Kvantitativne i molekularne metode za analizu fitoplanktona

Devčić, Barbara

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:266562

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKLUTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Kvantitativne i molekularne metode za analizu fitoplanktona
Quantitative and molecular methods for phytoplankton analysis

SEMINARSKI RAD

Barbara Devčić
Preddiplomski studij Znanosti o okolišu
(Undergraduate study of Environmental sciences)
Mentor: Prof.dr.sc. Anđelka Plenković- Moraj

Zagreb, 2012.

SADRŽAJ

1.) FITOPLANKTON.....4
1.2.) Cvijetanje algi.....6
2.) MIKROSKOPSKE METODE.....6
2.1.) Mikroskopske metode za enumeraciju i identifikaciju fitoplanktona.....7
3.) PRIRODNA FLUORESCENCIJA.....7
4.) BOJANJE STANICA.....7
5.) ANALIZA SLIKE.....8
6.) PROTOČNA CITOMETRIJA.....8
7.) MOLEKUALRNE TEHNIKE.....8
7.1.) Laboratoriji u kojima se koriste molekularne tehnike.....9
7.2.) Identifikacija i kvantifikacija fitoplanktonskih vrsta.....9
7.3.) Vredovanje molekularnih metoda.....9
8.) METODE KVANTITATIVNE ANALIZE.....10
8.1.)Utermöhl metoda za kvantitativnu analizu fitoplanktona.....10
8.1.1.)Priprema uzorka.....12
8.1.2.) Formula za izračunavanje broja stanica po litri.....14
8.1.3.) Razmatranje metode.....14
8.2.) Metoda sedimentacijske boce za kvantitativnu analizu fitoplanktona.....14
8.2.1) Formula za izračunavanje rezultata.....15
8.2.2.) Razmatranje metode.....16
8.3.) Metoda prebrojavajućih komorica za kvantitativnu analizu fitoplanktona...16
8.3.1.) Sedgwick - Rafter metoda.....17
8.3.1.1.) Pohranjivanje uzoraka.....17
8.3.1.2.) Formula za izračunavanje rezultata.....18
8.3.2.) Palmer – Maloney metoda.....18
8.3.3.) Hemocitometar metoda.....19

8.3.3.1.) Izvođenje metode.....20
8.3.3.2.)Formula za izračunavanje rezultata.....21
8.3.3.3.) Razmatranje metode.....21
8.4.) Filtriranje – bojanje Calcofluorom- kvantitativna epifluorescencijska mikroskopija za analizu fitoplanktona.....21
8.4.1.) Formula za izračunavanje rezultata.....22
8.4.2.) Razmatranje metode.....23
8.5.) Filtriranje – polutransparentni filteri za kvantitativnu analizu 23
8.5.1.) Formula za izračunavanje rezultata.....23
8.5.2.) Razmatranje metode.....23
8.6.) Filter-transfer-freeze metoda za kvantitativnu analizu fitoplanktona (FlowCAM)24
8.7.) Slikovna dijagnostika pomoću protočne citometrije za kvantitativnu analizu fitoplanktona.....25
8.7.1.) Formula za izračunavanje rezultata.....27
8.8.) Detektiranje intaktnih stanica algi pomoću hibridizacije.....29
8.8.1.) Fluorescencijska Hibridizacija In Situ ili FISH.....29
8.8.2.) Formula za izračunavanje rezultata.....30
8.9.) Elektrokemijska detekcija toksičnih algi pomoću biosenzora.....30
8.9.1.) Osnovni principi elektrokemijske detekcije algi pomoću biosenzora.....32
8.9.2.)Formule za izračunavanje rezultata.....32
9.)Molekularne metode analize fitoplanktona.....32
9.1.) Hibridizacija i detekcija fitoplanktona pomoću mikroniza i fluorescencije....33
9.1.1.) Osnovni principi hibridizacije.....33
9.1.2.) Formule za izračunavanje rezultata.....33
10.) ZAKLJUČAK.....34
11.) LITERATURA.....34
12.) SAŽETAK.....35
13.) SUMMARY.....35

1.) Fitoplankton

Planktonu pripadaju organizmi manji od 2 cm, lebde u vodi ili raspolažu s ograničenim mogućnostima kretanja te ovise o gibanjima vodenih masa.

Fitoplankton obuhvaća jednostanične autotrofne i miksotrofne protiste te jednostanične cijanobakterije (modrozelene alge). Fitoplanktonski organizmi su najbrojniji u osvijetljenoj, eufotičkoj zoni, gdje uz pomoć sunčeve svjetlosti provode proces fotosinteze, odnosno izgradnje nove organske tvari. Riječ je o primarnim proizvođačima organske tvari, čija ukupna godišnja neto proizvodnja iznosi između 15×10^9 i 18×10^9 tona ugljika. Oni su temelj života u moru.

Fitoplankton je kritična komponenta marinskih ekosistema na način, da je on odgovoran za približno polovicu svjetske neto primarne produkcije. Do danas je opisano oko 4000 marinskih vrsta fitoplanktona. Oni imaju potencijal da nam koriste kao indikatori hidro-klimatskih promjena te govore i o drugim posljedicama u okolišu; kao što je acidifikacija oceana koja se događa uslijed sagorijevanja fosilnih goriva i eutrofikacije.

Unutar određenih uvjeta u okolišu, fitoplankton može doživjeti nagli rast i zadržati veliku gustoću stanica. Ta pojava je poznata kao cvjetanje algi.

1.2.) Cvjetanje algi

Cvjetanje algi, označava nagli povećani razvoj i nakupljanje algi u vodi. Masovni razvoj algi oboji površinu vode zeleno, a u posebnim slučajevima plavo ili crveno, voda postaje mutna i puna "oblaka". Razlog je najčešće pretjerana količina hranjivih tvari, najčešće u obliku fosfata, u vodi.

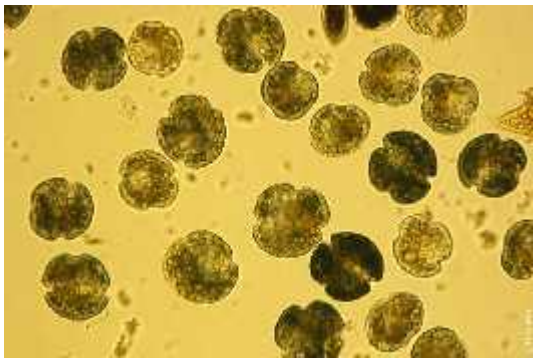
Cvjetanje fitoplanktona, koji svojim masovnim razmnožavanjem povećano troše kisik, može biti uzrok masovnom trovanju riba, ptica pa čak i ljudi, danas privlače sve veću pažnju znanstvenika širom svijeta.

Uzročnici toksičnog cvjetanja najvećim su dijelom organizmi iz skupine dinoflagelata, manjim dijelom iz skupine dijatomeja, te cijanobakterije (modrozelene alge).

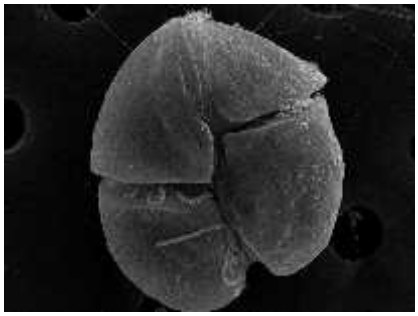
Postoje različiti tipovi cvjetanja algi. Neki od njih su prirodni događaji, kao proljetno cvjetanje dijatomeja, kada se dogodi erupcija razvoja dijatomeja kao odgovor na povećanu

dostupnost svjetla i kao posljedica stabilizacije ekoloških parametara u stupcu vode. To se događa kao dio godišnjeg ciklusa.

Neka cvjetanja mogu imati negativan učinak na marinske sisteme i industriju akvakulture, te su i zbog toga nazvani štetnim algalnim cvjetanjima (Harmful Algal Blooms-HAB). Neke od takvih vrsta, kao dinoflagelati, *Karenia mikimoto* (slika 1. i 2.), koja tvori algalne cvatove visoke gustoće s više od milijun stanica po litri te stvara velike probleme.



Slika 1. *Karenia mikimoto* (izvor:
http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/portfolios/portfolio20020802/zooms/photoz01.jpg)



Slika 2. *Karenia mikimoti* slikana scanning elektronskim mikroskopom (izvor:
http://www.flickr.com/photos/myfwc/5842745854/)

Mnoge zemlje svijeta uvele su program monitoringa fitoplanktona kako bi zaštitile svoju industriju akvakulture. Politika usmjerena na zaštitu morskih staništa je uvela poboljšanja u svome radu, upravo kroz porast važnosti brojnih direktiva, koje su napravljene upravo radi praćenja kvalitete vode.

Jedna od tih direktiva, The Water Framework Directive (WFD), koristi fitoplankton kao jednu od komponenti ekosistema nužnih za praćenje kvalitete statusa morskih i slatkovodnih objekata. Fitoplankton je također, tražena komponenta neophodna u monitoringu jedne od strategija Europske Unije, koja također ima svrhu zaštiti i očuvati marinske okoliše.

Inetrnacional Maritime Organization (IMO) je usvojila Konvenciju o balastnim vodama, u 2004. godini, iako još nije ratificirana; ta konvencija zapravo regulira koliko kojih vrsta organizama smije biti u balastnoj vodi.

Upravo radi toga, postoji velika potreba da se prati abundancija, sastav i raznolikost zajednice fitoplanktona.

Postoje, upravo radi gore navedenih razloga i primjera, priručnici kojima je cilj, kroz objašnjavanje korištenja različitih metoda, omogućiti znanstvenicima upravo da identificiraju i prebroje fitoplankton, radi praćenja stanja kvalitete voda.

Ja ću u ovom radu, pokušati ukratko objasniti neke od mikroskopskih i molekularnih metoda za kvantitativnu analizu fitoplanktona.

2.) Mikroskopske metode

Metode temeljene na proučavanju pomoću mikroskopa uključuju identifikaciju fitoplanktonskih vrsta, ali zasnovanu na morfologiji i drugim vizualnim kriterijima. Oni koji se bave determinacijom vrsta bi trebali imati vrlo veliko znanje i iskustvo prilikom identifikacije vrsta prisutnih u vodama i trebali bi proći svojevrsnu obuku, koja bi dakako, bila inkorporirana u njihov radni program. Bitno je za znanstvenike da su upućeni u literaturu, pogotovo i onu stariju. Vrlo je bitno stalno biti u korak s literaturom, jer su sistematika i nomenklatura fitoplanktona, neprestano u reviziji.

