

Validace metody Colilert-18 pro testování kompostů a podobných matric na přítomnost *Escherichia coli*

Vhodnost využití kompostů a podobných matric pro hnojení zemědělské půdy je prokazatelná pouze za předpokladu, že koncentrace určitých bakterií, např. *Escherichia coli*, nepřekračuje schválené hodnoty. Pro kvantifikaci relevantních bakterií je vhodná řada metod. Jedna z těchto metod, Colilert®-18, byla porovnána s jinými schválenými postupy, jako je fermentace ve zkumavkách nebo membránová filtrace (Kramer & Liu, Eccles a kol.). Některé země, například Velká Británie, navíc zahrnují Colilert-18 spolu s ostatními standardními metodami do pokynů pro mikrobiologickou analýzu těchto matric (Microbiology of Sewage Sludge Part 3).

V České republice již platí nařízení, které určuje podmínky pro použití upravených kalů a biologicky rozložitelných odpadů na zemědělské půdě (Vyhláška č. 437/2016 Sb.). Tato vyhláška požaduje, aby byla matrice před použitím testována na *E. coli* s cílem zajistit, že je dostatečně upravena.

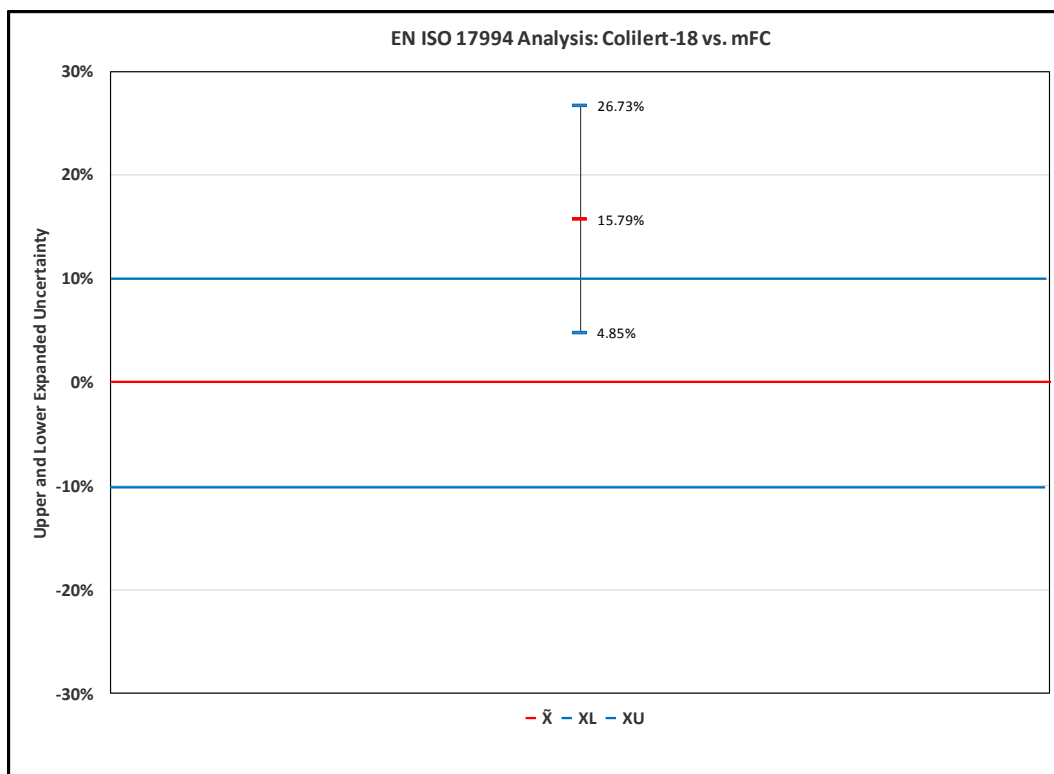
V současné době je v České republice standardní metodou analýzy přítomnosti *E. coli* v těchto matricích použití přímého výsevu fekálních koliformních bakterií na agar (metoda mFC agar, ACTA HYGIENICA, EPIDEMIOLOGICA ET MICROBIOLOGICA, číslo 1/2008). Je možné použít alternativní metodu, pokud se prokáže, že je nejméně stejně účinná jako schválená standardní metoda.

Mikrobiologická laboratoř hygieny půdy a odpadů ve Státním zdravotním ústavu byla spolupředatelem studie porovnávající účinnost metody Colilert®-18 s přímým výsevem na mFC agar. Analyzovanými matricemi byly komposty vzniklé z upravených odpadních kalů a zeleného bioodpadu. Vzorky byly připraveny ve Státním zdravotním ústavu a poté byly rozeslány do ostatních devíti zúčastněných laboratoří k analýze.

Získaná data byla analyzována pomocí celé řady statistických technik, včetně postupů specifikovaných v EN ISO 17994:2014.

Výsledky a statistická analýza

Analýza jednotlivých souborů dat podle typu matrice vykazuje určité odchylky, i když platí obecná tendence, že metoda Colilert-18 je citlivější. Když byly zkombinovány údaje pro podobné matrice, zřetelně se projevily statisticky významné rozdíly mezi metodami. Analýza kompletního souboru kombinovaných dat (Obr. 1) naznačuje, že Colilert-18 je citlivější než mFC agar při detekci *E. coli* v analyzovaných matricích.



Obrazek 1: Analýza kombinovaných dat podle EN ISO 17994:2014.

Analýza jednotlivých souborů dat podle koncentrace bakterií (tabulka 1) vykazuje také určité odchylky, i když opět platí obecná tendence, že metoda Colilert-18 je citlivější.

Analýza podle EN ISO 17994	Stat'	A	B	C	D	E	Vše
Průměrný relativní rozdíl	\bar{x}	-6,33	-0,29	3,52	35,8	26,39	15,79
Směrodatná odchylka	S	0,77	0,58	0,95	0,89	1,11	0,91
Standardní nejistota	$S\bar{x}$	0,21	0,07	0,12	0,11	0,13	0,05
Polovina šířky rozšířené nejistoty	W	42,58	14,85	23,6	21,47	26,85	10394
Spodní limit rozšířené nejistoty	x_L	-48,91	-15,15	-20,07	14,33	-0,46	4,85
Horní limit rozšířené nejistoty	x_U	36,25	14,56	27,16	57,28	53,24	26,73
Počet vzorků	n	13	62	65	68	68	276

Tabulka 1: Statistická analýza dat podle typu ředění, provedená v souladu s EN ISO 17994:2014

Výstupy ISO 17994 (tabulka 2) pro řadu analýz vedly k neprůkaznému výsledku, což poukazuje na fakt, že pro získání průkazného statistického výstupu je nutné analyzovat více vzorků. Kombinování dat zvyšuje velikost vzorku a obvykle vede k průkazným statistickým výstupům.

Matrice	ISO 17994 - 2L = 10 %		ISO 17994 - 2L = 20 %	
	Oboustranná	Jednostranná	Oboustranná	Jednostranná
A	NEPRŮKAZNÉ	NEPRŮKAZNÉ	NEPRŮKAZNÉ	NEPRŮKAZNÉ
B	NEPRŮKAZNÉ	NEPRŮKAZNÉ	BEZ ROZDÍLU	BEZ ROZDÍLU
C	NEPRŮKAZNÉ	NEPRŮKAZNÉ	NEPRŮKAZNÉ	NEPRŮKAZNÉ
D	RŮZNÉ	ALT' VYŠŠÍ	RŮZNÉ	ALT' VYŠŠÍ
E	NEPRŮKAZNÉ	BEZ ROZDÍLU	NEPRŮKAZNÉ	BEZ ROZDÍLU
VŠECHNA DATA	RŮZNÉ	ALT' VYŠŠÍ	RŮZNÉ	ALT' VYŠŠÍ

Tabulka 2: Výstupy ISO 17994 pro data generovaná podle typu ředění. Byly zváženy maximální intervaly spolehlivosti 10 % i 20 %.

Celkově lze říci, že data vygenerovaná během studie naznačují, že Colilert-18 je vhodnou alternativou k metodě mFC agaru pro analýzu kompostu a podobných maticí s cílem detekovat *E. coli*. V kontextu revidovaných předpisů by proto měla být zohledněna jako alternativní metoda.

Zúčastněné laboratoře

Státní zdravotní ústav, Zdravotní ústav v Ostravě (Ostrava), Zdravotní ústav v Ostravě (Olomouc), EMPLA AG, s.r.o., Laboratoř Morava, EKO-LAB Žamberk spol. s r.o., Ekologická laboratoř PEAL, Aquatest, a.s., Abitec, s.r.o. a Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka v Praze.

Odkazy

ISO 9308-2 (2012) - Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria Part 2: Most probable number method

ISO 17994 (2014) - Water quality — Criteria for establishing equivalence between microbiological methods

The Microbiology of Sewage Sludge – Part 3 (2003): Methods for the Isolation and Enumeration of *Escherichia coli* Including Verocytotoxigenic *E. coli*. Standing Committee of Analysts.

Vyhláška o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě a změně vyhlášky č. 437/2016 Sb.

Redakční rada: prof. MUDr. V. Bencko, DrSc., MUDr. J. Mika, RNDr. F. Rettich, CSc., Mgr. J. Veselá, MUDr. J. Volf, Ph.D. (2008): Metodický návod pro stanovení indikátorových organismů v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalech z čistíren odpadních vod, digestátech, substrátech, kompostech, pomocných růstových prostředcích a podobných matricích. *Acta Hygienica, Epidemiologica et Microbiologica*.

J.P. Eccles, J. P., R. Searle, D. Holt and P.J. Dennis (2004): A comparison of methods used to enumerate *Escherichia coli* in conventionally treated sewage sludge. *Journal of Applied Microbiology*. 96, 375–383.

T.A. Kramer & Liu J. (2002): Enumeration of Coliform Bacteria from Wastewater Solids Using Defined Substrate Technology. *Water Environment Research*. 74-6. 526-530.

Colilert®-18 a Quanti-Tray® jsou registrovanými obchodními známkami společnosti IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook Maine USA.