

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Katedra fyziologie a anatomie rostlin



Heterogenita fotosyntetické odezvy fytoplanktonu

Bakalářská práce
2008

Kristina Felcmanová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Ondřej Prášil, PhD.

Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.

Bakalářská diplomová práce:

Felcmanová K., 2008: Heterogenita fotosyntetické odezvy fytoplanktonu. [Heterogeneity of photosynthetic response of phytoplankton. Bc. Thesis, in Czech.]-48p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Chlorophyll fluorescence technique is a nondestructive tool used to study photochemical and nonphotochemical processes in photosynthetic organisms. This study deals with measurements and analysis of chlorophyll fluorescence response of individual algal cells sampled from natural environments of fish-ponds near Třeboň using the technique of fluorescence kinetic microscopy.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 6. 1. 2009

.....

Felcmanová Kristina

Poděkování:

Zde bych chtěla poděkovat především svému školiteli Doc. RNDr. Ondřeji Prášilovi, PhD. za jeho pomoc, trpělivost a čas, který mi věnoval. Dále kolegům za jejich ochotu mi s čímkoliv pomoci, za jejich vstřícnost a za přátelskou atmosféru, která vládla v laboratoři. Velký dík patří mé rodině za podporu (nejen morální) po celou dobu mého studia. A samozřejmě děkuji svým nejbližším přátelům, kteří mi byli vždy oporou.

Obsah

1. Cíle práce	4
2. Použité zkratky	5
3. Úvod.....	6
3.1 Fluorescence chlorofylu-historie	6
3.2 Fluorescence chlorofylu-základy.....	7
3.3 Vztah fotosyntézy a fluorescence.	8
3.4 Variabilní fluorescence.....	9
3.5 Analýza variabilní fluorescence.	9
3.6 Fytoplankton.	11
3.7 Pigmentové složení a fluorescenční vlastnosti fytoplanktonu.....	13
4. Metodika.	14
4.1 Lokality.....	14
4.2 Práce v terénu.	14
4.3 Práce v laboratoři.	14
4.3.1 Příprava média.	15
4.3.2 Příprava 1% agarozového gelu.	15
4.3.3 Příprava vzorku pro měření.	15
4.3.3.1 Průtoková komůrka.....	18
4.3.3.1.1 Příprava vzorku v komůrce.....	18
4.3.3.1.2 Skládání komůrky.	18
4.4 Fluorescenční mikroskop.....	20
4.4.1 Vlastní měření.....	21
4.4.2 Stanovení intenzity světla.	22
5. Výsledky.	24
6. Diskuze	36
7. Závěr.....	41
8. Citovaná literatura	42
9. Přílohy.	46
9.1 Zhášecí protokol	46
9.2 Velikost světelného pole.....	48

1. Cíle práce:

- Pomocí fluorescenční kinetické mikroskopie zjistit, zda můžeme mezi jednotlivými druhy směsných přirozených populací fytoplanktonu nalézt heterogenitu v indukční křivce variabilní fluorescence.
- Pokud ano, pak zodpovědět otázku, zda se tato heterogenita mění během roku (sledovaných měsíců) a mezi lokalitami s různým druhovým složením.
- Charakterizovat fotosyntetickou aktivitu pomocí parametrů, které lze určit z fluorescenční indukce a zhášení a sledovat jejich sezónní změny.

2. Použité zkratky:

AL	<u>A</u> ctinic <u>L</u> ight (aktinické světlo)
CCD	<u>C</u> harge- <u>C</u> oupled <u>D</u> evice
FIK	<u>F</u> luorescenční <u>I</u> ndukční <u>K</u> řivka
FKM	<u>F</u> luorescence <u>K</u> inetic <u>M</u> icroscope (fluorescenční mikroskop)
F₀	minimální výtěžek fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu
F₀'	minimální výtěžek fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu
F_M	maximální výtěžek fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu
F_M'	maximální výtěžek fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu
F_S	fluorescence v ustáleném stavu
F_V	maximální výtěžek variabilní fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu
F_V'	maximální výtěžek variabilní fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu
Chl <u>a</u>	chlorofyl <u>a</u>
Chl <u>b</u>	chlorofyl <u>b</u>
Chl <u>c</u>	chlorofyl <u>c</u>
LHC	<u>L</u> ight <u>H</u> arvesting <u>C</u> omplex (světlosběrný komplex)
ML	<u>M</u> easuring <u>L</u> ight (měřící světlo)
NPQ	<u>N</u> on- <u>P</u> hotochemical <u>Q</u> uenching (nefotochemické zhášení)
PAM	<u>P</u> ulse <u>A</u> mplitude <u>M</u> odulated fluorometer (pulsní amplitudová modulace)
PSI	Photosystem I (fotosystém I)
PSII	Photosystem II (fotosystém II)
qF	<u>F</u> luorescence <u>Q</u> uenching (fluorescenční zhášení)
qP	<u>P</u> hotochemical <u>Q</u> uenching (fotochemické zhášení)
qN	<u>N</u> on-photochemical <u>Q</u> uenching (nefotochemické zhášení)
RC	<u>R</u> eakční <u>C</u> entra
SP	<u>S</u> aturation <u>P</u> ulse (saturační puls)
Φ_{Po}	kvantový výtěžek fotochemie

3. Úvod

3.1 Fluorescence chlorofylu - historie

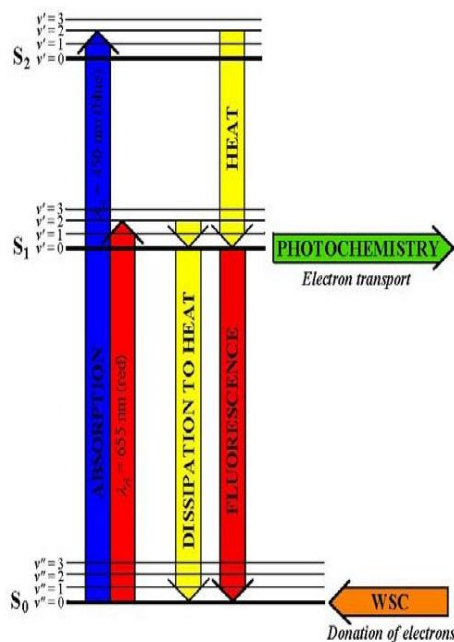
První pozorování fluorescence chlorofylu sahají patrně až do první poloviny 19. století (Sir David Brewster, Sir John Herschel), ale zásadní pokrok přinesly až v roce 1931 kvalitativní pozorování profesora H. Kautskeho a A.Hirshe (o historii výzkumu fluorescence chlorofylu viz Govindjee 2004). Ti zjistili nepřímou souvislost mezi intenzitou fluorescence chlorofylu a a fotosyntézou, když pozorovali změny ve fluorescenci Chl a po osvětlení listu rostliny. Tato nepřímá závislost je základem využití měření variability fluorescence jako indikátoru fotochemické fáze fotosyntézy.

K rozšíření metody fluorescence chlorofylu jako běžné neinvazní metody studia fotosyntézy došlo ale až po zavedení fluorimetrů, které pracují na základě pulsní amplitudové modulace (PAM – Schreiber a spol., 1986). Tyto přístroje umožnily spolehlivá měření změn výtěžku fluorescence a nově také získávání informací o fotochemických procesech fotosyntézy pomocí tzv. zhášecí analýzy (Bradbury a Baker, 1983; Gray a spol., 2006; Papageorgiou a Govindjee, 2004; Ritchie, 2006; Šiffel a spol., 2000). Další technický rozvoj umožnil prostorové zobrazení variabilní fluorescence za použití zobrazovacích CCD kamer (Nedbal a spol., 2000). Tyto systémy umožňují získat dvojdimenzionální (2D) obraz kinetiky fluorescence objektů s rozlišením jednotlivých zobrazovacích bodů. V závislosti na použitém zobrazovacím zařízení tak lze mapovat heterogenitu ve fotosyntetické aktivitě vzorků od úrovně jednotlivých chloroplastů až po celé porosty. Pomocí počítačové analýzy signálů lze stanovit a zobrazit fyziologicky relevantní parametry studovaných fotosyntetických organismů. Rozšířením na 2D zobrazování se tak metodě fluorescence Chl otevřela zcela nová oblast možných aplikací, např. v ekofyziologii.

V této práci jsme používali zobrazovací metodu CCD kamery ve spojení s kinetickým fluorescenčním mikroskopem (Berman-Frank a spol., 2001; Ferimazova a spol., 2002; Gachon a spol., 2006; Küpper a spol., 2000; Küpper a spol., 2002; Küpper a spol., 2004; Küpper a spol., 2007; Küpper a spol., 2008; Šetlíková a spol., 2005) pro studium heterogenity fotosyntetické odezvy u planktonních řas a sinic.

3.2 Fluorescence chlorofylu - základy

Ačkoliv fotosyntetické organismy obsahují celou řadu různých pigmentů (chlorofyly, karotenoidy a fykobiliny), má pro fluorescenční sledování fotosyntézy zásadní význam chlorofyl *a*. Je totiž pigmentem vnitřních světlosběrných antén a reakčních center, který zabezpečuje fotochemické rozdělení náboje. Molekula chlorofylu absorbuje záření buď přímou absorpcí fotonu, nebo přenosem excitační energie od sousedních pigmentů. Tím dojde k přechodu elektronu ze základní hladiny (S_0) do vyššího energetického stavu. Modré světlo excituje molekulu do druhé singletní hladiny (S_2), červené pak do první (S_1). Vyšší excitované stavy jsou nestabilní, a proto záhy dochází k vnitřnímu přechodu na první excitovanou hladinu S_1 . Excitace ale ani zde není stabilní a během nanosekund se získaná energie (exciton) buď využije, nebo ztratí a molekula tak přejde opět do základního stavu S_0 . Proces, při kterém excitované molekuly chlorofylu ztrácejí získanou energii, se obecně nazývá zhášení. To se děje ve 3 formách, které si vzájemně konkurují – změna v účinnosti jedné dráhy ovlivní účinnost ostatních (obr. 3.1):



- 1) Fotochemické zhášení (qP) – energie excitovaného stavu je přeměněna na chemickou energii. Je to cesta fotosyntézy, kdy se exciton dostane do reakčního centra a je využit pro fotochemické rozdělení náboje.
- 2) Nefotochemické zhášení (qN) – energie excitovaného stavu se nevyužije a přemění se v teplo.
- 3) Fluorescenční zhášení (qF), fluorescence – při přechodu do základního stavu se vyžáří foton s vlnovou délkou odpovídající energii rozdílu hladin S_1 a S_0 .

Obr. 3.1: Využití excitační energie v molekule chlorofylu RC PSII (internetový zdroj ^{1,1}).

Maximální kvantová účinnost přeměny zachycené energie na fotochemii rozdělení nábojů ve fotosystému II je kolem 70%. Ztráty v podobě fluorescence se pohybují v rozmezí 2-5%. Rozdíl se ztrácí jako teplo (Falkowski, Raven, 1997).

Fluorescenci chlorofylu lze pozorovat v červené oblasti spektra. Při pokojové teplotě pochází většina emitovaného záření z fotosystému II. Fotosystém I vykazuje významnou

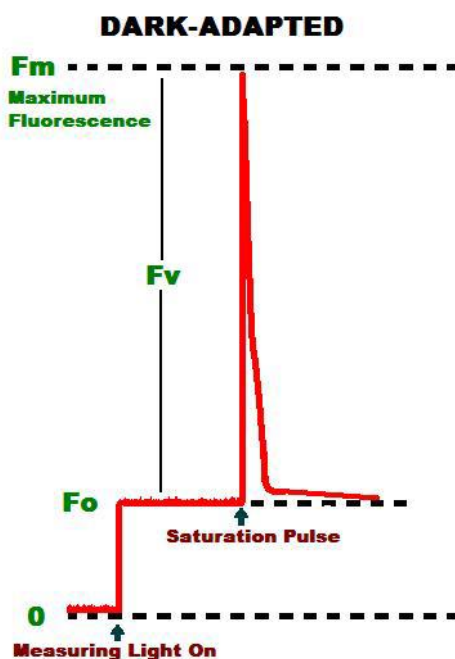
fluorescenci jen při nízkých teplotách (77K), (Procházka a spol., 1998). Hlavní maximum emise PSII je okolo 680 nm, ve spektru lze pozorovat i podružná vibrační maxima, např. u 730 nm. Jak již bylo uvedeno, fluorescence chlorofylu fotosyntetických organismů je dynamický jev, její intenzita v průběhu času nabývá různých hodnot v závislosti na změnách v účinnosti fotochemie a tepelné disipace. Časový záznam těchto změn se nazývá fluorescenční indukční křivka (FIK).

3.3 Vztah fotosyntézy a fluorescence

Fluorescence chlorofylu je úměrná té části zachycené energie, která nebyla využita při fotochemii a tedy při fotosyntéze. Protože většina fluorescence pochází z fotosystému II, je právě vazba mezi fluorescencí a účinností fotochemie PSII nejsilnější. Ze změn v intenzitě fluorescence můžeme odvozovat, jak fotosyntetické organismy (řasy i rostliny) využívají absorbovanou energii. Čím více energie je využito pro separaci náboje v reakčních centrech, tím je variabilní část fluorescence nižší. Pokud je q_F minimální, pak se účinnost posouvá k fotochemickým reakcím (fotosyntéza), pokud je q_F maximální, pak je účinnost fotosyntézy minimální.

3.4 Variabilní fluorescence

Variabilní fluorescence se stanovuje jako rozdíl mezi maximální (F_M) a minimální fluorescencí (F_0), (obr. 3.2). Hodnotu minimální fluorescence získáme, pokud buňku vystavíme pouze slabému měřicímu světlu, které nemá významný aktinický efekt. Ve stavu F_0 jsou RC PSII otevřena a primární akceptor Q_A je oxidován. Pokud chceme změřit maximální hodnotu fluorescence, pak fotosyntetický organismus, který byl adaptován na tmou, musíme vystavit silnému saturačnímu pulsu. Ten může být buď jednoobrátkový (ST = single-turnover, délka ~ mikrosekundy) nebo mnohoobrátkový (MT = multi-turnover, délka řádově desítky až stovky ms). V obou případech dojde k zahlcení reakčních center fotosystému II a v případě



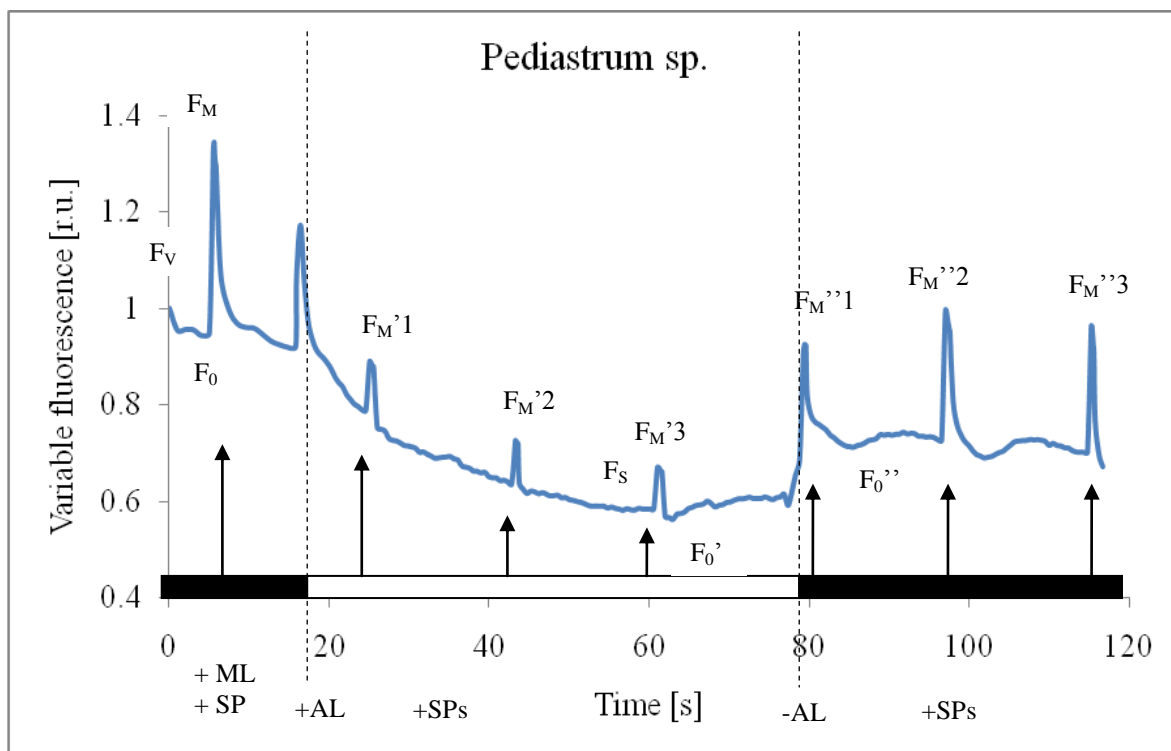
MT pulsu také ke zredukování celé akceptorové strany PSII. S tím, jak se snižuje pravděpodobnost nalezení otevřeného RC, se zvyšuje výtěžek fluorescence (Falkowski, Raven, 1997). Akceptor Q_A je zredukován a RC PSII nejsou schopna využít zachycenou energii k dalšímu rozdělení náboje. Podíl zachycené energie, která se ztrácí ve fluorescenci, je vysoký, tím dostaneme maximální výtěžek fluorescence, F_M (Nedbal a spol., 2000, Papageorgiou, Govindjee, 2004). Osvětlení na tmou adaptovaného vzorku saturačním světlem, může zvýšit výtěžek fluorescence Chl a z F_0 na F_M až 3krát (při použití ST pulsu) nebo až 5krát (při použití MT pulsu).