2.1.) Mikroskopske metode za prebrojavanje i identifikaciju fitoplanktona

Kvalitetni mikroskop je nužan za enumeraciju i identifikaciju fitoplanktonskih vrsta. Dva tipa mikroskopa koji se obično koriste su: standardni uspravan i invertni mikroskop. Bitno je za reći da zbog toga što su mnoge vrste fitoplanktona prozirne, koriste se različite tehnike kako bi se povećao kontrast.

3.) Prirodna fluorescencija

Fluorescencija stvorena od fotosintetskih i drugih pigmenata u fitoplanktonu, može se koristiti kao sredstvo za identifikaciju i enumeraciju vrsta. Ova je metoda najprimjerenija za

rad sa živim uzorcima i uzorcima očuvanim pomoću formaldehida ili glutaraldehida. Ako se za konzervaciju, koristi Lugolov jodin, prirodna fluorescencija neće biti vidljiva.

Fluorescencija se osobito može koristiti za razlikovanje heterotrofnih od autotrofnih organizama.

Mikroskop mora biti, što je vrlo važno, opremljen odgovarajućim objektivima te treba imati i odgovarajuće setove filtera zbog potreba detektiranja fluorescencije. Korisni filterski set za promatranje fluorescencije klorofila *a* i fikoeritrina, sastoji se od filetra za eksitaciju na 450-490nm i dugo prolaznog filtera za emisiju na 515 nm.

4.) Bojanje stanica

Različite boje se koriste za identifikaciju fitoplanktonskih vrsta. Jedna od boja koje ću spomenuti je Calcofluor. Ona se veže za celulozne teke ”oklopljenih” dinoflagelata i omogućava detaljno pregledavanje stanica. Pregledavanje ovom vrstom boja korisno je za stanice koje su morfološki veoma nalik jedna drugoj. Fluorokromi se također često koriste u kombinaciji s antitijelima ili RNA ciljanim ispitivačima za identifikaciju fitoplanktona. Dakako, važno je za naglasiti da su neki objektivi nepodobni, jer ne propuštaju ultraljubičastu svjetlost i onemogućavaju time rad sa fluorokromima, koji upravo trebaju eksitaciju UV svjetlosti.

5.) Analiza slike

Analiza slike može oduzeti puno vremena i potrebno je veliko znanje identifikacije stanica na temelju same morfologije. Zbog toga se razvila ideja o svojevrsnoj automatiziranoj analizi slika fitoplanktonskih uzoraka. Najjednostavnije metode analize slika, generalno, ne razlikuju detritus i drugi materijal od samog fitoplanktona. To predstavlja problem prilikom same primjene rutinske analize uzoraka. U globalu govoreći, sve metode analize slika uzoraka fitoplanktona, zahtijevaju visoko specijaliziranog i obučenog stručnjaka koji zna primijeniti određenu vrstu softvera za samu analizu, ali i koji zna ocijeniti kvalitetu rezultata nastalih automatskom analizom i obradom slike.

6.) Protočna citometrija

Protočna citometrija je neka vrsta brojača čestica, inicijalno razvijena za potrebe medicine. Autofluorescencija i neka druga raspršena svojstva se koriste za određivanje različitih vrsta. Različite vrste neće se dobro razlikovati taksonomski, kada se koristi neki standardni instrument. Ova metoda koju sam navela, izvrsna je za procjenu gustoće npr. autotrofnog pikoplanktona. Još naprednija vrsta ove metode je ona, koja koristeći kamericu, daje slike pojedinačnih organizama. Automatizirane analize fotografija omogućavaju identifikaciju organizma.

No svejedno, potreban je, opet naglašavam stručnjak, koji će procijeniti kvalitetu rezultata.

7.) Molekularne tehnike

Mikroalgalne studije sve više koriste u svome radu molekularne metode, radi nedostataka određivanja pojedinih vrsta temeljem morfologije. Mnoge molekularne metode, imaju podrijetlo u medicini, i posljednjih tri desetljeća različite tehnike su bile testirane, modificirane i redefinirane za potrebe identifikacije algi, njihove detekcije i kvantifikacije. Velika važnost metoda molekularne analize, je u tome što one omogućavaju otkrivanje filogenetskog položaja nekog organizma. Kao što znamo, danas nije moguće opisati novu vrstu, na temelju samo morfoloških značajki, već ja za to nužno potkrijepiti određenu pretpostavku molekularnim podacima, ali i podacima o ultrastrukturi te o biogeografskoj distribuciji određenog organizma. Dakako, primjenom molekularnih metoda, omogućeno je i razumijevanje evolucijskih odnosa između mikroalgalnih taksona. Prostorno odvojene populacije mikroalgalnih vrsta mogu pokazivati različita svojstva, kao što je na primjer proizvodnja toksina. Proučavanjem manjih razlika unutar genoma, populacije se mogu razgraničiti do određenih lokacija. Također porast znanja i metoda za istraživanje ekspresije i strukture gena, omogućio je bolje razumijevanje algalnih fizioloških procesa.

7.1.) Laboratoriji u kojima se koriste molekularne tehnike

Različiti tipovi molekularnih tehnika imaju različite zahtjeve što se tiče laboratorijskih ustanova i samih instrumenata. Raspon ide od vrlo dobro opremljenih laboratorija do terenskih instrumenata .

7.2.) Identifikacija i kvantifikcija fitoplanktonskih vrsta putem molekularnih metoda

Molekularne metode imaju za cilj maknuti se od identifikacije vrsta i klasifikacije istih putem morfoloških osobina koje vrlo često zahtijevaju visoko specijaliziranu opremu, kao što su elektronski mikroskopi npr. umjesto toga molekualarne tehnike istražuju razlike među vrstama na razini gena. Metode molekularne analize zahtijevaju korištenje specijalne opreme i visoko specijaliziranog osoblja i najvažnije od svega bitno je imati prethodno znanje o genetičkoj raznolikosti fitoplanktona u pojedinim regijama.

7.3.) Vrednovanje molekularnih metoda

rDNA i rRNA su postale najpopularnije ciljane regije za identifikaciju mikroalgalnih vrsta. Ove regije su atraktivne za početnice i ispitivačke konstrukcije zato jer sadrže konzervirane, ali i promjenjive regije i svuda su prisutne, u svim organizmima. Također, mnoge sekvence nukleotida su dostupne i pohranjene u takozvanoj GENEBANK koja služi za komparativnu analizu i dizajniranje oligonukleotidnih ispitivača i PCR početnica. Unatoč opsežnim analizama sekvenci uzgojenih vrsta fitoplanktona, može se dogoditi unakrsna reakcija s drugim organizmima u prirodi, izbog toga je krucijalno da se testiraju razvijene početnice i sa ciljanim i neciljanim vrstama. Iako ti postupci oduzimaju puno vremena, to je esencijalno jer na kraju te metode trebaju biti primjenljive. I najvažnije od svega na kraju, je kontrola kvalitete rezultata i metoda. Kao kod svih znanstvenih istraživanja, bitno je istražiti raznolikost metoda prije primjene tih istih metoda za buduće programe monitoringa.

8.) Metode kvantitativne analize

8.1.) Utermöhl metoda za kvantitativnu analizu fitoplanktona

Utermöhl metoda je vrlo korisna, jer se stanice osim što se mogu prebrojati, mogu se i identificirati. Pomoću ove metode, moguće je odrediti veličinu pojedine stanice, vrstu te biovolumen.

Ako se uzorci analiziraju odmah ili unutar nekoliko dana, koriste se plastične boce, jer se u duljem razdoblju pohrane uzoraka konzervansi apsorbiraju od strane plastike ili pak reagiraju s plastikom. Za dugoročniju pohranu uzoraka koriste se staklene boce, kako bi se utjecaj bilo

kakve reakcije konzervansa s uzorkom smanjio na minimum. Za što bolju fiksaciju uzoraka nužno je i uzorke pohraniti na mračno i hladno mjesto da se spriječi reakcija Lugolova jodina na svjetlu. Bocu je potrebno i dobro začepiti kako ne bi došlo do prolijevanja ili evaporacije uzorka. Preporučuje se da se boca napuni do 75-80% njezina volumena, što omogućava bolju homogenizaciju uzorka prije stavljanja u sedimentacijsku komoricu (slika 4.). Tvari za fiksiranje uzorka, moraju se izabrati ovisno o objektu istraživanja unutar neke studije. Najčešće korištena kemikalija je kalcijev jodid; Lugolova jodna otopina-kisela, neutralna ili bazična. Ako se uzorci pohranjuju na dulje vrijeme, mogu se i konzervirati pomoću neutralnog formaldehida.

Sedimentacijske komorice se sastoje od dva dijela, gornjeg cilindra i donjeg tanjurića s tankim staklom. Obično su napravljene od pleksiglasa u volumenima od 2, 5, 10, 25 i 50 mL. Debljina staklene baze ne smije prijeći preko 0,22 mm, jer bi u suprotnom to moglo utjecati na rezoluciju koja se može postići određenim mikroskopom. Komorice za prebrojavanje trebaju biti kalibrirane. To se postiže vaganjem komorice kada je prazna i kada je napunjena kako bi se pravilno izmjerio volumen.

Za potrebe Utermöhl metode, koristi se invertni mikroskop (slika 3.). Optička kvaliteta mikroskopa, naravno, je krucijalna za identifikaciju fitoplanktona. Fazni ili diferencijalno-interferencijski kontrast može biti od pomoći prilikom identifikacije većine fitoplanktona budući da svjetlo polje može biti u prednosti prilikom identifikacije kokolitoforida.

