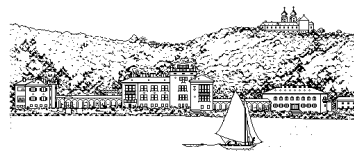


Ecology of Lake Balaton/ A Balaton ökológiája

MTA ÖK BLI Elektronikus folyóirata
2017. 4: 34-41.



A FITOPLANKTON CITOMETRIAI DIVERZITÁSÁNAK VÁLTOZÁSA A BALATONBAN

Pálffy Károly*, Somogyi Boglárka, Vörös Lajos

MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet, 8237 Tihany,
Klebelsberg Kuno u. 3.

*palfy.karoly@okologia.mta.hu

Kulcsszavak: fitoplankton, áramlási citometria, autotróf pikoplankton, pigment dominancia, szezonális mintázat

Kivonat: A planktonikus közösségek ökológiai kutatása során napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek összetételük dinamikus természetének minél részletesebb feltérképezésére. Ez többek között a mintavételek, következőképp a begyűjtött mintákkal kapcsolatos vizsgálatok időbeli felbontásának növelését is szükségessé teszi. Ennek köszönhetően az összetételben végbemenő változások nyomon követésére a mikroszkópos technika mellett az áramlási citometria is egyre szélesebb körben kerül alkalmazásra. A citométereket egyelőre többnyire tengerek alga közösségeinek vizsgálatára használják, édesvízi környezetben a műszerekben rejlő potenciál még felfedezésre vár. Jelen munka célja a két módszerrel nyert eredmények összevetése, illetve a fitoplankton diverzitás citometriai paraméterekkel jellemezhető tér- és időbeli mintázatának feltárása a Balaton példáján. Eredményeink szerint az autotróf pikoplankton (APP) összetételének szezonális mintázata, valamint a Balaton hossz tengelye mentén kimutatható változása jól tükrözi a tóra bizonyos mértékben még mindig jellemző kelet-nyugati trofikus gradiens hatását.

Bevezetés

Mikrobiológiai kutatásokban a hagyományos mikroszkópos vizsgálatok mellett napjainkban egyre szélesebb körben használt technika az áramlási citometria (WANG *et al.*, 2010). Ez alól a planktonikus algák (fitoplankton) sem jelentenek kivételt, a módszert édesvízi (WANG *et al.*, 2009) és tengeri közösségekre (MACKEY *et al.*, 2002), valamint laboratóriumi tenyészetekre (BROOKES *et al.*, 2000) egyaránt alkalmazták. Alga együttesek összetételének részletekbe menő, fajsztíntű meghatározására ugyan még nem alkalmas, de a mikroszkópos technikával szemben kétségtelen előnye, hogy a detektált sejtszám tekintetében általában nagyobb pontosságot biztosít, ezáltal az eredmény hibaszórása kisebb (WANG *et al.*, 2010). Tovább növeli a módszer versenyképességét, hogy a minták bevizsgálása kevesebb időt igényel, az így megnövelt mintakapacitásnak köszönhetően pedig a különböző méretű és pigment dominanciájú csoportok változása nagyobb idő- vagy térbeli felbontásban tanulmányozható.

A Balaton planktonikus alga (fitoplankton) közösségeinek kutatása több évtizedes múltra tekint vissza, összetételbeli változásuk vizsgálata hagyományos fordított, illetve epifluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokon alapul. A fajsztíntű meghatározás a fitoplankton kutatásának nélkülözhetetlen része, azonban az áramlási citometria alkalmazásával, előnyeit kiaknázva, részletesebb képet nyerhetünk a közösséget alkotó csoportok idő- és térbeli variabilitásáról. A módszer alkalmazásának előfeltétele a mikroszkópos vizsgálatokkal való összevetés, validálás, ez teszi lehetővé a citométerrel beazonosítható csoportok rutinszerű elemzését, monitorozását. Jelen kézirat célja elsősorban a két módszerrel nyert eredmények összevetése, illetve a fitoplankton diverzitás citometriai paraméterekkel jellemezhető tér- és időbeli mintázatának feltárása.

