

# Několik metodických poznámek ke stanovení chlorofylu-a pomocí ČSN ISO 10260

Tereza Pouzarová, Petr Pumann

*Státní zdravotní ústav*

Vodárenská biologie 2011

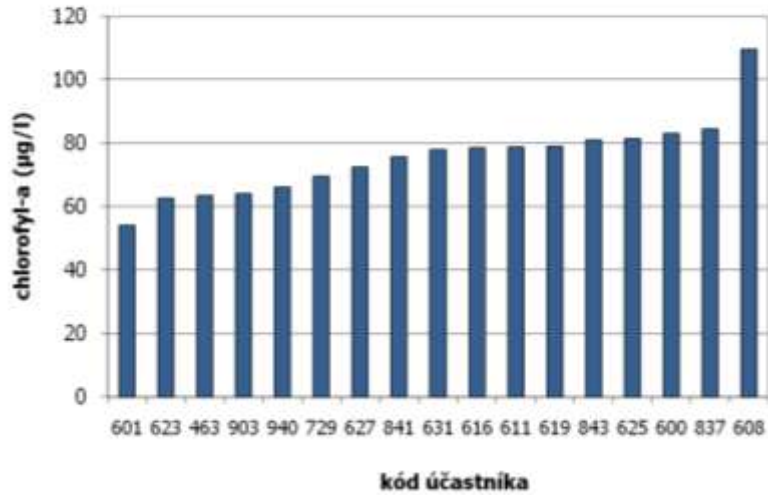
2.-3.2.2011, Praha

# Chlorofyl-a

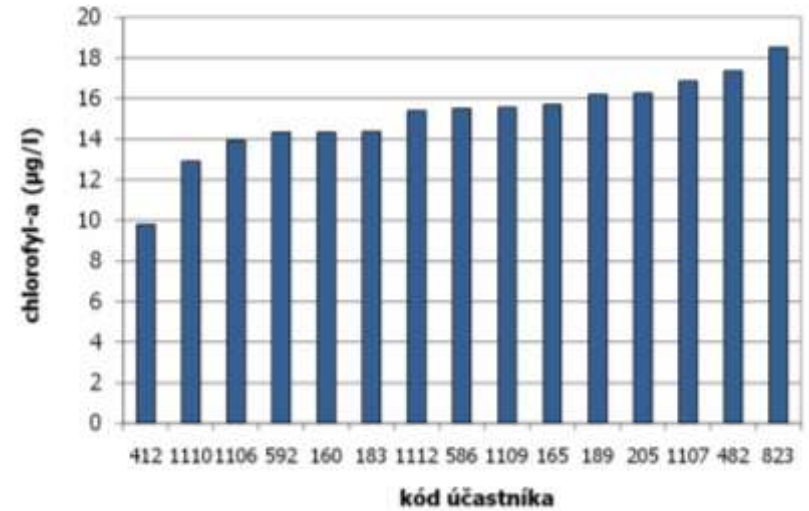
- ve vodním prostředí přítomen v řasách, sinicích, ale i v makrofytech
- údaj o jeho koncentraci se využívá jako míra pro množství přítomného fytoplanktonu
- různé metody stanovení
  - spektrofotometricky po extrakci (různými činidly - etanol, aceton, metanol)
  - spektrofotometricky in vivo (návrh nové EN normy)
  - in-situ fluorescenční sondy
  - HPLC
- v provozní praxi především ČSN ISO 10260 – Jakost vod – Měření biochemických ukazatelů –  
Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a
  - rutinně v několika desítkách laboratoří (podniky povodí, zdravotní ústavy, některé vodárny a jiné provozní laboratoře)

# Výsledky MPZ 2007 - 2009

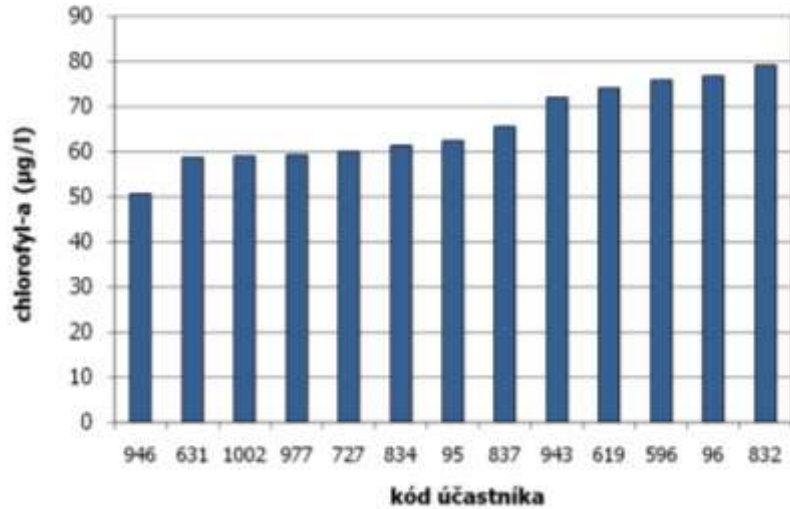
2007



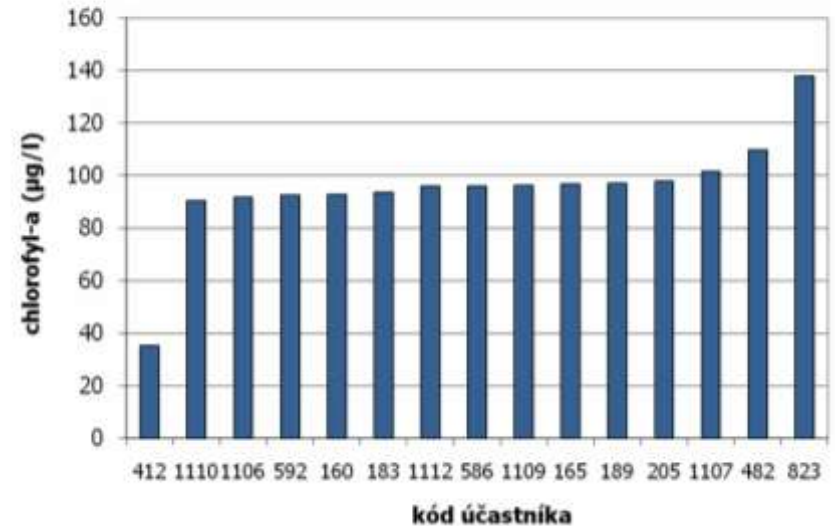
2009 - nižší



2008



2009 - vyšší



# Postup

- filtrace (obvykle 0,1 - 2 litry vzorku)
  - skleněná vlákna, záchyt nad 1 $\mu$ m
- extrakce v 90% etanolu
  - filtr roztřepat
  - vodní lázeň při 75°C po dobu 5 min (varianta B)
- vyčištění extraktu
  - centrifugace nebo filtrace
- měření při 665 a 750 nm
- měření při 665 a 750 nm po okyselení HCl (korekce na feopigmenty)
- výpočet (výsledky v  $\mu$ g/l) dle známých vlastností chlorofylu-a