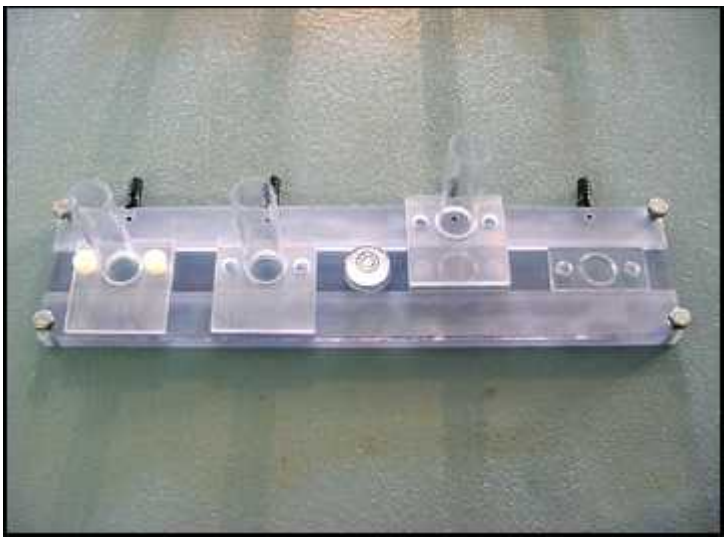
Epifluorescenijska oprema je u velikoj prednosti za brojanje i identifikaciju organizama s celuloznim stjenkama, kao što su na primjer: dinoflagelati, klorofiti i gljive. Kada se boja primjeni na uzorak to uzrokuje fluorescenciju celuloze. Jedan okular bi trebao biti opremljen kalibriranim okularnim mikrometrom. A drugi okular bi trebao biti opremljen s dvije paralelne linije koje formiraju neki transekt. Okular s mikrometrom mora biti kalibriran za svako povećanje. Mikroskop bi trebao imati objektive 4-6X, 10X, 20X i 40-60X. Za detaljnu analizu i pregledavanje uzorka bio bi dobar objektiv 100X uz imerzijsko ulje. Ako se pak radi o epifluorescencijskoj mikroskopiji trebale bi se koristiti odgovarajuće leće, a u svakom slučaju bilo bi dobro da je mehanički stalak mobilan.



Slika 3. Invertni mikroskop (Izvor: http://www.microscope-microscope.org/basic/microscope-images/inverted-microscope-350.jpg)

Što se tiče brojača stanica, često se koriste medicinski brojači za krve stanice koji mogu također poslužiti za analizu uzoraka fitoplanktona. Poželjno je da se prilikom rada koristi i neki računalni program za brojanje koji direktno proučene vrste registrira u bazi podataka.

Postrojenja u kojima se analizira fitoplankton moraju imati prostorije za pohranjivanje, manipuliranje i čišćenje sedimentacijskih komorica. Za vrijeme sedimentacije uzorci bi trebali biti pohranjeni na povišenoj, horizontalnoj i čvrstoj površini. To će spriječiti bilo kakvo neslučajno sedimentiranje stanica fitoplanktona.



Slika 4. Sedimentacijske komorice (izvor: http://www.aquaticresearch.com/images/phyto5l.jpg)

8.1.1.) Priprema uzorka

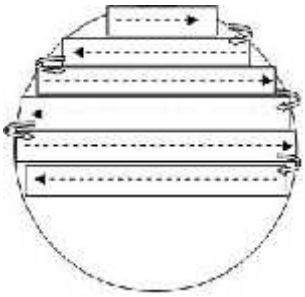
Preparacija uzorka: Nakon što smo sakupili uzorak i ulili ga u bocu za uzorke on se treba odmah konzervirati ili Lugolovom jodnom otopinom ili neutralnim formaledehidom. Prednost Lugolove jodne otopine je što ima trenutni efekt u smislu da povećava težinu organizama te time smanjuje vrijeme sedimentacije. No, ta kemikalija ima i nedostatak, naime ona uzrokuje obezbojenje nekih vrsta fitoplanktona čim se otežava identifikacija. A prednost formaldehida je ta što uzorci ostaju dugo vremena vijabilni. No formaldehid nije pogodan za fiksaciju golih stanica algi, jer se gube flagele i oblik se ne može sačuvati. Također neke gole algalne frome se mogu i dezintegrirati. Neophodno je naglasiti da se treba raditi s posebnim oprezom, kada se radi s formaldeidom, jer je on otrovan. Sačuvani uzorci se trebaju, kao što sam već rekla, pohraniti na hladno i tamno mjesto. A sama boja uzorka je također od važnosti, ona se mora pregledavati, i ako je potrebno treba se dodati još kemikalija, u slučaju da je korištena Lugolova otopina joda. Uz sve navedeno, bitno je i da se temperature fitoplanktonskog uzorka i sedimentacijske komorice poklapaju sa sobnom temperaturom. Naglasila bih da je to važno, jer se time onemogućuje stvaranje mjehurića zraka. Pogodno bi bilo i da se uzorci analiziraju bez odgode, jer oni koji stoje godinu dana i više, nisu od koristi. Osim svega navedenog, treba se paziti da li je uzorak dovoljno homogeniziran. Homogenizacija se postiže nježnim, a opet čvrstim protresanjem boce. U slučaju kada bismo jako protresli bocu s uzorkom, došlo bi do stvaranja mjehurića, koje je onda teško ukloniti. Nakon što je uzorak sedimentiran, sedimentacijska komorica se postavlja na horizontalnu površinu i nježno se puni uzorkom iz boce. Komorica se zatim zatvori pokrovnim staklom, i također prilikom rada, treba paziti da ne nastanu mjehurići zraka. Nakon sedimentacije ”dimnjak” komorice se nježno pomakne s dna tanjurića i zamijeni se pokrovnim staklom. Pažljivo, se zatim, prenosi donji tanjurić na invertni mikroskop i zatim se stanice fitoplanktona broje i identificiraju.

Kvantitativna analiza bi trebala započeti sa skeniranjem čitavog uzorka pri manjem povećanju, tek toliko da se dobije dojam o gustoći i distribuciji fitoplanktona. Ako je distribucija nejednaka, uzorak se može slobodno baciti. Tokom skeniranja bilo bi dobro da se napravi preliminarni popis vrsta, što može pomoći da izaberemo strategiju brojanja. Organizmi bi trebali biti identificirani do najniže kategorije. Na kraju, objekt studije će nam odrediti u kojem smjeru će se odvijati identifikacija. Polako, daljnjim radom, prelazi se na

veće mikroskopsko povećanje. Bitno je, radi primjerene usporedbe između uzoraka uvijek brojati specifične vrste pri istom povećanju.

U svrhu postizanja razumne procjene prilikom brojanja, sedimentirani uzorak se mora pregledati da se dobije dojam o općoj raspodjeli stanica na dnu komorice te da se dobije i dojam o pojavnosti i raspodjeli stanica po veličini u uzorku. Ako se radi o uzorku koji nam vizualno izgleda nejednak na određenim dijelovima komorice, te ukazuje na neka strujanja, on se mora baciti.

Brojanje započinje pri najmanjem povećanju, koje se postupno mora povećavati. Prilikom rada s pikoplanktonom (0,2-2 µm) koristi se povećanje 1000X za koji moram naglasiti da nije pogodan za istraživati ovom metodom. Prilikom rada s nanoplanktonom (2-20 µm), koristi se povećanje 100-400X, a prilikom rada s mikroplanktonom (veći 20µm) povećanje 100X.



Slika 5.Prikaz poprečnog pregledavanja komorice.(Izvor: http://www.helcom.fi/groups/monas/CombineManual/AnnexesC/en_GB/annex6/)

Brojanje čitave komorice se radi prelaženjem naprijed i nazad preko dna komorice (slika 5). Dakle pažljivo se broje određeni trasekti, i pri tome se treba paziti na dijelove koji su već izbrojani. Brojanje dna se može izvesti na različite načine. Ako želimo analizirati pola dna komorice, mora se prebrojati svaki drugi transekt cijele komorice. Ako se analizira manji dio, onda se jedan, dva ili čak tri ili više dijametara trasekta analiziraju i broje. Nakon što se svaki trasekt prebroji, komorica se rotira za oko 25-45 °C . Kako bismo zadržali statistički jasan rezultat kvantitativne analize bitno je da se broje određene jedinice. Koliko ćemo jedinica brojiti ovisi o tome koliko precizni želimo biti.

8.1.2.) Formula za izračunavanje broja stanica po litri

Stanice/L= N*(A1/AC)*(1000/V)

Stanice/mL= N*(A1/AC)*(1/V)

V= Volumen komorice za prebrojavanje (mL)

A1= čitava površina komorice za prebrojavanje (mm na kvadrat)

AC= prebrojeno područje komorice za prebrojavanje (mm na kvadrat)

N= broj stanica određene vrste koje su prebrojane

C= koncentracija određene vrste

8.1.3.) Razmatranje opisane metode

Dakle, opisana metoda je najčešće korištena metoda za pregledavanje fitoplanktonskih zajednica u uzorcima vode. Godinama su se mikroskopi i komorice usavršavali, ali na kraju, taksonomska vještina onoga koji analizira postavlja standard samog rezultata. Ova metoda, određuje kvantitetu i raznolikost fitoplanktona u uzorku vode, i biovolumen. Metoda omogućuje vrlo detaljnu analizu. Da bi se dobili pouzdani rezultati, onaj koji analizira mora imati znanje na razini, mora vrlo dobro poznavati literaturu vezanu za taksonomiju.

8.2.) Metoda sedimentacijske boce za kvantitativnu analizu fitoplanktona

Ova metoda se koristi za kvantitativnu i kvalitativnu analizu fitoplanktona. Što se tiče detekcijskog dometa, on ovisi o volumenu sedimentiranog uzorka i o broju analiziranih ”pruga”. Ova metoda je zapravo modificirana Utermöhl tehnika. Temelji se na promatranju i brojanju fitoplanktonskih stanica nakon sedimentacije koristeći inverzni mikroskop. Razlikuje se od ostalih sličnih metoda po tome što, nakon što je uzorak jednom uzet i konzerviran, nema potrebe za daljnjom manipulacijom.

Dakle, nakon što smo uzeli uzorak vode, on se prenosi direktno u bocu, dodaje mu se konzervans i on se pohranjuje do obrade. Boce se pune skoro do vrha, ali ostavlja se tek toliko prostora za dodavanje konzervansa. Važno je i prilikom pohrane paziti na to da se ne stvaraju mjehurići u boci. Za homogenizaciju, potrebno je uzorak nježno protresti, kako se ne bi stvorili mjehurići. Boce, u kojima se pohranjuju uzorci, ne bi trebale biti ni prevelike niti premale, jer ako su premale, neće stati dovoljno uzorka, a ako su velike nemoguće ih je staviti pod mikroskop. Što se tiče kemikalija, koje će poslužiti kao konzervansi, koristi se Lugolova otopina joda ili neutralni formalin. Treba naglasiti da se prije pohrane uzoraka, boce moraju

dobro očistiti i prilagoditi na sobnu temperaturu. Nakon što je sve ovo učinjeno, uzorci ili uzorak se pohranjuje na hladno i mračno mjesto.

