

Odběr vzorků fytobentosu a makrozoobentosu tekoucích vod pro analýzu DNA

P. Urbánková, J. Štěpka, A. Zapriháčová, E. Janeček

Prosinec 2025

Univerzita J.E. Purkyně a Povodí Ohře, s.p.

1. Úvod	4
2. Termíny	5
3. Fytobentos.....	6
Materiál	6
Dekontaminace pomůcek.....	7
Postup odběru.....	7
Negativní kontroly	8
Skladování vzorků.....	8
4. Makrozoobentos	9
Materiál	9
Postup odběru.....	9
Skladování vzorků.....	9
Homogenizace:	10
Negativní kontroly:	11
5. Literatura	12

1. Úvod

Vodní toky poskytují společnosti řadu klíčových ekosystémových služeb, jejichž kvalita je přímo závislá na ekologickém stavu těchto vodních útvarů. Jedním z hlavních ukazatelů ekologického stavu podle Rámcové směrnice o vodách (WFD 2000/60/EC) je druhové složení bentických společenstev, zejména fytobentosu a makrozoobentosu. Současné hodnocení je založeno na morfologické identifikaci organismů, která je časově náročná, vyžaduje vysokou odbornou expertizu a je u některých taxonů či vývojových stadií obtížná nebo prakticky nemožná.

Moderní molekulární metody umožňují překonat část těchto omezení. Mezi nejvíce rozvinuté patří DNA metabarcoding, který identifikuje organismy na základě analýzy krátkých referenčních úseků DNA (tzv. DNA-barkódů) získaných z environmentálních vzorků bentických společenstev. Tato metoda nabízí citlivý, reprodukovatelný a potenciálně vysoce standardizovatelný nástroj pro určování druhového složení bentosu. Napříč EU probíhá systematické úsilí integrovat DNA metabarcoding do rutinního monitoringu paralelně s tradičními metodami, a to zejména v rámci mezinárodních pracovních skupin ECOSTAT a projektu DNAqualMG, který navázal na mezinárodní iniciativu DNAqua-Net (COST).

Vzhledem k vysoké míře robustnosti většiny kroků DNA metabarcodingu lze očekávat, že připravovaný evropský standard bude definovat především soubor minimálních kvalitativních a technických požadavků, nikoli jednotný podrobný laboratorní nebo bioinformatický postup. Detailní metodické volby tak zůstanou v kompetenci členských států. Pro zachování návaznosti na dosud platné národní postupy bude nezbytné validovat a optimalizovat metody DNA metabarcodingu na reprezentativním souboru vzorků pokrývajících široké ekologické a geografické spektrum České republiky. Tím se zajistí kompatibilita s existujícími datovými řadami a dlouhodobě konzistentní hodnocení ekologického stavu vod v ČR.

Tato metodika se zaměřuje na klíčový výchozí krok celého procesu: odběr, konzervaci a skladování vzorků makrozoobentosu a fytobentosu určených pro DNA metabarcoding. Postup vychází z platných národních metodik pro odběr makrozoobentosu a fytobentosu tekoucích vod (Marvan & Heteša 2006; Kokeš & Němejcová 2006) a je plně využitelný také pro bentos stojatých vod (Adámek 2006, Marvan & Kozáková 2006). Současně reflektuje doporučení používaná v evropském kontextu (CEN/TR 17245:2018, DNAqua-Net, DNAqualMG).

Metodika je primárně určena pro podniky a instituce provádějící biologický monitoring vodních útvarů. Je strukturována tak, aby byla snadno převoditelná do interních standardních operačních postupů (SOP) těchto organizací.

2. Termíny

Bentos – soubor organismů žijících na dně

Fytobentos – fotosyntetické organismy bentosu

Makrozoobentos – živočišná složka bentosu viditelná pouhým okem (> 0,5 mm)

Čistá laboratorní voda – destilovaná, deionizovaná nebo jinak vysoce čištěná voda

Dekontaminace – proces odstranění reziduální DNA. V metodice je použit 0,5% roztok chlornanu sodného (NaClO) nebo jeho šetrnější varianta (viz Příloha 1). Jako alternativu lze použít také komerčně dostupné dekontaminační prostředky určené k chemické degradaci nukleových kyselin (DNA).

