

METODIKA ODBĚRU A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ MAKROZOOBENTOSU TEKOUČÍCH VOD METODOU PERLA



J. Kokeš, D. Němejcová

Červenec 2006



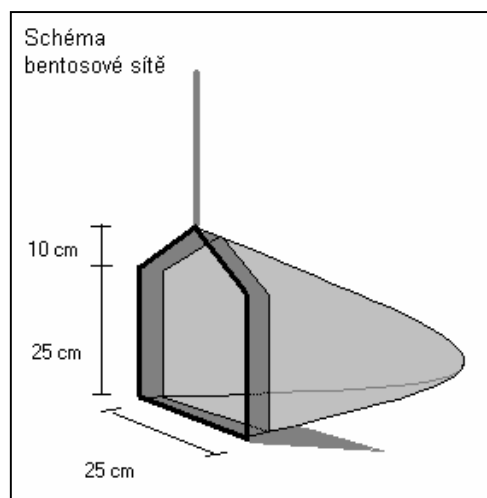
1. Úvod

Systém PERLA byl vytvořen pro hodnocení ekologického stavu toků a je v souladu s požadavky Rámcové Směrnice (WFD) (2000). Metoda je vytvořená pro odběr vzorků makrozoobentosu z broditelných tekoucích vod. Vzorkování je proto možné aplikovat pouze na těch tocích, které může hydrobiolog ve vysokých holínkách nebo v brodících kalhotách přejít napříč za normálního vodního stavu, tzn. asi do 1 m hloubky (rychlost proudu do $1 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$). Odběr se doporučuje provést za normálního, případně podnormálního, vodního stavu (Q_{270_d} a nižší). Metoda PERLA je založena na multihabitatovém odběru (ČSN 757703), při kterém jsou habitaty v toku vzorkovány proporcionálně podle jejich výskytu v odběrovém úseku toku. Pro odběr se používá standardní metoda 3-minutového semikvantitativního multihabitatového vzorkování s použitím ruční bentosové sítě. Vzorky jsou determinovány v takové podrobnosti, aby bylo dosaženo alespoň závazné determinační úrovně. U jednotlivých taxonů jsou počítány abundance.

2. ZÁKLADNÍ VYBAVENÍ

2.1 Terénní vybavení

- brodící holínky nebo brodící kalhoty
- polarizační brýle
- bentosová síť o velikosti ok 500 μm s dlouhou rukojetí
- ruční bentosová síťka o stejné velikosti ok a průměru rámu 25 – 30 cm (vhodná k manipulaci se vzorkem, zejména pro praní vzorku)
- 2 plastová vědra o objemu 10 litrů
- stopky
- fotoaparát
- GPS přístroj
- pásmo, laserový dálkoměr
- terénní přístroje pro analýzu vody (pH, O_2 , 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
- misky pro vybírání biologického materiálu (osvědčily se bílé fotografické misky ve formátech A_4 a A_3)
- entomologické pinzety různého tvaru a tvrdosti, balónkové pipety a vybírací síťka
- plastové širokohrdlé vzorkovnice o objemu 0,5 – 2 litry (pro uchování a transport netříděného odebraného materiálu do laboratoře)
- skleněné epruvety či lékovky (pro uchování materiálu vybraného terénu)
- ethanol (80% roztok) k fixaci biologického materiálu



METODIKA ODBĚRU A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ MAKROZOOBENTOSU TEKOUČÍCH VOD METODOU PERLA

- formaldehyd (40% roztok) k fixaci biologického materiálu
- gumičky na svazkování epruvet
- sada barevných vodostálých fixů, grafitová tužka, propiska, psací podložka, nůžky, stojánek na epruvety...
- campingový nábytek – skládací stůl a sedačky (pro zpracování vzorků v terénu)
- přepravky na vybavení a vzorky.



2.2 Laboratorní vybavení

- dělicí zařízení (na pod-vzorkování)
- stereomikroskop (na třídění a determinaci vzorků v laboratoři)
- mikroskop (na determinaci vzorků v laboratoři)
- preparační jehly
- Petriho misky, zkumavky a mikroskopická skla
- roztoky pro zhotovování trvalých mikroskopických preparátů: Apathyho sirup, kanadský balzám, Liquido-Faure, roztok glycerolu
- determinační klíče.

