

## POČÍTÁNÍ BEZBARVÝCH BIČÍKOVců A AMÉB VE VODĚ – ZKUŠENOSTI Z MEZILABORATORNÍCH POROVNÁVACÍCH ZKOUŠEK

**Petr Pumann, Tereza Pouzarová**

*Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42, ppumann@szu.cz, tereza.pouzarova@szu.cz*

### Souhrn

Data ze čtyř ročníků mezilaboratorních porovnávacích zkoušek (MPZ) pořádaných Státním zdravotním ústavem ukazují, že výsledky mikroskopického stanovení vzorků (podle ČSN 75 7712), které obsahují heterotrofní organismy (především bezbarvé bičíkovce a améby), je mnohem hůře reprodukovatelné než stanovení vzorků, které se standardně vydávají účastníkům v rámci MPZ, v nichž dominují řasy (především rozsivky).

**Klíčová slova:** bezbarví bičíkovci; améby; mikroskopický rozbor pitné vody; kvantifikace

### Summary

The data from four rounds of proficiency tests (PT) organized by the National Institute of Public Health shows that the results of microscopic analysis (Czech national standard ČSN 75 7712) of samples containing heterotrophic organisms (mainly colourless flagellates and amoebas), are much less reproducible than analysis of samples with algae (mainly diatoms), which are usually used for PTs.

**Key words:** colourless flagellates; amoebas; microscopic analysis of drinking water; quantification

### Úvod

Podíváme-li se na výsledky stanovení bioestonu v mezilaboratorních porovnávacích zkouškách (MPZ) v oblasti mikroskopického rozboru vody, obvykle zjistíme, že část laboratoří poskytla poměrně odlehle hodnoty. Častěji se jedná o hodnoty výrazně nižší než u většiny laboratoří (občas i nulové), v menším počtu případů se naopak jedná o nálezy významně vyšší. Lze se domnívat, že za většinou takto odlehle výsledků je malá zkušenost pracovníků provádějících rozbor, kteří část organismů přehlédnou nebo počítají něco, co organismem není. Data větší části laboratoří se však vzájemně příliš neliší. Pro organizátora MPZ pak není příliš složité stanovit rozumně široký interval vztažných hodnot. Jak jsme však již popsali v jednom našem starším příspěvku z této konference [4], mají vzorky vydávané v rámci MPZ jeden nedostatek. Jsou totiž vybírány organizátory obvykle tak, aby při jejich zpracování většina laboratoří neměla vážné metodické problémy. Proto u vzorků pitných vod jsou obvykle vydávány vzorky obsahující planktonní rozsivky, které jsou pro zkušeného pracovníka téměř nepřehlédnutelné díky tomu, že mají křemičitou frustulu, takže i v nepříznivých podmínkách je zachovával typický tvar, nejsou pohyblivé (nebo jen omezeně) a během jednoho až dvou dnů, ve kterých příprava a zpracování vzorků v rámci MPZ probíhá, se ani nenamnoží, ani nelyzují. V reálných vzorcích pitné vody však rozsivky (ani další skupiny řas) obvykle nepředstavují dominantní skupinu. Kolář [2] uvádí, že ve vzorcích z pražské vodovodní sítě představovali autotrofní organismy pouze necelých 5% vyskytujících se živých organismů. Zbytek tvořili heterotrofní organismy (bezbarví bičíkovci, nálevníci, améby, micromycety, případně bakterie nebo mnohobuněční živočichové). Žádný v ČR působících organizátorů MPZ, pokud víme, nevydal vzorek pro kvantifikaci mikroskopických organismů v pitné vodě, ve kterém by dominovaly heterotrofní organismy. V našem případě (ale předpokládáme, že stejně smýšlí i kolegové připravující vzorky pro Aslab a CSlab) to neděláme částečně z obavy, že vzorky nebudou dostatečně stabilní, ale především proto, že se tyto organismy počítají mnohem hůře než rozsivky, takže se dá předpokládat, že výsledky i zkušených laboratoří budou mít mnohem větší rozptyl a nepůjde je pak rozumně vyhodnotit.

