

1. ÚVOD

Predmetom metodiky je návrh sledovania a hodnotenia biologických prvkov kvality vo vodných nádržiach na Slovensku. Metodiku spracovali pracovníci VÚVH v rámci úlohy “Doplnkové sledovanie biologických prvkov kvality (makrozoobentos, makrofyty, fytobentos a fytoplanktón) pre stanovenie MEP a GEP vo vybraných vodných nádržiach“ (Makovinská a kol., 2006)

V rámci biologického monitorovania vodných nádrží sa budú sledovať tieto biologické prvky kvality vody:

1. zloženie a početnosť flóry vodných makrofytov,
2. štruktúra profundálnych spoločenstiev (bentických bezstavovcov),
3. stanovenie druhovej diverzity a abundancie fytoplanktónu,
4. stanovenie druhovej diverzity a abundancie fytobentosu.

2. ZÁKLADNÉ POJMY

Podľa spôsobu života rozlišujeme vo vodnom prostredí dva základné typy spoločenstiev organizmov:

1. planktón – organizmy, ktoré sú svojimi životnými nárokmi viazané na voľnú vodu (planktonické organizmy)
2. bentos – organizmy, ktoré sú svojím spôsobom života viazané na dno rôznych typov vôd (bentické organizmy).

Spoločný názov pre všetko, čo sa vo voľnej vode nachádza (stojatej i tečúcej) je sestón. Sestón sa delí:

- abiosestón – organický a anorganický detrit,
- biosestón – všetky živé organizmy voľnej vody.

Biosestón sa ďalej delí:

1. organizmy (rastliny i živočíchy), ktoré sú svojím spôsobom života viazané na vodnú blanku (neustónne organizmy - **neustón**),
2. vyššie rastliny, plávajúce na hladine, alebo voľne sa vznášajúce vo vodnom stĺpci (**pleustón**),
3. živočíchy (ryby, voľne plávajúci hmyz, napr. potápniky), ktoré aktívne prekonávajú prúd vody (**nektón**),
4. organizmy viac-menej pasívne sa vznášajúce vo vodnom stĺpci, ktoré nedokážu vlastným aktívnym pohybom prekonávať prúd vody (**planktón**).

Spoločným znakom všetkých skupín planktónu je krátky život jedincov. Pritom platí, že čím je jedinec menší, tým má kratší život, ale tým sa rýchlejšie rozmnožuje. Toto všetko však súvisí aj s teplotou vody a dostatkom potravy (HUDEC, 1996).

2.1 Fytoplanktón

Fytoplanktón možno charakterizovať ako jednobunkové riasy a cyanobaktérie, voľne žijúce alebo koloniálne, ktoré žijú prinajmenšom časť z ich životného cyklu vo vodnom stĺpci na povrchu vodných organizmov.

Kým vyššie rastliny (makrovegetácia) rastú na stanovišti počas celej vegetačnej sezóny, pre fytoplanktón je typické striedanie druhov (kvality) a množstva (kvantity) počas celej vegetačnej sezóny.

Počas vegetačnej sezóny rozoznávame 3 obdobia vývoja fytoplanktónu a navyše zimné obdobie pokoja:

1. jarný fytoplanktón – často vytvára jedno jarné maximum s viacerými druhmi rias, ale predovšetkým s rozsievkami, chryzomonádami a kryptomonádami. Začína pri teplotách vody okolo 10 °C. V našich vodách sa vytvára jarný fytoplanktón od konca marca do konca mája.
2. obdobie čistej vody – alebo ústup rias v dôsledku vyčerpania živín z vody a konzumáciou fytoplanktónu filtrujúcim zooplanktónom. Trvá rôzne dlho, niekoľko dní, až mesiac.
3. letný fytoplanktón - vytvára sa v júni, až v júli. Tvorí veľkú biomasu s vlastnou vnútornou dynamikou, často vytvára niekoľko nevýrazných vrcholov. Vrcholy reprezentujú rôzne druhy zelených rias, cyanobaktérií (siníc) a rozsievok, často v relatívne rýchlom slede. Na toto obdobie sa najmä v plytkých nádržiach (napr. rybníkoch) viaže obdobie tvorby vodného kvetu. Podľa prevládajúcich druhov hovoríme o sinicovom vodnom kvete alebo o vodnom kvete chlorokokálnych rias, ktorých vegetácia sa zväčša predlžuje do septembra, až októbra.
4. zimný fytoplanktón – začína sa pri inverznej stratifikácii v stojatých vodách pri teplotách pod 4 °C. V našich stojatých vodách je toto obdobie bez ohľadu na množstvo živín druhovo chudobné. Často ho tvoria chladnomilné (stenofilné) rozsievky a žltohnedé bičíkovce.

Zastúpenie rias v jednotlivých obdobiach vývinu fytoplanktónu je dosť rôznorodé a druhová skladba závisí od množstva dostupných živín (dusík, fosfor a pod.) vo vode, ale aj od typu ekosystému. Všeobecne, viac-menej platí, že na jarnom maxime sa v stojatých vodách podieľajú najmä riasy; na letnom maxime v plytkých nádržiach sinice a riasy, v hlbokých nádržiach prevažne riasy (HUDEC, 1996).

2.2 Fytozobentos

Ide o cievne rastliny, heterotrofné organizmy a fotosyntetizujúce riasy (vrátane cyanobaktérií) žijúce na substráte alebo iných organizmoch v povrchovej vode.

Jeho rozmiestnenie na dne podmieňujú svetelné nároky jednotlivých druhov a množstvo živín. V stojatých vodách závisia svetelné podmienky litorálu od hĺbky vody a množstva suspendovaných látok v nej. V tečúcich vodách fytozobentos navyše závisí od rýchlosti prúdu vody, jej teploty, množstva suspendovaných látok, atď.

Podľa toho na akom podklade (substráte) sa fytozobentos vyvíja, rozlišujeme:

- nárasty na pevnom podklade (epilitón) - ich priestorové usporiadanie je zložité. Na vláknité riasy prirastajú ďalšie riasy (*Achnanthes*,

Coconeis), navyše sa vyskytujú aj voľne žijúce riasy (*Navicula*, *Nitzschia*) a euglény,

- nárasty na vyšších vodných rastlinách (**perifytón**) – pestrejšie spoločenstvo ako na pevných podkladoch, v dôsledku zložitejšieho vzťahu medzi podkladom (vyššou rastlinou) a nárastom,
- nárasty povlakov kontaktnej zóny sediment – voda – osídľujú povrchy bahnitých sedimentov, tvoria epipelické povlaky (**epipelón**), ich zástupcovia neprirastajú pevne k podkladu a mnohé druhy sú schopné sa pohybovať (rozsievky, bičíkovce).

Bentické rozsievky sú skupinou rias, ktorá v riasových nárastoch v tokoch najčastejšie prevažuje, ich používané determinačné techniky sú ustálené, a hoci je ich determinácia náročná, má veľmi dlhú tradíciu, a teda aj obrovské možnosti konfrontácie a overenia dosiahnutých výsledkov. Bentické rozsievky ako samostatnú indikačnú skupinu kvality vody používajú v niekoľkých štátoch EÚ ako jeden z dôležitých biologických hodnotiacich parametrov, nakoľko dokážu odraziť veľké množstvo vybraných charakteristík prostredia (alkalita, acidita, konduktivita, prítomnosť ťažkých kovov) (PRYGIEL, 1991; ROUND, 1991; WHITTON A ROTT, 1996).

2.3 Makrozoobentos

Živočíšne spoločenstvá osídľujúce dná všetkých vodných biotopov bez ohľadu na ich typ. Významovo termínu makrozoobentos zodpovedajú názvy bentické makrovertebráta, resp. makrobezstavovce (benthic macroinvertebrates) alebo bentická makrofauna. Veľkostná hranica medzi makrozoobentosom a menšími skupinami (meiobentos a mikrobentos) je zvyčajne vymedzená hranicou 1 mm dĺžky (MANN, 1991), resp. pri dĺžke nad túto hodnotu, (do 3 mm) hmotnosťou (TIMM, 2002), teda toto vymedzenie nie je striktné. Napr. niektoré skupiny Nematoda, ktoré sa tradične chápu ako meiobentos veľkostne zodpovedajú makrozoobentosu. Dôležitým momentom, ktorý viedol k odčleneniu makrozoobentosu, je skutočnosť, že je možné ho získavať jednotnými odberovými metódami a získané dáta vyhodnocovať jednotnými postupmi.

V ponímaní limnológov patria medzi makrozoobentos, resp. bentickú makrofaunu: hubky (Porifera), ploskulice (Turbellaria), pamachovky (Kamptozoa), machovky (Bryozoa), mäkkýše (Mollusca), mnohoštetinavce (Polychaeta), máloštetinavce (Oligochaeta), pijavice (Hirudinea), kôrovce (Crustacea), hmyz (Insecta): podenky (Ephemeroptera), vážky (Odonata), pošvatky (Plecoptera), bzdochy (Heteroptera), vodnárky (Megaloptera), sieťokrídlovce (Planipennia), potočníky (Trichoptera), chrobáky (Coleoptera) a dvojkrídlovce (Diptera) s najvýznamnejšími čeľad'ami Chironomidae, Simuliidae, Chaoboridae, ...).

Koncepcia využitia prítomnosti/absencie indikátorových druhov (resp. zoskupení druhov) makrozoobentosu na hodnotenie kvality má pomerne dlhú tradíciu. Základy hodnotenia kvality vody znečistenej organicky odbúrateľnými látkami podľa zmien druhového zloženia makrozoobentosu boli položené už na prelome 19. a 20. storočia (KOLKWITZ & MARSSON, 1909). Sapróbny systém bol aplikovaný a zdokonaľovaný najmä v stredoeurópskom priestore a v Nemecku (SLÁDEČEK, 1973), zatiaľ čo v iných krajinách Európy a v Severnej Amerike boli vyvinuté iné systémy indikácie eutrofizácie tokov založenej na bentických makrovertebrátoch – Trent Biotic Index (WOODIWISS, 1964), Chandler Biotic Score (CHANDLER, 1970), Indice Biotique (TUFFERY & VERNEAUX, 1968), Belgian Biotic Index method (DE

Príloha č. 8: Sledovanie biologických prvkov kvality (makrozoobentos, makrofyty, fytobentos a fytoplanktón) vo vodných nádržiach

PAUW & VANHOOREN, 1983), Biological Monitoring Working Party (BMWP) Score (ARMITAGE et al., 1983), River Invertebrate Prediction and Classification System (RIVPACS) program (WRIGHT et al., 1989), Chironomid Pupal Exuviae Technique (CPET) (WILSON & RUSE, 2005). Väčšina z týchto a viaceré ďalšie metriky sú súčasťou metodiky AQUEM (AQEM CONSORTIUM, 2002).

Obohacovanie stojatých vôd živinami (eutrofizácia) patrí, podobne ako v prípade tokov, k najstarším typom znečisťovania vôd a takisto jeho indikácia pomocou bentických makrovertebrát patrí k najstarším metódam jeho biologického hodnotenia v podmienkach mierneho pásma. Pre tento účel sa tradične používali a používajú profundálne spoločenstvá makrovertebrát. Dominantné postavenie, počtom druhov, ako aj počtom jedincov majú máloštetinavce (Oligochaeta) a pakomáre (Chironomidae). Pôvodný systém hodnotenia trofického stavu jazier založený na distribúcii lariev pakomárov v profundáli (THIENEMANN, 1922) bol ďalej modifikovaný (BRUNDIN, 1949, 1956; SÆTHER, 1979; WIEDERHOLM, 1980).

Profundál predstavuje v porovnaní s litorálnou zónou homogénnejšie a svojim spôsobom jednoduchšie prostredie.

Cenózy profundálu sú tvorené len konzumentami a ich druhové zloženie a denzita sú kontrolované dvoma faktormi: množstvom a kvalitou potravy, ktorá je produkovaná v eufotickej zóne (litorál, epipelagiál) a množstvom rozpusteného kyslíka (BITUŠÍK, 2005).

Eutrofizované nádrže majú dostatok potravy na dne a larvy väčšiny druhov pakomárov žijú v neprenosných rúrkovitých puzdrách a potravu buď zberajú z dna, alebo ju aktívne filtrujú z prúdu vody vyvolanom pohybmi ich tela.

Máloštetinavce sú spoločne s larvami pakomárov najvýznamnejšou skupinou profundálnej makrofauny, napriek tomu neboli využívané tak často ako indikátory hlavne kvôli ťažkej determinácii. BRINKHURST (1966) vychádzajúc z poznania, že *Limnodrilus hoffmeisteri* zvyšuje abundanciu s narastajúcim znečistením predpokladal, že pomer zastúpenia tohto druhu k ostatným druhom Oligochaeta môže byť meradlom organického znečistenia.

Avšak zmena profundálneho spoločenstva, v ktorom dominovali pakomáre na spoločenstvo s dominanciou Oligochaeta je často jedným z prvých signálov eutrofizácie (CARTER, 1978; SÆTHER, 1979; 1980).

Litorálna zóna predstavuje spravidla mozaiku mikrohabitatov, ktorú podmieňuje heterogenita substrátu, prítomnosť makrofýty, nepravidelná distribúcia rôznorodejších potravných zdrojov. Litorálna makrofauna je druhovo bohatšia a medzidruhové vzťahy sú komplexnejšie než v profundáli.

2.4 Vodné makrofyty

Vodné makrofyty sú podľa STN EN 14 184 väčšie rastliny rastúce v sladkých vodách ľahko viditeľné voľným okom vrátane všetkých vodných cievnatých rastlín, machorastov, parožnatiek (*Characeae*) a nárastov makrorias. Prieskum makrofytov sa robí z lode alebo formou prieskumu litorálnej a príbrežnej zóny (alebo formou potápačského prieskumu). Zaznamenáva sa prítomnosť taxónov vodných makrofytov v definovaných úsekoch vodnej plochy. Rozličnými metódami upravenými na rozsah a účel danej štúdie sa posudzuje početnosť makrofytov meraná v zmysle priestorového rozšírenia taxónov alebo porastu makrofytov a relatívna početnosť taxónov makrofytov. Číselné odvodené hodnoty zloženia a početnosti makrofytov v

Príloha č. 8: Sledovanie biologických prvkov kvality (makrozoobentos, makrofyty, fytobentos a fytoplanktón) vo vodných nádržiach

skúmanom úseku stojatej vody sa môžu použiť na identifikáciu odchýlky od prírodných podmienok špecifických pre daný typ.

RSV určuje makrofyty ako jeden z prvkov kvality pre povrchové vody – rieky, nádrže, pričom ich charakterizuje:

- taxonomické zloženie
- početnosť

Všeobecné faktory určujúce štruktúru a druhové zloženie:

- hydrologický režim a výška vodného stĺpca
- svetlo
- substrát
- živiny
- znečistenie

U makrofytov sa stretávame s rôznymi rastovými formami, ktoré sú zaznamenávané a hodnotené:

- submerzná vegetácia
- koreňujúce rastliny s plávajúcimi (listami a kvetmi)
- emerzná vegetácia
- voľne plávajúce rastliny
- makroskopické riasy

3. ODBER A SPRACOVANIE VZORIEK

3.1 Odber vzoriek fytobentosu

Odber vzoriek fytobentosu z nádrží principiálne vychádza z inštrukcií pre odber vzoriek bentických rozsievok z tečúcich a stojatých vôd v rámci DALES projektov hodnotenia ekologického stavu jazier prostredníctvom rozsievok (KELLY A KOL., 2005).

Vzorky nárastových rias sa odoberajú z ponorených substrátov v rôznych častiach nádrže v závislosti od vhodnosti odberového miesta a ďalších podmienok opísaných nižšie, s cieľom získať vzorky reprezentujúce nárastové spoločenstvo daného útvaru. Zvoleným cieľovým substrátom sú kamene rôznej veľkostnej kategórie alebo makrofytná vegetácia, pokiaľ kamenný substrát nie je k dispozícii.

Odberové miesta sú vyberané tak, aby bolo možné odoberať rôzne biologické prvky v čo najtesnejšej vzdialenosti. Vzorky fytobentosu sa vždy odoberajú z litorálu, vždy v oblasti vystavenej čo najmenšiemu kolísaniu hladiny a bez zjavného a priameho zdroja znečistenia v dôsledku antropogénnej činnosti. Okrem miest spĺňajúcich tieto kritériá sa v niektorých prípadoch odoberajú aj kontrolné vzorky z miest, ktoré sú vystavené špecifickým podmienkam a nemusia reprezentovať typické nárastové spoločenstvo v danej nádrži.

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 odoberaným substrátom je kamenný substrát, preferujú sa valúny (veľkostná kategória 64-256 mm) a v miestach bez výskytu pevného dnového substrátu, resp. s väčšou hĺbkou sa vzorkuje makrofytná vegetácia. Najčastejšie sa môže jednať o zástupcov rodu *Potamogeton* sp., resp. *Ceratophyllum* sp.

3.1.1 Odber vzoriek z pevného substrátu

Vzorky nárastov z pevného kamenného substrátu sa zoškrabávajú pomocou zubnej kefky používanej jednorázovo (t.j. pre každý odber sa používa nová kefka), aby sa zabránilo vzájomnej kontaminácii vzoriek. Vo vybranom odberovom mieste sa z dna uvoľní cca. 5 kusov valúnov (resp. kameňov z inej veľkostnej kategórie), jemne sa prepláchnu vodou z nádrže, pokiaľ je nárast zanesený vrstvou sedimentov alebo bahna a prenesú sa na fotomisku. Vo fotomiske sa nárast oškrabe kefkou a dôkladne opláchnu vodou z nádrže. Odoberatá vzorka sa prenesie do vzorkovnice, maximálne do troch štvrtín objemu vzorkovnice, t. j. s dostatočnou zásobou vzduchu.

3.1.2 Odber vzoriek z makrofytnnej vegetácie

Vzorky nárastov z makrofytov sa odoberajú buď z emerznej alebo submerznej vegetácie, priamo oddelením listov, resp. častí rastlín trvale ponorených pod hladinou, v dostatočne presvetlenej oblasti vodného stĺpca. Odoberá sa minimálne 5 listov, resp. častí rastlín z viac ako dvoch zdravých rastlín bez známkov poškodenia alebo zhoršeného fyziologického stavu. Rastliny sa prenášajú do vzorkovnice celé a vo vzorkovnici sa zalejú vodou z nádrže, tak aby v nej ostala dostatočná zásoba vzduchu.

3.1.3 Transport a laboratórne spracovanie vzoriek

Vzorky sú transportované do laboratória v chlade a s dostatočnou zásobou vzduchu vo vzorkovniciach, živý materiál sa spracúva do 48 hodín od odberu, po uplynutí tejto doby sa zafixuje do výslednej koncentrácie 4%. V prípade, že analýza nemôže byť vykonaná do 48 hodín, vzorky sa fixujú okamžite.

Jednotlivé odoberaté subvzorky sa transportujú, aj analyzujú samostatne. V prípade analýzy spoločenstva bentických rozsievok sa pripravujú trvalé rozsievkové preparáty, a táto skupina sa ďalej po analýze živého materiálu analyzuje samostatne.

3.1.4 Predúprava vzoriek pred mikroskopickým skúmaním

Na správnu identifikáciu rozsievok je nevyhnutné odstrániť celý bunkový obsah a pripraviť trvalý preparát rozsievok použitím média s vysokým indexom lomu. **Na vyčistenie schránok rozsievok** sa používa silné oxidačné činidlo. Odporúča sa peroxid vodíka, ktorý je najpoužívanejším oxidačným činidlom, ale aj inými metódami sa dajú dosiahnuť vyhovujúce výsledky. Vzorky, ktoré okrem rozsievok obsahujú veľa organickej hmoty, vyžadujú silnejšiu oxidáciu ako čisté vzorky. Najskôr sa má vyskúšať optimálny pomer vzorky k oxidačnému činidlu. Tuhé uhličitany môžu spôsobovať problémy a ovplyvniť typ úpravy a postupnosť použitých oxidačných činidiel (napríklad v uhličitanových vodách sa musia odstrániť uhličitany pomocou HCl pred použitím silnej kyseliny sírovej, aby sa zabránilo tvorbe síranu vápenatého). Úprava zriedenou HCl je nevyhnutná aj pri vzorkách bohatých na železo.

Príloha č. 8: Sledovanie biologických prvkov kvality (makrozoobentos, makrofyty, fytozobentos a fytoplanktón) vo vodných nádržiach

V literatúre je špecifikovaných veľa rozličných metód čistenia rozsievok, ktoré sú vhodné na štúdie kvality vody. Prístroje a zariadenia sa majú udržiavať v maximálnej čistote, aby sa minimalizovalo riziko znečistenia medzi jednotlivými vzorkami. Miešadlá sa nemajú používať na miešanie viacerých vzoriek, aby sa nimi neprenášali rozsievky z jednej vzorky do druhej. Pasteurove pipety sa musia použiť iba jednorazovo.

Vzorka sa homogenizuje pretrepaním a od 5 ml do 10 ml suspenzie sa preniesie do kadičky alebo varnej skúmavky. Pridá sa približne 20 ml peroxidu vodíka a zahrieva sa na variči, pieskovom alebo vodnom kúpeli približne pri teplote $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, kým nezoxидуje všetok organický materiál (zvyčajne od 1 h do 3 h). Hrubý rastlinný materiál vzoriek makrofytov sa môže odstrániť po 30 min. S koncentrovaným peroxidom vodíka treba manipulovať (zahrievanie alebo nalievanie do organického materiálu a vodných rastlín) opatrne.

Kadička alebo varná skúmavka sa zloží z variča. Pridá sa pár kvapiek kyseliny chlorovodíkovej (HCl), aby sa odstránil zvyšok peroxidu vodíka a uhličitany a steny kadičky sa zmyjú destilovanou alebo demineralizovanou vodou. Nechá sa ochladiť v digestore.

POZNÁMKA. – Kyselina chlorovodíková sa nemusí pridávať, ak je vzorka z oblasti, kde nie je pravdepodobná prítomnosť uhličitánov.

Obsah kadičky, alebo varnej skúmavky sa preleje do centrifugačnej skúmavky, doplní sa destilovanou, alebo demineralizovanou vodou a odstredí sa. Supernatant sa zleje, zvyšok sa premyje destilovanou alebo demineralizovanou vodou a odstredovanie sa zopakuje. Premývanie sa má opakovať najmenej trikrát, alebo až kým sa neodstránia všetky zvyšky peroxidu vodíka. Po odstránení všetkého peroxidu vodíka a kyseliny sa vzorka rozsievok zmieša s malým množstvom destilovanej alebo demineralizovanej vody a roztok sa preleje do čistej malej fľaštičky. Pridá sa pár kvapiek 4 % formalínu, peroxidu vodíka alebo etanolu, aby sa zabránilo rastu húb. Vzorka sa potom môže skladovať dlhodobo.

3.1.5 Príprava trvalých preparátov

Vyčistená suspenzia rozsievok sa zriedi na vhodnú koncentráciu. Ak sa suspenzia drží oproti svetlu, mali by byť vidieť iba jemné častice. Ak je suspenzia veľmi hustá, má sa na zriedenie pridať destilovaná alebo demineralizovaná voda. Hustota misiek sa dá tiež rýchlo skontrolovať rýchlym odparením kvapky suspenzie na krycom sklíčku a prezretím pri menšom zväčšení (t. j. $400\times$). Ak je suspenzia veľmi riedka, na zahustenie ju možno odstrediť, alebo sa nechajú rozsievky sedimentovať a supernatant sa zleje. Ak sa nedosiahne požadovaný výsledok, postup prípravy sa zopakuje.

POZNÁMKA. – Na zriedenie suspenzie sa môže pridať aj etanol. Pomôže to aj na rovnomerné rozmiestnenie rozsievok na krycom sklíčku.

