

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra botaniky



Diplomová práce  
2009

**Analýza pigmentového složení přírodních  
společenstev sladkovodních fotosyntetických  
mikroorganismů**

Bc. Eva Žiřková

vedoucí práce: Mgr. Michal Koblížek Ph.D.

**Žišková, E. (2009):** Analýza pigmentového složení přírodních společenstev sladkovodních fotosyntetických mikroorganismů. [Analysis of phytoplankton pigments from freshwater systems. – MSc. Thesis, in Czech]. Faculty of Sciences, University of South-Bohemia, České Budějovice, 42pp.

**Anotace:**

The aim of this study was to use pigments to determine freshwater phytoplankton composition . The samples were collected from freshwater lakes in the Czech Republic and Germany. The pigment analyses were conducted using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The HPLC data were processed by computer program CHEMTAX to calculate the composition of phytoplankton. The obtained pigment data were compared with standard light microscopy which was used to obtain more detailed taxonomic resolution.

**Poděkování:**

Děkuji všem zúčastněným, především svému školiteli Dr. Michalu Koblížkovi za odborné vedení práce a podporu, panu prof. Jiřímu Kopáčkovi, Dr. Michalu Mašínovi a Dr. Petru Znachorovi za zprostředkované odběry lokalit, svému garantovi práce Dr. „Hansy“ Kaštovskému za věcné připomínky a kolegům Třeboňským za vytvoření přátelské atmosféry.

Projekt byl podpořen Grantovou agenturou České Republiky (GA ČR 206/07/0241).

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47 zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30.4. 2009

---

podpis

## Obsah:

<b>1. Úvod</b> .....	1
1.1 Rozdělení a charakteristika fotosyntetických pigmentů .....	2
1.1.1 Chlorofyly .....	2
1.1.2 Karotenoidy.....	3
1.1.3 Fykobiliny .....	5
1.2 Distribuce hlavních fotosyntetických pigmentů uvnitř skupin sinic a řas .....	6
1.2.1 Chlorofyly .....	6
1.2.2 Karotenoidy.....	8
1.3 Metody zkoumání fytoplanktonu .....	11
1.3.1 Chromatografická separace .....	11
1.3.2 CHEMTAX.....	12
<b>2. Cíle práce</b> .....	13
<b>3. Materiál a metody</b> .....	14
3.1 Odběrové lokality.....	14
3.2 Odběr, přeprava a skladování.....	15
3.3 Filtrace .....	15
3.4 Extrakce.....	15
3.5 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) .....	16
3.6 Světelná mikroskopie.....	19
3.7 CHEMTAX.....	20
<b>4. Výsledky</b> .....	21
4.1 Chromatografické stanovení pigmentů sladkovodních fotosyn. mikroorgan.....	21
4.2 Determinace fytoplanktonu z pigment. složení pomocí programu CHEMTAX .....	27
4.3 Determinace fytoplanktonu mikroskopickým pozorováním .....	28
4.4 Závislost diverzity pigmentů na míře trofie lokality .....	31
<b>5. Diskuse</b> .....	32
<b>6. Závěry</b> .....	35
<b>7. Použitá literatura</b> .....	36
<b>8. Přílohy</b>	

## 1. ÚVOD

Sinice (Cyanophyta) a řasy (Algae) jsou klíčovou složkou biocenózy jak v oceánech, tak i ve sladkovodních ekosystémech (SARMENTO & DESCY 2008). V našich zeměpisných šířkách vykazují tato společenstva během vegetační sezóny značnou dynamiku, mění se nejen jejich druhové složení, ale i poměr zastoupení jednotlivých skupin ve fytoplanktonu.

Sinice jsou evolučně staré prokaryotní organismy, které mají fotosyntézu rostlinného typu, provázenou produkcí kyslíku. Oxygenní fotosyntéza se vyvíjela na základě biochemického modelu, jehož předchůdcem je bakteriální anoxygenní fotosyntéza (KALINA & VÁŇA 2005). Jejich fotosyntetické pigmenty (Tab 1.1) se nachází ve fykobilizomech (fykobiliproteiny) a v tylakoidech.

Řasy jsou jednoduché eukaryotní autotrofní organismy, jejichž oxygenní fotosyntéza je založena na podobné funkci a struktuře fotosyntetického aparátu, přítomnosti a složení fotosyntetických pigmentů jako u sinic.

Z hlediska vzájemné variability fotosyntetických pigmentů mezi organismy, jsou sinice a řasy unikátními v rostlinné říši. Díky tomuto rozrůznění, ke kterému došlo v průběhu evoluce při vývoji jednotlivých skupin, jsme schopni využít znalosti o fotosyntetických pigmentech k fylogenetické analýze či taxonomické determinaci (ROWAN 1989).

STILES 1925, RABINOWITCH 1945 a LOOMIS 1960 byli jedni z prvních, kteří shrnuli řadu pozorování, jež daly vznik našim současným znalostem o řasových fotosyntetických pigmentech (chlorofyly, karotenoidy a biliproteiny). STOKES 1864 provedl první experimentální pokusy, když rafinoval chlorofyl *c* a fukoxantin z hnědých řas. Dokonce bylo možné díky mikrospektroskopu porovnávat jednotlivá spektra objevených pigmentů (SORBY 1877); tehdy známých jako např. fykoxantin (= dnes známý jako oscillaxantin nebo zeaxantin; z *Oscillatoria* sp.), pezizaxantin (=  $\beta$ -karoten, anteridia rodu *Fucus*) nebo xantofyl (= lutein; z *Porphyra vulgaris*). "Chromatografická adsorbční analýza" byla k separaci pigmentů poprvé využita CVĚTEM (1906) za použití kolony s pevným adsorbentem (ROWAN 1989). V počátcích se zdálo, že metoda je neúčinná a výsledky jsou zkresleny přítomností artefaktů. Negativní názory na chromatografii vyvrátil dalšími experimenty STRAIN (1936, 1938). Za artefakt byl považován i chlorofyl *c* dříve nazývaný chlorofucine (SORBY 1873). Později byl definován jako přírodní pigment, který se vyskytuje ve třech formách  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$  (JEFFREY 1963; JEFFREY & SHIBATA 1969; VESK & JEFFREY 1987). Chromatografické metody se k analýze pigmentů využívají dodnes.

## 1.1 Rozdělení a charakteristika fotosyntetických pigmentů

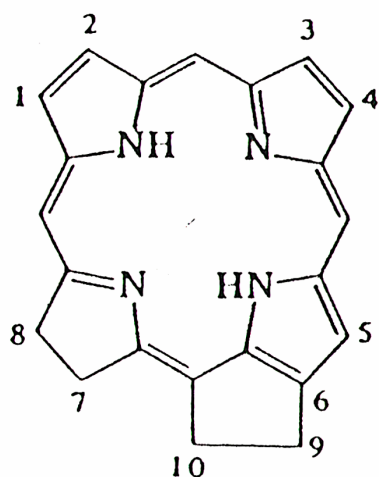
Chlorofyly a biliproteiny mají dobře definovanou funkci. Jsou to světlosběrné pigmenty schopné při fotosyntéze přeměnit světelnou energii v energii chemických vazeb a umožnit tak průběh biochemických procesů v buňce. Fyziologická úloha karotenoidů je složitější. Karotenoidy primárně slouží jako pomocná světlosběrná barviva v podobně pigment-proteinových komplexů ukotvených v membráně tylakoidů. Na druhou stranu mají karotenoidy funkci ochrannou, tj. chrání fotosyntetický aparát před nepříznivými účinky nadměrného ozáření. Karotenoidy zde působí buď jako pasivní světelný filtr, případně jsou též schopny zhášet energii excitovaných stavů chlorofylových molekul a chránit je tak před tvorbou a poškozením volnými radikály (SIEFERMANN–HARMUS 1987).

### 1.1.1 Chlorofyly

Chlorofyl *a* (Obr. 1.1) je ústřední molekulou vytvářející fotosyntetická reakční centra. Je složen ze dvou komponent, tzv. substituovaného porfyrinového kruhu s centrálně navázaným kationtem  $Mg^{2+}$  a dlouhého uhlovodíkového řetězce – fytolu (terpenový alkohol C<sub>20</sub>). Jestliže se nějakým degradačním procesem odstraní hořčnatý iont, hovoříme o feofytinech.

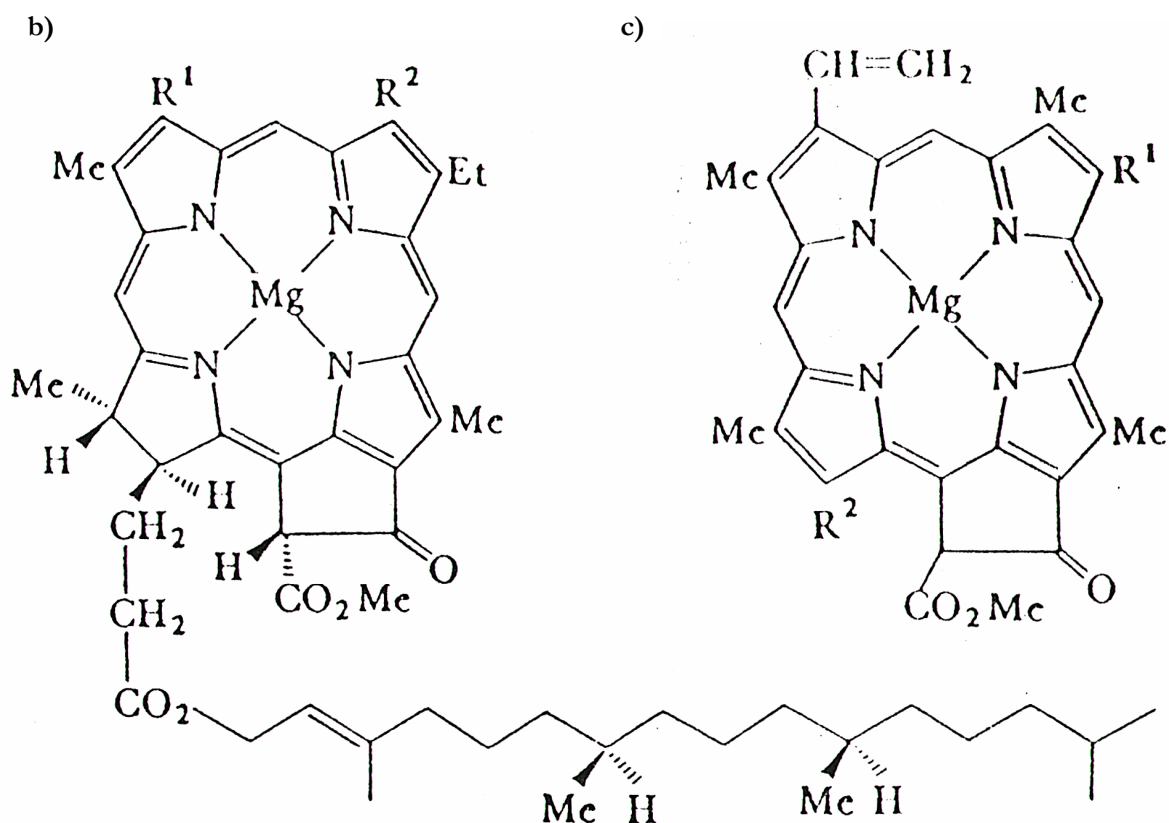
Biosyntéza tetrapyrrolů se u řas a sinic odvozuje od kyseliny  $\delta$ -aminolevulové, jejíž dvě molekuly kondenzují za vzniku porfobilinogenu. Ačkoli porfyrin má hydrofilní charakter, nepolární charakter fytolu je pro molekuly chlorofylů významnější a jsou proto dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech (etanol, aceton, benzen, atd.).

a)



**Obr 1.1 Chemická struktura chlorofylů**

- a) Forbin: základní struktura všech chlorofylů  
 b) Chl *a* ( $R^1 = CH=CH_2$ ;  $R^2 = Me$ )  
 Chl *b* ( $R^1 = CH=CH_2$ ;  $R^2 = CHO$ )  
 Chl *d* ( $R^1 = CHO$ ;  $R^2 = Me$ )  
 c) Chl *c*<sub>1</sub> ( $R^1 = Et$ ;  $R^2 = CH=CH-CO_2Me$ )  
 Chl *c*<sub>2</sub> ( $R^1 = CH=CH_2$ ;  $R^2 = CH=CH-CO_2Me$ )  
 MgDVP ( $R^1 = CH=CH_2$ ;  $R^2 = CH=CH-CO_2H$ )  
 (JACKSON 1976)



### 1.1.2 Karotenoidy

Karotenoidy (např. Obr 1.2) jsou pravděpodobně nejrozšířenější skupinou přírodních pigmentů. U rostlin, živočichů i mikroorganismů bylo až dosud popsáno více než 400 různých druhů karotenoidů.

Z chemického hlediska patří do skupiny tetraterpenoidů, přesněji jsou to oligomery isoprenu. Vlastní karotenoidy se vyznačují pouze několika variantami uhlíkového skeletu: mají buďto ryze alifatický řetězec nebo řetězec zakončený jedním či dvěma cykly (šestičlenným nebo pětičlenným). Pokud jsou navázány na bílkovinnou molekulu mají nepolární charakter.

Podle chemické struktury rozdělujeme karotenoidy do dvou skupin:

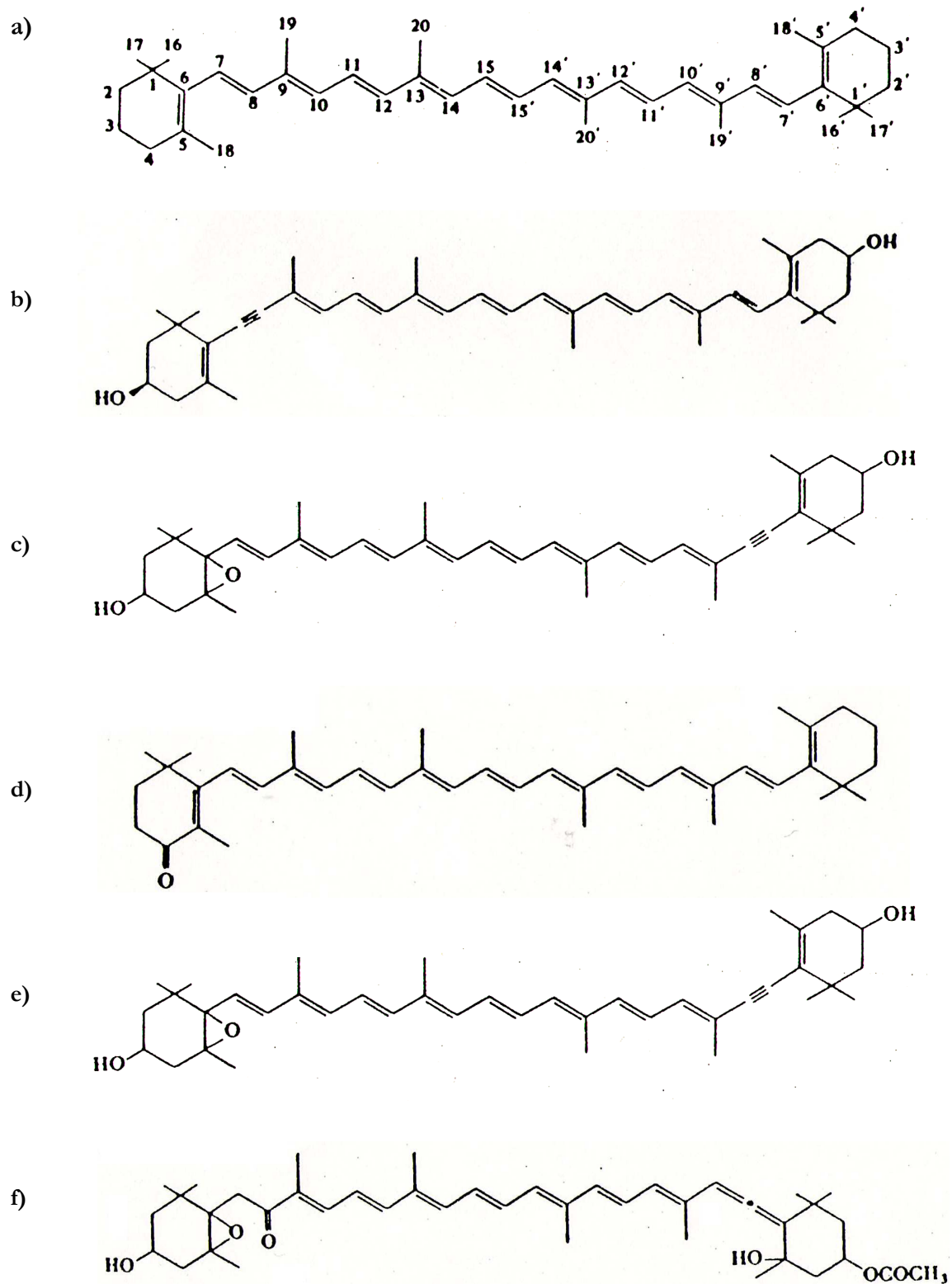
- karoteny (obsahující pouze atomy uhlíku a vodíku)
- xantofyly (obsahující též atom(y) kyslíku: oxo-, hydroxy-, karbomethoxy-, methoxy-, epoxy-, karboxy deriváty)

Isoprenoidní struktura s dvojnými vazbami mezi uhlíky umožňuje *cis*, *trans* konfiguraci. Syntéza karotenoidů se odvíjí od acetyl koenzymu A, z něhož řadou reakcí vzniká kyselina mevalonová, která je prekursorem všech isoprenoidů.

## Obr 1.2 Chemická struktura karotenoidů

a)  $\beta$  - karoten; b) diatoxantin; c) diadinoxantin; d) echinenon; e) lutein; f) fukoxantin

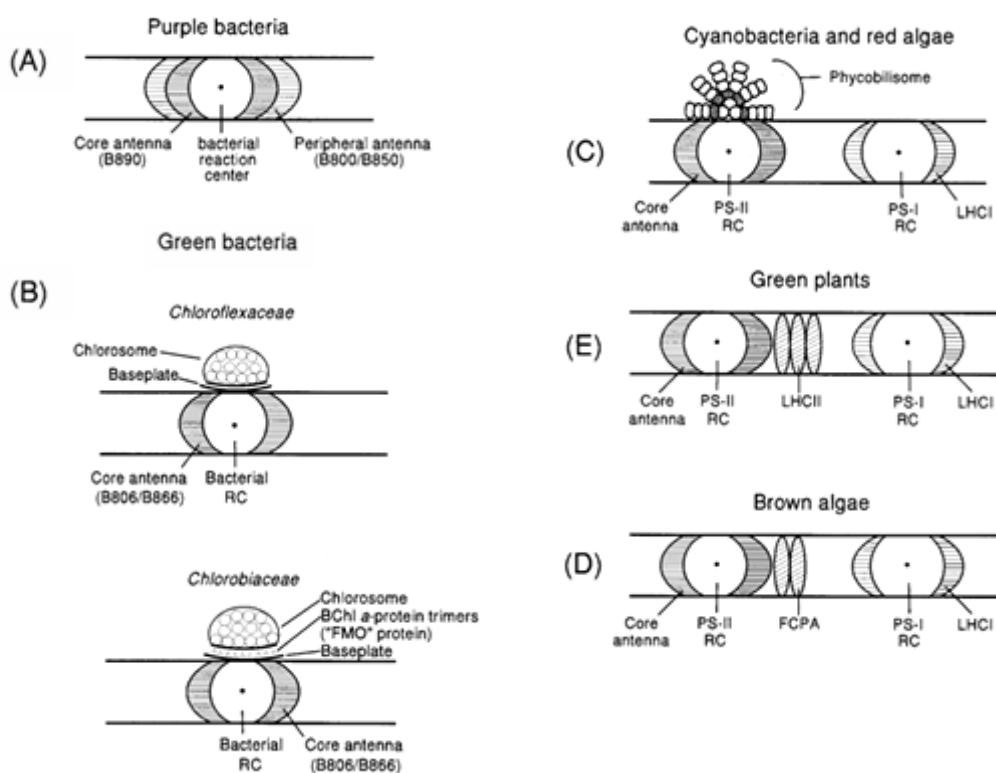
(ROWAN 1989)



### 1.1.3 Fykobiliny

Fykobiliny jsou přídavné fotosyntetické pigmenty, které rozdělujeme do tří skupin: alofykocyanin, fykocyanin a fykoerytrin. Jsou to lineární tetrapyroly vznikající oxidačním otevřením tetrapyrolového kruhu. Fykobiliny jsou kovalentní vazbou mezi cysteinem a vinylovým řetězcem navázány na proteinové jednotky a vytvářejí tak hydrofilní fykobiliproteiny (HLADÍK & SOFROVÁ 1990).

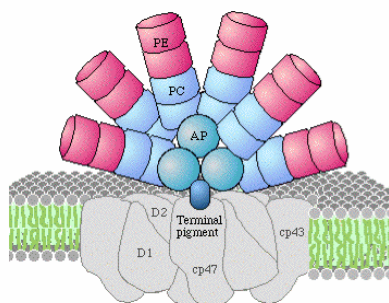
Fykobiliny jsou součástí tzv. pigmentových antén (Obr. 1.3a), které slouží k akumulaci kvant energie i ve slabém světle. Tím zvýší efektivitu zachycování světla reakčními centry více než stokrát a kombinací různých pigmentů se využije světlo různých vlnových délek. Tyto pigmentové antény mají u různých organismů podobnou strukturu (Obr 1.3b).



**Obr 1.3a Schéma architektury antén u různých skupin fotosyntetických organismů**

Světlosběrné antény umožňující fotosyntézu se u různých skupin fotosyntetických organismů liší.

A – sirmé bakterie, B – zelené bakterie, C – Cyanophyta, Rhodophyta (fykobilizóm); D – Chromophyta, E – Chlorophyta



**Obr. 1.3b Struktura fykobilizómu – vněmembránový komplex (Cyanobacteria, Rhodophyta)**

Na povrchu tylakoidu se nachází tzv. fykobilizóm obsahující specifické světlosběrné pigmenty k akumulaci světelné energie:

PE (phycoerythrin) – fykoerytrin

PC (phycocyanin) – fykocyanin

AP (allophycocyanin) – alofykocyanin

(KANEHISA 2009)



Organizace pigmentů do světlosběrných komplexů:

Pigmenty jsou ve fotosyntetických organismech navázány na bílkovinné molekuly, se kterými tvoří takzvané světlosběrné komplexy, jejichž úlohou je zachytit světelnou energii a předat ji do reakčních center. Absorpci kvanta záření světlosběrným (anténním) pigment-proteinovým komplexem tylakoidních membrán začíná proces fotosyntézy. Takto zachycená excitační energie je dopravena ke speciálnímu páru chlorofylu ( $P_{700}$  a  $P_{680}$ ), který spolu s dalšími složkami vytváří tzv. reakční centrum fotosystému (RC PS).

V blízkosti reakčního centra, někdy také spojené s reakčním centrem, se nachází vnitřní světlosběrné komplexy, které jsou pevné a neměnné. U řas a sinic jsou tvořeny především chlorofylem *a* a karotenoidy. Variabilnější k prostředí jsou vnější světlosběrné komplexy, které se rozlišují na tzv. periferní vněmembránové (zelené a sírné bakterie, Cyanophyta, Rhodophyta, Cryptophyta) a integrální-vnitromembránové antény (purpurové fotosyntetické bakterie, řasy (vyjma ruduch a skrytěnek) a vyšší rostliny). Tyto vnější antény jsou potom tvořeny i řadou dalších doplňkových pigmentů jako je chlorofyl *b* u zelených řas, chlorofyl *c* u rozsivek nebo fykobiliny u řady sinic.

## 1.2 Distribuce hlavních fotosyntetických pigmentů uvnitř skupin sinic a řas

### 1.2.1 Chlorofyly

#### *Chlorofyl a*

Chlorofyl *a* je obsažen ve všech oxygenních fotosyntetických organismech (sinice, řasy).

#### *Chlorofyl b*

Tato forma chlorofylu se vyskytuje ve všech třídách oddělení **Chlorophyta** a takéž u Prochlorophyta (LEWIN 1976, 1977), které obsahují chlorofyl *b* místo obvyklého biliproteinu. *Prochlorothrix hollandica* obsahuje *a/b* proteinový komplex (BULLERJAHN *et al.* 1987). LUBIAN & ESTABLIER 1982 potvrdili, že tři druhy původně považované za rod *Nannochloris* Naumann – *Nannochloris* sp.(strain No. 269), *N. oculata* a *Monallantus salina* neobsahují chlorofyl *b* a nepatří do Chlorophyceae, ale do Eustigmatophyceae, jako *Nannochloropsis*.

#### *Chlorofyl c*

V každé ze tříd **Chromophyta** (kromě Eustigmatophyceae) najdeme chlorofyly  $c_1$  a  $c_2$ . Chrysophyceae, Prymnesiophyceae a Bacillariophyceae obsahují také chlorofyl  $c_3$  (VESK & JEFFREY 1987).

