

# **Základy stanovení mikroskopického obrazu ve vodě - úvod**

**Petr Pumann**

*kurz Základy mikroskopického obrazu vody*  
duben 2012, Praha

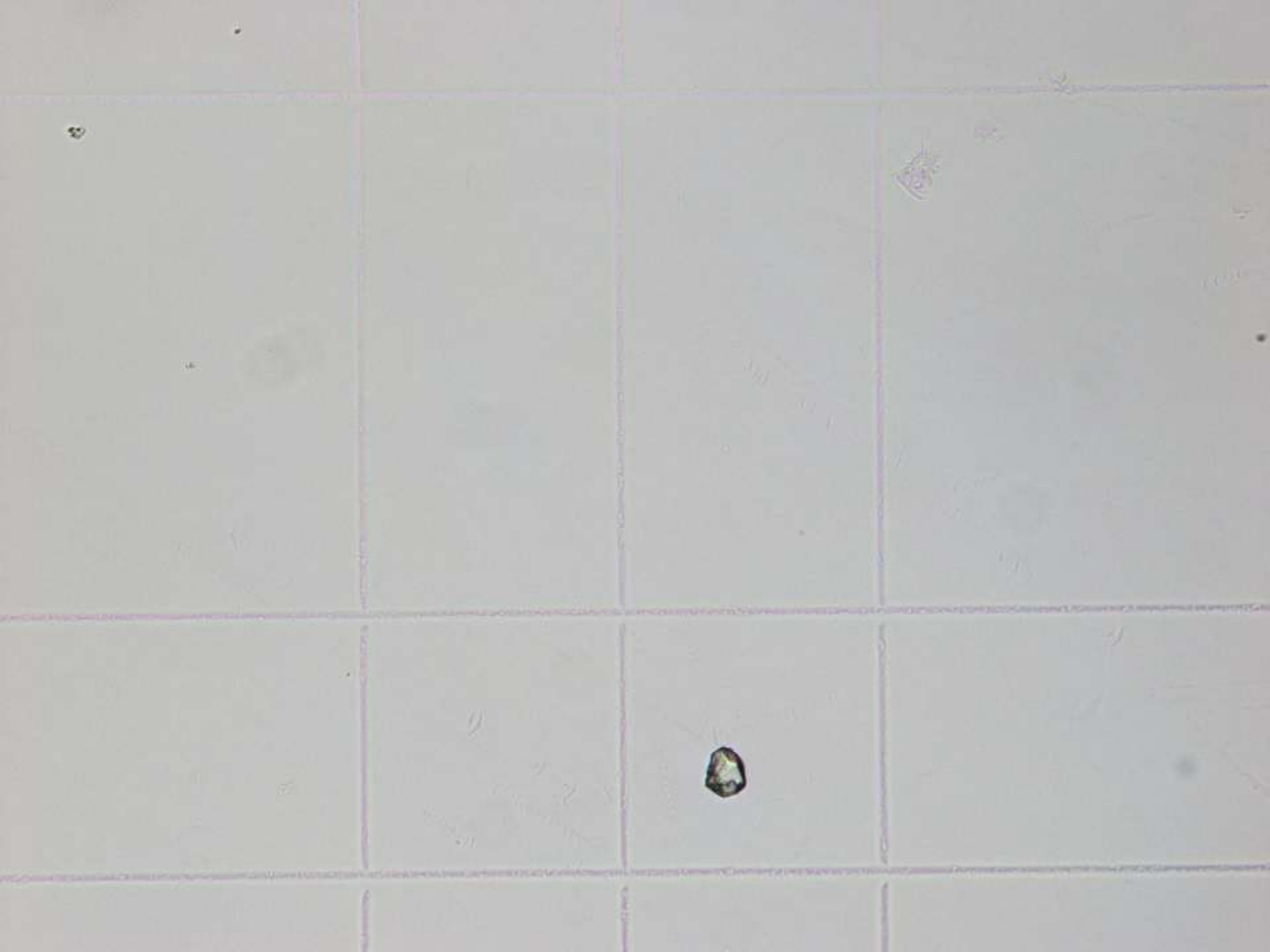
# Využití mikroskopických rozborů vody

## ➤ Standardní rozборы

- mikroskopická kontrola pitné vody pro účely vyhlášky č. 252/2004 Sb.
- mikroskopická kontrola surové vody a vody v procesu úpravy pro účely vyhlášky č. 428/2001 Sb.
- mikroskopický obraz v koupacích vodách podle vyhlášky č. 238/2011 Sb.
- stanovení sinic v koupacích vodách,
- ...

## ➤ „Nestandardní“ rozборы

- „hydrobiologický audit“
- vyšetření příčiny nějakého jevu (např. pachu, zákalu, nárostu ...)



Název rozboru	Jednotka	2.1/11/XXX Výsledek - zdroj		Limit hodnota (typ)	2.1/11/YYY Výsledek - balená voda					Limit hodnota (typ)	Identifikace metody	Pozn.
		vzorek 1	vzorek 2		lahev 1	lahev 2	lahev 3	lahev 4	lahev 5			
<i>enterokoky</i>	KTJ/250 ml	0	0	0 (NMH)	0	0	0	0	0	0 (NMH)	SOP 1/2.1 (ČSN EN ISO 7899-2)	A
<i>Escherichia coli</i>	KTJ/250 ml	0	0	0 (NMH)	0	0	0	0	0	0 (NMH)	SOP 5/2.1 (ČSN EN ISO 9308-1)	A
<i>koliformní bakterie</i>	KTJ/250 ml	0	0	0 (NMH)	0	0	0	0	0	0 (NMH)	SOP 5/2.1 (ČSN EN ISO 9308-1)	A
<i>siřičitany redukující střevní sporující anaerobní bakterie</i>	KTJ/50 ml	0	0	0 (NMH)	0	0	0	0	0	0 (NMH)	SOP 16/2.1 (ČSN EN 26461-2)	A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KTJ/250 ml	0	0	0 (NMH)	0	0	0	0	0	0 (NMH)	SOP 4/2.1 (ČSN EN ISO 16266)	A
<i>počty kolonií při 22°C</i>	KTJ/1 ml	4; 2	20; 11	20 (MH)	15	50	50	28	23	100 (MH)*	SOP 6/2.1 (ČSN EN ISO 6222)	A
<i>počty kolonií při 36°C</i>	KTJ/1 ml	3; 1	1; 3	5 (MH)	2	3	1	0	6	20 (MH)*	SOP 6/2.1 (ČSN EN ISO 6222)	A
<i>mikroskopický obraz - živé organismy</i>	jedinci/ml	0;0	-	0 (NMH)	0	-	-	0	-	0 (NMH)	SOP 13/2.1 (ČSN 75 7712)	A

Název rozboru	Jednotka	Výsledek	Doporučená / limitní hodnota	Identifikace metody	Pozn.
<i>sinice</i>	buněk/ml	349650	20000/100000	SOP 42 (TVN 75 7717)	A
<i>sinice</i>	mm <sup>3</sup> /l	15,6	2/10	TVN 75 7717	

Poznámky:

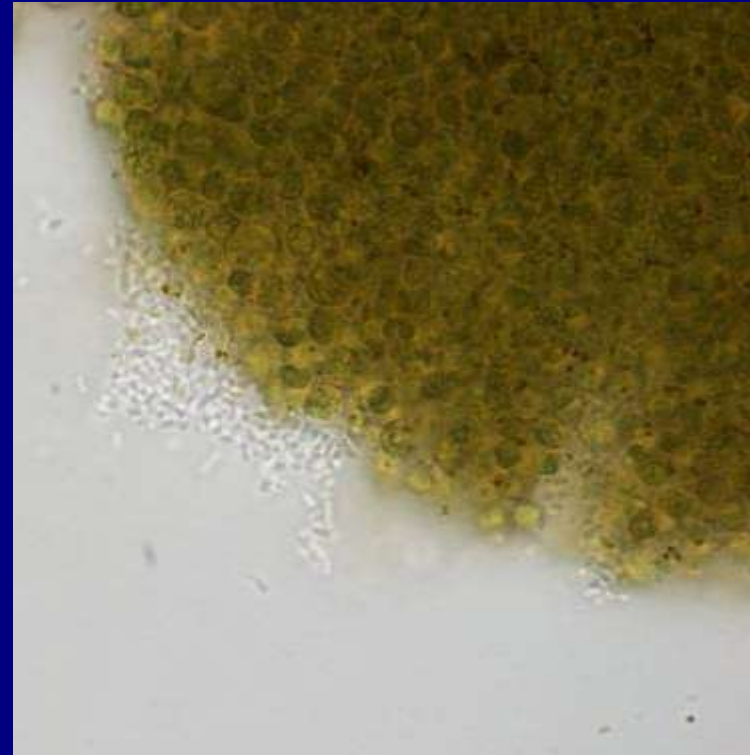
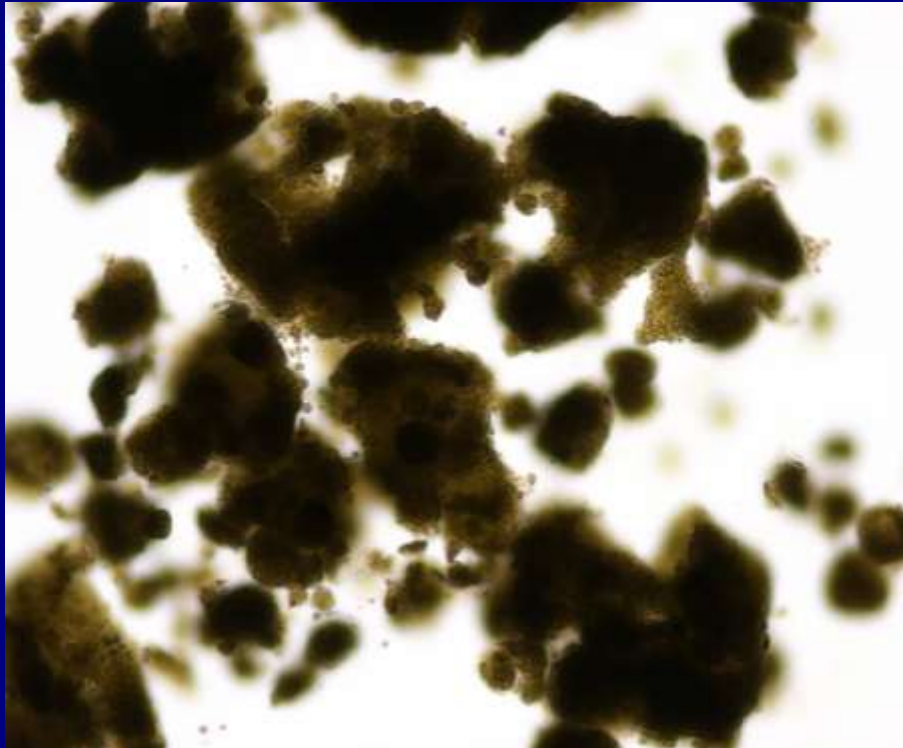
Mikroskopický obraz: Ve fytoplanktonu dominovaly (odhadem více než 50%) sinice (viz. níže). Z řas byly zastoupeny především centrické rozsivky, skrytěnky a zelené řasy.

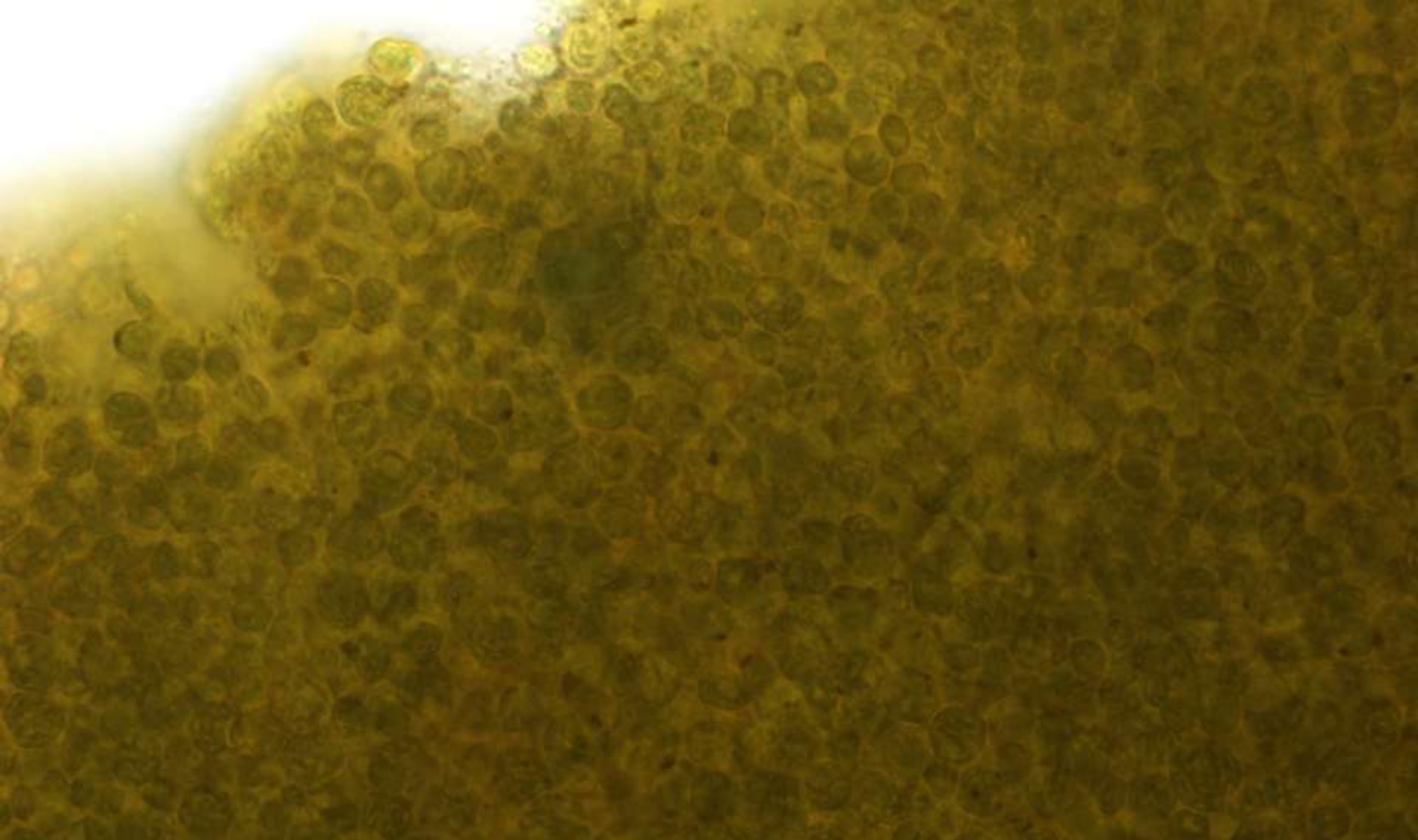
Sinice: Mezi sinicemi převládaly vláknité sinice. Nevice bylo *Planktothrix agardhii* (177300 buněk/ml; 9,5 mm<sup>3</sup>/l). Méně četné byly sinice zřejmě rodu *Gietlerinema* (56450 buněk/ml; 0,9 mm<sup>3</sup>/l), sinice rodu *Anabaena* (*A. flos-aquae*, méně pak *A. compacta*; 54150 buněk/ml, 3,4 mm<sup>3</sup>/l) a *Aphanizomenon gracile* (25700 buněk/ml; 1,2 mm<sup>3</sup>/l). Přítomnost tenkých vláknitých sinic byla poměrně nízká (30500 buněk/ml; 0,3 mm<sup>3</sup>/l).

Stanovení objemové biomasy je nutno považovat za orientační.

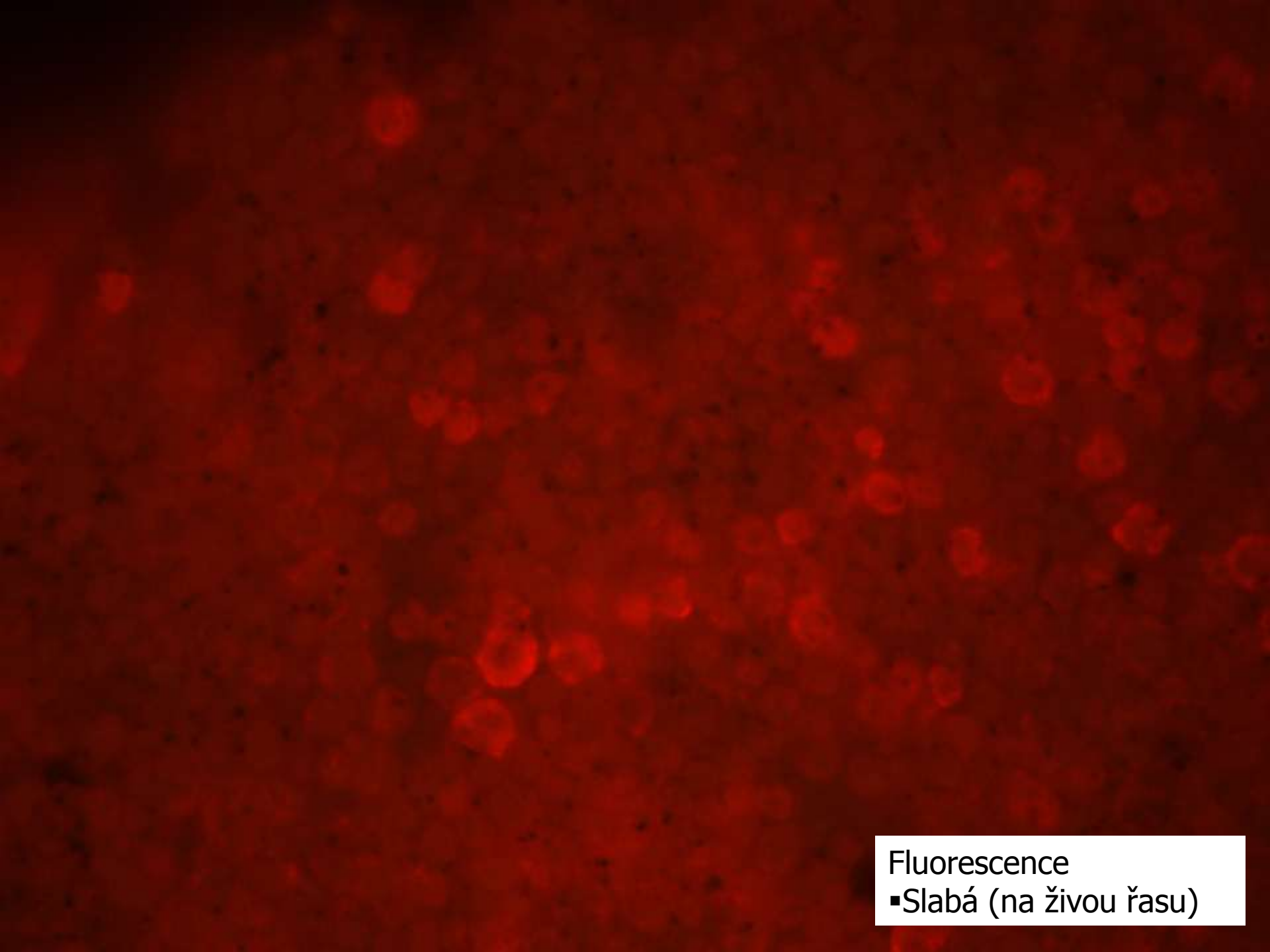
# Příklad „nestandardního“ rozboru

- stížnost „zelená“ balená voda
- mikroskopický nálezn atypický
- pach – seno, hniloba (lehce)

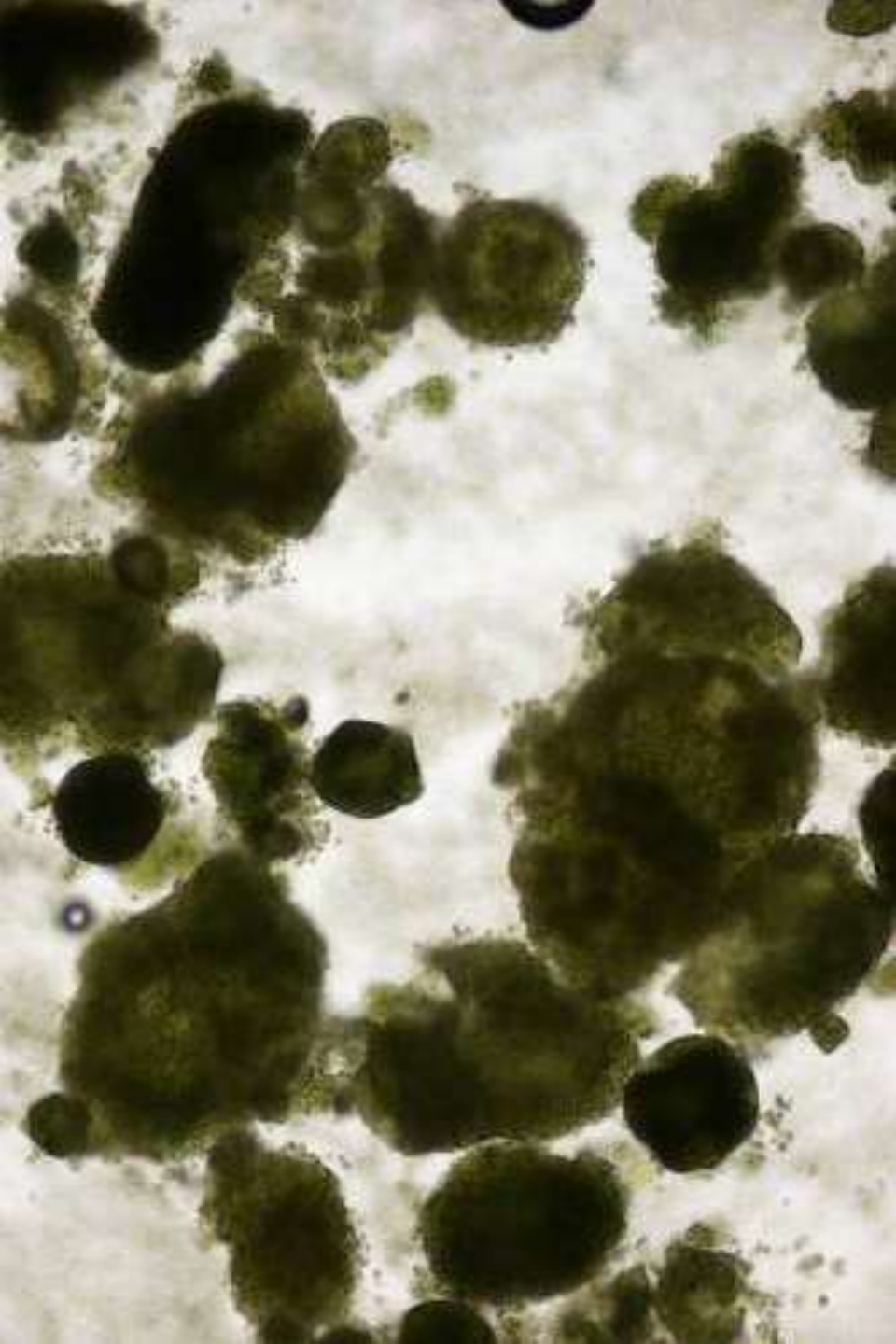
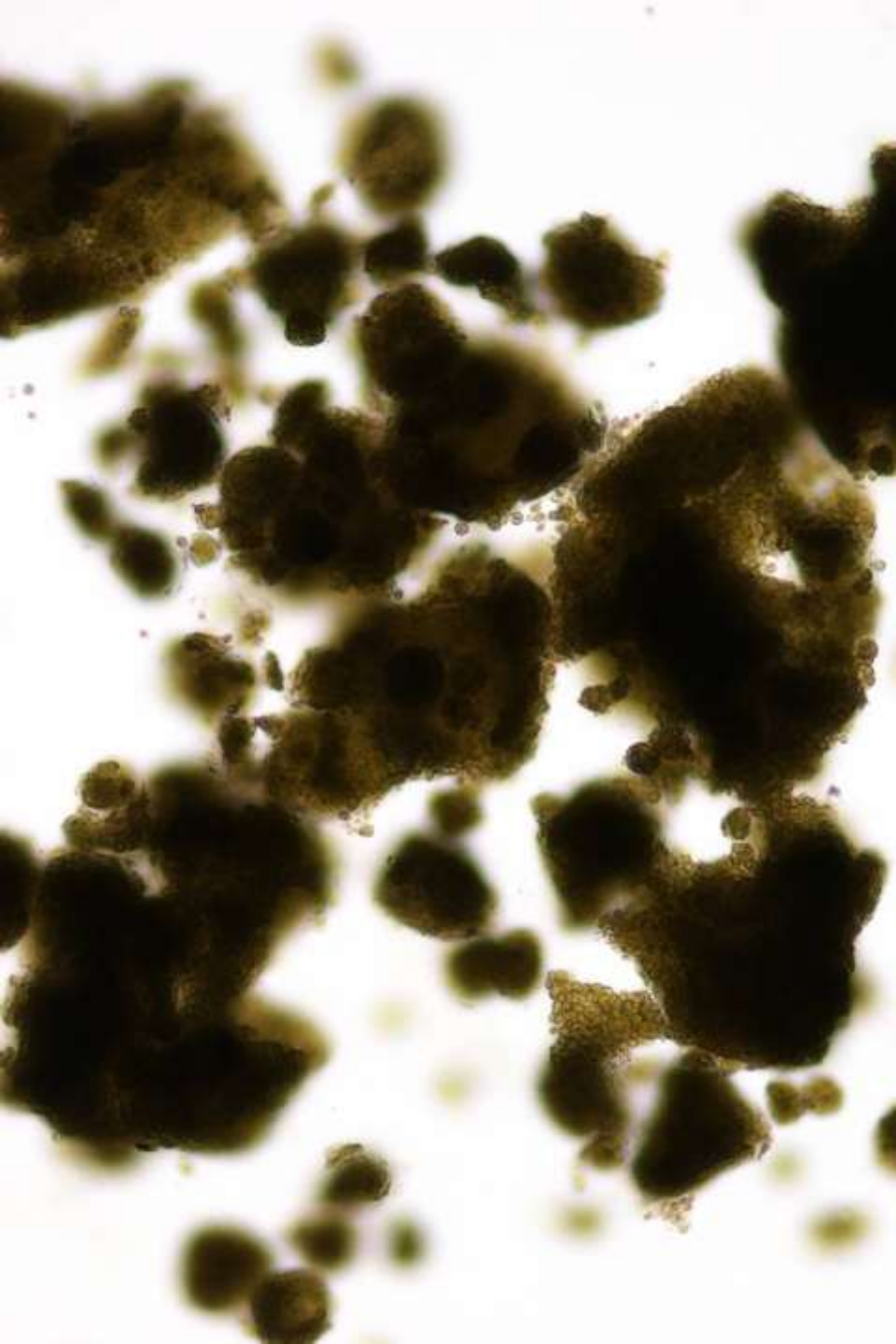




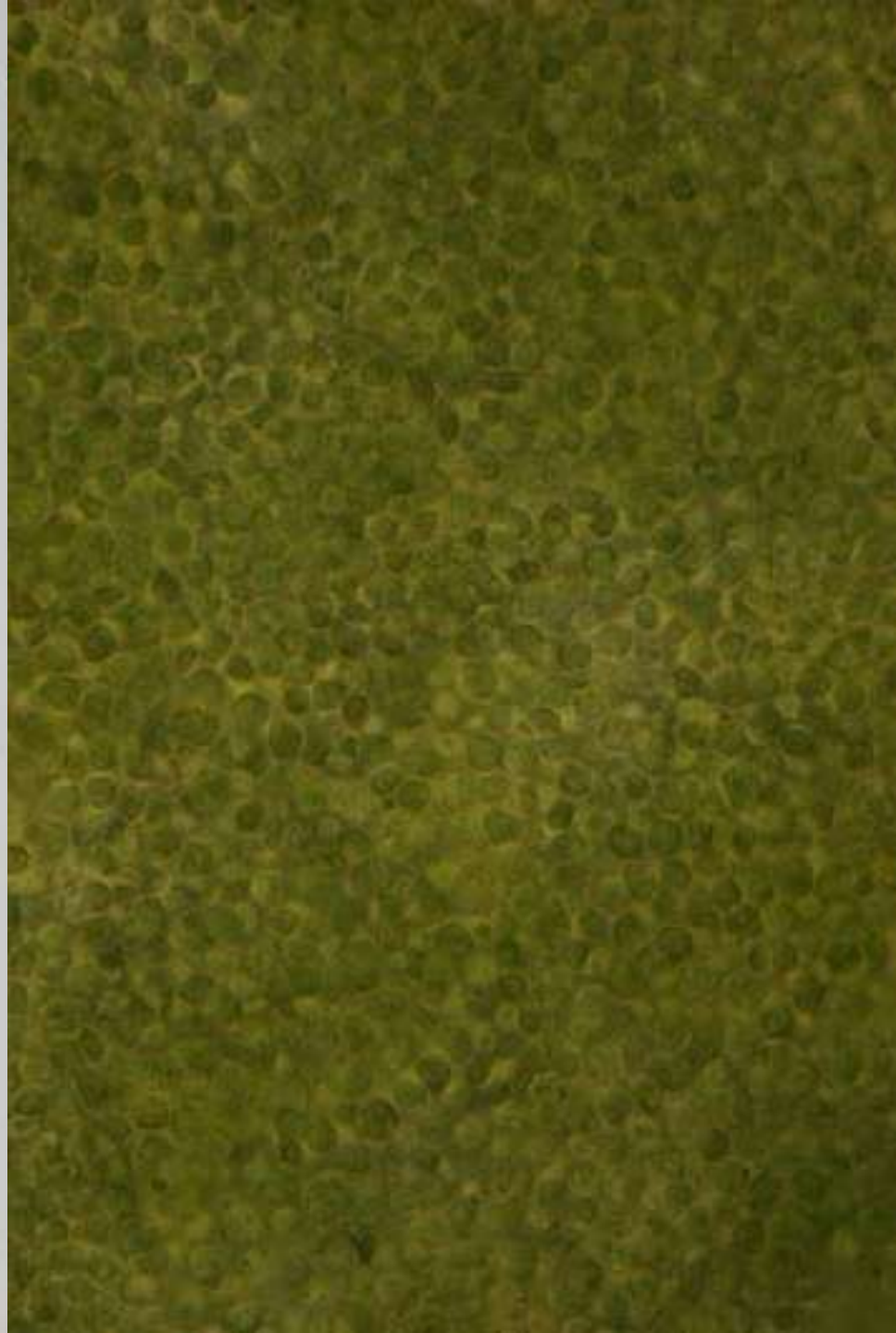
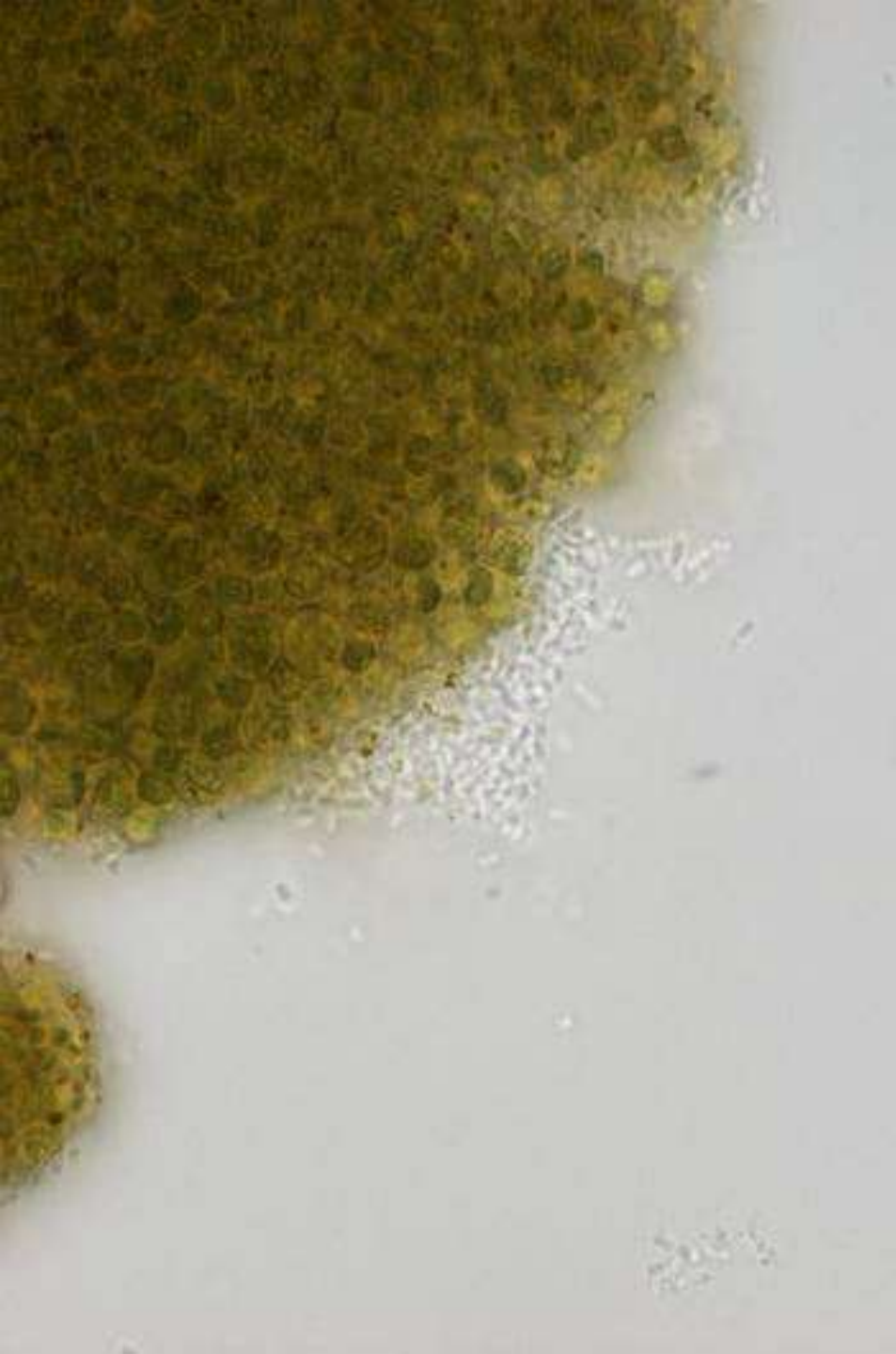
- velmi husté
- jeden druh
- eukaryotní (pravděpodobně zelená řasa)
- kolonie - nepodobá se ničemu známému



Fluorescence  
▪Slabá (na živou řasu)







## VÝSLEDKY LABORATORNÍCH ZKOUŠEK

Název rozboru	Jednotka	Výsledek	Identifikace metody	Pozn.
mikroskopický rozbor		viz. Poznámka	SOP 13/2.1 (ČSN 75 7712)	A

**Poznámka:** Ve vzorku se vyskytovaly kompaktní shluky tvořené jedním druhem zelené kokální řasy, ale poměrně v netypickém stavu. Jednalo se pravděpodobně o řasy rodu *Chlorella* z rozdrcené tablety (viz srovnání v příloze). Ve fluorescenčním mikroskopu v modrém excitačním světle svítily řasy slabě (oranžově) nebo vůbec. V zeleném excitačním světle svítily výrazně červeně, což poukazuje na fakt, že řasy nejsou fyziologicky aktivní. Ve vzorku se vyskytoval také menší počet heterotrofních bakterií, jejichž výskyt však může být až sekundárního původu (pomnožení na biomase řasy po přidání tablety). Vzorek měl pro tablety chlorelly typický pach (připomíná seno).

# Schopnost interpretovat nález

Ale to je důležité nejen v biologii

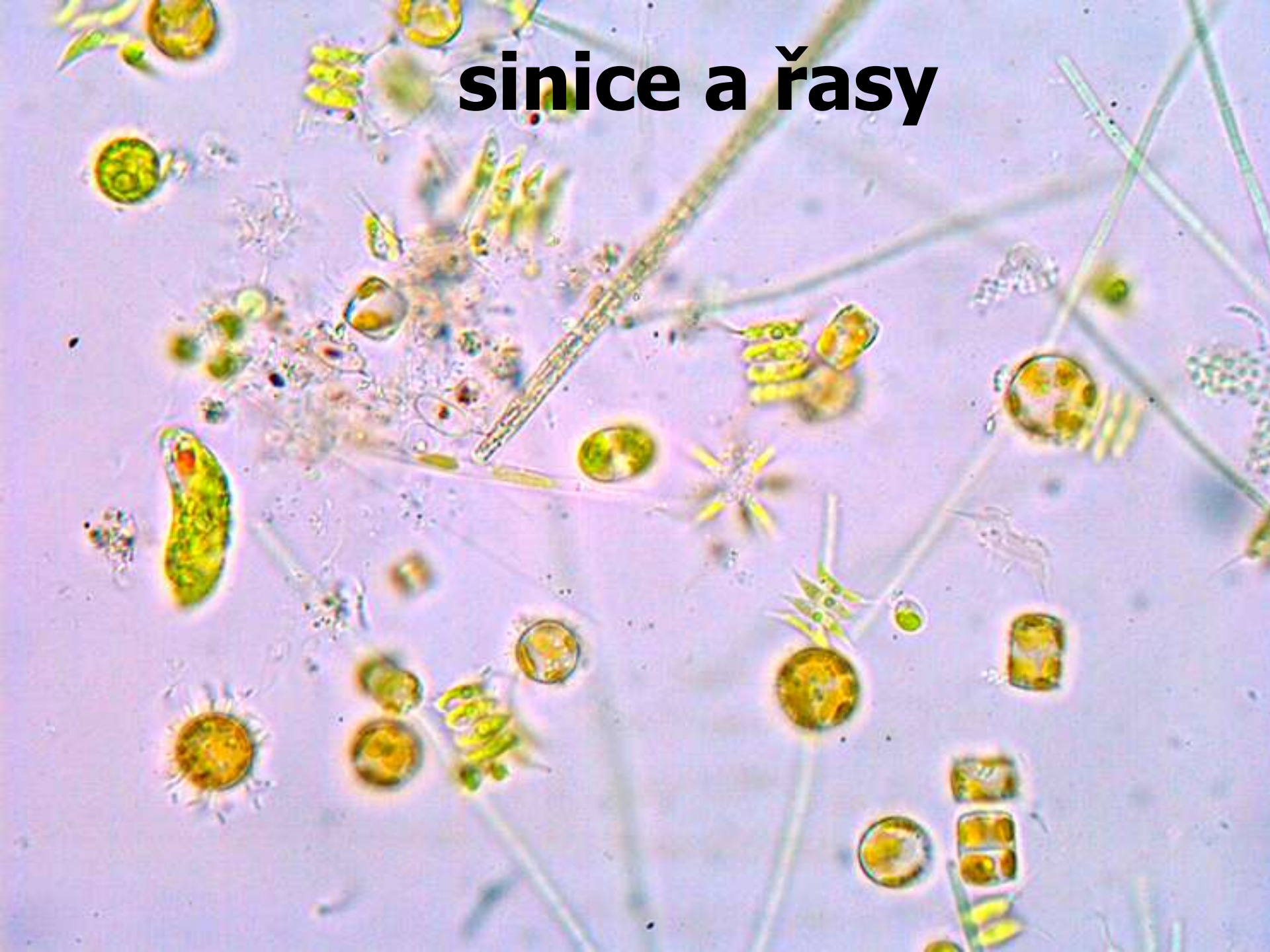
# Co by měl pracovník provádějící mikroskopické rozbory vody znát

- metodické postupy včetně toho, jak správně mikroskopovat
- mikroskopické organismy a další ve vodě se běžně vyskytující objekty
- chování jednotlivých vyšetřovaných systémů (pro správnou interpretaci nálezu), včetně základních informací o ekologii vodních organismů

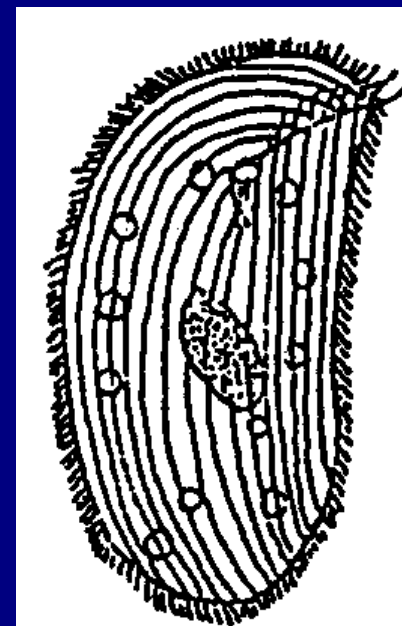
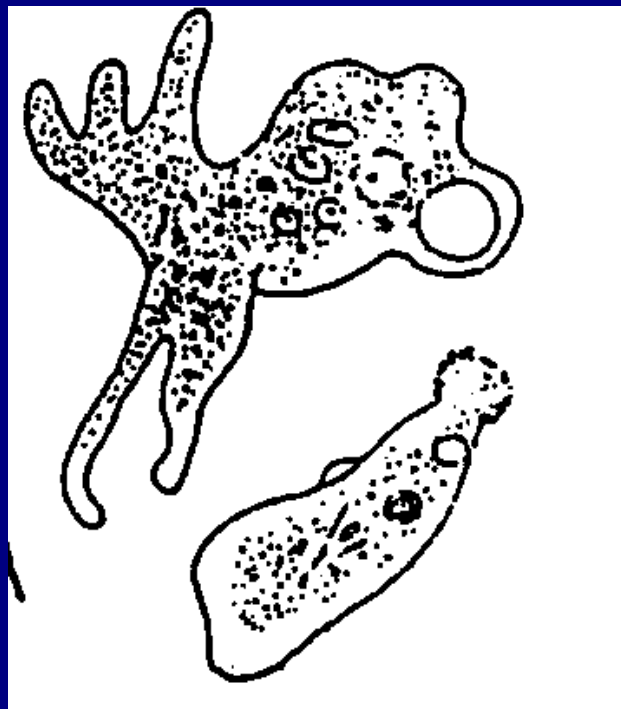
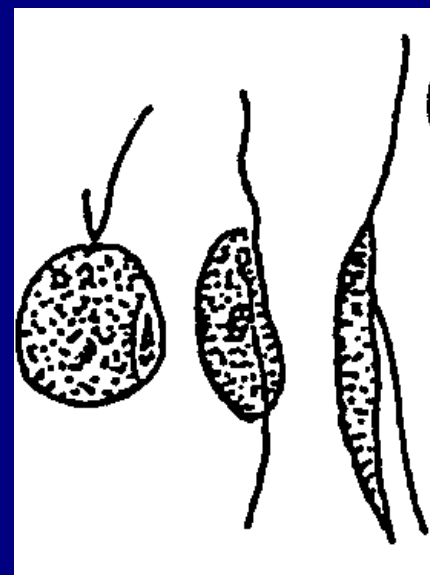
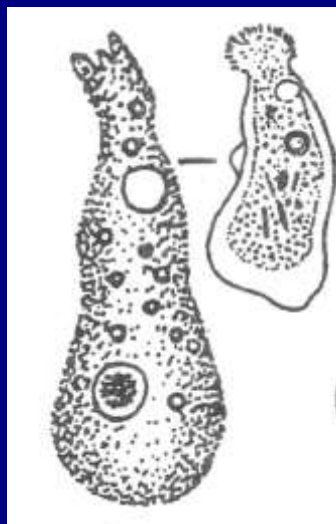
# Co se nachází při mikroskopickém rozboru vody?

- sinice a řasy
- prvoci (bezbarví bičíkovci, nálevníci)
- bakterie – jen omezeně – většinou jsou příliš malé
- vířníci a korýši (buchanky, vznášivky, peroločky) – jen ojedinělé nálezy (při standardním objemu vzorku)
- abioseston – neživé částice

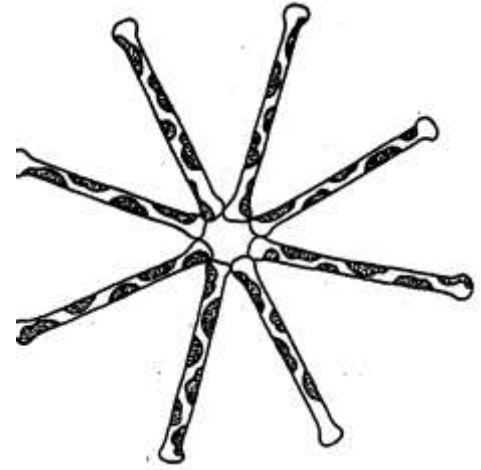
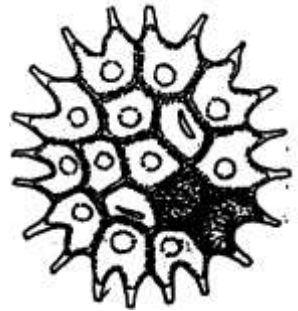
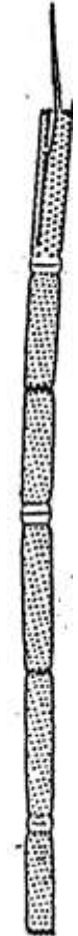
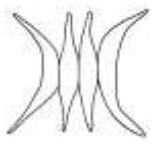
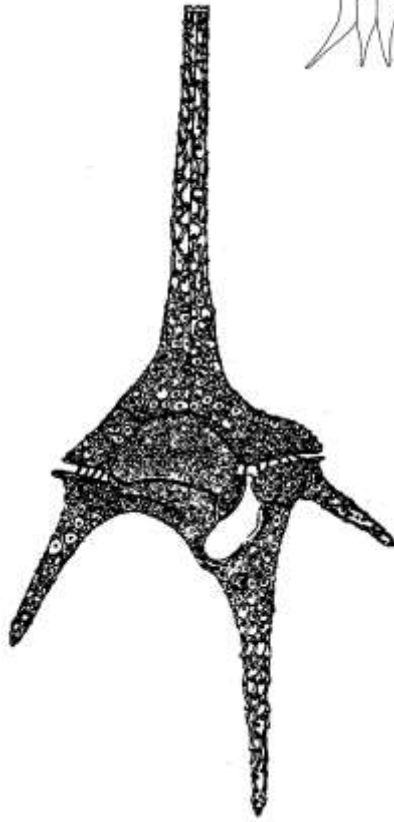
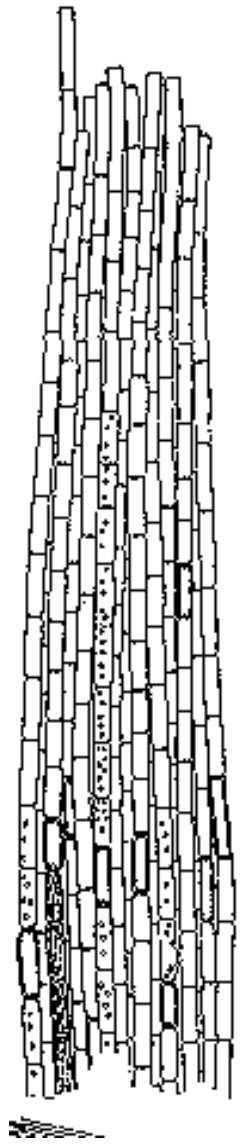
# sinice a řasy



# prvoci



100  $\mu$ m





# Důležité

- naučit se určovat chvíli trvá
- rozhodně ne všechno lze určit, i když to už docela umíte

# Vyhláška č. 252/2004 Sb.

- důležité poznámky k jednotlivým ukazatelům

č.	ukazatel	jednotka	limit	typ limitu	Vysvětlivky
5	mikroskopický obraz – abioseston	%	10	MH	3
6	mikroskopický obraz – počet organismů	jedinci/ml	50	MH	3, 4
7	mikroskopický obraz – živé organismy	jedinci/ml	0	MH	3, 4, 5

3. Nedílnou součástí výsledku zkoušky jsou i další informace získané při mikroskopickém rozboru, které mohou přispět k interpretaci výsledků. Tento slovní popis obsahuje zejména složení přítomného abiosestonu (případně jeho možný původ), bližší zařazení přítomných organismů a jejich možný původ (surová voda, pomnožení v síti), jejich příslušnost k obtížně odstranitelným skupinám apod. V případě výskytu živých organismů u vod zabezpečených dezinfekcí je vždy nutné udat, o jaké organismy se jednalo. U podzemních vod se zaznamenává především přítomnost organismů vázaných na povrchové vody a organismů indikujících zhoršenou jakost vody. Podzemní voda s výskytem organismů vázaných na povrchové vody musí být považována za vodu podzemní ovlivněnou vodou povrchovou (viz vysvětlivka 1).

4. Organismy zahrnované pod tento ukazatel se pro účely vyhlášky rozumí sinice a všechny eukaryontní organismy (řasy, prvoci, mikromycéty, vířníci, hlístice apod.). Mikroskopický nálezný masového výskytu organotrofních bakterií (více než 100 bakterií/ml) je třeba posuzovat jako překročení MH ukazatelů č. 6 příp. č. 7.

5. Mezní hodnota platí pouze u vod zabezpečených dezinfekcí. Živé organismy obsahující chlorofyl se odliší pomocí autofluorescence chlorofylu. Ostatní, pokud je to možné, podle dalších znaků (například pohyb, stav protoplastu).

# Microcystin-LR

## **z vyhlášky č. 252/2004 Sb. (v platném znění)**

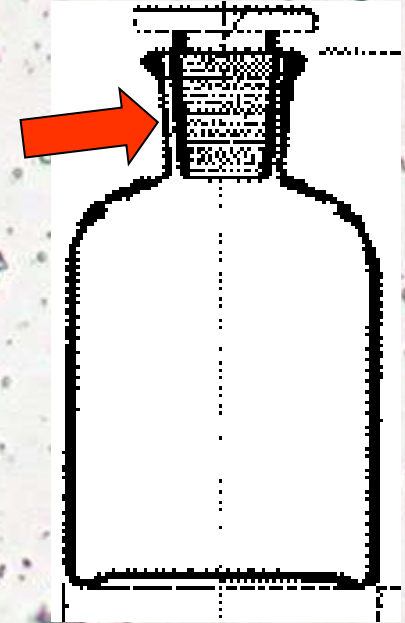
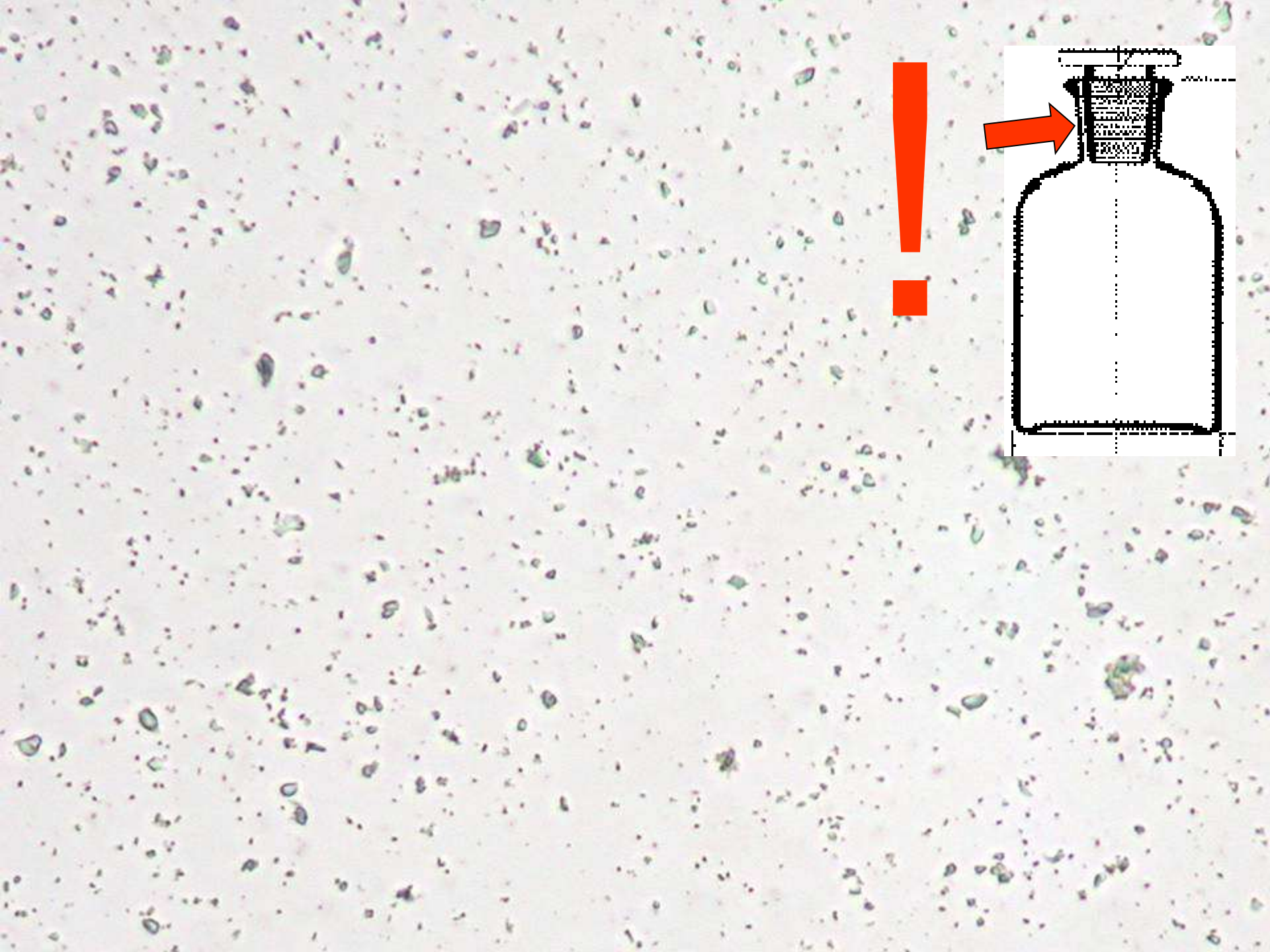
*„Stanovuje se u pitné vody upravené z povrchové vody v období, kdy lze očekávat zvýšený výskyt sinic. Četnost stanovení může orgán ochrany veřejného zdraví omezit nebo od stanovení tohoto ukazatele zcela upustit tam, kde osoba podle § 3 odst. 2 zákona<sup>3</sup> do provozního řádu podle § 4 odst. 3 zákona uvede vhodný postup zaručující, že možný výskyt cyanotoxinů v pitné vodě bude podchycen a následně budou činěna včasná a účinná opatření, která zabrání ohrožení veřejného zdraví. Za vhodný postup k podchycení cyanotoxinů se považuje např. sledování sinic ve vodárenském zdroji pomocí vhodných metod, použití vhodného biotestu ke zjištění, zda přítomné sinice obsahují cyanotoxiny, případně stanovení toxinů přímo v biomase sinic nebo v surové vodě. Za účinná opatření se považují např. změna odběrového horizontu s nižší koncentrací sinic, použití vodárenské technologie prokazatelně vedoucí k odstranění cyanotoxinů z upravované vody nebo dočasné odstavení vodárenského zdroje.“*

# Metodické normy

- ČSN 75 7712 – Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení biosestonu (2005)
- ČSN 75 7713 – Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení abiosestonu (1998)

# Odběr

- „odběrové normy“ normy řady ČSN (EN) ISO 5667
- vzorkovnice plnit cca do 4/5 objemu
- u dezinfikovaných pitných vod je nutné neutralizovat účinky dezinfekce thiosíranem sodným stejným způsobem jako u vzorků pro mikrobiologický rozbor
  - na každých 100 ml jejího objemu 0,1 ml 1,8 % (m/m) roztoku pentahydrátu thiosíranu sodného
- pozor na vzorkovnice se zábrusem
  - možnost uvolňování drobných skleněných střípků





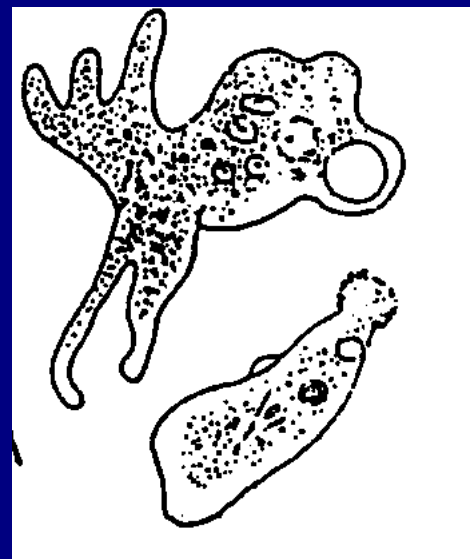


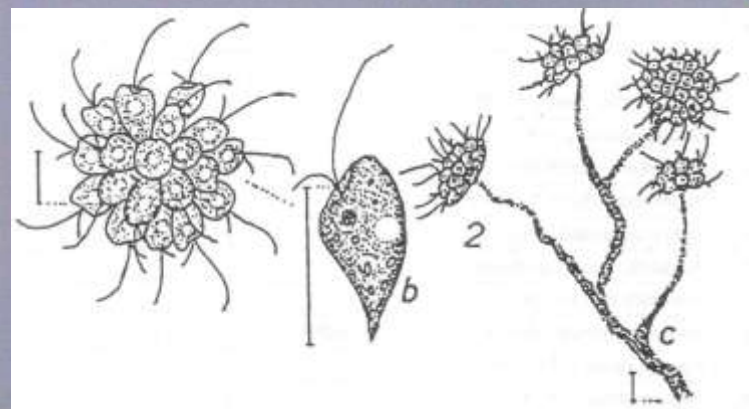
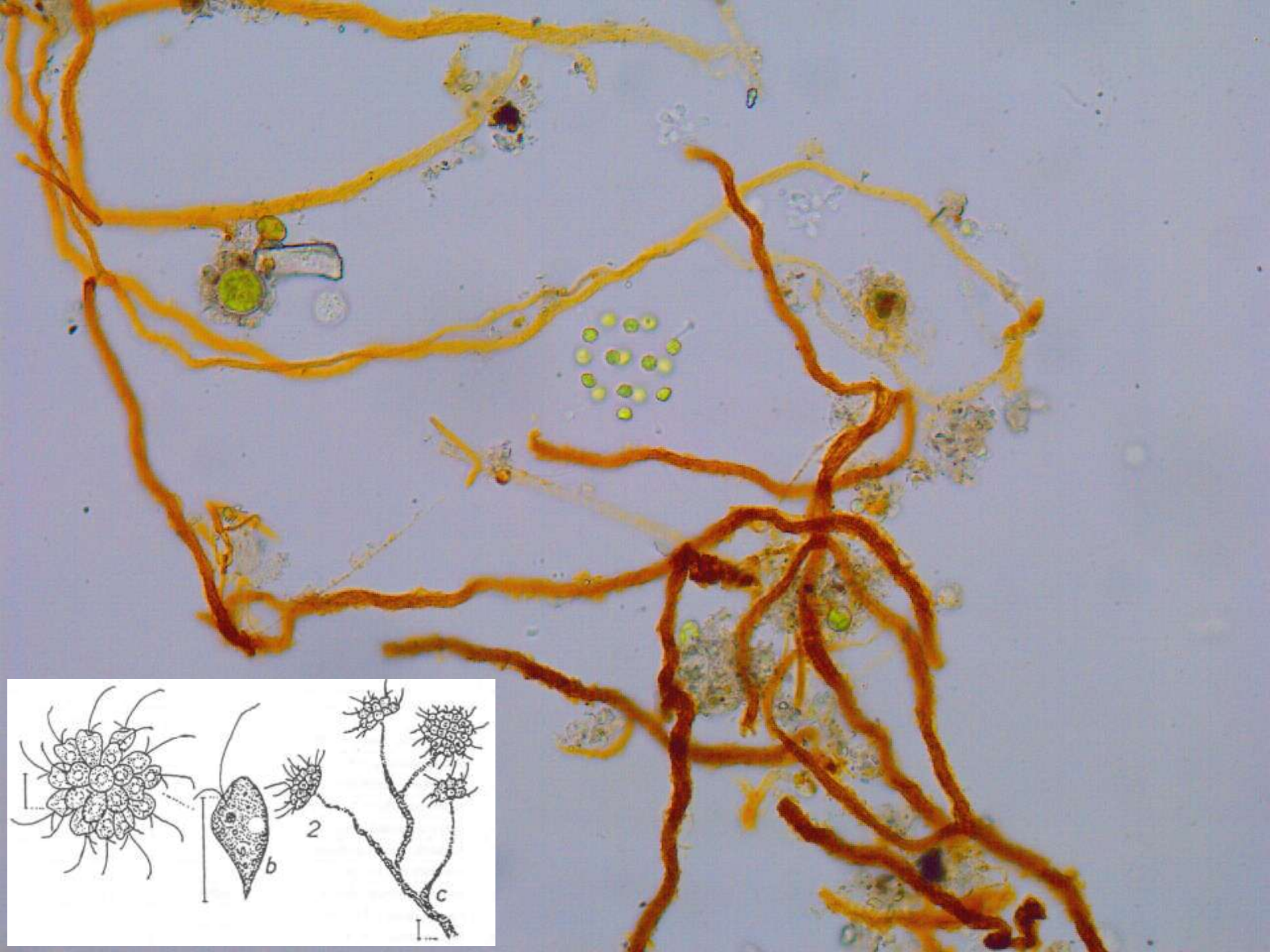
# Transport vzorků

- zpracování do 24 hodin
- předepsáno ČSN 75 7712
  - teplota: 2 – 5°C
  - tma

# Staré vzorky

- změna kvantity i druhového složení
- pomnožení některých organismů (např. *Anthophysa vegetans*, bezbarví bičíkovci, měňavky)



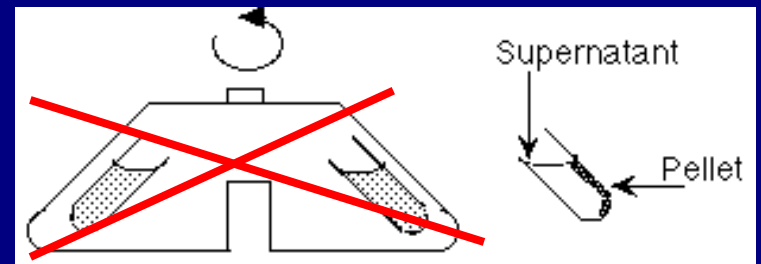
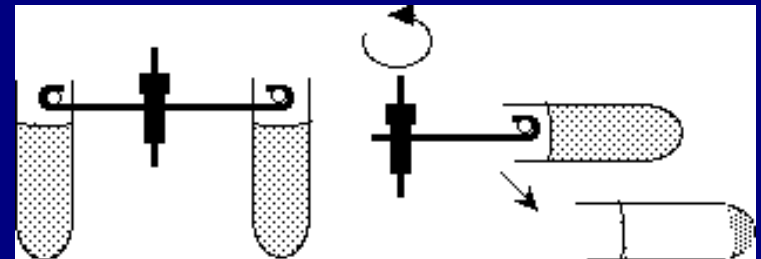




# Zahuštění – odstředění, centrifugace

# Pomůcky - odstředivka

- odstředivka s výkyvným rotorem
- úhlový rotor nepřípustný
- kontrola otáček

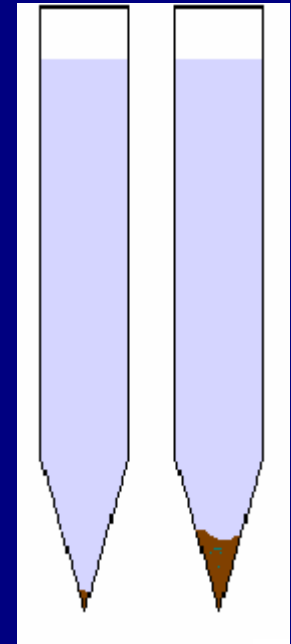


# Parametry odstředování

- 2000 otáček za minutu po dobu 5 min.
  - bez uvedení poloměru rotoru je údaj, který necharakterizuje přesně podmínky odstředování
  - přejata informativní příloha, ve které je uveden přepoččet otáček v závislosti na poloměru rotoru

# Pomůcky - zkumavky

- kalibrace na 10 ml; 1 ml; 0,5 ml; 0,2 ml
- ověření kalibrace osobou, která bude provádět zahušťování
- z 10 ml na ?
  - pitná voda 0,2 ml
  - povrchová podle množství přítomných organismů





# Problémy při centrifugaci

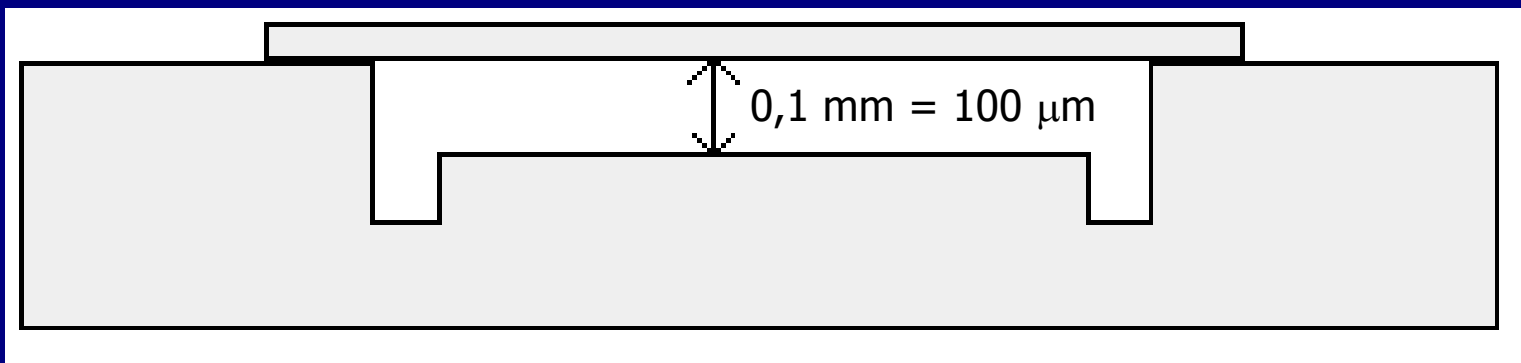
- ztráty
- chyby při odměřování objemu

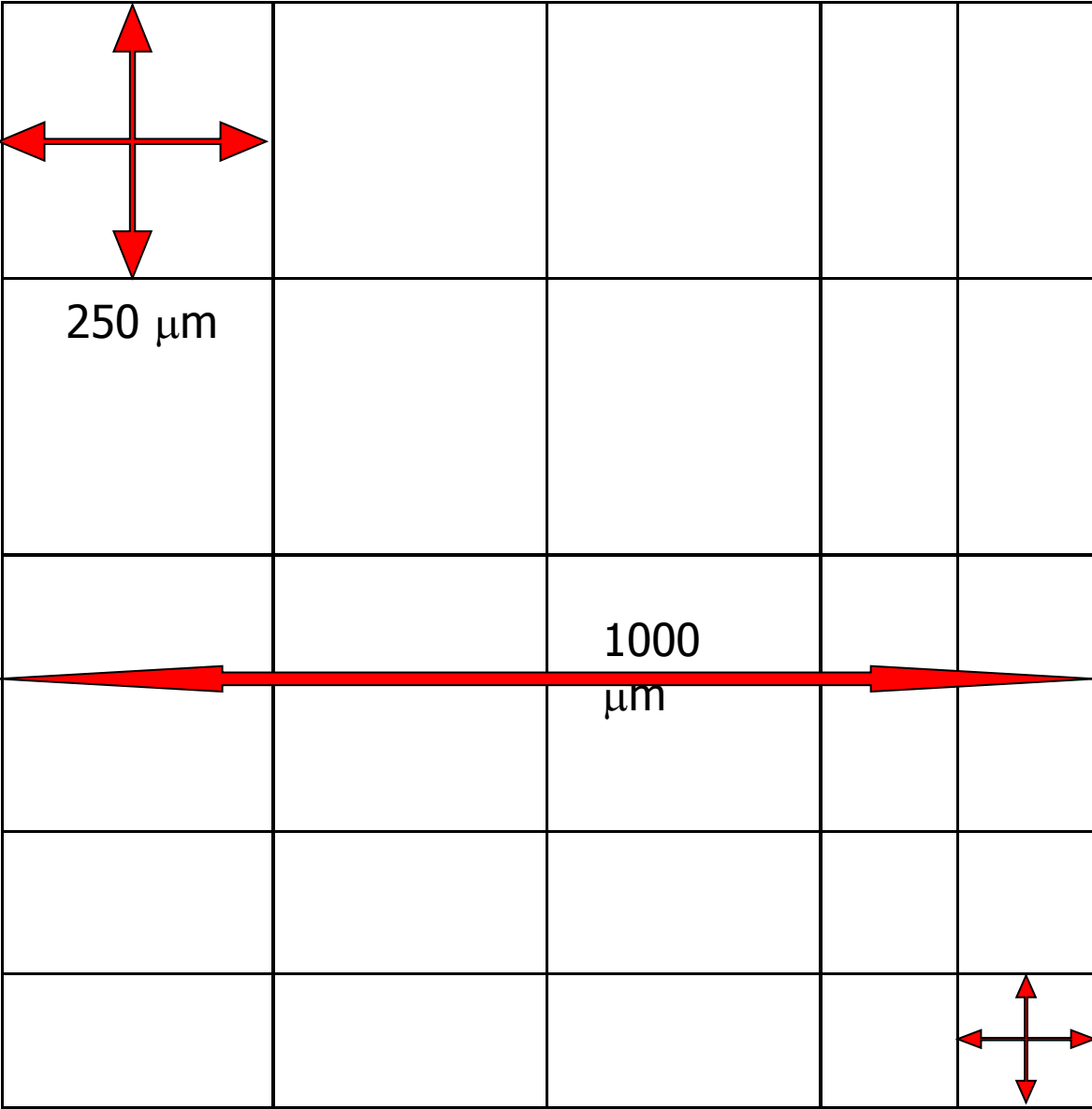


*Důsledek – pokud se zahušťuje, budou výsledky méně přesné a v některých případech podhodnocené*

# Počítací komůrka Cyrus I

- plocha 1 cm<sup>2</sup>
- 40 x 40 pásů

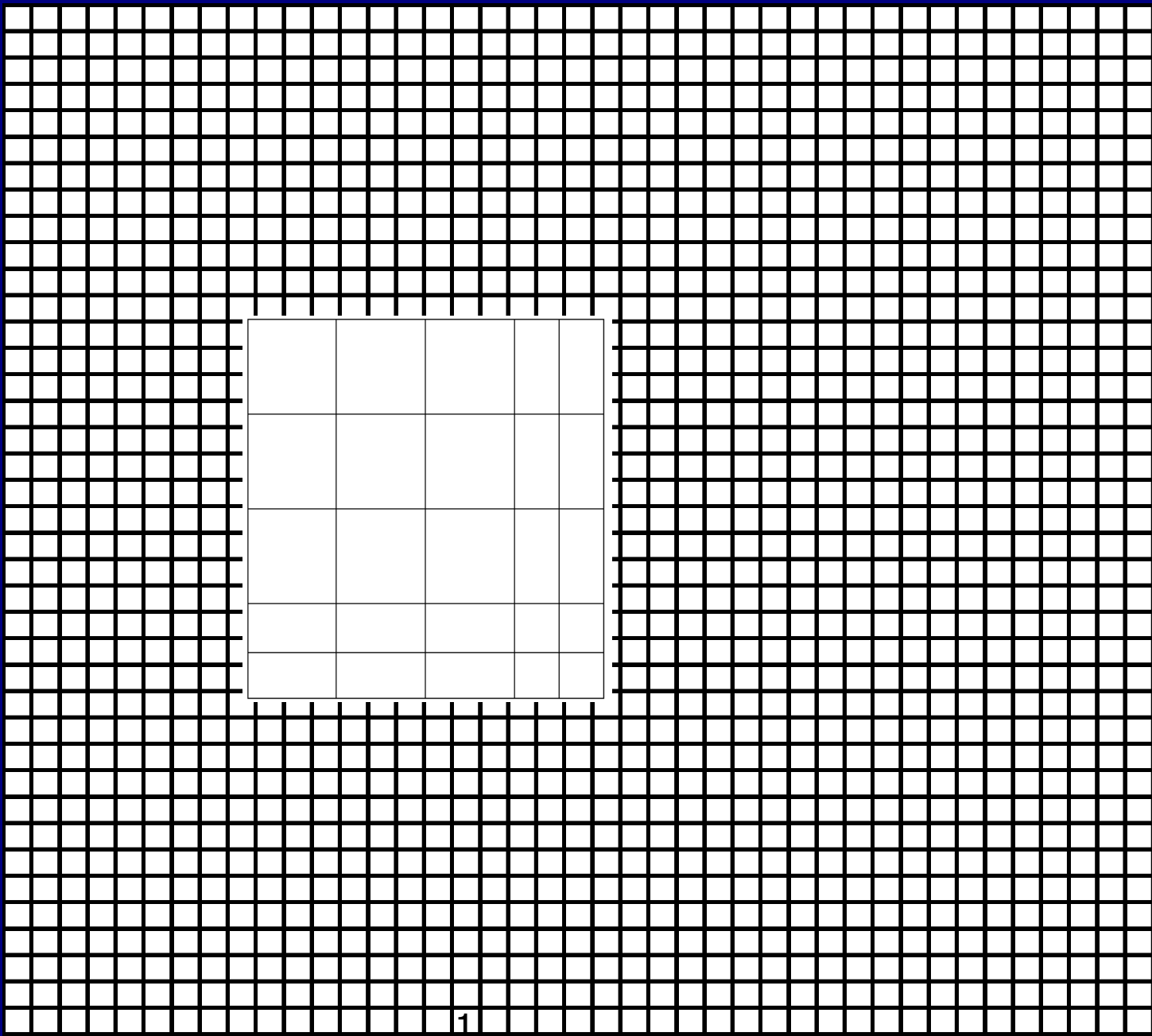


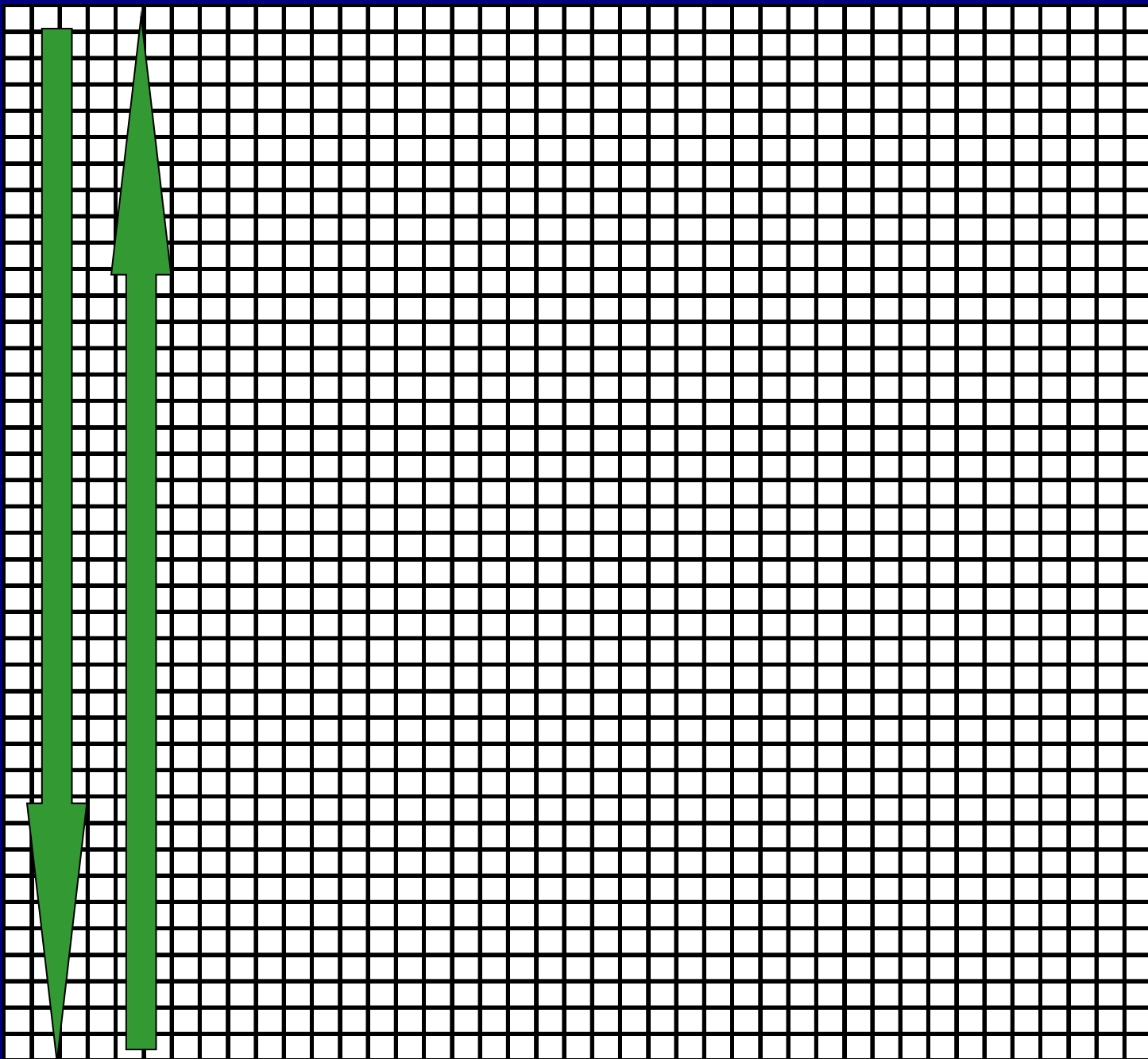


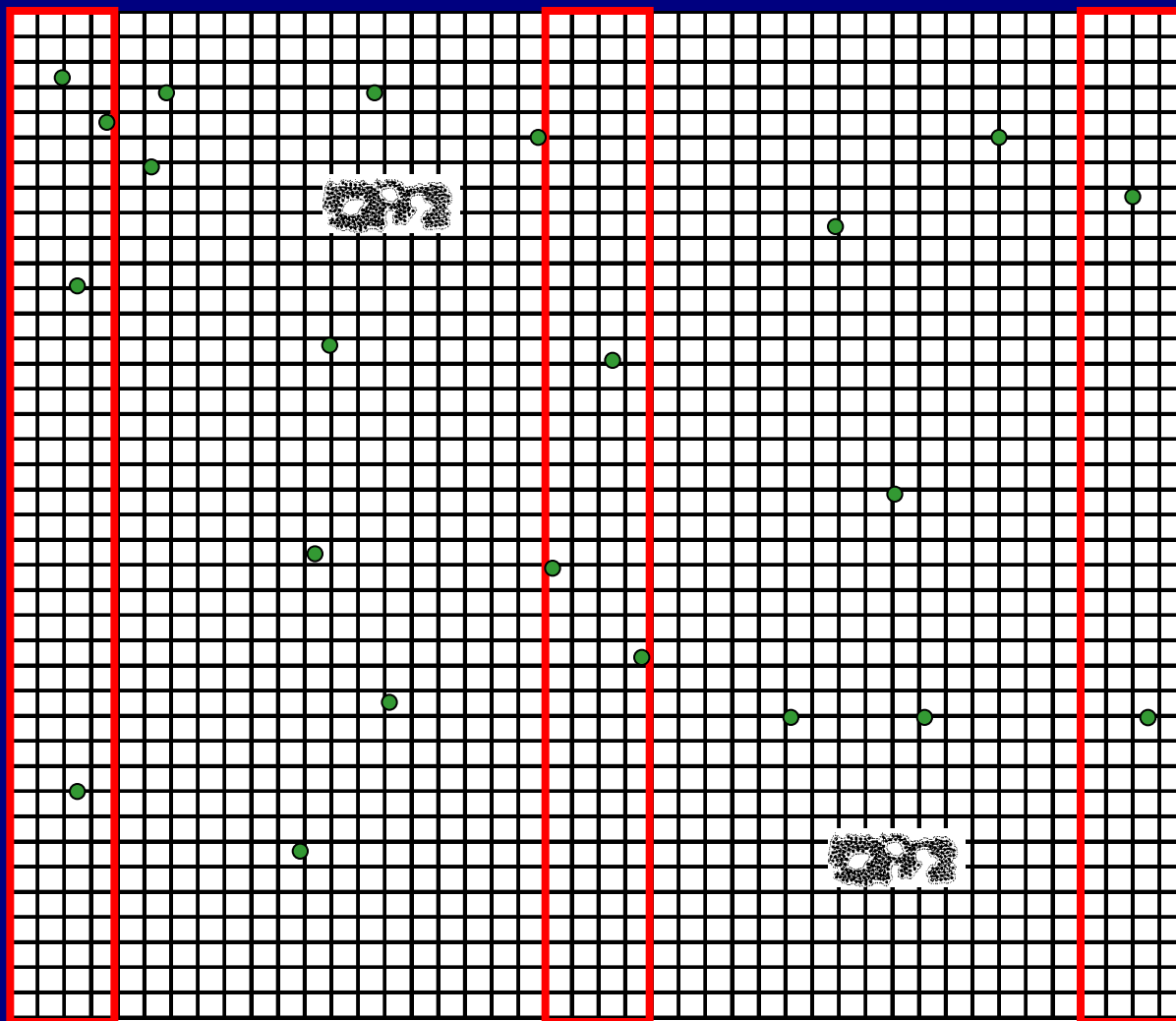
250 μm

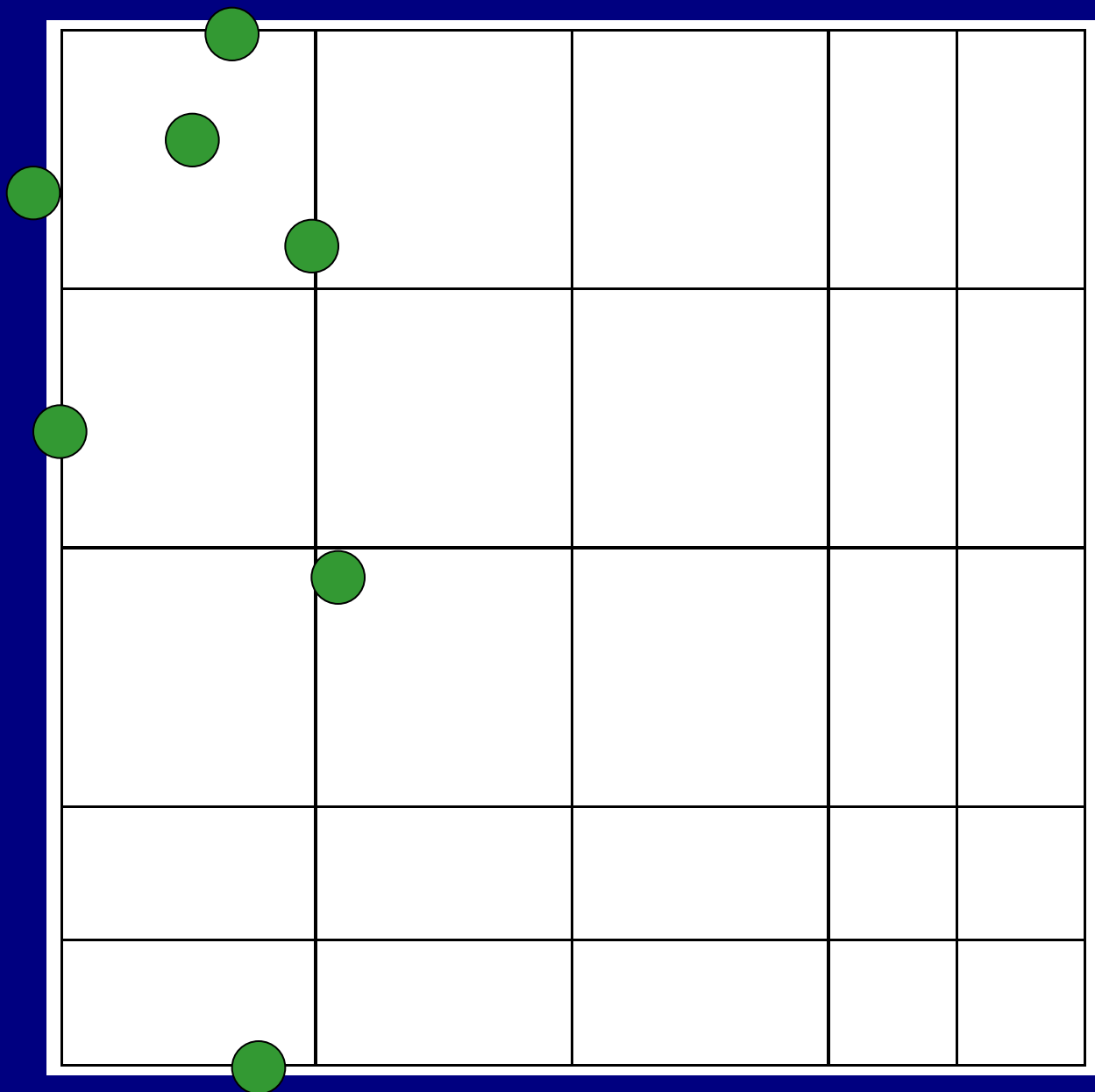
1000  
μm

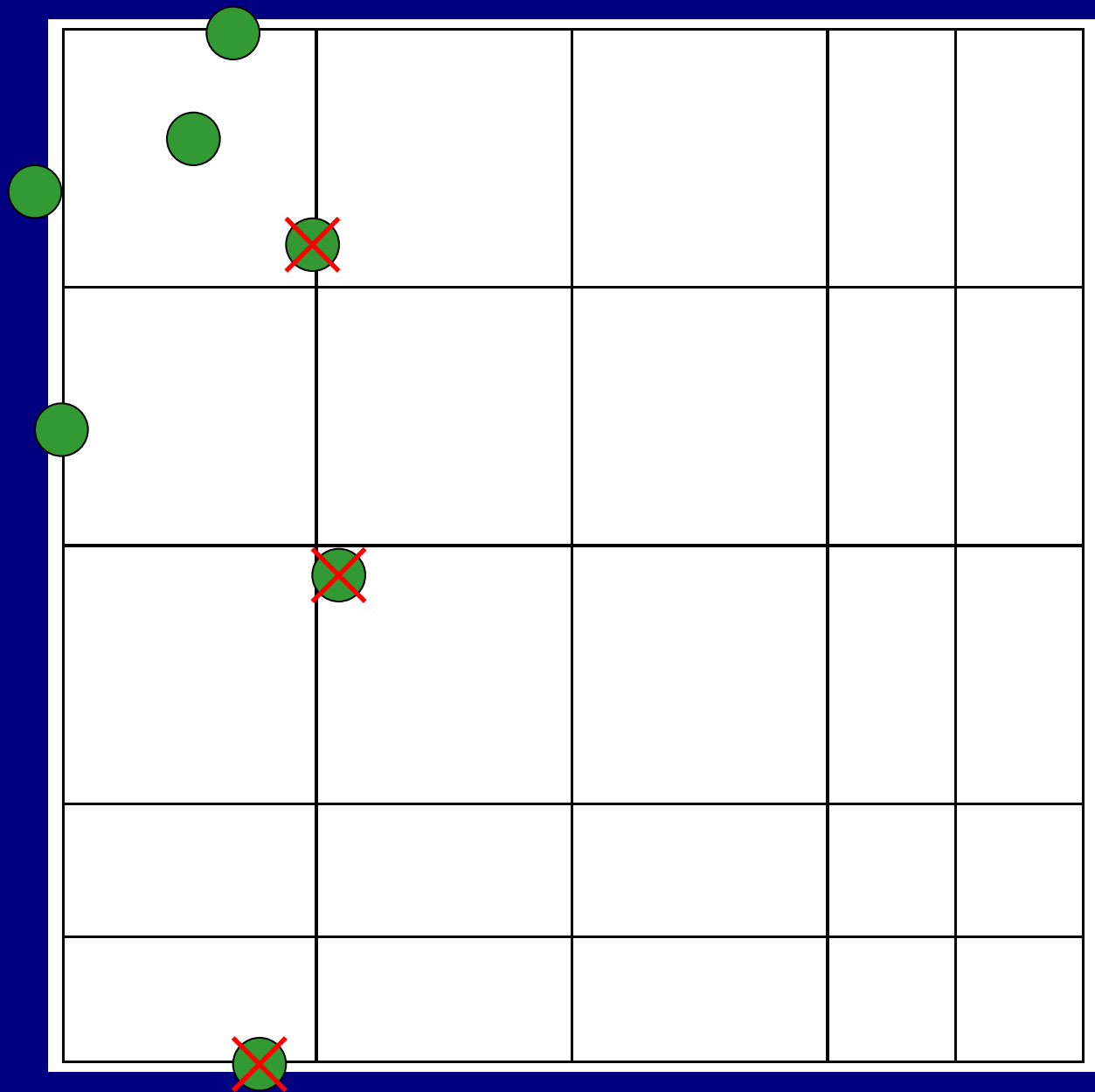
125  
μm















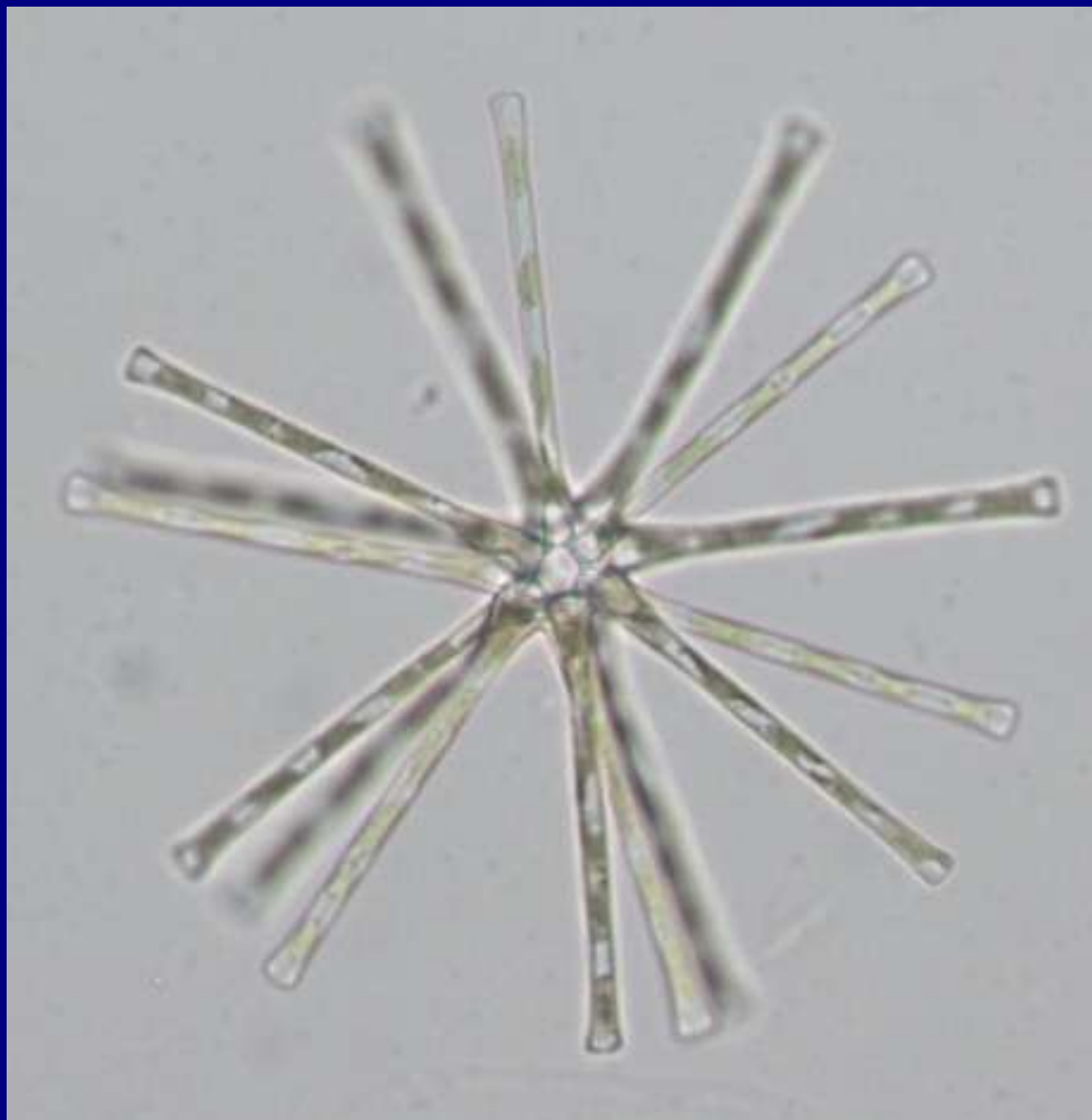
# Jednotky pro vyjádření výsledků

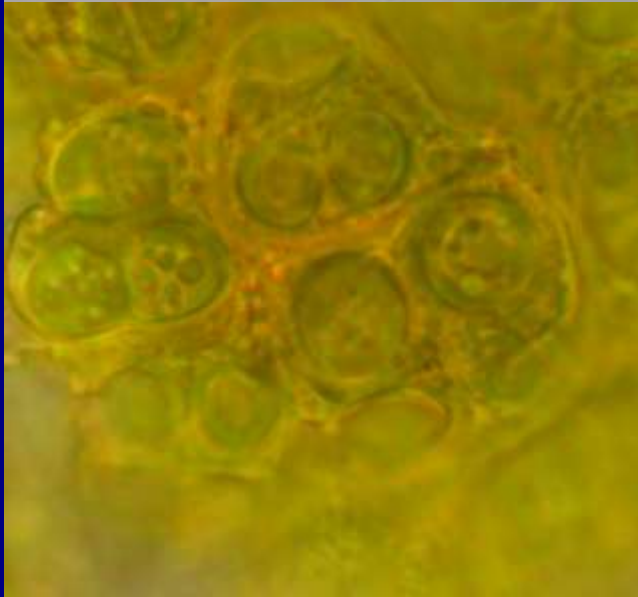
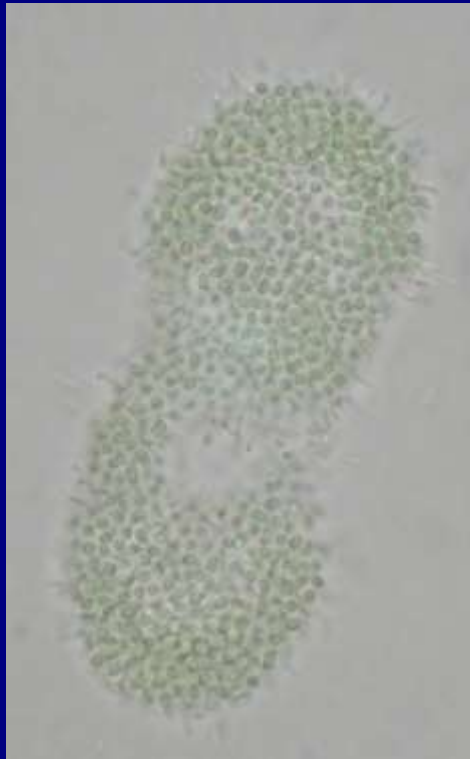
- posun od „protěžování“ jedinců k rovnoprávnosti vyjadřování výsledků v jedincích či buňkách v závislosti na účelu rozboru
  - jedinci – rychlé, v některých případech je však obtížné interpretovat výsledek
  - buňky - především u řas a sinic, ale u některých organismů (např. velké kolonie) je nelze spočítat

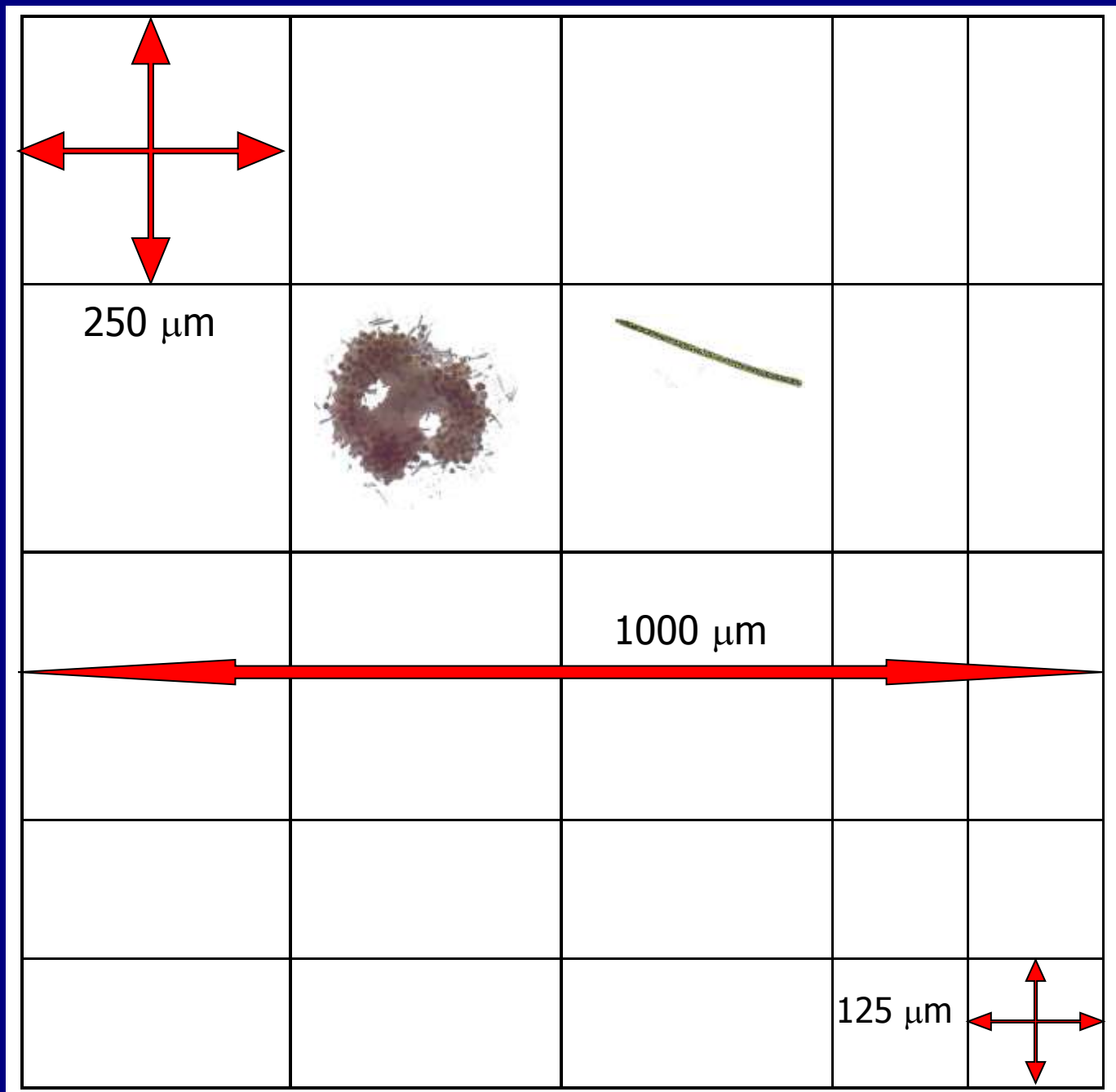
# Termín jedinec (organismus)

- *Za jedince se považuje samostatná buňka (nezáleží na její velikosti), dále cenobium nebo kolonie do velikosti 100 $\mu$ m