

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



Pavla Štangelová

MONITOROVÁNÍ VÝSKYTU SINIC NA VODNÍM DÍLE SEČ
POMOCÍ ANALYTICKÝCH METOD

Monitoring of the occurrence of Cyanobacteria in the Seč water
resevoir by analytical methods

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Konzultant: Dr. Sándor T. Forczek, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 23.5.2013

Abstrakt

Sinice jsou jedny z nejstarších žijících organismů na planetě Zemi. Jsou schopny přežívat za nejrůznějších podmínek, prakticky ve všech biotopech. Růst sinic je ovlivněn množstvím živin přítomných v jejich životním prostředí, převážně dusíku a fosforu, a klimatickými poměry. Ve větším množství se začaly sinice rozšiřovat v několika minulých desetiletích vlivem lidské činnosti. Důsledkem nadměrného užívání hnojiv a vymýváním živin z půdy je nepřírozená eutrofizace vod a rozšíření tzv. „vodního květu“.

Přítomnost sinic ve vodách se monitoruje za pomoci rozličných analytických metod. Výskyt sinic na vodním díle Seč byl stanoven fluorimetrickou detekcí obsahu barviva c-fykocyaninu ve vzorcích přírodních vod a porovnán s obsahem chlorofylu-a v těchto vzorcích.

Klíčová slova: sinice, c-fykocyanin, chlorofyl-a, fluorimetrie

Abstract

Cyanobacteria are one of the oldest living organisms on the planet Earth. They are able to survive in different conditions under various conditions, almost in all habitats. The growth of cyanobacteria is affected by the amount of nutrients present in the environment, especially nitrogen and phosphorus, and by the climatic conditions. In larger quantities cyanobacteria began to spread in past few decades due to human activities. As a result of excessive use of fertilizers and washing nutrients from the soil is human-caused eutrophication and expansion of the so-called „water bloom“.

The presence of cyanobacteria in water is monitored using various analytical methods. The occurrence of cyanobacteria on the water reservoir Seč was determined by fluorimetric detection of pigment c-phycoyanin in samples of natural waters and compared with chlorophyll a content in these samples.

Key words: cyanobacteria, c-phycoyanin, chlorophyll-a, fluorimetry

Obsah

1	Cíle práce.....	6
2	Úvod	7
2.1	Sinice	7
2.1.1	Zařazení do systému	7
2.1.2	Charakterizace sinic.....	7
2.1.3	Evoluce sinic	8
2.1.4	Ekologie sinic	8
2.1.5	Zeměpisné rozšíření.....	9
2.1.6	Morfologie Sinic.....	9
2.1.7	Fotosyntetické pigmenty	14
2.1.8	Adaptace na světelnou intenzitu	16
2.1.9	Vybrané významné rody sinic	16
2.2	Eutrofizace	21
2.2.1	Příčiny.....	21
2.2.2	Důsledky.....	22
3	Materiály a metody	23
3.1	Charakterizace VD Seč	23
3.1.1	Chrudimka	23
3.1.2	Parametry vodního díla, odběrová místa	23
3.2	Použité materiály	25
3.3	Metody	25
3.3.1	Monitoring sinic	25
3.3.2	Odběr vzorků vod	26
3.3.3	Terénní stanovení	26
3.3.4	Multiparametrická sonda	27
3.3.5	Metody kvantifikace řas a sinic	27
3.3.6	Fluorescenční spektrometrie.....	28
3.3.7	Příprava pokusů pro fluorimetrická stanovení.....	29
3.3.8	Statistické zpracování dat	32
	Výsledky a diskuze.....	34
3.4	Analýza obsahu c-fykocyaninu v přírodních vzorcích	34
3.4.1	Kalibrace.....	34

3.4.2	Ovlivnění fluorescenčních vlastností vzorku	34
3.4.3	Fluorimetrická determinace obsahu c-fykocyaninu v přírodních vzorcích	37
3.4.4	Srovnání změřeného množství c-fykocyaninu s hodnotami naměřenými v laboratoři státního podniku Povodí Labe Hradec Králové	46
4	Závěr	48
5	Použitá literatura	49
6	Přílohy	51

1 Cíle práce

1. Provedení literární rešerše na téma výskytu a přemnožení sinic
2. Odběry přírodních vzorků vod v terénu, včetně měření multiparametrickou sondou
3. Seznámení se s analytickou metodou fluorimetrie
4. Ověření metodiky úpravy vzorku
5. Stanovení obsahu c-fykocyaninu v přírodních vzorcích vody
6. Zhodnocení výsledků práce a porovnání s výsledky naměřenými v laboratoři Povodí Labe Hradec Králové

2 Úvod

2.1 Sinice

Sinice je označení pro fotosyntetizující gramnegativní eubakterie o velikosti buněk většinou 1-10 μm . Z tohoto složitého popisu vyplývá také složitost jejich začlenění pro vědu. O cyanobakterie se zajímají botanici, pak je nazývají cyanoprokaryofyta, ekologové, toxikologové a mikrobiologové je nazývají cyanobakterie. Botanici se o ně zajímají proto, že jde o skupinu nejstarších organismů, které jsou schopny fotosyntetické asimilace stejně, jako vývojově mladší eukaryotní řasy a rostliny. Jednotlivé taxony cyanobakterií tvoří buď jednobuněčné, vláknité nebo koloniální uspořádání buněk. Kromě vegetativních buněk se u vláknitých sinic vyskytují heterocyty (sloužící k fixaci molekulárního dusíku) a artrospory (akinety), které slouží stejně jako spory bakterií k překonání nepříznivých podmínek. (1)

2.1.1 Zařazení do systému

Sinice se řadí do skupiny řas, jejich oddělení má dvě vědecká jména, přičemž obě jsou platná. Jejich starší pojmenování je sinné řasy, Cyanophyta (řasa, řecky Phykos), to však bylo roku 1930 nahrazeno názvem sinice, Cyanobacteria, aby byl znatelně specifikovaný rozdíl mezi prokaryotními sinicemi a eukaryotními řasami. Dle současného zařazení tedy sinice patří do impéria Prokarya, říše Bakterie (Bacteria) a oddělení Sinice (Cyanobacteria). (2, 3)

2.1.2 Charakterizace sinic

Sinice jsou velmi drobné a jednoduché fotoautotrofní organismy. Fotosyntetizují a mají tedy schopnost krýt veškerou svou spotřebu energie na účet energie solární a syntetizovat základní živiny a látky pro výstavbu vlastního těla z CO_2 , vody a minerálních látek. Mají jednobuněčnou, případně vláknitou stélku, žijí jednotlivě nebo i v koloniích. Pro svou pevnou, čtyřvstvou buněčnou stěnu jsou řazeny mezi gramnegativní bakterie. V jejich protoplazmě se nachází složitě vinutá kruhová molekula DNA, ribozomy a další buněčné struktury, jako jsou například specifické plynové váčky. Na rozdíl od eukaryotních buněk řas, neobsahují sinice chloroplasty, mitochondrie ani Golgiho aparát. Cytoplazma obsahuje thylakoidy a fykobilisomy, v nichž jsou obsaženy fotosyntetické pigmenty, chlorofyly, převážně chlorofyl-a, α -karoten i β -karoten a xantofyly, a fykobiliproteiny, c-fykocyanin, allofykocyanin, c-fykoeritrin, a c-fykobilin. Latinský název, cyanobacteria, podtrhuje jejich asimilační modré barvivo fykocyanin, jenž s dalšími asimilačními barvivy, uděluje sinicím charakteristické modrozelené (sinné) zbarvení stélek. (2, 3, 4)

Cyanobakterie produkují širokou škálu látek, kterými mohou ovlivňovat své okolí. Patří sem oligosacharidy, organické kyseliny, peptidy, hormony, enzymy, antibiotika, polysacharidy, ale také pachy, pachutě a toxiny. Tři posledně jmenované skupiny látek se výrazně projevují tehdy, chceme-li používat vodu pro rekreační a vodárenské účely (1).

2.1.3 Evoluce sinic

Sinice jsou jedny z nejstarších rostlin na světě, svědčí o tom primitivní stavba buňky (nerozlišené v jádro, cytoplazmu a plastidy) a kosmopolitní rozšíření na světě, které je ovšem způsobeno jejich nenáročností a snadností přemístění (3).

Nejstarší známá mikrobiální komunita pochází ze západní Austrálie (Apex Chert), je stará právě 3,5 miliardy let. Mimo jiné organismy zde byla nalezena vlákna podobná sinicím řádu *Oscillatoriales*. Zatímco určení nejstarších zbytků je nejisté, dobře zachované sinice najdeme v horninách z období mezi 2 a 0,9 miliardami let. Prekambrické sinice jsou morfologicky identické se současnými. Období mezi 2,5 a 0,6 miliardami let je označeno jako „věk sinic“. V tomto období byly sinice dominujícími fototrofy na Zemi a postupně, i když velmi pomalu, zvyšovaly koncentraci kyslíku v atmosféře. (2)

Stromatolity, jedny z nejstarších geologických útvarů na Zemi, mají na svědomí sinice. Jedná se o víceméně hříbovité útvary, které vznikají usazováním především uhličitanu vápenatého v pochvách sinic. Dnes jsou to celkem ojedinělé útvary, ale v prekambrických horninách se vyskytují velice často. Považují se za místo vzniku nejstarších organismů produkujících kyslík, které tak změnilo celkové složení atmosféry Země do dnešní podoby. (5)

2.1.4 Ekologie sinic

Vodní květ je výsledkem přemnožení určité skupiny sinic ve vodách s nadbytkem dusíkatých a fosforečnanových živin. V našich zeměpisných podmínkách se projevuje zejména v letním období a vytváří hygienické problémy na koupalištích a přehradách, které byly původně určeny jako zdroje pitné vody. Společenstvo vodního květu tvoří rody *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix* aj. Jejich pobyt u hladiny umožňují aerotopy, které jsou vytvořeny u všech druhů vodních květů. První náznaky vodního květu se na hladině objevují koncem jara. Do té doby se sinice udržují na dně nádrže a na hladině se jejich přítomnost neprojevuje. Později se vynořují větší či menší obláčky vodního květu, které vítr postupně rozptýlí po celé hladině. V plném rozvoji vytváří vodní květ hustý koberec u břehů a v klidných zálivech. Ve večerních hodinách se část vodního květu ponoří do větších hloubek, příští den opět vyplave zpět na hladinu. Kromě toxinů které sinice produkují, dochází při

rozkladu biomasy k hnilobným procesům spojeným s vyčerpáním kyslíku a s další produkcí toxických látek. Odstranění vodního květu je obtížné, zejména vzhledem ke schopnosti sinic adaptovat se na změněné podmínky. Vodní květy postihují nejen sladkovodní nádrže, ale také pobřežní mořské vody (např. *Nodularia*, *Trichodesmium*). (2)

2.1.5 Zeměpisné rozšíření

Sinice jsou obecně rozšířeny všude v přírodě. Rostou i na místech, na nichž jsou životní podmínky pro ostatní rostliny nepřijatelné (skály, ledovce, horká vřídla atd.). Vynikají neobyčejnou odolností vůči nízkým teplotám. Některé, a je pozoruhodné, že tím vynikají právě termální sinice, snášejí po několik týdnů teplotu tekutého vzduchu -190°C . Rostou jako první organismy na nově vytvořené neosídlené zemi, např. na vulkanických ostrovech, na uměle obnažených skalách v lomech atd. Většina sinic jsou sladkovodní organismy. Mnohem méně jich žije v moři, a to nejčastěji v přílivové zóně, na přístavních stavbách, v brakické vodě a v slaných močálech. Důležitá úloha v přírodě připadá sinicím ve vlhkých oblastech světa, zvláště tropech, protože zde intenzivně obohacují vodu i půdu dusíkem (3).

2.1.6 Morfologie Sinic

2.1.6.1 Buněčná stěna

Sinice patří mezi gramnegativní bakterie. To znamená, že jejich buňky mají pevnou buněčnou stěnu, která svým složením znemožňuje barvení protoplastu podle K. Gramma. Buněčná stěna je vícevrstevná. Vnější buněčný obal tvoří slizová vrstva, složená z lipopolysacharidů (glykokalyx). Lipopolysacharidová vrstva má fibrilární strukturu a bývá vyvinuta v různé míře. U některých sinic tvoří nápadný homogenní nebo vrstevnatý, někdy zbarvený obal buňky nazývaný pochva. Postupujeme-li buněčnou stěnou směrem k protoplastu, pak další složkou je dvojice lipoproteinových membrán, vnější a vnitřní membrána. Pevná složka buněčné stěny je uložena mezi oběma membránami a je složena z peptidoglykanu, kde hlavní složkou je murein. Mureinová vrstva je poměrně tenká. Může být enzymaticky odbourána lysozymem. Syntézu buněčné stěny znemožňuje podobně jako u bakterií, penicilin.

V buněčné stěně jsou vytvořeny transportní kanály. Patří k nim pasivní kanály obsahující protein porin. Porinové kanály umožňují difúzi iontů nebo malých molekul. Difúzi pomalu penetrujících látek zajišťují kanály se specifickými vazebnými místy. Zvláštní druhy pórů, připomínající plazmodesmy, byly pozorovány v příčných přehrádkách některých vláknitých sinic (2).

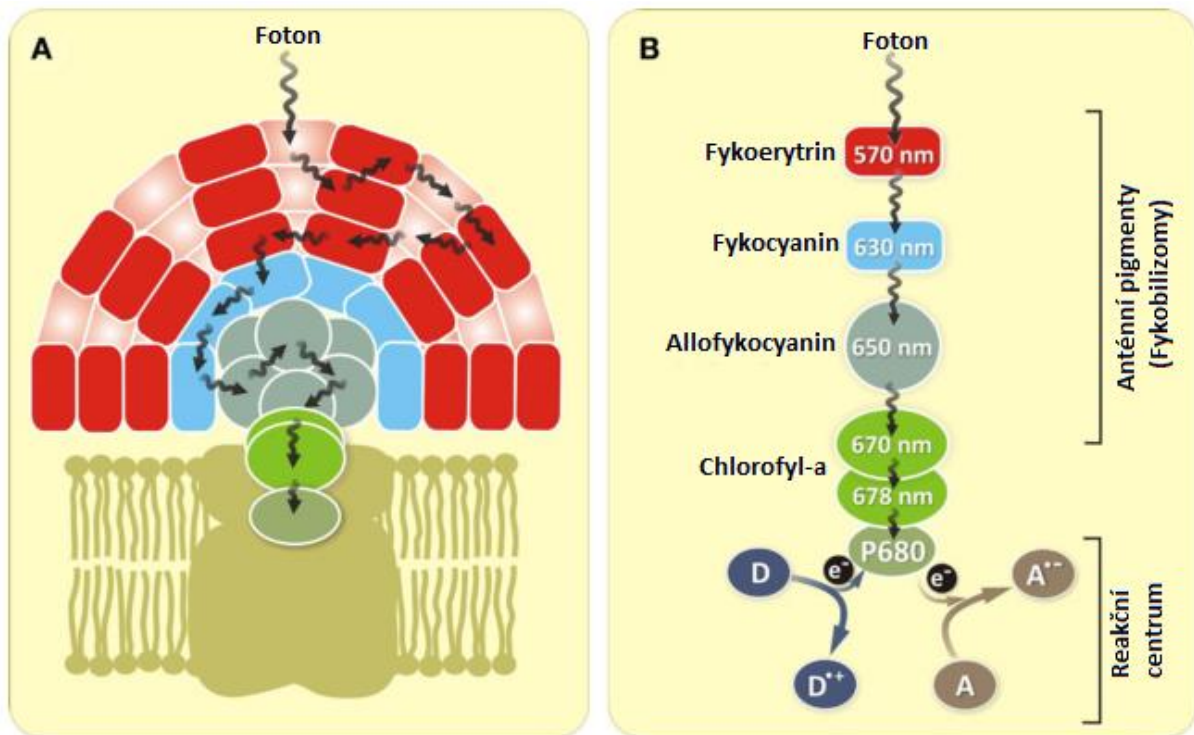
2.1.6.2 Stavba protoplastu

V živé buňce sinice, kterou pozorujeme ve světelném mikroskopu, můžeme rozlišit povrchovou, výrazněji zbarvenou chromatoplazmu, kde převažují fotosyntetické membrány (thylakoidy). Ve světlejší středové oblasti, centroplazmě, převládá cytoplazma, DNA, ribozomy a další plazmatické struktury. Centroplazma se často nazývá nukleoplazmatická oblast. Je v ní uložena velká kruhová molekula DNA. Podrobné studium druhu *Anabaena variabilis* ukázalo, že molekula DNA je uspořádána v četných smyčkách (doménách) připevněných k plazmatické membráně. Stejně jako u bakterií nejsou vlákna (chromonemy) vzájemně spojena. Chybějí zde histoproteiny, které u eukaryotních buněk zajišťují spojení chromonem v chromozomech. V buňce může být několik molekul DNA, což závisí na stupni ploidie, která je u sinic poměrně běžným jevem. V cytoplazmě sinic jsou to malé kruhové molekuly DNA, plazmidy, které se uplatňují při rekombinačním procesu.

