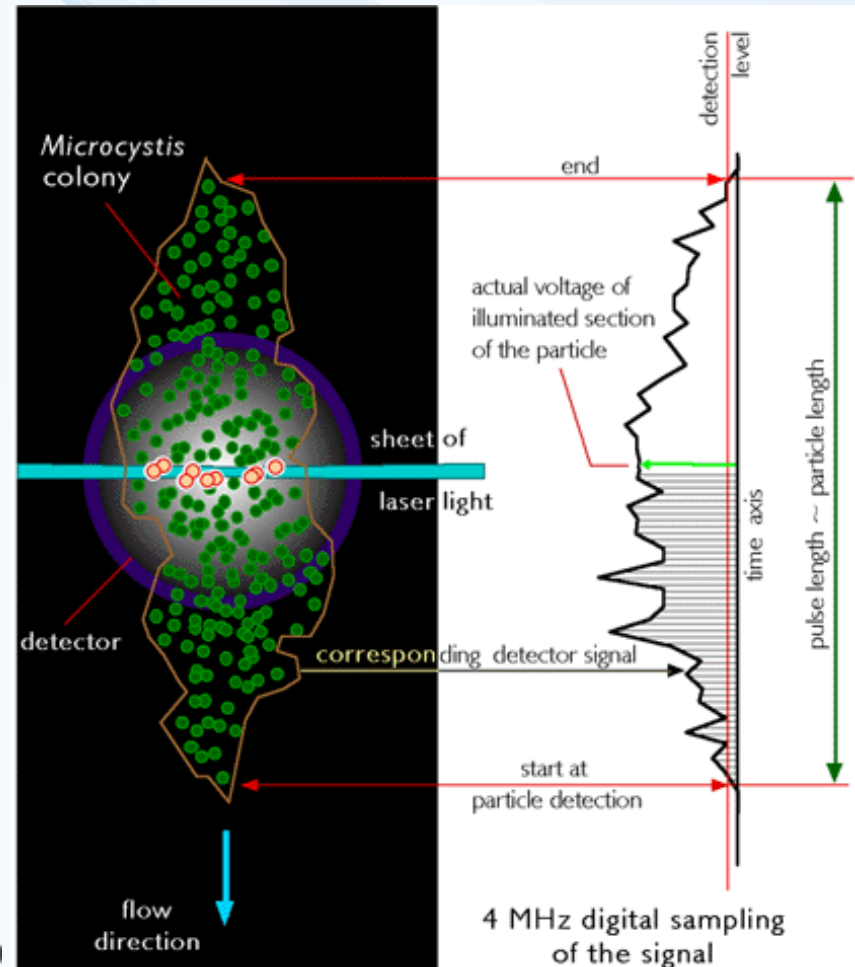
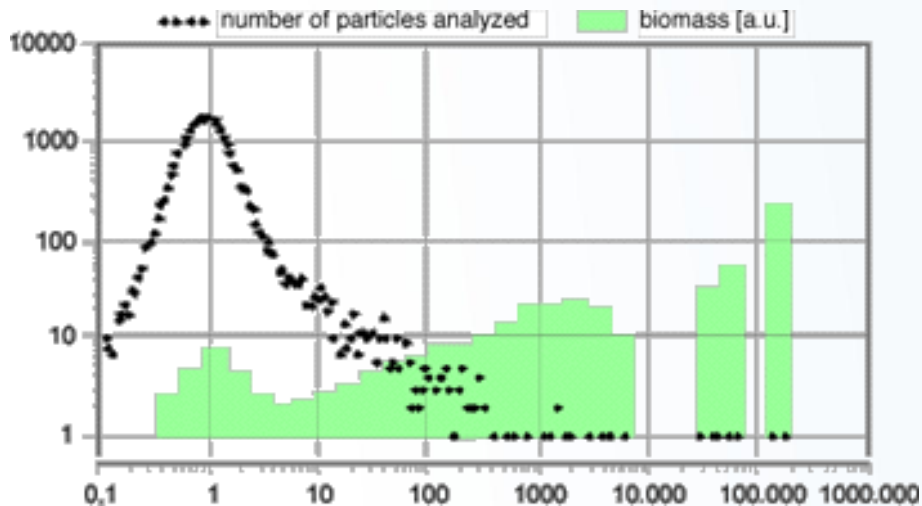
Průtoková cytometrie

