

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Morfologická analýza a kvantifikace koloniálních
pikoplanktonních sinic metodou analýzy obrazu**

Diplomová práce

Bc. Jakub Psohlavec

Školitelka: RNDr. Jitka Jezberová, Ph.D. (BC AV ČR)

Konzultant: RNDr. Vojtěch Kasalický, Ph.D. (BC AV ČR)

České Budějovice 2022

Psohlavec, J., 2022: Morfologická analýza a kvantifikace koloniálních pikoplanktonních sinic metodou analýzy obrazu. [Morphological analysis and quantification of colonial picoplanktonic cyanobacteria by image analysis. Mgr. Thesis, in Czech.] – 73 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Cílem diplomové práce je kombinací mikroskopické metody a počítačové analýzy obrazu proniknout do heterogenity koloniálních pikoplanktonních sinic v přírodě a vyvinout metodiku, pomocí níž by bylo možné koloniální sinice kvantifikovat a řadit do různých funkčních a morfologických skupin. Na základě uspořádání buněk v koloniích bylo určeno šest morfologických skupin a ke každé skupině byl definován faktor hustoty. Buňky i kolonie byly důkladně proměřeny. Kolonie byly porovnávány mezi vodními lokalitami o různé trofii. Výsledky práce budou mít široký přesah i do vodohospodářství, kde je v současné době žádáno nastavení metodiky pro kvantifikaci pikoplanktonních sinic při běžné analýze fytoplanktonu.

The aim of this work is to use a combination of microscopic methods and computer image analysis to understand the heterogeneity of colonial picoplanktonic cyanobacteria in nature and to develop a methodology for quantification and classification of the colonial cyanobacteria into different functional and morphological groups. Six morphological groups were determined. A density factor was defined. Colonies were compared among aquatic sites of different trophy. The results of this work will also have a broad impact on water management, where the setting of a methodology for the quantification of picoplanktonic cyanobacteria in the routine analysis of phytoplankton is currently requested.

Klíčová slova:

Pikoplanktonní sinice, analýza obrazu, faktor hustoty, kvantifikace

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 7.12. 2022

.....

Bc. Jakub Psohlavec

Poděkování

Ze všeho nejvíce děkuji mé vedoucí diplomové práce RNDr. Jitce Jezberové, Ph.D. za její cenné rady a ochotu pomoci, kdykoli bylo zapotřebí. Děkuji mému konzultantovi RNDr. Vojtěchovi Kasalickému, Ph.D. za užitečné rady. Dále bych rád poděkoval RNDr. Jiřímu Nedomovi, CSc., který mi pomáhal během celého vývoje metodiky a naučil mě pracovat se softwarem. V neposlední řadě bych rád poděkoval RNDr. Jaroslavu Vrbovi, CSc. a RNDr. Pavlu Rychteckému, Ph.D. za přínosné poznámky během dokončování mé diplomové práce. Na konec bych rád poděkoval mé rodině a přítelkyni za jejich neskutečnou podporu a pevné nervy.

Obsah

Úvod.....	1
Literární rešerše	2
1. Planktonní organismy a jejich klasifikace.....	2
2. Pikoplanktonní sinice.....	2
2.1 Fyziologické vlastnosti	3
2.1.1 Buněčná stěna.....	3
2.1.2 Fotosyntetický aparát.....	3
2.2 Klasifikace pikoplanktonních sinic	4
2.2.1 Jednobuněčné formy	4
2.2.2 Koloniální formy	5
2.3 Výskyt a dynamika pikoplanktonních sinic	6
3. Význam a problematika sinic ve vodárenství	7
3.1 Sinicové květy a toxicita.....	7
3.1.1 Toxické kokální koloniální sinice.....	7
3.1.2 Cyanotoxiny	8
3.2 Pikoplanktonní sinice ve vodárenství	8
4. Analytické metody	9
4.1 Přímé analytické metody.....	9
4.2 Nepřímé analytické metody	10
4.2.1 Metoda analýzy obrazu.....	10
4.2.1.1 Akvizice obrazu.....	10
4.2.1.2 Vylepšení obrazu	11
4.2.1.3 Segmentace.....	11
4.2.1.4 Binární zpracování.....	11
4.2.1.5 Stanovení parametrů.....	11
Cíle a hypotézy	11
Materiály a metody.....	12
5. Vývoj semi-automatické metody	12
5.1 Příprava vzorků.....	12
5.2 Práce s hardwarem	13

5.2.1	Dvojměrné kolonie pikoplanktonních sinic	13
5.2.2	Trojměrné kolonie pikoplanktonních sinic	13
5.3	Práce se softwarem	14
5.3.1	Kategorie pro koloniální pikoplanktonní sinice.....	14
5.4	Analýza obrazu	15
5.4.1	Makro pro dvojměrné kolonie pikoplanktonních sinic	16
5.4.2	Trojměrné kolonie pikoplanktonních sinic	19
5.4.2.1	První makro – počet buněk a plocha kolonie.....	19
5.4.2.2	Druhé makro – parametry jednotlivých buněk	21
5.5	Analýza dat	22
6.	Aplikace semi-automatizované metody	23
6.1	Příprava vzorků.....	23
6.2	Práce s hardwarem	24
6.2.1	Dvojměrné kolonie pikoplanktonních sinic	24
6.2.2	Trojměrné kolonie pikoplanktonních sinic	25
6.3	Práce se softwarem	25
6.3.1	Analýza obrazu	25
6.3.2	Analýza dat.....	26
7.	Statistika.....	26
Výsledky.....		26
8.	Vývoj semi-automatizované metody	26
8.1	Kategorie APT1	26
8.2	Kategorie APT2	28
8.3	Kategorie APT3	30
8.4	Kategorie MER	31
8.5	Kategorie CYN1	33
8.6	Kategorie CYN2	34
9.	Aplikace faktoru hustoty v praxi.....	36
10.	Aplikace semi-automatizované metody.....	37
10.1	Kolonie v kategorii APT1	37
10.1.1	Počet buněk a plocha kolonie	38

10.1.2	Velikostní parametry buněk.....	39
10.2	Kolonie v kategorii APT2.....	40
10.2.1	Počet buněk a plocha kolonie	40
10.2.2	Velikostní parametry buněk.....	41
10.3	Kolonie v kategorii APT3.....	42
10.3.1	Počet buněk a objem kolonie	43
10.3.2	Velikostní parametry buněk.....	44
10.4	Kolonie v kategorii MER.....	44
10.4.1	Počet buněk a plocha kolonie	45
10.4.2	Velikostní parametry buněk.....	46
10.5	Kolonie v kategorii CYN1	47
10.5.1	Počet buněk a plocha kolonie	47
10.5.2	Velikostní parametry buněk.....	48
10.6	Kolonie v kategorii CYN2.....	48
10.6.1	Počet buněk a plocha kolonie	49
10.6.2	Velikostní parametry buněk.....	50
Diskuse.....		51
11.	Semi-automatická metoda.....	51
11.1	Kategorie pro koloniální pikoplanktonní sinice	51
11.2	Kategoriální faktory hustoty pro kolonie	53
12.	Analýza koloniálních pikoplanktonních sinic	54
12.1	Počet kolonií v ml.....	54
12.2	Počet buněk v koloniích.....	55
12.3	Plocha (objem) kolonií.....	55
12.4	Velikostní parametry buněk v koloniích.....	55
Závěr.....		56
Použitá literatura.....		56
Seznam příloh.....		67

Úvod

Tato práce vznikla na základě požadavku laboratoří na úpravu pitné vody v Nýrsku a Kutné Hoře, aby jim pomohla vyřešit problematickou kvantifikaci pikoplanktonních sinic v surové vodě, se kterou se v letních měsících pravidelně potýkali.

Pikoplanktonní sinice jsou velice drobné organismy, které se vyskytují téměř ve všech vodních ekosystémech. V těchto ekosystémech se jednotlivé buňky vyskytují samostatně nebo utvářejí kolonie. V prvním případě, kde se buňky nacházejí osamocené, je jejich kvantifikace jednoduchá. K určení počtu jednotlivců není zapotřebí příliš drahá technika ani složité metody. Problém nastává u koloniálních pikoplanktonních sinic, které jsou mnohdy pro svou složitou morfolologii běžnými metodami nepočítatelné.

Jak již bylo řečeno, pikoplanktonní sinice jsou rozšířeny ve všech typech vod o různé trofii, přičemž výjimkou výskytu nejsou ani vodní nádrže s funkcí zásobárny pitné vody. Problematika těchto drobných organismů nabývá na významu, a to hlavně z důvodu nedostatečné, často zcela chybějící metodiky kvantifikace koloniálních zástupců.

Laboratoře, které se zabývají úpravou pitné vody obvykle nemají k dispozici drahé přístroje, které by bylo možné pro kvantifikaci koloniálních pikoplanktonních sinic použít. Počet koloniálních buněk v surové vodě se určuje tzv. od oka, výsledná abundance je tedy v mnoha případech nepřesná a může vést k dalším problémům v následujících postupech úpravy pitné vody.

V souladu s touto problematikou byly stanoveny cíle mé diplomové práce, s účelem zjednodušit analýzu, a hlavně přesněji určit počet pikoplanktonních sinic tvořících kolonie ve vodních ekosystémech, včetně vodních nádrží. Cílem mé diplomové práce je vytvořit metodu, díky které bude možné získat počet buněk ve strukturně odlišných koloniích pikoplanktonních sinic. Na základě mikroskopické metody v kombinaci s analýzou obrazu koloniální pikoplanktonní sinice zařadit do funkčních a morfologických kategorií. Následně otestovat vytvořenou metodu na přírodních vzorcích fytoplanktonu z různých lokalit, kde se koloniální forma vyskytuje nejčastěji (nádrže a rybníky) a společně se zařazením do příslušných kategorií kvantifikovat koloniální pikoplanktonní sinice.

Literární rešerše

1. Planktonní organismy a jejich klasifikace

Planktonní organismy lze dělit na základě několika kritérií. Jedná se o fyziologické, taxonomické (Malone 1980; Stockner et al. 1986) nebo velikostní členění (Dussart 1965; Sieburth et al. 1978). Mezi základní složky planktonu patří bakterioplankton, který je tvořený převážně heterotrofními prokaryotickými organismy. Dále je to fytoplankton, zahrnující sinice a eukaryotické organismy. Posledním článkem planktonu je zooplankton, tvořený eukaryotickými jednobuněčnými a mnohobuněčnými organismy (Callieri a Stockner 2002). Na základě velikosti planktonu Dussart (1965) navrhl a Sieburth et al. (1978) později doplnili schéma, ve kterém je plankton klasifikován do pěti velikostních kategorií: makroplankton (200–2000 μm), mikroplankton (20–200 μm), nanoplankton (2–20 μm), pikoplankton (0,2–2 μm) a femtoplankton (0,02–0,2 μm).

Pikoplankton zahrnuje prokaryotické a eukaryotické fotoautotrofní a heterotrofní organismy, které jsou rozšířeny po celém světě ve všech typech vodních ekosystémů. Fototrofní organismy se od těch heterotrofních odlišují mimo jiné přítomností fotosyntetických pigmentů (Callieri a Stockner 2002). Při porovnání eukaryotického a prokaryotického organismu je hlavním rozdílným znakem absence buněčného jádra a buněčných organel u prokaryot. Z hlediska buněčných organel, prokaryotická buňka neobsahuje chloroplasty, mitochondrie ani diktyozomy.

2. Pikoplanktonní sinice

Termín pikoplanktonní sinice označuje prokaryotické fotoautotrofní organismy. Jedná se o nejmenší zástupce sinic s velikostí pohybující se od 0,2 do 2 μm , při čemž může docházet k překročení vrchní hranice (Jasser a Callieri 2017). Pikoplanktonní sinice jsou kosmopolitně rozšířeny, lze je nalézt prakticky v každém vodním ekosystému. Vyskytují se ve sladkovodních, brakických i mořských prostředích, za nízkých i vysokých teplot, za různých světelných podmínek a koncentrací živin (Callieri et al. 2012; Scanlan 2012). Schopnost přežít v takto různorodých a často nepříznivých prostředích mohou hlavně díky mnoha evolučním znakům, které si pikoplanktonní sinice dokázaly vytvořit v rámci své dlouhé existence. V jejich prospěch při získávání živin hraje na rozdíl od větších organismů důležitou roli malá velikost a relativně velký poměr plochy k objemu buňky na rozdíl od

větších organismů (Agawin et al. 2000). Kromě toho malá velikost snižuje energetické výdaje potřebné na chod buňky na minimum (Callieri a Stockner 2002).

2.1 Fyziologické vlastnosti

Podíváme-li se na samotnou buňku pikoplanktonních sinic detailněji, nalezneme zde různé anatomické znaky, které jsou výsledkem specifických adaptací.

2.1.1 Buněčná stěna

Buňky pikoplanktonních sinic se z hlediska Gramovo barvení řadí mezi gramnegativní bakterie, nicméně samotná struktura buněčné stěny obsahuje mimo jiné i znaky, které se vyskytují u grampozitivní bakterií (Callieri et al. 2022). Jedním z nich je periplazmatický prostor ohraničený vnější membránou a vnitřní cytoplazmatickou membránou. Periplazmatický prostor obsahuje silnou peptidoglykanovou vrstvu, ta zajišťuje ochrannou funkci buněk. Tato vrstva peptidoglykanu je silnější než vrstva většiny gramnegativních bakterií, a navíc se nachází v komplexu s polysacharidy, což se více podobá peptidoglykanu právě u grampozitivních bakterií (Hoiczuk a Hansel 2000). Dalším anatomickým znakem je složení samotné vnější membrány. Vnější membrána pikoplanktonních sinic je složena z lipopolysacharidů s navázaným fosfátem a obsahuje neobvyklé mastné kyseliny, karotenoidy a poriny (Callieri et al. 2022). Mezi další anatomické znaky buněčné stěny pikoplanktonních sinic patří schopnost tvořit vnější povrchovou parakrystalickou vrstvu složenou z glykoproteinů. Mimo ochrannou funkci je tato vrstva často spojována se schopností pohybu (Jasser a Callieri 2017).

2.1.2 Fotosyntetický aparát

Kromě již zmíněných anatomických znaků mají pikoplanktonní sinice v rámci autotrofních organismů největší variabilitu v oblasti fotosyntetických pigmentů, která jim umožňuje obsadit širokou škálu nik vodních biotopů s rozdílnými světelnými podmínkami (Farrant et al. 2016; Grébert et al. 2018; Six et al. 2007). Struktura, která obsahuje mnoho z těchto pigmentů se nazývá fykobilizom. Fykobilizom představuje bílkovinnou strukturu nacházející se na povrchu thylakoidů pikoplanktonních sinic. Jeho funkce spočívá v pohlcování světla v rozsahu 500–650 nm (zelené až oranžové světlo), zatímco chlorofyl *a* absorbuje převážně modré světlo (~440 nm) a červené světlo (~678 nm) (Six et al. 2007; Wood et al. 1985). Fykobilizom obsahuje určité množství fykocyaninu (PC) a fykoerytrinu (PE), na jehož základě rozlišujeme dva typy buněk. Uvedené fykobiliproteiny absorbují

světlo v různých vrcholech. Fykoerytrin pohlcuje světlo při ~570 nm (zelená část spektra), zatímco fykocyanin absorbuje světlo při ~630 nm (červená část spektra). Pikoplanktonní sinice bohaté na PE se často vyskytují v čistých oligotrofních vodách, kde je dostupné zelené a modrozelené světlo. Naopak ty, které jsou bohaté na PC se nacházejí v zakalených eutrofních vodách, kde převažuje červené světlo (Callieri 2016; Stomp et al. 2007; Vörös et al. 1998).

2.2 Klasifikace pikoplanktonních sinic

Pikoplanktonní sinice se ve vodním prostředí vyskytují ve dvou hlavních formách. První formou jsou jednotlivé buňky, které svým tvarem připomínají kokoid nebo tyčinku. Druhou formou jsou druhy, které za příznivých podmínek vytvářejí sliz nebo obal. Díky této schopnosti zůstávají v blízkosti mateřské buňky a utvářejí mikrokolonie (5–50 buněk) a kolonie (50 a více buněk). Na rozdíl od jednobuněčných forem se u kolonií a mikrokolonií setkáváme s různorodou strukturou a tvarem (Callieri et al. 2012).

Morfologické znaky, které slouží ke správnému začlenění pikoplanktonních sinic do příslušného taxonu mnohdy nejsou dostatečně zřetelné (Komárek et al. 2004; Staley 1997). Z tohoto důvodu jsou využívány molekulární metody. Standardní používanou metodou je analýza genu 16S rRNA (Komárek et al. 2020). Jelikož se jedná o konzervovaný gen, při analýze především sladkovodních pikoplanktonních sinic nedocílíme přesných výsledků (Crosbie et al. 2003). Proto, za účelem přesnější analýzy, byly dříve využívány metody na základě DNA fingerprintingu, které pracovaly s méně konzervovanými geny (Becker et al. 2002; Ernst et al. 2003; Rocop et al. 2002). Nyní jsou pro taxonomické členění pikoplanktonních sinic používány sekvence metagenomů a genomů (Cabello-Yeves et al. 2022; Cabello-Yeves et al. 2021; Cabello-Yeves et al. 2017; Dore et al. 2020; Salazar et al. 2020).

2.2.1 Jednobuněčné formy

Taxonomie pikoplanktonních sinic není jednoduchá, neboť jsou to prokaryotní fotosyntetizující organismy, a proto se zde potkávají dva přístupy – botanický (tzv. Botanický kód, ICBN) a prokaryotní (Prokaryotní kód, ICNP). Tak se stalo, že jsou stejné organismy taxonomicky řazeny do různých skupin podle toho, zda se vyskytují jednotlivě nebo v koloniích. S nástupem citlivých molekulárních metod dochází v současné době

k postupnému sjednocení (Cabello-Yeves et al. 2022; Komárek et al. 2020; Salazar et al. 2020).

Pikoplanktonní sinice vyskytující se ve formě jednotlivých buněk členíme do tří základních rodů – *Prochlorococcus*, *Synechococcus* a *Cyanobium*. S rozvíjejícími se molekulárními metodami se toto členění mění. *Prochlorococcus* je striktně mořský a u nás se nevyskytuje. *Synechococcus* je mořský i sladkovodní. Jedná se o taxonomicky problematický rod, jelikož se ukázalo, že je polyfyletický tzn. jeho zástupci se vyskytují na různých místech fylogenetického stromu u vzájemně nepříbuzných větví, tedy že nemají společného předka (Castenholz 2001; Herdman et al. 2001; Komárek et al. 2020; Salazar et al. 2020; Waterbury a Rippka 1989). Typový rod *Synechococcus* Nägeli (1849) (Rippka a Cohen-Bazire 1983) je poprvé popsán z bentosu a řadí se fylogeneticky jinam než všechny pikoplanktonní druhy. Díky jednoduchému tvaru buňky se však tento název chybně užívá pro většinu pikoplanktonních sinic.

Zbývající rody nekoloniálních pikoplanktonních sinic jsou pouze sladkovodní. Jsou to rody *Synechocystis*, *Cyanothece*, *Cyanobacterium* a *Cyanobium* (Jasser a Callieri 2017). Rod *Cyanobium* se dále v současné době rozpadá na další rody – *Lacustricoccus*, *Regnicoccus*, *Vulcanicoccus*, *Juxtasynechococcus* (Di Cesare et al. 2018; Dore et al. 2020; Salazar et al. 2020), které ale ještě nejsou validně popsány podle žádného z taxonomických kódů (Komárek et al. 2020). Rod *Synechococcus*, společně s rodem *Cyanobium* a *Prochlorococcus*, představují nejlépe charakterizované zástupce pikoplanktonních sinic (Bailey-Watts et al. 1968).

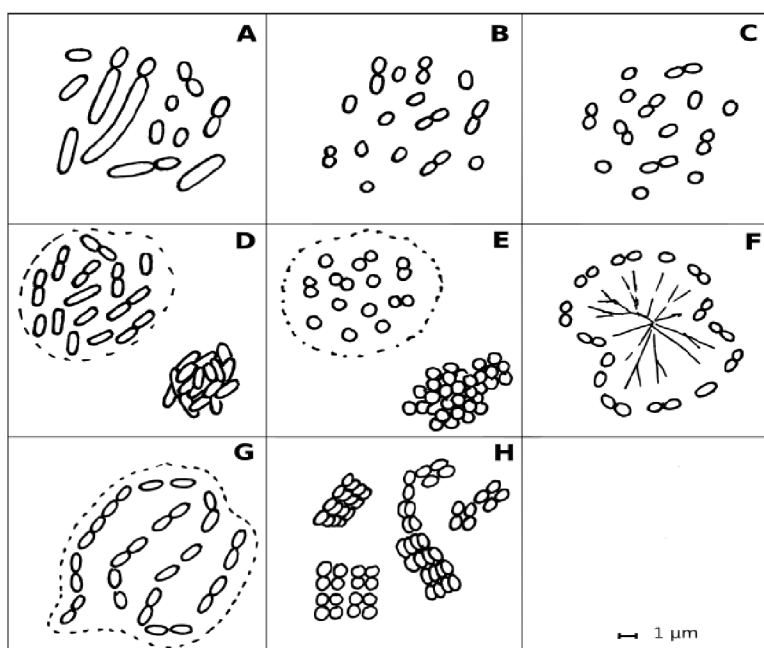
2.2.2 Koloniální formy

Koloniální pikoplanktonní sinice se nesprávně řadí mezi sinice řádu *Chroococcales* (Callieri et al. 2012). Mezi nejběžnější pikoplanktonní sinice, které tvoří mikrokolonie (5–50 buněk) a kolonie (50 a více buněk) ve sladkých vodách se řadí rody *Aphanocapsa*, *Aphanothece* (*Anathece*), *Chroococcus*, *Coelosphaerium*, *Cyanobion*, *Cyanodictyon*, *Merismopedia*, *Romeria*, *Snowella* a *Tetracercus* (Jasser a Callieri 2017). Zmíněné rody jsou klasifikovány podle Botanického kódu.

Jednotlivé rody koloniálních pikoplanktonních sinic se rozlišují na základě specifické morfologie buněk v koloniích a jejich uspořádání. Buňky uvnitř kolonie mohou být volně nebo hustě uspořádané, mohou tvořit tzv. pseudofilamenty či jiné síťovité struktury. U

některých rodů, např. *Snowella*, jsou buňky přichyceny ke slizovitým stonkům, které se nacházejí ve středu kolonie (Callieri et al. 2012).

V současné době se však ukazuje, že jednobuněčné a koloniální formy pikoplanktonních sinic jsou navzdory své odlišné morfologii geneticky identické a všechny patří do příbuznosti rodu *Cyanobium* (řád Synechococcales, čeleď Cyanobiaceae) (e.g. Huber et al. 2017; Komárek et al. 2011).



Obr. 1: Schéma pikoplanktonních sinic (Jezberová, nepublikováno).

A – *Synechococcus*, B – *Cyanobium*, C – *Prochlorococcus*, D – *Aphanothece (Anathece)*

E – *Aphanocapsa*, F – *Snowella*, G – *Cyanodictyon*, H – *Merismopedia*

2.3 Výskyt a dynamika pikoplanktonních sinic

Pikoplanktonní sinice jsou početnými a všudypřítomnými primárními producenty jak ve sladkovodním, tak mořském prostředí. V mírném podnebném pásu jsou pikoplanktonní sinice hojně zastoupeny ve vodních tělesech s různým stupněm trofie. Nalezneme je v oligotrofních, mezotrofních a eutrofních přehradních nádržích a jezerech. Rovněž se vyskytují v hypertrofních rybnících. Jednobuněčné formy pikoplanktonních sinic nalezneme především ve studených a hlubokých oligotrofních vodách. Naopak koloniální zástupce

pozorujeme v teplých a mělkých mezo-eutrofních vodních systémech (Callieri et al. 2012; Huber et al. 2017; Komárková 2002).

Sezónní vývoj jednobuněčných pikoplanktonních sinic je typicky bimodální, s vrcholem na jaře nebo začátku léta a druhým vrcholem na konci léta/podzimu. Vrchol na konci léta/podzimu se zároveň shoduje s maximem koloniálních pikoplanktonních sinic (Jasser a Callieri 2017; Stockner et al. 2000). S tímto modelem se setkáváme u velkých, typicky nezamrzajících jezer. Dochází však k výjimkám, kdy sezónní vývoj není čistě bimodální (Callieri a Piscia 2002; Gaedke a Weisse 1998; Padisák et al. 2003). Velká meziroční variabilita dynamiky pikoplanktonních sinic souvisí s trofickým stavem, ročním obdobím a vertikálním profilem vodního tělesa (Callieri et al. 2012). Jedná se především o povětrnostní podmínky, které způsobují rozdílné jarní míchání a následnou stabilizaci vodního sloupce (Weisse 1993). V našich podmínkách nastává vrchol sezónního vývoje pikoplanktonních sinic obvykle během pozdního jara/léta. V mělkých eutrofních, hypertrofních nebo dystrofních jezerech dochází k maximálnímu rozvoji v jarním období (Callieri et al. 2012).