Dakle kao što sam rekla prednost ove metode je što se ne može manipulirat uzorkom nakon što je jednom pohranjen i uzorkovan. Također, ova metoda omogućuje identifikaciju i kvantifikacijsku analizu pojedinih ili više vrsta. Također, možemo otkriti i štetne vrste. Ujedno, boce za sedimentaciju su vrlo jeftine.

Vezano za analizu uzorka, stanice se mogu prebrojati korištenjem inverznog mikroskopa. Ova metoda nam omogućava da, pregledavanjem cijelog dna te prelaženjem popreko po širini i dužini boce, otkrijemo stanice bilo koje vrste ili tipa.

Nakon što su pojedinačne vrste prebrojane, moramo umnožiti naš rezultat pomoću faktora konverzije (F), kako bismo dobili gustoću stanica po jediničnom volumenu.

8.2.1.) Formula za izračunavanje rezultata

Ova metoda se može primijeniti na sve sedimentacijske tehnike za enumeraciju fitoplanktona.

Generalna formula za dobivanje F vrijednosti je:

F=(taložno područje/ analizirano područje)* (1000mL/ volumen uzorka).

Vrijednost od F može varirati, ako brojimo pruge uzduž boce, a to ovisi i o uvećanju leća objektiva, broju pregledanih pruga duž boce, i o tome da li su pruge orijentirane uduž i poprijeko boce. Širina polja mora se odrediti, prije samog analiziranja i brojanja, koristeći kalibriran mrežni uzorak na optičkom instrumentu, ovom slučaju mikroskopu, i to pri svakom povećanju. Čest problem u identifikaciji planktona i enumraciji istog je: arhiviranje pojedinačnih uzroka za buduće reference, verifikaciju identiteta vrsta u drugim studijama.

8.2.2) Razmatranje metode

Prednost ove metode, kao što sam već rekla, je minimiziranje manipuliranja uzorkom, jer manipulacijom uzorka povećava se broj grešaka. Uzorci fiksirani formalinom mogu biti pohranjeni kao neoštećeni kroz duži vremenski period.

Svaka tehnika ima svoje nedostatke. Nedostatak je taj da kemikalije koje se upotrebljavaju kao konzervansi mogu procuriti sa strane u boci za uzgoj tkiva, te se to događa nakon što je uzorak dulje stajao i to može uzrokovati smanjenu kvalitetu proučavanja uzoraka.

Također problem može predstavljati proučavanje stanica na samom rubu strana boce. No kako god, metoda je pogodna za uzorke koji se pohranjuju na dulje vrijeme, pogotovo ako su konzervirani pomoću formalina. I usporedbi s drugi metodama, ova metoda je vrlo jeftina.

8.3.) Metoda prebrojavajućih komorica za kvantitativnu analizu fitoplanktona

Ova metoda je utvrđena i priznata metoda za brojanje planktona. Postoje 3 najčešća tipa brojanja komorica za enumeraciju fitoplanktona, a to su : Sedgewick-Rafter komorica za brojanje (slika 6.), Palmer- Maloney komorica za brojanje i hemocitometerska komorica za brojanje.

Sve tri metode su jednostavne u smislu primjene. Potreban je fiksiran uzorak i kvalitetan sastavljeni mikroskop te komorice za brojanje. Ova metoda je pogodna za korištenje kada se radi o uzorcima u kojima su visoke gustoće stanica, kao u slučaju cvjetanja. Mogućnost ovih metoda za pregled čitavih zajednica fitoplanktona uključuje i uočavanje prisutnosti štetnih vrsta. No, opet naglašavam, za pravilnu i preciznu identifikaciju i dalje je potreba visoko stručna osoba.

8.3.1.) Sedgwick-Rafter metoda

Ovo je tradicionalna metoda za brojanje stanica koja koristi sastavljeni mikroskop i relativno je brza, ako je radi iznimno stručan taksonom. Dakle, metoda je relativno brza kada se radi o kvantifikaciji uzorka s velikim brojem stanica. Stakalce čini prozirna baza, koja ima namještenu komoricu i može zadržati 1mL uzorka. Baza ove komorice ima pravilnu mrežu tako da je 1 mL uzorka podijeljen na pojedine mikrolitre. Komorica (slika 6.) je prekrivena pokrovnim staklom koje štiti uzorak od isušivanja i bilo kakvih poremećaja. I naravno, uzorak se stavlja pod mikroskop i vrši se prebrojavanje.



Slika 6. Sedgewick-Rafter ćelija (izvor: http://www.2spi.com/catalog/standards/images/SEDPLAS.jpg, 14.07.2012.,20:53)

8.3.1.1.) Pohranjivanje uzoraka

Uzorci bi trebali biti pohranjeni na mračnom mjestu, kako bi se izbjegla direktna svjetlost, koja djeluje na Lugolova otopina joda koja se koristi kao fiksativ, i dakako uzorci moraju biti prilagođeni na sobnu temperaturu. Naglasila bih kako, ako se radi o dužoj pohrani uzoraka, bitno ih je redovno pregledavati i dodati po potrebi kemikaliju koju koristimo kao konzervans.

8.3.1.2.) Formula za izračunavanje rezultata

Što se tiče formula za izračunavanje rezultata, Sedgewick-Rafterova komorica ima volumen 1 mL, s bazom podijeljenom na 1000 kvadratića (50 redova puta 20 redova), a svaki predstavlja 1/1000 volumenakomorice. Na primjeru ću pokazati kako se izračunava vrijednosti od F.

F=1000/ (broj prebrojenih kvadratića)*1000, dakle ako imamo 4 niza, dakle 200 kvadratića; F se izračunava prema formuli: F= (1000/200)*1000=5000.

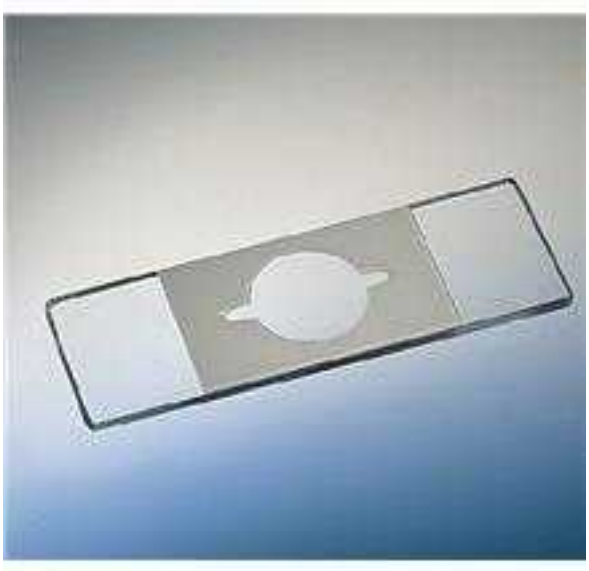
8.3.1.3.) Razmatranje metode

Ova metoda je najbolja za analizu kultura ili visokih biomasa uzrokovanih cvjetanjem. Ova metoda ne zahtijeva sedimentaciju, i može omogućiti brzu procjenu uzorka vode. Može omogućiti točne rezultate između 10 000 do 100 000 stanica po litri.

Metoda je bolje iskoristiva, ako se radi o uzorcima koji sadrže veće stanice fitoplanktona.

8.3.2.) Palmer - Maloney metoda

Metoda koja predstavlja izrazito brzu i jasnu tehniku koja je isprva bila namijenjena prebrojavanju nanoplanktona. Komorica za brojanje (slika 7.) je okrugla, mjere su joj 17.9 mm u promjeru, 400 μm dubina i sadrži volumen 0.1 mL. Kanali za punjenje nalaze se s obje strane komorice za brojanje. Ova komorica nema nikakvu mrežu i korisna je za kulture, uzorke s visokom gustoćom stanica ili pak za prekocentrirane uzorke. Ovom metodom mogu se analizirati uzorci koji sadrže od 10 do 10 000 stanica po litri. Za izvođenje ove metode, potreban nam je sastavljeni ili invertni mikroskop s objektivima 10X i 20X. Palmer Maloney metoda je izvrsna za prebrojavanje na primjer gustog cvjetanja. Metoda omogućuje brzu analizu uzorka.

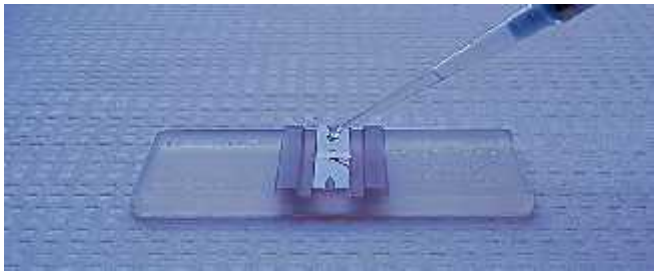


Slika 7.: Palmer- Maloney ćelijica (izvor: http://www.thomassci.com/_resources/_global/media/resized/00020/ihwx.85f95990-6fca-4ba7-88a9-dbecd7421129.218.218.jpg,)

8.3.3.) Hemocitometar metoda

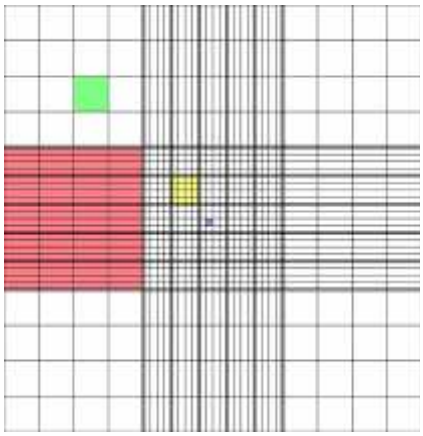
Ova metoda je pogodna za rad sa uzorcima koji sadrže ekstremno visoke koncentracije stanica iznimno malih organizama (manjih od 30nm). Hematocitometar (slika8.) je isprva dizajniran za brojenje krvnih stanica. Danas se koristi i za brojenje drugih vrsta stanica, kao što su na primjer stanice fitoplanktona. Hematocitometar je konstruirao Louis Charles

Malassez. Sastoji se od tankog mikroskopskog stakalca s pravokutnim otiskom koji tvori komoricu. Ova komorica je urezana laserom i ima mrežu okomitih i poprečnih linija. Hemocitometar je napravljen vrlo oprezno tako da se točno zna koje područje je omeđeno linijama tj. koje područje sadrži mrežu (slika 9.) te je također dubina komorice poznata. Stoga je i moguće prebrojati broj stanica ili čestica u određenom volumenu fluida, i prema tome izračunati koncentraciju stanica u cjelokupnoj tekućini.



