



**Pražské vodovody
a kanalizace**

Zkušenosti z testování průtokové cytometrie s rozlišením živých/mrtvých buněk v reálných a uměle kontaminovaných vzorcích vod

Autoři:

Ing. Jana Zuzáková, Ing. Jana Kabátová, doc. RNDr. Jana Říhová Ambrožová, Ph.D.,
Ing. Lenka Vavrušková, Ing. Zuzana Nováková



SIGRIST BactoSense

Automatický průtokový cytometr pro on-line, nebo laboratorní měření počtu, velikosti a rozlišení živých/mrtvých mikrobiálních buněk (zejm. bakterií) ve vodě



APLIKACE VE VODÁRENSTVÍ

- monitoring kvality surové vody
- monitoring procesů úpravy vody
- kontrola a optimalizace desinfekce pitné vody
- monitoring kvality pitné vody během její distribuce
- kontrola proplachovacích procedur rozvodů pitné vody
- rychlá detekce mikrobiální kontaminace pitné vody
- monitoring veřejných a soukromých domovních instalací
- výzkumné účely



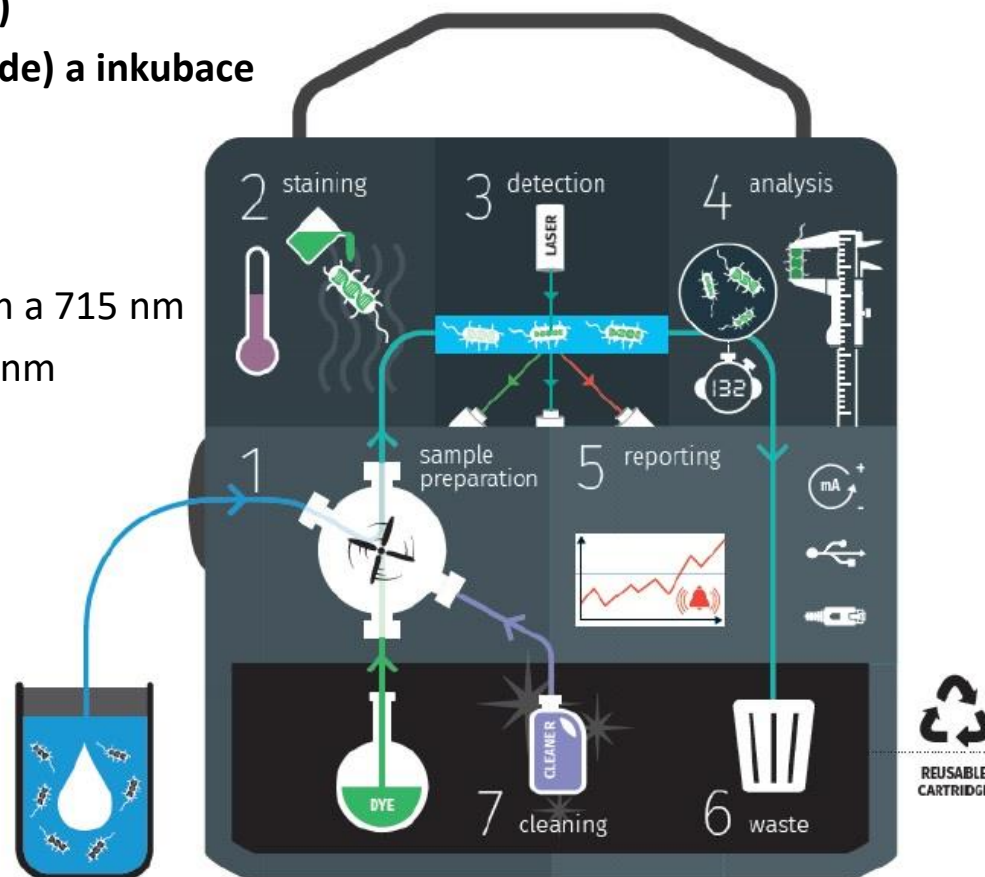
Princip

- 1) odběr vzorku (automaticky/manuálně)
- 2) obarvení (SYBR Green, Propidium Iodide) a inkubace
- 3) průtoková cytometrie

