

Sinice w wodach Bałtyckich – wstępna analiza możliwości zastosowania różnych metod do wyznaczania ich biomasy



Sinice (cyjanobakteria) występujące w środowisku morskim są grupą glonów zróżnicowaną pod względem taksonomicznym. Występują w przeciągu całego roku jako pojedyncze komórki, cenobia, kolonie i nici. Są uważane za organizmy prokariotyczne biorące udział w procesie fotosyntezy a organizacja ich wewnątrzkomórkowych struktur wykazuje cechy charakterystyczne zarówno dla roślin, jak i bakterii. System anten w aparacie fotosyntetycznym sinic, oprócz karotenoidów zawiera dodatkowo kompleksy różnych biliprotein tzw. fikobilisomów zlokalizowanych w membranie tylakoidów (np. MacColl 1998). Najczęściej występującymi fikobilinami są fikoerytryna (PE), fikocyjanina (PC) i allofikocyjanina (AP) a ich właściwości pozwalają na pochłanianie światła w paśmie od 450 do 660 nm (np. Grossman i wsp. 1993). Wśród karotenoidów – zeaksantyna jest powszechnie uznawana za biomarker tej grupy glonów (Jeffrey i Vesk 1997, Roy i wsp. 2011), natomiast pozostałe karotenoidy, takie jak echinenon, myksoksantofil, afanizofyl, kantaksantyna, odnotowano w komórkach cyjanobakterii w ilościach nie przekraczających 10% sumarycznej zawartości pozostałych składników komórkowych. Obecność różnych rodzajów pigmentów, których stężenie jest zmienne i zależne od warunków środowiskowych, jest głównym czynnikiem wpływającym na widma absorpcji światła widzialnego przez społeczności fitoplanktonu.

W ostatnich dziesięcioleciach zaobserwowano wzrost produktywności i występowania potencjalnie toksycznych zakwitów sinic w wodach przybrzeżnych i otwartych Morza Bałtyckiego oraz niektórych polskich jeziorach pomorskich (np. Pliński i wsp. 1998). Ogromne zakwity sinic pojawiają się niemal każdego lata, obejmując obszar dochodzący do 100 000 km² (np. Kahru i wsp. 1994). *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aque* oraz niektóre gatunki z rodzaju *Anabaena* to dominujące cyjanobakterie występujące w Zatoce Gdańskiej (Pliński i wsp. 2007), natomiast *Microcystis spp.* są zdecydowanie najczęściej występującymi cyjanobakteriami w zbiornikach słodkowodnych (Kobos i wsp. 2005, 2013). Picocyjanobakterie jak *Synechococcus spp.* lub *Synechocystis spp.* odgrywają również ważną rolę podczas zakwitów (Mazur-Marzec i wsp. 2013). Ich biomasa może stanowić do 80% całkowitej biomasy glonów i mogą one odpowiadać nawet za 50% pierwotnej produkcji w akwenu (np. Stal i wsp. 2003). Oprócz tych dominujących gatunków sinic, inne organizmy, takie jak *Pseudanabaena spp.* są również obecne w Morzu Bałtyckim i słodkowodnych zbiornikach zbiorowisk sinic (Stal i wsp. 2003, Mazur-Marzec i wsp. 2013).

Ze względu na zdolność wytwarzania biologicznie aktywnych związków, zarówno toksyn, jak i potencjalnych farmaceutyków, bałtyckie cyjanobakterie są w ostatnich latach interesującym przedmiotem badań (Mazur-Marzec i wsp. 2015).

Wyznaczenie biomasy tych organizmów jest niezwykle istotnym zagadnieniem, nie tylko ze względu na określenie produktywności danego akwenu czy ilości zaabsorbowanej przez te organizmy energii słonecznej, ale również ze względu na ich toksyczne właściwości.

Klasyczną metodą wyznaczania biomasy poszczególnych grup glonów, w tym również cyjanobakterii, jest mikroskopowa analiza składu gatunkowego fitoplanktonu występującego w danym rejonie i sezonie. Jest to metoda niezwykle czasochłonna i wymagająca wysokich specjalistycznych kwalifikacji do oceny taksonomicznej organizmów.

Inną metodą szacowania biomasy danej grupy fitoplanktonu jest wykorzystanie zidentyfikowanego odpowiedniego zestawu barwników wskaźnikowych charakterystycznych dla danych klas glonów. Metoda takiej aproksymacji, wykorzystująca optyczne właściwości aktywnych składników komórek znalazła zastosowanie w badaniach oceanograficznych (Roy et al. 2011; Sobiechowska et al. 2010; Ston-Egiert et al. 2010). Pigmenty, naturalnie występujące w strukturach komórkowych w postaci kompleksów pigmentowo-białkowych, są izolowane z komórek glonów przy wykorzystaniu rozpuszczalników organicznych (aceton, etanol, metanol) lub innych mediów oraz mechanicznego zniszczenia ścian komórkowych. Stężenie danego barwnika wskaźnikowego jest określane na drodze chromatograficznego rozdzielania mieszaniny związków barwnych lub pomiarów intensywności ich fluorescencji oraz odpowiedniej analizie ilościowej opartej na wcześniejszych kalibracjach wykorzystywanych systemów. Zastosowanie tej metody daje dobre rezultaty w przypadku określenia całkowitej biomasy fitoplanktonu w zależności od stężenia chlorofilu a, lub biomasy odpowiedniej grupy fitoplanktonu tworzącej zakwit, czyli stanowiącej ponad 90% całkowitej biomasy fitoplanktonu, w zależności od stężenia odpowiedniego karotenoidu wskaźnikowego. Można wówczas zakładać, że stężenie danego barwnika wskaźnikowego związane jest wyłącznie z obecnością konkretnej klasy glonów (Latelier i in. 1993, Andersson i in. 1996, Peeken 1997, Mackey i in. 1996, Stoń-Egiert i wsp. 2010). W przypadku fitocenoz złożonych z mieszanych grup glonów, sytuacja jest bardziej skomplikowana, gdyż stężenie charakterystycznego dla danej klasy pigmentu-markeru nie zawsze musi odpowiadać danej klasie. Barwniki, jak wiadomo, występują w różnych proporcjach jakościowo-ilościowych w komórkach organizmów przynależnych do danej klasy, ale również występują w komórkach glonów należących do różnych klas. Ponadto – zawartość barwników w komórkach może ulegać modyfikacjom pod wpływem różnych czynników stresowych dla komórek. Dlatego też, szacowanie biomasy różnych grup fitoplanktonu na podstawie stężeń odpowiednich barwników obarczone jest pewnymi niedokładnościami.

