

Stanovení sinic (revize ČSN 75 7717) a chlorofylu

Seminář „Laboratorní metody, vzorkování a způsoby
hodnocení povrchových vod ke koupání“

Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.M., v.v.i. , 29.4.2014

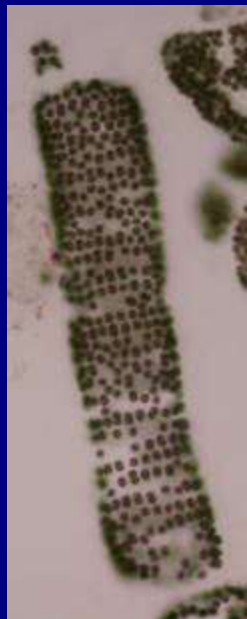
Petr Pumann

Státní zdravotní ústav

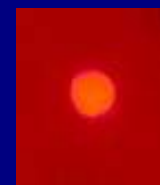
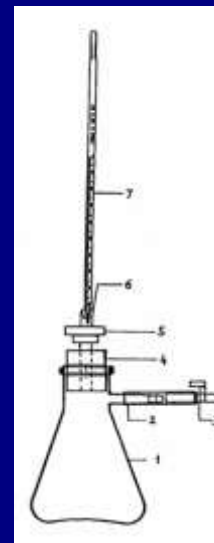
Seminář je výstupem projektu Technologické agentury ČR
„Nové metodické přístupy pro kontrolu a hodnocení
povrchových vod ke koupání“; evidenční č. TA01020675 .



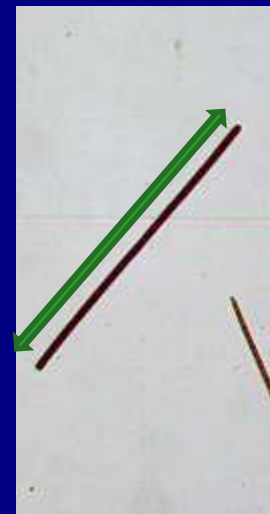
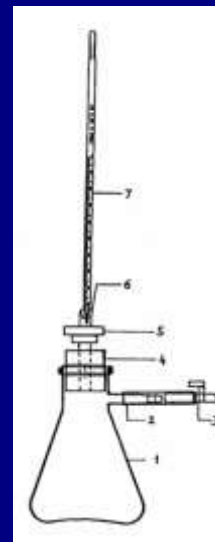
ČSN 75 7717 – kokální sinice



?



ČSN 75 7717 – vláknité sinice



Dezintegrace některých taxonů



Dezintegrace

ČSN 75 7717 z roku 2008 obsahovala 4 způsoby dezintegrace:
1) automatickou pipetou, 2) injekční stříkačkou s tupou jehlou
3) homogénizátorem Potter-Evehjem, 4) ultrazvukovým homogénizátorem



Dezintegrace

MPZ 2008 -2013 – pomůcky k dezintegraci

rok	2008	2009	2010	2011	2012	2013
počet účastníků	15	15	10	13	10	10
bez dezintegrace	4	2	0	2	4	0
stříkačka (obvykle s KOH)	9	10	9	10	5	5
ultrazvuk	2	2	1	1	1	4
jen KOH	0	1	0	0	0	0
automatická pipeta	0	0	0	0	0	1

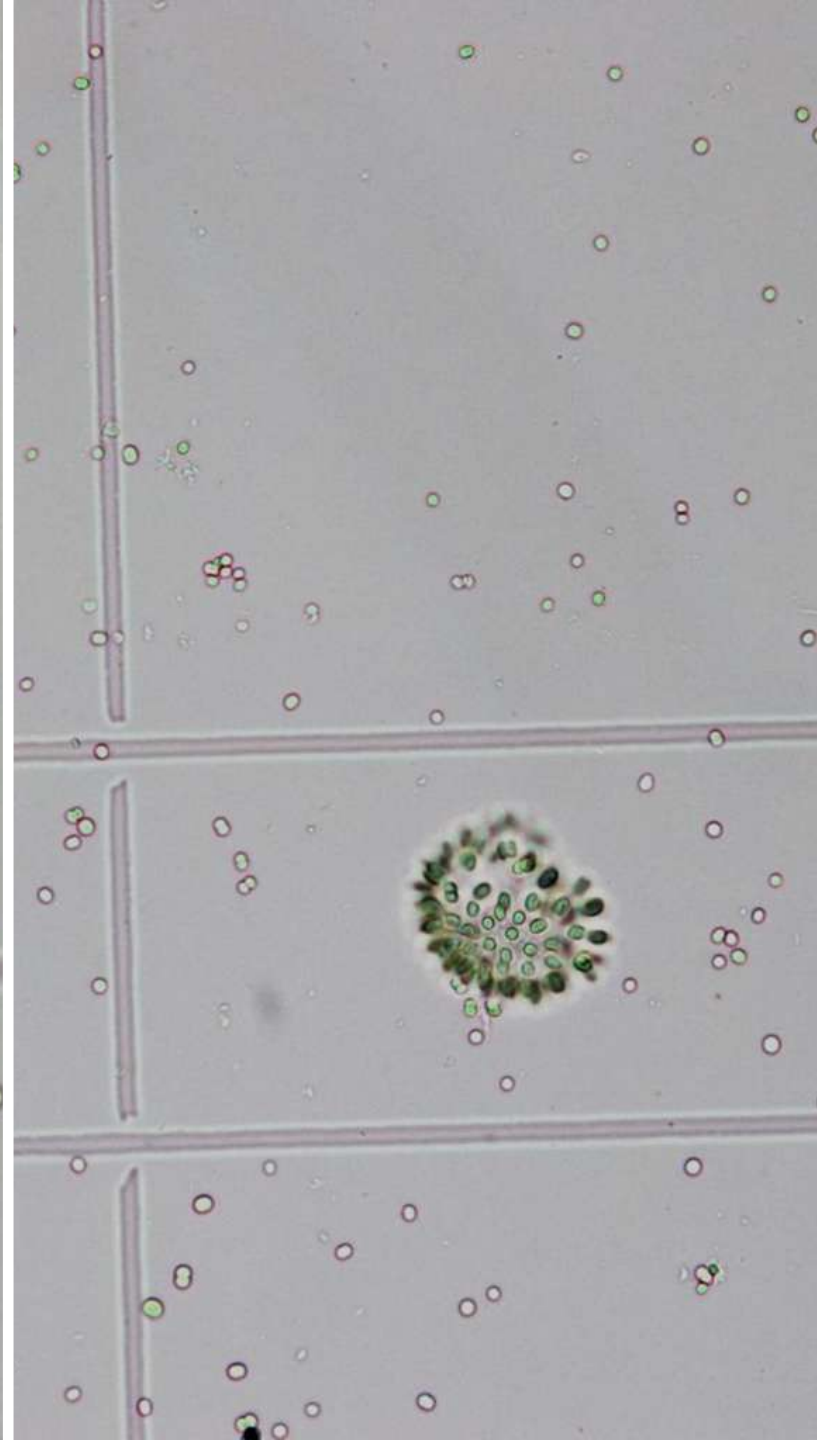
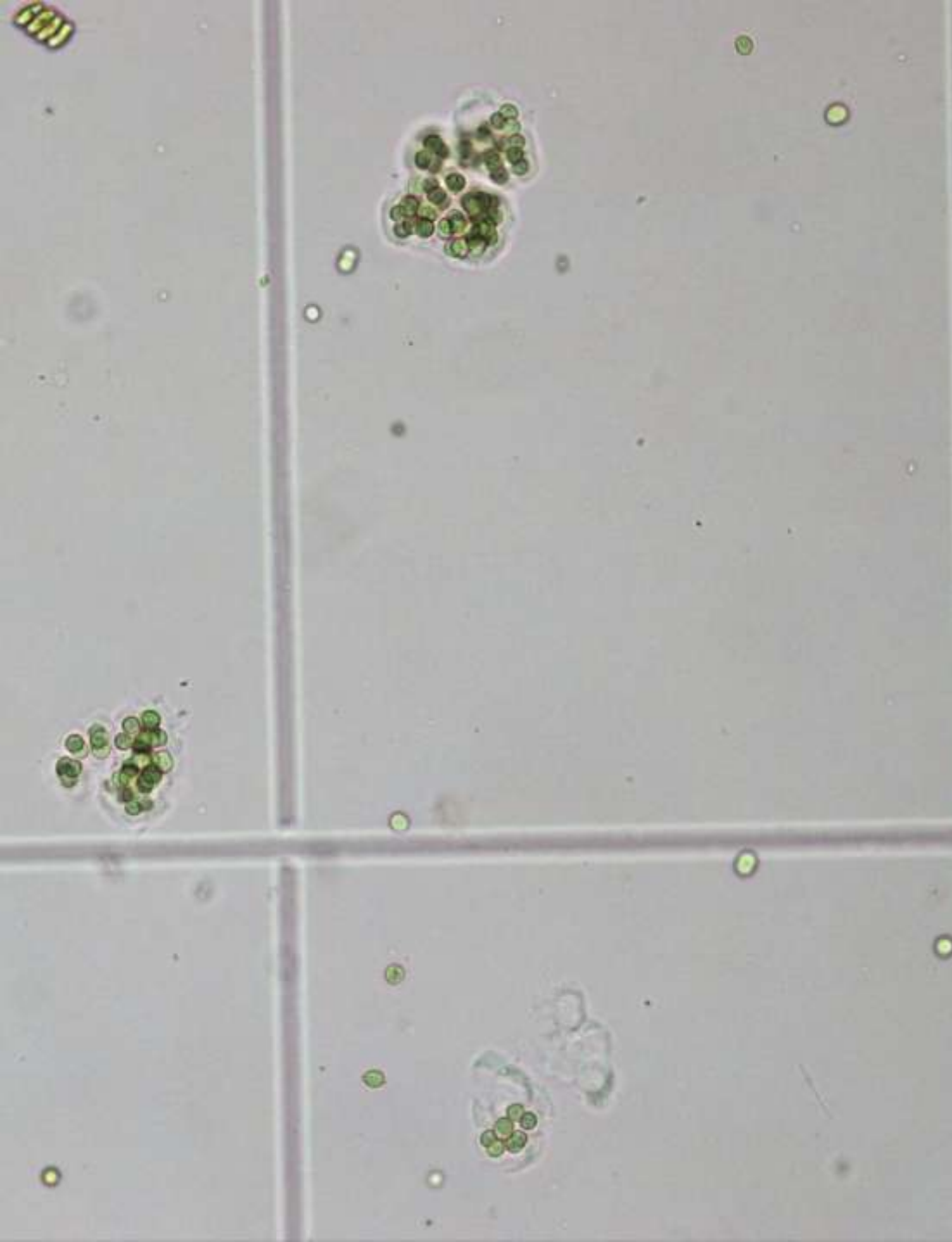
Dezintegrace

