



VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE  
Fakulta technologie ochrany prostředí  
Ústav technologie vody a prostředí



# Porovnání alternativní a klasické kultivační metody detekce somatických kolifágů

Bc. David Janák, Ing. Jana Zuzáková,  
doc. RNDr. Jana Říhová Ambrožová, Ph.D.  
Vodárenská biologie 2021, 10.2.2021

# Hlavní cíle práce

- **Porovnání výsledků stanovení somatických kolifágů pomocí metod ČSN EN ISO 10705-2 a kitu Bluephage BP1601**
- **Vyzkoušení odlišných podmínek pro různé metody (55 °C a 45 °C)**
- **Posouzení použitelnosti kitového stanovení Bluephage BP1601**

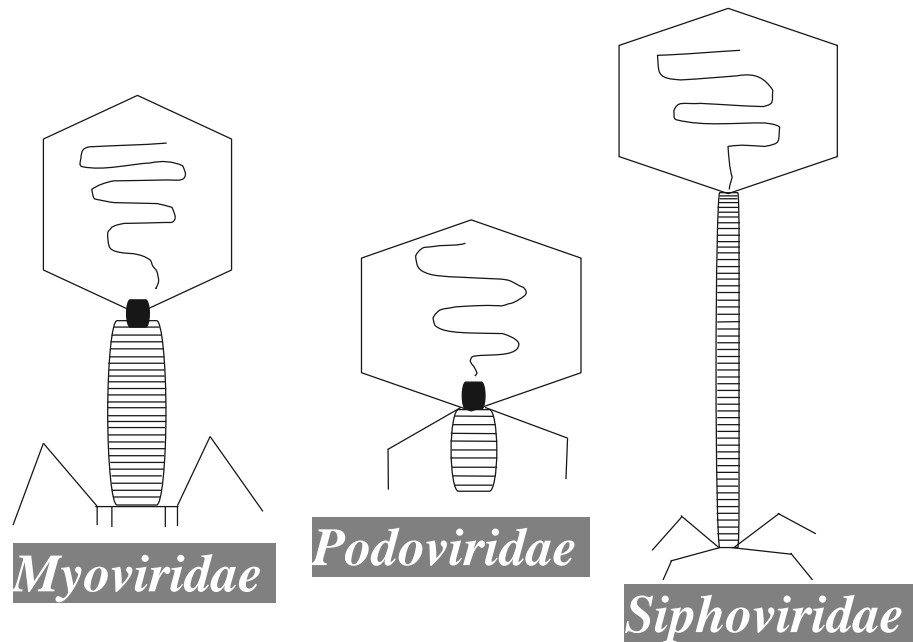
# Důvody stanovení somatických kolifágů

- **Indikátorové mikroorganismy:** fekální znečištění  
přítomnost virů
- **Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184  
o jakosti vody určené k lidské spotřebě**
  - provozní monitoring: <50 PTJ/100 ml surová voda
- **Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741  
o minimálních požadavcích na opětovné využívání vody**
  - validační monitoring

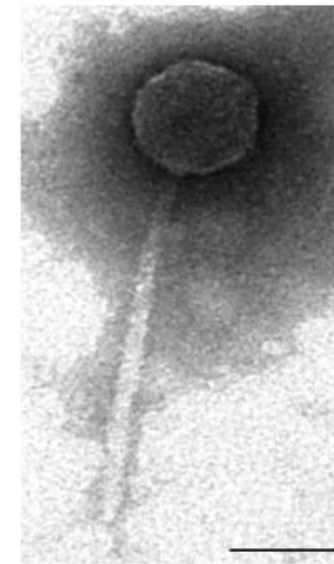
PTJ.....Plaky tvořící jednotku

# Taxonomie somatických kolifágů

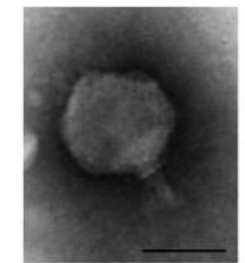
- dsDNA a ssDNA viry



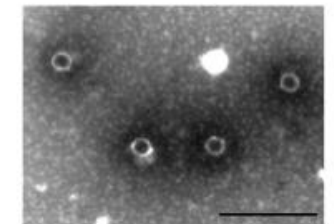
**Myoviridae**



**Siphoviridae**



**Podoviridae**



**Microviridae**

Jebri, S., et al., *General and host-associated bacteriophage indicators of faecal pollution*, in *Global Water Pathogen Project*. 2019.

