

## **Fragment pracy *Nadzór merytoryczny nad poborem prób i oznaczaniem fitobentosu w rzekach i jeziorach wraz z opracowaniem oceny stanu i klucza do oznaczania fitobentosu***

Zamówienie zostało wykonane przez Firmę Adasa Sistemas pod kierownictwem Rominy Álvarez Troncoso. Przy realizacji wymaganych prac z ramienia wykonawcy uczestniczył zespół specjalistów diatomologów, w składzie:

- prof. dr hab. Andrzej Witkowski,
- prof. dr hab. Joanna Żelazna-Wieczorek,
- dr Joanna Picińska-Fałtynowicz,
- dr Agata Wojtał,
- dr Małgorzata Bąk,
- dr Ewelina Szczepocka,
- dr Katarzyna Szulc,
- dr Bogusław Szulc,
- dr Hanna Szymańska.

***prof. dr hab. Joanna Żelazna-Wieczorek  
dr Małgorzata Bąk***

### **Uwagi i proponowane zmiany do przewodnika metodycznego z roku 2006**

uzupełnienie

PN-EN 14407 czerwiec 2007

Jakość wody. Wytyczne dotyczące identyfikacji, oznaczania ilościowego i interpretacji wyników badania próbek okrzemek bentosowych z wód płynących

#### **1. Termin poboru prób**

W Polsce optymalnym dla odnotowania dynamiki sezonowych zmian jakości wody byłby trzykrotny pobór prób: wczesną wiosną (marzec/kwiecień); latem (lipiec) i jak wyżej, koniec roku hydrologicznego (wrzesień/październik) i dodatkowy zimowy termin dla rzek wyżynnych i górskich. Ze względu na ograniczenie wydatków pobór prób fitobentosu okrzemkowego, może odbyć się okresie zamykającym rok hydrologiczny, na przełomie września i października. W większości typów wód płynących jest to czas stabilnych przepływów. Jednocześnie, tak wybrany czas poboru prób pozwala uchwycić wpływ antropopresji związany ze sposobem zagospodarowania i użytkowania zlewni.

Przy wyznaczaniu terminu poboru prób należy:

- uwzględnić warunki meteorologiczne i hydrologiczne (co najmniej 3 dni po nawalnych opadach deszczu z pominięciem okresów długotrwałych wezbrań i niżówek),
- oraz pamiętać, aby coroczny pobór prób odbywał się w analogicznym terminie (+/- 2 tygodnie), jednak z uwzględnieniem ewentualnych anomalii pogodowych w poszczególnych latach.

### W jeziorach (bez zmian).

## 2. Stanowisko badawcze

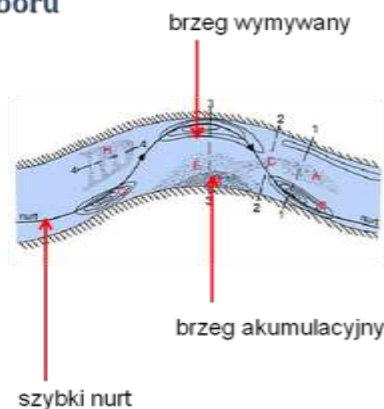
Wody płynące:

- stanowisko poboru prób powinno być zlokalizowane na odcinku brzegowym rzeki o długości od 50 do 100 m, charakterystycznym dla danego typu rzeki (patrz poniżej),
- wybrane miejsce poboru próby musi charakteryzować się umiarkowanym przepływem wody (unikamy szybkiego nurtu i zastoisk),
- wybieramy miejsce o jak największym nasłonecznieniu,
- fitobentos zbieramy z podłoża trwale zanurzonego w wodzie,

Wody stojące:

- stanowisko powinno znajdować się w strefie litoralnej,
- w miejscu pozbawionym częstego i silnego falowania.

