



Fluorescence vs. mikroskopický rozbor

Jakub Gregor

26.1.2007

[Kvantifikace řas a sinic]

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

[Kvantifikace řas a sinic]

Stanovení biomasy

- Mikroskopie
- Analýza obrazu
- Flowcytometrie

Výstupy:

- Počty buněk
- Biomasa (V, m)

Stanovení pigmentů

- Spektrofotometrie
- Fluorometrie
- Chromatografie

Výstupy:

- Množství pigmentů

[Kvantifikace řas a sinic]

- Přesnost metody vs. náročnost
- Hledání kompromisů a vzájemně se doplňujících metod

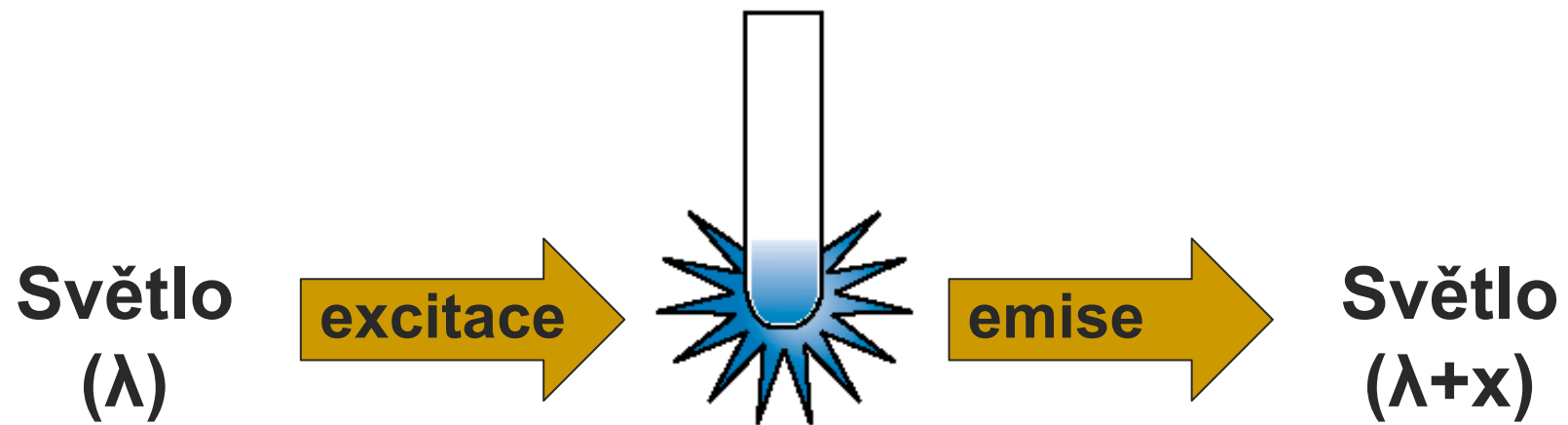


[Kvantifikace řas a sinic]

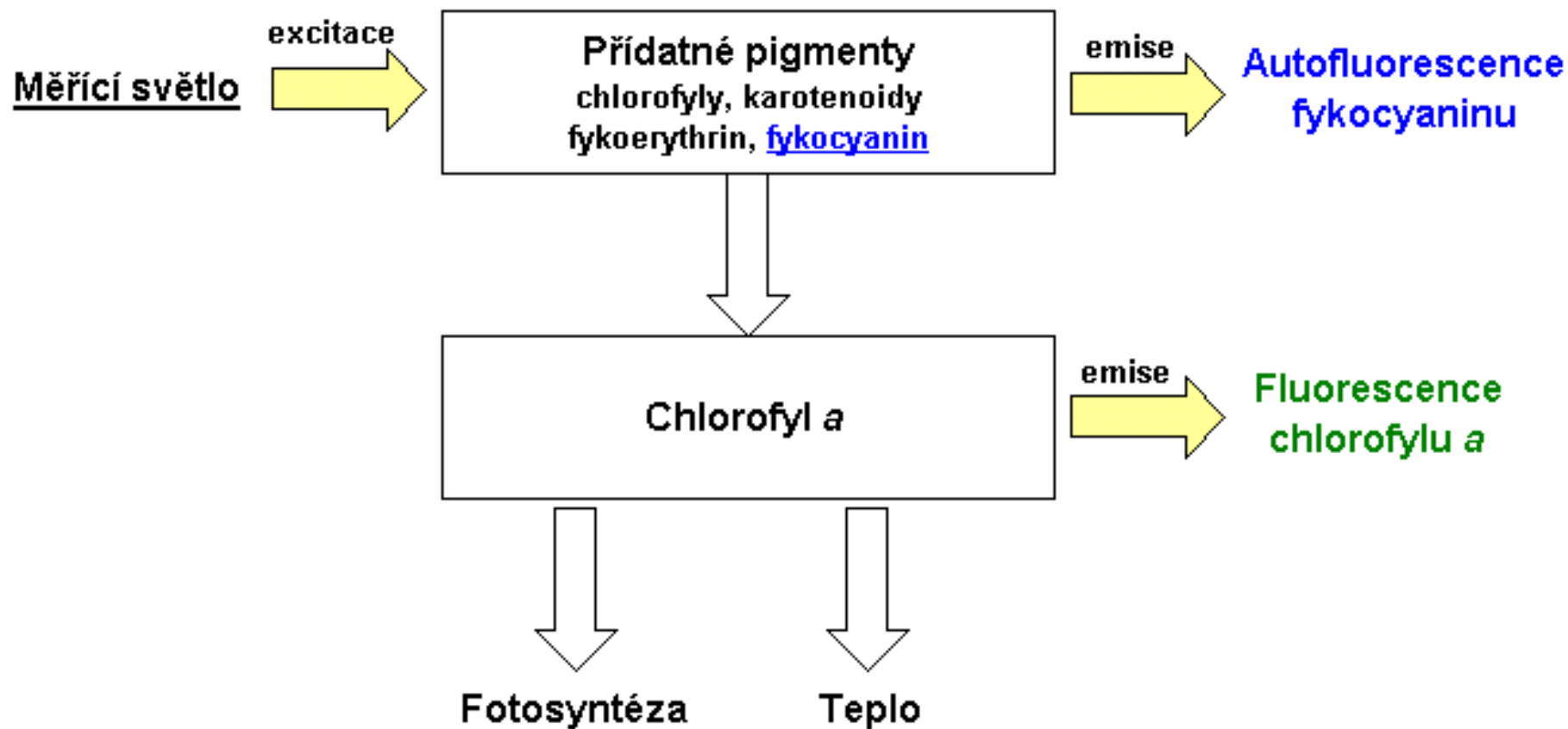
- Monitoring – velké množství vzorků
- Použití in situ metod pro detekci změn ve společenstvu – výběr vzorků pro mikroskopické analýzy



[Fluorescence]