Elbreki, M., et al., *Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment*. *Journal of Viruses*, 2014.

# Metody stanovení somatických kolifágů

- **ČSN EN ISO 10705-2**

Dvouvrstvá plaková titrace > 3 PTJ/ml

- **ČSN ISO 10705-3**

Koncentrační metody < 3 PTJ/ml

Flokulace, Membránová filtrace

Elektropozitivní filtr

- **U.S. EPA 1601**

Jednovrstvá plaková titrace

- **Stanovení pomocí komerčně dostupných kitů**

Bluephage, Fast Phage PA



<https://www.bluephage.com/index.php/project/bp1604/>

# Postup stanovení

- **ČSN EN ISO 10705-2**

2,5 ml ssMSA + 1 ml vzorek + 1 ml hostitelský kmen *E.coli*

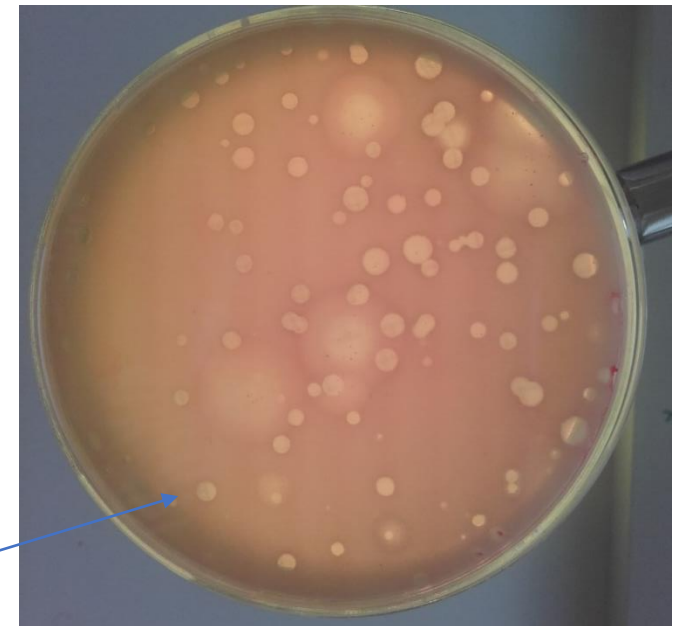
teplota vodní lázně 45 °C, přídavek TTC

-> rozlití na vrstvu MSA v Petriho misce

-> zatuhnutí druhé vrstvy

inkubace: 18 h ± 2 h, 36 °C ± 2 °C,

závěsná poloha-> odečet plaků



Plak

# Postup stanovení

- **Bluephage BP1601**

2,5 ml ssMSA + nalidixová kyselina + 1ml vzorek

+ 1 ml hostitelský kmen *E.coli* WG5

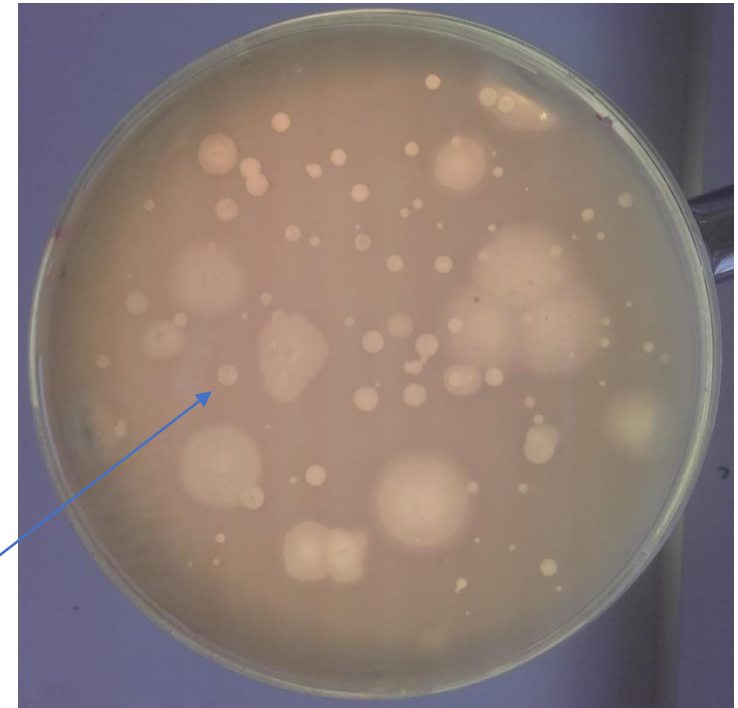
teplota vodní lázně 55 °C

-> rozlití na vrstvu MSA v Petriho misce

-> zatuhnutí druhé vrstvy

inkubace: 18 h ± 2 h, 36 °C ± 2 °C,

závěsná poloha-> odečet plaků



Plak

# Odlišnosti jednotlivých stanovení

	<b>BLUEPHAGE BP1601</b>	<b>ČSN EN ISO 10705-2</b>
<b>Teplota vodní lázně</b>	<b>55 °C</b>	<b>45 °C</b>
<b>Hostitelský kmen <i>E. coli</i></b>	<b>WG 5</b>	<b>CNCTC 5005</b>
<b>Ostatní</b>	<b>kyselina nalidixová</b>	<b>x</b>



# Obsah kitu Bluephage BP1601

- 10 x *E. coli* WG5
- nalidixová kyselina
- 3 ml destilovaná voda
- 1 ml 1M NaOH
- 1,8 ml 1M chloridu vápenatého
- 5 x bakteriofág ΦX174
- 5 x 2 ml fosfátový pufr (PBS)
- 10 x polotekutý modifikovaný Scholtensův agar (ssMSA)
- 10 x modifikovaný Scholtensův bujón (MSB)
- 70 x 10 ml zkumavky



[Bluephage S.L. \(@bluephageWATER\) / Twitter](https://twitter.com/bluephageWATER)

# Výsledky – reálné vzorky

Vzorek	Teplota vodní lázně (°C)	BP1601 (PTJ/ml)	ČSN EN ISO 10705-2 (PTJ/ml)
Přítok ČOV 2	45	2500	Přerostlé doprovodnou mikroflórou
Odtok ČOV 2	45	2	2
Odtok ČOV 1	45	23	20
Vltava nad ÚČOV	45	3	0
Odtok ČOV 3	45	65	63
Odtok ČOV 3	55	21	12

# Výsledky – reálné vzorky (odtok ČOV)

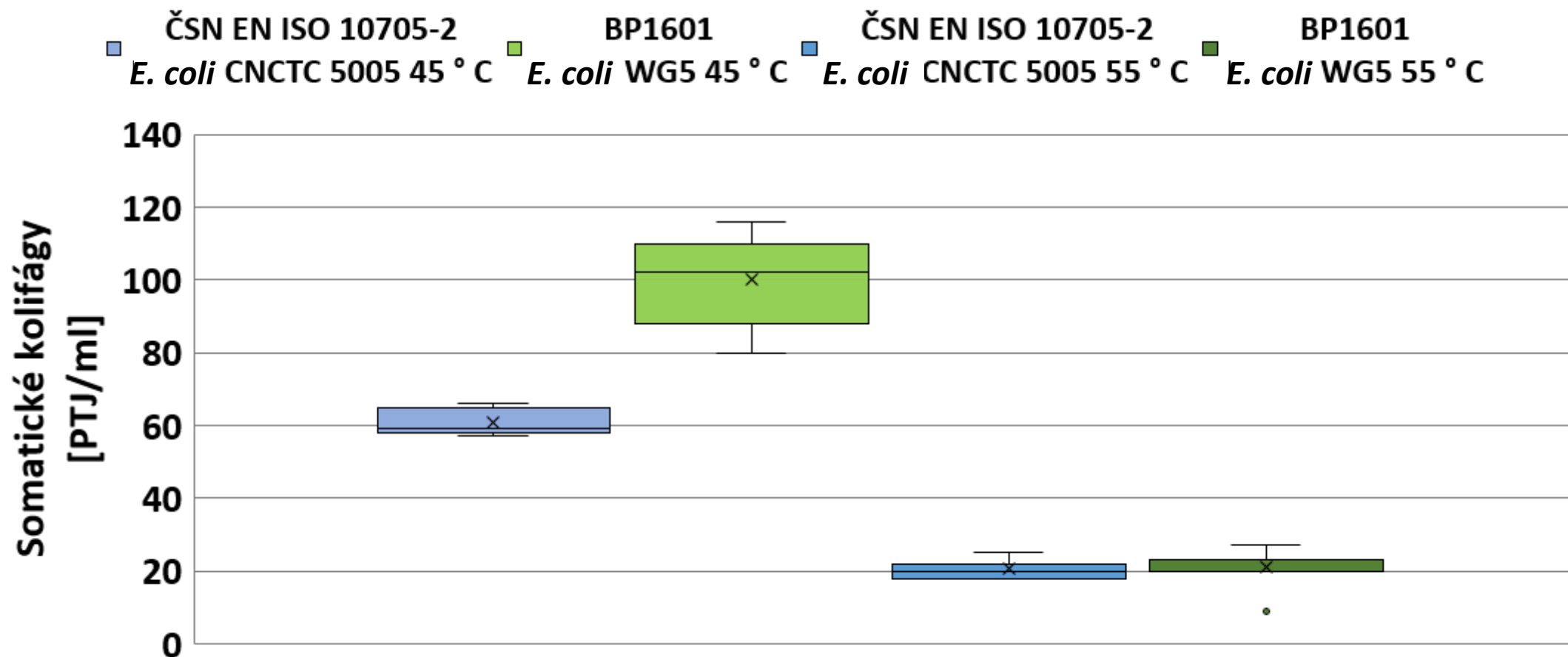
	Paralelní stanovení	teplota vodní lázně 45° C		teplota vodní lázně 55° C	
		ČSN EN ISO 10705-2 (PTJ/ml)	BP1601 (PTJ/ml)	ČSN EN ISO 10705-2 (PTJ/ml)	BP1601 (PTJ/ml)
01.12.2020	1	60	62	11	21
	2	66	68	13	20
	průměr	63	65	12	20,5
08.12.2020	1	42	39	30	25
	2	64	38	58	23
	průměr	53	38,5	44	24
15.12.2020	1	72	88	90	67
	2	68	86	69	87
	průměr	70	87	79,5	77

# Výsledky – modelové vzorky

modelový vzorek = připraven dle ČSN ISO 10705-3

Paralelní stanovení	teplota vodní lázně 45° C		teplota vodní lázně 55° C	
	ČSN EN ISO 10705-2 (PTJ/ml)	BP1601 (PTJ/ml)	ČSN EN ISO 10705-2 (PTJ/ml)	BP1601 (PTJ/ml)
1	58	116	20	27
2	66	88	22	23
3	57	110	18	9
4	58	110	19	23
5	59	80	25	20
6	65	102	18	21
7	62	94	22	23

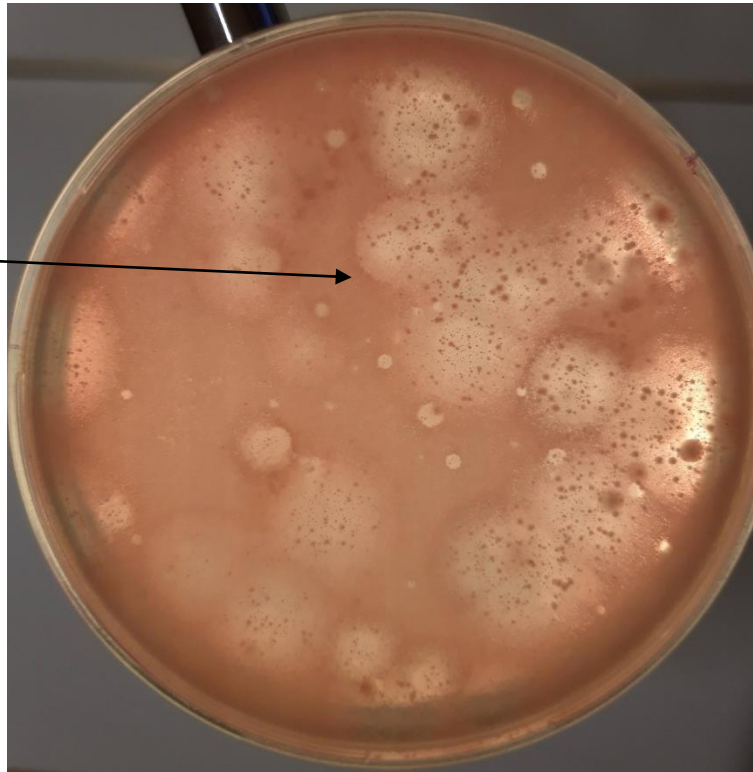
# Výsledky – modelové vzorky



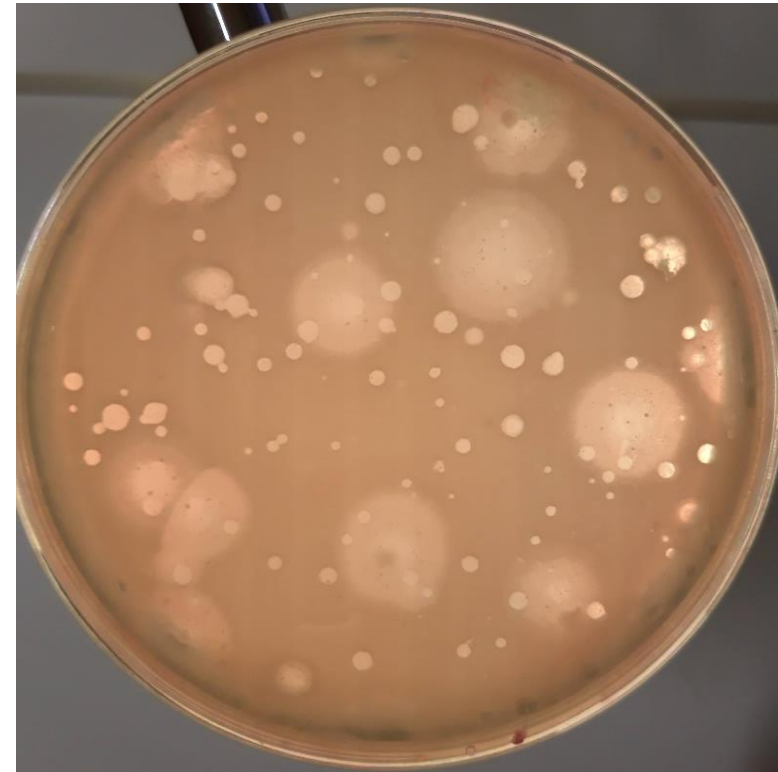
# Výsledky – modelové vzorky

**ČSN EN ISO 10705-2**  
***E. coli* CNCTC 5005**

Vyhodnocení  
ovlivněno  
výskytem  
doprovodné  
mikroflóry



**Bluephage BP1601**  
***E. coli* WG5 + nalidixová kyselina**



# Shrnutí výsledků analýz

- ČSN EN ISO 10705-2: teplota vodní lázně **45 °C**
- Bluephage: teplota vodní lázně **55 °C**  
lepší manipulace s polotekutým médiem X **falešně negativní výsledky**
- Stanovení modelových vzorků pomocí **ČSN EN ISO 10705-2**  
nižší počet PTJ/ml způsoben rušením doprovodnou mikroflórou
- V Bluephage BP1601 zahrnut kmen ***E. coli* WG5 + nalidixová kyselina**  
->možnost stanovení mikrobiálně zatížených vod – eliminace doprovodné mikroflóry

# Výhody a nevýhody

## Bluephage BP1601

## ČSN EN ISO 10705-2

Výhody	+ ihned k použití (po přípravě MSA)	+ pořizovací náklady při rutinním stanovení
	+ připravená média ssMSA a MSB	
Nevýhody	- pořizovací náklady	- časová náročnost příprav (zejm. hostitelského kmene, dále ssMSA, MSB a chemikálií)
	- kity neobsahují - Petriho misky, MSA agar	- nutnost optimalizace a osvojení si metody v laboratoři



Děkuji za pozornost

