

NOVÉ METODY STANOVENÍ MIKROBIOLOGICKÝCH PARAMETRŮ V ČISTÍRENSKÝCH KALECH

JAK VYUŽÍT METODU COLILERT®-18 A ENTEROLERT PRO STANOVENÍ INDIKÁTOROVÝCH ORGANISMŮ V ČISTÍRENSKÝCH KALECH

Ladislava Matějů

Josef Keder, Martina Štěpánková,
Magdalena Zimová, Lucie Synecká

lmateju@szu.cz

Státní zdravotní ústav
Šrobárova 47, Praha 10



SPII2f1/32/07 „Výběr a metody stanovení indikátorových organismů pro hodnocení vlivů na zdraví a životní prostředí při nakládání s biologicky rozložitelnými odpady“

Odborný garant projektu : Bc. J. Tomek
MŽP ČR

Odpovědný řešitel projektu : Ing. Ladislava Matějů
Spoluřešitelé projektu: MUDr. Magdalena Zimová, CSc.,
SZÚ Praha

Stěžejním výstupem a cílem tohoto projektu bude stanovení indikátorů účinnosti hygienizace a návrh a ověření metod pro rychlé a spolehlivé metody stanovení přímých nebo potenciálních patogenních mikroorganismů jako indikátorů mikrobiologického znečištění ve výstupním produktu.

Právní předpisy



Zákon 185/2001 Sb. o odpadech, ve znění posledních platných předpisů

376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů –infekčnost

382/2001 Sb. o nakládání s upravenými čistírenskými kaly na zemědělskou půdu.- Příloha č. 4

294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady.

341/2008 Sb. o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady

Zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech a o agrochemickém zkoušení zemědělských půd (zákon o hnojivech), ve znění pozdějších předpisů

Právní předpisy



NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU RADY (ES) Č. 1774/2002 ze 3. října 2002, kterým se stanoví hygienická pravidla týkající se vedlejších živočišných produktů, které nejsou určeny k lidské spotřebě ve znění posledních předpisů

Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1069/2009 ze dne 21. října 2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě, a o zrušení nařízení (ES) č. 1774/2002 (nařízení o vedlejších produktech živočišného původu).

Nařízení nabude účinnosti dne 4. března 2011.

Prováděcí předpis

Draft Commission Regulation (EU) No .../.. of [...] implementing Regulation (EC)

No 1069/2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002, (Text with EEA relevance), SANCO/7066/2010, Brussels, 26.04.2010.

Mikrobiologické ukazatele pro čistírenské kaly

Zákon 185/2001Sb. o odpadech, příloha č. 4 k vyhlášce č.382/2001 Sb.

Mikrobiologická kritéria pro použití kalů na zemědělské půdě

Kategorie kalů	Přípustné množství mikroorganismů(KTJ*)v 1g sušiny aplikovaných kalů		
	termotolerantní koliformní bakterie	enterokoky	<i>Salmonella sp.</i>
I	$< 10^3$	$< 10^3$	negativní nález
II	$10^3 - 10^6$	$10^3 - 10^6$	nestanovuje se

*KTJ –kolonie tvořící jednotku

Kategorie I – kaly, které je možno obecně aplikovat na půdy využívané v zemědělství při dodržení ostatních ustanovení této vyhlášky

Kategorie II – kaly, které je možno aplikovat na zemědělské půdy určené k pěstování plodin a na půdy na kterých se nejméně 3 roky po použití čistírenských kalů nebude pěstovat polní zeleniny a intenzivně plodící ovocná výsadba, a při dodržení zásad ochrany zdraví při práci a ostatních ustanovení vyhlášky

Mikrobiologické ukazatele pro čistírenské kaly

Kritéria pro kontrolu účinnosti hygienizace prováděné na základě sledování indikátorových mikroorganismů – **vyhl.341/2008 Sb.**

Indikátorový mikroorganismus	Výstup	Jednotky	Počet zkoušených vzorků při každé kontrole výstupu		Limit (nález/ KTJ*)
<i>Salmonella spp.</i>	Rekultivační kompost / rekultivační digestát/ kal	nález v 50g	5		negativní
<i>Termotolerantní koliformní bakterie</i>	Rekultivační kompost / rekultivační digestát/ kal	KTJ* v 1 gramu	5	2	< 10 ³
				3	< 50
<i>Enterokoky</i>	Rekultivační kompost / rekultivační digestát/ kal	KTJ* v 1 gramu AHEM 1/2008	5	2	< 10 ³
				3	< 50

Kritéria pro kontrolu účinnosti hygienizace prováděné na základě sledování indikátorových mikroorganismů – **Nařízení 1774/2002**

Indikátorový mikroorganismus	Výstup	Jednotky	Počet zkoušených vzorků při každé kontrole výstupu		Limit (nález/ KTJ*)
<i>Salmonella spp.</i>	Rekultivační kompost / rekultivační digestát	nález v 25g	5		negativní
<i>Escherichia coli</i>	Rekultivační kompost / rekultivační digestát	KTJ* v 1 gramu	5	1	$< 5 \cdot 10^3$ -
				4	$< 10^3$
<i>Enterokoky</i> **	Rekultivační kompost / rekultivační digestát	KTJ* v 1 gramu	5	1	$< 5 \cdot 10^3$
				4	$< 10^3$

Ověřování základních parametrů mikrobiologických metod pro stanovení indikátorových organismů

Salmonella spp., *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, Enterokoky a *Enterococcus faecalis*, *Listeria sp.*.

Metody byly porovnávány mezi sebou v laboratoři SZÚ a pak v 7 laboratořích jako MPZ.

SZÚ: 19 metod

reálné vzorky - v pěti opakováních pro každou metodu.

8 přídavek 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 pro všechny metody

Analýzy byly prováděny na 6 vzorcích upravených bioodpadů (kompostů a digestátů) a kalů (výstupy různých technologií).

MPZ: 13 metod

4 přídavek v rozmezí koncentrace 0 - 10^7 KTJ na gram vzorku ve třech opakováních pro každou metodu.

rozbory 4 reálných vzorků všemi metodami všemi 7 laboratořemi,
březen až červen 2010, 15 kol

Ověřování základních parametrů mikrobiologických metod pro stanovení indikátorových organismů

Vyhodnocení – SZÚ

Výsledky získané v jedné laboratoři byly statisticky zpracovány na základě normy ČSN EN ISO 17994: Kritéria pro zjištění ekvivalence dvou mikrobiologických metod
Jako referenční metoda byla zvolena metoda užívaná v ČR.

Pro statistické vyhodnocení základních parametrů validace **shodnost a opakovatelnost** byly použity standardní statistické postupy - vážená směrodatná odchylka, 2,8násobek

Výsledky porovnání metod mezi sebou byly vyhodnocovány robustní lineární regresí podle Passinga a Babloka

analýza výsledků metod A/P byla založena na logistické regresi.

MPZ

reálné vzorky - pro metody prezence/ absence hodnocení na základě míry shody mezi dvěma laboratořemi, pro kterou byl použit index *delta*
podle (Andrés a Marzo, 2004) - uspořádání výsledků stanovení do čtyřpolní tabulky

Výsledky porovnání metod mezi sebou byly vyhodnocovány robustní lineární regresí podle Passinga a Babloka