S touto odtržeností MPZ od reality jsme se nechtěli úplně smířit a v roce 2009 jsme poprvé do našeho programu zařadili vzorek s dominancí heterotrofních organismů. Nebylo to však místo standardního vzorku s dominancí rozsivek. Tak odvážní (nebo lehkovážní) jsme nebyli. Jednalo se o nepovinný vzorek, jehož hodnocení nebylo součástí certifikátu. To mělo za následek, že výsledky dodala jen část účastníků. Od té doby zařazujeme tento nepovinný vzorek každým rokem (tedy již celkem 4x). V tomto příspěvku shrneme naši dosavadní zkušenost z těchto programů a pokusíme se také poukázat

na to, co z těchto výsledků vyplývá pro interpretaci běžných vzorků pitné vody s výskytem heterotrofních mikroskopických organismů.

### Metody

Naše MPZ pro stanovení mikroskopického obrazu v pitné vodě pořádáme každoročně na jaře. Informace o tomto programu (zprávy, obrazová dokumentace) je možné najít na internetové adrese <http://www.szu.cz/stanoveni-mikroskopickeho-obrazu-v-pitne-a-surove-vode>.

Vzorky jsme připravovali v laboratoři Státního zdravotního ústavu (SZÚ). Jednalo se vždy o samovolně vyvinutá společenstva, která byla v některých případech (2011 a 2012) cíleně inokulovaná vhodným přírodním vzorkem (vodou ze studny, ve které byli před tím nalezeni bezbarví bičíkovci). Před přípravou vzorků pro účastníky byly v některých letech „kultury“ mikroskopických organismů ředěny odstátou vodovodní vodou (tab. 1). Dominovali v nich obvykle bezbarví bičíkovci nebo améby (tab. 1), jejichž kvantita se pohybovala v řádu stovek nebo tisíců jedinců/ml (tab. 1). Vzorky pro účastníky byly připraveny vždy ráno v den vydávání účastníkům. Zpracovány měly být druhý den standardním postupem pro stanovení biosestonu podle ČSN 75 7712 [1]. Stejným způsobem byl zpracováván i standardní vzorek s dominancí rozsivek.

**Tabulka 1.** Příprava a složení vzorků s dominancí heterotrofních organismů pro MPZ z let 2009 – 2012; údaj o kvantitě je výsledek laboratoře Státního zdravotního ústavu (průměr ze tří vzorků).

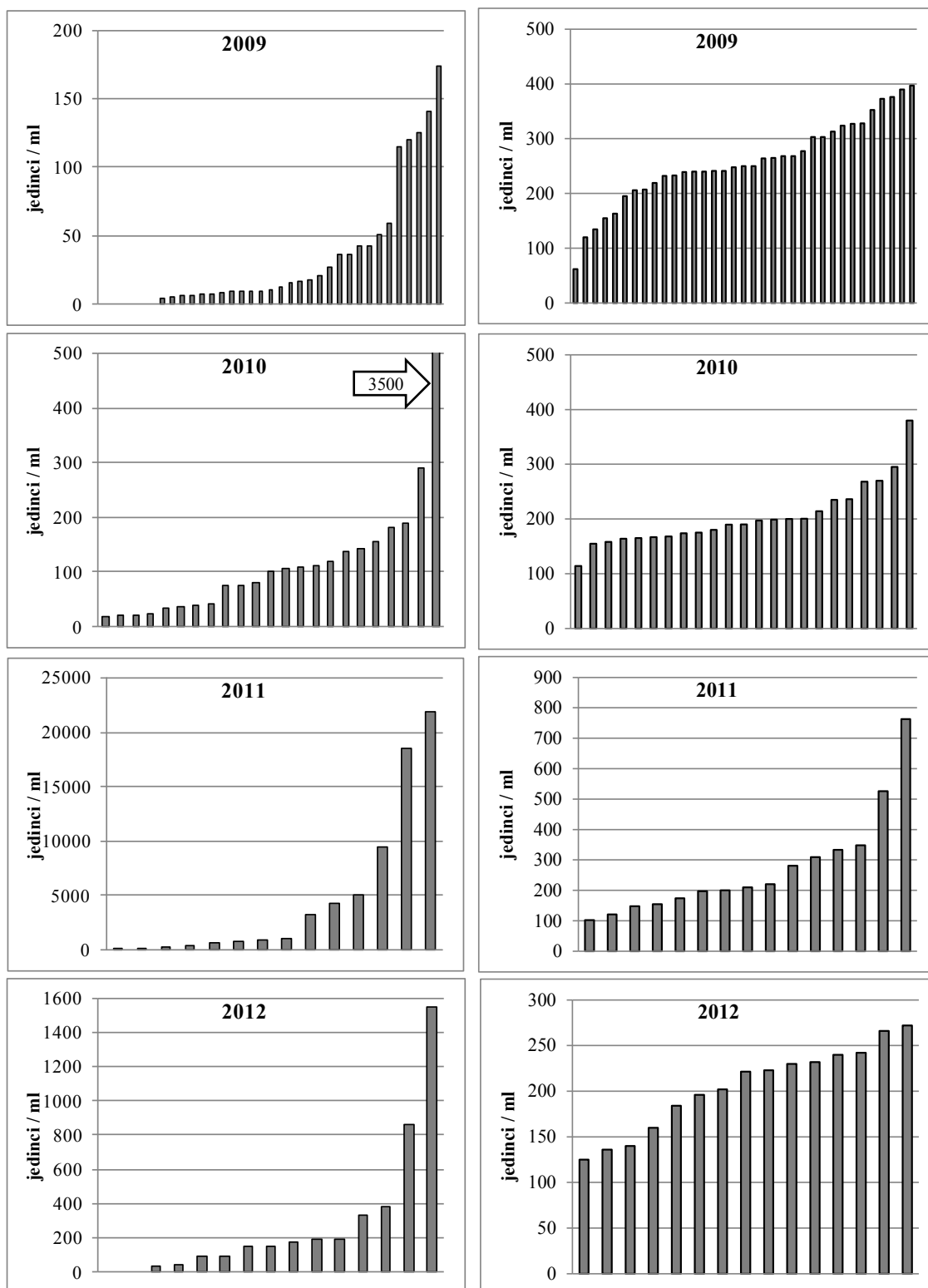
rok	způsob přípravy	složení	jedinci/ml
2009	Vzorek ze skleněného akvária plněného vodovodní vodou (pozůstatek po jednom skončeném testu). Biocénóza se v akváriu vyvinula samovolně po cca 4 měsících stání v laboratorní teplotě na světle. Před vydáním vzorků účastníkům došlo ještě k naředění dechlorovanou vodovodní vodou.	Dominovaly drobné améby, v menší míře bezbarví bičíkovci, cysty (zřejmě améb) a spory mikromycet.	125
2010	Samovolně vyvinuté společenstvo (směs vodovodní vody, suchých listů, prachu a výluhu z půdy), které bylo v laboratorní teplotě udržováno po dobu cca tři týdnů.	Dominovali velmi drobní bezbarví bičíkovci (možná zoospory micromycet?); dále přítomny améby, spory	190
2011	Samovolně vyvinuté společenstvo (směs vodovodní vody, vody ze studny s bezbarvými bičíkovci a filtrovaného půdního výluhu), které bylo v laboratorní teplotě udržováno po dobu cca 10 dní a před vydáním ještě naředěno dechlorovanou vodovodní vodou.	Dominovali bezbarví bičíkovci (přinejmenším 3 různé taxony).	5969
2012	Samovolně vyvinutá společenstva (směs vodovodní vody, vody ze studny s bezbarvými bičíkovci a filtrovaného půdního výluhu). První společenstvo bylo udržováno v lednici, druhé při laboratorní teplotě. Před vydáním byl smíchán vzorek ze společenstva lednice (1 litr) a vzorek udržovaný při laboratorní teplotě (15 ml) s litrem dechlorované vodovodní vody.	Především bezbarví bičíkovci, méně améby, shluky bakterií.	866