Slika 8. Punjenje hemocitometra

(izvor: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hemocytometer.jpg,)



Slika 9. Mreža hemocitometra (izvor: http://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer,)

Crveni kvadrat= 1 mm^2, 100 nl

Zeleni kvadrat = 0.0625 mm^2, 6.25 nl

Žuti kvadrat = 0.04 mm^2, 4 nl

Plavi kvadrat = 0.0025 mm^2, 0.25 nl

Pri dubini od 0.1 mm.

8.3.3.1.) Izvođenje metode

Sad ću nešto reći i o izvođenju metode. Dakle pokrovno staklo je postavljeno preko obje komorice hemocitometra. Nježnim pokretom, fiksirani uzorak se nježno preokrene otprilike 10-20 puta da se osigura da je uzorak izmiješan temeljito. Zatim punimo Pasteurovu

pipetu s dobro izmiješanim uzorkom. Nadalje, svaka komorica hemocitometra se puni držeći pipetu pod kutom od 30° do 45° s otvorenim nastavkom za dijeljenje, te dozvoljavajući pipeti da dotakne žlijeb te se potom sporo ispušta kap tekućine. Kapilarna aktivnost će djelovati na način da će se čitava komorica ispuniti uzorkom. Važno je i da se provjeri da li se tekućina širi preko srebrno obojene komorice bez prelijevanja u svojevrsni žlijeb. Zatim nakon što je sve ovo učinjeno, treba pričekati 2-3 minute da se stanice slegnu. Stakalce bi se trebalo odmah skenirati pod mikroskopom kako bi bilo lakše odrediti strategiju brojanja. Cijelo stakalce ili selektirani broj velikih kvadrata na njemu, bi se trebao prebrojati kako bi se zadržao statistički značajan broj stanica (Andersen i Throndsen 2004). Svaka strana hemocitometra ima mrežu s 9 kvadrata veličine 1 mm^2 koji su nadalje podijeljeni na manje dijelove, ovisno o tipu hemocitometra. Broj prebrojenih organizama i kvadrata se treba zabilježiti. Kako bi se izbjeglo brojanje stanica dva puta, moraju se zabilježiti unaprijed , stanice koje diraju 2 od 4 stranice kvadrata. Nakon što je brojanje dovršeno, hemocitometar se mora temeljito očistiti i vodom i alkoholom.

8.3.3.2.) Formula za izračunavanje rezultata

Formule za izračunavanje rezultata. Dakle, zbroje se sve stanice i podijele se s brojem velikih kvadrata (1 mm) kako bismo zadržali broj stanica po kvadratu. Zatim pomnožimo prosječni brojstanica po kvadratu s 10 000 kako bismo dobili broj stanica po mL. Na primjer, ako imamo 200 stanica u 4 velika prebrojena kvadrata, onda je prosječni broj prebrojenih stanica 200/4=50 i to se zatim pomnoži s 10 000 i dobijemo 50 000 stanica po mL.

8.3.3.3.) Razmatranje metode

Na kraju, rekla bih kako je hemocitometar vrlo dobra metoda za brojenje stanica koje su vrlo male, ali u iznimno visokim koncentracijama. Uzorci se mogu proučavati pod objektivom 10X što se tiče složenog mikroskopa, a pod objektivom 10X ili 20X kod invertnog mikroskopa. No, moram i reći da ova metoda nije povoljna kad se rade nekakve rutinske kontrole i praćenje kvalitete vode, jer je za izvođenje ove metode potrebna vrlo visoka biomasa kako bi se dobio statistički značajan broj stanica. I dakako da onda nećemo moći dobiti ukupan pregled stanja fitoplanktonske zajednice, osobito organizama koji imaju malu gustoću. A u slučaju kada je koncentracija uzoraka niska, potrebno je koncentrirati uzorak. To se može postići, sedimentacijom; uzorak se prelijeva u obilježeni cilindar (volumen A) i zatim se tako ostavlja neko vrijeme dok se stanice ne slegnu. Voda se nakon

toga, iz gornjeg dijela cilindra, izlijeva i bilježi se konačni volumen B. A druga metoda uključuje filtriranje uzorka kroz mrežicu okaca promjera od 10 do 20 µm. Koncentracijski faktor (CF) se računa kao A (početni volumen) kroz B (konačni volumen). Na primjer: CF=A/B, odnosno 100/10=10.

8.4.) Filtriranje – bojanje Calcofluorom- kvantitativna epifluorescencijska mikroskopija za analizu fitoplanktona

Identifikacija i prebrojavanje su vrlo zahtjevni, pogotovo ako se radi o tekatnim dinoflagelatima i to toksičnim vrstama. Ova metoda, je bazirana na kvantitativnoj epifluorescencijskoj tehnici koja koristi kao boju Calcoflour White M2R. To je specifična boja koja je vrlo korisna za kvalitativnu i kvantitativnu analizu tekatnih dinoflagelata, zato jer boji celulozu u tekatnim pločama dinoflagelata, a istovremeno ne boji druge organizme i detritus. Korištenjem ove metode moguće je analizirati uzorke od 10 do 500 mL.

Procedura brojanja i izračunavanja koncentracije se može raditi pod mikroskopskim povećanjem 100X. Učinkovitost ove boje mora se procijeniti na način da se utvrdi da tekatni dinoflagelati svijetle plavo na tamnoj pozadini (slika 10.).



Slika 10. *Dinophysis rotundata* obojen s Calcofluorom snimljen epifloorescencijskim mikroskopom

(izvor:http://www.photomacrography.net/forum/userpix/154_Dinophysis_rotundata_50x50um_N3100826_30x_1022_rw_117_1.jpg)

8.4.1.) Formula za izračunavanje rezultata

Sama strategija brojanja ovisi o broju stanica koje se nalaze na filteru. Broji se cijela površina filtera. Ako se pak radi o velikom broju stanica na filteru, mogu se brojati samo frakcije. Što se tiče samog izračuna koncentracije različitih vrsta, mora se znati: V(volumen uzorka koncentriranog na filteru) ,Ba (površina filtera), Bc (prebrojena površina na filteru), N (broj stanica vrste od interesa koje su prebrojane).

Prema tome (koncentracijski faktor) CF= Ba/Bc, a koncentracija vrsta C (stanice po mL) je : C=N*(CF/V).

8.4.2.) Razmatranje metode

Metoda je izvrsna za brzo obrađivanje uzoraka. Brza obrada uzoraka je bitna što se tiče praćenja kvalitete vode. Ovom metodom je moguće uočiti čak i niske koncentracije tekatnih dinoflagelata u prisutstvu visoke pelagijske biomase. Moguće je identificirati tekatne dinoflagelate do najnižih taksonomskih kategorija zbog lakog prepoznavanja tekatnih ploča od taksonomske važnosti, što inače nije moguće preko Utermöhl metode. Ova procedura omogućuje i razlikovanje autotrofnih i heterotrofnih dinoflagelata na temelju postojanja odnosno nepostojanja klorofila i drugih pigmenata mijenjanjem filterskih setova.

8.5.) Filtriranje – polutransparentni filteri za kvantitativnu analizu fitoplanktona

Fitoplanktonske vrsta, kao što su dinoflagelati, često su prisutne u niskim koncentracijama u stupcu vode. Prema tome, uzorci moraju prvo biti koncentrirani kako bismo točno kvantificirali ove vrste. Jedna od metoda za koncentraciju fitoplanktona u uzorcima vode je korištenje polutransparentnih membranskih filtera (Fournier 1978). Dakle, uzorci vode se direktno filtriraju na membranu filtera koja se onda stavlja pod mikroskop kako bi se provela identifikacija i prebrojavanje fitoplanktona.

8.5.1) Formula za izračunavanje rezultata

Za izračunavanje koncentracije stanica različitih vrsta mora se znati, kao i u prethodnoj metodi: V (volumen uzorka koncentriranog na filteru u mL), Ba (površina filtera) , Bc (prebrojeni dio filtera), N (broj prebrojenih stanica vrste od interesa). Koncentracijski fakor CF računa se prema formuli: CF=Ba / Bc, a koncentracija vrsta C je onda; C= N* (CF / V).

8.5.2.) Razmatranje metode

Ova metoda je također vrlo brza metoda za koncentriranje uzoraka fitoplanktona prije samog prebrojavanja. Metoda je fleksibilna, s obzirom na to, da se može mijenjati volumen filtirane tekućine ovisno o ciljanim vrstama, odnosno o vrstama koje želimo analizirati. Detekcijska granica, može se poboljšati povećanjem filtiranog volumena tekućine. Nikakva posebna oprema nije potrebna za izvođenje ove metode. Koristi se standardna laboratorijska oprema koja i nije toliko skupa. Glavna prednost ove metode je zapravo brzina kojom se rezultati obrađuju od vremena dolaska u laboratorij.

Veličina pora na filteru određuje veličinu stanica koje se zadržavaju na filteru. Dakle, odabir filtera je bitan, jer s njime možemo odmah može eliminirati ono što nam ne treba.

Metoda ima i neke nedostatke u odnosu na druge metode. Dakle zbog nemogućnosti za fizičkom manipulacijom stanica fitoplanktona na filteru, mogu se dogoditi neke poteškoće vezane za taksonomsku karakterizaciju tih istih stanica, jer ih se ne može orijentirati i radi toga je teško odrediti neke morfološke karakteristike.

Glavni nedostatak ove metode je što se stanice mogu uništiti tijekom procesa filtracije. Ova metoda nije preporučljiva kada se radi o nježnim i osjetljivim vrstama kao što su haptofiti i krizofiti, jer nakon tretiranja te stanice ne bi bile definirane i izgubio bi im se oblik. Ova metoda je pogodna za robustnije vrste, kao što su dijatomeje i dinoflagelati.