Revize ČSN 75 7717 z roku 2013 obsahuje již jen 2 způsoby dezintegrace:

- 1) injekční stříkačkou s tupou jehlou
- 2) ultrazvukovým homogenizátorem



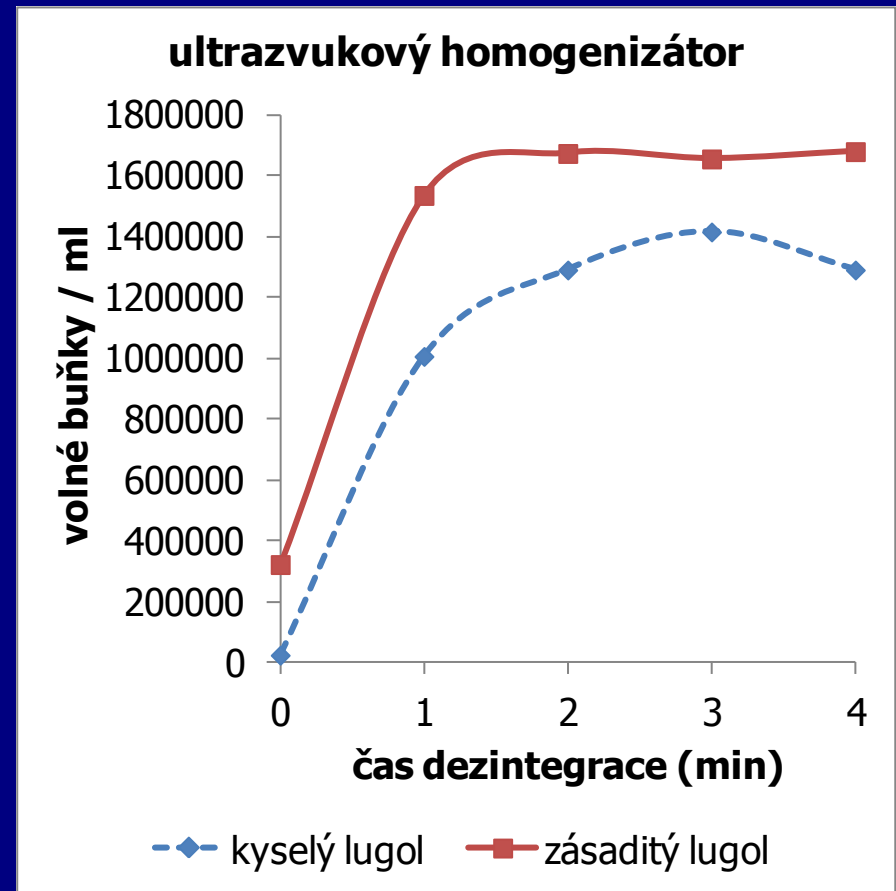
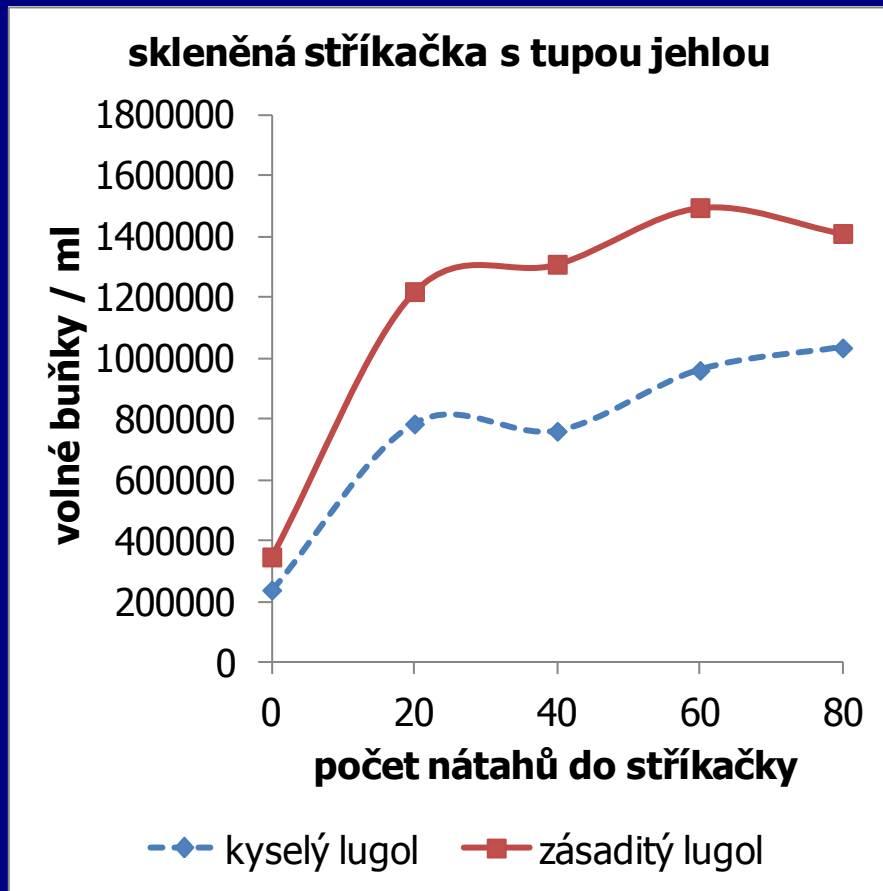




Dezintegrace po přidání zásaditého Lugolova roztoku

Funguje na obtížně dezintegrovatelné taxony (počítání až druhý den po přidání zásaditého Lugolova roztoku).

M. viridis:



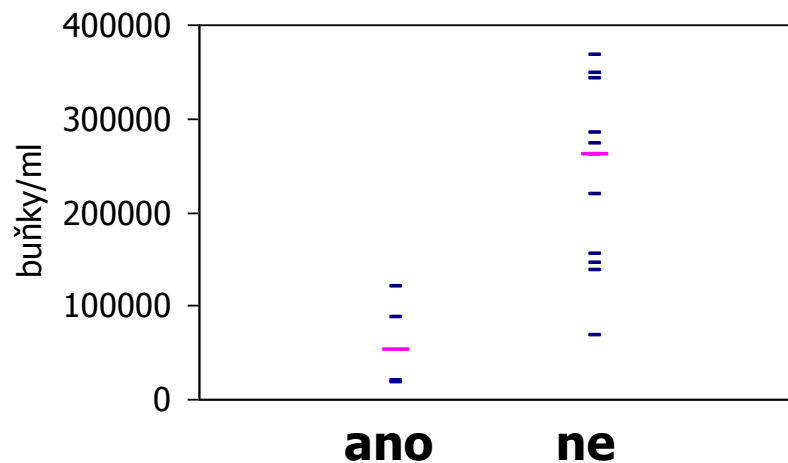
Zahušťování

- zahustit odstředěním
každý vzorek z 10 na 0,2
ml – v praxi zažitý postup
- alternativně filtrace
(aparatura Petra Marvana)
- významné ztráty (i vzorků
fixovaných Lugolem)
- výtěžnost SZÚ obvykle
mezi 60 – 90 %

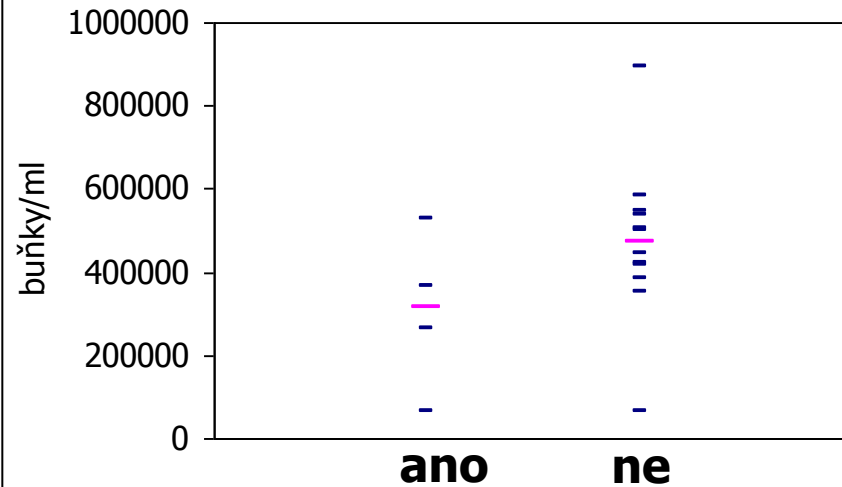


Zahušťování vzorku s *Microcystis* během mezilaboratorních zkoušek SZÚ v letech 2008 – 2011 (modré – jednotliví účastníci, růžová – medián)

