

JAN IGOR RYBAK

PORÓWNANIE WYBRANYCH METOD ILOŚCIOWEGO OPRACOWYWANIA PRÓB PLANKTONOWYCH

Z Zakładu Higieny Komunalnej PZH

WSTĘP

Ocena stopnia zanieczyszczenia zbiornika wodnego opiera się na założeniu, że organizmy typowe dla wód zanieczyszczonych charakteryzują w sposób pośredni środowisko, w którym żyją. Badanie jakościowego składu organizmów i ich ilościowego występowania daje w wyniku obraz warunków biocenotycznych panujących w danym zbiorniku i pozwala zakwalifikować wodę do odpowiedniej strefy saprobowej. Dla sanitarnego orzecznictwa nie jest decydująca obecność organizmów wskaźnikowych, lecz ich ilościowe występowanie. Jak wiadomo biologiczna analiza wody opiera się na masowo pojawiających się organizmach wskaźnikowych, a nie na sporadycznie występujących gatunkach. Badania jakościowe dają możliwość stwierdzenia, jakie gatunki występują w zbiorniku, ale dominację niektórych z nich prześledzić można tylko przy badaniach ilościowych. Również następstwo gatunków można obserwować tylko przy badaniach ilościowych.

Stosowanie w sanitarno-higienicznej ocenie wód powierzchniowych metod ilościowych obok jakościowych pozwala na uchwycenie zmian zachodzących w biocenozie badanego zbiornika i wcześniejszą interwencję w celu niedopuszczenia do dalszego zanieczyszczania. Nie ma metody zupełnie doskonałej i każda z metod stosowanych w praktyce posiada mniejszy lub większy błąd metodyczny. Zależny on jest zarówno od używanej aparatury, sposobu pobierania prób i metodyki ich opracowywania, w przypadku np. prób planktonowych stosuje się metody Sedgwick-Raftera, Kolkwitza, mikroskopu odwróconego Utermöhla lub metodę kropelkową (5). Jednak błąd jakim jest obarczona każda metoda nie powinien uniemożliwiać stwierdzenia charakteru i kierunku zmian w biocenozie z sanitarno-higienicznego jak również ekologicznego punktu widzenia. Jeżeli więc przy stosowaniu jakiejś metody popełnia się stale jeden i ten sam błąd to charakter i kierunek zmian w życiu zbiornika można mimo to łatwo uchwycić.

Trzeba tu również wspomnieć o metodzie czeskiego hydrobiologa *Gabriela* (2, 3, 4), która opierając się na tzw. indeksie biologicznym pozwala na uchwycenie stosunku między reducentami, producentami i konsumentami oraz wnioskowanie na tej podstawie o stopniu zanieczyszczenia badanej wody. Metoda ta nie zastępuje dokładnej analizy jakościowo-ilościowej (1) zapoczątkowanej przez *Kolkwitza* i *Marssona*, ale szybko relacjonuje o warunkach biocenotycznych na podstawie stosunku ilościowego między organizmami o różnych sposobach odżywiania.

Przy ilościowych badaniach planktonu zbiorników wodnych najczęściej nie przelicza się wszystkich obecnych w próbie organizmów ze względu na dużą zazwyczaj ich ilość. Stosuje się wtedy częściowe liczenie, przeliczając ilości osobników w części próby i przez odpowiednie przeliczenie otrzymują się prawdopodobną ilość osobników w całej próbie. Spośród wielu sposobów analizy ilościowej prób planktonowych wybrano tu kilka.

Tematem niniejszego opracowania jest porównanie ze sobą niektórych metod ilościowego badania planktonu w celu przedstawienia zalet i wad każdej metody. Badania porównawcze przeprowadzono na 6 próbach pobranych w Żabieńcu ze strugi leśnej i stawów. Każdą próbkę analizowano trzema metodami: Sedgwick-Raftera, Kolkwitza i metodą kropelkową. Prócz tego każdą próbę przejrzano w całości pod mikroskopem licząc występujące w niej organizmy.

