

Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica
Číslo 1/2008

**Metodický návod pro stanovení indikátorových organismů
v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalech z čistíren
odpadních vod, digestátech, substrátech, kompostech,
pomocných růstových prostředcích a podobných matricích**

Redakční rada: prof. MUDr. V. Bencko, DrSc., MUDr. J. Mika,
RNDr. F. Rettich, CSc., Mgr. J. Veselá, MUDr. J. Volf, Ph.D.

Vydává Státní zdravotní ústav v Praze
ISSN 1804-9613

ACTA HYGIENICA, EPIDEMIOLOGICA ET MICROBIOLOGICA
Číslo 1/2008 – 1. vydání – leden 2009

Metodický návod pro stanovení indikátorových organismů v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalech z čistíren odpadních vod, digestátech, substrátech, kompostech, pomocných růstových prostředcích a podobných matricích

Autor: Ing. Ladislava Matějů
SZÚ, Centrum laboratorních činností, Odbor hygieny, mikrobiologie a ekotoxikologie,
Laboratoř hygieny půdy a odpadů, NRL pro hygienu půdy a odpadů

Vydal Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10

Telefon redakce: 267082288, e-mail: ahemszu@szu.cz

Obsah

Předmluva.....	4
ČÁST 1 - DETEKCE JEDNOTLIVÝCH INDIKÁTOROVÝCH ORGANISMŮ	5
1 VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ	5
1.1 Úvod.....	5
1.2 Předmět a vymezení působnosti	5
1.3 Normativní a legislativní předpisy	5
1.4 Odběr vzorku a nakládání s ním v laboratoři	7
1.5 Kultivační půdy a činidla	8
1.6 Postup zkoušky.....	8
1.7 Vyjadřování výsledků	8
1.8 Protokol o zkoušce	10
1.9 Bezpečnost	10
1.10 Zajištění systému QA-QC	11
1.11 Odstranění odpadů.....	11
2 METODY STANOVENÍ INDIKÁTOROVÝCH ORGANISMŮ	11
2.1. Stanovení termotolerantních koliformních bakterií	11
2.2. Stanovení enterokoků.....	19
2.3 Detekce salmonel	26
ČÁST 2 - HODNOCENÍ ÚČINNOSTI HYGIENIZACE TECHNOLOGIÍ ZPRACOVÁVAJÍCÍCH BIOODPADY.....	38
3 VALIDACE ÚČINNOSTI HYGIENIZACE BIOTECHNOLOGICKÝCH, TEPELNÝCH A CHEMICKÝCH PROCESŮ VEGETATIVNÍMI BUŇKAMI	38
3.1 Úvod.....	38
3.2 Předmět a vymezení působnosti	38
3.3 Normativní odkazy	39
3.4 Symboly a zkratky.....	40
3.5 Princip validačního procesu	40
3.6 Činidla, zředovací roztoky a kultivační média	40
3.7 Přístroje	41
3.8 Pracovní postup.	42
Příloha A	48
4 VALIDACE ÚČINNOSTI HYGIENIZACE BIOTECHNOLOGICKÝCH, TEPELNÝCH A CHEMICKÝCH PROCESŮ STANOVENÍM POČTŮ VYBRANÝCH ENDOGENNÍCH ORGANISMŮ V SUBSTRÁTU PŘED A PO ZPRACOVÁNÍ A VÝPOČET STUPNĚ REDUKCE (ANALÝZA VSTUPU-VÝSTUPU).....	50
4.1 Úvod.....	50
4.2 Předmět a vymezení působnosti	50
4.3 Normativní odkazy.....	51
4.4 Symboly a zkratky.....	51
4.5 Princip validačního procesu analýzou vstupu-výstupu	51
4.6 Činidla, zředovací roztoky a kultivační média	51
4.7 Přístroje	51
4.8 Stanovení počátečního počtu mikroorganismů v nezpracované matrici (vstup).....	52
4.9 Stanovení počátečního počtu mikroorganismů ve zpracované matrici (výstup).....	52
4.10 Stanovení stupně inaktivace (IR)	52
Literatura	53

Předmluva

Nakládání s bioodpady, upravenými bioodpady, sedimenty a kaly z čistíren odpadních vod musí být řízeno tak, aby byly vyloučeny jejich negativní vlivy na zdraví lidí a zvířat, životní prostředí a jeho jednotlivé složky, při nesprávném užívání či odstranění. Pro nakládání s bioodpady jsou zpracovány právní předpisy, které stanoví podrobnosti pro jejich nakládání včetně stanovení jejich kvalitativních parametrů v závislosti na způsobech jejich využívání.

Metodický návod předkládá metody pro hodnocení mikrobiologických kvalitativních parametrů pomocí stanovení indikátorových organismů v určených matricích a hodnocení účinnosti hygienizace biotechnologických, termálních a chemických procesů zpracování bioodpadů a čistírenských kalů.

Metodický návod rozšiřuje a upravuje použití metod uveřejněných v AHEM č. 7/2001 „Stanovení indikátorových mikroorganismů pro mikrobiologická kritéria pro použití kalů na zemědělské půdě ve smyslu vyhlášky č. 382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě.“

Předkládané metody jsou určeny pro stanovení indikátorových organismů v půdě v odvodněných hygienizovaných kales z čistíren odpadních vod, v souladu s vyhláškou č. 382/2001 Sb., o využití upravených kalů na zemědělské půdě v posledním platném znění, pro upravené odpady ve smyslu vyhlášky č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady. Metody lze použít pro stanovení indikátorových organismů pro zjišťování kvalitativních parametrů výstupů z kompostáren a bioplynových stanic podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002 ze 3. října 2002, kterým se stanoví hygienická pravidla týkající se vedlejších živočišných produktů, které nejsou určeny k lidské spotřebě (ve znění Nařízení Komise (ES) č. 208/2006, Annex VI a VIII) a také kvalitativních znaků sedimentů, pomocných půdních látek, substrátů, kompostů a organominerálních a organických hnojiv podle zákona č. 156/1998 Sb., o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech a o agrochemickém zkoušení zemědělských půd (zákon o hnojivech) ve znění pozdějších předpisů.

Dále jsou metody určeny pro hodnocení validace účinnosti hygienizace procesů úpravy bioodpadů pomocí vnesených indikátorových organismů podle vyhlášky č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady a o změně vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady (vyhláška o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady). Návod dále obsahuje metodu hodnocení účinnosti hygienizace metodou vstup-výstup.

Jako indikátory mikrobiologické kontaminace pro účely tohoto metodického návodu se rozumí bakterie rodu *Salmonella spp.* (dále též salmonela), termotolerantní koliformní bakterie, *Escherichia coli* a enterokoky.

Metodický návod má dvě části:

- Detekce jednotlivých indikátorových organismů
- Hodnocení účinnosti hygienizace metodou přímého hodnocení procesu vneseným indikátorovým organismem a metodou kontroly parametrů vstupu a výstupu.

ČÁST 1 - DETEKCE JEDNOTLIVÝCH INDIKÁTOROVÝCH ORGANISMŮ

1 VŠEOBECNÁ USTANOVENÍ

1.1 Úvod

Postup stanovení je určen pro detekci indikátorových organismů v půdě, bioodpadech, upravených bioodpadech, kalech z čistíren odpadních vod, digestátech, substrátech, kompostech, rekultivačních kompostech a digestátech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích, sedimentech a podobných matricích (dále jen určené matrice a matrice).

Postup stanovení je rozdělen na část všeobecnou a část speciální. V první části – pro všeobecná stanovení, jsou popsána ustanovení platná pro všechny sledované indikátorové organismy. V druhé části – speciální jsou popsána ustanovení a podmínky stanovení a detekce specifická pro jednotlivé indikátorové organismy.

1.2 Předmět a vymezení působnosti

Účelem tohoto návodu je poskytnout pokyny pro kvantitativní stanovení počtů kolonie tvořících jednotek (dále jen KTJ) termotolerantních koliformních bakterií, *Escherichia coli* a enterokoků a pro detekci salmonel v určených matricích.

Při analýze je třeba dodržet všeobecná ustanovení pro mikrobiologická zkoušení včetně zásad přepravy a uchování vzorku.

1.3 Normativní a legislativní předpisy

1.3.1 Citované a související normativní předpisy

ČSN ISO 7667: Mikrobiologie. Standardní struktura metod mikrobiologického zkoušení.

ČSN EN ISO 6887-1: Mikrobiologie potravin a krmiv. Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění. Část 1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinasobných ředění.

ČSN EN ISO 6887-1: Oprava 1, Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění – Část 1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinasobných ředění.

ČSN EN ISO 6887-4 (56 0102): Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění – Část 4: Specifické pokyny pro vzorky jiné než mléko a mléčné výrobky, maso a masné výrobky a ryby a rybí výrobky.

ČSN EN ISO 6887-4 (56 0102): Oprava 1, Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění – Část 4: Specifické pokyny pro vzorky jiné než mléko a mléčné výrobky, maso a masné výrobky a ryby a rybí výrobky

ČSN ISO 7218: Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení

ČSN ISO 3696: Jakost vody pro analytické účely. Specifikace a zkušební metody

ČSN ISO 3696 Změna 1 (68 4051): Jakost vody pro analytické účely. Specifikace a zkušební metody

ČSN EN ISO 8199: Jakost vod – Obecný návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami.

ČSN ISO 9998: Jakost vod – Kontrola a hodnocení mikrobiologických kultivačních médií pro stanovení počtu kolonií používaných při zkoušení jakosti vod.

ČSN P ENV ISO 13843: (75 7015): Jakost vod – Pokyny pro validaci mikrobiologických metod.

ČSN P ENV ISO 13843: Oprava 1 (75 7015) Jakost vod – Pokyny pro validaci mikrobiologických metod.

ČSN ISO 5725-1 (01 0251): Přesnost (správnost a shodnost) metod a výsledků měření. Část 1: Obecné zásady a definice.

ČSN ISO 4832: Mikrobiologie – Všeobecné pokyny pro stanovení počtu koliformních bakterií. Technika počítání kolonií.

ČSN 75 7835 (75 7835): Jakost vod – Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*.

ČSN EN ISO 7899-2: Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků, Část 2: Metoda membránových filtrů.

ČSN EN ISO 6579: Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*.

ČSN EN 12176 (75 8010): Charakterizace kalů – Stanovení pH.

ČSN EN 12880 (75 8006): Charakterizace kalů – Stanovení veškerých látek a obsahu vody.

ČSN-ISO 10381-6: Kvalita půdy – Odběr vzorků – Část 6: Pokyny pro odběr, manipulaci a uchovávání půdních vzorků určených pro studium aerobních mikrobiálních procesů v laboratoři.

ČSN EN 14899: Charakterizace odpadů – Vzorkování odpadů – Zásady přípravy programu vzorkování a jeho použití.

ČSN EN 15002 (83 8003): Charakterizace odpadů – Příprava zkušebních podílů z laboratorního vzorku.

ČSN 01 8003: Zásady pro bezpečnou práci v chemických laboratořích.

