

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

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

SEMINARSKI RAD

Barbara Dević
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.) PROTO NA CITOMETRIJA	8
7.) MOLEKULARNE 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 prebrojavanja u komorama 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.) Izvo enje metode.....	20
8.3.3.2.)Formula za izra unavanje 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 izra unavanje rezultata.....	22
8.4.2.) Razmatranje metode.....	23
8.5.) Filtriranje – polutransparentni filteri za kvantitativnu analizu	23
8.5.1.) Formula za izra unavanje rezultata.....	23
8.5.2.) Razmatranje metode.....	23
8.6.) Filter-transfer-freeze metoda za kvantitativnu analizu fitoplanktona (FlowCAM)	24
8.7.) Slikovna dijagnostika pomo u proto ne citometrije za kvantitativnu analizu fitoplanktona.....	25
8.7.1.) Formula za izra unavanje rezultata.....	27
8.8.) Detektiranje intaktnih stanica algi pomo u hibridizacije.....	29
8.8.1.) Fluorescencijska Hibridizacija In Situ ili FISH.....	29
8.8.2.) Formula za izra unavanje rezultata.....	30
8.9.) Elektrokemijska detekcija toksi nih algi pomo u biosenzora.....	30
8.9.1.) Osnovni principi elektrokemijske detekcije algi pomo u biosenzora.....	32
8.9.2.)Formule za izra unavanje rezultata.....	32
9.)Molekularne metode analize fitoplanktona.....	32
9.1.) Hibridizacija i detekcija fitoplanktona pomo u mikroniza i fluorescencije....	33
9.1.1.) Osnovni principi hibridizacije.....	33
9.1.2.) Formule za izra unavanje rezultata.....	33
10.) ZAKLJU AK.....	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 ograničanim mogućnostima kretanja te ovisno o gibanjima vodenih masa.

Fitoplankton obuhvaća jednostanične autotrofne i miksotrofne protiste te jednostanične cijanobakterije (modrozelenoalge). Fitoplanktonski organizmi su najbrojniji u osvjetljenoj, 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 kojima, 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.

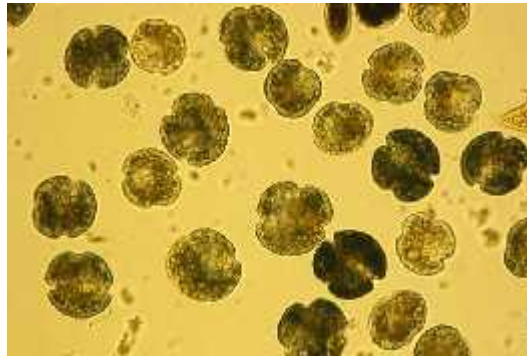
Cvjetanje fitoplanktona, koji svojim masovnim razmnožavanjem povećano troše kisik, može biti uzrok masovnom trovanju riba, ptica pa čak i ljudi, danas privlači sve više pažnju znanstvenika širom svijeta.

Uzročnici toksičnog cvjetanja najčešće su dijelom organizmi iz skupine dinoflagelata, manjim dijelom iz skupine diatomeja, te cijanobakterije (modrozelenoalge).

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

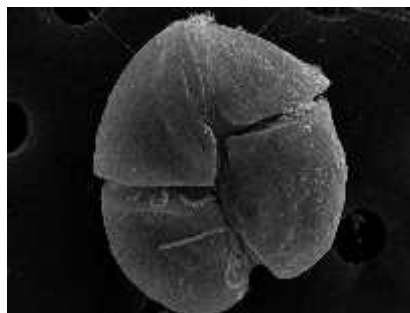
dostupnost svjetla i kao posljedica stabilizacije ekoloških parametara u stupcu vode. To se događa kao dio godišnjeg ciklusa.

Neka cvjetanja mogu imati negativan utjecaj 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, stvara velike probleme.



Slika 1. *Karenia mikimoto* (izvor:

<http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/portfolios/portfolio20020802/zooms/photoz01.jpg>)



Slika 2. *Karenia mikimoto* 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 obnoviti marinske okoliše.

International 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 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 i 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 i 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 pigmenta u fitoplanktonu, može se koristiti kao sredstvo za identifikaciju i enumeraciju vrsta. Ova je metoda najprimjerenija za

rad sa živim uzorcima i uzorcima o uvanim pomo u formaldehida ili glutaraldehida. Ako se za konzervaciju, koristi Lugolov jodin, prirodna fluorescencija ne e biti vidljiva.

