

Československá společnost mikrobiologická, Komise mikrobiologie vody
Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka, v.v.i., oddělení mikrobiologie vody

Sborník referátů přednesených na semináři

Mikrobiologie vody a prostředí 2011



Editor: Dana Baudišová

Tupadly. Motel Kryštof, 19.-21. října 2011

Obsah:

Badurová P., Buriánková I., Brabcová L., Bednařík A., Mach V., Rulík M.: Detekce a vertikální distribuce metanogenních archeí v říčním sedimentu toku Sitka	3
Baudišová D.: Metody mikrobiologických analýz koupacích vod v České republice	6
Brablčová L., Buriánková I., Badurová P. a Rulík M.: Stručný přehled metod pro analýzu společenstva metanogenů v hyporheických sedimentech říčního toku	10
Buriánková I., Brabcová L., Rulík M.: Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) a její využití ve výzkumu metanogenních archeí	13
Cíchová M. a Prokšová M.: Porovnávací štúdia chromogénnych a fluorogénnych médií pre špecifickú detekciu environmentálnych izolátov <i>Escherichia coli</i>	17
Gabriel J., Gryndlerová H., Grynder M.: Záchyt bakterie <i>Asaia lannaensis</i> v pitné balené vodě	23
Kalendová L., Mlejnková H.: Metody a hygienický význam stanovení <i>E. coli</i> O157 v odpadních vodách	26
Konečná J., Mlejnková H.: Využití fluorescenční mikroskopie při kvantifikaci bakterií ve vodách.	30
Matějů L., Štěpánková M.: Porovnání metod stanovení indikátorových organismů v bioodpadech a jejich porovnávací zkoušky	35
Mlejnková H., Slezáková K., Medek P.: Mikrobiální kontaminace toků v oblastech s intenzivním zemědělským hospodařením	42
Podholová E., Lišková P.: Alternativní metodiky stanovení bakterií rodu <i>Salmonella</i>	51
Prokšová M., Cíchová M.: Medzinárodná porovnávací skúška na testovanie metodických postupov na stanovenie <i>Legionella spp.</i> vo vzorkách vody	57
Purkrťová S., Segurová R., Pazlarová J., Demnerová K.: Molekulárně biologické metody v mikrobiologii vody a jejich využití (PCR, genotypizační techniky) pro charakterizaci izolátů salmonel z ČOV	62
Slezáková K., Mlejnková H., Baudišová D.: Lze překonat problémy se stanovením bakterií v pitných vodách pomocí chromogenních půd?	67
Šašek J.: Zdravotní rizika listerií v pitné a rekreační vodě	74

Detekce a vertikální distribuce metanogenních archeí v říčním sedimentu toku Sitka

Badurová P., Buriánková I., Brablčová L., Bednařík A., Mach V., Rulík M.

Katedra ekologie a životního prostředí PřF UP v Olomouci, Laboratoř mikrobiální ekologie vod, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc

V laboratoři mikrobiální ekologie vody se zaměřujeme na biogeochemický cyklus uhlíku a metanogenní systém hyporheických sedimentů malého nížinného toku Sitka pramenící v Hrubém Jeseníku. V podélném profilu (od horního toku po nížinnou část, o celkové délce asi 30km) je zde vytipováno 5 lokalit, které nám již několik let slouží ke studiu produkce a emise metanu. Vzhledem k aktuálnosti problematiky metanu je znalost jeho vzniku a využití v ekosystémech důležitým krokem k pochopení celého jeho cyklu. Přestože ekosystém tekoucích vod, včetně dnových sedimentů, bývá považován za aerobní prostředí, je nutné zdůraznit, že metanogeneze je v tekoucích vodách nejen běžná, ale v některých případech tvoří převládající cestu rozkladu organických látek. Naše předchozí studie prokázaly, že z toku Sitka je ročně uvolněno více než půl metrické tuny metanu.

Ze systematického hlediska řadíme metanogeny do domény Archaea (od euakryot a bakterií se liší složením fosfolipidů v cytoplazmatické membráně a absencí mureinu v buněčné stěně) a kmene Euryarchaeota, jež obsahuje pět hlavních fyziologických skupin: metanogenní archea, extrémně halofilní archea, archea postrádající buněčnou stěnu, síran redukující archea a extrémně termofilní archea metabolizující elementární síru.

Metanogenní archea žijí v anaerobním prostředí a využívají k tvorbě metanu různé typy substrátů. Ve sladkých vodách to jsou zejména acetáty (acetoklastická metanogeneze) nebo oxid uhličitý a vodík (hydrogenotrofní metanogeneze). V mořských ekosystémech pak využívají i methylsulfid, methylamin a methanol. Podíl těchto substrátů na tvorbě metanu se může v různých prostředích výrazně lišit. Ve sladkovodních sedimentech se acetoklastická metanogeneze podílí na produkci metanu ze 30–70%. V mořských ekosystémech se předpokládá, že dominuje hydrogenotrofní metanogeneze. Kromě vodních ekosystémů se metanogenní archea vyskytují v hojné míře v rýžovištích, permafrostu, močálech, hnilých materiálech, odpadních vodách, ale i v gastrointestinálním traktu přežvýkavců, člověka, termitů, či švábů. Mezi nejrozšířenější skupiny patří řády Methanosarcinales (Methanosarcinaceae - acetotrofní i hydrogenotrofní, Methanosaetaceae - acetotrofní) a Methanobacteriales (Methanobacteriaceae - hydrogenotrofní). K detekci fylogenetických skupin metanogenních archeí jsme zvolili metodu fluorescenční in situ hybridizace (FISH), profilovou lokalitou byla lokalita č.IV, která dlouhodobě vykazuje vysoký metanogenní potenciál i enormní koncentrace metanu v intersticiální vodě sedimentů.

Vzorky sedimentu byly odebrány pomocí tzv. freeze-core metody s tekutým dusíkem; po rozmrazení je sediment prosíván sítí s různou porozitou. K dalším analýzám používáme frakci menší než 1mm. Tato frakce je poté sonikována a po přidání detergentu (triton) minimálně 6h třepána. Dále následuje izopyknická hustotní centrifugace, která společně s předchozími metodami slouží k separaci buněk od sedimentu. Vzniklý supernatant je pak použit k vlastnímu fluorescenčnímu barvení. FISH je molekulárně-cytologická metoda hojně využívaná k identifikaci jak bakterií tak archeí. Základem je schopnost DNA sondy značené fluorochromem navázat se ke komplementárnímu úseku cílové DNA s následnou vizualizací a analýzou fluorescenčních signálů ve fluorescenčním mikroskopu. Na našem pracovišti

používáme tyto sondy-próby: MB1174 detekující čeleď *Methanobacteriaceae*, MX825 detekující čeleď *Methanosarcinaceae*, MS821 detekující čeleď *Methanosaetaceae*, ARCH915 detekující zástupce domény *Archaea* a MPB1 detekující skupinu methanogenních archeí.

Z dosavadních výsledků vyplývá, že s rostoucími hodnotami metanu směrem do hloubky sedimentu roste i abundance metanogenů. Otázka diverzity vybraných skupin (*Methanosaetaceae*, *Methanobacteriaceae* a *Methanosarcinaceae*) ve vertikálním profilu není zcela jasně zodpovězena. Prozatím je zřejmé, že dané skupiny se vyskytují ve všech hloubkách v různém zastoupení a žádný trend v závislosti na dané hloubce a měřených parametrech (množství metanu, kyslíku, acetátů...) nebyl prokázán. Tyto skupiny zauímají v průměru asi 10% z celkového počtu buněk detekovaných v 1g mokrého sedimentu. Výsledky nám podávají přehled o celkové abundanci, diverzitě a distribuci metanogenů. Nicméně je třeba získaná data verifikovat a detailněji zpracovat během dalších studií, které nám tak poskytnou další zajímavé informace o této skupině.

Tato studie vznikla za podpory projektu GAČR č. 526/09/1639 s názvem „Biogeochemie metanu a detekce metanogenních a metanotrofních bakterií v říčních sedimentech“ a projektu studentské grantové soutěže č. PrF_2011_030 s názvem „Populace metanogenních archeí a metanotrofních bakterií a jejich prostorová distribuce v hyporheických sedimentech“.

LITERATURA:

- BALCH, W. E., FOX, MAGRUM, L. J., WOESE, C. R., WOLFE, R. S. (1979): Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews* 43: 260-296.
- CONRAD, R. (2007): Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. *Advances in Agronomy*. 96: 1-63.
- FRASE, B.G., WILLIAMS D.D., (1998): Seasonal boundary dynamics of a groundwater/surface-water ecotone. *Ecology*, Vol. 79, No. 6: 2019 -2031.
- SEDLÁČEK, I. (2006): Taxonomie prokaryot, Masarykova univerzita, Brno.

Kontakt na autory:

Katedra ekologie, Přírodovědecká fakulta, UP Olomouc
Šlechtitelů 11, 77900 Olomouc – Holice
email: badurova.pavlina@centrum.cz

Metody mikrobiologických analýz koupacích vod v České republice

Dana Baudišová

Výzkumný ústav vodohospodářský TGM v.v.i., Praha

V České republice je celkem evidováno a monitorováno 186 koupacích míst. Mikrobiologické analýzy v těchto místech v roce 2010 zajišťovalo a výsledky do IS PiVo dodávalo 28 laboratoří ze všech rezortů (Zdravotní ústavy, podniky povodí, vodohospodářské laboratoře a soukromé laboratoře).

Současné právní předpisy sice předepisují metody stanovení mikrobiologických ukazatelů, připouštějí však použití několika různých metodik, které neposkytují zcela srovnatelné výsledky. V některých případech se liší i výsledky získané na různých médiích (různé provenience) se stejným složením. Navíc není zcela dořešena metoda stanovení *Escherichia coli* dle normy ČSN EN ISO 9308-1 (konfirmasi na základě indol testu či β -D-glukuronidázy), která se navíc v současné době reviduje. Do IS PiVo se zatím výsledky stanovení *E. coli* nedávaly, takže praktické provozní výsledky se stanovením tohoto ukazatele v koupacích vodách nejsou valné.

Nejsou údaje o výskytu patogenních bakterií (např. *Campylobacter spp.*) v koupacích vodách a jejich korelace s indikátory fekálního znečištění a o případném hygienickém riziku. Existují i další metodické problémy – nejistoty výsledků, vliv doby transportu (skladování vzorku do počátku zpracování) na výsledek (za dodržení předepsaných podmínek dle ČSN EN ISO 19458), apod. Dotazníkovou akcí (viz dále) bylo zjištěno, že 80 % laboratoří zpracovává odebrané vzorky do 6 hodin po odběru vzorků.

Výše uvedené problémy řeším od letošního roku v projektu TA ČR 01020675, jehož hlavním výstupem má být příprava metodického pokynu (technického doporučení), který bude upřesňovat metody stanovení předepsaných mikrobiologických ukazatelů v koupacích vodách.

Postup řešení v roce 2011

- Zjištění současné situace ohledně používaných metod (dotazníková metoda) a zhodnocení výhod a nevýhod stávajících metod
- Testování vybraných metod stanovení indikátorových mikroorganismů a vybraných patogenů na pilotních profilech (rybník Šeberák, přehrada Orlická – Radava, vodní tok Berounka – Černošice a Otava – Vojník (zde je již začátek vzdutí přehrady Orlická)).

Výsledky hodnocení metod indikátorů fekálního znečištění včetně výsledků pilotních analýz

Bylo dotazováno všech 28 laboratoří, které v ČR nyní analyzují koupací vody, odpovědělo 61% z nich. Metodu dle ČSN 75 7835 pravidelně používá 29 % laboratoří, 53 % laboratoří používá metodu dle ČSN EN ISO 9308-1. Nikdo nepoužívá metodu dle ČSN EN ISO 9308-3 (mikrotitrační destičky) a 29 % má zkušenosti s metodou dle Colilert Quanti-Tray. Zhodnocení metod stanovení *E. coli* a výsledky našich pilotních analýz (9 až 10 odběrů v koupací sezóně) jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tab. 1: Zhodnocení jednotlivých metod stanovení *E. coli*

Metoda	Charakteristika	Výhoda	Nevýhoda
ČSN 75 7835	Pevné médium (mFC), inkubace při 44°C, GLR test	Velmi selektivní a specifická	Není evropská, i když ve světě se používá a je málo citlivá
ČSN EN ISO 9308-1 – laktózový TTC agar a tergitolem	Pevné médium inkubace při 36°C, IND, případně GLR test	?	Vysoká doprovodná mikroflóra, není dořešeno použití GLR testu, nepřesné výsledky kvůli přepočítávání izolovaných kolonií na celkový počet
Navrhovaná revize EN ISO 9308-1, Chromocult Coliformen agar (CCM)	Pevné médium (CCM), inkubace při 36 °C, GLR test	Snad jen že se nemusí přeočkovávat vybrané kolonie a přepočítávat výsledek	Velice citlivá s enormním množstvím doprovodné mikroflóry
Rapid E. coli agar (Biorad), validace AFNOR ke stávající EN ISO 9308-1	Pevné médium (Rapid 2 E. coli agar), inkubace při 36 °C, GLR test	-, - a dále barevně dobře odlišitelná <i>E. coli</i> (lépe než u CCM)	Velice citlivá s enormním množstvím doprovodné mikroflóry
Colilert Quanti-Tray	Tekuté médium, 36°C inkubace, GLR test	Pro <i>E. coli</i> dostatečně specifická, jednoduchá metoda	Není dosud standardizovaná (připravuje se EN ISO 9308-2), není vhodná alternativa pro enterokoky, nejdražší metoda
ČSN EN ISO 9308-3	Tekuté médium, 42°C inkubace, GLR test	Vysoce specifická	Vysoký limit detekce – 15 ktj/ml

Tab. 2: Výsledky stanovení *E. coli* v pilotních profilech (geometrický průměr) jednotlivými metodami. U metod dle ČSN EN ISO 9308-1 je v závorce uveden podíl *E. coli* mezi celkovým počtem kolonií na filtru.

	Otava-Vojníkov	Vltava-Orlík, Radava	Berounka Cernošice	Šeberák
ČSN 757835	429	2,3	216,5	12,6
ČSN EN ISO 9308-1 – TTC	1173 (3 %)	8,2 (0,5 %)	897 (2 %)	38 (1 %)
ČSN EN ISO 9308-1 CCM	779 (5,29%)	3,9 (0,6 %)	462 (2%)	22,8 (0,22 %)
Rapid 2 E.coli agar	837 (13 %)	4 (2 %)	607 (10 %)	17 (2 %)
Colilert QuantriTray	913	7,6	734	32
EN ISO 9308-3	951,2	<15	797	12,9 = <15

Zhodnocení metod stanovení intestinálních enterokoků jednotlivými metodami a výsledky našich pilotních analýz jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4. Všechny laboratoře používají metodu dle ČSN EN ISO 7899-2, ale užívají médium Slanetz-Bartley od různých výrobců. Nikdo nepoužívá metodu dle ČSN EN ISO 7899-1 (mikrotitrační destičky) ani jakýkoliv typ Enterolertu Quantitray.

Tab. 3: Zhodnocení metod stanovení intestinálních enterokoků

Metoda	Charakteristika	Výhoda	Nevýhoda
ČSN EN ISO 7899-2	Pevná média (SB agar a ŽEA), inkubace při 36 a 44°C	Tradiční, obecně dobře zvládnutá metoda	Analýza se stává ze dvou kroků – kultivace a konfirmace, velké rozdíly mezi záchyty na SB různé provenience)
ČSN EN ISO 7899-2	Tekuté médium, GUD aktivita, inkubace při 42°C	Specifická metoda	Vysoký limit detekce - 15 ktj/100 ml
Enterolert Quantitray	Tekuté médium, GUD aktivita, inkubace při 36°C	Jednoduchá	Různé typy Enterolertů, možná falešně pozitivní reakce, není evropská metoda, je nejdražší

Tab. 4: Výsledky stanovení intestinálních enterokoků (geometrický průměr) v pilotních profilech. Byly testovány dva typy Slanetz Bartley agaru (typ B – Biorad a typ H- Himedia), v závorce je uvedeno procento konfirmovaných presumptivních kolonií.

	Otava-Vojníkov	Vltava-Orlík, Radava	Berounka Cernošice	Šeberák
ČSN EN ISO 7899-1	178	<15	137	17
ČSN EN ISO 7899-2 SB typ B	108 (87 %)	5,84 (81 %)	94 (92 %)	22 (98 %)
ČSN EN ISO 7899-2 SB typ H	279 (53 %)	20 (76 %)	126 (51 %)	33 (37 %)
Enterolert E QuantiTray	129	9,9	63	56

Výsledky stanovení vybraných patogenů

Termotolerantní Campylobacter

Termotolerantní druhy rodu *Campylobacter* jsou jedny z mála bakterií, u kterých jsou v současné době popsány epidemie z vodního prostředí ve vyspělém světě. Jedním z důvodů je nízká infekční dávka člověka – stačí stovky bakteriálních buněk.

Termotolerantní *Campylobacter* byl stanoven ve 100 ml vzorku po kultivaci na CCDA agaru, konfirmace byla testy katalázou a oxidázou (pozitivní) a mikroskopicky. Ke konečné konfirmaci byla použita metoda fluorescenční in situ hybridizace- FISH (sonda 5' GCC CTA AGC GTC CTT CCA 3', která by měla být specifická pro 4 druhy *C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. upsaliensis*).

V profilu Orlík- Radava nebyl *Campylobacter* detekován ani jednou, v rybníku Šeberák byl detekován pouze v jednom z odběrů a to v počtu 22 ktj/100 ml, proto vyšla průměrná hodnota 2,44 ktj/100 ml). V říčních profilech byl *Campylobacter* běžně detekován, průměrná hodnota v profilu Otava- Vojníkov byla 20,65 ktj/100 ml a v profilu Berounka – Černošice to bylo 17,64 ktj/100 ml.

Listeria monocytogenes

Byla stanovena ve 100 ml vzorku na ALOA agaru, s konfirmací na Rapid L-Mono agaru. Všechny výsledky byly negativní. V příštím roce bude použito kvalitativní stanovení s pomnožením ve Fraserově médiu.

Salmonella spp.

Byla stanovena pouze dvakrát, a to v objemech 1000 ml metodou dle ČSN ISO 19250. Všechny záchyty byly negativní.

Poděkování

Příspěvek vznikl díky projektu TA ČR 01020675.

Kontakt na autora: oddělení mikrobiologie vody, VÚV TGM, v.v.i., Podbabská 30, 160 00 Praha 6, dana_baudisova@vuv.cz

Stručný přehled metod pro analýzu společenstva metanogenů v hyporheických sedimentech říčního toku

Lenka Brablcová, Iva Buriánková, Pavlína Badurová a Martin Rulík

Katedra ekologie a životního prostředí, Laboratoř mikrobiální ekologie vod, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Hyporheické sedimenty hrají významnou roli v procesu samočištění, jsou vysoce metabolicky aktivní a umožňují existenci širokého spektra mikrobiálních společenstev. Hyporheická zóna obsahuje anoxické a hypoxické kapsy nepravidelně uskupené v povrchovém sedimentu a vytváří tak mozaiku různých typů prostředí. Tato různá prostředí podmiňují existenci rozmanitých mikrobiálních populací, jimiž zprostředkované odlišné mikrobiální procesy mohou v tomto prostředí probíhat současně. Aerobní i anaerobní metabolické dráhy jsou významné nejen pro dynamiku dekompozice, ale i kvůli zvyšování obsahu skleníkových plynů v atmosféře a globálnímu oteplování. Metan je hlavní komponentou v koloběhu uhlíku v anaerobních ekosystémech a zároveň významným skleníkovým plynem. Komplexy molekul organických látek jsou konvertovány do metanu přes složité kooperativní interakce různých typů bakterií a metanogenních archeí a metan se pak vrací zpět do formy oxidu uhličitého díky metanotrofním bakteriím.

Ve výzkumu probíhajícím v Laboratoři mikrobiální ekologie vody, zaměřeném na biogeochemický cyklus uhlíku a metanogenní systém hyporheických sedimentů, používáme široké spektrum detekčních metod. Výstupy těchto metod a jejich vzájemné propojení mohou poskytnout obraz o neporušenosti a fungování společenstva hyporheického sedimentu.

Používané metody můžeme rozdělit do dvou skupin.

První skupinu tvoří metody, které detekují a identifikují konkrétní společenstvo metanogenů hyporheického sedimentu. K detekci fylogenetického složení metanogenního společenstva používáme metodu fluorescenční in situ hybridizace (FISH). FISH má dvě základní fáze, v první jsou buňky s roztokem fluorescenčně značené próby hybridizovány při teplotě specifické pro daný taxon, ve druhé je nenavázaná nebo nespecificky navázaná próba vymyta pracím puřem. Tento krok zajistí spojení proub s komplementárními cílovými úseky. Tyto cílové úseky jsou přitom vybrány tak, aby představovaly specifickou část genomu určitého taxonu, tudíž platí: co próba, to jiný taxon. Zastoupení jednotlivých taxonů ve společenstvu je pak vyjádřeno jako procentuální podíl z celkového počtu buněk ve společenstvu, obvykle identifikovaných pomocí fluorochromu DAPI. Pomocí FISH jsme charakterizovali metanogenní společenstvo od úrovně domény (*Archaea*) až na úroveň čeledí (*Methanosarcinaceae*, *Methanobacteriaceae* a *Methanosaetaceae*).

Pro určení taxonomické diverzity metanogenních archeí jsme nově zavedli metodu denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE). DGGE je moderní technologie umožňující separaci molekul DNA v polyakrylamidovém gelu na základě odlišné sekvence nukleotidů. Třídění fragmentů probíhá v lineárním gradientu denaturačních činidel (zpravidla formamidu a močoviny). Výsledkem je soubor proužků (bandů), podle jejichž množství a intenzity lze stanovit diverzitu společenstva. Předběžné výsledky potvrdily přítomnost metanogenů na studovaných lokalitách, odhad diverzity se pohybuje kolem 10 hlavních taxonů.

Do druhé skupiny metod řadíme metody, které se zabývají obecnou charakteristikou mikrobiálního společenstva hyporheického sedimentu jako celku. Patří sem metody určení

přímých počtů (DAPI), měření aktivity nescifických esteráz (hydrolýza FDA), měření respirační - ETS aktivity (INT, CTC), určení podílu živých a mrtvých buněk (LIVE/DEAD) a stanovení množství polysacharidů. Výše jmenovanými metodami lze popsat procesy fungování rozmanitého společenstva hyporheického sedimentu. Některé metody umožňují detekovat nejen celkovou buněčnou biomasu (DAPI), ale i podíl buněk, které v přírodním prostředí přežívají (LIVE/DEAD) a jaká část z přeživších je schopna aktivně respirovat (CTC). Jiné poskytují informace o schopnosti společenstva vytvářet polymerní substance (stanovení množství polysacharidů), s níž úzce souvisí tvorba biofilmových struktur. V neposlední řadě také podávají obraz o fungování vybraných bakteriálních enzymů (množství spotřebovaného FDA vyjadřuje aktivitu esteráz a množství spotřebovaného INT aktivitu dehydrogenáz) a s nimi souvisejícím potenciálem metabolických procesů. Intenzita metabolických procesů, závislá na celkovém počtu, životaschopnosti a aktivitě společenstva sedimentu je významná nejen pro procesy dekompozice a odbourávání organických látek, ale také pro základní tok energie a koloběh živin v celém ekosystému.

Základem zjišťování přímých počtů je použití fluorochromu DAPI. DAPI je barvivo s modrou fluorescencí, váže se na DNA a počet buněk je pak detekován v epifluorescenčním mikroskopu. Principu detekce aplikovaných fluorochromů pomocí fluorescenční mikroskopie se využívá také u metody LIVE/DEAD, kdy je ke vzorku přidána směs nukleových barviv SYTO 9 a propidium jodid. Barviva pronikají buňkou v závislosti na porušenosti/neporušenosti buněčné membrány a výsledkem je, že se živé buňky zbarví zeleně, zatímco buňky s poškozenými membránami se zbarví červeně.

K měření metabolické aktivity využíváme v naší laboratoři metody založené na detekci aktivity extracelulárních enzymů. K detekci se využívají původně nefluoreskující substráty, u nichž po inkubaci se vzorkem vzniká fluoreskující produkt, detekovatelný mikroskopicky nebo spektrofotometricky. Konkrétně jsme ke stanovení podílu respirujících buněk/respirační aktivity využili jako substrát tetrazoliové soli (CTC, INT). K měření esterázové aktivity slouží jako substrát fluorescein diacetát (FDA). Množství vzniklého produktu (v případě INT a CTC formazánu, u FDA fluoresceinu) tak odpovídá intenzitě metabolické aktivity. Spektrofotometrie se využívá také ke stanovení množství polysacharidů. Základem metody je dehydratace cukrů kyselinou sírovou a kondenzace fenolem za vzniku barevného kondenzačního produktu. Konkrétní výstupy těchto metod byly detekovány na všech zkoumaných lokalitách a vykazují značnou variabilitu.

Literatura:

- Baker, M.A., Dahm, C.N. and Vallet, H.M. (1999): Acetate retention and metabolism in the hyporheic zone of a mountain stream. *Limnol.Oceanogr.* 44:1530–1539
- Giorgio P.A., Williams P.B. (2005): *Respiration in aquatic ecosystems.* Oxford University Press, Oxford UK
- Pernthaler J., Glöckner F.O., Schönhuber W., Amann R.I. (2001): Fluorescence in situ hybridization, vol. 30 in J. Paul (ed.), *Methods in Microbiology- Marine Microbiology.* Academic Press Ltd., London, UK
- Queric N.V., Soltwedel T., Arntz W.E. (2004): Application of a rapid direct viable count method to deep-sea sediment bacteria. *J.Microb.Methods* 57: 351 – 367
- Schimel, J. (2004): Playing scales in the methane cycle: From microbial ecology to the globe. *PNAS* 101,34: 12400-12401

- Tóth L.G. (1993): Measurement of the terminal electron transport system (ETS) activity of the plankton and sediment – International Training Course. Balaton Limnological Res. Inst. of the Hong. Acad. Sci. Hungary.
- <http://ddgehelp.blogspot.com/2005/11/dgge-guide.html>

Tato studie vznikla za podpory projektu GAČR č. 526/09/1639 s názvem „Biogeochemie metanu a detekce metanogenních a metanotrofních bakterií v říčních sedimentech“ a projektu studentské grantové soutěže č. PrF_2011_030 s názvem „Populace metanogenních archeí a metanotrofních bakterií a jejich prostorová distribuce v hyporheických sedimentech“.

Kontakt:

Katedra ekologie a životního prostředí

Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci

Šlechtitelů 11

Olomouc – Holice 786 71

formicula@email.cz,

ivaburiankova@seznam.cz,

badurova.pavlina@centrum.cz,

martin.rulik@upol.cz

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) a její využití ve výzkumu metanogenních archeí

Iva Buriánková, Lenka Brablcová a Martin Rulík

*Katedra ekologie a životního prostředí, Laboratoř mikrobiální ekologie vod,
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci*

Denaturační gradientová gelová elektroforéza je moderní technologie umožňující separaci molekul DNA v polyakrylamidovém gelu na základě odlišné sekvence nukleotidů. Gel obsahuje lineární gradient koncentrace denaturačního roztoku, zpravidla formamidu a močoviny. Pomocí DGGE lze vygenerovat genetický profil neboli tzv. "fingerprint" mikrobiálního společenstva. Sekvence DNA o stejném zastoupení nukleotidů se zastaví na určité pozici v gelu a vytvoří proužky (tzv. "bandy"), které z profilu mohou být extrahovány a pomocí sekvenace (přečtení pořadí nukleotidů v sekvenci) mohou být identifikovány dominantní zástupci mikrobiální populace.

Možnost analýzy celého společenstva má proto využití v mnoha oblastech mikrobiologie, od klinické medicíny po vodárenství. V oblasti mikrobiologie vody je DGGE používaná především pro analýzu málo diverzifikovaných přírodních společenstev. Příkladem může být zhodnocení bioremediace, úprava odpadních i pitných vod, tvorba biofilmů, mikrobiálně indukovaná koroze materiálů nebo identifikace mikrobiální kontaminace komerčních nebo průmyslových produktů. V rámci studia schopnosti bioremediace se obvykle hodnotí podobnost/rozdílnost v mikrobiálním složení společenstva (dominantních skupin bakterií nebo hub aj.) mezi rozdílnými vzorky a pozorují se změny kompozice společenstva v čase nebo vlivem působení jiných faktorů. DGGE může být např. použita pro monitoring podzemních vod k určení odlišnosti dominantních skupin bakterií v kontaminovaném a nekontaminovaném vzorku vody. Protože DGGE poskytuje kvantitativní i kvalitativní informace o společenstvu, může se tedy uplatnit při určování bakteriálních skupin, které jsou stimulovány určitými zásahy jako přidání živin, růstového substrátu nebo třeba antibiotik.

DGGE je jednou z nejužívanějších metod tzv. PAGE (polyakrylamidové gelové elektroforézy). Jedná se o vertikální elektroforézu, kdy použitým elektroforetickým médiem je polyakrylamidový gel. Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje při pokojové teplotě v pufru (TAE) pomocí volných radikálů poskytovaných persulfátem amonným (APS), který způsobuje homolytické štěpení vazeb O-O. K urychlení polymerizace se používá volná zásada TEMED (tetrametylendiamin), který katalyzuje tvorbu volných radikálů persulfátu amonného. Použitá koncentrace akrylamidu se liší podle velikosti separovaných fragmentů DNA. Rozdíl koncentrací denaturačních roztoků závisí na diverzitě společenstva, měl by však tvořit alespoň 10%. Experimentální uspořádání elektroforézy gelu je tzv. plošného typu, neboť gel je rozprostřen v tenké vrstvě mezi skleněnými deskami. Elektroforéza se provádí ve speciálních aparátech, v nichž se nosič se vzorkem k separaci umístí mezi dvě elektrody, mezi nimiž prochází stejnosměrný proud.

K vlastnímu provedení elektroforézy je potřeba dostatečně kvalitní DNA vyizolovaná z původní matrice. Pomocí PCR a speciálně navržených primerů (krátkých úseků DNA) se vyselektují a cyklicky namnoží z celkové genomické DNA jen úseky, které nesou cílovou sekvenci. Tyto úseky pak putují gelem rychlostí určenou její molekulovou hmotností až do

doby, než vstoupí do části gelu s koncentrací denaturačních látek způsobující denuraci dvouvláknové (ds) DNA na jednovláknovou (ssDNA). Rychlost denaturace DNA závisí na počtu vodíkových můstků mezi nukleotidy. Řetězce DNA se od sebe budou snáze oddělovat v místech bohatých na AT páry (spojeny dvěma vodíkovými můstky), zatímco úseky bohaté na GC budou stabilnější (tři vodíkové můstky).