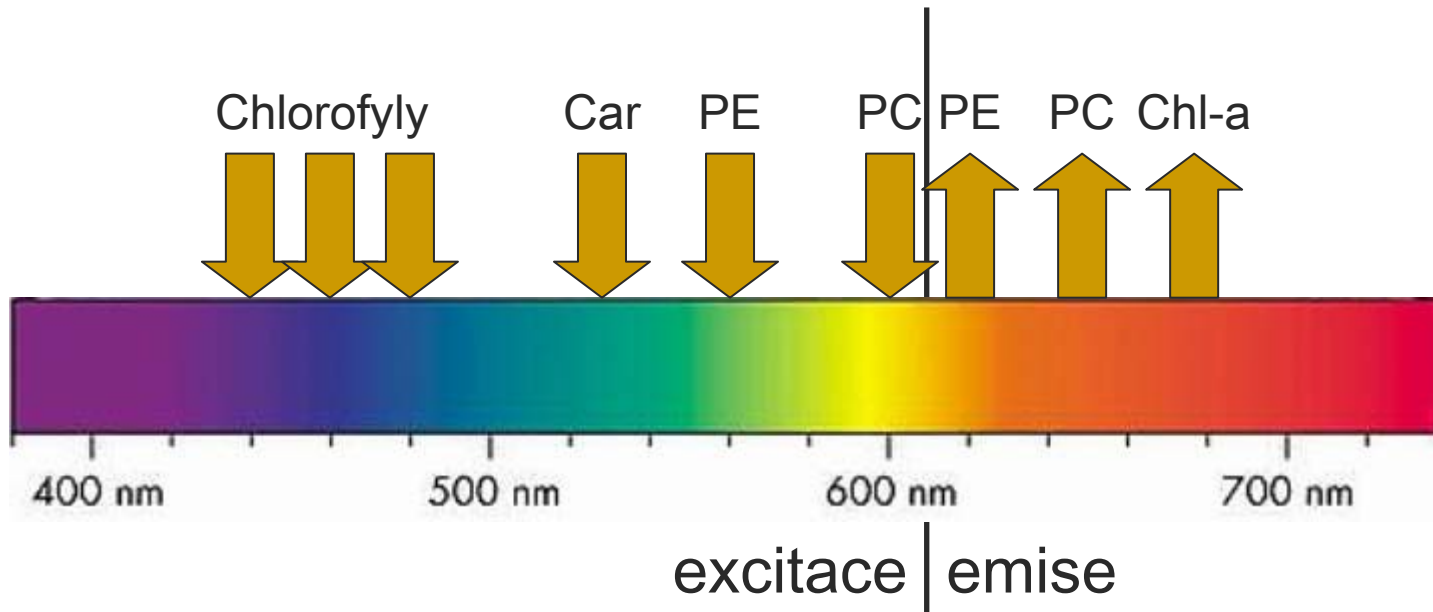
[Fluorescence]



[Fluorescence]

<i>Oddělení</i>	<i>Pigmenty</i>	<i>Excitace (nm)</i>	<i>Emise (nm)</i>
Chlorophyta	Chlorofyl-b	480	685*
Chromophyta Dinophyta	Chlorofyl-c Karotenoidy	460 525	685*
Cyanobacteria	Fykocyanin	610	650 685*
Cryptophyta	Fykoerythrin Chlorofyl-c	550 460	620 685*

[Fluorescence]



[Fluorescence]

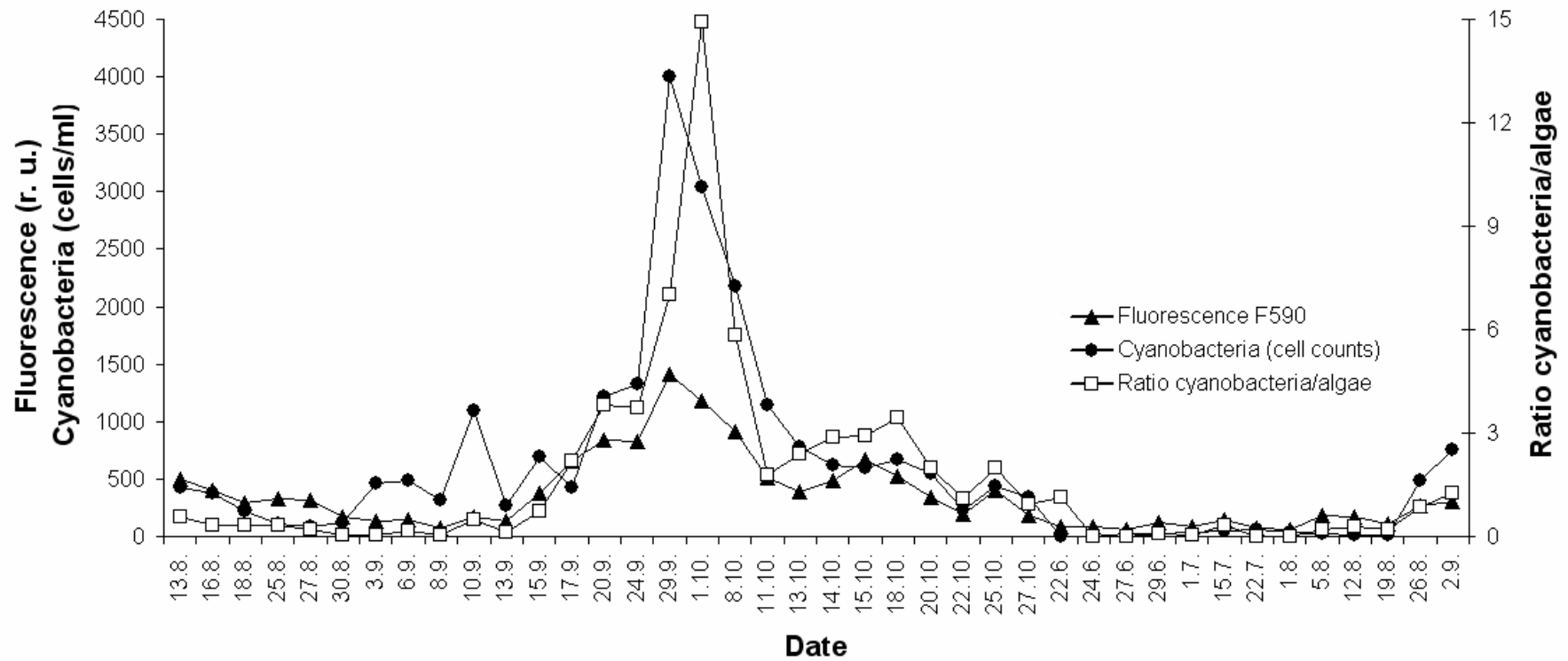
- Možnost rozlišení a kvantifikace hlavních spektrálních skupin
- Stanovení pigmentů (Chl-a, PC, PE)

