



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Vzorkování a základní chemické a biologické analýzy v hodnocení životního prostředí

BIOLOGICKÁ ČÁST



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

- dle WFD (Water Framework Directive) (2000)- nutné hodnotit kvalitu povrch. vod
- několik možných přístupů:
 - indexy znečištění (saprobity)
 - index diverzity (Shannon&Weaver)
 - bioindikátory



- znečištění vod je rozděleno do zón díky různé účinnosti samočisticích schopností povrchových vod (fyz, chem, bio)
- zóny jsou charakterizovány- množstvím O_2 , organickou hmotou, produkty rozkladu a mineralizace



Hodnocení stavu povrchových vod - indexy znečištění

Saprobní index

– systém hodnocení stavu znečištění vodního toku dle společenstev (typ společenstva vykazující odolnost vůči urč. stupni znečištění „tolerance organismů vůči množ. organických látek/O₂“

Saprobity – ukazatel množství organických látek (OL) ve vodním tělese

Kategorie sapr. indexu kvality povrch. vod:

-**polysaprobni** -nejznečištěnější voda , vysoké množství OL a bakterií, nedostatek O₂ , anaerobní procesy - chybí obratlovci

α-mesosaprobni - střední úroveň OL, málo O₂ , maximální přirozené znečištění povrchových vod, anaerobní i aerobní procesy - výskyt méně náročných eukaryotů

β-mesosaprobni - mírně znečištěná voda, obsah O₂ dobrý, spíše aerobní procesy, výskyt živočichů typu pstruh, okoun

oligosaprobni - OL a mikroorganismy skoro chybí, nadbytek O₂, silně aerobní procesy - i náročnější živočichové (mihule)



Hodnocení stavu povrchových vod - indexy znečištění

Klasifikace saprobit:

- eusaprobita (E) - odpadní vody
- izosaprobita (i) například městské splašky
- metasaprobita (m) zahnívající městské splašky
- hypersaprobita (h) odpadní vody potravinářského průmyslu (jatka)
- ultrasaprobita (u) hustá odpadní voda, ve které ještě nezapočaly rozkladné procesy.

Saprobní index S celého společenstva, který nám charakterizuje znečištění, je dán vztahem:

- **$S = \text{suma } (h \cdot si) / \text{suma } h$**
- kde h je abundance zjištěného organismu, si je individuální saprobní index organismu
- používán v Evropě (hlavně Stř. a V Evropa)

Úskalí:

determinace organismů do druhů, potřeba znát abundanci, omezené znalosti o ekologických nárocích druhu



Hodnocení stavu povrchových vod - indexy diverzity

- stresové faktory mohou ovlivnit strukturu společenstva
- předpoklad, že narušení vod. ekosystému/společenstva povede ke snížení biodiverzity (stresorem je i znečištění)
- index diverzity je založen na:
 - počtu objevených druhů (richeness)
 - četnosti individuí v rámci druhu (abundance)
 - druhové vyrovnanosti (evenness)

(Shannon-Wiener index, Wilhm and Doris index)

$$H' = - \sum_{i=1}^R p_i \log p_i$$

p_i - celkové množ. jedinců (celková biomasa) i -druhů

R - počet druhů



Hodnocení stavu povrchových vod - indexy diverzity

Výhody:

- snadný výpočet
- vhodné i pro 1 lokalitu (srovnání v čase)

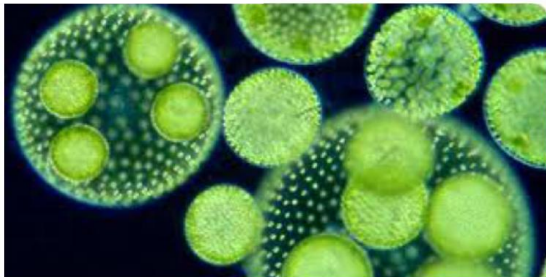
Nevýhody:

- variabilita rozmanitosti i v nenarušené lokalitě (chybí referenční hodnota)
- všechny druhy stejná váha (nevhodné pro srovnání lokalit ve stejném čase)
- > žádná EU země nepoužívá indexy diverzity jako národní standard biol. hodnocení vod



Hodnocení stavu povrchových vod - bioindikátory

- Planktonní druhy (fytoplankton, zooplankton) - kategorizace dle velikosti
- **fyto/zooplankton** –krátký živ.cykus-rychlá odezva na změny v ekosystému (znečištění)
- fytoplankton - druhy snášející trofizované vody i druhy citlivé na organické/chemické znečištění
- některé řasy – masivní rozvoj (zápach, hnilobné procesy, blokace filtrů - Cladophora, Spirogyra, Cyanobacteria) – pojmy: bentické řasy, perifyton, epifyton, epiliton
- nutné vzorkovat v různých hloubkách na obou stranách toku



Název skupiny	Velikost		Příklady skupin
Megaplankton	$> 2 \times 10^{-2}$ m	(20+ mm)	živočichové
Makroplankton	2×10^{-3} - 2×10^{-2} m	(2-20 mm)	drobní živočichové
Mezoplankton	2×10^{-4} - 2×10^{-3} m	(0.2 mm-2 mm)	drobní živočichové
Mikroplankton	2×10^{-5} - 2×10^{-4} m	(20-200 μ m)	řasy, drobní korýši
Nanoplankton	2×10^{-6} - 2×10^{-5} m	(2-20 μ m)	drobní prvoci a řasy
Pikoplankton	2×10^{-7} - 2×10^{-6} m	(0.2-2 μ m)	bakterie a drobní prvoci
Femtoplankton	$< 2 \times 10^{-7}$ m	(< 0.2 μ m)	viry



Hodnocení stavu povrchových vod - bioindikátory

- princip:

znečištění- úbyvá málo tolerantních druhů->klesá bohatost společenstva

- kvantifikace

- stanovení biomasy (sušina, čerstvá váha)

- stanovení chlorofylu a (spektrofotometricky)

- počítání buněk/délka vláken (bude rozebíráno ve cvičení)

-> používán v Evropě (11 států)



Hodnocení stavu povrchových vod - bioindikátory

- vodní makrofyta- jejich nepřítomnost může indikovat změny v kvalitě vody (zvýšený zákal, salinita, přítomnost herbicidů)
- makrozoobentos (= bentos) – středně dlouhý živ. cyklus, celoživotní kontakt se sedimentem
- změny v morfologii, počtu, chování indikují změnu ve vod. ekosystému (lehké vzorkování, omezená pohyblivost)



Biologické rozbory – pitná voda (PiV)

- dle zákona 252/2004 Sb. má být PiV bez: chuti, zápachu, nebezpečných chemikálií, zákalu a mikroorganismů ohrožujících veřejné zdraví → vymezeno hygienickými limity
- nutné pravidelné rozbory k ověření kvality PiV (četnost odběrů dle počtu obyvatel a objemu vody v zás. oblasti) + výjimečné situace (přerušení dodávky >24h, po opravě havárie vodovodu, nový zdroj PiV,..)
- zahrnuty i výdejní automaty a zdroje PiV mimo rozvodnou síť



Biologické rozborý – pitná voda (PiV)- četnost odběrů

A. Minimální roční četnost odběru a rozsah rozborů vzorků pitné vody (mimo balené vody)

Počet obyvatel zásobované oblasti (§ 2 písm. d)) při denní spotřebě 200 l na osobu	Objem vody rozváděné či produkované v zásobované oblasti (m ³ /den) *)	Roční počet vzorků pro krácený rozbor **)	Roční počet vzorků pro úplný rozbor **)
≤ 50	≤ 10	1	1 za dva roky
> 50 ≤ 100	> 10 ≤ 20	2	1
> 100 ≤ 500	> 20 ≤ 100	3	1
> 500 ≤ 5 000	> 100 ≤ 1 000	4	2
> 5 000 ≤ 50 000	> 1 000 ≤ 10 000	4 + 3 na každých 1 000 m ³ /den (včetně nedokončených) z celkového objemu	1 + 1 na každých 3 300 m ³ /den (včetně nedokončených) z celkového objemu
> 50 000 ≤ 500 000	> 10 000 ≤ 100 000		3 + 1 na každých 10 000 m ³ /den (včetně nedokončených) z celkového objemu
> 500 000	> 100 000		10 + 1 na každých 25 000 m ³ /den (včetně nedokončených) z celkového objemu



Biologické rozbory – pitná voda (PiV)

č.	ukazatel	jednotka	limit	typ limitu	Vysvětlivky
1	<i>Clostridium perfringens</i>	KTJ/100 ml	0	MH	1
2	enterokoky	KTJ/100 ml	0	NMH	
		KTJ/250 ml	0	NMH	2
3	<i>Escherichia coli</i>	KTJ/100 ml	0	NMH	
		KTJ/250 ml	0	NMH	2
4	kolidformní bakterie	KTJ/100 ml	0	MH	
5	mikroskopický obraz – abioseston	%	10	MH	3, 4
6	mikroskopický obraz – počet organismů	jedinci/ml	50	MH	3, 4
7	mikroskopický obraz – živé organismy	jedinci/ml	0	MH	3, 5
8	počty kolonií při 22 °C	KTJ/ml	200	MH	6
		KTJ/ml	500	NMH	2
9	počty kolonií při 36 °C	KTJ/ml	100	MH	7
		KTJ/ml	20	NMH	2
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KTJ/250 ml	0	NMH	2