ČSN 01 8003: Oprava 1 – Zásady pro bezpečnou práci v chemických laboratořích.

ČSN 01 8003: Oprava 2 – Zásady pro bezpečnou práci v chemických laboratořích.

1.3.2 Citované a související legislativní předpisy

Zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech v posledním platném znění

Vyhláška č. 382/2001 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě v posledním platném znění

Vyhláška č. 341/2008 Sb. o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady a o změně vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady (vyhláška o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady) v posledním platném znění

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002 ze 3. října 2002, kterým se stanoví hygienická pravidla týkající se vedlejších živočišných produktů, které nejsou určeny k lidské spotřebě (ve znění Nařízení Komise (ES) č. 208/2006, Annex VI a VIII)

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 809/2003 ze dne 12. května 2003 o přechodných opatřeních podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002 týkajících se norem zpracování materiálu kategorie 3 a hnoje používaného v zařízeních na kompostování

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 810/2003 ze dne 12. května 2003 o přechodných opatřeních podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002 týkajících se norem zpracování materiálu kategorie 3 a hnoje používaného v zařízeních na výrobu bioplynu

Vyhláška MZe č. 273/1998 Sb., ze dne 12. listopadu 1998 o odběrech a chemických rozbořech vzorků hnojiv ve znění pozdějších předpisů

Zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech a o agrochemickém zkoušení zemědělských půd (zákon o hnojivech) ve znění pozdějších předpisů

Vyhláška č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady

Metodický návod o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady podle stávajících předpisů, MŽP ČR, 2008

Metodický pokyn MŽP ke vzorkování odpadů z roku 2008

(http://ceho.vuv.cz/CeHO/CeHO/Analytika_odpadu/Analytika_MP_vzorkovani_2008.pdf)

1.4 Odběr vzorku a nakládání s ním v laboratoři

1.4.1 Odběr, přeprava a uchovávání vzorku

Vzorky určené matrice se odeberou v souladu s platnou legislativou a plánu vzorkování. Vzorky se uchovávají a přepravují podle ČSN-ISO 10381-6 Kvalita půdy – Odběr vzorků – část 6 volně uzavřené ve sterilních vzorkovnicích v chladicích boxech tak, aby nemohlo dojít k druhotné kontaminaci. Laboratorní vzorek musí mít hmotnost 500 g.

1.4.2 Úpravy vzorku v laboratoři a příprava výchozích suspenzí

Vzorky určených matric musí být zpracovány co nejdříve po odběru v souladu s platnou legislativou. U vzorků stabilních matric (např. komposty, stabilizované kaly z ČOV apod.) je možné tuto dobu prodloužit (není-li legislativou předepsáno jinak) na dobu ne delší než 7 dnů po odběru. Po celou dobu ale musí být vzorek uchováván v lednici při teplotě $5\pm 3^{\circ}\text{C}$. Vzorek se homogenizuje podle typu matrice (ČSN ISO 7218: Všeobecné pokyny pro mikrobiologické zkoušení).

Analyzovaný vzorek, u kterého se předpokládá vyšší sušina (např. vyšší než 10%, sušené pelety, komposty), se musí přesít přes síto, aby byly odstraněny větší kusy a použije se frakce s malými kousky. V případě, že pelety tvoří velké celky, je třeba je podrtit na malé.

U vzorků zemin a písků se k dosažení homogenity vzorku povede prosátí přes kovové síto o velikosti otvorů 2–5 mm (podle konzistence matrice). Prosévání je nutno provádět ručně ve sterilních rukavicích ve vymezeném prostoru. Síto se po každém vzorku důkladně umyje, usuší a vydezinfikuje lihem a po řádném uschnutí může znovu použít.

Navážka vzorku se smíchá s určeným množstvím ředícího roztoku (v závislosti na použité metodě stanovení indikátorového organismu) a homogenizuje se. Pokud není uvedeno jinak,

v případě, že se použije pro homogenizaci stomacher, provádí se homogenizace 30 impulzy za minutu po dobu 2 minut. V případě použití přístroje Pulsifier® se homogenizuje po dobu 30 s.

Jestliže vzorek matrice obsahuje ostré předměty, například z kompostu, neměl by být vzorek ve výchozí suspenzi homogenizován na stomacheru, ale jinou alternativní metodou např. přístrojem typu Pulsifier®. V případě, že alternativní metoda není dostupná a musí se použít stomacher, provádí se homogenizace s frekvencí 30 impulzů celkem 1 minutu.

1.4.2.1 Specifická příprava výchozí suspenze pro specificky upravené matrice

V případě, že matrice je podrobena hygienizaci chemickou úpravou (např. vápnem), je třeba zajistit, aby pH při naředění roztoku pro výchozí suspenzi nekleslo pod hodnotu $4,5 \pm 0,2$ a nebylo vyšší než $pH = 7,0 \pm 0,2$. Úprava se provádí kyselinou chlorovodíkovou (1 mol/l) nebo roztokem hydroxidu sodného (1 mol/l).

1.5 Kultivační půdy a činidla

K zachování standardnosti výsledků, při přípravě kultivačních médií se zásadně užívají buď složky standardní jakosti a chemikálie s označením pro analýzu, dehydratovaná kompletní kultivační média nebo již hotová kultivační media na miskách.

Při přípravě kompletních kultivačních médií je třeba se řídit pokyny výrobce. Pokud nejsou kultivační média ihned použita, uchovávají se při teplotě $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ v temnu nejdéle 1 měsíc, za podmínek, které zabrání změnám jejich složení nebo jiného znehodnocení. Užívá se pouze destilovaná voda nebo voda s ekvivalentní čistotou.

Složení a užití jednotlivých médií je v kapitolách stanovení jednotlivých indikátorů mikrobiální kontaminace určených matric.

1.6 Postup zkoušky

Schéma postupu a podmínky stanovení jsou uvedeny v příslušných kapitolách pro metoda stanovení jednotlivých indikátorových organismů.

1.7 Vyjadřování výsledků

1.7.1. Vyjádření výsledků pro kvantitativní stanovení

Pro stanovení termotolerantních koliformních bakterií, *Escherichia coli* a enterokoků platí následující pravidla pro výpočet konečného výsledku. Pro všechny metody se předpokládá očkování 0,2 ml výchozí suspenze nebo neředěné matrice. Navážka se předpokládá 10 g.

1.7.1.1. Obecný případ pro nález 15 až 300 kolonií

Počet N (KTJ) termotolerantních koliformních bakterií (*E. coli* nebo enterokoků) na gram vzorku se vypočte podle následujících rovnic:

$$N = \frac{\Sigma a}{(n_1 + 0,1 n_2) d \times V} \quad (1)$$

kde:

Σa je součet kolonií spočítaných po identifikaci na všech vybraných plotnách

n_1 počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění

n_2 počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění

d první pro výpočet použité ředění

N počet kolonií v 1 g vzorku

V objem očkovaného vzorku (předpoklad 0,2 ml)

Výsledek se zaokrouhlí tak, aby obsahoval pouze dvě číslice různé od nuly.

Výsledek se vyjádří jako počet KTJ mikroorganismů na gram vzorku a to jako číslo 1,0 až 9,9 násobené 10^x , kde x je příslušná mocnina 10.

V případě, že je předepsáno právním předpisem, přepočte se výsledek na sušinu.

$$N_{suš} = \frac{N}{\text{suchá hmotnost (\%)}} \times 100 \quad (2)$$

kde:

N je počet kolonií v KTJ na gram vzorku

$N_{suš}$ je počet kolonií v KTJ přepočtený na gram sušiny vzorku

PŘÍKLAD

Přímý odečet mikroorganismů poskytl tyto výsledky:

- z prvního ředění použitého pro výpočet (10^{-2}): 168 a 215 kolonií
- z druhého ředění použitého pro výpočet (10^{-3}): 14 a 25 kolonií

Tyto počty kolonií byly potvrzeny např. dle 2.1.4:

- z plotny se 168 koloniemi: 5 kolonií, z nichž 4 vyhověly stanoveným kritériím, takže $a = 168$
- z plotny s 215 koloniemi: 5 kolonií, z nichž 3 vyhověly stanoveným kritériím, takže $a = 129$
- z plotny se 14 koloniemi: 5 kolonií, z nichž 4 vyhověly stanoveným kritériím, takže $a = 14$
- z plotny s 25 koloniemi: všech 5 kolonií bylo potvrzeno jako hledané mikroorganismy.

Proto

$$N = \frac{\Sigma a}{(n_1 + 0,1 n_2) d} = \frac{168 + 129 + 14 + 25}{(2 + 0,2) \times 10^{-2} \times 0,2} = \frac{366}{4,4 \times 10^{-3}} = 76\,364$$

Po zaokrouhlení výše uvedeným způsobem je výsledek $7,6 \times 10^3$ KTJ termotolerantních koliformních bakterií (enterokoků nebo *E. coli*) na g vzorku.

1.7.1.2 Odhad nízkých počtů

Jestliže dvě misky očkované neředěným vzorkem nebo výchozí suspenzí obsahují méně než 15 kolonií, vypočte se jejich aritmetický průměr m . Konfidenční meze pro odhad nízkých počtů kolonií pro 95% pravděpodobnost je v tabulce 1 (ISO 7218 Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné pokyny pro mikrobiologické zkoušení...).

Výsledek se vyjádří následovně:

$N = m$ pro neředěné matrice;

$N = m/d$ pro ostatní matrice, kde d je faktor ředění výchozí suspenze (10^{-1} , 10^{-2} atd.);

$N_{suš}$ se spočítá podle kapitoly 1.7.1.1, rovnice (2).

1.7.1.3 Nezjištěny žádné charakteristické kolonie

Jestliže dvě misky očkované neředěným vzorkem nebo jeho výchozí suspenzí neobsahují žádné kolonie, výsledek se vyjádří takto:

$N < 5$ pro neředěné matrice;

$N < 5/d$ pro ostatní matrice, kde d je faktor ředění výchozí suspenze (10^{-1} , 10^{-2} atd.).

1.7.1.4 Vzájemná shoda výsledků

Ze statistických důvodů kolísají konfidenční meze při technice počítání kolonií od $\pm 16\%$ do $\pm 52\%$. Při počtu kolonií na plotně nižším než 15 udává konfidenční meze tabulka v ISO 7218 Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné pokyny pro mikrobiologické zkoušení (tab. 1).

V praxi mohou být zjištěny i větší odchylky, zejména mezi výsledky získanými různými pracovníky.

1.7.1.5 Stanovení sušiny matrice

Sušina se stanoví metodou podle ČSN EN 12880 (75 8006): Charakterizace kalů - Stanovení veškerých látek a obsahu vody.

Tabulka č. 1: Konfidenční meze pro odhad nízkých počtů kolonií pro 95% pravděpodobnost

Počet mikroorganismů	Konfidenční meze	
	Dolní mez	Horní mez
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

1.7.1.6 Vyjádření výsledků pro kvalitativní stanovení

V souladu s výsledky se uvede přítomnost nebo nepřítomnost bakterií rodu *Salmonella spp.* ve zkušebním vzorku o hmotnosti 50 g matrice jako negativní nebo pozitivní nález.