Ačkoli obecně zástupci třídy **Cryptophyceae** obsahují pouze Chl  $c_2$  bez Chl  $c_1$ . JACKSON 1976 pozoroval přítomnost obou chlorofylů v *Chroomonas mesostigmatica*, tento fakt ovšem nebyl při opakovaném pozorování potvrzen Andersen, Haxo, Lee a Kurgens (ROWAN 1989). U běžných zástupců **Dinophyceae** najdeme Chl  $c_2$ , výjimkou je např. *Peridinium foliaceum* (WITHERS & HAXO 1975) nebo *Gambierdiscus toxicus* (DURAND & BERKALOFF 1985). Původně se myslelo, že skupina **Chrysophyceae** vůbec neobsahuje chlorofyl  $c$ . ANDERSEN & MULKEY 1983 však potvrdili přítomnost  $c_2$  a  $c_1$  u *Chryso-sphaerella brevispina* ( $c_1$  i  $c_2$ ) a *Giraudyopsis stellifera* (jen  $c_2$ ). *Pelagococcus subviridis* obsahuje namísto  $c_1$  chlorofyl  $c_3$  (VESK & JEFFREY 1987). Jelikož rody *Synura* a *Mallomonas* neobsahují chlorofyl  $c_2$  byly z Chrysophyceae vyčleněny do Synuraceae a Mallomonadaceae (ANDERSEN 1987). Největší množství chlorofylu  $c$  najdeme u **Tribophyceae** a díky tomu je můžeme spolehlivě rozpoznat od Chrysophyceae (GIBBS *et al.* 1980).  $c_2$  a  $c_1$  typ chlorofylů mají někteří zástupci **Prymnesiophyceae**; např. *Pavlova gyrans* (FAWLEY 1988). Chlorofyl  $c_3$  se vyskytuje u druhu *Emiliana huxleyi* (VESK & JEFFREY 1987), *Phaeocystis pouchetii* (JEFFREY & WRIGHT 1987), *Pavlova salina*. Taktéž u **Bacillariophyceae** je Chl  $c_2$  a  $c_1$  běžnou součástí a v případě, že obsahují málo  $c_1$ , je přítomen i  $c_3$ . *Nitzschia bilobata* obsahuje všechny tři typy chlorofylů v přibližně stejném množství, naproti tomu *N. clostridium* jen  $c_2$ , stejně jako *N. frigida* (ROWAN 1989). Některé druhy **Prasinophyceae** obsahují pigment známý pod zkratkou MgDVP (Magnesium 2, 4-divinylfeoporfyrin a 5-monometyl ester) (RICKETTS 1966, JEFFREY & WRIGHT 1987). Někdy je tento pigment popisován jako chlorofyl  $c$  (BROWN 1985).

### *Chlorofyl d*

Chlorofyl  $d$  je chemicky velmi podobný Chl  $a$ , ale má jiné absorpční spektrum (MANNING & STRAIN 1943) a nachází se u skupiny **Rhodophyta** (poprvé popsáný z druhu *Girgatinia gardii*). Velmi neobvyklé světlosběrné komplexy obsahující chlorofyl  $d$  byly též popsány u mořské sinice *Acaryochloris marina*, která je symbiontem mořských sumek rodu *Trididemnum*.

### *Bakteriochlorofyly*

Různé další formy chlorofylů nacházíme u fotosyntetických bakterií. Tyto barviva se obecně nazývají bakteriochlorofyly jejichž různé analogy se opět označují pomocí písmen. Bakteriochlorofyl  $a$  je přítomen ve většině fotosyntetických bakterií, především u purpurových bakterií a aerobních anoxygenních fototrofů (AAPs). Mezi další formy patří bakteriochlorofyl  $b$  (přítomný v bakterii *Blastochloris viridis*), bakteriochlorofyly  $c$  a  $e$  přítomné v zelených sírných fotosyntetických bakteriích (rod *Chlorobium*) a bakteriochlorofyl  $g$  přítomný v heliobakteriích.

### 1.2.2 Karotenoidy

Úloha karotenoidů, zejména fukoxantinu, jako doplňkových světlosběrných pigmentů v procesu fotosyntézy byla poprvé popsána u rozsivek a později u hnědých řas. Fukoxantin má významnou funkci v tylakoidních membránách těchto organismů, které se často vyskytují v mořích v hloubkách kolem 10 m pod povrchem, kde je nejen značně snížena intenzita fotosynteticky využitelného záření, ale také se výrazně mění spektrální kvalita (s rostoucí hloubkou je pohlcena červená – nad 600 nm a pak i modrá – pod 400 nm oblast spektra (HLADÍK & SOFROVÁ 1989). Účinnost přenosu absorbované energie z fukoxantinu na chlorofyl je téměř stoprocentní. Podobné uplatnění má peridinin (xantofyl obrněnek) v pigment-proteinových komplexech tylakoidních membrán obrněnek a porfyrinové pigmenty (tzv. fykobiliny) sinic a ruduch (GLAZER 1983, 1984, ZILINSKAS & GREENWALD 1986). Lutein je z hlediska účinku přenosu absorbované energie na chlorofyl méně účinný než fukoxantin a peridin (GOEDHEER 1965).

Udává se (GOODWIN 1980), že se mezi zástupci **Cyanophyceae** vyskytuje než 24 různých karotenoidů, avšak obvykle obsahuje jeden druh maximálně 7–8 pigmentů. U *Chlorogloea fritschii* jich bylo pozorováno dokonce 14, u *Rivularia firma* 12 (ROWAN 1989). Často vytvářejí glykosidické estery, nejběžněji myxoxantofyly. Ty se nevyskytují u některých druhů rodu *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Spirulina* (GOODWIN 1980) a *Oscillatoria bornetti* (HALLENSTVET *et al.* 1979). U všech druhů je přítomný echinenon a  $\beta$ -karoten. Unikátní skupinou mezi Prokaryoty jsou **Prochlorophyceae** (druh *Prochloron*; LEWIN 1976, 1977), protože mimo zeaxantinu a  $\beta$ -karotenu obsahují také chlorofyl *b* a neobsahují myxoxantofyly.

Skupina **Rhodophyceae** obsahuje  $\alpha$  i  $\beta$ -karoten a jeho 3-hydroxy deriváty: lutein a zeaxantin (STRAIN 1958, 1966). Kultury obsahovaly i  $\alpha$ ,  $\beta$ -kryptoxantin a anteraxantin (BJØRNLAND & AGUILAR-MARTINEZ 1976, ROWAN 1989). Aloxantin je klíčovým determinačním pigmentem u **Cryptophyceae**. Dalšími xantofyly jsou krokoxantin a monadoxantin (chybí u *Chroomonas salina*). U *Cryptomonas ovata* byly pozorovány i lycopene a zeaxantin (PENNINGTON *et al.* 1985). Specifickým pigmentem pro **Dinophyceae** je komplex  $C_{37}$  peridinin (STRAIN *et al.* 1976), diadinoxantin a  $\beta$ -karoten. Minoritními jsou pyroxantin (druh *Gyrodinium resplendens*; LOEBLICH & SMITH 1968) a peridinol a pyroxantinol (druh *G. dorsum*; JOHANSEN *et al.* 1974) a  $\alpha$ -karoten. U druhů, které postrádají peridin, byl nalezen diatloxantin (JOHANSEN *et al.* 1974). Endosymbiotičtí zástupci Dinophyceae obsahují spíše fukoxantin a jeho deriváty než peridinin (ROWAN 1989). *Gymnodinium* sp. a *G. aureolum* obsahují 19'-hexanoyloxyfukoxantin (BJØRNLAND & TANGEN 1979), který se také nachází u *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). U *Peridinium balticum* a *Gymnodinium nagasakiensis* nejdeme taktéž 19'-hexanoyloxyfukoxantin a fukoxantin.

U **Chrysophyceae** a **Synurophyceae** je typickým pigmentem fukoxantin. U všech zástupců se nachází  $\beta$ -karoten; neoxantin pouze u *Ochromonas* sp. a violaxantin u *Phaeosacceon callinsii*. Ze skupiny Chrysophyceae byly odděleny **Prymnesiophyceae** (CHRISTENSEN 1962), které se jim velmi podobají ve složení karotenoidů, ale liší se absencí violaxantinu (CRAIGIE *et al.* 1971). Minoritně jsou u této skupiny zastoupeny deriváty fukoxantinu, 19'-hexanoyloxyfukoxantin, 19'-butanoyloxyfukoxantin. Naopak konstantní zastoupení představují  $\beta$ -karoten, diatoxantin, diadinoxantin a fukoxantin, stejně jako u **Bacillariophyceae (Diatoms)** (GOODWIN 1971, 1980, JEFFREY & STAUBER 1985). U *Nitzschia clorobacterium* je také neoxantin (HAGER & STRANSKY 1970). U skupiny **Tribophyceae (Xanthophyceae)** je hlavním karotenoidem heteroxantin, dále vaucherixantin, neoxantin (STRANSKY & HAGER 1970); diadinoxantin, doprovázený diatoxantinem.

**Eustigmatophyceae** mohou obsahovat tyto xantofyly: zeaxantin, anteraxantin, violaxantin (STRANSKY & HAGER 1970) a podobně jako Tribophyceae i vaucherixantin a neoxantin, ale neobsahují Chl *c*, což potvrzuje jejich odlišnost od Tribophyceae, ke kterým byly dříve řazeny (HIBBERD 1981). *Nannochloropsis oculata* obsahuje také astaxantin a kantaxantin (ANTIA & CHENG 1982). Fukoxantin má hlavní zastoupení u **Phaeophyceae**, které dále obsahují  $\beta$ -karoten a violaxantin (STRAIN 1958, 1966).

**Euglenophyceae** jsou složením karotenoidů podobné Chromophyta, protože obsahují diatoxantin, diadinoxantin a heteroxantin. HAGER A STRANSKY 1970 také našli v zástupců této skupiny neoxantin. U *Eutreptiella gymnastica* byly identifikovány tři unikátní pigmenty – sifoenin, eutreptielanon, anhydrodiatoxantin (BJØRNLAND 1982).

Pigmenty podobné zejména vyšším rostlinám najdeme u skupiny **Chlorophyceae** (GOODWIN 1965, LIAAEN-JENSEN 1977), tedy lutein,  $\beta$ -karoten, neoxantin, zeaxantin, anteraxantin, violaxantin (HAGER 1980). Ostatní karotenoidy se občasně vyskytují ve větších množstvích; např. sifonaxantin (ester sifoneinu, který je u Caulerpales a Dichotomosiphonales) nebo loroxantin (AITZETMULLER *et al.* 1969). Oba jsou přítomny u Cladophorales a Siphonocladales. Sifonaxantin je důležitým pigmentem u řas rostoucích na zastíněných místech nebo v hlubokých vodách. Ale také je obsažen v *Codium* sp. rostoucím na velmi osvětlených biotopech. U druhů, které sifonein nebo sifonaxantin obsahují je častěji přítomen  $\alpha$ -karoten než  $\beta$ -karoten (STRAIN 1965). Složení xantofylů podobné jako u Chlorophyceae má část skupin **Prasinophyceae** (bičíkovci obsahující Chl *a* a Chl *b*). Jsou to zeaxantin, lutein (RICKETTS 1970) a sifonein. Ostatní sifonein neobsahují a zeaxantin je nahrazen luteinem. U *Pyramimonas olivacea* byl extrahován také sifonaxantin (ROWAN 1989), pozorován byl i pigment prasinoxantin (kokální mořská řasa, FOSS *et al.* 1984). Stejně jako u Chlorophyceae, ani u zástupců **Charophyceae** nebyl

nalezen  $\alpha$ -karoten (HAGER & STERANSKY 1970).  $\gamma$ -karoten (lykopen) obsahuje *Chara foetida* (anteridia, KARRER *et al.* 1943).

Tab 1.1 Distribuce hlavním taxonomicky významných fotosyntetických pigmentů sinic a řas

Pigment	Cyanophyta	Prochlorophyta	Rhodophyta	Cryptophyta	Chlorophyceae	Prasinophyceae	Euglenophyta	Eustigmatophyta	Bacillariophyceae	Dinophyta	Prymnesiophyceae	Chrysophyceae	Raphidophyceae
<b>Chlorofyly</b>													
<i>a</i>	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
<i>b</i>			•		•	•	•						
<i>c</i> <sub>1</sub>									•	•	•		•
<i>c</i> <sub>2</sub>				•					•	•	•	•	•
<i>c</i> <sub>3</sub>											•	•	
MgDVP						•							
<b>Karotenoidy</b>													
Aloxantin				•									
Anteraxantin					•	•	•						
Astaxantin					•	•							
Diadinoxantin							•		•	•	•	•	•
Diatoxantin							•		•	•	•	•	•
Dinoxantin										•			
Echinenon	•						•						
Fukoxantin									•		•	•	•
Lutein					•	•							
Peridinin										•			
Violaxantin					•	•		•					
Zeaxantin	•	•	•		•			•					

### 1.3 Metody zkoumání fytoplanktonu

Při vyhodnocování vzorků fytoplanktonu ve sladkých vodách a k jejich následné determinaci se tradičně užívá světelná mikroskopie. Nanoplankton a pikoplankton je však složité identifikovat a kvantifikovat, pokud nepoužijeme další mikroskopické metody (např. fluorescenční či elektronovou mikroskopii). Pracné a časově náročné je počítání jednotlivých buněk organismu pod mikroskopem, abychom zjistili jeho přesné zastoupení ve vzorku (SARMENTO & DESCY 2008). Proto se ke kvantifikaci začala v posledních letech využívat hlavně chromatografie (LEWITUS *et al.* 2005); zvláště HPLC (WRIGHT *et al.* 1996). Výsledky jsou reprodukovatelnější, než ty z mikroskopického pozorování (SCHLÜTER *et al.* 2000).

Metoda se výborně uplatňuje zejména při rozsáhlých výzkumech, kde je potřeba rychle zpracovat velké množství vzorků z různých lokalit a hloubek. Ke zpracování dat z HPLC byl vyvinut speciální počítačový program CHEMTAX, který dokáže určit zastoupení hlavních skupin fytoplanktonu z poměrového zastoupení pigmentů ve vzorku. Pokud potřebujeme fytoplankton studovat detailněji než na úrovni tříd, je nutné kombinovat chemotaxonomii s tradičním postupem a jednotlivé druhy určit pomocí světelné mikroskopie (SARMENTO & DESCY 2008).

#### 1.3.1 Chromatografická separace

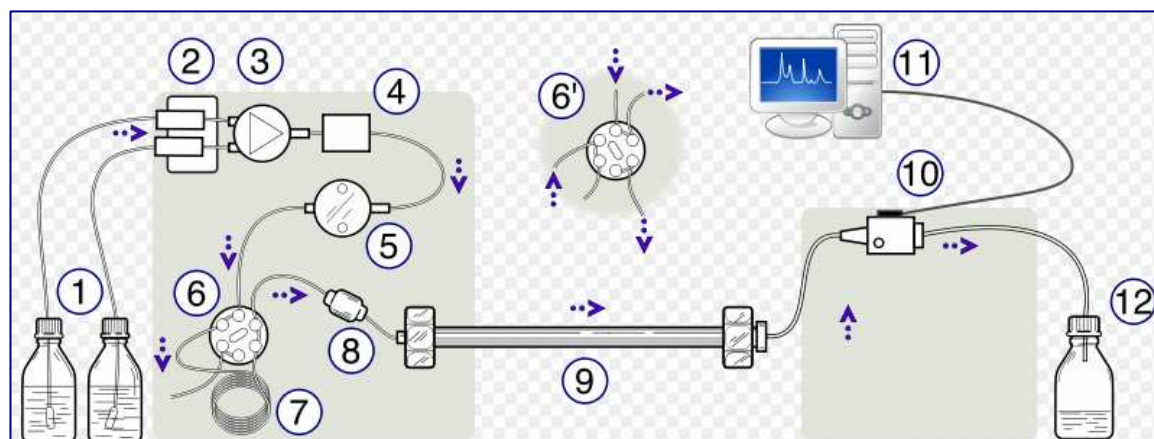
Chromatografie je bezesporu jednou z nejrozšířenějších metod separace látek, která umožňuje spolehlivou identifikaci a kvantifikaci složek sledovaného vzorku. K rozdělení látek dochází na základě jejich různé pohyblivosti ve dvou fázovém systému – stacionární (zakotvené) a mobilní (pohyblivé) fáze. Stanovované látky se liší ve svých adsorpčních vlastnostech, v hodnotách rozdělovacích koeficientů, ve svých rozměrech či ve svých nábojích, což lze využít v chromatografii k jejich rozdělení na vhodném chromatografickém zařízení. Chromatografickou separaci pigmentů poprvé popsal ruský botanik CVĚT (1906) (někdy udáván též jako Tswett), když oddělil chlorofyl *a* a *b* na sloupci CaCO<sub>3</sub>.

Chromatografické techniky rozlišujeme dle různých hledisek. Z hlediska uložení stacionární fáze (sloupcová, plošná) nebo podle charakteru nepohyblivé (stacionární) fáze (např. rozdělovací, adsorpční, ionexová, gelová). Dále dělíme techniky podle skupenství mobilní fáze, kde rozeznáváme chromatografii plynovou a kapalinovou.

#### High Performance Liquid Chromatography (HPLC – vysoce účinná kapalin. chromat.)

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (Obr 1.4) využívá k separaci látek fáze stacionární i mobilní. Vlastní separace probíhá na koloně, kde se jednotlivé analyty dělí na základě rozdílné afinity ke stacionární fázi. Různé analyty (dělené látky) podléhají jiné distribuci

(rozdělování) mezi mobilní a stacionární fází, proto jsou rozdílně zadržovány a rozdílně zpouzdřovány (retardovány). Velkou výhodou této metody je rychlost, citlivost a může být využita i jako preparativní chromatografie. Navíc jsou pigmenty chráněny před degradací způsobenou molekulami kyslíku.



**Obr. 1.4 Schéma přístroje HPLC**

Před použitím HPLC je třeba zvolit si kolonu a solventy vhodné pro separaci pigmentů. Samotný přístroj se skládá z několika komponent (viz. níže) a jeho obsluha je díky přehlednému softwaru velmi snadná.

Jednotlivé komponenty přístroje: 1. zásobní láhve s mobilními fázemi; 2. vysokotlaká čerpadla; 3. směšovač; 4. čidlo tlaku; 5. tlumič pulsů; 6. šestičetný ventil; 7. dávkovací smyčka; 8. ochranná předkolona; 9. kolona (stacionární fáze); 10. detektor; 11. výstup dat (počítač); 12. odpadní látky

(CLARK 2007)

### 1.3.2 CHEMTAX (Ratio matrix programme)

CHEMTAX (odvozeno od CHEMical TAXonomy; MACKAY *et al.* 1996) je počítačový program, který dokáže stanovit zastoupení skupin sinic a řas (Cyanophyta, Chlorophyta, Dinophyta, Chrysophyceae, Bacillariophyceae) na základě dat získaných z HPLC (HAVSKUM *et al.* 2004).

Tento program používá iterativní proces k nalezení optimálních poměrů mezi pigmenty ku celkovému množství chlorofylu *a* a určuje poměrově charakteristické množství pigmentů u jednotlivých skupin fotosyntetických organismů na základě jejich koncentrací. Program byl původně vyvinut k analýze a kvantifikaci mořského fytoplanktonu (WRIGHT & JEFFREY 2006). Aby mohl být CHEMTAX aplikován i ve sladkých ekosystémech je nutná jeho úprava (FIETZ & NICKLISCH 2004) a to úpravou poměrů (pigment/Chl *a*) u pozorovaných pigmentů, protože fytoplankton mořských vod se liší od sladkovodních.

## 2. CÍLE PRÁCE

1. Pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) vytvořit přehled spekter a retenčních časů fotosyntetických pigmentů, které se nejčastěji vyskytují ve sladkovodním fytoplanktonu.
2. Pozorovat celoroční změny v koncentraci a různorodosti pigmentů fotosyntetických mikroorganismů metodou HPLC na různých sladkovodních lokalitách.
3. Na základě dat z HPLC determinovat fytoplankton pomocí počítačového programu CHEMTAX a porovnat s výsledky získanými světelnou mikroskopií. Zhodnotit souvislost diverzity pigmentů a míry trofie vody u vybraných sladkovodních ekosystémů.



### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Odběrové lokality

Vzorky určené k analýze pigmentů jsme odebírali z více než 20 sladkovodních jezer v Čechách a v Německu. Charakteristiku odběrových lokalit znázorňuje Tab 3.1. Na lokalitách Čertovo jezero, Plešné jezero a Velká Amerika byly vzorky odebírány v průběhu celého roku 2008. Celoroční odběry byly prováděny ve spolupráci s Hydrobiologickým ústavem AV ČR, Prof. Ing. J. Kopáčkem, Ph.D a Ph.D. M. Mašínem (Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň). Vzorky byly odebírány každý měsíc od března 08 do prosince 08. U lokalit – Plešné a Čertovo jezero – byly v měsících březnu, květnu a říjnu odebrány vzorky dvakrát. Lokalita Římov byla ve spolupráci s Ph.D. P. Znachorem pozorována od května do října roku 2008. Na ostatních lokalitách byly odběry provedeny jednorázově.

**Tab. 3.1 Charakteristika odběrových lokalit**

Lokalita	Charakter	Chemie	Rozloha (ha)	Nadmořská výška (m)	Max hloubka (m)	Geografická poloha
Čertovo jezero	Oligotrofní horské jezero	Kyselé, Al	10.7	1028	35	49°10' N, 13°13' E
Plešné jezero	Mezotrofní horské jezero	Kyselé	7.6	1090	19	48°48' N, 13°52' E
Velká Amerika	Mezotrofní jezero	Kyselé	2	333	11	49°50' N, 14°12' E
Římov	Mezotrofní vodní nádrž	Neutrální	210	470	43	48°51' N, 14°29' E
Cep	Oligotrofní jezero	Neutrální	12	450	9	48°55' N, 14°53' E
Laka	Mezotrofní	-	2.6	1096	3	49°06' N, 13°19' E
Prášílské jezero	Oligotrofní horské jezero	Kyselé	4.2	1080	17	49°40' N, 13°23' E
Černé jezero	Oligotrofní horské jezero	Kyselé, Al	18.8	1008	40	49°11' N, 13°11' E

Lokalita (jezero)	Rozloha (km <sup>2</sup> )	Max hloubka (m)	Průměrná hloubka (m)	Objem (10 <sup>6</sup> m <sup>3</sup> )	Plocha povodí (km <sup>2</sup> )	Geografická poloha
Dollgow						53°14' N, 12°84' E
Wittwe	1.604	13	5.5	8.84	4.76	53°11' N, 13°05' E
Melzer	0.0129	-	-	-	-	53°17' N, 13°04' E
Grosse Fuchskuhle NE	0.02	5.6	3.5	0.05	0.005	53°10' N, 13°02' E
Grosse Fuchskuhle NW	0.02	5.6	3.5	0.05	0.005	53°10' N, 13°02' E
Grosse Fuchskuhle SE	0.02	5.6	3.5	0.05	0.005	53°10' N, 13°02' E
Grosse Fuchskuhle SW	0.02	5.6	3.5	0.05	0.005	53°10' N, 13°02' E
Roofen	0.572	19.1	8.95	5.12	4.99	53°11' N, 13°03' E
Nehmitz	0.98	18.6	6.79	5.34	-	53°13' N, 12°98' E
Nehmitz Süd	0.62	18.6	6.79	3.96	-	53°12' N, 12°98' E
Stechlin	4.3	68	22.8	96.9	26	53°10' N, 13°02' E
Dagow	0.225	8	-	-	2.32	53°15' N, 13°06' E
Haus	1.36	12	6	8.15	4	53°18' N, 13°24' E
Breiter Luzin	3.57	58.5	25.2	67.5	14	53°20' N, 13°28' E
Schmaler Luzin	-	-	-	-	-	53°32' N, 13°43' E
Carwitz	-	-	-	-	-	53°30' N, 13° 44'E
Stolp	-	-	-	-	-	53°17' N, 13° 21'E
Peetsch	0.891	21.5	10	7.96	4.26	53°17' N, 13° 08'E
Tiefwaaren	1.4	24	8.2	12.9	17.5	53°31' N, 12°42' E

### 3.2 Odběr, přeprava a skladování

Na jednotlivých lokalitách byly vzorky odebírány z povrchové vrstvy (0–1 m) do 1,5 l plastových lahví a přepravovány při nízkých teplotách (optimálně v chladicí tašce na ledu a ve tmě). U jezera Stechlin byl odběr proveden v celém vodním sloupci. Následně byly vzorky zpracovány (filtrace, extrakce). Pokud je nebylo možné zpracovat ihned po odběru, krátkodobě se skladovaly v chladové místnosti.

Při nesprávné manipulaci se vzorkem při odběru (např. příliš dlouhým skladováním, zvýšenou teplotou při přepravě), může dojít k degradaci pigmentů a znehodnocení vzorku. Proto je ideální zpracovat vzorek co nejdříve po odběru a pokud to není možné, tak ho udržovat v chladu a temnu.

### 3.3 Filtrace

Vzorky byly filtrovány na filtrační aparatuře Nalgene o objemu jeden litr s použitím filtrů ze skleněných vláken MN GF-5 o průměru 47 mm (Macherey Nagel, Německo). Podtlak vakua byl okolo  $\sim 0.2$  atmosfér (20 kPa). Nakonec byl zaznamenán objem zfiltrované vody (pro sladké vody nejlépe zfiltrovat 0.3 – 5 l).

