

(NE)REPRODUKOVATELNOST MIKROSKOPICKÉHO STANOVENÍ SINIC

Petr Pumann, Tereza Pouzarová

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

Souhrn: Státní zdravotní ústav (SZÚ) pořádá od roku 2000 programy zkoušení způsobilosti na stanovení sinic v koupalištích ve volné přírodě, které zahrnují správné určování i kvantifikaci. Z těchto dat si lze udělat (byť s jistým omezením) představu o reprodukovatelnosti používané metody ČSN (TNV) 75 7717. Pro tyto účely bylo vybráno 9 zkušených laboratoří z více než 50 účastníků programu. Výsledky kvantifikace vláknitých sinic rodu *Planktothrix* jsou evidentně lépe reprodukovatelné než výsledky pro sinice kokální.

Klíčová slova: sinice; mikroskopická kvantifikace; programy zkoušení způsobilosti; mezilaboratorní porovnávací zkoušky; koupání

Summary: The National Institute of Public Health (SZU) has organized interlaboratory comparisons for determination and quantification of cyanobacteria in bathing water since the year 2000. Data from these comparisons can be used for the reproducibility assessment of the Czech national standard (no. 75 7717) for cyanobacteria counting. Nine skilled laboratories were chosen for this purpose (from more than 50 participants of the comparisons). Analyses of filamentous cyanobacteria (genus *Planktothrix*) are more reproducible than analyses of coccoid ones.

Key words: cyanobacteria; microscopic quantification; proficiency testing; interlaboratory comparison; bathing

Úvod

V monitorování výskytu sinic v přírodních koupacích vodách a vodárenských nádržích mají mikroskopické rozborů nezastupitelné místo. Ve srovnání s metodami chemického rozboru však s sebou vždy nesou daleko větší riziko vzniku hrubých chyb a velkou nejistotu stanovení. Hlavní příčinou tohoto jevu je, že do okulárů mikroskopu se dívá člověk, což je nejhůře unifikovatelná část všech analýz. Systém akreditací a autorizací jen velmi těžko může eliminovat nedostatečně kvalifikované, nedostatečně zodpovědné, případně nedostatečně talentované pracovníky. Proto je vždy nutné k interpretaci výsledků mikroskopických metod přistupovat kriticky a nespokojit se s předpokladem, že data od akreditované laboratoře nemohou být úplně mimo realitu. Neradi bychom však vzbudili dojem, že mikroskopická stanovení sinic jsou pro hodnocení koupacích a surových vod obtížně použitelná. Na základě našich dlouhodobých zkušeností z programů zkoušení způsobilosti se proto pokusíme podat informaci o reprodukovatelnosti metody podle ČSN 75 7717 [1], která se k mikroskopickému stanovení sinic pro koupací a surové vody v ČR používá.

Práce na metodice vedoucí k ČSN 75 7717 začala v roce 2000. Hlavním podnětem k jejímu zpracování byla situace, kdy nebylo možné do vznikající vyhlášky (č. 464/2000 Sb.) pro koupací vody zabudovat doporučení Světové zdravotnické organizace z roku 1999 [4], protože v něm byly limitní hodnoty pro výskyt sinic uváděny v počtech buněk nebo jako objemová biomasa. K tomu však v naší vodohospodářské praxi neexistovala žádná použitelná metodika. Na jaře 2001 vznikl první návrh metodického doporučení SZÚ ke sjednocení metody kvantifikace fytoplanktonu v koupalištích ve volné přírodě. V květnu 2004 byla upravená metodika vydána jako odvětvová technická norma vodního hospodářství TNV 75 7717 [2]. V červnu 2008 pak po dalších úpravách byla vydána metoda jako ČSN 75 7717.