Obr. 3.2: Popis základních parametrů variabilní fluorescence. Hodnota F_V se získá rozdílem hodnot F_M (po saturačním pulsu) a F_0 změřených v temnotně adaptovaném stavu. (internetový zdroj ^{1,2}).

3.5 Analýza variabilní fluorescence

Kvantitativní vztah mezi fluorescencí a účinností fotochemie lze vyjádřit pomocí základních parametrů, které lze získat z měření variabilní fluorescence. V zásadě se pro získání parametrů používají dva odlišné experimentální přístupy, které také poskytují odlišné parametry a kvantitativní vztahy (přehledně viz Roháček a spol., 2008): a) měření kinetiky rychlé indukce fluorescence v mikrosekundové – sekundové oblasti (výše zmíněná FIK) anebo b) zhášecí analýza během pomalé fluorescenční indukce. Vzhledem k technickým možnostem zobrazovacích kamer se ve 2D fluorescenční kinetické mikroskopii používá druhý

přístup, zhášecí analýza během pomalé fluorescenční indukce (obr. 3.3). Tato metoda je podrobně popsána v literatuře (Maxwell, Baker and Oxborough, Roháček), proto zde uvádím pouze základní vztahy:



Obr. 3.3: V grafu je znázorněna kinetika pomalé indukce fluorescence řasy *Pediastrum sp.* zaznamenaná *in vivo* na fluorescenčním kinetickém mikroskopu Micro FluorCam 2000 od firmy PSI.

Aby bylo možné získané údaje navzájem porovnávat, jsou vzorky vystaveny dobře definovaných světelným podmínkám a pak změřen jejich fluorescenční výtěžek. Počítačové řízení experimentu umožňuje sestavení tzv. měřících protokolů, které celé měření automatizují. Výsledkem mohou být např. kinetické křivky (příklad viz obr. 3.3). Z těchto záznamů kinetiky pomalé indukce lze odečíst hodnoty fluorescenčního výtěžku v definovaných časových bodech (F_M , F_0 , F_S , F_M' , F_0'), které se pak používají ve výpočtech různých parametrů, které kvantifikují účinnost fotosyntetických procesů (Φ_{P_0} , qP , qN , qO , NPQ , Φ_{II}). F_M a F_0 charakterizují na tmě adaptovaný stav buňky, zatímco F_M' , F_S a F_0' jsou fluorescenční výtěžky vzorků vystavených aktinickému světlu. Hodnota maximální variabilní fluorescence F_V se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$F_V = F_M - F_0$$

Na světle je variabilní fluorescence

$$F_V' = F_M' - F_S$$

Základní a nejpoužívanější parametr, který lze z variabilní fluorescence vypočítat je kvantový výtěžek fotochemických procesů v PSII, Φ_{PSII} .

$$\Phi_{PSII} = F_V/F_M \text{ nebo na světle } F_V'/F_M'$$

Φ_{PSII} udává účinnost fotochemického rozdělení nábojů v RC PSII za daných podmínek. Jeho maximální hodnota v nestresových podmínkách vyšších rostlin dosahuje až 0,82. Hodnoty tohoto poměru slouží pro výpočet rychlosti lineárního toku elektronů skrz PSII.

$$qP = (F_M' - F_S)/(F_M' - F_0')$$

Tento parametr udává jaká část ze všech reakčních center PSII zůstává v daném okamžiku otevřená.

$$NPQ = (F_M - F_M')/F_M'$$

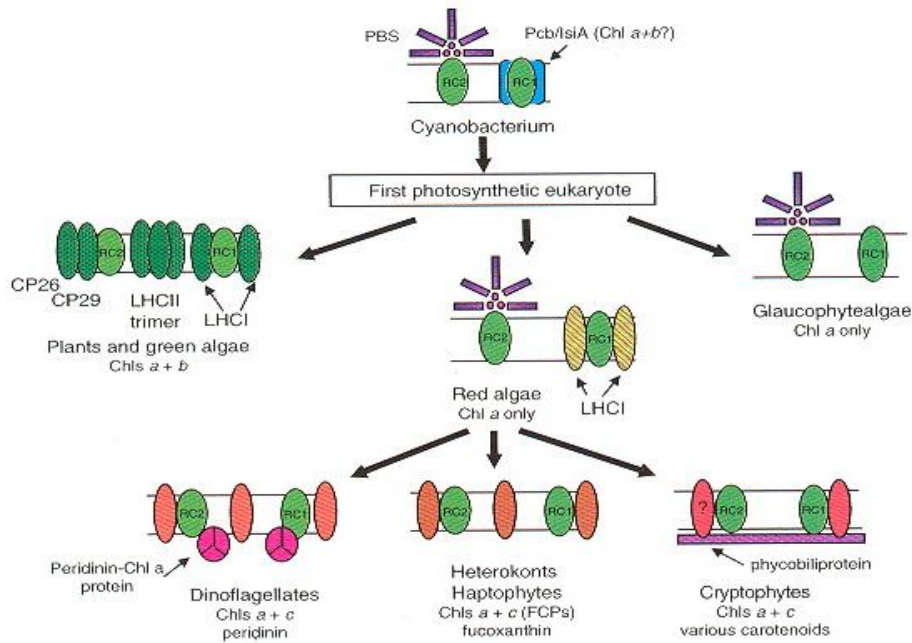
Parametr NPQ je používán jako relativní indikátor množství energie, která se v anténním komplexu PSII ztrácí ve formě tepla (Roháček a spol., 2008).

3.6 Fytoplankton

Fytoplankton je společenstvo mikroskopických fotosyntetizujících organismů (sinic, řas a prvoků), které obývají vodní sloupec nádrží, jezer apod. Fytoplankton našich rybníků zahrnuje rozmanité druhy ze všech známých oddělení (od *Cyanobacteria* přes *Rhodophyta*, *Chromophyta* až po *Chlorophyta*). Distribuce jednotlivých druhů je závislá na ročním období, tak jak se mění teplota a radiace. Neméně důležitá je také míra eutrofizace. Kombinace těchto tří základních podmínek určuje, které řasy budou v danou dobu dominovat a které se budou vyskytovat jenom zřídka (o ekologii viz Lee, 1989; internetový zdroj^{1,3})

Důležitou roli ve výskytu řas hraje vertikální gradient distribuce limitujících živin a vertikální gradient využitelné radiace. Tyto gradienty přímo určují jejich distribuci ve vodním sloupci. Vertikální gradient distribuce limitujících živin může vést k diverzifikaci strategií v získávání živin (potravy). Vertikální gradient distribuce radiace poskytuje místo pro separaci a koexistenci různých strategií využití světla ve stratifikovaných podmínkách: Druhy schopné adaptace na vyšší hodnoty záření dominují v horních vrstvách vodního sloupce, zatímco druhy adaptované na nízké hodnoty záření obývají větší hloubky (Lichtman, 2007). Je to dáno tím, že každé oddělení řas má odlišné hlavní pigmenty a různě uspořádané světloběrné antény. Jejich uspořádání pak určuje míru citlivosti řas k záření. Variabilita světloběrných antén souvisí s evolucí řas (obr. 3.4.). Evoluce všech fotosyntetických eukaryot je úzce spjata s historií endosymbiozy. Primární endosymbioza (pohlčení sinice eukaryotní nefotosyntetickou buňkou) dala vzniknout prvním fotosyntetickým eukaryotům a následující vývoj vedl ke vzniku tří linií řas s primárními plastidy: *Chlorophyta*, *Rhodophyta*

a *Glaucophyta*. Čtvrtá skupina řas, která využívá Chl c (*Cryptophyta*, *Haptophyta*, *Dinophyta*), je výsledkem sekundární symbiozy, kdy nefotosyntetizující eukaryota pohltila endosymbionta červených řas (Green, 2007).



Obr. 3.4: Světlosběrné antény. Předchůdce chloroplastu u sinic měl fykobilizómy a anténu, která mohla být spojena s PSI. Potomci prvních fotosyntetických eukaryot se rozlišili do zelené linie (zelené řasy, rostliny), do červené linie (červené řasy), a do linie *Glaucophyta*. Zelená linie má LHC vázící Chl $a+b$, červená pouze Chl a . Jedna nebo více sekundárních endosymbioz zahrnující endosymbionta červených řas dala vznik čtyřem hlavním skupinám řas s Chl a/c v LHC. Peridin-Chl a protein byl nalezen jen u obrněnek (*Dinophyta*), přesněji v jádrech reakčních center PSI a PSII (Green, 2007).

3.7 Pigmentové složení a fluorescenční vlastnosti fytoplanktonu

Taxonomické skupiny řas mají charakteristické pigmentové složení a tedy i optické vlastnosti - různé spektrální oblasti absorpce a emise záření (tab. 1).

Tabulka 1: Fytoplanktonní organismy emitují při pokojové teplotě v červené oblasti spektra (pokud obsahují fykobilisomy zhruba od 600 nm, bez fykobilisomů emise okolo 680 nm). Fykoerythrin, který se nachází u některých sinic a skrytěnek emituje v oranžové oblasti. U eukaryotických řas je fluorescence excitována především modrým světlem, které absorbují chlorofyly (cca 400-530 nm). Fykocyanin typický pro většinu sinic absorbuje světlo v oranžovo-červené části spektra.

Pigment	Výskyt pigmentu (oddělení)	Excitační maximum	Emisní maximum
Chlorofyl <i>a</i>	Všechny sinice a řasy	440 nm	685 nm
Chlorofyl <i>b</i>	Chlorophyta	480 nm	685 nm (via chl <i>a</i>)
Chlorofyl <i>c</i>	Chromophyta, Dinophyta, Cryptophyta	460 nm	685 nm (via chl <i>a</i>)
Fukoxanthin	Chromophyta	525 nm	685 nm (via chl <i>a</i>)
Peridin	Dinophyta	525 nm	685 nm (via chl <i>a</i>)
Fykocyanin	Cyanobacteria	620 nm	650 nm
Fykoerythrin	Cyanobacteria, Cryptophyta	565 nm	385, 620 nm

Rozdílnost fluorescenčních emisních a excitačních spekter různých pigmentů lze využít při detekci přítomnosti určitých řas a sinic, např. ve vodohospodářství. Příkladem jsou odlišná emisní spektra fykocyaninů, které lze využít jako citlivý indikátor přítomnosti sinic ve vodě pro včasné monitorování přítomnosti potenciálně toxických metabolitů sinic v nádržích.

4. Metodika

Naše práce byla součástí sezónního pokusu organizovaného Doc. RNDr. Liborem Pecharem CSc. ze ZF JčU, jehož cílem bylo zjistit, zda obhospodařování intenzivních rybníků vede k vyšší primární, sekundární a terciární produkci.

4.1 Lokality

Odběry vzorků probíhaly na rybnících Klec a Rod (obr. 4.1).

Klec

Poloha: 1 km jihovýchodně od vsi Klec

Nadmořská výška: 415 m. n. m.

Výměra: 69,35 ha

Rod

Poloha: 0,5 km východně od vsi

Frahelž

Nadmořská výška: 415 m. n. m.

Výměra: 36,10 ha



Obr. 4.1: Mapa umístění rybníků.

Rybník Rod je součástí přírodní rezervace vyhlášené v r. 1990. Slouží k chovu ryb, má vysoký obsah živin. Východní část rybníka přechází v rašeliniště.

Rybník Klec má vyšší míru eutrofizace než rybník Rod.

4.2 Práce v terénu

Odběry vzorků probíhaly v období od května do října 2008, jednou za 14 dní, v dopoledních hodinách. Směsný vzorek jsme získali pomocí tzv. planktonní trubky. Na jednom konci měla síťku nepropustnou pro velký zooplankton, na druhém uzávěr, díky kterému po vytažení z vody v trubce zůstal vodní sloupec. Vzorky byly odebírány v různých místech rybníka.

4.3 Práce v laboratoři

Protože se tato práce teprve zaváděla a metodiku sledování jednotlivých buněk planktonních řas pomocí fluorescenčního kinetického mikroskopu jsme v Laboratoři fotosyntézy MBÚ AVČR v Třeboni testovali, věnovali jsme se i optimalizaci metodiky přípravy média a

optimální metodě fixování vzorku pro měření. Dále pak bylo třeba na fluorescenčním mikroskopu určit přibližnou intenzitu světla pro jednotlivé použité objektivy a v programu FluorCam6 vytvořit měřicí protokol pro metodu fluorescenčního zhášení.

4.3.1 Příprava média

Médium jsme získali přefiltrováním cca 1,5l rybníční vody. Pro filtraci jsme použili membránový filtr Porafil CM 045. Díky tomu jsme se zbavili zooplanktonu, fytoplanktonu a veškerých nečistot obsažených ve vodě.

Protože vzorek obsahoval mnoho bičíkatých nebo obrvených druhů řas, které by se při měření v zorném poli pohybovaly, bylo třeba ho zafixovat. Pro měření fluorescence metodou fluorescenčního zhášení je totiž důležité, aby objekty nebyly v pohybu. Vhodným gelem pro tuto práci je agar. Je to polysacharid s vysokou gelující schopností, vyrábí se z červených mořských řas. Gel se vytvořil smícháním agarózy a vody. Agaróza má formu prášku, který je při teplotách kolem 90°C rozpustný ve vodě.

4.3.2 Příprava 1% agarosového gelu

Na analytických vahách (Precisa 125A JK 81732) bylo naváženo 0,1g agarosay (Sigma, Type VII), která byla rozpuštěna v 10 ml média. Pro snadnější rozpouštění byla lahvička s roztokem dána na několik vteřin do mikrovlnné trouby, protože agarosa se v mediu, které mělo zhruba 20°C, špatně rozpouštěla. Poté byl roztok umístěn na míchačku, aby došlo k rozbití i těch nejmenších částíček. Hotový gel byl průhledný a neobsahoval žádné nerozpuštěné částice. Aby gel nez tuhnul, byl vložen do termostatu se stálou teplotou 37°C. Tuto teplotu jsme v průběhu pokusu snížili na 33°C, což byla hranice jejího pomalého tuhnutí, abychom buňky pokud možno co nejméně ovlivnili.