Aby filtrace byla co nejpřesnější, měli bychom používat stále stejný typ filtrů, správně sestavit filtrační aparaturu a přesně odměřit filtrovaný objem (hlavně v případě, že často doléváme filtrovanou vodu).

### 3.4 Extrakce

Vzorky se po filtraci extrahovaly extrakční směsí (směs acetonu a metanolu v poměru 7:2). Jelikož výsledný objem při mísení těchto složek je menší než součet jejich objemů, bylo nutné odměřit každý objem zvlášť. Mokrý filtr (znatelně zelený či nahnědlý) se vysušil mezi filtračním papírem nebo papírovým ručníkem a natrhal se na menší kousky ( $\sim 5$ ), pak se umístil do 15 ml homogenizační kyvety. Pokud byl vzorek odebírán z lokality s nízkým pH, byl kvůli neutralizaci pH přidán do vzorku pevný  $MgCO_3$  (špička špachtle), což zamezilo případné degradaci (feofytinizaci) pigmentů. Nakonec bylo do kyvety přidáno 5 ml extrakční směsi.

Nahrubo rozmělněný filtr se dále zhomogenizoval pomocí teflonového pístu tak, že se vzorek pomalu homogenizoval v homogenizátoru při rychlosti otáček 9 (rozsah 1–9). Pokud by se vzorek homogenizoval příliš dlouho (více než cca 5 min) a došlo by k jeho nadměrnému zahřátí, mohlo by dojít k nechtěné degradaci pigmentů.

Obsah kyvety byl postupně rozmělněn na suspenzi, která měla konzistenci mléka bez viditelných větších kusů filtru. Pak se kvantitativně převedl do skleněných centrifugačních zkumavek a ponechal se v chladničce (cca 2 hod.).

K podhodnocení skutečného obsahu pigmentů může dojít tehdy, pokud vzorek není kvalitně rozmělněn (např. u organismů s pevnými schránkami, stěnami nebo slizovými obaly). V tomto případě je třeba uvažovat o změně rozpouštědel a extrakčního postupu.

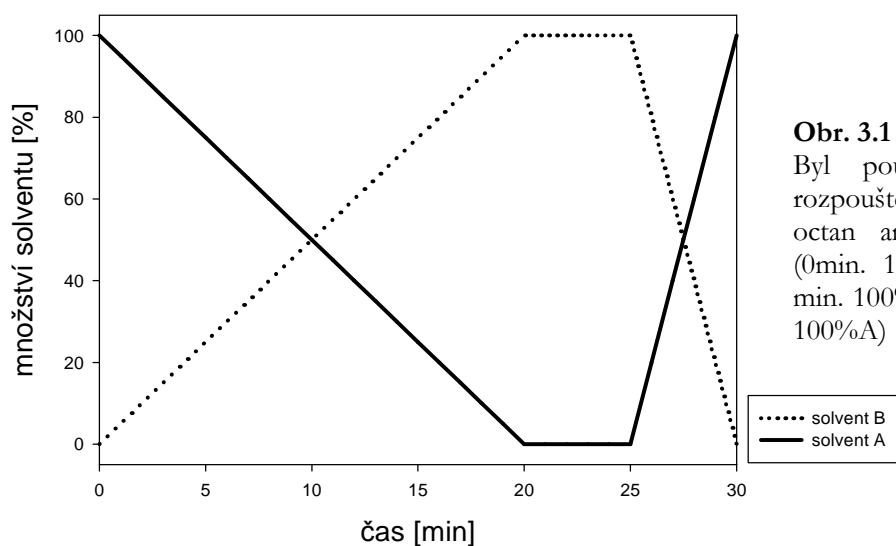
Nakonec se obsah zkumavek stočil 5 minut při 5000 otáčkách za minutu (centrifuga Janetzki 23). Ve skleněném válci (10 ml) se změřil objem čirého supernatantu. Supernatant byl uchováván v tmavých lahvičkách s kvalitním víčkem, popsán (lokality, datum, filtrovaný objem, rozpouštědlo) na samolepící etiketu a uložen do hlubokomrazícího boxu nebo do mrazáku.

Extrakt je nutné uchovávat v uzavřených tmavých lahvičkách, protože aceton je poměrně těkavá látka a jeho odpar může způsobit změnu objemu, která zakoncentruje vzorek a může dojít k nadhodnocení skutečného obsahu pigmentů v pozorovaném vzorku.

### 3.5 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Extrahované vzorky byly analyzovány pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (systém Agilent 1100 Series – Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) a detekovány pomocí UV–VIS detektoru s diodovým polem (Agilent DAD 61315B). V některých případech byl navíc využit i hmotnostní spektrometr Agilent 1100 Series LC/MSD Trap s modulem chemické ionizace (APCI, tlak plynu v nebulizéru 50 psi, teplota nebulizéru 350 °C, kapilární napětí 4000 V, koróna 4 A, teplota odpařovače 400 °C, frekvence amplitudy 1,5 V).

Pigmenty byly rozděleny pomocí upravené metody podle Van Heukela a Thomase (2001) na termostátované (35 °C) koloně Phenomenex Luna 3 $\mu$  C8(2) 100 Å s dvousložkovým systémem rozpouštědel (Obr 3.1).



**Obr. 3.1 Diagram rozpouštědel**

Byl použit dvousložkový systém rozpouštědel **A**: 70% metanol + 30% octan amonný, **B**: 100% metanol (0min. 100%A; 20 min. 100%B; 25 min. 100%B; 27 min. 100%A; 30 min. 100%A)

## Kalibrace HPLC

Před vlastní analýzou vzorků fytoplanktonu bylo nutné přístroj HPLC zkalibrovat. HPLC byla zkalibrována pro Chl *a*, Bchl *a* a  $\beta$ -karoten s použitím kultur fotosynteticky aktivních mikroorganismů obsahujících daný pigment (*Synechocystis* PCC 6803, *Rhodobacter sphaeroides*). Tyto standardy se nejprve extrahovaly metanolem, pak byla vytvořena ředící kalibrační řada 0,1; 0,25; 0,4; 0,5; 1. Ve spektrofotometru se změřila jejich absorbance při různých vlnových délkách a vypočetla koncentrace pigmentu podle vzorce:

$$c_{(\text{Chl}_a)} = A_{665} / \epsilon_{\text{mM}}; \epsilon_{\text{mM}} = 71,4 \text{ [l.mmol}^{-1}\text{.cm}^{-1}] \text{ (PORRA } et al. 1989)$$

$$c_{(\text{Bchl}_a)} = A_{770} / \epsilon_{\text{mM}}; \epsilon_{\text{mM}} = 54.8 \text{ [l.mmol}^{-1}\text{.cm}^{-1}] \text{ (PERMENTIER } et al. 2000)$$

$$c_{(\beta\text{-karoten})} = A_{440} / \epsilon_{\text{mM}}; \epsilon_{\text{mM}} = 141 \text{ [l.mmol}^{-1}\text{.cm}^{-1}] \text{ (JEFFREY } et al. 1997)$$

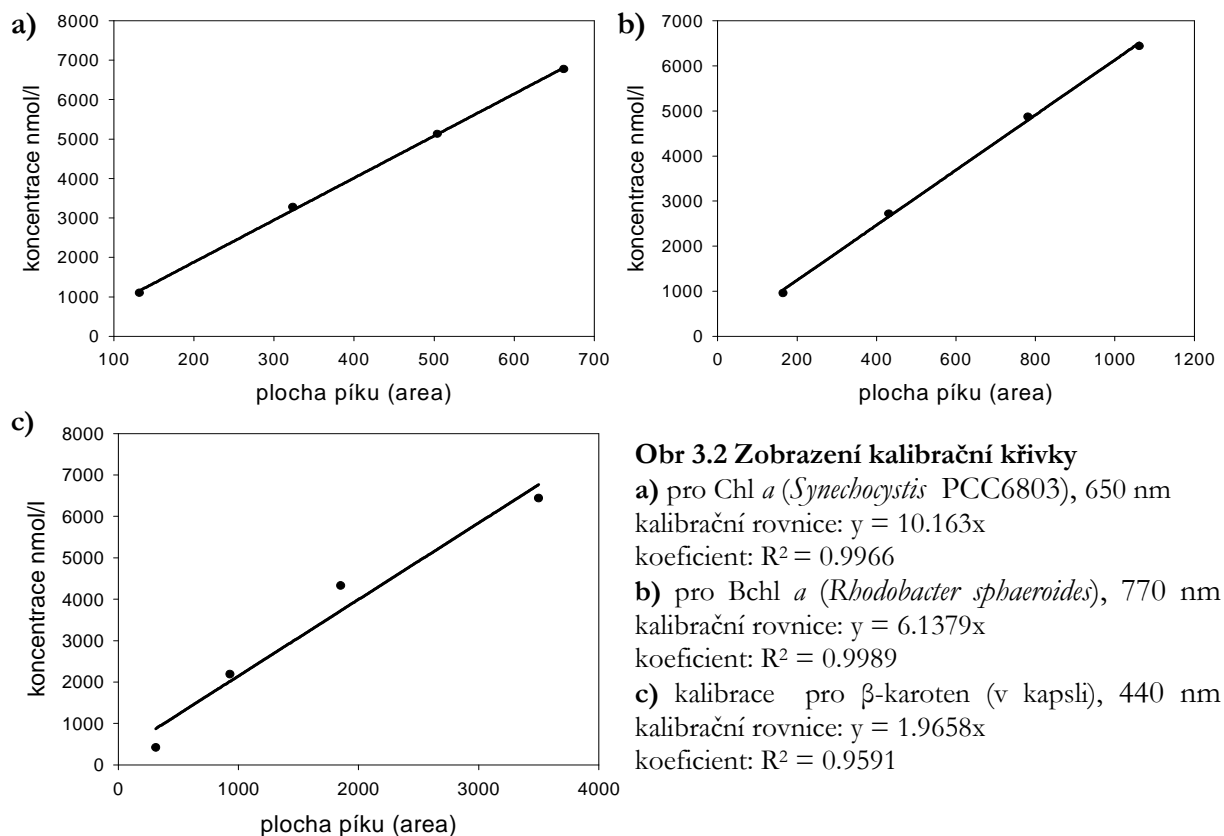
Z chromatogramů získaných při analýze standardů v různých koncentracích se integrací získaly plochy píků. Z naměřených dat se pomocí lineární regrese vypočítaly koeficienty kalibrační rovnice – závislosti plochy (výšky) píku pozorovaného pigmentu na jeho koncentraci (Obr 3.2). Na základě kalibrace byly vyhodnocovány chromatogramy (Obr. 3.3). Z plochy píku odečtené z chromatogramu vzorku se následně vypočetl obsah jednotlivých pigmentů ve vzorku:

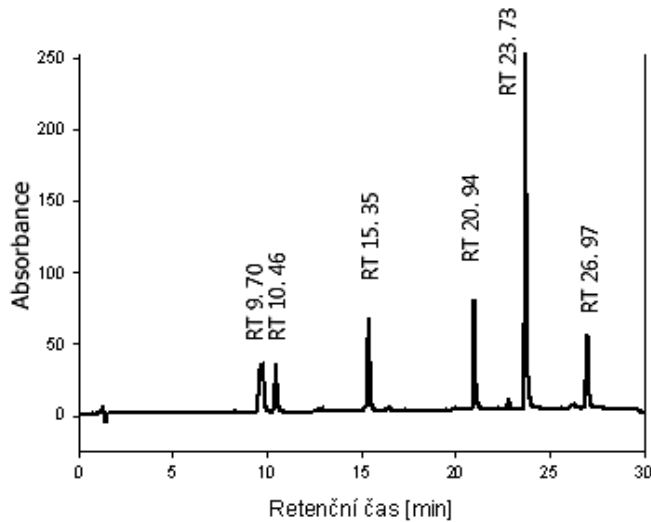
### 1. koncentrace Chl *a* [ $\mu\text{g/l}$ ] ve vzorku

$$= \text{plocha píku} * \text{koeficient Chl } a * V_{(\text{extraktu})} / V_{(\text{filtrace})} \text{ [ml]} * Mr_{(\text{Chl } a)} \text{ [g/mol]}$$

### 2. koncentrace Bchl *a* [ $\mu\text{g/l}$ ] ve vzorku

$$= \text{plocha píku} * \text{koeficient Bchl } a * V_{(\text{extraktu})} / V_{(\text{filtrace})} \text{ [ml]} * Mr_{(\text{Bchl } a)} \text{ [g/mol]}$$



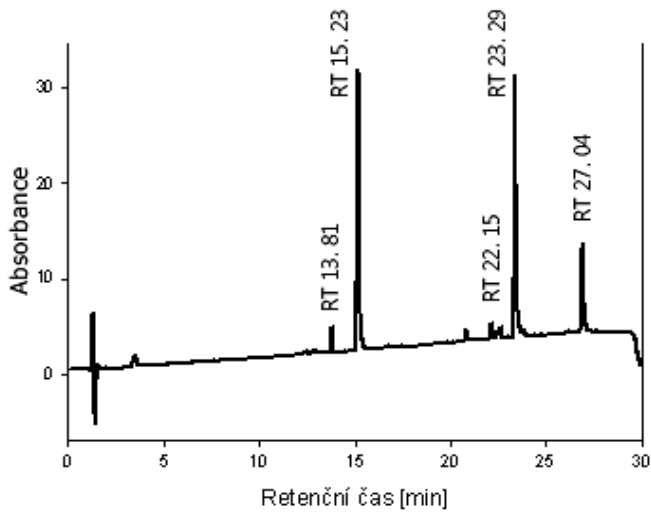


### Obr 3.3 Chromatogramy

Píky představují fotosyntetické pigmenty.

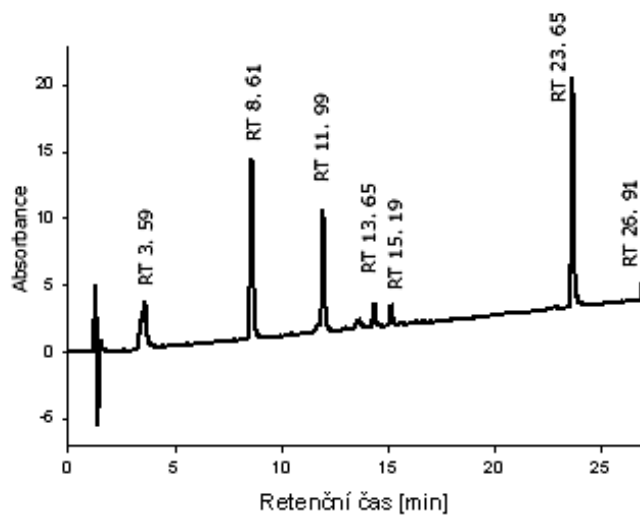
#### a) *Chlamydomonas* sp.

RT 9.70 – fukoxantin  
 RT 10.46 – violaxantin  
 RT 15.35 – zeaxantin+lutein  
 RT 20.94 – Chl *b*  
 RT 23.73 – Chl *a*  
 RT 26.87 –  $\beta$ -karoten



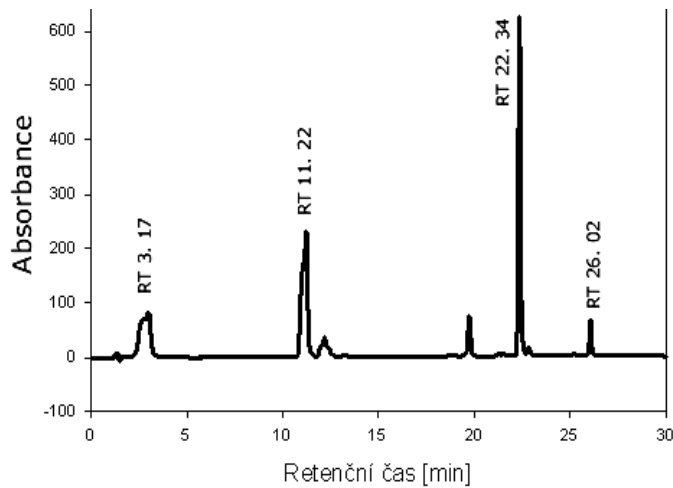
#### b) *Prochlorococcus* sp.

RT 13.81 - myxoxantofyl  
 RT 15.23 – zeaxantin  
 RT 22.15 – echinenon  
 RT 23.29 – Chl *a*  
 RT 27.04 -  $\beta$ -karoten



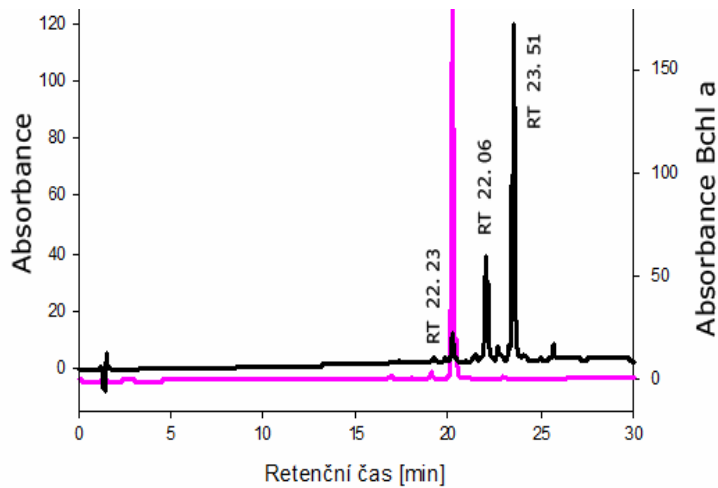
#### c) *Thalassiosira* sp.

RT 3.59 – Chl *c*  
 RT 8.62 – fukoxantin  
 RT 11.99 – diadinoxantin  
 RT 13.65 – diatoxantin  
 RT 15.19 – zeaxantin  
 RT 23.65 – Chl *a*  
 RT 26.91 -  $\beta$ -karoten



**d) *Rhodomonas* sp.**

RT 3.17 – Chl *c*  
 RT 11.22 – aloxantin  
 RT 22.34 – Chl *a*  
 RT 26.02 –  $\beta$ -karoten



**e) *Rhodobacter* sp.**

RT 20.23 – Bchl *a*  
 RT 22.06 – sferoidenon  
 RT 23.51 – sferoiden

### 3.6 Světelná mikroskopie

Vzorky fytoplanktonu odebírané jednorázově na lokalitách v Německu byly ihned po odběru determinovány pod světelným mikroskopem (Olympus BX50). K pořízení fotografické dokumentace byl u sledovaných vzorků použit digitální fotoaparát OLYMPUS Camedia. Preparáty byly většinou zkoumány při 40–ti násobném zvětšení. Relativní abundance druhů ve vzorcích byla stanovena pomocí šesti stupňové tabulky abundance (HINDÁK *et al.* 1978) (Tab. 3.8).

**Tab 3.8 Šesti stupňová tabulka abundance (HINDÁK *et al.* 1978)**

stupeň	abundance druhu	pokryvnost [%]
6	masově zastoupený	90 – 100
5	velmi hojný	50 – 90
4	hojný	20 – 50
3	dostí hojný	5 – 20
2	zřídka se vyskytující	1 – 5
1	vevmi zřídka se vyskytující	0,1 – 1
+	ojediněle zastoupený	0,1

### 3.7 CHEMTAX

Koncentrace pigmentů získané HPLC analýzou fytoplanktonu jsme dále zpracovali počítačovým programem CHEMTAX (MACKEY *et al.* 1996; WRIGHT & JEFFREY 2006), abychom determinovali, které skupiny fytoplanktonu se na pozorovaných lokalitách vyskytují. K determinaci fytoplanktonu z fotosyntetických pigmentů jsme použili poměry (pigment/Chl *a*) odvozené ze sladkovodních řasových kultur podle SCHLÜTER *et al.* 2006.

Program CHEMTAX jsme aplikovali na jednorázově odebírané lokality (Tab 3.1), složení fytoplanktonu na úroveň rodovou (popř. druhovou) jsme zpřesnili mikroskopickým pozorováním (viz. kapitola 3.7).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Chromatografické stanovení pigmentů sladkovodních fotosyn. mikroorganismů

#### *Česká republika*

Chromatografickou analýzou (High Performance Liquid Chromatography) pro detekci pigmentů podle Van Heukel a Thomas (2001) bylo analyzováno celkem 32 vzorků z lokalit Velká Amerika (VA), Plešné (PL) a Čertovo jezero a to v pravidelných měsíčních intervalech od února, popř. března 08 do prosince 08. V průběhu března, června a září se vzorky odebíraly dvakrát (většinou na začátku a ke konci měsíce). Odběry na lokalitě Římov byly provedeny od května do října roku 2008. Charakteristiky odběrových lokalit jsou uvedeny v Příloze 1, Tab 4.1.

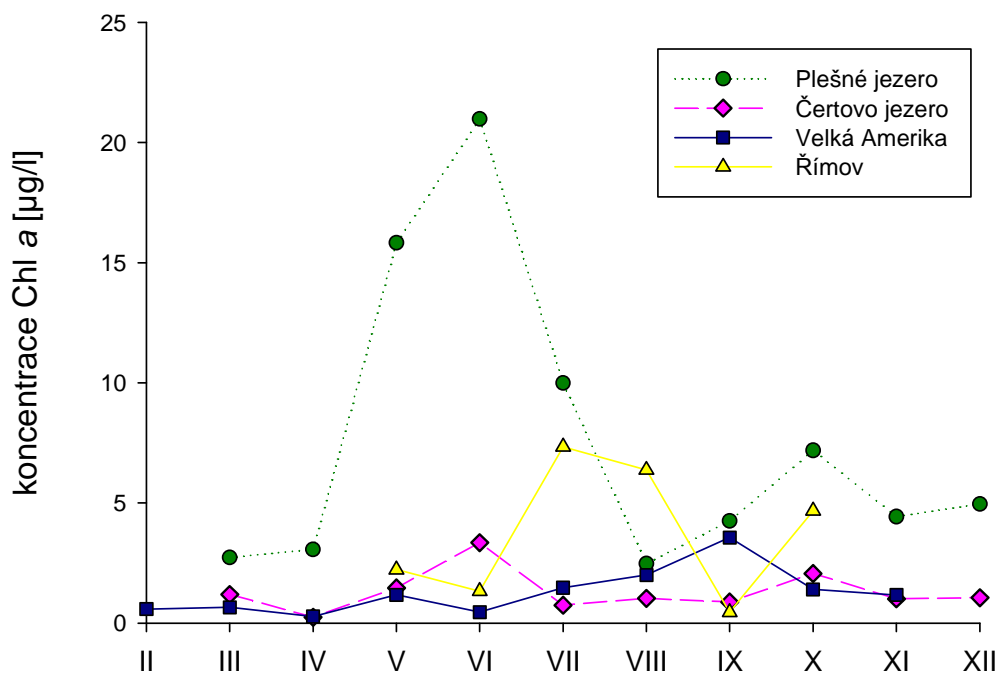
U odebíraných vzorků jsme každý měsíc sledovali množství chlorofylu *a*, které odpovídalo výskytu fotosyntetických mikroorganismů na dané lokalitě a variabilitu ostatních pigmentů (Příloha 1, Obr 4.11).

Obrázek 4.1 znázorňuje změny obsahu Chl *a* ve sledovaných lokalitách. Celoročně největší množství chlorofylu *a* bylo pozorováno v Plešném jezeře, kde se jeho koncentrace pohybovala v rozmezí hodnot 1.2 µg/l (březen 08) až 21.0 µg/l (červen 08). Naopak nejmenší koncentrace Chl *a* jsme pozorovali na Čertově jezeře, kde nejnižší hodnoty koncentrací v průběhu roku nepřevýšily hodnotu 1 µg/l a maximální naměřená koncentrace byla 3.35 µg/l Chl *a*.

Přítomnost anoxygenních fotosyntetických bakterií ve studovaných lokalitách byla monitorována pomocí bakteriochlorofylu *a* (Bchl *a*). Na lokalitě Velká Amerika byl Bchl *a* detekován v průběhu celého roku. V první polovině roku narůstá koncentrace Bchl *a* i Chl *a* a dosahují největších maxim v březnu. V červnu a listopadu pozorujeme maxima Bchl *a*, ale min. koncentrace Chl *a*. V druhé polovině roku koncentrace Bchl *a* oscilovalo v rozmezí 8.9 až 11 µg/l (Obr 4.2). Jiná situace byla pozorována na Plešném jezeře, kde byl bakteriochlorofyl *a* byl detekován pouze v druhé polovině roku. V červenci koncentrace Bchl *a* dosáhla maxima 46.7 µg/l a pak jeho koncentrace postupně klesala. V první polovině roku jeho nárůst korespondovala s nárůstem koncentrace Chl *a*, v druhé polovině byla max. jejich koncentrací opačná (Obr 4.3).