Kolejna metoda wykorzystywana do określenia biomasy grup glonów oparta jest na zdolności fitoplanktonu do fluorescencji, czyli do emisji promieniowania przez wzbudzone cząstki odpowiednich barwników zawartych w komórkach (Ostrowska i wsp. 2015, Houliez i wsp. 2017). Właściwość ta jest wykorzystywana w przyrządach pomiarowych pozwalających na określenie odpowiednio zdefiniowanych grup glonów bezpośrednio w środowisku morskim na podstawie charakterystycznych widm wzbudzenia fluorescencji. *In situ, in vivo* fluorometria (IVF) jest uważana za cenne narzędzie do uzyskiwania bardzo szybkiej informacji i dużej ilości danych dotyczących przestrzennych i czasowych zmian fitoplanktonu, umożliwiając wykrywanie sinic w rozmaitych ekosystemach wodnych, szczególnie w strefach przybrzeżnych (Seppälä 2009). Zazwyczaj sondy tego typu wykorzystują długości fali fluorescencji charakterystycznych wyekstrahowanych pigmentów, aczkolwiek w wielu instrumentach tego typu długość fali światła użytego do wzbudzenia fluorescencji może być nieoptymalna dla zbiorowisk fitoplanktonu w których sinice stanowią ważny składnik (Kromkamp and Forster, 2003, Raateoja i wsp., 2004b, Simis i wsp., 2012).

Właściwe określenie biomasy sinic jest istotne ze względów monitoringowych szczególnie w okresie letnim. Przedstawimy porównanie różnych (w tym zdalnych) metod

określania biomasy tej grupy glonów. W tym celu wykorzystana zostanie baza danych empirycznych Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk zawierająca wieloletnie wyniki pomiarów właściwości fizykochemicznych cyjanobakterii, stężeń związków barwnych zawartych w ich komórkach oraz wyniki oznaczeń mikroskopowych.

Materiał empiryczny i metodyka oznaczeń

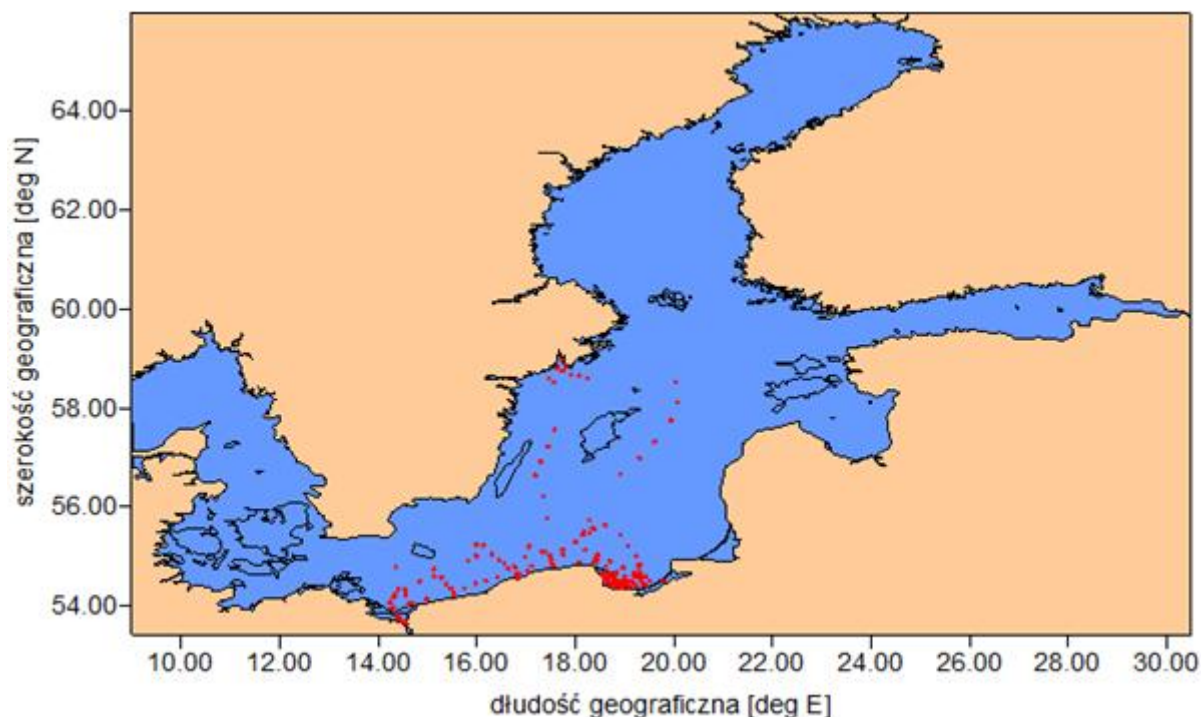
Materiał empiryczny wykorzystany do realizacji celu obejmował lata 2010 – 2015. W tym okresie w czasie rejsów w różnych rejonach Morza Bałtyckiego w różnych miesiącach (patrz rys.1 i tab.1) kolekcjonowano próbki wody morskiej z powierzchni i dodatkowych głębokości w celu przeprowadzenia odpowiednich oznaczeń laboratoryjnych oraz wykonywano pomiary *in situ* różnych charakterystyk środowiska morskiego. Rejsy odbywały się na statkach r/v ‘Oceania’ i ‘Oceanograf’ (latem 2011 i 2012 i 2013 w rejonie Zatoki Gdańskiej).

Zgromadzono następujące dane empiryczne:

- wyniki stężeń barwników fitoplanktonu określane metodą chromatograficzną RP-HPLC i spektrofluorymetryczną w próbkach wody,
- wyniki oznaczeń składu taksonomicznego fitoplanktonu i jego biomasy wyznaczane na podstawie oznaczeń mikroskopowych,
- wyniki stężeń odpowiednich grup glonów wyznaczane na podstawie przeprowadzanych *in situ* pomiarów fluorescencji fluorymetrem FluoroProbe bbe (Moldaenke).

Tab.1. Zestawienie miesięcy w poszczególnych latach pomiarowych 2010-2015, w których pobierano materiał empiryczny w różnych rejonach Morza Bałtyckiego. Oznaczenia: ob. – wody otwartego Bałtyku, zg – Zatoka Gdańska, zp – Zatoka Pomorska, zs – Zalew Szczeciński.

	2010				2011				2012				2013				2014				2015			
	ob.	zg	zp	zs	ob.	zg	zp	zs	ob.	zg	zp	zs	ob.	zg	zp	zs	ob.	zg	zp	zs	ob.	zg	zp	zs
styczeń																								
luty										x							x	x	x	x				
marzec	x	x			x	x	x		x	x			x	x			x				x	x	x	x
kwiecień					x	x			x	x							x	x			x	x		
maj	x	x			x	x			x	x			x	x			x	x			x	x		
czerwiec						x				x				x				x						
lipiec						x				x				x				x						
sierpień						x				x				x				x						
wrzesień					x	x			x	x			x	x	x	x	x	x			x	x		
październik					x	x			x	x				x										
listopad													x	x			x	x				x		
grudzień																								



Rys 1. Rozmieszczenie stacji pomiarowych w latach 2010-2015.

