

VODOHOSPODÁŘSKÉ, TECHNICKO-EKONOMICKÉ INFORMACE

VTEI / 2021 / 1

TÉMA

Mikrobiologie vody

24 / Změna mikrobiálního společenství při terciárním čištění odpadních vod

48 / Rozhovor s mikrobioložkou RNDr. Danou Baudišovou, Ph.D.

50 / Monitoring koronaviru SARS-CoV-2 v odpadních vodách – co nám dosud ukázal a kam směřuje

Louis Pasteur

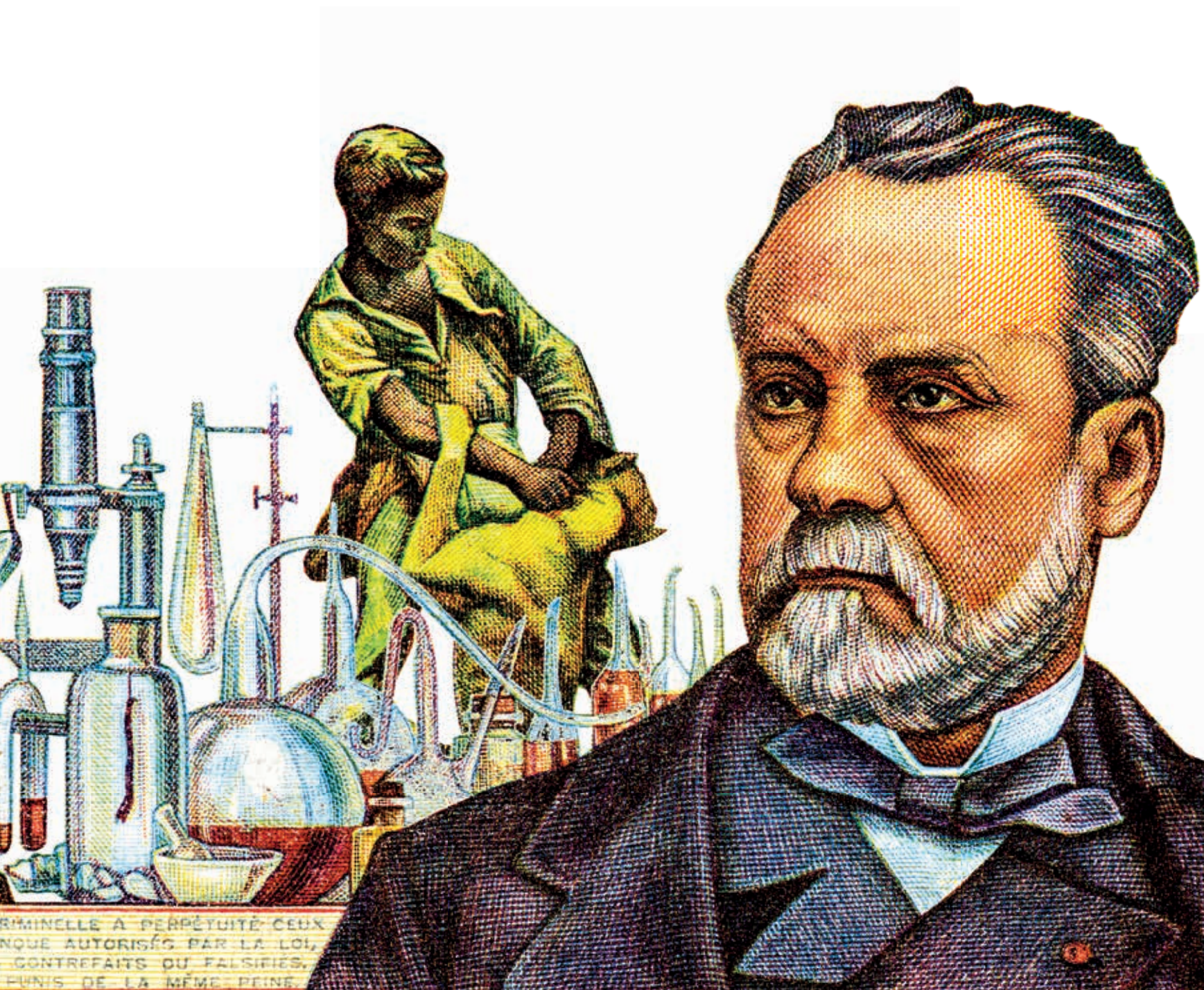
(27. 12. 1822–28. 9. 1895)

Louis Pasteur byl francouzským chemikem a biologem, který se díky svému nadšení a vědeckému bádání stal jednou z nejvýznamnějších osobností v oblasti mikrobiologie. V průběhu své profesní kariéry se mu podařilo z mikrobiologie vytvořit vědní obor. Jeho nejznámějším objevem byl proces kvašení. Nepopíratelně dokázal, že proces kvašení je způsoben kvasinkami, živými buňkami, které se běžně vyskytují v našem okolí. Obdobně se zasloužil o objev pasterizace či řešení problémů s kysáním vína či piva v podobě vysokých teplot, které zničí přítomné bakterie. Svým vědeckým bádáním tak odhalil skutečnost, že existují organismy, které přežívají i bez kyslíku. Tímto však výčet Pasteurových objevů nekončí. Zásadním milníkem byla jeho

zásluha o vznik oboru imunologie a očkování proti vzteklině. Pasteur dal za vznik myšlenky, že proti mikroorganismům lze bojovat extraktem z původce choroby, a vytvořil tak již zmíněnou vakcínu.

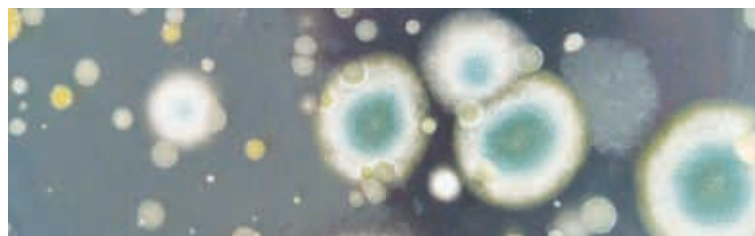
Samozřejmě jeho bádání nezůstalo bez odporu, za svůj profesní život se setkal s několika svými odpůrci, avšak bez úspěchu. Nelze tedy pochybovat, že Louis Pasteur byl velkým vědcem, který nám zanechal dědictví, které je potřeba dále rozšiřovat.

Redakce



CRIMINELLE A PERPÉTUITÉ CEUX
QUE AUTORISÉS PAR LA LOI,
CONTREFAITS OU FALSIFIÉS,
PUNIS DE LA MÊME PÈNE.

Obsah



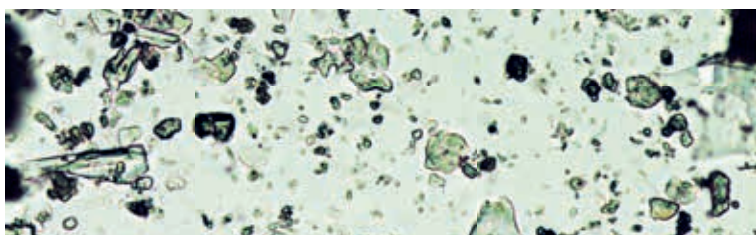
3 Úvod

4 Mikrobiologické zamyšlení

Hana Mlejnková

6 Stanovení somatických kolifágů a koncentrační metody používané pro vzorky vod s jejich nízkým výskytem

Jana Zuzáková, David Janák, Jana Říhová Ambrožová



15 Nová směrnice EU o pitné vodě

Dana Baudišová, František Kožíšek

19 Hledání vhodných molekulárních markerů pro rozlišení různých druhů enterokoků

Šárka Bobková, Dana Baudišová

24 Změna mikrobiálního společenství při terciárním čištění odpadních vod

Andrea Benáková, Eliška Vobecká, Martin Pečenka, Jana Říhová Ambrožová, Jiří Wanner

33 Vliv revize ČSN 75 7713 (2015) na výsledky stanovení abiosestonu

Petr Pumann

37 Využití metod dálkového průzkumu Země pro monitoring stavu koupacích míst

Václava Maťašovská, Filip Kothan, Ondřej Ledvinka, Petr Pumann, Tomáš Fojtík, Marcela Makovcová, Lenka Bendakovská

47 Autoři

48 Rozhovor s mikrobioložkou RNDr. Danou Baudišovou, Ph.D.

Hana Mlejnková



50 Monitoring koronaviru SARS-CoV-2 v odpadních vodách – co nám dosud ukázal a kam směřuje

Hana Mlejnková, Kateřina Sovová, Věra Očenášková, Eva Juranová, Lucie Jašíková, Petra Vašíčková, Alena Fialová



Vážení čtenáři,

jak to vypadá, tak asi byly opravdu vyslyšeny prosby, které v předchozích letech zaznívaly, a konečně se nám snad vrací období, které bychom z pohledu vody mohli nazvat standardním. Minulý rok byl ve srovnání s předchozími šesti lety rozumně vodným a zůstalo jen několik málo oblastí, kde sucho ještě v podzemí doznívalo. Sněhová pokrývka, kterou nám tato zima přináší i do měst, je nadějným startem do dalšího roku. Doufejme, že sněh bude odtávat tak pomalu, aby nám přinesl kýžené obohacení podzemních vod doplňujících tolik potřebné zásoby, ale zároveň nezpůsobil povodně, které nám vodu bez užitku odvedou pryč. Určitě bychom se však neměli nechat ukolébat pocitem, že už to tak zůstane navěky.

Co však s námi zůstane nadlouho, a dá se usuzovat, že pro naši generaci bohužel už asi napořád, je klimatická změna se svými výkyvy počasí a zcela jistě i rostoucí potřeba kvalitní vody. Evropská unie sice cíle v oblasti vody na první pohled pro nás, jako stát nemající moře, zredukovala jen na ochranu zdrojů pitné vody a řešení odpadních vod včetně kalů, ale když se zamyslíme nad skutečným rozměrem a dopadem těchto cílů v kontextu našeho území,

které je střechou Evropy, tak budeme mít co dělat, abychom je naplnili. Dnes už je asi každému jasné, že se musíme intenzivně starat o zadržování vody všemi možnými způsoby a zároveň nekompromisně dbát na její kvalitu. Stejně jako nám naši předci zanechali vodohospodářská díla a principy, ze kterých dnes profitujeme, tak i my bychom svým potomkům měli zanechat životní prostředí ve stavu, za který nám poděkují. Jsem si jist, že inspiraci najdete v tomto čísle VTEI, které je věnované mikrobiologii vody.



Ing. Tomáš Urban
ředitel VÚV TGM, v. v. i.

Mikrobiologické zamyšlení

Existenci bakterií objevil v roce 1676 Antoni van Leeuwenhoek a nazval je *animalcules* (zvířátka). Pod vlastníma rukama sestaveným mikroskopem, který dokázal až 275x zvětšení, pozoroval čtyři druhy malých zvířátek, z čehož tři druhy byly prvoci (0,005 až 0,05 mm) a čtvrtý mnohonásobně menší popsal Královské společnosti v Londýně takto: kdyby jich leželo 100 vedle sebe, nedosáhly by velikosti pískového zrna a ani milion těchto „bytostí“ by nemohlo zaplnit jeho objem. Následujících cca 200 let se nedůvěřiví badatelé věnovali hledání důkazů pro potvrzení existence „zvířátek“. Pochyby byly zcela rozptýleny, když Louis Pasteur a Robert Koch v 19. století prokázali, že bakterie jsou dokonce původci řady chorob. Na sklonku 19. století přišlo další překvapení. Bylo zjištěno, že extrakt z napadeného tabáku přecezený přes síto, neprostupné pro bakterie, zůstává stále infekční. Takto se svět dozvěděl, že se skupina mikroorganismů rozšířila o velkou skupinu předbuněčných forem, označovaných jako viry. Nekonečné množství druhů neviditelných mikroorganismů (přibývajících spontánními mutacemi) dává od těch dob mikrobiologům obrovské možnosti zajímavého a užitečného bádání.

Začátek roku 2020 významně zvýšil povědomí o existenci mikroorganismů i mezi zbývající (nemikrobiologickou) populací. Do této doby byli zástupci této skupiny vnímáni na jedné straně jako užiteční pomocníci v mnoha odvětvích průmyslu, zejména potravinářském (bakterie), lihovarnictví a pivovarnictví (kvasinky) a farmakologickém (plísňe), na straně druhé jako původci nevídaných onemocnění, obvykle však zvládnutelných léčbou antibiotiky (bakterie), nebo vyležením a dobrou imunitou (viry). Atak neviditelného nepřítele, který vyděsil a ochromil celý svět, však upozornil, že i při svých mikroskopických rozměrech mohou mít mikroorganismy mimořádnou sílu.

Praktickým učitelem mikrobiologie se stal jeden ze zástupců skupiny virů, nazvaný SARS-CoV-2, který svým atypickým projevem, založeným na nenápadném bezpříznakovém šíření, dokázal ve velmi krátké době rozšířit respirační onemocnění COVID-19 na úroveň celosvětové pandemie. Už téměř rok díky němu žijeme v nouzovém stavu s mnoha nepříjemnými omezeními a každý den čekáme, kdy se svět začne vracet do normálního života.

Pro mikrobiology a příbuzné profese je však tato situace příležitostí a výzvou jak se připravit na další, dosud neznámé, zástupce neviditelného světa. Od časů Leeuwenhoekova mikroskopu se možnosti analýzy mikroorganismů raketově vyvinuly. Dnes umíme bakterie nejen pomnožovat na živných půdách, ale dokážeme přečíst jejich genetickou informaci a využít jedinečnosti jejich fyziologických i buněčných vlastností k jejich správné identifikaci. To nám nabízí možnosti smysluplně využívat jejich specifické vlastnosti v náš prospěch a současně je v případě potřeby účinně likvidovat.

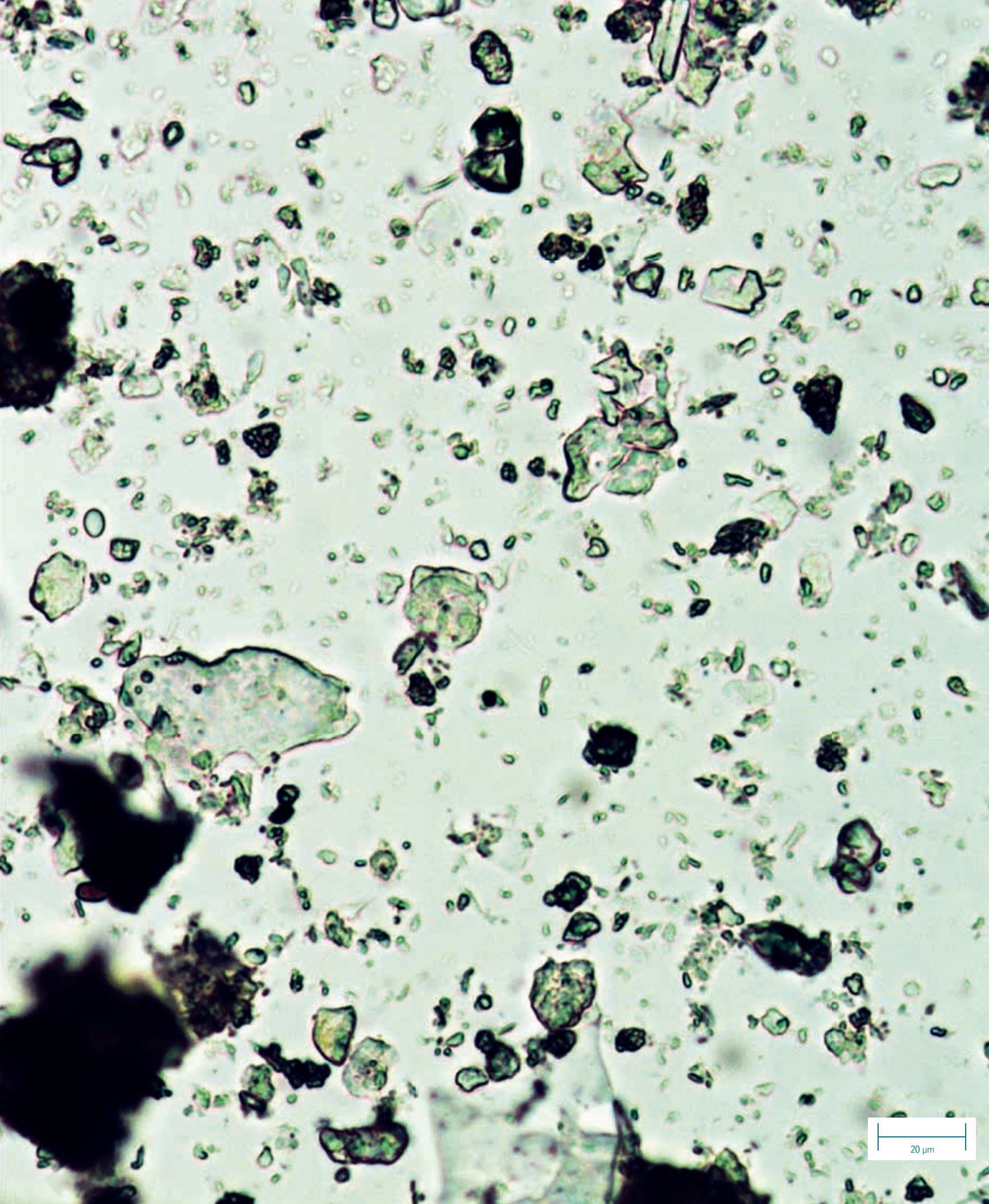
I naše aktivity získaly nový směr a jsou, díky novým analytickým přístupům a možnostem, nasměrovány k využití průkazu infekčních agens v odpadních vodách pro vývoj systému včasného varování, který by mohl být užitečným nástrojem sledování vývoje epidemiologické situace v ČR.

Odborná skupina Mikrobiologie vody, která navázala na dlouholetou práci nestora mikrobiologie vody RNDr. Jiřího Häuslera, DrSc., který každoročně organizoval vzdělávací semináře v oblasti mikrobiologie vody, pořádá od roku 1998 v pravidelném režimu konference na stejné téma. Jeden ročník je pořádán v České republice, druhý na Slovensku a třetí rok je problematika mikrobiologie vody zařazena jako samostatná sekce do programu Kongresu Československé společnosti mikrobiologické.

V roce 2020 se měla konference „Mikrobiologie vody a prostředí“ konat v Malé Morávce v Jeseníkách. Bohužel díky epidemiologickým omezením byla zrušena a já pevně doufám, že se jí podaří zorganizovat v roce 2021.

Optimisticky věřím, že současný boj s neviditelným nepřítelem zvládneme a že nám po něm zbude i o kousek lepší svět.

RNDr. Hana Mlejnková, Ph.D.
vedoucí oddělení mikrobiologie vody VÚV TGM, v. v. i.



20 µm

Stanovení somatických kolifágů a koncentrační metody používané pro vzorky vod s jejich nízkým výskytem

JANA ZUZÁKOVÁ, DAVID JANÁK,
JANA ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ

Klíčová slova: somatické kolifágy – koncentrační metody – indikátory fekálního znečištění – kvalita pitné vody – opětovné využití odpadních vod

SOUHRN

Somatické kolifágy jsou novým ukazatelem kontroly účinnosti úpravy a čištění vody zmiňovaným ve směrnici Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě a i v nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741 ze dne 25. května 2020 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vody. Z tohoto důvodu bude nezbytné v blízké době postupně zavádět metodu stanovení somatických kolifágů ve vodách do některých provozních či jiných laboratoří. Možnost využití kultivačního postupu v souladu s postupem v normě ČSN EN ISO 10705-2 [3] je řešena od roku 2019 v mikrobiologické laboratoři Ústavu technologie vody a prostředí na VŠCHT Praha. Somatické kolifágy byly zjišťovány ve vzorcích různě zatížených vod, resp. v povrchových vodách, odpadních vodách (odtoky z čistíren odpadních vod) a šedých vodách. Experimentálně byly také zkoušeny a ověřovány vybrané koncentrační metody (flokulace hydroxidem hořečnatým a membránová filtrace), které je nutné používat pro vzorky vod s nízkým výskytem somatických kolifágů (< 3 PTJ/ml). Na základě provedených testů bylo zjištěno, že metoda membránové filtrace s využitím elektronegativních filtrů vykazuje vyšší účinnost při zkoncentrování somatických kolifágů ze vzorku vody než flokulace hydroxidem hořečnatým.

ÚVOD

Z vodárenské praxe jsou za posledních několik let známy případy kontaminace pitné vody virovým agens, ať už se jednalo o případy spojené s výskytem enterovirů, norovirů, nebo adenovirů. Tyto případy byly tiskem a odbornou veřejností medializované. Viry jsou všeobecně považovány za více rezistentní živé systémy (organismy) vůči biologickým i fyzikálně-chemickým vlivům prostředí než bakterie. I přes rizikovitost tohoto mikroorganismu není požadavek na jeho stanovení v rámci prováděných mikrobiologických analýz vody zohledněn např. vyhláškou č. 252/2004 Sb., v platném znění, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Většinu

Concentration and enumeration methods of somatic coliphages in water samples

JANA ZUZÁKOVÁ, DAVID JANÁK,
JANA ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ

Keywords: somatic coliphages – concentration methods – indicators of fecal pollution – drinking water quality – wastewater reuse

SUMMARY

Somatic coliphages are a new indicator for monitoring the efficiency of water treatment and purification in the Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption and in Regulation (EU) 2020/741 of the European Parliament and of the Council from 25 May 2020 on minimum requirements for water reuse. For this reason, it will be necessary in the near future to gradually introduce a method for the determination of somatic coliphages in water in some operational or other laboratories. The possibility of using the cultivation procedure in accordance with the procedure in the ČSN EN ISO 10705-2 standard has been addressed since 2019 in the microbiological laboratory of the Department of Water Technology and Environmental Engineering at the University of Chemistry and Technology in Prague. Somatic coliphages were detected in samples of differently polluted waters, specifically in surface waters, wastewaters (effluents from wastewater treatment plants) and grey waters. Selected concentration methods (magnesium hydroxide flocculation and membrane filtration), which must be used for water samples with a low concentration of somatic coliphages (< 3 PFU/ml), were also tested and verified experimentally. Based on the performed tests, it was found that the membrane filtration method using electronegative filters shows higher efficiency in concentrating somatic coliphages from a water sample than flocculation with magnesium hydroxide.

INTRODUCTION

In the last few years, cases of contamination of drinking water with viral agents have been known from water supply practice, whether these were cases associated with the occurrence of enteroviruses, noroviruses, or adenoviruses. These cases were publicized by the press and the professional public. Viruses are generally considered to be more resistant living systems (organisms) to biological and physico-chemical environmental influences than bacteria. Despite the danger of this microorganism, the requirement for its determination within the performed microbiological analyses of water is not taken into account,

virů není možné kultivačním postupem detekovat, namísto nich se uplatňují metody molekulární biologie (např. PCR = polymerázová řetězová reakce), které vyžadují adekvátní vybavení laboratoře, což je patřičně i ekonomicky nákladné. Stanovení některých typů virů kultivačně je na provedení v provozní mikrobiologické laboratoři náročné, protože jsou zapotřebí přítomné hostitelské buňky vybraných kmenů bakterií a optimalizované postupy.

Somatické kolifágy jsou v současné době velmi diskutovaným tématem v oblasti kontroly kvality vody, protože vykazují určitou morfologickou podobnost jako lidské enterické viry a je možné na ně pohlížet jako na případné indikátorové organismy přítomnosti virové kontaminace ve vodách. Kvůli stále se zvyšujícím požadavkům na kvalitu pitné vody i tlakům společnosti na opětovné využívání vyčištěných odpadních vod, byly somatické kolifágy legislativně navrženy jako nové ukazatele pro kontrolu účinnosti úpravy a čištění vody. Z toho důvodu je velice žádoucí kontrola jejich přítomnosti v některých typech vod, zejména ke kontrole vody určené pro lidskou spotřebu. Somatické kolifágy jsou skupinou nepatogenních bakteriálních virů tzv. „bakteriofágů“, které infikují buňky koliformních bakterií (skupina *Enterobacteriaceae*), a zejm. pak buňky bakterie druhu *Escherichia coli*. Přirozeným prostředím somatických kolifágů je, stejně jako pro bakterie *Escherichia coli*, gastrointestinální trakt člověka a teplotně optimální prostředí.

Dne 12. 1. 2021 vstoupila v platnost směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 ze dne 16. 12. 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě, která je kompletně přepracovanou novelou stávající směrnice č. 98/83/EC. Předpoklad implementace této směrnice do národních právních předpisů je konec roku 2022 až začátek roku 2023.

Účelem směrnice pro pitnou vodu je ochrana zdraví spotřebitelů před následky užívání znečištěné vody a zajištění zdravotní nezávadnosti pitné vody prostřednictvím definovaných norem kvality, které jsou členské státy EU povinné dodržovat. Revize se mimo jiné věnovala právě aktualizaci seznamu ukazatelů kvality pitné vody, které již neodpovídaly současným poznatkům. Somatické kolifágy jsou novým ukazatelem, který bude muset být sledován v rámci provozního monitorování účinnosti procesu úpravy pitné vody, pokud ve zdroji surové vody bude zjištěno > 50 PTJ/100 ml (PTJ = plak tvořící jednotku) [1].

Somatické kolifágy jsou rovněž zmiňovány v novém nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741 ze dne 25. května 2020 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vody [2]. Díky tomuto nařízení by mělo být pro členské státy Evropské unie (EU) snadnější opětovně využívat vyčištěné městské odpadní vody, a to zejména k závlahám v zemědělství. Kromě minimálních požadavků na kvalitu recyklované vody, stanovuje nařízení také četnost rutinního a validačního monitorování. Somatické kolifágy je nutné posuzovat v rámci validačního monitorování zařízení u kategorie s nejpřísnějšími požadavky na kvalitu vody (třída A, pro kterou platí: „Všechny potravinářské plodiny konzumované za syrova, jejichž jedlá část je v přímém kontaktu s recyklovanou odpadní vodou, a kořenové plodiny konzumované za syrova.“) [2]. Smyslem validačního monitorování je hodnocení účinnosti daného zařízení v odstranění vybraných indikátorových organismů patogenních bakterií, prvoků a virů.

Po vyhlášení přijatých legislativních dokumentů v Úředním věstníku EU mají následně členské státy EU povinnost zapracovat příslušné změny do svých právních předpisů. Nařízení EU je možné přímo aplikovat v členských státech EU. Metodu stanovení somatických kolifágů ve vodách bude tedy nezbytné zavést do některých provozních či jiných laboratoří, a tyto laboratoře budou muset následně věnovat určitý čas optimalizaci metody.

Možnost využití kultivačního postupu v souladu s postupem v normě ČSN EN ISO 10705-2 [3] je soustavně řešena od roku 2019 v mikrobiologické laboratoři Ústavu technologie vody a prostředí na VŠCHT Praha. Metoda uvedená touto normou se používá pro detekci somatických kolifágů v různých zatížených vodách. Při zkoušení postupu stanovení podle uvedené normy se zjišťovaly možnosti a případná uplatnění metody specifikované normou [3] pro

for example, by Decree No. 252/2004 Coll., as amended, which sets hygienic requirements for drinking and hot water and the frequency and scope of drinking water control. Most viruses cannot be detected by cultivation procedure: molecular biology methods are used instead (e.g., PCR = polymerase chain reaction), which require adequate laboratory equipment, which is expensive. Determination of some types of viruses by cultivation is difficult to perform in an in-house microbiological laboratory because host cells of selected bacterial strains and optimized procedures are required.

Somatic coliphages are currently a much-discussed topic in the field of water quality control, as they show some morphological similarity to human enteric viruses and can be seen as possible indicator organisms for the viral contamination in water. Due to the ever-increasing demands on drinking water quality and the society's pressure for the reuse of treated wastewater, somatic coliphages were legislatively proposed as new indicators to monitor the efficiency of water treatment and purification. For this reason, it is highly desirable to monitor their presence in certain types of water, especially water intended for human consumption. Somatic coliphages are a group of non-pathogenic bacterial viruses called "bacteriophages", which infect cells of coliform bacteria (*Enterobacteriaceae* group) and, in particular, cells of the bacterium *Escherichia coli* (*E. coli*). The natural environment of somatic coliphages is, as for *E. coli* bacteria, the gastrointestinal tract of humans and warm-blooded organisms.

The Directive of the European Parliament and of the Council (EU) 2020/2184 from 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption came into force on 12 January 2021, which is a completely recast amendment to the Directive 98/83/EC. The precondition for the implementation of this Directive into national legislation is the end of 2022 to the beginning of 2023.

The purpose of the Drinking Water Directive is to protect consumer health from the consequences of polluted water use and to ensure the safety of drinking water through defined quality standards, which EU Member States are required to comply with. Among other things, the revision focused on updating the list of drinking water quality indicators, which no longer corresponded to current knowledge. Somatic coliphages are a new indicator that will have to be checked in the operational monitoring of the drinking water treatment process effectiveness if > 50 PFU/100 ml (PFU = plaque forming unit) is detected in the raw water source [1].

Somatic coliphages are also mentioned in the new Regulation 2020/741 of the European Parliament and of the Council (EU) of 25 May 2020 on minimum requirements for water reuse [2]. This regulation should make it easier for the Member States of the European Union (EU) to reuse treated urban wastewater, especially for irrigation in agriculture. In addition to the minimum requirements for the quality of recycled water, the regulation also stipulates the frequency of routine and validation monitoring. Somatic coliphages must be assessed as part of the validation monitoring of the device for the category with the most stringent water quality requirements (Class A, for which the following applies: "All food crops consumed raw, the edible part of which is in direct contact with recycled wastewater, and root crops consumed raw") [2]. The purpose of validation monitoring is to evaluate the effectiveness of the device in removing selected indicator organisms of pathogenic bacteria, protozoa, and viruses.

Following the publication of the adopted legislative documents in the EU Official Journal, EU member states are subsequently obliged to incorporate the relevant changes into their legislation. EU regulations can be directly applied in EU member states. The method of determining somatic coliphages in water will therefore need to be introduced in some operational or other laboratories, and these laboratories will then have to devote some time to optimize the method.

The possibility of using the cultivation procedure in accordance with the procedure in the standard ČSN EN ISO 10705-2 [3] has been systematically dealt with since 2019 in the microbiological laboratory of the Department of Water Technology and Environmental Engineering at the University of Chemistry and Technology in Prague. The method introduced by this standard is used for

běžný mikrobiologický monitoring stavu mikrobiální kontaminace (resp. fekálního znečištění) povrchových vod, odpadních vod (odtoky z čistíren odpadních vod) a šedých vod. Pro zajímavost byla do testů zařazena i pitná voda. Experimentálně byly zkoušeny a ověřovány koncentrační metody, které je nezbytné používat pro vzorky vod s nízkým výskytem somatických kolifágů (< 3 PTJ/ml) a jsou uvedené v normě ČSN ISO 10705-3 [4] (platné od 1. 12. 2020). Postupy stanovení a problémy spojené s metodami uvedenými v normě ČSN EN ISO 10705-2 [3] a v normě pro koncentrační metody ČSN ISO 10705-3 [4] jsou diskutovány dále v příspěvku.

METODIKA

Za účelem stanovení somatických kolifágů byly odebírány vzorky povrchových vod, odtoků z ČOV, šedých vod a pitné vody. Somatické kolifágy byly následně stanovovány podle postupu uvedeného v normě ČSN EN ISO 10705-2 [3], Část 2: Kvantitativní stanovení somatických kolifágů. Vzhledem k tomu, že zmíněná metoda je vhodná spíše pro vody s vyšším výskytem somatických kolifágů, byly experimentálně ověřovány vybrané koncentrační metody navrhované v příloze A normy ČSN ISO 10705-3 [4], Část 2: Validace metod pro zkoncentrování bakteriofágů z vody (metoda membránové filtrace a flokulace hydroxidem hořečnatým).

POSTUP STANOVENÍ SOMATICKÝCH KOLIFÁGŮ

Metoda stanovení podle ČSN EN ISO 10705-2 [3] spočívá v kultivaci a udržování příslušného hostitelského kmene *Escherichia coli*, který je následně použit pro stanovení somatických kolifágů pomocí dvouvrstvé plakové titrace. Pro účely testování byl hostitelský kmen *Escherichia coli* získán ze sbírky Státního zdravotního ústavu v Praze, kde je veden pod označením CNCTC 5005. Z obdrženího lyofilizovaného referenčního hostitelského kmene byla postupně pomocí modifikovaného Scholtensova média (MSB) připravena štoková a pracovní kultura. Požadovaná hustota (10^8 KTJ/ml) buněk pracovní kultury byla před stanovením somatických kolifágů kontrolována spektrofotometricky pomocí měření absorbance, a to na základě předem provedené kalibrace mezi absorbancí a počtem kolonií narostlých na modifikovaném Scholtensovu médiu MSA.

Samotné stanovení somatických kolifágů bylo následně prováděno podle standardního postupu uvedeného v normě [3] s drobnými modifikacemi. K temperování roztopeného polotekutého Scholtensova média (ssMSA) s přidavkem chloridu vápenatého byla použita vodní lázeň o teplotě 45 °C. Do sterilních bakteriologických zkumavek umístěných ve vodní lázni bylo postupně pipetováno 2,5 ml ssMSA média, 1 ml inokulační kultury hostitelského kmene *E. coli* a 1 ml analyzovaného vzorku. Směs byla promíchána a následně byla nalita na povrch kompletního média MSA v Petriho misce. Po zatuhnutí byly misky inkubovány v závěsné poloze při teplotě 37 °C po dobu cca 18 h. Somatické kolifágy tvoří na povrchu média viditelné zóny projasnění, tzv. plaky, které se odečítají a následně vyjadřují jako počet plaků tvořících jednotky (PTJ) v objemové jednotce. Pro kontrolu správnosti provedení bylo zároveň prováděno slepé stanovení, kterým je směs inokulační kultury hostitelského kmene a polotekutého ssMSA média.

KONCENTRAČNÍ METODY

Účinnosti vybraných koncentračních metod, v tomto případě membránové filtrace a flokulace hydroxidem hořečnatým, byly experimentálně zkoušeny na reálných vzorcích odpadních vod odebíraných na odtoku z městské

the detection of somatic coliphages in differently loaded waters. When testing the determination procedure according to the said standard, the possibilities and possible applications of the method specified by the standard [3] for routine microbiological monitoring of the state of microbial contamination (or fecal contamination) of surface waters, wastewater (effluent from wastewater treatment plants), and grey water were identified. For interest, drinking water was also included in the tests. Concentration methods that must be used for water samples with a low incidence of somatic coliphages (< 3 PFU/ml) and are listed in the standard ČSN ISO 10705-3 [4] (valid from 1 December 2020) were tested and verified experimentally. Determination procedures and problems associated with the methods specified in the standard ČSN EN ISO 10705-2 [3] and in the standard for concentration methods ČSN ISO 10705-3 [4] are discussed further in the paper.

METHODOLOGY

In order to determine somatic coliphages, samples were taken of surface water, effluents from WWTPs, grey water, and drinking water. Somatic coliphages were subsequently determined according to the procedure specified in the standard ČSN EN ISO 10705-2 [3], Part 2: Quantitative determination of somatic coliphages. Due to the fact that the method is more suitable for waters with a higher incidence of somatic coliphages, selected concentration methods proposed in Annex A of the standard ČSN ISO 10705-3 [4], Part 2: Validation of methods for concentration of bacteriophages from water (method of membrane filtration and flocculation with magnesium hydroxide) were verified experimentally.

PROCEDURE FOR DETERMINING SOMATIC COLIPHAGES

The method of determination according to ČSN EN ISO 10705-2 [3] consists of cultivating and maintaining the appropriate host strain of *E. coli*, which is subsequently used for the determination of somatic coliphages by two-layer plaque titration. For testing purposes, the *E. coli* host strain was obtained from the collection of the State Institute of Public Health in Prague, under the designation CNCTC 5005. From the obtained lyophilized reference host strain, a stock and working culture was gradually prepared using modified Scholtens medium (MSB). The required density (10^8 CFU/ml) of working culture cells was checked spectrophotometrically by absorbance measurements prior to somatic coliphage determination, based on a pre-calibration between absorbance and number of colonies grown on modified MSA Scholtens medium.

The determination of somatic coliphages per se was subsequently performed according to the standard procedure given in the standard [3] with minor modifications. To temper the molten semi-liquid Scholtens medium (ssMSA) with the addition of calcium chloride, a 45 °C water bath was used. In total 2.5 ml of ssMSA medium, 1 ml of inoculum culture of the *E. coli* host strain, and 1 ml of the analysed sample were sequentially pipetted into sterile bacteriological tubes placed in a water bath. The mixture was stirred and subsequently poured onto the surface of the complete MSA medium in a Petri dish. After solidification, the dishes were incubated in a suspended position at 37 °C for about 18 hours. Somatic coliphages form visible zones of brightness on the surface of the medium, so-called plaques, which are read and subsequently expressed as the number of plaques forming units (PFU) in a unit of volume. To check the correctness of the procedure, a blank determination was also performed, which is a mixture of an inoculum culture of the host strain and a semi-liquid ssMSA medium.

mechanicko-biologické čistírny odpadních vod (ČOV). Obě metody byly testovány metodou standardního přídávku. Pro zjištění účinnosti flokulace bylo dávkováno 10 ml vzorku odtoku z ČOV do 90 ml odstáté kohoutkové vody. V případě testování membránové filtrace byl do 100 ml (případně 90 ml) destilované vody pipetováno 1 ml (případně 10 ml) vzorku odtoku z ČOV. Ve vzorku odtoku z ČOV, tzn. ve vzorku pro přídávku, byly paralelně stanovovány somatické kolifágy podle normy ČSN EN ISO 10705-2 [3]. Takto připravené suspenze byly následně předupraveny jednotlivými koncentračními metodami pro zachycení kolifágů.