1.8 Protokol o zkoušce

V protokolu o zkoušce musí být specifikovaná užitá metoda zkoušení a získané výsledky. Rovněž zde musí být uvedeny všechny okolnosti či podmínky pracovního postupu, které nejsou touto metodou specifikovány, nebo které jsou považovány za volitelné, a dále všechny podrobnosti o událostech, které mohly mít vliv na výsledky zkoušení.

Protokol o zkoušce musí obsahovat všechny informace nezbytné pro úplnou identifikaci vzorku.

1.9 Bezpečnost

Je třeba dodržovat pravidla a předpisy pro práci v mikrobiologické laboratoři ČSN ISO 8199, bod 4 a ČSN 018003 Zásady pro bezpečnou práci v chemických laboratořích. Většina určených matric obsahuje patogenní a podmíněně patogenní organismy v počtech, které mohou při nesprávné manipulaci vyvolat onemocnění.

Při práci s určenými matricemi, zvláště s čistírenskými kaly a digestáty, je nutné nosit ochranné rukavice a pomůcky. Vzhledem k tomu, že mohou obsahovat zbytky bioplynu, je třeba zabránit vzplanutí, ke kterému by mohlo dojít při neopatrné manipulaci v blízkosti ohně.

Při transportu vzorků určených matric je třeba dodržovat jak mezinárodní, tak vnitrostátní předpisy pro přepravu matric s nebezpečnými vlastnostmi.

Z hlediska zdraví laboratorních pracovníků, vzhledem k povaze matrice, je nezbytné, aby se zkoušky ke stanovení výše vedených indikátorů prováděly výhradně v laboratořích k tomu účelu vhodně vybavených, řízených zkušeným mikrobiologem a za podmínky, že s veškerými inkubovanými materiály se nakládá s velkou opatrností.

Při práci je zakázáno pít, jíst a kouřit.

Více v poznámkách „Pozor“ u vlastních metodik.

1.10 Zajištění systému QA-QC

Kontrola kvality stanovení je realizována následnými kroky.

1.10.1 Vnitřní kontrola

Musí být zajišťována:

- kontrolou sterility živných médií
- kontrolou kvality kultivačních médií
- kontrolou čistoty ovzduší
- kontrolou sterility skla
- ke zjištění přesnosti výsledků prováděním duplicitních vyšetření téhož vzorku
- kontrolním stanovením s referenčním materiálem.

1.10.2 Vnější kontrola

Je realizována účastí v mezilaboratorních porovnávacích testech, pokud se organizují. V případě, že se neorganizují, je možné provádět kontrolní stanovení s jinou laboratoří.

1.11 Odstranění odpadů

Prování se v souladu s provozním řádem odstranění odpadů v laboratoři, který je v souladu se zákonem č. 185/2001 Sb., o odpadech v platném znění.

2 METODY STANOVENÍ INDIKÁTOROVÝCH ORGANISMŮ

2.1. Stanovení termotolerantních koliformních bakterií

2.1.1 Termíny a definice

Pro účely tohoto metodického pokynu platí definice:

Termotolerantní koliformní bakterie: gramnegativní tyčinky netvořící spory z čeledi *Enterobacteriaceae*, s negativním cytochromoxidázovým testem, které tvoří za aerobních

podmínek kolonie během 24 hodin kultivace při teplotě $43\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$ na selektivním diferenciacním médiu s laktózou za současné tvorby kyselin (případně aldehydu) a plynu.

Na selektivním půdě dané tímto postupem rostou jako modré kolonie.

Escherichia coli (*E. coli*) je termotolerantní koliformní bakterie hydrolyzující v médiu přítomný 4-metyl – umbelliferyl- β -D-glukuronid (MUG) na 4-metyl-umbelliferon, vykazující v dlouhovlnném UV záření světlem modrou fluorescenci. Většina druhů *E. coli* je schopna produkovat indol z tryptofanu a je pozitivní na β -glukuronidázu.

2.1.2. Podstata zkoušky

Stanovení je založeno na zachycení uvedených mikroorganismů ze zkoušeného podílu vzorku na povrchu selektivní pevné půdy obsahující laktózu. Určený objem výchozí suspenze se očkuje na povrch předsušeného pevnou kultivační půdu. Jako kultivační půda se používá pro tento postup mFC agar. Kultivace se provádí při $43\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$, 18–24 hod. Jako termotolerantní koliformní bakterie se hodnotí modré kolonie.

Stupeň ředění je třeba volit tak, aby výsledný počet kolonií na jedné plotně byl 15 až 150 KTJ (kolonie tvořící jednotku). Za stejných podmínek se desetinásobným ředěním výchozí suspenze inokulují další dvojice ploten. Pro každé ředění se očkují dvě plotny.

Z počtu typických kolonií pro termotolerantní koliformní bakterie se získá počet KTJ v 1 gramu vzorku. Výsledky se vyjádří podle požadavku legislativy buď v KTJ/g nebo přepočtené na sušinu vzorku KTJ/g suš.

E. coli

Jako *E. coli* se hodnotí modré kolonie, které jsou dourčeny konfirmačními testy pro *E. coli*, počet se vyjádří v KTJ/g vzorku nebo sušiny vzorku.

2.1.3. Zjišťování přítomnosti suspektních kolonií

Jako termotolerantní koliformní bakterie počítáme všechny laktóza-pozitivní kolonie, tj. ty, které vykazují modré zbarvení.

2.1.4. Konfirmace

Termotolerantní koliformní bakterie

Konfirmace se provádí v případě, že vyrostlé kolonie jsou ovlivněny nárůstem doprovodných bakterií a nevykazují typické modré zbarvení a nárůst, nebo pracovník provádějící analýzu, považuje doplnění konfirmačních testů za nutné. Vybrané kolonie (alespoň 5) pro konfirmaci se přeočkují na živný agar (nebo jiný vhodný agar bez inhibičních přísad) a po 24 hodinové kultivaci se provede test na negativní přítomnost oxidázy.

E. coli

Konfirmaci *E. coli* provedeme dále uvedenými testy. Většina druhů *E. coli* je schopna produkovat indol z tryptofanu a je pozitivní na β -glukuronidázu.

Konfirmace může být provedena komerčně vyráběnými testy např. API, COLI test, Enterotest apod.

2.1.5 Kultivační půdy a činidla

2.1.5.1 mFC agar

Složení

tryptóza nebo biosate	10,0 g
proteóza-pepton č. 3 nebo polypepton	5,0 g
kvasničný extrakt	3,0 g
chlorid sodný (NaCl)	5,0 g

laktóza	12,5 g
žlučové sole č. 3 nebo směs žlučových solí	1,5 g
anilínová modř	0,1 g
alkalický roztok kyseliny rosolové	10 ml
agar	12,0–15,0 g*
voda	do 1000 ml

*podle ztužovací schopnosti agaru

Příprava

Předepsané složky se postupně rozpustí v 1000 ml destilované vody, která již obsahuje 10 ml alkalického roztoku kyseliny rosolové. Potom se médium zahřeje těsně pod bod varu a ihned se ochladí na teplotu 45 °C – 55 °C. Nesterilizuje se. Nakonec se upraví hodnota pH na 7,4 ± 0,2.

Připravené médium se skladuje nejdéle 2 týdny při teplotě 4 °C – 8 °C tak, aby nedocházelo k jeho vysychání.

Doporučuje se používat komerčně dostupné dehydratované médium.

Alkalický roztok kyseliny rosolové

roztok hydroxidu sodného (NaOH) o koncentraci 0,2 mol/litr	100 ml
kyselina rosolová	1,0 g

Příprava

Po dokonalém rozpuštění kyseliny rosolové v roztoku hydroxidu sodného se roztok přefiltruje. Skladuje se ve tmě při teplotě 2 °C – 10 °C nejdéle 2 týdny. Pokud se změní barva roztoku z tmavě červené na hnědou, nelze jej použít. Nesterilizuje se, kyselina rosolová se při vyšších teplotách rozkládá.

2.1.5.2 Živný agar

Složení

masový extrakt	1,0 g
pepton	1,0 g
chlorid sodný (NaCl)	5,0 g
agar	15,0 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml
pH	7,2–7,4

Příprava

Jednotlivé složky se postupně přidávají do vody. Zahřívají se tak dlouho, dokud se zcela nerozpustí. Hodnota pH se upraví roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol.l⁻¹ přibližně na 7,2 až 7,4. Pak se kultivační prostředí povaří 10 minut, zfiltruje a znovu se upraví pH tak, aby bylo v rozmezí 7,2 až 7,4. Sterilizuje se v autoklávu při 121 ± 3 °C po dobu 15 minut.

2.1.5.3 Fosfátový ředící roztok (pufr)

Složení

Fosfátový ředící roztok

dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	34,0 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml
pH	7,2 ± 0,5

Roztok chloridu hořečnatého

chlorid hořečnatý	38 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml

Příprava fosfátového roztoku

V 500 ml destilované vody se rozpustí dihydrogenfosforečnan draselný. Pak se upraví 1 ml roztoku hydroxidu sodného pH na $7,2 \pm 0,5$. Nakonec se roztok doplní na 1000 ml.

Příprava roztoku chloridu hořečnatého

V 1000 ml se rozpustí chlorid hořečnatý.

Příprava fosfátového ředícího roztoku (pufry)

Do 1000 ml destilované vody se přidá 1,25 ml fosfátového roztoku a 5,0 ml roztoku chloridu hořečnatého.

Před použitím se roztok plní do skleněných nádob o objemu 250–500 ml a sterilizuje se v autoklávu při 121 ± 3 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí se plní po 90 ml do sterilních reagenčních lahvíček. Při plnění je potřeba zachovat aseptické podmínky práce.

2.1.5.4 Ringerův roztok – čtvrtinová koncentrace

Složení

chlorid sodný (NaCl)	2,25 g
chlorid draselný (KCl)	0,105 g
chlorid vápenatý bezvodý (CaCl ₂)	0,12 g
hydrogenohličitan sodný (NaHCO ₃)	0,05 g
voda	do 1000 ml

Příprava

Jednotlivé složky se rozpustí ve vodě a roztok se doplní vodou na 1000 ml. Sterilizuje se v autoklávu při 121 ± 3 °C po dobu 15 minut.

2.1.5.5 Oxidázový test – činidlo k průkazu oxidázy

Složení

N,N,N',N'-tetramethyl-p-fenylen-diamin dihydrochlorid	1,0 g
voda	1000 ml

Příprava

Látka se rozpustí v chladné vodě. Reagens se připravuje těsně před použitím.

Lze použít komerčně vyráběné testy a postupovat dle návodu výrobce.

2.1.5.6 MUG roztok

Složení

MUG* (4-methyl-umbelliferyl b-D-glucuronide)	100,0 mg
N-N-dimethylformamid	2 ml

Příprava

Roztok se připraví rozpuštěním MUG v N-N-dimethylformamidu.

POZOR - N-N-dimethylformamid je toxický a karcinogenní. Je škodlivý jak při inhalaci, tak při kontaktu s kůží a požití. Při práci použijte ochranný štít.

2.1.5.7 Kovacsovo činidlo

Složení

4-di-methylamino benzaldehyd (C ₉ H ₁₁ NO)	5,0 g
Isoamyl alcohol (C ₅ H ₁₂ O)	75,0 ml
Kyselina chlorovodíková (ρ = 1,18 g/ml)	25,0 ml

Příprava

4-dimethylamino benzaldehyd se rozpustí v isoamyl alkoholu a zahřeje se na vodní lázni na 60 °C po dobu 5 minut. Po té se pomalu přidá kyselina chlorovodíková. Činidlo se použije nejdříve po 6 až 7 hodinách (indikuje žlutá barva). Uchovává se v lednici a ve tmě.

POZOR - Kovacsovo činidlo je toxické po požití, dráždí dýchací ústrojí a kůži. Doporučuje se s ním pracovat ve flow boxu.

2.1.6 Přístroje a pomůcky

2.1.6.1 Přístroj ke sterilizaci horkým vzduchem (sušárna) mající schopnost udržet teplotu na 160 °C až 180 °C ± (-1 až +5 °C)

2.1.6.2 Skříň k sušení nebo sušárna s nuceným oběhem vzduchu a s teplotou udržovanou v rozmezí 36 °C ± 2 °C až 55 °C ± 1 °C

2.1.6.3 Inkubátor s teplotou udržovanou na 36 °C ± 2 °C

2.1.6.4 Inkubátor s teplotou udržovanou na 44 °C ± 1 °C

2.1.6.5 Přístroj k měření pH s přesností na ± 0,1 jednotky pH při 25 °C

2.1.6.6 Kultivační baňky nebo lahve

2.1.6.7 Zkumavky

2.1.6.8 Odměrné válce

2.1.6.9 Dělené pipety jmenovitého objemu 10 ml s dělením a jmenovitého objemu 1 ml s dělením po 0,1 ml.

2.1.6.10 Petriho misky malé (o průměru 90–100 mm)

2.1.6.11 Kochův hrnec na rozehřátí kultivačních médií

2.1.6.12 Očkovací kličky ze slitiny platiny a iridia nebo ze slitiny niklu a chrómu s očkem o průměru asi 3 mm nebo jednorázové umělohmotné

2.1.6.13 Homogenizátor typu Stomacher, Vortex, Pulsifier

2.1.6.14 Autokláv 121 ± (-1 až +3 °C)

2.1.6.15 Drigalskiho klička

2.1.6.16 Laboratorní lžičky

2.1.6.17 UV lampa – 366 nm

2.1.6.18 Analytické váhy

2.1.6.19 Lednice

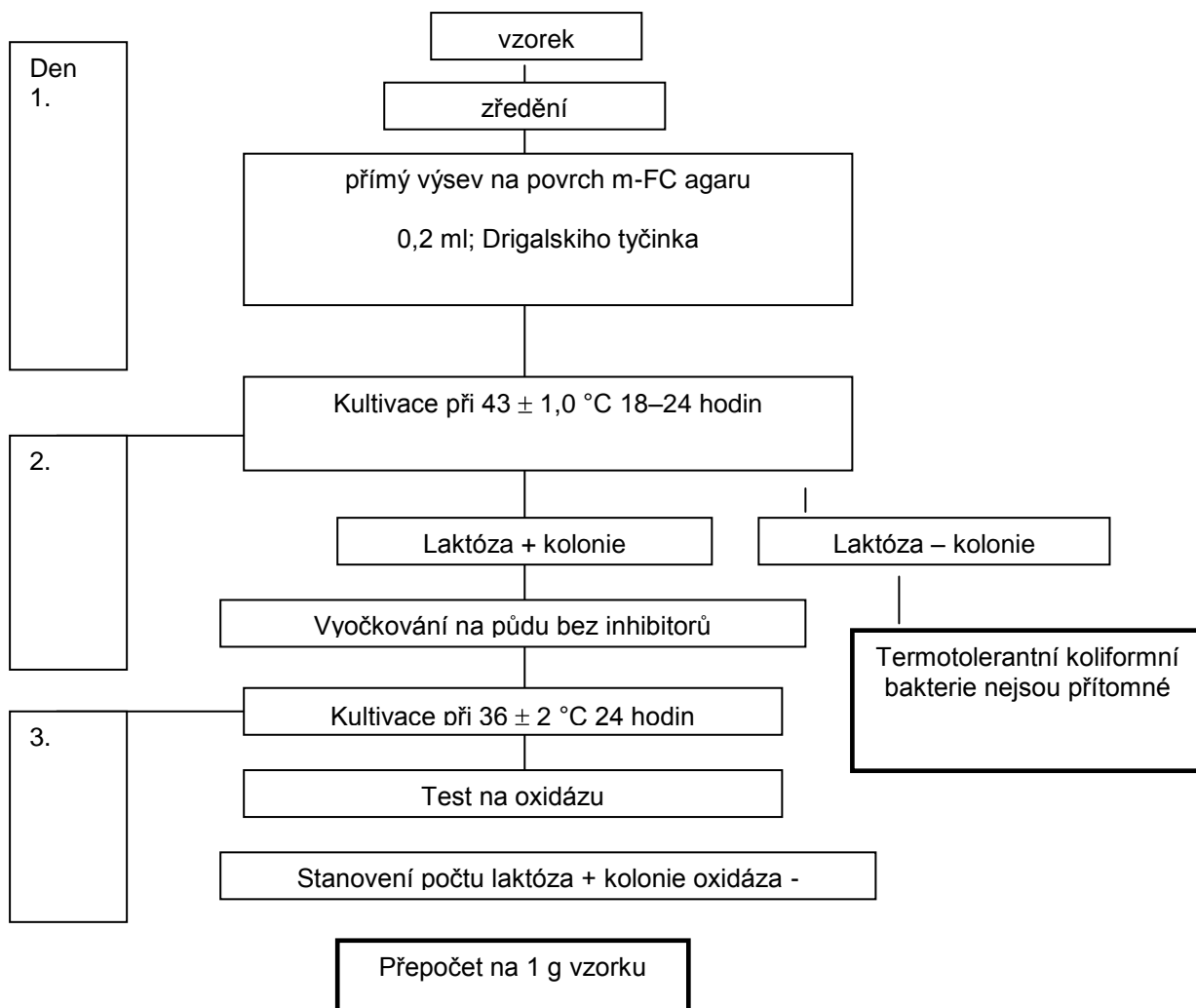
2.1.6. 20 Hazard flow box

POZNÁMKA - Pomůcky pro jedno použití, pokud mají vhodnou specifikaci, jsou přijatelnou náhradou skleněných pomůcek.

POZNÁMKA - Lze používat baňky nebo lahve opatřené šroubovacím uzávěrem z netoxického kovu nebo plastu.

2.1.7 Postup zkoušky

Schéma stanovení termotolerantních koliformních bakterií metodou přímého výsevu na povrchu kultivačního média „m-FC agar“



2.1.7.1 Zkušební vzorek a výchozí suspenze

Výchozí suspenzi připravíme tak, že k 10 g upravené určené matrice (1.4) přidáme 90 ml sterilního zředovacího roztoku (2.1.5.3, nebo 2.1.5.4) a homogenizujeme. Doba homogenizace je daná analyzovanou matricí (1.4). Necháme 5 min. ustát. Z výchozí suspenze se připraví série desetinásobného ředění.

2.1.7.2 Inokulace, inkubace

Pipetujeme paralelně na dvě Petriho misky s m-FC agarem (2.1.5.1.) 2 x 0,2 ml základního a prvního dekadického ředění, ev. dalších vždy dvou po sobě jdoucích dekadických ředění vzorku určené matrice (postup dle ČSN ISO 6887-1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinásobných ředění). Rozetřeme sterilní skleněnou tyčinkou a po zaschnutí při teplotě laboratoře umístíme dnem vzhůru v termostatu s teplotou 43 ± 1 °C na 18–24 hod.

2.1.7.3 Vyhodnocení

Po předepsané době inkubace se spočítají všechny charakteristické kolonie (sytě modré) na plotnách obsahujících méně než 150 typických kolonií o průměru 0,5 mm nebo větším.

V případě konfirmace se náhodně vybere 5 kolonií pro konfirmaci. V případě, že vyroste méně než 10 kolonií, berou se pro konfirmace všechny kolonie. V případě, že více než polovina povrchu plotny je přerostlá, nebere se k vyhodnocení. Je-li přerostlá méně jak polovina povrchu, spočítají se kolonie ve druhé části a extrapoluje se tak, aby počet odpovídal celému povrchu plotny.

2.1.7.4 Konfirmace

Výběr kolonií pro konfirmaci

Pro konfirmaci se z každé plotny vybere nejméně po pěti koloniích pro subkultivaci

Subkultivace

Typické kolonie z reprezentačního vzorku se přeočkují na povrch živného agaru (viz 2.1.5.2). Naočkované misky se inkubují při teplotě $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ po dobu 18 až 24 hodin a z každé z inkubovaných ploten se vybere dobře izolovaná kolonie pro konfirmaci.

Konfirmace termotolerantních koliformních bakterií

Oxidázová reakce

S použitím platino-iridiové kličky nebo drátu nebo skleněné tyčinky se odebere část každé dobře izolované kolonie a načárkuje se na filtrační papír zvlhčený oxidázovým reagens (2.1.5.5) nebo na komerčně dostupný disk. Nikl-chromová klička nebo drát se nepoužívá. Negativní reakce potvrzuje příslušnost k termotolerantním koliformním bakteriím.

Konfirmace *E. coli*

Následná kultivace pro identifikaci *E. coli* na půdě nasycené 4-metyl –umbelliferyl- β -D-glukuronidem (MUG). Pozitivní výsledek, vykazuje v dlouhovlnném UV záření světle modrou fluorescenci.

Konfirmace *E. coli* může být také provedena komerčně vyráběnými testy např. API, COLI test, Enterotest apod.

2.1.8 Vyjádření výsledků

Obecný popis způsobu vyjadřování výsledků a stanovení počtu bakterií ve vzorku viz ISO 8199 a kap.1.7 tohoto předpisu. Výsledek se uvede na 1 g vzorku vztaženo na suchou hmotnost (1.7.1.1).

2.1.8.1 Obecný případ – (pro použití konfirmace)

Jestliže alespoň 80 % z vybraných typických kolonií je oxidáza negativních je počet termotolerantních koliformních bakterií týž, jako byl spočítán v odst. 2.1.7.3.

Ve všech ostatních případech se množství bakterií vypočítá z procentuálního podílu oxidáza negativních z celkového počtu kolonií vybraných podle 2.1.7.3. "

2.1.9 Zabezpečování jakosti

Zabezpečování jakosti se provádí naplněním bodů v kapitole 1.10 tohoto metodického návodu.

Pro kontrolu způsobilosti laboratoře prokazovat termotolerantní koliformní bakterie touto metodou a s užitím půd popsaných v této metodě se jako referenční materiál používají následující doporučené kmeny.

Pozitivní růst :

Escherichia coli CCM 3954 – Česká sbírka mikroorganismů PřF MU Brno,

Escherichia coli ATCC 8739, Francie.

Negativní růst:

Enterobacter faecalis CCM 4224.

2.1.10 Charakteristiky metody

Při ověřování metody v laboratořích SZÚ a mezilaboratorních ověřovacích zkouškách (MOZ) byly zjištěny následující výsledky při podmínkách daných uvedeným postupem.

Vzorky kontaminované pomocí RM

Pro stanovované počty >750 KTJ na 1 g kalu (>1 až 15 KTJ na miskách) byla shoda výsledků stanovení u 80 % laboratoří

pro stanovované počty >750 KTJ na 1 g kalu (>1 až 15 KTJ na miskách) byla shoda výsledků stanovení u 85 % výsledků stanovených v 1 laboratoři

z 33 výsledků analýz termotolerantních koliformních bakterií provedených během MOZ byl 1 falešně pozitivní výsledek

z 67 analýz provedených jednou laboratoří byl jeden falešně pozitivní výsledek

speciální studie opakovatelnosti v jedné laboratoři se dvěma laborantkami pro 15000 KTJ v 10 g kalu (>15 KTJ na miskách, 1500 KTJ v 1 g kalu) poskytla jako míru opakovatelnosti (vyjádřenou směrodatnou odchylkou přirozených logaritmů původních hodnot) hodnotu 0,456 nebo vyjádřenou jako $\exp(0,456) = 1,6$.

Vzorky přirozeně kontaminované

Ověření bylo provedeno 15 laboratořemi pro dva různé kaly. Míra reprodukovatelnosti metody (vyjádřená směrodatnou odchylkou přirozených logaritmů původních hodnot) poskytla hodnotu 1,22 nebo vyjádřenou jako $\exp(1,22) = 3,4$.

2.1.11 Zkratky a symboly

E. coli - *Escherichia coli*

MUG - 4-methylumbelliferyl-b-D-glucuronide

KTJ - kolonie tvořící jednotka

MOZ - mezilaboratorní ověřovací zkouška

2.2. Stanovení enterokoků

2.2.1 Termíny a definice

Pro účely tohoto metodického pokynu platí definice:

Enterokoky: bakterie, které mají schopnost redukovat 2,3,5-trifenylnitrotetrazoliumchlorid na formazan a hydrolyzovat eskulin při teplotě 44 ± 1 °C na médiích specifikovaných tímto postupem. Jsou grampozitivní, kataláza – negativní, kokoidního až vejčitého tvaru, většinou tvoří páry nebo řetězky a mají antigen D podle Lancefieldové. Od ostatních grampozitivních, kataláza - negativních koků se liší pozitivním růstem na selektivní půdě se žlučovými solemi, azidem sodným a 6,5% chloridem sodným, redukuje 2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid (TTC) to na formazan a tvoří pyroglutamateaminopeptidázu (PYR reakce).

2.2.2 Podstata zkoušky

Určený objem výchozí suspenze se očkuje na povrch předsušeného pevného kultivačního média, který obsahuje azid sodný (k potlačení růstu G-bakterií) a 2,3,5-trifenylnitrotetrazolium chlorid (který je redukován na červený formazan, způsobující charakteristické zbarvení kolonií). Vyrostlé kolonie jsou dále podrobeny konfirmačním testům (růst na žluč-eskulin azidovém agaru, katalátový test, popř. pyr-test). Stanoví se počet KTJ/g sušiny nebo KTJ/g vzorku.

2.2.3 Zjišťování přítomnosti suspektních kolonií

Po inkubaci se počítají jako presumptivní enterokoky všechny vyrostlé kolonie, které jsou kaštanově, červenohnědě, červeně či růžově zbarvené.

Stupeň ředění je třeba volit tak, aby výsledný počet kolonií na jedné plotně byl 15 až 150 KTJ (kolonie tvořící jednotku). Za stejných podmínek se desetinásobným ředěním výchozí suspenze inokulují další dvojice ploten. Pro každé ředění se očkují dvě plotny.

2.2.4 Konfirmace

Selektivita používané kultivační půdy není absolutní. Na m-enterokokovém agaru mohou růst též streptokoky, které nepatří do skupiny D, dále mikrokoky, někdy i sporující mikroby. Proto je nutné provést konfirmační testy.

Vybrané kolonie (alespoň 5) pro konfirmaci se přeočkují na konfirmační kultivační médium žluč-eskulin-azidový agar a plotny se inkubují při 44 °C po dobu 4 až 24 hodin. Enterokoky rostou na tomto kultivačním médiu a hydrolyzují aeskulin. Konečný produkt hydrolyzy je 6, 7-dihydroxikumarin, který v kombinaci s Fe^{3+} ionty dává tříslově hnědou až černou sloučeninu, která difunduje do kultivačního média.

Další vybrané kolonie (alespoň 5) pro konfirmaci se přeočkují na živný agar a po 24 hodinové kultivaci se pro potvrzení může provést test na pyrrolidonylpeptidázovou aktivitu, která je charakteristická pro všechny druhy enterokoků. Lze použít komerčně dostupné testy (např. PYRA TEST)

Provede se test na katalázu s 3% peroxidem vodíku..

Z počtu potvrzených typických kolonií pro enterokoky se získá počet KTJ v 1 gramu vzorku.

2.2.5 Kultivační půdy a činidla

POZOR - Všechna selektivní kultivační média popsaná v této části normy obsahují azid sodný. Protože tato látka je vysoce toxická a mutagenní, musí být dodržována opatření, aby se zabránilo kontaktu s ní, především inhalací jemného aerosolu během přípravy z komerčně vyráběných dehydratovaných kompletních kultivačních médií. Kultivační média obsahující azid sodný nesmí být směřována se silnými anorganickými kyselinami, neboť může být produkován silně toxický azid vodíku (HN_3). Roztoky obsahující azid sodný mohou také tvořit explozivní sloučeniny ve styku s kovovým potrubím, například ve výlevce. Azid může být bezpečně rozložen přísadkou nasyceného roztoku dusitanu.

2.2.5.1 M – enterokokový agar (Slanetz – Bartley)

viz ČSN ISO 7899-2 Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků, Část 2: Metoda membránových filtrů: 1984 nebo komerčně vyráběná půda o stejném složení.

Základní médium

Složení

Tryptóza	20,0 g
kvasniční extrakt	5,0 g
Glukóza	2,0 g
hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)	4,0 g
azid sodný (NaN_3)	0,4 g
Agar	8,0 g až 18,0 g*
Voda	do 1000 ml

*závisí na viskozitě agaru

Příprava

Uvedené reagentie se doplní do 1 l destilovanou vodou a zahřeje se vše k varu. Po té se ochladí na 50 °C a rozlije do Petriho misek. Půda má barvu slámy. V případě, že se objeví růžový nádech, došlo k přehřátí a půdu nelze použít. Po vychladnutí se Petriho misky uloží do lednice. Půda se **nesmí autoklávovat!**

pH se upraví na $7,2 \pm 0,2$.

TTC

Složení

2,3,5-trifenyltetrazoliumchlorid	1,0 g
Voda	do 100 ml

Příprava

Indikátor se rozpustí za stálého míchání ve vodě. Sterilizuje se membránovou filtrací (0,2 µm) Rostok je nutno chránit před světlem a vylít, pokud má růžové zbarvení.

Kompletní médium

Složení

Základní médium	1 000 ml
Roztok TTC	10 ml

Příprava

Roztok TTC se přidá k ochlazenému základnímu médiu 50–60 °C.

Misky s médiem lze uchovávat nejdéle 2 týdny ve tmě, při teplotě $5 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

2.2.5.2 Žluč-azidový agar

viz ČSN ISO 7899-2 Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků, Část 2: Metoda membránových filtrů: 1984 nebo komerčně vyráběná půda o stejném složení

Složení

trypton	17,0 g
pepton	3,0 g
kvasniční extrakt	5,0 g
volská žluč dehydratovaná	10,0 g
chlorid sodný (NaCl)	5,0 g
eskulin	1,0 g
Citran železito-amonný	0,5 g

Azid sodný (NaN ₃)	0,15 g
Agar	8,0 g – 18,0 g (dle použitého agaru)
Voda	do 1 000 ml

kultivační půda je matná a zeleno hnědá. pH se upraví na $7,1 \pm 0,2$.

Příprava

Všechny ingredience se smíchají v baňce, přidá se 1000 ml destilované vody za neustálého míchání se rozpustí. Autoklávuje se při $121 \pm 3 \text{ °C}$ po dobu 15 minut.

2.2.5.3 Fosfátový ředící roztok (pufr)

Fosfátový roztok

Složení

dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	34,0 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml
pH	7,2 ± 0,5

Roztok chloridu hořečnatého

chlorid hořečnatý	38 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml

Příprava fosfátového roztoku

V 500 ml destilované vody se rozpustí dihydrogenfosforečnan draselný. Pak se upraví 1 ml roztoku hydroxidu sodného pH na 7,2 ± 0,5. Nakonec se roztok doplní na 1000 ml.

Příprava roztoku chloridu hořečnatého

V 1000 ml se rozpustí chlorid hořečnatý.

Příprava fosfátového ředícího roztoku (pufru)

Do 1000 ml destilované vody se přidá 1,25 ml fosfátového roztoku a 5,0 ml roztoku chloridu hořečnatého.

Před použitím se roztok plní do skleněných nádob o objemu 250–500 ml a sterilizuje se v autoklávu za přetlaku 0,1 MPa po dobu 15 minut. Po vychladnutí se plní po 90 ml do sterilních reagenčních lahvíček. Při plnění je potřeba zachovat aseptické podmínky práce.

2.2.5.4 Ringerův ředící roztok – čtvrtinová koncentrace

Složení

chlorid sodný (NaCl)	2,25 g
chlorid draselný (KCl)	0,105 g
chlorid vápenatý bezvodý (CaCl ₂)	0,12 g
hydrogenohličitan sodný (NaHCO ₃)	0,05 g
voda	do 1000 ml

Příprava

Jednotlivé složky se rozpustí ve vodě a roztok se doplní vodou na 1000 ml. Sterilizuje se v autoklávu při 121 ± 3 °C po dobu 15 minut.

2.2.5.5 Živný agar

Složení

masový extrakt	1,0 g
pepton	1,0 g
chlorid sodný (NaCl)	5,0 g
Agar	15,0 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml
pH	7,2–7,4

Příprava

Jednotlivé složky se postupně přidávají do vody. Zahřívají se tak dlouho, dokud se zcela nerozpustí. Hodnota pH se upraví roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol.l⁻¹

přibližně na 7,2–7,4. Pak se kultivační prostředí povaří 10 minut, zfiltruje a znovu se upraví pH tak, aby bylo v rozmezí 7,2–7,4. Sterilizuje se v autoklávu při $121 \pm (-1 \text{ až } +3)^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut.

2.2.5.6 Peroxid vodíku

Složení

peroxid vodíku	30,0 g
destilovaná voda (doplnit do)	1000 ml

Příprava

30 g peroxidu vodíku se rozpustí 1000 ml destilované vody. Roztok se uchovává při pokojové teplotě nejdéle jeden týden.

2.2.5.7 PYR test

Komerčně vyráběný test na pyrrolidonylpeptidázovou aktivitu.

2.2.6. Přístroje a pomůcky

Běžné vybavení laboratoře, zejména přístroje a pomůcky uvedené v kapitole 2.1.6 Přístroje a pomůcky.

POZNÁMKA – Pomůcky pro jedno použití, pokud mají vhodnou specifikaci, jsou přijatelnou náhradou skleněných pomůcek.

2.2.7 Postup zkoušky

2.2.7.1 Zkušební vzorek a výchozí suspenze

K 10 g upraveného vzorku určené matrice přidáme 90 ml sterilního zředovacího roztoku (kap. 2.2.5.3 nebo 2.2.5.4). Provedeme homogenizaci pomocí homogenizátoru. Necháme 5 minut ustát. Z výchozí suspenze se připraví série desetinásobného ředění vzorku.

2.2.7.2 Inokulace, inkubace

Pipetujeme paralelně na dvě Petriho misky s m-enterokokovým agarem (2.2.5.1) 2 x 0,2 ml výchozí suspenze a prvního dekadického ředění, eventuálně dalších vždy dvou po sobě jdoucích dekadických ředění vzorku (postup dle ČSN ISO 6887-1) Rozetřeme sterilní skleněnou tyčinkou a po zaschnutí při teplotě laboratoře umístíme dnem vzhůru v termostatu. Inkubují se nejprve 4 hod. při $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ a potom 20–44 hod. při $43^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$.

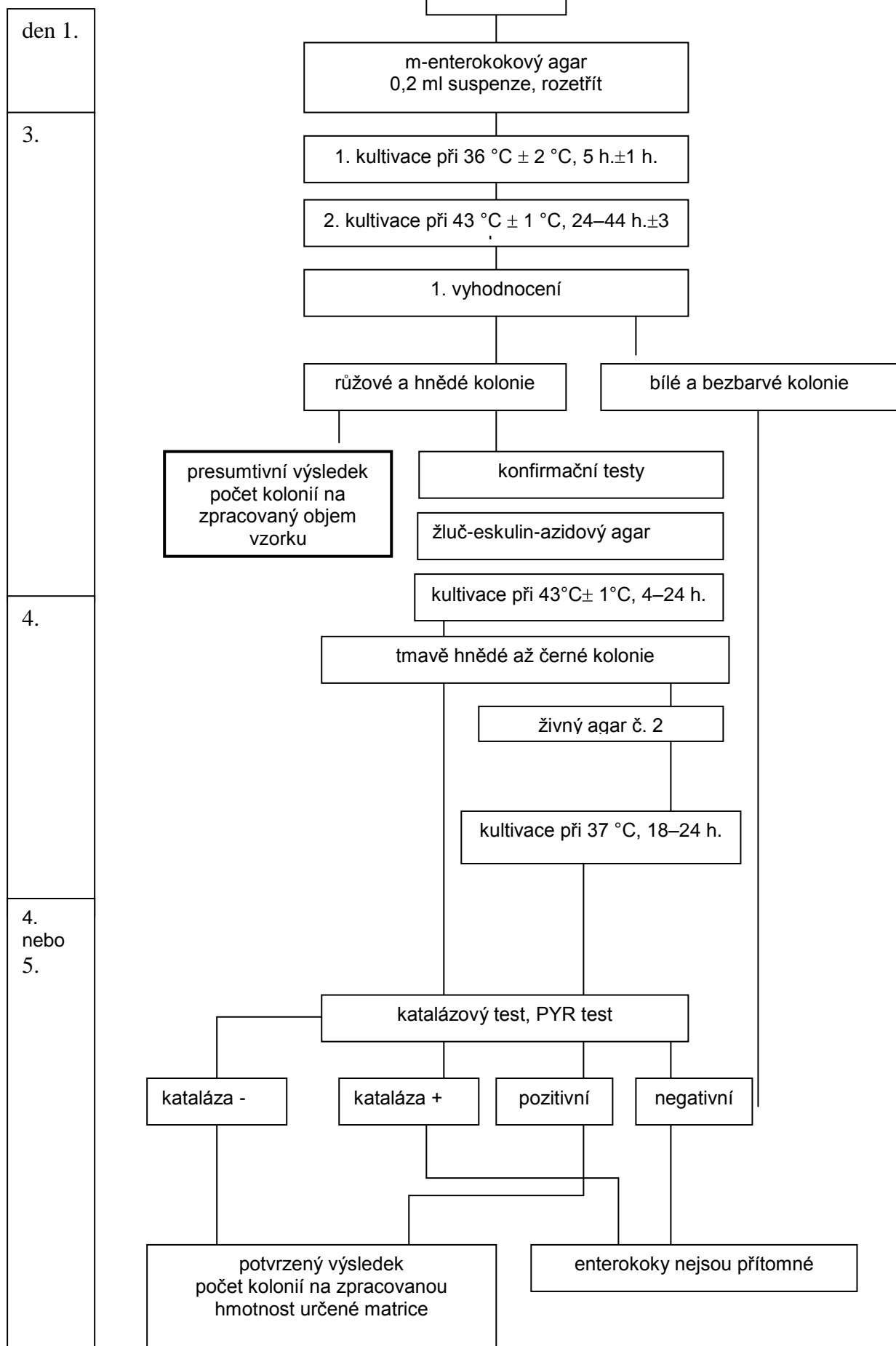
2.2.7.3 Vyhodnocení

Vyberou se inkubované plotny obsahující méně než 150 typických kolonií. Z každé vybrané misky se počítají všechny narostlé kolonie červeně, kaštanově nebo růžově zbarvené. Počítají se kolonie zcela zbarvené i kolonie pouze se zbarveným středem. Předpokládá se, že jsou to presumptivní enterokoky.

Schéma stanovení enterokoků metodou přímého výsevu na povrchu kultivačního média.

Náhodně se vybere 5 kolonií pro subkultivaci a biochemickou confirmaci. Další určování se neprovádí v případě, že více než polovina povrchu plotny je přerostlá. Je-li přerostlá méně jak polovina povrchu, spočítají se kolonie ve druhé části a extrapoluje se tak, aby počet odpovídal celému povrchu plotny.

Schéma stanovení enteokoků



2.2.7.4 Konfirmace

Některé rody *Bacillus*, *Aerococcus* a *Staphylococcus* mohou vykazovat pozitivní růst na Slanetz and Bartley (m-Enterococcus) agaru. *Bacillus spp.* produkuje ploché růžové kolonie, které jsou obvykle kostrbaté s hrubým povrchem, velmi často přerůstají. Rody *Staphylococcus* produkuje červené kolonie, ale jsou kataláza pozitivní. Rody *Aerococcus* produkuje červené kolonie, které jsou kataláza negativní, ale mají také negativní PYR test (pyroglutamateaminopeptidáza negativní).

Výběr kolonií pro konfirmaci

Pro konfirmaci se z každé plotny vybere nejméně po pěti koloniích považovaných za suspektní.

Subkultivace

Typické kolonie z reprezentačního vzorku se přeočkují na povrch živného agaru (2.2.5.5) Naočkované misky se inkubují při teplotě $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ po dobu 18–24 hodin a z každé z inkubovaných ploten se vybere dobře izolovaná kolonie pro konfirmaci.

Potvrzující test

Typické kolonie z reprezentačního vzorku se přeočkují na povrch žluč-eskulin-azidového agaru. Naočkované misky se inkubují při teplotě $43\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$ po dobu 4–24 h. Vyhodnocují se všechny misky vykazující tříslově hnědé až černé zabarvení kolonií a nebo kultivačního média kolem kolonií.

Katalázový test

Na kolonie narostlé na žluč-eskulin-azidovém agaru se kápne po jedné kapce roztoku peroxidu vodíku. Tvorba bublin kyslíku indikuje kataláza-pozitivní mikroorganismy. Za enterokoky se považují pouze kataláza-negativní kolonie.

POZNÁMKA – Na žluč-eskulin-azidovém agaru může dojít k tvorbě falešné pozitivní katalázové reakce. Aby se tato chyba vyloučila, je třeba test zopakovat na přeočkované kultuře na neselektivním kultivačním médiu – živný agar – viz subkultivace.

Test potvrzující pyroglutamataminopeptidázovou aktivitu

POZNÁMKA – provádí se v případě, že předchází katalázový test a potvrzující test na žluč-eskulinovém agaru nedávají jednoznačné informace.

Suspektivní kolonie se přeočkují na živný agar (2.2.5.5) a po 24 až 48 hodinách inkubace se podrobí testu na přítomnost pyroglutamataminopeptidázy (komerčně vyráběný test).

Za enterokoky se považují kolonie vykazující pozitivní reakce. Kromě živného agaru (2.2.5.5) lze použít jakýkoliv agar bez interferenčních a inhibičních přísad.

2.2.8 Vyjádření výsledků

Vyjadřování výsledků a stanovení počtů bakterií ve vzorku se provede podle kapitoly 1.7. Jestliže alespoň 80 % z vybraných typických kolonií vykazuje vlastnosti typické pro enterokoky ve smyslu tohoto postupu, je počet týž, jako byl spočítán v odst. 2.2.7.3. Ve všech ostatních případech se množství bakterií vypočítá z procentuálního podílu z celkového počtu kolonií vybraných podle 2.2.7.3.

2.2.9 Zabezpečování jakosti

Zabezpečování jakosti se provádí naplněním bodů v kapitole 1.10 tohoto postupu.

Pro kontrolu způsobilosti laboratoře prokazovat enterokoky uvedenou metodou a s užitím půd popsaných v této metodě se doporučuje jako referenční materiál:

Enterococcus faecalis CCM 4224 - Česká sbírka mikroorganismů

Enterococcus faecium CCM 2541 (Francie)

Negativní růst:

Escherichia coli CCM 3954

2.2.10. Charakteristiky metody

Při ověřování metody v laboratořích SZÚ a mezilaboratorních ověřovacích zkouškách (MOZ) byly zjištěny následující výsledky při podmínkách daných uvedeným postupem.

Vzorky kontaminované pomocí RM

pro stanovované počty >750 KTJ na 1 g kalu (>1 až 15 KTJ na miskách) byla shoda výsledků stanovení u 78,6 % laboratoří

pro stanovované počty >750 KTJ na 1 g kalu (>1 až 15 KTJ na miskách) byla shoda výsledků stanovení u 85 % výsledků stanovených v 1 laboratoři

z 33 výsledků analýz enterokoků provedených během MOZ bylo 15 % falešně negativních výsledků

z 67 analýz provedených jednou laboratoří byl jeden falešně pozitivní výsledek

speciální studie opakovatelnosti v jedné laboratoři se dvěma laborantkami pro 15000 KTJ v 10 g kalu (>15 KTJ na miskách, 1500 KTJ v 1 g kalu) poskytla jako míru opakovatelnosti (vyjádřenou směrodatnou odchylkou přirozených logaritmů původních hodnot) hodnotu 0,795 nebo vyjádřenou jako $\exp(0,795) = 2,2$.

Vzorky přirozeně kontaminované

Ověření bylo provedeno 15 laboratořemi pro dva různé kaly. Míra reprodukovatelnosti metody (vyjádřená směrodatnou odchylkou přirozených logaritmů původních hodnot) poskytla hodnotu 2,13 nebo vyjádřenou jako $\exp(2,13) = 8,4$.

2.3 Detekce salmonel

2.3.1. Termíny a definice

Účelem tohoto postupu je poskytnout pokyny pro detekci bakterií rodu *Salmonella spp.* v určených maticích. Při zkoušení provedeném podle tohoto postupu nález kvalifikován jako pozitivní nebo negativní nález ve sledované matici.

Při analýze je třeba dodržet všeobecná ustanovení pro mikrobiologická zkoušení včetně zásad přepravy vzorku.

Pro účely tohoto zkoušení jsou bakterie rodu *Salmonella spp.* mikroorganismy, které vytvářejí na tuhých selektivních půdách typické kolonie a které vykazují popsané biochemické a sérologické vlastnosti.

2.3.2 Podstata zkoušky

Průkaz bakterií rodu *Salmonella spp.* vyžaduje čtyři po sobě následující stupně.

POZNÁMKA - Bakterie rodu *Salmonella spp.* mohou být přítomny v nízkých počtech a jsou často provázeny značně vyššími počty jiných příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae* nebo příslušníků jiných čeledí. Proto je nezbytné selektivní pomnožení, kromě toho je nezbytné předpomnožení, které umožňuje průkaz často subletálně poškozených bakterií rodu *Salmonella spp.*

2.3.2.1 Předpomnožení v neselektivní tekuté půdě

Do tlumivé peptonové vody se inokuluje zkušební vzorek a inkubuje se při $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 16–20 hodin.

2.3.2.2 Předpomnožení v selektivních tekutých půdách

Kultura získaná podle 3.3.2.1. se inokuluje do dvou tekutých půd, a to do půdy podle Rappaporta a Vassiliadise s chloridem hořečnatým a malachitovou zelení a do půdy se seleničitanem a cystinem.

Půda podle Rappaporta a Vassiliadise s chloridem hořečnatým a malachitovou zelení se inkubuje při $41 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 h a po dalších 24 h, půda se seleničitanem a cystinem se inkubuje při $36 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 h a dalších 24 h.

2.3.2.3 Vyočkování na pevné půdy a zjišťování přítomnosti suspektních kolonií

Každá z kultur získaných podle 2.3.2.3 se vyočkuje na dvě pevné selektivní půdy:

- agar s fenolovou červení a briliantovou zelení
- xylózo-lyzín-deoxycholátový agar

Inkubuje se při $36 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 h, a pokud je to nutné, rovněž po 48 h. se zjišťuje přítomnost kolonií, které jsou na základě svých znaků považovány za suspektní kolonie bakterií rodu *Salmonella spp.*

2.3.2.4 Konfirmace

Suspektní kolonie bakterií rodu *Salmonella spp.* získané vyočkováním, jak je popsáno v 2.3.2.3 se subkultivují a konfirmují pomocí vhodných biochemických a sérologických testů.

2.3.3 Kultivační půdy a činidla

2.3.3.1 Půda se seleničitanem a cystinem

ZÁKLAD PŮDY

Složení

trypton	5,0 g
laktóza	4,0 g
hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	10,0 g
hydrogenseleničitan sodný (NaHSeO_3)	4,0 g
voda	900 ml

Příprava

První tři složky základu se rozpustí ve vodě za varu po dobu 5 min. Po ochlazení se přidá hydrogenseleničitan sodný.

Pokud je třeba, upraví se pH tak, aby jeho hodnota činila 7,0.

Roztok L-cystinu

Složení

L-cystin	0,1 g
roztok hydroxidu sodného $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$	15 ml
sterilní voda do konečného objemu	100 ml

Příprava

Složky se vnesou do sterilní odměrné baňky.

Doplň se voda do 100 ml.

Roztok se nesterilizuje.

Roztok kvasničného extraktu

Složení

kvasničný extrakt ve formě prášku	1,5 g
sterilní voda	100 ml

Příprava

Kvasničný extrakt se vnese do sterilní odměrné baňky a doplní se do 100 ml vodou.

Sterilizuje se v autoklávu při $121 \pm (-1 \text{ až } +3)^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut.

KOMPLETNÍ PŮDA

Složení

základ	900 ml
roztok L-cystinu	10 ml
roztok kvas. extraktu	100 ml

Příprava

Základ půdy a roztok kvasničného extraktu se ochladí, asepticky spojí a nakonec se asepticky přidá roztok L-cystinu.

Pokud je třeba, upraví se pH tak, aby jeho hodnota činila 7,0.

Půda se asepticky rozplní do sterilních baněk vhodného objemu tak, aby se získaly jednotlivé dávky potřebné pro zkoušení.

Půda se použije v den přípravy.

2.3.3.2 Xylózo-lysin-deoxycholátový agar

ZÁKLADNÍ ROZTOK

Složení

D(+)-xylóza	3,5 g
L(+)-Lyzín	5,0 g
deoxycholát sodný	2,5 g
kvasničný extrakt	3,0 g
sacharóza	7,5 g
laktóza	7,5 g
chlorid sodný (NaCl)	5,0 g
thiosíran sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	6,8 g
citrát železitý	0,8 g
agar	13 g
voda	do 1000 ml

Roztok fenolové červeně

Složení

fenolová červeně	0,4 g
voda	do 100 ml

Příprava

Fenolová červeně se za občasného míchání rozpustí v daném objemu vody.

KOMPLETNÍ PŮDA

Příprava

Veškeré složky základního roztoku se rozpustí v 1 l vody, přidá se 20 ml roztoku fenolové červeně a za občasného míchání se přivede k varu. Po ochlazení na 50°C se médium rozlije do Petriho misek.

Neautoklávuje se.

V případě potřeby se pH upraví na $7,4 \pm 0,1$.

2.3.3.3 Půda pro neselektivní předmnožení: Tlumivá peptonová voda

Složení

pepton	10,0 g
chlorid sodný	5,0 g
hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9,0 g
dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	1,5 g
voda	1000 ml

Příprava

Složky se rozpustí ve vodě, a je-li třeba, zahřejí se. Pokud je třeba, upraví se pH tak, aby se po sterilizaci jeho hodnota činila 7,0. Půda se rozplní do baněk vhodného objemu tak, aby se získaly jednotlivé dávky potřebné pro zkoušení. Sterilizuje se v autoklávu při $121 \pm (-1 \text{ až } +3)^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut.

2.3.3.4 Půda s chloridem hořečnatým a malachitovou zelení

Podle Rappaporta a Vassiliadise (dále půda RV)

Roztok A

Složení

trypton nebo sójový pepton	4,5 g
chlorid sodný	8,0 g
dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	1,6 g
voda	1000 ml

Příprava

Složky se rozpustí ve vodě za záhřevu asi na 70 °C. Roztok se připravuje v den přípravy půdy RV.

Roztok B

Složení

chlorid hořečnatý hexahydrát ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	400,0 g
voda	1000 ml

Příprava

Chlorid hořečnatý se rozpustí ve vodě. Vzhledem k tomu, že tato sloučenina je velmi hygroskopická, doporučuje se rozpustit celý obsah chloridu hořečnatého z nově otevřeného balení, a to podle výše uvedeného poměru. Například k 250 g chloridu hořečnatého se přidá 625 ml vody, což poskytne roztok o celkovém objemu 795 ml a o koncentraci asi 31,5 g ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) na 100 ml. Roztok se uchovává v lahvi z hnědého skla při pokojové teplotě.

Roztok C

Složení

šřavelan malachitové zeleně	0,4 g
voda	100 ml

Příprava

Šřavelan malachitové zeleně se rozpustí ve vodě a roztok se uchovává v zásobní láhvi z hnědého skla při pokojové teplotě.

KOMPLETNÍ PŮDA

Složení

roztok A	1000 ml
roztok B	100 ml
roztok C	10 ml

Příprava

K 1000 ml roztoku A se přidá 100 ml roztoku B a 10 ml roztoku C, pH se upraví tak, aby po sterilizaci jeho hodnota byla 5,2. Půda se rozplní do zkumavek po 10 ml. Sterilizuje se v autoklávu při $115 \pm (-1 \text{ až } +3)^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut. Půda se uchovává v lednici.

2.3.3.5 Fyziologický roztok

Složení

chlorid sodný	8,5 g
voda	1000 ml

Příprava

Chlorid sodný se rozpustí ve vodě, je-li třeba, za zřhřevu. V případě potřeby se pH upraví tak, aby jeho hodnota po sterilizaci činila 7,0. Roztok se rozplní do baněk tak, aby po sterilizaci byl jeho objem 90–100 ml. Sterilizuje se v autoklávu při $121 \pm (-1 \text{ až } +3)^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut.

2.3.3.6 Agar s fenolovou červení a briliantovou zelení (podle Edela a Kampelmachera)

ZÁKLAD PŮDY

Složení

masový extrakt ve formě prášku	5,0 g
pepton	10,0 g
kvasničný extrakt ve formě prášku	3,0 g
hydrogenfosforečnan disodný (Na_2HPO_4)	1,0 g
dihydrogen fosforečnan sodný (NaH_2PO_4)	0,6 g
agar	12–18 g*
voda	900 ml

* v závislosti na ztužovací schopnosti agaru

Příprava

Dehydratované složky základu nebo kompletní dehydratovaný základ půdy se rozpustí ve vodě, a je-li třeba, za zřhřevu. Po sterilizaci je hodnota pH 7,0. Základ půdy se rozplní do zkumavek nebo baněk vhodného objemu. Sterilizuje se v autoklávu při $121 \pm (-1 \text{ až } +3)^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut.

Roztok laktózy, sacharózy a fenolové červeně

Složení

laktóza	10,0 g
sacharóza	10,0 g
fenolová červeně	0,09 g
voda do konečného objemu	100 ml

Příprava

Složky se vnesou do 50 ml vody v odměrné baňce a doplní se vodou na 100 ml. Po dobu 20 minut se roztok zahřívá na vodní lázni při 70 °C. Potom se ochladí na 55 °C ± 1 °C a bezprostředně poté se použije.

Roztok briliantové zeleně (podle Edela a Kampelmachera)

Složení

briliantová zeleň	asi 0,5 g
voda	100 ml

Příprava

Briliantová zeleň se přidá do vody a ponechá se 1 den v temnu, aby mohlo dojít k autosterilizaci.

KOMPLETNÍ PŮDA

Složení

základ	900 ml
roztok laktózy, sacharózy a fenolové červeně	100 ml
roztok briliantové zeleně	1 ml

Příprava

Za aseptických podmínek se roztok briliantové zeleně přidává k roztoku laktózy, sacharózy a fenolové červeně ochlazenému na 55 °C ± 1 °C. Tento roztok se přidá k základu půdy ochlazenému na 50 °C – 55 °C.

