

## Mikrobiální ekologie vody

### 4. Metody – přehled: **Jak a Proč**



PřFUK Katedra ekologie  
Josef K. Fuksa, VÚV T.G.M.  
josef\_fuksa@vuv.cz

© JKF 2008

### Metody mikrobiální ekologie vody

Specifika:

- Směs kmenů (populací).
- Nedefinované prostředí (velikost habitatu).
- Interference dalších skupin organismů.
- Mikrobiální složka společenstva vs. možnosti sledování na úrovni populace, jedince...

Vývoj:

- Práce na miskách.
- Práce se společenstvem jako Black box.
- Kombinace buňka/polulace + „fysiologie“.

2

### Metody mikrobiální ekologie vody

Obecný a zjednodušený rozdíl proti obecnému přístupu k ekologii Eukaryot:

- Nic na nich nevidím – ani abych je „poznal/a“, ani abych si představil/a co „tam doma“ dělají.
- Pozorováním „v zajetí“ se toho také moc nedovím o tom co dělají „doma“.
- Musím použít „sofistikované metody pozorování“.

3

### Metody mikrobiální ekologie vody

1. Počty organismů.
2. Biomasa.
3. Identifikace.
4. Růstová rychlost
5. Produkce.
6. Aktivita.
7. Interakce v ekosystémech.
8. Vzorování a práce se vzorky.

4

### 1. Počty mikrobů ve vodě:

Přímé metody:

- Elektronová mikroskopie.
- Optická mikroskopie.

Kultivační metody:

- Pevné půdy.
- Tekuté půdy – MPN.

Stanovení virů:

Přímé a kultivační metody i mikroskopie.

5

### Počty mikrobů ve vodě – přímé metody:

Elektronová mikroskopie.

Optická mikroskopie:

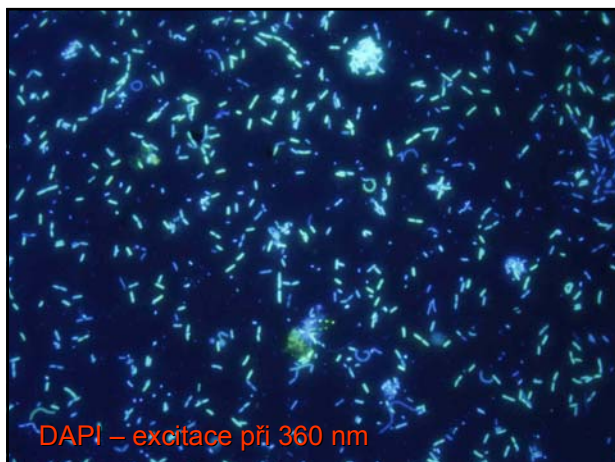
Procházející světlo:

- Erythrosin (Razumov).
- Akridinová oranž (Strugger).
- Fázový posun apod.

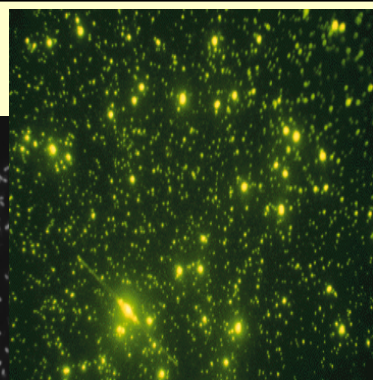
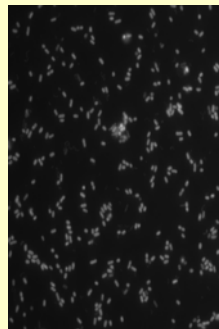
Epifluorescence:

- AODC (470 nm).
- DAPI (360 nm) + kombinace.
- Počty „označených“ buněk (markery).

6



DAPI:



8

### Počty mikrobů ve vodě – přímé metody:

Provedení (nezávisle na metodě):

1. Fixace a Filtrace vzorku.
2. Barvení / odbarvení filtru.
3. Montování do imersního oleje.
4. Počítání (okem nebo image analysis).

Výpočet:

- Propočtená plocha/počet polí mřížky.
- Filtrovaný objem, filtrační plocha.
- Analýza mikroskopického obrazu.

9

### Kultivační metody – misky:

**Misky s pevnými půdami** = substráty, růstové faktory, soli, puřry atd. + agar – agar.

- Roztírání na povrch misky, nebo
- zalévání do roztaveného vlašného agaru.
- Kultivace v termostatu (standardní čas a teplota !!).
- Počítání kolonií.