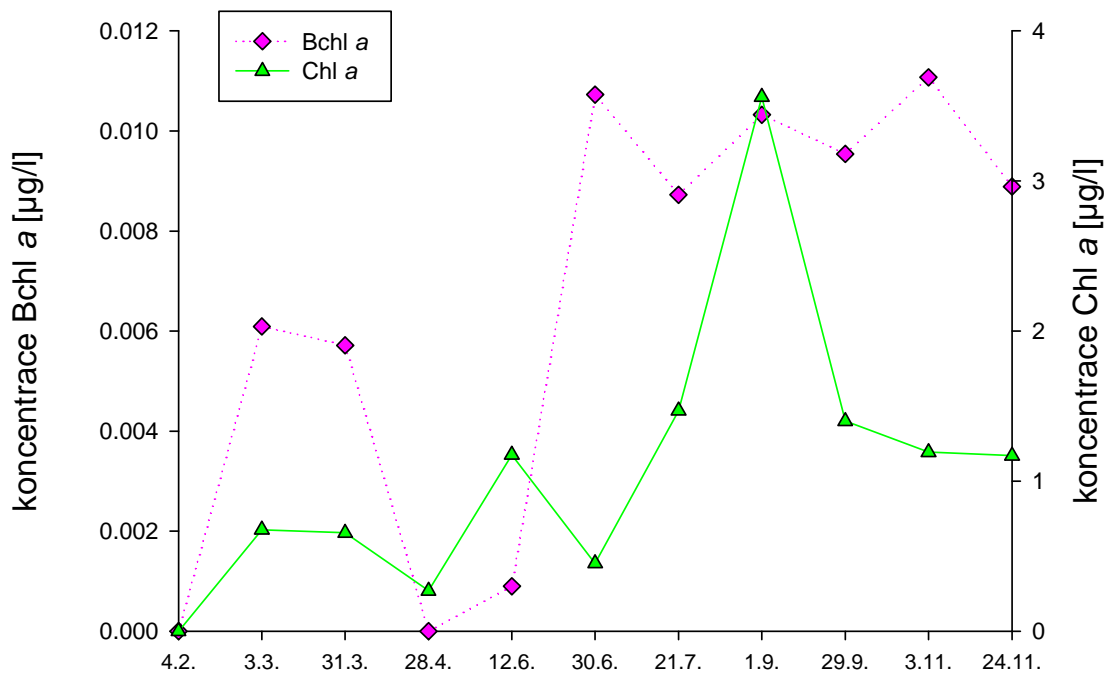
Bchl *a* jsme naměřili také na ostatních sledovaných lokalitách v měsíci červenci a to v těchto koncentracích: Plešné jezero – 46 ng/l, Čertovo jezero – 89 ng/l. Na lokalitě Římov nebyl Bchl *a* detekován. V průběhu července jsme odebrali vzorky i na několika jednorázově pozorovaných místech přítomnost Bchl *a* jsme potvrdili na lokalitě Zlatá Ktíž – 13 ng/l.



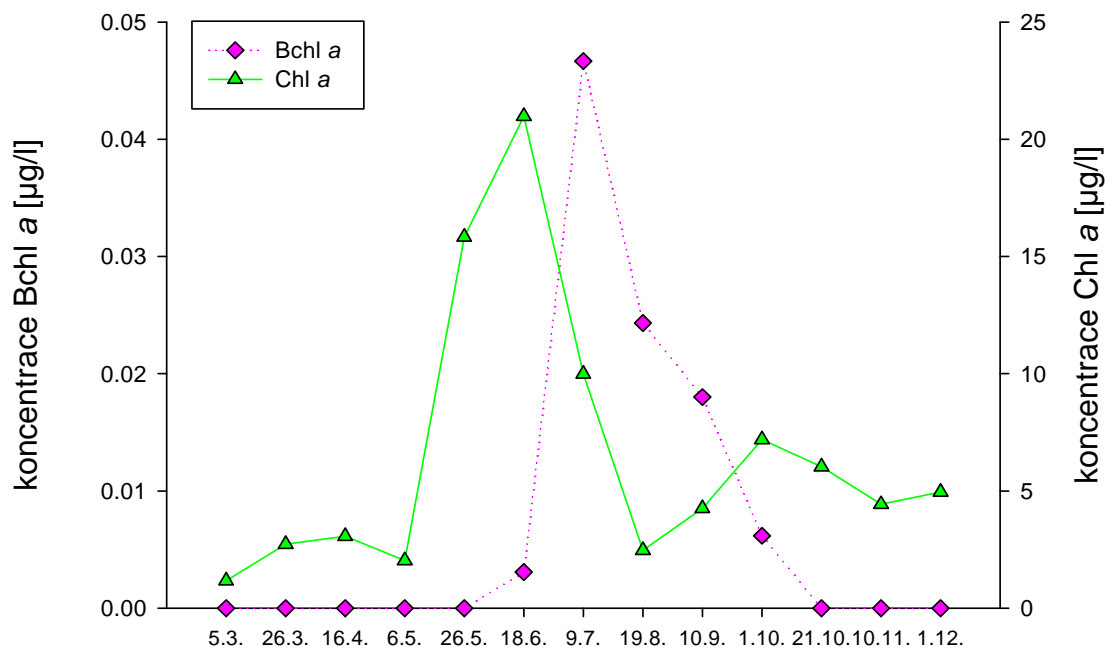


**Obr 4.1** Koncentrace chlorofylu *a* na sledovaných lokalitách v průběhu roku 2008

- u lokalit, kde se vzorky odebíraly dvakrát za měsíc jsou uvedeny hodnoty měřené ke konci měsíce  
 Koncentrace Chl *a* se na pozorovaných lokalitách v průběhu roku výrazně lišila. Na všech lokalitách byl zaznamenán výrazný nárůst koncentrací dvakrát do roka. Většinou v obdobích duben – červen a září – říjen. Nejvýraznější nárůst Chl *a* byl pozorován mezi dubnem a srpnem na lokalitě Velká Amerika.



**Obr 4.2** Obsah chlorofylu *a* a bakteriochlorofylu *a* na lokalitě Velká Amerika v roce 2008



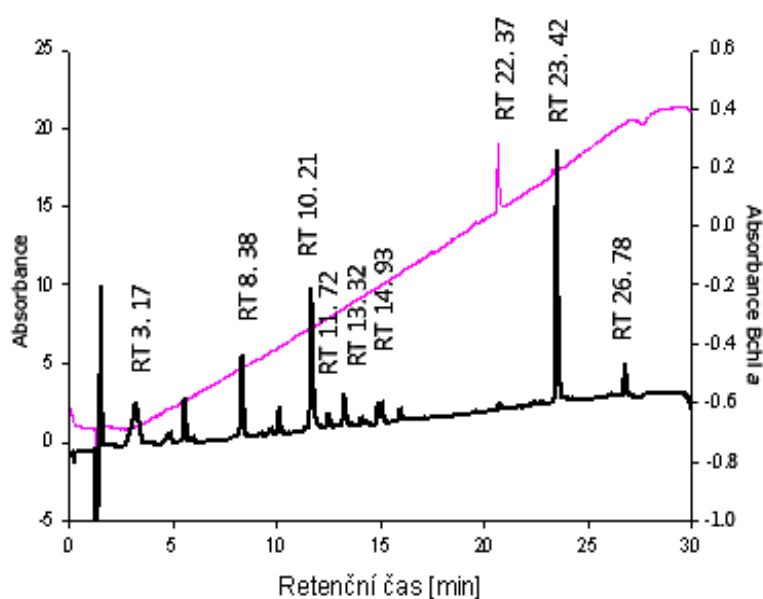
Obr 4.3 Obsah chlorofylu *a* a bakteriochlorofylu *a* na lokalitě Plešné jezero v průběhu roku 2008

HPLC analýzou fytoplanktonu jsme získali primární data zobrazená v podobě chromatogramů (např. Obr 4.4), které sloužily jako základní zdroje dat pro stanovování diverzity a koncentrace pigmentů.

Ze znalosti retenčních časů a max. absorpance fotosyntetických pigmentů jsme vyhodnotili celkem 38 chromatogramů. U definovaných pigmentů jsme vypočítali jejich koncentrace ve vzorku (viz. Příloha 1, Obr 4.11). Pigmenty se stanovovaly při charakteristické vlnové délce, která je pro karotenoidy při 440 nm, chlorofyly při 650 nm a pro bakteriochlorofyl *a* při 770 nm.

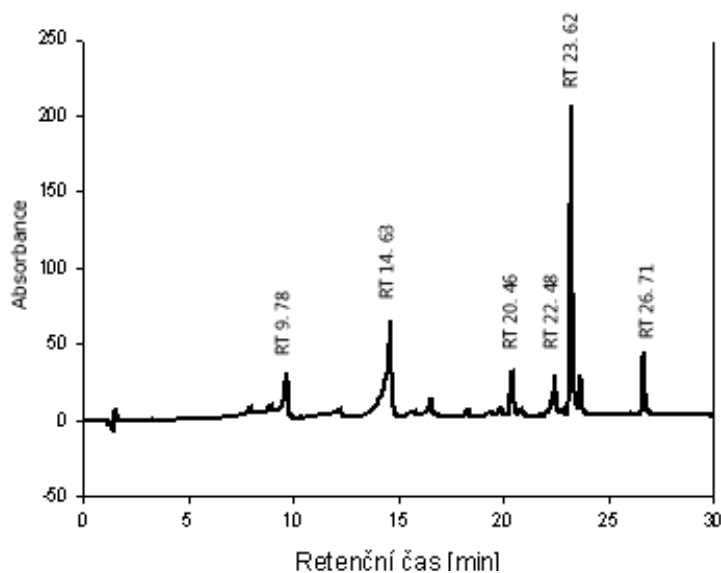
Koncentrace pigmentů byly na jednotlivých lokalitách v průběhu roku variabilní a vykazovaly několik trendů. Na lokalitách VA a PL převažoval na začátku roku fukoxantin. V podobných koncentracích se vyskytoval i na podzim spolu s dalšími pigmenty, jejichž koncentrace se začala navyšovat v letních měsících – dinoxantin, diatoxantin a zeaxantin. Zeaxantin jsme pozorovali spíše v druhé polovině roku; při podzimní stratifikaci. Koncentrace luteinu se mezi lokalitami lišila. Na lokalitě Velká Amerika byl lutein v min. množství, největšího píku dosáhl na podzim, kdežto v Plešném jezeře dosáhl maxim v letních i podzimních měsících. Na Čertově jezeře jsme zaznamenali nejmenší diverzitu pigmentů.  $\beta$ -karoten dosáhl maxima v srpnu 08. Lutein, fukoxantin a zeaxantin při jarní a podzimní stratifikaci. Na Římově v průběhu května až října byly pigmenty nejvariabilnější v červenci a srpnu (zeaxantin, diatoxantin, lutein,  $\beta$ -karoten).

Jako příklad variability pigmentů uvádíme chromatogramy z června 2008 (Obr 4.4).



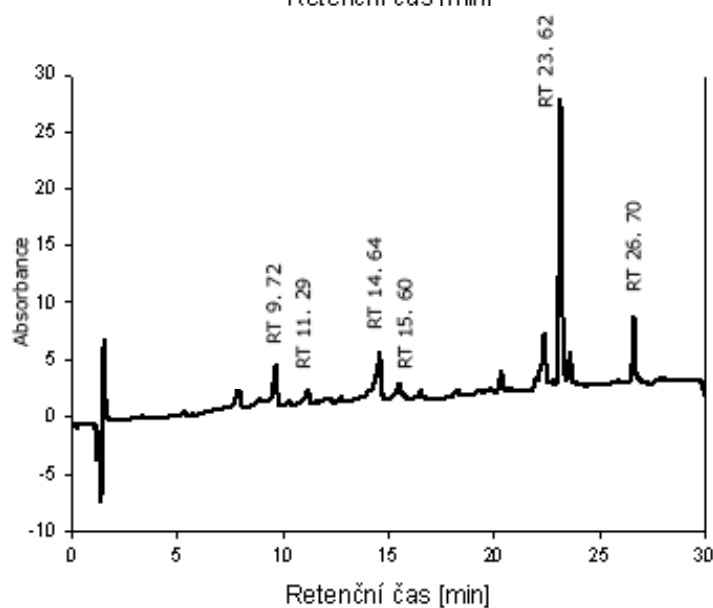
### Velká Amerika

- RT 13.17 – Chl *c*
- RT 8.38 – fukoxantin
- RT 10.21 – violaxantin
- RT 11.72 – diadinoxantin
- RT 13.32 – diatoxantin
- RT 14.93 – zeaxantin + lutein
- RT 22.37 – Bchl *a*
- RT 23.42 – Chl *a*
- RT 26.78 –  $\beta$ -karoten



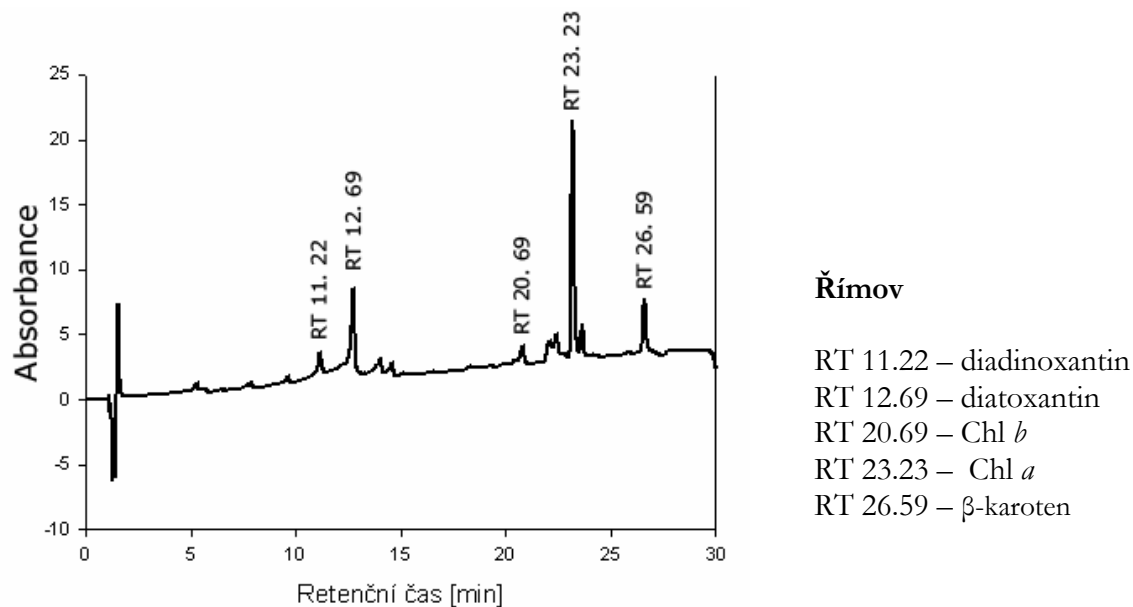
### Plešné jezero

- RT 9.78 – fukoxantin
- RT 14.63 – zeaxantin
- RT 20.46 – Chl *b*
- RT 22.48 – echinenon
- RT 23.62 – Chl *a*
- RT 26.71 –  $\beta$ -karoten



### Čertovo jezero

- RT 9.72 – fukoxantin
- RT 11.29 – diadinoxantin
- RT 14.64 – zeaxantin
- RT 15.60 – lutein
- RT 23.62 – Chl *a*
- RT 26.70 –  $\beta$ -karoten

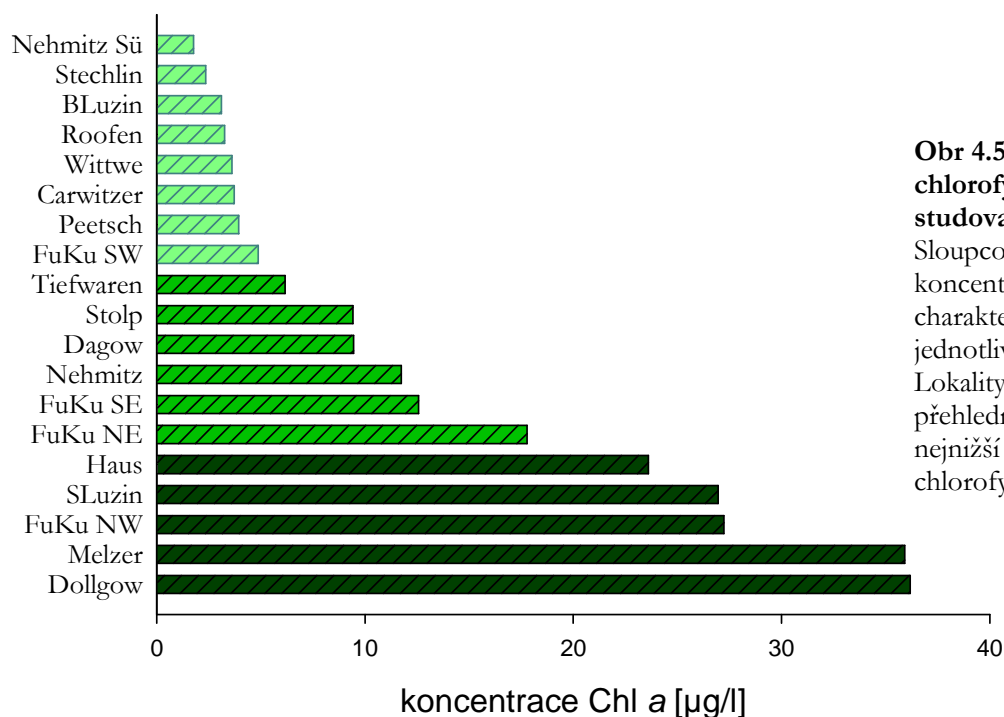


**Obr 4.4 Chromatogramy zobrazující největší diverzitu pigmentů v průběhu června 2008**

Chromatogramy znázorňují pigmenty na jednotlivých lokalitách při vlnové délce 440 nm. U lokality Velká Amerika je uveden i chromatogram při vlnové délce 770 nm s vyznačeným píkem Bchl *a* (RT 20.56).

### Německo

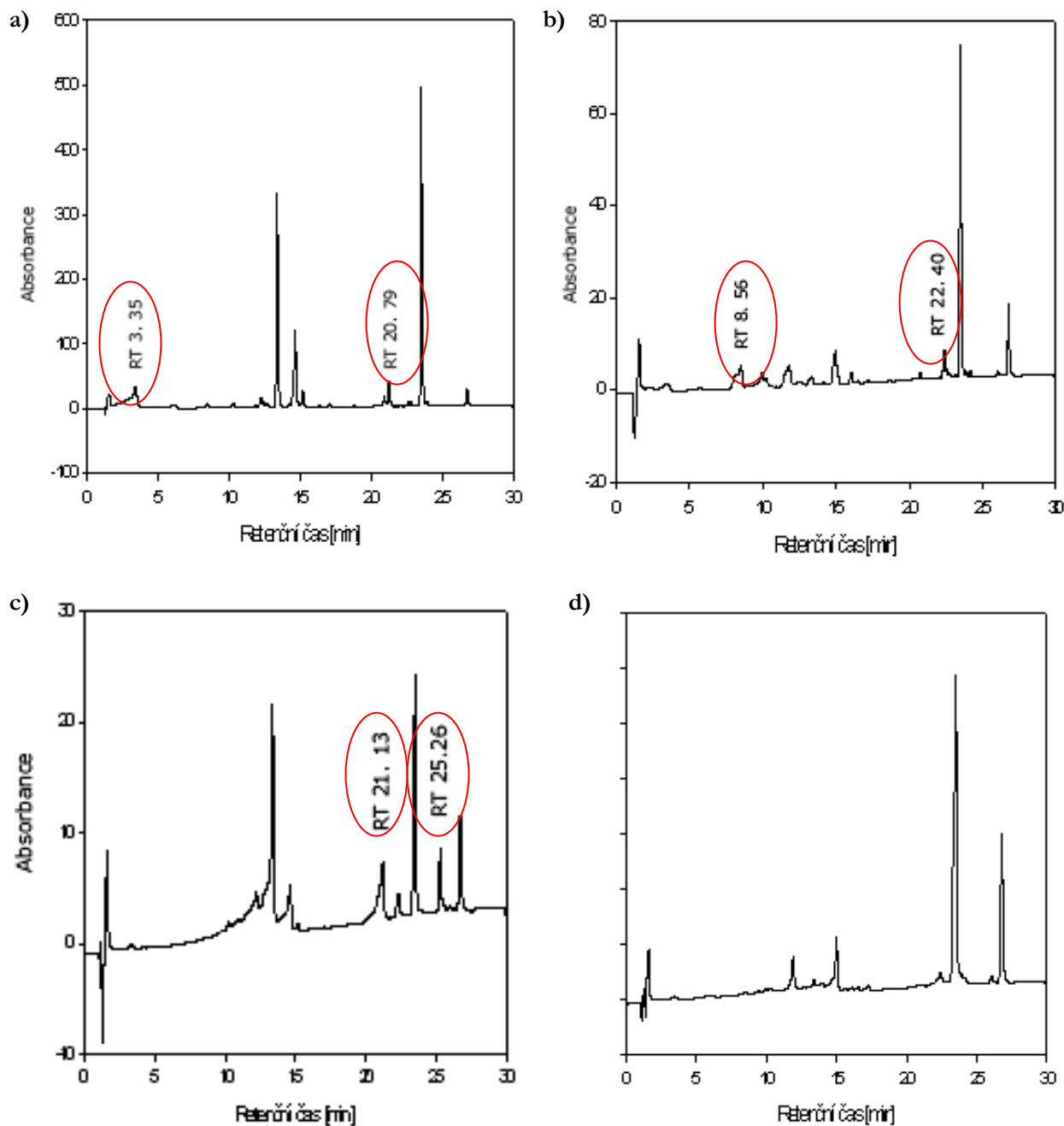
V průběhu měsíce června 2008 jsme metodou HPLC analyzovali vzorky odebrané z 19–ti sladkovodních lokalit v oblasti Brandenbursko-Meklenburských jezer, Německo (Příloha 1, Tab 4.1d). Obrázek 4.5 zachycuje rozdílnou koncentraci Chl *a* v jednotlivých jezerech. Nejvyšší koncentrace Chl *a* (35,7 µg/l) byla naměřena v jezeře Dollgow (53°14' N, 12°84' E); naopak nejnižší v jezeře Nehmitz Süd (0,7 µg/l).



**Obr 4.5 Koncentrace chlorofylu *a* ve studovaných jezerech**

Sloupcový graf ukazuje koncentraci Chl *a*, která charakterizuje míru trofie jednotlivých jezer. Lokality jsou pro přehlednost seřazeny od nejnižší koncentrace chlorofylu po nejvyšší.

Abychom zjistili pigmentové složení těchto jezer vyhodnotili jsme celkem 19 chromatogramů. Stanovené pigmenty jsme kvantifikovali a z nich jsme usuzovali na taxonomické složení fytoplanktonu pozorovaných lokalit. Jako příklad výsledku uvádíme chromatogramy ze čtyř výrazně odlišných lokalit lišících se svou trofíí Obr 4.6.



**Obr 4.6 Chromatogramy znázorňující pigmentové složení jezer s různou trofíí**

Chromatogramy ukazují píky (stanovované pigmenty) při vlnové délce 440 nm. Při této vlnové délce se zobrazují karotenoidy a chlorofyly. Pigmenty se na lokalitách s různou trofíí liší vzájemnými poměry i diverzitou ve vzorcích. Lišící se pigmenty jsou vyznačeny červeně.

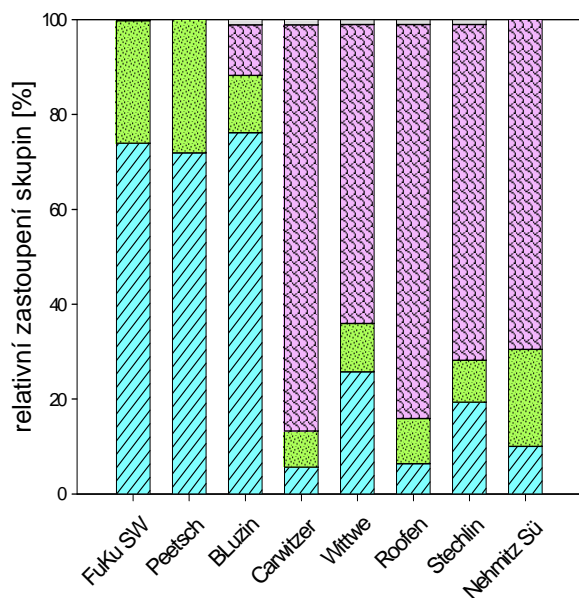
oligotrofní: a) jezero Nehmitz; b) jezero Stechlin; mezotrofní c) jezero Fuku (SW); eutrofní d) jezero Haus

Pigmenty: RT 3.35 – Chl *a*; RT 20.79 – Chl *b*; RT – 8.56 – fukoxantin; 22.40 – echinenon; RT 21.13 – vaucheriaxantin; RT 25.26 – feofytin

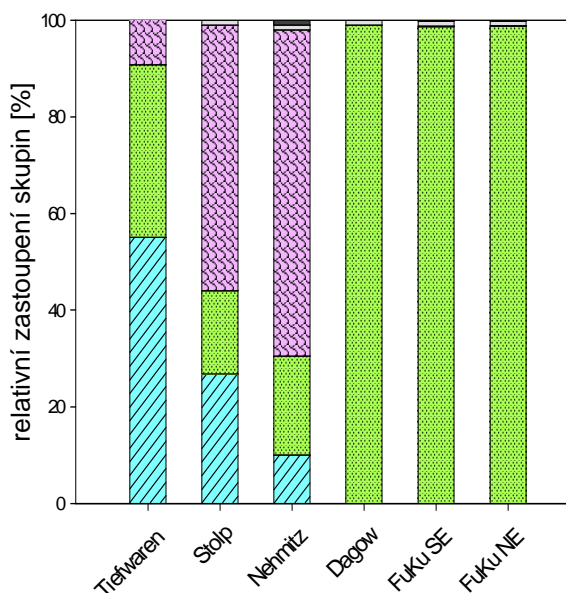
#### 4.2 Determinace fytoplanktonu z pigment. složení pomocí programu CHEMTAX

Ze stanovených koncentrací pigmentů jsme pomocí počítačového programu CHEMTAX určili složení fytoplanktonu jednotlivých lokalit (na úrovni skupin). Jelikož byl CHEMTAX vyvinut primárně k determinaci složení fytoplanktonu v mořském prostředí, upravili jsme způsob výpočtu vynecháním pigmentů, které se ve sladkovodních ekosystémech nevyskytují. U jezer oligotrofnějšího typu, převažují ve fytoplanktonu zástupci skupin Cyanophyta a Bacillariophyceae, naopak v malém množství jsou Chrysophyceae. Chlorophyta převažují spolu s Dinophyta v mezotrofních vodách. Na eutrofnějších lokalitách najdeme všechny zmiňované skupiny (viz Obr 4.7).

