

Metody kvantifikace fytoplanktonu a revidovaná ČSN 75 7717

Petr Pumann, Lenka Šejnohová

Determinační schůzka CCT

15.5.2009, Brno

upraveno pro publikaci na internetu

Metody pro stanovení fytoplanktonu

- mikroskopické
- stanovení pigmentů
 - spektrofotometricky
 - fluorescenčně
- ALE třeba i velmi jednoduché metody
 - průhlednost
 - vizuálně vodní květ
- NEBO výhledově třeba pomocí průtokové cytometrie, molekulárně biologických metod,
....

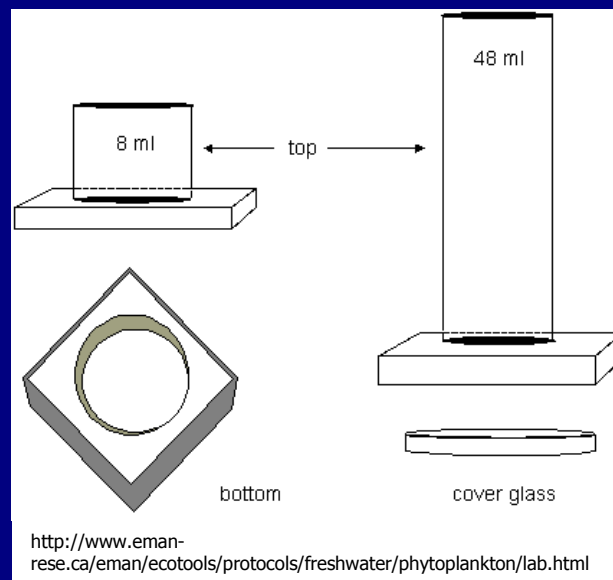
Účel rozboru na prvním místě

- Jak přesnou kvantifikaci potřebuji?
- Kolik na to mám času?
- A co se stane, když se hodně seknu ve výsledku?
- V mnoha případech bývá metoda legislativně předepsána

Postupy - metodické normy

- ČSN EN 15204 (75 7718) – Jakost vod – Návod pro počítání fytoplanktonu za použití inverzní mikroskopie (metoda podle Utermöhla) - *duben 2007*
- ČSN 75 7712 Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení biosestonu - *květen 2005*
- ČSN 75 7717 Jakost vod – Stanovení planktonních sinic – *červen 2008*

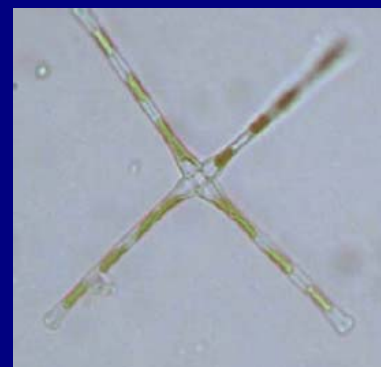
Mezinárodní standardní metodika pro fytoplankton



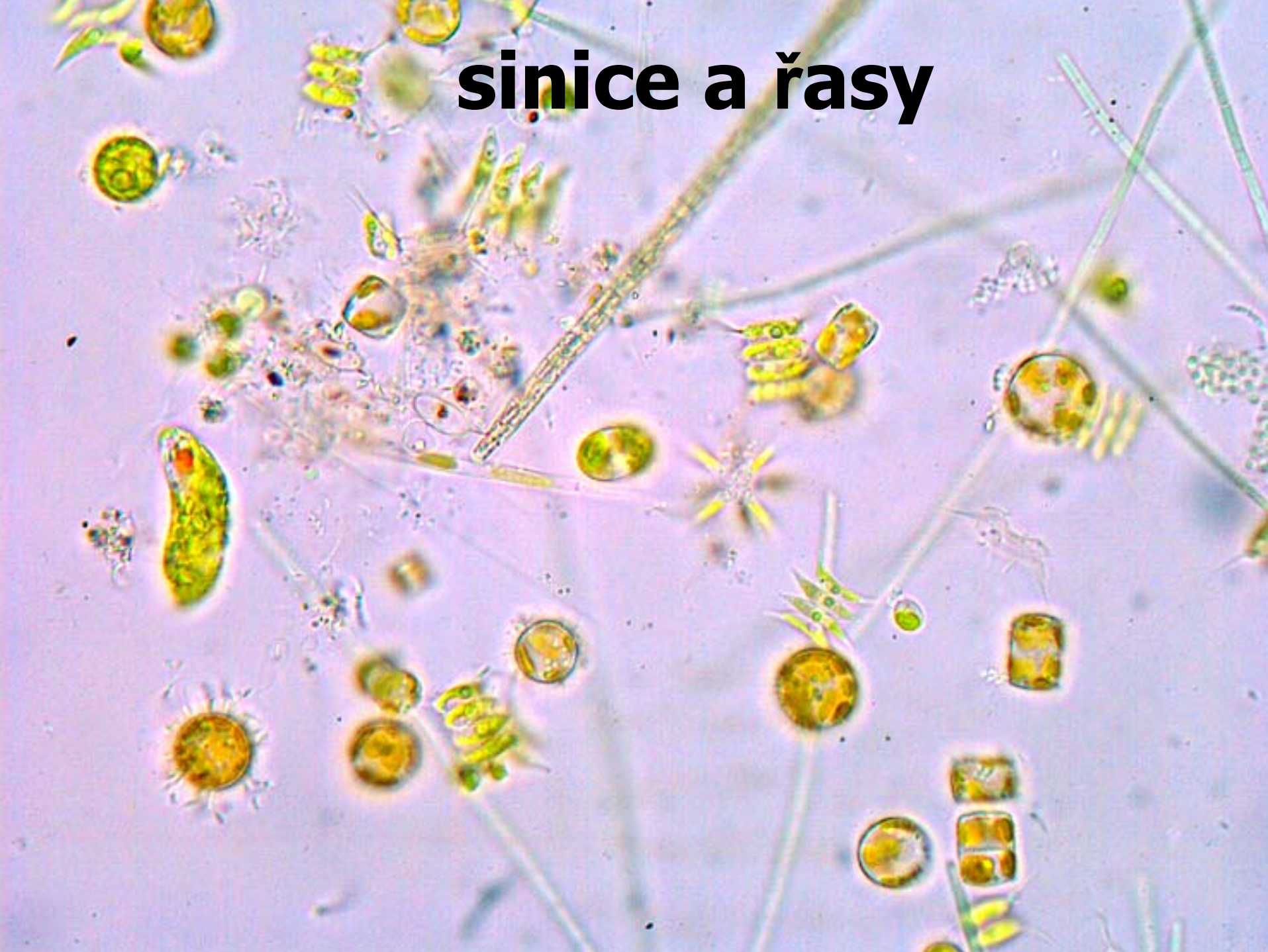
- převrácený mikroskop není běžně dostupný ve vodárenských a hygienických laboratořích
- pro některé účely není metodika vhodnější než u nás zavedené postupy

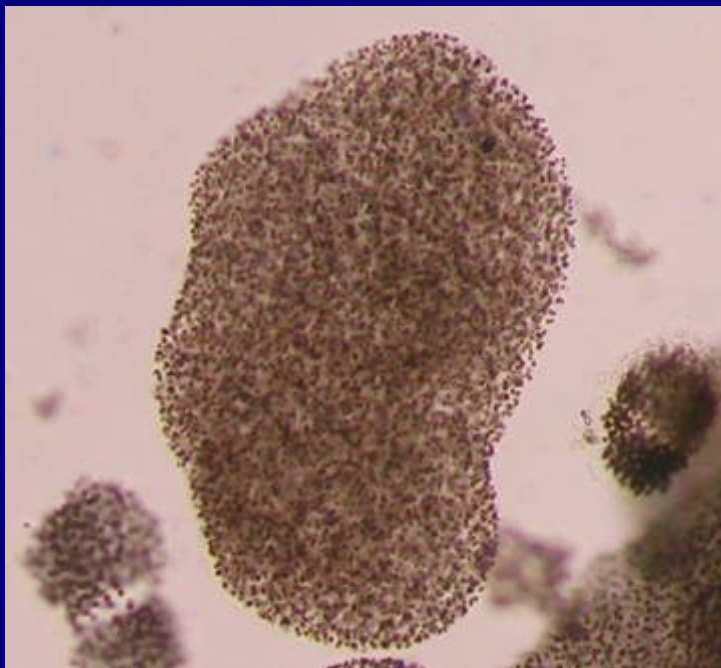
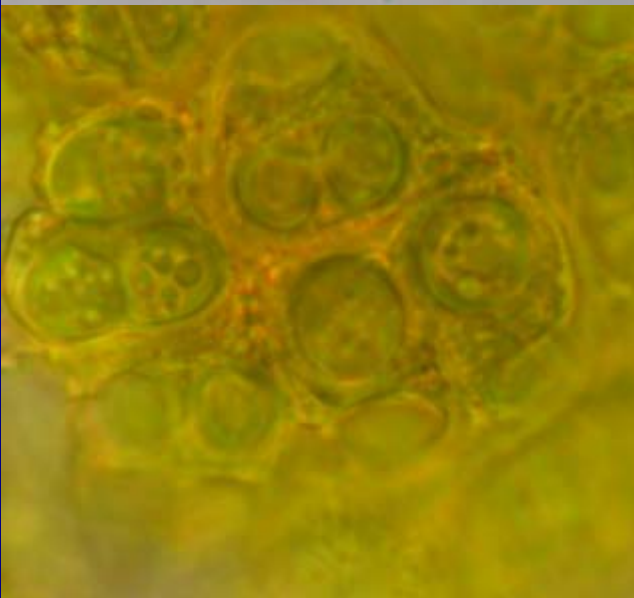
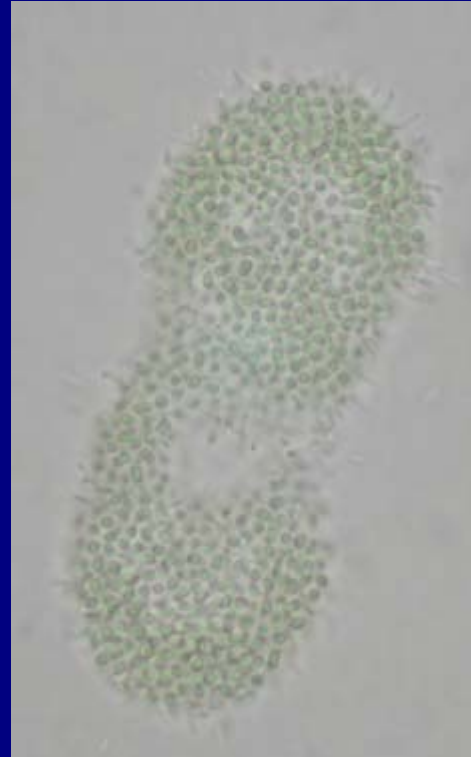
Vyjadřování výsledků (jednotky)

- jedinec („přirozený“)
- jedinec (ve smyslu ČSN 75 7712)
- buňka
- objemová biomasa



sinice a řasy





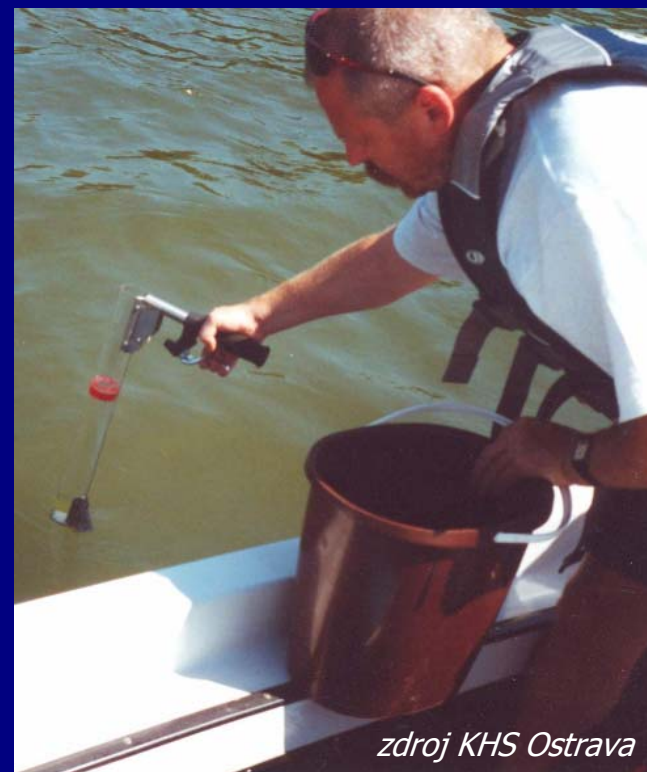
ČSN 75 7717 Jakost vod – Stanovení planktonních sinic

ČSN 75 7717 - geneze

- 2000 – potřeba rutinní metody pro stanovení planktonních sinic
- 2001 – první návrh metodického doporučení
- 2004 – TNV 75 7717 – Jakost vod – Stanovení planktonních sinic
- 2008 - ČSN 75 7717 – Jakost vod – Stanovení planktonních sinic

Specifikace požadavků na odběr

- Především pro koupací vody
 - hloubku odběru (0-30 cm)
 - dílčí vzorky (alespoň 3)
 - čas odběru (6 – 11 h)
 - je vždy nutné (a výhodné) ji dodržovat?
- konzervace – dva vzorky, z nichž se jeden na místě konzervuje Lugolem



zdroj KHS Ostrava

Stupnice pro hodnocení výskytu sinic

Stupeň	Výskyt	Popis
0	Žádný	Sinice nejsou pouhým okem pozorovatelné.
1	Pozorovatelný	Ve vodě jsou zjistitelné ojedinělé zelené vločky nebo kolonie.
2	Hojný	Ve vodě se mohou vyskytovat slabší příhladinové květy při břehu nebo četné kolonie ve vodním sloupci.
3	Masový	Výskyt silných příhladinových květů velkého rozsahu. Na břehu může být naplaveno větší množství zeleného kašovitého materiálu.

Jak zaznamenávat do PiVa?

stupeň 1 – pozorovatelný



stupeň 2 - hojný



stupeň 3 - masový

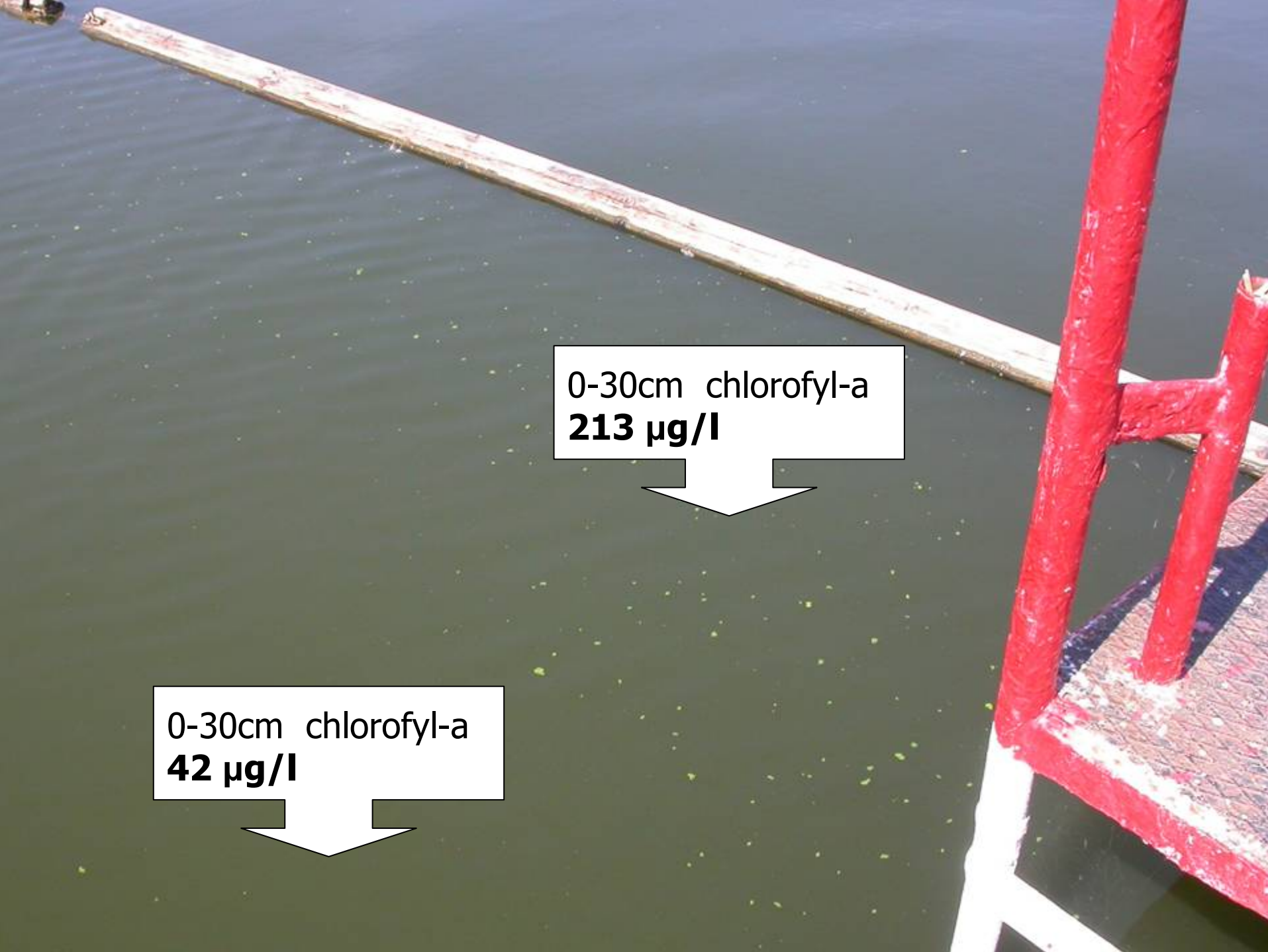


stupeň 3 - masový



Malý metodický problém velké kolonie *Microcystis ichthyoblabe*





0-30cm chlorofyl-a
213 $\mu\text{g/l}$

0-30cm chlorofyl-a
42 $\mu\text{g/l}$



Microcystis ichthyoblabe
2 500 000 buněk/ml



Microcystis ichthyoblabe
10 000 buněk/ml

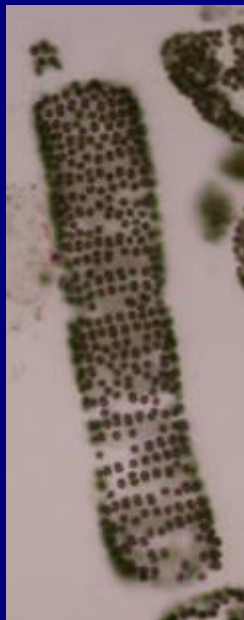
Velké kolonie *Microcystis ichthyoblabe*



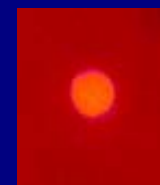
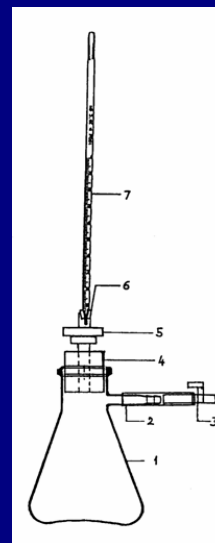




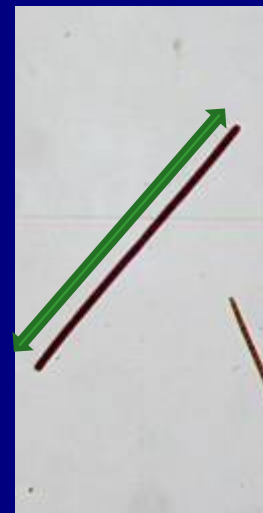
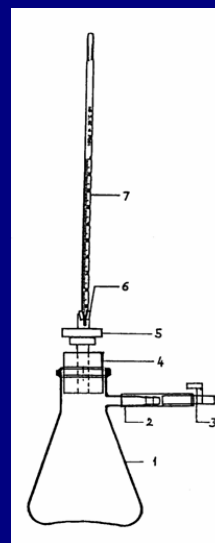
ČSN 75 7717 – kokální sinice



?



ČSN 75 7717 – vláknité sinice

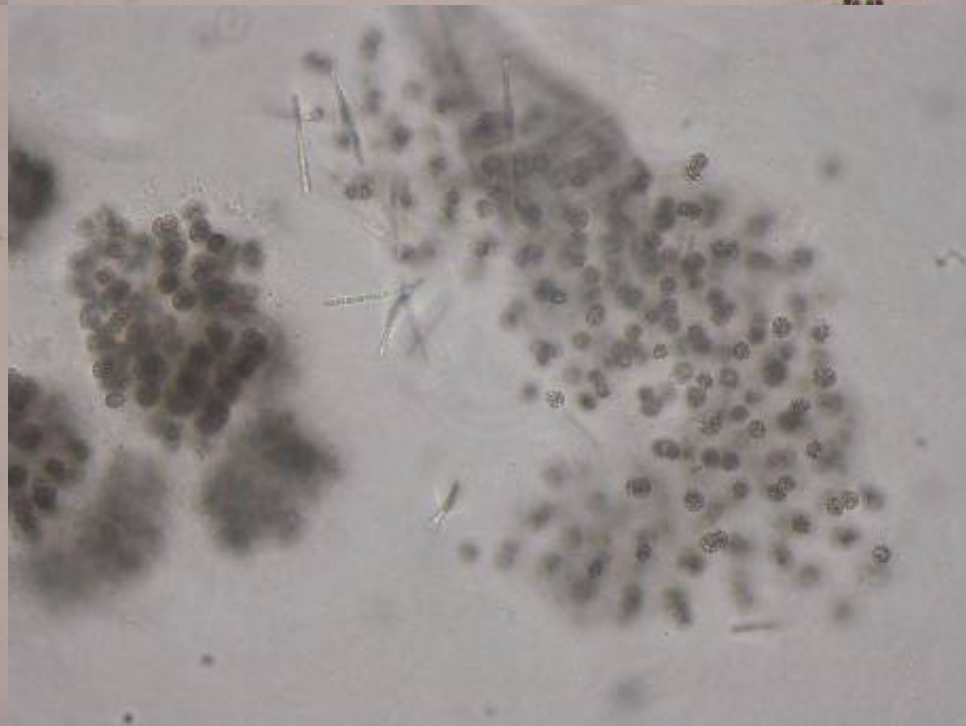
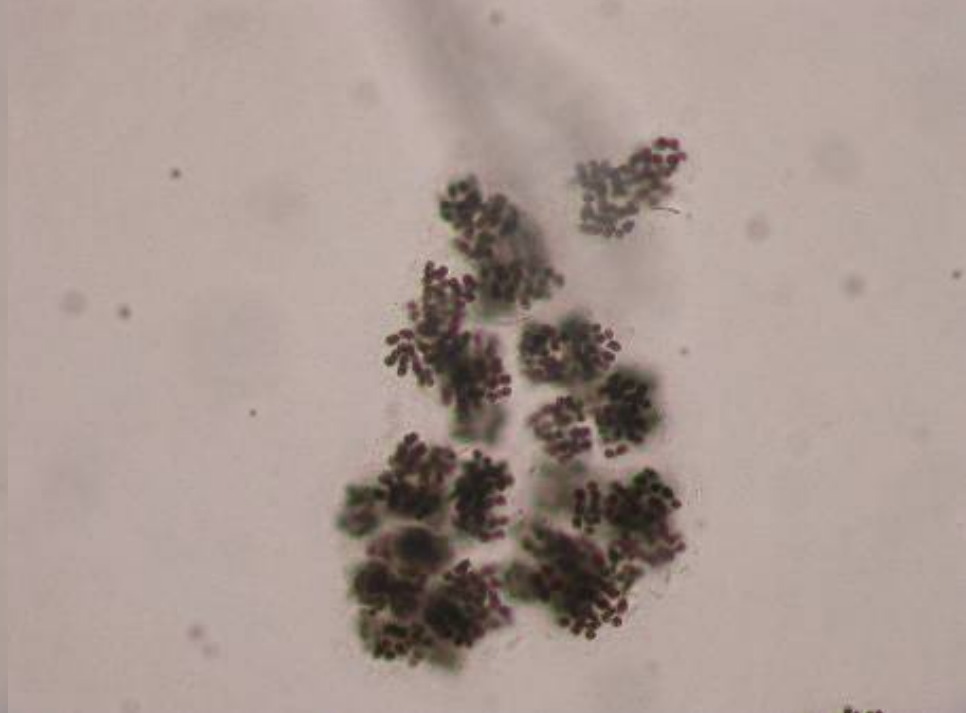
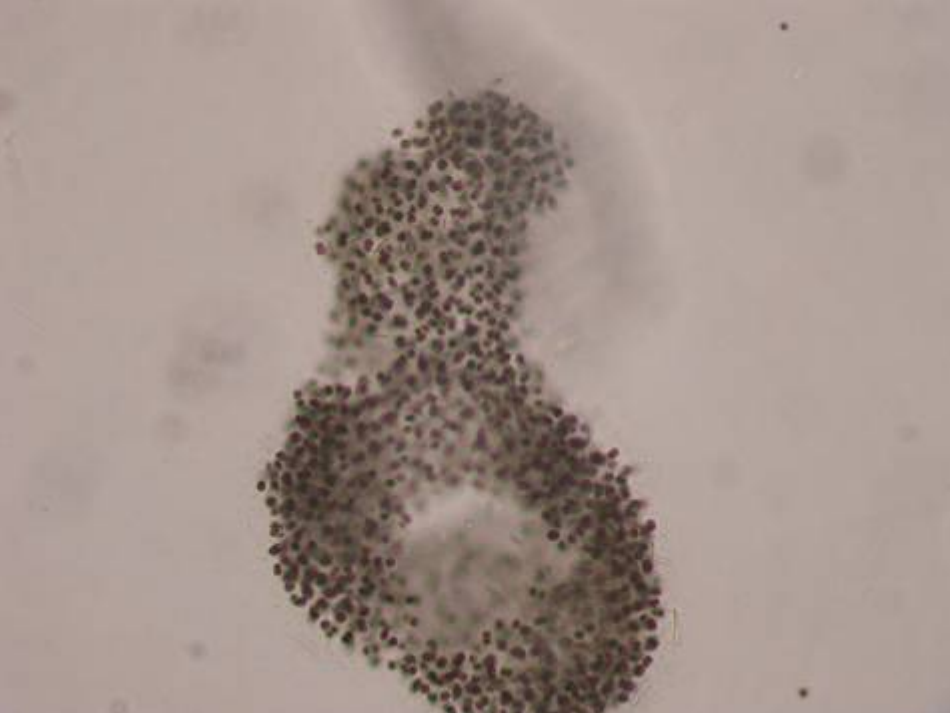


Představa o přítomných sinicích

- údaje z odběrového protokolu (pozorování typických kolonií ve vodním sloupci, průhlednost, ..)
- smyslové posouzení vzorku v laboratoři
- taxonomická determinace (většinou nutné zahustit - membránová filtrace)

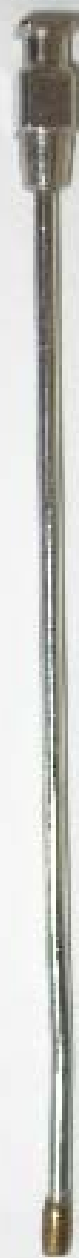


Postup pro stanovení kokálních sinic - podrobně



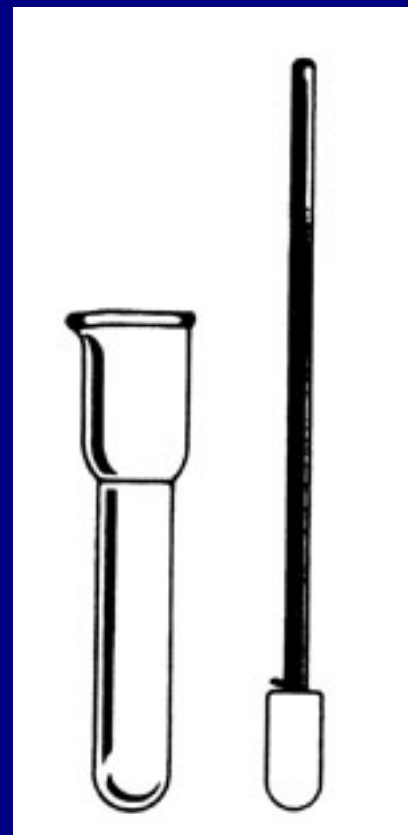
Dezintegrace

- přidání KOH
- mechanicky
- standardně 5 ml vzorku, ale někdy nemusí být dostatečné



Alternativy – homogenizátor Potter-Evehjem

- Převzato z literatury
 - Bernard C, Monis P, Baker P (2004): Disaggregation of colonies of *Microcystis* (Cyanobacteria): efficiency of two techniques assessed using an image analysis system. *Journal of Applied Phycology* 16(2): 117-123.
- ALE dělali jen na dobře dezintegrovatelných taxonech
- na *M. viridis* a *M. wesenbergii* moc nefunguje



Ultrazvukový homogénizátor

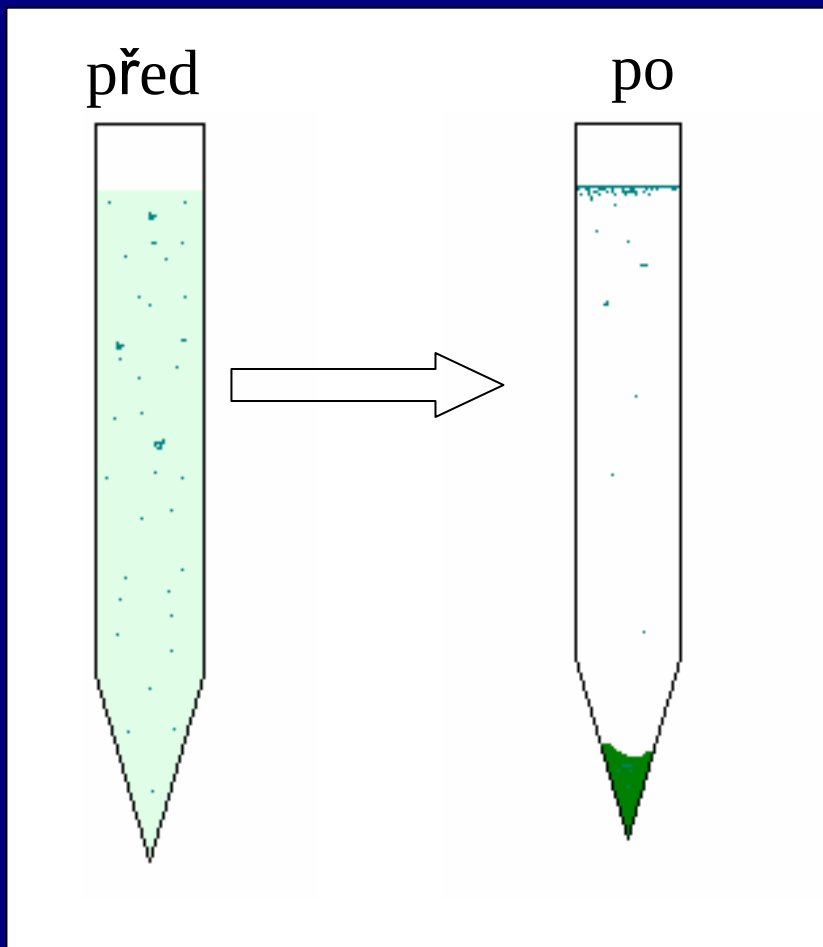
- Dobrý ale drahý (ve srovnání s injekční stříkačkou)
- Je nutné větší množství vzorku (což je však spíš výhoda)



http://www.maneko.cz/images/karta/stredni/v211_maneko.jpg

Zahušťování

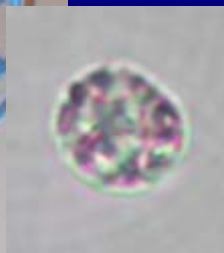
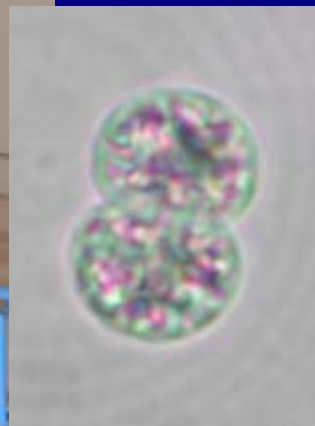
Odstředování



Zahušťování - ultrafiltrace

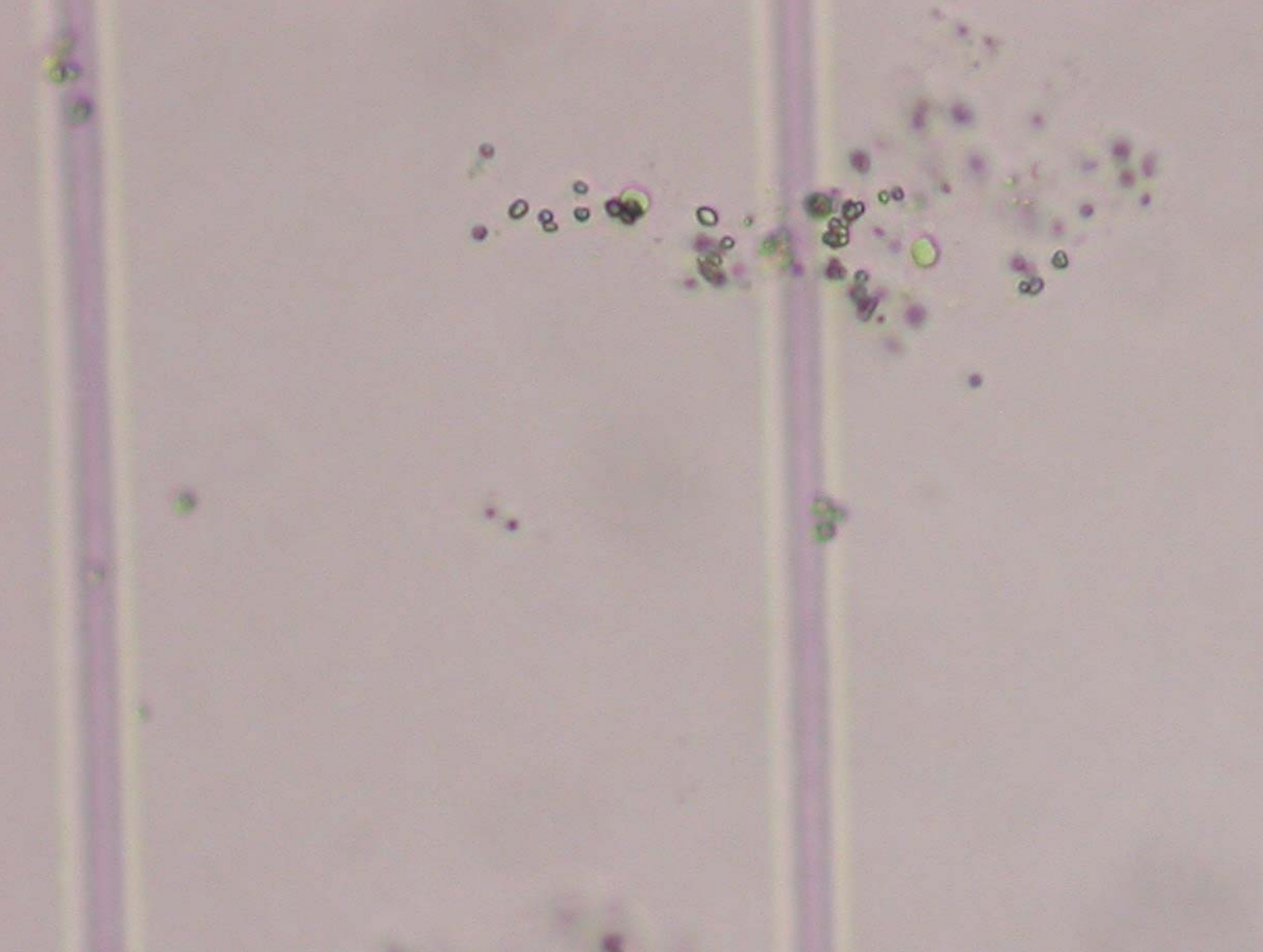
- snadno přenosné,
rychlé, nemusí se
rozbíjet aerotopy
- ALE
 - při vyšším oživení se
ucpává
 - ztráty (alespoň u mě
😊)
 - není možno koupit





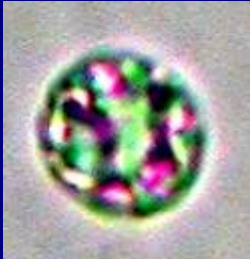
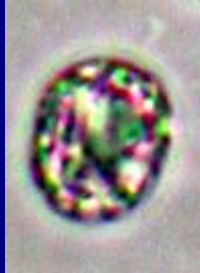
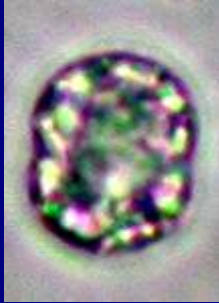
Počítání

- v Cyrusově, Burkrově komůrce
- je možno využít fluorescenci
- kontrolovat dezintegraci
- kontrolovat, zda se nevznáší část buněk u krycího skla

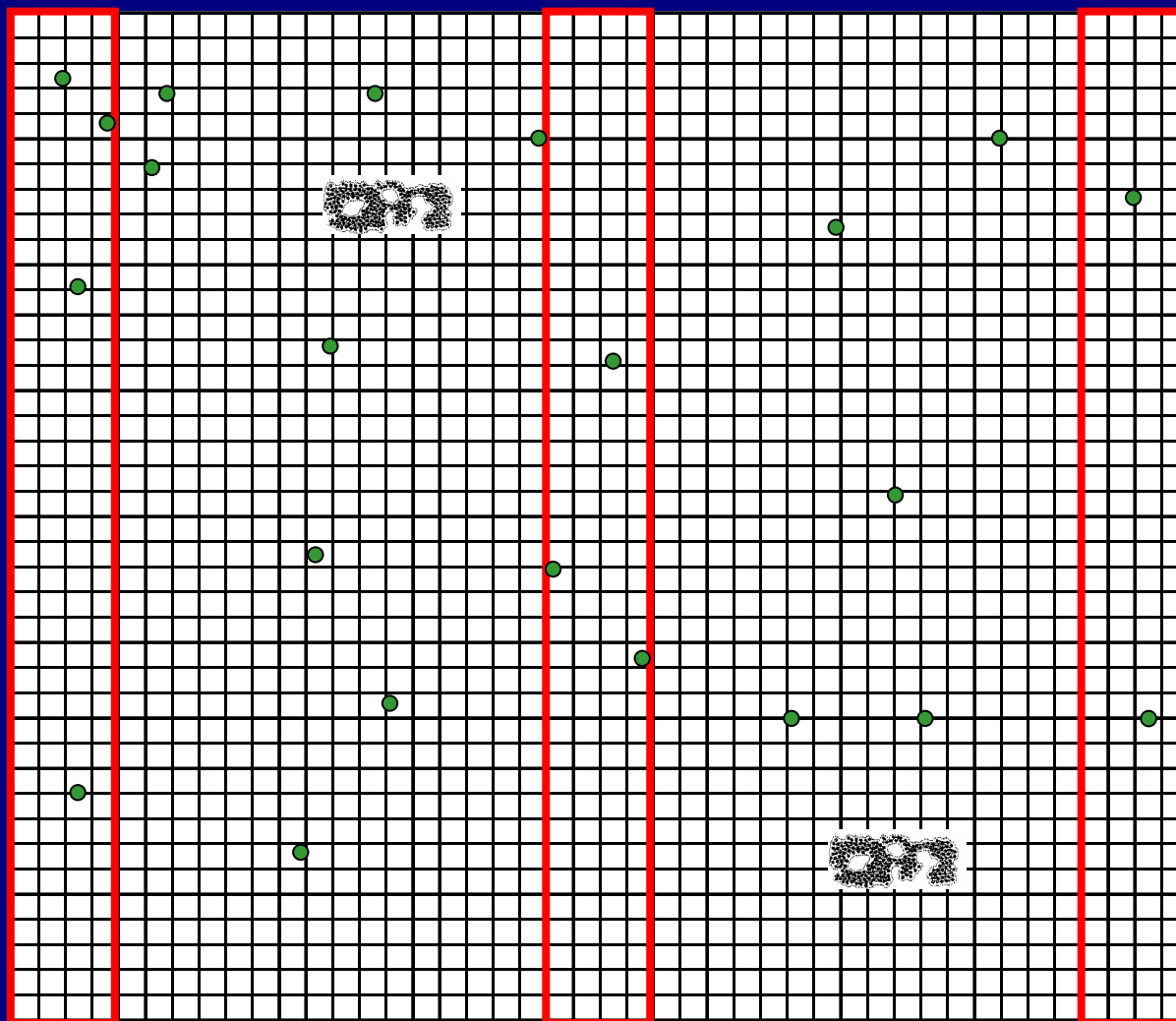




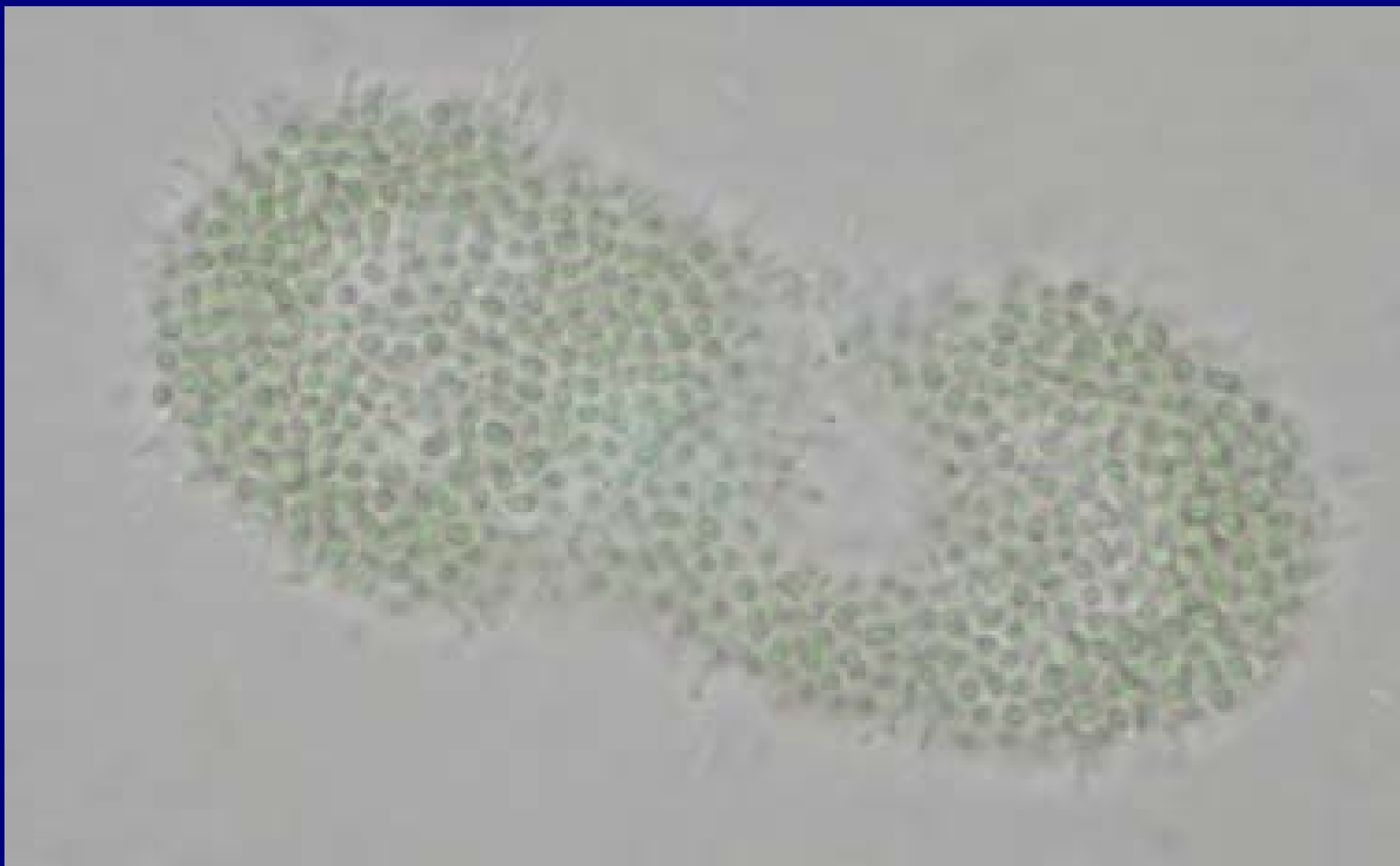
Dělicí se buňky

A	B	C	D	E
				
1 buňka	1 buňka	1 buňka	2 buňky	2 buňky





Metodické problémy - velmi malé buňky



Cyanogranis



Romeria

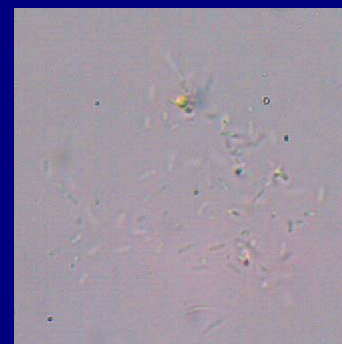


Koloniální sinice s drobnými buňkami

Merismopedia



Aphanothece



Merismopedia



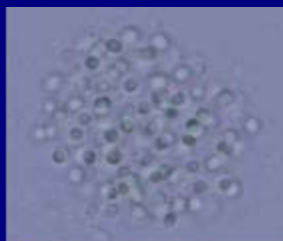
Cyanodictyon



Cyanocatena



Aphanocapsa



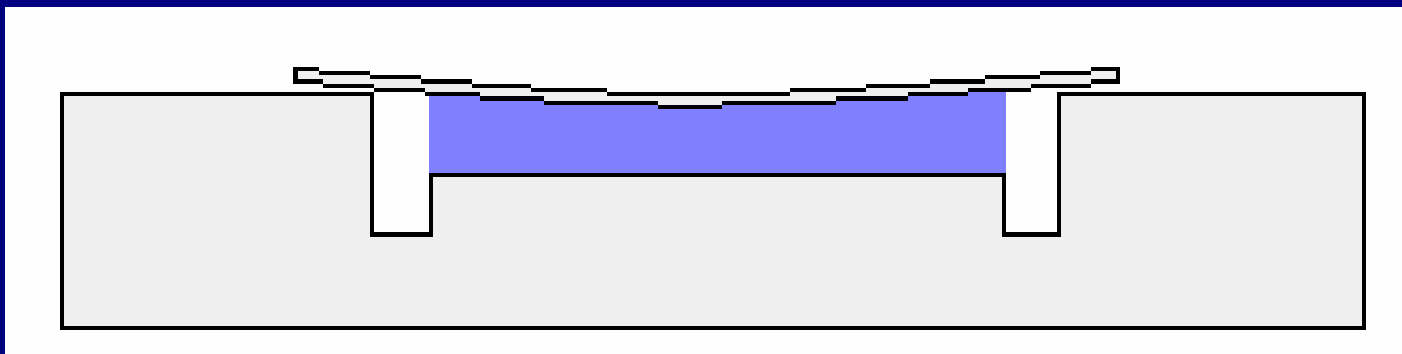
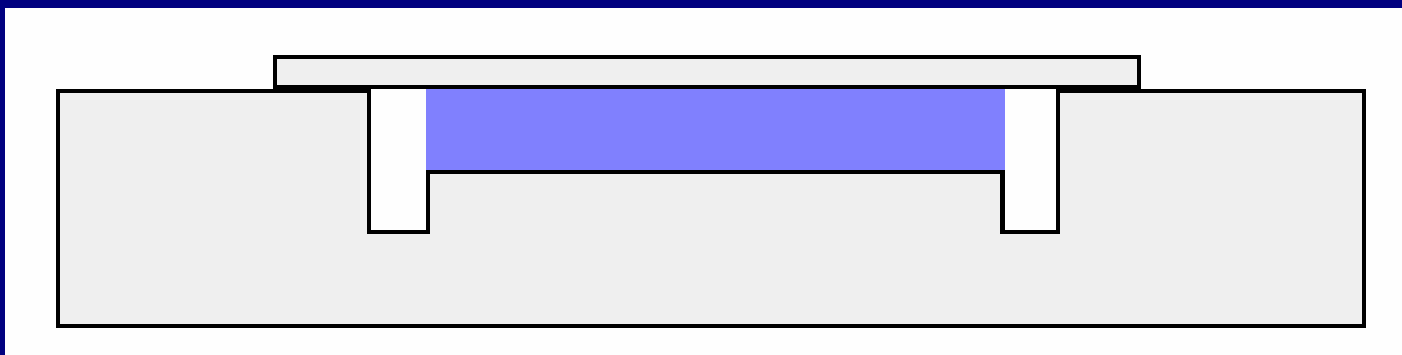
Velmi malé buňky

- pro koupací vody – nepočítají se buňky menší než $2\mu\text{m}$



Možnost využít tenké sklo a/nebo fluorescenci

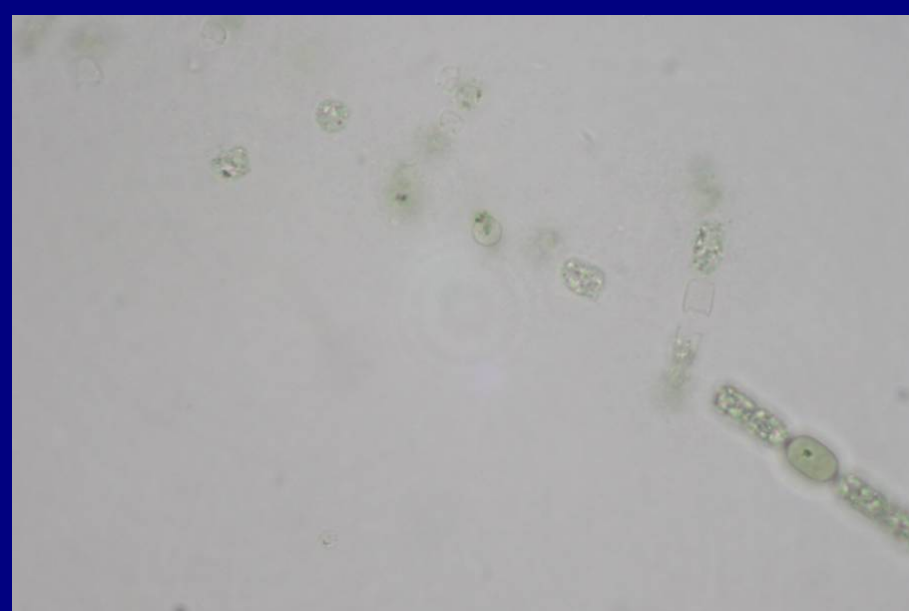
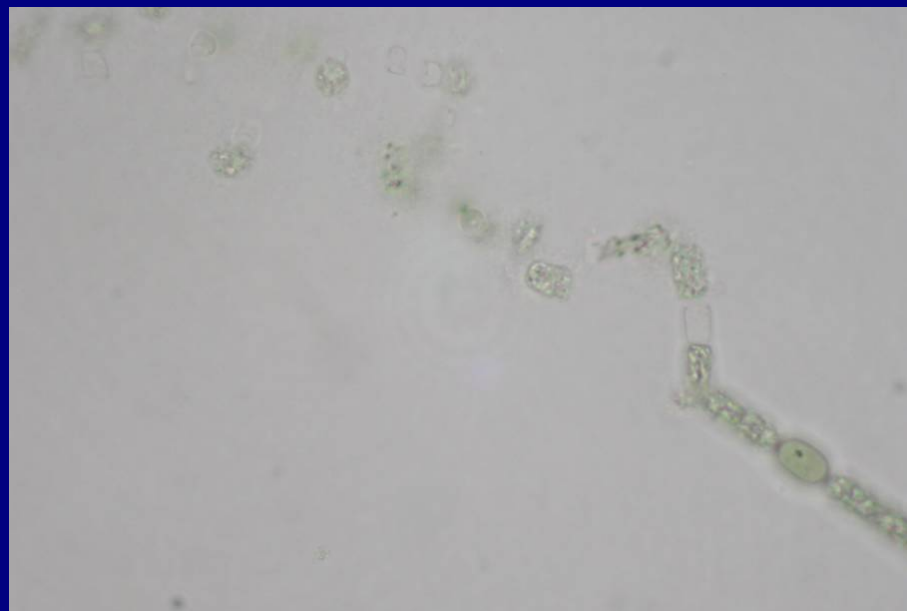
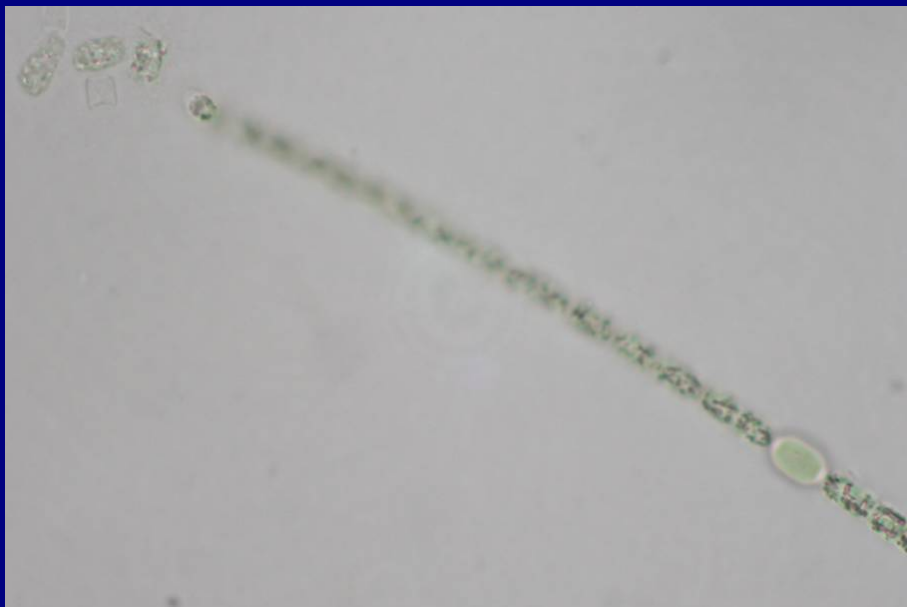
- využít lepších optických vlastností tenkého krycího skla
- není dodržena standardní výška komůrky – stanovení pouze orientační (cca 90% původního objemu)



Vláknité sinice - podrobně

Problém - lyze buněk při přepravě a zpracování

➤ Lugol !



Zahuštění

- nutno častěji zahušťovat než kokální sinice
- při zahušťování centrifugací Lugolem fixovaných vzorků nebývá problém s velkými ztrátami
- ALE ...

