



**Letem
mikrobiologií
kalů**

imateju@szu.cz

**Státní zdravotní ústav,
Šrobárova 47, Praha 10**

Vodárenská mikrobiologie 2015

Letem mikrobiologií kalů

- změny v právních předpisech
- řešení podstatných nejasností v pojmech a požadavcích předpisů
- MZe ČR TNV 75 8090 Hygienizace kalů v čistírnách odpadních vod
- malá informovanost jak použít limity a kdy a jak hodnotit účinnost hygienizace
- CEN/TR 16193:2013 Kaly z čistíren odpadních vod, ošetřené bioodpady a půda – Detekce a stanovení počtů bakterií *Escherichia coli* (CEN/TC 400)
- proč je vzorkování pro mikrobiologické rozbory opomíjenou částí

Definice - současný stav

Poplatná době, kdy vznikl předpis

Kaly z čistíren odpadních vod a další biologicky rozložitelné odpady § 32

Pro účely této části zákona se rozumí

a) kalem

1. kal z čistíren odpadních vod zpracovávajících **městské odpadní vody nebo odpadní vody z domácností a z jiných čistíren odpadních vod, které zpracovávají odpadní vody stejného složení jako městské odpadní vody a odpadní vody z domácností,**
2. kal ze **septiků a jiných podobných zařízení,**
3. kal z čistíren **odpadních vod výše neuvedených,**

b) upraveným kalem - kal, který byl podroben biologické, chemické nebo tepelné úpravě, dlouhodobému skladování nebo jakémukoliv jinému vhodnému procesu tak, že se **významně sníží obsah patogenních organismů v kalech,** a tím zdravotní riziko spojené s jeho aplikací,

c) použitím kalu - zapracování kalu do půdy,

d) programem použití kalů - dokumentace zpracovaná v rozsahu stanoveném prováděcím právním předpisem.

Zpracovatelská zařízení	Označení výstupu	Označení po zahuštění		Právní předpis pro využití výstupu
		Označení Zahuštěné frakce	Označení tekuté frakce	
<p>ČOV – zpracovávající odpadní vody kal z čistíren odpadních vod zpracovávajících městské odpadní vody nebo odpadní vody z domácností a z jiných čistíren odpadních vod, které zpracovávají odpadní vody stejného složení jako městské odpadní vody a odpadní vody z domácností, kal ze septiků a jiných podobných zařízení</p>	kal	kal	kalová voda	<p>Zákon 185/2001 Sb. o dpadech: Vyhl.č.382/2001 Sb., Vyhl.č.341/2008 Sb., Vyhl č.294/2005 Sb. Zákon o hnojivech č. 156/1998 Sb.: Vyhl.474/2000 Sb</p>
<p>ČOV – zpracovávající odpadní vody a VŽP kal – kal z čistíren odpadních vod zpracovávajících odpadní vody a současně zpracovávající odpady na základě rozhodnutí krajského úřadu, kterým je udělen souhlas k provozování zařízení pro nakládání s odpada s jeho provozním řádem</p>	zbytek rozkladu kal	tuhý zbytek kal	tekutý zbytek kalová voda	<p>Nařízení EU_č.1069/2009): Nařízení EU č. 142/2011 341/2008 Sb.,</p>

Kdy je třeba vzorkovat čistírenské kaly?

Limitní koncentrace indikátorových organismů pro upravené čistírenské kaly určené k využití na zemědělské půdě dle vyhl. 382/2001.

Příloha č. 4 k vyhlášce č.382/2001 Sb., 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

Limitní koncentrace indikátorových organismů pro výstupy dle vyhlášky č. 341/2008 Sb. pro výstupy z anaerobního zpracování (BS) a kompostáren

Indikátorový mikroorganismus	Výstup dle 341/2008 Sb. limit nález	
	Počet vzorků	nález
<i>Salmonella spp.</i> nález v 50g	5	negativní
Termotolerantní koliformní bakterie KTJ* v 1 gramu	1	< 10 ³
	4	< 50
Enterokoky KTJ* v 1 gramu	1	< 10 ³
	4	< 50

Limitní koncentrace indikátorových organismů pro výstupy z dle Nařízení 1069/2009 (EU č. 142/2011) pro výstupy z BS a kompostáren

Indikátorový mikroorganismus	Výstup dle Nařízení 1069/2009 Limit nález**	
	Počet vzorků	nález
<i>Salmonella spp.</i> *** nález v 25g		negativní
<i>Escherichia coli</i> ** KTJ* v 1 gramu	1	< 5.10 ³
	4	< 10 ³
Enterokoky** KTJ* v 1 gramu	1	< 5.10 ³
	4	< 10 ³

a) kal současná definice v zákoně

1. kal z čistíren odpadních vod zpracovávajících městské odpadní vody nebo odpadní vody z domácností a z jiných čistíren odpadních vod, které zpracovávají odpadní vody stejného složení jako městské odpadní vody a odpadní vody z domácností,
2. kal ze septiků a jiných podobných zařízení,
3. kal z čistíren odpadních vod výše neuvedených,

3. kal definice z normy TNV 75 8090

1. kal z čistíren odpadních vod zpracovávajících městské odpadní vody nebo odpadní vody z domácností a z jiných čistíren odpadních vod, které zpracovávají odpadní vody stejného složení jako městské odpadní vody a odpadní vody z domácností,
2. kal ze septiků a jiných podobných zařízení,
3. kal – kal z čistíren odpadních vod zpracovávajících odpadní vody (viz.1) a současně zpracovávající odpady na základě rozhodnutí krajského úřadu, kterým je udělen souhlas k provozování zařízení pro nakládání s odpady a s jeho provozním řádem

a) kal definice z infrigentové novely (snad červenec 2015)

