

# Různé metody hodnocení kvantit fytoplanktonu, fixace vzorků podle taxonomické skupiny a účelu



Lenka Šejnohová & kol.

Determinační schůzka CCT, 8. 9. 2006



# Metody hodnocení kvantity fytoplanktonu

- 1) Koncentrace chl-a ( $\mu\text{g/l}$ ) ČSN ISO 10260
- 2) Počet buněk/ml ČSN 75 7712
- 3) Objemová biomasa

# 1) Koncentrace chl-a

- Terén
  - sonda Fluoro-Probe – celk. chl-a + rozdělení na 4sk. (Cyanophyta, Chlorophyta, Chromophyta, Cryptophyta)  
<http://www.sinice.cz/cz/popularizacni/fluoroprobe.htm>
- Laboratoř
  - extrakce ethanolem – chl-a (ČSN ISO 10260)
  - mikrodestičky Genios

výhody: malá časová náročnost, v případě sondy měření in situ+profil vodního sloupce

: zachycení reálných poměrů biomas jednotlivých skupin a druhů (x b/ml)

nevýhody: nevíme nic o druhovém složení (znát aspoň dominantu jednotlivých skupin? – příp. toxicita)

: sonda – finanční náročnost

: práce s živými vzorky hned

## 2) Počet buněk/ml

- průtoková cytometrie

- počet buněk jednotlivých tax. skupin

výhoda: časová nenáročnost, přesnost, možnost zpracovat velké množství vzorků

nevýhoda: finanční nedostupnost, živé vzorky

- počítací komůrky

- Bürker

- Cyrus I., Cyrus II.

# 2a) Počet b./ml – výhody/nevýhody

výhoda: dostupné, finančně nenáročné, možnost fixáží

nevýhoda: časová náročnost, hlavní problém taxonomicky různorodé skupiny - různé typy a velikosti stélek

bičíkatci – útkají, praskají

kolonie – sinice bez desintegrace velká variabilita odhadu dle osoby, po desintegraci komplikace určit druh

vlákna – sinice svazečky, různé velikosti vláken

chyba ve velikostech – 5 $\mu$ m sinice vs. „zelená koule“ 50  $\mu$ m brána stejným počtem 1

vnitřní struktury v buňkách – PROBLÉM při počítání-jiná rovina na sklíčku, koncentrování

Přesný plán metodiky promyslet:

- (fixace), zkoncentrování, desintegrace, počítání, výpočet podle vzorce

## 2b) Počet b./ml – fixace 1

### Lugolův roztok

10 g jodidu draselného se rozpustí ve 20 ml vody, přidá se 5 g krystalického jodu a smíchá se s 50 ml 10% kyseliny octové. Po promíchání se nechá 1 den ustát.

### výhoda:

- fixace rozsivek – fyto-bentos, šupinaté chrysomonády pro TEM
- fixace VK – při koncentraci lze využít centrifugaci (TNV 75 7717)

### nevýhoda:

- sinice (fotografování změna barvy, zakrytí fotosyntetických barviv – nemožnost použít fluorescenci!!-problém pikocyanobakterie)

Dlouhodobá fixace

## 2b) Počet b./ml – fixace 2

### Formaldehyd

výsledná koncentrace ve vzorku 1,5-2%

výhoda:

- zachování fluorescence, fotografování (ale je krátkodobé!)

nevýhoda:

- VK – při koncentraci se musí využít vakuová filtrace
- vyblednutí vzorku během krátkého časového intervalu-fluorescence nefunkční
- rozsivky a šupinaté chrysomonády – porušení struktur SiO<sub>2</sub>
- citlivé buňky praskají (skrytěnky, vacuolarie atd.)

Krátkodobá fixace

## 2b) Počet b./ml – fixace shrnutí

- 1) Je-li možnost – zpracovat vzorek živý (lednice uchování cca max. týden-VK ale jen den!, uvést do protokolu)
- 2) Fixace – zvážit účel analýzy a hustotu vzorku  
– jaké tax. skupiny jsou ve vzorku mám možnost použít fluorescenci?  
(formaldehyd – sinice VK;  
Lugol – rozs., chrysomonády, citlivý bičíkatci)
- 3) Je-li možnost: vzorek fixovat dvojmo –  
obě metody fixace (ale problém místa, peněz za fixáže/vzorkovnice, čas zpracování ...)



## 2c) Počet b./ml

### - zkoncentrování vzorku

KDY ?

- počet b. < 50tis.b/ml

PROČ ?

- bez zkoncentrování nezaznameníme některé zástupce, které se pak mohou rozvinout v dominantu..

CO VĚDĚT PŘEDEM ?

- Přibližné SLOŽENÍ, abychom neeliminovali některé skupiny zvolenou metodikou

JAK ?