Anyag és módszer

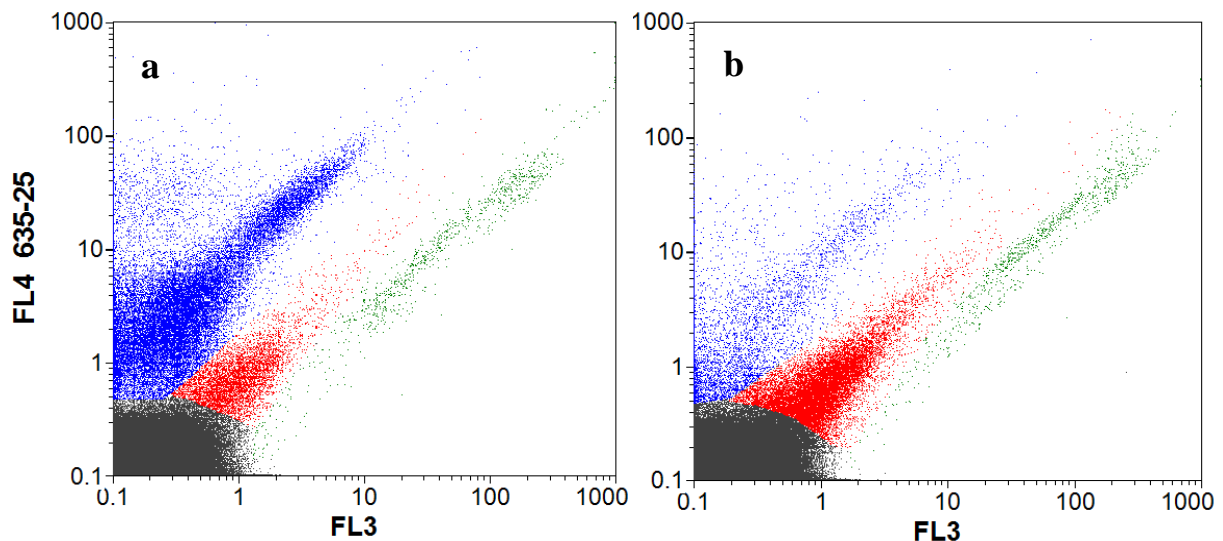
A mintavételek 2013-ban és 2014-ban történtek kétheti/havi gyakorisággal áprilistól novemberig. A vizsgálatok minden esetben frissen gyűjtött vízoszlop mintákból történtek Partec CyFlow Space citométerrel. A vízmintában lévő sejtek detektálása 200 μm átmérőjű kapillárisban történt, 1 $\mu\text{l/s}$ áramlási sebesség mellett, 830 μl mintatérfogat felhasználásával. Köpenyfolydékként a gyártó (Partec, jelenleg Sysmex) által forgalmazott terméket használtuk. Az alga sejtek gerjesztése 488 nm-es hullámhosszúságú kék és 638 nm-es vörös lézerrel, az sejtek detektálása 4 különböző optikai csatornán történt. A műszer FSC (forward scatter) detektora által mérhető fényszórási paramétert a sejt méret becslésére használtuk, míg a fluoreszcens detektálási csatornák a különböző pigment dominanciájú sejtek elkülönítését teszik lehetővé. Ennek megfelelően az 575 nm-es detektálási csúcsú FL2 csatorna a fikoeritrin tartalmú sejtek (egyres cianobaktériumok és a Cryptophyta divízió algái), az FL3 csatorna (675 nm) pedig a klorofill vörös fluoreszcenciájának köszönhetően minden alga és cianobaktérium sejt detektálására alkalmas. Az FL2 és FL3 csatornák a kék lézeres gerjesztés eredményeként jelentkező fluoreszcencia érzékelését szolgálják, míg a vörös lézeres gerjesztésből adódó vörös fluoreszcens fény (675 nm) detektálását szolgáló FL4 csatorna a fikocianin pigmentdominanciájú cianobaktériumok észlelésére alkalmas. Az így nyert citometriai adatokat FloMax 3.0 szoftverrel értékeltük ki.