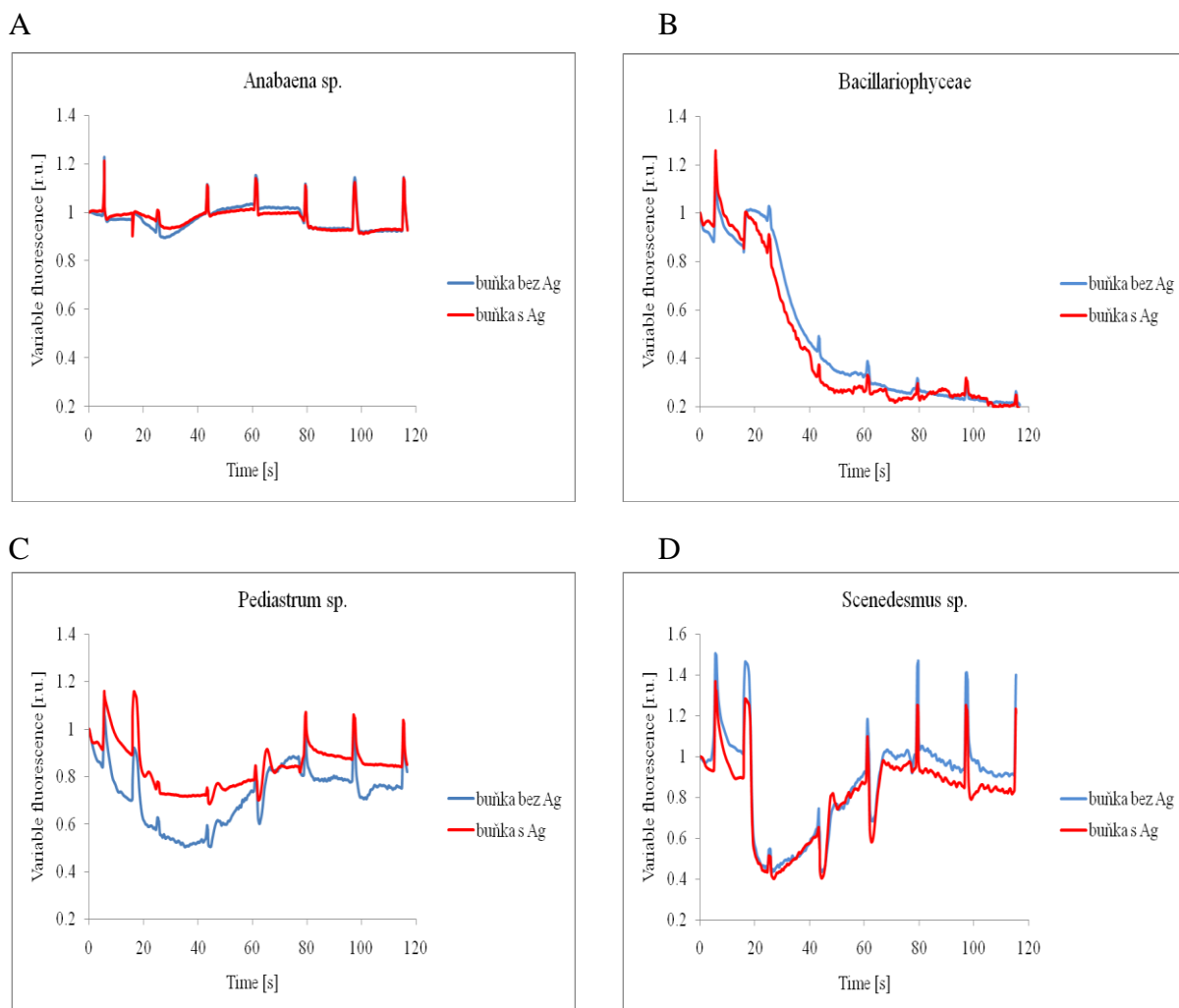
4.3.3 Příprava vzorku pro měření

Vzorek byl nejprve zbaven zooplanktonu a nečistot scezením přes 100 mikronovou síťku. Poté jsme vzorky zahustili na filtru. K přefiltrování vzorku jsme používali membránové filtry s velikostí pórů 6µm (Pragopor). Podle hustoty vzorku bylo filtrováno 5-10ml vody, aby se filtr pokryl souvislou vrstvou řas. Samotná filtrace se prováděla velmi jemně, aby nedošlo k rozbití buněk a abychom buňky nevystavovali přílišnému tlaku a tím i stresu. V letních měsících většinou stačilo filtrovat 5 ml. Vyskytlo se však několik výjimek, a to hlavně u vzorků z Rodu, kdy se muselo filtrovat 10 ml.

V začátcích pokusu jsme filtr se vzorkem nechávali na podložním sklíčku. Tím se zabránilo možnému pohybu bičíkatých a obrvených zástupců řas. Pod mikroskopem však zůstávaly póry filtru viditelné (po osvětlení IR světlem, nutné pro taxonomickou identifikaci buněk dle jejich tvaru). Zkusili jsme použít i speciální filtry pro světelný mikroskop s póry o velikosti 5 μ m (Millipore), ale i ty byly vidět. K ovlivnění měření tím nedocházelo, ale přenášený obraz byl nekvalitní. Proto jsme se rozhodli fixovat vzorky na sklíčku 1% agarosovým gelem, který je čirý a průhledný.

Filtr s buňkami jsme opatrně přenesli na podložní sklíčko, kde bylo nakápnuto 10 μ l média. Filtr jsme v médiu smáčeli, dokud se většina buněk nedostala do média. Poté jsme vzorek zakápli stejným množstvím ohřátého gelu a přiklopili krycím sklíčkem. Důležité je vždy zachovat poměr v množství média a gelu, tj. 1:1.

Problém, který zde mohl nastat, byl ve změně podmínek po přidání gelu. Teplota agarosy měla totiž v okamžiku vyjmutí z lázně 33°C. Ale protože se odpipetovalo 10 μ l gelu, je pravděpodobné, že teplota gelu ještě poklesla, než byl gel přidán ke vzorku. Abychom ověřili, zda a v jaké míře agarosa ovlivňovala buňky a jejich fluorescenční odezvu, provedli jsme testovací měření. Výsledky jsou shrnuty v grafech na obrázku 4.2, které ukazují kinetické záznamy variabilní fluorescence buněk měřených s agarosou nebo bez ní.



Obr. 4.2 A - D: Záznamy fluorescenční kinetiky buněk, které byly pro měření fixovány ve vzorku agarosou (červeně) nebo bez přítomnosti agarosy (modře).

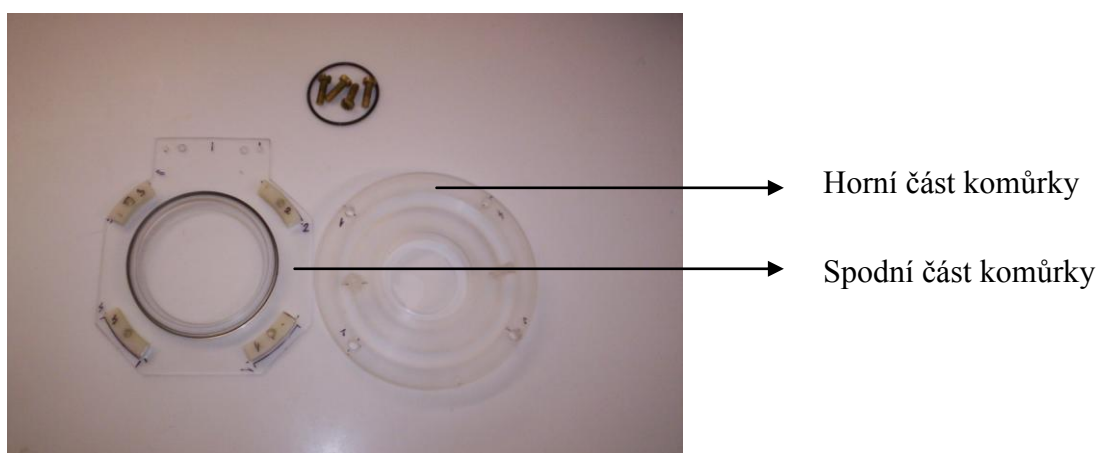
Takto připravený a zafixovaný vzorek můžeme použít pro měření na fluorescenčním mikroskopu.

V období přípravných pokusů jsme také zkusili nahradit podložní sklíčko speciální průtokovou komůrkou. Pro měření fotosyntetických vodních organismů je výhodné používat měřící komůrku. Problémem podložního a krycího sklíčka je rychlé vyčerpání CO_2 . Při dlouhodobějším měření dochází vlivem záření ke zvyšování teploty vzorku, nebo dokonce k jeho vysychání. Tyto podmínky pak pro měřené buňky znamenají stres a ovlivňují výsledky měření. Tento problém jsme vyřešili tak, že každý vzorek na sklíčko jsme proměřovali maximálně dvakrát. Od přípravy vzorku k měření uběhly max. 3 minuty. Měřící komůrka je konstruována tak, aby jí mohlo protékat médium o konstantní teplotě a rychlosti. Médium pak bývá ještě obohacováno požadovanou směsí plynů bubláním plynu skrz médium nebo je médium obyčejně saturováno vzduchem. Výhoda měřící komůrky tedy spočívá v plné kontrole podmínek (Ferimazova a spol., 2002; Küpper a spol., 2004; Küpper a spol., 2000;

Šetlíková a spol., 2000). Námí používaná komůrka byla vyrobena v dílně Mikrobiologického ústavu v Třeboni.

4.3.3.1 Průtoková komůrka

Komůrkou (obr. 4.3) protéká médium a díky tomu se ke vzorku dostávají živiny, nemění se poměr dýchacích plynů a můžeme vzorek proměřovat delší dobu. Nevýhodou je instalace a provoz relativně složité aparatury kolem komůrky, přes kterou je vedeno médium. Náročné je také vlastní skládání komůrky, které je nesnadné a při kterém se musí postupovat velmi rychle, kvůli tuhnutí agarose.



Obr. 4.3: Průtoková komůrka.

4.3.3.1.1 Příprava vzorku v komůrce

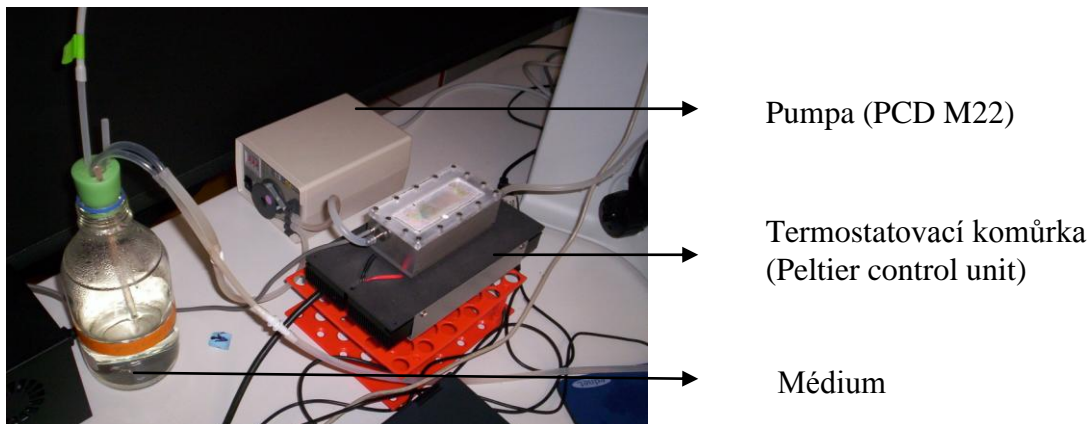
Na kulatou plochu uprostřed vrchní části komůrky jsme napipetovali 90 μ l média. Vzorek byl přefiltrován a buňky přeneseny do média na komůrce. Přidal se stejný objem 1% agarosy.

4.3.3.1.2 Skládání komůrky

Komůrka sestává ze dvou částí. Při skládání komůrky se musí postupovat rychle, protože agarosa po vyjmutí z lázně tuhne. V nádobce s destilovanou vodou, byl ponořen čtvereček celofánu o rozměrech 10x10 cm. Do vrchní části komůrky jsme připravili vzorek, viz výše. Celofán vytažený z destilované vody jsme přilepili na plochu se vzorkem uvnitř komůrky tak, aby byl napnutý. Na celofán se vzorkem se umístilo závaží, které mělo pomoci udržet celofán napnutý a přes které se na vnější stranu plochy navlékla gumička. Gumička držela celofán se vzorkem na ploše uvnitř komůrky. Přesahující okraje celofánu byly odstríženy a nasadila se

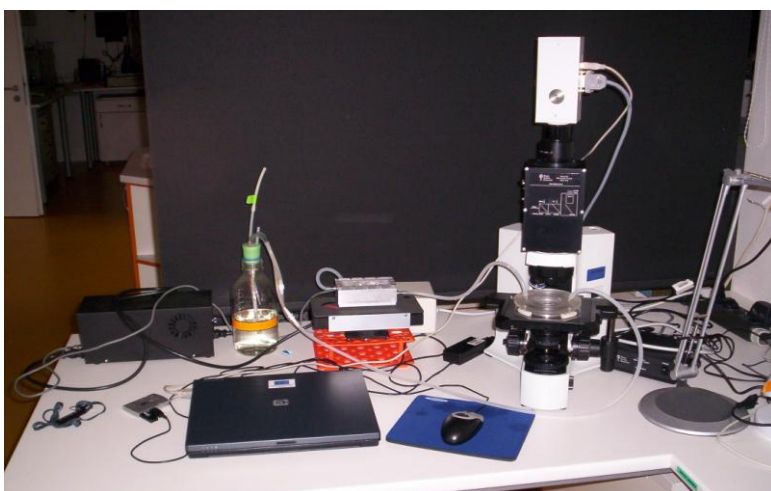
dolní část komůrky. Důležité bylo komůrku řádně zacvaknout a dotáhnout šrouby, aby nedocházelo k úniku média.

Aparatura okolo komůrky se skládala z několika částí (obr. 4.4 a 4.5). Byla napojena na zdroj média, dále k peristaltické pumpě (PCD M22, firma Kouřil) a ke komůrce na chlazení média s termostatem (Peltier control unit, firma PSI).



Obr. 4.4: Aparatura kolem komůrky-nádoba s mediem, pumpa, chladicí komůrka.

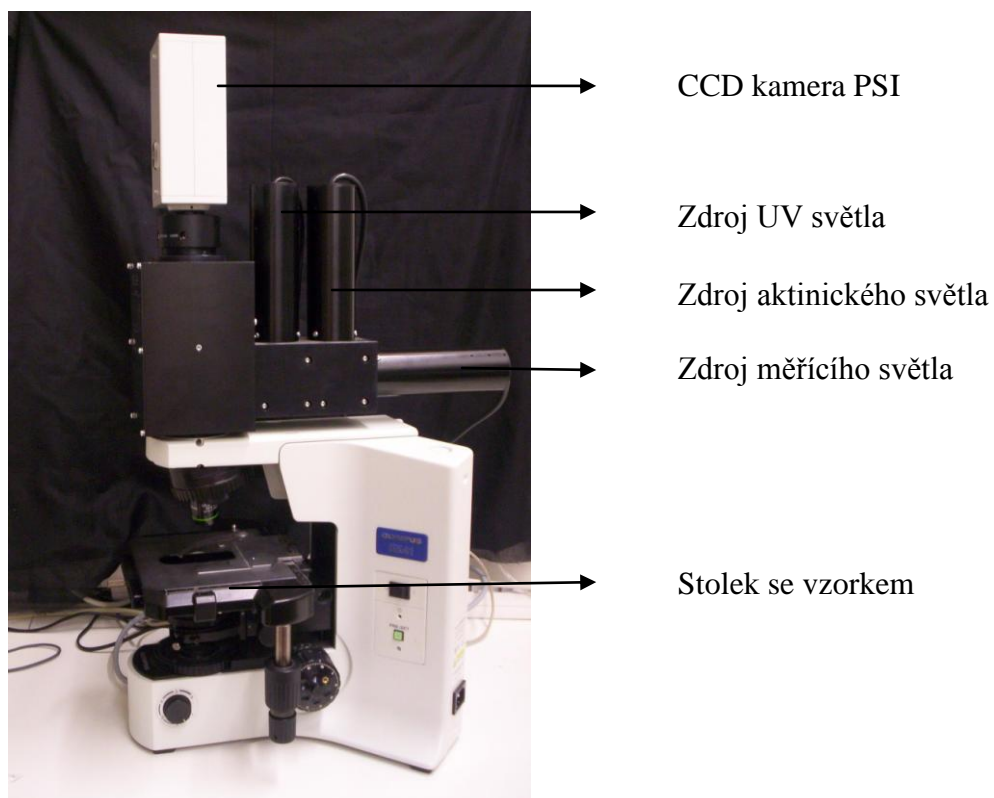
Pumpa poháněla médium, které bylo vedeno do termostatovací komůrky, ta udržovala teplotu média, a odtud bylo médium vedeno do komůrky. Hadička mezi termostatovací komůrkou a komůrkou pod mikroskopem by měla být co nejkratší, aby nedocházelo k ohřátí média teplotou vzduchu.



Obr. 4.5: Sestava mikroskopu a měřicí komůrky.

