

NĚKTERÉ ASPEKTY STANOVENÍ ABIOSESTONU ODHADEM POKRYVNOSTI ZORNÉHO POLE

Petr Pumann

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

Souhrn

Množství abiosestonu ve vodě se vyjadřuje podle ČSN 75 7713 jako pokryvnost zorného pole ve světelném mikroskopu. Reprodukovatelnost výsledků získaných touto metodou je však nízká. Na dvou testech s pracovníky laboratoří, kterým byla promítána modelová zorná pole s různě velkými částicemi, bylo ukázáno, že to může být částečně vinnou nevhodně zvolené odhadní stupnice.

Klíčová slova: abioseston; mikroskopický rozbor vody; kvantifikace,

Summary

Abiosestone amount in water is expressed according to the Czech national standard ČSN 75 7713 as a percentage of field of view covered by abiosestone in a light microscope. The reproducibility of the results obtained by this method is poor. Two trials with analysts from various labs were organized. These trials were based on the projection of mode fields of view with particles of different size to the participants. The results revealed, that the problem of the poor reproducibility could be caused partially by inappropriate pictures with scale included in the standard.

Keywords: abiosestone; microscopic analysis; quantification

Úvod

Abioseston se obvykle kvantitativně nevyjadřuje v počtu částic v určitém objemu vody jako je tomu u biosestonu, ale jako procento pokryvnosti zorného pole mikroskopu. Stanovení probíhá v počítačové komůrce s hloubkou 0,1 mm (obvykle Cyrus I) po padesátinásobném zahuštění odstředěním. Porovná se několik zorných polí mikroskopu se vzorovými tabulemi („stupnicí“) s různě velkou plochou pokrytou abiosestonem. Tabulí je celkem 12 (viz malé kruhy na obr. 1) a jsou součástí normy na stanovení abiosestonu ČSN 75 7713 [1]. Pokud se abioseston stanovuje souběžně s biosestonem, zabere to jen pár desítek sekund práce navíc. Daní za jednoduchost je však velmi špatná reprodukovatelnost metody, zvláště u vzorků s vyšším množstvím abiosestonu, což je ukázáno na výsledcích z programů zkoušení způsobilosti v příspěvku z této konference z roku 2007 [2].

V současné době probíhá revize ČSN 75 7713 Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení abiosestonu [1]. Ta se dotkne i problematického postupu pro stanovení pokryvnosti. Jaké změny však v něm při revizi udělat, není zcela jasné. Ideální by byl nějaký objektivnější způsob hodnocení, např. pomocí analýzy obrazu [2], [3]. Úplný přechod k analýze obrazu by však narazil na několik obtížně překonatelných problémů. Jednak všechny laboratoře nejsou vybaveny potřebnou technikou, a navíc stanovení analýzou obrazu zabere mnohem více času než stanovení odhadem. Dle mých zkušeností přinejmenším několik minut (ale spíš deset minut nebo déle). Při stanovení je totiž nutné vycházet z většího počtu snímků, mají-li být výsledky dostatečně přesné.