3. Význam a problematika sinic ve vodárenství

3.1 Sinicové květy a toxicita

Sinice se běžně vyskytují v mnoha vodních ekosystémech. Za příznivých podmínek se jejich zvýšený rozvoj, v němž dominuje jeden nebo několik málo druhů, označuje jako sinicový květ (Chorus a Bartram 1999). Květy sinic jsou považovány za škodlivé, pokud jsou spojeny s negativními dopady na životní prostředí, jako je snížení stability ekosystému, produkce vysoce toxických sloučenin (cyanotoxiny) a úmrtnost organismů (Chorus 2001). Silná eutrofizace sladkých vod, z nichž mnohé zahrnují i nádrže s pitnou vodou, zvýšila výskyt a intenzitu sinicových květů (Sivonen et al. 1990). Přičemž, přibližně 50 % z nich produkuje toxické metabolity (Codd 1995).

3.1.1 Toxické kokální koloniální sinice

Některé koloniální pikoplanktonní sinice se morfologicky výrazně podobají sinici rodu *Microcystis*. Rod *Microcystis* spadá do řádu *Chroococcales*, kam jsou nesprávně řazeny i pikosinicové koloniální formy (viz kapitola 2.2.2). Jedná se o nejčastěji se vyskytující zástupce sinic napříč světem, s výjimkou cirkumpolárních oblastí (Komárek 1996). Jednotlivé buňky jsou často kulovité nebo sférické, mají průměr 2–7 μm a na rozdíl od

pikoplanktonních sinic obsahují aerotopy (Lee et al. 2021). Za příznivých podmínek utvářejí mikroskopické a makroskopické slizové kolonie, které jsou svou morfologií velice podobné koloniím pikoplanktonních sinic. Pokud je vodní sloupec stabilní, kolonie plavou a hromadí se na hladině. Vytvářejí hustou vrstvu, která může pokrývat část nebo celou hladinu vodního tělesa. Jestliže jsou kolonie ve vodě rozptýleny a vytvářejí shluky, označují se disperzními koloniemi neboli vodními květy (Almanza et al. 2016). Povlak na hladině nebo vodní květ obvykle vznikají za podmínek, kdy teplota vody přesáhne 15 °C (Jacoby et al. 2000; Okino 1974; Reynolds et al. 1981). Mnoho zástupců z rodu *Microcystis* může produkovat silný cyanotoxin – tzv. microcystin. Schopnost produkovat toxické sekundární metabolity a dominovat ve vodních tělesech je považováno za významné riziko ve vodárenském odvětví.

3.1.2 Cyanotoxiny

Cyanotoxiny jsou sekundární metabolity produkované sinicemi, které představují různorodou skupinu chemických sloučenin, jako jsou peptidy, alkaloidy a lipopolysacharidy. V závislosti na cílových orgánech nebo buňkách organismů se cyanotoxiny klasifikují jako: hepatotoxiny, neurotoxiny, cytotoxiny a dráždivé látky pro kůži a zažívací trakt (Briand et al. 2003; Falconer 2008; Kaebernick a Neilan 2006). Uvolňování cyanotoxinů do okolní vody může představovat nebezpečí pro zvířata a lidi, kteří vodu používají (Carmichael a Falconer 1993; Falconer 1998; Lam et al. 1995), zejména pokud je zdrojem pitné vody (Oberholster et al. 2004). Cyanotoxiny mohou u lidí způsobit onemocnění (Kuiper-Goodman et al. 1999; Svircev et al. 2009), a při expozici hemodialýzou dokonce smrt (Jochimsen et al. 1998; Pouria et al. 1998).

3.2 Pikoplanktonní sinice ve vodárenství

Toxicita pikoplanktonních sinic byla dlouho přehlížena, nicméně s narůstajícími znalostmi o produkci cyanotoxinů přibývají studie, které toto tvrzení podporují. Jedny z prvních byly výzkumy Ambrožové (2006) a Bláhy a Maršálka (1999), které se zmiňují o případné tvorbě sekundárních metabolitů pikoplanktonními sinicemi. V roce 2021 byla publikována studie, která potvrdila výše uvedené tvrzení. Pikoplanktonní sinice, v tomto případě *Synechococcus* sp., mohou produkovat cyanotoxiny a anatoxiny, přičemž monitorovací přístroje nejsou obvykle příliš přesné a prokázat tak toxicitu není snadné (Gin et al. 2021). Jelikož se jedná o organismy, které se vyskytují ve všech vodních

ekosystémech, včetně nádrží se zásobní funkcí, lze považovat produkci toxických látek těmito organismy za potenciální riziko.

V případě pikoplanktonních sinic se setkáváme s problémem, kdy běžná úprava pitné vody nedosahuje požadovaného efektu. Jelikož se jedná o velice drobné organismy s pevnou buněčnou stěnou, pikoplanktonní sinice jsou odolné vůči běžným metodám úpravy vody a jsou schopny proniknout hlouběji do filtračních systémů (Ambrožová 2006). Běžně nacházíme za pískovými filtry vitální životaschopné buňky (Jezberová, nepublikováno). S tím souvisí, kromě již zmíněné toxicity, případné riziko ucpávání filtrů, podpora rozvoje mikrobiální smyčky či produkce geosminů (nepříjemného zápachu pitné vody) (Ambrožová 2006).

Vodárenské nádrže zajišťující zásobní funkci podléhají přísnému monitoringu a hodnocení stavu kvality vody. Laboratoře úpravny vody jsou pravidelně kontrolovány Státní hygienickou stanicí. Jednou z hlavních disciplín kontroly fytoplanktonu v surové vodě a vybírání vhodných odběrových oken v nádrži je stanovení koncentrace chlorofylu-a a kvantifikace přítomných fotosyntetických organismů. V případě hojnosti koloniálních forem pikoplanktonních sinic nastává problém jejich kvantifikace. V mnoha případech jsou hlavně koloniální formy pikoplanktonních sinic běžnými mikroskopickými metodami nepočítatelné, je potřeba speciální fluorescenční mikroskop a veliké zvětšení.

4. Analytické metody

Přesná identifikace a určení koncentrace sinic hraje důležitou roli pro správu vodního hospodářství. Metody identifikace a stanovení počtu buněk sinic jsou proto nezbytnou součástí monitoringu kvality vody. V současné době je k dispozici řada přímých a nepřímých analytických metod (Jin et al. 2018).

4.1 Přímé analytické metody

Nejčastěji využívanou metodou identifikace a stanovení počtu buněk v rámci monitoringu a hodnocení stavu vod je přímá mikroskopická metoda s použitím počítací komůrky nebo filtru. Při aplikaci této metody, především při hodnocení přírodního vzorku, se však vyskytují komplikace související se slabým kontrastem buněk vůči pozadí, vysokou druhovou rozmanitostí, proměnlivou morfologií jednotlivých buněk a komplexností buněčných agregátů nebo kolonií (Jin et al. 2018). Obvykle se jednobuněčné druhy počítají

přímo a uvádějí se jako počet buněk na jednotku objemu, zatímco koloniální druhy se před počítáním dezintegrují (Box 1981).

4.2 Nepřímé analytické metody

K odhadu koncentrace buněk sinic ve vodě byly vyvinuty také nepřímé kvantifikační metody, jako je průtoková cytometrie (Marie et al. 2005), imunofluorescenční mikroskopické testy s protilátkami (Vrieling a Anderson 1996), detekce fluorescenčních fragmentů pomocí PCR (Bolch 2001), qPCR (Al-Tebrineh et al. 2012; Popels et al. 2003), molekulární sondy využívající sendvičovou hybridizaci (Scholin et al. 1996) a fluorescence in situ (Glöckner et al. 1996). Tyto metody však často vyžadují vybavení, které se v běžných laboratořích na kontrolu vody nevyskytuje. Rovněž průtoková cytometrie není vždy dostatečně přesná, aby odlišila buňky od jiných částic ve vodní matrici. Nepřímé metody založené na fluorescenci fotosyntetických pigmentů, zejména chlorofylu-a, nejsou specifické pro sledované buňky, a proto mohou vést k nesprávnému výsledku (McQuaid et al. 2011; Orozco a Medlin 2013; Zamyadi et al. 2016).

4.2.1 Metoda analýzy obrazu

Metoda analýzy obrazu spadá mezi nepřímé analytické metody. Na rozdíl od předešlých metod představuje efektivní a v rámci potřebného vybavení levný způsob monitorování kvality vody. Analýza obrazu je obecně definována jako získávání informací z obrazu (Glasbey a Horgan 1997). Zahrnuje hardwarové vybavení (např. mikroskop, digitální kamera, počítač, paměťové zařízení a případně motorizovaný stůl) a software. Počítačový software je členěn do několika fází: akvizice obrazu, korekce vad, vylepšení, segmentace, binární zpracování a stanovení parametrů (Russ 2006).

4.2.1.1 Akvizice obrazu

V rámci této metody se setkáváme se dvěma typy snímků; jednoduchými, kde jsou objekty zájmu dobře viditelné a snímky složitými, kde jsou objekty zájmu špatně rozpoznatelné. Obvyklý postup spočívá ve snaze převést obtížné snímky na ty jednoduché, a to zdokonalením preparátu nebo pomocí zpracování obrazu (Russ 2006).

4.2.1.2 Vylepšení obrazu

Zpracování obrazu se používá za účelem zlepšení vizuálního vzhledu a přípravy snímku na stanovení parametrů a struktur objektu. Účelem operací vylepšujících obraz je zvýšit viditelnost určitých aspektů nebo složek, i když obvykle na úkor jiných, jejichž viditelnost je snížena (Russ 2006).

4.2.1.3 Segmentace

Segmentace je proces rozdělení obrazu na jednotlivé oblasti, které odpovídají objektům nebo prvkům zájmu. V nejjednodušším případě lze obraz segmentovat pouze na dvě oblasti, a to na oblast objektu a oblast pozadí, přičemž odpovídající pixely se vyselektují automaticky pomocí analýzy histogramu, která určuje, zda se jedná o objekt nebo oblast pozadí, poloautomaticky s manuální korekcí nebo manuálně. Konečným výsledkem je binární obraz (Russ 2006).

4.2.1.4 Binární zpracování

Cílem zpracování binárních obrazů je získat binární obraz, který pokud možno nejlépe charakterizuje zájmové rysy toho původního. Operace zpracování se dělí buď na morfologické, které upravují jednotlivé pixely nebo operace pro kombinování obrazu (Russ 2006).

4.2.1.5 Stanovení parametrů

Finální fází analýzy je extrakce kvantitativních informací z binárního obrazu. V rámci softwaru existuje mnoho způsobů, jak popsat jeho vlastnosti. Těmi nejběžnějšími je velikost, tvar a poloha objektu (Russ 2006).

Cíle a hypotézy

Cílem mé diplomové práce je vyvinout metodiku pro kvantifikaci koloniálních pikoplanktonních sinic a jejich zařazení do funkčních a morfologických skupin na základě mikroskopické metody v kombinaci s analýzou obrazu.

Dalším cílem je kvantifikace a zařazení koloniálních pikoplanktonních sinic do funkčních a morfologických skupin v přírodních vzorcích fytoplanktonu z různých lokalit.

- H_1 : Hustota buněk v koloniích stejného typu se mezi jednotlivými koloniemi neliší, a to ani mezi koloniemi pocházejícími z různých lokalit.
- H_2 : Nádrže a rybníky se liší v relativním zastoupení a početnosti (počtu kolonií na mililitr) jednotlivých typů kolonií a v jejich velikosti (počtu buněk a plochy (objemu) kolonie).

Materiály a metody

5. Vývoj semi-automatické metody

5.1 Příprava vzorků

Jednalo se o přírodní vzorky, které obsahovaly vyšší koncentraci koloniálních pikoplanktonních sinic fixované roztokem formaldehydu (2 %). Ten dobře zachoval tvar i vnitřní strukturu protoplastu. Vzorky byly umístěny v chladící místnosti s vhodnými podmínkami, tedy konstantní teplotou 4 °C. Lokality, ze kterých jednotlivé vzorky pocházely, byly jezera (Majcz, Milada a Most), vodní nádrže (Landštejn, Vrchlice, Žlutice, Slapy a Altenberg) a rybníky (Kuc, Vydýmač, Šamonický Dolní, Buchhammer, Hůry-náves, Rod a Vodňany (R5)).

Samotná příprava vzorků byla prováděna v digestoři s pomocí filtrační aparatury. Do připravené filtrační aparatury byl vložen černý polykarbonátový filtr (Nucleopore filtr 20 mm; porozita 0,2 μm) a mikropipetou (Finnpipette 4500) přeneseny 2 ml přírodního vzorku vody (fixovaného formaldehydem na 2% finální koncentraci), do kterého bylo následně napipetováno 50 μm fluorescenčního barviva DAPI ((4',6-diamidin-2-fenylindol dihydrochlorid)), které se pevně váže na AT bohaté oblasti v DNA. Pro správné navázání fluorescenčního barviva na DNA pikoplanktonních sinic byl vzorek v klidovém režimu po dobu tří minut. Jakmile došlo k pevnému navázání fluorescenčního barviva, vzorek byl za pomoci kompresoru přefiltrován. Membránový filtr se vzorkem byl následně přesunut na podložní sklíčko, které bylo pro lepší přilnavost zakápnuto imerzním olejem. Posledním krokem bylo zakápnutí samotného membránového filtru imerzním olejem a přiložením krycího sklíčka. Tímto způsobem byly vytvořeny preparáty pro následující zkoumání.

5.2 Práce s hardwarem

Dalším krokem v realizaci první části výzkumu bylo vytvoření dostatečného množství reprezentativních snímků jednoduchých dvojrozměrných a kompaktních trojrozměrných kolonií pikoplanktonních sinic.

5.2.1 Dvojrozměrné kolonie pikoplanktonních sinic

Preparáty s jednotlivými vzorky byly postupně zpracovány na fluorescenčním mikroskopu (Olympus BX60). Fluorescenční mikroskop byl vybaven digitální kamerou (Jenoptik), která byla pro rychlý přenos pořízených snímků připojena k počítači. Kolonie byly, za použití imerzního oleje, pozorovány okulárem (Olympus WH10X/22) a objektivem (Olympus UplanApo, 100x/1,35 Oil Iris), vyfoceny a následně uloženy do počítače pomocí programu NIS Elements (verze 4.60.00). Tímto způsobem bylo vytvořeno několik desítek snímků (ve formátu tif) jednoduchých kolonií pikoplanktonních sinic, které se lišily jak svou strukturou, tak velikostí a tvarem jednotlivých buněk.

5.2.2 Trojrozměrné kolonie pikoplanktonních sinic

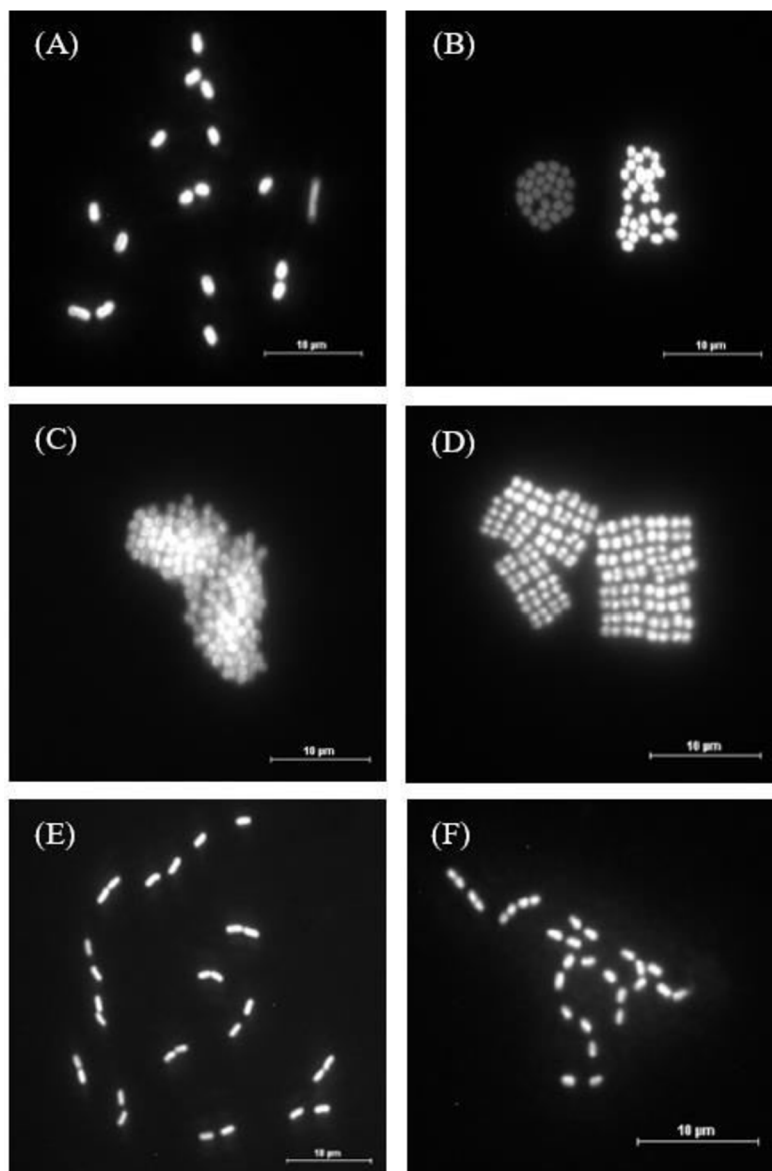
Kromě jednoduchých kolonií, kde se jednotlivé buňky nepřekrývají a jsou jasně rozpoznatelné, jsem se v rámci mého výzkumu zabýval i kompaktními trojrozměrnými koloniemi pikoplanktonních sinic. K pořízení snímků těchto kolonií byl použit automatický fluorescenční mikroskop (Nikon Eclipse 90i) s motorizovaným Z-posuvem (ostřením), opatřený automatickým pohyblivým pracovním stolem. Fluorescenční mikroskop byl vybaven digitální kamerou (Andor Clara), která byla připojena k počítači. Jelikož se jednalo o strukturně složitější typ kolonií, bylo zapotřebí realizovat akvizici obrazu v několika po sobě jdoucích krocích. Kompaktní kolonie byla zaostřena do své spodní části a následně vrcholu pomocí okuláru (Nikon CFI 10x/22) a objektivu (Nikon Plan Apo, 100x/1,40 Oil Iris). V programu NIS Elements (verze 5.11.00) následovalo označení zjištěné spodní části kompaktní kolonie, jejího vrcholu a spuštění automatickému snímání obrazu, tzv. Z-stacking. Výška, o který se pracovní stůl při automatickém snímání posunul byla nastavena na hodnotu 0,6 μm . Výsledkem těchto kroků byl soubor (ve formátu nd2) obsahující sekvenci jednotlivých snímků, které dohromady vytvořily celkový obraz kompaktní kolonie pikoplanktonních sinic.

5.3 Práce se softwarem

5.3.1 Kategorie pro koloniální pikoplanktonní sinice

Podle míry hustoty jednotlivých buněk, které tvořily sledovanou kolonii nebo struktury samotné kolonie bylo možno všechny sledované kolonie rozdělit celkem do šesti kategorií založených na morfologických popisech koloniálních pikoplanktonních sinic z publikace Komárek a Anagnostidis (1998). Způsob, kterým kategorie byly vytvořeny, se zakládal na pozorování jednotlivých kolonií. K jejich vytvoření bylo zapotřebí pouze to, jak kolonie vypadala neboli její morfologie. Kategorie a jejich charakteristika byly následující:

- **Aphanothece 1** (APT1) – Dvojměrné kolonie pikoplanktonních sinic ve slizové kolonii, kde se jednotlivé buňky vyskytovaly daleko od sebe (**Obr. 2A**).
- **Aphanothece 2** (APT2) – Dvojměrné kolonie pikoplanktonních sinic, ve kterých se jednotlivé buňky nacházely v těsné blízkosti (**Obr. 2B**).
- **Aphanothece 3** (APT3) – Trojměrné kompaktní kolonie pikoplanktonních sinic, ve kterých byly jednotlivé buňky nahuštěné přes sebe (**Obr. 2C**).
- **Merismopedia** (MER) – Dvojměrné kolonie pikoplanktonních sinic s charakteristickou strukturou po čtyřech buňkách. Jednotlivé buňky se dělily pouze ve dvou směrech a vytvářely specifickou mřížku (**Obr. 2D**).
- **Cyanodictyon 1** (CYN1) – Dvojměrné kolonie pikoplanktonních sinic ve slizové kolonii, které se skládaly z po sobě jdoucích jednotlivých buněk – tzv. řetízkové kolonie. Jednotlivé buňky, které tvořily řetízkovou kolonii byly v prostoru volné (**Obr. 2E**).
- **Cyanodictyon 2** (CYN2) – Dvojměrné kolonie pikoplanktonních sinice ve slizové kolonii, které se skládaly z po sobě jdoucích jednotlivých buněk – tzv. řetízkové kolonie. V tomto případě byly však jednotlivé buňky v těsné blízkosti (**Obr. 2F**).



Obr. 2: Příklady kolonií pikoplanktonních sinic pro jednotlivé kategorie (A – **APT1**, B – **APT2**, C – **APT3**, D – **MER**, E – **CYN1**, F – **CYN2**; zvětšení 1000x).

5.4 Analýza obrazu

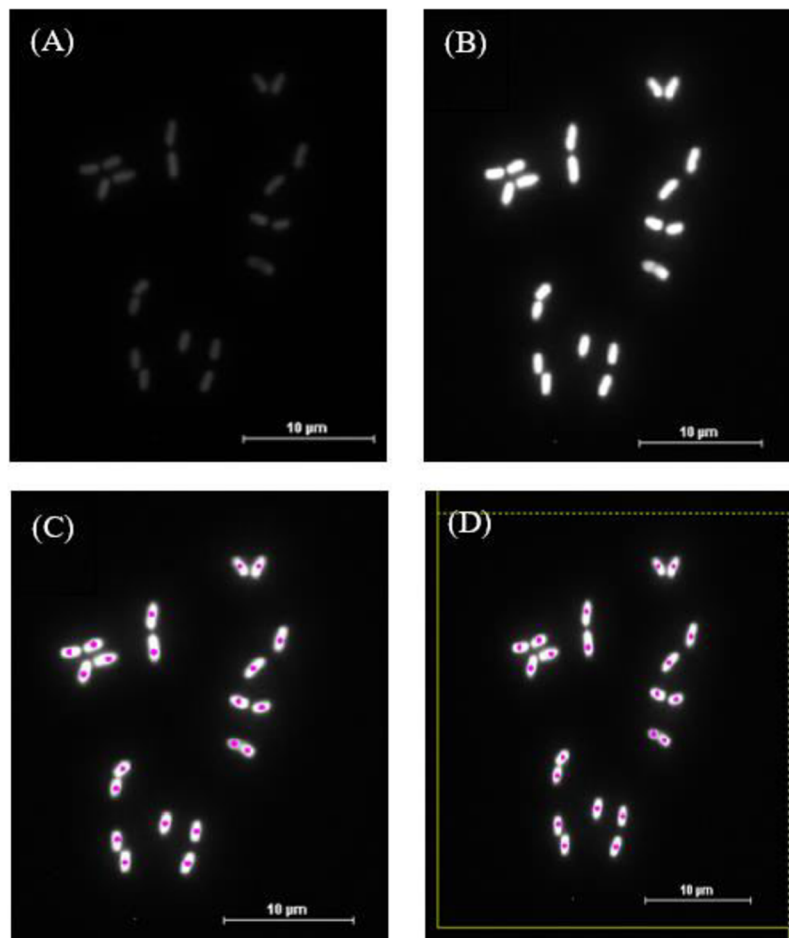
Pořízené snímky koloniálních pikoplanktonních sinic byly analyzovány v programu NIS Elements (verze 5.11.00). Účelem analýzy dílčích kolonií bylo generování potřebných dat, jejichž získání bylo běžnými metodami zdoluhavé, často i neproveditelné. Data byla zaznamenána do tabulek v programu Excel. Výstupní data získaná analýzou obrazu byla následující:

- plocha/objem kolonie pikoplanktonních sinic
- počet jednotlivých buněk tvořící sledovanou kolonii
- velikost a tvar jednotlivých buněk tvořící sledovanou kolonii

5.4.1 Makro pro dvojrozměrné kolonie pikoplanktonních sinic

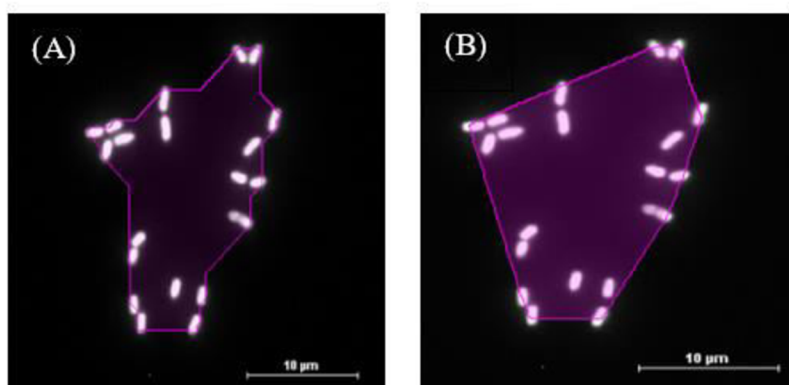
Pro dvojrozměrné kolonie pikoplanktonních sinic bylo vytvořeno jedno makro, viz obrázek v seznamu příloh (**Obr. P1**). Jakmile byl v programu NIS Elements (verze 5.11.00) otevřen snímek s dvojrozměrnou kolonií pikoplanktonních sinic (kat. **APT1**, **APT2**, **CYN1**, **CYN2**, **MER**), došlo k nastavení makra pomocí funkce **SelectObjectFeature**. Na základě této funkce byly zvoleny následující parametry: *Area*, *Perimeter*, *Elongation*, *Circularity*, *Convexity*, *MaxFeret* a *MinFeret*.

