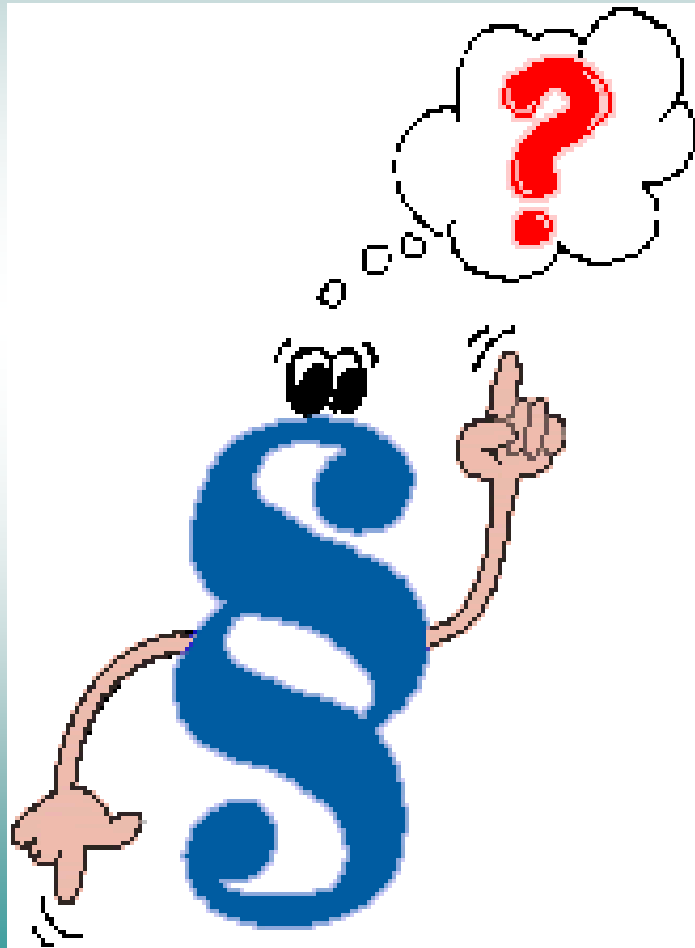


STANOVENÍ KLOSTRIDIÍ V ČISTÍRENSKÝCH KALECH – POROVNÁNÍ METOD



Vodárenská biologie 2010- Praha, Populus, Ekomonitor



*Státní zdravotní ústav, Šrobárova 47,
Praha 10*



420 267082456



imateju@szu.cz

Směrnice Rady 86/278/EEC z 12. června 1986 o ochraně životního prostředí a zejména půdy při používání kalů z čistíren odpadních vod v zemědělství

Working document Biological Treatment of Biodegradable waste, 1st draft (Brussel, 20 October 2000, DG ENV.E.3/LM/biowaste/ 1st draft)

Working document on sludge, 3rd draft

(Brussel, 27, April 2000, DG ENV.E.3/LM/ sludge/ 3rd draft)

Working document on sludge, 2nd draft Biological Treatment of Biowaste (Brussel, 2001, DG ENV.A.2/LM/biowaste/2nd draft)

Draft Diskussion Dokument for the Ad Hoc meetin on Biowastes and Sludges (Brussel, 15-16 January, 2004)

Ekologicky správné použití biologicky rozložitelného odpadu v EU (Brusel, 31.5.-1.6. 2006)

Sludge Directive Workshop 29 April 2009

Přesto nebyl vydán žádný závazný EU předpis



Consultation Report on Options and Impacts

Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land

Používání kalů na půdě - vliv na životní prostředí, ekonomiku a sociální vlivy
Konzultační zpráva o možnostech a dopadech

Alternativa 1 : nic nedělat, nechat původní směrnici

Alternativa 2 : zařadit přísnější zaručené standardy, zvláště pro těžké kovy, některé organické látky a patogeny a více přísnějších opatření pro aplikaci, vzorkování a monitoring kalů (blíží se Working document on sludge, 3rd draft)

Alternativa 3 : zařadit přísnější standardy pro všechny látky a hlášení o aplikaci kalů k některým plodinám,

Alternativa 4: úplný zákaz aplikace kalů na půdu

Alternativa 5: zrušení směrnice

Přehled států, které mají určené limity pro patogeny

Státy, které mají standardy pro limity patogenů

Norsko

Finlansko

Maďarsko

Velká Británie

Nizozemsko – existuje určený postup pro odstranění co nejvyššího množství patogenů

Francie

Polsko

Luxembursko

Itálie

Dánsko

Belgie – s výjimkami

Státy, které nemají standardy pro limity patogenů

Německo

Švédsko

Řecko

Belgie – u kalu upraveného vápnem vápnem nebo pro kal s pH vyšším než 9,5 se kontrola na patogeny neprovádí

ČR ??????????, SR ?????