Část hygienických laboratoří začala vyjadřovat sinice v buňkách již v roce 2002, kdy byl vydán metodický pokyn hlavního hygienika k vyhlášce č. 464/2000 Sb., v němž se doporučovalo pro účely hodnocení zdravotních rizik souběžně se stanovením počtu organismů provádět také se stanovením množství sinic v počtu buněk/ml [3]. V roce 2004 pak vyšla vyhláška č. 135/2004 Sb. (nahradila vyhl. č. 464/2000 Sb.), ve které už bylo zapracováno výše uvedené doporučení WHO. Stanovení sinic pro účely této vyhlášky mělo být provedeno podle TNV 75 7717. Díky tomu bylo zavedeno stanovení sinic v buňkách v mnoha laboratořích zdravotních ústavů. Zároveň metodiku začalo používat také několik vodárenských laboratoří a laboratoří podniků povodí.

Metodika podle ČSN 75 7717 zahrnuje dva základní postupy. Jeden pro koloniální kokální sinice, kam spadají především různí zástupci rodu *Microcystis* a *Woronichinia naegeliana*, jejichž kolonie je nutné před počítáním v komůrce dezintegrovat (nejlépe na jednotlivé buňky). Druhý postup se týká sinic

tvořící rovná nebo kroucená vlákna, u kterých se v komůrce počítá počet buněk ve vláknech (*Anabaena*, *Anabaenopsis*) nebo měří délka jednotlivých vláken (především zástupci rodů *Planktothrix*, *Aphanizomenon*, nebo tenkých vláknitých sinic *Pseudanabaena* a *Limnothrix*). Je-li to nutné, vzorky se před počítáním zahušťují, což může vést ke ztrátám zvláště v případě dezintegrováných kokálních sinic.

Státní zdravotní ústav od roku 2000 (proběhlo zkušební kolo) pořádá programy zkoušení způsobilosti zaměřené na stanovení sinic v přírodních koupacích vodách. Kvantitativní stanovení bylo zpočátku zaměřené pouze na stanovení fytoplanktonu a sinic v jedincích/ml. V roce 2002 proběhlo první kolo programu zahrnující také stanovení sinic v buňkách/ml. Od roku 2004 jsou v rámci programu vydávány vždy dva vzorky. Jeden s dominancí vláknitých a jeden s dominancí kokálních sinic, aby byly prověřeny oba metodické postupy.

Metody

V příspěvku jsou zahrnuta data celkem ze 7 kol programu. Konají se jednou ročně vždy v září nebo říjnu. Celkem se od roku 2002 našeho programu pro kvantifikaci sinic zúčastnilo 53 laboratoří (42 zdravotních ústavů, 4 laboratoře podniků povodí, 5 vodárenských společností a soukromých laboratoří a 2 výzkumné ústavy). Popis a přípravu jednotlivých vzorků pro kvantifikaci sinic v buňkách shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1: Popis a příprava vzorků pro kvantifikaci sinic v buňkách z programů zkoušení způsobilosti pořádaných SZÚ v letech 2002 – 2008. Všechny vzorky pocházely z rybníků v Praze a Středočeském kraji.