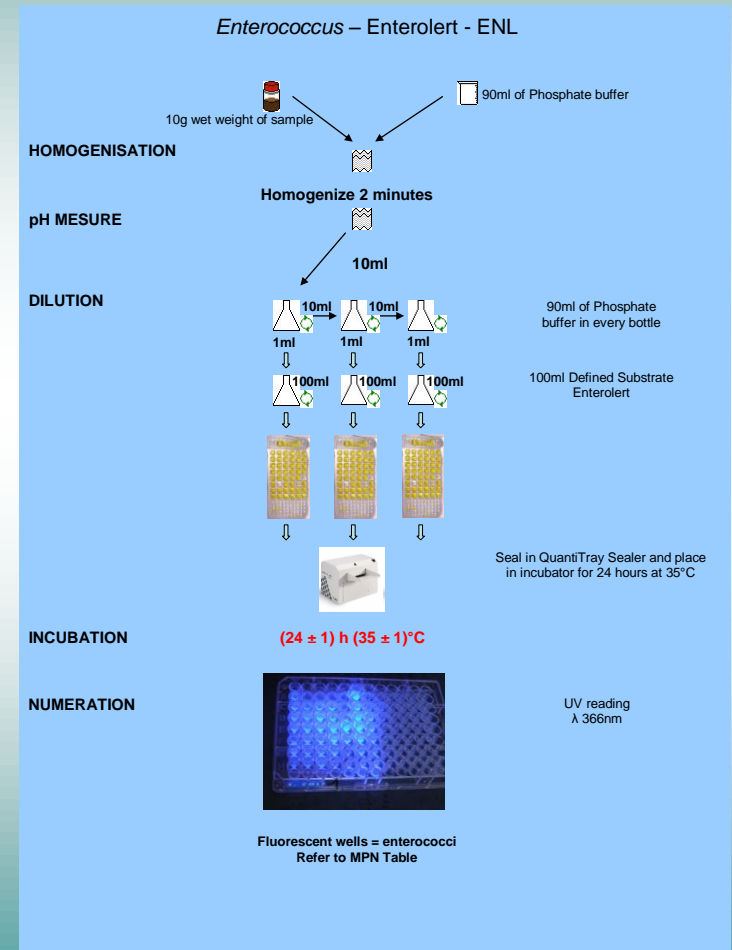
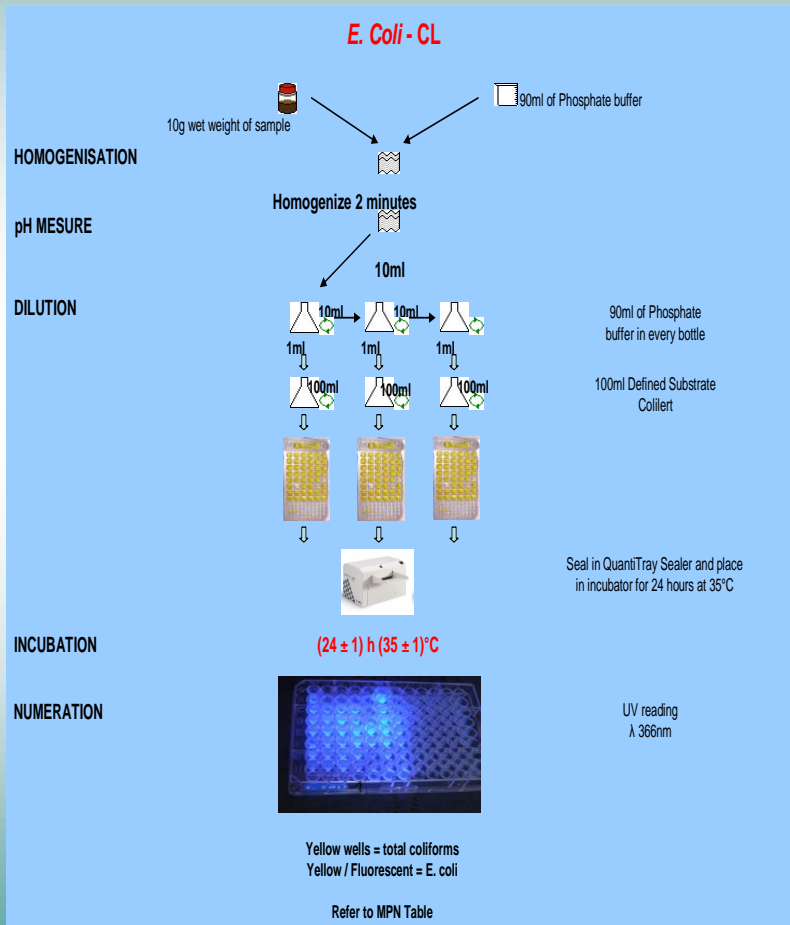
Porovnávané metody

MPZ 13 metod

Stanovení salmonel	3 metody
Stanovení <i>Escherichia coli</i>	4 metody
Stanovení <i>Clostridium perfringens</i>	2 metody
Enterokoky	3 metody
Listerie	1 metoda

CL - Stanovení *E.coli* modifikovanou metodou Colilert

ENL - Stanovení enterokoků metodou Enterolert



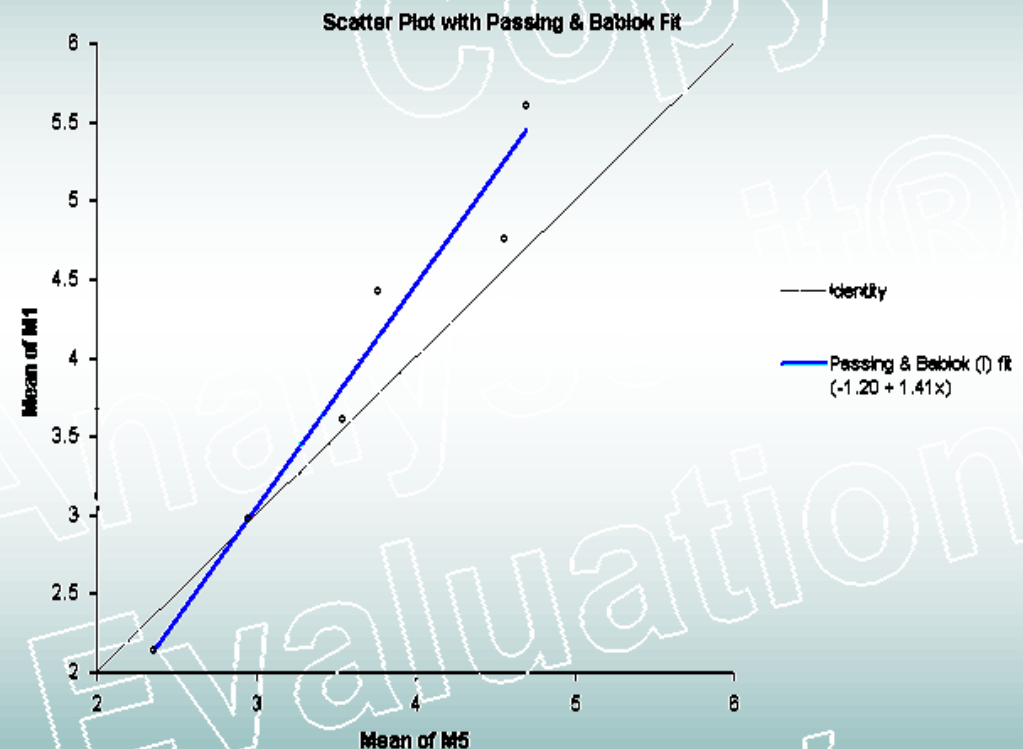
Stanovení *E.coli* modifikovanou metodou Colilert, reálné vzorky SZÚ

Robustní lineární regrese podle P a B

podle normy
ČSN EN ISO 17994

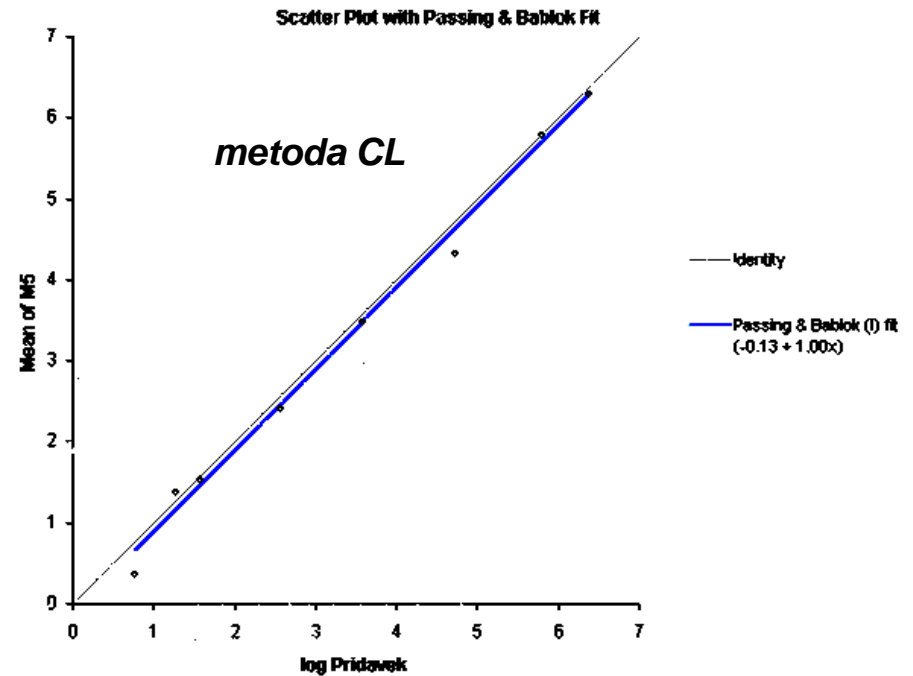
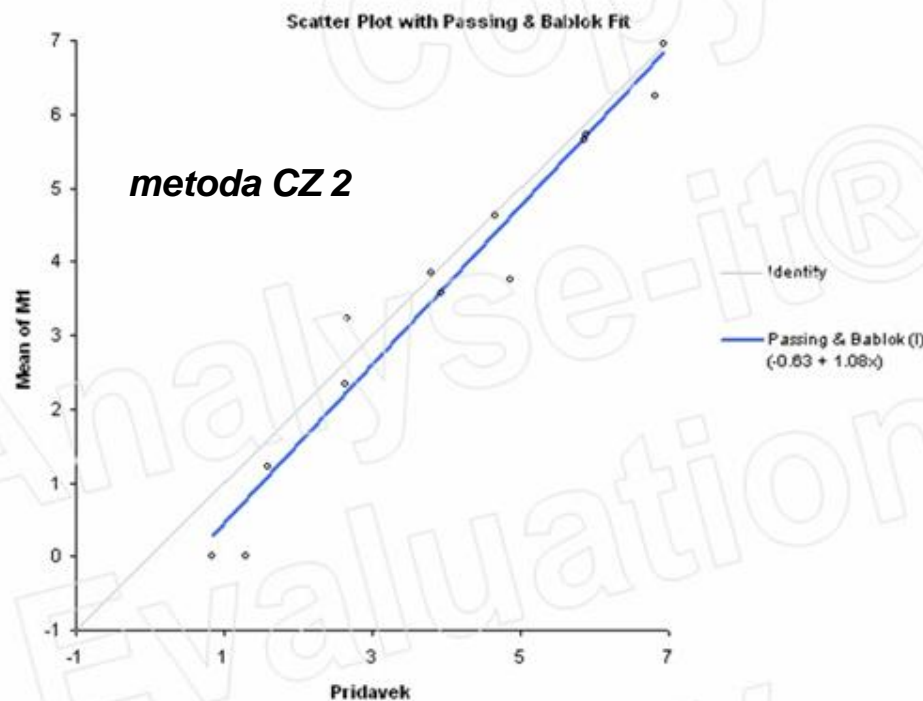
	Absolutní člen	95% interval spolehlivosti	Směrnice	95% interval spolehlivosti
CZ/CL	-1.20	-9.05 0.14	1.41	1.07 3.57

Parametr	CZ 2 - CL
Průměr	62,48
Směrodatná odchylka	106,36
Rozšířená nejistota	38,84
Konfidenční interval:	
Dolní mez x_L	23,64
Horní mez x_H	101,32



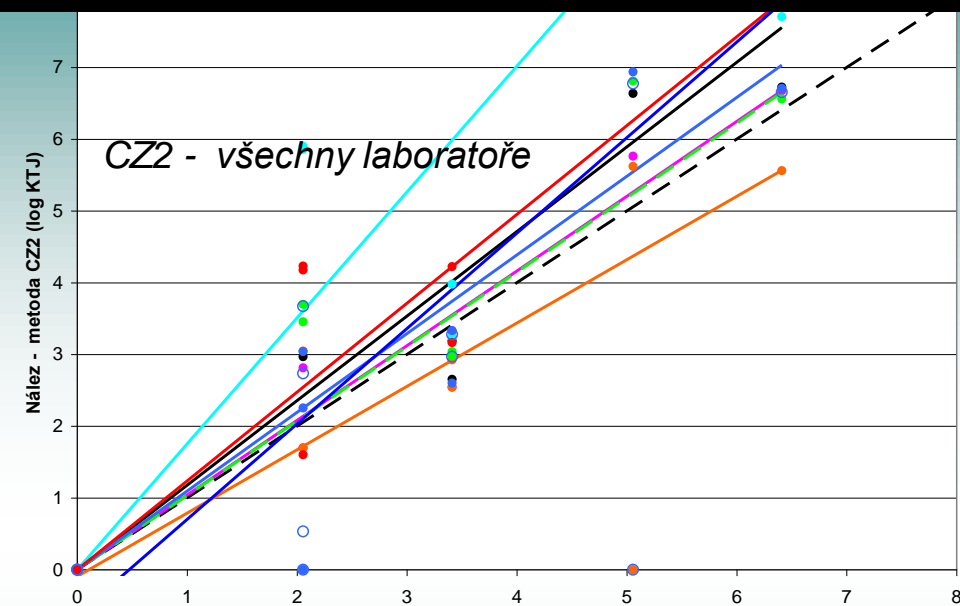
metody vykazují mezi sebou rozdíly
metoda CZ 2 dávala nižší výtěžnost pro daný soubor šetření než metoda CL 2
výsledky vzhledem k dostatečnému počtu vzorků jsou průkazné.

CL - Stanovení *E.coli* modifikovanou metodou Colilert, přídavky známého množství KTJ, SZÚ

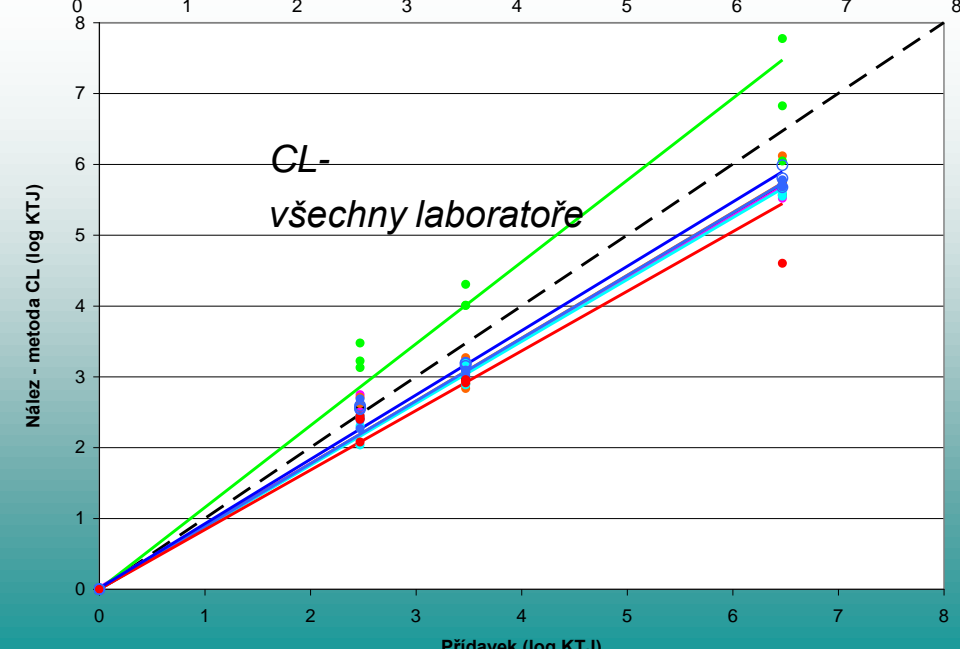


Lepší výsledky vykazuje metoda CL
mírné stejnoměrné podceňování výsledků v celém rozsahu testovaného souboru přídavků,
Metoda CZ 2 podceňuje výsledky pro nižší koncentrace

CL - Stanovení *E.coli* modifikovanou metodou Colilert, přídatky známého množství KTJ, MPZ



- LabA
- LabB
- LabC
- LabD
- LabE
- LabF
- LabG
- Průměr
- - - Identita
- PB LabA
- PB LabB
- PB LabC
- PB LabD
- PB LabE
- PB LabF
- PB LabG
- PB Průměr



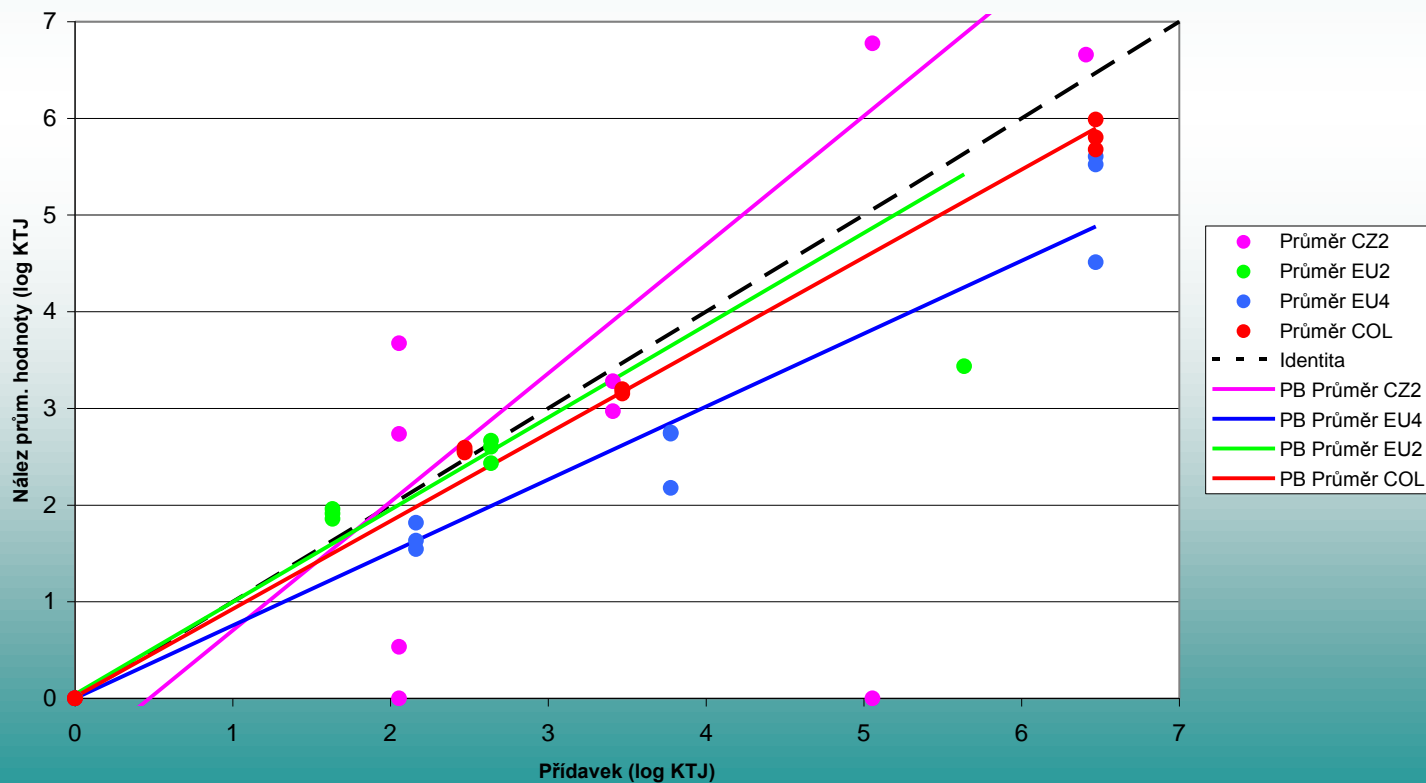
- LabA
- LabB
- LabC
- LabD
- LabE
- LabF
- LabG
- Průměr
- - - Identita
- PB LabA
- PB LabB
- PB LabC
- PB LabD
- PB LabE
- PB LabF
- PB LabG
- PB Průměr



CL - Stanovení *E.coli* modifikovanou metodou Colilert, přídavky známého množství KTJ, MPZ

Metoda	Opakovatelnost	Metoda	Shodnost
CZ 2	3,3756	CZ 2	1,4199
CL	0,1426	CL	0,0509

Metody pro *E. coli*

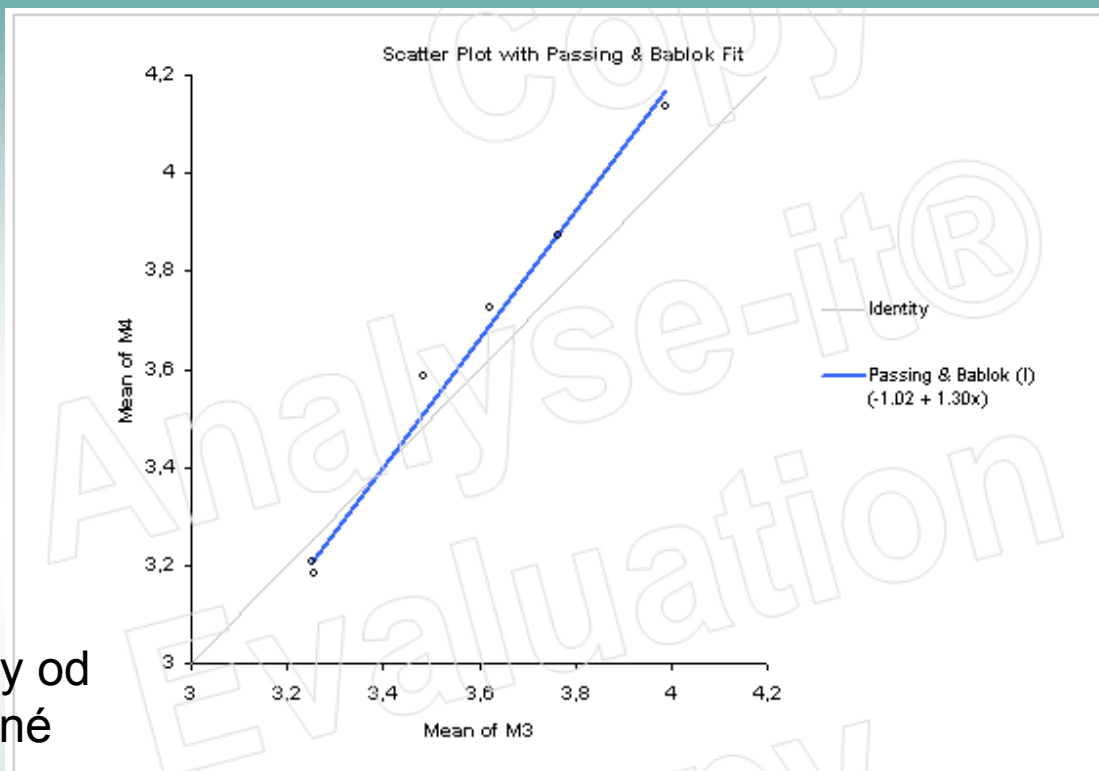


ENL - Stanovení enterokoků modifikovanou metodou Enterolert, reálné vzorky SZÚ

podle normy ČSN EN ISO 17994

Parameter	CZ 3 - ENL
Průměr	-28,03
Směrodatná odchylka	112,78
Rozšířená nejistota	22,90
Konfidenční interval:	
Dolní mez x_L	-50,93
Horní mez x_H	-5,13

metoda ENL dává rozdílné výsledky od metody CZ 3. Výsledky jsou průkazné pro daný soubor šetření.



metody zcela rozdílné výsledky
metoda CZ 3 ve srovnání s metodou ENL
nadhodnocuje v oblasti vyšších koncentrací

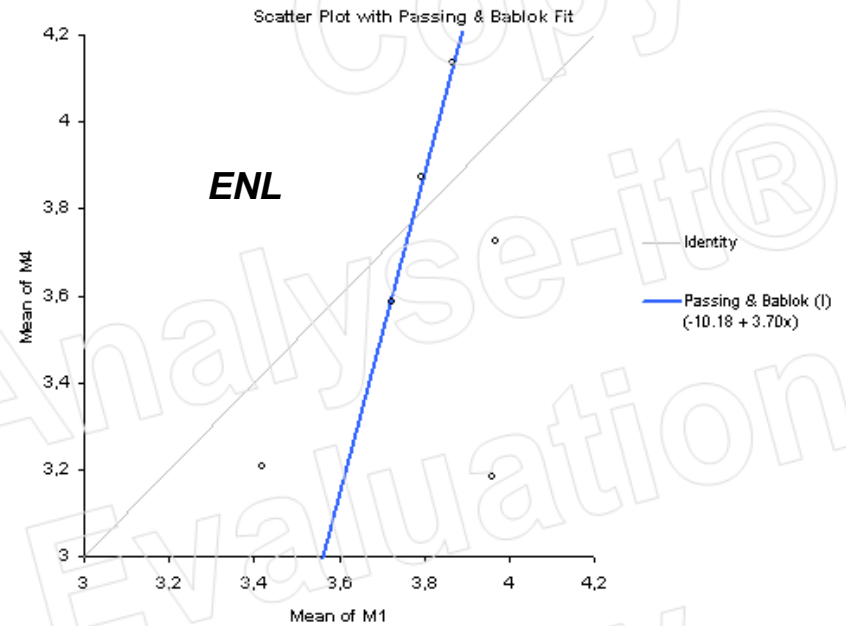
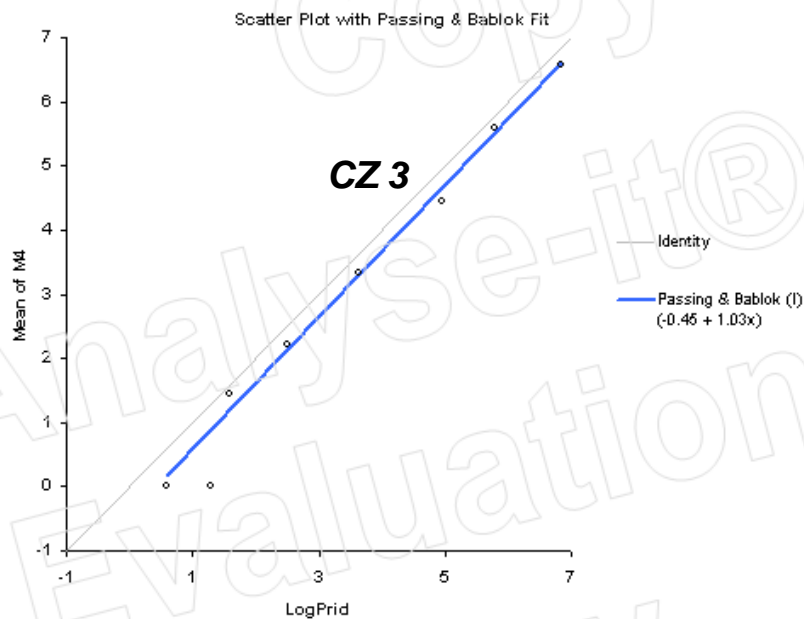
Robustní lineární regrese P a B

	Absolutní člen	95% interval spolehlivosti	Směrnice	95% interval spolehlivosti
CZ 3 / ENL	-1.02	-2.66...0.01	1.30	1.03...1.78

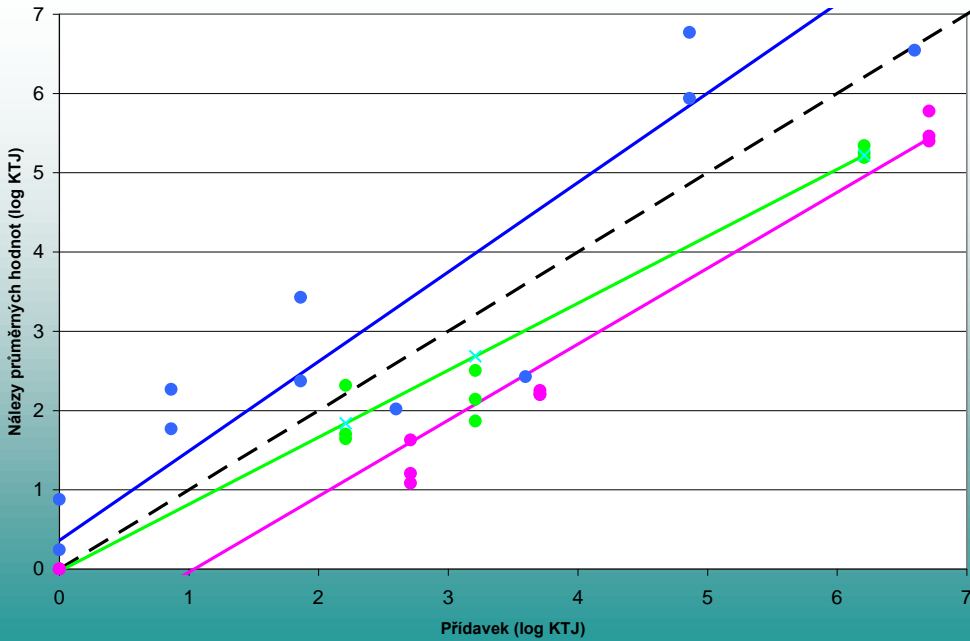
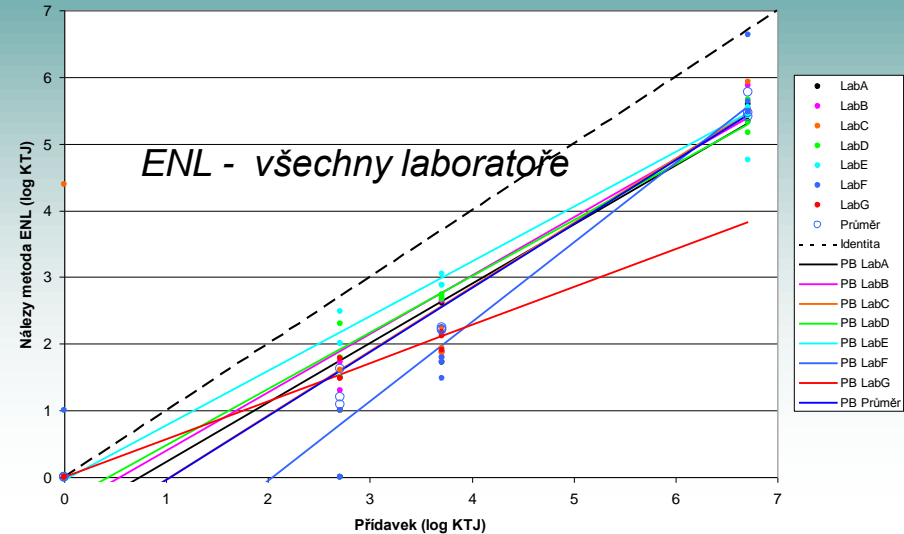
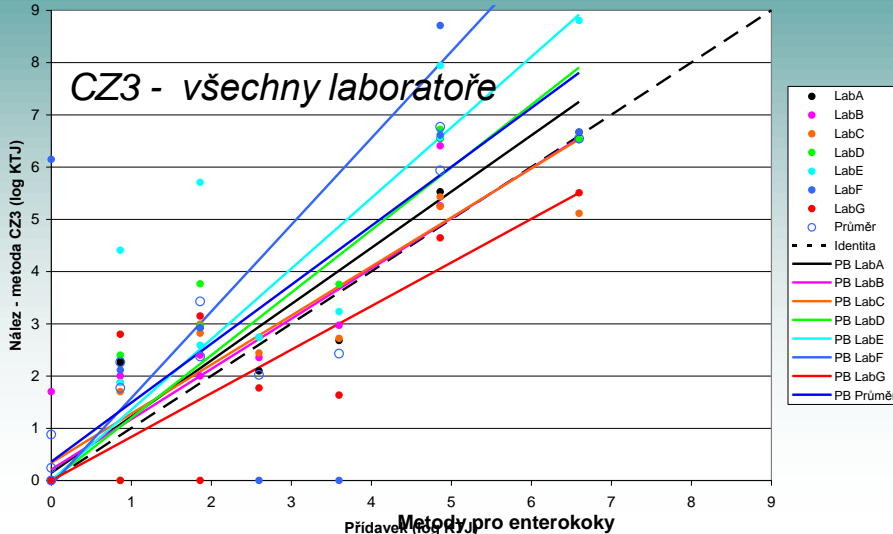
ENL - Stanovení enterokoků modifikovanou metodou Enterolert, přídavky, SZÚ

Metoda	Absolutní člen	95% interval spolehlivosti	Směrnice	95% interval spolehlivosti
CZ 3	-0.45	-1.40 -0.06	1.03	0.92 1.24
ENL	-0.06	-0.61...0.22	0.97	0.84...1.08

lepší výsledky vykazuje metoda metoda CZ 3
největší chybu je nutno očekávat u metody ENL



ENL - Stanovení enterokoků modifikovanou metodou Enterolert, přídavky MPZ



Závěr:

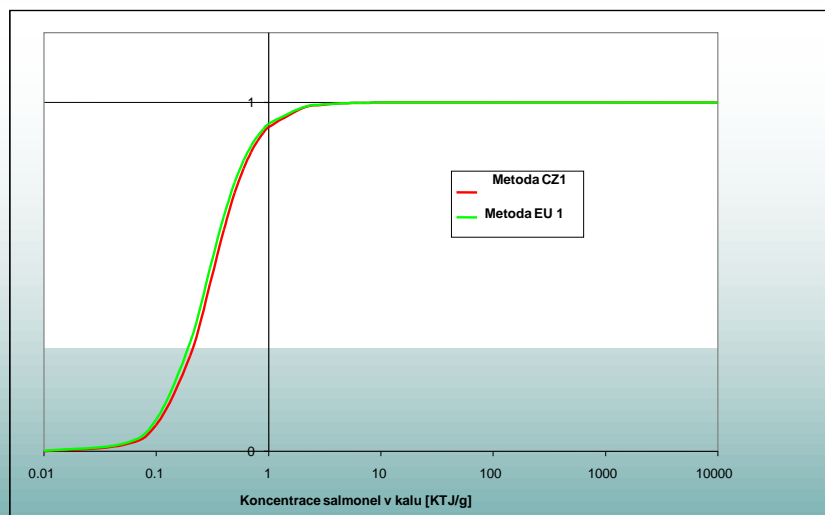
Lze použít metody Enterolert a Colilert pro stanovení indikátorových organismů v čistírenských kalech?????



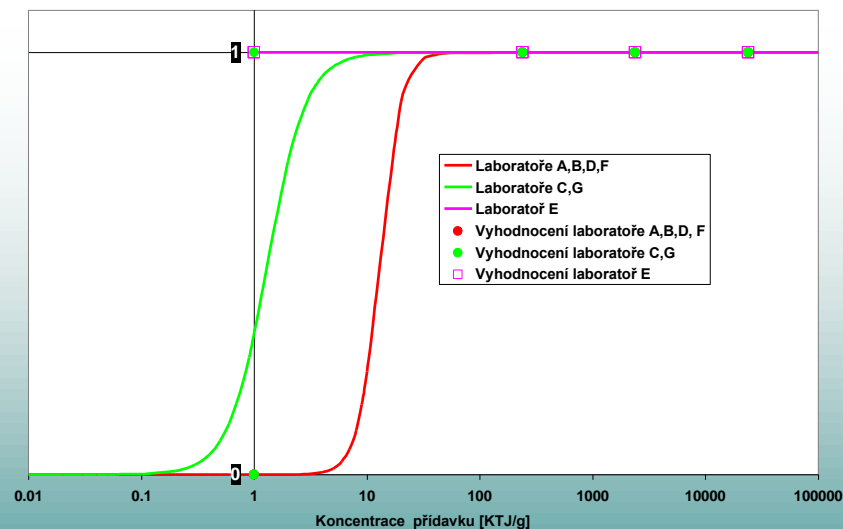
**Colilert ano
Enterolert nedoporučujeme**

Ověřování základních parametrů mikrobiologických metod pro stanovení indikátorových organismů

Salmonely Porovnávané metody EU 1, EU 9, EU 10, CZ1.
EU 1 - CZ 1



Porovnání odezvy metody CZ 2 a EU 1



*Porovnání odezvy metody EU 1
na koncentraci salmonel*

metoda	laboratoř	Přídavek (KTJ/g)			
		0	2,3.10 ²	2,3.10 ³	2,3.10 ⁴
EU 1	A	---	+++	+++	+++
	B	---	+++	+++	+++
	C	-+-	+++	+++	+++
	D	---	+++	+++	+++
	E	+++	+++	+++	+++
	F	---	+++	+++	+++
	G	--+	+++	+++	+++
+ pozitivní nález, - negativní nález					

EU 9, EU 10

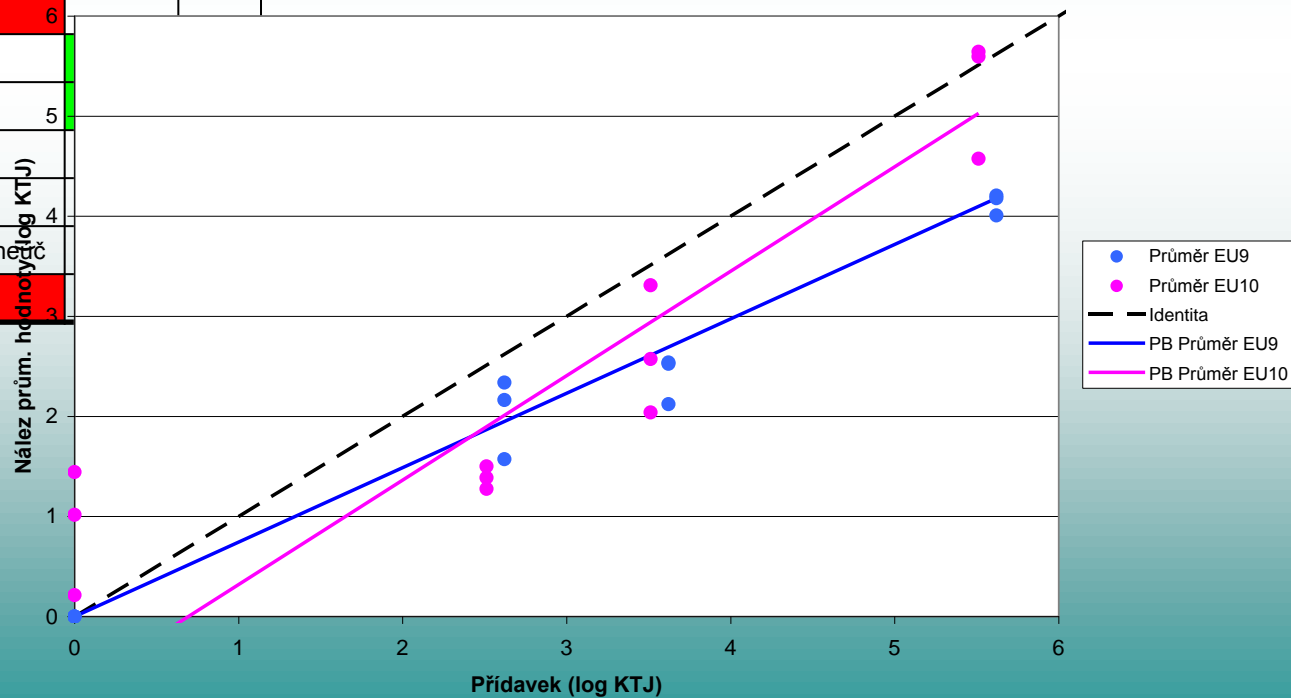
Metoda	Shodnost	Metoda	Opakovatelnost
EU 9	0,1862	EU 9	0,5213
EU 10	0,4943	EU 10	1,3841

Metoda	laboratoř	absolutní člen	95% interval spolehlivosti	směrnice	95% interval spolehlivosti
EU 9	A	0	-1,35 – 0,19	0.8295	0,67 – 1,16
	B	0	-1,29 – 0,27	0.8295	0,64 – 1,14
	C	0	-,81 – 0,09	0.6573	0,56 – 0,91
	D	0	-1,56 – 0,08	0.7271	0,53 – 1,17
	E	- 0,0160	-1,24 -0,00	0,6573	0,53 – 1,00
	F	0,1893	-0,12 – 0,99	0.7357	0,53 – 0,91
	G	0	-4,68 – 0,76	0.6232	0,34 – 2,40
	Metoda*	0	-0,70 – 0,27	0.7435	0,62 – 0,89
EU 10	A	- 0,4084	-2,30 – 0,00	1,0739	0,89 – 1,58
	B	- 0,3848	-3,13 – 0,062	1,0587	0,70 - 1,76
	C	nevyhodnoceno	nevyhodnoceno	nevyhodnoceno	nevyhodnoceno
	D	- 0,3559	-3,36 – 0,16	1,0482	0,79 – 1,80
	E	nevyhodnoceno	nevyhodnoceno	nevyhodnoceno	nevyhodnoceno
	F	neúčast	neúčast	neúčast	neúčast
	G	0,0485	-4,32 – 1,12	0,7197	0,09 – 2,06
	Metoda*	-0,7230	-2,46 – 0,66	1,0132	0,64 – 1,51

	Rs*	Ri**	Nej	Použ	Ne po
Metoda EU 9					
Lab A	0,1705	0			
Lab B	0,1705	0			
Lab D	0,2729	0			
Lab F	0,2647	0,1893			
Lab C	0,3426	0			
Lab E	0,3427	0,0160			
Lab G	0,3768	0			
metoda	0.2765	0			
Metoda EU 10					
LabD	0,0482	0,3559			
LabB	0,0587	0,3848	6		
LabA	0,0739	0,4084			
LabG	0,2803	0,0485	5		
LabE	ne	ne			
LabC	ne	ne			
LabF	neúčast	neúčast	neúčast		
metoda	0,0132	1,0996			

Porovnání metody EU9 a EU10– prům. hodnoty

Metody pro salmonely



Escherichia coli EU 2, CZ 2, EU 5, CL. *přídavky KTJ*

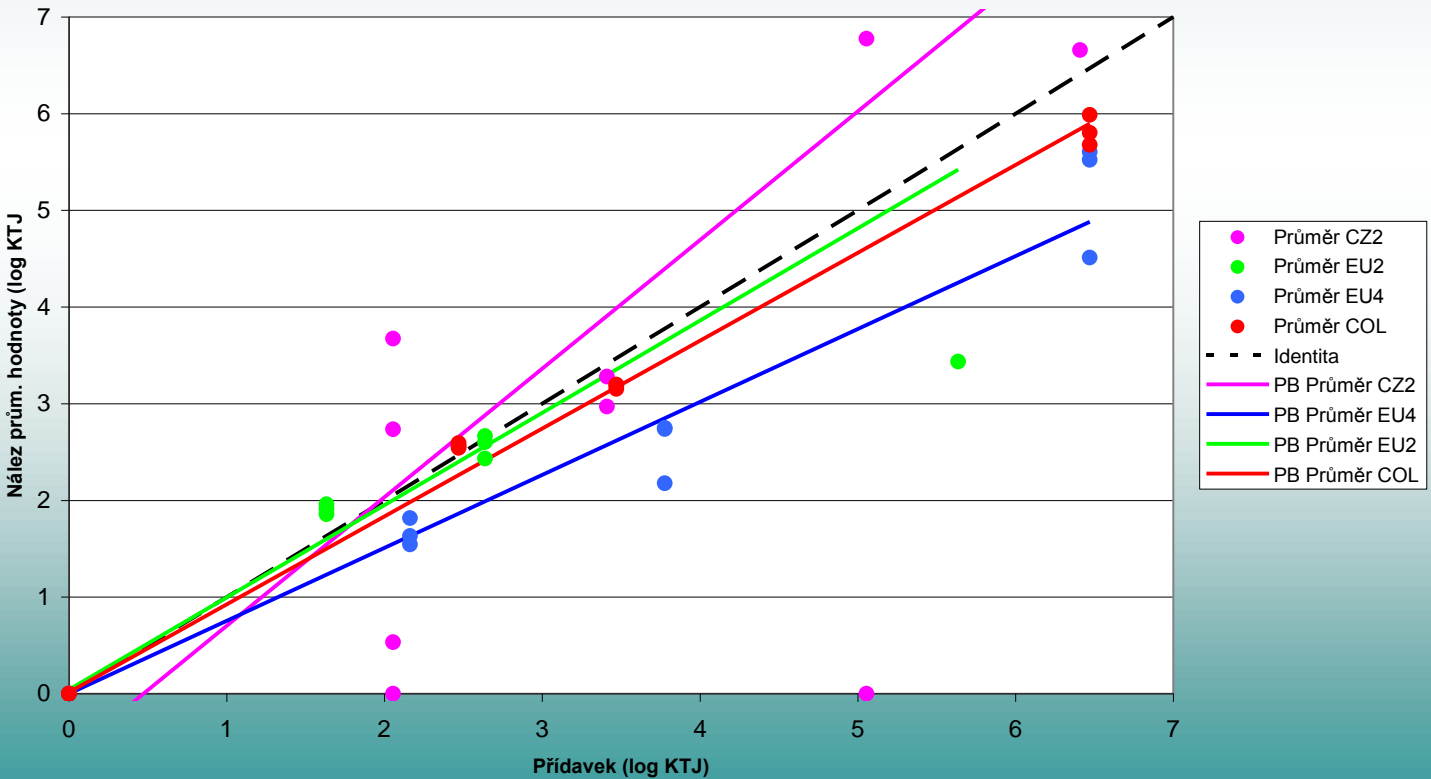
	Rs*	Ri**	nej	pou	np
Metoda CZ 2					
Lab D	0,0379	0			
Lab B	0,0415	0			
Lab F	0,0972	0			
Lab C	0,1167	0,0936			
Lab A	0,1788	0			
Lab G	0,2384	0			
Lab E	0,7555	0			
laboratoře	0,3306	0,6291			
Metoda EU 2					
LabA	0,0040	0			
LabC	0,0192	0			
LabD	0,0233	0			
LabG	0,0957	0			
LabB	0,1007	0			
LabE	0,1007	0			
LabF	neúčast	neúčast	neúčast	neúčast	
laboratoře	0,0457	0,0425			

Metoda EU 4					
LabD	0,07758	0			
LabA	0,09202	0			
LabF	0,10930	0,06489			
LabB	0,13479	0,11827			
LabE	0,24642	1,27809			
LabC	0,29540	0			
LabG	1	3,96848			
laboratoře	0,2456	0			
Metoda CL					
Lab C	0,11332	0			
Lab F	0,11411	0			
Lab A	0,11870	0			
Lab E	0,12556	0			
Lab B	0,12630	0,02915			
Lab D	0,15530	0			
Lab G	0,15841	0			
laboratoře	0,0913	0,0162			

Escherichia coli EU 2, CZ 2, EU 5, CL. *přídavky* KTJ

Metoda	Shodnost	Metoda	Opakovatelnost
CZ 2	1,4199	CZ 2	3,3756
EU 2	0,0571	EU 2	0,1599
EU 4	0,3163	EU 4	0,8856
CL	0,0509	CL	0,1426

Metody pro E. coli



Porovnání metod E. coli

Enterokoky : EU 5, CZ 3, ENL. – přídavky KTJ

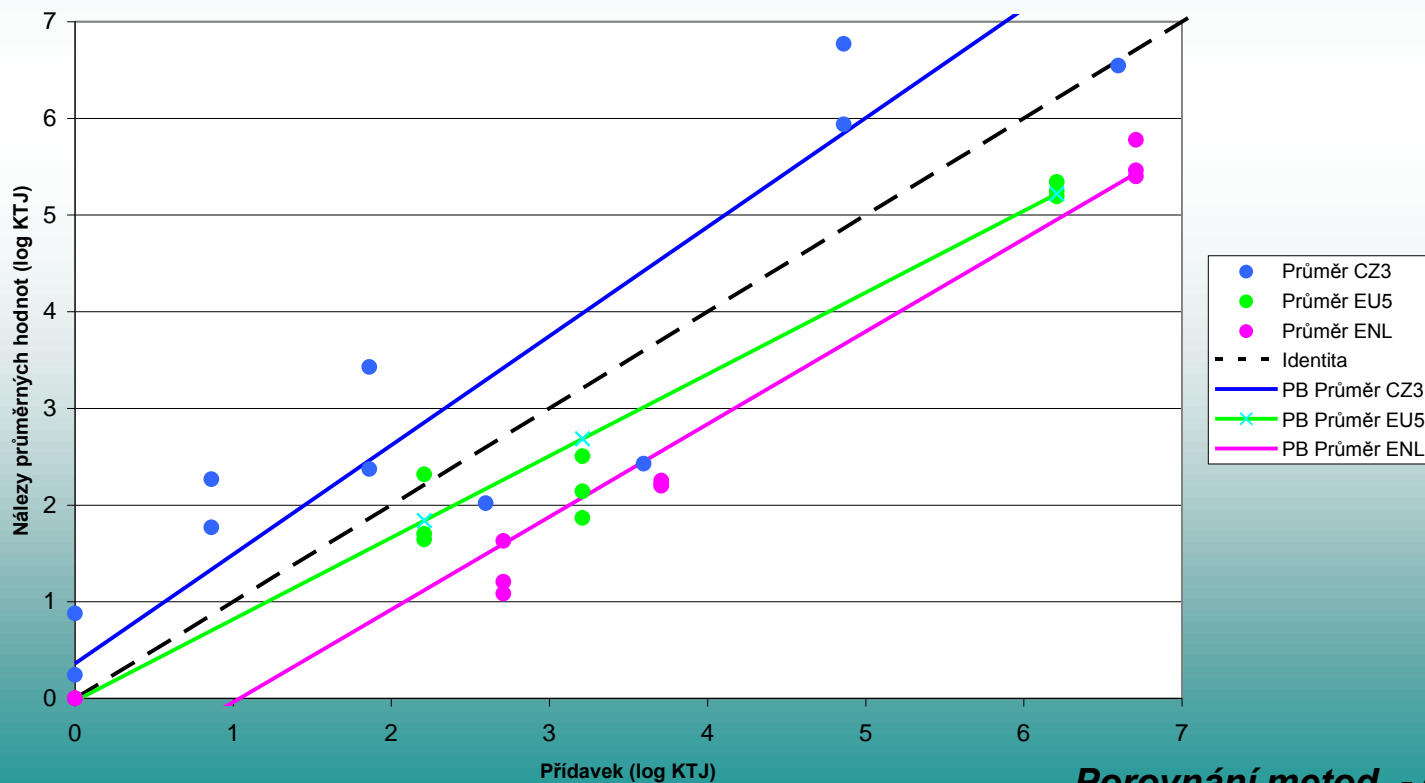
	Rs*	Ri**	nej	použ	np
Metoda CZ 3					
LabB	0,0383	0,2097			
LabC	0,0607	0,3383			
LabA	0,0770	0,1451			
LabG	0,1655	0			
LabD	0,1985	0			
LabE	0,3516	0			
LabF	0,6585	0,0815			
laboratoře	0,1289	0,3595			
Metoda EU 5					
LabC	0,0946	0			
LabA	0,1159	0			
LabD	0,1133	0			
LabG	0,1178	0			
LabB	0,1301	0,0056			
LabE	0,1405	0			
LabF	0,3557	0,0147			
laboratoře	0,1549	0,0282			

Metoda ENL					
LabD	0,03647	0,99792			
LabA	0,10817	0,66964			
LabF	0,12426	0,48546			
LabB	0,15633	0,36368			
LabE	0,17993	0,04414			
LabC	0,19188	2,44204			
LabG	0,43000	0			
laboratoře	0,0001	-1,2714			

Enterokoky: EU 5, CZ 3, ENL. – přídavky KTJ

Metoda	Shodnost	Opakovatelnost
CZ 3	0,4826	1,3512
EU 5	0,2313	0,6477
ENL	0,2111	0,5911

Metody pro enterokoky



Porovnání metod - enterokoky

Clostridium perfringens : EU7 a EU 8 přídavky KTJ

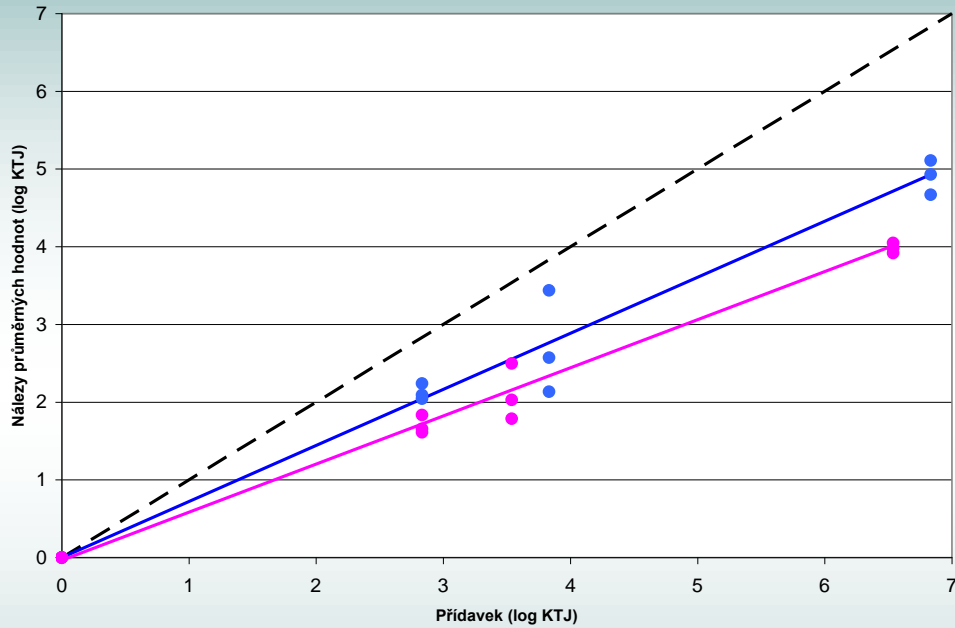
	Rs*	Ri**	nej	použ	np
Metoda EU 7					
LabA	0,0413	0			
LabF	0,0016	0,7797			
LabB	0,1424	0,1229			
LabE	0,2636	0,6264			
LabC	0,3355	0,7342			
LabD	nehodnoceno	nehodn			
LabG	neúčast	neúčast			
laboratoře	0,4057	0,6548			
Metoda EU 8					
LabA	0,0635	0,2009			
LabB	0,0692	0,1641			
LabE	0,1596	0			
LabD	0,2873	1,3617			
LabF	0,6700	1,6334			
LabC	nehodnoceno	nehodn			
LabG	neúčast	Neúčast			
laboratoře	0,4943	0,6412			

EU7

EU 8

Clostridium perfringens : EU7 a EU 8 přídavky KTJ

Metody pro Cl. perfringens

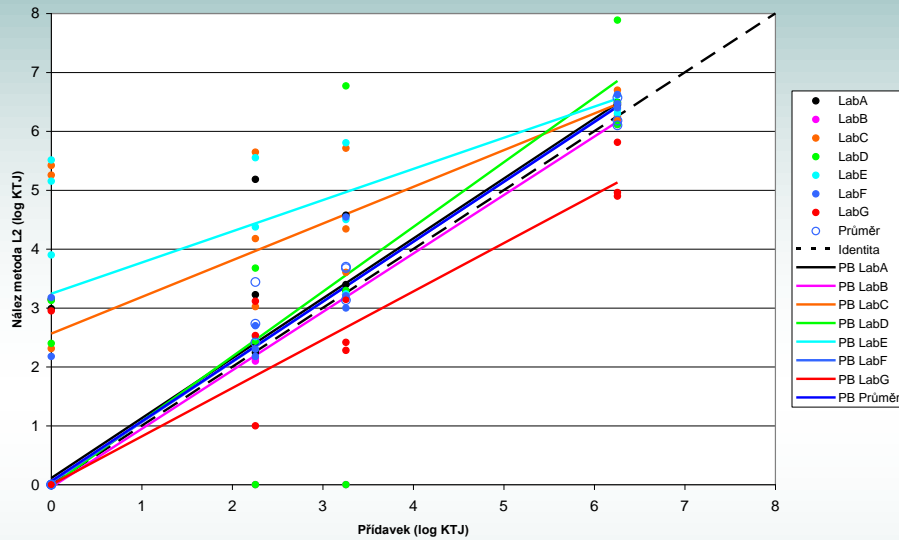


Metoda	Shodnost
EU7	0,4231
EU8	0,1431

Metoda	Shodnost
EU7	1,1846
EU8	0,4008

- Průměr EU7
- Průměr EU8
- - - Identita
- PB EU7 Průměr
- PB EU8 Průměr

Listerie monocytogenes : EL2



EL 2- všechny laboratoře

	Rs*	Ri**	nej	použ	np
Metoda EL2					
LabB	0,0076	0,0438			
LabA	0,0173	0,1117			
LabF	0,0215	0,0407			
LabD	0,0994	0,0216			
LabG	0,1796	0			
LabC	0,3769	2,5645			
LabE	0,4706	3,2436			
laboratoře	0,0618	0,0157			

CEN/TR 15215-3 Detection and enumeration of *Salmonella spp.* in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes - Part 3: Presence/absence method by liquid enrichment in peptone-novobiocin medium followed by Rapport-Vassiliadis - **EU 1**

CEN/TR 15215-2 Detection and enumeration of *Salmonella spp.* in sludges, soils, soil improvers, growing media and bio-wastes - Part 2: Liquid enrichment method in selenite-cystine medium followed by Rapport-Vassiliadis for semi-quantitative Most Probable Number (MPN) determination – **EU 10**

CEN/TR 15214-1 Detection and enumeration of *Escherichia coli* in sludges, soils, soil improvers, growing media and bio-wastes - Part 1: Membrane filtration method for quantification –**EU2**

Stanovení *E.coli* metodou Colilert - **CL**

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 7**

Soils, sludges and treated bio-wastes — Isolation and enumeration of intestinal enterococci in sludges, soils and treated biowastes – Part 1: Membrane filtration method onto selective agar –**EU 5**

Stanovení enterokoků dle AHEM 7/2001 – **CZ 3**

ČSN EN ISO 11290-2/A1 (1999/2005): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* - Část 2: Metoda stanovení počtu – **EL 2.**

Finanční náklady na jednotlivé metody

metoda		cena*
Stanovení <i>E. coli</i> filtrační metodou	EU 2	237,57,-
<i>E.coli</i> metoda Colilert 18	CL	274,-až 410,-
Stanovení enterokoků filtrační metodou	EU 5	155,16,-
Stanovení salmonel P/A	CZ 1	1276,07,-
Stanovení salmonel P/A	EU 2	1254,87,-
Stanovení salmonel metodou MPN	EU 10	1448,13,-
Stanovení <i>Clostridium perfringens</i> filtrační metodou	EU 7	499,02
Stanovení počtů <i>Listeria monocytogenes</i>	EL 2	989,77,-
Stanovení termotolerantních koliformních bakterií	CZ 2	273,4,-
Stanovení enterokoků	CZ 3	95,05,-

cena je vždy na 1 vzorek do pátého ředění, kromě P/A

nové metody

stávající metoda, která je ponechána

stávající metody

Navržené změna v právních předpisech

Návrh pro metodický návod pro stanovení indikátorových organismů v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalech z čistíren odpadních vod, digestátech, substrátech kompostech, pomocných růstových prostředcích, sedimentech a podobných maticích.

Indikátorový mikroorganismus	Jednotky	Počet zkoušených vzorků při každé kontrole výstupu**		Limit (nález/ KTJ*)
<i>Salmonella spp.</i>	nález v 50g	5		negativní
<i>Escherichia coli</i>	KTJ* / 1 g	5	1	$< 5 \cdot 10^3$
			4	$< 10^3$
<i>Enterokoky</i>	KTJ* / 1 g	5	1	$< 5 \cdot 10^3$
			4	$< 10^3$

Roční produkce zařízení Kal ČOV	Jednotky	Četnost kontrol výstupů
Do 150	t	1 x za rok
0 – 1000	t	2 x za rok
1001 – 5000	t	4 x za rok
5001 a více	t	12 x za rok
Velikost uskladněné hromady	t	Počet jednorázově odebraných vzorků
do 50	t	1 šarže (1x5vzorků)
51 - 100	t	2 šarže
100 - a více	t	2 šarže + na každých dalších 50t 1 šarže

Otázky?

Děkuji za pozornost