

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 μ m sinice vs. „zelená koule“ 50 μ 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 SiO₂
- 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

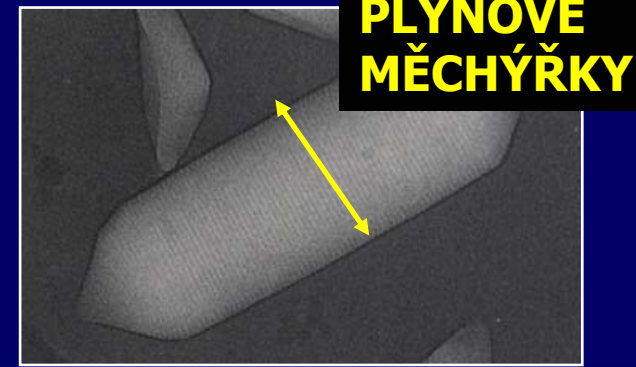
Centrifugace



Vakuová filtrace



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



Záleží na:

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

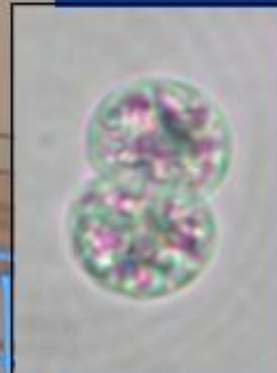
ŠIROKÉ GV = KŘEHKÉ praskají při menším tlaku

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

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

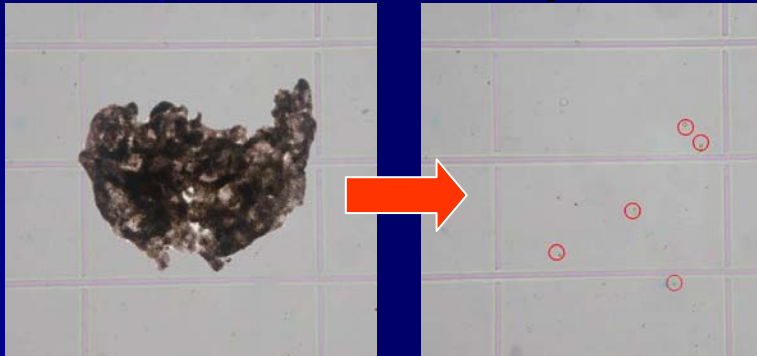
Možnosti : stříkačka
 : automatická pipeta
 : ultrazvuk

Automatická pipeta vs. Injekční stříkačka

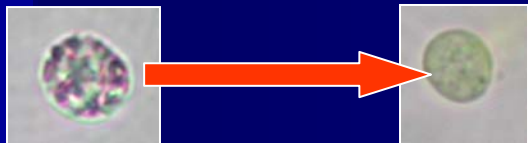


Injekční stříkačka s KOH

- 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

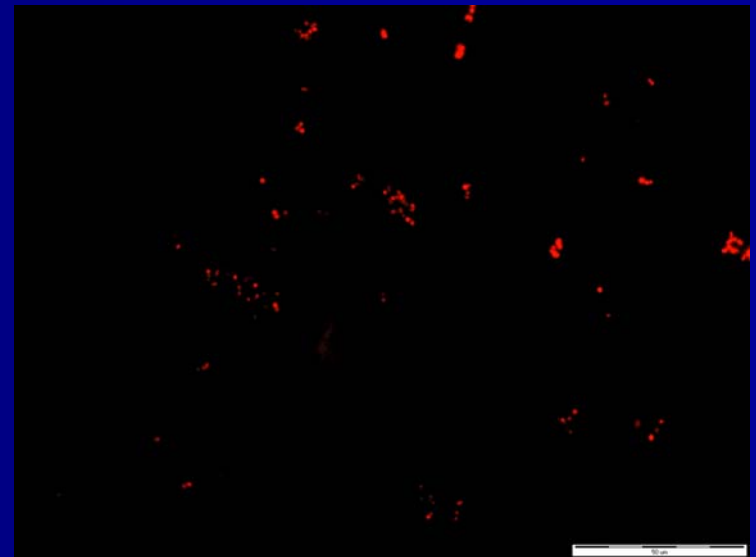
Vlákná a svazečky vláken:

- dle ČSN délka vláken/5 = počet buněk

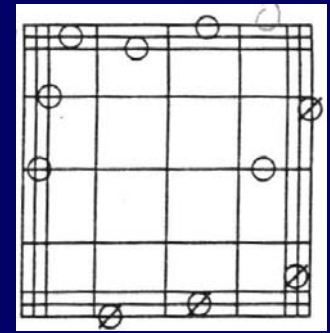
Kolonie - desintegrace

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) |