a vlákna do délky 100 $\mu$ m. Cenobia, kolonie a vlákna překračující uvedené rozměry se vyjadřují jako jejich násobky. U koloniálních nálevníků, vířníků a drobných mnohobuněčných živočichů se počítá každý jedinec zvlášť.*









1 nebo 3?



1, 2 nebo 3?



1 nebo 8?



1 nebo 2?





# Důležitá informace o jedincích

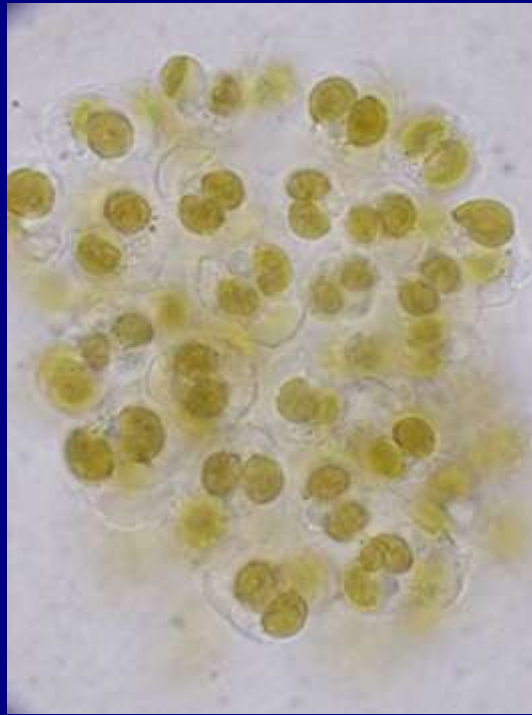
- moc si s tím nelámat hlavu, tak nanejvýš v okružních rozborech

# Zahuštění na různé objemy podle oživení vzorku

- původní normy umožňovaly zahušťovat pouze na 0,2 ml
- revidovaná norma – podle oživení vzorku zahušťovat lze v rozmezí 0,1 – 1 ml
- nezahušťovat vzorky od počtů 50 000 jedinců/ml a více (původně od 10 000 jedinců/ml)

# Fixace Lugolovým roztokem podle Utermöhla

- povinnost zpracovávat část vzorku po fixaci Lugolovým roztokem podle Utermöhla
  - při výskytu organismů, které špatně sedimentují (typicky sinice vodních květů)
  - při výskytu většího množství organismů, které snadno podléhají destrukci