A citometriai és mikroszkóppal nyert abundancia értékek összehasonlítását az autotróf pikoplankton (APP, $d < 2 \mu\text{m}$) esetében végeztük el, elsősorban azért, mert ez a méretkategória, illetve az ide tartozó három csoport (pikoeukarióták, fikocianinos és fikoeritrines pikocianobaktériumok) citométerrel, mikroszkópos validálás nélkül is könnyen beazonosítható, megszámlálható. A mikroszkópos vizsgálatnál a különböző

pigmentdominanciájú csoportok mennyiségi meghatározásához Nikon Optiphot 2 epifluoreszcens mikroszkópot használtunk. A vízmintákból 1-5 ml-t 0,45 µm-es pórusméretű fekete cellulóz-acetát membránfilterre (Macherey-Nagel) szűrtünk, majd az így elkészült preparátumot glicerinbe ágyazva 1000x-es nagyításon vizsgáltuk. Digitális kamerával minden preparátum esetében 10 látótérről készült felvétel, melyek kiértékeléséből becsültük a minták APP abundanciáját és összetételét. A három eltérő pigment összetételű csoport elkülönítése kékesibolya és zöld gerjesztőfény segítségével történt (MACISAAC & STOCKNER, 1993).

Eredmények és megbeszélésük

Az **1. ábrán** jól látható, hogy a klorofill fluoreszcenciájával korreláló FL3 és a fikocianin fluoreszcenciáját detektáló FL4 csatorna kiválóan alkalmas három nagyobb, eltérő pigment dominanciájú fitoplankton csoport elkülönítésére, mennyiségi meghatározására. A detektált sejtek FL3 és FL4 paramétereit ábrázoló szórásdiagramokon az eukarióta algák, valamint a fikocianinos és fikoeritrines cianobaktériumok különálló sávokban jelentkeznek. A kapott adatokból a Balaton nyugat-kelet irányú trofitási gradienséből adódó, összetételbeli eltérések is megmutatkoznak. Míg a mezo-eutróf Keszthelyi-medencében 2013 júliusában a cianobaktériumokon belül a fikocianinos fajok domináltak (**1.a ábra**), addig az oligo-mezotróf Siófoki-medence keleti csücskében (Balatonfüzfőnél, **1.b ábra**) a fikoeritrines taxonok abundanciája volt magasabb.

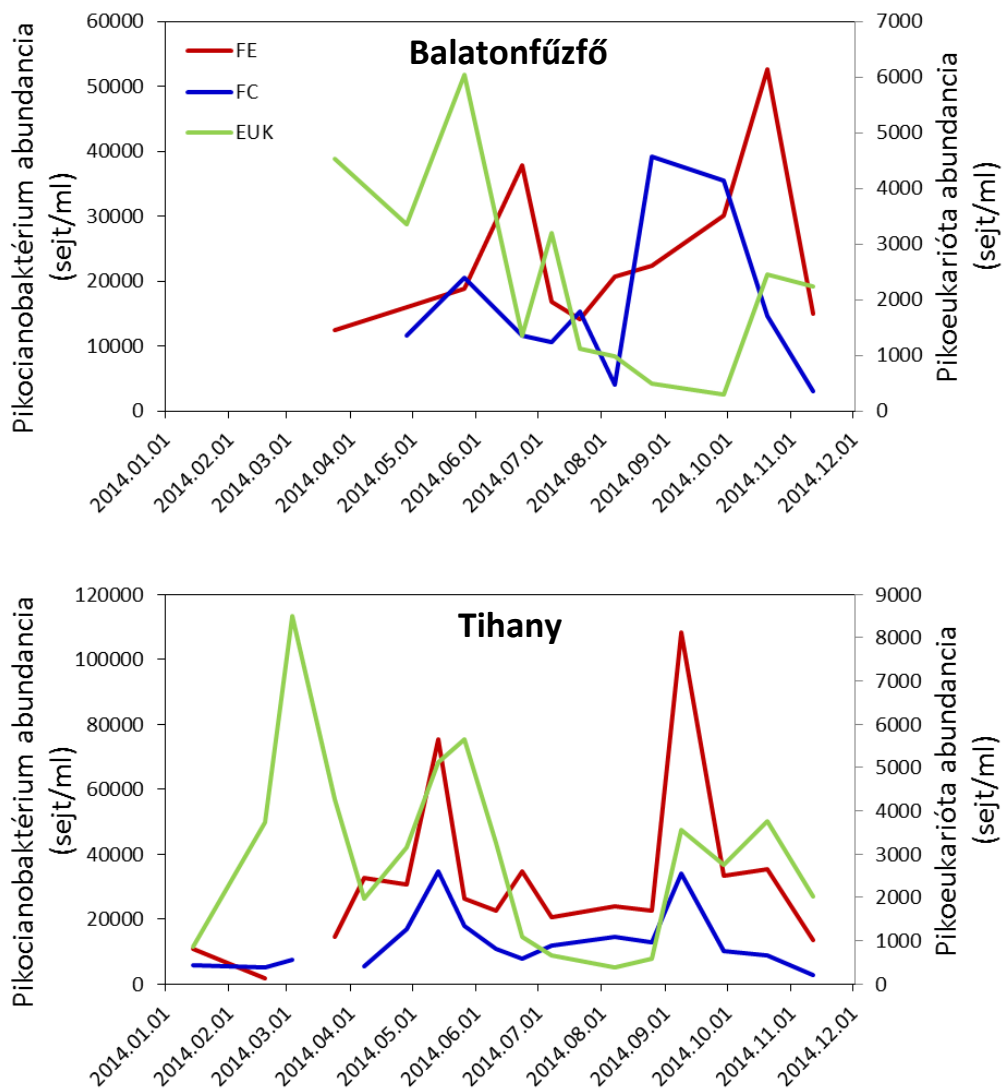


1. ábra. A fitoplankton citometriai szórásdiagramja Keszthelynél (**a**) és Balatonfüzfőnél (**b**) 2013. július 23-án. FL3 (optikai csatorna): kék lézeres (488 nm) gerjesztésből adódó vörös fluoreszcencia relatív intenzitása; FL4 (optikai csatorna): vörös lézeres (635 nm) gerjesztésből adódó vörös fluoreszcencia relatív intenzitása. Zöld pontfelhő: eukarióta algák; kék pontfelhő: fikocianinos cianobaktériumok, vörös pontfelhő: fikoeritrines cianobaktériumok.

2014-ben kiterjedtebb, nagyobb térbeli lefedettségű mintavételekre nyílt lehetőségünk, márciustól novemberig a rendszeres kettő (Tihany és Keszthely) helyett öt mintavételi ponton (Balatonfüzfőnél, Zánkánál és Szigligetnél is) történtek gyűjtések, kétheti/havi gyakorisággal. A citométer fényszórási (FSC) paramétere és a fluoreszcens csatornák alapján szétválasztott autotróf pikoplankton csoportok abundanciájának változása