METODYKA BADAŃ

Sposób postępowania z każdą próbką był następujący: zawartość słoika, w którym znajdowała się utrwalona próbka przelewano do cylindra miarowego, następnie, po opadnięciu na dno zawartych w niej organizmów, odciągano wodę nad osadu. Ilość pozostałej w cylindrze wody wraz z osadem uzależniona była od stosowanej metody. Dalsze postępowanie z próbą w zależności od metody było następujące:

Metoda I — kropelkowa — próbkę umieszczoną w cylindrze miarowym dekantowano do objętości 5 ml. Następnie w trakcie dokładnego mieszania pobierano pipetą o szerokim otworze część zawiesiny i spuszczano z niej na szkiełko przedmiotowe 1 kroplę. Po przykryciu szkiełkiem nakrywkowym przglądano całą kroplę pod mikroskopem. Z każdej próbki pobierano w ten sposób po 5 kropli. Po zsumowaniu ilości osobników występujących w poszczególnych kroplach, znając wielkość kropli obliczano ilość osobników w całej próbie.

Metoda II — Sedgwick-Raftera — używano w tej metodzie komory planktonowej, prostokątnej, płaskiej o objętości 1 ml. Dekantowano próbkę do objętości 10 ml, następnie, po dokładnym wymieszaniu, pobierano pipetą 1 ml roztworu, wylewano go do komory i liczono pod mikroskopem. Po odpowiednim przeliczeniu otrzymywano ilości form w próbie.

Metoda III — Kolkwitza — używano w tej metodzie komory planktonowej płaskiej, okrągłej o objętości 20 ml. Dno komory podzielone było na cały szereg prostokątów. Próbkę dekantowano do objętości 20 ml, następnie całą próbkę wylewano do komory. Po opadnięciu zawiesiny liczono osobniki w pięciu prostokątach wybranych losowo. Po odpowiednich przeliczeniach otrzymywano ilości osobników poszczególnych form w całej próbie.

W analizie ilościowej stosowanie metody kropelkowej daje możliwość używania dużych powiększeń mikroskopowych dla wykonania jednocześnie oznaczeń jakościowych. Używanie do badań ilościowych komór planktonowych stwarza konieczność stosowania małych powiększeń mikroskopu i w ten sposób badania jakościowe trzeba przeprowadzać oddzielnie. Istnieje obawa, że przy stosowaniu małych powiększeń nastą-

pić może pominięcie drobnych form przy liczeniu. Odnosi się to szczególnie do metody Kolkwitza.

W poszczególnych metodach do analizy pobierano różną ilość materiału i tak: przy metodzie I do obliczania ilości osobników użyto 0,4 ml roztworu z zagęszczonej próby, tzn. przejrzano pod mikroskopem 8% całej próby. Przy metodzie II przejrzano 10% całej próby, a przy metodzie III — 6,5% całej próby.

WYNIKI BADAŃ

Jak wspomniano we wstępie badaniom poddano 6 prób planktonu pobranych czerpakiem planktonowym 1 litrowym typu Patalasa. Wodę zagęszczano siatką planktonową nr 17. Wyniki podano w przeliczeniu na ogólne ilości osobników, według ilości uzyskanej dla każdej metody oddzielnie. Ponadto podano rzeczywiste ilości osobników występujących w danej próbie po przejrzaniu całej próby pod mikroskopem oraz obliczono dla wyróżnionych form procenty w stosunku do rzeczywistych ilości w próbie (tab. I).

Metoda I — kropelkowa — Uzyskane przy pomocy tej metody wyniki wykazywały duży zakres wahań między ilością wyliczonych osobników, a rzeczywistą ilością osobników zawartych w poszczególnych próbach. W odniesieniu do form drobnych (wrotki — *Rotatoria*) wartości liczbowe ulegały wahaniom od 55,5 do 146,6% w stosunku do rzeczywistych ilości w próbach. Jak wynika z tabeli I, najbliższą rzeczywistości wartość uzyskano w próbie 5 (89,2%) przy wystąpieniu 280 osobników wrotków, oraz w próbie 6 (84,0%) gdzie znaleziono 71012 osobników. W odniesieniu do innych form, (z wioślarek — *Cladocera* i z widłonogów — *Copepoda*) — różnice otrzymano jeszcze większe. Trzeba tu dodatkowo wyjaśnić, że niektórych form nie znajdowano niekiedy w ogóle np. *Copepodit* — *Cyclopidae* nie znaleziono w próbach 2, 3, 4, 5 i *Daphnia longispina* nie wystąpiła w próbie 1 (patrz tab. I).