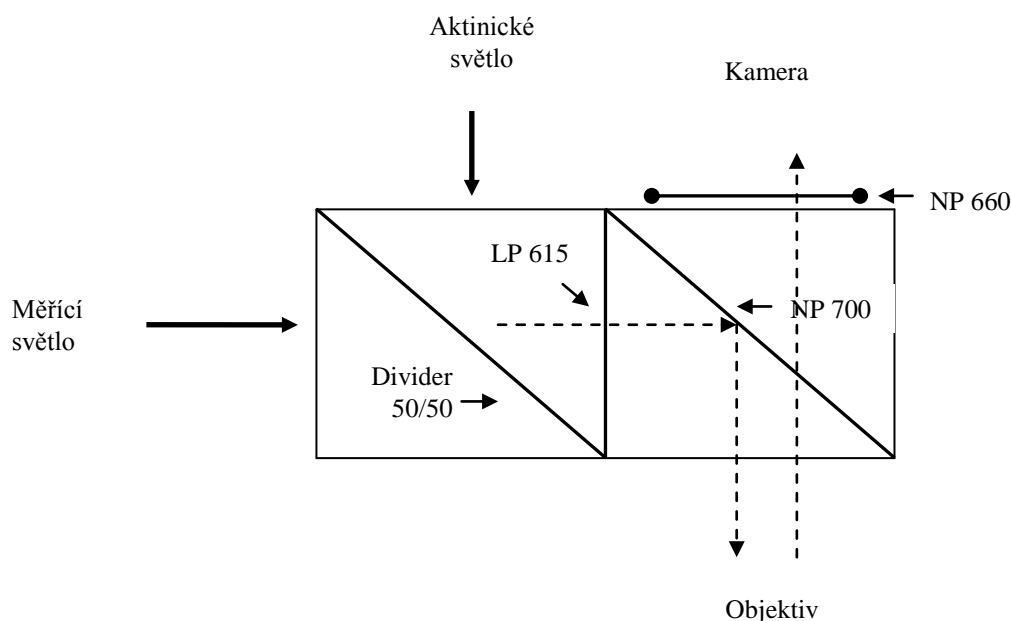
4.4 Fluorescenční mikroskop

Měření fluorescence probíhalo na fluorescenčním kinetickém mikroskopu Micro-FluorCam FC 2000 od firmy PSI. Základem je upravený přenosný fluorescenční mikroskop Olympus BX41 s CCD kamerou (obr. 4.6).



Obr. 4.6: Fluorescenční kinetický mikroskop Olympus BX41 upravený pro měření variabilní fluorescence chlorofylu (Micro-FluorCam FC 2000).

Úprava spočívá v přidání světelných zdrojů (tubusy s LED diodami, které slouží jako světelné zdroje – bílé LED jako měřicí, saturační a aktinické světlo a pomocná LED světla IR (735 nm) a UV (350 nm)), ve vybavení mikroskopu soustavou fluorescenčních filtrů (excitačního LP 615, dichroického NP 700 a emisního NP 660, viz obr. 4.7), CCD kamerou a řídicí elektronikou.



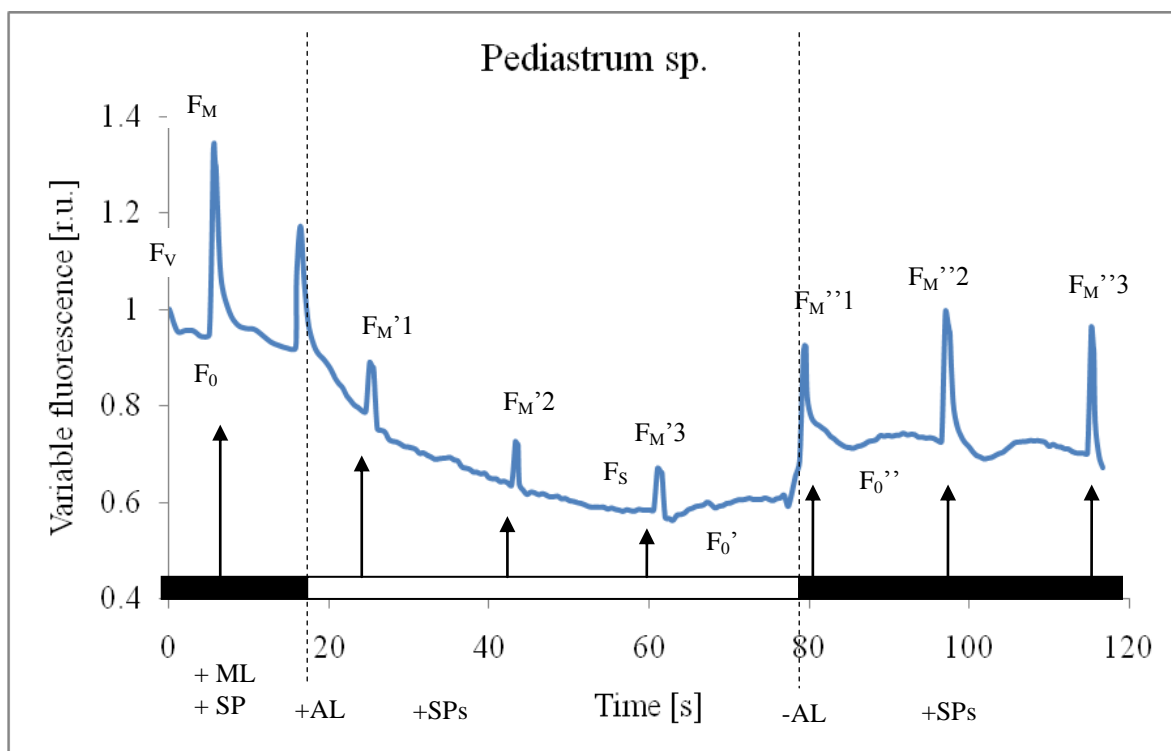
Obr. 4.7: Schéma soustavy fluorescenčních filtrů uvnitř FKM.

Během měření jsme používali objektiv Olympus se zvětšením 60x/1.20 W (pro použití s vodní imerzí). K dispozici jsme měli objektivy i s menším zvětšením, ale ty jsme nepoužívali, protože buňky byly většinou malé a pod objektivem s menším zvětšením nebyl jejich signál dostatečný. Kamera mikroskopu byla přes USB port připojena k notebooku HP, ve kterém byl nainstalovaný řídicí software ovládání kamery a mikroskopu FluorCam6 (od firmy PSI Brno), který sloužil také pro zpracování a vyhodnocení záznamů. Pomocí měřicího programu jsme nastavovali podmínky, kterým byly buňky po dobu měření vystaveny. V tomto programu jsme si také sestavili vlastní zhasací protokol, který jsme pak používali po celou dobu měření.

4.4.1 Vlastní měření

Celý měřicí protokol trvá 120 sekund. Před měřením jsme ponechali vzorek alespoň 1 minutu ve tmě. Měření začíná tím, že buňka se v temnotní fázi osvětlí slabým modulovaným měřicím světlem (ML), které trvá 5 vteřin a změří se parametr F_0 . Poté je buňka vystavena silnému

saturačnímu pulsu (SP), který vybudí maximální fluorescenci F_M . SP jsou záblesky silného bílého světla, mají vysokou saturační hustotu toku elektronů a jejich intenzita způsobí zahlcení reakčních center fotosystému II. V našem protokolu SP trvá 800ms. Pak nastává 10 - ti vteřinová relaxace vzorku ve tmě. Následně je vzorek vystaven aktinickému světlu (AL), které trvá 60 vteřin. Během AL jsou přidány 4 saturační pulsy. První SP se objeví 9 vteřin po spuštění aktinického světla. Po vypnutí aktinického světla následuje konečná temnotní fáze relaxace se dvěma saturačními pulsy (obr. 4.8). Podrobný popis zhášecího protokolu viz příloha 9.1.



Obr. 4.8: Průběh vytvořeného zhášecího protokolu použitý na buňce *Pediastrum sp.* (*Chlorophyta*).

4.4.2 Stanovení intenzity světla

Abychom zjistili, jaké intenzitě světla jsou buňky pod různými objektivy vystaveny, museli jsme nejprve vypočítat plochy světelných stop, které jednotlivé objektivy v ohniskové rovině vytvářejí. Ty jsme získali tak, že pod daný objektiv se vložil list pokojové rostliny, na který se posvítilo s maximální intenzitou aktinického světla. Poté byla ozářená plocha vyfotografována při zvětšení 4x. Obsah oblasti ozářeného pole byl změřen pomocí programu ImageJ (Abramoff a spol., 2004; Rasband, 1997-2009) a pomocí kalibrace mikroskopickým měřítkem (1mm odpovídá 453 pixelům). Měření jsme opakovali 2krát a zprůměrovali. Zprůměrované

hodnoty jsme později použili intenzity světla, které prochází a dopadá pod daný objektiv, viz dále.

Pod všemi objektivy při 100% intenzitě světla jsme pomocí přenosného fotometru SPh 2020 (Vývojová optická dílna AVČR, Turnov) změřili intenzitu aktinického a saturačního světla v $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (tab. 2). Abychom pro každý objektiv získali hodnotu intenzity světla na stupnici od 0 do 100 (tato stupnice odpovídá stupnici v programu FluorCam6), vytvořili jsme si tabulku pro AL i SP, kde hodnota 0 odpovídá 0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a hodnota 100 naměřené intenzitě při 100%), (tab. 3, 4). Pomocí těchto tabulek jsme sestrojili grafy, ze kterých lze jednotlivé intenzity pro dané hodnoty odečíst.

Tabulka 2: Hodnoty aktinického světla (AL) a saturačního světla (SP) naměřené při 100% intenzitě záření pro jednotlivé objektivy pomocí fotometru SPh 2020.

Zvětšení objektivu	AL ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	SP ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
4x	123	286
10x	116	271
20x	98	227
40x	25.6	55.4
60x	22.7	52

Intenzitu světla, které dopadá pod objektiv, jsme získali podílem obsahu daného objektivu s hodnotami získanými z grafů.

Tabulku pro výpočet ML jsme dělat nemuseli. Toto světlo má jen 5 hodnot, na které se může nastavit. Proto jsme intenzitu procházejícího světla pro tyto hodnoty změřili na výše uvedeném přístroji a výsledky vynásobili také se stopou světelného pole pro dané objektivy, abychom získali intenzitu světla dopadající na zaostřené místo. Tabulka velikostí světelného pole pro ML, AL a SP viz příloha 9.2.

Naše nastavení intenzity světla bylo na AL maximálně na hodnotě 5 a na SP maximálně 10 (na škále 0-100). Hodnota 5 na AL podle našich výpočtů odpovídá 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a hodnota 10 pro SP odpovídá 153 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, které by v kontinuálním režimu dopadaly na zaostřenou plochu pod objektivem. Nastavením ML se zároveň nastavovala elektronická clona (electronic shutter). Nejvhodnější hodnoty ML pro měření byly 0, 1 maximálně 2. Ve větších hodnotách totiž ML začíná mít aktinický efekt. To pak mělo negativní vliv na kvantový výtěžek, který byl v jeho důsledku snižován.

5. Výsledky

Ačkoliv byl tento pokus zahájen v květnu, kvalitní a reprodukovatelné záznamy fluorescenční kinetiky buněk se nám podařilo získávat až počátkem července. Během sledovaného období se měnilo druhové zastoupení fytoplanktonu. Na jaře byly hojné rozsivky, které počátkem léta ustupovaly. Nejvíce zastoupenými se v létě, především v období července a srpna, stávají sinice. Tento rok však nebyly výrazně dominantní (Pechar, ústní sdělení). Počet buněk zelených řas byl stejný jako počet buněk sinic. S koncem léta a s nástupem podzimu sinice zmizely. Nejvíce zastoupenými se opět staly zelené řasy a rozsivky. Podrobnější informace o druhovém složení na sledovaných lokalitách a dalších parametrech, které byly v rámci experimentu monitorovány nejsou době podání této práce známy. V tab.5 jsou uvedeny dny odběrů a měření vzorků, určené druhy ve fytoplanktonu a celkový počet buněk daného druhu, u kterých jsme změřili fluorescenční křivky.

Tabulka 5: Přehled pozorování jednotlivých druhů fytoplanktonu v průběhu sezóny.

	4.6.	17.6	2.7.	29.7.	12.8.	26.8.	9.9.	24.9.	7.10.	21.10
Cyanobacteria										
<i>Anabaena sp.</i>	-	2	16	4	11	8	5	-	-	-
Chromophyta										
Centrální rozs.	-	-	-	4	-	5	3	2	2	3
Penátní rozs.	-	6	-	3	2	2	4	3	-	8
Chlorophyta										
<i>Scenedesmus sp.</i>	13	8	18	6	12	7	15	9	6	8
<i>Pediastrum sp.</i>	7	6	2	5	3	5	10	3	5	9
<i>Coelastrum sp.</i>	6	-	-	3	-	2	1	2	1	4
<i>Cosmarium sp.</i>	-	-	-	2	-	-	2	1	-	-
<i>Oocystis sp.</i>	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	-	-	-	2	1	2	1	4	5	2
Neurčené										
kulovité buňky	8	8	-	3	5	7	4	1	4	3
vláknité řasy	-	-	2	1	3	6	5	1	2	3

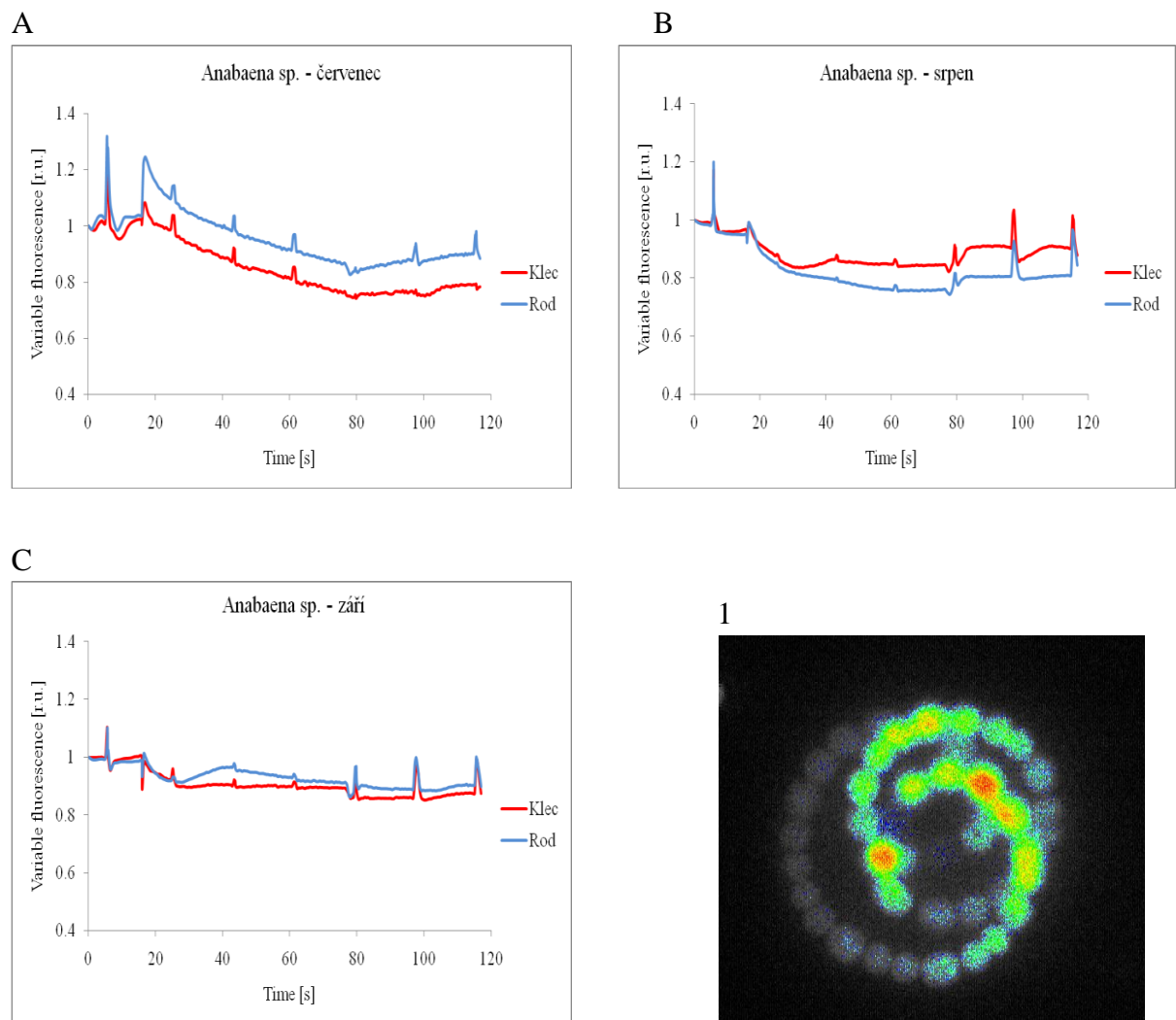
V podrobnější analýze, kterou uvádíme dále, jsme se soustředili celkem na 5 druhů řas ze třech oddělení. Jde o druhy, které byly nejvíce zastoupené:

Cyanobacteria – *Anabaena sp.*

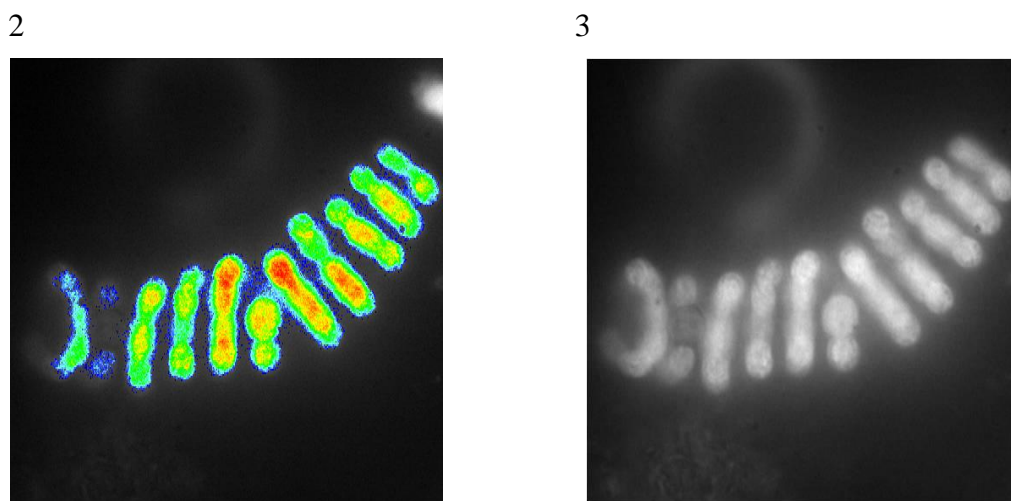
Chromophyta – centrické a penátní rozsivky

Chlorophyta – *Pediastrum sp.*, *Scenedesmus sp.*

Cyanobacteria – *Anabaena sp.*



Obr. 5.1 A – C: Záznamy fluorescenční kinetiky buněk sinice *Anabaeny sp.* z rybníků Klec a Rod.



Obr 5.2: Na obrázku 1 a 2 jsou buňky *Anabaeny sp.* zachyceny ve fázi F_M . Na obrázku 3 jsou buňky osvětlené ML.

Tabulka 6: Hodnoty NPQ a qP pro řasu *Anabaena sp.*

	NPQ ¹		qP		
	Klec	Rod	Klec	Rod	
Červenec	0,27	0,25	0,61	0,6	qP_L1 ²
			0,66	0,7	qP_L3 ³
Srpen	0,18	0,2	0,25	0,42	qP_L1
			0,69	0,7	qP_L3
Září	0,15	0,13	0,6	0,75	qP_L1
			0,69	0,86	qP_L3

Obecná charakteristika fluorescenčních křivek sinic:

V porovnání s ostatním fytoplanktonem se všechny fluorescenční křivky sinic vyznačovaly nižším nefotochemickým zhášením, ale i menší variabilní fluorescencí (obr. 5.1 A – D). Hodnoty koeficientů pro fotochemické zhášení (tab. 6) se ve všech případech na AL postupně zvyšují (qP_L1 < qP_L3), (tab. 6).

Sezónní změny a rozdíly mezi lokalitami:

Během tří měsíců pozorování, kdy se sinice vyskytovaly ve fytoplanktonu (červenec – září, tab. 5), byla variabilní fluorescence sinice *Anabaeny sp.* nejvyšší v červenci a nefotochemické zhášení bylo také nejvýraznější (obr. 5.1 A). V průběhu dalších měsíců se F_V výrazně snižovalo a hodnoty nefotochemického zhášení byly poměrně nízké (viz tab. 6). Rozdíl F_V mezi buňkami z rybníků Klec a Rod nebyl výrazný.

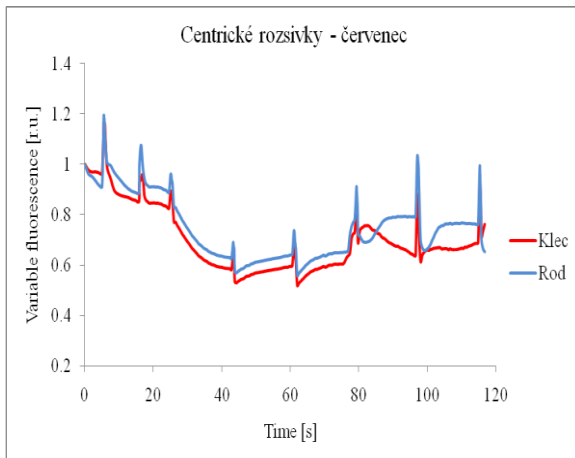
¹ Průměrná hodnota získaná z NPQ_L1 a NPQ_L3 (hodnoty související s první a třetí naměřenou F_M')

² qP_L1 je hodnota qP vypočítaná k první naměřené F_M'

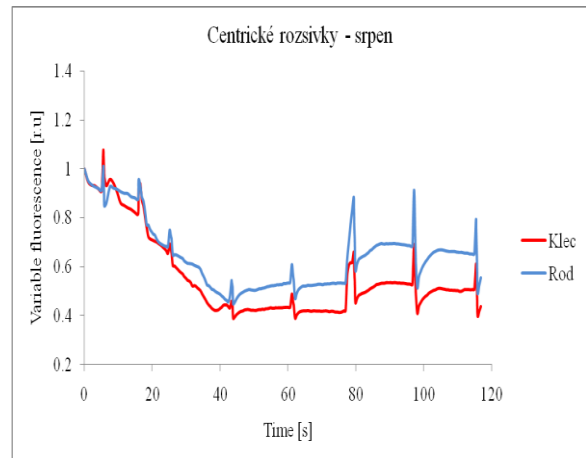
³ qP_L3 je hodnota qP vypočítaná ke třetí naměřené F_M'

Chromophyta – centrické rozsivky

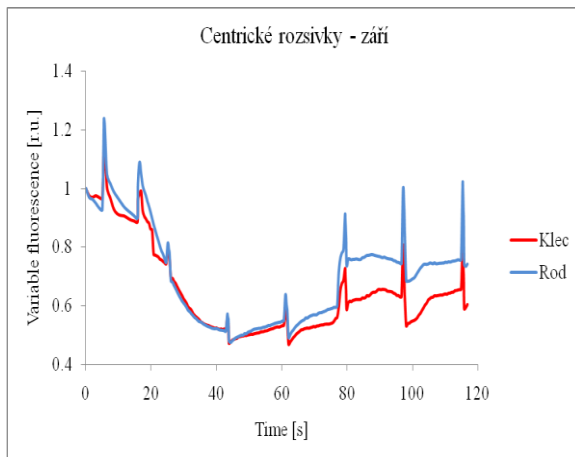
A



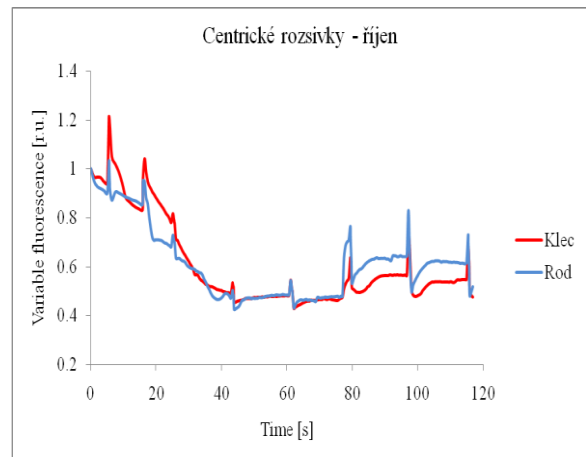
B



C

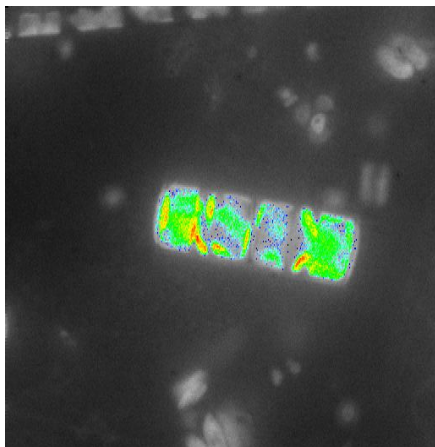


D

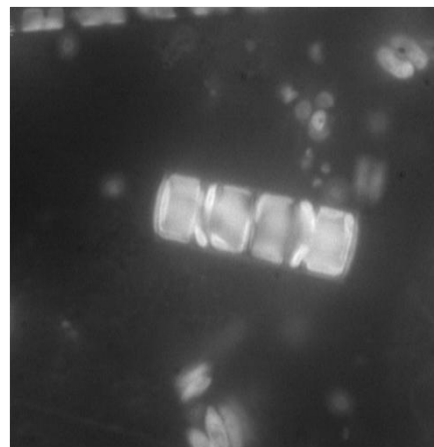


Obr. 5.3 A – D: Záznamy fluorescenční kinetiky buněk centrických rozsivek z rybníků Klec a Rod.

1



2



Obr. 5.4: Na obrázku 1 je centrická rozsivka zachycena ve fázi F_M . Na obrázku 2 je buňka nasvícená ML.

Tabulka 7: Hodnoty NPQ a qP pro centrické rozsivky.

	NPQ		qP		
	Klec	Rod	Klec	Rod	
Červenec	0,5	0,4	0,5	0,48	qP_L1
			0,54	0,54	qP_L3
Srpen	0,6	0,4	0,3	0,6	qP_L1
			0,5	0,53	qP_L3
Září	0,55	0,5	0,4	0,38	qP_L1
			0,57	0,63	qP_L3
Říjen	0,65	0,6	0,2	0,4	qP_L1
			0,54	0,54	qP_L3

Obecná charakteristika fluorescenčních křivek centrických rozsivek:

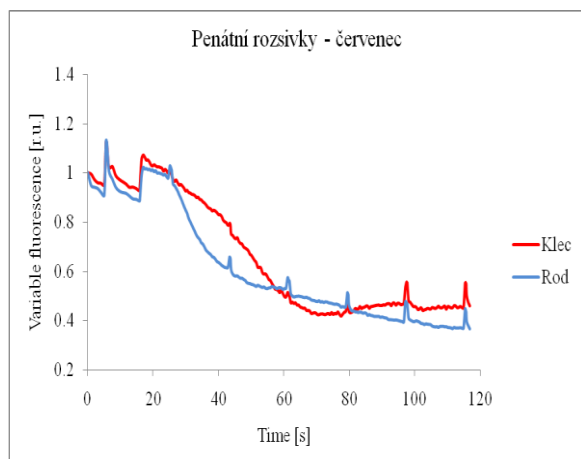
Hodnoty koeficientů nefotochemického zhášení centrických rozsivek jsou 2x vyšší než hodnoty NPQ sinic (viz tab. 6, 7). Pozorovali jsme výrazné zhášení celkové fluorescence, zvláště pak v první půli světelné fáze (během prvních 30 sec osvětlení). Poté došlo ke stabilizaci zhášení (obr. 5.3 C) nebo někdy i k jeho uvolnění (obr. 5.3 D). V temnotní fázi jsme pozorovali částečný návrat k původním hodnotám. Centrické rozsivky měly vyšší variabilní fluorescenci, hodnoty koeficientu qP se v průběhu světelné fáze zvyšovaly (qP_L1 < qP_L3), (tab. 7).

Sezónní změny a rozdíly mezi lokalitami:

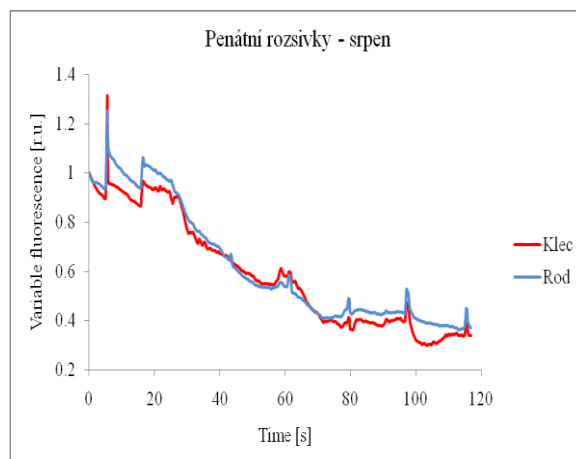
Variabilní fluorescence centrických rozsivek dosahovala podobných hodnot téměř ve všech sledovaných měsících (obr. 5.3 A – D). Výrazně nižší byla v srpnu (obr. 5.3 B), a to u buněk z obou rybníků a také u buněk z rybníka Rod v říjnu (obr. 5.3 D). Rozdíl variabilní fluorescence mezi buňkami z rybníků Rod a Klec nebyl první tři měsíce (obr. 5.3 A – C) pozorován. Výjimkou byly buňky z rybníku Rod v říjnu (obr. 5.3 D). Ty dosahovaly zhruba polovičních hodnot F_v buněk z rybníku Klec.

Chromophyta – penátní rozsivky

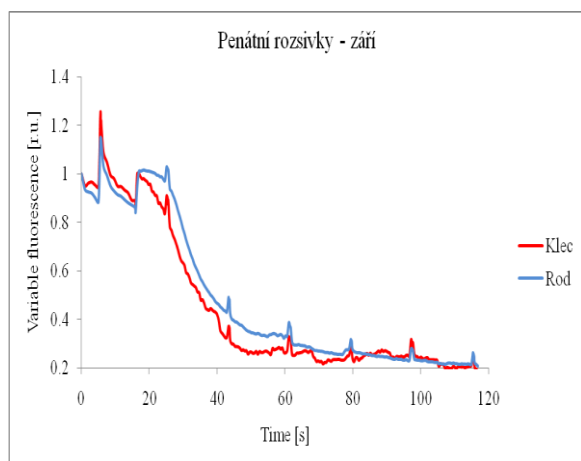
A



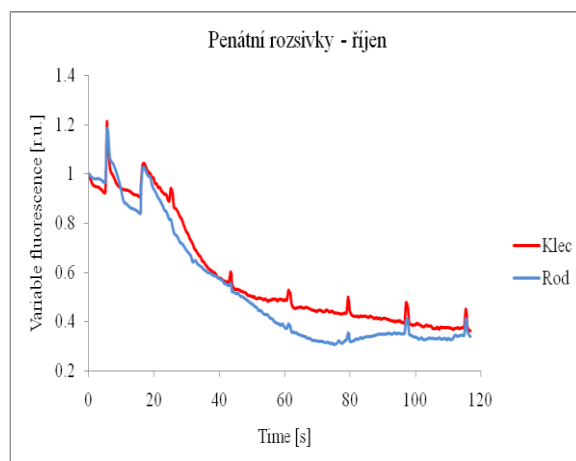
B



C

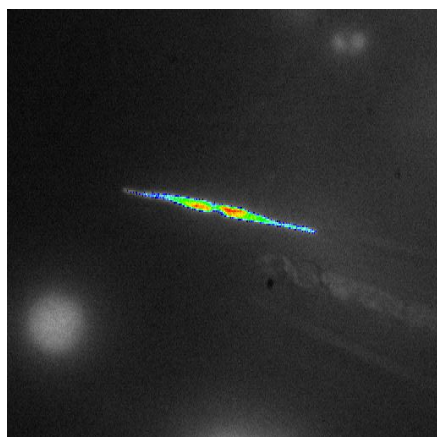


D

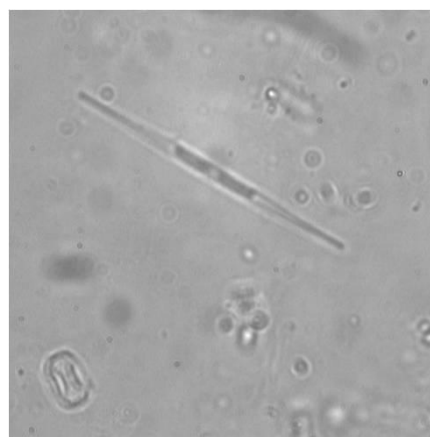


Obr. 5.5 A – D: Záznamy fluorescenční kinetiky buněk penátních rozsivek z rybníků Klec a Rod.

