



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE



ÚSTAV TECHNOLOGIE
VODY A PROSTŘEDÍ

ONLINE BIOSENZORY PŘI HLEDÁNÍ KONTAMINACE PITNÉ VODY

Ing. Jana Zuzáková

Ing. Jana Zuzáková, Doc. RNDr. Jana Říhová Ambrožová, PhD., Ing. Dana Vejmelková, PhD., Ing. Roman Effenberg,
RNDr. Miroslav Ledvina CSc.

Kvalita pitné vody

- Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody

- chemické ukazatele
- fyzikální ukazatele
- organoleptické ukazatele
- **mikrobiologické ukazatele**
- biologické ukazatele

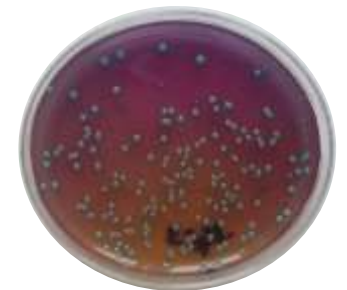
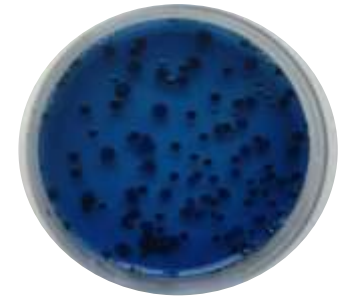
č.	ukazatel	jednotka	limit	typ limitu
1	<i>Clostridium perfringens</i>	KTJ/100 ml	0	MH
2	Intestinální enterokoky	KTJ/100 ml KTJ/250 ml	0 0	NMH NMH
3	<i>Escherichia coli</i>	KTJ/100 ml KTJ/250 ml	0 0	NMH NMH
4	koliformní bakterie	KTJ/100 ml KTJ/250 ml	0 0	MH MH
5	mikroskopický obraz - abioseston	%	10	MH
6	mikroskopický obraz - počet organismů	jedinci/ml	50	MH
7	mikroskopický obraz - živé organismy	jedinci/ml	0	MH
8	počty kolonií při 22 °C	KTJ/ml	Bez abnormál- ních změn	MH
		KTJ/ml	200	DH
		KTJ/ml	100	NMH
9	počty kolonií při 36 °C	KTJ/ml	Bez abnormál- ních změn	MH
		KTJ/ml	40	DH
		KTJ/ml	20	NMH
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KTJ/250 ml	0	NMH

Mikrobiologická kvalita vody

- Kultivační metody [KTJ/ml] – dle platné legislativy

+ specifita, cenová dostupnost, jednoduchost

- vyšší koncentrace nutrientů v médiu, ne všechny bakterie lze kultivovat, !!! **dlouhá doba kultivace** !!!



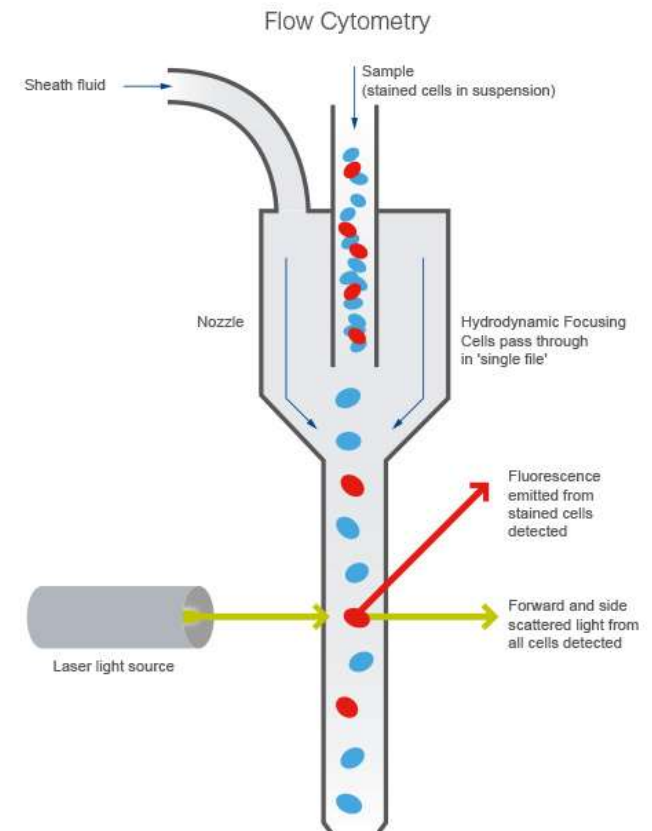
Ukazatel	Doba kultivace	Doba confirmace
<i>Escherichia coli</i>	18h – 24h	2h – 4h
Koliformní bakterie	18h – 24h	x
Intestinální enterokoky	44h ± 4h	2h