Rozlišení sinic od řas

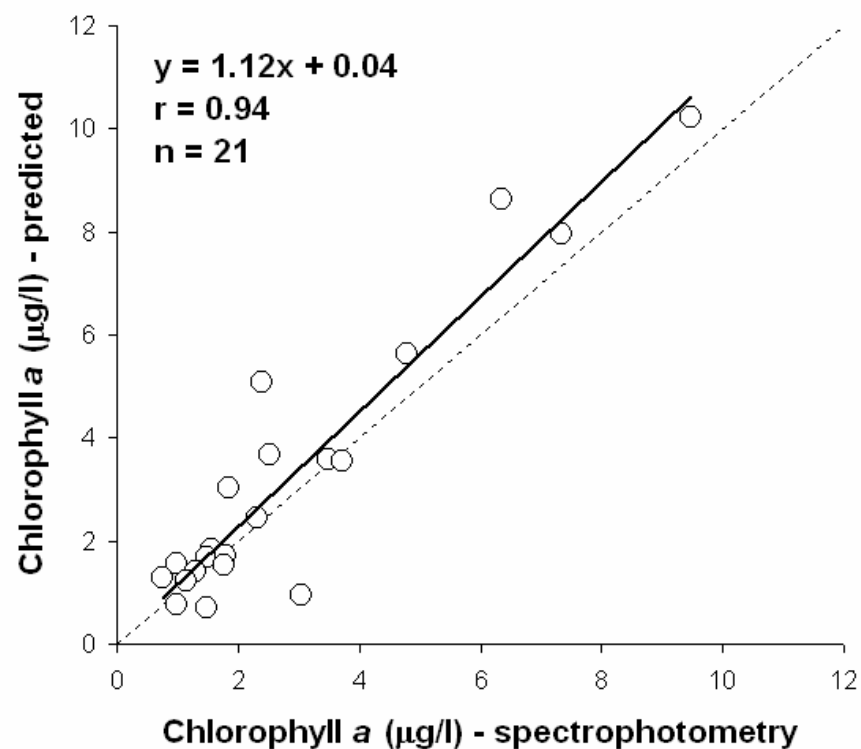
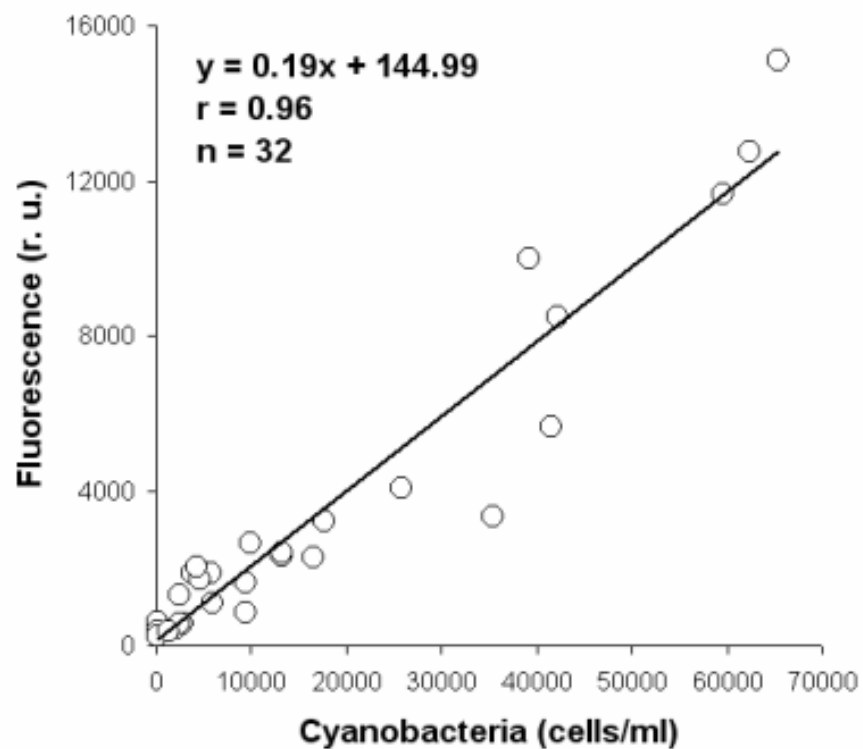
- Sinice:
 - excitace 600 nm, emise 650-685 nm
- Řasy:
 - excitace 450-500 nm, emise 685 nm
- Aplikace: vodárny, hygiena, biotesty
- Stačí běžný fluorometr, existují i ponorné sondy

Gregor J., Maršálek B., Šípková H. (2007) Detection and estimation of potentially toxic cyanobacteria in raw water at the drinking water treatment plant by *in vivo* fluorescence method. Water Research 41(1), 228-234.

[ÚV Švařec]



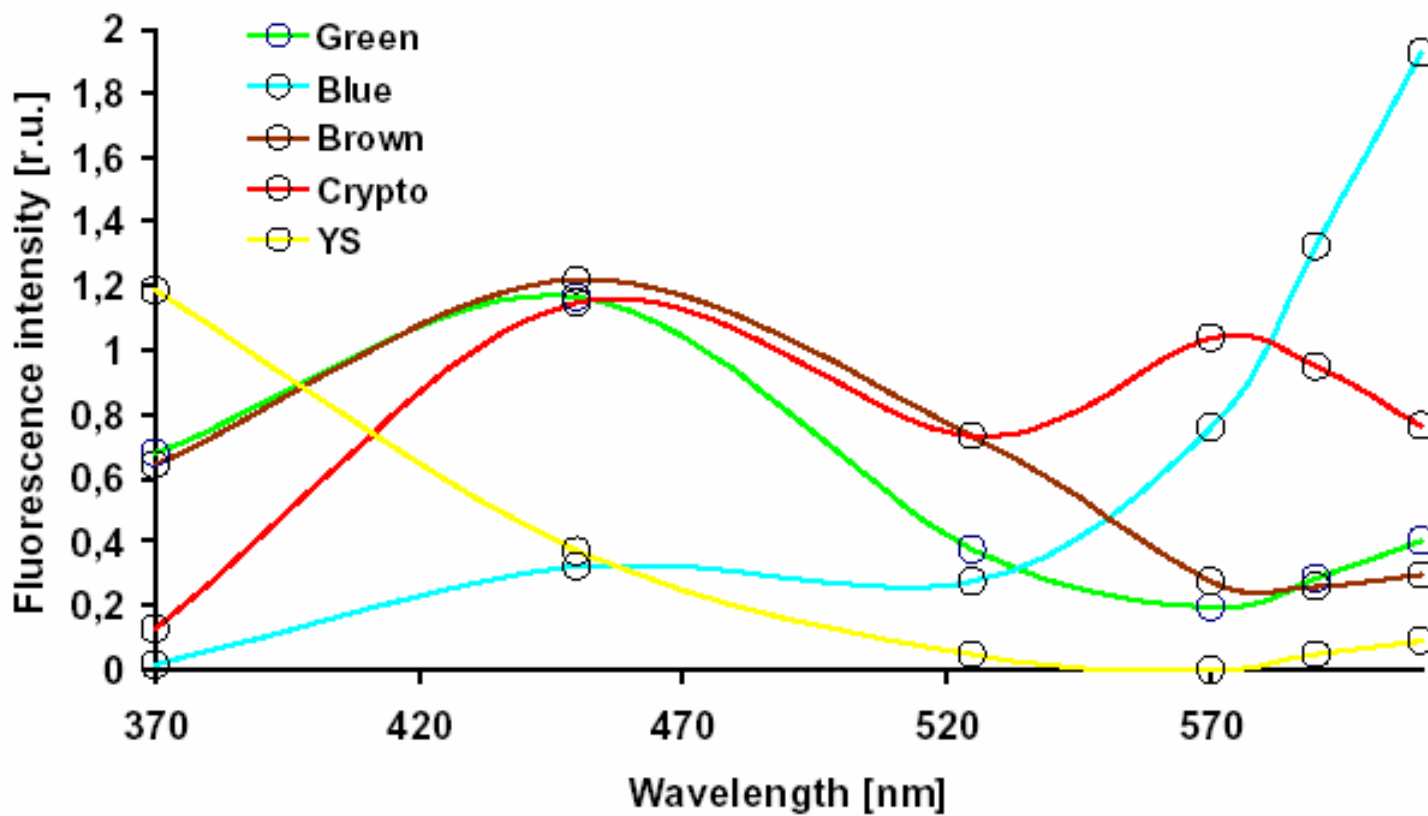
[ÚV Švařec]