8.6.) Filter-transfer-freeze metoda za kvantitativnu analizu fitoplanktona (FlowCAM)

Ova metoda se smatra jednom od klasičnih metoda za brojanje stanica i njihovu identifikaciju, iako to u stvari i nije.
Filter Transfer Freeze metoda je osmišljena 1983. (Hewes i Holm-Hansen), i iako je jednostavna i dokazano učinkovita i dalje nije široko primijenjena.
Metoda je pogodna za brzu, no površnu analizu uzoraka fitoplanktona. Metoda je isprva dizajnirana za istraživanja nanoplanktona, što je potvrđeno i time da je njena učinkovitost veća kod nižih kategorija veličine od 5-200 mikrometara u promjeru. Za izvođenje ove metode nisu potrebni sofisticirani uvjeti.

FTF metoda je direktno primjenjiva za analizu uzoraka uzetih ravno iz morske vode, pošto filtracija imobilizira stanice, a brzo zamrzavanje ih ubija. Stanice smrznute na filteru mogu se pohraniti na nekoliko sati bez ikakve štete. FTF metoda ima neke prednosti i nedostatke, kao i svaka do sada. Problemi vezani za gubitak oblika, slab kontrast, slabu rezoluciju i bojanje stanica su ,što se tiče ove metode, eliminirani. A s obzirom na Utermöhl metodu, ova metoda je u prednosti po tome što ne zahtijeva dugotrajnu sedimentaciju. Brojanje se može izvesti običnim mikroskopom. FTF metoda može se kombinirati i s nekim drugim metodama i tehnikama kao što su bojanje Calcofluorom. Vrijeme za pripremanje uzorka je vrlo kratko, ali kao i kod drugih tehnika temeljenih na filtraciji, fizički gubitak stanica ili njihovo oštećenje mora se pratiti tijekom procedure pripremanja uzorka. Sve treba izvesti pažljivo. Treba se temeljito oprati i očistiti aparatura za filtraciju, mora se pazit da se ne prenapuni filter. U usporedbi s nekim alternativnim tehnikama za brojanje stanica ova metoda pokazala se metodom s najmanje standardnih grešaka unutar koncentracijskog ranga od 102 do 105 stanica po Litri.

8.7.) Slikovna dijagnostika pomoću protočne citometrije za kvantitativnu analizu fitoplanktona

Prilikom analize kvalitete vode i samog monitoringa, mogućnost da se broje organizmi, uhvate i spreme slike čestica ili samih organizama u uzorku, je od iznimne vrijednosti.

Klasične metode za brojanje mogu biti spore i iscrpljujuće. FlowCAM metoda bilježi digitalne fotografije čestica u toku nekog fluida koristeći pritom lasersku svjetlost za detekciju, omogućavajući pritom mjerenje mnogih parametara koji se odnose na stanicu, kao što su: širina, dužina, ekvivalentni sferni promjeri fluorescencija.
Zabilježene fotografije određenog uzorka mogu se vizualno proučavati, a mogu se i naknadno obrađivati koristeći računalo. FlowCAM otkriva i mjeri fluorescenciju na dvije valne duljine. Obično se radi o crvenoj i narančastoj fluorescenciji, što ukazuje ili na prisutnost klorofila ili fikoeritrina unutar pojedinih stanica u uzorku. FlowCAM metoda omogućava automatsko brojanje stanica i zabilježavanje slika stanica u nekom uzorku. Korištenjem podataka prikupljenih prilikom prijašnjih istraživanja i slika pohranjenih u bazi podataka, moguće je analizirati i klasificirati uzorke. FlowCAM (Slika 11.) se može upotrijebiti za otkrivanje i kvantifikaciju različitih grupa algi unutar uzorka, uključujući i štetne vrste algi. Oprema za izvođenje ove metode sastoji se od pokretnog Flow CAM-a (svojevrsni slikovno

dijagnostički protočni citometar) koji mora biti opremljen sa plavim ili zelenim laserom za detekciju fluorescencije ili čestica. Instrument bi trebao biti spojen i na objektiv (4X ili 10X) ovisno o veličini stanica koje će biti kvantificirane i vizualizirane. Ova metoda je originalno razvijena za detekciju i kvantifikaciju, i idealna je za analizu uzoraka sa terena koji sadrže specifične grupe ili vrste mikroplanktona, koje se obično broje tradicionalnim tehnikama brojanja. FlowCAM uključuje i računalo te naravno laser, koji se prije početka rada treba uključiti i pustiti da se zagrije oko 20 minuta. Kako se laser zagrijava, može se uključiti i softver. FlowCAM se mora propisno fokusirati, kao da se radi o mikroskopu kako bismo dobili dobru vizualizaciju. Obično proces namještanja i uštimavanja uređaja traje od 20-40 minuta. Nakon što su sve postavke za detekciju mikroplanktona fiksirane, one ne smiju biti mijenjane između uzoraka, a jedino se mogu mijenjati ako se ekosistem ili pozadina unutar uzorka mijenjaju.



Slika 11.: FlowCAM

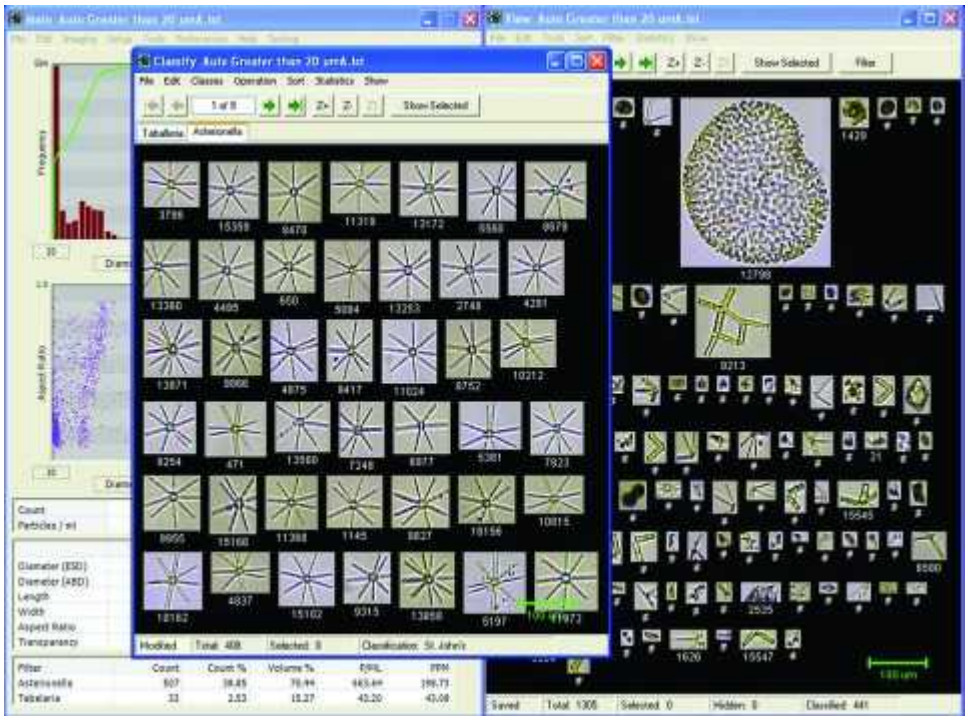
(izvor: http://photos.labwrench.com/equipmentPhotos/9000/9572-7201.jpg)

Za analizu i brojanje mikroplanktona u uzorcima koriste se obično objektivi 4X,10X ili 20X u kombinaciji sa odgovarajućom Flow Cell. Flow Cell je pravokutna staklena cijev koja može varirati u veličini ovisno o tome koji se objektiv koristi. Silikonska tuba je pričvršćena na oba kraja i dopušta da uzorci prolaze kroz cijev do pumpe.

FlowCell oponaša staklo mikroskopa i za razliku od njega postavljen je vertikalno. Sakupljanje podataka se vrši na način da se kao prvo svaki sakupljeni uzorak mora dobro promiješati kako bi se resuspendirale one čestice koje su se slegle.

Koristeći obilježeni cilindar, unaprijed određeni volumen nekog uzorka se stavlja u vrh pipete. Zatim se namjesti softver FlowCAM–a čime može započeti analiza i prikupljanje podataka. Pokreće se i peristaltička pumpa, netom što je započelo prikupljanje podataka. Vrši se i analiza fluorescencije fitoplanktona pomoću lasera koji se usklađen i namješten na FlowCAM.

Dakle, svaka fluorescentna čestica ili stanica je digitalno zabilježena i arhivirana pomoću softvera (slika 12.).



Slika 12. Fotografije stanica dobivene korištenjem FlowCAM Fluid Imaging tehnikom, (Izvor: http://www.wastewaterpr.com/assets/images/photos/Fluid_Imaging_FlowCAM_Images_Microorganisms_and_Particles.jpg)

Softver omogućava korisniku da koristi prije prikupljenu bazu fotografija određenih organizama kao pomoć pri analizi uzoraka. Te baze su stvorene na temelju slika dobivenih organizama koji su ili uzgojeni u kulturi ili su pozitivno identificirani na terenu i zabilježeni. Baza podataka uvelike olakšava rad znanstvenicima, a što je važno omogućuje i sortiranje podataka u određene, od strane korisnika definirane kategorije. Konačna koncentracija stanica svake grupe je određena jednadžbom koja sadrži broj stanica, analizirani volumen i FlowCell faktor.

