

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE - PERSPEKTIVNÍ ALTERNATIVA V ANALÝZE MIKROBIOLOGICKÝCH UKAZATELŮ KVALITY VOD

^{1*} P. Mikula, ¹ B. Maršálek

**¹ Botanický ústav Akademie věd ČR, Oddělení experimentální
fykologie a ekotoxikologie, Lidická 25/27, 602 00 Brno**

**** premysl.mikula@centrum.cz***

Hygienické požadavky na (pitnou) vodu

- cílem zajištění odpovídající hygienické kvality 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 (ve znění 404/06 Sb.)
 - 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

Kultivační techniky

- kultivace různých druhů mikroorganismů na živných půdách (základní, selektivní, diagnostické, selektivně diagnostické atd.)
- kultivovatelnost mikroorganismů vyjádřena v KTJ na mL (Kolonie Tvořící Jednotky na mL)
 - **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)

Kultivační techniky

Výhody:

- standardizace – definované podmínky analýzy
- nenáročné provedení
- nízká cena analýzy
- možnost zaměření na potenciální patogeny

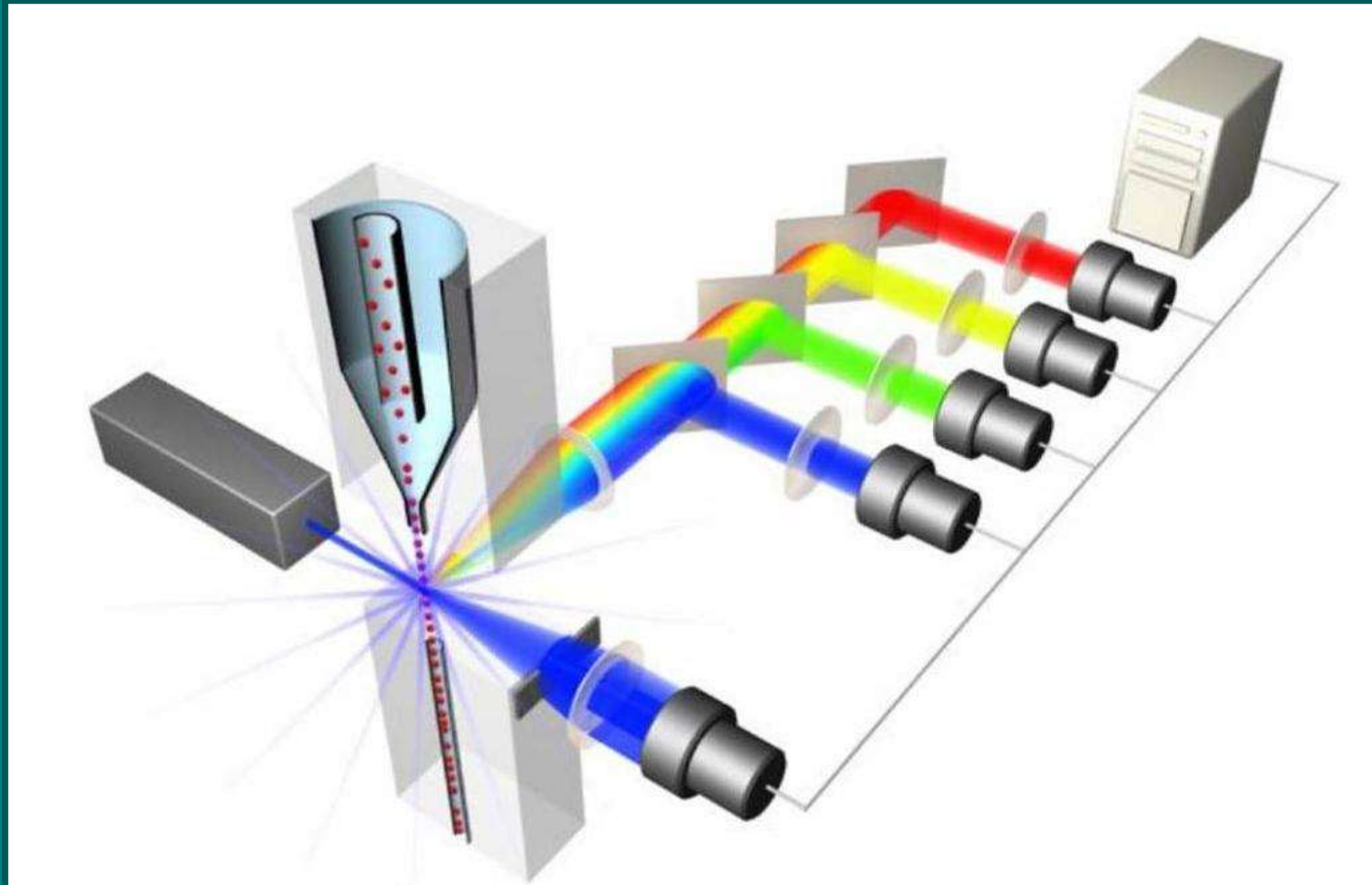
Nevýhody:

- časová náročnost/“pomalost“ (výsledky analýzy známy v horizontu dní)
- většina mikroorganismů (bakterií) není kultivovatelná
 - obtížně kultivovatelné druhy
 - VBNC bakterie (Viable But Non-Culturable)
- nadbytek nutrientů v médiích – výsledky kultivací vzdáleny realitě

Průtoková cytometrie

- stanovení celkového počtu (tzn. kvantifikace) 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 vlnové délce vyšší
- komponenty průtokového cytometru:
 - fluidika
 - optika
 - elektronika
- optické charakteristiky částic (buněk) po průchodu paprskem excitačního světla (laserem) snímány pomocí detektorů
 - forward scatter (FSC)
 - side scatter (SSC)
 - fluorescenční parametry (FL1-FLx)

Průtoková cytometrie

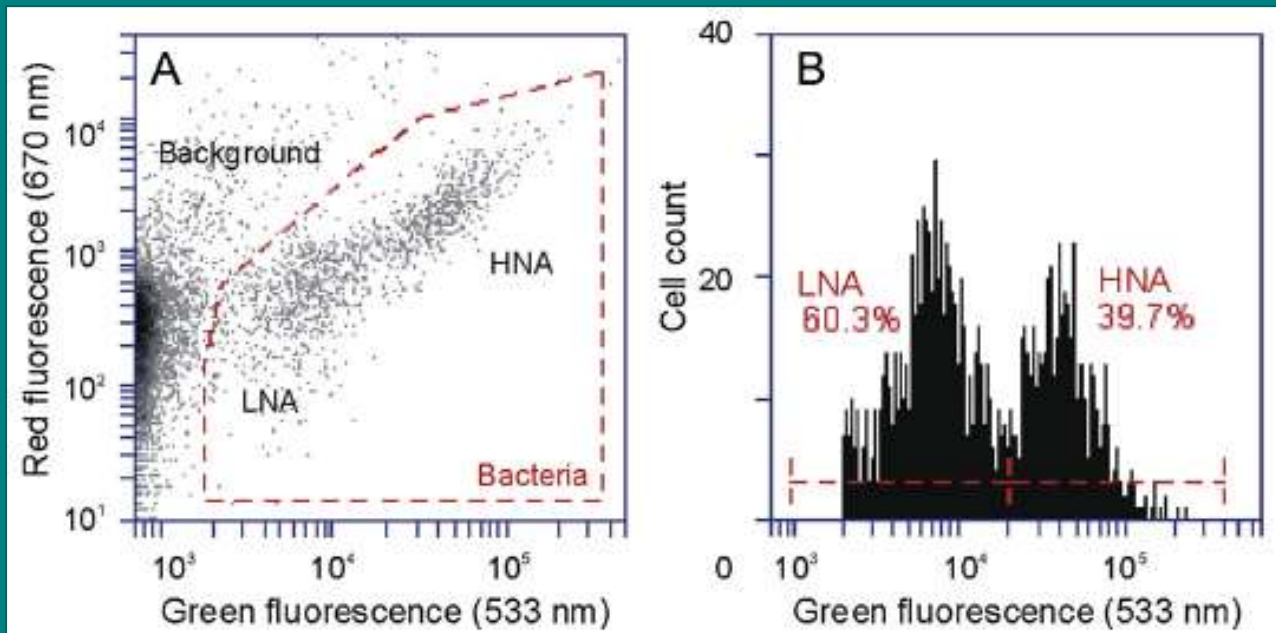


Obr. 1) Princip průtokové cytometrie – schéma.
zdroj: http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=302

Průtoková cytometrie

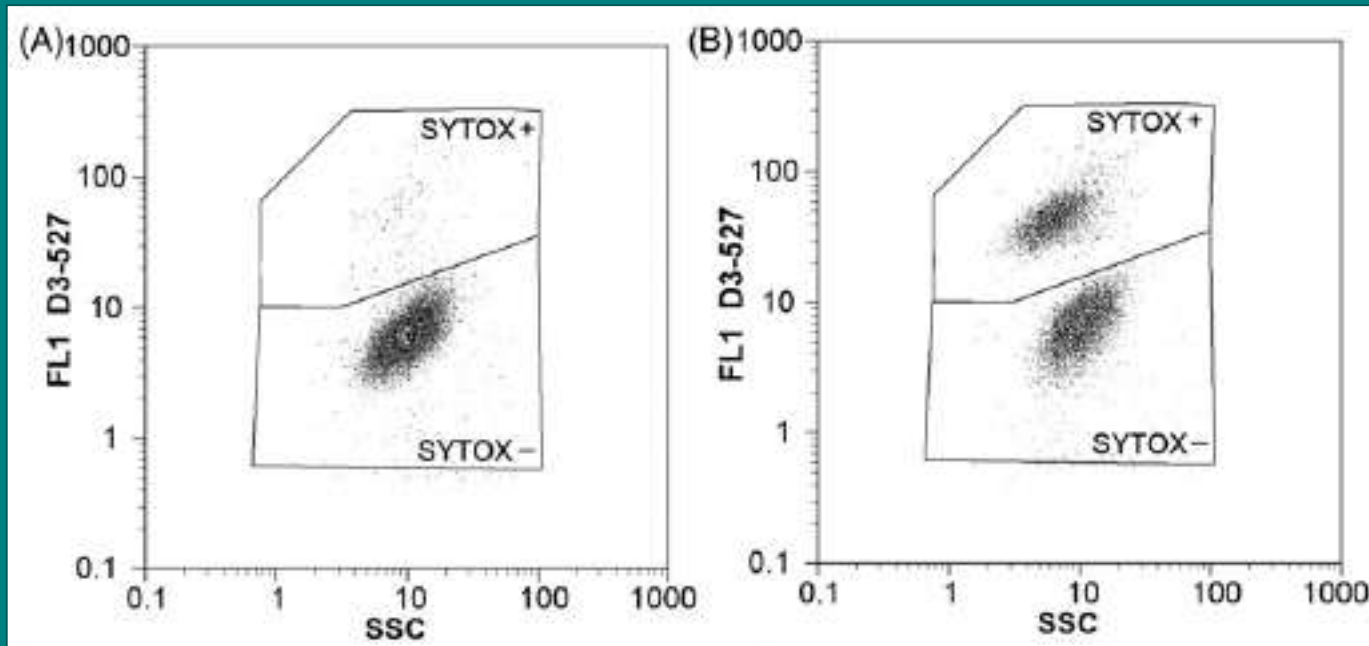
- celkové počty mikroorganismů (bakterií) (TCCs) - po obarvení vzorků barvivem vázajícím se na intracelulární nukleové kyseliny (SYBR Green I, SYTO 9, SYTO 13, DAPI, Hoechst 33342)
- obsah nukleových kyselin – HNA bakterie (High Nucleus Acid content) vs. LNA bakterie (Low Nucleus Acid content)
- metabolická aktivita – 5',6'-carboxyfluorescein diacetát (CFDA)
- respirační aktivita – cyanoditolyl-tetrazoliumchlorid (CTC)
- integrita buněčné membrány
 - bakterie: duální barvení SYBR Green I + propidiumjodid (PI) – PI s výraznou červenou fluorescencí selektivně proniká pouze do buněk s poškozenou membránou (tj. „mrtvých“)
 - sinice (zelené řasy) – SYTOX Green

Průtoková cytometrie



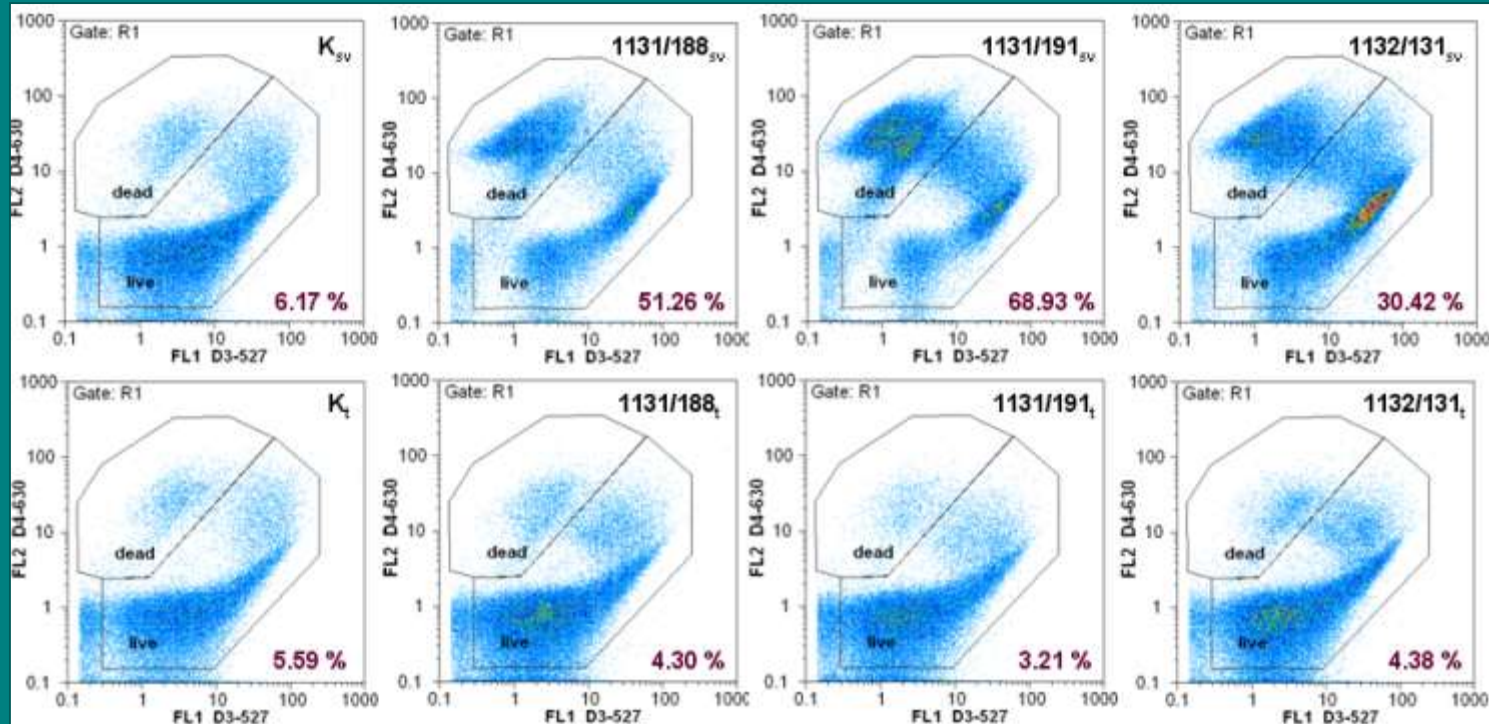
Obr. 2) Bakteriální společenstva ve vzorku pitné vody barveném barvivem SYBR Green I. Ve vzorku detekovány jak bakterie s vysokým obsahem nukleových kyselin (HNA), tak bakterie s nízkým obsahem nukleových kyselin (LNA). (Prest et al., 2013)

Průtoková cytometrie



Obr. 3) Stanovení membránové integrity sinic *Microcystis aeruginosa* na počátku experimentu (A) a po 24 hodinové expozici peroxidem vodíku (B) ve vzorcích barvených barvivem SYTOX Green. Cyanobakterie s intaktní membránou lokalizovány v regionu SYTOX- , buňky s poškozenou membránou pak v regionu SYTOX+ (Mikula et al., 2012)

Průtoková cytometrie



Obr. 4) Hodnocení antibakteriálních účinků různých druhů ftalocyaninů na bakterii *Escherichia coli* za spolupůsobení světla (horní řada) a ve tmě (spodní řada). Intaktní bakterie lokalizovány v regionu „live“, bakterie s poškozenou membránou pak v regionu „dead“. Vzorky obarveny pomocí duálního barvení SYBR Green I + propidiumjodid (Mikula et al., unpublished data)

Průtoková cytometrie

Výhody:

- zvyšující se dostupnost přístrojového vybavení
- rychlost měření (výsledky analýzy známy ještě v den měření)
- možno měřit různé druhy parametrů v originálním vzorku - více informací o fyziologickém stavu mikroorganismů (bakterií, sinic, řas)
- online monitoring - fluorescenční fingerprinting mikrobiálních společenstev (Hammes et al., 2012; Prest et al., 2013)
- vysoká citlivost měření
- „real-time flow cytometry“ - možnost kontinuálního měření dynamiky mikrobiálních procesů v čase (Arnoldini et al., 2013)

Průtoková cytometrie

Nevýhody:

- vyšší vstupní náklady (v poslední době však náklady na pořízení přístroje výrazně klesají)
- praktická nemožnost rozlišení konkrétních rodů/druhů mikroorganismů přítomných ve vzorku
- detekční limit přístroje (většinou v řádech set až tisíců buněk na mL)

Průtoková cytometrie a její využití v analýze vod

- stanovení vlivu chlorace na životaschopnost sinic *Microcystis aeruginosa* (Daly et al., 2007)
- stanovení vlivu chemicky a elektrochemicky dávkovaného chloru na životaschopnost bakterií *Escherichia coli* resp. *Legionella beliardensis* (Wang et al., 2010)
- stanovení vlivu působení oxidačních činidel používaných ve vodárenství na fyziologický stav bakteriálních společenstev pitné vody (Ramseier et al., 2011)
- stanovení účinností nanovláknenných materiálů určených pro filtraci vod (Mikula et al., 2012)
- stanovení vlivu stagnace vody ve vodovodním řadu na její mikrobiologickou kvalitu (Lautenschlager et al., 2010)

Průtoková cytometrie – současnost a perspektivy

- kvantifikace buněk bakterií pomocí průtokové cytometrie schválena švýcarským Federálním úřadem pro veřejné zdraví (FOPH) jako doporučená metoda pro analýzu mikrobiální kvality pitných vod
- další evropské státy budou pravděpodobně v brzké době následovat
- vzhledem k některým nevýhodám (na jejichž odstranění se intenzivně pracuje) nelze ještě v nejbližší době očekávat rutinní využívání průtokové cytometrie v analýzách vod, již teď je však zřejmé, že se jedná o velmi vhodnou alternativu použitelnou v kombinaci s jinými analytickými metodami (kultivační techniky, PCR-DGGE, analýza ATP)

Děkuji Vám za pozornost!