- Kategorizace částic podle tvaru, velikosti, fluorescence
- Úroveň rodů a druhů?
- Problém velkých kolonií
- Speciální průtokové cytometry na fytoplankton



Průtoková cytometrie

- Kvantifikace koloniálních druhů (*Microcystis*)



2. Kvantifikace pigmentů Spektrofotometrie

Absorbance *in vivo*

- růstové experimenty, biotesty

Extrakty

- chlorofyl-a
- fykobiliproteiny



Spektrofotometrie

Chlorofyl-a

- Celkový fytoplankton
- Extrakce org. rozpouštědlem (ethanol, methanol, aceton)
- ISO 10260

Fykobiliproteiny

- Fykocyanin – sinice
- Extrakce fosfátovým pufrem
- Obtížná a zdlouhavá extrakce



Extrakty

- Méně časté
- Chlorofyl-a, fykobiliproteiny
- Proces extrakce stejný jako u spektrofotometrie

Fluorescence *in vivo*

- Vhodné pro *in situ* a on-line aplikace
- Podrobněji v příspěvku J. Gregor & B. Maršálek



In vivo fluorescence řas a sinic

Sinice – fykocyanin

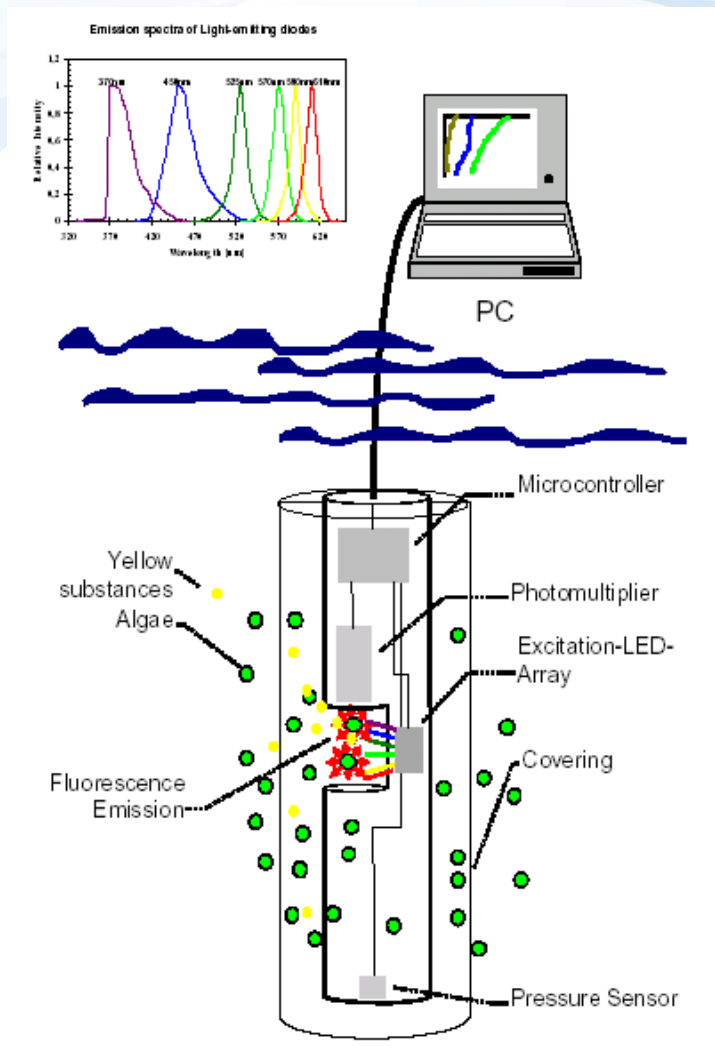
- excitace **590-630** nm
- emise **640-660** nm