Wynikało to z tego, że formy te występowały ogólnie w niewielkich ilościach i w większości przypadków istniało małe prawdopodobieństwo spotkania tych osobników. W próbie 3 na ogólną ilość 10 osobników *Diaptomus castor* znaleziono 2 osobniki przy użyciu omawianej metody, a z przeliczenia wynikało, że w próbie tej powinno być 25 osobników. Przeliczenie procentowe dawało 250% w stosunku do rzeczywistych ilości (tab. I).

Ogólne przeliczenia procentowe mające odzwierciedlać stosunek ilości osobników, przy użyciu w tym przypadku metody kropelkowej do ilości rzeczywiście obecnych w próbie zestawiono w tabeli II — wynika z niej, że wahania ilości obejmują zakres od 60 do 138%. Najbliższą rzeczywistości wartość otrzymano w próbie 4 (87,5%).

Metoda II — Sedgwick-Raftera. — Podobnie jak przy stosowaniu metody kropelkowej i w tym przypadku stwierdzono również duże wahania wyników. W stosunku do pewnych form różnice między otrzymanymi z przeliczeń wartościami liczbowymi, a rzeczywistymi zawartymi w próbie wynoszą od 0 do 1000% (przy występowaniu w próbie jednego okazu z *Harpacticoida*). Jest zupełnie oczywiste, że uzyskanie wyniku 0% jak również 1000% było spowodowane, podobnie jak przy

Tabe
Wyniki ilościowe i dane procentowe w stosunku
poszczególnych form zooplanktonu

Nr próby		1				2				3	
		I	II	III	całość próby	I	II	III	całość próby	I	II
Metoda											
Nazwa organizmu											
<i>Rotatoria</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$	146,6	186,9	52,8	100,0	80,5	80,5	34,4	100,0	55,5	111,1
		179,0	2230,0	630	1193,0	700,0	700,0	300,0	870,0	50,0	100,0
<i>Nauplii</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$		300,0		100,0	108,6	130,4	65,2	100,0	68,1	363,6
			10,0		3,0	250,0	300,0	150,0	230,0	75,0	400,0
<i>Copepodit Cyclopidae</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$		125,0	125,0	100,0					100,0	
			30,0	30,0	24,0					20,0	
<i>Copepodit Centropag.</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$										
<i>Harpacticoida</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$		1000,0		100,0						
			10,0		1,0						
<i>Diaptomus castor</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$	105,0	42,0	142,0	100,0					250,0	
		125,0	50,0	169,0	119,0					25,0	
<i>Bosmina longirostris</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$										
<i>Daphnia longispina</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$		142,0	214,0	100,0						
			10,0	15,0	7,0						
<i>Diaphanosoma brachyurm</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$										
<i>Ceriodaph. quadrangula</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$										
<i>Polyphemus pediculus</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$										
<i>Alona tenuicaudis</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$										
<i>Alona rectangula</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$										
<i>Cladocera iuv.</i>	$\frac{\%}{\text{ilość}}$	125,0	166,0	50,0	100,0				100,0		
		75,0	100,0	30,0	60,0				10,0		
O g ó ł e m		138,0	174,0	62,5	100,0	84,0	88,4	40,6	100,0	60,0	200,0
		1990,0	2440,0	874,0	1407,0	950,0	1000,0	450,0	1130,0	150,0	50,0