1



2



Obr. 5.6: Na obrázku 1 je penátní rozsivka ve fázi F_M , na obrázku 2 je osvětlena světlem fared.

Tabulka 8: Hodnoty NPQ a qP pro penátní rozsivky.

	NPQ		qP		
	Klec	Rod	Klec	Rod	
Červenec	0,55	0,51	0,3	0,53	qP_L1
			0,2	0,7	qP_L3
Srpen	0,55	0,6	0,2	-	qP_L1
			0,6	-	qP_L3
Září	0,7	0,66	0,5	0,5	qP_L1
			0,79	0,62	qP_L3
Říjen	0,6	0,7	0,45	-	qP_L1
			0,8	0,5	qP_L3

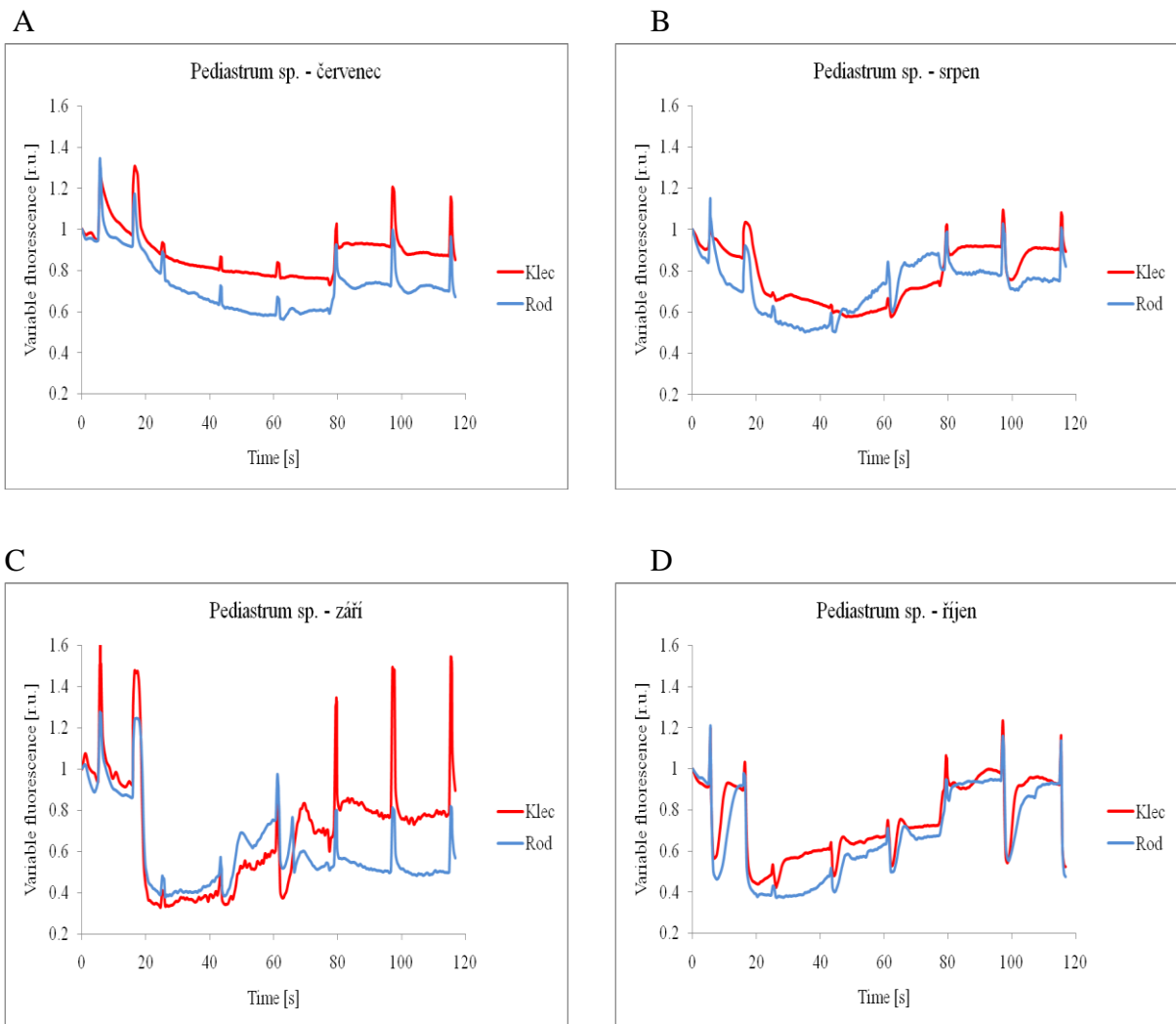
Obecná charakteristika fluorescenčních křivek penátních rozsivek:

Koeficient nefotochemického zhášení penátních rozsivek dosahuje podobných hodnot jako u centrických (tab. 7, 8). V grafech (obr. 5.5 A – D) je také vidět, že nefotochemické zhášení bylo silné, a to zejména v první polovině světelné fáze. Ve druhé polovině světelné periody buňky zhášely dále, ale zhášení bylo pomalejší. Hodnota koeficientu fotochemického zhášení se v průběhu světelné fáze zvyšovala ($qP_{L1} < qP_{L3}$), (tab. 8).

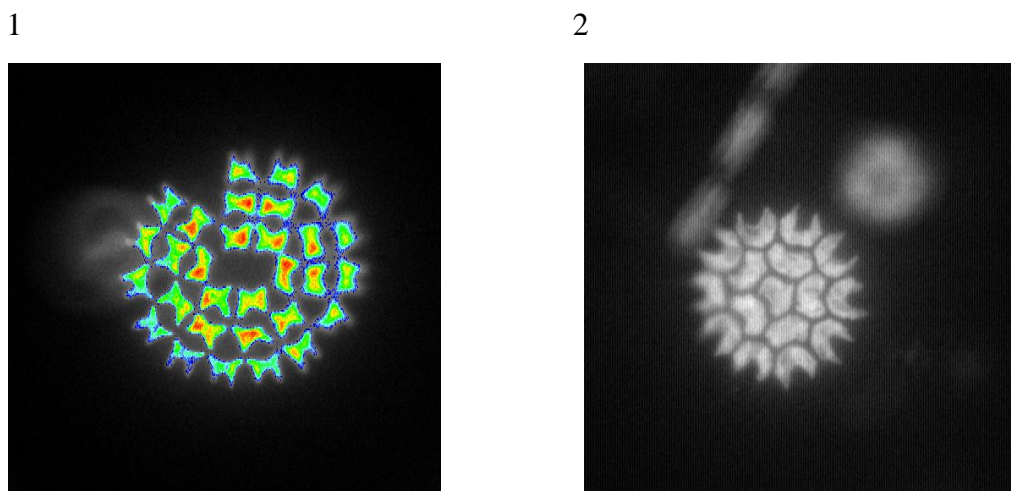
Sezónní změny a rozdíly mezi lokalitami:

Variabilní fluorescence penátních rozsivek se během sledovaných měsíců měnila. Nejvyšší dosažené hodnoty jsme pozorovali během srpna (obr. 5.5 B), zatímco nejnižší F_v vykazovaly buňky v červenci a říjnu (obr. 5.5 A). Rozdíly variabilní fluorescence mezi buňkami z obou rybníků nebyly nijak výrazné.

Chlorophyta – *Pediastrum* sp.



Obr. 5.7 A – D: Záznamy fluorescenční kinetiky buněk *Pediastrum* sp. z rybníků Klec a Rod.



Obr. 5.8: Na obrázku 1 je buňka *Pediastrum* sp. ve fázi F_M . Na obrázku 2 je buňka nasvícena ML.

Tabulka 9: Hodnoty NPQ a qP pro řasu *Pediastrum sp.*

	NPQ		qP		
	Klec	Rod	Klec	Rod	
Červenec	0,55	0,75	0,64	0,6	qP_L1
			0,86	0,8	qP_L3
Srpen	0,58	0,6	0,5	0,57	qP_L1
			0,6	0,43	qP_L3
Září	1,2	0,98	0,82	0,86	qP_L1
			0,55	0,48	qP_L3
Říjen	0,91	1,04	0,54	0,87	qP_L1
			0,4	0,38	qP_L3

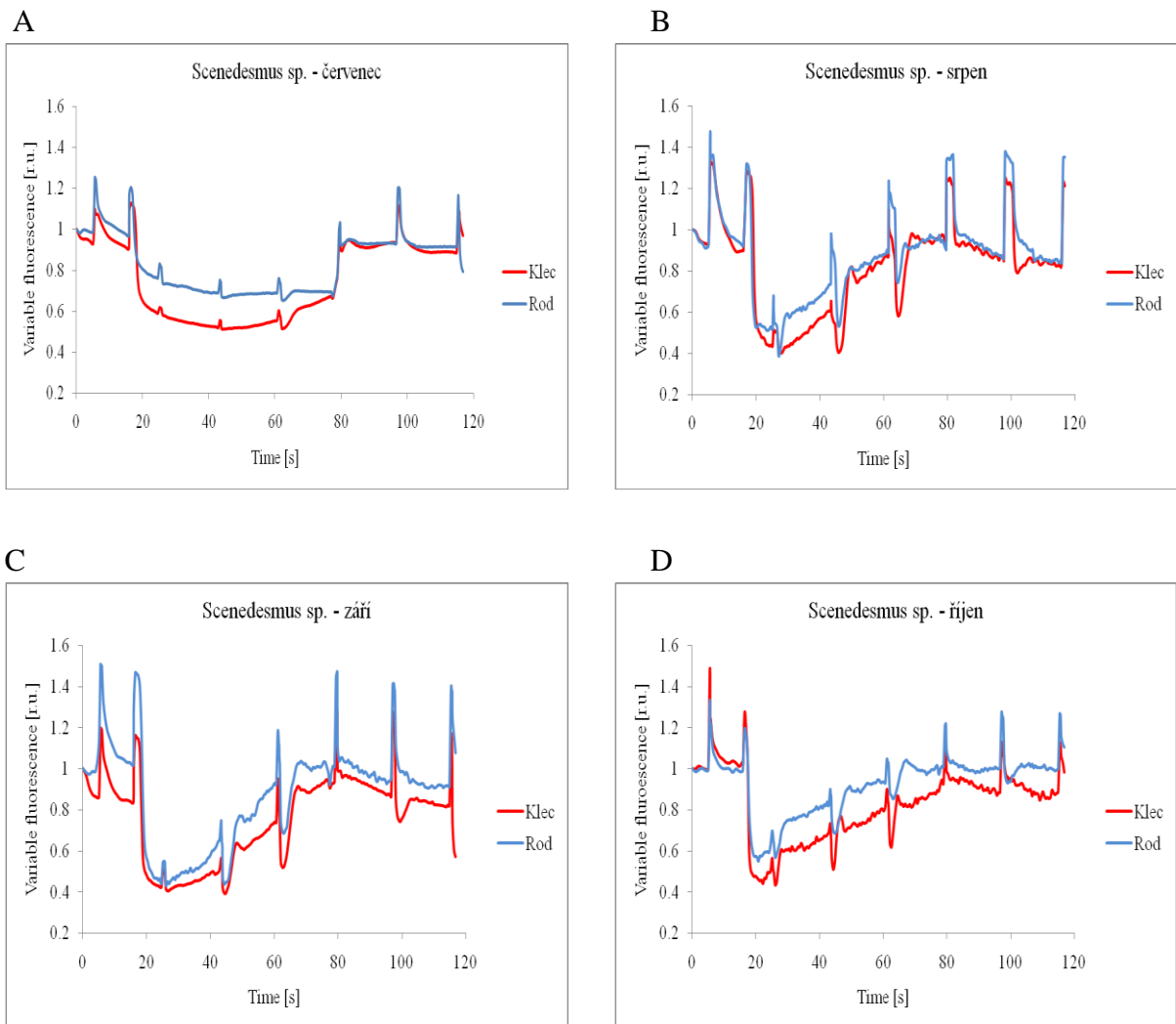
Obecná charakteristika fluorescenčních křivek zelených řas *Pediastrum sp.*:

Zelené řasy *Pediastrum sp.* měly vysokou hodnotu variabilní fluorescence (obr. 5.7 A – D). Buňky po zapnutí AL extrémně zhášely, hodnoty koeficientu nefotochemického zhášení jsou vysoké (tab. 9). Nefotochemické zhášení bylo v některých případech velmi rychlé (minima dosaženo během 20 sec po zapnutí aktinického světla), (obr. 5.7 C). Po vypnutí světla došlo k rychlé a výrazné obnově fluorescenčních parametrů. Hodnota koeficientu fotochemického zhášení se v průběhu světelné fáze snižuje ($qP_{L1} > qP_{L3}$), (tab 9).

Sezónní změny a rozdíly mezi lokalitami:

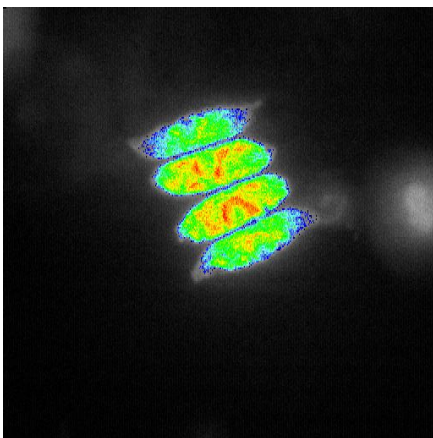
Variabilní fluorescence buněk *Pediastrum sp.* dosahovala poměrně vysokých hodnot. V průběhu sledovaného období však výrazně kolísala. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny v červenci a září (obr. 5.7 A, C), zatímco buňky měřené v srpnu a v říjnu (obr. 5.7 B, D) dosáhly hodnot asi polovičních. Rozdíl ve variabilní fluorescenci mezi buňkami z rybníku Klec a Rod nebyl patrný. Výjimkou byly buňky z rybníka Klec v měsíci září (obr. 5.7 B). V odezvě buněk *Pediastrum sp.* jsme pozorovali propady variabilní fluorescence (zhášení) po skončení saturačních pulsů. Tento rys je vidět na AL na křivkách v grafech 5.7 B – D u buněk z obou rybníků. Navíc v říjnu (obr. 5.7 D) se tento typ výrazného zhášení vyskytl i v temnotní fázi.

Chlorophyta – Scenedesmus sp.

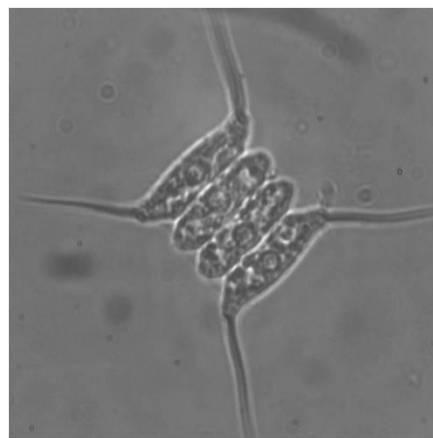


Obr. 5.9 A – D: Záznamy fluorescenční kinetiky buněk *Scenedesmus sp.* z rybníků Klec a Rod.

1



2



Obr. 5.10: Na obrázku 1 je buňka *Scenedesmus sp.* ve fázi F_M . Na obrázku 2 je buňka nasvícena světlem far-red.