Denaturovaný etanol kompatibilní s analýzou DNA – etanol denaturovaný činidly, která neinterferují s molekulárně-biologickými analýzami. Vhodná je denaturace MEK (methyl-ethylketone), PET (petrolether) nebo IPA (isopropanol). Denaturace etanolu lékařským benzínem je problematická, protože benzín nemá přesně definované a stabilní složení a může obsahovat látky interferující s izolací a analýzou DNA. Vzhledem k možným změnám složení v čase není předchozí validace dostatečná; kompatibilitu lze ověřit pouze souběžnou kontrolou v rámci konkrétního projektu. Z tohoto důvodu není tato forma denaturace vhodná jako standardní postup pro vzorky určené k molekulárně-biologickým analýzám.

3. Fytobentos

Materiál

- Plastový tác
- čistá laboratorní voda – min. 50 ml na vzorek včetně negativních kontrol
- 96 % nebo absolutní etanol (čistý nebo denaturovaný kompatibilní s analýzou DNA) – min. 40 ml na vzorek včetně negativních kontrol
- 2× dávkovací lahvička (voda a etanol)
- 50 ml plastové vzorkovnice – 2 ks na jeden odběr (vzorek pro DNA a pro morfologii) + 1ks na každou negativní kontrolu
- jednorázový zubní kartáček
- skalpel nebo kapesní nůž (dekontaminovaný)
- jednorázová injekční stříkačka nebo plastová Pasteurova pipeta
- jednorázové rukavice
- lihový popisovač
- chladicí box (přeprava vzorků)



Obr 1. Materiál a vybavení pro odběr fytobentosu

Dekontaminace pomůcek

Pomůcky, které nejsou nové nebo určeny na jedno použití, musí být před odběrem zbaveny veškeré reziduální DNA. Pro dekontaminaci je možné použít následující postup. V případě použití komerčních prostředků je nutné postupovat v souladu s návodem výrobce.

Postup dekontaminace:

1. Pomůcky mechanicky očistíme vodou s detergentem.
2. Ponoříme na minimálně 15 min do 0,5 % roztoku NaClO (např. SAVO při ředění 1:9 s vodou) nebo do šetrnějšího dekontaminačního roztoku (viz Příloha 1).
3. Důkladně opláchneme velkým množstvím vody.
4. Necháme oschnout na čistém místě (např. na čistém odkapávači či podložce).
5. Pomůcky uložíme tak, aby nedošlo ke kontaminaci během transportu ani během práce v terénu (např. do dekontaminovaného uzavíratelného plastového boxu nebo do nového plastového sáčku vhodné velikosti).

Postup odběru

Odběr vychází z metodiky Marvan & Heteša (2006). Řasový biofilm se odebírá alespoň z pěti kamenů, ideálně o velikosti 10–20 cm. Pokud nejsou v toku dostupné kameny, je možné použít alternativní dlouhodobě ponořené povrchy (rostliny, jemné sedimenty dna, dřevo, konstrukce mostů apod.). Použití alternativního substrátu musí být zaznamenáno v odběrovém protokolu, protože může ovlivnit srovnatelnost výsledků.

Odběr biofilmu

1. Nasadíme si jednorázové rukavice (měníme mezi jednotlivými odběry).
2. Do nové vzorkovnice odměříme 50 ml čisté laboratorní vody z dávkovací lahvičky.
3. Z proudnice vybereme vhodné kameny. Rukou očistíme spodní stranu kamenů a dáme je do misky s 50 ml čisté laboratorní vody.
4. Společenstvo z povrchu kamenů stíráme jednorázovým kartáčkem. Opakovaným oplachováním kartáčku ve vodě ho přeneseme do roztoku.
5. Očištěné kameny vrátíme do toku.
6. Roztok v misce promícháme a 10 ml homogenizovaného roztoku přelijeme do vzorkovnice určené pro izolaci DNA.
7. Do vzorkovnice přidáme 40 ml etanolu z dávkovací lahvičky a důkladně promícháme (cílová koncentrace $\geq 70\%$).

8. Vzorek pro morfologickou determinaci ponecháme nefixovaný pro pre-screening. Nefixovaný vzorek transportujeme a uchováváme v chladu. Pokud není možné provést pre-screening v do 48 hodin, je možné vzorek fixovat etanolem, stejně jako vzorek pro analýzu DNA, nebo formaldehydem do výsledné koncentrace 3-4 %.
9. Označíme odebrané vzorky unikátním identifikačním kódem a postup zapíšeme do odběrového protokolu.

Negativní kontroly

Negativní kontrola se provádí před prvním odběrem a následně s každým desátým odběrem.

Postup:

1. Do čistého tácu nalijeme z dávkovací lahvičky 50 ml čisté laboratorní vody.
2. Opláchneme v ní nové i dekontaminované pomůcky, které používáme pro odběr vzorků (kartáček, skalpel, nůž). Injekční stříkačkou nebo pipetou několikrát nasajeme a vypustíme vodu.
3. Vodu promícháme pohybem tácu.
4. Odebereme 10 ml, přidáme 40 ml etanolu z dávkovací lahvičky a promícháme.
5. Negativní kontrola musí být zařazena do evidence a dále prochází všemi kroky jako běžný vzorek (skladování – extrakce a sekvenace DNA – bioinformatické zpracování).

Skladování vzorků

Vzorky určené pro analýzu DNA skladujeme:

- bez přístupu světla,
- při teplotě $\leq +4$ °C, pokud budou zpracovány do 3 měsíců od odběru,
- při teplotě ≤ -20 °C pro dlouhodobé uchování (preferenčně v hlubokomrazícím boxu nebo v tekutém dusíku).

Pro úsporu prostoru je možné skladovat jenom část vzorku (minimálně 10 ml). Při delším skladování je nutné kontrolovat odpařování etanolu a případně jej doplnit, aby nedošlo ke snížení koncentrace.

4. Makrozoobentos

Materiál

Materiál a vybavení odpovídá metodice Odběr a zpracování vzorků makrozoobentosu tekoucích vod PERLA (Kokeš & Němejcová 2006).

Pro fixaci vzorků nepoužíváme formaldehyd, protože znemožňuje následné DNA analýzy.

K fixaci lze použít absolutní nebo 96 % etanol, čistý nebo denaturovaný látkami, které neinterferují s následnou analýzou DNA (vhodné jsou např. MEK, PET, IPA).

Postup odběru

1. Před odběrem důkladně promyjeme síť vodou z toku a vizuálně zkontrolujeme, že v ní nezůstali živočišné nebo jejich tkáně z předchozích odběrů. Zkontrolujeme čistotu misek a nástrojů, které používáme pro třídění materiálu v terénu.
2. Odběr provedeme podle metodiky PERLA (Kokeš & Němejcová 2006), tj. 3-minutové semikvantitativní multihabitatové vzorkování ruční bentosovou sítí.
3. Pokud je v toku malé množství biologického materiálu, připravíme samostatný vzorek pro DNA analýzu.

Pokud je materiálu dostatek vytvoříme podvzorek, který je 1/4 vzorku. Ze vzorku odstraníme hrubé nečistoty (větvíčky, listy a kameny), důkladně promícháme a 1/4 vzorku dáme do samostatné vzorkovnice.

4. Po třídění v terénu vzorek/podvzorek fixujeme přidáním 96 % etanolu v poměru vzorek: etanol \leq 1:3. Zajistíme tím výslednou koncentraci etanolu \geq 70 %.
5. Etanol ze vzorku/podvzorku je nutné vyměnit do 24 hodin po odběru. Ke slítí etanolu je vhodné použít sítko s velikostí ok 500 μ m, které zamezí ztrátě organismů. Mezi vzorky je nutné sítko důkladně umýt a odstranit případné zbytky organismů. Po slítí přidáme stejné množství 96 % etanolu

Skladování vzorků

Vzorky určené pro analýzu DNA skladujeme:

- bez přístupu světla,

- při teplotě $\leq +4$ °C, pokud budou zpracovány do 3 měsíců od odběru,
- při teplotě ≤ -20 °C pro dlouhodobé uchování (preferenčně v hlubokomrazícím boxu nebo v tekutém dusíku).