Ribozomy sinic jsou menší než u eukaryotních buněk. Sestávají z malé a velké subjednotky, z nichž malá subjednotka obsahuje 16S RNA, zatímco velká subjednotka obsahuje 23S RNA (2).

2.1.6.3 Fotosyntetický aparát

Hlavní strukturou fotosyntetického aparátu jsou thylakoidy, ploché měchýřky, jejichž stěny jsou tvořeny fotosyntetickou membránou uloženou v periferní plazmě nebo prorůstající celým protoplastem. Vnitřní prostor thylakoidu obsahuje důležité složky fotosyntetického aparátu oxygenního typu fotosyntézy. V thylakoidu jsou umístěny proteinové komplexy fotosystému I a fotosystému II, kde se světelná energie mění v energii chemickou. V komplexu fotosystému II probíhá fotooxidace molekuly vody a dále zde dochází k přenosu elektronů na plastochinon. Fotosystém I přenáší elektrony na NADP^+ a navíc se účastní cyklického toku elektronů. Při vnitřním povrchu thylakoidů se redukuje NADP^+ a vyčnívá komplex ATP-synthasy. Vodíkové ionty a uvolněné elektrony vstupují dále do reakčního centra. Fotochemické reakční centrum je srdcem fotosyntetického aparátu, je tvořeno proteinovým a pigmentovým komplexem a zajišťuje přenos energie v elektronových transportních řetězcích. Povrch thylakoidů pokrývají polokulovité fykobilizomy, které představují hlavní světlosběrnou anténu fotosyntetického aparátu sinic. Ta umožňuje využít pro fotosyntézu světlo různé vlnové délky. (2, 4)



Obrázek 1 Strukturální uspořádání světlosběrné antény fotosystému II pro červené řasy a sinice (A) a kroky energetického transferu včetně separace náboje (fotochemická reakce) v reakčním centru fotosystému II (B) pro sinice. (6)

2.1.6.3.1 Typy fotosyntetického aparátu sinic

U sinice *Gloeobacter violaeus* thylakoidy chybí, fykobilizomy sedí na povrchu plazmatické membrány, fotosyntetické pigmenty a subjednotky fotosyntetického aparátu jsou součástí plazmatické membrány. Primitivní stav ukazuje na vývojovou příbuznost s purpurovými bakteriemi a chlorobakteriemi.

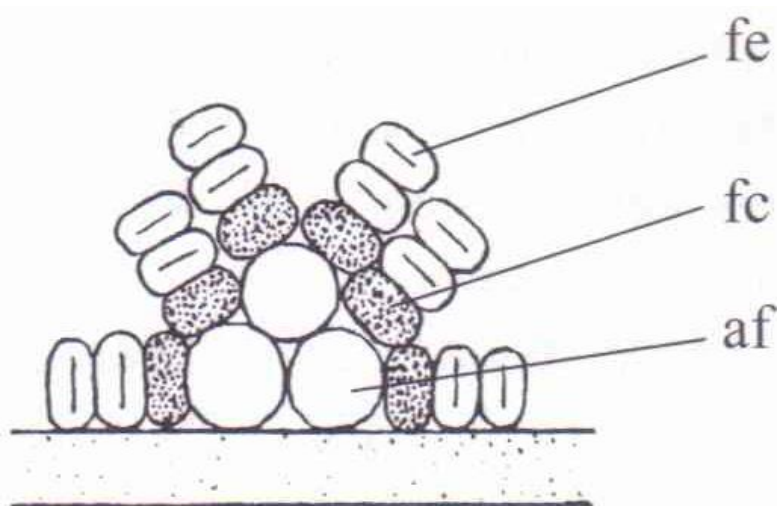
U valné většiny sinic jsou v buňce četné thylakoidy, rovnoběžně uložené podél buněčné stěny nebo prorůstající protoplastem. Jejich povrch pokrývají fykobilizomy, které udržují stejnou vzdálenost mezi thylakoidy. Fotosyntetické pigmenty a subjednotky fotosyntetického aparátu jsou uloženy v thylakoidech.

U sinic rodů *Prochloron*, *Prochlorococcus*, *Prochlorothrix* a *Acaryochloris* fykobilizomy chybí. Fotosyntetické pigmenty a subjednotky fotosyntetického aparátu jsou uloženy v thylakoidech. Na rozdíl od prvních dvou skupin jsou thylakoidy srostlé svou pochvou do dvou nebo po čtyřech, podobně jako v chloroplastech zelených řas. Tyto rody byly dříve řazeny do oddělení Prochlorophyta. Fylogeneticky významné je, že všechny známé druhy chlorofylů se vyskytují u sinic.

Fykobilizomy první a druhé skupiny obsahují tři druhy fykobiliproteinů. Jejich chromoforovou skupinu tvoří modrý allofykocyanin, modrý fykocyanin, a červený fykoerytrin. V thylakoidech je obsažen chlorofyl-a, které je u většiny sinic hlavním fotosyntetickým pigmentem. U třetí skupiny sinic jsou fotosyntetické pigmenty obsaženy pouze v thylakoidech. (2)

2.1.6.3.2 Struktura fykobilisomu

Supramolekulární struktura fykobilisomu je znázorněna na Obrázek 2. Fykobilisom sestává z dřevné substrukтуры a povrchových tyčinek. Dřeň je tvořena allofykocyaninem (af) ($A_{\max} = 650 \text{ nm}$), který je v přímém kontaktu s membránou thylakoidu. Vnější strukturu tvoří šest komplexů tyčinek, které směřují paprscitě ve směru od dřevě. Tyčinky obsahují fykocyanin (fc) ($A_{\max} = 620 \text{ nm}$) a fykoerytrin (fe) ($A_{\max} = 656 \text{ nm}$). Pro sinice je charakteristická rychlá reakce na změnu spektrálního složení světla, popsána jako chromatická adaptace. Při pokusech s monochromatickým světlem získáme celou stupnici barevných odstínů téhož kmene sinic v rozsahu od ocelové šedé přes modravou, zelenou, malachitově zelenou a červenavou. Při chromatické adaptaci využívají sinice různé mechanismy, v nichž hlavní roli hrají fykobilizomy. Zpravidla se jedná o změnu počtu fykocyaninových a fykoerytrinových subjednotek, allofykocyaninová dřev se nemění. (2)



Obrázek 2 Struktura fykobilisomu sinice, supramolekulární stavba (af - allofykocyanin, fc - fykocyanin, fe - fykoerytrin). (2)

2.1.6.4 Zásobní látky

U většiny sinic je hlavní zásobní látkou sinicový škrob, patřící mezi α -1,4-glukany. Svými vlastnostmi je shodný s glykogenem některých bakterií, hub a živočichů. Dusíkatou zásobní látku představují cyanofycinová zrnka, tvořená aminokyselinami argininem a asparaginem.

V buňkách se nacházejí také polyfosfátové granule (voluntin), obsahující kondenzované ortofosforečnany. Voluntin se v buňkách hromadí v době přebytku fosforečnanů v prostředí a využívá se v období nedostatku. (2)

2.1.6.5 Fixace dusíku

Podobně jako mnohé bakterie mají i mnohé sinice schopnost vázat plynný dusík a pomocí enzymu nitrogenázy syntetizovat amonné sloučeniny. Proces vyžaduje přísně anaerobní podmínky, protože nitrogenáza je inaktivována v přítomnosti kyslíku. Fixace probíhá v heterocytech. Jsou to specializované buňky, které se tvoří v průběhu asi 24 hodin jako reakce na nízký obsah dusíkatých látek v prostředí. Heterocyty známe pouze u sinic řádu Nostococales a Stigonematales. Heterocyty obsahují tylakoidy, kde jsou funkční pouze komplexy fotosystému I, které na světle neprodukují kyslík. Současně vstupují do heterocytů redukující látky z vegetativních buněk, které dále omezují přítomnost kyslíku. V opačném směru do vegetativních buněk se pohybují dusíkaté sloučeniny. Fixaci dusíku známe i u druhů, které nemají heterocyty. Ty řeší problémy s kyslíkem časovým oddělením fotosyntézy a fixace dusíku, která probíhá v noci, kdy je fotosyntéza minimální. (2)

2.1.6.6 Plynové měchýřky a aerotopy

Četné planktonní sinice, zejména ty které tvoří vodní květ, obsahují v plazmě plynové měchýřky, které jsou zpravidla agregované do aerotopů. Aerotopy snižují specifickou hmotnost buněk a umožňují vznášení ve vodě. Jednotlivé měchýřky jsou 70-75 nm široké a často až 1000 nm dlouhé, mají válcovitý tvar se zahrocenými konci. Stěna měchýřky je poměrně pevná a tvoří ji proteinové molekuly. Je propustná pro plyny rozpuštěné ve vodě a právě tyto plyny měchýřky obsahují. Plynové měchýřky jsou jedinou známou plynem naplněnou strukturou v živých buňkách. Jsou velmi stabilní, praskají při tlaku 200-1000 Pa, jejich počet je regulován buněčnými mechanismy. (2)

2.1.6.7 Cyanotoxiny

Cyanotoxiny jsou biologicky aktivní sekundární metabolity. Podle účinku rozlišujeme dvě hlavní skupiny toxinů: toxiny působící smrtelné otravy (neurotoxiny, anatoxiny a hepatotoxiny) a toxiny které smrtelné otravy nepůsobí (cytotoxiny). Do první skupiny patří druhy rodu *Microcystis*, *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Planktothrix rubescens*, *Trichodesmium*. Rod *Microcystis* je nejvýznamnějším světovým producentem mikrocytinů, toxinů patřících do skupiny extrémně toxických látek produkovaných

kontinuálně sladkovodními sinicemi. Prozatím bylo objeveno již více než 70 různých druhů mikrocystinů. Mikrocystiny inhibují eukaryotní protein serin/threonin fosfatázu, což má za následek nadměrnou fosforylaci cytoskeletárních filamentů způsobující závažné poškození jater. Problémy s otravou cyanotoxiny vznikají požitím vody obsahující sinice nebo kontaktem při koupání. Častým následkem kontaktu s vodním květem jsou kožní alergie, záněty spojivek a bronchitidy. Dlouhodobá expozice malému množství mikrocystinů může vyvolat rakovinu jater. Jejich akutní toxicita se pohybuje mezi 50-800 g/kg tělesné hmotnosti. (2, 7)

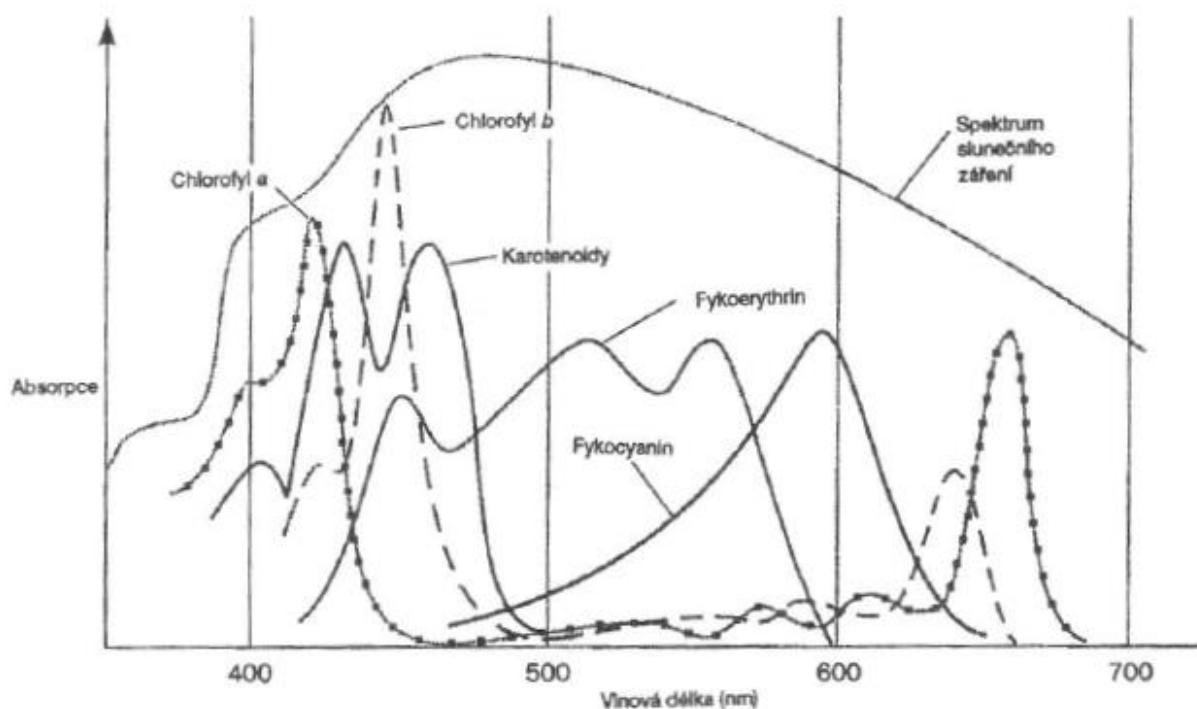
2.1.6.8 Rozmnožování sinic

Jednobuněčné a koloniální sinice se rozmnožují dělením buněk, vláknité se rozmnožují hormogoniemi, nebo akinetami. Všeobecně je uznáváno nepohlavní rozmnožování, i když existují nepřímé důkazy o rekombinaci genů v parasexuálním procesu (1).

Buňky se dělí zaškrcováním plazmatické membrány. Nové buňky se tvoří rozdělením buňky ve dvě části. Dceřiné produkty dorostou a nabudou tvaru mateřské buňky. Protože buňky sinic jsou oblaněné, je dělení protoplastu mateřské buňky vždy spojeno s tvorbou příčné membrány. Jednobuněčné sinice se zaškrtnou v rovině dělení a v tom místě se utvoří kroužek vnitřní přepážky, který se zvětšuje a po způsobu clonky zcela uzavře; tím se vytvoří příčná stěna, která oddělí obě dceřiné buňky. U hormogonálních sinic zcela chybí endogenní dělení protoplastu. Mají-li sinice tlusté vnější slizové membrány, dělí se a vytváří přepážku jen vnitřní, vlastní buněčná membrána. Opětovaným dělením buněk vznikají měchýřkovité, koncentricky uspořádané kolonie, např. u rodu *Gloeocapsa*. Podobně u vláknitých sinic, jejichž buňky mají válcovitý tvar, se utvoří uprostřed válcové plochy membrány kroužek přepážky, který roste dovnitř, uzavře se jako clonka a oddělí obě buňky (3).