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

Mikroskop mora biti, što je vrlo važno, opremljen odgovaraju im objektivima te treba imati i odgovaraju e 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

Razli ite boje se koriste za identifikaciju fitoplanktonskih vrsta. Jedna od boja koje u spomenuti je Calcofluor. Ona se veže za celulozne teke "oklopljenih" dinoflagelata i omogu ava detaljno pregledavanje stanica. Pregledavanje ovom vrstom boja korisno je za stanice koje su morfološki veoma nalik jedna drugoj. Fluorokromi se tako er esto koriste u kombinaciji s antitijelima ili RNA ciljanim ispitiva ima za identifikaciju fitoplanktona. Dakako, važno je za naglasiti da su neki objektivni nepodobni, jer ne propuštaju ultraljubi astu svjetlost i onemogu avaju 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 govore i, sve metode analize slika uzoraka fitoplanktona, zahtijevaju visoko specijaliziranog i obuenog stru njaka koji zna primijeniti odre enu vrstu softvera za samu analizu, ali i koji zna ocijeniti kvalitetu rezultata nastalih automatskom analizom i obradom slike.

6.) Proto na citometrija

Proto na citometrija je neka vrsta broja a estica, inicijalno razvijena za potrebe medicine. Autofluorescencija i neka druga raspršena svojstva se koriste za određivanje različitih vrsta. Različite vrste ne mogu 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 koriste i kamericu, daje slike pojedinačnih organizama. Automatizirane analize fotografija omogućavaju identifikaciju organizma.

Na svejedno, potreban je, opet naglašavam stručnjak, koji može 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 je 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 kvantifikacija 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 molekularne 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 genetici i 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 polietničke 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 GENE BANK koja služi za komparativnu analizu i dizajniranje oligonukleotidnih ispitivača i PCR polietnički. Unatoč opsežnim analizama sekvenci uzgojenih vrsta fitoplanktona, može se dogoditi unakrsna reakcija s drugim organizmima u prirodi, iz tog razloga je ključno da se testiraju razvijene polietničke i ciljane i neciljane vrste. Iako ti postupci oduzimaju puno vremena, to je esencijalno jer na kraju te metode trebaju biti primjenjive. 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 dugoročnu 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 mra no i hladno mjesto da se sprije i reakcija Lugolova jodina na svjetlu. Bocu je potrebno i dobro za epiti kako ne bi došlo do prolijevanja ili evaporacije uzorka. Preporu uje se da se boca napuni do 75-80% njezina volumena, što omogu ava bolju homogenizaciju uzorka prije stavljanja u sedimentacijsku komoricu (slika 4.). Tvari za fiksiranje uzorka, moraju se izabrati ovisno o objektu istraživanja unutar neke studije. Naj eš e korištena kemikalija je kalcijev jodid; Lugolova jodna otopina-kisela, neutralna ili bazi na. Ako se uzorci pohranjuju na dulje vrijeme, mogu se i konzervirati pomo u neutralnog formaldehida.

Sedimentacijske komorice se sastoje od dva dijela, gornjeg cilindra i donjeg tanjuri a s tankim staklom. Obi no su napravljene od pleksiglasa u volumenima od 2, 5, 10, 25 i 50 mL. Debljina staklene baze ne smije prije i preko 0,22 mm, jer bi u suprotnom to moglo utjecati na rezoluciju koja se može posti i odre enim 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.). Opti ka kvaliteta mikroskopa, naravno, je krucijalna za identifikaciju fitoplanktona. Fazni ili diferencijalno-interferencijski kontrast može biti od pomo i prilikom identifikacije ve ine fitoplanktona budu i da svjetlo polje može biti u prednosti prilikom identifikacije kokolitoforida.

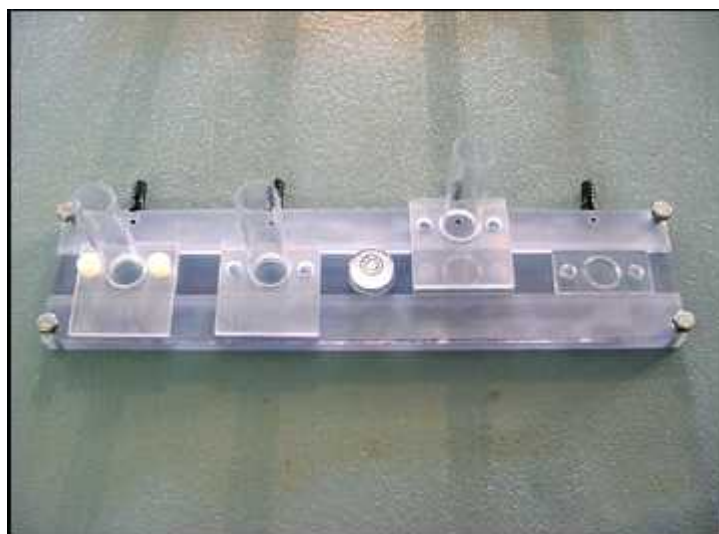
Epifluorescenijska oprema je u velikoj prednosti za brojanje i identifikaciju organizama s celuloznim stjenkama, kao što su na primjer: dinoflagelati, klorofiti i gljive. Kada se boja primjeni na uzorak to uzrokuje fluorescenciju celuloze. Jedan okular bi trebao biti opremljen kalibriranim okularnim mikrometrom. A drugi okular bi trebao biti opremljen s dvije paralelne linije koje formiraju neki transekt. Okular s mikrometrom mora biti kalibriran za svako pove anje. Mikroskop bi trebao imati objektivne 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 epifluorescenijskoj mikroskopiji trebale bi se koristiti odgovaraju e le e, a u svakom slu aju bilo bi dobro da je mehani ki stalak mobilan.