### Výsledky a diskuze

Většina laboratoří, která se účastnila našich MPZ, nepovinné vzorky pro stanovení heterotrofních organismů zpracovala. V jednotlivých letech se jednalo o 35 (2009), 23 (2010), 15 (2011) a 15 (2012) laboratoří. Výsledky z let 2009 – 2012 jsou patrné z obr. 1. Na stejném obrázku jsou pro srovnání výsledky ze standardního vzorku s dominancí rozsivek (do grafů byly vybrány jen výsledky těch laboratoří, které provedly rozbor obou vzorků).

Aniž by bylo nutné používat nějakou popisnou statistiku, je z grafů na obrázku 1 naprosto evidentní, že variabilita výsledků u vzorků s heterotrofními organismy je mnohem větší než u standardních vzorků s rozsivkami. Na jedné straně se vyskytuje velké množství nulových výsledků nebo velmi nízkých výsledků (především v roce 2009), na druhé straně se objevují výsledky vyšší. Těch je však

méně než nízkých a navíc přinejmenším v některých letech jsou mnohem blíže skutečnosti než výsledky „průměrné“, i když pochopitelně nevíme, jaké počty organismů ve skutečnosti ve vzorcích byly.



**Obr. 1.** Výsledky MPZ pořádaných Státním zdravotním ústavem v letech 2009 až 2012. V levém sloupci jsou výsledky nepovinného vzorku, který obsahoval především heterotrofní organismy, v pravém pak výsledky standardního vzorku s dominancí autotrofů (především planktonních rozsivek) od stejných laboratoří jako v levém sloupci.

V roce 2009 ve vzorku dominovaly drobné améby, které bylo poměrně snadné přehlédnout. Pouze 12 účastníků z 35 je při zpracování vzorku zaznamenalo. Někteří účastníci nepozorovali ani přítomné bezbarvé bičíkovce. Výsledky byly tak tristní, že jsme se rozhodli zařazovat typově podobné vzorky do MPZ pravidelně.

V dalších letech sice ubylo nulových nálezů, což může být způsobeno tím, že laboratoře již očekávají, že ve vzorku nějaké organismy budou, zatímco v prvním roce se mohly snáze domnívat, že se jedná z naší strany o chyták a že jsme záměrně vydali vzorek bez organismů. Navíc v dalších letech již dominovali bezbarví bičíkovci, kteří jsou díky rychlejšímu pohybu (ve srovnání s amébami) lépe zpozorovatelní.

Nutno však dodat, že jsme tento nedobry stav vcelku očekávali. Počítání bezbarvých bičíkovců, nálevníků a améb je totiž poměrně problematické. Jedná se o objekty pohyblivé, takže ani bezbarví bičíkovci, ani nálevníci obvykle nečekají spořádaně na dně počítací komůrky, ale plavou (různě rychle) po celém objemu komůrky, takže je nutno stále zaostřovat. Navíc se situace v komůrce po naplnění může rychle měnit (a bezbarví bičíkovci mohou rychle mizet nebo se přemisťovat). Proto je vhodné při výskytu hbitě se pohybujících citlivých organismů pracovat rychle. A pokud během počítání začnou organismy zjevně ubývat, založit výsledek raději jen na počtech z několika nejdříve propočítaných pásů. Většina bezbarvých bičíkovců a améb je v mikroskopu také mnohem hůř vidět např. ve srovnání s řasami nebo sinicemi. Jednak se většinou jedná o poměrně malé organismy, ale hlavně (jak název napovídá) jsou bezbarví. Je tedy nutno v takových případech pracovat velmi pozorně, aby nedošlo k jejich přehlédnutí.