- centrifugace
- vakuová filtrace

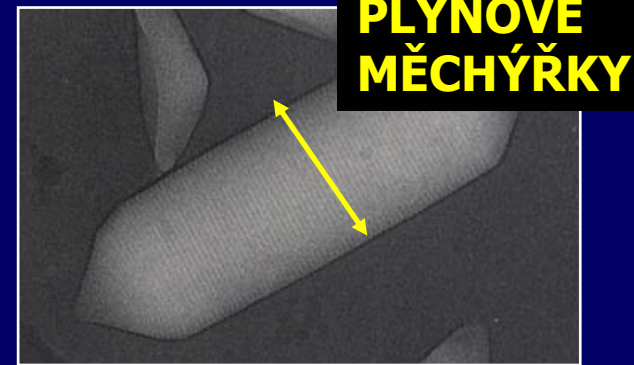
# Centrifugace



# Vakuová filtrace



## 2d) Počet b./ml – Desintegrace kolonií VK + destrukce aerotopů



Záleží na:

Šířce plynových měchýřků (gas veziklů=GV), která je rodově dána !!!

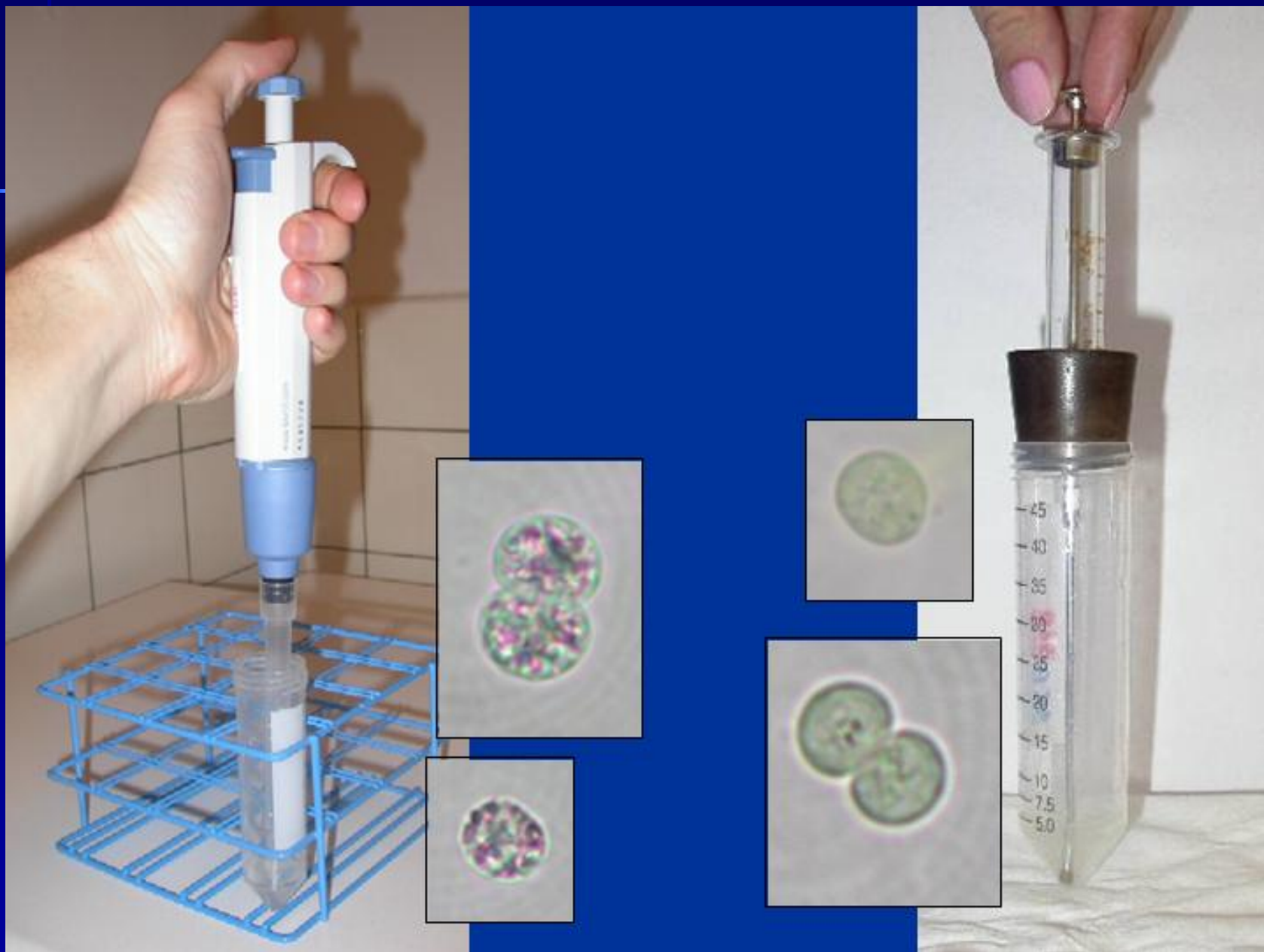
ŠIROKÉ GV = KŘEHKÉ                      praskají při menším tlaku