Metoda flokulace hydroxidem hořečnatým spočívá v separaci kolifágů zachycených do vznikajících vloček. K testovanému objemu připraveného vzorku jsou postupně přidávány roztoky chloridu hořečnatého (1 mol/l) a hydrogenufosforečnanu draselného (1 mol/l), a to v objemu uvedeném v normě ČSN ISO 10705-3 [4]. Po kapkách se přidává roztok hydroxidu sodného (2 mol/l) do vzniku viditelného zákalu, přičemž je současně kontrolována hodnota pH, která by neměla přesahovat hodnotu 8,6. Suspenze se pomalu míchá po dobu cca 15 minut, přičemž vznikající vločky následně sedimentují cca 30 minut. Po opatrném odtahování supernatantu je řídký sediment zkoncentrován pomocí centrifugace při malé rychlosti (relativní centrifugační zrychlení RCF = 1 000 g) po dobu 15 minut. Po slití supernatantu je sediment resuspendován pomocí peptonové vody s chloridem sodným a intenzivním třepáním. Stanovení somatických kolifágů následně probíhá podle normy ČSN EN ISO 10705-2 [3]. V rámci testování účinnosti koncentrační metody byl rovněž sledován vliv hodnoty pH při flokulaci (hodnoty pH: 7,6; 8,0; 8,3; 8,6 a 9,0).

Metoda membránové filtrace spočívá ve filtraci daného objemu vzorku přes elektronegativní filtr ze směsi acetátu celulózy a nitrátu celulózy, o velikosti pórů 0,22 μm a průměru 47 mm. Filtraci předchází přídávka roztoku chloridu hořečnatého. Filtr je následně rozstříhán na cca 8 menších částí a vložen do skleněné baňky s elučním roztokem (1 % hovězí extrakt, 0,5 mol/l NaCl, 3 % Tween 80), který se vloží do ultrazvukové lázně na cca 4 minuty. Stanovují se současně somatické kolifágy uvolněné do elučního roztoku a zachycené na filtrech. V rámci testování účinnosti metody byl sledován také vliv složení elučního roztoku (zde: 1 % hovězí extrakt, 0,5 mol/l NaCl; 1 % hovězí extrakt, 0,5 mol/l NaCl, 3 % Tween 80; 3 % hovězí extrakt, 0,5 mol/l NaCl; 3 % hovězí extrakt, 0,5 mol/l NaCl, 3 % Tween 80).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výskyt somatických kolifágů ve vodním prostředí obvykle indikuje znečištění způsobené zvířecími nebo lidskými fekáliemi. Přestože jsou přirozenými hostitelskými kmeny somatických kolifágů bakterie druhu *Escherichia coli*, bylo některými studii zjištěno, že pro svou replikaci mohou využívat i jiné příbuzné bakteriální druhy, které nejsou fekálního původu [5]. Porovnání výskytu somatických kolifágů v různě zatížených vodách, resp. v pitných vodách, povrchových vodách, šedých vodách a ve vyčištěných odpadních vodách (odtok z ČOV) je patrné v *tabulce 1*. Stanovení bylo provedeno podle postupu uvedeného v normě ČSN EN ISO 10705-2 [3]. V testovaných povrchových vodách se počty somatických kolifágů pohybovaly v rozmezí od 0 do 25 PTJ/ml. Vzhledem k tomu, že byly odebrány a analyzovány různé typy povrchových vod (tekoucí, stojaté) z odlišných lokalit, není uváděna průměrná hodnota počtu PTJ. Z testovaných vod byly nejvyšší počty somatických kolifágů nacházeny v odtocích z čistíren odpadních vod. Celkem bylo otestováno šest různých ČOV, přičemž nálezy somatických kolifágů se v odtocích pohybovaly v rozmezí od 8 do 84 PTJ/ml s průměrnou hodnotou cca 42 PTJ/ml. V odpadních vodách na přítoku ČOV nebyly laboratorně somatické kolifágy zatím zjišťovány (důvodem je zvýšený výskyt doprovodné mikroflóry, která ruší odečet plaků při vyhodnocování). Pro doplnění, odborná literatura uvádí počty somatických kolifágů na přítocích do ČOV v rozsahu od $5 \cdot 10^6$ do $5 \cdot 10^7$ PTJ/100 ml [6]. U vzorků šedých vod, ve kterých

CONCENTRATION METHODS

The efficiencies of selected concentration methods, in this case, membrane filtration and flocculation with magnesium hydroxide, were experimentally tested on real wastewater samples taken from effluent from the municipal mechanical-biological wastewater treatment plant (WWTP). Both methods were tested by the standard addition method. To determine flocculation efficiency, 10 ml of the WWTP effluent sample was dosed in 90 ml of standing tap water. In the case of membrane filtration testing, 1 ml (or 10 ml) of a sample of the effluent from the WWTP was pipetted into 100 ml (or 90 ml) of distilled water. In the WWTP effluent sample, i.e., in the sample for addition, somatic coliphages were determined in parallel according to the standard ČSN EN ISO 10705-2 [3]. The suspensions thus prepared were subsequently pre-treated by individual concentration methods to capture coliphages.

The method of flocculation with magnesium hydroxide consists of the separation of coliphages captured in the resulting flakes. Solutions of magnesium chloride (1 mol/l) and potassium hydrogen phosphate (1 mol/l) are gradually added to the tested volume of the prepared sample, at the volume specified in the standard ČSN ISO 10705-3 [4]. Sodium hydroxide solution (2 mol/l) is added dropwise until visible turbidity is obtained, while simultaneously checking the pH value, which should not exceed 8.6. The suspension is stirred slowly for about 15 minutes, during which the resulting flakes settle for about 30 minutes. After carefully withdrawing the supernatant, the thin sediment is concentrated by low speed centrifugation (relative centrifugal acceleration RCF = 1,000 g) for 15 minutes. After decanting the supernatant, the sediment is resuspended in peptone water with sodium chloride and vigorous shaking. Determination of somatic coliphages is then performed according to the standard ČSN EN ISO 10705-2 [3]. The effect of pH on flocculation (pH: 7.6; 8.0; 8.3; 8.6, and 9.0) was also monitored to test the effectiveness of the concentration method.

The membrane filtration method consists of filtering a given volume of sample through an electronegative filter made of a mixture of cellulose acetate and cellulose nitrate, with a pore size of 0.22 μm and a diameter of 47 mm. Filtration is preceded by the addition of magnesium chloride solution. The filter is then cut into about 8 smaller parts and placed in a glass flask with an elution solution (1% bovine extract, 0.5 mol/l NaCl, 3% Tween 80), which is placed in an ultrasonic bath for about 4 minutes. Simultaneously, the somatic coliphages released into the elution solution and collected on the filters are determined. As part of testing the effectiveness of the method, the effect of the composition of the elution solution was also monitored (here: 1% bovine extract, 0.5 mol/l NaCl; 1% bovine extract, 0.5 mol/l NaCl, 3% Tween 80; 3% bovine extract, 0.5 mol/l NaCl; 3% bovine extract, 0.5 mol/l NaCl, 3% Tween 80).

RESULTS AND DISCUSSION

The presence of somatic coliphages in the aquatic environment usually indicates pollution caused by an animal or human feces. Although they are natural host strains of somatic coliphages of *E. coli* bacterium, some studies have found that they may use other related bacterial species that are not of fecal origin for their replication [5]. Comparison of the occurrence of somatic coliphages in differently loaded waters, or in drinking water, surface water, grey water, and in treated wastewater (effluent from WWTP) is evident in *Table 1*. Determination was performed according to the procedure specified in the standard ČSN EN ISO 10705-2 [3]. In the tested surface waters, the numbers of somatic coliphages ranged from 0 to 25 PFU/ml. Due to the fact that different types of surface water (flowing, standing) from different sites were taken and analysed, the average value of the number of PFU is not given. Of the tested waters, the highest numbers of somatic coliphages were found in effluent from wastewater treatment plants. A total of 6 different WWTPs were tested, while the

je výskyt koliformních bakterií a případně *E. coli* obvyklý a byl v analyzovaných vzorcích potvrzen (viz *tabulka 1*), nebyla přítomnost somatických kolifágů kulturačně potvrzena. V pitných vodách odebíraných z kohoutku u spotřebitele nebyla podle očekávání přítomnost somatických kolifágů zjištěna.

Tabulka 1. Výskyt somatických kolifágů v různých druzích vod – postup podle normy ČSN EN ISO 10705-2 [3]

Druh vody	Průměrná hodnota SK	Minimální hodnota SK	Maximální hodnota SK
	PTJ/ml	PTJ/ml	PTJ/ml
pitná voda	0	0	0
povrchová voda	x*	0	25
šedá voda	0	0	0
vyčištěná odpadní voda z ČOV	42	8	84

*Poznámka: Pro povrchové vody není uvedena průměrná hodnota z důvodu odběru vzorků z různých lokalit.

Vzhledem k tomu, že stanovení somatických kolifágů podle normy ČSN EN ISO 10705-2 [3] využívá standardně k analýze 1 ml vzorku, může tento postup vést k chybě a nesprávné interpretaci výsledků zkoušky při analýze vod s nižší koncentrací kolifágů a nižším mikrobiálním znečištěním. Vody méně mikrobiálně oživené, např. povrchové stojaté a tekoucí vody, šedé vody a pitné vody vyžadují předúpravu vzorku metodou jejich zkoncentrování podle ČSN ISO 10705-3 [4]. Použití spolehlivé metody zkoncentrování somatických kolifágů ve vzorku vody před jeho analýzou může účinnost detekce výrazně zlepšit. V grafech na obr. 1–3 jsou uvedeny laboratorně zjištěné účinnosti koncentračních metod flokulace hydroxidem hořečnatým a membránové filtrace. U metody flokulace hydroxidem hořečnatým se účinnost zkoncentrování somatických kolifágů pohybovala v rozmezí od cca 32 do 64 %, přičemž byla zjištěna její závislost na hodnotě pH. Nejvyšší počty somatických kolifágů byly stanoveny u vzorků s pH 8,0 (účinnost zkoncentrování cca 64 %) a 8,3 (účinnost zkoncentrování cca 64 %), viz obr. 1. Lze předpokládat, že účinnost záchytu kolifágů do vloček bude vyšší u koncentrování více organicky zatížené vody. Výrazně vyšší účinnost vykazovala oproti flokulaci metoda membránové filtrace. V závislosti na použitém elučním roztoku se účinnost pohybovala v rozmezí cca 40 až 100 %, viz obr. 2. Zásadní je pro uvolnění somatických kolifágů z membránových filtrů obsah neiontového tenzidu Tween 80 v elučním roztoku. S jeho pomocí bylo ve většině případů dosahováno cca 100 % účinnosti zkoncentrování somatických kolifágů. Jak je patrné z obr. 3, má v postupu koncentrování membránovou filtrací důležitý význam také chlorid hořečnatý, který je ke vzorku přidáván před jeho zfiltrováním. Bez jeho použití se průměrné účinnosti záchytu somatických kolifágů v závislosti na elučním roztoku pohybovaly v rozmezí 19–52 %. Multivalentní kationty, jako je Mg^{2+} , Ca^{2+} a Al^{3+} , umožňují při nižším pH účinnější adsorpci kolifágů na elektronegativních membránových filtrech [7].

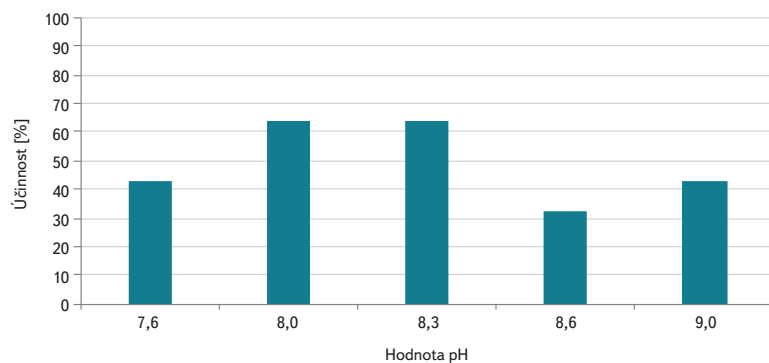
findings of somatic coliphages in the effluent ranged from 8 to 84 PFU/ml with an average value of about 42 PFU/ml. Laboratory somatic coliphages have not yet been detected in the wastewater at the WWTP inflow (the reason is the increased occurrence of the accompanying microflora, which disturbs the plaque reading during evaluation). For the sake of completeness, the professional literature reports the numbers of somatic coliphages on inflows to WWTP in the range from $5 \cdot 10^6$ PFU/100 ml to $5 \cdot 10^7$ PFU/100 ml [6]. In grey water samples, in which the occurrence of coliform bacteria and possibly *E. coli* is common and was confirmed in the analysed samples (see *Table 1*), the presence of somatic coliphages was not confirmed by cultivation. As expected, the presence of somatic coliphages was not detected in drinking water taken from the consumer's tap.

Table 1. Occurrence of somatic coliphages in various types of waters – procedure according to the standard ČSN EN ISO 10705-2 [3]

Type of water	Average SC	Minimum SC	Maximum SC
	PFU/ml	PFU/ml	PFU/ml
Drinking water	0	0	0
Surface water	x*	0	25
Grey water	0	0	0
Treated wastewater from WWTP	42	8	84

*Note: For surface waters, no average value is given due to sampling from different sites.

Due to the fact that the determination of somatic coliphages according to the standard ČSN EN ISO 10705-2 [3] uses 1 ml of sample for analysis, this procedure can lead to error and incorrect interpretation of test results in the analysis of waters with lower coliphage concentration and lower microbial contamination. Waters with less microbial activity (e.g. surface standing and running water, grey water, and drinking water) require pre-treatment of the sample by the method of their concentration according to ČSN ISO 10705-3 [4]. The use of a reliable method of concentrating somatic coliphages in a water sample before its analysis can significantly improve the detection efficiency. The graphs in Fig. 1 to 3 show the laboratory-determined efficiencies of concentration methods of magnesium hydroxide flocculation and membrane filtration. In the magnesium hydroxide flocculation method, the concentration efficiency of somatic coliphages ranged from about 32% to 64%, and its pH dependence was found. The highest numbers of somatic coliphages were determined for samples with pH 8.0 (concentration efficiency about 64%) and 8.3 (concentration efficiency about 64%), see Fig. 1. It can be assumed that the efficiency of capturing coliphages in flakes will be higher when concentrating more organically loaded water. The membrane filtration method showed significantly higher efficiency compared to flocculation. Depending on the elution solution used, efficiency ranged from about 40% to 100%, see Fig. 2. The content of the non-ionic surfactant Tween 80 in the elution solution is essential for the release of somatic coliphages from the membrane filters. With its help, about 100% efficiency of the concentration of somatic coliphages was achieved in most cases. As can be seen in Fig. 3, magnesium chloride (which is added to the sample before it is filtered) is also important in the process of concentrating by membrane filtration. Without its use, average capture efficiencies of somatic coliphages ranged from 19% to 52%, depending on the elution solution. Multivalent cations such as Mg^{2+} , Ca^{2+} , and Al^{3+} allow more efficient adsorption of coliphages on electronegative membrane filters at lower pH [7].



Obr. 1. Účinnost flokulace hydroxidem hořečnatým při zkoncentrování somatických kolifágů a vliv hodnoty pH

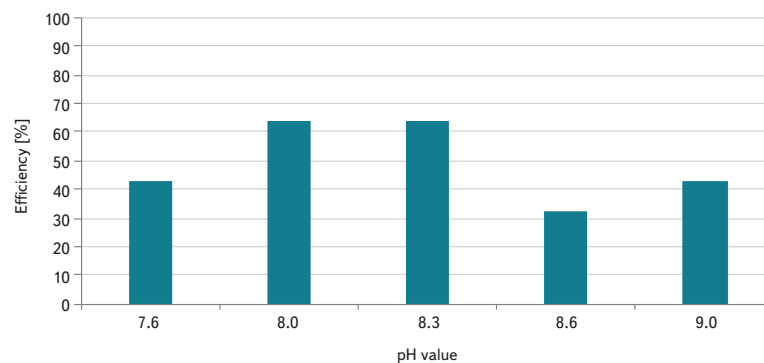
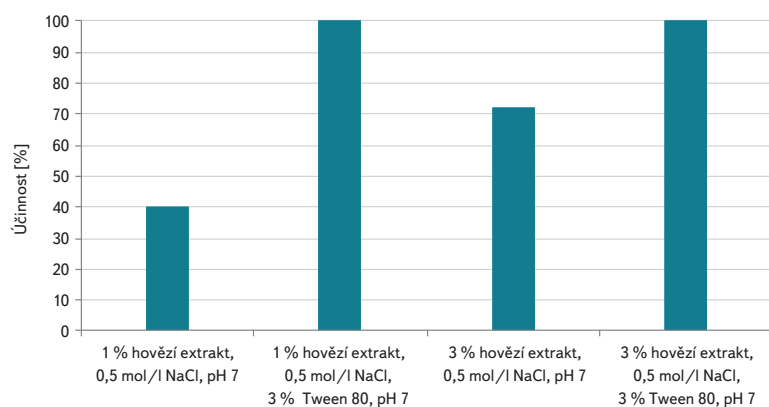


Fig. 1. Magnesium hydroxide flocculation efficiency in the concentration of somatic coliphages and the effect of pH



Obr. 2. Účinnost membránové filtrace podle postupu v ČSN ISO 10705-3 [4] (včetně přídávku MgCl₂) při zkoncentrování somatických kolifágů a vliv různého elučního roztoku

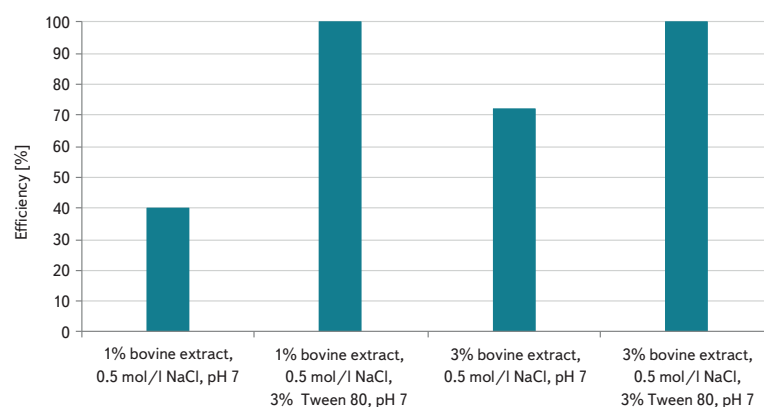
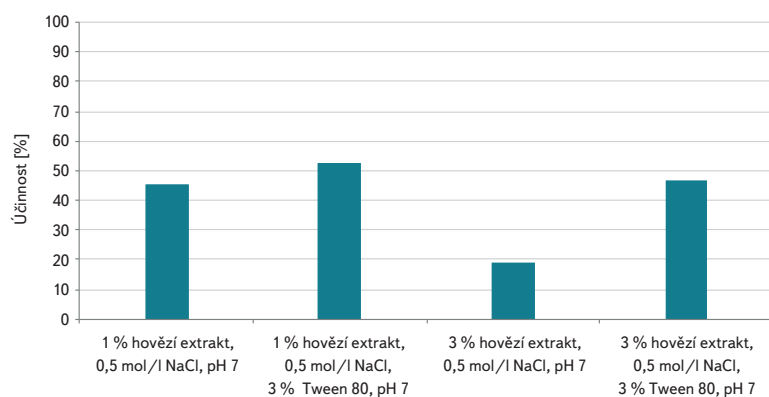


Fig. 2. Membrane filtration efficiency according to the procedure in ČSN ISO 10705-3 [4] (including the addition of MgCl₂) in the concentration of somatic coliphages and the effect of different elution solution



Obr. 3. Účinnost membránové filtrace podle postupu v ČSN ISO 10705-3 [4] (bez přídávky MgCl₂) při zkoncentrování somatických kolifágů a vliv různého elučního roztoku

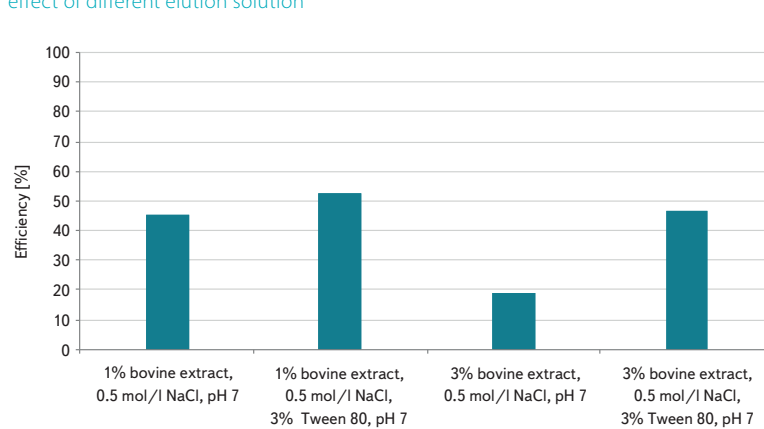


Fig. 3. Membrane filtration efficiency according to the procedure in ČSN ISO 10705-3 [4] (without addition of MgCl₂) in the concentration of somatic coliphages and the effect of different elution solution

PROBLÉMY ŘEŠENÉ PŘI STANOVENÍ SOMATICKÝCH KOLIFÁGŮ VE VODÁCH

Stanovení somatických kolifágů bylo v tomto prezentovaném případě, až na několik drobných modifikací, provedeno podle platné normy ČSN EN ISO 10705-2 [3]. Mezi tyto drobné modifikace lze uvést například pořadí aplikace jednotlivých složek do bakteriologických zkumavek. Zpočátku byla zejména kvůli rychlému tuhnutí (tvorbě hrudek) polotekutého média ssMSA dávana přednost prvotní aplikaci 1 ml testovaného vzorku, 1 ml inokulační kultury a až následně přídávku 2,5 ml média ssMSA. Nicméně, pomocí prováděných kontrolních sledů stanovení bylo zjištěno, že prvotní aplikací vzorku do bakteriologických

PROBLEMS IN THE DETERMINATION OF SOMATIC COLIPHAGES IN WATERS

In this presented case, the determination of somatic coliphages was performed, except for a few minor modifications, according to the valid standard ČSN EN ISO 10705-2 [3]. These minor modifications include, for example, the order of application of the individual components to the bacteriological tubes. Initially, mainly due to the rapid solidification (lumping) of the semi-liquid ssMSA medium, it was preferred to initially apply 1 ml of the test sample,

zkumavek může následně docházet ke křížové kontaminaci inokulační kultury a ssMSA média kolifágy. Preferována byla tedy aplikace v následujícím pořadí: polotekuté médium ssMSA, inokulační kultura, testovaný vzorek. Řešením rychlého tuhnutí polotekutého ssMSA média může být buď přídavek nižší navážky agaru s rizikem sesunutí vrchní vrstvy, nebo volba agaru o nižší teplotě tuhnutí. Případně je možné testovaný vzorek aplikovat do bakteriologických zkumavek takovým způsobem, aby pomalu stékal po vytemperované stěně zkumavky. Připravená směs byla vždy zlehka ručně promíchána kvůli zamezení vzniku vzduchových bublin a rychle nalita na kompletní médium MSA v Petriho miskách. Vyhodnocení, resp. odečet vzniklých plaků somatických kolifágů ruší nejen přítomnost vzduchových bublin, ale také přítomnost kondenzované vody ulpěné na povrchu zatužené horní vrstvy (i v závěsné poloze). Z toho důvodu by měly být misky před inkubací nejprve předsušeny s částečně otevřenými víčky v termostatu (toto uvádí norma ČSN EN ISO 10705-2 [3] a je to důležité).

Při experimentálním ověření vybraných koncentračních metod popsaných v normě ČSN ISO 10705-3 [4] byly rovněž nalezeny některé problémové postupy. V případě metody flokulace hydroxidem hořečnatým viditelně nedocházelo k sedimentaci všech vzniklých vloček. Z důvodu jejich co největšího zachytu bylo nutné odstřeďovat větší objem vzorku, resp. bylo využíváno zkumavek o objemu 50 ml. Resuspendování vzniklého sedimentu v peptonové vodě s obsahem NaCl může být v menším objemu než 30 ml problémové, vločky v některých případech nebylo možné rozpustit ani intenzivním třepáním ani vortexováním (promíchání vírem kapaliny). V případě vzorku o nízké koncentraci kolifágů (< 3 PTJ/ml), který je koncentrován flokulací, by bylo vhodné pracovat zároveň s jeho dvěma různými objemy, z nichž alespoň jeden umožní kvantifikaci plaků v 1 ml (příp. 5 ml) zředovacího roztoku o celkovém objemu 30 ml.

Oproti flokulaci je metoda membránové filtrace podstatně rychlejší a jednodušší. Nejvíce problémová je v tomto případě práce s filtry. Po provedené filtraci vzorku by měly být jednotlivé filtry rozstříhány na cca osm částí, upraveny v ultrazvukové lázni a následně aplikovány lícem dolů na vrstvu média ssMSA s hostitelským kmenem. Zároveň s filtry by měl být stanoven eluční roztok metodou podle ČSN EN ISO 10705-2 [3]. Nejenže tato práce s filtry vyžaduje určitou zručnost s pinzetou, ale nepřináší ani očekávané výsledky, resp. somatické kolifágy v podobě plaků není možné z kultivovaných ploten s jistotou odečíst, viz obr. 4.



Obr. 4. Stanovení somatických kolifágů pomocí membránové filtrace – problematický odečet zachycených kolifágů na filtrech

1 ml of inoculum culture, and only subsequently to add 2.5 ml of ssMSA medium. However, using control blanks, it has been found that initial application of the sample to bacteriological tubes can subsequently cross-contaminate the inoculum culture and the ssMSA medium with coliphages. Thus, application in the following order was preferred: semi-liquid ssMSA medium, inoculum culture, test sample. The solution to the rapid solidification of the semi-liquid ssMSA medium can be either the addition of a lower amount of agar (with the risk of the top layer sliding) or the choice of agar with a lower solidification temperature. Alternatively, the test sample can be applied to the bacteriological tubes in such a way that it slowly runs down the tempered wall of the tube. The prepared mixture was always lightly stirred by hand to prevent the formation of air bubbles and quickly poured onto the complete MSA medium in Petri dishes. Evaluation, or the reading of the formed plaques of somatic coliphages, is disturbed not only by the presence of air bubbles, but also by the presence of condensed water adhering to the surface of the solidified upper layer (even in the suspended position). For this reason, the dishes should first be pre-dried with the lids partially open in a laboratory thermostat before incubation (this is stated in the standard ČSN EN ISO 10705-2 [3] and it is important).

During the experimental verification of selected concentration methods described in the standard ČSN ISO 10705-3 [4], some problematic procedures were also found. In the case of the magnesium hydroxide flocculation method, sedimentation of all formed flakes did not occur visibly. To capture as many as possible, it was necessary to centrifuge a larger volume of sample, or 50 ml tubes were used. Resuspension of the resulting sediment in peptone water containing NaCl can be problematic in less than 30 ml; in some cases it was not possible to dissolve the flakes either by vigorous shaking or by vortexing. In the case of a sample with a low concentration of coliphages (< 3 PFU/ml) which is concentrated by flocculation, it would be appropriate to work simultaneously with its two different volumes, at least one of which will allow quantification of plaques in 1 ml (or 5 ml) of total volume of 30 ml.

Compared to flocculation, the membrane filtration method is significantly faster and simpler. The most problematic in this case is working with filters. After filtration of the sample, individual filters should be cut into about 8 parts, treated in an ultrasonic bath, and subsequently, applied face down to the layer of ssMSA medium with the host strain. Simultaneously with the filters, the elution solution should be determined by the method according to ČSN EN ISO 10705-2 [3]. Not only does this work with filters require a certain skill with tweezers, but it does not bring the expected results, or somatic coliphages in the form of plaques cannot be read with certainty from cultivated plates, see Fig. 4.



Fig. 4. Determination of somatic coliphages using membrane filtration – problematic enumeration of captured coliphages on filters

ZÁVĚR

Indikace fekálního znečištění je důležitým nástrojem pro zjištění zdravotní nezávadnosti vody. V poslední době se pozornost přesouvá na další možné indikátorové organismy, resp. na somatické kolifágy, které mohou být využity při sledování účinnosti odstranění malých a více rezistentních částic (např. viry) procesem úpravy vody nebo čištění vod. V rámci testů provedených v mikrobiologické laboratoři Ústavu technologie vody a prostředí na VŠCHT Praha bylo zjištěno, že postup stanovení somatických kolifágů podle normy ČSN EN ISO 10705-2 [3] není vhodný pro pitné vody, šedé vody a některé povrchové vody, tedy tam, kde se očekává velmi nízká nebo nulová koncentrace kolifágů. U těchto typů vod bude ve většině případů nutné používat koncentrační metody uvedené v ČSN ISO 10705-3 [4], kterými dojde k převedení somatických kolifágů ze vzorku o větším objemu do objemu menšího. Metody jsou vybírány na základě objemu vzorku, obsahu částic nebo zákalu. Z prozatím získaných zkušeností s metodou flokulace hydroxidem hořečnatým a membránovou filtrací na elektronegativních filtrech lze říci, že druhá zmíněná metoda je schopna účinněji zkoncentrovat somatické kolifágy ze vzorku vody. Kromě toho, že je poměrně rychlá a prostorově méně náročná, bude pravděpodobně také provozními laboratořemi lépe proveditelná.

Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu *Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FT0P_2020_026*.

Literatura

- [1] Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepřacované znění). In: *Úřední věstník Evropské unie*, L 435, 23. 12. 2020, s. 1–62. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32020L2184>
- [2] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/741 ze dne 25. května 2020 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vody. In: *Úřední věstník Evropské unie*, L 177, 5. 6. 2020, s. 32–55. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/TXT/?uri=CELEX:32020R0741>
- [3] ČSN EN ISO 10705-2. Jakost vod – Průkaz přítomnosti a kvantitativní stanovení bakteriofágů – Část 2: Kvantitativní stanovení somatických kolifágů. Praha: ÚNMZ, 2002, 20 str.
- [4] ČSN ISO 10705-3. Kvalita vod – Průkaz přítomnosti a kvantitativní stanovení bakteriofágů – Část 3: Validace metod pro zkoncentrování bakteriofágů z vody. Praha: ÚNMZ, 2020, s. 16.
- [5] BAUDIŠOVÁ, D. *Metody mikrobiologického rozboru vody*. 1st ed. 2017. ISBN 978-80-87402-61-0.
- [6] JOFRE, J. et al. Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources. *Water*, 2016. Vol. 8, No. 5.
- [7] LANDE, V.W. and SINHA, V.R.P. Isolation, characterization and recovery of coliphages from sewage source. *Journal of Global Biosciences*, 2020, 9.5, p. 7442–7453.

CONCLUSION

The indication of fecal contamination is an important tool for determining the safety of water. Recently, attention has shifted to other possible indicator organisms, specifically somatic coliphages, which can be used to monitor the effectiveness of removing small and more resistant particles (e.g. viruses) by water treatment or water purification. As part of tests performed in the microbiological laboratory of the Department of Water Technology and Environmental Engineering at the University of Chemistry and Technology in Prague, it was found that the procedure for determining somatic coliphages according to ČSN EN ISO 10705-2 [3] is not suitable for drinking water, grey water, and some surface waters; that is, where a very low or zero concentration of coliphages is expected. For these types of waters, in most cases it will be necessary to use the concentration methods specified in ČSN ISO 10705-3 [4], which will convert somatic coliphages from a sample with a larger volume to a smaller volume. Methods are selected based on sample volume, particle content or turbidity. From the experience gained so far with the method of magnesium hydroxide flocculation and membrane filtration on electronegative filters, it can be said that the latter method is able to more efficiently concentrate somatic coliphages from a water sample. In addition to being relatively fast and less space-consuming, it is also likely to be more feasible for operations laboratories.

Acknowledgements

This output was created within the project of *Specific University Research – project No. A2_FT0P_2020_026*.

Autoři

Ing. Jana Zuzáková

✉ jana.zuzakova@vscht.cz

ORCID: 0000-0002-4060-2909

Bc. David Janák

✉ david.janak@vscht.cz

ORCID: 0000-0001-9417-0278

doc. RNDr. Jana Říhová Ambrožová, Ph.D.

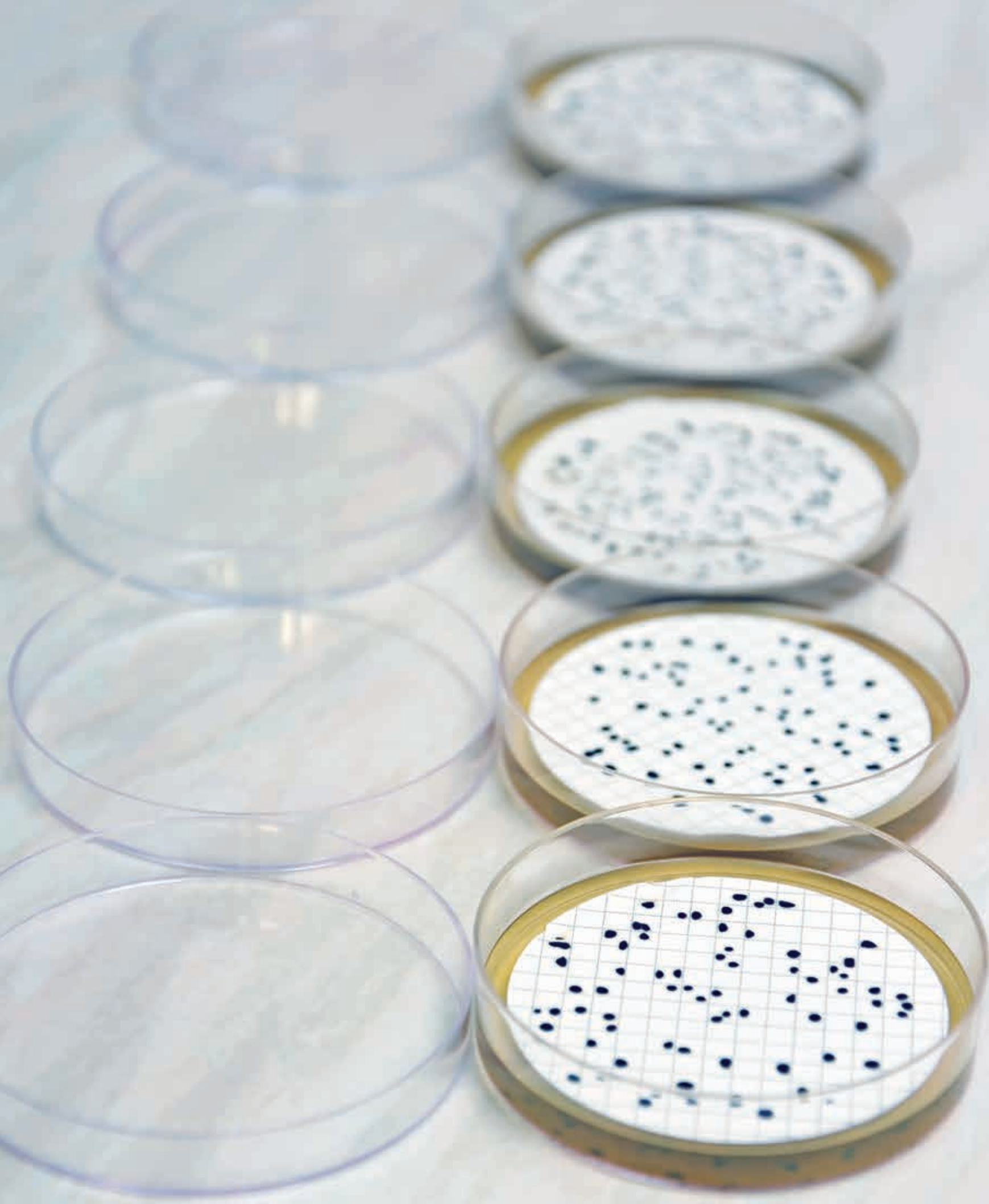
✉ jana.ambrozova@vscht.cz

ORCID: 0000-0002-1503-409X

Ústav technologie vody a prostředí,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Department of Water Technology and Environmental Engineering,
University of Chemistry and Technology, Prague

Příspěvek prošel lektorským řízením.

DOI: 10.46555/VTEI.2020.11.002



Nová směrnice EU o pitné vodě

DANA BAUDIŠOVÁ, FRANTIŠEK KOŽÍŠEK

Klíčová slova: pitná voda – směrnice EU – mikrobiologické ukazatele – mikrobiologické indikátory

SOUHRN

V únoru 2020 byl schválen návrh kompletní novely směrnice 98/83/ES o jakosti vody určené pro lidskou spotřebu. Nová směrnice vyšla po všech úředních procedurách dne 16. prosince 2020. Vzhledem k tomu, že změny ve výše uvedené směrnici jsou rozsáhlé, a vzhledem k zaměření tohoto mimořádného čísla VTEI jsou v tomto příspěvku prezentovány pouze ty části směrnice, které se bezprostředně týkají mikrobiologických ukazatelů (*Escherichia coli*, intestinální enterokoky, *Clostridium perfringens*, koliformní bakterie, počty kolonií, bakterie rodu *Legionella* a somatické kolifágy), se zaměřením na příslušné novinky.

ÚVOD

Evropské směrnici, která upravuje minimální požadavky na kvalitu a kontrolu pitné vody (směrnice Rady 98/83/ES o jakosti vody určené pro lidskou spotřebu), bylo v roce 2020 již 22 let. I když má v sobě zabudováno ustanovení, že Evropská komise má každých 5 let přezkoumat její aktuálnost a v případě potřeby zajistit její novelizaci, trvalo velmi dlouho, než se k potřebné zásadní novele přistoupilo. Již v roce 2003 proběhl dvoudenní seminář v Bruselu, jehož výstupem bylo doporučení na poměrně významné změny (tehdy se právě objevil nový „hit“ v podobě posouzení rizik čili water safety plans). Nicméně tehdy se k novele nepřistoupilo s odůvodněním, že členské země mají dosud málo zkušeností s fungováním směrnice v praxi a že je potřeba vyčkat dalších pět let. Ke stále potřebnější novele se však nepřistoupilo ani za dalších pět či deset let, byť to bylo ze strany Evropské komise (EK) opakovaně slibováno. Tehdy již byly na vině „vyšší politické hry“, resp. určité napětí mezi EK, Radou a Evropským parlamentem.

Když už byla situace neudržitelná, provedla EK v roce 2015 aspoň novelu příloh II a III (směrnici Komise (EU) 2015/1787), která však byla zcela nedostatečná vzhledem k moderním potřebám. Až 1. 2. 2018 byl zveřejněn dlouho očekávaný návrh EK, týkající se kompletní novely směrnice. Poté byl tento návrh přibližně rok projednáván jednak v Radě EU, která přijala své oficiální stanovisko 5. 3. 2019, jednak v Evropském parlamentu (EP), který naštěstí – i přes nové volby v květnu 2019 – stačil schválit svou pozici do poloviny roku 2019. Na podzim 2019 byly zahájeny pod finským předsednictvím triology (Rada – EK – EP), které se podařilo zdárně dokončit těsně před koncem roku, takže v únoru 2020 byl zveřejněn kompletní návrh novely této směrnice. Nová směrnice o jakosti vody určené pro lidskou spotřebu byla po všech úředních procedurách ze strany právní a jazykové služby vydána dne 16. prosince 2020 (č. 2020/2184). Transpozice do legislativy České republiky by měla proběhnout do dvou let. Změny se dotknou nejen zákona o ochraně veřejného zdraví (č. 258/2000 Sb.) a jeho prováděcích vyhlášek (č. 252/2004 Sb. a č. 409/2005 Sb.), ale velmi pravděpodobně i zákona o vodách (č. 254/2001 Sb.) a zákona o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu (č. 274/2001 Sb.) a jejich prováděcích vyhlášek.

V nové směrnici [1], je hodně významných novinek, které se dotknou nejen provozovatelů vodovodů, pracovníků orgánů ochrany veřejného zdraví (KHS) či pracovníků analytických laboratoří. Jedná se např. o povinné zavedení přístupu založeném na posouzení a řízení rizik systémů zásobování pitnou vodou (včetně oblastí povodí, která souvisí s místem odběru jímání vody určené k lidské spotřebě) a posouzení rizik domovního rozvodného systému; dále bude na úrovni EU sjednocen systém testování materiálu pro styk s pitnou vodou a jeho zezávaznění.

Vzhledem k tomu, že změny v této novele jsou rozsáhlé a toto mimořádné číslo VTEI je speciálně zaměřeno, budou v tomto příspěvku prezentovány především body, které se bezprostředně týkají stanovení a hodnocení mikrobiologických ukazatelů.

MINIMÁLNÍ POŽADAVKY NA HODNOTY UKAZATELŮ, POUŽÍVANÉ K POSOUZENÍ JAKOSTI VODY URČENÉ K LIDSKÉ SPOTŘEBĚ

E. coli a intestinální enterokoky se považují za „klíčové ukazatele“ a četnost jejich monitorování nepodléhá možnosti snížení, a to ani na základě výsledků posouzení rizik systémů zásobování vodou. Jejich limitní hodnota je 0 KTJ ve 100 ml, která bude v české legislativě zavedena jako NMH (nejvyšší mezní hodnota), pro vodou stáčenou do lahví nebo nádob je limit 0 KTJ/250 ml. Pro stanovení *E. coli* jsou ve směrnici předepsané metody podle ČSN EN ISO 9308-1 [2] a ČSN EN ISO 9308-2 [3]; pro stanovení intestinálních enterokoků je předepsaná metoda podle ČSN EN ISO 7899-2 [4]. Všechny tyto metody jsou v českých mikrobiologických laboratořích běžně používané.

INDIKÁTOROVÉ UKAZATELE

Indikátorové ukazatele nemají přímý vliv na veřejné zdraví. Jsou však důležitým nástrojem ke zjištění, jak fungují zařízení pro výrobu a distribuci pitné vody, a jsou též důležitým prostředkem pro hodnocení jakosti vody. Mohou pomoci odhalit nedostatky při úpravě či distribuci vody a hrají důležitou úlohu z hlediska zvyšování a zachování důvěry spotřebitelů v její jakost. Z mikrobiologických ukazatelů jsou indikátorové ukazatele koliformní bakterie, počty kolonií při 22 °C a *Clostridium perfringens*.

Pro stanovení koliformních bakterií jsou předepsány metody podle ČSN EN ISO 9308-1 [2] a ČSN EN ISO 9308-2 [3], tedy shodné jako pro stanovení *E. coli*. Předepsaná hodnota 0 KTJ/100 ml (pro vodu stáčenou do lahví nebo nádob 0 KTJ/250 ml) bude zřejmě zavedena jako mezní hodnota.

Pro stanovení počtu kolonií při 22 °C je předepsaná již zavedená a běžně používaná metoda podle ČSN EN ISO 6222 [5]. Jejich „předepsaná limitní hodnota“ v 1 ml je stanovena jako „bez abnormálních změn“. I tento princip hodnocení se již v České republice řadu let používá. Ve směrnici nejsou uvedeny počty kolonií při 36 °C, to však není změna, nevyskytovaly se pro nebalenou pitnou vodu ani v původní směrnici. Přesto se očekává, že tento ukazatel se bude u nás používat i nadále.

C. perfringens se bude stanovat metodou podle ČSN EN ISO 14189 [6]. Tuto metodu (kultivace *C. perfringens* na TSC agaru a konfirmace kyselou fosfatázou) již mají mnohé laboratoře zavedenou a výsledky zkoušek způsobilosti ukazují, že úspěšně. Dnes jsou již k dispozici vhodná (pracovně i finančně) činidla, která nejenže dobře konfirmují přeočkované kolonie, ale lze je použít i přímo na kolonie vyrostlé na membránových filtrech (obr. 1). Pro *C. perfringens* je ve směrnici uvedena hodnota 0 KTJ/100 ml s tím, že se má stanovovat „včetně spor“. Tento termín je však zavádějící, spory se totiž stanovují vždy. Znamená to, že se budou stanovovat jak spory, tak vegetativní buňky, tudíž se nebude provádět eliminační krok (tepelná inaktivace buněk). *C. perfringens* se má stanovovat v případě, že to vyplývá z posouzení rizik.



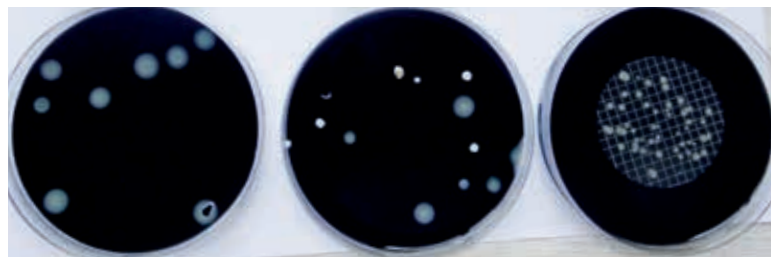
Obr. 1. Tmavé kolonie vyrostlé na TSC agaru v anaerobních podmínkách, které po působení činidla na kyselou fosfatázu zčervenaly, jsou považovány za *C. perfringens*
Fig. 1. Dark colonies, growing on TSC medium in anaerobic condition, that turn red as effect of acidic phosphatase reagent are supposed to be *Clostridium perfringens*

UKAZATELE RELEVANTNÍ PRO POSOUZENÍ RIZIK DOMOVNÍHO ROZVODNÉHO SYSTÉMU

Ještě před zahájením novely si EK nechala zpracovat od Světové zdravotnické organizace (WHO) studii, které ukazatele by se mohly ze směrnice vypustit a které naopak by se měly nově zařadit, resp. u kterých ukazatelů by měla být upravena limitní hodnota. WHO ve své zprávě [7] uvedla, že v EU je ročně hlášeno okolo šesti tisíc případů legionelózy (s desetiprocentní smrtností), a i když je toto číslo zřejmě značně podhodnoceno, stále to staví legionely na první místo co do příčiny úmrtí na nemoci související s vodou. Bakterie rodu *Legionella* nebyly dosud ve směrnici uvedeny. Bylo to v první řadě proto, že v době, kdy se připravovala směrnice č. 98/83/ES – tedy v polovině 90. let – bylo informací o výskytu legionel nepoměrně méně a situace se ani zdravotním úřadům, ani zákonodárcům nezdála tak naléhavá. Dalším důvodem může být skutečnost, že přestože se zmíněná směrnice nazývá „o jakosti vody určené pro lidskou spotřebu“ a podle definice se vztahuje také na vodu určenou pro kontakt s lidským tělem, řada členských zemí EU ji považovala za směrnici na pitnou, nikoliv teplou vodu. A právě domovní rozvody teplé vody jsou jedním z vhodných prostředí pro pomnožení legionel.

Jak již bylo uvedeno v úvodu, v novele směrnice je předepsáno posouzení rizik v domovních rozvodech vody v prioritních budovách, a právě legionely jsou jedním z hlavních ukazatelů. Prioritní budovy, na které se bude tato povinnost vztahovat, si určí na základě subsidiarity samy členské státy EU; může se jednat např. o zdravotnická zařízení, věznice, domovy pro seniory, vzdělávací zařízení, budovy s ubytovací kapacitou, sportovní a rekreační zařízení apod.

Pro bakterie rodu *Legionella* je stanovena hodnota 1 000 KTJ/litr. Nápravná opatření lze zvažovat i v případě, že této hodnoty ukazatele není dosaženo, například v případě prokázaných infekcí a ohnisek nálezů. V takových případech by měl být zdroj infekce potvrzen a určen jeho biologický druh. Základní stanovení legionel se provádí metodou podle ČSN EN ISO 11731 [8]. Růst legionel z teplé užitkové vody je na obr. 2.



Obr. 2. Růst legionel z teplé užitkové vody (GVPC médium vlevo, BCYE médium uprostřed) a na membránovém filtru (GVPC médium, vpravo)
Fig. 2. The growth of legionellae from warm water (GVPC medium on the left side, BCYE medium in the centre) and on the membrane filter (GVPC medium, on the right side)

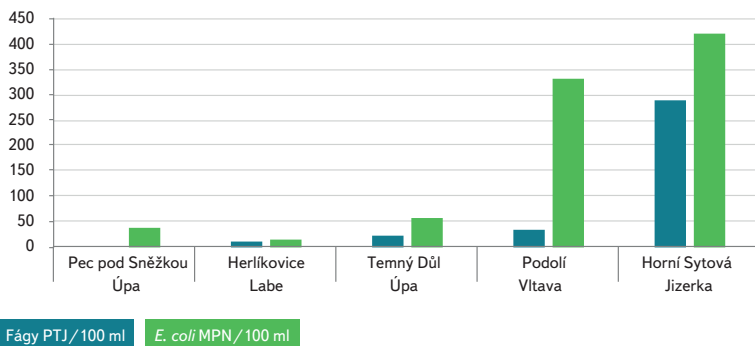
PROVOZNÍ MONITOROVACÍ PROGRAM

Součástí provozního monitorovacího programu je také monitorování somatických kolifágů, aby se kontrolovala účinnost procesů úpravy, zaměřených na mikrobiologická rizika. Somatické kolifágy jsou bakteriální viry, napadající citlivé buňky *E. coli*. Stanovují se plakovou titrací, metodami podle ČSN EN ISO 10705-2 [9] a ČSN ISO 10705-3 [10]. Tento ukazatel se má sledovat, pokud to vyplývá z posouzení rizik. Je-li zjištěna přítomnost somatických kolifágů v surové vodě v koncentraci větší než 50 PTJ/100 ml, mělo by se toto stanovení provést po dokončení série kroků úpravy vody, aby bylo možno určit log hodnotu odstranění prostřednictvím existujících bariér a posoudit, zda je riziko průniku patogenních virů skrze úpravu dostatečně pod kontrolou.

S tímto ukazatelem jsou v České republice pouze minimální zkušenosti a v následujících letech této problematice bude muset být věnována značná pozornost. A to nejen z hlediska laboratorního stanovení, ale i použití, přístupu a hodnocení tohoto ukazatele v praxi.

Výsledky z analýz povrchové/odpadní vody [11–13] ukázaly, že somatické kolifágy vykazují určitou korelaci s *E. coli*, což ale může být u surové vody samozřejmě jinak. Pro začátek jsme ze studia výsledků *E. coli* z databáze „surová voda“ (ČHMÚ) vytypovali naše nejohroženější zdroje. Maximální hodnoty *E. coli* vyšší než 50 KTJ/100 ml vykazovalo 15 (27 %) povrchových a 5 (0,5 %) podzemních zdrojů v České republice. Nejohroženější se zdají být surové vody z podhorských povrchových toků, a to především v brzkém jarním období (zřejmě v souvislosti se zvýšenými průtoky v období tání sněhu).

Na obr. 3 jsou orientační výsledky (*E. coli* a somatické kolifágy) z pěti toků, které se v blízkosti našeho odběrového místa alespoň částečně používají jako surová voda. V době odběru nebyly v žádné z lokalit zaznamenány zvýšené průtoky. Somatické kolifágy byly stanoveny pomocí hostitelského kmene ATCC 13706, upravenou metodou od autorek Šimková a Miklošovičová [14], *E. coli* byla stanovena metodou podle ČSN EN ISO 9308-2 [3].



Obr. 3. Výsledky stanovení *E. coli* a somatických kolifágů ve vybraných povrchových tocích

Fig. 3. Results of *E. coli* and somatic coliphages detection in chosen surface waters

Poděkování

Vznik příspěvku byl podpořen v rámci MZ ČR – RVO (Státní zdravotní ústav – SZÚ, IČ 75010330).

Literatura

- [1] Rada EU: Rada EU: Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepřacované znění). Pracovní verze č. j. st 6230 – 2017/0332 (COD) ze dne 6. 10. 2020.
- [2] ČSN EN ISO 9308-1 (75 7836): Kvalita vod – Stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií – Část 1: Metoda membránových filtrů pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry.
- [3] ČSN EN ISO 9308-2 (75 7836): Kvalita vod – Stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií – Část 2: Metoda nejpravděpodobnějšího počtu.
- [4] ČSN EN ISO 7899-2 (75 7831): Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků – Část 2: Metoda membránových filtrů.
- [5] ČSN EN ISO 6222 (75 7821): Jakost vod – Stanovení kultivovatelných mikroorganismů – Stanovení počtu kolonií očkovaním do živného agarového kultivačního média.
- [6] ČSN EN ISO 14189 (757865): Kvalita vod – Stanovení *Clostridium perfringens* – Metoda membránových filtrů.
- [7] WHO: Drinking Water Parameter Cooperation Project. Support to the revision of Annex I Council Directive 98/83/EC on the Quality of Water Intended for Human Consumption (Drinking Water Directive). Recommendations. WHO Euro, Bonn 2017, 240 p.
- [8] ČSN EN ISO 11731 (75 7881): Kvalita vod – Stanovení bakterií rodu *Legionella*.
- [9] ČSN EN ISO 10705-2 (75 7871): Průkaz přítomnosti a kvantitativní stanovení bakteriofágů – Část 2: Kvantitativní stanovení somatických kolifágů.
- [10] ČSN ISO 10705-3 (757871): Kvalita vod – průkaz přítomnosti a kvantitativní stanovení bakteriofágů – Část 3: Validace metod pro zkoncentrování bakteriofágů z vody.
- [11] BAUDIŠOVÁ, D. a FUKSA, J. Jakost vody v Labi a dolní Vltavě – mikrobiologické ukazatele. Bulletin Projektu Labe 13/1997.
- [12] BAUDIŠOVÁ, D. Mikrobiální zatížení Labe. VTEI, 11-12/1998, s. 409–416, 1998.
- [13] ČAPKOVÁ, J. a BAUDIŠOVÁ, D. Zkoušení domovních čistíren odpadních vod podle ČSN EN 12566-3 ve VÚV TGM. v. v. i. In: Andrea Benáková, Iveta Růžičková Sborník přednášek a posterových sdělení z 12. bienální konference a výstavy VODA 2017. Poděbrady, 20. 9. 2017. Brno: Tribun EU, s. r. o., s. 219–222. 20017.
- [14] ŠIMKOVÁ, A. a MIKLOŠOVIČOVÁ, A. Metodika na kontrolu kontaminácie vod enterovirusmi. *Acta hygienica epidemiologica et microbiologica*, příloha č. 20/81986, s. 1–19.

Autoři

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.

✉ dana.baudisova@szu.cz
ORCID: 0000-0003-3993-6845

MUDr. František Kožíšek, CSc.

✉ frantisek.kozisek@szu.cz
ORCID: 0000-0002-0107-6969

Státní zdravotní ústav

Příspěvek prošel lektorským řízením.

DOI: 10.46555/VTEI.2020.11.001

NEW EUROPEAN UNION DIRECTIVE ON DRINKING WATER

BAUDIŠOVÁ, D.; KOZÍSEK, F.

National Institute of Public Health

Keywords: drinking water – EU directive – microbiological parameters – microbiological indicators

A proposal for a complete amendment to Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption was approved in February 2020. The new Directive came into force after all official procedures on 16 December 2020. Since the changes in the above-mentioned Directive are large and given to the focus of this extraordinary VTEI issue, only parts of the Directive directly related to microbiological indicators (*Escherichia coli*, intestinal enterococci *Clostridium perfringens*, total coliforms, colony counts, *Legionella* spp. and somatic coliphages) are presented in this paper, focusing on relevant news.



Hledání vhodných molekulárních markerů pro rozlišení různých druhů enterokoků

ŠÁRKA BOBKOVÁ, DANA BAUDIŠOVÁ

Klíčová slova: *Enterococcus* – fekální znečištění – molekulární markery – trasování původu mikroorganismů (MST)

SOUHRN

Enterokoky patří spolu se zástupci druhu *Escherichia coli* mezi tzv. indikátory fekálního znečištění, které se používají při hodnocení mikrobiologické kvality koupacích vod. Jejich stanovení se řídí vyhláškou MZ ČR č. 238/2011 Sb. a provádí se kultivačně na selektivních agarových médiích. Je známo, že ne všechny druhy enterokoků jsou fekálního původu a mají tedy přímou souvislost s fekálním znečištěním vody. Pro správné hodnocení kvality koupací vody by bylo vhodné znát i původ těchto bakterií. K trasování původu mikroorganismů (tzv. MST, „microbial source tracking“) se s výhodou používá metod molekulární biologie. Pomocí PCR metody lze amplifikaci molekulárních markerů (tj. specifických úseků DNA) odlišit různé druhy enterokoků. Publikací zabývajících se touto tematikou je mnoho, nicméně ve většině studií se k druhovému rozlišení používá pouze jeden marker, a to při práci s přírodními vzorky nemusí být vždy dostatečné. Pro spolehlivou druhovou identifikaci u přírodních vzorků by bylo výhodnější použít kombinaci několika markerů. Zároveň by bylo vhodné aplikovat poznatky získané z experimentů s čistými kulturami na přírodní vzorky koupacích vod, a to jak čistých, tak fekálně znečištěných. Pro praxi by byly důležité i postupy umožňující PCR ze smíšeného přírodního vzorku, tedy bez nutnosti předkultivace na selektivních médiích, aby se maximálně zkrátila doba, za kterou je znám výsledek.

Cílem tohoto příspěvku je přehledně shrnout publikované molekulární markery pro identifikaci jak enterokoků, tak příbuzných mikroorganismů, a zhodnotit jejich možné použití v mikrobiologii vody pro rychlé zařazení zástupců rodu *Enterococcus* do druhů při analýze přírodních vzorků.

CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY ENTEROKOKŮ

Enterokoky jsou gram pozitivní, kataláza negativní koky uspořádané obvykle do krátkých řetízků. Jsou to chemoorganotrofové, jejichž hlavním koncovým produktem při fermentaci cukrů je kyselina mléčná. Ačkoliv fenotypické a biochemické odlišení enterokoků od ostatních bakteriálních druhů je složité, mezi hlavní znaky tohoto rodu patří přítomnost D antigenu, tolerance k vyšším teplotám (až 45 °C) i schopnost růstu v přítomnosti 6,5% NaCl. Při jejich identifikaci v laboratořích se používají selektivní média, na kterých jsou eliminovány ostatní bakteriální druhy (např. SB médium obsahující azid sodný pro potlačení G- tyčků).

Taxonomicky patří mezi *Enterococcaceae* a v současné době zahrnuje tento rod 43 druhů [1]. Typickým zástupcem je *E. faecalis*. Enterokoky se přirozeně vyskytují v trávicím traktu teplokrevných živočichů včetně člověka i v trávicím traktu některých bezobratlých (koryši, šneci) [2, 3] a byly izolovány i z povrchových sladkých i slaných vod, z půdy či z rostlinné vegetace. Některé druhy (např. *E. faecalis*, *E. faecium*) jsou podmíněně patogenní.

Přítomnost enterokoků ve vodě může mít různý původ: buď jsou přirozenou součástí vodního ekosystému a vyskytují se tam volně, nebo mohou být asociovány s rostlinnou vegetací (typicky *E. mundtii*, *E. casseliflavus*) [4, 5], nebo se zooplanktonem [6], případně se mohou do vody dostat z půdy [7]. Dalším zdrojem mohou být odpadní vody či exkrementy živočichů, a to jak obratlovců, tak bezobratlých. Za typické intestinální druhy jsou považovány *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* [8].

Jak je z výše uvedeného výčtu patrné, ke správné interpretaci zvýšené hladiny enterokoků ve vodním prostředí by bylo vhodné znát jejich původ.

Metody, které se používají k vystopování původu určitých organismů v prostředí, se souhrnně nazývají „microbial source tracking“ (MST). Principem těchto metod je, že určité druhy bakterií jsou asociovány s určitými hostiteli či prostředím. U enterokoků jsou např. druhy *E. faecalis*, *E. faecium* považovány za typické intestinální druhy (ačkoliv byly izolovány i z jiných ekosystémů) a naopak *E. mundtii*, *E. casseliflavus* jsou většinou spojeny s rostlinami [9, 10]. Jednou z metod MST je PCR amplifikace určitých (definovaných) úseků DNA (tzv. molekulárních markerů), na jejichž základě je možné rozlišit enterokoky do jednotlivých druhů. V tomto směru existuje značné množství literatury týkající se nejen enterokoků, ale i jiných rodů bakterií, a je možné z toho při hledání vhodných molekulárních markerů vycházet.

MOLEKULÁRNÍ MARKERY PRO MST

Obecná charakteristika molekulárních markerů

Vhodný molekulární marker pro druhové rozlišení bakterií by měl splňovat několik kritérií:

1. měl by být široce rozšířen v genomech bakterií, tj. ve většině bakterií by měl mít ortologní gen,
2. na druhou stranu také musí obsahovat úseky unikátní pro daný druh bez možných paralogních genů,
3. jejich velikosti musí být dostatečné pro možná porovnávání, ale zároveň ne příliš dlouhé, aby se daly celé sekvenovat,
4. sekvence musí být dostatečně reprezentativní, aby postihla spolehlivě charakteristiku genomu daného druhu.

Tabulka 1. Přehled diskutovaných molekulárních markerů
Table 1. Summary of discussed molecular markers

Gen	Produkt genu	Komentář	Reference
Kandidátní geny vzešlé ze studie Zeigler a kol. 2003			
<i>recN</i>	recombinační-opravný protein	vyhodnocen podle in silico analýz jako nejlepší vhodný molekulární marker u enterokoků analyzován v souvislosti s tvorbou biofilmu	Zeigler, D.R. 2003 Frank, K.L. 2013
<i>lig</i>	DNA ligaza		Zeigler, D.R. 2003
<i>dnaX</i>	podjednotka DNA polymerazy III	vhodný pro odlišení druhů s redukovaným genomem	Zeigler, D.R. 2004
<i>glyA</i>	serin hydroxymethyltransferase	není ortologní gen u rodu <i>Mycobacterium</i> použita jako proba při multiplex ligation-dependent probe amplification na odlišení 13 druhů patogenů způsobujících alimentární nákazy	Zeigler, D.R. 2005 So-Young Kim a kol. 2016
<i>cysS</i>	cysteine tRNA synthase		Zeigler, D.R. 2005
<i>thdF</i>	GTP-vázající thiphene oxidaza	použit při LATE-PCR assay na detekci 17 bakteriálních patogenů spojených se sepsí	Zeigler, D.R. 2006, Rice, L.M. a kol. 2013
<i>uvrC</i>	C podjednotka ABC excisazy	není ortologní gen u rodu <i>Chlamidia</i> podílí se na rezistenci k UV	Zeigler, D.R. 2006 Ozawa a kol. 1997
<i>ruvB</i>	A podjednotka helikázy	není ortologní gen u druhu <i>Bacillus anthracis</i>	Zeigler, D.R. 2006
Geny primárního metabolismu			
16SrRNA	16S rRNA	různé části 16S rRNA k odlišení druhů u <i>Bacteroides</i> především odlišení <i>Enterococcus</i> od jiných rodů	Bernhardt a Field 2000, Layton a kol. 2006, Haughland 2010, Mieszcin 2009
23SrRNA	23S rRNA	domena V k odlišení <i>E. faecalis</i> od ostatních druhů enterokoků	Tsiodras, S. a kol. 2000
16S-23S spacer	intergenová oblast mezi 16S a 23S	rozlišení enterokoků do 3 skupin navržených Falklamem a Collinsem	Tyrell a kol. 1997, Facklam a Collins 1989
tRNA space	intergenová oblast mezi tRNA geny	odlišení 9 druhů enterokoků	Baele a kol. 2000
<i>ddl</i>	D-ala: D-ala ligase	odlišení 4 klinicky významných druhů specifický primer pro odlišení <i>E. faecalis</i>	Dutka-Malen 1995 Harwood a kol. 2004, Ozawa a kol. 2000
<i>sodA</i>	superoxid dismutaza Mn závislá	odlišení 23 druhů enterokoků	Jackson a kol. 2004, Layton a kol. 2010
<i>cpn60</i>	chaperonin 60	odlišení 17 druhů enterokoků	Goh a kol. 2000
<i>atpA</i>	alfa podjednotka ATP syntázy	odlišení většiny druhů enterokoků	Naser, S. a kol. 2005
<i>rpoA</i>	RNA polymeraza alfa podjednotka	odlišení většiny druhů enterokoků, použití spolu s <i>pheS</i>	Naser, S. a kol. 2005
<i>pheS</i>	phenyl alanin tRNA syntaza	odlišení většiny druhů enterokoků, použití spolu s <i>rpoA</i>	Naser, S. a kol. 2005
<i>tuf</i>	EF-Tu	odlišení enterokoků od většiny klinicky významných bakterií	Ke, D. 1999
Faktory virulence a geny rezistence			
<i>esp</i>	povrchový protein	využití jako molekulárního markeru u enterokoků nejednoznačné	Shannon M. McQuaig a kol. 2006
<i>asaI</i>	povrchový agregující protein	využití jako molekulárního markeru u enterokoků nejednoznačné	Edyta Golińska a kol. 2013
<i>gelA</i>	želatinaza	využití jako molekulárního markeru u enterokoků nejednoznačné	Edyta Golińska a kol. 2013
<i>vanA</i>	D-ala:D-lak ligaza		
<i>vanB</i>	D-ala:D-lak ligaza	rezistence k vankomycinu, odlišení především rezistentních vs. citlivých klinických izolátů	Evers a kol. 1994, Navarro a Courvalin 1994
<i>vanC</i>	D-ala:D-ser ligaza		

Markery diskutované v tomto příspěvku jsou shrnuty v *tabulce 1*. Zeigler a kolektiv porovnávali ve své práci 44 bakteriálních genomů, reprezentujících 16 rodů, za účelem hledání takových genových oblastí, které by mohly být použity obecně na rozlišení bakteriálních druhů. Z celkových analýz nakonec vyplynulo 8 různých genů (genových oblastí), které splňovaly výše uvedená kritéria [11]. Daná studie nezahrnovala genom enterokoků, avšak pracovala mimo jiné s genomy 4 druhů streptokoků, mezi něž se enterokoky původně řadily. Z navržených 8 kandidátních genů byly 4 (*recN*, *glyA*, *thdF*, *uvrC*) zkoumány i u enterokoků, a to buď v souvislosti s tvorbou biofilmu (*recN*), nebo resistance k UV (*uvrC*) [12, 13]. Geny *glyA* a *thdF* byly použity spolu s jinými geny pro odlišení různých bakteriálních patogenů způsobujících alimentární infekce [14, 15]. Amplifikace *recN* byla použita i pro odlišení několika druhů streptokoků [16]. Tento gen se tedy nabízí jako jeden z několika vhodných kandidátů též k detekci enterokoků.

Skupiny genů vhodných pro MST

GENY KÓDUJÍCÍ KOMPONENTY TRANSKRIPČNÍHO A TRANSLAČNÍHO APARÁTU

Geny, jejichž produkty se podílí na expresi genetické informace, tedy na transkripci a translaci, splňují podmínku přítomnosti ortologů (tj. ve všech mikroorganismech, kde jsou přítomné, plní stejnou funkci) a zároveň též obsahují úseky specifické pro daný druh. Proto také 16S a 23S rDNA byly mezi prvními kandidáty na molekulární markery pro MST. Použitím různých oblastí 16S rDNA jako biologického markeru se zabývalo mnoho skupin, a to nejen u enterokoků [17], ale v souvislosti s MST též u bakterií rodu *Bacteroides* [18, 19]. *Bacteroides* tvoří významnou část střevní mikroflóry teplotně odolných živočichů včetně člověka, a proto o nich také bylo uvažováno jako o možných alternativních indikátorech fekálního znečištění [20, 21]. Na rozdíl od *E. coli* a intestinálních enterokoků jsou ale obtížně kultivovatelné. Jejich zástupci jsou druhově specifičtější pro určité hostitele [22], čehož by bylo možné s výhodou využít právě pro MST. Sekvence 16S rDNA patří stále mezi nejpoužívanější metody pro identifikaci druhů enterokoků, přestože má svoje limity při rozlišení blízké příbuzných druhů, zejména ze skupiny *E. faecium* [23].

Tsiordas s kolegy analyzoval sekvence genu 23S rDNA kódujícího RNA velké podjednotky bakteriálního ribozomu. Použili doménu V 23S rDNA pro odlišení *E. faecalis* od ostatních druhů enterokoků [24].

Později si badatelé všimli, že zatímco geny pro 16S a 23S rRNA jsou fylogeneticky velmi konzervované, intergenové oblasti vykazují větší variabilitu a byly by tedy pro odlišení druhů vhodnější. Na základě srovnání intergenové oblasti mezi 23S a 16S rRNA Tyrell a kolektiv mohli rozlišit enterokoky do tří fylogenetických skupin (I, II, III, navržených dříve Facklamem a Collinsem) [25, 26]. V rámci skupiny II bylo navíc i možné odlišit intestinální druh *E. faecium* od typicky přírodního druhu *E. casseliflavus* a druhu *E. mundtii*. Výhodou tohoto markeru je též fakt, že pro amplifikaci se pro všechny druhy používá jeden pár primerů a jednotlivé druhy se liší velikostí amplifikovaného úseku (úseků).

Obdobně Baele a kolektiv použili intergenovou oblast mezi geny pro tRNA k odlišení devíti druhů enterokoků [27]. Při těchto experimentech použili primery navržené v krajních konzervovaných oblastech tRNA genů, pro amplifikaci oblasti mezi těmito geny. To by mohlo umožnit využití této strategie u mnoha bakteriálních druhů, čemuž nasvědčuje fakt, že obdobná genová oblast byla použita pro druhové rozlišení u streptokoků [28], *Acinetobacter* spp. [29], *Listeria* spp. [30] a stafylokoků [31, 32].

Dalším slibným markerem je gen *rpoA* kódující a podjednotku RNA polymerázy. Bylo ukázáno, že při použití *rpoA* spolu s dalším markerem – *pheS* (gen pro fenylalaninyl-tRNA syntázu) je možné rozlišit 30 druhů enterokoků [33]. Gen *rpoA* byl též mezi kandidátními geny navrženými Zeiglerem a kol. nicméně s menším skóre než výše zmíněných vybraných osm kandidátních genů. Zdá se však, že pro enterokoky by mohl být na odlišení druhů spolehlivě použit.

Podobně lze gen *tufK* kódující elongační faktor Tu využít pro odlišení enterokoků od ostatních klinicky významných bakterií [34]. Je třeba ale podotknout, že navržené primery se vážaly též na sekvence ortologních genů u několika druhů *Listeria* spp. a zástupců rodu *Abiotrophia*.

GENY KÓDUJÍCÍ DALŠÍ PROTEINY PRIMÁRNÍHO METABOLISMU

Poroznost je věnována i genům kódujícím proteiny primárního metabolismu, především genům *ddl*, *sodA*, *atpA* a *cpn60*.

Gen *ddl* kóduje D-ala:D-ala ligázu nezbytnou při syntéze peptidoglykanu. Na rozdíl od amplifikace intergenových oblastí, při použití genu *ddl*, byla použita pro různé druhy různá dvojice primerů. Výsledkem PCR byl potom buď specifický namnožený úsek DNA odpovídající genu daného druhu, nebo žádný produkt. Nevýhodou této metody je, že v případě většího množství druhů znamená identifikace tímto způsobem velké množství jednotlivých PCR reakcí. Použitím *ddl* jako markeru bylo možné rozlišit čtyři druhy enterokoků (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*) [35]. Harwood a kolektiv později identifikovali *ddl* úsek, který byl specifický pro odlišení *E. faecalis* od ostatních druhů. Nicméně odlišení druhého typického intestinálního druhu *E. faecium* bylo s tímto markerem dost složité a často ani nekorelovalo s výsledky biochemických testů [36].

Na obdobném principu, tedy navržení dvojice primerů specifických pro daný druh v rámci jednoho genu navrhli Jackson a kolektiv 23 párů primerů pro amplifikaci genu *sodA* kódující superoxidodismutázu závislou na Mn [37]. Tyto primery byly pak použity hromadně v celkem 7 PCR reakcích (multiplex PCR). Layton a kolektiv navíc optimalizovali pozici některých primerů, a tím zvýšili jejich druhovou specifičnost [38].

Produkt genu *atpA* je alfa podjednotka ATP syntázy, tedy enzymu zodpovědného za syntézu ATP. Bylo zjištěno, že tímto markerem je možné rozlišit většinu druhů enterokoků. Pomocí *atpA* spolu s *rpoA* a *pheS* bylo možné ještě zvýšit spolehlivost druhového určení a navrhnout kombinaci této trojice markerů spolu s 16S rDNA jako vhodné geny pro typizaci enterokoků [33, 39].

Goh a kolektiv využili degenerovaných primerů k odlišení 17 druhů enterokoků na základě amplifikace genu pro chaperonin (*cpn 60*) [40].

GENY PRO FAKTORY VIRULENCE A ANTIBIOTICKÉ RESISTENCE

Je na místě se domnívat, že intestinální druhy enterokoků se mohou od těch volně v přírodě žijících druhů lišit produkcí faktorů virulence včetně produkce adhesinů. Ačkoliv se původně myslelo, že např. povrchový protein Esp s funkcí adhesinu je specifický pro izoláty *E. faecalis* pocházejících z intestinálního traktu člověka [41], později byl tento protein nalezen i u izolátů ze zvířat či jiných přírodních vzorků [42, 43].

Přítomnost genů pro jiné faktory virulence jako např. pro povrchový agregující protein (*asa 1*) či gen pro želatinázu (*gel E*) se lišila i u klinických izolátů jednoho druhu [44]. Z tohoto důvodu by mohlo být použití těchto genů jako markerů nejednoznačné.

Typicky přírodní druhy enterokoků (*E. casseliflavus* a *E. gallinarum*) jsou, na rozdíl od druhů izolovaných z klinických vzorků, obecně citlivé k antibiotikům. Geny rezistence se často používají jako markery pro odlišení bakteriálních druhů i rezistentních versus citlivých izolátů především v humánní medicíně. K největším současným problémům antibiotické rezistence u enterokoků patří rezistence k vankomycinu, který byl dlouho podáván při infekcích multirezistentními kmeny především u hospodářských zvířat. Vankomycin inhibuje syntézu peptidoglykanu, na jehož syntéze se mimo jiných podílí též výše diskutovaná D-ala:D-ala ligáza (gen *ddl*). Geny, jejichž produkty jsou zodpovědné za rezistenci k vankomycinu, *vanA*, *vanB*, *vanC1*, a *vanC2* jsou příbuzné k *ddl* [35, 45, 46]. Proti vankomycin rezistentním enterokokům se v současné době používá antibiotikum linezolid inhibující proteosyntézu. Na rezistenci k linezolidu se podílí produkty genů *cfr* kódující ribozom modifikující enzymy a *optrA*, jehož produktem je ABC transporter [47]. Avšak použití genů rezistence pro

rozlišení humánních a zvířecích druhů má svoje limity – geny rezistence se mohou v populaci rychle šířit horizontálním přenosem nebo spolu s transpozicií elementy a jejich přenos úzce souvisí se selekčním tlakem v prostředí. Navíc izoláty enterokoků humánního původu mohou vykazovat značné rozdíly v citlivosti k antibiotikům i v rámci jednoho druhu a jednoho prostředí. Proto použití antibiotických genů jako markerů má pravděpodobně jen omezené uplatnění.

ZÁVĚR

Příspěvek shrnuje testované a publikované molekulární markery, které byly nebo mohou být použity pro druhové rozlišení enterokoků, což by mělo pomoci při charakterizaci jejich původu v koupacích vodách. Většina studií se zabývá vždy jedním vhodným genem, ale to může být při analýze přírodních navíc znečištěných vzorků nedostačující. Pro spolehlivé zařazení enterokoků do druhů by bylo tedy lepší použít kombinaci několika genů včetně jednoho rodově specifického obsahujícího část 16S rRNA. Naser navrhl použít kombinaci genů *rpoA*, *pheS* a *atpA* a 16S rDNA pro typizaci enterokoků. Svoje výsledky však ověřoval na čistých kulturách. Bylo by tedy zajímavé přenést tyto poznatky do praxe a ověřit je i na přírodních vzorcích koupacích vod. Kromě toho by z uvedeného výčtu mohl být pro typizaci použit ještě některý z genů navržených Zeiglerem a kolektivem jako např. gen *recN* případně *glyA* nebo *thdF*. Pro tyto geny by ale bylo nutné udělat ještě podrobnější *in silico* sekvenční analýzy. Zdá se, že kromě kódujících oblastí, jsou zajímavé i intergenové oblasti, jako např. oblasti mezi geny pro tRNA. Jejich výhodou je možnost použití universálních primerů v konzervovaných oblastech i možnost srovnání s jinými rody, u nichž byl již tento přístup použit.

Výčet zde prezentovaných kandidátů není zdaleka úplný a v literatuře existuje ještě řada dalších možných genových oblastí, které by bylo možné použít jako např. další geny kódující proteiny primárního metabolismu, nebo naopak repetitivní nic-nekodující sekvence. Některé nebyly uvedeny z praktického důvodu, neboť se nehodily pro jednoznačné odlišení původu znečištění nebo k nim není v současné době dostatek dat (nebylo na ně odkázáno ve více studiích). Je zde však velký potenciál dalších možných kandidátů.

Poděkování

Tento příspěvek vznikl v rámci projektu TA ČR TJ04000132 Využití metod molekulární biologie k identifikaci zdrojů znečištění v koupacích vodách.

Literatura

- [1] ŠVEC, P. and FRANZ, C.M.A.P. Part III: The family Enterococcaceae. In: *HOLZAPFEL, W.H. and WOOD, B.J.B. (eds.). Lactic acid bacteria. Wiley Blackwell, 2014, p. 171–211.*
- [2] ŠVEC, P. et al. Characterization of yellow-pigmented and motile enterococci isolated from intestines of the garden snail *Helix aspera*. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, Vol. 92, No. 5, p. 951–957.
- [3] SIGNORETTO, C. et al. Persistence of *Enterococcus faecalis* in aquatic environments via surface interactions with copepods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, Vol. 71, No. 5, p. 2756–2761. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2756-2761.2005.
- [4] ŠVEC, P. et al. *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2012, 62, Pt 7, p. 1499–1505. DOI: 10.1099/ijs.0.033357-0.
- [5] OTT, E.M. et al. Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, Vol. 91, No. 1, p. 54–66. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01334.x.
- [6] SIGNORETTO, C. et al. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the nonculturable state to plankton is the main mechanism responsible for persistence of this bacterium in both lake and seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, Vol. 70, No. 11, p. 6892–6896. DOI: 10.1128/AEM.70.11.6892-6896.2004.
- [7] BYAPPANAHALLI, M. and FUJIOKA, R. Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. *Water Sci. Technol.*, 2004, Vol. 50, No. 1, p. 27–32. ISSN 0273-1223.

- [8] WHITEHEAD, M. and GODFREE, V. Imperial Cancer Research Fund and the Lancet. *Lancet*, 1997, 350, 9091, p. 1627. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)64042-1.
- [9] GODFREE, A.F. et al. Faecal streptococci as indicators of faecal contamination in water. *J. Appl. Microbiol.*, 1997, 83, S1, p. 110–119. DOI: 10.1046/j.1365-2672.83.s1.12.x.
- [10] MULLER, T. et al. Identification of plant-associated enterococci. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, Vol. 91, No. 2, p. 268–278. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01373.x.
- [11] ZEIGLER, D.R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, 53, Pt 6, p. 1893–1900. DOI: 10.1099/ijs.0.02713-0.
- [12] FRANK, K.L. et al. AhrC and Eep are biofilm infection-associated virulence factors in *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.*, 2013, Vol. 81, No. 5, p. 1696–1708. DOI: 10.1128/IAI.01210-12.
- [13] OZAWA, Y. et al. Cloning and genetic analysis of the UV resistance determinant (*uvr*) encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pAD1. *J. Bacteriol.*, 1997, Vol. 179, No. 23, p. 7468–7475. DOI: 10.1128/jb.179.23.7468-7475.1997.
- [14] RICE, L.M. et al. Design of a single-tube, endpoint, linear-after-the-exponential-PCR assay for 17 pathogens associated with sepsis. *J. Appl. Microbiol.*, 2013, Vol. 114, No. 2, p. 457–469. DOI: 10.1111/jam.12061.
- [15] KIM, S.Y. et al. Simultaneous Identification of 13 Foodborne Pathogens by Using Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism Coupled with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and Its Application in Foods. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2016, 13, 10, p. 566–574. DOI: 10.1089/fpd.2016.2143.
- [16] GLAZUNOVA, O.O. et al. Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2010, 60, Pt 9, p. 2140–2148. DOI: 10.1099/ijs.0.018176-0.
- [17] DEASY, B.M. et al. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2000, 23, 4, p. 510–522. DOI: 10.1016/S0723-2020(00)80025-9.
- [18] BERNHARD, A.E. and FIELD, K.G. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66, 4, p. 1587–1594. DOI: 10.1128/aem.66.4.1587-1594.2000.
- [19] LAYTON, A. et al. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72, 6, p. 4214–4224. DOI: 10.1128/AEM.01036-05.
- [20] FIKSDAL, L. et al. Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, 49, 1, p. 148–150. DOI: 10.1128/AEM.49.1.148-150.1985.
- [21] KREADER, C.A. Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61, 4, p. 1171–1179. DOI: 10.1128/AEM.61.4.1171-1179.1995.
- [22] DICK, L.K. et al. Host distributions of uncultivated fecal *Bacteroidales* bacteria reveal genetic markers for fecal source identification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71, 6, p. 3184–3191. DOI: 10.1128/AEM.71.6.3184-3191.2005.
- [23] DEVRIESE, L.A. et al. Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, Vol. 92, No. 5, p. 821–827. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01586.x.
- [24] TSIODRAS, S. et al. Diversity of domain V of 23S rRNA gene sequence in different *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, Vol. 38, No. 11, p. 3991–3993. DOI: 10.1128/JCM.38.11.3991-3993.2000.
- [25] FACKLAM, R.R. and COLLINS, M.D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.*, 1989, Vol. 27, No. 4, p. 731–734. DOI: 10.1128/JCM.27.4.731-734.1989.
- [26] TYRRELL, G.J. et al. Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, Vol. 35, No. 5, p. 1054–1060. DOI: 10.1128/JCM.35.5.1054-1060.1997.
- [27] BAELE, M. et al. Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, Vol. 38, No. 11, p. 4201–4207. DOI: 10.1128/JCM.38.11.4201-4207.2000.
- [28] MCCLELLAND, M. et al. Length polymorphisms in tRNA intergenic spacers detected by using the polymerase chain reaction can distinguish streptococcal strains and species. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, Vol. 30, No. 6, p. 1499–1504. DOI: 10.1128/JCM.30.6.1499-1504.1992.
- [29] EHRENSTEIN, B. et al. *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, Vol. 34, No. 10, p. 2414–2420. DOI: 10.1128/JCM.34.10.2414-2420.1996.
- [30] VANECHOUTTE, M. et al. Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998, 48, Pt 1, p. 127–139. DOI: 10.1099/00207113-48-1-127.
- [31] MAES, N. et al. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, Vol. 35, No. 10, p. 2477–2481. DOI: 10.1128/JCM.35.10.2477-2481.1997.
- [32] WELSH, J. and MCCLELLAND, M. PCR-amplified length polymorphisms in tRNA intergenic spacers for categorizing staphylococci. *Mol. Microbiol.*, 1992, Vol. 6, No. 12, p. 1673–1680. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb00892.x.
- [33] NASER, S.M. et al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology (Reading)*, 2005, 151, Pt 7, p. 2141–2150. DOI: 10.1099/mic.0.027840-0.

- [34] KE, D. et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, Vol. 37, No. 11, p. 3497–3503. DOI: 10.1128/JCM.37.11.3497-3503.1999.
- [35] DUTKA-MALEN, S. et al. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, Vol. 33, No. 1, p. 24–27. DOI: 10.1128/JCM.33.1.24-27.1995.
- [36] HARWOOD, V.J. et al. Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2004, Vol. 38, No. 6, p. 476–482. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2004.01518.x.
- [37] JACKSON, C.R. et al. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, Vol. 42, No. 8, p. 3558–3565. DOI: 10.1128/JCM.42.8.3558-3565.2004.
- [38] LAYTON, B.A. et al. Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.*, 2010, Vol. 109, No. 2, p. 539–547. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x.
- [39] NASER, S. et al. Phylogeny and identification of Enterococci by *atpA* gene sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, Vol. 43, No. 5, p. 2224–2230. DOI: 10.1128/JCM.43.5.2224-2230.2005.
- [40] GOH, S.H. et al. Identification of Enterococcus species and phenotypically similar Lactococcus and Vagococcus species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, Vol. 38, No. 11, p. 3953–3959. DOI: 10.1128/JCM.38.11.3953-3959.2000.
- [41] SCOTT, T.M. et al. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, Vol. 39, No. 1, p. 283–287.
- [42] LAYTON, B.A. et al. Distribution and diversity of the enterococcal surface protein (*esp*) gene in animal hosts and the Pacific coast environment. *J. Appl. Microbiol.*, 2009, Vol. 106, No. 5, p. 1521–1531. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.04113.x.
- [43] WHITMAN, R.L. et al. Incidence of the enterococcal surface protein (*esp*) gene in human and animal fecal sources. *Environ. Sci. Technol.*, 2007, Vol. 41, No. 17, p. 6090–6095. DOI: 10.1021/es070817t.
- [44] GOLINSKA, E. et al. Virulence factors of Enterococcus strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *World. J. Gastroenterol.*, 2013, Vol. 19, No. 23, p. 3562–3572. DOI: 10.3748/wjg.v19.i23.3562.
- [45] EVERS, S. et al. Sequence of the *vanB* and *ddl* genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene*, 1994, Vol. 140, No. 1, p. 97–102. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90737-4.
- [46] NAVARRO, F. and COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 1994, Vol. 38, No. 8, p. 1788–1793. DOI: 10.1128/aac.38.8.1788.
- [47] SADOWY, E. Linezolid resistance genes and genetic elements enhancing their dissemination in enterococci and streptococci. *Plasmid*, 2018, 99, p. 89–98. DOI: 10.1016/j.plasmid.2018.09.011.

Autoři

RNDr. Šárka Bobková, Ph.D.

✉ sarka.bobkova@szu.cz

ORCID: 0000-0003-3552-2530

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.

✉ dana.baudisova@szu.cz

ORCID: 0000-0003-3993-6845

Státní zdravotní ústav

Příspěvek prošel lektorským řízením.

DOI: 10.46555/VTEI.2020.12.005

SEARCH FOR SUITABLE MOLECULAR MARKERS FOR SPECIES DIFFERENTIATION OF ENTEROCOCCI

BOBKOVA, S.; BAUDISOVA, D.

National Institute of Public Health

Keywords: *Enterococcus* – faecal contamination – molecular markers – microbial source tracking (MST)

Enterococci, together with representatives of the species *Escherichia coli*, belong to the so-called indicators of faecal pollution, which are used in the evaluation of the microbiological quality of bathing waters. Their determination is governed by the Decree of the Ministry of Health No. 238/2011 Coll. and performed by culture on selective agar media. It is known that not all types of enterococci are of fecal origin and are therefore directly related to fecal water pollution. To properly assess the quality of bathing water, it would be useful to know the origin of these bacteria. For tracing the origin of these microorganisms (so-called microbial source tracking) the molecular biology methods can be used. Using PCR method, different types of enterococci can be distinguished by amplification of molecular markers (ie specific parts of DNA). There are many publications dealing with this topic, however, in most studies, only one marker is analyzed for species differentiation, and this may not always be sufficient when working with natural samples. For reliable species identification in natural samples, it would be more advantageous to use a combination of several markers. At the same time, it would be appropriate to apply the knowledge gained from experiments with pure cultures to natural samples of bathing water, both pure and faecally polluted. For practice, it would be also important to use procedures enabling PCR from a mixed natural sample, without the need for pre-cultivation on selective media, in order to minimize the time for which the result is known.

The aim of this paper is to summarize the published molecular markers for the identification of both enterococci and related microorganisms, and to evaluate their possible use in water microbiology for the rapid classification of *Enterococcus* species into species during the analysis of natural samples.

Změna mikrobiálního společenství při terciárním čištění odpadních vod

ANDREA BENÁKOVÁ, ELIŠKA VOBECKÁ, MARTIN PEČENKA, JANA ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, JIŘÍ WANNER

Klíčová slova: dezinfekce — *Escherichia coli* — odpadní voda — opětovné využívání — poloprovozní jednotka — terciární čištění — závlahy

SOUHRN

Cílem příspěvku je prezentace dílčích výsledků testování terciární technologie pro recyklaci vyčištěných městských vod tak, aby mohly být využity pro závlahy městské zeleně, hřišť či pro čištění ulic. Kvalita získané vody závisí na oblasti použití. Důraz je kladen zejména na mikrobiologickou kvalitu získané vody, neboť chemické ukazatele upravované odpadní vody nepředstavují významné riziko při využívání vody pro nepitné účely. Byl potvrzen význam dezinfekčního stupně. Kvalita vody byla dostatečně hygienicky zabezpečena i při skladování.

ÚVOD

Cílem příspěvku je prezentace dílčích výsledků společného projektu Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, Fakulty technologie a ochrany prostředí a Pražských vodovodů a kanalizací, a. s., TA ČR TH03030080 „Recyklace odpadních vod pro využití ve vodním hospodářství měst budoucnosti“. Projekt je zaměřen na testování vhodné kombinace vodárenských a čistírenských technologií pro dočištění odtoku z městské čistírny odpadních vod tak, aby byl svojí kvalitou vhodný zejména pro využití ve městě. Ve městech je využívána pro nepitné účely voda pitná. Navrhované technologie si kladou za cíl nahradit využívání drahé pitné vody levnější vodou recyklovanou a šetřit zásoby podzemních a povrchových vod. V rámci testování byly odzkoušeny kombinace běžně používaných technologií úpravy a čištění vod jako koagulace, písková filtrace, membránová filtrace, filtrace přes granulované aktivní uhlí a hygienické zabezpečení (dezinfekce) chlorací a UV zářením. Koagulace byla zařazena pro odstranění zbytkových koncentrací organického znečištění, separace po koagulaci byla řešena pískovou či membránovou filtrací. Membránová filtrace je sice dražší na pořízení a provoz, ale přispívá ke zvýšení účinnosti hygienického zabezpečení upravované vody. Pro odstranění mikropolutantů, např. léčiv, pesticidů apod. byla zařazena filtrace přes granulované aktivní uhlí.

Jako příklad terciárního dočištění odpadních vod a jejich využití v praxi lze uvést jižní Austrálii, kde byl v roce 1999 uveden do provozu projekt, který zahrnuje využití sekundárního čištění (primární sedimentace, zkrápěné filtry a stabilizační rybníky) následovaného terciárním čištěním (flotace, filtrace a dezinfekce). Následný distribuční systém dodává ročně přes 20 mil. m³ závlahové vody ročně. V australském Sydney bylo již v roce 2000 zásobeno 15 000 domů v nové rezidenční čtvrti denně 25 000 m³ vody pro nepitné účely s využitím duálního distribučního systému. Čistírna odpadních vod se zde skládá z primární sedimentace, biologického odstraňování dusíku a fosforu, koagulace, flokulace, usazování, filtrace, dezinfekce chlorem a úpravy hodnoty pH. Kanadské City of Vernon čerpá svoji vyčištěnou odpadní vodu do reservoáru, kde setrvává téměř celý rok, než je dezinfikována chlorem a používána pro závlahy v zemědělství i v rekreačních oblastech. Při rozšiřování zavlažované oblasti byla navíc uvedena do provozu čistírna s biologickým odstraňováním nutrientů, filtrací, UV zářením a chlorací. V japonském Tokiu již od roku 1989 běží projekt využívající vyčištěnou odpadní vodu pro splachování toalet, úklid v komerčních budovách a hotelích a zalévání v okolních parcích. Čištění zahrnuje biologické čištění, chemickou koagulaci, filtraci, ozonizaci a chloraci. Průměrně je tak denně dodáváno 2 372 m³ vyčištěné odpadní vody.

Z Evropy je možné zmínit Španělsko, kde je ve městě Portbou odpadní voda čištěna s využitím koagulace, flokulace, filtrace a dezinfekce UV zářením i chlorem. Kapacita systému je 15 m³·h⁻¹ a vyčištěná voda je využívána pro městské nepitné účely, včetně zavlažování, čištění ulic a požární ochrany [1–3].

Reálné možnosti opětovného využívání recyklovaných odpadních vod závisí na vývoji evropské a národní legislativy. V květnu roku 2020 vešlo v platnost nařízení Evropského parlamentu a rady (EU) 2020/741 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vod, které reaguje na nedostatek vodních zdrojů, a podporuje tak využívání recyklovaných odpadních vod zejména pro závlahy v zemědělství, ale i v dalších odvětvích [4]. Mezi dodatečnými parametry se rovněž vyskytují těžké kovy, pesticidy, léčivé přípravky, vedlejší produkty dezinfekce, mikroplasty či geny rezistence na antibiotika. V souvislosti

Tabulka 1. Požadavky na kvalitu recyklované vody pro závlahy podle [4, 5]

Table 1. Requirements for the quality of recycled water for irrigation according to [4, 5]

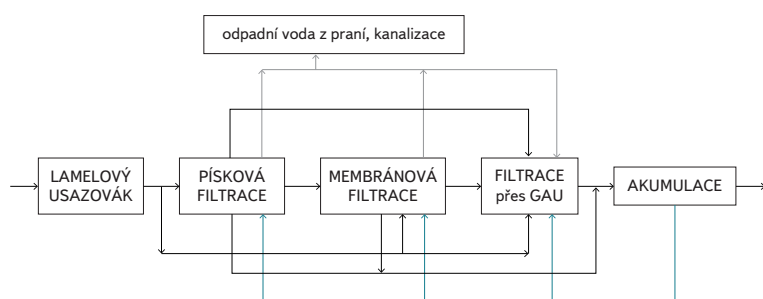
		ČSN 75 7143 [5]			Nařízení EU 2020/741 [4]			
		Třída I	Třída II	Třída III	Třída A	Třída B	Třída C	Třída D
Koliformní bakterie	KTJ/ml	100	1 000	> 1 000	x	x	x	x
Enterokoky	KTJ/ml	10	100	> 100	x	x	x	x
<i>Escherichia coli</i>	číslo/100 ml	x	x	x	≤ 10	≤ 100	≤ 1 000	≤ 10 000

s těmito látkami však bude nutné vypracovat metodiku pro rizikovou analýzu těchto látek při daném využití recyklované odpadní vody. Dalším závazným dokumentem v oblasti zemědělských závlah je norma ČSN 75 7143 Jakost vody pro závlahy, která je platná již od roku 1992 [5]. Oba tyto dokumenty jsou v příspěvku využity pro posouzení mikrobiální kvality vody upravené čtyřmi vybranými technologickými uspořádáními. Požadavky na námi sledované ukazatele podle těchto dvou dokumentů jsou uvedeny v *tabulce 1*. Pro využití recyklované vody v městském vodním hospodářství je důležitá i norma ČSN ISO 20761 Opětovné využití vody v městských oblastech [6].

METODIKA

Poloprovozní jednotka

Pro terciární dočištění odpadních vod bylo na základě laboratorního testování navrženo poloprovozní zařízení o kapacitě $1 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ vyprodukované vody (viz *obr. 1*). Navržené zařízení kombinuje různé typy filtrace a dezinfekce pro hygienické zabezpečení vody a umožňuje získat produkt s různou kvalitou podle způsobu využití. Navržená jednotka je testována od září 2019 na Ústřední čistírně odpadních vod Praha.



Obr. 1. Schéma poloprovozního zařízení

Fig. 1. Schema of pilot plant

V *tabulce 2* jsou definovány parametry dílčích technologií, které je možné provozovat v různých kombinacích. Do surové vody je možné dávkovat koagulační činidlo, polymerní organický flokulant či chlornan sodný pro předchloraci vody. Následuje lamelová usazovací nádrž, ve které dochází k odstranění sraženin vzniklých během procesu koagulace. Pro filtrace vody se v úplném uspořádání jedná o pískovou filtraci, membránovou filtraci (ultrafiltraci) a filtraci přes granulované aktivní uhlí (GAU), hygienické zabezpečení UV lampou (UVAT001) a chlornanem sodným (postupně zkoušené koncentrace chloru $3,5$ a $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Upravená voda je jímána do akumulace (doba zdržení 90 minut). Na vstupu a výstupu je kontinuálně měřen zákal, hodnota pH a teplota vody. Za každým technologickým stupněm jsou umístěna odběrová místa pro pravidelné vzorkování upravované vody. V předložené práci jsou prezentovány výsledky následujících technologických uspořádání:

- uspořádání A: koagulace – písková filtrace – dezinfekce – akumulace,
- uspořádání B: písková filtrace – membrána – dezinfekce – akumulace,
- uspořádání C: písková filtrace – GAU – dezinfekce – akumulace,
- uspořádání D: koagulace – písková filtrace – membránová filtrace – GAU – dezinfekce – akumulace.

Tabulka 2. Charakterizace dílčích technologií poloprovozního zařízení
Table 2. Characterization of partial technologies of pilot unit

Technologie	Parametr	Hodnota
Písková filtrace	zrnitost podložní vrstvy	1,6–4 mm
	zrnitost náplně	1–2 mm
	průtočná rychlost	$1 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$
	filtrační cyklus	16 hodin
	max. tlaková ztráta	6,2 bar
	výška filtrační náplně	1 m
Membránová filtrace	velikost vláken	0,8–1,2 mm
	velikost pórů	$0,08 \mu\text{m}$
	režim	out-in
	průtočná rychlost	$1 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$
	filtrační cyklus	15 min.
	max. transmembránový tlak	2,2 bar
GAU filtrace	typ uhlí	Filtrisorb F300
	velikost částic	8×30 mesh
	koef. stejnorodnosti	1,9
	jodové číslo	min. $950 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$
	BET	$950 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
	výška filtrační náplně	1 m

Mikrobiologické analýzy

Jako mikrobiální indikátory účinnosti terciárního čištění odpadních vod byly zvoleny kultivovatelné mikroorganismy při $22 \text{ }^\circ\text{C}$ a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ podle normy ČSN EN ISO 6222 [7] či psychrofilní a mezofilní bakterie podle norem ČSN 75 7842 [8] a ČSN 75 7841 [9]. Dále koliformní bakterie a *Escherichia coli* podle normy ČSN EN ISO 9308-2 [10], koliformní bakterie podle normy ČSN 75 7837 [11], *Escherichia coli* podle normy ČSN 75 7835 [12], intestinální enterokoky podle normy ČSN EN ISO 7899-2 [13] a *Clostridium perfringens* podle přílohy č. 6 vyhlášky č. 252/2004 Sb. [14]. Protože byla na určitou dobu uzavřena biologická laboratoř ÚTVP VŠCHT Praha z důvodů pandemie koronaviru a bylo zapotřebí zachovat kontinuitu sledování provozu poloprovozního zařízení, byly vzorky zpracovávány pracovištěm PVK, a. s., Laboratoř pracoviště PVK, a. s., má pro námi sledované ukazatele mikrobiální kvality vody zavedené trochu jiné metody (na základě jiných norem). V tomto případě namísto kultivovatelných mikroorganismů při $22 \text{ }^\circ\text{C}$ a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ byly stanovovány psychrofilní a mezofilní bakterie (ČSN 75 7842; ČSN 75 7842), koliformní bakterie kultivačně na Endoagaru (ČSN 75 7837) a *E. coli* na m-FC médiu (ČSN 75 7835).

Koliformní bakterie, *Escherichia coli*, intestinální enterokoky, *Clostridium perfringens* a kultivovatelné mikroorganismy jsou sledované mikrobiologické parametry v pitné vodě (dané vyhláškou č. 252/2004 Sb.). Norma ČSN 75 7143 Jakost vody pro závlahy předepisuje sledování parametrů koliformní bakterie, fekální koliformní bakterie, intestinální enterokoky, salmonely a somatické kolifágy [5]. Nařízení EU 2020/741 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vod

předepisuje pravidelné sledování *Escherichia coli* a *Clostridium perfringens* při testování účinnosti nového zařízení pro dočištění odpadní vody. V případě možnosti vzniku aerosolů rovněž legionely [4]. Koliformní bakterie, *Escherichia coli* a intestinální enterokoky jsou indikátory fekálního znečištění. *Clostridium perfringens* je uváděn jako indikátor přítomnosti parazitických prvoků *Cryptosporidium* či *Giardia* a kultivovatelné mikroorganismy jsou indikátorem účinnosti jednotlivých technologií [15].

V případě kultivovatelných mikroorganismů, psychrofilních a mezofilních bakterií byl očkovan objem 1 ml ředěného či neředěného vzorku (titr ředění byl vždy zvolený podle stupně mikrobiálního znečištění vzorku vody, např. 10^{-1} až 10^{-4}). Pro ostatní mikrobiální ukazatele (koliformní bakterie, *E. coli*, intestinální enterokoky a *C. perfringens*) byl použit objem 0,1, 1, 10 a 100 ml neředěného vzorku (volba objemu neředěného vzorku se řídila stupněm mikrobiálního znečištění).

Mikrobiologické analýzy byly prováděny s četností 1x týdně. Pro lepší přehlednost uvádíme sledované mikrobiologické parametry v tabulce 3.

Tabulka 3. Sledované mikrobiologické parametry

Table 3. Monitored microbial parameters

Parametr	Norma	Zkratka v textu
Kultivovatelné mikroorganismy při 22 °C, 36 °C	ČSN EN ISO 6222	Kumi 22 °C, 36 °C
Psychrofilní bakterie	ČSN 75 7842	PB
Mezofilní bakterie	ČSN 75 7841	MB
Koliformní bakterie	ČSN EN ISO 9308-2 ČSN 75 7837	Koli
<i>Escherichia coli</i>	ČSN EN ISO 9308-2 ČSN 75 7835	<i>E. coli</i>
Intestinální enterokoky	ČSN EN ISO 7899-2	Ent
<i>Clostridium perfringens</i>	vyhláška č. 252/2004 Sb., příl. č. 6	CP

Tabulka 4. Mikrobiální kvalita vstupní odpadní vody

Table 4. Microbial quality of incoming wastewater entering the pilot plant

	Jednotka	Průměr	Medián	Minimum	Maximum
Koliformní bakterie (ČSN EN ISO 9308-2)	MPN/100 ml	553 315	387 300	24 000	2 419 600
Koliformní bakterie (ČSN 75 7837)	KTJ/100 ml	169 969	142 500	46 000	420 000
<i>E. coli</i>	MPN/100 ml	151 235	101 700	3 000	1 203 300
Enterokoky	KTJ/100 ml	30 385	18 050	2 000	550 000
<i>Clostridium perfringens</i>	KTJ/100 ml	5 626	2 450	500	40 000
Psychrofilní bakterie	KTJ/ml	79 875	98 000	7 000	129 000
Mezofilní bakterie	KTJ/ml	56 778	56 000	8 000	107 000
Kultivovatelné mikroorganismy 22 °C	KTJ/ml	256 211	180 000	21 800	1 090 000
Kultivovatelné mikroorganismy 36 °C	KTJ/ml	183 167	159 000	5 400	970 000

VÝSLEDKY A DISKUSE

Kvalita vstupní odpadní vody

Z pohledu fyzikálně-chemických parametrů, vyčištěná odpadní voda, která byla dále terciárně dočišťována, vyhovuje mezinárodním standardům pro opětovné využívání vody a jejich snižování nebylo předmětem návrhu polopropovozní jednotky. I tak lze říci, že při zařazení technologických stupňů písková filtrace, membránová filtrace a filtrace přes GAU docházelo ke snížení o 28 % v případě organického znečištění charakterizované parametrem chemická spotřeba kyslíku ($CHSK_{Mn}$), amoniakální dusík byl odstraněn z cca 28 %, koncentrace celkového fosforu byla snížena v průměru o 46 % a koncentrace orthofosforečnanového fosforu o 40 %. Po zařazení sorpčního stupně analýzy prokázaly, že GAU snižuje obsah organického znečištění vody. Oproti uspořádání bez sorpčního stupně došlo k odstranění tohoto typu znečištění o 72 %.

Vstupní odpadní voda obsahuje vysoké počty mikroorganismů (tabulka 4), což by znamenalo zdravotní riziko při jejím využívání, proto je důraz kladen na mikrobiologickou kvalitu výstupní odpadní vody po terciární úpravě. V tabulce 4 jsou průměrná data mikrobiálních ukazatelů za období 10/19–11/20. Z hodnot je patrné, že mikrobiální kvalita vstupní odpadní vody je kolísavá. Koliformní bakterie byly nejčastěji přítomny v řádech 10^5 MPN/100 ml, resp. KTJ/100 ml, *E. coli* v řádech 10^4 či 10^5 MPN/100 ml, intestinální enterokoky 10^4 KTJ/100 ml, *Clostridium perfringens* v řádech 10^3 KTJ/100 ml, psychrofilní bakterie v řádech 10^4 či 10^5 KTJ/ml, mezofilní bakterie v řádech 10^4 KTJ/ml, kultivovatelné mikroorganismy při 22 °C v řádech 10^5 KTJ/ml a kultivovatelné mikroorganismy při 36 °C v řádech 10^5 KTJ/ml. Ukazatel *E. coli* představoval průměrně 19 % z celkového počtu zastoupených koliformních bakterií. Nebyl prokázán významný vliv ročního období na mikrobiální kvalitu vstupní odpadní vody.

Uspořádání koagulace – písková filtrace – dezinfekce – akumulace (uspořádání A)

V tabulce 5 jsou uvedeny průměrné hodnoty mikrobiálních parametrů z jednotlivých stupňů daného uspořádání. V tabulce 6 jsou zaznamenány účinnosti odstranění sledovaných mikroorganismů v jednotlivých stupních technologického uspořádání. Z tabulky 5 je patrné, že koagulace nemá zásadní vliv na eliminaci mikrobiálního znečištění. Počty koliformních bakterií, *E. coli* a kultivovatelných mikroorganismů při 22 °C byly zvýšeny. Po pískové filtraci došlo ke snížení

Tabulka 5. Mikrobiální kvalita v jednotlivých stupních uspořádání A
Table 5. Microbial quality in individual stages of arrangement A

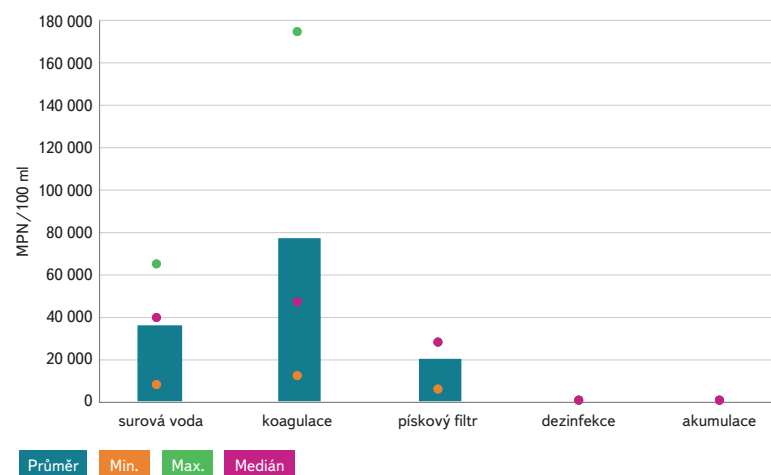
	Koli (MPN/100 ml)	E. coli (MPN/100 ml)	Ent (KTJ/100 ml)	CP (KTJ/100 ml)	Kumi 22 °C (KTJ/ml)	Kumi 36 °C (KTJ/ml)
Vstup	173 830	36 587	9 807	2 633	73 833	56 800
Koagulace	196 180	76 840	8 447	2 550	84 733	39 533
Pískový filtr	128 829	19 995	6 310	537	40 800	14 243
Dezinfekce	0	0	0	45	1 939	240
Akumulace	0	0	1	28	82	47

Tabulka 6. Účinnost odstranění mikroorganismů v jednotlivých stupních uspořádání A
Table 6. Efficiency of microorganisms removal in individual stages of arrangement A

	Koli (%)	E. coli (%)	Ent (%)	CP (%)	Kumi 22 °C (%)	Kumi 36 °C (%)
Koagulace	-13	-110	14	3	-15	30
Pískový filtr	26	45	36	80	45	75
Dezinfekce	100	100	100	98	97	cca 100
Akumulace	100	100	100	99	cca 100	cca 100

Pozn.: Porovnáno vždy s počty ve vstupní vodě.

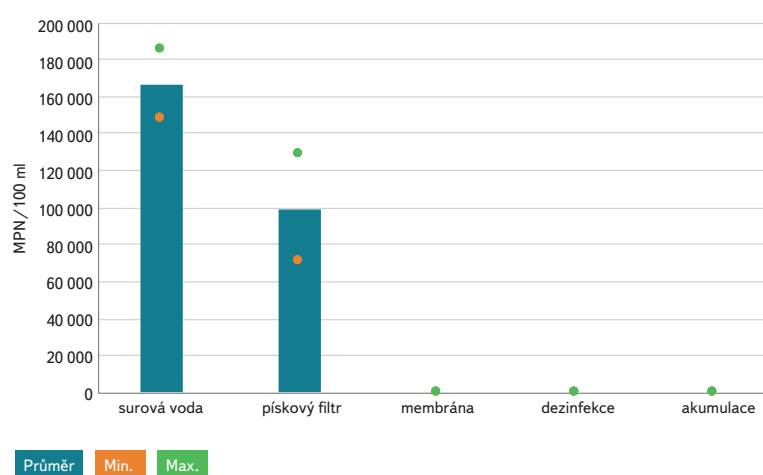
počtů všech sledovaných mikroorganismů, ale pouze u ukazatele *Clostridium perfringens* bylo toto snížení o jeden řád (80% účinnost ve srovnání se vstupem). Za dezinfekční stupněm byly se 100% účinností odstraněny koliformní bakterie, *E. coli* a intestinální enterokoky, a dále *Clostridium perfringens* a kultivovatelné mikroorganismy s účinností vyšší než 97%. Akumulace kvalitu vody nezhorsila, naopak došlo k dalšímu mírnému snížení počtů *Clostridium perfringens* a kultivovatelných mikroorganismů. Voda po dezinfekci a akumulaci splňovala kritéria pro závlahové vody třídy I. podle ČSN 75 7143 [5] v ukazatelích koliformní bakterie a enterokoky a kritéria pro recyklaci vod třídy A podle nařízení EU 2020/741 [4] v ukazateli *E. coli*. Na obr. 2 jsou vyobrazeny statistické charakteristiky pro *E. coli* podle normy ČSN EN ISO 9308-2 (lit. 10, tři měření). U pískového filtru je hodnota mediánu a maxima přibližně shodná.



Obr. 2. Statistické charakteristiky pro *E. coli*, uspořádání A
Fig. 2. Statistical characteristics for *E. coli*, arrangement A

Uspořádání písková filtrace – membrána – dezinfekce – akumulace (uspořádání B)

V tabulce 7 jsou uvedeny průměrné hodnoty mikrobiálních parametrů z jednotlivých stupňů daného uspořádání. V tabulce 8 jsou zaznamenány účinnosti odstranění sledovaných mikroorganismů v jednotlivých stupních technologického uspořádání. Z tabulky 7 je patrné, že písková filtrace snížila počty všech mikroorganismů, maximálně však o jeden řád u počtů *E. coli* podle ČSN EN ISO 9308-2, koliformních bakterií podle ČSN 75 7837 a psychrofilních bakterií. Největší účinnost odstranění na pískovém filtru byla zaznamenána u psychrofilních bakterií (79%), nejmenší pak u koliformních bakterií podle ČSN 75 7837. Zařazení membránové filtrace významně vylepšilo účinnost eliminace zejména



Obr. 3. Statistické charakteristiky pro *E. coli*, uspořádání B
Fig. 3. Statistical characteristics for *E. coli*, arrangement B

Tabulka 7. Mikrobiální kvalita v jednotlivých stupních uspořádání B
Table 7. Microbial quality in individual stages of arrangement B

	Koli (MPN/100 ml)	<i>E. coli</i> (MPN/100 ml)	Koli (KTJ/100 ml)	Ent (KTJ/100 ml)	CP (KTJ/100 ml)
Vstup	726 250	166 650	130 833	25 450	1 900
Pískový filtr	327 700	99 550	93 733	10 595	1 150
Membrána	0	0	2	77	1 121
Dezinfekce	0	0	1	2	0
Akumulace	3	0	1	1	11

Tabulka 7. Mikrobiální kvalita v jednotlivých stupních uspořádání B – pokračování
Table 7. Microbial quality in individual stages of arrangement B – continuation

	PB (KTJ/ml)	MB (KTJ/ml)	Kumi 22 °C (KTJ/ml)	Kumi 36 °C (KTJ/ml)
Vstup	19 000	34 500	326 500	381 000
Pískový filtr	4 000	10 750	140 000	109 500
Membrána	20	401	890	1 640
Dezinfekce	0	3	386	106
Akumulace	0	2	92	198

Tabulka 8. Účinnost odstranění mikroorganismů v jednotlivých stupních uspořádání B
Table 8. Efficiency of microorganisms removal in individual stages of arrangement B

	Koli 1 (%)	Koli 2 (%)	<i>E. coli</i> (%)	Ent (%)	CP (%)	PB (%)	MB (%)	Kumi 22 °C (%)	Kumi 36 °C (%)
Pískový filtr	55	28	40	58	39	79	69	57	71
Membrána	100	cca 100	cca 100	99,7	41	99,9	99	99,7	99,6
Dezinfekce	100	cca 100	cca 100	cca 100	100	100	cca 100	99,9	cca 100
Akumulace	cca 100	cca 100	cca 100	cca 100	99	100	cca 100	cca 100	99,9

Pozn.: Porovnáno vždy s počty ve vstupní vodě, Koli 1 hodnoty podle metody ČSN EN ISO 9308-2 [11], Koli 2 hodnoty podle metody ČSN 75 7837 [12].

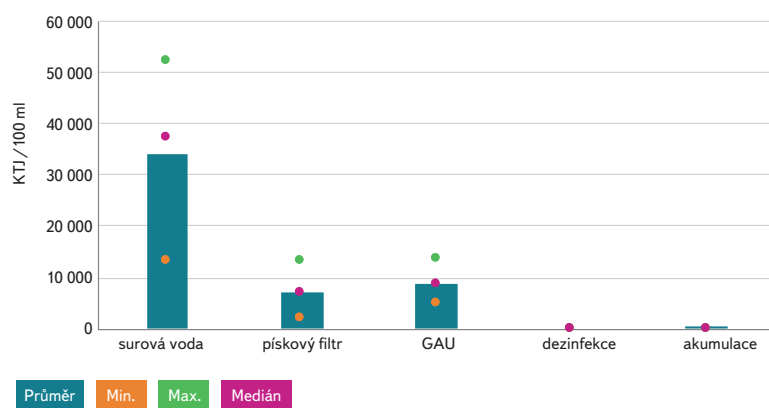
v ukazatelích koliformní bakterie a *E. coli*, které byly sníženy na nulové či téměř nulové hodnoty. Rovněž s velkou účinností byly odstraněny intestinální enterokoky (99,7 % ve srovnání se vstupem), psychofilní a mezofilní bakterie (více jak 99 % ve srovnání se vstupem) a dále kultivovatelné mikroorganismy při 22 °C a 36 °C (více než 99 % ve srovnání se vstupem). Ukazatel *Clostridium perfringens* byl eliminován pouze s 41% účinností za membránou. Dezinfekční krok pak eliminoval *Clostridium perfringens* na nulové hodnoty, které byly mírně zvýšeny během akumulace. Celková účinnost odstranění *Clostridium perfringens* však zůstala na vysokých hodnotách 99 %. Kritéria pro závahové vody třídy I. podle ČSN 75 7143 [5] v ukazatelích koliformní bakterie a enterokoky a kritéria pro recyklaci vod třídy A podle nařízení EU 2020/741 [4] v ukazateli *E. coli* byla již splněna po membránové filtraci. Na obr. 3 jsou vyobrazeny statistické charakteristiky pro *E. coli* podle normy ČSN EN ISO 9308-2 [10]. Medián není uveden, protože jsou prezentována data ze dvou hodnot.

Uspořádání písková filtrace – GAU – dezinfekce – akumulace (uspořádání C)

V tabulce 9 jsou uvedeny průměrné hodnoty mikrobiálních parametrů z jednotlivých stupňů daného uspořádání. V tabulce 10 jsou zaznamenány účinnosti odstranění sledovaných mikroorganismů v jednotlivých stupních technologického uspořádání. Z tabulky 9 je patrné, že písková filtrace snížila počty všech sledovaných mikrobiologických ukazatelů, avšak pouze u enterokoků a *E. coli* podle normy ČSN 75 7835 došlo ke snížení o řád (účinnost 49 %, resp. 80 %). Psychofilní a mezofilní bakterie byly na pískovém filtru odstraněny s více než 50% účinností. Filtrace přes granulované aktivní uhlí dále kvalitu vody vylepšila. Řádové změny byly zaznamenány u počtu koliformních bakterií (účinnost 82 % ve srovnání se vstupem) a psychofilních bakterií (účinnost 91 % ve srovnání se vstupem). K významnému snížení počtů všech sledovaných mikroorganismů došlo až po dezinfekci. Po akumulaci došlo k navýšení počtu psychofilních bakterií, avšak účinnost odstranění zůstává na hodnotách vyšších než 99 %. Voda po dezinfekci a akumulaci splňovala kritéria pro závahové vody

Tabulka 9. Mikrobiální kvalita v jednotlivých stupních uspořádání C
Table 9. Microbial quality in individual stages of arrangement C

	Koli (KTJ/100 ml)	<i>E. coli</i> (KTJ/100 ml)	Ent (KTJ/100 ml)	PB (KTJ/ml)	MB (KTJ/ml)
Vstup	180 000	34 067	11 917	81 000	50 000
Pískový filtr	120 000	6 983	6 083	26 833	21 467
GAU	32 167	8 687	3 287	6 973	12 190
Dezinfekce	0	0	0	0	1
Akumulace	1	1	0	281	6



Obr. 4. Statistické charakteristiky pro *E. coli*, uspořádání C
Fig. 4. Statistical characteristics for *E. coli*, arrangement C

třídy I. podle ČSN 75 7143 [5] v ukazatelích koliformní bakterie a intestinální enterokoky a kritéria pro recyklaci vod třídy A podle nařízení EU 2020/741 [4] v ukazateli *E. coli*. Na obr. 4 jsou vyobrazeny statistické charakteristiky pro *E. coli* podle metody ČSN 75 7835 (lit. 12, pět měření).

Uspořádání koagulace – písková filtrace – membránová filtrace – GAU – dezinfekce – akumulace (uspořádání D)

V tabulce 11 jsou uvedeny průměrné hodnoty mikrobiálních parametrů z jednotlivých stupňů daného uspořádání. V tabulce 12 jsou zaznamenány účinnosti odstranění sledovaných mikroorganismů v jednotlivých stupních technologického uspořádání. Opět bylo potvrzeno, že koagulace se významně nepodílí na eliminaci sledovaných mikroorganismů. Zvýšeny byly počty intestinálních enterokoků, *Clostridium perfringens* a kultivovatelných mikroorganismů při 22 °C.

Tabulka 10. Účinnost odstranění mikroorganismů v jednotlivých stupních uspořádání C
Table 10. Efficiency of microorganisms removal in individual stages of arrangement C

	Koli (%)	<i>E. coli</i> (%)	Ent (%)	PB (%)	MB (%)
Pískový filtr	33	80	49	67	57
GAU	82	75	72	91	76
Dezinfekce	100	100	100	100	cca 100
Akumulace	cca 100	cca 100	100	99,7	cca 100

Pozn.: Porovnáno vždy s počty ve vstupní vodě.

Písková filtrace snížila počty sledovaných mikroorganismů kromě ukazatele *E. coli*. S největší účinností byly odstraněny koliformní bakterie (účinnost 60 % ve srovnání se vstupem). Filtrace přes membránu způsobila významné snížení sledovaných mikroorganismů. Účinnost jejich eliminace byla téměř 100 % (ve srovnání se vstupem).

GAU způsobilo mírné navýšení téměř všech mikroorganismů. Dezinfekce snížila počty koliformních bakterií, *E. coli*, intestinálních enterokoků a *Clostridium perfringens* na nulové hodnoty. Kultivovatelné mikroorganismy při 22 °C a 36 °C snížily počty na jednotky KTJ/ml. Stejná kvalita vody byla udržena i během akumulace. Voda splňovala kritéria pro závlahové vody třídy I. podle ČSN 75 7143 v ukazatelích koliformní bakterie a intestinální enterokoky a kritéria pro recyklaci vod třídy A podle nařízení EU 2020/741 [4] v ukazateli *E. coli* již po membránové filtraci. Po filtraci přes GAU byly zvýšeny počty intestinálních enterokoků, voda přestala splňovat v tomto ukazateli kritéria pro vodu kvality třídy I. podle ČSN 75 7143 [5]. Dezinfekce však následně snížila počty mikroorganismů na kvalitu pitné vody, kterou si udržela rovněž během akumulace. Na obr. 5 jsou vyobrazeny statistické charakteristiky pro *E. coli* podle normy ČSN EN ISO 9308-2 (lit. 10, čtyři měření).

Porovnání prezentovaných technologií

Koagulace neměla významný vliv na odstranění sledovaných mikroorganismů. Koagulační stupeň byl řešen způsobem tzv. in-line koagulace (jednostupňové koagulace) s dávkováním 10× ředěného koagulačního preparátu a pouze rychlým promícháním činidla. Tato technologie dlouhodobě nevykazuje vysokou účinnost na eliminaci mikrobiálního znečištění. Souběžný odběr bodových vzorků nátoky a vody po koagulaci (tento vzorek je navíc odebírán až po určité době zdržení v lamelovém usazováku) je pravděpodobnou příčinou zjištěných záporných hodnot odstranění mikrobiálního znečištění. Rodríguez-Chueca a kolektiv [16] studovali vliv kombinace koagulace, flokulace a Fentonovy

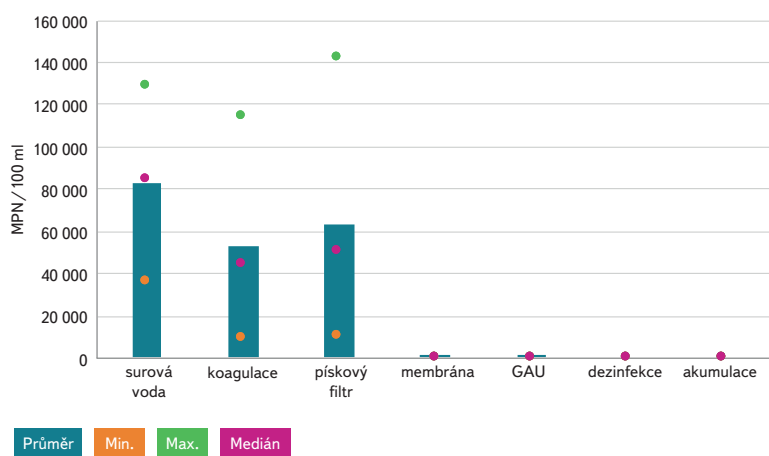
Tabulka 11. Mikrobiální kvalita v jednotlivých stupních uspořádání D
Table 11. Microbial quality in individual stages of arrangement D

	Koli (MPN/100 ml)	<i>E. coli</i> (MPN/100 ml)	Ent (KTJ/100 ml)	CP (KTJ/100 ml)	Kumi 22 °C (KTJ/ml)	Kumi 36 °C (KTJ/ml)
Vstup	597 963	83 250	29 400	16 125	357 500	171 500
Koagulace	281 238	52 963	62 250	25 500	502 250	163 750
Písková filtrace	238 702	63 478	28 250	12 670	289 250	160 875
Membrána	3	2	8	1	2 193	927
GAU	16	2	167	4	2 864	652
Dezinfekce	0	0	0	0	5	10
Akumulace	0	0	0	0	1	2

Tabulka 12. Účinnost odstranění mikroorganismů v jednotlivých stupních uspořádání D
Table 12. Efficiency of microorganisms removal in individual stages of arrangement D

	Koli (%)	<i>E. coli</i> (%)	Ent (%)	CP (%)	Kumi 22 °C (%)	Kumi 36 °C (%)
Koagulace	53	36	-112	-58	-40	5
Písková filtrace	60	24	4	21	19	6
Membrána	cca 100	cca 100	cca 100	cca 100	cca 100	99
GAU	cca 100	cca 100	99	cca 100	cca 100	99
Dezinfekce	100	100	100	100	cca 100	cca 100
Akumulace	100	100	100	100	cca 100	cca 100

Pozn.: Porovnáno vždy s počty ve vstupní vodě.



Obr. 5. Statistické charakteristiky pro *E. coli*, uspořádání D
Fig. 5. Statistical characteristics for *E. coli*, arrangement D

reakce na počty bakterií druhů *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Během koagulace (Fe^{3+} , $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) došlo ke snížení počtů všech bakterií druhů *Enterococcus faecalis* a *Pseudomonas aeruginosa* o 1,5 logaritmické jednotky, ale počet bakterií *E. coli* byl snížen pouze o 0,5 logaritmické jednotky.

Písková filtrace vždy snižovala počty sledovaných mikroorganismů, ale maximálně o jeden řád. Výjimkou je *E. coli*, která v jednom případě zvýšila počty po pískové filtraci přibližně o 20 %, ale koliformní bakterie své počty nezvýšily. Účinnosti eliminace mikroorganismů se nejčastěji držely pod 50 %. Vojtěchovská Šrámková a kolektiv ve studii [17] dosahovali účinností pro eliminaci koliformních bakterií, *E. coli*, intestinálních enterokoků a kultivovatelných mikroorganismů při 22 °C přes 90 % za použití pískové filtrace s náplní o jemnější zrnitosti 0,5–1 mm. Během laboratorního testování pískové filtrace jsme se v našem projektu potýkali se zhoršenou kvalitou vody za pískovou filtrací pravděpodobně díky nežádoucímu strhávání mikrobiálního biofilmu [18]. Tento jev se nám v poloprovzním uspořádání podařilo eliminovat.

Zařazení membránové filtrace za pískovou filtraci dosahovalo účinností odstranění všech mikroorganismů více než 99 %, voda splňovala vždy již za membránovou filtrací nejpřísnější kritéria podle nařízení EU 2020/741 [4] a v jednom případě i podle ČSN 75 7143 [5].

GAU za membránovou filtraci zhoršilo kvalitu zejména v ukazateli intestinálních enterokoků. Přesto by tato voda mohla být využita pro zemědělské závlahy podle nařízení EU 2020/741 [4].

Ve všech prezentovaných technologiích byla potvrzena nutnost zařazení hygienického stupně pro maximální eliminaci mikrobiálních parametrů, což je v souladu se studií Vojtěchovské Šrámkové a kol. [17], která potvrdila 100% účinnost odstranění *E. coli*, koliformních bakterií a intestinálních enterokoků za floataci, pískovým filtrem a filtrem s Filtralite až po dezinfekci UV zářením. Všechny

technologie po dezinfekci splňovaly požadavky pro závlahové vody třídy I. podle ČSN 75 7143 [5] v ukazatelích koliformní bakterie a enterokoky a kritéria pro recyklaci vod třídy A podle nařízení EU 2020/741 [4]. V případě uspořádání koagulace – písková filtrace – membránová filtrace – GAU – dezinfekce – akumulace byly dokonce po dezinfekci splněny požadavky na kvalitu pitné vody. V případě uspořádání filtrace – membrána – dezinfekce – akumulace a uspořádání koagulace – písková filtrace – membránová filtrace – GAU – dezinfekce – akumulace byla nejpřísnější kritéria pro *E. coli* podle nařízení EU 2020/741 [4] splněna již za membránou. Membrána v rozšířeném uspořádání eliminovala rovněž enterokoky na hodnoty splňující kritéria pro závlahové vody třídy I. podle ČSN 75 7143 [5]. Podobných výsledků dosáhli rovněž Hendricks a Pool [19], kteří detekovali za membránou při terciárním čištění odpadní vody počty *E. coli* nižší než 1 KTJ ve 100 ml.

Vysoká kvalita vody byla rovněž udržena i během akumulace. Obecně lze konstatovat, že akumulace neměla na zhoršení kvality získané vody významný vliv.

ZÁVĚR

Cílem studie byla prezentace dílčích výsledků projektu TA ČR TH03030080 Recyklace odpadních vod pro využití ve vodním hospodářství měst budoucnosti. Na základě výsledků laboratorních testů byla navržena kontejnerová pilotní jednotka pro terciární dočištění biologicky vyčištěné odpadní vody s množností kombinace filtračních a dezinfekčních technologií. V příspěvku byla prezentována čtyři technologická uspořádání zahrnující různé kombinace koagulace, pískové filtrace, filtrace přes GAU a membránové filtrace včetně dezinfekce UV zářením a chlorací. Kvalita vody během akumulace nebyla významně negativně ovlivněna. I při nejjednodušším uspořádání koagulace – písková filtrace bylo po dezinfekci dosaženo mikrobiální kvality vody vhodné pro závlahy či pro vodní hospodářství ve městech, pokud nebude docházet k tvorbě aerosolů, neboť v rámci příspěvku nebyly sledovány počty legionel. O zařazení GAU, membránové filtrace či jejich kombinace budou rozhodovat další přísnější požadavky na chemickou kvalitu získané recyklované vody.

Poděkování

Práce byla vypracována v rámci projektu TA ČR TH03030080 Recyklace odpadních vod pro využití ve vodním hospodářství měst budoucnosti. Autoři děkují RNDr. Šárce Liškové z PVK, a. s., za provedené mikrobiologické analýzy.

Literatura

- [1] ASANO, T., BURTON, F.L., LEVERENZ, H.L., TSUCHIHASCHI, R., and TCHOBANOGLIOUS, G. *Water Reuse: Issues, Technologies, and Applications*. 2007, Mc Graw-Hill, New York. ISBN 978-0-07-145927-3.
- [2] JIMENEZ, B. and ASANO, T. *Water Reuse: And international survey of current practice, issues and needs*. IWA Publishing, 2008. ISBN 9781843390893.
- [3] ESLAMIAN, S. *Urban Water Reuse: Handbook*. 2016, IWA Publishing. ISBN 978-1-4822-2914-1.
- [4] Nařízení Evropského parlamentu a rady (EU) 2020/741 ze dne 25. 5. 2020 o minimálních požadavcích na opětovné využívání vod.
- [5] ČSN 75 7143 *Jakost vod. Jakost vody pro závlahy*. Praha: Český normalizační institut, 1991.
- [6] ČSN ISO 20761 *Opětovné využití vody v městských oblastech – Směrnice pro hodnocení bezpečnosti opětovného využití vody – Hodnocené ukazatele a metody*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2020.
- [7] ČSN EN ISO 6222 *Jakost vod – Stanovení kultivovatelných mikroorganismů – Stanovení počtu kolonií očkovaním do živného agarového kultivačního média*. Praha: Český normalizační institut, 2000.
- [8] ČSN 75 7842 *Jakost vod – Stanovení psychrofilních bakterií*. Praha: Český normalizační institut, 1999.
- [9] ČSN 75 7841 *Jakost vod – Stanovení mezofilních bakterií*. Praha: Český normalizační institut, 1999.
- [10] ČSN EN ISO 9308-2 *Kvalita vod – Stanovení Escherichia coli a koliformních bakterií – Část 2: Metoda nejpravděpodobnějšího počtu*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2014.
- [11] ČSN 75 7837 *Jakost vod – Stanovení koliformních bakterií v nedesinfikovaných vodách*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010.
- [12] ČSN 75 7835 *Jakost vod – Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a Escherichia coli*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2009.
- [13] ČSN EN ISO 7899-2 *Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků – Část 2: Metoda membránových filtrů*. Praha: Český normalizační institut, 2001.
- [14] Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, příl. č. 6, 2004.
- [15] BITTON, G. *Wastewater microbiology*, 3rd edition, 2005, John Wiley & Sons, Inc., USA, p. 740.
- [16] RODRÍGUEZ-CHUECA, J., MORALES, M., MOSTEO, R., ORMAD, M.P., and OVELLEIRO, J.L. Inactivation of *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* present in treated urban wastewater by coagulation–flocculation and photo-Fenton processes. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2013, Vol. 12, p. 864–871. DOI: 10.1039/c3pp25352j.
- [17] VOJTĚCHOVSKÁ SRÁMKOVÁ, M., DIAZ-SOSA, V., and WANNER, J. Experimental verification of tertiary treatment process in achieving effluent quality required by wastewater reuse standards. *Journal of Water Process Engineering*, 2018, Vol. 22, p. 41–45. DOI: 10.1016/j.jwpe.2018.01.003.
- [18] PEČENKA, M., PETERKOVÁ, E., ČIHÁKOVÁ, P., JANDA, V., WANNER, J., et al. Tertiary treated effluent of municipal waste water treatment plants as an alternative water source for use in smart cities. ICETI 2018, 2nd International Conference on Environmental Technology and Innovations, Radek Vurm (Ed.), 21. 11.–22. 11. 2018, Prague, Czech Republic, 108–118. ISBN 978-80-7592-034-8 (on-line version).
- [19] HENDRICK, R. and POOL, E.J. The effectiveness of sewage treatment processes to remove faecal pathogens and antibiotic residues. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2012, Vol. 47, p. 289–297. DOI: 10.1080/10934529.2012.637432.

Autoři

Ing. Andrea Benáková, Ph.D.

✉ andrea.benakova@vscht.cz

ORCID: 0000-0001-8842-5262

Ing. Eliška Vobecká

✉ eliska.vobecka@vscht.cz

ORCID: 0000-0002-9779-8367

Ing. Martin Pečenka, Ph.D.

✉ martin.pecenka@vscht.cz

ORCID: 0000-0002-6412-1974

doc. RNDr. Jana Říhová Ambrožová, Ph.D.

✉ jana.ambrozova@vscht.cz

ORCID: 0000-0002-1503-409X

prof. Ing. Jiří Wanner, DrSc.

✉ jiri.wanner@vscht.cz

ORCID: 0000-0003-0788-995X

Ústav technologie vody a prostředí,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Příspěvek prošel lektorským řízením.

DOI: 10.46555/VTEI.2020.12.004

CHANGE OF MICROBIAL COMMUNITY IN TERTIARY WASTEWATER TREATMENT

**BENAKOVA, A.; VOBECKA, E.; PECENKA, M.;
RIHOVA AMBROZOVA, J.; WANNER, J.**

Department of Water Technology and Environmental Engineering,
University of Chemistry and Technology, Prague

Keywords: disinfection – *Escherichia coli* – wastewater –
reuse – pilot plant – tertiary treatment – irrigation

The aim of this contribution is the presentation of partial results of testing tertiary technology for recycling of treated urban wastewater. The obtained water will be used for watering of greenery, playgrounds, or for street cleaning. The quality of the treated water depends on the purpose of the use. Emphasis is placed especially on the microbiological quality of the obtained water because the chemical parameters of treated wastewater do not pose a significant risk when used for non-drinking purposes. The importance of the disinfection step was confirmed. The water quality was sufficiently hygienically ensured even during storage.

Vliv revize ČSN 75 7713 (2015) na výsledky stanovení abiosestonu

PETR PUMANN

Klíčová slova: abioseston — pitná voda — Česká republika — ČSN 75 7713 — vyhláška č. 252/2004 Sb.

SOUHRN

V článku je ukázáno, jak se revize metodické normy ČSN 75 7713 pro stanovení abiosestonu ve vodě z prosince 2015 a snížení limitní hodnoty z 10 % na 5 % v novele vyhlášky č. 252/2004 Sb. z dubna 2018 promítly do výsledků stanovení abiosestonu v provozních laboratořích. V rámci programů zkoušení způsobilosti pořádaných každoročně v letech 2011 až 2020 Státním zdravotním ústavem byly výsledky tří kol z pěti před revizí ČSN 75 7713 značně nadhodnoceny při srovnání se stanovením abiosestonu pomocí analýzy obrazu. U vzorků v dalších pěti kolech programu pořádaných po revizi normy k tak významnému nadhodnocení již nedocházelo. Výsledky rutinních kontrol pitné vody za období 2012 až 2019 (uložené v databázi IS PiVo) v době platnosti původní metodické normy byly statisticky významně vyšší než výsledky po revizi. Byl také pozorován statisticky významný pokles v zastoupení výsledků překračujících 5 % v období po novelizaci vyhlášky č. 252/2004 Sb. (0,07 % výsledků) ve srovnání s obdobími před novelizací, tj. po revizi metodické normy (0,35 %) i před ní (0,92 %).

ÚVOD

V pitné vodě se kromě mikroskopických organismů mohou vyskytovat i různé (většinou neživé) částice, které se řadí do ukazatele abioseston. Jedná se např. o produkty metabolismu železitých bakterií, zbytky schránek různých organismů (řas, prvoků, koryšů, hmyzu), pylová zrna, zbytky rostlinných pletiv, detritus, produkty koroze, krystaly uhličitanu vápenatého nebo půdní částice. Ukazatel abioseston se podle vyhlášky č. 252/2004 Sb., která v současnosti určuje požadavky na kvalitu pitné vody, musí kromě textové informace o jeho složení obsahovat také kvantifikaci vyjádřenou jako pokryvnost zorného pole mikroskopu v komůrce Cyrus I po padesátinásobném zahuštění.

V legislativě ČR (resp. bývalého Československa) se abioseston jako „kvantitativní“ ukazatel s limitem 10 % pokryvnosti zorného pole poprvé objevil v roce 1991 v ČSN 75 7111 Pitná voda [1]. V době platnosti vyhlášky č. 376/2000 Sb. od ledna 2001 do dubna 2004 ze seznamu sledovaných ukazatelů sice vypadl, ale při další změně legislativy byl do něj již zmíněnou vyhláškou č. 252/2004 Sb. zase navrácen. Důvodem ke znovuzařazení nebyla jeho nepostradatelnost pro hodnocení kvality vody, ale především minimální pracnost stanovení, pokud se provádí společně se stanovením počtu mikroskopických organismů [2]. Je otázka, zda si někdo v pracovní skupině (včetně autora tohoto článku), v níž byla změna mikroskopických ukazatelů před novelizací diskutována, uvědomoval, že metoda podle ČSN 75 7713 z roku 1998 [3] je pro vzorky s větším množstvím abiosestonu obtížně reprodukovatelná. Každopádně již v roce 2007 byly popsány zásadní výhrady nejen k používané metodě (především k nevhodným odhadovým tabulím), ale také k nastavení limitní hodnoty ve vyhlášce (limitní hodnota 10 % pro

abioseston řádově neodpovídá limitní hodnotě 5 NTU pro zákal) [4]. V roce 2010 bylo rozhodnuto o přípravě revize metodické normy ČSN 75 7713 z roku 1998 [5]. Revidovaná norma byla vydána až koncem roku 2015 [6]. Obsahovala nové odhadové tabule, jejichž vhodnost byla ověřena ve třech sériích pokusů s účastníky determinačních kurzů [7, 8]. Poté, co byl revidovanou normou ČSN 75 7713 upraven metodický postup, mohlo být přistoupeno také ke snížení limitní hodnoty ve vyhlášce č. 252/2004 Sb. z 10 % na 5 % [9]. K této změně došlo v dubnu roku 2018 (vyhláškou č. 70/2018 Sb., která přinesla především změny týkající se rizikové analýzy), čímž byly úpravy navrženy v roce 2007 [4] v zásadě dokončeny. Zda měl tento více než desetiletí trvající proces nějaký praktický dopad, tj. zda se změny odrazily ve výsledcích provozních laboratoří, je náplní tohoto článku.

METODY

Prvním zdrojem dat pro srovnání výsledků před a po revizi ČSN 75 7713 byl soubor výsledků z programu zkoušení způsobilosti (PZZ) Mikroskopický rozbor pitné a surové (povrchové) vody, který pořádá každoročně Státní zdravotní ústav (SZÚ). Do zpracování byla zahrnuta data za roky 2011 až 2020 (tedy pět let podle původní normy ČSN 75 7713 a pět let po její revizi). V uvedeném období dodalo výsledky pro ukazatel abioseston odhadem podle ČSN 75 7713 mezi 14 a 21 účastníky (*tabulka 1*). Do zpracování byly zahrnuty také výsledky získané pomocí analýzy obrazu (metoda nebyla předepsána, ale jednalo se vždy o postup rámcově popsany v příspěvku z roku 2007 [4]). Analýzou obrazu vzorky zpracovávala jen menšina (ročně 3 až 6) účastníků (*tabulka 1*).

Druhým zdrojem dat byla databáze IS PiVo, kterou spravují pracovníci Státního zdravotního ústavu. Do IS PiVo jsou zasílány výsledky rutinních kontrol pitné vody z veřejných vodovodů podle platné legislativy. Využita byla data za období leden 2012 až začátek prosince 2019. Toto období bylo rozděleno na tři nestejně dlouhé části:

- před revizí metodické normy ČSN 75 7713 (1. 1. 2012–30. 11. 2015),
- po revizi ČSN 75 7713 (1. 12. 2015–26. 4. 2018),
- po revizi ČSN 75 7713 a zároveň po snížení limitu v novele vyhlášky č. 252/2004 Sb. z 10 % na 5 % (27. 4. 2018–2. 12. 2019).

V IS PiVo se nachází za uvedené období více než 126 000 výsledků stanovení abiosestonu. Za stejné období jako u abiosestonu byla zpracována také data pro zákal.

K porovnání jednotlivých období u dat z IS PiVo byl použit Kruskalův-Wallisův test s následným tzv. mnohonásobným porovnáváním (po dvojicích), při němž se p-hodnoty korigují („zprůšňují“), aby se zohlednilo, že každá ze skupin vstupuje do porovnání několikrát. Dále byl v jednotlivých obdobích srovnáván počet překročení hodnoty 5 % pokryvnosti abiosestonem pomocí Fisherova

Tabulka 1. Počet účastníků (N), aritmetický průměr, medián a popis převládající složení abiosestonu v jednotlivých kolech PZZ
 Table 1. Number of participants (N), arithmetic mean, median and description of abioseston in particular rounds of PTs

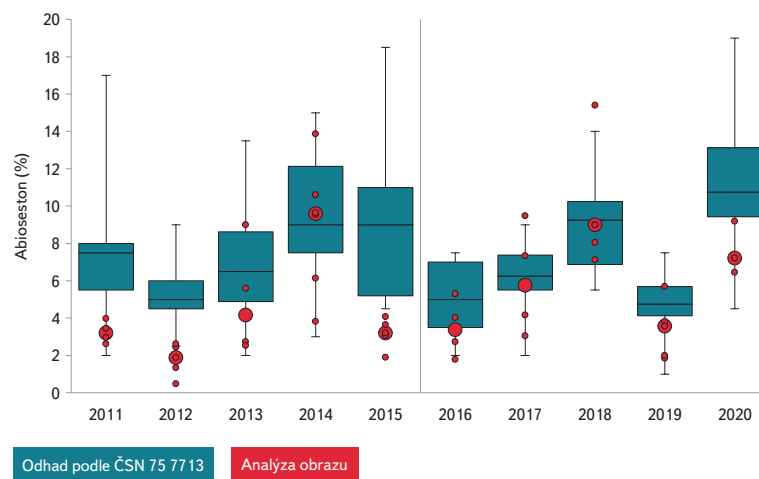
Rok	Odhadem			Analýzou obrazu			Popis složení vzorku
	N	průměr	medián	N	průměr	medián	
2011	21	7,77	7,50	4	3,25	3,21	sraženiny Fe malé a střední velikosti (desítky μm)
2012	17	5,33	5,00	5	1,76	1,89	sraženiny Fe malé a střední velikosti (desítky μm)
2013	20	6,84	6,50	4	4,96	4,16	převládaly světlé částice (krystaly) střední velikosti
2014	20	9,50	9,00	6	8,94	9,60	<i>Gallionella</i> – jednotlivě i velké shluky (stovky μm)
2015	21	9,28	9,00	5	3,18	3,20	sraženiny Fe malé a střední velikosti (desítky μm)
2016	17	4,97	5,00	4	3,46	3,38	sraženiny Fe hlavně střední velikosti (desítky μm)
2017	14	6,15	6,25	4	6,01	5,76	<i>Gallionella</i> – jednotlivě
2018	16	8,94	9,25	5	9,71	9,00	sraženiny Fe především střední velikosti (desítky μm)
2019	14	4,77	4,75	5	3,39	3,57	sraženiny Mn malé a střední velikosti (desítky μm)
2020	16	11,0	10,75	3	7,62	7,21	sraženiny Fe malé až velké velikosti (> 100 μm)

exaktního testu s následným mnohonásobným porovnáním s Bonferroniho korekcí. Ke statistické analýze byl použit software Stata. Zpracování dat a další analýzy byly provedeny v MS Excel.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Vzorky pro stanovení abiosestonu v rámci PZZ pořádaných SZÚ se každoročně liší jak množstvím přítomného abiosestonu, tak jeho složením. Není tak téměř možné jen prosté srovnání výsledků před revizí metodické normy ČSN 75 7713 a po ní. K posouzení změn byly proto využity také výsledky abiosestonu stanoveného pomocí analýzy obrazu. Tato metoda je jednak výrazně méně subjektivní než stanovení odhadem podle ČSN 75 7713, ale především zúčastněné laboratoře (pravděpodobně) používaly po celé období stejnou metodu, takže lze výsledek získaný analýzou obrazu považovat za referenční hodnotu, ke které je možné výsledky pomocí odhadu vztahovat. Také tato metoda má však různé nedostatky a i v ní hraje dojem analytika svou roli. Problematický je také mnohem menší počet laboratoří, které dodaly výsledek.

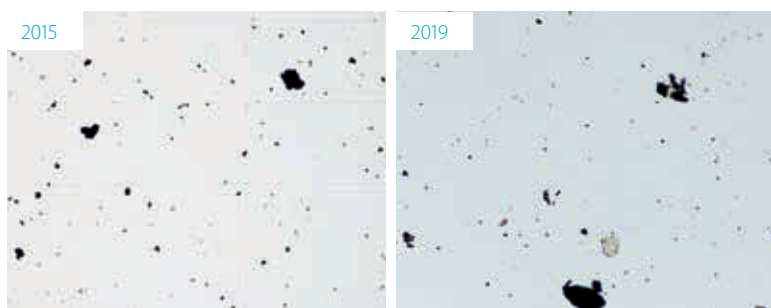
Srovnání výsledků obou metod v deseti kolech PZZ je patrné z obr. 1 a tabulky 1. Téměř ve všech případech je střední hodnota (medián, aritmetický průměr) u stanovení analýzou obrazu nižší než u stanovení odhadem. Výjimku představovaly roky 2014 (medián) a 2018 (průměr). Výrazný rozdíl je především v letech 2012 a 2015. Důvod, proč v letech 2013 a 2014 rozdíl nebyl tak velký, lze hledat především ve velikosti částic. V pokusech s účastníky determinačních kurzů docházelo při využití odhadových tabulí z původní ČSN 75 7713 z roku 1998 k výraznému nadhodnocení výsledků především u vzorků s velkým množstvím malých částic [7]. U částic středních a velkých nebylo použití původní normy natolik problematické [7]. Ve vzorcích z let 2012 a 2015 byly právě malé částice hojně zastoupeny (tabulka 1). V roce 2014 byly přítomny stopky železité bakterie rodu *Gallionella*, které jsou také relativně malé a navíc protažené. V některých předchozích kolech PZZ (mimo zkoumané období) způsobovaly také výrazné nadhodnocení výsledků (např. v roce 2007 [10]). V roce 2014 se však kromě jednotlivých stopek bakterií rodu *Gallionella* vyskytovaly také jejich



Obr. 1. Výsledky abiosestonu (odhadem podle ČSN 75 7713 a analýzou obrazu) v PZZ pořádaných SZÚ v období 2011–2020; střed krabicových grafů pro stanovení odhadem představuje medián, okraje krabiček 25. a 75. percentil; čárky na konci úseček (vousů) vyznačují nejvyšší a nejnižší hodnotu; výsledky analýzou obrazu jsou kvůli nízkému počtu účastníků zobrazeny jako medián (větší červený kruh) a výsledky jednotlivých účastníků (malé červené kruhy)

Fig. 1. Abioseston results (estimation according to the ČSN 75 7713 and image analysis) in the PTs organised by the National Institute of Public Health between 2011–2020; the central line of the box-plots shows the median of the results (by estimation according to the ČSN 75 7713), the ends the 25th and 75th percentile and the whiskers the highest and lowest values; results by image analysis are shown (due to low numbers of participants) as the median (bigger red circle) and individual participant values (small red circles)

shluky velké až stovky μm . U takto velkých částic bylo pravděpodobné při využití odhadových tabulí z původní ČSN 75 7713 spíše podhodnocení výsledků [7], což efekt malých částic zřejmě vykompenzovalo. Celkový výsledek stanovení odhadem se tak od výsledku stanovení analýzou obrazu téměř nelišil. Ačkoliv



Obr. 2. Ukázky abiosestonu u podobných vzorků (z PZZ) před a po revizi metodické normy; pomocí analýzy obrazu bylo v obou kolech zjištěno zhruba stejné množství abiosestonu (mírně přes 3 %), pomocí odhadu podle ČSN 75 7713 byly získány výrazně odlišné výsledky (v roce 2015 před revizí více než 9 %, v roce 2019 po revizi normy pouze necelých 5 %)

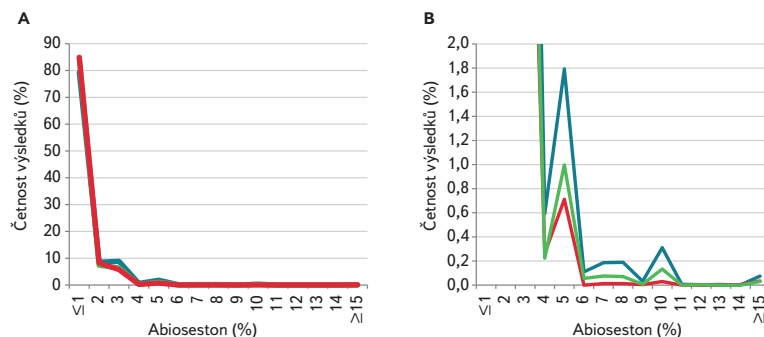
Fig. 2. Examples of abioseston from two similar samples (from PTs) before and after the revision of the methodical standard; approximately equal amount of abioseston was found in both rounds by image analysis, different results were obtained by estimation according to the ČSN 75 7713 (in 2015 before the revision more than 9 %, in 2019 after standard revision slightly less than 5%)

mají výsledky některých kol PZZ po revizi ČSN 75 7713 daleko do ideálního stavu (především kola v letech 2016, 2019, 2020), neobjevovaly se v nich tak velké rozdíly mezi stanovením abiosestonu odhadem a analýzou obrazu, jako tomu bylo před revizí metodické normy. To lze dobře demonstrovat na vzorcích z let 2015 a 2019, které si byly velmi podobné jak složením abiosestonu, tak jeho množstvím (obr. 2). Zatímco výsledky získané analýzou obrazu v obou letech byly srovnatelné (tabulka 1), výsledky odhadem pokrývnosti podle původní ČSN 75 7713 z roku 1998 byly téměř dvojnásobné (více než 9 % v roce 2015, necelých 5 % v roce 2019).

