

# MIKROBIOLOGICKÉ ROZBORY V MATRICÍCH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ



[lmateju@szu.cz](mailto:lmateju@szu.cz)

**Státní zdravotní ústav Šrobárova 48, Praha 10**

## Mikrobiologické rozbory

- upravené bioodpady, sedimenty, zeminy, statková hnojiva
- proč je nutné provádět mikrobiologické rozbory
- role vzorkování –
- nejasnost v pojmech a požadavcích předpisů
- malá informovanost jak použít limity a hodnotit účinnost hygienizace
- praxe

## mikrobiologie opomíjenou částí

málo studií o přenosu patogenů na člověka z půdy a ze vzduchu -

většina patogenů z půdy se dostává do vzduchu a do vody  
staré teorie – kejda a hnůj se na pole dávalo už za našich dávných předků a nemocní nebyli

švýcarská studie – hnojení statkovými hnojivy při ekologické zemědělství je poměrně bezpečné, protože se při použití správného postupu kompostování....

pro šíření patogenních *E. coli* jsou náchylné intenzivní chovy  
v roce 2007 bylo prokázáno v EU 26 případů

Urs Niggli – je třeba při aplikaci statkových hnojiv uplatňovat všechna opatření, která napomáhají eliminovat šíření a kontaminaci patogeny

<http://egri.cz/public/web/mze/potravin/bezpecnost-potravin/stanovisko-efsa-ke-zdravoznimu-riziku.htm>

Španělská studie\* - review dosažitelné literatury během 20 let

prokázání vztahu mezi hnojením a onemocněním obyvatel a pracovníků,






prokázání „cestování“ patogenů v půdě

vir dětské obrny [Poliovirus](#) - 50 m, přežíval až 70 dní

viry z anaerobně vyhnílého kalu po dobu 7 let vertikálně i horizontálně rozšířeny

Kanadští vědci sledovali schopnost kampylobaktera přežít [kompostování](#). Tyto bakteriální zárodky pocházely z chlévské mrvy masného skotu, který byl léčen antibiotiky. Během 10 měsíčního [kompostování](#) docházelo ke změnám obsahu vody, [dusíku](#) a [uhlíku](#) stejně jako elektrické vodivosti mezi pokusnou a kontrolní hromadou. Na konci se prokázalo, že nedošlo k [redukci](#) množství DNA kampylobaktera.

*Campylobacter überleben DLG-Mitteilungen, 2010, č. 4, s. 9, 2010*

Table 3. Quick Guide to Important Animal-Pathogen Associations in Minnesota			
Animal Reservoir	Top Pathogens to Consider	Pathogens to Also Consider	
 Calves	<i>Cryptosporidium</i> <i>E. coli</i> O157:H7	<i>Campylobacter</i> <i>Salmonella</i>	
 Reptiles	<i>Salmonella</i>		
 Baby Chicks & Ducklings	<i>Salmonella</i>	<i>Campylobacter</i>	
 Adult Poultry	<i>Campylobacter</i>	<i>Salmonella</i>	
 Puppies & Kittens (particularly those with diarrhea)	<i>Campylobacter</i>	<i>Salmonella</i>	

Rezistence – získaná mutací, kterou vyvolávají subinhibiční množství antibiotik přítékajících v odpadních vodách (kaly)

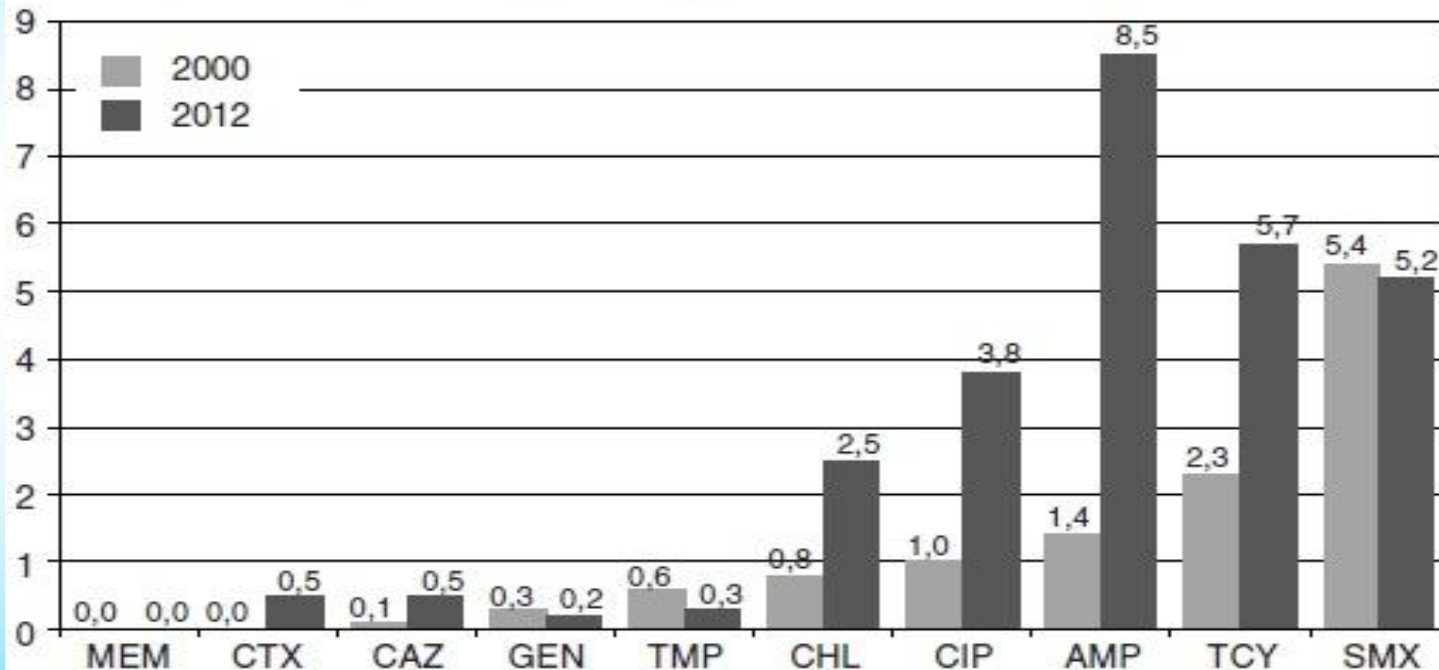
- zbytky antibiotik v hnoji, chlévské mrvě, slepičí podestýlce
- získaná pomocí horizontálního přenosu determinantů rezistence již rezistentních kmenů

**Pokud se nezmění přístup k používání antibiotik, zemře na následky multirezistentních bakterií v budoucnu víc lidí než na rakovinu, počet úmrtí drasticky stoupá – summit G7, červen 2015**

**Elisabeth Meyer z Ústavu hygieny a environmentální medicíny Charité v Berlíně.**

# Trend rezistence na ATB u *Salmonella enterica*

**Graf 1: ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE (%)  
U *SALMONELLA ENTERICA* V ROCE 2000  
(n=2447) a 2012 (n=637)**



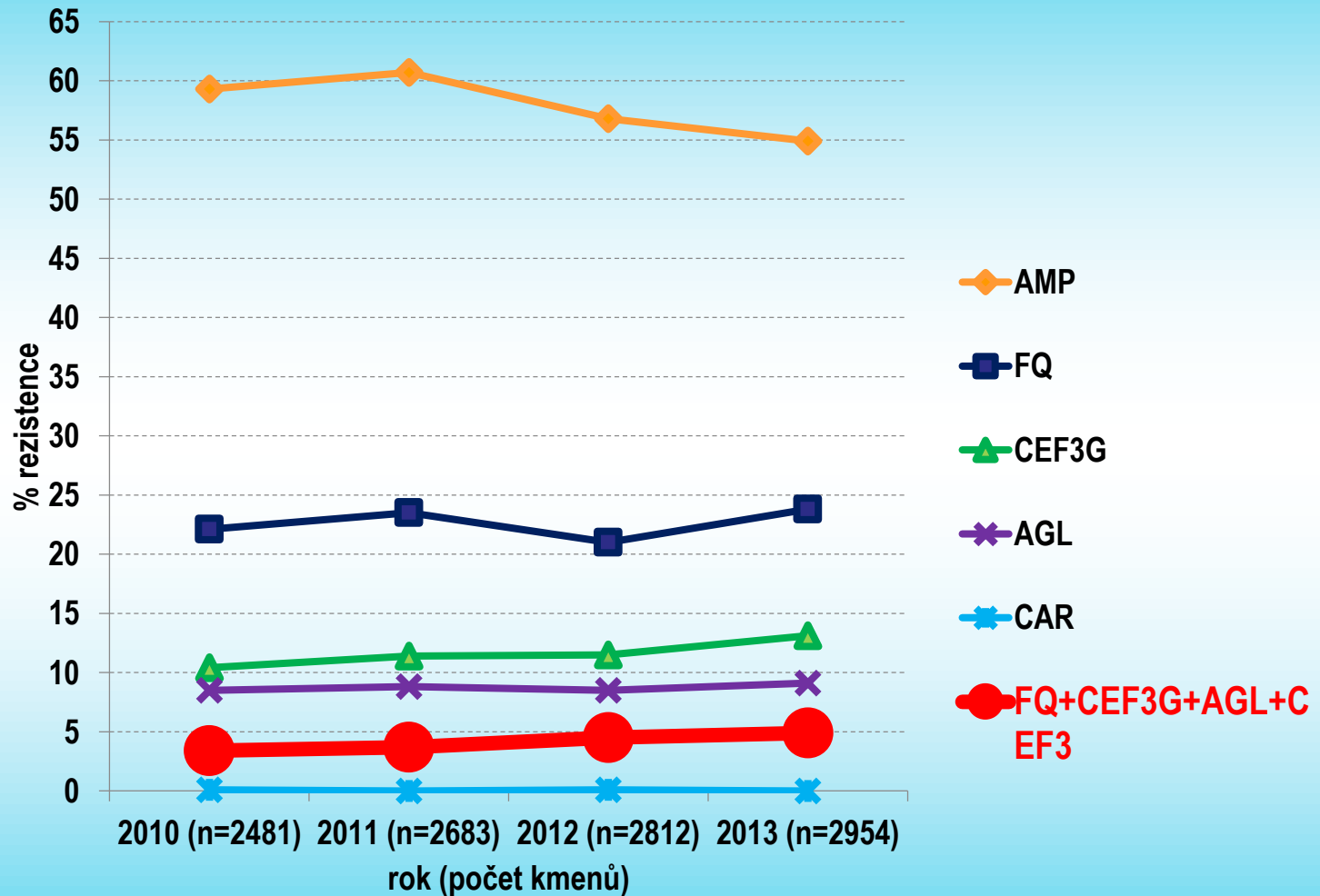
Zkratky antibiotik:

AMP – ampicilin; CAZ – ceftazidim; CIP – ciprofloxacín;

CHL – chloramfenikol; CTX – cefotaxim; GEN – gentamicin;

SMX – sulfamethoxazol; TCY – tetracyklin; TMP – trimethoprim.

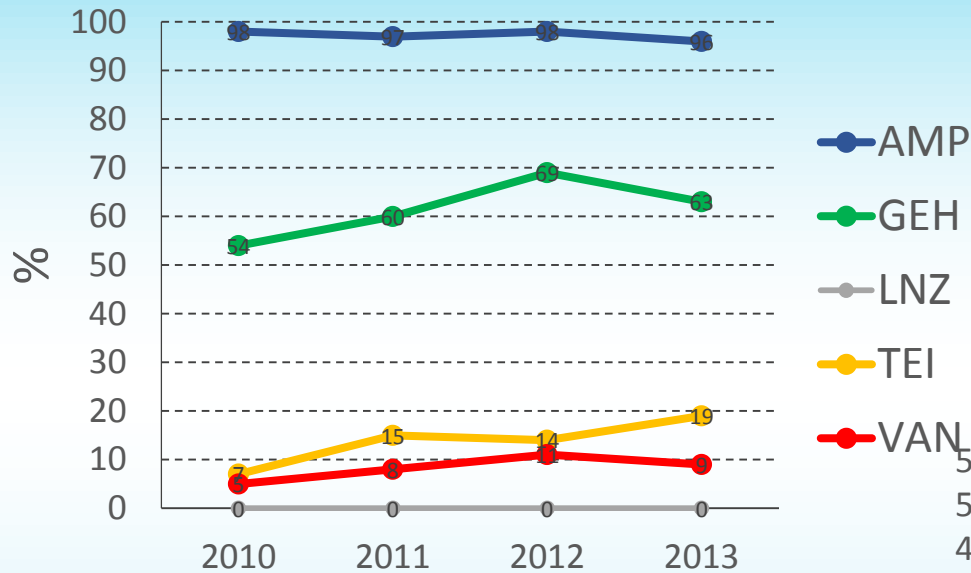
# Escherichia coli -trendy rezistence 2010 - 2013



AMP – ampicilin  
 FQ – fluorochinol  
 CEF- cefalosporiny 3. generace  
 CAR – carbapeny  
 AGL – volné mast. kyseliny.

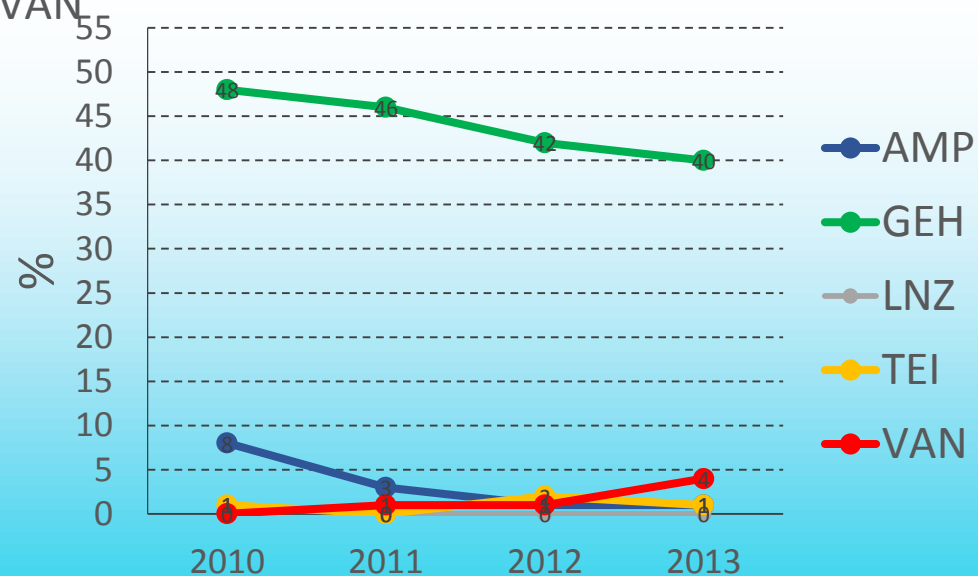
# *Enterococcus faecium* trendy rezistence 2010 – 2013

*E. faecium*, trendy rezistence



AMP - ampicilin  
 GEH - gentamycin  
 LNZ - linkomycin  
 TEI - teicoplanin  
 VAN - vankomycin

*E. faecalis*, trendy rezistence





## Cíl mikrobiologických rozborů

Cílem sledování mikrobiologické kontaminace v upravených odpadech je potvrzení, že odpad byl dostatečně zpracována upraven, že technologie úpravy byla účinná a že došlo ke snížení počtů sledovaných indikátorových organismů.

Účinnost úpravy (hygienizace) technologie je potvrzena redukcí počtů v aktuálním výstupu materiálu z technologie na předepsané limitní hodnoty a snížením počtů vnesených indikátorových organismů v kontejnerech na začátku procesu úpravy.

Dostatečná redukce indikátorových organismů se liší dle požadované úpravy a dle právních předpisů jednotlivých států. Všeobecně se předpokládá, že při konvenčních procesech úpravy (s částečnou hygienizací) musí dojít ke snížení **nejméně o dva řády (99%)**. Způsoby úpravy kalů s dostatečným stupněm hygienizace předpokládají **snížení počtů minimálně o 6 řádů**, to znamená, že dojde k redukci 99,9999% počtů indikátorového organismu.

Zároveň jsou ale předepsané hodnoty pro indikátorové organismy ve výstupním materiálu. Ty se liší stát od státu, předpis od předpisu.

Matrice jako jsou odpady, zeminy kaly, sedimenty, komposty a jiné upravené odpady jsou z hlediska mikrobiologické kontaminace velmi heterogenní, organismy nejsou homogenně rozptýleny, jsou vázány na organické složky, vodu a živný substrát.

Z hlediska mikrobiologické kontaminace se jedná o značně nehomogenní materiál.

## Jak stanovit reprezentativní vzorek?

Studie Horizontal -HYG WP1-1 (Lambkin).

EPA (SHARON).

Studie sledovaly mikrobiologickou kontaminaci ve výstupech (včetně kalů ČOV) z různých technologií úpravy bioodpadu na několika zařízeních a navrhli obhajitelné přístupy pro sběr a manipulaci s reprezentativními vzorky biomasy určené pro mikrobiální analýzy.

- u kompostu a jiných pevných matric uložených na hromadách by měla být před odběrem vzorků nejprve sejmuta horní vrstva cca 15 cm
- analýza několika jednorázových vzorků biomasy je účinnější pro identifikování proměnlivosti mikrobiální kontaminace různých šarží zpracovaných odpadů než je analýza kompozitních (směsných) vzorků
- odběr a analýza jednorázových vzorků odebíraných po několik dní pomáhá získat reprezentativnější obraz o kvalitě a pomáhá zachytit proměnlivost upravených bioodpadů
- je vhodnější odebíráni jednorázových vzorků o přiměřeně menším objemu či hmotnosti, což umožňuje jejich rychlé a krátké zchlazení (One-litr metody US EPA 1680, 1.681, a 1.682 )

- požadovaný počet vzorků výstupů z úpravy technologie odpadů závisí na heterogenitě vstupujících surovin, stupni míchání (homogenizace) v průběhu zpracování a přesnosti, kterou požadujeme pro výsledné sledované hodnoty
- při výpočtu potřebných počtů vzorků, které mají být testovány, je třeba brát v úvahu variabilitu při zpracování v laboratoři a proměnlivost surovin před úpravou odpadu
  
- pokud budeme testovat mikrobiologické parametry, např. *E.coli*, počet vzorků odebraných k analýze by neměl být menší než pět
- interval spolehlivosti výsledků by se měl uvádět pouze v případě, že splňuje regulační meze laboratoře pro danou analýzu.
- interval spolehlivosti by měl respektovat příslušný správní a nebo kontrolní orgán a při posuzování odpadu k němu přihlížet (Labkin a kol. 2006).

na variabilitě výsledků i nejistotách měření se podílí mnoho faktorů.

Aby byly tyto faktory eliminovány na co nejnižší míru, přistoupila většina států ve svých předpisech pro dodržení limitů pro 5 jednorázových vzorků.

Způsob odběru 5 vzorků lze akceptovat, protože ve studii Labkin a kol. (2006), (při použití pro statistické vyhodnocení pravidla 0,5 log) bylo zjištěno, že současný požadavek testovat pět vzorků pro určení počtů

***E. coli* ± 0,5 log 10 KTJ/g sušiny je dostatečný (s pravděpodobností 95%).**

Zákon č. 185/2001 Sb, o odpadech

Vyhláška č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady a o změně vyhlášky č. 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 biologicky rozložitelnými odpady).

Vyhláška č. 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 (mžp.cz)

Zákon č. 156/1998 Sb., zákon o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných půdních přípravcích a substrátech a o agrochemickém zkoušení zemědělských půd, v platném znění

Vyhláška č. 131/2014 Sb., kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 474/2000 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva, ve znění pozdějších...

Vyhláška č. 476/2000 Sb., o skladování a způsobu používání hnojiv, ve znění pozdějších 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 Komise (EU) č. 142/2011 ze dne 25. února 2011, kterým se provádí nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1069/2009 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu a získané produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě, a provádí směrnice Rady 97/78/ES, pokud jde o určité vzorky a předměty osvobozené od veterinárních kontrol na hranici podle uvedené směrnice

Zpracovatelská zařízení	Mikrobiologická kritéria dle právních předpisů pro využití výstupu	
	registrovaný kompost	rekultivační kompost
zařízení – zpracovávající odpad z kuchyní <b>odpad pouze rostlinného charakteru</b>	Zákon o hnojivech č. 156/1998 Sb.: Vyhl.474/2000 Sb.  nesleduje se žádný mikr. parametr	Zákon 185/2001 Sb. o odpadech: Vyhl.č.341/2008 Sb., Vyhl č.294/2005 Sb.  Sleduje se pouze výstup
zařízení zpracovávající odpad z kuchyní veškerý potravinářský odpad včetně použitého stolního oleje (kitchen oil, jedlé oleje) s původem v restauracích, stravovacích zařízeních.....	Nařízení EU_č.1069/2009): Nařízení EU č. 142/2011  Sleduje se výstup dle nařízení	-Nařízení EU_č.1069/2009): Nařízení EU č. 142/2011  Sleduje se výstup dle nařízení
zařízení zpracovávající zemědělské přebytky a statková hnojiva	<b>Nařízení EU č. 1069/2009:</b> <b>Nařízení EU č. 142/2011</b> <b>Mikrobiologické rozbory se neprovádí !!!!!</b> Zákon o hnojivech č. 156/1998 Sb.: Vyhl.474/2000 Sb.	<b>Nařízení EU č. 1069/2009:</b> <b>Nařízení EU č. 142/2011</b>
zařízení – zpracovávající odpad pouze rostlinného charakteru	Zákon o hnojivech č. 156/1998 Sb.: Vyhl.474/2000 Sb.	Zákon 185/2001 Sb. o odpadech: Vyhl.č.341/2008 Sb., Vyhl č.294/2005 Sb.  -

Zpracovatelská zařízení	Mikrobiologická kritéria dle právních předpisů pro využití výstupu	
	Registrovaný kompost	rekultivační kompost dle využití výstupů
zařízení – zpracovávající odpad z kuchyní odpad pouze rostlinného charakteru + kaly z ČOV	Zákon o hnojivech č. 156/1998 Sb.: Vyhl.474/2000 Sb. Vyhl.č.341/2008 Sb.,	Zákon 185/2001 Sb. o odpadech: Vyhl.č.341/2008 Sb., Vyhl. č.294/2005 Sb.
zařízení zpracovávající odpad z kuchyní veškerý potravinářský odpad včetně použitého stolního oleje (kitchen oil, jedlé oleje) s původem v restauracích, stravovacích zařízeních.... . +kaly z ČOV	Nařízení EU_č.1069/2009): Nařízení EU č. 142/2011	Nařízení EU_č.1069/2009): Nařízení EU č. 142/2011
zařízení zpracovávající zemědělské přebytky a statková hnojiva +kaly z ČOV	<b>Nařízení EU č. 1069/2009:</b> <b>Nařízení EU č. 142/2011</b> <b>Mikrobiologické rozborů se neprovádí !!!!!</b> Zákon o hnojivech č. 156/1998 Sb.: Vyhl.474/2000 Sb. <b>-Vyhl.č.341/2008 Sb.,</b>	<b>Nařízení EU č. 1069/2009:</b> <b>Nařízení EU č. 142/2011</b>
zařízení – zpracovávající odpad pouze rostlinného charakteru +kaly z ČOV	Zákon o hnojivech č. 156/1998 Sb.: Vyhl.474/2000 Sb. <b>-Vyhl.č.341/2008 Sb.,</b>	Zákon 185/2001 Sb. o odpadech: Vyhl.č.341/2008 Sb., Vyhl č.294/2005 Sb. -

# Mikrobiologická kritéria

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

Indikátorový mikroorganismus	Výstup dle 341/2008 Sb. limit nález	
	Počet vzorků	nález
<i>Salmonella spp.</i> nález v 50g	5	negativní
<i>Termotolerantní koliformní bakterie</i> KTJ* v 1 gramu	2	< 10 <sup>3</sup>
	3	< 50
<i>Enterokoky</i> KTJ* v 1 gramu	2	< 10 <sup>3</sup>
	3	< 50

Limitní koncentrace indikátorových organismů pro výstupy z dle Nařízení 1069/2009 (EU č. 142/2011) pro výstupy z BS a kompostáren + novela 382/2001 I.kat

Indikátorový mikroorganismus	Výstup dle Nařízení 1069/2009 Limit nález**	
	Počet vzorků	nález
<i>Salmonella spp.</i> nález v 50g	5	negativní
<i>Termotolerantní koliformní bakterie</i> KTJ* v 1 gramu <b>nebo</b>	1	< 5.10 <sup>3</sup>
	4	< 10 <sup>3</sup>
<i>Enterokoky</i> KTJ* v 1 gramu	1	< 5.10 <sup>3</sup>
	4	< 10 <sup>3</sup>

\* KTJ- kolonie tvořící jednotku

Vyhláška 382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě

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

\* KTJ- kolonie tvořící jednotku

Novela 382/2001 Sb. kat II ????

Indikátorový mikroorganismus	Výstup dle novela 382/2001 Sb. Limit nález	
<i>Salmonella spp.</i> *** nález v 25g	negativní	
<i>Termotolerantní koliformní bakterie</i> KTJ* v 1 gramu	5	< 5.10 <sup>3</sup>
<i>Enterokoky</i> KTJ* v 1 gramu	5	< 5.10 <sup>3</sup>



## Četnost vzorků pro mikrobiologická stanovení

	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 (3/2)		g
	enterokoky	5 (3/2)		g
	salmonela	5	v 50g	nález
Nařízení 142/2011 kompost nebo digestát	<i>E. coli</i>	5 (4/1)		g
	enterokoky	5 (4/1)		g
	salmonela	5	v 25g	nález

Parametr		označení laboratoře	naspikovaný vzorek							
			1		2		3		4	
Salmonella	stanoveno	nález	neg	neg	poz.	poz.	N	N	poz.	poz.
	spike	nález	neg	neg	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.

Parametr		označení laboratoře	naspikovaný vzorek							
			5		6		7			
Salmonella	stanoveno	nález	neg.	neg.	poz.	poz.	poz.	poz.		
	spike	nález	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.	poz.		

Vysvětlivky: N - nestanoveno

Testy byly vyhodnocovány stanovením relativní odchylky naměřené hodnoty od hodnoty spiku. Odchylka byla vypočtena jako rozdíl dekadického logaritmu hodnoty spiku a dekadického logaritmu naměřené hodnoty. Relativní odchylka byla vyjádřena jako podíl odchylky a dekadického logaritmu hodnoty spiku. Vzorky s relativní odchylkou do 15% je možné považovat za velmi dobré.

Parametr		označení laboratoře	naspikovaný vzorek							
			1		2		3		4	
enterokoky	naměřená hodnota	KTJ/g	1,90E+05	≤ 50	1,20E+05	≤ 50	3,50E+03	2,90E+04	≤ 50	2,70E+05
	spike	KTJ/g	2,30E+05	≤ 50	2,30E+05	≤ 50	2,30E+05	2,30E+05	≤ 50	2,30E+05
	odchylka od spike	%	-1,55%	0,00%	-5,27%	0,00%	-33,90%	-16,77%	0,00%	1,30%
Escherichia coli	naměřená hodnota	KTJ/g	6,80E+06	≤ 50	4,50E+05	≤ 50	N	N	≤ 50	4,00E+05
	spike	KTJ/g	4,40E+05	≤ 50	4,40E+05	≤ 50	4,40E+05	4,40E+05	≤ 50	4,40E+05
	odchylka od spike	%	21,07%	0,00%	0,17%	0,00%	N	N	0,00%	-0,73%

Parametr		označení laboratoře	naspikovaný vzorek							
			5		6		7			
enterokoky	naměřená hodnota	KTJ/g	2,20E+04	9,00E+04	8,00E+05	1,10E+06	2,90E+05	1,40E+05		
	spike	KTJ/g	2,30E+05	2,30E+05	2,30E+05	2,30E+05	2,30E+05	2,30E+05		
	odchylka od spike	%	-19,01%	-7,60%	10,10%	12,68%	1,88%	-4,02%		
Escherichia coli	naměřená hodnota	KTJ/g	1,90E+05	1,50E+05	1,60E+05	2,00E+05	4,10E+05	4,20E+05		
	spike	KTJ/g	4,40E+05	4,40E+05	4,40E+05	4,40E+05	4,40E+05	4,40E+05		
	odchylka od spike	%	-6,46%	-8,28%	-7,78%	-6,07%	-0,54%	-0,36%		

Vysvětlivky: N - nestanoveno

Ukazatel	označení laboratoře	1					3					4					Vyhláška č.341/2008 Sb. Tabulka č.5.4. Kritéria pro kontrolu účinnosti hygienizace			
	označení vzorku	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	limit	počet vzorků splňujících limit	limit	počet vzorků splňujících limit
enterokoky	KTJ/g	1,4E+03	2,8E+02	8,0E+01	1,5E+03	1,3E+02	1,8E+04	4,5E+02	<50	7,8E+02	<50	3,3E+03	7,5E+01	1,3E+04	1,0E+02	5,0E+01	<1,0 E+03	2	<50	3
<i>E.coli</i>	KTJ/g	1,0E+03	1,3E+02	<50	5,0E+02	<50	N	N	N	N	N	3,3E+02	7,5E+01	7,5E+01	1,5E+02	<10	-	-	-	-
TKB	KTJ/g	1,0E+03	1,8E+02	<50	5,0E+02	<50	1,6E+03	<50	<50	<50	<50	3,3E+02	7,5E+01	1,5E+2	4,5E+02	<10	<1,0 E+03	2	<50	3
salmonela	nález	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	negativní	5		

Ukazatel	označení laboratoře	5					6					7					Vyhláška č.341/2008 Sb. Tabulka č.5.4. Kritéria pro kontrolu účinnosti hygienizace			
	označení vzorku	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	limit	počet vzorků splňujících limit	limit	počet vzorků splňujících limit
enterokoky	KTJ/g	5,0E+02	8,2E+02	<50	4,1E+02	8,6E+02	2,4E+03	3,0E+03	2,3E+03	7,3E+02	≤ 50	1,0E+03	5,9E+02	1,2E+03	≤750	≤750	<1,0 E+03	2	<50	3
<i>E.coli</i>	KTJ/g	3,3E+02	7,8E+02	<10	<10	3,1E+02	5,0E+01	1,1E+03	1,5E+02	≤ 50	≤ 50	≤ 50	≤ 50	≤750	≤ 50	≤ 50	-	-	-	-
TKB	KTJ/g	9,1E+02	1,7E+03	<50	<50	1,3E+03	1,0E+02	1,2E+03	1,8E+02	≤ 50	≤ 50	N	N	N	N	N	<1,0 E+03	2	<50	3
salmonela	nález	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	negativní	5		

Vysvětlivky: N - nestanoveno

Enterokoky	p (pravděpodobnost) při $\alpha = 0,05$ (hladina významnosti)
laboratoře	0,787
vzorky	0,641
laboratoř*vzorek	0,750

**Nebýt bakterií, nevznikl by člověk.  
Ale jednou nás nejspíš vyhubí...**

**Děkuji za  
pozornost**