

**WYTYCZNE DO PRZEPROWADZENIA BADAŃ
TERENOWYCH I LABORATORYJNYCH
FITOPLANKTONU JEZIORNEGO**

Autor:

Prof. dr hab. Andrzej Hutorowicz
Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie
ahut@infish.com.pl

Olsztyn, listopad 2009

Spis treści

1. Wstęp	2
2. Zbieranie materiałów	4
2.1. Próby ilościowe	4
2.2. Utrwalanie i konserwacja prób	5
3. Analiza ilościowa fitoplanktonu metodą Utermöhla	5
3.1. Mikroskop i jego wyposażenie	6
3.2. Skalowanie wartości mikrometrycznej okularów i wyznaczenie współczynników przeliczenia	7
4. Analiza jakościowa	9
4.1. Lista dominujących taksonów	9
5. Analiza ilościowa	11
5.1. Przygotowanie próby do liczenia glonów	11
5.2. Liczenie glonów w komorach	12
5.3. Obliczanie liczebności taksonów	13
5.4. Szacowanie biomasy	14
5.5. Projekt protokołu wyników badań	15
6. Lista zalecanych kluczy do oznaczania glonów planktonowych	17
Literatura	19
Załącznik	
Sposoby mierzenia glonów o różnym kształcie	tab. I - VI

1. Wstęp

Fitoplankton jest jednym z podstawowych elementów ekosystemów wodnych. Poznanie składu gatunkowego, biomasy i struktury tego zbiorowiska wnosi wiele informacji o stanie ekologicznym jezior (Pliński i in. 1984, Oleksowicz 1988, Burchardt 1994, Kawecka i Eloranta 1994). Zakłada się, że w zbiornikach o ustabilizowanych warunkach fizyczno-chemicznych, przy określonej koncentracji pierwiastków biogennych możliwe jest określenie modeli zbiorowisk fitoplanktonu, które są charakterystyczne dla poszczególnych etapów sukcesji troficznej (Reynolds 1984, Burchardt 1994). W różnych opracowaniach można znaleźć propozycje określenia grup gatunków charakteryzujących typy troficzne jezior w okresie letnim, oraz opisujących sezonową dynamikę gatunków dominujących w jeziorach oligo-, mezo-, eu- i hipertroficznych (Reynolds 1984, Burchardt i in. 1994). Według modelu sezonowych zmian obfitości fitoplanktonu opracowanego przez Oleksowicza (1988), w jeziorach o ubogiej puli związków biogennych biomasa planktonu roślinnego jest mała. Jedynie wiosną, po roztopieniu się pokrywy lodowej, obserwuje się jedyny w ciągu roku nieduży szczyt biomasy glonów. W jeziorach o średniej zasobności w związki biogenne w sezonie wegetacyjnym pojawiają się już dwa szczyty biomasy. Pierwszy obserwuje się w okresie wiosennego mieszania wody, a drugi jesienią. Oddziela je okres stratyfikacji, w czasie którego wewnętrzne zasilanie w biogeny jest mocno ograniczone. W tym czasie w epilimnionie rozwijają się głównie gatunki wolno rosnące, które dobrze znoszą małą zasobność środowiska w związki biogenne.

Biomasa glonów planktonowych w jeziorach o bogatej puli zasobów pokarmowych jest znacznie większa niż w dwóch poprzednio omówionych typach zbiorników. W sezonie wegetacyjnym notuje się dwa, bardzo wyraźne szczyty biomasy. Pierwszy występuje wiosną, a drugi, znacznie większy, latem. Tworzą go przeważnie gatunki sinic, okrzemek, bruzdnic lub zielenic kokalnych. Natomiast w jeziorach bardzo żyznych, które w większości wypadków są zanieczyszczane związkami biogennymi ze spływu obszarowego oraz ze źródeł punktowych, obserwuje się przez cały rok bardzo dużą biomasę fitoplanktonu, chociaż w ciągu lata jest ona z reguły największa.

Szczegółowe systematyczne obserwacje prowadzone w jeziorach różnych typów troficznych pozwoliły wykazać, że w zbiornikach oligotroficznych w czasie sezonu wegetacyjnego rośnie złożoność układu, tzn. zwiększa się różnorodność ekologiczna. W konsekwencji jesienią w zbiorowisku fitoplanktonu występuje więcej gatunków charakterystycznych niż wiosną, jednak liczebność poszczególnych taksonów jest

równocześnie wyraźnie mniejsza (Burchard i in. 1994). Odwrotny typ sukcesji można natomiast obserwować we względnie stabilnych i izolowanych układach hipertroficznym. W ciągu roku w zbiorowisku ubywa gatunków wyróżniających (bioindykatorów), a w końcu okresu wegetacyjnego obserwuje się wyraźnie uproszczoną strukturę fitoplanktonu, chociaż z reguły ich obfitość jest bardzo duża.