Vizuální stránka snímku s dvojrozměrnou kolonií pikoplanktonních sinic byla poté pomocí funkce **Contrast** vylepšena pro zjednodušení následujících kroků. Následovala funkce **Spot-detection**, která pracuje na základě segmentace obrazu. Výsledkem této funkce bylo rozdělení obrazu na oblasti objektu a oblast pozadí. Jelikož se v mnoha případech sledované kolonie na snímcích nevyskytovaly samostatně, byly zapotřebí funkce **MeasFrame** a **ImageEdit**. První z těchto funkcí vygenerovala rámeček, s jehož pomocí bylo možné ohraničit oblast objektu. Druhá funkce sloužila k finální úpravě samotné kolonie. Tímto způsobem vznikl binární obraz, díky kterému bylo možné určit počet jednotlivých buněk, které tvořily sledovanou kolonii.



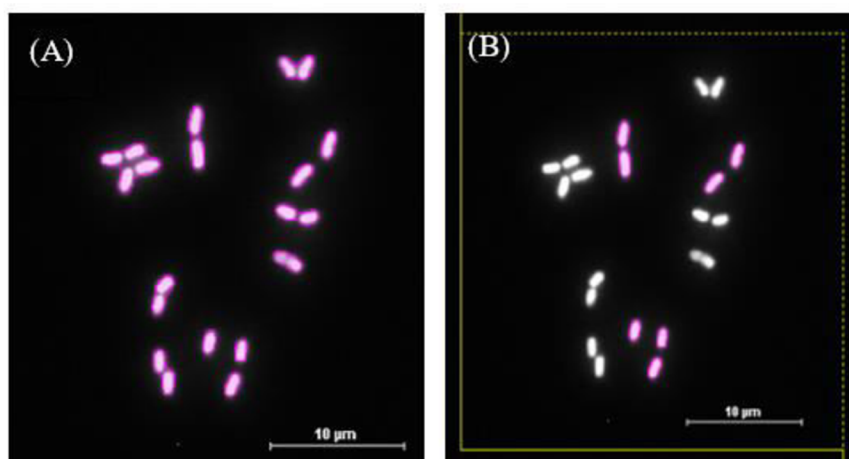
Obr. 3: Postup pro získání počtu buněk pikoplanktonních sinic ve dvojrozměrné kolonii (A – originální obraz, B – obraz upraven funkcí **Contrast**, C – segmentace obrazu funkcí **Spot-detection**, D – ohraničení objektu funkcí **MeasFrame** a finální úprava; zvětšení 1000x).

Poté, co byl počet buněk zapsán do excelové tabulky, následovalo určení plochy kolonie pikoplanktonních sinic. K tomu posloužily dvě na sobě závislé funkce. První z nich byla matematicko-morfologická funkce **Close**. Funkce Close je dilatace následovaná erozí, takže velikost objektů nebyla významně ovlivněna. Druhou funkcí byl **Convex Hull**. Díky těmto dvěma funkcím bylo možné určit plochu sledované kolonie a její konvexnost. Zjištěné hodnoty byly zapsány do excelové tabulky.



Obr. 4: Postup pro získání plochy dvojrozměrné kolonie pikoplanktonních sinic (A – určení konvexnosti kolonie funkcí **Close**, B – určení plochy funkcí **Convex Hull**; zvětšení 1000x).

Posledními parametry, které byly nutné určit, byla velikost a tvar jednotlivých buněk. Dosavadní binární obraz byl smazán a nahrazen novým. V tomto případě však nebyla použita funkce spot-detection, nýbrž funkce **DefineTreshold**. Tato funkce rozdělila oblast objektu od oblasti pozadí vcelku, na rozdíl od funkce spot-detection. Vznikly tak binární objekty, které přesně kopírovaly tvar dílčích buněk. Binární obraz byl opět za pomoci funkcí **MeasFrame** a **ImageEdit** ohraničen a upraven. Upravený obraz s vybranými zástupci buněk pikoplanktonních sinic byl změřen. Velikost a tvar buněk byl zapsán do excelové tabulky.



Obr. 5: Postup pro získání jednotlivých parametrů buněk pikoplanktonních sinic ve dvojrozměrné kolonii (A – segmentace obrazu funkcí **DefineTreshold**, B – ohraničení a finální úprava obrazu funkcemi **MeasFrame** a **ImageEdit**; zvětšení 1000x).

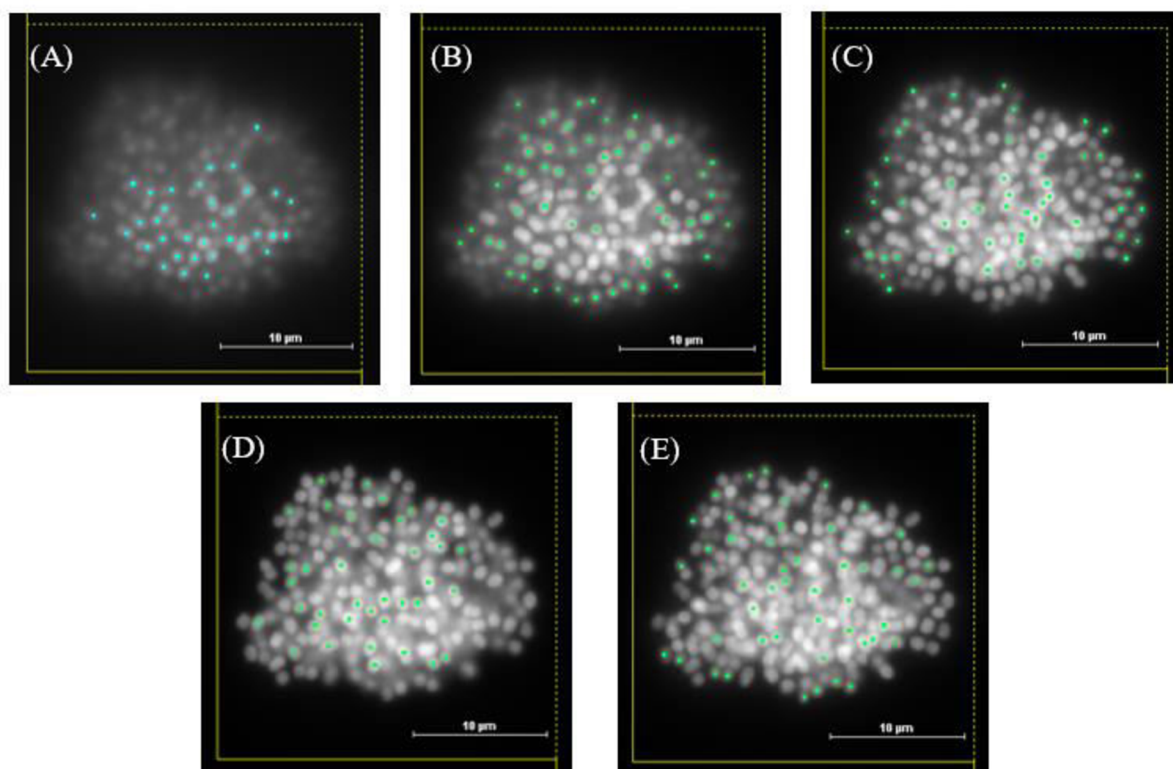
5.4.2 Trojrozměrné kolonie pikoplanktonních sinic

Makra pro trojrozměrné kolonie pikoplanktonních sinic (**kat. APT3**) byla vytvořena dvě. První makro bylo vytvořeno za účelem získání počtu buněk (**Obr. P2**). Druhé makro mělo za cíl získat hlavní parametry jednotlivých buněk, které tvořili sledovanou kolonii (**Obr. P3**). V tomto případě byly parametry, nastavené funkcí **SelectObjectFeature**, následující: *Area*, *Perimeter*, *Elongation*, *Circularity*, *MaxFeret* a *MinFeret*.

Na rozdíl od dvojrozměrného typu kolonií, však bylo zapotřebí postup k získání objemu kolonie a počtu buněk pozměnit. Důvodem této změny byla rozměrově složitější struktura sledovaných kolonií.

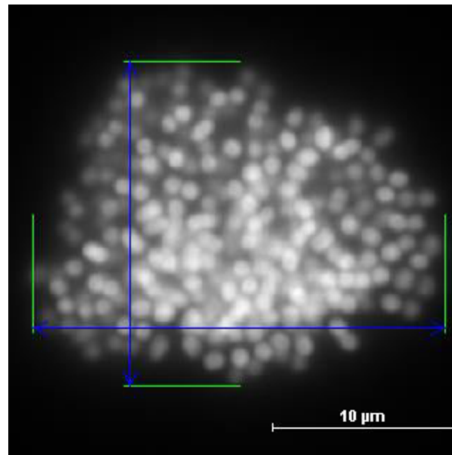
5.4.2.1 První makro – počet buněk a plocha kolonie

Soubor obsahující sekvence snímků, které dohromady tvořily sledovanou kolonii v prostoru byl otevřen v programu. Zatímco u makra pro dvojrozměrné kolonie nebylo zapotřebí měnit mezi dílčími snímky, zde bylo potřeba začít od prvního snímku. Následně byl vylepšen obraz funkcí **LUTs**, která zvýšila kontrast sledovaných objektů. K rozdělení oblasti objektu od oblasti pozadí byla využita funkce **Spot-detection**. V rámci této funkce bylo pro správné fungování důležité vybrat možnost použití jen na aktuální snímek. Stejně jako tomu bylo u předešlého makra pro dvojrozměrné kolonie, k ohraničení oblasti objektu byl využit rámeček vygenerovaný funkcí **MeasFrame**. Jakmile byl vytvořen binární obraz, bylo použito několik na sebe navazujících funkcí – **BinaryOperations**, **Expand** a **MoreBinaries**. Základem těchto funkcí je práce s referenčními snímky. Z prvního snímku sekvence byla vytvořena první referenční vrstva binárního obrazu. Poté byl zvolen druhý snímek, který byl uložen jako druhá referenční vrstva. Buňky se shodujícím se místem výskytu z prvního referenčního snímku byly na druhém snímku odečteny. Díky těmto na sebe navazujícím funkcím byl získán počet pouze těch buněk pikoplanktonních sinic, které se nepřekrývaly. Následovalo smazání obou referenčních vrstev, vytvoření referenčních vrstev nových z druhého a třetího snímku a odečtení buněk se shodujícím se místem výskytu. Tento postup byl opakován na celé sekvenci snímků, díky němuž bylo možné získat a zapsat do excelové tabulky data určující počet jednotlivých buněk v kompaktní trojrozměrné kolonii.



Obr. 6: Postup pro získání počtu buněk pikoplanktonních sinic v trojrozměrné kolonii (A – segmentace obrazu funkcí **Spot-detection**, (B–E) – jednotlivé vrstvy s nepřekrývajícími se buňkami zpracovány funkcemi **BinaryOperations**, **Expand** a **MoreBinaries**; zvětšení 1000x).

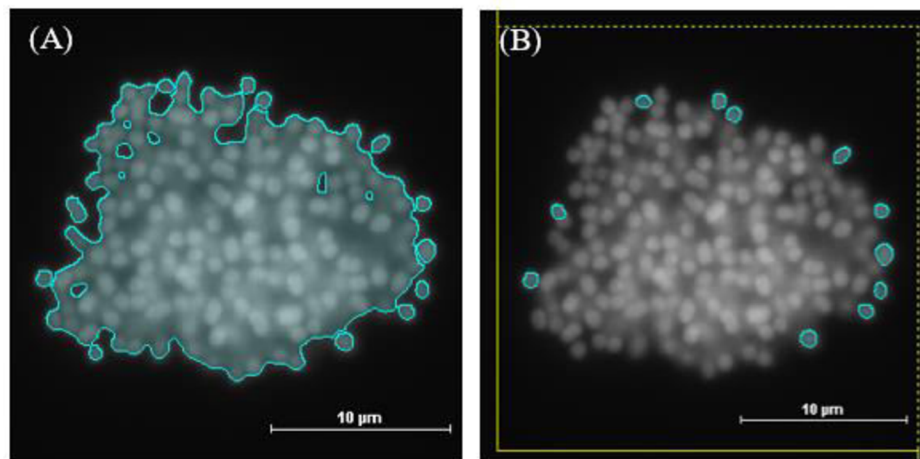
V případě trojrozměrných kolonií pikoplanktonních sinic se místo plochy kolonie, jako tomu bylo u dvojrozměrného typu kolonií, zjišťoval jejich objem. Jelikož program NIS Elements (verze 5.11.00) nedisponoval žádnou funkcí, která by spolehlivě tento parametr určila, bylo zapotřebí délku a šířku sledované kolonie změřit ručně pomocí funkce **MeasureLenght** a dále pracovat s programem Excel. Scházející parametr, výška kolonie, odpovídal součtu mezer mezi vrstvami, které společně tvořily obraz kompaktní kolonie. V tomto případě činil rozdíl mezi jednotlivými vrstvami 0,6 µm. Jakmile byly zjištěny všechny potřebné hodnoty os sledované kolonie, v programu Excel byl vypočítán její objem. K tomu byl použit vzorec na objem elipsoidu.



Obr. 7: Měření délky a šířky trojrozměrné kolonie funkcí **MeasureLength** (zvětšení 1000x).

5.4.2.2 Druhé makro – parametry jednotlivých buněk

Soubor, který obsahoval sekvence snímků byl otevřen v programu NIS Elements (verze 5.11.00). Při určování velikosti a tvaru jednotlivých buněk, které tvořily kompaktní trojrozměrnou kolonii se postupovalo podobně jako u dvojrozměrných kolonií. Jediným rozdílem v postupu byl výběr vhodného snímku ze sekvence, na kterém se nacházeli zřetelně oddělené buňky. Jakmile byl snímek vybrán, dosavadní binární obraz byl smazán a nahrazen binárním obrazem vytvořeným funkcí **DefineTreshold**. Následovalo ohraničení a úprava, stejně jako u dvojrozměrných kolonií, pomocí funkcí **MeasFrame** a **ImageEdit**. Nově vzniklý binární obraz byl změřen a zjištěné hodnoty byly zapsány do excelové tabulky.



Obr. 8: Postup pro získání jednotlivých parametrů buněk pikoplanktonních sinic v trojrozměrné kolonii (A – segmentace obrazu funkcí **DefineThreshold**, B – ohraničení a úprava objektů funkcemi **MeasFrame** a **ImageEdit**; zvětšení 1000x).

5.5 Analýza dat

Data získaná z programu NIS Elements byla průběžně zapisována do vytvořené tabulky v programu Excel. Pro každou z šesti kategorií bylo zanalyzováno zhruba sto kolonií. Jednotlivé kolonie pikoplanktonních sinic byly do kategorií zařazeny na základě jejich morfologie, především na míře hustoty jejich buněk. Za tímto účelem byl vytvořen faktor hustoty pro dvojrozměrné a trojrozměrné kolonie pikoplanktonních sinic.

Faktor hustoty byl stanoven jako podíl počtu buněk, které se nacházely v kolonii a její plocha, případně objem. Výsledná hodnota udávala množství buněk na jednotku plochy nebo objemu (μm^2 nebo μm^3). Tímto způsobem byly všechny kolonie zanalyzovány a následně zařazeny do vytvořených kategorií. Hraniční hodnota hustoty mezi kategoriemi **APT1** a **APT2** byla stanovena na **0,2 buněk/ μm^2** . Z toho vyplynulo, že do kategorie APT1 byly zařazeny kolonie s faktorem hustoty, který byl menší nebo roven $0,2 \text{ buněk}/\mu\text{m}^2$, a naopak do kategorie APT2 byly zařazeny kolonie s faktorem hustoty větším než $0,2 \text{ buněk}/\mu\text{m}^2$. Stejným způsobem, jako tomu bylo u předešlých dvou kategorií, byla vytvořena hraniční hodnota hustoty mezi kategoriemi **CYN1** a **CYN2**. V tomto případě byla hodnota hustoty stanovena na **0,1 buněk/ μm^2** . Do kategorie CYN1 byly zařazeny kolonie s faktorem hustoty menším nebo rovným $0,1 \text{ buněk}/\mu\text{m}^2$ a do kategorie CYN2 kolonie s faktorem hustoty větším než hraniční hodnota hustoty. Pro zbylé dvě kategorie nebylo zapotřebí uvažovat o

hraničních hodnotách hustoty, jelikož se zde vyskytovaly kolonie pikoplanktonních sinic se specifickou a nezaměnitelnou morfologií. V případě kategorie **APT3** to byly trojrozměrné kompaktní kolonie s na sobě nahuštěnými buňkami a v rámci kategorie **MER** zase kolonie, které tvořily specifickou mřížku.

Posledním krokem v analyzování získaných dat bylo vytvoření faktoru hustoty pro každou z šesti kategorií. K tomu byly využity již zjištěné hodnoty hustot buněk, které společně tvořily kolonie. Hodnota celkového faktoru hustoty byla stanovena jako průměr všech hodnot hustot, které se v dané kategorii nacházely.

6. Aplikace semi-automatické metody

6.1 Příprava vzorků

V druhé části mého výzkumu byly použity přírodní vzorky s fytoplanktonem zafixované dvouprocentním roztokem formaldehydu. Stejně jako tomu bylo u předešlých vzorků i v tomto případě byly uloženy v chladicí místnosti s konstantní teplotou 4 °C. Lokality, ze kterých jednotlivé vzorky pocházely a datумы odběru byly následující:

- vodní nádrž Landštejn – 30.7. 2020
- vodní nádrž Slapy – 11.8. 2020
- vodní nádrž Žlutice – 11.8. 2020
- jezero Majez – 1.9. 2020
- jezero Kuc – 1.9. 2020
- vodní nádrž Landštejn – 10.9. 2020
- rybník Šamonický Dolní – 15.9. 2020
- rybník Buchhammer – 15.9. 2020
- rybník Hůry-náves – 30.9. 2020
- rybník Vydýmač – 30.9. 2020
- rybník Mrhal – 30.9. 2020
- rybník Punčocha – 30.9. 2020

Příprava vzorků proběhla v digestoři s filtrační aparaturou. K přenesení vzorku do filtrační aparatury byla použita mikropipeta (Finnpipette 4500), která byla nastavena na požadovaný objem. Velikost objemu jednotlivých přírodních vzorků byla určena na základě hustoty fytoplanktonu (**Tab. 1**). Následovalo přidání 50 µm fluorescenčního barviva DAPI.

Poté byl vzorek nechán tři minuty bez zásahu za účelem správného navázání fluorescenčního barviva na AT bohaté oblasti DNA buněk pikoplanktonních sinic. Po třech minutách byl přírodní vzorek s přidáním fluorescenčním barvivem za pomoci kompresoru přefiltrován. Jako porézni přepážka byly zvoleny černé polykarbonové membránové filtry (Nuclepore) o průměru 20 mm a velikosti póru 0,2 μm . Posledním krokem v přípravě bylo zakápnutí podložního sklíčka imerzním olejem, přenesení membránového filtru s filtračním koláčem, zakápnutí samotného membránového filtru imerzním olejem, a nakonec přiložení krycího sklíčka. Tímto způsobem bylo vytvořeno 12 preparátů, které obsahovaly vzorky z výše uvedených lokalit.

Na základě chemismu vody byly lokality rozděleny do dvou skupin: nádrže a rybníky. Skupina „nádrže“ zahrnovala oligotrofní a mesotrofní vodní nádrže a jezera s větší průhledností vody 1,6–5,8 m, zatímco skupina „rybníky“ zahrnovala hypertrofní rybníky s průhledností 0,2–0,6 m.

Tab. 1: Velikost objemů jednotlivých přírodních vzorků.

Lokalita	Objem	Lokalita	Objem	Lokalita	Objem
Kuc	1 ml	Majcz	3 ml	Hůry-náves	5 ml
Landštejn (1)	1 ml	Punčocha	3 ml	Mrhal	5 ml
Vydýmač	1 ml	Buchhammer	5 ml	Slapy	5 ml
Šamonický Dolní	1 ml	Žlutice	5 ml	Landštejn (2)	5 ml

6.2 Práce s hardwarem

Následujícím krokem bylo přenesení živého obrazu do digitální podoby. Pro každý z 12 vzorků bylo vytvořeno cca 50 snímků, na kterých se nacházely typově různorodé kolonie pikoplanktonních sinic.

6.2.1 Dvojměrné kolonie pikoplanktonních sinic

Připravené preparáty byly postupně vkládány na pracovní stůl fluorescenčního mikroskopu (Olympus BX60), který byl vybaven digitální kamerou (Jenoptik). Kolonie byly, za použití imerzního oleje, pozorovány okulárem (Olympus WH10X/22) a objektivem (Olympus UplanApo, 100x/1,35 Oil Iris), vyfoceny a následně uloženy do počítače pomocí programu NIS Elements (verze 4.60.00). Manipulace s pracovním stolem, tedy i se

samotným preparátem měla určitá pravidla. Způsob manipulace spočíval v určení bodu, odkud bude s preparátem posouváno. V mém případě byl počáteční bod určen jako horní okraj membránového filtru. Následoval pohyb směrem k dolnímu okraji membránového filtru. Jakmile došlo k dosažení dolního okraje, pracovní stůl byl posunut o délku zorného pole doprava a postup se opakoval směrem k hornímu okraji. Výsledkem byl prozkoumaný pás membránového filtru o známé velikosti plochy. Tímto způsobem byly pořízeny snímky dvojrozměrných kolonií pikoplanktonních sinic ve všech přírodních vzorcích z jmenovaných lokalit.

6.2.2 Trojrozměrné kolonie pikoplanktonních sinic

Kompaktní kolonie pikoplanktonních sinic byly zpracovány na fluorescenčním mikroskopu (Nikon Eclipse 90i), který byl vybaven automatickým pohyblivým pracovním stolem a digitální kamerou (Andor Clara). Kompaktní kolonie byla zaostřena do své spodní části a následně vrcholu pomocí okuláru (Nikon CFI 10x/22) a objektivu (Nikon Plan Apo, 100x/1,40 Oil Iris). Obě části byly označeny v programu NIS Elements (verze 5.11.00). V programu bylo spuštěno automatické snímání, tzv. Z-stacking. Mezera mezi snímanými vrstvami kolonie byla nastavena na hodnotu 0,6 μm . Manipulace s pracovním stolem byla stejná jako u akvizice obrazu dvojrozměrných kolonií pikoplanktonních sinic (viz výše). Výchozím bodem byl zvolen horní okraj membránového filtru. Následoval pohyb směrem ke spodnímu okraji. Poté, co byl dosažen spodní okraj, pracovní stůl byl posunut o délku zorného pole doprava a postup se opakoval směrem k hornímu okraji. Výsledkem byl určitý počet prozkoumaných pásů membránového filtru o známé velikosti plochy. Tímto způsobem byly vytvořeny soubory (ve formátu nd2) se snímky trojrozměrných kolonií pikoplanktonních sinic ve všech přírodních vzorcích z jmenovaných lokalit.

6.3 Práce se softwarem

6.3.1 Analýza obrazu

Pořízené snímky kolonií z daných lokalit byly zpracovány v programu NIS Elements (5.11.00). Snímky dvojrozměrných a trojrozměrných kolonií pikoplanktonních sinic byly zanalyzovány semi-automatickou metodou, která byla v rámci první části výzkumu pro oba typy kolonií vytvořena. Zjištěné hodnoty počtů buněk, ploch kolonií, velikost a tvar jednotlivých buněk byly zaznamenány do excelové tabulky.

6.3.2 Analýza dat

Data získaná analýzou obrazu byla dále hodnocena v programu Excel. Zároveň se zapisováním dat získaných analýzou obrazu byly jednotlivé kolonie pikoplanktonních sinic třízeny do vytvořených kategorií (kat. **APT1**, **APT2**, **APT3**, **CYN1**, **CYN2**, **MER**). Celkový počet kolonií, v rámci každé kategorie, byl vypočten pomocí faktoru. Hodnota faktoru (76,5) byla určena podílem plochy filtračního koláče (314 mm²) a plochy pásu (4,1 mm²) neboli zorného pole. Výsledkem byl počet kolonií pikoplanktonních sinic, který se nacházel v objemu vzorku o velikosti 1 ml. Tímto způsobem byly získány počty kolonií v jednotlivých kategoriích napříč všemi lokalitami.

7. Statistika

Veškerá data byla statisticky vyhodnocena v programu GraphPad Prism (verze 9.4.1). Uvnitř každé z šesti kategorií byly hodnoty, které odpovídaly množství buněk zjištěnému analýzou obrazu a množství buněk dopočítané pomocí vytvořeného faktoru hustoty statisticky vyhodnoceny funkcí lineární regrese. V případě porovnání lokalit, ze kterých pocházely kolonie pikoplanktonních sinic byla též využita analýza rozptylu (jednofaktorová ANOVA). V rámci analýzy fytoplanktonu v přírodních vzorcích z nádrží a rybníků byl ke statistickému ověření použit Welchův t-test.