**Ředění vzorků** / optimální počet kolonií na misce.

**Výsledek:** Počet kolonií = KTJ či CFU / ml.

**DISPROPORCE** proti PŘÍMÝM METODÁM !!!

10



### Kolonie na miskách:

MPA  
MFC  
Enterokoky



## Kultivační metody – tekuté půdy:

Ředění vzorků – řada ředění (desetinná).

- Inokulace do zkumavek s médiem.
- Kultivace v termostatu.
- Stanovení pozitivních zkumavek – četné možnosti : zákal, „změna barvy“ (růst, pH), mikroskopický nález, produkce metabolitu...
- Výpočet statistické hodnoty MPN.
- Výsledek: **MPN** – Most Probable Number.

Proti „miskám“ podstatně více možností, bez limitace prostorem na misce a „kolonií“.

13

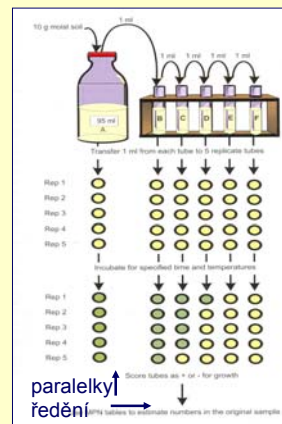
## Most Probable Number

MPN [ml<sup>-1</sup>] je **nespojité** (statistická) hodnota.

Podmínky:  
Min. 5 paralelek a 5 ředění.  
Poslední ředění negativní.

Obrovské možnosti:

- volby média
- podmínek kultivace
- indikace pozitivních zkumavek
- **Automatizace**  
- destičky, odečítání, PC knihovny...



## Disproporce

mezi přímými a kultivačními metodami:

- Specifičnost médií.
- Koncentrace substrátů vs. vlastnosti kmene/populace.
- SAD – Substrate Accelerated Death.
- Teplota při zalévání a kultivaci.
- Konkurence na misce – prostorová, substráty, metabolity.
- Doba kultivace – pomalu a rychle rostoucí typy.
- Klustery – mikrokolonie, vločky > 1 kolonie.
- Pohyb po povrchu agarů.
- Obecně, ale ne vždy:  
Čím bohatší „vzorkované prostředí“, tím vyšší procento „kultivovatelných“ v celkovém počtu.

15

## Virtuální metodické cvičení



Metoda citlivá na Fe:

1. Kolik jich je ?  
(Bez civilistů !!)
2. Mrtví / živí ?

- Běhají / neběhají.
- Mávají mečem / nemávají.
- Stojí / leží.

© JKF 2008

## Viable count:

Vztah k S	OLIGOKARBOFILNÍ AUTOCHTONNÍ	KOPIOTROFNÍ ALLOCHTONNÍ
Původ	AUTOCHTONNÍ	ALLOCHTONNÍ
Růst na mediích	Nukultivovatelné Viable / nonculturable VBNC	Kultivovatelné Viable / culturable
Charakteristiky:		
K	nízká	vyšoká
μ-max	nízká	vyšoká
V-max	nízká	vyšoká
Vyhrává/kontroluje	nízké S K -spec.	vyšoké S „r - spec.“

17

## Viable count – jsou živé ?

Růst na mediích – misky, zkumavky.

Přímé metody:

- Autoradiografie – příjem značených substrátů.
- Respirace – TTC, TCA >> formazan.
- Afinita ke genetickým sondám.

Výsledek:

Většina buněk barvených AODC nebo DAPI je (byla před fixací vzorku) **živá**.

18

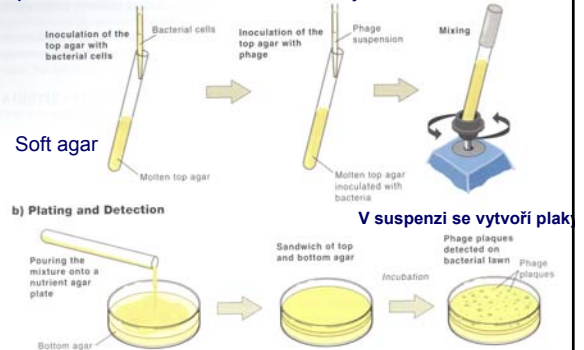
## VIRY:

- Většinou fágy.
- Elektronová mikroskopie.
- Epifluorescenční mikroskopie (DAPI, SYBR gold).
- Klasická kultivační metodika:  
Suspenze citlivého bakteriálního kmene + vzorek >>> plaky. Potlačení bakterií ve vzorku (chloroform).
- Patogenní viry – speciální techniky.

19

## Klasické stanovení bakteriofágů:

Suspenze standardního bakt. kmene + vzorek vody.



## 2. Biomasa

Základní problém:

Nelze oddělit bakterie (společenstvo, populaci) od ostatních částic ve vzorku a potom provést stanovení.

Možnosti:

- Mikroskopické metody.
- Chemické metody.

21

## Ekologie – který organismus je úspěšný?

Tatínek pěruje synka:

„Johnny, když bylo Abe Lincolnovi tolik co tobě, tak se ve světle krbu celé večery učil!“

„Jo, tati, a když mu bylo tolik co tobě, byl prezident!“

Dodatek skeptika: „Když mu bylo tolik co mně, byl dávno mrtvola. A bezdětek.“

Jen správné otázky v pravý čas a na správném místě vedou ke správné odpovědi. Va dalším kole může být správná další odpověď.

22

## Biomasa - mikroskopicky

DAPI (AODC):

- Celkový počet bakterií (buněk).
- Změření délky a šířky, výpočet objemů.
- Průměrný objem buňky.
- Faktor objem >  
> sušina (45%) > C-org. (10-30fgC/buňka)

Výpočet bakteriální biomasy:

- Biovolume / ml.
- Sušina / ml.
- C-org / ml.
- Manuálně nebo **analýzou obrazu**.
- **Problém – poznat bakterie a archebakterie.**

23

## Biomasa chemicky:

**ATP:** Aktivní biomasa:

V moři O.K., ve sladkých vodách interference ostatních organismů.

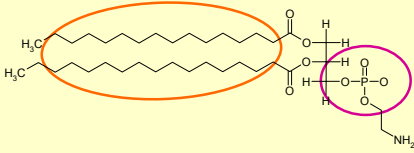
**PLFA:** PhosphoLipid Fatty Acids

- Pouze Prokaryota.
- Rozdíl Eubacteria / Archea.
- Specifické „markery“ pro různé typy.

24

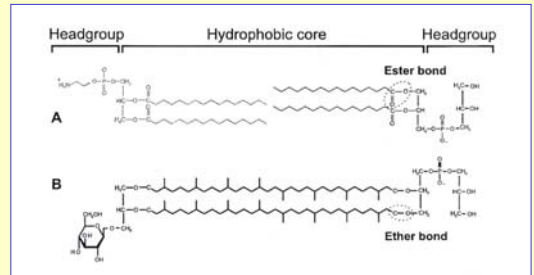
## Biomasa PLFA

Mastná kyselina – glycerol – fosfát.



25

## Biomasa PLFA



A - Eubacteria  
B - Archaea

26

## Biomasa PLFA

Mastná kyselina – glycerol – fosfát.

FA/glycerol:

- Eubacteria – esterová vazba.
- Archea – etherová vazba,
- G+ :větvené PLFA
- G- : nenasycené PLFA.
- Bohaté možnosti knihovny markerů.
- Živá biomasa. (Intepretace ne vždy jasná.)

27

## 3. Identifikace

### Klasické metody:

Isolace kolonie, kultivace, biochemické testy, tvar kolonií atd.

Bergeys Manual, jména, čísla/kódy.

Imunologické metody.

Analýzy komponent biomasy – PLFA.

Analýza výsledků: Automatizace, knihovny matric testů. DENDROGRAM typů.

Průmyslová a zdravotnická mikrobiologie.

*Další přístupy viz Hygienické aspekty.*

28

### Identifikace - klasické metody:

- Výsledek: Určení druhu, kódu.
- Klasická taxonomie, základem je „rod“.
- Neodpovídá fylogenezi, atd.

Lze určit všechny bakterie ve vzorku?

Ne, protože:

- Nerostou na médiích.
- Nemají jména.
- Je jich moc - kusů a asi i druhů.

29

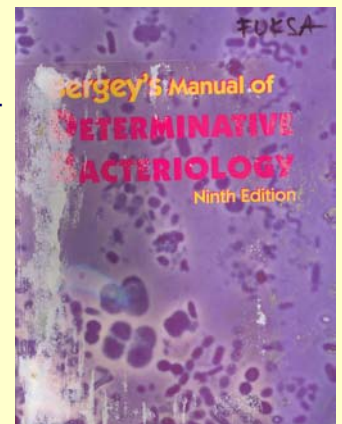
## BIBLE

Edice 9 - 1994

787 stran

## 36 skupin

BM of  
Systematic  
Bacteriology  
(2001)



## Identifikace - klasické metody:

Fysiologické skupiny – pragmatický přístup:

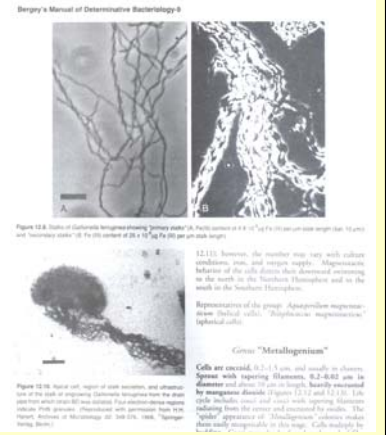
Skupiny podle významného fysiologického rysu:

- Amonifikace.
- Nitrifikace.
- Denitrifikace.
- Sírné (autotrofní).
- Desulfurikační.
- Železité.
- Sporující.
- Rozkládající tuky, ropné uhlovodíky, celulózu atd.

Některé skupiny jsou zcela umělé.

31

## “Železité bakterie” Gallionella

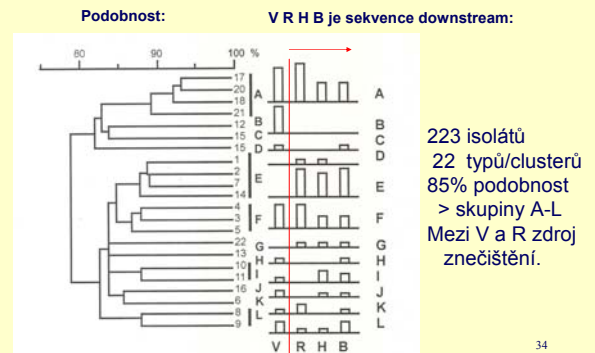


## Co poskytuje klasická identifikace ?

- Rutinní data pro testování podle norem (hygiena, průmysl).
- Kontrola hygienicky významných typů – patogenů, indikátorů.
- Podobnost vzorků v oblasti možnosti identifikace – přísun do systému apod.
- Změny vzorku v čase, změny struktury společenstva (pro významné typy) v čase, podél proudu, atd.

33

## Klasická identifikace – Maše, HbÚ AVČR



## Identifikace – molekulární metody

Ribozomální RNA 16S (23S): Konservativní, nefunkční gen, nízký horizontální transfer, typická pro fylogenetické skupiny,

pro „druhy“??

**Ecotype:** Defined by environment.

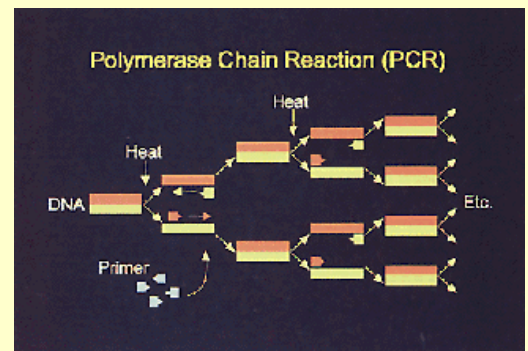
**Phylotype:** Defined by phylogenetic group, related to ribotype.

**Ribotype:** Different 16S rRNA sequence.

**Operational Taxonomic Unit (OTU):** anything goes.

35

## PCR – jakýkoliv vzorek



36

## PCR a co dále:

Vzorek – extrakce DNA, RNA.

PCR v cyklech.

Identifikace amplifikovaných fragmentů.

- Hybridizace sondami.
- Elektroforéza.

Příprava genetických sond.

Sondy >> FISH.

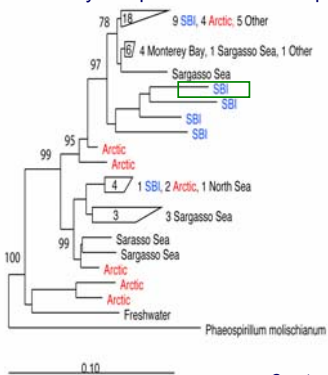
37

## Klasika - PCR mořských vzorků:

- 30% bakterií v oceáně je **SAR 11** (původně typ Sargasso Sea 11):
- Neroste na půdách.
- Neroste v obohacené mořské vodě.
- Je heterotrofní.
- Doba zdvojení > 26 hodin.
- Už je jasno, že to není „druh“.

38

Nearly complete 16S rRNA sequences of all SAR11



SAR11 is not one “species”

Average difference is about 15% among SAR11

Constructed by Matt Cottrell

40

## FISH - fluorescent in situ hybridization

### 1. Fixace vzorku - Lugol, pak formaldehyd.

- Po > 2 hod odbarvení thosíranem.
- Filtrace (0,2 µm Poretics), propláchnutí.
- **Filtry uskladnit v -20°.**

### 2. Hybridizace:

- Sonda + pufr (NaCl, Tris, formamid atd.)
- **Filtr na výseče, expozice se sondami - 2 hod při 46°.**
- Proprání (pufr, destilka).

### 3. Barvení DAPI.

- Proprání.
- Sušení.

40

## FISH - fluorescent in situ hybridization

### 4. Zpracování vzorku - mikroskop (epifluorescence):

- **Celkové počty DAPI.**
- **Počty označených (hybridizovaných) bakterií.**
- (Media zpomalující vyhasínání fluorescence.)

**SONDY:** Fluorochrom - Cy3 - indokarbocyanin.

- Eubacteria
- α - Proteobacteria
- β - Proteobacteria
- R - BT (podskupina β - Proteobacteria)
- γ - Proteobacteria
- Cytophaga - Flavobacterium
- Gram pozitivní

41

## FISH – další možnosti

- Libovolná sonda – osudy v systému.
- Kombinace s autoradiografií – utilizace značeného substrátu (<sup>3</sup>H) MAR FISH.
- Kvantitativní autoradiografie STAR FISH.
- Kombinace s měřením dalších aktivit v buňce – respirace apod.
- **Bez kultivace.**
- **Podmínky in situ, až pak fixace vzorku atd.**
- **Přiblížení úrovní autekologie.**

42

## FISH – LIMITACE

- Citlivost – stav populace/buněk.
- **CARD-FISH** (horse raddish peroxidase)
- Specifické/nescifické sondy.
- **Fylotypy nejsou ekotypy.**
- **Označená skupina není populace.**
- Ekologický význam „označené skupiny“ musí být potvrzen dalšími metodami/důkazy.
- Lze použít „nekonzervativní“ části RNA?

43

## 4. Růstová rychlost

### Růst = dělení buněk – ztráty

Ztráty:

- Mortalita obecně
- Fágy – lyze
- Žraní - prvoci, filtrátoři, benthos...

Možnosti:

Populace: Identifikace „našeho“ kmene.  
Práce s kmenem – chemostat.

Společenstvo: Celkové změny.  
Identifikace kmenů / skupin během pokusů.

PCR: „Počty“ genů pro enzymy, skupiny apod.  
Není nutno pracovat s mikroby, stačí např. sediment.  
Záleží na PRIMERU !!! Záleží na aktivitě (represi) enzymu.  
Knihovny sekvencí.

44

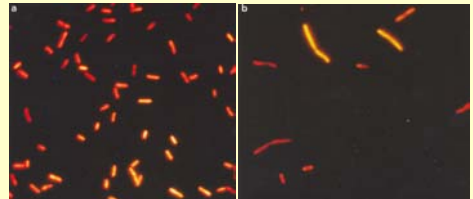
## Růstová rychlost:

- Změny celkových počtů během inkubace.
- Porovnávání paralelek : filtrované/nefiltrované atd.
- Lze kombinovat s FISH atd. („populace“).
- Inkubace v lahvích, v dialyzačních membránách atd.
- Výpočet – viz rychlost dělení  $T=1/R(c)$ .
- Problémy – délka inkubace!!
- Pro populace – chemostat.

45

## Růstová rychlost

- Frekvence dělení buněk obecně: celk. počty + analýza velikostí
- Frequency of Dividing Cells (jen G-): kys. nalidixová – inhibice tvorby přepážky



46

## 5. Produkce

Produkce = tvorba biomasy.

1. Stanovení změn objemové produkce během inkubace: DAPI + Image Analysis (+ autoradiografie atd.).
2. Inkorporace  $^3\text{H}$ -thymidinu.
3. Inkorporace  $^3\text{H}$ -leucinu.

47

## Inkorporace $^3\text{H}$ -thymidinu.

- Krátká inkubace – THY do DNA.
- Nízké koncentrace (10-20 nmol/l THY).
- Postup:
- Inkubace (0,5 hod) + fixace (formalin).
- Filtrace (za chladu), promytí TCA.
- Měření radioaktivity filtrů (LSC).
- **Výsledky:** inkorporace THY pmol/l/hod, přepočet na objem, sušinu, C-org. (viz „2. Biomasa“).

48



## Inkorporace $^3\text{H}$ -thymidinu

Problémy: Selektivita THY >> DNA.  
(možná i jako substrát).

### Inkorporace $^3\text{H}$ -leucinu:

- orientace na metabolismus,
- spolehlivější.