Výsledky rutinních rozborů pitné vody z veřejných vodovodů uložených v databázi IS PiVo ukazují na vliv revidované normy ještě zřetelněji než výsledky PZZ. Období před revizí ČSN 75 7713 vykazuje při použití Kruskalova-Wallisova testu s následným mnohonásobným porovnáváním statisticky významně vyšší výsledky než obě období po revizi ($p < 0,001$). Rozdíly lze dobře pozorovat na obr. 3B i v tabulce 2. Největší přesun výsledků proběhl mezi kategoriemi 3 % a ≤ 1 %, což znamená, že podle původních odhadových tabulí byly nadhodnocovány i výsledky na této relativně nízké úrovni. Proč byl přesun z kategorie 3 % vyšší než z kategorie 2 %, je zřejmě dáno tím, že původní norma obsahovala pouze tabule pro 1, 3, 5 10, 20 a 40 %. Místo výsledku 2 %, pro který nebyla odhadová tabule, laboratoře v mnoha případech určily výsledek jako 3 %.

Tabulka 2. Průměrný roční počet vzorků a relativní četnost (v %) pro výsledky abiosestonu z veřejných vodovodů v databázi IS PiVo od ledna 2012 do začátku prosince 2019
Table 2. Annual average of number of samples and relative frequency (%) for abioseston results in public supply in the IS PiVo database between January 2012 and the beginning of December 2019

Vzorky	Období	Abioseston (%)											Σ
		≤ 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	> 10	
N/rok	před revizí ČSN	12 752	1 370	1 417	96	288	18	30	30	5	50	15	16 070
	po revizi ČSN	14 008	1 212	1 050	37	165	9	12	12	1	22	2	16 529
	po změně limitu	12 461	1 211	841	39	104	0	2	2	1	4	2	14 667
%	před revizí ČSN	79,4	8,52	8,82	0,59	1,79	0,11	0,19	0,19	0,03	0,31	0,09	100
	po revizi ČSN	84,7	7,33	6,35	0,22	1,00	0,06	0,08	0,07	0,01	0,13	0,01	100
	po změně limitu	85,0	8,25	5,74	0,26	0,71	0,00	0,01	0,01	0,00	0,03	0,01	100



Obr. 3. A. Rozdělení výsledků (v procentech) stanovení abiosestonu ve veřejných vodovodech v období mezi lednem 2012 a začátkem prosince 2019 pro tři zkoumaná období; B. Stejný graf jako 3A s jiným měřítkem na ose y obr. 3A, při kterém jsou lépe vidět změny v okolí 5 a 10 % v jednotlivých obdobích

Fig. 3. A. Abioseston results distribution (in %) from public water supply between January 2012 and beginning of December 2019 for three explored periods; B. The same chart as in 3A with a different scale in the y-axis, where changes near 5 and 10% of abiosestone are clearly apparent

Tomu odpovídá i mírně vyšší zastoupení výsledků 3 % ve srovnání s 2 % (obr. 3A, tabulka 2), i když ve skutečnosti nelze takové rozdělení dat u tohoto ukazatele předpokládat. Zvýšení četnosti výsledků je možné pozorovat i pro 5 a 10 %. V případě 5 a 10 % se však projevuje i další efekt, kterým je obecná tendence preferovat „(půl)kulatá“ čísla. Proto zřejmě výsledek 4 % je mnohem méně častý než 5 % (i když z rozdělení dat je evidentní, že by to tak být ve skutečnosti nemělo) nejen v období před revizí normy, ale i po ní, a to přesto, že nové tabule jsou připraveny v intervalu od 1 do 12 % pro každé celé procento.

Vliv snížení limitu v dubnu 2018 na výsledky abiosestonu v rutinních rozbořech pitné vody, jenž byl testován jako rozdíl období po revizi ČSN 75 7713 do novelizace vyhlášky č. 252/2004 Sb. v dubnu 2018 a období od novelizace po začátek prosince 2019, při použití Kruskalova-Wallisova testu s následným mnohonásobným porovnáváním, nebyl prokázán. Při srovnání zastoupení výsledků vyšších než 5 % pomocí Fisherova exaktního testu s následným mnohonásobným porovnáním s Bonferroniho korekcí však statisticky významný rozdíl mezi všemi porovnávanými obdobími zjištěn byl ($p < 0,001$). Tento rozdíl je dobře patrný na obr. 3 a v tabulce 2. V intervalu 6 až 10 % bylo před novelizací necelých 0,4 %, po novelizaci jen necelých 0,1 % všech hodnot. V absolutních číslech se jedná o několik desítek výsledků ročně, které před novelizací splňovaly limit a po ní by už byly nad ním.

Vliv snížení limitu v dubnu 2018 na výsledky abiosestonu v rutinních rozbořech pitné vody, jenž byl testován jako rozdíl období po revizi ČSN 75 7713 do novelizace vyhlášky č. 252/2004 Sb. v dubnu 2018 a období od novelizace po začátek prosince 2019, při použití Kruskalova-Wallisova testu s následným mnohonásobným porovnáváním, nebyl prokázán. Při srovnání zastoupení výsledků vyšších než 5 % pomocí Fisherova exaktního testu s následným mnohonásobným porovnáním s Bonferroniho korekcí však statisticky významný rozdíl mezi všemi porovnávanými obdobími zjištěn byl ($p < 0,001$). Tento rozdíl je dobře patrný na obr. 3 a v tabulce 2. V intervalu 6 až 10 % bylo před novelizací necelých 0,4 %, po novelizaci jen necelých 0,1 % všech hodnot. V absolutních číslech se jedná o několik desítek výsledků ročně, které před novelizací splňovaly limit a po ní by už byly nad ním.

Jejich absenci v období po novelizaci lze vykládat různě – zlepšením stavu vody (nápravná opatření provedená při nevyhovujícím výsledku), selekcí reportovaných výsledků (z většího množství výsledků jsou do IS PiVo poslány jen ty lepší) či již na úrovni analytika, který (ať už vědomě či podvědomě) se rozhodne pro limit nepřekračující výsledek.

Při interpretaci výsledků je třeba mít na paměti rovněž to, že obě změny v dokumentech (tedy revize ČSN 75 7713 v roce 2015 a novelizace vyhlášky č. 252/2004 Sb. z roku 2018) mají sice jasně určené datum účinnosti, ale že ve skutečnosti se nejednalo o ostrý předěl ze dne na den. O tom, že jsou staré odhadové tabule špatné a že se připravují nové, řada laboratoří věděla předem (přinejmenším tam, kde se jejich pracovníci účastnili pokusů s novými tabulemi v rámci kurzů [7, 8]), takže jejich výsledky už mohly být ovlivněny před datem účinnosti. Navíc i k původním tabulím mohly laboratoře přistupovat s vědomím, že výsledky získané s jejich pomocí jsou obvykle nadhodnocené. Na nic takového však data z IS PiVo neukazují. Při srovnání dat z roku 2015 s předcházejícími lety není patrný žádný rozdíl. V úvahu připadá i opačný efekt, tedy že ihned s nástupem účinnosti revidované normy (tedy po 1. 12. 2015) nezačaly všechny laboratoře pracovat s novými tabulemi. Při srovnání výsledků z let 2016 a 2017 však nebyl patrný žádný rozdíl.

Samozřejmě není ani možné předem vyloučit možnost, že zjištěné změny ve výsledcích abiosestonu byly způsobeny nějakým jiným faktorem než změnou metodické normy (např. klesajícím počtem nerozpuštěných částic ve veřejných vodovodech). Provedli jsme proto i srovnání s daty pro zákal (ukazuje také na množství ve vodě přítomných částic) za stejné období. Žádné rozdíly jako u výsledků abiosestonu však patrné nebyly.

ZÁVĚR

Výsledky PZZ, které každoročně pořádá SZÚ, i výsledky z rutinních rozborů z veřejných vodovodů ukazují na to, že se použití revidované metodické normy ČSN 75 7713 z konce roku 2015 v praxi zřetelně projevilo. Ubyla značná část vysokých hodnot, což byly pravděpodobně většinou výrazně nadhodnocené výsledky, za které mohly především špatné odhadové tabule v původní normě. Celkově se přesunulo zhruba 5 % výsledků z vyšších hodnot do kategorie ≤ 1 %. Snížení limitní hodnoty z 10 % na 5 % lze ve výsledcích rutinních rozborů z veřejných vodovodů také pozorovat. Do budoucna by bylo vhodné uvažovat o dalším snížení limitu ve vyhlášce č. 252/2004 Sb., protože i stávajících 5 % je poměrně vysoká hodnota (vzhledem k limitu pro zákal). V této souvislosti je vhodné připomenout, že původní návrh před zařazením abiosestonu do legislativy (ČSN 75 7111) [1] byl 3 %. Zvýšen na 10 % byl až v rámci připomínkových řízení především z metodických důvodů [11].

Poděkování

Vznik příspěvku byl podpořen v rámci MZ ČR – RVO (Státní zdravotní ústav – SZÚ, IČ 75010330). Danielovi Weyessovi Garimu děkuji za přípravu dat z IS PiVo. Marku Malému děkuji za provedení statistické analýzy a upřesnění některých formulací.

Literatura

- [1] ČSN 75 7111 Pitná voda. Účinnost od 1. 1. 1991, 24 str.
- [2] PUMANN, P. Biologické ukazatele v novelách vyhlášek Ministerstva zdravotnictví pro pitnou vodu a koupaliště. *Sborník ze semináře Aktuální otázky vodárenské biologie*: 16–23, 2003.
- [3] ČSN 75 7713 Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení abiosestonu. červenec 1998. 16 str.
- [4] PUMANN, P. a POUZAROVÁ, T. Kvantitativní stanovení abiosestonu. *Sborník konference Vodárenská biologie 2007*, s. 19–24.

[5] FREMROVÁ, L. *Prověření norem ČSN a TNV z oboru jakosti vody – biologické metody*. HYDROPROJEKT CZ, a. s., 2010.

[6] ČSN 75 7713 Kvalita vod – Biologický rozbor – Stanovení abiosestonu. listopad 2015. 32 str.

[7] PUMANN, P. Některé aspekty stanovení abiosestonu odhadem pokryvnosti zorného pole. *Sborník konference Vodárenská biologie 2014*, s. 15–20.

[8] PUMANN, P., ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. a FREMROVÁ, L. Revidovaná norma ČSN 75 7713 Kvalita vod – Biologický rozbor – Stanovení abiosestonu. *Sborník konference Vodárenská biologie 2016*, s. 11–17.

[9] PUMANN, P. Další vývoj mikroskopických ukazatelů v pitné vodě s ohledem na zavádění posouzení rizik. *Sborník z konference Vodárenská biologie 2017*, 1.–2. 2017, Praha, 2017, s. 15–19.

[10] Závěrečná zpráva z PT#V/6/2007 Stanovení mikroskopického obrazu v pitné vodě, Praha, červen 2007. Dostupné na http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/pt/pt6_2007z.pdf

[11] POPOVSKÝ, J. Diskusní příspěvek. Aktuální otázky vodárenské biologie, 1986, s. 155–158.

Autor

Mgr. Petr Pumann

✉ petr.pumann@szu.cz

ORCID: 0000-0002-8199-1883

Státní zdravotní ústav

Příspěvek prošel lektorským řízením.

DOI: 10.46555/VTEI.2020.12.006

INFLUENCE OF THE REVISION OF ČSN 75 7713 (2015) ON THE RESULTS OF ABIOSESTON DETERMINATION

PUMANN, P.

National Institute of Public Health

Keywords: abioseston – drinking water – Czech Republic – ČSN 75 7713 – Decree No. 252/2004 Coll.

It is shown in the article, how the revision of the Czech methodical standard for abioseston analysis in water ČSN 75 7713 from December 2015 and the lowering of the limit value for abioseston in the Decree No. 252/2004 Coll. (drinking water quality) from 10 to 5% influenced results of routine laboratories. The results of three rounds (from five) of the proficiency testing programmes organised annually between 2011 and 2020 by the National Institute of Public Health before the revision of ČSN 75 7713 were overestimated substantially in comparison with the abioseston results obtained by image analysis. There were not such overestimations within the rounds after the standard revision. The results of routine drinking water monitoring (stored in the IS PiVo database) from the period 2012–2019, when the original methodical standard was valid, were significantly higher than the results after revision. The statistically significant decrease of results higher than 5% in the period after the Decree No. 252/2004 Coll. amendment (0.07% of results higher than 5%) comparing the periods before the amendment, i.e., after the revision of the methodical standard (0.35%) and before this revision (0.92%).

Využití metod dálkového průzkumu Země pro monitoring stavu koupacích míst

VÁCLAVA MAŤAŠOVSKÁ, FILIP KOTHAN, ONDŘEJ LEDVINKA, PETR PUMANN,
TOMÁŠ FOJTÍK, MARCELA MAKOVCOVÁ, LENKA BENDAKOVSKÁ

Klíčová slova: dálkový průzkum — monitoring stavu koupacích vod — spektrální indexy — regrese

SOUHRN

Ministerstvo zdravotnictví ve spolupráci s dalšími dotčenými orgány sestavuje každoročně Seznam přírodních koupališť na povrchových vodách, ve kterých nabízí službu koupání provozovatel, a dalších povrchových vod ke koupání. Ten je sestavován na základě dlouhodobého monitoringu prováděného krajskými hygienickými stanicemi, a to výhradně *in situ* na bázi kalendářních let. Vzhledem k tomu, že je tento způsob monitoringu nejen časově, ale i finančně náročný, vzniká tedy přirozeně potřeba tyto nároky minimalizovat.

V současnosti probíhající projekt *Využití metod dálkového průzkumu Země pro monitorování stavu a kvality koupacích míst v České republice* nabízí možnost některé ukazatele potřebné pro tato hodnocení monitorovat distančně. Jeho cílem je za pomoci moderních statistických technik v kombinaci s využitím GIS nástrojů nalézt a popsat vzájemný vztah mezi daty získanými při terénních šetřeních a satelitními daty. Prostřednictvím svých výstupů tak může nabídnout krajským hygienickým stanicím nástroj nejen pro stanovení běžně hodnocených ukazatelů, ale i pro identifikaci možných nových koupacích míst. Díky vytvořeným časovým řadám může zároveň sloužit jako podklad pro hodnocení koupací sezony.

V předloženém příspěvku jsou prezentovány zejména postupy použité pro dosažení stanovených cílů. Na čtrnácti modelových lokalitách proběhly dvě etapy terénních šetření s navazujícími laboratorními pracemi. Zároveň byly hledány optimální způsoby zpracování satelitních dat vysokého prostorového rozlišení (Sentinel-2). Po základním zpracování multispektrálního obrazu bylo otestováno 105 spektrálních indexů, přičemž byl potvrzen počáteční předpoklad silné korelace některých indexů s hodnotami naměřených ukazatelů. Pro predikci hodnot sledovaných ukazatelů byly využity dvě modelovací techniky, a to *Random Forests* a *Partial Least Squares regression*, kterým byla satelitní data předkládána jako vysvětlující proměnné.

ÚVOD

Koupací vody

Za koupací vody lze považovat veškeré vody, které jsou využívány ke koupání větším počtem obyvatel. Lze je podrobněji rozčlenit na přírodní a umělá koupaliště. Pro potřeby řešeného projektu jsou v úvahu brána pouze koupaliště přírodní. Těmi se podle § 6 odst. 1 zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví, rozumí *stavba povolená k účelu koupání nebo nádrží ke koupání, v nichž je voda ke koupání obměňována řízeným přítokem a odtokem pitné vody nebo trvalým*

přítokem a odtokem chemicky neupravené podzemní nebo povrchové vody, nebo stavba povolená k účelu koupání vybavená systémem přírodního způsobu čištění vody ke koupání, nebo povrchová voda, ve které nabízí službu koupání provozovatel.

Problematika koupacích vod je legislativně ukotvena zejména ve výše uvedeném zákoně, který reflektuje nařízení a požadavky směrnice Evropského parlamentu a Rady 2006/7/ES ze dne 15. února 2006, o řízení jakosti vod ke koupání. Jsou zde mj. upravena práva a povinnosti fyzických a právnických osob v oblasti ochrany a podpory veřejného zdraví. Dále je zde definována soustava orgánů ochrany veřejného zdraví, včetně jejich pravomocí a působnosti [1, 2]. Dalším významným předpisem je vyhláška č. 238/2011 Sb., o stanovení hygienických požadavků na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch. Ta stanovuje základní pravidla pro monitoring a posouzení jakosti vody v přírodních koupalištích a její klasifikaci, rovněž určuje rozsah informování veřejnosti o jakosti povrchových vod ke koupání.

Pokud zvláštní prováděcí předpis nestanoví jinak, je při odběru vzorků pro zjišťování hodnot ukazatelů jakosti vody (*tabulka 1*) postupováno podle následujících technických norem:

- ČSN EN ISO 5667-1 (75 7051) Jakost vod – Odběr vzorků, část 1: Návod a návrh programu odběru vzorků a pro způsoby odběru vzorků,
- ČSN ISO 5667-4,6 (75 7051) Jakost vod – Odběr vzorků, část 4: Pokyny pro odběr vzorků z vodních nádrží,
- ČSN ISO 5667-4,6 (75 7051) Jakost vod – Odběr vzorků, část 6: Návod pro odběr vzorků z řek a potoků,
- ČSN EN ISO 19458 (75 7801) Jakost vod – Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu,
- ČSN 75 7717 Jakost vod – Stanovení planktonních sinic [3, 4].

Četnost odběrů vzorků a jejich rozložení po dobu koupací sezony, včetně míst odběrů v případě dalších povrchových vod ke koupání, je dána monitorovacím kalendářem. Ten je vydáván pravidelně před zahájením koupací sezony 1. května krajskou hygienickou stanicí (KHS) jako opatření obecné povahy. Koupací sezona je pak zpravidla vymezena obdobím od 30. května do 1. září, nebo obdobím, během něhož lze očekávat velký počet koupajících se osob [1].

Vyhláška rovněž stanovuje pravidla pro posuzování a postupy při klasifikaci jakosti koupacích vod [3, 4]. Přírodní koupaliště a povrchové vody využívané ke koupání, u nichž je základním předpokladem splnění hygienických limitů, jsou zařazeny do Seznamu přírodních koupališť na povrchových vodách, ve kterých nabízí službu koupání provozovatel, a dalších povrchových vod ke koupání (dále jen seznam). Ten je každoročně sestavován do 31. března a po dobu 10 kalendářních dnů zpřístupněn na úředních deskách Ministerstva zdravotnictví (MZd) a KHS, včetně jejich územních pracovišť, veřejnosti k připomínkám. Po vyhodnocení všech uplatněných připomínek je upravený seznam ještě před

Tabulka 1. Sledované ukazatele pro hodnocení jakosti koupacích vod
Table 1. Monitored indicators for the assessment of bathing waters quality

Mikrobiologické ukazatele	příloha vyhlášky č. 1, sloupec A	intestinální enterokoky [KTJ/100 ml]
		<i>Escherichia coli</i> [KTJ/100 ml]
		průhlednost [m]
		vodní květ [stupeň]
Sledování výskytu sinic	příloha vyhlášky č. 4, tab. č. 1 a 2	sinice – buněčný objem [buňky/ml], [mm ³ /l]
		chlorofyl-a [µg/l]
		vodní květ [stupeň]
		mikroskopický obraz (slovní popis)
Vizuální kontrola	příloha vyhlášky č. 5	znečištění odpady [stupeň]
		přírodní znečištění [stupeň]

zahájením koupací sezony znovu uveřejněn na úředních deskách a na portálu veřejné správy [5]. Zároveň je seznam s uvedením důvodů jeho změn oproti předchozímu roku, pokud k nim došlo, předložen Ministerstvem životního prostředí (MŽP) Evropské komisi. Do 31. prosince kalendářního roku po uplynutí koupací sezony MŽP ve spolupráci s MZd zpracuje a předloží zprávu o výsledcích monitorování a posouzení jakosti povrchových vod uvedených v seznamu s popisem významných opatření, která byla přijata příslušnými orgány k řízení jakosti vody ke koupání [1, 2].

Dálkový průzkum Země

Dálkový průzkum Země (DPZ) je relativně moderní metoda získávání informací o objektech a jevech na zemském povrchu, přičemž musí být splněna základní podmínka, a to že přenos informací je zajištěn pomocí elektromagnetického záření. To je členěno podle vlnové délky do tzv. elektromagnetického spektra, které je spojitě a velmi rozsáhlé, avšak pro potřeby DPZ je využita pouze jeho část (pásma viditelného záření, infračerveného záření a pásma mikrovlonná). Za základní členění metod DPZ by se dalo považovat rozdělení na konvenční a nekonvenční. Zatímco v případě konvenčních metod jsou pořizovány a zpracovávány fotografické snímky zachycené centrální projekcí na fotografický materiál, nekonvenční metody využívají registrace elektromagnetického záření pomocí snímačů. Pro účely tohoto výzkumu byly využívány výhradně produkty metod nekonvenčních, a to snímání zemského povrchu pomocí družicových systémů.

Existuje několik důvodů, proč metody DPZ využít, ať už v přírodovědných, či technických oborech. První nespornou výhodou je aktuálnost získaných informací, která výrazně předčí informace pořízené metodami klasického pozemního šetření. S tím je úzce spjata další vysoce ceněná vlastnost, opakovatelnost pořízení dat. To se týká především družicových systémů, které mají pevně stanovenou dráhu oběhu. Díky tomu je umožněno zachycení časové dynamiky sledovaných jevů. Nelze opomenout ani rozsah zachyceného území v jednom okamžiku (řádově několik desítek až stovek km²). Po provedení geometrických a radiometrických korekcí, jejichž účelem je odstranění zkreslení dat, je zpravidla získán geometricky přesný a standardizovaný obraz. Ten umožňuje nejen zjištění přesné polohy objektu zájmu, ale i stanovení a porovnání získaných hodnot registrovaného elektromagnetického záření [6]. Relativně novou výzvou pro oblast DPZ jsou volně dostupné produkty Evropské kosmické agentury (ESA). Ta v současné době zajišťuje provoz šesti typů družicových systémů (mise

Sentinel-6 zahájena 21. listopadu 2020) se zaměřením na různé složky životního prostředí, díky kterým jsou naplňovány cíle programu Copernicus. Jeho hlavním cílem je poskytovat informační služby založené na DPZ, a umožnit tak sledování nejrůznějších komponent životního prostředí. Pro účely projektu byla využita data družicového systému Sentinel-2. Hlavním úkolem této mise je především monitoring stavu lesů a zemědělství, avšak díky parametrům výsledných dat (prostorové rozlišení, rozsah snímaného elektromagnetického spektra a perioda snímání) jsou současně snímky družic Sentinel-2 vysoce atraktivní i pro jiná odvětví monitoringu životního prostředí [7].

Výzkumný projekt Zéta II TJ02000091 – *Využití metod dálkového průzkumu Země pro monitoring stavu a kvality koupacích míst v České republice* je zaměřen na nalezení optimálních metod pro hodnocení ukazatelů sledovaných na koupacích vodách s využitím satelitních dat. Cílem řešeného projektu je pomocí kombinace těchto dat s daty z pozemního šetření identifikovat rozsah a intenzitu znečištění vodních ploch (především zelenou organickou složkou) využívaných pro koupání (např. chlorofyl-a, množství sinic a řas nebo zákal). Základní motivací pro využití informací získaných metodami DPZ pro řešení projektu je skutečnost, že již v minulosti byla prokázána závislost mezi projevy odrazivosti a množstvím pevných částic ve vodním prostředí. V případě fytoplanktonu (mikroskopické sinice a řasy volně se vznášející ve vodě) byly popsány změny v projevech odrazivosti při využití vlnových délek 0,5–0,75 µm, tedy v červeném a infračerveném pásmu elektromagnetického spektra [8, 9]. Hlavním očekávaným výsledným produktem je nástroj ve formě webové mapové aplikace pro zvýšení efektivity zejména KHS při činnostech souvisejících s monitoringem stavu koupacích vod a hodnocením uplynulé koupací sezony. Přidanou hodnotou by pak měla být možnost získání některých parametrů jakosti koupacích vod bez nutnosti přímého kontaktu s nimi, a to i na lokalitách, které nepodléhají současnému monitoringu, a ucelený přehled o heterogenitě vodních ploch a jejím vývoji v čase.

METODIKA ŘEŠENÍ

Terénní šetření

První etapa terénního šetření proběhla v období měsíců června až října 2019, kdy byl pracovníky Státního zdravotního ústavu (SZÚ) prováděn pravidelný odběr vzorků vody na čtrnácti modelových lokalitách v Praze, Středočeském,

Pardubickém a Královohradeckém kraji (*tabulka 2*). Při výběru modelových lokalit bylo dbáno na rozmanitost vodních ploch z hlediska jejich velikosti, charakteru a oživení fytoplanktonem – v tomto případě byla brána v úvahu nejen kvantita fytoplanktonu, ale i jeho předpokládané složení. Předběžný časový harmonogram terénních šetření byl vytvořen tak, aby korespondoval s dobou přeletu družice. Letový plán družic Sentinel-2 je dostupný online [10] od listopadu 2015 ve formátu KML.

Pro každou modelovou lokalitu bylo zvoleno jedno hlavní odběrové místo (H). U oficiálně sledovaných vod bylo většinou totožné s monitorovaným místem odběru provozovatele či KHS. Na hlavním odběrovém místě byly z horizontu 0–30 cm (standardní odběr pro koupací vody) Andělovou tyčí odebírány vzorky pro stanovení chlorofylu-a, zákalu, fluorimetrické stanovení fytoplanktonu a mikroskopický rozbor. V souladu s postupem ČSN 75 7717 byl vytvořen směsný vzorek z několika dílčích vzorků (zpravidla z pěti) z okruhu několika metrů, kde hloubka dosahovala minimálně 1 m. Pro utvoření představy o přítomnosti a složení větších zástupců fytoplanktonu (především sinic) byl odebírán vzorek s použitím planktonní sítě s oky o průměru 20 µm. Odběry vzorků z horizontu 0–10 cm (těsně pod hladinou) byly využity pro fluorimetrické stanovení fytoplanktonu a zákalu. Současně byla stanovena průhlednost vody, přítomnost vodního květu a další přímo pozorovatelné ukazatele kvality koupacích vod a změřena teplota v obou horizontech odběru. Kromě odběrových míst (H) byl vytipován i různý počet vedlejších odběrových míst (O) – většinou 2–4 podle plochy modelové lokality. Na těch byly vzorky odebírány pouze z horizontu těsně pod hladinou. Odběry byly prováděny vstupem do vody, z mola, v některých případech z lodi.

Laboratorní práce

Fluorescenční analýzy, filtrace a extrakce vzorků pro stanovení chlorofylu-a byly vždy prováděny po návratu do laboratoře v den odběru. Ukazatele spjaté se sinicemi a řasami byly mikroskopicky stanoveny metodou podle ČSN 75 7717 a podle ČSN 75 7712. Vzorky pro kvantifikaci byly konzervovány v Lugolově roztoku. Chlorofyl-a byl stanoven pomocí standardní metody ČSN ISO 10260. Fluorescence fytoplanktonu byla měřena fluorometrem AquaPen AP100, který měří odezvu vzorků excitovaných při dvou vlnových délkách (450 a 620 nm). Pro odebrané vzorky byla stanovena hodnota okamžité fluorescence chlorofylu (Ft) po excitaci při obou vlnových délkách a OJIP křivky (450 a 620 nm), ze kterých, kromě množství fytoplanktonu, lze získat informace i o jeho fyziologickém stavu. Pro stanovení zákalu byl využíván turbidimetr HACH 2100P [4].

Zpracování multispektrálního obrazu

Zpracovávaná data pocházela z mise Sentinel-2, která byla zahájena 23. června 2015 vypuštěním družice Sentinel-2A do oběhu. Je vybavena senzorem MultiSpectral Imager, který snímá data ve 13 pásmech ve vysokém prostorovém rozlišení (10–60 m). Za nejdůležitější je považováno pásmo viditelné (B2, B3, B4) a infračervené části (B5, B6, B7, B8 a B8a) elektromagnetického spektra. Ostatní pásma jsou určena především pro radiometrické korekce obrazu. Doba oběhu této družice je 10 dní, ve spolupráci se sesterskou družicí Sentinel-2B (vypuštěna do oběhu 7. března 2017) se však perioda snímání stejné lokality snižuje na polovinu, v případě rovníkových oblastí dokonce až na tři dny. V rámci jedné pořízené scény je zachyceno 290 × 290 km zemského povrchu [11].

Pro základní předzpracování obrazu bylo testováno několik softwarových prostředí. Prvním byl SNAP – ver. 6.0 vyvíjený společností Brockmann Consult, Array Systems Computing and C-S pro účely programu Copernicus.

Tabulka 2. Modelové lokality 2019
Table 2. Model sites 2019

Název lokality	Typ lokality	Výměra vodní plochy [km ²]	Uvedeno v seznamu [5]	Složení fytoplanktonu
Očko	písník	0,11	ne	tenké vláknité sinice, anorganický zákal
Ovčáry	písník	0,17	ne	koncem sezony vláknité i kokální sinice, vodní květ
Proboštská jezera	písník	0,27	ano	obrněnky rodu <i>Ceratium</i>
Opatovický písník	písník	0,31	ano	velmi nízké oživení fytoplanktonem
Mělice	písník	0,43	ano	fekální kontaminace, nízké oživení fytoplanktonem
Mělice (malý písník)	písník		ne	velmi nízké oživení fytoplanktonem
Eliška	nádrž	0,02	ne	střední oživení fytoplanktonem (spíše řasy)
Marvánek	nádrž	0,02	ne	sinicové vodní květy <i>Microcystis</i> , <i>Aphanizomenon</i>
Vyžlovka	nádrž	0,20	ano	koncem sezony vláknité sinice (<i>Planktothrix</i>)
Hostivař	nádrž	0,35	ano	vláknité sinice (<i>Planktothrix</i> a další)
Seč	nádrž	1,62	ano	sinice (vodní květy), fekální kontaminace
Rozkoš (horní)	nádrž	8,95	do 2018	silné vodní květy sinic (<i>Microcystis</i>)
Rozkoš (dolní)	nádrž		ano	střední oživení fytoplanktonem (sinice i řasy)
Labe (Stará Boleslav)	řeka		ne	silné oživení fytoplanktonem (řasy), anorganický zákal

Tento software je distribuován pod licencí GPL (General Public Licence), je tedy volně k dispozici. Jeho nevýhodou však je, že se stále vyvíjí, jeho moduly jsou vyvíjeny samostatně a velmi často se vyskytují problémy s aplikací v různých operačních systémech [12]. Dále byly jednotlivé kroky předzpracování testovány a prováděny v komerčním softwaru Geomatica (PCI). Prvním krokem bylo převzorkování jednotlivých pásem na stejné prostorové rozlišení 10 m. Tento krok byl nezbytný pro další předzpracování obrazu. Následně byly provedeny pro jednotlivé scény atmosférické korekce. Jedná se o nejkomplicovanější formy opravy obrazu. Vlivem rozptylu, pohlcování a také emisivity atmosféry dochází k modifikaci hodnot pixelu. Všeobecně je pro úpravu hodnot pixelů využíváno přírodního modelu a jeho aproximací, s cílem zajistit, aby tyto hodnoty co nejvíce odpovídaly skutečným odrazovým nebo zářivým vlastnostem sledovaného objektu. Zároveň zde byly vygenerovány tzv. masky mraků, tedy pixely oblačnosti, které byly z dalších analýz vyloučeny.

Vzhledem k tomu, že bylo získáno velké množství dat, vznikla potřeba (z důvodů časové a výpočetní náročnosti) velikost získaných dat a čas nutný k jejich zpracování snížit. Prvním krokem bylo tzv. mozaikování dlaždic. Jedná se o proces, při kterém v případě, kdy sledované území je pokryto více snímky, je dosaženo bezešvé a barevně vyrovnané mozaiky (nebudou zde patrné přechody mezi jednotlivými snímky). Kvalita výsledné mozaiky závisí především na geometrické přesnosti snímků, velikosti jejich překryvů a rozdílech ve způsobu jejich pořízení. K mozaikování byl využit modul softwaru Geomatica, Mosaic Tool, ve kterém bylo na základě uživatelských recenzí využito manuální metody [13]. Díky tomuto procesu byl následně snížen počet opakování u dalších kroků digitálního zpracování snímku. Ke snížení celkového objemu dat bylo nutné vybrat z mozaiky pouze vodní plochy. Ty byly získány výběrem prvků z vrstvy vodních ploch ZABAGED*. Takto získané datové sady očištěné o „nepotřebná data“ vstupovaly do dalších analýz.

Je patrné, že zdrojová satelitní data a manipulace s nimi představují poměrně velkou zátěž pro paměť pracovní stanice a vysoké časové nároky na získání a zpracování obrazových dat. Poměrně zajímavou možností automatizace nabízí R balíček „sen2r“. Při využití některých jeho funkcí lze podle zadání požadovaných parametrů získat více snímků najednou, provést na nich atmosférickou korekci (za využití nástroje Sen2Cor), vytvořit jejich mozaiky (po dnech snímání), maskování oblačnosti, ořez na požadované vodní plochy a výpočet spektrálních indexů v uživatelsky přívětivém prostředí [14].

TVORBA MODELŮ

Vlastní modelování hodnot ukazatelů jakosti vody prostřednictvím satelitních dat proběhlo pomocí dvou modelovacích technik v prostředí statistického softwaru R [15], který je rovněž distribuován pod licencí GPL.

Random Forests (RF) je jednou z technik využívajících např. klasifikačních a regresních stromů (CART). Jedná se o ansámblovou metodu učení pro klasifikaci, predikci, měření významnosti proměnných, měření efektu proměnných na predikci, shlukování a detekci odlehých hodnot. Spočívá především v konstrukci velkého počtu rozhodovacích stromů, přičemž výsledná regresní funkce je vážený průměr regresních funkcí všech stromů. Při konstrukci RF jsou využívány binární stromy, při jejichž tvorbě se vstupní data dělí na testovací a trénovací soubor. Souborem vstupních dat, se kterým se zde pracuje, je myšlen ansámbl bootstrapových výběrů. Jedná se tedy o náhodné výběry s opakováním vzniklé z původního vzorku pozorovaných dat. Tím lze zajistit, že i velmi malé soubory dat mohou být rozděleny na velký počet testovacích a trénovacích souborů. Trénovací soubory jsou použity pro konstrukci stromů.