Fľaštička so suspenziou vyčisteného materiálu sa pretrepe. Pomocou čistej Pasteurovej pipety sa odoberie časť suspenzie zo strednej časti skúmavky. Kvapka sa naniesie na nové krycie sklíčko a kvapalina sa nechá odpariť tak, že sa nechá sklíčko na teplom bezprašnom mieste (napríklad exsikátor), alebo sa jemne zohreje na variči. Výsledkom má byť tenký sivý povlak pokrývajúci asi dve tretiny sklíčka.

Príloha č. 8: Sledovanie biologických prvkov kvality (makrozoobentos, makrofyty, fytobentos a fytoplanktón) vo vodných nádržiach

Pri používaní zalievacieho média sa dodržiavajú pokyny výrobcu. Zabezpečí sa, aby médium pokrývalo aj okraje krycieho sklíčka. Nechá sa ochladiť a skontroluje sa pod mikroskopom. Ideálny počet misiek v jednom poli mikroskopu pri tisíc násobnom zväčšení je od 10 do 15 misiek. Ak je na sklíčku viac misiek na jedno pole, postup sa opakuje so zriedenejšou vzorkou vyčistených rozsievok.

Sklíčko sa označí minimálne údajmi o mieste a dátume odberu vzoriek spolu so všetkými kódmi potrebnými na identifikáciu preparátu.

3.1.6 Analýza vzoriek fytobentosu

Živé vzorky sa po prenesení do laboratória analyzujú priamo, bez zahustenia vo svetelnom mikroskope. Identifikujú sa všetky prítomné skupiny organizmov, t.j. nielen fototrofná zložka nárastov, ale aj ostatné skupiny organizmov, teda konzumenty (Ciliata, Rotatoria) a deštruenty (Bacteria, Mycophyta). Prítomné taxóny a taxonomické skupiny sa determinujú na najnižšiu možnú úroveň. Prítomné taxóny sa kvantifikujú prostredníctvom odhadovej stupnice na škále od 1-9 (1-vzácnny, 9-masový) v súlade s STN 83 0532 časť 5A. Po analýze živej vzorky sa zo suspenzie nárastov pripraví trvalý rozsievkový preparát v súlade s STN EN 13946:2002, ktorý je opísaný vyššie, t.j. použije sa metóda horúceho peroxidu vodíka. Rozsievky sa v preparáte identifikujú na najnižšiu možnú taxonomickú úroveň a kvantifikujú sa rovnakým spôsobom ako ostatné skupiny rias a organizmov analyzovaných už v živej vzorke, t.j. cez stupne hojnosti.

Výsledkom analýz je zoznam taxónov s priradenými stupňami hojnosti.

3.2 Odber a spracovanie vzoriek fytoplanktónu

Odber a konzervácia vzoriek sa vykonáva v súlade s STN EN 25667-2, STN EN ISO 5667-3, STN ISO 5667-6.

Vzorky sa odoberajú do čistých vzorkovníc, naplnených do 4/5 objemu. Pre kvalitatívnu a kvantitatívnu (abundanciu) analýzu fytoplanktónu sa odoberá 250 ml vzorky.

Pre kvantitatívnu (abundancia a biomasa) a kvalitatívnu analýzu fytoplanktónu sa odoberá voľná voda, alternatívne sa na kvantitatívnu analýzu použije zahusťovanie planktónovou sieťkou (zvyčajne sa používa sieťka s veľkosťou oka 10 µm).

Ak nie je možné vzorku spracovať do 24 hodín od odberu vzorky, alebo si to vyžaduje účel rozboru, vzorka sa konzervuje Lugolovým roztokom do slabo žltého zafarbenia alebo formaldehydom do výslednej koncentrácie 4%. Vzorky pre kvalitatívnu analýzu fytoplanktónu sa nekonzervujú, a musia sa preto spracovať do 24 hodín po odbere vzorky.

Vzorky sa prenášajú do laboratória v chladiacich boxoch (maximálne do teploty 8 °C) a do doby spracovania sa uchovávaly v tme pri teplote 2-5 °C.

Vzhľadom na sezónnu dynamiku cyanobaktérií (siníc) a rias sa odbery v nádržiach uskutočňujú vo vegetačnom období (júl-september).

3.2.1 Postup stanovenia druhovej diverzity a abundancie fytoplanktónu

Príloha č. 8: Sledovanie biologických prvkov kvality (makrozoobentos, makrofyty, fytobentos a fytoplanktón) vo vodných nádržiach

Pred kvantitatívnym stanovením fytoplanktónu (abundanciou) je potrebné uskutočniť sledovanie druhovej diverzity, aby bolo zrejmé, ktoré organizmy treba na komôrke spočítať. Na komôrke možno dosiahnuť najväčšie zväčšenie približne štyristokrát, a teda drobné cyanobaktérie a riasy nemožno spoľahlivo determinovať, pretože pre určité determinačné znaky je potrebné zväčšenie až tisíckrát.

Jednotlivé druhy sa určujú na podložnom sklíčku za pomoci vhodnej determinačnej literatúry. Snahou je určiť čo najviac druhov cyanobaktérií a rias, a to najmä tých, ktoré kvantitatívne vo vzorke prevládajú.

Do centrifugačnej skúmavky sa odmeria 10 ml dôkladne premiešanej vzorky. Voda sa odstredí 5 min., v centrifúge s polomerom rotora 0,08 m pri 2000 otáčkach za minútu.

Po centrifugácii sa supernatant zleje, a to tak, aby celý sediment ostal v skúmavke. Objem odstredeného sedimentu sa upraví pipetou na 0,1 ml ak predpokladáme, že v 1 ml bude nižší počet organizmov ako 2000 (prípadne na 0,2 ml, ak predpokladáme počet organizmov vyšší ako 2000). Kvapka homogenizovanej vzorky sa preniesie na podložné sklíčko alebo na mriežku počítacej komôrky a prekryje sa krycím sklíčkom, resp. sa upevní svorkami k počítacej komôrke.

Pod mikroskopom sa spočítajú organizmy (sinice/cyanobaktérie a riasy) na celej ploche komôrky alebo na časti podľa hustoty vzorky.