Při delším skladování je nutné kontrolovat odpařování etanolu a případně jej doplnit, aby nedošlo ke snížení koncentrace. Před extrakcí DNA musí být směsný vzorek homogenizován. Pro úsporu prostoru lze vzorek homogenizovat a archivovat část homogenátu (minimálně 5 ml).

Homogenizace:

Homogenizaci provádíme v mixéru, ideálně s nerezovou nádobou, případně v kuličkovém homogenizátoru.

Postup homogenizace:

1. Před homogenizací ze vzorku odstraníme kameny a kusy dřeva, které by mohly zařízení poškodit.
2. Vzorek ochladíme na -20 °C, aby se zamezilo degradaci DNA, ke které může dojít při zahřívání během homogenizace.
3. Mixujeme 3 min při 25 000 rpm (s méně výkonným přístrojem prodloužíme dobu mixování).
4. Homogenizovaný vzorek vrátíme do původní nádoby nebo odebereme 50 ml do menší vzorkovnice pro dlouhodobé skladování.
5. Mixér zbavíme DNA (viz postup dekontaminace).

Postup dekontaminace mixéru

1. Mixér důkladně omyjeme vodou s detergentem.
2. Naplníme roztokem určeným k odstranění DNA (0,5 % roztok NaClO (př. SAVO 1:9 s vodou) nebo méně korozivní čistící roztok – viz Příloha 1).
3. Mixér spustíme na 20 s.
4. Opláchneme velkým množstvím čisté laboratorní vody.

Negativní kontroly:

Negativní kontrola homogenizace se provádí před zpracováním prvního vzorku a následně s každým desátým vzorkem. Každá kontrola prochází celým postupem jako běžný vzorek (skladování – extrakce a sekvenace DNA – bioinformatické zpracování).

Postup:

1. Do dekontaminované nádoby mixéru nalijeme 100 ml etanolu.
2. Mixér spustíme na 20 sekund.
3. Roztok přelijeme do vzorkovnice a označíme.

5. Literatura

Adámek, Z. (2006). *Metodika odběru a zpracování vzorků bentosu stojatých vod*. Praha: VÚV TGM. Metodika MŽP.

Buchner, D., Zizka, V.M.A., Leese, F. & Elbrecht, V. (2021) 'Evaluation of a cost-effective cleaning protocol for DNA contamination removal in metabarcoding studies', *Metabarcoding and Metagenomics*, 5, e67615. doi: 10.3897/mbmg.5.67615.

CEN/TR 17245:2018 – Water quality. Technical report for the routine sampling of benthic diatoms from rivers and lakes adapted for metabarcoding analyses. Brusel: CEN.

Směrnice 2000/60/EC Evropského parlamentu a Rady z 23. října 2000 ustavující rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky. (Water Framework Directive)

Kokeš, J. & Němejcová, D. (2006) *Odběr a zpracování vzorků makrozoobentosu tekoucích vod – metodika PERLA*. Praha: VÚV TGM. Metodika MŽP.

Marvan, P. & Heteša, J. (2006) *Metodika odběru fytozobentosu v tekoucích vodách*. Praha: VÚV TGM. Metodika MŽP.

Marvan, P. & Kozáková, T. (2006). *Metodika odběru a hodnocení bentosu stojatých vod*. Praha: VÚV TGM. Metodika MŽP.

Příloha 1. Čistící roztok podle Buchner et al. (2021) - Roztok je možné připravit ve větším množství a skladovat při pokojové teplotě.

0,5 % NaClO (komerčně prodávané SAVO v poměru 1:9 s vodou)

0,25 M KOH ($14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

90 mM NaHCO₃ ($7,56 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

1 % roztok laboratorního aniontového detergentu vhodného pro čištění skla a kovových nástrojů (př. Alconox)