- zdroj světla - laser 488 nm
- 2 detektory fluorescence – 525 nm a 715 nm
- 1 detektor bočního rozptylu - 488 nm

- 4) analýza
- 5) výsledky
- 6) odpad
- 7) čištění

Délka procesu – cca 30 min
Výsledky – cca po 20 min

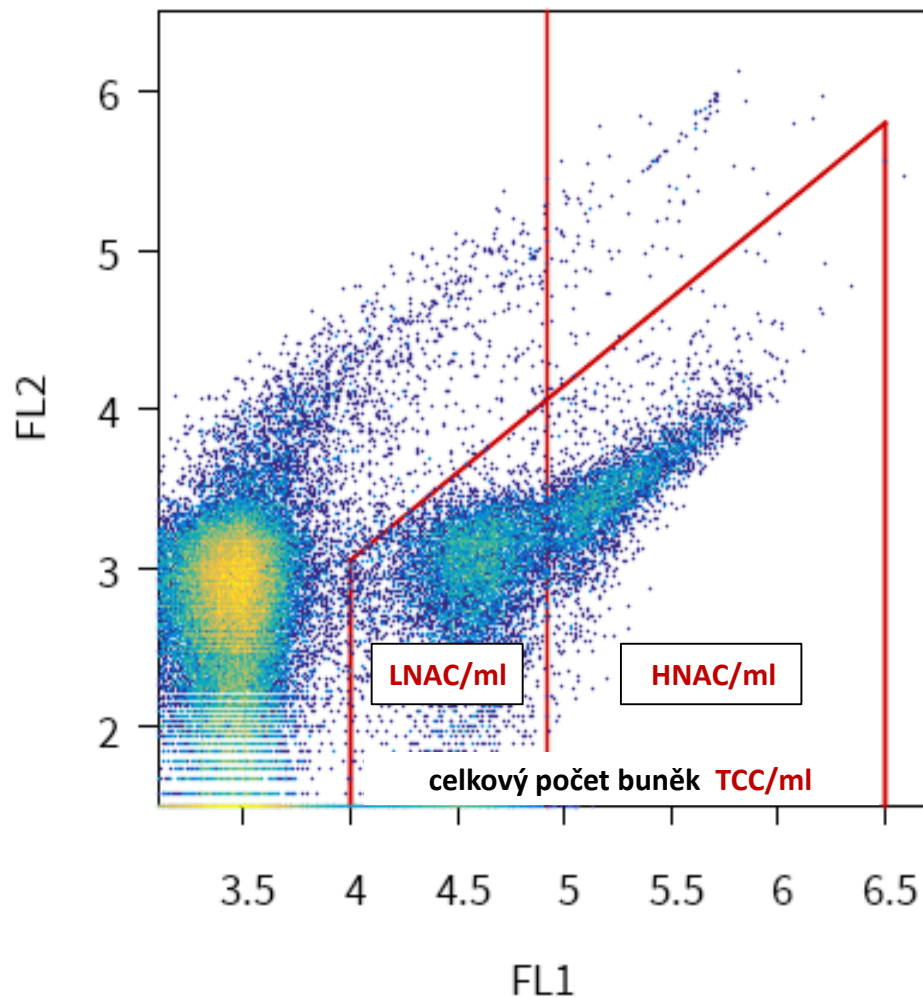




Výstupy – základní kartridž TCC

Fluorescenční barvivo: **SybrGreen**

- celkový počet buněk **TCC/ml**
- velikost buněk:
 - **HNAC/ml** - velké buňky
 - **LNAC/ml** - malé buňky
 - **HNAP [%]** - podíl velké/TCC

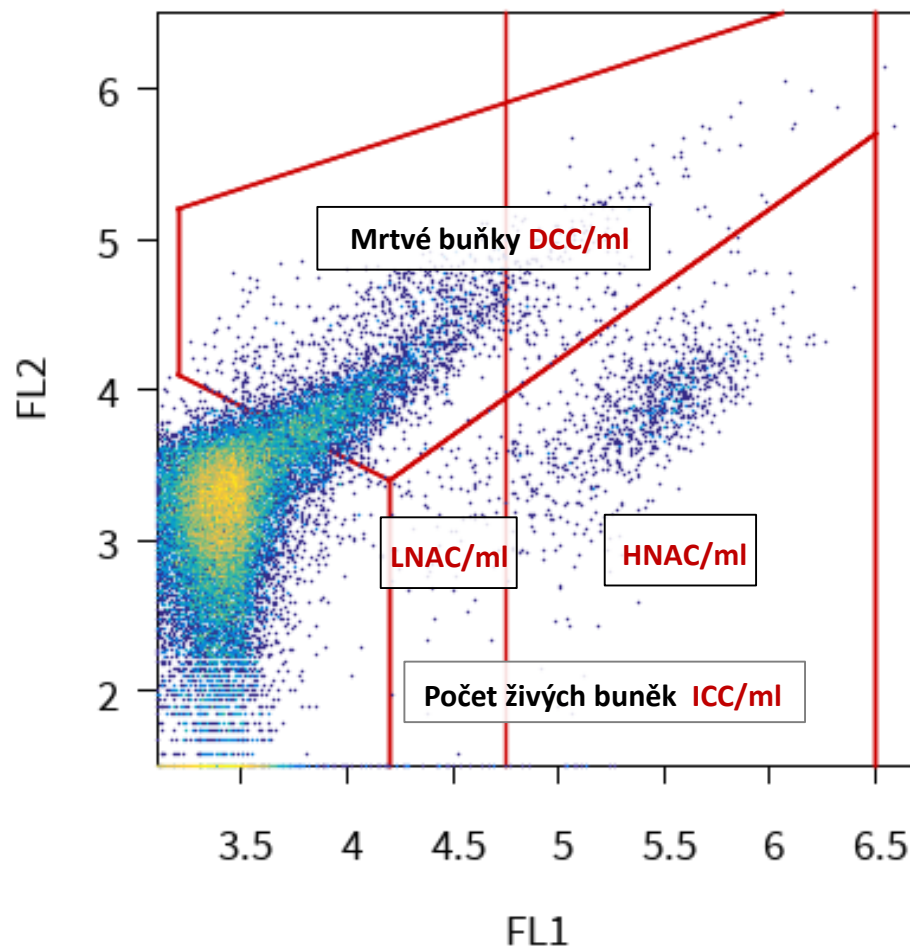




Výstupy – kartridž LDC (živé/mrtvé buňky)

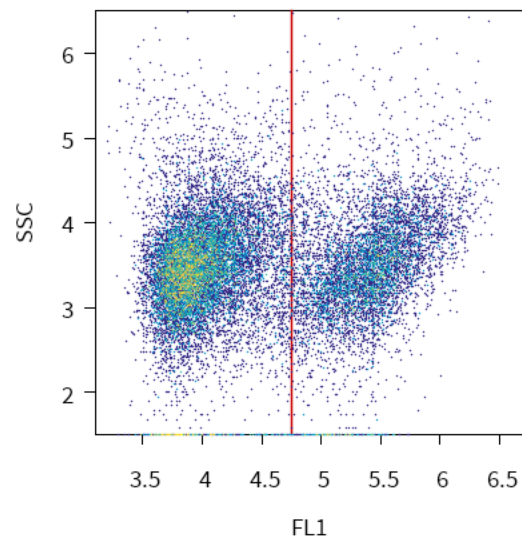
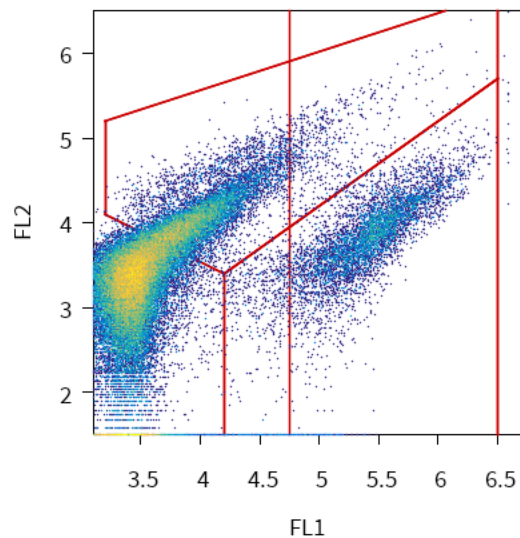
Fluorescenční barvivo: **SybrGreen** a **Propidium iodide**