Ia I

do rzeczywistych ilości osobników
dla wyróżnionych metod

		4				5				6			
III	całość próby	I	II	III	całość próby	I	II	III	całość próby		II	III	całość próby
	100,0 90,0	147,0 250,0		88,2 150,0	100,0 170,0	89,2 250,0	142,8 400,0	53,5 150,0	100,0 280,0	84,0 59675	113,2 80400,0	131,1 93120,0	100,0 71012,0
	100,0 110,0	47,6 100,0	190,4 400,0		100,0 210,0		125,0 100,0		100,0 80,0	91,2 450,0	288,0 1420,0	241,3 1190,0	100,0 493,0
	100,0 20,0				100,0 10,0				100,0 10,0	87,7 100,0	221,4 310,0	191,4 268,0	100,0 140,0
										108,7 25,0	43,5 10,0		100,0 23,0
1500,0 150,0	100,0 10,0												
										110,1 850,0	115,3 890,0	169,0 1305,0	100,0 772,0
	100,0 10,0									192,3 25,0			100,0 13,0
										106,9 200,0	64,2 120,0	61,4 115,0	100,0 187,0
										250,0 25,0	100,0 10,0		100,0 10,0
	100,0 10,0												100,0 5,0
					100,0 10,0								
											500,0 10,0		100,0 2,0
60,0 150,0	100,0 250,0	87,5 350,0	100,0 400,0	37,5 150,0	100,0 400,0	67,5 250,0	135,1 500,0	40,5 150,0	100,0 370,0	79,0 61350,0	107,1 83170,0	123,6 95998,0	100,0 72657,0

Tabela II

Wartości procentowe zooplanktonu z poszczególnych metod w stosunku do rzeczywistych ilości w próbach

Numer próby Metoda	1	2	3	4	5	6
I	138,0	84,0	60,0	87,5	67,5	79,0
II	174,0	88,4	200,0	100,0	135,5	107,1
III	62,5	40,6	60,0	37,5	40,5	123,6

stosowaniu metody kropelkowej, ogólnie małą częstością występowania i małą liczebnością tych organizmów. Trzeba dodać jeszcze, że przy zachodzącej konieczności przeliczania ilości osobników z pobranej do analizy podpróbki różnice jeszcze bardziej uwypuklają się. Nie mniej w stosunku do form występujących w większych ilościach uzyskane wyniki także odbiegają niejednokrotnie od rzeczywistych i to dość znacznie (tab. I). W stosunku do wszystkich form zooplanktonu wyniki procentowe (przy przeliczeniach z komory Sedgwick-Raftera) wahały się od 88,4% do 200% jak to wynika z tabeli II. Należy tu zwrócić uwagę na uzyskanie tylko w jednym przypadku (próba 2) wyniku poniżej 100%, w pozostałych próbach uzyskano wyniki przewyższające rzeczywiste ilości osobników w próbce. Tylko w jednym przypadku (próba 4) wyniki uzyskane tą metodą z przeliczeń zgadzały się z rzeczywistymi ilościami (tab. II).

Metoda III — Kolkwitza — Metoda ta podobnie jak obydwie poprzednie dawała dużą zmienność wyników w odniesieniu do poszczególnych form. W odniesieniu np. do *Diaptomus castor* w próbce 3, podobnie jak to było z tym gatunkiem w metodzie I, otrzymano również bardzo wysoki wynik procentowy (1500%). Podobny rezultat, jak to już było powiedziane uzyskano z *Harpacticoida* w metodzie II i uwagi tam zamieszczone odnoszą się oczywiście i do tego przypadku.

Większość uzyskanych wyników w metodzie Kolkwitza w odniesieniu zarówno do poszczególnych form, jak i ogólnej ilości organizmów jest znacznie niższa niż rzeczywiste ilości tych organizmów zawartych w poszczególnych próbach (tab. I, II). Nawet dla form drobnych występujących w dość dużych ilościach, jak np. wrotki, stwierdzono duże różnice w ilościach organizmów z przeliczeń i rzeczywiście obecnych. Tylko w jednym przypadku (próba 6) uzyskany wynik przewyższa rzeczywistą ilość osobników wszystkich form w próbce (tabela II), w pozostałych próbach otrzymane wyniki są znacznie niższe od rzeczywistych. W porównaniu z uprzednio omówionymi metodami obserwuje się tu mniejszą stosunkowo zmienność w poszczególnych próbach (z wyjątkiem próby 6), choć uzyskane wyniki są znacznie niższe niż rzeczywiste (tab. II).