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

Što se tiče brojanja stanica, često se koriste medicinski brojači za krvne 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 iščupanje sedimentacijskih komorica. Za vrijeme sedimentacije uzorci bi trebali biti pohranjeni na povišenoj, horizontalnoj i vrstoj površini. To će spriječiti bilo kakvo neslučajno sedimentiranje stanica fitoplanktona.



Slika 4. Sedimentacijske komorice (izvor: <http://www.aquaticresearch.com/images/phyto51.jpg>)

8.1.1.) Priprema uzorka

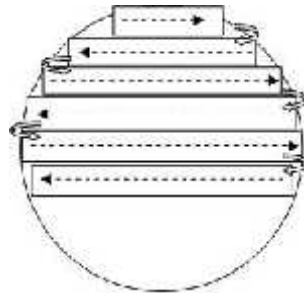
Preparacija uzorka: Nakon što smo sakupili uzorak i ulili ga u bocu za uzorke on se treba odmah konzervirati ili Lugolovom jodnom otopinom ili neutralnim formaldehidom. Prednost Lugolove jodne otopine je što ima trenutni efekt u smislu da poveća težinu organizama te time smanjuje vrijeme sedimentacije. No, ta kemikalija ima i nedostatak, naime ona uzrokuje obezbojenje nekih vrsta fitoplanktona i otežava identifikaciju. 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 forme 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 vrstnim 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 i 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 istavog 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

ve e mikroskopsko pove anje. Bitno je, radi primjerene usporedbe izme u uzoraka uvijek brojati specifi ne vrste pri istom pove anju.

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

Brojanje zapo inje pri najmanjem pove anju, koje se postupno mora pove avati. Prilikom rada s pikoplanktonom (0,2-2 μm) koristi se pove anje 1000X za koji moram naglasiti da nije pogodan za istraživati ovom metodom. Prilikom rada s nanoplanktonom (2-20 μm), koristi se pove anje 100-400X, a prilikom rada s mikroplanktonom (ve i 20 μm) pove anje 100X.



Slika 5. Prikaz popre nog pregledavanja komorice. (Izvor:

http://www.helcom.fi/groups/monas/CombineManual/AnnexesC/en_GB/annex6/)

Brojanje itave komorice se radi prelaženjem naprijed i nazad preko dna komorice (slika 5). Dakle pažljivo se broje odre eni trasekti, i pri tome se treba paziti na dijelove koji su ve izbrojani. Brojanje dna se može izvesti na razli ite na ine. Ako želimo analizirati pola dna komorice, mora se prebrojati svaki drugi transekt cijele komorice. Ako se analizira manji dio, onda se jedan, dva ili ak tri ili više dijametara trasekta analiziraju i broje. Nakon što se svaki transekt prebroji, komorica se rotira za oko 25-45 °C . Kako bismo zadržali statisti ki jasan rezultat kvantitativne analize bitno je da se broje odre ene jedinice. Koliko emo jedinica brojiti ovisi o tome koliko precizni želimo biti.

8.1.2.) Formula za izra unavanje broja stanica po litri

$$\text{Stanice/L} = N \cdot (A1/AC) \cdot (1000/V)$$

$$\text{Stanice/mL} = N \cdot (A1/AC) \cdot (1/V)$$

V= Volumen komorice za prebrojavanje (mL)

A1= itava 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 mjehuri i u boci. Za homogenizaciju, potrebno je uzorak nježno protresti, kako se ne bi stvorili mjehuri. 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 o istiti i prilagoditi na sobnu temperaturu. Nakon što je sve ovo u injeno, uzorci ili uzorak se pohranjuje na hladno i mra no mjesto.

Dakle kao što sam rekla prednost ove metode je što se ne može manipulirat uzorkom nakon što je jednom pohranjen i uzorkovan. Tako er, ova metoda omogu uje identifikaciju i kvantifikacijsku analizu pojedinih ili više vrsta. Tako er, 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 omogu ava da, pregledavanjem cijelog dna te prelaženjem popreko po širini i dužini boce, otkrijemo stanice bilo koje vrste ili tipa.

Nakon što su pojedina ne vrste prebrojane, moramo umnožiti naš rezultat pomo u faktora konverzije (F), kako bismo dobili gusto u stanica po jedini nom volumenu.