### Rzeka nizinna – lokalizacja miejsca poboru prób



Potencjalne miejsca poboru prób

Miejsca nie zalecane do poboru prób

### Jezioro – lokalizacja miejsca poboru prób



Potencjalne miejsca poboru prób

Miejsca nie zalecane do poboru prób



### 3. Metody poboru prób

#### 3.1. Wybór podłoża

Zgodnie z EN 13946 wybrane podłoże musi być stale zanurzone w wodzie i być tego samego typu dla wszystkich badanych stanowisk. W rzekach na obszarze Polski wyznaczenie jednego typu podłoża jest niemożliwe. Zalecane do badań fitobentosu jest twarde podłoże, z którym okrzemki są trwale związane takie, jak skała, różnej wielkości kamienie lub podłoża wprowadzone do wód przez człowieka – podpory mostów (ale nie wykonane z drewna), cegły. Elementy wprowadzone przez człowieka, muszą znajdować się w wodzie przynajmniej przez 4 tygodnie. W głębokich rzekach, w których dominującym typem podłoża jest muł i piasek, europejska norma zaleca wprowadzenie sztucznego podłoża w strefie eufotycznej. Jednocześnie dopuszcza zbieranie prób fitobentosu z zanurzonych stale części makrofitów.

Należy jednak pamiętać, że każdy typ podłoża charakteryzuje się swoim właściwym składem gatunkowym okrzemek, między innymi związanym ze sposobem związania się z podłożem, co między innymi zależy od szybkości nurtu rzeki.

#### 3.2. Pobór prób w zależności od rodzaju podłoża

**Epipsammon, epipelon.** Bentos zbieramy przy użyciu szklanej lub plastikowej pipety zakończonej gruszką, z powierzchniowej warstwy dna o miąższości 5 – 25 mm, z większej głębokości czerpakami; próby umieszczamy w 100 ml pojemnikach na próbę (moczówek, te należy przechowywać w ciemności) lub w butelkach z ciemnego szkła.

**Epiliton, epiksylon.** Bentos zbieramy z kamieni, drewna, zanurzonych trwale w wodzie. Pobieramy przez zeszkrobanie z powierzchni śliskiego biofilmu nożykiem, szpatułką lub szczoteczką. Zebrane kamienie, drewno przenosimy do kuwety, w której znajdują się czysta woda destylowana (70–90 ml) i myjemy je przy użyciu szczoteczki a zebraną warstwę zlewamy do pojemnika na próbę.

**Epifiton.** Zbieramy z zanurzonych części makrofitów. Wycinamy odpowiednie fragmenty roślin, przenosimy je do plastikowej kuwety i płuczemy, myjemy wodą destylowaną, następnie zlewamy wypłukany epifiton do pojemnika na próbę. Można także widoczny nalot okrzemkowy z części makrofitów zeszkrobać nożykiem.

**Użyte do poboru próby pipety, nożyki, kuwety itp., należy umyć, każdorazowo po poborze próby, najlepiej w wodzie bieżącej. Szczoteczki traktujemy jako narzędzie jednorazowe dla każdej z prób!**

Zebrane próby należy dokładnie opisać (zaetykietować) z uwzględnieniem daty, miejsca poboru oraz charakteru siedliska itp.

Utrwalenie materiału: alkohol etylowy w takiej ilości, alby stężenie końcowe roztworu wynosiło około 20%, płyn Lugola.

**Uwaga:** jeżeli istnieje taka możliwość, czyli niewielka odległość miejsca poboru prób od laboratorium, lub możliwość przechowywania prób w niskiej temperaturze (nie dłużej jak 24 godziny), próby powinno się przejrzeć wstępnie na żywo, przed utrwaleniem, w celu sprawdzenia czy próba została dobrze zebrana, oceny obfitości okrzemek, oszacowania ilości żywych do martwych pancerzyków okrzemek itd.,

#### **4. Przygotowanie prób do analizy**

bz.

#### **5. Metody oczyszczania okrzemek**

##### **Metoda 5. Gorący nadtlenek wodoru – metoda zmodyfikowana**

Sprzęt: wyciąg laboratoryjny (niezbędny), probówki kwasoodporne (ewentualnie zlewki o pojemności 150ml), pipety, bagietka szklana, zlewka, szkiełka podstawowe, szkiełka nakrywkowe, ewentualnie wirówka.

Odczynniki chemiczne: 10% kwas chlorowodorowy (HCl), stężony perhydrol (nadtlenek wodoru,  $H_2O_2$ , ~37%), woda destylowana lub demineralizowana.

##### Metodyka:

Próby w laboratorium przenieść do zlewek o pojemności 150 ml, zalać 10% HCl w celu usunięcia węglanów. Proces prowadzić do czasu ustania burzenia, od czasu do czasu mieszając szklaną bagietką. Następnie próby przepłukać się czterokrotnie wodą destylowaną lub demineralizowaną w odstępie 12 godzin, bądź odwirować (patrz metoda 1). Aby usunąć materię organiczną próby gotuje się w stężonym perhydrolu (~37%) od 2 do 12 godzin, uzupełniając perhydrol, jeśli zachodzi taka potrzeba. Wygotowane próby płucze się ponownie czterokrotnie wodą destylowaną w odstępach 12-to godzinnych lub odwirowuje. Po zdekantowaniu i uzupełnieniu wodą destylowaną lub demineralizowaną do 100 ml powstałą zawiesinę nanosi się na szkiełka nakrywkowe (liczba kropli jest zależna od gęstości zawiesiny), a pozostały materiał konserwuje się odpowiednio (patrz poprzednie metody) i przechowuje do ewentualnej weryfikacji.

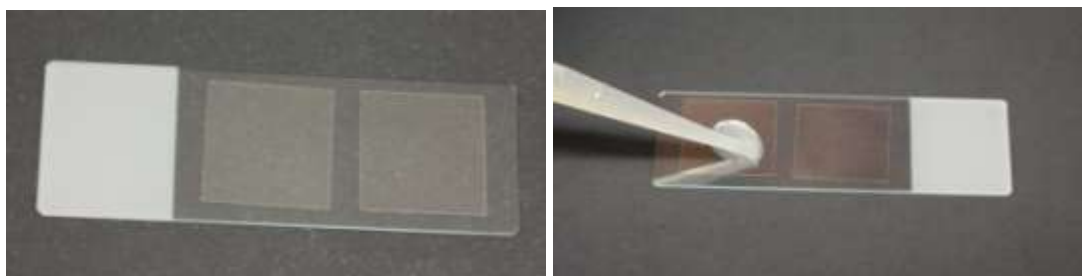
## 6. Przygotowanie preparatów trwałych

Sprzęt: wyciąg, ceramiczna płyta grzejna, grzejnik elektryczny, jednorazowe pipety;

Odczynniki chemiczne: woda destylowana, żywica syntetyczna o współczynniku załamania światła  $> 1,6$ ; na przykład Naphrax®;

Metodyka:

- przed wykonaniem preparatów stałych należy odtłuścić szkiełka nakrywkowe etanolem, jeśli nie były odtłuszczone fabrycznie;
- na szkiełku podstawowym umieszczamy 1 lub 2 szkiełka nakrywkowe, na które наносimy wyprażony materiał krzemkowy;



- w przypadku dużego zagęszczenia osadu na szkiełka nakrywkowe наносimy od 1 do 2 kropli materiału krzemkowego i uzupełniamy go roztworem chlorku amonu lub wodą kranową (po uprzedniej kontroli, czy nie ma w niej okryw krzemkowych) rozprowadzając równomiernie materiał po całym szkiełku;
- w celu bardziej równomiernego rozprowadzenia materiału krzemkowego po szkiełku, można zastosować odwrotną kolejność – najpierw uzupełniamy szkiełko roztworem salmiaku lub wody kranowej, a następnie dodajemy materiał krzemkowy.

Do sporządzenia preparatów przygotowuje się 10% roztwór chlorku amonu (salmiaku,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), który zapobiega tworzeniu się agregatów.

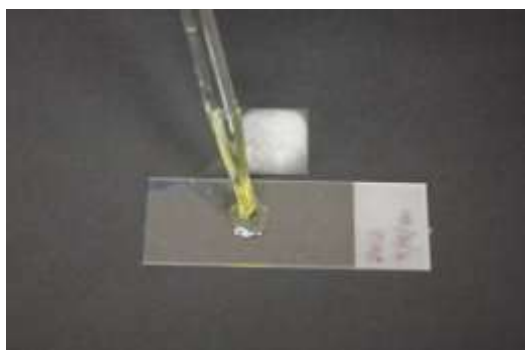
- Jeżeli na szkiełko nakrywkowe nakrapiamy 1-4 kropli próby krzemkowej wtedy roztwór chlorku przygotowujemy następująco: 100 ml wody destylowanej + 10 kropli 10%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Tym roztworem uzupełniamy szkiełko, w pierwszej kolejności наносząc roztwór chlorku, a następnie próbę krzemkową.
- Jeżeli całe (lub prawie całe = 20-25 kropli) szkiełko nakrapiamy materiałem krzemkowym to roztwór chlorku przygotowujemy następująco: 10 ml wody destylowanej + 20 kropli 10%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Wtedy na szkiełko dodajemy tylko 1 kroplę tak przygotowanego roztworu.

Tak przygotowane szkiełka zostawia się do odparowania w temperaturze pokojowej. Następnie na płycie grzewczej nagrzanej do temperatury 351°C wyprażamy chlorek amonu przez ok. 3 minuty.

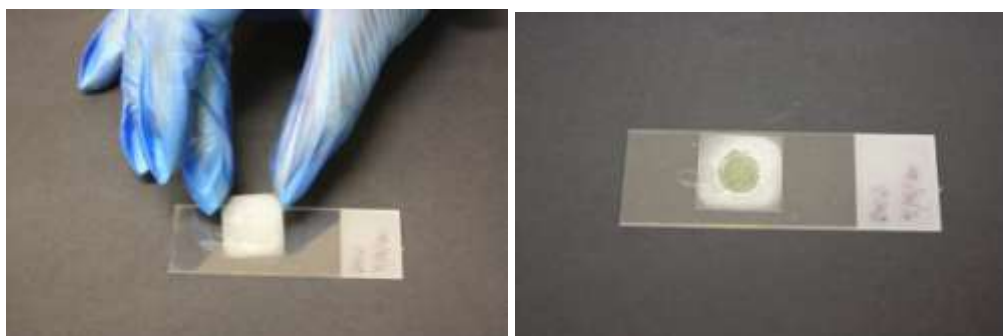


**Następne czynności wykonujemy pod wyciągiem, ponieważ rozpuszczalnikiem żywicy Naphrax® jest toluen.**

- Następnie przygotowujemy czyste i opisane szkiełka podstawowe i umieszczamy na każdym z nich po 2 krople Naphraxu®;



- szkiełko nakrywkowe kładziemy stroną z materiałem okrzemkowym na krople Naphraxu®;



- tak przygotowane szkiełko podstawowe kładziemy na gorącej ceramicznej płycie grzejnej lub piecyku (około 200°C) i podgrzewamy do momentu zagotowania się Naphraxu® (odparowania rozpuszczalnika z żywicy) pod szkiełkiem nakrywkowym (kilka do kilkunastu sekund);
- zdejmujemy preparat z ceramicznej płyty grzejnej lub piecyka elektrycznego i delikatnie dociskamy szkiełko nakrywkowe w celu usunięcia pęcherzyków powietrza i nadmiaru żywicy;

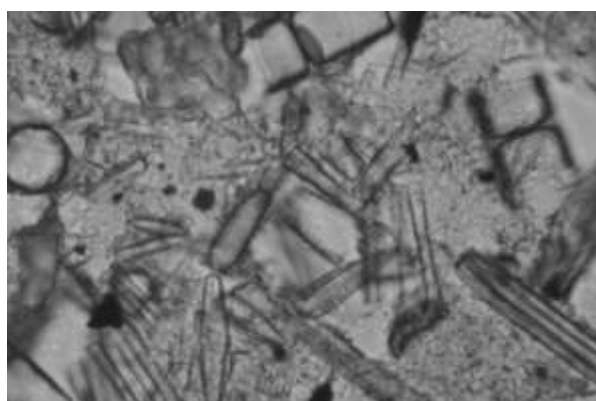


- po wystygnięciu żywica musi być twarda (powinna się kruszyć, nie ugiąć czy ciągnąć lub płynąć).

**W poprawnie wykonanym preparacie w polu widzenia przy powiększeniu 1000x powinny być widoczne 15 – 20 okryw okrzemek.**

**Dobrze wykonany preparat**

**Niepoprawnie wykonany preparat**



Tak przygotowane preparaty stałe służą do dalszych analiz taksonomicznych i mogą być przechowywane przez długi czas (ponad sto lat), zabezpieczone przed mechanicznym uszkodzeniem w odpowiednich pudełkach na preparaty.



