

Metode de colectare și păstrare a probelor de fitoplancton

Modul de colectare a probelor de fitoplancton iar ulterior de prelucrare și păstrare a acestora, reprezintă o sarcină nu tocmai ușoară pentru cercetători ca urmare a caracteristicilor foarte variate ale organismelor ce îl formează, pe de o parte din punct de vedere a dimensiunii (începând de la sub 1 μm) iar pe de alta parte datorită compoziției lor biochimice diferite.

Puncte de prelevare și frecvența de colectare

Pentru prelevarea probelor de fitoplancton din apele marine din apropierea țărmului (pe timpul staționării navei), ar trebui ținut cont de următoarele aspecte:

- punctele de prelevare trebuiesc fixate la o distanță rezonabilă față de țărm, pentru a elimina posibilitatea contaminării probelor cu perifiton;
- algele planctonice se dezvoltă în zona eufotică (zona în care cantitatea de lumină pătrunsă este suficientă pentru a permite fotosinteza), zonă a cărei adâncime maximă variază în funcție de bazinul de apă;
- se recomandă folosirea discului Secchi, pentru a estima adâncimea maximă a zonei eufotice în locația aleasă (în general se admite ca adâncimea până la care se întinde zona eufotică este de 2-2,5 ori adâncimea măsurată cu discul Secchi);
- există o serie de alge planctonice mobile (flagelate) care își pot schimba poziția de-a lungul coloanei de apă;
- pe de altă parte, alge precum unele Cyanobacterii planctonice se pot acumula la suprafața apei, pe când altele se pot concentra la diferite adâncimi (ex. *Anabena*);
- deși cel mai adesea populațiile fitoplanctonice sunt relativ omogene în coloana de apă, se recomandă totuși recoltarea mai multor probe (3 până la 5) de la diferite adâncimi și apoi amestecarea lor pentru obținerea unor probe omogene de la punctul de prelevare respectiv.

Frecvența de colectare depinde de rata de creștere a organismelor luate în studiu. În general se recomandă o frecvență săptămânală pentru prelevarea de probe de fitoplancton. În acest mod se pot detecta schimbările rapide atât în ceea ce privește compoziția specifică cât și abundența (ritmul de apariție a generațiilor de alge situându-se între mai puțin de 24 de ore până la câteva zile).

În perioadele reci ale anului sau în masele de apă cu temperaturi scăzute, frecvența de prelevare a probelor poate fi mai redusă, ca urmare a faptului că algele pot avea o rată de creștere și de înmulțire mai scăzută.

Un alt aspect de care trebuie să se țină cont este legat de momentul zilei în care se face prelevarea, deoarece există o serie de componente ale fitoplanctonului care realizează deplasări pe verticală în masa apei, astfel încât, se pot găsi la suprafață în anumite momente ale zilei (în funcție de perioadele mai însorite sau când suprafața de apă este afectată de vânt), deplasându-se în profunzime ulterior.

Modalități de colectare

Probele **calitative** de fitoplancton se colectează cu ajutorul fileelor fitoplanctonice –există diferite tipuri de astfel de filee, la care poate varia: dimensiunea (diametrul, lungimea), materialul din care sunt confecționate, dimensiunea ochiurilor, etc.

Probele **cantitative** de fitoplancton se colectează prin prelevarea unui volum precis de apă din stațiile și adâncimile stabilite.

