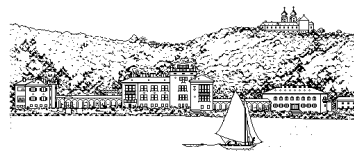


# *Ecology of Lake Balaton/ A Balaton ökológiája*

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, fajsztintú 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 fajsztintú 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**

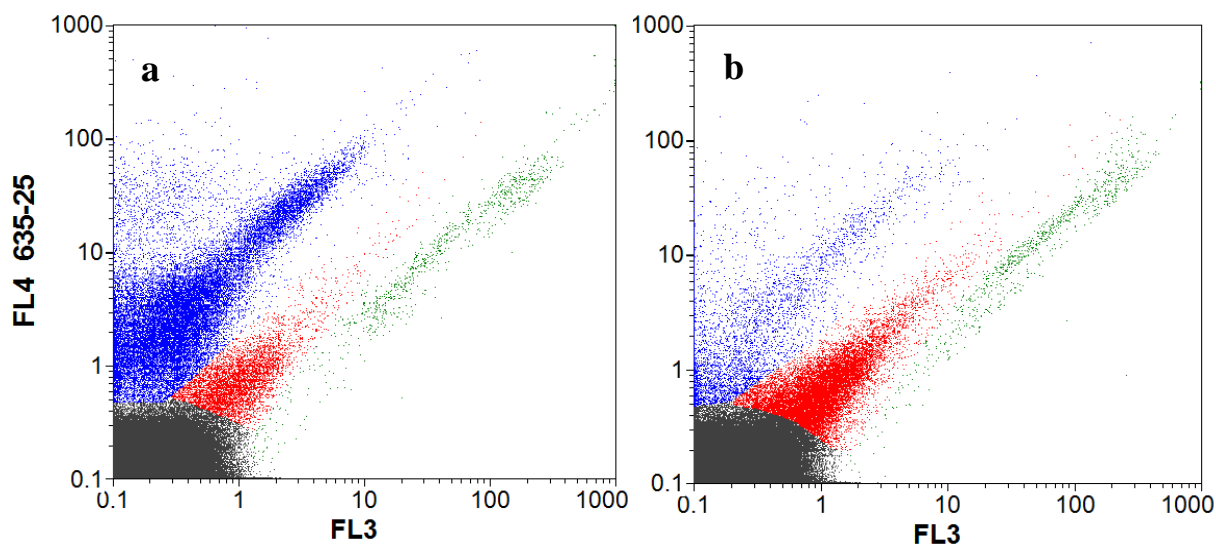
A mintavételek 2013-ban és 2014-ban történtek kétheti/havi gyakorisággal áprilistól novemberig. A vizsgálatok minden esetben frissen gyűjtött vízoszlop mintákból történtek Partec CyFlow Space citométerrel. A vízmintában lévő sejtek detektálása 200  $\mu\text{m}$  átmérőjű kapillárisban történt, 1  $\mu\text{l/s}$  áramlási sebesség mellett, 830  $\mu\text{l}$  mintatér fogat felhasználásával. Köpenyfolyadékként 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 látótérrel 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 (Balatonfűzfőnél, **1.b ábra**) a fikoeritrines taxonok abundanciája volt magasabb.

