

## REVIDOVANÁ NORMA ČSN 75 7713 KVALITA VOD – BIOLOGICKÝ ROZBOR - STANOVENÍ ABIOSESTONU

**Petr Pumann**<sup>1)</sup>, **Jana Řihová Ambrožová**<sup>2)</sup>, **Lenka Fremrová**<sup>3)</sup>

1) *Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42, e-mail: [petr.pumann@szu.cz](mailto:petr.pumann@szu.cz);*

2) *VŠCHT ÚTVP, Technická 3, Praha 6, 166 28, e-mail: [jana.ambrozova@vscht.cz](mailto:jana.ambrozova@vscht.cz);*

3) *Sweco Hydroprojekt a.s., Táborská 31, Praha 4, 140 16,  
e-mail: [lenka.fremrova@sweco.cz](mailto:lenka.fremrova@sweco.cz)*

### Souhrn

Revize normy ČSN 75 7713 Kvalita vod – Biologický rozbor - Stanovení abiosestonu z listopadu 2015 přináší některé zásadní změny. Správnému určení částic ve vzorcích vody má pomoci informativní příloha obsahující sedm tabulí s mikrofotografiemi. Pro odhad pokrývnosti byly připraveny nové obrázkové tabule (s různě velkými kruhy, protaženými obdélníky a do černobílého obrázku převedenými fotografiemi skutečného abiosestonu). Rovněž byl modifikován postup, jak odhad provádět. Doplněna byla také příloha zajištění a řízení kvality a provedeny další menší změny.

**Klíčová slova:** abioseston; metody; voda; mikroskopický rozbor; ČSN 75 7713

### Summary

The revised standard ČSN 75 7713 Water quality – Biological analysis – Determination of abioseston published in November 2015 brings some important changes. A new informative annex containing seven pages of microphotographs should help to a correct identification of particles in water samples. New pictures with model field of view have been prepared (with circles of different size, elongated rectangles and black-and-white pictures of real abioseston). The method for assessment of field-of-view coverage has been modified as well. Moreover, a new annex for quality assurance and quality control has been included and other less important changes have been made.

**Keywords:** abioseston; methods; water; microscopic analyses; ČSN 75 7713

### Úvod

Potřeba revize ČSN 75 7713 Jakost vod - Biologický rozbor – Stanovení abiosestonu z roku 1998 [1] byla jedním ze závěrů prověrky biologických norem (ČSN a TNV, nikoli překládaných evropských a mezinárodních norem) starších než pět let, která proběhla v roce 2010 [3]. Práce na revizi začaly na jaře roku 2013 a byly dokončeny v září 2015. Revidovaná norma byla vydaná v listopadu 2015 jako ČSN 75 7713 Kvalita vod - Biologický rozbor – Stanovení abiosestonu (účinnost od prosince 2015) [2]. Celý proces tedy trval bezmála tři roky, což je mnohem více než u dalších obdobných norem (např. ČSN 75 7712). Provedené úpravy však byly mnohem rozsáhlejší, než se původně předpokládalo, navíc se z části jednalo nejen o zapracování existujících zkušeností a znalostí do textu normy, ale nové vytváření části pracovního postupu včetně jeho ověřování (např. [5]). V příspěvku se pokusíme probrat změny v textu normy s důrazem na ty významné, a to včetně poukázání na důvody, které ke změnám vedly.

### Určování abiosestonu

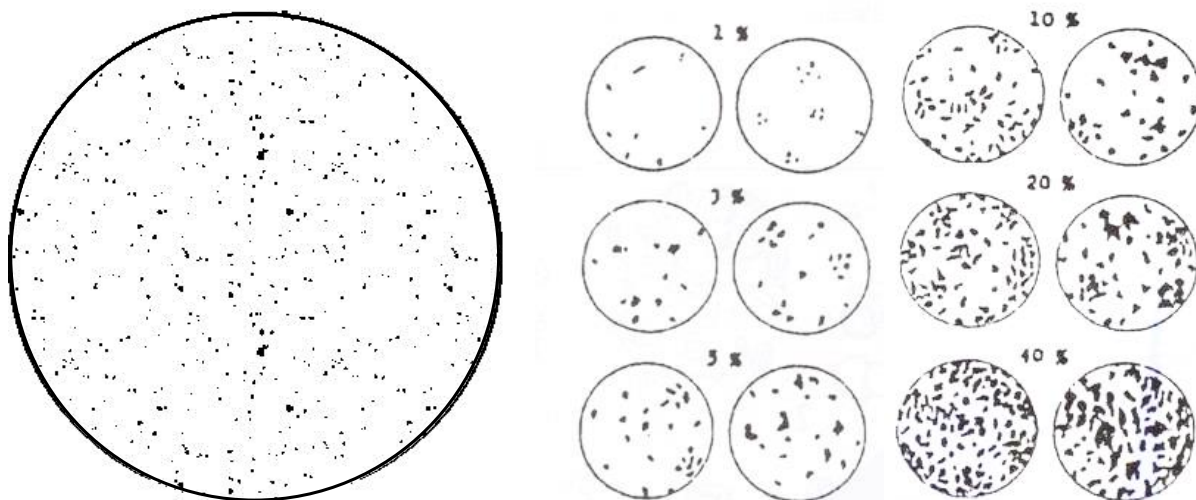
Při mikroskopickém rozboru je správné určení přítomných organismů a částic v mnoha případech důležitější než jejich kvantifikace. Ke správnému určování však musí mít pracovník provádějící rozbor kromě dostatečných znalostí a zkušeností s mikroskopováním různých vzorků také k dispozici vhodnou determinační literaturu. Zatímco pro určování organismů existuje řada specializovaných publikací s kresbami či fotografiemi, pro určování abiosestonu jsou v provozních laboratořích dostupné v podstatě jen čtyři tabule černobílých kreseb (přílohy původní ČSN 75 7713 či téměř identické tabule z atlasů Sládečka a Sládečkové [8] a [9]) nebo omezené množství fotografií v publikovaných (např. [7]) i nepublikovaných materiálech prvních dvou autorů tohoto příspěvku (např. na internetu dostupné materiály z programů zkoušení způsobilosti pořádaných Státním zdravotním ústavem). Určování abiosestonu podle černobílých kreseb může být velmi problematické.

Chybí barvy, omezené možnosti jsou při vykreslování povrchové struktury apod. Proto byla do normy zařazena nová, poměrně rozsáhlá informativní příloha obsahující 7 tabulí se 103 barevnými fotografiemi různého abiosestonu (pylová a škrobová zrna, zbytky rostlin a bezobratlých živočichů, železité sraženiny včetně produktů železitých bakterií, různé anorganické částice, příklady přírodních vláken). Přesto, že v našich archivech máme poměrně velké množství vlastních fotografií, neměli jsme k dispozici vše, abychom plně nahradili původní přílohu s kresbami. Kresba navíc přináší trochu jinou informaci než fotografie. Proto jsme se rozhodli v revidované normě ponechat přes tematický překryv v nezměněné podobě i tabule s kresbami.

Mezi fotografiemi na tabulích převládají pylová zrna (tři kompletní tabule), která byla na tabulích s kresbami zastoupena pouze pylem borovice. To naprosto nevystihovalo variabilitu této skupiny ve vodě se běžně vyskytujících částic. Až na výjimky však uživatelům neradíme, aby se snažili pyly přesně určit. Příloha nepřináší informaci o důležitých determinačních znacích (např. o velikosti, přítomnosti pórů, různých povrchových strukturách), které v mnoha případech ani nejsou na fotografiích v příloze patrné. Dokonce i specializované pylové analýzy např. pro účely monitorování aktuální situace ovzduší častokrát končí na úrovni čeledě (růžovité, lipnicovité).

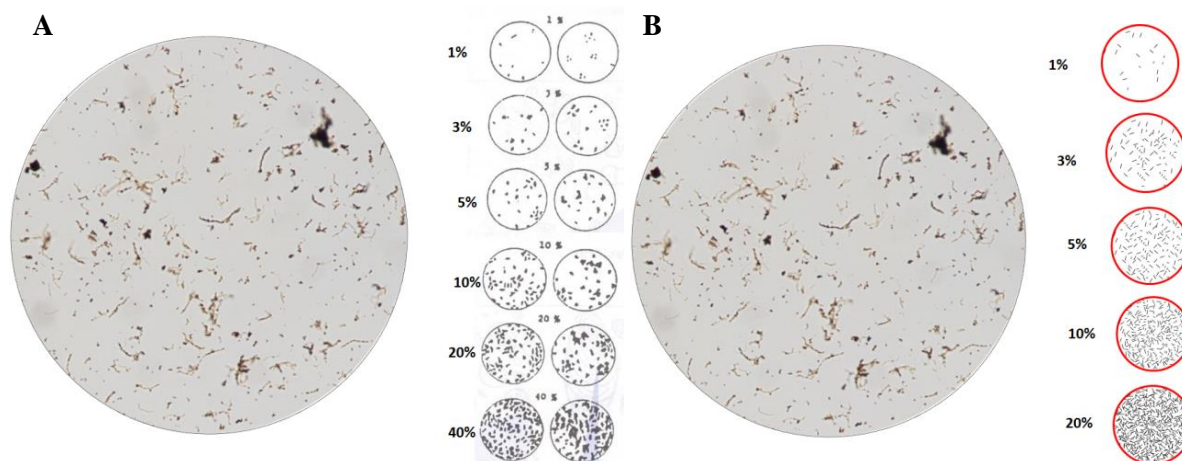
### Stanovení odhadu pokryvnosti zorného pole

Za nejzásadnější, ač původně neplánovanou [3] změnu v revidované normě lze považovat úpravu postupu pro odhad pokryvnosti zorného pole. Postup z původní normy [1] je z různých důvodů problematický (více viz [6]). Z počátku jsme však měli pouze nejasnou představu, jak ho alespoň mírně vylepšit. Věděli jsme, že vhodné by bylo nahradit odhadové tabule, které nepochybně přispívaly k nízké reprodukovatelnosti metody. Díky nim docházelo významnému nadhodnocení výsledků především u vzorků s malými částicemi [6], [5]. Pokud byly částice v zorném poli relativně (vzhledem k velikosti zorného pole) menší než částice na tabulích, byly výsledky ve většině případů nadhodnocené (obr. 1). Jasně tento jev ukázaly také výsledky pokusů s účastníky dvou akcí na jaře roku 2013 (většinou šlo o pracovníky provádějící rutinně mikroskopický rozbor vody) [5].



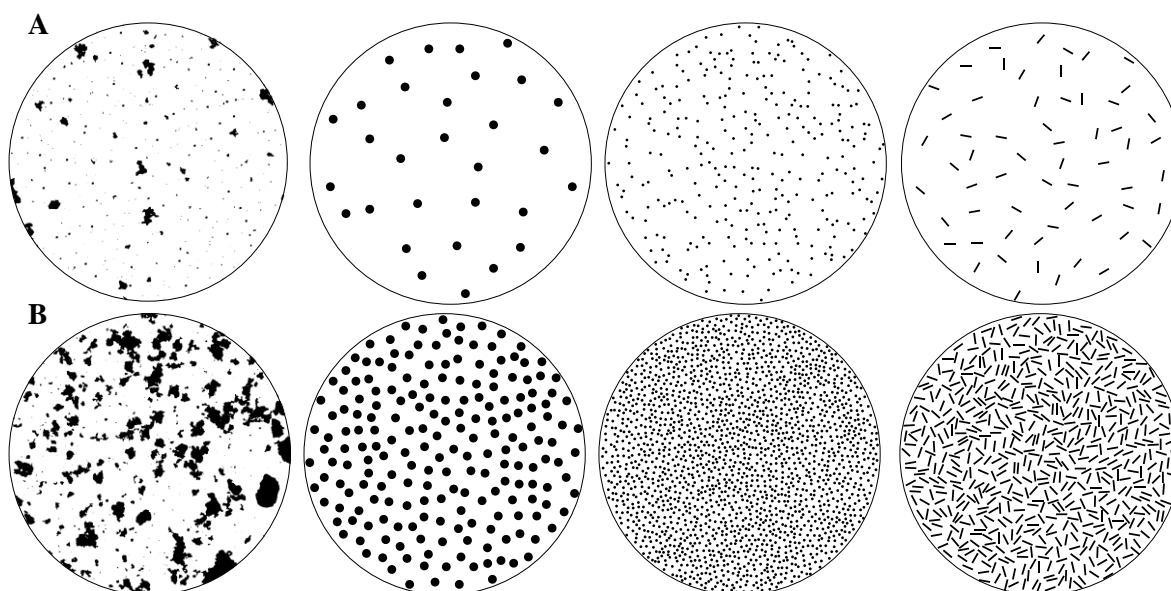
**Obr. 1.** Zorné pole ze vzorku v rámci programu zkoušení způsobilosti pořádaného SZÚ v roce 2015. Většina účastníků výsledky výrazně nadhodnotila. Pravděpodobnou příčinou bylo to, že ve vzorku převládaly velmi drobné částice. Zatímco výsledky analýzou obrazu se pohybovaly většinou mezi 3 až 4 %, polovina zúčastněných laboratoří při stanovení abiosestonu odhadem uváděla výsledky 10 % a vyšší. I když k nadhodnocení výsledků většinou účastníků dochází v rámci programu zkoušení způsobilosti vždy, v tomto případě byla jeho míra vyšší než obvykle. *Poznámka:* Zobrazené pole je fotomontáž z několika totožných snímků (kamera zabírá jen menší část zorného pole při pohledu přímo do mikroskopu).

Staré tabule dále nezohledňovaly protažený tvar částic v některých vzorcích. Tvar produktů železitých bakterií *Gallionella* či *Leptothrix ochracea* lze zjednodušeně charakterizovat jako velmi protažené obdélníky. Úprava modelových tabulí se v tomto případě ukázala jako velmi prospěšná (obr. 2).



**Obr. 2.** 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 %. Převzato z [5].

Na základě výše uvedeného byly připraveny nové tabule. Stupnice byla připravena ve „zhuštěné“ podobě. Místo původních 6 úrovní pokrývnosti (1 %, 3 %, 5 %, 10 %, 20 % a 40 %) jich bylo připraveno 20 (1 – 12 %, 14 %, 16 %, 18 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % a 40 %). Pro každou úroveň pokrývnosti byly připraveny dvě tabule s černými kruhy (menší, kde jeden kruh zabíral 0,01 % plochy zorného pole, a větší s obsahem 0,1 % plochy zorného pole), jedna tabule s tyčinkovitými objekty (stejně velké protažené obdélníky s poměrem délky k šířce 6,15:1) a jedna připravená z reálných fotografií abiosestonu s různou velikostí částic. Tyto fotografie byly převedeny do binárního obrazu a mírně modifikovány, aby odpovídaly přesně procentům pokrývnosti. Tabule byly připraveny ve velkém rozlišení, a proto nejsou součástí textu normy, ale je možné je stáhnout a tisknout ze samostatného souboru. Příklad nových tabulí je na obr. 3.

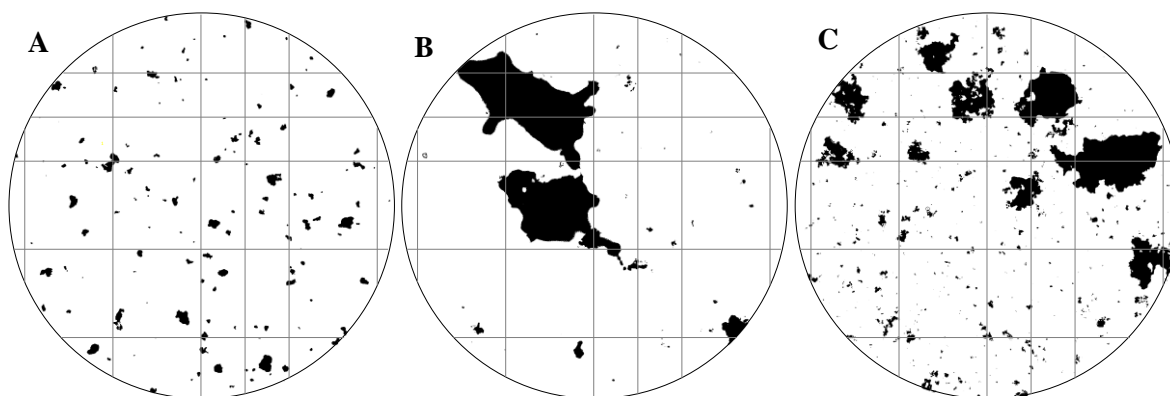


**Obr. 3.** Příklady odhadových tabulí pokrývnosti zorného pole z revidované ČSN 75 7713: A) 3 %, B) 20 %.

Samotný postup není založený pouze na pocitovém srovnání zorného pole mikroskopu s odhadovými tabulemi. Od jisté velikosti částic není pocitové srovnání s tabulemi vhodné. V přítomnosti velkých částic se doporučuje jejich myšlené „přesouvání“ do jedné části zorného pole a následný odhad

plochy. Podle charakteru částic v zorném poli se tedy zvolí jeden z dále uvedených způsobů odhadu pokrývnosti:

- **A) Porovnání s odhadovou stupnicí.** Tento postup se použije, pokud se v zorném poli nacházejí částice velikostně srovnatelné s objekty zobrazenými ve druhém až čtvrtém sloupci zleva odhadové stupnice (viz obr. 3). Ukázka zorného pole, pro které je vhodné použít tento postup, je znázorněna na obr. 4A. K porovnání se použijí tabule s objekty, jejichž velikost a tvar nejlépe odpovídají částicím ve vzorku. Standardně se začíná při 200násobném zvětšení. Pokud si částice v zorném poli mikroskopu a objekty na tabulích velikostí neodpovídají, použije se k jejich lepšímu přiblížení jiný objektiv. Jsou-li zastoupeny převážně velké částice, doporučuje se provést odhad při 100násobném zvětšení. Jsou-li částice velmi malé, lze odhad provést při 400násobném zvětšení nebo odhad neprovádět pro celé zorné pole, ale pouze na ploše jednoho čtverce počítací komůrky. Výsledek se zaznamená v % pokrývnosti.
- **B) Odhadem pokrývnosti jednotlivých částic.** Tento postup se použije v případě, že se v zorném poli nacházejí částice, jejichž relativní velikost i při použití 100násobného zvětšení je mnohem větší než velikost objektů zobrazených na odhadových tabulích. Ukázka zorného pole, pro které je vhodné použít tento postup, je znázorněna na obr. 4B. Pro tento postup je nutno znát, jak velkou část zorného pole v procentech představuje jedno pole počítací komůrky. Jak zjistit plochu zorného pole mikroskopu je popsáno v samostatné informativní příloze. Postup je založen na odhadu počtu polí počítací komůrky, které zabírají (pokrývají) přítomné částice. K tomu je vhodné si představit jejich přesun do jedné části zorného pole a odhadnout, kolik čtverců tyto částice zabírají (viz obr. 5).
- **C) Kombinace obou postupů.** V případě, že se v zorném poli vyskytují jak malé, tak velké částice, zkombinují se oba výše uvedené postupy. Ukázka zorného pole, pro které je vhodné použít tento postup, je znázorněna na obr. 4C. Konečný výsledek je nutno dopočítat podle vzorce uvedeného v normě (i když ve většině případů se po zaokrouhlení nebude lišit od prostého součtu obou hodnot).



**Obr. 4.** Příklady zorných polí pro použití jednotlivých postupů pro odhad pokrývnosti (detaily výše v textu).

A) K odhadu pokrývnosti se využije srovnání s odhadovou tabulí, v tomto případě sloupec s většími kulatými objekty.

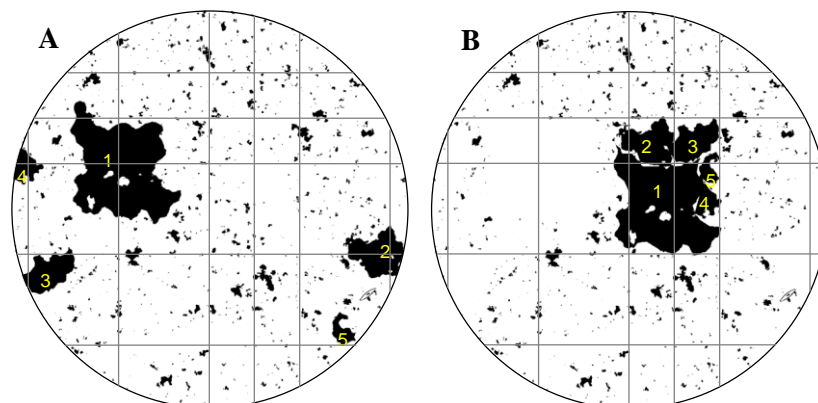
B) Pokrývnost odhadem počtu polí počítací komůrky, které zabírají přítomné částice a ze známé velikosti zorného pole. Drobné částice představují zjevně zanedbatelnou část pokrývnosti.

C) Zorné pole, pro které by bylo vhodné využít kombinaci obou postupů. Drobné částice představují jen menší část pokrývnosti, přesto by již nebylo správné ji zcela zanedbat.

V praxi se i před vydáním revidované normy při odhadu pokrývnosti zorných polí s velkými částicemi často používalo jejich myšlené „přesouvání“ do jedné části zorného pole a následný odhad plochy. Dokonce původní ČSN 75 7713 uváděla možnost pracovat obdobným způsobem a použít Whipplův okulárový mikrometr, který má mřížku 10 × 10 čtverců (jeden čtverec představuje 1 % plochy pod mřížkou). Laboratoře ho však v naprosté většině případů nevlastní. V revidované normě je k tomuto



účelu použita mřížka počítací komůrky, která je sice méně vhodná, co se přepočtů týká (výsledkem jsou desetinná čísla), ale při rozboru se nemusí manipulovat s okulárem, navíc se odečet provádí z celého zorného pole.



**Obr. 5.** Na obrázku A je znázorněno zorné pole s použitím objektivu zvětšujícího 20 $\times$ . Při současném výskytu malých a velkých částic se postupem nejdříve odhadne pokryvnost malými částicemi porovnáním s odhadovými tabulemi, při kterém se neberou v úvahu velké částice. V tomto případě je odhadovaná pokryvnost malými částicemi zhruba 3 %. Potom se odhadne, kolik čtverců počítací komůrky zabírají velké částice. K tomu je potřebné si představit jejich přesun do jedné části zorného pole a odhadnout, kolik čtverců tyto částice zabírají (obrázek B). V tomto případě částice zabírají zhruba jeden velký a dva malé čtverce. Ze známé plochy zorného pole a známé plochy čtverců komůrky bylo vypočítáno, že zabírají 9,86 %. Při použití vzorce pro výpočet celkové pokryvnosti (v tomto příspěvku ho neuvádíme) a následném zaokrouhlení na celá čísla se získá výsledek 13 %.

V revidované normě je rovněž uvedeno, že výsledek by měl být stanoven z odhadu pokryvnosti alespoň čtyř náhodně vybraných zorných polí a že jejich počet musí být vyšší v případech, kdy výsledky náhodně vybraných polí se vzájemně významně liší, např. kvůli výskytu velkých částic. Norma neuvádí, zda by primární záznamy měly obsahovat odhady pokryvnosti jednotlivých polí, ze kterých se výsledná hodnota stanoví. Domníváme se, že to není nutné v případech, kdy je pokryvnost nízká (na úrovni 1 % až 2 %).

### Analýza obrazu

V textu normy je rovněž zmíněna možnost využít k určení pokryvnosti analýzu obrazu. Tato metoda je v řadě laboratoří zavedena a výrazně by snížila míru subjektivity vnášené do hodnocení při stanovení odhadem. Výsledky obou postupů však nejsou vzájemně srovnatelné (alespoň co se týká výsledků podle původního postupu). V úvahu tak nepřipadalo využití analýzy obrazu ani jako rovnocenné alternativy, ani její předepsání jako jediné metody stanovení abiosestonu. Stanovení analýzou obrazu je výrazně časově náročnější a její povinné zavedení by zároveň přineslo nový finanční požadavek na vybavení laboratoří, které doposud nevlastní digitální fotoaparát či kameru (včetně napojení na mikroskop se jedná o náklad v řádu desetitisíců) či software pro analýzu obrazu (lze využít i freewarové programy). První z uvedených důvodů však považujeme za důležitější.

### Zahušťování vzorku

V revidované normě je lépe popsána předúprava vzorku. V původním znění nebylo uvedeno, že se vzorek zahušťuje na z 10 ml na 0,2 ml, což je pro následný odhad zásadní informace. Revidovaná norma striktně netrvá na zahuštění na 0,2 ml. Je možno zahušťovat např. na 0,1 ml či v případě velmi bohatých vzorků na větší objemy (0,5 ml, 1 ml či vzorek vůbec nezahušťovat). Jakékoli jiné zahuštění než na 0,2 ml je však nutno poznamenat do protokolu o zkoušce. Následně je pak nutné provést přepočet (tab. 1). U hodnot vyšších než 100 % závisí způsob vyjádření výsledků na účelu stanovení; uvede se buď „vyšší než 100 %“ („> 100 %“), nebo konkrétní číselná hodnota větší než 100 % (viz tab. 1).

**Tabulka 1.** Vliv zahuštění na konečný výsledek (příklad). Revidovaná norma umožňuje provést odhad i při jiném zahuštění než z 10 ml na 0,2 ml (tedy 50×). Je však nutno následně výsledky přepočítat, jak je naznačeno v této tabulce.

Zahuštění z 10 ml na objem	Odhad pokryvnosti podle tabulí	Výsledný odhad pokryvnosti
0,2 ml	20 %	20 %
0,1 ml	20 %	10 %
1,0 ml	20 %	>100 % nebo 200 %

### „Drobné“ změny

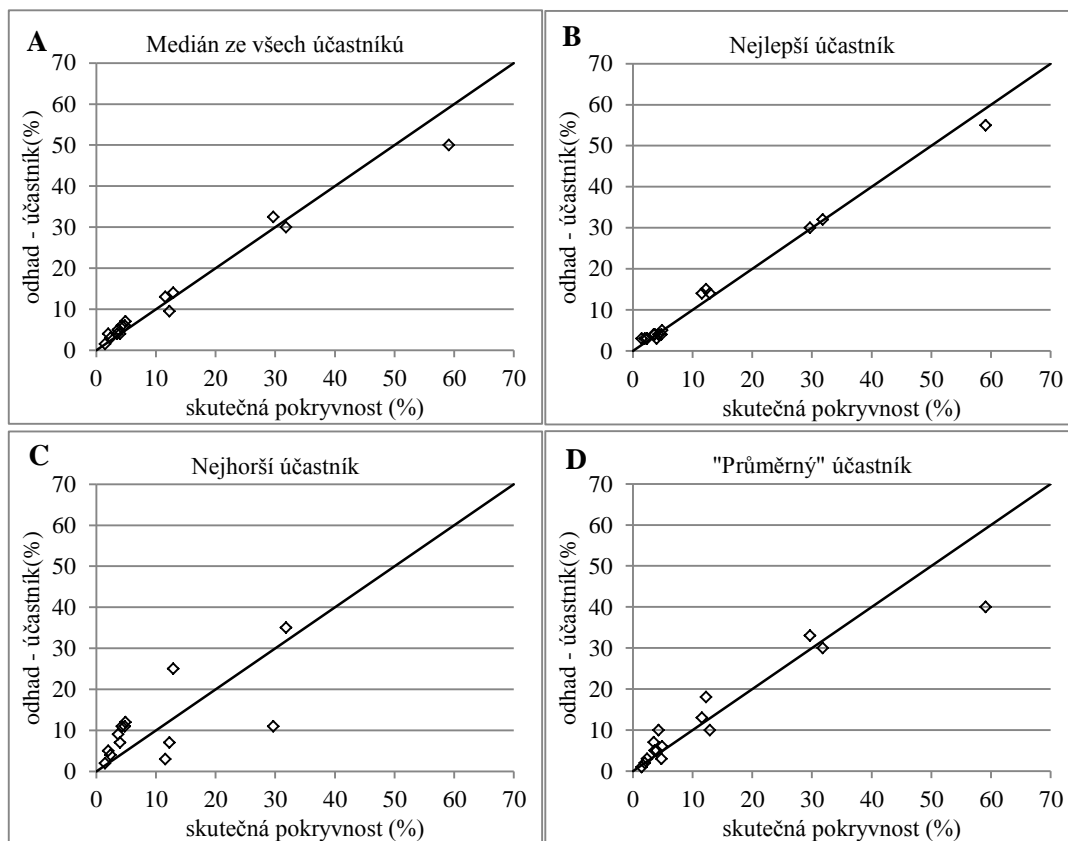
Kromě uvedených zásadních změn byl text celkově revidován. Řada formulací byla zpřesněna, doplněna byla definice abiosestonu, upraveny byly normativní odkazy a kapitola věnovaná přístrojům a pomůckám, přidána byla krátká bibliografie (až úplně na konec za přílohy). Odstraněna byla tabulka 1 původní normy rozdělující nalezené částice podle velikosti na hlinité, jílovité, prachové a jemnozrnny písek - nepoužívala se a navíc ani řádově nekorespondovala s dělením částic do velikostních skupin z jiných publikací. V revidované normě je řešeno i stanovení abiosestonu v konzervovaných vzorcích. Tato skutečnost musí být uvedena v protokolu o zkoušce a v textu normy je upozorněno, že v případě použití konzervačního činidla může dojít ke shlukování koloidních částic, ke vzniku sraženin a ke změně barvy částic abiosestonu. Zařazena byla také nová informativní příloha „Zabezpečování kvality (QA) a řízení kvality (QC) hydrobiologických rozborů“. Tato příloha se příliš neliší od obdobných příloh z ČSN 75 7712 či ČSN 75 7717, vzhledem ke způsobu kvantitativního stanovení (jedná se o odhad) je však méně obsáhlá. Není totiž možné v rámci verifikace metody v jednotlivých laboratořích smysluplně stanovit např. mez detekce a některé další parametry metody.

### Implementace revidované normy v praxi

Revidovanou normu rozhodně nepovažujeme za dokonalou. Pro lepší provádění kvalitativního rozboru by v horizontu několika let (po shromáždění nového fotografického materiálu) bylo vhodné připravit samostatný fotografický atlas, který by byl obsáhlejší a lépe systematicky tříděný než fotografická příloha normy a obsahoval by rovněž vysvětlující texty. Inspirací nám mohou být i některé zahraniční publikace z jiných oborů (např. [4]).

Zda upravený postup pro odhad pokryvnosti zorného pole přinese významné zlepšení výsledků, nejsme schopni odhadnout. Navíc jsme v rámci revize neřešili problematiku nerovnoměrného rozložení částic v počítačové komůrce, které může mít (při nejmenším v některých případech) srovnatelný nebo i větší vliv než samotný způsob odhadu pokryvnosti. Samotný postup v konečné podobě byl ověřován v červnu 2015 v rámci Determinačního kurzu České algologické společnosti, na kterém proběhl modelový pokus (organizace obdobná jako u akcí z roku 2013 [5]) s promítáním obrázků reálných zorných polí s abiosestonem převedených do černobílého binárního obrazu. Tabule na obr. 4 pochází z této akce. Každý účastník měl k dispozici vytištěné nové odhadové tabule a na začátku pokusu byl popsán postup jejich použití. Na podrobnější popis výsledků není v tomto příspěvku prostor, proto je zmíníme jen stručně. Většina účastníků dosáhla velmi dobrých výsledků (obr. 6). Přesto u části z nich se objevily značné rozdíly mezi správnou a odhadovanou pokryvností u většiny zkoušených zorných polí (obr. 6D). Do budoucna považujeme za vhodné připravit větší množství vzorových zorných polí (cca sto), na nichž si bude moci kdokoli nacvičit správný odhad. Předpokládáme, že by tato pole byla volně dostupná na internetu.

Revize metody je však jen jedním krokem směrem k smysluplnějšímu využívání ukazatele abiosestonu ve vodohospodářské a hygienické praxi. Přehodnocení si rozhodně zaslouží rovněž předpisy pro kvalitu pitné a surové vody (vyhlášky č. 252/2004 Sb. a č. 428/2001 Sb. ve znění pozdějších předpisů). Např. limit 10 % pro vodu na kohoutku spotřebitele naprosto nekoresponduje s limitem pro zákal (např. [6]). Přistoupit k úpravám však bude mít smysl jedině v případě, že implementace revidované ČSN 75 7713 v praxi přinese významné zlepšení výsledků ve většině laboratoří, což se, doufáme, ukáže v rámci budoucích kol programu zkoušení způsobilosti.



**Obr. 6.** Na obrázku jsou zobrazeny výsledky pokusu s 21 účastníky Determinačního kurzu České algologické společnosti v červnu 2015. Účastníkům bylo postupně promítnuto 15 tabulí abiosestonu (tři z nich jsou na obr. 3), u kterých měli odhadnout pokryvnost s využitím testování nových odhadových tabulí a upraveného postupu stanovení. Příмка v grafech ukazuje úplnou shodu mezi správnou hodnotou a odhadem. A) medián z hodnot všech účastníků pro každou z odhadovaných tabulí, B) výsledky účastníka s nejmenší odchylkou od správných hodnot, C) výsledky účastníka s největší odchylkou od správných hodnot (vzorek se skutečnou pokryvností 60 % není zobrazen - účastník uvedl výsledek jako > 40 %), D) výsledky účastníka s 11. nejmenší odchylkou od správných hodnot („průměrný“ účastník).

**Poděkování:** Děkujeme všem, kteří se zapojili do připomínkového řízení či jinak vyjádřili svůj názor na metodu a pomohli tak formovat její současnou podobu. Rovněž děkujeme všem respondentům, kteří se zúčastnili testů se zkušebními tabulemi v letech 2013 a 2015.

#### Použitá literatura

- [1] ČSN 75 7713 Jakost vod - Biologický rozbor – Stanovení abiosestonu (1998).
- [2] ČSN 75 7713 Kvalita vod - Biologický rozbor – Stanovení abiosestonu (2015).
- [3] Fremrová L.: Prověření norem ČSN a TNV z oboru jakosti vody – biologické metody. HYDROPROJEKT CZ a.s. 2010
- [4] PETRACO N., KUBIC T. (2004): Color Atlas and Manual of Microscopy for Criminalists, Chemists, and Conservators. CRC Press, 313 s.
- [5] PUMANN P. (2014): Některé aspekty stanovení abiosestonu odhadem pokryvnosti zorného pole. Sborník konference Vodárenská biologie 2014: 15–20.
- [6] PUMANN P., POUZAROVÁ T. (2007): Kvantitativní stanovení abiosestonu. Sborník konference Vodárenská biologie 2007: 19 – 24.
- [7] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ J. (2006): Encyklopedie hydrobiologie. Dostupné on-line na adrese [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_es-006/index.html](http://147.33.74.135/knihy/uid_es-006/index.html).
- [8] SLÁDEČEK V., SLÁDEČKOVÁ A. (1996): Atlas vodních organismů se zřetelem na vodárenství, povrchové vody a čistírny odpadních vod, 1. Díl: Destruenti a producenti, ČSVTS vodohospodářská Praha. 351 s.
- [9] SLÁDEČEK V., SLÁDEČKOVÁ A. (1997): Atlas vodních organismů se zřetelem na vodárenství, povrchové vody a čistírny odpadních vod, 2. Díl: Konzumenti, ČSVTS vodohospodářská Praha. 358 s.