[Rozlišení spektrálních skupin]

<i>Oddělení</i>	<i>Pigmenty</i>	<i>Skupina</i>
Chlorophyta	Chlorofyl-b	zelená
Chromophyta, Dinophyta	Chlorofyl-c, Karotenoidy	hnědá
„Modré“ sinice	Fykocyanin	modrá
„Červené“ sinice	Fykoerythrin	červená
Cryptophyta	Fykoerythrin, Chlorofyl-c	smíšená

[Excitační spektra]



[FluoroProbe]



- 6 LEDs
- 4 skupiny fytoplanktonu + korekce na YS
- Kvantifikace v ug/l chl-a

[FluoroProbe]

Hubenov 7.7.03.FLP

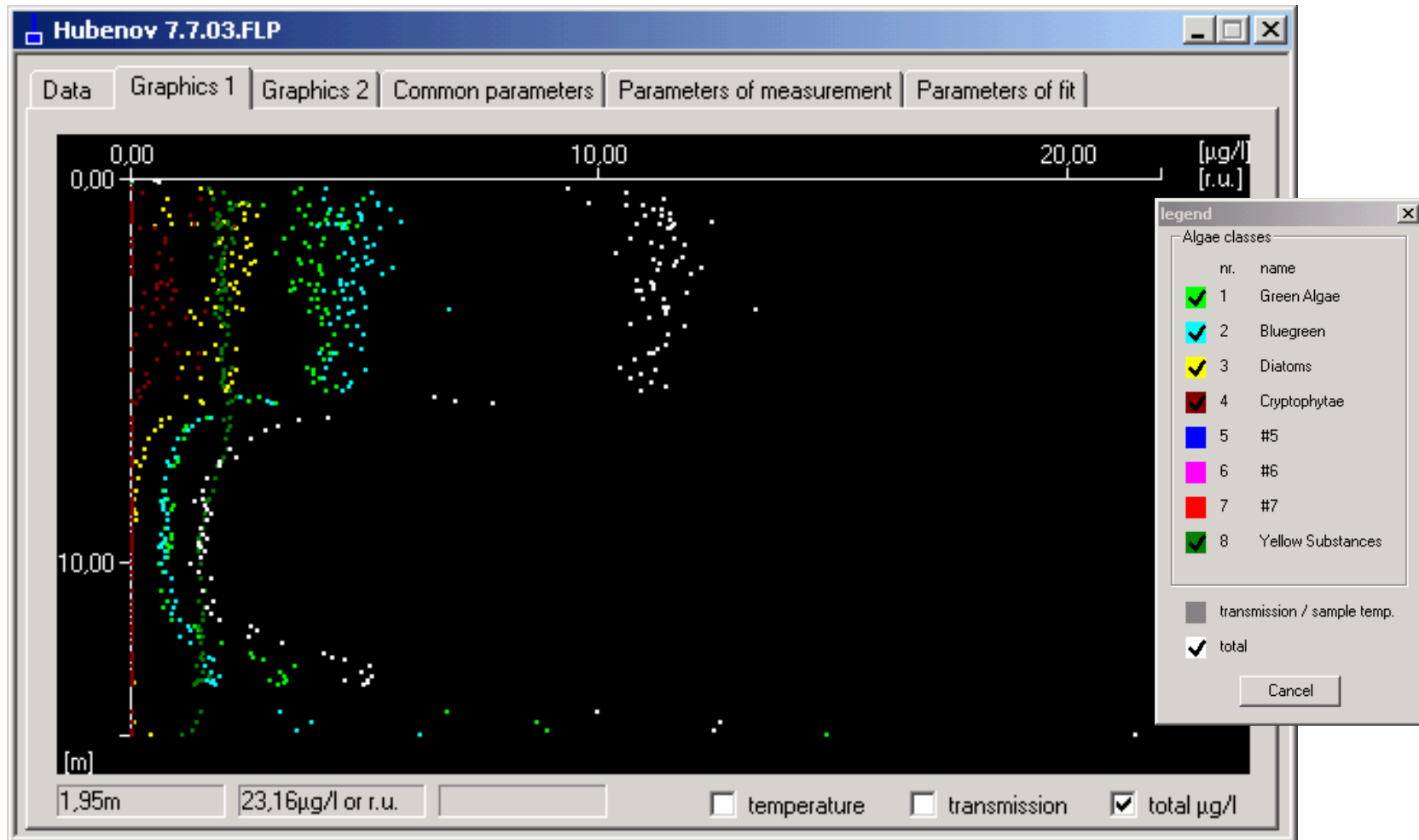
Data | Graphics 1 | Graphics 2 | Common parameters | Parameters of measurement | Parameters of fit

time	depth [m]	temp. [°C]	algae [µg/l] / YS [r.u.]					total [µg/l]	transm. [%]	int. temp.	
			Green.	Bluegr.	Diatom.	Crypto.	Yellow.			[°C]	[°C]
07:50:49	4,89	19,7	3,75	4,17	1,09	1,44	2,18	10,44	47,74	24,4	23,4
07:50:52	4,97	19,7	3,91	5,02	2,26	0,00	1,96	11,18	47,94	24,5	23,4
07:50:54	5,08	19,8	3,90	4,54	2,10	0,33	1,97	10,87	47,99	24,5	23,5
07:50:57	5,18	19,8	4,03	4,12	1,50	1,02	1,98	10,67	47,91	24,5	23,5
07:50:59	5,27	19,7	3,89	4,70	2,18	0,36	1,92	11,13	47,89	24,5	23,5
07:51:01	5,39	19,7	4,38	4,65	2,07	0,30	1,98	11,40	48,11	24,5	23,5
07:51:04	5,51	19,7	4,17	4,54	2,01	0,16	2,14	10,88	48,06	24,5	23,5
07:51:06	5,68	19,7	2,76	2,35	1,18	0,20	2,24	6,48	48,02	24,5	23,5
07:51:08	5,77	19,5	2,52	2,93	1,47	0,00	2,17	6,92	48,18	24,5	23,5
07:51:11	5,83	19,4	3,07	3,01	1,55	0,11	2,06	7,75	47,98	24,5	23,5
07:51:16	6,20	18,4	1,62	1,73	0,82	0,01	2,13	4,19	49,02	24,5	23,5
07:51:19	6,27	17,8	1,43	1,47	0,64	0,02	1,98	3,57	49,19	24,5	23,5

results: (raw data) (processed data)

