

METODIKA ODBĚRU A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ FYTOPLANKTONU TEKOUČÍCH VOD



J. Heteša, P. Marvan

Červenec 2006



1. Úvod

Princip metody: V toku vybereme vhodné místo k odběru vzorku vody, pokud možno v proudnici. Vzorkem naplníme vzorkovnici, kterou transportujeme do laboratoře. V laboratoři provedeme zahuštění vzorku a determinaci jednotlivých druhů. Poté přeneseme (zahuštěný) vzorek do počítačící komůrky, ve které počítáme zastoupené druhy (jedince). Pokud jsou významně zastoupeny rozsívky, zhotovíme pro determinaci rychlou metodou i preparát rozsivek se zalitím do prostředí s vysokým lomem světla. Zbylou část vzorku nafixujeme (nejlépe Lugolovým roztokem v Utermöhlově úpravě) a později zakonzervujeme 40% formaldehydem do vzniku 2 % roztoku.

Postup stanovení se přidrží **ČSN 75 7712, bod 4: Stanovení drobného biosestonu** (počítání organismů v počítací komůrce, v základní standardizované podobě po zahuštění organismů odstředěním). Dává se přednost stanovení živých organismů. Spolu s organismy fytoplanktonu lze stanovit i heterotrofní zástupce biosestonu, které však WFD nevyžaduje. U vzorků s abundancí převyšující 50 000 org. v 1 ml vody se od zahuštění upouští. K doplňkovému stanovení planktonních sinic s aerotypy lze použít postup podle **TNV 75 7717 Jakost vod – Stanovení planktonních sinic**, který je založen na zahuštění vzorku filtrací přes membránové filtry. Pro přesnější hodnocení kvantity fytoplanktonu lze použít zahuštění vzorku sedimentací v komůrkách. Tento postup vyžaduje fixaci vzorku Lugolovým činidlem a vybavení laboratoře Utermöhlovým mikroskopem.

Stanovení fytoplanktonu v tekoucích vodách by se mělo omezit jen na velké, hlubší toky (dolní toky řek) s omezeným uplatněním fyto-bentosu (a obtížněji získatelnými daty o rozvoji makrozoobentosu) a jinak jen na výjimečné případy, kdy je žádoucí hodnotit ovlivnění toku stojatými vodami v povodí.

Jako podklady pro odvození biotických indexů, charakterizujících kvalitu vody, mají výsledky rozboru fytoplanktonu jen omezenou použitelnost. Mohou poskytnout informaci o stavu vody v nějakém delším úseku toku, ne však o lokálních změnách v jeho podélné ose.

Metodika hodnocení ekologického stavu toku podle fytoplanktonu ve smyslu WFD je zatím v celoevropském měřítku ve stádiu přípravy, zatím spíše jen na úrovni rozpracovávání klasifikačních schémat (srov. např. Nixdorf B. et al. 2000).

2. ZÁKLADNÍ VYBAVENÍ

2.1 Terénní vybavení

- rybářské holinky
- libovolný typ sběrače pro odběr vzorků vody
- vzorkovnice – optimálně 100 ml objem, umělohmotná (PE) s uzávěrem
- permanentní (lihový) fix na popisování vzorkovnic
- chladič box
- polarizační brýle
- fotoaparát
- GPS přístroj
- pásmo, laserový dálkoměr
- terénní přístroje pro analýzu vody (pH, O₂, teplota, vodivost)
- gumové rukavice, nejlépe veterinární nebo chemické, které chrání ruku po loket a do kterých je možno použít textilní či kožené rukavice k ochraně proti chladu

2.2 Laboratorní vybavení

- centrifuga s výkyvným rotorem, na 10 ml zkumavky s možností 2 000 ot.min⁻¹
- centrifugační zkumavky 10 ml, vytažené do úhlu s vnitřním úzkým zakulacením
- podložní a krycí skla
- Pasteurova pipeta
- počítač komůrka Cyrus I s originálním krycím sklem
- světelný mikroskop s objektivy 20 – 100x (imerze)
- determinační literatura
- chemikálie:
 - Lugolův roztok JJK (doporučen v Utermöhlově modifikaci)
 - formaldehyd 40 %
 - Pleurax nebo Naphrax
 - imerzní olej
 - peroxid vodíku 30 %
 - ethanol

3. VZORKOVÁNÍ

3.1 Vzorkovací období

Odběr vzorků je optimálně prováděn v měsíčním intervalu v období března - října.