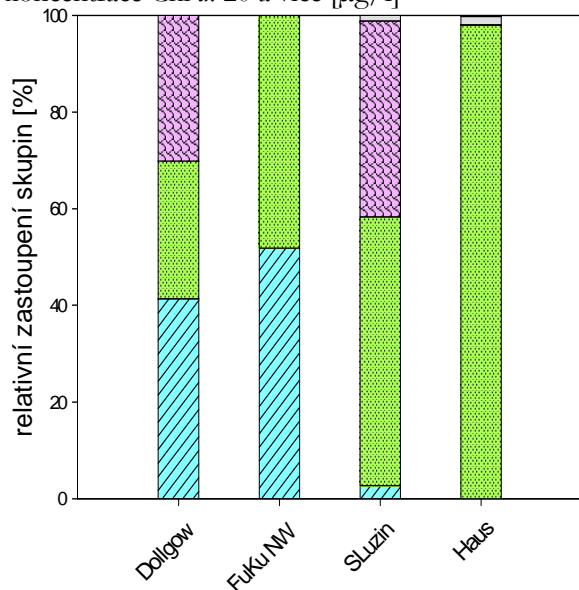
koncentrace Chl *a*: 0 – 5 [µg/l]



koncentrace Chl *a*: 5 – 20 [µg/l]

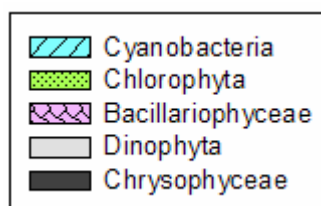


koncentrace Chl *a*: 20 a více [µg/l]

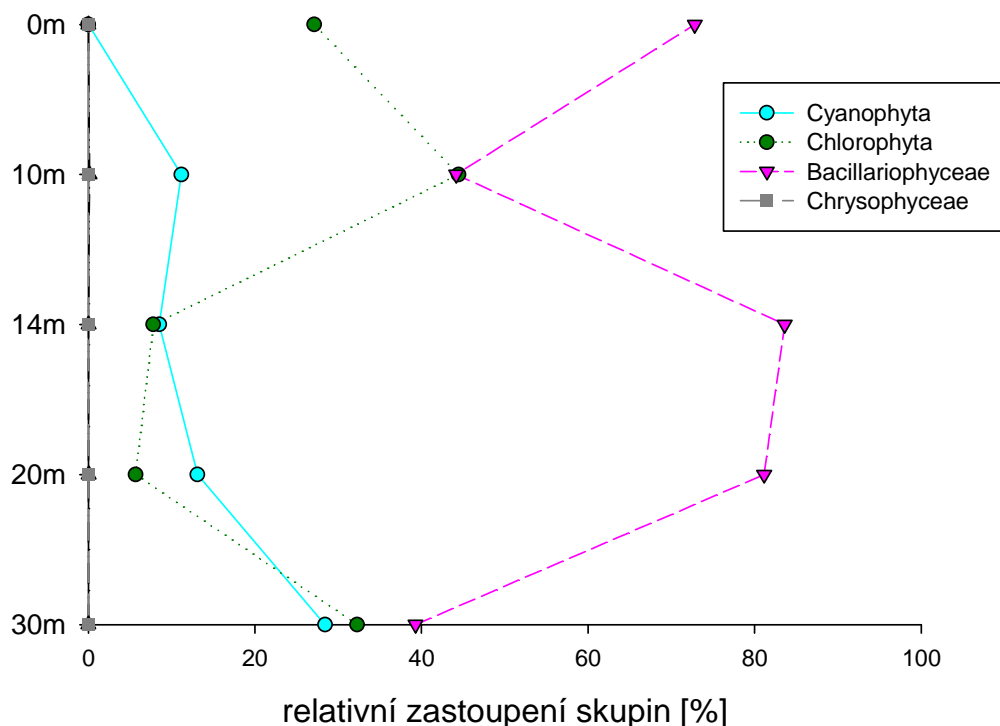


**Obr 4.7 Složení fytoplanktonu u souboru jezer v oblasti Brandenburg-Mecklenburg určené z HPLC dat pomocí programu CHEMTAX.**

Jednotlivé lokality jsou rozděleny podle množství chlorofylu do 3 skupin: méně než 5 µg/l, 5 až 20 µg/l a více než 20 µg/l.



Pomocí programu CHEMTAX jsme nejen vzájemně porovnávali jednotlivé lokality, ale také jsme zjišťovali změny ve složení fytoplanktonu v hloubkovém profilu jezera Stechlin. Distribuce jednotlivých skupin sinic a řas se lišila v závislosti na hloubce jezera. Chlorophyta byly nejhojnější na hladině, ale dominovaly Bacillariophyceae. Své max. výskytu měly ve 14-ti metrech (u termokliny), s přibývajícím hloubkou jejich koncentrace klesala. Cyanophyta se vyskytovala v celém vodním sloupci pouze minimálně (viz. Obr 4.8).



Obr 4.8 Zastoupení skupin fytoplanktonu v profilu vodního sloupce jezera Stechlin (16.6.08)

#### 4.3 Determinace fytoplanktonu mikroskopickým pozorováním

Odebírané vzorky fytoplanktonu jsme nejen chromatograficky analyzovali, ale ihned po odběru také mikroskopovali. Světelným mikroskopem bylo determinováno celkem 10 rodů sinic a 26 rodů řas z celkem 17-ti sladkovodních lokalit (Příloha 1, Tab 4.1d ). Relativní zastoupení jednotlivých rodů, popř. druhů na dané lokalitě zobrazuje Tab 4.3.

Výsledky z mikroskopického pozorování jsme využili ke porovnání s analýzou složení fytoplanktonu provedenou programem CHEMTAX.

Výsledek spolu korespondovaly. Výjimkou byly některé lokality, např. eutrofní jezero Haus. Podle programu CHEMTAX v něm výrazně dominují zelené řasy. Mikroskopickým pozorováním jsme dominanci zelených řas potvrdili, ale zjistili jsme také přítomnost sinic,

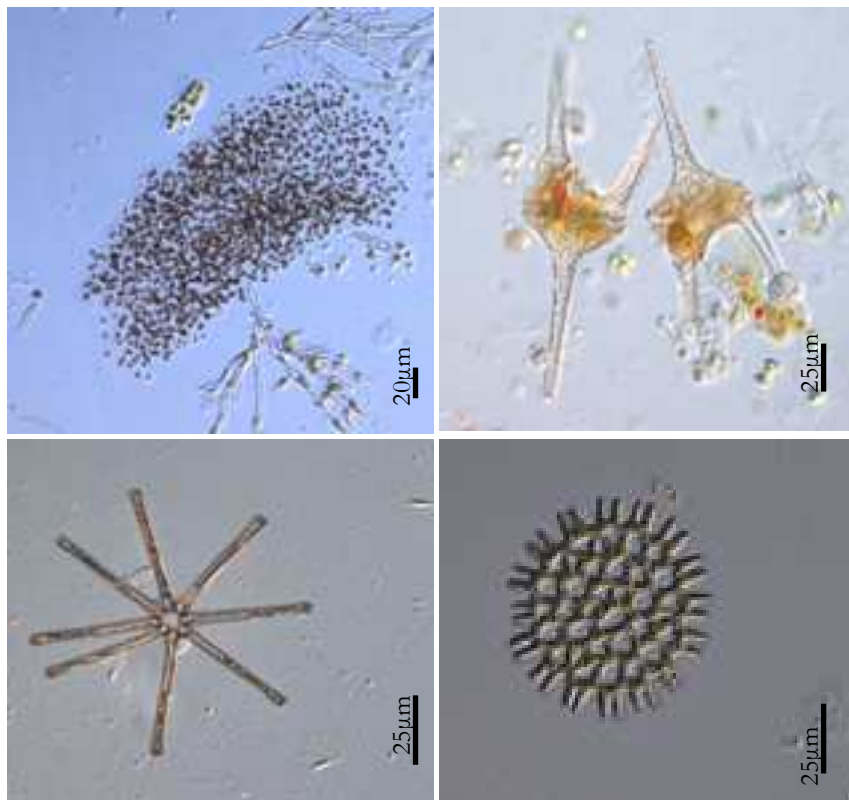
zejména druhu *Anabaena flos-aque*, stejně jako u Schmaler Luzin. Podobně u mezotrofního jezera Dagow vyhodnotil CHEMTAX pouze zelené řasy, světelná mikroskopie potvrdila výraznou přítomnost rozsivek s dominancí rodů *Asterionella* sp., *Tabelaria* sp, stejně jakou u Fuchskuhle SW. U jezera Petsch CHEMTAX nevyhodnotil rozsivky. Hnědé řasy byly zastoupeny druhem *Dinobryon* sp., který byl ve zanačné míře nejen v jezere Fuchskuhle SE (CHEMTAX), ale i v jezerech: Dagow, Nehmitz, Stechlin, Carwitzer, Roofen, Breiter Luzin a Schmaler Luzin.

Tab 4.3 Relativní zastoupení jednotlivých rodů sinic a řas na lokalitách v Německu (červen 08)

	Nehmitz	Stechlin	BLuzin	Roffen	Wittwe	Carwitzer	Peetsch	FuKu SW	Tiefwaren	Stolp	Dagow	FuKu SE	FuKu NE	Haus	SLuzin	FuKu NW	Dollgow
<b>Bacillariophyceca</b>	3	6		5	4	5	5	5	2	6	2						6
<i>Asterionella</i> sp.	5		+							5	3						
<i>Cymbella</i> sp.			2														
<i>Navicula</i> sp.			1														
<i>Tabelaria</i> sp.	6		4							2	4				3		
<b>Chlorophyta</b>																	
<i>Closterium</i> sp.										+							
<i>Coelastrum</i> sp.		3								1							4
<i>Cosmarium</i> sp.	+						+			+							+
<i>Crucigenia?</i> sp.										+							+
<i>Scenedesmus</i> sp.		2		4	3		1			2							6
<i>Staurastrum</i> sp.	+				3					1				5			5
<i>Pediastrum</i> sp.				3													5
<i>Tetraedron</i> sp.				+													
<i>Unidentified green algae</i>	5	5	3	4	5	5	6	6	6	3	5	6	5	+	3	6	
<b>Cyanophyta</b>																	
<i>Anabaena</i> sp.					4	6	4		4	5					6		
<i>Anabaena flos-aque</i>	5		+			5						3		5	4	2	
<i>Anabaena lemmermanii</i>		4							4	5							
<i>Aphanocapsa</i> sp.					3		1										6
<i>Leptolyngbya</i> sp.			6							+						2	
<i>Merismopedia</i> sp.				1													1
<i>Microcystis</i> sp.	2			6			4							+			6
<i>Microcystis wesenbergii</i>																	4
<i>Oscillatoria</i> sp.																	+
<i>Planktothrix</i> sp.															5		
<b>Dinophyta</b>																	
<i>Ceratium</i> sp.	5	4	2	5	3	4	5			4	5				3		
<i>Gymnodinium</i> sp.	+	2	1	3	3		2			1	+				1		
<i>Peridinium</i> sp.	4	2				2				4	4				1		
<b>Chromophyta</b>																	
<i>Dinobryon</i> sp.	4	5	5	4		5		6			4				5		



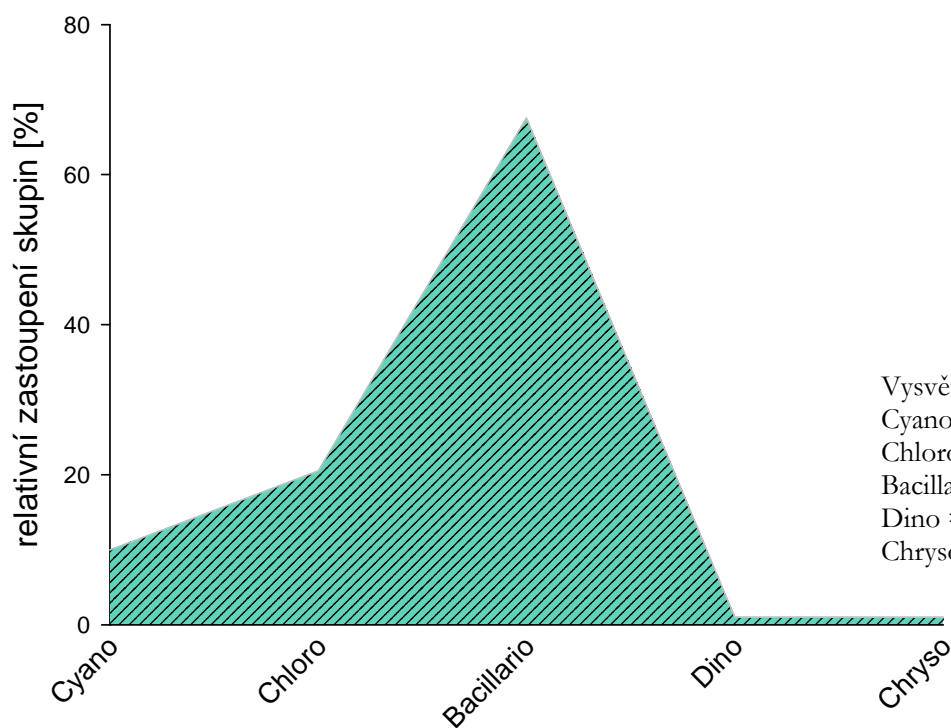
Abychom získali co nejpřesnější představu o složení fytoplanktonu tamějších jezer, sjednotili jsme výsledky z programu CHEMTAX a mikroskopického pozorování. Jako příklad jsme zvolili mezotrofní jezero Nehmitz. Hlavní složku fytoplanktonu zde tvořily Bacillariophyceae (*Asterionella* sp., *Tabellaria* sp.) a Chlorophyta (např. *Pediastrum* sp., *Scenedesmus* sp.). Rody s menším zastoupením byly *Microcystis* sp., *Ceratium* sp.; *Dinobryon* sp.. Jako příklad výsledku uvádíme Obr 4.9.



**Obr 4.9 Složení fytoplanktonu mezotrofního jezera Nehmitz (11.6. 2008)**

Graf znázorňuje kvantifikaci skupin fytoplanktonu podle CHEMTAX. Obrázky zachycují druhovou diverzitu fytoplanktonu pozorovanou světelnou mikroskopií.

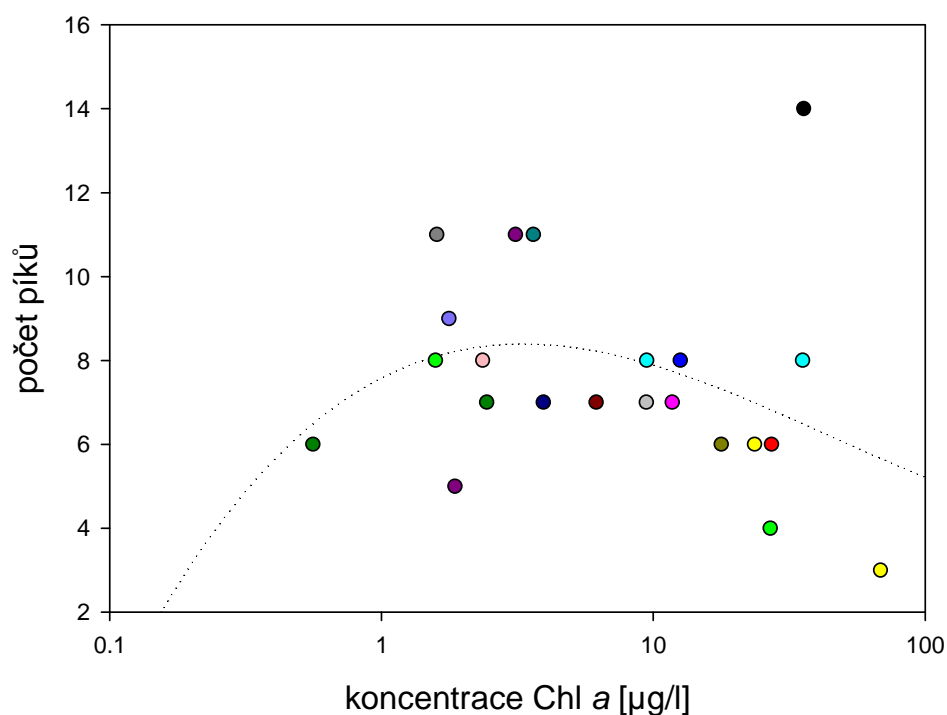
Zleva: *Microcystis aeruginosa*, *Ceratium hirundinella*, *Asterionella formosa*, *Pediastrum duplex*



Vysvětlivky:  
 Cyano = Cyanophyta  
 Chlora = Chlorophyta  
 Bacillario = Bacillariophyceae  
 Dino = Dinophyceae  
 Chryso = Chrysophyceae

#### 4.4 Závislost diverzity pigmentů na míře trofie lokality

Klasickou otázkou ekologie ekosystémů je nakolik souvisí diverzita a produktivita ekosystému. Podle některých představ produktivnější ekosystémy by mohly podporovat větší množství druhů. Jiné výsledky naznačují, že diverzita velmi produktivních ekosystémů může být nižší. K odpovědi na tuto otázku byl využit dataset získaný z analýz Německých a Českých sladkovodních lokalit. Jelikož pigmentové složení v sobě nese taxonomickou informaci, byla pro jednoduchost diverzita hodnocena pouze jako počet nalezených pigmentů v jednotlivých lokalitách (počítány byly pouze pigmenty, jejichž množství bylo větší než 5% obsahu chlorofylu). Jako proxy produktivity byl použit obsah chlorofylu. Získaná data byla vynesena do grafu a proložena křivkou kubické regrese (Obr 4.10). Přes malý počet bodů se zdá, že mezotrofní jezera od 2 do 10  $\mu\text{g Chl/l}$  vykazují nejvyšší rozmanitost pigmentového složení. To napovídá, že tato jezera pravděpodobně budou vykazovat i poněkud vyšší druhovou rozmanitost v porovnání s jezery oligotrofními nebo eutrofními.



Obr 4.10 Závislost počtu pigmentů na obsahu chlorofylu v různých lokalitách.

## 5. DISKUZE

HPLC – CHEMTAX je efektivní metoda pro rozsáhlé výzkumy, protože umožňuje rychlé zpracování velkého množství vzorků na četných lokalitách a v různých hloubkách (SARMENTO & DESCY 2008).

Analýzou vzorku pomocí HPLC jsme schopni odhadnout pigmentové složení už z prvního měření. To je pro nás velkou výhodou hlavně z hlediska úspory času a množství vzorku, které je k analýze potřeba (SARMENTO & DESCY 2008). Metoda je velmi přesná, protože pozorované pigmenty, obsažené ve fotosynteticky aktivních mikroorganismech, se vzájemně liší svou polaritou a absorpčními spektry (ROWAN 1989). Kombinace těchto dvou charakteristik umožňuje přesnou detekci pozorovaného pigmentu.

V případě, že vzorek obsahuje degradované produkty (např. chlorofylidy, feofytiny či karotenové izomery) přítomné buďto ve své přirozené formě jako součást odumřelých stélek nebo jako artefakty vzniklé při extrakci vzorku, může být vyhodnocení získaných dat z chromatogramu zatíženo chybami. A je potřeba vyhnout se nesprávné interpretaci dat. Na přesnost vyhodnocení má nevyhnutelně vliv také zvolená kolona, její typ a stáří ovlivňuje retenční časy pigmentů. Získaná spektra pigmentů velmi závisí na použitých solventech. V literatuře najdeme mnoho údajů charakterizujících absorpční spektra jednotlivých pigmentů (tzv. absorpční maxima), které se liší v závislosti na druhu použitého rozpouštědla. Výsledky se mohou odlišovat i laboratoř od laboratoře. Proto jsme se v této studii pokusili metodu standardizovat, aby ji bylo možné jednoduše aplikovat v praxi i při budoucích výzkumech (Příloha 2, Retenční časy a spektra pigmentů obsažených v běžně se vyskytujícím fytoplanktonu).

Existuje mnoho prací, které se zabývají extrakcí pigmentů z řas (STRAIN 1954, 1958; GOODWIN, 1980; HOLDEN 1965; STRAIN 1966, 1969; DAVIES 1965, 1976; JENSEN 1966, 1978; AASEN & LAAEN-JENSEN 1966; HAGER & STRANSKY 1970; BRITTON & GOODWIN 1971; KJØSEN & LIAAEN-JENSEN 1972; JOHANSEN, SVEC *et al.* 1974; BERGER *et al.* 1977; SVEC 1978, KRINSKY & WELANKIWAR 1984; PECHAR 1987) a tato metoda se stále více zdokonaluje. Ukázalo se, že ideální k extrakci chlorofylu *a* je směs 90% acetonu: metanolu v poměru 5:1, ale existuje mnoho variant (PECHAR 1987). Záleží na druhu rozpouštědla, které bychom měli volit s ohledem na analyzovaný organismus. Efektivita extrakce se nám tak zvýší. Například u řas je rozdíl zda-li extrahujeme mikrofyta nebo makrofyta, hlavně kvůli rozdílné velikosti stélek. K determinaci bakterií, sinic a řas z přírodního vzorku sladkovodního fytoplanktonu se nám nejvíce osvědčil poměr rozpouštědel 7:2 (aceton:metanol). Předpokladem ke kvalitní extrakci není jen volba vhodného

rozpouštědla, ale také dodržení určitých pracovních podmínek při extrahování vzorku. Pigmenty mohou podlehnout chemické oxidaci, hydrolyze nebo izomerizaci. Ukázalo se, že k těmto nežádoucím reakcím dochází u vzorku upraveného zahřáním méně, než u toho, který je zamrazen. Ačkoli zahřívání (90% acetonem na 55 °C) se můžou inaktivovat některé enzymy způsobující degradaci, zvyšuje se také pravděpodobnost izomerizace a pyrolýzy (MANN & MAYERS 1968). Zmrazení se doporučuje pouze v případě, že vzorek není po odběru ihned extrahován (YOKOHAMA *et al.* 1981). Použitím 90% acetonu snížíme riziko vzniku chlorofylidů (ROWAN 1989).

Extrakci předchází filtrace za účelem odstranění nežádoucích partikulí a získání co největšího počtu buněk mikroorganismů. Při tomto kroku je velmi důležitá kvalita a účinnost filtru (DALEY *et al.* 1973A), jinak by mohlo dojít ke zkreslení výsledku. Abychom zvolili vhodný typ filtrů, které budou splňovat nároky na filtraci (inertnost k použitému rozpouštědлу, vysokou rychlost filtrace, efektivní zadržování partikulí), testovali jsem několik druhů filtrů (GF/F od firmy Whatman, USA a GF-5 filtr od firmy (Macherey Nagel, Německo). Zjistili jsem, že nejvhodnější pro naše účely jsou filtry MN GF-5. Naše výsledky by tedy neměly být zkresleny chybou, která vzniká při použití nevhodně zvolených filtrů ani chybami z nesprávného skladování odebraného vzorku, protože pokud vzorky nebyly ihned zfiltrvány, byly uloženy v temnu a chladu.

Aplikace této metody nám značně ušetřila čas a ulehčila práci v monitorování lokalit a sezónních změn ve fytoplanktonu. Pomocí analýzy fotosyntetických pigmentů jsme byli schopni odhadnout distribuci jednotlivých skupin ve fytoplanktonu v průběhu roku 2008. Vývoj fytoplanktonu se podobal PEG modelu (SOMMER 1986), podle kterého se v limnologii predikuje sezónní vývoj v dimiktickém jezeře. Šumavská jezera (Plešné jezero, Čertovo jezero) se vzájemně výrazně lišila v diverzitě pigmentů v průběhu celého roku. Příčinou může být různá trofie těchto jezer. Oligotrofní Čertovo jezero bylo co se týče variability pigmentů chudší než mezotrofní Plešné jezero nebo lom Velká Amerika, který je taktéž mezotrofní a z hlediska variability pigmentů se podobala Plešnému jezeru. Výrazný jarní pík (nárůst fukoxantinu, karotenu a Chl *a*) jsme pozorovali u Plešného jezera, což odpovídá predikovanému jarnímu píku Chrysophyceae a centrických rozsivek podle PEG modelu. V létě a na podzim byla na všech lokalitách největší variabilita pigmentů (zeaxantin, fukoxantin, lutein, karoten, diatoxantin, diadinoxantin) a tedy i předpokládaného fytoplanktonu (Cyanophyta, Bacillariophyceae, Chlorophyta, Dinophyta).

