



## **Pokyny pro zpracování vzorků PT#V/5/2022 - Stanovení mikroskopického obrazu v přírodních koupalištích, stanovení sinic a stanovení chlorofylu-a**

### **Vzorky č. 1A a 1B (kvantitativní rozbor sinic)**

**Uchování vzorků:** Vzorky 1A i 1B jsou **živé**. Až do zpracování přechovávejte živé vzorky v temnu a chladu. Živé vzorky zpracujte ve středu 5. 10. 2022. Pokud nemůžete provést stanovení tento den, můžete vzorek fixovat Lugolovým činidlem dle Utermöhla. V tomto případě však činidlo přidejte do vzorku až 5. 10.

**Zpracování vzorků:** Stanovení proveďte podle ČSN 75 7717 – Kvalita vod – Stanovení planktonních sinic z roku 2013. Při kvantifikaci sinic podle ČSN 75 7717 lze postupovat v závislosti na přítomných dominantních zástupcích především dvěma způsoby:

- dezintegrace koloniálních sinic (typicky *Microcystis*, *Woronichinia*) a přímé počítání jednotlivých buněk. Pokud budou přítomny z hlediska dezintegrace problematické taxony *Microcystis viridis*, *M. wesenbergii*, *M. aeruginosa* (u tohoto druhu jsou problematické jen některé populace) nebo *Woronichinia naegeliiana*, doporučujeme dezintegraci provádět po konzervaci zásaditým Lugolovým roztokem (a s časovou prodlevou alespoň několika hodin od jeho přidání ke vzorku).

- proměrování (má jednoznačně přednost) nebo odhad délky jednotlivých vláken (typicky *Planktothrix*, *Aphanizomenon*) nebo přímé počítání buněk ve vláknu (typicky *Dolichospermum*) a to nejlépe ve vzorku fixovaném Lugolovým činidlem. V případě vláknitých sinic s nezřetelnými buněčnými přepážkami (typicky *Planktothrix*, *Aphanizomenon*) se za standardní délku buňky považuje 5  $\mu\text{m}$ .

K ověření schopnosti účastníků kvantifikovat sinice oběma způsoby jsme připravili dva odlišné vzorky. Neznamená to ovšem, že jeden vzorek musí obsahovat výlučně kolonie tvořící kokální sinice a druhý vláknité sinice.

Součástí protokolu je i stručný dotazník, ve kterém jsou otázky na pracovní postup v laboratořích účastníků. Dotazník je v tomto kole rozšířený také o podrobnosti ke stanovení objemové biomasy.

Sinice s velmi drobnými buňkami (< 2  $\mu\text{m}$ ; např. *Aphanocapsa incerta*) se do celkového počtu buněk sinic nepočítají. Naopak tenké vláknité sinice (např. *Pseudanabaena* nebo *Limnothrix*) se do celkového výsledku zahrnují. Do celkového počtu se také nezahrnuje běžně se vyskytující endogloeická (tzn. žijící ve slizu jiných organismů) sinice *Pseudanabaena mucicola* (ve vzorcích se vyskytuje vždy společně se sinicemi rodu *Microcystis* a téměř vždy tvoří zanedbatelnou část abundance sinic).

Výsledky vyjádřete v buňkách na 1 ml vzorku. Uveďte i výsledky pro jednotlivé taxony (!), jdou-li od sebe v komůrce vzájemně odlišit.

Prosíme také všechny účastníky schopné provést stanovení buněčného objemu o zaslání výsledků vyjádřených nejen v buňkách/ml ale rovněž v  $\text{mm}^3/\text{l}$  (metoda např. podle Přílohy A.3 z ČSN 75 7717). Dle vyhlášky č. 238/2011 Sb. by u některých vzorků (především s dominancí sinic s tenkými vlákny) mělo být automaticky provedeno.

**Poznámka:** S velkou opatrností je nutno přistupovat k zahuštění vzorku. Velké ztráty mohou vznikat při odstředování buněk z úspěšně dezintegrovaných kolonií a to i v případech destrukce aerotopů nebo sinic fixovaných Lugolovým činidlem. Proto u dostatečně oživených vod dáváme přednost počítání nezahuštěných vzorků. Pokud zahuštíme, je nejlépe využít filtrační metodu nebo centrifugovat vzorek (u něhož byly předtím destruovány aerotopy a provedena fixace Lugolovým činidlem) ještě před dezintegrací.

**Poznámka:** Je možné použít i jinou metodu než ČSN 75 7717. Potom ji však podrobně popište v protokolu a pro srovnání dodržte alespoň výše uvedené zásady vyjadřování výsledků (např. standardní délka buňky, nepočítání sinic s velmi drobnými buňkami apod.).