Alternativní metody

- **Průtoková cytometrie** (FCM- flow cytometry)

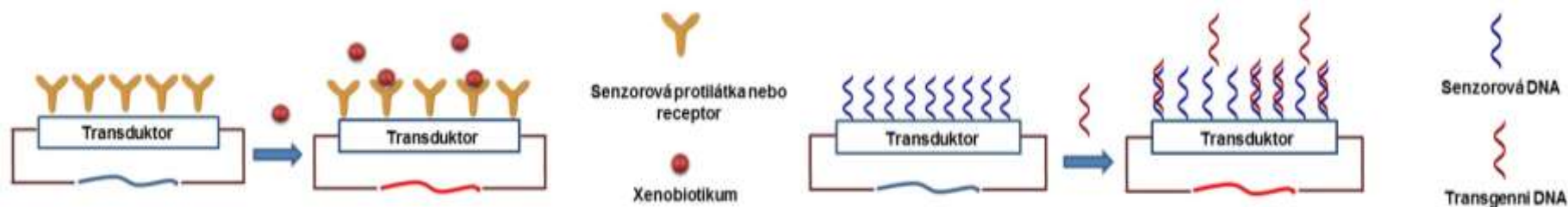
Výstupem je „celkový počet buněk“ (TCC), informace o jednotlivých buňkách a jejich fyziologickém stavu

- +
 - rychlost
 - automatizace (online/manuálně)
 - realističtější výsledky
- - nerozeznávání agregátů/shluků od jednotlivých buněk → sonikace
 - **!!! výsledek v TCC !!!**
(chybí detekce a kvantifikace konkrétních skupin organismů)



Biosenzory

Biosenzory jsou analytické přístroje složené ze dvou základních částí – **biologického prvku (senzorová biomolekula) a transduktoru**



Ledvina M. 2017. Biosenzory jako nástroj pro monitorování bakteriální kontaminace pitné vody v reálném čase. Sbor.konf. Vodárenská biologie 2017, 1.-2.února, Praha ČR, Říhová Ambrožová J., Pecinová A. (Edit.), 30-33.

- uplatnění v klinické medicíně, potravinářství, v životním prostředí ...
- perspektivní pro **vodárenství**
- **online monitoring kvality pitné vody**

+ rychlost, citlivost, selektivita

Projekt a stavba biosenzoru

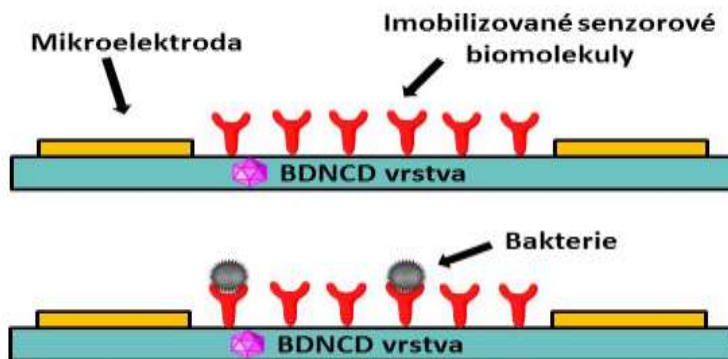
FV10312 Biosenzory pro detekci bakteriální kontaminace pitné vody

Cíl - vývoj a aplikace ultracitlivého elektrochemického biosenzoru

Modelový organismus – bakterie *Escherichia coli*

Vazebná interakce

- protilátka: **intimin**
- senzorové molekuly: **glykosidy** odvozené od L-fukózy, D-manózy a D-galaktózy a **peptidy**



Metodika

- ✓ senzоровé molekuly syntetizovány
- ✓ testování selektivity k povrchu bakterií *E. coli*

Senzorové molekuly označené fluorescenčními barvivy

- **Cy5** – č. 1, 2, 3, 5, 7, 9
- **Bodipy** – č. 4, 6, 8

Testované kmeny

- *Escherichia coli* CCM 3954
- *Escherichia coli* CCM 4787 - patogenní O157:H7
- *Staphylococcus aureus* CCM 3953 (negativní kontrola)

Fixace vzorků

- skla s epoxidovou maskou
- aplikace preparátu (označené senzorné molekuly s čistými kmeny)
- fluorescenční barvivo DAPI - zviditelnění buněk
- Mounting oil/ Vectashield proti vysvěcování

Mikroskopické vyšetření

- Epifluorescenční mikroskop typ Olympus BX51
- 3D konfokální mikroskop typ Olympus Lext OLS 3100