8.7.1.) Formula za izračunavanje rezultata

Stoga, formula glasi: Koncentracija stanica (stanica/mL) = (N (broj stanica) / Volumen uzorka (mL))* FlowCell faktor. FlowCell faktor se automatski izračunava pomoću softvera.
Prednost ove metode je što su detekcija i brojanje mikrofitoplanktona, iz uzoraka s terena, automatizirane. Klasifikacija stanica korištenjem FlowCAM softvera je najbolje iskorištena kod specifičnih vrsta fitoplanktona , koje imaju jedinstvene karakteristike stanice, kao što su veličina, oblik ili pak boja. Za primjer, rodovi *Dinophysis*, *Ceratium* i *Chaetoceros* imaju mnoge karakteristične morfološke značajke. FlowCAM se najbolje koristiti za istraživanje širokog raspona vrsta unutar jednog uzorka.
Može se koristiti i kao oružje za monitoring u istraživanjima obalnih područja, ili u laboratorijima za analiziranje određenog uzorka kada je to potrebno. Neke od prednosti ove metode su te što je količina manualnog rada potrebnog za procesuiranje samog uzorka znatno reducirana. Potrebno je samo uključiti softver i povremeno pratiti FlowCAM kada radi i vrši registriranje čestica.
FlowCAM bilježi digitalni zapis svake čestice ili stanice unutar posebnog raspona veličine (koju korisnik određuje) za daljnju analizu.
Podaci prikupljeni ovom tehnikom su pohranjeni i mogu se ponovno analizirati, ako je potrebno i ako se pojave neki problemi.
Još jedna od prednosti je što, softver omogućuje trenutačnu analizu slike svake četice i to do 30 različitih parametara na slici. Ti parametri odnose se na širinu čestice, dužinu, ekvivalentni sferični dijametar, fluorescenciju, i tako dalje.
FlowCAM je prenosiv što je također jedna od prednosti. K tome, omogućuje i vizualizaciju i otkrivanje širokog spektra veličina stanica ili čestica. Neki od nedostataka ove metode su ti da je potrebno postići najbolji mogući fokus, prilikom identifikacije stanice, jer će u suprotnome slike biti mutne i samim time analiza će biti otežana. A zbog toga što, ako ekosistem koji se analizira ima stanice različitog ranga veličine, najbolje bi bilo da se koriste dva FlowCAM-a na dva različita povećanja. Također, ponekad se javlja problem kada se radi o uzorcima koji su hladni, kao što su uzorci duboke vode koji se analiziraju na istraživačkim brodovima, jer dolazi do zgušnjavanja, što može otežati otkrivanje i uočavanje čestica. Rješenje ovog problema je da se mora dopustiti uzorku da prilagodi svoju temperaturu sobnoj temperaturi. Uzorak je potrebno fiksirati prije manipulacije. Da se izbjegnu greške kod velikih gustoća uzoraka, kao što je slučaj sa riječnim detritusom, potrebno je koristiti Auto Image Mode kako

bi se spriječile pogreške (kao primjer:čestice koje ne fluorescenciraju se bilježe kao fluorescencirajuće). I naravno, za izvođenje ove metode potrebna je osoba koja ima znanje potrebno za identifikaciju fitoplanktona.

8.8.) Detektiranje intaktnih stanica algi pomoću hibridizacije

Ribosomsi su organeli koji se nalaze u citoplazmi stanice. Sastoje se bjelančevina i rRNA. Imaju ulogu u prevođenju genetske upute koja dolazi u obliku glasničke RNA (mRNA) u polipeptidni lanac (npr. bjelančevinu). Na njima se odvija sinteza proteina koje grade aminokiseline koje dovode transportne ili tRNA. Kako nastaju po DNA, proteini su jedinstveni za svako živo biće. Ribosomi se sastoje od dvije podjedinice - velike i male.

Život bi bez ribosoma bio nemoguć. Veliki su dvadesetak nm. Neki su vezani za endoplazmatski retikulum (koji se zato zove "hrapavi" ili rER-rough endoplasmic reticulum) i sintetiziraju proteine koji se uglavnom ugrađuju u staničnu membranu, a neki slobodno plivaju u citoplazmi i sintetiziraju proteine koji odlaze izvan stanice.

Ribosomi su mjesta za sintezu proteina u svim stanicama. Sve stanice imaju uključene ribosome u svojoj građi, zbog toga što je sinteza proteina neprekidan i važan proces.

Dakle, svaki ribosom se sastoji od ribosomalnih RNA i pratećih proteina. RNA unutar proteina nabire se u oblik koji dopušta sintezu proteina, ali omogućuje i normalno funkcioniranje samog ribosoma. Ako se dogode mutacije, koje ugrožavaju namatanje molekule, molekula je onda nefunkcionalna. Unutrašnjost namotane RNA sadrži konzervirane sekvence. One se ne mijenjaju, a u slučaju ako se promjene, molekula se neće moći namatati pravilno.

Neke od varijabilnih regija vezane su za površinu RNA molekule. Prema tome, te regije mogu biti identificirane u rRNA, te će ih prepoznati svi članovi široke grupe kao što su carstva organizama ili mogu biti tako selektivne da ih prepoznaju samo grupe unutar vrste. Te kratke sekvence se koriste za razvijanje ispitivača za identifikaciju organizama na različitim taksonomskim nivoima.

Danas je moguće razviti te ispitivače za širok spektar kategorija. Kada su ti ispitivači spareni s fluorescentnim markerom, ciljani organizam se može lako identificirati.

8.8.1.) Fluorescensijskom In Situ hibridizacijom ili FISH

Ona omogućava brzu detekciju različitih vrsta. Ova tehnika je uspješno iskorištena za otkrivanje štetnih algi (Anderson 1995.) kao i razreda algi (Simon i sur.i 1997.). Osnovni principi ove metode (FISH) su algalne stanice hibridizirane sa fluorescentno (na primjer fluorokromom fluorescinom izotiocijanatom FITC) označenim oligonukleotidnim ispitivačem, koji se veže za komplementarnu sekvencu ribosomalne RNA na ribosomima. To rezultira time što je cijela stanica onda označena , upravo iz razloga što sadrži puno ribosoma.

Cijeli popis algalnih ispitivača se moje naći na webisteu: (htttp://www.sb-roscoff.fr/Phyto/PICODIV/). Na početku izvođenja ove metode, stanice su fiksirane pomoću fiksirane koji čini staničnu membranu propusnom za ulazak ispitivača u stanicu. Taj fluorescentno označeni ispitivač nalazi svoj put do ribosoma i veže se za regiju ribosomalne RNA s kojom je komplementaran, tvoreći dvostruku uzvojnicu. Kada se uzorak pregledava pod fluorescencijskim mikroskopom koristeći svjetlost odgovarajuće valne duljine, fluorokrom je pobuđen i stanica koja nam je od interesa može se lako vizualizirati. Samo otkrivanje mikroalgalne RNA FISH metodom je vrlo osjetljivo.

Volumen stanica koje je moguće opaziti ovisi o volumenu samog uzorka. A velike biomase mogu otežati traženje stanica. Što se tiče ispitivača, oni su dostupni samo za ograničeni broj vrsta. Osobe koje se bave ovom tehnikom trebaju imati dobru podlogu što se tiče znanja molekularne biologije. Sami ispitivači su dostupni samo za ograničeni broj vrsta.

8.8.2)Formule za izačunavanje rezultata:

Formula za izračunavanje stanica / L je = (broj stanica na filetru (N)) / (Volumen uzorka (mL)) *1000.

Ova metoda može poslužiti kao jednostavna, ali učinkovitna za analizu štetnih algalnih vrsta.

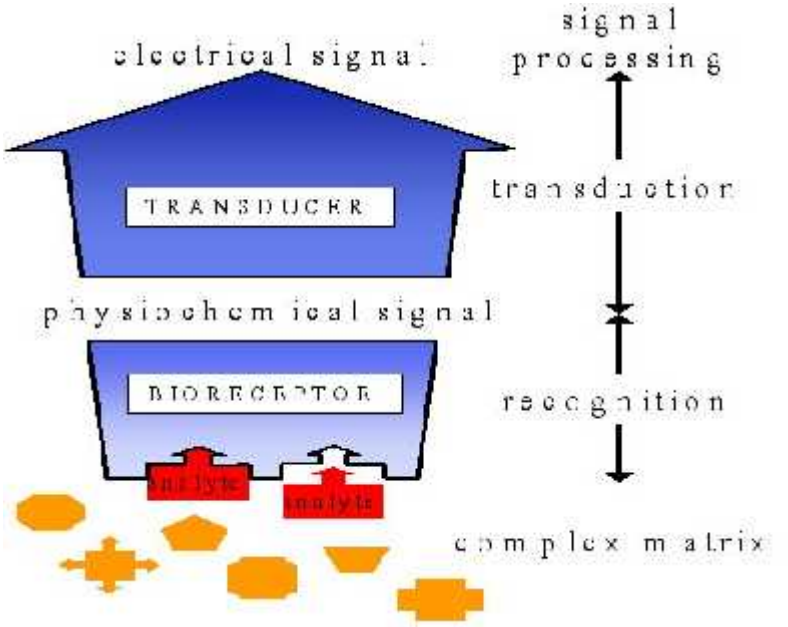
8.9.) Elektrokemijska detekcija toksičnih algi pomoću biosenzora

DNA biosenzori su uređaji koji koriste molekularne ispitivače za otkrivanje ciljanih nukleinskih kiselina u uzorku. Oni se koriste u raznim znanstvenim istraživanjima. Biosenzori su analitički uređaji (slika 13.) koji pretvaraju biološki odgovor u električni signal. Sastoje se od 3 dijela: biološkog elementa, mjernog osjetila i signalnog procesora. A da bi bio

uspješan , biosenzor mora biti visokospecifičan za potrebe analize, stabilan prilikom skladištenja i treba imati stabilnost trajanja. Kada se biosenzori koriste za invazivno nadziranje u kliničkoj dijagnostici mjerno osjetilo mora biti malo, biokompatibilno i netoksično. Trebao bi biti i malen, jeftin i prenosiv.

Postoje razne primjene biosenzora, a neke od njih su praćenje razine glukoze kod dijabetičara, zatim primjena u zaštiti okoliša, npr. detekcija pesticida i riječnih zagađenja, detekcija patogena,određivanje razine toksičnih tvari prije i nakon bioremedijacije. Otkrivanje i određivanje organofosfata, analitičko mjerenje folne kiseline, biotina, vitamina B12 i pantotenske kiseline kao alternativa mikrobiološkim metodama, detekcija ostataka lijekova u hrani, procjena biološke aktivnosti novih spojeva ili pak detekcija toksičnih metabolita, kao što su mikotoksini.Najrašireniji primjer komercijalne primjene biosenzora su biosenzori koji mjere razinu glukoze u krvi.

Biosenzori za fluoresentno obilježavanje koriste fluorokrom molekule za obilježavanje imunoglobulina u mikroorganizmima. Fluorokrom apsorbira svjetlost kratke valne duljine i onda emitira svjetlost više valne duljine koja se detektira fluorescentnom mikroskopijom. Koriste se za testiranje uzoraka hrane, analizu vode i detekciju bakterija. Koristi svojstvo mikroorganizama koji mogu prevesti svoje metaboličke redoks reakcije u mjerljive električne signale pomoću oksidoredukcijskih reakcija i odgovarajućih posrednika.



Slika 13. Shema biosenzora (izvor: http://emri.tums.ac.ir/pages/mainpage.asp?I=56914I032)

8.9.1) Osnovni principi elektrokemijske detekcije toksičnih algi pomoću biosenzora

Identifikacija toksičnih algi je temeljena na oligonukleotidnim ispitivačima koji specifićno ciljaju ribosomalnu RNA. Mete ispitivača su male i velike podjedinice ribosomalnih RNA gena u ribosomima stanice. Konzervirane i promjenljive regije u tim genima omogućuju razvijanje ispitivača specifičnih za različite taksonomske nivoe.