Opis metodyki pomiarowej:

- metodyka oznaczeń stężeń chlorofilu i karotenoidów metodą chromatograficzną

Barwniki były izolowane z komórek fitoplanktonu przy wykorzystywaniu 90% acetonu (Strickland i Parsons 1972, Parsons i in. 1984), a później rozdzielane z mieszaniny przy zastosowaniu techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wykorzystując odpowiednie procedury i konfiguracje systemu opisane w pracach (Stoń i Kosakowska 2002; Stoń-Egiert i Kosakowska 2005). Kalibracja systemu chromatograficznego została przeprowadzona w oparciu o komercyjnie dostępne wzorce chlorofilu i karotenoidów (The International Agency for 14C Determination DHI Institute for Water and Environment w Danii).

Jakościowa i ilościowa identyfikacji odpowiednich chlorofilu i karotenoidów została przeprowadzona w oparciu o odpowiednie dla każdego barwnika uzyskane krzywe kalibracyjne.

- metodyka oznaczeń stężeń fikobiliprotein metodą spektrofлуorymetryczną

Ekstrakcja barwników fikobilinowych, czyli fikocyjaniny i fikoerytryny przebiegała przy zastosowaniu odpowiedniego medium ekstrakcyjnego składającego się z 0.25 M Trizma Base, uwodnionego 10 mM disodium EDTA (2H₂O) i 2 mg cm⁻³ lizozymu, o pH = 5.5 (Steward and Farmer 1984).

Z kolei jakościowa i ilościowa charakterystyka fikocyjaniny i fikoerytryny w analizowanych próbkach opierała się na wynikach pomiarów spektrofлуorymetrycznych (Cary Eclipse, Varian, Agilent Technologies) uprzednio przygotowanych ekstraktów tych związków. Kalibracja urządzenia i określenie współczynników kalibracyjnych zostało przeprowadzone na bazie komercyjnie dostępnych wzorców fikobilin (ProZyme Inc., USA), a szczegółowy opis procedur metodycznych jest zamieszczony w pracy Sobiechowska-Sasim i in. (2014).

- metodyka mikroskopowego oznaczeń składu gatunkowego fitoplanktonu i określenia biomasy poszczególnych klas glonów

Mikroskopowym oznaczeniom składu gatunkowego fitoplanktonu poddano odpowiednio konserwowane (wodnym roztworem jodku potasu) i przechowywane próbki wody morskiej. Analiza jakościowa i ilościowa fitoplanktonu w próbkach była wykonywana przy zastosowaniu techniki komór sedimentacyjnych Utermohl'a (Willen 1962) i wykorzystaniu mikroskopu odwróconego (typu Axiovert 35, Carl Zeiss, Germany). Zliczenia komórek fitoplanktonu przeprowadzano w oparciu o procedurę zamieszczoną w pracy Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM (1997).

W trakcie analizy mikroskopowej poszczególne osobniki były identyfikowane do gatunków lub wyższych jednostek systematycznych zgodnie z obowiązującym podziałem systematycznym (Hällfors 2004). Wyznaczano objętość każdej komórki na podstawie pomiarów jej odpowiednich charakterystyk morfometrycznych, przy założeniu podobieństwa kształtów komórek do figur stereometrycznych (Olenina i in. 2006). Objętość zidentyfikowanych komórek przeliczano na biomasę przy założeniu, że $1 \mu\text{m}^3$ jest równy 1 pg (Edler 1979). Zawartość węgla w próbkach fitoplanktonu wyliczano według równań przedstawionych w pracy Menden-Deuer i Lessard (2000):

- dla okrzemek (ze względu na niższą zawartość węgla):
$$\text{Carbon [pgC cell}^{-1}] = 0,288 * \text{cell volume}^{0.811}$$
- dla pozostałych grup fitoplanktonu (z wyjątkiem okrzemek):
$$\text{Carbon [pgC cell}^{-1}] = 0,216 * \text{cell volume}^{0.939}$$

gdzie cell volume jest wyrażona w μm^3 .

- metodyka pomiarów stężeń odpowiednich grup glonów wyznaczanych na podstawie pomiarów *in situ* fluorescencji fluorymetrem FluoroProbe bbe (Moldaenke).

Pomiary fluorescencji poszczególnych grup glonów przeprowadzane były przy wykorzystaniu fluorymetru FluoroProbe (Moldaenke). Jest to bardzo czuły instrument pomiarowy wykorzystywany do pomiaru chlorofilu a z możliwością wyszczególnienia następujących grup alg: zielenic (*Chlorophyceae*, green algae), sinic (cyjanobakteria, blue-green algae), okrzemek (*Bacillariophyceae*, diatoms), bruzdnic (*Dniophyceae*, dinoflagellates) i kryptofitów (*Cryptophyceae*). Możliwość rozróżnienia tych grup wynika z podobieństwa w składzie i wzajemnych proporcjach barwników fotosyntetycznych w komórkach glonów należących do danej klasy, stąd też widma wzbudzenia fluorescencji dla odpowiedniej grupy glonów są charakterystyczne. Glony należące do sinic charakteryzują się maksymalnym wzbudzeniem przy 610 nm związanym z właściwościami fotosyntetycznego pigmentu antenowego – fikocyjaniny. Fluorescencja obecnego w komórkach sinic chlorofilu a wykazuje niskie natężenie przy 450nm, co jest wynikiem maskującego wpływu fikocyjaniny na widmo emisji fluorescencji tych glonów.

Porównanie różnych metod określania stężeń składników optycznie aktywnych w komórkach glonów oraz biomasy fitoplanktonu w tym sinic

Zgromadzony materiał empiryczny zawierający wyniki: stężeń barwników, biomasy glonów i zawartości glonów określonych fluorymetrycznie przedstawiony we wcześniejszym rozdziale, stanowił podstawę do poszukiwań wzajemnych związków pomiędzy różnymi metodami

pozwalającymi na określenie stężeń składników optycznie aktywnych występujących w komórkach glonów oraz biomasy fitoplanktonu w tym zidentyfikowanych w wodach sinic.