*Vhodnou volbou objemu vzorku, etanolu a optické dráhy kyvety lze měřit chl-a v různých koncentračních úrovních*

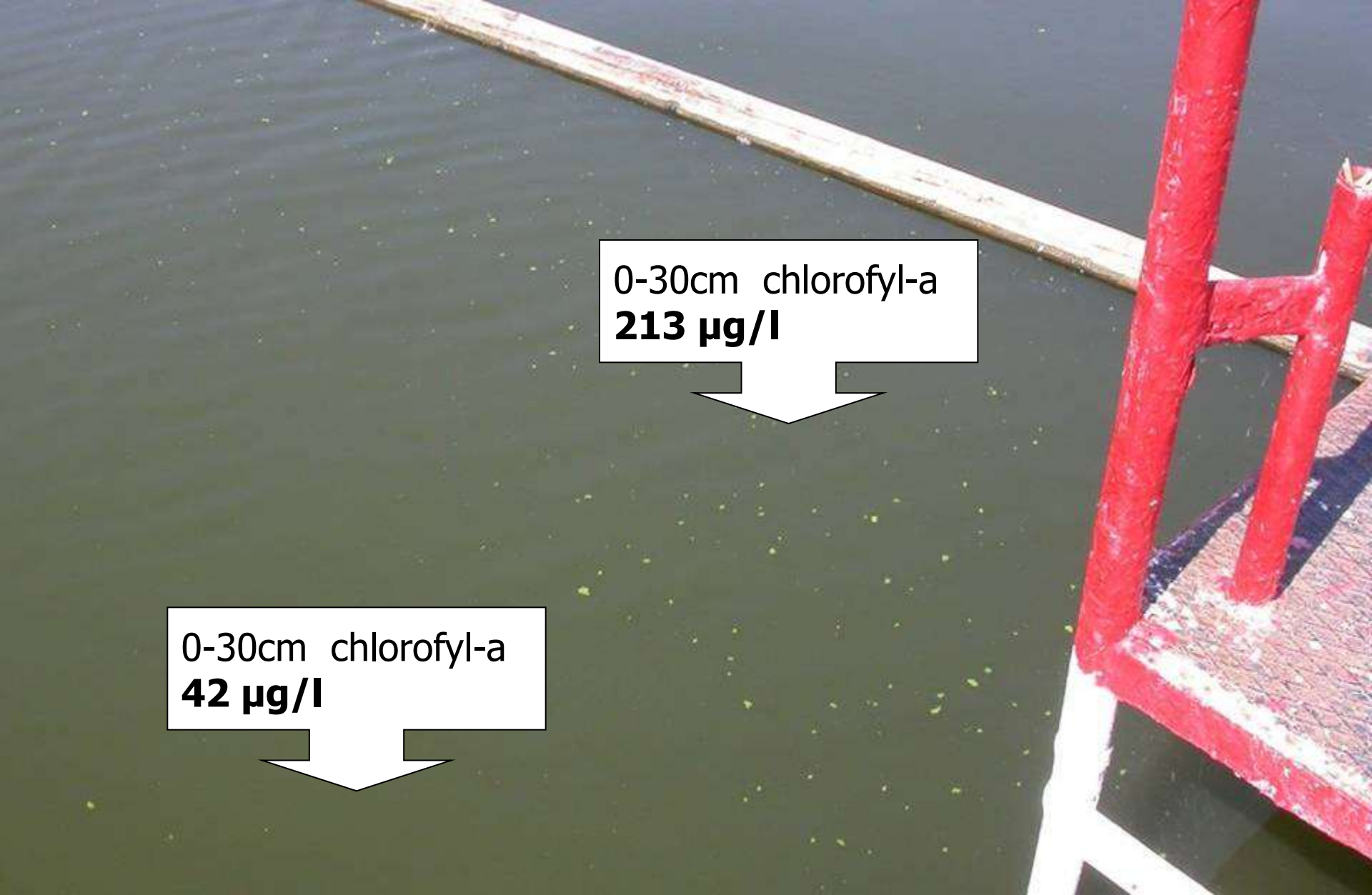


# *Snad aspoň trochu zajímavá odbočka*

## Odběr – problém heterogenity

- stanovení chlorofylu-a podle ČSN ISO 10260 se snáze vypořádá (ve srovnání s mikroskopickou kvantifikací) s velkými organismy typu koloniálních sinic, ALE...





0-30cm chlorofyl-a  
**213  $\mu\text{g/l}$**

0-30cm chlorofyl-a  
**42  $\mu\text{g/l}$**

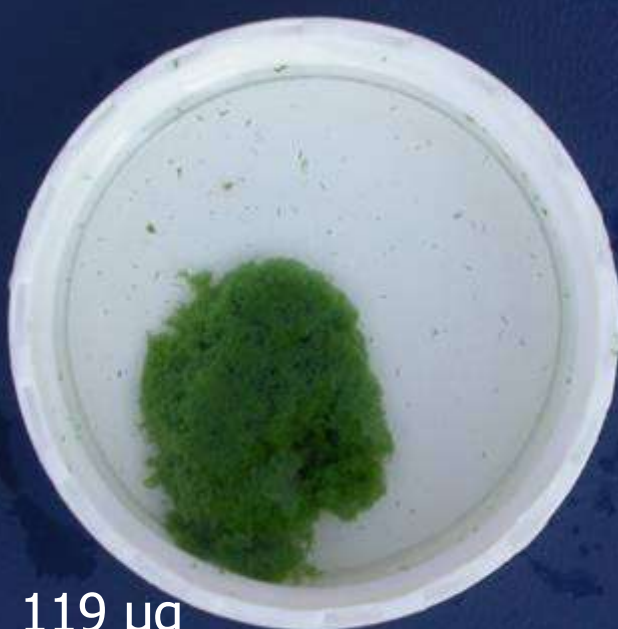
Vodní květ *Microcystis ichthyoblabe* v srpnu 2008 na Hostivaři. Čísla ukazují rozdíly v koncentraci chlorofylu-a standardně odebraného z profilu 0-30 cm.