Eukaryotické řasy – chlorofyly, karotenoidy

- excitace **440-530** nm
- emise **680-690** nm



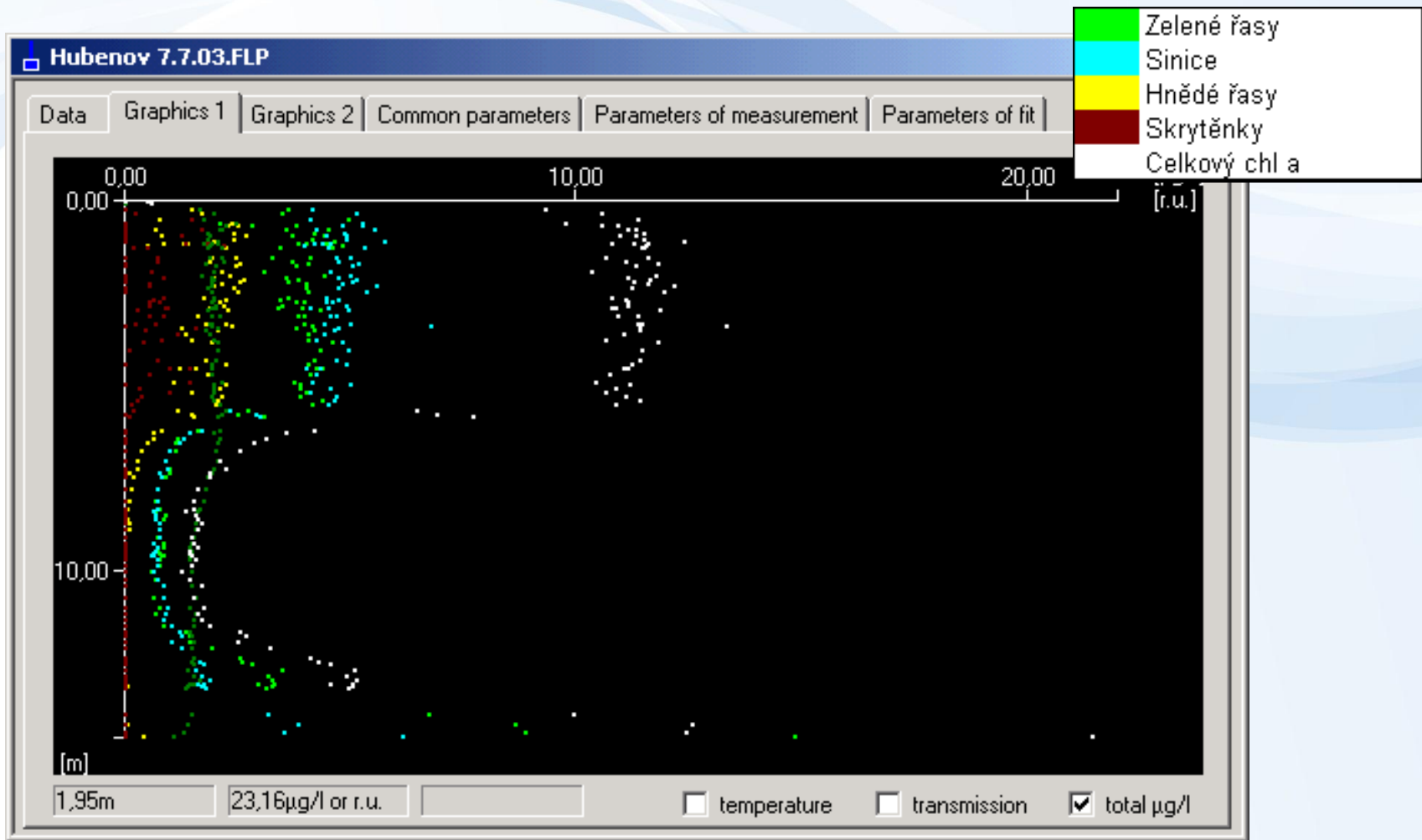
Ponorné fluorescenční sondy



- Ponorné fluorometry + PC
- On-line data



Ponorné fluorescenční sondy



Gregor and Maršálek, 2004, Water Research

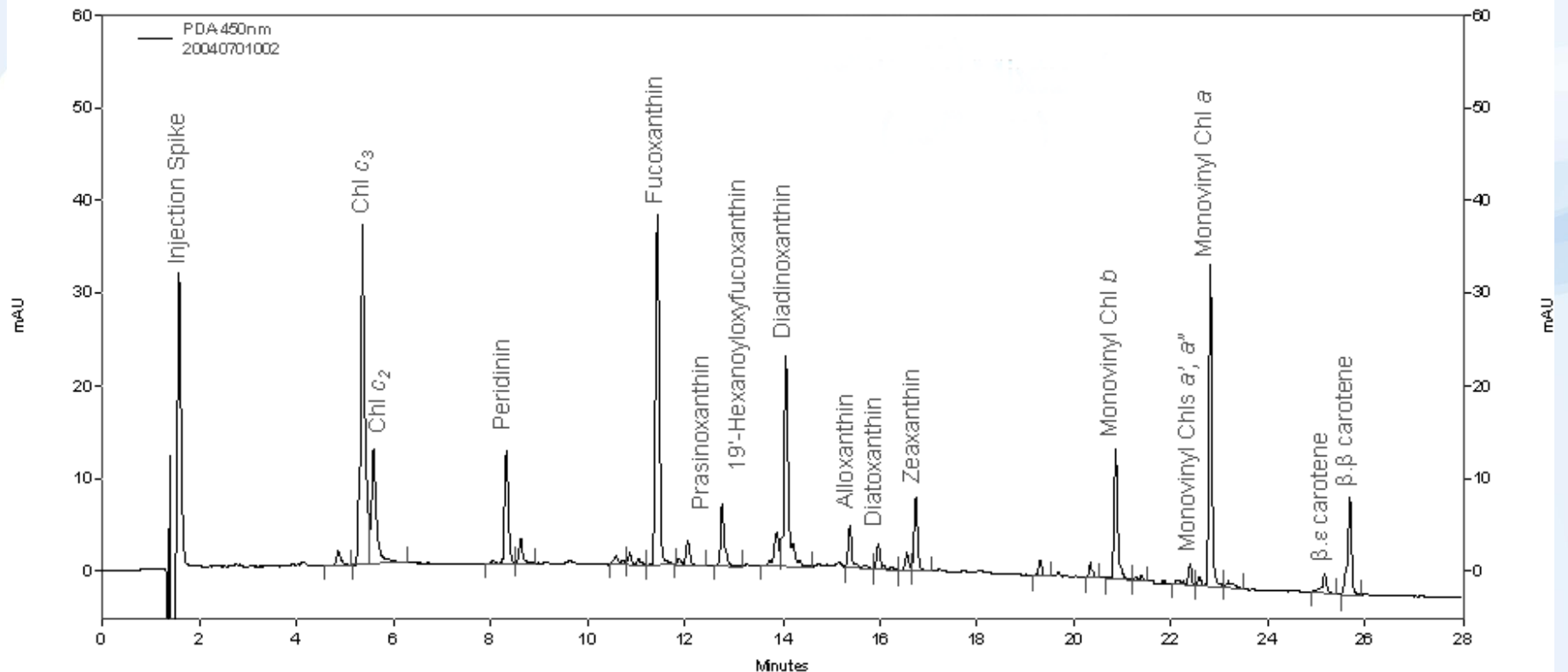


Chromatografie

- Komplexní analýza pigmentů
- Problém rozpustnosti chlorofylů a karotenoidů oproti fykobiliproteinům
- Rozlišení skupin na základě charakteristických pigmentů, kvantifikace v $\mu\text{g/l}$ chl-a
- **CHEMTAX** - program určený pro kvantifikaci skupin fytoplanktonu na základě HPLC analýz; definovaný poměr charakteristických pigmentů a chl-a pro jednotlivé skupiny



Chromatografie



Chromatografie

- Vhodné pro eukaryotický fytoplankton
- Sinice – zeaxanthin (fotoprotektivní karotenoid)