3. VZORKOVÁNÍ

3.1 Vzorkovací období

Většina druhů společenstva makrozoobentosu prodělává rozdílné vývojové cykly během roku. Vzhledem k tomu, že hodnocení ekologického stavu se opírá o taxonomické složení, abundanci a diverzitu, musí být výběr vzorkovacího období a podmínky odběru jasně definovány. Odběry jsou prováděny ve dvou aspektech a to:

- v jarním (březen – polovina května); fenologicky je to období do začátku květu řepky
- v podzimním (konec září – polovina listopadu)

3.2 Výběr odběrových profilů

Obecné principy

Výběr lokalit budoucí monitorovací sítě musí splnit velké množství kritérií, které vychází z požadavků Rámcové Směrnice na monitoring vybraných relevantních biologických složek. Tato metodika je zaměřena na biologickou složku makrozoobentos a proměnné prostředí, navržené ke sledování, jsou vztaženy k tomuto společenstvu.

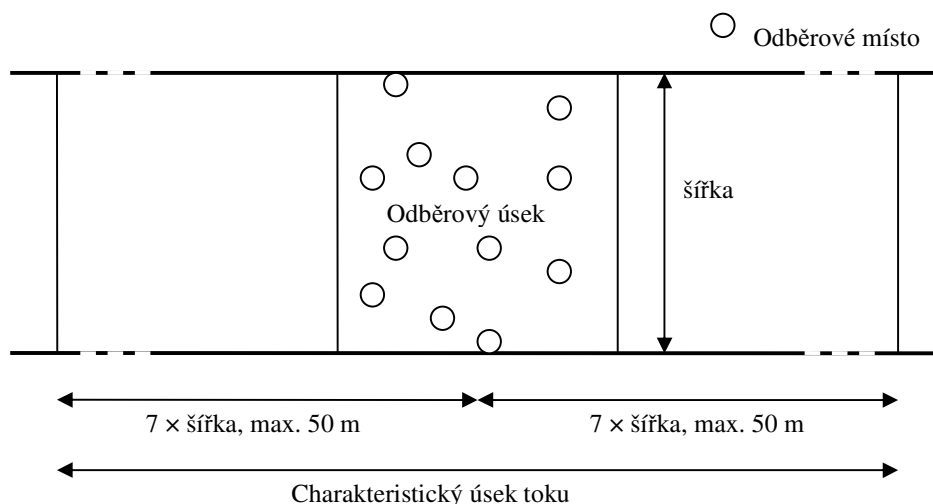
V biologických monitorovacích programech mohou být první chyby udělány již při výběru umístění odběrových lokalit. Aby se chyby minimalizovaly, mělo by být dodrženo následující:

- hlavním cílem monitorovacích programů není posoudit lokální stav toku, ale vystihnout ekologický stav delšího úseku toku. Z tohoto důvodu musí vybraná odběrová lokalita a současně i odebraný vzorek reflektovat stav úseku toku, který je hodnocen.
- odběr vzorků pro biologické analýzy nemusí být proveden na lokalitách sloužících pro odběr vzorků pro chemické analýzy. Např. místa v těsné blízkosti mostů, kde bývá vzorkována voda, nejsou vhodná pro odběr vzorků makrozoobentosu. Odběrová lokalita, na které je vzorkována některá z biologických složek, by měla reflektovat fyzikální a ekologické charakteristiky hodnoceného úseku toku.

Výběr reprezentativního - charakteristického - úseku toku

Nejdříve musíme od sebe rozlišit charakteristický úsek toku, odběrový úsek toku a vlastní odběrová místa.

Charakteristický úsek toku musí reflektovat fyzikální a ekologické charakteristiky hodnoceného úseku toku. Délka charakteristického úseku toku se rovná minimálně 7-násobku šířky toku nebo 50 m (podle toho, co je kratší) směrem proti a po proudu toku od středu odběrového úseku toku. Celkem se tedy délka odběrového úseku rovná 14násobku šířky, maximálně však činí 100 m.



Odběrový úsek toku musí být reprezentativní částí charakteristického úseku toku. Je kratší a stanovuje se z toho důvodu, že charakteristický úsek toku obvykle není možné vzorkovat celý. Odběrový úsek toku

- musí zahrnovat všechny typy habitatů v tom poměru, v kterém se vyskytují v charakteristickém úseku;
- břehová vegetace by měla mít v odběrovém úseku toku charakteristické druhové složení, výška a hustota porostu musí dávat typické zastínění toku jaké je v hodnoceném úseku toku či povodí (u malých toků);
- poměr peřejí a tůň musí být shodný s charakteristickým úsekem toku a při vzorkování musí být odebrány vzorky z tůň i peřejí. Místa blízko mostů, silnic, brodů a jezů by neměla být vzorkována, pokud toto není typické pro hodnocený úsek toku;
- místa bodových zdrojů znečištění by měla být přiměřeně vzdálena tak, aby došlo k dobrému promíchání znečištěné vody a vody v toku;
- pro sledování ekologického stavu toků by neměla být užívána místa, kde je makrozoobentos často vzorkován (minimální pauza mezi odběry: 1 měsíc).