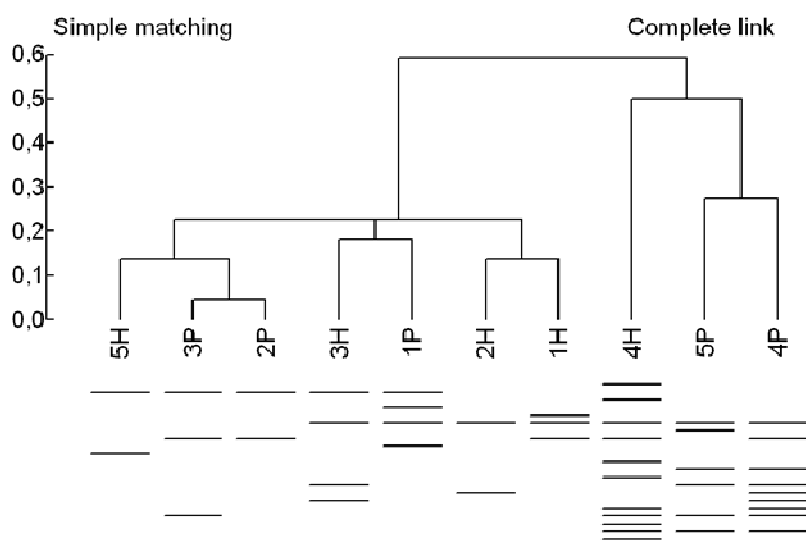
Vznikající denaturovaná vlákna putují při elektroforéze mnohem pomaleji, takže čím snáze se určitý úsek denaturuje, tím blíže startu se vzorek DNA zastaví. Tím se výrazně změní její pohyblivost. Konečná pozice fragmentu DNA v gelu závisí tedy na denaturačním bodu. Protože zcela oddělená ssDNA by vytvořila neostré proužky, používají se při amplifikaci DNA primery s tzv. GC-svorkou. PCR produkt pak obsahuje dvoušroubovice, které mají na jednom konci pouze GC páry; v tomto místě se řetězce denaturují jen nesnadno. DGGE trvá od 3 do 20 hodin, délka se různí podle vzorků a je nepřímě úměrná zvolenému napětí (cca 50 – 250 V). Po nabarvení fluorescenčním barvivem (EtBr, SYBR Green..) je gel vizualizován a obraz zachycen pomocí transiluminátoru s UV zářením a snímací technikou. Pomocí speciálního softwaru je obraz analyzován a lze stanovit diverzitu společenstva podle množství a intenzity vzniklých proužků (bandů), z nichž každý představuje určitou mikrobiální skupinu společenstva.

Variantou DGGE je teplotní gradientová gelová elektroforéza (TGGE). Tato metoda je schopná na základě chování molekul v lineárně rostoucím teplotním gradientu separovat rozdílné molekuly nejen dle náboje a velikosti, ale i v závislosti na konformačních změnách. Na rozdíl od DGGE zde denuraci nezpůsobuje koncentrace denurátu, ale mění se teplota. Pomocí TGGE se nedosahuje takové citlivosti jako DGGE, tato metoda je proto méně používaná.

Na poli mikrobiální ekologie má denaturační gradientová gelová analýza, vzhledem k vysoké míře nekultivovatelnosti kmenů z přírodních vzorků, opravdu široké využití. Často se jako cílové sekvence používají konzervativní fragmenty genů, kódující ribozomální RNA v 16S (tzv. malá ribozomální podjednotka) a které jsou přítomny v buňce v mnohem vyšším množství než DNA, které je kóduje. Podle postavení a množství bandů lze vizualizovat variabilitu v genetické mikrobiální diverzitě a provést stanovení odhadu bohatství a zastoupení hlavních skupin společenstva. V současnosti vzniká velké množství studií zaměřených na DGGE funkčních genů (tj. geny zapojené např. do redukce síry, fixace dusíku, oxidace amoniaku nebo produkce metanu bakterií/archeí), které ukazují, že lze získat informace o mikrobiální funkci i fylogenezi současně.

V rámci výzkumu probíhajícím v Laboratoři mikrobiální ekologie vody, zaměřeného na biogeochemický cyklus uhlíku a metanogenní systém hyporheických sedimentů, zavádíme DGGE jako jednu z metod, které by nám mohly pomoci odhalit taxonomické bohatství a ekologické funkce metanogenních archeí v říčních sedimentech. Po překonání technických nástrah a náročné optimalizaci (která věrně provází úpravu přírodních vzorků pro potřeby molekulární biologie) jsme dospěli k prvotním výsledkům. K analýze byly použity vzorky z pěti lokalit podélného profilu říčky Sitky (od horního úseku toku po nížinnou část, o celkové délce asi 30 km) a DGGE primery 0357F (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGGGGG G CCC TAC GGG GCG CAG CAG-3') a 0691R (5'-GGATTACARGATTTAC-3'). Podle předběžných výsledků byla přítomnost metanogenů potvrzena na všech lokalitách do hloubky 50 cm, rozdělených na „povrchový profil“ 0-25 cm a „hloubkový profil“ 25-50 cm. Rozdíl v celkové diverzitě metanogenů mezi lokalitami není markantní, liší se ovšem intenzitou zastoupení dominantních (reprezentativních) taxonů. Pomocí shlukové analýzy (obr. 1), zpracované v programu GEL2k metodou simple match - complete link, (Svein Norland, Dept. Of Biology, University of Bergen), byly designovány dva typy lokalit, lišící se množstvím dominantních

metanogenních taxonů. První skupinu tvoří lokalita 4 (povrch i hloubka) a 5 (povrch) s výrazně vyšším počtem dominantních taxonů (6-11 taxonů), druhou skupinu pak ostatní lokality (2-4 taxony). Současně nebyl prokázán signifikantní rozdíl v zastoupení mezi hloubkou a povrchem sedimentu. Odhad diverzity se pohybuje kolem 10 reprezentativních taxonů, což koresponduje s předběžnými výsledky klonování a sekvenace, které odkazují na fylogenetickou spjitost s rody *Methanobacterium*, *Methanosarcina* a *Methanosaeta*. Z hlediska množství i intenzity zastoupení metanogenů se jako nejbohatší jeví lokalita č. 4 (hloubka i povrch), ležící v nížinné části toku v zemědělsky intenzivně využívané krajině, kde dochází k ukládání organického materiálu z horních částí toku. Toto zjištění je podpořeno výsledky detekce metanogenů pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH), zároveň zde byla naměřena největší produkce metanu ze dna toku, stejně jako nejvyšší metanogenní potenciál. Předběžné výsledky poskytují zajímavé informace o struktuře, diverzitě a funkci systému metanogenních archeí v našich tocích, je však třeba získaná data verifikovat a detailněji zpracovat během dalších studií. Tento výzkum byl podpořen GAČR v rámci projektu č. 526/09/1639 „Biogeochemie metanu a detekce metanogenních a metanotrofních bakterií v říčních sedimentech“.



Obr.1. Shluková analýza zastoupení hlavních skupin metanogenních archeí na podélném profilu říčky Sitky

Poděkování

Tento výzkum byl podpořen GAČR v rámci projektu č. 526/09/1639 „Biogeochemie metanu a detekce metanogenních a metanotrofních bakterií v říčních sedimentech“.

Literatura:

Osborn A. M., Smith C. J., 2005. Molecular Microbial Ecology. Taylor & Francis Group, New York USA.

Willey J., Sherwood L., Woolverton C (2008): Prescott - Harley - Klein's Microbiology (7 Rev Ed.), McGraw-Hill Education - Europe (United States)

<http://ddgehelp.blogspot.com/2005/11/dgge-guide.html>

Kontakt na autory: Katedra ekologie, Přírodovědecká fakulta, UP Olomouc

Šlechtitelů 11, 77900 Olomouc – Holic

ivaburianskova@seznam.cz, formicula@email.cz, martin.rulik@upol.cz

Porovnávacie štúdiá chromogénnych a fluorogénnych médií pre špecifickú detekciu environmentálnych izolátov *Escherichia coli*

Marianna Cíchová a Miloslava Prokšová

Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábřežie armádneho generála L. Svobodu 5,
812 49 Bratislava, tel. č. 0259343401, 0259343421,
cichova@vuvh.sk, proksova@vuvh.sk

Medzi základnými analýzami na zistenie mikrobiologickej kvality vody je stanovenie indikátorov fekálneho znečistenia vody. K týmto indikátorom patrí skupina koliformných baktérií a najmä *Escherichia coli*. Biotop baktérie *Escherichia coli* je viazaný výlučne na tráviaci trakt cicavcov, často vo veľmi vysokých počtoch až 10^9 baktérií/g faeces. Je to jediný druh z čelade *Enterobacteriaceae*, ktorý má výlučne fekálny pôvod a je teda považovaný za najvhodnejší a zároveň špecifický indikátor fekálnej kontaminácie (Warnes a Keevil, 2004). I napriek tomu, že *E. coli* žije ako komenzál hrubého čreva cicavcov, môže byť pôvodcom rôznych ochorení. Všetky kmene *E. coli* sú schopné spôsobovať sekundárne infekcie, ktoré sú pôvodcom hnačkových ochorení, infekcií močových ciest ako aj nozokomiálnych infekcií vrátane septikémií a meningitíd. V súčasnej dobe je veľká pozornosť venovaná vysoko patogénnym kmeňom *Escherichia coli*, ktoré produkujú shiga toxín (STEC, tiež nazývané enterohemoragické *Escherichia coli* - EHEC) ako aj ďalšie faktory virulencie. Shiga toxín produkujúce kmene *E. coli* sú pôvodcami enterických infekcií a hemoragických kolitíd s ťažkými abdominálnymi kŕčmi a ochorenie môže mať v niektorých prípadoch život ohrozujúce komplikácie, ako hemolyticko-uremický syndróm (HUS), sprevádzaný akútnym renálnym zlyhaním. Podobne ako u šigelózy stačí na vyvolanie infekcie infekčná dávka 10^2 až 10^3 . Najrozšírenejším celosvetovým patogénom z tejto skupiny kmeňov *E. coli* je v súčasnosti sérotyp *E. coli* O157:H7. V posledných rokoch sa objavili prípady výskytu infekcií vyvolaných týmto patogénom aj v súvislosti s prenosom prostredníctvom fekálne znečistenej pitnej a úžitkovej vody. Najväčšie ohrozenie týmto patogénom je možné v krajinách s bohatou živočíšnou výrobou a difúznym znečistením.

Norma STN EN ISO 9308-1 na stanovenie *E. coli* a koliformných baktérií membránovou filtráciou definuje *E. coli* ako koliformnú baktériu, ktorá fermentuje laktózu s produkciou kyseliny a plynu pri teplote 36 ± 3 °C za 21 h \pm 3 h a navyše produkuje indol z tryptofánu pri teplote $44,0 \pm 0,5$ °C za 21 h \pm 3 h. Štandardná skúška pre stanovenie *E. coli* opisovaná v uvedenej norme je teda založená na metóde membránovej filtrácie s následnou kultiváciou na selektívnom laktózovom médiu a ďalšej biochemickej charakterizácii (cytochrómoxidázový test, test na produkciu indolu) typických laktóza-pozitívnych kolónií. Mnohé kmene *E. coli* však nie je možné fenotypicky odlišiť od ostatných koliformných baktérií, niektoré kmene nie sú termotolerantné, neskvajú laktózu a neprodukujú plyn a indol (Schets a Havelaar, 1991).

V posledných rokoch sa začínajú zvyšovať požiadavky na spoľahlivú detekciu bakteriálnych fekálnych indikátorov vo vodách, pričom je potrebné nájsť takú charakteristiku (najlepšie biochemickú), ktorá by spoľahlivo odlišila cieľový mikroorganizmus od sprievodnej mikroflóry. Tieto požiadavky by mohli spĺňať špecifické enzýmy, ktorých aktivita môže byť detekovaná priamo prostredníctvom presne definovaných substrátov. Nová generácia metód

s použitím definovaných substrátov teda vychádza z novej definície koliformných baktérií a *E. coli*, ktorá je zameraná na priamu detekciu enzýmov β -D-galaktosidázy a β -D-glukuronidázy.

Nová generácia kultivačných médií určených na stanovenie *E. coli* využíva práve schopnosť produkcie špecifického enzýmu β -D-glukuronidázy (GUD) v prítomnosti špecifického substrátu. Enzým GUD je produkovaný u 94–96 % kmeňov *E. coli*, ale aj u niektorých kmeňov rodu *Salmonella* spp. (17-29 %), *Shigella* spp. (40-67 %) a *Yersinia* spp. (Hartman, 1989). Niektorí autori uvádzajú prítomnosť GUD-pozitívnych kmeňov aj u ďalších druhov ako *Citrobacter freundii* (Gauthier a kol., 1991) *Klebsiella oxytoca*, *Serratia fonticola* a *Yersinia intermedia* (Alonso a kol., 1998). Ďalšie druhy rodu *Escherichia* ako aj niektoré patogénne kmene *E. coli* (*E. coli* O157:H7) pravdepodobne neprodukuje tento enzým (Frampton a Restaino, 1993). Produkcia a aktivita enzýmu GUD je detekovaná prostredníctvom štiepenia rôznych chromogénnych a fluorogénnych substrátov v rôznych médiách ako napr. p-nitrophenol- β -D-glukuronid (PNPG), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronid (X-GLUC) ako aj 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glukuronid (MUG).

Fluorogénny substrát MUG je hydrolyzovaný enzýmom GUD s produkciou fluoreskujúceho produktu, ktorý je viditeľný v UV svetle (366 nm). Substrát MUG je súčasťou viacerých tekutých kultivačných médií ako Lauryl sulfate broth, m-Endo broth, EC broth, Brila-broth, DEV-lactosepepton-broth a LMX broth. Pevné kultivačné médiá s obsahom substrátu MUG je možné nájsť pod názvom Violet red bile agar, ECD-agar alebo Fluorocult. Médium Fluorocult (Merck) je často používané médium na detekciu *E. coli* v liekoch (Huang a kol., 1994), v potravinách živočíšneho pôvodu (Bredie a de Boer, 1992), v klinických vzorkách (Mori et al., 1991), v mlieku a mliečnych produktoch (Hahn a Wittrock, 1991) ako aj v kúpacích vodách (Havemeister, 1991). Minimálna koncentrácia substrátu MUG v médiách pre indikačné rozlíšenie *E. coli* bola stanovená na 50 mg/ml. Okrem koncentrácie substrátu je dôležitým faktorom detekcie aj hodnota pH média, ktorá by mala byť mierne alkalická. Alkalické prostredie média je nevyhnutné pre vytvorenie typickej modro-bielej fluorescencie vzniknutého produktu. Výhodou použitia substrátu MUG je aj skutočnosť, že môže byť sterilizovaný spolu s ostatnými zložkami média a navyše dodnes neboli zaznamenané prípady inhibičného vplyvu tohto substrátu na rast *E. coli*. Na druhej strane, prítomnosť substrátu MUG v pevných kultivačných médiách môže byť niekedy nevýhodou z dôvodu rýchlej difúzie fluorescencie z kolónií do okolitého agarového média. Metódy s použitím fluorogénneho substrátu na detekciu *E. coli* sú citované v normách na detekciu *E. coli* najmä v potravinách ako mlieko, mäso ale aj na detekciu koliformných baktérií a *E. coli* vo vodách v norme STN 75 7841 Stanovenie koliformných baktérií a *Escherichia coli* metódou definovaného substrátu.

Detekciu enzýmu GUD je možné použiť aj v chromogénnych médiách ako je napr. TBX Agar. TBX médium je modifikáciou média Tryptone bile agar, do ktorého bol pridaný špecifický substrát 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronid (X-GLUC) na detekciu enzýmu GUD. Enzým GUD hydrolyzuje chromogénny substrát X-GLUC s produkciou chromofóru, ktorý zapríčiňuje modro-zelené sfarbenie kolónií *E. coli*. Použitie média je odporúčané aj niektorými normami na detekciu *E. coli* v potravinách a krmivách.

Keďže koliformné baktérie ako aj *E. coli* sú považované za dôležité indikátory znečistenia vo vodách, simultánna detekcia oboch indikátorov zostáva stále aktuálna. V súčasnosti je v mikrobiologickej praxi využívaná celá paleta komerčne dostupných médií, ktoré umožňujú spoločnú detekciu koliformných baktérií a *E. coli*. Tieto médiá využívajú rôzne typy

definovaných substrátov na detekciu oboch enzymatických aktivít: β -D-galaktozidázy na detekciu koliformných baktérií a β -D-glukuronidázy na detekciu *E. coli*. (Manafi, 1996). Prítomnosť enzýmu β -D-galaktozidázy na detekciu koliformných baktérií je detekovaná pomocou hydrolýzy substrátov ako o-nitrophenyl- β -D-galaktopyranozidu (ONPG), p-nitrophenyl- β -D-galaktopyranozidu (PNPG), 6-bromo-3-indolyl- β -D-galaktopyranozidu (Salmon-Gal), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranozidu (XGAL) a ďalších. Prídavok niektorých zlúčenín ako 1-isopropyl- β -D-thiogalaktopyronozidu (IPTG) do média (Manafi, 1995) môže významne ovplyvniť aktivitu enzýmu prostredníctvom zvýšeného transportu enzýmu ako aj substrátu cez vonkajšiu membránu bunky.

Z komerčne dostupných, tekutých médií na simultánnu detekciu oboch indikátorov je v súčasnosti známy systém Colilert (IDEXX), ktorý obsahuje substráty ONPG/MUG. Z ďalších médií bežne používaných na simultánnu detekciu oboch indikátorov sú komerčne dostupné systémy ako LMX[®] broth a ReadyCult[®] so zložením detekčných substrátov Xgal/MUG ako aj Chromocult coliforms agar (CCA) s obsahom chromogénnych substrátov Salmon-GAL a X-GLUC.

Dostupnosť nových, alternatívnych metód detekcie indikátorov vo vodách na komerčnom trhu ešte nemusí znamenať úspešné zavedenie do laboratórnej praxe. Európska smernica pre pitnú vodu (EUDWD) umožňuje použiť okrem referenčných ISO metód aj iné alternatívne metódy za predpokladu, že budú vykazovať vyššie alebo prinajmenšom rovnaké výťažnosti ako u referenčných metód. V súvislosti s možnosťami použitia alternatívnych metód bolo vypracovaných veľké množstvo validačných štúdií, ktoré porovnávajú vlastnosti referenčnej metódy s novými alternatívnymi metódami s použitím fluorogénnych a chromogénnych médií z hľadiska špecificity, výťažnosti, konfirmačných stupňov ako aj inhibície rastu sprievodnej mikroflóry.

V práci autorov Mavridou a kol. (2010) bolo porovnávaných 5 rôznych alternatívnych kultivačných metód na detekciu *E. coli* s laktózovým TTC médiom s Tergitolom 7 s prídavkom dodatočného konfirmačného testu na detekciu enzýmu β -D-glukuronidázy. Výsledky boli vyhodnotené na základe štatistickej analýzy priemerných relatívnych rozdielov potvrdených počtov podľa ISO 17994. Metódy s použitím médií Chromocult Coliform Agar, Membrane Lauryl Sulfate Agar (inkubačná teplota 44 °C) a TBX medium (inkubačná teplota 44 °C) nevykazovali rozdiely v porovnaní s TTC Tergitolom 7. Metódy mFC médium (inkubačná teplota 44 °C) a Colilert 18/ QuantiTray poskytovali signifikantne vyššie počty *E. coli* v porovnaní s TTC Tergitolom 7.

V práci autorov Ramteke a kol. (2001) bol v rámci porovnávacieho testu fluorogénnych a chromogénnych médií na detekciu *E. coli* detekovaný vysoký stupeň falošne negatívnych výsledkov. Zo 7 testovaných médií až 5 fluorogénnych médií vykazovalo 32 až 48 % výskyt falošne negatívnych výsledkov v dôsledku zlyhania detekcie enzýmu GUD. Autori poskytli niekoľko možností pre vysvetlenie nedostatočnej expresie uvedeného enzýmu na testovaných médiách: neprítomnosť permeáz, ktoré sa podieľajú na transporte glukuronidového substrátu cez bunkové membrány, zloženie kultivačného média a najmä obsah selektívnych zložiek, inkubačný čas a teplota ako aj pH média. Z výsledkov porovnávania médií bola optimálna expresia enzýmu GUD detekovaná v médiách s obsahom sorbitolu a tryptofánu. Prítomnosť deoxycholátu sodného v médiu signifikantne zvyšovala aktivitu enzýmu, pravdepodobne v dôsledku zvýšenej permeability buniek (Fujisava a Mori, 1997).

Práca autorov Fricker a kol. (2008) bola zameraná na porovnanie štandardnej metódy detekcie *E. coli* s použitím dvoch odlišných inkubačných teplôt 36 °C a 44 °C ako aj na porovnanie s metódou definovaného substrátu pre testovanie dvoch konfirmačných postupov. S použitím konfirmačného postupu produkcie indolu z tryptofánu pri 44 °C podľa STN EN ISO 9308-1 boli najvyššie počty *E. coli* detekované štandardnou metódou pri 36 °C. Opačná situácia nastala, keď bol použitý alternatívny konfirmačný test (produkcia GUD), najvyššie počty *E. coli* boli detekované s použitím Colilertu a najmenšie počty štandardnou metódou pri 36 °C. Použitie štandardnej metódy s TTC médiom pri 36 °C a konfirmačným testom produkcie indolu detekovalo o 29 % viac *E. coli* v porovnaní s použitím alternatívneho konfirmačného testu. Pri zmene primárnej inkubačnej teploty štandardnej metódy z 36 °C na 44 °C, rozdiely medzi potvrdenými *E. coli* identifikovanými s použitím dvoch rozdielnych konfirmačných procedúr dosahovali iba menej ako 1 % a teda neboli štatisticky významné. Pre Colilert bol detekovaný už štatisticky významný rozdiel 2,6 %, pričom vyšší konfirmačný stupeň bol detekovaný pre alternatívny konfirmačný postup.

V práci autorov Venkateswaran a kol. (1996) z celkového počtu 200 izolátov *E. coli* iba 1% neprodukovalo enzým β -D-glukuronidázu a iba 2,2% non-*E.coli* izolátov produkovalo tento enzým. Práca autorov Cakir a kol. (2002) poukázala na skutočnosť, že nemá význam používať konfirmačný test na produkciu indolu ak izolát produkuje enzým β -D-glukuronidázu, pretože viac ako 90% GUD-pozitívnych organizmov produkuje zároveň aj indol.

Cieľom našej práce bolo odskúšanie doplňujúcej metodiky štandardného stanovenia *Escherichia coli* pomocou detekcie enzýmu β -D-glukuronidázu, ktorá je v súlade s aktuálnou opravou normy STN EN ISO 9308-1 a porovnanie výsledkov po doplňujúcej konfirmácii s ďalšími alternatívnymi metódami detekcie *E. coli*. Aktuálna norma STN EN ISO 9308-1 odporúča použitie prídavného testu na detekciu enzýmu β -D-glukuronidázu pre znižovanie počtu falošne pozitívnych výsledkov v súvislosti s častým výskytom indol-pozitívnych kmeňov *Klebsiella oxytoca*. Výsledky z testovania nebolo možné porovnať s použitím štatistického vyhodnotenia z dôvodu malého počtu výsledkov v štatistickom súbore.

Na detekciu prítomnosti enzýmu β -D-glukuronidázy ako alternatívneho konfirmačného testu boli testované dve médiá :

- Fluorocult LMX bujón (Merck, chromogénne/fluorogénne médium)
- Brila Broth (Merck, chromogénne/fluorogénne médium)

Referenčná metóda s použitím laktózového TTC agaru s tergitolom 7 bola porovnávaná s ďalšími metódami s použitím médií :

- Membrane Faecal Coliform medium (mFC, laktózové médium)
- Chromocult Coliform agar (Merck, chromogénne médium)
- Colilert 18/Quantitray (IDEXX Colilert-18, chromogénne/fluorogénne médium)

Pri výbere médií na testovanie konfirmačného testu na detekciu β -D-glukuronidázy sme vychádzali z výsledkov niektorých štúdií (Ramteke a kol, 2001), ktoré popisovali vysokú špecifickosť a citlivosť testovaných médií. I napriek uvedeným tvrdeniam v práci, médium Brila Broth poskytovalo pri našom testovaní veľmi slabú detekčnú reakciu fluorescencie, ktorej rozlíšenie bolo ovplyvnené vysokou subjektivitou laboratórneho pracovníka. Testovanie média bolo pre nejednoznačnosť výsledkov vylúčené. Konfirmácia izolátov získaných na jednotlivých médiách bola robená iba s použitím média Fluorocult LMX broth. Médium umožňuje detekciu troch enzýmov: β -D-galaktózidázy, β -D-glukuronidázy a tryptofanázy do 24 hodín pri teplote 36 °C.

Analýzovaný súbor vôd bol zatiaľ spracovaný s použitím 15 vzoriek povrchových vôd. Izoláty z jednotlivých médií boli potvrdzované indolovým testom (tryptónová voda) a β -D-glukuronidázovým testom (LMX bujón). Celkovo bolo potvrdených 86 izolátov prezumptívnych *E. coli*. Pre overenie špecificity metód a potreby potvrdzovať izoláty bolo vybraných 56 izolátov z rozdielnych primárnych izolačných médií na dodatočnú identifikáciu biochemickým testom Enterotestom. Na identifikáciu boli vybrané izoláty s rôznymi kombináciami dvoch fenotypických charakteristík - produkcia indolu (IND) a produkcia glukuronidázy (GUD). Izoláty s fenotypickým prejavom IND+ GUD+ boli všetky identifikované ako *E. coli*. Izoláty s fenotypom IND+ GUD- boli identifikované ako *Klebsiella oxytoca* (90 %). Z izolátov získaných na TTC pri 36 °C a ktoré boli IND+ iba 56 % bolo biochemicky identifikovaných ako *E. coli* a teda až 44 % IND+ izolátov z TTC pri 36 °C môže predstavovať nesprávne identifikované *E. coli*. Pri pozmenení inkubačnej teploty na 44 °C bola detekcia izolátov s fenotypom IND+ GUD- zaznamenaná ojedinele, pravdepodobne v dôsledku potlačenia rastu falošne pozitívnych *E. coli* príslušnou teplotou 44 °C. V prípade Colilertu-18 iba 3,4 % GUD+ izolátov nebolo identifikovaných ako *E. coli*. Všetky tieto izoláty boli následne identifikované ako *Citrobacter* spp.

I keď médium mFC neposkytovalo najvyššie počty *E. coli* pre ani jeden z konfirmačných testov, všetky izoláty *E. coli* izolované na tomto médiu vykazovali pozitivitu produkcie β -D-glukuronidázy na 100 %. Zvýšená špecificita stanovenia *E. coli* pri teplote 44 °C môže byť pravdepodobne vyvolaná zvýšenou expresiou niektorých enzýmov participujúcich pri hydrolýze laktóзовého substrátu pri uvedenej teplote 44 °C.

Predbežné výsledky nášho testovania naznačili potrebu rozsiahlejšieho porovnávania a zároveň testovania na rôznych typoch vzoriek vôd. Navyše pre overenie konfirmácii budú získané izoláty podrobené aj molekulárnej detekcii s použitím PCR reakcie na detekciu *E. coli*.

Použitá literatúra

- Alonso, J.L., Soriano, K., Amoros, I., Ferrus, M.A., 1998. Quantitative determination of *E. coli* and fecal coliforms in water using a chromogenic medium. *J. Environ. Sci. Health* 33, 1229–1248.
- Bredie, W.L., de Boer, E., 1992. Evaluation of the MPN, Anderson-Baird-Parker, Petrifilm *E. coli* and Fluorocult ECD method for enumeration of *E. coli* in foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 16, 197–208.
- Cakir, I., Dogan, H. B., Baspinar, E., Keven, F. & Halkman, A. K. 2002 The need for confirmation in coliform and *E. coli* enumeration foods. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 26, 1049–1053.
- Frampton, E.W., Restaino, L., 1993. Methods for *E. coli* identification in food, water and clinical samples based on β -glucuronidase detection. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 223–233.
- Fricke C. R., Bullock S., Murrin K. and Niemela S. I. a kol. 2008 Use of the ISO 9308-1 procedure for the detection of *E. coli* in water utilizing two incubation temperatures and two confirmation procedures and comparison with defined substrate technology. *Journal of Water Health*, p.389-307.
- Gauthier, M.J., Torregrossa, V.M., Babelona, M.C., Cornax, R., Borrego, J.J., 1991. An intercalibration study of the use of 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide for the specific enumeration of *E. coli* in seawater and marine sediments. *Syst. Appl. Microbiol.* 14, 183–189.
- Hahn, G., Wittrock, E., 1991. Comparison of chromogenic and fluorogenic substances for differentiation of coliforms and *E. coli* in soft cheese. *Acta Microbiol. Hung.* 38, 265–271.
- Havemeister, G., 1991. Determination of total coliform and faecal coliform bacteria from bathing water with Fluorocult-Brila broth. *Acta Microbiol. Hung.* 38, 257–264.
- Huang, H., Oberkotter, E., Blume, H., 1994. Determination of *E. coli* with MUG Fluorocult-lauryl sulfate broth for the testing of microbial contamination in drugs. *Pharmazie* 49, 428–432.
- Manafi, M., 1995. New medium for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* in water. Abstracts of the 95th Meeting of the American Society for Microbiology. Washington, DC, Abstr.P-43, p. 389. 1242-1244

- Manafi, M., 1996. Fluorogenic and chromogenic substrates in culture media and identification tests. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 45–58.
- Mavridou, E. Smeti, G. Mandilara, P. Boufa, M. Vagiona-Arvanitidou, A. Vantarakis, G. Vassilandonopoulou, O. Pappa, V. Roussia, A. Tzouanopoulos, M. Livadara, I Aisopou, V. Maraka, E. Nikolaou and G. Mandilara Equivalency testing of TTC Tergitol 7 agar (ISO 9308-1:2000) with five culture media for the detection of *E. coli* in water samples in Greece. *Water Science & Technology—WST Vol 61 No 1 pp 67–76 © IWA Publishing 2010*
doi:10.2166/wst.2010.781
- Mori, T., Takahashi, H., Maehata, E., Naka, H., 1991. Rapid identification of *E. coli* from urine by using Fluorocult media. *Acta. Microbiol. Hung.* 38, 273–281.
- Ramteke [Prmod W.](#) and [Suman Tewari.](#) 2001. Comparative Study of Fluorogenic and Chromogenic Media for Specific Detection of Environmental Isolates of Thermotolerant *Escherichia coli* [Environmental Monitoring and Assessment Volume 79, Number 2](#), 121-127
- Schets F. M., Havelaar A. H., 1991: Comparison of indole production and β -glucuronidase activity for the detection of *Escherichia coli* in a membrane filtration method. *Letters in Applied Microbiology* 17, 17-19
- STN EN ISO 9308-1: 2003 Kvalita vody. Stanovenie *Escherichia coli* a koliformných baktérií. Časť 1: Metóda membránovej filtrácie
- STN EN ISO 17994: 2004 Kvalita vody. Kritériá na hodnotenie rovnocennosti mikrobiologických metód
- STN 75 7841. Stanovenie koliformných baktérií a *Escherichia coli* metódou definovaného substrátu
- Venkateswaran, K., Murakashi, A. & Satake, M. 1996 Comparison of commercially available kits with standard methods for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2236–2243.
- Warnes S.L., Keevil W.C.: Desk studies on feasibility of horizontal standard rapid methods for detection of *E. coli* and *Salmonella*. *Horizontal 2004*
- WHO, Guidelines FOR DW SAFETY, Assessing Microbial Safety of Drinking Water, 2004

Záchyt bakterie *Asaia lannaensis* v pitné balené vodě

Jiří Gabriel, Hana Gryndlerová, Milan Gryndler
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i. v Praze 4-Krči převzal na základě objednávky firmy INSERVIS MVC s.r.o. ze dne 3.1.2011 24 kusů 1,5l uzavřených lahví ochucené vody Rajec se žádostí o vyhodnocení mikrobiologické čistoty vzorků. Cílem bylo zachytit případnou mikrobiální kontaminaci, kultivovat, identifikovat kontaminující mikroorganismy a stanovit jejich koncentraci ve vzorcích a posoudit míru nebezpečnosti (toxicity).

K prvotní izolaci plísni byl použit SEA agar s bengálskou červení. Tato živná půda omezuje růst bakterií a využívá se proto ke kultivaci plísni, které se pak mohou snadno spočítat a určit. Bylo hodnoceno všech 24 lahví ochucené vody Rajec. Každá láhev byla ručně protřepána, poté otevřena a z každé bylo odlito 50 ml vzorku do zkumavky. Zkumavky byly 10 min centrifugovány při 3000 x g, tím došlo ke koncentraci případných mikroorganismů na dně zkumavky. Ze zkumavek pak bylo ve sterilním boxu opatrně odpipetováno vrchních 45 ml a zbylých 5 ml bylo 10 sekund vortexováno a z každého vzorku byl následně odebrán 2 x 1 ml vzorek do 2 prázdných sterilních Petriho misek a přelit tuhoucím SEA agarem s bengálskou červení. Takto bylo naočkováno celkem 48 Petriho misek (dvě z každého vzorku), stejným způsobem byly provedeny i kontrolní vzorky z vodovodní a sterilní vody. Misky byly umístěny v kultivačním boxu při teplotě 25° C a po 7 dnech vyhodnoceny a vyfotografovány. Ke zjištění počtů a hrubé rodové identifikaci narostlých kolonií plísni byla použita binokulární lupa a světelný mikroskop. Pro izolaci bakterií byl použit stejný postup, avšak agar byl bez bengálské červení.

Po 7 dnech kultivace bylo zjištěno, že vzorky z 6 lahví nevykazovaly žádnou mikrobiální kontaminaci, v 6 lahvích byla nalezena plíseň, z toho ve 4 lahvích (11a, 11c, 34b, 38b) v minimálním množství 2 a méně kolonií plísni na misce a ve 2 lahvích (34a, 38c) hojně 30 a více kolonií plísni na misce (tab. 1). Všechny kolonie plísni patřily do rodu *Penicillium*. Vzorky ze 12 lahví vytvořily na Petriho miskách velmi hustý bakteriální povlak (tab. 1), který ovlivnil celkovou barevnost misky (červená →oranžová).

Bylo vybráno 16 vhodných bakteriálních kolonií, každá byla očkovací kličkou přenesena na Petriho misku s PDA agarem a rozetřena. Po 7 dnech kultivace při 25°C bylo zvoleno 6 vhodných Petriho misek, z každé z nich pak byla přenesena 1 bakteriální kolonie do 50ml tekutého PDA živného média v Erlenmayerově baňce. Baňky byly umístěny do třepačky a několik dnů třepány, aby došlo k rovnoměrnému nárůstu bakteriální kolonie v celém objemu nádoby. Po 5 dnech byly baňky centrifugovány a vzniklý sediment byl použit pro extrakci DNA. Extrakce byla provedena pomocí Macherey-Nagel Soil DNA extrakčního kitu. Získané vzorky DNA byly amplifikovány v PCR s použitím primerů 16Seu27f a 783r-abc a odeslány do laboratoře Macrogen (Jižní Korea), kde byly purifikovány a sekvenovány.

Ze všech 6 vzorků se podařilo získat kvalitní sekvence DNA o délce zhruba 650 nukleotidů. Porovnáním jejich sekvence s databází NCBI (nt) bylo zjištěno, že všechny sekvence vykazují vysokou podobnost sekvencím bakterie druhu *Asaia lannaensis* (tab. 2). Na základě této podobnosti jsme konstatovali, že se v našem případě jedná o tento druh.

Číslo vzorku	Výrobní číslo lahve	Narostlé mikroorganismy z 1 ml vzorku	
		miska 1	miska 2
11a	400410A	1 plíseň	1 plíseň
11b	400410A	0	0
11c	400410A	0	1 plíseň
12a	400410A	0	0
12b	400410A	0	0
12c	400410A	0	0
34a	310308B	37 plísní	30 plísní
34b	310308B	0	1 plíseň
34c	310308B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
34d	310308B	0	0
34e	310308B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
34f	310308B	0	0
34g	310308B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
34h	310308B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
34ch	310308B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
38a	030408B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
38b	030408B	1 plíseň	2 plísně
38c	030408B	42 plísní	53 plísní
39a	030408B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
39b	030408B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
39c	030408B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
40a	030408B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
40b	030408B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
40c	030408B	bakteriální povlak	bakteriální povlak
vodovodní voda		0	0
sterilní voda		0	0

vzorek	Popis nejpodobnější sekvence z databáze NCBI	Stupeň pokrytí srovnání	E	Stupeň identity sekvence
34a	<i>Asaia lannaensis</i> HM234123	100%	0,0	100%
34c	<i>Asaia lannaensis</i> HM234123	100%	0,0	99%
34e	<i>Asaia lannaensis</i> HM234123	100%	0,0	99%
38c	<i>Asaia lannaensis</i> HM234123	100%	0,0	100%
39c	<i>Asaia lannaensis</i> HM234123	100%	0,0	100%
40c	<i>Asaia lannaensis</i> HM234123	100%	0,0	99%

Všechny vykultivované kolonie plísní patřily do druhu *Penicillium* sp. Znečištění vzorků plísněmi je nerovnoměrná a menší než tomu bylo v případě bakterií. Molekulárně genetickým srovnáváním bylo potvrzeno, že všechny sledované bakteriální kmeny způsobující kontaminaci ochucených vod jsou shodné a patří druhu *Asaia lannaensis*. Tento nový druh byl nejprve izolován z květů podešky v Thajsku a zařazen do čeledi Acetobacteriaceae (Malimas et al. 2008). V literatuře bylo popsáno i několik případů nosokomiálních infekcí touto bakterií (Juretschko et al. 2010) a byla zjištěna i u vážně nemocných pacientů s oslabenou imunitou (Abdel-Haq et al. 2009). Bakteriologická laboratoř v Belfastu v Severním Irsku izolovala druh *Asaia* sp. z balených vod s ovocnou příchutí v koncentracích vyšších než 10^6 v 1 ml (Moore et al. 2002). Horskáková a spol. izolovali kmen bakterie rodu

Asaia z reklamovaných ovocných nápojů. U získaných bakterií pozorovali polysacharidovou kapsuli a shluky kompaktních aglomerátů tvořících velmi rezistentní biofilm, který byl těžko odstranitelný běžnou sanací. Autoři zároveň testovali růst bakterie při koncentracích 1,5 mml/l a 7 mmol/l obecně používaných konzervačních látek (benzoanu, sorbátu a dimethylkarbonátu). Zjistili, že běžně užívané koncentrace těchto konzervantů v nápojích významně neomezují růst bakterie *Asaia* sp. a že tato bakterie je schopna růstu i při poměrně značně kyselém pH 3,45. Tato fakta znamenají vážný problém pro sanaci technologického zařízení výroben nápojů při jejich kontaminaci zmiňovanou bakterií (Horsáková et. al 2009).



Ilustrační foto: vlevo výsledky kultivace plísní, vpravo makroskopický snímek chuchvalců bakterie v lahvích s vodou.

Zdroj kontaminace ve vodě se nám nepodařilo odhadnout, je velmi pravděpodobné, že vzhledem k potvrzené tvorbě biofilmu se bakterie dostala do stáčíren z ovocných šťav a následně kolonizovala výrobní zařízení. V tom duchu byl i doporučen další postup (důkladné vyčištění stáček linky).

Literatura:

- Abdel-Haq N. et al. (2009): *Asaia lannaensis* blood stream infection in a child with cancer and bone marrow transplantation. J.Med.Microbiol., 974-6
- Horsáková I. et al. (2009): *Asaia* sp. as a bacterium decaying the packaged still fruit beverages. Czech J.Food Sci. (27), 362-365
- Juretschko S. et al. (2010): Nosocomial infection with *Asaia lannaensis* in two pediatric patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. J.Med.Microbiol. (59), 848
- Malimas T. et al. (2008): *Asaia lannaensis* sp.nov, a new acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. Biosci.Biotechnol.Biochem.(72),666-71
- Moore J.E. et al. (2002): *Asaia* sp., an unusual spoilage organism of fruit-flavored bottled water. Applied and Environmental Microbiology. (68), 4130-4131

Kontakt na autory: Sektor ekologie, MBÚ AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4-Krč,
gabriel@biomed.cas.cz, gryndler@biomed.cas.cz, GryndlerovaHana@seznam.cz

Metody a hygienický význam stanovení *E.coli* O157 v odpadních vodách

¹Lucie Kalendová, ²Hana Mlejnková

¹Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie,
Oddělení mikrobiologie, Brno;

²Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. M., v. v. i., pobočka Brno

Úvod

Escherichia coli je známá jako běžně se vyskytující bakterie v lidském organismu, která je jeho nedílnou součástí. Existují ale její sérotypy, které člověku škodí a mohou mu způsobit vážné zdravotní komplikace.

E.coli O157 patří mezi patogenní druhy patřící do skupiny EHEC (VTEC) – enterohemoragické *E.coli*, vyznačující se produkcí toxinů, tzv. verocytotoxinů. Kmeny jsou oxidáza negativní, neprodukují β -glukuronidázu, fermentují laktózu a produkují indol. Typickou vlastností *E.coli* O157 je, že neutilizuje sorbitol, čehož se významně využívá při diagnostice k odlišení od jiných serotypů *E.coli*. Patogenita spočívá v poškození endotelu tlustého střeva toxiny, což se projevuje vodnatými průjmy, hemoragickou kolitidou doprovázenou horečkou a při vážných komplikacích se může objevit mnohdy až smrtelný hemolyticko-uremický syndrom (HUS) či trombotická trombocytopenická purpura. Přírodním rezervoárem *E.coli* O157 je střevní trakt hospodářských zvířat. Přenos je možný kontaktem s nakaženou osobou, pozřením syrové zeleniny, nedostatečně tepelně upraveného masa či nepasterizovaných mléčných produktů, kontaminované pitné vody, případně při znečištění koupacích vod. Ohroženou skupinou jsou zejména děti do 5 let, starší lidé a osoby s imunodeficiencí. Inkubační doba je okolo 3-4 dní a terapie je podobná s léčbou jiných průjmových onemocnění (Bednář a kol. 1996, Votava a kol. 2003, Votava a kol. 2006).

Tématem práce bylo sledování výskytu *E.coli* O157 v odpadních vodách a optimalizace vybraných metod sloužících k její identifikaci.

Metody

Bylo analyzováno celkem 30 vzorků odpadních a silně znečištěných povrchových vod: sada vzorků z ČOV (dodáno z VÚV Praha, Dr. Baudišová) a vlastní odběry z ČOV Modřice a z toků Trkmanka, Okluky a Spálený potok (viz Tab. 1).

Pro identifikaci byly použity tyto metody:

- a) komerční test Singlepath® *E. coli* O157
- b) kultivační metody
- c) molekulárně-biologické metody – PCR

Výše zmíněné metody byly nejprve kontrolně otestovány na sbírkových kmenech - *E.coli* CCM 4787, CCM 4724; po úspěšném zavedení metod se přistoupilo k testování reálných vzorků z prostředí.

Všechny vzorky byly nejprve předkultivovány v pomnožovacím modifikovaném bujónu mTSB s Novobiocinem při teplotě 37 °C po dobu 18-24 hodin (ČSN EN ISO 16654).

První z testovaných metod byla detekce pomocí komerčního testu **Singlepath® *E. coli* O157** patřící mezi tzv. GLISA-Rapid Test (Gold Labelled ImmunoSorbent Assay) určený pro kvalitativní detekci *E.coli* O157 v potravinách a v životním prostředí v krátkém čase. Test funguje na bázi zlatem značených protilátek specifických pro tento kmen bakterií. Výrobce udává jako největší přednost testu v porovnání s jinými vyšší specifickou a citlivost (manuál Singlepath® *E. coli* O157).

Druhým použitým postupem byly kultivační metody. Kultivačním médiem selektivním pro *E.coli* O157 byl modifikovaný **MacConkey agar se sorbitolem, cefiximem a teluričitanem draselným (CT-SMAC)**. Kultivace probíhala v aerobních podmínkách při teplotě 37 °C po dobu 18-24 hodin. Bezbarvé kolonie na miskách byly odečteny jako pozitivní na *E.coli* O157, červené až růžové kolonie znamenaly nález jiných sérotypů *E.coli* než O157 (ČSN EN ISO 16654).

Třetí použitá technika byla na bázi molekulárně biologických metod. Nejprve byla provedena izolace genomové DNA tzv. alkalickou extrakcí, ve které se získaný zcentrifugovaný pelet resuspenduje se solným roztokem KOH, povaří a po vychladnutí neutralizuje roztokem HEPES (4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazinethansulfonická kyselina). Získaný hrubý lyzát se buď zamrazí nebo se s ním dále pracuje (Horáková a kol. 2006). Dále byla provedena **polymerázová řetězová reakce (PCR)**, jejíž princip spočívá v replikaci nukleových kyselin, kterým získáme velký počet identických kopií matricového fragmentu DNA. Vybraný úsek DNA je ohraničen primery. Byly zvoleny dva primery podle cílových genů: lacZ±1 o velikosti 264 bp pro gen β-D-galaktosidáza koliformních bakterií a ECuidA±1 s velikostí 252 bp určen pro gen β-D-glukuronidáza *E.coli* O157. PCR směs obsahovala kromě primerů také pufr s MgCl₂, dNTP, destilovanou vodu, hrubý lyzát DNA a termostabilní Taq polymerázu nezbytnou pro syntézu nového vlákna DNA. Byla provedena negativní (bez DNA) a pozitivní kontrola (DNA sbírkového kmene *E.coli* CCM 4724). Vizualizace PCR produktů byla provedena pomocí gelové elektroforézy (1,8 % agarosový gel obarven ethidium bromidem).

Výsledky

Souhrnné výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 1.

Všechny testované vzorky (až na jednu výjimku-Trkmanka) měly v testu Singlepath pozitivní výsledek.

Sada vzorků z ČOV (dodáno z VÚV Praha, Dr. Baudišová) pozitivní na Singlepath byla testována kultivačně a PCR. Vzorky (kromě dvou případů) po vyočkování na misky nenarostly i přes opětovné kultivace v pomnožovacím bujónu. Důvodem bylo jejich dlouhé uchování při nízkých teplotách -80 °C.

Ze vzorku vody z ČOV Modřice narostly na miskách červené až růžové kolonie, tj. negativní nález sérotypu O157. Vzorek Trkmanka vzhledem ke kultivaci není zcela jasný, kolonie sice byly mírně dočervena, s jistotou ale nemůžeme vyloučit, že se nejedná o hledaný sérotyp. U posledních dvou vzorků (Spálený potok a Okluky) byly prokázány na selektivním médiu bezbarvé kolonie, mohlo by se tedy kultivačně jednat o *E.coli* O157.

Hodnocení kultivací na miskách nedávalo možnost jednoznačného výsledku. Záleželo na délce kultivace, bylo nutné odečítat kolonie hned druhý den, jinak se mohlo stát, že vzorky na miskách začaly degradovat a tím se významně změnila i jejich barva, druhým problémem mohlo být samotné určování barevných odstínů kolonií. Použití více selektivních půd (př. komerční půdy) by možná mohlo detekci usnadnit a zpřesnit.

Z tabulky je patrné, že metoda PCR podala specifičtější výsledky, naopak test Singlepath® *E. coli* O157 se pro detekci neosvědčil.

Gen β-D-galaktosidáza koliformních bakterií byl prokázán u zhruba poloviny vzorků z Prahy, dále u ČOV Modřice, Spálený potok a Okluky. Vzorek vody Trkmanka tento gen zřejmě neobsahoval. U druhého genu β-D-glukuronidáza *E.coli* O157 je pozitivních výsledků ještě

méně. Pouze odběry z ČOV Modřice, Trkmanka a Okluky vykazovaly na elektroforegramu slabé bendy.

Komerční test Singlepath® *E. coli* O157 se ukázal být nevhodný pro rychlé testování vod na přítomnost *E. coli* O157. U téměř všech testovaných vzorků vykazoval falešně pozitivní výsledek na hledaný sérotyp, ovšem pouze tři z nich by mohly i podle PCR tento kmen opravdu obsahovat.

Nejspolehlivější metodou byla PCR. Potvrdila gen β -D-glukuronidáza *E. coli* O157 u celkem tří vzorků. Přestože je ještě nutné optimalizovat jednotlivé kroky reakce k získání přesnějších výsledků, zdá se být metodou nejvhodnější pro detekci *E. coli* O157.

Z 30 testovaných vzorků získáváme jediný pozitivní výsledek na přítomnost *E. coli* O157 – říčka Okluky u Mistřína. Je nutné však testování opakovat, abychom si byli o správnosti výsledku zcela jisti.

Tab. 1: Výsledky detekce *E. coli* O157 ve vzorcích odpadních a povrchových vod rychlým imunologickým testem Singlepath® *E. coli* O157, kultivačně (medium CT-SMAC) a pomocí PCR (geny *lacZ* a *ECuidA*)

	Místo	Singlepath	Růst CT-SMAC	PCR primer <i>lacZ</i> ±1	PCR primer <i>ECuidA</i> ±1
VZORKY - PRAHA	ČOV 1 přítok	+	-	+	-
	ČOV 1 přítok	+	-	+	-
	ČOV 1 přítok	+	-	+	-
	ČOV 1 přítok	+	-	+	-
	ČOV 1 přítok	+	-	+	-
	ČOV 1 odtok 1	+	-	+	-
	ČOV 1 přítok	+	-	+	-
	ČOV 2 odtok	+	-	+	-
	ČOV 3 odtok	+	-	-	-
	ČOV 4 odtok	+	-	-	-
	ČOV 3 odtok	+	-	+	-
	ČOV 4 odtok	+	-	-	-
	ČOV 5 odtok	+	-	-	-
	ČOV 6 odtok	+	-	+	-
	ČOV 7 odtok po dočištění	+	-	+	-
	ČOV 8 odtok	+	-	-	-
	ČOV 9 odtok	+	-	+	-
	ČOV 6 odtok	+	-	+	-
	ČOV 9 odtok	+	-	-	-
	ČOV 7 přítok	+	+	-	-
	ČOV 7 odtok	+	-	+	-
	VÚV odpadní voda přítok	+	-	-	-
	ČOV 5 oxický filtr	+	-	+	-
	ČOV 8 odtok	+	-	-	-
	ČOV 7 odtok, zbytky	+	-	-	-
	ČOV 7 odtok, zbytky	+	+	+	-
	ČOV Modřice	+	-	+	+
	Trkmanka - Podivín	-	(-)	-	+
Krumvíř - Spálený potok	+	+	+	-	
Mistřín - Okluky	+	+	+	+	

Vysvětlivky: slabý bend

Závěr

Byly odzkoušeny různé způsoby detekce *E.coli* O157 v odpadních a silně znečištěných povrchových vodách - imunologické testy, selektivní kultivační metody a z molekulárně biologických metod PCR. Naše výsledky ukázaly: nevhodnost použití Singlepath® *E.coli* O157 pro výskyt falešně pozitivních reakcí; komplikované použití kultivačních metod pro nejednoznačné hodnocení výsledků; specifitu a spolehlivost při použití PCR.

Získané poznatky je však třeba potvrdit opakováním a rozšířením experimentů, což je plánováno v další etapě např. detekce genů pro verocytotoxiny pomocí PCR či použití komerčního testu Duopath® Verotoxins.

Práce vznikla za podpory Výzkumného záměru MŽP 0002071101, subprojektu 3609 a v rámci magisterského studia na PřF MU s tématem „Metody a hygienický význam stanovení *E.coli* O157 v odpadních vodách“.

Literatura

Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. (1996): Lékařská mikrobiologie. 1. vydání, Marvil, Praha, 558 s.

ČSN EN ISO 16654 (2002) - Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu *Escherichia coli* O157

Horáková K., Mlejnková H., Mlejnek P. (2006): Direct detection of bacterial faecal indicators in water samples using PCR. *Wat Sci Tech*, 54: 135-140.

Manuál Singlepath® E. coli O157

http://www.merck-chemicals.com/czech-republic/singlepath-e-coli-o157/MDA_CHEM-104141/p_uuid?attachments=APPL

Votava M., Obdržálek V., Ondrovčík P., Růžička F., Zahradníček O., Woznicová V. (2003): Lékařská mikrobiologie II. Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii. 1. vydání, Vydavatelství MU, Brno, 309 s.

Votava M., Černožorská L., Heroldová M., Holá V., Mejzlíková L., Ondrovčík P., Růžička F., Dvořáčková M., Woznicová V., Zahradníček O. (2006): Lékařská mikrobiologie, speciální dotisk, Neptun, Brno, 493 s.

Kontakt na autory: lkalendova@gmail.com, Hana.Mlejnкова@vuv.cz

Využití fluorescenční mikroskopie při kvantifikaci bakterií ve vodách

Jana Konečná¹, Hana Mlejnková²

¹Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie,
Oddělení mikrobiologie, Brno;

²Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. M., v. v. i., pobočka Brno

Úvod

Využití mikroskopických metod ke kvantifikaci bakterií je výhodné zejména díky rychlejšímu získání výsledků než při klasických kultivačních metodách. Mikroskopickými metodami lze stanovit celkové (přímé) počty bakterií, tzv. „direct counts“ (DC) a nikoliv pouze počty kolonií. S omezením lze pozorovat i morfologické znaky buněk. Mikroskopie je vhodná zejména tam, kde jsou cílem studie i mikroorganismy v tzv. nekultivovatelném stavu, tzv. VBNC („viable but non culturable“). Podle některých zdrojů lze kultivačně v některých typech vod zachytit i méně než 1 % všech přítomných mikroorganismů (Häusler, 1991). Mikroskopické metody využívají různé typy vizualizace, přirozeně většinou nebarevných bakteriálních buněk, jako je barvení buněk, barvení spór, fluorescence, fázový kontrast apod. Tato práce je orientována na využívání fluorescenčních metod.

K fluorescenci dochází po osvětlení látky schopné fluorescence světlem o vysoké energii a určité vlnové délce (tzv. excitační neboli absorpční záření). Podstatou fluorescence je excitace elektronů a jejich přeskok na vyšší energetické hladiny a poté opět navrácení elektronů na základní hladinu, při kterém látka vysílá záření s nižší energií a větší vlnovou délkou zvané emisní záření. V některých případech dochází k přirozené fluorescenci, např. u chlorofylu, u dalších látek detekujeme fluorescenci po dodání fluorescenční látky (fluorochromu). K přímé fluorescenci lze použít jako fluorochrom např. DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid), Hoechst 33258 a další. K detekci fluorescence lze používat zejména spektrofluorimetry, fluorescenční skenery, průtokové cytometry a fluorescenční mikroskopy (epifluorescenční, konfokální)

(<http://is.muni.cz/el/1431/podzim2011/Bi7230/um/6053971/PBMEBprednasky.html>).

Fluorescenční mikroskopii lze následně využít pro kvantifikaci bakterií po obarvení fluorochromy. Speciální metodou využívající fluorescence je FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), která využívá fluorescenčně značené sondy k detekci určitých skupin bakterií nebo i jednotlivých druhů bakterií. Obě tyto metody lze využít ke stanovení počtu bakterií v různých typech vod, a to zejména v případě bakterií v nekultivovatelném stavu, které nelze klasickými kultivačními metodami zachytit (Baudart a kol., 2002; Amann a kol., 1995).

Naším cílem bylo vytvořit zázemí pro spolehlivé použití mikroskopických metod v naší práci, např. ve studii vlivu vnějšího prostředí na vlastnosti mikroorganismů, využívaných k indikaci znečištění ve vodách (téma disertační práce).

Materiál a metody

K optimalizaci metod fluorescenčního barvení byly použity suspenze sbírkových kmenů bakterií a dále vzorky z prostředí. Vzorky byly barveny vybranými barvivami – DAPI, Hoechst 33258, FDA (fluorescein diacetát) a PI (propidium jodid). Pro metodu FISH byly použity komerčně syntetizované sondy nesoucí fluorescenční značku Cy3.

Barvivo DAPI se váže s vysokou afinitou do malého žlábků DNA a používá se na stanovení tzv. přímých počtů bakterií ve vzorcích po jejich fixaci formaldehydem. Vzorek vody je filtrován přes membránový filtr (25 mm, 0,2 µm, GTTP, Millipore), který je následně pokryt cca 450 µl roztoku DAPI o koncentraci 1 µg/ml. Barvení se provádí ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Po barvení je filtr promyt v MQ vodě (deionizované) a usušen při laboratorní teplotě (Mlejnková a Horáková, 2006).

Barvivo Hoechst 33258, které se rovněž váže do malého žlábků DNA, může být tedy alternativou k předchozímu barvení. Na 1 ml filtrovaného vzorku je do filtrační nálevky přidáno 15 µl barviva o koncentraci 100 µg/ml. Po 5-10 minutovém působení je vzorek přefiltrován a připraven k pozorování.

Pro odlišení živých a mrtvých bakteriálních buněk ve vzorku jsou zkoušeny různé kombinace fluorochromů a postupů barvení, např. FDA/PI. Barvivo FDA se působením enzymů esteráz nacházejících se v buňce pod buněčnou stěnou rozkládá na fluorescein, který následně detekujeme ve fluorescenčním mikroskopu. Barvivo je rozloženo pouze v živých buňkách, kde pak dochází k fluorescenci. Propidium jodid se váže k DNA mrtvých buněk. K barvení je použit FDA o koncentraci 500 µg/ml, do 1 ml vzorku je přidán cca 1 µl roztoku barviva. Po uplynutí cca 5 minut působení barviva je, opakovanou centrifugací a promytím vzorku, odmyt přebytek barviva. Bez tohoto kroku dochází k velmi slabé fluorescenci a vysoké pozadí fluorescenci, což komplikuje kvantifikaci bakterií ve vzorku. Po následné filtraci a umístění filtru na podložní sklíčko je vzorek připraven k pozorování.

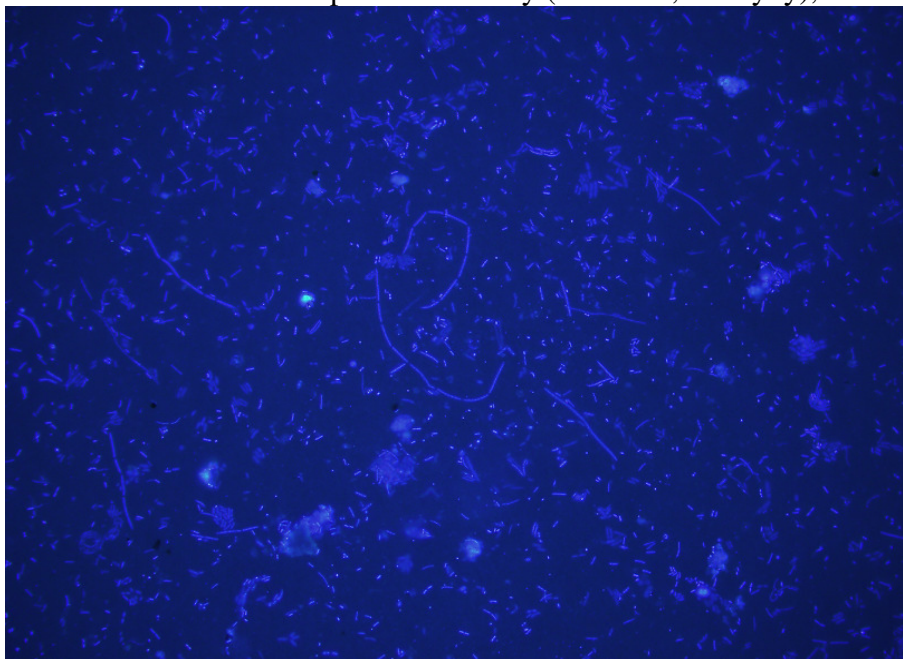
K barvení PI je používán roztok o koncentraci 5 µg/ml. Do 1 ml vzorku je přidáno cca 2–3 µl roztoku barviva, vzorek je filtrován a ihned připraven k pozorování.

K mikroskopii je používáno zvětšení min. 1000x, tj. imersní objektiv 100x, okulár 10x, příp. navíc korekce 1,25x.

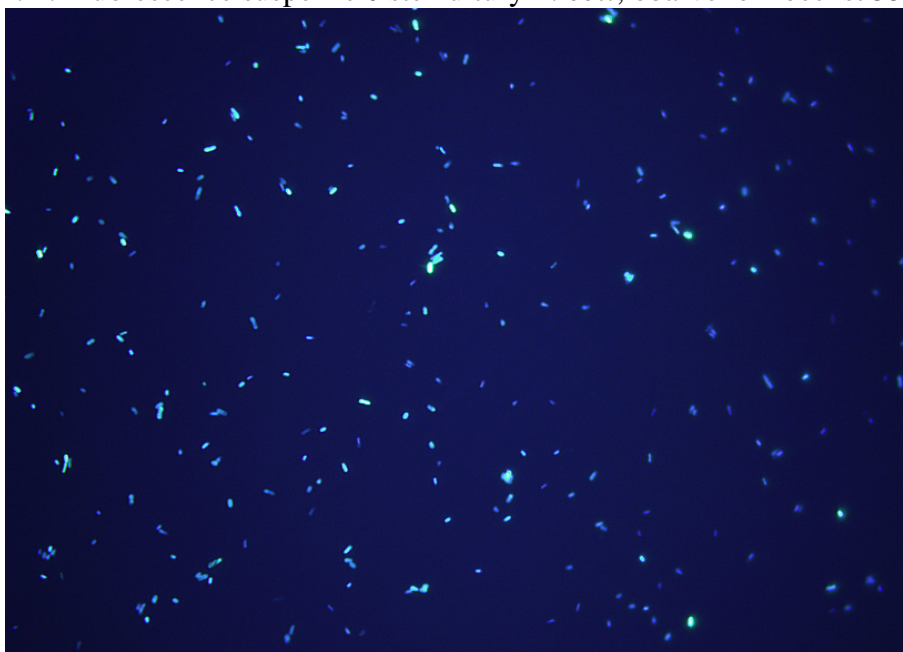
Výsledky

Barvení vzorků barvivy DAPI a Hoechst 33258 ve většině případů poskytuje dobrý fluorescenční signál (Obr. 1 a 2), jehož intenzita koresponduje s velikostí bakteriálních buněk, u menších buněk dochází k rychlejšímu vyhasínání. Při fluorescenčním barvení je důležitá správná volba množství a koncentrace použitého barviva. Příklad prebarvení vzorku je znázorněn na Obr. 3. Výsledek závisí rovněž na množství bakterií ve vzorku (hustota buněk v zorném poli mikroskopu), homogenizaci vzorku (přehledné rozmístění buněk, doprovodné částice) a zkušenostech pozorovatele s kvantifikací bakterií (odlišení bakteriálních buněk od nespecificky nabarvených částic či jiných buněk ve vzorku). U bakteriální buňky zejména při barvení roztokem FDA (Obr. 4) je obecně komplikací složení buněčné stěny a tedy horší prostupnost barviva do bakterií. Rozdíl v intenzitě barvení je patrný u gram pozitivních a gram negativních bakterií, které se liší strukturou buněčné stěny. V některých případech může při pozorování docházet k poměrně rychlému vyhasínání fluorescenčního signálu, čemuž bráníme přidáním média prodlužujícího fluorescenci (Vectashield H-1000) a co nejkratší dobou pozorování vzorku.

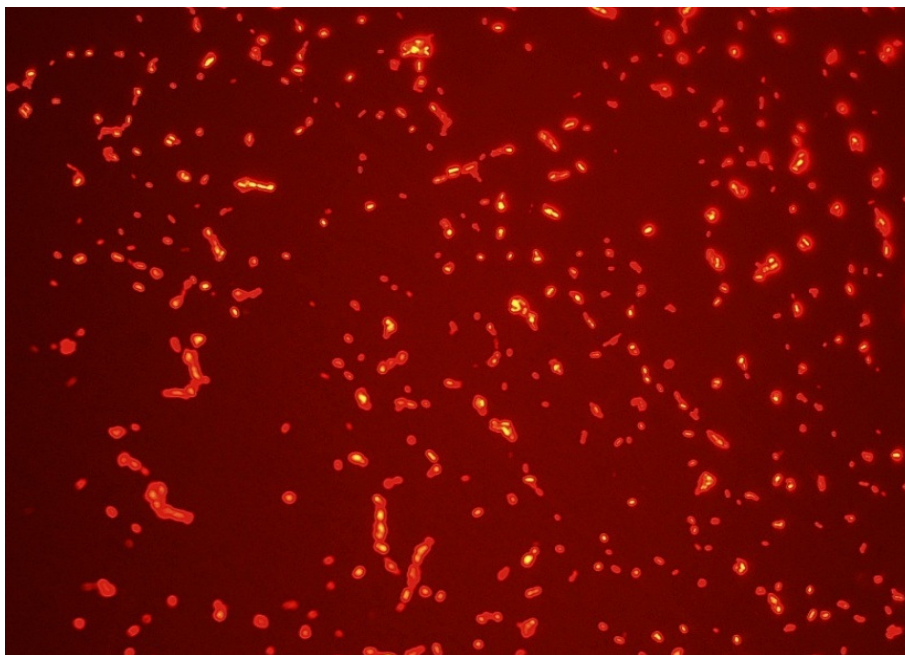
Obr. 1: Fluorescence vzorku čisté povrchové vody (Morávka, Beskydy), obarveno DAPI



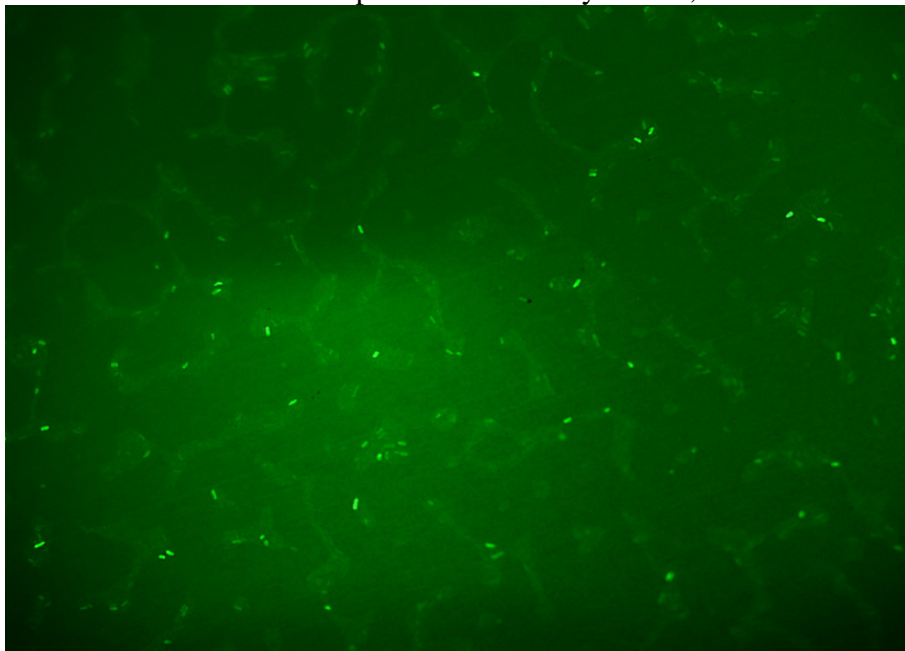
Obr. 2: Fluorescence suspenze čisté kultury *E. coli*, obarveno Hoechst 33258



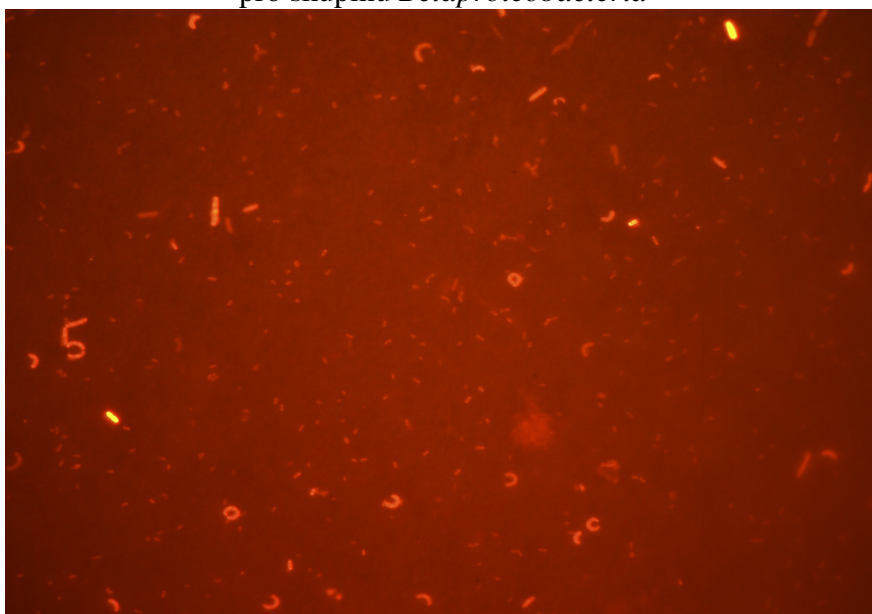
Obr. 3: Fluorescence suspenze čisté kultury *E. coli* po přidání příliš velkého množství barviva PI



Obr. 4: Fluorescence suspenze čisté kultury *E. coli*, barveno FDA



Obr. 5: Fluorescence vzorku vody po hybridizaci se sondou specifickou pro skupinu *Betaproteobacteria*



Závěr

Mikroskopické metody, využívající fluorescenční barvení a hybridizaci se specifickými sondami (FISH) jsou velmi perspektivní pro komplexní studium bakterií z vodního prostředí, včetně bakterií nekultivovatelných, které tvoří i více než 99 %. Zdokonalení schopností využívání těchto metod a jejich zavedení do praxe je předpokladem pro rozšíření spektra znalostí v mikrobiální ekologii a příbuzných oborech, současně se studiem vzájemných vztahů mikroorganismů a prostředí.

Práce vznikla za podpory Výzkumného záměru MŽP 0002071101, subprojektu 3609 a v rámci postgraduálního studia na PřF MU s tématem „Adaptace indikátorových bakterií na vnější prostředí“.

Literatura

- Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K-H. (1995): Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation, *Microb. Rev.*, 59 (1), str. 143 – 169
- Baudart J., Coallier J., Laurent P., Prévost M. (2002): Rapid and Sensitive Enumeration of Viable Diluted Cells of Members of the Family *Enterobacteriaceae* in Freshwater and Drinking Water, *Appl. Environ. Microb.*, 68 (10), str. 5057 – 5063
- Häusler J. (1991): Mikrobiologické metody kontroly jakosti vod III, Vydalo mimisterstvo životního prostředí ČR v Zemědělském nakladatelství BRÁZDA v Praze, str. 11 – 21
<http://is.muni.cz/el/1431/podzim2011/Bi7230/um/6053971/PBMEBprednasky.html>
- Mlejnková H., Horáková, K. (2006): Stanovení celkových (přímých) počtů bakterií ve vodách metodou fluorescenční mikroskopie, *Zpravodaj pro hydroanalytické laboratoře*, 6 (4), str. 15 - 19

Kontakt na autory:

- Mgr. Jana Konečná: Masarykova Univerzita, Fakulta přírodovědecká, Ústav experimentální biologie, Oddělení mikrobiologie, Tvrdého 14, Brno; konecna.jana85@gmail.com;
- RNDr. Hana Mlejnková, Ph.D.: Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, veřejná výzkumná instituce, Mojmírovo náměstí 2997/16, Brno; hana_mlejnkova@vuv.cz

Porovnání metod stanovení indikátorových organismů v bioodpadech a jejich porovnávací zkoušky

Ladislava Matějů, Martina Štěpánková
Státní zdravotní ústav, Praha

Úvod

Pro současné hodnocení kvality bioodpadů a čistírenských kalů, které je založeno na stanovení aktuálního počtu přítomných indikátorových organismů v kalu nebo upraveném bioodpadu, neexistují zatím v Evropské unii jednotné metody stanovení indikátorových organismů. V České republice jsou jednotné metody dány v právních předpisech odpadového hospodářství a jsou uvedeny v Acta Hygienica, Epidemiologica et Microbiologica 7/2001 a 1/2008 (Matějů, 2010). Od roku 2004 byly Evropskou unií jednotné metody řešeny v rámci projektu Horizontál - SSPI-CT-2004- 513660. Projekt končil v roce 2006 vydáním návrhů metod pro stanovení *E.coli*, enterokoků, salmonel, klostridií, bakteriofágů a helmintů. V evropských laboratořích byly mezilaboratorními testy ověřeny 3 metody pro salmonely, 2 metody pro *E. coli* a 2 metody pro enterokoky. Metody pro ostatní indikátorové organismy (klostridia, bakteriofágy a helminty) byly vypracovány pouze jako návrhy metod bez ověření. Vydání nových metod Evropskou unií předpokládá i jejich zavedení státy Evropské unie. Vzhledem k tomu, že pro připravované indikátorové organismy v České republice již existují metody i dlouhodobé sledování kvality kalů a upravených bioodpadů, je třeba zjistit návaznost na nové metody a porovnat možnosti posuzování výsledků, které byly dlouhodobě získávány a posoudit významnost rozdílů metod. Proto bylo provedeno porovnání metod EU a metod používaných v ČR.

Metody stanovení

V letech 2007 – 2010 se v naší laboratoři porovnávaly metody navržené Evropskou unií s metodami užívanými v České republice (MPZ) v rámci projektu MŽP SPII2f1/32/07 „Výběr a metody stanovení indikátorových organismů pro hodnocení vlivů na zdraví a životní prostředí při nakládání s biologicky rozložitelnými odpady“. Nejprve byly všechny metody navržené Evropskou unií ověřeny a porovnány s „českými“ metodami v laboratořích SZÚ. Z výsledků tohoto porovnávání byly vybrány metody, které dávaly nejvěrohodnější výsledky a tyto metody byly ověřeny v 7 laboratořích České republiky. Všechny výsledky vyhodnocení porovnání metod byly statisticky vyhodnoceny a z navržených metod Evropské Unie a metod užívaných v ČR

- CEN/TR 15215-3 Detection and enumeration of *Salmonella spp.* in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes - Part 3: Presence/absence method by liquid enrichment in peptone-novobiocin medium followed by Rapport-Vassiliadis - **EU 1**
- Stanovení salmonel v kalech a bioodpadech (AHM, ČR.) – **CZ1**
- CEN/TR 15215-1 Detection and enumeration of *Salmonella spp.* in sludges, soils, soil improvers, growing media and bio-wastes - Part 1: Membrane filtration method for quantitative resuscitation of sub-lethally stressed bacteria (to confirm efficacy of log drop treatment procedures) - **EU 9**
- CEN/TR 15215-2 Detection and enumeration of *Salmonella spp.* in sludges, soils, soil improvers, growing media and bio-wastes - Part 2: Liquid enrichment method in selenite-cystine medium followed by Rapport-Vassiliadis for semi-quantitative Most Probable Number (MPN) determination – **EU 10**

- CEN/TR 15214-1 Detection and enumeration of *Escherichia coli* in sludges, soils, soil improvers, growing media and bio-wastes - Part 1: Membrane filtration method for quantification –**EU2**
- CEN/TR15214-2 Detection and enumeration of *Escherichia coli* in sludges, soils, soil improvers, growing media and bio-wastes - Part 2: Miniaturised method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium –**EU3**
- CEN/TR 15214-3 Detection and enumeration of *Escherichia coli* in sludges, soils, soil improvers, growing media and bio-wastes - Part 3: Macromethod (Most Probable Number) in liquid medium **EU 4**
- Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E.coli* (AHEM, ČR) - **CZ2**
- Stanovení *Clostridium Perfringens* (SOP 8/2005) dle SZU – **CZ 4**
- Soils, sludges and treated bio-wastes — Isolation and enumeration of *Clostridium perfringens* in sludges, soils and treated bio-wastes – Part 1: Membrane filtration method onto selective agar – **EU 7**
- Soils, sludges and treated bio-wastes — Detection of *Clostridium perfringens* in sludges, soils and treated bio-wastes – Part 2: Macromethod (Most Probable Number) by inoculation into selective liquid medium – **EU 8**
- Soils, sludges and treated bio-wastes — Isolation and enumeration of intestinal enterococci in sludges, soils and treated bio-wastes – Part 1: Membrane filtration method onto selective agar –**EU 5**
- Soils, sludges and treated bio-wastes — Detection and enumeration of intestinal enterococci in sludges, soils and treated bio-wastes – Part 2: Miniaturised method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium – **EU 6**
- Stanovení enterokoků dle AHEM 7/2001 – **CZ 3,**

byly vybrány pro ověření v mezilaboratorním porovnávání metody: pro salmonely EU 1, CZ1, EU 9, EU 10, pro *E. coli* EU 2, CZ 2, pro klostridia – EU 7, EU 8, pro enterokoky EU 5 a CZ 3.

Navíc byly porovnávány metody firmy IDEXX (USA) :

- Stanovení *E.coli* metodou Colilert - **CL**
- Stanovení enterokoků metodou Enterolert – **ENL**

a modifikovaná metoda stanovení pro listerie :

- Modifikovaná ČSN EN ISO 11290-1/A1 (1999/2005): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* - Část 1: Metoda průkazu – **EL 1**

Postup ověřování

MPZ se účastnilo 7 laboratoří. Ověřování se provádělo na spikovaných vzorcích upraveného odpadu (komposty, digestáty, kaly) přidáním známého počtu KTJ. Pro každou metodu a variantu prováděných pokusů každá laboratoř obdržela postup práce a formulář protokolu, do kterých byly zapsány hodnoty rozborů zjištěné laboratořemi a po té zaslány do laboratoře SZÚ.

Vyhodnocení výsledků bylo provedeno statistickou metodou lineární robustní regrese podle Passinga a Babloga. Výsledky metod mikrobiologických stanovení laboratoří byly porovnány mezi sebou metodou robustní regrese (na základě přídavek KTJ). Pro výpočet Passing-Bablogovy regrese bylo použito programu Analyse-it, jehož demoverze je volně dostupná na Internetu

(http://www.analyse-it.com/products/method_evaluation/).

Pro statistické vyhodnocení základních parametrů validace jako je shodnost a opakovatelnost byly použity standardní statistické postupy. Shodnost metody byla charakterizována váženou směrodatnou odchylkou (pooled standard deviation). Pro každou hodnotu přídávku byla pro každou metodu stanovena směrodatná odchylka výsledků. Výsledná shodnost metody je charakterizována směrodatnou odchylkou, stanovenou jako vážený průměr přes všechny hodnoty přídávku. Opakovatelnost metody na 5% hladině významnosti je dána jako 2,8 násobek směrodatné odchylky.

Pro hodnocení metod stanovení prezenze/ absence byla použita metoda logitové regrese.

V případě reálných vzorků bylo pro metody prezenze/ absence použito hodnocení na základě míry shody mezi dvěma laboratořemi, pro kterou byl použit index *delta* podle (Andrés a Marzo, 2004). Hodnocení bylo založeno na uspořádání výsledků stanovení do čtyřpolní tabulky (Matějů, 2010).

Výsledky a diskuse

Metody pro stanovení salmonel

Porovnávané metody EU 1, EU 9, EU 1, CZ1.

Na základě výsledků získaných pomocí metody známých přídavek KTJ, byla doporučena do návrhu jednotných metod pro stanovení A/P metoda

EU 1 - CEN/TR 15215-3 Detection and enumeration of Salmonella spp. in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes - Part 3: Presence/absence method by liquid enrichment in peptone-novobiocin medium followed by Rapport-Vassiliadis

a metoda

CZ 1- Stanovení salmonel v kalech a bioodpadech (AHEM 7/2001).

Metody CZ 1 a EU 1 vykazovaly navzájem velmi dobrou shodu při porovnávání v jedné laboratoři. Metody vykazují shodné výsledky v celém rozsahu zjišťovaných koncentrací

(Matějů,2010). Odezva laboratoří na koncentraci salmonel ve vzorku pro koncentraci vyšší než 10 KTJ/g salmonel byla téměř v 60%. Na tomto výsledku se nepochybně podepsala jedna laboratoř, která pro všechny vzorky, i s nulovou koncentrací KTJ salmonel, zjistila pozitivní nálezy. Ze závěrů porovnávání v rámci projektu Horizontál (Maux, 2007) ale vyplývá, že hraničním limitem pro absenci/ prezenci metody EU1 je 69,3 KTJ v 50g. Tato hodnota byla zjištěna při porovnávání téměř 600 spikovaných vzorků a koresponduje s hodnotou zjištěnou metodou CZ 1 již v roce 1999 (50 KTJ na 50g).

Z porovnávání výsledků na reálných vzorcích bylo zjištěno, že všechny zúčastněné laboratoře indikovaly přítomnost salmonel ve vzorku shodně. Na základě výše uvedeného, byla metoda zařazena do MN.

Pro stanovení počtů KTJ byla doporučena metoda EU10. Podstatou metody je stanovení MPN.

EU 10 - CEN/TR 15215-2 Detection and enumeration of *Salmonella spp.* in sludges, soils, soil improvers, growing media and bio-wastes - Part 2: Liquid enrichment method in selenite-cystine medium followed by Rapport-Vassiliadis for semi-quantitative Most Probable Number (MPN) determination

Získané parametry pro metodu v jedné laboratoři jsou v souladu se zjištěnými hodnotami získanými s ověřováním v MPZ pro známé přídávky KTJ. V případě parametru směrnice a absolutního členu byly dosaženy dokonce lepší hodnoty v MPZ.

Při porovnání metod na reálných vzorcích bylo zjištěno, že metoda EU 10 vykázala daleko větší rozptyl hodnot než při porovnávání pomocí známých přídávků KTJ.

Metoda	Shodnost		Opakovatelnost	
	Přídávky KTJ	Reálné vzorky	Přídávky KTJ	Reálné vzorky
EU 10 - MPZ	0,4943	1,4112	1,3840	3,9514
EU 10 - lab	0,3997	-	1,1192	-
	absolutní člen	95% interval spolehlivosti	směrnice	95% interval spolehlivosti
EU 10 - MPZ	0,0618	-0,26 – 0,28	1,0157	0,94 – 1,21
EU 10 - lab	-1,39	-2,98 - 0,77	0,98	0,00 - 1,34

Tabulka 1 Parametry metody pro stanovení salmonel

Metody pro stanovení *Escherichia coli*

Porovnávané metody: EU 2, CZ 2, EU 5, CL. Do jednotných metod pro stanovení byly na základě výsledků vybrány dvě metody:

EU 2 - CEN/TR 15214-1 Detection and enumeration of *Escherichia coli* in sludges, soils, soil improvers, growing media and bio-wastes - Part 1: Membrane filtration method for quantification

CL - Stanovení *E.coli* modifikovanou metodou Colilert

Metoda EU 2 vykazuje lepší shodu, opakovatelnost i směrnici pro výsledky získané v jedné laboratoři, metoda CL paradoxně v MPZ vykázala lepší hodnoty sledovaných parametrů. Nicméně z hodnot výsledků v tabulce 2 lze konstatovat, že obě metody vykazují srovnatelné výsledky a jsou vhodné pro doporučení do jednotných metod pro stanovení indikátorových organismů v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalech z čistíren odpadních vod,

digestátech, substrátech kompostech, pomocných růstových prostředcích, sedimentech a podobných maticích.

Metoda	Shodnost		Opakovatelnost	
	Přidavky KTJ	Reálné vzorky	Přidavky KTJ	Reálné vzorky
EU 2 - lab	0,3997	-	1,1192	-
EU 2 - MPZ	0,4943	0,2952	1,3840	0,8266
CL - lab	0,1513	-	0,4236	-
CL - MPZ	0,0509	0,4719	0,1452	1,3214
	absolutní člen	95% interval spolehlivosti	směrnice	95% interval spolehlivosti
EU 2 - lab	-1,39	-2,98 - 0,77	0,98	0,00 - 1,34
EU 2 - MPZ	0,06	-0,26 - 0,28	1,0157	0,94 - 1,21
CL - lab	-0,13	-0,50 - 0,18	1,00	0,88 - 1,10
CL - MPZ	0,02	-0,19 - 0,31	0,91	0,83 - 1,03

Tabulka 2 Parametry metod pro stanovení *E. coli*

Metody pro stanovení enterokoků

Porovnané metody: EU 5, CZ 3, ENL. Všechny metody zjišťují aktuální počty KTJ ve sledované matici. Do jednotných metod pro stanovení byla na základě výsledků vybrána jedna metoda:

EU 5 - Soils, sludges and treated bio-wastes — Isolation and enumeration of intestinal enterococci in sludges, soils and treated bio-wastes – Part 1: Membrane filtration method onto selective agar.

Ze získaných výsledků lze konstatovat, že hodnoty opakovatelnosti a shody dosažené v jedné laboratoři i v MPZ jsou téměř totožné, v laboratoři metoda podhodnocovala výsledky více než v MPZ (tab. 3). Směrnice zjištěná v laboratoři byla téměř rovná 1, v MPZ vykazuje podhodnocování pro vyšší počty o cca 15%. Rozptyl hodnot u reálných vzorků je vyšší než u porovnávání s přidavky KTJ.

Metoda	Shodnost		Opakovatelnost	
	Přidavky KTJ	Reálné vzorky	Přidavky KTJ	Reálné vzorky
EU5 - lab	0,2313	-	0,6952	-
EU5 - MPZ	0,2483	0,4361	0,6477	1,2211
	absolutní člen	95% interval spolehlivosti	směrnice	95% interval spolehlivosti
EU5 - lab	-0,26	-0,90 - 0,14	1,05	1,00 - 1,20
EU5 - MPZ	-0,03	-0,73 - 0,12	0,85	0,73 - 1,03

Tabulka 3 Parametry metody pro stanovení enterokoků

Metody pro stanovení *Clostridium perfringens*

Porovnané metody: EU7 a EU 8. Obě metody zjišťují aktuální počty KTJ ve sledované matici, metoda EU 7 kultivační technikou a metoda EU 8 technikou MPN. Do jednotných metod pro stanovení byla na základě výsledků vybrána jedna metoda, která dávala srovnatelnější výsledky:

EU 8 - Soils, sludges and treated bio-wastes — Isolation and enumeration of *Clostridium perfringens* in sludges, soils and treated bio-wastes – Part 1: Membrane filtration method onto selective agar.

Hodnoty shodnosti a opakovatelnosti získané v laboratoři při porovnávání metod s přidavky známých počtů i reálných vzorků byly lepší než v MPZ, stejně jako hodnoty směrnice. Metoda při MPZ dávala podstatně horší výsledky než v laboratoři, přesto lepší než další porovnávané metody. V laboratoři metoda dávala nižší výtěžnost a podhodnocovala výsledky, v MPZ nadhodnocovala. Z výsledků MPZ a počtů falešně pozitivních a falešně negativních výsledků je zřejmé, že metoda dělala účastníkům ověřování potíže.

Metoda	Shodnost		Opakovatelnost	
	Přidavky KTJ	Reálné vzorky	Přidavky KTJ	Reálné vzorky
EU 7 - lab	0,2870	-	0,8036	-
EU 7 - MPZ	0,4231	0,5963	1,1846	1,6697
	absolutní člen	95% interval spolehlivosti	směrnice	95% interval spolehlivosti
EU 7 - lab	-0,28	-1,55 – 0,49	1,07	0,80 - 1,38
EU 7 - MPZ	0,65	-0,33 – 1,24	0,59	0,41 – 0,85

Tabulka 4 Parametry metody pro stanovení *Clostridium perfringens*

Metody pro stanovení *Listerie monocytogenes*

Byla ověřena pouze jedna metoda:

EL 2 - ČSN EN ISO 11290-2/A1 (1999/2005): Mikrobiologie potravin a krmiv Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* - Část 2: Metoda stanovení počtu.

Metoda pro stanovení listerií dávala výsledky s vyšším rozptylem hodnot, ale metoda nepodhodnocovala výsledky, směrnice pro porovnávání v laboratoři v MPZ měly hodnotu blízkou 1 a jejich přímky byly téměř totožné s identitou.

Metoda	Shodnost		Opakovatelnost	
EL 2 - lab	0,4713		1,3196	
EL 2 - MPZ	0,5819		1,6294	
	absolutní člen	95% interval spolehlivosti	směrnice	95% interval spolehlivosti
EL 2 - lab	-0,36	-1,90 0,32	1,08	0,90 1,40
EL 2 - MPZ	0,06	-0,26 – 0,29	1,02	0,94 – 1,21

Tabulka 5 Parametry metody pro stanovení listerií.

Závěr

Výše vybrané metody byly zpracovány jako Metodický návod pro stanovení indikátorových organismů v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalech z čistíren odpadních vod, digestátech, substrátech kompostech, pomocných růstových prostředcích, sedimentech a podobných matricích (MN). Tento MN by měl nahradit metody pro stanovení indikátorových organismů ve stávajících AHEM 1/2008 (2010).

Metodický návod z roku 2008 byl vydán pouze Státním zdravotním ústavem jako AHEM č 1/2008 - Acta hygienica epidemiologica et microbiologica,): Metodický návod pro stanovení indikátorových organismů v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalech z čistíren odpadních vod, digestátech, substrátech kompostech, pomocných růstových prostředcích, sedimentech a podobných matricích (Matějů, 2010). MŽP Metodický návod zatím nevydalo, přestože podle tohoto metodického návodu postupuje většina laboratoří v celé republice. Vzhledem k tomu, že neexistují v České republice jiné ověřené metodiky, ostatní laboratoře používají nesprávné metody určené pro pitnou vodu a tak dochází k tomu, že jsou vydávány

protokoly s výsledky, které neodpovídají aktuálnímu stavu sledované matrice, proto by MN měl být MŽP aktualizován a měl by nahradit AHEM 1/2008 z roku 2010.

PODĚKOVÁNÍ

Příspěvek byl vypracován za podpory programu MŽP ČR SP2f1/32/07 „Výběr a metody stanovení indikátorových organismů pro hodnocení vlivů na zdraví a životní prostředí při nakládání s biologicky rozložitelnými odpady“.

Literatura:

Andrés, A., M., Marzo, P.F. (2004): Delta: A new measure of agreement between two raters, *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, 57,1-19

AHEM 7/2001,(2001): Stanovení indikátorových mikroorganismů pro mikrobiologická kritéria pro použití kalů na zemědělské půdě ve smyslu vyhlášky č.382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě. *Acta hygienica epidemiologica et microbiologica*, No 7, 2001, ISSN 0862-5956, Státní zdravotní ústav, Praha

Bablok, W., Passing, H..(1985): Application of statistical procedures in analytical instrument testing, *Journal of Automatic Chemistry of Clinical Laboratory Automation*, 7(2), (Apr-Jun 1985),74-79

http://www.analyse-it.com/products/method_evaluation/

Colilert návod na stanovení, firemní materiál, IDEXX,

ČSN EN ISO 11290-2/A1 (1999/2005): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* - Část 2: Metoda stanovení počtu

Maux, M., Molinier, O. and Guarini, P. (2007): Validation Study Report - Interlaboratory trial to the performances of the 6 draft *E. coli* and *Salmonella* spp. Horizontal-Hygiene standards (DL 2/1.10), EC-FP6-project Horizontal-Hyg contract n° SSPI-CT-2003-502411.

Matějů, L., Štěpánková, M. (2008): Dílčí zpráva, Příloha č.2 Ověřování základních parametrů mikrobiologických metod pro stanovení indikátorových organismů, VaV MŽP ČR SP2f1/32/07 „Výběr a metody stanovení indikátorových organismů pro hodnocení vlivů na zdraví a životní prostředí při nakládání s biologicky rozložitelnými odpady“, SZÚ, Praha.

Matějů, L. (2010): Metodický návod pro stanovení indikátorových organismů v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalcích z čistíren odpadních vod, digestátech, substrátech kompostech, pomocných růstových prostředcích, sedimentech a podobných maticích.

Matějů, L. (2010a): Závěrečná zpráva, VaV MŽP ČR SP2f1/32/07 „Výběr a metody stanovení indikátorových organismů pro hodnocení vlivů na zdraví a životní prostředí při nakládání s biologicky rozložitelnými odpady“, SZÚ, Praha.

Kontakt na autory: Státní zdravotní ústav Praha, CZŽP, Laboratoř hygieny půdy a odpadů, Šrobárova 48, 100 42 Praha

lmateju@szu.cz, mstepankova@szu.cz

Mikrobiální kontaminace toků v oblastech s intenzivním zemědělským hospodařením

Hana Mlejnková, Katarína Slezáková, Petr Medek
Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka, v.v.i., Brno

Úvod

V 50. letech minulého století byla v ČR v rámci kolektivizace zavedena řada nevhodných opatření, jejichž negativní vliv na životní prostředí je patrný dodnes. V současné době k těmto negativním pozůstatkům z minulosti přibýly vlivy, doprovázející kapitalistický způsob hospodaření, včetně současných politických a ekonomických jevů. Zemědělské hospodaření dnešní doby je pod silným ekonomickým tlakem, způsobeným mj. nesprávnou zemědělskou politikou státu, která povoluje dovoz dotovaných produktů, čímž významně narušuje tržní možnosti českých zemědělců. Tato situace nutí zemědělce ke zvyšování produkce za minimálních nákladů, která zahrnuje např. intenzifikaci zvýšeným hnojením a současně nedostatek financí nedovoluje provádět opatření snižující kontaminaci povrchových a podzemních vod, jako je budování kanalizací, čistíren apod.

Znečištění vod ze zemědělství v České republice je kombinací zdrojů ze živočišné a rostlinné výroby. Živočišná výroba se podílí především na přísunu organických látek a fekální kontaminace. Zdrojem mohou být odpadní vody kontaminované exkrementy, statková hnojiva, chov vodní drůbeže, průsaky silážních šťáv (pH=4), používání veterinárních léků, apod. V rostlinné výrobě mohou ke kontaminaci vod přispět především splachy z polí a průsaky do spodních vod, obsahující mj. nutrienty z průmyslových hnojiv, biocidy (insekticidy, herbicidy, fungicidy), organické látky a fekální znečištění ze statkových hnojiv.

Zdrojem mikrobiální kontaminace vod ze zemědělství jsou především tekuté a pevné odpady z chovů hospodářských zvířat. V těchto odpadech mohou být kromě běžných střevních bakterií přítomny patogenní bakterie (např. původci leptospirózy, antraxu, tetanu, slintavky, salmonelózy, brucelózy), patogenní houby, parazitární prvoci aj., což může být zdrojem pro šíření chorob a antibiotické rezistence (Nicholson et al., 2004; Pell, 1997; Stehlík, 1988).

Prevence uvedených rizik by měla být podchycena ve státem řízeném monitoringu jakosti povrchových vod, jehož základem v Evropě je Rámcová směrnice EU pro vodní politiku (2000/60/ES). Ta však nezahrnuje mikrobiální parametry jakosti vody. V ČR jsou požadavky této směrnice implementovány do vyhlášky o monitoringu (98/2011), dosud se monitoring realizuje dle Rámcového programu monitoringu z roku 2008. Reálný stav provádění monitoringu je, díky problémům s jeho financováním, významně redukováný rozsah v počtu profilů i ukazatelů na rozsah odpovídající potřebám správců toků. Správa drobných toků přešla od roku 2011 ze ZVHS na Lesy ČR a podniky Povodí bez vyjasnění povinnosti pokračovat ve sledování jakosti vody, přičemž došlo k výraznému omezení počtu sledovaných profilů. Z uvedeného je zřejmé, že probíhající státní monitoring nezaručuje podchycení rizik souvisejících s mikrobiální kontaminací toků v zemědělských oblastech a související možnost návrhů opatření v rámci vodních útvarů.

Metodika sledování kontaminace toků v oblastech s intenzivním zemědělským hospodařením

Byly vybrány toky protékající zemědělsky aktivními oblastmi s odběrnými místy v rámci krajů Jihomoravského, Vysočina, Olomouckého, Jihočeského a Zlínského (současně zde bylo prováděno sledování pesticidů). Odběry byly prováděny v letech 2010–2011, v období

zemědělských prací (jaro, léto, podzim). Bylo sledováno 37 profilů na různých tocích, toky byly zařazeny do kategorií, uvedených v Tabulce 1.

Tabulka 1: Rozdělení lokalit podle vodnosti toku

Kategorie toku	průtok
1	potoky do 0,75 m ³ /s
2	řičky 1 000 až 3 000 m ³ /s
3	řeky 5 000 až 10 000 m ³ /s
4	velké řeky 15 000 až 35 000 m ³ /s

Ve vzorcích byly stanovovány následující mikrobiologické ukazatele:

- indikátory fekálního znečištění (fekální koliformní bakterie = FC a enterokoky = ENT)
- indikátory organického zatížení (kultivovatelné mikroorganismy při 22 °C = HPC22).

Stanovení byla prováděna standardními kultivačními metodami dle ČSN 75 7835, ČSN EN ISO 7899-2 a ČSN EN ISO 6222.

Získaná data byla hodnocena v rámci velikostních kategorií toků, pro FC a ENT bylo použito zařazení podle ČSN 75 7221 – Jakost vod – Klasifikace jakosti povrchových vod (Tabulka 2). Pro HPC22 bylo použito zařazení dle navržené stupnice (Tabulka 3). Průměrné hodnoty výsledných hodnot, zařazené do tříd byly zpracovány do mapových výstupů (Obr. 5 - 7). Hodnoty byly porovnány s NEK-NPH (nejvyšší přípustné hodnoty normy environmentální kvality) nového Nařízení vlády č. 23/2011 Sb. (NV 23/2011), Tabulka 4.

Tabulka 2: Zařazení do tříd jakosti dle ČSN 75 7221

Třída	Klasifikace jakosti vody
1	neznečištěná
2	mírně znečištěná
3	znečištěná
4	silně znečištěná
5	velmi silně znečištěná

Tabulka 3: Hodnocení stupně organického zatížení podle počtu kultivovatelných mikroorganismů při 22 °C

(KTJ/ml)	stupeň zatížení
0-100	1
101-500	2
501-1 000	3
1 001-5 000	4
5 001-10 000	5
10 001-50 000	6
50 001-100 000	7
100 001-1 000 000	8

Tabulka 4: Nejvyšší přípustné hodnoty norem environmentální kvality Nařízení vlády č. 23/2011 Sb.

Parametr	NEK – NPH (Percentil 90)
fekální koliformní bakterie	4 000 KTJ/100 ml
enterokoky	2 000 KTJ/100 ml

Výsledky

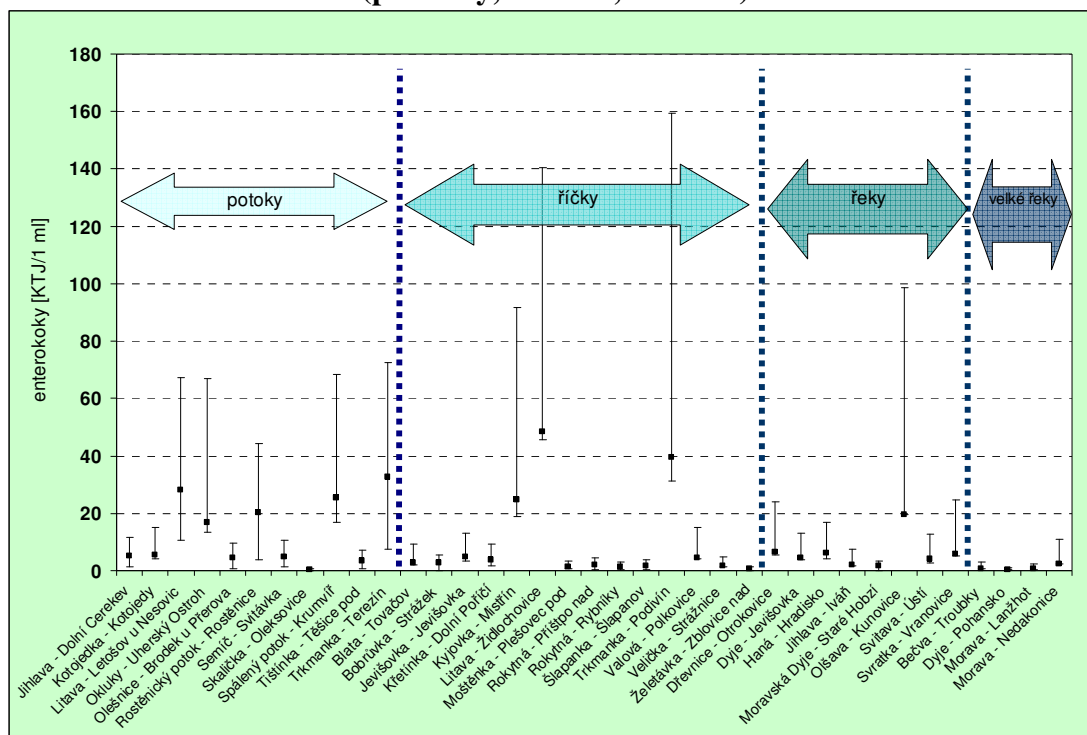
Výsledky pro jednotlivé mikrobiální parametry jsou uvedeny v grafech a mapových výstupech na Obr. 1 – 7.

Výsledky ukázaly, že toky s malou vodností (kategorie: potoky, říčky) byly významně fekálně znečištěny. Na malých tocích byly zachyceny extrémní hodnoty (ENT: 4 000-12 000 KTJ/100 ml; FC: 10 000-44 000 KTJ/100 ml). Enormní fekální znečištění bylo zjištěno na tocích: Okluky (kategorie 1), Spálený potok (kategorie 1), Litava (kategorie 1 a 2), Trkmanka (kategorie 1 a 2), Kyjovka (kategorie 2). Příčiny lze hledat nejen v menším naředění přinášeného znečištění, ale hlavně ve specifiku zemědělských oblastí v ČR, které jsou charakteristické nedostatečným nebo žádným čištěním odpadních vod z malých obcí, absencí kanalizačních systémů, vysokou produkcí komunálního znečištění, větší četností podniků zabývajících se různými druhy zemědělské výroby a regulací toků, která přispívá ke snížení samočisticí schopnosti. Limitní hodnoty stanovené NV 23/2011 byly nejčastěji překročeny v kategorii potoky a říčky (Tabulka 5).

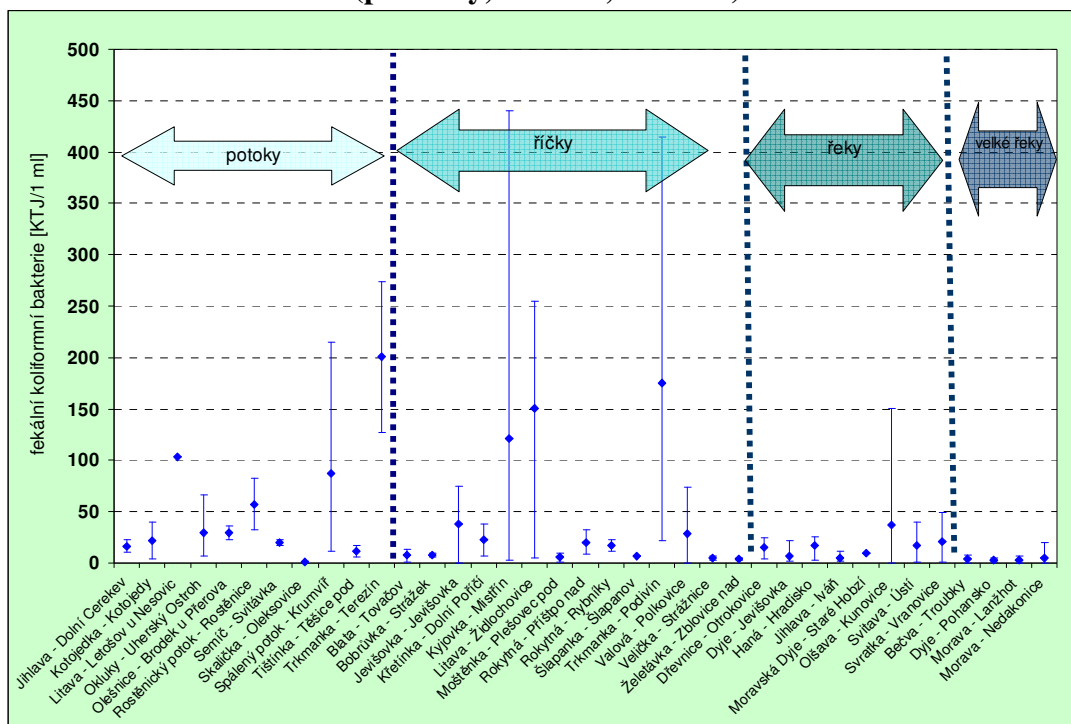
Tabulka 5: Podíl překročení NEK dle kategorie toku

%	enterokoky	fekální koliformní bakterie
potoky	31	38
říčky	18	29
řeky	5	8
velké řeky	0	0

Obr. 1: Kontaminace toků v zemědělských oblastech enterokoky (průměry, minima, maxima)

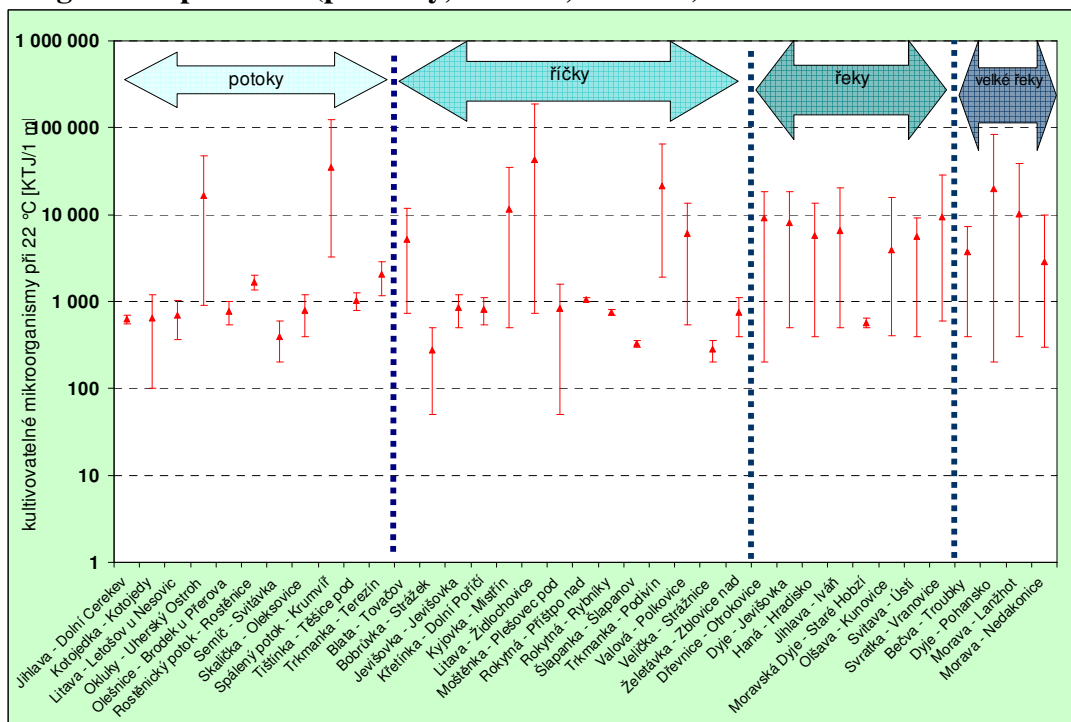


Obr. 2: Kontaminace toků v zemědělských oblastech fekálními koliformními bakteriemi (průměry, minima, maxima)



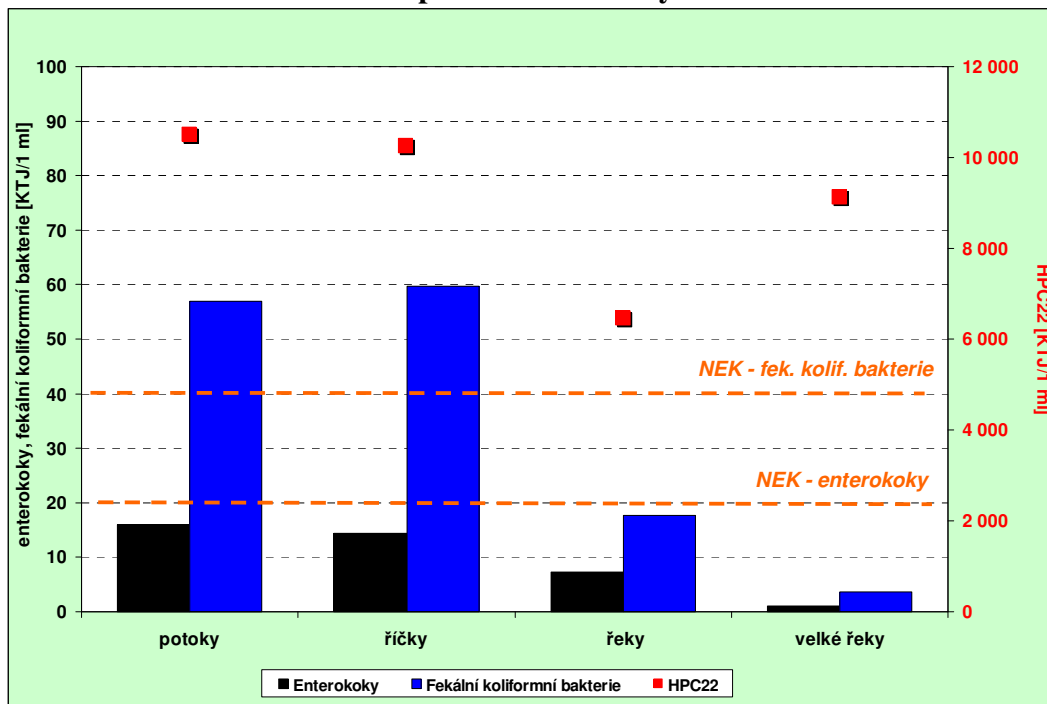
Hodnoty kultivovatelných mikroorganismů při 22 °C ukázaly srovnatelné organické zatížení u všech kategorií toků, s větší výkyvy u větších toků (Obr. 3).

Obr. 3: Organické zatížení toků v zemědělských oblastech podle počtu kultivovatelných mikroorganismů při 22 °C (průměry, minima, maxima)

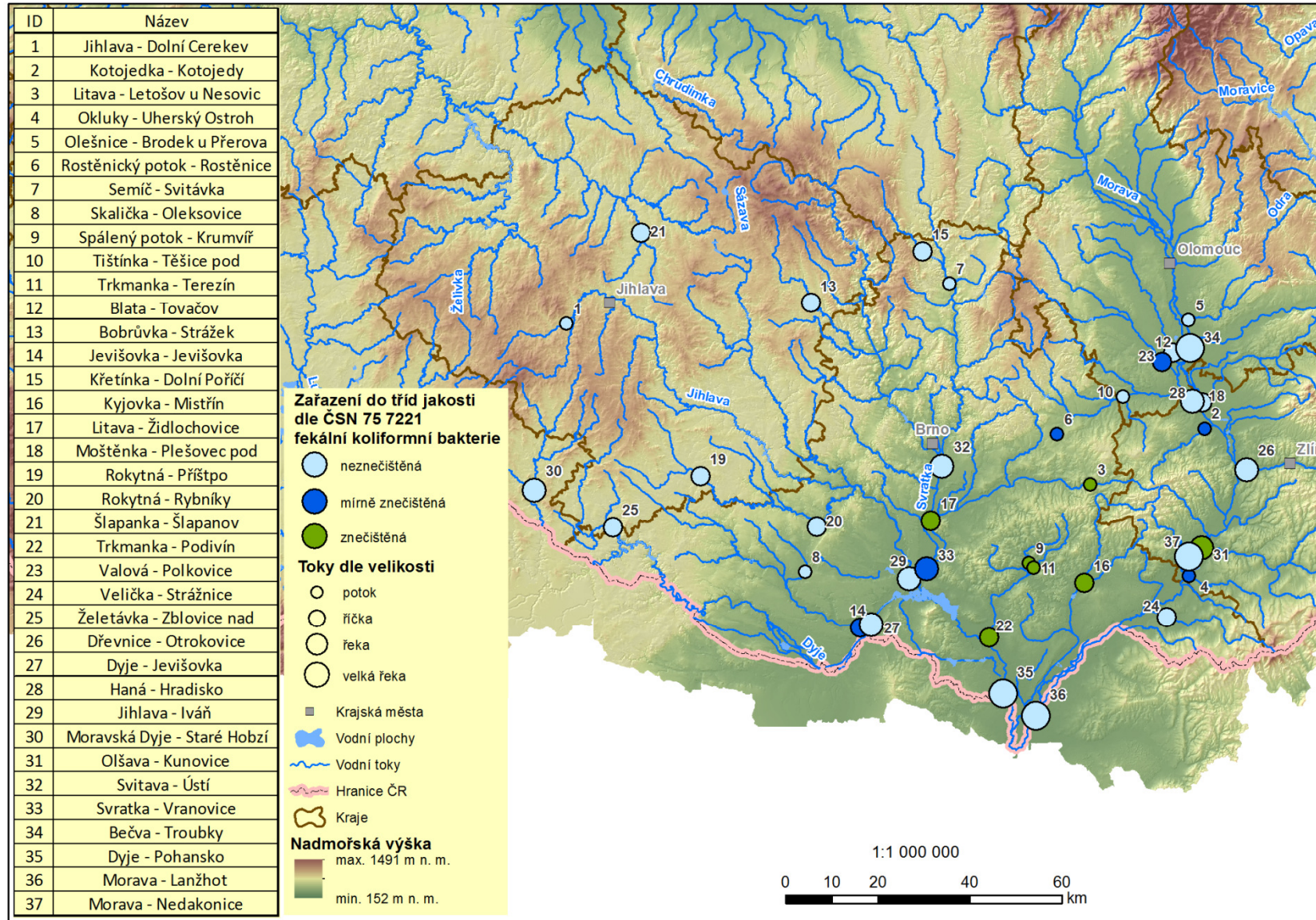


Z Obr. 4 je patrné, že fekální znečištění klesalo s velikostí toku. U větších toků nebylo zachyceno překročení limitních hodnot (NEK) NV 23/2011.

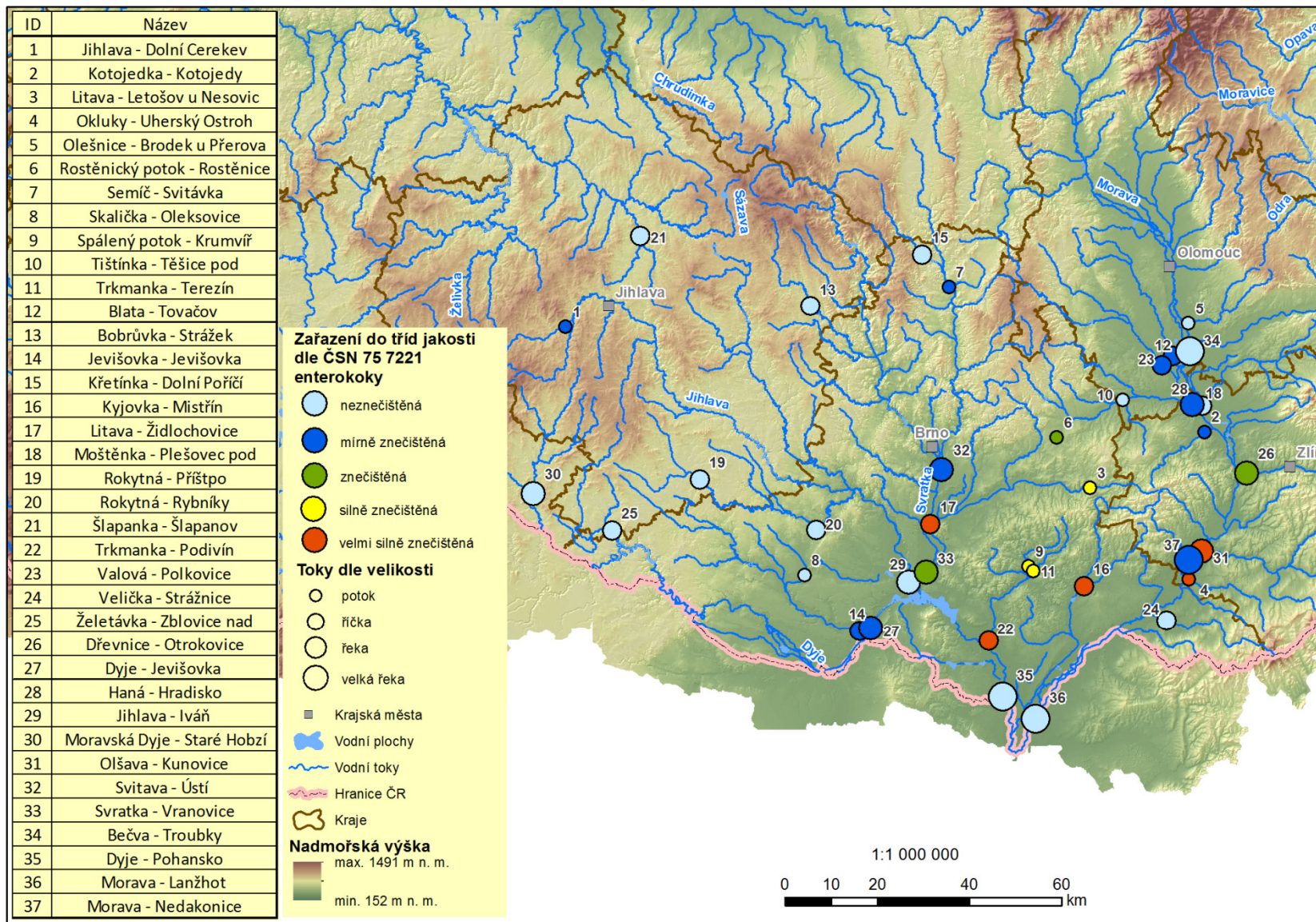
Obr. 4. Mikrobiální znečištění toků v zemědělských oblastech s rozlišením vodnosti toků – průměrné hodnoty



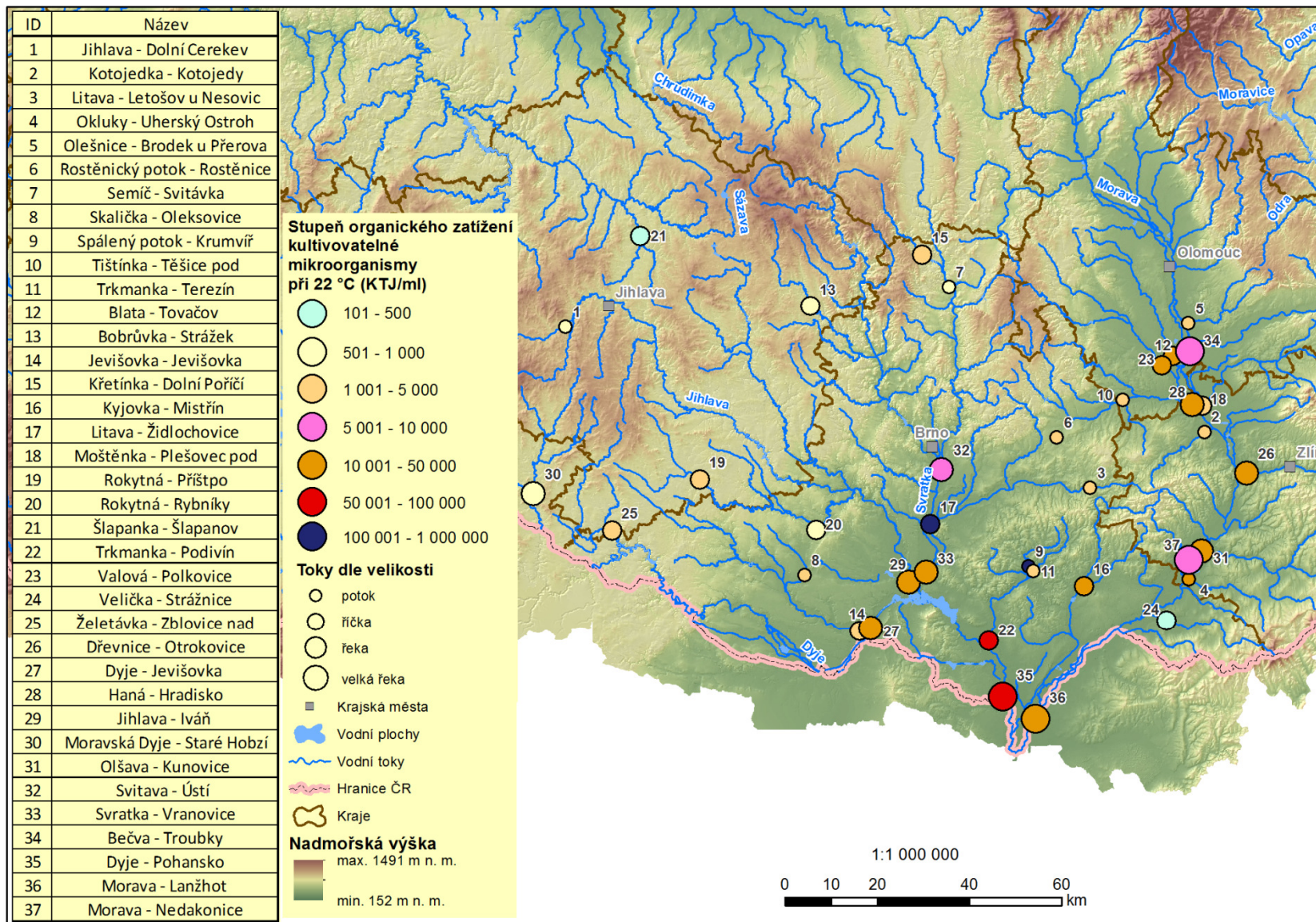
Obr. 5: Kontaminace vod fekálními koliformními bakteriemi



Obr. 6: Kontaminace vod enterokoky



Obr. 7: Kontaminace vod kultivovatelnými mikroorganismy při 22 °C



Závěry

- byla prokázána významná mikrobiální kontaminace toků v oblastech s intenzivním zemědělským hospodařením – zejména regulované menší toky;
- zjištěné extrémy by mohly představovat riziko šíření chorob (lze předpokládat i aktivní šíření antibiotické rezistence);
- současný systém monitoringu není na tento typ znečištění dostatečně orientován, opatření na zlepšení stavu v rámci vodních útvarů mohou být zanedbána!

Práce byla prováděna s podporou Výzkumného záměru MŽP 0002071101 v rámci subprojektů:

- 3617.04: Vlivy zemědělsky obhospodařovaných povodí na kvalitu odtékající vody
- 3630: Studie výskytu látek v současné době nepodléhajících pravidelnému sledování v hydrosféře

Literatura

ČSN 75 7221 Jakost vod - Klasifikace jakosti povrchových vod, 1998.

ČSN EN ISO 6222 – Jakost vody – Stanovení kultivovatelných mikroorganismů Stanovení počtu kolonií očkovaním do živného agarového kultivačního media, 2000.

ČSN EN ISO 7899-2 – Jakost vody – Stanovení intestinálních enterokoků – část 2: Metoda membránových filtrů, 2001.

ČSN 75 7835 Jakost vody - Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*, 2009.

Nařízení vlády č. 61/2003 Sb. ze dne 28. února 2003 o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech ve znění nařízení vlády č. 23/2011 Sb.

Nicholson F.A., Chambers B.J., Moore A., Nicholson R.J. and Hickman G. (2004): Assessing and managing the risks of pathogen transfer from livestock manures into the food chain. *The Journal*, vol. V18N3, pp. 155–160.

Pell A.N. (1997): Manure and microbes: public and animal health problem? *J. Dairy Sci.*, vol. 80, pp. 2673–2681.

Rámcová směrnice EU pro vodní politiku (2000/60/ES);

Stehlík, K. (1988): Závlahové využití odpadních vod: Tekutá statková hnojiva a zemědělské odpadní vody. Min. zemědělství a výživy ČR, Praha.

Kontakt na autory: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka, v.v.i., pobočka Brno, Mojmírovo nám. 16, 612 00 Brno, tel: 541 126 333; hana_mlejnkova@vuv.cz (mikrobiologie); petr_medek@vuv.cz (pesticidy)

Alternativní metodiky stanovení bakterií rodu *Salmonella*

Eva Podholová¹, Petra Lišková²

¹VŠCHT Praha, FTOP, Ústav chemie ochrany prostředí
²VŠCHT Praha, FTOP, Ústav technologie vody a prostředí

Úvod

Cílem této práce bylo zhodnotit možnosti izolace a identifikace bakterií rodu *Salmonella* s využitím kultivačních metod. Při identifikaci bakterií rodu *Salmonella* z čistých kultur a ze vzorků vod byly, kromě standardní kultivační metody, použity i metody alternativní. Stanovení salmonel je velmi obtížné a řídí se zásadami platné normy (ČSN ISO 19250). Běžné metody pro izolaci a identifikaci salmonel spoléhají na obohacení v neselektivním mediu (předobohacení), selektivním pomnožení (obohacení) a rozsevu na selektivní media s následnou biochemickou a sérologickou identifikací. Nová komerční media využívají fluorogenní a chromogenní substráty pro rychlou detekci salmonel.

Z alternativních metod stanovení salmonel byly vybrány tyto kultivační média: HiCrome *Salmonella* Agar, HiCrome MM Agar, Rapid *Salmonella* Agar, Compact Dry SL, *Salmonella* Differential Medium a Path-Chek Hygiene *Salmonella* Detection.

HiCrome *Salmonella* Agar

Toto chromogenní médium se používá pro izolaci a odlišení druhů *Salmonella* od jiných střevních bakterií (koliformních bakterií). HiCrome *Salmonella* agar je modifikací původního přípravku od Rambacha. *Escherichia coli* a *Salmonella* jsou snadno odlišitelné kvůli jejich charakteristickým koloniím. Formy *Salmonella* tvoří světle fialové kolonie s fialovým kruhem. *E. coli* se projevuje charakteristickou modrou barvou kolonií, kvůli přítomnosti enzymu β -glukuronidáza. Světle fialová a modrá barva kolonií je způsobena chromogenní směsí. Přítomné žlučové soli inhibují gram-pozitivní organismy.

HiCrome MM Agar

HiCrome MM Agar se doporučuje pro identifikaci a rozlišení bakterií rodu *Salmonella* od jiných bakterií, kterými je např. *Citrobacter*. HiCrome MM Agar se používá pro identifikaci vzorků potravin, vody a klinických vzorků. HiCrome MM agar byl vytvořen Millerem a Millisonem pro specifické izolace a detekce *Salmonella*. Toto médium je lepší než xylóza-lysin-dezoxycholátové médium (XLD), protože podporuje růst *Salmonella*, z důvodu přítomnosti příslušného podílu čtyř cukrů. Využití cukru organismy má za následek změnu pH. Toho se využívá jako prostředek k rozlišení *Salmonella* od konkurenčních bakterií na základě barvy kolonie.

Rapid *Salmonella* Agar

Rapid *Salmonella* Agar je alternativní chromogenní půda, která slouží k získání orientačního výsledku, zda vyšetřovaný vzorek salmonely obsahuje či nikoliv. Půda ale není konfirmační, při pozitivním výsledku je třeba udělat konfirmační zkoušku, o jakou konkrétní salmonelu se jedná. Toto chromogenní médium se používá pro detekci a stanovení počtu bakterií rodu *Salmonella* v potravinách nebo v nesterilních produktech farmaceutického průmyslu. Může být použito jako alternativní půda k půdě XLD dle TNV 75 7855.

Stanovení bakterií rodu *Salmonella* je založeno na přítomnosti dvou enzymů:

- C8-esteráza způsobuje, že salmonely rostou na tomto médiu v typických fialových koloniích, které jsou velmi snadno identifikovatelné.
- β -D-glukosidáza zajišťuje odlišení salmonel od ostatních enterobakterií.

Compact Dry SL

Compact Dry SL je připravený k okamžitému použití pro testované vzorky. Metoda pomáhá zkrátit dobu potřebnou k provedení mikrobiálního testu, protože umožňuje maximální produktivitu tím, že zvyšuje efektivitu. Disky mohou být použity pro testování surovin, jakož i pro hotové výrobky jakou jsou potraviny, nápoje, maso, kosmetické či jiné vzorky. Compact Dry jsou velmi bezpečné a pohodlné produkty.

Disky jsou založeny na kombinaci tří různých zkušebních zásad:

- alkalizace na médiu, schopnost salmonel dekarboxylázy lyzinu (barva média se změní z modro-fialové na žlutou)
- obruba na kolonii, způsobená rozkladem chromogenního substrátu enzymem salmonel (černé kolonie jsou generovány H_2S , který je produktem salmonel)
- nahromadění salmonel.

Salmonella Differential Medium

Chromogenní médium slouží k detekci a stanovení počtu salmonel odlišených od ostatních enterobakterií. Půda se používá pro stanovení počtu bakterií rodu *Salmonella* v potravinách nebo ve vodě.

Path-Chek Hygiene Salmonella Detection

Path-Chek Hygiene *Salmonella* Detection je určen k použití v prostředí potravinářských výrobních, zpracovatelských provozů a na povrchu přicházejícím do kontaktu s potravinami. Path-Chek Hygiene *Salmonella* Detection se skládá ze dvou prvků:

- zvlhčený stěr Path-Chek Hygiene Swab, který napomáhá uvolnění bakterií z testovaných ploch, zejména suchých povrchů. Složení zvlhčovacího roztoku také zaručuje neutralizaci případných zbytkových množství sanitčního prostředku,
- detekční bujon Path-Chek Hygiene Salmonella Detection Broth. Bujon se skládá z pufovaného růstového média obsahujícího růstové aktivátory, selektivní aditiva a specifický indikátorový systém.

Výsledky

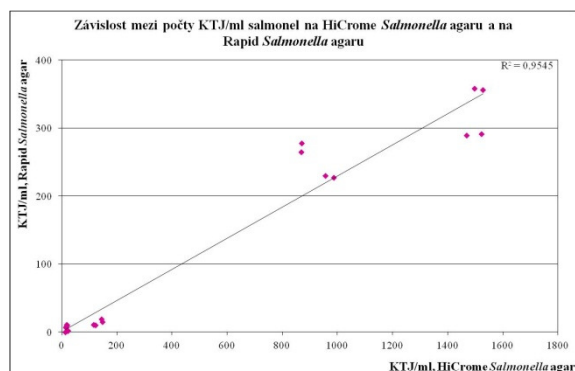
Pro detekci salmonel byly vybrány metody popsané výše. Byla zjišťována a srovnávána účinnost testovaných metod a bylo prováděno porovnání jednotlivých metodik mezi sebou. Byly vypočteny korelační koeficienty a byly provedeny *T*-testy. Výsledky jsou uvedeny v následujících grafech (Graf 1 – Graf 6).

Závislost mezi počty salmonel na HiCrome *Salmonella* agaru a na Rapid *Salmonella* agaru (Graf 1)

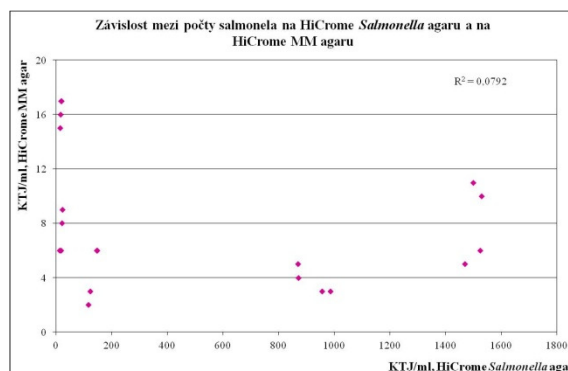
Bylo otestováno 20 vzorků vod. Korelační koeficient pro toto porovnání byl 0,9769, což nám dokazuje vysokou korelaci mezi jednotlivými metodami. Hodnota směrnice regresní přímky se blíží 1. Po provedení *F*-testu můžeme říci, že $F > F_{krit.}$ (viz Tab. 1) a tudíž se rozptyly obou souborů statisticky významně liší (hladina významnosti $\alpha = 0,05$). Na základě výsledku *T*-testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ bylo možné potvrdit, že rozdíl mezi výsledky testovaných metod byl statisticky významný. Hodnota *T*-testu byla větší než hodnota kritická (viz Tab. 1) a pravděpodobnost *p* ($p = 0,007$) je menší než 0,05 (hladina významnosti α), což nám potvrzuje, že mezi naměřenými daty je statisticky vysoce významný rozdíl.

Závislost mezi počty salmonel na HiCrome *Salmonella* agaru a na HiCrome MM agaru (Graf 2)

Bylo otestováno 20 vzorků vod. Korelační koeficient pro toto porovnání byl -0,2814, což nám dokazuje nepřímou závislost mezi daty. Hodnota směrnice regresní přímky je 0,0792. Po provedení F -testu můžeme říci, že $F > F_{krit.}$ (viz Tab. 1) a tudíž se rozptýly obou souborů statisticky významně liší (hladina významnosti $\alpha = 0,05$). Na základě výsledku T -testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ bylo možné potvrdit, že rozdíl mezi výsledky testovaných metod byl statisticky významný. Hodnota T -testu byla větší než hodnota kritická (viz Tab. 1) a pravděpodobnost p ($p = 0,0006$) je menší než 0,05 (hladina významnosti α), což nám potvrzuje, že mezi naměřenými daty je statisticky vysoce významný rozdíl.



Graf 1: Závislost mezi počty salmonel na HiCrome *Salmonella* agaru a na Rapid *Salmonella* agaru



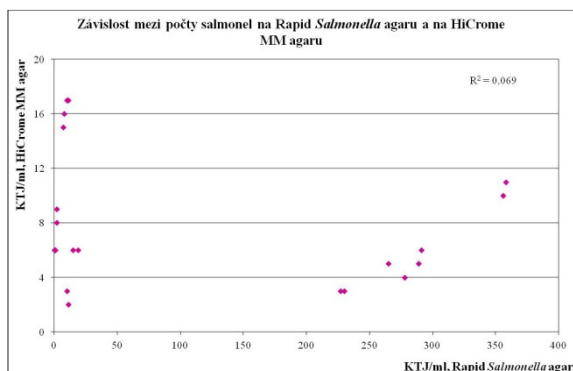
Graf 2: Závislost mezi počty salmonel na HiCrome *Salmonella* agaru a na HiCrome MM agaru

Závislost mezi počty salmonel na Rapid *Salmonella* agaru a na HiCrome MM agaru (Graf 3)

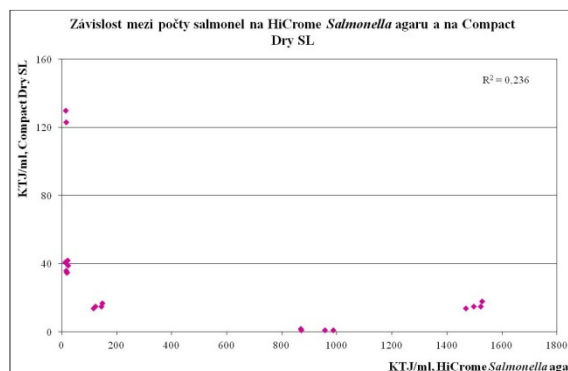
Bylo otestováno 20 vzorků vod. Korelační koeficient pro toto porovnání byl -0,2627, což nám dokazuje nepřímou závislost mezi daty. Hodnota směrnice regresní přímky je 0,069. Po provedení F -testu můžeme říci, že $F > F_{krit.}$ (viz Tab. 1) a tudíž se rozptýly obou souborů statisticky významně liší (hladina významnosti $\alpha = 0,05$). Na základě výsledku T -testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ bylo možné potvrdit, že rozdíl mezi výsledky testovaných metod byl statisticky významný. Hodnota T -testu byla větší než hodnota kritická (viz Tab. 1) a pravděpodobnost p ($p = 0,001$) je menší než 0,05 (hladina významnosti α), což nám potvrzuje, že mezi naměřenými daty je statisticky vysoce významný rozdíl.

Závislost mezi počty salmonel na HiCrome *Salmonella* agaru a na Compact Dry SL (Graf 4)

Bylo otestováno 20 vzorků vod. Korelační koeficient pro toto porovnání byl -0,4858, což nám dokazuje nepřímou závislost mezi daty. Hodnota směrnice regresní přímky je 0,236. Po provedení F -testu můžeme říci, že $F > F_{krit.}$ (viz Tab. 1) a tudíž se rozptýly obou souborů statisticky významně liší (hladina významnosti $\alpha = 0,05$). Na základě výsledku T -testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ bylo možné potvrdit, že rozdíl mezi výsledky testovaných metod byl statisticky významný. Hodnota T -testu byla větší než hodnota kritická (viz Tab. 1) a pravděpodobnost p ($p = 0,001$) je menší než 0,05 (hladina významnosti α), což nám potvrzuje, že mezi naměřenými daty je statisticky vysoce významný rozdíl.



Graf 3: Závislost mezi počty salmonel na Rapid *Salmonella* agaru a na HiCrome MM agaru



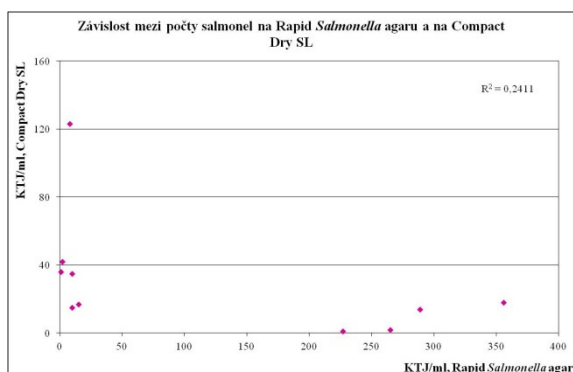
Graf 4: Závislost mezi počty salmonel na HiCrome *Salmonella* agaru a na Compact Dry SL

Závislost mezi počty salmonel na Rapid Salmonella agaru a na Compact Dry SL (Graf 5)

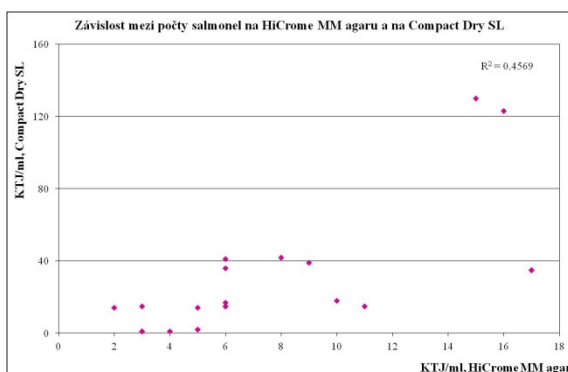
Bylo otestováno 20 vzorků vod. Korelační koeficient pro toto porovnání byl -0,4910, což nám dokazuje nepřímou závislost mezi daty. Hodnota směrnice regresní přímky je 0,2411. Po provedení *F*-testu můžeme říci, že $F > F_{krit.}$ (viz Tab. 1) a tudíž se rozptyly obou souborů statisticky významně liší (hladina významnosti $\alpha = 0,05$). Na základě výsledku *T*-testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ bylo možné potvrdit, že rozdíl mezi výsledky testovaných metod byl statisticky významný. Hodnota *T*-testu byla větší než hodnota kritická (viz Tab. 1) a pravděpodobnost *p* ($p = 0,0104$) je menší než 0,05 (hladina významnosti α), což nám potvrzuje, že mezi naměřenými daty je statisticky vysoce významný rozdíl.

Závislost mezi počty salmonel na HiCrome MM agaru a na Compact Dry SL (Graf 6)

Bylo otestováno 20 vzorků vod. Korelační koeficient pro toto porovnání byl 0,6759, což nám dokazuje závislost mezi daty. Hodnota směrnice regresní přímky je 0,8735. Po provedení *F*-testu můžeme říci, že $F > F_{krit.}$ (viz Tab. 1) a tudíž se rozptyly obou souborů statisticky významně liší (hladina významnosti $\alpha = 0,05$). Na základě výsledku *T*-testu s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ bylo možné potvrdit, že rozdíl mezi výsledky testovaných metod byl statisticky významný. Hodnota *T*-testu byla větší než hodnota kritická (viz Tab. 1) a pravděpodobnost *p* ($p = 0,0079$) je menší než 0,05 (hladina významnosti α), což nám potvrzuje, že mezi naměřenými daty je statisticky významný rozdíl.



Graf 5: Závislost mezi počty salmonel na Rapid *Salmonella* agaru a na Compact Dry SL



Graf 6: Závislost mezi počty salmonel na HiCrome MM agaru a na Compact Dry SL

Tab. 1: Hodnoty F -testu a T -testu pro salmonely

	F	$F_{\text{krit.}}$	p	T	$T_{\text{krit.}}$	p
HiCrome Salmonella agar/Rapid Salmonella agar	18,302	2,1683	$1,93 \cdot 10^{-8}$	2,8327	2,0244	0,0074
HiCrome Salmonella agar/HiCrome MM agar	15 752	2,1683	$6,31 \cdot 10^{-36}$	3,7226	2,0244	0,0006
Rapid Salmonella agar / HiCrome MM agar	860,69	2,1683	$6,10 \cdot 10^{-24}$	3,4789	2,0244	0,0013
HiCrome Salmonella agar/Compact Dry SL	296,50	2,1683	$1,47 \cdot 10^{-19}$	3,5524	2,0244	0,0010
Rapid Salmonella agar /Compact Dry SL	16,200	2,1683	$5,48 \cdot 10^{-8}$	2,6956	2,0244	0,0104
HiCrome MM agar/ Compact Dry SL	53,126	2,1683	$1,40 \cdot 10^{-12}$	2,8048	2,0244	0,0079

Další metodikou použitou pro detekci salmonel ze vzorků vod byl systém Path-Chek Hygiene *Salmonella* Detection, který se využívá jako screeningová metoda a poskytuje pouze kvalitativní výsledky. Nejprve byl systém vyzkoušen na čistých kulturách bakterií (*Salmonella* Abony CCM 4518, *Salmonella* Enteritidis CCM4420 a *Salmonella* Typhimurium CCM 3807). U všech vzorků byla pozorována změna barvy detekčního média (fialová na černou). Path-Chek Hygiene *Salmonella* Detection se ukázal jako vhodná metodika pro stanovení salmonel, protože prokázal přítomnost všech testovaných kmenů. Poté proběhla identifikace bakterií ze vzorků vod, u vzorků z ČOV byla pozorována změna barvy detekčního média z fialové na černou, avšak u vorků povrchových vod nedocházelo ke změně detekčního média a výsledky byly negativní, což nám potvrdila metodika PCR.

Jako další metodika byla použita metoda *Salmonella* Differential Medium, toto médium slouží k detekci a stanovení počtu salmonel odlišených od ostatních enterobakterií. Nejprve byla provedena detekce čistých kultur bakterií (*Salmonella* Abony CCM 4518, *Salmonella* Enteritidis CCM4420 a *Salmonella* Typhimurium CCM 3807). *Salmonella* Differential Medium se ukázalo jako nevhodné kultivační médium pro stanovení salmonel, protože neprokázalo přítomnost jediného testovaného kmenu. U čistých kultur bylo provedeno ředění 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} a 10^{-7} , ale pouze u ředění 10^{-6} u kultury *Salmonella* Typhimurium vyrostly barevně nedefinovatelné kolonie. Formy salmonel měly tvořit růžové kolonie, ale vyrostly pouze krémové kolonie. Po uplynutí 24 hodin bylo médium ve většině případů zcela vyschlé, i když byly dodrženy pokyny výrobce.

I přes výše uvedené problémy, byla tato metoda odzkoušena na vzorcích vod z ČOV či na vzorcích vod povrchových. U vzorků vod byla prokázána pouze přítomnost *Escherichia coli*. Formy *Salmonella* měly tvořit růžové kolonie, ale na médiu vyrostly pouze modrozelené kolonie.

Závěr

Závěrem lze říci, že použití vhodné alternativní metody (např. Path-Chek Hygiene *Salmonella* Detection či Compact dry SL) by ušetřilo nejenom práci, ale i čas, hlavně v případech kdy je potřeba v co nejkratším časovém úseku vědět, zda námi zkoumaný vzorek obsahuje salmonely či nikoliv.

Obohacení vzorku v neselektivním a selektivním médiu, mělo pozitivní vliv na nárůst přítomné mikroflóry u chromogenních médií (HiCrome *Salmonella* Agar, HiCrome MM Agar, Rapid *Salmonella* Agar). Z tohoto důvodu je přímý výsev nepoužitelný a alternativní chromogenní půdy mohou sloužit pouze k získání kvalitativního výsledku.

Compact dry SL nabízí rychlý a pohodlný způsob identifikace bakterií rodu *Salmonella*. Tato metoda byla jediná, která poskytla i kvantitativní výsledky.

Dehydratované chromogenní médium (*Salmonella* Differential Medium), jež bylo v této práci použito, se ukázalo pro stanovení salmonel jako nepoužitelné. Po uplynutí 24 hodin bylo médium ve většině případů zcela vyschlé, i když byly dodrženy pokyny výrobce a podložka byla navlhčena 2,5 ml sterilní destilované vody.

Velkou výhodou u metody stanovení Path-Chek Hygiene *Salmonella* Detection je její praktičnost, jednoduchost a možnost použití v terénu. Nezanedbatelná výhoda spočívá hlavně v tom, že metoda je vhodná i pro laika.

Tento příspěvek byl vypracován v rámci Výzkumného záměru MSM 6046137308.

Literatura:

Bio-Rad Laboratoires Rapid *Salmonella* agar. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/fsd/literature/356-3961_4705_RAPIDSalmo_TechSheet_V6_030810_US.pdf (accessed Oct 16, 2011).

DriFilter membrane Nutrient Pad media; HiMedia Laboratories Pvt. Limited: India.

HiMedia Laboratories, The HiMedia Manual a manual of Microbiology Laboratory Practice, 2009, p. 396-397, 406-407

HyServe GmbH Co. CompactDry, Easy Test Method for Counting Microorganisms, 2004. HyServe. http://www.unitechscientific.com/pdf_files/903-001_Compact-Dry-3.pdf (accessed Sept 04, 2011).

Meloun, M.; Militký, J. *Statistické zpracování experimentálních dat*, 2nd ed.; EAST PUBLISHING, a.s.: Praha, 1998.

MICROGEN BIOPRODUCTS LTD, 2007. Path-Chek Hygiene Pathogen Detection. http://www.microgenbioproducts.com/Path_Chek%20Pathogen/Path%20Chek%20Hygiene_Flier.pdf (accessed Sept 04, 2011).

Kontakt na autory: VŠCHT Praha, FTOP, Ústav chemie ochrany prostředí, Technická 5, 166 28, Praha 6, Eva.Podholova@vscht.cz

Medzinárodná porovnávacia skúška na testovanie metodických postupov na stanovenie *Legionella* spp. vo vzorkách vody

Miloslava Prokšová, Marianna Cíhová

Výskumný ústav vodného hospodárstva, Bratislava,

ÚVOD

Legionely patria k patogénnym mikroorganizmom s prirodzeným výskytom vo vodnom prostredí, kde parazitujú na protozoách a rovnaký mechanizmus využívajú aj pri infekcii človeka. Z prirodzeného vodného prostredia sa dostávajú do prostredí vytvorených umelo, tam kontaminujú vodu a predstavujú nebezpečenstvo pre človeka. Vdýchnutie vodných kvapiek kontaminovaných legionelami vnímavým jedincom môže vyústiť v legionelózu. Závažnosť legionelózy sa pohybuje od mierneho horúčkovitého ochorenia (Pontiacka horúčka) až k vážnej pneumónii pľúc. *Legionella pneumophila* je najčastejším etiologickým agens, avšak je tu predpoklad, že všetky druhy legionel sú schopné vyvolať ochorenie. *L. pneumophila* je gramnegatívna kokopalička patriaca do gama podskupiny proteobaktérií. V súčasnosti čeľaď *Legionellaceae* pozostáva len z jedného rodu, rodu *Legionella*, ktorý ale obsahuje 57 druhov (<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>) a 70 séroskupín a z nich 15 patrí *L. pneumophila* (Euzéby, 1997; Fields a kol., 2002).

Prenos legionelózy z osoby na osobu nie je známy a toto ochorenie je prenášané len kontaminovanou vodou. Všeobecná prítomnosť legionel vylučuje ich celkové odstránenie z prostredia, preto sa pri prevencii pred týmto ochorením musíme sústrediť na redukciiu prenosu baktérie k vnímavým jedincom (Fields a kol. 2002).

Monitorovanie prítomnosti legionel v distribučnej vodovodnej sieti budov predstavuje jednu z možností kontroly a predchádzaniu infekcií legionelami.

Svetová zdravotnícka organizácia vo svojej publikácii z roku 2007 uvádza príklady stanovených limitov pre výskyt legionel vo vode z distribučnej siete (tabuľka č.1) v niekoľkých štátoch.

Tabuľka č. 1 Príklady zdravotných limitov pre počty *Legionella* vo vzorkách pitnej vody v jednotlivých krajinách (WHO, 2007).

Krajina	Limit KTJ/1000 ml	Komentár	Referencia
Francúzsko	< 1000	Všeobecné verejné zariadenia	Ministère de la Sante et des Solidarités (2005)
	< 100	Prevenciu nozokomiálnych infekcií	
	< 50	Zariadenie pre rizikových pacientov	
Nemecko	1000		DVGW (2004)
Holandsko	100	Pernica	VROM (2002)
Veľká Británia	< 100	Pernica	HSE (2004)

Podľa Slovenskej legislatívy je predpísané stanovenie legionel v bazénoch s vodnými atrakciami, pri ktorých vznikajú vodné aerosoly (Vyhláška MZ SR č. 72). Objem vzorky pre stanovenie *Legionella* spp. musí byť najmenej 50 ml.

V súčasnosti sa pre detekciu legionel vo vzorkách vody sa využíva kultivačné stanovenie podľa normy STN ISO 11731 a STN ISO 11731-2. Podľa STN ISO 11731 je možné robiť stanovenie legionel vo všetkých typoch vôd, kým podľa časti STN ISO 11731-2 je možné stanoviť legionely len v čistých vodách. Kultivačné stanovenie baktérií zatiaľ predstavuje zlatý štandard medzi diagnostickými metódami pre ich stanovenie. Pri kultivácii smerovanej na zachytenie legionel vo vzorkách vody musíme myslieť na niekoľko špecifických okolností a to:

- a) Legionely sa vo vode môžu vyskytovať v nízkych koncentráciách a jednotlivé limity pre ich výskyt sú určené na objemy od 50 do 1000 ml, preto je tu nutnosť koncentrácie vzorky vody,
- b) vo vode môže byť prítomná sprievodná mikroflóra vo veľkom počte a môže potláčať rast cieľového mikroorganizmu,
- c) legionely patria k pomaly rastúcim mikroorganizmom a preto môže dôjsť k ich prerastaniu sprievodnou mikroflórou.

Koncentrácia vzorky

Podľa STN ISO 11731 ak sa predpokladá, že počet legionel prekročí 10^5 na liter, kvapalné vzorky môžeme naočkovať priamo na pevné médium. Na zabezpečenie zistenia legionel v kvapalných vzorkách, v ktorých nie je tento počet dosiahnutý, je potrebná koncentrácia vzorky. Pretože počet legionel vo vzorkách zvyčajne nie je známy, koncentráciu vzorky je nutné urobiť. Na koncentráciu je možné použiť membránovú filtráciu, alebo odstredenie.

Na filtrácii vzorky sa voda filtruje pomocou peristaltického čerpadla sa vzorka filtruje pod tlakom cez membránový filter, v prípade zakalenej vzorky, vzorky s vysokým obsahom suspendovaných častíc sa použije odstredenie. Pre menšie objemy vody (pod 200 ml) sa môže použiť podtlaková filtrácia podľa STN ISO 8199 (2008). Pre filtráciu sa použijú nylonové alebo polykarbonátové filtre s veľkosťou pórov 0,22 μm alebo 0,45 μm . Membránový filter sa vyberie z filtračného zariadenia a vloží sa do nádoby so závitovým uzáverom. Na oddelenie mikroorganizmov z membrány sa pridá od 5 ml do 25 ml sterilného zriedovacieho roztoku, filtrátu, alebo sterilnej destilovanej vody a najmenej 2 minúty sa silne pretrepáva, alternatívne sa na uvoľnenie môže použiť ultrazvukový vodný kúpeľ, optimálny čas je potrebné odskúšať.

Pri odstredení vzoriek sa vzorka najprv pretrepe a v centrifuguje sa v sterilných kyvetách 10 minút pri 6000 rpm, alebo 30 minút pri 3000 rpm, teplotu je potrebné udržať v rozmedzí od 15 °C do 25 °C. Supernatant sa asepticky zleje a usadenina sa resuspenduje v 2 ml až 20 ml zriedovacieho roztoku. Tento koncentrát predstavuje pripravenú vzorku.

Kultivačné médiá

Legionely sú schopné rasti na umelých živných médiách, ale pre svoj rast majú špeciálne požiadavky. Štandardný agar, označený ako BCYE agar (buffered charcoal yeast extract agar) obsahuje kvasničný extrakt, aktívne uhlie, α -ketoglutarát, L-cysteín a tris(difosforečnan) tetraželezitý. Pre podporu rastu cieľových baktérií je kritické pH agaru a musí byť upravené na pH 6,9 pridaním ACES (kyselina N-2-acetamido-2-aminoetánsulfónová) pufru.

Pre spracovanie vzoriek je potrebné použiť selektívne médium s prídavkom antibiotík na potlačenie rastu sprievodnej mikroflóry. Ako selektívne médium sa podľa STN normy používa GVPC agar, čo je BCYE s prídavkom glycínu, a antibiotík vankomycín, polymyxín B a cykloheximid.

Úprava vzorky

Legionely sú pomaly rastúce mikroorganizmy a v prítomnosti sprievodnej mikroflóry môžu byť prerastené rýchlejšie rastúcimi mikroorganizmami, prípadne mikroorganizmami s plazivým rastom, ako je napríklad *Proteus*. Pri spracovaní vzoriek sa použije úprava teplom a úprava pridaním kyseliny. Pri úprave teplom sa vzorka zohreje vo vodnom kúpeli pri teplote $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $30\text{ min} \pm 2\text{ min}$. Pri úprave pridaním kyseliny sa pridá kyslý pufrovací roztok s $\text{pH } 2,2 \pm 0,2$ a nechá sa pôsobiť $5\text{ min} \pm 0,5\text{ min}$.

CIEĽ PRÁCE

Cieľom medzinárodnej štúdie bolo porovnať výťažnosť a selektivitu troch médií s prídavkom rôznych antibiotík, tri rôzne spôsoby koncentrácie vzorky a dva spôsoby úpravy vzorky.

V súčasnosti prebieha revízia normy STN ISO 11731 pre stanovenie *Legionella*. Podnetom k revízii boli výsledky z porovnávacích testov medzi metódami používanými v Holandsku a v Nemecku. Vo výsledkoch boli zistené veľké rozdiely v počtoch stanovených legionel. Ďalšie dáta boli k dispozícii z iných experimentov s použitím rôznych médií podľa národných štandardov jednotlivých krajín a tiež vykazovali rozdiely vo výťažnosti a pri identifikácii jednotlivých druhov *Legionella*. Na základe týchto poznatkov sa pracovná skupina pod vedením Simon in 't Veld (microbiology manager at Vitens – laboratóriá pre pitnú vodu v Holandsku) rozhodla usporiadať porovnávací test, na ktorom sa zúčastnia rôzne laboratóriá pre získanie lepšieho a obsiahlejšieho pohľadu na účinnosť jednotlivých metód. Štúdia sa uskutočnila vo februári a zúčastnilo sa jej 10 laboratórií z rôznych krajín.

POROVNÁVACÍ EXPERIMENT

V predpokladanej revidovanej norme ISO 11731 sú vzorky vody rozdelené do troch skupín:

1. skupina - vzorky s nízkou koncentráciou interferujúcej mikroflóry
2. skupina - vzorky s vysokou koncentráciou interferujúcej mikroflóry
3. skupina - vzorky s extrémne vysokou koncentráciou interferujúcej mikroflóry

V štúdiu bolo potrebné analyzovať tri typy vzoriek. Ako prvé boli štyri vzorky vody dodané organizátorom (tieto vzorky patrili do skupiny vzoriek s nízkou koncentráciou interferujúcej mikroflóry). Ďalej to bolo 20 vlastných pozitívnych vzoriek, 10 vzoriek s nízkou koncentráciou interferujúcej mikroflóry a 10 vzoriek s vysokou koncentráciou interferujúcej mikroflóry. Pre zjednodušenie experimentu bol tento zameraný len na prvé dve skupiny.

Okrem toho bolo potrebné pripraviť modelovú vzorku s čistou kultúrou legionely na jednoduchšie porovnanie dvoch spôsobov koncentrácie, filtrácia a centrifugácia podľa ISO 11731 a spôsoby úpravy vzorky.

Použité vzorky vody

Pre testovanie boli poskytnuté štyri vzorky vody organizátorom štúdie. V dvoch vzorkách bola prítomná *Legionella pneumophila* sv. 1, v prvej vzorke sa koncentrácia pohybovala rádovo 10^4 a v druhej vzorke 10^3 KTJ/1000 ml. V tretej a štvrtej vzorke bola prítomná *Legionella anisa* a koncentračná úroveň bola 10^3 a 10^2 KTJ/1000 ml.

Okrem týchto vzoriek bolo v našom laboratóriu spracovaných 30 vzoriek vody. Výber bol zameraný na cieľ nájsť pozitívne vzorky, preto sme pre odber vyberali miesta, ktoré sa nachádzali vo väčších budovách, jednalo sa o stavby postavené aspoň pred dvadsiatimi rokmi a staršie. 25 vzoriek bolo odobratých v bytových domoch u spotrebiteľa, z tohto počtu bolo 15 vzoriek pozitívnych. 5 vzoriek bolo odobratých v rôznych inštitúciách (poliklinika, školy, a podobne), tiež sa jednalo o väčšie, staršie budovy a odbery boli urobené na miestach s nízkym odberom vody. Všetkých 5 vzoriek bolo pozitívnych. Vo vzorkách sme dokázali prítomnosť *L. pneumophila* sv 1 a sv. 2-14 (potvrdené latexovým aglutinačným setom Oxoid), v niektorých vzorkách bolo prítomných viac sérotypov. Po otestovaní boli vzorky rozdelené do dvoch skupín podľa navrhovanej normy, vzorky s nízkou koncentráciou sprievodnej mikroflóry (pri kultivácii neupravenej sme do tejto skupiny zaradili tie vzorky kde bol maximálne 50% podiel sprievodnej mikroflóry k cieľovým mikroorganizmom). Druhú skupinu predstavovali vzorky s vysokou koncentráciou sprievodnej mikroflóry.

VÝSLEDKY

Výsledky testovania vzoriek Vitens

Výsledky z testovania vzoriek Vitens dodalo 9 laboratórií z 10-tich zúčastnených. Výsledky z jednotlivých laboratórií boli tiež veľmi rozdielne a vo vzorkách s nižším počtom legionel viaceré laboratóriá nedetekovali cieľový mikroorganizmus. Vzorka Vitens 1 obsahovala rádovo 10^4 KTJ/1000 ml *Legionella pneumophila* sv. 1 a nebola v nej prítomná žiadna sprievodná mikroflóra. Výsledky z kvantitatívneho stanovenia legionela v tejto vzorke bola pomerne vyrovnaná. Priemerné výsledky zo stanovenia sú uvedené v tabuľke č. 2.

Tabuľka č. 2. Výsledky stanovenia vo vzorke Vitens 1 dodanej organizátorom štúdie, vzorka obsahovala *Legionella pneumophila* sv. 1, výsledky sú prepočítané na 1000 ml vzorky.

Priama filtrácia, filtrovaný 1 ml vzorky		Koncentrácia filtráciou (20 x koncentrované)				Koncentrácia centrifugáciou (20 x koncentrované)			
B	G	B	G	B	G	B	G	B	G
13250	11750	6289	8211	3189	4150	1581	1797	2213	664
100%		58%		29%		14%		12%	

B – BCYE+ab médium

G – GVPC médium

Počty získané filtráciou cez nitrát celulózy filter, pričom kultivácia prebehla priamo na membránovom filtri na povrchu referenčného média, GVPC a na povrchu testovaného média BCYE+ab, sme považovali za skutočný počet sledovaného mikroorganizmu vo vzorke. Oproti tomuto počtu sme prepočítali výťažnosť jednotlivých spôsobov koncentrácie a úpravy vzorky. Pri spracovaní tejto vzorky nebola použitá kyslá úprava, takže máme len výťažnosti kultivácie po tepelnej úprave vzorky.

Testovanie selektívnych médií

Testovanie selektívnosti médií so vzorkami Vitens a vzorkami odobratými a pracovníkmi nášho laboratória. Vzorky Vitens boli všetky zaradené podľa návrhu revidovanej normy do skupiny s nízkym pozadím sprievodnej mikroflóry. Naše vzorky boli po prvotnom otestovaní rozdelené do 1. a do 2. skupiny podľa množstva sprievodnej mikroflóry. Všetky testované

média boli od firmy Oxoid. Pre vzorky 1. skupiny bola porovnávaná výťažnosť a selektivita GVPC média s antibiotikami vankomycín, polymyxín B a cykloheximid a BCYE+ab s antibiotikami polymyxin B, cefazolín a pimarcicín. Vzorky boli analyzované postupom používaným v laboratóriu, koncentrácia bola urobená membránovou filtráciou s použitím polykarbonátového filtra (veľkosť pórov 0,2 µm) s následnou elúciou v 10 ml zried'ovacieho roztoku v skúmavke so sklenenými guľčkami a minútovým pretrepávaním na vortexe. Ako referenčné médium bolo použité GVPC. Ako testované médium bolo použité BCYE+ab médium.

V prípade tejto skupiny vzoriek pri porovnávaní výťažností oboch testovaných médií nevykazovala rozdiely. Rozdiel bol v selektivite, kde GVPC bolo selektívnejšie a rast sprievodnej mikroflóry bol výrazne potlačený oproti testovanému médiumu.

Vzorky z 2. skupiny boli spracované rovnakým postupom a kultivované na GVPC médium. Pre revíziu normy ISO 11731 bolo pre tieto vzorky vybrané iné selektívne médium, a to MWY s obsahom antibiotík polymyxin B, anisomycin a vancomycin.

Pri tejto skupine vzoriek pri porovnávaní výťažnosti bola vyššia výťažnosť zistená pri kultivácii na GVPC médium, ale MWY médium bolo selektívnejšie a prípade veľmi vysokej koncentrácie sprievodnej mikroflóry len na tomto médium sa nám podarilo dokázať prítomnosť legionel.

Výsledky, ktoré sme získali nebolo možné spracovať štatisticky, lebo náš súbor nebol dostatočne veľký a výsledky od všetkých 10 účastníkov štúdie ešte neboli spracované, preto sú naše závery zatiaľ len predbežné.

Testovanie koncentrácie vzorky a úpravy vzorky

V rámci štúdie sme urobili aj experiment pre otestovanie dvoch spôsobov koncentrácie vzoriek, ktoré sú v norme, a to koncentráciu filtráciou a koncentráciu centrifugáciou a dvoch spôsobov úpravy, teplom a pôsobením kyslého tlmivého roztoku. Organizátori štúdie na základe svojich predchádzajúcich experimentov predpokladali nízku výťažnosť centrifugácie. Pre test sme si v laboratóriu pripravili modelovú vzorku s počtom legionel, aby sa dosiahol počet KTJ okolo 100 na Petriho misku pri priamom očkovaní bez koncentrácie a 100 násobne riedenie suspenzie, aby po centrifugácii 100 ml vzorky sme dosiahli rovnaký počet. Desť paralelných vzoriek bolo naočkovaných priamo na BCYE+ab agar bez koncentrácie, zriedená vzorka bola skoncentrovaná filtráciou a centrifugáciou, tiež bolo spracovaných po desť vzoriek. Skoncentrované vzorky boli rozdelené na tri časti, jedna bola inokulovaná priamo bez úpravy, druhá bola podrobená tepelnej úprave a tretia časť kyslej úprave.

Výťažnosť koncentrácie podľa normy ISO 11731:

- koncentráciu filtráciou – výťažnosť okolo 60%
- koncentráciu centrifugáciou - 27 % výťažnosť

Výsledky - výťažnosť úpravy vzorky

- Koncentrácia filtráciou, vzorka s použitou tepelnou úpravou – 50 %
- Koncentrácia filtráciou, vzorka s použitou kyslou úpravou – 25 %

Tieto výsledky potvrdzujú predpoklad pracovnej skupiny pre revíziu ISO 11731.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Euzéby, J.P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *Int. J. Syst. serological methods.Bacteriol.* 47, 590–592.

Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. 15, 506–526.

<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>

WHO (2007) Legionella and the prevention of legionellosis.

STN ISO 11731 (2001) Kvalita vody. Stanovenie Legionella

STN ISO 11731-2 (2008) Kvalita vody. Stanovenie Legionella. Časť 2 Metóda priamej membránovej filtrácie pre vody s malým počtom baktérií

STN EN ISO 8199 (2008) Kvalita vody Všeobecné pokyny na stanovenie mikroorganizmov kultivačnými metódami

Vyhláška Ministerstva zdravotníctva SR č. 72 (2008) o podrobnostiach o požiadavkách na kvalitu vody kúpalísk, vody na kúpanie a jej kontrolu a na kúpaliská.

Kontakt na autory: Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábr. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava, tel.: 02/59 343 401, e-mail: proksova@vuvh.sk, cichova@vuvh.sk

Molekulárně biologické metody v mikrobiologii vody a jejich využití (PCR a genotypizační techniky) pro charakterizaci izolátů salmonel z ČOV

Sabina Purkrtová, Růžena Segurová, Jarmila Pazlarová, Kateřina Demnerová
Ústav biochemie a mikrobiologie VŠCHT v Praze

Úvod

Salmonely patří mezi významné primární střevní patogeny člověka a zvířat, domácích i divokých. Jednotlivé sérotypy *Salmonella bongori* a *Salmonella enterica* mohou vyvolávat různě závažná onemocnění u lidí i zvířat v závislosti na svém hostiteli a sérotypu. Mezi tato onemocnění patří též salmonelóza, v současné době druhé nejčastější gastrointestinální onemocnění v České republice. Jeho původcem jsou určité sérotypy *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, nejčastěji Typhimurium a Enteritidis. Salmonely se vyznačují vysokou odolností proti vnějším vlivům (vysychání, mráz, prostředí chudé na živiny), což jim umožňuje přežívat velmi dlouhou dobu mimo své hostitele v různých typech prostředí jako jsou odpadky, voda či půda (Rhen *et al.*, 2007). Životní prostředí takto poté slouží jako zdroj kontaminace pro domácí zvířectvo, ať již přímo či přenosem přes divoká zvířata, zatímco fekální kontaminace odpadních vod či použití kontaminovaných organických odpadů zpětně kontaminuje životní prostředí (Hanning *et al.*, 2009). Hlavním zdrojem infekce pro člověka je požití kontaminované potravy živočišného či rostlinného původu. V důsledku nadužívání či nesprávného užívání antibiotik ve veterinární i humánní medicíně dochází postupně ke vzniku a šíření rezistentních forem bakterií. V případě salmonel patří mezi nejčastěji detekované rezistence rezistence k tetracyklinu vyvolávaná zvláště determinantami rezistence, které kódují transmembránové proteiny zajišťující aktivní eflux tetracyklinu z buňky (Tet A – Tet G, Tet I – Tet L; Chopra *et al.*, 2001). Genotypizační metody umožňují srovnání zjištění příbuznosti jednotlivých izolátů na základě analýzy shodnosti jejich genomu. Genotypizační metoda ERIC-PCR je založena na PCR amplifikaci úseků vymezených tzv. enterobakteriálními repetitivními intergenovými konsensy (ERIC-Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus; Hulton *et al.*, 1991; Olive a Bean, 1999). Tyto sekvence, dlouhé 124-127 párů bazí, obsahují vysoce konzervativní centrálně vložené opakování a jsou přítomné v extragenových oblastech genomu ve 30-50 kopiích. K PCR amplifikaci jsou použity primery komplementární ke koncovým sekvencím této centrální repetitivní sekvence. Výsledkem amplifikace je poté pro každý izolát specifická sada fragmentů odlišných délek (tzv. fingerprint), která reflektuje rozdíly v genomu jednotlivých izolátů (změna velikosti fragmentů v případě delece či inserce). Cílem této práce bylo charakterizovat jednotlivé izoláty ze dvou Čističek odpadních vod (ČOV) na jejich rezistenci k tetracyklinu a charakterizovat je genotypově.

Materiál a metody

K práci byly použity izoláty *Salmonella enterica* subsp. *enterica* získané ze dvou mimopražských ČOV (zdroje A, B) v období říjen 2009 až říjen 2010 během celkem šesti nezávislých odběrů (značeny T1 – T6). Ze zdroje A bylo takto postupně získáno 10 izolátů při čtyřech nezávislých odběrech – izoláty S1, S2, S3, S4, S5 (v čase T1); S6 (T2); S7, S8 (T3); S9, S10 (T6). Ze zdroje B byl získán izolát S11 v čase T4 a dále skupina izolátů S12 (S12-0, S12-1, S12-2, S12-3, S12-4, S12-5, S12-6) v čase T5. Pracovní kultury byly kultivovány na XLD agaru (Merck, Německo) při 37 °C přes noc a dále uchovávány při 4 °C. Přeočkování bylo prováděno jednou za dva týdny. Identifikace izolátů byla provedena sadou biochemických testů Enterotest24 (Lachema, Česká republika).

Vyšetření rezistence k tetracyklinu bylo provedeno diskovou difuzní metodou na půdě Mueller-Hinton (HiMedia, Indie) za použití tetracyklinových disků (Oxoid, Německo). V případě izolátů rezistentních k tetracyklinu byla též určena jejich minimální inhibiční koncentrace pomocí M.I.C.E. stripů (Oxoid, Německo). Krátce 24 hodinová kultura rostoucí na PCA (Merck, Německo) byla resuspendována v 6 ml fyziologického roztoku a dále ředěna 1:10 také do fyziologického roztoku. K přelivu plotny s Mueller-Hintonovým agarem o přesné výšce 4 mm byly použity 2 ml této suspenze. Po 5 minutách byla přebytečná suspenze odsáta, plotny osušeny (37 °C, 15 minut) a byly aplikovány tetracyklinové disky a M.I.C.E. stripy.

Izolace chromozomální DNA byla provedena pomocí komerčního kitu GenElute Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, USA) z bakteriální suspenze rostoucí v BHI (Merck, Německo) přes noc při 37 °C. V případě plazmidové DNA byla doba kultivace prodloužena na 48 hodin a použit komerční kit GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich, USA).

K PCR detekci genů *tetA*, *tetB*, *tetC* a *tetG* kódujících transmembránové proteiny zajišťující aktivní eflux tetracyklinu z buňky byly použity sekvence primerů a reakční profily známé z literatury (Guillaume *et al.*, 2000). K detekci bylo použito 5 µl izolované DNA v celkovém objemu reakce 25 µl za použití 1 U *aTaq* polymerázy (Promega, USA). Složení reakční směsi bylo následující: pufr pro polymerázu (1X), hořečnaté kationty (1,5 mM), nukleotidy (0,2 mM; Promega, USA), primery (0,4 µM každý; Metabion, Německo). Elektroforetická separace byly proveden při 1,5 % agarosovém gelu (Bio-Rad, Kanada) při 90 V po dobu 60 minut. Primery a reakční profil pro genotypizační metody ERIC-PCR byly převzaty z literatury (Albufera *et al.*, 2009). K detekci bylo použito 3 µl izolované DNA v celkovém objemu reakce 25 µl za použití 1 U *aTaq* polymerázy (Promega, USA). Složení reakční směsi bylo následující: pufr pro polymerázu (1X), hořečnaté kationty (2,5 mM), nukleotidy (0,2 mM; Promega, USA), primery (2 µM každý; Metabion, Německo). Elektroforetická separace byly proveden při 1,5 % agarosovém gelu (Bio-Rad, Kanada) při 90 V po dobu 120 minut. Tato metoda poskytla u jednotlivých kmenů sadu 12 -14 dobře viditelných fragmentů v rozsahu zhruba 180 – 1800 bp.

Výsledky a diskuse

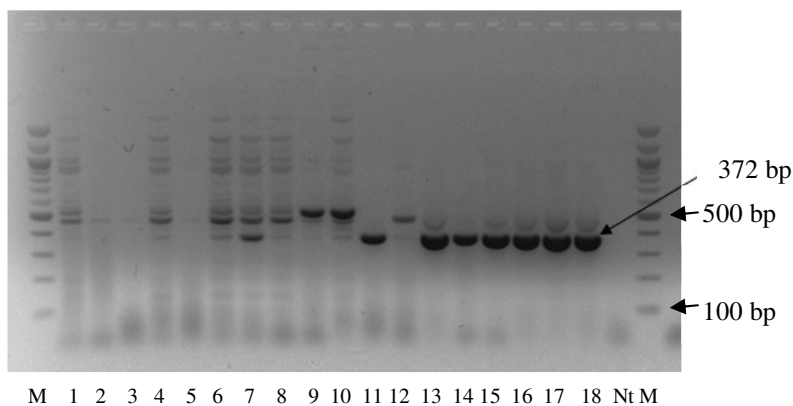
V případě zdroje A nevykazoval žádný z deseti izolátů *Salmonella enterica* subsp. *enterica* fenotypovou rezistenci k tetracyklinu. PCR detekce všech sledovaných *tet* genů (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetG*) neprokázala jejich přítomnost na chromozomální DNA a u genů *tetB*, *tetC* a *tetG* ani na plazmidové DNA. PCR amplifikace s primery komplementárními k *tetA* provedená s plazmidovou DNA poskytla očekávaný produkt o velikosti 372 párů bazí u šesti izolátů, avšak o výrazně nižší intenzitě v porovnání s izoláty rezistentními k tetracyklinu ze zdroje B (Obr. 1). Pro bližší objasnění povahy těchto produktů a jejich vztahu k přítomnosti a fenotypovému projevu *tetA* u izolátů sensitivních k tetracyklinu (např. mutace či nedokonalý horizontální přenos genu) je však nutno provést jejich další analýzu (např. restriční štěpení či sekvenace). Při analýze metodou ERIC-PCR poskytlo těchto deset izolátů celkem tři různé sady fragmentů (Obr.2). K první kombinaci patřily izoláty S1, S2, S5 (T1); S6 (T2); S9 (T6). Ke druhé kombinaci patřily izoláty S3, S4 (T1) a S10 (T6). Třetí kombinaci tvoří izoláty S7 a S8 (T3). Tyto výsledky by naznačovaly, že v prvních dvou případech mohlo dojít k opakované kontaminaci odpadních vod izoláty ze dvou různých zdrojů (1 - T1, T2, T6; 2 - T1, T6). Pro ověření této domněnky bude provedena potvrzující genotypizace izolátů dalšími genotypizačními metodami (REP-PCR, PFGE).

V případě zdroje B byla zjištěna rezistence k tetracyklinu o různých minimálních inhibičních koncentracích u celkem sedmi izolátů poskytujících genotypizační metodou ERIC-PCR tři odlišné sady fragmentů (Obr.2). První skupinu izolovanou v čase T5 tvořily izoláty S12-1 (64 µg/ml) a S12-2 (128 µg/ml). Druhou skupinu izolovanou v čase T5 tvořily izoláty S12-3, S12-

4, S12-5 a S12-6, u kterých byla ve všech případech zjištěna minimální inhibiční koncentrace tetracyklinu rovná 64 µg/ml. V čase T4 byl získán izolát S11 (26 µg/ml) poskytující stejnou sadu fragmentů jako izoláty S3, S4 (T1) a S10 (T6) získané ze zdroje A. Poslední izolát S12 (T5) byl k tetracyklinu sensitivní a jeho sada fragmentů se neshodovala s žádným z ostatních izolátů. U všech izolátů rezistentních k tetracyklinu byla PCR detekcí zjištěna přítomnost genu *tetA* na chromozomální i plazmidové DNA (Obr.1, Obr.3). Faldýnová *et al.* (2003) zjistili, že výskyt *tetA* u rezistentních izolátů *Salmonella enterica* sv. Typhimurium v České republice začal mít v letech 2000-2002 vzrůstající význam. Výskyt rezistence k tetracyklinu u izolátů o odlišném genotypu ve stejném čase (S12-1,S12-2;S12-3,S12-4,S12-5,S12-6) či vyskytujících se v nereizistentní formě i ve zdroji A (S11) by mohl svědčit o přítomnosti tzv. hot-spot ve vztahu k tetracyklinové rezistenci, tj. místa se zvýšenou pravděpodobností vývoje či přenosu rezistence k tetracyklinu, v okolí zdroje B.

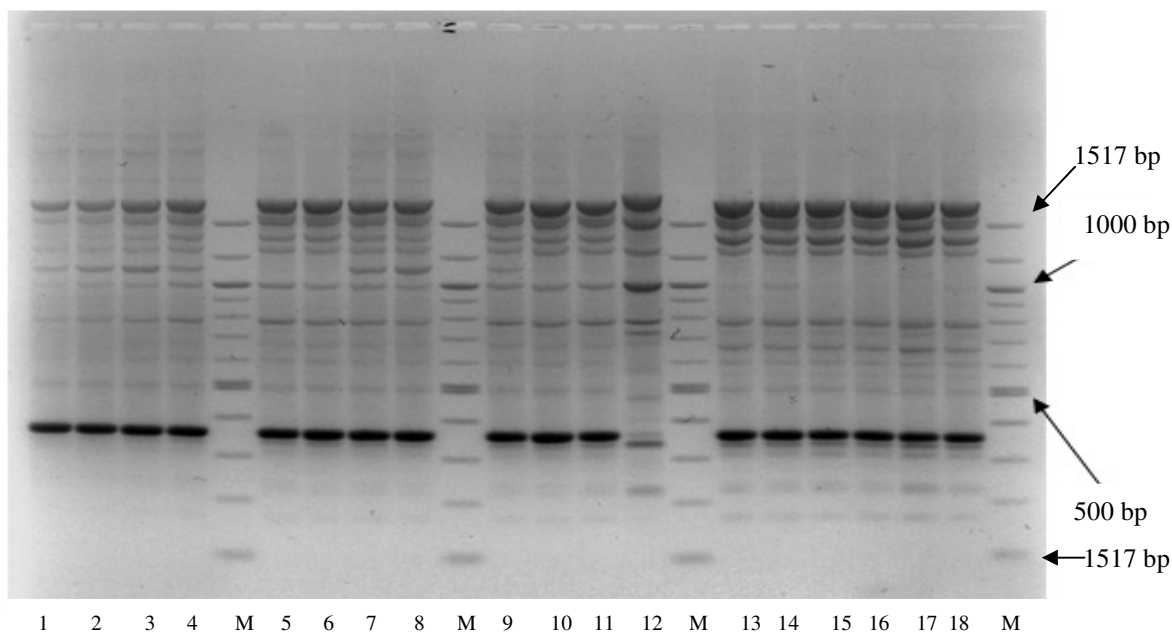
Závěr

V případě zdroje A byly všechny izoláty *Salmonella enterica* subsp. *enterica* k tetracyklinu sensitivní. Byl však zjištěn opakovaný výskyt dvou genotypů detekovaných metodou ERIC-PCR v průběhu času, což by mohlo poukazovat na přítomnost děletrvajícího zdroje salmonel v okolí zdroje A. V případě zdroje B byla zjištěna rezistence k tetracyklinu u sedmi izolátů o třech různých genotypech. U pěti izolátů byla zjištěna MIC rovná 64 µg/ml, u dalších dvou 26 µg/ml a 128 µg/ml. Ve všech případech byla tato rezistence kódována genem *tetA*, detekovaným jak na chromozomální, tak plazmidové DNA. Jeden ze zjištěných genotypů byl detekován též ve zdroji A, avšak bez rezistence k tetracyklinu. Možným vysvětlením těchto jevů je výskyt podmínek příznivých pro vývoj či přenos rezistence k tetracyklinu (tzv. hot-spot) v okolí zdroje B.



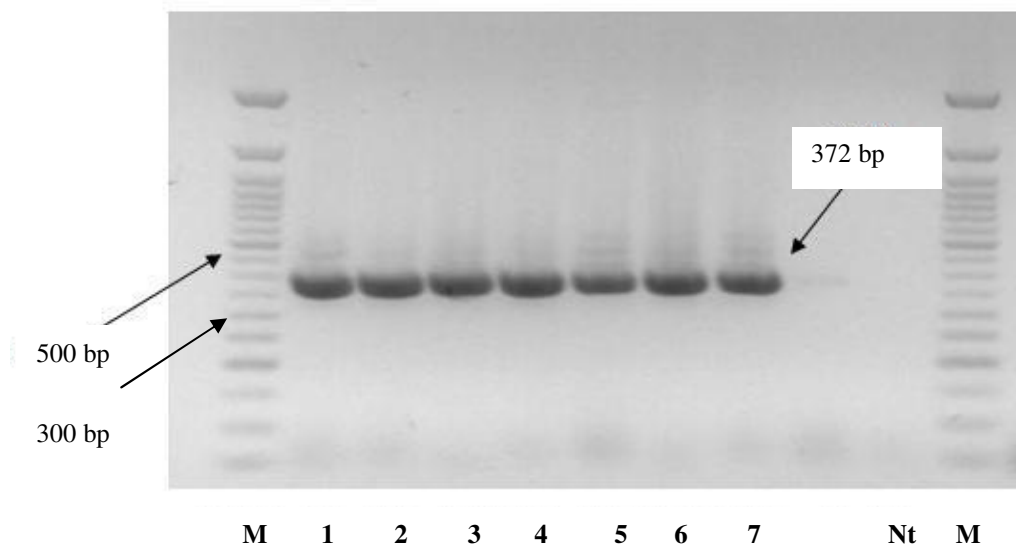
Obr.1 PCR detekce *tetA* na plazmidové DNA u jednotlivých izolátů

Legenda: M – 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, USA), Nt – beztemplátová kontrola. 1: S7, 2: S8, 3: S1, 4: S2, 5: S3, 6: S4, 7: S5, 8: S6, 9: S9, 10: S10, 11: S11, 12: S12-0, 13: S12-1, 14: S12-2, 15: S12-3, 16: S12-4, 17: S12-5, 18: S12-6.



Obr.2 Genotypizace izolátů metodou ERIC-PCR.

Legenda: M – 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, USA), Nt – beztemplátová kontrola. 1: S7, 2: S8, 3 : S1, 4: S2, 5: S3, 6: S4, 7: S5, 8: S6, 9: S9, 10: S10, 11: S11, 12: S12-0, 13: S12-1, 14: S12-2, 15: S12-3, 16: S12-4, 17: S12-5, 18: S12-6.



Obr.3 PCR detekce *tetA* na chromozomální DNA u izolátů rezistentních k tetracyklinu

Legenda: M – 50 bp DNA Ladder (New England Biolabs, USA), Nt- beztemplátová kontrola. 1: S12-0, 2: S12-1, 3: S12-2, 4: S12-3, 5: S12-4, 6: S12-5, 7 : S12-6.

Literatura:

- Albufera U. *et al.* (2009) : Molecular characterization of *Salmonella* isolates by REP-PCR and RAPD analysis. *Infect. Genet. Evol.*, 322-327
- Faldýnová M. *et al.* (2003) : Evolution of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains isolated in the Czech Republic between 1984 and 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002-2005

Guillaume G. *et al.* (2000): PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. *FEMS Microbiol. Lett.*, 77–85

Hanning I. B. *et al.* (2009): Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. *Foodborne Pathog. Dis.*, 635-48

Hulton C. S. *et al.* (1991): ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.*, 825–834

Chopra *et al.* (2001) : Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 232–260.

Olive D. M., Bean P. (1999): Principles and applications of methods for DNA- based typing of microbial organisms. *Journ. Clin. Microb.*, 1661-1669

Rhen M. *et al.* (2007): *Salmonella: Molecular Biology and Pathogenesis*, 1st ed., Taylor and Francis, London

Kontakt na autory: Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT v Praze, Technická 5, 166 28, Praha 6, purkrtos@vscht.cz

Poděkování

Tato práce byla podpořena projektem LD11048.

Lze překonat problémy se stanovením koliformních bakterií v pitných vodách pomocí chromogenních pŕd?

Katarína Slezáková, Hana Mlejnková, Dana Baudišová
²Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. M., v. v. i.

Úvod

V současné době lze v české republice stanovit koliformní bakterie a *Escherichia coli* ve vodách dle tří normativních předpisů. Metody popsané v těchto normách však skýtají pro běžnou rutinní praxi mnohá úskalí. Na trhu se proto čím dál víc objevují přípravky pro stanovení těchto organismů alternativními metodami. Cílem této práce bylo odpovědět na otázku, zda je možné překonat problémy se stanovením koliformních bakterií v pitných vodách pomocí chromogenních pŕd.

1. Současné normativní předpisy

ČSN 75 7837 (757837): Jakost vod - Stanovení koliformních bakterií v nedesinfikovaných vodách

V této normě je pro stanovení koliformních bakterií doporučenou kultivační pŕdou Endo agar. Námí zvolené dehydratované médium Modified Endo Agar Base s pŕdávkem suplementu Basic Fuchsin bylo od firmy HiMedia-ČADERSKÝ-ENVITEK spol. s r.o. Pro konfirmační cytochromoxidázový test bylo v laboratoři čerstvě pŕipravené činidlo s následujícím složením:

– tetramethyl-p-fenylendiamindi(hydro)chlorid	1,0 g
– pentahydrát thiosíranu sodného	0,2 g
– disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Chelaton 3)	0,1 g
– destilovaná voda	100 ml

Principem této metody je fermentace laktózy a současná tvorba kyseliny, popŕ. aldehydu pŕi 37 °C a následně negativní cytochromoxidázová aktivita. (Baudišová, 2007)[1]

Pro dosažení potřebných výsledků je důležité složení Endo agaru a to obsah NaCl a masového extraktu.

ČSN EN ISO 9308-1 (757836): Jakost vod - Stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií - Část 1: Metoda membránových filtrů

Pro toto stanovení bylo vybráno normou doporučené dehydratované médium Modified Tergitol 7 Agar Base s pŕdávkem TTC Solution 1% a pro následnou neselektivní kultivaci presumptivních kolonií dehydratované médium Tryptone Yeast Extract Agar (HiMedia-ČADERSKÝ-ENVITEK spol. s r.o.). Po té byl proveden cytochromoxidázový test za pomoci činidla o složení uvedeném v odstavci 1.1 a činidla pro test OXIDÁZA od společnosti MICRO-LA-TEST -PLIVA Lachema. Přítomnost bakterií rodu *Escherichia coli* byla potvrzena detekčními proužky COLI test a činidlem protest INDOL (MICRO-LA-TEST -PLIVA Lachema).

Tato metoda rovněž využívá vlastnost koliformních bakterií fermentovat laktózu a současně tvořit kyselinu, popŕ. aldehyd pŕi 37 °C. Pro konfirmaci se kontroluje negativní cytochromoxidázová aktivita.

Vlastností bakterií rodu *E.coli* je aktivita enzymu β -D-glukuronidázy (fluorescence při UV záření) a enzymu tryptofanázy (schopnost odštěpovat indol z tryptofanu).

Nevýhodou této metody je přítomnost doprovodné mikroflóry u nedezinfikovaných vod, pracnost metody při vyšším počtu laktóza pozitivních kolonií a snížená přesnost výsledků v důsledku přepočtů.

ČSN 75 7835 (757835): Jakost vod - Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*

Termotolerantní koliformní bakterie byly selektivně kultivovány při 44°C na půdě připravené z dehydratovaného média m-FC Agar Base obohaceného o kyselinu rosolovou (HiMedia-ČADERSKÝ-ENVITEK spol. s r.o.)

Kultivační médium potřebné pro konfirmaci *E.coli* bylo připraveno v laboratoři ve složení:

-pepton	5 g
-masový(kvasničný) extrakt	3 g
-agar	15 g
-MUG Supplement (4-methyl-umbelliferyl- β -D-glukuronidem) (HiMedia-ČADERSKÝ-ENVITEK spol. s r.o.)	
-destilovaná voda	1000 ml

Fekální koliformní bakterie mají vlastnost fermentovat laktózu, která způsobí změnu barvy acidobazického indikátoru z bezbarvé na modrou. U této metody není nutný konfirmační cytochromoxidázový test. (Zástupci cytochromoxidáza-pozitivních kmenů při 44 °C prakticky nerostou.)

Aktivita enzymu β -D-glukuronidázy u *E.coli* (fluorescence při UV záření) je prokázána kultivací na médiu s obsahem 4-methyl-umbelliferyl- β -D-glukuronidu.

2. Alternativní metody

Metody definovaného substrátu (Colilert-18/Quanti-Tray-Consyngen CZ)

K průkazu koliformních bakterií rostoucích v živném prostředí Colilertu je používán chromogenní substrát ONPG (orto-nitro-fenyl- β -D-galaktopyranosid), který slouží k detekci enzymu β -D-galaktosidázy, produkovaného koliformními bakteriemi. Při hydrolýze ONPG tímto enzymem dochází k změně zbarvení substrátu z bezbarvé na žlutou, což indikuje pozitivitu testu. Přítomnost enzymu β -D-glukuronidázy (*E.coli*) je prokázána fluorescencí při UV záření.