W wyniku analiz statystycznych ustalono następujące zależności pomiędzy:

- stężeniami poszczególnych karotenoidów występujących w komórkach sinic: echinenonu, zeaksantyny, b-karotenu, kantaksantyny, afanizomnonu, myksoksantorilu zidentyfikowanych dzięki zastosowaniu metody HPLC i stężeniami fikobiliprotein (fikocyjaniny i fikoerytryny) zidentyfikowanych metodą spektrofotometryczną a stężeniem chlorofilu a wyznaczonym metodą HPLC (rys.2)
- sumarycznymi stężeniami zidentyfikowanych metodą HPLC karotenoidów charakterystycznych dla sinic a stężeniem chlorofilu a, fikobiliprotein a stężeniem chlorofilu a oraz sumą barwników charakterystycznych dla sinic a stężeniem chlorofilu a (rys.3)
- sumaryczną biomasą zidentyfikowanych na podstawie oznaczeń mikroskopowych gatunków fitoplanktonu a stężeniem chlorofilu a wyznaczonym metodą HPLC jako wskaźnikiem biomasy fitoplanktonu (rys 4a)
- sumaryczną zawartością chlorofilu a wyznaczoną na podstawie fluorescencji grup glonów w pomiarach *in situ* wykonywanych przy wykorzystaniu fluorometru FluoroProbe bbe Moldaenke a stężeniem chlorofilu a wyznaczonym metodą HPLC jako wskaźnikiem biomasy fitoplanktonu (rys 4b)
- sumaryczną biomasą zidentyfikowanych na podstawie oznaczeń mikroskopowych gatunków fitoplanktonu a sumaryczną zawartością chlorofilu a wyznaczoną na podstawie fluorescencji grup glonów w pomiarach *in situ* wykonywanych przy wykorzystaniu fluorometru FluoroProbe bbe Moldaenke (rys 4c)
- sumaryczną biomasą sinic zidentyfikowanych na podstawie oznaczeń mikroskopowych a sumarycznym stężeniem karotenoidów i fikobiliprotein charakterystycznych dla sinic wyznaczonych metodą HPLC i spektrofotometryczną (rys 5a)
- sumaryczną biomasą sinic zidentyfikowanych na podstawie oznaczeń mikroskopowych a zawartością sinic wyznaczoną na podstawie fluorescencji tej grupy glonów w pomiarach *in situ* wykonywanych przy wykorzystaniu fluorometru FluoroProbe bbe Moldaenke (rys 5b)
- sumarycznym stężeniem karotenoidów i fikobiliprotein charakterystycznych dla sinic wyznaczonych metodą HPLC i spektrofotometryczną a zawartością sinic wyznaczoną na podstawie fluorescencji tej grupy glonów w pomiarach *in situ* wykonywanych przy wykorzystaniu fluorometru FluoroProbe bbe Moldaenke (rys 5c).

Otrzymane zależności przedstawiono w tabelach 2-4, zamieszczając w nich liczbę danych N oraz współczynnik determinacji r^2 .

W pierwszej kolejności wyznaczono zależności w postaci (rys.2):

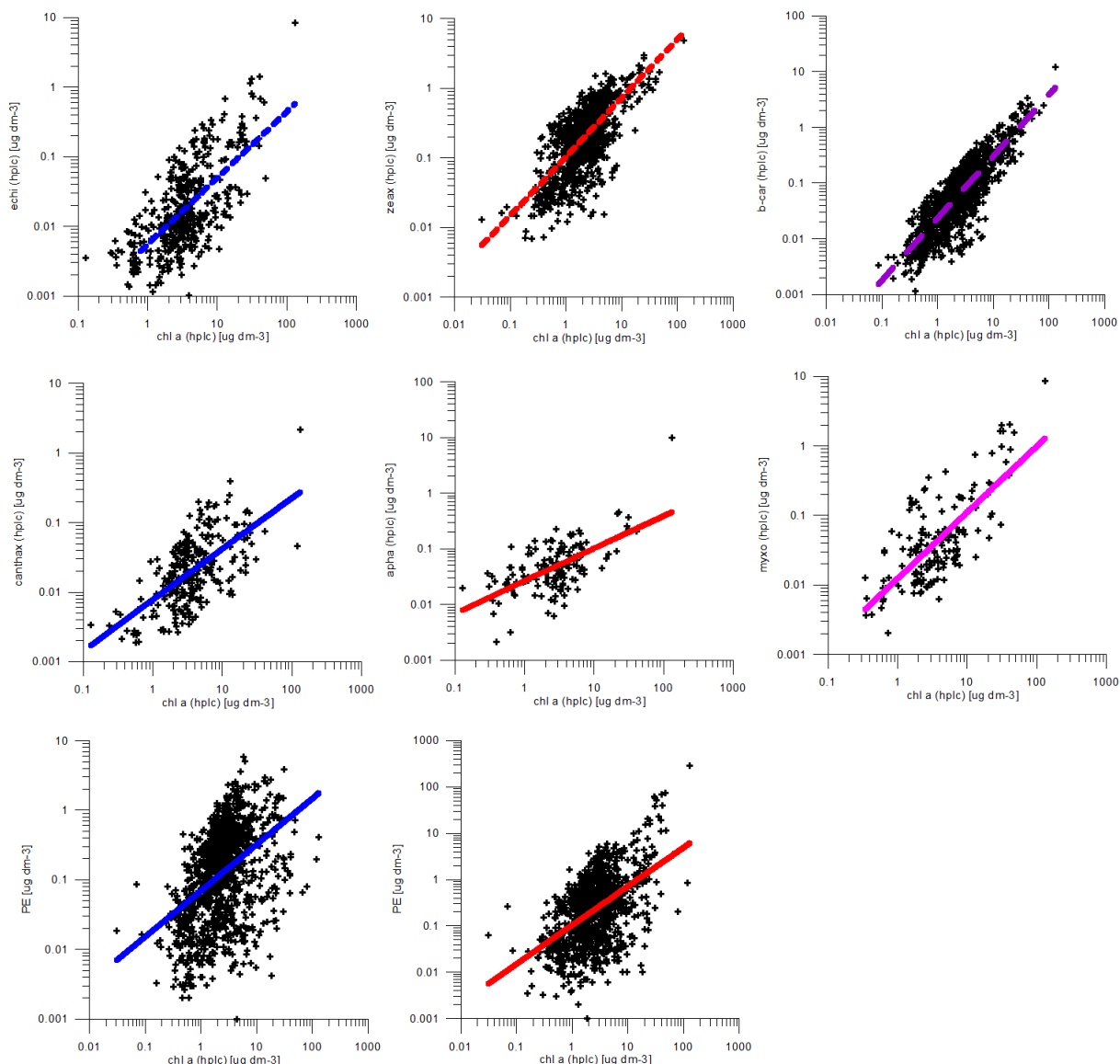
$$C_{\text{barwnik}} = C_{\text{chl a}}^A + B$$

pomiędzy stężeniami barwników (C_{barwnik}) określonych w próbkach fitoplanktonu przy zastosowaniu metody HPLC i spektrofotometrycznej w odniesieniu do stężenia chlorofilu a $C_{\text{chl a}}$, natomiast a w tabeli 3 zamieszczono otrzymane zależności. Należy podkreślić, że analizowane stężenia barwników zostały wyznaczone przeprowadzeniu odpowiednich dla danych związków procesów ekstrakcji z komórek naturalnie występującego fitoplanktonu.

