

PT#V/9/2006

**Stanovení mikroskopického
obrazu v koupalištích ve
volné přírodě a stanovení
chlorofylu-a**

Petr Pumann

Státní zdravotní ústav

Praha 30.11.2006 – upraveno pro publikaci na internetu

Nová literatura

- Hindák – CD zelené řasy (prezentace)
- Prezentace z taxonomické sekce CCT (www.sinice.cz)

IDENTITA

PZZ

Název Stanovení mikroskopického obrazu v koupalištích ve volné přírodě a stanovení chlorofylu-a
Předmět voda koupaliště přírodní
Program biologický rozbor
PT# V-9-2006
Vydáno dne 28. listopadu

Pořadatel

Adresa Státní zdravotní ústav
Šrobárova 48
Praha 10 Vinohrady
PSČ 10042
IČO 75010330
Kontakt Mgr. Petr Pumann
Posice koordinátor ESPT
Telefon 267082220
Fax 267082271
E-mail petr.pumann@szu.cz
www www.szu.cz/chzp/voda/pt/

Účastník

Adresa Státní zdravotní ústav Praha
Šrobárova 48
Praha 10 - Vinohrady
PSČ 10042
IČO 75010330
Kontakt Mgr.Petr Pumann
Posice vedoucí biologie
Telefon 267082220
Interní Id lab **596**
Externí Id lab

**kód účastníka, pod kterým je
veden v celé zprávě**

Počet účastníků

- stanovení mikroskopického obrazu
28 účastníků
- stanovení chlorofylu-a
19 účastníků

Chlorofyl-a a feopigmenty

Příprava vzorků:

- zdroj: rybník Papež v Dobříši
- vysoká koncentrace chlorofylu-a → filtrace části vzorku planktonní sítí + ředěno odstátou vodou
- mícháno v 50 litrovém barelu
- celkem připraveno 29 vzorků
- SZÚ zpracování vzorků 1, 9, 17, 29



Chlorofyl-a a feopigmenty

Stanovení vztažných hodnot

- Výsledky dvou pilotních laboratoří (po dvou vzorcích) a laboratoře SZÚ (4 vzorky)
- Vztažná hodnota počítána jako aritmetický průměr z průměru výsledků pilotních laboratoří a laboratoře SZÚ

Výsledky pilotních laboratoří chlorofyl-a

Laboratoř	1.	2.	3.	4.	průměr
SZÚ	60,8	62,0	62,0	60,5	61,3
619	58,4	59,1			58,8
631	43,7	42,7			43,2

Výsledky pilotních laboratoří feopigmenty

Laboratoř	1.	2.	3.	4.	průměr
SZÚ	14,6	15,6	16,7	17,1	16,0
619	13,1	13,7			13,4
631	15,8	16,4			16,1

Vztažné hodnoty

Chlorofyl-a

vztažná hodnota: 54,4 $\mu\text{g/l}$

vztažná odchylka: 8,0 $\mu\text{g/l}$

meze pro správné hodnoty: 38,42 - 70,41 $\mu\text{g/l}$

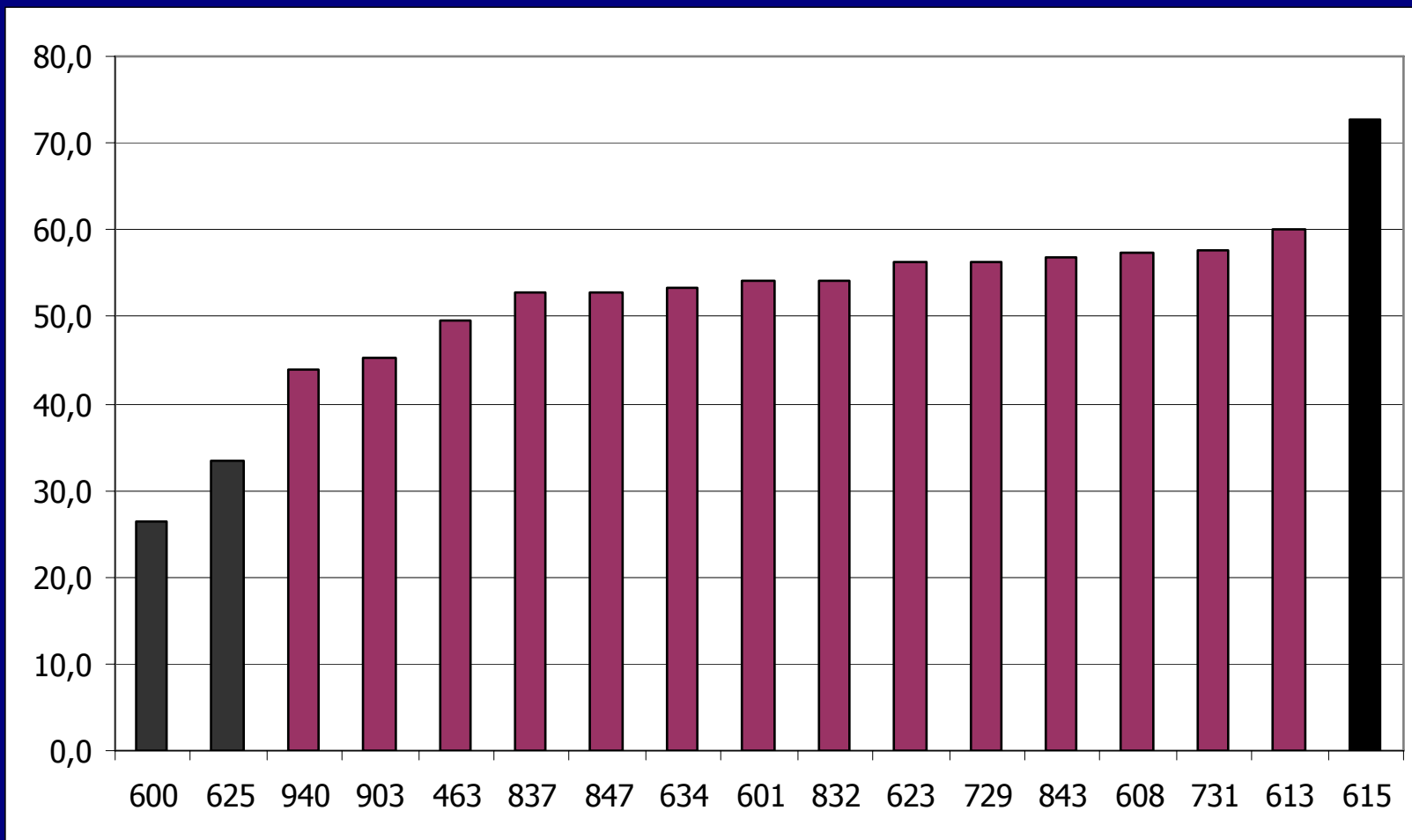
Feopigmenty

vztažná hodnota: 15,2 $\mu\text{g/l}$

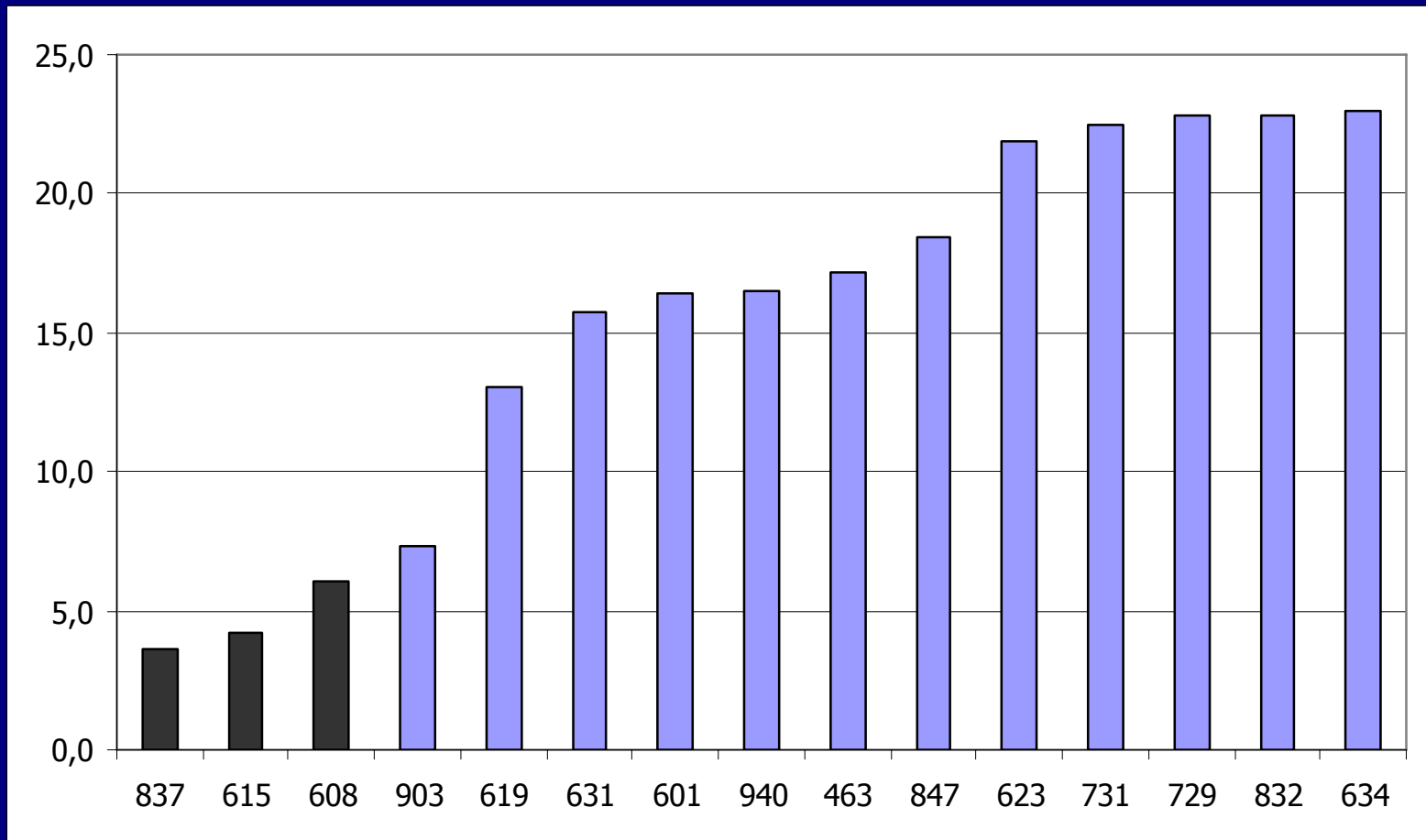
vztažná odchylka byla rozšířena na $\pm 55\%$

meze pro správné hodnoty: 6,82 - 23,51 $\mu\text{g/l}$

Chlorofyl-a - účastníci



Feopigmenty - účastníci



Chlorofyl – možné problémy s metodou

- některé laboratoře nemají dobře vyladěný poměr objemu vzorku, extrakčního činidla a optické dráhy kyvety – příliš nízká absorbance

Kvantitativní rozbor sinic

Příprava vzorků

Vzorek 1A

- záměr – *Planktothrix*
- realita – *Planktothrix* + velmi hojné tenké Oscillatoriales
- Měšice – 10 km severně od Prahy
2.10.2006



Vzorek 1B

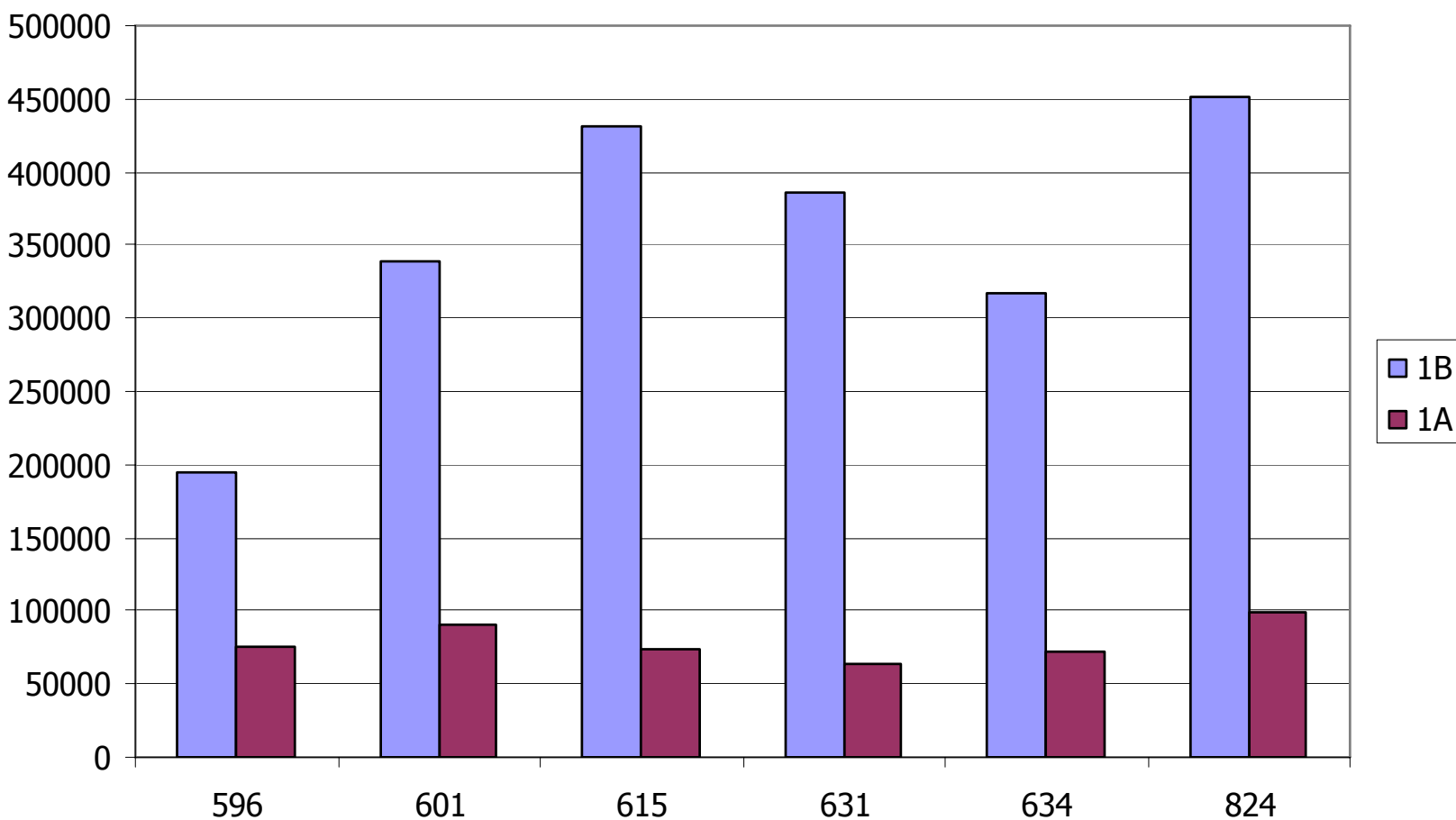
- záměr – *Microcystis* sp.
- realita – *Microcystis viridis*
- Koryto v Dobříši 2.10.2006
- před plněním filtrace přes gázu k odstranění největších kolonií + ředění filtrovanou vodou

Zajištění homogenity

- promícháno v 10 litrovém barelu se spodním výpustním kohoutek
- celkem připraveno 35 vzorků
- SZU zpracování vzorků 1, 10, 18, 27, 35



Pilotní laboratoře



Stanovení vztažných hodnot

- předem vybráno 5 pilotních laboratoří, které dodávaly „dobré výsledky“ během předchozích kol + osobní zkušenost s lidmi, kteří stanovení provádějí
- pilotním laboratořím nebylo předem sděleno, že byly vybrány pro stanovení vztažných hodnot
- každá jen jeden náhodně vybraný vzorek
- laboratoř SZÚ dodala pouze průměr svých stanovení

Vztažné hodnoty

Vzorek 1A - kokální

vztažná hodnota: 78991 buněk/ml

vztažná odchylka: $\pm 50\%$ (rozšíření)

meze pro správné hodnoty: 39496 – 118487

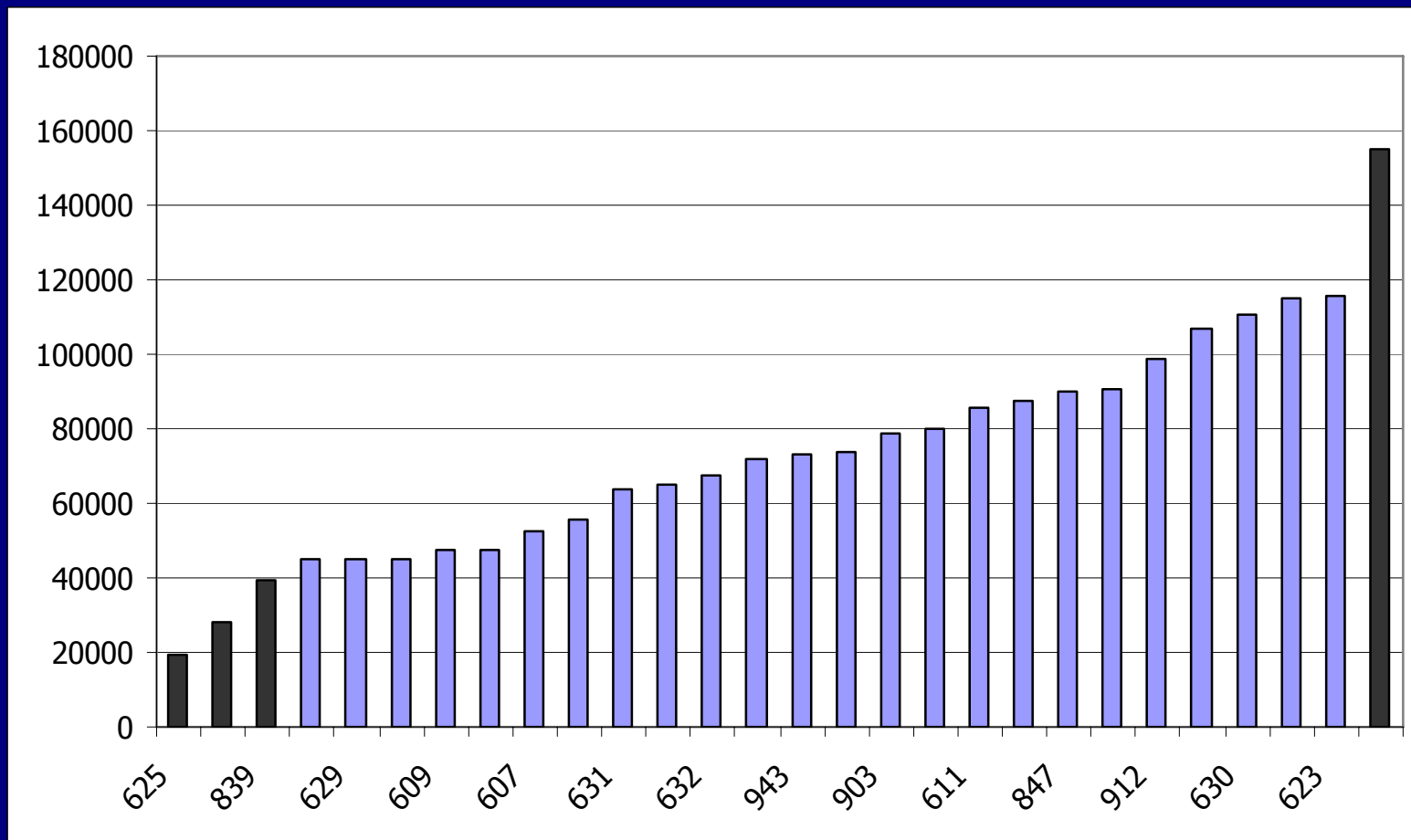
Vzorek 1B vláknité

vztažná hodnota: 353273 buněk/ml

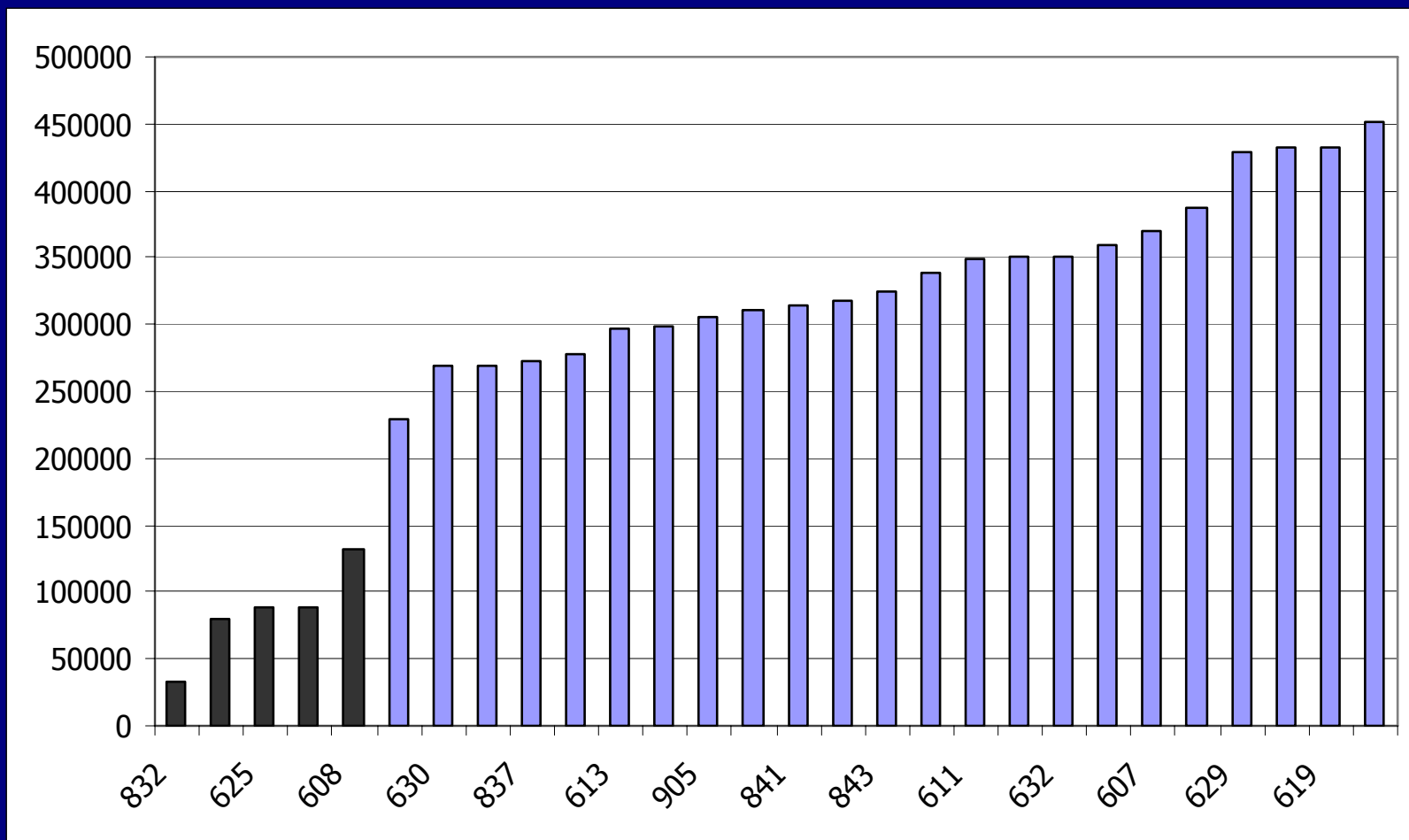
vztažná odchylka: $\pm 50\%$ (rozšíření)

meze pro správné hodnoty: 176637 – 529910

Kvantifikace sinic – vz.1A - vláknité



Kvantifikace sinic – vz.1B - kokální



Metodické poznámky

- Ztráty při zahuštění odstředěním u dezintegrovaných vzorků kokálních sinic
- Vlákňité sinice – při plnění komůrky kápnutím na mřížku a následném přikrytí krycím sklem vznikají místa s vysokými počty vláken a výsledky stanovení jsou obvykle vyšší než při plnění komůrky z boku.

Kvalitativní rozbor sinic

Vzorek 2A

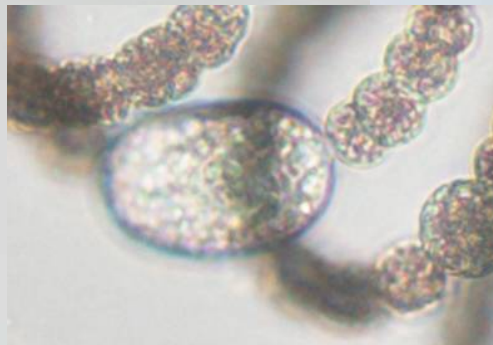
➤ odběr

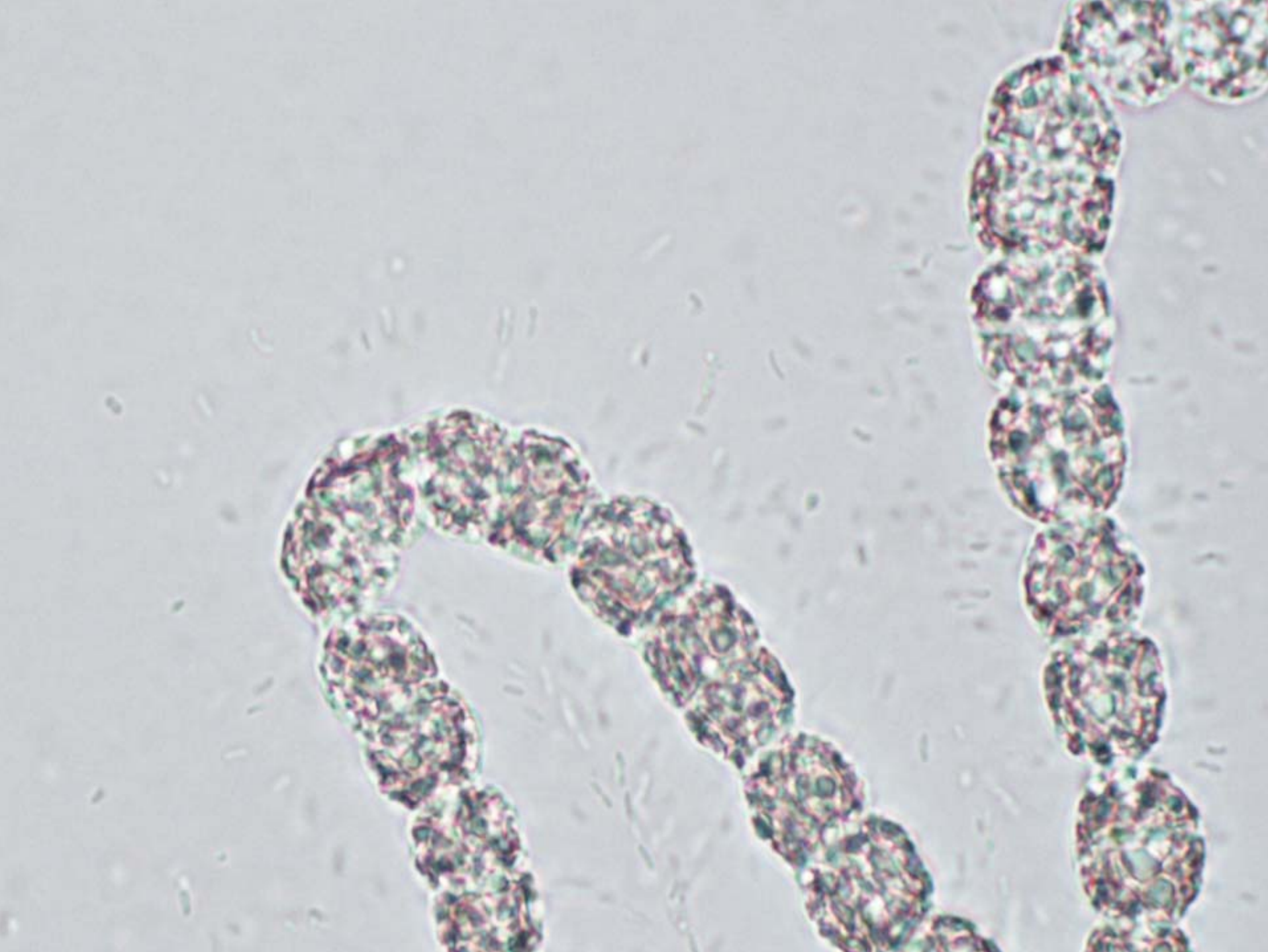
- Jezero Poděbrady
- září 2006
- planktonní síť 40 μm

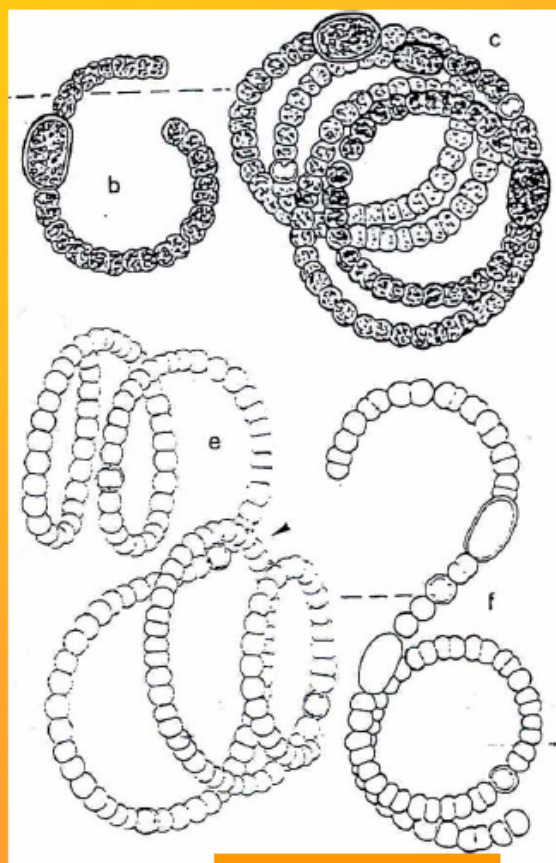
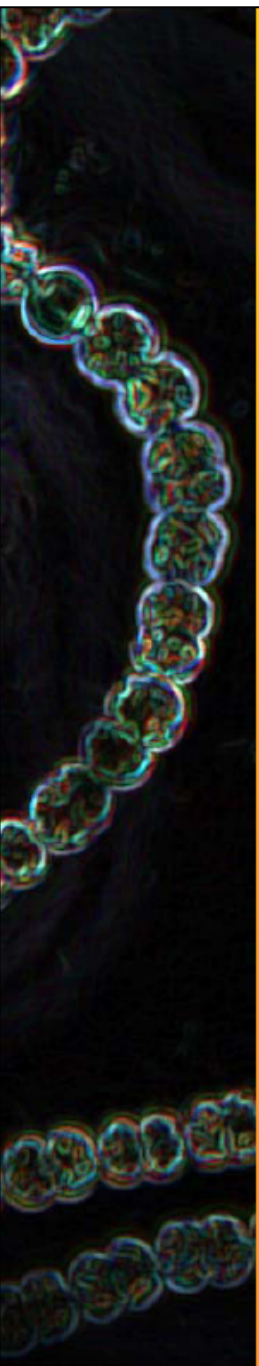
➤ hodnocené taxony

- *Anabaena spiroides*
- *Woronichinia naegeliana*

Anabena spiroides

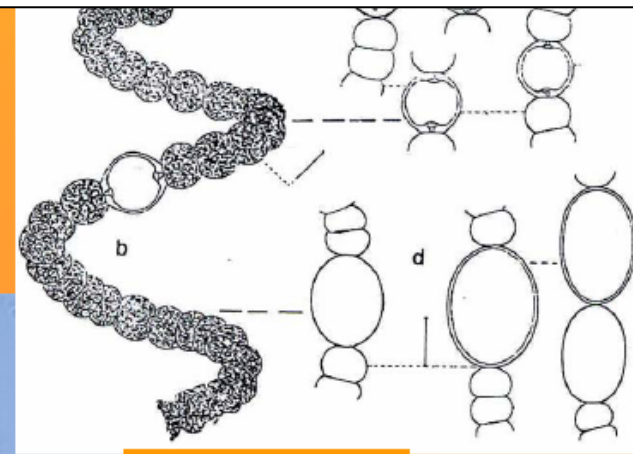






**Anabaena
circinalis**

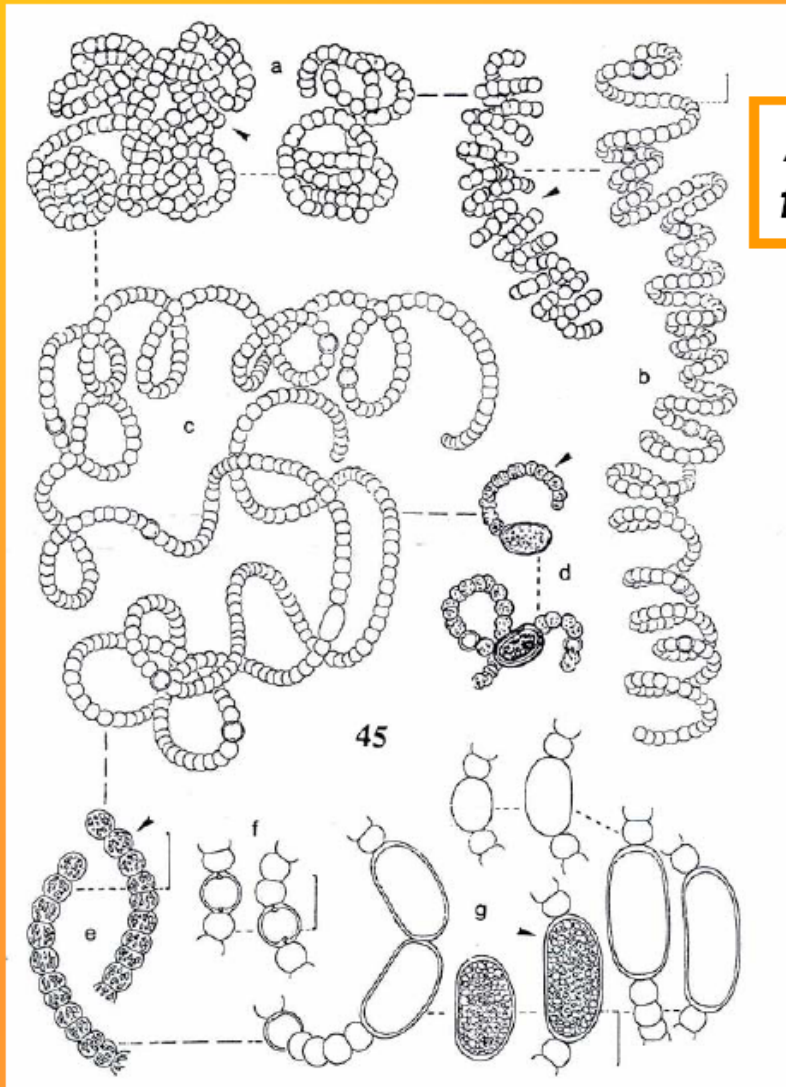
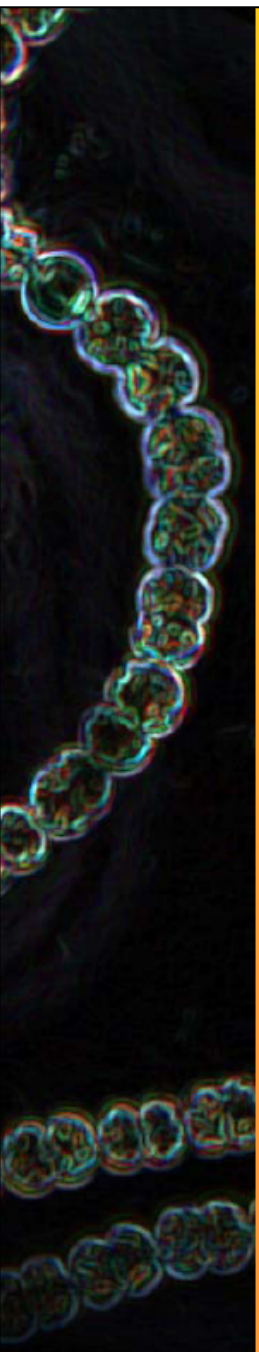
„silné“



**Anabaena
crassa**

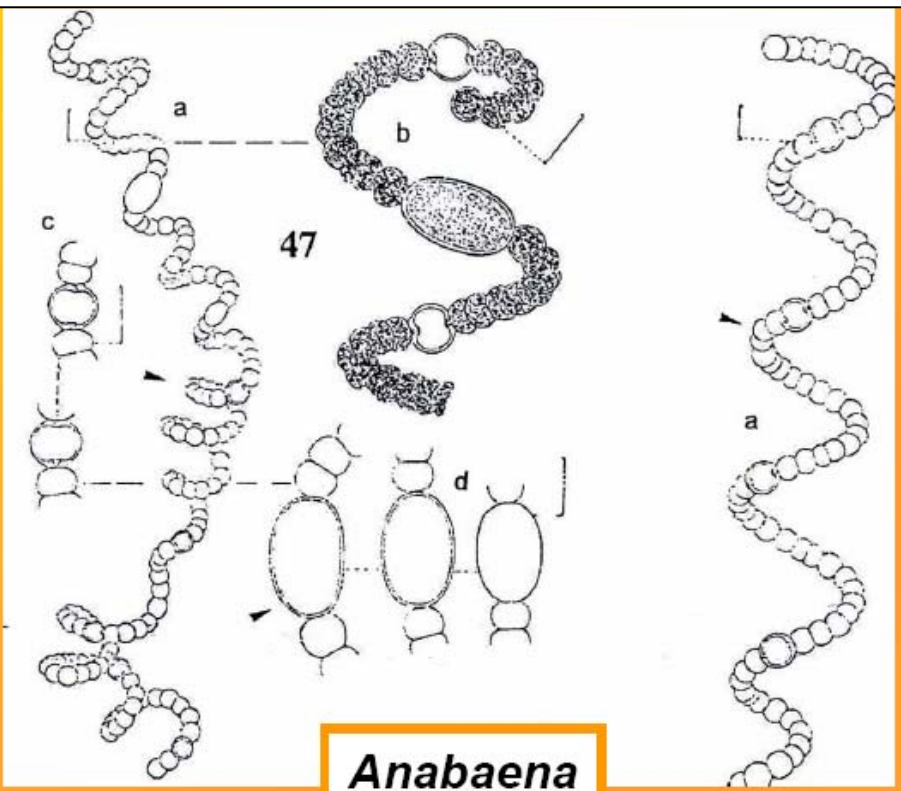


„střední“



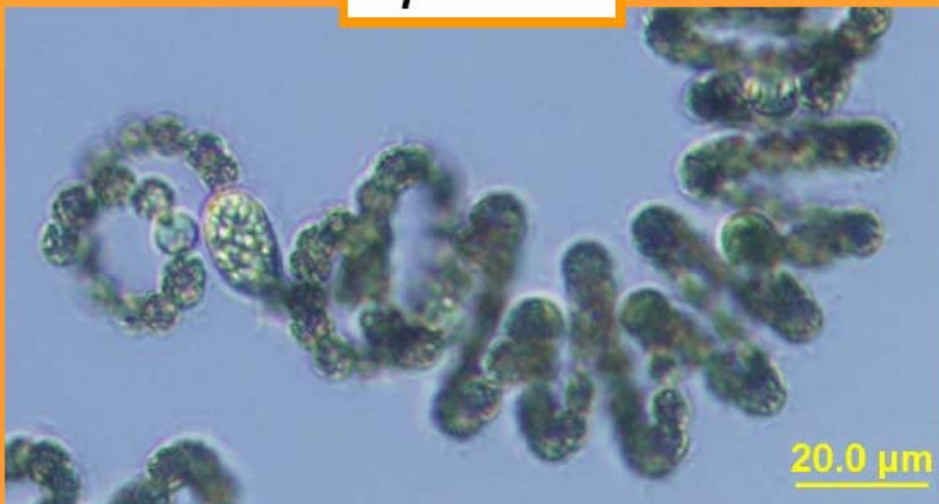
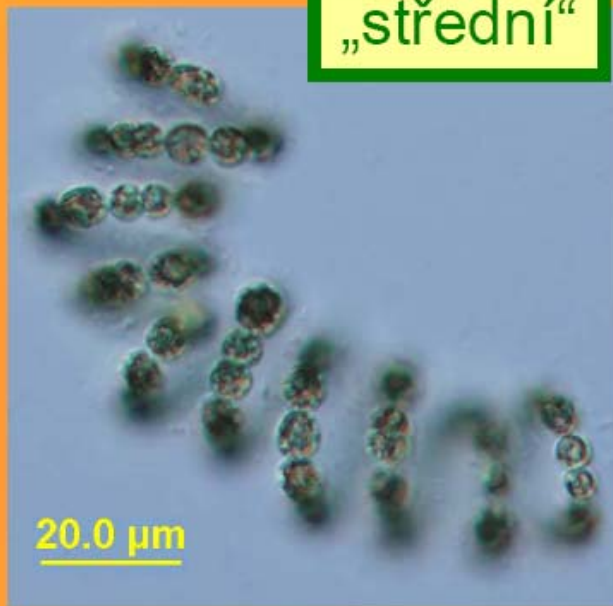
Anabaena flos-aquae





Anabaena spiroides

„střední“



Woronichinia neageliana



Microcystis aeruginosa



***Aphanizomenon gracile* ?**



Woronichinia neageliana



Planktothrix agardhii



Vzorek 2B

➤ odběr

- rybník v Šeberově
- září 2006
- planktonní síť 40 μm

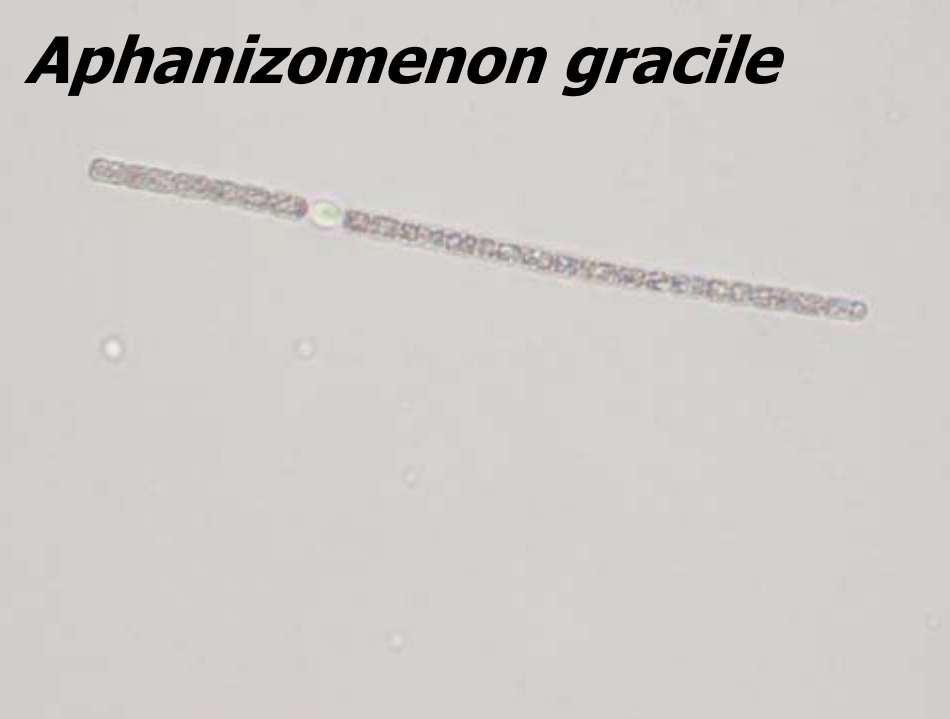
➤ hodnocené taxony

- *Pseudanabaena limnetica*

Pseudanabaena limnetica



Aphanizomenon gracile



Anabaenopsis



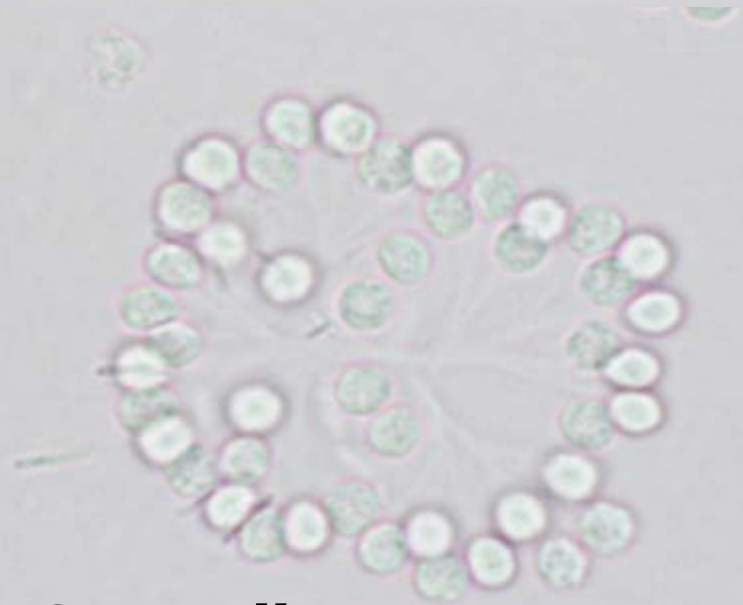
Vzorek 2C

- odběr
 - Bezdrev
 - září 2006
 - planktonní síť 20 μm
- hodnocené taxony
 - *Planktothrix agardhii*

Planktothrix agardhii



Aphanizomenon



Snowella

Vzorek 2D

- odběr
 - Koryto (Dobříš)
 - říjen 2006
 - planktonní síť 20 μm
- hodnocené taxony
 - *Microcystis viridis*



Microcystis viridis

This image shows several clusters of Microcystis viridis. The colonies are composed of numerous small, dark green, spherical cells arranged in irregular, branched groups. The background is light and contains some smaller, individual cells.

M. aeruginosa



M. flos-aquae

This image features a large, circular, dark brown colony of Microcystis flos-aquae. The colony has a dense, granular texture. To its left, there are several smaller, dark green clusters of cells. The background is light and shows some faint, out-of-focus structures.

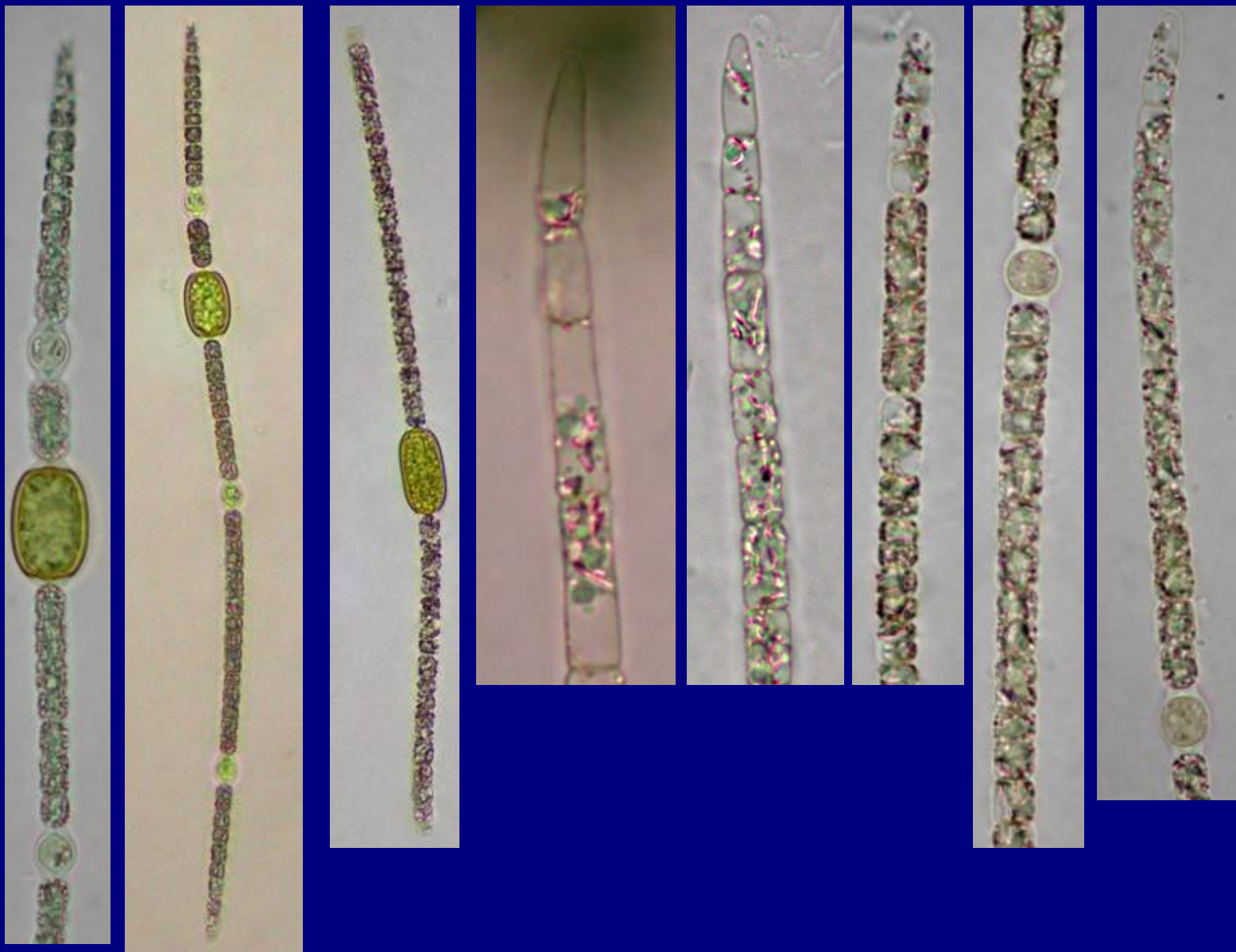


M. ichthyoblabe

This image displays a large, circular, dark brown colony of Microcystis ichthyoblabe. The colony is very dense and has a granular appearance. It is surrounded by several smaller, dark green clusters of cells. The background is light and contains some faint, out-of-focus structures.

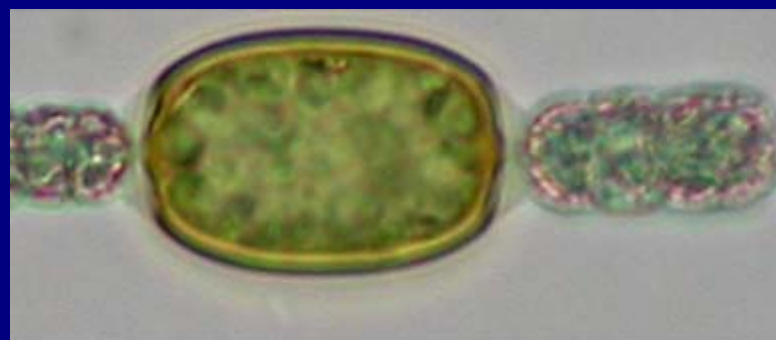
Zajímavé taxony sinic

Anabaena bergii, *A. minderi*



Znaky

- vlákno je zakončeno špičatou buňkou
- ke konci vlákna se buňky prodlužují

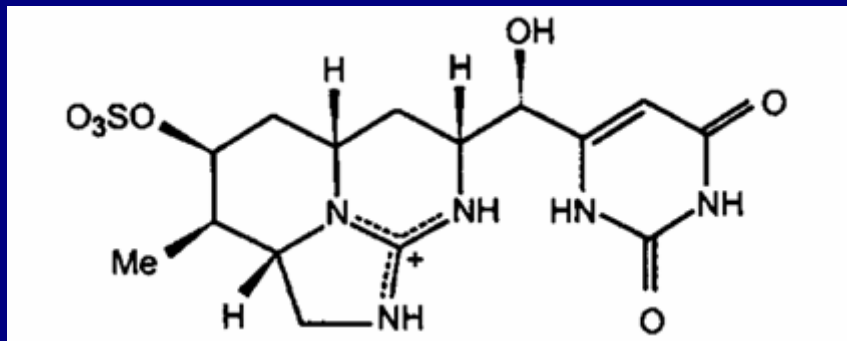


Nálezy

- vždy pouze jako příměs bohatšího společenstva
 - ve 3 pískovnách v povodí Labe mezi Starou Boleslaví a Kostelcem n. Labem
 - pískovna v Dubici u České Lípy
 - Máchovo jezero (nález Emil Janeček)

Produkce cylindropermopsinu

- *A. bergii* je známá jako producent cylindropermopsinu stejně jako jiná u nás příležitostně se vyskytující sinice *Cylindropermopsis raciborskii*
- cylindropermopsin může způsobit poškození jater nebo ledvin



Aphanizomenon aphanizomenoides



- hrozí záměna s *A. gracile* u vláken bez akinet

Novinky v legislativě

vyhl. č. 135/2004 Sb. - monitoring

- standardně - 1 x měsíčně
 - chlorofyl-a + druhové složení mikroskopicky
- při předpokládaném rozvoji sinic – 1 x 14 dní (nebo častěji)
 - chlorofyl-a + druhové složení mikroskopicky + mikroskopická kvantifikace sinic + vizuální sledování vodních květů
- doplňkové informace - celkový fosfor a průhlednost, ...

vyhl. č. 135/2004 Sb. - hodnocení

- tři stupně limitních hodnot
 - I. stupeň (10 µg/l chl-a + 20 000 b./ml)
 - II. stupeň (50 µg/l chl-a + 100 000 b./ml)
 - III. stupeň (vodní květ) nebo při významném překročení limitních hodnot II. stupně u sinic netvořících vodní květy

Směrnice 7/2006/ES

čl. 2 Definice

11. „Rozmnožením sinic“ se rozumí nahromadění sinic ve formě květu, koberce nebo pěny.

čl. 8 Rizika související se sinicemi

1. Naznačuje-li profil vod ke koupání možnost rozmnožení sinic, provede se odpovídající monitorování, aby bylo možno včas určit zdravotní rizika.

2. Dojde-li k rozmnožení sinic a byla-li zjištěna nebo předpokládají-li se zdravotní rizika, přijmou se neprodleně přiměřená opatření řízení, aby se zabránilo vystavení tomuto riziku, včetně informování veřejnosti.

čl. 16 Technická přizpůsobení a prováděcí opatření

Postupem uvedeným v čl. 16 odst. 2 se rozhodne o:

b) stanovení prováděcích pravidel k čl. 8 odst. 1,

Příloha III.: Profil vod ke koupání uvedený v článku 6 obsahuje:

c) posouzení možného rozmnožení sinic;

Co do novelizované legislativy (1)

- systém může zůstat velmi podobný současnému
- odstranění „drobných“ problémů

vyhláška č. 135/2004 Sb. problémy

(3) Hodnocení výskytu sinic se provádí podle přílohy č. 2. Při překročení limitů I. stupně stanoveného v příloze č. 2 se volí zkrácení četnosti odberů za účelem kontroly na 5 až 7 dní, při překročení limitů II. stupně stanoveného v příloze č. 2 se nedoporučuje koupání a provozování vodních sportů zejména pro děti, těhotné ženy, osoby trpící alergií a osoby s oslabeným imunitním systémem. Při přítomnosti druhů vytvářejících mohutné příhladinové květy je nutné sledovat vznik vodních květů. V případě výrazného překročení limitních hodnot u druhů netvořících vodní květy nelze provozovat koupání, i když nebylo dosaženo limitů III. stupně stanoveného v příloze č. 2. Při dosažení limitů pro III. stupeň nelze provozovat koupání.

Příloha č. 2 k vyhlášce č. 135/2004 Sb.

Limitní hodnoty pro koupaliště ve volné přírodě se zvýšeným rizikem vzniku masového rozvoje sinic

Ukazatel	Jednotka	I. stupeň	II. stupeň	III. stupeň	Četnost	Vysvětlivky
sinice	buňky/ml	20 000 až 100 000	>100 000	-	14 denní	1
	mm ³ /l	2–10	>10	-	14 denní	1
chlorofyl-a	µg/l	10–50	>50	-	14 denní	
vizuální hodnocení		-	-	vodní květ přítomen	14 denní	2
mikroskopický obraz					14 denní	3

Použité zkratky:

mm³/l – buněčný objem sinic

Co do novelizované legislativy (2)

- zrovnoprávnit sledování fytoplanktonu (včetně sinic) pomocí fluorescenčních sond s mikroskopickou kvantifikací a stanovením chlorofylu-a
- propracovat metodiku pro vizuální sledování vodních květů

Problém špatného překladu: bloom, mat, scum

CZ: „Rozmnožením sinic“ se rozumí nahromadění sinic ve formě květu, koberce nebo pěny.

EN: cyanobacterial proliferation' means an accumulation of cyanobacteria in the form of a bloom, mat or scum

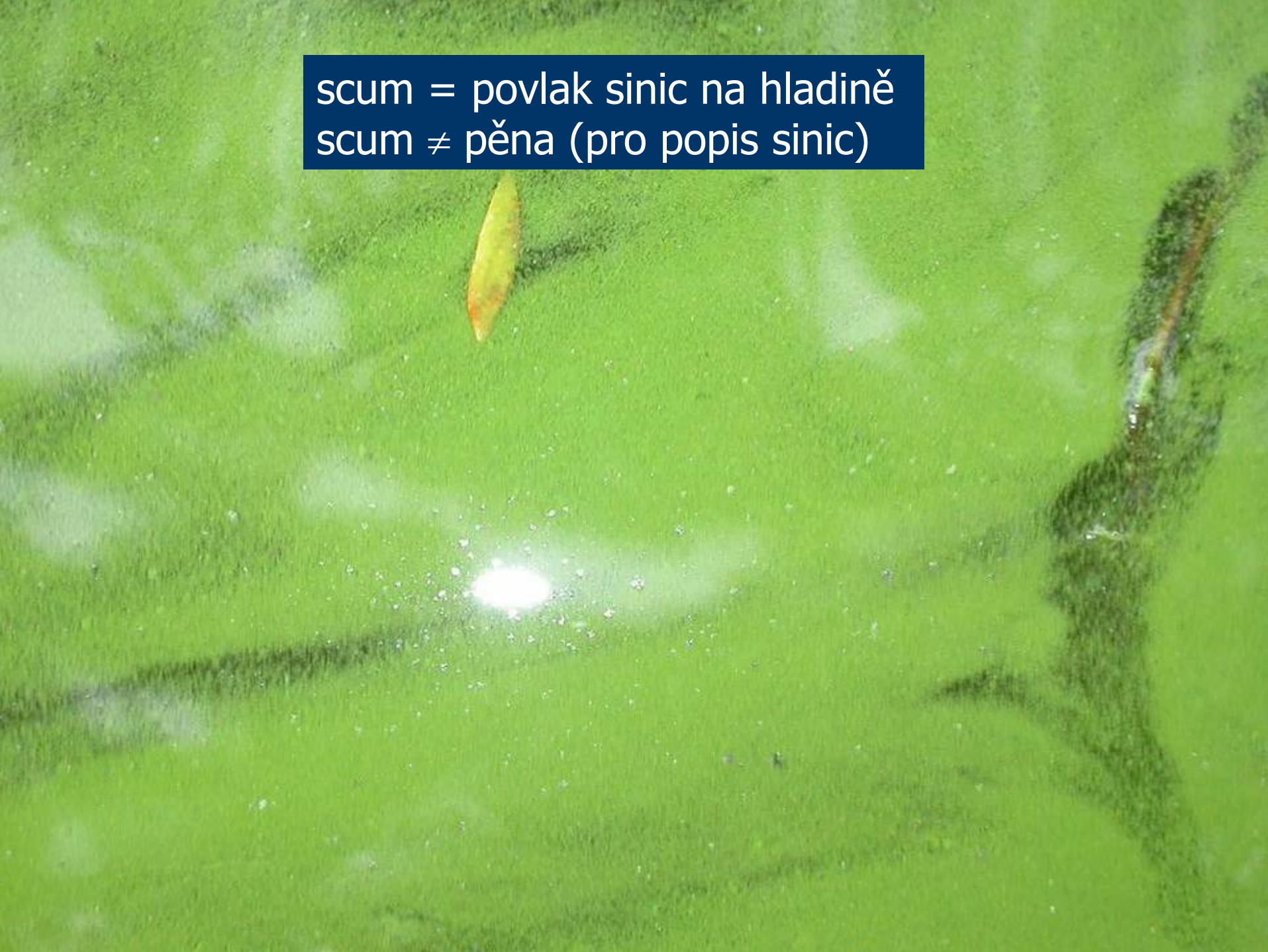
DE: „Massenvermehrung von Cyanobakterien“: kumuliertes Auftreten von Cyanobakterien in Form von Blüten, Matten oder Schlieren.