Prije same analize uzoraka sa terena , molekularni ispitivači se moraju testirati kako *in situ* tako i *in silico* (poradzumijeva kompjutersku simulaciju). Ispitivači za nukleinske kiseline su razvijeni za mikroalgalne skupine uključujuči dijatomeje i dinoflagelate.

8.9.2.) Formule za izračunavanje rezultata

Za svaku vrstu, se mora istražiti RNA koncentracija po stanici. Posljedično, koncentracija stanica ciljanih vrsta u uzorku vode može se izračunati preko elektrokemijskog signala : nA (signal ispitivača)= ukupni ng RNA (prisutan u uzroku) i zatim slijedi formula: broj stanica = nA(signal ispitivača)/ngRNA(po stanici).

Elektrokemijska detekcija je brza metoda za otkrivanje ciljanih algi u uzorku vode. Većina koraka prilikom izvođenja ove metode je automatizirana. Limitirajući faktor je jedino izolacija RNA , koju radi osoba koja radi ovu metodu. Razlog tomu je što je određena kvantiteta visoko kvalitetne RNA potrebna kako bi se uopće izvela kvalitetna analiza uzorka vode ovom metodom. Različiti ljudi će izolirati različito kvalitetnu RNA iz istog uzorka. Dobiveni intenziteti signala ne mogu se usporediti sa brojem stanica određenim korištenjem drugih tehnika prebrojavanja.

9.) Molekularne metode za analizu fitoplanktona

9.1.) Hibridizacija i detekcija fitoplanktona pomoću mikroniza i fluorescencije

Ova metoda predstavlja jednu od najvećih inovacija u području mikrobiologije. Metoda je specifična po tome što omogućava brzo prikupljanje podataka. Također ova metoda čini jedan od najnovijih eksperimentalnih pristupa u molekularnoj biologiji, koja omogućava analizu velikog broja uzoraka rabeći različite ispitivače.

Mikorniz se sastoji od DNA sekvenci koje se nanose na površinu staklaca koje ima posebna svojstva na površini (sadrži različite kemijske supstancije). DNA eksperiment mikroniza uključuje produkciju mikronizova, izolaciju i pripremu uzorka, hibridizaciju i analizu podataka. Prije same hibridizacije , ciljana nukleinska kiselina se označava s fluorescentom bojom, koja se može direktno ugraditi u nukleinsku kiselinu ili indirektno putem nekih drugih substanci. Uzorak hibridizacije se može zabilježiti putem fluorescentne eksitacije u posebnom uređaju , skeneru za mikronizove. Dakle, ova metoda predstavlja novost u pogledu identifikacije organizama u morskoj vodi. DNA mikronizovi, ili takozvani ”phylochipo”-vi su korišteni za identifikaciju fitoplanktona.

9.1.1.) Osnovni principi hibridizacije i detekcije fluorescentnog mikroniza

Hibridizacija se odnosi na povezivanje dva samostalna lanca nukleinskih kiselina koji sadrže komplementarne sekvence. Pri tom koristi osnovna fizičko-strukturalna svojstva molekule DNA. DNA ima strukturu dvostruke zavojnice, čije lance povezuju vodikove veze. Kada se DNA zagrije na temperaturu iznad 90°, lanci se kidaju i DNA se dijeli na dva samostalna lanca. Kada se temperatura ponovno spusti, lanci se ponovno mogu povezati. Komplementarne nukleinske kiseline (one koje su slične) mogu se lakše spojiti i čvršće povezati. Ispitivači za DNA mikronizove predstavljaju jedan lanac DNA te ako postoje komplementarne sekvence u pregledanom uzorku, oba lanca će hibridizirati skupa. Ta pojava se može otkriti stavljanjem fluorescentne oznake na jedan od dva lanca koji se vežu skupa. Ovaj eksperiment se može izvesti i s ribosomalnom RNA ili DNA. Korištenje PCR fragmenata prilikom ove metode nije poželjno, jer može dovesti do nekih odstupanja. Ova metoda se treba izvoditi u laboratoriju za molekularnu biologiju.

9.1.2.) Formula za izračunavanje rezultata

Koncentracija stanica (stanica/L) = (N(broj stanica na filteru)) / Volumen uzorka (mL))*1000. Primjena molekularnih metoda je povećala potencijal za istraživanje bioraznolikosti fitoplanktona u morskim okolišima.

Identifikacija fitoplanktona, osobito štetnih vrsta je važna s ekonomskog i ekološkog gledišta. Ova metoda je relativno pouzdana, jer je jako teško pomoću mikroskopa, bio on i elektronski odrediti o kojoj se vrsti radi. Jedina zamjerka ovoj metodi je što je ovisna o bazi podataka što se tiče DNA sekvenci, koje služe za izrađivanje ispitivača. Izrađivanje ne bi bilo moguće, bez

te banke. Procijenjeno je da baza podataka sekvenci ribosomalne RNA predstavlja samo jedan mali komadić bioraznolikosti prisutne u cijelom okolišu. Opseg ove metode, odnosno njen takozvani detekcijski limit ili domet ovisi o tome koliko je osjetljiv ispitivač. Također, na izvođenje metode utječe i vještina onog tko je izvodi.

10.) Zaključak

Tema ovog rada su dakle, bile molekularne i kvantitativne metode analize fitoplanktona. Dakako da metoda ima još puno, ali ove su nekako najprihvaćenije i možda najbolje. Odabir metoda ovisi prvenstveno o uzorku s kojim se radi, o znanju onoga koji radi određenu metodu, o potrebama istraživanja, ali također ovisi i o financijskim sredstvima. Svaka od navedenih tema ima svoje prednosti i nedostatke, ali je na onome koji se bavi analizama da procjeni onu koja će mu najbolje pomoći. Ove metode su sve više potrebnije, s obzirom na širenje zagađenja i sve veću potrebu za monitoringom našeg okoliša, prvenstveno voda, koje su najveće blago. A praćenjem malih sitnih bića u vodi, možemo dobiti puno odgovora na stanje u našem okolišu.

11.) Literatura

Anderson DM (1995) *Identification of harmful algal species using molecular probes: an emerging perspective*. In: Lassus P, Arzul Erard G, Gentien P, Marcaillou C, (eds) Harmful marine algal blooms. Lavoisier, Intercept Ltd, p. 3-13

Fournier RO (1978) *Membrane filtering*. In*: Sournia, A (ed) Phytoplankton manual. Monographs on oceanographic methodology 6*, Unesco, Paris, p. 108-112

Hallegraeff GM, Anderson, DM, Cembella AD (2004) *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Unesco Publishing, Paris. ISBN 92-3-103871-0

Karlson, B., Cusack, C. i Brensan, E., (2010) *Microscopic and molecular methods for qunatitative phytoplankton analysis*, Intergovermental Oceanographic Comission, Manuals and Guides Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55.) (IOC/2010/MG/55)

Hallegraeff *et. al.* (2004.), *The Manual on Harmful Marine Microalgae*, Intergovermental Oceanographic Comission, Manuals and Guides Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55.) (IOC/2010/MG/55)

Simon N, Brenner J, Edvardsen B, Medlin LK (1997) *The identification of Chrysochromulina and Prymnesium species (Haptophyta, Prymnesiophyceae) using fluorescent or chemiluminescent oligonucleotide probes: a means of improving studies on toxic algae*. Eur J Phycol 32:393-401

http://biology.berkeley.edu/crl/flow_cytometry_basic.html, 3.7.2012., 22:30

http://www.izor.hr/web/guest/fitoplankton, 3.7.2012.,22:19

http://hr.wikipedia.org/wiki/Cvjetanje_mora, 15.7, 10:15

http://hr.wikipedia.org/wiki/Ribosomi, 20.7.2012,11:43

http://www.google.hr/#hl=hr&sclient=psy-ab&q=+biosenzori&oq=+biosenzori&gs_l=serp.3..0l2j0i30l2.9400.9400.0.9607.1.1.0.0.0.0.119.119.0j1.1.0...0.0...1c.KFNsP2C_7vc&pbx=1&bav=on.2,or.r_gc.r_pw.r_qf.,cf.osb&fp=8637501faff44ccd&biw=1280&bih=869, 20.7.2012., 11:50

http://plankt.oxfordjournals.org/content/22/12/2255.full , 20.7.2012., 13:00

12.) Sažetak

Posljednjih 150 godina u laboratorijima diljem svijeta usavršavale su se i razvijale metode za analiziranje fitoplanktona. Per Teodor Cleve (1840-1905) , švedski kemičar, je bio jedan od prvih istraživača koji se prihvatio posla i počeo se baviti istraživanjem razvijanja metoda za kvantitativnu analizu fitoplanktona. On je koristio svilene mreže za plankton, kako bi istraživao raspodjelu fitoplanktona u Sjevernom moru. Hans Lohman (1863-1934) je prvi otkrio nanoplankton (fitoplankton u rasponu veličina od 2-20 µm). A klasičnu metodu za analiziranje uzoraka u sedimentacijskoj komorici je osmislio Utermöhl 1958. godine. Tokom 70-ih godina 20 stoljeća se počeo upotrebljavati fluorescencijski mikroskop, a ispočetka se koristio za kvantitativnu analizu bakterija u morskoj vodi. Tijekom 80-ih godina 20 stoljeća su se počele koristiti tehnike bojenja stanica i filtracije za istraživanje autotrofnog i heterotrofnog nanoplanktona. Dakle od izuma mikroskopa u 17. stoljeću pa do danas usavršene su i opisane brojne metode za analiziranje fitoplanktona. Opet, ponavljam, na onome koji ih izvodi je da na temelju svog znanja odredi koju metodu i kada će koristiti.

13.) Summary

Phytoplankton analysis is essential part in the process of understanding and predicting changes in our environment. There are plenty of new methods, several based on molecular biology, that make it possible to investigate and observe phytoplankton. Phytoplankton occupies the base of the food web of the sea. It plays a vital role in the global carbon cycle and is also of importance since some phytoplankton may cause harmful algal bloom that can do problems for aquaculture, for example. This work aim was to shortly describe a few phytoplankton analysis methods. Some of methods are missing, some are old and some need to be developed and tested.