

# **Přehled metod pro kvantifikaci biomasy planktonních cyanobakterií (sinic)**

---

Doc. Ing. Blahoslav Maršálek, CSc.  
Jakub Gregor, Ph.D.



# 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**

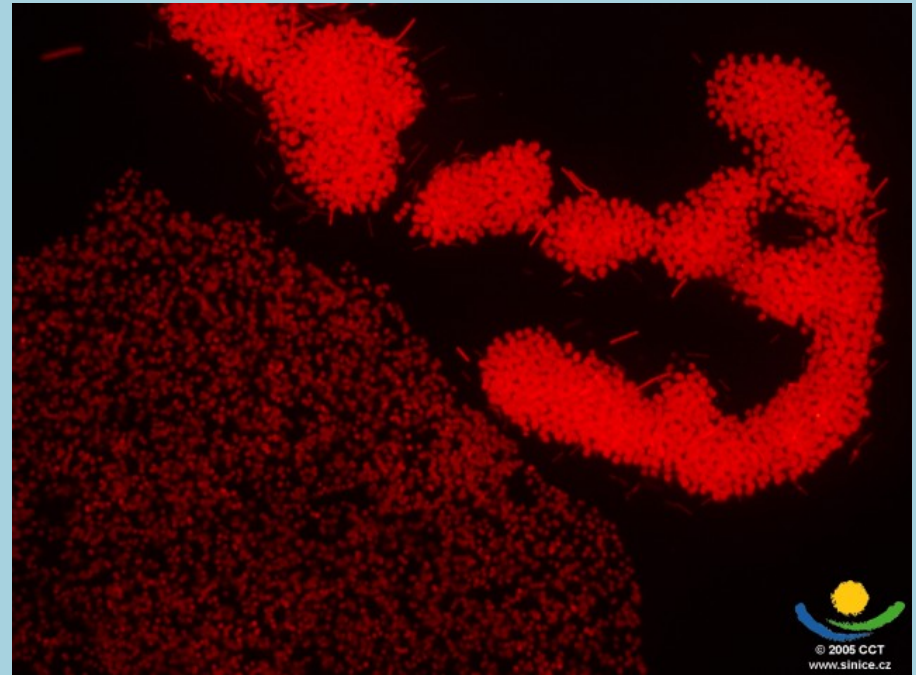
- Náročnost na čas a lidské zdroje
- Statistická chyba při počítání, variabilita
- Přehlédnutí pikocyanobakterií

# Mikroskopické analýzy

---

## Fluorescenční mikroskop

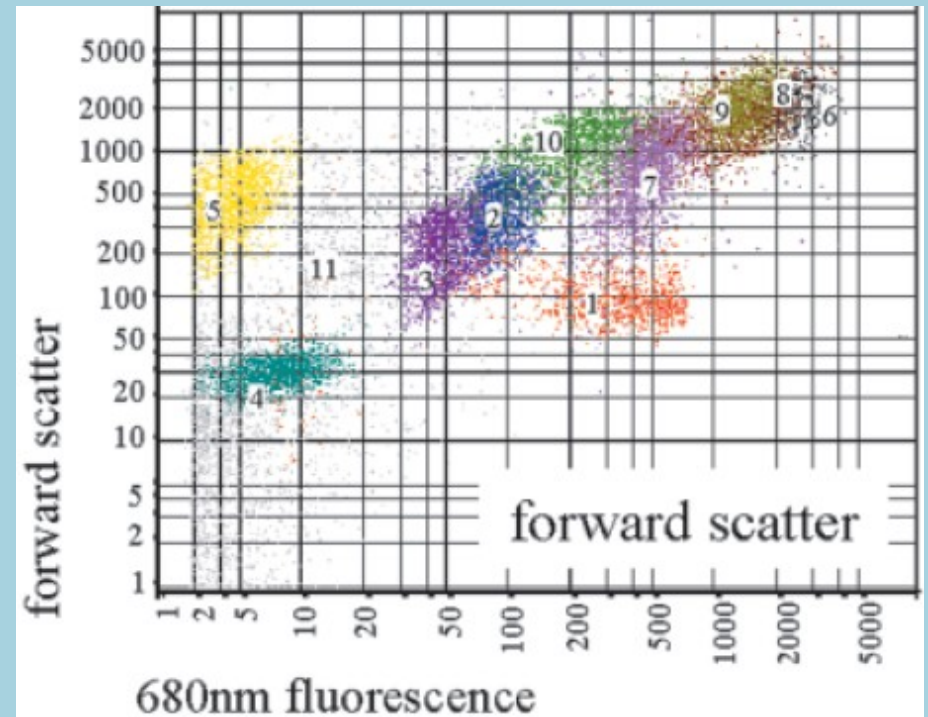
- **Odlišení sinic od řas**
- **... a léta praxe**