49

## Cytofluorometrie - třídění vzorku

Za přiměřených podmínek lze po

- barvení specifickými barvivami,
  - aplikaci genetických sond,
  - navázání např. železa,
- rozdělit vzorek cytofluorometricky na „populace“ nebo skupiny.

50

## 6. Aktivita

### Co to je?

- Aktivní buňka je taková, u které lze prokázat životní projevy přímo, nebo v krátkodobém inkubačním pokusu (Hobbie). Mezi aktivitou a produkcí není stoprocentní přechod. Mnohdy se měří rychlost transformace látek a podíl na metabolismu systému.

### Projevy aktivity:

- spotřeba substrátu (a akceptoru e),
- produkce metabolitu (vč.  $\text{CO}_2$ ),
- schopnost růstu.
- Patří sem i stanovení % aktivních B.

51

## 6. Aktivita - Respirace:

Měření spotřeby kyslíku n. produkce  $\text{CO}_2$  :

1. Krátkodobé měření v podmínkách in situ.
2. Separace fytoplanktonu, eukaryot atd.
3. Filtrací se oddělí část B na partikulích.
4. Možnosti měření:  
V lahvích, v komůrkách, Warburg, zvony na sedimentu ....
5. Rozdíl proti BSK – viz 1) !!!

52

## 6. Aktivita – značené substráty:

### Autoradiografie:

- Průkaz inkorporace do jedné určité buňky.
- Kombinace s DAPI, FISH atd. (viz MAR FISH).
- Pro bakterie –  $^3\text{H}$  – substráty/tracery!  
Proč? – dolet  $\beta$  částice v emulzi.

53

## 6. Aktivita – značené substráty:

### Uptake (= spotřeba):

- Inkubace, fixace, filtrace, měření radioaktivity – „jak prosté“, ale....

Problémy:

- Čím, jak, kde značeno.
- Poměr přidané (A) a přirozené koncentrace (S).
- Lokalizace značeného atomu v molekule a v metabolismu (inkorporace/respirace).

54

## 6. Aktivita – značené substráty:

Čím, jak, kde značeno:

$^{14}\text{CO}_2$ ,  $^{32}\text{S}$ , ...:

- Známe koncentraci, ale nevíme KDO inkorporuje (autotrofové).

$^{14}\text{C}$ -org (substráty):

- Známe „místo“ uhlíku v molekule. Neznáme koncentraci substrátu v systému.
- Můžeme měřit „osud“, tj. inkorporaci / respiraci.
- Přidáváme vysoké koncentrace ( $A \gg S$ ).

$^3\text{H}$ -substráty:

- Nízké koncentrace, neznáme „místo“.
- Transport H a C „se liší“.

55

Uptake  $^{14}\text{C}$ -glukosy apod.:

- Uptake nespecifického substrátu.
- Prokázána „saturační kinetika“.

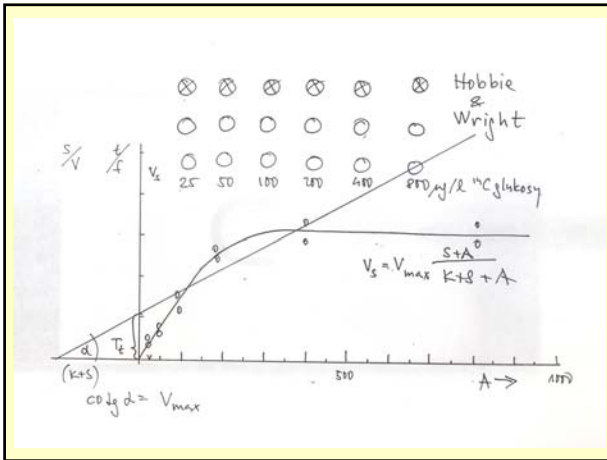
$$V = V_{\max} \frac{S}{K+S}$$

- Neznámá přirozená koncentrace.
- Možnosti stanovení parametrů saturační křivky:  $V_{\max}$ ,  $(K+S)$ .

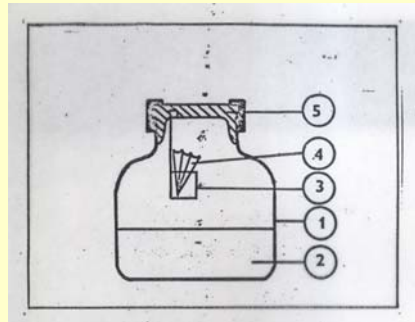
$$V_S = V_{\max} \frac{(S+A)}{(K+S+A)}$$

- Stanovení inkorporace s řadou koncentrací (A) a linearizace křivky.