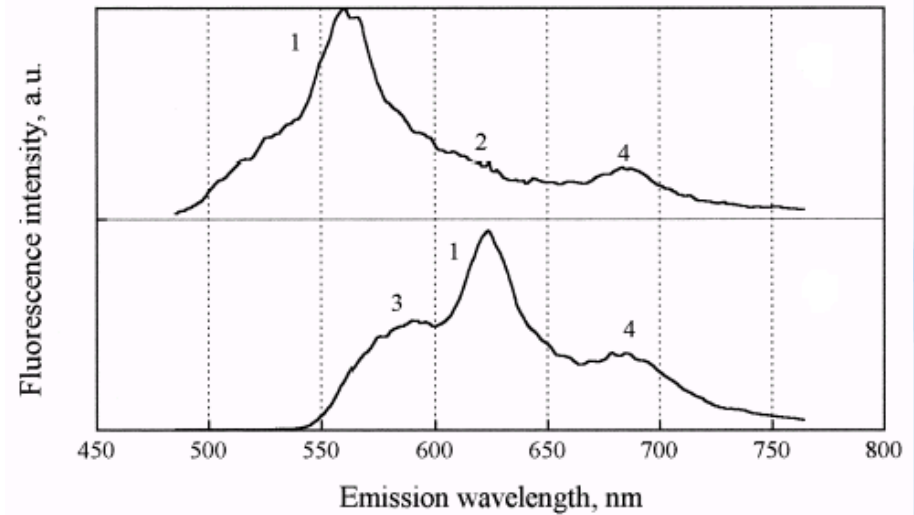
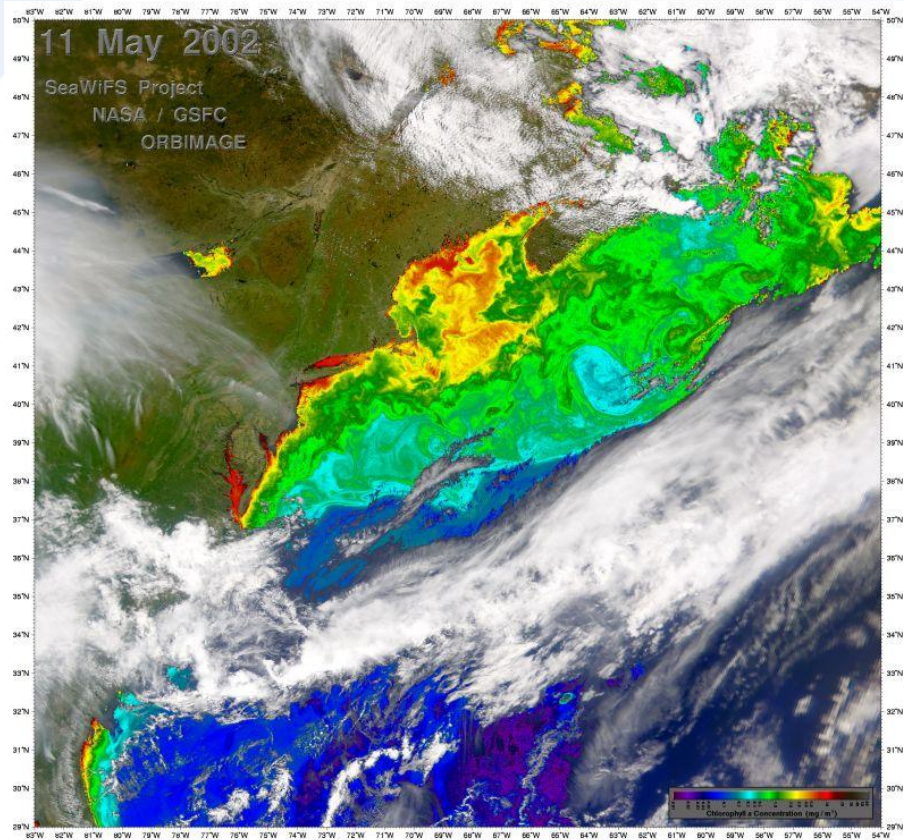


Dálkový průzkum Země

- AVHRR
 - satelitní snímky
- LIDAR
 - **L**ight **D**etection **A**nd **R**anging
 - Excitace laserovým paprskem
 - Snímání emisního spektra



Dálkový průzkum Země



3. Molekulární biologie

- 16S rRNA pro identifikaci kmenů sinic
- DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) pro stanovení diverzity a struktury přírodních populací vodních květů sinic
- DNA-array Technology- lze rozeznat různé genotypy sinic (toxické a netoxické populace)

- + nevyžadují dlouhodobé zkušenosti
- - vyžadují speciální vybavení



Závěr:

- v praxi se běžně používá parametr chl. a
- dále převládají mikroskopické metody
- velmi perspektivní a prověřená metoda je kvantifikace *in situ* pomocí fluorescenčních profilů
- Vždy je nutno **zvážit účel, čas, variabilitu a celkovou přesnost metody**





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem
České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí