

KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ ABIOSESTONU

Petr Pumann, Tereza Pouzarová

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42, tel.: 267082220, e-mail: ppumann@szu.cz

Úvod

Mikroskopický rozbor může přinést cenné informace o kvalitě vody a vhodně doplnit výsledky dalších rozborů. Proto byly mikroskopické rozborů v ČR zachovány pro rutinní vyšetření pitné a surové vody, i když to příslušné evropské směrnice [14], [15] nepožadují. Běžnými mikroskopickými rozborů vody, prováděnými v počítačící komůrce Cyrus I, jsou detekovány organismy a neživé částice velké řádově mikrometry a větší. Do tohoto spektra spadají mikroskopické organismy jako některé bakterie, většina sinic a řas, mikromycéty, prvoci, z neživých částic pak pozůstatky těl různých organismů (např. produkty metabolismu železitých bakterií, prázdné schránky rozsivek, zbytky schránek obrněnek, korýšů, vířníků, hmyzu, pylová a škrobová zrna, zbytky rostlinných pletiv, detritus) nebo částice anorganického původu (např. produkty koroze, různé sraženiny, půdní částice). Tyto mikroskopicky pozorovatelné neživé částice se nazývají abioseston. Výsledek stanovení abiosestonu v pitné vodě podle vyhlášky č. 252/2004 Sb. [19] musí obsahovat textovou informaci o složení abiosestonu a kvantifikaci vyjádřenou jako pokryvnost zorného pole mikroskopu s limitní hodnotou 10 %. A právě toto kvantitativní vyjádření považujeme za velmi problematické, jak po stránce metodické, tak co do výše limitní hodnoty.

Stanovení abiosestonu podle ČSN 75 7713 [5]

Pro stanovení abiosestonu ve vodách se v laboratořích v ČR používá metoda podle ČSN 75 7713 [5]. Ta se provádí v rámci běžného stanovení biosestonu [4] (či mikroskopického obrazu), které zahrnuje odstředění 10 ml vzorku, odlití supernatantu, úpravu objemu vody nad sedimentem a přenesení zahuštěného materiálu do počítačící komůrky Cyrus I. Navíc oproti stanovení biosestonu je nutno odhadnout pokryvnost zorného pole v procentech. To se provede při 200 násobném zvětšení srovnáním s obrázky z normy. Na nich jsou zobrazeny případy 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 40% pokryvnosti. Odhad pokryvnosti je nepochybně nejslabší část metodiky (asi potvrdí každý, kdo někdy zpracovával na abioseston trochu bohatší vzorek) a bude komentován níže. Norma také zmiňuje Whiplův okulárový mikrometr, který by měl pomoci s odhadem pokryvnosti zorného pole.¹ Z textu není zcela zřejmé, zda se musí ke stanovení používat nebo zda se jedná jen o nepovinné doplnění. Domníváme se, že Whiplův okulárový mikrometr laboratoře pro kvantifikaci abiosestonu běžně nepoužívají (ač jsme na toto téma dosud neprováděli žádný průzkum).

Alternativní metody

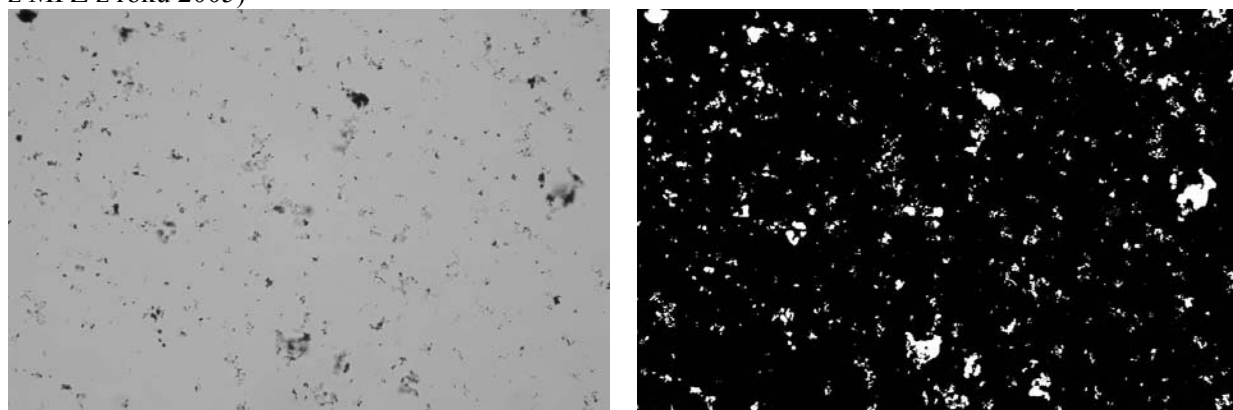
Stanovení abiosestonu podle ČSN 75 7713 není samozřejmě jedinou možností, jak kvantifikovat neživé částice ve vodě. V této kapitole uvedeme několik alternativ, kterými lze metodu stanovení podle ČSN 75 7713 vylepšit nebo ji nahradit. Možných metodik je samozřejmě mnohem více, např. stanovení nerozpuštěných látek, použití počítačů částic.

Analýza obrazu. Velmi subjektivní odhad pokryvnosti zorného pole lze nahradit použitím analýzy obrazu. O této metodě informovala již v roce 2000 na této konferenci ŽILÁKOVÁ [21]. Vzorek se zpracuje postupem podle ČSN 75 7713, ale místo odhadu pokryvnosti je třeba nasnímat několik zorných polí. Větší počet snímků lépe eliminuje variabilitu způsobenou velkými částicemi. Snímky se následně převedou (obr. 1 vlevo) do šedé škály (alespoň v postupu, který používáme v naší laboratoři). Potom je ještě nutný převod do binárního obrazu pomocí tzv. prahování. Při něm se volí hranice, podle kterých budou všechny pixely v obrázku převedeny na černé nebo bílé (obr. 1 vpravo). Posledním krokem je automatické spočítání procentuální zastoupení černých a bílých pixelů v binárním obrázku, což je vlastně výsledek stanovení pokryvnosti zorného pole abiosestonem.

¹ Whiplův okulárový mikrometr je mřížka vyrytá na kulatém sklíčku a je tvořená 100 malými čtverci (10 x 10 čtverců). Vkládá se, jak název napovídá, do okuláru.

Stanovení abiosestonu pomocí analýzy obrazu pomalu začíná být dostupné i pro provozní laboratoře. Je k němu zapotřebí pouze zařízení na snímání obrazu, tzn. digitální fotoaparát nebo kamera a patřičný adaptér k připevnění snímacího zařízení na mikroskop (lze pořídit i poměrně levně). Další nezbytnou pomůckou je software na analýzu obrazu, který však lze získat i zdarma. Použitelný je např. freeware UTHSCSA ImageTool (volně k dispozici na internetové adrese <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). Použit lze samozřejmě různé komerčně dostupné programy. Výhodou analýzy obrazu je (kromě objektivního stanovení pokryvnosti), že při ní vzniká fotodokumentace přítomného abiosestonu, která slouží jako doklad o analýze a měla by být náležitě archivována (stejně jako všechna primární data). Fotodokumentace může být zpětně přehodnocena (při podezření na chybu stanovení) nebo vyhodnocována pro různé jiné účely (např. hledání trendů nebo příčin problémů).

Obrázek 1. Stanovení pokryvnosti zorného pole abiosestonem pomocí analýzy obrazu (vlevo snímek převedený do šedé škály, vpravo binární obraz po prahování; pokryvnost stanovena na 4,75%; vzorek z MPZ z roku 2005)



Stanovení abiosestonu analýzou obrazu má také řadu úskalí a nevýhod. Ve srovnání s ČSN 75 7713 je nepochybně pracnější a náročnější na vybavení. Pro některé vzorky, ve kterých se vyskytují např. střípky skla nebo prázdné schránky rozsivek (tzn. průsvitné částice), může být obtížné najít hranice pro prahování. Snímky použité ke stanovení musí být pořízeny mimo mřížku komůrky, která by jinak rušila při prahování. Také je obtížné automaticky odlišit abioseston od organismů, což vadí především v případě jejich vyššího výskytu. Přes všechny uvedené problémy je analýza obrazu zřejmě jediná cesta jak standardizovat kvantitativní stanovení abiosestonu vyjádřené jako pokryvnost zorného pole mikroskopu.

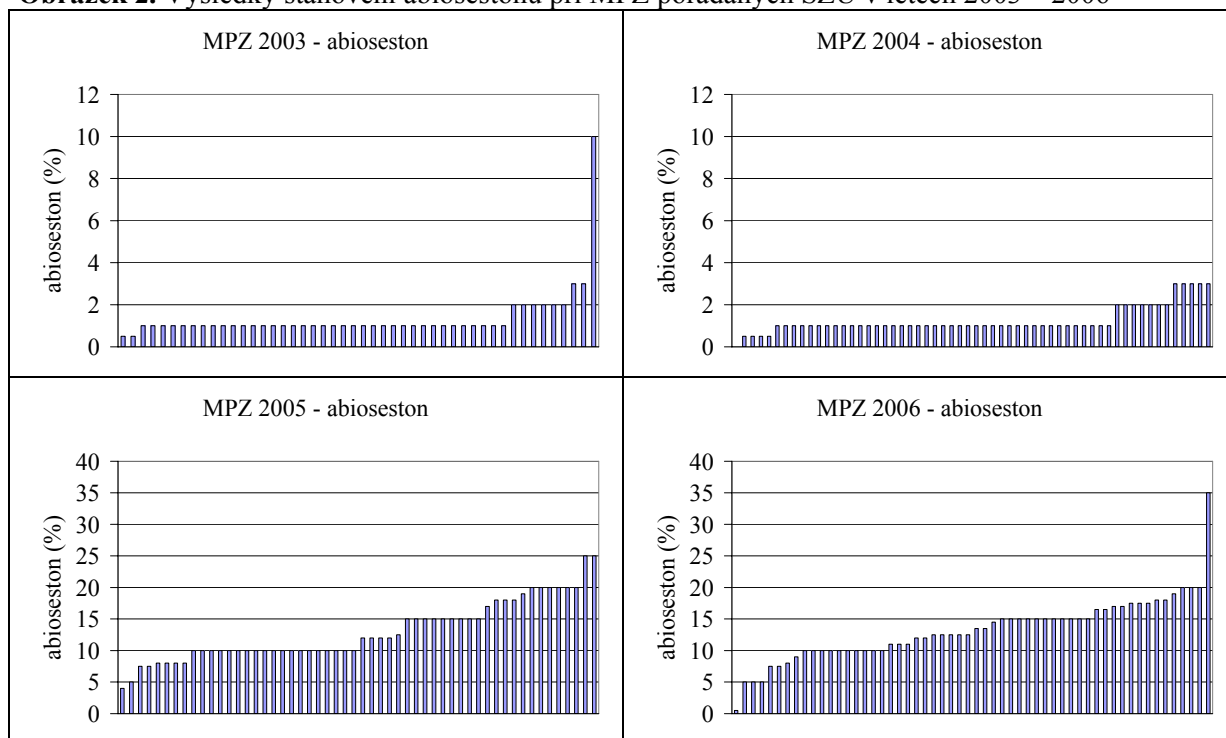
Měření objemu. Další alternativní metodou je stanovení objemu sedimentu ve vzorcích pitné vody zahuštěných nejprve filtrací a následně odstředěním. Tento postup je používán např. v Maďarsku, kdy filtrují přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm nejméně 1 litr vody. Zachycené částice smyjí a zahustí odstředěním. Limitní hodnota sedimentu v pitné vodě je 0,1 ml sedimentu/1 litr vody. Potom následuje mikroskopický rozbor tohoto sedimentu [17]. Měření objemu sedimentu využívá i metoda USEPA pro optimalizaci účinnosti vodárenské úpravy pomocí mikroskopické analýzy částic [18], při které se zpracovávají mnohem větší objemy vzorků a používají speciální filtry. Nemysleme, že by tyto metody mohly v našich podmínkách dosáhnout velkého využití. Jsou však pro nás zajímavé, protože jsou součástí mikroskopických rozborů v jiných státech.

Stanovení zákalu. Ve vodárenství rutinně používanou metodou, která také poukazuje na množství přítomných částic, je stanovení zákalu. Zákal je navíc jeden z ukazatelů směrnice 98/83/ES [14]. Existuje pro něj metodická norma ČSN EN ISO 7027 [10] a správnou činnost přístroje lze pravidelně ověřovat pomocí standardů. Velmi užitečná je také existence kontinuálních analyzátorů. Z výsledků však nelze poznat, zda je zákal tvořen organismy či abiosestonem. K tomu musí být stanovení doplněno mikroskopickým rozbohem. Navíc ve výsledku zákalu se mohou odrazit i částice, které se při stanovení abiosestonu nezjistí díky malé velikosti.

Problémy s ČSN 75 7713

Ve Státním zdravotním ústavu zařazujeme každoročně do programu mezilaboratorního porovnávání zkoušek (MPZ) pro mikroskopický obraz pitné vody také stanovení abiosestonu. Do roku 2004 byl pro stanovení počtu organismů a stanovení abiosestonu připravován jeden společný vzorek. Pro snadnější počítání organismů jsme se při přípravě vzorků snažili udržet množství abiosestonu na nízké úrovni. Uvědomovali jsme si, že takto připravované vzorky nejsou ideální z hlediska ověření schopností laboratoří správně provádět stanovení abiosestonu. Proto jsme v roce 2005 poprvé přistoupili k přípravě samostatné vzorkovnice pro stanovení abiosestonu. V letech 2005 a 2006 jsme vydávali vzorky s výrazně větším množstvím abiosestonu než v předchozích kolech MPZ. Výsledky z MPZ z let 2003 - 2006 jsou zobrazeny na obrázku 2. V letech 2003 a 2004, kdy bylo abiosestonu ve vzorcích málo, zhruba $\frac{3}{4}$ účastníků uvedlo výsledky <1% nebo 1%. Z těchto MPZ nemáme stanovení vyhodnoceno pomocí analýzy obrazu, ale nepochybně bylo <1%. Z obrázku 2 je dále patrné, že v letech 2005 a 2006 po zvýšení množství abiosestonu ve vzorcích variabilita výsledků výrazně vzrostla. Všechny výsledky se v roce 2005 pohybovaly v rozmezí 4 – 25%, v roce 2006 pak většina výsledků byla mezi 5 a 20%. V těchto letech byl abioseston stanovený rovněž pomocí analýzy obrazu v naší laboratoři a v roce 2006 ještě jedním účastníkem. Z tabulky 1 je patrný značný rozdíl mezi pokryvností stanovenou odhadem účastníky (a terčovými laboratořemi) a analýzou obrazu. I když nemůžeme vydávat naše výsledky analýzy obrazu za referenční hodnotu, chyba bude jistě výrazně menší než u odhadu. Zajímavé je i to, že nejsou významné rozdíly mezi výsledky účastníků (jsou mezi nimi i nezkušené a špatně pracující laboratoře) a terčovými laboratořemi (mezi které jsou vybírány pouze dobře pracující laboratoře). To napovídá, že s reprodukovatelností metody pomocí odhadu pokryvnosti to nebude příliš slavné.

Obrázek 2. Výsledky stanovení abiosestonu při MPZ pořádaných SZÚ v letech 2003 – 2006



Tabulka 1. Srovnání výsledků odhadu pokryvnosti zorného pole účastníky a terčovými laboratořemi při MPZ v letech 2005 a 2006, stejné vzorky vyhodnocené SZÚ a jednou účastnickou laboratoří pomocí analýzy obrazu a výsledky zákalu z roku 2006 stanovené v laboratoři SZÚ

rok	odhad pokryvnosti (%) - medián		pokryvnost (%) analýzou obrazu		zákal (ZF _n)
	účastníci	terčové lab.	účastník 561	SZÚ	SZÚ
2005	12	15	-	3,58	-
2006	13	12	3,75	2,84	59,6

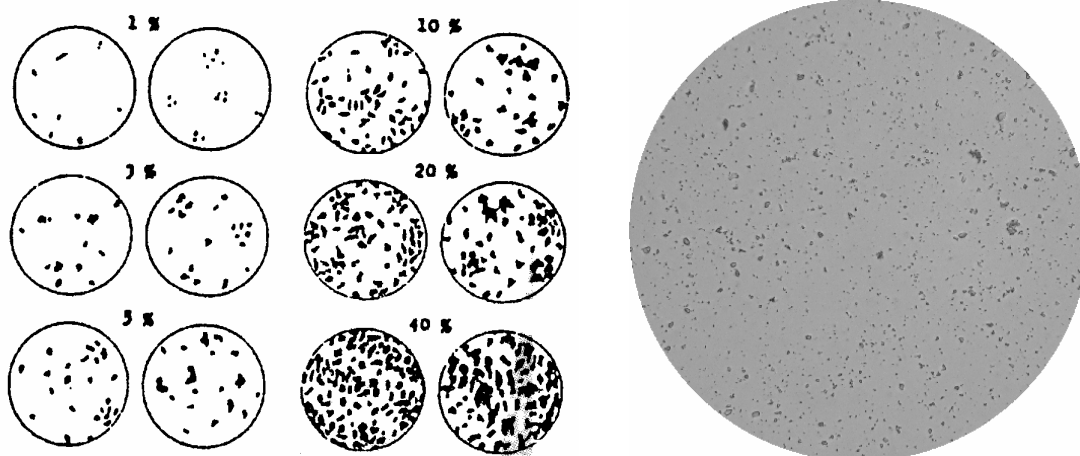
Část problémů mohla nastat vypuštěním některých částí starších metodik při tvorbě ČSN 75 7713. Při srovnání metody podle ČSN 75 7713 se staršími postupy [1], [7] (v kombinaci s [6]) a [13], lze najít dva důležité rozdíly. První se týká objemu, na který se vzorek zahušťuje. ČSN 83 0532 [7], [6] předepisuje zahuštění na 0,2 ml, zatímco v ČSN 75 7713 není uvedena žádná konkrétní hodnota. Pokud mají být výsledky porovnány s limitní hodnotou, je nutno tento objem specifikovat. Domníváme se však, že toto opominutí nezpůsobuje v praxi větší problémy, protože stanovení abiosestonu se provádí společně se stanovením biosestonu, u něž se zahušťuje obvykle na 0,2 ml (alespoň v pitné vodě) [4]. Druhou částí, která se do ČSN 75 7713 nedostala, je uvádění výsledků nikoli v procentech, ale ve stupních podle odhadní stupnice (viz tab. 2). Použití stupňů (narozdíl od vyjádření v procentech) nebudí podle našeho názoru u lidí neseznámených s metodikou dojem přesné kvantifikace (ve smyslu chemických metod). I když při pohledu na výsledky MPZ a srovnání s hodnocením pomocí analýzy obrazu by asi ani návrat k odhadní stupnici nebyl dostatečný.

Tabulka 2. Odhadní stupnice pokrývnosti zorného pole abiosestonem podle starších metod

stupeň	1	2	3	5	7	9
pokrývnost v % podle [7], [1]	<1	1 – 3	3 – 10	10 – 20	20 – 40	40 – 100
pokrývnost v % podle [13], [16]	<1	1 – 3	4 – 10	11 – 20	21 – 40	41 – 100

Jako jeden z důvodů nadhodnocování výsledků při odhadu pokrývnosti zorného pole ve srovnání s analýzou obrazu považujeme provedení obrázků zorných polí s různou pokrývností z ČSN 75 7713 (obr. 3 vlevo). Jsou totiž značně odlišné od skutečného pohledu do mikroskopu (příklad na obr. 3 vpravo). Většina lidí provádějící analýzu zřejmě není schopna rozhodnout (naše domněnka podložená osobní zkušeností s metodou), kterému obrázku je situace v zorném poli mikroskopu nejpodobnější. Částice abiosestonu jsou často mnohem drobnější než černé plošky na kresbách z normy, navíc mají většinou i jiný tvar. Pro pracovníka provádějícího rozbor je pak velmi obtížné odhadnout přesně pokrývnost. Ve většině případů pak pokrývnost nadhodnotí.

Obrázek 3. Srovnání zorného pole z mikroskopu s obrázky z ČSN 75 7713 [5]



Kvantifikace abiosestonu při hodnocení kvality pitné vody

I u legislativních opatření může být užitečná exkurze do minulosti. V našich starých normách pro pitnou vodu (od roku 1959) [2], [9], [8] se objevuje pouze konstatování: „Centrifugát ze 100 ml nesmí obsahovat žádné mikroskopicky zjištělné organické zbytky rostlinné a živočišné“. Přímý ukazatel abioseston se poprvé objevuje v ČSN 75 7111 Pitná voda, která byla účinná od roku 1991 [3]. Je u něj uvedena mezní hodnota 10 %. Původní návrh byl však výrazně nižší, totiž 3 % [11]. Podle sdělení doc. Popovského se ke změně přistoupilo při projednávání návrhu normy. Připomínky se týkaly značné subjektivity při rozlišování 3 a 5 % pokrývnosti. Z důvodu ostřejší hranice mezi 5 a 10 % bylo nakonec přistoupeno k mezní hodnotě 10 %.

Platná vyhláška č. 252/2004 Sb. [18] má stanovený limit pro abioseston 10%. Vyhláška č. 376/2000 Sb. [20], která byla v platnosti v letech 2001 - 2004 přitom ukazatel abioseston neobsahovala. V původním záměru vyhlášky č. 252/2004 Sb. byl abioseston pouze součástí kvalitativního ukazatele *mikroskopický obraz* bez limitní hodnoty [12]. Jako samostatný ukazatel s limitem byl přidán až na základě jednání pracovní skupiny hydrobiologů v roce 2002, a to především proto, že odhad pokryvnosti je velmi snadný, provádí-li se ve vzorku rovněž stanovení biosestonu [4]. Výše limitu byla převzata z ČSN 75 7111 [3].

Zajímavý z hlediska kontroly kvality vody je i vztah limitních hodnot ukazatelů zákal a abioseston. Díky tomu, že od roku 2004 jsou data o kvalitě pitné vody shromažďována v databázi IS PiVo, můžeme ho vyhodnotit na poměrně velkém souboru dat. Za roky 2004 – 2006 bylo do IS PiVo vloženo 46 573 vzorků z veřejných vodovodů, komerčních a veřejných studní, u kterých byly stanoveny oba ukazatele. V tabulce 3 je srovnáno překročení limitních hodnot pro oba ukazatele. Z tabulky je patrné, že častěji (více než dvakrát) docházelo k překročení limitní hodnoty pro zákal za současně vyhovujícího abiosestonu než opačně. To nasvědčuje, že je limit pro abioseston stanoven výše než by odpovídalo limitu pro zákal. Stejný závěr (a mnohem výrazněji; jedná se však pouze o jeden vzorek) ukazují i výsledky z MPZ z roku 2006 (viz. tab. 1), kdy byl kromě abiosestonu (odhadem i analýzou obrazu) stanoven i zákal. Totéž srovnání jsme provedli s limitní hodnotou 3% pro abioseston (původní navrhovaná limitní hodnota pro ČSN 75 7111 [11]). V tomto případě by velká část vzorků vyhovujících limitu pro zákal nevyhověla limitu pro abioseston, ale jak bylo uvedeno výše, laboratoře výsledky abiosestonu mají tendenci spíše nadhodnocovat. Výsledky stanovené pomocí analýzy obrazu by byly jistě v daleko větším souladu s limitní hodnotou pro zákal.

Tabulka 3. Srovnání limitních hodnot z vyhlášky č. 252/2004 Sb. pro zákal a abioseston z IS PiVo z let 2004 – 2006 ve veřejných vodovodech, komerčních a veřejných studních (v posledním řádku navíc spočítáno totéž s limitní hodnotou 3%, o níž se dříve uvažovalo; čísla představují počty vzorků; LH = limitní hodnota)

limity	zákal \leq LH abioseston \leq LH	zákal \leq LH abioseston $>$ LH	zákal $>$ LH abioseston \leq LH	zákal $>$ LH abioseston $>$ LH
zákal 5 ZF _n abioseston 10%	46203	109	237	24
zákal 5 ZF _n abioseston 3%	42412	3900	166	95

Návrhy na řešení

Řešit neuspokojivou situaci kvantitativního stanovení abiosestonu bude vhodné jak v metodické normě tak ve vyhlášce pro pitnou vodu.

Pro metodickou normu ČSN 75 7713 se nabízí následující možnosti:

- Doplnit přílohu, ve které budou četné fotografie zorných polí s různou pokryvností abiosestonem, který bude tvořen částicemi o různé velikosti a tvaru, tak aby bylo jednodušší odhadnout pokryvnost zorného pole při srovnání s pohledem do mikroskopu. Pokud by byla zvolena tato varianta, bylo by nanejvýš vhodné ji předem otestovat v několika laboratořích na vzorcích, které budou zároveň vyhodnoceny pomocí analýzy obrazu.
- Nahradit odhad pokryvnosti metodou analýzy obrazu, případně zkombinovat s předchozím bodem.
- Současně se změnami uvedenými výše by měl být doplněn objem, na který je třeba zahušťovat vzorek po odstředění a zvážena možnost opětovného zařazení odhadové stupnice.
- Zachovat stávající znění normy a k výsledkům přistupovat s vědomím, že především u vzorků s vyšším množstvím abiosestonu budou výsledky často významně nadhodnoceny. Tuto variantu však nepodporujeme.

Pro novelu vyhlášky č. 252/2004 Sb. je nejprve nutné zodpovědět otázku, zda je vůbec potřeba kvantitativní stanovení abiosestonu pro posuzování jakosti pitné vody. Pokud se rozhodneme mezní

hodnotu z vyhlášky vypustit a zachovat pouze kvalitativní stanovení, je možné kvantitu odhadnout z hodnot zákalu. Pokud limit pro pokryvnost ve vyhlášce zůstane zachován, musí být upravena metodika (viz. výše) a přehodnocena velikost limitní hodnoty (tzn. snížena), tak aby lépe odpovídala hodnotě zákalu. K tomu by bylo nutné provést větší počet souběžných stanovení zákalu a abiosestonu vyhodnocených pomocí analýzy obrazu.

Závěrem

Náš příspěvek má za cíl především vyvolat diskuzi na toto téma, a tak budeme vděční za všechny reakce (včetně nesouhlasných). Výčet navrhovaných řešení rozhodně není úplný a jakékoli další nápady jsou vítány.

Literatura

- [1] CYRUS Z., SLÁDEČEK V. (1967): Jednotné metody biologického rozboru vod. Acta hygienica, Příloha č. 2/1967: 61 stran.
- [2] ČSN 56 7900 Pitná voda (účinnost od 1.7.1959).
- [3] ČSN 75 7111 Pitná voda (účinnost od 1.1.1991).
- [4] ČSN 75 7712 – Jakost vod – Biologický rozbor - Stanovení biosestonu (2005).
- [5] ČSN 75 7713 – Jakost vod – Biologický rozbor - Stanovení abiosestonu (1998).
- [6] ČSN 83 0532 – Část 2 – Biologický rozbor povrchové vody - Stanovení biosestonu (1978).
- [7] ČSN 83 0532 – Část 3 – Biologický rozbor povrchové vody - Stanovení abiosestonu (1978).
- [8] ČSN 83 0611 Pitná voda (účinnost od 1.1.1975).
- [9] ČSN 83 0611 Pitná voda (účinnost od 1.10.1964).
- [10] ČSN EN ISO 7027 – Jakost vod - Stanovení zákalu (2000).
- [11] POPOVSKÝ J. (1986): Diskusní příspěvek. Aktuální otázky vodárenské biologie: 155 – 158.
- [12] PUMANN P. (2002): Připomínky k mikroskopickým (biologickým) ukazatelům ve vyhláškách MZ pro pitnou vodu a koupaliště. Aktuální otázky vodárenské biologie: 18 – 21.
- [13] SLÁDEČEK V. a kol. (1989): Biologický rozbor vod – Stanovení mikroskopického obrazu. Komentář k ČSN 757111. Vydavatelství norem. 103 s.
- [14] Směrnice Rady č. 98/83/ES o jakosti vody určené pro lidskou spotřebu.
- [15] Směrnice Rady 75/440/EHS o požadované jakosti povrchových vod určených k odběru pitné vody v členských státech
- [16] ŠTĚPÁNEK A KOL. (1982): Biologické metody vyšetřování vod ve zdravotnictví. Avicenum, zdravotnické nakladatelství 408 stran.
- [17] TÖRÖKNE A. (2005): Hungary: Regulation on Drinking Water and Bathing Water Quality including Cyanobacteria. In Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. CHORUS I. (ed.). UmweltBundesAmt: 77 – 80.
- [18] USEPA (1996): Microscopic Particulate Analysis (MPA) for Filtration Plant Optimization. EPA 910-R-96-001. 40 stran.
- [19] Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, v platném znění.
- [20] Vyhláška č. 376/2000 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou vodu a rozsah a četnost kontroly pitné vody.
- [21] ŽILÁKOVÁ L. (2000): Kvantitativne stanovenie abiosestonu pomocou obrazovej analýzy. Aktuální otázky vodárenské biologie 2000: 23 – 27.