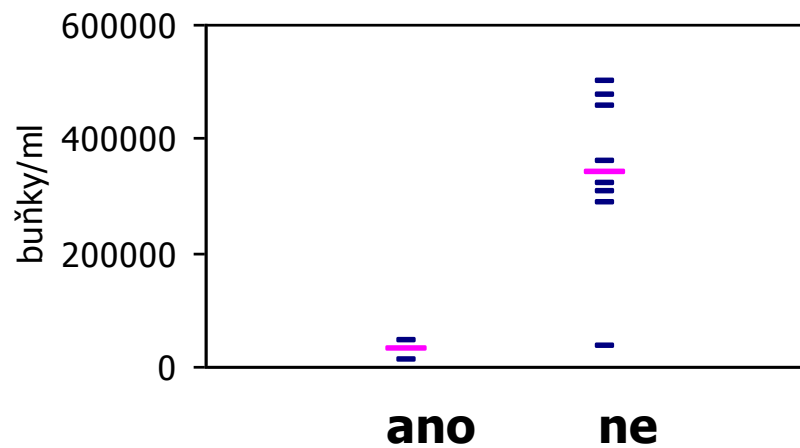
2008



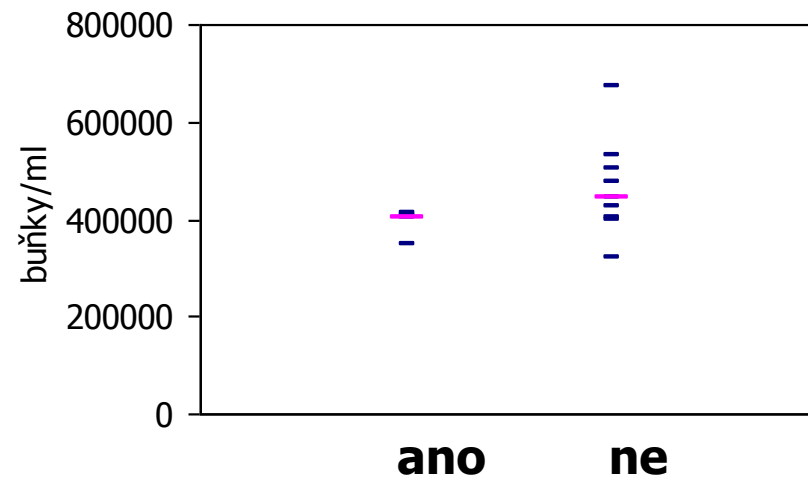
2009



2010



2011



Změna v revizi ČSN 75 7717

- odstraněno Limni jako výrobce aparatury
- odstředování
 - prodloužen čas z **10 na 15** minut a
 - zvýšena odstředivá síla **ze 700 na 1 100 g**
 - pečlivě vyvažovat!
- přednostně nezahušťovat

Neukázněné chování *Planktothrix* v komůrce



Neukázněné chování *Planktothrix* v komůrce

- pásy s výrazně vyšší hustotou vláken než na zbytku komůrky

A

0	5	3	2	2	4	4	1	3	3
4	1	3	4	2	3	2	2	2	6
1	2	4	4	2	5	6	7	11	15
1	1	2	6	8	16	17	38	41	31
1	3	6	3	6	15	21	31	17	20
7	6	5	3	2	4	1	3	2	3
1	1	3	3	1	3	3	2	4	7
1	3	6	1	2	3	2	2	2	5
1	2	3	3	1	3	5	3	3	5
3	4	2	2	0	5	7	5	2	3

B

2	3	3	4	1	1	3	2	0	1
1	3	1	3	1	0	3	1	1	2
1	3	0	2	3	1	0	1	5	2
6	2	7	2	4	4	3	7	4	4
2	3	1	6	2	4	1	1	3	0
1	4	4	2	3	0	3	4	5	4
3	1	2	2	3	2	6	0	3	5
2	1	3	0	2	2	4	5	2	5
2	6	1	2	2	5	2	4	2	5
2	1	1	4	3	4	3	1	0	3

Planktothrix – v revizi 2013

POZNÁMKA Při dominanci vláknitých sinic (především *Planktothrix agardhii*) se poměrně často stává, že jsou vlákna na mřížce komůrky rozmístěna velmi nerovnoměrně. V těchto případech se vyskytují oblasti (pásy) s výrazně větší hustotou vláken než v ostatních částech komůrky. **V takovém případě je nutné komůrku naplnit znovu.** Tento jev se vyskytuje častěji, pokud je kapka vzorku na mřížce komůrky přikryta krycím sklem s časovým odstupem (deset sekund a déle). Proto je vhodné přikrýt kapku krycím sklem co nejrychleji (během několika sekund).

Objemová biomasa

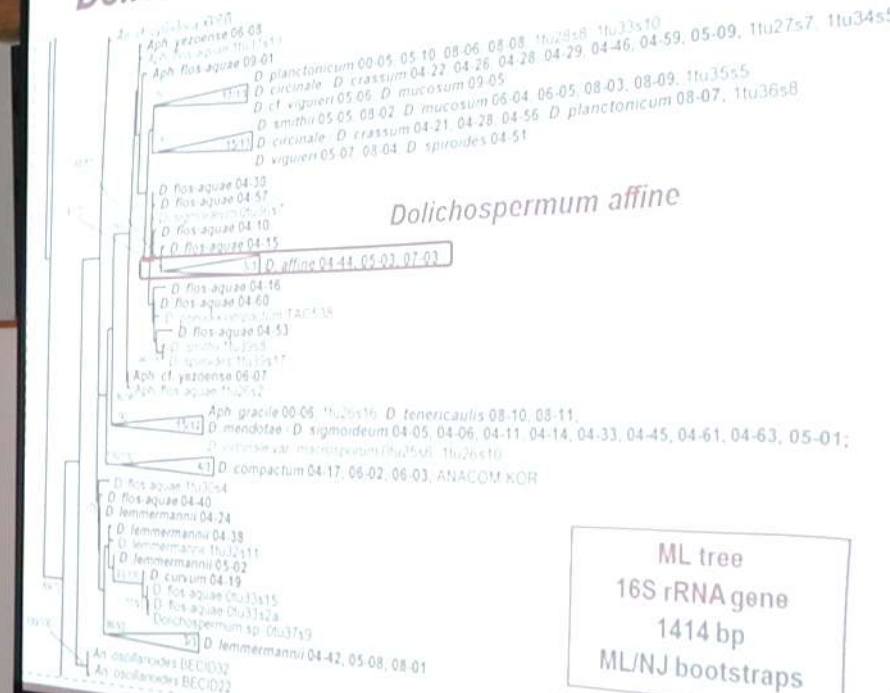
- podle vyhlášky č. 238/2011 Sb. je nutno stanovit objemovou biomasu v případech kdy dominují tenké vláknité sinice
- do přílohy A.3 revidované normy vložena tabulka se šířkou vláken (na horní hranici uváděné velikosti) pro případ, že není dostatek času proměřovat nebo laboratoř není technicky vybavena
- na <http://www.szu.cz/tema/zivotni-prostredi/koupaliste-metody> ke stažení soubor ve formátu MS Excel na přepočítání objemové biomasy sinic

Tabulka A.2 – ~~Parametry měřené u jednotlivých typů sinic~~

Taxon	Šířka vlákna μm
<i>Pseudanabaena</i>	2
<i>Limnothrix</i>	2,5
<i>Planktolyngbya</i>	2
<i>Planktothrix agardhii</i>	5

Taxonomická revize rodů *Anabaena* a *Aphanizomenon*

Dolichospermum + Aphanizomenon



Dolichospermum affine

ML tree
16S rDNA gene
1414 bp
ML/NJ bootstraps
(Zapomělová et al. in prep.)