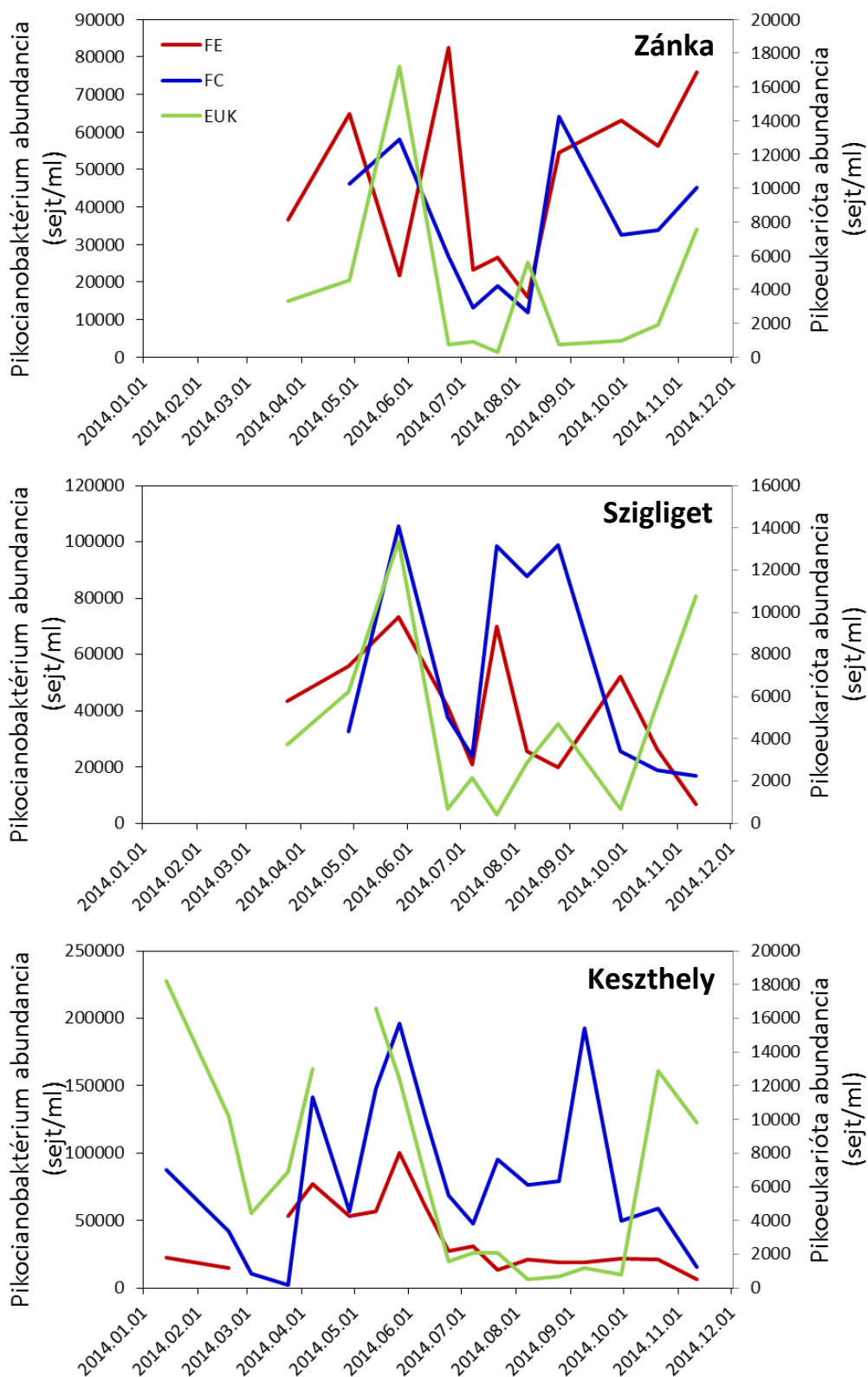
így mind szezonálisan, mind a tó hossztengele mentén nyomon követhető (2.a, 2.b ábra).

Az oligo-mezotróf Siófoki-medence (Balatonfűzfő, Tihany) és a mezo-eutróf Keszthelyi-medence (Zánka, Szigliget, Keszthely) között eltérő APP mintázatot figyeltünk meg. Pikoekarióták elsősorban a tavaszi időszakban fordultak elő nagyobb mennyiségben, nyáron abundanciájuk nagy mértékben lecsökkent, majd az ősz folyamán ismét növekvő tendenciát mutatott. A Siófoki-medencében tavaszi előfordulásukat kettős csúcs, egy korai márciusi és egy mérsékelt májusi maximum jellemezte, mennyiségük 307 és 8500 sejt ml⁻¹ között változott (2.a ábra). Ettől eltérően a tó nyugati felében csak a májusi csúcs volt megfigyelhető, de egész éves szinten a legnagyobb értéket januárban, Keszthelynél találtuk (2.b ábra). Itt az abundancia is összességében nagyobb volt, mint a tó keleti felében (320-18200 sejt ml⁻¹).