First Minus 12 Prev Next Plus 12 Last Fullscreen

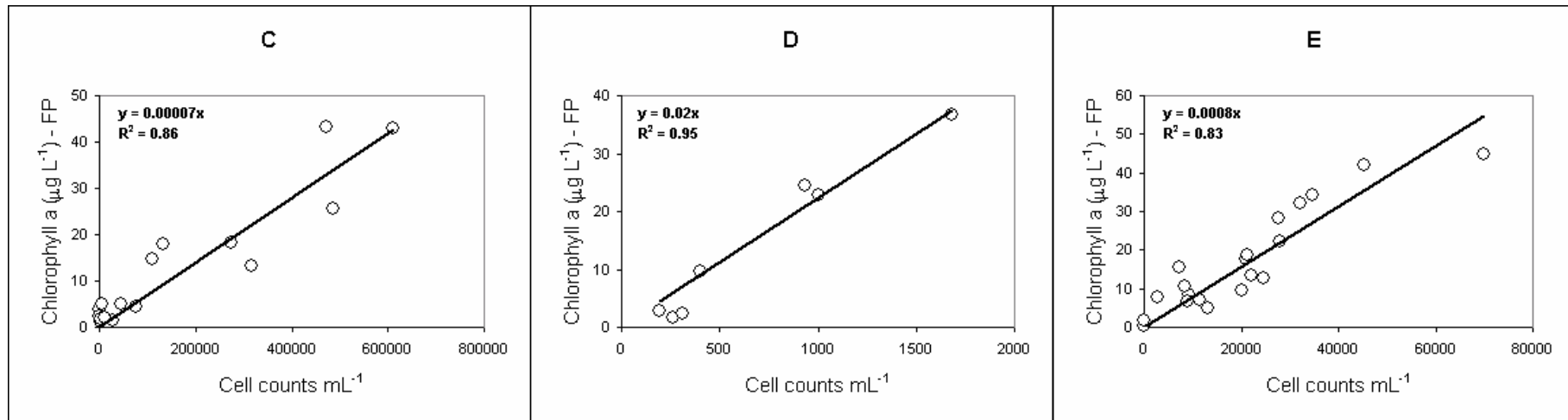
[FluoroProbe]



[FluoroProbe x počty buněk]

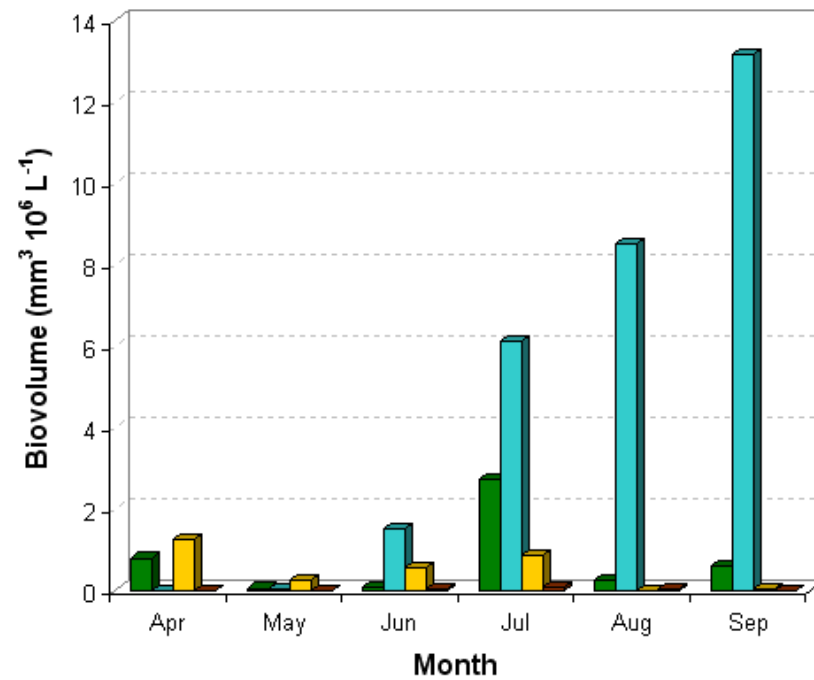
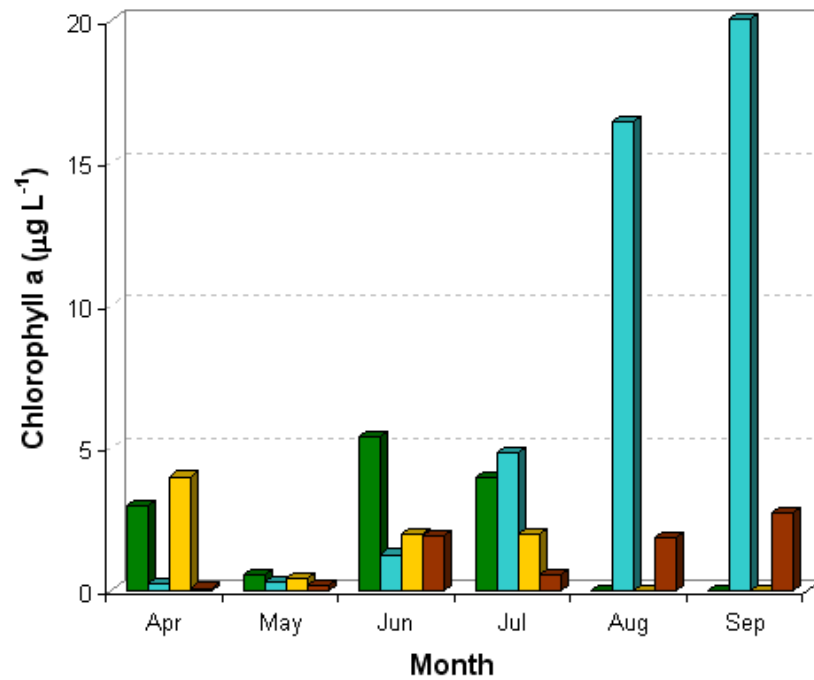
- Lze srovnávat pouze při dominanci 1 nebo více podobných druhů v rámci 1 spektrální skupiny

[FluoroProbe x počty buněk]

