

Dana Baudišová

Novinky v mikrobiologii vody 2014

Heterotrofní mikroorganismy

Počty kolonií při 36 a 22 C – „kultivovatelné mikroorganismy“

Dominantními taxony tohoto spektra jsou *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Comamonas* spp., *Enterobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Klebsiella* spp., *Moraxella* spp., *Pseudomonas* spp., *Sphingomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Bacillus* spp., závisí na teplotě kultivace.

Hygienický význam různý – včetně změn organoleptických vlastností vody ,
kažení

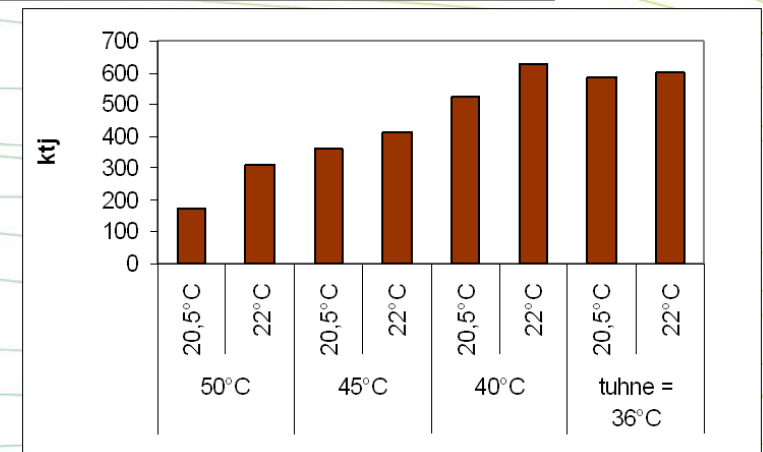
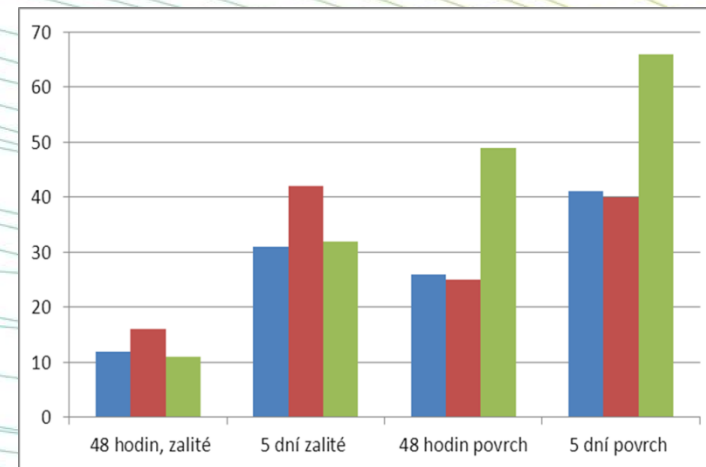
- Indikátory obecného znečištění, mohou zahrnovat jak alochtonní tak autochtonní mikroflóru
- U čistých, málo organicky znečištěných vod tvoří podíl 0,1 % celkového počtu bakterií, u silně znečištěných vod až 10 %. Může to v závislosti na vnějších podmínkách kolísat.
- Mezofilní a psychofilní bakterie již historie, používají se pouze výjimečně (např. ve výzkumu) – jiné médium (více živin)



Kultivovatelné mikroorganismy – metody

Kultivovatelné mikroorganismy jsou velmi citlivé na manipulaci:

- Skladování vzorku dle ČSN EN ISO 19458 pouze 12 hodin!
- Vysoká teplota rozpuštěného kultivačního média při zalévání vzorku. Nedostatečné promísení rozpuštěného kultivačního média se vzorkem při zalévání. Prudké pohyby pracovníků při zalévání. Přílišné míchání vede ke tvorbě bublin v médiu – ruší odečítání)
- Peptonová voda na ředění přidává živiny, nutnost zpracovat vzorek do 15 minut po zaočkování
- Problém přerůstání misek (Bacillus/Aktinomycety, mikromycety, studny?)
- Počítání kolonií – tmavé pozadí, lupa, splývavé kolonie, nejistota v počítání (na seminářích) do 10 %. Ne proti oknu! Včas si pořídit vhodné dioprické brýle!



Společné počítání – příklad

ideální počet kolonií, bezproblémový typ kolonií , a je to vynikající výsledek!

	vzorek 61	vzorek 62
pracovník A	74	24
pracovník B	74	25
pracovník C	71	25
pracovník D	67	18
průměr	71,5	23
smodch	3,316625	3,366502
varkoef	4,64%	14,64%

Změny ve vyhlášce o „pitné vodě“

83/2014 Sb. - Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., od 29. května 2014

Změny v hodnocení kultivovatelných mikroorganismů – počty kolonií

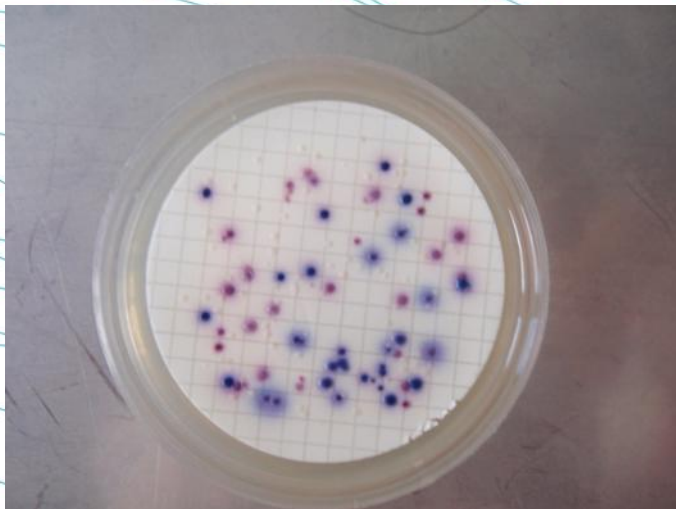
Hodnoty 200 (pro 22 C) a 40 (pro 36 C) KTJ/ml platí pouze **jako doporučené, jako mezní hodnota je uvedeno „bez abnormálních změn“**. **K tomu bylo vydáno metodické doporučení SZÚ. Čeká se jak dopadne první rok „provozu“, pak by mělo být hodnocení, jak funguje (doporučeny 3 možnosti hodnocení)**, **V zemích EU již běžně funguje**

Pokud je u malého zdroje tak malý počet stanovení, že nelze určit „bez abnormálních změn“, platí jako mezní hodnota - hodnota doporučená. Ale musejí se sbírat data (ne déle než 3 roky, minimálně 7 hodnot) – hodnocení je věc **PROVOZOVATELŮ** (98 percentil ročního klouzavého průměru, Shewhartův diagram 2SD, 3 SD, pozor na nenormální rozložení!), pak násovek (1,5 až 20 – při nízkých hodnotách)

Pro malé, nedesinfikované zdroje a pro náhradní zdroje platí doporučené hodnoty 500 (22 C) a 100 (36 C) KTJ/ml

Koliformní bakterie a *E. coli*

- **Koliformní bakterie** postupně mizí z právních předpisů týkajících se jakékoliv povrchové vody (pouze pitné)
- **Fekální (termotolerantní) koliformní bakterie** jsou doposud používány, svým způsobem je to česká specialita, ČSN 757835 výborně funguje, je hodně selektivní, ale málo citlivá, téměř se nepoužívá
- ***E. coli*** je hlavní indikátor fekálního znečištění – ale v současné době je používána řada nesrovnatelných metod



Metody

ČSN 75 7835 mFC, 44 C, GLR, není mezinárodní, díky vysoké primární teplotě kultivace jsou podhodnocené výsledky

ČSN EN ISO 9308-1 Tergitol, 36 C, IND nebo GLR již **NEPLATÍ**, ale Chromogenní agar CCA (paralelní stanovení koliformních bakterií a E. coli, 36 C, drahé, citlivé, pouze pro desinfikované vody, **oxitest lze přímo na filtru**). Revize EN ISO 9308-1 platí od září 2014, ČSN jaro 2015 (duben)

ISO 9308-2 Colilert, GLR, 36 C, tekuté (již platí, bude EN a pak ČSN EN)

ČSN EN ISO 9308-3 Mikrotitrační destičky , GLR 44 C, tekuté, vysoká mez detekce

ISO 9308-2 (ČSN EN ISO 9308-2 již platí)

- Metoda dle ISO 9308-2 (Colilert Quanti-Tray) byla zhodnocena jako nejvhodnější pro stanovení *E. coli* v koupacích vodách (mez detekce, specifčnost, citlivost) a Ministerstvem zdravotnictvím bude povolena
- Ve vyhlášce na pitnou vodu je jako alternativní metoda (jako ČSN ISO ... což je chyba)
- Byla prokázána její ekvivalence na úrovni 20 % s referenční metodou dle ČSN EN ISO 9308-3
- Od letošního roku zastupuje firmu IDEXX (USA) Cymedica s.r.o. (ing. Jiří Žufánek)

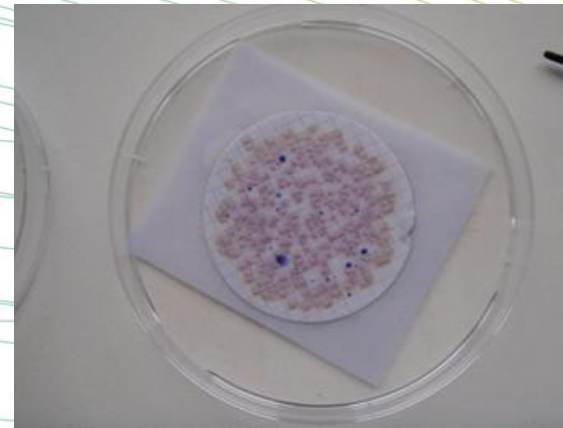
Chromocult Coliformen agar

- Velmi citlivé a neselektivní médium k simultánnímu stanovení koliformních bakterií a *E. coli* ve vodách s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry, bude pouze pro pitné vody a nebude se používat pro jakékoliv povrchové vody, není s další selektivním supplementem
- **PRINCIP:** β -GAL (PRINCIP testu ONPG) a GLR test
- Problém barev, selektivity a cytochromoxidázového testu
- Nejistota v počítání (zatím neškolené „oči“ na seminářích 9-19 %



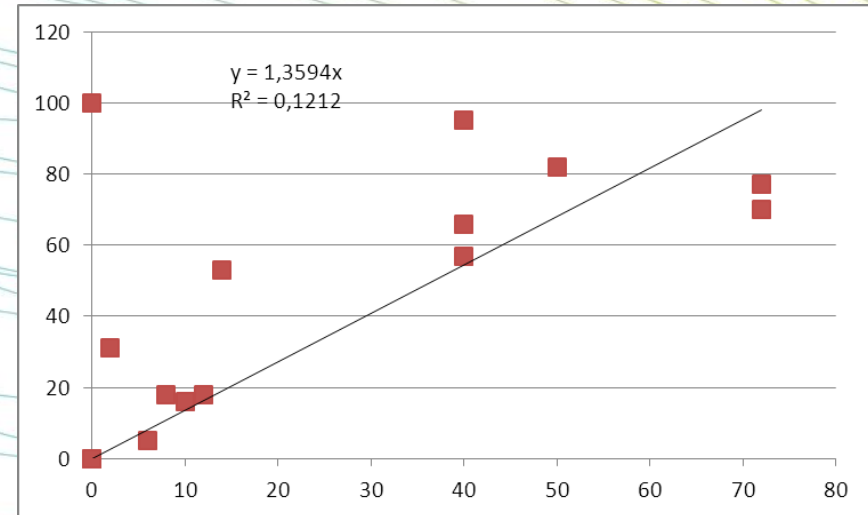
NOVÁ EN ISO 9308-1

ČSN v půlce roku 2015 ?

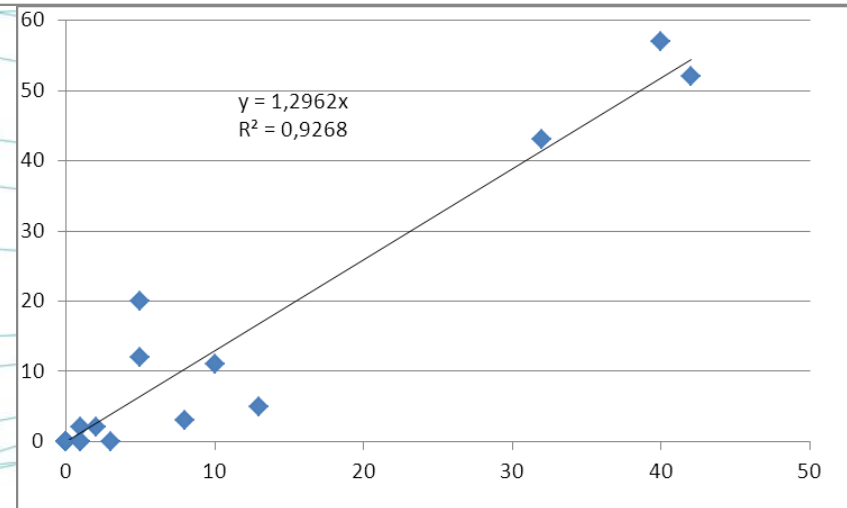


Různé principy, různé výsledky

Koliformní: b-GAI vers.
fermentace laktózy
(větší záchyt)

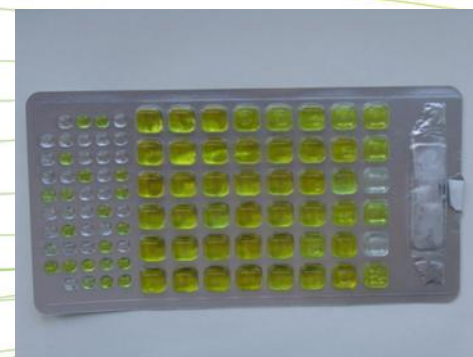
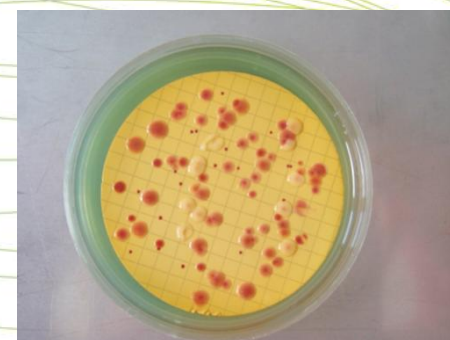


E. coli indol vers. GLR
(zde jen GLR)
(menší záchyt)



E. coli různými metodami

Výsledky z OR-MB-1/14	E. coli KTJ/ 100 ml
ČSN 75 7835	98
ČSN EN ISO 9308 -1 IND	216
ČSN EN ISO 9308-1 GLR	182
Colilert 18 / Quanti-Tray	123



Problémy **intestinálních** enterokoků

Citlivé stanovení na kvalitu média, statisticky neporovnatelné výsledky i mezi SB médii)

Firma Biorad už zase dodává SB s TTC uvnitř (OK servis)

Enterolert nedosahuje výsledků jako Colilert (a je více typů o různé formuli)

Firmy dodávající hotové půdy (na miskách) ne vždy uvádějí původ ingrediencí.

Enterolert Quanti-tray

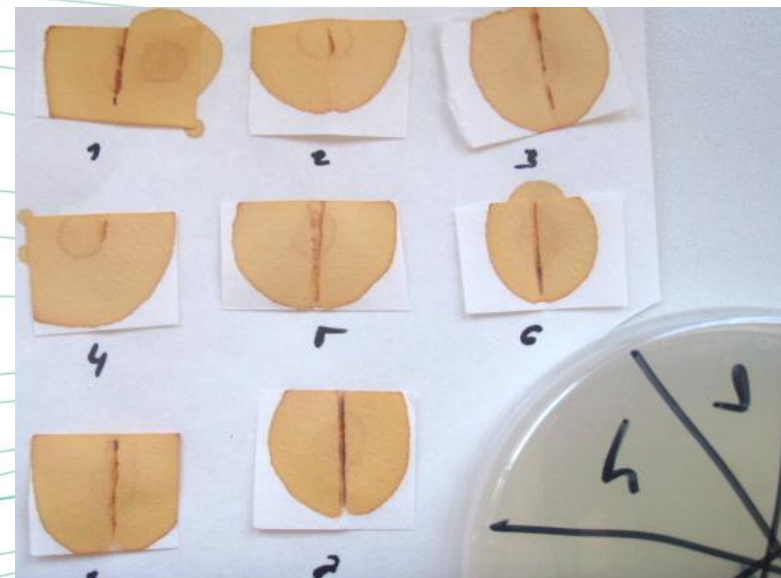
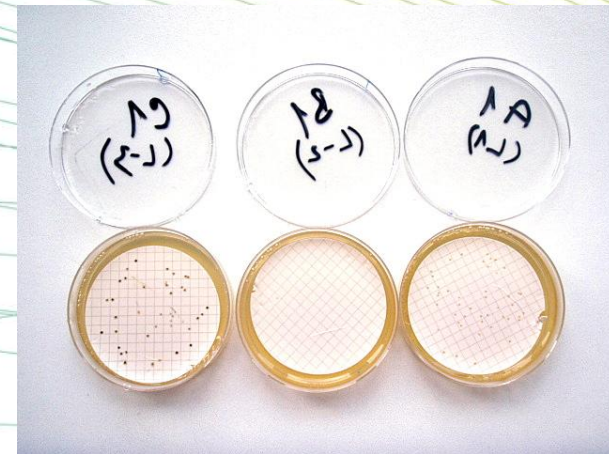
- Různé typy Enterolertu, Pro koupací vody je deklarován jako nejvhodnější typ Enterolert E, zatímco chromogenní Enterolert DW je určen především pro pitnou vodu
- Opět založen na aktivitě enzymu β -D-glukosidázy v selektivním prostředí
- Dosud ne zcela uspokojivé výsledky, ani není normované
- Podezřelé (falešně pozitivní??) výsledky v určitém období vegetační sezóny u stojatých vod. Tato falešná pozitivita může být způsobena určitou aktivitou β -D-glukosidázy, kterou produkují i některé řasy. Zřejmě nedochází k dostatečné inhibici aktivity řas selektivním médiem.
- Žádná laboratoř tento test dosud nepoužívá

Enterolert E Quanti-Tray



Clostridium perfringens

- ISO 14189:2013 Jakost vod. Stanovení *Clostridium perfringens* ... uvidí se jak bude zohledněno dále (Směrnice pro pitnou vodu apod.), zatím se neakceptuje jako ČSN ISO , ale už byl schválen návrh jako EN (ČR byla proti)
- Drahé (zejména činidlo na kyselou fosfatázu), je nutné ověřovat všechny vyrostlé kolonie, TSC médium je nestálé (pak kolonie dostatečně nečernají)



Další novinky v mikrobiologii vody

Nové vydání dokumentu **Accreditation for Microbiological Laboratories** (2. vydání, Eurachem, 2013), zatím není přeloženo, nejsou významné změny oproti EA 4/10

Proběhla důkladná revize norem ČSN 750176-1 a 2 Názvosloví mikrobiologie vody : spojení obou norem, redukce nadbytečných termínů, doplnění moderních termínů a rozdělení termínů do skupin – taxonomie, ekologie, metabolismus apod. **Vhodný studijní materiál ! Do konce roku vyjde**

Obecně normy

Úprava cen tištěných norem

Ne všechny ČSN EN normy se musejí přeložit!

Každý může připomínkovat návrhy norem na stránkách normalizačního institutu (EN, ČSN EN), dostane se ke Zpravodaji pro ČR

**Norma ISO 11133 už hotová ČSN ISO
„Microbiology of food, animal feed and
water — Preparation, production,
storage and performance testing of
culture media“**

- Týká se kontroly kultivačních médií referenčními kmeny
- Zahrnuje i média na analýzy vod
- Konkrétní médiu/konkrétní referenční kmen, většinou kvalitativní testy, zohlední se i Česká sbírka mikroorganismů, *včetně kmenů s definovaným obsahem bakterií*

Revize ISO/TC 13843

- Water quality – requirements for establishing performance characteristics of **quantitative** microbiological methods (*původní pr EN 13843 – validate*)
- Podle plánu dokončení v příštím roce
- Velmi povedená norma, ukazuje výpočet citlivosti, specifičnosti, výtěžnosti, selektivity, opakovatelnosti, reprodukovatelnosti, nejistoty v počítání a dalších validačních parametrů)

Česká sbírka mikroorganismů – Kontrolní kmeny ve formě želatinových disků s definovanou hodnotou cfu (1 lahvička, 10 disků, expirace 1 rok) . Pro vodu E. faecalis, E. coli. S. aureus). Rozumná cena (10 disků necelých 1000 Kč)

Nutné skladovat při -20 C!!!

Stabilitu 1 rok jsme prokázali

E. faecalis je stabilnější než E. coli

Nejistoty měření

Je definována jako „parametr spojený s výsledkem měření, jenž charakterizuje rozptýlení hodnot, které může být přisouzeno měřené veličině“.

Parametr se vyjadřuje jako standardní nejistota, nebo relativní standardní nejistota.

Nejistota je vždy, není to „špatná práce“ nebo “náhodná chyba“

Pro „vodu“ platí ČSN ISO 29201

Dva možné postupy – nutno se správně rozhodnout

Nejistota složka po složce

- Matrice a odběr podvzorků (není uvedena **homogenizace**)
- Zředění
- Zkoušený objem
- Inkubace
- **Počítání**

Podle mě vhodnější, i když pracnější způsob

Globální postup stanovení operační nejistoty

Odkaz na ISO/TS 19036

Používají potravináři, pro vodu se zatím příliš neosvědčila.

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost:

Stejný vzorek jiná osoba ve stejné laboratoři s použitím jiného zařízení, jiných šarží materiálu, jiných analytických podmínek a podmínek inkubace

Zřejmě proto pro vodu vždy podhodnocené

Nejistoty měření

Je definována jako „parametr spojený s výsledkem měření, jenž charakterizuje rozptýlení hodnot, které může být přisouzeno měřené veličině“.

Parametr se vyjadřuje jako standardní nejistota, nebo relativní standardní nejistota (%).

Nejistota je vždy, není to „špatná práce“ nebo “náhodná chyba“

Co je to správně nastavená nejistota?

- Realistická pro analyzované vzorky v laboratoři (nízké hodnoty vers. „normální hodnoty“ tj. ktj/ misce více než 10). Distribuce partikulí ve vzorku (viz ČSN EN ISO 19458), další informace viz ČSN P ENV ISO 13843)
- Vejdou se do mezí výsledky duplicitních stanovení
- Umí se správně obhájit/ vysvětlit
- Pro nízké hodnoty (pod mezí stanovitenosti) se používá Poissonovo rozdělení, pro vyšší *hodnoty* se pohybuje nejistota mikrobiologických stanovení okolo 30 %. – **Toto je pouze orientační pomůcka!**

Udávání nejistot na protokolu o výsledcích

- Podle ČIA je povinné, pokud je hodnocení výsledků (interpretace, počítá se i porovnání s limitem)
- ALE: Pouze výsledky nad mezí stanovitelnosti (mez detekce 0-3 KTJ)

OPAKOVÁNÍ Z HISTORIE:

Co je to mez stanovitelnosti?

A to bude další velmi významný oříšek (po validacích a nejistotách)

Dana Baudišová

Novinky v mikrobiologii vody 2014