Tab. 1: Výpočet celkového počtu organizmov v 1 ml pri analýze nezahusťovanej vzorky na počítacej komôrke Cyrus I.

Sledovaná plocha	Počet štvorcov	Počet nájdených organizmov v sledovanej ploche	Celkový počet v 1 ml
štvorec	1	a	a.160000
1 pás	40	a	a.4000
2 pásy	80	a	a.2000
4 pásy	160	a	a.1000
10 pásov	400	a	a.400
20 pásov	800	a	a.200
Celá komôrka	1600	a	a.100
1 mm ²	16	a	a.10000

Pre výpočet sa používa vzorec: $X = a/n.160000$

kde: a = nález organizmov v štvorcoch;
n = počet vyšetrených štvorcov.

3.3 Odber vzoriek makrofytov

3.3.1 Odber a analýza vzoriek makrofytnéj vegetácie

Odber a analýza makrofytnéj vegetácie prebieha súčasne. Skúmanie makrofytov sa má vykonávať v období od konca jari do začiatku jesene (zvyčajne od júna do konca septembra, až októbra, v závislosti od miestneho podnebia), keď sú porasty

makrofytov v optimálnom stave. Vzhľadom na to, že jednotlivé druhy makrofytov rastú a dozrievajú v rozličných obdobiach leta. Preto, ak sa vyžadujú porovnateľné údaje, prieskumy na mieste sa majú vykonávať v tom istom vodnom útvere chronologicky v krátkych intervaloch. Porovnávacie prieskumy v nasledujúcich rokoch sa majú vykonávať v tom istom čase roka, ako sa vykonávali predchádzajúce prieskumy. Zníži to zmeny spôsobené rozličným porastom v rozličných obdobiach. Tvorba porastov makrofytov na jar sa v rámci jednotlivých rokov líši, pretože veľmi závisí od hladiny vody, fyzikálneho porušenia, prietokového režimu, slnečného žiarenia (fotosynteticky aktívneho žiarenia, PAR a od teploty vody). Všetky tieto faktory sa v jednotlivých rokoch môžu meniť. Z týchto dôvodov je nevyhnutné ešte pred prieskumom miesto navštíviť a posúdiť štádium rastu.

1. Metodika je založená na hodnotení vodnej makrofytnéj vegetácie (chár, machorastov a pečeňoviek, papradí, semenných rastlín, v špeciálnych prípadoch tiež vláknitých rias) v kontinuálnych/susediacich analyzovaných jednotkách (synonymá: analyzované úseky, survey units, survey length, survey stretches).
2. U všetkých prítomných rastlinných druhov sa v týchto analyzovaných jednotkách stanoví „rastlinná masa“ (nemecky –Pflanzenmenge, ang. Plant Mass). Na základe týchto informácií vzniknú presné zoznamy rastlinných druhov a numerické deriváty hodnôt masy rastlín (Plant Mass Estimates - PME), ktoré sú prezentované vo vzájomne porovnateľnej grafickej forme.
3. Numerické hodnoty sa môžu použiť tiež na štatistické porovnávanie.
4. Zoznamy druhov (môže sa pripojiť informácia o rastových formách, prítomnosti druhov evidovaných v Červených zoznamoch, o údajoch týkajúcich sa projektu Natura 2000, atď.) a numerické deriváty sa môžu použiť na opisy druhového bohatstva a štruktúry, vzácnosti, ohrozenia pred vyhynutím, dominantných druhov a distribučných typov v rôznych typoch vôd, úsekoch riečneho systému a ekologických riečnych zónach.

3.3.2 Stanovenie rastlinnej masy

1. V každej analyzovanej jednotke/úseku sa stanoví druhové zloženie a „abundancia“ *senzu* „Pflanzenmenge“ (Kohler et al. 1971). V tomto kontexte sa rozumie „abundancia“ ako „Pflanzenmenge“, alebo v hrubom preklade ako „Plant Mass“. Nie je to totožné s biomasou (=kg/jednotka plochy), ale je to ekvivalent k množstvu „3-D-amount“ (Nieman 1980), alebo bioobjemu – „biovolume“, porastu v širokom zmysle slova.

Poznámka: Termín „Bio-volume“ nie je definovaný v jednotnom zmysle. Môže to byť aktuálny objem rastlinných orgánov (zvyčajne osí, listov), ktorý sa použije pri stanovovaní rastlín. Môže to byť tiež objem vody, ktorý „zaberá“ jedna rastlina alebo porast. Špeciálne u veľmi rozvetvených rastlín nie je ľahké exaktné stanovenie.

2. Rastlinná masa (Plant Mass) **neznamená** relatívnu pokryvnosť (v %), ale postihuje vertikálny vývoj každého rastlinného druhu v poraste. Je to potrebné, pretože je rozdiel, ak napr. riečne koryto je úplne pokryté rastlinou *Berula erecta*, ktorá má výšku 1 cm, a keď je porast vysoký 50 cm.

Príloha č. 8: Sledovanie biologických prvkov kvality (makrozoobentos, makrofyty, fytobentos a fytoplanktón) vo vodných nádržiach

3. Rastlinná masa (Plant Mass) sa stanovuje 5-člennou opisnou škálou (KOHLEA A KOL., 1971, Anglická terminológia je podľa HOLMES, WHITTON 1975) :

- 1 veľmi zriedkavý, až ojedinelý druh /rare
- 2 zriedkavý druh / occasional
- 3 rozšírený druh / frequent
- 4 hojný druh /abundant
- 5 veľmi hojný, až prevládajúci druh / very abundant

4. V každej analyzovanej jednotke sa stanoví pre každý prítomný rastlinný druh rastlinná masa (Plant Mass Estimates - PME) [Bio –Volume Estimates BVEs].

Jednotlivé druhy sa určujú priamo v teréne. Dokumentácia sa robí aj v herbári a vo forme liehom konzervovaných vzoriek (rastliny uložené v 30 % etanole).

3.4 Odber vzoriek makrozoobentosu

3.4.1. Terénne práce

Vzorky makrozoobentosu sa odoberajú vo vodných nádržiach z dnového substrátu metódou hlbinného odoberacieho zariadenia Ekman-Birgeho bagra (SCHWOERBEL, 1970; WETZEL & LIKENS, 2000), v počte piatich odberov. Odber je kvantitatívny, plocha sedimentu, ktorú zariadenie vysekne z dna zodpovedá veľkosti zariadenia, zvyčajne však 220 – 250 cm².

