

ZMĚNY V REVIDOVANÉ ČSN 75 7712 - JAKOST VOD – BIOLOGICKÝ ROZBOR – STANOVENÍ BIOSESTONU

Mgr. Petr Pumann¹⁾, prof. RNDr. Alena Sládečková, CSc.²⁾, RNDr. Blanka Desortová, CSc.³⁾, RNDr. Ladislav Havel, CSc.³⁾, Mgr. Karel Kolář, Ph.D.⁴⁾, Ing. Lenka Fremrová⁵⁾, Emil Janeček⁶⁾, RNDr. Petr Marvan CSc.⁷⁾

¹⁾Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42, e-mail: ppumann@szu.cz, ²⁾Havlovického 3, Praha 4, 147 00, ³⁾Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka, Podbabská 30, Praha 6, 160 62

⁴⁾Pražské vodovody a kanalizace, a.s. – člen skupiny Veolia Voda, Dykova 3, Praha 10, 101 00,

⁵⁾Hydroprojekt, Tábořská 31, Praha 4, 140 16 ⁶⁾Povodí Ohře, Novosedlická 758, Teplice, 415 01

⁷⁾Limni s.r.o., Poštovská 8/D, Brno, 602 00

V našich provozních hydroanalytických laboratořích byly do května 2005 používány ke stanovení mikroskopického obrazu resp. drobného biosestonu dvě velmi podobné metody: ČSN 75 7711 [3] a ČSN 75 7712 (u této normy se jednalo jen o čl.4 věnovaný stanovení drobného biosestonu) [2]. Logickým krokem ke zjednodušení situace bylo sloučení obou norem, což bylo uskutečněno vydáním revidované normy ČSN 75 7712 Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení biosestonu [1], která nahradila původní ČSN 75 7712 a ČSN 75 7711 [3] včetně obsáhlého komentáře [4]. V tomto příspěvku se pokusíme shrnout a zdůvodnit významnější věcné změny, které revidovaná norma přináší.

Změny v revidované ČSN 75 7712

Odběr vzorku. Obě staré normy popisovaly provedení odběru vzorku. Odběry se však podrobně zabývá řada specializovaných norem [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. Proto byly z revidované ČSN 75 7712 pasáže týkající se odběru vypuštěny a nahrazeny pouze odkazem na uvedené odběrové normy.

Neutralizace účinků dezinfekce. Má-li se rozlišovat biologický stav přítomných mikroskopických organismů, je nutné bezprostředně po odběru vzorků vod dezinfikovaných chlorem, neutralizovat jeho účinky pomocí thiosíranu sodného (0,1 ml 1,8% roztoku na 100 ml vzorku), což je ve shodě s požadavky na vzorky pro stanovení mikrobiologických ukazatelů [14]. Protože tento požadavek v ČSN 75 7711 nebyl obsažen, byla dosavadní praxe provozních laboratoří v tomto bodě nejednotná.

Upřesnění parametrů odstředování. ČSN 75 7711 uváděla, že se vzorek odstředuje 5 minut při 2000 otáčkách za minutu. Ve staré ČSN 75 7712 byly parametry odstředování stejné a navíc byl doplněn odkaz na přílohu TNV 75 5940 [5] se vztahem mezi počtem otáček za minutu a poloměrem rotoru. Za standardní byl považován rotor s poloměrem 0,08 m. Pro jiné poloměry rotoru je třeba dopočítat odpovídající počet otáček. Příloha z citované TNV byla převzata do revidované ČSN 75 7712.

Jednotky pro vyjádření výsledků. V naší vodohospodářské praxi jsou výsledky kvantifikace mikroskopických rozborů tradičně uváděny v počtu jedinců, což je výhodné především v rychlosti, se kterou je stanovení provedeno ve srovnání se stanovením počtu buněk. Nelze však přehlížet, že počet jedinců má v mnoha případech velmi nízkou výpovědní hodnotou. Proto je v revidované normě vyjadřování počtu mikroskopických organismů v buňkách považováno za rovnocenné s vyjadřováním v jedincích (organismech). Použití jednoho nebo druhého způsobu závisí na účelu, pro který se stanovení provádí. Např. pro stanovení saprobního indexu biosestonu se uvádí abundance v počtu jedinců, pro abundanci fytoplanktonu je vhodné dávat přednost vyjádření v počtu buněk, zvláště jsou-li přítomny velké kolonie a cenobia nebo různě dlouhá vlákna, pro která je vyjádření v počtu jedinců málo vypovídající. V některých případech je vhodné mít k dispozici výsledky jak v počtu buněk, tak jedinců (např. pro zjišťování účinnosti úpravné vody). Pokud je účelem rozboru splnění legislativního předpisu, je vyjádření výsledku spojeno s přesně definovanou jednotkou. Např. u vyhlášek pro pitnou

nebo surovou vodu [15, 16] je evidence výsledků v jedincích/ml nutností, protože v nich není jiná jednotka přípustná¹.

Upřesnění termínu jedinec (organismus). V předchozích normách nebylo jednotné, co se přesně míní pojmem jedinec (organismus). V ČSN 75 7711 byla následující definice: „*Jedinec - buňka, kolonie, cenobium, vlákno či jeho fragment*“. V komentáři [4] následovalo doplnění:

- U vláken je za jedince považováno vlákno do 100 µm délky. Při překročení této délky se vyjadřují jedinci jako násobky.
- U kolonií a cenobií je za základní mez považováno 60 µm (u okrouhlých tvarů průměr, u podlouhlých délka). Při větších rozměrech se opět vyjadřují jedinci jako násobky. U větších konzumentů (především koloniální nálevníci a vířníci) se počítá každý člen kolonie jako jeden jedinec.

V ČSN 75 7712 byl pojem jedinec definován takto: „*Za jedince se považuje buňka, cenobium, kolonie a vlákna do délky 100 µm. U koloniálních nálevníků a vířníků se počítá každý jedinec zvlášť.*“ Oproti ČSN 75 7711 tedy chyběla velikostní mez 60 µm pro kolonie a cenobia. Nebylo však jasné, zda se na ně nevztahuje žádná velikostní mez nebo stejně jako pro vlákna mez 100 µm.

Revidovaná ČSN 75 7712 definici upřesňuje: „*Za jedince se považuje samostatná buňka (nezáleží na její velikosti), dále cenobium nebo kolonie do velikosti 100 µm a vlákna do délky 100 µm. 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.*“ Stejně se však v praxi narazí na nejasné případy, a proto bude problematika rozpracována v připravovaném komentáři.

Zahuštění na různé objemy podle oživení vzorku. V ČSN 75 7711 i ve staré ČSN 75 7712 bylo uvedeno, že objem odstředěného vzorku po odlití supernatantu se upraví na 0,2 ml. Zahustit vzorek ve špičce zkumavky na jiný objem norma přímo neumožňovala, i když v případě více oživených vod by to byl vhodný způsob, jak předejít přílišnému nahuštění mikroskopických organismů na mřížce počítací komůrky. Revidovaná norma místo původních 0,2 ml zavádí rozmezí 0,1 – 1 ml s poznámkou, že pro pitnou vodu se zpravidla používá úprava objemu na 0,2 ml.

Dále byla upravena hodnota, při které není nutné vzorek zahušťovat. Původních 10 000 jedinců/ml bylo nahrazeno 50 000 jedinci/ml, což odpovídá 500 jedinců na mřížce komůrky Cyrus I.

Fixace Lugolovým roztokem podle Utermöhla. ČSN 75 7711 doporučovala v případě přítomnosti sinic vodního květu zpracovat souběžně s živým vzorkem vzorek fixovaný Lugolovým roztokem podle Utermöhla. Stará ČSN 75 7712 takovou možnost neuváděla. Do revidované ČSN 75 7712 jsme požadavek na použití Lugolova roztoku v případě výskytu sinic vodních květů zařadili, i když to nemusí být vždy 100% účinné (především u kolonií *Microcystis*). Ve většině případů to však bude dostatečné pro účel rozboru. Novinkou je požadavek na fixaci vzorku při významném výskytu organismů snadno podléhajících destrukci (typicky ze skupin Cryptophyceae nebo Chrysophyceae), u nichž je počítání v živém vzorku zatíženo velkou chybou.

Odstranění vzorce pro odhad chyby stanovení. Z normy byl odstraněn problematický vzorec pro odhad chyby stanovení. Hlavním důvodem bylo, že je v některých případech velmi nepřesný a navíc jsou problémy s definicí pojmu jedinec pro tento vzorec (není totožná s jedincem pro vyjádření výsledků). Proto jsme se rozhodli řešit tuto problematiku až v rámci komentáře.

Využití fluorescence při výskytu velmi drobných organismů. Počítání velmi drobných organismů v počítací komůrce Cyrus I (a všech podobných komůrkách) ve světlém poli je obtížné a vždy bude zatíženo velkou chybou. V revidované normě je pro počítání těchto organismů doporučeno použití

¹ Požadavky legislativního předpisu nemusí být vždy vhodně nastaveny. Není však předmětem metodické normy, aby řešila případné nedostatky legislativních předpisů hodnotících jakost vody.

fluorescenčního mikroskopu, což může rozbor významně usnadnit. I přesto je nutno považovat stanovení velmi drobných organismů za orientační².

Rozlišení biologického stavu (tj. odlišení živých organismů). V ČSN 75 7711 byl popsán postup k rozlišení živých a mrtvých mikroskopických organismů velmi stručně a nepřesně. Navíc se týkal jen organismů obsahujících chlorofyl. Revidovaná norma uvádí, že pro organismy neobsahující chlorofyl-a je nutné využít jiných znaků (pohyb, stav protoplastu). Pro rozlišení biologického stavu na základě fluorescence u řas jsou jednak specifikovány použité sady filtrů (včetně konkrétních příkladů pro některé druhy mikroskopů) a dále je upřesněn postup stanovení:

- Při rozlišení biologického stavu fluorescencí je nutné nejprve přerušit nebo utlumit procházející světlo.
- U vod s nízkým výskytem organismů (týká se většiny pitných vod) je nutné nejprve prohlížet vzorek v komůrce v procházejícím světle a teprve při nálezu organismu zjišťovat jeho biologický stav pomocí fluorescence³.
- Pouze pro hodně oživené vzorky je možné využít způsob uvedený v ČSN 75 7711, kdy jsou nejprve spočítány organismy v procházejícím světle a potom je komůrka znovu prohlédnuta pomocí fluorescence.