Součástí rozboru vzorků č. 1A a 1B je také slovní popis ve smyslu poznámky k ukazateli mikroskopický obraz z přílohy č. 4 vyhlášky č. 238/2011 Sb.: *Ukazatel „Mikroskopický obraz“ obsahuje slovní popis, ve kterém jsou uvedeny především dominantní taxony sinic, dále dominantní zástupci fytoplanktonu a jakékoli další informace, které mohou přispět k interpretaci výsledků.* Výsledek by měl být podobný tomu, který vkládáte rutinně do IS PiVo jako poznámku k ukazatelům mikroskopický obraz a/nebo sinice (příklad na našich [www stránkách](http://www.szu.cz/pzz-sinice) <http://www.szu.cz/pzz-sinice>).

**Hodnocení:** Každý z obou vzorků bude hodnocen zvlášť ze vztažných hodnot získaných z výsledků terčovými laboratořmi a laboratoře SZÚ. Určení dominantního taxonu sinic ve vzorcích 1A a 1B bude součástí



hodnocení ukazatele kvalitativní rozbor sinic. Zařazeno bude i hodnocení ukazatele mikroskopický obraz, do něhož bude zahrnut nejen výsledek kvalitativní rozbor sinic, ale rovněž dalších ve vzorku přítomných dominantních organismů.

### **Vzorky č. 2 A, B, C, D (kvalitativní rozbor sinic)**

**Uchování vzorků:** Vzorky č. 2A až 2D jsou konzervovány formalínem (je toxický). Vzorky č. 2 se nemusí dopravovat a uchovávat v chladu.

**Zpracování vzorků:** Vzorkovnice v ruce protřepejte a přeneste kapku vzorku na podložní sklíčko, přikryjte krycím sklíčkem a určete všechny nalezené zástupce sinic. Zooplankton ani řasy neurčujte. Následujícím způsobem stanovte relativní četnost jednotlivých taxonů sinic u vzorků 2A až 2D. V několika zorných polích spočítejte nejméně sto jedinců sinic (pokud tvoří velké kolonie nebo dlouhá vlákna, tak i více) a přiřadte četnost jednotlivým taxonům. Relativní četnost jednotlivého taxonu spočítáte podle následujícího vzorce:

$$\text{relativní četnost taxonu (v \%)} = \frac{\text{počet spočítaných jedinců taxonu}}{\text{počet všech spočítaných jedinců sinic}} \times 100$$

Výsledek zaokrouhlete na celá procenta. Taxonům, které jste ve vzorku určili, ale nezaznamenali při počítání relativní četnosti, přiřadte v protokolu symbol +. Za jedince považujte kolonii okrouhlého tvaru do průměru 100 μm a vlákna do délky 100 μm. Pokud však budou ve vzorcích jednotlivé buňky sinic, které pocházejí z rozpadlých kolonií nebo vláken, nepočítejte je k relativní četnosti (např. jednotlivé buňky z rozpadlých kolonií *Microcystis*). Do relativní četnosti také nepočítejte sinice žijící ve slizu jiných sinic či dalších organismů. Do protokolu je však uveďte a v kolonce relativní četnost označte písmenem P.

**Příklad:** Když z 200 jedinců sinic bude 120 jedinců tvořit *Microcystis aeruginosa*, její relativní četnost bude 60%.

**Zásady určování:** V případě, že si nejste jisti určením do druhu, vyjádřete pochybnost otazníkem nebo písmeny cf. mezi rodovým a druhovým jménem (např. *Microcystis* cf. *aeruginosa*) nebo zařadte pouze do rodu.

**Poznámka:** Uveďte prosím použitou určovací literaturu v protokolu do určené kolonky.

**Hodnocení:** U vzorků 2A až 2D se většinou hodnotí správné určení jednoho nebo dvou dominantních taxonů sinic. Může však být hodnoceno i správné určení dalších ve vzorku dostatečně zastoupených sinic. Proto věnujte pozornost i dalším taxonům. Zcela špatné určení (typicky záměna nepřibuzných rodů) u jakéhokoli hodnoceného taxonu bude znamenat neúspěch v ukazateli kvalitativní rozbor sinic. Pro úspěch v kvalitativním rozboru sinic stačí určit přítomné sinice správně do rodu. V některých případech považujeme za dostatečné i méně podrobné určení (tam, kde např. nelze spolehlivě určit ani rod). Podrobnosti a způsob hodnocení v konkrétních případech lze najít ve zprávách z předchozích kol (k dispozici volně <http://www.szu.cz/pzz-sinice>).