8.2.1.) Formula za izra unavanje rezultata

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

Generalna formula za dobivanje F vrijednosti je:

$$F = (\text{taložno podru je} / \text{analizirano podru je}) * (1000\text{mL} / \text{volumen uzorka}).$$

Vrijednost od F može varirati, ako brojimo pruge uzduž boce, a to ovisi i o uve anju le a 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, koriste i kalibriran mrežni uzorak na opti kom instrumentu, ovom slu aju mikroskopu, i to pri svakom pove anju. est problem u identifikaciji planktona i enumraciji istog je: arhiviranje pojedina nih uzroka za budu e reference, verifikaciju identiteta vrsta u drugim studijama.

8.2.2) Razmatranje metode

Prednost ove metode, kao što sam ve rekla, je minimiziranje manipuliranja uzorkom, jer manipulacijom uzorka pove ava se broj grešaka. Uzorci fiksirani formalinom mogu biti pohranjeni kao neošte eni 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 a 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. U usporedbi s drugim metodama, ova metoda je vrlo jeftina.

8.3.) Metoda prebrojavanja u 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 rđavih zajednica fitoplanktona uključuje i mogućnost proučavanja prisutnosti štetnih vrsta. No, opet naglašavam, za pravilnu i preciznu identifikaciju i dalje je potreba visoke stručne osobe.

8.3.1.) Sedgewick-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 elija (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 mra nom mjestu, kako bi se izbjegla direktna svjetlost, koja djeluje na Lugolova otopina joda koja se koristi kao fiksativ, i dakako uzorci moraju biti prilago eni 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 izra unavanje rezultata

Što se ti e formula za izra unavanje rezultata, Sedgewick-Rafterova komorica ima volumen 1 mL, s bazom podijeljenom na 1000 kvadrati a (50 redova puta 20 redova), a svaki predstavlja 1/1000 volumenakomorice. Na primjeru u pokazati kako se izra unava vrijednosti od F.

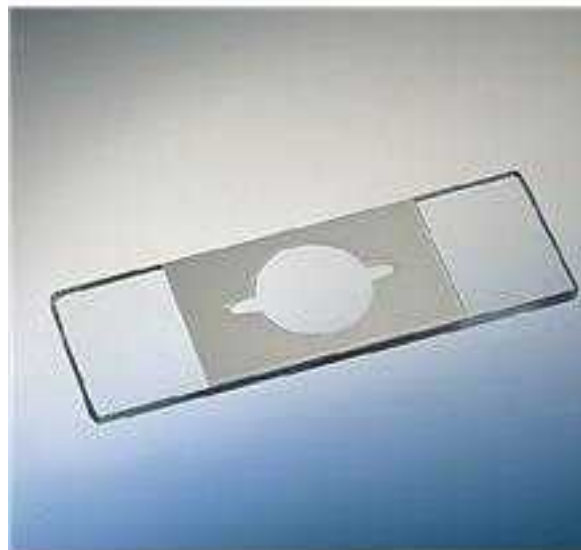
$F = 1000 / (\text{broj prebrojenih kvadrati } a) * 1000$, dakle ako imamo 4 niza, dakle 200 kvadrati a; F se izra unava prema formuli: $F = (1000/200) * 1000 = 5000$.

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 omogu iti brzu procjenu uzorka vode. Može omogu iti to ne rezultate izme u 10 000 do 100 000 stanica po litri. Metoda je bolje iskoristiva, ako se radi o uzorcima koji sadrže ve e 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 μ m 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 gusto om stanica ili pak za prekocentrirane uzorke. Ovom metodom mogu se analizirati uzorci koji sadrže od 10 do 10 000 stanica po litri. Za izvo enje 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 omogu uje brzu analizu uzorka.



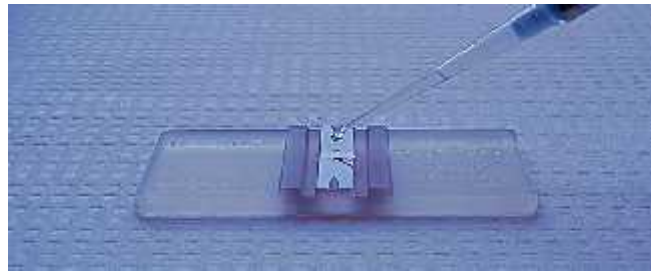
Slika 7.: Palmer- Maloney elijica (izvor:

<http://www.thomassci.com/resources/global/media/resized/00020/ihwx.85f95990-6fca-4ba7-88a9-dbecd7421129.218.218.jpg>)

