

SPÔSOB VÝPOČTU SINÍC PRI ODOBRATÝCH VZORKÁCH Z VODNÝCH NÁDRŽÍ

THE METHOD OF CALCULATING CYANOBACTERIA IN WATER SAMPLES TAKEN FROM THE TANK

Tibor DZURO – Peter RUMAN – Miroslav BADIDA – Dušan ŠEBO

ABSTRAKT

Tento príspevok zahrňa stanovenie počítania buniek (resp. meranie dĺžky vlákien) siníc v svetelnom mikroskope (prípadné využitie fluorescencie), po predošlej determinácii vyskytujúcich sa taxónov siníc. Bunky sa spočítavajú v komôrke Cyrus I. až po dezintegrácii kolónií na jednotlivé bunky či vlákna, prípadne po dezintegrácii na menšie kolónie do počtu 50 buniek. Vzorky sa predtým väčšinou neupravujú odstredením. Odstredenie sa používa len pri vzorkách s nízkou abundanciou siníc a tiež pri vzorkách po mechanickej deštrukcii aerotopv, resp. chemickej deštrukcii - fixácii.

Kľúčové slová: sinice, vzorky, voda, centrifúga, preparát

ABSTRACT

This post includes the determination of cell count (or measure the length of fiber) cyanobacteria in the light microscope (possible use of fluorescence) after previous determinación occurring taxa of cyanobacteria. Cells were counted in the chamber Cyrus I. to the disintegration of colonies into individual cells or fibers, or after the disintegration into smaller colonies of 50 cells. Samples are usually not provided before centrifugation. Spinning is used only for samples with low abundance of cyanobacteria and also in samples after mechanical destruction aerotopv respectively. Chemical destruction - fixation.

Key words: cyanobacteria, samples, water, centrifuges, preparation

ÚVOD

Kvalitu vôd na kúpanie a hygienické podmienky prírodných rekreačných lokalít ako aj umelých kúpalísk na Slovensku sleduje Úrad verejného zdravotníctva (ÚVZ) Slovenskej republiky a 36 Regionálnych úradov verejného zdravotníctva (RÚVZ), ktoré vo svojej pôsobnosti v rámci výkonu Štátneho zdravotného dozoru (ŠZD) a špecializovaných úloh verejného zdravotníctva zabezpečujú monitorovanie kvality vody na kúpanie, vydávajú pokyny na odstránenie zistených nedostatkov, ukladajú úhradu nákladov a sankcie. Vstúpením nášho štátu do EÚ sa SR zaviazala každoročne predkladať, po skončení kúpackej sezóny, Správu o kvalite sladkovodných oblastí určených na kúpanie, ktoré sa nachádzajú na jej území. Výsledky zo ŠZD a z monitoringu zhromažďuje a vyhodnocuje ÚVZ SR, a na základe získaných výsledkov vypracováva Správu o pripravenosti kúpalísk na letnú turistickú sezónu (LTS), ako aj Správu SR o kvalite vody na kúpanie, ktorú predkladá Európskej komisii (EK) v spolupráci so Slovenskou agentúrou životného prostredia (SAŽP). Na to, aby SAŽP mohlo vypracovať Správu o kvalite vôd musí vykonať odbery vzoriek stanoviť jednotlivé druhy baktérií a určiť ich množstvo.

ODBER, KONZERVÁCIA, TRANSPORT A UCHOVANIE VZORIEK

Vzorky sa odoberajú do čistých vzorkovníc, naplnených do 4/5 objemu. Používa sa rúrkový vzorkovač.

Na stanovenie siníc/cyanobaktérií v stojatých vodách (napríklad nádrže, prírodné kúpaliska) sa na odberovom mieste odoberie vzorka z hĺbkového horizontu od 0 cm do 30 cm. Podľa rozptýlenia siníc/cyanobaktérií na odberovom mieste sa odporúča odobrať plošne zlievanú integrovanú vzorku z minimálne 3 čiastkových vzoriek v okruhu odberového miesta (do 4 m). Postupuje sa tak, že rúrkový vzorkovač sa vnorí do vodného stĺpca a v hĺbke 30 cm sa uzavrie. Čiastkové vzorky sa premiešajú a zlejú do vhodnej nádoby a zhomogenizujú. Minimálny objem jednej čiastkovej vzorky musí byť aspoň 0,5 l. Po premiešaní čiastkových vzoriek v nádobe sa následne naplnia do vzorkovnice. Zvyšná zhomogenizovaná vzorka z nádoby sa využije na naplnenie vzorkovnic pre stanovenie ostatných taxonomických skupín fytoplanktónu (rias) a chlorofylu-a. Vzorky sa odoberajú z lode, odberového móla, ojedinelé z brehu, kde je minimálna hĺbka vody 1 m.[1]

Odoberú sa najmenej 3 čiastkové vzorky z hĺbkového horizontu od 0 cm do 30 cm.