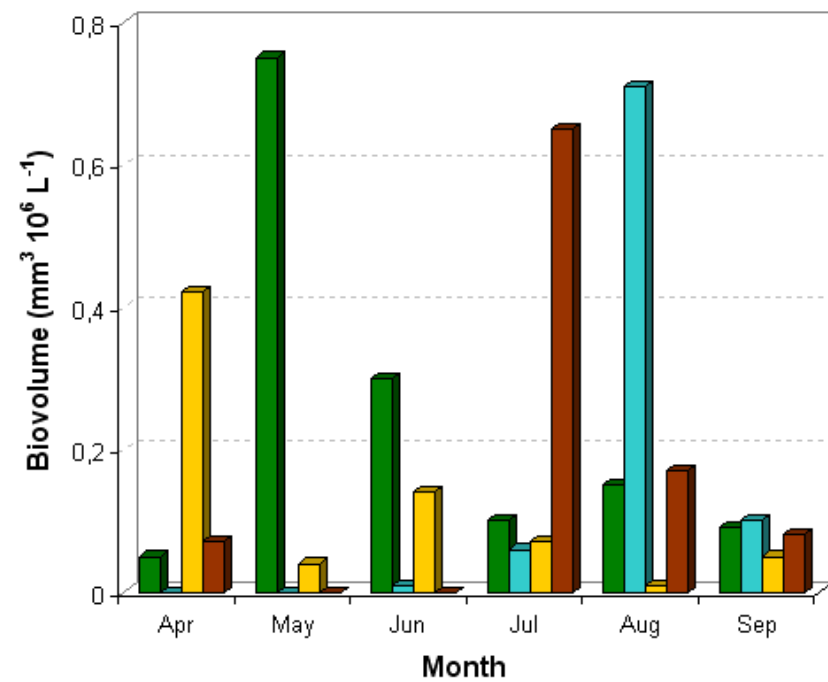
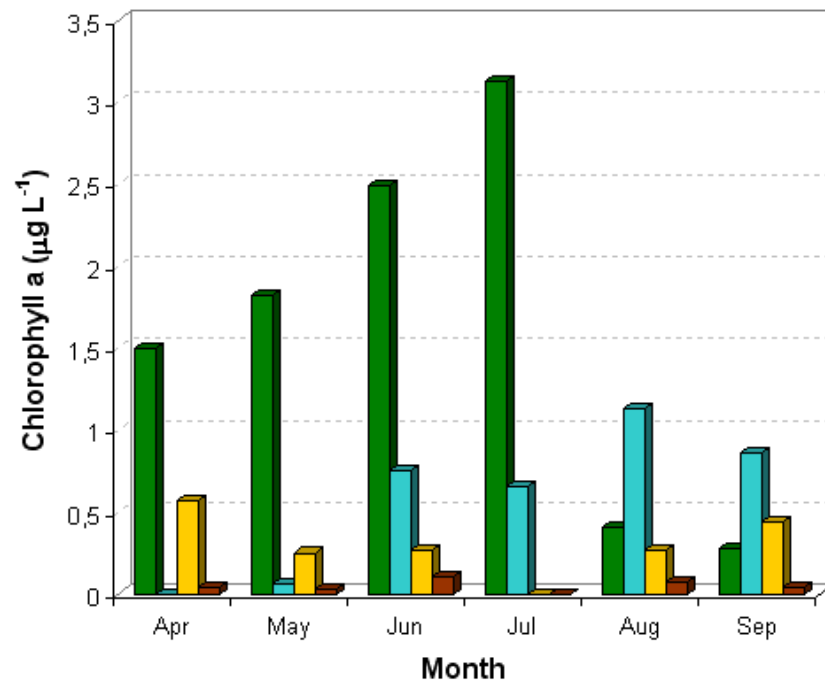


Microcystis, Staurastrum, rozsivky

[FluoroProbe x objem. biomasa]



[FluoroProbe x objem. biomasa]



Fluorescence vs. Mikroskopie

Problémy

- Heterogenní společenstva
- Nízké koncentrace
- Metodika vzorkování

[Fluorescence]

- Měřítko množství pigmentů (chl-a)
- Relativní množství pigmentů kolísá
- Částečně ovlivněna dalšími faktory:
 - Světlo
 - Živiny
 - Teplota
 - Stres

[Fluorescence - limitace]

- Zákal
 - Interference s optickým principem metody
 - Problém především ve vodních tocích
 - Možné korekce
 - Otázka typu zákalu

[Fluorescence - limitace]

- Fluorescence org. látek
 - Huminy, huminové kyseliny, org. polutanty
 - Excitace i emise v oblasti krátkých vln. délek (UV, modrá)
 - Může rušit při excitaci modrým světlem
 - U FP je integrována korekce

[Fluorescence - limitace]

- Velké množství fytoplanktonu
 - 1-buň. org. – až do cca 400 ug/l Chl-a
 - Vodní květy koloniálních sinic – vzájemné „stínění“, reabsorpce emitovaného světla = podcenění skutečného množství

[Fluorescence - limitace]

- Koloniální sinice
 - Velké kolonie (>1000 b.) – problém
 - Špatný průnik světla k buňkám uvnitř
 - Nehomogenní rozložení buněk v prostoru

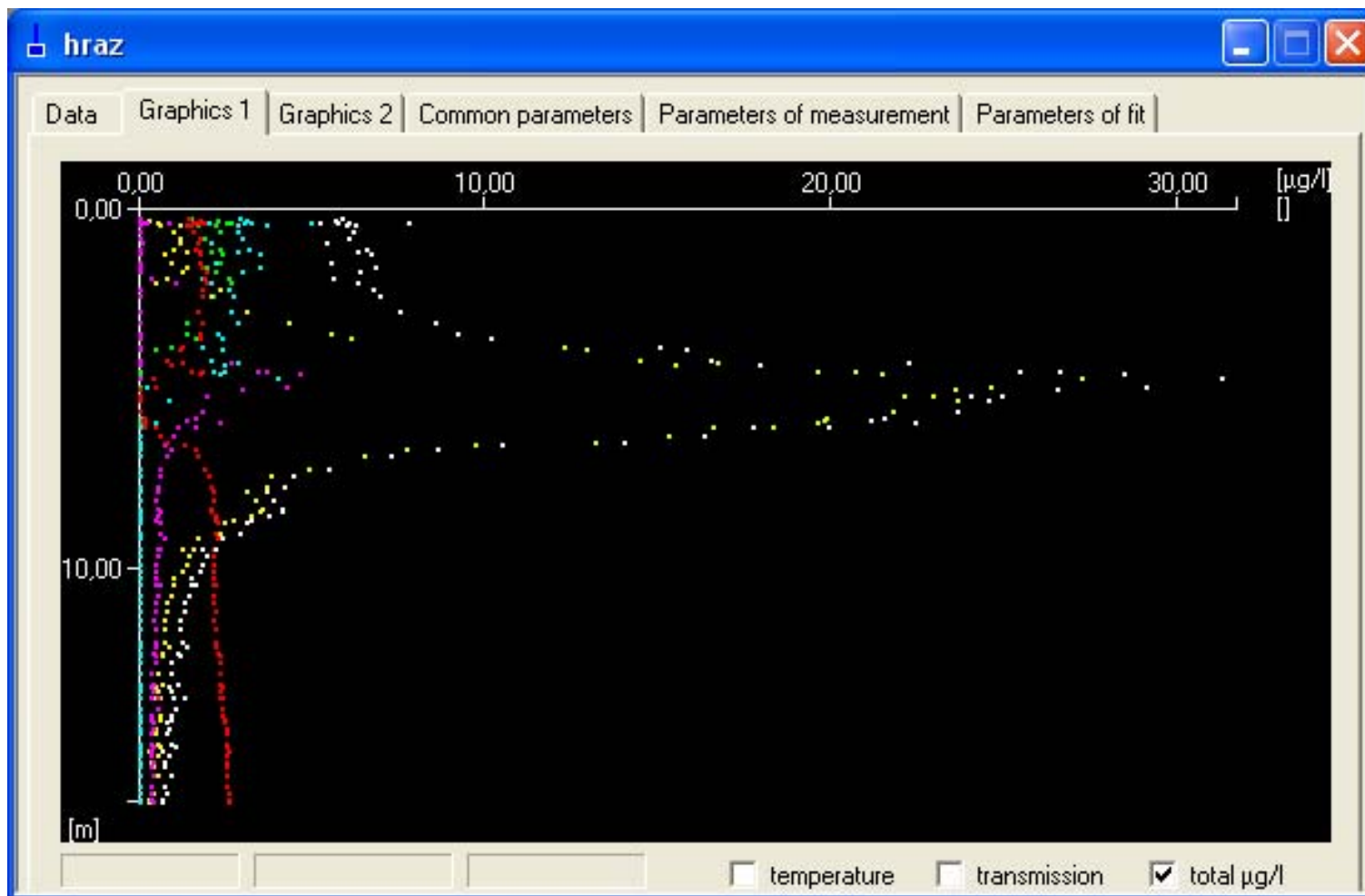
[Fluorescence - limitace]