HPLC je velmi využívanou metodou k pozorování pikoplanktonu (LEWITUS *et al.* 2005). Pozorováním Bchl *a* z HPLC dat byly v roce 2002 na lokalitě Velká Amerika detekovány bakterie, tzv. AAPs – aerobic anoxygenic phototrophs (MAŠÍN *et al.* 2008), které se dříve

považovaly za výhradně mořské pikoplanktonní organismy. V roce 2008 jsme změny koncentrací Bchl *a* znovu pozorovali a zaznamenali je nejen na Velké Americe, ale také v Plešném jezeře (v druhé polovině roku). Na obou lokalitách se objevoval podobný trend. V první části roku 2008 koncentrace Chl *a* a Bchl *a* současně vzrůstala a klesala. V druhé polovině roku se maxima jejich koncentrací rozrůžňují. Když je v maximu Bchl *a*, Chl *a* má nízkou koncentraci. Tento trend zaznamenal i MAŠÍN *et al.* 2008 a může poukazovat na životní strategii těchto fotorofů.

Původně byl CHEMTAX využíván ke kvantifikaci fytoplanktonu v mořském prostředí (WRIGHT & JEFFREY 2006), kde spolu s metodou HPLC představoval velmi efektivní, rychlou a snadně opakovatelnou (SCHLÜTER *et al.* 2000) metodu užívanou ke kvantifikaci hlavních skupin fytoplanktonu. V posledních letech se začal využívat i ve sladkovodních ekosystémech.

CHEMTAX vyhodnocuje složení fytoplanktonu na základě poměrů jednotlivých pigmentů ku celkovému obsahu chlorofylu *a*. Lze ho aplikovat i na společenstva sladkovodních ekosystémů, protože poměry pigmentů z mořského a sladkovodního prostředí se nijak výrazně neliší (SCHLÜTER *et al.* 2000), s výjimkou u Prymnesiophyt, které představují minoritní část fytoplanktonu sladkovodních jezer. Pro dosažení nejpresnějších výsledků jsme použili poměry jednotlivých pigmentů/Chl *a* optimalizované na řasových kulturách podle SCHLÜTER *et al.* 2006. Tyto poměry jsou přizpůsobené podmínkám (světlo, živiny), které simulují přirozené prostředí fytoplanktonu, ve kterém se vyskytuje. Různé světelné podmínky však nemají zásadní vliv na změny celkových poměrů pigment/Chl *a* (SCHLÜTER *et al.* 2006), protože fotosynteticky aktivní pigmenty se změnám záření přizpůsobují spolu s Chl *a* (LATASA 1995). Mnoho přídatných pigmentů, např.  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoten, diatoxantin, diadinoxantin, anteraxantin a zeaxantin, slouží k ochraně fotosyntetického aparátu před napadením volnými radikály (DEMING-ADAMS & ADAMS 1992). V období nedostatku světla a živin za stacionárního buněčného růstu mají karotenoidy tendenci svou aktivitu zvyšovat, kdežto u světlosběrných pigmentů aktivita klesá (LATASA 1995, SCHLÜTER *et al.* 2000).

Protože program CHEMTAX nelze používat jako tzv. černou skříňku, musíme před samotnou analýzou dat odhadnout přibližné složení fytoplanktonu, abychom optimálně zvolili pigmenty, které zadáváme ke zpracování. Ideálním řešením se nabízí světelná mikroskopie či odhad na základě dřívějšího pozorování lokality.

Výsledky získané kombinací metod HPLC a CHEMTAX jsou srovnatelné s těmi, které jsou získané světelnou mikroskopií (SCHLÜTER *et al.* 2006). Tyto metody dokáží přesně kvantifikovat a určit objem pozorovaných skupin ve fytoplanktonu – důležitých indikátorů vodního prostředí (např. Cyanophyta, Chrysophyceae, Dinophyta). CHEMTAX však není schopen přesnější taxonomické determinace, např. na úrovni rodové či druhové. A tak pouhá analýza pigmentů bez

identifikace hlavních druhů fytoplanktonu pod světelným mikroskopem nemůže poskytnout optimální zhodnocení fytoplanktonu na dané lokalitě.

## 6. Závěry

1. Vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) bylo analyzováno 32 vzorků z celoročně pozorovaných lokalit a více než 23 vzorků sladkovodního fytoplanktonu z jednorázově odebíraných lokalit.
2. Byl vytvořen přehled absorpčních spekter a dalších základních charakteristik fotosyntetických pigmentů běžně se vyskytujících ve sladkovodních ekosystémech.
3. Diverzita fytoplanktonu byla u vybraných lokalit vyhodnocena programem CHEMTAX a mikroskopickým pozorováním, kterým bylo determinováno 10 rodů sinic a 26 rodů řas.

## 6. POUŽITÁ LITERATURA

- AASEN, A. J., LIAAEN-JENSEN, S. (1966). The carotenoids of the flexibacteria. II. A new xanthophyll from *Saphrospira grandis*. Acta Chem. Scand. **20**: 811–19.
- AITZETMULLER, K., STRAIN, H. H., SVEC, W. A., GRANDOLFO, M., KATZ, J. J. (1969). Loroaxantin, a unique xanthophyll from *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. Phytochemistry **8**: 1761–70.
- ANDERSEN, R. A., MULKEY, T. J. (1983). Synurophyceae classis nov., a new class of algae. Am. J. Bot. **74**: 337–53.
- ANDERSEN, R. A. (1987). Synurophyceae classis nov., a new class of algae. Am. J. Bot. **74**: 337–53.
- ANTIA, N. J., CHENG, J. Y. (1982). The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae. Br. Phycol. J. **17**: 39–50.
- BERGER, R., LIAAEN-JENSEN, S., MCALISTER, V., GUILLARD, R. R. L. (1977). Carotenoids of Prymnesiophyceae (Haptophyceae). Biochem. Syst. Ecol. **5**: 71–5.
- BJØRNLAND, T., AGUILAR-MARTINEZ, M. (1976). Carotenoid in red algae. Phytochemistry **15**: 291–6.
- BJØRNLAND, T., AND TANGEN, K. (1979). Pigmentation and morphology of a marine *Gyrodinium* (Dinophyceae) with a major carotenoid different from peridinin and fucoxanthin. J. Phycol. **15**: 457–63.
- BJØRNLAND, T. (1982). Chlorophylls and carotenoids of the marine alga *Eutreptionella gymnastica*. Phytochemistry **21**: 1715–19.
- BULLERJAHN, G. S., MATTHIJS, H. C. P., MUR, L. R., SHERMAN, L. A. (1987). Chlorophyll-protein composition of the thylakoid membrane from *Prochlorothrix hollandica*, a prokaryote containing chlorophyll *b*. Eur. J. Biochem. **168**: 295–300.
- BRITTON, G., GOODWIN, T. W. (1971). Biosynthesis of carotenoids. Cambridge University Press.
- BROWN, J. S. (1985). Three photosynthetic antenna porphyrins on a primitive green alga. Biochim. Biophys. Acta **807**: 143–6.
- CLARK, J. (2007). Chromatography guide, <http://www.chemguide.co.uk/chromatography/hplc.1>
- CRAIGIE, J. S., LEIGH, C., CHEN, L. C., MCLACHLAN, J. (1971). Pigments, polysaccharides and photosynthetic products of *Phaeosaccion callesii*. Can. J. Bot. **49**: 1067–74.
- DALEY, R. J., GRAY, C. B. J., BROWN, S. R. (1973A). A quantitative, sensitive method for determining algal and sedimentary chlorophyll derivatives. J. Fish. Res. Board. Can. **30**: 345–56.

- DAVIES, B. H. (1965). Analysis of carotenoid pigments. In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 1st ed., ed. T. W. Goodwin, pp. 489–532. London: Academic Press.
- DAVIES, B. H. (1976). Carotenoids. In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2nd ed., Vol. 2, ed. T. W. Goodwin, London: Academic Press, pp. 38–165.
- DEMMING-ADAMS, B., ADAMS, W. W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 599–626.
- DURAND, M., BERKALOFF, C. (1985). Pigment composition and chloroplast organization of *Gambieriscus toxicans* Adachi and Fukuyo (Dinophyceae). *Phycologia* **24**: 217–23.
- FAWLEY, M. W. (1988). Separation of chlorophylls  $c_1$  and  $c_2$  from pigment extracts of *Pavlova gyrams* by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* **86**: 76–8.
- FIETZ S., NICKLISCH A. (2004). An HPLC analysis of the summer phytoplankton assemblage in Lake Baikal. *Freshwater Biology* **49**: 332–345.
- FOSS, P., GUILLARD, R. R. L., LIAAEN-JENSEN, S. (1984). Prasinoxanthin. A chemosystematic marker for algae. *Phytochemistry* **23**: 1629–33.
- GIBBS, S. P., CHU, L. L., MAGNUSSEN, C. (1980). Evidence that *Olisthodiscus luteus* is a member of the Chrysophyceae. *Phycologia* **19**: 173–7.
- GLAZER, A. N. (1983). Comparative biochemistry of photosynthetic light-harvesting systems. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 123–57.
- GLAZER, A. N. (1984). Phycobilisome. A macromolecular complex optimized for light-energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **768**: 28–51.
- GOEDHEER, J. C. BIRNIE, F. (1965). Fluorescence polarization and location of fluorescence maxima of C-phycoerythrin. *Biochim. Biophys. Acta* **94**: 579–81.
- GOODWIN, T.W (1965). *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 1st ed. London: Academic Press.
- GOODWIN, T. W. (1971). Algal carotenoids. In *Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry*, ed. T. W. Goodwin, London: Academic Press, pp. 315–56.
- GOODWIN, T. W. (1980). *The Biochemistry of the Carotenoids*, 2nd ed., Vol. 1 and 2. London: Chapman and Hall.
- HAGER, A. (1980). The reversible, light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast. In *Pigments in Plants*, 2nd ed., ed. F.-C. Czygan, Stuttgart: Fischer, pp. 57–79.
- HAGER, A., STRANSKY, H. (1970). Das carotinoidmuster und die Verbreitung des leuchtenduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen algenklassen. I. Methoden zen Identifizierung der Pigmente. *Arch. Mikrobiol.* **71**: 132–63.



- HALLENSTVET, M., LIAEN-JENSEN, S., SKULBERG, O. M. (1979). Carotenoids of *Oscillatria borneyi* f. *tenuis*. *Biochem. Syst. Ecol.* **7**: 1–2.
- HAVSKUM, H., SCHLÜTER, L., SCHAREK, R., BERDALET, E., JACQUET, S. (2004). *Marine ecology progress series*, Vol. **273**: 31–42.
- HIBBERD, D. J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes, Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **82**: 93–119.
- HINDÁK, F. (1978). *Sladkovodné riasy*. Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava, pp. 724.
- HLADÍK, J., SOFROVÁ, D. (1990). Karotenoidy oxygenní fotosyntézy II. Funkce ve fotosyntéze. *Biologické listy* **55** (1): 14–28.
- HOLDEN, M. (1965). Chlorophylls. In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 1st ed., ed. T. W. Goodwin, London: Academic Press, pp. 1–37.
- CHRISTEN, T. (1962). Alger. In *Systematis Botanik*, Vol. 2, 178 p. No. 2, ed. T. W. Böcher, M. Lange, and T. Sorensen, Copenhagen: Munksgaard.
- JACKSON, A. H. (1976). Structure, properties and distribution of chlorophyll. In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2nd. ed. , Vol. 1, ed. T. W. Goodwin, London: Academic Press , pp. 1–63.
- JEFFREY, S. W. (1963): Purification a properties of chlorophyll *c* from *Sargassum flavicans*. *Biochem. J.* **86**: 313–18.
- JEFFREY, S. W., SHIBATA, K. (1969). Some spectral characteristic of chlorophyll *c* from *Tridacna crocea ooxanthellae*. *Biol. Bull.* **136**: 54–62.
- JEFFREY, S. W., STAUBER, J. L. (1985). Photosynthetic pigments in diatoms. In *Proc. 2nd Int. Phycol. Cong.*, Copenhagen, August 1985, p. 74.
- JEFFREY, S. W., WRIGHT, S. W. (1987). A new spectrally distinct component in preparations of chlorophyll *c* from the micro-alga, *Emilliana huxleyi* (Prymnesiophyceae). *Biochim. Biophys. Acta* **894**: 180–8.
- JEFFREY S.W., MANTOURA R.F.C., WRIGHT S.W. (1997): *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*, Scientific and Cultural Organization, pp. 458–553.
- JENSEN, A. (1966). Carotenoids of Norwegian brown seaweeds and of seaweed meals. *Norw. Inst. Seaweed res. Trondheim Rep. No.* 31.
- JENSEN, A. (1978). Chlorophylls and carotenoids. In *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*, ed. J. A. Hellbust and J. S. Cragie, Cambridge:

- Cambridge University Press, pp. 59–70.
- JOHANSEN, J. E., SVEC, W. A., LIAAEN-JENSEN, S., HAXO, F.T. (1974). Carotenoids of Dinophyceae. *Phytochemistry* **13**: 2261–72.
- KALINA, T., VÁŇA, J. (2005): Šinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii, Nakladatelství Karolinum, ČR, pp. 58–128.
- KANEHISA, M. (2009). Photosynthesis antenna proteins. [Http://www.genome.jp](http://www.genome.jp).
- KARRER, P., FATZER, W., FAVANGER, M., JUCKERU, E. (1943). Die Antheridien-farbstoffe von Chara-Arten (Armlenlergewächse). *Helv. Chim. Acta* **26**: 2121–2.
- KJØSEN, H., LIAAEN-JENSEN (1972). Carotenoids of higher plants. 6. Total synthesis of lycopanthin and lycophyll. *Acta Chem. Scand.* **26**: 4121–9.
- KRINSKY, N. I., WELANKIWAR, S. (1984). Assay of carotenoids. *Methods Enzymol.* **105**: 15562.
- LATASA, M.. (1995). Pigment composition of *Heterocapsa* sp. and *Thalassiosira weissflogii* growing in batch cultures under different irradiances. *Scientia Marina*, **59**: 25–37.
- LEWIN, R. A. (1976). *Oricgkiriogyta* as a orioides bew duvusuib if algae. *Nature* **261**: 697–8.
- LEWIN, R. A. (1977). *Prochloron*: Type genus of the Prochlorophyta. *Phycologia* **16**: 217.
- LEWITUS, A.J., WHITE, D.L., TYMOWSKY, R. G., GEESEY, M.E., HYMEL, S.N., NOBLE, P.A. (2005): Adapting the CHEMTAX Method for Assessing Phytoplankton Taxonomic Composition in Southeastern U.S. Estuaries, *Estuaries* Vol. 28, No. 1, p. 160–172.
- LIAAEN-JENSEN, S. (1977). Algal carotenoids and chemosystematics. in *Marine Natural Products Chemistry: Nato Special Program Panel on Marine Sciences*, pp. 239–59. New York: Plenum Press.
- LOEBLICH, L. A., SMITH, V. E. (1968). Chloroplast pigments of the marine dinoflagellate *gyrodinium replendens*. *Lipids* **3**: 5–13.
- LOOMIS, W. E. (1960). Historical introduction. *Enc. Plant Physiol.* (1st ed. ) **5**(1): 85–114.
- LUBIAN, L. M., ESTABLIER, R. (1982). Comparative study of pigment composition fo some *Nannochloris* strains (Eustigmatophyceae). *Inv. Pesq.* **46**: 379–89.
- MACKEY, M. D., MACKEY, D.J., HIGGINS, H. W. (1996). CHEMTAX – a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, **144**: 265–283.
- MANN, J. E., MYERS, J. (1968). On pigment, growth, and photosynthesis of *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Phycol.* **4**: 349–55.
- MANNING, W. M., STRAIN, H. H. (1943). Chlorophyll *d*, a green pigment in red algae. *J. Biol. Chem.* **151**: 1–19.

- MAŠÍN, M. (2007): Distribution of aerobic anoxygenic phototrophs in temperate freshwater systems. *Environmental Microbiology*, **10**(8), 1988–1996.
- PECHAR, L. (1987). Use of an acetone:methanol mixture for the extraction and spectrophotometric determination of chlorophyll *a* in phytoplankton. *Arch. Hydrobiol.* [Suppl.] **781**: 99–117.
- PENNINGTON, F.C., HAXO, F.T., BORCH, G., LIAAEN-JENSEN, S. (1985). Carotenoids of cryptophyceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **13**: 215–19.
- PERRMENTIER, H. P., SCHMIDT, K. A., KOBAYASHI, M., AKIYAMAMA, M., HAGER-BRAUN, C., NEERKEN, S., MILLER, M., AMESZ, J. (2000). Composition and optical properties of reaction center of core complexes from the green sulphur bacteria *Prosthecochloris aestuarii* and *Chlorobium tepidum*. *Photosynth. Res.* **64**: 27–39.
- PORRA R.J., THOMPSON W.A., KRIEDEMANN P.E. (1989): Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* **975**: 384–349.
- ROWAN, K. S. (1989). *Photosynthetic pigments of algae*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Melbourne, Sydney, pp. 10–156.
- RABINOWITZ, E. I. (1945): *Photosynthesis a Related Process*, Vol. 1. New York: Interscience.
- RICKETTS, T. R. (1966). The carotenoids of the phytoflagellate *Micromonas pusilla*. *Phytochemistry* **5**: 223–9.
- RICKETTS, T. R. (1970). The pigments of the Prasinophyceae and related organisms. *Phytochemistry* **9**: 1835–43.
- SARMENTO, H., DESCY, J-P. (2008). Use of marker pigments and functional groups for assessing the status of phytoplankton assemblages in lakes. *Journal of Applied Phycology* **20**: 1001–1011.
- SCHLÜTER, K.D., KATZER C., FRISCHOPF, K., WENZEL, S., TAIMOR, G., PIPER, H. M. (2000). Expression, release, and biological activity of parathyroid hormone-related peptide from coronary endothelial cells. *Circ. Res.* **86**: 946–951.
- SCHLÜTER, L., LAURIDEN, T. L., KROGH, G., JØRGENSEN, T. (2006). Identification and quantification of phytoplankton groups in lakes using new pigment ratios – a comparison between pigment analysis by HPLC and microscopy. *Freshwater Biology* **51**: 1474–1485.
- SIEFERMANN-HARMS, D. (1987). The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physio. Plant.* **69**: 561–8.
- SOMMER, U., GLIWICZ, Z., M., LAMPERT, W., DUNCAN, A. (1986). PEG-model of Seasonal

- Succession of Planktonic Events in Fresh Waters. *Archives of Hydrobiology*, **106**(4): 433–471.
- SORBY, H. C. (1877). On the characteristic colouring-matter of the red groups of algae. *Bot. J. Linn. Soc.* **15**: 34–40.
- SORBY, H. C. (1873). On comparative vegetable chromatology. *Proc. R. Soc. (Lond.)* **21**: 144–83.
- STILES W. (1925). *Photosynthesis: The Assimilation of Carbon by Green Plants*. London: Longmans.
- STOKES, G. G. (1864). On the supposed identity of biliverdin with chlorophyll, with remarks on the constitution of chlorophyll. *Proc. R. Soc. (Lond.)* **13**: 144–5.
- STRAIN, H. H. (1936). Leaf xanthophylls. *Science* **83**: 241–2.
- STRAIN, H. H. (1938). Leaf xanthophylls. Publ. No. 490 Carnegie Inst. Washington.
- STRAIN, H. H. (1954). Leaf xanthophylls. The action of acids on violaxanthin, violoxanthin, taraxanthin a tereoxanthin. *Arch. Biochem. Biophys.* **48**: 458–68.
- STRAIN, H. H. (1958). *Chloroplast Pigments and Chromatographic Analysis*, 32nd Annual Priestly Lecture. University Park, PA: Penn State University Press.
- STRAIN, H. H. (1965). Chloroplast pigments and the classification of some siphonlean green algae of Australia. *Bio. Bull.* **129**: 366–70.
- STRAIN, H. H. (1966). Fat-soluble chloroplast pigments: Their identification a distribution in various Australian plants. In *Biochemistry of Chloroplasts*, Vol. 1, ed. T.W. Goodwin, pp. 387–406. London: Academic Press.
- STRAIN, H. H. (1969): Some procedures for the chromatography of the chloroplast pigments. *Anal. Biochem.* **24**: 54–69.
- STRAIN, H. H. A SVEC, W. A., WEGFAHRT, P., RAPOPORT, H., HAXO, F.T., NORGARD, S., KJØSEN, H., LIAAEN-JENSEN, S. (1976). Algal carotenoids. XIV. Structural studies on peridinin. Pt. I. Structural elucidation. *Acta Chem. Scand.* **30b**: 109–20.
- SVEC W. A. (1978). The isolation, preparation, characterization a estimation of the chlorophylls a the bacteriochlorophylls. In *The Porphyrins*, Vol. 5: Physical Chemistry, Part C, ed. D. Dolphin, pp. 341–99. New York: Academic Press.
- TSWETT, M. (1906). Physikalisch-chemische Stendem über das Chlorophyll. Die Apsorptionen. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **24**: 316–23.
- VAN HEUKELEM, L., AND THOMAS, C.S. (2001). Computer-assisted high-performance liquid chromatography metod development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *J Chromatography A* **910**: 31–49.

- VESK, M., JEFFREY, S. W. (1987). Ultrastructure and pigments of two strains of the picoplanktonic alga, *Pelagococcus subviridis* (Chrysophyceae). J. Phycol. **23**: 322–36.
- WHITHERS, N. W., HAXO, F. T. (1975). Chlorophyll  $c_1$  and  $c_2$  and extraplastidic carotenoids in the dinoflagellate, *Peridinium foliaceum* Stein. Platan Sci. Lett. **5**: 7–15.
- WRIGHT, S. W., D. P. THOMAS, H. J. MARCHANT, H. W. HIGGINS, M. D. MACKEY, D. J. (1996). Analysis of phytoplankton of the Australian sector of the Southern Ocean: Comparison of microscopy and size frequency data with interpretations of pigment HPLC data using the 'CHEMTAX' matrix factorisation program. Marine Ecology Progress Series **144**: 285–298.
- WRIGHT, S.W., JEFFREY, S.W. (2006). Pigment markers for phytoplankton production, Marine Organic Matter: Biomarkers, isotopes and DNA (J.K.Volkman, ed.), Springer-Verlag, Berlin, ISBN-10-3-540-28401-X, pp. 71–104.
- YOKOHAMA, Y. (1981). Distribution of the green light-absorbing pigments, siphonaxanthin and siphonein in marine green algae. Bot. Mar. **24**: 637–40.
- ZILINSKAS, B. A., GREENWALD, L. S. (1986). Phycobilisome structure and component of the phycobilisome core of *Nostoc* sp. Plant Physiol **70**: 1060–5.