Alternativa 2



Quality Management Systems – *Not a Requirement*

QMS	No QMS
➤ Norway – HACCP	➤ Hungary
➤ Finland – HACCP	➤ The Netherlands
➤ UK – HACCP	➤ France - but
➤ Sweden – National Certification Scheme (ReVAQ)	compulsory monitoring required
➤ Luxembourg – Best Agric Guide	➤ Poland -Code of Practice used instead
➤ Germany – Voluntary Certification Scheme – but no national QMS	➤ Greece
	➤ Italy
	➤ Belgium
	➤ Denmark

ČR??? SR???

Zajištění kvality, analýza nebezpečí a kritický kontrolní bod (HACCP) v kalech

„Analýza nebezpečí a kritický kontrolní bod (HACCP)“ - Codex Alimentarius 1997

Zajištění kvality (QA) – formalizování postupů tak, aby bylo zaručeno, že činnosti jsou pokaždé prováděny správně.

QA bylo poprvé aplikováno na recyklaci kalů největším zpracovatelem kalů ve Spojeném království v r. 1989. Výsledkem byla 100% shoda s legislativou a příručkou správné praxe.

Například:

v Německu plán spolupracujících na QA zahrnuje 35 000 farmářů a využití 250 000 t kalů;

ve Francii v r. 2002 zahájili odborníci činnost národního plánu SYPREA, který počítá s úpravou kalů;

ve Švédsku existuje nezávislý systém QA;

v Norsku je legislativní požadavek QA při úpravě kalů; **ve Spojených státech nabízí National Biosolids Partnership audit EMS třetí osobou**

**The application of HACCP procedures in the water industry:
biosolids treatment and use on agricultural land. See:**

http://www.water.org.uk/static/files_archive/0WUK_Haccp_guide_FINAL_19_Mar_04.pdf

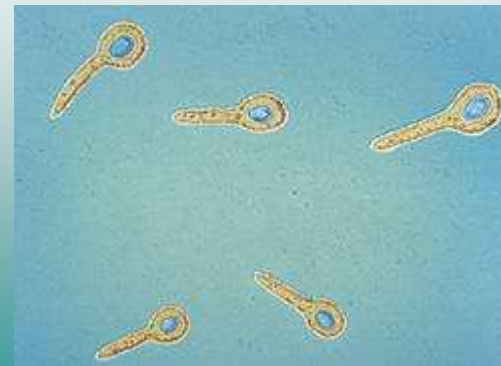
Indikátorové organismy

- *Salmonella sp - Salmonella Senftenberg* (775W, H2S negativní).
- *Escherichia coli*
- *Clostridium perfringens*
- *Enterokoky -Enterococcus faecalis*

- *Listerie*

- ✧ V současné době neexistuje jednotný legislativně závazný předpis Evropské unie, jenž by určoval, které indikátorové organismy by se měly používat při hodnocení čistírenských kalů, bioodpadů a bioodpadů zpracovaných aerobním nebo anaerobním procesem.
- ✧ Bakterie *Clostridium perfringens* je jedním z kandidátů, který by mohl splňovat parametry pro indikátorový organismus.
- ✧ *Clostridium perfringens* se používá v některých zemích jako indikátor přítomnosti fekálních materiálů a účinnosti hygienizace. Spory klostridií přežívají v životním prostředí dlouhou dobu a jsou mnohem více rezistentní k účinkům chemických a fyzikálních faktorů než vegetativní buňky, jsou indikátory staršího nebo periodického znečištění.

Klostridia během stádia sporulace

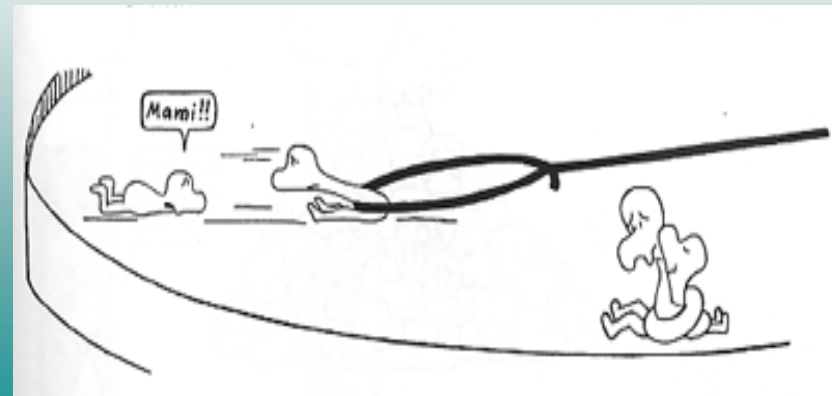


Ověřování metod stanovení bakterie *Clostridium perfringens*

EU 8 Soils, sludges and treated bio-wastes —
Isolation and enumeration of *Clostridium perfringens* in sludges,
soils and treated bio-wastes – Part 1: Membrane filtration method onto selective agar

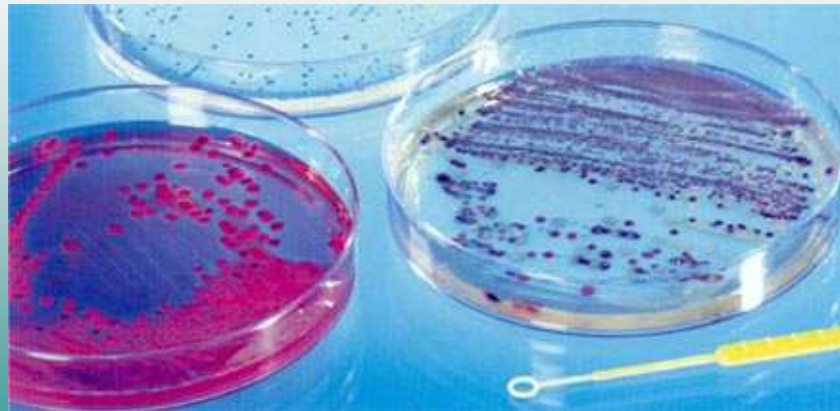
EU 9 Soils, sludges and treated bio-wastes —
Detection of *Clostridium perfringens* in sludges, soils and treated
bio-wastes – Part 2: Macromethod (Most Probable Number)
by inoculation into selective liquid medium

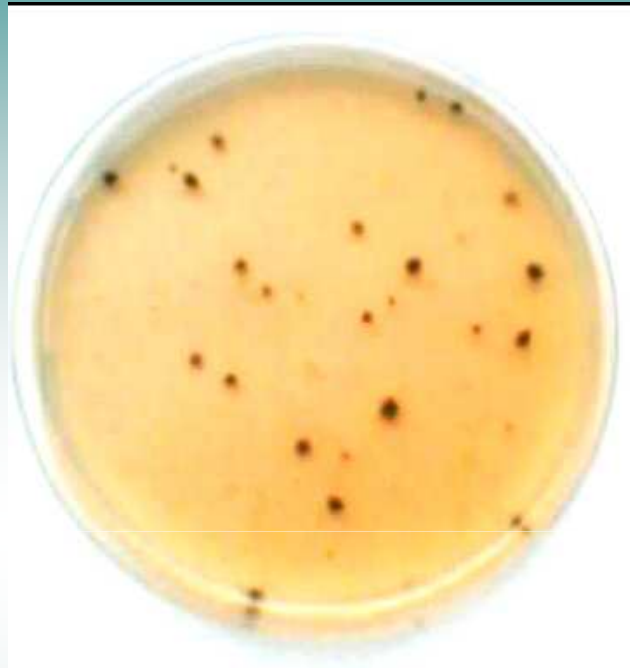
CZ 4 Stanovení *Clostridium perfringens* (SOP 8/2005)



