

VYUŽITÍ SCREENINGOVÝCH MIKROBIOLOGICKÝCH TESTERŮ HACH LANGE

Při své práci se pravidelně setkávám s produkty společnosti HACH LANGE s.r.o. Mikrobiologické testy pro stanovení přítomnosti či nepřítomnosti a přibližného počtu mikroorganismů používám dlouhodobě. Své zkušenosti a doporučení shrnuji níže.

Autor:

Doc. RNDr. Jana Říhová Ambrožová, Ph.D.
Ústav technologie vody a prostředí
Vysoká škola chemicko-technologická
v Praze

Lopátkové testery

MATRICE APLIKACÍ

Vodní vzorky:

technologická, provozní (procesní), chladicí, povrchová s mikrobiální kontaminací

Stěry z pevných povrchů:

povrchy technologických nádrží, zařízení a jednotek (variabilní materiály konstrukcí s různou povrchovou úpravou s minimální porozitou)

PROSTŘEDÍ APLIKACÍ

Provozy a technologie s procesní a chladicí vodou (průmysl, energetika)

- ▶ sledování mikrobiální úrovně pro potřeby volby vhodné dávky biocidního prostředku aplikovaného do procesní vody
- ▶ sledování biofoulingu (tvorby biofilmu) na smáčených stěnách technologických zařízení a jednotek



Úpravy vody včetně distribuce a akumulace

- ▶ sledování charakteru tvorby biofilmů na stěnách technologických zařízení (audity), ve vodovodních řadech (odkalování)
- ▶ optimalizace harmonogramu četnosti čištění vodojemů (HACCP)
- ▶ sledování vzdušné kontaminace objektů vodojemů (spady, výluhy filtračních náplní vzduchových filtrů)

POROVNÁNÍ METOD ODBĚRU VZORKŮ STĚRŮ

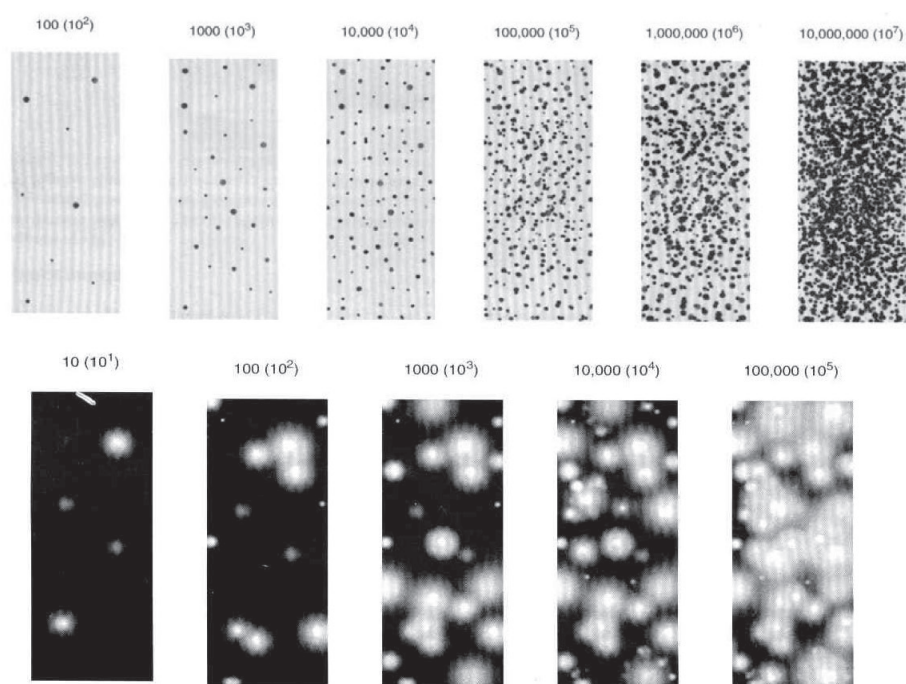
Projekt 1G58052 „Výzkum řešení degradace jakosti pitné vody při její akumulaci“ (NAZV) se zabýval definováním faktorů, které mají významný vliv na udržení jakosti vody v akumulacích pitné vody a dále pak v distribuční síti. Po biologické stránce byly řešeny problémy týkající se vzdušné kontaminace a tvorby biofilmů a nárostů na smáčených stěnách v akumulacích, které pocházejí z rozmnožovacích stadií transportovaných vodou či vzduchem. Stěry z dostupných míst ze smáčených povrchů lze provádět různými způsoby. Dále uvedené postupy byly kriticky posouzeny pro případné využití hodnocení úrovně mikrobiální kontaminace v objektech vodojemů.

- ▶ Podle TNV 75 5941 je specifikován stěr laboratorním kartáčkem ovinutým proužkem tenkého molitanu, který se následně po odběru setřenému materiálu vloží do polyethylenové vzorkovnice o objemu 100 ml naplněné vodou z příslušné lokality. Tento postup je vhodný pro mikroskopické vyhodnocení vzorku. V případě mikrobiologického rozboru vzorku výluhu z molitanu, se musí na místo odběru transportovat sterilní vzorkovnice spolu se sterilním fyziologickým roztokem. Nevýhodou uvedené metody je stírání plochy nedefinovaných rozměrů, nedostatečné uvolnění zachyceného materiálu z molitanu do vody, náročnost na předpřípravu materiálu a roztoků v laboratoři před vlastním odběrem, transport sterilních vzorkovnic, roztoků a molitanů na místo odběru.
- ▶ Alternativní metodou je způsob odběru vzorku stěru setřením plochy 100 cm², vymezené čtvercem o velikosti 10x10 cm. K setření se používají sterilní vatové stěrky, které se namáčejí před vlastním odběrem vzorku stěru, do sterilního fyziologického roztoku. Po setření se vloží do sterilní láhve obsahující definovaný objem sterilního fyziologického roztoku. Nevýhodou uvedené metody je nedostatečné uvolnění zachyceného materiálu z vatové stěrky do vody, náročnost na předpřípravu materiálu a roztoků v laboratoři před vlastním odběrem, transport sterilních vzorkovnic, roztoků a molitanů na místo odběru.
- ▶ Screeningové metody (tzv. ready-to-use), které jsou komerčně dodávány společností Hach Lange, pod názvem lopátkové testery (paddle testers), mají definované rozměry destičky. Na obou stranách destičky je výrobcem nanášena kultivační půda, která slouží pro záchyt vždy dvou typů specifických skupin organismů (celkové aerobní bakterie, koliformní bakterie, plísňe a kvasinky, mikroorganismy pro účely kontroly dezinfekce). Testery lze ponořit do vzorku sledované vody, či je přímo otisknout na testovaný povrch. Výhodou metody je způsob odběru, vzorek je nanášen přímo na plochu kultivačního média otiskem, ze kterého se po určité době kultivace odečítá přibližné množství mikroorganismů. Uváží-li se i značné nároky na přípravu selektivních půd, laboratorních pomůcek a dále nároky na pracnost a provedení kultivačních technik, jsou testery značným usnadněním.

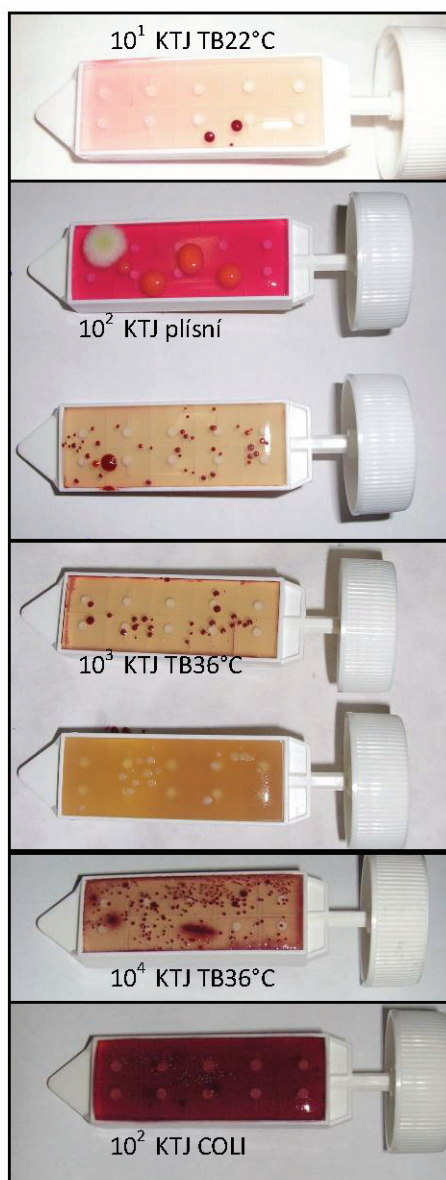
POSTUP POUŽITÍ LOPATKOVÝCH TESTERŮ

Lopatkové testery mají definované rozměry destičky, na které je přímo výrobcem nanášena kultivační půda (na rubové i lícni straně). Testery slouží pro záchyt vždy dvou typů specifických skupin organismů, např. na jedné ploše testeru lze kultivovat celkové aerobní bakterie a na druhé ploše např. koliformní bakterie, plísně a kvasinky či provádět kontrolu dezinfekce. Testery lze ponořit do vzorku sledované vody, či je přímo otisknout na povrch, a tím odebrat stěr. Testery se po určitou dobu, danou typem lopatkového

testeru, kultivují ve tmě při definovaných teplotách (20 °C, 22 °C, 25 °C, 36 °C). Poté se plocha testeru s narostlými koloniemi porovnává s ilustračními tabulkami udávajícími titer (10^x počtu mikroorganismů), viz obr. 1. Přiloženy jsou i příklady úrovní kontaminace na plochách testerů.



Obr. 1 Ilustrační schéma interpretace úrovně kontaminace. Horní řada se používá při vyhodnocování lopatkových testerů sloužících pro zjištění úrovně kontaminace celkovými aerobními bakteriemi, kontrolu dezinfekce a koliformních bakterií. V tomto případě není uveden i stav, kdy je možné říci, že je úroveň kontaminace 10^1 . Dolní řada se používá při vyhodnocování lopatkových testerů sloužících pro zjištění úrovně kontaminace kvasinkami a plísněmi.



Obr. 2 Příklady úrovně kontaminace na lopatkových testerech. TB22°C představují celkové počty aerobních mikroorganismů kultivovatelných při 22 °C, TB36°C představují celkové počty aerobních mikroorganismů kultivovatelných při 36 °C, DEZ představují úrovně kontroly dezinfekce, COLI představují úrovně přítomnosti koliformních bakterií.

ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ

- ▶ Běžně používané metody mikrobiologického rozboru jsou odkázány na laboratorní přípravu půd a růstových médií a dále pak na vlastní laboratorní zpracování vzorků. Provozy laboratoří mají rozsáhlé množství vzorků (dle harmonogramu odběrů) a nejsou na rozboru vzorků stěrů a sedimentů často zařízeny (počty replikátů, řady ředění, řady stanovení). Uzanční mikrobiologické metody stanovení indikátorových organismů dle vyhlášky č. 252/2004 Sb. nelze v plném rozsahu nahradit rychlými screeningovými metodami. Účelem použití těchto metod je orientační zjištění kontaminace vodojemů (akumulací) přímo na místě laikem (obsluha vodojemů, která nemá potřebné biologické vzdělání).
- ▶ Výhodou lopatkových testerů je snadná manipulace a odběr vzorků vody a stěrů.
- ▶ Pro provozu a obsluhu vodojemů a akumulací lze z mikrobiologických ukazatelů vybrat obecné indikátory, které lze monitorovat na lopatkových testerech. Tyto testery umožňují záchyt celkových aerobních bakterií (lze kultivovat při 22 °C a 36 °C), koliformních bakterií, plísň a kvasinek a monitorovat kontrolu dezinfekce.
- ▶ Výsledky z rozborů, provedených na základě lopatkových testerů či testů biologické aktivity, mají informativní charakter a jsou naprosto dostačující pro následující manipulace v objektech vodojemů.

- ▶ Záchyt mikroorganismů na lopatkových testerech byl porovnáván s běžnými kultivačními technikami. I přes to, že je vyhodnocení lopatkových testerů založeno na odhadu pokryvnosti plochy testeru, jsou výsledky porovnatelné s kultivačními technikami. Výsledky se pohybují ve stejných řádech.

TECHNICKÁ DOPORUČENÍ (UCELENÉ PUBLIKACE, MONOGRAFIE)

- ▶ Říhová Ambrožová J. 2006: Biologický monitoring chladicích vod. Technické doporučení I-F-23, Hydroprojekt CZ, a.s.:38 pp., AA 3,8
- ▶ Říhová Ambrožová J., Hubáčková J., Čiháková I. 2008: Konstrukční uspořádání, provoz a údržba vodojemů. Technické doporučení (I-D-48), Hydroprojekt CZ, a.s.: 60 pp., AA 4,8

Testy biologické aktivity (BART™)

MATRICE APLIKACÍ

Voda:

technologická, provozní (procesní), chladicí, povrchová s mikrobiální kontaminací, odpadní, užitková, pitná, podzemní



PROSTŘEDÍ APLIKACÍ

Provozy a technologie s procesní a chladicí vodou (průmysl, energetika)

- ▶ sledování mikrobiální úrovně pro potřeby volby vhodné dávky biocidního prostředku aplikovaného do procesní vody
- ▶ sledování biofoulingu (tvorby biofilmu) na smáčených stěnách technologických zařízení a jednotek
- ▶ detekce koroze, přítomnost sulfát redukujících organismů
- ▶ zjištění přítomnosti významných fyziologických skupin organismů

Provozy a technologie s odpadní vodou

- ▶ sledování mikrobiální úrovně pro potřeby zjištění průběhu nitrifikace, denitrifikace
- ▶ sledování mikrobiální úrovně pro potřeby volby vhodné dávky biocidního prostředku aplikovaného do procesní vody
- ▶ sledování biofoulingu (tvorby biofilmu) na smáčených stěnách technologických zařízení a jednotek
- ▶ detekce koroze, přítomnost sulfát redukujících organismů
- ▶ zjištění přítomnosti významných fyziologických skupin organismů

Úpravný vody včetně distribuce a akumulace:

- ▶ sledování charakteru tvorby biofilmů na stěnách technologických zařízení (audity), ve vodovodních řadech (odkalování)
- ▶ optimalizace harmonogramu četnosti čištění vodojemů (HACCP)
- ▶ detekce koroze, přítomnost sulfát redukujících organismů
- ▶ zjištění přítomnosti významných fyziologických skupin organismů

POSTUP POUŽITÍ TESTŮ BIOLOGICKÉ AKTIVITY

V provozech lze pro případné hodnocení mikrobiální kontaminace vzorku vody použít i testy biologické aktivity, tzv. BART™ testy. Tyto testy slouží pro monitoring přítomnosti/nepřítomnosti fyziologických skupin bakterií

(např. železité, slizotvorné, sírany redukující, denitrifikační a nitrifikační, celkové aerobní, fluorescenční pseudomonády atd.). Do výrobcem připravené sterilní zkumavky (50 ml) se odebere vzorek vody, 15 ml vzorku se přelije do další speciální zkumavky, ve které je dehydrované médium. Tato zkumavka se uzavře a dle návodu od výrobce se její obsah protřepe/neprotřepe a kultivuje se buď v horizontální nebo vertikální poloze, ve tmě nebo na světle. Každý den se sleduje barva média a případné reakce, např. tvorba bublinek, sedimentu či barevných proužků. Výsledkem testu BART™ je pak přibližný počet bakterií KTJ·ml⁻¹, který se odečte z diagramu či barevné reakce testu, viz obr. 1, na kterém je uveden příklad hodnocení přítomnosti železitých bakterií, vyplavovaných při odkalování vodovodních řadů.



**BART™ TEST FOR IRB
IRON RELATED BACTERIA**

Present/Absent - observe daily for 8 days.

ABSENT (Negative - Non-aggressive)
The solution has NO brown slime.

PRESENT (Positive - Aggressive)
A Brown slime ring or foam around the ball, and/or
A Brown slime growth at the base of tube.

1. View test each day for 8 days.
2. Observe any growth/color changes.
3. Compare with descriptions.

*Note: Refer to page bottom for approximate population

Advanced test information.

Determination of Dominant Bacteria

FD	IRB	IRB+	IRB-	IC	IC+	IC-	IC+	IC-
FOAM/FOD around ball - Enterobic Bacteria	IRB (IRB+ IRB24/IRB3, G(+)/BC(-), and/or CLB(+)/CB(-) - IRB	Solution (G(+)/G(-)/G(+)) - Pseudomonads	Solution (G(-)/G(+)/G(-)) - Enteric Bacteria	Solution (G(+)/G(+)/G(+)) - Heterotrophic Bacteria	Solution (G(-)/G(-)/G(-)) - Pseudomonads and Enterics			

Determination of Potential IRB Population - observe daily for reaction.