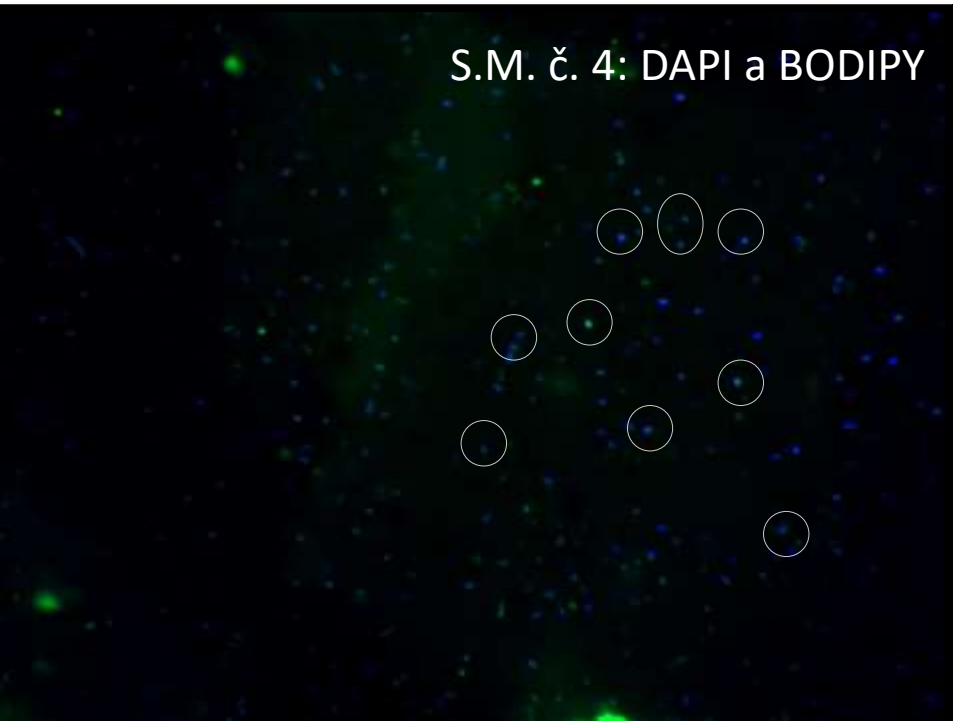
Optimalizace postupu

(různé úpravy čisté suspenze bakterií, nominální objemy, barvení, fixace)

