

# Obecné zásady interpretace výsledků - mikrobiologie vody

Hodnocení rozborů vody

Konzultační den

RNDr. Jaroslav Šašek

# ČSN P ENV ISO 13843: 2002

## Jakost vod - Pokyny pro validaci mikrobiologických metod

- Mez detekce / mez stanovitelnosti
- Opakovatelnost / reprodukovatelnost
- Nejistoty / konfidenční interval (CI 95%)
- Shodnost / přesnost / robustnost
- Citlivost / specifická / proporcionalita (linearita)
- Variační koeficient (CV)

# Výsledek vyšetření

ovlivňují

následující skutečnosti

# Vliv vzorkování

- vyhlášky odkazují na normalizované postupy (odběry vzorků, metody vyšetření)
- výjimečně specifikují postup odběru (odběry z bazénů, legionel)
  - jak a kde odebrat vzorek

# Normalizované postupy

- **ČSN EN ISO 19458 : 2007**  
Jakost vod – Odběr vzorků pro  
mikrobiologickou analýzu
- **Jakost vod – Odběry vzorků**  
ČSN EN 25667 - 1-2  
ČSN EN ISO 5667- 3  
ČSN EN ISO 5667 – 4-14

# Vliv metody stanovení

- kulturační metody
- metody přímých počtů
- genetické metody

Absolutní počet mikrobů - stanoví přímé počty

kulturační - zlomek přímých počtů

# Kultivovatelnost v % z celkového počtu přítomných bakterií

[Aman, R.I. et al.: 1995]

<u>lokalita:</u>	<u>% kultivovatelnosti</u>
mořská voda	0,001 – 0,1
sladká voda	0,25
mesotrofní jezera	0,01 – 1,0
neznečištěná voda v ústí řek	0,1 – 3
aktivovaný kal	1 – 15
sedimenty	0,25
půda	0,3

# Mikrobiologické vyšetřovací metody (kultivace)

## U Z A N Ě N Í

- definován cílový mikroorganismus
- stanoven postup vyšetření

Nejedná se o stanovení absolutního počtu mikrobů či cílových skupin, druhů (stanoví se okruh, daný specifikací postupu)



# Výsledek stanovení ovlivní

- Volba:**
- kultivačního média
  - způsob očkování (MF, SP, PP)
  - inkubační teplota
  - inkubační doba

teplotní šok, aerobní šok (potlačení striktně aerobních při PP), anaeroby či mikroaerofily při aerobní kultivaci, nutriční šok

# Stanovení organotrofních mikrobů

max. počty :        dosaženy po 12 – 14 dnech

dosažení 50% max. počtů :

20 °C	= 8 dní
28 °C	= 6 dní
35 °C	= 4 dny

**Pro praxi je vhodný kompromis: 5 – 7 dní**

**normalizované metody: 2 - 3 dny**

# Odečítání KTJ na plotnách

- pro kalkulaci výsledků nutno použít jen určitý počet kolonií na plotnách

# ČSN ISO 8199:1994

uvádí pro metodu očkování na povrch média (SP – spread)  
& metoda zalévání do média (PP-pour plate technique)

= očkovat tak, aby bylo dosaženo počtů **25 - 300**  
na plotně o  $\phi$  90/100 mm

pro MF – membránová filtrace:

do **100** kolonií na MF  $\phi$  47 – 50 mm

# Limit 500 KTJ /ml

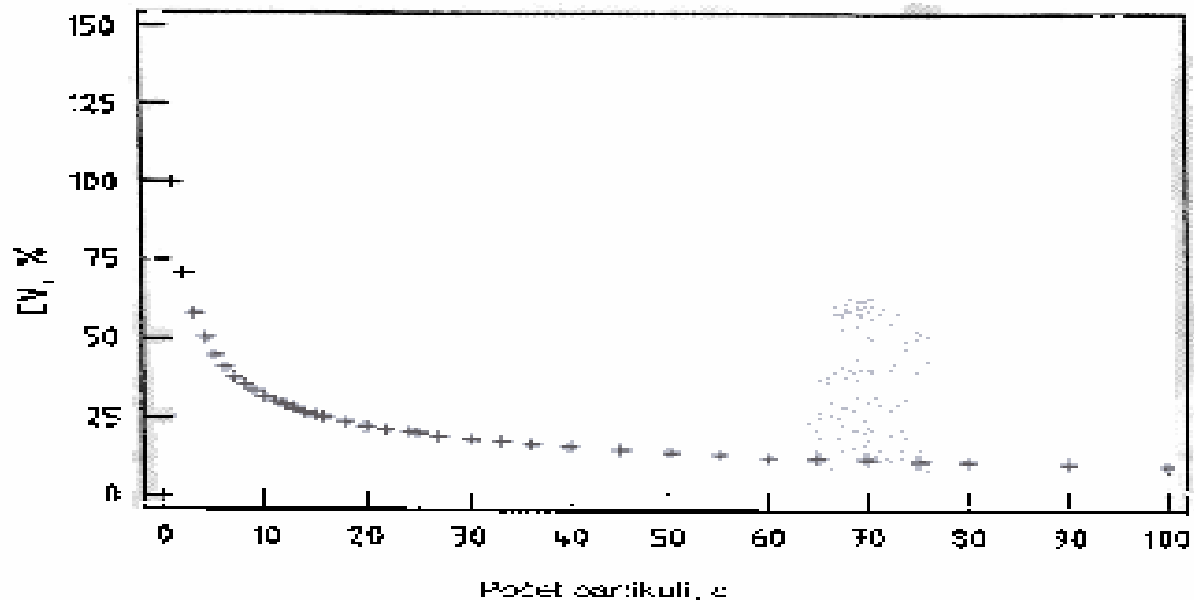
Vyhl č. 252/2004 Sb. – pro NZ, DP, zdroje < 5 m<sup>3</sup>/den

Očkování 1 ml metodou zalévání do média = 300 KTJ

vyšetřit: 2 x 0,5 ml nebo ředění 1:10

# Počet partikulí (c) & relativní shodnost (CV- variační koeficient = 100 RSD)

- Graf ukazuje, proč 20 – 30 KTJ je tradičně považováno za nejnižší statisticky spolehlivé počty

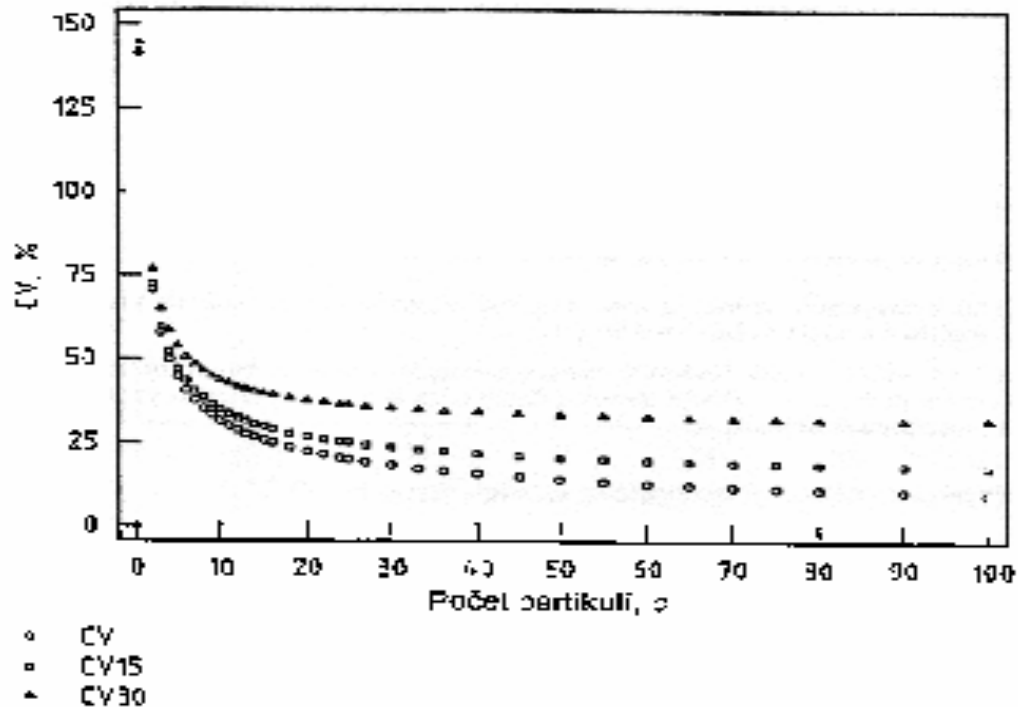


Obrázek 1 – Variační koeficient počtu partikulí c v dokonale promíchané suspenzi dle zákona Poissonova rozdělení

# Počet partikulí (c) & relativní shodnost (CV- variační koeficient = 100 RSD)

ČSN F ENV ISO 13843

Obrázek 3 znázorňuje vliv rozdílných stupňů nadměrné disperze na celkovou relativní shodnost (variační koeficient).



POZNÁMKA. Závislost variačního koeficientu (CV) na počtu (c) odečtených partikulí a na mírném vzdáleném rozptýlení. Dolní křivka: Poissonův model bez nadměrné disperze. Horní křivky: záporné binomické rozdělení s 15 % a 30 % nadměrné disperze ( $\nu = 0,15$  a  $0,30$ ).

Obrázek 3 – Vliv nadměrné disperze na CV

# Vyjadřování výsledků KTJ / objem (ISO/DIS 8199)

rozpětí optimální přesnosti = 10 KTJ – horní limit  
přesnost rychle klesá při  $< 10$  KTJ

4 KTJ = mez stanovitelnosti  
(předpoklad přijatelné RSD = 50%)

3 – 1 KTJ = průkaz / objemu  
(přesnost výsledku je velice nízká)

0 KTJ =  $< 1$  KTJ / objem



NULA

0 KTJ / objem

odečet 0/ml = se vyjádří  $< 1 / \text{ml}$   
dle ISO /DIS 8199

Konfidenční meze (CI 95%) = 0 - 5

# Paralelní vyšetření & shodnost

- Shodnost = se vyjadřuje jako směrodatná odchylka  
(je nepřímo úměrná celkovému počtu mikrobů)

$$\text{RSD} = \sqrt{1/c}$$

příklad:

**48** KTJ / 1 plotně  $\Rightarrow$  **RSD =  $\pm 0,14$**  (VC = 14%)  
12+16+20 = **48/3** plotny = 16 **RSD = 0,16** (VC = 16%)

# Náhodná (Poissonova) & nadměrná disperze

Počet KTJ potřebný k dosažení dané rel. shodnosti je v podmínkách nadměrné disperze je **vyšší** než při náhodné !!

$$C = 1 / \text{RSD}^2 - u^2$$

Příklad: téže shodnosti se dosáhne

$u = 0,15$  ;  $\text{RSD} = 0,2$  (20%)       $c = 57$  (  $c =$  počet odečtených KTJ )

$u = 0$                        $\text{RSD} = 0,2$                        $c = 25$

**lepší shodnost = opakování postupu**

# Konfidenční meze (interval spolehlivosti)

Z - počet kolonií na plotně / MF:

- $Z \geq 20$        $C \pm 95\% \text{ CI} = Z \pm 2\sqrt{Z} / A \cdot V$   
/ČSN ISO 8199/

*(100 KTJ / plotně = 82 – 122)*

- $Z < 20$  zvýšená asymetrie Poissonovy distribuce na CI 95% zohlední korekci  
 $C \pm 95\% \text{ CI} = (Z + 2 \pm 2\sqrt{Z+1}) \cdot V/A$

Poissonovy tabulky

# Konfidenční meze

## (Poissonova distribuce)

$$1 \quad \text{KTJ} / \text{objem} \quad = \quad 0,0253 \quad - \quad 5,57$$

$$0 \quad \text{KTJ} / \text{objem} \quad = \quad 0 \quad - \quad 5$$

Table 13 95% Confidence Intervals (95% CI) for the (unobserved) count from the second half-sample for the observed count from the first half-sample of 0 to 100 (see section 6.2.6)

Observed count in first half-sample	95% CI for unobserved count in second half-sample	Observed count in first half-sample	95% CI for unobserved count in second half-sample
0	0-5	24	12-40
1	0-7	25	13-41
2	0-9	26	13-43
3	0-11	27	14-44
4	0-12	28	15-45
5	0-14	29	16-47
6	1-16	30	16-48
7	1-17	31	17-49
8	2-19	32	18-50
9	2-20	33	19-52
10	3-22	34	19-53
11	3-23	35	20-54
12	4-24	36	21-55
13	5-26	37	22-56
14	5-27	38	22-58
15	6-28	39	23-59
16	6-30	40	24-60
17	7-31	41	25-61
18	8-32	42	26-63
19	8-34	43	26-64
20	9-35	44	27-65
21	10-36	45	28-66
22	10-38	46	29-67
23	11-39	47	29-69
48	30-70	75	52-102
49	31-71	76	53-103
50	32-72	77	54-104
51	33-73	78	55-105
52	33-75	79	56-106
53	34-76	80	57-107
54	35-77	81	58-108
55	36-78	82	58-110
56	37-79	83	59-111
57	38-80	84	60-112
58	38-82	85	61-113
59	39-83	86	62-114
60	40-84	87	63-115
61	41-85	88	63-117
62	42-86	89	64-118
63	42-88	90	65-119
64	43-89	91	66-120
65	44-90	92	67-121
66	45-91	93	68-122
67	46-92	94	69-123
68	47-93	95	69-125
69	47-95	96	70-126
70	48-96	97	71-127
71	49-97	98	72-128
72	50-98	99	73-129
73	51-99	100	74-130
74	52-100		

## Příloha A (normativní)

## Konfidenční meze pro odhad počtu

Hodnoty uvedené v tabulkách A.1 a A.2 jsou založeny na literárním prameni [10].

Tabulka A.1 - Odhad počtu z jedné Petriho misky

Počet mikroorganismů <sup>1)</sup>	Konfidenční meze pro pravděpodobnost 95 %		Procento chyby pro mez <sup>2)</sup>	
	dolní mez	horní mez	dolní	horní
1	< 1	6	- 97	+ 457
2	< 1	7	- 88	+ 261
3	< 1	9	- 79	+ 192
4	1	10	- 73	+ 156
5	2	12	- 68	+ 133
6	2	13	- 63	+ 118
7	3	14	- 60	+ 106
8	3	16	- 57	+ 97
9	4	17	- 54	+ 90
10	5	18	- 52	+ 84
11	6	20	- 50	+ 79
12	6	21	- 46	+ 75
13	7	22	- 47	+ 71
14	8	24	- 45	+ 66
15	8	25	- 44	+ 65

1) Je roven počtu kolonií.

2) Je vztaženo na počet mikroorganismů (1. sloupec).

Tabulka A.2 - Odhad počtu ze dvou Petriho misek

Počet kolonií <sup>1)</sup>	Počet mikroorganismů	Konfidenční meze pro pravděpodobnost 95 %		Procento chyby pro mez <sup>2)</sup>	
		dolní mez	horní mez	dolní	horní
1	1	1	3	- 97	+ 457
2	1	1	4	- 88	+ 261
3	2	1	4	- 79	+ 192
4	2	1	5	- 73	+ 156
5	2	1	6	- 68	+ 133
6	3	1	6	- 63	+ 118
7	4	2	7	- 60	+ 103
8	4	2	8	- 57	+ 87
9	4	2	9	- 54	+ 80
10	5	3	9	- 52	+ 84
11	6	3	10	- 50	+ 79
12	6	3	10	- 48	+ 75
13	6	3	11	- 47	+ 71
14	7	4	12	- 45	+ 68
15	8	4	12	- 44	+ 65
16	8	5	13	- 43	+ 62
17	8	5	14	- 42	+ 60
18	9	5	14	- 41	+ 58
19	10	6	15	- 40	+ 56
20	10	6	15	- 39	+ 54
21	10	6	16	- 38	+ 53
22	11	7	17	- 37	+ 51
23	12	7	17	- 36	+ 50
24	12	8	18	- 35	+ 49
25	12	8	18	- 35	+ 48
26	13	8	19	- 35	+ 47
27	14	9	20	- 34	+ 46
28	14	9	20	- 34	+ 45
29	14	9	21	- 33	+ 44
30	15	10	21	- 32	+ 43

1) Spočítány ze dvou Petriho misek.

2) Je vztaheno na počet mikroorganismů (2. sloupec)



# Konfidenční meze

pro různé počty mikroorganismů

Grafy ukazují, jakou mají pravděpodobnost

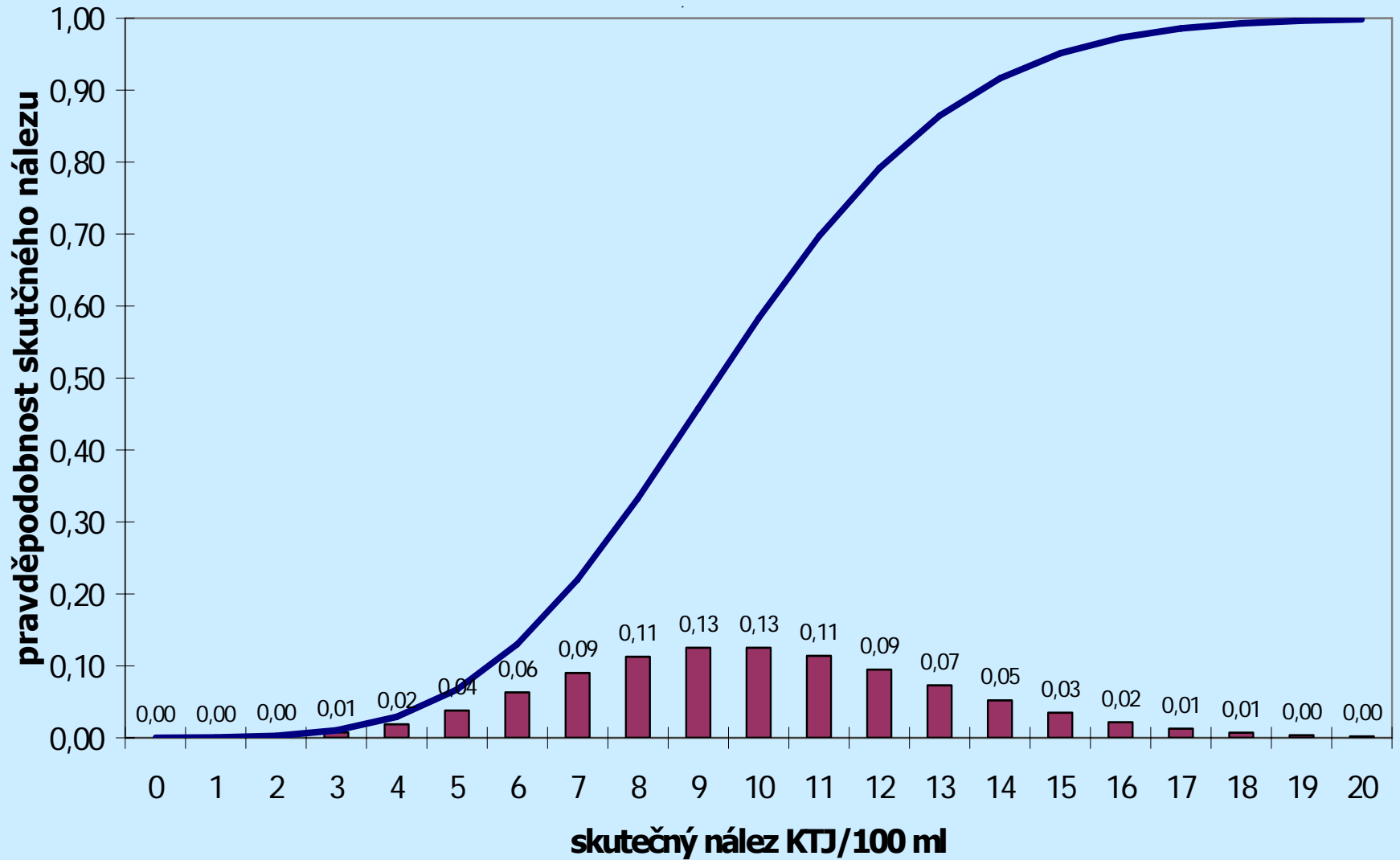
jednotlivé počty KTJ

v daném intervalu spolehlivosti

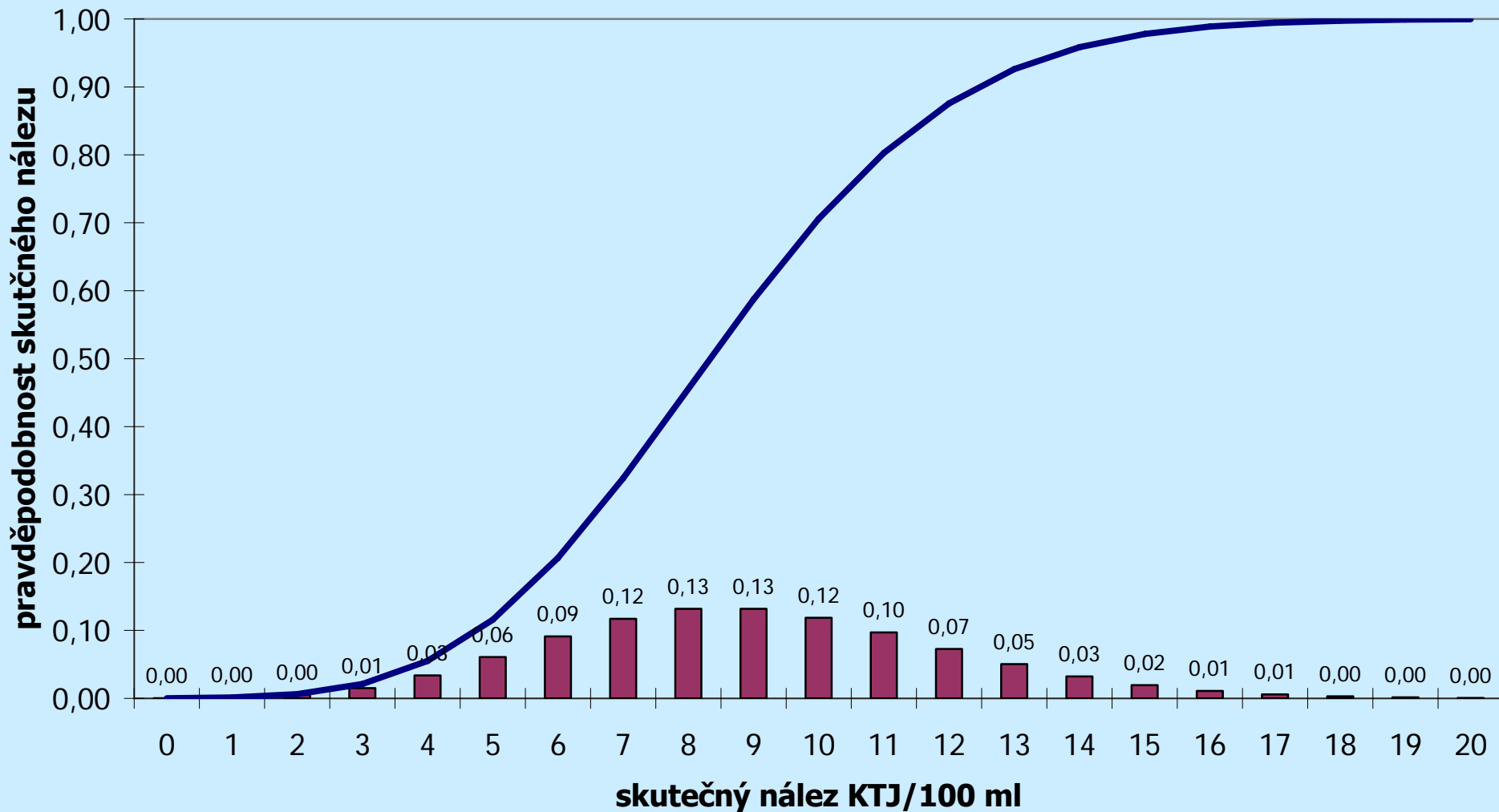
$$1 \text{ KTJ / objem} = 0 - 6$$

# Interpretace nulového nálezu v mikrobiologii a při mikroskopických rozborech

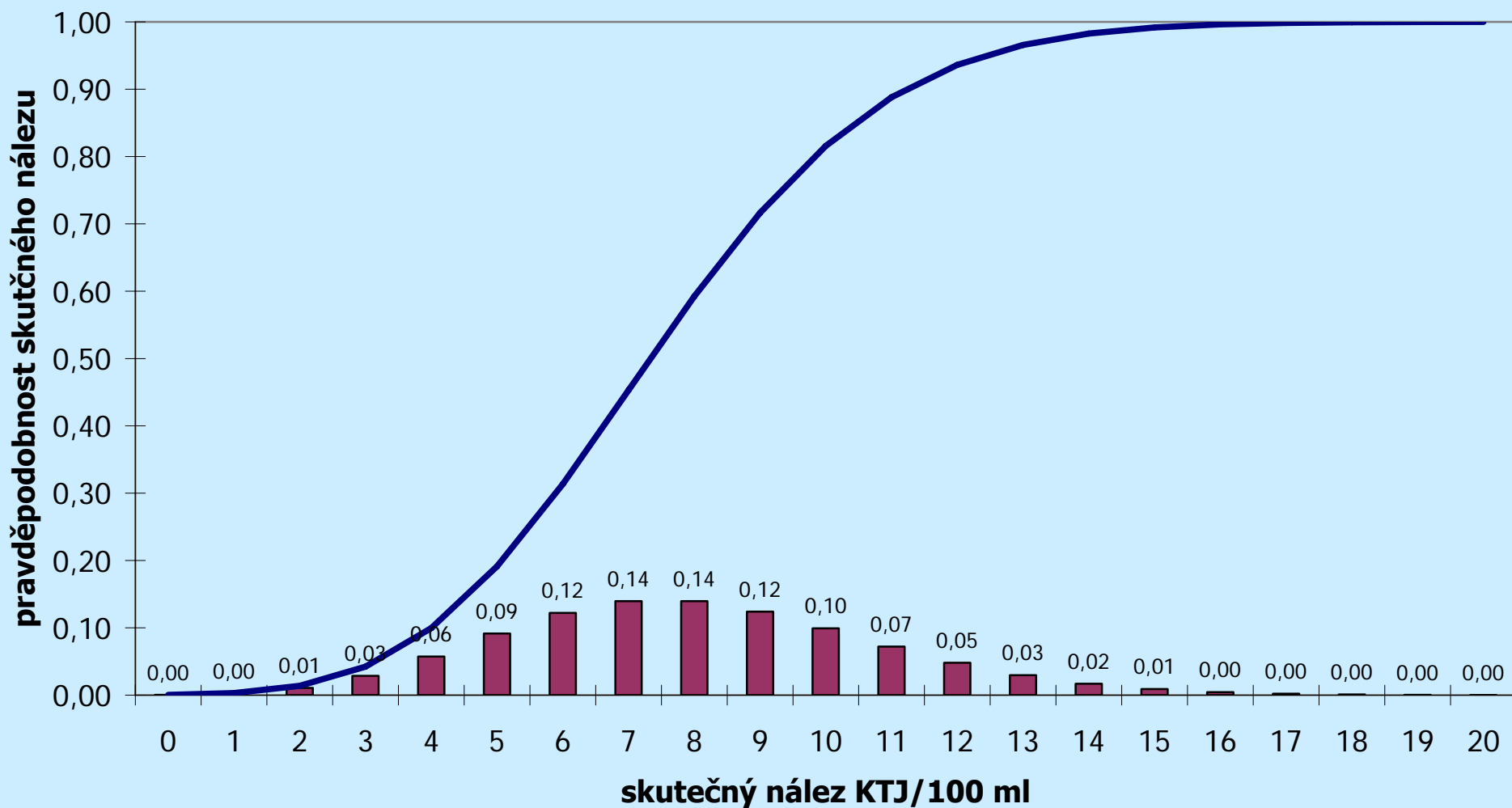
## Střední hodnota - 10 KTJ/100 ml



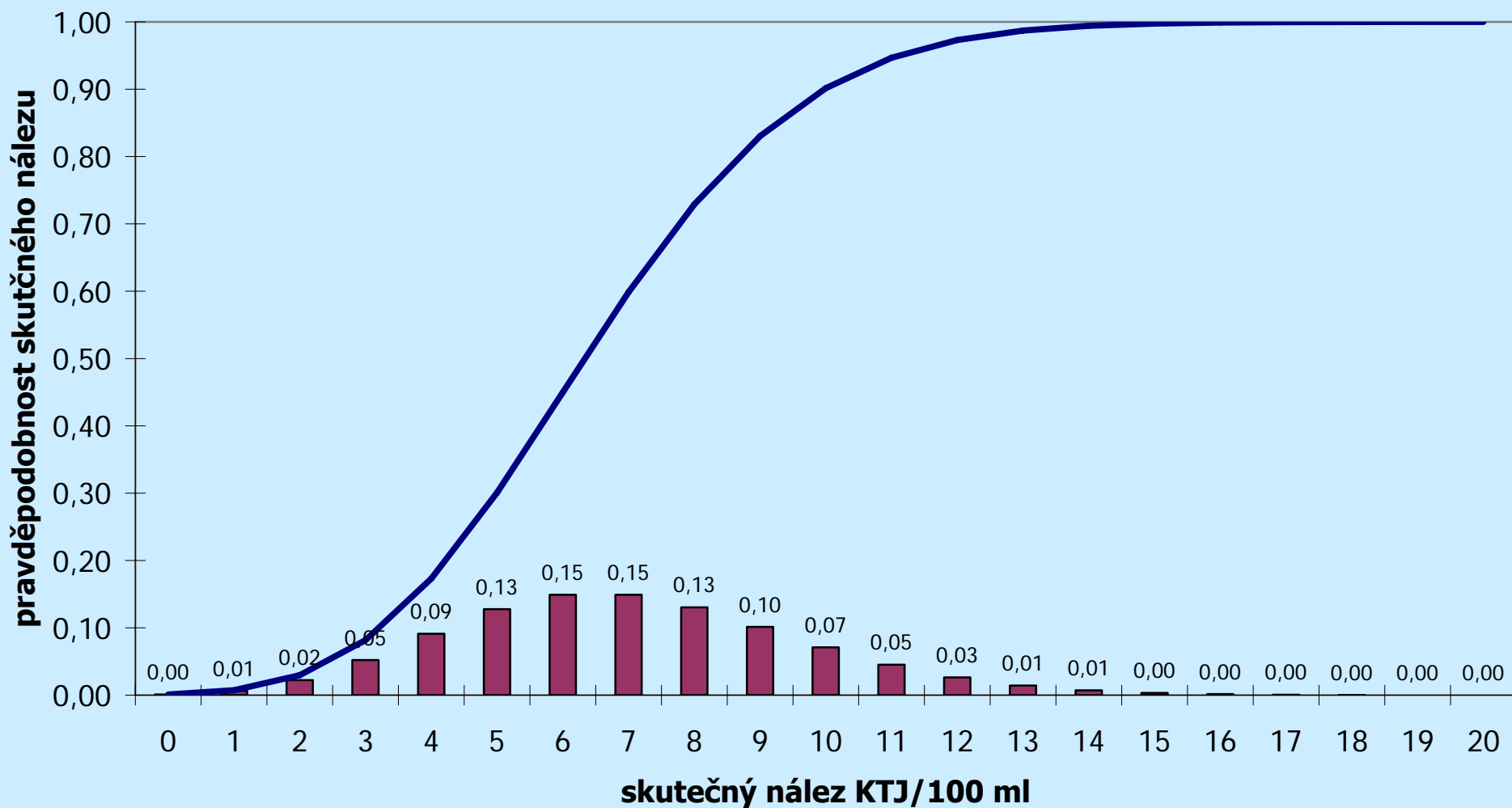
## Střední hodnota - 9 KTJ/100 ml



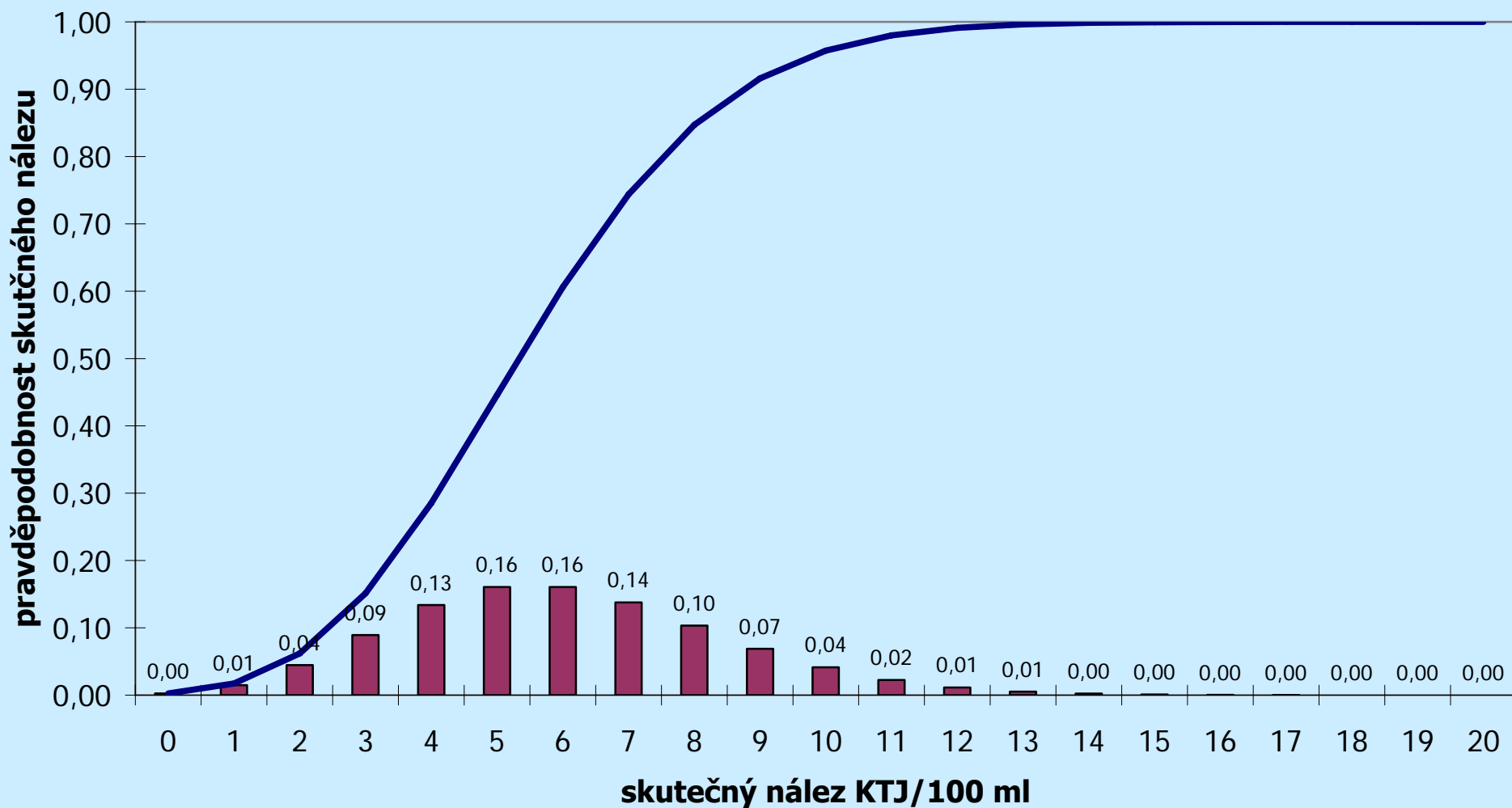
## Střední hodnota - 8 KTJ/100 ml



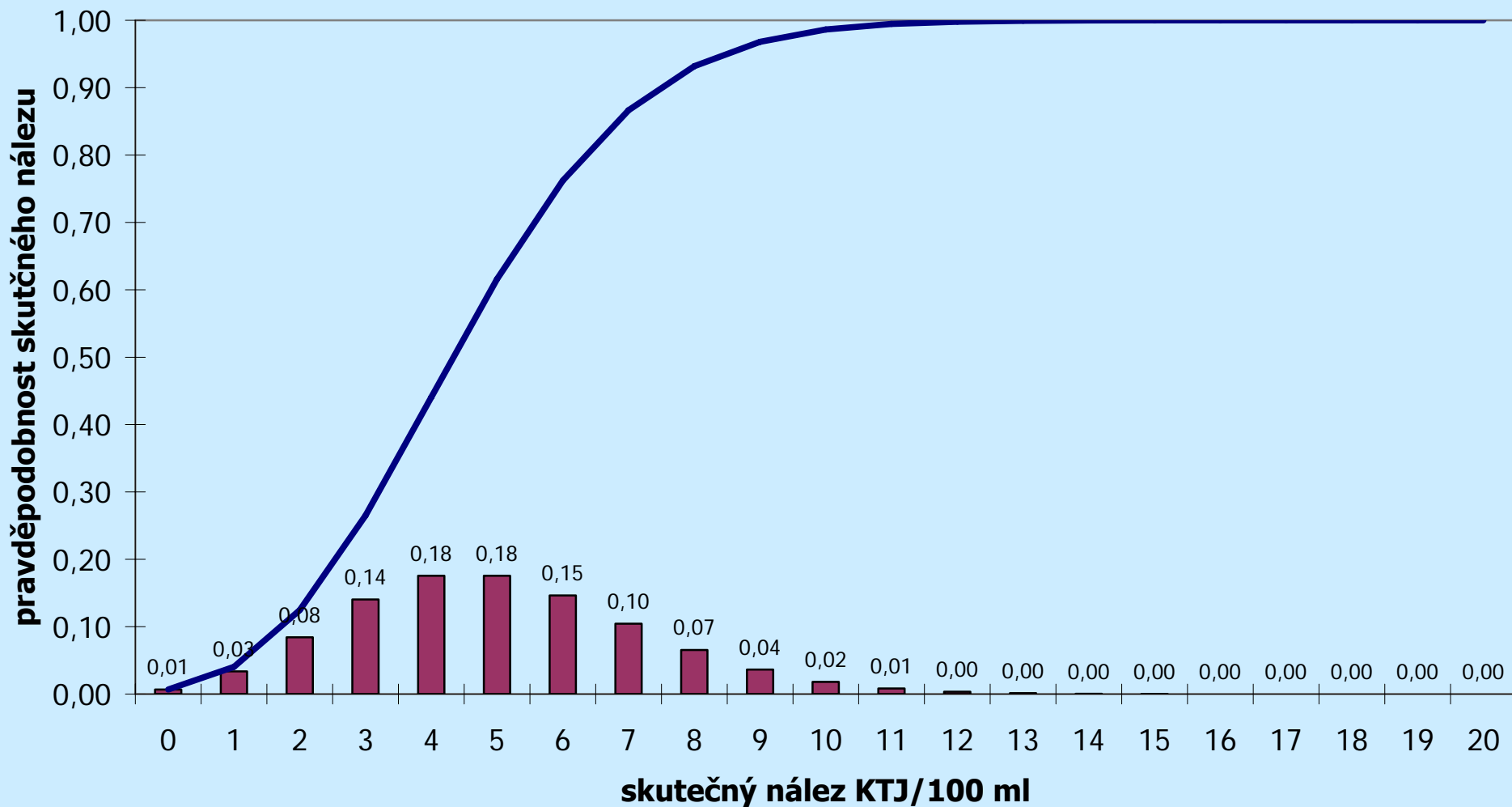
## Střední hodnota - 7 KTJ/100 ml



## Střední hodnota - 6 KTJ/100 ml

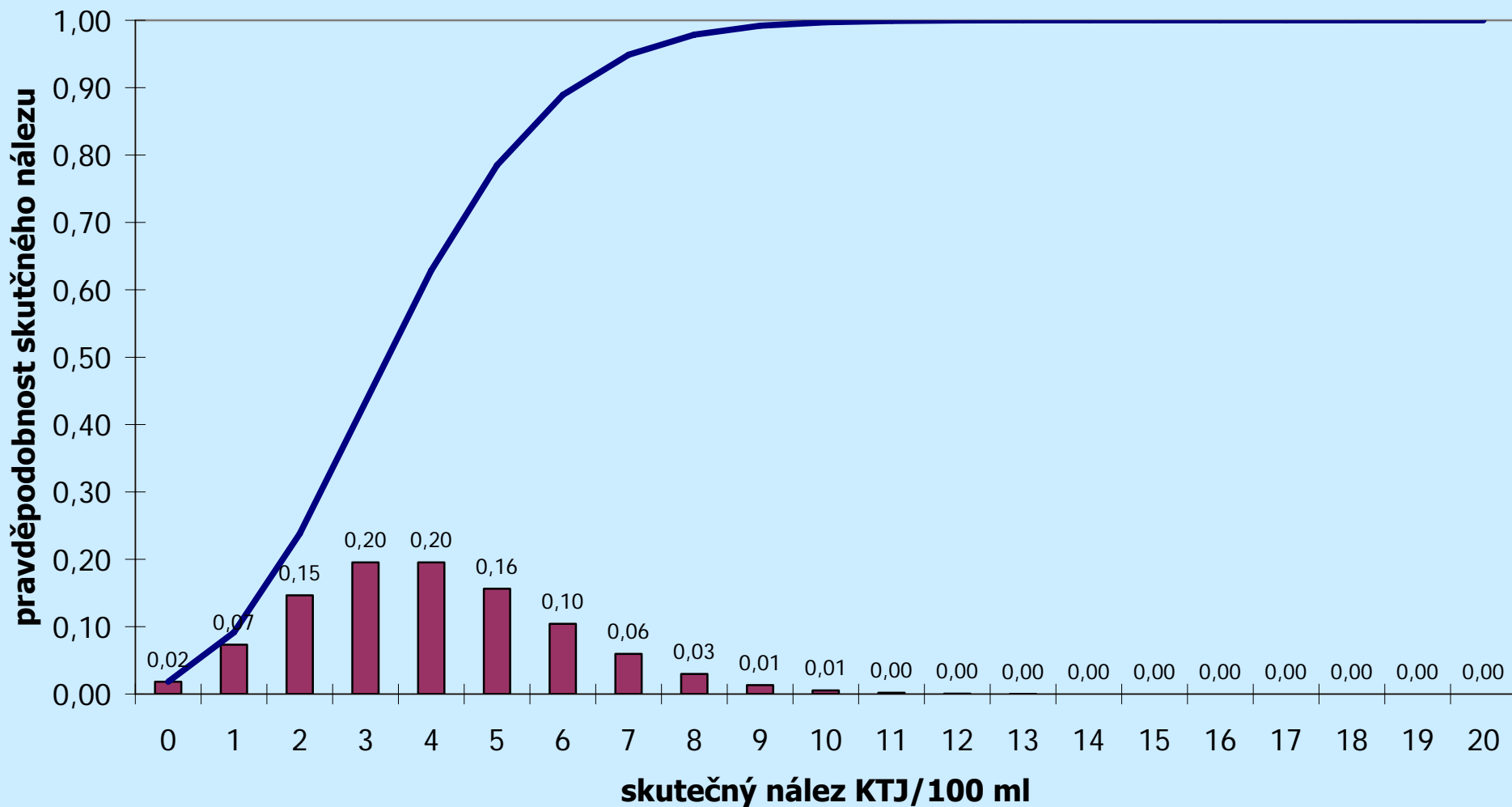


## Střední hodnota - 5 KTJ/100 ml

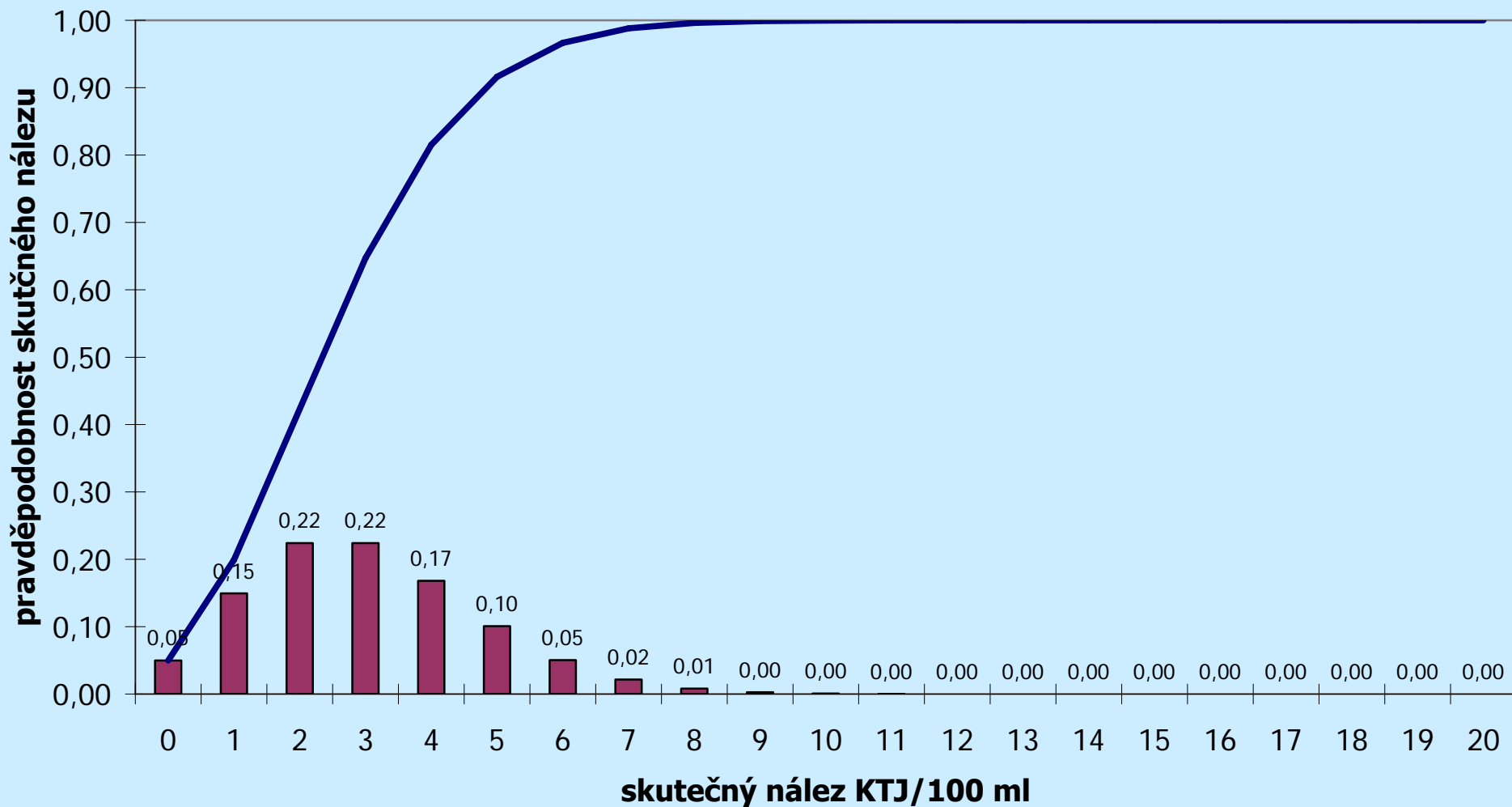




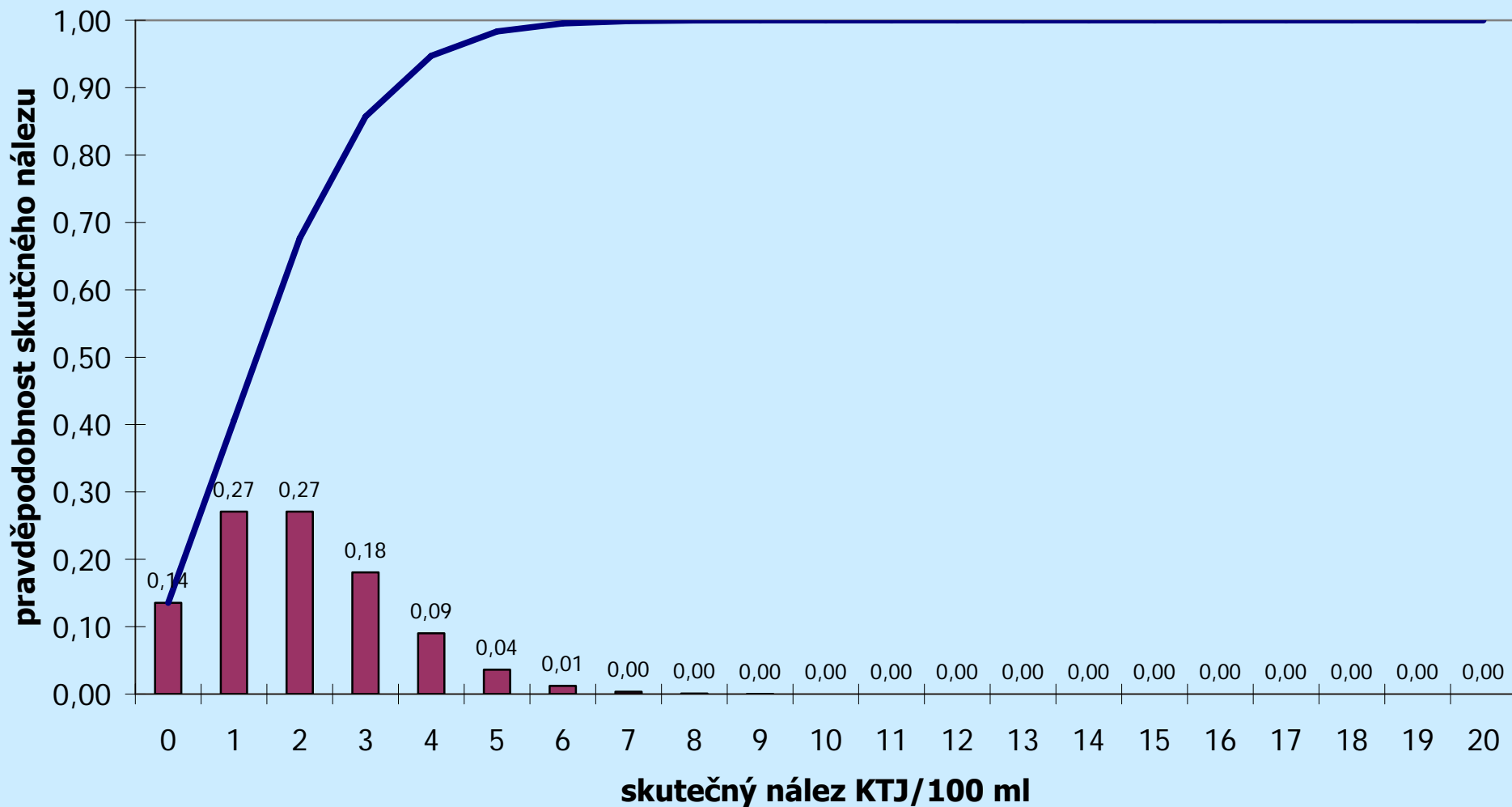
## Střední hodnota - 4 KTJ/100 ml



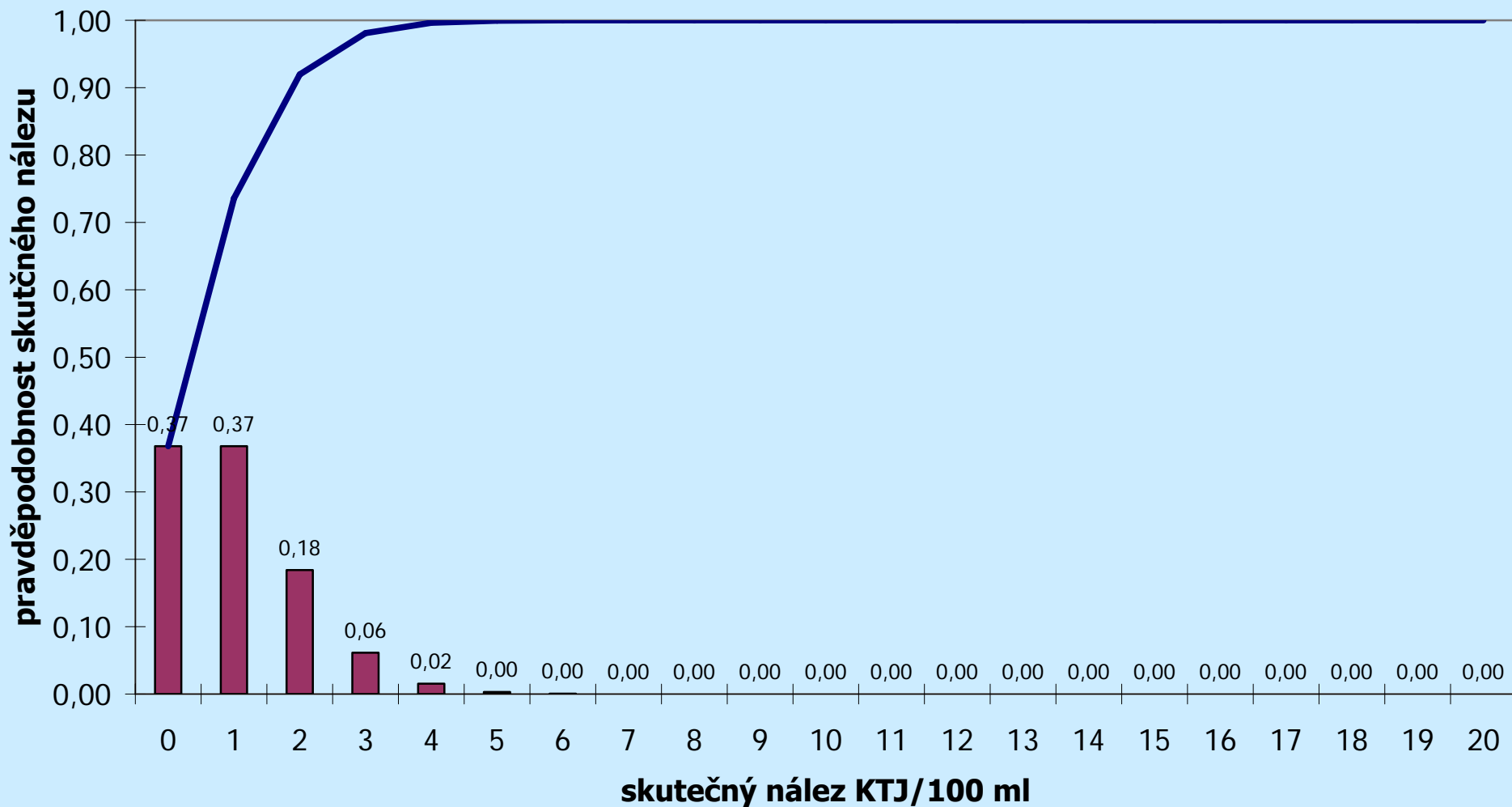
## Střední hodnota - 3 KTJ/100 ml



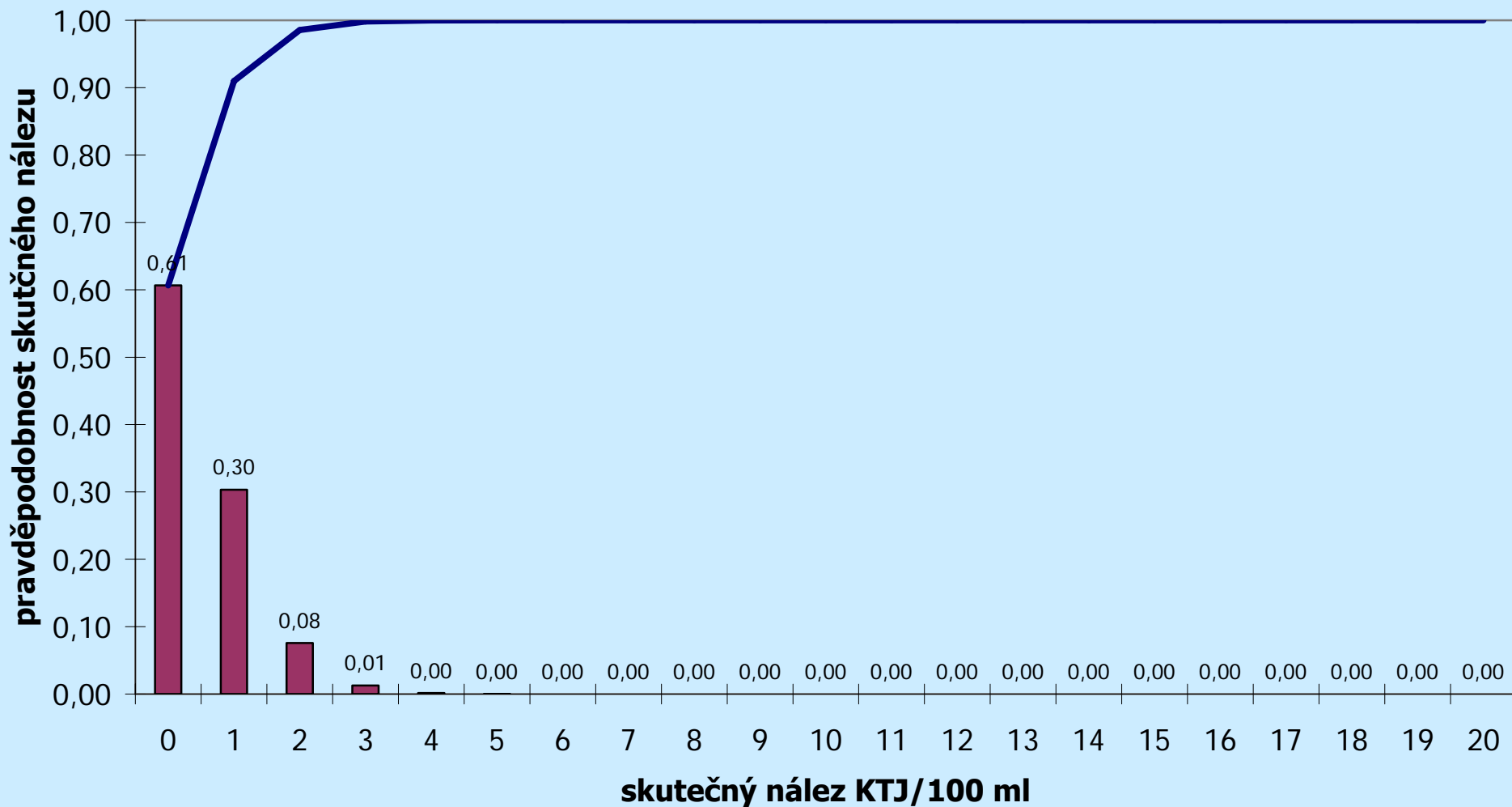
## Střední hodnota - 2 KTJ/100 ml



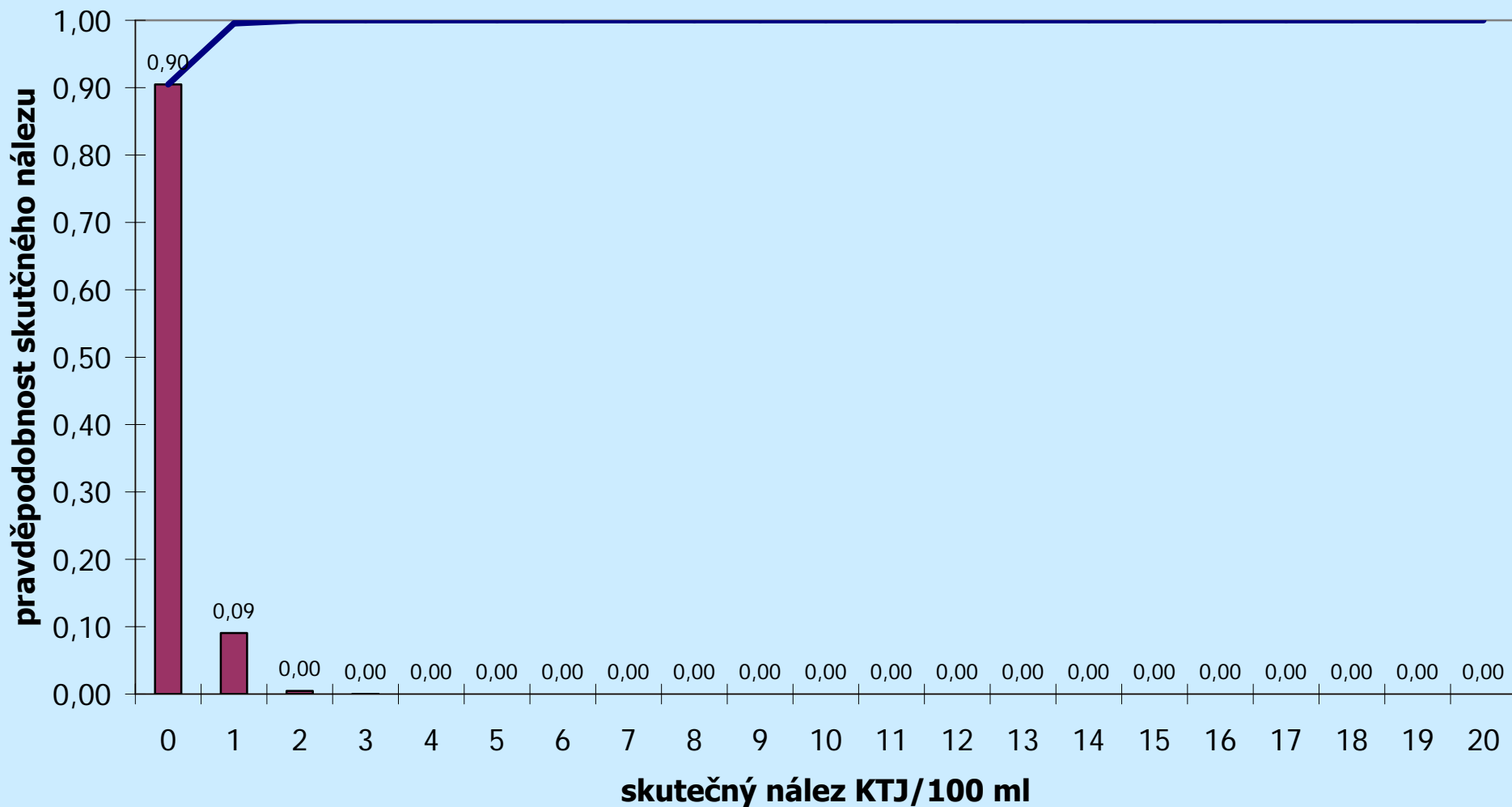
## Střední hodnota - 1 KTJ/100 ml



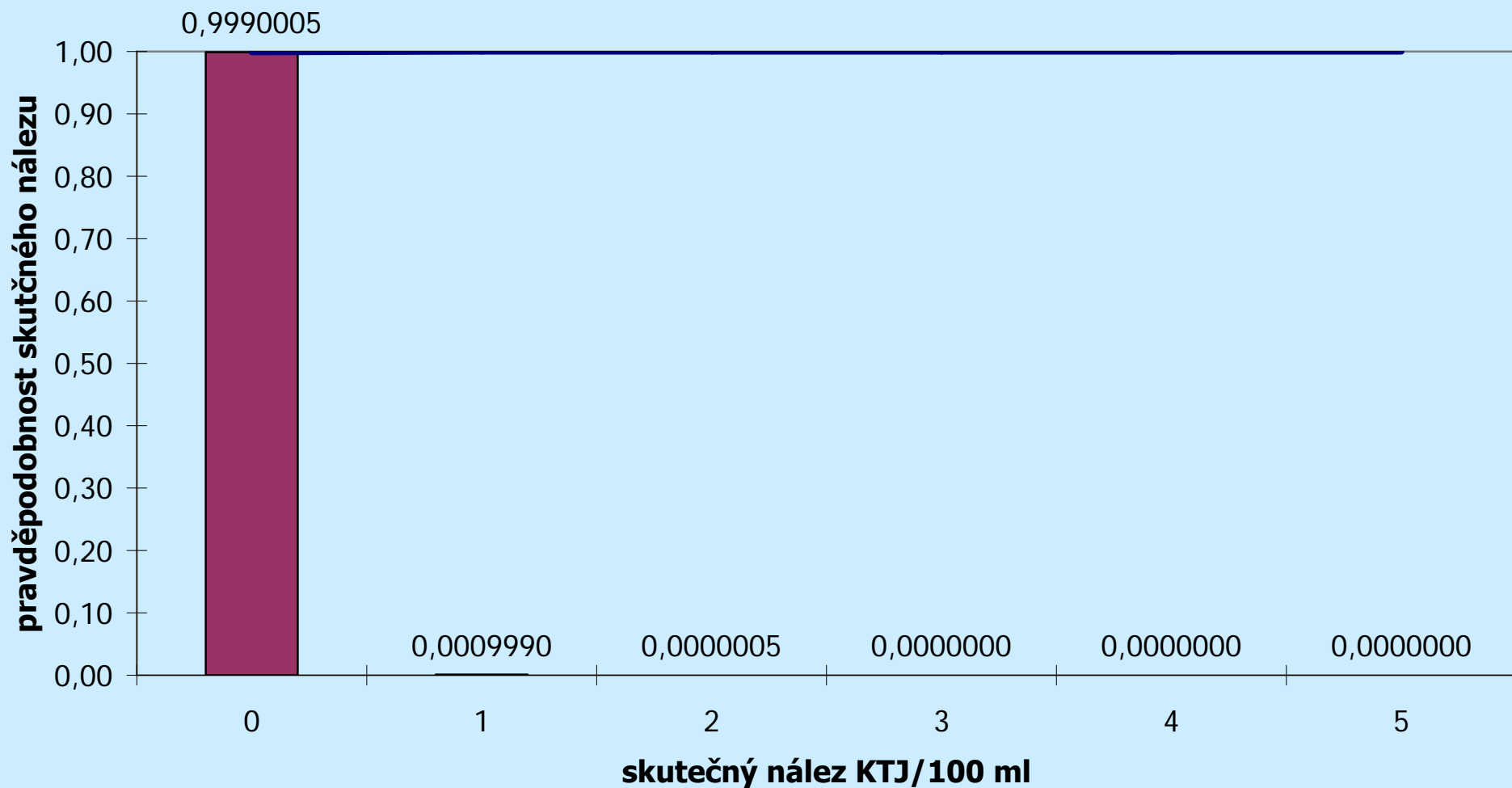
## Střední hodnota - 0,5 KTJ/100 ml



## Střední hodnota - 0,1 KTJ/100 ml



**Střední hodnota - 0,001 KTJ/100 ml  
= 1 KTJ/100 l**



# Náhodná distribuce (Poissonova)

0 – 7 KTJ (v praxi je větší než náhodná)

Tillet, Lightfoot, 1995

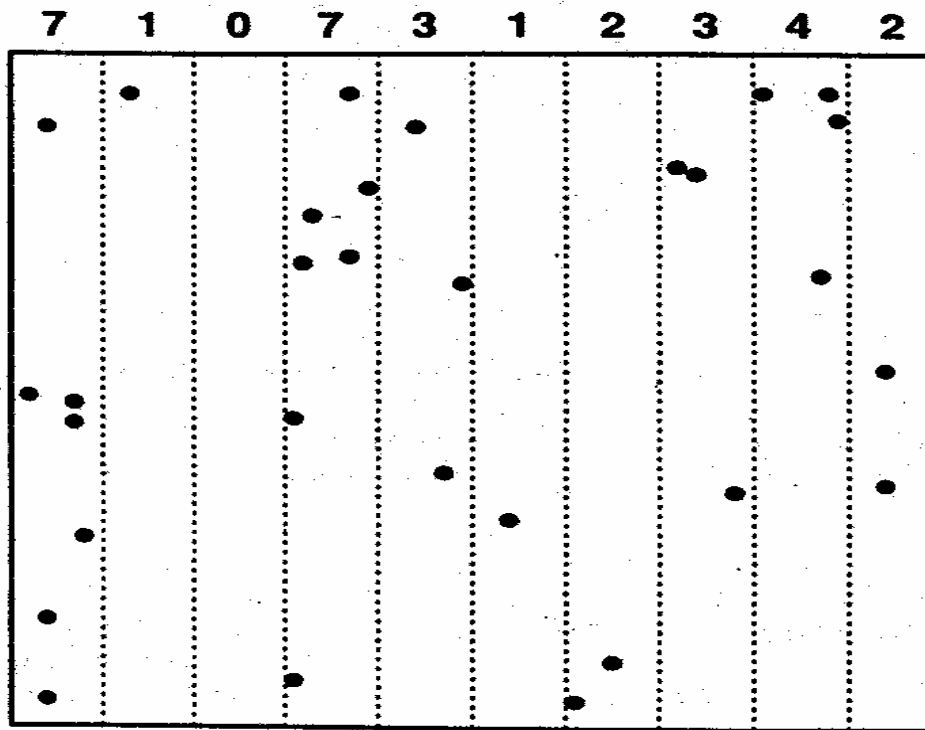


Figure 1. Random distribution of 30 organisms in 10 subsamples of water



# fenomén CLUSTERING

tvorba shluků, chomáčů atd.

Gale, 1996, UK

celkové počty koliformů, vodárny UK, 1991

<u>% vzorků:</u>	<u>denzita:</u>
80,1	0 / 100 ml
3,8	1 / 100 ml
7,4	> 10 / 100 ml
2,1	> 100 / 100 ml

**log - normální rozdělení hodnot**

podobně uvádí: Christian, Pipes, USA, (1983) pro CPM a koliformy,  
Maul et al., Metz, Francie, (1985) pro CPM

# Jaký objem vzorku vyšetřit ???

## Vyhlášky MZ ČR:

- stanoví limity [KTJ/ objem]
- stanoví metody pro odběr a vyšetření
  - specifické podmínky přímo ve vyhlášce
  - odkaz na normalizované postupy

**Výslovně neuvádí, jaký objem se má vyšetřit !!**

# Vyjadřování výsledků rozborů

Přepočty z různých objemů

(sledovat jednotlivé normy)

# Přepočty výsledků z různých objemů

## Nenulové počty:

matematicky -

$$4 \text{ ml} = 400 / 100 \text{ ml} = 4000 / 1$$

## Lépe:

dodržet ČSN ISO 8199, (8.4.) (předpoklad - pro ředění i MF jsou **dvě** vhodná ředění či objemy k dispozici)

## Nulové počty:

$$0 / \text{ml} = < 100 / 100 \text{ ml}$$

$$[ 0 / \text{ml} = < 1 / \text{ml} ] \quad \text{dle ISO /DIS 8199}$$

# Přepočty výsledků z různých objemů

KVP – povrchové vody :

*požadavek limitů = na 100 ml*

**technicky nereálné vyšetřit celý objem !!!**

Řešení: - dodržet ČSN ISO 8199, (8.4.)

- metody koncipované na principu MPN  
(Colilert, Enterolert, Microplate E. coli ,  
Microplate Enterococcus – ČSN EN ISO 9308-3  
a ČSN EN ISO 7899-1)

**umožní vyšetřit široké rozpětí objemů vody**

# přepočty výsledků z různých objemů

## Vliv na konečný výsledek:

MF - 100 ml = 50 KTJ

- 10 ml = 5 KTJ

1 KTJ

20 KTJ (cluster – shluk)

Dodržet zásady očkování dle ČSN ISO 8199, bod 8.2.3.  
a 8.2.5.; provedení výpočtu dle 8.4.

+ normy pro jednotlivá stanovení ukazatelů

= dosáhnout statisticky spolehlivé počty