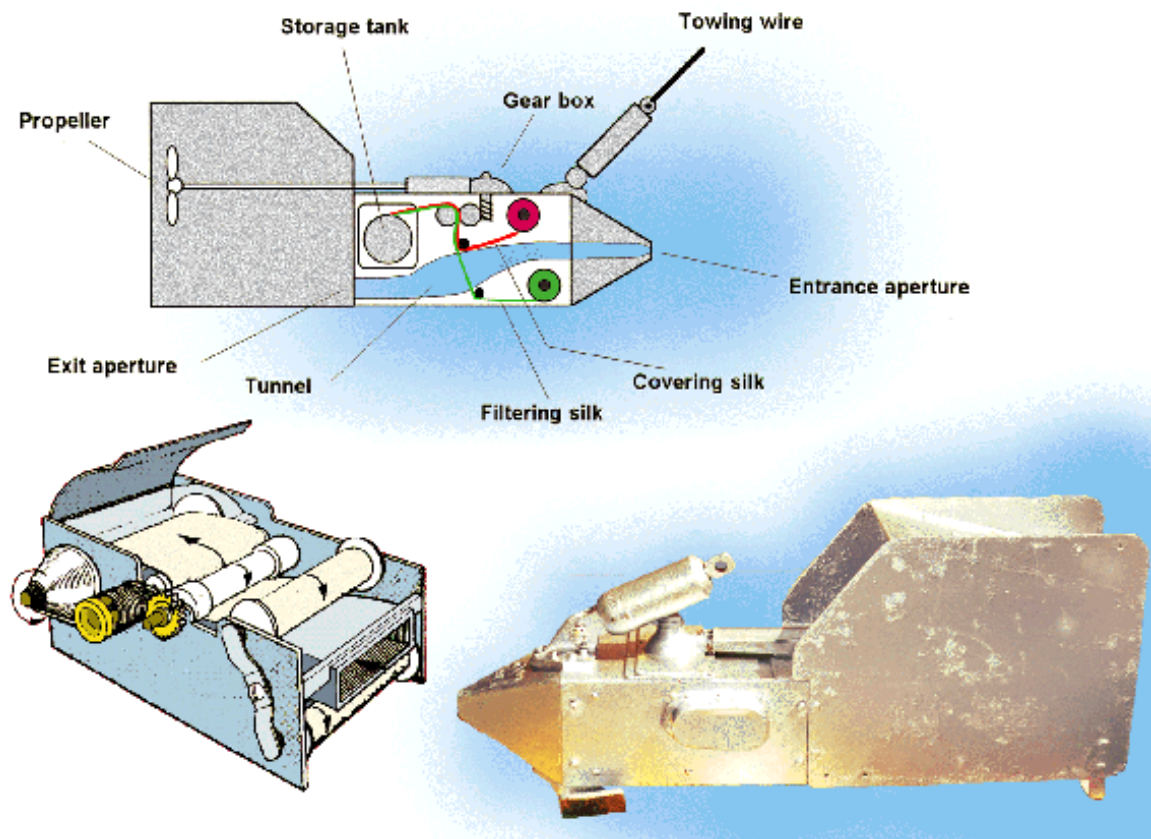
Nu este recomandabilă prelevarea exclusivă a unor probe numai cu ajutorul fileului (căci o parte din algele de dimensiuni foarte mici pot scăpa prin ochiurile fileului).

Pentru colectare se folosesc diferite dispozitive (numite de obicei “batometre”), cu care se poate lua apă de la orice adâncime dorită.

OBS. Consultând materialul indicat – *Australian Antarctic Magazine*, issue 13 – referitor la metoda și echipamentul de colectare **Continuous Plankton Recorder**, consider că este un dispozitiv potrivit și adaptat colectării de probe de fitoplancton în timpul expediției, în timpul deplasării navei.

Acest dispozitiv poate fi remorcat de diferite tipuri de nave și preia probe de la aproximativ 10 metri adâncime. Este folosit începând din anul 2007 în studii de monitorizare în mările și oceanele lumii (Marea Mediterană, Baltică, Oceanul Atlantic, Oceanul Pacific), dar și bazine de apă dulce (lacuri).

Apa (împreună cu planctonul) trece prin acest dispozitiv, care are un sistem de filtrare mobil; iar în final plasele (filtrele) cu planctonul fixat trec într-un vas (tanc) colector ce conține **formalină**. De aici sunt scoase pentru studiul în laborator (calitativ și cantitativ).



Secțiune prin CPR (desen) și o imagine (fotografie) a dispozitivului (http://en.wikipedia.org/wiki/Continuous_Plankton_Recorder)

Fixarea probelor

În funcție de obiectivele studiului, probele se pot analiza imediat, dar cel mai adesea, ca și în cazul altor probe de material algal, probele de apă destinate analizei fitoplanctonului trebuie fixate imediat după colectare, pe teren, pentru a evita degradarea celulelor sau coloniilor de alge din probă. Metodele și soluțiile folosite trebuie alese în așa fel încât organismele vii să fie omorâte cât mai rapid, pentru a se păstra toate caracteristicile lor (asemănător cu aspectul și particularitățile lor în stare vie).

Pentru fixare se pot folosi o serie de soluții, fiecare cu avantajele și dezavantajele lor.

a) **soluție Lugol** (1:100) – adăugarea acestei soluții va imprima probei o culoare gălbui/maroniu deschis. Folosirea acestei soluții asigură păstrarea probelor timp de mai mulți ani, dacă sunt depozitate corect și verificate periodic pentru completare cu soluția de conservare.

Prepararea soluției: 20 g KI +200 ml apă distilată, la care se adaugă 10 grame de iod pur. Se adaugă acid acetic glacial, cu câteva zile înainte de utilizare. Soluția se păstrează în spații întunecoase și bine ventilate, în recipiente de sticlă, cel puțin un an.

Un avantaj al folosirii acestei soluții este că determină sedimentarea pe fundul recipientului care conține proba, a tuturor organismelor algale (deoarece determină creșterea greutății lor specifice), inclusiv a coloniilor de cianoficee care, datorită prezenței unor vacuole gazoase în celule manifestă în mod obișnuit o flotabilitate pozitivă. Alt avantaj este acela că algele flagelate își mențin flagelii. De asemenea grupe importante ca: Diatomeele de dimensiuni mai mari, Cryptomonadalele, Peridineele, algele verzi de tip cocoid, Desmidiaceele, precum și marea majoritate a Cyanobacteriilor, nu sunt afectate de această soluție. Pot fi afectate Diatomeele de talie mică ce au teci silicioase mai delicate precum și Mallomonadele (din grupul Chrysophyta). Probele conservate în acest mod trebuie păstrate la întuneric, în sticle bine închise, care trebuie verificate (anual) pentru completarea soluției de fixare.

b) **soluție de formaldehidă acidificată cu acid acetic** – ceea ce asigură păstrarea probelor timp de mai mulți ani.

Prepararea soluției de formaldehidă 20% - se amestecă părți egale de formalină 40% și acid acetic concentrat. Pentru fixarea probei se adaugă 2 ml de formaldehidă acidificată la 100 ml probă.

Este recomandată pentru păstrarea algelor verzi (Chlorophyta), algelor albastre (Cyanobacteria) și Dinoflagelatelor, deoarece celulele și păstrează culoarea. Printre dezavantajele metodei se numără faptul că celulele nude (de exemplu ale multor flagelate) își modifică forma iar flagelii sunt distruși.

c) **soluție de glutaraldehidă** (concentrație 1% -2%) – și în acest caz păstrarea probeleor este posibilă timp de mai mulți ani.

OBS. Aceste ultimele două soluții menționate sunt foarte toxice pentru om, de aceea trebuie luate măsuri foarte stricte de depozitare și manipulare (în spații special destinate acestui scop; manipularea probelor cu mănuși de protecție, etc).

d) **soluție Boiun** – preparată din acid acetic 5%, formaldehidă 9% și acid picric 0,9%. Deși este un excelent fixativ pentru păstrarea structurilor delicate, este deosebit de periculos (inflamabil, exploziv) și dăunător pentru om –posibil cancerigen.

e) **alcool etilic absolut** – soluții 25%, 50% sau 70%.

Prepararea probei – cu alcool etilic absolut 70% - se introduce proba într-o sticlă, în așa fel încât să fie umplută cel puțin o pătrime, se marchează la exteriorul sticlei nivelul, și se adaugă alcoolul în raport de 1 parte probă: 3 părți alcool. Se pot face soluții de 25% respectiv 50%, în mod asemănător, respectând proporțiile.

Probele conservate cu alcool 70% se pot păstra la întuneric și în locuri uscate pentru perioade lungi de timp (câteva luni) sau la rece (frigider) pentru perioade mai îndelungate.

Dezavantaje: este un lichid foarte inflamabil, fiind interzis transportul cu avionul, iar pentru alt mod de transportare există diferite reglementări în funcție de țară.

Probele proaspete, nefixate, pentru analiza imediată, în laborator, pot fi ținute la rece (dar nu congelate), la întuneric, nu mai mult de 12 ore de la recoltare.

Prelucrarea în laborator

În laborator probele trebuie lăsate în repaus cca 14 zile, timp suficient pentru sedimentarea tuturor algelor pe fundul sticlei în care a fost adusă proba. Se procedează apoi la sifonarea supernatantului, pentru a se obține o concentrare a materialului algal într-un volum mai mic de apă.

După determinarea acestui raport de concentrare, se trece la analiza cantitativă și calitativă a probei, determinându-se:

- compoziția acesteia;
- densitatea numerică pe specii și totală;
- biomasa pe specii și totală.

Analiza rezultatelor

Ulterior, se trece la analiza și interpretarea rezultatelor, prin compararea situației la diferite stații de prelevare, la diferite orizonturi de eșantionare sau, după caz, la compararea rezultatelor obținute într-o serie de timp, la bazine diferite etc.

Totodată în funcție de obiectivele programului de monitorizare, se pot calcula/compara anumiți indici structurali, precum

- frecvența,
- abundența,
- diversitatea,
- indici de similaritate în cazul studiilor comparative la mai multe ecosisteme, etc.

Plecând de la valorile biomasei fitoplanctonului, se determină indicele de troficitate, respectiv starea de trofie a apei din bazinul monitorizat.

Nu în ultimul rând, analizând compoziția fitoplanctonului, se pot evidenția speciile cu valoare de bioindicatori, stabilind starea de saprobitate a apei respective.