Odběry lze však také provádět čtvrtletně (bez zimního odběru). Jarní a podzimní odběr je v tomto případě vhodné spojit s odběrem makrozoobentosu, nicméně zatímco vzorky makrozoobentosu je možné odebírat v jarním období již od března, vzorky fytoplanktonu by neměly být odebírány dříve než v dubnu.

Odběry vzorků se provádějí:

- v jarním období (duben – polovina května)
- v letním období (červenec – polovina srpna)
- v podzimním období (říjen – polovina listopadu).

3.2 Výběr odběrových profilů

K odběru vzorku je třeba vybrat charakteristický úsek toku a to postupem shodným jako při odběru vzorků fytozobentosu. Při výběru odběrového místa si vybíráme především takové úseky, které umožňují přístup k proudnici.

3.3 Vlastní odběr vzorku

Do proudící vody ponoříme sběrač nebo dobře vymytou láhev a po jejím propláchnutí ji naplníme vodou z proudnice. Dbáme především toho, aby se do vzorku nedostal sediment zvržený našimi botami či náradím nebo jinými členy skupiny, pracujícími v toku. Nelze-li odebrat vzorek přímo v proudnici, odebíráme jej alespoň co nejdále od břehu a vyhýbáme se místům se stagnující nebo v kruhu cirkulující vodou.

Vodou z láhve (sběrače) naplníme vzorkovnici asi ze 4/5, aby pod zátkou zůstala vzduchová bublina (usnadní to pozdější promíchávání vzorku protřepáním). Každou vzorkovnici je nutné na povrchu popsat názvem lokality a datem odběru a doložit k ní odběrový protokol. Do vzorkovnice **ne** vkládáme papírek s označením vzorku, mohlo by to nevhodně ovlivnit výsledek stanovení.

Vzorkovnice transportujeme v chladicím boxu. Zpracování živých (nefixovaných) vzorků provádíme co nejdříve (ihned po odběru, nejpozději však do 48 hodin). Nelze-li tento požadavek splnit, fixujeme vzorek Lugolovým roztokem do žlutého (nikoli hnědého!) zabarvení a vlastní zpracování provedeme do několika dnů. Pro zpracování s ještě větším časovým odstupem (nebo pro dlouhodobé uchovávání vzorků) je nutno fixovaný vzorek ještě konzervovat 40 % formaldehydem do vzniku 2 % roztoku.

4. ZPRACOVÁNÍ VZORKU V LABORATOŘI

Postup stanovení se provádí podle ČSN 75 7712, bod 4

Zahušťování vzorku

Do centrifugační zkumavky se odměří 10 ml důkladně promíchaného vzorku. Odstředí se při 2 000 otáčkách/min po dobu 5 min při použití rotoru s poloměrem 0,08 m. Doběh odstředivky nesmí být bržděn. Po odstředění se voda nad centrifugátem (sedimentem) ze zkumavky slijí do čisté nádoby bez zviření sedimentu. Odstředěný zbytek se upraví Pasteurovou pipetou na vhodný objem (např. 0,1 ml až 1 ml). K úpravě objemu se použije voda po odstředění.

Obsah se důkladně ale opatrně promíchá opakovaným nasáváním Pasteurovou pipetou (ne probubláváním) nebo rychlou rotací preparační jehlou. Kapka homogenizovaného vzorku se Pasteurovou pipetou rychle přenesí na podložní sklíčko nebo na mřížku počítací komůrky předem vyčištěné ethanolem a překryje krycím sklem, které se připevní svorkami. Přebytečná voda, uniklá do bočních kanálků, se odstraní vyfouknutím.

Je-li ve vzorku větší množství bičíkovců, nelze je obvykle korektně spočítat v živém stavu v počítací komůrce. Proto provádíme zahušťování znovu se vzorkem, který je fixován Lugolovým roztokem.

*Jako doplňkovou metodu pro zahušťování fytoplanktonu ve vzorcích je možno použít též **ultrafiltrační metodu**. Ultrafiltraci provádíme přes filtry o velikosti pórů 0,8 – 1,2 μm ve filtračním zařízení, umožňujícím zahuštění fytoplanktonu do menšího objemu V_{fin} známé velikosti. Pro analýzu filtrujeme 5 – 50 ml vzorku, podle množství fytoplanktonu (zpravidla 10 ml). Zahuštění provádíme k rysce vyznačující V_{fin} (zpravidla asi 0,25 ml; přesný objem musíme kalibrovat). Podtlak potřebný pro filtraci vyvoláme ve filtrační nádobě ústy, nikdy nepoužíváme vývěvu! Po dosažení hranice rysky zrušíme podtlak a opakovaně ústy vyvoláme podtlak a přetlak, skončíme přetlakem a uzavřením kohoutu na filtrační nádobě. Vodu nad filtrem doplníme vodou po rysku. Sediment na filtru rozmícháme stíráním a opatrným probubláváním pipetou s balónkem, jejíž konec je otaven tak, aby nepoškodil filtr. Touto metodou dostaneme do výsledného objemu i sinice s aerotopy.*

Počítání organismů v komůrkách

Pod mikroskopem se spočítají organismy na celé ploše komůrky, nebo na části její plochy podle jejich hustoty.

Za jedince se považuje samostatná buňka (nezáleží na její velikosti), dále cenobium nebo kolonie do velikosti 100 μm a vlákna do délky 100 μm . Cenobia, kolonie a vlákna překračující uvedené rozměry se vyjadřují jako jejich násobky. Pokud to vyžaduje účel rozboru, počítají se jednotlivé buňky (hodnocení technologických procesů, podklad pro stanovení objemové biomasy apod.).

Obsahuje-li vzorek větší množství organismů snadno podléhajících destrukci (typicky zástupci skupiny Cryptophyceae, Chrysophyceae) nebo organismy špatně sedimentující (i v menším množství; typicky sinice vodních květů), je třeba část vzorku fixovat Lugolovým roztokem a znovu odstředit.

Při počítání organismů je nutno dodržet tento postup:

- preparát se prohlédne a propočítá při malém zvětšení. Velké a pohyblivé organismy se propočítávají na celé ploše komůrky;

- preparát se propočítá při základním zvětšení 200krát až 250krát; pokud se nepočítává celá komůrka, doporučuje se pro vyrovnání rozdílů v nerovnoměrném rozmístění organismů na ploše komůrky propočítávat jednu střední a dvě okrajové části komůrky;
- velmi drobné organismy (např. pikoplankton) se počítají při zvětšení 400krát až 450krát, pokud to dovolí pracovní vzdálenost silnějšího objektivu. Pro počítání pikoplanktonu se doporučuje použít fluorescenční mikroskop.
- pro dostatečnou přesnost metody je třeba napočítat alespoň 200 jedinců (buněk).

Výpočet množství buněk (jedinců) v 1 ml vzorku

Počet jedinců nebo buněk X v 1 ml vzorku se vypočte podle vzorce:

$$X = a \cdot \frac{10\,000 \cdot V_{\text{fin}}}{V_{\text{inic}} \cdot n \cdot P}$$

kde

a = počet jedinců nebo buněk v n čtvercích;

V_{inic} = objem centrifugovaného vzorku v ml;

V_{fin} = objem zahuštěného vzorku v ml;

n = počet vyšetřených čtverců;

P = plocha jednoho čtverce v mm^2 .

přičemž

$P = 0,0625 \text{ mm}^2$ pro komůrku Cyrus I,

5. DETERMINACE

Determinaci provádíme během vlastního počítání a po přenesení kapky centrifugátu na podložní sklo a překrytí tenkým krycím sklíčkem. Používáme při tom větší zvětšení, v případě potřeby i imerzi (1000 x). Druhovú determinaci v komůrkách se silným krycím sklem je totiž velmi obtížná a v řadě případů i nemožná. Při tom se

- do laboratorního protokolu zaznamenají základní údaje o vzorku a jeho stavu,
- provádí determinaci řas a sinic do nejnížší dosažitelné taxonomické úrovně podle doporučené determinační úrovně, vyznačené v taxalitech)
- registruje stav organismů (údaje o pohyblivosti, přítomnosti deformovaných buněk, tvarových abnormalit, buněk s poškozeným buněčným obsahem, zastoupení prázdných schránek (frustulí) rozsivek, resp. mrtvých zbytků těl jiných organismů. Rozsivky pak budou dále determinovány na základě zhotovení trvalých preparátů).
- pořizuje kresebná nebo fotografická dokumentace druhů, které se nepodařilo určit a jejichž taxonomické postavení je radno později konzultovat s odborníky na jednotlivé taxonomické skupiny,
- u neurčených druhů podle potřeby zaznamenávají údaje o velikosti, tvarové proměnlivosti apod.
- do laboratorního protokolu zaznamenají odkazy na pořízenou dokumentaci,

- výsledky rozboru fototrofní složky podle možností doplní i o údaje o výskytu jiných organismů než řas a sinic.