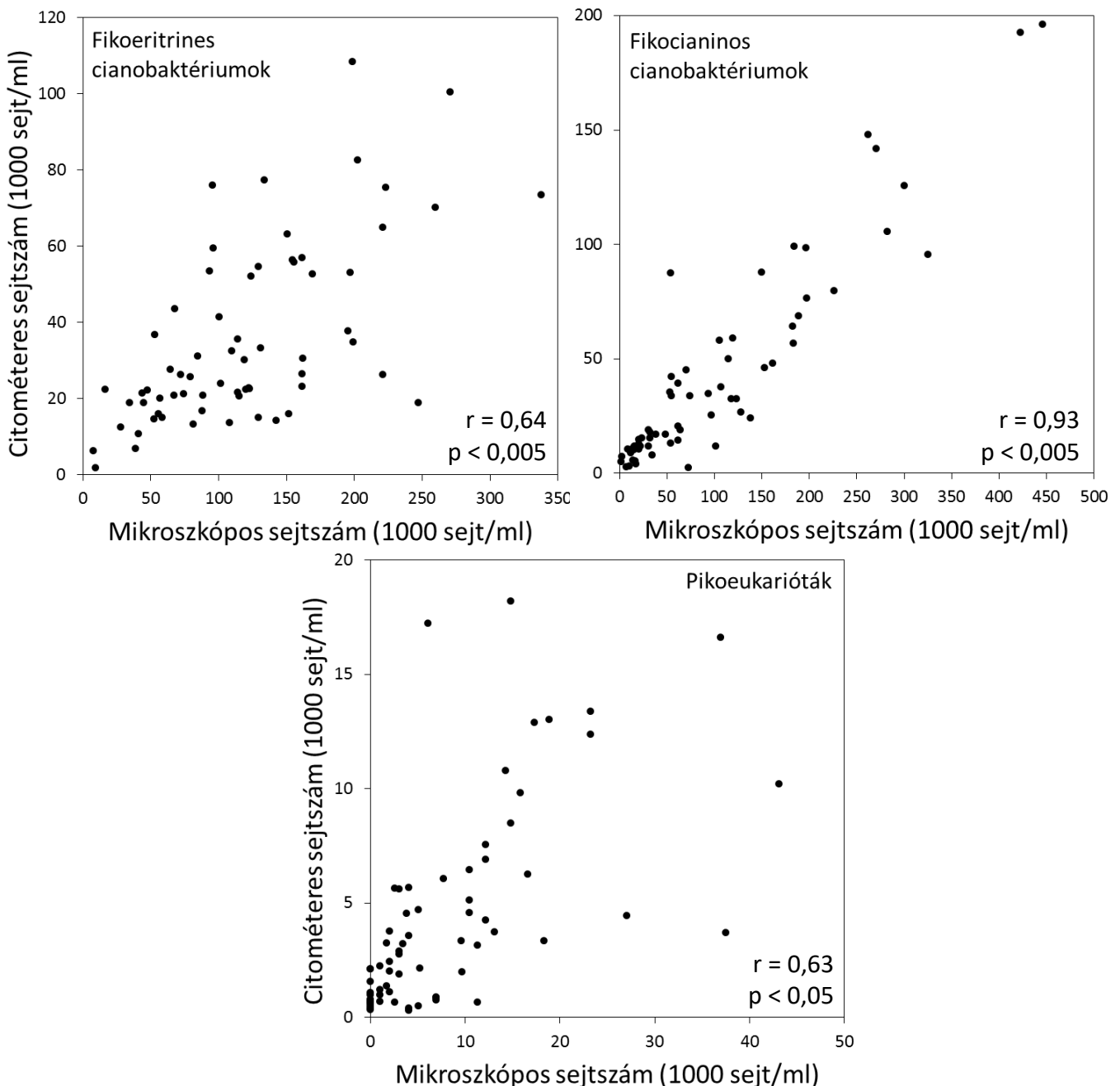
2.a ábra. A autotróf pikoplankton abundanciájának szezonális változása 2014-ben a Balatonban Balatonfűzfőnél és Tihanynál. FE: fikocitrinikus pikocianobaktériumok; FC: fikocianinikus pikocianobaktériumok; EUK: pikoekarióták.