Tabulka 10: Hodnoty NPQ a qP pro řasu *Scenedesmus sp.*

	NPQ		qP		
	Klec	Rod	Klec	Rod	
Červenec	0,8	0,59	0,57	0,7	qP_L1
			0,6	0,7	qP_L3
Srpen	0,94	0,89	0,8	0,53	qP_L1
			0,4	0,7	qP_L3
Září	0,85	1,02	0,8	0,8	qP_L1
			0,47	0,54	qP_L3
Říjen	1,14	0,82	0,57	0,76	qP_L1
			0,3	0,23	qP_L3

Obecná charakteristika fluorescenčních křivek zelených řas *Scenedesmus sp.*:

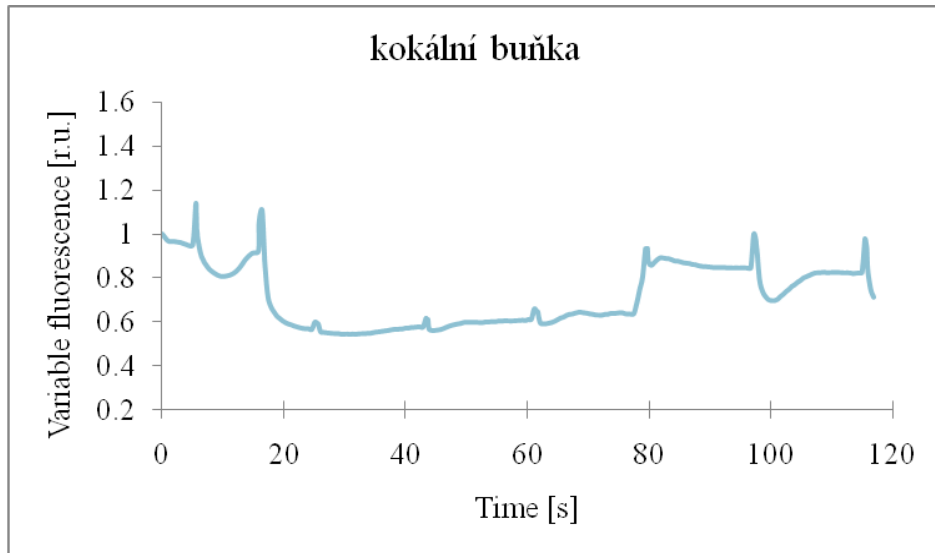
Průběh zhášení u řasy *Scenedesmus sp.* (obr. 5.9 A – D) je velmi podobný průběhu křivek u řasy *Pediastrum sp.* (obr. 5.7 A – D). Hodnoty NPQ jsou vysoké (tab. 10), zhášení po zapnutí AL bylo extrémní. Hodnoty koeficientu fotochemického zhášení se v průběhu světelné fáze snižují ($qP_{L1} > qP_{L3}$), (tab. 10).

Sezónní změny a rozdíly mezi lokalitami:

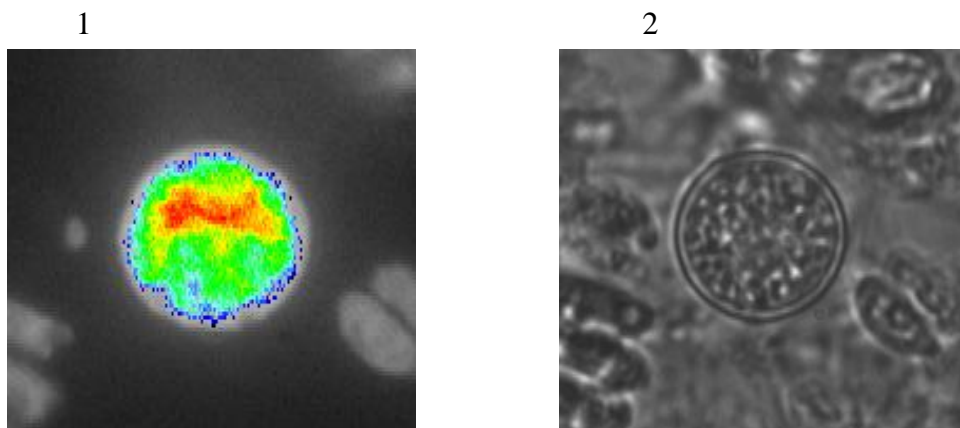
Variabilní fluorescence buněk *Scenedesmus sp.* byla vysoká (obr. 5.9 A – D). Dosahovala dokonce vyšších hodnot, než tomu bylo u buněk *Pediastrum sp.* Buňky řasy *Scenedesmus sp.* měřené v období od srpna do října dosahovaly podobných hodnot variabilní fluorescence. Nižší naměřená F_V byla zaznamenána v červenci (obr. 5.9 A). Rozdíl F_V mezi buňkami z rybníku Klec a Rod byl výrazný v měsíci červenci a září (obr. 5.9 A, C). O něco menší rozdíl byl patrný i v říjnu (obr. 5.9 D). U odezvy buňky *Scenedesmus sp.* se nachází stejný rys, který jsme pozorovali u buněk *Pediastrum sp.*, a to zhášení fluorescence za saturačními pulsy. U této řasy se však tento znak vyskytuje pouze na aktinickém světle. Mírný náznak propadu křivky v temnotní fázi se objevil u buněk z rybníku Klec v měsíci září (obr. 5.9 C).

Pokus o určení neurčených řas pomocí záznamu kinetiky fluorescence

Ve fytoplanktonu se po celé období našeho pokusu hojně vyskytovaly kokální buňky i vláknitá řasa, které jsme ze získaných obrázků nedokázali určit. Pomocí získaných informací o fluorescenčním zhášení námi studovaných řas jsme se pokusili tyto neurčené druhy dle jejich odezvy přiřadit do jednotlivých oddělení.

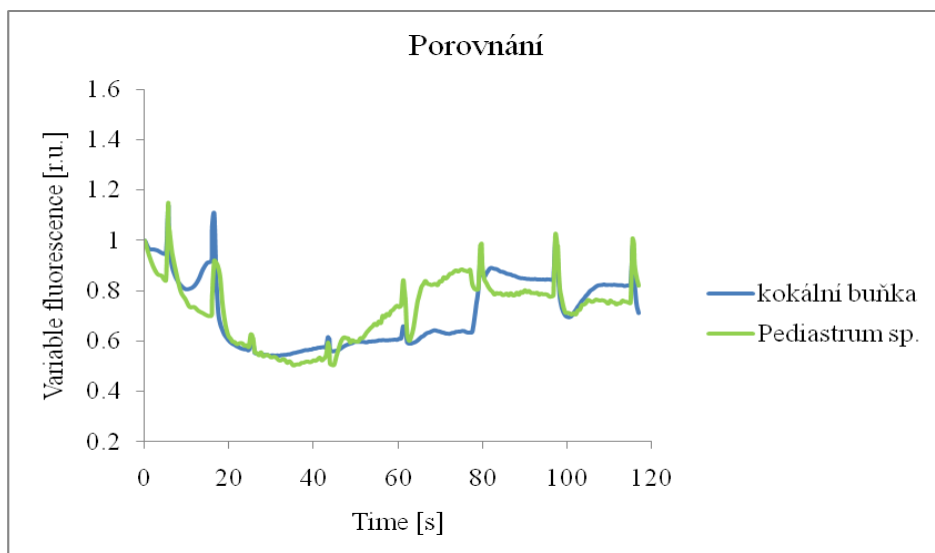


Obr. 5.11: Záznam fluorescenční kinetiky neurčené kokální buňky.

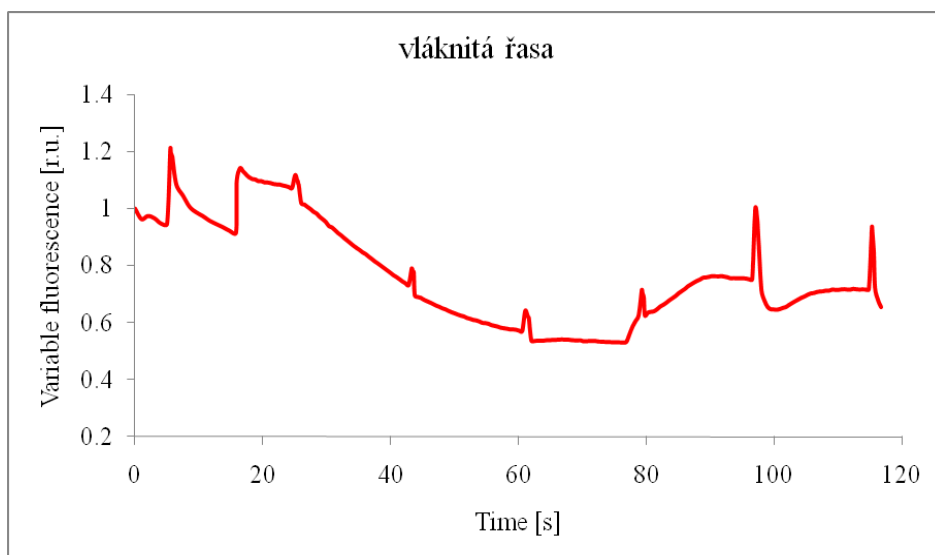


Obr. 5.12: Na obrázku 1 je kokální buňka ve fázi F_M . Na obrázku 2 je buňka nasvícena světlem far-red.

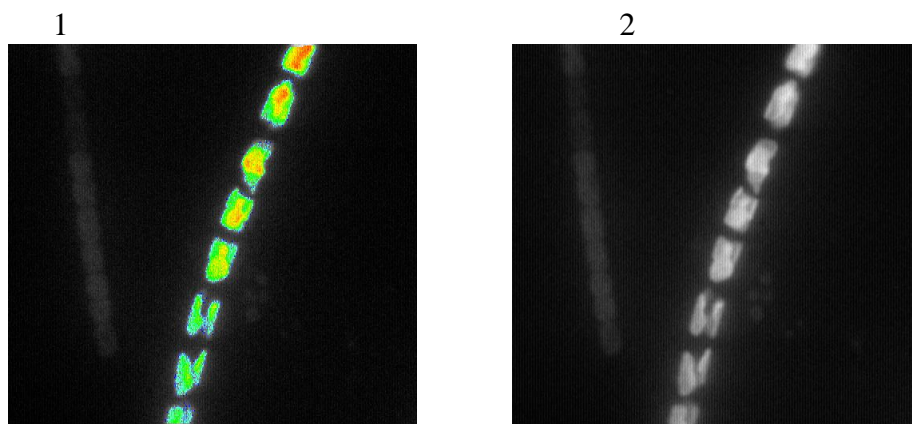
Charakteristickou vlastností pro tuto buňku bylo silné zhášení po zapnutí AL, uvolnění zhášení v temnotní fázi a výrazný propad křivky za SP v temnotní fázi. Tyto znaky vykazovaly při našich měřeních zelené řasy.



Obr. 5.13: Srovnání kinetiky fluorescence neurčené kokální řasy s buňkou *Pediatrum sp.*

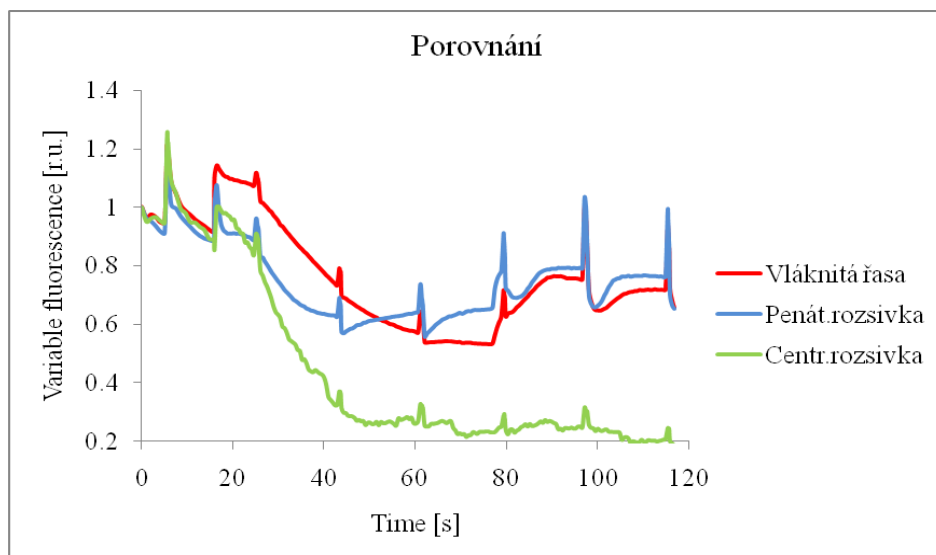


Obr. 5.14: Fluorescenční odezva neurčené vláknité řasy.



Obr. 5.15: Na obrázku 1 je vláknitá řasa ve fázi F_M . Na obrázku 2 je nasvícena ML.

Typickým znakem těchto buněk bylo zhášení po celou dobu světelné fáze. V temnotní fázi pak docházelo k uvolňování zhášení. Průběh této křivky nejvíce odpovídal průběhu, jaký vykazovaly rozsivky, viz obr. 5.16.

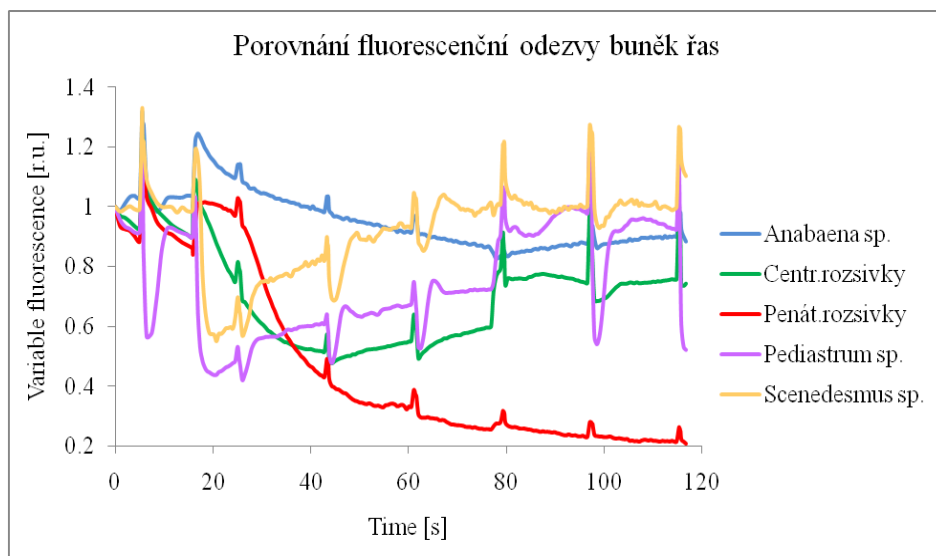


Obr. 5.16: Srovnání kinetiky fluorescence neurčené vláknité řasy s penátními a centrickými rozsivkami.

6. Diskuse

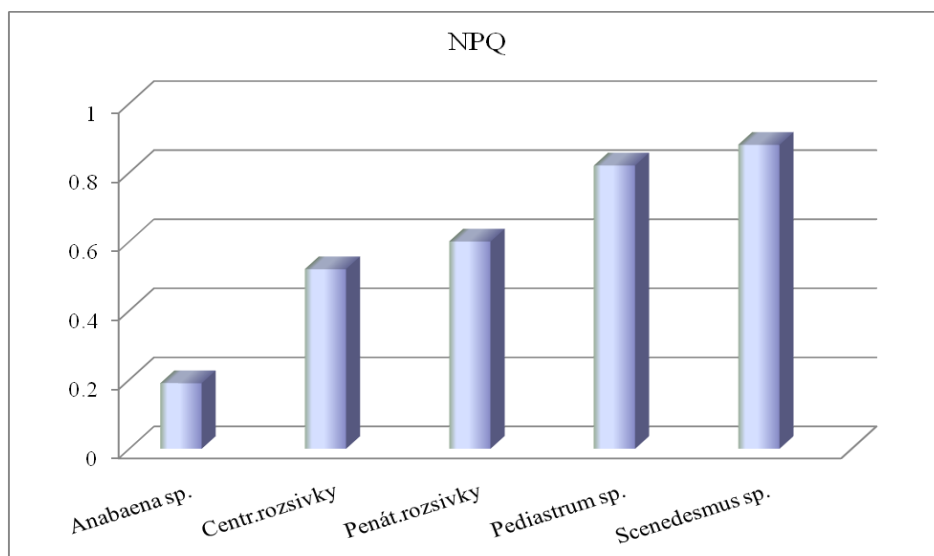
Měřením na FKM s 2D zobrazením fluorescenční kinetiky jsme se pokusili charakterizovat fluorescenční odezvu pro vybraná oddělení a buňky, vypočítat parametry fluorescence a vzájemně tyto charakteristiky porovnat.

Na úrovni oddělení jsme v indukčních křivkách variabilní fluorescence pozorovali výraznou heterogenitu.(obr. 5.17).



Obr. 5.17: Charakteristické fluorescenční odpovědi pro jednotlivé zástupce.