# Průtoková cytometrie

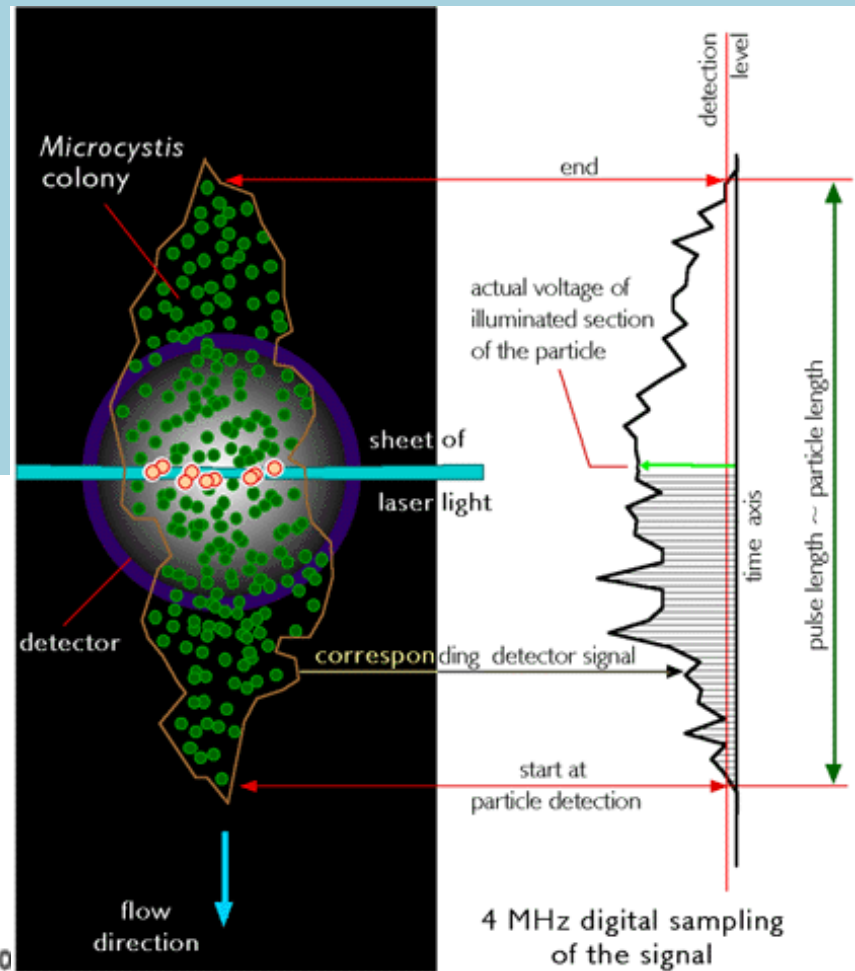
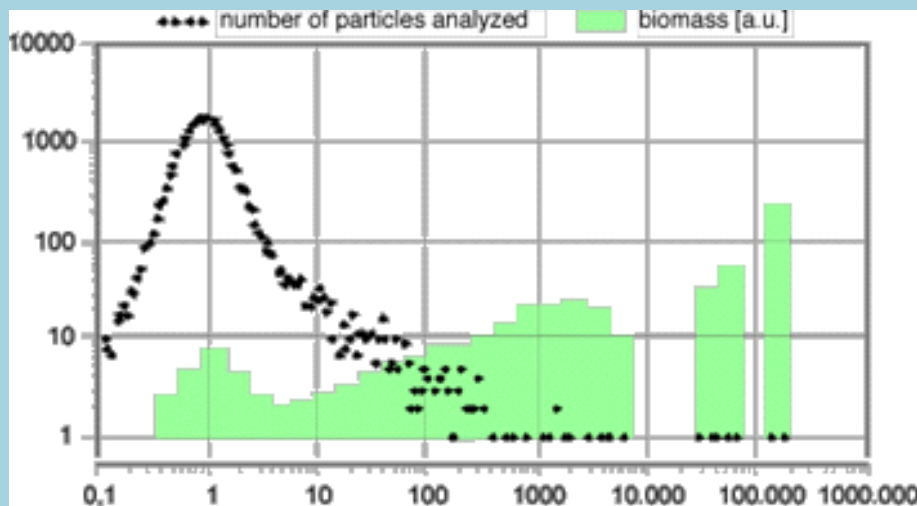
- Kategorizace částic podle tvaru, velikosti, fluorescence
- Úroveň rodů a druhů?
- Problém velkých kolonií
- Speciální průtokové cytometry na fytoplankton