8.3.3.) Hemocitometar metoda

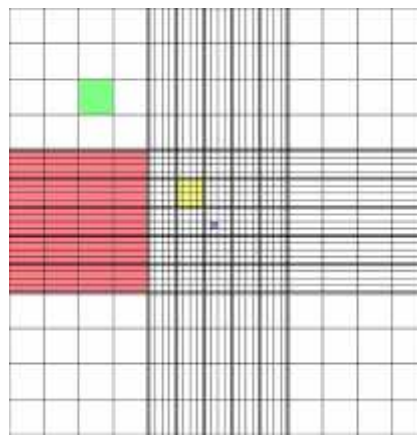
Ova metoda je pogodna za rad sa uzorcima koji sadrže ekstremno visoke koncentracije stanica iznimno malih organizama (manjih od 30nm). Hematocitometar (slika8.) je isprva dizajniran za brojenje krvnih stanica. Danas se koristi i za brojenje drugih vrsta stanica, kao što su na primjer stanice fitoplanktona. 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 to ne 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 u nešto reči 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 drže i pipetu pod kutom od 30° do 45° s otvorenim nastavkom za dijeljenje, te dozvoljavaju i pipeti da dotakne žlijeb te se potom sporo ispušta kap tekućine. Kapilarna aktivnost će djelovati na navedenu i da se ista 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 Thronsen 2004). Svaka strana hemocitometra ima mrežu s 9 kvadrata veličine 1 mm² 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 oprati 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 prosječnu broj stanicu 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 prosječna 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 ne možemo i 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 kona ni volumen B. A druga metoda uklju uje filtriranje uzorka kroz mrežicu okaca promjera od 10 do 20 μm . Koncentracijski faktor (CF) se ra una kao A (po etni volumen) kroz B (kona ni 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 toksi nim vrstama. Ova metoda, je bazirana na kvantitativnoj epifluorescencijskoj tehnici koja koristi kao boju Calcoflour White M2R. To je specifi na boja koja je vrlo korisna za kvalitativnu i kvantitativnu analizu tekatnih dinoflagelata, zato jer boji celulozu u tekatnim plo ama dinoflagelata, a istovremeno ne boji druge organizme i detritus. Korištenjem ove metode mogu e je analizirati uzorke od 10 do 500 mL.

Procedura brojanja i izra unavanja koncentracije se može raditi pod mikroskopskim pove anjem 100X. U inkovitost ove boje mora se procijeniti na na in da se utvrdi da tekatni dinoflagelati svijetle plavo na tamnoj pozadini (slika 10.).



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

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

8.4.1.) Formula za izra unavanje 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 izra una koncentracije različitih vrsta, mora se znati: V (volumen uzorka koncentriranog na filteru), B_a (površina filtera), B_c (prebrojena površina na filteru), N (broj stanica vrste od interesa koje su prebrojane).

Prema tome (koncentracijski faktor) $CF = B_a/B_c$, 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 tečajnih dinoflagelata u prisutstvu visoke pelagijske biomase. Moguće je identificirati tečajne dinoflagelate do najnižih taksonomskih kategorija zbog lakog prepoznavanja tečajnih plova 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 pigmenta mijenjanjem filterskih setova.

8.5.) Filtriranje – polutransparentni filteri za kvantitativnu analizu fitoplanktona

Fitoplanktonske vrste, kao što su dinoflagelati, često su prisutne u niskim koncentracijama u stupcu vode. Prema tome, uzorci moraju prvo biti koncentrirani kako bismo to mogli kvantificirati 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 izra unavanje rezultata

Za izra unavanje koncentracije stanica različitih vrsta mora se znati, kao i u prethodnoj metodi: V (volumen uzorka koncentriranog na filteru u mL), B_a (površina filtera), B_c (prebrojeni dio filtera), N (broj prebrojenih stanica vrste od interesa). Koncentracijski faktor CF računa se prema formuli: $CF = B_a / B_c$, 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 filtrirane tekućine ovisno o ciljanim vrstama, odnosno o vrstama koje želimo analizirati. Detekcijska granica, može se poboljšati povećanjem filtriranog 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 oistiti aparatura za filtraciju, mora se paziti 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 protokne citometrije za kvantitativnu analizu fitoplanktona

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

Klasične metode za brojanje mogu biti spore i iscrpljujuće. FlowCAM metoda bilježi digitalne fotografije stanica u toku nekog fluida koriste i pritom lasersku svjetlost za detekciju, omogućavaju i 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 prikazivati, a mogu se i naknadno obradivati koriste i 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 FlowCAM-a (svojevrsni slikovno

dijagnosti ki proto ni citometar) koji mora biti opremljen sa plavim ili zelenim laserom za detekciju fluorescencije ili estica. Instrument bi trebao biti spojen i na objektiv (4X ili 10X) ovisno o veli ini stanica koje e biti kvantificirane i vizualizirane. Ova metoda je originalno razvijena za detekciju i kvantifikaciju, i idealna je za analizu uzoraka sa terena koji sadrže specifi ne grupe ili vrste mikroplanktona, koje se obi no broje tradicionalnim tehnikama brojanja. FlowCAM uklju uje i ra unalo te naravno laser, koji se prije po etka rada treba uklju iti i pustiti da se zagrije oko 20 minuta. Kako se laser zagrijava, može se uklju iti i softver. FlowCAM se mora propisno fokusirati, kao da se radi o mikroskopu kako bismo dobili dobru vizualizaciju. Obi no proces namještanja i uštivanja ure aja traje od 20-40 minuta. Nakon što su sve postavke za detekciju mikroplanktona fiksirane, one ne smiju biti mijenjane izme u uzoraka, a jedino se mogu mijenjati ako se ekosistem ili pozadina unutar uzorka mijenjaju.