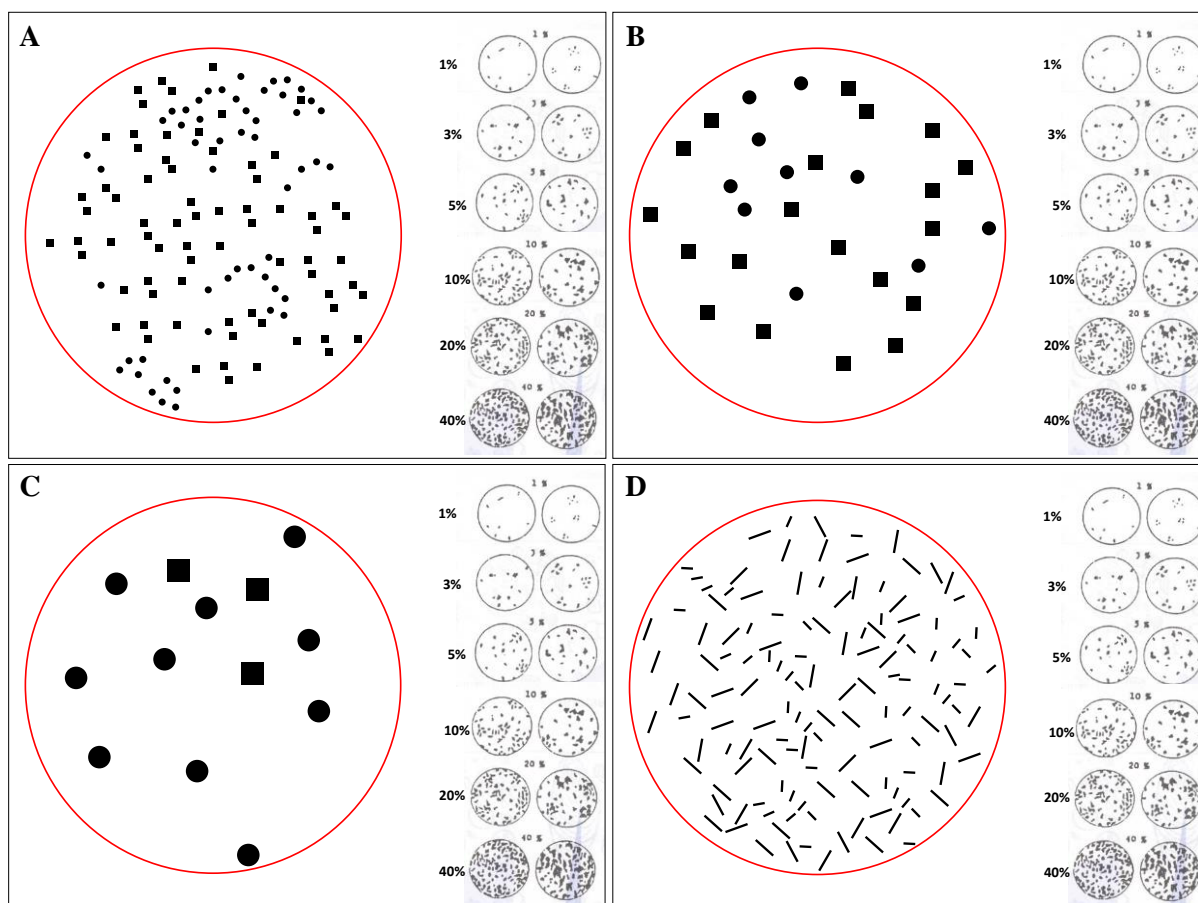
Lze se také pokusit modifikovat stávajícího postup stanovení pokryvnosti zorného pole odhadem tak, aby byly jeho výsledky lépe reprodukovatelné. K tomu je však nutné zjistit, proč poskytuje tak problematické výsledky. Již v příspěvku z roku 2007 [2] bylo naznačeno, že na vině mohou být špatné tabule s odhadovou stupnicí. Názorně se to pokusím ukázat na výsledcích testů s účastníky (dále je označuji jako respondenty) dvou školících akcí.

Metody

První test proběhl 30.5.2013 v Praze na Státním zdravotním ústavu v rámci semináře k vyhodnocení programu zkoušení způsobilosti pro mikroskopický rozbor pitné vody, druhý pak dne 12.6.2013 v Bohuslavicích poblíž Telče v rámci každoročního determinačního kurzu zaměřeného na určování řas

a sinic. Prvního testu se účastnilo 10 respondentů, druhého 25. Šest respondentů se zúčastnilo obou testů. Mezi respondenty byli většinou pracovníci provozních laboratoří, kteří stanovení abiosestonu provádějí běžně. Druhého testu se však účastnili také 3 studenti algologie, kteří se s tímto stanovení setkali během testu poprvé.

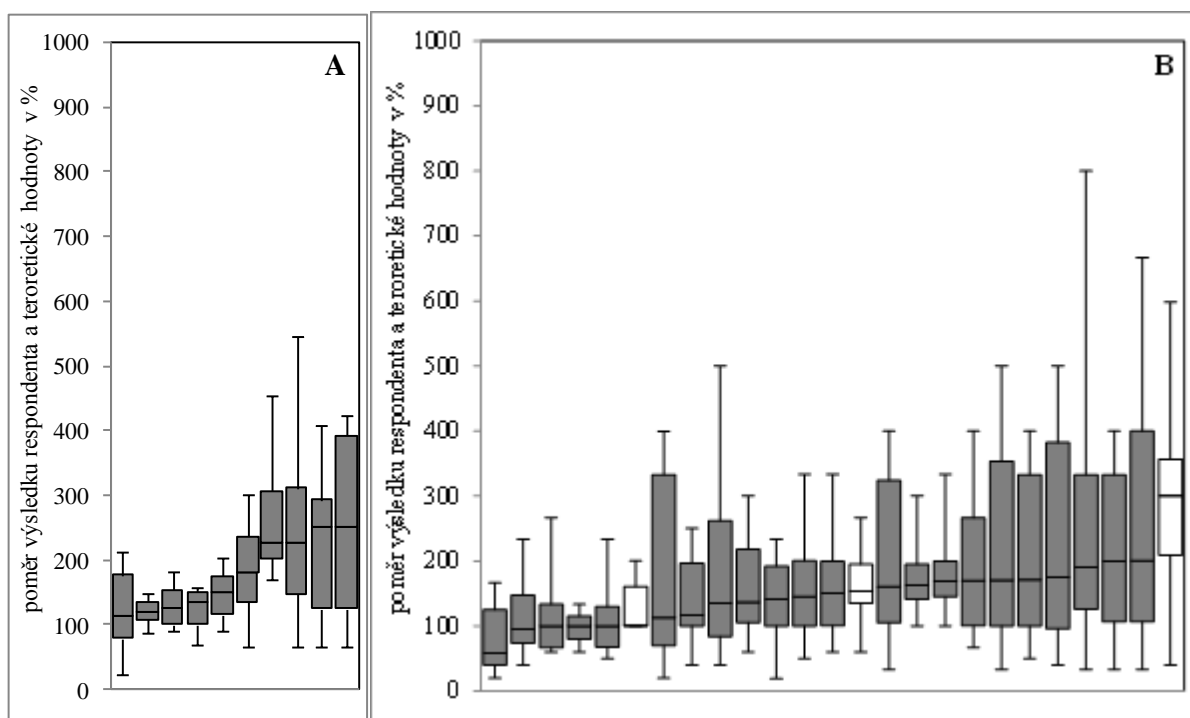
Testy spočívaly v promítnutí modelových zorných polí respondentům pomocí projektoru. Každé modelové pole bylo promítáno společně s odhadovou stupnicí z normy. Příklady několika použitých modelových polí jsou vidět na obr. 1. Respondenti měli odhadnout pokryvnost, zapsat ji na papír, který po skončení testu odevzdali. Modelová pole byla složena v prvním testu s černých čtverců, kruhů a trojúhelníků. V druhém testu byly použity už jen kruhy a čtverce a v některých případech i výrazně protažené obdélníky (simulující vzorek se železitými bakteriemi *Gallionella* nebo *Leptothrix*). Pokryvnost modelových polí, která je dále v textu nazývána jako „teoretická pokryvnost“, byla stanovena jako podíl plochy všech použitých geometrických útvarů a známé velikosti kruhového zorného pole. Celkem bylo v prvním testu respondentům promítnuto 7 tabulí, ve druhém 18. Teoretická pokryvnost na promítaných tabulích se pohybovala v prvním testu mezi 2 a 8,8 %, v druhém pak mezi 3 a 16 %. Do druhého testu byly pro kontrolu „stability odhadu v čase“, zařazeny v různých částech testu čtyři stejné zorné pole se středně velkými částicemi o teoretické pokryvnosti 5% a tři pole s malými částicemi o teoretické pokryvnosti 3%. Na konci druhého testu byly navíc promítnuty ještě 4 fotografie reálných zorných polí, u které měli respondenti rovněž odhadnout pokryvnost (dvě z nich jsou na obr. 6).



Obr. 1. Příklady promítaných tabulí v rámci druhého testu na determinačním kurzu 12.6.2013. Pro názornost byly vybrány tabule s teoretickou pokryvností 5 %. Na tabulích jsou příklady zorných polí s malými (A), středními (B) a velkými (C) částicemi. Na tabuli D jsou tyčinkovité částice, které tvarem zhruba odpovídají produktům železitých bakterií *Gallionella* nebo *Leptothrix*.

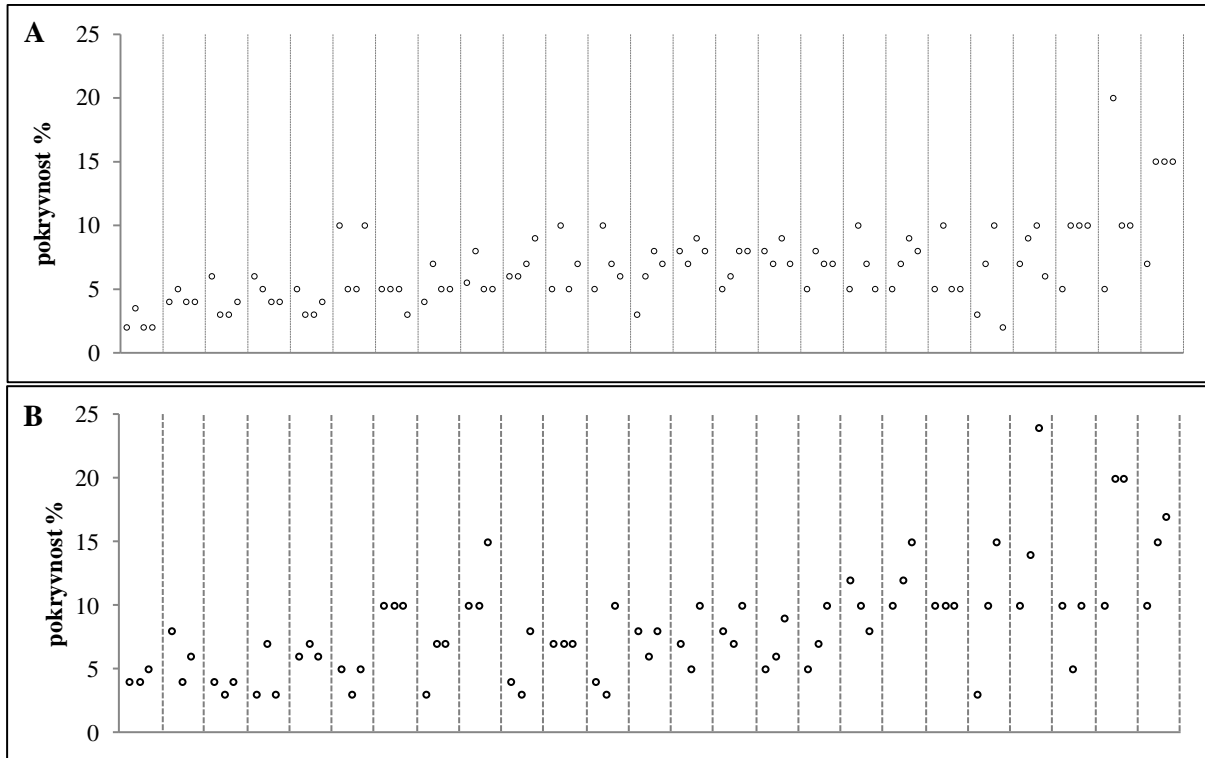
Výsledky a diskuze

Výsledky respondentů obou testů jsou vidět na obr. 2. Pouze dva respondenti ve většině případů své odhady podhodnotili a čtyři další měli počet podhodnocených i nadhodnocených zorných polí stejný. Zbylí respondenti (všech 10 v prvním testu a 19 ve druhém častěji odhady nadhodnocovalo). Znatelně vyšší výsledky v prvním testu, které jsou patrné z obr. 2, lze vysvětlit tím, že v prvním testu bylo zařazeno více modelových zorných polí s malými částicemi. Pole s malými částicemi jsou obvykle výrazně nadhodnocována, což bude ukázáno níže v textu. Naopak ze šesti respondentů účastnících se obou testů, nastalo výrazné zlepšení ve druhém testu pouze u jednoho. U zbývajících byly změny (zhoršení i zlepšení) menšího rázu (data nejsou ukázána). Nelze tedy zlepšení výsledku přičítat tomu, že by se tito respondenti z prvního testu nějak výrazně poučili. U studentů, kteří se účastnili druhého testu a kteří přišli do styku se stanovením abiosestonu poprvé v životě, pouze jeden z nich měl své výsledky výrazně nadhodnocené. Dva zbývající se nelišili od ostatních respondentů (obr. 2B).

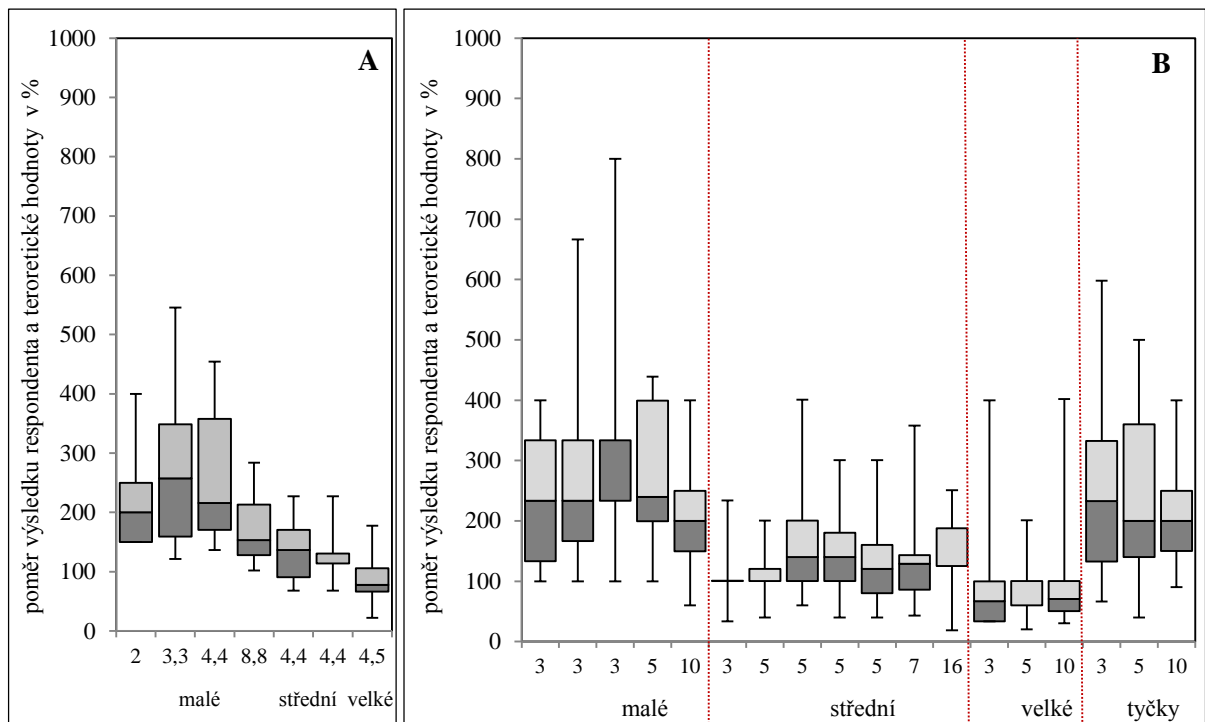


Obr. 2. Výsledky respondentů vyjádřeny jako poměr k teoretické hodnotě pokryvnosti v procentech. Každý sloupec představuje všech 7, resp. 18 výsledků jednoho respondenta. Úsečky směřující nahoru představují maximální hodnotu každého respondenta, úsečky směřující dolů hodnotu minimální. Horní okraj sloupců představuje 75. percentil, spodní 25. percentil, středová čára pak medián. Respondenti jsou seřazeni vzestupně podle mediánu. Bílé sloupce patří studentům, kteří s metodou neměli doposud žádnou zkušenost. Na obrázku A) jsou výsledky z testu konaného 30.5.2013, na obrázku B) pak 12.6.2013.

Velice zajímavé je srovnání tabulí se stejnou velikostí částic a pokryvností zařazených opakovaně na různá místa testu (viz obr. 3). Respondenti pochopitelně nevěděli, že jedná o stejná pole. Pole se středně velkými částicemi s pokryvností 5 %, která se v testu opakovala 4x (byla pouze pootočená), žádný z respondentů 4x neodhadl ve všech případech stejně (3A). Pole s malými částicemi s pokryvností 3 % se v