# Jak může ovlivnit náhodný záchyt 1 kolonie výsledek?

- měření chlorofylu-a v koloniích sinic na dvou pražských koupalištích ve volné přírodě (Hostivař a Šeberák 2008 - 2010)
- v roce 2010 rozšířeno i na další organismy



176  $\mu\text{g}$



119  $\mu\text{g}$



10  $\mu\text{g}$



39  $\mu\text{g}$



179  $\mu\text{g}$

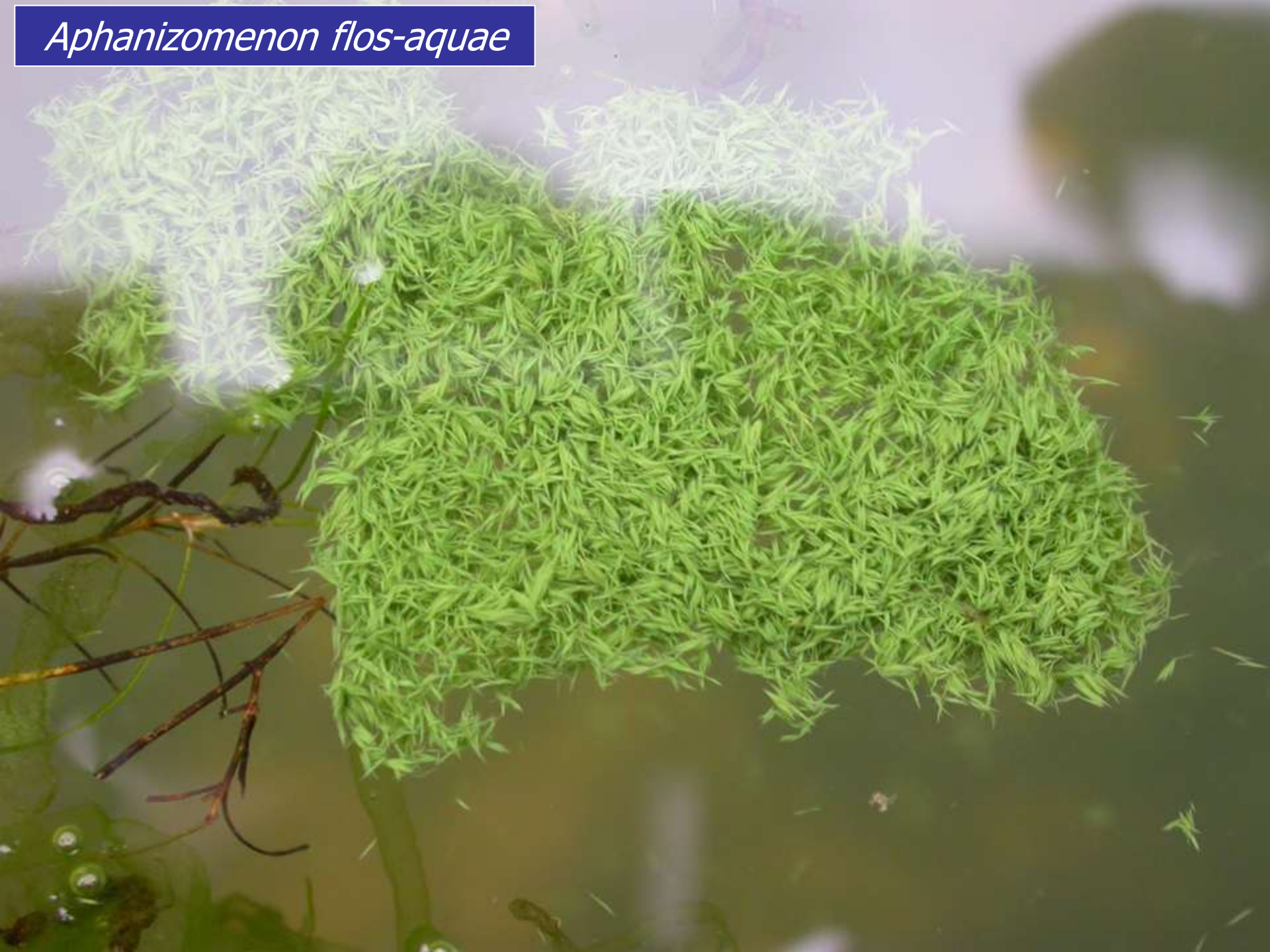


47  $\mu\text{g}$

Kolonie *Microcystis aeruginosa* odebrané 7.10.2009 na Šeberáku. Čísla u kolonií znamenají koncentraci chlorofylu-a. Průměr bílého víčka je 4 cm.