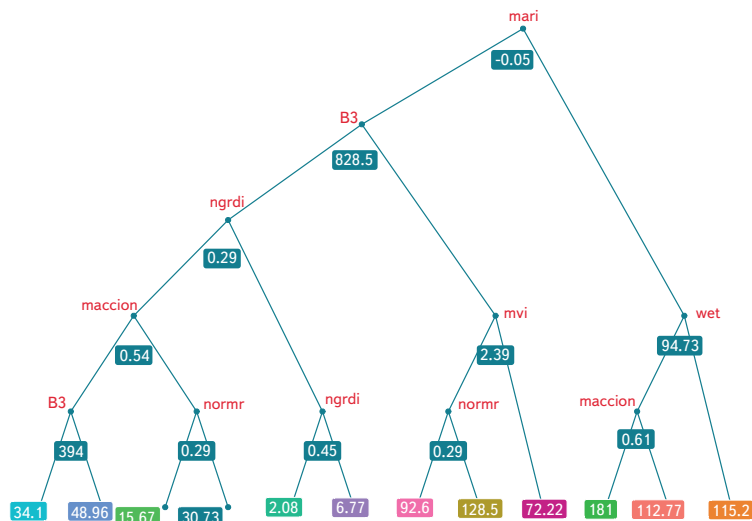
Tabulka 3. Ukazatele sledované v terénu
Table 3. Indicators monitored in terrain

Zkratka ukazatele	Slovní popis	Jednotka
ALG.30	řasy pro standardní odběr pro koupací vody (0–30 cm)	jedinci/ml
CHA.30	chlorofyl-a pro standardní odběr pro koupací vody (0–30 cm)	µg/l
CYANBACCELL.30	sinice (buňky) pro standardní odběr pro koupací vody (0–30 cm)	buňky/ml
CYANBACVOL.30	sinice (objem) pro standardní odběr pro koupací vody (0–30 cm)	mm ³ /l
FEOPIG.30	feopigmenty (buňky) pro standardní odběr pro koupací vody (0–30 cm)	µg/l
OJIP450.10	fluorescence (křivka OJIP ve vlnové délce 450 nm) pro odběr těsně pod hladinou (0–10 cm)	bezrozměrné
OJIP450.30	fluorescence (křivka OJIP ve vlnové délce 450 nm) pro standardní odběr pro koupací vody (0–30 cm)	bezrozměrné
OJIP620.10	fluorescence (křivka OJIP ve vlnové délce 620 nm) pro odběr těsně pod hladinou (0–10 cm)	bezrozměrné
OJIP620.30	fluorescence (křivka OJIP ve vlnové délce 620 nm) pro standardní odběr pro koupací vody (0–30 cm)	bezrozměrné
OJIPSUM.10	fluorescence (součet křivek OJIP ve vlnových délkách 450 nm a 620 nm) pro odběr těsně pod hladinou (0–10 cm)	bezrozměrné
OJIPSUM.30	fluorescence (součet křivek OJIP ve vlnových délkách 450 nm a 620 nm) pro standardní odběr pro koupací vody (0–30 cm)	bezrozměrné
TEMP.10	teplota pro odběr těsně pod hladinou (0–10 cm)	°C
TEMP.30	teplota pro standardní odběr pro koupací vody (0–30 cm)	°C
TURB.10	zákal pro odběr těsně pod hladinou (0–10 cm)	NTU
TURB.30	zákal pro standardní odběr pro koupací vody (0–30 cm)	NTU

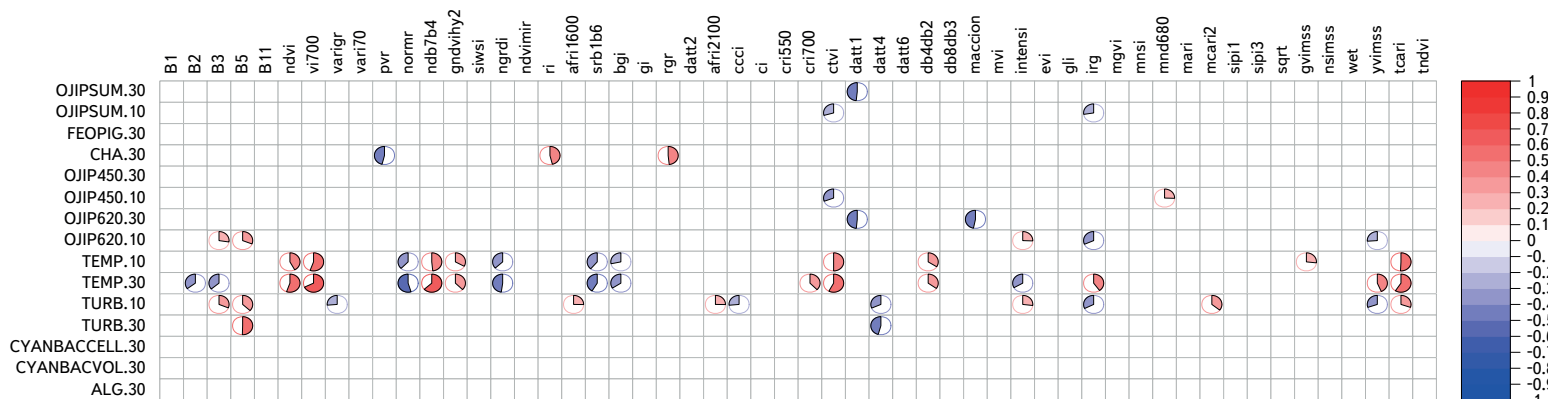
Testovací soubory, tedy pozorování, která se do výběru pro trénování nedostala, jsou využity k odhadu chyby. Základním algoritmem tvorby RF je:

1. vytvoření bootstrapového podsouboru o velikosti N (trénovací soubor),
2. výběr náhodné podmnožiny prediktorů s předem zvoleným počtem těchto prediktorů,
3. vytvoření stromu na bootstrapovém souboru pouze pomocí této podmnožiny prediktorů,
4. zařazení hodnot z testovacího souboru vytvořeným stromem a určení predikce,
5. opakování kroků 1–4 až do vytvoření lesa s požadovaným počtem stromů [16].

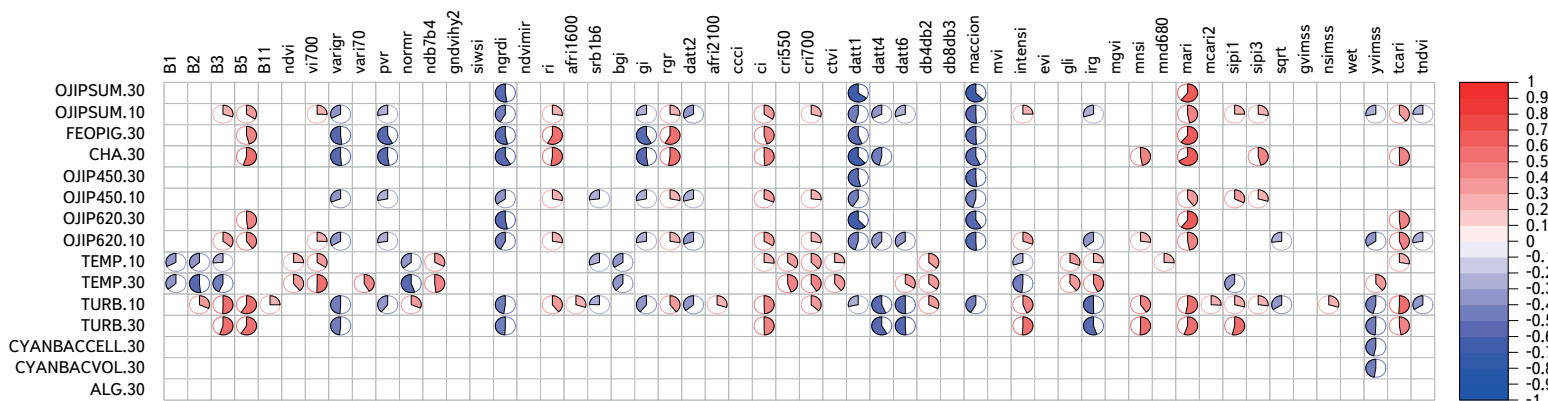
Volba optimálního počtu prediktorů ve druhém kroku algoritmu byla zajištěna postupem implementovaným v R balíčku „CAST“, kde bylo využito funkcí dalších balíčků „caret“ a „randomForest“ [17–22]. Ostatní parametry byly ponechány ve výchozím nastavení. Příklad zkonstruovaného regresního stromu s nejmenším počtem uzlů pro ukazatel CHA.30 je znázorněn na obr. 1.



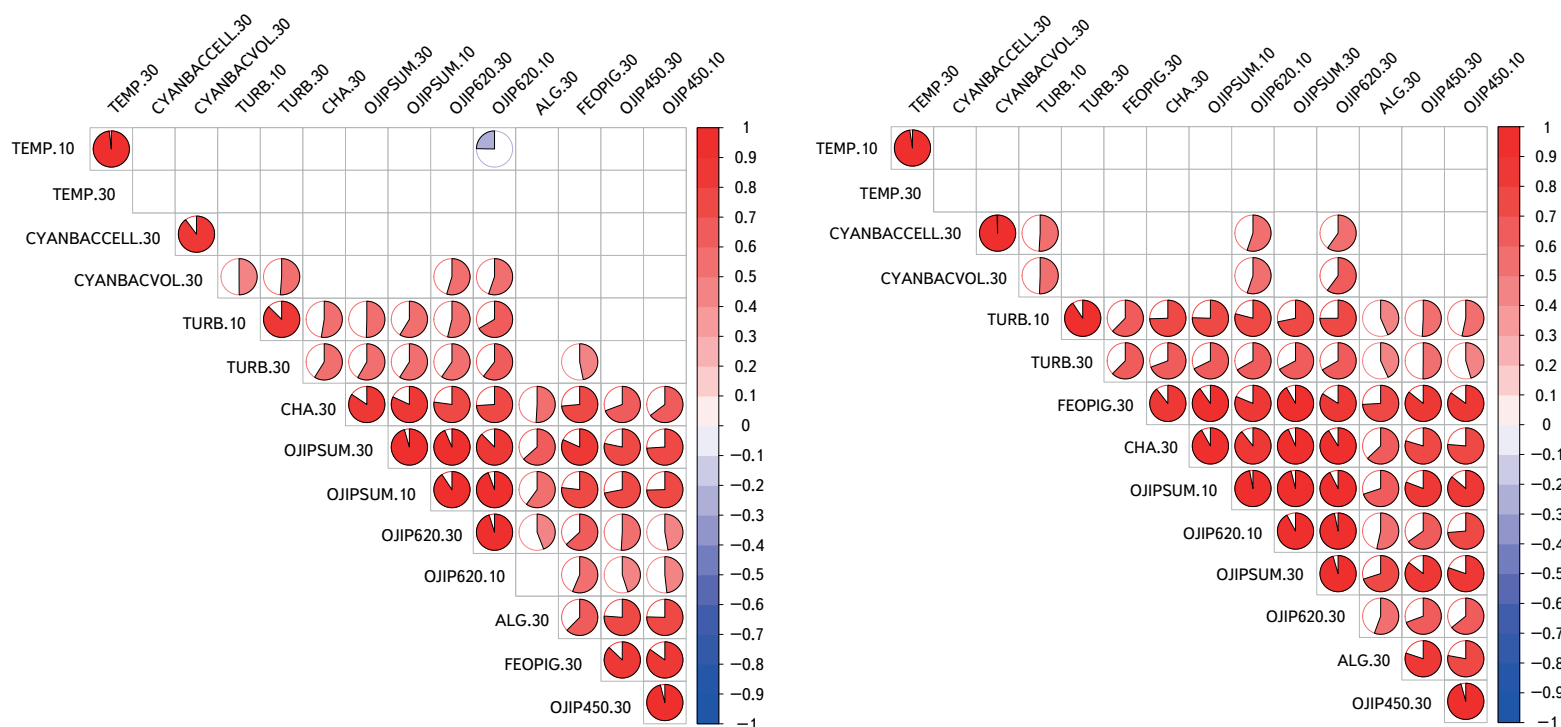
Obr. 1. Příklad regresního stromu s nejmenším počtem uzlů pro ukazatel CHA.30
 Fig. 1. An example of the chlorophyll-a indicator (30 cm depth) regression tree with the smallest number of nodes



Obr. 2. Korelační graf znázorňující vypočítané hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu a jejich statistické významnosti na hladině 0,001 pro měřené ukazatele a prediktory vstupující do jakéhokoliv RF modelu
 Fig. 2. Correlation plot showing computed values of the Pearson correlation coefficient and their statistical significance at the 0.001 level for measured indicators and predictors entering any of the RF models



Obr. 3. Korelační graf znázorňující vypočítané hodnoty Spearmanova korelačního koeficientu a jejich statistické významnosti na hladině 0,001 pro měřené ukazatele a prediktory vstupující do jakéhokoliv RF modelu
 Fig. 3. Correlation plot showing computed values of the Spearman correlation coefficient and their statistical significance at the 0.001 level for measured indicators and predictors entering any of the RF model



Obr. 4. Korelační grafy znázorňující vypočítané hodnoty Pearsonova (vlevo) a Spearmanova (vpravo) korelačního koeficientu a jejich statistické významnosti na hladině 0,001 pro měřené terénní ukazatele samotné

Fig. 4. Correlation plots showing computed values of the Pearson (left) and Spearman (right) correlation coefficients and their statistical significance at the 0.001 level for measured terrain indicators themselves

Partial Least Square regression (PLSR) technika pro vytvoření modelu a následnou predikci je v současné době hojně využívána nejen v přírodních vědách, ale například v ekonomii či marketingu. Původně byla vyvinuta pro účely zpracování chemických dat a poprvé byla popsána statistikem H. Woldem [23]. Svě uplatnění nalézá především při posuzování velkého množství možných korelací a vysvětlujících proměnných. Promítnutím mnoha proměnných do výrazně nižšího počtu ortogonálních latentních proměnných redukuje jejich dimenzi. Jinými slovy, informační obsah prediktorů přenesení do uměle vytvořených vzájemně nekorelovaných proměnných, při zachování maximálního informačního rozsahu. Tyto proměnné jsou následně optimalizovány pro aplikaci vícerozměrné lineární regrese. PLSR se snaží pomocí latentních proměnných v prostoru matice prediktorů popsat směr rozptylu v prostoru matice vysvětlovaných proměnných. Před samotným modelováním je část vstupních dat skryta. Kalibrace tedy probíhá nasazením modelu na data známá, zatímco validace modelu pomocí skryté části dat. Při výpočtech byla využita kombinace R balíčků „caret“ a „pls“ [24]. Pro individuální vysvětlované proměnné byly konstruovány modely s maximálním počtem latentních proměnných získávaných z původních proměnných vysvětlujících (tj. spektrálních indexů či pásem).

Výkonnost finálních modelů byla posouzena běžnými „performance“ statistikami, jako jsou např. koeficient determinace (R^2), symetrická střední absolutní procentní chyba (SMAPE), střední čtvercová chyba (MSE) a odmocninová střední čtvercová chyba (RMSE).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Na čtrnácti modelových lokalitách (51 odběrových míst) bylo v rámci první etapy terénního šetření (v roce 2019) odebráno 218 vzorků koupacích vod. Pro každé odběrové místo byly stanoveny hodnoty 15 ukazatelů (tabulka 3).

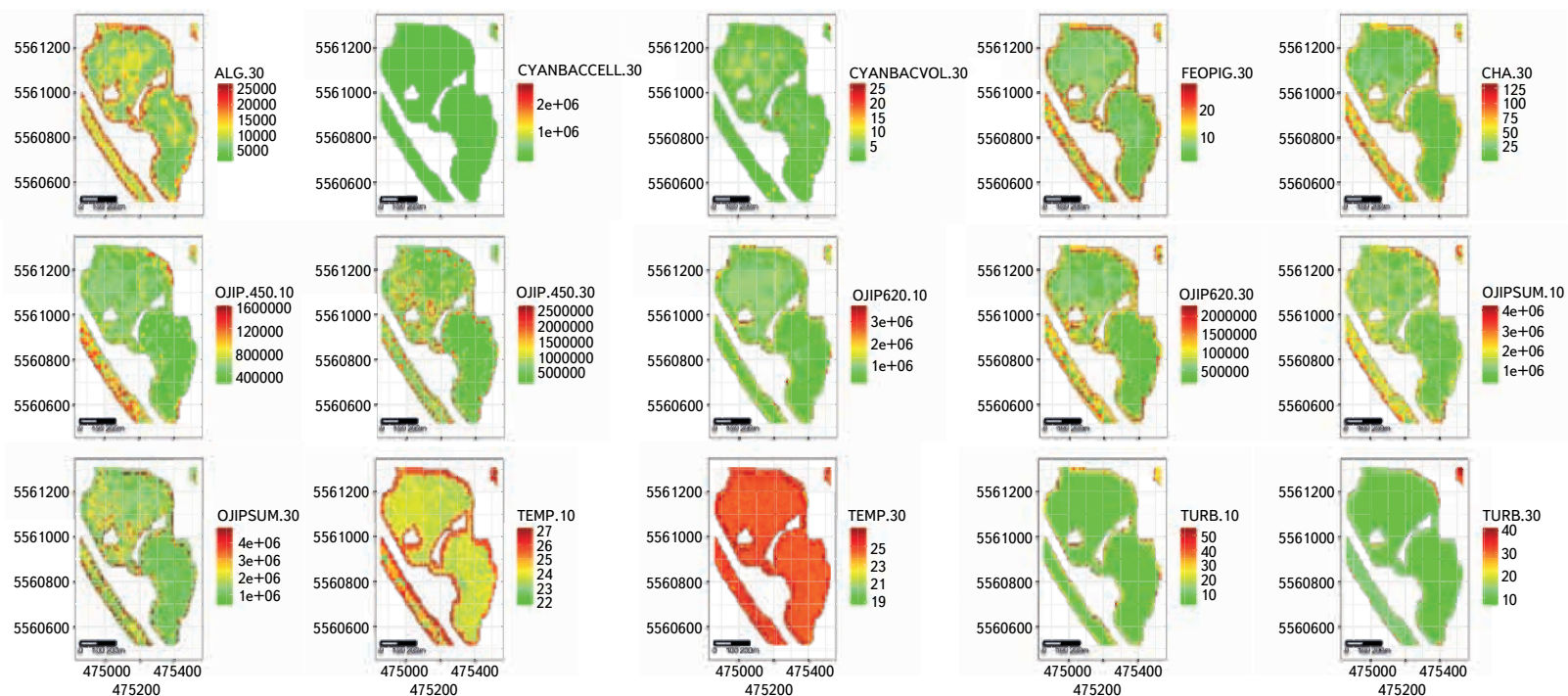
Jedním z významných omezení při využití optických dat DPZ pro monitoring je oblačnost. Je třeba poznamenat, že i když četnost terénních šetření byla výrazně vyšší, nízká kvalita satelitních dat z důvodu nadměrné oblačnosti v několika dnech způsobila, že pro další analýzy bylo relevantních pouze 19 odběrových dní v rámci koupací sezony 2019.

Po skončení první etapy byla terénními pracovníky předána data nejen s hodnotami naměřených ukazatelů, ale i s lokalizací odběrových míst v souřadnicovém systému WGS 84. Tato data byla ještě před vstupem do procesu modelování při standardizaci (např. převod z dlouhého formátu tabulky na formát široký) zbavena zjevných chyb, které mohly být způsobeny častou konverzí datových typů v rámci různých uživatelských prostředí. Pro pozice se známými souřadnicemi bylo po transformaci na společný souřadnicový systém z družicových dat (WGS 84/UTM zone 33N) pro budoucí modely vypočteno 105 spektrálních indexů a určeny hodnoty odrazivosti 11 samostatných spektrálních pásem družic Sentinel-2, tedy celkem 116 prediktorů. Algoritmy pro výpočet vhodných spektrálních indexů byly sestaveny na základě formulací uvedených v databázi indexů využitelných v DPZ (IDB) dostupné online na <https://www.indexdatabase.de/>. Při výběru zdrojových kombinací spektrálních pásem byl především brán ohled na uvedenou primární aplikaci konkrétního spektrálního indexu a na spektrální pásma obsažena v kombinaci. Bylo zjištěno, že ve zdrojové databázi IDB jsou uvedeny duplicitní kombinace spektrálních pásem uvedené pod jiným názvem nebo chybně uvedeny rovnice. Duplicitní prediktory a kombinace s nestandardními či chybějícími hodnotami byly odstraněny, tedy byl redukován počet prediktorů vstupujících do modelu na 104 (93 spektrálních indexů a 11 samostatných spektrálních pásem).

V počáteční fázi prediktivního modelování byly zkoumány vzájemné vztahy mezi veličinami získanými v terénu a prediktory reprezentovanými výstupy ze satelitních dat. Pro tento účel byly vypočteny hodnoty korelací prostřednictvím Pearsonova koeficientu pro lineární vztahy a Spearmanova koeficientu

Tabulka 4. Celková výkonnost modelů RF a PLSR měřená vybranými statistikami
 Table 4. Total performance of the RF and PLSR models measured by selected statistics

	R^2		SMAPE		RMSE	
	RF	PLSR	RF	PLSR	RF	PLSR
ALG.30	0,2	0,05	0,82	1,03	10 243,99	11 147,99
CHA.30	0,59	0,13	0,54	0,74	33,36	48,47
CYANBACCELL.30	0,26	0,07	1,32	1,46	697 731,24	784 006,77
CYANBACVOL.30	0,39	0,19	1,27	1,32	9,09	10,48
FEOPIG.30	0,43	0,04	0,68	0,84	10,06	13,03
OJIP450.10	0,61	0,12	0,45	0,71	484 544,69	723 564,01
OJIP450.30	0,4	0,16	0,58	0,62	541 691,78	641 248,93
OJIP620.10	0,65	0,13	0,49	0,82	865 358,57	1 355 970,77
OJIP620.30	0,49	0,05	0,49	0,75	689 958,74	943 232,68
OJIPSUM.10	0,62	0,09	0,47	0,75	1 203 672,5	1 864 324,12
OJIPSUM.30	0,63	0,03	0,41	0,69	913 420,07	1 471 812,86
TEMP.10	0,69	0,26	0,07	0,11	2,09	3,23
TEMP.30	0,64	0,4	0,07	0,11	2,27	2,91
TURB.10	0,51	0,19	0,43	0,62	15,8	20,35
TURB.30	0,57	0,37	0,34	0,41	7,69	9,32



Obr. 5. Vizualizace výsledných rastrů odhadů sledovaných ukazatelů pro den 3. 6. 2019 vzniklých pomocí RF modelu za využití satelitních dat (lokality Proboštská jezera)
 Fig. 5. Visualization of resulting raster layers of monitored indicators estimates for 3 June 2019 produced using the RF model fed by satellite data (Proboštská lakes site)

pro zahrnutí vztahů nelineárních. Jejich statistická významnost byla sledována na hladinách 0,05, 0,01 a 0,001. U některých vysvětlujících proměnných byla zaznamenána poměrně silná korelace (s absolutními hodnotami koeficientů $> 0,7$) s ukazateli měřenými v terénu. Pouze vysoké hodnoty korelačních koeficientů však nejsou zárukou pro dosažení relevantních výsledků modelování. Základním předpokladem je znalost kauzálních vztahů. Proto byly průběžně výsledky konzultovány v rámci řešitelského týmu s odborníky na jakost koupacích vod. Na základě korelací, s přihlédnutím k jejich statistické významnosti na zvolené hladině, lze tedy usuzovat o vztazích lineárních i nelineárních, na nichž je možné stavět další analýzy.

Výsledky statistického hodnocení vzájemných vztahů mezi proměnnými jsou zobrazeny pro hladinu 0,001 ve formě korelačních grafů znázorněných na obr. 2 a 3 (z důvodu stručnosti jen pro RF modely a prediktory do nich vstupující). Popisují nejen vzájemné vztahy, ale jsou zároveň i výčtem spektrálních pásem a jejich kombinací, které vstoupily do vlastního procesu modelování (v případě PLSR modelů tvořily latentní proměnné všechny prediktory). Zde je patrné, že v modelech jsou zahrnuty i vysvětlující proměnné, které statisticky významnou korelaci nevykazovaly, nebo byl jejich vstup do modelu založen na nelineárním vztahu. Ty měly při náhodném výběru, prováděném balíčkem „CAST“, zásadní vliv na vysvětlení měřených ukazatelů. Skutečnost, že korelace vždy nemusí indikovat kauzalitu, potvrzuje i fakt, že nejvyšší četnost vstupu do modelů měly prediktory B1, ndb7b4, cri700, datt4, maccion, mnd680.

Z výše zobrazených korelačních grafů rovněž vyplývá, že ukazatele chlorofyl-a a zákal významně korelují s pásmy o vlnových délkách 0,69–0,71 μm a jejich kombinacemi. Pásma o vlnových délkách 0,5–0,6 μm , na která byla zaměřena studie provedená Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích [8, 9], v tomto případě nevykazovala významnou závislost. To si lze vysvětlit zejména vyšší heterogenitou námi zvolených modelových lokalit.

Pro prediktivní modelování bylo využito dvou modelovacích technik, jejichž základní principy jsou popsány výše. Celkem bylo zkonstruováno 30 modelů (tj. pro 15 ukazatelů měřených v rámci terénního šetření a dvě modelovací techniky). Pro modelové lokality vzniklo celkem 570 rastrových vrstev s hodnotami transformovanými do hodnot ukazatelů sledovaných v terénu (tj. pro všech 19 možných dnů). Z hodnocení jejich výkonnosti v tabulce 4 vyplývá, že výrazně kvalitnějších výsledků dosahují modely konstruované pomocí RF, kde u většiny ukazatelů nabývá R^2 hodnot nad 0,5. Nejlepších výsledků dosahuje ukazatel teploty vody v obou měřených horizontech, rovněž hodnoty křivek OJIP (v obou vlnových délkách) a v odběrovém horizontu těsně pod hladinou. Podle očekávání byly vysoko hodnoceny i ukazatele chlorofyl-a a zákal, což koresponduje s výsledky studií [8, 9]. Modely pro predikci sinic nedosahují bohužel uspokojivých výsledků. To lze přiknout nedostatečnému zohlednění sezonnosti a různých vývojových stádií sinic.

Odhady hodnot ukazatelů, pro které se neosvědčil ani jeden z konstruovaných modelů využitých k transferu informace ze satelitních dat do výsledných rastrů, mohou rovněž vycházet ze vztahů mezi ukazateli samotnými, které naznačují korelační grafy na obr. 4. Podmínkou však je, že ukazatel, ze kterého bude potenciálně možné informaci přenést, bude dobře vystižen výše uvedenými modely a zároveň bude vykazovat dobrou korelaci s ukazatelem, kterému bude třeba tuto informaci dodat. Při jejím hodnocení je nezbytně nutné uvědomit si příčinné souvislosti. Z hodnot korelačních koeficientů je též možno posoudit vhodnost využití lineárního, potažmo nelineárního regresního modelu, příp. nutnost veličiny transformovat tak, aby těmto modelům coby vstupy vyhovovaly.

Na obr. 5 je zobrazeno všech 15 ukazatelů pro jeden odběrový den (konkrétně 3. 6. 2019) na modelové lokalitě Proboštská jezera v Brandýse nad Labem. Již na první pohled je patrné, že v mnoha případech zde vznikají na okrajích vodní plochy nadhodnocené predikce. Jedná se převážně o zahrnutí okolní vegetace do pixelů, které zasahují do vodních ploch. Tato systematická chyba byla potlačena ořezem vstupní polygonové vrstvy s vodními plochami a posunem prvků v bodové vrstvě s odběrnými místy.

ZÁVĚR

Monitoring a hodnocení stavu a kvality koupacích vod jsou významné nejen pro pravidelný reporting příslušným institucím, ale i pro informování veřejnosti o stavu životního prostředí. Doposud získané výsledky v rámci řešeného projektu TJ02000091 – *Využití metod dálkového průzkumu Země pro monitoring stavu a kvality koupacích míst v České republice* potvrzují počáteční hypotézu o tom, že data získaná pomocí metod dálkového průzkumu Země mohou představovat významnou podporu a zefektivnění těchto činností. V předloženém článku byla nastíněna nejen základní problematika koupacích vod a monitoringu jejich stavu, ale především zde byly popsány dílčí činnosti postupu, který lze použít pro odhad požadovaných ukazatelů pomocí satelitních snímků, včetně jeho předností a nedostatků. Vzhledem k tomu, že v současné době projekt stále probíhá, budou v průběhu příštího roku jeho kompletní výsledky promítnuty do výstupů projektu v podobě tištěného Atlasu koupacích míst a webové mapové aplikace provozované Výzkumným ústavem vodohospodářským T. G. Masaryka, v. v. i. Rovněž budou závěrečné výsledky i s postupy pro jejich dosažení představeny na workshopu určeném především pracovníkům krajských hygienických stanic a dotčených ministerstev.

Poděkování

Autoři děkují za finanční podporu Technologické agentuře České republiky. Příspěvek byl zpracován s podporou projektu 2. veřejné soutěže Programu aplikovaného výzkumu ZÉTA TJ02000091 – Využití metod dálkového průzkumu Země pro monitoring stavu a kvality koupacích míst v České republice (2019–2021).

Literatura

- [1] Zákon č.258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů.
- [2] Legislativa vztahující se ke koupalištím. Státní zdravotní ústav [online]. SZÚ: ©2020 [cit. 2020-11-27]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/zivotni-prostredi/koupani-ve-volne-prirode/legislativa-vztahujici-se-ke-koupalisticim>
- [3] Vyhláška č. 238/2011 Sb., o stanovení hygienických požadavků na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch.
- [4] PUMANN, P., BAUDIŠOVÁ, D., KOŽÍŠEK, F., ŠAŠEK, J. a MYŠÁKOVÁ, M. *Metodický návod na vzorkování, terénní a laboratorní vyšetřování a hodnocení jakosti vody v přírodních koupalištích a povrchových vodách ke koupání* [online]. Praha: Státní zdravotní ústav [certifikovaná metodika], 2014. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/zivotni-prostredi/koupaliste-metody?lang=1>
- [5] Ministerstvo zdravotnictví. *Seznam přírodních koupališť na povrchových vodách* [online]. [cit. 2020-12-01], 2020. Dostupné z: <https://www.mzcr.cz/category/ochrana-verejneho-zdravi/koupani-v-prirode>
- [6] DOBROVOLNÝ, P. Dálkový průzkum Země: digitální zpracování obrazu. Brno: Masarykova univerzita, 1998. ISBN 80-210-1812-7.
- [7] European Space Agency. [online]. *European Space Agency* [cit. 2020-12-02], 2020. Dostupné z: <https://sentinel.esa.int>
- [8] BROM, J., NEDBAL, V. a DURAS, J. Rybníky pohledem z výšky – hodnocení kvality vody a eutrofizace pomocí dálkového průzkumu Země. In: *Rybníky 2019* [online]. Praha: Česká společnost krajinných inženýrů, 2019, s. 98–106. ISBN 978-80-01-06595-2. Dostupné z: <http://www.cski-cr.cz/uskutecne-udalosti/13-14-6-rybniky-2019-konference/>
- [9] NEDBAL, V. a BROM, J. Hodnocení znečištění povrchových vod pomocí satelitních snímků. *Vodní hospodářství*, 2019, roč. 69, č. 5, s. 6–8. ISSN 1211-0760.
- [10] European Space Agency: Sentinel-2 Acquisition Plans [online]. [cit. 2020-12-02]. Dostupné z: <https://sentinel.esa.int/web/sentinel/missions/sentinel-2/acquisition-plans>
- [11] European Space Agency: Sentinel-2 – Missions [online]. [cit. 2020-12-02]. Dostupné z: <https://sentinel.esa.int/web/sentinel/missions/sentinel-2>
- [12] SNAP. ESA Step: Science Toolbox Exploitation [online]. 2020 [cit. 2020-12-01]. Dostupné z: <http://step.esa.int/main/toolboxes/snap/>
- [13] PCI Geomatica (2018). Geomatica Help.
- [14] RANGHETTI, L., BOSCHETTI, M., NUTINI, F., and BUSETTO, L. "sen2r": An R toolbox for automatically downloading and preprocessing Sentinel-2 satellite data. *Computers & Geosciences* [online], 2020, Vol. 139, 104473. ISSN 0098-3004. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.cageo.2020.104473.
- [15] R CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing* [online]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2020. Dostupné z: <https://www.R-project.org/>

[16] BREIMAN, L. Random forests. *Machine Learning* [online], 2001, Vol. 45, No. 1, p. 5–32. ISSN 0885-6125. Dostupné z: doi:10.1023/A:1010933404324.

[17] MEYER, H., REUDENBACH, CH., HENGL, T., KATURJI, M., and NAUSS, T. Improving performance of spatio-temporal machine learning models using forward feature selection and target-oriented validation. *Environmental Modelling & Software* [online], 2018, Vol. 101, p. 1–9. ISSN 1364-8152. Dostupné z: doi:10.1016/j.envsoft.2017.12.001.

[18] MEYER, H., REUDENBACH, CH., WÖLLAUER, S., and NAUSS, T. Importance of spatial predictor variable selection in machine learning applications – Moving from data reproduction to spatial prediction. *Ecological Modelling* [online], 2019, Vol. 411, 108815. ISSN 0304-3800. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecolmodel.2019.108815.

[19] MEYER, H. CAST: „caret“ Applications for Spatial-Temporal Models [online], 2020. Dostupné z: https://CRAN.R-project.org/package=CAST

[20] KUHN, M. *caret: Classification and Regression Training*. [online], 2020. Dostupné z: https://CRAN.R-project.org/package=caret

[21] KUHN, M. and JOHNSON, K. *Applied Predictive Modeling*. New York, NY: Springer New York, 2013. ISBN 978-1-4614-6848-6.

[22] LIAW, A. and WIENER, M. Classification and Regression by randomForest. *R News*, 2002, Vol. 2, No. 3, p. 18–22. ISSN 1609-3631.

[23] WOLD, H. Estimation of principal components and related models by iterative least squares. In: KRISHNAIAH, P.R. ed. *Multivariate Analysis. Proceedings of the International Symposium held in Dayton, Ohio, June 14-19, 1965*. New York: Academic Press, 1966, p. 391–420.

[24] MEVIK, B.-H., WEHRENS, R., and LILAND, K.H. *pls: Partial Least Squares and Principal Component Regression*. [online], 2020. Dostupné z: https://CRAN.R-project.org/package=pls

Autoři

Ing. Bc. Václava Maťašovská¹

✉ vaclava.matasovska@vuv.cz
ORCID: 0000-0001-9229-463X

Mgr. Filip Kothan²

✉ filip.kothan@szu.cz
ORCID: 0000-0003-3210-5782

Mgr. Ondřej Ledvinka, Ph.D.³

✉ ondrej.ledvinka@chmi.cz
ORCID: 0000-0002-0203-7064

Mgr. Petr Pumann²

✉ petr.pumann@szu.cz
ORCID: 0000-0002-8199-1883

Ing. Tomáš Fojtík¹

✉ tomas.fojtik@vuv.cz
ORCID: 0000-0001-6480-3900

Ing. Marcela Makovcová¹

✉ marcela.makovcova@vuv.cz
ORCID: 0000-0002-1060-4188

Ing. Lenka Bendakovská, Ph.D.²

✉ lenka.bendakovska@szu.cz
ORCID: 0000-0001-8795-8008

¹Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v. v. i.

²Státní zdravotní ústav

³Český hydrometeorologický ústav

Příspěvek prošel lektorským řízením.

DOI: 10.46555/VTEI.2020.12.003

USE OF EARTH REMOTE SENSING METHODS TO MONITOR THE CONDITION OF BATHING SITES

MATASOVSKA, V.¹; KOTHAN, F.²; LEDVINKA, O.³; PUMANN, P.²; FOJTIK, T.¹; MAKOVCOVA, M.¹; BENDAKOVSKA, L.²

¹T. G. Masaryk Water Research Institute, p.r.i.

²National Institute of Public Health

³Czech Hydrometeorological Institute

Keywords: remote sensing – monitoring of bathing waters status – spectral indices – regression

The Ministry of Health in cooperation with other related bodies compiles, on an annual basis, the *List of outdoor bathing sites on surface waters where the bathing service is offered by the operator, and other surface waters used for bathing*. It is compiled based on the long-term monitoring, performed, exclusively as *in-situ* measurements, by the regional hygiene stations. With respect to the fact that this way of monitoring is not only time-consuming but also financially demanding, the need for minimizing these expenses naturally arises.

The currently running project *Use of remote sensing methods for monitoring the status and quality of bathing waters in the Czech Republic* offers possibilities of distant monitoring of some of these indicators necessary for such assessment. The objective is to find and describe the relationships between data obtained in terrain and remote sensing data, by means of up-to-date statistical techniques combined with the use of suitable GIS tools. The project outcomes may then provide the regional hygiene stations with a tool beneficial not only from the perspective of conducting the routine assessment of the parameters but also from the perspective of identification of new bathing sites. In addition, thanks to its time-series character, the produced material can serve as a basis for the assessment of the bathing season.

In the present paper, the procedure leading to the fulfillment of the desired goals is mainly presented. Two stages of field analysis were carried out in 14 selected model sites, followed by laboratory works. In the meantime, optimal ways of processing the satellite data with a huge spatial resolution (Sentinel-2) were sought. After basic multispectral image processing, 105 spectral indices were tested, while the initial assumption was confirmed regarding the strong correlation between some of the indices and the values of measured parameters. For the prediction of these values using the satellite data, two machine-learning techniques were employed, namely *Random Forests* and *Partial Least Squares regression*.