Odběrová místa jsou konkrétní habitaty, ze kterých jsou v toku odebírány vzorky makrozoobentosu podle principu popsaného níže.

Označení odběrových úseků

Odběrový úsek a jeho délka musí být jasně definovány. Poloha musí být zaznamenána do mapy a popsána slovně, popř. náčrtkem do odběrového protokolu pro snadnou identifikaci při příštím odběru. Pořizuje se fotodokumentace odběrového úseku (foto proti proudu, po proudu a pohled na celý odběrový úsek)) a měří se souřadnice jeho spodního konce pomocí GPS přístroj.

3.3 Vlastní odběr vzorků makrozoobentosu

Metoda PERLA je vzorkovací metoda založená na multihabitatovém odběru (ČSN 757703), při kterém jsou habitaty v toku vzorkovány proporcionálně podle jejich výskytu v odběrovém úseku toku. Pro odběr se používá standardní metoda 3-minutového semikvantitativního multihabitatového vzorkování s použitím ruční bentosové sítě. Do celkové doby odběru se započítává pouze čas, po který je dno rozrušováno, jsou promývány rostliny atd., čas strávený přecházením mezi odběrovými místy není do doby lovu započítán.

Před vlastním odběrem vytipujeme všechny habitaty, které se v odběrovém úseku vyskytují a odhadneme jejich plošný podíl z celkové plochy dna odběrového úseku (v procentech). Při odběru vzorku pak každému habitatu věnujeme odpovídající podíl celkové doby odlovu. Habitaty jsou místa s různou rychlostí proudu, různě vzdálená od břehu, trsy trav splývající u břehu do vody (habitat pro některé schránkaté chrostíky), větve nebo kmeny ležící po určitou dobu ve vodě (habitat pro schránkaté chrostíky, některé jepice či pošvatky), kořeny, místa s různým typem substrátu jako např. kamenitý, písčitý (např. *Ephemera* spp.), jemné sedimenty (střechatky, máloštětinatí červi), trsy vodních rostlin v proudu (muchničky), klidnější voda s vodními rostlinami poblíž břehu (např. *Asellus aquaticus*, larvy vážek) atd.

Při odlovu se postupuje směrem proti proudu řeky, aby se nenarušovala ještě neprozkoumaná plocha. Ruční síť je postavena spodní stranou rámu na dno a substrát před sítí je rozrušován



nohou nebo rukou do hloubky 5 - 10 cm (kick sampling). Uvolněné organismy jsou splavovány proudem vody do sítě. Rozrývaný úsek dna je těsně před sítí, v silnějším proudu může být vzdálenost větší, aby do sítě nebylo splaveno mnoho písku. V místech se silným proudem je možno si stoupnout před síť (zády ke směru proudu). Proud přicházející do sítě je tím zmírněn. Do sítě jsou rovněž oplachovány ponožené vodní rostliny, listy suchozemských rostlin splývající do vody, kořeny stromů, větve apod. Výskyt přisedlých organismů (pijavky, *Ancylus fluviatilis* atd.) je třeba dodatečně kontrolovat prohlížením kamenů a jejich případným omytím rukou. V místech kde je proud neznatelný a dno je bahnité, je možné rozrušit dno nohou a pak nad ním mávat sítí. Obvykle není možné odebrat celý vzorek do sítě najednou. Aby nedošlo k vyplavování vzorkovaného materiálu ze sítě, je nezbytné během vzorkování několikrát síť vyprázdnit do PVC vědra (kbelíku).

Zpracování vzorku v terénu

V terénu je vzorek zbaven hrubších anorganických sedimentů dekantací, jsou odstraněny větvičky, listy a je řádně promyt přes odběrovou síť, aby byl zbaven jemných sedimentů.

Postup dekantace: síť je umístěna ve vodě tak, aby rám byl nad vodou, a z PVC vědra je vzorek sléván do sítě (sléváno je do vody, nikoli na tkaninu sítě). Nejdříve jsou slity lehčí části. Zbylé těžší části vzorku (kameny, písek) jsou ve vědru opakovaně promíchávány rukou v rukavici ve vodě a voda s materiálem slévána do sítě, dokud není oddělen hrubý anorganický substrát od zbytku vzorku. Oddělený substrát (písek a kameny) je prohlédnut na míse a všechny zbylé organismy (larvy chrostíků se schránkami z kamínků či měkkýši) jsou individuálně vybrány. Dokonalé proprání a umytí všech odběrových pomůcek (zvláště sítě) po každém odběru je nezbytné.

