

# MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR PODLE NOVELY VYHLÁŠKY O PITNÉ VODĚ

**Dana Baudišová**

*Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka, v.v.i., Podbabská 30/2581, Praha 16, 160 00,  
e-mail: dana\_baudisova@vuv.cz*

## **Souhrn**

Příspěvek shrnuje mikrobiologické ukazatele aktuálně stanovované v pitné vodě, změny jejich stanovení podle návrhu novely vyhlášky a využití těchto ukazatelů v monitorovacích programech pro rizikovou analýzu.

**Klíčová slova:** pitná voda; mikrobiologické ukazatele; metody; riziková analýza

## **Summary**

This study summarizes microbiological indicators in drinking water, changes in detection methods according to new legislation and their importance in risk assessment analysis.

**Keywords:** drinking water; microbiological indicators; methods; risk assessment

## **Úvod**

V souvislosti s novou Směrnicí Komise EU ze dne 6. října 2015 (2015/1787) se připravuje novela zákona o ochraně veřejného zdraví a vyhlášky o pitné vodě. Ta kromě novinek, týkajících se mikrobiologických rozborů, bude nově obsahovat kapitoly ohledně posouzení rizik a monitorovacího programu (jehož účelem je ověřovat, zda opatření zavedená za účelem kontroly rizik pro lidské zdraví fungují účinně v celém řetězci zásobování vodou, poskytovat informace o kvalitě vyráběné a dodávané pitné vody a určovat nejvhodnější způsoby zmírňování rizik pro lidské zdraví). V tomto příspěvku jsou uvedeny charakteristiky mikrobiologických ukazatelů pro pitnou vodu, právně závazné metody jejich stanovení (v některých případech nové) a význam jednotlivých ukazatelů pro rizikovou analýzu (dle WHO, 2011). Není zde uvedena *Pseudomonas aeruginosa*, která se stanovuje pouze v balené vodě.

## **Mikrobiologické ukazatele**

### **Koliformní bakterie a *Escherichia coli***

Koliformní bakterie byly dříve považovány za hlavní indikátor fekálního znečištění. V současné době je však tento význam z několika důvodů zpochybňován. Jedná se totiž o heterogenní skupinu bakterií zahrnující i druhy, které se ve fekáliích zásadně nevyskytují, např. *Serratia fonticola*, *Rahnella aquatilis*, *Buttiauxella agrestis* atd. Některé druhy zejména rodů *Citrobacter* a *Enterobacter*, i když jsou původem ze zažívacího traktu člověka a teplotokrevných živočichů, ve vodním prostředí relativně dlouhou dobu přežívají a při dostatečné koncentraci organických látek se dokonce mohou i pomnožovat. Mohou se vyskytovat i ve vyšších počtech v případech, kdy další indikátory fekálního znečištění jako *E. coli* a intestinální enterokoky chybí. **Dnes jsou koliformní bakterie využívány především pro operační monitoring, ukazující na čistotu a integritu distribučního systému. Jejich výskyt může ukazovat na různé technologické závady (zvýšená tvorba biofilmů, sekundární kontaminace a další).**

Stanovení *Escherichia coli* jak v evropské, tak české legislativě prakticky nahradilo stanovení termotolerantních (fekálních) koliformních bakterií. Stanovení přímo *E. coli* je oproti stanovení termotolerantních koliformních bakterií výhodnější z několika důvodů. Jak již bylo uvedeno, *E. coli* vždy pochází ze střevního traktu člověka či teplotokrevných živočichů (na rozdíl od některých dalších zástupců termotolerantních koliformních bakterií, především druhů z rodů *Citrobacter* a *Enterobacter*) a ve vodním prostředí se nerozmnožuje. **V pitných vodách *E. coli* indikuje jednoznačné a závažné fekální znečištění, které by mělo vést k okamžitému vyhledání zdrojů kontaminace (neadekvátní čištění, porušení integrity distribučního systému apod.). Výskyt *E. coli* zároveň dobře koreluje s výskytem řady střevních patogenů (např. salmonely, shigely, campylobacter apod.).**

- **Změna normy na stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií**

Tato změna přímo nesouvisí s novou Směrnicí EU 2015/1787, protože číslo původní i nové normy (ČSN EN ISO 9308-1) je shodné, a ani v této nové Směrnici není uvedena přesná datace normy. Jedná se však o významnou metodickou změnu, kdy původně používaný laktózový TTC agar s Tergitolem 7 je nahrazen chromogenním médiem Chromocult Coliformen agar (CCA). Hlavní změna spočívá v tom, že nově používané médium je výrazně citlivější a vzhledem k tomu, že koliformní bakterie se stanovují na základě aktivity enzymu  $\beta$ -D-galaktozidázy (která štěpí laktózu na glukózu a galaktózu) je zachycena výrazně širší skupina druhů z čeledi *Enterobacteriaceae*, než tomu bylo dříve, kdy byla požadovaná kompletní fermentace laktózy až na kyselé produkty. Naopak stanovení *Escherichia coli* pomocí aktivity enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy je výrazně specifitější, než tomu bylo při stanovení na základě indol testu, který pozitivně určil i další druhy především z rodů *Kluyvera*, *Klebsiella* a *Citrobacter*. Test na aktivitu enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy sice původní norma připouštěla, ale prakticky se téměř neprováděl. Další výhodou nové metody je skutečnost, že výsledky obou ukazatelů jsou k dispozici již 24 hodin po naočkování.

- **Uvedení metody Colilert-18/Quanti-Tray jako alternativní metody**

Stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií metodou nejpravděpodobnějšího počtu pomocí metody Colilert-18/Quanti-Tray (IDEXX, USA) je již delší dobu normováno (ČSN EN ISO 9308-2). Tato metoda je řadou laboratoří používána, ve Směrnici EU 2015/1787 je však uvedena jako plnohodnotná alternativní metoda. Stanovení *E. coli* touto metodou je dostatečně specifické (princip je opět aktivita enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy), u stanovení koliformních bakterií je třeba dávat pozor na určité nadhodnocení výsledků, neboť se neprovádí konfirmace pomocí oxidázového testu.

### **Intestinální enterokoky**

Intestinální enterokoky jsou tradičním a významným indikátorem fekálního znečištění. Jsou citlivější vůči vnějším vlivům než skupina koliformních bakterií a ve vodě se zřídka pomnožují. Mohou tedy být považovány za ukazatele čerstvého fekálního znečištění. Na druhé straně jsou rezistentnější k chlóru či jiným dezinfekčním prostředkům a mohou přežít takové dávky chlóru, které koliformní bakterie bezpečně usmrtí. **Mohou tak indikovat nedostatečně provedenou dezinfekci pitné vody chlórem (i za nepřítomnosti koliformních bakterií).** Jejich stanovení není součástí kráceného, ale pouze úplného rozboru pitné vody. Pro stanovení intestinálních enterokoků je předepsána tradiční, dostatečně selektivní a citlivá metoda podle ČSN EN ISO 7899-2.

### ***Clostridium perfringens***

Spory druhu *Clostridium perfringens* jsou přítomné v lidských i živočišných exkrementech, v odpadních vodách i v půdě. Nejsou však tak hojné jako koliformní bakterie. Na rozdíl od *E. coli* a ostatních koliformních bakterií spory ve vodě přežívají dlouhou dobu a jsou podstatně více rezistentní k účinkům chemických a fyzikálních faktorů, než vegetativní buňky. Mohou indikovat starší a periodické znečištění. Vegetativní buňky (nikoliv spory) *C. perfringens* však přežívají ve vzorku povrchové vody jen velmi krátce. Hlavní negativní vliv na přežívání vegetativních buněk *C. perfringens* má zřejmě ve vodě přítomný kyslík.

*C. perfringens* se stanovuje v pitné vodě, upravované přímo z povrchových vod nebo u podzemních vod ovlivněných povrchovými vodami. V nové vyhlášce o pitné vodě by mělo být stanovení *C. perfringens* součástí pouze úplného (nikoliv kráceného) rozboru. ***C. perfringens* je indikátorem účinnosti fyzikálních čistících procesů a dezinfekce pro viry.** Tam, kde hodnota tohoto ukazatele není dodržena (negativní záchyt ve 100 ml), by se měl prozkoumat daný vodní zdroj a technologie úpravy, aby se zjistilo, zda lidské zdraví není potenciálně ohroženo přítomností patogenních mikroorganismů, např. parazitických prvoků z rodu *Cryptosporidium*.

- **Změna metody stanovení *Clostridium perfringens***

Ve Směrnici EU 2015/1787 je předepsána nová metoda stanovení *C. perfringens* dle normy EN ISO 14189 (ČSN EN ISO 14189 měla by vyjít v březnu až v dubnu 2017). Metoda předepisuje stanovení *C. perfringens* membránovou filtrací vzorků přes membránové filtry o porozitě 0,45 µm (od dříve používané porozity 0,2 µm se upustilo, protože při větší porozitě je lepší kontakt rostoucích bakterií s kultivačním médiem), kultivací na TSC médiu (trypton siřičitanový agar s cykloserinem) 21 ± 3 hodin při 44 ± 0,5 °C v anaerobním prostředí a confirmací kolonií kyselou fosfatázou. Presumptivní kmeny *C. perfringens* rostou na TSC médiu jako černé, šedé až šedožluté kolonie. Ty je třeba přeočkovat na neselektivní, na živiny bohatý agar (např. trypton sójový agar, TSA), kultivovat 21 ± 3 hodiny při 36 ± 2 °C v anaerobních podmínkách (pokud si nejsme jisti, že se jedná o čistou kulturu, tak přečistit), přenést na filtrační papír a zakápnout činidlem na kyselou fosfatázu. Přeočkovat se musí všechny podezřelé kolonie, nebo alespoň jejich poměrná část (minimálně 10 a výsledek se přepočítá na celkový počet presumptivních kolonií). Pozitivní reakce se projeví zčervenáním až zhnědnutím bakteriální biomasy (vždy je vhodné mít negativní kontrolu). Výhodné je též udělat (i když to norma nepředepisuje) dvojí přeočkování a paralelní kultivaci přeočkovaných kolonií v aerobních podmínkách, čímž se vyloučí část siřičitany redukující doprovodné mikroflóry. Na TSC médiu částečně roste ve formě žlutohnědých kolonií i *E. coli*.

### **Stanovení počtů kolonií při 22 °C a 36 °C**

Organotrofní mikroorganismy, stanovené jako počty kolonií při 22 °C resp. 36 °C, tvoří malou část celkového počtu bakterií a mají jen omezený hygienický význam. Jedná se o všudypřítomné bakterie, kterých člověk denně přijímá do organismu např. s potravou o několik řádů vyšší počty, než může být maximální příjem z pitné vody, a tato expozice nevede k žádným nepříznivým zdravotním účinkům. Nepříjemnosti, plynoucí z pomnožení organotrofních bakterií ve vodě, mohou být především zhoršené organoleptické vlastnosti vody (protože narůst počtů kolonií může indikovat růst biofilmu a tvorbu produktů ovlivňujících senzorku vody), a dále vyšší riziko kažení potravin připravovaných z takové vody, případně zkreslování výsledků mikrobiologického rozboru závažnějších ukazatelů (např. stanovení *E. coli* a koliformních bakterií dle ČSN EN ISO 9308-1). Z potenciálně patogenních mikroorganismů se mohou mezi tímto ukazatelem vyskytovat druhy rodů *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Serratia*, *Pseudomonas* a *Xanthomonas*.

Zvýšený počet organotrofních mikroorganismů většinou signalizuje znečištění vodního zdroje z vnějšího prostředí a to buď přímo buňkami mikroorganismů, nebo organickými látkami, na nichž se mohou tyto mikroorganismy silně pomnožit. Pomnožování organotrofních mikroorganismů ve vodě a v distribuční síti ovlivňuje řada faktorů, kterými je: původní počet organotrofních bakterií ve zdroji, doba zdržení vody v síti a s ní související faktory jako je teplota vody, rychlost proudění vody, zbytková koncentrace a druh dezinfekčního prostředku, přítomnost biofilmu či korozních produktů na stěnách potrubí a sedimentu na dně potrubí, kvalita materiálu rozvodné sítě a především tzv. stabilita vody (= přítomnost živin bakteriemi využitelných) měřená např. pomocí ukazatelů asimilovatelný organický uhlík (AOC), případně biodegradabilní organický uhlík (BDOC).

**Z výše uvedených důvodů, mají tyto ukazatele především provozní význam při monitorování účinnosti filtrace a dezinfekce vody (včetně validace a verifikace těchto procesů úpravy), při monitorování stavu podmínek a změn distribuční sítě, včetně domovních rozvodů vody apod.**

Proto došlo ke změně právních předpisů a ve vyhlášce o pitné vodě (již ve vyhlášce 252/2004 Sb. ve znění pozdějších předpisů) jsou uvedeny hodnoty 200 KTJ/ml (pro počty kolonií při 22 °C) a 40 KTJ/ml (pro počty kolonií při 36 °C) pouze jako doporučené, a jako mezná hodnota je uvedeno hodnocení „bez abnormálních změn“. Pokud u zásobované oblasti nelze pro malý počet vzorků určit, zda se jedná o abnormální změny (jako minimum pro hodnocení je nutná existence 7 hodnot v období ne delším než 3 roky), platí doporučené hodnoty 200 KTJ/ml (pro počty kolonií při 22 °C) a 40 KTJ/ml (pro počty kolonií při 36 °C) jako mezné. Aktivity, vedoucí k hodnocení stavu „bez

abnormálních změn“ jsou záležitostí provozovatelů a Státní zdravotní ústav k tomu vypracoval metodické doporučené (Kožíšek a kol. 2014) dostupné na adrese: <http://szu.cz/tema/zivotni-prostredi/pitna-voda>. Důležitá není jen abnormální náhlá změna mimo obvykle se vyskytující rozmezí hodnot počtů kolonií, ale také setrvalý rostoucí trend. I to by mělo být považováno za rizikový faktor a potenciálně nepříjemný stav, který si vyžaduje vyšetření příčin, případně přijetí nápravného opatření.

Ke stanovení počtů kolonií při 22 °C i 36 °C je předepsána metoda dle ČSN EN ISO 6222, která se v našich laboratořích používá již téměř 20 let.

### **Poděkování**

Příspěvek byl zpracován v rámci projektu Technologické agentury ČR TD03000155 „Podmínky úspěšné transpozice a implementace systému rizikové analýzy při zásobování pitnou vodou v České republice“ v Programu na podporu aplikovaného společenského výzkumu a experimentálního vývoje OMEGA.

### **Použitá literatura**

- [1] Kožíšek F., Pumann P., Šašek J: Hodnocení výsledků ukazatelů počty kolonií při 22 °C a 36 °C v pitné vodě.
- [2] Metodické doporučení SZÚ, (2014)
- [3] WHO (2011) : [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/WSP/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/WSP/en/);  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2011/dwq\\_chapters/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_chapters/en/)