

VYUŽITÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE PRO DETEKCI ÚČINNOSTI FILTRACE BAKTERIÍ V PROCESECH ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD

P. Mikula ^{a*}, J. Lev ^{b,c}, L. Kalhotka ^b, M. Holba ^{a,c}, D. Kimmer ^d, B. Maršálek ^a, M. Vítězová ^b

a) Botanický ústav Akademie věd ČR, Oddělení experimentální fykologie a ekotoxikologie, Lidická 25/27, 602 00 Brno

b) Mendelova univerzita v Brně, Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Zemědělská 1, 613 00 Brno

c) ASIO s.r.o., Tuřanka 1, 627 00 Brno

d) SPUR a.s., třída Tomáše Bati 299, 764 22 Zlín

*[*premysl.mikula@centrum.cz](mailto:premysl.mikula@centrum.cz)*

Technologie čištění a úprav (odpadních) vod

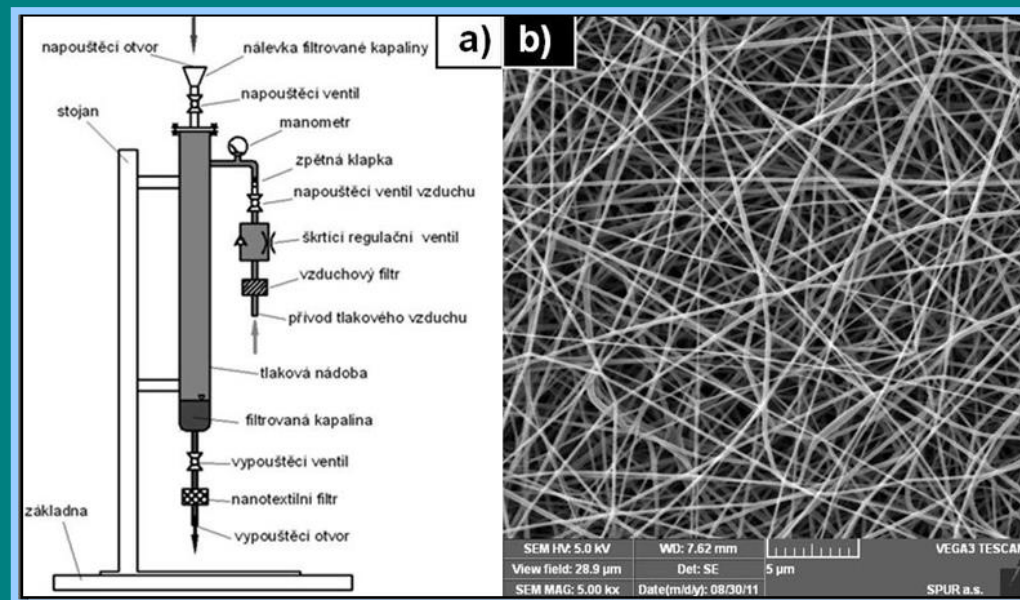
- cílem zajištění odpovídající hygienické kvality čištěné vody s ohledem na:
 - a) možnou kontaminaci organickými polutanty
 - b) možnou kontaminaci těžkými kovy
 - c) možný výskyt cyanotoxinů
 - d) výskyt potenciálně patogenních mikroorganismů
- legislativa upravující mikrobiologické požadavky na kvalitu vod:
 - a) vyhl. 252/04 Sb. (ve znění 187/05 Sb. resp. 293/06 Sb.) – požadavky na pitnou vodu
 - b) vyhl. 275/04 Sb. – zdravotní nezávadnost balených vod
 - c) nař. vlády 61/03 Sb. (ve znění 229/07 Sb., resp. 23/11 Sb.) - přípustná znečištění povrchových a odp. vod
 - d) ČSN 757143 - požadavky na jakost vody určené na závlahu

Technologie čištění a úprav (odpadních) vod

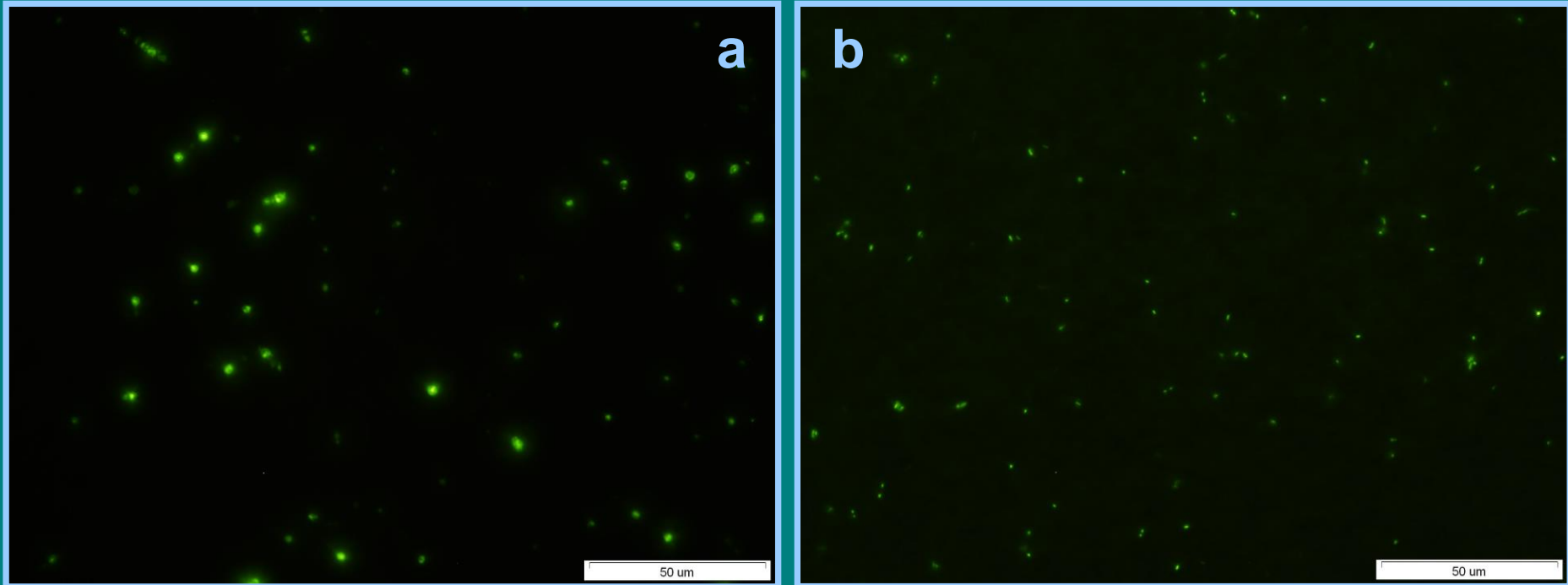
- **postupy používané k odstranění mikroorganismů**
 - a) chemické ošetření – chlorace, chloraminace, oxidace
 - b) fyzikální ošetření – ultrazvuk
 - c) **mechanické odstranění – filtrace**
- **filtrační materiály z nanovláken**
 - vyrobeny pomocí tzv. electrospinningu
 - nanovlákná o průměru méně než 100 nm
 - velmi nízké průměry pórů
 - snadná modifikovatelnost nanovláken (např. antibakteriální látky)

Cíle

- studium filtrační účinnosti vybraných nanomateriálů v procesech filtrace bakterií ve vzorcích vod (suspenze *E. coli* v destilované vodě resp. přirozené bakteriální společenstvo vody z odtoku z ČOV)
- srovnání standardně používaných kultivačních technik a průtokové cytometrie jako analytických metod využitelných pro hodnocení účinnosti filtrace



Cíle



Obr. 3) Mikroskopické snímky bakteriální kultury *E. coli* suspenzované ve vodě (a) resp. přirozeného bakteriálního společenstva odtoku z ČOV (b). Bakterie vizualizovány pomocí barviva SYBR Green I.