- Fyziologický stav buněk
 - Částečný vliv na intenzitu fluorescence
 - Živiny, světlo, teplota, stáří populace

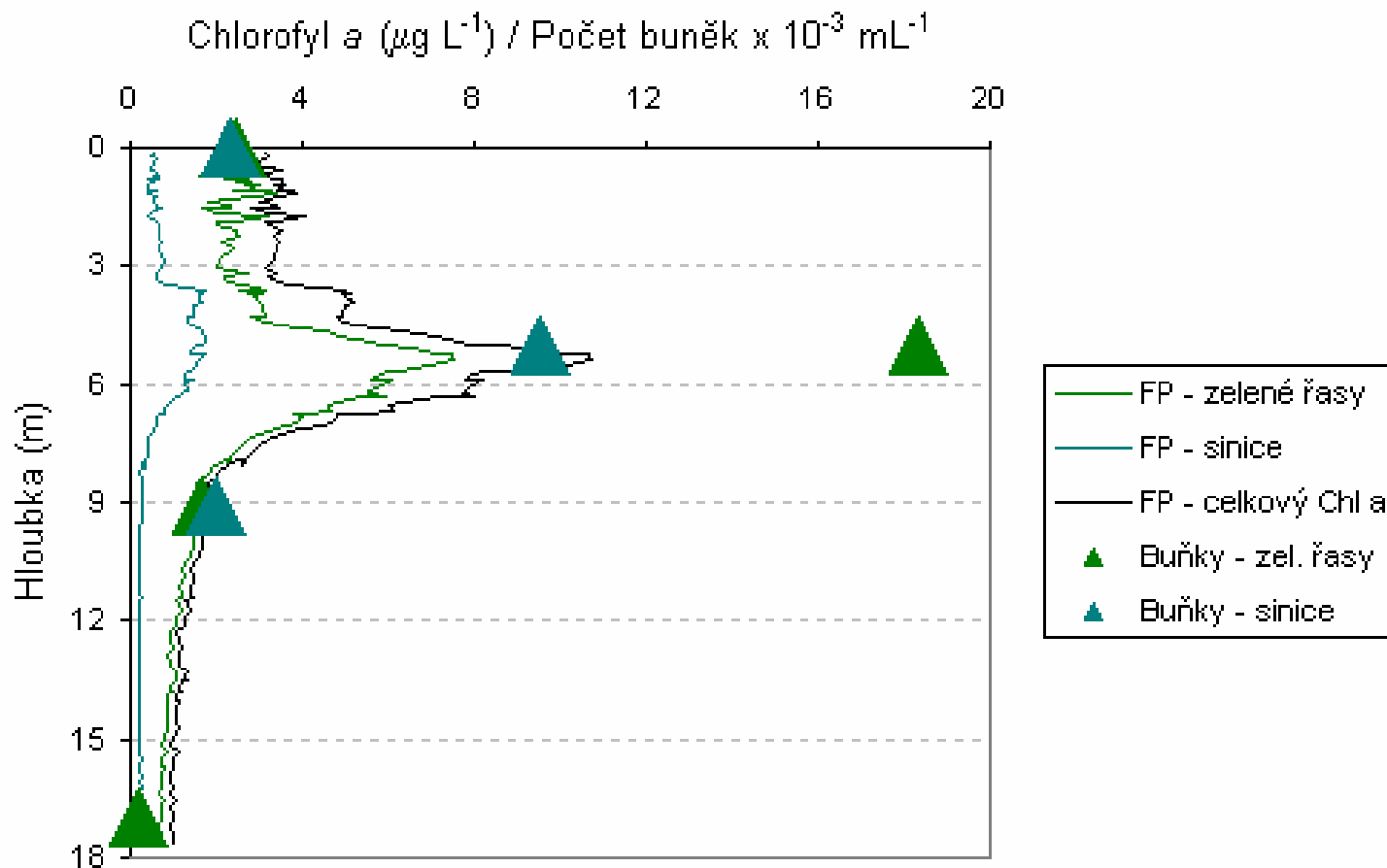
[Fluorescence - výhody]

- Kontinuální on-line měření
- Zjištění distribuce fytoplanktonu v celém vodním sloupci
- Vysoká citlivost
- Detekce pikocyanobakterií
- Integrace kvalitativní a kvantitativní analýzy