## 7. PŘÍLOHY (1. ČÁST)

**Tab 4.1 Charakteristika odběrových lokalit**

a) Velká Amerika, b) Plešné jezero, c) Čertovo jezero, d) jezera v Německu

a)

<i>Datum odběru</i>	<i>Hloubka</i>	<i>Teplota vody</i>	<i>Čas</i>	<i>Vodivost (25°C)</i>
	<i>m</i>	<i>oC</i>	<i>bod</i>	<i>%</i>
4/2/2008	0	3	12:13	105.4
3/3/2008	0	4.4	12:13	102.4
31/3/2008	1	2.3	14:00	103.3
28/4/2008	0	9	12:07	97.8
12/6/2008	0	16	12:30	117
30/6/2008	0	21	11:45	109.8
21/7/2008	1	18.7	13:00	119
1/9/2008	0	18.4	12:00	116.5
29/9/2008	0	12.8	13:00	89.2
3/11/2008	0	7.5	13:15	90.1
24/11/2008	0	6.1	11:45	93.6

b)

<i>Datum odběru</i>	<i>Hloubka</i>	<i>Teplota vody</i>	<i>pH (laboratoř)</i>	<i>Vodivost (25°C)</i>
	<i>m</i>	<i>oC</i>		<i>μS/cm</i>
5/3/2008	0	0.7	4.35	37.9
26/3/2008	0	0.2	4.38	39.5
16/4/2008	0	0.6	4.5	25.3
6/5/2008	1	5.9	4.69	28.4
26/5/2008	0	12.5	4.80	23.1
18/6/2008	1	13.8	5	18.8
9/7/2008	1	15.8	5.07	17.2
19/8/2008	0	15.3	5.17	18.6
10/9/2008	1	15.5	5.38	17.5
1/10/2008	1	8.2	5.17	20.9
21/10/2008	1	6.8	5.02	22.5
10/11/2008	0	5.6	5.05	22.3
1/12/2008	1	1	5.2	23.3

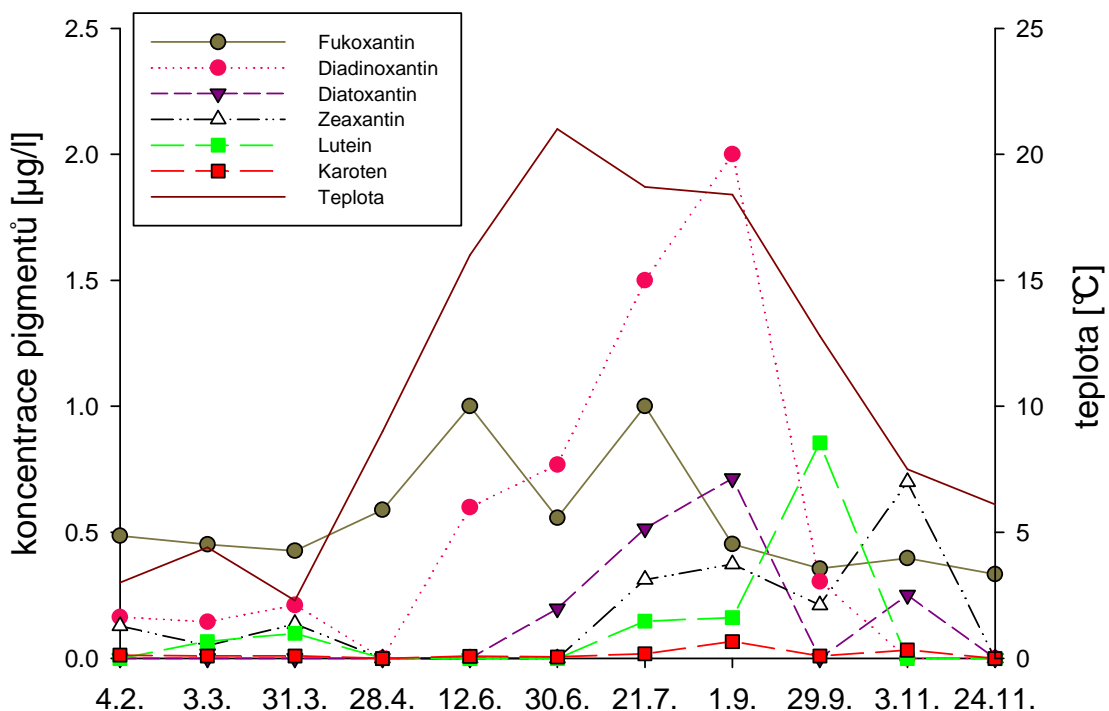
c)

<i>Datum odběru</i>	<i>Hloubka</i>	<i>Teplota vody</i>	<i>pH (laboratoř)</i>	<i>Vodivost (25°C)</i>
	<i>m</i>	<i>oC</i>		<i>μS/cm</i>
25/3/2008	0	0.4	4.28	35.7
14/4/2008	0	1.3	4.33	35.7
5/5/2008	1	6.5	4.60	23.5
28/5/2008	0	18.0	4.52	23.6
16/6/2008	1	14.2	4.54	23.6
7/7/2008	1	18.9	4.57	22.6
18/8/2008	1.0	16.1	4.58	23.4
8/9/2008	0.5	16.2	4.70	21.5
29/9/2008	0.0	9.3	4.69	21.4
1/10/2008	1	8.9	4.62	23.7
12/11/2008	1	6.1	4.67	22.4
3/12/2008	1	1.8	4.74	22.3

d)

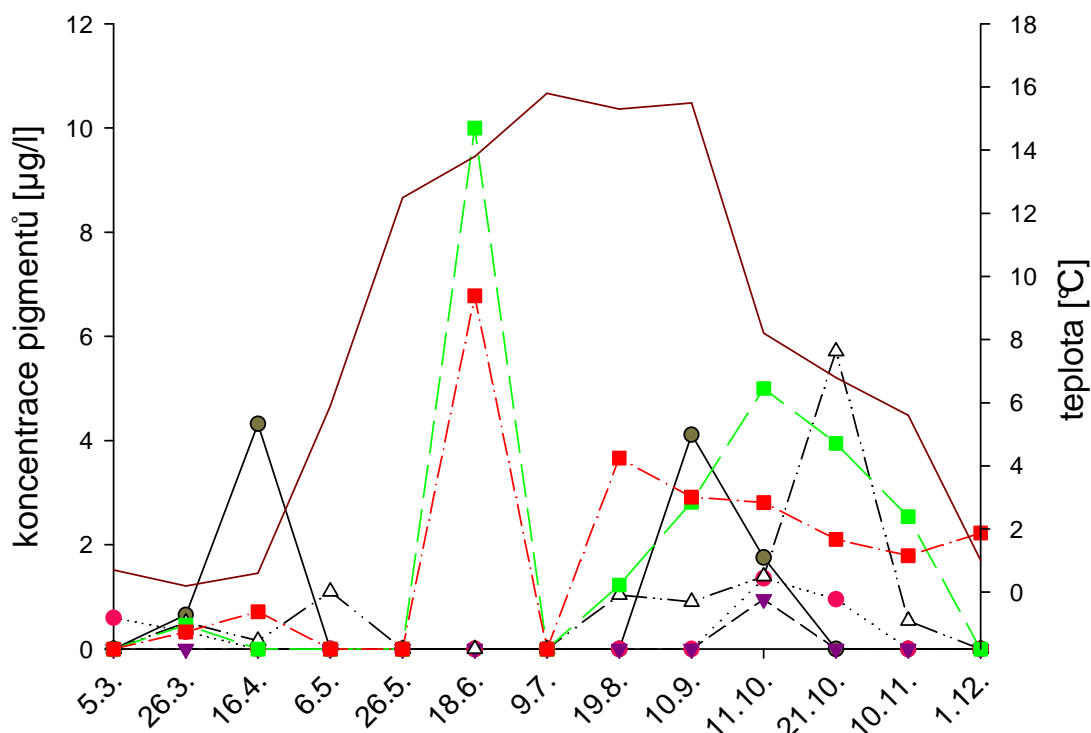
Lokalita	Datum odběru	Hloubka	Teplota vody	Vodivost	Kyslík	pH
		<i>m</i>	<i>oC</i>	$\mu\text{s/cm}$	%	
Dollgow	11/6/2008	0	22.8	568	128.3	8.34
Wittwe	13/6/2008	0.5	21.8	229	118.8	8.72
Roofen	13/6/2008	1	22.2	381	114.8	8.45
Grosse Fuchskuhle NE	13/6/2008	0	22.7	30	162	6.55
Grosse Fuchskuhle NW	13/6/2008	0	22.5	30	166	6.14
Grosse Fuchskuhle SE	13/6/2008	0	21.6	30	189	6
Grosse Fuchskuhle SW	13/6/2008	0	21.4	52	90	4.5
Nehmitz	11/6/2008	0	21.7	284	111.9	8.4
Nehmitz Süd	11/6/2008	0	21.9	260	117.5	8.48
Stechlin	11/6/2008	0	20.4	297	112.7	8.7
Dagow	11/6/2008	0	21.9	405	112.5	8.39
Haus	12/6/2008	0	20.2	333	111	8.64
Breiter Luzin	12/6/2008	0	19.4	372	112	8.56
Schmaler Luzin	12/6/2008	0	8.56	367	109.2	19.9
Carwitzer	12/6/2008	0	19.9	367	116.5	8.75
Stolp	13/6/2008	0	19.8	477	102.9	8.6
Petsch	16/6/2008	0	19.4	181.3	117	9
Tiefwaren	16/6/2008	0	18.8	605	110	8.62

Používané zkratky v textu: Grosse Fuchskuhle = Fuku, Nehmitz Sü = Nezhmitz Süd, Breiter Luzin = BLuzin, Schmaler Luzin = SLuzin.



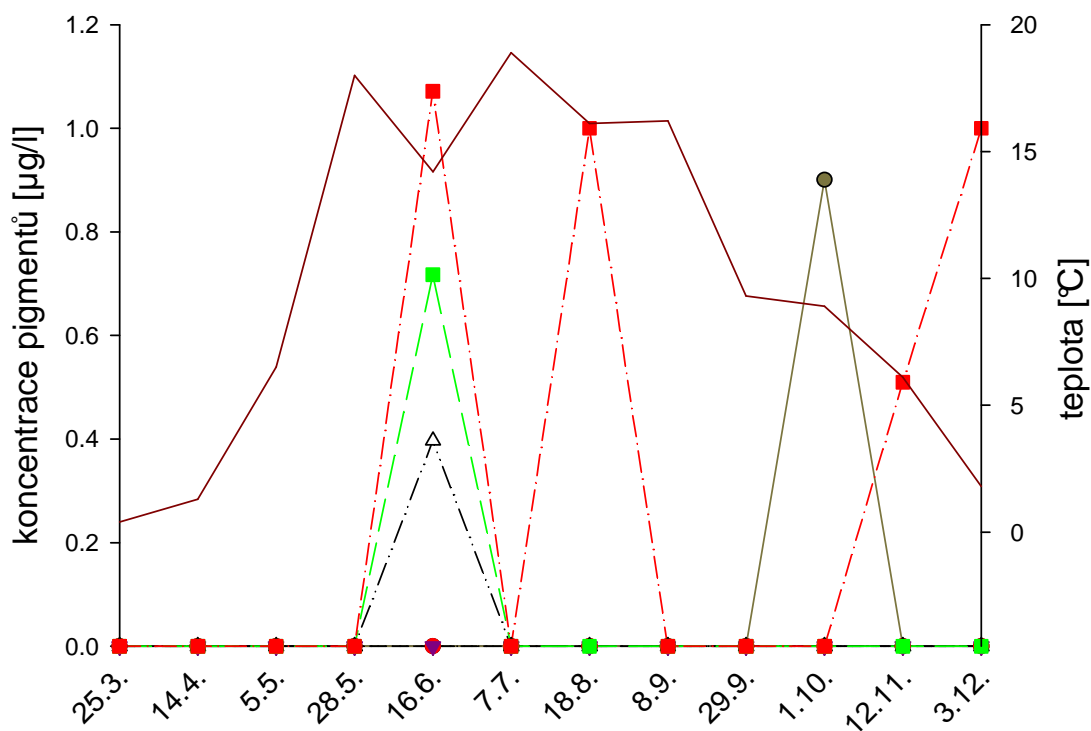
**Obr 4.11a Změny v koncentraci karotenoidů na lokalitě Velká Amerika v roce 2008**

V průběhu celého roku je zaznamenána koncentrace fukoxantinu; nejvíce v červnu a červenci. Značnou diverzitu pigmentů pozorujeme při podzimní stratifikaci – diadinoxantin a diatoxantin (Dinophyta), zeaxantin (Cyanopyta), lutein (Chlorophyta) a karoten.



**Obr 4.11b Změny v koncentraci karotenoidů na lokalitě Plešné jezero v roce 2008**

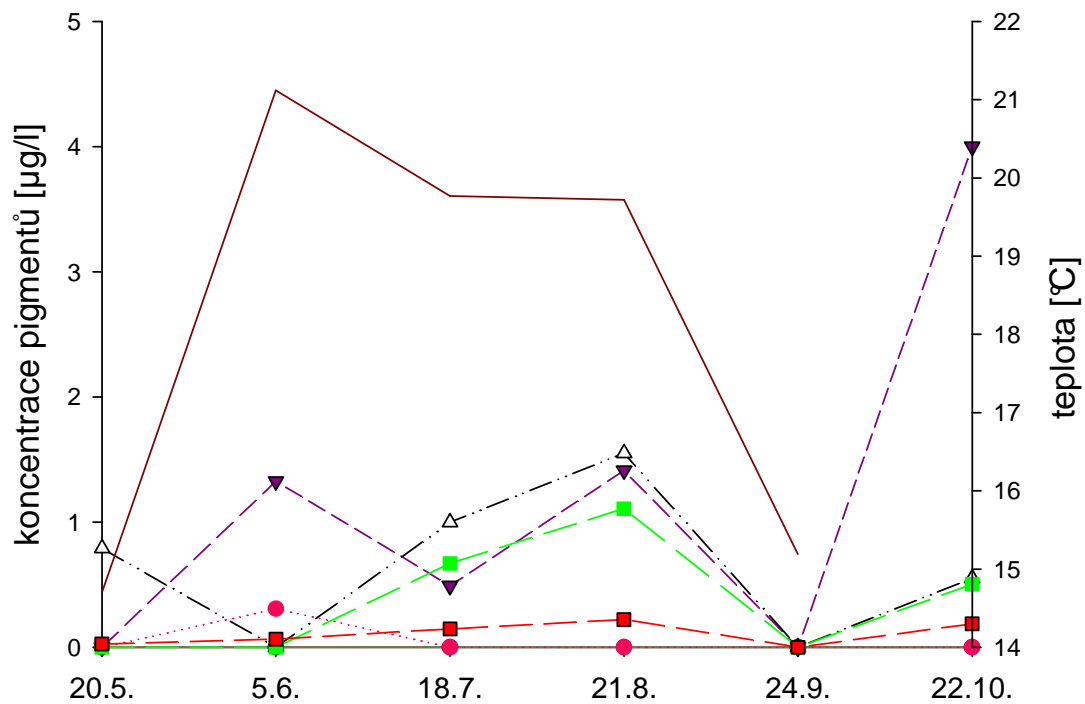
V jarních měsících převládá fucoxantin (*Chrysophyceae*, centrické rozsivky). V červnu výrazně narůstá koncentrace luteinu a karoten, což predikuje výskyt *Chlorophyta*. Od srpna do října se pigmenty rozrůžňují (diadinoxantin, diatoxantin – *Dinophyta*; fucoxantin – *Bacillariophyceae*; lutein – *Chlorophyta*; zeaxantin – *Cyanophyta*).



**Obr 4.11c Změny v koncentraci karotenoidů na lokalitě Čertovo jezero v roce 2008**

Na této oligotrofní lokalitě je nejmenší variabilita pigmentů. V červnu narůstá koncentrace karotenu, luteinu a zeaxantinu (*Chlorophyta*, *Cyanophyta*). Na podzim se objevuje fucoxantin (*Bacillariophyceae*).





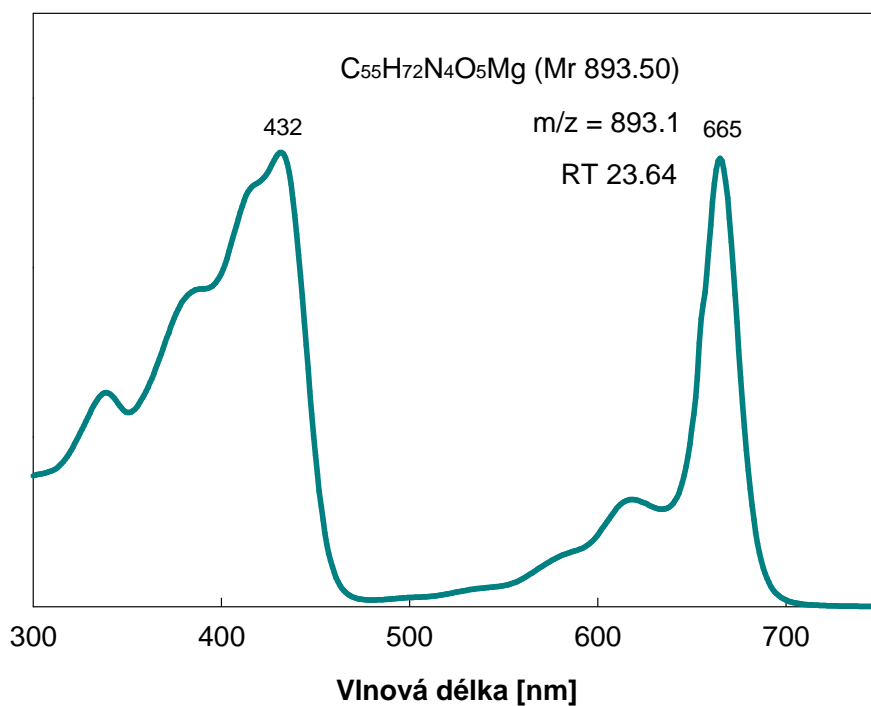
**Obr 4.11d Změny v koncentraci karotenoidů na lokalitě Římov v roce 2008**

Tato lokalita byla sledována v období od května do října 2008. Od června narůstá koncentrace zeaxantinu, diatoxantinu, luteinu a  $\beta$ -karotenu. Maxima dosahují v srpnu.

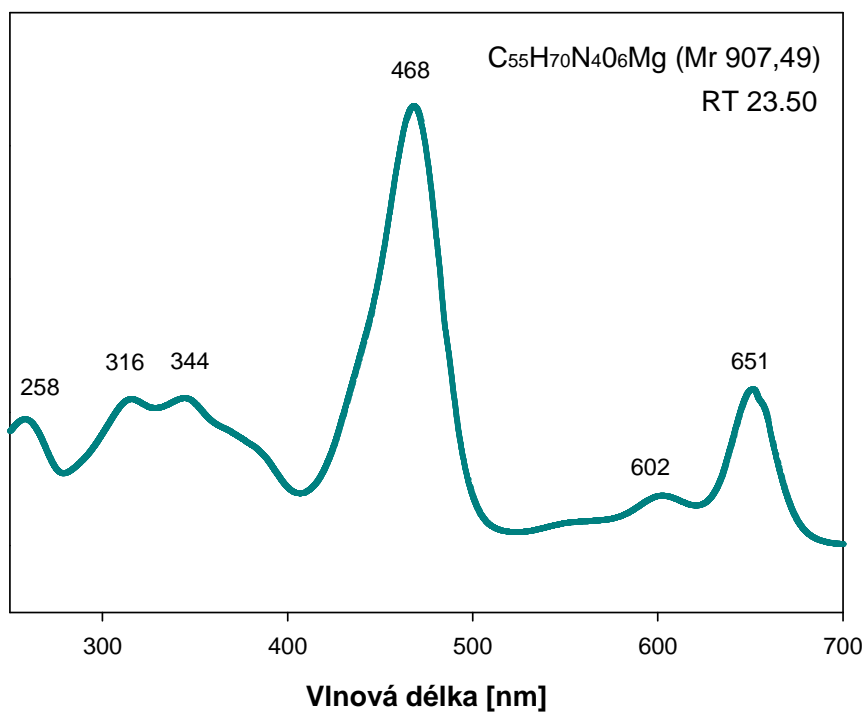
## 7. PŘÍLOHY (2. ČÁST)

Přehled absorpčních spekter pigmentů vyskytujících se u sladkovodních fotosyntetických mikroorganismů. Pigmenty jsou charakterizovány max. absorbancí, relativní molekulovou hmotností (Mr) a retenčním časem (RT), tj. časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce látky detektorem.

