

Paci, paci, pacičky

(o důležitosti používání svorek při počítání v počítacích komůrkách)

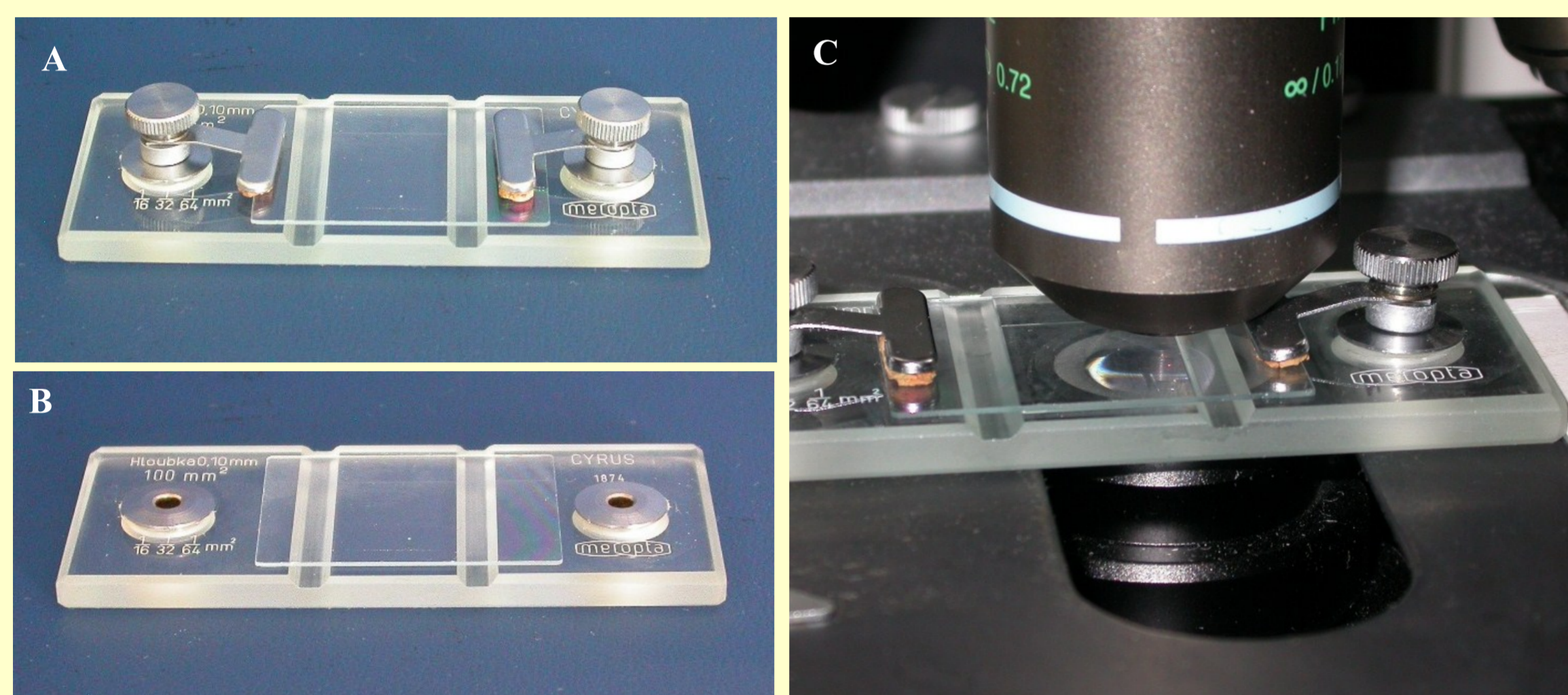
Tereza Pouzarová, Petr Pumann

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42, tel.: 267082220, e-mail: ppumann@szu.cz

Souhrn: U počítacích komůrek se krycí sklo připevňuje svorkami, což však některé laboratoře nedělají. Ze srovnání provedených naší laboratoří na 4 různých vzorcích vyplynulo, že výsledky jsou při práci s komůrkou bez použití svorek oproti standardnímu postupu o několik procent vyšší (102,4 – 109 %). Objem vzorku použitého k plnění komůrky (50 a 100 μ l) neměl na výsledky vliv.

Úvod

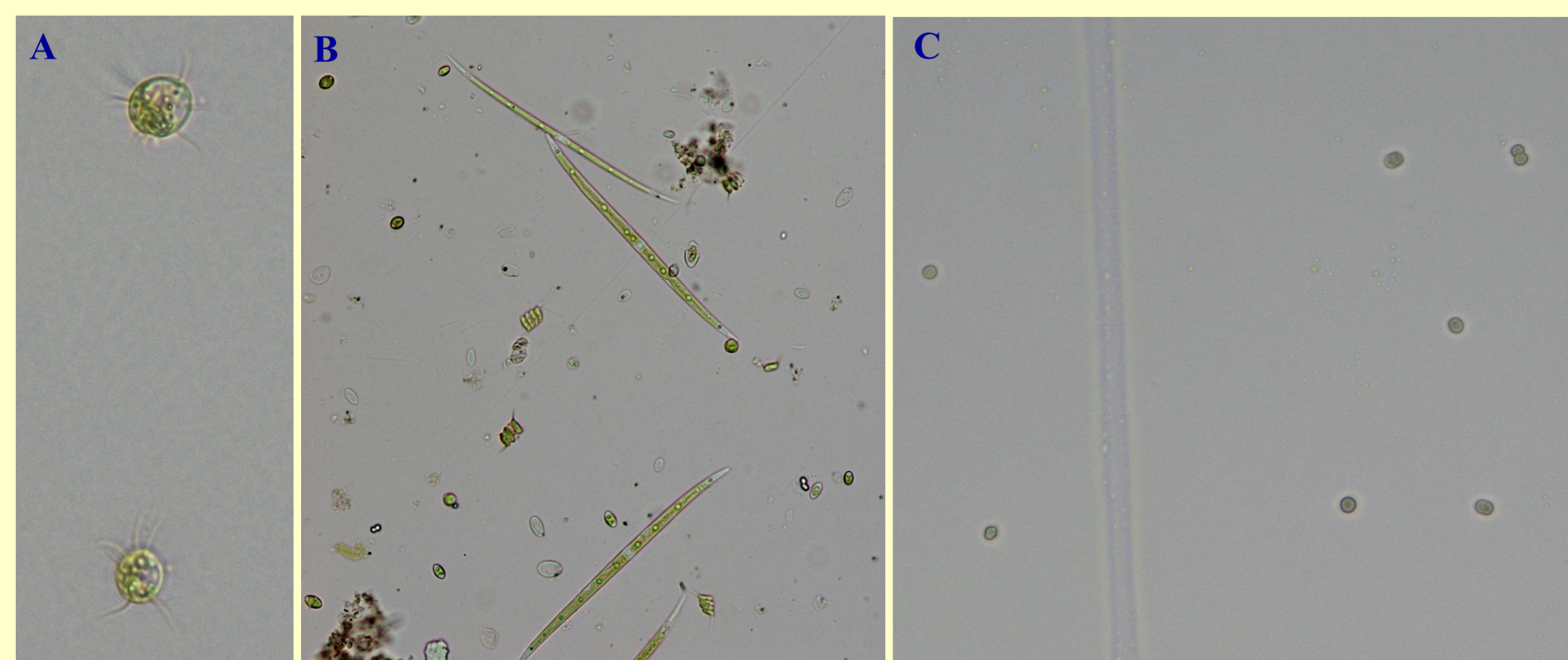
Při revizi ČSN 75 7712 [1] bylo diskutováno, zda je nutné používat při práci s počítacími komůrkami k připevňování krycího skla svorky (obr. 1A). Některé laboratoře totiž z praktických důvodů svorky nepoužívají (obr. 1B). Při práci se širšími objektivy s menší pracovní vzdáleností mohou překážet objektivu ve volném pohybu nad celou plochou mřížky (obr. 1C). Podle informací dr. Havla se výsledky počítání se svorkami a bez nich liší (bez svorek jsou výsledky vyšší) [2]. Dr. Havel se odvolával na svoje starší nepublikované výsledky, které jsou však již v současnosti nedohledatelné [2]. Abychom si udělali představu o míře tohoto ovlivnění, rozhodli jsme se provést na několika modelových vzorcích jednoduché srovnání při počítání vzorku se svorkami a bez svorek. Zkoumali jsme také vliv objemu vzorku kápnutého na mřížku počítací komůrky.



Obrázek 1. Fotografie naplněné komůrky s krycím sklem přichyceným svorkami (A) a bez nich (B). Kolize objektivu 40x a svorek při práci s komůrkou na mikroskopu Nikon E400 (C).

Metody

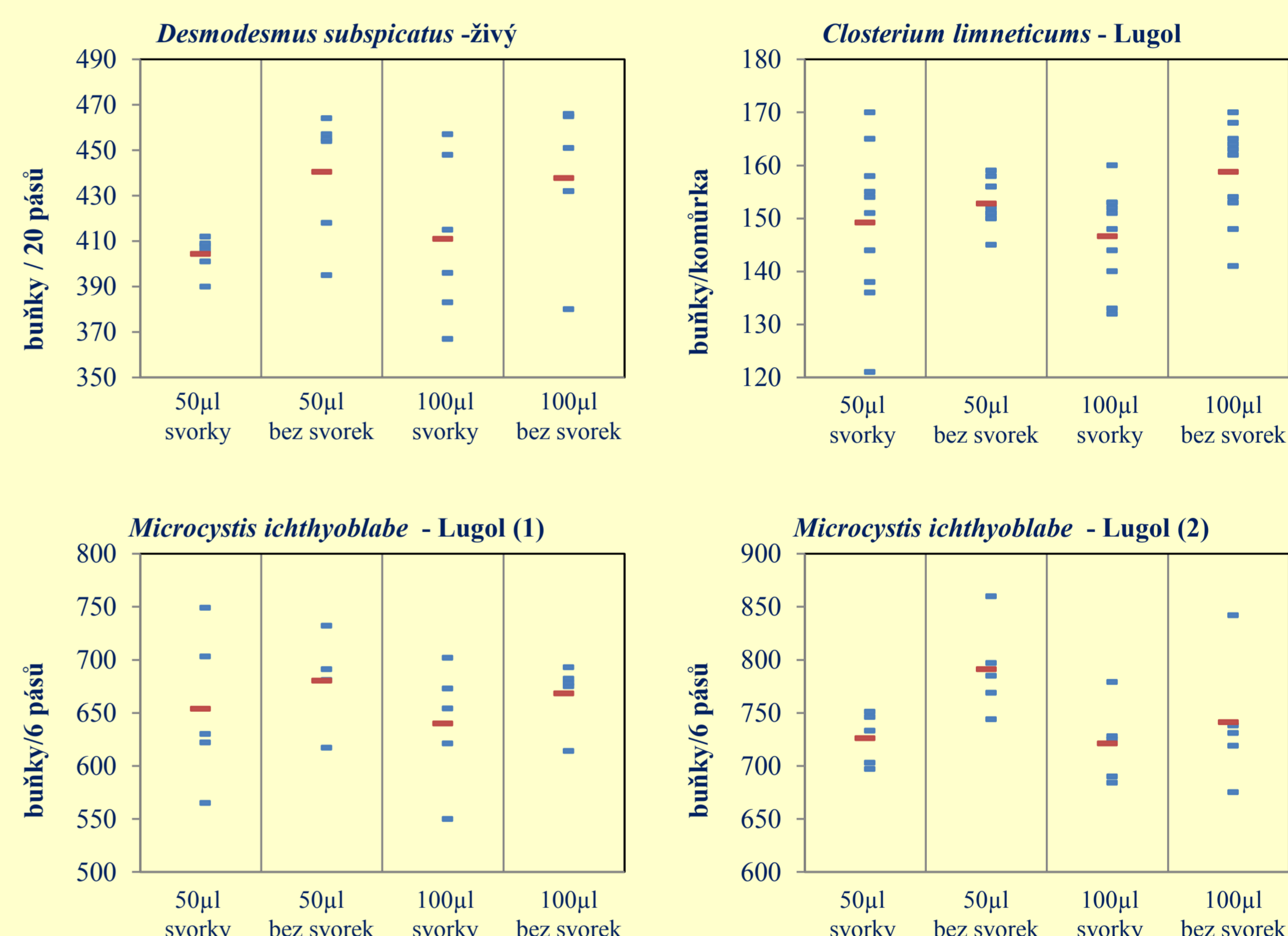
Ze 4 modelových vzorků (živý vzorek laboratorní kultury zelené řasy *Desmodesmus subspicatus*, Lugolem fixovaný vzorek s hojným výskytem krásivky *Closterium limneticum* a dva vzorky fixované Lugolem připravené z velké kolonie *Microcystis* cf. *ichthyoblabe*) jsme po důkladném promíchání odebrali mikropipetou se seříznutou špičkou 50 nebo 100 μ l a káplí tento vzorek na mřížku vyčištěné počítací komůrky Cyrus I. Kapku jsme pak bez prodlení (během několika sekund) přikryli silným krycím sklem, které jsme v polovině případů připevnili svorkami a v polovině případů nechali jen volně položené na komůrce. Přebytný vzorek (pouze s objemem 100 μ l) jsme z kanálků komůrky vyfoukli. Každou ze zkoušených možností (použití svorek a velikost kapky) jsme několikrát (4 – 10 krát) opakovali. Počítání jsme prováděli v mikroskopu Nikon E400 s použitím objektivů se zvětšením 10x a 20x. Propočítávali jsme buď celou plochu komůrky, nebo její část (vždy stejnou). Ke zpracování a statistickému hodnocení dat jsme použili MS Excel 2010 (popisná statistika, T-test).



Obrázek 2. Fotografie použitých taxonů (různá zvětšení): A) *Desmodesmus subspicatus* (živý vzorek), B) *Closterium limneticum* (živý vzorek), C) *Microcystis ichthyoblabe* (Lugolův roztok).

Výsledky a diskuze

Výsledky jednotlivých sérií jsou patrné z tab. 1. Aritmetický průměr z provedených stanovení byl ve všech vzorcích vyšší při práci bez svorek (102,4 – 109 %), i když rozdíly byly statisticky významné ($p < 0,05$) jen ve třech z osmi srovnání. Data (i přes omezený rozsah) podle nás svědčí dost jasně o tom, že práce bez svorek vnáší do výsledků produkovaných laboratoří systematickou chybu. I když tato chyba není velká (do deseti procent), neměly by ji laboratoře ignorovat. Technické problémy kolize svorek s objektivem by pak měly řešit jinak (např. propočítáváním menší plochy komůrky, kde ke kolizi nedochází). Jednou z možností, kterou jsme však zatím neprověřovali (tak nevíme, zda funguje), je nejprve sklíčko standardně upevnit na komůrku svorkami a po tom, co se organismy usadí na mřížce, svorky odstranit.



Obrázek 3. Výsledky jednotlivých měření (modře) a aritmetické průměry (červeně).

Velikost kapky neměla na výsledky významný vliv ani v jednom případě.

Při plnění komůrek vzorkem obsahujícím Lugolem fixovanou sinici *Microcystis* se v některých případech objevovala na mřížce místa s výrazně vyššími počty buněk nebo na krycím skle místa s velkým množstvím přichycených buněk. Příčinu těchto jevů jsme neodhalili, i když některá podezření máme. Nicméně, při zjištění těchto nehomogenit jsme komůrku nepočítali a vždy ji naplnili znovu.

vzorek	velikost kapky způsob plnění	počet stanovení	aritmetický průměr	medián	variální koeficient	srovnání průměrů	
<i>Desmodesmus subspicatus</i> (buňky na 20 pásů)	50 μ l se svorkami	6	404,3	407	1,79%	109,0%*	
	50 μ l bez svorek	6	440,5	454,5	5,71%		
	100 μ l se svorkami	6	411,0	405,5	7,98%		
	100 μ l bez svorek	6	437,7	441,5	6,67%		
<i>Closterium limneticum</i> (buňky na komůrku)	50 μ l se svorkami	10	149,2	152,5	9,34%	102,4%	
	50 μ l bez svorek	10	152,8	151,5	2,70%		
	100 μ l se svorkami	10	146,6	149,5	5,95%		108,3%*
	100 μ l bez svorek	10	158,8	162,5	5,61%		
<i>Microcystis ichthyoblabe</i> (buňky na 6 pásů)	50 μ l se svorkami	5	653,8	630	9,90%	104,0%	
	50 μ l bez svorek	4	680,3	686	6,06%		
	100 μ l se svorkami	5	640,0	654	8,15%		104,4%
	100 μ l bez svorek	5	668,4	678	4,17%		
<i>Microcystis ichthyoblabe</i> (buňky na 6 pásů)	50 μ l se svorkami	5	726,0	733	3,05%	109,0%*	
	50 μ l bez svorek	5	791,0	785	4,90%		
	100 μ l se svorkami	5	721,2	725	4,71%		102,7%
	100 μ l bez svorek	5	741,0	731	7,43%		

Tabulka 1. Srovnání vzorků počítaných v komůrce s krycím sklem upevněným svorkami a s krycím sklem na komůrce jen volně položeným. Čísla v posledním sloupci „Srovnání průměrů“ byla vypočítána jako podíl aritmetických průměrů z výsledků bez svorek a se svorkami vynásobený stem. Hvězdičkou jsou označeny rozdíly, které vyšly pomocí T-testu statisticky významně ($p < 0,05$).

Literatura. [1] ČSN 75 7712 – Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení biosestonu; [2] Havel L. Ústní sdělení ze dne 4.10.2012.

Poděkování. Práce byla provedena v rámci projektu Technologické agentury ČR „Nové Metodické přístupy pro kontrolu a hodnocení povrchových vod ke koupání“ (TA 01020675).