Jak wspomniano we wstępie głównymi składnikami komórkowymi determinującymi obecność określonych grup taksonomicznych w składzie badanej fitocenozy są barwniki. Do grupy związków charakterystycznych dla komórek sinic należą karotenoidy tj. echinenon, zeaksantyna, b-karoten, kantaksantyna afanizofyl, myksoksantofil oraz fikobiliny tj.; fikocyjanina i fikoerytryna. Należy jednak pamiętać, że barwniki te mogą występować w komórkach glonów należących do innych klas systematycznych (Jeffrey i Vesk 1997, Roy i wsp 2011). Zeaksantyna uważana za karotenoidowy marker sinic, występuje również jako główny barwnik stanowiący 10% całkowitej zawartości chlorofili i karotenoidów w komórkach prochlorofitów (*Prochlorophyceae*) oraz glonów czerwonych (*Rhodophyceae*).

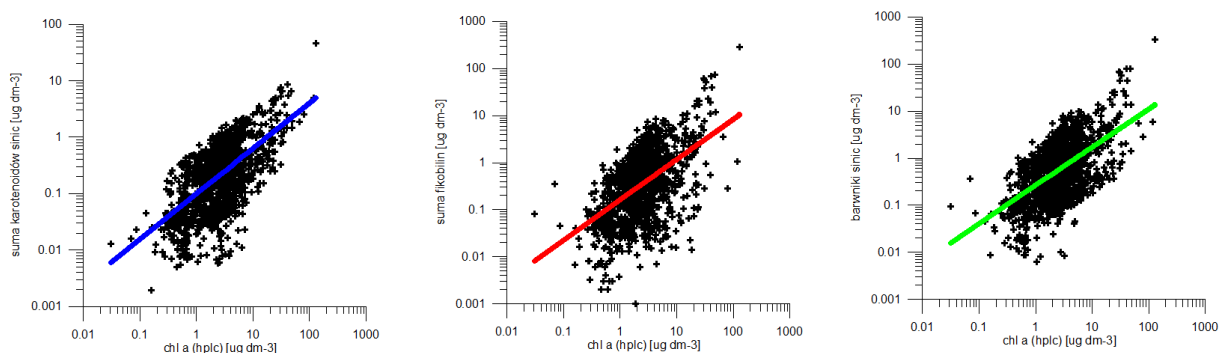
Badania składu barwnikowego sinic bałtyckich wykazały, że nie we wszystkich szczepach hodowlanych sinic zeaksantyna jest w barwnikiem dominującym (Wojtasiewicz i Stoń-Egiert 2016). Ponadto zeaksantyna jest barwnikiem biorącym udział w tzw. 'cyklu ksantofilowym' związanym z procesami niefotochemicznego tłumienia energii wzbudzenia cząstek. Cykl ten polega na odwracalnej sekwencji dwóch niezależnych reakcji enzymatycznych: epoksydacji i deepoksydacji, wywoływanej przez zmiany natężenia światła (Goss i in. 1998). W warunkach nadmiernego natężenia światła – wiolaksantyna jest przekształcana do formy zeaksantyny (poprzez ogniwo pośrednie – anteraksantynę) w reakcji de-epoksydacji (czyli usunięcia dwóch/jednej grup tlenowych z cząsteczki) i odwrotnie – w warunkach niskiego światła zachodzi proces epoksydacji zeaksantyny. De-epoksydacja jest reakcją szybką (sekundy/minuty do godziny), natomiast epoksydacja może trwać nawet dni przy działaniu dodatkowego czynnika stresowego. Cykl ten jest szeroko opisany w literaturze jako kluczowy w procesach dyssypacji nadmiaru energii wzbudzenia i regulacji przepływu energii w antenach fotosyntetycznych (Demmig-Adams 1990, Demmig-Adams i Adams 1996, Young i in. 1997, Larkum 2003). W związku z tym – obecność zeaksantyny w próbkach może wynikać z adaptacji komórek do warunków oświetleniowych. Echinenon, z kolei, został dodatkowo wyizolowany z komórek organizmów należących do zielenic prazynofitów i euglenin, B-karoten z komórek glonów należących do większości klas systematycznych. Podobnie fikobiliproteiny, oprócz cyjanobakterii są również notowane jako główne barwniki kryptofitów i glonów czerwonych (*Rhodophyceae*).

Najlepszą korelację uzyskano dla zależności β -karotenu ($r^2=0.74$) od stężenia chlorofilu a, stosunkowo najliczniej reprezentowanego w wynikowym zbiorze danych $N=1456$. Współczynnik determinacji zeaksantyny wyniósł $r^2=0.50$ (przy $N=1100$), natomiast myksoksantofilu 0.56 ($N=171$).



Rys.2. Zależności pomiędzy stężeniami zidentyfikowanych karotenoidów występujących w komórkach sinic: echinenonu (echi), zeaksantyny (zeax), b-karotenu (b-kar), kantaksantyny (canthax), afanizomenonu (apha), myksoksantofilu (myxo) i stężeniami fikobiliprotein: fikocyjaniny (PC) i fikoerytryny (PE) zidentyfikowanych metodą spektrofлуorymetryczną a stężeniem chlorofilu a wyznaczonym metodą HPLC.

Z kolei zależność pomiędzy sumaryczną zawartością karotenoidów charakterystycznych dla sinic a stężeniem chlorofilu a (rys.3) charakteryzowała się współczynnikiem determinacji $r^2=0.37$ ($N=1361$), pomiędzy sumaryczną zawartością fikobiliprotein a chlorofilem a $r^2=0.28$ ($N=1298$), natomiast zależność uwzględniająca karotenoidy i fikobiliproteiny charakterystyczne dla sinic w odniesieniu do stężenia chlorofilu a $r^2= 0.33$ ($N=1461$).