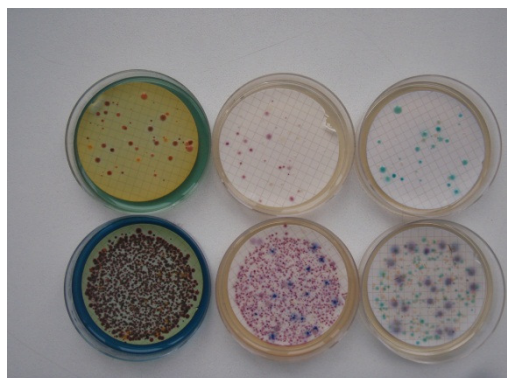
Výhodou této metody je jednoduchost zpracování z čehož plyne možnost zpracování více vzorků, pro bakterie fyziologicky vhodnější tekuté prostředí, detekce TC a ECOLI zároveň a početní rozmezí stanovení až tří řádů.

Nevýhodou je naopak vysoká prvotní investice na pořízení zatavovacího zařízení, odlišné pojetí stanovení (přítomnost enzymu β -D-galaktosidázy, ne fermentace laktózy). Výsledky jsou udávány v MPN-nejpravděpodobnější počet.

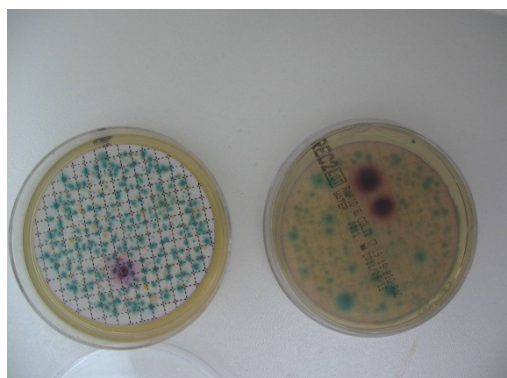
Chromogenní půdy (RAPID'E.coli 2™ Agar (REC)-BIO-RAD)

Princip spoléhá na současnou detekci dvou enzymatických aktivit, β -D-glukuronidázy (GLUC) a β -D-galactozidázy (GAL). Médium obsahuje dva chromogenní substráty. Jeden ze substrátů je specifický pro GAL a výsledné modrozeleně zbarvené kolonie jsou pozitivní pro tento enzym a druhý substrát je specifický pro GLUC a vede k fialovému zbarvení kolonií pozitivních pro tento enzym.

Koliformních bakterií, jiné než *E. coli* (GAL + / GLUC-) tvoří modrozeleně zbarvené kolonie, zatímco kolonie *E. coli* (GAL + / GLUC +) mají fialové zbarvení. Počet všech koliformních bakterií lze získat součtem modrých a fialových kolonií.



Obr. 1: Znečištěné toky (TTC, CHROMOCULT, RAPID E. coli 2)

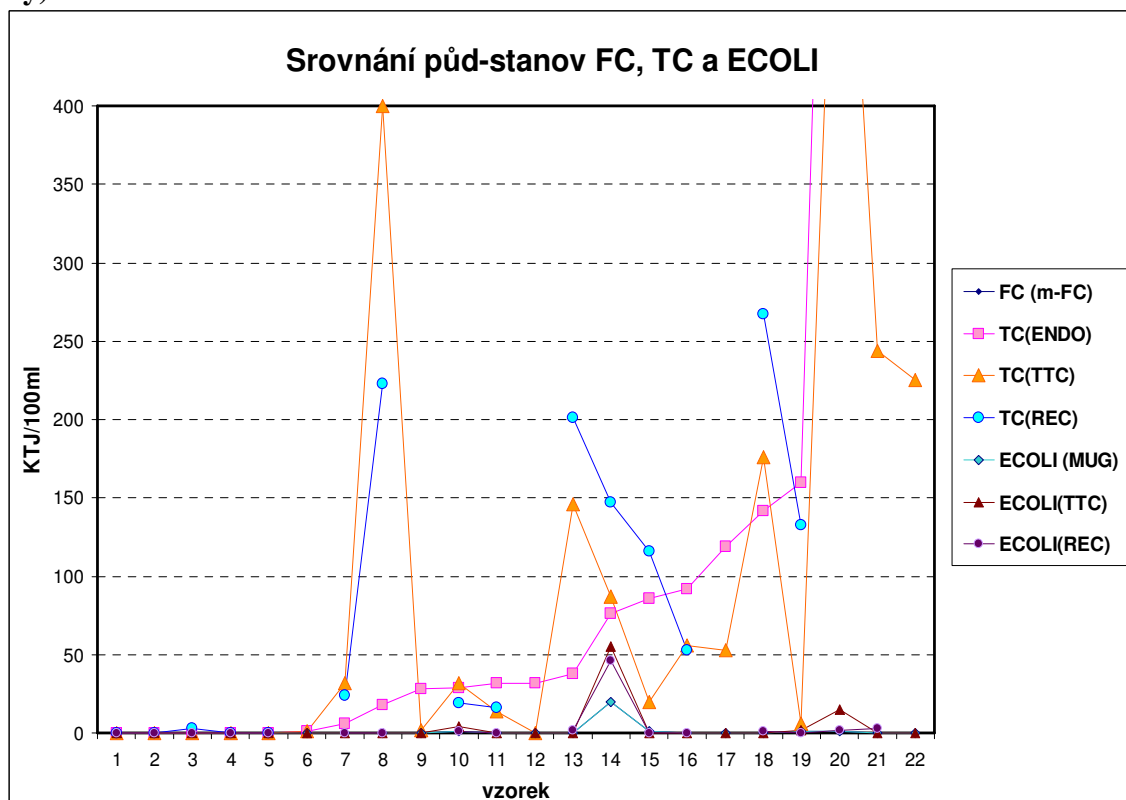


Obr. 2: Přehradý (RAPID E. coli 2)

Tab. 1: Výsledky srovnávání kultivačních půd pro TC a ECOLI ve vzorcích pitných vod (studny)

číslo vzorku	parametr/půda(KTJ/100 ml)								
	FC	TC					ECOLI		
	m-FC	ENDO		TTC		REC	m-FC/MUG	TTC/INDOL	REC
	presump.	potvrz.	presump.	potvrz.					
1	0	0	0	102	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	5	0	1	0	3	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	1	1	1		0	0	0
7	0	16	6	32	32	24	0	0	0
8	0	42	18	414	400	223	0	0	0
9	0	28	28	5	2		0	0	0
10	1	36	29	34	32	19	1	4	1
11	0	36	32	25	14	16	0	0	0
12	0	32	32	0	0		0	0	0
13	0	105	38	206	146	201	0	0	2
14	20	96	76	112	87	147	20	55	46
15	1	132	86	100	20	116	1	0	0
16	0	113	92	56	56	53	0	0	0
17	0	124	119	53	53		0	0	0
18	0	203	142	410	176	267	0	0	1
19	1	200	160	6	6	133	1	2	0
20	1	1520	960	655	655	N	1	15	2
21	0	1600	1360	263	244	N	0	0	3
22	0	N	N	250	225		0	0	0

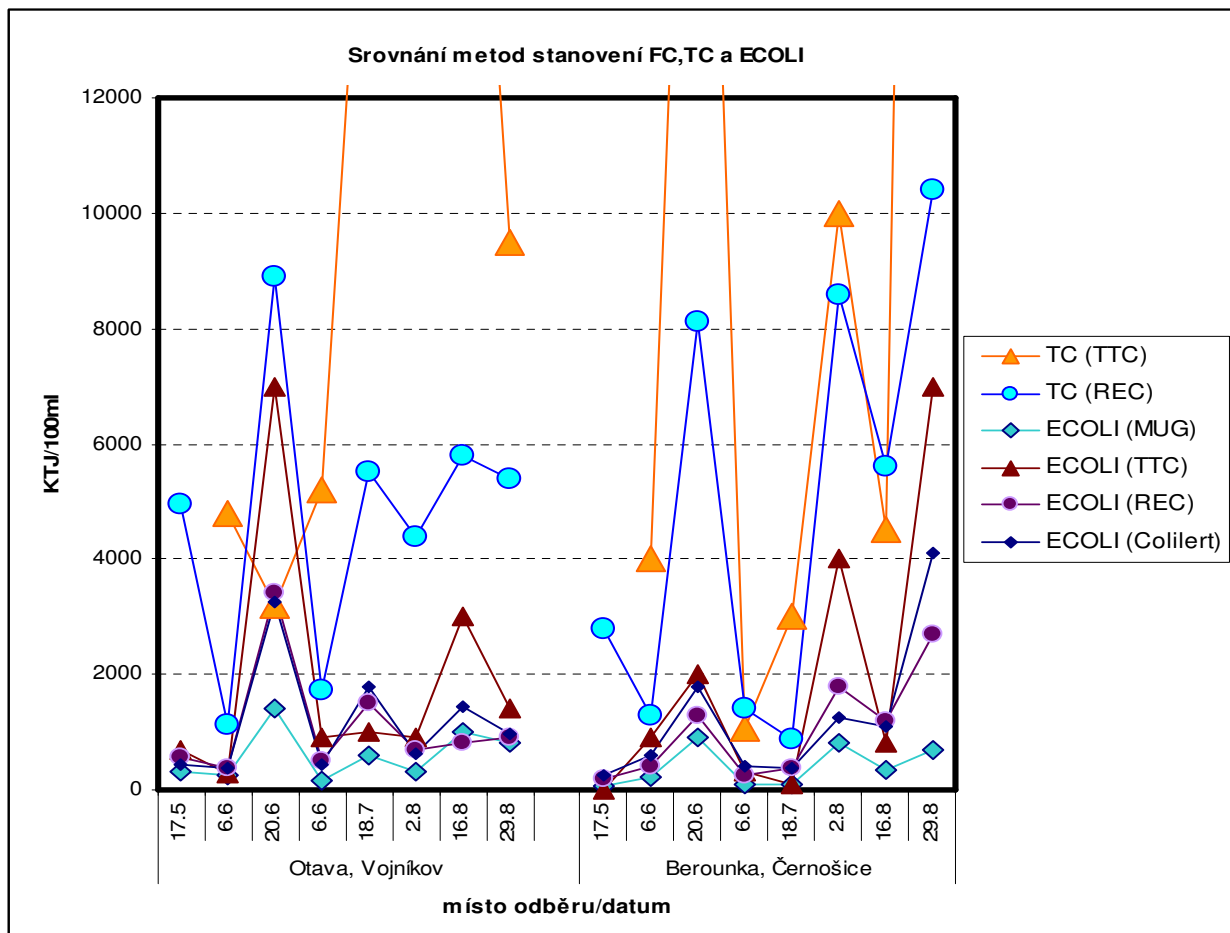
Graf 1: Výsledky srovnávání kultivačních půd pro TC a ECOLI ve vzorcích pitných vod (studny)



Tab. 2: Výsledky srovnávání kultivačních půd pro TC a ECOLI ve vzorcích povrchových vod (znečištěné toky)

místo odběru vzorku	datum odběru (2011)	parametr/půda(KTJ/100 ml)							
		FC	TC			ECOLI			
			m-FC	TTC		REC	m-FC/MUG	TTC/INDOL	Colilert
			presump.	potvrz.					
Otava, Vojníkov	17.5	520	20000		4960	320	700	435	560
	6.6	360	15000	4800	1140	260	280	384	370
	20.6	2000	15000	3200	8900	1400	7000	3255	3400
	6.6	180	30000	5200	1720	150	900	446	510
	18.7	1100	67000	18000	5500	600	1000	1785	1500
	2.8	500	30000	68000	4400	300	900	638	700
	16.8	1500	100000	22000	5800	1000	3000	1439	800
	29.8	800	80000	9500	5400	800	1400	959	900
Berounka, Černošice	17.5	90	190		2780	50	6	265	180
	6.6	320	40000	4000	1300	220	900	598	400
	20.6	950	50000	25000	8100	900	2000	1782	1300
	6.6	110	6000	1050	1400	90	310	399	250
	18.7	150	24000	3000	890	100	100	373	390
	2.8	1400	200000	10000	8600	800	4000	1259	1800
	16.8	460	50000	4500	5600	360	800	1106	1200
	29.8	700	250000	49000	10400	700	7000	4106	2700

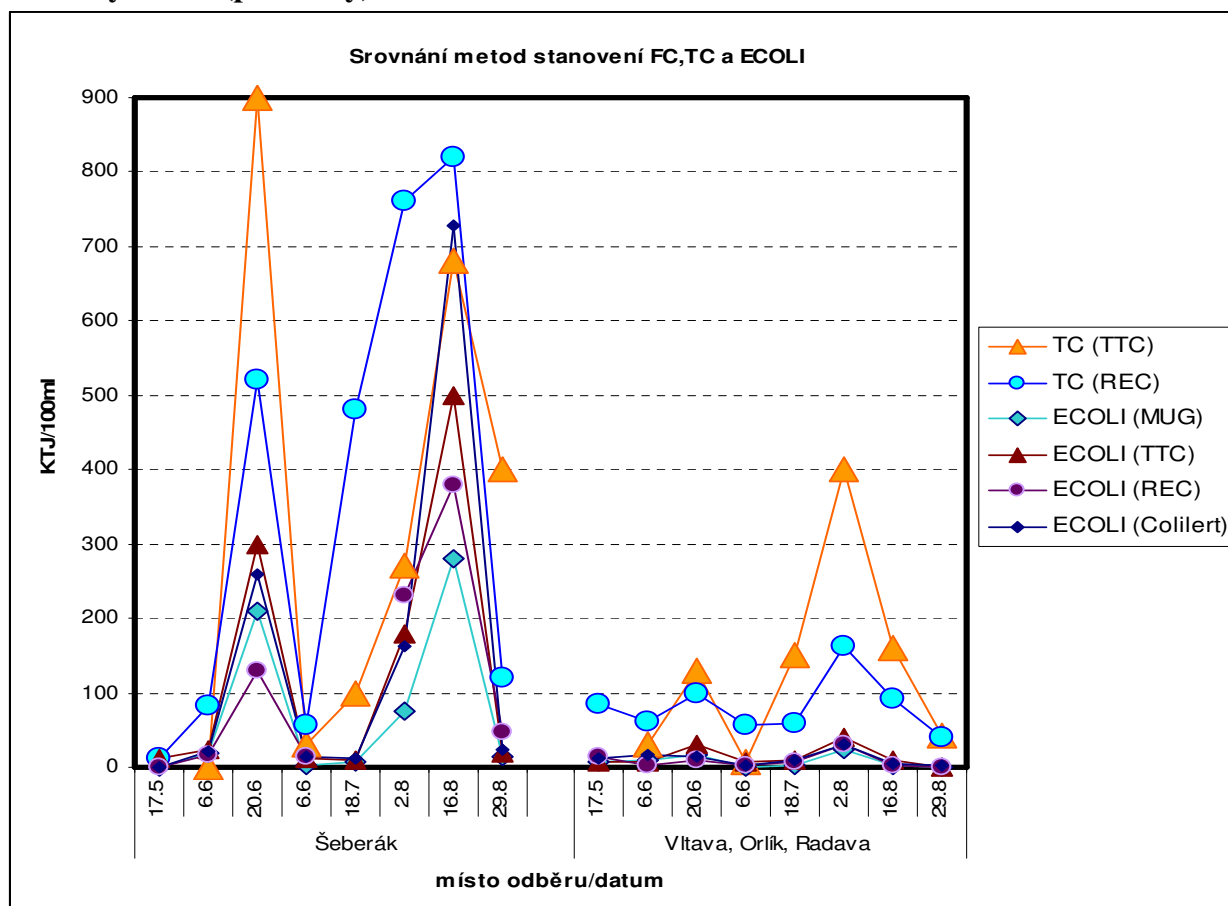
Graf 2: Výsledky srovnávání kultivačních půd pro TC a ECOLI ve vzorcích povrchových vod (znečištěné toky)



Tab. 3: Výsledky srovnávání kultivačních půd pro TC a ECOLI ve vzorcích povrchových vod (přehrady)

místo odběru vzorku	datum odběru (2011)	parametr/půda(KTJ/100 ml)							
		FC	TC			ECOLI			
		m-FC	TTC		REC	m-FC/MUG	TTC/INDOL	Colilert	REC
		presump.	potvrz.						
Šeberák	17.5	0	400		11	0	12	1	0
	6.6	22	N	N	82	20	24	20,9	16
	20.6	270	3000	900	520	210	300	260,2	130
	6.6	2	2000	30	56	2	11	13,1	13
	18.7	12	2000	100	480	8	10	11,8	
	2.8	84	10000	270	760	76	180	161,6	230
	16.8	380	15000	680	820	280	500	727	380
	29.8	18	10000	400	119	14	20	22,8	47
Vltava, Orlík, Radava	17.5	7	400		85	7	7	12	15
	6.6	17	N	30	61	10	8	16,3	3
	20.6	17	7000	130	99	16	30	13	9
	6.6	3	1500	8	57	0	6	2	3
	18.7	4	3000	150	58	3	10	9,8	8
	2.8	30	10000	400	162	24	40	31,3	31
	16.8	2	1000	160	93	2	10	4,1	3
	29.8	0	1000	42	40	0	1	2	0

Graf 3: Výsledky srovnávání kultivačních půd pro TC a ECOLI ve vzorcích povrchových vod (přehrady)



Závěr:

Lze překonat problémy se stanovením koliformních bakterií v pitných vodách pomocí chromogenních půd?

- ***Escherichia coli***
-ANO (stejný princip-detekce β -D-glukuronidázy)
- **Koliformní bakterie**
-NE úplně (jiný princip detekce)

Literatura:

Baudišová, D. Současné metody mikrobiologického rozboru vody : příručka pro hydroanalytické laboratoře, 1. vyd., 2007, ISBN 978-80-85900-72-9, Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka.

Zdravotní rizika listerií v pitné a rekreační vodě.

Jaroslav Šašek

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

Před několika lety došlo při konzumaci potravin (měkké sýry) k několika fatálním případům v naší republice a při této příležitosti tak jako v jiných případech jsme provedli rozbor případného rizika listerií, zejména *L. monocytogenes* (dále LM), v pitné a koupací vodě.

Charakteristika bakterie: Gram pozitivní tyčinka, velmi odolná vůči zevním vlivům, nesporeující, velikost 0,4 – 0,5 x 0,5 – 2 µm, aerobní, ale fakultativně i anaerobní

Výskyt: ubiquitní (všeobecný), reservoárem jsou volně žijící zvířata (především ptactvo) a přírodní prostředí:

- **půda** – izolace ve 22 % vzorků, přežívání v půdě značné (i 295 dní), počet se nesnižuje ani po 8 týdnech po kontaminaci půdy;
- **povrchové vody** – Colburn (1990) izoloval v řekách v Kalifornii v zimě listerie v 81 % a LM v 62 %; v sedimentech toků jen ve 30,4 % a 17,4 %; Watkins a Sleath (1981) uvádějí pro říční vzorky počty LM 3 až 170 (výjimečně i > 180)/litr; v blízkosti chovů hospodářských zvířat se dá očekávat častější výskyt LM v povrchové vodě (trus racků obsahuje LM v závislosti na prostředí – vyšší nálezy jsou v oblastech, kde jsou odpadní vody (i 15 %), než v oblastech bez těchto zdrojů);
- **odpadní vody, kaly** – Watson (1985) uvádí výskyt ve velkých počtech, ale bez přesných kvantitativních údajů; Watkins a Sleath (1981) uvádějí výskyt listerií v odpadních vodách (po mechanickém předčištění, před biologickým čištěním) potravinářských závodů na úrovni salmonel, tj. 1-100 LM/ml.

Výskyt v odpadních vodách a splaškových kalech:

Watkin, Steath, 81

primary tank effluent (odtok z usazovací nádrže)

datum	ktj/ ml			ktj / l	
	E. coli	fekální streptokoky	C. perfringens	Salmonella	Listeria monocytogenes
I- II. 79	400 - 30.000	600 - 22.000	60 - 630	0 – 5.000	700 - >18.000
VII-VIII. 79	16.000-230.000	9.000 – 23.000	7 – 2.100	0 – > 18.000	2.500 - >18.000
IX – X. 79	50.000 – 150.000	7.600 – 55.000	90 - 380	500 - >18.000	1.700 – 16.000

Kampelmacher, von Noorle Jansen, 1976

počty ze splaškových kalů

datum	pozn.:	počty / l	
		Salmonella	Listeria monocytogenes
I. 79		1200	11.000
III. 79		1300	2500
IV. 79		7.000 – 16.000	800 – 16.000
12.2.80	primary sludge	1.800	1.800
25.2.80	primary sludge	> 18.000	> 18.000

Výskyt listerií v povrchové vodě:

Watkin, Steath, 81

Počty listerií, salmonel a fekálních indikátorů v říční vodě

datum	počty / ml			počty / l	
	E. coli	fekální streptokoky	C. perfringens	Salmonella	Listeria monocytogenes
VIII. 79	/	/	/	/	170
II.79	13 - 480	10 - 400	0 - 11	18 - 50	3 – 90 (> 180)

Přežívání listerií a salmonel ve splaškových kalech:

Watkin, Steath, 81

Přežívání salmonel a L. monocytogenes ve splaškových kalech aplikovaných na půdu

týden	datum	počty / 100 g půdy	
		Salmonella	Listeria monocytogenes
0	4.12.79 – 29.1.80	130	170
1		35	350
2		8	225
5		1	> 180
6		0	> 180
7		0	> 180
8		0	160
plocha bez aplikace		0	0
tanker		70	250

Přírodní reservoár: půda (obdělávaná i neobdělávaná) včetně lesní půdy; zvířata (savci, ptáci, plazi) – domácí (hlavně hovězí dobytek) i divoká (ptáci, rackové, havrani); hmyz. Cesty přenosu: půda, rostliny, zvířata (domácí i divoká), hmyz, prach (přenos vzduchem), potraviny, interhumánní přenos (hlavně na plod, jinak vylučování nemocnými a bacilonosiči močí, fekáliemi, sekrety, krví), kontaminovaná krmiva na zvířata, siláže (2-6 %; nekvalitní i 22 %

s listerií, zaplísňené i 44 %), potravinářský průmysl – hlavně masný (odpadní vody a kaly a jejich užití k hnojení půdy a k závlahám).

Vstupní brána infekce: zažívací trakt, spojivky, respirační a urogenitální, poraněná kůže.

Inkubační doba: 3 – 70 dní.

Onemocnění:

Listeria způsobuje onemocnění (listeriózu) zvířat (skot, ovce) i lidí, ale i přes značné rozšíření listerií v prostředí je onemocnění poměrně vzácné. Většinou je způsobeno konzumací stravy, je možná i cesta nosokomiální, interhumánní přenos – nejčastěji se uplatňuje při transplacentárním přenosu, existuje bacilonosičství. Onemocnění vzniká především u predisponovaných osob (mortalita u nich 30%). Onemocnění vyvolávají různé serotypy LM. Onemocnění začíná průjemem, nevolností, zvracením.

Formy humánní listeriosis – listeriosa těhotných, novorozenců, listeriové meningitidy a meningoencefalitidy (hlavně novorozenci a starší lidé), kožní listeriosa (hlavně profesní-ošetřování zvířat), septická forma s faringitidou a mononukleosou, oční forma (konjunktivitida způsobená listeriem může přejít v purulentní meningitidu, končící často fatálně), plicní forma. Další formy vyskytující se zřídka (cervikoglandulární, lokální infekce mohou manifestovat jako artritidy, peritonitidy, osteomyelitidy, mozkové a míšňí abscesy).

Odolnost vůči vlivům:

Vliv teploty: růst v rozsahu 1 – 45 °C; minimální teplota pro růst 4 °C (prokázán i při 1°C a 3 °C). Optimální teplota růstu 30-37 °C, maximální 45-50 °C; nad 55°C devitalizační účinky, nepřežívá 60 °C. Bezpečná devitalizace při zahřátí nad 70 °C po dobu 10 minut.

Ionizující záření: na devitalizaci vyšších denzit (10⁴) postačí dávka 5 kGy (Co⁶⁰, Cs¹³⁷).

UV záření: 274 nm při intenzitě 100 μW/cm² po dobu 4 minut redukuje o 7 log. řádů.

Vliv soli: růst ještě v 10 % roztoku NaCl; ve 25 % roztoku ještě přežívá.

Vliv plynů: částečný inhibiční vliv vykazuje vakuové balení v kombinaci s nízkou teplotou, rovněž 20% CO₂ a nízká teplota. Ochranná atmosféra (80% N₂+ 20% CO₂ bez O₂) nemá výrazné letální účinky na listerie.

Dezinfekce: účinek volného chloru v živném médiu (s obsahem peptonů, bílkovin), koncentrace chloru a čas, za který dojde k redukci počtu listerií o 1 log řád – 10 mg/l = 4,7 sekund; 1 mg/l = 11,2 sekund; 0,5 mg/l = 61,7 sekund.

Antagonismus (kompetice): působí zejména příslušné bakterie mléčného kvašení (Pediococcus, Lactobacillus, Streptococcus). Naopak proteolytické bakterie (pseudomonády) umožňují růst.

Infekční dávka:

a) U zvířat: pro myši (ID₅₀) 10^{3,2-4,5}; pro myši s podanými steroidy jen 10¹⁻².

b) U člověka není ID bezpečně stanovena. Farber (1989, citovaný v Tomanové 1991) uvádí že 10³⁻⁴ buněk je schopno vyvolat onemocnění. Vnímavost k LM je snížena u osob s narušenou imunitou, způsobenou chorobami (AIDS, alkoholismus, chronická onemocnění jater a ledvin, cirrhosa jater, diabetes, leukémie), užíváním léků (glukokortikoidy, imunosupresiva) nebo fyziologicky (těhotenství). U těchto citlivějších osob stačí i < 100 buněk LM k vyvolání onemocnění. ID je však značně individuální a závisí na okamžitém stavu jedince (Tomancová, 1991). V současné době je názor na infekční dávku LM podobný (V. Špelina, NRL pro mikrobiologii potravin, osobní sdělení).

Limitní hodnoty v potravinách:

Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 852/2004 o hygieně potravin, které platí i v ČR, bere riziko z listerií v úvahu a stanoví následující limity u potravin určených k přímé spotřebě:

- pro potraviny neumožňující jejich růst: 100 LM/g.
- pro potraviny umožňující jejich růst: 0 LM/25g (po ukončení výroby), resp. 100 LM/g (v oběhu).

Riziko pro rekreaci v povrchových vodách:

Vzhledem k tomu, že infekční dávka pro člověka není dosud bezpečně stanovena, je odhad možného rizika založen na následujících úvahách:

Listerie se vyskytují všude v prostředí. Jejich přírodní rezervoár (půda), dále zvířata divoká i hospodářská, siláže, odpadní vody z chovu hospodářských zvířat a z potravinářských provozů dávají důvod k předpokladu, že v různém rozsahu bude docházet i ke kontaminaci povrchových vod. Kvantitativní poměry lze jenom odhadovat, protože povrchové vody se na listerie běžně nevyšetřují, stejně jako na původce anthraxu, brucelasy či tuberkulosní mykobakterie, které se v odpadní vodě a tím i povrchové také nacházejí (Watson, 1985).

Již citovaná práce (Watkins a Sleath, 1981) uvádí, že v odpadních vodách (jen mechanicky čištěných!) potravinářských závodů je výskyt listérií na úrovni salmonel, tj. 1-100/ml. Podle této práce se zároveň v těchto odpadních vodách vyskytovaly *E. coli* v řádu desetitisíců až statisíců v 1 ml a fekální streptokoky v řádu tisíců až desetitisíců ve stejném objemu vzorku.

Vzhledem k tomu, že odpadní vody z potravinářských provozů nejsou bez čištění vypouštěny přímo do toků (a čištěním dojde k poklesu o několik řádů) a že i vypouštěné čištěné vody se dále v recipientu ředí, bude koncentrace listérií v povrchové vodě velmi nízká. Dokládá to opět citovaná práce, která ve vzorcích říční vody v Anglii zjistila koncentrace *E.coli* a fekálních streptokoků v řádu desítek až stovek KTJ/ml, zatímco nálezy LM a salmonel v těchto vzorcích se pohybovaly obvykle v řádu **desítek KTJ v 1 litru** (pozor na rozdílné jednotky objemu vzorku!).

Uvažujeme-li množství vody, které koupající se vypije (cca 20 ml – 30 ml), tak lze předpokládat při rekreaci požití asi jedné buňky LM, v nejhorším případě pak méně než 10 buněk LM. Což u zdravých jedinců je hluboko pod infekční dávkou a nezdá se to být dostatečnou infekční dávkou ani pro citlivé (oslabené) jedince.

Vezmeme-li dále v úvahu výše uvedený vztah mezi počty indikátorů fekálního znečištění (*E.coli* a fekální streptokoky) a LM v odpadních vodách a stávající limitní hodnoty indikátorů fekálního znečištění vody vhodné ke koupání ve volné přírodě (příloha č. 1 k vyhlášce č. 135/2004 Sb.), je patrné, že tyto limity chrání i před rizikem z nákazy LM.

Je nutné si však uvědomit (jak jsme již zdůraznili v našem informačním materiálu k ptačí chřipce a rekreaci), že **při koupání na vodních plochách ve volné přírodě – bez ohledu na listerie nebo jiná infekční agens – vždy existuje určité riziko nákazy některou z infekčních nemocí**, ať už to jsou akutní onemocnění zažívacího traktu (zvracení, průjemy), akutní horečnatá onemocnění dýchacího traktu, konjunktivitidy, aseptické meningitidy, leptospiróza, cercariová dermatitida a nebo některé jiné vzácnější onemocnění. Ve většině případů jsou zřejmě původci viry. Obvykle je však toto riziko velmi nízké a zdaleka se nevyrovná prospěšným účinkům koupání ve volné přírodě, mezi které patří hlavně pohybová aktivita, otužování či pobyt na čerstvém vzduchu. **Nicméně pokud je někdo léčen na poruchu imunity, měl by se poradit se svým ošetřujícím lékařem, zda je vhodné tuto aktivitu ve volné přírodě provozovat.**

Riziko v pitné vodě:

Vodárenská úprava a dezinfekce vody představují bezpečnou bariéru proti listeriím. Zranitelnější mohou být studny, ale zde by případná nutná masivní kontaminace vodou s listeriami představovala obdobnou problematiku, jako je kontaminace střevočními bakteriemi

(salmonely, E. coli O 157 aj.), parazitickými prvky či viry. Muselo by se jednat o hrubé závady těchto zdrojů pitné vody, kdy voda ze studny je pod přímým vlivem odpadní vody nebo znečištěné povrchové vody.

Citovaná literatura:

- Colburn, K. G. et : *Listeria* Species in a California Coast Estuarine Environment, p. 2007-2011, Vol. 56, No.7, 1990.
- Watkins J. and Sleath K.P. Isolation and Enumeration of *Listeria monocytogenes* from Sewage, Sewage Sludge and River Water. *Journal of Applied Bacteriology*, 1981, 50, 1-9.
- Tomancová Iva: Problematika *Listeria monocytogenes* v potravinách. AS vydavatelství potravinářské literatury, p.80, 1991
- Watson, D.C.: Potential risk to human and animal health arising from land disposal of sewage sludge. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* 1985, 95S-103S.

Poděkování

Příspěvek vznikl díky projektu TA ČR 01020675.