Prowadzenie bioindykacji na podstawie składu, obfitości i struktury dominacji w obrębie zbiorowisk glonów planktonowych wymaga dobrej znajomości roli poszczególnych taksonów, a przede wszystkim gatunków o dość szerokim spektrum ekologicznym. Dobrym przykładem tego typu gatunków jest *Ceratium hirundinella*, które spotykane jest w jeziorach oligo-, mezo-, eu-, hiper- i politroficznym (Reynolds 1984, Burchardt i Żalik 1991, Bucka i Wilk-Woźniak 2002). W każdym z tych typów troficznych gatunek ten ma jednak odmienny status ekologiczny. W fitoplanktonie jezior oligotroficznym jest taksonem towarzyszącym innym gatunkom dominującym. W jeziorach mezo- i politroficznym jest gatunkiem subdominującym, a w zbiornikach eutroficznym może dominować wraz z grupą kilku obficie występujących subdominantów (Reynolds 1984, Burchardt i in. 1994).

Z pozoru otwartą kwestią pozostaje pytanie o sens prowadzenia żmudnej analizy ilościowej i jakościowej fitoplanktonu, skoro obfitość glonów można ocenić na podstawie w miarę mało skomplikowanego oznaczenia zawartości chlorofilu w wodzie (Keskitalo 1976, Eloranta 1986, Sladeček 1978, Hillbricht-Ilkowska i Kajak 1986, Szląg-Wasielewska 1992, Hutorowicz 1993, 1999, 2001, Kajak 2001), a bezpośrednio pomiary warunków fizycznych i określenie koncentracji różnych związków chemicznych w jeziorze jest szybsze i mniej pracochłonne. Skład i obfitość glonów jest jednak niezwykle cenną informacją przy ocenie stanu ekologicznego jezior, ponieważ odzwierciedlają one ogólne warunki środowiska, a nie chwilowe stany w danym zbiorniku. Koncentracja wielu jonów (szczególnie mineralnych form związków biogennych), zawartość tlenu rozpuszczonego oraz odczyn wody w warstwie powierzchniowej mogą zmieniać się w ciągu dnia nawet w dość dużym zakresie (Kajak 1995). Jedną z podstawowych przyczyn tych wahań są dobowe zmiany intensywności oświetlenia powierzchni wody promieniami słonecznymi.

O wartości wskaźnikowej glonów planktonowych świadczą też udane próby odtworzenia na podstawie składu i obfitości zbiorowisk skorupki okrzemki zdeponowanych w osadach dennym jezior warunków panujących w jeziorach i ich zmian w czasie, m.in. średniej temperatury latem, odczynu i zawartości węgla organicznego w wodzie, oraz koncentracji glinu i azotu amonowego (Dixie i in. 1993, Rosén i in. 2000).

Niezależnie od wszystkich wspomnianych i niewymienionych, w tym krótkim zarysie, problemów związanych z badaniami struktury i biomasy glonów planktonowych w jeziorach najistotniejszym elementem, który powinien umożliwić wyciągnięcie wniosków na podstawie badań prowadzonych przez Wojewódzkie Inspektoraty Ochrony Środowiska jest ujednoczenie metody analizy ilościowej fitoplanktonu. Ekologiczna ocena jakości wód możliwa będzie tylko wtedy gdy uzyskane wyniki będą porównywalne, nie tylko w skali kraju, ale także w skali państw członków Unii Europejskiej. W tym celu podjęta została próba ujednoczenia metody poboru prób, oznaczania i liczenia fitoplanktonu, zgodnie z ramowymi wytycznymi Unii Europejskiej.

2. Zbieranie materiałów

2.1. Próby ilościowe

Próby wody do badań ilościowych fitoplanktonu powinny być pobierane czerpaczem wody, np. czerpaczem Ruttnera, Patalasa lub „Toń“.

Pobór prób należy prowadzić w strefie otwartej wody, najlepiej w najgłębszym miejscu jeziora. Latem w jeziorach o wyraźnej stratyfikacji termicznej próby należy pobierać w całej miąższości epilimnionu, natomiast wiosną, jesienią oraz w zbiornikach polimiktycznych – do głębokości 5 m.

Wodę należy pobierać co 1 metr głębokości, następnie zlewać w równej objętości do pojemnika (wiadra). Następnie, po dokładnym wymieszaniu, napęścić butelkę z ciemnego szkła o pojemności 150-200 ml. Butelki napęścić się w około 90%, tak aby poziom wody znajdował się co najmniej 1 cm poniżej wylotu butelki. Umożliwia to późniejsze dokładne wymieszanie próby podczas analiz mikroskopowych. W czasie poboru prób, (najlepiej na etykiecie butelki) zawsze należy zanotować miejsce i datę poboru oraz warstwę wody z jakiej pochodzi próba.

W czasie zbierania próby ilościowej fitoplanktonu dobrze jest jednocześnie zebrać próbę planktonu cedzonego przez siatkę planktonową, którą gdy istnieje możliwość podjęcia badań w przeciągu kilku godzin pozostawia się niekonserwowaną, w przeciwnym wypadku należy ją zakonserwować płynem w składzie: 50 ml 95% alkoholu etylowego lub metylowego, 10 ml zobojętnionej formaliny, 5 ml kwasu octowego lodowatego i 35 ml wody destylowanej. Przeglądanie żywej próby jakościowej niezwykle ułatwia identyfikację wielu gatunków (konieczne przy sporządzeniu listy gatunków dominujących – por. rozdz. 1.2.4.),

ponieważ doskonale widoczne jest charakterystyczne dla wielu gromad zabarwienie komórek. Często też pod wpływem płynów utrwalających i konserwujących rozpadają się kolonie glonów. Szczególnie wrażliwe na utrwalanie są kolonijne złotowiciowce. Ponadto jedynie, która nie była konserwowana płynem Lugola, można w prosty sposób sporządzić trwałe preparaty okrzemkowe (niezbędne do dokładniejszych oznaczeń).

