

Kvalitativní rozbor sinic v mezilaboratorním porovnávání zkoušek

Qualitative analysis of cyanobacteria in interlaboratory comparison test

Petr P u m a n n

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, CZ – 100 42 Praha

Abstract

Interlaboratory comparison method for identification of cyanobacteria is proposed. Formalin preserved samples of water blooms or samples collected with plankton net were determined using light microscope. The correct identification of dominant species in each sample was evaluated according to the simple point system. Advantages and disadvantages of this method are summarized.

Úvod

Mezilaboratorní porovnávání zkoušek (MPZ) má za úkol posoudit, jak se výsledky různých laboratoří vzájemně shodují. Laboratoře, jejichž výsledky se významně odlišují, mají hledat a odstranit příčinu této odchylky. U mikroskopických rozborů vody je účast v MPZ důležitá o to více, že se zde nedají používat (na rozdíl od fyzikálně-chemických stanovení) interní standardy, což jsou vzorky, u nichž přesně známe hodnotu stanovované veličiny. MPZ je v tomto případě pak jedinou možnou kontrolou kvality práce laboratoře.

Zatímco pro kvantitativní stanovení mikroskopických organismů existují postupy, kterými lze poměrně snadno hodnotit laboratoře v rámci MPZ, pro stanovení kvalitativní je objektivní hodnocení velmi obtížné. Jedním z důvodů, proč jsme v září 2000 uspořádali zkušební testy, bylo vyzkoušet nový způsob hodnocení laboratoří při kvalitativním rozboru planktonních sinic. Zaměřili jsme se hlavně na sinice schopné vytvářet vodní květy, jejichž správné určení je podsttné pro laboratoře hygienické služby při hodnocení kvality vody v koupalištích ve volné přírodě. Od roku 2001 se chystáme zařadit tyto testy mezi pravidelné akce pořádané SZÚ.

Testu se zúčastnilo 12 laboratoří hygienické služby, Laboratoř hygieny vody ze Státního zdravotního ústavu (SZÚ) a odborník na planktonní sinice z Botanického ústavu AVČR (BÚ). Za vztažné hodnoty byly považovány

výsledky BÚ a SZÚ. Test se skládal ze dvou částí. V první části laboratoře zpracovávaly živý vzorek z rekreační nádrže běžným způsobem (kvantifikace a určení přítomných organismů se zaměřením na sinice). Ve druhé části byly každé laboratoři rozdány 4 vzorky bohaté na planktonní sinice - buď přímo vodní květ nebo vzorek odebraný planktonní sítí. Vzorky byly konzervovány formalínem. Pokyny pro zpracování vzorků jsou uvedeny v rámečku. V tomto příspěvku je popsána pouze druhá část testu.

Pokyny pro zpracování vzorků rozdávané účastníkům testu:

1. Vzorky jsou konzervovány formalínem, takže je můžete zpracovat kdykoli.
2. Přeneste kapku ze vzorkovnice na podložní sklíčko, přikryjte krycím sklíčkem a určete přítomné zástupce sinic. Zooplankton ani řasy neurčujte.
3. Pro snazší hodnocení určete relativní četnost jednotlivých taxonů sinic. Spočítejte v několika zorných polích nejméně sto jedinců* a přiřaďte četnost. Př.: Když ze 100 jedinců sinic bude 60 jedinců tvořit *Microcystis aeruginosa*, tak její relativní četnost bude 60%. Taxonům, které jste ve vzorku určili, ale nezaznamenali při počítání relativní četnosti, přiřaďte v protokolu symbol +.

Zásady určování: V případě, že si nejste jisti zařazením do druhu, vyjádřete pochybnost buď otazníkem nebo písmeny cf. mezi rodovým a druhovým jménem anebo zařaďte pouze do rodu. Mějte na paměti, že je to menší chyba než určení druhu špatně. Často je přesné druhové určení přímo nemožné díky chybějícím determinačním znakům.

**Jedinec = samostatně žijící organismy jedno- a vícebuněčné. Kolonie a cenobia okrouhlého tvaru o průměru 60 µm považujeme za jednotky, větší kolonie a cenobia pak vyjadřujeme jako jejich násobky. Vlákna a trichomy počítáme za jednotku, jsou-li dlouhá do 100 µm, delší vlákna vyjadřujeme jako jejich násobky.*

MPZ by měly splňovat následující požadavky: (1) nenechat bez povšimnutí, ty kteří určují špatně, (2) nikoho nepoškodit a (3) zajistit aby výsledky byly nezpochybnitelné.

Navrhují hodnotit laboratoře bodovým systémem za správné určení dominantního taxonu či taxonů. Systém přidělování bodů je patrný z tabulek (tab. 1-8). Při přidělování bodů je nutné jednoznačně odlišit hodnocený taxon od ostatních. Proto jsem také zvolil uvádění relativní četnosti taxonů sinic ve vzorku, což není časově příliš náročné a pro daný účel dostatečné.

Počet bodů k obdržení osvědčení je věcí diskuse. Pro potřeby hygienické služby ve většině případů stačí určení na úrovni rodu. Pouze v některých případech, kdy je přesnější určení poměrně snadné a má význam i z hlediska možného obsahu toxinů (např. odlišení *Microcystis wesenbergii* od ostatních druhů *Microcystis*), má význam trvat na určení do druhu. Na druhé straně záměna např. rodů *Anabaenopsis* a *Anabaena* není z hygienického hlediska

zásadní. Limit by měl laboratoře přimět k tomu, aby v případě nejistoty druhového určení raději svoji nejistotu vyjádřily také v protokolu nebo zůstávaly na rodové úrovni.

Pro jasné odlišení kvality práce laboratoří při určování sinic je nezbytné zvolit vhodné vzorky, na což je poukázáno při hodnocení výsledků z tohoto pokusného testu. Je třeba také pamatovat, že fixace vzorků formalínem může ovlivnit u některých taxonů důležité determinační znaky (rozpad kolonií u r. *Aphanizomenon*, ztráta barvy - důležité u r. *Planktothrix* - viz vzorek č.3). Problémem jsou samozřejmě i změny v taxonomii, a s tím i přístup k moderní determinační literatuře. Podle mých informací pro planktonní sinice má většina laboratoří k dispozici nové česky psané určovací klíče (MARŠÁLEK et al. 1996, KOMÁREK 1999).

Pro nezpochybnitelnost je nutné zajistit určení několika nezávislými erudovanými pracovníky, kteří po prohlédnutí navrhovaných vzorků vzájemnou dohodou vyberou vhodné vzorky pro účely testu, určí rozmezí pro hodnocené taxony a způsob jejich bodování. To vše musí proběhnout ještě před vydáváním vzorků účastníkům MPZ (včetně ověření Českým institutem pro akreditace).

Výsledky testu

Tabulky s výsledky jsou na konci příspěvku.

Vzorek č. 1: Nejednoduší případ - dominance *Microcystis aeruginosa* (charakteristické kolonie). Žádné problémy s přidělením bodů. Pro účely testu vhodný vzorek.

Vzorek č. 2: Ve vzorku dominovala *Anabaenopsis elenkinii* (dobře vyvinutá populace - heterocyty, akinety), i když ne tak výrazně jako u předešlého vzorku. Přesto lze jednoznačně odlišit, co laboratoře považovaly za dominantní taxon. Pro potřeby testu také vhodný vzorek.

Vzorek č. 3: Zde dominovaly druhy vláknitých sinic. Hodnoceným taxonem byla sinice *Planktothrix*. Ve dvou případech došlo evidentně k záměně za *Aphanizomenon* (H2 a H5), v jednom za *Phormidium* či *Aphanizomenon* (H8). Problémem tohoto vzorku bylo, že některé laboratoře nepočítaly do relativní četnosti sinici rodu *Pseudanabaena*, čímž se automaticky zvýší relativní četnost u ostatních taxonů. Z tohoto důvodu je vzorek pro potřeby MPZ méně vhodný.

Vzorek č. 4: Dominance *Microcystis aeruginosa* a *M. wesenbergii*, s příměsí dalších druhů *Microcystis*. Z hlediska didaktického velmi vhodný vzorek - porovnání různých druhů *Microcystis*. Problémy však mohou nastat při hodnocení. Prvním z nich je nerozeznání obou dominantních taxonů od sebe (H10). Bylo by nesprávné přidělit plný počet bodů této laboratoři za určení *M.aeruginosa* (když ho neodliší od *M. wesenbergii*) a nepřiznat žádný bod za

to, že v druhovém seznamu chybí *M. wesenbergii* (správně zařazeno do rodu, i když ke špatnému druhu). Navrhované bodové hodnocení pro tento případ v tabulce č. 8. Dalším problémem je poměrně vysoká četnost zastoupení druhů *Microcystis* (*M. novacekii* u H2, *M. ichthyoblabe* u H5), které při stanovení pilotními laboratořemi nebyly zaznamenány vůbec nebo jen s nízkou frekvencí. Zařazení podobného vzorku do příštích rozborů by mohlo být z hlediska hodnocení problematické.

Závěry

Z výsledků evidentně plyne, že nejlépe byly zvládnuty vzorky, kde dominoval pouze jeden druh. Je tedy nutné věnovat velkou pozornost výběru vhodných vzorků. Komplikovanější směsné vzorky lépe prověří determinační schopnosti pracovníků, ale hodnocení výsledků jednotlivých laboratoří je rovněž komplikovanější.

Testy by v budoucnu měly laboratoře přimět k tomu, aby se lépe naučily určovat planktonní sinice a v případě pochybností v určení tuto pochybnost vyjádřily v protokolu.

Dalším přínosem pro laboratoře je správně určený materiál, ke kterému se mohou kdykoli vrátit a pozorovat na něm znaky přímo v mikroskopu. Při tom už nejsou důležité jen dominantní taxony a i ty zastoupené s menší četností.

Dalším krokem, který zvažujeme, je pořádání semináře, kde budou vzorky demonstrovány na projekčním mikroskopu.

Poděkování

Děkuji všem laboratořím, které se testu zúčastnily.

Literatura

- KOMÁREK, J. (1999): Přehled planktonních sinic v povodí Labe. – Mezinárodní komise pro ochranu Labe, Magdeburg, 84 pp.
- MARŠÁLEK, B., KERŠNER, V. & MARVAN, P. (1996): Vodní květy sinic. – Nadatio flos-aquae, Brno, 142 pp.

Tabulka 1–8:

Z výsledků laboratoří byly vybrány u vzorků 1 a 4 pouze koloniální druhy; ve vzorcích 2 a 3 vláknité. Čísla znamenají procentuální zastoupení jednotlivých taxonů sinic. H1-12 jsou kódy laboratoří hygienické služby, SZU – Státní zdravotní ústav, BU – Botanický ústav

Table 1-8: The results of individual laboratories (H1 – 12, individual laboratories, SZU – State Health Institute, BU specialist from Botanical Institute, numbers are in %)

Tabulka č. 1: Vzorek 1

Taxon	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	SZU	BU
<i>Microcystis aeruginosa</i>	90		100		100		100		100	100	98	98	98	100
<i>Microcystis cf. aeruginosa</i>		90				100								
<i>Microcystis ichthyoblabe</i>								97			1			
<i>Microcystis cf. ichthyoblabe</i>													2	
<i>Microcystis cf. novacekii</i>		10												
<i>Microcystis wesenbergii</i>											+			
<i>Microcystis sp.</i>				97								2		
Hodnocení	5	4	5	3	5	4	5	2	5	5	5	5	-	-

Tabulka č. 2: Způsob hodnocení laboratoří u vzorku 1

Rozmezí pro hodnocený taxon 60 - 100%

Taxon	body
<i>Microcystis aeruginosa</i>	5
<i>Microcystis cf. Aeruginosa</i>	4
<i>Microcystis sp.</i>	3
<i>Microcystis cf.</i> - jiný druh	3
<i>Microcystis</i> - jiný druh	2
vše ostatní	0

Tabulka č. 3: Vzorek 2

Taxon	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	SZU	BU
<i>Anabaena cf. flos aque</i>						90								
<i>Anabaena sp.</i>		80							20	1			2	+
<i>Anabaenopsis arnoldii</i>											90			
<i>Anabaenopsis cf. arnoldii</i>												87		
<i>Anabaenopsis elenkinii</i>							80	87		91			76	97
<i>Anabaenopsis cf. elenkinii</i>			90											
<i>Anabaenopsis sp.</i>	85			94	95				80					
Hodnocení	3	1	4	3	3	1	5	5	3	5	2	3	-	-

Tabulka č. 4: Způsob hodnocení laboratoří u vzorku 2:

Rozmezí pro hodnocený taxon 60 - 100%

Taxon	body
<i>Anabaenopsis elenkinii</i>	5
<i>Anabaenopsis cf. Elenkinii</i>	4
<i>Anabaenopsis sp.</i>	3
<i>Anabaenopsis cf.</i> - jiný druh	3
<i>Anabaenopsis</i> - jiný druh	2
<i>Anabaena sp.</i> (nebo jiný druh)	1
vše ostatní	0

Tabulka č. 5: Vzorek 3

Taxon	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	SZU	BU
<i>Anabena cf. affinis</i>						4								
<i>Anabaena cf. circinalis</i>			2											
<i>Anabaena planctonica</i>								9						
<i>Anabaena viguieri</i>			19								9		9	7
<i>Anabaena sp.</i>	10	25		8	15		10		60	10		12		
<i>Aphanizomenon elenkinii</i>											8			
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>									+					
<i>Aphanizomenon issatschenkoi</i>	5						10						4	7
<i>Aphanizomenon cf. issatschenkoi</i>			4											
<i>Aphanizomenon yezoense</i>								39						
<i>Aphanizomenon cf. yezoense</i>						7								
<i>Aphanizomenon sp.</i>		70		2	70					10		10	4	
<i>Gleotrichia echinulata</i>						6								
<i>Limnothrix redekei</i>			22											
<i>Neurčeno</i>					15									
<i>Oscillatoria sp.</i>											+			
<i>Phormidium sp.</i>							20	52						
<i>Planktolyngbya limnetica</i>	5													
<i>Planktothrix agardhii</i>	75		4				47			71	46	52	39	56
<i>Planktothrix cf. rubescens</i>			43											
<i>Planktothrix sp.</i>				87		83			40					
<i>Pseudanabaena catenata</i>														30
<i>Pseudanabaena limnetica</i>										6	35			
<i>Pseudanabaena limnetica?</i>							13							
<i>Pseudanabaena sp.</i>												20		
<i>Pseudanabaena sp. ?</i>													40	
Hodnocení	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	3	3	-	-

Tabulka č. 6: Hodnocení laboratoří u vzorku 3:

Rozmezí pro hodnocení taxon 20 - 80%

Taxon	body
<i>Planktothrix sp. (agardhii, rubescens)</i>	3
vše ostatní	0

Tabulka č. 7: Vzorek 4

Taxon	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	SZU	BU
<i>Microcystis aeruginosa</i>	36		39		20		38	18	40	91	33	36	40	48
<i>Microcystis cf. aeruginosa</i>		40				50								
<i>Microcystis cf. flos-aquae</i>												3		
<i>Microcystis cf. novacekii</i>		30												
<i>Microcystis flos-aquae</i>			4		10			14						
<i>Microcystis ichthyoblabe</i>	+		5		30					2			2	+
<i>Microcystis cf. ichthyoblabe</i>							8							
<i>Microcystis smithii</i>								3						
<i>Microcystis viridis</i>							1				+		2	+
<i>Microcystis wesenbergii</i>	47		32	21	40		42		50		54	45	42	49
<i>Microcystis cf. wesenbergii</i>		30				50								
<i>Microcystis sp.</i>				52								5		
<i>Woronichinia naegeliana</i>			2				1	28					+	2
<i>Woronichinia sp.</i>				3	+									
Hodnocení <i>M. aeruginosa</i>	5	4	5	3	5	4	5	5	5	3*	5	5	-	-
Hodnocení <i>M. wesenbergii</i>	5	4	5	5	5	4	5	0	5	2*	5	5	-	-

Tabulka č. 8: Hodnocení laboratoří u vzorku 4:

Rozmezí pro oba hodnocené taxony 15 - 80%

Taxon	body
<i>Microcystis aeruginosa (wesenbergii)</i>	5
<i>Microcystis cf. aeruginosa (wesenbergii)</i>	4
<i>Microcystis sp.</i>	3
<i>Microcystis cf.</i> – jiný druh	3
<i>Microcystis</i> - jiný druh	2
vše ostatní	0

* rozhodnuto direktivně, aby laboratoř nebyla poškozena