Dále se postupuje jedním z následujících způsobů:

1. **Doporučený postup:** Pro omezení mechanického poškození živočichů je vzorek v terénu předtříděn na bílých fotomiskách (30 x 50 cm) do skleněných tabletovek dle taxonomických skupin. Přímo v terénu je vhodné ze vzorku vybrat zejména křehké larvy hmyzu (Ephemeroptera, Plecoptera, Zygoptera apod.) a také zástupce měkkýšů a muchniček apod., které lze pak v tabletoвке odděleně konzervovat ethanolem.



Částečně vytříděný vzorek je zbaven přebytečné vody, vložen do PVC vzorkovnice o objemu 1 – 2 litry a fixován. Dotřídění zbylých organismů je provedeno v laboratoři.

2. Vzorek je v terénu vložen do PVC vzorkovnice o objemu 1 – 2 litry bez předtřídění a vytřídění organismů je provedeno až v laboratoři. Při tomto postupu dochází k mechanickému poškození křehkých larev hmyzu, což ztěžuje, případně znemožňuje, pozdější determinaci. Proto se tento postup nedoporučuje a měl by být uplatněn pouze v případě nepříznivých klimatických podmínek během vzorkování jako je déšť, silný vítr, mlha či mráz.

Konzervace vzorků

Vzorky i zkumavky jsou fixovány přidáním 40% roztoku formaldehydu do výsledné 4% koncentrace (ČSN EN ISO 5667-3). Některé organismy je lépe fixovat a konzervovat etanolem (měkkýše, muchničky) neboť z jejich schránek a krunýřů by formaldehyd postupně odstranil vápenec, což by ztížilo až znemožnilo determinaci. Použití jiné fixáže než formaldehydu by mělo být označeno přímo na vzorku (ČSN EN ISO 5667-3). Fixované vzorky by se měly uchovávat pokud možno v chladu, dovolují-li to podmínky transportu.

Značení vzorků

Vzorky se označují dovnitř vzorkovnic a zkumavek papírovými štítky popsanými obyčejnou tužkou (grafitem) nebo štítky natištěnými na laserové tiskárně či nakopírovanými na fotokopírce. Vně se vzorkovnice značí vodostálými fixy. Štítek i vnější popis by měl vždy obsahovat kódové označení vzorku, datum odběru, název toku a lokalizaci.

Ke každému vzorku je nezbytné vyplnit odběrový protokol. Do odběrového protokolu je zaznačen také počet vzorkovnic a zkumavek s vytříděnými organismy. V případě odchytu velkých měkkýšů či koryšů, lze, v případě spolehlivé determinace v terénu, druh a počet kusů zapsat do protokolu a živočichy pustit zpět do toku.

4. ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ V LABORATOŘI

Konzervované vzorky makrozoobentosu jsou po transportu do laboratoře uloženy na vyznačeném místě, které by mělo být dobře odvětrávané s pokud možno konstantní teplotou.

Zpracováním vzorku rozumíme pod-vzorkování, vytřídění a determinaci organismů.

Při zpracování vzorku v laboratoři postupujeme tak, že fixovaný vzorek vyklopíme ze vzorkovnice do ruční sítě o velikosti ok 250 μ m a dobře propláchneme. Je-li vzorek bohatý na organismy, je přípustné pro snížení časové a finanční náročnosti zpracovat pouze jeho část.

Minimální velikost zpracovaného vzorku je $\frac{1}{4}$., (Doporučené pod-vzorkování je vhodné poznačit přímo v terénu). Nejdříve vzorek musíme homogenizovat (jemně zamíchat) v plastové misce s vodou a umístit na dělicí zařízení. Dělicí zařízení je v podstatě miska se dnem ze síťoviny. Zařízení částečně ponoříme do vody tak, aby dnová síť byla pod vodou, ale horní hrany nikoliv. Na síti dělicího zařízení rovnoměrně rozvrstvíme biologický materiál po ploše (jsou-li ve vzorku větší kusy dřeva aj., vyndáme je a prohlédneme, zda se na nich nepřichytily organismy). Pak vytáhneme zařízení z vody a vykrajovacím čtvercem o definované ploše vydělíme požadovanou část vzorku. Tuto část lopatkou přeneseme do kádinky s vodou. (Pod-vzorkováním dojde nepochybně ke ztrátě určitého počtu málo početných druhů, ale výsledek je mnohem reprezentativnější, než kdyby byl přímo v toku odebrán malý vzorek v kratším časovém intervalu.)