Pro oddělení *Cyanobacteria* je typické malé nefotochemické zhášení. Hodnoty koeficientů NPQ jsou velmi nízké. Hodnoty koeficientů pro fotochemické zhášení se na AL postupně zvyšují ($qP_{L1} < qP_{L3}$). Rozsivky (*Chromophyta*) mají fotosyntetický aparát citlivý na aktinické světlo. Během měření vykazovaly výrazné zhášení, a to především v první polovině světelné fáze. Hodnoty koeficientu qP se v průběhu světelné fáze zvyšují ($qP_{L1} < qP_{L3}$). Hodnoty koeficientů nefotochemického zhášení jsou 2x vyšší než hodnoty NPQ sinic (obr. 5.13). Ve druhé polovině světelné fáze a v temnotní fázi se pak průběh fotosyntetické odpovědi lišil u centrických a penátních rozsivek. Zatímco u centrických rozsivek došlo po silnějším zhášení na AL ve druhé půli ke stabilizaci a ve tmavé fázi docházelo k uvolnění zhášení, u penátních rozsivek jsme zjistili mírnější průběh zhášení ve druhé polovině světelné fáze i během relaxace. Pro oddělení *Chlorophyta* je charakteristické extrémní zhášení po zapnutí AL a vysoká míra tepelné disipace. A to jak pro řasy *Scenedesmus sp.*, tak pro *Pediastrum sp.* Hodnoty koeficientu NPQ jsou 4x vyšší než u sinic (obr. 5.14). Hodnota koeficientu fotochemického zhášení se v průběhu světelné fáze snižuje ($qP_{L1} > qP_{L3}$).



Obr. 5.18: Průměrné hodnoty NPQ pro sledované druhy

Fluorescenční křivky sledovaných buněk se v průběhu sledovaných měsíců výrazněji neměnily. Pouze u sinic jsme v červenci pozorovali vyšší variabilní fluorescence a vyšší nefotochemické zhášení a u buněk *Pediastrum sp.* nedocházelo v prvních dvou měsících k tak silnému zhášení. Snižování variabilní fluorescence v pozdějších fázích sezóny korelovalo s jejich úbytkem v populacích.

Variabilní fluorescence mezi buňkami z rybníků Klec a Rod se u sinice příliš neměnila. U centrických rozsivek jsme zjistili rozdíl v F_V v měsíci říjnu u buňky z rybníku Klec, která byla výrazně vyšší. U penátních rozsivek byla zaznamenána vyšší F_V v měsíci září také u buněk z rybníku Klec. Buňky řasy *Pediastrum sp.* z rybníku Klec vykazovaly o polovinu vyšší F_V , než tomu bylo u buněk z rybníku Rod. U buněk řasy *Scenedesmus sp.* z rybníku Rod byla vyšší F_V v období červenec – září, v říjnu pak měly vyšší F_V buňky z rybníku Klec. Buňky u centrických rozsivek, penátních rozsivek a *Pediastrum sp.*, které vykazovaly vyšší F_V byly z rybníku Klec.

V průběhu měření jsme se setkali s problémem nízké hodnoty variabilní fluorescence. Variabilní fluorescence mohla být snížena v důsledku použití silnějšího modulovaného světla. Modulované světlo se totiž ve vyšších hodnotách mění na aktinické. To by znamenalo, že buňka by začala zhášet jako na AL, nestanovila by se F_0 a saturační puls by také nedosáhl maximální hodnoty.

Optimální hodnota kvantového výtěžku fotochemie by se měla pohybovat v rozmezí hodnot 0,6-0,8 (příčemž hodnota 0,8 je považována za maximální možnou). Toto rozmezí znamená plnou funkčnost PSII a poukazuje na to, že fotosystém II není nijak poškozen. Při

našich měřeních na FKM však dosáhl kvantový výtěžek maximálně hodnoty 0,3. To by poukazovalo na zničený fotosystém II a nižší hodnoty pak dokonce na možnost, že by buňky mohly být mrtvé. Avšak vzorky, které jsme paralelně proměřili v suspenzi na přístroji Fluor Pen, vykazovaly normální aktivitu řas. Naměřené kvantové výtěžky viz tab. 11.

Tabulka 11: Kvantové výtěžky naměřené na přístroji Fluor Pen FP 100.

Φ_{Po}	2.7.	15.7.	12.8.	9.9.	24.9.	7.10.	21.10.
Klec	0,680	0,6133	0,4955	0,6168	0,566	0,57	0,5736
Rod	0,5721	0,6385	0,4952	0,6106	0,5071	0,547	0,54

Pomocí pokusných měření ve spolupráci s kolegy z firmy PSI Brno, jsme dospěli k závěru, že hodnota kvantového výtěžku závisí na velikosti použitého objektivu. Tedy čím větší zvětšení objektivu, tím zdánlivě menší je kvantový výtěžek. Všemi objektivy sice prochází při stejné intenzitě světla stejný proud fotonů, ale právě větší zvětšení způsobí, že tento proud fotonů se koncentruje na menší plošku pod objektivem. Navíc imerzní objektivy svazek fotonů ještě více usměrní do plochy pod nimi a nedochází zde tedy k takovému úniku a odrazu světla jako u suchých objektivů. Nastavení nižší intenzity AL však nebylo řešením, jak zvýšit kvantový výtěžek, jelikož buňky pak téměř na aktinické světlo nereagovaly. Řešením pro nás nebylo ani použití objektivů s menším zvětšením. Sice jsme dostali cca 2x vyšší hodnoty kvantového výtěžku při měření s objektivem se zvětšením 20x, ale fluorescenční odezvy buněk řas byly hodně zašuměné a prakticky nepoužitelné.

7. Závěr

- Zjistili jsme heterogenitu v indukčních křivkách variabilní fluorescence mezi odděleními *Cyanobacteria*, *Chromophyta* a *Chlorophyta*.

- Pozorovali jsme dva odlišné typy indukčních křivek u oddělení *Chromophyta*.

- Zjistili jsme velmi podobný průběh indukčních křivek u dvou zástupců oddělení *Chlorophyta*.

- Heterogenita ve fluorescenční odezvě v průběhu sledovaných měsíců se výrazněji neměnila.

- Heterogenitu ve fluorescenční odezvě mezi lokalitami jsme pozorovali jen v určitých měsících a jen u některých zástupců.

8. Citovaná literatura

Abramoff M.D., Magelhaes P.J., Ram S.J. 2004: Image Processing with ImageJ. Biophotonics International, vol. 11, issue 7: pp. 36-42.

Baker N. R, Oxborough K. 2003: Chlorophyll fluorescence as probe of plant photosynthetic productivity. In: Papageorgiou G. C., Govindjee (eds) 2004: Chlorophyll-a Fluorescence. A signature of Photosynthesis. Springer, The Netherlands: pp. 65-82.

Berman-Frank I., Lundgren P., Chen Y., Küpper H., Kolber Z., Bergman B., Falkowski P. 2001: Segregation of Nitrogen Fixation and Oxygenic Photosynthesis in the Marine Cyanobacterium *Trichodesmium*. SCIENCE, vol 294: pp. 1534-1537.

Bradbury M., Baker N. R. 1983: Analysis of the induction of chlorophyll fluorescence in leaves and isolated thylakoids: contributions of photochemical and non-photo-chemical quenching. Proc R Soc Lond B, 220: pp. 251-264.

Falkowski P.G., Raven J.A. 1997: Aquatic photosynthesis. Blackwell Science.

Ferimazova N., Küpper H., Nedbal L., Trtílek M. 2002: New Insights into Photosynthetic Oscillations Revealed by Two-dimensional Microscopic Measurements of Chlorophyll Fluorescence Kinetics in Intact Leaves and Isolated Protoplasts. Photochemistry and Photobiology 76(5): pp.501-508.

Gachon C. M. M., Küpper H., Küpper F. C., Šetlík I. 2006: Single-cell chlorophyll fluorescence kinetic microscopy of *Pylaiella littoralis* (Phaeophyceae) infected by *Chytridium polysiphoniae* (Chytridiomycota). Eur. J. Phycol. 41(4): pp. 395-403.

Govindjee 2004: Chlorophyll *a* Fluorescence: A Bit of Basics and History. In: Papageorgiou G. C., Govindjee (eds) 2004: Chlorophyll-a Fluorescence. A signature of Photosynthesis. Springer, The Netherlands: pp. 1-42.

Green B., R. 2007: Evolution of Light-Harvesting Antennas in an Oxygen World. In: Falkowski G. P., Knoll A. H. 2007: Evolution of Primary Producers in the Sea: pp. 37-53.

Grey D. W., Zoe G., Cardon & Lewis L. A. 2006: Simultaneous collection of rapid chlorophyll fluorescence induction kinetics, fluorescence quenching parameters, and environmental data using an automated PAM 2000/CR10X data logging system. *Photosynthesis Research* 87: pp. 295-301.

Küpper H., Ferimazova N., Šetlík I., Berman-Frank I. 2004: Traffic Lights in *Trichodesmium*. Regulation of Photosynthesis for Nitrogen Fixation Studied by Chlorophyll Fluorescence Kinetic Microscopy. *Plant physiology*, vol 135: pp. 2120-2133.

Küpper H., Parameswaran A., Leitenmaier B., Trtílek M., Šetlík I. 2007: Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New phytologist* 175: pp. 665-674.

Küpper H., Šetlík I., Hlásek M. 2004: A versatile chamber for simultaneous measurements of oxygen exchange and fluorescence in filamentous and thallos algae as well as higher plants. *PHOTOSYNTHETICA* 42(4): pp. 579-583.

Küpper H., Šetlík I., Seibert S., Prášil O., Šetlíková E., Strittmatter M., Levitan O., Lohscheider J., Adamska I., Berman-Frank I. 2008: Iron limitation in the cyanobacterium *Trichodesmium* reveals new insights into regulation of photosynthesis and nitrogen fixation. *New phytologist* 179: pp. 784-798.

Küpper H., Šetlík I., Spiller M., Küpper F. C., Prášil O. 2002: Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of *in vivo* heavy metal chlorophyll formation. *J. Phycol.* 38: pp. 429-441.

Küpper H., Šetlík I., Trtílek M., Nedbal L. 2000: A microscope for two-dimensional measurements of *in vivo* chlorophyll fluorescence kinetics using pulsed measuring radiation, continuous actinic radiation, and saturating flashes. *PHOTOSYNTHETICA* 38 (4): pp. 553-570.

Lichtman E. 2007: Resource Competition and the Ecological Success of Phytoplankton. In: Falkowski G. P., Knoll A. H. 2007: *Evolution of Primary Producers in the Sea*: pp. 351-375.

Lee R. E. 1989: Phycology. Cambridge University Press.

Maxwell K., Johnson G. N. 2000: Chlorophyll fluorescence – a practical guide. Journal of experimental botany, Vol. 51, No. 345: pp. 659-668.

Nedbal L., Soukupová J., Kaftan D., Whitmarsh J., Trtílek M. 2000: Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. Photosynthesis Research 66: pp. 3-12.

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kol. 1998: Fyziologie rostlin. Academia, Praha.

Rasband W. S., 1997-2009: ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

Ritchie G. A. 2006: Chlorophyll Fluorescence: What Is It and What Do the Numbers Mean?, USDA Forest service Proceeding. RMRS-P-43: pp. 34-43.

Roháček K., Soukupová J., Barták M. 2008: Chlorophyll fluorescence: A wonderful tool to study plant physiology and plant stress. Research Signpost: pp. 41-104.

Schreiber U. 2004: Pulse-Amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method. In: Papageorgiou G. C., Govindjee (eds) 2004: Chlorophyll-a fluorescence: A signature of Photosynthesis. Springer, The Netherlands: pp. 279-319.

Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. 1986: Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis Research 10: pp. 51-62.

Šetlíková E., Šetlík I., Küpper H., Kasalický V., Prášil O. 2005: The photosynthesis of individual algal cells during the cell cycle of *Scenedesmus quadricauda* studied by chlorophyll fluorescence kinetic microscopy. Photosynthesis Research 84: pp. 113-120.

Šiffel P., Hunalová I., Roháček K. 2000: Light-induced quenching of chlorophyll fluorescence at 77K in leaves, chloroplasts and Photosystem II particles. *Photosynthesis Research* 65: pp. 219-229.

Internetové zdroje:

^{1.1} <http://www.otvrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/5soukupova.pdf>
(stav ke 14.3.2008)

^{1.2} <http://www.sci.muni.cz/~fyzrost/fluorometrie.pdf>
(stav ke 22.10.2008)

^{1.3} <http://www.sinicearasy.cz>

9. Přílohy

9.1 Zhášecí protokol

```
;protocol body - generated by wizard
;version PK June 24, 2005
include default.inc ;Includes standard options, do not remove it !
ElectronicShutter=4
Sensitivity=100
Irradiance=11
SuperIrradiance=3
f0duration=5.04
;
;this is Fo definition
;
<0,1s..5.04s>=>mfmsub
<0s>=>checkPoint,"startFo"
<5.04s>=>checkPoint,"endFo"
;
;this saturation pulse Fm measurement
;
<5.04s+80ms>=>SatPulse(800ms+40ms+20ms)
<5.04s+80ms>=>actinlightOn(800ms+40ms+20ms)
<5.04s+80ms+800ms/2,5.04s+80ms+800ms/2+80ms..5.04s+80ms+800ms>=>mfmsub
<5.04s+80ms+800ms/2>=>checkPoint,"startFm"
<5.04s+80ms+800ms+20ms>=>checkPoint,"endFm"
;
;dark pause
;
<5.04s+80ms+800ms+40ms*13,5.04s+80ms+800ms+120ms*13..5.04s+800ms+10s>=>mfmsub
;
;actinic light definition
;
<5.04s+800ms+10s+80ms>=>actinlightOn(61s)
;
;measuring in Kautsky induction and after Dark relaxation
;
<5.04s+800ms+10s+80ms,5.04s+800ms+10s+80ms+80ms*6..5.04s+800ms+10s+61s+40s>=>mfmsub
;
;saturating pulses in Kautsky induction and Dark relaxation
;
<24.96s-80ms*6>=>checkPoint,"startFt_L1"
<24.96s>=>SatPulse(800ms-20ms)
<24.96s+800ms/2>=>checkPoint,"startFm_L1"
<24.96s+800ms-80ms>=>checkPoint,"endFm_L1"
<24.96s+800ms/2,24.96s+800ms/2+80ms..24.96s+800ms-80ms>=>mfmsub
<24.96s+18s-80ms*6>=>checkPoint,"startFt_L2"
<24.96s+18s>=>SatPulse(800ms-20ms)
<24.96s+18s+800ms/2>=>checkPoint,"startFm_L2"
<24.96s+18s+800ms-80ms>=>checkPoint,"endFm_L2"
<24.96s+18s+800ms/2,24.96s+18s+800ms/2+80ms..24.96s+18s+800ms-80ms>=>mfmsub
<24.96s+2*18s-80ms*6>=>checkPoint,"startFt_L3"
<24.96s+2*18s>=>SatPulse(800ms-20ms)
<24.96s+2*18s+800ms/2>=>checkPoint,"startFm_L3"
<24.96s+2*18s+800ms-80ms>=>checkPoint,"endFm_L3"
<24.96s+2*18s+800ms/2,24.96s+2*18s+800ms/2+80ms..24.96s+2*18s+800ms-80ms>=>mfmsub
<24.96s+3*18s-80ms*6>=>checkPoint,"startFt_L4"
<24.96s+3*18s>=>SatPulse(800ms-20ms)
<24.96s+3*18s+800ms/2>=>checkPoint,"startFm_L4"
<24.96s+3*18s+800ms-80ms>=>checkPoint,"endFm_L4"
```

<24.96s+3*18s+800ms/2,24.96s+3*18s+800ms/2+80ms..24.96s+3*18s+800ms-80ms>=>mfmsub
<24.96s+4*18s-80ms*6>=>checkPoint,"startFt_L5"
<24.96s+4*18s>=>SatPulse(800ms-20ms)
<24.96s+4*18s+800ms/2>=>checkPoint,"startFm_L5"
<24.96s+4*18s+800ms-80ms>=>checkPoint,"endFm_L5"
<24.96s+4*18s+800ms/2,24.96s+4*18s+800ms/2+80ms..24.96s+4*18s+800ms-80ms>=>mfmsub
<24.96s+5*18s-80ms*6>=>checkPoint,"startFt_L6"
<24.96s+5*18s>=>SatPulse(800ms-20ms)
<24.96s+5*18s+800ms/2>=>checkPoint,"startFm_L6"
<24.96s+5*18s+800ms-80ms>=>checkPoint,"endFm_L6"
<24.96s+5*18s+800ms/2,24.96s+5*18s+800ms/2+80ms..24.96s+5*18s+800ms-80ms>=>mfmsub
<5.04s+500ms>=>checkPoint,"timeVisual"

