

STANOVENÍ VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ V ODPADNÍCH VODÁCH A METODY JEJICH DETEKCE

Roulová N.¹, Mořková P.², Brožková I.², Pejchalová M.²

¹*Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice*

²*Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice*

nikola.roulova@seznam.cz

Úvod: Vypouštění odpadních vod nedostatečné mikrobiologické kvality do prostředí nebo jejich opětovné používání představuje zdravotní riziko pro obyvatelstvo. Samotný proces čištění odpadních vod nedokáže zcela vyloučit patogenní mikroorganismy. Sledování výskytu bakterií v nátocích a odtocích z čistíren odpadních vod a povrchových vodách, do kterých je přečištěná odpadní voda vypouštěna, umožňuje nejenom posoudit účinnost čistícího procesu, ale také získat informace o schopnosti přežití a distribuci bakterií v životním prostředí (1).

Vzorky vod a odpadních vod představují komplexní matici, která s vysokou pravděpodobností obsahuje více než jeden patogenní mikroorganismus (2). Patogenní mikroorganismy se ve vodním prostředí vyskytují nárazově, neboť jsou vylučovány pouze nakaženými jedinci (3). Z těchto důvodů se k určení relativního rizika přítomnosti patogenních mikroorganismů ve vzorku používají indikátorové mikroorganismy (2, 4). Průkaz nebo stanovení bakterií by v ideálním případě mělo být rychlé, citlivé, přesné, levné a snadné (2). Přestože tradiční kultivační metody obvykle splňují požadavky na nízké náklady a jednoduchost, výraznou komplikaci představuje časová náročnost (4, 5, 6, 7). I přes tuto nevýhodu jsou nadále používány a patří mezi normované metody.

Cíl práce: Cílem práce bylo izolovat vybrané bakterie z reálných vzorků odpadních vod pomocí klasických kultivačních technik. Cílovými bakteriemi byly zvoleny tradiční indikátorové mikroorganismy fekálního znečištění – termotolerantní koliformní bakterie, *Escherichia coli* a intestinální enterokoky, dále patogenní a podmíněně patogenní bakterie rodu *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Aeromonas* a *Pseudomonas*.

Materiál a metody: Pro průkaz vybraných bakterií bylo odebráno 10 prostých vzorků odpadních vod z 5 čistíren odpadních vod různých velikostí. Byla analyzována surová odpadní voda (nátok do čistíren odpadních vod) a voda po procesu přečištění (odtok z čistíren odpadních vod). Odpadní vody byly odbírány v souladu s normami ČSN EN ISO 19458 – Jakost vod – odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu (8), ČSN EN ISO 5667-1 – Jakost vod – odběr vzorků (9), ČSN ISO 5667-10 – Jakost vod – Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod (10).

Průkaz patogenních bakterií byl proveden dle platných norem: *Salmonella* (ČSN EN ISO 6579-1) (11), *Yersinia* (ČSN EN ISO 10273) (12, 13) a *Campylobacter* (ČSN EN ISO 10272-1) (14, 15). Pro průkaz bakterií rodu *Aeromonas*, *Pseudomonas* a *Enterococcus*, bakterie *Escherichia coli* a termotolerantních koliformních bakterií byla použita metoda membránové filtrace a očkování roztěrem L-hokejkou. Membránová filtrace odpadních vod byla provedena dle pokynů uvedených v normě ČSN EN ISO 8199 – Jakost vod – Obecný návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami (16).

Výsledky a diskuze: Metodu pro potvrzení přítomnosti bakterií rodu *Salmonella* ve vzorcích vod specifikuje norma ČSN ISO 19250 (17). Postup zahrnuje neselektivní pomnožení v pufrované peptonové vodě (M614, HiMedia) selektivní pomnožení v médiu dle Rappaport Vassiliadis se sójou (M1137I, HiMedia), vyočkování na selektivně-diagnostické půdy

a konfirmaci. Pro selektivní pomnožení bylo v naší práci současně použito i médium dle Mueller-Kauffmanna s tetrathionátem a novobiocinem (M1496I, HiMedia). Bakterie rodu *Salmonella* byly izolovány pouze po selektivním pomnožení v médiu dle Mueller-Kauffmanna s tetrathionátem a novobiocinem (M1496I, HiMedia). Vyšší selekční tlak média dle Rappaport Vassiliadis se sójou (M1137I, HiMedia) spolu s teplotou kultivace (41,5 °C) zřejmě vedl k úplnému potlačení bakterií rodu *Salmonella*. Xylóza-lyzin-deoxycholátový agar (M031, HiMedia) se pro izolaci bakterií rodu *Salmonella* z odpadních vod ukázal jako málo účinný (1). Jak ale uvádějí autoři (18), kolonie bakterií rodu *Salmonella* mohou být na xylóza-lyzin-deoxycholátovém agaru zcela potlačeny v případě, že se ve vyšetřovaném vzorku nachází vysoké množství konkurenčních Gram-negativních bakterií. Přes přítomnost suspektních kolonií na xylóza-lyzin-deoxycholátovém agaru (M031, HiMedia) se bakterie rodu *Salmonella* nepodařilo potvrdit. Druhou selektivní tuhou půdou byl zvolen Rambach® agar (Merck KGaA). Až jeho použití umožnilo izolovat bakterie rodu *Salmonella* ze vzorků odpadních vod. Nicméně na Rambach® agaru (Merck KGaA) vyrůstaly v typických koloniích pro bakterie rodu *Salmonella* také zástupci rodu *Citrobacter* (1).

Bakterie rodu *Yersinia* byly horizontální metodou dle ČSN EN ISO 10273 (12, 13) prokázány v 5 vzorcích. Přestože norma ČSN EN ISO 10273 (12, 13) stanovuje metodu pro průkaz *Yersinia enterocolitica* v potravinách a krmivech, byla v této práci využita i pro odpadní vody, neboť norma pro průkaz *Yersinia enterocolitica* ve vodách neexistuje. Všech 7 izolátů, které byly získány z agaru s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem (M843, HiMedia) a náležely do rodu *Yersinia* bylo identifikováno jako *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica*. Na agaru s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem (M843, HiMedia) vyrůstaly v typických koloniích pro bakterie rodu *Yersinia* taktéž bakterie rodu *Citrobacter*. Ve všech případech byly bakterie rodu *Yersinia* izolovány z kultur po alkalizaci. Prodloužení doby alkalizace z 20 sekund, které určuje norma, na 40 až 60 sekund vedlo k úplnému potlačení růstu doprovodné mikroflóry na agaru s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem (M843, HiMedia) i u silně kontaminovaných nátoků do čistíren odpadních vod, ale nikoli k jednoznačnému zvýhodnění bakterií rodu *Yersinia* (1).

Bakterie rodu *Campylobacter* byly prokazovány dle ČSN EN ISO 10272-1 z července 2006 (14). U všech vyšetřovaných vzorků byly na modifikovaném deoxycholátovém agaru s aktivním uhlím a cefoperazonem (M887, HiMedia) přítomné charakteristické drobné, šedobílé, vodnaté kolonie s nepravidelným okrajem. Konfirmační testy a mikroskopie v zástinu potvrdila u každého vzorku alespoň jeden izolát s pozitivní tvorbou katalázy a oxidázy a typickým vlnitým pohybem připomínající komáří hejno. U všech těchto kmenů byl ale prokázán růst při 42 °C aerobně i při 25 °C mikroaerofilně za méně než 24 hodin. Pozitivní růst kolonií ve zmíněných podmínkách vyloučil přítomnost bakterií rodu *Campylobacter* ve všech vzorcích (1). Autor (19) uvádí, že atypické izoláty z vodního prostředí považované za bakterie rodu *Campylobacter*, jsou často identifikovány jako bakterie z rodu *Arcobacter*. Podle autora (20) jsou zástupci rodu *Arcobacter* lépe přizpůsobeni pro přežití ve vodním prostředí. Na rozdíl od bakterií rodu *Campylobacter* vykazují vyšší odolnost vůči vysokým koncentracím chloridu sodného, jsou schopni růstu při nízkých teplotách a v přítomnosti kyslíku.

Bakterie rodu *Enterococcus* byly prokázány v 7 vzorcích odpadních vod. Ze Slanetz-Bartley agaru (M612, HiMedia) bylo celkem získáno 24 izolátů z nichž 18 náleželo do rodu *Enterococcus* a 6 do rodu *Streptococcus*. 15 izolátů bylo identifikováno jako *Enterococcus faecalis* a 3 jako *Enterococcus casseliflavus* (1). Autor (21) uvádí, že v odpadních vodách a výkalech teplokrevných zvířat jsou převládajícími druhy *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*.

K průkazu termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli* byly využita dvě selektivně-diagnostická média. Prvním z nich bylo chromogenní médium Chromocult® Coliform agar (Merck KGaA), který obsahuje specifické substráty pro průkaz enzymů β -D-galaktozidázy a β -D-glukuronidázy a umožňuje simultánní detekci koliformních bakterií a *E. coli*. Z Chromocult® Coliform agaru (Merck KGaA) bylo získáno 16 izolátů, které vyrůstaly v tmavě modrých nebo fialových koloniích. Z těchto izolátů bylo 15 identifikováno jako *E. coli*. Druhým používaným médiem byl agar pro stanovení fekálních koliformních mikroorganismů metodou membránové filtrace (M1122, HiMedia) (1). Jak ale uvádí autor (22), agar pro stanovení fekálních koliformních mikroorganismů metodou membránové filtrace je založen na schopnosti bakterií využívat laktózu a růst při teplotě 44, 5 °C. Nicméně tyto vlastnosti nejsou, na rozdíl od produkce enzymu β -D-glukuronidázy, specifické pouze pro *E. coli*. Z agaru pro stanovení fekálních koliformních mikroorganismů metodou membránové filtrace (M1122, HiMedia) bylo celkem získáno 25 izolátů, které vyrůstaly v charakteristických tmavě modrých koloniích. Z těchto izolátů bylo 19 identifikováno jako *E. coli*.

Bakterie rodu *Aeromonas* byly prokázány ve všech testovaných vzorcích odpadních vod. Nejčastěji izolovaným druhem byla *Aeromonas caviae*, která byla kromě m-Aeromonas agaru (M1283, HiMedia) zachycena i na jiných selektivně-diagnostických půdách. Na m-Aeromonas agaru (M1283, HiMedia) rostly v typických koloniích pro bakterie rodu *Aeromonas* bakterie rodu *Klebsiella* nebo *Raoutella*.

Bakterie rodu *Pseudomonas* byly prokázány vždy v nátoku do čistírny odpadních vod, v odtoku žádné čistírny odpadních vod nebyly bakterie rodu *Pseudomonas* detekovány. Z cetrimidového agaru (M024, HiMedia) bylo získáno celkem 21 izolátů, z nichž 15 bylo identifikováno jako bakterie rodu *Pseudomonas*. Převládajícím druhem byla *Pseudomonas aeruginosa*, v jednom případě byla identifikována *Pseudomonas putida* (1).

Závěr: Bakterie rodu *Salmonella* byly prokázány ve 40 % vzorků, a to vždy současně v nátoku a odtoku z čistírny odpadních vod. Bakterie rodu *Yersinia* byly prokázány v 50 % vzorků. Bakterie rodu *Campylobacter* nebyly prokázány ani v jednom ze vzorků. Bakterie rodu *Aeromonas* a bakterie *Escherichia coli* byly prokázány ve všech vyšetřovaných vzorcích. Termotolerantní koliformní bakterie byly prokázány v 80 % vzorků a bakterie rodu *Enterococcus* v 70 % vzorků. Bakterie rodu *Pseudomonas* byly prokázány v 50 % vzorků, a to vždy v nátoku do čistírny odpadních vod.

Průkaz bakterií v odpadních vodách pouze pomocí klasických kultivačních metod je nedostačující. Selektivní tlak používaných médií často nedokáže potlačit vysoké množství doprovodné mikroflóry. Nepříznivé podmínky v odpadních vodách mohou u bakterií způsobit tvorbu životaschopných, ale nekultivovatelných forem nebo ovlivnit růst a vzhled bakteriálních kolonií na selektivně-diagnostických půdách. Vhodným řešením je používat současně s kultivačním průkazem i jiný způsob detekce bakterií – např. metody molekulární biologie.

Poděkování: Tato práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy jako účelová podpora na specifický vysokoškolský výzkum (SGFChT 005/2018).

Literatura:

1. Roulová, N. *Stanovení vybraných mikroorganismů v odpadních vodách a metody jejich detekce*. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie.
2. Toze, S., 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research*. Vol. 33, no. 17, s. 3545-3556. ISSN 1879-2448.

3. Badurová, J., 2011. Mikrobiální znečištění vypouštěných odpadních vod městských čistíren. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace*. Vol. 53, no. 3, s. 17-19. ISSN 1805-6555.
4. Alhamlan, F.S., Al-Qahtani, A.A., Al-Ahdal, M.N., 2015. Recommended advanced techniques for waterborne pathogen detection in developing countries. *Journal of Infection in Developing Countries*. Vol. 9, no. 2, s. 128-135. ISSN 2036-6590.
5. Lazcka, O., Campo, F.J.D., Muñoz, F.X., 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. Vol. 22, no. 7, s. 1205-1217. ISSN 1873-4235.
6. Helmi, K., Barthod, F., Méheut, G., Henry, A., Poty, F., Laurent, F., Charni-Ben-Tabassi, N., 2015. Methods for microbiological quality assessment in drinking water: A comparative study. *Journal of Water and Health*. Vol. 13, no. 1, s. 34-41. ISSN 1996-7829.
7. Law, J.W.F., Ab Mutalib, N.S., Chan, K.G., Lee, L.H., 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 5. ISSN 1664-302X.
8. ČSN EN ISO 19458, 2007. *Jakost vod – Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu*. Praha: Český normalizační institut.
9. ČSN EN ISO 5667-1, 2007. *Jakost vod – Odběr vzorků – Část 1: Návod pro návrh programu odběru vzorků a pro způsoby odběru vzorků*. Praha: Český normalizační institut.
10. ČSN ISO 5667-10, 1996. *Jakost vod. Odběr vzorků. Část 10: Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod*. Praha: Český normalizační institut.
11. ČSN EN ISO 6579-1, 2017. *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu, stanovení počtu a sérotypizace bakterií rodu Salmonella – Část 1: Průkaz bakterií rodu Salmonella*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
12. ČSN EN ISO 10273, 2004. *Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu suspektních patogenních Yersinia enterocolitica*. Praha: Český normalizační institut.
13. ČSN EN ISO 10273, 2017. *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu patogenních Yersinia enterocolitica*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
14. ČSN EN ISO 10272-1, 2006. *Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Campylobacter spp. – Část 1: Metoda průkazu*. Praha: Český normalizační institut.
15. ČSN EN ISO 10272-1, 2018. *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu bakterií rodu Campylobacter – Část 1: Metoda průkazu*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
16. ČSN EN ISO 8199, 2008. *Jakost vod – Obecný návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami*. Praha: Český normalizační institut.
17. ČSN ISO 19250, 2011. *Jakost vod – Průkaz přítomnosti bakterií rodu Salmonella*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
18. El-Sherif, A.M., Elmossalami, M.K., 1998. Rambach agar as a new plate differential medium for the identification of some enteric pathogens in meat products. *European Food Research and Technology*. Vol. 207, no. 2, s. 160-163. ISSN 1438-2385.
19. Jacob, J., Feuerpfel, I., Schulze, E., 1996. PCR-mediated DNA fingerprinting of atypical *Campylobacter* strains isolated from surface and drinking water. *Zentralblatt für Bakteriologie*. Vol. 285, no. 1, s. 106-112. ISSN 0934-8840.

20. Collado, L., Inza, I., Guarro, J., Figueras, M.J., 2008. Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environmental Microbiology*. Vol. 10, no. 6, s. 1635-1640. ISSN 1462-2920.
21. Maheux, A.F., Bissonnette, L., Boissinot, M., Bernier, J.L.T., Huppé, V., Bérubé, È., Boudreau, D.K., Picard, F.J., Huletsky, A., Bergeron, M.G., 2011a. Method for rapid and sensitive detection of *Enterococcus* sp. and *Enterococcus faecalis/faecium* cells in potable water samples. *Water Research*. Vol. 45, no. 6, s. 2342-2354. ISSN 1879-2448.
22. Maheux, A., Bérubé, E., Boudreau, D.K., Cantin, P., Boissinot, M., Bissonnette, L., Rodrigue, L., Bergeron, M.G., 2011b. Ability of three DNA-based assays to identify presumptive *Escherichia coli* colonies isolated from water by the culture based mFC agar method. *Water Research*. Vol. 45, no. 8, s. 2638-2646. ISSN 1879-2448.