Informativní příloha F

Původní jméno	Nové jméno
<i>Anabaena mendotae</i>	<i>Dolichospermum mendotae</i>
<i>Anabaena affinis</i>	<i>Dolichospermum affine</i>
<i>Anabaena bergii</i>	<i>Chrysoosporum bergii</i>
<i>Anabaena circinalis</i>	<i>Dolichospermum circinale</i>
<i>Anabaena compacta</i>	<i>Dolichospermum compactum</i>
<i>Anabaena crassa</i>	<i>Dolichospermum crassum</i>
<i>Anabaena curva</i>	<i>Dolichospermum curvum</i>
<i>Anabaena danica</i>	<i>Dolichospermum danicum</i>
<i>Anabaena flos-aquae</i>	<i>Dolichospermum flos-aquae</i>
<i>Anabaena lemmermannii</i>	<i>Dolichospermum lemmermannii</i>
<i>Anabaena mucosa</i>	<i>Dolichospermum mucosum</i>
<i>Anabaena planctonica</i>	<i>Dolichospermum planctonicum</i>
<i>Anabaena reniformis</i>	<i>Sphaerospermopsis reniformis</i>
<i>Anabaena sigmoidea</i>	<i>Dolichospermum sigmoideum</i>
<i>Anabaena smithii</i>	<i>Dolichospermum smithii</i>
<i>Anabaena spiroides</i>	<i>Dolichospermum spiroides</i>

Stanovení chlorofylu-a

Chlorofyl-a

- ve vodním prostředí přítomen v řasách, sinicích, ale i v makrofytech
- údaj o jeho koncentraci se využívá jako míra pro množství přítomného fytoplanktonu
- různé metody stanovení
 - spektrofotometricky po extrakci (různými činidly - etanol, aceton, metanol)
 - spektrofotometricky in vivo
 - in-situ fluorescenční sondy
 - HPLC
- v provozní praxi především ČSN ISO 10260 – Jakost vod – Měření biochemických ukazatelů –
Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a
 - rutinně v několika desítkách laboratoří (podniky povodí, zdravotní ústavy, některé vodárny a jiné provozní laboratoře)

Postup

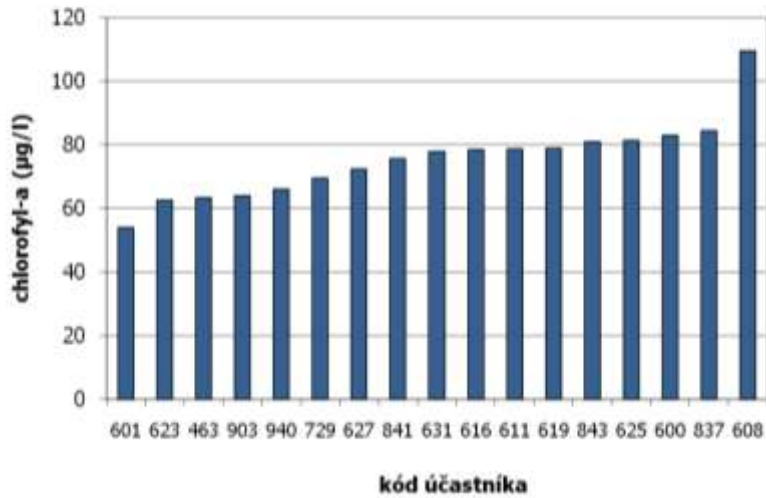
- filtrace (obvykle 0,1 - 2 litry vzorku)
 - skleněná vlákna, záchyt nad 1 μ m
- extrakce v 90% etanolu
 - filtr roztřepat
 - vodní lázeň při 75°C po dobu 5 min (varianta B)
- vyčištění extraktu
 - centrifugace nebo filtrace
- měření při 665 a 750 nm
- měření při 665 a 750 nm po okyselení HCl (korekce na feopigmenty)
- výpočet (výsledky v μ g/l) dle známých vlastností chlorofylu-a

Vhodnou volbou objemu vzorku, etanolu a optické dráhy kyvety lze měřit chl-a v různých koncentračních úrovních

