

METODIKA ODBĚRU A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ FYTOBENTOSU TEKOUČÍCH VOD



P. Marvan, J. Heteša

Březen 2006



1. Úvod

Princip metody: V toku je proveden výběr vhodného podkladu (preferenze kameny), řasový nárost (epilíton) se oškrábe zubním kartáčkem nebo ostrým předmětem v plastové misce, umístí do vzorkovnice a v chladu a temnu transportuje do laboratoře. Poté je proveden mikroskopický rozbor tj. determinace a kvantifikace stanovením kvantitativního zastoupení jednotlivých druhů řas pomocí odhadní stupnice, která druhy zařazuje do určitých intervalů na základě odhadu jejich abundance v mikroskopickém preparátu analyzovaného vzorku (Sládečková & Marvan 1978). Rozsivky jsou dodatečně determinovány na základě zhotovení trvalých preparátů. Vzorky se konzervují roztokem formaldehydu do konečné 2-4% koncentrace (pokud tak nebylo učiněno hned po odběru) a archivují.

Postup stanovení se přidržuje ČSN 75 7715 Jakost vod - Biologický rozbor - Stanovení nárostů (účinnost od 1. 8. 1998) a nijak podstatně se neliší od postupu označeného v dokumentu CEN/TC 230 N 0540 (návrh normy „Water quality - Guidance standard for surveying, sampling and laboratory analysis of phytobenthos in shallow running water“) jako SHS (Simple habitat sampling)

Terminologická poznámka:

V souladu s WFD je termín fyto-bentos používán pro označení souboru fototrofních mikrofyt osidlujících dno. V tomto pojetí tedy nejsou do pojmu zahrnuty vyšší vodní rostliny (makrofyt), které podle některých jiných koncepcí bývají rovněž pokládány za součást fyto-bentosu. Sporné postavení mezi oběma fototrofními složkami bentosu mají mechorosty a parožnatky. V této národní metodice jsou řazeny k makrofytům. Naproti tomu jsou k zde mikrofytům počítány i velké (makroskopické) řasy (jako např. *Cladophora* nebo *Batrachospermum*), které někteří jiní autoři řadí k makrofytům.

Další odborné termíny:

Epilíton: nárost na kamenech; vedle fototrofních organismů (sinic a řas) obsahuje i heterotrofní složku (např. bezbarvé bičíkovce, nálevníky, bakterie atd.). Není to tedy společenstvo ve fyto-cenologickém slova smyslu, ale biocenóza.

Epifyton: obecně soubor organismů přisedlých (nebo i volně žijících) na jiném rostlinném organismu. V dalším textu pod ním budeme rozumět jen soubor organismů na vyšších vodních rostlinách, a to jak fototrofních, tak i heterotrofních

Epipelon: soubor fototrofních (i heterotrofních) organismů na povrchu jemných sedimentů

2. ZÁKLADNÍ POMŮCKY

2.1 Terénní pomůcky

- rybářské holinky
- zubní kartáček, nůž, zabroušená lžíce nebo skalpel, pinzeta
- plastová miska
- plastová lahvička (optimálně 100 ml) se šroubovacím uzávěrem
- nesmazatelný fix
- chladič box
- fotoaparát
- GPS přístroj

- pásma, laserový dálkoměr
- terénní přístroje pro analýzu vody (pH, O₂, teplota, vodivost)
- gumové rukavice

2.2 Laboratorní pomůcky

- mikroskop se zvětšením až 50-1000x
- pasturova pipeta
- konzervační činidlo: formaldehyd
- mikroskopická podložní a krycí sklíčka
- zalévací médium např. Pleurax nebo Naphrax
- laboratorní kahan nebo elektrický vařič
- široké zkumavky
- základní určovací literatura

3. VZORKOVÁNÍ

3.1. Vzorkovací období

Odběr vzorků je optimálně prováděn čtvrtletně, zimní odběr je možné vynechat. Jarní a letní odběr je vhodné spojit s odběrem makrozoobentosu. Odběry vzorků se provádějí:

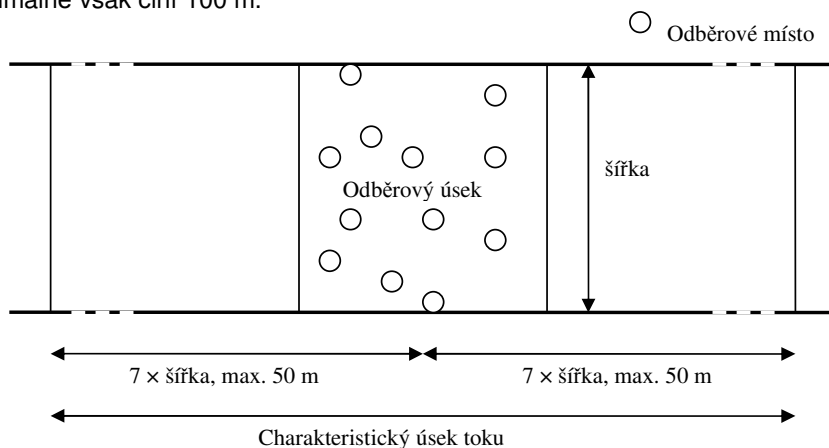
- v jarním období (březen – polovina května); fenologicky je to období do začátku květu řepky
- v letním období (konec června – polovina srpna)
- v podzimním období (říjen – polovina listopadu).

3.2 Postup při výběru odběrových míst a podkladů k odběru vzorků

K odběru vzorku je třeba vybrat charakteristický úsek toku a to postupem shodným jako při odběru vzorků makrozoobentosu, na jehož dně se přirozeně nalézají kameny různé velikosti, které lze vyjmout z toku.

Výběr reprezentativního - charakteristického - úseku toku

Charakteristický úsek toku musí reflektovat fyzikální a ekologické charakteristiky hodnoceného úseku toku. Délka charakteristického úseku toku se rovná minimálně 7-násobku šířky toku nebo 50 m (podle toho, co je kratší) směrem proti a po proudu toku od středu odběrového úseku toku. Celkem se tedy délka odběrového úseku rovná 14násobku šířky, maximálně však činí 100 m.



Odběrový úsek toku musí být reprezentativní částí charakteristického úseku toku. Je kratší a stanovuje se z toho důvodu, že charakteristický úsek toku obvykle není možné vzorkovat celý.

Odběrový úsek toku

- musí zahrnovat všechny typy habitatů v tom poměru, v kterém se vyskytují v charakteristickém úseku;
- břehová vegetace by měla mít v odběrovém úseku toku charakteristické druhové složení, výška a hustota porostu musí dávat typické zastínění toku jaké je v hodnoceném úseku toku či povodí (u malých toků);
- poměr peřejí a tůní musí být shodný s charakteristickým úsekem toku a při vzorkování musí být odebrány vzorky z tůní i peřejí. Místa blízko mostů, silnic, brodů a jezů by neměla být vzorkována, pokud toto není typické pro hodnocený úsek toku;
- místa bodových zdrojů znečištění by měla být přiměřeně vzdálena tak, aby došlo k dobrému promíchání znečištěné vody a vody v toku;

Odběrová místa jsou konkrétní podklady, ze kterých jsou v toku odebírány vzorky fytozobentosu podle principů popsanych níže.

Označení odběrových úseků

Odběrový úsek a jeho délka musí být přesně definovány. Poloha musí být zaznamenaná do mapy a popsána slovně, popř. náčrtkem do odběrového protokolu pro snadnou identifikaci při příštím odběru. Pořizuje se fotodokumentace odběrového úseku (foto proti proudu, po proudu a pohled na celý odběrový úsek) a měří se souřadnice jeho spodního konce pomocí GPS přístroje.

Výběr podkladů k odběru vzorku

Odebírá se přednostně epilíton. V případě nížinných řek, kde se přirozeně takový substrát nenachází, je možné vzorky odebrat z povrchu objektů dlouhodobě ponořených v toku, jako jsou například mostní (nikoliv však dřevěné) pilíře. Není-li v celém monitorovaném úseku toku k dispozici kamenný podklad pro odběr epilítonu, mohou být odebrány vzorky epifytonu z ponořených cévnatých rostlin a mechorostů, případně vzorky epipelónu, zejména projevuje-li se rozvoj sinic, rozsivek nebo jiných jednobuněčných fototrofních organismů zbarvením povrchové vrstvy sedimentu. Na rozdíl od epilítonu je druhové složení tohoto typu nárostu ovlivněno procesy probíhajícími v sedimentu.

V některých případech (např. při sledování referenčních lokalit) bude účelné odebrat jak vzorky epilítonu, tak i vzorky epipelónu a epifytonu.

Obecně jsou pro odběr preferovány kameny o velikosti 10 – 20 cm, protože stabilita tohoto podkladu umožňuje rozvoj společenstva řas a zároveň se s tímto podkladem dobře manipuluje. V případě, že se tyto podklady na lokalitě nevyskytují, je možné provést odběr i z kamenů větších nebo menších. Je vhodné odebrat vzorky nejméně z 5 kamenů. V případě, že jsou odebírány jak vzorky epilítonu, tak i vzorky epipelónu a epifytonu, odebírá se vzorek také nejméně z 5 míst jako směsný, nesměšují se však jednotlivé typy dohromady (např. epilíton s epifytonem a pod.).

Do odběrového protokolu je nutné zaznamenat, z jakých podkladů a za jakých podmínek byl odběr proveden. Z odběru je nutné vyloučit místa příliš blízko břehu a místa s velkým zastíněním (pokud toto není možné, zaznamenejte tento fakt do odběrového protokolu). Dále musí být podklady ponořeny v toku tak dlouho, aby společenstvo na nich vytvořené dosáhlo konečného stadia sukcese. Doporučeno je 4 až 6 týdnů v závislosti na podmínkách prostředí. Přesná hloubka není důležitá, pouze je nezbytné, aby substrát nebyl vystaven působení vzduchu a nacházel se v eufotické zóně.

Vzorky mají být odebírány v hlavním proudu řeky. Úseky s velmi pomalou rychlostí proudu ($\leq 20 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) se nedoporučují, protože tam může být společenstvo zaneseno bahnem a detritem.

Na odběrovém úseku se provádí základní fyzikálně - chemická měření: (teplota vody, koncentrace rozpuštěného O_2 , pH a měrná elektrická vodivost).

3.3 Vlastní odběr vzorku

Z kamenů vybraných k odběru se odstraní případné znečištění (např. organický detrit) rychlým omytím ve vodě a kámen se potom umístí v misce s asi 50 ml říční vody. Odběr se provádí tvrdým zubním kartáčkem, který se omyje v čisté říční vodě a očistí na čistém povrchu tak, aby se minimalizovalo znečištění rozsivkami či jinými organismy z předchozího vzorku. Silným přitlačením kartáčku se z horního povrchu kamene odstraní řasový nárost. Kartáček se opakovaně oplachuje ve vodě v misce, aby se tam tímto způsobem přenesly odebírané řasy. Viditelná vlákna řas je možné do odběrové lahvičky přenést pinzetou, aby se předešlo jejich poškození.

K odběru řasového nárostu může být také použit nůž nebo jiný ostrý nástroj zvláště pokud jsou řasy pevně přichyceny. Také nůž musí být omyt říční vodou a očištěn. Případně se nemusí nárost z kamene odebírat v misce, ale může se přenést kartáčkem nebo nožem přímo do odběrové lahvičky naplněné vodou z lokality.

Odběrová lahvička se nikdy neplní vzorkem až po hrdlo. Suspense s nárostem by neměla přesahovat asi $\frac{1}{4}$ objemu lahvičky, jinak hrozí nebezpečí, že v důsledku vyčerpání kyslíku ve vodě dojde k úhynu jemnějších organismů.

Každou lahvičku se vzorkem je nutné na povrchu popsat názvem lokality a datem odběru a doložit k ní odběrový protokol. Dovnitř lahvičky nelze popisku vložit, způsobila by úhyn citlivějších druhů.

Vzorek se transportuje do laboratoře v chladicím boxu bez přístupu světla a až do zpracování přechovává v chladničce.

Pokud nelze vzorek zpracovat do 48 hodin po odběru, je nutné jej ihned po odběru zakonzervovat konzervačními činidly. Nejvhodnější je konzervace formaldehydem na výslednou koncentraci 2-3 %. V konzervovaném vzorku se mění zbarvení chloroplastů a dochází k deformaci buněk (u organismů bez pevných buněčných stěn často k nepoznání), takže se ztíží nebo zcela znemožní identifikace. Proto přistupujeme ke konzervaci jen ve výjimečných případech, kdy skutečně nelze splnit podmínku časového intervalu mezi odběrem a rozbořením vzorku.

Ve speciálním případě, kdy je požadováno zpracování pouze rozsivkové části společenstva fyto-bentosu, se postupuje obdobným způsobem. Přesný metodický postup je stanoven v ČSN: ČSN EN 13946 Jakost vod – Návod pro rutinní odběr a úpravu vzorků bentických rozsivek z řek.

4. Zpracování vzorku

Odebrané nárostové řasy je nutné nejprve krátce analyzovat v čerstvém stavu, a to co nejdříve po odběru. Při zpracování se:

- do laboratorního protokolu zaznamenají základní údaje o vzorku a jeho stavu
- provádí determinace řas a sinic alespoň do taxonomické úrovně vyznačené v taxalitech jako závazná determinační úroveň
- stanoví a zaznamená do laboratorního protokolu údaj o abundanci (viz dále)
- registruje stav organismů - údaje o pohyblivosti, přítomnosti deformovaných buněk, tvarových abnormalit, buněk s poškozeným buněčným obsahem, zastoupení prázdných schránek (frustulí) rozsivek, resp. mrtvých zbytků těl jiných organismů (rozsivky pak budou dále determinovány na základě zhotovení trvalých preparátů, viz. Zhotovení trvalých preparátů)

- pořizuje kresebná nebo fotografická dokumentace druhů, které se nepodařilo určit a jejichž taxonomické postavení je radno později konzultovat s odborníky na jednotlivé taxonomické skupiny
- u neurčených druhů podle potřeby zaznamenávají údaje o velikosti, tvarové proměnlivosti apod.; zejména je nutno připojit poznámky o morfologických znacích rozsivek, jejichž určení bude možné až v trvalém preparátu
- do laboratorního protokolu zaznamenají odkazy na pořízenou dokumentaci,
- výsledky rozboru fototrofní složky podle možností doplní i o údaje o výskytu jiných organismů než řas a sinic.

Podrobný mikroskopický rozbor řasového společenstva se provádí ve světelném mikroskopu, a to nejprve při slabším zvětšení (cca 100 násobném), poté i při silnějším zvětšení, umožňujícím lepší poznání diakritických znaků.

Kvantitativní zastoupení jednotlivých druhů se provádí při slabším zvětšení, a to pomocí odhadní stupnice, která druhy zařazuje do určitých intervalů na základě odhadu jejich abundance v mikroskopickém preparátu analyzovaného vzorku (Sládečková & Marvan 1978). Nejčastěji je používána stupnice:

- 6 - druh masově zastoupený, s pokryvností 90 - 100%
- 5 - druh velmi hojný, s pokryvností 50 - 90%
- 4 - druh hojný, s pokryvností 20 - 50%
- 3 - druh dost hojný, s pokryvností 5 - 20%
- 2 - druh zřídka, s pokryvností 1 - 5%
- 1 - druh velmi zřídka, s pokryvností 0,1 - 1%
- + - druh ojediněle zastoupený, s pokryvností do 0,1%

Křížkem jsou nadto označovány taxony rozsivek s velmi nízkým zastoupením, zjištěné až v trvalém preparátu, u nichž tedy není ověřeno, že byly ve vzorku zastoupeny živými buňkami.

Zpracování vzorku rozsivek

Pro přesné druhové určení rozsivek je nutné z rozsivkových schránek odstranit buněčný obsah a poté připravit mikroskopický preparát pomocí uzavíracího média. Buněčný obsah je možné odstranit za použití silného oxidačního činidla. Nejčastěji používané oxidační činidlo je peroxid vodíku, který je také doporučen v ČSN. Část vzorku se ve zkumavce zalije peroxidem vodíku. Je vhodné použít širší zkumavku, ve vzorku zpravidla dochází k tvorbě pěny a v úzké zkumavce se může část vzorku vylít. Vzorek se pak nechá 24 hodin stát. Je-li suspenze usazená na dně, je možno supernatant slít a vyměnit za destilovanou vodu. To se pak ještě alespoň 2x opakuje. Vzorky pocházející z vápencových oblastí se doporučuje před oxidačním procesem přelít zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, v níž se rozpustí vysrážený CaCO_3 . Existuje však i řada dalších metod, které je možné využít.

Pro přípravu trvalého preparátu se vyčištěná suspenze rozsivkových schránek naředí do vhodné koncentrace. Pokud je suspenze mléčně bílá nebo zakalená, zředí se destilovanou nebo demineralizovanou vodou. Hustota schránek rozsivek může být také ověřena odpařením kapky suspenze na podložním sklíčku a prohlédnutím pod mikroskopem při středním zvětšení (400 ×). Pokud je suspenze hodně řídká, je nutné vzorek centrifugovat a tento postup opakovat až do dosažení vhodné koncentrace, při níž se rozsivky v preparátu vzájemně nepřekrývají.

Zkumavka obsahující suspenzi rozsivek se protřepe a čistou Pasteurovou pipetou se odpipetuje část suspenze ze střední části zkumavky. Kapka suspenze se pak umístí na čisté krycí sklíčko a nechá odpařit umístěním v suchém bezprašném prostředí (např. v exsikátoru) nebo opatrným zahříváním nad plamenem nebo na teplé plotně. Výsledkem by měl být jemný šedý film pokrývající asi dvě třetiny krycího sklíčka.

Při všech uvedených operacích je nutno až úzkostlivě dbát na to, aby nedocházelo k přenosu rozsivek z jiného vzorku. Měla by se proto používat pipeta s velmi širokým hrdlem, která jde dobře promýt. Zejména při sériové přípravě preparátů, při níž se používá centrifugace k zahuštění příliš řídké suspenze, je nutno věnovat velkou péči promytí centrifugačních zkumavek, příp. raději se vyhnout centrifugaci a místo ní vzorek zahustit prostou sedimentací, a to i za cenu, že příprava preparátu se prodlouží.

Po odpaření se s použitím zalévacího média zhotoví preparát. Čisté podložní sklíčko se na chvilku podrží nad plamenem nebo horkou plotnou, aby bylo dokonale suché, a kápne se na něj médium s vyšším indexem lomu světla (Pleurax nebo Naphrax). Na kapku se položí krycí sklíčko s vrstvičkou přichycených rozsivek. I toto krycí sklíčko by se mělo předtím podržet nad plamenem, aby se odstranily zbytky vody, které by se mohly držet v nedokonale vysušených rozsivkových schránkách. Celý preparát se pak v pinzetě přidržuje nad plamenem, příp. nad horkou elektrickou plotnou, a to tak dlouho, až se pod krycím sklíčkem začnou tvořit bubliny a médium se rozteče pod celou jeho plochu. Pak je možno ještě horký preparát položit někam na místo, které nemůže poškodit zvýšenou teplotou, a jemně přitlačit, příp. upravit polohu krycího sklíčka, které v tomto stavu lze ještě po podložním sklíčku posouvat. Bublínky rozpuštěné pod krycím sklíčkem po chvíli samy zmizí. Po zchladnutí je možno preparát zkontrolovat pod mikroskopem. V ideálním případě je v preparátu 10 –20 schránek rozsivek v jednom zorném poli při zvětšení 1900 x).

Hotový preparát se označí kódem vzorku, místem a datem odběru. Podobně se i označí zásobní suspenze pro případ zhotovení dalších preparátů.

V trvalém preparátu se opětně provede determinace rozsivek se záznamy o abundanci jednotlivých taxonů. Ty je pak nutno převést na původní vzorek.

Poznámka:

Kromě citované ČSN 75 7715 je k hodnocení ekologického stavu vody v ČR k dispozici ČSN EN 13946 (75 7707) Jakost vod - Návod pro rutinní odběr a úpravu vzorků benthických rozsivek z řek (účinnost od 1.11.2003); a dále ČSN EN 14407 (75 7722) Jakost vod - Návod pro identifikaci a kvantifikaci benthických rozsivek z vodních toků a pro interpretaci dat. Oproti výše uvedenému postupu, založenému na hodnocení celého komplexu fytozoozoo, má hodnocení omezené jen na rozsivkovou komponentu benthického společenstva nižší výpovědní hodnotu a postup, předepisující kvantifikaci rozsivek počítáním buněk/valv v trvalých preparátech, je pro potřeby hodnocení ekologického stavu zbytečně pracný.

5. DETERMINACE

Při determinaci se používá základní taxonomická literatura. Dnes jsou pro členské státy EU všeobecně přijímaným standardem svazky ediční řady Süßwasserflora von Mitteleuropa. Podle nich by se měla volit jména a koncepce jednotlivých taxonů. Toto však nelze brát jako závazný předpis. Jejich univerzální používání je omezeno tím, že nejsou na všech pracovištích k dispozici, a jednak i tím, že náplně jmen pro mnohé taxony byly od doby vydání příslušného svazku změněny (a to nezdědka i samotnými autory svazku; týká se to zejména povýšení určitého infraspecifického taxonu, např. variety, do ranku samostatného druhu, ale i rozpadu velkých rodů až i na desítky úžeji vymezených rodů). Kromě toho některé taxonomické skupiny nebyly pro toto určovací kompendium zpracovány. Je tedy nutno připustit i používání jiných určovacích pomůcek. Je však vždy velmi žádoucí v laboratorním protokolu o tom vést příslušný záznam.

6. ODBĚROVÝ A DETERMINAČNÍ PROTOKOL

Viz přílohy.

7. BEZPEČNOST PRÁCE

Práce ve vodě nebo v její blízkosti může být nebezpečná. Je odpovědností uživatele stanovit náležitá bezpečnostní a i zdravotní opatření a zajistit shodu se všemi podmínkami národních i případných interních předpisů.

8. LITERATURA

- ČSN 75 7715 (757715) Jakost vod - Biologický rozbor - Stanovení nárostů (účinnost 1.8.1998)
- CEN/TC 230 N 0540 Water quality = Guidance standard for the surveying, sampling and laboratory analysis of phytobenthos in shallow running water. Working Document.
- ČSN EN 13946 (75 7707) Jakost vod - Návod pro rutinní odběr a úpravu vzorků bentických rozsivek z řek
- ČSN EN 14407 (75 7722) Jakost vod - Návod pro identifikaci a kvantifikaci bentických rozsivek z vodních toků a pro interpretaci dat.
- SLÁDEČKOVÁ, A. & MARVAN, P. (1978): Fytobentos. - In: Hindák, F. et al.: Sladkovodné riasy. - Slov. pedagog. naklad., Bratislava, p. 62-104.