Rok	Popis vzorku	Příprava
kokální sinice		
2008	směs <i>Microcystis</i> (<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. ichthyoblabe</i>), mírná příměs vláknitých sinic	odfiltrování velkých kolonií přes gázu
2007	směs <i>Microcystis</i> (<i>M. aeruginosa</i> , <i>M. ichthyoblabe/flos-aquae</i>), příměs vláknitých sinic <i>P.agardhii</i>	směs volné vody filtrované planktonní sítí 40µm a hladinového vzorku
2006	dominance <i>Microcystis viridis</i> s malou příměsí jiných taxonů rodů <i>Microcystis</i>	odfiltrování velkých kolonií přes gázu + naředění vodu z téže lokality (filtrace přes 1µm skleněné filtry)
2005	<i>Microcystis</i> spp. + <i>Pseudanabaena mucicola</i> ve slizu <i>M. aeruginosa</i>	odfiltrování velkých kolonií přes gázu
2004	<i>Microcystis</i> s příměsí vláknitých sinic (<i>Planktothrix</i> , <i>Pseudanabaena</i> .)	použito bez úpravy
2003	<i>Microcystis</i> spp.	2/3 vzorku filtrovány planktonní sítí 40µm
2002	<i>Microcystis</i> spp.	použito bez úpravy
vláknité sinice		
2008	<i>Planktothrix agardhii</i> téměř bez příměsí jiných sinic	použito bez úpravy
2007	<i>Planktothrix agardhii</i> malou příměsí sinic	použito bez úpravy
2006	<i>Planktothrix agardhii</i> a různé oscilatorální sinice s tenkými vlákny	filtrace přes 1µm skleněné filtry + přídavek vzorku zachyceného planktonní sítí, v němž byl menší podíl tenkých vláknitých sinic ve srovnání s volnou vodou
2005	<i>Planktothrix agardhii</i> s menším podílem oscilatorálních sinic s tenkými vlákny	použito bez úpravy
2004	<i>Planktothrix isothrix</i> ?	použito bez úpravy

Zpracování dat a základní statistické výpočty (průměr, výběrová směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka) byly provedeny v MS Excel.

Výsledky a diskuze

Použití souboru všech účastníků pro informace o reprodukovatelnosti metody naráží na problém, že se programu účastní i řada laboratoří, které nemají dostatečně zkušené pracovníky. Proto jsme se snažili vybrat z účastníků skupinu „spolehlivých“ laboratoří, jejichž výsledky by o reprodukovatelnosti vypovídali lépe než data všech účastníků. Za „spolehlivé“ jsme považovali laboratoře pravidelně se účastnící tohoto programu, o nichž jsme přesvědčeni (na základě osobní zkušenosti), že zvládají metodiku, nad pracovním postupem se snaží přemýšlet a v posledních letech jsme u nich v rámci

našeho programu nezaznamenali žádný extrémní výsledek. Mezi „spolehlivé“ jsme vybrali 3 laboratoře zdravotních ústavů, 3 vodárenské laboratoře, 2 laboratoře podniku povodí a laboratoř SZÚ. V rámci standardního hodnocení našich programů slouží výsledky některých „spolehlivých“ laboratoří pro výpočet vztažných hodnot.

Z údajů, které jsme během let pořádání programu shromáždili, si můžeme udělat také představu o opakovatelnosti pro laboratoř SZÚ. K tomu jsme využili data vzniklá za účelem ověřování homogenity. Výsledky však nepocházejí z jedné, ale z několika vzorkovnic (vždy první a poslední připravená a další rovnoměrně vybrané, aby reprezentovaly proces přípravy), takže je zde o jeden zdroj variability navíc. Protože však považujeme připravované vzorky za dostatečně homogenní, dovolíme si tento nedostatek zanedbat. Zpracovaná data jsou uvedena v tabulce 2.

Co tedy můžeme z vypočítaných údajů o metodě říci? Relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti (RSD_R) pro výsledky kokálních sinic je obvykle vyšší ve srovnání s vláknitými sinicemi, a to jak u všech účastníků, tak i u „spolehlivých“ laboratoří. Od roku 2005 nepřesáhla hodnota RSD_R pro stanovení vláknitých sinic u „spolehlivých“ laboratoří 25 % a je zhruba srovnatelná s relativní směrodatnou odchylkou opakovatelnosti (RSD_I) laboratoře SZÚ. U kokálních sinic je RSD_R výrazně vyšší. Pro „spolehlivé“ laboratoře po mírném poklesu v letech 2005 a 2006 (18 a 28 %) se v posledních dvou letech zvýšila a blíží se 40 %. Z grafů na obrázku 1 lze vyčíst ještě další zajímavý fakt. Zatímco výrazně podhodnocené výsledky lze najít jak u vzorků s kokálními, tak i vláknitými sinicemi (i když u kokálních jich je přeci jen více), výsledky výrazně nadhodnocené se objevují pravidelně jen u sinic vláknitých (každé kolo alespoň jedna laboratoř), u kokálních k tomu došlo jen jednou, a to v roce 2005.

Tabulka 2: Základní statistické zpracování kvantitativního rozboru sinic z programů zkoušení způsobilosti pořádaných SZÚ v letech 2002 – 2008.

Rok	Všechny zúčastněné laboratoře				Vybrané „spolehlivé“ laboratoře				Státní zdravotní ústav			
	N	\bar{x} buňky/ml	σ buňky/ml	RSD_R %	N	\bar{x} buňky/ml	σ buňky/ml	RSD_R %	N	\bar{x} buňky/ml	σ buňky/ml	RSD_I %
kokální sinice												
2008	16	188 641	114 581	60,7	7	244 177	93 901	38,5	10	176 400	39 596	22,4
2007	23	169 010	99 037	58,6	9	214 133	78 941	36,9	10	282 540	38 509	13,6
2006	29	287 999	112 213	39,0	8	344 382	97 172	28,2	14	191 464	57 250	29,9
2005	40	274 773	113 695	41,4	8	337 906	61 677	18,3	10	379 798	35 752	9,4
2004	39	107 942	62 349	57,8	8	141 337	70 950	50,2	12	219 997	23 836	10,8
2003	28	196 459	112 148	57,1	3	301 787	180 809	59,9	6	421 142	32 605	7,7
2002	27	30 737	18 378	59,8	5	35 374	23 463	66,3	3	70 648	15 973	22,6
vláknité sinice												
2008	16	605 299	304 184	50,3	7	710 246	126 006	17,7	12	687 847	106 845	15,5
2007	23	189 023	95 962	50,8	9	182 241	25 451	14,0	13	195 409	40 155	20,5
2006	29	73 415	29 963	40,8	8	80 690	15 908	19,7	12	77 166	12 754	16,5
2005	40	336 493	128 095	38,1	8	355 480	86 234	24,3	11	209 969	19 398	9,2
2004	39	149 840	102 932	68,7	8	168 473	55 594	33,0	10	152 780	28 655	18,8

N – počet vzorků; \bar{x} - aritmetický průměr; σ – výběrová směrodatná odchylka; RSD_R – relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti v procentech; RSD_I – relativní směrodatná odchylka opakovatelnosti v procentech;

Jak jsme se snažili již vysvětlit dříve [5], má informace o reprodukovatelnosti metody z dat z komerčních programů zkoušení způsobilosti jistá omezení. Řada účastníků potřebuje z programu osvědčení o úspěšné účasti, a proto nelze vyloučit, že některé výsledky byly před odesláním upraveny podle údajů z jiné laboratoře. Jsme však přesvědčeni, že námi vybrané „spolehlivé“ laboratoře své výsledky neupravují (byť alespoň část z nich je před odesláním nepochybně konzultuje). Dalším faktorem, který snižuje platnost získaných údajů pro běžné vzorky, je to, že se při přípravě vzorků vyhýbáme problematickým organismům z hlediska homogenity a stability. Jedná se především o odstranění velkých kolonií sinic (*Aphanizomenon flos-aquae* a *Microcystis* spp.), které by mohly významně nadhodnotit abundanci v některých vzorkovnicích (viz údaje v tabulce 1). Dále se vyhýbáme většímu zastoupení sinic, jejichž buňky snadno lyžují při zpracování zaživa. To se týká

především sinic rodů *Aphanizomenon* a *Anabaena*. Posledním závažným omezením je nedostatek odvahy nás organizátorů zařadit do programu vzorek, u nějž bude abundance kokálních sinic natolik nízká, že většina účastníků bude muset před stanovením vzorek zahušťovat. Všechny v tomto odstavci uvedené skutečnosti mohou přispět k tomu, že údaje reprodukovatelnosti z tabulky 2 budou u rutinních vzorků v některých případech ještě horší. U „spolehlivých“ laboratoří rozdíl zřejmě nebude natolik významný, protože správným postupem lze většinu zmíněných metodických problémů minimalizovat (např. vždy kvantifikovat sinice rodů *Aphanizomenon* a *Anabaena* jen po fixaci lugolem nebo kontrolou výtěžnosti koncentračních postupů).