Zestawiając ze sobą wyniki poszczególnych metod zauważono, że w odniesieniu do konkretnej próby otrzymano znacznie od siebie odbiegające rezultaty. Różnice te były dość wysokie i sięgały nawet 160% w przypadku próby 3 między metodą II i III. Jak wspomniano powyżej znaczne różnice w przeliczeniach procentowych były spowodowane małą najczęściej ilością osobników w próbce, mimo że różnice liczbowe były

niewielkie, jak to wynikało przy omawianiu poszczególnych metod z *Diaptomus castor* i z *Harpacticoida*. Wiadomo jest, że dla sanitarno-higienicznych badań większe znaczenie mają organizmy występujące masowo. W tym układzie błąd popełniany przy stosowaniu którejkolwiek metody będzie mniejszy. Jest najbardziej istotne, aby wybrana metoda ilościowego badania planktonu wykazywała zawsze ten sam błąd (*in minus* albo *in plus*), a nie wykazywała dużych wahań.

Pod tym względem najmniejsze wahania wykazuje metoda III, jednak w tym przypadku wyniki odbiegają bardzo od rzeczywistych powodując niekiedy pominięcie przy analizie szeregu ważnych gatunków, które aczkolwiek występują w małych ilościach osobników, jednak przy zmianie warunków środowiskowych mogą wyprzeć dominujące w danej chwili gatunki. Niejednokrotnie istotne jest stwierdzenie momentu pojawienia się w środowisku gatunków typowych dla wód zanieczyszczonych, które wprawdzie w tym czasie nie charakteryzują jeszcze zbiornika, ale dają możliwość stwierdzenia w jakim kierunku ulegają zmianie warunki środowiska. Metody I i II wykazują mniejsze odchylenie od wartości rzeczywistych, lecz zakres wahań ilości osobników jest znacznie większy od zakresu wahań metody III.

Analizowane metody poza jednym przypadkiem (próba 1 w metodzie II) nie wykazywały wszystkich wyróżnionych form znalezionych przy przeglądaniu całej próby pod mikroskopem. W niektórych próbach przy użyciu poszczególnych metod stwierdzono występowanie połowy lub mniej form rzeczywiście obecnych. Szczególnie rzadko były stwierdzane formy reprezentowane przez bardzo małą ilość osobników. Przy badaniach, w których jest konieczne pobranie większej ilości prób, jest bardzo istotną sprawą pracochłonność i czasochłonność analizy ilościowej prób planktonowych. Rozpatrując pod tym względem 3 metody za pomocą których wykonano niniejsze badania, można powiedzieć, że najbardziej czasochłonna była metoda liczenia planktonu w komorze Kolkwitza (konieczność dwukrotnej sedymentacji materiału). Metody kropelkowa i Sedgwick-Raftera zabierają mniej czasu, przy czym metoda kropelkowa jest szybsza. Stosowanie metody kropelkowej pozwala więc na pobieranie i analizę ilościową większej ilości różnorodnych prób, co większa dokładność badań.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonej analizy 6 prób planktonowych wybranymi 3 metodami (kropelkową, Sedgwick-Raftera i Kolkwitza) wypływają następujące spostrzeżenia:

1. Żadna z badanych metod nie daje zadowalających wyników. Rezultaty uzyskane przy stosowaniu tych metod analizy ilościowej prób planktonowych daleko odbiegają od rzeczywistych ilości poszczególnych form i osobników w próbie, przewyższając lub znacznie obniżając ilości osobników w porównaniu z rzeczywistymi ilościami.

2. Wyniki uzyskane przy stosowaniu danej metody w poszczególnych próbach również ulegały znacznym wahanom, nie dając pewności w jakim stopniu wynik odbiega od wartości rzeczywistych.

3. Najmniejsze ilości w porównaniu z ilościami rzeczywistymi wykazywała metoda III (Kolkwitza) również wyniki poniżej rzeczywistych

wartości daje metoda I — kropelkowa, jednak wyniki te w znacznie mniejszym stopniu odbiegają od rzeczywistych niż przy metodzie III. Wyniki powyżej rzeczywistych wartości daje w przeważającej ilości prób metoda II (Sedgwick-Raftera).