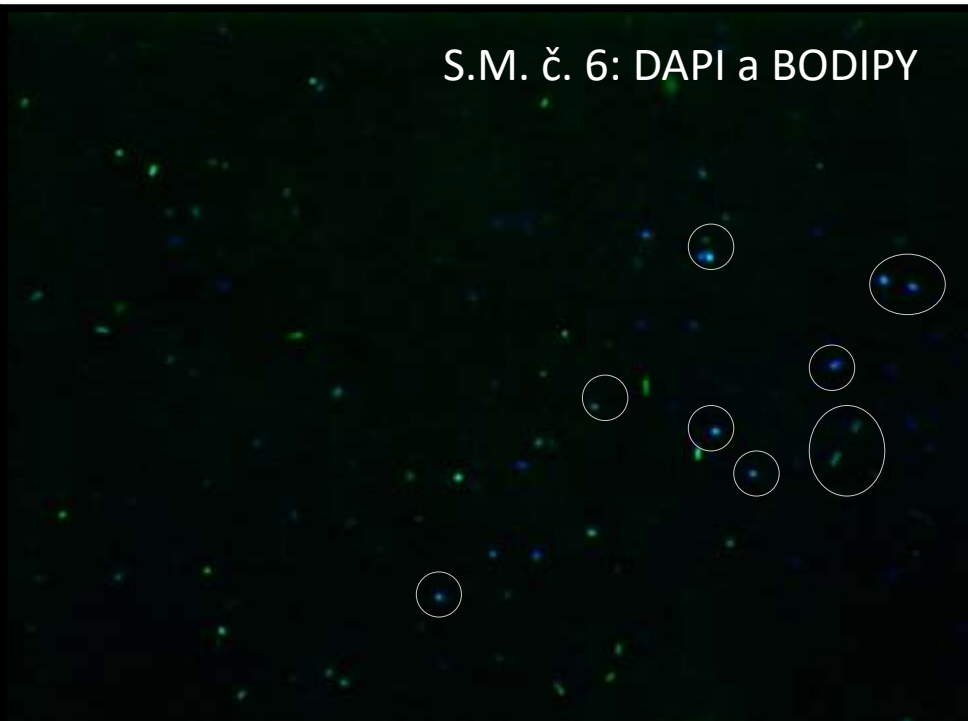
Výsledky

Escherichia coli CCM 4787 O157:H7

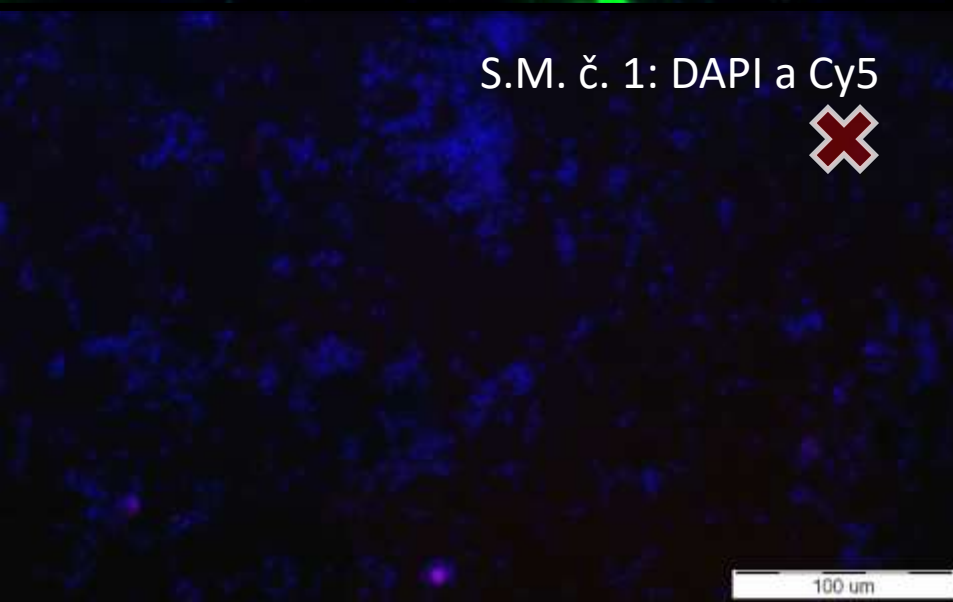
S.M. č. 4: DAPI a BODIPY



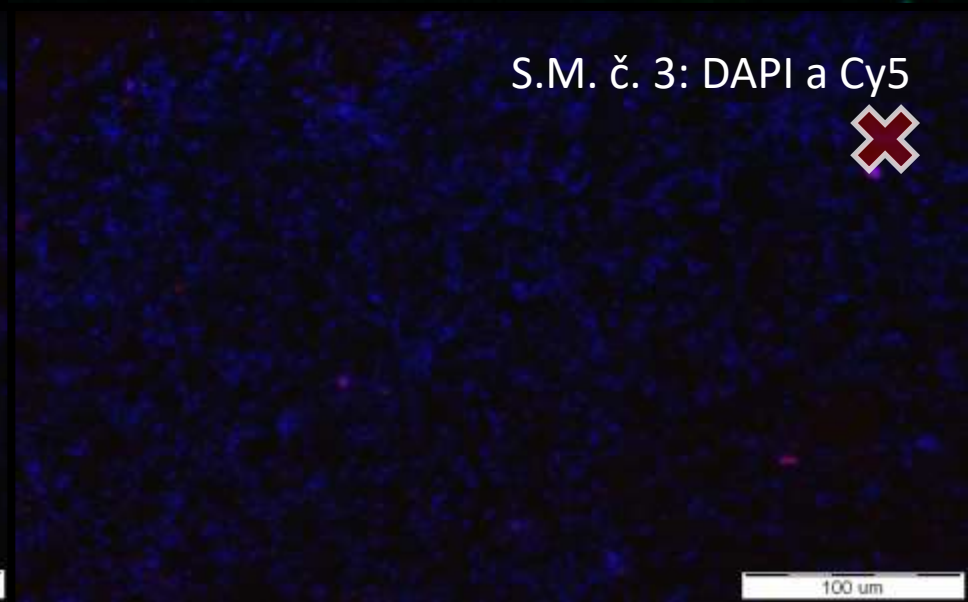
S.M. č. 6: DAPI a BODIPY



S.M. č. 1: DAPI a Cy5



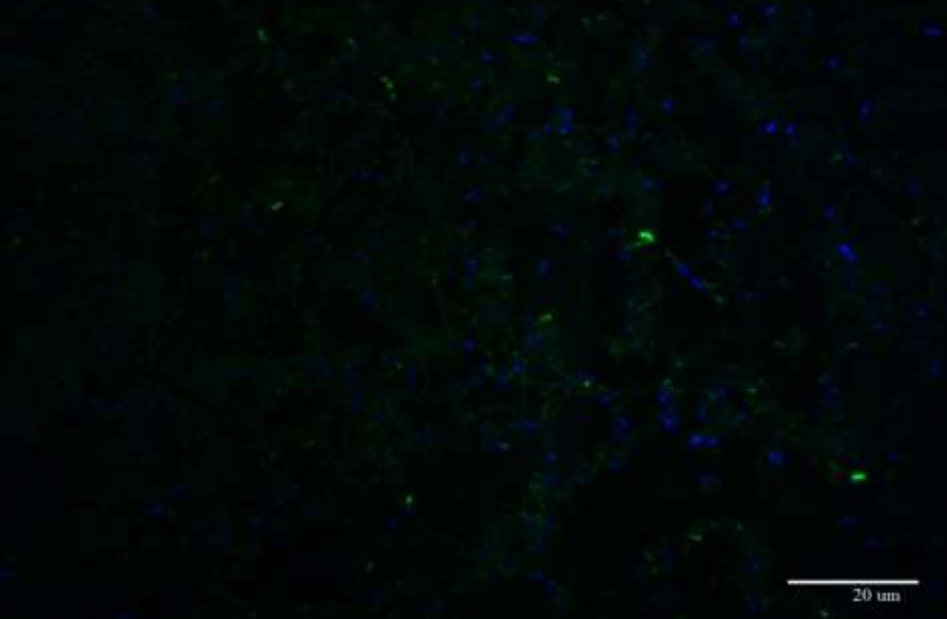
S.M. č. 3: DAPI a Cy5



Výsledky

Escherichia coli CCM 3954

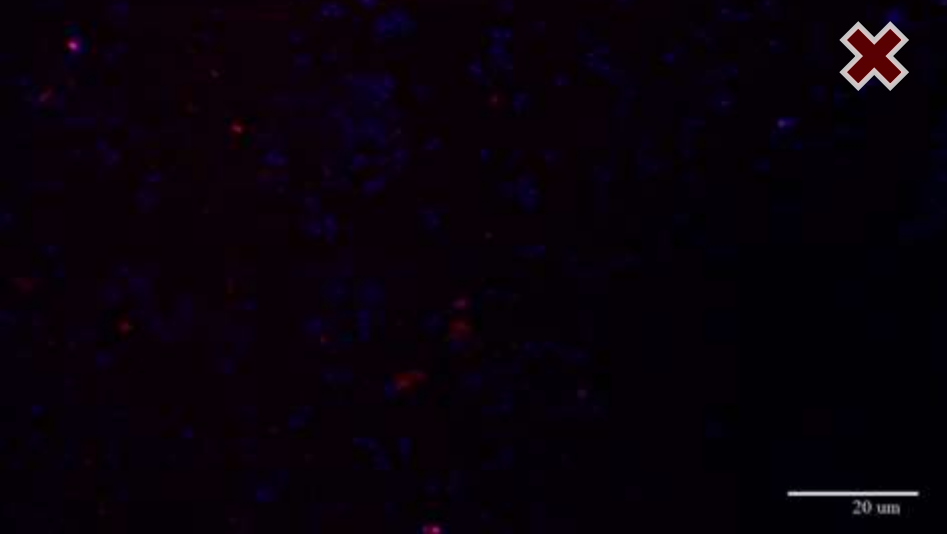
S.M. č. 8: DAPI a BODIPY



S.M. č. 8: DAPI a BODIPY



S.M. č. 3: DAPI a Cy5



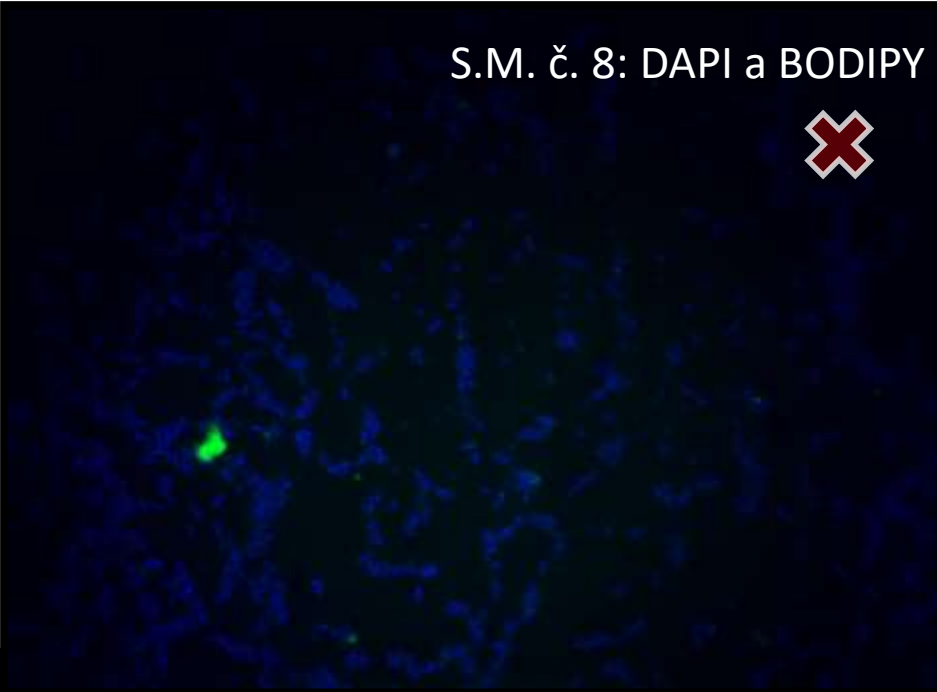
S.M. č. 1: DAPI a Cy5



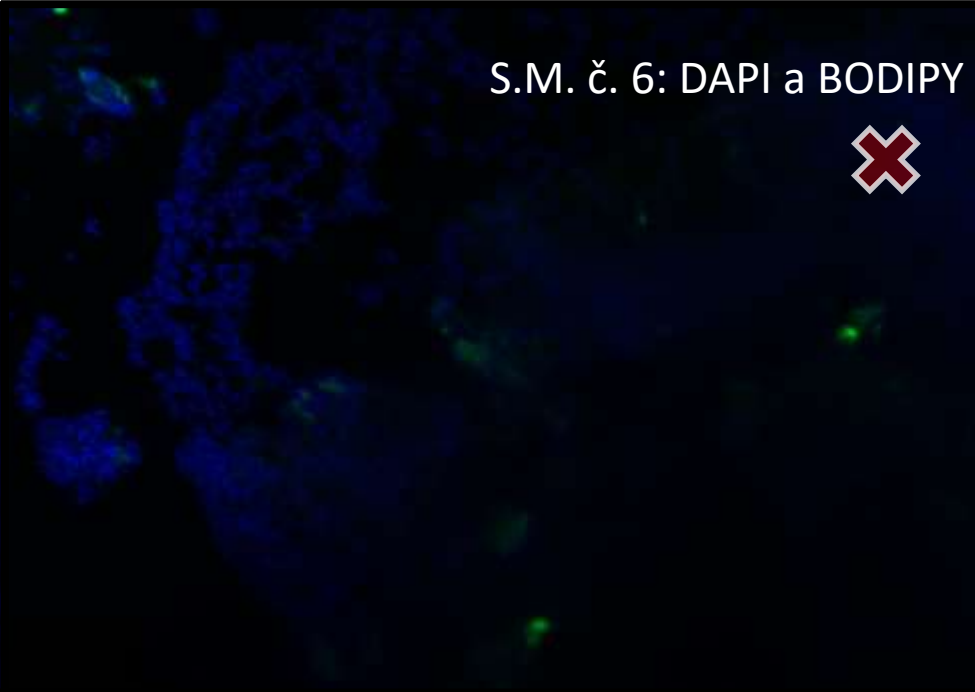
Výsledky

Staphylococcus aureus CCM 3953

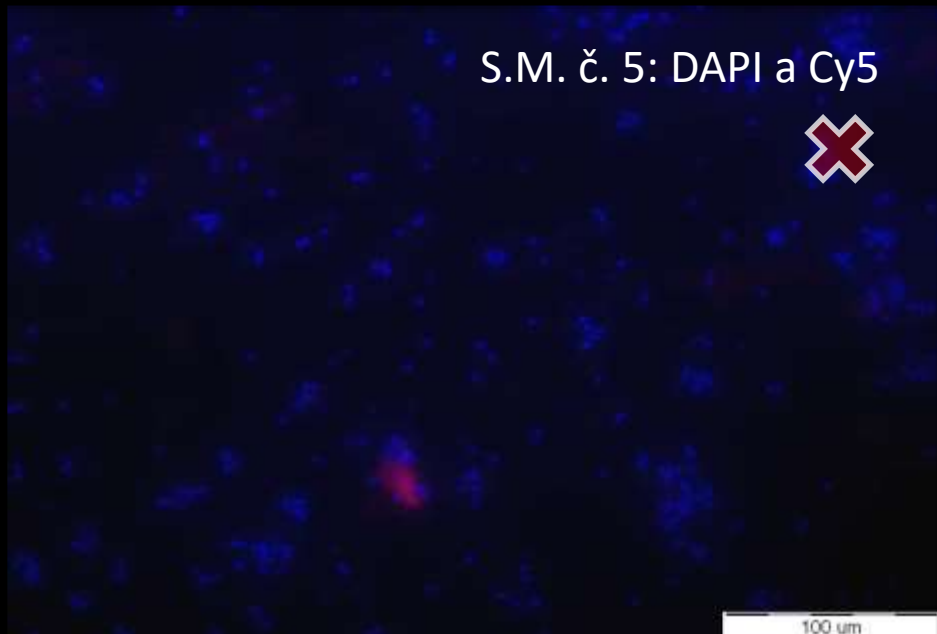
S.M. č. 8: DAPI a BODIPY



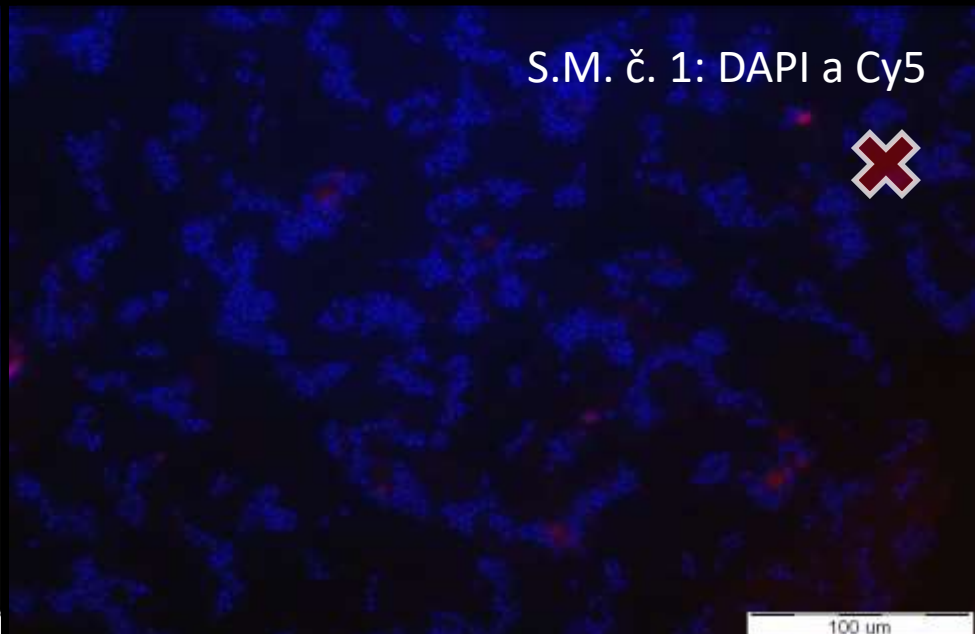
S.M. č. 6: DAPI a BODIPY



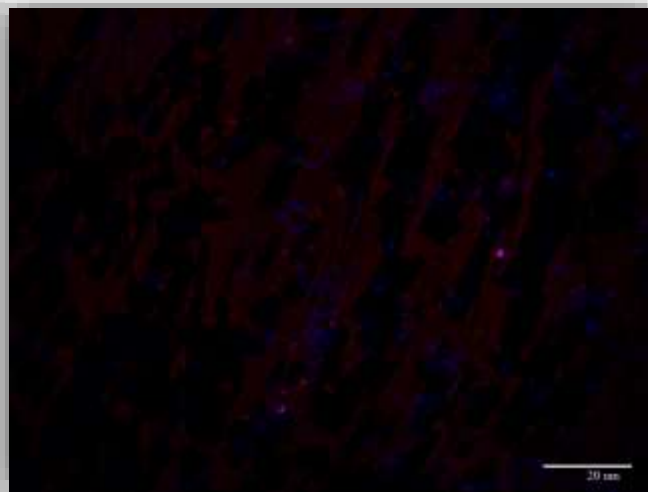
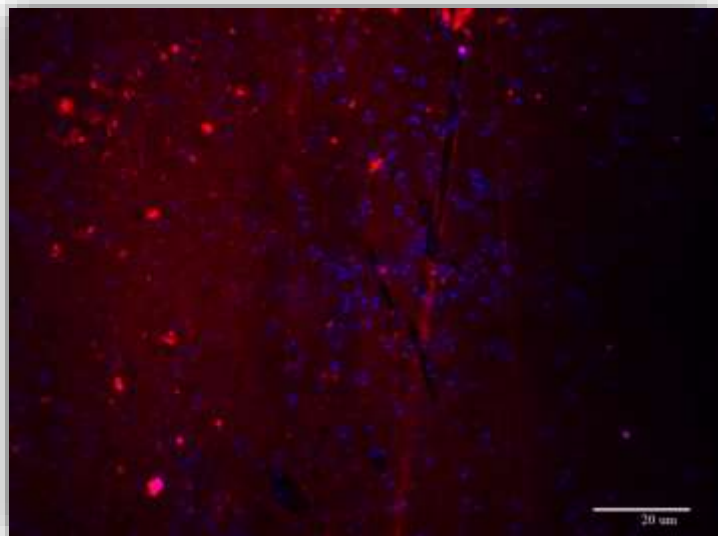
S.M. č. 5: DAPI a Cy5



S.M. č. 1: DAPI a Cy5

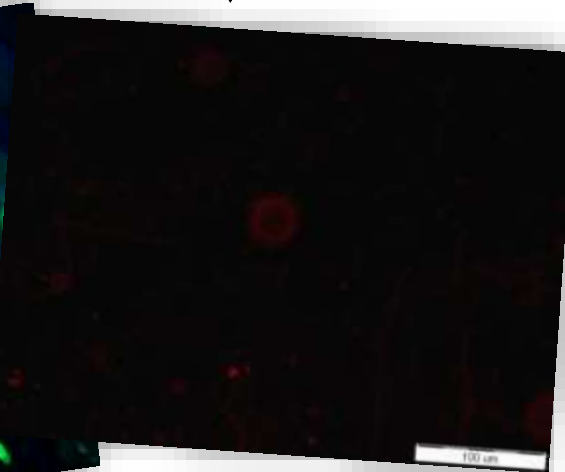
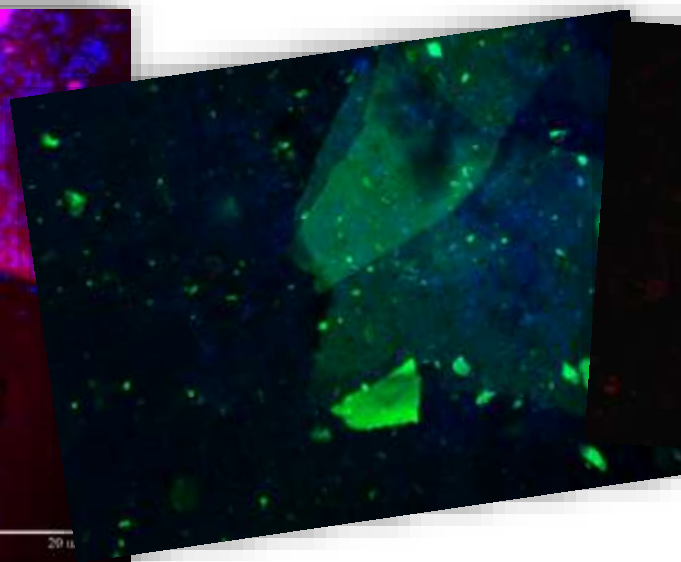
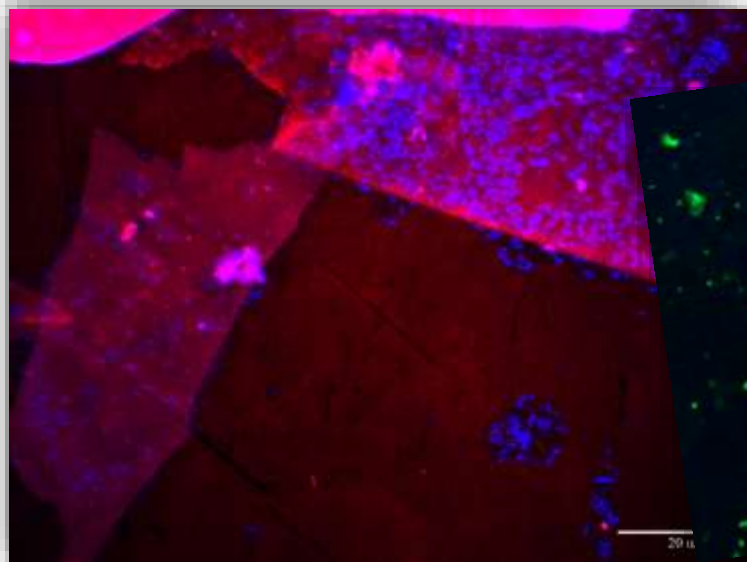


Falešný pozitivní signál



← Barvení skel

↓ Barvení nečistot



Závěr

- ✘ **senzorové molekuly označené Cy5** měly **nulovou afinitu** k buňkám *Escherichia coli* CCM 4787 i CCM 3954 a neposkytovaly **žádný signál** k buňkám *Staphylococcus aureus* CCM 3953
- ✔ **senzorové molekuly označené Bodipy** poskytovaly **pozitivní signál** k buňkám *Escherichia coli* CCM 4787 i CCM 3954 a **negativní signál** k buňkám *Staphylococcus aureus* CCM 3953

Plány do budoucna

- ✔ optimalizace postupu přípravy sensorových molekul a fixace vzorků
- ✔ testy s novými peptidy a sacharidy označenými BDP
- ✔ testování selektivity k povrchu bakterií *E. coli*
- ✔ testy se směsnou kulturou
- ✔ testy s živými a mrtvými buňkami
- ✔ testy se surovou pitnou vodou
- ✔ testy s pitnou vodou odebranou z vodovodního řadu
- ✔ použití kultivačních metod s cílem verifikace postupu a zjištění určité korelace