Lze závěrem napsat něco pozitivního o reprodukovatelnosti metody podle ČSN 75 7717? Myslíme, že ano. Při nejmenším stanovení vláknitých sinic (především *Planktothrix*), pokud je prováděné zkušenými pracovníky, je pro účely hodnocení koupacích vod dobře použitelné. Se stanovením kokálních sinic je to o něco horší. Je však třeba si uvědomit, že sinice rodu *Microcystis* jsou z hlediska (nejen) mikroskopické kvantifikace problematické organismy. Některé kolonie jdou velmi špatně dezintegrovat (např. *M. wesenbergii* nebo *M. viridis*, která dominovala ve vzorku v roce 2006; občas je obtížné rozbít i kolonie *M. aeruginosa*), což samozřejmě vede k větší variabilitě výsledků. Drobné buňky *M. ichthyoblabe* je zase poměrně snadné při počítání v komůrce přehlédnout. Jako trefná se jeví poznámka J. Hesse, kterou poslal v připomínkovém řízení k ČSN 75 7717: „Pro objektivní posouzení případného hygienického rizika výskytu sinic není nezbytné znát naprosto přesný počet buněk sinic. Dostatečně objektivní posouzení rizika se dá docílit kombinací vhodného posouzení situace v terénu a odhadu počtu buněk v 1 ml vody. Pro posouzení rizika nezáleží na tom, zda je napočítáno např. 191 360 buněk/ml (viz příloha B, příklad 1) nebo odhadnuto množství mezi 150 000 – 200 000 buněk/ml. Za významnější v dané problematice považuji správné posouzení situace v terénu, výběr místa pro odběr a objektivně provedený odběr sinic na lokalitě.“ S tímto názorem se z velké části ztotožňujeme (až na fakt počítání a tím spíše odhad jsou ve většině případů o poznání méně přesné než uvedené rozmezí 150 – 200 tisíc buněk/ml). A jsme si vědomi toho, že pro jakýkoli úřad je (bohužel) mnohem snazší vzít právě jedno přesně se tvářící číslo a to srovnat s limitní hodnotou a z něj udělat patřičný závěr.

Poděkování

Příspěvek vznikl s podporou projektu podpory vědy a výzkumu MŽP SP/2e7/58/08 „Zjištění parametrů ovlivňujících profily vod ke koupání z hlediska životního prostředí“. Děkujeme také všem účastníkům našich programů.

Literatura

- [1] ČSN 75 7717 – Jakost vod – Stanovení planktonních sinic (2008).
- [2] TNV 75 7717 – Jakost vod – Stanovení planktonních sinic (2004).
- [3] Metodický návod Hlavního hygienika ČR k zajištění jednotného postupu při plnění úkolů, vyplývajících z výkonu státního zdravotního dozoru na koupalištích a v saunách, vydávám podle § 80 odst. 1 písm. a) zákona č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů v platném znění tento metodický návod. HEM-3245-4.1.02/119.
- [4] CHORUS I., BARTRAM J. (1999): Toxic Cyanobacteria in Water. E&FN Spon. 416 s.
- [5] PUMANN P., POUZAROVÁ T. (2006): Problémy s pořádním mezilaboratorním porovnáváním zkoušek v oblasti mikroskopických rozborů vody. Sborník ze semináře Vodárenská biologie 2006: 150 -155.

Obr. 1: Grafy představují výsledky všech účastníků programů zkoušení způsobilosti pořádaných SZÚ v letech 2002 – 2008. Světlé sloupce představují data „spolehlivých“ laboratoří.