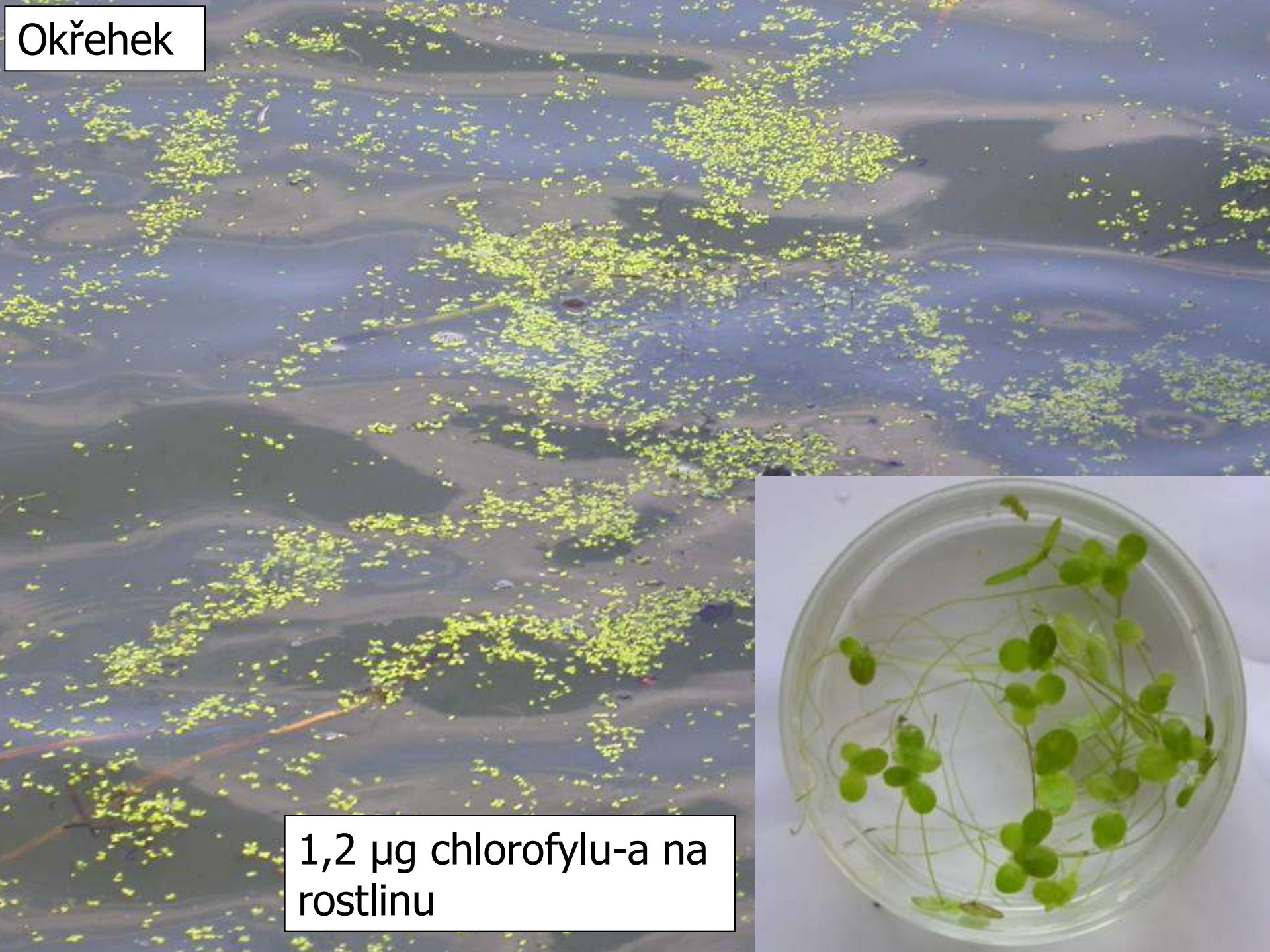
*Aphanizomenon flos-aquae*





*Aphanizomenon flos-aquae* (Šeberák 24.8.2010) - 350  $\mu\text{g}$  chl-a v kolonii -  
koncentrace v nádrži byla 5  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

Okřehek

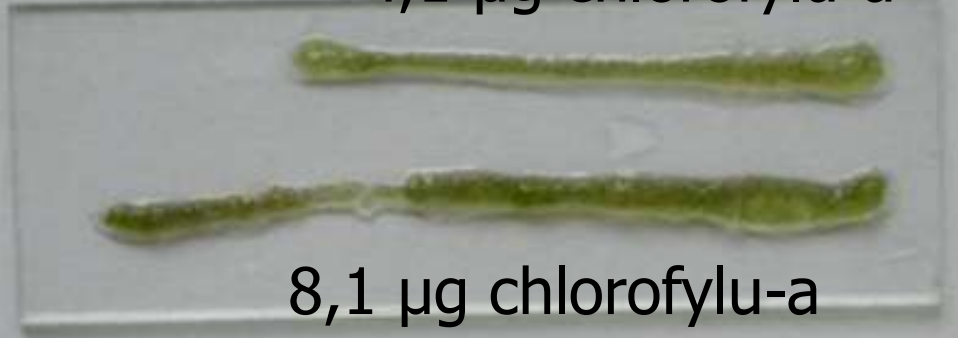


1,2  $\mu\text{g}$  chlorofylu-a na  
roślinu



*Hydrodictyon*

4,1  $\mu\text{g}$  chlorofylu-a



8,1  $\mu\text{g}$  chlorofylu-a



| lokalita          | problémový organismus                | 1 kolonie,<br>rostlina, fragment   | voda     | 2 l vzorkovnice<br>s 1 částicí |
|-------------------|--------------------------------------|------------------------------------|----------|--------------------------------|
| Hostivař,<br>2008 | <i>Microcystis ichthyoblabe</i>      | až 38µg                            | 150 µg/l | 169 µg/l                       |
| Šeberák,<br>2008  | <i>Microcystis ichthyoblabe</i>      | až 350 µg<br>v kolonii             | 221 µg/l | 396 µg/l                       |
| Šeberák,<br>2009  | <i>Microcystis aeruginosa</i>        | až 200 µg<br>v kolonii             | 158 µg/l | 258 µg/l                       |
| Šeberák,<br>2010  | <i>Aphanizomenon flos-<br/>aquae</i> | až 350 µg<br>v kolonii             | 5 µg/l   | 180 µg/l                       |
| Šeberák,<br>2010  | okřehek                              | průměrně 1,2 µg                    | 23 µg/l  | 23,6 µg/l                      |
| Šeberák,<br>2010  | fragmenty řas<br><i>Hydrodictyon</i> | 8,1µg na 6,3 cm<br>dlouhý fragment | 7,7 µg/l | 11,8 µg/l                      |

# MPZ 2010 - dotazník

## Otázky

- Setkali jste se někdy při stanovení chlorofylu-a s tím, že ve vzorku plavaly kusy vláknitých zelených řas nebo vodních makrofyt (např. okřehku)?
- Jak byste takový vzorek zpracovali (nevšíkali bychom si toho; zmíněné organismy bychom ze vzorku před zpracováním odstranili; stanovení bychom provedli s nimi, ale poznamenali bychom to do protokolu; a jiné)?

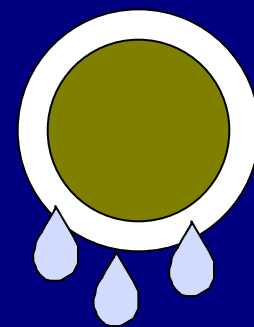
## Odpovědi (použitelných 7)

- 5x nesetkali, 2x setkali
- 2x odstranili, 2x nechali, 2x zpracovali s i bez a 1x by se rozhodli podle toho, kolik by tam těch organismů bylo

# A teď už opravdu do laboratoře...



# Voda ve filtrech



- norma uvádí, že se filtr vysuší sáním, ale to si každý může představovat jinak

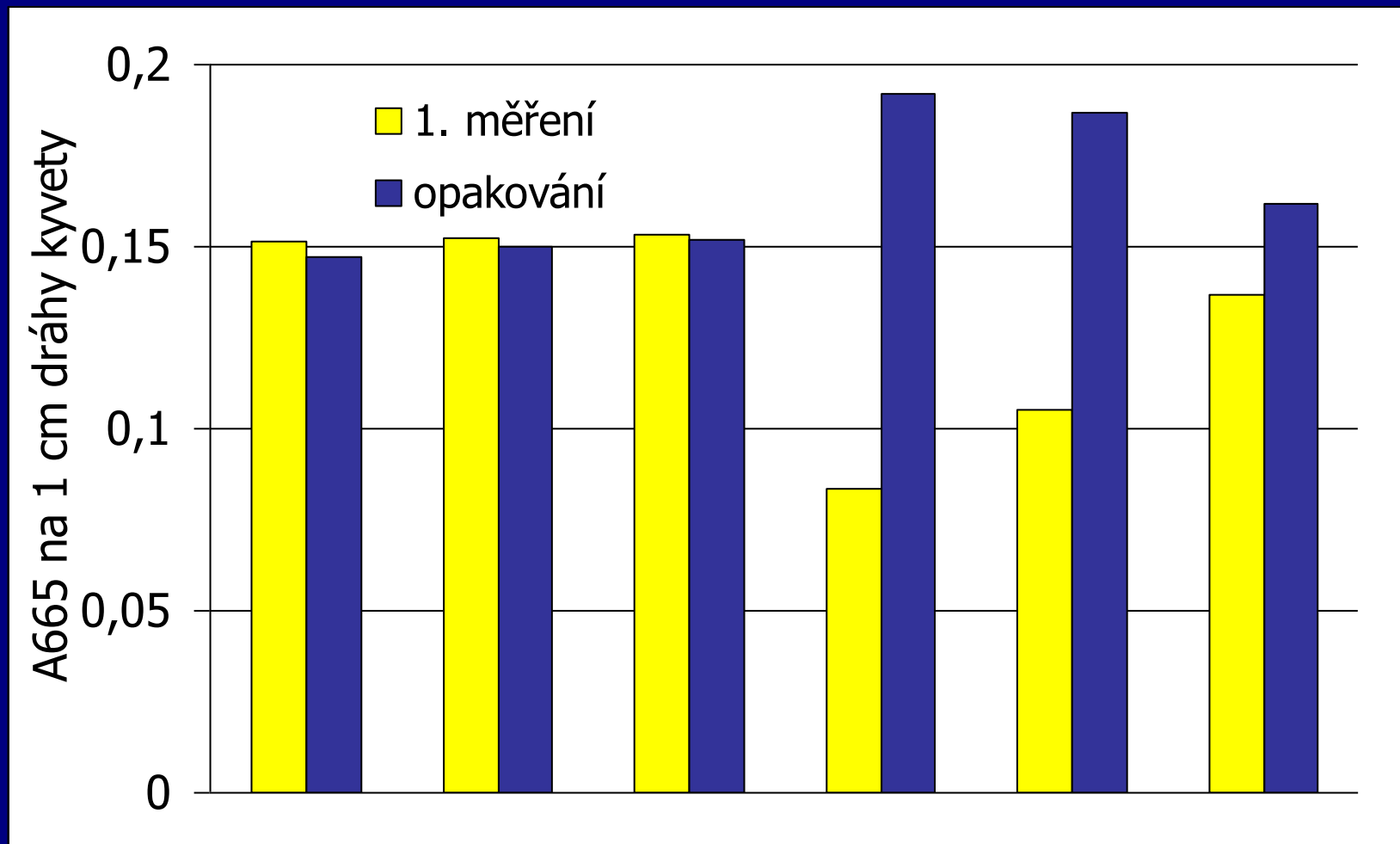
| typ filtru  |                       | WHATMAN GF/B<br>průměr 47mm | WHATMAN GF/C<br>průměr 47mm |
|---|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| hmotnost vody ve filtru   |                       | 1,33 g                      | 0,56 g                      |
| procento<br>zbytkové<br>vody na<br>celkovém<br>objemu<br>extraktu | při 10 ml<br>extraktu | 11,8 %                      | 5,3 %                       |
|   | při 20 ml<br>extraktu | 6,2 %                       | 2,7 %                       |
|   | při 25 ml<br>extraktu | 5,1 %                       | 2,2 %                       |

- zbytková voda ve filtru znamená podhodnocení výsledku (netýká se extrakční varianty A)
- podhodnocují všichni (vždy nějaká voda zůstane)
- nižší koncentrace etanolu v extr. činidle než 90%

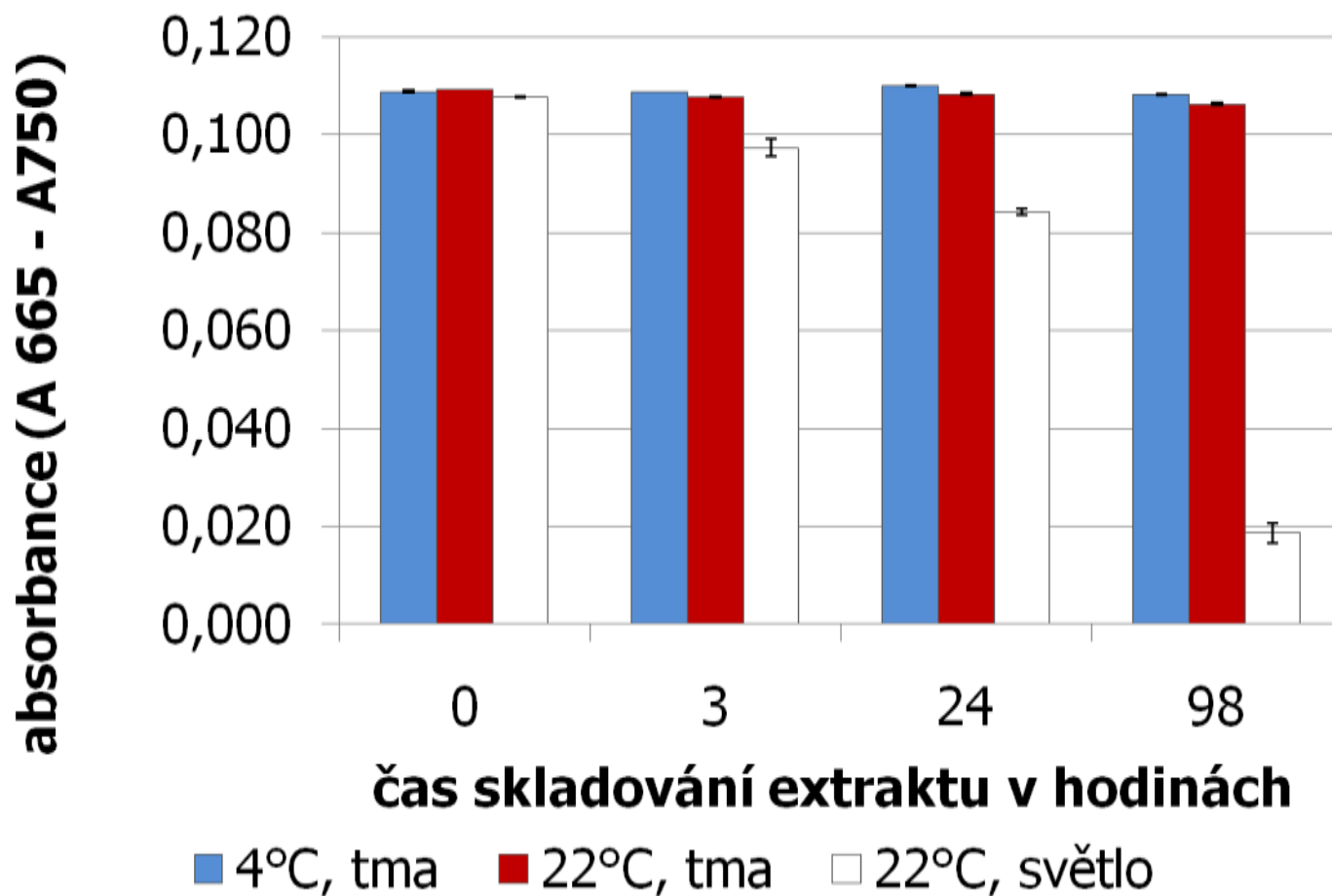


# Nedokonalá extrakce

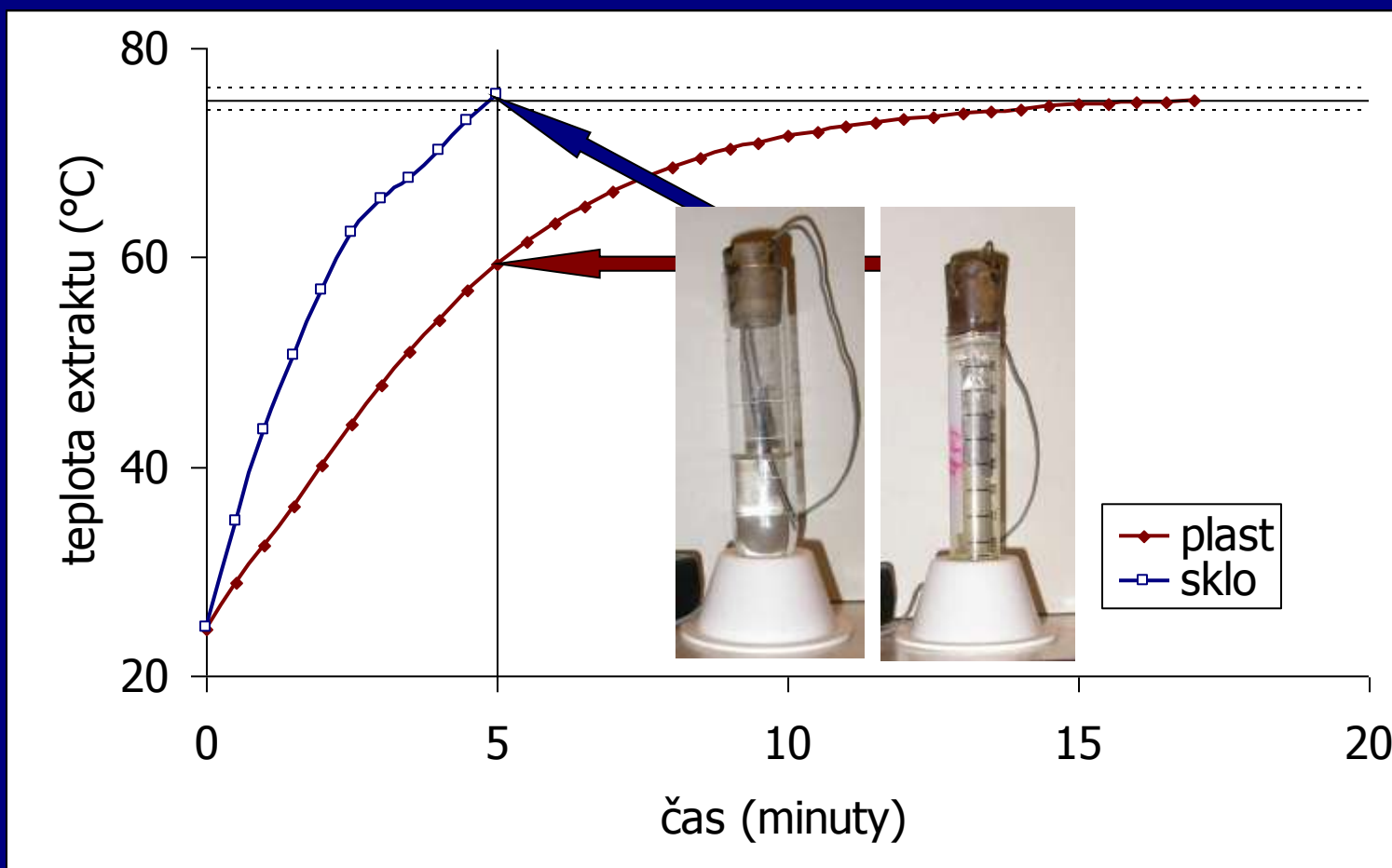
(nezamýšlený experiment při zácvičku nové pracovnice)