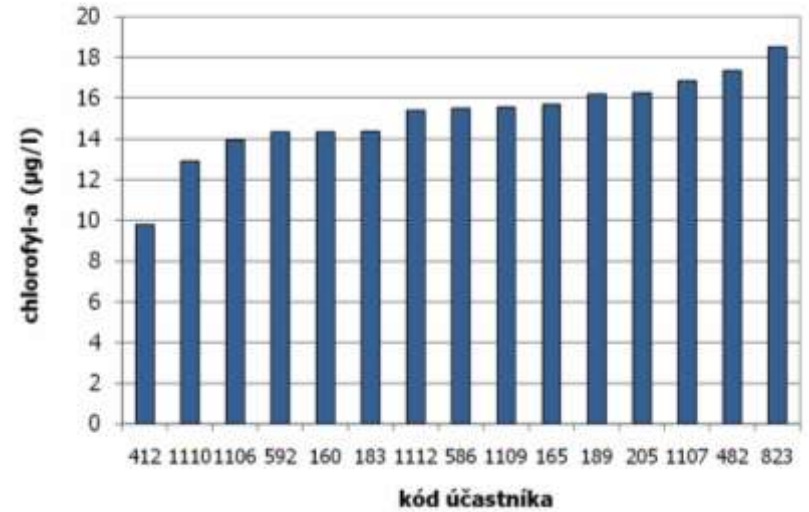


Výsledky MPZ 2007 - 2009

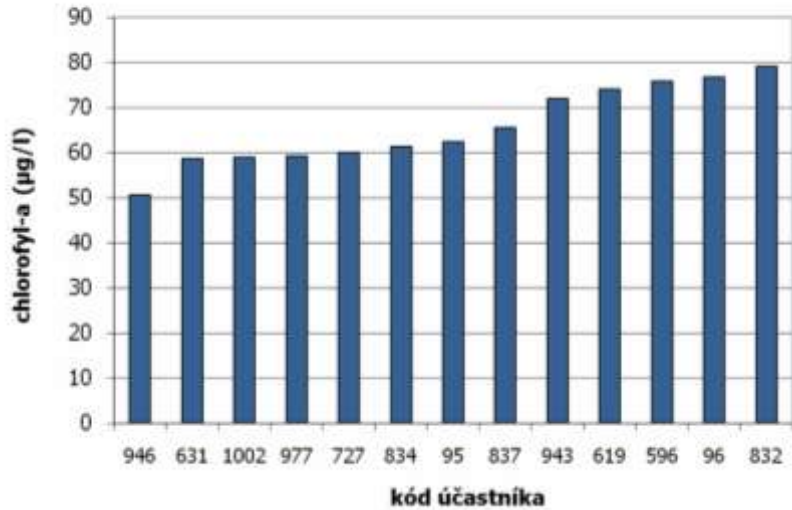
2007



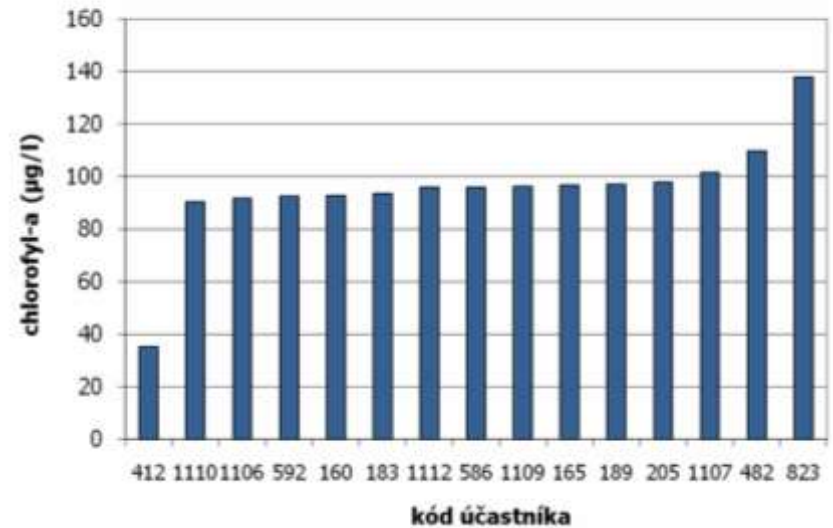
2009 - nižší



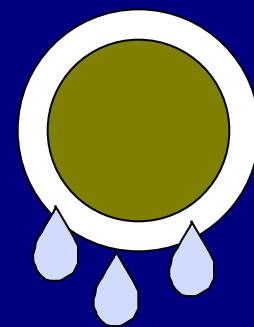
2008



2009 - vyšší



Voda ve filtrech

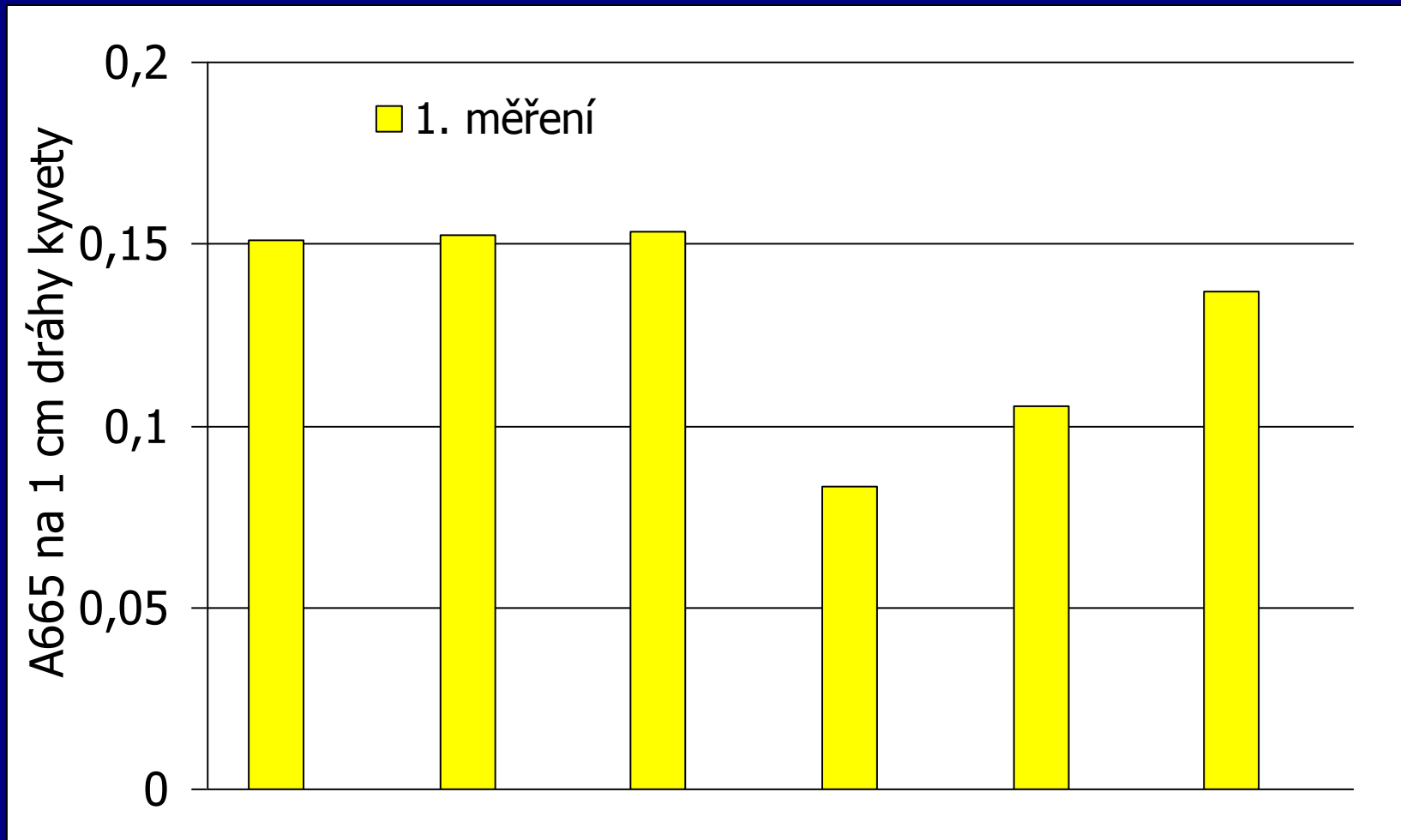


- norma uvádí, že se filtr vysuší sáním, ale to si každý může představovat jinak

typ filtru		WHATMAN GF/B průměr 47mm	WHATMAN GF/C průměr 47mm
hmotnost vody ve filtru		1,33 g	0,56 g
procento zbytkové vody na celkovém objemu extraktu	při 10 ml extraktu	11,8 %	5,3 %
	při 20 ml extraktu	6,2 %	2,7 %
	při 25 ml extraktu	5,1 %	2,2 %

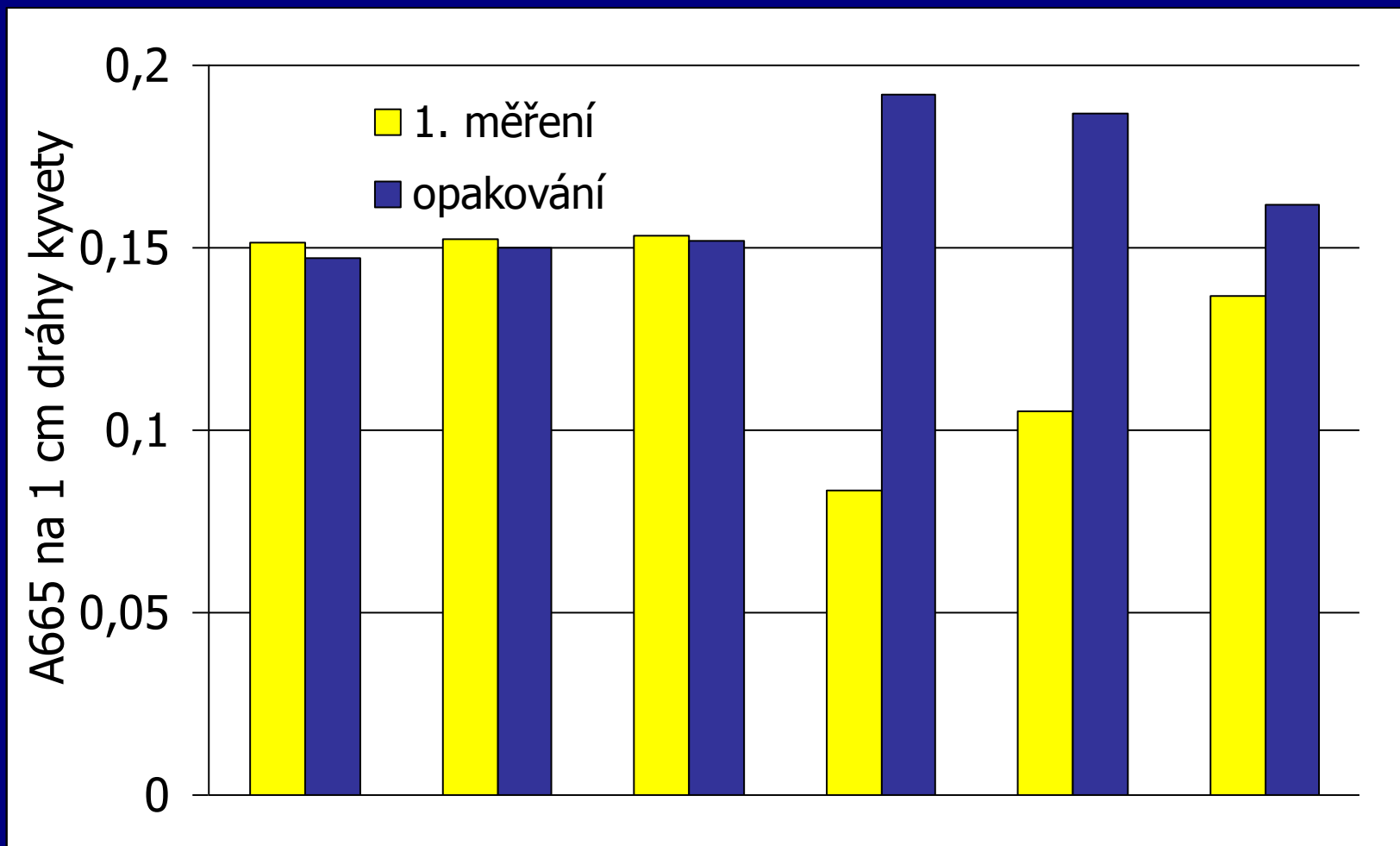
- zbytková voda ve filtru znamená podhodnocení výsledku (netýká se extrakční varianty A)
- podhodnocují všichni (vždy nějaká voda zůstane)
- nižší koncentrace etanolu v extr. činidle než 90%

Nedokonalá extrakce (nezamýšlený experiment při zácvičku nové pracovnice)

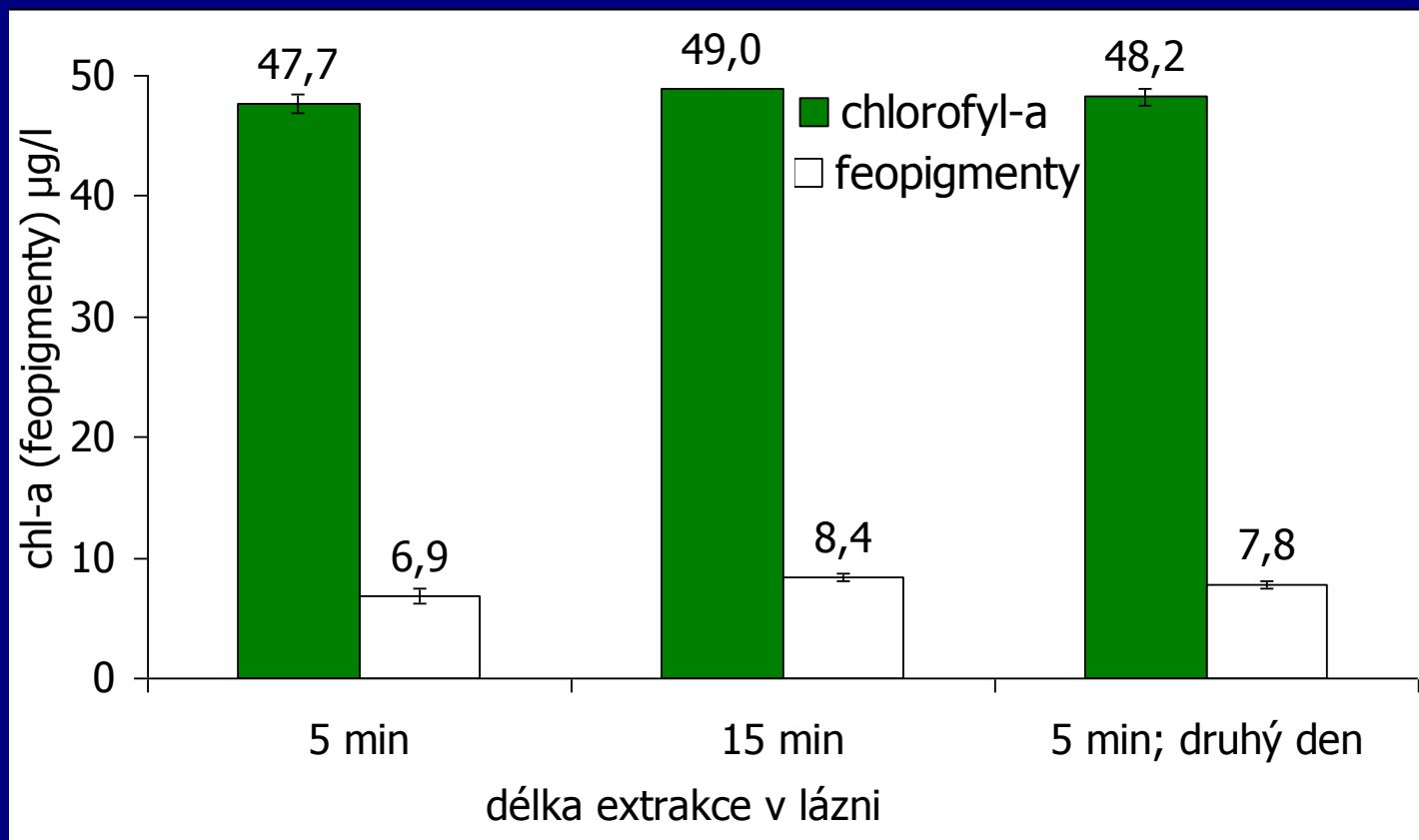


Nedokonalá extrakce

(nezamýšlený experiment při zácvičku nové pracovnice)