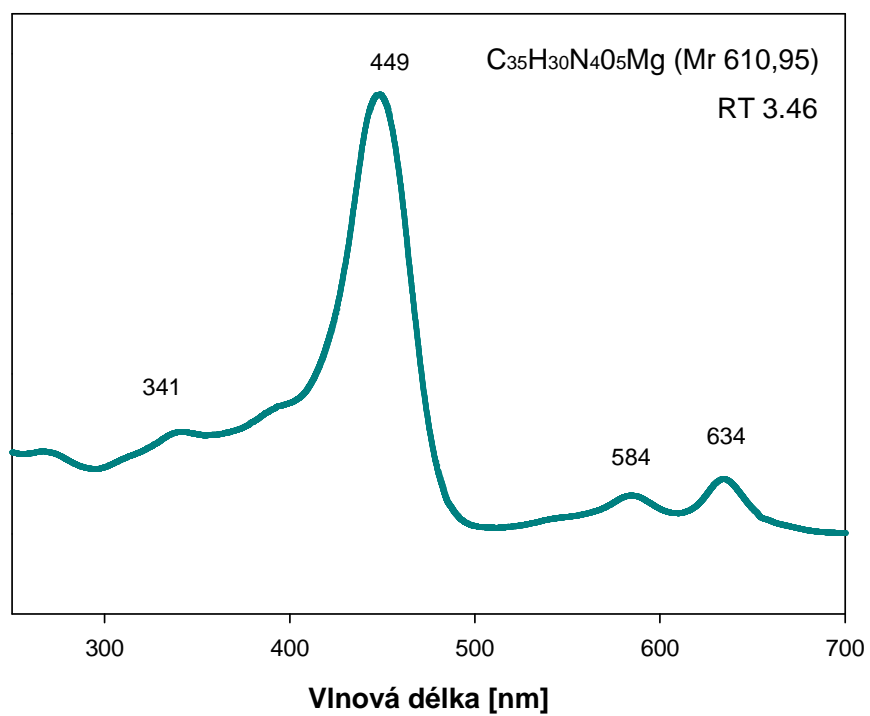
### Chlorofyl a



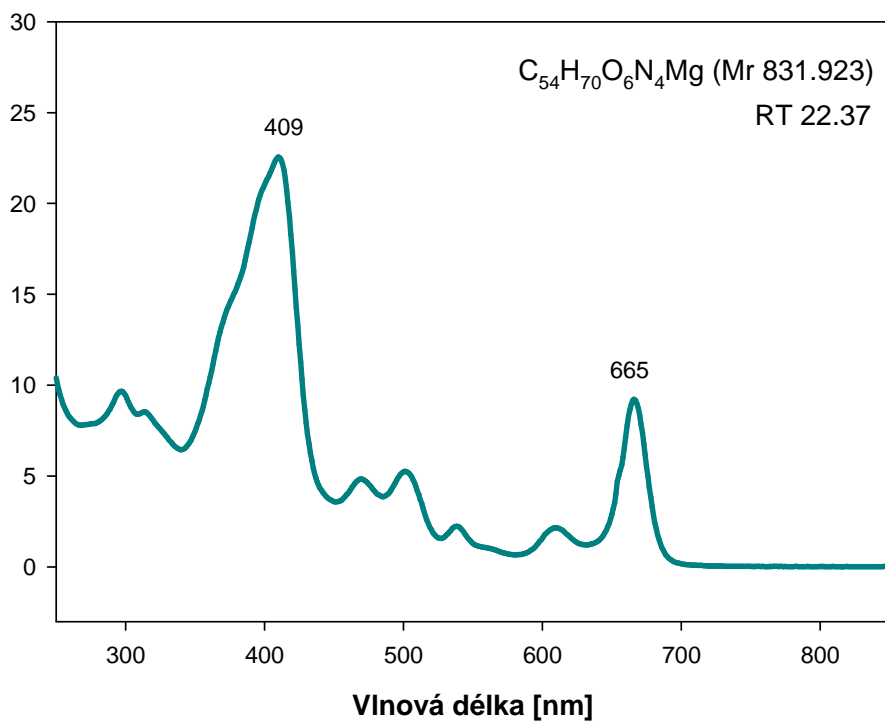
## Chlorofyl *b*



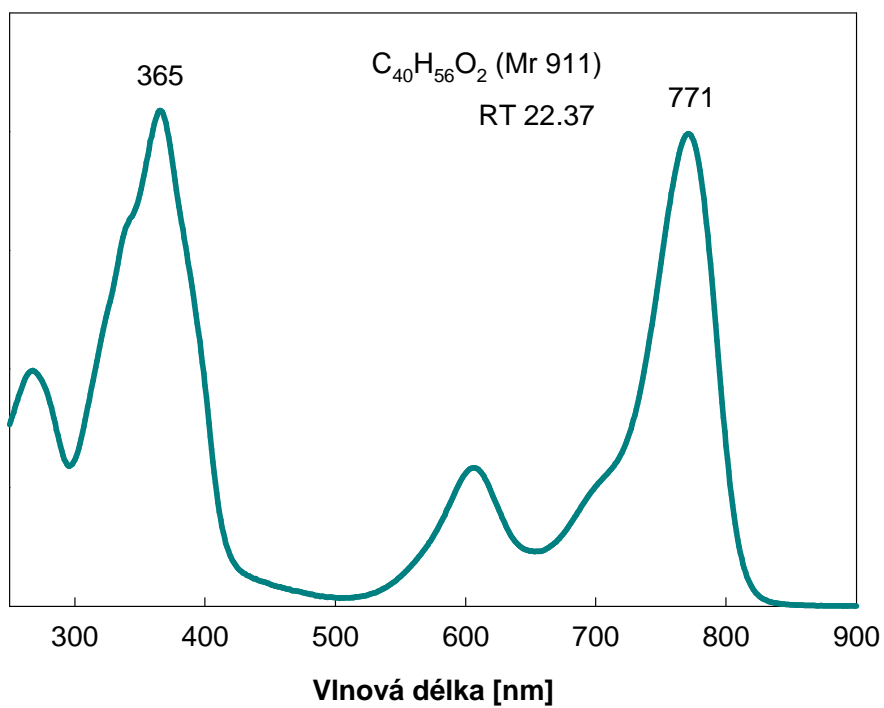
## Chlorofyl *c*<sub>1</sub>



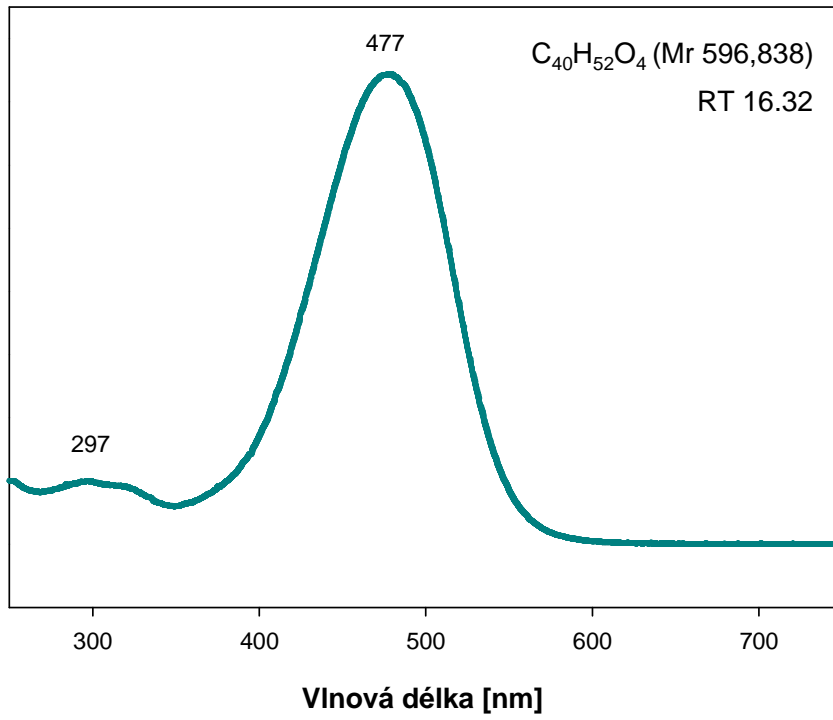
## Chlorofyl d



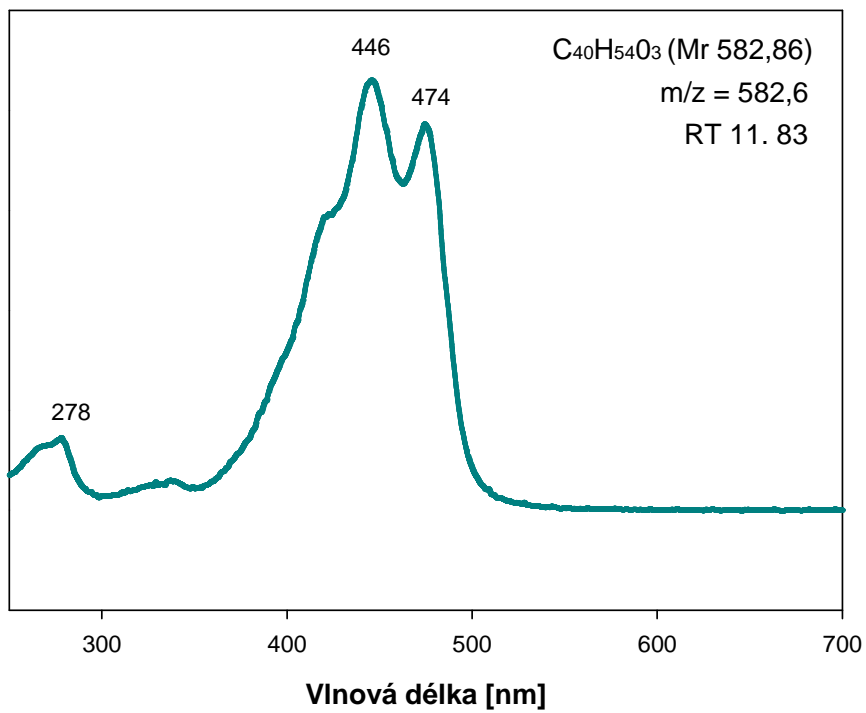
## Bacteriochlorofyl a



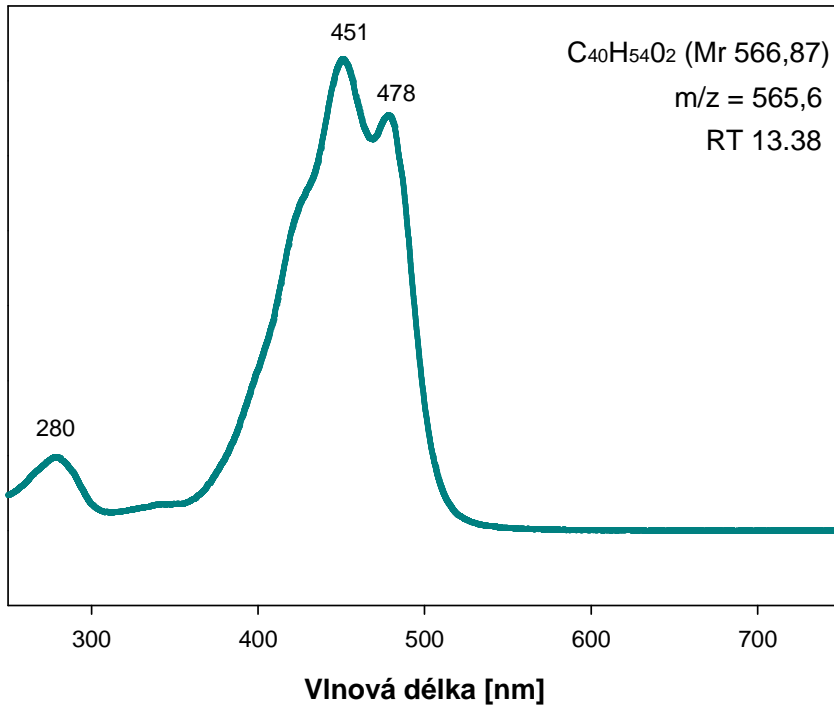
## Astaxantin



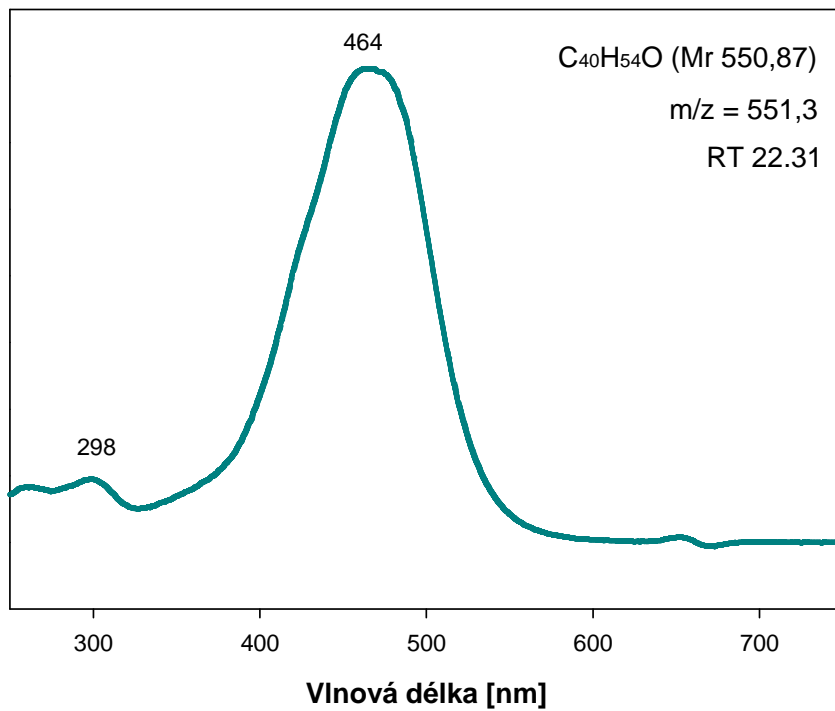
## Diadinoxantin



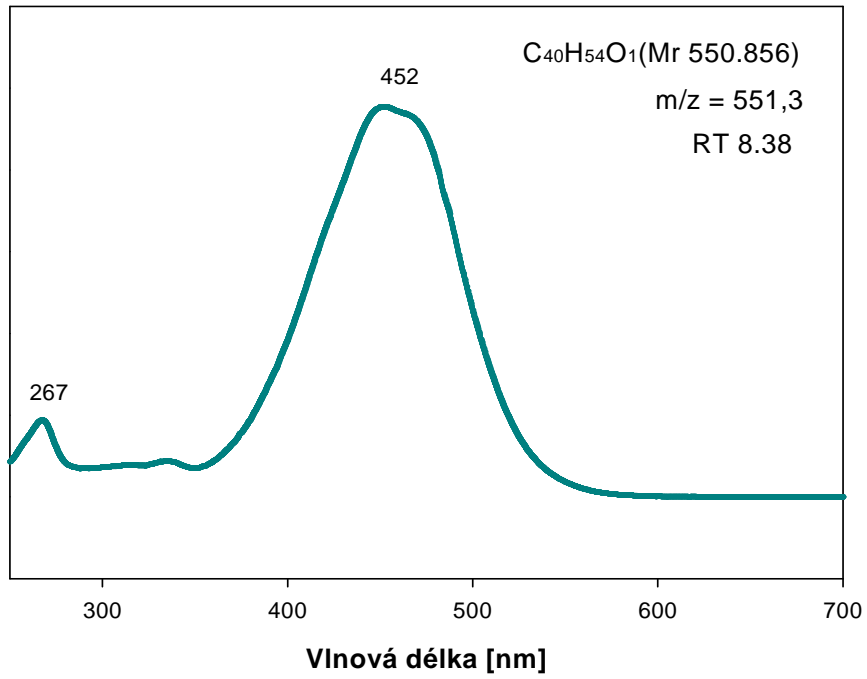
## Diatoxantin



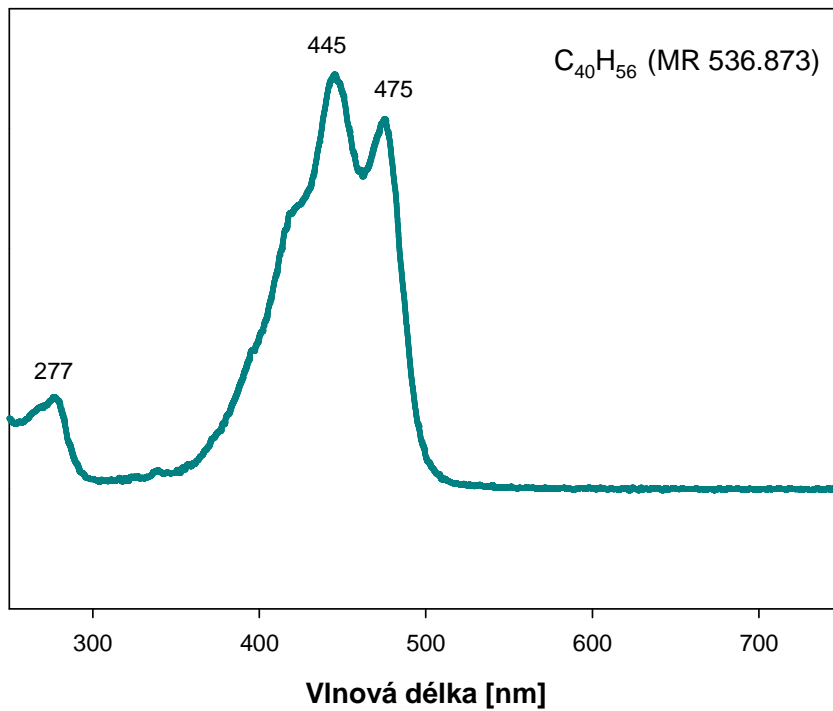
## Echinenon



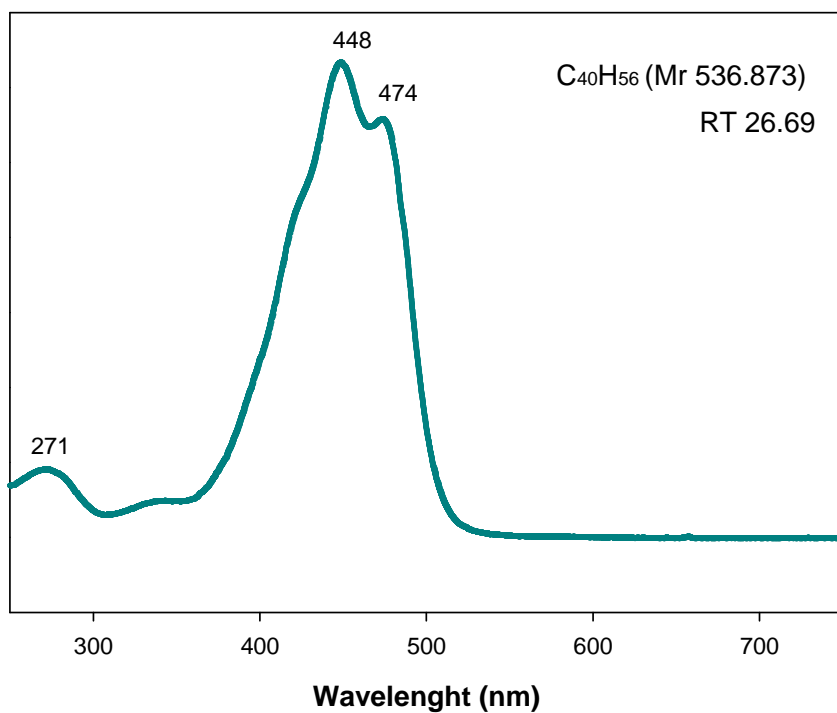
## Fukoxantin



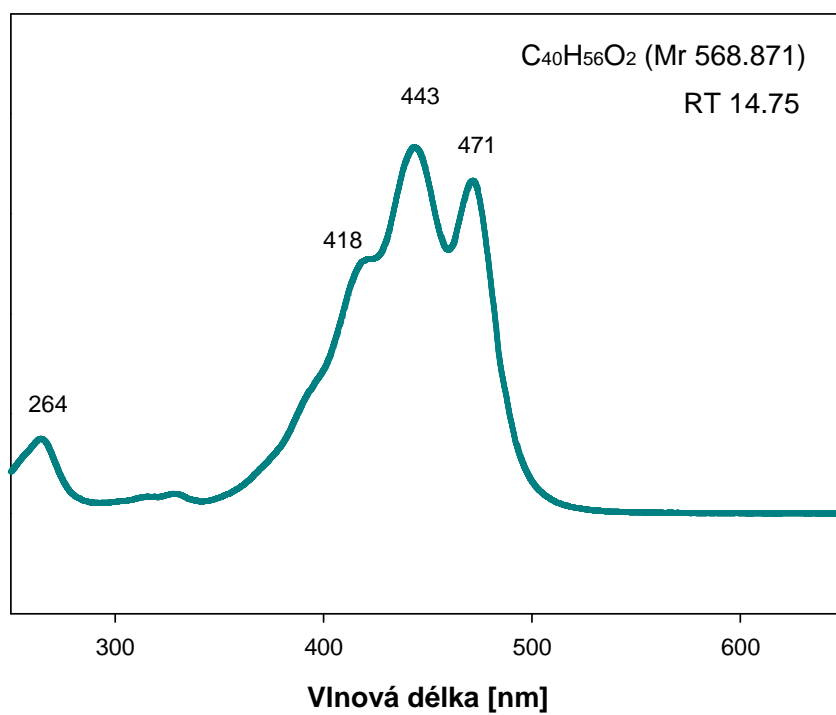
## Alfa - karoten



## Beta - karoten

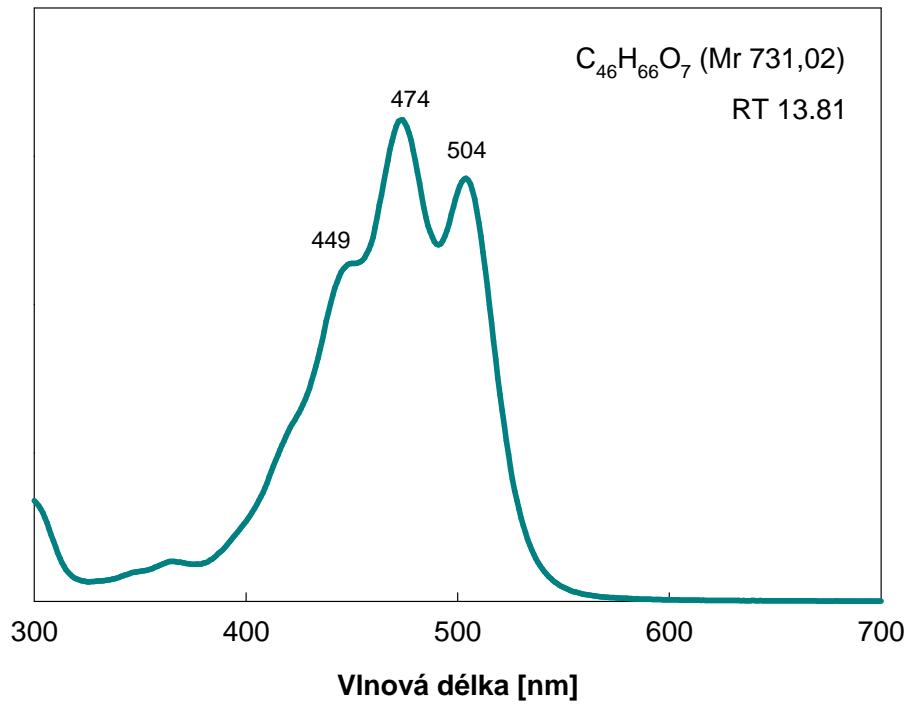


## Lutein

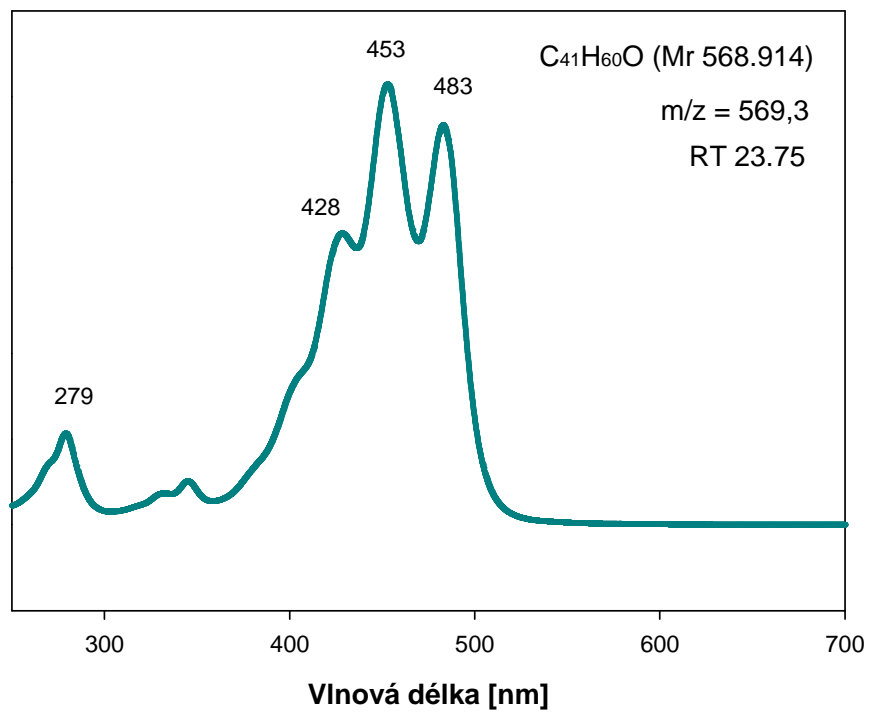




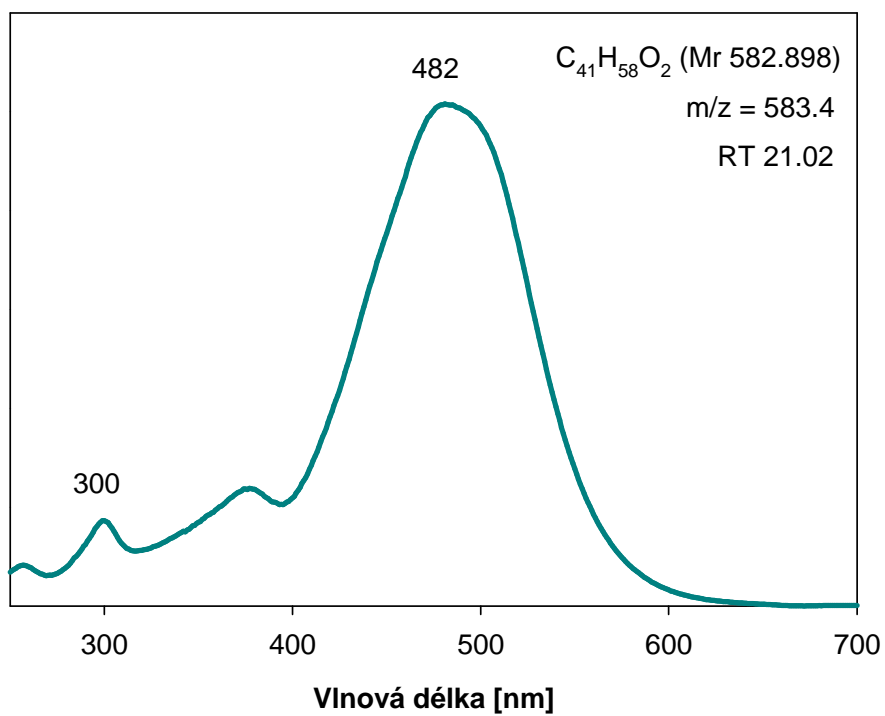
## Myxoxantofyl



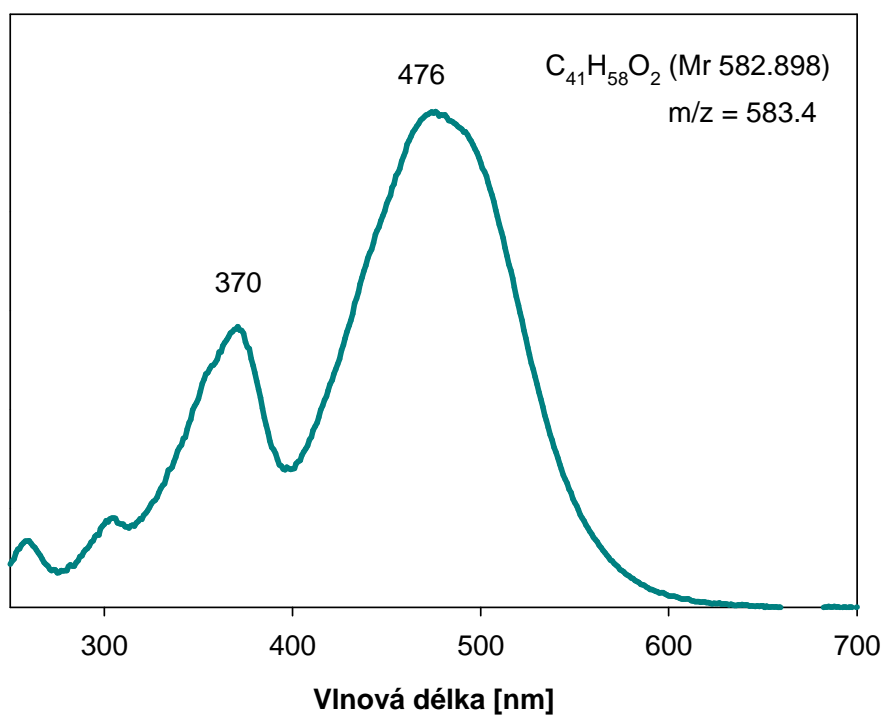
## Sferoiden



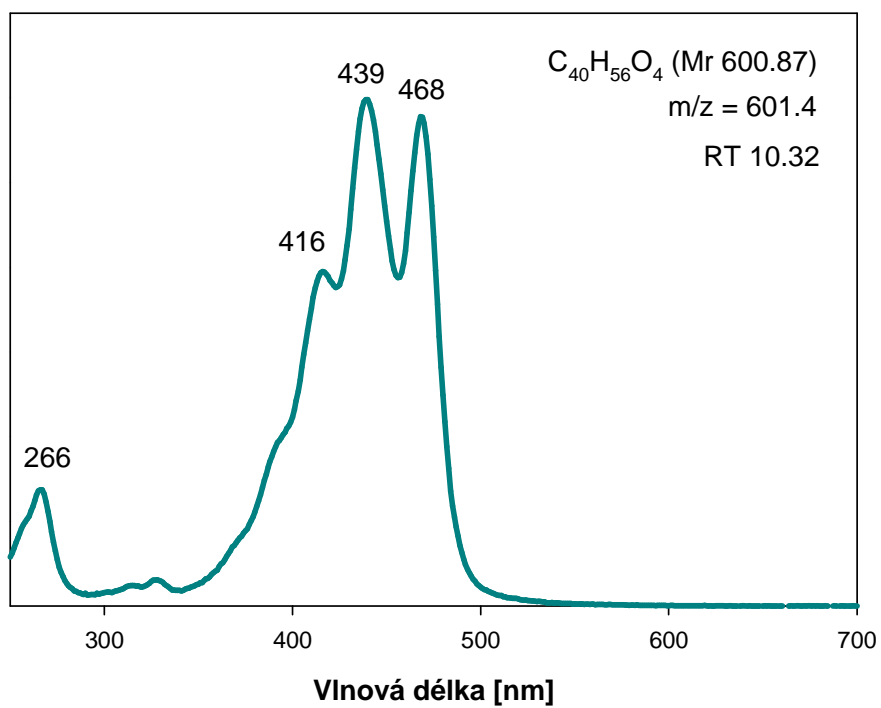
## Sferoidenon



## Cis - sferoidenon



## Violaxantin



## Zeaxantin