2.1.7 Fotosyntetické pigmenty

Existují tři kategorie fotosyntetických pigmentů. Chlorofyly (porfyriny), molekuly podobné hemu, např. v hemoglobinu a cytochromech. Fykobiliny, s otevřeným tetrapyrolovým řetězcem, podobné též žlučovým barvivům biliverdinu, bilirubinu, sterkobilinu. Karotenoidy (isoprenoidy), příbuzné se steroidy. (4)



Obrázek 3 Absorpční spektra fotosyntetických pigmentů. Tyto pigmenty pokrývají prakticky celé spektrum slunečního záření ve viditelné oblasti. (4)

2.1.7.1 Chlorofyly

Jsou obligatorními a nejdůležitějšími fotosyntetickými pigmenty. Základní strukturou je porfyrin. Porfyriny jsou tetrapyroly vzájemně spojené methinovými můstky s bohatým systémem konjugovaných dvojných vazeb. Všechny chlorofyly mají obdobnou strukturu. Kromě porfyrinu, který je vždy zodpovědný za fotochemické vlastnosti, obsahuje molekula chlorofylu ještě alkohol: nejčastěji fytylový zbytek obsahující 20 atomů uhlíku. Je to isoprenoid. Univerzální rozšíření chlorofylu-a u organismů s oxygenním typem fotosyntézy vedlo ke správnému názoru, že pouze chlorofyl-a je vlastním transformátorem energie ve fotosyntéze, který se bezprostředně účastní primárního fotochemického děje, tj. přeměny elektromagnetického záření v energii chemickou. Molekuly chlorofylů absorbují v oblasti vlnových délek 415 až 440 nm a v červené oblasti spektra 640 až 700 nm. Absorbce v červené oblasti spektra je významná pro fotosyntézu, odpovídá excitaci elektronů do 1. singletového excitovaného stavu. (4)

2.1.7.2 Ostatní pigmenty

Ostatní pigmenty v thylakoidech mají pouze pomocnou funkci: zachycují kvanta dopadajícího záření a energii svého excitovaného stavu přenášejí na chlorofyl-a v reakčním centru. Proto se nazývají pomocná, akcesorická nebo doplňková. Doplnují, rozšiřují totiž spektrum

fotosyntetického účinného záření. Patří sem další typy chlorofylů, u sinic a ruduch biliproteiny (fykobiliny), které rozšíří fotosynteticky účinné záření o modrou a červenou oblast, eventuelně karotenoidy, které doplní záření ve žlutozelené části spektra. (4)

2.1.8 Adaptace na světelnou intenzitu

Fytoplankton reaguje na kolísání světla v různých denních dobách. Jedná se o tzv. anténní efekt, což znamená distribuci pigmentů přes maximální oblast zachycení, které může být dosaženo ve výrazně zploštělých (zkrácení v jednom rozměru) nebo oslabených tvarech (zkrácení ve dvou rozměrech), to vyžaduje evoluční čas. Zvýšení koncentrace fotosyntetických pigmentů na jednotku biomasy zvyšuje konkrétní možnosti buňky pro sklizeň světla a může být účinná v rámci celého života jednotlivců. V přírodní populaci fotoadaptivní *Asterionella formosa*, bylo zjištěno, že během jednoho dělení buněk se koncentrace chlorofylu-a na buňku může zvýšit koeficientem 1,8. Podobný nárůst byl pozorován u *Cryptomonas cf. ovata*, a v populaci *Planktothrix mougeotii* byl prokázán dokonce devítinásobný rozdíl. Druhy s možností přizpůsobení své vertikální pozice ve vodním sloupci (pomocí vztlaku nebo plavání) mohou aktivně vybrat tu svou část, která je optimální pro fotosyntézu. Dalším prostředkem ke zvýšení spektrální šířky absorpce světla (chromatická adaptace) je dosaženo zvyšováním koncentrací pomocných pigmentů, zvláště fykobiliproteinů a xantofylů (8).

2.1.9 Vybrané významné rody sinic

2.1.9.1 Řád Chroococales

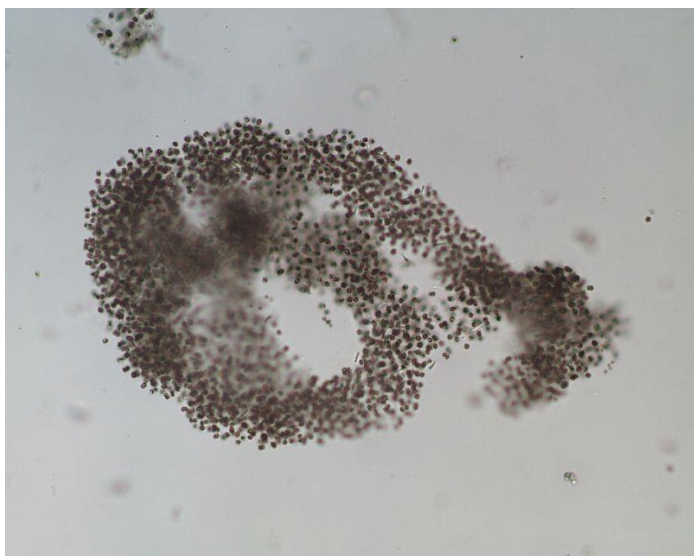
Jednobuněčné sinice, zpravidla tvořící kolonie. U nejsložitějších z nich je náběh k vláknitému růstu (3). Kokální typ stélky, neobsahuje heterocyty ani akinety (9).

Rod *Microcystis*

Jedná se o zástupce kokálních sinic tvořící mikroskopické nebo makroskopické slizové kolonie, které se jeví jako práškovitý vodní květ. Kolonie jsou zprvu kulovité nebo mírně zploštělé, později nepravidelné, laločnaté, děrované, s nepravidelně uloženými kulovitými buňkami v homogenním amorfním bezbarvém slizu. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 3 - 10 μm v závislosti na příslušnosti k morfotypu. (10)

Nejčastější součást vodních květů. Ve 20. letech byla v Jihoafrické republice u druhu *M. toxica* poprvé popsána toxicita sinic. Nejčastější zástupci u nás jsou *M. aeruginosa*, která má typické prolamované kolonie a úzký lem kolem okraje kolonie a *M. wesenbergii*, která má

pevný sliz a střevovité části kolonie. *M. ichthyoblabe* má nepravidelné kolonie, často subkolonie a velmi malé buňky (5).



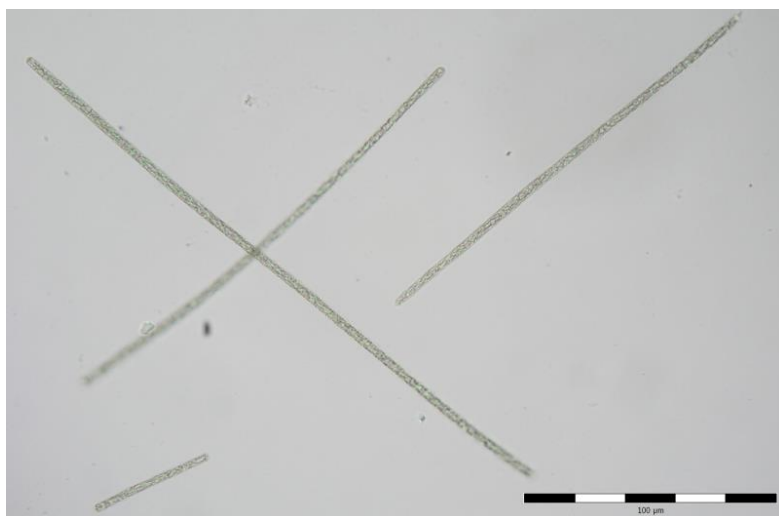
Obrázek 4 *Microcystis aeruginosa* (5)

2.1.9.2 Řád Oscillatories

Jsou to vláknité sinice, lišící se od pleurokapsálních sinic svou hormogonální stavbou. Znamená to, že jejich buňky jsou sestaveny v jednořadě, zřídka víceřadě vlákno a tvoří tzv. trichom (3). Vláknitá nevětvená stélka, neobsahuje heterocyty ani akinety (9).

Rod *Planktothrix*

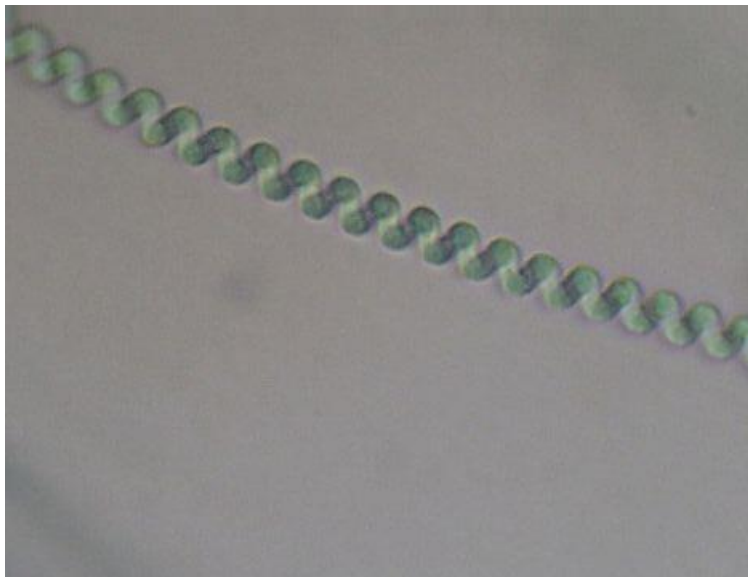
Jednotlivá planktonní vlákna, tvořící vodní květy. Trichomy mají velmi patrné aerotopy, v optickém mikroskopu jsou vidět jako spousta tmavých zrníček. Častými druhy jsou *P. agardhii*, která je zelená, a červená *P. rubescens* (5).



Obrázek 5 *Planktothrix agardhii* (5)

Rod *Spirulina*

Hustě spirální vlákna, jejichž buněčné přepážky jsou mezi jednotlivými buňkami ve světelném mikroskopu prakticky nepozorovatelné. Většina druhů je dosti halotolerantní - vyskytují se v mírně zasolených vodách, většinou v nárostech (např. *S. major*) (5).



Obrázek 6 *Spirulina sp.* (5)

2.1.9.3 Řád Nostocales

Stélka vláknitá, nevětvená, nebo s nepravým větvením, obsahuje heterocyty i akinety (9).

Rod *Anabaena*

Velmi častý rod, jehož větší část druhů je planktonní a tvoří významnou část vodního květu, druhá část je bentická. Zhruba kulovité buňky tvoří charakteristické řetízky s častými heterocyty (metamerické vlákno). Planktonních druhů je jen u nás 15 – 20, některé jsou mírně toxické. Nejvíce se vyskytovaly ve slabě hnojených rybnících, s rozvojem těžkého hnojení zmizely skoro všechny kromě *A. lemmermanii*. Planktonní typy vytváří buď rovná vlákna (*A. viguierii*), nebo jsou šroubovitě stočené (*A. crassa*). Nejčastějším druhem je výše zmiňovaná *A. lemmermanii*, jejíž vlákna se sdružují do nepravidelných chomáčů, akinety se vyvíjejí po obou stranách heterocytu a vlákna se smotají tak, že ty akinety tvoří shluk uprostřed. Bentické anabaeny nemají na rozdíl od planktonních druhů aerotopy. U nás je patrně nejběžnější půdní druh *A. subcylindrica* (5)



Obrázek 7 *Anabaena circinalis* (11)

Rod *Nostoc*

Velice široký rod o mnoha zástupcích. Vyznačuje se zejména tvorbou makroskopických kolonií. Větší část zástupců rodu žije mimo vodní prostředí: nejčastější zástupce, *N. commune*, tvoří několika centimetrové, tmavě zelené kolonie na suché písčité půdě - na okrajích cest, ve stepích a na polopouštích. Velké množství druhů rodu *Nostoc* vstupuje do symbiotických vztahů (5).

2.1.9.4 Řád Stigonematales

Vláknitá stélka s pravým větvením, obsahuje heterocyty i akinety (9).

Rod *Stigonema*

Rozsáhlý rod (asi 40 druhů), s těžištěm výskytu v tropech. Boční vlákna vyrůstají z hlavního vlákna do všech stran. Především žijí subaericky, v půdě nebo v nárostech, ale ne v planktonu. Jejich vlákna mohou být buď uniseriátní (jednořadé) nebo polyseriátní (více buněk vedle sebe). *S. ocellatum* je uniseriátní druh, který žije v nárostech kyselých vod, *S. informe* je polyseriátní a vyskytuje se na vlhkých skalách v horách (Krkonoše, Tatry) (5).



Obrázek 8 *Stigonema ocellatum* (5)

2.2 Eutrofizace

Eutrofizace je soubor přírodních a uměle vyvolaných procesů vedoucích ke zvyšování obsahu anorganických živin stojatých a tekoucích vod (12).

Termín eutrofizace, odvozený od slova eutrophia řeckého původu, o významu „dobře živěný“, popisuje stav jezer či nádrží s nadměrným růstem sinic a řas. Ačkoli některé produkty sinic i řas jsou nezbytné pro podpoření potravinového řetězce vodního ekosystému, zvýšený růst sinic a řas za eutrofních podmínek může vést k těžkému zhoršení stavu vodního tělesa. (13)

2.2.1 Příčiny

Eutrofizace je přírodní děj, jenž v důsledku lidské činnosti přesáhl přirozené meze. Přírodní eutrofizace je způsobena uvolňováním dusíku a fosforu, případně silikátů, z půdy, sedimentů a odumřelých vodních organizmů. Umělá eutrofizace je způsobena intenzivní zemědělskou výrobou, některými druhy průmyslových odpadních vod, používáním polyfosforečnanů v pracích a čistících prostředcích a zvýšenou produkcí komunálních odpadních vod a odpadů fekálního charakteru (12).

Prvním krokem k eutrofizaci vodního tělesa je přísun rostlinných živin z odtoku povodí, či kanalizace. Vodní těleso bohaté na živiny poté fotosyntézou vyprodukuje velké množství rostlinné biomasy, společně s menším množstvím živočišné biomasy. Odumřelá biomasa se shromažďuje na dně jezera, kde se částečně rozkládá, recykluje živiny: oxid uhličitý, fosfor, dusík a draslík. Pokud jezero není příliš hluboké, rostliny zakořeněné na dně začnou růst, čímž urychlují nahromadování pevného materiálu v kotlině. Případně může vzniknout i bažina, ze které se časem vytvoří louka nebo les (13).