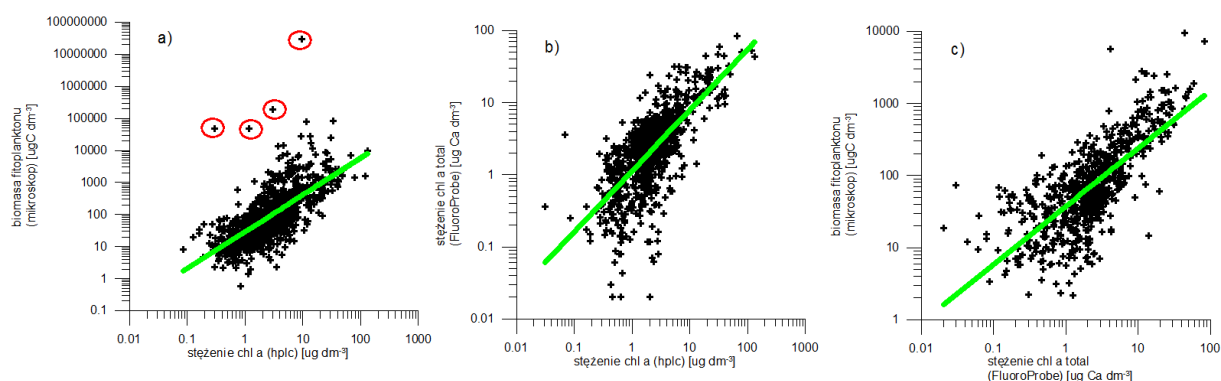


Rys.3. Zależności pomiędzy wartościami sumarycznych stężeń zidentyfikowanych karotenoidów metodą HPLC a stężeniem chlorofilu a, fikobiliprotein a stężeniem chlorofilu a oraz sumy barwników charakterystycznych dla sinic a stężeniem chlorofilu a

Tab.2. Zestawienie współczynników zależności w postaci $C_{barwnik} = C_{chl a}^A * B$ otrzymanych zależności, liczby danych N i współczynnika determinacji.

Lp	Zależność rys 11, 12			Liczba danych N	Współczynnik determinacji R^2
	Barwnik	Współczynnik A	Współczynnik B		
1	echinenon	0.9533	0.0055	431	0.45
2	zeaksantyna	0.8442	0.1029	1100	0.50
3	b-karoten	1.1098	0.02349	1456	0.74
4	kantaksantyna	0.7312	0.00779	270	0.40
5	afanizomenon	0.5846	0.0263	148	0.41
6	myksoksantofil	0.9513	0.0123	171	0.56
7	fikoerytryna	0.6631	0.0693	1278	0.19
8	fikocyjanina	0.8385	0.1025	1244	0.27
9	suma karotenoidów sinic	0.8151	0.0976	1361	0.37
10	suma fikobiliprotein	0.8577	0.1604	1298	0.28
11	suma barwników sinic (karotenoidy + fikobiliny)	0.8107	0.2631	1461	0.33

W kolejnym etapie analiz ustalono zależności pomiędzy sumaryczną biomasą zidentyfikowanego fitoplanktonu wyrażoną w $\mu\text{gC dm}^{-3}$ wyznaczoną na podstawie mikroskopowej identyfikacji gatunków w próbkach naturalnych a stężeniem chlorofilu a wyznaczonym metodą HPLC z ekstraktu mieszaniny barwników (rys 4a). Zaznaczone na czerwono 4 punkty to komplety danych mogące zwierać błędne dane pomiarowe lub niestandardowe sytuacje biooptyczne i powinny w dalszych pracach by poddane reanalizom i wyjaśnieniu.



Rys.4. Zależności pomiędzy a) sumaryczną biomasą zidentyfikowanych na podstawie oznaczeń mikroskopowych gatunków fitoplanktonu a stężeniem chlorofilu a wyznaczonym metodą HPLC, b) sumaryczną zawartością chlorofilu a wyznaczoną na podstawie fluorescencji grup glonów w pomiarach *in situ* wykonywanych przy wykorzystaniu fluorymetru FluoroProbe bbe Moldaenke a stężeniem chlorofilu a wyznaczonym metodą HPLC, c) sumaryczną biomasą zidentyfikowanych na podstawie oznaczeń mikroskopowych gatunków fitoplanktonu a sumaryczną zawartością chlorofilu a wyznaczoną na podstawie fluorescencji grup glonów w pomiarach *in situ* wykonywanych przy wykorzystaniu fluorymetru FluoroProbe bbe Moldaenke.

Jak wiadomo, chlorofil a jest powszechnie uważany za wskaźnik biomasy fitoplanktonu. W odniesieniu do analizowanego zbioru danych otrzymano zależność opartą na 1020 kompletach danych biomasy fitoplanktonu (wyznaczonej na drodze analiz mikroskopowych) i koncentracji chlorofilu a wyznaczonej metodą HPLC, a współczynnik determinacji tej zależności wyniósł $r^2=0.48$.

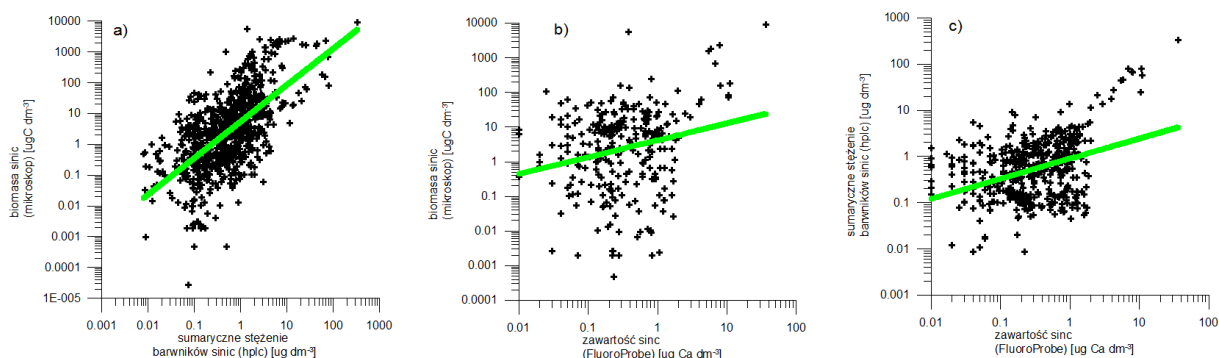
Następnie ustalono związek pomiędzy stężeniem chlorofilu a wyznaczonym na podstawie pomiarów HPLC i sumaryczną zawartością chlorofilu a wyznaczoną na podstawie fluorescencji grup glonów w pomiarach *in situ* wykonywanych przy wykorzystaniu fluorymetru FluoroProbe bbe Moldaenke (rys 12.b). W tym przypadku analizowany zbiór danych zawierał 987 kompletów takich pomiarów, a otrzymany współczynnik determinacji wyniósł 0.51.

Porównano również dwie alternatywne metody wyznaczania biomasy glonów: czasochłonną i wymagającą specjalistycznych kwalifikacji metodę mikroskopowej oceny składu taksonomicznego oraz metodę opartą na pomiarach widm fluorescencji grup fitoplanktonu mierzonych *in situ* przy wykorzystaniu fluorymetru FluoroProbe bbe Moldaenke (rys 4c). Otrzymana zależność charakteryzowała się $r^2= 0.53$ dla 688 kompletu danych.

Tab.3. Zestawienie otrzymanych zależności, liczby danych N i współczynnika determinacji przedstawionych na rys.4.