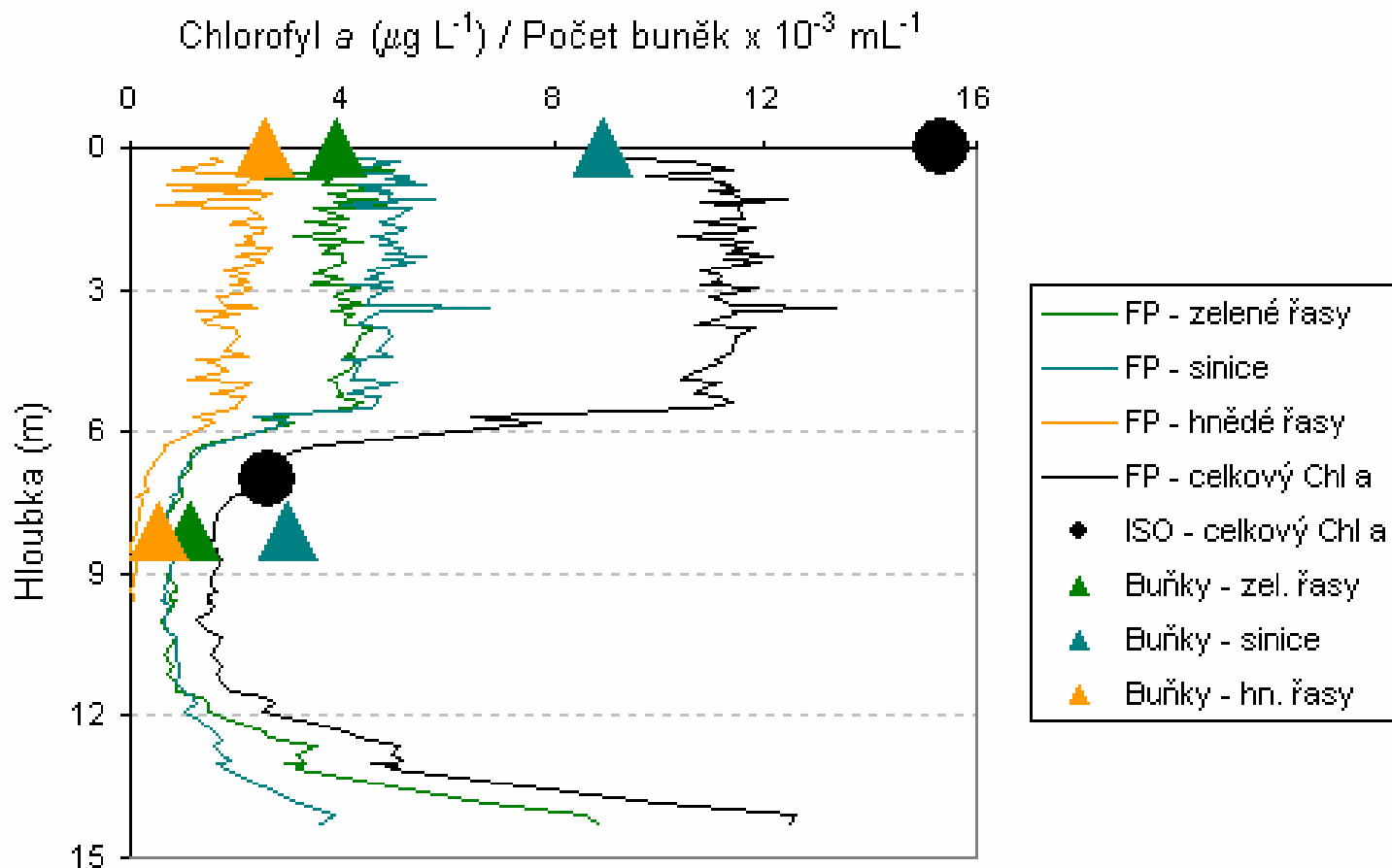
[Zajímavosti, ukázky]



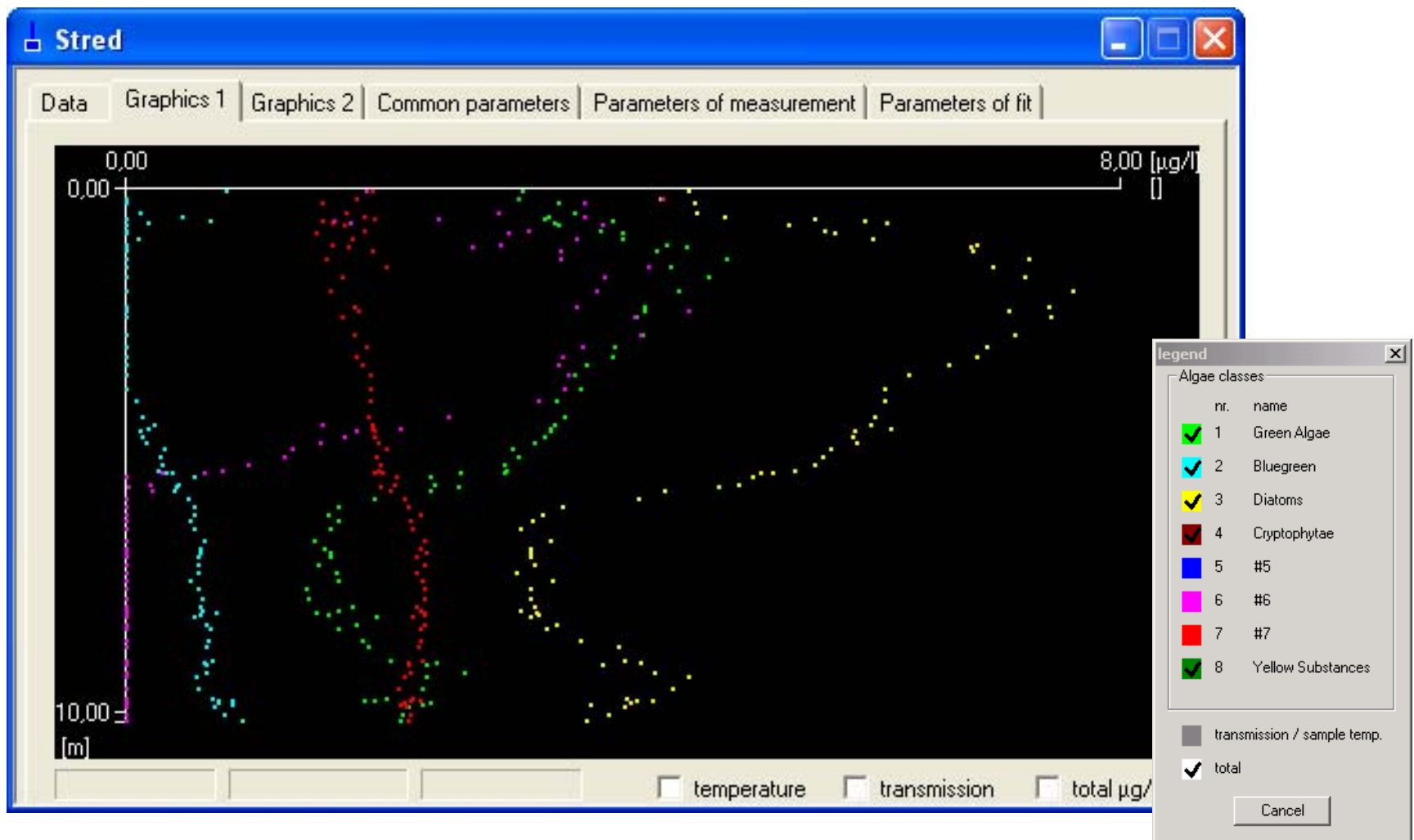
[Zajímavosti, ukázky]



[Zajímavosti, ukázky]



[Zajímavosti, ukázky]



[Zajímavosti, ukázky]

