

## REVIZE ČSN 75 7712 KVALITA VOD – BIOLOGICKÝ ROZBOR – STANOVENÍ BIOSESTONU

**Petr Pumann<sup>1</sup>, Jana Říhová Ambrožová<sup>2</sup>, Lenka Fremrová<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10, ppumann@szu.cz

<sup>2</sup>VŠCHT ÚTVP, Technická 5, 166 28 Praha 6, jana.ambrozova@vscht.cz

<sup>3</sup>Sweco Hydroprojekt a.s., Táborská 31, 140 16 Praha 4, lenka.fremrova@sweco.cz

### Souhrn

V prvním čtvrtletí roku 2013 bude vydána revidovaná norma ČSN 75 7712 Kvalita vod – Biologický rozbor – Stanovení biosestonu. Bude obsahovat pouze menší změny (např. vynechání v praxi nepoužívaných kapitol a doplnění několika technických detailů – popis počítací komůrky Cyrus nebo nové obrázky). Největším rozdílem je upřesnění pojmu jedinec v některých konkrétních případech (např. u kolonie přesahující 100 µm velikost u rozsivky *Asterionella*, u organismů se stočenými vlákny).

**Klíčová slova:** normy; mikroskopický rozbor vody; kvantifikace mikroskopických organismů

### Summary

Amended standard ČSN 75 7712 Water quality – Biological analysis – Determination of bioseston will be released in the first quarter of the year 2013. Only minor changes are included (e.g. exclusion some clauses and adding several technical details – the description of the Cyrus counting chamber and several new pictures). The biggest change is more accurate specification of the unit organism (or individual) in some special cases (e.g. colony of diatom *Asterionella* larger than 100 µm, organisms with spiral filaments).

**Keywords:** standards; microscopic analysis of water; quantification of microscopic organisms

### Úvod

V roce 2010 byla prověřena potřeba revidovat biologické normy (ČSN, TNV, ale nikoli překládané evropské a mezinárodní normy) starší než pět let [6]. Mezi normy, pro které byla doporučena revize, byla zahrnuta také ČSN 75 7712 pro stanovení biosestonu z roku 2005 [1]. Práce na revizi probíhaly v druhé polovině roku 2012 a její předpokládané vydání je v prvním čtvrtletí roku 2013. Změny v revidované normě nejsou zásadního charakteru. Text normy je spíše aktuální revizí precizován, než aby byl nějak podstatně změněn. Postup zkoušky pro stanovení drobného biosestonu zůstává (téměř) shodný s původní normou z roku 2005. V našem příspěvku probereme všechny úpravy textu normy (kromě těch, které jsou jen ryze formálního rázu, jako jsou třeba změny odkazů na jiné normy nebo drobné formulační úpravy).

### Změny v revidované normě

Pro lepší orientaci uživatelů jsou doplněny informace o některých výrobcích/dodavatelích používaných přístrojů a pomůcek (zkumavky, počítací komůrky, sestavy filtrů pro fluorescenci). Samozřejmě použití obdobných výrobků od v normě uvedených výrobců/dodavatelů je možné.

Norma je doplněna o podrobný popis počítací komůrky Cyrus I a nákres mřížky, což je změna, která se běžného uživatele prakticky nedotkne. Nicméně podrobný popis komůrky Cyrus I, která se prakticky využívá jen v ČR a na Slovensku, by měl být obsažen alespoň v jedné z ČSN, která předpokládá její použití. Doplněn byl také obrázek centrifugační zkumavky.

Drobnou změnou je úprava teploty, při které se vzorek uchovává při dopravě. Původní rozsah 2 °C až 5 °C byl ve shodě s ČSN EN ISO 5667-3 [5] rozšířen na 1 °C až 5 °C. V úvahu ještě připadala možnost přizpůsobit teplotu ČSN EN ISO 19458 [4], kde je požadavek na uchování vzorků při teplotě (5 ± 3) °C (čili 2 °C až 8 °C). Požadavky v ČSN EN ISO 5667-3 se však týkají přímo vzorků pro hydrobiologický rozbor.

Pro promíchání zbytku vzorku po odstředění a jeho přenos na mřížku počítací komůrky je k Pasteurovým pipetám (skleněným i plastovým) přidána i automatická mikropipeta s plastovou špičkou, kterou k tomu účelu některé laboratoře využívají.

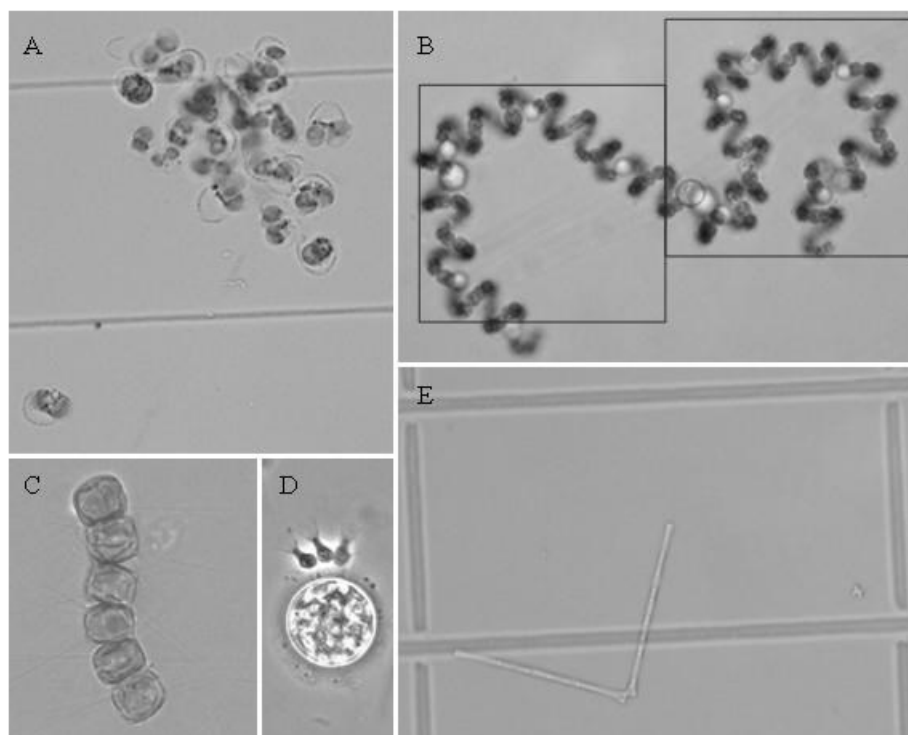
Doplněny jsou údaje týkající se vzorků konzervovaných Lugolovým roztokem. Upozorněno je jednak na skutečnost, že výsledky stanovení na živých a Lugolovým roztokem konzervovaných vzorcích jsou obtížně srovnatelné, a také, že není možné používat pro odstředování vzorku určeného k rozlišení fyziologického stavu organismů centrifugační zkumavky, ve kterých je odstředován i fixovaný vzorek.

Z revidované normy budou také vypuštěny části popisující postup stanovení biosestonu v sedimentačních komůrkách pomocí inverzního mikroskopu. V roce 2005, kdy byla provedena poslední revize ČSN 75 7712, nebyla ještě vydána EN 15204 (vyšla až v roce 2006; česky v roce 2007) [3], která uvedenou metodu obšírně zabývá. Po jejím vydání již není důvod v textu revidované normy ČSN 75 7712 tuto metodu řešit jinak než odkazem.

Velkou změnou rozsahu je vypuštění kapitol 6 *Stanovení reosestonu* a 7 *Stanovení vloček plovoucích bakterií a hub*. Účastníci připomínkového řízení a projednávání se shodli na tom, že ani jeden z uvedených postupů se v praxi nepoužívá, takže pro jejich zachování v rámci normalizovaných metodik není důvod.

Zřejmě největší změnou z hlediska běžného uživatele je mírně změněný a upřesněný způsob vyjadřování jedinců (organismů). V revidované normě je sice zachována definice ve znění z roku 2005 (v poznámce pod čarou), je však upřesněna v nové informativní příloze. Tato upřesnění lze rozdělit do několika skupin:

- **Kolonie bičíkovců rozpadlé až v počítací komůrce** (příklad na obr. 1A).  
Při zpracování vzorků s některými citlivými koloniálními řasami často dochází v počítací komůrce k částečnému nebo úplnému rozpadu kolonií (např. uvolnění jednotliví bičíkovci z koloniálních zlativek *Synura* nebo *Dinobryon*) i k postupné destrukci buněk (ztráta pohybu, tvaru apod.). Jednotliví bičíkovci pak mohou ležet na dně komůrky těsně vedle sebe (*Synura*) nebo v blízkosti loriky (*Dinobryon*). V normě je doporučeno, aby se taková rozpadlá kolonie považovala za jednoho jedince, pokud je zjevné, že jednotliví bičíkovci opravdu pocházejí z jedné kolonie.
- **Zprohýbaná nebo stočená vlákna** (příklad na obr. 1B).  
Nebylo zřejmé, jak přistupovat k řasám a sinicím, které mají výrazně zprohýbaná nebo stočená vlákna. Při striktním výkladu definice by jeden jedinec měl u všech vláknitých organismů být úsek vlákna do délky 100 µm. Délku u vláken, která nejsou rovná, jde odhadnout nebo změřit jen obtížně (zvláště u vláken nepravidelně stočených). Proto je v normě doporučeno pro organismy s výrazně nepravidelně zkroutenými vlákny (typicky sinice *Anabaena lemmermannii* nebo některé *Anabaena flos-aquae*) nebo pro organismy s pravidelně vinutými vlákny (spirální forma *Aulacoseira granulata*, *Anabaena circinalis*, *Anabaena compacta* apod.) vždy odhadovat počet jedinců podle plochy (velikosti), nikoli podle délky vlákna. Je to pro uživatele výrazně jednodušší, i když pochopitelně vypovídací hodnota počtu jedinců je u těchto organismů poměrně nízká.
- **Volně spojené buňky centrických rozsivek** (příklad na obr. 1C).  
Upřesněn je také přístup k centrickým rozsivkám v krátkých volně spojených vláknech (typicky *Stephanodiscus*). Ty by se měly považovat za jednoho jedince (pokud vlákno nepřesáhne délku 100 µm).
- **Kompaktní spojení dvou a více různých organismů** (příklad na obr. 1D).  
Upřesněn je také přístup ke dvěma a více druhům mikroskopických organismů tvořících jeden kompaktní celek. Typickými případy jsou parazitické mikromycety na rozsivkách, epifytičtí bezbarví bičíkovci na různých planktonních řasách nebo řasy a sinice žijící ve slizu *Microcystis* a dalších koloniálních sinic. V takových případech je v normě uvedeno, že se parazitické/epifytické organismy (bez ohledu na jejich počet) počítají jako jeden jedinec. Organismus, na kterém jsou tyto parazitické/epifytické organismy přisedlé, se počítá samostatně jako další jedinec (případně jedinci, pokud překračuje velikostní meze).



**Obr. 1.** Příklady vyjadřování jedinců nově uvedené v revidované ČSN 75 7712.

Položka **A**) 1 jedinec – kolonie zlativky rodu *Synura* (rozpadlá až v počítací komůrce); z této kolonie pravděpodobně pochází i odlehlá buňka vlevo dole.

Položka **B**) 2 jedinci – u sinic s pravidelně zkroucenými vlákny *Anabaena compacta* se jedinci počítají podle plochy.

Položka **C**) 1 jedinec – centrické rozsivky volně spojené do rozpadavých vláken jsou považovány za jednoho jedince, pokud nepřekročí délku 100  $\mu\text{m}$ .

Položka **D**) 2 jedinci – tři bezbarví bičíkovci na centrické rozsivce jsou počítáni jako jeden jedinec, centrická rozsivka potom jako další jedinec.

Položka **E**) 1 jedinec – 2 buňky rozsivky *Asterionella* ve srovnání s mřížkou počítací komůrky zjevně delší než 50  $\mu\text{m}$ . Norma však doporučuje počítat podobné kolonie vždy jako jednoho jedince bez ohledu na velikost.

- **Některé kolonie nebo cenobia překračující stanovenou mez 100  $\mu\text{m}$**  (příklad na obr. 1E).

Zjednodušení pro uživatele přináší i doporučení pro počítání jedinců u organismů tvořících pravidelné kolonie a cenobia přesahující hranici 100  $\mu\text{m}$ . V praxi docházelo občas k situacím, kdy např. hvězdicovité kolonie rozsivky *Asterionella* měly buňky o několik  $\mu\text{m}$  delší než 50  $\mu\text{m}$ . Potom kolonie mírně překračovaly velikostní mez 100  $\mu\text{m}$ , což pak znamenalo, že jedna samotná buňka byla jeden jedinec a dvě a více buněčné kolonie byly vždy dva jedinci. V těchto případech revidovaná norma doporučuje pro zjednodušení považovat kolonie vždy jen za jednoho jedince, přestože při důsledné aplikaci 100  $\mu\text{m}$  pro délku vláken resp. plochu kolonií by se jednotlivé kolonie měly vyjadřovat jako násobky (tj. obvykle jako dva jedinci). Proto kolonie *Asterionella formosa* (další organismy tvořící hvězdicovité kolonie), cenobia zelených řas (např. u rodu *Pediastrum* nebo zelených bičíkovců rodu *Eudorina* nebo *Volvox*) nebo některé kolonie tvořící zlativky (např. *Uroglena* nebo *Synura*) se vždy doporučuje považovat za jednoho jedince bez ohledu na velikost. Pravdou je, že např. v případě rodu *Volvox*, může být překročení 100  $\mu\text{m}$  hranice poměrně značné. Z planktonních jedinců zůstane 100  $\mu\text{m}$  hranice především pro koloniální sinice (*Microcystis*, *Aphanothece* apod.), sinice s kroucenými vlákny a některé zelené řasy (*Botryococcus*).

Vyjadřování mikroskopických organismů v jedincích je sice poměrně jednoduché, ale pro některé organismy není příliš vhodné, protože takto vyjádřené výsledky je obtížné interpretovat. Informativní příloha B proto také uvádí příklady sinic a řas, pro které je vyjadřování v jedincích problematické. Jedná se o sinice s proměnlivou velikostí kolonií (např. *Microcystis*), velké řasy (např. *Ceratium*) nebo organismy s rozpadavými koloniemi (*Asterionella*). Přinejmenším v těchto případech je doporučeno, aby byly výsledky doprovázeny doplňujícími údaji.

### **Diskutované, ale nezařazené změny**

V prvním návrhu revidované normy bylo umožněno používání komůrky bez svorek připevňujících krycí sklo ke komůrce, pokud kvůli jejich kolizi s objektivem není možné vyšetřit celý objem komůrky. Někteří účastníci připomínkového řízení však byly proti tomu, a proto byla tato možnost vyřazena. Více o problému v samostatném příspěvku v tomto sborníku [7].

Zvažováno rovněž bylo vyřazení kapitoly 5 *Stanovení většího (síťového) biosestonu*. Toto stanovení se týká především zooplanktonu. Pro jeho stanovení však existuje zavedená evropská norma ČSN EN 15110 [2] (pro odběr) a pracovníky podniků Povodí je využívána též metodika MŽP [8]. Postupy stanovení většího biosestonu uvedené v těchto dokumentech a v ČSN 75 7712 se však liší. Kapitola věnovaná stanovení síťového biosestonu v revidované normě zůstane, aby na ni pracovníci laboratoří mohli odkazovat ve standardních operačních postupech.

### **Závěr**

Z výčtu změn v revidované normě je zjevné, že implementace této revize do praxe nebude příliš pracná. Úpravy ve standardních operačních postupech nebudou buď žádné, nebo budou minimální. Při důsledné aplikaci informativní přílohy B by měly alespoň některé rozborů doprovázet doplňující údaje (např. formou poznámky k protokolu), což nemusí být vždy snadné z hlediska používaných laboratorních systémů.

**Poděkování:** Norma ČSN 75 7712 byla vypracována ve spolupráci s dalšími členy TNK Kvalita vod a odborníky, jmenovitě s RNDr. Blankou Desortovou, CSc. RNDr. Ladislavem Havlem, CSc., Mgr. Karlem Kolářem, Ph.D., Emilem Janečkem, Mgr. Čestmírem Ondrušákem, Mgr. Rodanem Gerišem, RNDr. Jindřichem Durasem, Ph.D. a RNDr. Petrem Marvanem, CSc.

### **Použitá literatura**

- [1] ČSN 75 7712 Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení biosestonu (2005)
- [2] ČSN EN 15110 (75 7702) Jakost vod – Návod pro odběr vzorků zooplanktonu ze stojatých vod (2006)
- [3] ČSN EN 15204 (75 7718) Jakost vod – Návod pro počítání fytoplanktonu za použití inverzní mikroskopie (metoda podle Utermöhla) (2007)
- [4] ČSN EN ISO 19458 (75 7801) Jakost vod – Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu (2007)
- [5] ČSN EN ISO 5667-3 (75 7051) Jakost vod – Odběr vzorků – Část 3: Návod pro konzervaci vzorků a manipulaci s nimi (2004)
- [6] Fremrová L.: Prověření norem ČSN a TNV z oboru jakosti vody – biologické metody. HYDROPROJEKT CZ a.s. 2010
- [7] Pouzarová T., Pumann P. O důležitosti používání svorek při počítání v počítacích komůrkách. Vodárenská biologie 2013
- [8] Přikryl I. Metodika odběru a zpracování vzorků zooplanktonu stojatých vod. Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.M. 2006, 14 stran