Každú vodnú plochu reprezentujú tri odberové stacionáre, ktoré sú plošne rozmiestnené približne v rovnakých vzdialenostiach od seba v inej časti nádrže. Odoberanie sa uskutočňuje v hĺbke od 5 do 10 m, pričom odoberacie zariadenie nie je vystavené vplyvom vodných prúdov, ktoré by mohli znehodnotiť odber prípadným nadľahčovaním až do tej miery, že by zariadenie prestalo byť ovládateľné. Prevažnú časť dnového substrátu môže tvoriť bahno a FPOM.

Bager s odobratou vzorkou sa vytiahne nad hladinu, obsah sa vyklopí do pripravenej siete s hustotou 200 – 250 µm a vzorka sa premyje. Obsah siete sa premiestni na pripravenú plytkú misku, hrubé časti detritu, resp. anorganického substrátu sa odstránia a zvyšok sa zleje do polyetylénovej širokohrdlej fľaše. Všetky odobraté vzorky sa umiestnia do jednej nádoby. Na brehu sa vzorka označí a zafixuje 4% roztokom formaldehydu. Ďalšie spracovanie prebieha v laboratóriu.

3.4.2. Laboratórne práce

Makroevertebráta sa vyberajú zo sedimentu pomocou mäkkej entomologickej pinzety pod stereomikroskopom pri 4-násobnom zväčšení. Materiál sa separuje podľa taxonomickej príslušnosti a ukladá do Petriho misiek s vodou. Po prezretí celej vzorky sa organizmy z každej skupiny sčítajú a uložia do samostatných epruviet so 75 – 80% roztokom benzínalkoholu.

Pri ďalšom vyhodnocovaní sa výsledné počty odobratých jedincov z 5 vzoriek prepočítavajú ako aritmetický priemer na jednu vzorku a následne sa stanovuje denzita jedincov na 1 m².

Pre determináciu je potrebné larvy pakomárov montovať do trvalých mikroskopických preparátov. Materiál sa preniesie z epruvety do Petriho misky s destilovanou vodou a roztriedi sa pod stereomikroskopom do morfológicky

Príloha č. 8: Sledovanie biologických prvkov kvality (makrozoobentos, makrofyty, fytoobentos a fytoplanktón) vo vodných nádržiach

podobných skupín, aby sa nemuseli preparovať všetky odobraté larvy, čo by proces spracovania značne predĺžilo. Z každej skupiny sa na preparáciu vyberie niekoľko lariev (zvyčajne 4 – 5), ostatné sa znova uložia do epruvety s benzínalkoholom a deponujú ako dokladový materiál.

Ako zalievacie médium pri príprave trvalých mikroskopických preparátov sa môže použiť vodou riediteľné Berleseho chloralhydrátové médium (LEWIS, 1973).

3.4.3. Analýza makrozoobentosu

Na stanovenie organického zaťaženia nádrže (eutrofizácie), resp. trofického statusu nádrže sa použije „**benthic quality index**“ (BQI) (WIEDERHOLM, 1980):

$$\text{BQI} = \sum \frac{k_i n_i}{N},$$

kde k_i je hodnota i-teho indikátorového druhu, n_i je počet jedincov i-teho indikátorového, N je celkový počet jedincov všetkých indikátorových druhov.

Hodnota výsledného indexu sa pohybuje od 5 (oligotrofia) do 1 (eutrofia), ostatné hodnoty vyjadrujú prechody medzi nimi (hodnota 3 zodpovedá mezotrofii).

Ako pomocné hodnotenia profundálnych spoločenstiev, zvlášť pri porovnávaní jednotlivých nádrží medzi sebou, sa použije **Shannonov index diverzity**:

$$H = - \sum (n_i / N) \cdot \log_2(n_i / N),$$

kde n_i je hodnota početnosti každého druhu a N je súčet hodnôt početností všetkých druhov,

a tiež index **vyrovnanosti (equitability)**:

$$e = H / \ln S,$$

kde S je počet druhov, H je Shannonov index (BEGON et al., 1997).

LITERATÚRA

1. ABAFFY, D., LUKÁČ, M., (1991). Priehrady a nádrže na Slovensku. ALFA Bratislava, 143 pp.
2. ARMITAGE P.D., MOSS D., WRIGHT J.F. & FURSE M.T., (1983). The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. – Water Research, 17: 334-347.
3. AQEM CONSORTIUM, (2002). Manual for the application of the AQEM method. A comprehensive method to assess European streams using benthic

Príloha č. 8: Sledovanie biologických prvkov kvality (makrozoobentos, makrofyty, fytobentos a fytoplanktón) vo vodných nádržiach

macroinvertebrates. developed for the purpose of the Water Framework Directive. Version 1.0. February 2002.