Próby wody do spektrofotometrycznej analizy zawartości chlorofilu *a* należy pobrać z tego samego zlewanego materiału co ostateczną próbę ilościową fitoplanktonu.

2.2. Utrwalanie i konserwacja prób

Zebrany materiał należy natychmiast w terenie utrwalić płynem Lugola lub zbuforowanym płynem Lugola (tab. 1) w objętości 10 kropli na 100 ml konserwowanej próby. Prawidłowo utrwalona próba powinna uzyskać barwę herbaty. Tak utrwaloną próbę można przechowywać co najwyżej przez 6 miesięcy. Jeśli materiał nie będzie jednak wcześniej opracowywany należy próbę zakonserwować zubożoną formaliną, dodając 1 ml formaliny na 100 ml próbki. Nie należy wlewać formaliny przed utrwaleniem próby płynem Lugola, ponieważ ulegają wtedy zniszczeniu kruche komórki m.in. złotowiciowców i kryptofitów. Próby należy zawsze przechowywać w ciemności.

Tab. 1. Skład płynu Lugola według receptury Utermöhla (1958):

Płyn Lugola	Zbuforowany płyn Lugola
20 g KJ	10 g KJ
10 g J ₂	5 g J ₂
20 ml kwasu octowego	5 g CH ₃ COONa
200 ml wody destylowanej	70 ml wody destylowanej

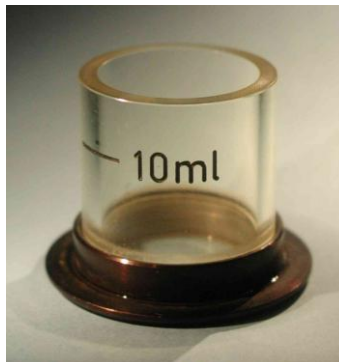
3. Analiza ilościowa fitoplanktonu metodą Utermöhla

Analiza ilościowa fitoplanktonu polega na policzeniu komórek glonów planktonowych w określonej objętości wody, a następnie oszacowaniu ich biomasy. Glony fitoplanktonowe mają różne formy. Są to pojedyncze komórki, kolonie, cenobia (składające się z dwóch, czterech ośmiu lub szesnastu komórek) oraz nici. Dlatego przy liczeniu fitoplanktonu stosuje się pojęcie liczonej jednostki, którą jest albo pojedyncza komórka, albo cenobium, kolonia lub

nić. W przypadku glonów kolonijnych zawsze szacuje się średnią liczebność komórek w kolonii, a w przypadku nici za jednostkę przyjmuje się odcinek o długości 100 μm .

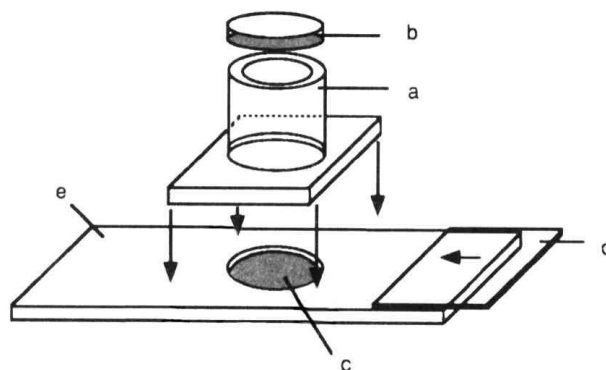
3.1. Mikroskop i jego wyposażenie

Liczenie glonów należy prowadzić w komorach sedymentacyjnych przy pomocy mikroskopu odwróconego, który powinien być wyposażony w stół z otworem o średnicy 25-27 mm, umożliwiając obserwację standardowych komór osadowych o objętości 5, 10 i 20 ml (ryc. 1). Poza komorami o dnie trwale połączonym z cylindrem używa się także komór o większej objętości (50 i 100 ml) o cylindrze przesuwalnym. Komory o małej objętości należy używać do liczenia glonów w próbach pobranych w jeziorach eutroficznym, a o większej objętości – liczenia prób pochodzących z jezior oligotroficznym.

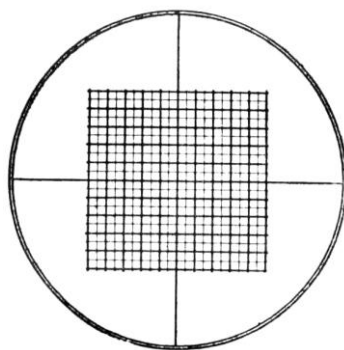


Ryc. 1. Cylindryczna komora o pojemności 10 ml do obserwacji i liczenia fitoplanktonu w mikroskopie odwróconym

Mikroskop powinien być wyposażony w okulary o co najmniej dziesięciokrotnym powiększeniu, a w jednym z nich powinien znajdować siatkowy mikrometr okularowy (ryc. 3), który będzie wykorzystywany podczas liczenia glonów. Mikroskop powinien mieć także co najmniej trzy obiektywy planapochromatyczne o powiększeniu 10-, 20- i 40-krotnym. Niezbędny jest też okular pomiarowy z mikrometrem.