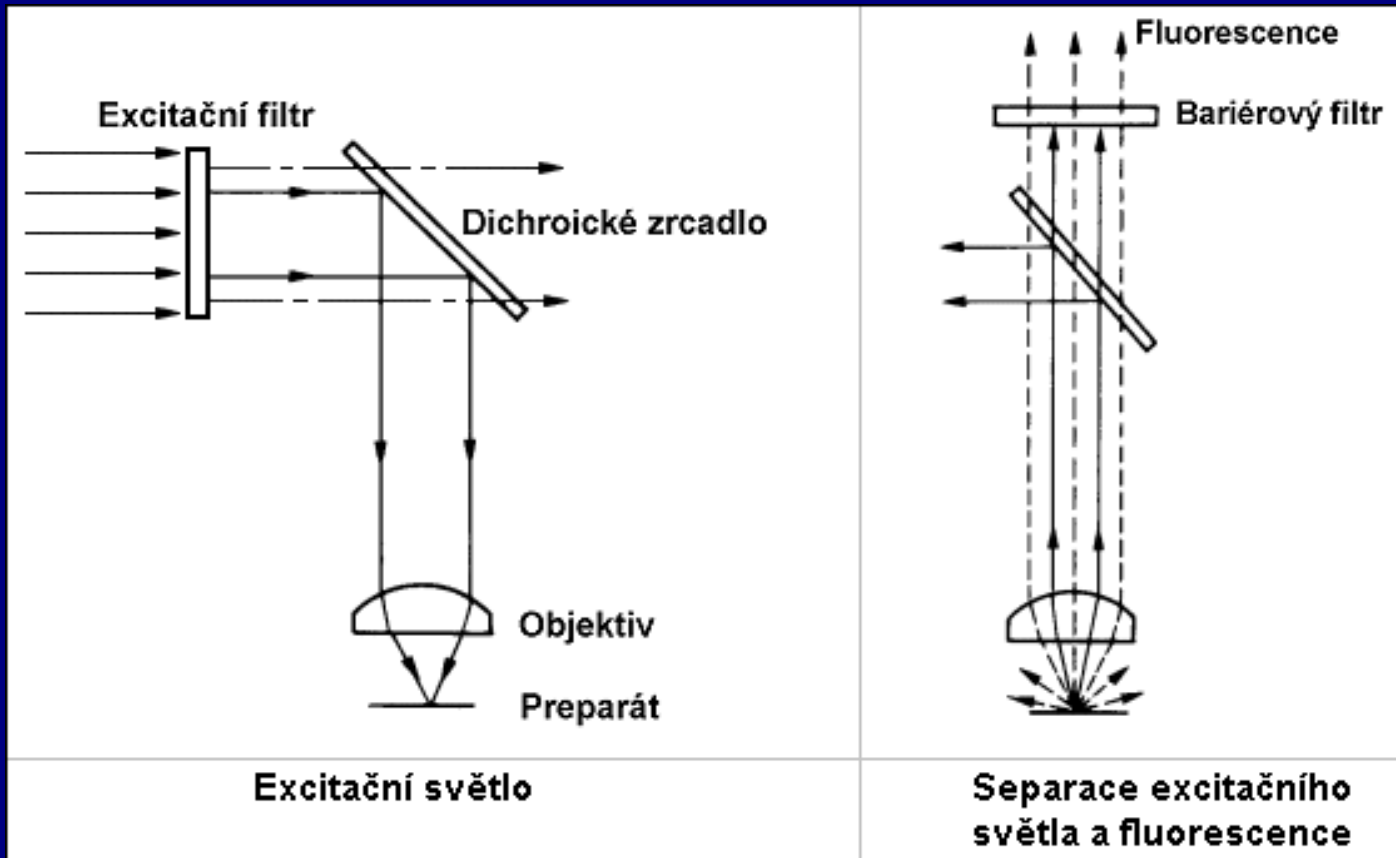
# Rozměry objektů

- hrubé odhady
  - podle velikosti zorného pole
  - podle mřížky počítačí komůrky
- měření (nutnost kalibrace)
  - mikrometr
  - analýza obrazu

# Rozlišení biologického stavu (tj. odlišení živých organismů)

- pro organismy s chlorofylem využita autofluorescence chlorofylu
- postup i pro organismy neobsahující chlorofyl (pohyb, stav protoplastu)

# Fluorescenční mikroskop

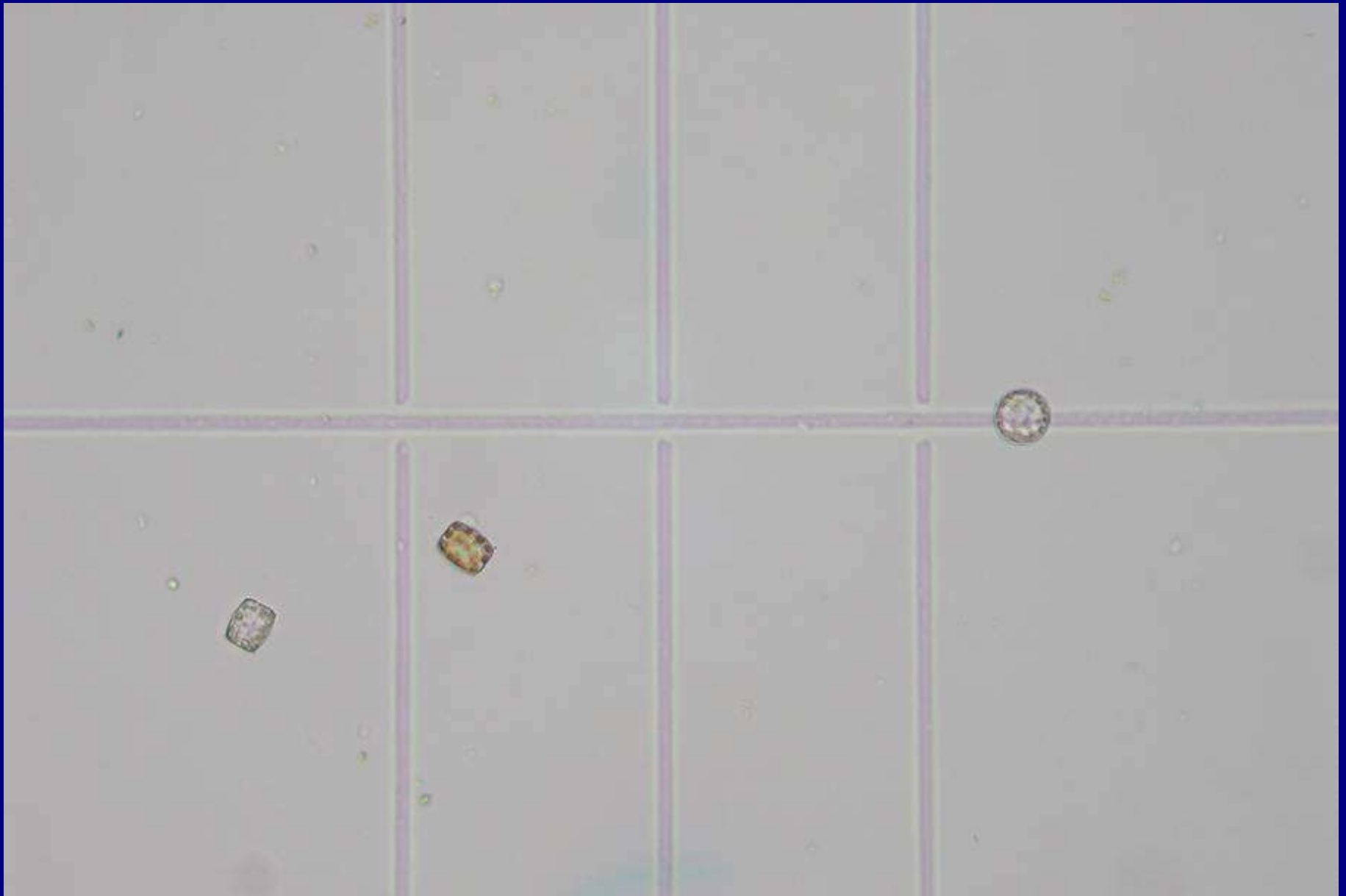


# *Nitzschia* živá x mrtvá



















# Využití fluorescence při výskytu velmi drobných organismů

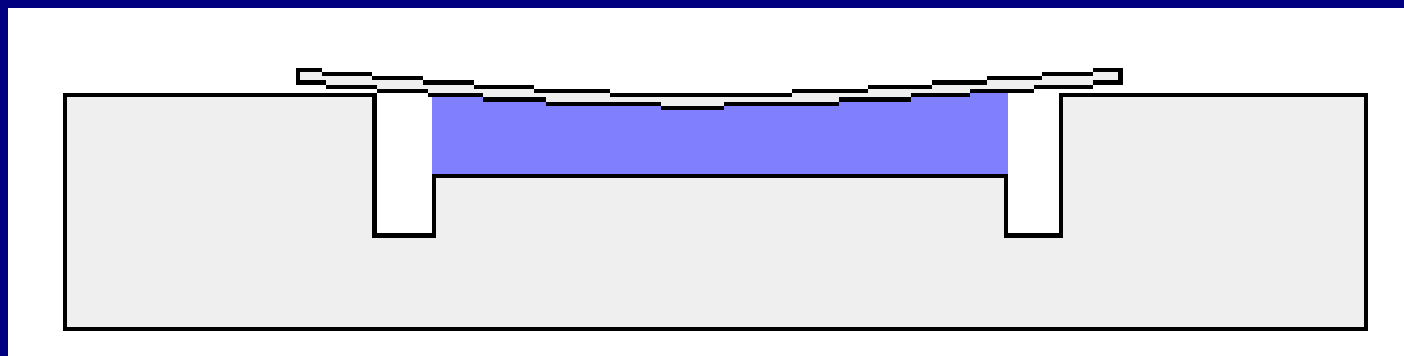
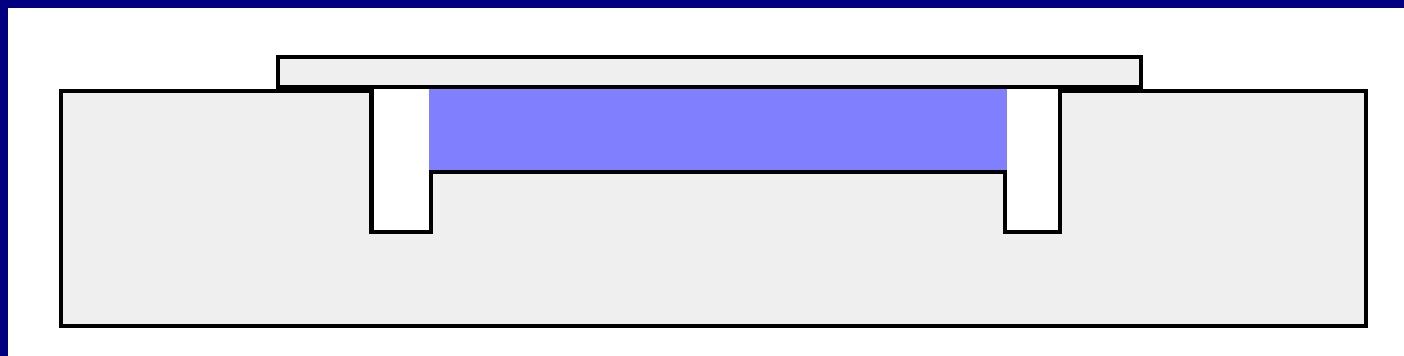
- počítání velmi drobných organismů v počítacích komůrkách Cyrus I, Burker apod. je zatíženo velkou chybou
- usnadnění pomocí fluorescence – i přesto bude stanovení zatíženo velkou chybou





# Omezení – velmi drobné organismy

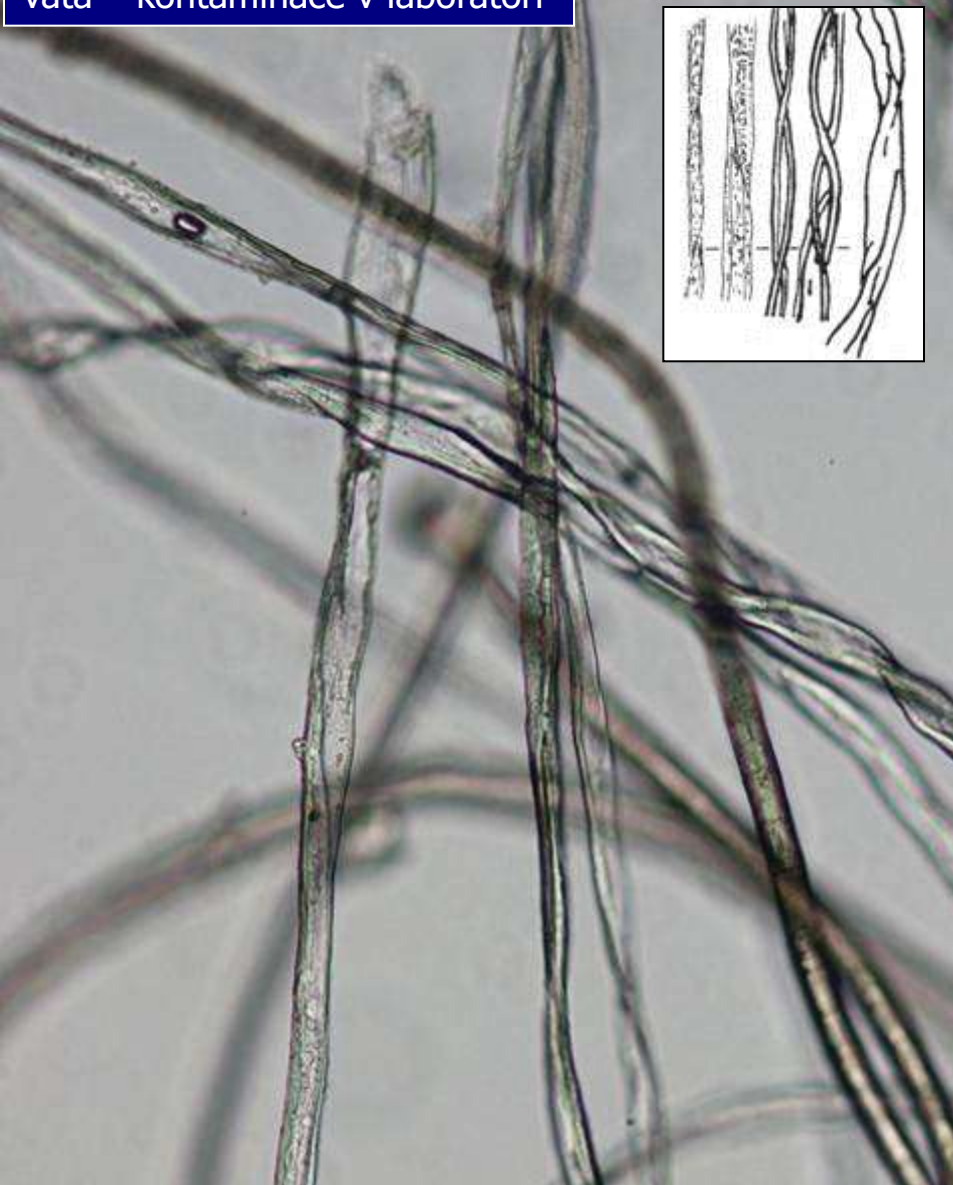
- využít lepších optických vlastností tenkého krycího skla
- není dodržena standardní výška komůrky – stanovení pouze orientační (cca 90% původního objemu)



Kontaminace vzorků – prach v laboratoři



## vata – kontaminace v laboratoři



Vata je slisované vláknenné rouno o hustotě až  $80 \text{ kg/m}^3$ , jehož vlákna drží vlastní silou pohromadě. Vyrábí se z krátké bavlny, bavlněného odpadu nebo z viskóznové stříže ke zdravotnickým, hygienickým a kosmetickým účelům.

<http://cs.wikipedia.org/wiki/Vata>

## buničina – kontaminace v laboratoři



Buničitá vata se vyrábí ve tvaru listu z bělené sulfitové nebo sulfátové buničiny, do které se smí přimíchávat až 20 % dřevní buničiny (papíru). Konečný výrobek sestává z jednoho listu nebo z několika vrstev nad sebou. Pro zdravotnické účely se vata dodává adjustovaná nebo dělená v různých formách a velikostech. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Vata>