Při zastoupení většího množství rozsivek ve vzorku zhotovíme expresní metodou trvalý preparát. 1-2 kapky centrifugátu rozmícháme na podložním skle s 1-2 kapkami 30 % peroxidu vodíku, necháme volně odpařit a zaschnout. Poté přidáme 1-2 kapky pleuraxu (naphraxu), přiložíme krycí sklo, krátkým zahřátím odpaříme přebytečné rozpustidlo a necháme zatuhnout. V takto zhotoveném preparátu dokončíme determinaci rozsivek, případně i některých zlativek.

Při determinaci se používá základní taxonomická literatura. Dnes jsou pro členské státy EU jakýmsi všeobecně přijímaným standardem svazky ediční řady Süsswasserflora von Mitteleuropa. Podle nich by se měla volit jména a koncepce jednotlivých taxonů.. Toto však nelze brát jako závazný předpis. Jejich univerzální používání je omezeno tím, že nejsou na všech pracovištích k dispozici, jednak i tím, že náplně jmen pro mnohé taxony byla od doby vydání příslušného svazku změněna. Kromě toho některé taxonomické skupiny nebyly pro toto určovací kompendium zpracovány. Je tedy nutno připustit i používání jiných určovacích pomůcek. Je však vždy velmi žádoucí v laboratorním protokolu o tom vést příslušný záznam.

6. ODBĚROVÝ A DETERMINAČNÍ PROTOKOL

Viz přílohy.

7. BEZPEČNOST PRÁCE

Práce ve vodě nebo v její blízkosti může být nebezpečná. Je odpovědností uživatele stanovit náležitá bezpečnostní a i zdravotní opatření a zajistit shodu se všemi podmínkami národních i případných interních předpisů.

8. LITERATURA

ČSN 75 7712 - Stanovení drobného biosestonu

TNV 75 7717 Jakost vod – Stanovení planktonních sinic,

Nixdorf B. et al. RIEDMÜLLER, U.; MISCHKE, U.; HOEHN, E. (2000): Klassifizierungsverfahren für Fließgewässer anhand des Phytoplanktons. Teil II der Literaturstudie über „Ökologische Gewässerbewertung – Phytoplankton“ im Auftrag der ATV/DVWK und LAWA-AG „Stehende Gewässer“)

KÓD VZORKU:	DATUM ODBĚRU:	DETERMINOVAL:
TOK:	ODEBRAL:	DATUM DETERMINACE:
PROFIL:	POZN.:	PODPIS:
Stav vzorku (nativní, fixovaný; trvalý preparát)		
Zahuštění (bez, cetrifugací, ultrafiltrací, sedimentací):		
Poměr zahuštění:		Komůrka:

[illegible]

METODIKA ODBĚRU A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ FYTOPLANKTONU TEKOUČÍCH VOD

Doplňkové rozbory (např. po defragmentaci kolonií)

Jméno taxonu	Načítáno	Suma	Na ploše	Přepočet. na 1 ml	Poznámka

Souhrny dle skupin

název skupiny	počet v ml
CYANOPROKARYOTA	
DINOPHYTA	
CRYPTOPHYTA	
CHRYSTOPHYTA-BACILLARIOPHYCEAE	
CHRYSTOPHYTA-ostatní	
EUGLENOPHYTA	
CHLOROPHYTA-monadoidní	
CHLOROPHYTA-kokální a trichální	
CHLOROPHYTA-spájkivé	
celkem	

Poznámky k vyplňování laboratorního protokolu na rozbor vzorků fytoplanktonu

Označení vzorku: uvádí se signatura a lokalita podle odběrového protokolu

Poznámka: zde je možno uvést údaje o použité determinační literatuře, příp. o použitém přístrojovém vybavení, o odchylkách od předepsaného postupu (pozdější zpracování vzorku apod.)

Do sloupce označeného **načítáno** se postupně zapisují počty zjištěných jedinců (buněk), do sloupce **na ploše** se uvede počet čtverců (pásů), na kterých se počítalo. Pokud se počítají i mrtvé organismy (zbytky), je nutno tyto počty uvést odděleně na dalším řádku (do celkového počtu se nezahrnují).

Do sloupce **poznámka** je možno připsat odkazy na pořízenou kresebnou a fotografickou dokumentaci a jakékoli další poznatky týkající se determinace druhu.

Další poznámky: Tento oddíl protokolu slouží k zaznamenání poznámek k nalezeným druhům, které se už nevešly do sloupce "poznámky" (např. údaje o naměřené velikost buněk, stručný popis k neurčeným druhům, poznámky o abiosestonu apod.)

Výsledné hodnocení: sem si může zpracovatel vzorku zaznamenat poznatky o analyzovaném vzorku.

Další poznámky

Předběžné hodnocení