# 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

# Fluorometrie

---

## 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

---

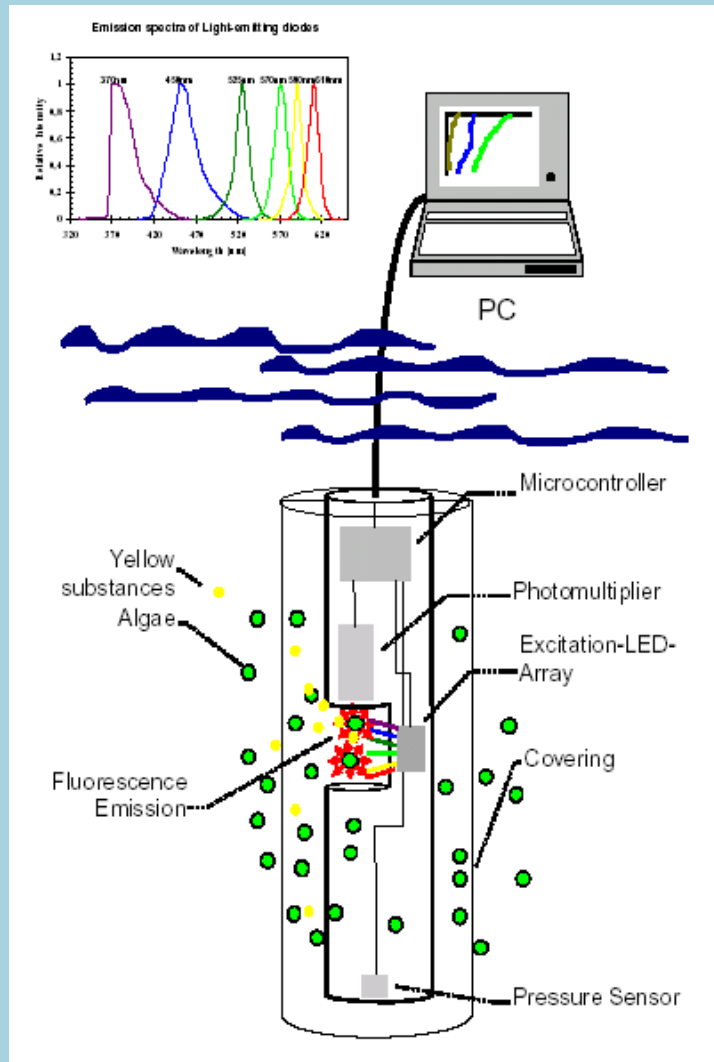
## Sinice – fykocyanin

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

## Eukaryotické řasy – chlorofyly, karotenoidy

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

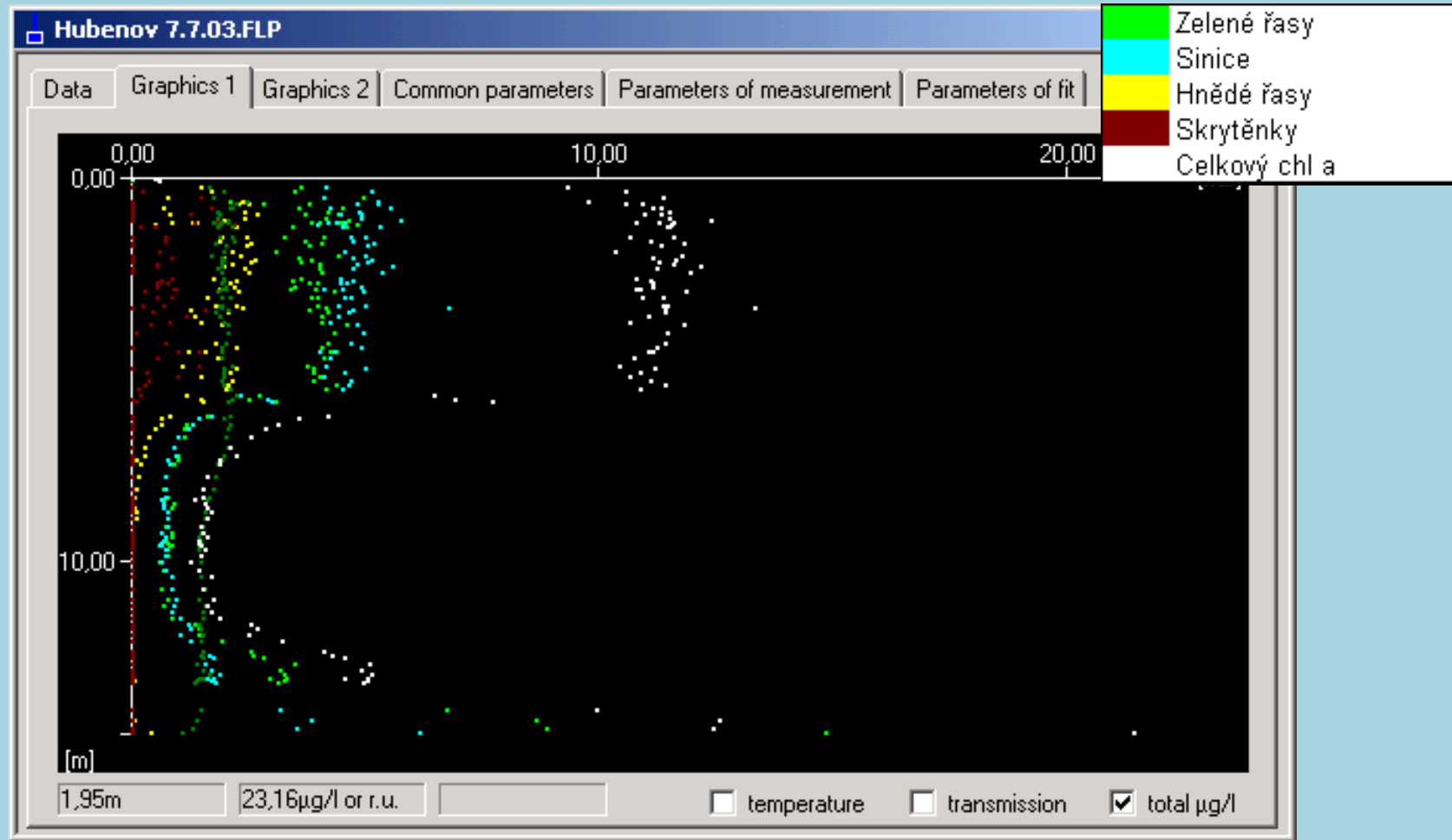
# Ponorné fluorescenční sondy



- Ponorné fluorometry + PC
- On-line data



# Ponorné fluorescenční sondy



Gregor and Maršálek, 2004, Water Research

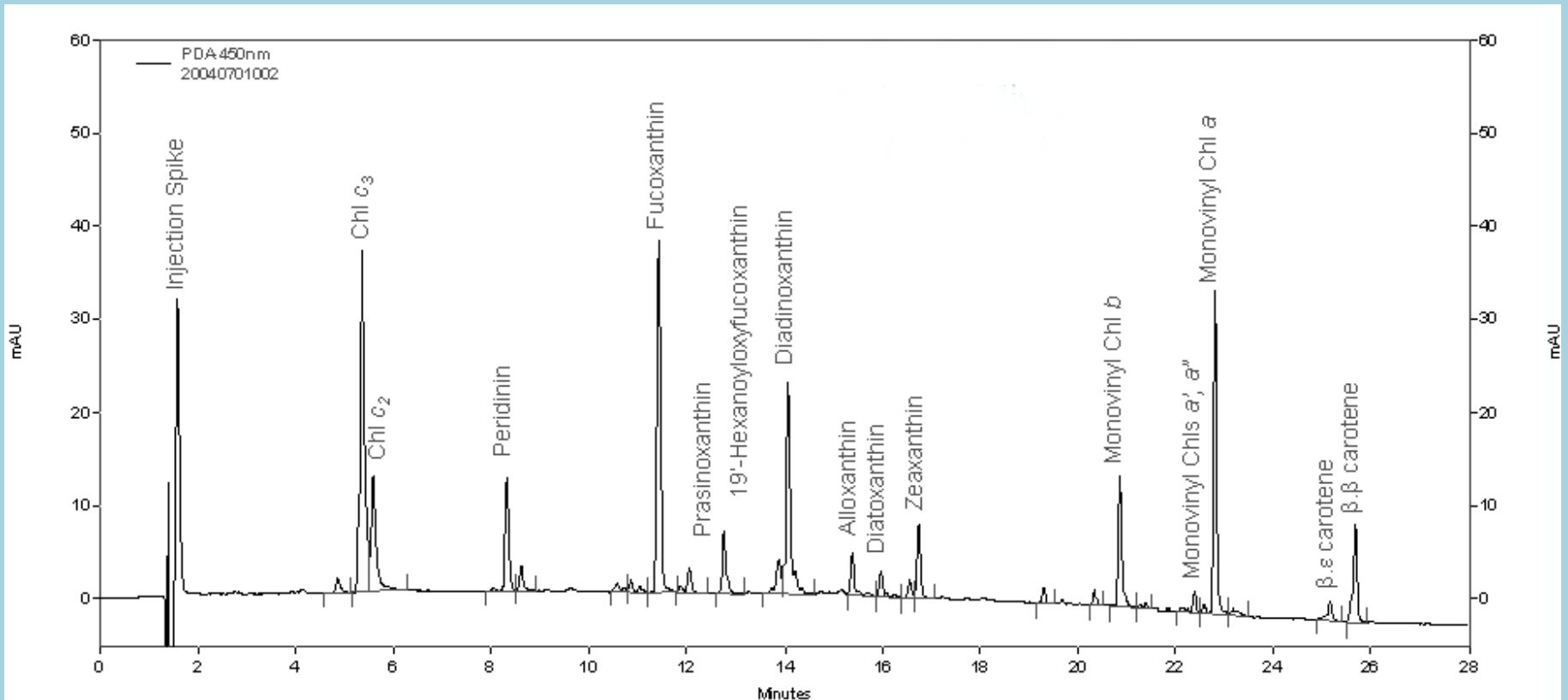
# Chromatografie

---

- 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

---

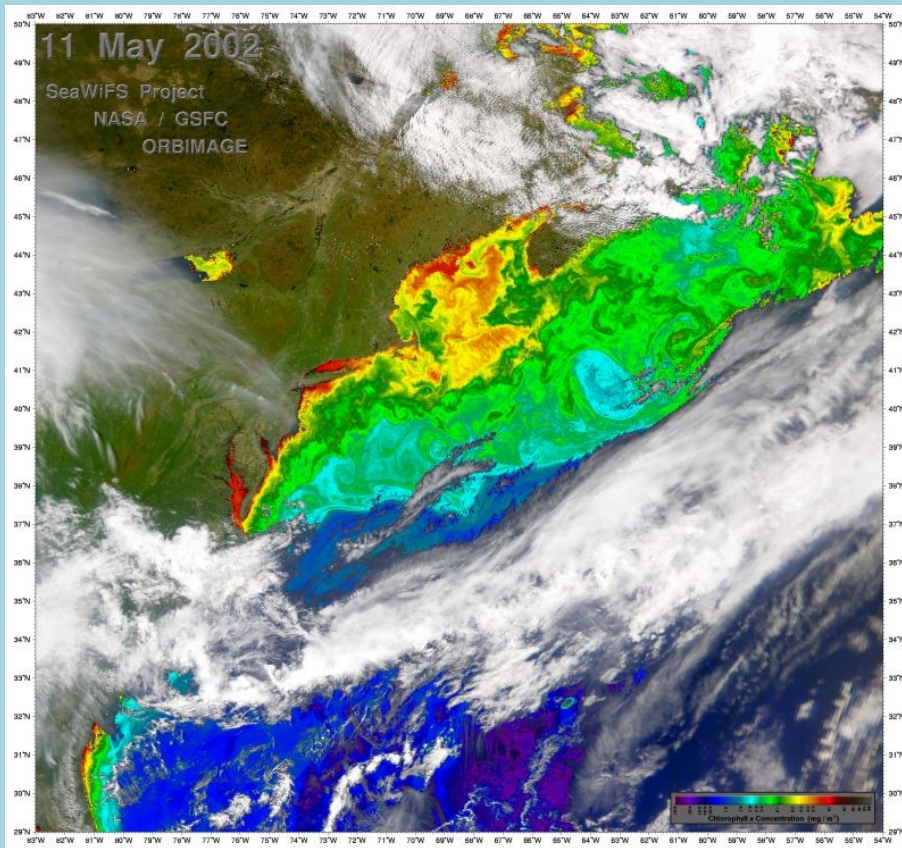
- Vhodné pro eukaryotický fytoplankton
- Sinice – zeaxanthin (fotoprotektivní karotenoid)