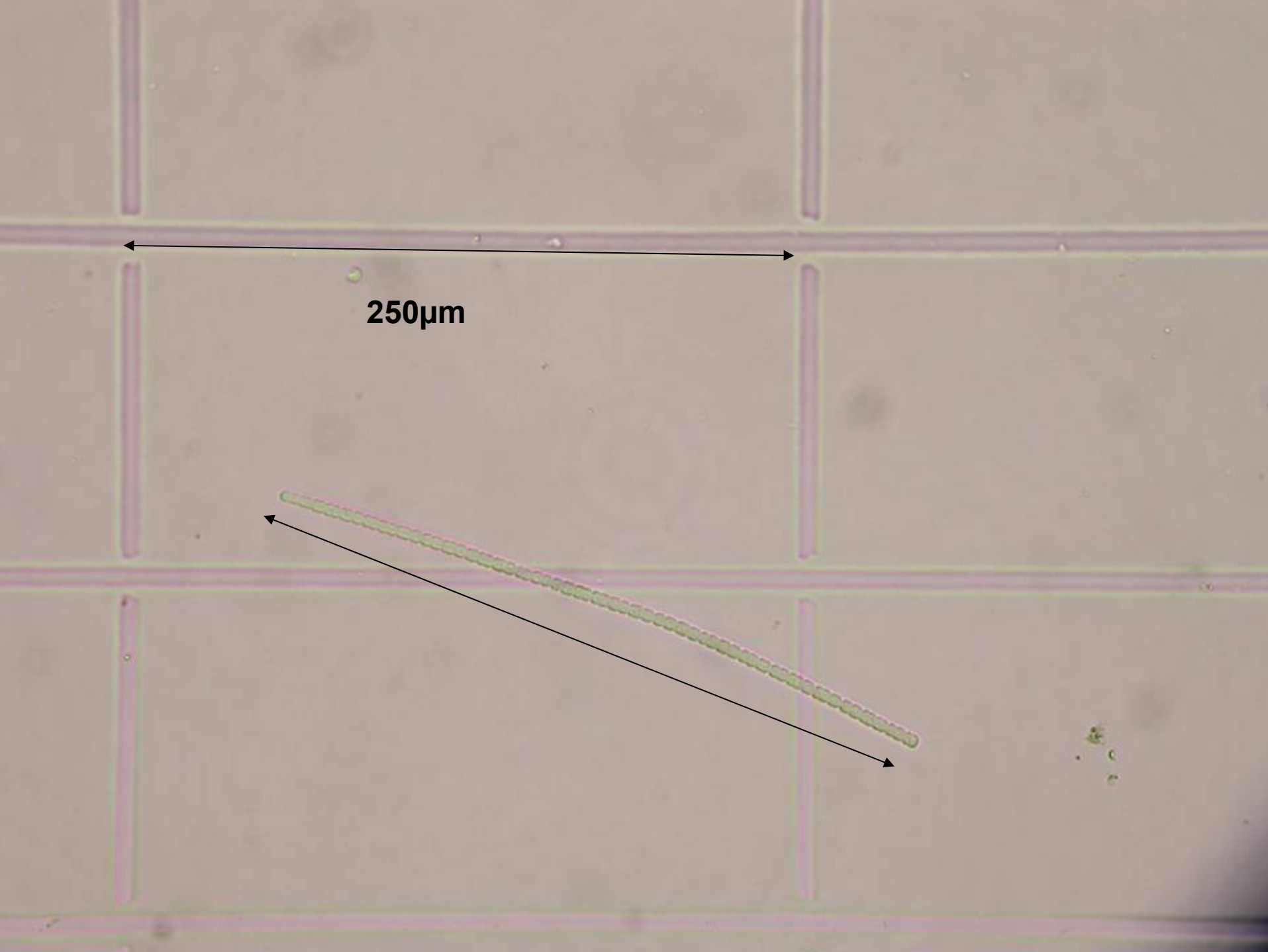


Problém – nezřetelné buňky

- především pro *Planktothrix* a *Aphanizomenon* – 1 buňka = 5 μm







250µm

[illegible]



[illegible]

180μm



[illegible]

Problém *Planktothrix*

- nehomogenita při plnění komůrky

Výpočet

$$\text{Počet buněk/ml} = \frac{B \times Pk \times Vz \times (Vd + VKOH)}{Pp \times Vp \times Vk \times Vd}$$

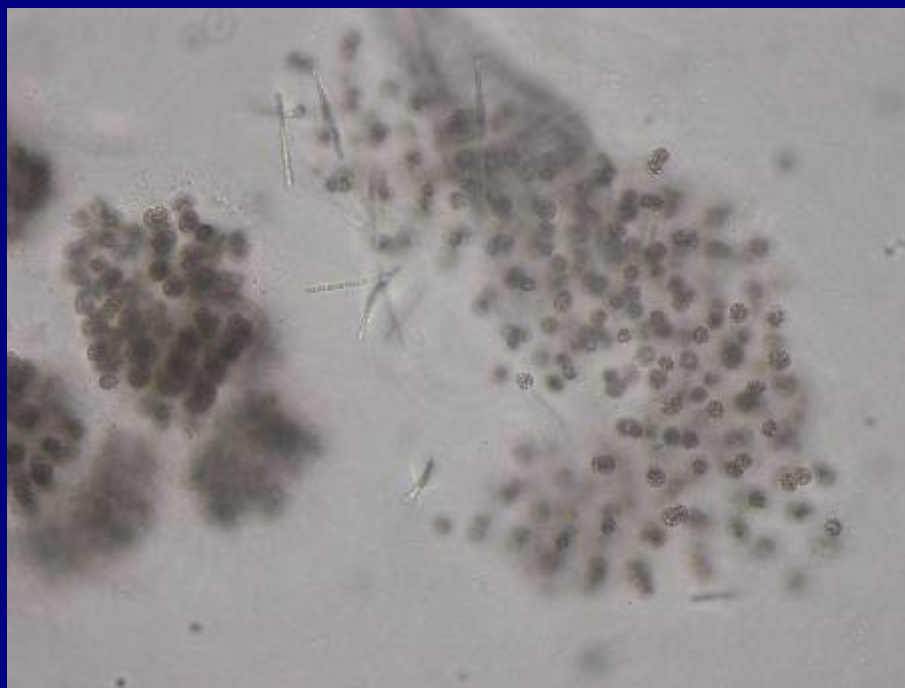
- B – počet napočítaných buněk
- Pp – propočítaná plocha komůrky vyjádřená v mm², počtem polí, pásů, aj.
- Pk – celková plocha komůrky uvedená ve stejných jednotkách jako Pp
- Vd – objem vzorku použitý k dezintegraci v ml
- VKOH – objem přidaného dezintegračního činidla v ml (KOH, formalín, Lugolovo činidlo, HCl*)
- Vp – objem vzorku použitého ke koncentraci v ml
- Vz – objem zahuštěného vzorku v ml
- Vk – objem komůrky v ml**

*V případě Lugolova činidla nebo formalínu většinou můžeme zanedbat.

** Pro komůrku Cyrus I je objem 0,01ml.

Případ *Pseudanabaena mucicola*

- podle ČSN 75 7717 se nepočítá, protože bývá vzhledem k biomase *Microcystis* zanedbatelná



Zabezpečování kvality (Příloha C)

➤ Interní kontrola

- ověření výtěžnosti zahuštění
- podchycení ztrát při dezintegraci

➤ Externí kontrola

- zpracovávat část vzorků společně s další laboratoří
 - vhodné především pro vzorky, které se nevydávají pro MPZ (*Anabaena*, *Aphanizomenon*)

➤ Kvalifikace pracovníků

- determinace alespoň 20 vzorků s různým složením pod dohledem zkušeného pracovníka
- kvantifikace alespoň 5 různých vzorků sinic pod dohledem

Objemová biomasa

- u přírodních koupacích vod je výrazně lepší jen pro některé taxony
- měřit nebo tabelované hodnoty?
 - neměřit je rychlejší a vede k větší shodě mezi laboratořemi
 - zvláště pro některé taxony mohou být údaje velmi proměnlivé
- MPZ – zatím docela tragédie
- změny objemu po přidání Lugolu
 - (Hawkins et al (2005). Harmful Algae 4: 1033-1043

Reprodukovatelnost mikroskopických metod

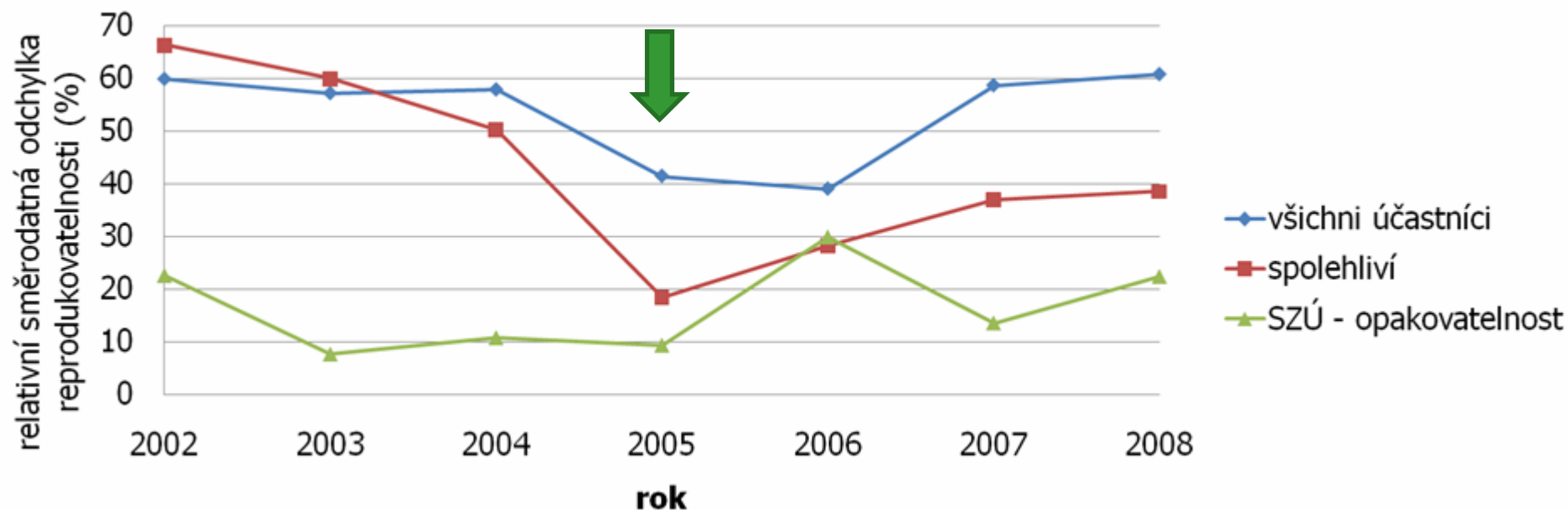
Problémy s využitím dat z MPZ pro reprodukovatelnost metody

- účast i málo zkušených laboratoří (pracovníků)
 - „objektivní ☺“ výběr z účastníků („spolehlivé“ laboratoře)
- mezilaboratorní komunikace a možná úprava některých výsledků
 - s tím nelze dělat téměř nic
- obvykle vydávány jednodušší vzorky
 - NE *Anabaena*, *Aphanizomenon* - lyzují
 - NE velké kolonie *Microcystis* – riziko nehomogenních vzorků
 - raději NE špatně dezintegrovatelné kolonie
 - raději NE málo sinicemi oživené vzorky – riziko ztrát při zahušťování (u kokálních)

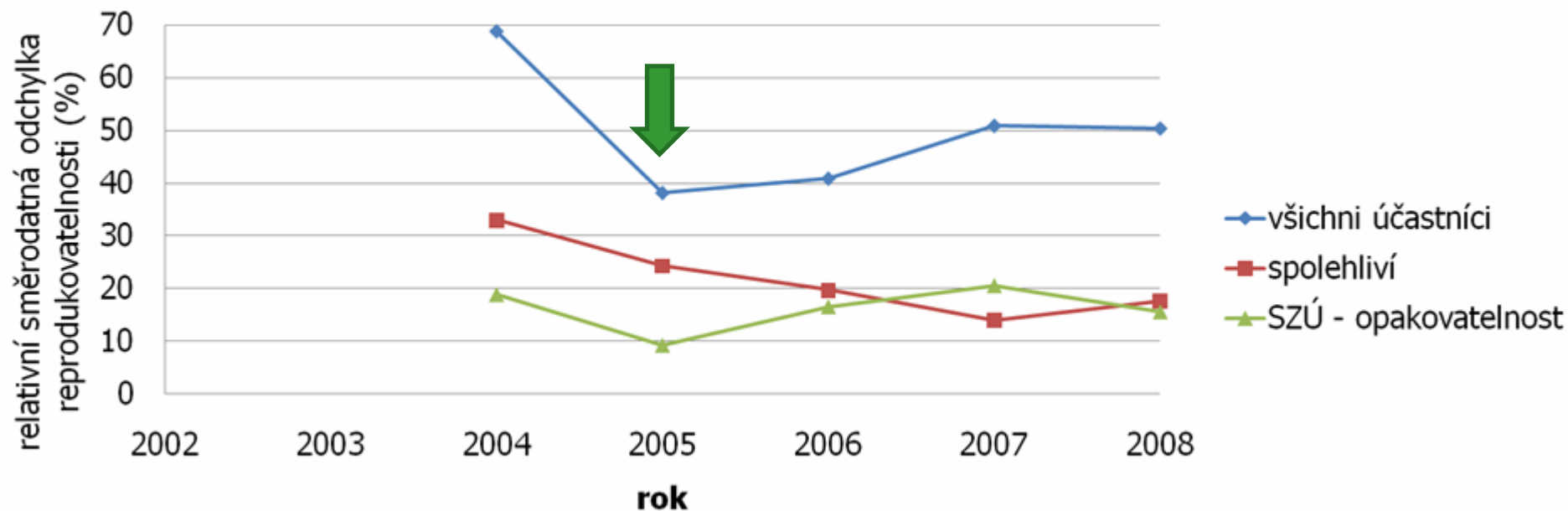
Výsledek předchozích úvah

- Typický vzorek pro vláknité sinice v MPZ
 - *Planktothrix agardhii*
- Typický vzorek pro kokální sinice v MPZ
 - Drobnější kolonie *Microcystis aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. flos-aquae*

Kokální sinice

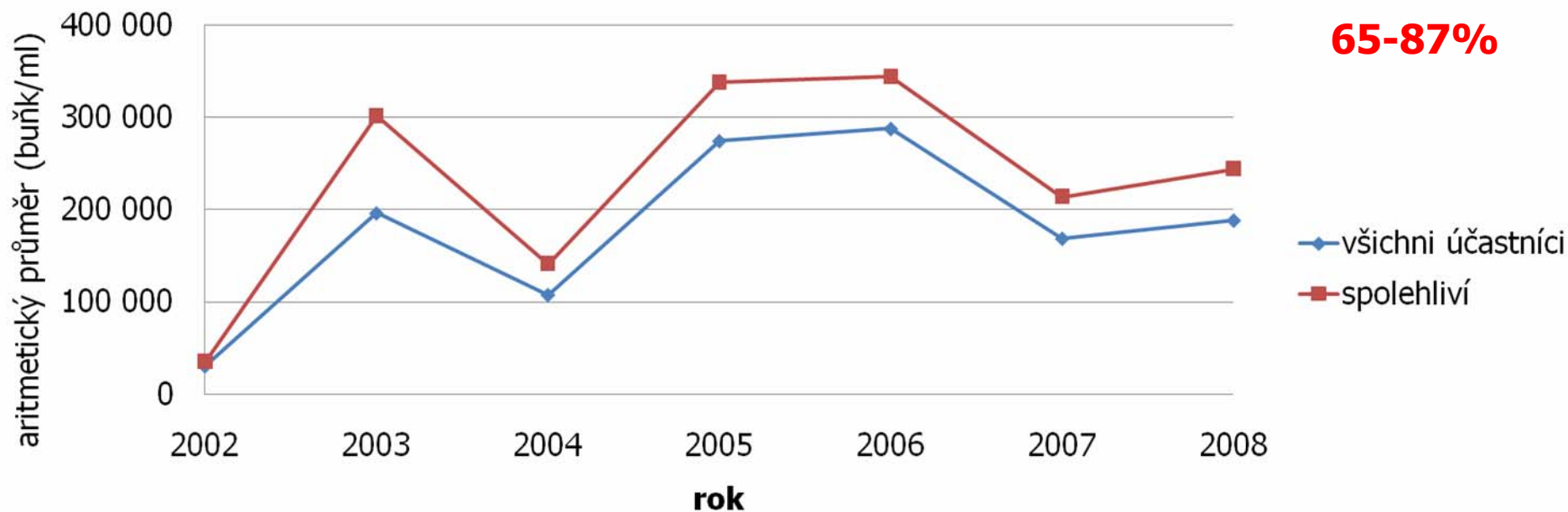


Vláknité sinice



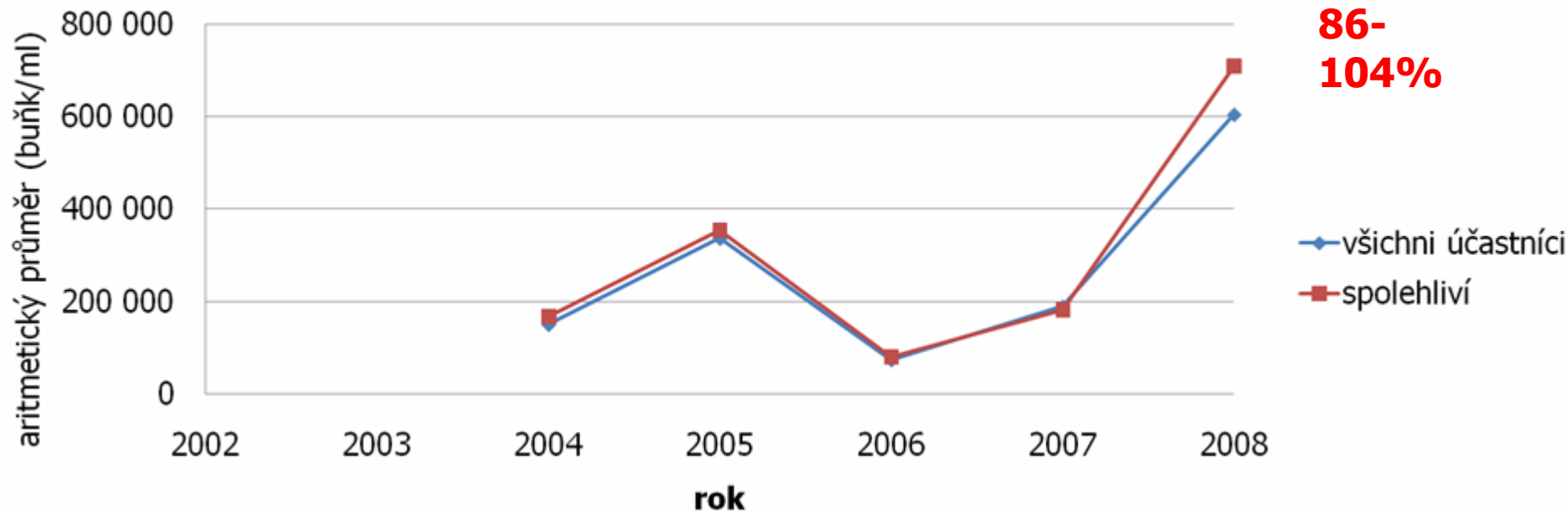
Kokální sinice

65-87%

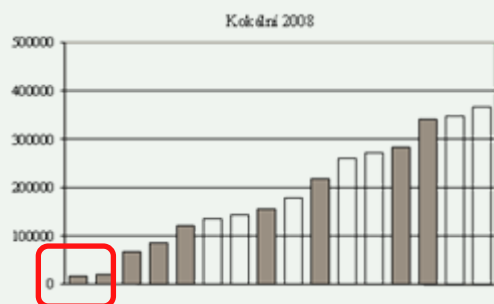
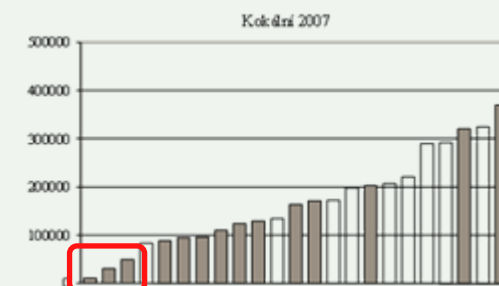
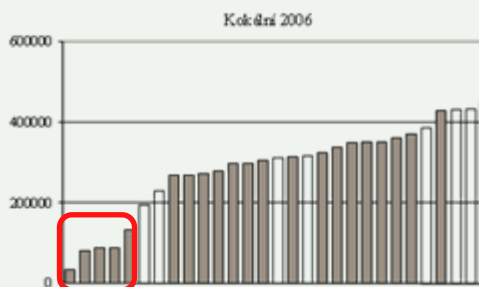
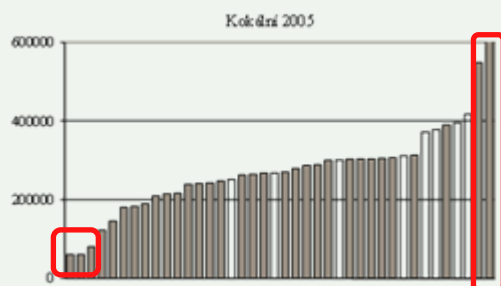
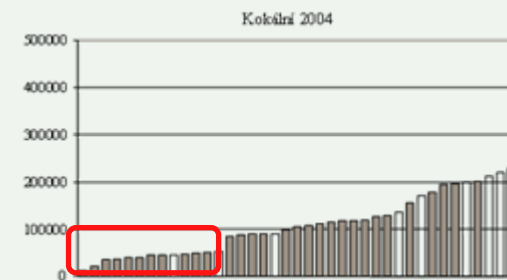
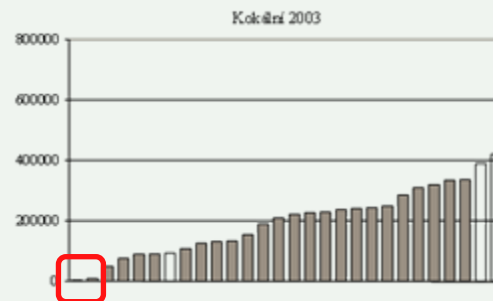
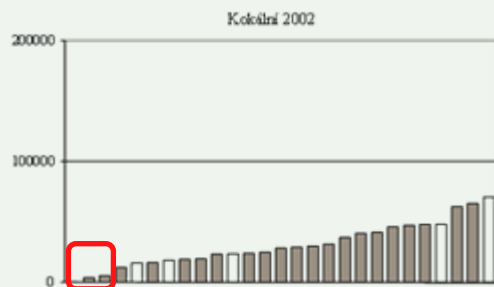


Vláknité sinice

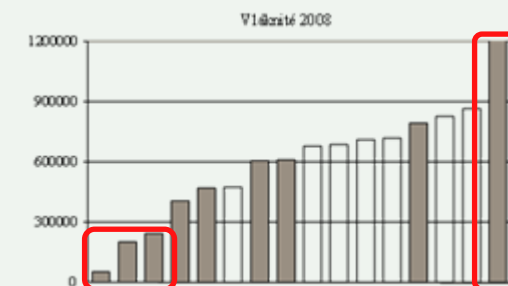
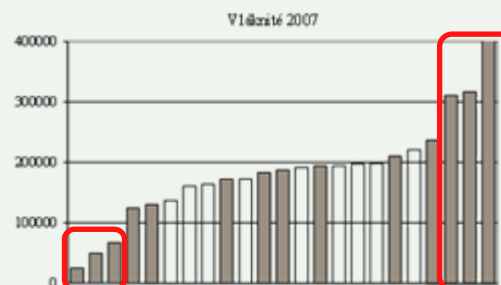
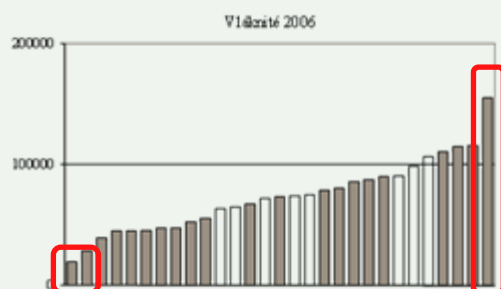
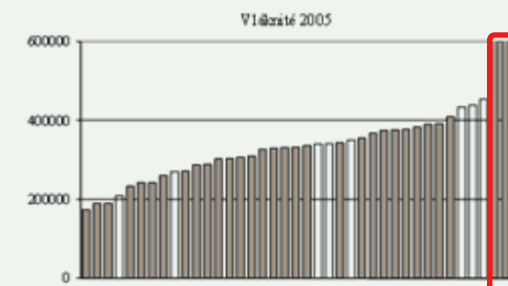
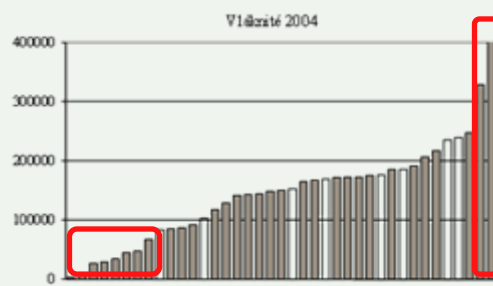
**86-
104%**



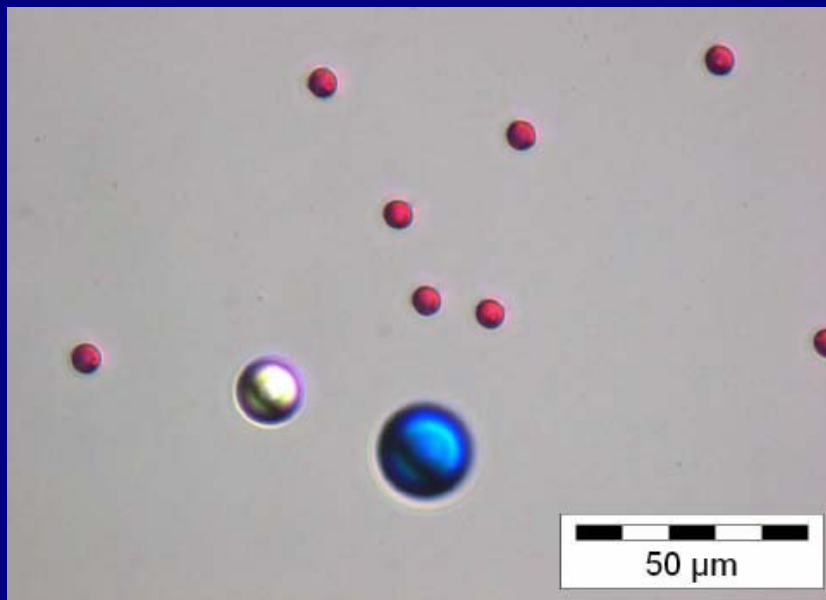
Kokální



Vláknité



Několik zajímavých výsledků z německých MPZ pro Utermöhlovu metodu



Proficiency Test Phytoplankton 2008

Report Juli 2008

Andreas Meybohm, Jan Trübsbach and Tilo Ihle

State Reservoir Administration of Saxony (Germany)
in cooperation with the Working Committee Drinkingwater Reservoirs (ATT)

Sample:	Synthetic sample	Robust mean value:	113,252 particles/l
Distinctive feature:	20.02 μm microparticles	Rel. reproducibility STD:	23.80%
Method:	DIN 38405 A45	Rel. repeatability STD:	9.41%
Number of participants:	65	Tolerance limits ($ \text{Zu-score} < 2.0$):	64,370 – 175,248 particles/l

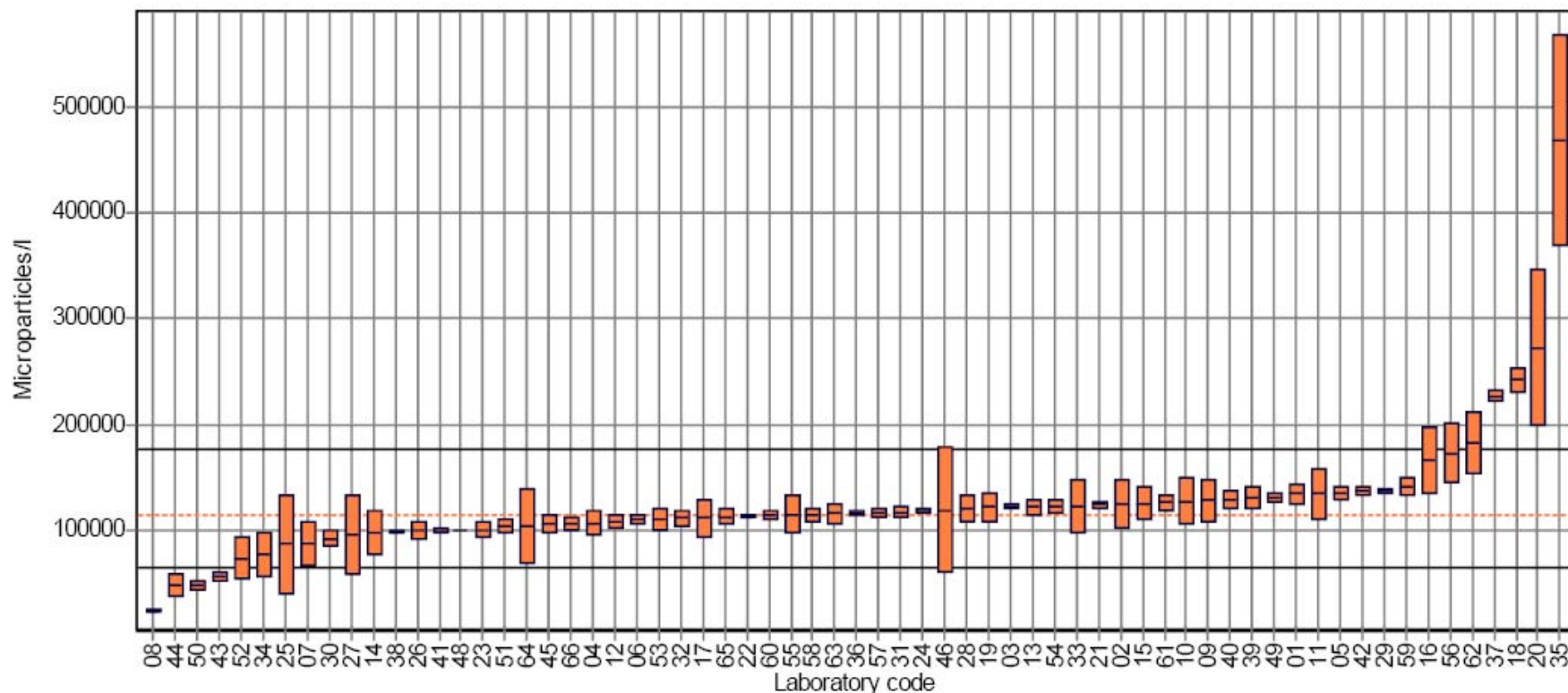


Figure 7: Results of the concentration classification for the 20.02 μm microparticles, mean laboratory value, standard deviation (boxes), robust mean value (dotted line) and lower and upper tolerance limits (black lines).

Sample:	Synthetic sample	Robust mean value:	1,143,412 particles/l
Distinctive feature:	13.84 μm microparticles	Rel. reproducibility STD:	37.40%
Method:	DIN 38405 A45	Rel. repeatability STD:	8.43%
Number of participants:	65	Tolerance limits ($ Z\text{-score} < 2.0$):	409,689 – 2,219,743 particle/l

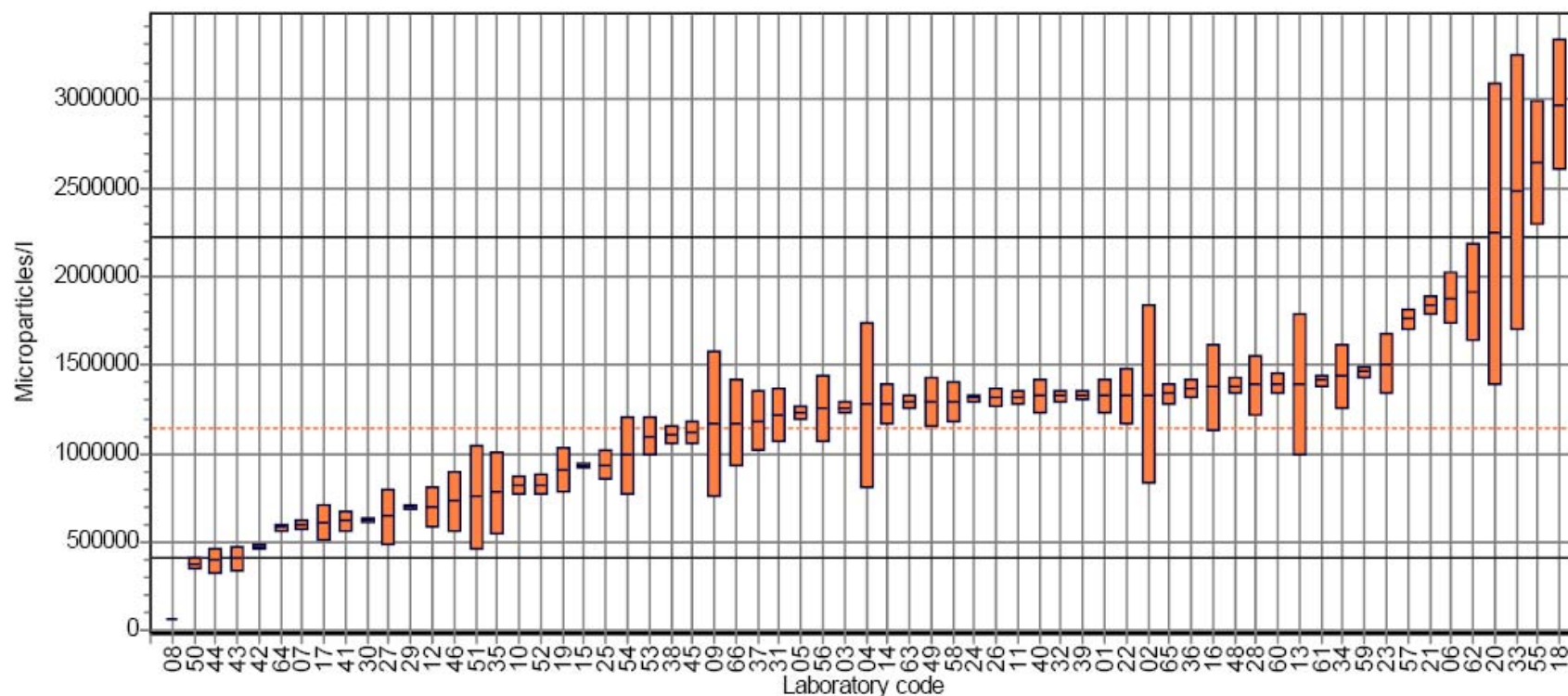


Figure 8: Results of the concentration classification for the 13.84 μm microparticles, mean laboratory value, standard deviation (boxes), robust mean value (dotted line) and lower and upper tolerance limits (black lines).

Sample:	Synthetic sample	Robust mean value:	10,517,222 particles/l
Distinctive feature:	5.84 μm microparticles	Rel. reproducibility STD:	33.50%
Method:	DIN 38405 A45	Rel. repeatability STD:	10.22%
Number of participants:	65	Tolerance limits ($ Z\text{-score} < 2.0$):	4,342,284 – 19,178,895 particles/l

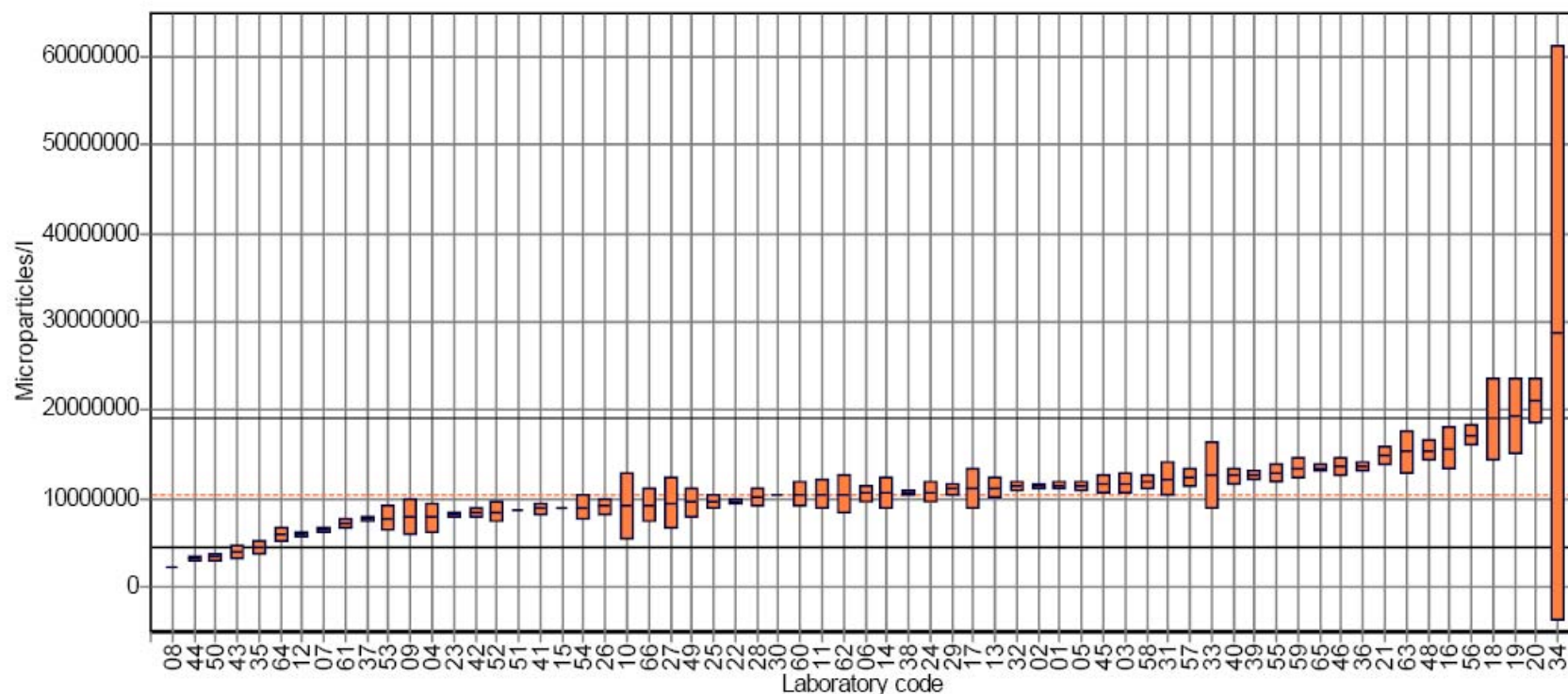


Figure 9: Results of the concentration classification for 5.84 μm microparticles, mean laboratory value, standard deviation (boxes), robust mean value (dotted line) and lower and upper limits (black lines).

Sample:	Natural plankton sample	Robust mean value:	845,734 cells/l
Distinctive feature:	Total cell count	Rel. reproducibility STD:	39.40%
Method:	DIN 38405 A45	Rel. repeatability STD:	11.31%
Number of participants:	64	Tolerance limits ($ Zu\text{-score} < 2.0$):	281,747 – 1,692,010 cells/l

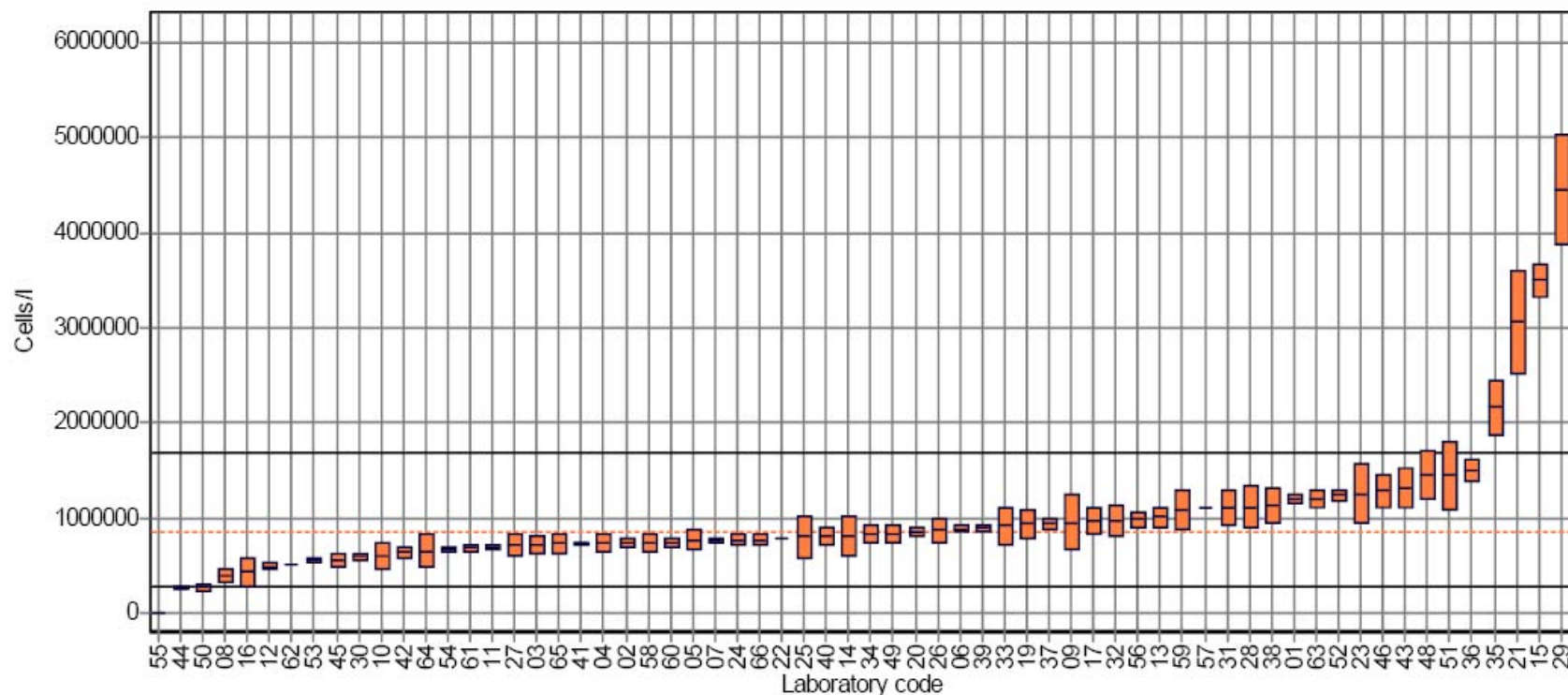


Figure 14: Results of the total cell count for the natural sample, mean laboratory value, standard deviation (boxes), robust mean value (dotted line) and lower and upper tolerance limits (black lines).

Sample:	Natural plankton sample	Robust mean value:	191,253 cells/l
Distinctive feature:	Cyanophyceae abundance	Rel. reproducibility STD:	68.76%
Method:	DIN 38405 A45	Rel. repeatability STD:	22.71%
Number of participants:	64	Tolerance limits ($ Z\text{-score} < 2.0$):	31,000 – 544,533 cells/l

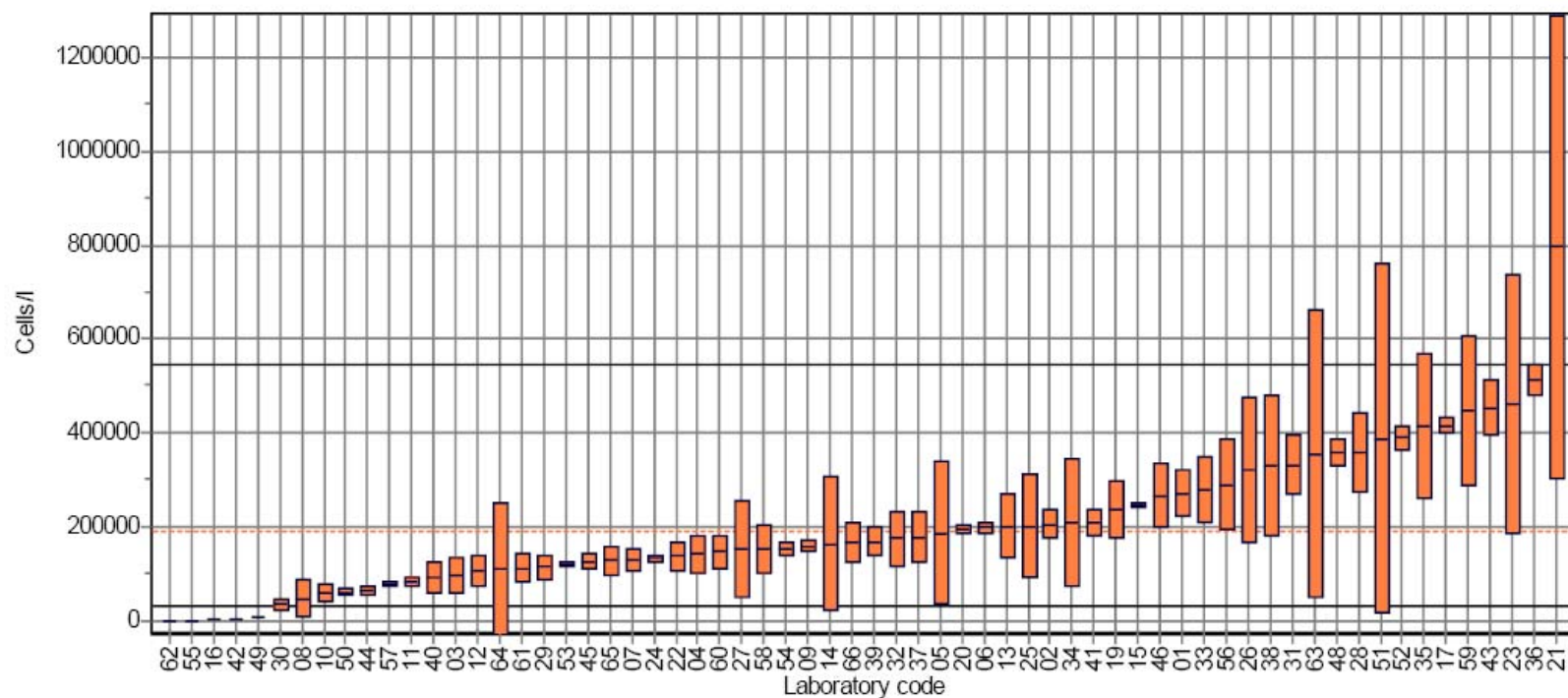
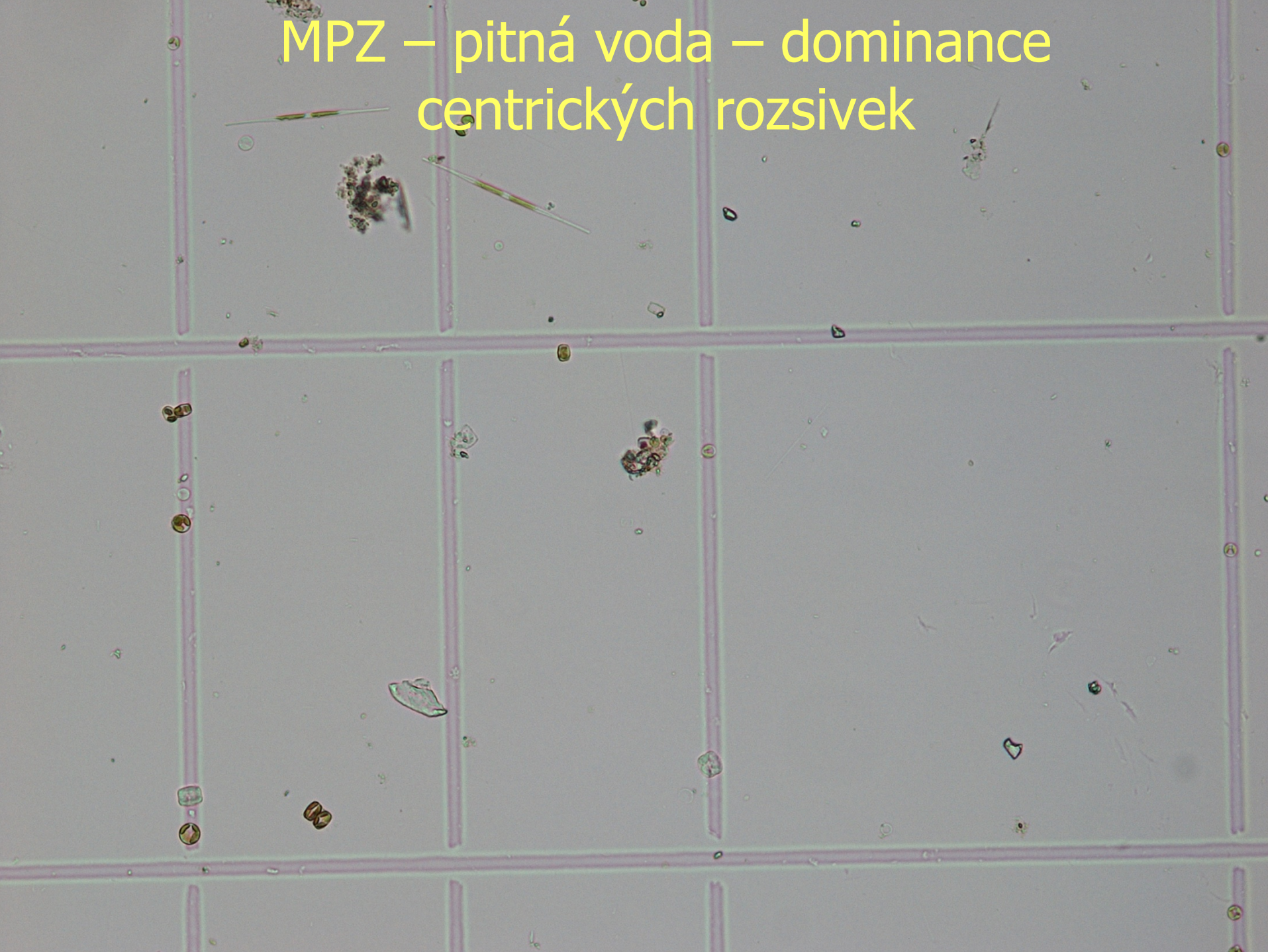
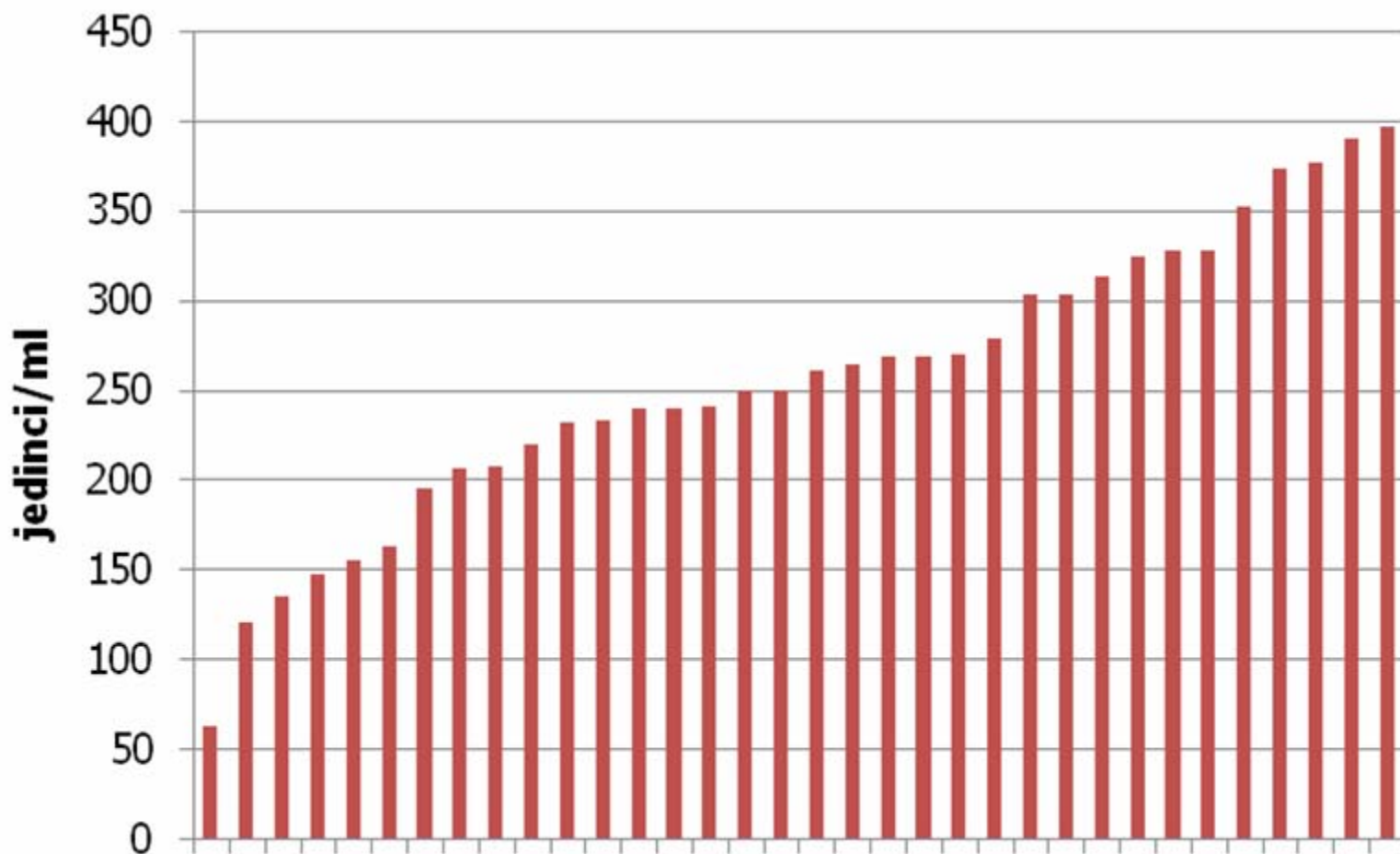


Figure 18: Results of the cell count for cyanophyceae in the natural sample, mean laboratory value, standard deviation (boxes), robust mean value (dotted line) and lower and upper tolerance limits (black lines).

MPZ – pitná voda – dominance
centrických rozsivek



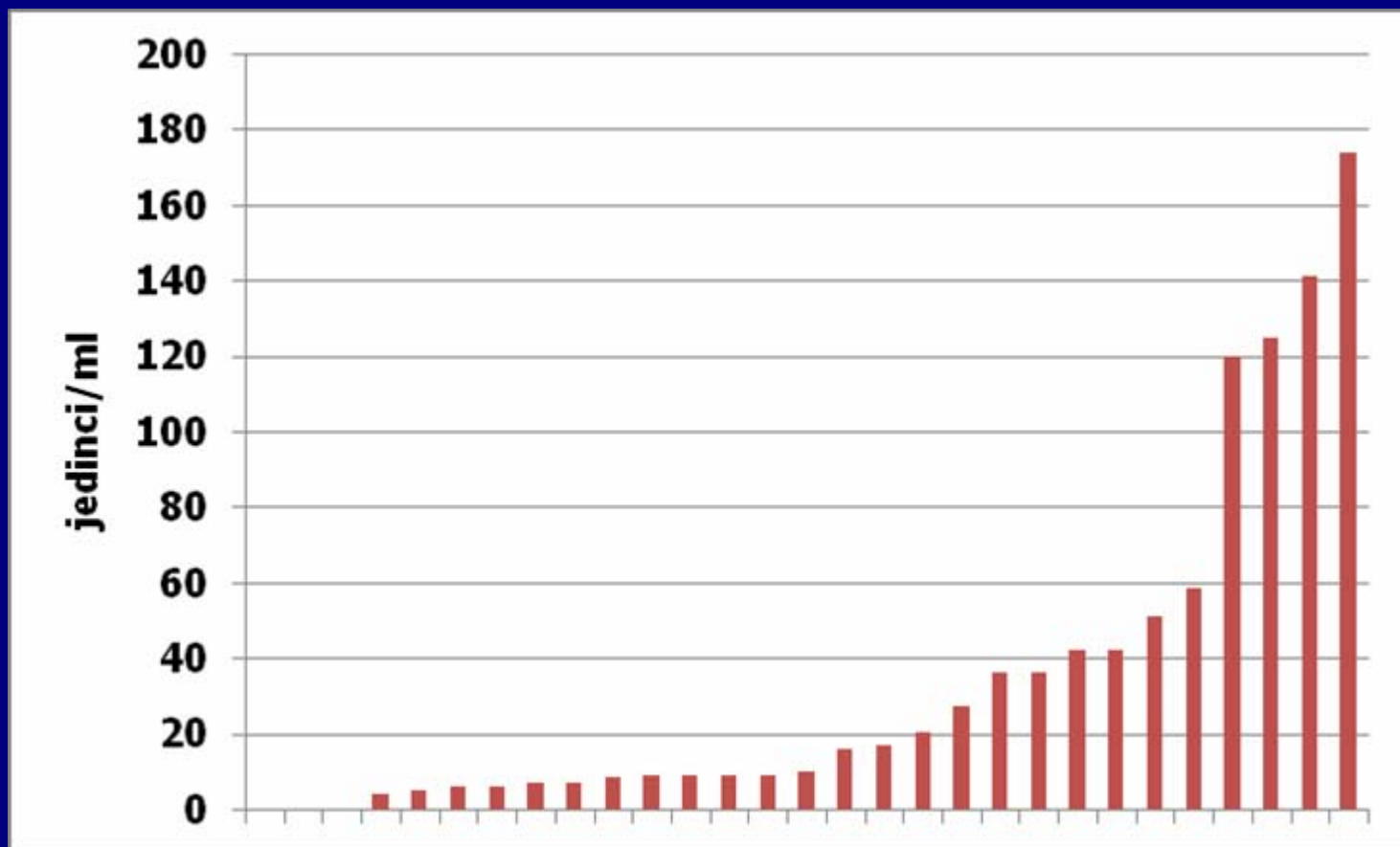
MPZ – pitná voda – dominance centrických rozsivek



MPZ – pitná voda – dominance améb a bezbarvých bičíkovců



MPZ – pitná voda – dominance améb a bezbarvých bičíkovců





Tak to je konec, díky za pozornost