testu objevilo celkem 3x. Tři respondenti měli odhad pokaždé stejný (nikoli však shodný s teoretickou pokryvností). Je tedy patrné, že stejné množství abiosestonu může být v odstupu několika minut ohodnoceno stejným pracovníkem odlišně.



Obr. 3. Odhady pokryvnosti pro A) 4 stejná zorná pole se středně velkými částicemi o teoretické pokryvnosti 5% a B) 3 stejná zorná pole s malými částicemi o teoretické pokryvnosti 3%. Úseky oddělené přerušovanou čarou představují vždy jednoho respondenta, tečky uvnitř těchto úseků jednotlivé výsledky.

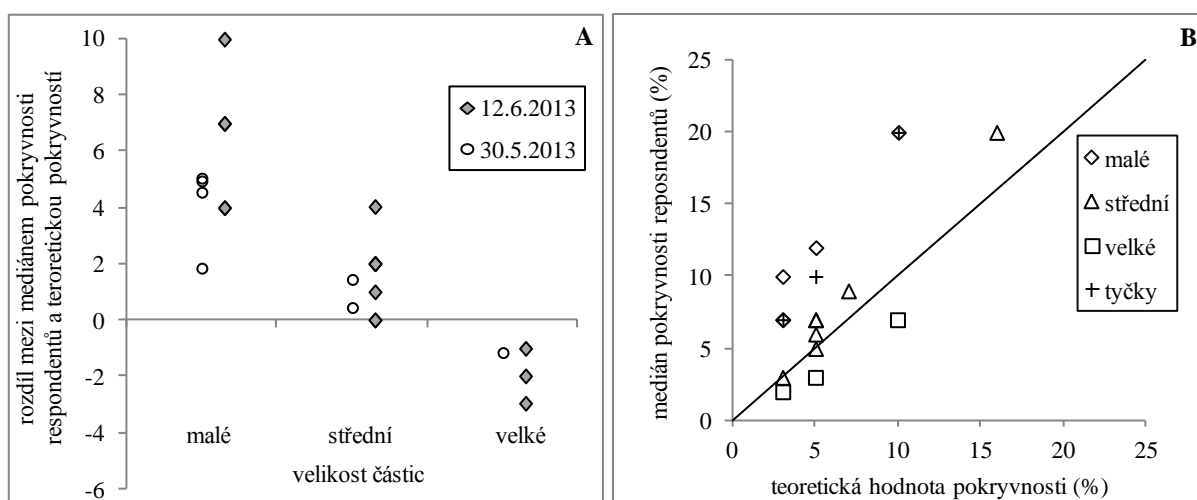


Obr. 4. Výsledky jednotlivých modelových tabulí. Každý sloupec představuje 10, resp. 25 hodnot od všech respondentů. Čísla pod osou x znamenají teoretickou pokryvnost tabule. Sloupce jsou v grafu řazeny do skupin podle velikosti/charakteru částic na tabulích a v rámci každé skupiny vzestupně podle teoretické pokryvnosti. Interpretace sloupců a úsečků je obdobná jako u obr. 2. Navíc je vyznačena část sloupce mezi mediánem a 75. percentilem světlejším odstínem.

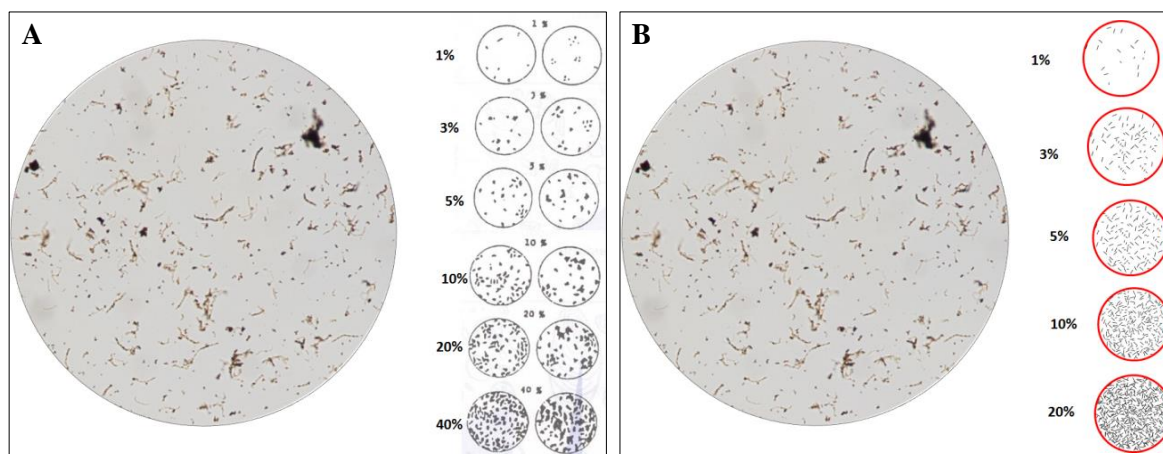
Asi nejdůležitější zjištění lze pozorovat na obr. 4 a 5A. Získané výsledky celkem jasně poukazují na vliv velikosti přítomných částic na výsledek stanovení. Je zřejmé, že v případě malých částic měli respondenti tendenci výsledky spíše nadhodnocovat, v případě velkých naopak podhodnocovat. Částice střední velikosti byly nadhodnoceny jen mírnou většinou respondentů. Střední velikost částic použitá v tomto testu, se svou relativní velikostí nejvíce blíží relativní velikosti částic modelových tabulí z ČSN 75 7713. Proto zřejmě byly odhady tabulí s částicemi střední velikosti nepřesnější.

Otázkou také je, zda s rostoucí pokrývností se zvyšuje i absolutní chyba odhadu. Z obrázku 5B je patrný trend pro malé částice a tyčky, nicméně žádný závěr si z toho vyvozovat netroufám. Bylo by zapotřebí provést další testy více zaměřené na tento jev.

Jak jiný tvar částic na obrazové tabuli pomohl respondentům v lepších výsledcích stanovených z fotografie reálného vzorku, je patrné z obr. 6. Zatímco při použití standardních tabulí byly výsledky respondentů více než 2x vyšší než výsledky stanovené analýzou obrazu, při použití tabulí s částicemi, které tvarem připomínaly částice na fotografii, bylo nadhodnocení jen malé (5 vs. 5,8 %).



Obr. 5. A) Na ose y je rozdíl mezi mediánem ze souboru respondentů a teoretickou (skutečnou) hodnotou pokrývnosti u testu z 30.5.2013 a 12.6.2013 u obrázků s malými, středními a velkými obrázky. Z výsledků vyplývá, že zatímco u malých obrázků měli účastníci tendenci nadhodnocovat, u velkých naopak podhodnocovat. B) Vztah teoretické pokrývnosti a mediánu pokrývnosti z výsledků respondentů. Černá čára ukazuje hranici, na které jsou oba parametry shodné.



Obr. 6. Odhad pokrývnosti reálného zorného pole s dominancí vláknitých útvarů (stopky železité bakterie *Gallionella*). Respondentům byly s tímto zorným polem nejprve promítnuty standardní odhadové tabule z normy (obr. A). Potom byly vyměněny novými odhadovými tabulemi s tyčkovitými částicemi (obr. B). Aritmetický průměr o odhadu pokrývnosti respondenty na obrázku A byl téměř 12 % na obrázku B jen 5,8 %, medián 10, resp. 5 %. Pokrývnost analýzou obrazu přitom byla stanovena přibližně na 5 %.

Co si z výsledků obou testů vzít pro vylepšení metody v ČSN 75 7713?

V době, kdy jsem přihlásil příspěvek na Vodárenskou biologii, jsem se domníval, že už budu moci do sborníku zařadit i konkrétní návrhy na vylepšení metody, ověřené dalším testem. Byla to však mylná představa, tak mohu na tomto místě pouze naznačit plány do blízké budoucnosti. Myslím, že jednoduchou cestou pro vylepšení metody je vytvoření nových tabulí s abiosestonem různé velikosti a tvarů (viz závěry vyplývající z obr. 4, 5A a 6). Na to, zda bude vhodné stupnici také zjemnit (tzn. mít příklady pokryvnosti nejen pro 1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 20 % a 40 %, jako je tomu nyní, ale také pro jinou pokryvnost, např. pro každé celé procento při pokryvnosti do 10 %), zatím nemám jednoznačný názor.

Ke zlepšení odhadu pokryvnosti lze doporučit dva jednoduché způsoby již nyní. Pokud se ve vzorku vyskytují částice, jejichž relativní velikost vzhledem k zornému poli je významně větší, než je abioseston z odhadových tabulí, lze k jeho odhadu použít objektiv s menším zvětšením (tzn. nejspíše použít místo objektivu zvětšujícího 20x, objektiv, který zvětšuje 10x). Pokud jsou naopak částice velmi drobné, lze použít zvětšení větší (to však v řadě případů narazí na technické problémy, např. na neostré kontury objektů při pozorování v komůrce s objektivem 40x) nebo abioseston odhadovat jen na jednom čtverci komůrky Cyrus I, což relativně (ve srovnání s odhadovou tabulí) abioseston zvětší.

Závěrem

Výsledky získané v rámci obou testů sice přinášejí zajímavé informace, ze kterých je možno vycházet při zlepšování metody pro odhad pokryvnosti zorného pole abiosestonem. Nelze je však přeceňovat. Jednak jsem při jejich interpretaci prozatím rezignoval na některé statistické postupy, takže nelze tvrdit, že výsledky jsou (nebo nejsou) statisticky významné, především si je však třeba uvědomit, že pozorování na plátne promítnutých geometrických obrazců zhruba stejné velikosti a mikroskopování reálného (tj. různorodého) abiosestonu jsou dvě dost odlišné věci.

Poděkování: Děkuji všem respondentům, kteří se zúčastnili testů se zkušebními tabulemi, a poskytli tak materiál pro tento článek. Dále děkuji všem, se kterými jsem se v průběhu času o metodě bavil a některé nápady pak včlenil i do tohoto článku.

Použitá literatura

- [1] ČSN 75 7713 – Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení abiosestonu (1998)
- [2] PUMANN P., POUZAROVÁ T.: Kvantitativní stanovení abiosestonu. Vodárenská biologie 2007: 19 – 27.
- [3] ŽILÁKOVÁ L. (2000): Kvantitatívne stanovenie abiosestonu pomocou obrazovej analýzy. Aktuální otázky vodárenské biologie 2000: 23 – 27.