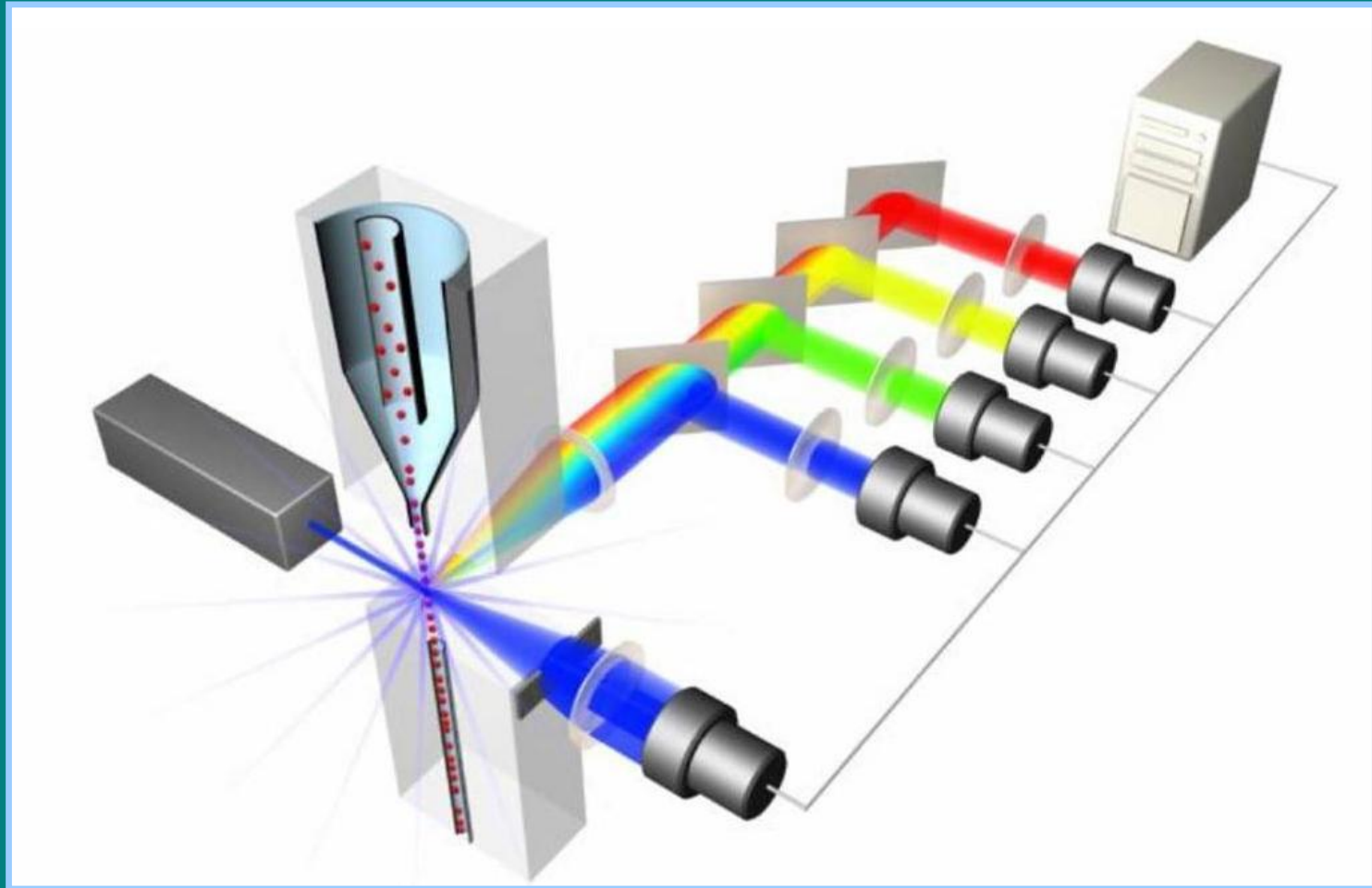
Kultivační techniky

- kultivace různých druhů mikroorganismů na živných půdách (základní, selektivní, diagnostické, selektivně diagnostické atd.)
 - **celkové počty** (kultivovatelných) **mikroorganismů (CPM)**
→ dle české legislativy při 22 resp. 36 °C [KTJ/ml] – inkubace po dobu 72 resp. 48 hodin (ČSN EN ISO 6222)
 - **termotolerantní koliformní bakterie** → m-FC agar - 44 °C, inkubace 24 hodin (ČSN EN ISO 9308-1)
 - ***E. coli*** → Endo agar - 37 °C /72 hod. (ČSN EN ISO 9308-1)
 - **enterokoky** → Slanetz-Bartley agar - 37 °C, kultivace 48 (72) hod. (ČSN EN ISO 7899-2)

Průtoková cytometrie

- stanovení celkového počtu a fyziologického stavu buněk v suspenzi vzorku na základě jejich fluorescenčních (optických) charakteristik
- fluorescence – následkem excitace jisté látky světlem o určité vlnové délce emitováno světlo o vyšší vlnové délce
- komponenty průtokového cytometru:
 - fluidika
 - optika
 - elektronika
- optické charakteristiky buněk po průchodu excitačním zdrojem (laserovým paprskem) snímány pomocí detektorů
 - forward scatter (FSC)
 - side scatter (SSC)
 - fluorescenční parametry (FL1-FLx)

Průtoková cytometrie



Obr. 1) Princip průtokové cytometrie – schéma.
zdroj: http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=302

Průtoková cytometrie

- **celkové počty bakterií** stanovovány ve 3 experimentech po obarvení vzorků barvivem **SYBR Green I** (zelená fluorescence bakterií po navázání barviva na bakteriální nukleové kyseliny)
- **membránová integrita bakterií** hodnocena v 1 experimentu ve vzorcích obarvených duálním barvením **SYBR Green I + propidiumjodid (PI)** – PI s výraznou červenou fluorescencí selektivně proniká pouze do buněk s poškozenou buněčnou membránou (tj. „mrtvých“)
 - **„živé“ bakterie** – vysoká zelená a nízká červená fluorescence
 - **„mrtvé“ bakterie** – vysoká červená a nízká zelená fluorescence

Experiment 1) – filtrace *E. coli*

Tabulka 1) Výsledky experimentu 1 - testování účinnosti filtrace suspenze bakterií *E. coli* v destilované vodě.

Materiál	vz.	KTJ/mL	FCM/mL	R _{KTJ} [%]	R _{FCM} [%]
kontrola	K	1,45E+04	6,93E+06	nd.	nd.
5N	1	1,70E+01	4,21E+04	99,88	99,39
	2	3,00E+01	5,83E+04	99,79	99,16
	3	1,00E+01	2,03E+04	99,93	99,71
6 DA	4	2,80E+01	4,68E+04	99,81	99,32
	5	3,40E+01	5,75E+04	99,77	99,17
	6	3,70E+01	5,84E+04	99,74	99,16
74 /1A ZV 80	8	1,49E+02	1,02E+05	98,97	98,53

KTJ/mL - počty kolonie tvořících jednotek na 1 mL vzorku zjištěné kultivací;

FCM/mL - počty bakterií ve vzorku stanovené pomocí průtokové cytometrie;

R_{KTJ} [%] - účinnost filtrace zjištěná na základě počtů bakterií stanovených kultivací

R_{FCM} [%] - účinnost filtrace zjištěná na základě počtů bakterií stanovených cytometrií

- vysoké korelace mezi počty bakterií zjištěnými pomocí obou metod
- vysoká účinnost filtrace bakterií *E. coli* (zejména 5N resp. 6 DA)
- počty bakterií ve filtrátech stanovované cytometricky v případě materiálů 5N resp. 6 DA jen lehce nad limitem detekce

Experiment 2) – filtrace přírodního bakteriálního společenstva

Kultivace bakterií na agarech

Tab. 2a) Výsledky experimentu 2 - testování účinnosti filtrace přirozeného společenstva bakterií v odtoku z ČOV - plotnové metody.

Materiál	vz.	CPM 22 °C		CPM 36 °C		termotol. koliformní b.		<i>E. coli</i>		enterokoky	
		KTJ/mL	R _{KTJ} [%]	KTJ/ml	R _{KTJ} [%]	KTJ/ml	R _{KTJ} [%]	KTJ/ml	R _{KTJ} [%]	KTJ/ml	R _{KTJ} [%]
kont.	K	21273	nd.	8682	nd.	254	nd.	21	nd.	22	nd.
kont. (ř. 10×)	8	2980	nd.	1350	nd.	64	nd.	1	nd.	9	nd.
5N	1	982	95,38	611	92,96	10	96,06	1	95,24	0	100,00
5N	2	1113	94,77	460	94,70	0	100,00	0	100,00	1	95,45
5N (ř. 10×)	7	315	89,43	90	93,33	0	100,00	0	100,00	0	100,00
6DA	3	2203	89,64	1036	88,07	0	100,00	4	80,95	0	100,00
6DA	4	2479	88,35	1255	85,54	20	92,13	3	85,71	2	90,91
MV 020T	5	251	98,82	71	99,18	5	98,03	0	100,00	0	100,00

CPM 22 °C - celkové počty bakterií zjištěné kultivací vzorku při 22 °C/72 hod.

CPM 36 °C - celkové počty bakterií zjištěné kultivací vzorku při 36 °C/48 hod.

- kultivací zjištěna ve všech sledovaných parametrech účinnost filtrace přesahující 80%

Experiment 2) – filtrace přírodního bakteriálního společenstva

Průtoková cytometrie

Tab. 2b) Výsledky experimentu 2 - testování účinnosti filtrace přirozeného společenstva bakterií v odtoku z ČOV - průtoková cytometrie.

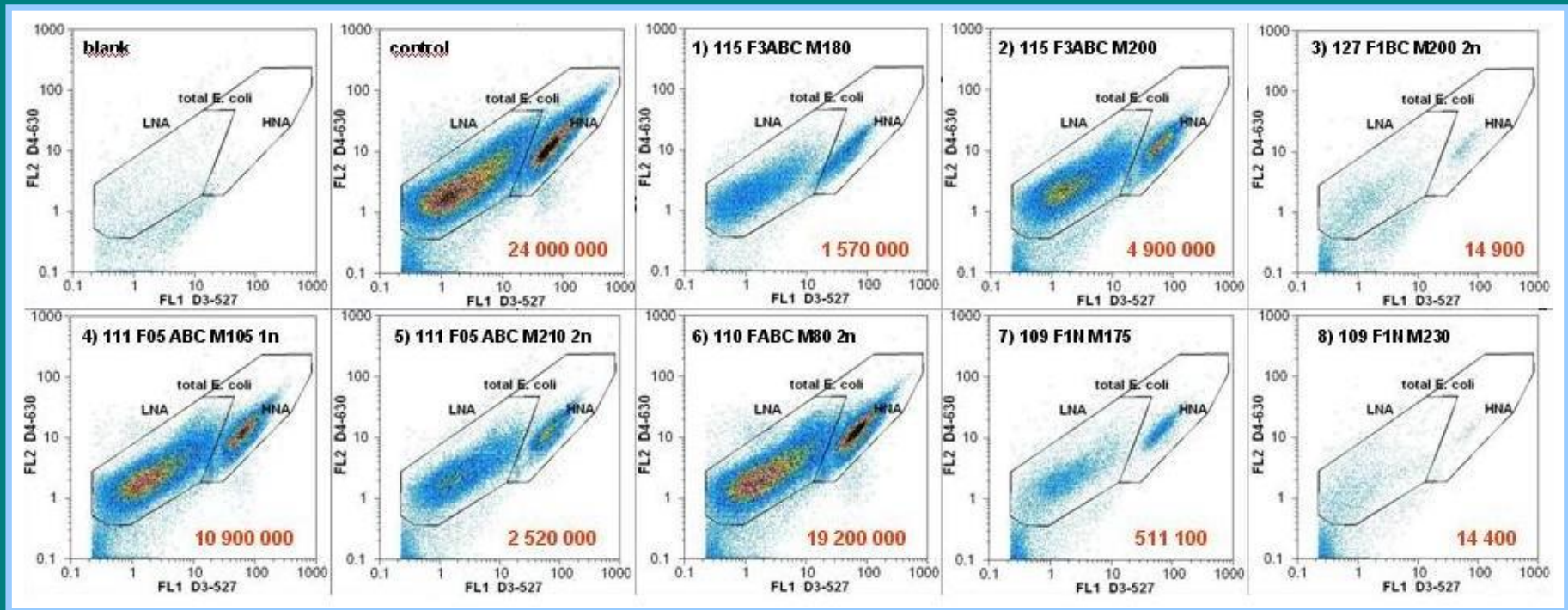
Materiál	vz.	FCM/mL	R _{FCM} [%]	PI [%]	PI ⁺ [%]
kontrola	K	1,95E+07	nd.	94,25	5,75
kontrola (ředění 10×)	8	2,10E+06	nd.	90,00	10,00
5N	1	1,35E+07	30,70	96,46	3,54
5N	2	1,47E+07	24,44	97,02	2,98
5N (ředění 10×)	7	1,83E+06	12,86	89,97	10,13
6DA	3	1,42E+07	27,16	96,03	3,97
6DA	4	1,71E+07	12,27	96,29	3,71
MV 020T	5	4,10E+05	97,90	77,25	22,75

PI (buňky s intaktní membránou - „živé“)

PI⁺ (buňky s porušenou membránou - „mrtvé“)

- zjištěny relativně nízké účinnosti filtrace (s výjimkou filtračního materiálu MV 020T maximální účinnost filtrace cca 30%)
- v souvislosti s filtrací zjištěny jen drobné změny membránové integrity bakterií

Experiment 3) – filtrace *E. coli*



Obr. 2) Stanovení celkového počtu bakterií *E. coli* v nefiltrovaném vzorku a ve filtrátech pomocí průtokové cytometrie. Bakterie ohraničeny v regionu „total *E. coli*“. Regiony LNA a HNA znázorňují bakterie s nízkým resp. vysokým obsahem nukleových kyselin.

Experiment 3) – filtrace *E. coli*

Tab. 3) Výsledky experimentu 3 - testování účinnosti filtrace suspenze bakterií *E. coli* v destilované vodě.

Materiál	vz.	KTJ/mL	FCM/mL	R _{KTJ} [%]	R _{FCM} [%]	Filt. objem [mL]	Filt. čas [s]
kontrola	K	2,37E+05	2,40E+07	nd.	nd.	nd.	nd.
110 FABC M80 2n	6	1,80E+04	1,92E+07	92,38	20,00	100	9,66
111 F05 ABC M105 1n	4	4,00E+04	1,09E+07	83,10	54,58	100	24,01
115 F3ABC M200	2	1,64E+04	4,90E+06	93,07	79,58	100	58,73
111 F05 ABC M210 2n	5	9,92E+03	2,52E+06	95,81	89,50	88	74,30
115 F3ABC M180	1	5,73E+03	1,57E+06	97,58	93,46	100	81,02
109 F1N M175	7	7,18E+02	5,11E+05	99,70	97,87	100	94,19
127 F1BC M200 2n	3	5,30E+01	1,49E+04	99,98	99,94	100	87,08
109 F1N M230	8	9,50E+01	1,44E+04	99,96	99,94	86	47,14

- na základě celkových počtů bakterií stanovených **kultivačně** zjištěny ve všech případech účinnosti filtrace převyšující **80%**
- filtrační účinnosti nanomateriálů zjištěné pomocí **průtokové cytometrie** v širokém **rozmezí 20 - 99.9%**
- **filtrační účinnosti nanomateriálů přímo úměrné době filtrace**

Interpretace výsledků a závěry

Odlišnosti v hodnotách filtračních účinností

- účinnost filtrace závislá na:
 - druhu filtračního materiálu (prostorová struktura, průměr nanovláken, velikost pórů)
 - charakteru bakteriálního společenstva (koncentrace bakterií ve vzorku a jejich velikost)
 - podmínkách filtrace - (tlak, objem filtrovaného vzorku atp.)

nemožno srovnávat výsledky obou analytických metod –
kultivovatelné bakterie (KTJ/mL) × celkové počty bakterií
(bb./mL) × „živé“ bakterie

Interpretace výsledků a závěry

Kultivační techniky

Výhody:

- standardizace → implementace metod do legislativy
- selektivita (možnost zaměřit se na konkrétní skupiny mikroorganismů – patogenů)

Nevýhody:

- časová náročnost
- irelevance - nadbytek nutrientů v kultivačních půdách (zejména pitné vody)
- nadměrná „specifita“ (kultivovatelnost ~ riziko pomnožení bakterií ve vodě)

Interpretace výsledků a závěry

Průtoková cytometrie

Výhody:

- rychlost
- komplexnost měření (přesnější informace o fyziologickém stavu mikroorganismů)

Nevýhody:

- vstupní náklady
- praktická nemožnost detekce konkrétních patogenů ve vzorcích obsahujících přírodní (vícedruhová) bakteriální společenstva

Závěry

- průtoková cytometrie je plnohodnotnou metodou stanovení mikrobiologických ukazatelů kvality vod
- nanomateriály mohou být vhodným prostředkem k zajištění odstranění bakterií v procesech čištění a úpravy vod
- filtrační vlastnosti nanomateriálů nutno stanovovat nejen na modelových vzorcích bakteriálních kultur, ale také na reálných vzorcích z ČOV

Poděkování

Práce vznikla s podporou Technologické agentury České republiky (projekt TA01010356 – NANAPL10 – Vhodné materiály pro nanotechnologické aplikace při čištění a úpravě vod a vzduchu).



Děkuji Vám za pozornost!