## 7. Analiza mikroskopowa

Na podstawie wytycznych dotyczących identyfikacji, oznaczania ilościowego i interpretacji wyników badania próbek okrzemek bentosowych z wód płynących zawartych w PN-EN 14407 czerwiec 2007 wymaganym wyposażeniem jest:

- mikroskop świetlny, wyposażony w ruchomy stolik i obiektyw immersyjny o dużym powiększeniu 100x. Zaleca się stosowanie kontrastu fazowego lub kondensora interferencyjno-różnicowego (Nomarskiego). Mikroskop powinien być wyposażony w podziałkę okularową o rozdzielczości co najmniej 1µm. Konieczne jest też:
  - wyposażenie do wykonywania fotografii mikroskopowej;
  - klucze do identyfikacji i źródła ikonograficzne, odpowiednie do rozpatrywanych siedlisk - *Klucz do identyfikacji okrzemek w fitobentosie na potrzeby oceny jakości wód powierzchniowych w Polsce jako źródło podstawowe oraz dodatkowo seria *Diatoms of Europe* i *Iconographia Diatomologica* – wybrane pozycje.*
- olejki immersyjne i dozownik;
- szmatka do soczewek;



- wyposażenie do zapisu danych w trakcie ich zbierania. Zaleca się, aby wybór arkuszy lub programów obliczeniowych uwzględniał wymagania programu zapewnienia jakości, który jest stosowany. **Arkusze powinny zawierać zmiany jakie zaszły w taksonomii okrzemek – najnowsze podziały taksonomiczne, stale aktualizowane wartości wskaźnikowe poszczególnych taksonów\***,
- wyposażenie do weryfikacji tożsamości trudnych do identyfikacji okazów. Powinno ono umożliwiać wykonanie wyskalowanych, wysokiej jakości fotografii mikroskopowych,
- w przypadku trudności i niepewności przy identyfikacji okrzemek zalecane jest kontaktowanie się w celu konsultacji z Ekspertami, szczególnie specjalistami z ośrodków naukowych zajmujących się tą grupą organizmów.

**\*Aktualizując arkusze kalkulacyjne należy bezwzględnie pamiętać o tym, że nie wystarczy zmienić jedynie nazwy gatunku na nową.** Istnieje wiele sytuacji, w których gatunek zyskuje nową nazwę i zawsze należy dokładnie przeanalizować przyczyny zmiany. Najprostsza sytuacja i najczęstsza dotyczy przeniesienia gatunku z rodzaju do rodzaju, ze względu na kryteria morfologiczne, czy genetyczne. Nie ulega wówczas zmianie charakterystyka autekologiczna i wartości wskaźnikowe gatunku. Zdecydowanie więcej komplikacji występuje przy podziale jednego gatunku na dwa, czy nawet kilka innych. Z ram starego gatunku (*sensu lato*) zostaje wyciągniętych kilka nowych gatunków, które zyskują nowe nazwy i muszą mieć na nowo ustaloną charakterystykę autekologiczną i wartości wskaźnikowe, gdyż najczęściej mają zawężone zakresy ekologiczne względem gatunku, z którego zostały „wyjęte”. Gatunek pierwotny często pozostaje pod tą samą nazwą (określany jako *sensu stricto*), jednakże najczęściej pozostaje z zawężoną charakterystyką ekologiczną i na nowo należy ustalić wartości wskaźnikowe (przykład np. *Gomphonema truncatum* – wydzielono kilka nowych, czy *Navicula pupula* – wydzielono kilkanaście nowych, a gatunek pierwotny przeniesiono do innego rodzaju – *Sellaphora pupula*). Wymaga to przestudiowania najnowszej literatury, a w przypadku braku danych literaturowych, określenia autekologii i wartości wskaźnikowych na podstawie wyników analiz – zestawienia liczebności z jak największej liczby prób z parametrami środowiskowymi. Jest to proces czasochłonny i wymaga znajomości najnowszej literatury diatomologicznej, zarówno taksonomicznej, jak i ekologicznej. Niedopuszczalne jest natomiast pozostawienie arkuszy kalkulacyjnych w formie niezmienionej, ponieważ będzie to przyczyna błędów i powód obniżenia jakości wdrażanego programu. Należy wkalkulować w koszty regularne (co 3–4 lata) aktualizacje arkuszy kalkulacyjnych, pod kątem zmian taksonomicznych i ekologicznych.