4. BEGON M., HARPER J.L. & TOWNSEND C.R., (1997). Ekologie: jedinci, populace, společenstva. – Vydavatelství Univerzity Palackého, Olomouc, 951 pp.
5. BITUŠÍK, P., (2005). Metodika sledovania a hodnotenia ekologického stavu stojatých – výrazne modifikovaných a umelých útvarov povrchových vôd pre vybrané biologické prvky kvality (bentické bezstavovce) v zmysle požiadaviek RSV. Technická univerzita vo Zvolene, Fakulta ekológie a environmentalistiky, Katedra biológie a všeobecnej ekológie: 12 pp.
6. BRINKHURST R.O., (1966). The Tubificidae (Oligochaeta) of polluted waters. – Internat. verein. Theor. Angew. Limnol. Verhand., 16: 854-859.
7. BRUNDIN L., (1949). Chironomiden und andere Bodentiere der Südschwedischen Urgebirgsseen. – Inst. Freshwater Res. Drottningholm Rep., 30: 1-914.
8. BRUNDIN L., (1951). Die bodenfaunistischen Seetypen und ihre Anwendbarkeit auf die Südhalbkugel. Zugleich eine Theorie der produktionsbiologischen Bedeutung der glazialen Erosion. – Rep. Inst. Freshw. Res. Drottningholm, 37: 186-235.
9. CARTER C.E., (1978). The fauna of muddy sediments of Lough Neagh, with particular reference to eutrophication – Freshwater Biology, 8: 547-549.
10. HUDEC, I., (1996). Hydrobiológia. Príroda, s. 103-106.
11. CHANDLER J.R., (1970). A biological approach to water quality management. – Water Pollution Control, 69: 415-421.
12. DE PAUW N. & VANHOOREN G., (1983). Method for biological quality assessment of watercourses in Belgium. – Hydrobiologia, 100: 153-168.
13. KELLY, M.G., YALLOP, M.L., HIRST, H. & BENNION, H., (2005). Sample collection. Version 2.1. 11pp. Unpublished DARES/DALES protocol. <http://craticula.ncl.ac.uk/dares/methods.htm>.
14. KOLKWITZ R. & MARSSON M., (1909). Okologie der tierischen Saprobien. Beiträge zur Lehre von der biologischen Gewässerbeurteilung. – Intern. Rev. ges. Hydrobiol. u. Hydrogeogr., 2: 126-152.
15. LEWIS D.J., (1973). Psychodidae and Phlebotomidae. – In Smith, K.G.V. (ed.), Insects and other arthropods of medical importance. Brit. Mus. (Nat. Hist.), London, p. 155-179.
16. MAKOVINSKÁ J., VELICKÁ Z., HLÚBIKOVÁ D., BALÁŽI, P., TÓTHOVÁ L., HAVIAR M., LEŠŤÁKOVÁ M., BITUŠÍK P., (2006). Doplnkové sledovanie biologických prvkov kvality (makrozoobentos, makrofyty, fytobentos a

Príloha č. 8: Sledovanie biologických prvkov kvality (makrozoobentos, makrofyty, fytozobentos a fytoplanktón) vo vodných nádržiach

fytoplanktón) pre stanovenie MEP a GEP vo vybraných vodných nádržiach, VÚVH, Bratislava, 25 s.

17. MANN K.H., (1991). Organisms and ecosystems – In Barnes R.S.K. & Mann K.H. (Eds), Fundamentals of aquatic ecology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 3-26.
18. PRYGIEL, J., (1991). The use of benthic diatoms in the surveillance of the Artois-Picardie water hydrobiological quality. In: Whitton, B.A., Rott, E. & FRIEDRICH, G. (eds.). Use of Algae for Monitoring Rivers, Institut fuer Botanik, Universität Innsbruck: 75-88.
19. SÆTHER, O.,A., (1979). Chironomid communities as water quality indicators. - Holarctic Ecology, 2: 65-74.
20. SÆTHER, O.,A., (1980). The influence of eutrophication on deep lake benthic invertebrate communities. – Progressive Water Technology, 12: 161-180.
21. SCHWOERBEL, J., (1970). Methods of Hydrobiology (Freshwater Biology). – Pergamon Press, Oxford, 200 pp.
22. SLÁDEČEK, V., (1973). System of water quality from the biological point of view. – Ergeb. Limnol., 7: 2-218.
23. SMERNICA 2000/60/ES EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY. Úradný vestník Európskych spoločenstiev, 23. októbra 2000, 99 pp.
24. STN EN 13946: 2002. Kvalita vody. Pokyny na rutinný odber a predprípravu vzoriek bentických rozsievok z tečúcich vôd.
25. STN EN 14184: 2004 Kvalita vody. Pokyny na skúmanie vodných makrofytov v tečúcich vodách
26. STN EN 25667-2: 1999. Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 2: Pokyny na techniky odberu vzoriek
27. STN 83 0532-5A: 1979. Biologický rozbor povrchovej vody. Stanovenie nárastov.
28. STN EN ISO 5667-3:2005. Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 3: Pokyny na konzerváciu vzoriek vody a manipuláciu s nimi.
29. STN ISO 5667-6: 1999. Kvalita vody. Odber vzoriek. Časť 6: Pokyny na odber vzoriek z riek a potokov.
30. THIENEMANN, A., (1922). Die beiden *Chironomus* - arten der Tiefenfauna der norddeutschen Seen. Ein hydrobiologisch es Problem. Archiv für Hydrobiologie, 13: 46 - 609.
31. TIMM, T., (2002). Meiobenthos in some Estonian small stratified lakes. – Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol., 51: 184-2003.

32. TUFFERY G. & VERNEAUX J. (1968). Méthode de Détermination de la Qualité Biologique des Eaux Courantes. Exploitation Codifiée des Inventaires de la faune du Fond. – Section Peche et Pisciculture. centre National d'Etude Techniques et de Recherches Technologiques pour l'Agriculture, les Forets et l'Equipment Rural, Ministere de l'Agriculture, Paris, France.
33. ROUDN, F.E., (1991). Diatoms in river water-monitoring studies. J. Appl. Phycol. 13: 129-145.
34. WETZEL R.G. & LIKENS G.E. (2000). Limnological Analyses. – Springer Verlag, New York Inc., 429 pp.
35. WHITTON, B. A. & ROTT, E., (1996). *Use of Algae for Monitoring Rivers II: Proceedings of the 2nd European Workshop, Innsbruck, 1995.*, 196pp. Universität Innsbruck. [Používanie rias na monitorovanie riek II.].
36. WIEDERHOLM, T., (1980). Chironomids as indicators of water quality in Swedish lakes. - Naturv. Limnol. Undersöhningar. Inf. , 10: 1-17.
37. WILSON R.S. & RUSE L.P., (2005). A guide to the identification of genera of chironomid pupal exuviae and their use in monitoring lotic and lentic fresh waters. Freshwater Biol. Assoc., 164 pp.
38. WOODIWISS, F.,S., (1964). The biological system of stream classification used by Trent River Board. – Chemistry and Industry, 83: 443-447.
39. WRIGHT J.F., ARMITAGE P.D., FURSE M.T. & MOSS D., (1989). Prediction of invertebrate communities using stream measurements. - Regulated Rivers: Research and Management, 4.