I když je eutrofizace jako každý přírodní jev způsobena celým komplexem faktorů, je obsah fosforu uváděn jako limitní faktor (zejména ve srovnání s obsahem dusíku). To potvrzuje i výzkum závislosti trofie jezer na obsahu dusíku a fosforu. Určující pro růst řas byla vždy koncentrace fosforu (c_P). V 1 kg polyfosforečnanů je obsaženo dostatečné množství fosforu pro vytvoření 115 kg biomasy vodních rostlin. Podle množství fosforu obsaženého ve vodách lze vody rozlišovat dle tabulky 1. (12)

Tabulka 1 Typy vod dle obsaženého množství fosforu

	$c_P / \mu\text{g/l}$
Oligotrofní	< 10
Oligo-mesotrofní	10 - 20
Mesotrofní	20 - 50
Eutrofní	50 - 100
Hypertrofní	> 100

2.2.2 Důsledky

Prvotním signálem počínající eutrofizace na vodním biotopu je nárůst planktonních sinic, řas a vodních makrofyt. Dále dochází ke zhoršování hydrochemického a kyslíkového režimu, ke vzniku a hromadění jedovatých plynů, k nepříznivým kyslíkovým poměrům u dna a ke zmenšení produkční plochy nádrží zarůstáním. Biocenóza fytoplanktonu je poměrně chudá, zvyšuje se zákal, a tudíž se snižuje průhlednost vody, v jednotlivých vrstvách vody během letní stratifikace jsou zaznamenány značné změny koncentrace kyslíku a zvýšení koncentrace živin. V některých úživných nádržích může dojít k masovému úhynu ryb. V jarním období se zde silně rozvíjí fytoplankton, který fotosyntetickou asimilací dodává do vodních vrstev kyslík a z vody zpětně vyčerpává oxid uhličitý. Tím se narušuje uhličitánová rovnováha, která se projeví zvýšením pH až do oblasti 10. Se zvýšením pH se zvyšuje i koncentrace amonných iontů a amoniaku, který je toxický pro ryby. V letním období, kdy začíná v nádrži narůstat teplota vody, se začíná pomnožovat zooplankton, který má spásající vliv na fytoplankton. Zooplankton vyžíráním způsobí silnou redukci fytoplanktonu, koncentrace chlorofylu ve vodním sloupci začne klesat. Jev se projeví snížením zákalu a zvýšením průhlednosti vody, také koncentrace kyslíku ve vodě klesá. U ryb se pak následně projevuje nekróza žáber (14).

3 Materiály a metody

3.1 Charakterizace VD Seč

Přehrada Seč byla vybudována v letech 1924 až 1935 na středním toku Chrudimky. Jejím hlavním úkolem bylo chránit území podél Chrudimky před velkými vodami a regulace průtoku v obdobích sucha. Její výstavbou došlo skutečně k podstatnému zlepšení průtokových poměrů. Minimální průtok byl zajištěn do výše 1,6 m³/s a retenční objem nádrže byl dostatečný. V roce 1947 byla uvedena do provozu vodní elektrárna. (15)

3.1.1 Chrudimka

Řeka Chrudimka má při své celkové délce téměř 109 km výškový rozdíl pramene a ústí 470 m. Pramení v CHKO Žďárské vrchy nedaleko obce Filipov cca 680 m.n.m.. Dříve se řece říkalo také Ohebka nebo Kamenice. Rozloha povodí je 858,5 km². Vodní stavby postavené na Chrudimce mají převážně vodárenský význam. Jsou využívány také k rekreaci a na výrobu elektrické energie. Jsou to přehrady: Hamry, Seč (2 nádrže), Křižanovice (2 nádrže). Největší z nich je přehrada Seč. Ta dokáže zadržet až 22 mil. m³ vody a výška hráze je 42 m. Nejstarší je přehrada Hamry, která byla postavena v roce 1912.

3.1.2 Parametry vodního díla, odběrová místa

Hlavní přehradní hráz Seč

Typ:	gravitační, oblouková, zděná z lomového kamene
Umístění:	v úzkém údolí mezi skalními výchozy Oheb a Vildštejn nedaleko města Seč
Šířka v úrovni základů:	42 m
Šířka v koruně:	6,8 m
Délka v koruně:	165 m
Kóta koruny hráze:	491,11 m. n. m.
Plocha povodí:	216,2 km ²
Průměrná výška ročních srážek:	793 mm
Průměrný roční průtok:	2,41 m ³ /s
Kóta hladiny:	469,61 m.n.m.
Objem:	1,303 mil. m ³
Zatopená plocha:	27,584 ha



Obrázek 9 Přehrada Seč s vyznačenými odběrovými místy. (15)

Tabulka 2 Souřadnice odběrových míst na VD Seč

	zkratka	GPS souřadnice
Odběrové místo 2	Seč02	N49°48.953'E015°39.780'
Odběrové místo 3	Seč03	N49°49.224'E015°38.834'
Odběrové místo 4	Seč04	N49°49.833'E015°38.550'
Odběrové místo 5	Seč05	N49°50.026'E015°39.109'
Odběrové místo 6	Seč06	N49°50.200'E015°39.150'

Odběry vzorků byly prováděny od 2. května 2012 do 23. října 2012. Na odběrovém místě Seč02 byl odebírán povrchový vzorek označený 2L a vzorek odebraný z hloubky u dna nádrže 2H (cca 3 m), na místě Seč03 byl odebírán povrchový vzorek 3L, na Seč04 byl odebírán povrchový vzorek 4L a vzorek z hloubky 4H (cca 12 m), na místě Seč05 byl odebírán povrchový vzorek 5L a na odběrovém místě Seč06 umístěném u hráze přehrady byl odebírán povrchový vzorek 6L, vzorek odebraný v poloviční hloubce ode dna 6H (cca 13 m) a hloubkový vzorek odebraný u dna 6P (cca 25 m).

Odběrová místa byla označena státním podnikem Povodí Labe. Na odběrovém místě Seč01 nebyly vzorky odebírány, jelikož je toto odběrové místo umístěno na přítoku řeky Chrudimky a kvůli proudění je odebírání vzorků na přítoku nevhodné pro stanovení rozšíření sinic v nádrži.

3.2 Použité materiály

Standardy:

C-fycocyanin ze *Spirulina sp.*, Sigma

Rozpouštědla:

Methanol HPLC, LAB-SCAN

3.3 Metody

3.3.1 Monitoring sinic

Všechny sinice obsahují chlorofyl-a. Mezi chlorofylem-a a abundancí sinic nelze hledat přímou závislost, protože koncentrace chlorofylu-a na jednotku biomasy je proměnlivá a navíc chlorofyl-a obsahují i všechny fototrofní řasy. Při interpretaci výsledů je vždy nutné tyto dva parametry srovnávat s vědomím, že neukazují na totéž. (16)

Účinnost různých monitorovacích metod při detekci změn kvality vody v čase, závisí na dosažitelných intervalech odběrů vzorků, a na tom, jak konkrétní intervaly souvisí s rozsahem dočasných změn kvality vody. Nicméně frekvence vzorkování vody je zřídka kdy přizpůsobena aktuální změně kvality vody ve sledované oblasti. Manuální vzorkování je často limitováno finančně, a ne optimálním načasováním odběrů vzorků. Toto omezení monitorovacích metod proto často určuje schopnost metod odhadnout skutečnou střední hodnotu a rozptyl hodnot pro určitou časovou periodu nebo roční období. V důsledku čehož odhadujeme, jak různé vzorkovací intervaly určují průměr a směrodatnou odchylku v určité sledované oblasti pomocí vysokofrekvenčních dat z in situ automatizovaných monitorovacích stanic. Měření fluorescence chlorofylu-a pro automatizované monitorovací stanice jsou kalibrovány pomocí měření fluorescence fykocyaninu a chlorofylu-a analyzovaného z vzorků vody v laboratoři. Výsledky se následně použijí pro odhad standardní chyby průměru a směrodatné odchylky pro různé velikosti vzorků. Měření v meso-eutrofních jezerech mírného pásma vykazují relativně vysoké statistické chyby při vzorkování prováděném jednou měsíčně. Naopak týdenní odběry přinesly relativně malé výhody v přesnosti ve srovnání s čtrnáctidenním vzorkováním. Toho může být využito při vývoji vzorkovacích metod úpravou intervalů vzorkování tak, aby vyhovovaly aktuálním dočasným změnám ve sledované oblasti, a také pro odhad užitečnosti již dříve získaných dat. (17)

3.3.2 Odběr vzorků vod

Správný odběr vzorků vod a kalů je nezbytnou podmínkou, aby výsledky odpovídaly skutečnému složení vod a kalů. Je proto zapotřebí dodržovat některé zásady, které jsou shrnuty v normách ČSN EN 5667 v částech 1 až 21, týkající se všech druhů vod, sedimentů a kalů (18).

Pro odběry vzorků jsou standardně používány různé druhy odběrových zařízení (tzv. odběráky, samplery), přesný typ se volí podle druhu lokality, hloubky odběru, objemu vzorku a také podle následně zamýšlené analytické metody. Nejjednodušším způsobem odebrání vzorků je hladinový odběr. Ten se může provádět, kromě prostého nabrání do nádoby, také za pomoci teleskopické tyče spojené s odběrovou nádobou. U stojatých vod (jezera, rybníky, studny, apod.) většinou potřebujeme odběrák schopný odebrat vzorek z větší hloubky. Nejčastěji používané odběráky pracují na principu dálkově ovladatelné pasti. Jedná se o nádoby, které se do hloubky spouštějí otevřené a po impulzu (trhnutí lankem, úder závaží, převrácení, apod.) se zavřou a vzorek je vytažen k hladině.

Pro odběr hloubkových vzorků přírodních vod byl použit Van Dornův odběrák. U nějž je možné analyzovat nejen fyzikálně chemické parametry vody, ale také kvantitativně hodnotit planktonní společenstva.

3.3.3 Terénní stanovení

Ať použijeme jakoukoliv metodu a zařízení, musíme vždy pamatovat na reprezentativnost vzorkování. Vzorek vody odebraný k rozboru musí reprezentovat jakost vody v místě odběru. Typ vzorku (prostý či směsný), druh (jednorázový či řadový), místo (např. název obce, levý či pravý břeh vodního toku, GPS souřadnice) a bod odběru (např. střed proudnice, hloubka), včetně četnosti a časové i prostorové návaznosti odběru, se řídí účelem rozboru a místními podmínkami. Pokud vzorkujeme větší vodní plochy, je dobré jednotlivé odběry provést na různých místech. Většina sledovaných pozadřových parametrů povrchových vod (pH, teplota, TOC a mnoho dalších) vykazuje výrazné sezónní, ale i diurnální výkyvy. Proto by vzorkování mělo probíhat např. v přibližně stejnou denní dobu, aby výsledné průměrné hodnoty mohly být považovány za reprezentativní.

Dalším důležitým okamžikem při odběru v terénu je uskladnění vzorku až do okamžiku konečné analýzy-rozboru. Je samozřejmostí, že uchovávací nádoby (stejně jako odběrové) musí být čisté a nesmí vzorek kontaminovat. Typ uchovávací nádoby musí odpovídat zamýšlené analýze. Při uskladňování vzorků dbáme především na teplotu a délku skladování.

U některých analýz je možná fixace (konzervace) vzorku podle standardizovaných postupů. Úkolem konzervace je zabránit změnám hodnot ukazatelů vody v odebraném vzorku v časovém intervalu mezi jeho odběrem a zahájením analýzy.

Velmi jednoduše se v terénu stanovuje transparence (průhlednost) vody, metodou tzv. Secchiho disku. Secchiho disk je kovová kruhová deska dané velikosti, na které jsou kontrastně (černá-bílá) odlišeny čtyři sektory. Desku spouštíme ze člunu nebo plošiny do hloubky a sledujeme, kdy dojde ke zmizení černobílých sektorů (kdy už nejsme schopni poznat rozdíl mezi černou a bílou). Vzdálenost na spouštěcím lanku označíme a změříme. Daná vzdálenost v metrech nebo centimetrech je pak hodnotou transparence vody.

3.3.4 Multiparametrická sonda

Běžně se v terénní analytice stanovují fyzikálně-chemické parametry vody jako pH, konduktivita, oxidačně-redukční potenciál, obsah kyslíku, teplota a zákal vody. Tato měření provádíme speciálními přístroji s připojenou sondou (s jednou nebo více elektrodami, senzory) na různě dlouhém kabelu, které pracují na principu měření elektrochemického napětí na membráně. Protože většina měřených parametrů je závislá na teplotě, jsou přístroje často vybaveny teplotním čidlem, umožňujícím automatickou teplotní kompenzaci. Pro terénní práci jsou určeny přístroje v přenosném kapesním, případně tužkovém provedení (tyto mají většinou také částečně vodotěsné provedení).

Pro měření byla použita multiparametrická sonda YSI 6600 V2 (YellowSprings, Ohio USA).

3.3.5 Metody kvantifikace řas a sinic

Ke kvantifikaci biomasy řas a sinic se využívá metod mikroskopie, flow-cytometrie a analýzy obrazu, výstupem těchto stanovení je počet buněk, případně objem a hmotnost biomasy. Ke stanovení množství pigmentů se používá metod spektrofotometrie, fluorimetrie a chromatografických metod. Při výběru vhodné metody kvantifikace se uplatňuje hledání kompromisů v přesnosti a náročnosti dané metody. Kvůli velkému množství vzorků se provádí monitoring in situ pro detekci změn ve společenstvu, zároveň se vyberou vzorky pro mikroskopickou analýzu. Fluorimetrické stanovení umožňuje rozlišení a kvantifikaci hlavních spektrálních skupin, stanovují se pigmenty chlorofyl-a, fykocyanin a fykoerytrin. Sinice se od řas odlišují na základě rozdílných excitačních a emisních vlnových délek pigmentů. Zatímco sinice excitují při 600 nm a emitují v rozmezí 650 - 685 nm, řasy excitují v rozmezí 450 - 500 nm a emitují při 685 nm. Fluorimetrické stanovení se provádí v laboratoři, nebo přímo v terénu ponornou sondou. Relativní množství pigmentů je částečně ovlivněno vnějšími

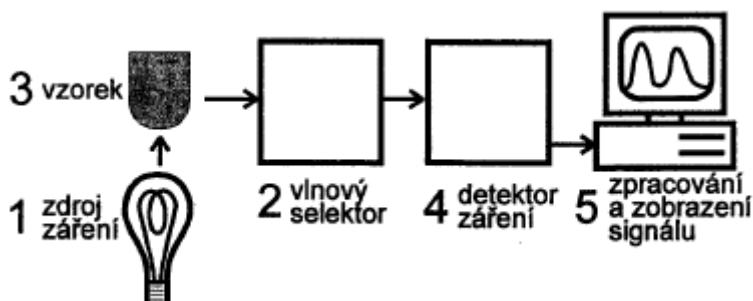
faktory, jako jsou světlo, živiny, teplota a stres, proto kolísá. Fluorimetrické stanovení může být limitováno rušivým vlivem zákalu, huminů, huminových kyselin a organických polutantů, může být též ovlivněno velkým množstvím fytoplanktonu, při němž dochází k vzájemnému stínění a reabsorbci emitovaného světla, velké kolonie (>1000 buněk) navíc neumožňují průnik světla k buňkám uvnitř. Fyziologický stav buněk má také částečný vliv na intenzitu fluorescence. Přesto, je hlavní výhodou fluorimetrie vysoká citlivost. (19)

3.3.6 Fluorescenční spektrometrie

Fluorescenční spektrometrie patří mezi optické metody, jejichž podstatou je interakce elektromagnetického záření se zkoumanou látkou. Při fluorescenční spektrometrii dochází k výměně energie mezi zářením a zkoumanou látkou, která spočívá v emisi záření, řadí se tedy mezi metody spektrální. Atomy jsou excitovány zářením a poté se velmi rychle vrací do základního energetického stavu. Emitované fluorescenční záření je měřeno a vyhodnocováno měřením velikosti světelného toku.

Fluorimetr

Základními součástmi přístrojů pro spektrální analýzu jsou: zdroj záření, zařízení pro umístění vzorku, disperzní soustava, detektor záření a vyhodnocovací/zpracovávací zařízení. (20)



Obrázek 10 Principiální uspořádání základních komponent spektrálních přístrojů pro fluorescenční spektrometrii. Fluorescenční záření se měří kolmo na směr budícího, aby nebylo intenzivním budícím zářením překryto. (20)

Zdroj záření umožňuje excitaci vzorku, který pak emituje charakteristické záření. Ve fluorescenčních spektrometrických metodách jsou základními typy zdrojů záření rozžhavené tuhé látky emitující spojité (polychromatické) spektrum záření, elektrický výboj v plynech a parách kovů poskytující dle konstrukce výbojky spojité nebo čárové spektrum záření. Měření fluorescence se provádí kolmo na směr budícího paprsku.

Vlnový selektor, monochromátor, je zařazen až za vzorek před detektor. Atomy absorbují záření ve velice úzkých pásmech vlnových délek a neexistuje monochromátor, který by z polychromatického zdroje vymezil tak úzké pásmo. Proto se v atomové fluorescenční spektrometrii používají speciální zdroje, z nichž vychází záření obsahující přesně ty vlnové délky, které stanovované atomy absorbují. A jsou to přesně ty vlnové délky, které stanovované atomy samy po excitaci emitují, tj. vlnové délky odpovídající emisním čarám příslušného stanovovaného prvku. Úkolem monochromátoru je z těch absorbovaných vlnových délek vybrat tu, která je pro detekci nejvýhodnější, zpravidla vlnovou délku odpovídající resonančnímu přechodu. (20)

Při měření emisních spekter fluorescence je excitační monochromátor nastaven na pevnou vlnovou délku budícího záření. Při měření excitačních spekter je pevně nastavena vlnová délka na emisním monochromátoru.

Pro měření byl použit fluorimetr TECAN Infinite M200 (TECAN, Švýcarsko).

3.3.7 Příprava pokusů pro fluorimetrická stanovení

Hodnoty fluorescence lze podle předem nebo následně získané kalibrační křivky snadno převést na konkrétní hodnoty chlorofylu-a (ten stanovíme u několika vybraných vzorků standardní metodou). Velkým problémem je to, že klasické fluorimetry umožňují okamžité měření pouze s jednou excitační a jednou emisní vlnovou délkou, což je vzhledem k různorodosti fotosyntetických pigmentů málo. Navíc ve sladkých vodách bývá velké množství rozpuštěných organických látek, které významně přispívají k celkové fluorescenci. V prvním případě bychom měřili fluorescenci chlorofylu-a (emise 685 nm) zprostředkovanou dalšími přídatnými pigmenty (chlorofyl-b, chlorofyl-c, karotenoidy - excitace v oblasti 460-500 nm), ve druhém pak autofluorescenci fykocyaninu (excitace cca 610 nm, emise cca 650 nm). Z poměru těchto dvou hodnot pak lze nepřímo určit podíl sinic na celkové biomase fytoplanktonu. (21)

3.3.7.1 Příprava na měření kalibrační přímky pro c-fykocyanin

0,4265 g krystalického c-fykocyaninu (Sigma) bylo kvantitativně převedeno do 10,0 ml odměrné baňky a následně doplněno 10 % roztokem methanolu na objem 10,0 ml. Z takto připraveného standardního roztoku c-fykocyaninu byla připravena kalibrační řada osmi roztoků o koncentracích 2000,0 µg/l, 1000,0 µg/l, 500,0 µg/l, 250,0 µg/l, 125,0 µg/l, 62,5 µg/l, 31,3 µg/l a 15,6 µg/l.

Tyto kalibrační roztoky byly napipetovány do otvorů fluorimetrické destičky (destička obsahuje 8 x 12 otvorů, objem každého otvoru je 300 µl). Pipetováno bylo vždy 3x 300 µl z každého kalibračního roztoku a destička se vložila do fluorimetru TECAN Infinite M200.

V programu Magellan byly nastaveny tyto parametry metody:

Orbitální protřepávání destičky po dobu 10 s amplitudou 1 mm a frekvencí 87,6 RPM

Excitační vlnová délka 595 nm

Šířka excitačního pásma 9 nm

Emisní vlnová délka 670 nm

Šířka emisního pásma 20 nm

Optimální zesílení;

následně se spustilo měření.

3.3.7.2 Centrifugace vzorků přírodních vod

Z povrchového vzorku přírodních vod silně napadeného vodním květem byl centrifugací zakoncentrován vodní květ. Centrifugace byla prováděna při teplotě 5 °C v různých časových intervalech a při různých otáčkách. 4000 RPM po dobu 5 minut se ukázalo jako zcela neefektivní, proto byly otáčky zvýšeny na nejvyšší možnou hodnotu nastavitelnou na použité centrifuze, tedy 5000 RPM, opět s časovým intervalem 5 minut. Nadále byly ponechány otáčky 5000 RPM a doba centrifugace se postupně zvyšovala po časových intervalech 5 minut až na interval 30 minut.

Jako nejvhodnější nastavení, s ohledem na účinnost centrifugace a časovou náročnost, byla následně vybrána centrifugace s dobou trvání 15 minut, při otáčkách 5000 RPM. Centrifugováno bylo vždy 50 ml vzorku. Supernatant byl odlit a pelet byl odebrán do plastické vialky a následně zamražen v mrazničce. Takto zamražený vodní květ byl následně používán jako standard pro pokusy, při kterých se zkoumaly rušivé vlivy ovlivňující fluorescenci vzorků.

3.3.7.3 Příprava pokusů na stanovení vlivu přidání extrakčního činidla ke vzorku na jeho fluorescenční vlastnosti

Byl sledován vliv přidání 10 % methanolu jako extrakčního činidla na fluorescenci vzorku. Ze zmraženého centrifugou zakoncentrovaného vodního květu, bylo odebráno 1,89 g zmraženého peletu. Ten byl následně rozpuštěn v 10 ml destilované vody a promíchán. Z tohoto zásobního roztoku byly vytvořeny dvě koncentrační řady. Obě vznikly odpipetováním 5,00 ml zásobního roztoku do plastických vialek. Obsah první vialky byl 10x

ředěn destilovanou vodou do druhé vialky, promíchán a 10x ředěn do třetí vialky, po promíchání obsahu třetí vialky bylo opět provedeno 10x ředění do čtvrté vialky. Do všech vialek druhé kalibrační řady bylo dodatečně přidáno 500 μ l 10 % methanolu. Všechny vialky byly důkladně protřepány, promíchány na vortex mixéru a ihned poté bylo z každé z nich odpipetováno 5x 300 μ l roztoku vzorku do fluorimetrické destičky, která byla následně proměřena při stejných parametrech jako kalibrační křivka, pro možnost porovnání a výpočet přesné koncentrace c-fykocyaninu v roztocích.

3.3.7.4 Příprava pokusů na stanovení vlivu mražení a rozmrazování na fluorescenční vlastnosti vzorku

Ze zmraženého centrifugou zakoncentrovaného vodního květu (viz kapitola 3.3.7.2), bylo odebráno 5,00 g zmraženého peletu. Následně byl rozpuštěn v 50 ml destilované vody. Z tohoto zásobního roztoku o neznámé koncentraci byly vytvořeny dvě koncentrační řady, každá z nich vznikla odpipetováním 10,00 ml, 5,00 ml, 2,50 ml a 1,25 ml zásobního roztoku do vialek a následným doplněním destilovanou vodou na celkový objem 10,00 ml. První koncentrační řada byla uložena do chladničky, aby bylo zabráněno rozkladu barviv vlivem osvětlení a teploty, druhá koncentrační řada byla zmražena pomocí suchého ledu a poté znovu rozmražena za laboratorní teploty.

Z těchto dvou koncentračních řad bylo, po důkladném protřepání vialek, odpipetováno 1800 μ l roztoku vzorku do zkumavek a přidáno 200 μ l 10 % roztoku methanolu, zkumavky byly promíchány na vortex mixéru a z jednotlivých zkumavek bylo okamžitě po promíchání odpipetováno vždy 5x 300 μ l každého roztoku do fluorimetrické destičky. Destička byla proměřena při stejných parametrech jako kalibrační křivka.

3.3.7.5 Příprava stanovení dalších vlivů na fluorescenci vzorků

Byly zkoumány další vlivy, které by mohly pozitivně ovlivnit měření fluorescence vzorků. Z odebraného povrchového vzorku přírodní vody bylo odpipetováno po 10,0 ml vzorku do 18 plastických vialek. Vždy pro 3 vialky byly vytvořeny stejné podmínky. Do vialek 1 - 15 bylo přidáno 1,1 ml 10 % roztoku methanolu, vialky 1 - 12 byly poté zmraženy v suchém ledu, zbylé vialky byly mezitím ponechány v chladničce. Zmražené vialky byly následně rozmraženy v sušárně při teplotě 30 °C po dobu 30 minut. Obsah vialek 1 - 6 byl mixován mixérem Ultra-Turrax po dobu 30 s. Vialky 1 - 3 a 7 - 9 byly na 10 minut vloženy do ultrazvukové lázně. Ve vialkách 16 - 18 byl původní vzorek bez úpravy.

Z každé vialky bylo odpipetováno 3x 300 µl roztoku do fluorimetrické destičky, která byla proměřena při parametrech metody shodných s parametry použitými při měření kalibrační řady.

3.3.7.6 Příprava přírodních vzorků pro fluorimetrickou determinaci obsahu c-fykocyaninu

Odebrané přírodní vzorky z nádrže Seč byly uskladněny v plastických vialkách v mrazničce. Po rozmražení za pokojové teploty byly vzorky důkladně protřepány a z každé vialky bylo odpipetováno 1800 µl do zkumavky, následně se přidalo 200 µl 10 % roztoku methanolu. Zkumavky se promíchaly na vortex mixéru a z každé bylo okamžitě pipetováno 5x 300 µl do fluorimetrické destičky. Ta se proměřila při parametrech metody shodných s parametry použitými při měření kalibrační přímky.

3.3.8 Statistické zpracování dat

Vypočtené hodnoty koncentrací fykocyaninu (c) byly nejprve uspořádány dle velikosti od nejmenšího po největší a poté se vypočetlo rozpětí R tohoto souboru výsledků ($n = 5$) jako rozdíl mezi největší a nejmenší hodnotou tohoto souboru:

$$R = c_{max} - c_{min} = c_n - c_1.$$

Poté byla vypočtena kritéria Q_1 a Q_n na základě Deanova a Dixonova testu pro odlehlé výsledky a srovnána s tabelovanou kritickou hodnotou kritéria Q_k pro $n = 5$.

$$Q_1 = \frac{c_2 - c_1}{R}$$

$$Q_n = \frac{c_n - c_{n-1}}{R}$$

Pro $Q_1 > Q_k$ byl výsledek x_1 vyloučen ze souboru jako odlehlý a pro $Q_n > Q_k$ byl výsledek x_n vyloučen jako odlehlý podle Deanova a Dixonova testu. Poté byly na odlehlost znovu testovány soubory výsledků, z nichž byly vyřazeny odlehlé výsledky a srovnána s tabelovanou kritickou hodnotou kritéria Q_k pro $n = 4$.

Střední hodnota souboru výsledků byla odhadnuta pomocí mediánu \tilde{c} , tedy hodnoty ležící uprostřed intervalu hodnot výsledků seřazených podle velikosti.

Směrodatná odchylka s pro malý počet stanovení provedených na jednom vzorku ($n \leq 20$) byla vypočtena dle vzorce:

$$s = k_n \cdot R,$$

kde k_n je koeficient tabelovaný pro jednotlivá n .

Relativní směrodatná odchylka s_r souboru dat byla vypočtena dle vzorce:

$$s_r = \frac{S}{\tilde{c}} \cdot 100.$$

Interval spolehlivosti $L_{1,2}$ na hladině významnosti 0,05, s koeficientem spolehlivosti 0,95, byl vypočten ze vzorce:

$$L_{1,2} = K_n \cdot R,$$

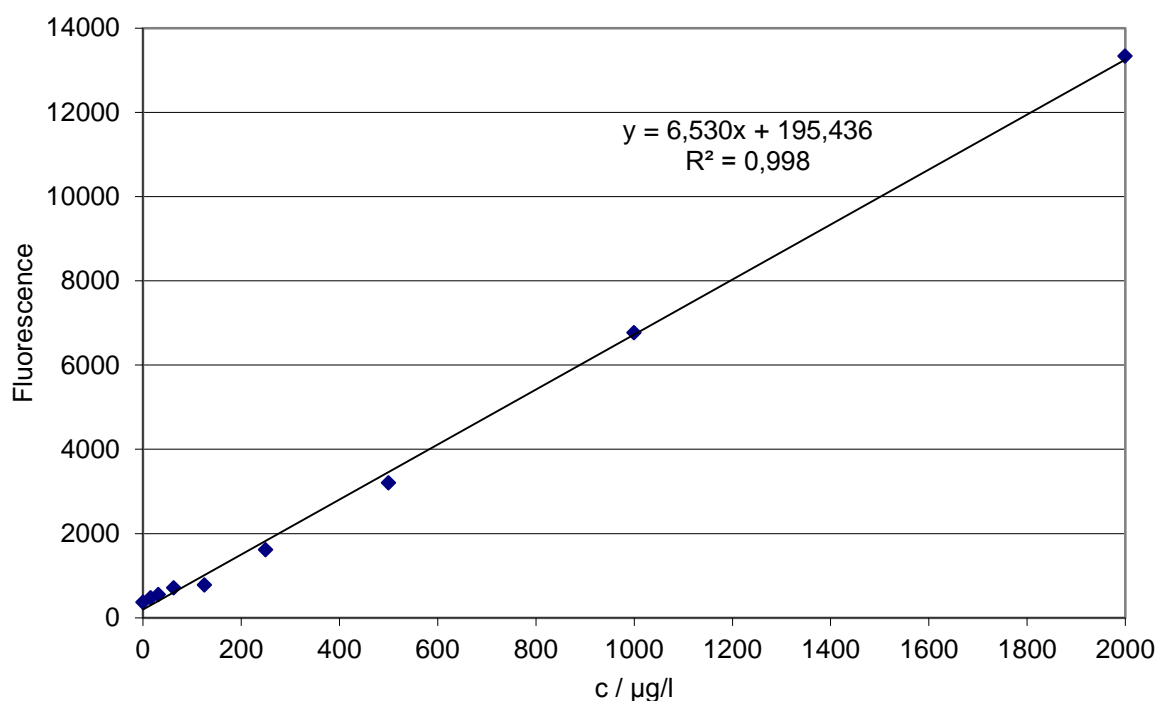
kde K_n je tabelovaný koeficient pro daný počet měření n a koeficient spolehlivosti 0,95. Pro koeficient spolehlivosti 0,95 leží výsledek s 95 % pravděpodobností v intervalu ohraničeném intervalem spolehlivosti $\tilde{c} \pm L_{1,2}$.

Výsledky a diskuze

3.4 Analýza obsahu c-fykocyaninu v přírodních vzorcích

3.4.1 Kalibrace

Optimální zesílení pro měření kalibrační řady bylo 193 násobné. Ze závislosti průměrné hodnoty fluorescence, vypočtené pro 3 měření, na koncentraci c-fykocyaninu ve vzorku, byla vynesla kalibrační přímka (viz graf 1). Všechna následující měření byla prováděna při zesílení 193, pro možnost srovnání a vypočtení koncentrace c-fykocyaninu z rovnice regrese.



Graf 1 Kalibrační závislost fluorescence na koncentraci c-fykocyaninu v roztoku

3.4.2 Ovlivnění fluorescenčních vlastností vzorku

3.4.2.1 Vliv přidání extrakčního činidla ke vzorku na jeho fluorescenční vlastnosti

Po přidání 10 % roztoku methanolu ke vzorkům přírodních vod obsahujících sinice, vykazovaly vzorky průměrně o 3 % nižší hodnoty fluorescence než vzorky obsahující destilovanou vodu.

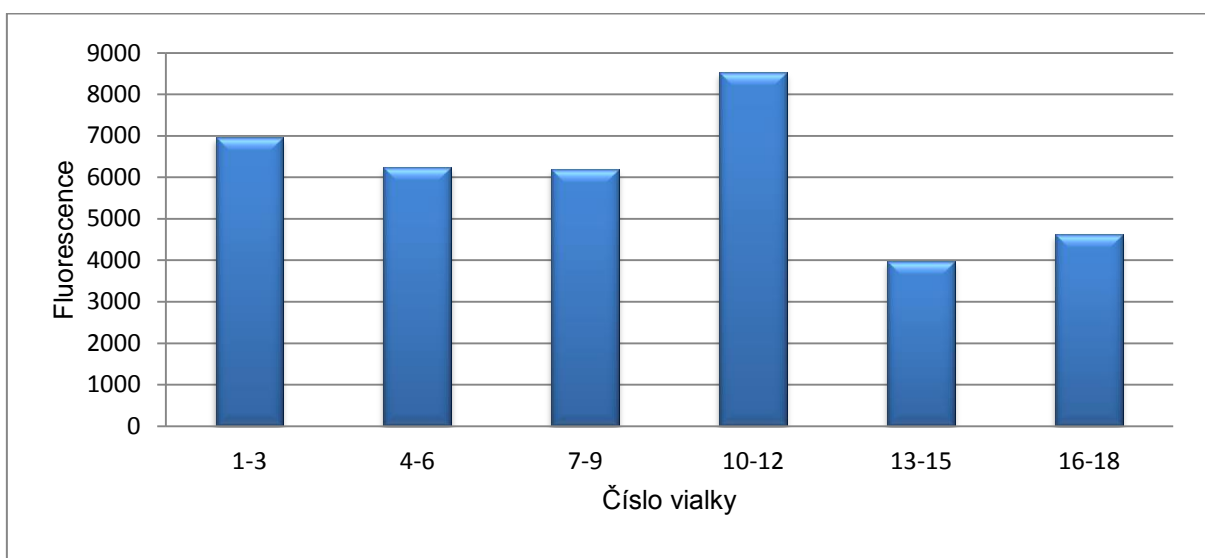
10 % roztoku methanolu byl v dalších pokusech používán jako extrakční činidlo, přestože jeho přidání snížilo hodnotu fluorescence vzorku. Toto snížení bylo považováno za nevýznamné, proto bylo při dalších pokusech zanedbáno.

3.4.2.2 Vliv mražení a rozmrazování na fluorescenční vlastnosti vzorku

Vyhodnocením naměřených hodnot fluorescence rozmražených vzorků bylo zjištěno, že naměřená hodnota fluorescence se v důsledku zmražení vzorku snižuje vždy o 5 %. Tento koeficient byl následně připočítáván ke změřeným hodnotám fluorescence všech rozmražených vzorků, jelikož přírodní vzorky odebrané z nádrže Seč nebylo možné analyzovat okamžitě a po převozu se uchovávaly v mrazničce.

3.4.2.3 Stanovení dalších vlivů na fluorescenci vzorků

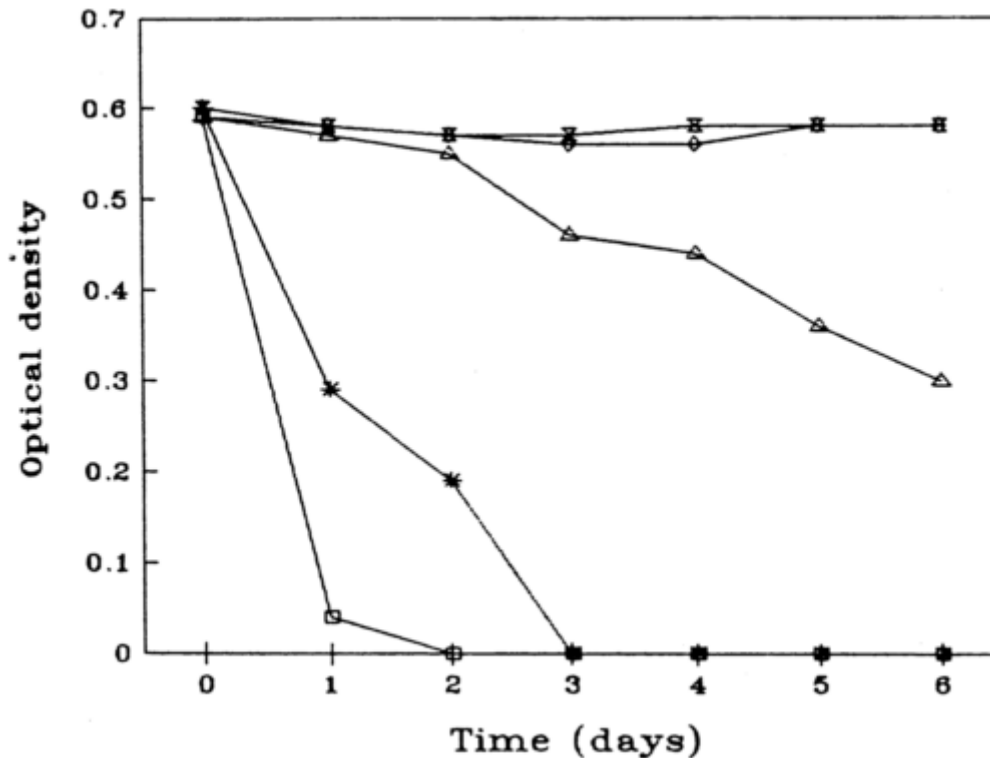
Průměrné hodnoty fluorescence ve vialkách 13 - 15 a 16 - 18 odpovídaly měření vlivu přidání 10 % roztoku methanolu ke vzorku, hodnota fluorescence původního vzorku byla mírně vyšší než naměřená hodnota fluorescence vzorku s přidaným methanolem. Jako nejvhodnější se ukázalo přidání 10 % roztoku methanolu ke vzorku před zmražením. Metody použití 10 % roztoku methanolu před zmražením s následným rozmixováním po rozmražení a s použitím ultrazvukové lázně po rozmražení se ukázaly být srovnatelně účinné. Metoda, při které se po rozmražení roztok rozmixoval a následně vložil do ultrazvukové lázně, vykazovala vyšší hodnoty fluorescence než dvě předchozí výše zmíněné metody, ale zároveň nižší hodnoty než metoda při které se před mražením přidal do vzorku methanol.



Graf 2 Vliv různých podmínek přípravy vzorku na jeho fluorescenci. Do vialek 1-3 bylo napipetováno 1,1 ml 10 % roztoku methanolu, byly zamrazeny, následně rozmrazeny

v sušárně při teplotě 30 °C po dobu 30 min, rozmixovány mixérem Ultra-Turrax po dobu 30 s a na 10 minut vloženy do ultrazvukové lázně. Do vialek 4-6 bylo napipetováno 1,1 ml 10 % roztoku methanolu, byly zamraženy, následně rozmraženy v sušárně při teplotě 30 °C po dobu 30 min a rozmixovány mixérem Ultra-Turrax po dobu 30 s. Do vialek 7-9 bylo napipetováno 1,1 ml 10 % roztoku methanolu, byly zamraženy, následně rozmraženy v sušárně při teplotě 30 °C po dobu 30 min a na 10 minut vloženy do ultrazvukové lázně. Do vialek 10-12 bylo napipetováno 1,1 ml 10 % roztoku methanolu, byly zamraženy, následně rozmraženy v sušárně při teplotě 30 °C po dobu 30 min. Do vialek 13-15 bylo napipetováno 1,1 ml 10 % roztoku methanolu. Ve vialkách 16 - 18 byl původní vzorek bez úpravy.

I přes pozitivní výsledky přidání 10 % roztoku methanolu ke vzorku před zmražením, byla u následujících pokusů používána metoda přidání 10 % roztoku methanolu ke vzorku až po jeho rozmražení, jelikož ve vialkách nebylo vždy stejné množství vzorku, kvůli čemuž nešlo přesně odhadnout optimální množství přidávaného methanolu. Nadále proto, že nebyl stanovován dlouhodobý vliv mražení vzorků s obsahem methanolu na jejich fluorescenci, zatímco vliv nízkých teplot na stabilitu fykocyaninu stanovil Sarada et al., podle něž se stabilita fykocyaninu při teplotě -4°C nemění ani po delších časových intervalech.



Obrázek 11 Graf závislosti absorbance vzorku na čase, vyjadřující stabilitu fykocyaninu při různých teplotách:

-○- - 4°C; -◇- 9 ± 1°C; -△- 30°C; -* - 45°C; a -□- 55°C. (22)

3.4.3 Fluorimetrická determinace obsahu c-fykocyaninu v přírodních vzorcích

Změřené hodnoty fluorescence přírodních vzorků odebíraných od května do října 2012 byly přepočítány na koncentraci c-fykocyaninu ve vzorcích. Vypočtené koncentrace byly statisticky zpracovány a testovány na odlehlost hodnot. Po vyřazení odlehlých hodnot na základě Deanova a Dixonova testu pro odlehlé výsledky, byly mediány koncentrací vyneseny do grafu znázorňujícího průběh zvyšování koncentrace c-fykocyaninu, a tedy i množství rozšíření sinic, v nádrži Seč v průběhu května až října 2012. Z přílohy 1 je zřejmé, že koncentrace c-fykocyaninu se v sezoně 2012 na všech odběrových místech zvyšovala pozvolna, ovlivněna nevhodnými klimatickými podmínkami pro růst sinic. Prudký nárůst koncentrace c-fykocyaninu nastal na většině odběrových míst na přelomu srpna a září.

Na odběrovém místě Seč02 vykazoval vzorek 2L nejvyšší koncentraci 4.9. 2012, zatímco vzorek 2H vykazoval maximální koncentraci již 1.8. 2012. Toto odběrové místo je umístěno nejbližší přítoku, je tedy velmi ovlivněno prouděním vodního toku, které způsobilo nízké naměřené koncentrace c-fykocyaninu ve vzorcích 2H.

Dne 15.5. 2012 nebyly odebírány vzorky 2L a 2H, dále ve dnech 9.10. 2012 a 23.10. 2012 nebyl odebírán vzorek 2H, kvůli nízkému stavu vody.

Tabulka 3 Vypočtené hodnoty koncentrace c-fykocyaninu ve vzorcích 2L. Vysvětlivky použitých symbolů viz kapitola 3.3.8.

2L	\bar{c}	\bar{R}	Q	s	$\frac{s_r}{\%}$	$\frac{L_{1,2}}{\mu\text{g/l}}$
Datum odběru	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}$				$\mu\text{g/l}$
2.5.	27	12	0,125	5	18	6
15.5.	-	-	-	-	-	-
29.5.	25	10	0,044	4	18	5
5.6.	37	24	0,263	10	27	12
13.6.	98	40	0,333	17	17	20
19.6.	67	18	0,301	8	11	9
26.6.	100	32	0,564	14	14	16
3.7.	101	14	0,110	6	6	7
10.7.	168	32	0,337	14	8	16
17.7.	173	23	0,499	10	6	12
24.7.	194	27	0,190	11	6	14
1.8.	153	6	0,100	3	2	5
6.8.	172	31	0,413	13	8	16
14.8.	242	53	0,260	22	9	27
21.8.	213	39	0,131	17	8	20
28.8.	501	280	0,141	119	24	143
4.9.	628	220	0,250	93	15	112
11.9.	251	71	0,179	30	12	36
18.9.	164	67	0,214	28	17	34
25.9.	55	17	0,064	7	13	9
9.10.	91	15	0,186	6	7	8
23.10.	39	10	0,155	4	11	5

Tabulka 4 Vypočtené hodnoty koncentrace c-fykocyaninu ve vzorcích 2H. Vysvětlivky použitých symbolů viz kapitola 3.3.8.

2H	\bar{c}	R	Q	s	$\frac{s_r}{\%}$	$\frac{L_{1,2}}{\mu\text{g/l}}$
Datum odběru	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}$				$\mu\text{g/l}$
2.5.	33	18	0,558	8	23	9
15.5.	-	-	-	-	-	-
29.5.	46	18	0,105	7	16	9
5.6.	45	16	0,336	7	15	8
13.6.	53	27	0,218	11	21	14
19.6.	51	15	0,315	6	13	8
26.6.	117	41	0,062	17	15	21
3.7.	86	12	0,618	5	6	6
10.7.	180	23	0,084	10	5	12
17.7.	202	47	0,067	20	10	24
24.7.	139	81	0,242	34	25	41
1.8.	206	85	0,188	36	18	44
6.8.	151	76	0,228	32	21	39
14.8.	139	31	0,164	13	10	16
21.8.	155	89	0,251	38	24	45
28.8.	162	32	0,220	14	8	16
4.9.	141	155	0,191	65	46	79
11.9.	193	58	0,009	24	13	29
18.9.	69	56	0,160	24	34	29
25.9.	47	21	0,149	9	19	11
9.10.	-	-	-	-	-	-
23.10.	-	-	-	-	-	-

Na odběrovém místě Seč03 byla změřena maximální koncentrace c-fykocyaninu dne 11.9. 2012, poté byl pozorován náhlý pokles koncentrace 18.9. 2012 a opětovný vzrůst 25.9. 2012. Tento pokles byl pozorován na všech odběrových místech a byl způsoben zvýšeným množstvím dešťových srážek a kolísáním teploty vzduchu. Následné opětovné zvýšení koncentrací c-fykocyaninu díky zlepšení klimatických podmínek na přelomu září a října 2012 bylo opět následováno poklesem v důsledku nástupu podzimu a souvisejícího ochlazení vzduchu.

Tabulka 5 Vypočtené hodnoty koncentrace c-fykocyaninu ve vzorcích 3L. Vysvětlivky použitých symbolů viz kapitola 3.3.8.

3L	\bar{c}	\bar{R}	Q	s	\bar{s}_r	$\bar{L}_{1,2}$
Datum odběru	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}$			%	$\mu\text{g/l}$
2.5.	28	10	0,547	4	14	5
15.5.	28	20	0,592	8	30	10
29.5.	26	14	0,327	6	22	7
5.6.	28	17	0,147	7	25	8
13.6.	42	4	0,564	1	4	2
19.6.	57	25	0,249	11	19	13
26.6.	80	6	0,000	3	3	3
3.7.	85	12	0,304	5	6	6
10.7.	142	80	0,088	34	24	41
17.7.	129	27	0,143	11	9	14
24.7.	133	69	0,431	29	22	35
1.8.	121	42	0,186	18	15	22
6.8.	126	67	0,530	29	23	34
16.8.	271	84	0,123	36	13	43
21.8.	131	32	0,086	13	10	16
28.8.	269	101	0,007	43	16	51
4.9.	321	82	0,083	35	11	42
11.9.	414	162	0,306	69	17	83
18.9.	149	98	0,012	41	28	50
25.9.	389	309	0,113	131	34	158
9.10.	239	85	0,129	36	15	44
23.10.	220	99	0,264	42	19	50

U odběrového místa Seč04 byla změřena nejvyšší koncentrace vzorku 4L dne 11.9. 2012 a vzorku 4H 4.9. 2012 což odpovídá aktuálním příznivým klimatickým podmínkám na nádrži Seč (viz příloha 5).

Tabulka 6 Vypočtené hodnoty koncentrace c-fykocyaninu ve vzorcích 4L. Vysvětlivky použitých symbolů viz kapitola 3.3.8.

4L	\bar{c}	\bar{R}	Q	s	$\frac{s_r}{\%}$	$\frac{L_{1,2}}{\mu\text{g/l}}$
Datum odběru	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}$				$\mu\text{g/l}$
2.5.	29	2	0,541	1	4	2
15.5.	29	6	0,256	2	8	3
29.5.	24	16	0,073	7	28	8
5.6.	32	7	0,144	3	9	3
13.6.	34	12	0,264	5	16	6
19.6.	50	9	0,277	4	8	5
26.6.	49	15	0,181	6	13	8
3.7.	91	16	0,290	7	8	8
10.7.	72	9	0,259	4	5	5
17.7.	148	42	0,469	18	12	21
24.7.	90	36	0,293	15	17	18
1.8.	100	19	0,203	8	8	10
6.8.	94	28	0,091	12	13	14
14.8.	172	84	0,382	36	21	43
21.8.	87	25	0,241	10	12	13
28.8.	210	128	0,085	54	26	65
4.9.	228	76	0,025	32	14	39
11.9.	435	185	0,246	78	18	95
18.9.	101	76	0,058	32	32	39
25.9.	277	62	0,675	26	9	31
9.10.	191	85	0,039	36	19	43
23.10.	91	85	0,023	36	40	44

Tabulka 7 Vypočtené hodnoty koncentrace c-fykocyaninu ve vzorcích 4H. Vysvětlivky použitých symbolů viz kapitola 3.3.8.

4H	\bar{c}	R	Q	s	$\frac{s_r}{\%}$	$\frac{L_{1,2}}{\mu\text{g/l}}$
Datum odběru	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}$				$\mu\text{g/l}$
2.5.	28	5	0,160	2	8	3
15.5.	32	119	0,030	50	159	61
29.5.	30	4	0,000	2	6	2
5.6.	27	9	0,230	4	14	5
13.6.	30	17	0,436	7	24	9
19.6.	30	9	0,211	4	12	4
26.6.	33	12	0,072	5	15	6
3.7.	27	13	0,478	6	21	7
10.7.	38	13	0,051	5	14	6
17.7.	56	25	0,000	10	19	12
24.7.	34	15	0,034	6	19	8
1.8.	40	12	0,053	5	13	6
6.8.	87	66	0,045	28	32	33
14.8.	40	17	0,023	7	18	9
21.8.	37	15	0,168	6	17	7
28.8.	48	64	0,062	27	55	32
4.9.	643	287	0,175	121	19	146
11.9.	370	148	0,375	62	17	75
18.9.	150	97	0,344	41	28	50
25.9.	206	138	0,129	58	28	70
9.10.	159	195	0,060	83	52	100
23.10.	73	75	0,040	32	43	38

Na odběrovém místě Seč05 byla u vzorku 5L naměřena nejvyšší hodnota koncentrace c-fykocyaninu dne 4.9. 2012, stejně jako u většiny přírodních vzorků z povrchových odběrů.

Tabulka 8 Vypočtené hodnoty koncentrace c-fykocyaninu ve vzorcích 5L. Vysvětlivky použitých symbolů viz kapitola 3.3.8.

5L	\bar{c}	$\frac{R}{\mu\text{g/l}}$	Q	s	$\frac{s_r}{\%}$	$\frac{L_{1,2}}{\mu\text{g/l}}$
Datum odběru	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}$				$\mu\text{g/l}$
2.5.	29	11	0,148	5	17	6
15.5.	27	6	0,485	3	10	3
29.5.	26	11	0,190	5	17	6
5.6.	33	11	0,597	5	15	6
13.6.	36	27	0,061	11	31	14
19.6.	56	6	0,506	3	5	5
26.6.	46	13	0,110	6	12	7
3.7.	53	14	0,190	6	11	7
10.7.	83	23	0,339	10	12	12
17.7.	138	26	0,168	11	8	13
24.7.	81	40	0,156	17	21	21
1.8.	101	24	0,304	10	10	12
6.8.	70	31	0,129	13	19	16
14.8.	185	76	0,338	32	17	39
21.8.	78	34	0,158	14	19	17
28.8.	253	78	0,288	33	13	40
4.9.	290	74	0,051	31	11	38
11.9.	269	63	0,347	27	10	32
18.9.	117	62	0,008	26	22	32
25.9.	180	234	0,032	99	55	119
9.10.	89	16	0,318	7	8	8
23.10.	93	42	0,310	18	19	21

Odběrové místo Seč06 vykazovalo u vzorku 6L nejvyšší koncentraci dne 4.9. 2012, podobně jako ostatní odběry, zatímco u vzorků 6H a 6P byla naměřena nejvyšší koncentrace c-fykocyaninu až 25.9. 2012, což mohlo být způsobeno promísením vody v důsledku dešťů a také pozvolným klesáním sinic na vodní dno na konci sezony.

Tabulka 9 Vypočtené hodnoty koncentrace c-fykocyaninu ve vzorcích 6L. Vysvětlivky použitých symbolů viz kapitola 3.3.8.

6L	\bar{c}	$\frac{R}{\mu\text{g/l}}$	Q	s	$\frac{s_r}{\%}$	$\frac{L_{1,2}}{\mu\text{g/l}}$
Datum odběru	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}$				
2.5.	28	13	0,306	6	20	7
15.5.	25	6	0,160	3	10	3
29.5.	27	11	0,269	5	17	5
5.6.	29	14	0,300	6	21	7
13.6.	40	18	0,101	8	20	9
19.6.	36	8	0,190	3	10	4
26.6.	47	18	0,368	8	16	9
3.7.	60	9	0,400	4	6	5
10.7.	54	14	0,083	6	11	7
17.7.	135	28	0,363	12	9	14
24.7.	99	14	0,000	6	6	7
1.8.	91	33	0,123	14	15	17
6.8.	70	20	0,565	8	12	10
14.8.	108	23	0,062	10	9	12
21.8.	58	30	0,172	13	22	15
28.8.	180	105	0,066	44	25	53
4.9.	263	77	0,053	32	12	39
11.9.	224	38	0,090	16	7	19
18.9.	132	279	0,015	118	90	142
25.9.	142	27	0,000	11	8	14
9.10.	114	90	0,051	38	33	46
23.10.	60	16	0,081	7	11	8

Tabulka 10 Vypočtené hodnoty koncentrace c-fykocyaninu ve vzorcích 6H. Vysvětlivky použitých symbolů viz kapitola 3.3.8.

6H	\bar{c}	R	Q	s	s_r	$L_{1,2}$
Datum odběru	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}$			%	$\mu\text{g/l}$
2.5.	33	13	0,330	5	16	6
15.5.	31	12	0,557	5	16	6
29.5.	31	12	0,021	5	17	6
5.6.	26	10	0,377	4	17	5
13.6.	26	13	0,167	6	21	7
19.6.	21	16	0,046	7	31	8
26.6.	27	13	0,031	5	20	6
3.7.	34	15	0,207	6	19	8
10.7.	103	22	0,355	9	9	11
17.7.	35	19	0,178	8	23	10
24.7.	33	9	0,517	4	12	5
1.8.	34	13	0,407	6	17	7
6.8.	39	20	0,131	9	22	10
14.8.	38	5	0,000	2	6	3
21.8.	29	13	0,397	6	19	7
28.8.	42	10	0,371	4	10	5
4.9.	39	32	0,160	13	34	16
11.9.	65	22	0,452	9	14	11
18.9.	55	95	0,161	40	72	48
25.9.	146	118	0,008	50	34	60
9.10.	90	37	0,132	16	17	19
23.10.	34	24	0,191	10	30	12

Tabulka 11 Vypočtené hodnoty koncentrace c-fykocyaninu ve vzorcích 6P. Vysvětlivky použitých symbolů viz kapitola 3.3.8.

6P	\bar{c}	R	Q	s	s_r	$L_{1,2}$
Datum odběru	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/l}$			%	$\mu\text{g/l}$
2.5.	29	16	0,351	7	22	8
15.5.	30	10	0,350	4	15	5
29.5.	36	2	0,273	1	3	2
5.6.	29	9	0,467	4	13	4
13.6.	29	11	0,497	5	16	6
19.6.	30	14	0,243	6	20	7
26.6.	28	6	0,102	3	10	3
3.7.	31	15	0,267	7	21	8
10.7.	37	4	0,018	2	4	2
17.7.	36	11	0,158	4	13	5
24.7.	31	13	0,247	5	17	6
1.8.	35	6	0,129	3	7	3
6.8.	43	12	0,282	5	12	6
14.8.	32	16	0,490	7	21	8
21.8.	31	3	0,109	1	5	3
28.8.	36	5	0,192	2	7	5
4.9.	43	71	0,162	30	70	36
11.9.	67	28	0,114	12	18	14
18.9.	53	70	0,031	30	56	36
25.9.	101	40	0,065	17	17	21
9.10.	101	62	0,193	26	26	32
23.10.	47	35	0,024	15	32	18

3.4.4 Srovnání změřeného množství c-fykocyaninu s hodnotami naměřenými v laboratoři státního podniku Povodí Labe Hradec Králové

3.4.4.1 Porovnání stanoveného množství c-fykocyaninu s množstvím chlorofylu-a v přírodních vzorcích

Porovnáním naměřených hodnot koncentrace c-fykocyaninu ve vzorcích odebíraných na nádrži Seč od května do října 2012 (příloha 1) s hodnotami koncentrace chlorofylu-a v těchto vzorcích naměřenými laboratoří státního podniku Povodí Labe (příloha 2), byla zjištěna vzájemná závislost těchto dvou koncentrací. Hodnoty koncentrace chlorofylu-a, které ukazují jak na přítomnost sinic, tak i řas, začaly vzrůstat již v polovině července, které následně poklesly v důsledku nižších teplot a zvýšeného množství dešťových srážek (viz příloha 5) a

následně opět začaly vzrůstat ve stejném období, ve kterém vzrůstala i koncentrace c-fykocyaninu. Nejprve se tedy v nádrži Seč v průběhu července 2012 zvyšovalo množství řas a teprve ve druhé polovině srpna 2012 se začaly rapidně množit sinice.

Hmotnostní poměr fykocyanin/chlorofyl pro *A. cylindrica* stanovil Lee et al. na 5,9:1 (23). Tento poměr však nelze použít pro ostatní druhy sinic. V našem případě z něj lze pouze vyčíst, že koncentrace fykocyaninu v sinicích je vyšší než koncentrace chlorofylu, což také odpovídá porovnání grafu časového průběhu koncentrace c-fykocyaninu (příloha 1) s grafem časového průběhu koncentrace chlorofylu-a (příloha 2).

3.4.4.2 Porovnání stanoveného množství c-fykocyaninu s výsledky stanovení celkového dusíku v přírodních vzorcích

Z grafu časového průběhu celkového dusíku v nádrži Seč (příloha 3), stanovení celkového dusíku bylo provedeno v laboratoři státního podniku Povodí Labe Hradec Králové, je zřejmé, že jeho hodnoty téměř konstantně klesaly a ve druhé polovině září se začaly ustalovat, zatímco hodnoty koncentrace c-fykocyaninu pozvolna stoupají a od druhé poloviny září se postupně snižují. Z toho vyplývá, že množení sinic není závislé na obsahu dusíku rozpuštěného ve vodě, v období úbytku dusíku z vody tedy sinice do svých buněk fixovaly vzdušný dusík.

3.4.4.3 Porovnání stanoveného množství c-fykocyaninu s výsledky stanovení celkového fosforu v přírodních vzorcích

Linie grafu časového průběhu celkového fosforu v nádrži Seč (příloha 4), stanovení celkového fosforu bylo provedeno v laboratoři státního podniku Povodí Labe Hradec Králové, se téměř shoduje s grafem časového průběhu koncentrace c-fykocyaninu (příloha 1). Nejvyšší hodnoty celkového fosforu v nádrži bylo dosaženo týden před naměřením maximální koncentrace c-fykocyaninu v nádrži. Tento přírůstek živin způsobil rozvoj vodního květu v nádrži Seč.

4 Závěr

V přírodě se vyskytuje mnoho druhů sinic, je pravděpodobné, že některé druhy prozatím nebyly objeveny. Nejčastěji se ve vodách vyskytují sinice rodu *Microcystis*, které také často tvoří vodní květ. V roce 2012 byly na vodním díle Seč převládající sinice z rodů *Woronichinia* a *Microcystis*.

Sledování vodního květu bylo provedeno měřením různých parametrů vody in situ a laboratorním stanovením c-fykocyaninu. Množství c-fykocyaninu v přírodních vodách se stanovuje multiparametrickou sondou se zabudovaným fluorimetrem, nebo v laboratoři.

Metodika úpravy odebraných přírodních vzorků pro stanovení koncentrace c-fykocyaninu byla testována při různých vstupních podmínkách. Byla vybrána nejvhodnější metoda úpravy, při které se v důsledku skladování příliš nesnižoval obsah c-fykocyaninu ve vzorcích, což byla metoda, při které se odebrané přírodní vzorky zamrazily, a po rozmražení byl přidán 10 % methanol.

Koncentrace c-fykocyaninu v přírodních vzorcích byla stanovena fluorimetricky. Následně byla porovnána s hodnotami koncentrace chlorofylu-a, celkového dusíku a celkového fosforu, které byly naměřeny akreditovanou laboratoří Povodí Labe Hradec Králové.

Byla pozorována nepřímá závislost obsahu c-fykocyaninu na obsahu chlorofylu-a ve vzorcích přírodních vod, jelikož c-fykocyanin je obsažen pouze v buňkách sinic, zatímco chlorofyl-a je obsažen v buňkách sinic i řas, tedy nárůst koncentrace chlorofylu-a přímo nesouvisí s nárůstem sinic v nádrži. Byla potvrzena závislost výskytu sinic na obsahu fosforu ve vodě. Závislost výskytu sinic na obsahu dusíku ve vodě nebyla potvrzena.

Výzkum bude probíhat i v roce 2013 a následně budou porovnány naměřené hodnoty s výsledky měření z roku 2012.

5 Použitá literatura

- (1) Maršálek, B. Co jsou cyanobakterie/sinice? **2005**, 1–2.
- (2) Kalina, T.; Váňa, J. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*; Nakladatelství Karolinum: Praha, 2010; pp. 1–606.
- (3) Fott, B. *Sinice a řasy*; Academia: Praha, 1967; pp. 1–520.
- (4) Kolektiv autorů *Biochemie Základní kurz*; 4th ed.; Nakladatelství Karolinum: Praha, 2009; pp. 1–230.
- (5) Kaštovský, J.; Hauer, T. www.sinicearasy.cz; Botanický ústav AV ČR.
- (6) Govindjee; Shevela, D. Adventures with cyanobacteria: a personal perspective. *Frontiers in plant science* **2011**, 2, 1–28.
- (7) Dai, R.; Liu, H.; Qu, J.; Ru, J.; Hou, Y. Cyanobacteria and their toxins in Guanting Reservoir of Beijing, China. *Journal of hazardous materials* **2008**, 153, 470–477.
- (8) Reynolds, C. S. *The Lakes Handbook*; 2004; Vol. 1, pp. 1–710.
- (9) Šejnohová, L. Determinace sinic vodních květů v ČR Polyfázický přístup on „species“ level **2007**, 1–24.
- (10) Šejnohová, L.; Maršálek, B.; Drábková, M. Autektologie rodu *Microcystis* **2004**, 1–12.
- (11) Zapomělová, E. www.botany.natur.cuni.cz; Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.
- (12) Kočí, V.; Burkhard, J.; Maršálek, B. Eutrofizace na přelomu tisíciletí. *Eutrofizace 2000* **2000**, 3–13.
- (13) Manahan, S. E. *Environmental chemistry*; 9th ed.; CRC Press, 2010; pp. 1–753.
- (14) Navrátilová, M. Studium sezónních změn jakosti vody ve vírské nádrži, 2008, pp. 1–121.
- (15) Holík, J.; Forczek, S.; Loukotová, Š.; Štangelová, P. *Studium faktorů, ovlivňujících rozvoj „vodního květu“ ve vodní nádrži Seč*; 2012; pp. 1–38.
- (16) SZÚ Metodický návod pro sjednocení hodnocení jakosti vod využívaných ke koupání ve volné přírodě **2004**, 1–7.
- (17) Anttila, S.; Ketola, M.; Vakkilainen, K.; Kairesalo, T. Assessing temporal representativeness of water quality monitoring data. *Journal of environmental monitoring* **2012**, 14, 589–595.

- (18) Fremrová, L.; Pitter, P.; Břízová, E.; Franče, P. *Odběr vzorků vod a kalů*; 2007; pp. 1–2.
- (19) Gregor, J. Fluorescence vs . mikroskopický rozbor Kvantifikace řas a sinic **2007**, 1–35.
- (20) Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z. *Základní analytická chemie*; 2nd ed.; Nakladatelství Karolinum: Praha, 2010; pp. 1–204.
- (21) Gregor, J.; Maršálek, B. *Optické metody pro in situ kvantifikaci biomasy sinic*; 2004; pp. 35–38.
- (22) Sarada, R.; Pillai, M. G.; Ravishankar, G. . Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry* **1999**, *34*, 795–801.
- (23) Lee, T.; Tsuzuki, M.; Takeuchi, T.; Yokoyama, K.; Karube, I. Quantitative determination of cyanobacteria in mixed phytoplankton assemblages by an in vivo fluorimetric method. *Analytica Chimica Acta* **1995**, *302*, 81–87.

6 Přílohy

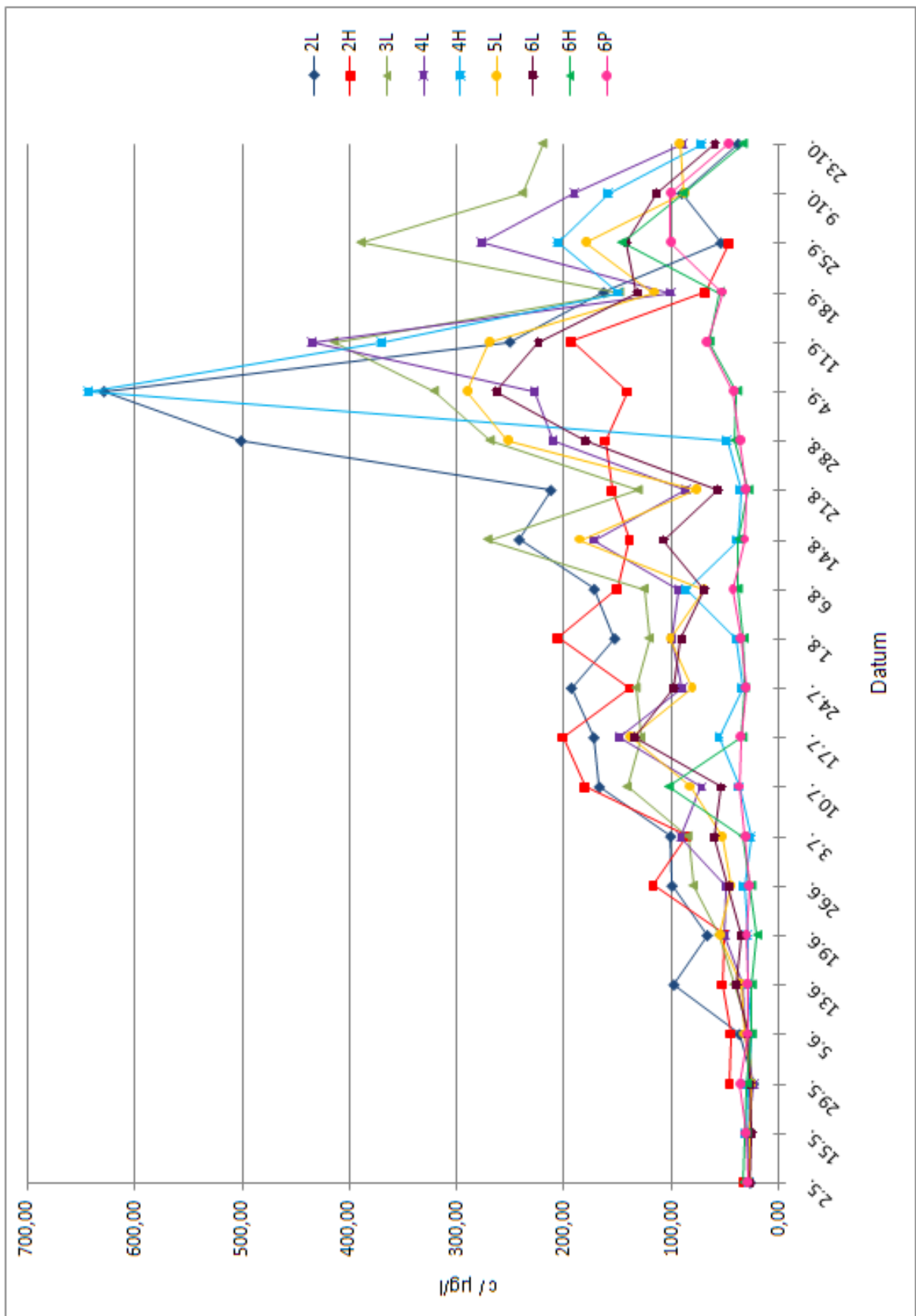
Příloha 1 Časový průběh koncentrací c-fykocyaninu v nádrži Seč (květen - říjen 2012)

Příloha 2 Časový průběh koncentrací chlorofylu-a v nádrži Seč (květen - říjen 2012)

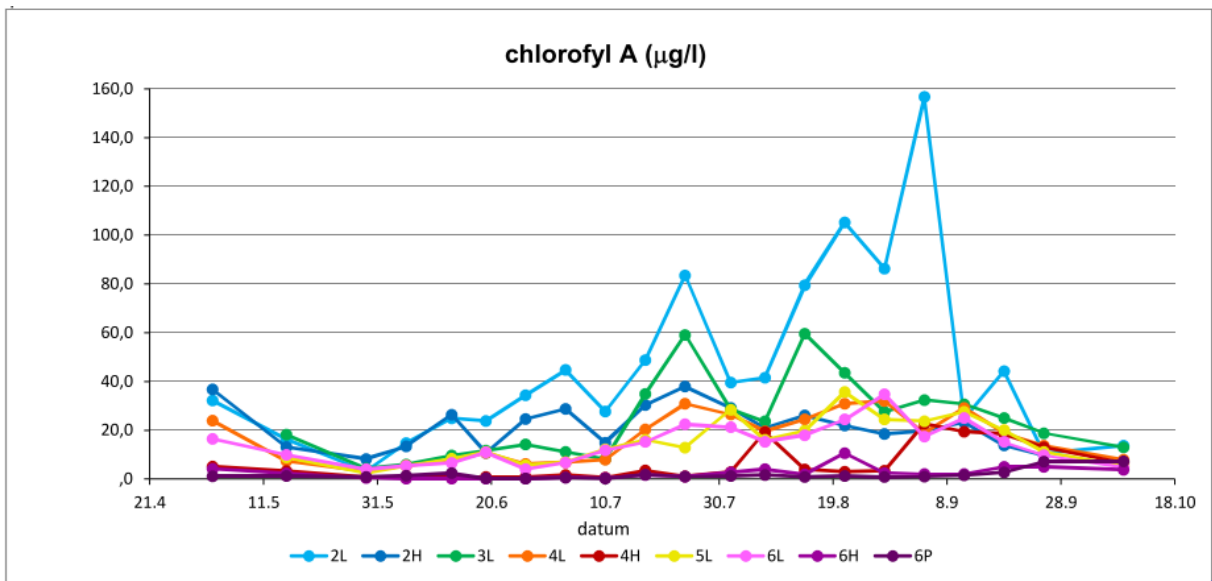
Příloha 3 Časový průběh stanovení celkového dusíku v nádrži Seč (květen - říjen 2012)

Příloha 4 Časový průběh stanovení celkového fosforu v nádrži Seč (květen - říjen 2012)

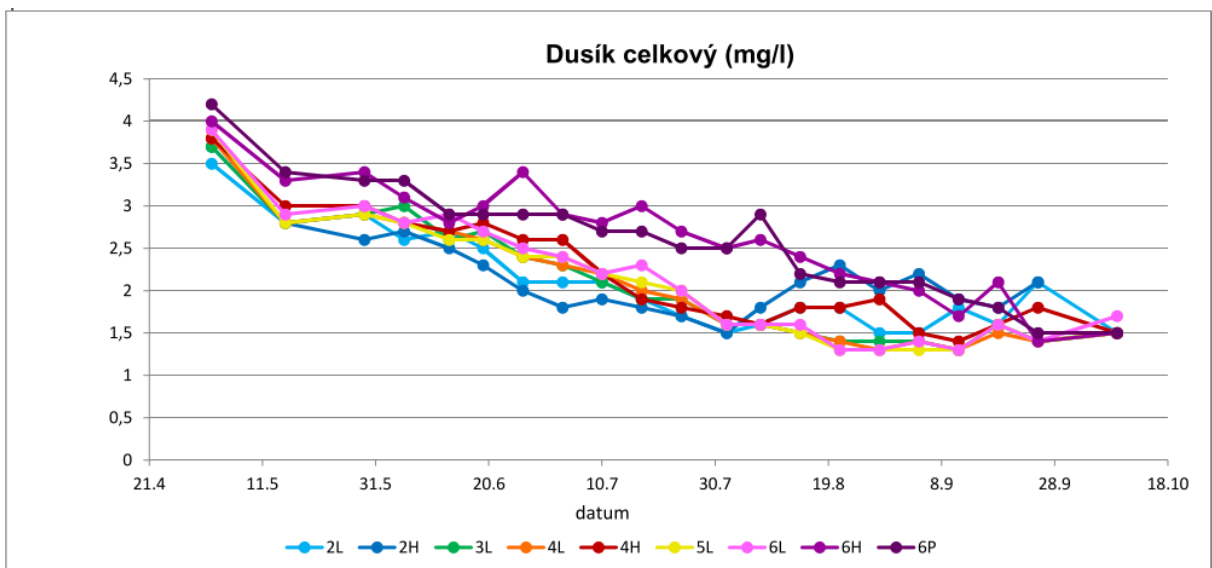
Příloha 5 Časový průběh teplot vzduchu a dešťových srážek v okolí nádrže Seč (květen - říjen 2012)



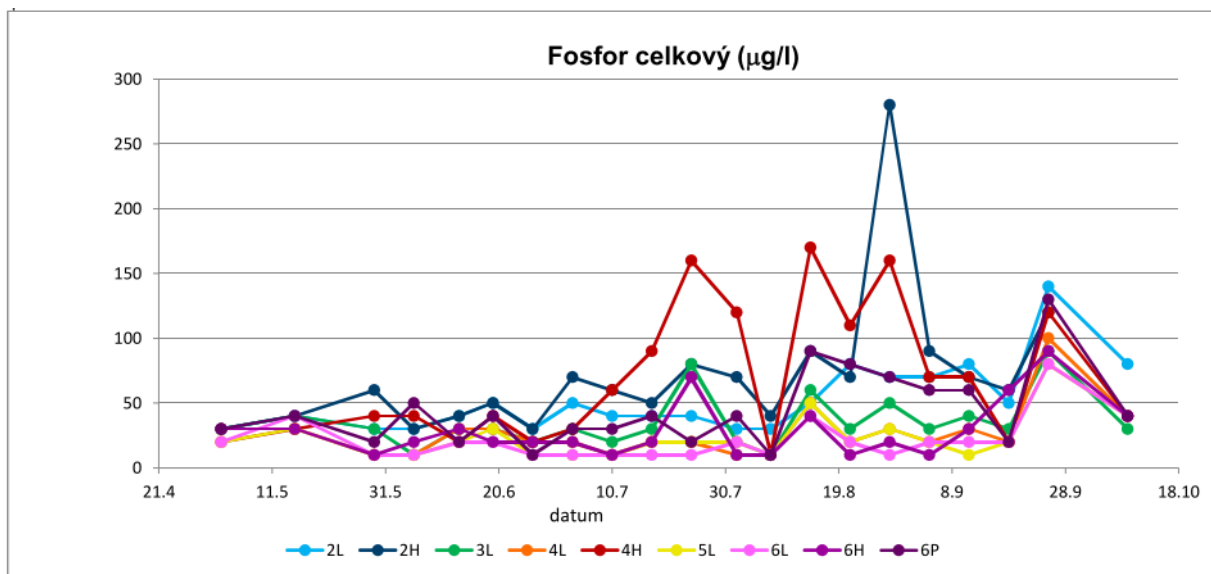
Příloha 1 Časový průběh koncentrací c-fyocyaninu v nádrži Seč (květen - říjen 2012)



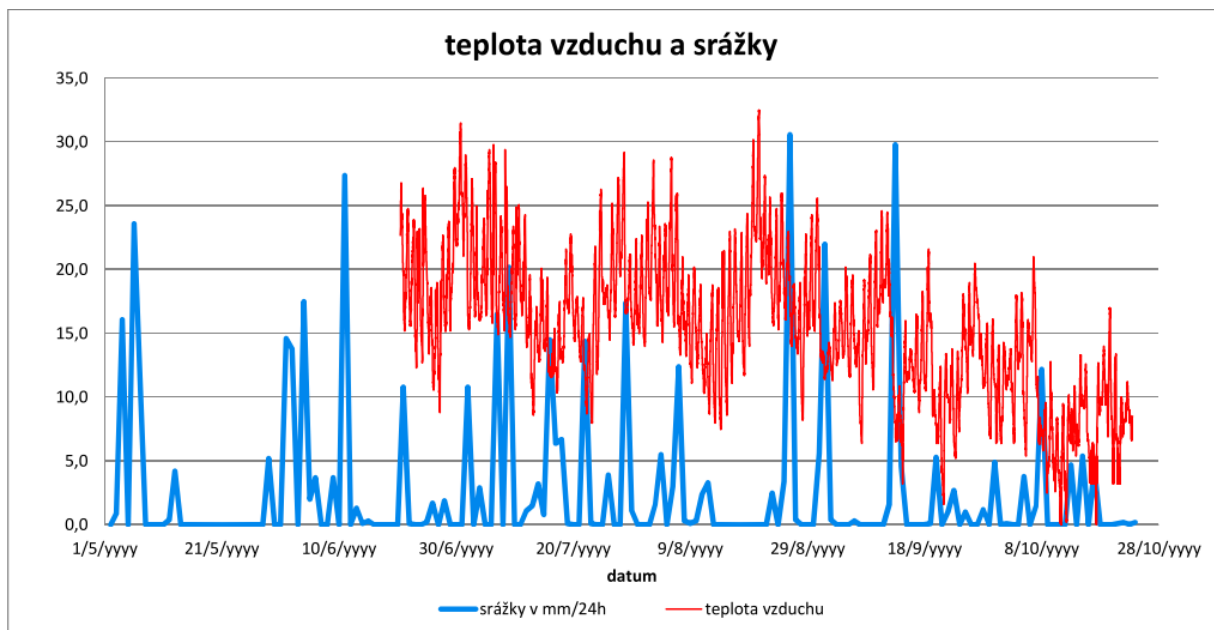
Příloha 2 Časový průběh koncentrací chlorofylu-a v nádrži Seč (květen - říjen 2012) (15)



Příloha 3 Časový průběh stanovení celkového dusíku v nádrži Seč (květen - říjen 2012) (15)



Příloha 4 Časový průběh stanovení celkového fosforu v nádrži Seč (květen - říjen 2012) (15)



Příloha 5 Časový průběh teplot vzduchu a dešťových srážek v okolí nádrže Seč (květen - říjen 2012) (15)