Při rozboru příčin nedobrych výsledků MPZ u vzorků s dominancí heterotrofních organismů je nutno uvažovat také to, že vzorky jsou pravděpodobně mnohem méně stabilní. Vzhledem k tomu, že při MPZ se vzorky zpracovávají po více než 24 hodinách od přípravy, je možné, že v nich dochází již k před zpracováním k zásadním změnám. Doposud jsme stabilitu u těchto nepovinných vzorků příliš neověřovali.

Částečně může mít vliv na větší variabilitu výsledků také menší význam těchto vzorků pro laboratoře. Alespoň část účastníků své výsledky MPZ ještě před odesláním konzultuje s jinými laboratořemi a na základě těchto konzultací může výsledky upravit, přepočítat vzorky atp. [3] Předpokládáme, že u nepovinných vzorků je motivace si vzájemně výsledky předem sdělovat, případně je upravovat, mnohem menší než u standardních vzorků pro MPZ.

Samozřejmě se nad těmito daty nabízí otázky, jak (ne)přesné budou výsledky reálných vzorků pitné vody obsahující heterotrofní mikroskopické organismy, a zda má vůbec smysl taková stanovení provádět. Domníváme se, že v reálných vzorcích to bude podobné jako ve vzorcích v rámci MPZ a v řadě případů budou výsledky vzorků s heterotrofními organismy zatíženy značnou chybou a v některých případech budou organismy přehlíženy zcela. V případech, kdy si pracovník provádějící mikroskopický rozbor nevšimne, že jsou ve vzorku přítomny stovky améb nebo bičíkovců, opravdu mikroskopický rozbor ztrácí smysl. Pokud jsou však alespoň nějaké organismy detekovány, je mnohem důležitější (než velmi přesná kvantifikace) to, jak bude nález interpretován a zda budou konána nějaká nápravná opatření. A k těmto účelům by mělo stačit, aby kvantitativní nález mohl být přiřazen do jedné ze třech úrovní 1) nulový nález, 2) mírný nález, 3) významný nález. Lze namítnout, že v případě laboratoří, které dodávají výrazně nižší výsledky, bude docházet s nižší četností k překračování hygienických limitů. To je nepochybně pravda. Jenže, vodárenská společnost by opatření neměla spouštět až po překročení limitu, ale již při změně oproti běžnému stavu. Ostatně hygienické limity u mikroskopických ukazatelů nebyly stanoveny na základě možných zdravotních následků, ale pouze dohodou expertů na základě dlouhodobé zkušenosti, proto by se neměly považovat jako univerzální, ale bylo by vhodné si je upravovat (snižovat) podle místních podmínek.

Také se domníváme, že práci laboratoří lze i v tomto směru systematicky zlepšovat. V rámci různých determinačních seminářů a kurzů pro pracovníky vodárenských, hygienických a vodohospodářských

laboratoři není problematika určování a počítání heterotrofních organismů probírána prakticky vůbec, což je jistě výzva do budoucna pro nás jako organizátory podobných akcí. Zájem ze strany laboratoří by o podobné tematické přednášky jistě byl.

**Poděkování:** *Děkujeme všem laboratořím, které zpracovaly v rámci MPZ i naše nepovinné vzorky a poskytly nám tak materiál pro tento článek.*

**Použitá literatura**

- [1] ČSN 75 7712 – Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení biosestonu
- [2] Kolář K. Problematika stanovení ukazatele živé organismy nejen z pohledu provozovatele vodárenského systému. Sborník ze semináře Aktuální otázky vodárenské biologie 2002: 22-27
- [3] Pumann P. Koluduji, tedy jsem (účastníkem MPZ). Vodárenská biologie 2010: 13-17
- [4] Pumann P., Pouzarová T. Problémy s pořádání mezilaboratorních porovnávání zkoušek v oblasti mikroskopických rozborů vody. Vodárenská biologie 2006: 150 - 155