4. Najbardziej zbliżone do siebie wyniki z poszczególnych prób daje metoda III (Kolkwitza).

5. Najmniej pracochłonna i czasochłonna jest metoda I — kropelkowa. Ona też nie wymaga posiadania specjalnej aparatury. Natomiast najbardziej czasochłonna jest metoda III (Kolkwitza). Zastosowanie metod mniej czasochłonnych pozwala na pobranie i analizę ilościową większej ilości prób równoległych, co zwiększa dokładność badań. Przy metodzie kropelkowej można jednocześnie wykonać badania jakościowe przez możliwość zastosowania dużych powiększeń mikroskopu. Natomiast niemożliwość zastosowania dużych powiększeń, szczególnie przy metodzie III — Kolkwitza, nasuwa obawy, że podczas liczenia organizmów nie dostrzeże się wielu form drobnych.

6. Wyniki uzyskane za pomocą metody I — kropelkowej i II Sedgwick-Raftera pozwalają sądzić, że aczkolwiek nie są to metody doskonałe jednak z wybranych 3 metod, te dwie są najbardziej godne polecenia.

7. Niniejszą pracę należy traktować jako wstępną do bardziej szczegółowych badań nad metodyką ilościowego badania planktonu, na materiale bardziej urozmaiconym i przy użyciu większej ilości metod.

Я. И. Рыбак

СРАВНИВАНИЕ ВЫБРАННЫХ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОБРАБАТЫВАНИЯ ПЛАНКТОНОВЫХ ПРОБ

Содержание

Автор сравнил три метода количественного анализа планктонных проб. Метод капельный, Sedgwick-Rafter и Kolkwitza. Пробы были взяты из близких окрестностей и каждая обработана была указанными выше методами; кроме того пересчитано все животные организмы выступающие а данной пробе. Констатировано, что все эти методы не дают удовлетворительных результатов и самое большое отклонение от действительной стоимости дает метод Kolkwitza. Оставшиеся два метода дают большую точность.

Однако несмотря на недостатки исследованных методов, лучшим оказались метод капельный и Sedgwick-Rafter.

Причиной являются меньшая трата времени и возможность провести большее количество проб. Кроме того капельный метод позволяет применять большие микроскопические увеличения что предотвращает ошибки во время считания мелких форм животных организмов.

J. I. Rybak

COMPARISON OF SELECTED QUANTITATIVE METHODS OF ELABORATING PLANKTON TESTS

Summary

Three quantitative methods of analysis of plankton tests were compared — droplet method, Sedgwick-Rafter and Kolkowitz methods. Specimens for the inve-

stigation were collected in a given area and each specimen was elaborated by the methods in question and besides that all the animal microorganisms appearing in the given specimen were counted. It was found that none of the studied methods give satisfactory results and the greatest deviations in reference to true values is shown by Kolkwitz method. Greater accuracy is obtained by the other two methods.

In spite of these defects the following methods are worth recommending: droplet method, and Sedgwick-Rafter's method because they do not require so much preparation and time for analysis thus allowing to analyze a greater number of parallel specimens. Moreover the droplet method allows to employ greater magnifying power of the microscope and thus prevents overlooking of very tiny forms during counting and allows to make quantitative analysis at the same time.

PISMIENNICTWO

1. *Cabejszek I., Malanowski Z.*: Nowe kierunki w biologicznej analizie wody GWTS, 29, 414, 1955. — 2. *Gabriel J.*: O potřebě biologických rozborů wod pitných. Časopis lékařů česk., 82, 953–976. Praha 1943. — 3. *Gabriel J.*: Principy biologického hodnocení vody. Časopis lékařů česk. 85, 1425–1431, Praha 1946. — 4. *Gabriel J.* Posuzování povrchových toků pomocí relativně kvalitativních řad (indexy jakosti). Časopis Voda Č. 9/1953. — 5. *Štarmach K.*: Metody badania planktonu, PWRiL, Warszawa 1955.