Optimálna denná doba pre odber je v čase medzi 6 hodinou a 11 hodinou.

POSTUP STANOVENIA BIOSESTÓNU

Do centrifugacnej skúmavky sa odmeria 10 ml dôkladne premiešanej vzorky. Voda sa odstredí 5 min v laboratórnej centrifúge s výkyvným nebrzdeným rotorom. V centrifúge s polomerom rotora 0,08 m sa odstredí pri 2 000 otáčkach za minútu, pri inom polomere rotora sa počet otáčok prepočíta podľa vzorca:

$$n_2 = \sqrt{\frac{n_1^2 \times r_1}{r_2}} = \sqrt{\frac{3,2 \times 10^5}{r_2}} \quad (1)$$

kde:

- n je počet otáčok rotora/min,
- r polomer rotora v m,
- index 1 vyjadrenie počtu otáčok pri polomere rotora 0,08 m,
- index 2 vyjadrenie počtu otáčok rotora/min pri inom polomere rotora.

Po centrifugácii sa supernatant odleje, a to tak, aby celý sediment ostal v skúmavke. Voda, ktorá príme na stenu centrifugačnej skúmavky sa spojí so sedimentom opakovaným krátkym, 30-sekundovým odstredením. Objem odstredeného sedimentu sa upraví pipetou na 0,2 ml. Na úpravu objemu sa použije voda zo supernatantu. Vzorka (upravený sediment) sa opatrne zhomogenizuje preparačnou ihlou. Kvapka zhomogenizovanej vzorky sa preniesie na mriežku počítacej komôrky (ktorá sa vopred vyčistí), prekryje sa krycím sklíčkom a upevní sa svorkami k počítacej komôrke. Prebytočná voda sa z bočných kanálikov počítacej komôrky odstráni vyfúknutím. [3]

Veľmi oživené vzorky alebo vzorky obsahujúce sinice/cyanobaktérie s aktívnymi aerotopmi je nutné spracovať bez zahustenia centrifugáciou. V tomto prípade sa na počítaciu komôrku preniesie kvapka dôkladne zhomogenizovanej vzorky (napríklad dôkladným pretrepávaním).

V mikroskope sa spočítajú organizmy (jedince alebo bunky) na celej ploche komôrky alebo na časti plochy podľa hustoty a charakteru taxónov vzorky. Pri počítaní organizmov sa má dodržať nasledujúci postup:

- a) preparát sa prezrie pri malom zväčšení,
- b) preparát sa prezrie pri základnom 200-násobnom až 250-násobnom zväčšení,
- c) veľmi drobné organizmy sa počítajú pri 400-násobnom až 450-násobnom zväčšení.

Pri nezahustených vzorkách sa postupuje podľa tabuľky 1 a zistené počty sa vyjadrujú ako:

- a) počet buniek na 1 ml,
- b) počet jedincov na 1 ml.

Tab. 1 - Výpočet počtu organizmov v 1 ml pri analýze nezahustenej vzorky na počítacej komôrke Cyrus I[2]

Časť komôrky	Počet štvorcov (n)	Počet jedincov alebo buniek	Počet v 1 ml (X)
štvorec	1	a	a x 160 000
1 pás	40	a	a x 4 000
2 pásy	80	a	a x 2 000
4 pásy	160	a	a x 1 000
10 pásov	400	a	a x 400
20 pásov	800	a	a x 200
celá komôrka	1 600	a	a x 100
1 mm ²	16	a	a x 10 000

Na výpočet sa používa vzorec:

$$X = \frac{axK}{nxyzV}, \quad (2)$$

kde:

- X je počet jedincov/buniek v 1 ml,
- a počet jedincov alebo buniek v n štvorcoch,
- n počet vyšetrených štvorcov,
- z zahustenie vzorky (ak sa vzorka nezahusťuje $z = 1$),
- K celkový počet štvorcov v komôrke (pre Cyrus I, $K = 1\ 600$),
- V objem komôrky v ml (pre Cyrus I, $V = 0,01$ ml).

Pre komôrku Cyrus I (obr. 1) pri zahustení vzorky z 10 ml na objem 0,2 ml ($z = 50$). [3]



Obr. 1 - Komôrka Cyrus I[1]

Pri určovaní rozsievok je potrebné pripraviť trvalý rozsievkový preparát podľa postupu v STN EN 13946. Výsledkom stanovenia producentov a konzumentov je zoznam určených taxónov a počet jedincov/buniek na 1 ml.

STANOVENIE SINÍC / CYANOBAKTÉRIÍ

Princípom stanovenia je určenie počtu buniek siníc/cyanobaktérií s veľkosťou buniek nad 2 μm na jednotku objemu. Najmä pri významnom zastúpení siníc/cyanobaktérií vo vzorke vzhľadom na ostatne taxonomické skupiny alebo pri ich účelovom stanovení je potrebné vzhľadom na ich charakteristické vlastnosti (tvorba početných kolónií, prítomnosť aerotopov) použiť aj iný postup úpravy vzorky. Výber postupu alebo postupov sa zvolí po predošlom vykonaní kvalitatívneho stanovenia smíc/cyanobaktení. [4]

Účinnosť dezintegrácie závisí od povahy konkrétnej vzorky. V prípade súčasného výskytu siníc uvedených v bode b) a c) je nutné spracovať a počítať vzorky jednotlivo, podľa oboch postupov.

Pri počítaní siníc/cyanobaktérií je potrebné spočítať minimálne 100 buniek alebo vlákien na komôrke. Sinice/cyanobaktérie sa počítajú pri 200-násobnom až 400-násobnom zväčšení za súčasného preostrovania vzorky, vzhľadom na prilnutie buniek siníc ku komôrke alebo kryciemu sklíčku. Pri kvantifikácii siníc/cyanobaktérií sa uprednostňuje počítanie nezahustenej vzorky. Zahustenie vzorky sa odporúča v prípade pridania Lugoiovho roztoku alebo KOH (po reaktivácii aerotopov), ak je predpokladaný počet buniek na komôrke menší ako 100. Zahusťuje sa centrifugáciou pri 700 g počas 5 min. Podľa očakávanej koncentrácie siníc je možné objem po centrifugácii pred počítaním na komôrke Cyrus I upraviť na 0,2 ml, 0,5 ml alebo 1 ml. Pri vláknitých siniciach/cyanobaktériách, kde nemožno jednoznačne rozlíšiť bunkové priehradky (napríklad Planktothrix, Aphanizomenon, Pseudanabaena, Limnothrix), sa na stanovenie počtu buniek meria dĺžka vlákna, pričom jednej bunke zodpovedá dĺžka vlákna 5 μm . [3]

Na výpočet početnosti siníc/cyanobaktérií s využitím dezintegrácie kolónií/vláken sa použije tento vzorec:

$$A_i = \sum_{i=1}^n \frac{p \times P_k \times V_z \times (V_d + V_{KOH})}{P_p \times V_p \times V_k \times V_d} \quad (3)$$

kde:

- A_i je početnosť buniek všetkých počítaných taxónov siníc/cyanobaktérií (bunky v 1 ml),
- n celkový počet spočítaných taxónov siníc/cyanobaktérií,
- p počet buniek siníc/cyanobaktérií v počítanej časti komôrky,
- P_p počítaná plocha komôrky v mm^2 , alebo vyjadrená ako počet pásov alebo štvorcov komôrky,
- P_k celková plocha komôrky v mm^2 , alebo 40 pásov alebo 1 600 štvorcov (P_p a P_k musí byť v rovnakých jednotkách),
- V_d objem vzorky použitý na dezintegráciu v ml,
- V_{koh} objem pridaného činidla v ml (KOH, Lugolov roztok), v prípade Lugolovho roztoku sa väčšinou zanedbáva,
- V_p objem vzorky použitý na zahusťovanie v ml (ak sa vzorka nezahusťuje $V_p = 1$ ml),
- V_z objem zahustenej vzorky v ml (ak sa vzorka nezahusťuje $V_z = 1$ ml),
- V_k objem komôrky Cyrus I v ml (0,01 ml). [4]

ODBER VZORIEK V STOJATÝCH VODÁCH

Technika odberu ako aj základné podmienky odberu sú rovnaké ako v prípade odberu vzoriek v tokoch. Vzorky bentických rozsievok a vzorky perifytónu a vláknitých baktérií sa odoberajú samostatne do samostatných vzorkovníc.

V princípe sa vzorky odoberajú z ponorených substrátov z jedného alebo viacerých odberových miest z rôznych častí vodných útvarov stojatých vôd (napríklad nádrže, jazera) v závislosti od ich veľkosti a vhodnosti odberového miesta.

Výber počtu odberových miest závisí od účelu stanovenia a od veľkosti a rôznorodosti vodného útvaru. Tak ako aj v tokoch, vzorky by sa mali odoberať v stojatých vodách z podobného substrátu, z litorálu a vždy v oblasti vystavenej čo najmenšiemu kolísaniu hladiny a bez zjavného priameho zdroja znečistenia v dôsledku antropogénnej činnosti (s výnimkou špecificky zameraných výskumných prác). [2]

Hĺbka odberu závisí od priehľadnosti vodného stĺpca, v priemere sa vyberá substrát v hĺbke do 50 cm v miestach s dostatočne presvetleným vodným stĺpcom. Najvhodnejším typom odoberaného substrátu sú kamene rôznych veľkostných kategórií alebo vodné makrofyty. Vodné makrofyty sa odoberajú najmä tam, kde je pevný substrát prítomný len v častiach veľmi ovplyvnených kolísaním hladiny alebo tam, kde chýba.

Odporúča sa odoberať vzorky z tých druhov vodných makrofytov, ktoré majú pevné listy a stonku. Ideálne je, ak sa na všetkých odberových miestach a aj útvaroch stojatých vôd odoberajú vzorky z rovnakých druhov.

Pred vlastným odberom sa na každom odberovom mieste zhodnotí štruktúra a stav nárastov. Pri vlastnom odbere treba dodržať rovnaký postup ako v prípade odberu vzoriek z tokov s tým rozdielom, že substrát sa nevyberá z prúdnice, ale z miesta čo najmenej ovplyvneného kolísaním hladiny, dostatočne presvetleného, kde sa nachádza nárast v stabilných podmienkach. Zoznam vyšších systematických skupín fyto-bentosu su zahrnuté v tabuľke 2. [5]

Tab. 2 - Zoznam vyšších systematických skupín fyto-bentosu zahrnutých do stanovenia percentuálneho podielu[3]

Latinský názov	Slovenský názov
Cyanophyta	sinice
Rhodophyta	červené riasy
Chlorophyta	zelené riasy
Chysophyceae	žltohnedé riasy
Bacillariophyceae	rozsievky
Conjugatophyceae	spájavky
ostatné skupiny	



ZÁVER

Problém znečistenia povrchových vôd živinami, predovšetkým fosforom a dôsledky masového rozvoja siníc sa stáva čoraz vážnejším. Nadmerný prísun živín naplavenín organických látok vedie k zhoršovaniu kvality vody a vedie k rozvoju vodného kvetu siníc a tým k obmedzeniu nielen rekreačného využitia nádrží. Preto je nutné merať jednotlivé mikroorganizmy vo vodných nádržiach a v prípade ich premnoženia zabrániť negatívnym vplyvom. Najúčinnnejším spôsobom je využitie eliminačných metód, či už mechanických, chemických, biologických alebo elektrolytických metód.

Tento článok bol vytvorený realizáciou projektu "Implementácia a modifikácia technológie na znižovanie výskytu siníc v stojatých vodách" (ITMS: 26220220028), na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] BAČKOR, M.: Základy systému nižších rastlín I. (Sinice, riasy a slizovky), UPJŠ, Košice, 2002, ISBN 80-7097-453-4.
- [2] BENDÍKOVÁ, M.: Eutrofizácia malých vodných nádrží. In: I. konferencia s medzinárodnou účasťou: Malé vodné diela alternatívne zdroje energie, Košice, Litera, 2001, s. 85-90, ISBN 80-232-0205-7.
- [3] BITTON, G.: Wastewater Microbiology, 3rd edition, New York, 2005, ISBN 0-471-65071-4.
- [4] ČISTÝ, M.: Rybníky a malé vodné nádrže II, STU Bratislava, 2005, ISBN 80-227-2294-4.
- [5] DRÁBKOVÁ, M. a kol.: Přípravky pro redukci masového rozvoje siníc, In: Cyanobacterie 2006, biologie, toxikologie a management, Sborník konference Brno, Průhonice, 2006, s. 156-160, ISBN 80-86188-22-1.

ADRESY AUTOROV

Tibor DZURO, Ing., Technická univerzita v Košiciach, Strojnícka fakulta, Katedra environmentalistiky, Park Komenského 8, 042 00 Košice, Slovenská republika, e-mail: tibor.dzuro@tuke.sk

Peter RUMAN, Ing., Technická univerzita v Košiciach, Strojnícka fakulta, Katedra environmentalistiky, Park Komenského 8, 042 00 Košice, Slovenská republika, e-mail: peter.ruman@tuke.sk

Miroslav BADIDA, Dr.h.c., prof., Ing., PhD., Technická univerzita v Košiciach, Strojnícka fakulta, Katedra environmentalistiky, Park Komenského 5, 042 00 Košice, Slovenská republika, e-mail: miroslav.badida@tuke.sk

Dušan ŠEBO, prof., Ing., PhD., Technická univerzita v Košiciach, Strojnícka fakulta, Katedra environmentalistiky, Park Komenského 5, 042 00 Košice, Slovenská republika, e-mail: dusan.sebo@tuke.sk

RECENZENT

Vojtech KOLLÁR, prof. Ing., PhD., Katedra bezpečnostného manažmentu, Ústav verejnej správy, Vysoká škola ekonómie a manažmentu verejnej správy v Bratislave, Furdekova 16, 851 04 Bratislava 5, Slovenská republika