Ryc. 2. Komora osadowa do liczenia glonów z przesuwным cylindrem (wg. Kaweckiej i Eloranty 1994, zmienione); a – cylinder, b – płytka przykrywająca cylinder, c – komora planktonowa, d – płytka zamykająca komorę, e – płytka pomocnicza ześlizgowa



Ryc. 3. Siatkowy mikrometr okularowy (wg. Starmacha 1989)

Do wyskalowania wartości mikrometrycznej okularów mikrometrycznych, oddzielnie dla każdego obiektywu, niezbędny jest liniowy mikrometr przedmiotowy.

3.2. Skalowanie wartości mikrometrycznej okularów i wyznaczenie współczynników przeliczenia

Pod każdym powiększeniem (dla każdego obiektywu oddzielnie) należy ustawić właściwą ostrość podziałki mikrometru przedmiotowego, a następnie porównać ile kresek mikrometru w okularze pokrywa się dokładnie z pewną liczbą kresek mikrometru przedmiotowego. Najmniejsza odległość pomiędzy kreskami skali na szkiełku podstawowym wynosi 10 μm .

Mniejszym błędem będzie obarczony wynik skalowania, gdy mikrometr okularowy wyskalowano wobec np. 90 kresek skali na szkiełku przedmiotowym, niż - 2-3 kresek. Zaleca się więc skalowanie mikrometrów okularowych na podstawie możliwie dużej części skali wzorcowej mikrometru przedmiotowego. Podczas skalowania mikrometru przy powiększeniu obiektywu 40x konieczne trzeba uwzględnić dużą szerokość kresek skali przedmiotowej, przyjmując za początek i koniec odcinka o znanej długości zawsze ten sam skraj kreski skali przedmiotowej, np. kreski mikrometru okularowego pokrywają się dokładnie z lewym skrajem obu kresek wyznaczających określoną odległość na skali przedmiotowej (ryc. 4).

Wartość mikrometryczną (WM) oblicza się według wzoru:

$$WM = \frac{n_p \cdot o_p}{n_o}$$

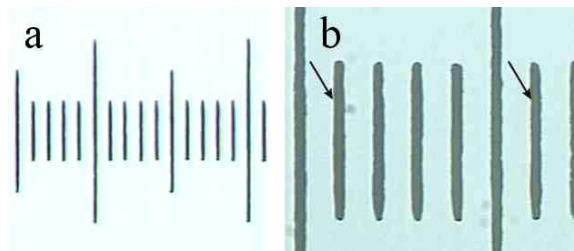
gdzie:

n_p – liczba kresek mikrometru przedmiotowego

o_p – przyjęty odstęp między kreskami mikrometru przedmiotowego = 10 μm

n_o – liczba kresek mikrometru okularowego, które dokładnie pokrywają się z przyjętymi do wyznaczenia n_p kreskami mikrometru przedmiotowego

Wartością mikrometryczną posługuje się przy przeliczaniu liczby kresek mikrometru okularowego na rzeczywiste wymiary komórek glonów.



Ryc. 4. Fotografie fragmentu podziałki mikroskopu podstawowego w powiększeniu obiektywu 12,5x (a) i 40x (b). Strzałki wskazują przykładowy sposób prowadzenia skalowania mikrometru okularowego (opis w tekście).

Analogicznie skaluje się siatkę mikrometryczną, sprawdzając ile kresek skali przedmiotowej możliwie dokładnie pokrywa się z brzegami całego kwadratu siatki mikrometrycznej. Pole kwadratu wylicza się podnosząc do drugiej potęgi iloczyn liczby kresek skali przedmiotowej i 10 μm .

Pole liczonego pasa wyznacza się mnożąc średnicę komory przez długość boku kwadratu siatki mikrometrycznej.

Objętość przegladanej próby (V_{pr}), gdy przegladane jest całe dno komory, równa się ilości próby nalanej do komory osadowej (V). Pod większym powiększeniem jest ona odpowiednio proporcjonalnie mniejsza. Wyliczana się ją z równania:

$$V_{pr} = \frac{P_{sm}}{P} \cdot V$$

gdzie:

V_{pr} – objętość przegladanej próby (nad liczonymi pasami)

P_{sm} – pole powierzchni liczonego psa (iloczyn szerokości pasa i średnicy komory)

P – powierzchnia dna komory

V – objętość próby nalanej do komory

4. Analiza jakościowa

4.1. Lista dominujących taksonów

Przed przystąpieniem do liczenia należy, przegladając komorę, sporządzić listę taksonów licznie występujących w próbce. Można przyjąć, że wystarczające będzie oznaczenie około 15-20 takich taksonów. Do oznaczania okrzemek należy przygotować preparaty trwałe. Ich przygotowanie należy rozpocząć od spalenia treści komórkowej, poprzez prażenie w perhydrofluorowodorze. Najpierw nanosi się kroplę zagęszczonego materiału na odtłuszczone szkiełko podstawowe, suszy się, a następnie po zakropieniu jedną dwoma kroplami perhydrofluorowodoru, ogrzewa się aż do jego całkowitego wyparowania perhydrofluorowodoru. Czynność tę dobrze jest powtórzyć dwa lub trzy razy. Następnie preparaty zamyka się szkiełkiem nakrywkowym w ośrodku silnie łamiącym światło (np. pleuraks lub hyraks). Preparaty trwałe umożliwiają obserwację okryw okrzemek w mikroskopie świetlnym pod imersją. Przygotowywanie takich preparatów bardzo ułatwia niewielki metalowy stolik, pod którym można umieścić palnik gazowy lub lampkę spirytusową (ryc. 5).



Ryc. 5. Metalowy stolik do przygotowywania trwałych preparatów okrzemkowych

Oznaczenie gatunków dominujących ułatwia liczenie glonów. Dobrze jest też w czasie oznaczania sporządzić dokumentację fotograficzną oznaczanych taksonów, także wtedy gdy udaje się określić jedynie jednostkę wyższej rangi niż gatunek.

5. Analiza ilościowa

5.1. Przygotowanie próby do liczenia glonów

Przygotowanie próby do liczenia glonów w mikroskopie odwróconym wymaga zachowania dużej staranności podczas kolejnych etapów procedury:

- Wybrać komorę o odpowiedniej wielkości. Przy wyborze należy kierować się ogólną zasadą: w jeziorach eutroficznych, hipertroficznych zagęszczenie glonów w fitoplanktonie jest z reguły bardzo duże i do liczenia wystarcza objętość kilku (najczęściej do 5) mililitrów próby. Liczenie glonów z jezior o czystej wodzie wymaga zastosowania komór o większej objętości (kilkanaście do kilkudziesięciu mililitrów).
- Dno komory przed nalaniem próby musi być zawsze bardzo dokładnie oczyszczone. Nie należy dopuszczać do silnego zabrudzenia, a tym bardziej porysowania dna komory.
- W komorach osadowych z ruchomym cylindrem osadowym (ryc. 2) na dolną część cylindra należy nałożyć cienką warstwę tłuszczu rozpuszczalnego w wodzie i umieścić go centrycznie nad komorą.
- Przed nalaniem próby do cylindra należy bardzo dokładnie wymieszać próbę, wstrząsając przez kilka chwil zamkniętą butelką.
- Napełnić cylinder próbą, zamknąć komorę płytką w ten sposób aby nie pozostały pęcherzyki powietrza i pozostawić komorę do sedymentacji. W przypadku posługiwania się komorą o objętości do 20 ml, w której dno komory na stałe jest połączone z cylindrem osadowym (ryc. 1) do napełniania komory należy używać pipetę miarową. W takim przypadku komorę można napełniać mniejszą objętością próby niż wynosi jej znamionowa pojemność.
- Komory o pojemności do 10 ml powinny być pozostawione do sedymentacji przez okres co najmniej 9 godzin, a większe przez dwie noce. Czas osadzania nie może być krótszy niż to wynika z ogólnej zasady mówiącej, że 1 cm wysokości próby w komorze wymaga osadzania przez co najmniej 1 godzinę.

- Po zakończeniu sedymentacji próby w komorach o zdejmowanym cylindrze osadowym, należy ostrożnie przesunąć cylinder na płytkę pomocniczą zamykając jednocześnie komorę specjalną płytką. W czasie przesuwania cylindra należy zwrócić szczególną uwagę na to, aby brzeg cylindra ani na moment nie znalazł się poza płytką komory i płytką pomocniczą. W przeciwnym razie woda z cylindra wypłynie na stół i cała próba zostanie wymyta z komory.
- Po ukończeniu osadzania glonów można ostrożnie przenieść komorę, nie wstrząsając, na stolik mikroskopu odwróconego.

5.2. Liczenie glonów w komorach

Liczenie osadzonego planktonu roślinnego wymaga przeliczenia dna komory pod różnymi powiększeniami. Glony prawie nigdy nie osadzają się równomiernie. Liczne gatunki dobrze jest liczyć osobno.

- Drobne taksony należy liczyć pod dużym powiększeniem (obiektyw 40x, powiększenie ok. 400-krotne) w dwóch prostopadle ułożonych do siebie pasach biegnących wzdłuż przekątnej dna komory. Podczas liczenia należy przyjąć stałą zasadę, że organizmy leżące na dwóch liniach bocznych, stykających się w jednym z wierzchołków kwadratu tworzącego pole do liczenia, należy pomijać, a na dwóch przeciwległych liniach tego kwadratu zawsze liczyć. Zasadę tę należy stosować konsekwentnie nawet w takich przypadkach, gdy większa część danej jednostki znajduje się poza lub w polu tego kwadratu.
- Duże formy glonów (kolonie, nici, duże komórki bruzdnic, itp., które zajmują najmniej od $\frac{1}{4}$ do całego pola widzenia i więcej niż jedno pole) należy liczyć pod małym powiększeniem (obiektyw 10x lub 20x) na powierzchni całego dna komory.
- Ze względu na wymóg uzyskania możliwie powtarzalnych wyników poprawnie dobrana objętość próby i liczba pasów, w których liczone komórki lub jednostki glonów, musi zapewnić przeliczenie co najmniej 400 obiektów (jednostek/komórek). Maksymalny błąd osiąga wtedy $\pm 10\%$ liczby 400, czyli prawdziwa liczba jednostek w próbce zawiera się w możliwym do przyjęcia przedziale 360-440 sztuk z prawdopodobieństwem 95%.

- Zaleca się aby liczba dużych jednostek (kolonii np. *Microcystis* lub *Fragilaria* i dużych bruzdnic np. *Ceratium*) policzonych pod mniejszym powiększeniem (obiektów 10x lub 20x) nie była mniejsza od 20 sztuk dla każdego liczonego w ten sposób taksonu.
- Jeżeli liczba jednostek /komórek po zakończeniu liczenia jednej komory jest znacząco mniejsza od 400 należy powtórzyć liczenie w odpowiednio większej objętości próby (np. po policzeniu jednostek w dwóch pasach pod dużym powiększeniem i policzeniu dużych jednostek pod małym powiększeniem z całego dna komory uzyskano ostateczny łączny wynik 165 jednostek, liczenie należy powtórzyć zwiększając dwukrotnie objętość wziętej do sedimentacji próby).
- Gatunki charakteryzujące się dużą zmiennością wymiarów komórek, a w konsekwencji objętości, należy liczyć w klasach wielkości. Przyporządkowanie do klasy wielkości następuje na podstawie wykonywanych jednocześnie pomiarów okulem ze skalą mikrometryczną największego wymiaru komórek – średnicy komórek kulistych, lub długości komórek wyciągniętych, długości nici itp. (por. załącznik).
- W protokole końcowym klasy wielkości jednej jednostki systematycznej (w randze gatunku, rodzaju, a w przypadku okrzemek nawet rzędu) mogą być ujęte w końcowym zestawieniu jako jedna pozycja. Dopuszczalne jest ujęcie w jednej grupie kilku rodzajów np. centryczne okrzemki obejmujące rodzaje: *Cyclotella*, *Cyclostephanos* i *Stephanodiscus*.

5.3. Obliczanie liczebności taksonów

Liczebność (zagęszczenie) oddzielnie każdego taksonu (N_x) wyliczana jest na podstawie wzoru:

$$L_x [\text{szt.}/\text{dm}^{-3}] = \frac{n_x \cdot P \cdot 1000}{V \cdot p_{pr}}$$

gdzie:

L_x – liczebność danego gatunku

n_x – liczba policzonych jednostek (komórek, kolonii, nici) danego gatunku

P – powierzchnia całkowita dna komory (mm^2)

V – objętość przegladanej próby (ml)

p_p – powierzchnia pola na którym zostały policzone jednostki (mm^2)

5.4. Szacowanie biomasy

Wyznaczanie biomasy poszczególnych taksonów opiera się na wyliczeniu średniej objętości liczonych jednostek (komórka, nić, kolonia, cenobium) każdego taksonu i przemnożeniu jej przez ich liczebność według wzoru:

$$OT_x [\text{mm}^3 / l] = \frac{SOK_x [\mu\text{m}^3] \cdot L_x [\text{szt.} / \text{ml}]}{1000000}$$

gdzie:

OT_x – łączna objętość komórek/jednostek danego taksonu

SOK_x – średnia objętość pojedynczej jednostki/komórki (wartość aktywna z odpowiednich tabeli)

L_x – liczebność danego taskonu

Objętość komórek, cenobium, nici, itp. uzyskuje się na podstawie przyrównania ich kształtu do odpowiednich figur geometrycznych (Pliński i in. 1984, Starmach 1989, Kawecka i Eloranta 1994). Przy założeniu, że gęstość komórek glonów swobodnie unoszących się w wodzie, jest równa 1,0 biomasa glonów równa się ich objętości.

Określenie biomasy taksonów prowadzone będzie na podstawie liczebności poszczególnych taksonów i ich standardowej objętości SOK_x (z uwzględnieniem ewentualnych klas wielkości) zestawionych w gotowych tabelach (oddzielna instrukcja).

5.5. Projekt protokołu wyników badań

Analiza ilościowa fitoplanktonu powinna zakończyć się prawidłowym zestawieniem wyników, które będzie zawierało podstawowe informacje o sposobie i miejscu pobrania próby oraz o składzie taksonomicznym, liczebności i objętości (biomasie) poszczególnych taksonów, a także o całkowitej biomacie glonów w próbie. Przykład protokołu wyników przedstawia tabela nr 2. W główce tabeli zawarte są podstawowe informacje pozwalające ocenić zgodność przeprowadzonej analizy z proponowaną metodą badań.

Jeszcze raz trzeba podkreślić fakt, że obok tabelarycznego zestawienia oznaczonych taksonów i ich liczebności oraz biomasy, bardzo istotnym wynikiem takich badań jest dokumentacja fotograficzna lub rysunkowa. Dlatego, o ile jest to możliwe, zalecone byłoby gromadzenie takiej dokumentacji, z zaznaczeniem skali zdjęć lub informacją o wymiarach (m.in. długości, szerokości komórek, cenobitów, itp.), które umożliwiłyby przynajmniej częściową weryfikację poprawności oznaczeń. Gromadzenie takiej dokumentacji w oczywisty sposób wpłynęłoby na poprawność, postulowaną w założeniach ekologicznej oceny stanu wód, oraz przeprowadzanych podsumowań merytorycznych. Ze względu na bardzo duży obszar, jaki obejmą badania prowadzone przez Wojewódzkie Inspektoraty Ochrony Środowiska, możliwe będzie prawdopodobnie znaczne poszerzenie wiedzy o rozprzestrzenieniu, a nawet o ekologii poszczególnych taksonów. Nadal bowiem zależności pomiędzy różnorodnością gatunkową biocenoz a różnorodnością funkcji ekosystemów jeziornych są jednym z podstawowych problemów współczesnej ekologii (Hillbricht-Ilkowska 1998).

Tab. 2. Przykładowy protokół analizy fitoplanktonu

Nazwa jeziora:

Data poboru próby:

Warstwa wody: Utrwalano **plynem Lugola**

Data wykonania analizy ilościowej

Liczono w komorach sedymentacyjnych o objętości ml . Objętość sedymentowanej próby: ml

Liczba powtórzeń: Łączna liczba policzonych jednostek

Zestawienie zawiera wartości uśrednione.

L.p.	Taksony	Liczebność		Biomasa	
		[szt. dm ⁻³]	[%]	[mg dm ⁻³]	[%]
1.	Cyanoprokaryota				
2.					
3.					
4.	Euglenophyta				
5.					
6.	Bacillariophyceae				
7.					
8.					
9.					
10.	Chlorophyta				
11.					
12.	Chlorophyceae				
13.					
14.					
15.					
16.	Conjugatophyceae				
	Razem:				

6. Lista zalecanych kluczy do oznaczania glonów planktonowych

Ze względu na bardzo duże zróżnicowanie taksonomiczne fitoplanktonu, w czasie oznaczania wskazane jest posługiwanie się wieloma opracowaniami. Przy oznaczaniu sinic szczególnie przydatne są następujące klucze:

1. Komárek J. 1999. *Cynaoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales*. H. Ettl, G. Gärtner., H. Heynig, D. Mollenhauer (red.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fisher, Jena - Stuttgart - Lübeck - Ulm.
2. Stramch K. 1966. *Cyanoprokaryota – sinice. Glaucophyta – galukofity*. K. Starmach (red.) *Flora słodkowodna Polski*. PWN, Warszawa.
3. Komárek J. 1996. *Kl'úč k určováí vodních květú sinic v České Republice*. [w:] B. Maršálek, V. Keršner, P. Marvan (red.) *Vodní květy sinic*. Nadatio flos-aquae, Brno

Do oznaczania złotowiciowców:

4. Starmach K. 1985. *Chrysophyceae und Haptophyceae*. H. Ettl, G. Gärtner., H. Heynig, D. Mollenhauer (red.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fisher Verlag, Jena

lub polska wersja klucza:

5. Starmach K. 1980. *Chrysophyceae – złotowiciowce (oraz zooflagelata wolnożyjące)*. K. Starmach, J. Siemińska (red.) *Flora słodkowodna Polski*. PWN, Warszawa - Kraków.

Do oznaczania okrzemek:

6. Krammer K., Lange-Bertalot H. 1997. *Bacillariophyceae. 1. Teil.: Naviculaceae*. H. Ettl, G. Gärtner., H. Heynig, D. Mollenhauer (red.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fisher, Jena - Stuttgart - Lübeck - Ulm.
7. Krammer K., Lange-Bertalot H. 1997. *Bacillariophyceae. 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae*. H. Ettl, G. Gärtner., H. Heynig, D. Mollenhauer (red.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart - New York
8. Krammer K., Lange-Bertalot H. 1997. *Bacillariophyceae. 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae*. H. Ettl, G. Gärtner., H. Heynig, D. Mollenhauer (red.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fisher Verlag Stuttgart, Gustav Fisher Verlag Jena

9. Krammer K., Lange-Bertalot H. 1991. *Bacillariophyceae. 4. Teil: Achnantheaceae, Kritische Ergänzungen zu navicula (Lineolatae) und Gomphonema Gesamtliteraturverzeichnis Teil 1-4.* H. Ettl, G. Gärtner., H. Heynig, D. Mollenhauer (red.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa.* Gustav Fisher Verlag Stuttgart, Gustav Fisher Verlag Jena

Do oznaczania bruzdnic:

10. Starmach K. 1974. *Cryptophyceae – kryptofity. Dinophyceae – dinofity. Raphidophyceae – rafidofity.* K. Starmach, J. Siemińska (red.) *Flora słodkowodna Polski.* PWN, Warszawa - Kraków.
11. Popovský J., Pfiester L. A. 1990 *Dinopheceae (Dinoflagelida).* H. Ettl, G. Gärtner., H. Heynig, D. Mollenhauer (red.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa.* Gustav Fisher Verlag Stuttgart, Gustav Fisher Verlag Jena

Do oznaczania euglenin:

12. Starmach K. 1983. *Euglenophyta – eugleniny.* . K. Starmach, J. Siemińska (red.) *Flora słodkowodna Polski.* PWN, Warszawa – Kraków.