## 7.1. Ustalenie taksonomicznych kryteriów analiz

Minimalny poziom w zakresie taksonomii, który jest akceptowalny w badaniach stanu ekologicznego wód wymaga identyfikacji do poziomu gatunku. W przypadku wykorzystywania okrzemek do oceny jakości wody, ważne jest upewnienie się, że identyfikacja przebiegła prawidłowo. Wymaga to weryfikacji oznaczeń z odpowiednią literaturą, jak seria *Diatoms of Europe* (6 tomów), czy wybrane tomy *Iconographia Diatomologica*, np. 2, 13, 16.

## 7.2. Ustalenie jednostek do oznaczenia ilościowego

Podstawową jednostką w celu określenia ilościowego udziału poszczególnych taksonów w próbie jest okrywa. W przypadku okrzemek np. z rodzaju *Amphora* bardzo często dwie okrywy liczone są jako jedna, co jest błędem.

## 7.3. Ustalenie wielkości próbki

Typowa liczona wielkość próbki zawiera od 300 do 500 jednostek (okryw). Sprawdzoną i stosowaną najczęściej metodą jest wielkość próbki licząca 400 okryw.

## 7.4. Postępowanie z okrzemkami uszkodzonymi i innymi niedającymi się zidentyfikować

W celu wyeliminowania ryzyka policzenia oddzielnych części uszkodzonych okryw lub skorupki przed rozpoczęciem badań zaleca się określenie konsekwentnego sposobu postępowania. Są możliwe następujące sposoby:

- uwzględnianie uszkodzonego okazu tylko wówczas, gdy istnieją w przybliżeniu jego trzy czwarte,
- uwzględnianie uszkodzonego okazu tylko wówczas, gdy istnieje co najmniej jeden biegun i pole środkowe,
- odrzucanie wszystkich uszkodzonych okazów – UWAGA, jednak w tym przypadku, istnieje ryzyko, że nawet przy drobnych błędach w preparatyce okrzemek, większość okryw ulegnie uszkodzeniu, lub zostaną uszkodzone okrywy gatunków delikatnych, o cienkich ścianach komórkowych – istnieje wtedy ryzyko nierzetelnego oznaczenia.

## Podsumowanie

Wdrażany program oceny jakości wód powierzchniowych w Polsce na podstawie fitobentosu (ze szczególnym uwzględnieniem okrzemek) zaczyna funkcjonować właściwie, o czym świadczą wyniki kwestionariuszy. Dla większości (około trzech czwartych) ankietowanych procedury związane z typowaniem miejsca, poborem prób, przygotowaniem preparatów i identyfikacją gatunków są jasne. Wątpliwości pozostałych osób powinny rozwiązać odpowiedzi i komentarze udzielane do poszczególnych, zgłaszanych w kwestionariuszach problemów i zadawanych pytań. Największy problem u większości badanych stanowi brak pewności siebie i poczucie niewystarczającej wiedzy hydrologicznej, jak i hydrobiologicznej (diatomologicznej w szczególności). Wśród ankietowanych jest bardzo duże zapotrzebowanie na cykliczne szkolenia, nie masowe, lecz w małych, regionalnych grupach lub bezpośrednio w Pracowniach, z możliwością indywidualnego kontaktu z prowadzącym i czasem na utrwalenie zdobytej wiedzy.

Bezwzględne uzupełnienia wymaga sprzęt mikroskopowy i laboratoryjny w niektórych pracowniach. W innych, dla zachowania jakości analiz, konieczne jest zasilenie kadry o dodatkowe osoby, bądź specjalizacja poszczególnych pracowni.

Uzupełnienia lub korekty wymaga Przewodnik Metodyczny, co powinno być dokonane na drodze przygotowania kolejnej, poprawionej wersji. Zarówno arkusze kalkulacyjne, jak i tabele gatunków w Przewodniku Metodycznym, należy bezwzględnie zaktualizować pod kątem najnowszych podziałów taksonomicznych – nazwy gatunków i wartości wskaźnikowe, jak też dopasować listy do zawartości *Klucza do identyfikacji okrzemek w fitobentosie na potrzeby oceny jakości wód powierzchniowych w Polsce*.