56



## Inkorporace vs. mineralizace



58

## Uptake: Inkorporace + mineralizace

1. Během inkubace se nesmí změnit „počet enzymových jednotek“.
2. Substrát typu glukosy je postupně mineralizován na  $\text{CO}_2$ .
3. Lze měřit na jednom vzorku inkorporaci i mineralizaci.
4. % mineralization pro daný substrát odpovídá Yieldu (viz 1 a 2).
5. Během inkubace klesá  $(S + A)$  a tím i rychlost uptake / linearita v čase. (5-10%A.)

59

Uptake  $^{14}\text{C}$ -glukosy apod. a  $^3\text{H}$ -substráty:

- S  $^3\text{H}$ -substráty lze měřit  $V_{\max}$  jen máme-li jistotu, že „jsme“ v saturační oblasti MM křivky.
- V tom případě můžeme měřit i s  $^{14}\text{C}$  bez nutnosti „celé řady“.
- S  $^3\text{H}$ -substráty lze TEORETICKY měřit i respiraci - pokud oddělíme rozpuštěný zbytkový  $^3\text{H}$ -substrát od  $^3\text{H}_2\text{O}$ .

60

### Problémy:

- Interference nespecifických substrátů – ředí značený substrát, vychází „nízká aktivita společenstva“.
- Substráty typu kys. glykolové – vysoké % mineralizace.
- Rozsah koncentrací nezabírá celou křivku.

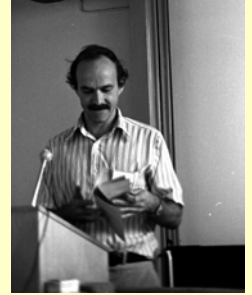
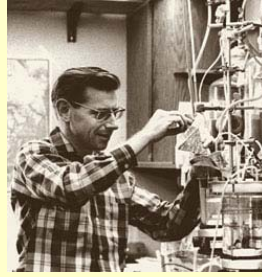
### Proč se společenstvo chová jako populace ?

- **Jannasch:** Jeden dominantní kmen.
- **Hobbie:** Všichni jsou K-specialisti a mají podobné charakteristiky.

61

Holger. W. Jannasch (1927 – 1998)

John. E. Hobbie



62

Enzymové aktivity:

### Enzymy dýchacího řetězce (ETS):

Tetrazolové soli (náhradní akceptory elektronů >> formazany):

- **TTC** : 2,3,5-trifenylyl tetrazolium chlorid
- **INT** : 2-(4-iodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-fenyl tetrazolium chlorid
- **CTC** : 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chlorid
- **XTT** : 3'-[1-(fenylamino)-karbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) hydrát kyseliny benzensulfonové
- **INDIKACE:**

Fotometricky, mikroskopicky v buňkách.

63

### Enzymové aktivity – ETS – redukce FDA:

Nespecifické esterázy:

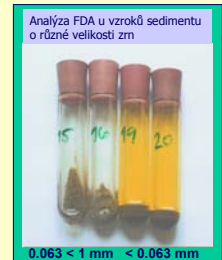
Fluorescein diacetát → fluorescein.

Detekce :

- Fotometricky.
- Mikroskopicky.

Integrita membrán:

Viable / non viable.



64

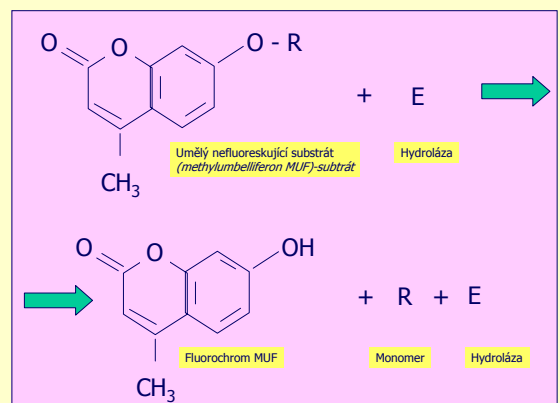
Enzymové aktivity - extracelulární enzymy:

**MUF-substrát + enzym (in situ) →**

**MUF (volný) + produkt(monomer) + enzym**

- Jedna nebo série inkubací v rozmezí  $10^{-4}$  až  $10^{-8}$ M (0,5 hod).
- Fluorimetrické stanovení.
- Vyhodnocení „křivek“ – často dvě křivky atd., nutná nelineární regrese.
- Interference – zákal, pH, přirozené enzymy.
- Výsledek: EEA nmol/litr/hod.