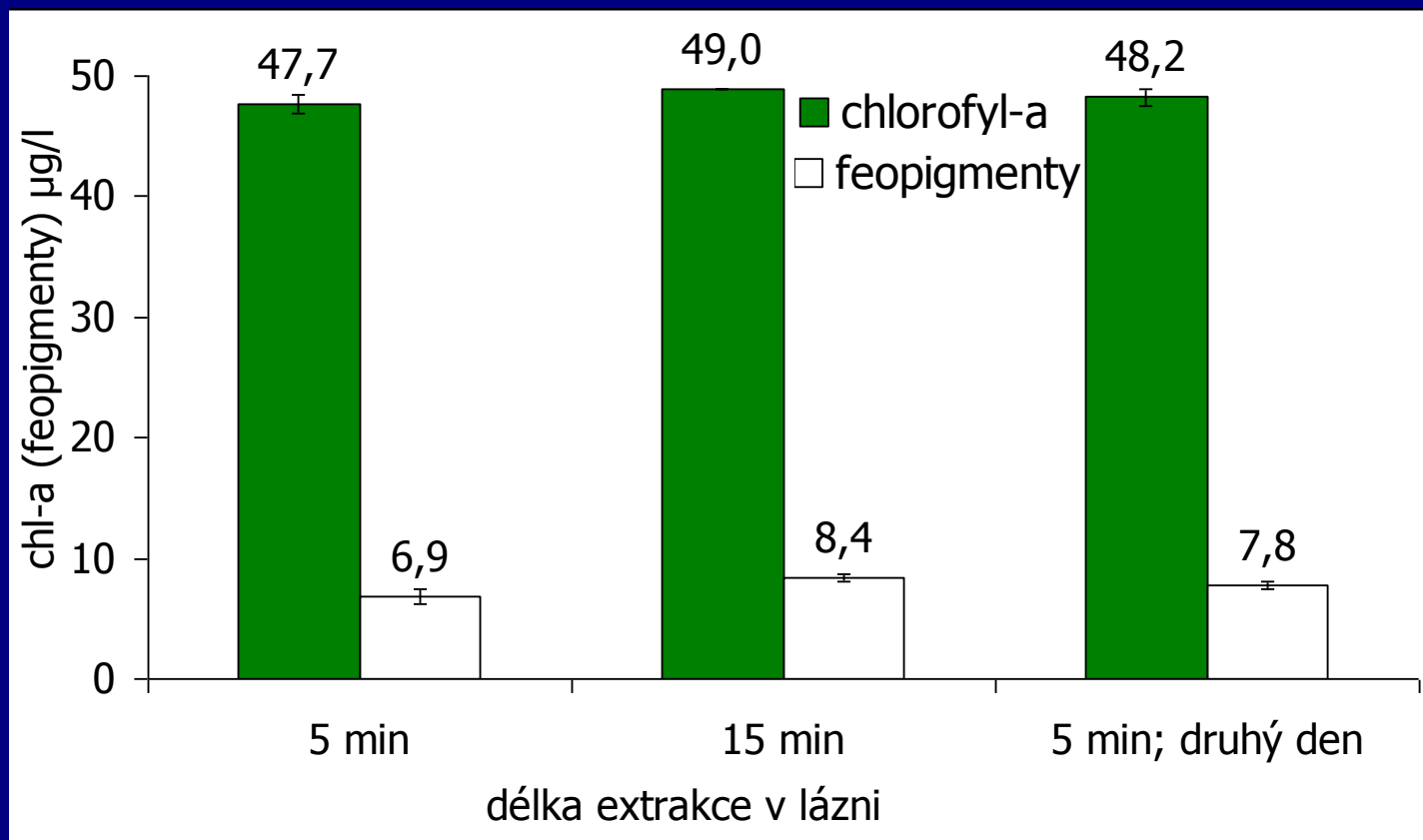
# Skladování extraktu



# Extrakce – vliv extrakční nádoby



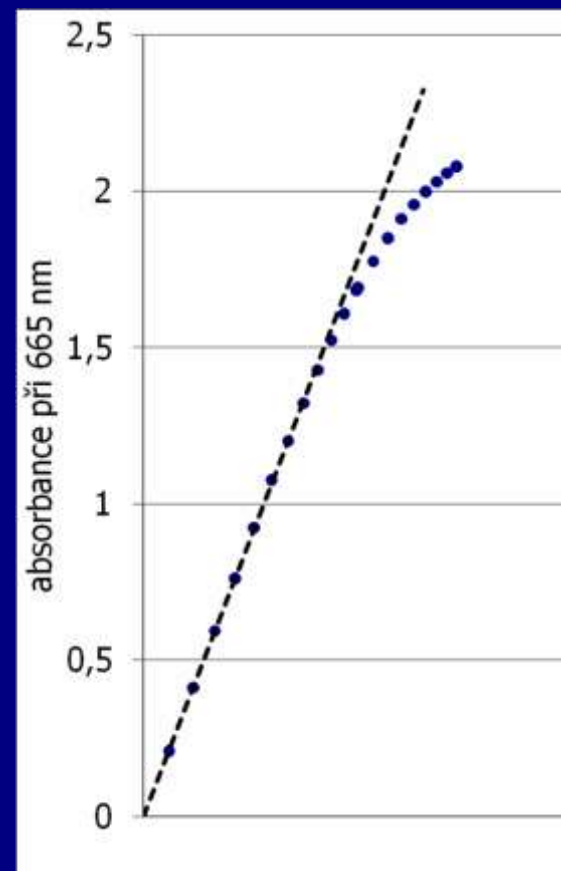
# Doba extrakce v plastových „falkonkách“ (příklad zelené řasy)



Budou se stejně chovat i jiné organismy (např. velké kolonie sinic)?