Present: 140,000, 8,000, 2,300, 500, 25

Approximate IRB Population (cfu/ml)

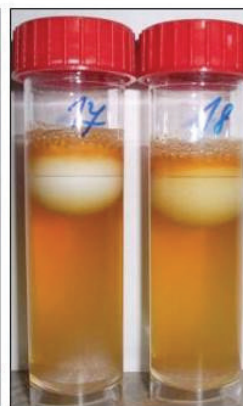
Days to reaction: 2 4 5 6 8 9

Příklady stanovení IRB Bart™ testu

Neprokázána aktivita IRB



9 000 KTJ/ml, reakce pozitivní 4.den, nahnědlý proužek a bublinky kolem plováku



49 700 KTJ/ml, reakce pozitivní 3.den, nahnědlá barva, zákal, bublinky kolem plováku

Přítomnost pseudomonád a enterobakterií



Obr. 1 Ilustrační schéma interpretace úrovně kontaminace železitými bakterie. Příklady barevné reakce testu dle úrovně kontaminace. Vzorky byly odebrány při odkalování vodovodního řadu.

PRODUKTY PRO MIKROBIOLOGICKÝ MONITORING

BART testery

Bart testery představují rychlou selektivní metodu pro detekci bakterií, které mohou způsobit korozi, zápach, změnu chuti, změny barvy či jiné závady ve vodách. Testery jsou vhodné pro stanovení přítomnosti mikroorganismů v procesních, chladicích a pitných vodách, stejně tak ve vodách odpadních či podzemních.

Pro inkubaci vzorků se vyžaduje teplota 20-25 °C, čili odpadá nutnost použití inkubátoru. Přítomnost mikroorganismů je zjištěna jednoduše vizuálním vyhodnocením reakce – změnou barvy, zákalem, tvorbou bublinek, slizu apod. Na základě reakce je možné v některých případech rozlišit typ převládajících mikroorganismů.

KATALOGOVÉ ČÍSLO	POPIS
2432309	BART TESTER, železité bakterie, 9 ks
2432327	BART TESTER, železité bakterie, 27 ks
2432409	BART TESTER, bakterie redukující sírany, 9 ks
2432427	BART TESTER, bakterie redukující sírany, 27 ks
2432509	BART TESTER, bakterie slizotvorné, 9/ks
2432527	BART TESTER, bakterie slizotvorné, 27/ks
2434809	BART TESTER kombinovaný set, na stanovení železitých bakterií, slizotvorných bakterií a bakterií redukujících sírany (po 3 ks)
2619309	BART TESTER, denitrifikující bakterie, 9 ks

KATALOGOVÉ ČÍSLO	POPIS
2619407	BART TESTER, nitrifikující bakterie, 7 ks
2432609	BART TESTER, fluoreskující Pseudomonády, 9 ks
2490409	BART TESTER, celkový počet mikroorganismů (Heterotrofní aerobní bakterie), 9 ks
2490427	BART TESTER, celkový počet mikroorganismů (Heterotrofní aerobní bakterie), 27 ks
2432709	BART TESTER, řasy, 9 ks
2432727	BART TESTER, řasy, 27 ks
2831409	BART TESTER, bakterie kyselinotvorné, 9 ks
2478409	BART TESTER, bazény a lázně (Pseudomonas sp.), 9 ks

Lopátkové testery

Lopátkové testery jsou vhodným prostředkem pro zjištění přítomnosti a počtu mikroorganismů. Lopátkový tester může být použit pro testování kapaliny nebo pevných povrchů. Po inkubaci se přítomnost mikroorganismů projeví nárůstem jednotlivých kolonií.

Časté použití nachází tyto semikvantitativní testery v potravinářství, při zpracovávání potravin, výrobě nápojů či při monitoringu procesních vod. Citlivost testerů je 100 KTJ/ml. Inkubační doba je 24-48 h pro bakterie a 5 dní pro plísně a kvasinky. Životnost je 1 rok při 2-8 °C.

KATALOGOVÉ ČÍSLO	POPIS
2610810	Celkový počet mikroorganismů (heterotrofních) a kvasinek + plísní, 10 ks
2610910	Celkový počet mikroorganismů (heterotrofních) a celkových koliformních bakterií, 10 ks
2619510	Celkový počet mikroorganismů (heterotrofních) a ověření desinfekce kapaliny anebo povrchu, 10 ks

Česká republika

HACH LANGE s.r.o.
Zastrčená 1278/8
141 00 Praha 4
www.hach-lange.cz
info@hach-lange.cz

Slovenská republika

HACH LANGE s.r.o.
Ročnícka 21
831 07 Bratislava - Vajnory
www.hach-lange.sk
info@hach-lange.sk