Výsledky

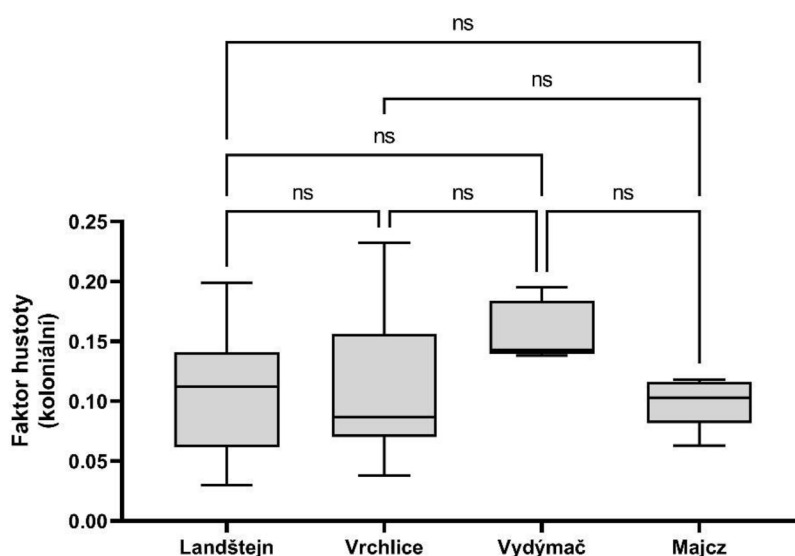
8. Vývoj semi-automatické metody

Snímky kolonií byly upraveny a analyzovány v několika krocích, které dohromady vytvořily semi-automatickou metodu neboli makro. Makra pro dvojrozměrné a trojrozměrné kolonie pikoplanktonních sinic byla v souborech typu .mac vložena do přílohy. Pro kategorie **APT1**, **APT2**, **APT3**, **MER**, **CYN1** a **CYN2** byly na základě analýzy dat vytvořeny faktory hustoty.

8.1 Kategorie APT1

V kategorii APT1 bylo zanalyzováno 93 kolonií z deseti různých lokalit. Zastoupení koloniemi pikoplanktonních sinic v daných lokalitách však nebylo shodné. Výrazný počet kolonií (více než 5) pikoplanktonních sinic se vyskytoval ve čtyřech lokalitách: Landštejn,

Vrchlice, Vydýmač a Majcz. Faktory hustoty jednotlivých kolonií se však napříč lokalitami signifikantně nelišily (**Obr. 9**).



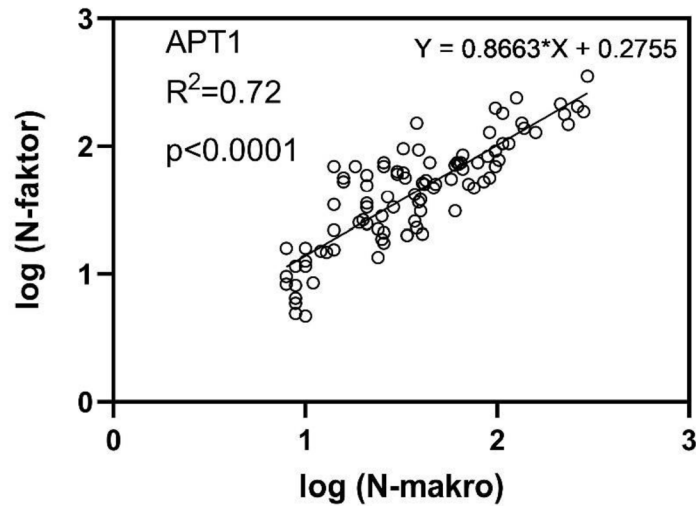
Obr. 9: Porovnání faktorů hustoty jednotlivých kolonií z nejhojněji zastoupených lokalit v kategorii APT1 (ANOVA).

Na základě analýzy dat byl faktor hustoty pro kategorii APT1 stanoven na hodnotu **0,10 ± 0,04**. Jeho správnost a funkčnost byla statisticky otestována lineární regresí, kde byly porovnávány počty buněk určené semi-automatickou metodou v analýze obrazu a počty buněk vypočítané zjištěným kategoriálním faktorem. Test v tomto případě s hodnotou $p < 0,0001$ prokazatelně vyšel (**Obr. 10**). Zbývající zjištěná data byla shrnuta do tabulky (**Tab. 2**).

Tab. 2: Vyhodnocená data kolonií v kategorii APT1.

APT1	N (m)	Konv.	A (m)	f(ρ)	x	y	A (vz)	N (f)	N (m)/N (f)	A (m)/A (vz)
Průměr	58	0,77	615,12	0,10	21,70	31,39	628,35	64	1,34	0,98
SD	62	0,10	605,70	0,04	10,86	15,02	595,07	61	0,84	0,16
Min	8	0,49	49,35	0,02	3,18	8,71	45,14	5	0,46	0,65
Max	297	0,92	3415,25	0,20	52,97	91,40	3441,39	350	4,89	1,46

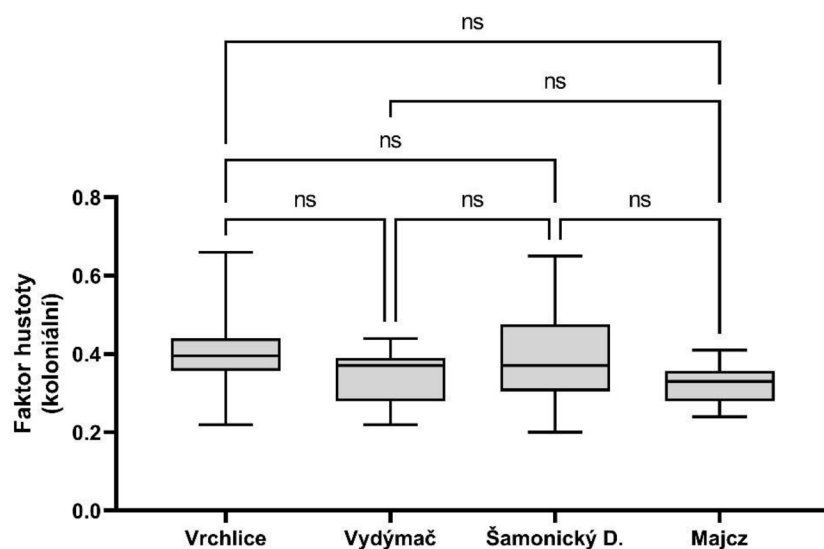
*N (m) – počet buněk (makro); Konv. – konvexitá; A (m) – plocha kolonie (makro); f (ρ) – faktor hustoty; x, y – osy kolonie; A (vz) – plocha (vzorec); N (f) – počet buněk (faktor)



Obr. 10: Výsledný graf lineární regrese zlogaritmovaného počtu buněk získaných skrze kategoriální faktor hustoty a semi-automatickou metodou v kategorii APT1.

8.2 Kategorie APT2

V kategorii APT2 bylo vyhodnoceno 100 kolonií pikoplanktonních sinic. Kolonie v této kategorii byly nalezeny ve vzorcích z deseti různých lokalit. Největší procentuální zastoupení kolonií v kategorii APT2 představovaly lokality Vrchlice, Vydýmač, Šamonický Dolní a Majcz. Při porovnání faktorů hustoty kolonií v těchto čtyřech lokalitách nedošlo k signifikantním rozdílům (**Obr. 11**).



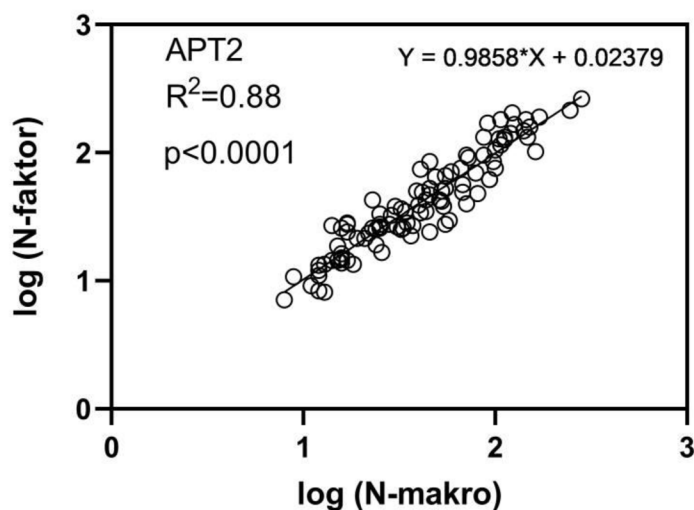
Obr. 11: Porovnání faktorů hustoty jednotlivých kolonií z nejhojněji zastoupených lokalit v kategorii APT2 (ANOVA).

V rámci analýzy dat byl pro kategorii APT2 vytvořen celkový (kategoriální) faktor hustoty. Jeho hodnota byla stanovena na $0,37 \pm 0,10$. Správnost a funkčnost faktoru hustoty byla statisticky otestována lineární regresí, kde byly porovnávány počty buněk určené semi-automatickou metodou v analýze obrazu a počty buněk vypočítané zjištěným kategoriálním faktorem. Test v tomto případě s hodnotou $p < 0,0001$ prokazatelně vyšel (**Obr.12**). Zbývající shrnutá data, která charakterizovala kolonie v kategorii APT2 jsou popsána v tabulce (**Tab. 3**).

Tab. 3: Vyhodnocená data kolonií v kategorii APT2.

APT2	N (m)	Konv.	A (m)	f(ρ)	x	y	A (vz)	N (f)	N (m)/N (f)	A (m)/A (vz)
Průměr	57	0,86	168,84	0,37	11,33	16,00	161,86	60	1,06	1,03
SD	50	0,07	162,84	0,10	6,65	8,36	148,61	55	0,32	0,13
Min	8	0,61	20,68	0,21	3,62	2,83	19,11	7	0,50	0,82
Max	285	0,95	815,74	0,66	57,46	45,80	713,34	265	1,93	1,36

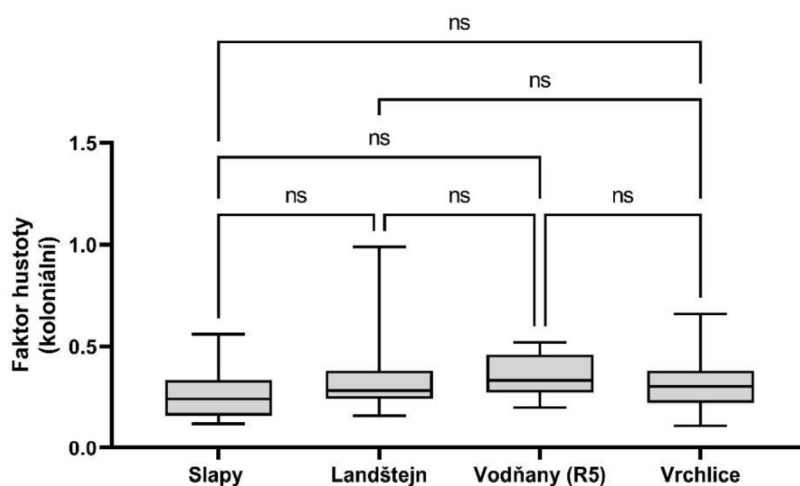
*N (m) – počet buněk (makro); Konv. – konvexita; A (m) – plocha kolonie (makro); f (ρ) – faktor hustoty; x, y – osy kolonie; A (vz) – plocha (vzorec); N (f) – počet buněk (faktor)



Obr. 12 Výsledný graf lineární regrese zlogaritmovaného počtu buněk získaných skrze kategoriální faktor hustoty a semi-automatickou metodou v kategorii APT2.

8.3 Kategorie APT3

V kategorii APT3 bylo metodou analýzy obrazu vyhodnoceno celkem 117 trojrozměrných kolonií pikoplanktonních sinic. Kompaktní kolonie byly součástí vzorků odebraných ze čtyř lokalit – Slapy, Landštejn, Vodňany (R5) a Vrchlice. Přičemž množství jednotlivých kolonií bylo v těchto lokalitách vůči sobě úměrné. Hodnoty koloniálních faktorů mezi zmíněnými lokalitami se nelišily (**Obr. 13**).



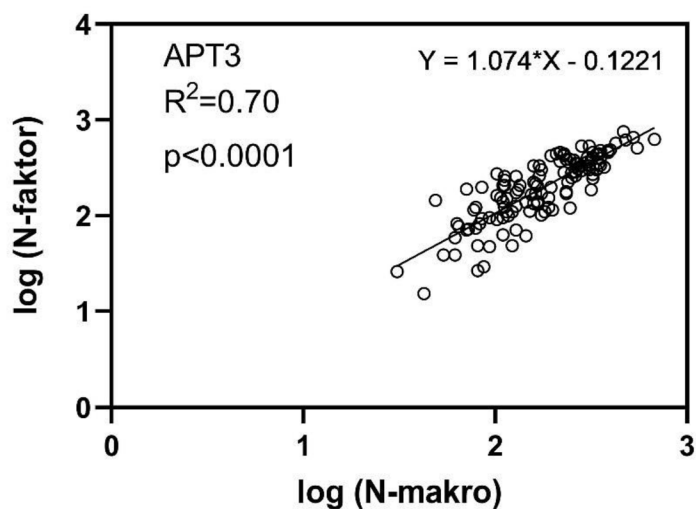
Obr. 13: Porovnání faktorů hustoty jednotlivých kolonií ze zastoupených lokalit v kategorii APT3 (ANOVA).

Pro kategorii APT3 s trojrozměrnými koloniemi pikoplanktonních sinic byl celkový faktor hustoty určen na hodnotu $0,31 \pm 0,14$. Jako tomu bylo u předešlých dvou kategorií, určená hodnota kategoriálního faktoru hustoty byla statisticky otestována. Funkce testující sílu závislosti mezi počty buněk vygenerované mnou vytvořenou metodou a počty buněk získané pomocí kategoriálního faktoru vyšla průkazně ($p < 0,0001$; **Obr. 14**). Ostatní parametry analýzy kolonií v kategorii APT3 byly shrnuty v tabulce (**Tab. 4**).

Tab. 4: Vyhodnocená data kolonií v kategorii APT3.

APT3	N (m)	x	y	z	V (vz)	f(p)	N (f)	N (m)/N (f)
Průměr	209	29,56	19,65	2,48	776,23	0,31	242	1,00
SD	120	11,30	6,95	0,97	487,61	0,14	152	0,45
Min	31	9,39	8,01	0,60	79,91	0,11	25	0,35
Max	670	71,78	43,25	7,80	2316,46	0,99	724	3,17

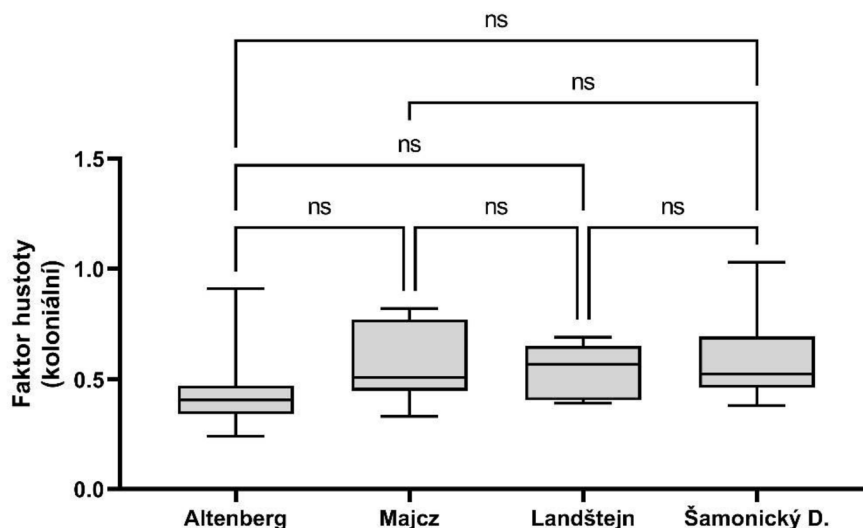
*N (m) – počet buněk (makro); x, y, z – osy kolonie; V (vz) – objem (vzorec); f (p) – faktor hustoty; N (f) – počet buněk (faktor)



Obr. 14: Výsledný graf lineární regrese zlogaritmovaného počtu buněk získaných skrze kategoriální faktor hustoty a semi-automatickou metodou v kategorii APT3.

8.4 Kategorie MER

Kolonií pikoplanktonních sinic se specifickou morfologií bylo zanalyzováno 103. Kolonie v této kategorii byly nalezeny ve vzorcích z devíti různých lokalit. Lokality s počtem více než pěti kolonií byly Altenberg, Majcz, Landštejn a Šamonický Dolní. Při statistickém hodnocení rozdílů v koloniálních faktorech hustoty v rámci těchto lokalit test neodhalil žádné rozdíly (**Obr. 15**).



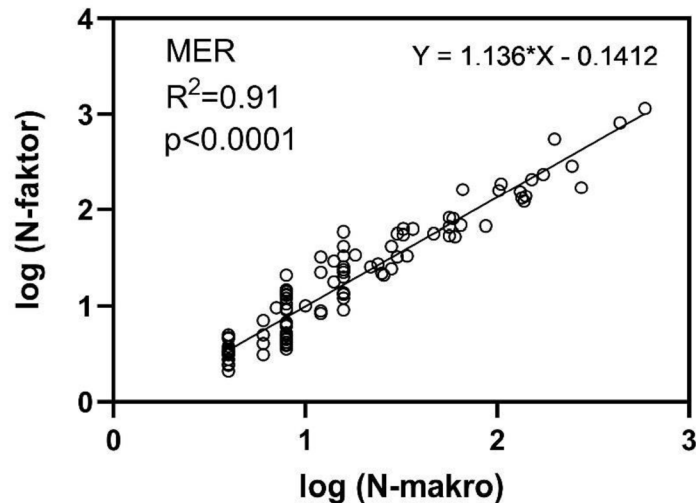
Obr. 15: Porovnání faktorů hustoty jednotlivých kolonií ze zastoupených lokalit v kategorii MER (ANOVA).

Kategoriální faktor hustoty byl v tomto případě stanoven na hodnotu $0,61 \pm 0,24$. Jeho správnost a funkčnost byla statisticky otestována lineární regresi, kde byly porovnávány počty buněk určené semi-automatickou metodou v analýze obrazu a počty buněk vypočítané zjištěným kategoriálním faktorem. Test v tomto případě s hodnotou $p < 0,0001$ prokazatelně vyšel (**Obr.16**). Výsledná data, kromě již zmíněného kategoriálního faktoru hustoty, byla shrnuta v tabulce (**Tab. 5**).

Tab. 5: Vyhodnocená data kolonií v kategorii MER.

MER	N (m)	Konv.	A (m)	f(ρ)	x	y	A (vz)	N (f)	N (m)/N (f)	A (m)/A (vz)
Průměr	43	0,89	99,95	0,61	8,28	8,24	98,88	60	1,06	1,05
SD	85	0,04	236,77	0,24	8,20	7,88	246,77	151	0,47	0,22
Min	4	0,76	3,37	0,19	2,02	1,76	3,33	2	0,28	0,39
Max	586	0,96	1749,84	1,22	49,81	47,69	1865,67	1138	2,31	2,20

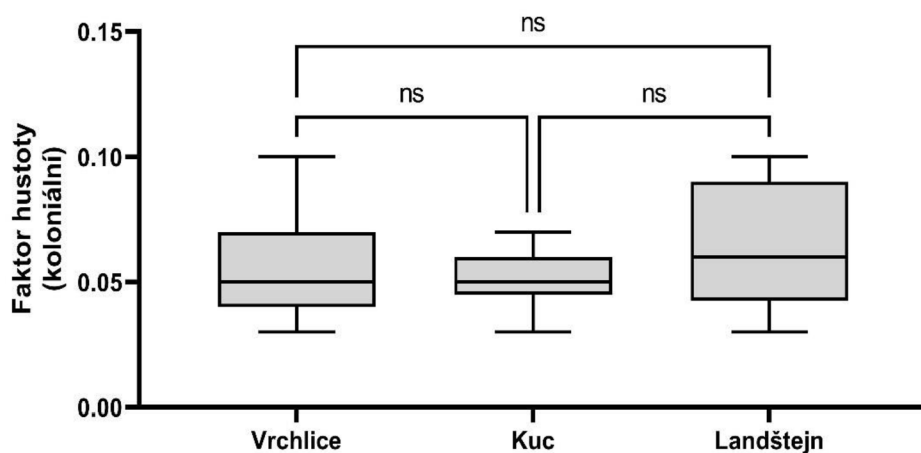
*N (m) – počet buněk (makro); Konv. – konvexita; A (m) – plocha kolonie (makro); f (ρ) – faktor hustoty; x, y – osy kolonie; A (vz) – plocha (vzorec); N (f) – počet buněk (faktor)



Obr. 16: Výsledný graf lineární regrese zlogaritmovaného počtu buněk získaných skrze kategoriální faktor hustoty a semi-automatickou metodou v kategorii MER.

8.5 Kategorie CYN1

V kategorii CYN1 bylo semi-automatickou metodou vyhodnoceno 81 kolonií pikoplanktonních sinic. Ty pocházely z celkem šesti lokalit, přičemž výrazné zastoupení kolonií (více než 5) bylo zaznamenáno ve vzorcích z lokalit Vrchlice, Kuc a Landštejn. Po statistickém vyhodnocení bylo potvrzeno, že faktory hustot kolonií z těchto čtyř lokalit se signifikantně nelišily (**Obr. 17**).



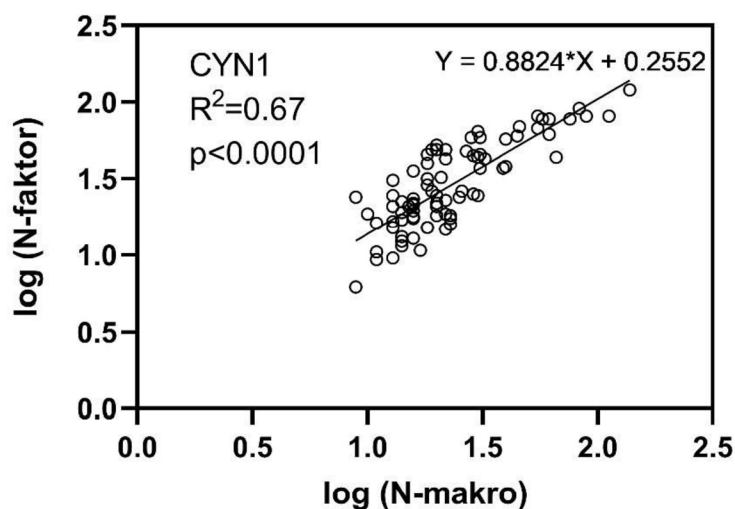
Obr. 17: Porovnání faktorů hustoty jednotlivých kolonií ze zastoupených lokalit v kategorii CYN1 (ANOVA).

Metoda analýzy obrazu a následné vyhodnocení získaných dat vytvořily faktor hustoty pro kategorii CYN1. Kategoriální faktor byl v tomto případě stanoven na hodnotu **0,06 ± 0,02**. Tato hodnota byla statisticky ověřena ($p < 0,0001$) výpočtem lineární regrese, kde se porovnávaly počty buněk získané při analýze obrazu a počty buněk, které byly vypočteny pomocí kategoriálního faktoru hustoty (**Obr. 18**). Ostatní data, která byla získána při analýze obrazu, byla vyobrazena v přehledné tabulce (**Tab. 6**).

Tab. 6: Vyhodnocená data kolonií v kategorii CYN1.

CYN1	N (m)	Konv.	A (m)	f(ρ)	x	y	A (vz)	N (f)	N (m)/N (f)	A (m)/A (vz)
Průměr	28	0,67	546,85	0,06	24,70	30,68	607,79	35	0,44	0,88
SD	23	0,12	419,44	0,02	11,64	11,68	404,10	23	0,16	0,21
Min	9	0,37	121,67	0,03	6,59	7,79	106,72	6	0,19	0,61
Max	137	0,89	2245,08	0,10	57,31	63,50	2090,42	121	0,80	2,15

*N (m) – počet buněk (makro); Konv. – konvexita; A (m) – plocha kolonie (makro); f (ρ) – faktor hustoty; x, y – osy kolonie; A (vz) – plocha (vzorec); N (f) – počet buněk (faktor)

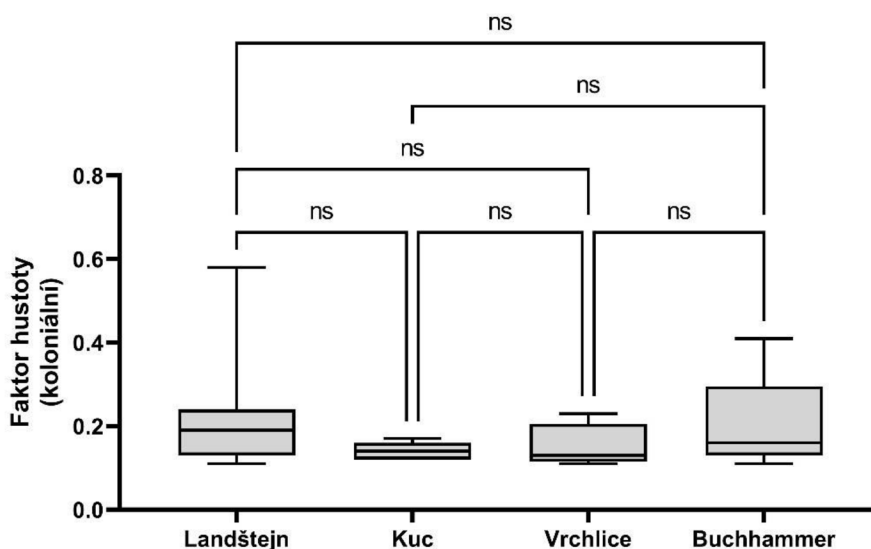


Obr. 18: Výsledný graf lineární regrese zlogaritmovaného počtu buněk získaných skrze kategoriální faktor hustoty a semi-automatickou metodou v kategorii CYN1.