A fitoplankton citometriai diverzitása a Balatonban



2.b ábra. A autotróf pikoplankton abuncanciájának szezonális változása 2014-ben a Balatonban Zánkánál, Szigligetnél és Keszthelynél. FE: fikoeritrines pikocianobaktériumok; FC: fikocianinos pikocianobaktériumok; EUK: pikoeukarióták.

A pikocianobaktériumok két aspektusból is különböző képet mutattak a Balaton keleti és nyugati felében. Egyrészt, mennyiségük a Siófoki-medencében összességében kisebb volt, mint a három nyugatabbra található mintavételi ponton, így míg Balatonfűzfőnél maximum abundanciájuk 67200 sejt ml^{-1} volt (fikocianinos és fikoeritrines együttesen), Keszthelynél ez az érték megközelítette 300000 sejt ml^{-1} -t. Ezen túlmenően a két csoport aránya is változott a tó hossz tengelye mentén. A Siófoki-medencében általában a fikoeritrines formák voltak túlsúlyban, bár Balatonfűzfőnél augusztus-szeptember táján az arány a fikocianinosok javára fordult. Érdekes jelenség, hogy a fikoeritrinesek Tihanynál észlelt májusi és szeptemberi csúcsa Balatonfűzfőn egy hónapos késéssel, júniusban és októberben volt megfigyelhető (2.a ábra).



3. ábra. Az autotróf pikoplankton három eltérő pigmentdominanciájú csoportjának mikroszkóppal számlált és citométerrel detektált abundanciája a 2014-ben gyűjtött balatoni vízmintákban.

Zánkától Keszthelyig a fikocianinos pikocianobaktériumok dominanciája került fokozatosan előtérbe, ezzel párhuzamosan a fiokeritrines formák, különösen nyáron, háttérbe szorultak (**2.b ábra**). Ez az összetétel elsősorban Szigligetnél és Keszthelynél volt jellemző, leginkább a július elejétől szeptember közepéig tartó időszakban. Ennek megfelelően a fikocianinos csoport május végi és augusztus-szeptemberi abundancia maximumainak értéke a Zánkán jellemző 55-65 ezer sejt ml⁻¹-ről Keszthelyig 190-200 ezer sejt ml⁻¹-re nőtt. A változás a fiokeritrines cianobaktériumok szeptember-októberi csúcsa esetében is tetten érhető volt: mennyiségük Zánkán már augusztusban jelentős gyarapodást mutatott, míg Szigligeten mindez csak szeptemberben következett be, Keszthelyen pedig július közepétől kezdődően minden időpontban viszonylag alacsony abundanciát (6290-22145 sejt ml⁻¹) találtunk.

A Balatoni vízminták áramlási citometriai vizsgálata alapján megállapíthatjuk, hogy a módszer alkalmasnak bizonyult a tó trofitási gradienseiből adódó fitoplankton összetételbeli eltérések, a tér- és időbeli mintázat feltárására. Az APP vizsgált csoportjainak összetétele egyezik VÖRÖS *et al.* (2009) epifluoreszcens mikroszkópos megfigyeléseivel, miszerint a fiokeritrines pikocianobaktériumok elsősorban a mezotróf Siófoki-medence, a fikocianinos formák a tó magasabb trofitású nyugati felének nyári közösségében jellemzők, míg a pikoeukarióták a téli időszak domináns APP szervezetei. A citometriai és mikroszkópos sejtszámlálással nyert adatok összevetéséből ugyanakkor az derül ki, hogy a módszer balatoni fitoplankton vizsgálatra történő alkalmazása további finomítást igényel (**3. ábra**). A két módszerrel mért adatpárok mindhárom APP csoportra nézve szignifikáns korrelációt mutattak, bár kimondottan szoros összefüggést csak a fikocianinos pikocianobaktériumok esetében találtunk ($r = 0,93$, $p < 0,005$). Fiokeritrines pikocianobaktériumokra a Pearson-féle korrelációs együttható 0,64 ($p < 0,005$), pikoeukariótákra 0,63 volt ($p < 0,05$). A kapott abundancia értékekben is különbségek mutatkoztak, mikroszkóppal rendszerint nagyobb abundanciát kaptunk, ugyanakkor egyes időpontokban a kimondottan alacsony (1000-2000 sejt ml⁻¹ alatti) pikoeukarióta sejtszám csak citométerrel volt detektálható.