1. kal z čistíren odpadních vod zpracovávajících městské odpadní vody nebo odpadní vody z domácností a z jiných čistíren odpadních vod, které zpracovávají odpadní vody stejného složení jako městské odpadní vody a odpadní vody z domácností, a to i v případě, že čistírny odpadních vod zpracovávají také biologicky rozložitelné odpady na základě rozhodnutí krajského úřadu, kterým je udělen souhlas k provozování zařízení pro nakládání s odpady a s jeho provozním řádem, nebo biologicky rozložitelné odpady spadající do působnosti nařízení o vedlejších produktech živočišného původu 6),
2. kal ze septiků a jiných podobných zařízení,
3. kal z čistíren odpadních vod zpracovávajících odpadní vody a materiály, které svými vlastnostmi odpovídají odpadním vodám a materiálům dle bodu 1, zejména odpadní vody a materiály, které mají původ v potravinářském průmyslu a zemědělství,“

Metody stanovení mikrobiologických parametrů

Mikrobiologické rozbory, které spadají pod vyhlášky zákona o odpadech a Nařízení 1069/2009

AHEM v platném znění
(AHEM Acta Hygienica, Epidemiologica et Microbiologica 7/2001
a 1/2008)

pro *E. coli* jako CEN/TR 16193 ve Velké Británii a ve Francii v květnu 2013, v ČR byla vydána v roce 2014
V Německu je norma ve stádiu příprav jako DIN.

Ostatní indikátory ????

vyhláška č.475/2000 Sb., kterou se mění vyhláška

Ministerstva zemědělství č.273/1998 Sb., o odběrech a chemických rozborech vzorků hnojiv – pro mikrobiologické metody uvádí pouze metody z oblasti
Jakost vod - špatně

CEN/TR 16193:2013

CEN/TC 400

Secretariat: DIN

**Sludge, treated biowaste and soil —
Detection and enumeration of *Escherichia coli***

CEN/TR 16193:2013

CEN/TC 400

Kaly z čistíren odpadních vod, ošetřené bioodpady a půda –
Detekce a stanovení počtů bakterií *Escherichia coli*

dokument (CEN/TR 16193:2013) byl připraven Technickým výborem
CEN/TC 400 „Projektový výbor – Horizontální normy pro oblast kalů z
čistíren odpadních vod, bioodpadů a půdy“, sekretariátem, který je zřízen DIN

Ustanovení 6: Metoda A – Metoda membránové filtrace pro kvantifikaci

Ustanovení 7: Metoda B – Miniaturizovaná metoda (Nejpravděpodobnější počet)
inokulací do tekuté půdy

Ustanovení 8: Metoda C – Makrometoda (nejpravděpodobnější počet) v tekuté půdě

Matrice	Metoda A Membr. filtrace	Metoda B Miniturizovaná MPN	Metoda C Makrometoda MPN
Kal z čistírny odpadních vod	Mesofilně anaerobně stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Vzduchem sušený peletizovaný kal z čistíren odpadních vod Odvodněný stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Kompostovaný kal z čistíren odpadních vod	Mesofilně anaerobně stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Vzduchem sušený peletizovaný kal z čistíren odpadních vod Odvodněný stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Kompostovaný kal z čistíren odpadních vod	Mesofilně anaerobně stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Vzduchem sušený peletizovaný kal z čistíren odpadních vod Odvodněný stabilizovaný kal z čistíren odpadních vod Kompostovaný kal z čistíren odpadních vod
Bioodpady	Kompostované bioodpady Kompostované zelené odpady Anaerobně ošetřené bioodpady	Kompostované bioodpady Kompostované zelené odpady Anaerobně ošetřené bioodpady	Kompostované bioodpady Kompostované zelené odpady Anaerobně ošetřené bioodpady

Metoda A – Metoda membránové filtrace pro kvantifikaci

Metoda A specifikuje postup membránové filtrace pro kvantitativní detekci kultur jednotlivých kolonií na chromogenní agarové půdě.

Není vhodná pro materiály, jejichž ošetření výrazně redukuje počty bakterií na méně než 10 životaschopných *E. coli* na gram vlhké hmotnosti jako je přídavek vápna, sušení nebo pasterizace ???????

Je vhodná pro stanovení řádové redukce *E. coli* během úpravy odpadu stejně jako pro stanovení kvality konečného produktu. ??????

Homogenizovaný naředěný vzorek se filtruje, membránový filtr se asepticky vyjme a inkubuje se na membránovém laktózoglukuronidovém agaru (MLGA), nejprve při $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ po dobu $(4,0 \pm 0,5)$ h. Potom se teplota zvýší na $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$. Přítomnost *E. coli* je indikována zelenými koloniemi, které vznikají hydrolýzou BCIG (**5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -glukuronid (BCIG)**).