# Dálkový průzkum Země

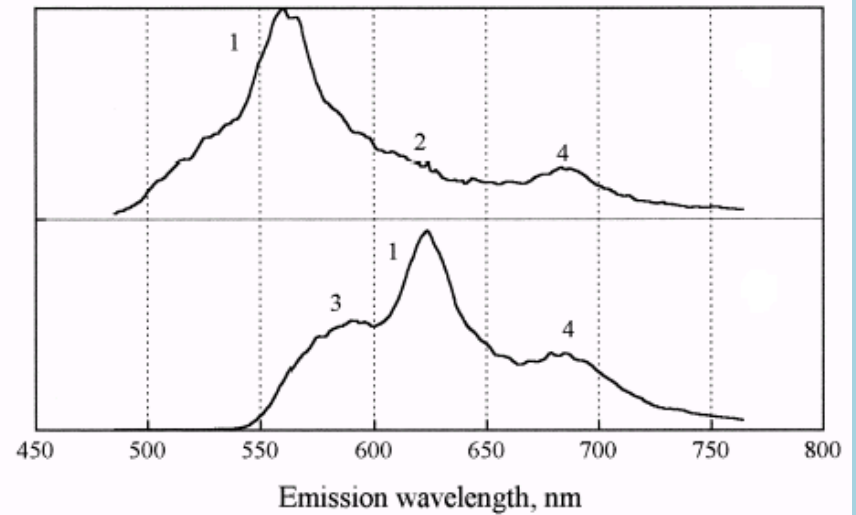
---

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

# Dálkový průzkum Země



Fluorescence intensity, a. u.



# 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**