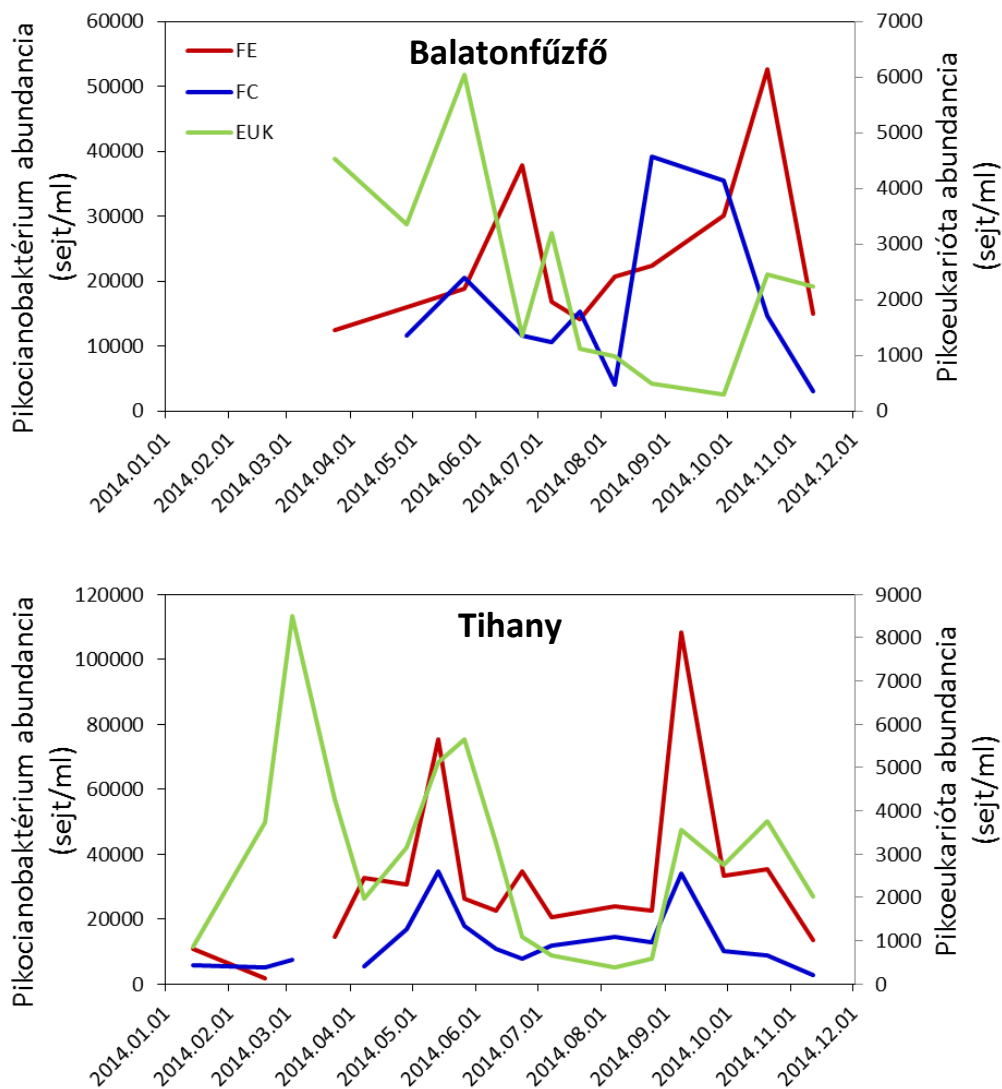


**1. ábra.** A fitoplankton citometriai szórásdiagramja Keszthelynél (**a**) és Balatonfűzfőnél (**b**) 2013. július 23-án. FL3 (optikai csatorna): kék lézeres (488 nm) gerjesztésből adódó vörös fluoreszcencia relatív intenzitása; FL4 (optikai csatorna): vörös lézeres (635 nm) gerjesztésből adódó vörös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

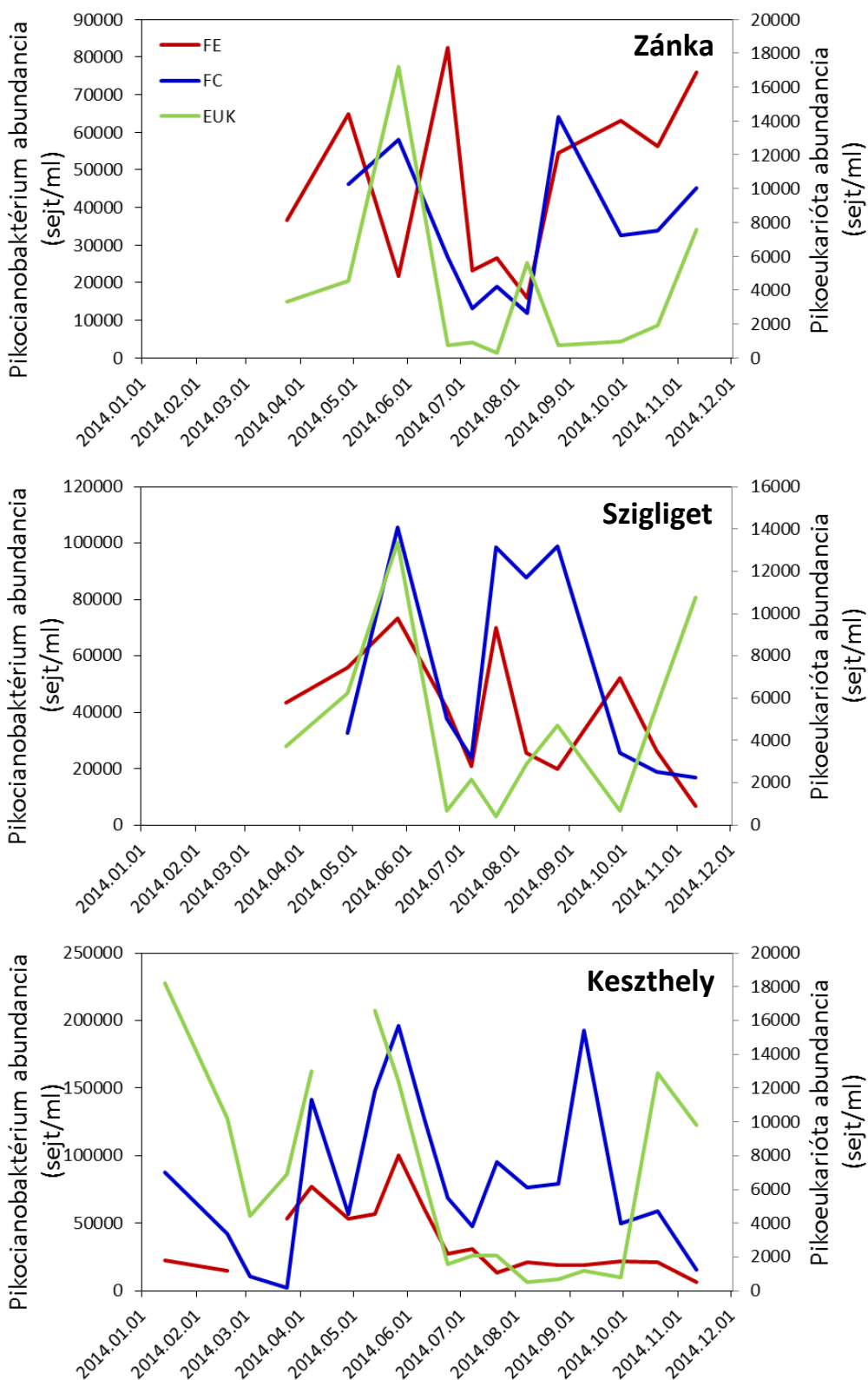
így mind szezonálisan, mind a tó hossztengeye mentén nyomon követhető (2.a, 2.b ábra).

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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>).



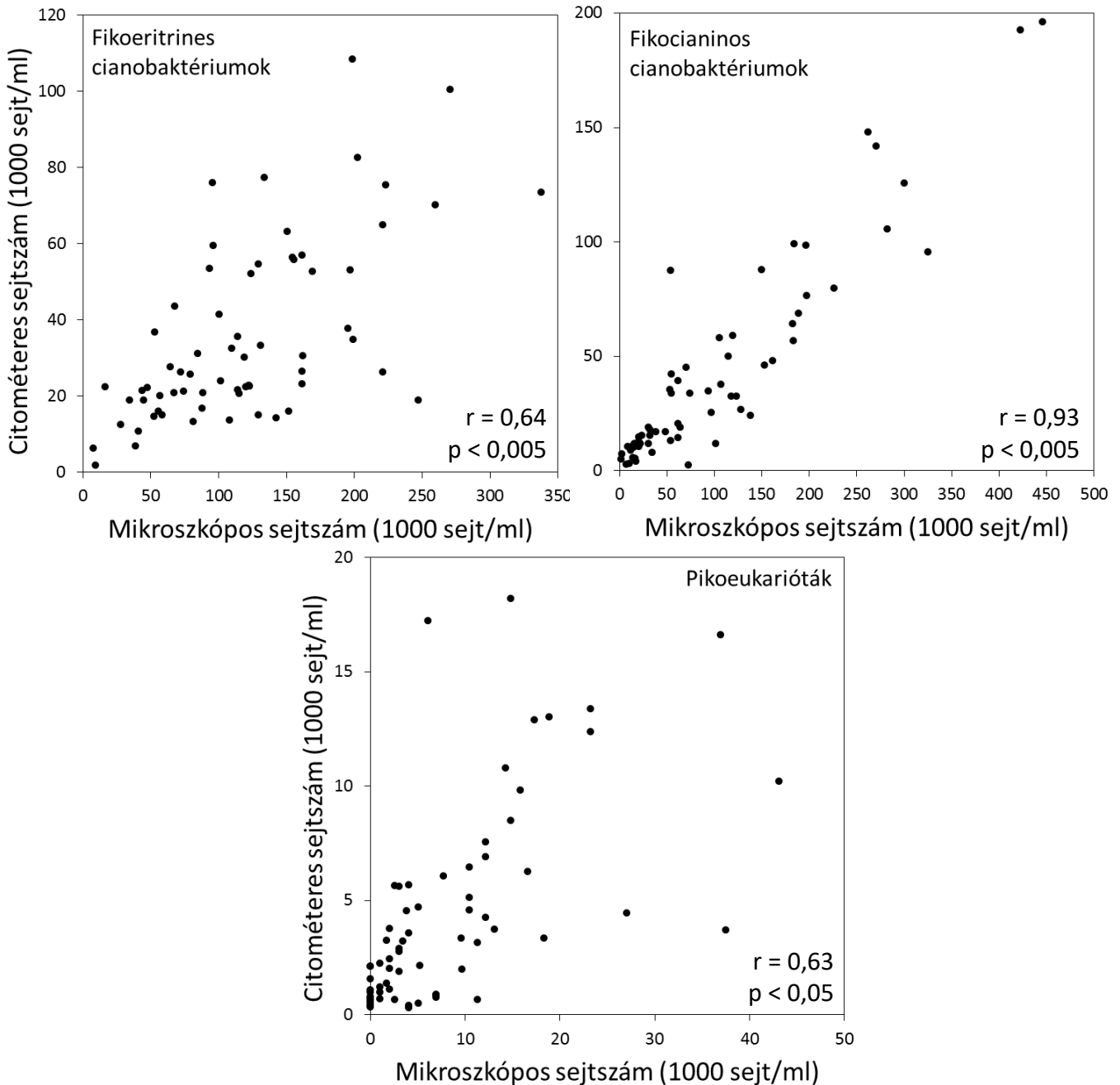
**2.a ábra.** A autotróf pikoplankton abundanciájának szezonális változása 2014-ben a Balatonban Balatonfűzfőnél és Tihanyánál. FE: fikocianobaktériumok; FC: fikocianinok; EUK: pikoekarióták.

*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<sup>-1</sup> volt (fikocianinos és fikoeritrines együttesen), Keszthelynél ez az érték megközelítette 300000 sejt ml<sup>-1</sup>-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<sup>-1</sup>-ről Keszthelyig 190-200 ezer sejt ml<sup>-1</sup>-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<sup>-1</sup>) találtunk.

A Balatoni vízminták áramlási citometriai vizsgálata alapján megállapíthatjuk, hogy a módszer alkalmasnak bizonyult a tó trofitási gradienséből 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<sup>-1</sup> 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