- celkový počet buněk **TCC/ml**
- počet mrtvých buněk **DCC/ml**
- počet živých buněk **ICC/ml**
- velikost živých buněk
 - **HNAC/ml** – velké buňky
 - **LNAC/ml** – malé buňky
- podíl HNAC/ICC **HNAP [%]**
- podíl ICC/TCC **ICP [%]**

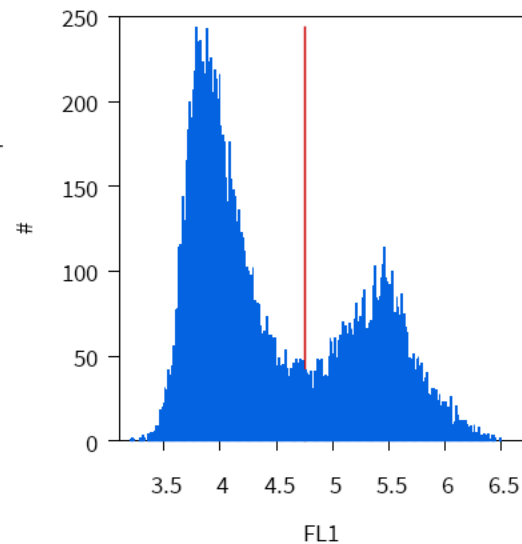




Výstupy



Name:
Protocol: analysis_water
UTC Date: 2019-09-06 12:37:54
Local Date: 2019-09-06 14:37:54 CET/CEST
TCC [/ml]: 227400
HNAP [%]: 90.55
ICC [/ml]: 78533
DCC [/ml]: 148866





I. Etapa testování – 11/2018

- **Kartridž TCC**
- výsledky prezentovány na konferenci **Hydroanalytika 2019**
- nevhodný pro jednorázovou detekci kontaminace v pitné vodě
- vhodný pro dlouhodobé monitorování zvolených míst

II. Etapa testování – 9/2019

- **Kartridž LDC**
- otestována možnost rozlišení živých/mrtvých buněk



II. Etapa testování – 9/2019

- monitoring jednotlivých technologických stupňů úpravy vody
- uměle kontaminované vzorky vody
- uměle kontaminované vzorky vody - **vliv hygienického zabezpečení**

Sledované parametry:

U vzorků byly zároveň s **počty buněk** zjišťovány také vybrané **mikrobiologické ukazatele**.

BactoSense	Kultivační metody
TCC/ml	<i>Escherichia coli</i>
ICC/ml	koliformní bakterie
DCC/ml	počty kolonií při 22 °C
HNAC/ml	počty kolonií při 36 °C
LNAC/ml	



Technologické vzorky – zdroje surové vody

Testováno:

- vodárenská nádrž
- tekoucí povrchová voda

název vzorku	°C	/ml	/ml	%	/ml	/ml	/ml	KTJ/100 ml		KTJ/1ml	
	t	TCC	ICC	ICP	DCC	HNAC	LNAC	KB	<i>E. coli</i>	PK 36 °C	PK 22 °C
vodárenská nádrž – 11/2018	7,5	1 788 610	-	-	-	1 410 877	377 733	190	1	13	150
vodárenská nádrž – 9/2019	8,2	1 772 882	1 449 872	81,8	323 010	1 253 296	196 574	0	0	66	370
tekoucí povrchová voda – 11/2018	9,8	3 251 800	-	-	-	2 535 420	716 380	2 100	34	240	2 500
tekoucí povrchová voda – 9/2019	18,1	7 193 740	6 000 660	83,4	1 193 080	5 619 280	381 380	3 500	540	2 400	6 100

- závislost oživení na teplotě
- vyšší oživení **tekoucí povrchové vody**
- stejný podíl ICC/TCC – **cca 80 %**



Technologické vzorky – upravená voda

Testováno:

- upravená voda A - zdroj vodárenská nádrž, chlorace
- upravená voda A - zdroj vodárenská nádrž, ozonizace a chlorace
- upravená voda B - zdroj podzemní voda, chlorace

název vzorku	/ml	/ml	%	/ml	/ml	/ml	KTJ/100 ml		KTJ/1ml	
	TCC	ICC	ICP	DCC	HNAC	LNAC	KB	<i>E. coli</i>	PK 36 °C	PK 22 °C
upravená voda A (chlorace)	471 882	21 743	4,6	450 139	15 804	5 939	0	0	3	0
upravená voda A - (ozonizace, chlorace)	9 909	-	-	-	7 107	2 802	0	0	0	0
upravená voda B (chlorace)	167 589	50 250	30,0	117 339	12 201	38 049	0	0	1	0

- nejnižší TCC/ml – upravená voda A zabezpečená O₃ a Cl₂
- upravená voda B – z ICC/ml převažují malé buňky



Detekce fekálního znečištění

UMĚLE PŘIPRAVENÉ VZORKY

název vzorku	/ml	/ml	%	/ml	/ml	/ml	KTJ/100 ml	
	TCC	ICC	ICP	DCC	HNAC	LNAC	KB	<i>E. coli</i>
matrice (podzemní voda bez hyg. zabezpečení)	252 877	139 555	55,19	113 322	41 688	97 866	0	0
matrice + směs <i>E. coli</i> (CCM 3954, CCM 4787), <i>E. faecalis</i> (CCM 4224), ředění 1:10 ⁶	271 266	164 733	60,73	105 533	51 966	112 766	4 450	4 450

VÝSLEDKY Z 11/2018

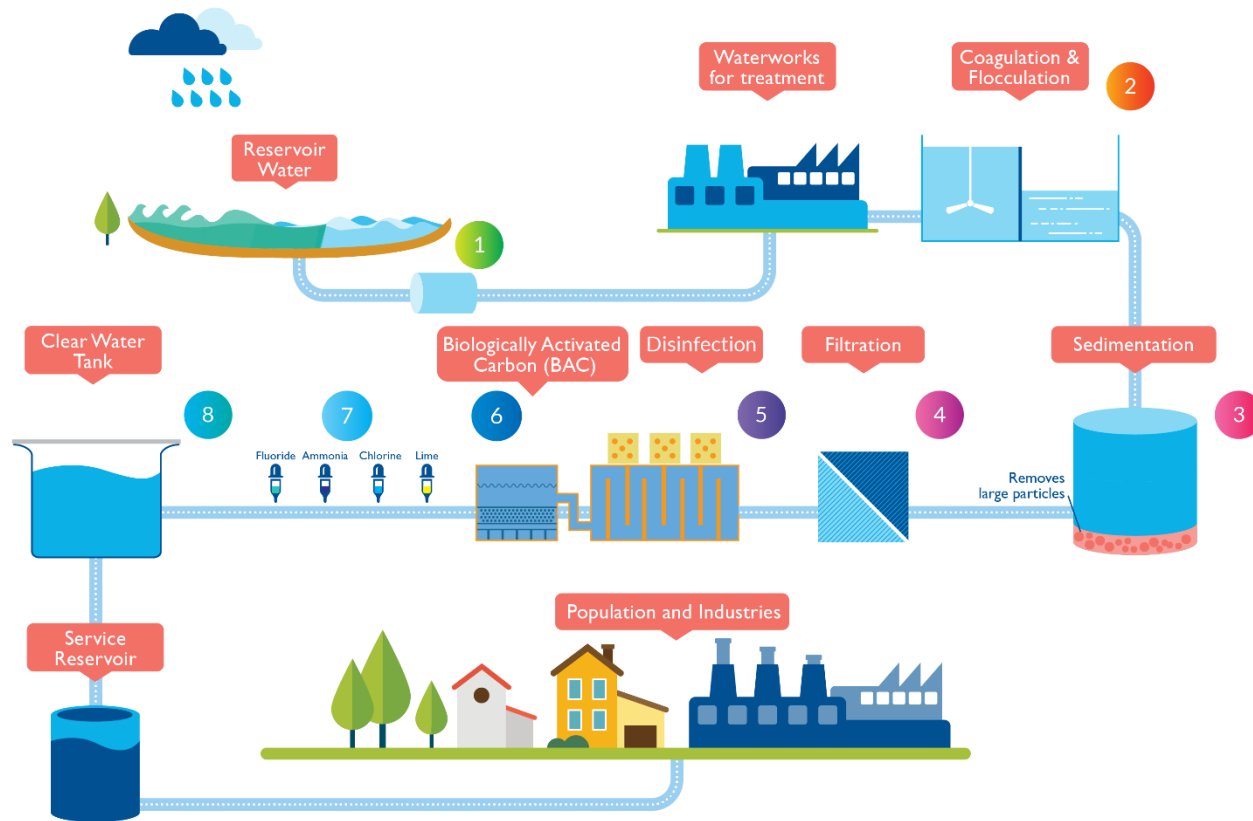
název vzorku	/ml	/ml	/ml	%	KTJ/100 ml	
	TCC	HNAC	LNAC	HNAP	koliformní bakterie	<i>E. coli</i>
matrice (pitná voda)	22 588	20 177	2 411	89,3	0	0
matrice + OV I, 1: 4 000	71 338	58 336	13 001	81,8	17 000	2 000
matrice + OV I, 1: 40 000	38 638	33 244	5 394	86,0	1 600	370