Slika 11.: FlowCAM

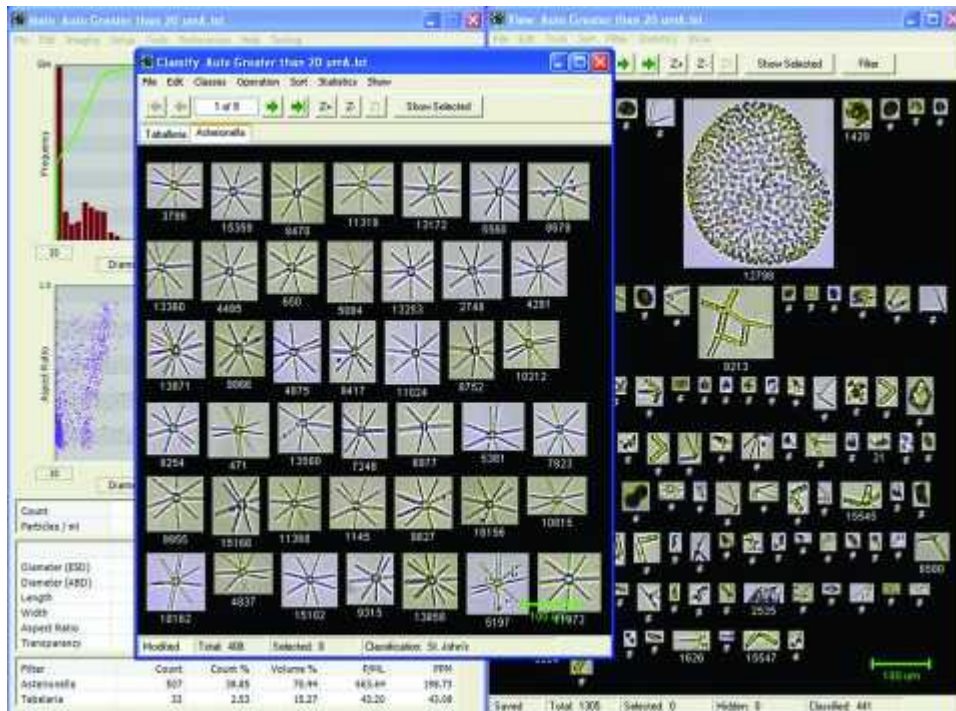
(izvor: <http://photos.labwrench.com/equipmentPhotos/9000/9572-7201.jpg>)

Za analizu i brojanje mikroplanktona u uzorcima koriste se obi no objektivni 4X,10X ili 20X u kombinaciji sa odgovaraju om Flow Cell. Flow Cell je pravokutna staklena cijev koja može varirati u veli ini ovisno o tome koji se objektiv koristi. Silikonska tuba je pri vrš ena 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 na in da se kao prvo svaki sakupljeni uzorak mora dobro promiješati kako bi se resuspendirale one estice koje su se slegle.

Koriste i obilježeni cilindar, unaprijed odredeni volumen nekog uzorka se stavlja u vrh pipete. Zatim se namjesti softver FlowCAM-a ime može započeti analiza i prikupljanje podataka. Pokreće se i peristaltička pumpa, netom što je započelo prikupljanje podataka. Vršiti se i analiza fluorescencije fitoplanktona pomoću lasera koji se usklađeni i namješteni 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. Koncentracija stanica svake grupe je određena jednadžbom koja sadrži broj stanica, analizirani volumen i FlowCell faktor.

8.7.1.) Formula za izra unavanje rezultata

Stoga, formula glasi: Koncentracija stanica (stanica/mL) = (N (broj stanica) / Volumen uzorka (mL))* FlowCell faktor. FlowCell faktor se automatski izra unava pomo u 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 specifi nih vrsta fitoplanktona , koje imaju jedinstvene karakteristike stanice, kao što su veli ina, oblik ili pak boja. Za primjer, rodovi *Dinophysis*, *Ceratium* i *Chaetoceros* imaju mnoge karakteristi ne morfološke zna ajke. FlowCAM se najbolje koristiti za istraživanje širokog raspona vrsta unutar jednog uzorka.

Može se koristiti i kao oružje za monitoring u istraživanjima obalnih podru ja, ili u laboratorijima za analiziranje odre enog uzorka kada je to potrebno. Neke od prednosti ove metode su te što je koli ina manualnog rada potrebnog za procesuiranje samog uzorka znatno reducirana. Potrebno je samo uklju iti softver i povremeno pratiti FlowCAM kada radi i vrši registriranje estica.