Lp	Zależność	Liczba danych N	Wsp. det. r^2
1	$Biomasa_{fitoplanktonu(mikroskop)} = C_{chl\ a\ (hplc)}^{1.150966648} * 29.05288895$	1020	0.48
2	$C_{chl\ a\ tot(FluoroProbe)} = C_{chl\ a\ (hplc)}^{0.8406380765} * 1.135410227$	987	0.51
3	$Biomasa_{fitoplanktonu(mikroskop)} = C_{chl\ a\ tot(FluoroProbe)}^{0.8007627788} * 37.58922075$	688	0.53

Przeanalizowano również możliwość wykorzystania wyników otrzymanych przy zastosowaniu różnych technik i metod pomiarowych pod kątem wyznaczenia biomasy sinic. Ustalono zależność pomiędzy sumaryczną biomasą sinic zidentyfikowanych na podstawie oznaczeń mikroskopowych a sumarycznym stężeniem karotenoidów i fikobiliprotein charakterystycznych dla sinic wyznaczonych metodą HPLC i spektrofлуorymetryczną (rys 5a). Zależność ta charakteryzowała się $r^2=0.4$ (dla $N=826$)



Rys.5. Zależności pomiędzy: a) sumaryczną biomasą sinic zidentyfikowanych na podstawie oznaczeń mikroskopowych a sumarycznym stężeniem barwników charakterystycznych dla sinic wyznaczonych metodą HPLC i spektrofлуorymetryczną; b) sumaryczną biomasą sinic zidentyfikowanych na podstawie oznaczeń mikroskopowych a zawartością sinic wyznaczoną na podstawie fluorescencji tej grupy glonów (fluorymetr FluoroProbe bbe); c) sumarycznym stężeniem barwników charakterystycznych dla sinic (HPLC i spektrofлуorymetr) a zawartością sinic wyznaczoną na podstawie fluorescencji tej grupy glonów (fluorymetr FluoroProbe bbe).

Z kolei zależność pomiędzy sumarycznym stężeniem karotenoidów i fikobiliprotein charakterystycznych dla sinic wyznaczonych metodą HPLC i spektrofлуorymetryczną a zawartością sinic wyznaczoną na podstawie fluorescencji tej grupy glonów w pomiarach *in situ* wykonywanych przy wykorzystaniu fluorymetru FluoroProbe bbe Moldaenke (rys 5c) posiadała współczynnik determinacji 0.13 (dla 457 kompletów danych).

Najniższą korelacją ($r^2=0.05$, $N=270$) charakteryzowała się zależność pomiędzy sumaryczną biomasą sinic zidentyfikowanych na podstawie oznaczeń mikroskopowych a zawartością sinic wyznaczoną na podstawie fluorescencji tej grupy glonów w pomiarach *in situ* (rys 5b).

Tab.4. Zestawienie otrzymanych zależności, liczby danych N i współczynnika determinacji przedstawionych na rys.5.

Lp	Zależność – rys 5	Liczba danych N	Wsp. det. r^2
1	$Biomasa_{sinic(mikroskop)} = C_{barwniki\ sinic\ (hplc)}^{1.182064922} * 5.505113756$	826	0.40
2	$Biomasa_{sinic(mikroskop)} = biomasa_{sinic\ (FluoroProbe)}^{0.4886483732} * 4.136885829$	270	0.05
3	$C_{barwiniki\ sinic(hplc)} = biomasa_{sinic\ (FluoroProbe)}^{0.433813358} * 0.895817151$	457	0.13

Podsumowanie

W ramach realizacji zadania zgromadzono bazę danych z lat 2010-2015 zawierającą empiryczne pomiary właściwości fizykochemicznych cyjanobakterii oraz związków barwnych zawartych w ich komórkach. Jakkolwiek skompletowany zbiór parametrów zawiera ogromną liczbę danych z różnych obszarów Morza Bałtyckiego, tak niestety okres letni jest reprezentowany najmniejszą liczbą danych ograniczonych do obszaru Zatoki Gdańskiej. Zgromadzone dane zostały wstępnie przeanalizowane pod kątem ich zróżnicowania wynikającego z sezonowo-regionalnej zmienności oraz pod kątem porównania różnych (w tym zdalnych) metod określania biomasy tych glonów wykorzystujących różnorakie właściwości biooptyczne komórek sinic i ich optycznie aktywnych składników.

Porównano metody oparte na klasycznej ocenie składu gatunkowego fitoplanktonu w próbkach i wyznaczania biomasy sinic poprzez oznaczenia mikroskopowe, z metodami wykorzystującymi charakterystyczne cechy i właściwości komórek, jak np. skład barwników określany poprzez oznaczanie chromatograficzne i spektrofluorymetryczne odpowiednio wyizolowanych związków oraz fluorescencja odpowiednich barwników. Generalnie, otrzymane wartości współczynników determinacji w odniesieniu do niektórych przybliżeń mogą wynikać ze specyfiki naturalnie występującej populacji glonów podlegającej różnym czynnikom środowiskowym, niejednokrotnie stresowym dla komórek, co w efekcie może modyfikować wartości wykorzystywanych parametrów biooptycznych.

Jest to pierwszy etap badań przewidzianych do kontynuowania w kolejnych latach.

Literatura

- Andersson A., Hajdu S., Heackey P., Kuparinen J., Wikner J., 1996, *Succession and growth limitation of phytoplankton in the Gulf of Bothnian (Baltic Sea)*, Mar. Biol., 126, 791-801
- Edler L. (ed.), 1979, *Recommendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea, phytoplankton and chlorophyll*, Balt. Mar. Biol. Publ. No 5, 1-38
- Grossman A.R., Schaefer M.R., Chiang G.G., Collier J.L., 1993, *The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions*, Microbiol Rev 57:725-749
- Hällfors G., 2004, *Checklist of Baltic Sea Phytoplankton Species (including some heterotrophic protistan groups)*, Balt. Sea Environ. Proc. No 95: 208 pp
- HELCOM, 1997, *Manual for Marine Monitoring in the COMBINE programme of HELCOM, Part C, Programme for monitoring of eutrophication and its effects*, Annex C-6, *Phytoplankton species composition, abundance and biomass*, C6-1 – C6-8
- Houliet E., Simis S., Nenonen S., Ylöstalo P., Seppälä J., 2017, *Basin-scale spatio-temporal variability and control of phytoplankton photosynthesis in the Baltic Sea: The first multiwavelength fast repetition rate fluorescence study operated on a ship-of-opportunity*, J of Marine Sys., 169 (2017) 40–51
- Jeffrey S.W., Vesik M., 1997, *Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures*, [w:] *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*, Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (red), UNESCO Publishing, Paris, 37-84
- Kahru M., Horstmann U., Rud O., 1994, *Satellite detection of increased cyanobacteria blooms in the Baltic Sea: natural fluctuation or ecosystem change*, Ambio 23:469–472
- Kobos J., Mazur-Marzec H., Dittmer B., Witek B., Pliński M., 2005, *Toxic cyanobacterial blooms in the Kociewskie Lakes (Northern Poland)*, Oceanol. Stud. 34,77–84
- Kobos J., Błaszczak A., Hohlfeld N., Toruńska-Sitarz A., Krakowiak A., Hebel A., Sutryk K., Grabowska M., Toporowska M., Kokociński M., Messyasz B., Rybak A., Napiórkowska-Krzebietke A., Nawrocka L., Pelechata A., Budzyńska A., Zagajewski P., Mazur-Marzec H., 2013, *Cyanobacteria and cyanotoxins in Polish freshwater Dobies*, Oceanol. Hydrobiol. Stud. 42,358–378
- Kromkamp, J., Forster, R., 2003, *The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology*, Eur. J. Phycol. 38, 103–112
- Latelier R.M., Bidigare R.R., Hebel D.V., Ondrusek M., Winn C.D., Karl D.M., 1993, *Temporal variability of phytoplankton community structure based on pigment analysis*, Limnol. Oceanogr., 38 (7), 1420-1437