**Poznámka:** Věnujte prosím pozornost správnému psaní jmen organismů (týká se samozřejmě i vzorků č. 1). Pokud si nejste jisti, kontrolujte správnost pomocí determinační literatury.

### **Vzorky č. 3A a 3B (chlorofyl-a)**

**Uchování vzorků:** Až do zpracování přechovávejte vzorky 3A a 3B v temnu a chladu. Vzorky zpracujte ve středu 5. 10. 2022.

**Zpracování vzorků:** Vzorky č. 3 zpracujte podle ČSN ISO 10260 – Jakost vod – Měření biochemických ukazatelů – Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a. Do protokolu uveďte jak hodnotu pro chlorofyl-a tak pro feopigmenty. Stanovení pokud možno proveďte paralelně (jako výsledek pak budeme brát aritmetický průměr z vašich stanovení). Vyplňte rovněž obecné údaje o metodě (bez těchto údajů nebudou výsledky účastníka hodnoceny).

**Hodnocení:** Vztažené hodnoty budou stanoveny na základě výsledků terčovými laboratoři a laboratoře SZÚ. Hodnocen bude každý vzorek zvlášť.

### **Vzorek č. 4 (extrakt)**



**Uchování vzorků:** Až do zpracování přechovávejte vzorek č. 4 v **temnu (naprosto nezbytná podmínka)** a chladu.

**Zpracování vzorků:** Vzorek č. 4 zpracujte ve středu 5. 10. 2022. Změřte na spektrofotometru absorbance stejně jako u extraktů u vzorků č. 3. Vyplňte požadované údaje do protokolu (absorbance při 665 a 750 nm bez okyselení a po okyselení a optickou dráhu kyvety). Pokud je to možné proveďte stanovení paralelně.

**Hodnocení:** Vzorek č. 4 bude sloužit pouze pro lepší interpretaci výsledků v laboratořích účastníků a k odhalení případných chyb. Hodnocení bude součástí zprávy nikoli však přílohy osvědčení. Přesto zpracování a zaslání výsledků tohoto vzorku je povinné.

### **Zpracování vzorků 1A, 1B, 3A a 3B pomocí fluorescence**

Pokud má vaše laboratoř zavedené měření chlorofylu pomocí fluorescenčních metod (ideálně s možností odlišit řasy od sinic), budeme rádi, pokud zpracujete vzorky 1A, 1B, 3A a 3B rovněž touto metodou a výsledky a použitý postup uvedete v protokolu na poslední straně nebo zašlete v samostatném souboru. Hodnocení bude závislé na počtu zúčastněných laboratoří.

### **Zápis a odeslání výsledků**

Pro zápis výsledků použijte elektronickou verzi ve formátu MS Excel (k dispozici bude i pdf), kterou si můžete stáhnout na výše uvedené internetové adrese. V elektronické verzi (xls) se vyplňují pouze žlutě zbarvená pole. Pro odeslání výsledků použijte elektronickou verzi protokolu, kterou po vyplnění uložte (**jako formát xls nikoli jako pdf!**) a odešlete e-mailem na [petr.pumann@szu.cz](mailto:petr.pumann@szu.cz) do 21. 10. 2022. Pokud budete zasílat tištěnou verzi protokolu poštou (není to povinné), učiňte tak na adresu Mgr. Petr Pumann, Státní zdravotní ústav, Šrobárova 49/48, Praha 10, 100 00.

### **Vyhodnocení**

Dne 24. 11. 2022 od 10<sup>00</sup> hodin bude místnosti č. 3 v budově č. 1 (ředitelství) SZÚ pořádán seminář k vyhodnocení výsledků a souvisejícím informacím (např. novinky v legislativě a metodických normách, metodické poznámky, zajímavé nálezy sinic). Pokud budete mít zájem o vystavení certifikátu o účasti na semináři, vyplňte elektronickou přihlášku, kterou naleznete na výše uvedené internetové adrese a zašlete ji na e-mailovou adresu [petr.pumann@szu.cz](mailto:petr.pumann@szu.cz) nejpozději 23. 11. 2022. Pokud certifikát o účasti na semináři nebudete požadovat, není nutné přihlášku posílat. Na semináři budou účastníkům předány certifikáty o účasti v tomto kole programu a závěrečné zprávy. V případě Vaší neúčasti na semináři Vám tyto dokumenty zašleme poštou.

V případě jakýchkoliv dotazů se neváhejte na nás obrátit telefonicky (267082220) nebo e-mailem. Rovněž vás prosíme, pokud budete mít k tomuto programu připomínky nebo náměty na zlepšení, sdělte nám je (buď hned na protokole, nebo kdykoliv později).

Na spolupráci se těší

Mgr. Petr Pumann  
koordinátor programu