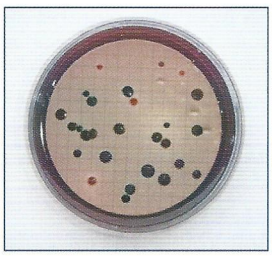
VÝZKUM V OBLASTI MIKROBIÁLNÍHO ZNEČIŠTĚNÍ POVRCHOVÝCH A ODPADNÍCH VOD

Výzkum v oblasti mikrobiálního znečištění povrchových vod v České republice je zaměřen na nově používané ukazatele jakosti a zdravotní nezávadnosti vod (včetně patogenních mikroorganismů), eliminaci mikrobiálního znečištění biologickým čištěním odpadních vod, včetně vlivu odtoků z ČOV na kvalitu vody v recipientu, studium mikrobiálních společenstev a detekci hygienicky významných bakterií v povrchových a odpadních vodách molekulárně-genetickými metodami (fluorescenční in situ hybridizace, polymerázová řetězová reakce apod.).

Mikrobiální znečištění povrchových vod, mikrobiologické ukazatele, metody hodnocení

Pro hodnocení jakosti vody v oblasti mikrobiologie jsou nejvhodnější vysoce specifické ukazatele, které se nemohou ve vodě pomnožovat a existují pro ně dostatečně selektivní metody detekce – jako jsou fekální koliformní bakterie (*obr. 1*), *Escherichia coli* a enterokoky. Pro hodnocení mikrobiologických ukazatelů je vhodné použít robustní statistické metody (pro průměrnou hodnotu místo aritmetického průměru geometrický průměr nebo medián a pro oblast nepříznivých hodnot místo charakteristické hodnoty příslušný percentil), které eliminují extrémní, netypické hodnoty. Ty se můžou vyskytovat např. v souvislosti s nárazovými srážkami a změnami průtoků především v menších tocích.

Escherichia coli postupně nahrazuje stanovení fekálních (termotolerantních) koliformních bakterií. Podle výsledků našich výzkumů se zastoupení *E. coli* mezi fekálními koliformními bakteriemi v povrchových vodách pohybuje v rozmezí 20–90 %, průměrně to je 60–70 %. V přisedlé složce (biofilm) bylo zastoupení *E. coli* mezi fekálními koliformními bakteriemi významně nižší, průměrně 30 %. Ve vodách se zjevným přísunem fekálního znečištění byla zaznamenána vysoká korelace počtů fekálních koliformních bakterií a *E. coli*; v čistých vodách je tato korelace výrazně nižší a více závislá na přírodních podmínkách (srážky, teplota vody apod.). Na základě výsledků stanovení *E. coli* v povrchových vodách České republiky (100 profilů, 12 odběrů ročně) v roce 2007 byl navržen limit přípustného znečištění toků 25 ktj/ml. V případě použití aritmetického průměru k hodnocení výsledků by tento limit splnilo 58 % profilů státní sítě.

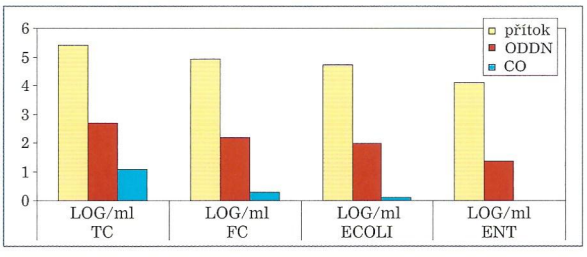


Obr. 1. Stanovení fekálních koliformních bakterií na mFC agaru – fekální koliformní bakterie tvoří na membránovém filtru tmavomodré kolonie

Pro odlišení původu mikrobiálního znečištění (zejména fekálního) lze využít především stanovení enterokoků, neboť při mikrobiální kontaminaci toků zemědělského původu (hospodářská zvířata) se v tocích vyskytuje více enterokoků než fekálních koliformních bakterií (v případě fekálního znečištění humánního původu je tomu naopak) a vyskytují se méně typické druhy enterokoků spjaté se střevním traktem teplokrevných živočichů.

Eliminace mikrobiálního znečištění biologickým čištěním

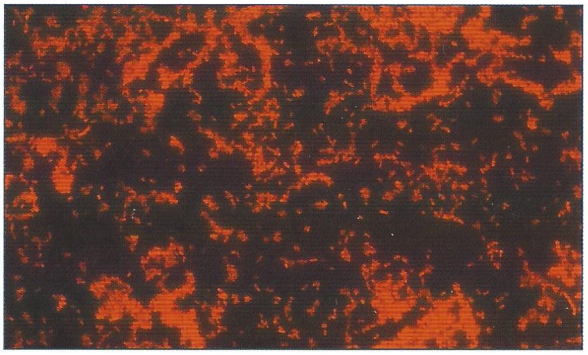
Bylo zjištěno, že biologické čištění odpadních vod snižuje počty indikátorů fekálního znečištění až o 2–3 řády, tj. o více než 95 %. Konečné procento úbytku bakterií je více závislé na jejich kolísajících počtech v surové odpadní vodě, než na kvalitě čištění. Pro hodnocení eliminace hygienicky významných bakterií biologickým čištěním je nejvhodnější sledování indikátorů fekálního znečištění v odtocích z ČOV (prosté, popř. krátkodobě (2–4 hodiny) slévané – směsné vzorky). Příklad eliminace fekálních bakterií biologickým čištěním je uveden na *obr. 2*. Jde o mechanicko-biologickou (aktivační) ČOV o velikosti zhruba 2 000 EO. Uvedená čistírna byla sledována v průběhu jednoho roku (n = 9), účinnost eliminace indikátorových mikroorganismů čistírenskou technologií činila 99,8 %, biologický rybník snížil počty bakterií o dalších 95,8 až 98,7 %, a celková účinnost systému tak byla větší než 99,99 %.



Obr. 2. Eliminace hygienicky významných bakterií biologickým čištěním (TC = koliformní bakterie, FC = fekální koliformní bakterie, ECOLI = *Escherichia coli*, ENT = enterokoky, přítok = surová odpadní voda, přítok do ČOV, ODDN = odtok z dosazovací nádrže, CO = odtok z rybníka = celkový odtok z ČOV)

Hodnoty indikátorů fekálního znečištění v odtocích z více než 100 sledovaných ČOV v celé České republice (různých typů a velikostí) průměrně desetinásobně převyšují hodnoty přípustného znečištění toků, dané českou legislativou (nařízení vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, ve znění nařízení vlády č. 229/2007 Sb.). Vliv takto znečištěných odtoků na recipient závisí nejen na počtech bakterií na jednotkový objem (ktj/ml) odtoku z ČOV a na velikosti ČOV a objemu vypouštěných biologicky čištěných odpadních vod, ale i na schopnosti recipientu (velikost, obsah živin, stupeň dalšího znečištění) tyto mikroorganismy dále eliminovat bez dalšího zhoršování kvality recipientu.

Odběry vzorků odpadních vod (i biologicky čištěných) k mikrobiologickým analýzám mají svá specifika, která je významně odlišují od vzorků určených k chemickým analýzám. Je to dané zejména vysokou nestabilitou a nižší homogenitou vzorků. Prosté vzorky vykazují dostatečnou stabilitu 4–6 hodin po odběru, totéž lze konstatovat pro směsné vzorky. Hodnoty mikrobiologických ukazatelů nevykazují žádný interpretovatelný denní průběh (na rozdíl od chemických ukazatelů), výsledky mikrobiologických analýz prostých vzorků z jedné lokality by tedy neměly být závislé na době odběru. Nelze doporučit odběry časně zrána (4–6 h).



Obr. 3. Čistá kultura *E. coli* označená specifickou sondou pro fluorescenční in situ hybridizaci (*γ-Proteobacteria*)

Stanovení mikrobiálních společenstev ve vodním prostředí molekulárně-genetickými metodami

Metody molekulární biologie přinášejí nové možnosti výzkumu mikrobiálních společenstev ve vodním prostředí zejména proto, že se pomocí těchto metod mohou detekovat i druhy nebo skupiny bakterií, které není možno kultivovat na běžných živných půdách. Na druhé straně i tyto metody mají svá omezení – týkající se zejména vyšší meze detekce a zvýšené možnosti falešně pozitivních výsledků.

V současné době provádíme především výzkum fylogenetických skupin bakterií metodami na základě sekvenční analýzy, fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Stanovují se doména *Archaea*, skupiny *α-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria* (*obr. 3*) a skupina bakterií *Cytophaga-Flavobacterium* v povrchových vodách různého stupně antropogenního zatížení a připravujeme stanovení patogenních mikroorganismů v odpadních a povrchových vodách. Další molekulárně-genetickou metodou, která nachází jisté uplatnění v mikrobiologii vody, je metoda polymerázové řetězové reakce (PCR).

Vybrané výstupy:

Baudišová, D. and Hejtmánek, V. Assessment of microbial contamination of surface waters. In Matoušek V. and Blažková Š. (eds) T. G. Masaryk Water Research Institute Collection of Papers 2006, s. 31–38, 2006.

Baudišová, D. *Escherichia coli* v povrchových vodách. VTEI, roč. 49, 2007, č. 3, s. 3–4, příloha VH 10/2007.

Baudišová, D. *Escherichia coli* v českých povrchových vodách. VTEI, roč. 50, 2008, č. 5, s. 4–5, příloha VH 10/2008.

Baudišová, D. a Mlejnková, H. Mikrobiální znečištění povrchových vod – mikrobiologické ukazatele. *Vodní hospodářství*, roč. 59, 2009, č. 3, s. 101–102.

Fremrová, L., Baudišová, D. a Šimonová, G. ČSN 75 7835 Jakost vod – Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*. 2009.

Horáková, K., Mlejnková, H., and Mlejnek, P. Specific detection of *Escherichia coli* isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: cytochrome bd complex, lactose permease, beta-D-glucuronidase, and beta-D-galactosidase. *Journal of Applied Microbiology*, roč. 105, 2008, č. 4, s. 970–976.

Horáková, K., Mlejnková, H., and Mlejnek, P. Evaluation of methods for isolation of DNA for PCR based identification of pathogenic bacteria from pure cultures and water samples. *Water Science and Technology*, roč. 58, 2008, č. 5, s. 995–999.

Kontakt:
RNDr. Dana Baudišová, Ph.D., Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v.v.i,
Podbabská 30, 160 00 Praha 6, tel.: 220 197 219, e-mail: dana_baudisova@vuv.cz,
RNDr. Hana Mlejnková, Ph.D., Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v.v.i,
pobočka Brno, Mojmírovo nám. 16, 612 00 Brno, tel.: 541 126 333, e-mail: hana_mlejnkova@vuv.cz