65



66

## Běžné substráty pro EEA:

Alkalické fosfatázy :

4-Methylumbelliferyl phosphate (MUFPP) 365/460 nm

$\alpha$ -D-Glucosidase ( $\alpha$ Glc) (škrob):

Methylumbelliferyl- $\alpha$ -glucopyranosid (MUF $\alpha$ Glp), 365/460 nm.

$\beta$ -D-Glucosidase ( $\beta$ Glc) (celulóza):

Methylumbelliferyl- $\beta$ -glucopyranosid (MUF $\beta$ Glp), 365/460 nm.

Leucine aminopeptidase (Leu-amp):

L-Leucine-4-methyl-7-coumarinylamideHCl (LeuMCA), 380/440 nm.

L-Leucine-p-nitroanilide (LeuPNA), spektrofotometricky při 380 nm.

$\beta$ -N-Acetylhexosaminidase (chitin):

Methylumbelliferyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (MUFGlcNAc), 364/465 nm.

67

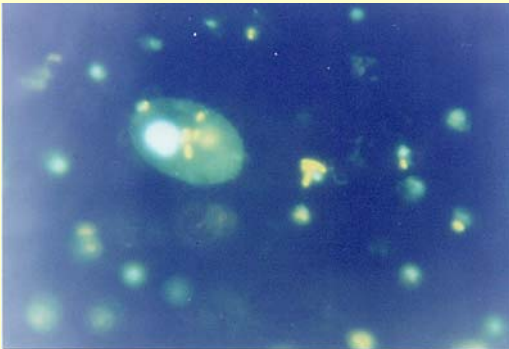
## 7. Interakce v ekosystémech:

Vyžírání bakterií:

- Změny počtů **B** při inkubaci – oddělení (filtrace) predátorů.
- Značené buňky – RA, fluorescenčně (FLB): Indikace ve vakuolách, ve střevě.
- Značené buňky – FISH.
- Značené částice (beads) simulující bakterie.

68

Prvek obsahující FLB:



## 7. Interakce v ekosystémech:

**Utilizace extracelulárních produktů PP:**

- Inkubace s  $^{14}\text{C}$ -karbonátem (PP B a.W).
- $^{14}\text{C}$ -karbonát  $\gg$   $^{14}\text{C}$ -org. v biomase +  $^{14}\text{C}$ -org. v extracelulárních produktech.
- Filtrace – oddělení buněk (B+Ř).
- Odehnání přebytku  $^{14}\text{C}$ -karbonátu.
- Stanovení  $^{14}\text{C}$ -org. ve filtrátu.

70

## Utilizace specifických substrátů

- Stacionární růstové pokusy.
- Růst na jediném zdroji C-org.
- Kultivace ve specifickém prostředí.
- Degradace substrátu smíšeným společenstvem – biofilm, biofilmové reaktory, kometabolismus.
- *Stanovení toxicity a citlivosti na antibiotika.*

71

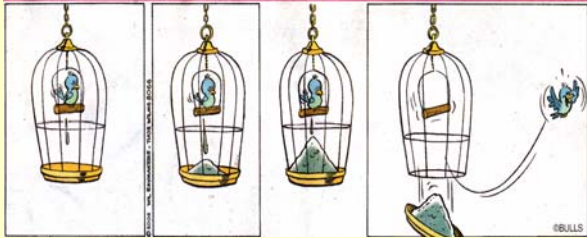
## A co vzorkování ??

- Bakterie nejsou makrozoobentos !!
- Riziko kontaminace je tu vždy.
- Sterilita: Hygienické problémy, vodovody, determinace ubikvitních typů.
- Podzemní vody, prameny, sedimenty, malé toky a nádrže: Kontaminace ze stěn, sedimentů, břehů atd.
- Pozor na denní cykly apod.!

72

### Obecně ke vzorkování:

A: Všechny vývoj atd. se skládá z denních a sezónních cyklů, a až někde nad nimi jsou „trendy“. Záleží na délce řídicích cyklů v systému (= vnějších) a jejich poměru k (vnitřním) cyklům „našeho“ objektu.



B: Trendy můžeme poznat až poznáme ty cykly, a ty většinou poznáváme jen dozadu.

73

### Vzorkování a osud vzorku:

#### Kultivační metody:

- Potřebujeme zastavit aktivitu a plně ji obnovit zase na místě. Nesplnitelné!
- Jak na to: Rychlé zpracování vzorků, opatrné chlazení atd.

#### Přímé metody:

- Většinou s fixací ihned po odběru, pak následuje „prodleva“ před dalším zpracováním.

74



**Příště: Dusík**