Z této vydělené části vzorku vytřídíme všechny organismy makrozoobentosu do zkumavek dle taxonomických skupin. Zkumavky řádně označíme popisem na víčko a dovnitř štítkem (kód vzorku, datum odběru) a konzervujeme 70% alkoholem nebo 4% formaldehydem. Na štítek přepíšeme, z jaké části vzorku je daná taxonomická skupina vytříděna. Není-li vzorek determinován ihned po vytřídění, počet zkumavek z jednotlivých taxonomických skupin zapíšeme buď do odběrového protokolu, a nebo do určené evidenční knihy. Do doby determinace uchováváme zkumavky na dobře odvětrávaném místě s pokud možno konstantní teplotou a ve tmě.

5. DETERMINACE

Základním a nezbytným vybavením pro determinaci biologického materiálu je mikroskopická technika. Pro determinaci je nezbytný preparační mikroskop (zvětšení v rozsahu cca 10 – 100x) a světelný mikroskop (zvětšení v rozsahu cca 400 – 1 000x).

Determinace vzorků makrozoobentosu se provádí na základě morfologických znaků do co nejnižší, obvykle druhové úrovně (s ohledem na stanovené determinační úrovně. Výsledky determinace se zaznamenávají do determinačního protokolu (viz příloha).

Determinační protokol musí vždy obsahovat:

- kódové označení vzorku
- název toku
- název profilu
- datum odběru
- datum determinace
- jméno determinátora a jeho podpis
- údaj o zpracovaném podílu vzorku
- seznam zjištěných taxonů s vyznačením vývojových stadií a s jejich abundancemi

Archivace

Z primárních záznamů je nezbytné archivovat odběrový a originální determinační protokol. Před archivací je nutno zkontrolovat úplnost jejich vyplnění. Dobu, po kterou je nutno archivovat vzorky, stanovuje zadavatel odběrů dle typu monitoringu.

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 7051 (EN 25667-2), 1995: Jakost vod - Odběr vzorků - Část 2: Pokyny pro způsoby odběru vzorků
- ČSN 75 7051 (EN 25667-6), 1994: Jakost vod - Odběr vzorků - Část 6: Pokyny pro odběr vzorků z řek a potoků
- ČSN 75 7051 (EN ISO 5667-3), 1996: Jakost vod - Odběr vzorků - Část 3: Pokyny pro konzervaci vzorků a manipulaci s nimi
- ČSN 75 7703 (EN 27828), 1996: Jakost vod - Metody odběru biologických vzorků - Pokyny pro odběr vzorků makrozoobentosu ruční sítkou.
- ČSN 75 7704 (EN 28265), 1996: Jakost vod - Konstrukce a použití kvantitativních vzorkovačů makrozoobentosu z kamenitých substrátů mělkých vod.
- ČSN 75 7716: Jakost vod - Biologický rozbor - Stanovení saprobního indexu
- ČSN 757720 (EN ISO 8689 – 1), 2000: Jakost vod - Biologická klasifikace vodních toků - Část 1: Pokyny pro interpretaci údajů o biologickém stavu toků na základě sledování makrozoobentosu
- ČSN 757720 (EN ISO 8689 – 2), 2000: Jakost vod - Biologická klasifikace vodních toků - Část 2: Pokyny pro prezentaci údajů o biologickém stavu toků na základě sledování makrozoobentosu
- Furse, M.T., Moss, D., Wright, J.F., Armitage P.D. & Gunn R.J.M. 1986: A practical manual for classification and prediction of macroinvertebrate communities in running water in Great Britain. Freshwater Biological Association, River Laboratory: 147 pp.
- Kokeš J. et Vojtíšková D., 1999: Nové metody hodnocení makrozoobentosu tekoucích vod. Výzkum pro praxi, sešit 39, VÚV T.G.M. Praha, 83 pp.
- Kokeš J., Němejcová D. et al., 2002: Predikční modely říčních ekosystémů. Závěrečná zpráva projektu VaV 510/7/99, Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.M. Praha, pobočka Brno, 84 pp. + přílohy
- Směrnice 2000/60/ES Evropského parlamentu a Rady z 23. Října 2000 ustavující rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky. (Water Framework Directive)
- Zahrádka J. et al., 2001: Metodická příručka pro biologický monitoring toků ve správě Zemědělské a vodohospodářské správy. AQUA-SERVICE, Brno, 18 pp.

Determinační protokol pro analýzu makrozoobentosu tekoucích vod

KÓD VZORKU:	DATUM ODBĚRU :	DETERMINOVAL:
TOK:	ODEBRAL:	DATUM DETERMINACE:
PROFIL:	Část zpracovaného vzorku:	PODPIS:

[illegible]