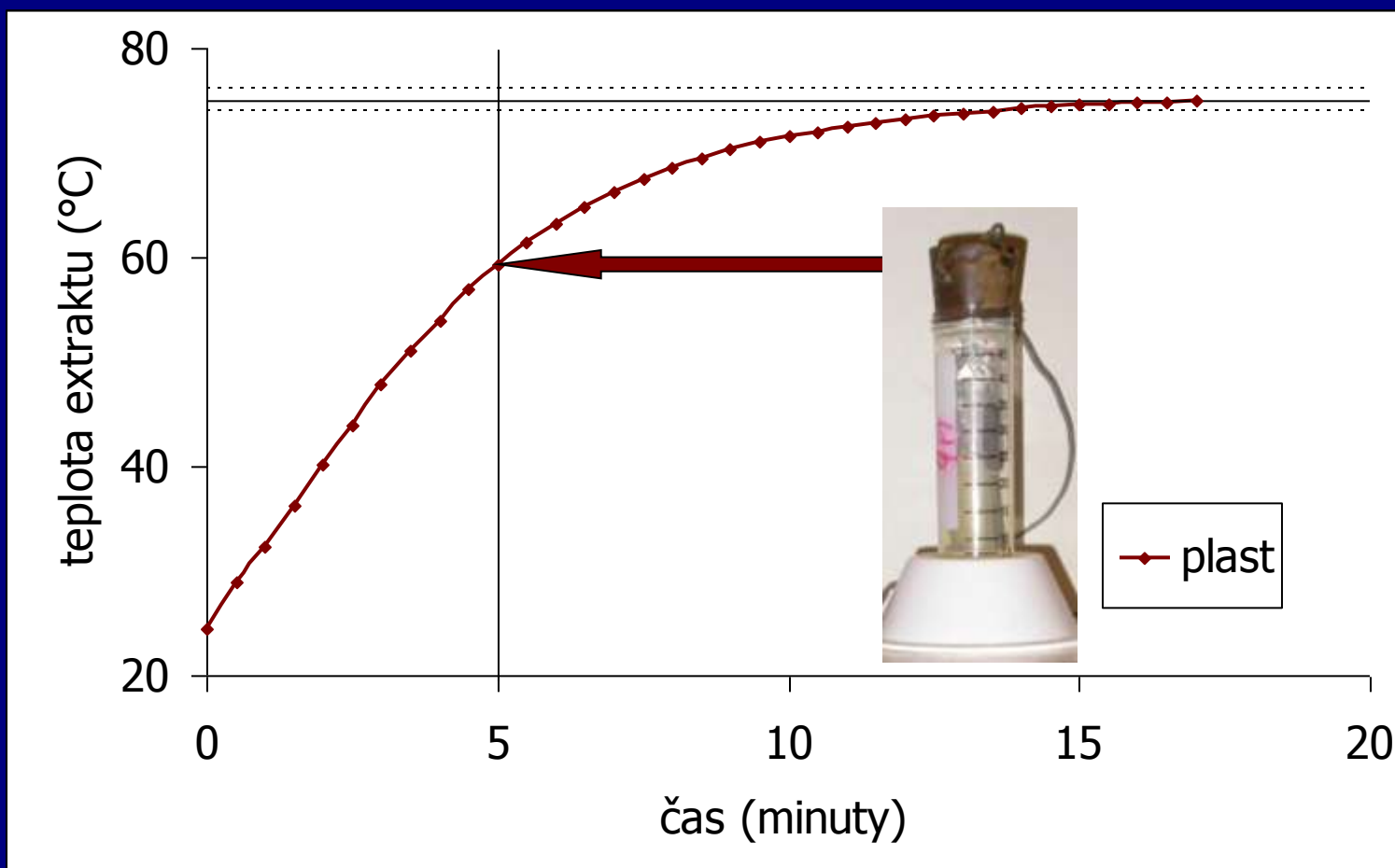


Doba extrakce v plastových „falkonkách“ (příklad zelené řasy)

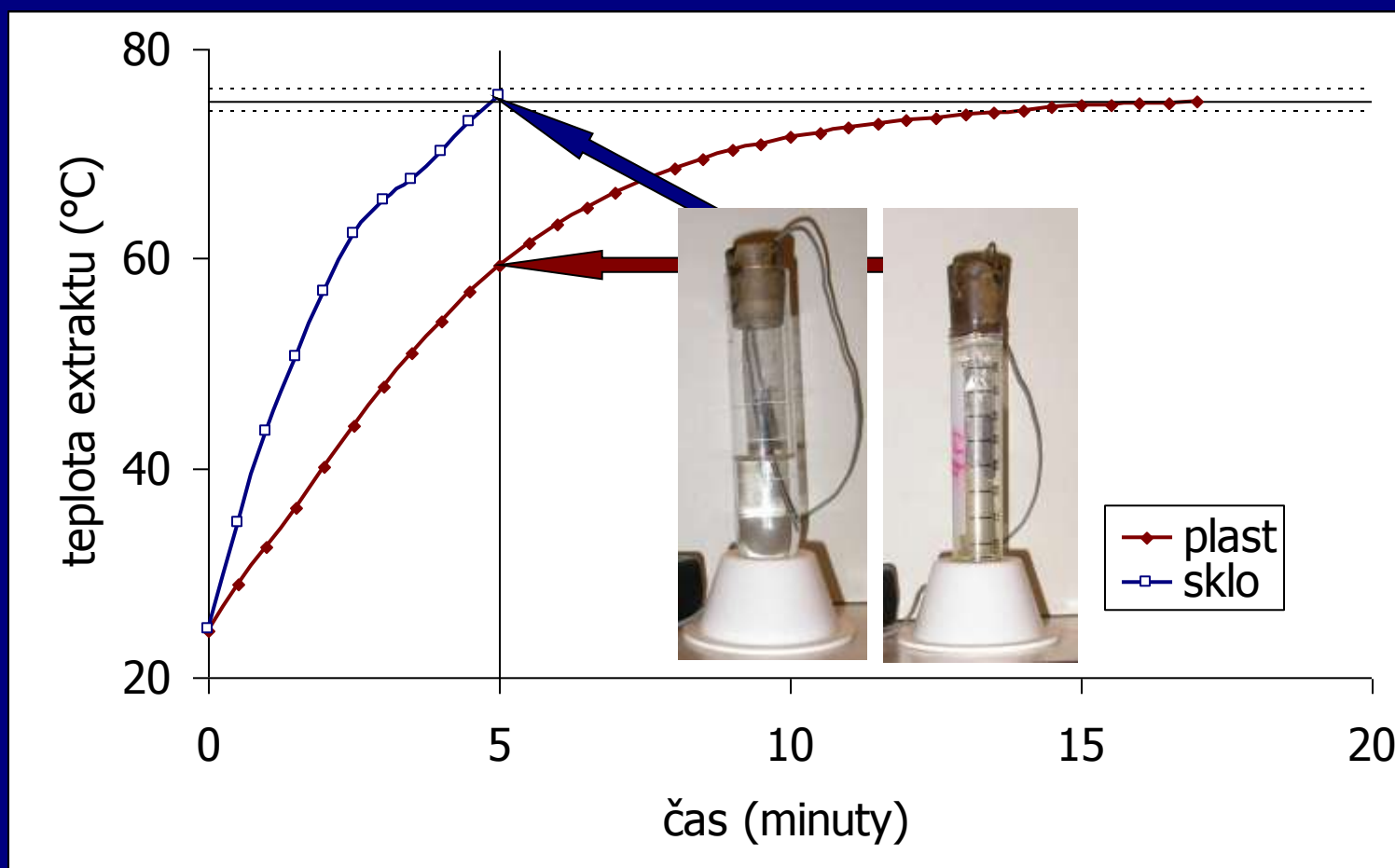


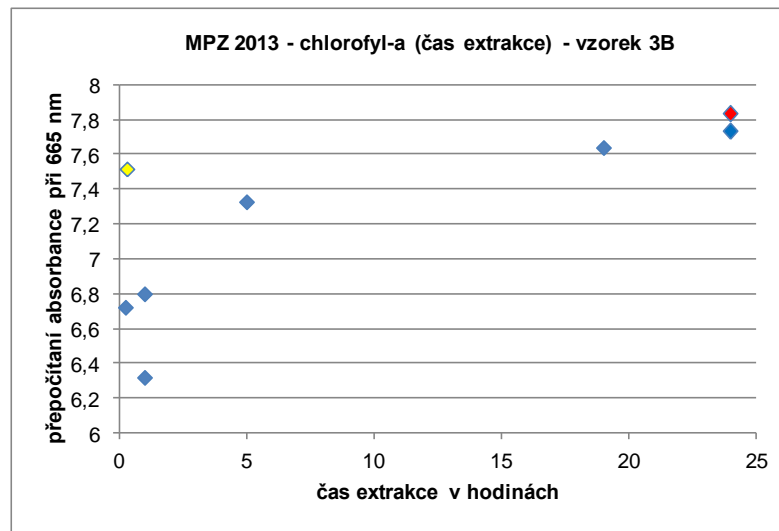
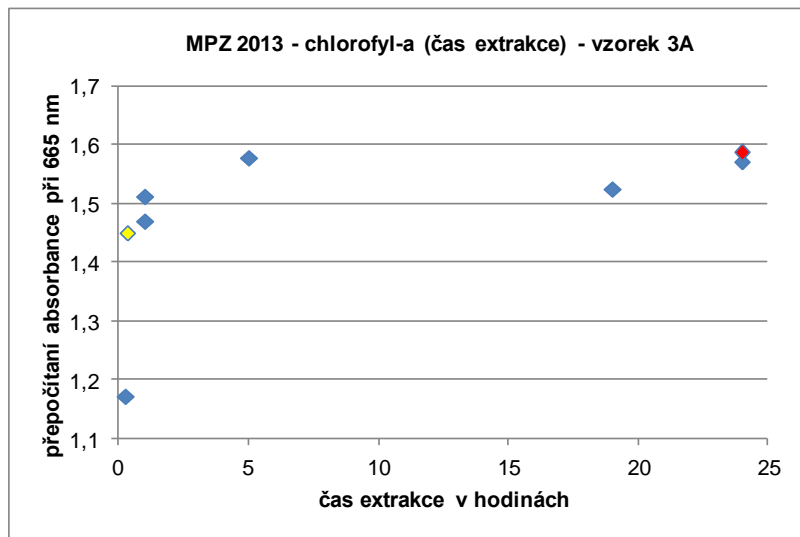
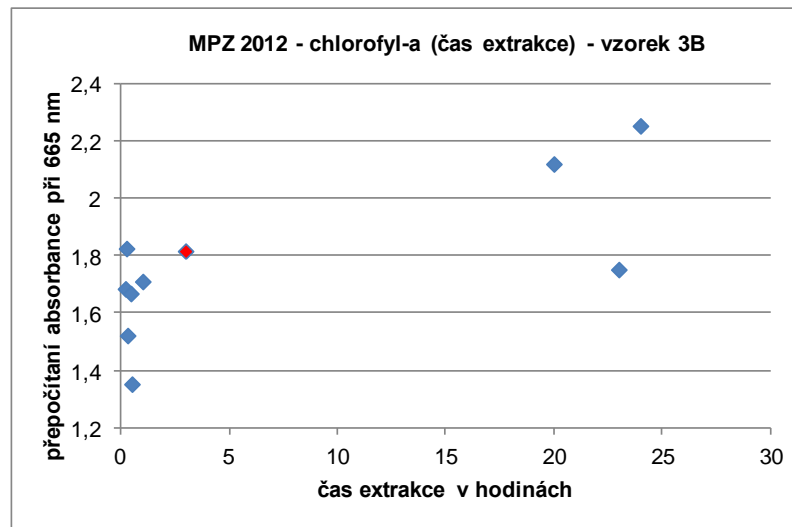
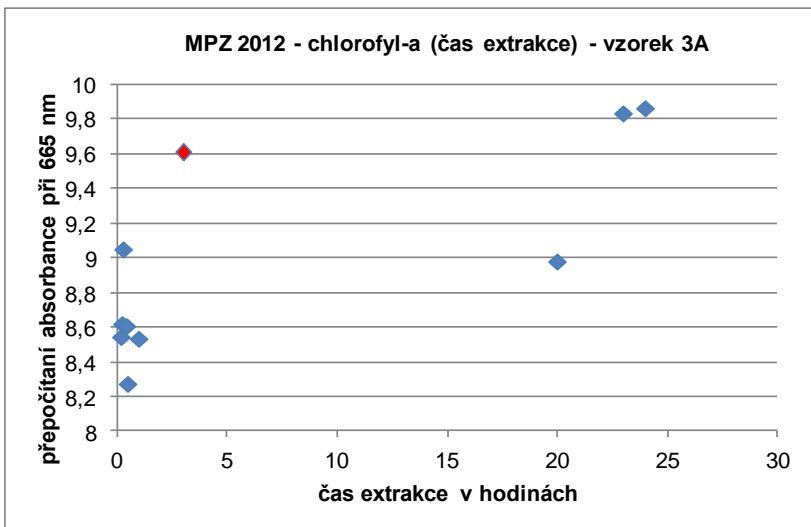
Budou se stejně chovat i jiné organismy (např. velké kolonie sinic)?