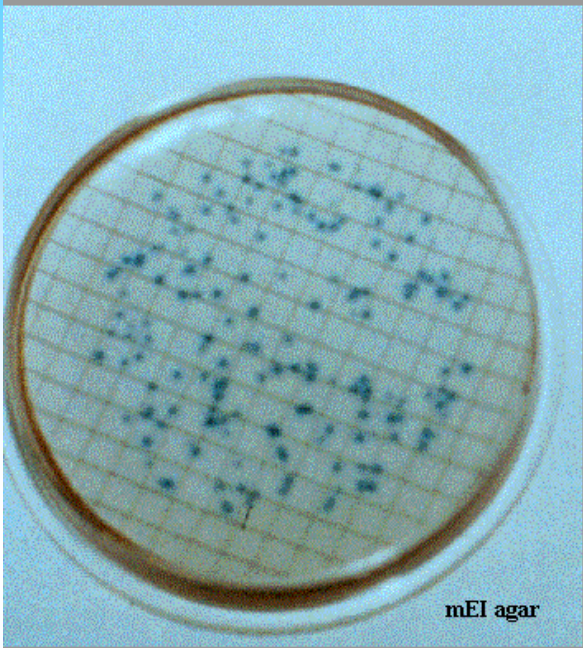
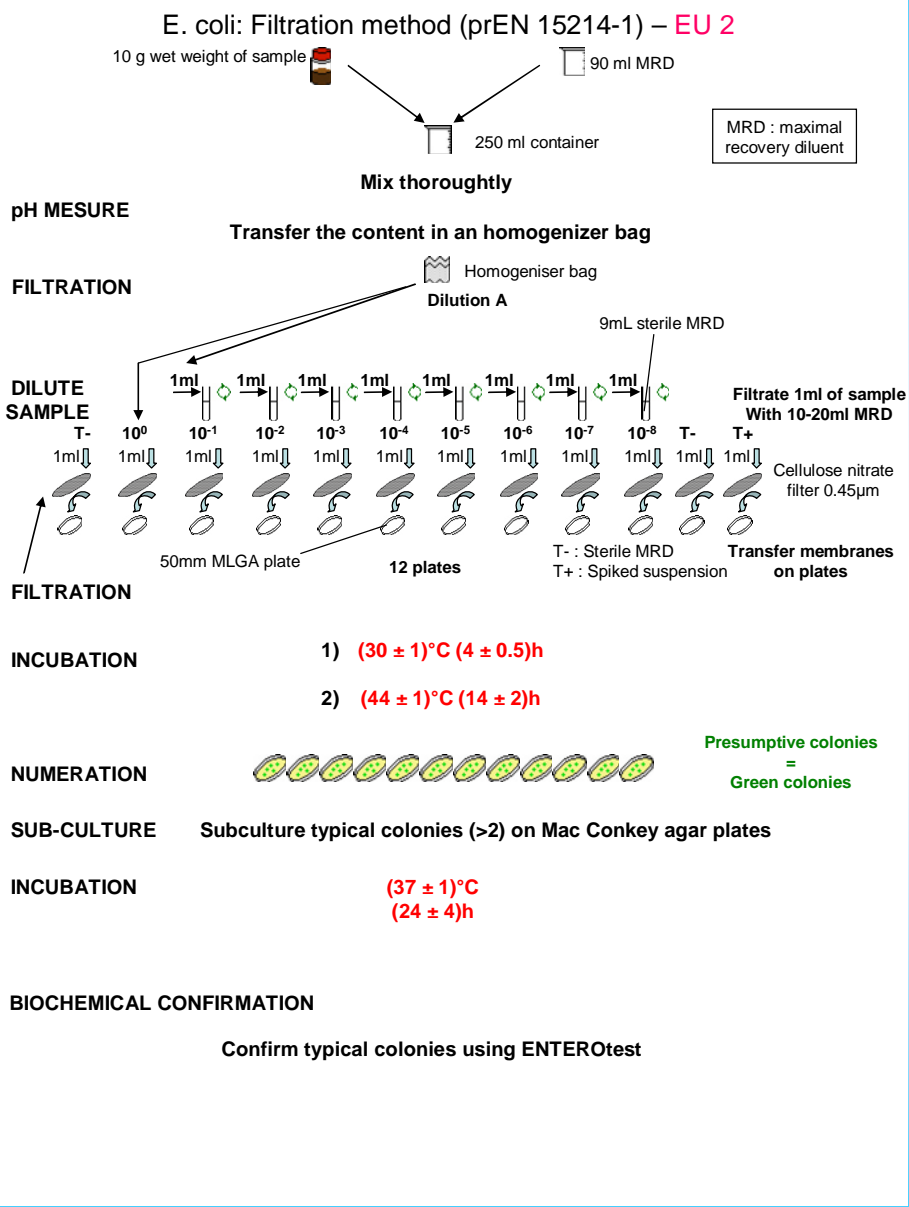
Limit detekce metody A je 27 KTJ *E. coli* na gram vlhké hmotnosti podle ENV ISO 13843 v závislosti na obsahu pevných látek. Při vysokých koncentracích ($> 0,1$ g/mL) může být omezen objem vzorku, který projde membránou, pokud není naředěn.

Matrice	Střední hodnota (<i>E. coli</i> /1 g vlhké hmotnosti)	Opakovatelnost (poměr)	Reprodukovatelnost (poměr)	Vyloučené odlehle hodnoty (statisticky určené)	Odstraněná data (Jiné důvody)	Celkový počet dat	Celkový počet laboratoří
Mesofilní anaerobní kal	< 26,96 ^a	-	-	-	-	0	13
	< 26,96 ^a	-	-	-	-	3	13
Anaerobně upravený bioodpad	1 784 260	2,8	59,4	2	-	33	13
	2 898 637	3,5	72	-	-	36	12
Peletizovaný vzduchem sušený kal	< 26,96 ^a	-	-	-	-	0	13
	385 222	7,1	29 465,7	-	1	36	13
Odvodněný kal z čistírny odpadních vod	6 632	3,2	7 499,5	-	-	35	12
	3 651	4,1	655,8	-	-	36	12
Kompostovaný kal	94 944 250	11,9	34,8	1	-	33	12
	968 981	5,9	88,1	1	-	36	13
Kompostovaný odpad ze zahrad	824 211	3,6	51,7	1	-	36	13
	433 007	2,5	32,3	-	-	39	13
Kompostované bioodpady	7 883 ^b	262,7 ^b	262,7 ^b	-	-	12	13
	16 967 925	4,3	33,6	-	-	39	13

^a Teoretická mez detekce s pravděpodobností 95 % vypočtená pro metodu

^b Nakonec pro zpracování dat jich bylo k dispozici jen málo. Pozorovaný rozptyl byl pouze náhodný rozptyl (žádná významná laboratorní vychýlení). Odhad je třeba brát v úvahu opatrně.

Metoda A – Metoda membránové filtrace pro kvantifikaci



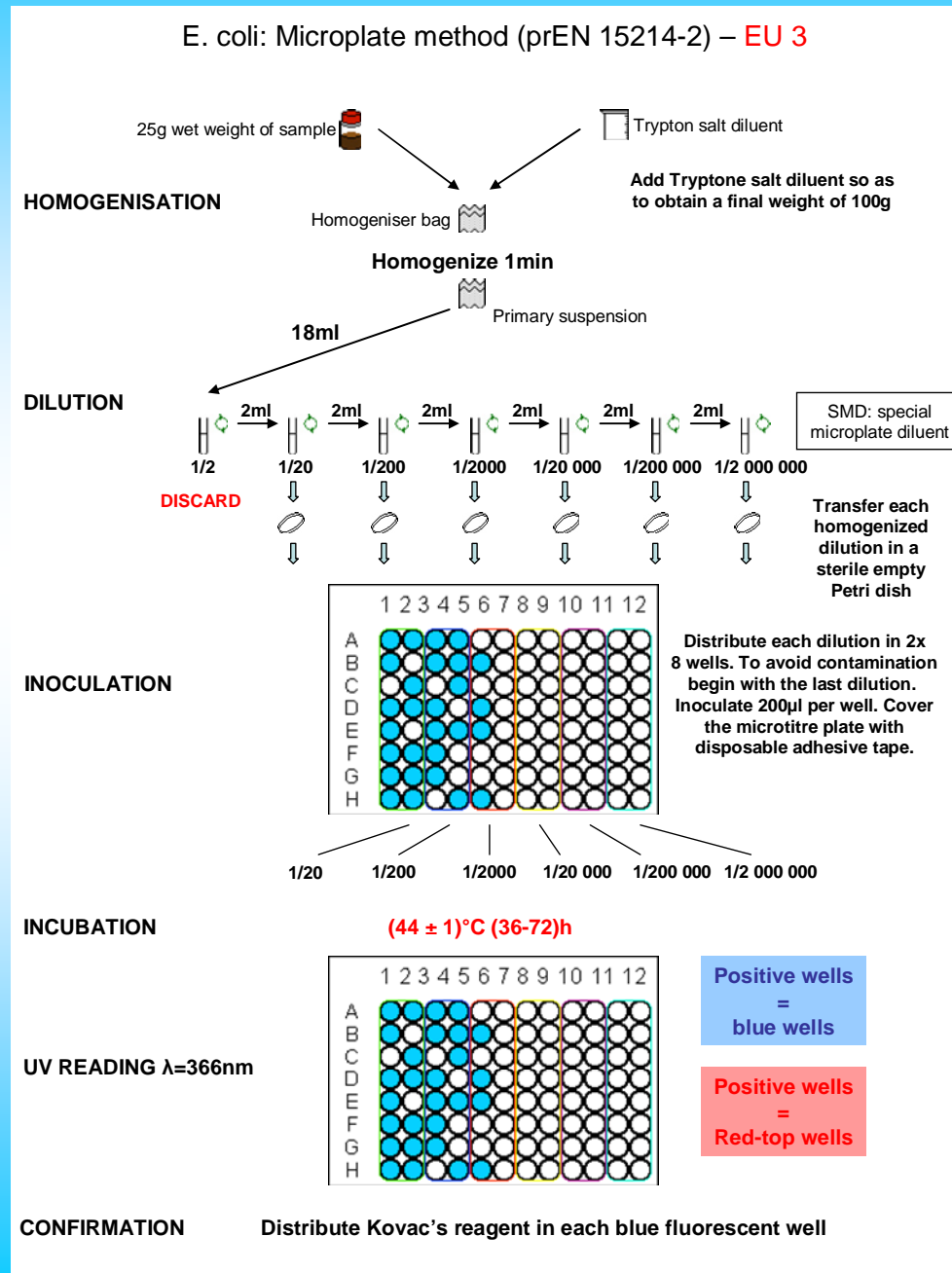
Metoda A – Metoda membránové filtrace pro kvantifikaci

Výpočet počtu KTJ *E. coli* (přítomných na g vlhké hmotnosti původního vzorku) se provádí

vydělením celkového počtu typických kolonií (n) na filtrační membráně vybraných ploten celkovým filtrovaným objemem původního vzorku. Výsledek konfirmačního kroku je třeba vzít v úvahu při odhadu celkového počtu typických kolonií pro výpočet konečných výsledků (viz ISO 8199)

Mez detekce 5 % <i>E. coli</i> g vlhké hmotnosti	Horní mez kvantifikace 5 % <i>E. coli</i> g vlhké hmotnosti	Pracovní rozsah jednotky \log_{10}	Výsledky disperze U^2
26,96	$1,32 \cdot 10^{11}$	9,7	Méně než 0,05

Metoda B – Miniaturizovaná metoda (Nejpravděpodobnější počet) inokulací do tekuté půdy



SMD-Special Microplate Diluent

Inokulace 16 jamek každým ředěním

Metoda B specifikuje miniaturizovanou metodu nejpravděpodobnějšího počtu (MPN) pro semi-kvantitativní detekci *Escherichia coli* v kalu, půdách a organických hnojivech podobné konzistence jako validované matrice. Je vhodná pro hodnocení řádového snížení *E. coli* během úpravy stejně jako kvality konečného produktu. Metoda B má detekční limit (5 %) přibližně 67 *E. coli* MPN na g vlhké hmotnosti a kvantifikační rozsah 6 řádů (viz ENV ISO 13843).

Metoda B – Miniaturizovaná metoda (Nejpravděpodobnější počet) inokulací do tekuté půdy

Příklad	Ředění						CN
	1/20	1/200	1/2 000	1/20 000	1/200 000	1/2 000 000	
A	16	16	9	3	0	0	16/9/3
B	16	16	9	7	1	0	9/7/1
C	12	5	0	0	0	0	12/5/0
D	0	1	0	0	0	0	0/1/0
E	16	16	12	5	0	0	16/12/5

Hodnoty pro MPN se určí z tabulky stejně jako konfidenční meze

Mez detekce 5 % <i>E. coli</i> g vlhké hmotnosti	Horní mez kvantifikace 5 % <i>E. coli</i> g vlhké hmotnosti	Pracovní rozsah jednotky \log_{10}	Výsledky disperze U^2
67,40	$7,07 \cdot 10^7$	6,0	0,1

METODA C – MAKROMETODA (NEJPRAVDĚPODOBNEJŠÍHO POČTU) V TEKUTÉ PŮDĚ

Metoda C specifikuje metodu nejpravděpodobnějšího počtu (MPN) pro semi-kvantitativní detekci *Escherichia coli* v kalech, upraveném bioodpadu a půdách s podobnou konzistencí jako validované matrice.

Je vhodná pro hodnocení řádové redukce *E. coli* v průběhu úpravy stejně jako pro hodnocení kvality konečného produktu.

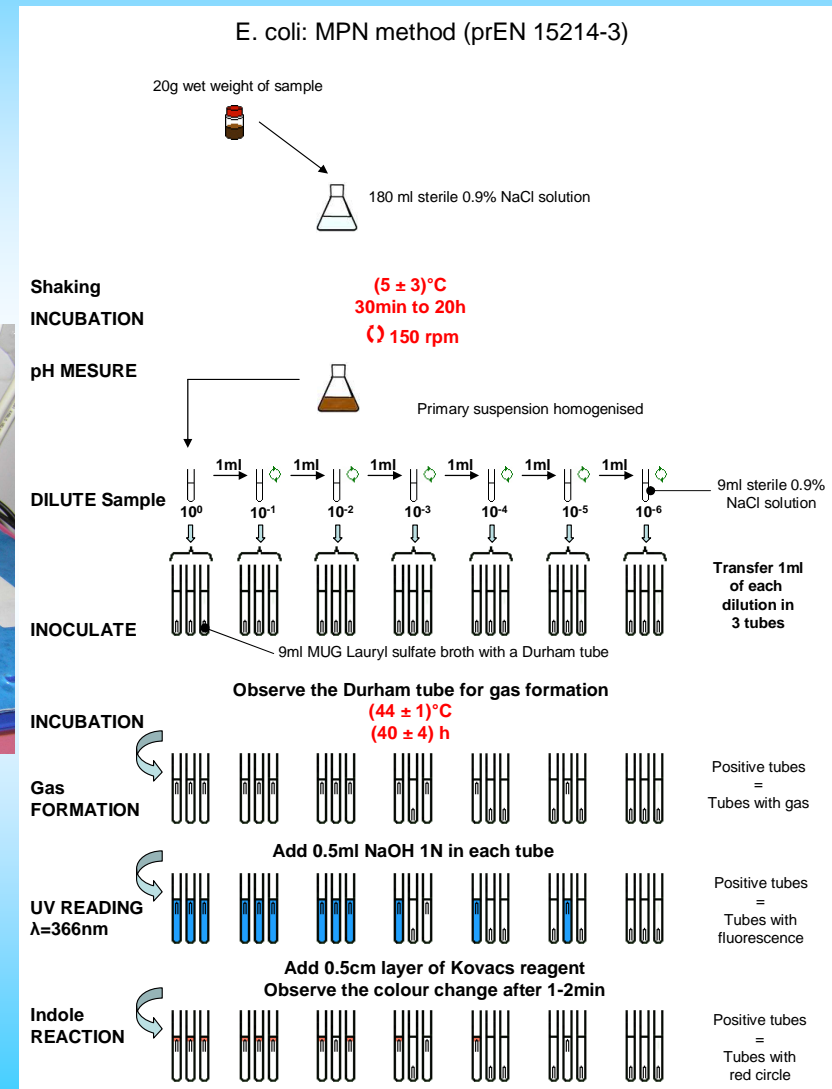
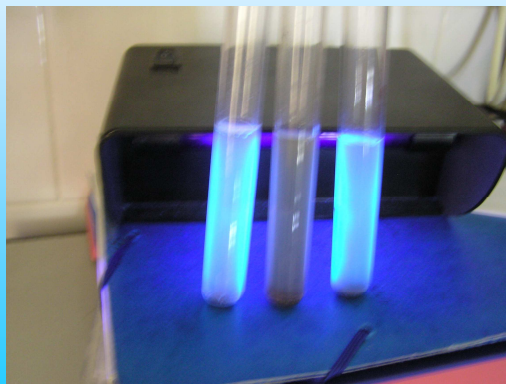
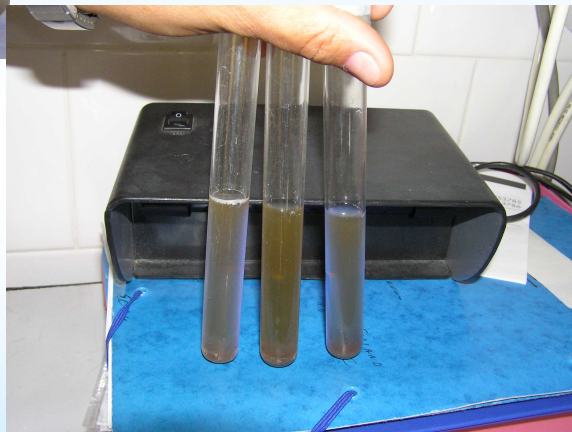
Metoda C se může použít bez ohledu na obsah sušiny zkoušeného materiálu.

Metoda C má detekční limit přibližně 10 *E. coli* MPN/g vlhké hmotnosti (viz ENV ISO 13843).

- příprava homogenizované suspenze vzorku v 0,9 % (hmota/objem, např. g/L) roztoku chloridu sodného;
- sériové ředění této suspenze ve stejném ředícím roztoku (od 10^{-1} až po 10^{-7});
- přenesení 3 x 1 mL z každého ředícího stupně do tří zkumavek obsahujících 9 mL Fluorocultu™ – lauryl sulfátové půdy
- kultivace při (44 ± 1) °C po dobu (40 ± 4) h;
- detekce produkce plynu, fluorescence a produkce indolu;
- kvantifikace MPN technikou.

Lauryl sulfátová půda – Fluorocult™.

METODA C – MAKROMETODA (NEJPRAVDĚPODOBŇJŠÍHO POČTU) V TEKUTÉ PŮDĚ



METODA C – MAKROMETODA (NEJPRAVDĚPODOBNĚJŠÍHO POČTU) V TEKUTÉ PŮDĚ

	Plyn+/Fluorescence+/Indol+						
Ředící krok	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶⁺	10 ⁻⁷⁺
Zkumavka 1	+	+	+	+	-	-	-
Zkumavka 2	+	+	+	-	+	-	-
Zkumavka 3	+	+	+	-	-	-	-
Charakteristické číslo	3	3	3	1	1	0	0
MPN index	7,5						
Ředící faktor	10 ⁻³						
Výsledek: MPN <i>E. coli</i> /g (vlhká hmotnost) vzorku	7.5 x 10 ³						

Limit detekce 5 % <i>E. coli</i> /g vlhké hmotnosti	Horní mez kvantifikace 5 % <i>E. coli</i> /g vlhké hmotnosti	Pracovní rozsah Log ₁₀ jednotka	Výsledky disperze U ²
8,99	4,65 · 10 ⁴	5,7	0,8

Escherichia coli

CEN/TR 15214-1 Detection and enumeration of *Escherichia coli* in sludges, -
- Part 1: Membrane filtration method for quantification - **EU 2**

CEN/TR 15214-2 Detection and enumeration of *Escherichia coli* in sludges, -
Part 2: Miniaturised method (Most Probable Number) by inoculation in li-
quid medium - **EU3**

CEN/TR 15214-3 Detection and enumeration of *Escherichia coli* in sludges, -
Part 3: Macromethod (Most Probable Number) in liquid medium – **EU 4**

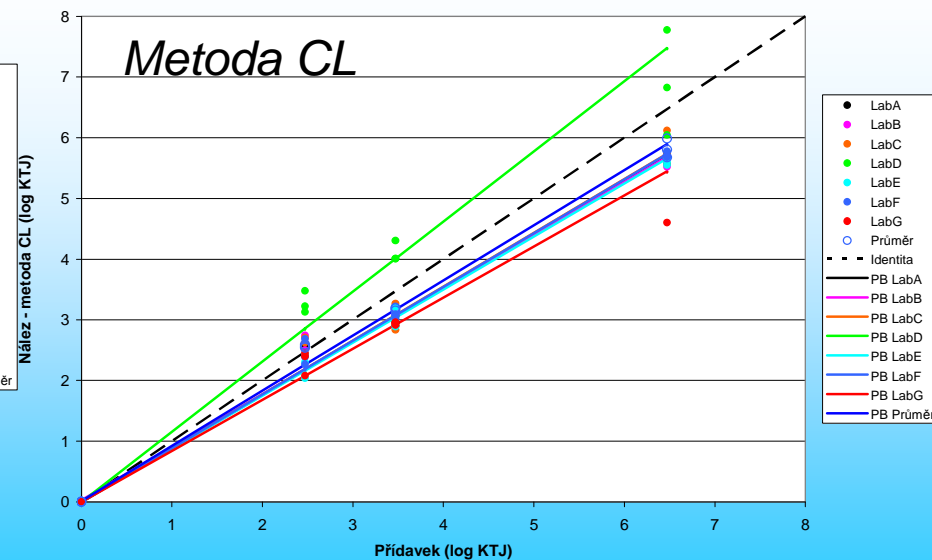
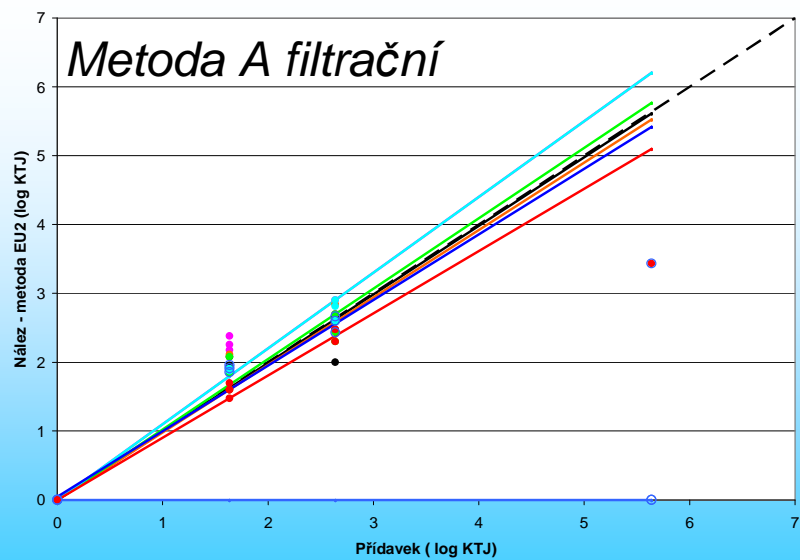
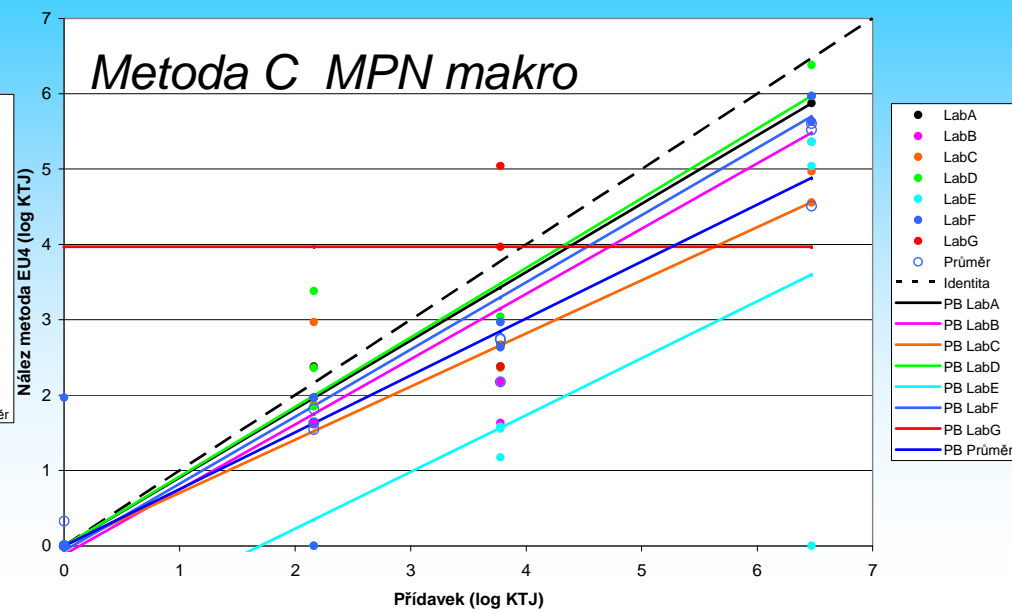
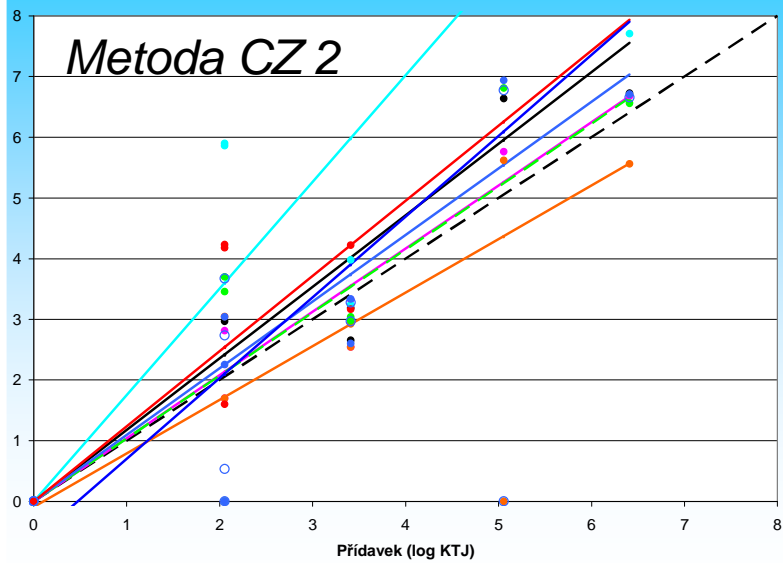
Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E.coli*
(AHEM 7/2001) - **CZ 2**

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

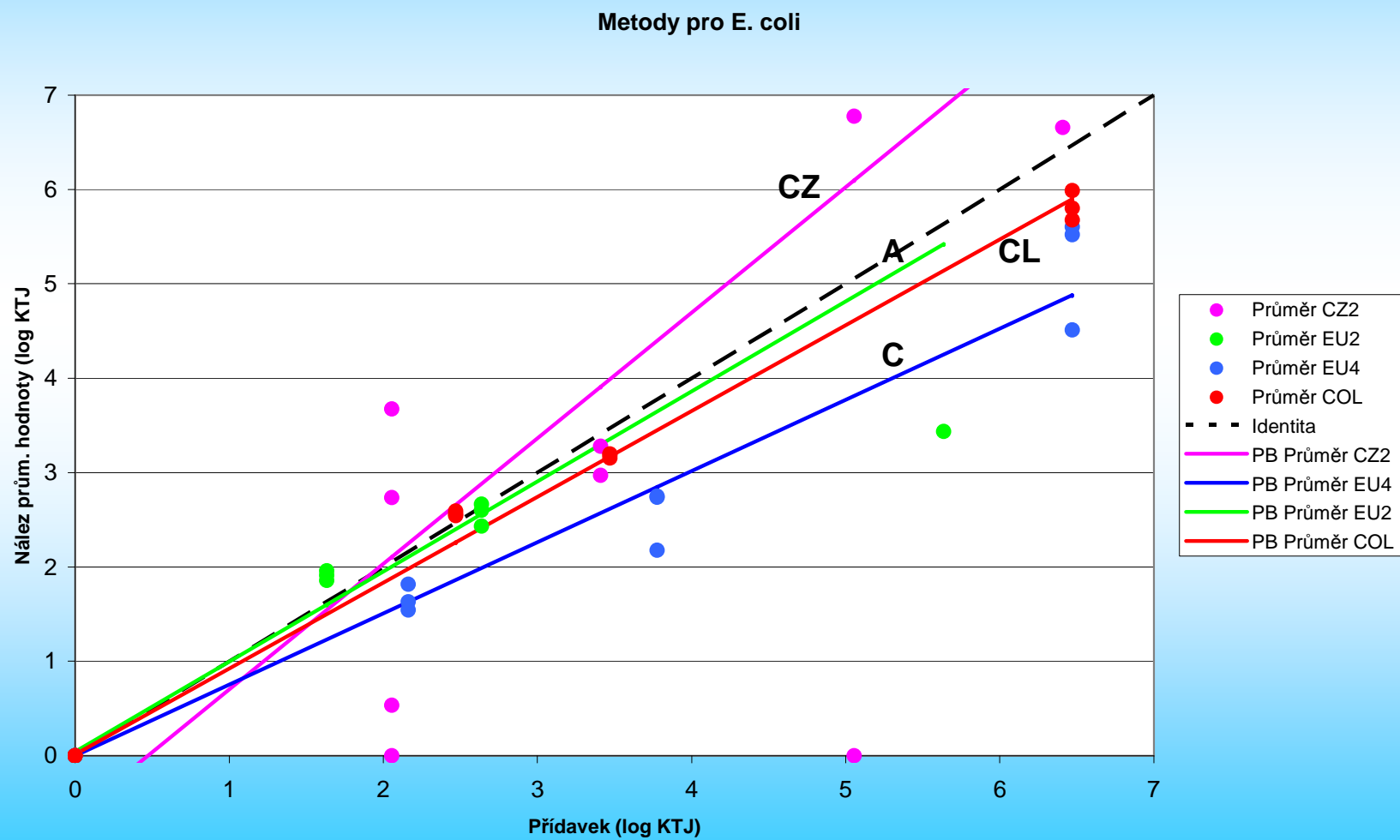
Clause 6: Method A - Membrane filtration method for quantification EU2;

**Clause 7: Method B - Miniaturised method (Most Probable Number) by
inoculation in liquid medium EU3;**

**Clause 8: Method C - Macromethod (Most Probable Number) in liquid
medium EU4.**



Porovnání všech metod pro stanovení *E.coli* – průměrné hodnoty



Normy na odběry kalů pro mikrobiologická stanovení

SSPI-CT-2003-502411 HORIZONTAL - ORG
HORIZONTAL STANDARDS ON ORGANIC MICRO-POLLUTANTS FOR
IMPLEMENTATION OF EU DIRECTIVES ON SLUDGE, SOIL AND
TREATED BIO-WASTE

D 2.2 - part B. Sampling of sewage sludge and treated biowastes –
Technical Report on Sampling – Guidance on selection and application
of criteria for sampling under various conditions.

Due date of deliverable: 1-1-2006 Actual submission date:30-1-2006

CEN/BT/TF 151

Date: 2007-04

prEN XXX:2007 (E)

Secretariat: DS

Soil, sludge and treated biowaste – Guidance for sample pretreatment

Zmínka o odběru pro mikrobiologické účely chybí POZNÁMKA 1 Pokud se mají vzorkovat pro stanovení mikrobiologických ukazatelů, je riziko křížové kontaminace vysoká a sub-vzorkování v terénu se nedoporučuje.

Četnost vzorků pro mikrobiologická stanovení

Předpis	Indikátorový mikroorganismus	Počet vzorků ke stanovení	poznámka	jednotky
Vyhl.č.382/2001 Sb. kal	TKB	1		g/suš
	enterokoky	1		g/suš
	salmonela	1	v 50g	nález
Vyhl. 341/2008 Sb. kompost nebo digestát	TKB	5 (4/1)		g
	enterokoky	5 (4/1)		g
	salmonela	5	v 50g	nález
Nařízení 142/2011 kompost nebo zbytek rozkladu	<i>E. coli</i>	5 (4/1)		g
	enterokoky	5 (4/1)		g
	salmonela	5	v 25g	nález

Z hlediska mikrobiologické kontaminace se jedná o nehomogenní materiál.

Poznatky z praxe

Vzorkování během okružních testů -- směsný vzorek až o 4 řády

Vzorkování pro pověřené osoby jednorázové a směsné - o 1 řád

Důležitá definice šarže

Nedůležitější

čas od odběru do rozboru,
podmínky uskladnění a přepravy
podmínky předúpravy vzorku v laboratoři
čas od navážení vzorku do naočkování na nebo do
růstového média



Děkuji za pozornost