Autoři VTEI

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.

Státní zdravotní ústav

✉ dana.baudisova@szu.cz
www.szu.cz



RNDr. Dana Baudišová, Ph.D., v roce 1988 ukončila obor Obecná biologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy a v roce 2000 ukončila na téže fakultě doktorandské studium mikrobiologie. Od roku 1993 pracovala 24 let ve VÚV TGM, v. v. i., kde se zabývala mikrobiologií vody (metody mikrobiologických analýz, mikrobiální kontaminace povrchových a odpadních vod, výzkum mikrobiálního znečištění, jeho zdrojů a eliminace). Od roku 2018 pracuje v oddělení hygieny vody Státního zdravotního ústavu se zaměřením na mikrobiologii pitných, koupacích a recyklovaných vod.

Ing. Andrea Benáková, Ph.D.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

✉ andrea.benakova@vscht.cz
www.vscht.cz



Ing. Andrea Benáková, Ph.D., v roce 2002 ukončila magisterský obor Technologie vody a v roce 2009 doktorský obor Chemie a technologie ochrany životního prostředí na Fakultě ochrany životního prostředí Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Je zaměstnankyní Oddělení laboratorní kontroly odpadních vod Pražských vodovodů a kanalizací, a. s., na pozici biologa a Ústavu technologie vody a prostředí Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. V PVK, a. s., se zabývá převážně biologickým rozбором čistírenských kalů a biologických pěn a mikrobiologickou analýzou odpadních vod. V rámci výzkumné činnosti na VŠCHT Praha se zabývá recyklací odpadních vod a detekcí mikroorganismů v čistírenských kalech a odpadních vodách pomocí molekulárně biologických metod. V rámci pedagogické činnosti na VŠCHT Praha se podílí na laboratorních cvičeních v předmětu Technologie vody a na přednáškách pro zahraniční studenty v předmětu Waste Water Treatment a dále na laboratorních cvičeních a přednáškách v předmětu Hydrobiologie pro ČVUT. Je autorkou či spoluautorkou 69 odborných článků v časopisech a sbornících konferencí. Je členkou výboru Asociace pro vodu ČR.

RNDr. Šárka Bobková, Ph.D.

Státní zdravotní ústav

✉ sarka.bobkova@szu.cz
www.szu.cz



RNDr. Šárka Bobková, Ph.D., je zaměstnankyní Státního zdravotního ústavu, Oddělení hygieny vody od roku 2019. Svůj doktorský titul získala v roce 2010 na Přírodovědecké fakultě UK v Praze a na Univerzitě Paříž-Jih ve Francii, v oboru biologie, specializace mikrobiologie. Pracovala v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, kde se podílela na základním výzkumu v rámci řešení grantových projektů. V současné době je zaměstnankyní Státního zdravotního ústavu na pozici přírodovědný analytik-dagnostik. Podílí se na mikrobiologických analýzách vody a je řešitelkou grantového projektu týkajícího se využití metod molekulární biologie pro identifikaci zdrojů znečištění v koupacích vodách (projekt TA ČR).

Ing. Bc. Václava Maťašová

VÚV TGM, v. v. i.

✉ vaclava.matasovska@vuv.cz
www.vuv.cz



Ing. Bc. Václava Maťašová je zaměstnankyní oddělení GIS a kartografie ve VÚV TGM, v. v. i., od roku 2018. V roce 2014 ukončila magisterský obor Regionální environmentální správa na Fakultě životního prostředí České zemědělské univerzity v Praze a v roce 2017 bakalářský obor Geoinformatika na Hornicko-geologické fakultě Vysoké školy báňské – Technické univerzity Ostrava. V současné době je hlavní řešitelkou projektu Využití metod dálkového průzkumu Země pro monitoring stavu a kvality koupacích míst v České republice (2019–2021). Zaměřuje se na aplikace nekonvenčních metod dálkového průzkumu Země ve vodním hospodářství.

Mgr. Petr Pumann

Státní zdravotní ústav

✉ petr.pumann@szu.cz
www.szu.cz



Mgr. Petr Pumann od absolvování magisterského studia na Přírodovědecké fakultě UK (obor Ochrana a tvorba životního prostředí) v roce 1997 pracuje ve Státním zdravotním ústavu v Oddělení hygieny vody a Národním referenčním centru pro pitnou vodu jako hydrobiolog, kde se zabývá problematikou přírodních koupacích vod a metodickými otázkami odběru a rozboru pitných a koupacích vod. Podílí se na přípravě národních norem v oblasti biologického rozboru vod a dalších metodických předpisů v této oblasti. Organizuje několik programů mezilaboratorního porovnávání a různé vzdělávací akce pro pracovníky provozních laboratoří (např. kurzy pro určování sinic a řas).

Ing. Jana Zuzáková

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

✉ jana.zuzakova@vscht.cz
www.vscht.cz



Ing. Jana Zuzáková v roce 2017 dokončila magisterské studium v oboru Technologie vody na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, na které dále navázala v rámci doktorského studijního programu v Ústavu technologie vody a prostředí. Tématem disertační práce jsou alternativní metody detekce mikrobiální kontaminace vod. Od roku 2018 je technologem pitných vod ve společnosti Pražské vodovody a kanalizace, a. s., kde se mimo jiné podílí na řešení výzkumných projektů, např. projektu s názvem „Vývoj technologie pro eliminaci vnosu mikropolutantů a genů rezistence na antibiotika do životního prostředí a lidského organismu“.



Autorka fotografie: Ing. Helena Brodská

Rozhovor s mikrobioložkou RNDr. Danou Baudišovou, Ph.D.

Mikroorganismy jsou velmi významnou a obdivuhodnou součástí systému živé přírody. Jejich význam je spojován zejména s dopady na zdraví lidí, tedy s lékařskou mikrobiologií. Vyskytují se však bez výjimky ve všech složkách prostředí, včetně vodního, kde je jejich význam obecně méně známý, nicméně velký.

Co Vás přivedlo k této zajímavé vědní disciplíně, kterou je mikrobiologie vody? Co je na studiu mikroorganismů ve vodách zajímavého?

Na to, jak je mikrobiologie vody úžasný obor, jsem přišla, jak už to tak bývá až poté, co jsem se jí začala pořádně zabývat. Cesta k ní nebyla úplně přímočará. Po maturitě jsem strávila 10 měsíců jako pomocný laboratorní pracovník v laboratoři Pražských vodáren, s. p., (dnes Pražské vodovody a kanalizace, a. s.), poté jsem na Přírodovědecké fakultě UK vystudovala obor Obecná biologie se specializací Mikrobiologie a nastoupila do toxikologické laboratoře Fakultní nemocnice 1 (dnes VFN) s poliklinikou. Zde jsem pracovala jako odborný pracovník – nelékař – a zabývala se především toxiny hub a rostlin. Po pěti letech jsem dostala chuť vrátit se zpátky k mikrobiologii a ve Výzkumném ústavu vodohospodářském zrovna někoho do mikrobiologie hledali. Moje profesní začátky ve VÚV TGM jsou spjaty především s krásnou spoluprací s RNDr. Josefem Fuksou, CSc., RNDr. Ladislavem Havlem, CSc., a s Ivanou Benákovou, která trvala prakticky po celou dobu mého působení ve VÚV TGM a za kterou moc děkuji.

Co je na studiu mikroorganismů nejzajímavější? Jak je známo a jak se píše v učebnicích mikrobiologie, mikroorganismy jsou všude, a tudíž i ve vodě. Problematika, kterou tento obor zahrnuje, je velmi široká, není to jen práce v laboratoři. Mikrobiolog vody se setká s mnoha aktivitami, od hledání zajímavých témat k řešení, návrhů projektů, terénních prací, přes laboratorní činnosti až ke konečnému vyhodnocení výsledků a jejich publikaci, zkrátka každý pracovní den bývá jiný.

Ve Výzkumném ústavu vodohospodářském jste strávila téměř 25 let, během nichž jste se v rámci výzkumných projektů setkala s velkým množstvím odlišných problematik v oblasti mikrobiologie vody. Zabývala jste se povrchovými, odpadními i pitnými vodami, a to jak z pohledu jejich jakosti a vlivu na životní prostředí a na zdraví, tak z pohledu jejich technologického využití v procesech čištění vod.

Která problematika byla pro Vás nejzajímavější jako cíl výzkumu a která nejpřínosnější pro využití v praxi?

Moje odborné začátky na konci 90. let minulého století jsou spjaty především s „Metodickým řízením laboratoří“ v souvislosti s přechodem na nové metody podle mezinárodních norem (ISO, následně EN ISO) a s přípravou systému kvality v mikrobiologických laboratořích. V tomto ohledu mě velmi



Autorka fotografie: RNDr. Šárka Bobková, Ph.D.

obohatila i spolupráce s ASLAB, za což jsem velmi vděčná. Od roku 2003 jsme se ve spolupráci s Odborem technologie vody a odpadů VÚV TGM začali systematicky věnovat mikrobiálnímu znečištění odpadních vod a jeho eliminaci, což bylo v té době u nás v začátcích.

Pak přišel výzkumný záměr „Výzkum a ochrana hydrosféry – výzkum vztahů a procesů ve vodní složce životního prostředí“, kde se mikrobiologická problematika (dílem ve spolupráci s kolegyněmi z poboček Brno a Ostrava) řešila v řadě oblastí (antropogenní znečištění toků, znečištění vod pocházející ze zemědělství, čištění odpadních vod včetně extenzivních způsobů čištění apod.). V období 2008–2011 byl zpracováván úkol „Dynamika mikrobiální kontaminace v povodí Olešky v souvislosti se změnami průtoků. Bohužel se na tento výzkum nepodařilo navázat, což mě dodnes mrzí, a je to úkol pro moje následovníky.

Od roku 2013 jsem byla hlavní řešitelkou několika projektů TA ČR, týkajících se metodických problémů při vyšetřování koupacích vod, výzkumem významu asimilovatelného organického uhlíku ve vodárenství a podílela jsem se na řešení řady dalších projektů, kde se mikrobiologie vody vyskytla. I z tohoto výčtu je vidět, jak je vědní disciplína mikrobiologie vody široká.

V roce 2000 jste navázala na dlouholetou práci RNDr. Jiřího Häuslera, DrSc., který každoročně organizoval vzdělávací semináře v oblasti mikrobiologie vody. Od tohoto roku jste pod záštitou Československé mikrobiologické společnosti spolu se slovenskou kolegyní RNDr. Miloslavou Prokšovou, CSc., v pravidelném režimu organizovala konference Mikrobiologie vody (od roku 2012 Mikrobiologie vody a prostředí).

Jak hodnotíte tuto tradici odborných setkání mikrobiologů se stejným zaměřením? Na kterou akci nejraději vzpomínáte?

RNDr. Jiří Häusler, DrSc., byl dlouholetý pracovník VÚV TGM, který odešel v devadesátých letech. Přestože jsem se s ním ve VÚV TGM nepotkala, měla jsem možnost s ním spolupracovat při přípravě řady českých technických norem. Poznala jsem ho na své první konferenci Mikrobiologie vody v roce 1994 ve Staré Turé, kde jsem referovala první poznatky o mFC médiu (pozn. red.: selektivní kulturační médium pro stanovení termotolerantních bakterií). Od té doby se uskutečnilo 16 obdobných velmi příjemných akcí, určených pro mikrobiologii vody, z nichž pět jsem organizovala.

Tato odborná setkání mikrobiologů jsou vždy skvělá. Naštěstí se v našem oboru daří udržovat přátelskou, nikoliv nezdravě konkurenční atmosféru, a byla zde navázána řada skvělých spoluprací a troufám si tvrdit, že i dlouholetá přátelství. Na kterou akci nejraději vzpomínám? To je strašně těžká otázka, zážitků máme za ta léta opravdu hodně. Ale vždycky mě samozřejmě potěší, když po letech účastníci s úsměvem vzpomínají na mnou organizované akce (např. Bedřichov 2000 nebo Tupadly 2011), současně musím říct, že jsem si vždycky moc užila konference, které organizovala slovenská kolegyně RNDr. Miloslava Prokšová, CSc.

Konferenci v loňském roce bohužel zhatila pandemie koronaviru, ale pevně doufám, že se podaří tuto akci uskutečnit v náhradním termínu v dubnu 2021.

V roce 2018 jste se rozhodla pro změnu a po téměř 25 letech jste odešla z VÚV TGM do Státního zdravotního ústavu (SZÚ). Co Vás vedlo k tomuto zásadnímu rozhodnutí?

Já to zase za tak zásadní rozhodnutí nepovažuji, protože jsem plně zůstala u mikrobiologie vody a na řadu věcí, které jsem řešila ve VÚV TGM, jsem plynule navázala. Navíc jsme s mnoha mými současnými kolegy již dříve řešili společné projekty, takže jsem je znala, a víceméně jsem věděla, do čeho jdu. Po 25 letech práce na jednom pracovišti jsem přeci jen potřebovala změnu. Novou výzvu věnovat se tématu, které mě vždy bavilo nejvíce, tedy studiu hygienicky významných mikroorganismů ve vodách, jsem s potěšením takřka bez váhání přijala... svého rozhodnutí rozhodně nelituji.

Jak ukazuje aktuální situace ve světě, která zvýšila povědomí o existenci mikroorganismů, má Váš obor velkou perspektivu. Čemu se aktuálně v SZÚ věnujete a jaké máte další plány?

Na svém současném pracovišti – Oddělení hygieny vody SZÚ – se zaměřuji mnohem více na vodu, která je v přímém kontaktu s lidmi – tedy na pitnou a koupací vodu. V současné době řešíme např. zajímavý projekt, který se týká výzkumu využití recyklované vody.

V prosinci 2020 vyšla nová směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (viz náš příspěvek v tomto časopise). Její implementace do praxe přináší řadu výzev, na které se velmi těším.

RNDr. Hana Mlejnková, Ph.D.

Monitoring koronaviru SARS-CoV-2 v odpadních vodách – co nám dosud ukázal a kam směřuje

Ve VÚV TGM, v. v. i., je od dubna 2020 prováděn monitoring přítomnosti koronaviru SARS-CoV-2 v odpadních vodách. Metoda průkazu je obdobná jako u klinických vzorků, tj. pomocí PCR je zjišťována přítomnost specifického fragmentu virové RNA. Významný rozdíl je v náročnosti úpravy vzorku odpadní vody, kdy je z ní nutné separovat čistou RNA s minimalizací ztrát jejího cílového množství. Analýzy provádí virologická laboratoř Výzkumného ústavu veterinárního lékařství (VÚVeL) v Brně, která má s detekcí virů v odpadních vodách dlouholeté zkušenosti. Stejný monitoring na vybraných ČOV byl prováděn v jarním období společností SOVAK, která zjištěná data poskytla do společného hodnocení. Vyhodnocení je prováděno ve spolupráci se Státním zdravotním ústavem (SZÚ), který ze zdravotnického sektoru zajistil údaje o počtech infikovaných osob v monitorovaných oblastech. V prvním kole monitoringu bylo odebráno celkem 137 vzorků nátoků na 40 čistírnách odpadních vod (ČOV) z celého území ČR. Pozitivní nález specifického fragmentu viru SARS-CoV-2 byl zjištěn u 28 % ČOV v 15 % vzorků.

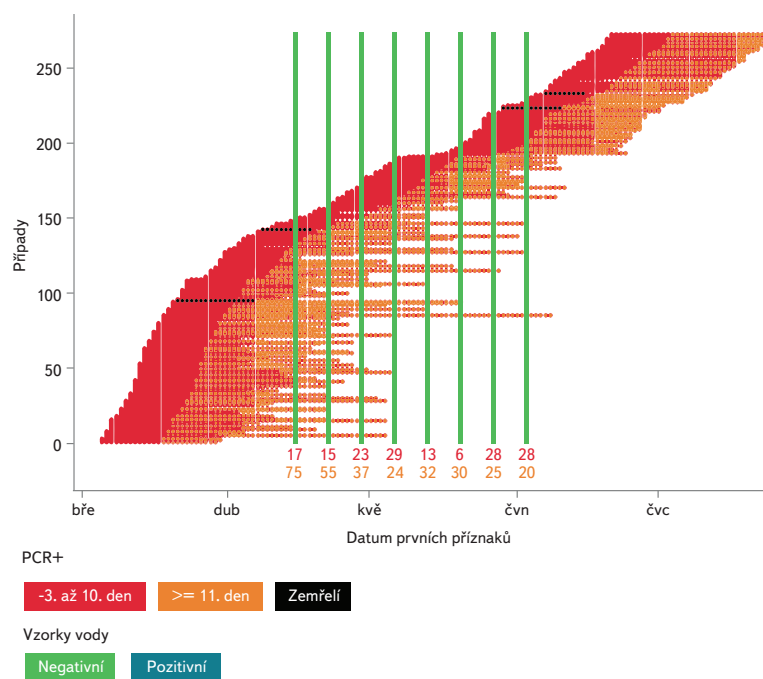
V současné době probíhá vyhodnocení jarního kola odběrů s využitím údajů o počtech infikovaných osob v konkrétních oblastech, které byly v průběhu monitoringu nedostupné. Data o osobách pozitivních na SARS-CoV-2 jsou získána z celostátního systému ISIN (Informační systém infekčních nemocí). Data do ISIN jsou vkládána z Krajských hygienických stanic. Ke grafickému zobrazení epidemiologické situace bylo využito datum prvních příznaků a předpoklad, že člověk je infekční až 3 dny před tímto datem a nejvíce viru vylučuje do 10. dne od prvních příznaků. U některých osob vylučování probíhá déle než 10 dní, což je v grafech zobrazeno slabší barvou. Délka se odvíjí od toho, zda je známo datum negativního PCR testu, pokud ne, je řada ukončena po 30 dnech. Pokud osoba zemřela, řada končí datem úmrtí. Grafy zobrazují výsledky monitoringu odpadních vod v konkrétních datech.

Monitoring pokračuje podzimním kolem odběrů vzorků odpadních vod, aby byly získány informace z druhé vlny epidemie, kdy jsou počty infikovaných osob řádově vyšší než v jarním období. Podíl infikovaných osob na počtu obyvatel napojených na sledované ČOV se na jaře pohyboval kolem 0,1 %, v podzimní vlně je to cca 2 %.

Za účelem zachycení nástupu další vlny zvýšeného výskytu onemocnění COVID-19 byla ze 40 sledovaných ČOV vybrána jedna středně velká ČOV, na níž je od dubna kontinuálně prováděn monitoring s frekvencí odběrů 1–2 týdny. Na této ČOV byla přítomnost virových fragmentů v jarním kole monitoringu prokázána ve 3 z 8 odběrů. Záchyt odpovídal 3–25 evidovaným infikovaným osobám z více jak 20 000 napojených obyvatel. V oblasti napojené na tuto ČOV bylo v době první vlny (do 7.7.2020) evidováno cca 60 infikovaných osob, tj. cca 0,3 % napojených obyvatel. V podzimní vlně zde počet infikovaných osob stoupl na cca 2 % (> 400 osob). Pozitivní nález virové RNA v odpadní vodě zde od jarní vlny nebyl zachycen. Příčinou může být rozdíl v průběhu nemoci v jarní a podzimní vlně, a tedy s možným menším množstvím virových částic, obsažených ve stolici nebo moči v lokalitě s intenzivním výskytem v jarní vlně.

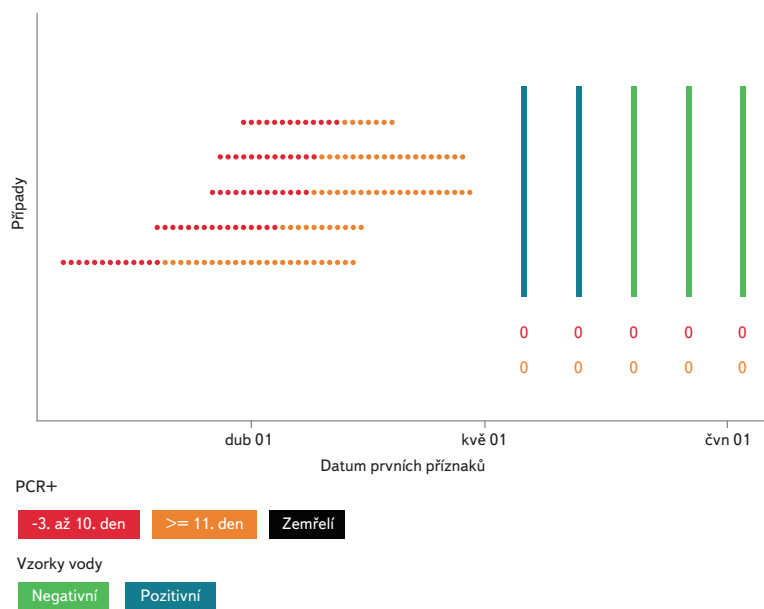
Dosavadní výsledky výzkumu nám potvrdily informace publikované, na začátku pandemie, nizozemskými vědci o výskytu virových fragmentů viru SARS-CoV-2 v nečistěných odpadních vodách. Jak vyplývá z klinických studií, je jejich pravděpodobným zdrojem trávicí a vylučovací systém člověka. Téma přítomnosti koronavirů ve střevech a moči však není dosud dostatečně klinicky probádáno, ale výzkum intenzivně pokračuje. Významný objev udělali vědci z Hubrechtova institutu v Utrechtu, kteří výzkumy na tkáňových kulturách potvrdili, že viry SARS-CoV-2 mohou infikovat buňky střev a množit se v nich. Tímto poznatkem se významně zvyšuje význam monitoringu odpadních vod a studium možné kontaminace vodního prostředí. Průkaz přenosu fekálně-orální cestou však dosud prokázán nebyl. Zatím nejsou známy údaje, zda se v tělních exkretách vyskytují fragmenty viru u všech infikovaných osob nebo zda záleží na průběhu a symptomech, v jakém množství, po jak dlouhou dobu, v které fázi nemoci a zda i u bezpříznakových jedinců. Důležitá je také konkrétní imunitní odpověď infikované osoby, která může probíhat různými mechanismy, z nichž některé mohou genom viru rozložit až na nedetekovatelné fragmenty. Lze tedy předpokládat, že neexistuje přímá úměra mezi počtem infikovaných osob a kontaminací odpadních vod virovými fragmenty.

Výsledky první vlny monitoringu přinesly, díky celkově velmi nízkému počtu infikovaných osob v ČR v první vlně epidemie, jedinečné výsledky, neboť umožnily zachytit dolní mez detekce zvolené metody. Pozitivní nález fragmentů SARS-CoV-2 byl stanoven u ČOV, kde byly aktuálně v daný den evidovány 1–3 infikované osoby z objemu odpadních vod od 6 000 do 12 000 napojených obyvatel. Vzhledem k předpokládanému časovému intervalu mezi

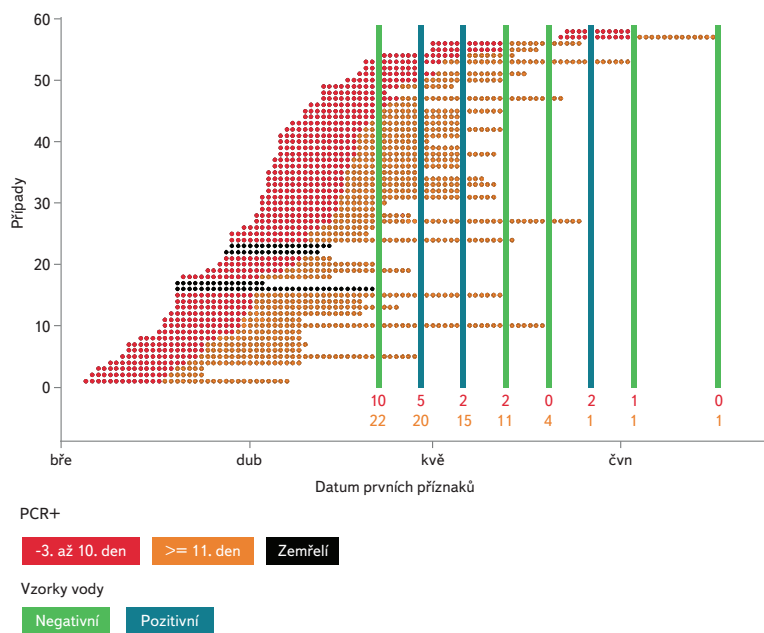


Obr. 1. Příklad ČOV s negativním nálezem viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a pozitivním výskytem infikovaných osob

hlášením infekce a potenciálním vylučováním virů do odpadních vod, je zde vhodnější jako možné maximum použít kumulativní údaj o počtu infikovaných osob v dané lokalitě za celé jarní období (do 7.7.2020). Také v tomto případě byly v odpadních vodách zachyceny fragmenty virové RNA již od 3–5 infikovaných osob z objemu odpadních vod od 6 000 do 80 000 napojených obyvatel. Tato velmi nízká čísla ukazují na velmi vysokou citlivost metody. Při interpretaci dat je nezbytné vzít v úvahu další zjištěná fakta a souvislosti, která budou významná při návrhu systematického epidemiologického sledování odpadních vod.



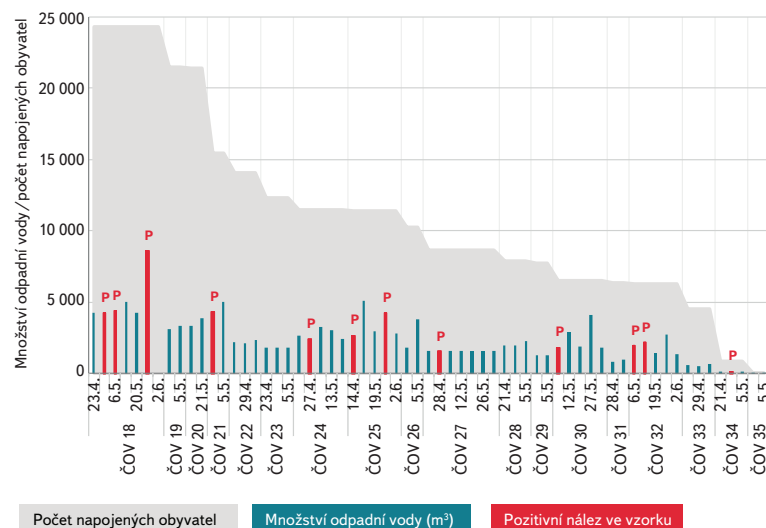
Obr. 2. Příklad ČOV s pozitivním nálezem viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a negativním výskytem infikovaných osob v době odběru vzorků



Obr. 3. Příklad ČOV s pozitivním nálezem viru SARS-CoV-2 v odpadní vodě a pozitivním výskytem infikovaných osob

Prvním faktem je zjištěná absence viru v odpadních vodách v lokalitách, kde byl evidován výskyt pozitivně testovaných osob (obr. 1). Příčinou může být velké naředění odpadních vod, tj. hledaná částice genomu nebyla do vzorku zachycena v detekovatelném množství nebo stavu (došlo např. k degradaci RNA pomocí enzymů štěpících RNA již před odběrem nebo při transportu vzorku). Dalším důvodem může být fakt, že se virové částice nedostaly do trávícího nebo vylučovacího systému infikovaných osob, jak bylo popsáno výše, nebo že se v době nemoci tyto osoby nevyskytovaly v místě, kde byly evidovány jako infikované (pobyt v zaměstnání, v rekreačních objektech apod.).

Druhým zajímavým faktem je pozitivní nález virových fragmentů v odpadních vodách v lokalitách, kde nebyly hlášeny žádné infikované osoby (obr. 2). Tento případ lze vysvětlit přítomností neevidovaných infikovaných osob, tj. buď bezpříznakových, nenahlášených, nebo evidovaných v jiném místě než skutečně pobývaly.



Obr. 4. Počet napojených obyvatel a množství odpadních vod u sledovaných ČOV s pozitivním nálezem SARS-CoV-2

Pro vývoj systému včasného varování budou nejdůležitější výsledky z lokalit, kde byly nalezeny pozitivní vzorky odpadních vod a hlášena přítomnost pozitivně testovaných osob (obr. 3). Pro správnou interpretaci těchto výsledků je třeba důrazně akceptovat rozdíly mezi typy a charakterem čistíren odpadních vod, neboť ne všechny jsou vhodné pro epidemiologické prognózy. Čistírny odpadních vod se liší především množstvím odpadních vod, které jsou na ně přiváděny; počtem napojených obyvatel; délkou a větvením kanalizační sítě a ve většině případů zpracováním kombinace komunálních a průmyslových odpadních vod (obr. 4). U velkých ČOV je nutné brát ještě zřetel na napojování dílčích stok a odebírat vzorky z více míst.

Na komplikovanou interpretaci výsledků monitoringu odpadních vod, ze stejných důvodů, upozornili i nizozemští kolegové (<https://www.waternewseurope.com/netherlands-covid-19-sewage-measurements-difficult-to-interpret/>), kteří jako první přišli s myšlenkou využití odpadních vod k epidemiologickému monitoringu.

První kolo monitoringu odpadních vod, prováděné v jarní vlně epidemie nemoci COVID-19, přineslo řadu zajímavých výsledků, které budou velmi cenné a nezbytné pro další práci na tvorbě systému, jehož cílem bude včasné zachycení varovného signálu nastupující epidemiologické situace v ČR a lokalizace rizikových míst. Tento cíl, spolu s optimalizací metodiky detekce viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách, bude v letech 2021–2022 řešen v rámci projektu „Využití monitoringu odpadních vod jako nástroje včasného varování před vznikem epidemiologické situace“, který byl podpořen ve 4. veřejné soutěži „Programu bezpečnostního výzkumu České republiky v letech 2015–2022“ (BV III/1-VS).

Hlavními výstupy projektu budou dvě metodiky: „Metodika využití monitoringu rizikových biologických agens a biomarkerů v komunálních odpadních vodách jako nástroje pro včasné epidemiologické varování“ a „Metodika detekce vybraných rizikových mikrobiologických agens pomocí PCR v odpadních vodách“. Metodiky budou nabídnuty kompetentním složkám státu k využití v praxi.

Autoři

RNDr. Hana Mlejnková, Ph.D.¹

✉ hana.mlejnkova@vuv.cz

Mgr. Kateřina Sovová, Ph.D.¹

✉ katerina.sovova@vuv.cz

Ing. Věra Očenášková¹

✉ vera.ocenaskova@vuv.cz

Ing. Eva Juranová¹

✉ eva.juranova@vuv.cz

Mgr. Lucie Jašíková, Ph.D.¹

✉ lucie.jasikova@vuv.cz

Mgr. Petra Vašíčková, Ph.D.²

✉ vasickova@vri.cz

RNDr. Alena Fialová, Ph.D.³

✉ alena.fialova@szu.cz

¹Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v. v. i.

²Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

³Státní zdravotní ústav

VTEI/2021/1

Od roku 1959

**VODOHOSPODÁŘSKÉ
TECHNICKO-EKONOMICKÉ INFORMACE**
**WATER MANAGEMENT
TECHNICAL AND ECONOMICAL INFORMATION**

Odborný dvouměsíčník specializovaný na výzkum v oblasti vodního hospodářství.
Je uveden v Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v ČR.

Ročník 63



VTEI.cz

Vydává: Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka,
veřejná výzkumná instituce, Podbabská 2582/30, 160 00 Praha 6

Redakční rada:

RNDr. Jan Daňhelka, Ph.D., doc. Dr. Ing. Pavel Fošumpaur, doc. Ing. Silvie Heviánková, Ph.D.,
Mgr. Róbert Chriateľ, Mgr. Vít Kodeš, Ph.D., Ing. Jiří Kučera, Ing. Milan Moravec, Ph.D.,
Ing. Jana Poórová, Ph.D., Mgr. Hana Sezimová, Ph.D., Dr. Ing. Antonín Tůma,
Mgr. Lukáš Záruba, Ing. Marcela Zrubková, Ph.D.

Vědecká rada:

doc. Ing. Martin Hanel, Ph.D., prof. RNDr. Bohumír Janský, CSc.,
prof. Ing. Radka Kodešová, CSc., RNDr. Petr Kubala, Ing. Tomáš Mičaník, Ph.D.,
Ing. Michael Trnka, CSc., Dr. rer. nat. Slavomír Vosika

Šéfredaktor:

Ing. Lenka Michálková
T: +420 220 197 465
E: lenka.michalkova@vuv.cz

Kontakt na redakci:

E: info@vtei.cz

Autoři fotografií tohoto čísla:

Archiv VÚV

Grafická úprava, sazba, tisk:

ABALON s. r. o., www.abalon.cz

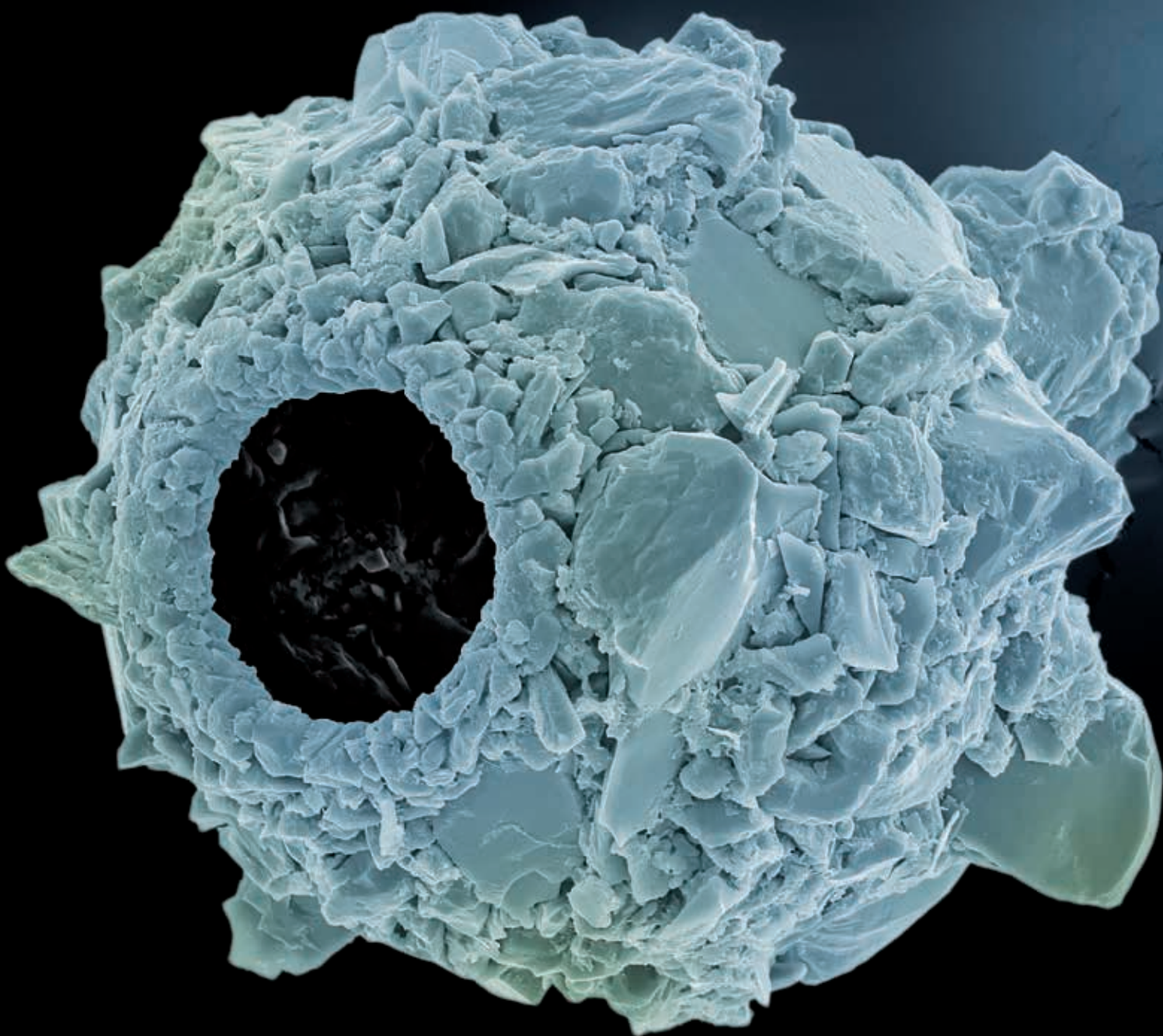
Náklad 1500 ks

Příští číslo časopisu vyjde v dubnu.
Pokyny autorům časopisu jsou uvedeny na www.vtei.cz.

ISSN 0322-8916

ISSN 1805-6555 (on-line)

MK ČR E 6365



SVĚDCI DÁVNÝCH DOB

Kromě malého Mechového jezírka v Krkonoších oplývá naše země pouhými pěti dochovanými ledovcovými jezery, která jsou všechna na Šumavě. Jejich sedimenty uchovávají cenná svědectví o historii vývoje naší přírody, stejně tak jako dno tzv. Staré jímky, kde tisíce let ležela tato krytenka, malý měňavkovitý prvok s jeho typickou schránkou. Právě podle druhového složení organismů v různých hloubkách sedimentů starých jezer je možné částečně rekonstruovat různé změny životních podmínek, které nastaly v průběhu čtvrtohor. *Text a fotografii dodal Petr Jan Juračka, www.petr.juracka.eu.*

**VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VODOHOSPODÁŘSKÝ
T.G. MASARYKA**

veřejná výzkumná instituce

VTEI.cz