A tapasztalt eltéréseket több tényező is okozhatta, ilyen például a mintavétel és a mérés között eltelt idő. Különösen nyáron, a begyűjtött vízminták összetétele, az abundanciaviszonyok, vagy a sejtek pigmenttartalma rövid idő alatt is módosulhatnak, például a megváltozott fényviszonyok vagy a hőmérséklet emelkedése miatt. További problémát jelenthet, hogy az esetenként összetapadó, de valójában egysejtű pikocianobaktériumokat vagy pikoeukariótákat az áramlási citométer egyetlen partikulumként detektálja, míg mikroszkópos vizsgálatnál ez a veszély nem áll fenn. Ezzel szemben mikroszkópos számlálásnál általában abból adódhatnak mennyiségi fölé- vagy alábecslések, ha a sejtek eloszlása a filteren heterogén, melynek következtében a kiválasztott látómezőkben meghatározott, majd extrapolált sejtszámok nem tekinthetők reprezentatívnak. Mivel az áramlási citométerekkel detektált fényszórás (FSC csatorna) mértéke a partikulumok méretével arányos, a sejtek összetapadásából adódó hiba jelentős mértékben csökkenthető, ha az abundanciát az FSC értékek ismeretében osztófaktorral vagy biomasszává konvertáljuk.

A munkánkban kimutatott mérési pontatlanságok ellenére az áramlási citometria alkalmazásában óriási kutatási potenciál rejlik, melyet a témában megjelent úttörő példák is igazolnak. Ide sorolható többek között HUNTER-CEVERA *et al.* (2016) munkája is, melyben 13 év órás felbontású citometriai adatsorát felhasználva tárták fel egy tengeri *Synechococcus* közösség tavaszi felszaporodása mögött rejlő fiziológiai és ökológiai tényezőket. Összességében kijelenthető, hogy a módszer továbbfejlesztésével, a potenciálisan felmerülő hibák kiküszöbölésével az áramlási citometria hatékony eszközzé

válhat hazai vizeink, többek között a Balaton alga összetételének, dinamikájának, valódi tér- és időbeli variabilitásának feltárásában.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönettel tartoznak Németh Balázsnak, Szabó Tímeának és Dobos Gézá-
nak a mintavétel során nyújtott segítségükért.

Irodalom

- BROOKES, J. D., G. G. GANF & R. L. OLIVER, 2000. Heterogeneity of cyanobacterial gas-vesicle volume and metabolic activity. *Journal of Plankton Research* **22**: 1579-1589.
- HUNTER-CEVERA, K. R., M. G. NEUBERT, R. J. OLSON, A. R. SOLOW, A. SHALAPYONOK & H. M. SOSIK, 2016. Physiological and ecological drivers of early spring blooms of a coastal phytoplankton. *Science* **354**: 326-329.
- MACKEY, D. J., J. BLANCHOT, H. W. HIGGINS & J. NEVEUX, 2002. Phytoplankton abundances and community structure in the equatorial Pacific. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **49**: 2561-2582.
- MACISAAC, E. A. & J. G. STOCKNER, 1993. Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy. In: KEMP, P. F., B. F. SHERR, E. B. SHERR & J. J. COLE (eds) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla: 187-197.
- VÖRÖS, L., A. MÓZES & B. SOMOGYI, 2009. A five-year study of autotrophic winter picoplankton in Lake Balaton, Hungary. *Aquatic Ecology* **43**: 727-734.
- WANG, B., C.-Q. LIU, F. WANG, Y. YU & Y. WU, 2009. Flow cytometric observation of picophytoplankton community structure in the cascade reservoirs along the Wujiang River, SW China. *Journal of Limnology* **68**: 53-63.
- WANG, Y., F. HAMMES, K. DE ROY, W. VERSTRAETE & N. BOON, 2010. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in Biotechnology* **28**: 416-424. doi:10.1016/j.tibtech.2010.04.006