Extrakce – vliv extrakční nádoby



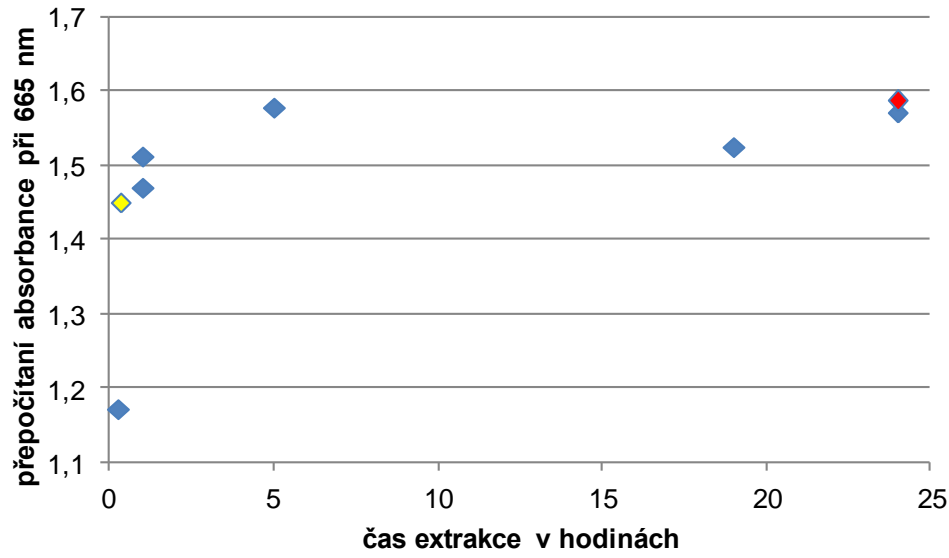
Extrakce – vliv extrakční nádoby



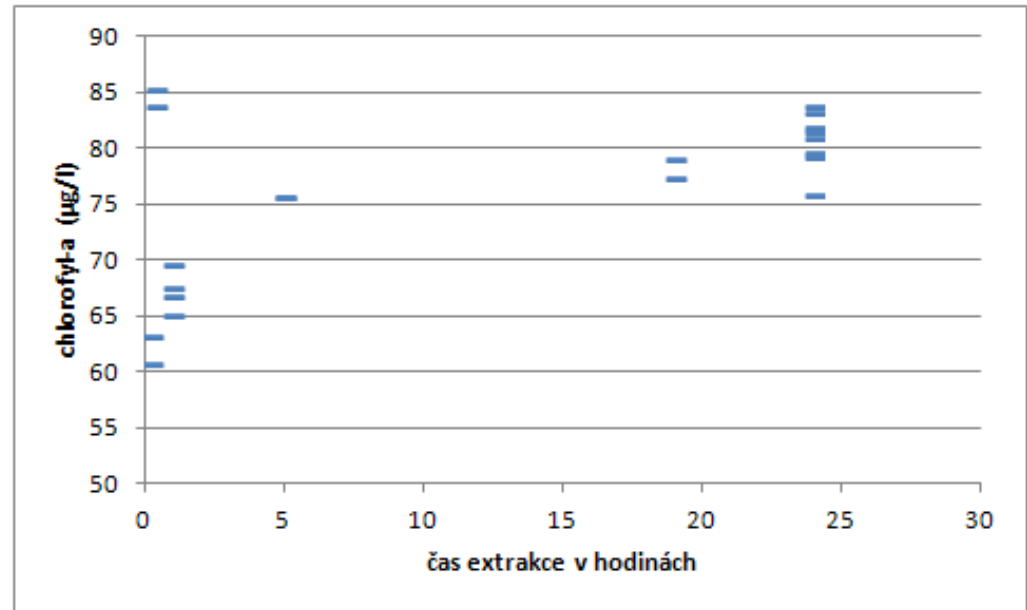


doba extrakce v MPZ 2012 a 2013

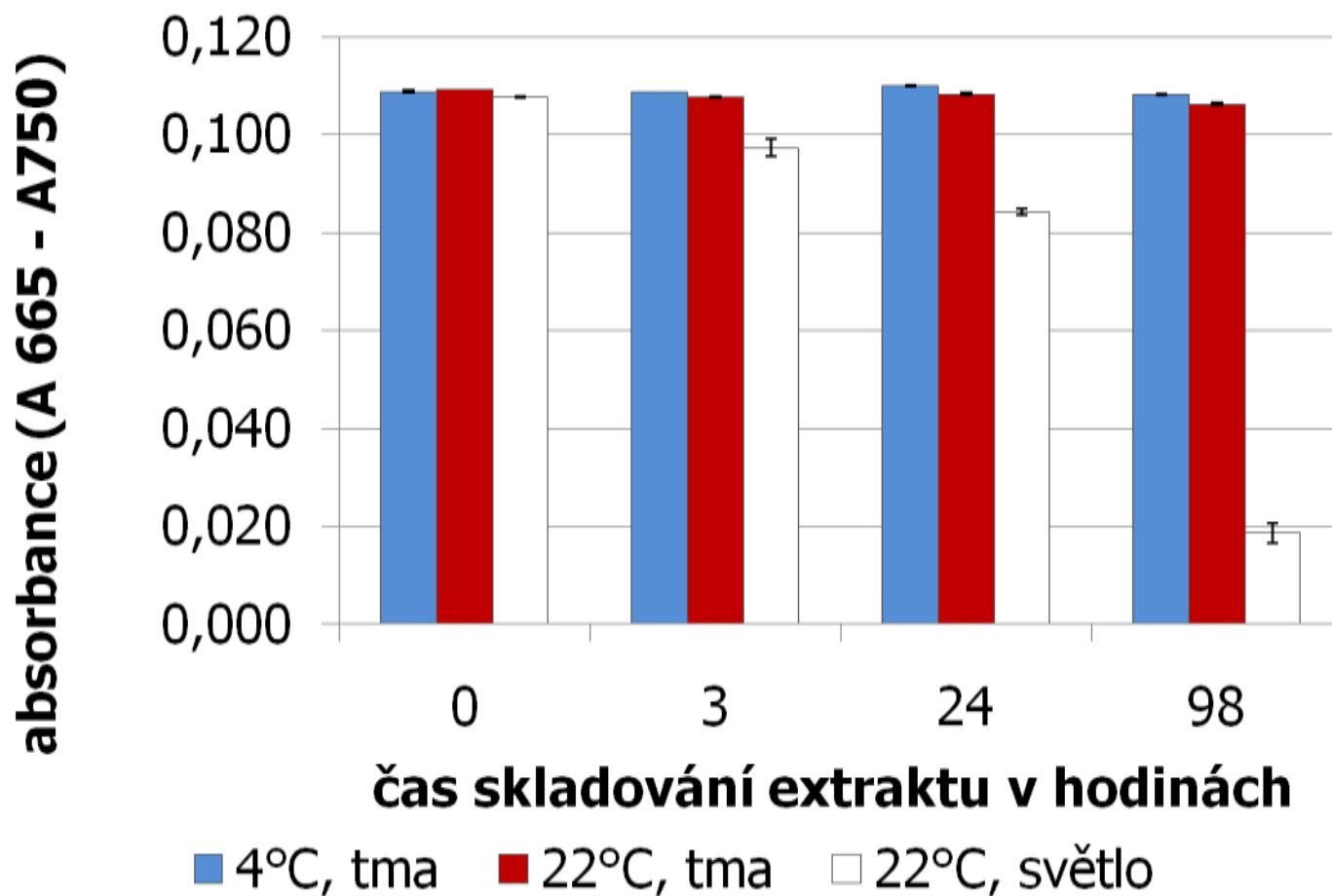
MPZ 2013 - chlorofyl-a (čas extrakce) - vzorek 3A



doba extrakce v MPZ 2013

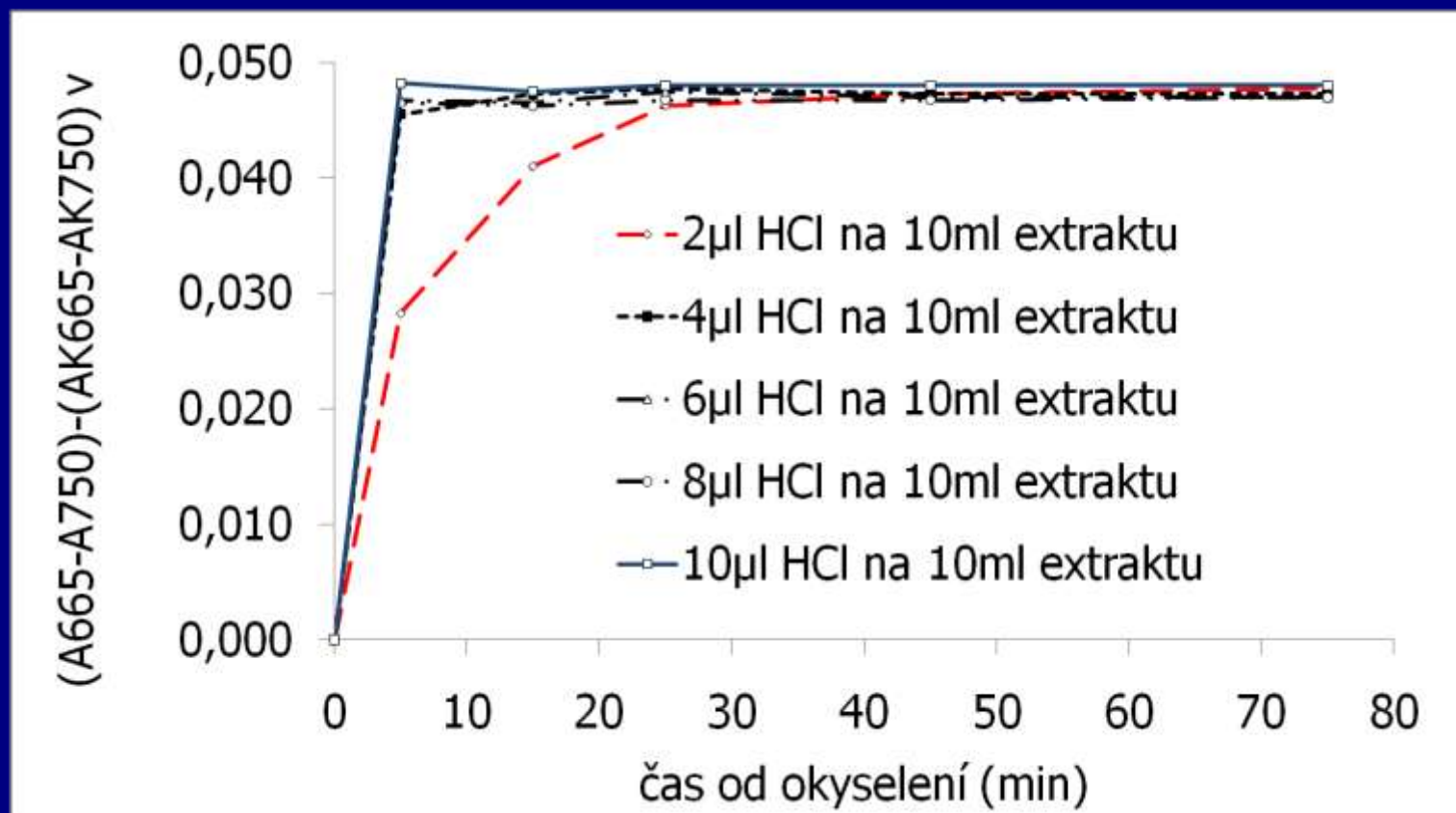


Skladování extraktu



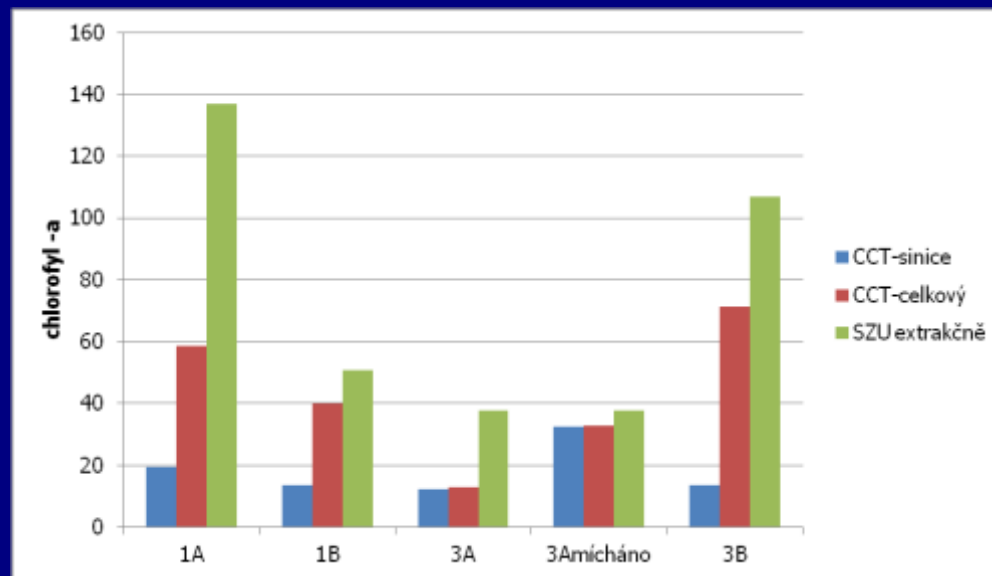
Okyselování extraktu

- Zkoušeno na extraktu s absorbancí při 665 nm 0,125 / 1 cm optické dráhy kyvety



Stanovení sinic a chlorofylu-a pomocí alternativních metod

- Fluorometrie, HPLC
- Srovnání klasického stanovení chl-a (SZU) a pomocí Fluoroprobe (CCT)



Microcystis

vláknité
sinice

Aphanizomenon
flos-aquae