SK: „Premnoženie sa cyanobaktérií“ znamená akumuláciu cyanobaktérií vo forme zákalu, pokrytia alebo peny.

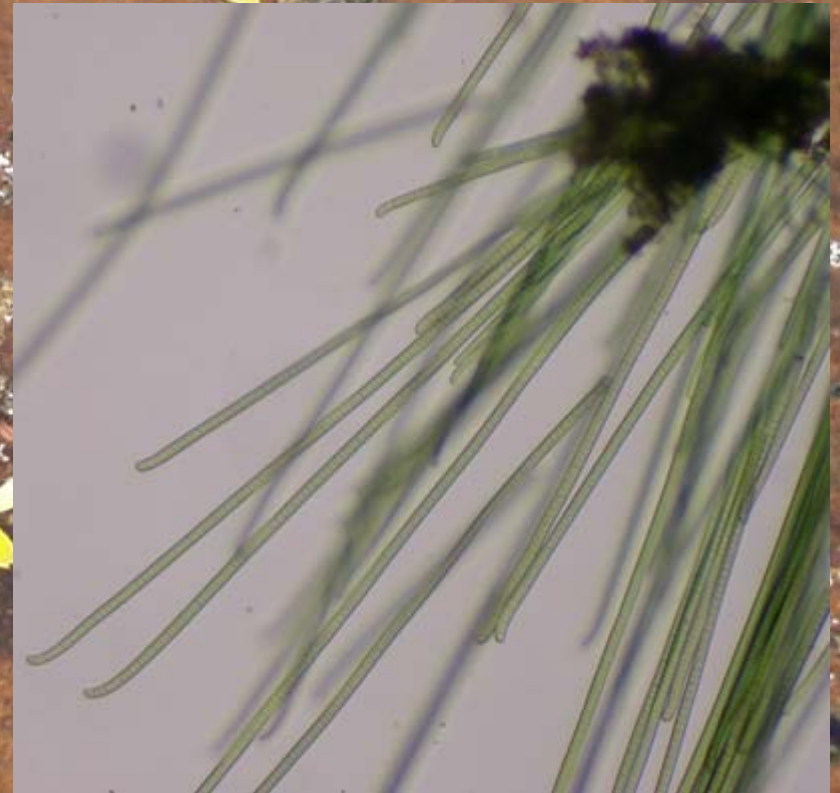
scum = povlak sinic na hladině
scum ≠ pěna (pro popis sinic)



scum = povlak sinic na hladině
scum ≠ pěna (pro popis sinic)



mat = nárost sinic včetně utržených volně plovoucích
mat \neq koberec (pro popis sinic)



Vodní květ – co to přesně je?

➤ definice z vyhl. č. 135/2004 Sb.:

(6) Vodní květ sinic (cyanobakterií) je stav, při kterém jsou pouhým okem vidět shluky sinic u hladiny, ve vodním sloupci nebo povlak sinic na hladině. Masový výskyt sinic (cyanobakterií) je stav, při kterém jsou sinice přítomny jako vodní květ nebo, v případě, že vodní květ není vytvořen, se vyskytují v koncentracích převyšujících 100 tisíc buněk/ml.

➤ výsledky do IS PiVo jako

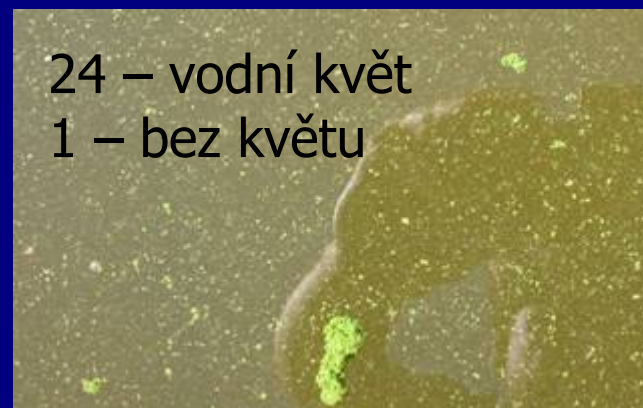
- vodní květ přítomen x nepřítomen
- pokud je přítomen mělo by následovat upřesnění



23 – vodní květ
3 – bez květu



24 – vodní květ
1 – bez květu



18 – vodní květ
8 – bez květu





Hrbáček (Aktuální otázky vodárenské biologie 2002)

body	makroskopické pozorování sinic
1	ve vodě hladiny nádrže jsou jednotlivé vločky sinic
3	ve vodě hladiny nádrže jsou patrné četné jednotlivé vločky
5	ve vodě nádrže se tvoří drobné shluky vloček
10	sinice tvoří při klidné hladině místy (často v určité vzdálenost podél břehu) pásy vodního květu, na kamenech vznikají více či méně široké modrozelené pásy
20	na některých místech hladiny zřetelný vodní květ i při silně zčeřené hladině
50	sinice tvoří pásy hustého vodního květu
100	u hladiny jednolitá suspenze velkých vloček sinic

Janeček (Povodí Ohře)

body	popis
0	bez výskytu zřetelných makroskopických kolonií
1	výskyt kolonií velmi ojedinělý, znatelný až při detailnějším pohledu
2	kolonie zřetelné, jednotlivé, velmi rozptýlené
3	kolonie tvoří znatelný zákal popř. agregáty, bez tvorby vrstvy na hladině
4	kolonie tvoří znatelnou vrstvu na hladině, tloušťka vrstvy ≤ 1 cm, nekompaktní
5	kolonie tvoří masivní kompaktní vrstvu na hladině, tloušťka vrstvy ≥ 1 cm

Duras (Povodí Vltavy – Berounka)

body	popis
1	žádný vodní květ (VK)
2	drobné vločky řídké až roztroušeně ve vodním sloupci (VS)
3	drobné vločky středně hustě ve VS
4	vločky sinic hustě ve VS, tendence k vytváření hladinových povlaků
5	masový výskyt sinic

Další stupnice???

- postup – domluvit se na jedné stupnici a tu začlenit to normované metodiky (TNV 757717)
- pokud bude schváleno – vydání jaro 2008

Problém makroskopických řas

Směrnice 2006/7/ES

Článek 9

1. Naznačuje-li profil vod ke koupání možné rozmnožení **makroskopických řas** nebo mořského fytoplanktonu, provede se šetření, aby se určila jejich přijatelnost a zdravotní rizika, a přijmou se přiměřená opatření řízení, včetně informování veřejnosti.

Příloha III.

Profil vod ke koupání uvedený v článku 6 obsahuje:
d) posouzení možného rozmnožení makroskopických řas nebo fytoplanktonu;

Bylo zamýšleno pro sladké vody?

Pokud ne, má cenu to naší legislativy dávat?





Děkuji za pozornost