8.6 Kategorie CYN2

V poslední kategorii, kde se vyskytovaly řetízkové kolonie s buňkami těsně u sebe, bylo proměřeno 61 objektů. Vzorky s těmito koloniemi byly odebrány ze 7 lokalit, přičemž

nejvíce zastoupené (více než 5 kolonií) byly Landštejn, Kuc, Vrchlice a Buchhammer. Faktory hustoty těchto kolonií byly statisticky ověřeny testem variance rozptylu. Test ověřil, že se koloniální faktory hustot v nejvíce zastoupených lokalitách prokazatelně nelišily (**Obr. 19**).



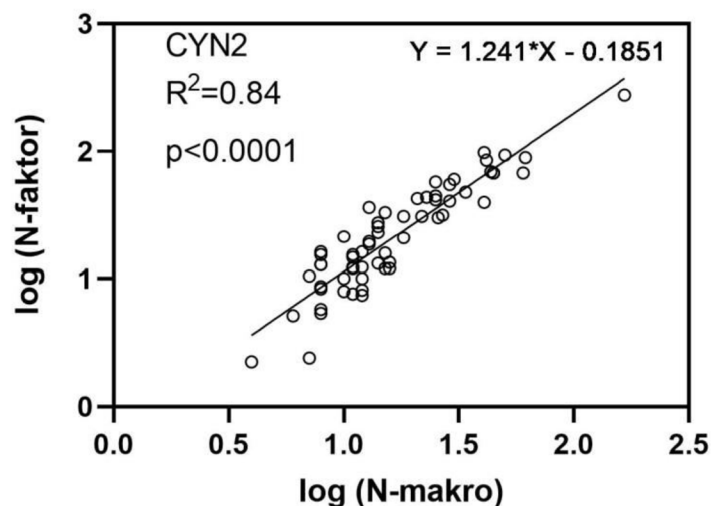
Obr. 19: Porovnání faktorů hustoty jednotlivých kolonií ze zastoupených lokalit v kategorii CYN2 (ANOVA).

V kategorii CYN2 byl celkový faktor hustoty vyhodnocen a stanoven na hodnotu $0,19 \pm 0,09$. Jeho spolehlivost a funkčnost byla statisticky ověřena. Test v tomto případě vyšel s hodnotou $p < 0,0001$ průkazně (**Obr. 20**). Ostatní parametry kolonií z analýzy v kategorii CYN2 byly shrnuty v tabulce (**Tab. 7**).

Tab. 7: Vyhodnocená data kolonií v kategorii CYN2.

CYN2	N (m)	Konv.	A (m)	f(ρ)	x	y	A (vz)	N (f)	N (m)/N (f)	A (m)/A (vz)
Průměr	22	0,76	150,66	0,19	13,43	15,36	174,21	34	0,85	0,85
SD	23	0,10	206,90	0,09	7,25	10,11	209,11	40	0,43	0,15
Min	4	0,47	6,92	0,11	3,07	1,47	11,64	2	0,36	0,59
Max	165	0,90	1499,41	0,58	41,03	44,84	1444,96	279	2,92	1,37

*N (m) – počet buněk (makro); Konv. – konvexita; A (m) – plocha kolonie (makro); f (ρ) – faktor hustoty; x, y – osy kolonie; A (vz) – plocha (vzorec); N (f) – počet buněk (faktor)



Obr. 20: Výsledný graf lineární regrese zlogaritmovaného počtu buněk získaných skrze kategoriální faktor hustoty a semi-automatickou metodou v kategorii CYN2.

9. Aplikace faktoru hustoty v praxi

Dvojměrné kolonie pikoplanktonních sinic pozorujeme při celkovém zvětšení 1000x. Na základě jejich morfologie se zařadí do příslušné kategorie. Na mikroskopu, vybaveném měřicí škálou získáme délku a šířku sledované kolonie. Tvar kolonie aproximujeme jako elipsu. Pomocí vzorce obsahu elipsy vypočítáme plochu dvojměrné kolonie.

$$\text{obsah elipsy} = \pi \times \text{poloosa a (délka)} \times \text{poloosa b (šířka)}$$

Výslednou hodnotu plochy kolonie vynásobíme příslušným faktorem hustoty (podle kategorie) a získáme počet jednotlivých buněk v dané kolonii.

Postup u trojrozměrných kolonií pikoplanktonních sinic je podobný. Celkové zvětšení je 1000x, a kromě měření délky a šířky se v tomto případě zaměřujeme i na výšku kompaktní kolonie. Hodnoty délky a šířky získáme stejným způsobem, pomocí měřicí škály v okuláru mikroskopu. Výšku změříme pomocí šroubu jemného posuvu, který zároveň disponuje stupnicí. Mikro posuvem zaostříme na dno a následně vrchol kolonie. Rozsah mezi těmito body je hloubka sledované kolonie. Objem kolonie aproximujeme jako elipsoid. Pomocí vzorce objemu elipsoidu vypočítáme objem trojrozměrné kolonie.

$$\text{objem elipsoidy} = \frac{4}{3} \times \pi \times \text{poloosa a (délka)} \times \text{poloosa b (šířka)} \times \text{poloosa c (výška)}$$

Výslednou hodnotu objemu kolonie vynásobíme faktorem hustoty pro kategorii APT3 a získáme počet jednotlivých buněk v dané kolonii. V tabulce (**Tab. 8**) jsou shrnuty veškeré informace potřebné k zařazení kolonie do kategorie a s nimi související faktory hustoty.

Tab. 8: Shrnutí charakteristik kategorií a příslušné kategoriální faktory hustoty.

Kategorie	Buňky v kolonii	Faktor hustoty
APT1	daleko od sebe	0,10 ± 0,04
APT2	v těsné blízkosti	0,37 ± 0,10
APT3	nahuštěné na sobě	0,31 ± 0,14
MER	specifická mřížka	0,61 ± 0,24
CYN1	řetízek – daleko od sebe	0,06 ± 0,02
CYN2	řetízek – v těsné blízkosti	0,19 ± 0,09

10. Aplikace semi-automatické metody

10.1 Kolonie v kategorii APT1

Kolonie pikoplanktonních sinic spadající do kategorie APT1 byly pozorovány ve všech vzorcích odebraných z nádrží (**Obr. P4A**). Kolonie v této kategorii chyběly ve vzorku z rybníka Hůry-náves (**Obr. P4B**). Ve vzorcích z nádrží byl průměrný počet kolonií/ml stanoven na hodnotu 466. Co se týče samotných nádrží, největší zastoupení v počtu kolonií/ml (727) bylo ve vzorku z nádrže Kuc. Naopak nejmenší zjištěný počet byl 100 kolonií/ml, a to ve vzorku z nádrže Slapy. V rybnících se průměrný počet kolonií v kategorii APT1, přepočtený na 1 ml, pohyboval okolo 140. Dominantní vzorek pocházel z rybníka Vydýmač, kde bylo 459 kolonií/ml. Slabý počet kolonií, kromě již zmiňované lokality, kde nebyly žádné kolonie, byl pozorován ve vzorku z rybníka Buchhammer. V tomto případě to bylo 15 kolonií/ml. Rozdíl mezi počtem kolonií ve vzorcích z nádrží a rybníků byl statisticky ověřen ($p < 0,05$). Počet kolonií v jednotlivých vzorcích byl shrnut v tabulce (**Tab. 9**).

Tab. 9: Počet kolonií/ml v kategorii APT1.

Nádrže	kol./ml	Rybníky	kol./ml
Landštejn (1)	612	Šamonický Dolní	77
Slapy	99	Buchhammer	15
Žlutice	520	Hůry-náves	0
Majcz	485	Vydýmač	459
Kuc	727	Mrhal	46
Landštejn (2)	352	Punčocha	102
Průměr	466	Průměr	140

10.1.1 Počet buněk a plocha kolonie

Ve vzorcích z nádrží bylo v koloniích průměrně 55 buněk (medián – 31 buněk), přičemž rozsah v počtu zde činil průměrně 9–240 buněk. Ve vzorcích z rybníků byl počet podobný, průměrně 53 buněk/kolonii (medián – 46 buněk). Podobnost v počtu buněk v koloniích z nádrží a rybníků byla ověřena statistickým testem ($p > 0,05$). Naopak rozsah mezi minimálním a maximálním počtem buněk zde byl užší, průměrně 42–79 buněk. Průměrné počty buněk a další údaje jednotlivých vzorků z nádrží (**Obr. P5A**) a rybníků (**Obr. P5B**) jsou popsány v grafech a tabulce (**Tab. 10**).

Tab. 10: Shrnutá data počtů buněk v koloniích (APT1) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

APT1		Prům.	Med	Max	Min	APT1		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	N buněk/kolonie				Rybníky	N kol.	N buněk/kolonie			
Landštejn (1)	24	72	43	279	10	Šamonický D.	1	21	21	21	21
Slapy	13	57	43	145	8	Buchhammer	1	140	140	140	140
Žlutice	33	36	27	144	8	Hůry-náves	0	0	0	0	0
Majcz	19	33	21	86	8	Vydýmač	6	55	31	130	24
Kuc	19	40	21	266	8	Mrhal	3	16	17	20	12
Landštejn (2)	23	90	32	519	10	Punčocha	8	32	22	83	11
Průměr celk.	22	55	31	240	9	Průměr celk.	4	53	46	79	42

Plocha kolonií ve vzorcích z nádrží byla v průměru $622 \mu\text{m}^2$ (medián – $415 \mu\text{m}^2$), naopak ve vzorcích z rybníků byly kolonie z kategorie APT1 menší. Průměrná plocha zde odpovídala $388 \mu\text{m}^2$ (medián – $350 \mu\text{m}^2$). Mediány ploch kolonií se signifikantně nelišily ($p > 0,05$). Rozmezí, ve kterém se velikosti kolonií pohybovaly, byla různá. Ve vzorcích z nádrží kolonie dosahovaly v průměru $2305 \mu\text{m}^2$, zatímco kolonie ve vzorcích z rybníků

v průměru pouhých 525 μm^2 . Co se týče spodní hranice rozsahu, u kolonií ze vzorků nádrží byla průměrná velikost ploch 65 μm^2 a ze vzorků z rybníků 312 μm^2 . Průměrné plochy kolonií a ostatní údaje o dílčích vzorcích z nádrží (**Obr. P6A**) a rybníků (**Obr. P6B**) byly popsány v grafech a tabulce (**Tab. 11**).

Tab. 11: Shrnutá data ploch kolonií (APT1) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

APT1		Prům.	Med	Max	Min	APT1		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	μm^2				Rybníky	N kol.	μm^2			
Landštejn (1)	24	1082	690	3096	54	Šamonický D.	1	530	530	530	530
Slapy	13	530	330	1843	43	Buchhammer	1	753	753	753	753
Žlutice	33	401	323	1854	50	Hůry-náves	0	0	0	0	0
Majcz	19	378	307	1459	47	Vydýmač	6	311	223	668	123
Kuc	19	611	460	2864	134	Mrhal	3	100	104	118	77
Landštejn (2)	23	731	381	2714	60	Punčocha	8	246	139	556	77
Průměr celk.	22	622	415	2305	65	Průměr celk.	4	388	350	525	312

10.1.2 Velikostní parametry buněk

Průměrná délka buněk ve vzorcích z nádrží byla 1,53 μm , průměrná šířka buněk se pohybovala okolo 0,65 μm a buněčný objem dosahoval 0,66 μm^3 . Podobně na tom byly parametry buněk ve vzorcích z rybníků. Zde byly buňky 1,35 μm dlouhé, 0,77 μm široké a jejich buněčný objem byl stanoven na 0,53 μm^3 . Z hlediska statistického ověření se průměrná délka buněk v nádržích a rybnících signifikantně lišila ($p < 0,05$), naopak průměrná šířka a buněčný objem se nelišily ($p > 0,05$). Průměrné hodnoty parametrů buněk v jednotlivých vzorcích z nádrží a rybníků byly shrnuty v tabulce (**Tab. 12**) a grafech (**Obr. P7**).

Tab. 12: Shrnutá data parametrů buněk (APT1) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

APT1	délka	šířka	bun. obj.	APT1	délka	šířka	bun. obj.
Nádrže	μm		μm^3	Rybníky	μm		μm^3
Landštejn (1)	1,53	0,75	0,60	Šamonický D.	1,26	0,64	0,33
Slapy	1,55	0,72	0,56	Buchhammer	1,34	0,82	0,58
Žlutice	1,50	0,73	0,55	Hůry-náves	0,00	0,00	0,00
Majcz	1,54	0,32	0,61	Vydýmač	1,43	0,74	0,54
Kuc	1,44	0,68	0,47	Mrhal	1,41	0,85	0,66
Landštejn (2)	1,67	0,74	1,06	Punčocha	1,30	0,80	0,54
Průměr	1,53	0,65	0,66	Průměr	1,35	0,77	0,53

10.2 Kolonie v kategorii APT2

Kolonie pikoplanktonních sinic zařazené do kategorie APT2 byly pozorovány ve všech vzorcích jak z nádrží (**Obr. P4C**), tak z rybníků (**Obr. P4D**). Ve vzorcích z nádrží bylo průměrně 291 kolonií/ml, zatímco průměrný počet kolonií/ml ve vzorcích z rybníků byl 1448. Přestože se průměrný počet kolonií na ml lišil, statistickou signifikanci se nepodařilo prokázat ($p > 0,05$). Co se týče nádrží, největší počet kolonií/ml (510) byl zjištěn ve vzorku Majcz a naopak nejméně kolonií/ml (77) bylo ve vzorku z nádrže Slapy. Vysoký počet kolonií ve vzorcích z rybníků byl pozorován v lokalitách Šamonický Dolní a Vydýmač. V první z nich se nacházelo 3978 kolonií/ml a v druhé bylo 2907 kolonií/ml. Nejmenší počet kolonií byl pozorován v rybníku v Hůrách na návsi (344 kolonií/ml). Počet kolonií ve zbývajících vzorcích byl shrnut v tabulce (**Tab. 13**).

Tab. 13: Počet kolonií/ml v kategorii APT2.

APT2		APT2	
Nádrže	kol./ml	Rybníky	kol./ml
Landštejn (1)	229	Šamonický Dolní	3978
Slapy	77	Buchhammer	536
Žlutice	168	Hůry-náves	344
Majcz	510	Vydýmač	2907
Kuc	383	Mrhal	551
Landštejn (2)	383	Punčocha	370
Průměr	291	Průměr	1448

10.2.1 Počet buněk a plocha kolonie

V koloniích pikoplanktonních sinic byly průměrné počty buněk jak ve vzorcích z nádrží (**Obr. P5C**), tak v těch z rybníků (**Obr. P5D**) totožné. V prvním případě bylo v koloniích 62 buněk (medián – 39 buněk) a v tom druhém se v koloniích vyskytovalo v průměru 58 buněk (medián – 34 buněk). Počet buněk v koloniích ve vzorcích z nádrží a rybníků se signifikantně nelišil ($p > 0,05$). Průměrný početní rozsah v případě nádrží byl 100–261 buněk a ve vzorcích z rybníků 9–327 buněk. Veškerá data týkající se počtu buněk byla vložena do tabulky (**Tab. 14**).

Tab. 14: Shrnutá data počtů buněk v koloniích (APT2) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

APT2		Prům.	Med	Max	Min	APT2		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	N buněk/kolonie				Rybníky	N kol.	N buněk/kolonie			
Landštejn (1)	9	28	21	69	14	Šamonický D.	52	49	37	169	12
Slapy	10	64	71	137	11	Buchhammer	35	69	32	476	8
Žlutice	11	114	36	689	8	Hůry-náves	45	52	44	134	9
Majcz	20	77	49	407	8	Vydýmač	38	52	25	246	8
Kuc	10	23	20	55	9	Mrhal	36	52	41	155	11
Landštejn (2)	25	67	38	207	11	Punčocha	29	77	28	779	6
Průměr celk.	14	62	39	261	10	Průměr celk.	39	58	34	327	9

Plocha kolonií ve vzorcích z nádrží (**Obr. P6C**) se v průměru pohybovala okolo 213 μm^2 (medián – 130 μm^2), o něco menší kolonie z kategorie APT2 byly ve vzorcích z rybníků (**Obr. P6D**). Jejich průměrná plocha byla 141 μm^2 a medián všech ploch kolonií odpovídal 79 μm^2 . Mediány ploch kolonií se signifikantně nelišily ($p > 0,05$). Průměrná maximální a minimální velikost kolonií byla v obou případech podobná. Velikostní rozmezí bylo ve vzorcích z nádrží 26–887 μm^2 a ve vzorcích z rybníků 14–886 μm^2 . V tabulce (**Tab. 15**) byla shrnuta veškerá data kolonií – jejich průměry, mediány, maximální a minimální hodnoty.

Tab. 15: Shrnutá data ploch kolonií (APT2) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

APT2		Prům.	Med	Max	Min	APT2		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	μm^2				Rybníky	N kol.	μm^2			
Landštejn (1)	9	114	85	319	37	Šamonický D.	52	138	100	699	20
Slapy	10	261	293	537	38	Buchhammer	35	196	108	1175	22
Žlutice	11	360	97	2045	27	Hůry-náves	45	114	93	362	11
Majcz	20	270	131	1562	17	Vydýmač	38	184	83	1034	13
Kuc	10	63	53	146	21	Mrhal	36	132	92	612	22
Landštejn (2)	25	214	119	714	16	Punčocha	29	224	80	2323	12
Průměr celk.	14	213	130	887	26	Průměr celk.	34	141	79	886	14

10.2.2 Velikostní parametry buněk

Délka jednotlivých buněk se v koloniích ze vzorků nádrží pohybovala v průměru 1,33 μm . Podobně na tom byly buňky v koloniích ze vzorků rybníků, ty byly 1,17 μm dlouhé. Šířka buněk v kategorii APT2 byla v obou případech stejná – 0,70 μm . Co se týče

buněčného objemu, buňky koloniálních pikoplanktonních sinic ve vzorcích z nádrží měly $0,46 \mu\text{m}^3$ a ve vzorcích z rybníků $0,39 \mu\text{m}^3$. Z hlediska statistického ověření se průměrná délka buněk v nádržích a rybnících signifikantně lišila ($p < 0,05$), naopak průměrná šířka a buněčný objem se nelišily ($p > 0,05$). Zprůměrované hodnoty vlastností buněk v jednotlivých vzorcích z nádrží a rybníků byly shrnuty v tabulce (**Tab. 16**) a grafech (**Obr. P7**).

Tab. 16: Shrnutá data parametrů buněk (APT2) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

APT2	délka	šířka	bun. obj.	APT2	délka	šířka	bun. obj.
Nádrže	μm		μm^3	Rybníky	μm		μm^3
Landštejn (1)	1,33	0,65	0,40	Šamonický D.	1,03	0,64	0,28
Slapy	1,50	0,74	0,58	Buchhammer	1,20	0,73	0,42
Žlutice	1,43	0,74	0,53	Hůry-náves	1,07	0,64	0,29
Majcz	1,18	0,70	0,39	Vydýmač	1,21	0,67	0,37
Kuc	1,28	0,73	0,47	Mrhal	1,17	0,73	0,41
Landštejn (2)	1,29	0,64	0,37	Punčocha	1,31	0,81	0,59
Průměr	1,33	0,70	0,46	Průměr	1,17	0,70	0,39

10.3 Kolonie v kategorii APT3

Trojrozměrné kolonie spadající do kategorie APT3 byly pozorovány pouze v jednom vzorku, odebraném z nádrže Slapy (207 kolonií/ml) (**Obr. P4E**) a ve třech vzorcích odebraných z rybníků (**Obr. P4F**). Co se týče vzorků z rybníků, zde byl průměrný počet stanoven na 32 kolonií/ml. Největší zastoupení (77) kolonií/ml bylo zjištěno ve vzorku z rybníka Šamonický Dolní a nejkudší lokalitou (8 kolonií/ml), kromě těch, kde nebyly žádné kolonie, byl rybník v Hůrách na návsi. Počty kolonií v jednotlivých vzorcích jsou shrnuty v tabulce (**Tab. 17**).

Tab. 17: Počet kolonií/ml v kategorii APT3.

APT3		APT3	
Nádrže	kol./ml	Rybníky	kol./ml
Landštejn (1)	0	Šamonický Dolní	77
Slapy	207	Buchhammer	0
Žlutice	0	Hůry-náves	8
Majcz	0	Vydýmač	0
Kuc	0	Mrhal	0
Landštejn (2)	0	Punčocha	13
Průměr	N/A	Průměr	32

10.3.1 Počet buněk a objem kolonie

Jak již bylo řečeno, kolonie z kategorie APT3 byly pouze v určitých vzorcích. Ve vzorku z nádrže Slapy (**Obr. P5E**) se v koloniích počet pohyboval v hodnotách 27–670 buněk, přičemž průměrně se v koloniích nacházelo 267 buněk (medián – 253 buněk). Ve vzorcích z rybníků (**Obr. P5F**) byly trojrozměrné kolonie pozorovány ve třech vzorcích, vždy po jedné kolonii. Počet v těchto třech koloniích byl 31 buněk (Šamonický Dolní), 207 buněk (Hůry – náves) a 259 buněk (Punčocha). Celkový průměr tří kolonií byl stanoven na 166 buněk. Pro lepší přehlednost byla vytvořena tabulka s výše popsány hodnotami (**Tab. 18**).

Tab. 18: Shrnutá data počtů buněk v koloniích (APT3) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

APT3		Prům.	Med	Max	Min	APT3		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	N buněk/kolonie				Rybníky	N kol.	N buněk/kolonie			
Landštejn (1)	0	0	0	0	0	Šamonický D.	1	31	31	31	31
Slapy	63	267	253	670	27	Buchhammer	0	0	0	0	0
Žlutice	0	0	0	0	0	Hůry-náves	1	207	207	207	207
Majcz	0	0	0	0	0	Vydýmač	0	0	0	0	0
Kuc	0	0	0	0	0	Mrhal	0	0	0	0	0
Landštejn (2)	0	0	0	0	0	Punčocha	1	259	259	259	259
Průměr celk.	63	267	253	670	27	Průměr celk.	1	166	166	166	166

Průměrný objem kolonií ve vzorku z nádrže Slapy (**Obr. P6E**) byl $1676 \mu\text{m}^3$ (medián – $1023 \mu\text{m}^3$). Rozsah ve velikostech ploch byl $254\text{--}6416 \mu\text{m}^3$. Plochy v koloniích z rybníčních lokalit (**Obr. P6F**) byly $209 \mu\text{m}^3$ (Šamonický Dolní), $1380 \mu\text{m}^3$ (Hůry–náves) a

1727 μm^3 (Punčocha). Celkový průměr těchto tří kolonií činil 1105 μm^3 . Data z výše jmenovaných lokalit byla zapsána do tabulky (**Tab. 19**).

Tab. 19: Shrnutá data ploch kolonií (APT3) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

APT3		Prům.	Med	Max	Min	APT3		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	μm^3				Rybníky	N kol.	μm^3			
Landštejn (1)	0	0	0	0	0	Šamonický D.	1	209	209	209	209
Slapy	27	1676	1023	6416	254	Buchhammer	0	0	0	0	0
Žlutice	0	0	0	0	0	Hůry-náves	1	1380	1380	1380	1380
Majcz	0	0	0	0	0	Vydýmač	0	0	0	0	0
Kuc	0	0	0	0	0	Mrhal	0	0	0	0	0
Landštejn (2)	0	0	0	0	0	Punčocha	1	1727	1727	1727	1727
Průměr celk.	27	1676	1023	6416	254	Průměr celk.	1	1105	1105	1105	1105

10.3.2 Velikostní parametry buněk

Koloniální buňky ve vzorku z nádrže Slapy byly průměrně 1,55 μm dlouhé, 0,72 μm široké a jejich buněčný objem byl odhadnut na 0,56 μm^3 . Co se týče kolonií ve vzorcích z rybníků, jednotlivé buňky byly v průměru 1,19 μm dlouhé, 0,71 μm široké a jejich průměrný buněčný objem byl stanoven na 0,42 μm^3 . Data z analýzy buněk byla vložena do tabulky (**Tab. 20**) a grafů (**Obr. P7**).