# Měření na spektrofotometru

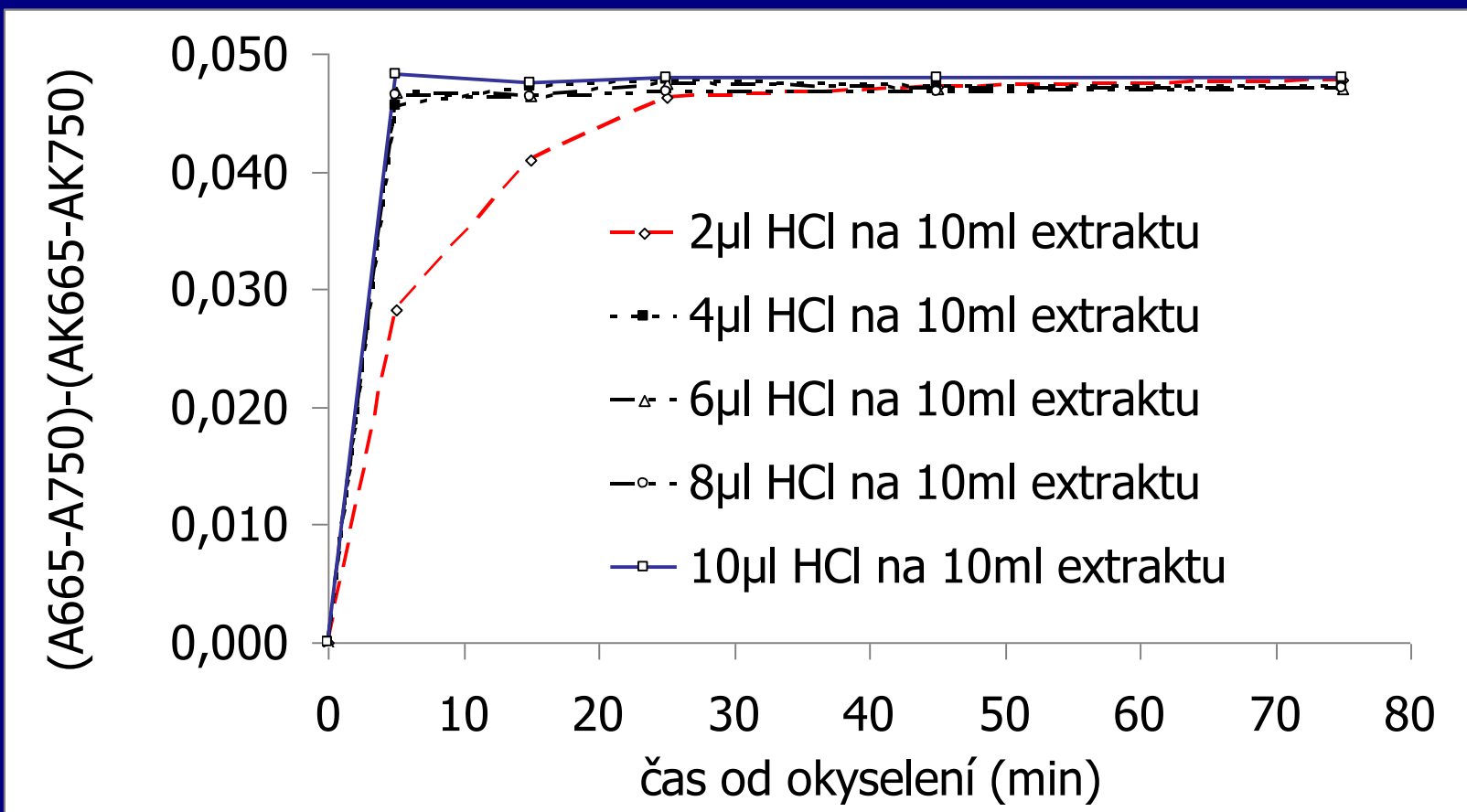
- Absorbance by měla být v intervalu od 0,01 do 0,8
- Poměrně často je v rámci MPZ uváděna absorbance  $>0,8$
- Některé laboratoře pravidelně uvádějí hodnoty nižší než 0,1, což je sice přípustné, ale zvyšuje se vliv náhodné fluktuace



linearita

# Okyselování extraktu

- Zkoušeno na extraktu s absorbancí při 665 nm 0,125 / 1 cm optické dráhy kyvety



# Závěry

- Z metodických předpisů není jasné, jak provést odběry pro stanovení chlorofylu-a (a pro mikroskopii) v případě výskytu ojedinělých velkých kolonií sinic, fragmentů vláknitých řas, okřehku, ani jak s takovými vzorky nakládat v laboratoři
- Domníváme se, že ze zkoumaných faktorů ovlivňujících mezilaboratorní variabilitu je nejvýznamnější proměnlivý obsah vody ve filtrech a nedostatečně provedená extrakce

# Projekt TA ČR

- Projekt Technologické agentury ČR  
„Nové metodické přístupy pro kontrolu a hodnocení povrchových vod ke koupání“
  - optimalizace mikrobiologických metod, stanovení sinic (a fytoplanktonu obecně) a metod hodnocení (analýza rizik, QMRA, ...)
  - doba řešení 2011-2013
  - VÚV TGM, SZÚ, Consygen





Každá metoda má své mouchy  
*(a je jich vždycky víc, než si myslíme)*

Prezentováno s podporou projektu Technologické agentury ČR „Nové metodické přístupy pro kontrolu a hodnocení povrchových vod ke koupání“; evidenční č. TA01020675