KTJ- kolonie tvořící jednotka

NMH – nejvyšší mezní hodnota

MH – mezní hodnota

Mikrobiologické ukazatele	Metoda
<i>Escherichia coli</i>	ČSN EN ISO 9308-1
kolidformní bakterie	ČSN EN ISO 9308-1
enterokoky	ČSN EN ISO 7899-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ČSN EN 12780
počty kolonií při 22°C a 36°C	ČSN EN ISO 6222
<i>Clostridium perfringens</i>	ČSN ISO 11731
Legionely	ČSN ISO 11731

Vysvětlivky k tabulkám:

1. Stanovuje se u pitných vod upravovaných přímo z povrchových vod nebo u podzemních vod ovlivněných povrchovými vodami. Tam, kde hodnota tohoto ukazatele není dodržena, musí se prozkoumat daný vodní zdroj a technologii úpravy, aby se zjistilo, zda lidské zdraví není potenciálně ohroženo přítomností patogenních mikroorganismů, např. kryptosporidií. Postup odpovědné osoby stanoví § 3 odst. 1 zákona č. 258/2000 Sb., ve znění zákona č. 274/2003 Sb.

2. Platí pouze pro balenou pitnou vodu.

3. Nedílnou součástí výsledku zkoušky jsou i další informace získané při mikroskopickém rozboru, které mohou přispět k interpretaci výsledků. Tento slovní popis obsahuje zejména složení přítomného abiosestonu (případně jeho možný původ), bližší zařazení přítomných organismů a jejich možný původ (surová voda, pomnožení v síti), jejich příslušnost k obtížně odstranitelným skupinám apod. V případě výskytu živých organismů u vod zabezpečených dezinfekcí je vždy nutné udat, o jaké organismy se jednalo. U podzemních vod se zaznamenává především přítomnost organismů vázaných na povrchové vody a organismů indikujících zhoršenou jakost vody. Podzemní voda s výskytem organismů vázaných na povrchové vody musí být považována za vodu podzemní ovlivněnou vodou povrchovou (viz vysvětlivka 1).

4. Organismy zahrnované pod tento ukazatel se pro účely vyhlášky rozumí sinice a všechny eukaryontní organismy (řasy, prvoci, mikromycéty, viřníci, hlístice apod.). Mikroskopický nález masového výskytu organotrofních bakterií (více než 100 bakterií/ml) je třeba posuzovat jako překročení MH ukazatelů č. 9, příp. č. 10.

5. Mezní hodnota platí pouze u vod zabezpečených desinfekcí. Živé organismy obsahující chlorofyl se odliší pomocí autofluorescence chlorofylu. Ostatní, pokud je to možné, podle dalších znaků (například pohyb, stav protoplastu).

6. Bez abnormálních změn. Pro náhradní zásobování; pro vodu dodávanou ve vzdušných, vodních a pozemních dopravních prostředcích a pro vodu z malých nedezinfikovaných zdrojů, produkujících méně než 5 m³ za den, platí mezní hodnota 500 KTJ/ml.

7. Bez abnormálních změn. Pro náhradní zásobování; pro vodu dodávanou ve vzdušných, vodních a pozemních dopravních prostředcích a pro vodu z malých nedezinfikovaných zdrojů, produkujících méně než 5 m³ za den, platí mezní hodnota 100 KTJ/ml.



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Biologické rozbory – pitná voda (PiV)

- **Clostridium perfringens**

Nachází se ve fekáliích a odpadních vodách, jedná se o běžnou součást střevní flóry teplokrevných zvířat a člověka. V celé lidské populaci se dá nalézt u necelé čtvrtiny osob. Tvoří velmi odolné spory, které byly navrženy jako indikátor účinnosti filtrace a indikátor přítomnosti virů a prvoků v upravené vodě. Spory přežívají v prostředí mnohem déle než patogeny, proto slouží také jako indikátor staršího fekálního znečištění.

Enterokoky

Přítomné v odpadních vodách a fekáliích teplokrevných živočichů a člověka. Výjimečně se mohou některé druhy množit i v půdě a na rostlinné vegetaci, která nebyla nijak fekálně znečištěna. Je to indikátor fekálního znečištění.

Escherichia coli

Přítomná v odpadních vodách a fekáliích teplokrevných živočichů a člověka. V současné době nejlepší indikátor fekálního znečištění. Vzhledem ke své citlivosti k okolním vlivům indikuje čerstvé fekální znečištění.

Koliformní bakterie

Neškodné, saprofytické bakterie, osidlující střevní trakt, ale žijící běžně i v půdě. I přesto se mezi nimi mohou výjimečně vyskytnout i patogenní kmeny, které tvoří toxiny, mohou proniknout do tkání a způsobit přímo ohrožení zdraví. Dnes jsou považovány víceméně za indikátor účinnosti úpravy a dezinfekce vody, sekundární kontaminace či vysokého obsahu živin v upravené vodě.