Tab. 20: Shrnutá data parametrů buněk (APT3) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

APT3	délka	šířka	bun. obj.	APT3	délka	šířka	bun. obj.
Nádrže	μm		μm^3	Rybníky	μm		μm^3
Landštejn (1)	0,00	0,00	0,00	Šamonický D.	1,04	0,65	0,28
Slapy	1,55	0,72	0,56	Buchhammer	0,00	0,00	0,00
Žlutice	0,00	0,00	0,00	Hůry-náves	1,46	0,87	0,73
Majcz	0,00	0,00	0,00	Vydýmač	0,00	0,00	0,00
Kuc	0,00	0,00	0,00	Mrhal	0,00	0,00	0,00
Landštejn (2)	0,00	0,00	0,00	Punčocha	1,07	0,60	0,26
Průměr	1,55	0,72	0,56	Průměr	1,19	0,71	0,42

10.4 Kolonie v kategorii MER

Kolonie pikoplanktonních sinic, které byly zařazeny do kategorie MER, byly pozorovány ve dvou vzorcích nádrží (**Obr. P4G**) a třech vzorcích rybníků (**Obr. P4H**). Průměrný počet v nádržích byl 179 kolonií/ml a 286 kolonií/ml v rybnících, přičemž se

signifikantně nelišil ($p > 0,05$). Největší zastoupení kolonií bylo zaregistrováno ve vzorku z rybníka Šamonický Dolní s hodnotou 459 kolonií/ml. Nejmenší počet byl pozorován ve vzorku z rybníka v Hůrách na návsi. Co se týče vzorků z nádrží, zde bylo zjištěno 281 kolonií/ml (Majcz) a 77 kolonií/ml (Žlutice). Jednotlivé hodnoty počtu kolonií/ml byly zapsány do tabulky (**Tab. 21**).

Tab. 21: Počet kolonií/ml v kategorii MER.

MER		MER	
Nádrže	kol./ml	Rybníky	kol./ml
Landštejn (1)	0	Šamonický Dolní	459
Slapy	0	Buchhammer	367
Žlutice	77	Hůry-náves	31
Majcz	281	Vydýmač	0
Kuc	0	Mrhal	0
Landštejn (2)	0	Punčocha	0
Průměr	179	Průměr	286

10.4.1 Počet buněk a plocha kolonie

Ve vzorcích z nádrží (**Obr. P5G**), které obsahovaly kolonie z kategorie MER, byl průměrný počet buněk/kolonii 90 (medián – 52 buněk/kolonii) a v průměru se pohyboval v rozmezí od 6 do 312 buněk/kolonii. Ve vzorcích z rybníků (**Obr. P5H**) byl stanoven průměr 64 buněk na kolonii (medián – 67 buněk/kolonii). Zároveň, maximální počet v kolonii činil 106 buněk a spodní hranici tvořilo 25 buněk/kolonii. Počty buněk v koloniích se při porovnání vzorků z nádrží a rybníků signifikantně nelišily ($p > 0,05$). Data, včetně těchto, byla popsána v tabulce (**Tab. 22**).

Tab. 22: Shrnutá data počtů buněk v koloniích (MER) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

MER		Prům.	Med	Max	Min	MER		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	N buněk/kolonie				Rybníky	N kol.	N buněk/kolonie			
Landštejn (1)	0	0	0	0	0	Šamonický D.	6	45	41	102	14
Slapy	0	0	0	0	0	Buchhammer	24	8	8	16	4
Žlutice	5	19	16	37	4	Hůry-náves	4	140	153	200	56
Majcz	11	161	88	586	8	Vydýmač	0	0	0	0	0
Kuc	0	0	0	0	0	Mrhal	0	0	0	0	0
Landštejn (2)	0	0	0	0	0	Punčocha	0	0	0	0	0
Průměr celk.	8	90	52	312	6	Průměr celk.	11	64	67	106	25

Kolonie pikoplanktonních sinic ve vzorcích z nádrží (**Obr. P6G**) odpovídaly průměrné ploše o velikosti 234 μm^2 (medián – 71 μm^2). Maximální průměrná velikost plochy činila 998 μm^2 a ta minimální 11 μm^2 . Ve vzorcích z rybníků (**Obr. P6H**) byly kolonie průměrně 187 μm^2 velké (medián – 157). Průměrné rozmezí hodnot velikostí ploch se pohybovalo od 61 do 391 μm^2 . Mediány ploch kolonií se signifikantně nelišily ($p > 0,05$). Data jednotlivých vzorků byla popsána v tabulce (**Tab. 23**).

Tab. 23: Shrnutá data ploch kolonií (MER) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

MER		Prům.	Med	Max	Min	MER		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	μm^2				Rybníky	N kol.	μm^2			
Landštejn (1)	0	0	0	0	0	Šamonický D.	6	94	71	266	16
Slapy	0	0	0	0	0	Buchhammer	24	10	9	25	4
Žlutice	5	88	28	247	6	Hůry-náves	4	457	390	883	164
Majcz	11	397	114	1750	15	Vydýmač	0	0	0	0	0
Kuc	0	0	0	0	0	Mrhal	0	0	0	0	0
Landštejn (2)	0	0	0	0	0	Punčocha	0	0	0	0	0
Průměr celk.	8	243	71	998	11	Průměr celk.	11	187	157	391	61

10.4.2 Velikostní parametry buněk

Koloniální buňky pikoplanktonních sinic v průměru měřily 1,07 μm do délky, 0,61 μm do šířky a jejich buněčný objem činil 0,27 μm^3 . Téměř totožné parametry buněk byly v koloniích ve vzorcích z rybníků. Buňky zde byly 1,10 μm dlouhé, 0,63 μm široké a jejich buněčný objem odpovídal 0,29 μm^3 . Z hlediska statistického ověření se průměrná délka ($p > 0,05$), průměrná šířka ($p > 0,05$) a buněčný objem ($p > 0,05$) v nádržích a rybnících signifikantně nelišily. Průměrné hodnoty parametrů buněk v jednotlivých vzorcích z nádrží a rybníků byly shrnuty v tabulce (**Tab. 24**) a grafech (**Obr. P7**).

Tab. 24: Shrnutá data parametrů buněk (MER) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

MER	délka	šířka	bun. obj.	MER	délka	šířka	bun. obj.
Nádrže	μm		μm^3	Rybníky	μm		μm^3
Landštejn (1)	0,00	0,00	0,00	Šamonický D.	0,94	0,57	0,20
Slapy	0,00	0,00	0,00	Buchhammer	1,12	0,62	0,28
Žlutice	1,08	0,61	0,27	Hůry-náves	1,23	0,70	0,39
Majcz	1,07	0,61	0,26	Vydýmač	0,00	0,00	0,00
Kuc	0,00	0,00	0,00	Mrhal	0,00	0,00	0,00
Landštejn (2)	0,00	0,00	0,00	Punčocha	0,00	0,00	0,00
Průměr	1,07	0,61	0,27	Průměr	1,10	0,63	0,29

10.5 Kolonie v kategorii CYN1

V kategorii CYN1 se kolonie pikoplanktonních sinic nacházely ve třech vzorcích odebraných z nádrží (**Obr. P4CH**), naopak ve vzorcích z rybníků nebyly žádné (**Obr. P4I**). Průměrný počet kolonií v 1 ml byl ze třech vzorků z nádrží stanoven na 259. Dominantní zastoupení (650 kolonií/ml) napříč nádržemi bylo ve vzorku z nádrže Kuc. Zbylé dvě lokality byly zastoupené méně, konkrétně 102 kolonií/ml ve vzorku z nádrže Landštejn (1) a 26 kolonií/ml ve vzorku z nádrže Majcz. Pro lepší vizualizaci byla vytvořena tabulka obsahující jednotlivé lokality a jejich počty kolonií (**Tab. 25**).

Tab. 25: Počet kolonií/ml v kategorii CYN1.

CYN1		CYN1	
Nádrže	kol./ml	Rybníky	kol./ml
Landštejn (1)	102	Šamonický Dolní	0
Slapy	0	Buchhammer	0
Žlutice	0	Hůry-náves	0
Majcz	26	Vydýmač	0
Kuc	650	Mrhal	0
Landštejn (2)	0	Punčocha	0
Průměr	259	Průměr	N/A

10.5.1 Počet buněk a plocha kolonie

V koloniích ze vzorků nádrží se vyskytovalo v průměru 43 buněk (medián – 37 buněk), přičemž početní rozsah se pohyboval od 23 do 80 buněk. Průměrné počty buněk a další údaje jednotlivých vzorků z nádrží (**Obr. P5CH**) a rybníků (**Obr. P5I**) jsou popsány v grafech a tabulce (**Tab. 26**).

Tab. 26: Shrnutá data počtů buněk v koloniích (CYN1) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

CYN1		Prům.	Med	Max	Min	CYN1		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	N buněk/kolonie				Rybníky	N kol.	N buněk/kolonie			
Landštejn (1)	4	59	57	80	41	Šamonický D.	0	0	0	0	0
Slapy	0	0	0	0	0	Buchhammer	0	0	0	0	0
Žlutice	0	0	0	0	0	Hůry-náves	0	0	0	0	0
Majcz	1	23	23	23	23	Vydýmač	0	0	0	0	0
Kuc	17	48	31	137	6	Mrhal	0	0	0	0	0
Landštejn (2)	0	0	0	0	0	Punčocha	0	0	0	0	0
Průměr celk.	7	43	37	80	23	Průměr celk	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Průměrná velikost ploch ve vzorcích obsahující kolonie z kategorie CYN1 činila 888 μm^2 (medián – 665 μm^2). Rozsah v tomto případě odpovídal průměrné velikosti od 321–1905 μm^2 . Průměrné plochy kolonií a ostatní údaje o dílčích vzorcích z nádrží (**Obr. P6CH**) a rybníků (**Obr. P6I**) byly popsány grafech a tabulce (**Tab. 27**).

Tab. 27: Shrnutá data ploch kolonií (CYN1) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

CYN1		Prům.	Med	Max	Min	CYN1		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	μm^2				Rybníky	N kol.	μm^2			
Landštejn (1)	4	1543	1163	3225	624	Šamonický D.	0	0	0	0	0
Slapy	0	0	0	0	0	Buchhammer	0	0	0	0	0
Žlutice	0	0	0	0	0	Hůry-náves	0	0	0	0	0
Majcz	1	244	244	244	244	Vydýmač	0	0	0	0	0
Kuc	17	878	588	2245	97	Mrhal	0	0	0	0	0
Landštejn (2)	0	0	0	0	0	Punčocha	0	0	0	0	0
Průměr celk.	7	888	665	1905	321	Průměr celk.	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

10.5.2 Velikostní parametry buněk

Průměrná délka buněk v koloniích byla 1,37 μm , průměrná šířka 0,70 μm a jejich průměrný buněčný objem činil 0,47 μm^3 . Průměrné hodnoty parametrů buněk v jednotlivých vzorcích z nádrží byly shrnuty v tabulce (**Tab. 28**) a grafech (**Obr. P7**).

Tab. 28: Shrnutá data parametrů buněk (CYN1) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

CYN1	délka	šířka	bun. obj.	CYN1	délka	šířka	bun. obj.
Nádrže	μm		μm^3	Rybníky	μm		μm^3
Landštejn (1)	1,49	0,70	0,54	Šamonický D.	0,00	0,00	0,00
Slapy	0,00	0,00	0,00	Buchhammer	0,00	0,00	0,00
Žlutice	0,00	0,00	0,00	Hůry-náves	0,00	0,00	0,00
Majcz	1,15	0,68	0,34	Vydýmač	0,00	0,00	0,00
Kuc	1,47	0,71	0,54	Mrhal	0,00	0,00	0,00
Landštejn (2)	0,00	0,00	0,00	Punčocha	0,00	0,00	0,00
Průměr	1,37	0,70	0,47	Průměr	N/A	N/A	N/A

10.6 Kolonie v kategorii CYN2

Kromě jednoho byly ve všech vzorcích z nádrží nalezeny kolonie pikoplanktonních sinic, které spadaly do kategorie CYN2 (**Obr. P4J**). U vzorků z rybníků byly nalezeny kolonie pikoplanktonních sinic pouze ve dvou z nich (**Obr. P4K**). Průměrný počet kolonií/ml ve vzorcích z nádrží byl stanoven na hodnotu 91. Ve dvou vzorcích z rybníků byl průměr 61 kolonií/ml. Počty kolonií na ml ve vzorcích z nádrží a rybníků se signifikantně

nelišily ($p > 0,05$). Co se týče nádrží, nejhojněji zastoupen (225 kolonií/ml) byl vzorek z Landštejna (1) a nejméně (31 kolonií/ml) vzorek odebraný v nádrži Žlutice (datum odběru 11.8. 2020). Ve vzorku z rybníka Vydýmač bylo 77 kolonií/ml a 46 kolonií/ml ve vzorku z rybníka Buchhammer. Tyto hodnoty společně s ostatními jsou znázorněny v tabulce (**Tab. 29**).

Tab. 29: Počet kolonií/ml v kategorii CYN2.

CYN2		CYN2	
Nádrže	kol./ml	Rybníky	kol./ml
Landštejn (1)	225	Šamonický Dolní	0
Slapy	0	Buchhammer	46
Žlutice	31	Hůry-náves	0
Majcz	26	Vydýmač	77
Kuc	115	Mrhal	0
Landštejn (2)	61	Punčocha	0
Průměr	91	Průměr	61

10.6.1 Počet buněk a plocha kolonie

Ve vzorcích z nádrží (**Obr. P5J**) se počet pohyboval v průměru 39 buněk/kolonii (medián – 23 buněk/kolonii). Největší zaznamenaný počet v kolonii činil 134 buněk, a naopak ten nejmenší pouhých 15 buněk/kolonii. Co se týče vzorků z rybníků (**Obr. P5K**), zde byl průměrný počet 17 buněk/kolonii (medián – 18 buněk/kolonii) a rozmezí se pohybovalo v průměru od 15–19 buněk. Počty buněk v koloniích se při porovnání vzorků z nádrží a rybníků signifikantně nelišily ($p > 0,05$). Veškerá data týkající se počtu buněk byla vložena do tabulky (**Tab. 30**).

Tab. 30: Shrnutá data počtů buněk v koloniích (CYN2) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

CYN2		Prům.	Med	Max	Min	CYN2		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	N buněk/kolonie				Rybníky	N kol.	N buněk/kolonie			
Landštejn (1)	10	70	26	424	11	Šamonický D.	0	0	0	0	0
Slapy	0	0	0	0	0	Buchhammer	3	12	13	15	7
Žlutice	2	40	40	50	30	Hůry-náves	0	0	0	0	0
Majcz	1	18	18	18	18	Vydýmač	1	23	23	23	23
Kuc	3	12	12	15	8	Mrhal	0	0	0	0	0
Landštejn (2)	4	54	20	165	10	Punčocha	0	0	0	0	0
Průměr celk.	4	39	23	134	15	Průměr celk.	2	17	18	19	15

Velikost kolonií ve vzorcích z nádrží (**Obr. P6J**) odpovídala v průměru $302 \mu\text{m}^2$ (medián – $185 \mu\text{m}^2$. Maximální průměrná hodnota velikosti plochy byla $967 \mu\text{m}^2$, zatímco nejmenší průměrná velikost byla $125 \mu\text{m}^2$. V rámci kolonií ve vzorcích z rybníků (**Obr. P6K**), průměrná velikost plochy skýtala $66 \mu\text{m}^2$ (medián – $73 \mu\text{m}^2$). Mediány ploch kolonií se signifikantně nelišily ($p > 0,05$). Zjištěný rozsah ve velikostech kolonií byl v tomto případě od $45\text{--}85 \mu\text{m}^2$. V tabulce (**Tab. 31**) byla shrnuta veškerá data kolonií – jejich průměry, mediány, maximální a minimální hodnoty velikostí ploch.

Tab. 31: Shrnutá data ploch kolonií (CYN2) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

CYN2		Prům.	Med	Max	Min	CYN2		Prům.	Med	Max	Min
Nádrže	N kol.	μm^2				Rybníky	N kol.	μm^2			
Landštejn (1)	10	434	176	2614	69	Šamonický D.	0	0	0	0	0
Slapy	0	0	0	0	0	Buchhammer	3	59	72	87	17
Žlutice	2	349	349	439	259	Hůry-náves	0	0	0	0	0
Majcz	1	154	154	154	154	Vydýmač	1	73	73	73	73
Kuc	3	86	71	129	59	Mrhal	0	0	0	0	0
Landštejn (2)	4	485	177	1499	87	Punčocha	0	0	0	0	0
Průměr celk.	4	302	185	967	125	Průměr celk.	2	66	73	80	45

10.6.2 Velikostní parametry buněk

Průměrná délka buněk ve vzorcích z nádrží byla $1,38 \mu\text{m}$, průměrná šířka buněk se pohybovala okolo $0,69 \mu\text{m}$ a buněčný objem dosahoval $0,48 \mu\text{m}^3$. Buňky ve vzorcích z rybníků byly $1,35 \mu\text{m}$ dlouhé, $0,77 \mu\text{m}$ široké a jejich buněčný objem byl stanoven na $0,53 \mu\text{m}^3$. Z hlediska statistického ověření se průměrná délka buněk v nádržích a rybnících nelišila ($p > 0,05$), naopak průměrná šířka a buněčný objem se signifikantně lišily ($p < 0,05$). Průměrné hodnoty parametrů buněk v jednotlivých vzorcích z nádrží a rybníků byly shrnuty v tabulce (**Tab. 32**) a grafech (**Obr. P7**).

Tab. 32: Shrnutá data parametrů buněk (CYN2) ve vzorcích z nádrží a rybníků.

CYN2	délka	šířka	bun. obj.	CYN2	délka	šířka	bun. obj.
Nádrže	μm		μm^3	Rybníky	μm		μm^3
Landštejn (1)	1,21	0,61	0,36	Šamonický D.	0,00	0,00	0,00
Slapy	0,00	0,00	0,00	Buchhammer	1,12	0,59	0,26
Žlutice	1,61	0,74	0,63	Hůry-náves	0,00	0,00	0,00
Majcz	1,40	0,78	0,56	Vydýmač	1,27	0,58	0,29
Kuc	1,32	0,70	0,45	Mrhal	0,00	0,00	0,00
Landštejn (2)	1,35	0,62	0,39	Punčocha	0,00	0,00	0,00
Průměr	1,38	0,69	0,48	Průměr	1,19	0,58	0,28

Diskuse

11. Semi-automatická metoda

V rámci mého výzkumu jsem se zabýval vytvořením semi-automatické metody za účelem kvantifikace buněk, získání plochy, případně objemu kolonie, a nakonec analýzy jednotlivých koloniálních pikoplanktonních sinic. Jejím cílem bylo uplatnění této metody v úpravách vody při analýze a kvantifikaci koloniálních pikoplanktonních sinic. Jelikož se jedná o vývoj nové metodiky, kvůli absenci prací zabývajících se koloniálními pikoplanktonními sinicemi a kombinací mikroskopické metody s analýzou obrazu, je obtížné diskutovat mé výsledky práce, tedy semi-automatickou metodu. Z moderních přístupů ke kvantifikaci organismů, včetně koloniálních pikoplanktonních sinic, lze považovat hojně využívanou průtokovou cytometrii. Na rozdíl od mé metodiky však slouží pouze k získání velikosti a počtu, přičemž dochází k porušení struktur analyzovaných kolonií (Owen et al. 2022). Kromě již zmíněné destrukce struktur kolonií, metoda průtokové cytometrie vyžaduje techniku, která je ve většině případů drahou záležitostí. V běžných laboratořích, které hodnotí kvalitu pitné vody, však v mnoha případech potřebná technika není k dispozici.

Semi-automatická metoda je nastavena na koloniální pikoplanktonní sinice, ale to neznamená, že musí pracovat pouze s těmito organismy. Jelikož se nejedná o plně automatizovanou metodu, lze ji využít i pro další organismy podobného charakteru. Krásným příkladem je sinicový rod *Microcystis*. Jediným rozdílem je v tomto případě nastavení funkce spot-detection. Jakmile dojde ke správnému nastavení, semi-automatická metoda je schopna vygenerovat počet buněk, jejich velikost a tvar, a nakonec plochu nebo objem sledované kolonie.

11.1 Kategorie pro koloniální pikoplanktonní sinice

V rámci vývoje semi-automatické metody jsem vytvořil funkční a morfologické kategorie koloniálních pikoplanktonních sinic. Při pohledu na zachycené snímky jednotlivých kolonií může vyvstat otázka, zdali se vůbec jedná o opravdovou kolonii a není to jen náhodný shluk buněk na filtru. V klasickém mikroskopu jsou jednotlivé kolonie rozeznatelné v podobě koulí nebo obláčků obalených slizem a kutálejících se ve vodě. To, že k sobě buňky patří a nejsou to jen náhodné shluky lze jednoduše dokázat například obarvením tuší. Kolonie jsou v obarveném vzorku krásně viditelné, průhledné a bezbarvé na rozdíl od černě obarveného okolí. Ve fluorescenčních mikroskopech lze rozeznat právě

kolonie pikoplanktonních sinic od náhodných shluků buněk pomocí přepnutí do UV světla. Pravou kolonii poznáme na základě nepřítomnosti bakterií ve slizu na rozdíl od zbytku filtru. Bakterie totiž ve slizu pikoplanktonních sinic primárně nejsou. V přírodě jsou všechny kolonie z geneticky identických buněk, ve většině případů se nejedná o náhodné shluky.

Jednotlivé kategorie pikoplanktonních sinic byly vytvořeny na základě porovnávání struktur kolonií. Hlavním parametrem zde byla hustota a postavení buněk uvnitř kolonie. Výsledkem bylo šest kategorií koloniálních pikoplanktonních sinic o specifické morfologii či různé hustotě buněk. Zařazením koloniálních pikoplanktonních sinic se ve své studii zabývali Huber et al. (2017). Na rozdíl od mého výzkumu, definovali pouze tři kategorie koloniálních pikoplanktonních sinic – *Cyanodictyon* (nepravidelně tvarované kulovité kolonie s nepravidelně uspořádanými buňkami), *Aphanocapsa* (pravidelné kulovité kolonie s kulatými buňkami pravidelně uspořádanými) a *Eucapsis* (kolonie s buňkami uspořádanými do balíčků).

V porovnání mé práce s prací Huber et al. (2017) jsou viditelné rozdíly jak v samotných kategoriích, tak v jejich definici. Jedním z kritérií pro zařazení koloniálních pikoplanktonních sinic do kategorie *Cyanodictyon* a *Aphanocapsa* je celkový tvar kolonie. Zároveň nedochází ani ke shodě v případě kritéria hodnotícího pravidelnost uspořádaní buněk. Tvar kolonie anebo uspořádanost buněk v mé metodě není zahrnuta. V mé práci jsou definovány kategorie pro řetízkové kolonie – *Cyanodictyon* 1 (buňky daleko od sebe) a *Cyanodictyon* 2 (buňky v těsné blízkosti). Popis rodu *Cyanodictyon* v mé studii je založen na základě publikace Komárek a Anagnostydis (1998). Kromě dvou již zmíněných skupin by do kategorií *Cyanodictyon* a *Aphanocapsa* vytvořených ve studii Huber et al. (2017) spadaly i skupiny *Aphanothece* 1 (buňky daleko od sebe), *Aphanothece* 2 (buňky v těsné blízkosti) a *Aphanothece* 3 (buňky nahuštěné přes sebe). Rozdíl mezi *Aphanothece* (v současné době přejmenované na *Anathece* (Komárek et al. 2011)) je dle morfologie pouze ve tvaru buněk. První zmíněné mají tyčinkovité či oválné buňky, *Aphanocapsa* buňky kulovité (Komárek a Anagnostydis 1998). Na základě genetických analýz bude členění jiné. Rod *Aphanocapsa* ke koloniálním pikoplanktonním sinicím vůbec nepatří (Jezberová, nepublikováno). A nakonec Huber et al. (2017) definovali kategorii *Eucapsis*, u které by se mohlo zdát, že mezi pracemi dochází ke shodě. Nicméně opak je pravdou, a to z důvodu uspořádanosti buněk uvnitř kolonie. V rámci mé práce by se přímo nabízela kategorie *Merismopedia*, jak již bylo řečeno, buňky nejsou uspořádané do balíčků, nýbrž tvoří destičku.

11.2 Kategoriální faktory hustoty pro kolonie

Pro vytvořenou semi-automatickou metodu je nezbytné kromě fluorescenčního mikroskopu i ucelené softwarové řešení pro analýzu obrazu. Za účelem ještě většího zjednodušení a minimalizace potřebného vybavení byly na základě dat získaných semi-automatickou metodou vytvořeny faktory hustoty pro každou z šesti definovaných kategorií. Může se zdát, že hodnoty kategoriálních faktorů hustoty jsou v některých případech podobné, či dokonce shodné. Podobnost v hodnotách pozorujeme především u kategorií Aphanothece 2 (APT2) a Aphanothece 3 (APT3). Jmenované kategorie jsou definovány pro kolonie s hustě uspořádanými buňkami. V tomto případě se však jedná o zcela odlišné typy kolonií, kde porovnáváme jednoduché dvojrozměrné kolonie a strukturně složité kompaktní trojrozměrné kolonie. Téměř shodné hodnoty se objevily i u kategorií Aphanothece 1 (APT1) a Cyanodictyon 1 (CYN1). Zde nastává stejná situace jako v předešlém případě. Buňky pikoplanktonních sinic uvnitř kolonií spadajících do těchto kategorií jsou sice v obou případech volně uspořádány, ale podíváme-li se na kolonie jako takové, uvidíme jejich zcela odlišnou morfologii. Z toho vyplývá, že nezáleží ani tak moc na hodnotě kategoriálního faktoru hustoty, jako spíše na správném zařazení koloniálních pikoplanktonních sinic do funkčních a morfologických skupin.

Během zařazení koloniálních pikoplanktonních sinic do funkčních a morfologických skupin, se můžeme setkat s jistou problematikou. Prvním a jistě nejdůležitějším aspektem správného zařazení kolonií do příslušných kategorií je praxe v podobě určité doby strávené mikroskopií právě pikoplanktonních sinic. Pomineme-li dobu strávenou mikroskopií, během samotné praxe může dojít k setkání s koloniemi, které jsou atypické. Příkladem může být kolonie o nepravidelném tvaru (např. trojúhelník), tudíž aproximací této kolonie na elipsu (elipsoid) a následným výpočtem množství buněk pomocí kategoriálního faktoru hustoty nedosáhneme přesného výsledku.

V rámci metodiky využívající kategoriální faktory hustoty se může naskytnout otázka, zdali jsou použité vzorce pro výpočet plochy nebo objemu kolonie vybrány správně. Pro výpočet plochy to je vzorec pro obsah elipsy, pro výpočet objemu je použit vzorec pro objem elipsoidu. Ve všech případech, kdy byly porovnány plochy (objemy) kolonií získané semi-automatickou metodou a příslušným kategoriálním faktorem docházelo k téměř shodným výsledkům. Na základě toho lze usuzovat, že tento krok v metodickém postupu byl zvolen korektně.

12. Analýza koloniálních pikoplanktonních sinic

S využitím semi-automatické metody byly analyzovány přírodní vzorky z nádrží a rybníků. Rybníky byly zahrnuty do studie proto, protože jsou v nich velice hojně zastoupené koloniální formy pikoplanktonních sinic. Rozšířily nám variabilitu typů kolonií, což mimo jiné zpřesnilo vytvoření faktoru hustoty. A protože jsme měli data pro nádrže i rybníky, tak už se přímo nabízela otázka, zda je mezi nimi nějaký rozdíl. Zda jsou v obou typech shodné kolonie, nebo se liší velikostně, morfologicky či typově. Zodpovězení této otázky má také ekologické přínosy, protože pomůže k prohloubení znalostí o obou ekosystémech. V nádržích jsou jiní predátoři a jiné hospodaření s živinami (Znachor et al. 2018; Znachor et al. 2020) než v rybnících (Kajgrová et al. 2022; Vrba et al. 2018), proto je tato informace také velice přínosná. Rozdíl ve vzniku kolonií nás také přiblíží více k objasnění jejich vzniku, o kterém je spousta hypotéz – obrana proti predátorům (Callieri et al. 2016; Huber et al. 2017; Jezberová a Komárková 2007; Ospina-Serna et al. 2020), obrana proti UV a světlu (Callieri 2010; Koblížek 2000) nebo oxidativnímu stresu (Callieri et al. 2019). Nicméně, zdali skutečně dochází ke vzniku kolonie jako odpověď na přítomnost predátora nebo na jiné faktory týkající se vodního prostředí se stále přesně neví a nedaří se v experimentech správně vyvolat (Jezberová, nepublikováno).

12.1 Počet kolonií v ml

Analýza koloniálních pikoplanktonních sinic v přírodních vzorcích z nádrží a rybníků přinesla zajímavé výsledky. V kategorii Aphanothece 1 (APT1) počet kolonií převažoval ve vzorcích z nádrží, rozdíl zde odpovídal zhruba trojnásobku. Naopak tomu bylo u kategorie Aphanothece 2 (APT2), kde bylo zjištěno větší množství kolonií ve vzorcích z rybníků, a to téměř pětinašobně. Nicméně, na rozdíl od předešlé kategorie, zde zjištěný rozdíl nebyl statisticky prokázán. Došlo i k situacím, kdy kolonie ve vzorcích z nádrží a rybníků nebyly pozorovány v určitých lokalitách či dokonce v žádné z lokalit. Do kategorie Aphanothece 3 (APT3) byly kolonie zařazeny pouze z jednoho vzorku z nádrží a ze tří vzorků z odebraných z rybníků. Podobná situace nastala i v případě kategorie Merismopedia (MER), s tím rozdílem, že ve vzorcích z nádrží byly příslušné kolonie pozorovány ve dvou lokalitách. Příkladem nepřítomnosti kolonií ve všech lokalitách byla kategorie Cyanodictyon 1 (CYN1). Kolonie pikoplanktonních sinic se nevyskytovaly v žádném ze vzorků odebraných z rybníčních lokalit. V kategorii Cyanodictyon 2 (CYN2) se počet kolonií v obou případech

podobal, ale zastoupení lokalit bylo odlišné. V případě nádrží se kolonie z této kategorie vyskytovaly ve čtyřech případech, naopak v rybnících pouze ve dvou.

Rozdíly v početnosti kolonií v těchto kategoriích mohlo zapříčinit více faktorů. Jedná se o odlišné faktory přímo ve vodních ekosystémech (viz výše) nebo může být příčinou způsob skladování či dokonce samotná příprava preparátů. V rámci způsobu skladování vzorků to může být doba jakou jsou samotné vzorky uchovávány. Ta může hrát důležitou roli v zachování podoby kolonií, kterou mají během svého života v přirozených podmínkách. S touto situací jsem se setkal během vývoje semi-automatizované metody, kdy byl během prvního měření vzorek plný kompaktních kolonií. V druhém měření ve stejném vzorku již žádné kompaktní kolonie nebyly. Zároveň při přípravě preparátů může dojít k nechtěnému narušení struktury kolonií, ať už nevhodnou manipulací či vyvíjením přílišné síly během vytlačování „bublin“ zpod krycího sklíčka. Důkazem jisté deformace byly kolonie z kategorie *Aphanothece* 3 (APT3), kde to bylo zřejmé z poměru hodnot délky a šířky a hodnoty výšky.

12.2 Počet buněk v koloniích

Počet buněk v koloniích pikoplanktonních sinic se v přírodních vzorcích z nádrží a rybníků nelišil. Jedná se o zajímavý úkaz, jelikož jsou to zcela odlišné vodní systémy – oligotrofní/mezotrofní nádrže a hypertrofní rybníky. Z pohledu na množství živin by se správně předpokládalo, že větší počet buněk by měl být pozorován právě ve vzorcích z rybníků.

12.3 Plocha (objem) kolonií

Velikost kolonií (plocha nebo objem) pikoplanktonních sinic se v přírodních vzorcích z nádrží a rybníků také signifikantně nelišila. Porovnáme-li počet buněk se zjištěnými hodnotami velikosti ploch a objemů, kolonie pikoplanktonních sinic si byly velice podobné jak ve vzorcích z nádrží, tak ve vzorcích z rybníků.

12.4 Velikostní parametry buněk v koloniích

Posledním analyzovaným objektem byly samotné buňky, které tvořily sledované kolonie. Z analýzy vyplynulo, že průměrná délka jednotlivých buněk je větší ve vzorcích z nádrží. Naopak tomu bylo u průměrné šířky, která byla podobná. Průměrný buněčný objem byl v rámci morfologických a funkčních skupin větší ve vzorcích z nádrží. Nicméně pokud

se zaměříme na porovnání velikostí koloniálních buněk uvnitř jednotlivých kategorií, výsledky už nejsou tak jasné. Setkali jsme se s kategoriemi, kde se parametry buněk prokazatelně lišily. Zároveň nastaly situace, ve kterých byly parametry buněk téměř totožné a tím pádem se signifikantně nelišily.

Závěr

Na základě mikroskopické metody v kombinaci s analýzou obrazu jsem vytvořil semi-automatickou metodu v programu NIS Elements, s jejíž pomocí je možné získat plochu nebo objem kolonie a následně počet, velikost a tvar jednotlivých buněk. V rámci této metody byly definovány funkční a morfologické kategorie pro koloniální pikoplanktonní sinice. Z dat získaných semi-automatickou metodou vzešly faktory hustoty pro každou z definovaných kategorií. Použitím těchto faktorů v kombinaci s mikroskopem je možné získat počet buněk v koloniích pikoplanktonních sinic bez potřeby práce se specializovaným softwarem. Nakonec byla použita semi-automatická metoda, díky které byly zanalyzovány koloniální pikoplanktonní sinice v přírodních vzorcích.

- H₁: Výsledky vývoje semi-automatické metody potvrdily, že hustota buněk v koloniích stejného typu se mezi jednotlivými koloniemi neliší, a to ani mezi koloniemi pocházejícími z různých lokalit.
- H₂: Nádrže a rybníky se prokazatelně lišily v relativním zastoupení a početnosti kolonií pouze v jedné kategorii (APT1), zbývající kategorie se nelišily. Velikost kolonií a počet buněk v koloniích z nádrží a rybníků se prokazatelně nelišily v žádné z kategorií.

Použitá literatura

AGAWIN, N. S. R., C. M. DUARTE a S. AGUSTÍ (2000): Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography* 45(3), 591–600.

AL-TEBRINEH, J., L. A. PEARSON, S. A. YASAR a B. A. NEILAN (2012): A multiplex

- qPCR targeting hepato- and neurotoxic cyanobacteria of global significance. *Harmful Algae* 15, 19–25.
- ALMANZA, V., O. PARRA, C. E. DE CARLOS BICUDO, C. BAEZA, J. BELTRAN, R. FIGUEROA a R. URRUTIA (2016): Occurrence of toxic blooms of *Microcystis aeruginosa* in a central Chilean (36° Lat. S) urban lake. *Revista Chilena de Historia Natural* 89(1), 1–12.
- AMBROŽOVÁ, J. (2006): Occurrence of picoplanktic species in surface waters and their removal by DAF process (Výskyt planktonních druhů v povrchových vodách a jejich odstraňování procesem DAF). Výsledky a závěry vědecko-výzkumných aktivit pracovníků FŽP z let 2005 až 2006, UJEP, Ústí nad Labem, 12–16.
- BAILEY-WATTS, A. E., M. E. BINDLOSS a J. H. BELCHER (1968): Freshwater Primary Production by a Blue–Green Alga of Bacterial Size. *Nature* 1968 220(5174), 1344–1345.
- BECKER, S., M. FAHRBACH, P. BÖGER a A. ERNST (2002): Quantitative Tracing, by Taq Nuclease Assays, of a *Synechococcus* Ecotype in a Highly Diversified Natural Population. *Applied and Environmental Microbiology* 68(9), 4486.
- BLÁHA, L. a B. MARŠÁLEK (1999): Microcystin production and toxicity of picocyanobacteria as a risk factor for drinking water treatment plants. *Algol Stud* 92, 95–108.
- BOLCH, C. J. (2001): PCR protocols for genetic identification of dinoflagellates directly from single cysts and plankton cells. *Phycologia* 40, 162–167.
- BOX, J. D. (1981): Enumeration of cell concentrations in suspensions of colonial freshwater microalgae, with particular reference to *microcystis aeruginosa*. *British Phycological Journal* 16(2), 153–164.
- BRIAND, J. F., S. JACQUET, C. BERNARD a J. F. HUMBERT (2003): Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary research* 34(4), 361–377.
- CABELLO-YEVES, P. J., C. CALLIERI, A. PICAZO, L. SCHALLENBERG, P. HUBER, J. RODA-GARCIA, M. BARTOSIEWICH, O. I. BELYKH, I. V. TIKHONOVA, A. TORCELLO-REQUERNA, P. M. DE PRADO, R.J. PUXTY, A. D. MILLARD, A. CAMACHO, F. RODRIGUEZ-VALERA a D. J. SCANLAN (2022): Elucidating the

- picocyanobacteria salinity divide through ecogenomics of new freshwater isolates. *BMC Biology* 20, 175.
- CABELLO-YEVES, P. J., C. CALLIERI, A. PICAZO, et al. (2021): The microbiome of the Black Sea water column analyzed by shotgun and genome centric metagenomics. *Environmental Microbiome* 16, 5.
- CABELLO-YEVES, P. J., J. M. HARO-MORENO, A. B. MARTIN-CUADRADO, R. GHAI, A. PICAZO, A. CAMACHO a F. RODRIGUEZ-VALERA (2017): Novel *Synechococcus* genomes reconstructed from freshwater reservoirs. *Frontiers in Microbiology* 8, 1151.
- CALLIERI, C. (2010): Single Cells and Microcolonies of Freshwater Picocyanobacteria: A Common Ecology. *Journal of Limnology* 69(2), 257–77.
- CALLIERI, C. (2016): Micro-players for macro-roles: aquatic microbes in deep lakes. *Journal of Limnology* 75(1), 191–200.
- CALLIERI, C., G. CRONBERG a J. G. STOCKNER (2012): Freshwater Picocyanobacteria: Single Cells, Microcolonies and Colonial Forms. In: WHITTON, B. (Ed): Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. Springer, Dordrecht, 229–269.
- CALLIERI, C., M. B. SATHICQ, P. J. CABELLO-YEVES, E. M. ECKERT a J. S. HERNÁNDEZ-AVILÉS (2019): TEP Production under Oxidative Stress of the Picocyanobacterium *Synechococcus*. *Journal of Limnology* 78(3).
- CALLIERI, C. a R. PISCIA (2002): Photosynthetic efficiency and seasonality of autotrophic picoplankton in Lago Maggiore after its recovery. *Freshwater Biology* 47(5), 941–956.
- CALLIERI, C., S. AMALFITANO, G. CORNO a R. BERTONI (2016): Grazing-induced *Synechococcus* microcolony formation: experimental insights from two freshwater phylotypes. *FEMS Microbiology Ecology* 92(11).
- CALLIERI, C., P. J. CABELLO-YEVES a F. BERTONI (2022): The “Dark Side” of Picocyanobacteria: Life as We Do Not Know It (Yet). *Microorganisms* 10(3).
- CALLIERI, C. a J. G. STOCKNER (2002): Freshwater autotrophic picoplankton: A review. *Journal of Limnology* 61(1), 1–14.

- CARMICHAEL, W. W. a I. R. FALCONER (1993): Diseases related to freshwater blue-green algal toxins and control measures. In: FALCONER I. R. (Ed): *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, 187–209.
- CASTENHOLZ, R. W. (2001): Oxygenic photosynthetic bacteria. In: BOONE, D. R., R. W. CASTENHOLZ a G. M. GARRITY (Eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2 ed.). Springer–Verlag New York, 473–600.
- CHORUS, I. a J. BARTRAM (1999): *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management* (1 ed.). CRC Press.
- CHORUS, I. (2001): *Cyanotoxins – Occurrence, Causes, Consequences*. Springer Science & Business Media, Berlin, 357.
- CODD, G. A. (1955): Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological signification. *Water. Sci. Technol.* 34, 149–156.
- CROSBIE, N. D., M. PÖCKL a T. WEISSE (2003): Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA*-intergenic spacer sequence analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9), 5716–5721.
- DI CESARE, A., P. J. CABELLO-YEVES, N. A. M. CHRISMAS, P. SÁNCHEZ-BARACALDO, M. M. SALCHER a C. CALLIERI (2018): Genome analysis of the freshwater planktonic *Vulcanococcus limneticus* sp. nov. reveals horizontal transfer of nitrogenase operon and alternative pathways of nitrogen utilization. *BMC Genomics* 19(1), 259.
- DORE, H., G. K. FARRANT, U. GUYET, J. HAGUAIT, F. HUMILZ et al. (2020): Evolutionary mechanisms of long-term genome diversification associated with niche partitioning in marine picocyanobacteria. *Front Microbiol* 11, 567–431.
- DUSSART, B. H. (1965): Les different categories de plancton. *Hydrobiologia* 26, 72–74.
- ERNST, A., S. BECKER, U. I. A. WOLLENZIEN a Ch. POSTIUS (2003): Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. *Microbiology* 149(1), 217–228.
- FALCONER, I. R. (1998): Algal toxins and human health. In: HRUBEC J. (Ed): *The Handbook of Environmental Chemistry* 5. Springer-Verlag, Berlin, 53–82.

- FALCONER, I. R. (2008): Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. In: HUDNELL K.H. (Ed.): Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Springer, New York, 607–612.
- FARRANT, G. K., H. DORÉ, F. M. CORNEJO-CASTILLO, F. PARTENSKY, M. RATIN, M. OSTROWSKI, F. D. PITT, P. WINCKER, D. J. SCANLAN, D. IUDICONE, S. G. ACINAS a L. GARCZAREK (2016): Delineating ecologically significant taxonomic units from global patterns of marine picocyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(24), 3365–3374.
- GAEDKE, U. a T. WEISSE (1998): Seasonal and interannual variability of picocyanobacteria in Lake Costance. *Arch Hydrobiol Spec Issues Adv Limnol* 53, 143–158.
- GIN, K. Y. H., Z. Y. SIM, K. Ch. GOH, J. W. K. KOK, S. H. TE, N. H. TRAN, W. LI a Y. HE (2021): Novel cyanotoxin-producing *Synechococcus* in tropical lakes. *Water Research* 192.
- GLASBEY, C. A. a G. W. HORGAN (1997): Image Analysis for the Biological Sciences. *Biometrics* 53(2), 783.
- GLÖCKNER, F. O., R. AMANN, A. ALFREIDER, J. PERNTHALER, R. PSENNER, K. TREBESIUS a K. H. SCHLEIFER (1996): An In Situ Hybridization Protocol for Detection and Identification of Planktonic Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 19(3), 403–406.
- KUIPER–GOODMAN, T., I. R. FALCONER, J. FITZGERALD (1999): Human health aspects. In: CHORUS I. a J. BARTRAM (Eds): Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, E & FN Spon, London, 113–153.
- GRÉBERT, T., H. DORÉ, F. PARTENSKY, G. K. FARRANT, E. S. BOSS, M. PICHERAL, L. GUIDI, S. PESANT, D. J. SCANLAN, P. WINCKER, S. G. ACINAS, D. M. KEHOE a L. GARCZAREK (2018): Light color acclimation is a key process in the global ocean distribution of *Synechococcus* cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(9), 2010–2019.

- HERDMAN, M., R. W. CASTENHOLZ, J. B. WATERBURY, R. RIPPKA (2001): Form-genus XIII. *Synechococcus*. In: BOONE, D. R., R. W. CASTENHOLZ, G. M. GARRITY (Eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2 ed.). Springer, Verlag New York, 473–600.
- HOICZYK, E. a A. HANSEL (2000): Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology* 182(5), 1191–1199.
- HUBER, P., N. DIOVISALVI, M. FERRARO, S. METZ, L. LAGOMARSINO, M. E. LLAMES, M. ROYO-LLONCH, J. BUSTINGORRY, R. ESCARAY, S. G. ACINAS, J. M. GASOL a F. UNREIN (2017): Phenotypic plasticity in freshwater picocyanobacteria. *Environ Microbiol.* 19(3), 1120–1133.
- JACOBY, J. M., D. C. COLLIER, E. B. WELCH, F. J. HARDY a M. CRAYTON (2000): Environmental factors associated with a toxic bloom of *Microcystis aeruginosa*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57(1), 231–240.
- JASSER, I. a C. CALLIERI (2017): Picocyanobacteria. In: MERILUOTO, J., L. SPOOF a G. A. CODD (Eds): *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 19–27.
- JEZBEROVÁ, J. a J. KOMÁRKOVÁ (2007): Morphological transformation in a freshwater *Cyanobium* sp. induced by grazers. *Environ Microbiol.* 9(7), 1858–1862.
- JIN, CH., M. M. F. MESQUITA, J. L. DEGLINT, M. B. EMELKO a A. WONG (2018): Quantification of cyanobacterial cells via a novel imaging-driven technique with an integrated fluorescence signature. *Scientific Reports* 8(1).
- JOCHIMSEN, E. M., W. W. CARMICHAEL, J. S. AN, M. D. CARDO, S. T. COOKSON, C. E. M. HOLMES, M. B. C. ANTUNES, D. A. DE MELO FILHO, T. M. LYRA, V. S. T. BARETTO, S. M. F. O. AZEVEDO a W. R. JARVIS (1998): Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 338, 873-878.
- KAEBERNICK, M. a B. NEILAN (2006): Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology* 35(1), 1–9.
- KAJGROVÁ, L., P. BLABOLIL, B. DROZD, K. ROY, J. REGENDA, M. ŠORF, J. VRBA (2022): Negative effects of undesirable fish on common carp production and overall

- structure and functioning of fishpond ecosystems. *Aquaculture* 549, 737811.
- KOBLÍŽEK, M., J. KOMENDA, J. MASOJÍDEK, L. PECHAR (2000): Cell Aggregation of the Cyanobacterium *Synechococcus Elongatus*: Role of the Electron Transport Chain. *J. Phycol.* 36(4), 662–668.
- KOMÁREK, J. (1996): Klíč k určování vodních květů sinic v České republice. In: MARŠÁLEK, B., V. KERŠNER a P. MARVAN (Eds): Vodní květy sinic. *Nadatio flos-aquae*, Brno, 22–85.
- KOMÁREK, J. a K. ANAGNOSTIDIS (1998): Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl, H., G. GÄRTNER, H. HEYNIG a D. MOLLENHAUER (Eds.): Süßwasserflora von Mitteleuropa 19(1). Gustav Fischer Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 548.
- KOMÁREK, J., V. CEPÁK, J. KAŠTOVSKÝ a J. SULEK (2004): What are the cyanobacterial genera *Cyanothece* and *Cyanobacterium*? Contribution to the combined molecular and phenotype taxonomic evaluation of cyanobacterial diversity. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* 113, 1–36.
- KOMÁREK, J., J. R. JOHANSEN, J. ŠMARDA a O. STRUNECKÝ (2020): Phylogeny and taxonomy of *synechococcus*-like cyanobacteria. *Fottea* 20(2), 171–191.
- KOMÁREK, J., J. KAŠTOVSKÝ, J. a JEZBEROVÁ (2011): Phylogenetic and taxonomic delimitation of the cyanobacterial genus *Aphanothece* and description of *Anathece* gen.nov. *European Journal Phycology* 46: 315–326.
- KOMÁRKOVÁ, J. (2002): Do cyanobacterial picoplankton exist in eutrophic reservoirs? *Verhandlungen der Internationalen Limnologie* 28, 497–500.
- LAM, A. K. Y., E. E. PREPAS, D. SPINK a S. E. HRUDEY (1995): Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implications for human health. *Water Res.* 29, 1845–1854.
- LEE, H., S. DEPUYDT, S. CHOI, G. KIM, Y. KIM, L. K. PANDEY, D. HÄDER, T. HAN a J. PARK (2021): Potential use of nuisance cyanobacteria as a source of anticancer agents. *Natural Bioactive Compounds*, 203–231.
- MALONE, T.C. (1980): Algal size and phytoplankton ecology. In: MORRIS I. (Ed): *The Physiological Ecology of Phytoplankton*. Blackwell Scientific, London, 433–463.

- MCQUAID, N., A. ZAMYADI, M. PREVOST, D. BIRD a S. DORNER (2011): Use of in vivo phycocyanin fluorescence to monitor potential microcystin-producing cyanobacterial biovolume in a drinking water source. *Journal of Environmental Monitoring* 13, 455–463.
- MARIE, D., N. SIMON a D. VAULOT (2005): Phytoplankton cell counting by flow cytometry. *Algal culturing techniques* 1, 253–267.
- OBERHOLSTER, P. J., A. M. BOTHA a J. U. GROBBELAAR (2004): Microcystis aeruginosa: source of toxic microcystins in drinking water. *African Journal of Biotechnology* 3(3), 159–168.
- OKINO, T. (1974): Studies on the blooming of Microcystis aeruginosa. II: rapid accumulation of phosphate by Microcystis aeruginosa. *J. Fac. Sci. Shinsu Univ.* 8, 135–145.
- OROZCO, J. a L. K. MEDLIN (2013): Review: advances in electrochemical genosensors-based methods for monitoring blooms of toxic algae. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 6838–6850.
- OSPINA-SERNA, J., P. HUBER, M. ODRIOZOLA, P. FERMANI a F. UNREIN (2020): Picocyanobacteria aggregation as a response to predation pressure: direct contact is not necessary. *FEMS Microbiology Ecology* 96(10).
- OWEN, B. M., CH. S. HALLETT, J. J. COSGROVE, J. R. TWEEDLEY a N. R. MOHEIMANI (2022): Reporting of methods for automated devices: A systematic review and recommendation for studies using FlowCam for phytoplankton. *Limnology and Oceanography: Methods* 20(7), 400–427.
- PADISÁK J., B FAR, R. KOSCHEL a L. KRIENITZ (2003): Deep layer cyanoprokaryota maxima are constitutional features of lakes: examples from temperate and tropical regions. *Arch Hydrobiol Spec Issues Adv Limnol* 58, 175–199.
- POPELS, L. C., S. C. CARY, D. A. HUTCHINS, R. FORBES, F. PUSTIZZI, CH. J. GOBLER a K. J. COYNE (2003): The use of quantitative polymerase chain reaction for the detection and enumeration of the harmful alga Aureococcus anophagefferens in environmental samples along the United States East Coast. *Limnology and Oceanography: Methods* 1(1), 92–102.