Do oznaczania zielenic kokalnych:

13. Komárek J., Fott B. 1983. *Das Phytoplankton des Süßwassers. 7. teil, 1. Hälfte. Chlorophyceae (Grünalgen). Ordnung: Chlorococcales.* [w:] H.-J. Elster, W. Ohle *Die Binnengewässer.* Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart

Wstępnie można także wykorzystywać syntetyczne klucze, w których zestawione są najczęściej spotykane gatunki:

14. Hindák F. Komárek J., Marvan P., Růžička J. 1975. *Kl'úč na určovanie výtrusných rastlin. I. diel. Riasy.* Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava
15. Hindák F. Cyrus Z., Marvan P., Javornický P., Komárek J., Ettl H., Rosa K., Sládečková A., Popovský J., Punčochářová M., Lhotský O. 1978. *Sladkovodně riasy.* Slovenské pedagogické nakladateľstvo, Bratislava
16. Starmach K. 1989. *Plankton roślinny wód słodkich.* PWN, Warszawa

Literatura

1. Bucka H., Wilk-Woźniak E. 2002. Gatunki kosmopolityczne i ubikwistyczne wśród glonów pro- i eukariotycznych występujących w zbiornikach wodnych Polski południowej. Zakład Biologii Wód PAN, Kraków.
2. Burchardt L. 1994. Bioindykacja w ocenie ekosystemu jeziornego. [W:] L. Burchardt (red.) Teoria i praktyka badań ekologicznych. Idee Ekologiczne 4, Ser, Szkice nr 3: 71-76.
3. Burchardt L., Łatowski K., Szmajda P. 1994. Różnorodność ekologiczna a bioindykacja. [W:] L. Burchardt (red.) Teoria i praktyka badań ekologicznych. Idee Ekologiczne 4, Ser, Szkice nr 3: 27-43.
4. Burchardt L., Żalik K. 1991. Badania algologiczne Jeziora Lednickiego w roku 1987. Muzeum Pierwszych Piastów w Lednicy. Studia Lednickie. Lednica-Poznań, II: 275-289.
5. Dixit S. S., Cumming B. F., Birks H. J. B., Smol J. P., Kingston J. C., Uutala A. J., Charles D. F., Camburn K. E. 1993. Diatom assemblages from Adirondack lakes (New York, USA) and the development of inference models for retrospective environmental assessment. *Journal of Paleolimnology* 8: 27-47.
6. Eloranta P. 1986. Phytoplankton structure in different lake types in central Finland. *Holarctic Ecology* 9: 214-224.
7. Hillbricht-Ilkowska A. 1998. Różnorodność biologiczna siedlisk słodkowodnych. [W:] M. Kraska (red.) Bioróżnorodność w środowisku wodnym. Idee Ekologiczne 13, Ser. Szkice nr 7: 13-54.
8. Hillbricht-Ilkowska A., Kajak Z. 1986. Parametry i wskaźniki przydatne do kontroli zmian funkcjonalnych i strukturalnych w ekosystemach jeziornych ulegających procesowi eutrofizacji. [W:] A. Hillbricht-Ilkowska (red.) Monitoring ekosystemów jeziornych. Wyd. PAN, Wrocław-Warszawa-Kraków-Gdańsk-Łódź ss. 23-45.
9. Hutorowicz A. 1993. *Gonyostomum semen* (Raphidophyceae) in Lake Smolak in northern Poland. *Fragm. Florist. et Geobot.* 38: 163-171.
10. Hutorowicz A. 1999. Zbiorowisko fitoplanktonu jako wskaźnik eutrofizacji jeziora Wigry. [W:] B. Zdanowski, M. Kamiński, A. Martyniak (red.) Funkcjonowanie i ochrona ekosystemów wodnych na obszarach chronionych. Wydawnictwo IS, Olsztyn ss. 279-288.
11. Hutorowicz A. 2001. Fitoplankton humusowego jeziora Smolak na tle zmian warunków fizyczno-chemicznych wywołanych wapnowaniem i nawożeniem. Idee Ekologiczne 14, ser. Zeszyty nr 7.
12. Kajak Z. 1995. Hydrobiologia. Ekosystemy wód śródlądowych Dział Wydawnictw Filii UW w Białymstoku.
13. Kawecka B., Eloranta P. V. 1994. Zarys ekologii glonów wód słodkich i środowisk lądowych. Wydawnictw Naukowe PWN, Warszawa
14. Keskitalo J. 1976. Phytoplankton pigment concentrations in the eutrophical Lake Lovojärvi, south Finland. *Ann. Bot. Fennici* 13: 27-34.
15. Oleksowicz A. 1988. Dynamika zbiorowisk glonów w troficznie zróżnicowanych jeziorach Pojezierza Kaszubskiego. Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Rozprawy. Toruń.
16. Pliński M., Picińska J., Targoński L. 1984. Metody analizy fitoplanktonu moskiego z wykorzystaniem maszyn liczących. *Zesz. Nauk. Wydz. Biol. i Nauk o Ziemi. Oceanografia*, 10: 129-155.
17. Reynolds C. 1984. The ecology of freshwater phytoplankton. *Studies in Ecology*, Cambridge University Press.

18. P., Hall R., Korsman T., Renberg I. 2000. Diatom transfer-functions for quantifying past air temperature, pH and total organic carbon concentration from lakes in northern Sweden. *Journal of Paleolimnology* 24: 109–123.
19. Sladeček V. 1978. relation of saprobic to trophic levels. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 20: 1885-1889.
20. Starmach K. 1963. *Rośliny słodkowodne. Wstęp ogólny i zarys metod badania.* PWN, Warszawa
21. Starmach K. 1989. *Plankton roślinny wód słodkich.* PWN, Warszawa
22. Szelaż-Wasielewska E. 1992. Relationships between phytoplankton and abiotic elements in a dam reservoir. *Acta Hydrobiol.* 34 (4): 341-356.
23. Utermöhl H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. internat. Verein. Limnol.* 9: 1-38.