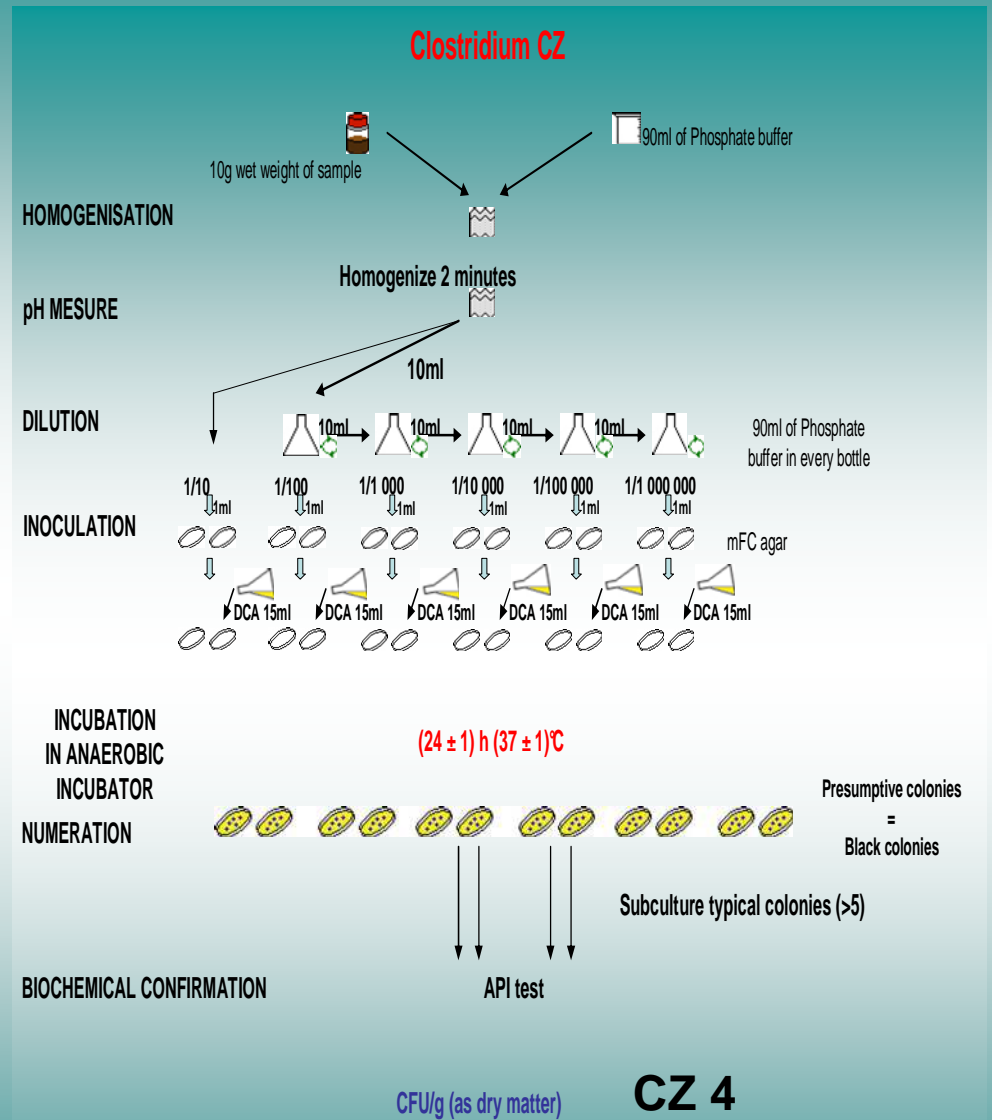
Jednotná struktura postupu.

- Analýzy na reálných vzorcích se prováděly vždy v pěti opakováních z jednoho vzorku a bylo analyzováno 6 vzorků v 5ti opakováních pro stanovení klostridií třemi metodami.
- Pro všechny výše ověřované metody bylo provedeno ověření s 8 přídávky známých počtů KTJ (<10 KTJ, 19 KTJ, 38 KTJ, 10^2 KTJ, 10^3 KTJ, 10^4 KTJ, 10^5 KTJ a 10^6 KTJ) v devíti opakováních.





Differential Clostridial Agar (DCA) acc. to WEENK



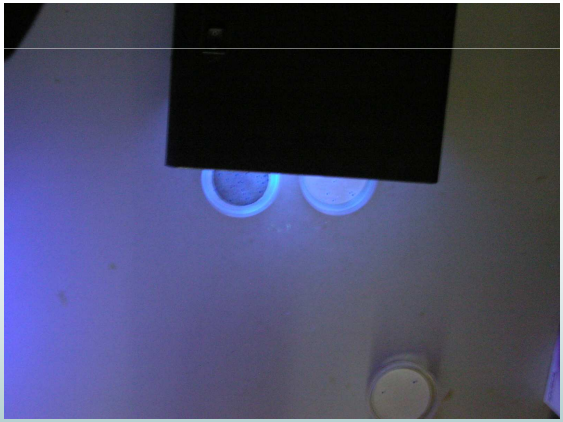
Differential Clostridial agar (DCA) acc. to WEENK (Merck)

kaseinový pepton	5,0 g
masový pepton	5,0 g
masový extrakt	8,0 g
kvasničný extrakt	1,0 g
škrob	1,0 g
D(+) glukóza	1,0 g
cystein chlorid	0,5 g
Resazurin	0,002 g
agar-agar	20,0 g
voda	1 000 ml

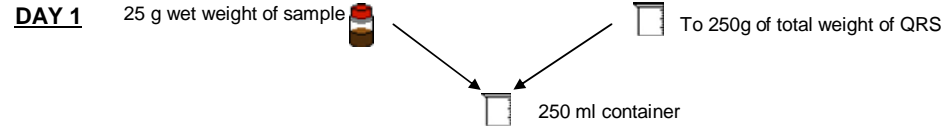
rozpustit v demineralizované vodě a autoklávat při 121°C po dobu 15 min. Zchladit na 48°C a těsně před použitím asepticky přidat 5 ml/l média čerstvě připraveného roztoku citrátu železitoamonného (1 g v 5 ml demineralizované vody, sterilizovat teplem) a 1,0 ml/litr roztoku siřičitanu sodného (2,5 g v 10 ml demineralizované vody, filtračně sterilizovat). Hodnota pH 7,6 ± 0,2 při 25°C.



mTSC - agar s tryptózou, šiřičitanem a cykloserinem



Clostridium: Filtration method

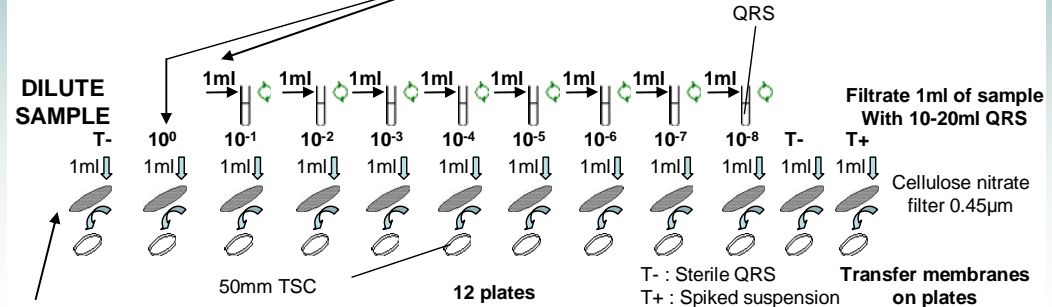
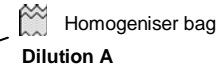


Mix thoroughly 2 minutes

pH MESURE

Transfer the content in an homogenizer bag

FILTRATION



FILTRATION

INCUBATION

(43 ± 1)°C (24 ± 4)h

DAY 2

UV READING NUMERATION



Presumptive colonies = Black or grey to yellow fluorescent colonies

SUB-CULTURE

Subculture typical colonies (>2) on agar plates

INCUBATION

(43 ± 1)°C (24 ± 4)h

DAY 3

BIOCHEMICAL CONFIRMATION

Confirm typical colonies using NH₄OH → pink colonies



mCP Yellow brown colonies

EU 8

Modified Tryptose sulphite cycloserine agar (mTSC agar)

Tryptóza	15 g	Sojový pepton	5 g
Kvasničný extrakt	5 g	disiřičitan sodný	1 g
citrát železitoamonný	1 g	Agar	15 g
Destilovaná voda	100 mL		

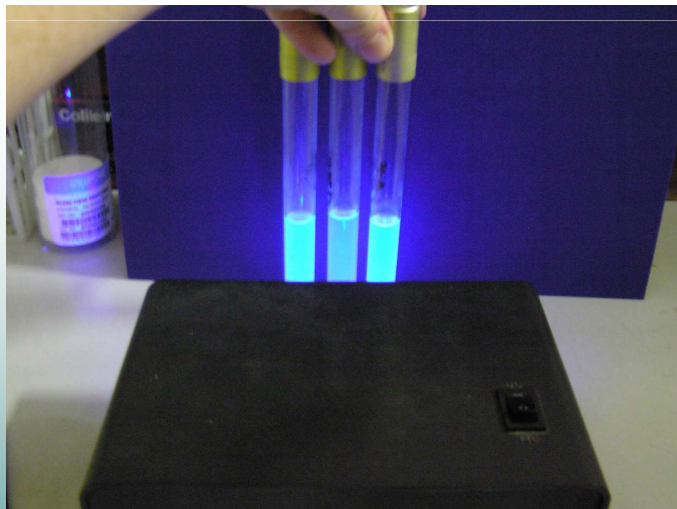
k 500 mL této půdy se přidá 200 mg D-cycloserinu a 50 mg 4-methylumbelliferyl fostátu sodné soli

Membrane Clostridium perfringens agar (mCP agar)

Agar	15 g	Bromocresolová červeň	0.04 g
L-cystein hydrochlorid	1 g	Chlorid železitý 6H ₂ O	0.09 g
Indoxyl- β -D-glucosid	0.06 g	síran hořečnatý 7H ₂ O	0.1 g
sacharóza	5 g	Tryptóza	30 g
Kvasničný extrakt	20 g		

35.6 g se rozpustí v 485 mL destilované vody. Po sterilizaci a ochlazení se přidá 220 mg D cykloserinu a 12,5 polmyxin-sulfátu, který byl vysterilizován v 5ml destilované vody. Pak se přidá 0,05 g fenolftaleinu zfiltrovaného s 10 ml destilované vody.

EU 9



Clostridium: MPN method (prEN 15214-3)

DAY 1

25g wet weight of sample



180 ml sterile QRS

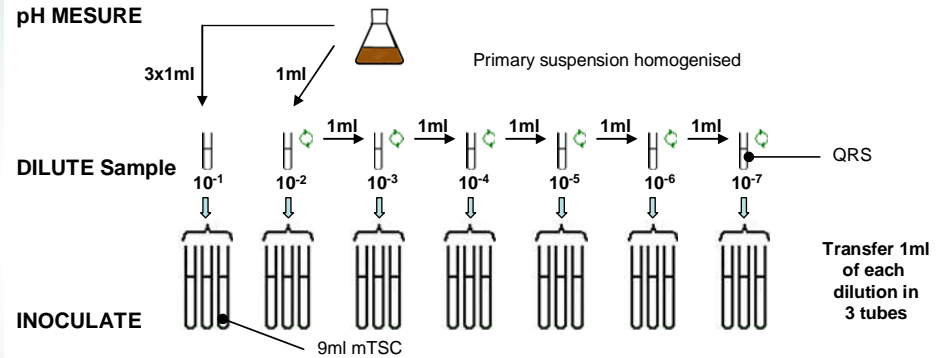
QRS – ¼ Ringier solution

Shaking

Homogenize 2 minutes

INCUBATION

pH MASURE

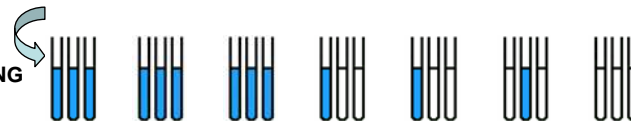


INCUBATION IN ANAEROBIC INCUBATOR

$(43 \pm 1)^\circ\text{C}$
 $(22 \pm 1) \text{ h}$

DAY 2

UV READING
 $\lambda=366\text{nm}$



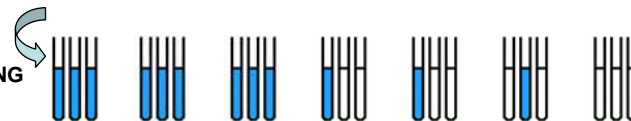
Positive tubes =
Tubes with fluorescence

INCUBATION IN ANAEROBIC INCUBATOR

$(43 \pm 1)^\circ\text{C}$
 $(22 \pm 1) \text{ h}$

DAY 3

UV READING
 $\lambda=366\text{nm}$



Positive tubes =
Tubes with fluorescence

Reálné vzorky

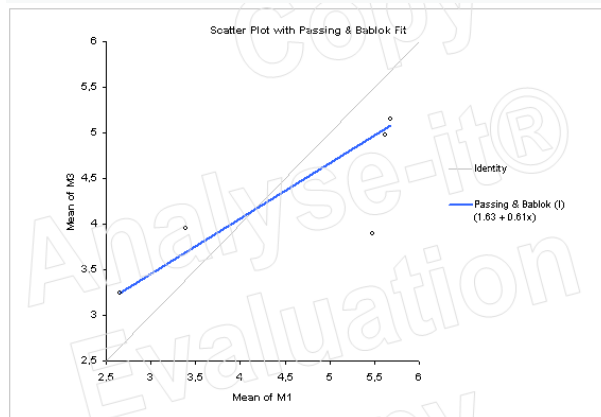
podle normy
ČSN EN ISO 17994

Robustní lineární regrese

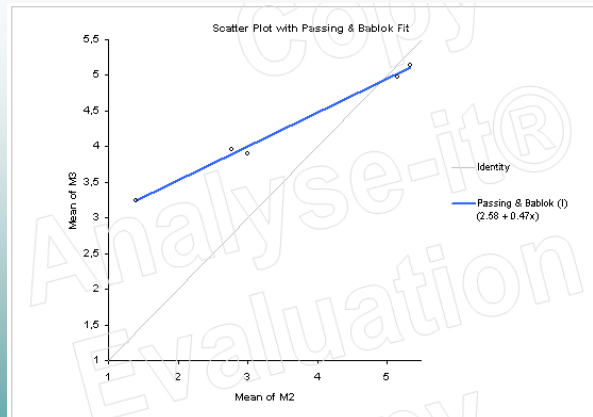
Parametr	CZ 4 – EU 9	CZ 4 – EU 8
Průměr	138,60	136,16
Směrodatná odchylka	211,60	226,03
Rozšířená nejistota	443,20	452,06
Konfidenční interval:		
Dolní mez x_L	-238,69	-13,66
Horní mez x_H	-140,50	85,98

vykazuje vyšší výtěžnost
a CZ 4 nevykazuje srovnatelné
průkazné pro daný soubor šetr

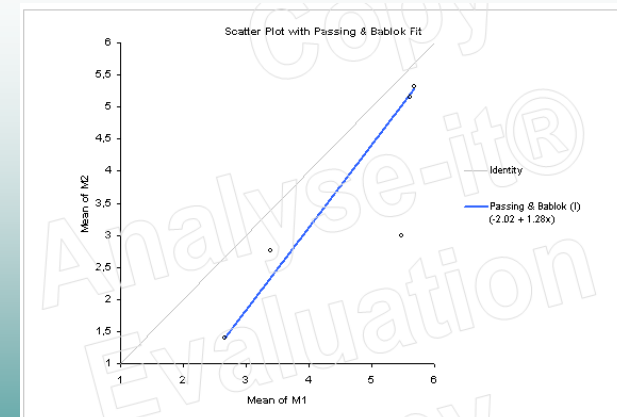
	Absolutní člen	95% interval spolehlivosti	Směrnice	95% interval spolehlivosti
CZ 4 / EU 9	1.63	-38.41 4.06	0.61	-0.03 7.73
CZ 4 / EU 8	2.53	1.06 4.68	0.47	-0.26 0.95
EU 9/ EU 8	-2.02	-81.40 2.39	1.28	0.11 15.41



CZ 4 a EU 9



CZ 4 a EU 8



EU 9 a EU 8

Přidavky známého množství KTJ

Metoda	Absolutní člen	95% interval spolehlivosti	Směrnice	95% interval spolehlivosti
CZ 4	-1.43	-4.07...-0.28	1.21	0.47...1.77
EU 8	-0.28	-1.55 0.49	1.07	0.80 1.38
EU 9	-0.97	-2.18 -0.28	1.04	0.66 1.35

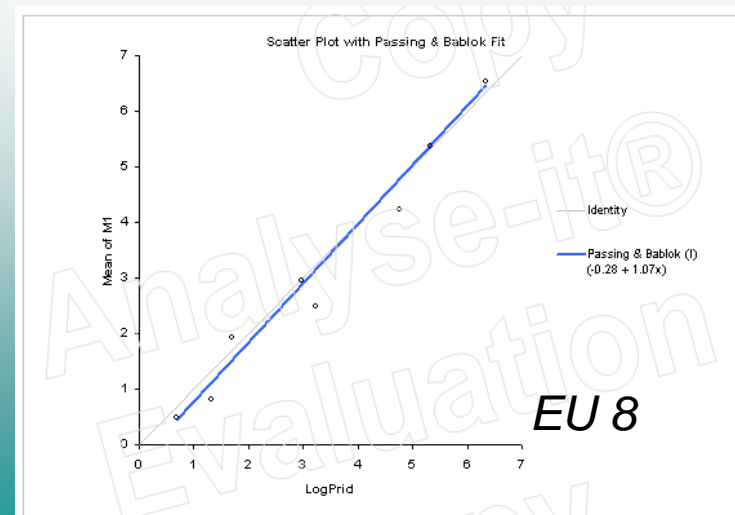
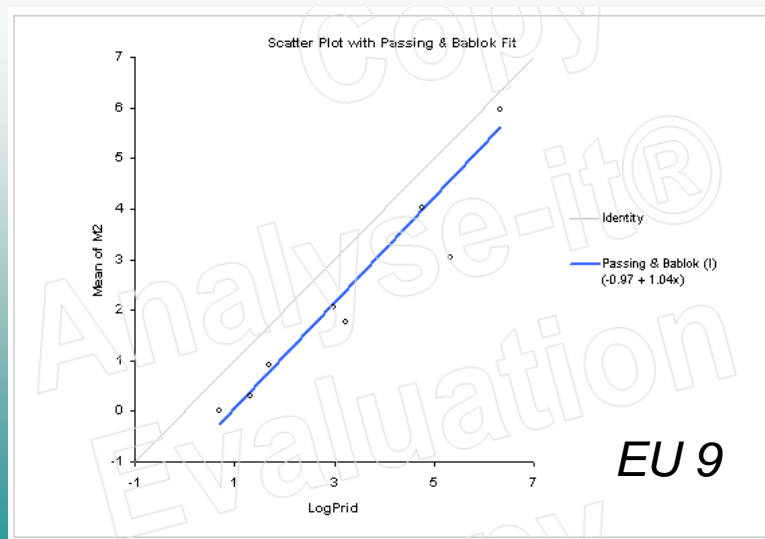
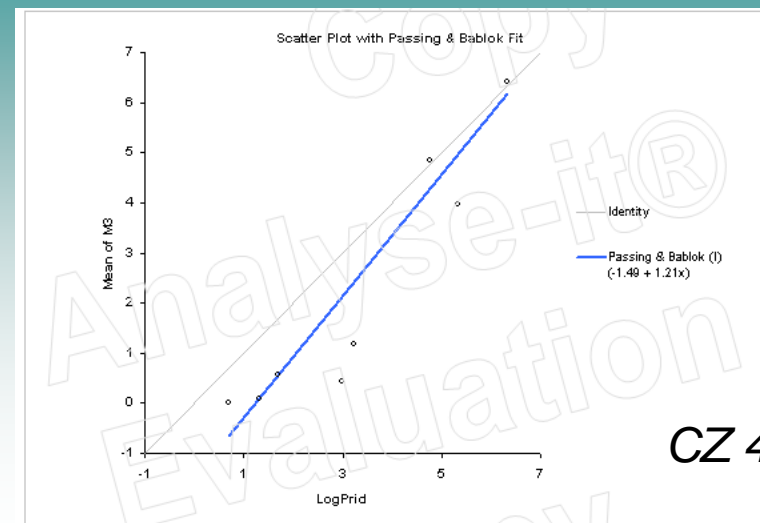
nejlepší výsledky vykazuje metoda EU 8

CZ 4 a EU 9 podhodnocují v některé části sledovaného rozsahu

CZ 4 vykazuje nejmenší podhodnocení v oblasti vysokých koncentrací.

EU 9 podhodnocuje souměrně v celém rozsahu koncentrací

největší chyby je nutno očekávat u metody CZ 4.



Zajištění kvality, analýza nebezpečí a kritický kontrolní bod (HACCP) v kalech

System HACCP má pro úpravu kalů dvě hlavní výhody:

- neomezuje procesy, které lze použít pro úpravu kalů, jestliže mohou být identifikovány CCP, které poskytnou požadovanou kvalitu produktu;
- je to systém dobře srozumitelný pro potravinářský průmysl, který potřebuje záruku, že použití upravených kalů na plodiny neohrozí bezpečnost potravin.



Statut tohoto dokumentu jako technické zprávy CEN/TR byl zvolen proto, že většina jeho obsahu není zcela v souladu s praxí a předpisy ve všech členských státech.

Tento dokument poskytuje obecné zásady hygienických aspektů. Ostatní příručky o správné praxi pro použití kalů - (pokyny 2, 4, 5, 6, 7, 8)

Guide 10 308069 308077 308089	TC308 N1115	PR CEN/TR 15809	GUIDE 10 D - Caractérisation des boues - Aspects hygiéniques - Traitements PL = Mr Muller (A)	May 2004 Dec. 2007				60,55	2008-11-19	CEN work completed (DOR)
Guide 11 308080	TC308 N1132 N459	PR CEN/TR	GUIDE 11 E - Characterisation of sludges - Good practice for dewatering F - PL = Mr Ginisty (FR)	2005			06,60			Preliminary stage. WG is working

34 publikovaných norem a normalizačních informací

TECHNICKÁ NORMALIZAČNÍ INFORMACE ICS 13.030.20 Návrh **Květen 2009**

**Charakterizace kalů – Hygienické aspekty –
Úprava kalů**

**TNI
CEN/TR 15809
75 8110**

Zajištění kvality, analýza nebezpečí a kritický kontrolní bod (HACCP) v kalech

Počátečním stupněm budování systému HACCP v samotných čistírnách odpadních vod je

- provedení analýzy nebezpečí, která identifikuje body v postupu úpravy, které jsou kritické pro dodávání konečných výrobků splňujících stanovené normy - kritické kontrolní body.
- v kritických bodech by se měly kontinuálně měřit relevantní parametry postupu související s inaktivací patogenů, (teplota, čas, koncentrace, hodnota pH atd.)

V těchto kritických kontrolních bodech (CCP) lze kontrolní údaje pro řízení bezpečné inaktivace příslušných patogenů **zafixovat pouze postupem validace.**

Stupeň inaktivace těchto patogenů je validována použitím reprezentativních zkušebních organismů v experimentálním pokusu.



Děkuji za pozornost

**Mikrobi jsou
bystřejší,
moudřejší a
výkonnější
než doktoři,
chemici,
inženýři
a ostatní.**