- Mackey M.D., Mackey D.J., Higgins H.W., Wright S.W., 1996, *CHEMTAX—a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton*, Mar. Ecol. Prog. Ser., 144, 265–283
- Mazur-Marzec H., Sutryk K., Kobos J., Hebel A., Hohlfeld N., Błaszczyk A., Toruńska A., Kaczkowska M.J., Łysiak-Pastuszak E., Kraśniewski W., Jesser I., 2013, *Occurrence of cyanobacteria and cyanotoxin in the Southern Baltic Proper. Filamentous cyanobacteria versus singlecelled picocyanobacteria*, Hydrobiologia, 701, 235–252
- Mazur-Marzec H., Błaszczyk A., Felczykowska A., Hohlfeld N., Kobos J., Toruńska-Sitarz A., Devi P., Montalvao S., D'Souza L., Tammela P., Mikosik A., Bloch S., Nejman-Faleńczyk B., Węgrzyn G., 2015, *Baltic cyanobacteria—a source of biologically active compounds*, Eur. J. Phycol., 50, 343–360
- MacColl R., 1998, *Cyanobacterial Phycobilisomes*, J. Struct. Biol., 124, 311–334
- Menden-Deuer S., Lessard E.J., 2000, *Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton*, Limnol. Oceanogr., 45(3), 569–579
- Olenina I., Hajdu S., Edler L., Andersson A., Wasmund N., Busch S., Göbel J., Gromisz S., Huseby S., Huttunen M., Jaanus A., Kokkonen P., Ledaine I., Niemkiewicz E., 2006, *Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea*, HELCOM Balt. Sea Environ. Proc. No. 106, 144 pp.
- Ostrowska M., Stoń-Egiert J., Woźniak B., 2015, *Modified methods for defining the chlorophyll concentration in the sea using submersible fluorimeters – Theoretical and quantitative analysis*, Cont. Shelf Res., 109, 46–54, <http://dx.doi.org/10.1016/j.csr.2015.09.009>
- Parsons T.R., Maita Y., Lalli C.M., 1984, *A manual of chemical and biological methods for seawater analysis*, Pergamon Press, Oxford, 173
- Peeken I., 1997, *Photosynthetic pigments fingerprints as indicator of phytoplankton biomass and development in different water masses of the Southern Ocean during austral spring*, Deep-Sea Res. II, 44 (1-2), 261–282
- Pliński M., Musiał A., Ostrowski B., 1998, *Blue-green algae blooms in the Gulf of Gdańsk and surrounding area*, Oceanol. Stud., 27, 179–183
- Pliński M., Mazur-Marzec H., Józwiak T., Kobos J., 2007, *The potential causes of cyanobacterial blooms in Baltic Sea estuaries*, Oceanol. Stud., 36, 125–137
- Raateoja M., Seppälä J., Ylöstalo P., 2004, *Fast repetition rate fluorometry is not applicable to studies of filamentous cyanobacteria from the Baltic Sea*, Limnol. Oceanogr. Methods, 49, 1006–1012
- Roy S., Llewellyn C.A., Egeland E.S., Skarstad E., Johnsen G., 2011, *Phytoplankton Pigments, Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*, Cambridge Environmental Chemistry Series, 890pp
- Seppälä J., 2009, *Fluorescence properties of Baltic Sea phytoplankton. Monographs of the Boreal Environment Research*, Edita Prima Ltd, Helsinki Finland. pp 83
- Simis S.G.H., Huot Y., Babin M., Seppälä J., Metsamaa L., 2012, *Optimization of variable fluorescence measurements of phytoplankton communities with cyanobacteria*, Photosynth. Res. 112, 13–30.
- Sobiechowska M., Bridoux M., Ferreira Ferreira A.H., Perez-Fuentetaja A., Alben K., 2010, *Biomarkers of algal populations in phytoplankton, filamentous alga, and sediments from the eastern basin of Lake Erie 2003 – 2005*, J. of Great Lakes Res., 36, 298 – 311
- Sobiechowska-Sasim M., Stoń-Egiert J., Kosakowska A., 2014, *Quantitative analysis of extracted phycobilin pigments in cyanobacteria—an assessment of spectrophotometric and spectrofluorometric methods*, J. Appl. Phycol., 26, 2065–2074
- Stal L.J., Albertano P., Bergman B., von Bröckel K., Gallon R.J., Haes P.K., Sivonen K., Walsby A.E., 2003, *BASIC: Baltic Sea cyanobacteria. An investigation of the structure and dynamics of water blooms of cyanobacteria in the Baltic Sea—responses to a changing environment*, Cont. Shelf Res., 23, 1695–1714
- Steward D.E., Farmer F.H., 1984, *Extraction, identification, and quantitation of phycobiliprotein pigments in phototrophic plankton*, Limnol. Oceanogr., 29, 2065–2074
- Stoń J., Kosakowska A., 2002, *Phytoplankton pigments designation—an application of RP-HPLC in qualitative and quantitative analysis*, J. Appl. Phycol., 14, 205–210
- Stoń-Egiert J., Kosakowska A., 2005, *RP-HPLC determination of phytoplankton pigments—comparison of calibration results for two columns*, Mar. Biol., 147, 251–260
- Stoń-Egiert J., Łotocka M., Ostrowska M., Kosakowska A., 2010, *The influence of biotic factors on phytoplankton pigment composition and resources in Baltic ecosystems: new analytical results*, Oceanologia, 52(1), 101–125
- Strickland J.D.H., Parsons T.R., 1972, *A practical handbook of seawater analysis*, 2nd ed. Bull. Fish. Res. Bd. Can. No. 167, 310
- Willen T., 1962, *Studies on the phytoplankton of some lakes connected with or recently isolated from the Baltic*, Oikos 13, 169–199