Široké GV – *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*  
(70nm a více) – praskají již při nízkém tlaku

Užší GV – *Microcystis* (65nm) – aerotopy odolávají i  
vyšším tlakům

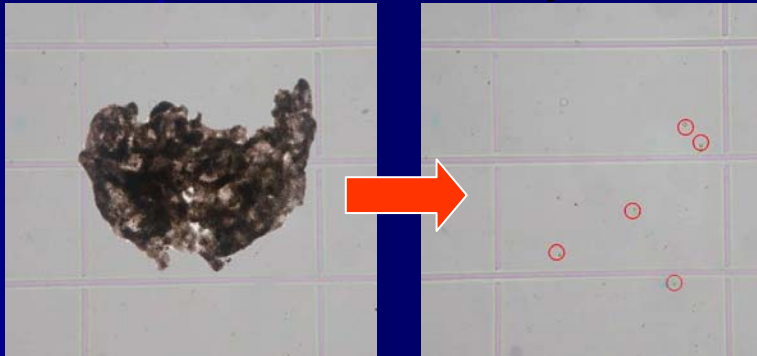
Možnosti                      : stříkačka  
   : automatická pipeta  
   : ultrazvuk

# Automatická pipeta vs. Injekční stříkačka

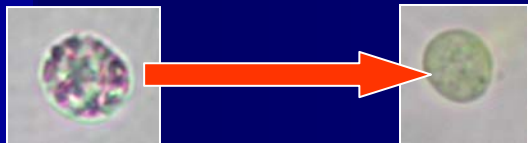


# Injekční stříkačka s KOH

- rychlá, levná  
desintegrace  
kolonií *Microcystis*



se současnou  
destrukcí aerotopů



## 2e) Počet b./ml – Vlastní počítání

Bičíkatci – např. skrytěnky v živém vzorku: projetí celého Burkra před zahajením počítání ostatních skupin



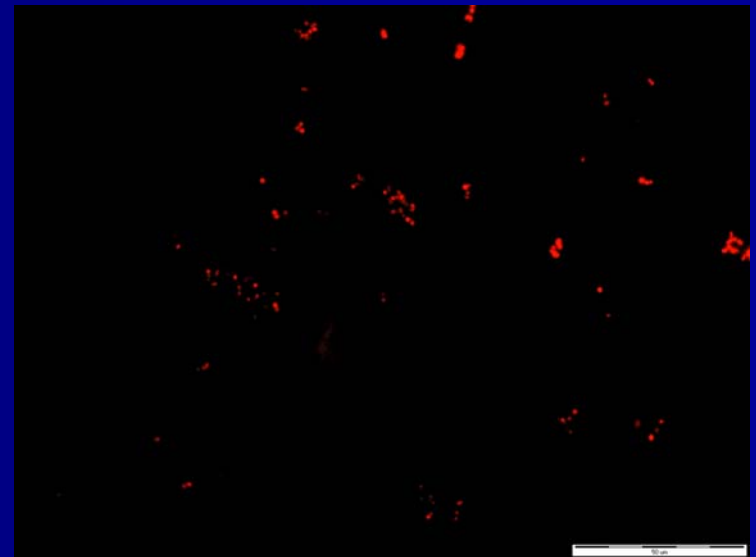
Vlákna a svazečky vláken:

- dle ČSN délka vláken/5 = počet buněk

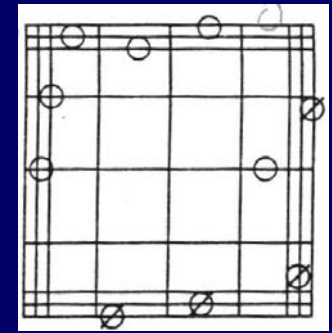
Kolonie - desintegrace

Doporučení fluroscence

- výskyt pikocyanobakterií – norma ČSN: „Stanovení pikoplanktonu je orientační...“
- po desintegraci *Microcystis*



## 2f) Počet b./ml – Vzorec Burker b./ml



Počítáme buňky uvnitř čtverce a ty, které leží nebo se dotýkají 2 zvolených stran (obvykle se volí horní a pravá str.)

### VZOREC

počet buněk v 50ti čtvercích \* 5 000 = b/ml

(pravidlo - spočítat min. 400b. jinak počítat dál a pak např.