FlowCAM bilježi digitalni zapis svake estice ili stanice unutar posebnog raspona veli ine (koju korisnik odre uje) 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 omogu uje trenutna nu analizu slike svake etice i to do 30 razli itih parametara na slici. Ti parametri odnose se na širinu estice, dužinu, ekvivalentni sferi ni dijametar, fluorescenciju, i tako dalje.

FlowCAM je prenosiv što je tako er jedna od prednosti. K tome, omogu uje i vizualizaciju i otkrivanje širokog spektra veli ina stanica ili estica. Neki od nedostataka ove metode su ti da je potrebno postiti i najbolji mogu i fokus, prilikom identifikacije stanice, jer e u suprotnome slike biti mutne i samim time analiza e biti otežana. A zbog toga što, ako ekosistem koji se analizira ima stanice razli itog ranga veli ine, najbolje bi bilo da se koriste dva FlowCAM-a na dva razli ita pove anja. Tako er, ponekad se javlja problem kada se radi o uzorcima koji su hladni, kao što su uzorci duboke vode koji se analiziraju na istraživa kim brodovima, jer dolazi do zgušnjavanja, što može otežati otkrivanje i uo avanje estica. 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 gusto a uzoraka, kao što je slu aj sa rije nim detritusom, potrebno je koristiti Auto Image Mode kako

bi se sprije ile pogreške (kao primjer: estice koje ne fluorescenciraju se bilježe kao fluorescenciraju e). I naravno, za izvo enje ove metode potrebna je osoba koja ima znanje potrebno za identifikaciju fitoplanktona.

8.8.) Detektiranje intaktnih stanica algi pomo u hibridizacije

Ribosomi su organeli koji se nalaze u citoplazmi stanice. Sastoje se bjelan evina i rRNA. Imaju ulogu u prevo enju genetske upute koja dolazi u obliku glasni ke RNA (mRNA) u polipeptidni lanac (npr. bjelan evinu). Na njima se odvija sinteza proteina koje grade aminokiseline koje dovode transportne ili tRNA. Kako nastaju po DNA, proteini su jedinstveni za svako živo bi e. Ribosomi se sastoje od dvije podjedinice - velike i male.

Život bi bez ribosoma bio nemogu . 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 ugra uju u stani nu 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 uklju ene ribosome u svojoj gra i, zbog toga što je sinteza proteina neprekidan i važan proces.

Dakle, svaki ribosom se sastoji od ribosomalnih RNA i prate ih proteina. RNA unutar proteina nabire se u oblik koji dopušta sintezu proteina, ali omogu uje 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 slu aju ako se promjene, molekula se ne e mo i namatati pravilno.

Neke od varijabilnih regija vezane su za površinu RNA molekule. Prema tome, te regije mogu biti identificirane u rRNA, te e ih prepoznati svi lanovi 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 ispitiva a za identifikaciju organizama na razli itim taksonomskim nivoima.

Danas je mogu e razviti te ispitiva e za širok spektar kategorija. Kada su ti ispitiva i spareni s fluorescentnim markerom, ciljani organizam se može lako identificirati.

8.8.1.) Fluorescencijskom 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. 1997.). Osnovni principi ove metode (FISH) su algalne stanice hibridizirane sa fluorescentno (na primjer fluorokromom fluoresceinom izotiocijanatom FITC) označenim oligonukleotidnim ispitivima, koji se veže za komplementarnu sekvencu ribosomalne RNA na ribosomima. To rezultira time što je cijela stanica označena, upravo iz razloga što sadrži puno ribosoma.

Cijeli popis algalnih ispitivima se može naći na webisteu: (<http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/PICODIV/>). Na početku izvođenja ove metode, stanice su fiksirane pomoću fiksirane kojih stanična membrana propusnom za ulazak ispitivima u stanicu. Taj fluorescentno označeni ispitivima nalazi svoj put do ribosoma i veže se za regiju ribosomalne RNA s kojom je komplementaran, tvoreći dvostruku uzvojnica. Kada se uzorak pregledava pod fluorescencijskim mikroskopom koriste i 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 ispitivima, 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 ispitivima su dostupni samo za ograničeni broj vrsta.

8.8.2) Formule za izračunavanje rezultata:

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

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

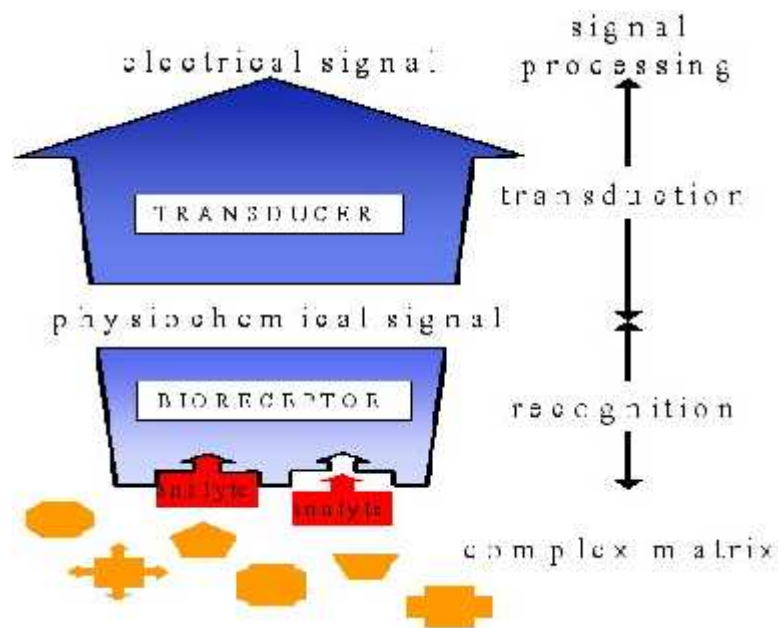
8.9.) Elektrokemijska detekcija toksinih algi pomoću biosenzora

DNA biosenzori su uređaji koji koriste molekularne ispitivima 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 fluorescentno 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. Koriste svojstvo mikroorganizama koji mogu prevesti svoje metabolite u 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 toksinih algi pomoću biosenzora

Identifikacija toksinih algi je temeljena na oligonukleotidnim ispitivima koji specifično ciljaju ribosomalnu RNA. Metode ispitivanja su male i velike podjedinice ribosomalnih RNA gena u ribosomima stanice. Konzervirane i promjenljive regije u tim genima omogućuju razvijanje ispitivanja specifičnih za različite taksonomske nivoe.

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

8.9.2.) Formule za izračunavanje rezultata

Za svaku vrstu, se mora istražiti RNA koncentracija po stanici. Posljedice, koncentracija stanica ciljanih vrsta u uzorku vode može se izračunati preko elektrokemijskog signala: nA (signal ispitivika) = ukupni ng RNA (prisutan u uzorku) i zatim slijedi formula: broj stanica = nA (signal ispitivika) / 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 ne mogu 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 predstavlja jedan od najnovijih eksperimentalnih pristupa u molekularnoj biologiji, koja omogućava analizu velikog broja uzoraka različitim ispitivim.

Mikronizacija se sastoji od DNA sekvenci koje se nanose na površinu staklaca koje ima posebna svojstva na površini (sadrži različite kemijske supstancije). DNA eksperiment mikronizacije uključuje produkciju mikronizovane, izolaciju i pripremu uzorka, hibridizaciju i analizu podataka. Prije same hibridizacije, ciljane nukleinske kiseline se označavaju s fluorescentnom bojom, koja se može direktno ugraditi u nukleinsku kiselinu ili indirektno putem nekih drugih supstanci. Uzorak hibridizacije se može zabilježiti putem fluorescentne ekscitacije u posebnoj uređaju, skeneru za mikronizove. Dakle, ova metoda predstavlja novost u pogledu identifikacije organizama u morskoj vodi. DNA mikronizovi, ili takozvani "phylochip"-ovi 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 vršiti i 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 izračunavanje ispitivaca. Izračunavanje ne bi bilo moguće, bez

te banke. Procijenjeno je da baza podataka sekvenci ribosomalne RNA predstavlja samo jedan mali komadi bioraznolikosti prisutne u cijelom okolišu. Opseg ove metode, odnosno njen takozvani detekcijski limit ili domet ovisi o tome koliko je osjetljiv ispitiva . Tako er, na izvo enje metode utje e 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 najprihva enije i možda najbolje. Odabir metoda ovisi prvenstveno o uzorku s kojim se radi, o znanju onoga koji radi odre enu metodu, o potrebama istraživanja, ali tako er 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 e mu najbolje pomo i. Ove metode su sve više potrebnije, s obzirom na širenje zaga enja i sve ve u potrebu za monitoringom našeg okoliša, prvenstveno voda, koje su najve e blago. A pra enjem malih sitnih bi a 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*, Intergovernmental 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*, Intergovernmental Oceanographic Commission, 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&scient=psy-ab&q=+biosenzori&oq=+biosenzori&gs_l=serp.3..012j0i3012.9400.9400.0.9607.1.1.0.0.0.119.119.0j1.1.0..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 kemi ar, je bio jedan od prvih istraživa a koji se prihvatio posla i po eo 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 veli ina od 2-20 μ m). A klasi nu metodu za analiziranje uzoraka u sedimentacijskoj komorici je osmislio Utermöhl 1958. godine. Tokom 70-ih godina 20 stolje a se po eo upotrebljavati fluorescencijski mikroskop, a ispo etka se koristio za kvantitativnu analizu bakterija u morskoj vodi. Tijekom 80-ih godina 20 stolje a su se po ele koristiti tehnike bojenja stanica i filtracije za istraživanje autotrofnog i heterotrofnog nanoplanktona. Dakle od izuma mikroskopa u 17. stolje u 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 e 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.