NELZE JEDNORÁZOVĚ POSODIT HYGIENICKOU NEZÁVADNOST PITNÉ VODY



Detekce mikrobiální kontaminace



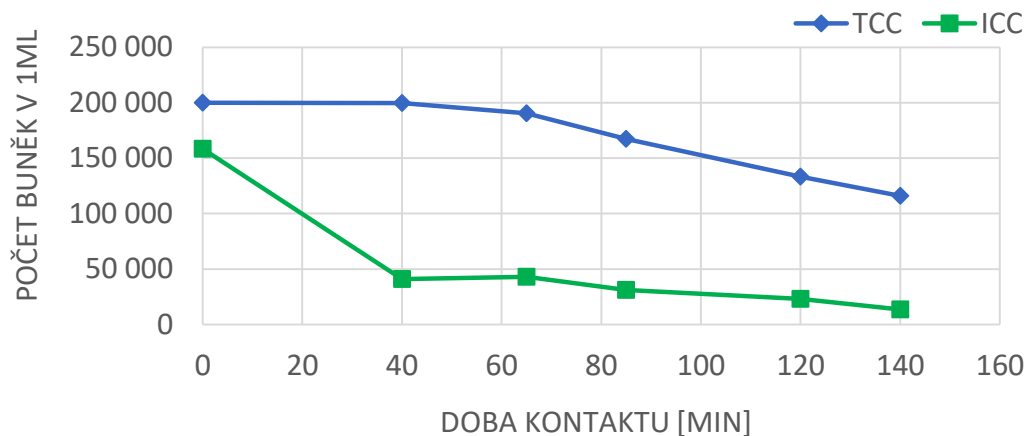
každé místo v systému má své přirozené pozadí → pro správnou interpretaci výsledků TCC/ml je nezbytné toto pozadí zahrnout do vyhodnocení případných změn kvality pitné vody



Vliv hygienického zabezpečení

Testováno:

- ☐ NaClO (SAVO, 4,7%),
- ☐ matrice + směs *E. coli* (CCM 3954, CCM 4787), *E. faecalis* (CCM 4224)



t	/ml	/ml	%	/ml	/ml	MPN/100 ml			KTJ/100ml	
	TCC	ICC	ICP	HNAC	LNAC	KB	<i>E. coli</i>	IE	KB	<i>E. coli</i>
0 min	199 944	158 500	79,27	49 622	108 877	4 352	2 613	31	4 450	4 450
40 min	199 553	40 993	20,54	6 376	34 617	0	0	0	0	0
65 min	190 433	42 844	22,50	3 077	39 766	-	-	-	-	-
85 min	167 355	31 122	18,60	1 733	29 388	0	0	0	0	0
120 min	133 422	22 944	17,20	1 300	21 644	0	0	0	0	0
140 min	115 911	13 544	11,68	522	13 022	-	-	-	-	-



Závěr

- **Nevhodný jako přenosný analyzátor k jednorázovému zjištění mikrobiologické kvality pitné vody, resp. k detekci nízké koncentrační úrovně mikrobiální (fekální) kontaminace**



- **Použitelný pro dlouhodobé monitorování zvolených míst (manuální i automatický režim) v rámci provozního monitoringu, např. on-line monitorování změny kvality surové/upravené vody, sledování účinnosti jednotlivých stupňů úpravy pitné vody**





Děkuji za pozornost!