Biologické rozbory – pitná voda (PiV)

Mikroskopický obraz – abioseston

Abioseston je tvořen částicemi organického i anorganického původu. Může být složený například z částí rostlinných a živočišných tkání, z částic půdy nebo prachu, pylových zrn a produktů koroze. Abioseston v pitné vodě většinou pochází z rozvodného systému. Může se do pitné vody ale dostat i ze surové vody nebo kontaminací během distribuce. Výskyt některých částic, i méně zastoupených, může poukázat na původ kontaminace pitné vody.

Mikroskopický obraz – počet organismů

Mikroskopické organismy se do pitné vody dostávají buď ze surové vody, nebo se mohou do systému dostat sekundárně a následně se mohou množit v rozvodném systému. Ve vodě mohou indikovat špatnou účinnost její úpravy, kontaminaci podzemního zdroje nebo nízkou biologickou stabilitu.

Mikroskopický obraz – živé organismy

Platí to samé jako u předešlého ukazatele, ovšem s tím rozdílem, že se jedná pouze o organismy neusmrčené dezinfekčním činidlem. Ukazatel indikuje především špatnou účinnost dezinfekce.

Počty kolonií při 22°C a počty kolonií při 36°C

Jedná se o všudypřítomné bakterie, které se množí ve vodě za vhodných podmínek. Na jejich množení má vliv velký počet faktorů, mezi něž může patřit například doba zdržení vody v síti a s ní související faktory, jako je vyšší teplota vody, rychlost proudění vody nebo druh dezinfekčního prostředku. Vliv hrají i korozní produkty a sediment na stěnách a dně potrubí, kvalita materiálu, a především takzvaná biologická stabilita vody a přítomnost nutrientů, tedy uhlíku, fosforu a dusíku.



Biologické rozbory – teplá voda (TeP)

A. Mikrobiologické a biologické ukazatele

č.	ukazatel	jednotka	limit	typ limitu	vysvětlivky
1	legionely	KTJ/100 ml	100	viz vysvětlivka 2	1, 2
2	počty kolonií při 36 °C	KTJ/ml	200	MH	1

- podobně je tomu i u mikrobiologických ukazatelů teplé vody pro účely osobní hygieny zaměstnanců
- navíc mykobakterie



Biologické rozbory – pitná voda (PiV)

- **Clostridium perfringens (včetně spor) :**

- Postup stanovení :

Membránová filtrace, po které následuje anaerobní kultivace membrány na m-CP agaru při $44 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 21 ± 3 hod. Počítá se četnost neprůsvitných žlutých kolonií, jejichž zbarvení přejde do růžova nebo červena po vystavení parám amoniaku po dobu 20 až 30 sekund.

- Agar m-CP má toto složení :

- ná	Bazální médium:	
	tryptóza	30 g
	kvasnicový extrakt	20 g
	sacharóza	5 g
	hydrochlorid L-cysteinu	1 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g
- ná	bromkrezolová purpurová červeně	40 mg
	agar	15 g
	voda	1000 ml

Tyto součásti bazálního média se rozpustí, pH se upraví na 7,6 a médium se na dobu 15 minut umístí v autoklávu při $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Poté se médium nechá zchladnout a přidají se následující přísady:

(ne

D- cycloserin	400 mg
polymyxin B ve formě síranu	25 mg
indoxyl-β-D-glukosid (předem rozpuštěný v 8 ml sterilní vody)	60 mg
sterilně zfiltrovaný 0,5% fenolftalein difosforečnanový roztok	20 ml
sterilně zfiltrovaný 4,5% FeCl ₃ ·6 H ₂ O	2 ml

bakterií z rukou
h lahví s

ly: médium

aparaturu,
iu (35°C , 24 h)

anismů

í filtru aniž by



Biologické rozборы - Odpadní vody (OV)

- **nařízení vlády o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod**
 - do vod povrchových a do kanalizací (61/2003),
 - do vod podzemních (416/2010)

Tabulka 1A: Ukazatele a emisní standardy pro odpadní vody vypouštěné z jednotlivých staveb pro bydlení a rekreaci:

Kategorie ČOV (EO) ^{1,2}	„m“ ³					„m“ ⁴	
	CHSK _{Cr}	BSK ₅	N-NH ₄ ⁺	NL	P _{celk}	Escherichia coli	Enterokoky
< 10	150	40	20	40	10	-	-
10 – 50	150	40	20	40	10	50 000	40 000
> 50	130	30	20	30	8	50 000	40 000





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem
České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí