

MOŽNOSTI VYUŽITÍ ALTERNATIVNÍCH METOD PŘI ŘEŠENÍ VÝJIMEČNÝCH STAVŮ MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE

**Ing. Lenka Vavrušková¹⁾, Mgr. Karel Kolář, Ph.D.¹⁾, Ing. Jana Kabátová¹⁾,
Ing. Dana Vejmelková, Ph.D.²⁾, doc. RNDr. Jana Říhová Ambrožová, Ph.D.²⁾**

¹⁾Pražské vodovody a kanalizace, a.s., Ke Kابلu 971, 102 00 Praha 10

²⁾Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
lenka.vavruskova@pvk.cz, dana.vejmelkova@vscht.cz

Úvod

V návaznosti na kvalitativní havárii pitné vody v květnu 2015 v Praze Dejvicích byly testovány alternativní metody vhodné pro záchyt mikrobiologické kontaminace pitné vody, které by informaci o kvalitě vody poskytly v kratším čase než klasické kultivační metody. V souladu s požadavky Vyhlášky č. 252/2004 Sb. v platném znění se pro laboratorní kontrolu pitné vody používají kultivační metody, které nám informaci o případné mikrobiologické kontaminaci pitné vody dávají v rozsahu 24 – 72 h a nejdříve po uplynutí tohoto časového rozmezí jsou k dispozici výsledky všech mikrobiologických analýz pro porovnání s hygienickými limity pitné vody.

Současné standardně využívané kultivační techniky jsou založené na detekci indikátorových organismů fekálního znečištění a stanovení celkového počtu mikroorganismů, ale patogenních organismů, které těmito technikami nelze postihnout se ve vodním prostředí může vyskytovat více.

Z tohoto důvodu jsme se v PVK začali zajímat o alternativní metody, které by nám informaci o kontaminaci vody daly v kratším časovém horizontu, aby bylo možné rychleji zjistit příčiny kontaminace a zahájit nápravná opatření. Současně jsme požádali o spolupráci i VŠCHT, abychom mohli otestovat širší spektrum vhodných a dostupných metod a měli jsme také k dispozici odbornou konzultaci a zázemí při řešení této problematiky.

Metody testované v laboratoři PVK

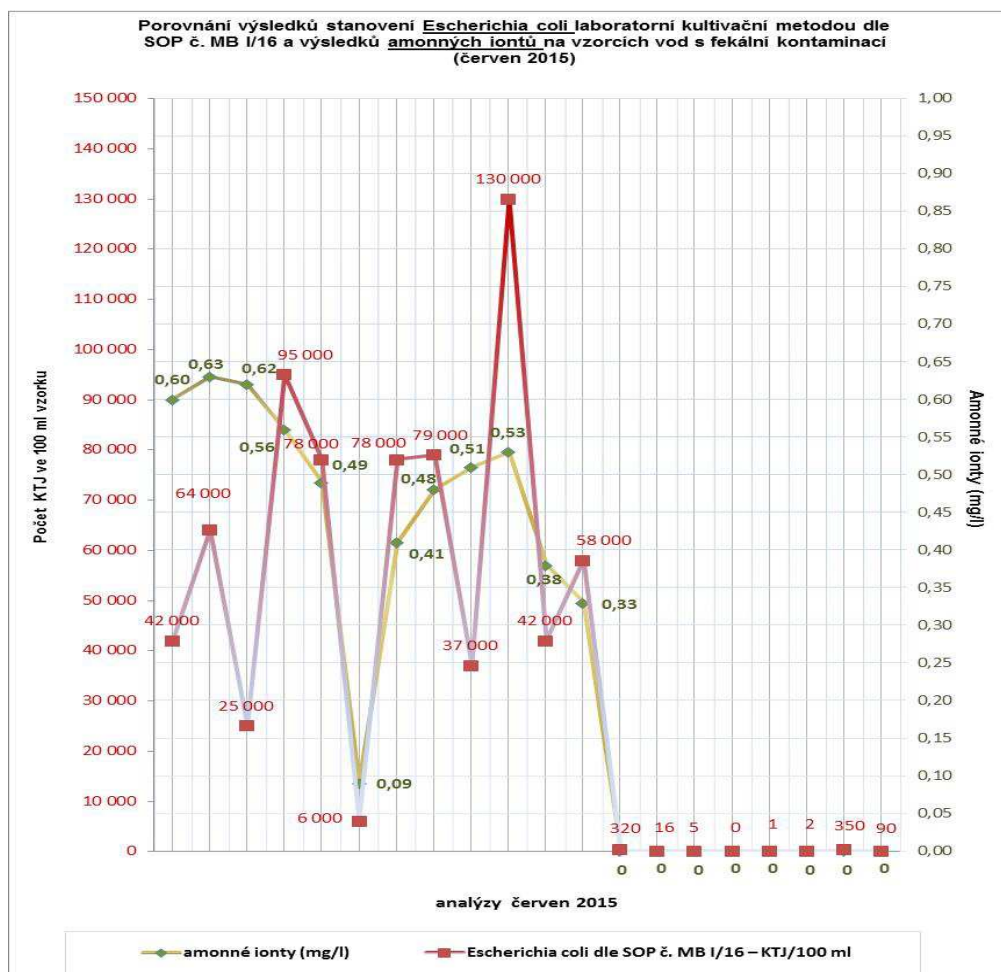
Měření amonných iontů

Následně po simulaci havárie, která proběhla v průběhu června 2015 na odstaveném vodovodním řádu v Praze Dejvicích, se ukázalo, že v podmínkách pražské vodovodní sítě lze pro zjištění masivní fekální kontaminace, použít měření amonných iontů a z toho důvodu, že amonné ionty se za normálních okolností vyskytují v koncentraci do ~0,05 mg/l.

Tato metoda není vhodná v případech, pokud se ke zdravotnímu zabezpečení vody používá chloraminace. Z realizovaných měření, v podmínkách PVK, se prokázalo, že pomocí měření amonných iontů lze detekovat fekální kontaminaci vody v řádu 10 000 KTJ/100 ml a více (Obr. 1).

Metoda BactControl

Poloautomatické semikvantitativní fluorescenční měření biochemické aktivity. Výsledky enzymatické aktivity se přepočítávají na ekvivalentní počty buněk koliformních bakterií (KB) a *Escherichia coli* (EC).



Obr. 1. Stanovení *E. coli* – porovnání ČSN EN ISO 9308-1 a identifikace fekální kontaminace s použitím stanovení amonných iontů

Výsledek 1 analýzy je k dispozici do 3 h. Doba analýzy je závislá na množství vzorku přefiltrovaného k analýze. Metoda je primárně určena pro on-line provoz, pro kontinuální sledování kvality vody. V podmínkách PVK byla metoda testována pro screeningové sledování kontaminace různých vzorků pitné vody, tj. různé matrice pitné vody. Analýzu KB a EC u jednoho vzorku lze naprogramovat a spustit, při průběhu analýzy není nutná přítomnost obsluhy. Výsledek je významně závislý na druhovém složení a fyziologickém stavu přítomných bakterií, ovlivnění výsledku také způsobuje přítomnost chloru i vedlejších produktů chlorace ve vodě, což snižuje aktivitu přítomných bakterií. Problémem je obsah železa u vzorků z distribuční sítě i při hodnotách železa pod hygienickým limitem tj. < 0,20 mg/l. Dochází k zanášení filtru a snižování filtrační rychlosti (prodloužení času filtrace = navýšování času zkoušky).

Systém umožňuje automatické rozesílání varovných hlášení resp. naměřených výsledků. Pro provedení zkoušky není nezbytná laboratoř, neboť celý postup (včetně filtrace) probíhá v mobilním analyzátoru BactControl.

Ze srovnávacích měření různě kontaminovaných vzorků vody akreditovanou metodou dle ČSN EN ISO 9308-1 a metodou BactControl vyplývá, že u vzorků s koncentrací *E. coli* v desítkách bakterií/100 ml metoda s mírou spolehlivosti 90 % poskytuje prokazatelný záchyt fekální kontaminace.

Část vzorků analyzovaných po havárii resp. výluce v pražské distribuční síti vykazuje falešně pozitivní odezvu u koliformních bakterií, přestože akreditovanou metodou kontaminace prokázána nebyla.

Kvantitativní interpretace výsledků může být pro cca 10 % vzorků i s řádovou chybou odhadu kontaminace.

Výsledky stanovení *E. coli* z přístroje BactControl lze tedy využít pro identifikaci fekální kontaminace pitné vody a jako podklad pro zahájení nápravných opatření v distribuční síti v případě aktivity *E. coli* nad mezí stanovitelnosti.

V dubnu tohoto roku proběhlo také testování přístroje ColiMinder, který pracuje na podobném principu jako BactControl. Závěry z tohoto testování budou shrnuty v prezentaci.

Metoda MicroSnap (Hygiene International)

Metoda MicroSnap je semikvantitativní bioluminiscenční test pro orientační stanovení počtu koliformních bakterií a *E. coli*. Na základě naměřené odezvy v jednotkách RLU (relative light unit) lze odhadnout úroveň kontaminace. V sérii lze zpracovat více vzorků s časovou náročností 6,5 - 8,5 h.

Pro provedení zkoušky je nezbytné zázemí laboratoře, neboť postup zahrnuje membránovou filtraci 100 ml vzorku, kultivaci v termostatu pro pomnožení přítomných mikroorganismů a následnou inkubaci před měřením signálu po přidavku vzorku do detekčního přípravku.

Selektivita zjišťovaných mikroorganismů je zajištěna složením pomnožovacího bujónu a činidel v detekčním přípravku. Naměřenou hodnotu RLU je nutno korigovat na slepé stanovení zpracované v sérii vzorků.

Z provedených měření lze definovat závěr, že při kontaminaci pitné vody v řádu desítky bakterií/100 ml metoda poskytuje s mírou spolehlivosti 90 % prokazatelný záchyt kontaminace.

Část vzorků analyzovaných po havárii resp. výluce v pražské distribuční síti, stejně jako v případě metody BactControl, vykazuje pozitivní odezvu signálu, přestože akreditovanou metodou kontaminace prokázána nebyla (falešně pozitivní kontaminace).

Interpretace výsledků může být u cca 10 % vzorků i s řádovou chybou odhadu kontaminace ve smyslu nadhodnocení.

Metoda MicroSnap představuje doplňkový semi-quantitativní rychlostest k metodě BactControl i k metodě kultivační pro získání rychlejší informace o případné fekální kontaminaci pitné vody pro větší počet vzorků.

Aktuálně lze výsledky využít jako podklad pro zahájení nápravných opatření v distribuční síti, i když v některých případech nebude mikrobiologická kontaminace následně prokázána (po ukončení akreditované kultivační metody).

Metoda SuperSnap (Hygiene International)

– modifikovaná metoda měření ATP

Metoda SuperSnap je založena na měření celkového ATP (adenosintrifosfátu). Z důvodu vyšší citlivosti bylo testováno měření ATP ve stěru mikrobiální suspenze zkoncentrované ze 100 ml vzorku.

Na základě naměřené odezvy v jednotkách RLU (relative light unit) lze odhadnout úroveň znečištění – metoda detekuje mikrobiální znečištění a současně přítomnost organické hmoty sloužící pro růst a rozvoj mikroorganismů. Odečet výsledků série vzorků se provádí po 20 minutách inkubace při 36 °C. Měření signálu (RLU) se provádí na stejném přístroji (luminometru) jako metoda MicroSnap.

Vzorky je vhodné analyzovat paralelně. Kritickým místem zkoušky je čistota prostředí a procesu zkoncentrování vzorku.

Z dosavadních měření vzorků pitné vody a pitné vody s přidavkem odpadní vody vyplývá, že metoda poskytuje prokazatelný rozdíl hodnoty ATP mezi hygienicky nezávadnou pitnou vodou a kontaminovanou vodou (odezva se liší o 1 až 2 řády).

Metoda není specifická – výsledky lze interpretovat pouze jako odhad množství aktivní mikrobiální biomasy (mikroorganismů a organického znečištění ve vzorku).

Metoda je vzhledem k rychlosti získání výsledku zavedena do rutinního používání – pravidelně jsou kontrolovány vzorky po výlukách a haváriích v distribuční síti a vzorky dle aktuální potřeby technologů pitných vod (např. vzorky odebírané na základě podnětu Hygienické stanice).

Závěry z testování v laboratoři PVK

Na základě zjištění z testování jednotlivých metod je nutné stanovit vhodnost metody pro zachycení jednotlivých úrovní fekální kontaminace pitné vody:

- I. Voda obsahuje fekální kontaminaci v řádu 10 000 KTJ/100ml a více; lze prokázat přítomností amonných iontů; BactControl i Microsnap poskytují pozitivní odezvu, ale pro identifikaci fekální kontaminace postačují amonné ionty (viz Obr. 1).
- II. Voda obsahuje fekální kontaminaci v hodnotách 10 až 1000 KTJ/100ml; amonné ionty jsou pod mezí stanovitelnosti; BactControl i Microsnap poskytují pozitivní odezvu – fekální kontaminace je prokázána.
- III. Voda překračuje hygienický limit pro stanovení *E. coli* v jednotkách KTJ/100ml; amonné ionty jsou pod mezí stanovitelnosti; BactControl i Microsnap poskytují odezvu dle fyziologického stavu bakterií a v těchto úrovních „mírnější“ kontaminace, tj. jednotkové překročení hygienického limitu, případně potvrzení, že voda je bez fekální kontaminace, identifikuje pouze kultivační metoda dle ČSN EN ISO 9308-1.

Na základě výsledků testovaných alternativních metod nelze deklarovat hygienickou nezávadnost pitné vody ve smyslu splnění požadavků vyhlášky na pitnou vodu, ale lze je využít jako podklad pro zahájení nápravných opatření resp. varovný podnět pro prověření kvality vody v distribuční síti.

Metody testované v laboratoři VŠCHT

Metoda měření ATP systémem Kikkoman Corp stěrky LuciPacW

Na pracovišti VŠCHT Praha se k měření úrovně ATP používá přístroj lumitester PD-10 (Kikkoman Corp.) a stěrky LuciPacW. U ATP je zaznamenávána jeho rychlá přeměna, v systému je poměrně nestabilní. Proto je důležité při odběru vzorku a vlastním měření dodržovat konstantní podmínky, např. teplotu, expozici světlu a hodnotu pH (7 – 8,5), alespoň 20 min ponechat stěrky temperovat při laboratorní teplotě. Průběh reakce je velmi rychlý, již po 10 sekundách je možné znát výsledek úrovně kontaminace v jednotkách RLU. U tohoto typu přístroje, lumitester PD-10 a používaných stěrek je nutné zmínit, že původně nejsou vyvinuty pro systém kontroly kvality vody, ale pro hodnocení povrchů v potravinářských zařízeních. Tudíž jakoukoliv případnou kontaminaci v řádech 10^2 anebo 10^3 KTJ přítomnou ve vodě, není přístroj schopný ze stěrky adekvátně analyzovat a vyhodnotit, např. vychází falešně negativní signál ve smyslu reálně se vyskytující kontaminace (11 až 15 RLU). Proto je nutné hodnocený vzorek upravit tak, aby bylo možné metodou se swab stěrky použít. Osvědčil se způsob jednorázové filtrace vzorku vody přes membránové filtry, sterilní millipore 0,22 μm , čímž se zajistí záchyt i případných sporulujících organismů. Navlhčenou stěrku LuciPacW se pak kvantitativně setře veškerá ulpělá biomasa z povrchu filtru a zjistí se hodnota RLU. Tento způsob měření je možné využít i při terénním hodnocení, k dispozici je nutné mít např. v plastovém provedení filtrační sestavu s ruční vakuovou pumpou s manometrem (dodává f. Merck, např.).

H₂S strip test

Tento test představuje velmi jednoduchý screeningový test na zjištění přítomnosti

fekálního znečištění vody, který je založený na detekci sulfanu produkovaného bakteriemi. Sulfan produkují zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* a také například sulfátredukující bakterie (*Clostridium perfringens*). Pro tento typ testu je potřebná kultivace vzorku v laboratoři, vzorek se inokuluje do peptonové vody (Fluka 70179) ve zkumavce, nezbytná je jistá mikrobiologická zkušenost s volbou adekvátně použitého poměru kultivačního média a vzorku (což výrobce neuvádí). V naší laboratoři se osvědčil poměr objemu peptonové vody a vzorku vody (neředěného, při úvaze kontaminace vody v řádech 10^2 KTJ v ml) např. 5:5, 5:3, 10:2. Mezi zátku a vnitřní stěnu zkumavky se umístí detekční strip a kultivuje se při 35 až 38 °C. Přítomnost bakteriální populace se projeví již po pár hodinách jemným zákalem peptonové vody a přítomnost bakterií se schopností produkce sulfanu se projeví černým zabarvením stripu papíru již po 18 h.

Barvicí metody využívající fluorescenčního značení

Účinné a dostupné jsou kity f. Molecular Probes, kterými se zjistí nejen přítomnost bakterií ve vzorku, ale současně je možné i rozlišení živých buněk od mrtvých. Pro zjištění přítomnosti a vitality buněk bakterií se doporučuje kit, jehož obchodní název je LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, L-7012). Kit kombinuje dvě barvicí složky, určené pro zjištění vitality buněk bakterií a založené na metabolismu buněk nebo integritě membrán. Velkou výhodou těchto kitů je jejich rychlá aplikace a vizualizace fluorescenčních produktů (povrchové značení, značení intracelulárních organel, apod.). Kity lze aplikovat ke vzorkům čistých či směsných kultur (např. z exponenciálně rostoucích kultur) a přírodním vzorkům, byly využívány i pro systém hodnocení kontaminace ve vodách. Detekcí se nezjistí typ bakterie a kontaminantu, ale jeho vitalita. Příprava vzorku a proces barvení vyžaduje alespoň 20 minut práce v laboratoři, vlastní mikroskopické vyhodnocení zabere 10 až 20 minut času na posouzení charakteru vzorku a případně i kvantifikaci přítomných buněk.

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR slouží k detekci a jako mezistupeň při identifikaci mikroorganismů. Během PCR dochází k rychlému pomnožení vybraného úseku DNA, jehož syntéza je řízena krátkými oligonukleotidy (tzv. primery). PCR je velice citlivá metoda, umožňuje detekci jediné kopie DNA ve vzorku tím, že tuto sekvenci namnoží do té míry, že je ji možno po separaci gelovou elektroforézou a obarvení snadno detekovat [1].

Úspěšnost PCR do značné míry ovlivňuje kvalita vstupního materiálu. Je možné použít komerčně dostupné izolační soupravy (kity), jejichž výhodou je časová nenáročnost a většinou snadnost provedení, nevýhodou je finanční nákladnost.

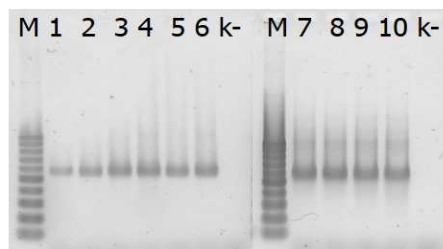
Izolace DNA ze vzorků vody uměle obohacené mikrobiální kontaminací byla provedena za použití RapidWater a PowerWater DNA izolačních kitů (MO BIO). Příslušný objem vzorku byl filtrován přes 0,22 µm membránový filtr, ten byl vložen do přiložené zkumavky, a následně se postupovalo dle instrukcí výrobce. Koncentrace získané DNA byla měřena na nanofotometru Implen P330 (Tab. 1).

Tabulka 1. Charakteristika zpracovávaných vzorků

č.	Filtrovaný objem [ml]	DNA izolační kit	c [ng/µl]	č.	Filtrovaný objem [ml]	DNA izolační kit	c [ng/µl]
1	100	RW	4,2	6	200	PW	Pmd
2	200	RW	3,7	7	100	PW	Pmd
3	100	PW	pmd	8	100	PW	Pmd
4	200	PW	pmd	9	200	PW	Pmd
5	100	PW	pmd	10	500	PW	Pmd

RW = RapidWater, PW = PowerWater, pmd = pod mezí detekce.

PCR s obecnými bakteriálními primery (Bac341F+Bac907R) byla provedena dle [2] za použití cykleru Biometra T-Personal. Z výsledků (Obr. 2) je patrná citlivost PCR. I přesto, že koncentrace DNA izolované pomocí PW kitu byla pod mezí detekce, ve všech vzorcích byla prokázána přítomnost bakterií.



Obr. 2. Elektroforetické vyhodnocení PCR produktů vzorků z Tab. 1.

M...velikostní standard, k-...negativní kontrola.

Časová náročnost PCR záleží na množství vzorků, které se zpracovává najednou. Přibližně: filtrace vzorku a izolace DNA (70 min), příprava PCR reakce (20 min), PCR reakce (120 min), elektroforéza (60 min), barvení (15 min), pořízení fotodokumentace (5 min). Tzn. celkem necelých 5 h od převzetí vzorku v laboratoři po získání výsledku.

Prozatím bylo provedeno testování izolace DNA komerčními kity a PCR s obecnými bakteriálními primery na vzorcích uměle kontaminované pitné vody. Dalším krokem bude vyzkoušení specifické PCR pro hygienicky významné bakterie ve vodách [3], standardizace filtrovaného objemu a rozšíření možností detekce na další hygienicky významné mikroorganismy (viry, prvoky).

Závěry z testování v laboratoři VŠCHT

- I. Metoda měření ATP je metoda citlivá a může se uplatnit při monitoringu mikrobiologické kvality pitné vody v distribučním systému. Je možné ji považovat i za test znečištění, protože detekuje nejen mikrobiální znečištění, ale i přítomnost organické hmoty, sloužící jako substrát pro následné zachycení a pomnožení mikroorganismů. Systém měření pomocí LuciPacW je možné využít i v terénu, pokud máme k dispozici přenosné filtrační zařízení s ruční vakuovou pumpou a jednorázově balené filtry. Varovným signálem přítomné kontaminace ve 100 ml přefiltrovaného vzorku je již úroveň RLU 100. Tato hodnota vychází ze zatím uskutečněných testů se vzorky vody uměle obohacené mikrobiální kontaminací v řádech 10^2 až 10^3 KTJ v ml.
- II. Metoda H_2S strip test je sice metoda velmi jednoduchá a účinná ve zjištění přítomnosti fekálního znečištění vody, nicméně je nevhodná z pohledu operativního přístupu v řešení přítomného mikrobiálního znečištění v distribučním systému. Po 18 h je potvrzena kontaminace metodou Colilert dokonce i kvantitativně.
- III. Metoda využívající LIVE/DEAD kit je metoda vyžadující nejen laboratorní zázemí, ale i dostatečně vybavený fluorescenční mikroskop a zkušenosti s barvicími metodami a mikroskopickou kvantifikací.
- IV. PCR se jeví jako citlivá metoda pro zjištění bakteriální kontaminace pitných vod. Nicméně je potřeba tuto metodu standardizovat. Vzhledem k časové úspoře ve srovnání s kultivačními metodami bude PCR podrobněji testována s primery specifickými pro hygienicky významné druhy bakterií ve vodách na reálných vzorcích kontaminovaných vod.

Literatura

1. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998): *Essential Cell Biology*. Garland Publishing, Inc., New York, USA.
2. Vejmelková D. (2013): Aplikace molekulárně-biologických metod při studiu a determinaci fyziologických skupin bakterií aktivovaných kalů. Dizertační práce, VŠCHT Praha.
3. Horáková K. (2008): Možnosti izolace a identifikace hygienicky významných bakterií ve vodách. Dizertační práce, Masarykova univerzita Brno.