

Mikrobiologie vody a prostředí 2014

Praha, VÚV T.G.M., v.v.i

3. - 4.12. 2014



**Sborník příspěvků a
dalších konferenčních materiálů**

Editor:

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.

Obsah:

Baudišová D.: Slovo úvodem

Fuksa J., Baudišová D.: Studie jakosti vody v pramenech – co určuje počty bakterií (str. 4)

Pazlarová J.: Proč studovat biofilmy? (str. 6)

Šašek J.: Metody stanovení *Clostridium perfringens* ve vodách (str. 9)

Pumann P., Pouzarová T.: Stanovení parazitických prvoků *Giardia* a *Cryptosporidium* ve vodách (str. 12)

Matějů L., Štěpánková M.: Metoda stanovení *E. coli* jako indikátorového organismu pro zjišťování mikrobiální kontaminace v bioodpadech a upravených bioodpadech (str. 19)

Mlejnková H.: Vývoj metodiky určení míry ohrožení kulturních památek mikroorganismy (str. 25)

Pejchalová M., Martinková Š.: Alternativní metody detekce aeromonád ve zdrojích pitných vod (str. 30)



Slovo úvodem

Milí kolegové,

konečně (i když s malým zpožděním) se mi podařilo sesbírat a dát dohromady materiály pro sborníček konference „Mikrobiologie vody a prostředí 2014“, kterou pořádala Československá společnost mikrobiologická, ve spolupráci s Výzkumným ústavem vodohospodářským T.G.Masaryka, v.v.i.

Doufám, že Vám sborník připomene zajímavé přednášky a krásné diskuse na konferenci a bude Vám pomůckou při další práci. Všem přispěvatelům mnohokrát děkuji a jako bonus všichni jistě uvítáte příspěvek Dr. Pejchalové, týkající se alternativních metod detekce aeromonád ve zdrojích pitných vod (autorka se díky sněhové kalamitě nemohla na konferenci dostavit).

Sborník bude dále k dispozici ke stažení na adrese:

<http://www.heisvuv.cz/data/spusteni/projekty/mikrobiologie/default.asp>

Těším se na další spolupráci a setkání,

Dana Baudišová

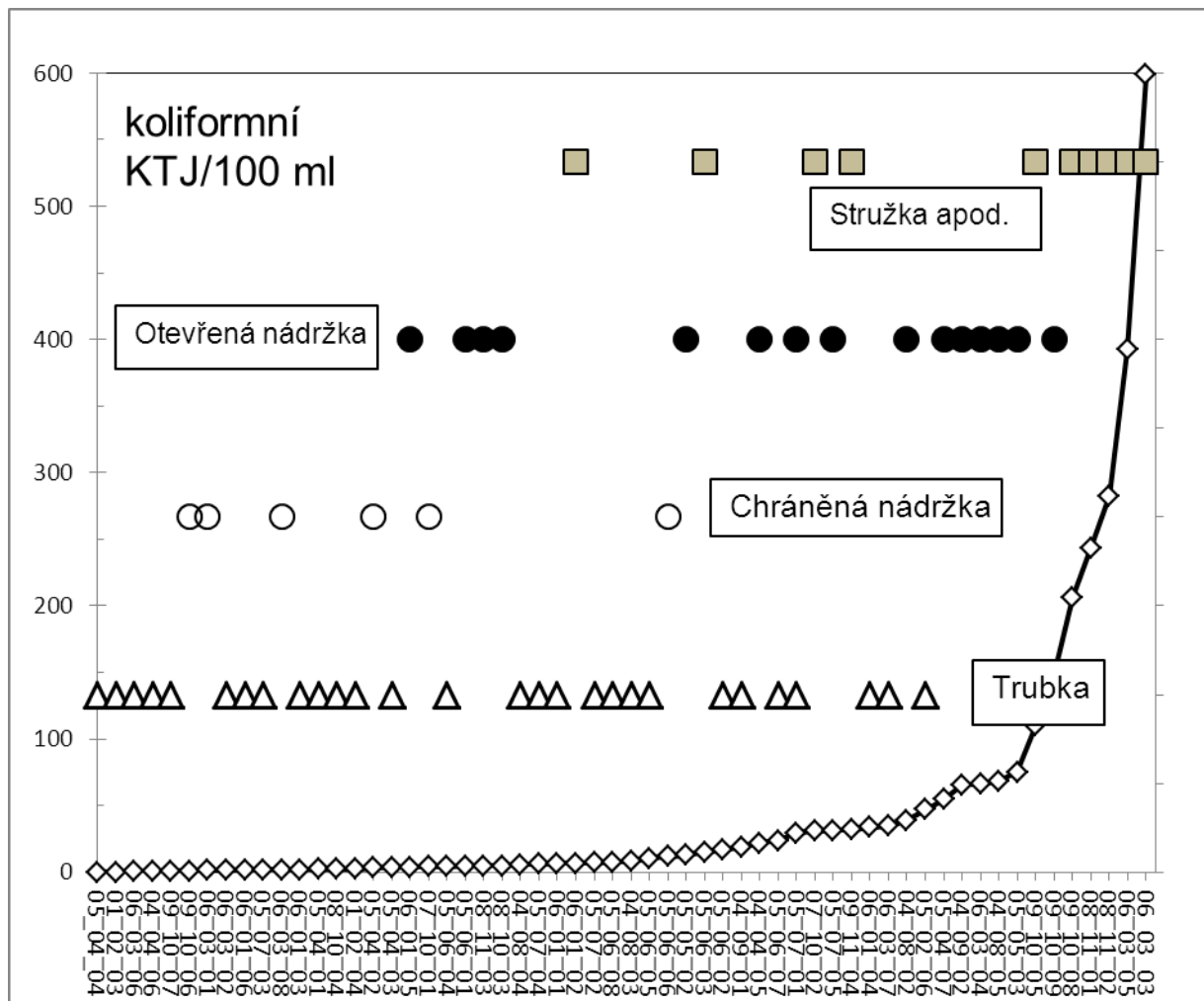
Studie jakosti vody v pramenech - co určuje počty bakterií

Josef K. Fuksa, Dana Baudišová,

Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka, v.v.i.

V rámci grantu min. vnitra č. 20112014028 „Náhradní zdroje vody v obcích v krizových situacích – využití původních zdrojů a pramenů“ jsme systematicky sledovali 61 pramenů na území Prahy. Vzorky byly odebrány od jara 2011 do konce roku 2013, soubor dat obsahuje pro každý pramen 11 hodnot (3 z roku 2011 a dva sezónní cykly v letech 2012 a 2013).

Hodnoty el. konduktivity, koncentrací dusičnanu, chloridu a síranu byly po celé období velmi stabilní a u většiny zdrojů vyhovovaly standardům pitné vody. Koncentrace dusičnanu jen výjimečně překračovaly 100 mg/l. Z hlediska bakteriologického některé prameny soustavně splňovaly standardy pro pitnou vodu, některé byly soustavně mimo možnost použití. Počty bakterií (VYPSAT) nekomunikovaly s koncentrací dusičnanu, vydatností apod., ale jako primární faktor určující „mikrobiologickou“ jakost vody se ukázal přímo stav pramene/prameniště.



Obrázek 1: Vztah počtů fekálních koliformních bakterií a stavu prameniště. Prameny jsou seřazeny podle průměrného počtu fekálních koliformních bakterií (průměry 2011-2014) – čára, Typy prameniště: výtok z trubky, krytá nádržka s odtokem, nechráněná nádržka/tůňka, prostá stružka.

Prameny byly rozděleny do čtyř typů:

- Výtok z trubky, bez možnosti kontaminace na povrchu.
- Výtok z uzavřené nebo chráněné nádržky, bez možnosti kontaminace na povrchu.
- Otevřená/nechráněná nádržka s vysokou možností kontaminace na povrchu.
- Otevřené neohraničené prameniště, odtoková stružka apod.

Na obr. 1 jsou vyneseny podle pořadí průměrné hodnoty počtů fekálních koliformních bakterií (KTJ/100 ml) a odpovídající typy pramenů. Podobný vztah platí i pro sledované typy bakteriálního znečištění.

Závěr:

Stav prameniště (vč. možností odběru vzorku) ovlivňuje zjišťované počty mikrobiologických indikátorů znečištění podstatně významněji, než případná kontaminace podzemní vody resp. hydrogeologického kolektoru.



Praha 5, Radlice. Malé studánky jsou vystaveny antropogennímu tlaku všeho druhu

Proč studovat biofilmy?

Jarmila Pazlarová

Ústav biochemie a mikrobiologie, FPBT, VŠCHT Praha

Biofilm je možné definovat jako tenkou vrstvu mikrobů rostoucích na pevném povrchu ((inertní i živé povrchy) různých předmětů, která má specifické uspořádání. Biofilm je přirozený způsob existence mikroorganismů a probíhá všude tam, kde jsou mikroorganismy a kontaktní povrchy. Jedná se o základní způsob existence mikroorganismů, neboť pokud žijí jednotlivé bakteriální buňky samostatně, často extrémní prostředí nepřežijí, případně se alespoň nemnoží. V případě biofilmů se jedná o komplexní ekosystémy, které představují vyšší a složitější způsob života (předznamenání tkání vyšších organismů.) Biofilmy v různých typech životních prostředí nesestávají jenom z jednoho druhu bakterie, ale spíše z celé řady mikroorganismů včetně archeí, protozoí, hub a dokonce i malých mnohobuněčných organismů. V celé historii mikrobiologie byly mikroorganismy charakterizovány a studovány jako planktonické, volně žijící suspensní buňky a byly popsány na základě svých růstových charakteristik na nutričně bohatých kultivačních půdách. Rozvoj studia mikrobiálních biofilmů odstartoval W. Costerton¹ (1934 - 2012), jehož článek z roku 1978 „How bacteria stick” vyvolal zájem o tuto problematiku.

Tvorba biofilmu

Tvorba biofilmu je dynamický proces. Plovoucí bakteriální buňky (tzv. planktonická forma) se přichytí na pevný povrch. Tvorba biofilmu začíná přichycením (attachment) volně žijících buněk na povrch. Tyto buňky – první kolonisté se uchycují na povrchy pomocí slabých reverzibilních van der Waalsových sil. Nejsou-li tyto kolonisté okamžitě odstraněni z povrchu, mohou se pevněji zakotvit za užití adhezivních molekul vylučovaných buňkou, jako jsou malé bíčičky bez aktivního pohybu - pili.

V další fázi mikroorganismy začínají za určitých podmínek vylučovat polysacharidy, které slouží jako ochrana před environmentálními stresy a následně znemožňují jejich odstranění z povrchů. Zároveň dochází ke ztrátě bíčičků a mikroby přecházejí na statický způsob života v matici². Tato trojrozměrná (3-D) matrice (matrix) složená z polysacharidů, proteinů, DNA (tyto složky tvoří extracelulární polymerické látky = extracelulární polymerní substance EPS) a mikroorganismů je označována jako “biofilm.” Buňky pak drží pohromadě v jakési hlenovité mikrokolonii, rostou, množí se a v kolonii vznikají následně i struktury zajišťující dostatečnou výživu, přísun čerstvé vody a případně i kyslíku pomocí kanálků. Následuje fáze růstu; koncentrace biomasy roste a biofilm se zvětšuje. Pokud velikost kolonie či tloušťka biofilmu přesáhne kritickou mez, některé buňky se začnou odlučovat, opět odplouvají a kolonizují další části přilehlých povrchů. Vytvořená struktura biofilmu je tedy složena z mikrobiálních buněk a EPS, má definovanou architekturu, a poskytuje optimální prostředí pro výměnu genetického materiálu mezi buňkami. **Matrice** je vícesložková substance obsahující nejen polysacharidy. Je složena z velkého počtu proteinů, glykoproteinů, a glykolipidů, a v mnoha případech také z extracelulární DNA (e-DNA). V biofilmech utvořených v environmentálních podmínkách, jsou polysacharidy jen minoritní složkou. Některé součásti EPS si vyžádaly zvýšenou pozornost. Jedná se např. o alginát, polyanionický polysacharid, který je nejlépe prostudovanou součástí mukoidních biofilmů *Pseudomonas aeruginosa*³. Buňky spolu také komunikují pomocí quorum sensing, tato regulace ale také může ovlivnit rozvolnění biofilmu, (detachment). **Quorum sensing** je

systém komunikace mezi bakteriemi, který kontroluje expresi mnoha genů v závislosti na hustotě populace⁴. Využívá malých signálních molekul zvaných autoinduktory. Dosáhne-li jejich množství prahové koncentrace, začnou přímo nebo nepřímo kontrolovat transkripci cílových genů. Gramnegativní bakterie produkují obvykle acylované homoserinové laktony, zatímco u grampozitivních to jsou oligopeptidy⁵. Řada genů pod touto regulací se aktivně účastní na tvorbě biofilmu a míra jejich exprese ovlivňuje tvorbu biofilmu.

Metody studia biofilmů

V současnosti je k dispozici celá řada metod, které využívají schopnost tvorby biofilmů na různých površích⁶. Metoda používající polystyrenové mikrotitrační destičky s následným barvením krystalovou violetí je značně rozšířená, protože pro různé promývací operace je k dispozici celá řada zařízení užívaných v imunochémii. Druhý nejrozšířenější způsob je kultivace na tzv. kuponech, což jsou tenké destičky zhotovené z nejrůznějších materiálů (sklo, nerez, různé typy plastů), které je možno kultivovat staticky ponořením do suspenze, nebo s využitím průtočných cel. Nevýhodou je poměrně složitý způsob vyhodnocování, tj. jak kvantitativně snést ze zkoumaného povrchu biofilm a následně jej analyzovat.

Mikroskopické techniky byly používány již od počátku studia biofilmů, takže jak skenovací elektronová mikroskopie (SEM), tak transmisní elektronová mikroskopie (TEM) mají své místo. Nejnověji je využívána konfokální skenovací laserová mikroskopie (CSLM), která umožňuje studium trojrozměrných struktur biofilmu asi nejlépe⁷. Umožňuje studium biofilmů, které rostou jako plovoucí trojrozměrná seskupení v kapalinách. Byly také publikovány studie využívající „atomic force microscopy“ (AFM).

Pozitiva a negativa biofilmů

Přirozeně utvořené biofilmy redukuje přenos tepla ve výměnících tepla a v chladicích věžích, znečišťují při reversní osmose membrány, a kontaminují výrobní zařízení potravinářského průmyslu, a tak napomáhají tvorbě kmenů rezistentních k ATB, jsou obecně považovány za nežádoucí jev. Odstranění těchto biofilmů je věnováno velké úsilí.

Biofilmy, které se vytvoří ve tkáních nebo na implantovaných lékařských pomůckách, jsou zdrojem infekce. Účinnost léčby antibiotiky bývá v těchto případech omezená. Navzdory sterilizačním a aseptickým postupům se mohou biofilmy tvořit i na lékařských implantátech a katetrech. Takto vzniklé infekce se špatně léčí, což vede k prodloužení doby hospitalizace⁸. Kloubní náhrady, které jsou považovány za optimální řešení těžkých artritických stavů jsou však u 1 – 2 % pacientů stíhány infekcemi vyvolanými biofilmy. Většinou jde o stafylokokovou infekci (*Staphylococcus aureus* a *S. epidermis*).

Důležitá je prevence vzniku biofilmu. Základní podmínkou je dokonalá sterilita implantátu. Další možností prevence je užití povrchů uvolňujících antibiotika a antibiotická profylaxe. Jestliže se biofilm vytvoří, nelze ho eradikovat ani větší dávkou antibiotik. Jedinou možností jak se zbavit biofilmu pak zůstává vyjmutí infikovaného implantátu, což prodlužuje dobu léčby a finanční náklady.

Vícedruhové biofilmy, spontánně nebo řízeně vzniklé jsou využívány průmyslově, hlavně při čištění odpadních vod, kde odstraňují organické látky a také těžké kovy. Přítomnost více druhů mikroorganismů umožňuje ošetření odpadů o různém složení, kde složení jednotlivých složek kolísá.

Biofilmové reaktory mohou být jednoduché jako např. batch reaktor, kontinuální míchaný reaktor (CSTR), packed bed reaktor (PBR), fluidized bed reaktor (FBR), airlift reaktor (ALR),

upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor, nebo jiná vhodná konfigurace. V těchto reaktorech jsou přednostně používány dva typy biofilmů:

1) Biofilmy rostoucí na nosiči jako dřevěné uhlí, kostní uhlí, pryskyřice, beton, úlomky cihel, nebo zrnka písku, biomasa roste na povrchu všech těchto částic a velikost nárůstu biofilmu stoupá s časem a může dosahovat několika mm v průměru. Densita nosných částic je obvykle vyšší než ve fermentačním mediu a proto biofilmem obalené částice mají tendenci zůstat v dolní sekci reaktoru.

2) Biofilmy tvořené jako výsledek tvorby vloček a jejich dalších seskupení. Tento typ biofilmu je označován jako granulární biofilm a reaktory, kde se využívá se nazývají granulární biofilmové reaktory. Tvorba granulí je různě dlouhá a může trvat od několika týdnů až několik měsíců. Buňky tvoří extracelulární polymerní látky (EPS), které pevně spojují buňky do vloček a ty do dalších agregátů.

Bakteriálním biofilmům a infekcím jimi vyvolaným je věnována velká pozornost především v potravinářském průmyslu, vzhledem k tomu, že mohou za určitých okolností ohrozit zdravotní nezávadnost a hygienickou bezpečnost potravin. Výskyt biofilmu, jako výsledku kolonizace bakterií na površích technologických zařízení, se tak dostává do povědomí potravinářů a pracovníků zodpovědných za hygienu výroby z hlediska mikrobiologie.

Naše laboratoř dosud publikovala údaje o odolnosti biofilmu *Listeria monocytogenes* k desinfekčním prostředkům⁹, působení desinfekčních látek na biofilm tvořený *Staphylococcus aureus*¹⁰, dále o účinku ampicilinu a vankomycinu na stejný typ biofilmu¹¹. Dále jsme studovali vliv podmínek užívaných v potravinářství na tvorbu biofilmu *L. monocytogenes*¹².

Literatura

1. Costerton, J.W., G.G.Geeseey, and G.K.Cheng. 1978 . How bacteria stick. Sci.Am. **238**: 86-95
2. Rumbo-Feal S, Gomez MJ, Gayoso C, et al.: PLoS One. **8**, e72968 (2013)
3. Davies DG, Chakrabarty AM, Geeseey GG. Appl. Environ.Microbiol. **59**,1181 (1993)
4. Bassler BL, Losick R. Cell **125**,237-246 (2006)
5. Waters CM, Bassler BL. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **21**, 319- 346 (2005)
6. Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R. Trends in Microbiologz **13**, 20 – 26 (2008)
7. Christensen BB, et al. Methods in Enzymology **310**, 20-42 (1999)
8. Hetrick E M, Schoenfisch MH Chemical Society Reviews **35**, 780-789 (2006)
9. Purkrťová S, Turoňová H, Pilchová T, Demnerová K, Pazlarová J. Czech Journal of Food Sciences **4**, 326-332 (2010).
10. Purkrťová S, Babulíková J, Karpíšková R, Demnerová K, Pazlarová J. . Czech Journal of Food Sciences **27**, Special Issue S1-S10 (2011)
11. Pazlarová J, Purkrťová S., Babulíková J., Demnerová K. Czech Journal of Food Sciences **32**, 137-144 (2014)

Metody stanovení *Clostridium perfringens* ve vodách

Jaroslav Šašek,

Státní zdravotní ústav

Při vyšetřování vod je stanovení *C. perfringens* požadováno jako parametr kvality především v případě pitných vod, vyrobených z povrchové vody. Zde slouží jako indikátor možného znečištění, zároveň je *C. perfringens* i podmíněný patogen. Infekce z pitné vody nejsou známy, problémy mohou nastat, je-li voda s přítomností *C. perfringens* použita pro výrobu potravin, kosmetických produktů apod. Metod stanovení tohoto indikátoru je celá řada. Standardisovaná je ČSN EN 26461-2 (EN vznikla převzetím ISO 6461-2), která ale stanoví jen spory siřičitany redukujících anaerobů (klostridií). Je založena na železito-siřičitanovém agaru nebo na tryptozo-siřičitanovém agaru bez dalších potvrzujících testů. Pro stanovení *C. perfringens* je nutno metodiku doplnit o 4 konfirmační testy pro testování MNLG (test pohyblivosti, redukce nitrátů na nitrity, zkvašování laktózy, zkapalňování želatiny).

Mezinárodní norma ISO 6461-2:1986 byla založena na selektivním TSC agaru bez žloutkové emulze s konfirmací na LMGN viz výše. Stala se tak alternativou k m-CP agaru, viz níže. Evropská směrnice Council Directive 98/83/EC pro ukazatel *C. perfringens* (vegetativní buňky a spory) pro „pitné vody“ uvádí jako referenční metodu postup na selektivním m-CP agaru (příloha III, poznámka 1) s konfirmací parami amoniaku. Tato metoda vychází ze starého postupu autorů Bisson, Cabelli, 1979, US EPA [1]. M-CP agar produkuje řadu falešně negativních výsledků; Bisson a Cabelli původně ohlásili jen 2%, později Cato, 86 udává, že 11-39 % kmenů *C. perfringens* není schopno fermentovat celobiosu, takže jsou na m-CP agaru zelené a nejsou počítány.

Jako alternativu k metodě na m-CP agaru navrhl Sartory, 98 [2] selektivní TSC agar se 4 výše uváděnými konfirmačními testy. Při srovnání m-CP agaru a TSC agaru zjistil na m-CP médiu 16,9 % falešně negativní kolonií. Největší rozdíly byly zjištěny v záchytnosti spor a vegetativních buněk mezi oběma médii. **Záchytnost spor** činí u m-CP 60% proti TSC (82,5%), v případě vegetativní buněk jen 0,7 % na m-CP proti 95 % na TSC.

Záchytnost *C. perfringens* na m-CP agaru ve srovnání s dalšími médii sledovali i Araujo [3]. Prokázali, že m-CP agar vykazuje **statisticky nižší počty** pro spory ze souboru porovnávaných médií a tedy vyvozují, že m-CP agar, používaný v EU jako referenční metoda není vhodné médium pro záchyt *C. perfringens* spor. Srovnávaly se – m-CP agar, TSC agar, TSCF (Fluorocult suplementovaný TSC agar s obsahem MUP), TSN agar (Perfringens Selective agar dle Marshall, Merck), SPS agar (sulfite polymyxin sulfadiazine), Wilson-Blair agar.

Jako další vylepšování specifity TSC agaru pro záchyt *C. perfringens* navrhli Eisbruber a Reuter (in Sartory, 98) pro potraviny při 37 °C Sulfit Cycloserine Azidový agar; pro vody autoři uvažovali, že by ho bylo též možné použít při 44-45 °C s membránovou filtrací.

Vylepšení identifikace *C. perfringens* představuje použití chromogenních a fluorogenních substrátů, Adcock a Saint [4]. Jedná se o detekci kyselé fosfatázy, která ze substrátu 4-methylumbelliferyl fosfát (MUP) produkuje 4-methylumbelliferon, jež fluoreskuje při 365 nm. Konfirmace je ještě doplněna o substrát ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG), neb TSC- MUP agar vykazuje vysoké počty falešně pozitivních izolátů (*C. subterminale* je MUP-pozitivní). Po doplnění testu s ONPG specifita vzrostla na 93,3% s falešně negativními výsledky 7,1%. MUP-ONPG test se provádí při 35 °C po dobu 4 hod. ve zkumavce; pozoruje se žluté zbarvení (po 4 hod.) a UV fluorescence jako důsledek aktivity kyselé fosfatázy během 1 hodiny.

Kyselá fosfatáza není specifická ani pro *C. perfringens*, ani pro klostridie. Tento enzym vykazuje řada bakterií jako stafylokoky, enterobakterie – *Enterobacter*, *Klebsiella*, ale i kvasinky *Candida* a řada anaerobů jako *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Lactobacillus*. Z klostridií vykazují reakci *C. perfringens*, *C. butyricum*, *C. chauvoei*, slabou aktivitu dále *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Veillonella*, *Sphaerophorus*.

Studie Sartory a kol. [5], shrnující i výsledky dalších studií ukazují, že 98,1 % (316 z 322 kmenů) *C. perfringens* vykazují pozitivní kyselou fosfatázu, zatímco jen 5,6 % (14 z 250 kmenů) non-*perfringens* kmenů jsou též pozitivní. Jednalo se hlavně o kmeny *C. baratii* (7 kmenů), 2 kmeny *C. sardiniensis* a po 1 kmenu *C. absonum*, *butyricum*, *chauvoei*, *rectum*, *tetanomorphum*.

Konfirmace presumptivních *C. perfringens* je založena buď na standardní konfirmaci MNLG, což je pracné, časově náročné (48 hod.), ale i nespolehlivé, zejména s ohledem na test redukce nitrátů. Asi 10 % kmenů či více *C. perfringens* jsou negativní [5]. Alternativní přístup pro konfirmaci *C. perfringens* je založen na průkazu kyselé fosfatázy, navržené Ueno a kol., 70. Addock a Saint [4] jej doporučili pro izoláty *C. perfringens* z vody, Eisbrugger a kol., 2000 pro potraviny. Je rychlý, redukuje dobu kultivace potvrzovacího testu pouze 4 hod., je méně pracný, nevyžaduje anaerobní podmínky pro použití.

Detekce kyselé fosfatázy je základem stanovení *C. perfringens* jak na m-CP agaru dle Bissona a Cabelliho [1] tak na fluorogenním TSC agaru (obsahuje MUP), který použili Araujo a kol. [3] na porovnání médií na stanovení *C. perfringens*, tak i média pro konfirmaci *C. perfringens* na TSC agaru autory Adcock a Saint [4]. Všechna tato média i konfirmační médium Adcock a Saint [4] však mají neutrální pH, jež dovoluje uplatnit jak kyselou tak alkalickou fosfatázu, čímž se spektrum klostridií, dávající pozitivní test rozšiřuje a specifita vůči *C. perfringens* klesá.

Oba přístupy potvrzení suspektních *C. perfringens* však dovolují malému procentu non-*perfringens* kmenů být potvrzeny jako *C. perfringens*. Pro MNLG testy by bylo možno tento nedostatek eliminovat zařazením dalších biochemických testů, např. fermentace salicinu a produkce indolu, čímž by se potup potvrzení ještě více komplikoval a protahoval. Pro test kyselé fosfatázy by se většina potencionálně falešně pozitivních výsledků eliminovala přidáním testu na zkapalňování želatiny (především pro eliminaci *C. baratii*). Tím by ale test s kyselou fosfatázou ztrácel na jednoduchosti a rychlosti; navíc některé kmeny *C. perfringens* selhávají v testu zkvašování želatiny.

Sartory [5] srovnával použití kyselé fosfatázy jako konfirmačního testu pro *C. perfringens*, izolované z vody a standardní konfirmaci MNLG postupem. Prokázali, že použití kyselé fosfatázy významně zjednodušuje analýzu, redukuje dobu vyšetření, vykazuje stejnou spolehlivost jako MNLG konfirmační postup. Použití MUP v TSC médiu však nepřináší zlepšení identifikace presumptivních *C. perfringens*. Ze 114 environmentálních izolátů, identifikovaných jako *C. perfringens* bylo pomocí kyselé fosfatázy potvrzeno 108 izolátů (94,7%) jako *C. perfringens* a pomocí MNLG postupu 104 (91,2%).

Ryzinska-Paier a kol. [6] uvádí přednosti testu s kyselou fosfatázou před standardní fenotypovou identifikací (LG MN konfirmace) *C. perfringens*, co by citlivější a spolehlivější konfirmační metody. Potvrzovací test s kyselou fosfatázou vykazuje vyšší procento správně identifikovaných kmenů (92%) než ISO_LGMN postup (83%). Selektivní médium TSC agar dle ISO/CD 6461-2:2002 vykazuje vyšší záchytnost než nestandardizovaná, ale referenční metoda pro stanovení *C. perfringens* v pitné vodě s mCP agarem dle Council Directive 98/83/CD.

Konečný návrh ISO/FDIS 14189 je určen pro stanovení vegetativních buněk a spor *C. perfringens* membránovou filtrací, vhodnou pro pitné a všechny ostatní typy vod, jež neinterferují s filtrací s ohledem na obsah partikulované a koloidní hmoty. Metoda je rovněž

založena na selektivním TSC agaru (jako v ISO/CD 6461-2:2002), konfirmace je však zjednodušená použitím jediného testu s kyselou fosfatázou. Receptura pro test kyselé fosfatázy je v ISO /FDIS 14189 jiná než v CD 98/83/CD i než v testech, jež uvádí Adcock a kol, Araujo a kol. i Sartory [3,4,5]; v tomto návrhu ISO normy pro test kyselé fosfatázy tato uvolňuje naftyl z 1-naftyl fosfátu a ten tvoří azo barvivo s diazonium o-dianiside.

Závěry:

V současné době (srpen 2014) byly národní normalizační orgány jednotlivých evropských států vyzvány, aby sdělily evropským orgánům svůj názor na možnost přijetí mezinárodní normy ISO/FDIS 14189 jako příslušnou EN ISO normu.

Proti médiu m-CP dle CD 98/83/CD hovoří řada nepříznivých skutečností ve srovnání s TSC médiem dle ISO/FDIS 14189 - především vykazuje nižší záchytnost než TSC médium dle ISO/CD 6461-2:2002 v případě spor (60% vs. 82,5% u TSC) a zejména v případě vegetativních buněk (0,7% vs. 95% na TSC). Dále řada kmenů (19-36%) vykazuje pozitivní reakci na cellobiosu a při odečtu se tak jeví jako falešně negativní *C. perfringens*.

Použití kyselé fosfatázy co by jediného potvrzujícího testu pro identifikaci suspektních *C. perfringens* je výhodnější než v případě konfirmačního postupu ISO_LMNG. Je méně pracný, časově nenáročný (4 hod. vs. 72 hod.). Tento test je součástí postupu dle CD 98/83/CD, i když receptura příslušných reagentů je v ISO/FDIS 14189 jiná; z hlediska přípravy, doby expirace a kancerogenity jednoho činidla značně nevýhodná.

Odkazy:

[1] Bisson, J. W. and Cabelli, V. J. (1979): Membrane filter enumeration method for *Clostridium perfringens*. Applied and Environmental Microbiology, Jan. 1979, p. 55-66, Vol. 37, No. 1

[2] Sartory, D.P. et al. (1998): Evaluation of two media for the membrane filtration enumeration of *Clostridium perfringens* from water. Letters in Applied Microbiology 1998, 27, 323-327.

[3] Araujo, M. et al. (2004): Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in groundwater samples: comparison of six culture media. J. of Microbiological Methods 57, 175-180.

[4] Adcock, P. W. and Saint, Ch., P. (2001): Rapid confirmation of *Clostridium perfringens* by using chromogenic and fluorogenic substrates. Applied and Environmental microbiology, Sept. 2001, p. 4382-4384, Vol. 67, No. 9.

[5] Sartory, D.P. et al. (2006): Evaluation of acid phosphatase as a confirmation test for *Clostridium perfringens* isolated from water. Letters in Applied Microbiology, 42, 418-424.

[6] Ryzinska-Paier, G. et al. (2011): Acid phosphatase test proves superior to standard phenotypic identification procedure for *Clostridium perfringens* strains isolated from water. Journal of Microbiological Methods, 87 (2011), 189-194.

Stanovení parazitických prvků *Giardia* a *Cryptosporidium* ve vodách

Petr Pumann, Tereza Pouzarová
Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10; ppumann@szu.cz

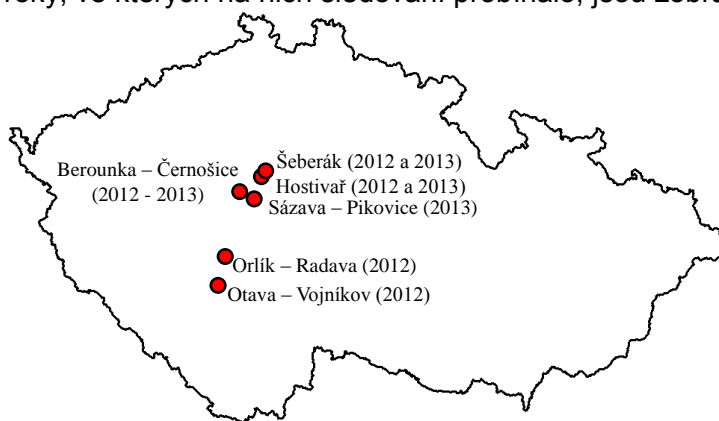
Úvod

Parazitičtí prvoci rodů *Giardia* a *Cryptosporidium* jsou si taxonomicky velmi vzdálení, přesto se často objevují v odborné literatuře bok po boku, za což může řada společných rysů, především vysoká odolnost trvalých stádií (cyst a oocyst) k některým vlivům vnějšího prostředí, např. k běžně používaným dezinfekčním přípravkům, která z nich dělá ideální patogeny pro šíření prostřednictvím vody. Epidemií z dezinfikovaných vod (pitných i bazénových) lze najít v odborné literatuře mnoho. Oba organismy se pochopitelně mohou šířit i prostřednictvím vod nedezinfikovaných (např. přírodních koupacích vod). V těchto vodách však přežívají i další organismy, takže jejich úloha již není tak výlučná. O výskytu obou prvků v přírodních koupacích vodách ČR jsme si chtěli udělat obrázek v rámci projektu, který jsme řešili v letech 2011 – 2013.

Pro stanovení parazitických prvků *Cryptosporidium* spp. a *Giardia* spp. ve vodě existují standardizované postupy podle ISO 15553 (2006), USEPA 1623 (2012) nebo agentury pro životní prostředí Anglie a Walesu (Environmental Agency, 2010). Všechny postupy zahrnují tři základní kroky: 1) zkoncentrování materiálu z velkého objemu vody (filtrací, odstředěním nebo sedimentací po flokulaci), 2) vyčištění koncentrátu bez významných ztrát cyst a oocyst prvků (nejčastěji imunomagnetickou separací, méně obvykle odstředěním s využitím hustotních gradientů) a 3) detekci (mikroskopicky po značení protilátkami s navázanou fluorescenční látkou, DAPI a DIC, případně pomocí molekulárně-biologických metod).

Metody

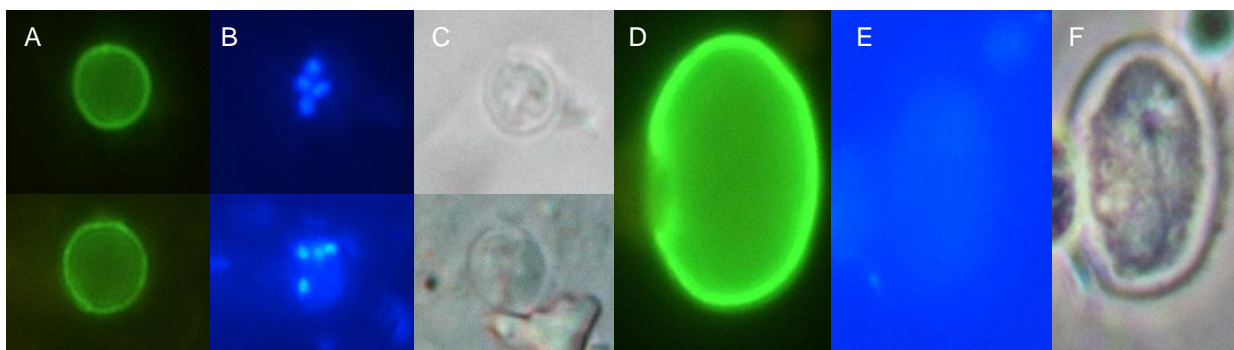
Odběry probíhaly na šesti vodách využívaných ke koupání, z nichž čtyři patří mezi oficiálně sledované lokality. Mezi sledované vody spadaly 3 nádrže různé velikosti a tři řeky. Pozice míst v rámci ČR a řeky, ve kterých na nich sledování probíhalo, jsou zobrazeny na obr. 1.



Obr. 1. Odběrová místa a řeky, ve kterých bylo místo sledováno.

Během let 2012 a 2013 jsme odebírali vzorky o objemu 10 – 25 litrů (podle typu lokality a aktuální kvality vody) do plastových barelů, které byly následně dopraveny do laboratoře a druhý den filtrovány. Do té doby byly skladovány při venkovní teplotě. Pro primární záchyt prvků byl využit systém Filta-Max dodávaný firmou IDEXX. Systém Filta-Max se skládá ze záchytu vzorku (v našem případě 3 – 25 litrů) filtrovaného pomocí peristaltického čerpadla přes filtry složené ze šedesáti polyuretanových kroužků. Filtry se zachycenými prvky a dalším materiálem jsou následně rozvolněny, promyty fosfátovým pufrům s detergentem.

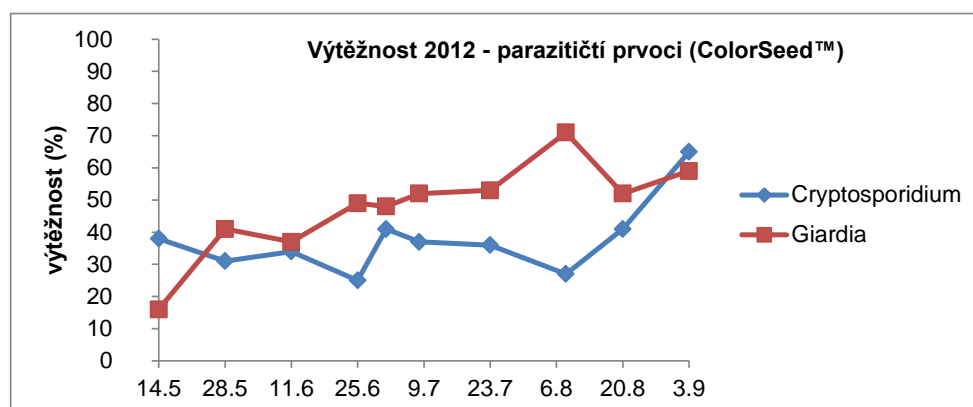
Uvolněný materiál v pufru o objemu zhruba 1,2 litru je zahuštěn nad membránovým filtrem na cca 50 ml koncentrátu. Ten je dále zahuštěn odstředěním na cca 3-4 ml. Odseparování cyst giardií a oocyst kryptosporidií od ostatních organismů a částic bylo provedeno pomocí imunomagnetické separace firmy Invitrogen (původně Dynal). Detekce byla prováděna ve fluorescenčním mikroskopu po značení protilátkami s navázaným FITC (od firmy Cellabs), které specificky zviditelní stěny cyst giardií a oocyst kryptosporidií a barvení DAPI, které zviditelní přítomnou DNA. K potvrzení jsme suspektní objekty pozorovaly Nomarskiho DIC kontrastem, případně fázovým kontrastem (obr. 2).



Obr. 2. Dvě oocysty *Cryptosporidium* sp. (A - značená FITC; B – po barvení DAPI, C – DIC kontrastu) a cysta *Giardia* sp. (D – značená FITC, E – po barvení DAPI, které je v tomto případě velmi nevýrazné, E – vnitřní struktura ve fázovém kontrastu však byla pozorovatelná velmi dobře).

Výsledky a diskuze

V roce 2012 jsme s každou sérií vzorků prováděli jedno stanovení pro kontrolu kvality. Do vody z jedné z lokalit, u nichž se předpokládá nízký výskyt prvoků (jednalo se buď o profil Orlík – Radava nebo nádrž Hostivař), byl přidán komerčně dostupný standard ColorSeed™, který obsahuje 100 cyst giardií a 100 oocyst kryptosporidií značených texaskou červení, takže je možné je odlišit od prvoků pocházejících z prostředí. Tyto vzorky byly zpracovány stejným postupem jako vzorky z lokalit. Výtěžnost se pro oocysty kryptosporidií pohybovala obvykle mezi 25 a 50 %, u cyst giardií kolem 50 % (obr. 3). V listopadu 2012 jsme se navíc zúčastnili mezinárodních okružních rozborů pořádaných britskou The Food and Environment Research Agency. Vzorek obsahující jak cysty, tak oocysty, byl v laboratoři naředěn vodovodní vodou (10 litrů) a dále standardně zpracováván. Dosáhli jsme velmi dobré výtěžnosti 49% pro oocysty kryptosporidií a 86% pro cysty giardií. Výtěžnost byla lepší než u vzorků koupacích vod zřejmě proto, že v pitné vodě není tolik interferujících objektů.



Obr. 3. Výtěžnost stanovení parazitických prvoků pomocí standardu ColorSeed™, který obsahuje 100 oocyst a 100 cyst. Standard byl v roce 2012 používán s každou sérií měření.

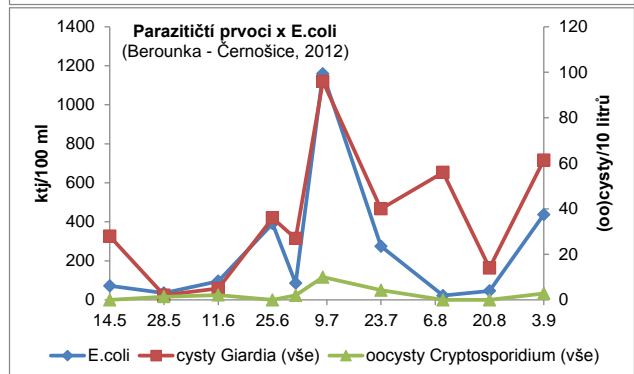
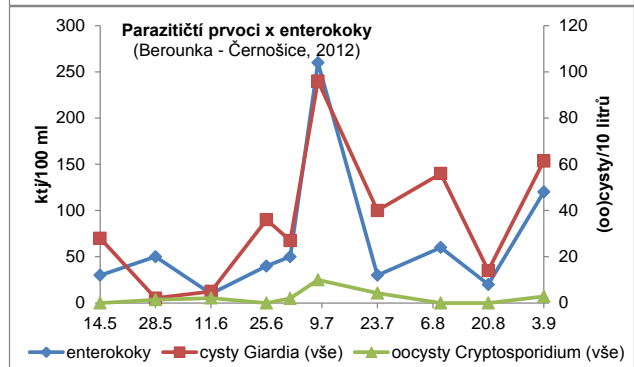
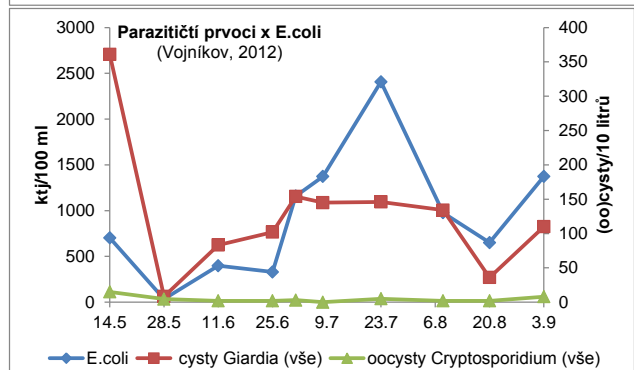
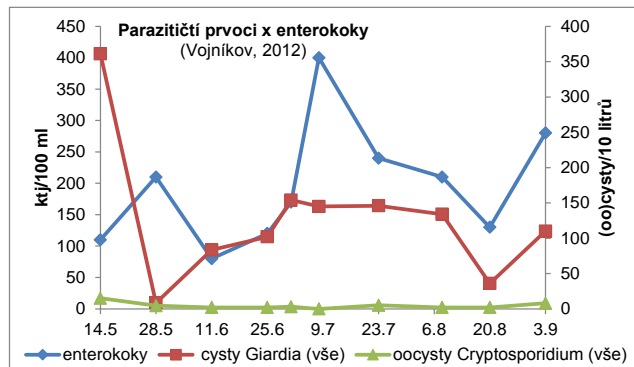
V roce 2012 byl patrný velký rozdíl mezi nálezy v řekách a v nádržích. V roce 2013 byl rozdíl mezi toky a nádržemi méně zřetelný (tab. 1), na čemž se mohly částečně podepsat červnové povodně. Přinejmenším odběry dne 17.čevna byly v nádržích ještě ovlivněny silným splachem při povodních, což bylo patrné zvláště na Hostivaři, která byla povodněmi velmi zasažena. V tomto termínu bakteriální indikátory již zvýšeny nebyly, prvoci ve srovnání s bakteriemi však přežívají výrazně déle. Proto odstup od povodně v řádu týdnů nebyl pro jejich eliminaci dostatečný.

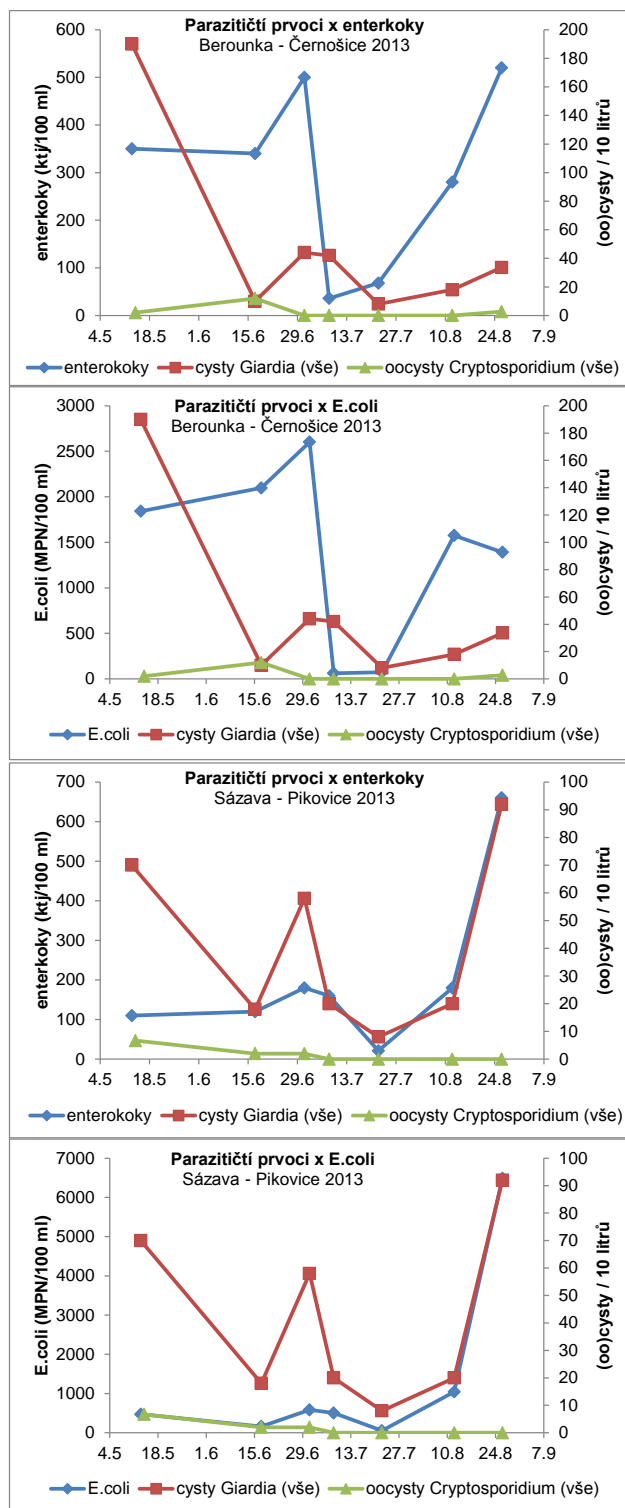
Tab. 1. Nálezy oocyst *Cryptosporidium* spp. a cyst *Giardia* spp. v letech 2012 (na třech nejvíce zatížených lokalitách) a 2013 (všech pravidelně sledovaných lokalitách). Výsledky jsou přepočteny na 10 l. Číslo za lomítkem znamená celkový počet nalezených (oo)cyst, číslo před lomítkem počet DAPI pozitivních (oo)cyst (u nich je možné, že jsou stále životaschopné). Číslo v závorce procento DAPI pozitivních (oo)cyst na celkovém počtu. Pokud je před číslem uvedeno znaménko méně než, znamená to, že ve vzorku nebyla nalezena žádná (oo)cysta. Na rozdíl od výpočtů pro QMRA jsou nálezy udávány v jiných jednotka (na 10 litrů) a do výpočtu aritmetického průměru je použita v případě nálezu pod mezí detekce nula.

Rok 2012	Termín odběru										Průměr
	Lokalita	14.5.	28.5.	11.6.	25.6.	1.7.	8.7.	23.7.	8.8.	20.8.	
<i>Cryptosporidium</i> spp.											
Černošice	<2/<2	1,4/1,4 (100%)	2,1/2,1 (100%)	<2/<2	1/2 (50%)	4/10 (40%)	<1,4/4,3 (0%)	<2/<2	<2/<2	1,4/2,9 (50%)	1,0/2,3 (44%)
Vojníkov	6/15 (40%)	3,9/4,5 (86%)	<0,7/2 (0%)	1/2 (50%)	1/3 (33%)	<2,5/<2,5	4/5 (80%)	<2/2 (0%)	2/2 (100%)	6/8 (75%)	2,6/4,6 (57%)
Šeberák	<2/2 (0%)	<0,7/<0,7	<0,7/<0,7	<2/<2	<2/4 (0%)	<3,3/<3,3	5/10 (50%)	<2,5/<2,5	<2,5/<2,5	<2,5/5 (0%)	0,5/2,1 (24%)
<i>Giardia</i> spp.											
Černošice	<2/28 (0%)	1,3/2 (67%)	<0,7/5 (0%)	<2/36 (0%)	<1/27 (0%)	2/96 (2%)	2,9/40 (7%)	2/56 (4%)	<2/14 (0%)	2,9/61,4 (5%)	1,1/36,5 (3%)
Vojníkov	<1/361 (0%)	3,2/8,4 (38%)	0,7/83,3 (1%)	<1/102 (0%)	<1/154 (0%)	<2,5/14 (0%)	2/146 (1%)	8/134 (6%)	<2/36 (0%)	4/110 (4%)	2,0/128 (2%)
Šeberák	<2/6 (0%)	<0,7/<0,7	<0,7/0,7 (0%)	<2/2 (0%)	<2/20 (0%)	<3,3/36,7 (0%)	2,5/75 (3%)	<2,5/5 (0%)	<2,5/12,5 (0%)	<2,5/17,5 (0%)	0,3/17,5 (1%)

Rok 2013	Termín odběru							Průměr	
	Lokalita	14.5.	17.6.	1.7.	8.7.	22.7.	12.8.		26.8.
<i>Cryptosporidium</i> spp.									
Černošice	2/2 (100%)	4/12 (33%)	<2/<2	<2/<2	<2/<2	<2/<2	<2/<2	0,9/2,7 (33%)	1,0/2,4 (41%)
Hostivař	<1/<1	2/10 20%	<2/<2	2/2 (100%)	<2/<2	<2/<2	<2/<2	<1/<1	0,6/1,7 (33%)
Pikovice	<3,3/7 0%	<2/2 0%	2/2 100%	<2/<2	<2/<2	<2/<2	<2/<2	<1/<1	0,3/1,6 (18%)
Šeberák	4/4 (100%)	<2,5/<2,5	<2,5/<2,5	<2,5/<2,5	2/2 (100%)	<2/2 (0%)	10/10 (100%)		2,3/2,6 (89%)
<i>Giardia</i> spp.									
Černošice	6/190 (3%)	<2/10 (0%)	10/44 (23%)	10/42 (24%)	<2/8 (0%)	2/18 11%	0,9/34 (3%)		4/49 (8%)
Hostivař	<1,3/3 (0%)	2/30 (7%)	<2/8 (0%)	<2/20 (0%)	<2/<2	<2/<2	<1/1 (0%)		0,3/6 (5%)
Pikovice	3,3/70 5%	2/18 (11%)	4/58 (7%)	4/20 (20%)	<2/8 (0%)	<2/20 (0%)	1/92 (1%)		2/41 (5%)

Šeberák	<2/4 (0%)	<2,5/7,5 (0%)	<2,5/<2,5	<2,5/<2,5	2/6 (33%)	<2/2 (0%)	<2/22 (0%)	0,3/6 (5%)
---------	--------------	------------------	-----------	-----------	--------------	--------------	---------------	-----------------------





Obr. 4. Sezónní průběh nálezu cyst *Giardia* spp. a oocyst *Cryptosporidium* spp. (bez ohledu na jejich životaschopnost – tzn. včetně prázdných cyst) a fekálních indikátorů *E. coli* (Colilert) a enterokoky (ČSN EN ISO 7899-2, SB médium od firmy Merck) na odběrových profilech na řekách (Vojníkovi, Černošice, Pikovice) v letech 2012 - 2013.

Zajímavý byl velmi vysoký podíl prázdných cyst giardií. I když jsme původně zvažovali možnost poškození cyst v rámci laboratorního zpracování, nakonec ji nepovažujeme za příliš pravděpodobnou. Nenasvědčovaly tomu výsledky okružních rozborů z Velké Británie,

kterých jsme se účastnili. Většina cyst ve vzorku byla naprosto v pořádku. Navíc cysty giardií jsou ve srovnání s kryptosporidii méně odolné a díky jejich větší velikosti jsou i prázdné cysty při mikroskopování zaznamenány, a to i v případě mírné deformace. Deformované oocysty kryptosporidií, které jsou ve srovnání s cystami giardií zhruba třetinové, je mnohem snazší přehlédnout. Spíše se kloníme k závěru, že vysoký podíl prázdných cyst byl již na lokalitách v době odběru.

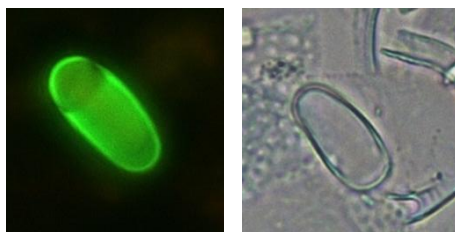
V roce 2012 byla korelace s mikrobiálními indikátory dobře patrná především u celkového počtu cyst *Giardia* spp. a oocyst *Cryptosporidium* spp. (tedy DAPI pozitivní i prázdných buněčných stěn) na profilu Berounka – Černošice. Na rozdíl od Černošic profil Vojníkov žádnou závislost počtu prvoků a indikátorů neukazuje (obr. 4; tab. 2). Pokud se však vyloučily první dva odběry (z května 2012), Pearsonův korelační koeficient vzrostl pro celkový počet cyst giardií na hodnotu přibližně 0,6 jak pro *E. coli*, tak pro enterokoky. V roce 2013 se korelace prvoků s fekálními indikátory na profilu Berounka – Černošice nepotvrdila. Poměrně vysoké koeficienty vykazovaly pouze všechny cysty giardií na profilu Sázava - Pikovice pro oba dva fekální indikátory (tab. 2).

Tab. 2. Pearsonův korelační koeficient pro parazitické prvoky a indikátory fekálního znečištění *E. coli* (Colilert) a enterokoky (ČSN EN ISO 7899-2, SB médium od firmy Merck).

2012	Otava – Vojníkov		Berounka - Černošice		Šeberák	
	<i>E.coli</i>	Enterokoky	<i>E.coli</i>	Enterokoky	<i>E.coli</i>	Enterokoky
<i>Giardia</i> – všechny cysty	0,26	-0,08	0,82	0,86	0,37	0,2
<i>Giardia</i> – cysty DAPI+	0,10	0,23	0,39	0,47	-0,01	-0,21
<i>Cryptosporidium</i> – všechny oocysty	0,04	-0,23	0,88	0,85	0,23	-0,28
<i>Cryptosporidium</i> – oocysty DAPI+	0,17	0,00	0,72	0,78	-0,01	-0,21
2013	Sázava - Pikovice		Berounka - Černošice		Šeberák	
	<i>E.coli</i>	Enterokoky	<i>E.coli</i>	Enterokoky	<i>E.coli</i>	Enterokoky
<i>Giardia</i> – všechny cysty	0,72	0,73	0,23	0,18	-0,31	0,38
<i>Giardia</i> – cysty DAPI+	-0,26	-0,14	0,09	-0,03	-0,09	-0,21
<i>Cryptosporidium</i> – všechny oocysty	-0,28	-0,28	0,37	0,24	-0,27	0,4
<i>Cryptosporidium</i> – oocysty DAPI+	-0,14	-0,05	0,43	0,27	-0,24	0,44

Přinejmenším z pohledu práce v naší laboratoři jsou zajímavé některé zjištěné metodické aspekty. O prázdných cystách *Giardia* spp. již byla zmínka výše. Další se týká filtrovaného objemu. Je celkem snadné přefiltrovat litry až desítky litrů oživené povrchové vody přes filtr z polyuretanových kroužků, i když občas při větších tlacích může docházet k prasknutí silikonové hadice. Následně další zahuštění nad membránovým filtrem, které využívá systém FiltaMax, je však při přefiltrování velkého objemu oživené povrchové vody časově mimořádně náročné. V řekách, ve kterých se vyskytuje prvoků poměrně vysoké množství, může být dostatečně filtrovat jen menší objem (obvykle 5 litrů). U nádrží, kde lze očekávat nízké počty prvoků, bylo možno v době clear water filtrovat desítky litrů (v podstatě celých 25 litrů, které se odebraly na lokalitě). S nástupem letního maxima bylo nutno filtrovaný objem snížit. Především u velmi oživeného Šeberáku (chlorofyl pravidelně přes 100 µg/l) nebylo možno filtrovat ani 5 litrů (obvykle se filtrovaly 3 – 4 litry, ale i to bylo poměrně velké množství). Následkem je příliš vysoká mez detekce, která se pak odrazí při interpretaci dat (např. při počítání rizika infekce – viz kapitola o QMRA).

Druhým zajímavým aspektem byly mikroskopické objekty, které bylo možné zaměnit za parazitické prvky. Tvarově nejpodobnější byly akinety sinic rodu *Anabaena*, které jsme nacházeli ve vzorcích z Hostivaře (obr. 5). Ty vykazovaly při excitaci modrým světlem zelenou fluorescenci stejně jako prvoci FITC značení. Navíc jsou cystám giardií dost podobné jak tvarem (lze je však odlišit), tak velikostí (jsou jen o několik μm větší). Zelenou fluorescenci měly i některá pylová zrna či obrněnky. Zde však již díky zcela odlišným tvarům nehrozí záměna. Jen mnoho zářících objektů na pozadí může maskovat výskyt hledaných cyst či oocyst. Obrněnky především v profilu Berounka – Černošice navíc zřejmě zkříženě reagovaly při imunomagnetické separaci (zda za to může příbuznost obrněnek se skupinou Apicomplexa, kam patří i *Cryptosporidium*, nevíme).



Obr. 5. Akinety sinic *Anabaena* tvarově i rozměrově podobné, ale odlišitelné od cyst rodu *Giardia*.

Metodické problémy přináší také nespecifický materiál, který není odstraněn při imunomagnetické separaci. Z tohoto hlediska byl nejproblematictější profil Sázava - Pikovice. V některých vzorcích bylo velmi obtížné zjišťovat vnitřní strukturu nalezených cyst/oocyst a jejich DAPI barvení kvůli značnému množství abiosestonu a řas na sklíčku. Problém vznikal také ve vzorcích s velkým množstvím sinic rodu *Microcystis*, které ve velkých počtech pronikaly do vyčištěného vzorku (např. v některých vzorcích z Orlíku - Radavy v roce 2012 nebo Šeberáku v roce 2013).

V březnu 2013 proběhla ve Státním zdravotním ústavu dozorová návštěva Českého institutu pro akreditace, v jejímž rámci jsme nechali metodu pro stanovení parazitických prvků ve vodě posoudit. Od dubna 2013 je metoda akreditována. V budoucnosti lze sice očekávat, že stanovení parazitických prvků zavedou některé další laboratoře (doposud kromě laboratoře Státního zdravotního ústavu se stanovení v ČR, pokud je nám známo, provádí pouze na Parazitologickém ústavu AV). Vzhledem k technické náročnosti a ceně spotřebního materiálu, však není pravděpodobné, že by takových laboratoří byl větší počet. Jako zásadní jsou jako u většiny metod s mikroskopickou koncovkou dostatečné znalosti pracovníků při identifikaci organismů, které je v tomto případě velmi těžká, protože je nutné znát organismy ze dvou oblastí 1) řasy a sinice (případně další organismy a částice z vody) a 2) parazity, což však najednou umí jen málo pracovníků.

Použitá literatura

Environmental Agency (2010): Methods for the Examination of Waters and Associated Materials. The Microbiology of Drinking Water (2010) - Part 14 - Methods for the isolation, identification and enumeration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. 132 stran.

USEPA (2012): Method 1623.1: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. 83 stran.

ISO (2006): ISO 15553:2006 Water quality -- Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water

METODA STANOVENÍ *E. COLI* JAKO INDIKÁTOROVÉHO ORGANISMU PRO ZJIŠŤOVÁNÍ MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE V BIOODPADECH A UPRAVENÝCH BIOODPADECH

Ladislava Matějů¹, Martina Štěpánková¹,
¹Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10,²
imateju@szu.cz

Souhrn

Právní předpisy v oblasti nakládání s čistírenskými kaly v České republice v současné době prochází revizí v důsledku nově připravovaného zákona o odpadech. Přístup k hodnocení kvality kalů se řídí právními předpisy, které nejsou jednotné v přístupu k samotnému nakládání s kaly z ČOV. Nejsou v současné době stejná ani kritéria pro mikrobiologické indikátory v kalech z různých čistíren odpadních vod. Navrhované legislativní úpravy by měly sjednotit přístup k hodnocení i samotnému nakládání s čistírenskými kaly.

Klíčová slova: čistírenské kaly, indikátorový organismus, *E. coli*

Summary

Regulations concerning sewage sludge management is revised in the Czech Republic contemporary. There exists no consistency in Czech legislation concerning microbiological evaluation of sludges including indicator organisms employed. Proposed revised legislation should united evaluation microbiological criteria for sewage sludges.

Keywords: sludge, indicator organismus, *E. coli*

1.0 ÚVOD

V návaznosti na snahu zpracovat co největší množství různých typů odpadů se rozvíjí různé technologie na zpracování bioodpadů, rozšiřuje se sortiment nekvalitních surovin pro anaerobní rozklad v bioplynových stanicích i na čistírnách odpadních vod a v neposlední řadě i způsoby využití výstupů.

V poslední době, nejen v České republice, narůstá využití zpracování biologicky rozložitelného odpadu na čistírnách odpadních vod, kde se biologicky rozložitelný odpad přidává ve fázi anaerobního rozkladu čistírenských kalů. Ve větší míře se spolu s čistírenským kalem zpracovávají vedlejší produkty živočišné produkce (dále také VŽP).

Všeobecně lze s produkty čistíren odpadních vod nakládat podle národních právních předpisů, ale pro produkty ze závodů, kde se zpracovávají vedlejší produkty živočišného původu (např. i kuchyňské odpady a odpady ze společného stravování) platí přednostně pro země EU a i pro Českou republiku Regulation (EC) No 1069/2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 and implementing Council Directive 97/78/EC as regards certain samples and items exempt from veterinary checks at the border (Commission Regulation on animal by-products) relevance, (dále taky Nařízení 1069/2009) [1]. Prováděcím předpisem k tomuto nařízení je Nařízení Komise (EU) č. 142/2011 ze dne 25. února 2011, kterým se provádí nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě, a provádí směrnice Rady 97/78/ES, pokud jde o určité vzorky a předměty osvobozené od veterinárních kontrol na hranici podle uvedené směrnice (dále také Nařízení č. 142/2011) [2].

2.0 SOUČASÝ STAV PRÁVNÍCH PŘEDPISŮ UPRAVUJÍCÍ SLEDOVÁNÍ MIKROBIOLOGICKÉ KONTAMINACE V ČISTÍRENSKÝCH KALECH

Přestože výstup ze všech zařízení, které anaerobně zpracovávají bioodpad, je zbytek po anaerobním rozkladu, výstupy z těchto zařízení nejsou označovány jednotnou terminologií,

jak ukazuje následující tabulka č.1. Terminologie se liší podle v stupních surovin i v případě ČOV (čistírna odpadních vod). Dle použitých vstupních surovin spadá pak nakládání s výstupy pod různé právní předpisy.

Stěžejním zákonem pro nakládání s čistírenskými kaly je zákon 185/2001 Sb. a jeho prováděcí předpisy - vyhláška 382/2001 Sb., o použití čistírenských kalů na zemědělské půdě a vyhláška 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady a o změně vyhlášky č.294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady (vyhláška o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady). V případě použití VŽP nebo odpadů spadajících do režimu nakládání s VŽP se jedná, jak již bylo uvedeno o Nařízení EU 1069/2009 a jeho prováděcího předpis Nařízení EU č. 142/2011. Dle tohoto předpisu je výstup ze zařízení označen jako zbytek po rozkladu („digestion residue“), v českých právních předpisech se pro tento výstup používá stále digestát. V případě ČOV, které zpracovávají i VŽP (odpady ze společného stravování) je běžně označován výstup jako čistírenský kal (viz Tabulka 1).

Tabulka č.1 Označení výstupů z technologií zpracovávající vstupní suroviny anaerobním rozkladem

Zpracovatelská zařízení	Označení výstupu	Označení po zahuštění		Právní předpis pro využití výstupu
		Označení zahuštěné frakce	Označení tekuté frakce	
ČOV – zpracovávající odpadní vody	kal	kal	kalová voda	Zákon č. 185/2001 Sb. o odpadech: Vyhl.č.382/2001 Sb., Vyhl.č.341/2008 Sb., Vyhl č.294/2005 Sb. [4]
ČOV – zpracovávající odpadní vody a VŽP	zbytek po rozkladu*	zahuštěný* zbytek po rozkladu		Nařízení EU č.1069/2009): Nařízení EU č. 142/2011
	kal	kal	kalová voda	Zákon č. 185/2001 Sb. o odpadech: Vyhl.č.382/2001 Sb., Vyhl.č.341/2008 Sb., Vyhl č.294/2005 Sb

*dle Nařízení EU 1069/2009 a jeho prováděcího předpisu Nařízení EU č. 142/2011

Stejně jako užití terminologie je sledování účinnosti hygienizace a mikrobiologická kontrola výstupu závislá na vstupních surovinách a řídí se tudíž různými právními předpisy.

Kontrolou snížení počtu patogenů, a tím spojeného rizika, je mikrobiologický rozbor výstupu a sledování účinnosti hygienizace. Mikrobiologická kontrola výstupů včetně limitů je uvedena v tabulce 2 a 3. Přestože se jedná vždy o čistírenský kal, mikrobiologický rozbor je třeba provádět dle vstupních surovin. Jak je patrné z výše uvedených tabulek, sledované

parametry nejsou jednotné a mnoho původců čistírenských kalů nerespektuje tyto odlišnosti a řídí se pouze místem vzniku výstupu.

Tabulka 2: Limitní koncentrace indikátorových organismů pro upravené čistírenské kaly určené k využití na zemědělské půdě [3]

Příloha č. 4 k vyhlášce č.382/2001 Sb Kategorie kalů	Přípustné množství mikroorganismů (KTJ) v 1g sušiny aplikovaných kalů		
	termotolerantní koliformní bakterie	enterokoky	<i>Salmonella sp.</i>
I	< 10 ³	< 10 ³	negativní nález
II	10 ³ - 10 ⁶	10 ³ - 10 ⁶	nestanovuje se

Kategorie I – kaly, které je možno obecně aplikovat na půdy využívané v zemědělství při dodržení ostatních ustanovení této vyhlášky

Kategorie II – kaly, které je možno aplikovat na zemědělské půdy určené k pěstování plodin a na půdy na kterých se nejméně 3 roky po použití čistírenských kalů nebude pěstovat polní zeleniny a intenzivně plodící ovocná výsadba, a při dodržení zásad ochrany zdraví při práci a ostatních ustanovení vyhlášky

Tabulka č.3 Limitní koncentrace indikátorových organismů pro výstupy dle Nařízení 1069/2009 (EU č. 142/2011) a vyhlášky č. 341/2008 Sb. [2] [5]

Indikátorový mikroorganismus	Výstup dle Nařízení 1069/2009 Limit nález		Výstup dle 341/2008 Sb. Limit nález	
<i>Salmonella spp.</i> nález v 50g	negativní		negativní	
<i>Escherichia coli/</i> <i>TKB*</i> KTJ* v 1 gramu	1	< 5.10 ³	1	< 10 ³
	4	< 10 ³	4	< 50
<i>Enterokoky</i> KTJ* v 1 gramu	1	< 5.10 ³	1	< 10 ³
	4	< 10 ³	4	< 50

*ve vyhlášce 341/2008 Sb.jdou sledovanými indikátorovými organismy termotolerantní koliformní bakterie

V důsledku nápravy legislativních předpisů i vzhledem k tomu, že se v důsledku nejasností právních předpisů množí různé výklady a MŽP a ČIŽP řeší mnoho případů špatného nakládání s kaly, došlo k přípravě impringentové novely zákona o odpadech a k přípravě novely normy TNV 75 8090 Hygienizace kalů v čistírnách odpadních vod. Impringentová novela zákona předpokládá změnu definice kalu v § 32 odst. 1 písmeno a), která zní následovně:

„a) kalem se rozumí

1. kal z čistíren odpadních vod zpracovávajících městské odpadní vody nebo odpadní vody z domácností a z jiných čistíren odpadních vod, které zpracovávají odpadní vody stejného složení jako městské odpadní vody a odpadní vody z domácností, a to i v případě, že čistírny odpadních vod zpracovávají také biologicky rozložitelné odpady na základě rozhodnutí krajského úřadu, kterým je udělen souhlas k provozování zařízení pro nakládání s odpady a s jeho provozním řádem, nebo biologicky rozložitelné odpady spadající do působnosti nařízení o vedlejších produktech živočišného původu),
2. kal ze septiků a jiných podobných zařízení,
3. kal z čistíren odpadních vod zpracovávajících odpadní vody a materiály, které svými vlastnostmi odpovídají odpadním vodám a materiálům dle bodu 1, zejména odpadní vody a materiály, které mají původ v potravinářském průmyslu a zemědělství“.

Došlo k úpravě definice v bodě 1 a pod pojem kal se zahrnuje i kal z ČOV, které zpracovávají bioodpad a VŽP či odpad, s kterým se nakládá v režimu VŽP. Dále pak došlo k vložení bodu 3, kam byly začleněny kaly z ČOV, které zpracovávají vody, které mají původ v potravinářském

průmyslu a zemědělství. Dřívější definice tento typ kalů neuvažovala.

V návaznosti na tyto změny je třeba, aby došlo co nejdříve ke změnám limitních hodnot i samotných mikrobiologických indikátorů v prováděcích vyhláškách k zákonu (vyhl. č. 382/2001 Sb. a vyhl.č.341/2008 Sb.).

3.0 METODY STANOVENÍ INDIKÁTOROVÝCH ORGANISMŮ

Komplikovanost právních předpisů má mnohdy za následek nesprávné použití indikátorových organismů a tím dochází k použití špatně zvolených metod jejich stanovení. Na základě takto získaných zavádějících výsledků dochází ke špatným rozhodnutím a špatným závěrům při posouzení mikrobiologické nezávadnosti výstupů z technologií zpracování čistírenských kalů.

Pro současné hodnocení kvality bioodpadů a čistírenských kalů, které je založeno na stanovení aktuálního počtu přítomných indikátorových organismů v kalu nebo upraveném bioodpadu, neexistují 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 [7], [8]. 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. Osmileté jednání a obhajování výsledků projektů bylo nakonec korunováno jen částečným úspěchem a v roce 2013 byla vydána metodika pro stanovení *E.coli* jako technická zpráva CEN/TR 16193:2013 Kaly z čistíren odpadních vod, ošetřené bioodpady a půda – Detekce a stanovení počtů bakterií *Escherichia coli* [6]. Zpráva byla vydána sekretariátem Technického výboru CEN/TC 400 „Projektový výbor – Horizontální normy pro oblast kalů z čistíren odpadních vod, bioodpadů a půdy“, který je zřízen DIN. Technická zpráva má tři ustanovení:

Ustanovení 6: Metoda A – Metoda membránové filtrace pro kvantifikaci

Ustanovení 7: Metoda B – Miniaturizovaná metoda (Nejpravděpodobnější počet) inokulací do tekuté půdy

Ustanovení 8: Metoda C – Makrometoda (nejpravděpodobnější počet) v tekuté půdě.

V České republice již existují metody i dlouhodobé sledování kvality kalů a upravených bioodpad. Metody zveřejněné v Technické zprávě CEN/TR 16193:2013, byly v ČR ověřovány 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“ a vybrané metody byly předány jako návrh metodického pokynu na MŽP v roce 2010. Tento návrh nebyl MŽP ani předán k připomínkování odborné veřejnosti ani vydán, přestože by bylo vhodné, aby laboratoře v ČR byly připraveny na nové metody. Metody byly však uveřejněny na stránkách SZÚ[8].

Stanovení *E. coli* podle CEN/TR 16193:2013 Kaly z čistíren odpadních vod, ošetřené bioodpady a půda – Detekce a stanovení počtů bakterií *Escherichia coli* [6]

Metody, které jsou doporučovány v technické zprávě jsou 3, uveřejněné jako ustanovení 1-3. Jsou určeny pro matrice, které jsou uvedené v tabulce č. 4.

Tabulka 4 Přehled doporučených metod stanovení *E. coli* pro různé matrice podle CEN/TR 16193

Matrice	Metoda A Membr. filtrace	Metoda B Miniturizovaná MPN	Metoda C Makrometoda MPN
Kal z čistírny odpadních vod	Mesofilně anaerobně stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Vzduchem sušený peletizovaný kal z čistíren odpadních vod Odvodněný stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Kompostovaný kal z čistíren odpadních vod	Mesofilně anaerobně stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Vzduchem sušený peletizovaný kal z čistíren odpadních vod Odvodněný stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Kompostovaný kal z čistíren odpadních vod	Mesofilně anaerobně stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Vzduchem sušený peletizovaný kal z čistíren odpadních vod Odvodněný stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Kompostovaný kal z čistíren odpadních vod
Bioodpady	Kompostované bioodpady Kompostované zelené odpady Anaerobně ošetřené bioodpady	Kompostované bioodpady Kompostované zelené odpady Anaerobně ošetřené bioodpady	Kompostované bioodpady Kompostované zelené odpady Anaerobně ošetřené bioodpady

Metoda A specifikuje postup membránové filtrace pro kvantitativní detekci kultur jednotlivých kolonií na chromogenní agarové půdě. Není vhodná pro materiály, jejichž ošetření výrazně redukuje počty bakterií na méně než 10 životaschopných *E. coli* na gram vlhké hmotnosti jako je přídavek vápna, sušení nebo pasterizace. Je vhodná pro stanovení řádové redukce *E. coli* během úpravy odpadu stejně jako pro stanovení kvality konečného produktu.

Homogenizovaný naředěný vzorek se filtruje, membránový filtr se asepticky vyjme a inkubuje se na membránovém laktózglukuronidovém agaru (MLGA), nejprve při $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ po dobu $(4,0 \pm 0,5)$ h. Potom se teplota zvýší na $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$. Přítomnost *E. coli* je indikována zelenými koloniemi, které vznikají hydrolýzou BCIG (5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -glukuronid (BCIG) .

Limit detekce metody A je 27 KTJ *E. coli* na gram vlhké hmotnosti podle ENV ISO 13843 v závislosti na obsahu pevných látek. Při vysokých koncentracích ($> 0,1$ g/mL) může být omezen objem vzorku, který projde membránou, pokud není naředěn.

Metoda B specifikuje miniaturizovanou metodu nejpravděpodobnějšího počtu (MPN) pro semi-kvantitativní detekci *Escherichia coli* v kalu, půdách a organických hnojivech podobné konzistence jako validované matrice. Je vhodná pro hodnocení řádového snížení *E. coli* během úpravy stejně jako kvality konečného produktu. Metoda B má detekční limit (5 %) přibližně 67 *E. coli* MPN na g vlhké hmotnosti a kvantifikační rozsah 6 řádů.

Metoda C specifikuje metodu nejpravděpodobnějšího počtu (MPN) pro semi-kvantitativní detekci *Escherichia coli* v kalech, upraveném bioodpadu a půdách s podobnou konzistencí jako validované matrice. Je vhodná pro hodnocení řádové redukce *E. coli* v průběhu úpravy stejně jako

pro hodnocení kvality konečného produktu. Metoda C se může použít bez ohledu na obsah sušiny zkoušeného materiálu. Metoda C má detekční limit přibližně 10 *E. coli* MPN/g vlhké hmotnosti. Postup metody spočívá v přípravě homogenizované suspenze vzorku v 0,9 % (hmota/objem, např. g/L) roztoku chloridu sodného, sériové ředění této suspenze ve stejném ředícím roztoku (od 10⁻¹ až po 10⁻⁷); a přenesení 3 x 1 mL z každého ředícího stupně do tří zkumavek obsahujících 9 mL Fluorocultu™ – lauryl sulfátové půdy. Kultivace se provádí při (44 ± 1) °C po dobu (40 ± 4) h.

Pozitivita *E. coli* je dána detekcí produkce plynu, fluorescence a produkce indolu. Jedná se o kvantifikaci MPN technikou.

V rámci ověřování metod v 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“ ukončeném v roce 2010, byly ověřovány následující metody:

- a) CEN/TR 15214-1 Detection and enumeration of *Escherichia coli* in sludges, Part 1: Membrane filtration method for quantification
- b) CEN/TR 15214-2 Detection and enumeration of *Escherichia coli* in sludges, Part 2: Miniaturised method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium
- c) CEN/TR 15214-3 Detection and enumeration of *Escherichia coli* in sludges, -Part 3: Macro method (Most Probable Number) in liquid medium
- d) Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E.coli* (AHM 7/2001)
- e) Stanovení *E.coli* metodou Colilert..

přičemž metody a) až c) jsou totožné s metodami uveřejněnými jako CEN/TR 16193. Na základě výsledků porovnávání v projektu MŽP byly řešiteli projektu doporučeny metody: Membrane filtration method for quantification a stanovení *E.coli* metodou Colilert. Tyto metody jsou zatím uvažovány jako jednotné metody pro ČR, přestože technická zpráva CEN/TR 16193 doporučuje všechny 3.

4.0 ZÁVĚR

Jak je výše uvedeno existuje snaha o nápravu nejasností v právních předpisech, o sjednocení terminologie i požadavků na limitní hodnoty indikátorových organismů v čistírenských kalech a v kalech po jakékoliv úpravě. Je velmi nutné, aby došlo k novelizaci všech právních předpisů najednou a nebo, aby byla zakotvena v zákoně přechodná doba než budou vydány prováděcí předpisy. Pokud vyjde pouze novela zákona, bude nejasností a zmatků při nakládání s čistírenskými kaly ještě víc než je dosud. Nadějí na zlepšení je tedy opět novela zákona o odpadech a jeho související předpisy, jejíž vydání se ale nepředpokládá dříve než v roce 2016.

5.0 SEZNAM ZKRATEK

CEN evropská normalizační komise
ČIŽP Česká inspekce životního prostředí

ČOV	čistírna odpadních vod
ČR	Česká republika
DIN	komise pro německé normy
EC	Evropská komise
EU	Evropská unie
KTJ	kolonie tvořící jednotku
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
TC	technická komise
TR	technická zpráva dokument přijatý CEN, obsahující soubor údajů jiného druhu než údaje obvykle vydávané jako evropské nebo mezinárodní normy nebo technické specifikace; vzhledem k charakteru údajů není v době dokončení dokumentu vhodné ho publikovat jako evropskou nebo mezinárodní normu nebo technickou specifikaci
TS	technická specifikace, dokument přijatý CEN, CENELEC, ISO nebo IEC, s možností budoucí dohody o evropské nebo mezinárodní normě, pro niž však v současné době: nelze získat potřebnou podporu ke schválení jako evropské nebo mezinárodní normy; jsou pochybnosti o tom, zda je dosaženo konsenzu; předmětná záležitost je stále ve stadiu technického vývoje; existuje jiný důvod znemožňující její okamžité vydání jako evropské nebo mezinárodní normy
VŽP	vedlejší produkty živočišného původu

Literatura

- [1] **Regulation (EC) No 1069/2009** laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 and implementing Council Directive 97/78/EC as regards certain samples and items exempt from veterinary checks at the border (Commission Regulation on animal by-products) relevance
- [2] **Nařízení Komise (EU) č. 142/2011** ze dne 25. února 2011, kterým se provádí nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě, a provádění směrnice Rady 97/78/ES, pokud jde o určité vzorky a předměty osvobozené od veterinárních kontrol na hranici podle uvedené směrnice na zdraví a životní prostředí při nakládání s biologicky rozložitelnými odpady“, SZÚ, Praha
- [3] **Vyhláška č.382/2001 Sb.** o použití upravených kalů na zemědělské půdě , příloha č. 4,
- [4] **Vyhláška č.294/2005 Sb.**, o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č.383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady a Vyhláška č.383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady ve znění pozdějších předpisů stanovují pouze podmínku, že účinnost hygienizace s cílem snížení nebo odstranění patogenních biologických činitelů musí být sledována pomocí fyzikálních, chemických a biologických ukazatelů (stejně jako pro čistírenské kaly)
- [5] **Vyhláška č.341/2008 Sb.**, o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady a o změně vyhlášky č.294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady (vyhláška o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady)
- [6] **CEN/TR 16193:2013** Kaly z čistíren odpadních vod, ošetřené bioodpady a půda – Detekce a stanovení počtů bakterií *Escherichia coli*
- [7] **Matějů, L. (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
- [8] **Matějů, L. (2009):** Metodický návod pro stanovení indikátorových organismů v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalych z čistíren odpadních vod, digestátech, substrátech kompostech pomocných růstových prostředcích a podobných matricích., *Acta Hygienica, Epidemiologica et Microbiologica* No1, 2008, ISSN 1804-9613
http://www.szu.cz/uploads/documents/knihovna_SVI/pdf/2008/full_2008_01.pdf

Vývoj metodiky určení míry ohrožení kulturních památek mikroorganismy

RNDr. Hana Mlejnková, Ph.D.,

Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka, v.v.i.


Projekt Ministerstva kultury ČR 2012-2015: „Identifikace významných území s kulturně historickými hodnotami ohrožených přírodními a antropogenními vlivy“

dílčí úkol: „Bioohrožení mikroorganismy původem z vodního prostředí“


- tento typ ohrožení je charakteristický pro celé území ČR a zároveň je jedním z nejčastějších jevů, který památková péče musí řešit,
- role mikroorganismů je v procesu deteriorace památek velmi významná,
- cílem práce je navrhnout objektivní metodický postup stanovení míry ohrožení památek mikroorganismy.

Biologické napadení – bioohrožení - biodegradace – bioznečištění - biokolonizace – biofouling – biodeteriorace - biokoroze ...

= procesy rozušování nebo poškozování materiálu vlivem biologických činitelů, které vedou k nežádoucím změnám ve vlastnostech materiálů.



= významný problém při ochraně památek



Biodeteriorační proces

1. Biologický činitel
2. Typ objektu, materiál
3. Zdroje a způsob kontaminace památek
4. Podmínky vzniku a rozvoje biologického poškození
5. Mechanismy biologického poškození



1. Biologičtí činitelé - původci ohrožení památek

široké spektrum organismů

- mikroorganismy - bakterie, sinice, řasy, plísně, houby
- mechy, lišejníky a vyšší rostliny
- živočiškové (hmyz, hlodavci, ptáci)
- (člověk)



Příklady biologických deterogenů a jejich působení

Bakterie – tvorba biofilmů, kolonizace všech prostor, kde jsou vhodné podmínky

Biologické agens	Způsob/proces poškození
slimá bakterie (<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>T. denitrificans</i> , <i>T. thiooxidans</i> , <i>T. concretionivorus</i> , <i>T. thiophilus</i> , <i>T. novellus</i>)	snížení pH vznikem H_2SO_4
desulfurizační bakterie (<i>Desulfurobium desulfuricans</i> , <i>D. vulgaris</i> , <i>D. gigas</i> , <i>D. africanus</i> , <i>Desulfotomaculum nigrificans</i> , <i>D. ruminis</i> , <i>D. orientis</i>)	přítomnost sírných pro další oxidaci sírnými bakteriemi
nitrifikační bakterie (<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosobolus</i> , <i>Nitrospira</i> , <i>Nitrosovirens</i> spp., <i>Nitrobacter</i> sp.)	produkce metabolitů HNO_2 a HNO_3 , které reagují s vápennými sloužkami staveb
denitrifikační bakterie (<i>Pseudomonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Mycoplana</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrion</i>)	transformace nitrátových látek

MINISTERSTVO KULTURY

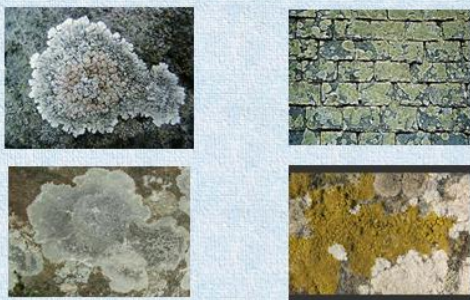
VÚV TGM

Vývoj metodiky určení ohrožení kulturních památek mikroorganismy

Hana Mlejnková



Lišejníky - tvoří typické útvary a vyskytují se na střešních krytinách, sochách, schodištích..., suchá místa



Houby a plísně - vyskytují se na vlhkých místech, vytváří povlaky různých barev



Řasy - osídlení zejména trvale vlhkých stanovišť s přístupem světla, tvorba nazelenalých povlaků.



Mechy, vyšší rostliny - osídlení vlhkých míst s přístupem světla



2. Objekty a materiály

- naše kulturní památky jsou architektonicky velmi různorodé:
 - Budovy – zámky, hrady, kostely, zříceniny...
 - Solitéry - sochy, památníky, fontány...
 - Exteriéry – archeologická naleziště, parky, pohřebiště, hradiště...
 - Interiérové vybavení – nábytek, textil, knihy, písemnosti...
- široké spektrum tradičních i neobvyklých materiálů:
 - kámen, dřevo, papír (archivní materiály, knihy), textil, betony, omítky, střešní krytiny, barvy a nátěry, kovy, dlažby...
- všechny mohou být za určitých podmínek napadeny mikroorganismy

3. Zdroje a způsob kontaminace památek

- voda (povodně, deště, přivalové srážky, vzlinání, zatékání, havárie...)
- půda (smyvy, splachy, návštěvníci...)
- vzduch (nálety z vnějšího prostředí...)
- iniciační infekce samotných materiálů (přenos z jiných depositářů)



4. Podmínky vzniku a rozvoje biologického poškození

- podmínky prostředí: fyzikálně-chemické, klimatické aj.
- vlhkost, teplo, živiny, hodnota pH, obsah kyslíku, světlo ...
- jedním z nejvýznamnějších faktorů pro rozvoj většiny organismů je **vlhkost**
- aktuální vlhkost a teplota – význam při bezprostředním ovlivnění napadení daného materiálu určitým druhem biodeteriogenu



5. Mechanismy biologického poškození

- **mechanické poškození** – irreversibilní, přímá aktivita větších organismů
- **asimilativní biodeteriorace** – degradace materiálu jako nutričního zdroje
- **disimilativní biodeteriorace** – poškození vyprodukovanými metabolity (koruze, pigmentace)



Nejčastější proces (kombinace mechanismů):

kolonizace nerovných povrchů bakteriemi nebo řasami, které vytvoří základ (primární biofilm) pro rozvoj dalších organismů (mechů, lišejníků, vyšších rostlin...) a současně působí v povrchovém biofilmu a uvnitř pórů metabolickými procesy, kterými narušují napadený materiál (produkce kyselin, korozní aktivita, akumulace vlhkosti v biofilmech, mrazové cykly...)



tvorba biofilmu

Postup vývoje metodiky - 1

1. **rešerše** na téma bioohrožení památek se zaměřením na metodiky stanovení jeho míry,
2. nebyla zjištěna existence postupů hodnocení bioohrožení jako uceleného problému. Jednotlivé práce se zabývají zejména determinací původců biodeteriorace a testováním metod detekce,
3. **výběr typových lokalit** s odlišnými podmínkami prostředí,
4. průzkum výskytu problému na základě **dotazníků** pro pracovníky NPÚ,
5. **terénní šetření** na vybraných lokalitách (popis a fyzikálně-chemická charakteristika prostředí, odběry vzorků, zkušenosti místních, fotodokumentace apod.).



Postup vývoje metodiky - 2

Návrh a odzkoušení postupu semikvantitativní detekce mikroorganismů z památkových objektů:

1. Odběr vzorků vatovým tampónem z kontaminované plochy, směsný vzorek z více míst;
2. Transport tampónu do laboratoře ve sterilním fyziologickém roztoku;
3. Homogenizace vzorku třepáním 20 min, krátké vortexování;
4. Očkování 1 ml neředěného, příp. zředěného vzorku;
5. Kultivace na povrchu Trypton Yeast Soya Extract Agarů při 22 °C po dobu 72 hodin;
6. Kultivace na povrchu Sabouraudova agarů při 25 °C po dobu 3 a 5 dní;
7. Hodnocení výsledků: při hodnotě **>1000 kolonií v 1 ml** je do hodnotícího formuláře zaznamenán výskyt masivního oživení mikroorganismy.

Vstupní chodba - přízemí Stěna sakristie - přízemí Roh kaple - přízemí

Zámek Uherčice - příklad

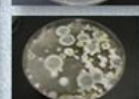
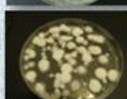
odběrové místo



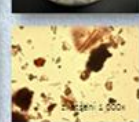
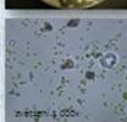
kultivace - bakterie



kultivace - plísňe



mikroskopie



Postup vývoje metodiky - 3

Návrh metodického postupu hodnocení míry bioohrožení – formulář, který zahrnuje jednoduché otázky cílené na získání informací o stavu hodnoceného prvku:

1. potenciální příčiny bioohrožení, ke kterým patří v největší míře zdroj vlhkosti (shora – deště, zatékání; zdola – povodně, vztlínající spodní voda; zboku – vlhkost v místnostech pod úrovní terénu).
2. reálný výskyt poškození biologickým agens – skvrny různého typu, biofilmy, povlaky plísní, dřevomorka, výskyt plísní (po kultivaci odebraného vzorku) aj.
3. negativní technické zásahy – nepropustné materiály, poškozené větrací systémy, poškozené kanalizační systémy aj.
4. podmínky prostředí – vlhkost; zápach, ukazující na výskyt vlhkosti; kondenzace vody aj.

Hodnoticí formulář

Postup vývoje metodiky - 4

Návrh celkového vyhodnocení památky rozlišuje tři základní stupně ohrožení:

- extrémní ohrožení,
- ohrožení,
- nevýznamné ohrožení.

Vybrané výsledky hodnocení:

Památky	skóre (z 100)	ohrožení
Památky Kuzněcký - město Olomouc - Olomouc	55	ohrožení
Památky šarounské (lince) - město Olomouc - Olomouc	7	ohrožení
Čáslav - Jambur	84	ohrožení
Čáslav - Jambur	24	ohrožení
Karlov - Karlov	71	ohrožení
Mladec nad Troskami - Mladec	22	ohrožení
Památky v okolí městečka - město - 5. město - město	10	ohrožení
ČP - Mladec a výhledy - město - 10. město - město	10	ohrožení
Mladec - výhledy - město	26	ohrožení
Stará Troska - město - město	26	ohrožení
Čáslav - město - město	25	ohrožení
Památky - město	46	ohrožení
Čáslav - město	29	ohrožení
Karlov - město - město - město - město - město	46	ohrožení
Čáslav - město	46	ohrožení
Čáslav - město	21	ohrožení
Čáslav - město	29	ohrožení
Čáslav - město	60	ohrožení
Čáslav - město	67	ohrožení



Závěry a postřehy

Výskyt mikroorganismů:

- všechny vzorkované plochy byly více či méně oživeny mikroorganismy,
- oživení jednotlivých míst bylo kvalitativně i kvantitativně velmi odlišné (kombinace různých druhů plísní, bakterií, řas...),
- není efektivní provádět přesnou determinaci přítomných organismů.



Dotazníky NPÚ:

- informace z dotazníkové akce se nezdají být v plné míře použitelné
- subjektivní pochopení otázek/odlišný způsob chápání problému definovaného v dotazníku, vyplňování „od stolu“



Závěry a postřehy

• Nejeфекtivnější způsob hodnocení je místní šetření ve spolupráci se správcem objektu;

• Zjištění stavu zadáním informací do „Hodnoticího formuláře“ vede k objektivnímu zjištění míry bioohrožení, je omezeno na objekty typu budov (90 % z NKP v ČR);

• Nejvýznamnějším činitelem podporujícím výskyt a rozvoj biologického poškození památek je vlhkost;

• Míra negativního působení vlhkosti je závislá na charakteru a zdrojích, době působení, opakování a spoluúčinku ostatních fyzikálních faktorů, např. teploty, světla, přísunu vzduchu apod.

• Výsledné bioohrožení koresponduje s technickým stavem památky.

Práce vznikla za podpory projektu MK ČR DF12P010VV035

Děkuji za pozornost



ALTERNATIVNÍ METODY DETEKCE AEROMONÁD VE ZDROJÍCH PITNÝCH VOD

Marcela Pejchalová, Šárka Martinková

Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita

Pardubice, Studentská 95, 532 10 Pardubice, Česká republika

1 Úvod

Rod *Aeromonas* tvoří Gram-negativní, fakultativně anaerobní, oxidáza i kataláza pozitivní rovné tyčinky až kokotyčinky. Pohyb je zajištěn polárními i laterálními bičíky, které hrají zásadní roli při tvorbu biofilmu.¹

Jedná se o bakterie všudypřítomné bakterie v životním prostředí. Běžně jsou po celém světě izolovány z vod odpadních, povrchových i podzemních, včetně vod chlorovaných.² Aeromonády jsou považovány za patogenní nejen pro vodní a suchozemské živočichy, ale též pro člověka. Dle nedávných studií, přibližně za 85 % celkových infekcí u lidí vyvolané tímto rodem nese odpovědnost *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. salmonicida* a *A. veronii*, způsobující ojediněle střevní infekce, sepse, peritonitidu, osteomyelitidu a infekce měkkých tkání³. Rod *Aeromonas* je rezistentní vůči celé škále antibiotik, což je spojeno s produkcí chromozomálně kódovaných β -laktamáz^{4,5}.
Chyba! Záložka není definována.

Cílem práce bylo provedení kráceného mikrobiologického rozboru dle vyhlášky č. 252/2004 Sb. Ve vzorcích vod byly rovněž stanoveny bakterie rodu *Aeromonas* kultivačními metodami, posléze také molekulárně biologickou technikou real-time PCR.

2 Experimentální část

2.1 Kultivační stanovení indikátorových mikroorganismů

Vzorky vod byly odebrány do sterilních 500 ml vzorkovnic z domovních studní a přírodních studánek. Do 12 hodin od odběru byl proveden krácený mikrobiologický rozbor dle vyhlášky č. 252/2004 Sb. prokazující přítomnost enterokoků, koliformních bakterií, *Escherichia coli* a stanovující celkové počty kolonií vykultivovaných při 22 °C a 36 °C. Počty enterokoků byly stanovovány metodou membránové filtrace s následnou kultivací (41 °C/48 h) na médiu Slanetz-Bartley obsahující azid sodný a TTC. Dále byl použit Enterolert-DW/Quanti-Tray. Koliformní bakterie a *E. coli* byly stanovovány kultivačně na Endově agaru (37 °C/ 48 h), prokazujícím fermentaci laktózy. Vedle klasické kultivační metody bylo využito metody Colilert-18/Quanti-Tray. Suspektní kolonie byly podrobeny konfirmačním testům (hydrolýza eskulinu, kataláza, cytochromoxidáza, Gramovo barvení, indol, VP test, MR test, ONPG-test, m-Colitest a ENTEROtest 24N).

2.2 Kultivační stanovení rodu *Aeromonas*

Izolace bakterií rodu *Aeromonas* byla prováděna metodou membránové filtrace s následující kultivací (37 °C/48 h). 10 ml vzorku vody bylo přefiltrováno přes membránový filtr s pórovitostí 0,45 μ m. Filtr byl poté inkubován na M-*Aeromonas* Selective agar, Rippey-Cabelli agar či Glutamát-škrobový agar s fenolovou červení s přidaným ampicilinem a deoxycholátem sodným (vše HiMedia, Indie). U suspektních (žlutě pigmentované) kolonií byla provedena biochemická konfirmace - test na tvorbu katalázy, oxidázy, kyselin, acetoinu, indolu, dále pak Gramovo barvení a NEFERMtest. Na krevním agaru s 5 % beraní krve byla sledována produkce hemolyzinu.

2.3 Stanovení rodu *Aeromonas* pomocí Real-time PCR

Detekce rodu *Aeromonas* pomocí real-time PCR byla modifikována dle studie Khana a kol.⁶. Srovnávací kmen *Aeromonas hydrophila* pro optimalizaci metody kultivovaný na krevním agaru s 5 % beraní krve pocházel ze zdrojů KBBV (Univerzita Pardubice).

2.3.1 Oligonukleotidové primery

Rod *Aeromonas* byl stanovován pomocí amplifikace úseku genu gyrázy B (*gyrB*) za použití oligonukleotidových primerů s následujícími sekvencemi: forward primer 5'-CTG AAC CAG AAC AAG ACC CCG-3' a reverse 5'-ATG TTG TTG GTG AAG CAG TA-3'. Očekávanou velikostí PCR produktu je 130 bp.

2.3.2 Reakční směs a amplifikační program

Reakční směs obsahovala 2 µl lyzátu, 10 µl SYBR[®] Green JumpStart *Taq* ReadyMix (Sigma, USA) či KAPA SYBR[®] fast qPCR kit (Kapa Biosystems, USA), 0,193 µl reverse primeru ($3,3 \cdot 10^{-5}$ M) a 0,188 µl forward primeru ($3,3 \cdot 10^{-5}$ M). Směs byla doplněna PCR vodou na celkový objem 25 µl. Amplifikační program PCR probíhal vždy za stejných podmínek, tedy po úvodní denaturaci při 94 °C po dobu 2 minut následovalo 40 cyklů amplifikace, v nichž docházelo k zahřátí na 94 °C po dobu 10 sekund (denaturace), ochlazení na 55 °C po dobu 10 sekund (annealing) a následnému zahřátí na 72 °C po dobu 10 sekund (elongace). Reakce byla provedena pomocí Rotor Gene[™] 3000 Corbett Research. Na základě znalosti koncentrace byla sestrojena kalibrační křivka, při níž byl stanoven detekční limit. Kontrola produktu amplifikace byla provedena elektroforeticky v 2% agarózovém gelu.

2.3.3 Stanovení detekčního limitu a izolace DNA

Stanovení detekčního limitu bylo provedeno proměřením koncentrační řady připravené desítkovým ředěním. Výchozí suspenze odpovídala stupni 0,5 McFarlandovy stupnice, tedy $1,5 \cdot 10^6$ KTJ/ml. Izolace DNA byla provedena dle pokynů výrobců silikagelových kolonek QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Francie) či RapidWater[®] DNA Isolation Kit (MO BIO, USA).

2.3.4 Analýza reálných vzorků

10 ml vzorku vody bylo přefiltrováno přes membránový filtr s pórovitostí 0,45 µm. Pro přímé stanovení byla dále izolována DNA dle pokynů výrobce RapidWater[®] DNA Isolation Kit (MO BIO, USA). Použití silikagelových kolonek QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Francie) vyžaduje izolaci DNA z kolonií, tudíž byl membránový filtr přenesen na selektivně diagnostické médium (M-*Aeromonas* Selective agar, Rippey-Cabelli agar či Glutamát-škrobový agar s fenolovou červení s přidaným ampicilinem a deoxycholátem sodným, kde po inkubaci (37 °C/24 h) byla provedena konfirmace suspektních kolonií. Následně byla z těchto kolonií připravena suspenze odpovídající stupni 0,5 McFarlandovy stupnice, tedy $1,5 \cdot 10^8$ KTJ/ml, z níž byla izolace DNA provedena dle pokynů výrobce (Qiagen, Francie).

2. Výsledky a diskuse

Celkem bylo odebráno, zpracováno a vyhodnoceno 40 vzorků vod pocházejících z technologicky neupravených pitných zdrojů, z nichž 23 bylo studen a 17 studánek.

Výskyt rodu *Aeromonas* v každém vzorku byl srovnáván s výskytem indikátorových mikroorganismů určujících jakost pitných vod. Srovnání výskytu aeromonád s ostatními ukazateli potvrzují nezávislost výskytu rodu *Aeromonas* na fekální kontaminaci. Ve studnách sloužících k individuálnímu zásobování byla přítomnost *Aeromonas* sp. detekována ve všech 23 vzorcích (100 %), zatímco v přírodních studánkách byly přítomny v 16 zdrojích (94,12 %).

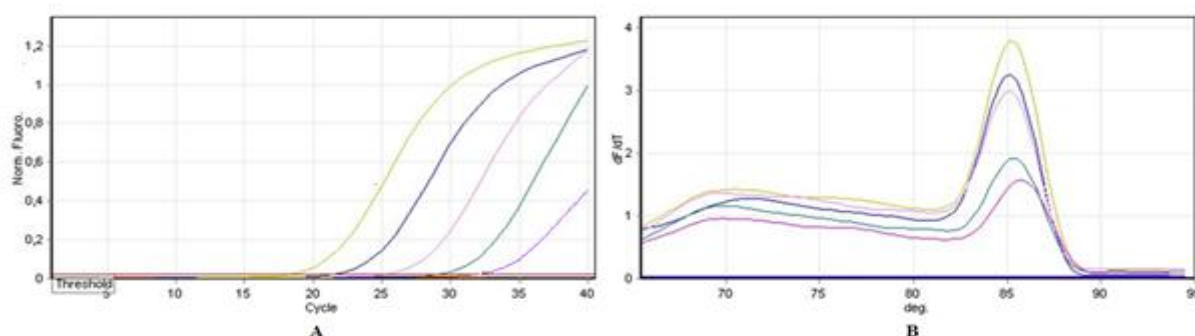
Stanovení bakterií rodu *Aeromonas* bylo prováděno na vybraných kultivačních médiích, v nichž jako selektivně diagnostická složka působí ampicilin. Společným znakem použitých médií je charakteristický růst aeromonád ve žlutě pigmentovaných koloniích, proto již pouhý nárůst takovýchto kolonií byl brán za pozitivní výsledek. Provedením konfirmačních testů ze suspektních i nesuspektních kolonií bylo potvrzeno, že nárůst žlutě pigmentujících kolonií na M-aeromonas selective agar po 48 hodinové kultivaci při 37 °C opravdu detekuje *Aeromonas* spp. Výjimku tvořil kmen *Aeromonas caviae*, jež na tomto médiu rostl v atypických tmavě zelených koloniích, což je pravděpodobně způsobeno jeho neschopností fermentace dextrinu. Na Rippey-Cabelli agaru byl zjištěn růst *Aeromonas schubertii*, rovněž v atypicky tmavě zelených koloniích, značící neschopnost fermentace trehalózy.

Biochemickou konfirmací byl zjištěn nejvyšší výskyt *Aeromonas sobria* (28,57 %). Četné zastoupení také vykazovala *Aeromonas veronii* biovar *sobria* (21,43 %), *A. caviae* (21,43 %), *A. schubertii* (14,29 %) a *A. enteropelogenes* shodně s *A. hydrophila* (7,14 %). Hemolyticky aktivní byly všechny kmeny s výjimkou *Aeromonas schubertii*. Potvrzení hemolytické aktivity zdůrazňuje patogenní potenciál těchto druhů, proto jejich přítomnost v pitných vodách představuje zdravotní riziko.

Další výzkum byl zaměřen na optimalizaci metody pro rychlejší a přesnější detekci aeromonád. Vzhledem k prokázanému výskytu druhů aeromonád v první části práce byla vybírána sekvence genu *gyrB* společná pro všechny kmeny. Pro potvrzení pozitivního průběhu reakce a velikosti ampikonů bylo vybráno 5 různých kmenů (*Aeromonas veronii* biovar *sobria*, *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. sobria*, *A. hydrophila*).

Optimalizace metody s cílem získání nižšího detekčního limitu spočívala ve výběru vhodnějšího komerčního kitu pro real-time PCR, provedením srovnávací analýzy SYBR® Green JumpStart *Taq* ReadyMix a KAPA SYBR® fast qPCR kit pro detekci genu *gyrB*. Sestavením kalibrační řady bakteriálních suspenzí *Aeromonas hydrophila* v rozmezí koncentrací $1,5 \cdot 10^6$ až $1,5 \cdot 10^0$ KTJ/ml a následnou izolací DNA byla stanovena mez detekce jednotlivých kitů (pro SYBR® Green $1,5 \cdot 10^3$ a pro KAPA SYBR® $1,5 \cdot 10^2$ KTJ/ml). Hodnoty C_t se měnily v závislosti na koncentraci izolované DNA. Vynesením hodnot C_t do grafu vykazují oba fluorescenční kity lineární závislost na koncentraci. Pomocí KAPA SYBR® fast qPCR kit byla získána desetkrát nižší mez detekce

Graf 1 A - Průběh real-time PCR amplifikace kalibrační řady bakteriální suspenze *Aeromonas hydrophila*. **B** – Analýza křivky tání ampikonů při detekci kalibrační řady bakteriální suspenze *Aeromonas hydrophila*.



Tabulka 1 Hodnoty popisující Graf 3.

	koncentrace bakteriální suspenze [KTJ/ml]	C_t	Poloha píku
■	$1,5 \cdot 10^6$	18,28	85,2
■	$1,5 \cdot 10^5$	21,43	89,8
■	$1,5 \cdot 10^4$	25,28	90
■	$1,5 \cdot 10^3$	29,11	90,8
■	$1,5 \cdot 10^2$	31,97	91

Metodou real-time PCR bylo provedeno stanovení 5 vzorků technologicky neupravených zdrojů pitných vod, u nichž byl znám předchozí kultivační rozbor. Přítomnost rodu *Aeromonas* byla potvrzena pouze v 1 vzorku.

Kultivačně bylo zjištěno enormně vysoké zastoupení těchto bakterií v analyzovaných vzorcích vod, přičemž metodou PCR takto vysoké zastoupení nebylo potvrzeno. Také několik dalších studií uvádí nekorelujícími počty mikrobiálních patogenů stanovenými kultivačně a real-time PCR v různých matricích vod či potravinách^{9,10}.

Metody se liší také dobou a cenou analýzy. Celkový čas od zpracování jednoho vzorku až po jeho vyhodnocení a potvrzení kultivační technikou je 5 – 9 dní, kdežto real-time PCR dokáže čas zkrátit na pouhé 2 hodiny. V případě kultivačních metod je k detekci zapotřebí mnoha kultivačních médií a činidel, přesto je však v porovnání s real-time PCR ekonomicky dostupnější.

4. Závěr

Kultivačními technikami byla sledována přítomnost intestinálních enterokoků, koliformních bakterií, *Escherichia coli* a celkových počtů kolonií kultivovaných při 22 °C a 36 °C, jejichž počty byly následně porovnány s počty rodu *Aeromonas* detekovanými technikou membránových filtrů s následnou kultivací na agaru M-aeromonas selective, Rippey-Cabelli a Glutamát-škrobovém s fenolovou červení.

Přítomnost rodu *Aeromonas* byla detekována téměř ve všech vzorcích sledovaných vod, konkrétně ve 39 ze 40. V další fázi bylo optimalizovanou metodou real-time PCR analyzováno 5 vybraných vzorků, pro něž byl znám kultivační rozbor. Porovnání real-time PCR a klasického stanovení kultivačními technikami poskytovalo značně rozdílné závěry, které dávají podnět k nalezení optimální metody detekce rodu *Aeromonas* jak z hlediska časového, tak ekonomického.

Získané výsledky ukazují na to, že tradiční mikrobiologické ukazatele nemusí být dostatečnými markery pro kontrolu kvality vody, jelikož i v jejich nepřítomnosti může docházet k výskytům některých z oportunních patogenů, tedy i rodu *Aeromonas*. Zjištění a potvrzení vysoké prevalence rodu *Aeromonas* je stále aktuálním mikrobiologickým tématem a je nutné mu věnovat neustálou pozornost.

¹ Angeles-Morales A. B., Mondragón-Flores R., Luna-Arias J. P., Enríquez-Nieto C. T., Parra-Ortega B., Castro-Escarpullí G: *Advances in Microbiology*, 2, 552-560 (2012).

² Parker J. L., Shaw J. G.: *J. Infect.*, 62, 109-118 (2011).

³ USA-FDA. Bad bug book. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. *Aeromonas hydrophila*, (2012).

⁴ Hatha M., Vivekanandhan A. A., Joice J.: *Int. J. Food Microbiol.*, 98, 131-134 (2005).

⁵ Miñana-galbis D., Farfán M., Lorén J. G., Fusté M. C.: *Syst. Appl. Microbiol.*, 33, 15-19 (2010).

⁶ Khan I. U. H., Loughborough A., Edge T. A.: *J. Water Health*, 7, 312-323 (2009).