- POURIA, S., A. DE ANDRADE, J. BARBOSA, R. CAVALCATI, V. BARRETO, C. WARD, W. PREISER, G. POON, G. NEILD a G. A. CODD (1998): Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru. *Brazil Lancet* 352, 21–26.
- REYNOLDS, C. S., G. H. M. JAWORSKI, H. A. CMIECH a G. F. LEEDALE (1981): On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Kutz. Emend. Elenkin *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 293 (1068), 419–477.
- RIPPKA, R. a G. COHEN-BAZIRE (1983): The Cyanobacteriales: A Legitimate Order Based on the Type Strain *Cyanobacterium stanieri*? *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie* 134, 21–36.
- ROCAP, G., D. L. DISTEL, J. B. WATERBURY a S. W. CHISHOLM (2002): Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* ecotypes by using 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 68(3), 1180–1191.
- RUSS, J. C. (2006): *The Image Processing Handbook* (5 ed.). CRC Press.
- SALAZAR, V. W., D. A. TSCHOEKE, J. SWINGS, C. A. COSENZA, M. MATTOSO, C. C. THOMPSON a F. L. THOMPSON (2020): A new genomic taxonomy system for the *Synechococcus* collective. *Environmental Microbiology* 22(11), 4557–4570.
- SCANLAN, D. J. (2012): Marine Picocyanobacteria. In: WHITTON, B. (Ed): *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 503–533.
- SCHOLIN, C., K. BUCK, T. BRITSCHGI, G. CANGELOSI a F. CHAVEZ (1996): Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats. *Phycologia* 35, 190–197.
- SIEBURTH J. M., V. SMETACEK a J. LENZ (1978): Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 23(6), 1256–1263.
- SIVONEN, K., S. I. NIEMALA, R. M. NIEMI, L. LEPISTO, T. H. LUOMA a L. A. RASANEN (1990): Toxic cyanobacteria (blue green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia* 190, 267–275.

- SIX, CH., J. C. THOMAS, L. GARCZAREK, M. OSTROWSKI, A. DUFRESNE, N. BLOT, D. J. SCANLAN a F. PARTENSKY (2007): Diversity and evolution of phycobilisomes in marine *Synechococcus* spp.: A comparative genomics study. *Genome Biology* 8(12), 1–22.
- STALEY, J. T. (1997): Biodiversity: are microbial species threatened? *Current Opinion in Biotechnology* 8(3), 340–345.
- STOCKNER, J., C. CALLIERI a G. CRONBERG (2000): Picoplankton and Other Non-Bloom-Forming Cyanobacteria in Lakes. In: *The Ecology of Cyanobacteria*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 195–231.
- STOCKNER, J. G., J. NAVAL a J. ANTIA (1986): Algal Picoplankton from Marine and Freshwater Ecosystems: A Multidisciplinary Perspective. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43(12), 2472–2503.
- STOMP, M., J. HUISMAN, L. VÖRÖS, F. R. PICK, M. LAAMANEN, T. HAVERKAMP a L. J. STAL (2007): Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecology letters* 10(4), 290–298.
- SVIRCEV, Z., S. KRSTIC, M. MILADINOV–MIKOV, V. BALTIC a M. VIDOVIC (2009): Freshwater cyanobacterial blooms and primary liver cancer epidemiological studies in Serbia. *J. Environ. Sci. Health* 1532–4095(27), 36–55.
- VÖRÖS, L., C. CALLIERI, K. V. BALOGH a R. BERTONI (1998): Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia* 369(0), 117–125.
- VRBA, J., Z. BENEDOVÁ, J. JEZBEROVÁ, A. MATOUŠŮ, M. MUSIL, J. NEDOMA, L. PECHAR, J. POTUŽÁK, K. ŘEHÁKOVÁ, K. ŠIMEK, M. ŠORF a J. ZEMANOVÁ (2018): Nevstoupíš dvakrát do téhož rybníka – předběžná zpráva o stavu dnešních hypertrofních rybníčních ekosystémů. *Vodní hospodářství* 68(8), 1–5.
- VRIELING, E. G. a D. M. ANDERSON (1996): Immunofluorescence in phytoplankton research: Applications and potential. *Journal of Phycology* 32(1), 1–16.
- WATERBURY, J. B. a RIPPKA R. (1989): The order Chroococcales. In: KRIEG, N. R. a J. B. HOLT (Eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 3. Williams and Wilkens, 1728–1746.

- WEISSE T. (1993): Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. In: JONES J. G. (Ed): *Advances in microbial ecology* 13. Plenum Press, New York, 327–370.
- WOOD, A. M., P. K. HORAN, K. MUIRHEAD, D. A. PHINNEY, C. M. YENTSCH a J. B. WATERBURY (1985): Discrimination between types of pigments in marine *Synechococcus* spp. by scanning spectroscopy, epifluorescence microscopy, and flow cytometry. *Limnology and Oceanography* 30(6), 1303-1315.
- ZAMYADI, A., F. CHOO, G. NEWCOMBE, R. STUETZ a R. K. A. HENDERSON (2016): A review of monitoring technologies for real-time management of cyanobacteria: Recent advances and future direction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 85, 83–96.
- ZNACHOR, P., J. NEDOMA, J. HEJZLAR, J. SEĎA, J. KOPÁČEK, D. BOUKAL a T. MRKVIČKA (2018): Multiple long-term trends and trend reversals dominate environmental conditions in a man-made freshwater reservoir. *Science of the Total Environment* 624, 24–33.
- ZNACHOR, P., J. NEDOMA, J. HEJZLAR, J. SEĎA, J. KOMÁRKOVÁ, V. KOLÁŘ, T. MRKVIČKA a D. BOUKAL (2020): Changing environmental conditions underpin long-term patterns of phytoplankton in a freshwater reservoir. *Science of the Total Environment* 710, 135626.

Seznam příloh

```
ClearBinary();
CloseAllDocuments(2);
SelectOptConf("100x");
ResetObjectFeatures();
OverlayTransparency(0);
_ImageOpen();
Contrast(0,0,0,0,0);
ShowScale(1);
ShowFrame(1);
_SpotDetection(0);
ImageEdit();
PauseMacro("Edit");
CleanBinary(4,2);
ScanObjects();
_ObjectData();
PauseMacro("Number of cells");
ResetObjectFeatures();
SelectObjectFeature("Convexity");
CloseBinary(80,4);
ScanObjects();
OverlayTransparency(80);
_ObjectData();
PauseMacro("Convexity");
ResetObjectFeatures();
SelectObjectFeature("Area");
ConvexHull();
ScanObjects();
OverlayTransparency(80);
_ObjectData();
PauseMacro("Colony");
ResetObjectFeatures();
SelectObjectFeature("Area");
SelectObjectFeature("Perimeter");
SelectObjectFeature("MaxFerret");
SelectObjectFeature("MinFerret");
SelectObjectFeature("Circularity");
SelectObjectFeature("Elongation");
ClearBinary();
_DefineThreshold();
CleanBinary(4,2);
ImageEdit();
PauseMacro("Edit");
CleanBinary(4,2);
ScanObjects();
_ObjectData();
```

Obr. P1: Zdrojový kód makra pro 2D kolonie.

```

ClearBinary();
CloseAllDocuments(2);
ResetObjectFeatures();
OverlayTransparency(0);
_ImageOpen();
LUTs_AutoScale();
ProcessLUTs();
ShowScale(1);
ShowFrame(1);
MeasureLength();
PauseMacro("Lenght");
ResetFieldFeatures();
ResetObjectFeatures();
SelectObjectFeature("CentreX");
SelectObjectFeature("CentreY");
LUTs_AutoScale();
ProcessLUTs();
ND_MoveInExperimentSeq(0);
_SpotDetection(0);
ScanObjects();
BinaryMore(0,6,0);
PauseMacro("Next frame");

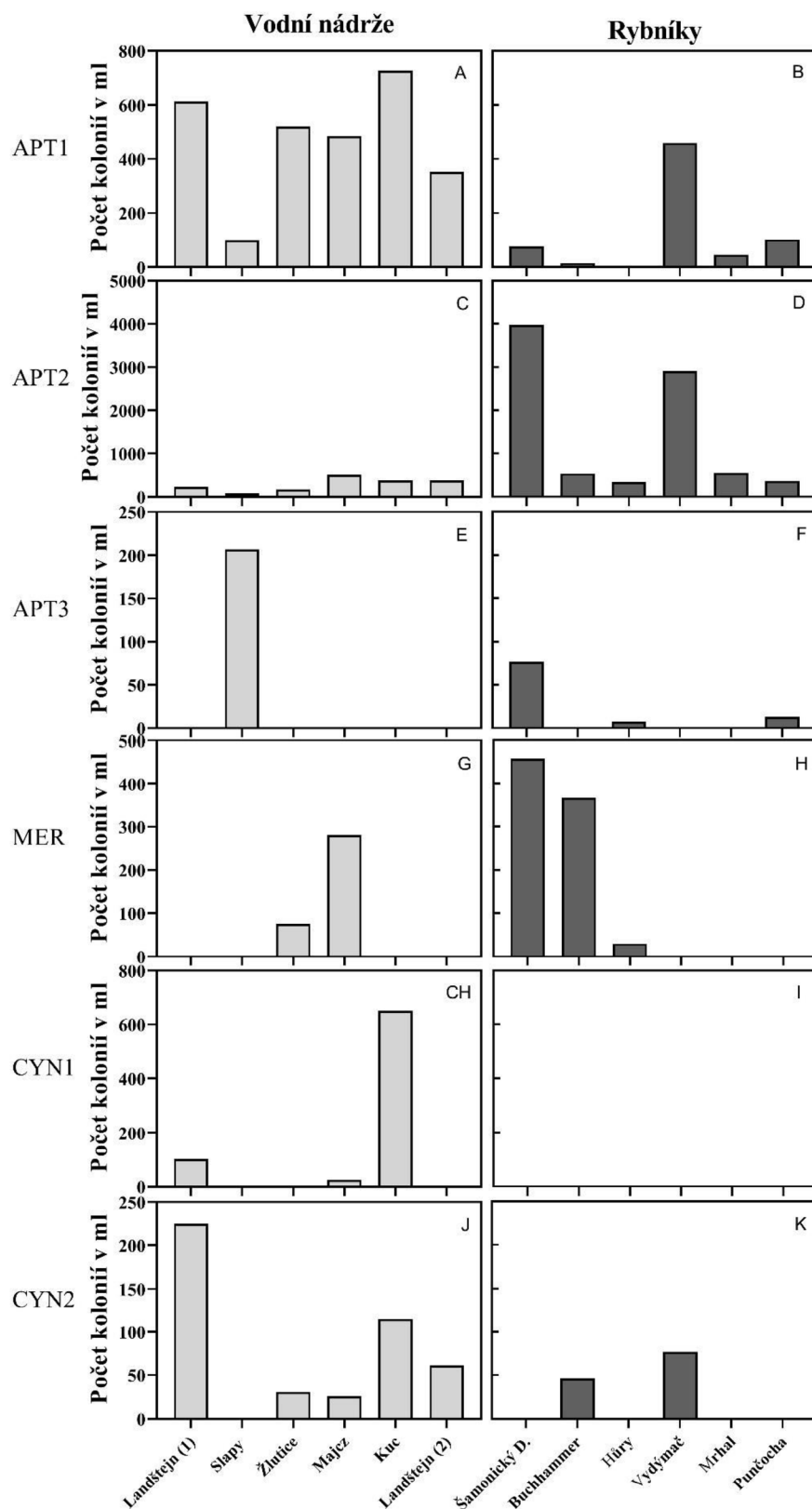
ND_MoveExperimentForward(-1);*
LUTs_AutoScale();
ProcessLUTs();
_SpotDetection(0);
BinaryMore(0,5,0);
BinaryMore(0,0,6);
BinaryMore(0,2,5);
Expand();
BinaryMore(0,4,0);
BinaryMore(0,0,5);
BinaryMore(0,2,4);
BinaryMore(0,6,5);
BinaryOperations(2);
ScanObjects();
PauseMacro("Next frame");

```

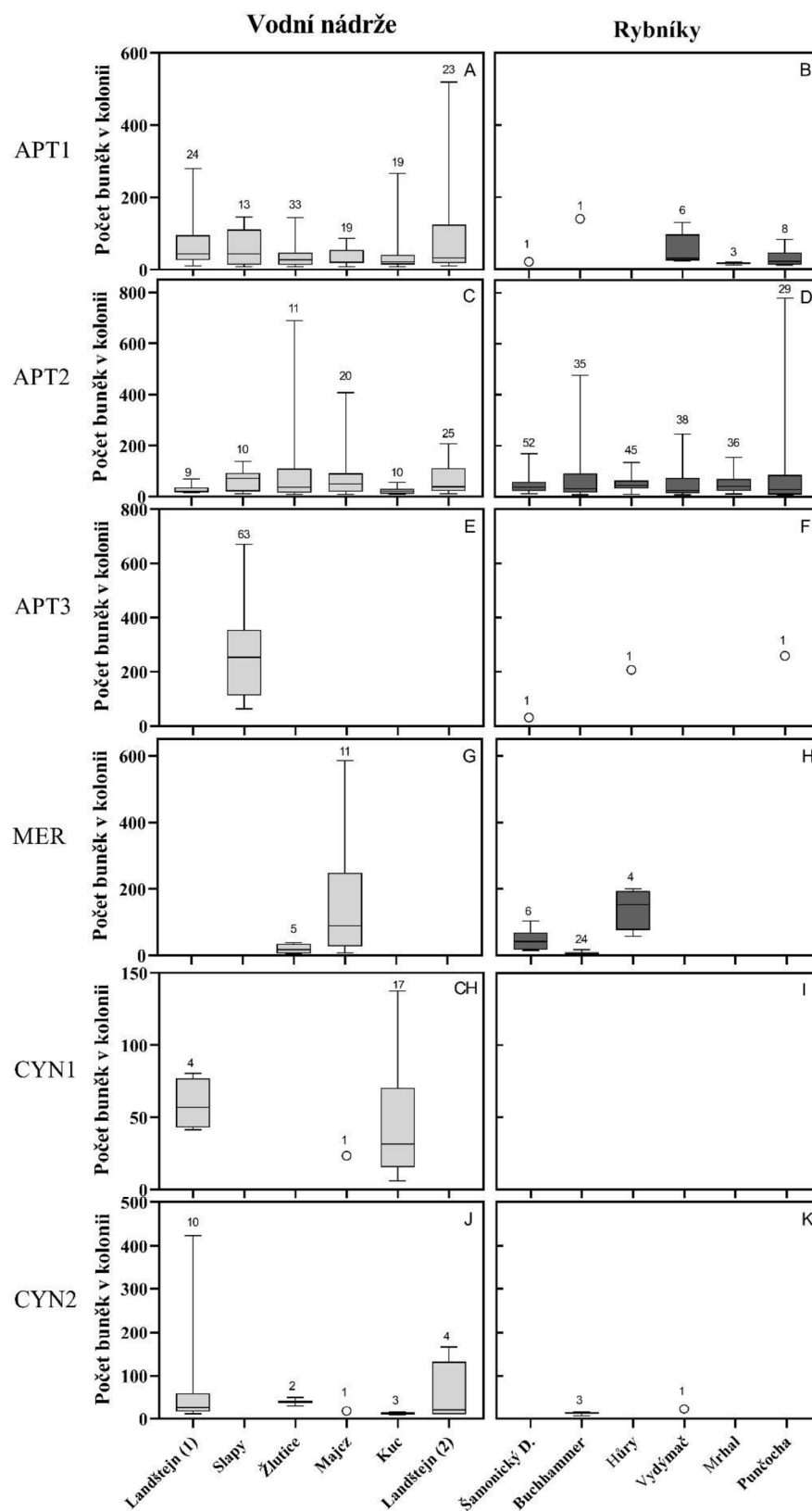
Obr. P2: Zdrojový kód pro 3D kolonie – plocha kolonie a počet buněk (* – repetitivní sekvence funkcí).

```
ClearBinary();
CloseAllDocuments(2);
SelectOptConf("100x");
ResetObjectFeatures();
SelectObjectFeature("Area");
SelectObjectFeature("Perimeter");
SelectObjectFeature("MaxFeret");
SelectObjectFeature("MinFeret");
SelectObjectFeature("Circularity");
SelectObjectFeature("Elongation");
_ImageOpen();
Contrast(0,0,0,0,0);
ShowScale(1);
OverlayTransparency(80);
_DefineThreshold();
ShowFrame(1);
CleanBinary(4,2);
ImageEdit();
PauseMacro("Edit");
CleanBinary(4,2);
ScanObjects();
_ObjectData();
```

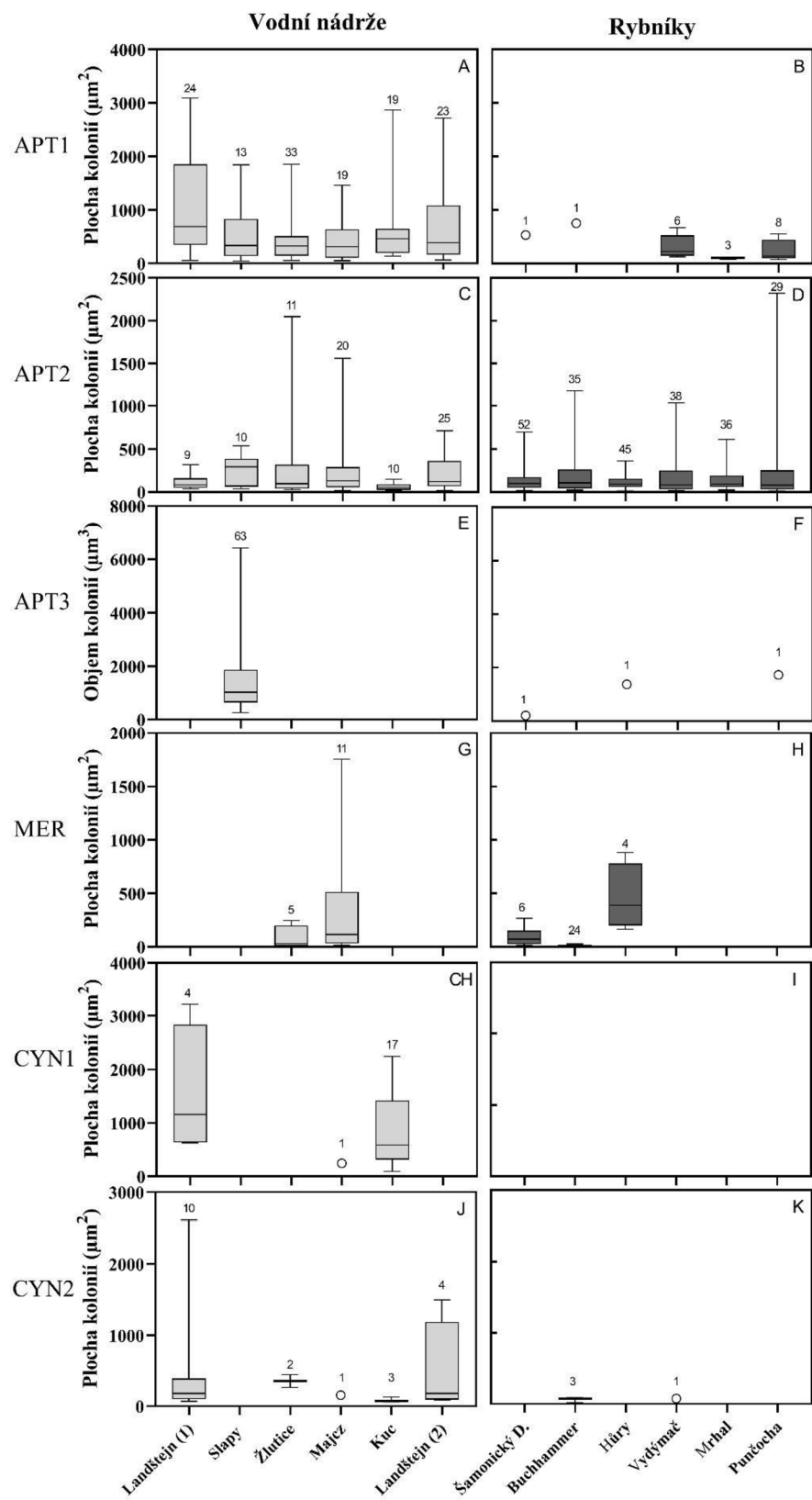
Obr. P3: Zdrojový kód pro 3D kolonie – velikost a tvar buněk.



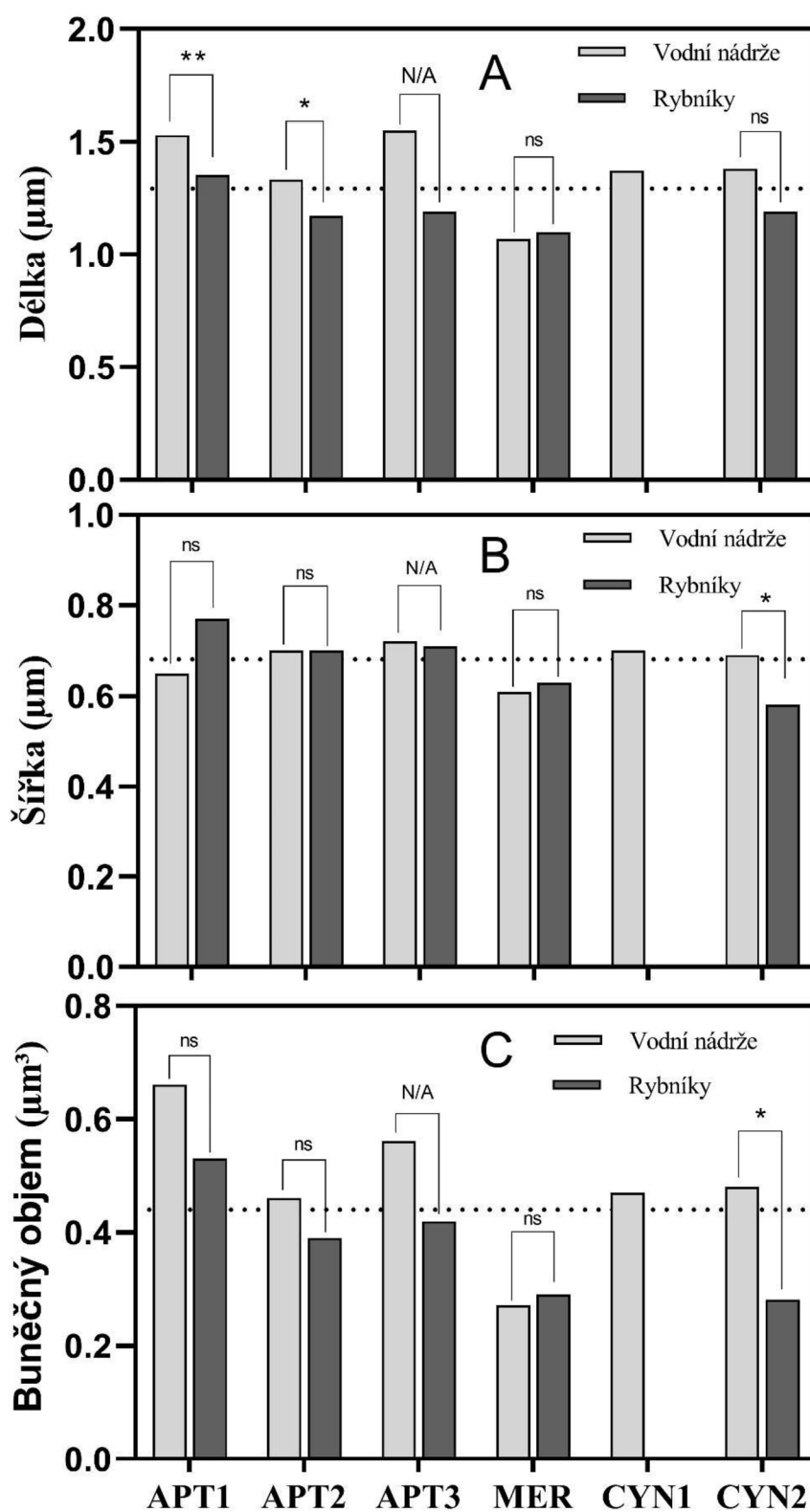
Obr. P4: Shrnutí počtu kolonií ve vzorcích z nádrží a rybníků v kategoriích APT1 ($p < 0,05$) a APT2–CYN2 ($p > 0,05$).



Obr. P5: Shrnutí počtu koloniálních buněk ve vzorcích z nádrží a rybníků v kategoriích APT1–CYN2 ($p > 0,05$).



Obr. P6: Shrnutí velikosti ploch kolonií ve vzorcích z nádrží a rybníků v kategoriích APT1–CYN2, ($p > 0,05$).



Obr. P7: Shrnutí délky, šířky a objemu buněk ve vzorcích z nádrží a rybníků v kategoriích APT1–CYN2 (přerušovaná čára – celkový průměr parametru).