100čtverců \* 2 500 = b/ml

- nezapomenout na vydělení při metodách zkoncentrování)

- doporučení: vytvoření vzorce v Excelu  
– pak jen vkládání počtu buněk jednotlivých druhů
- nutné mít tlusté krycí sklo (užší sklíčko podhodnocení cca na 80%)

# 3) Objemová biomasa (biovolume)

- Manuální výpočet (počet b. x objem)
- Program - Fyto-N (JU, České Budějovice)

výhody: zachycení reálných poměrů biomas jednotlivých skupin a druhů (x b/ml)

nevýhody: časová náročnost – program Fyto-N

**OK**



# ÚČEL – METODIKA - ČAS

Jednorázová univerzální metoda použitelná v každý čas na každém místě prakticky neexistuje

CO TEDY?

Pravidla

- 1) Použít během 1 projektu příp. u projektů, budeme co budemem srovnávat výsledky, 1 metodiku
- 2) V současnosti norma – OK chlorofyl-a počet b./ml (biovolume ale přesnější – sinice/řasy vel.b...)

Vždy zvážit základní otázku:

Účel projektu - je nutná detailní kvantitativní analýza?

fytoplankton s VK – nutné 2x počítání - před a po desintegraci..

# Praxe na BU AVČR Brno

## Hodnocení kvantity fytoplanktonu:

### Monitoring:

Sonda Fluoro-Probe kombinace  
s počtem b/ml

### Vědecky zaměřené projekty:

Fluoro-Probe s biovolume (objemová biomasa)

### **Počítání buněk/ml**

- Burker, většinou využití vakuové filtrace (VK) s celulozním filtrem 0.2um, desintegrace ultrazvukem, biovolume využití programu FYTO-n

# Modelový příklad

Jarní vzorek fytoplaktonu - eutrofní nádrž pod 50tis.b/ml  
- předpokládáme výskyt sinic VK

## ■ A)

- 1) vakuová filtrace (např. 50ml-100ml na 5ml-10ml do zkumavky)
- 2) 0,5ml prohlédnout druhové složení – výskyt *Microcystis* - %odhad morfortypů
- 3) 0,5ml Burker spočítat ostatní druhy než *Microcystis* (vlákna – změření délek)
- 4) 2ml desintegrace vzorku (ultrazvuk, stříkačka)
- 4) spočítání desintegrovaných buněk *Microcystis* (urychlí se fluorescencí, neplavou mají popraskané GV)
- 5) dosazení do vzorce (nezapomenout na vydělení při zkoncentrování!)

## ■ B)

- 1) fixace lugologým roztokem (pozor znemožníme si počítání buněk *Microcystis* pomocí fluorescence po desintegraci; při prefixování nelze použít ultrazvuk na desintegraci kolonií)
- 2) centrifugace 10ml 2x na 1ml
- 3) dále se pokračuje bodem 3) jako v předchozím případě

**Vždy nutné!!! – použitou metodiku zanést do protokolu!!!!**

# Praktické úkoly

- 1) kolonie *Microcystis* – variabilita odhadu počtu buněk u jednotlivců
- 2) Ukázka vzorku fytoplanktonu fix. Lugolem a formaldehydem - !!
- 3) Pikocyanobakterie - fluorescence

# Na závěr – související normy:

- TNV 75 7717 – Jakost vod – Stanovení planktonních sinic
- ČSN ISO 10260 (75 7575) – Jakost vod – Měření biochemických ukazatelů – Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a
- ČSN ISO 5667-4 (75 7051) – Jakost vod: Odběr vzorků – část 4: Pokyny pro odběr vzorků z vodních nádrží
- ČSN EN ISO 5667-3 (75 7051) – Jakost vod: Odběr vzorků – část 3: Pokyny pro konzervaci vzorků a manipulaci s nimi
- ČSN EN ISO 25667-2 (75 7051) – Jakost vod: Odběr vzorků – část 2: Pokyny pro způsoby odběrů vzorků

# Výskyt kolonií – buňky se navzájem překrývají

Různé metody počítání *Microcystis* = různé výsledky

DESINTEGRACE	ZPŮSOB	VÝSLEDEK	CHYBA
NE		VELICE PODHODNOCEN, ZÁVISÍ NA OSOĚ	- velké kol. se nedostanou do počítací komůrky, - nižší odhad b. v kolonii
MECHANICKY	automatická pipeta	Mírně podhodnocen	neúplná desintegrace, chyby jako bez desintegr.
	injekční stříkačka	Mírně podhodnocen	neúplná desintegrace,
	ultrazvukový prst	REÁLNÝ	(nevhodné frekvence)
CHEMICKY KOH	KOH za tepla	Mírně podhodnocen	neúplná desintegrace
KOMBINACE MECHANICKY- CHEMICKY	automatická pipeta, KOH	Mírně podhodnocen	neúplná desintegrace
	injekční stříkačka s KOH	REÁLNÝ	(vysoká koncentrace KOH)