Doplnění o prvky QA/QC. Novinkou proti předchozím normám je doplnění o přílohu B, která se zabývá zabezpečením a řízením jakosti hydrobiologických rozborů. Jsou zde vyjmenovány různé prvky interní a externí kontroly, bohužel pro praktické použití uvedeny místy v obecné rovině. Je to způsobeno tím, že „současný stav znalostí neumožňuje stanovení jednoznačných a závazných kritérií zabezpečování a řízení jakosti hydrobiologických rozborů“ (citujeme první větu přílohy B). Přesto některé konkrétní „hydrobiologické“ prvky interní kontroly jsou v příloze obsaženy. Týkají se ověřování objemů centrifugačních zkumavek, otáček odstředivky a účinnosti UV lampy. O upřesnění dalších uvedených kritérií se pokusíme v připravovaném komentáři.

Program na výpočet intervalů spolehlivosti.

Jeden z autorů tohoto příspěvku (P. Marvan) připravil jednoduchý program, pomocí něhož lze snadno přepočítat protokolární data na počty organismů v jednotce objemu vody a k těmto výsledkům navíc stanovit interval spolehlivosti. Program si může každý volně stáhnout na internetové adrese <http://www.szu.cz/chzp/voda/metody/bioseston.html>.

Komentář

Díky zrušení ČSN 75 7711 byla zrušena i platnost k ní se vztahujícího komentáře, i když řadu v něm obsažených obecně platných informací lze samozřejmě při hodnocení rozborů využívat i nadále. Při práci na revizi ČSN 75 7712 bylo shledáno, že řada bodů normy by potřebovala obsáhlejší doplnění a vysvětlení. Bylo domluveno, že bude připraveno nové znění komentáře, které však na rozdíl od zrušené verze bude více metodicky zaměřeno. Práce na komentáři začaly na jaře 2005 a jeho dokončení předpokládáme v roce 2006.

Literatura

1. ČSN 75 7712 Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení biosestonu. květen 2005
2. ČSN 75 7712 Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení biosestonu. červenec 1998
3. ČSN 75 7711 Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení mikroskopického obrazu. 28.zář 1987
4. Sládeček V., Havel L., Moravcová V., Popovský J., Sládečková A.: Biologický rozbor vod – Stanovení mikroskopického obrazu. Komentář k ČSN 757711. Vydavatelství norem. 1989. 103 stran.
5. TNV 75 5940 Mikroskopické posuzování účinnosti vodárenské technologie. duben 1997
6. ČSN EN 25667-1 (75 7051) Jakost vod - Odběr vzorků - Část 1: Pokyny pro návrh programu odběru vzorků
7. ČSN EN 25667-2 (75 7051) Jakost vod - Odběr vzorků - Část 2: Pokyny pro způsoby odběru vzorků

² U vzorků s významným podílem velmi drobných organismů to může způsobit problémy v praxi, protože ve vyhláškách pro jakost pitné a surové vody [15, 16] je s limitní hodnotou srovnávána suma všech přítomných mikroskopických organismů (bez ohledu na jejich velikost).

³ Ke snížení pravděpodobnosti úniku živého objektu s chlorofylem-a lze samozřejmě doporučit opakovanou kontrolu komůrky ve fluorescenci.

8. ČSN EN ISO 5667-3 (75 7051) Jakost vod - Odběr vzorků - Část 3: Návod pro konzervaci vzorků a manipulaci s nimi
9. ČSN ISO 5667-4 (75 7051) Jakost vod - Odběr vzorků - Část 4: Pokyny pro odběr vzorků z vodních nádrží
10. ČSN ISO 5667-5 (75 7051) Jakost vod - Odběr vzorků - Část 5: Pokyny pro odběr vzorků pitné vody a vody užívané při výrobě potravin a nápojů
11. ČSN ISO 5667-6 (75 7051) Jakost vod - Odběr vzorků - Část 6: Pokyny pro odběr vzorků z řek a potoků
12. ČSN ISO 5667-10 (75 7051) Jakost vod - Odběr vzorků - Část 10: Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod
13. ČSN ISO 5667-11 (75 7051) Jakost vod - Odběr vzorků - Část 11: Pokyny pro odběr vzorků podzemních vod
14. ČSN ISO 8199 (75 7810) Jakost vod – Obecné pokyny pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami. únor 1994
15. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody (v platném znění).
16. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 428/2001 Sb., kterou se provádí zákon č. 274/2001 Sb., o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu a o změně některých zákonů (v platném znění).