Příprava agarových ploten

Do každé z přiměřeného počtu velkých Petriho misek se dá asi 40 ml čerstvě připravené půdy. Půda se nechá ztuhnout. Bezprostředně před použitím se agarové plotny předsouší v sušárně se sejmutým víčkem a povrchem agarové vrstvy dolů při teplotě 37 °C – 55 °C. Pokud jsou plotny připravovány předem, uchovávají se předem nevysušené nejméně 4 hodiny při pokojové teplotě nebo alespoň jeden den v chladničce.

Specifikace briliantové zeleně se provede dle ČSN-EN 12824 příloha C normy

2.3.3.7 Živný agar

Složení

masový extrakt	3,0 g
pepton	5,0 g
agar	12–18 g*
voda	1000 ml

* v závislosti na ztužovací schopnosti agaru

Příprava

Dehydratované složky základu nebo kompletní dehydratovaný základ půdy se rozpustí ve vodě, a je-li třeba, za záhřevu. Po sterilizaci se hodnota pH upraví na pH 7,0. Základ půdy se rozplní do zkumavek nebo baněk vhodného objemu. Sterilizuje se v autoklávu při $121 \pm (-1 \text{ až } +3)^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut.

Příprava ploten živného agaru

15 ml rozehřáté půdy se dá do malých Petriho misek a dále se postupuje jako v bodě 3.3.3.6.

2.3.3.8 Agar s glukózou, laktózou, sacharózou a citranem železitým (TSI agar)

Složení

masový extrakt	3,0 g
kvasničný extrakt	3,0 g
pepton	20,0 g
chlorid sodný	5,0 g
laktóza	10,0 g
sacharóza	10,0 g
glukóza	1,0 g
citran železitý	0,3 g
thiosulfát sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,3 g
fenolová červeň	0,024 g
agar	12,0–18,0 g*
voda	1000 ml

* v závislosti na ztužovací schopnosti agaru

Příprava

Složky půdy nebo dehydratovaná kompletní půda se rozpustí ve vodě, a je-li třeba, za záhřevu. Hodnota pH se upraví tak, aby po sterilizaci byla 7,4. Půda se rozplní do zkumavek po 10 ml a sterilizuje se v autoklávu při $121 \pm (-1 \text{ až } +3)^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut. Ponechá se utuhnout v šikmé poloze tak, aby hloubka svislé části činila 2,5 cm.

2.3.3.9 Činidla pro biochemické a sérologické konfirmace

Pro průkaz biochemických a sérologických konfirmací se použijí komerčně vyráběná činidla a postupuje se podle návodu výrobce nebo se postupuje podle ČSN EN ISO 6579 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella spp.*

Pro průkaz biochemických vlastností se osvědčily řady Enterotestů, např. od firmy Pliva – Lachema Brno nebo API od firmy BioMerieu, Oxoid, lze použít i jiné komerčně vyráběné vyhovující kvality.

Komerčně je dostupná řada typů aglutinačních sér obsahujících protilátky vůči jednomu nebo několika O-antigenům, např. antiséra obsahující jednu nebo více „O“ skupin (označují se jako monovalentní nebo polyvalentní anti-O séra), dále anti-Vi séra a antiséra obsahující protilátky vůči jednomu nebo několika H-faktorům (označují se jako monovalentní nebo polyvalentní anti-H séra).

Je třeba všemožně se pokusit zajistit, aby užitá antiséra byla dostačující pro detekci všech sérovarů bakterií rodu *Salmonella spp.* Doporučuje se k tomuto účelu používat antiséra připravená dodavatelem, který je uznáván jako kompetentní.

2.3.4 Přístroje a pomůcky

Obvyklé vybavení laboratoře, zejména přístroje a pomůcky uvedené v kapitole 2.1.6 Přístroje a pomůcky.

POZNÁMKA – Pomůcky pro jedno použití, pokud mají vhodnou specifikaci, jsou přijatelnou náhradou skleněných pomůcek.

2.3.5 Postup zkoušky

2.3.5.1 Zkušební vzorek a výchozí suspenze

Pro přípravu výchozí suspenze se jako ředící roztok použije půda pro neselektivní předpomnožení (tlumivá peptonová půda) specifikovaná v 3.3.3.3.

Výchozí suspenze se připraví tak, že se 50 g zkušební vzorku přidá do 450 ml půdy pro neselektivní předpomnožení (3.3.3.3), což je poměr zkušební vzorku k půdě pro neselektivní předpomnožení specifikovaný tímto postupem.

2.3.5.2 Neselektivní předpomnožení

Výchozí suspenze se inkubuje při $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ po dobu ne méně než 16 h a ne více než 20 h.

2.3.5.3 Selektivní pomnožení

0,1 ml kultury získané podle 3.3.5.2. se přenesse do zkumavky obsahující 10 ml půdy RV (3.3.3.4) a inkubuje se při $41,5 \pm 0,5\text{ °C}$ po dobu 24 h (dalších 24 h - viz poznámka k čl. 3.3.2), 10 ml kultury získané podle (3.3.5.2) se přenesse do baňky obsahující 100 ml půdy se seleničitanem a cystinem (3.3.3.1) a inkubuje se při $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ po dobu 24 h (dalších 24 h).

2.3.5.4 Vyočkování a identifikace

a) Kultura získaná v půdě RV po inkubaci 24 h (a je-li třeba, ještě dalších 24 h) se inokuluje kličkou na povrch první selektivní půdy pro vyočkování - agar s fenolovou červení a brilantovou zelení (viz 3.3.3.6) a druhé - xyloso-lysin-deoxycholátový agar (3.3.3.2) vylité do velkých Petriho misek, a to tak, aby se získaly dobře izolované kolonie.

Pokud nejsou velké Petriho misky k dispozici, užije se půda vždy ve dvou malých miskách a očkuje se nejprve jedna a poté druhá malá miska touž kličkou (viz poznámka).

b) Stejně se postupuje s kulturou získanou z druhé selektivní pomnožovací půdy se seleničitanem a cystinem. Při očkování na povrch z druhé selektivní pomnožovací půdy se použije jiná sterilní klička a počet Petriho misek se užije tak, jak to odpovídá jejich velikosti.

POZNÁMKA - Pro rozočkování čarami na selektivní pevné půdy (agar s fenolovou červení a brilantovou zelení a xylózo-lyzín-deoxycholátový agar) se doporučuje následující způsob: Použije se jedna klička pro dvě misky. Odebere se kapka tekuté půdy z její hladiny při okraji nádoby. Inokulují se obě misky podle schémat postupu zkoušky. Využije se celá plocha misky. Čáry vedené kličkou mají být navzájem vzdáleny asi 0,5 cm. (Klička se neopaluje, ani se do ní znovu nenabírá, a to ani po provedení první čáry, ani při přechodu na druhou misku.) Je-li užita pouze jedna velká miska, je třeba pro rozočkování čarami použít způsob uvedený pro první misku.

Kultury získané ze selektivních pomnožení (kap. 3.3.5.3) se vyočkují po 24 a 48 hod. Vyočkování se provede vždy na dvě různé selektivní pevné půdy.

Misky se obrátí dnem vzhůru a umístí do inkubátoru s teplotou udržovanou na $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

2.3.5.5 Vyhodnocení

Po inkubaci po dobu 20–24 h se na plotnách zjišťuje přítomnost typických kolonií bakterií rodu *Salmonella spp.* Růst typických kolonií bakterií rodu *Salmonella spp.* na půdě s fenolovou červení a briliantovou zelení působí změnu barvy půdy z růžové na červenou. Na půdě xyloso-lysin-deoxycholátovém agaru v případě pozitivního nálezu vyrostou červenočerné až černé kolonie.

Je-li růst pouze slabý nebo nejsou-li typické kolonie bakterií rodu *Salmonella spp.* přítomny, inkubují se plotny znovu při příslušné teplotě po dobu dalších 18–24 h. Na plotnách se opakovaně zjišťuje přítomnost typických kolonií bakterií rodu *Salmonella spp.*

POZNÁMKA - Je nezbytné podrobit každou typickou nebo suspektní kolonii konfirmaci; rozpoznání kolonií bakterií rodu *Salmonella spp.* je ve velké míře věcí zkušenosti, vzhled kolonií může být poněkud pozměněn, a to nejen pokud jde o vzájemně různé sérovary, ale rovněž pokud jde o vzájemně různé výrobní dávky půdy. S ohledem na to může v této fázi zkoušení usnadnit rozpoznání suspektních kolonií aglutinace s polyvalentním salmonelovým antisérem.

2.3.5.6 Konfirmace

Výběr kolonií pro konfirmaci

Pro konfirmaci se z každé plotny každé selektivní půdy (viz 3.3.5.3 a 3.3.5.4) vybere nejméně po pěti koloniích považovaných za typické nebo suspektní. Pokud je na jedné plotně méně typických nebo suspektních kolonií než pět, vyberou se pro konfirmaci všechny typické nebo suspektní kolonie. Každá z vybraných kolonií se rozočkuje na povrch ploten předsušeného živného agaru (3.3.3.7) tak, aby se umožnil vývoj dobře izolovaných kolonií.

Inokulované plotny se inkubují při $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ po dobu 18–24 h. Pro biochemickou a sérologickou konfirmaci se užijí čisté kultury.

Biochemická konfirmace

Použijí se identifikační sady běžně komerčně dostupné, které umožňující identifikaci bakterií rodu *Salmonella spp.* a postupuje se podle návodu výrobce nebo se postupuje se podle ČSN EN ISO 6579: Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella spp.*

Sérologická konfirmace a sérotypizace

Před vlastní typizací je třeba vyloučit spontánně aglutinující kmeny.

Použijí se identifikační sady běžně komerčně dostupné, které umožňující sérotypizaci bakterií rodu *Salmonella spp.* a postupuje se podle návodu výrobce nebo se postupuje podle ČSN EN ISO 6579: Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella spp.*

Vyloučení spontánně aglutinujících kmenů

Na pečlivě očištěné podložní sklo se nanese kapka fyziologického roztoku, kam se kličkou vnese část kolonie určené ke zkoušení. Dobře se rozptýlí tak, aby se dostala homogenní směs. Sklem se zvolna pohybuje kývavými pohyby asi 30 až 60 sekund. Proti tmavému pozadí se zjišťuje, zda dochází k tvorbě vloček. V případě, že výskyt vloček je pozitivní, není možné kmeny podrobit dalšímu vyšetření na průkaz antigenů.

Interpretace biochemických a sérologických reakcí

Postupuje se podle ČSN EN ISO 6579: Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella spp.*

Konečná confirmace

Pokud je třeba, kmeny považované za příslušné do rodu *Salmonella* a kmeny, které mohou být příslušné rodu *Salmonella*, mohou být zaslány do NRL pro hygienu půdy a odpadu a předány do NRL pro bakterií rodu *Salmonella* ke konečné typizaci.

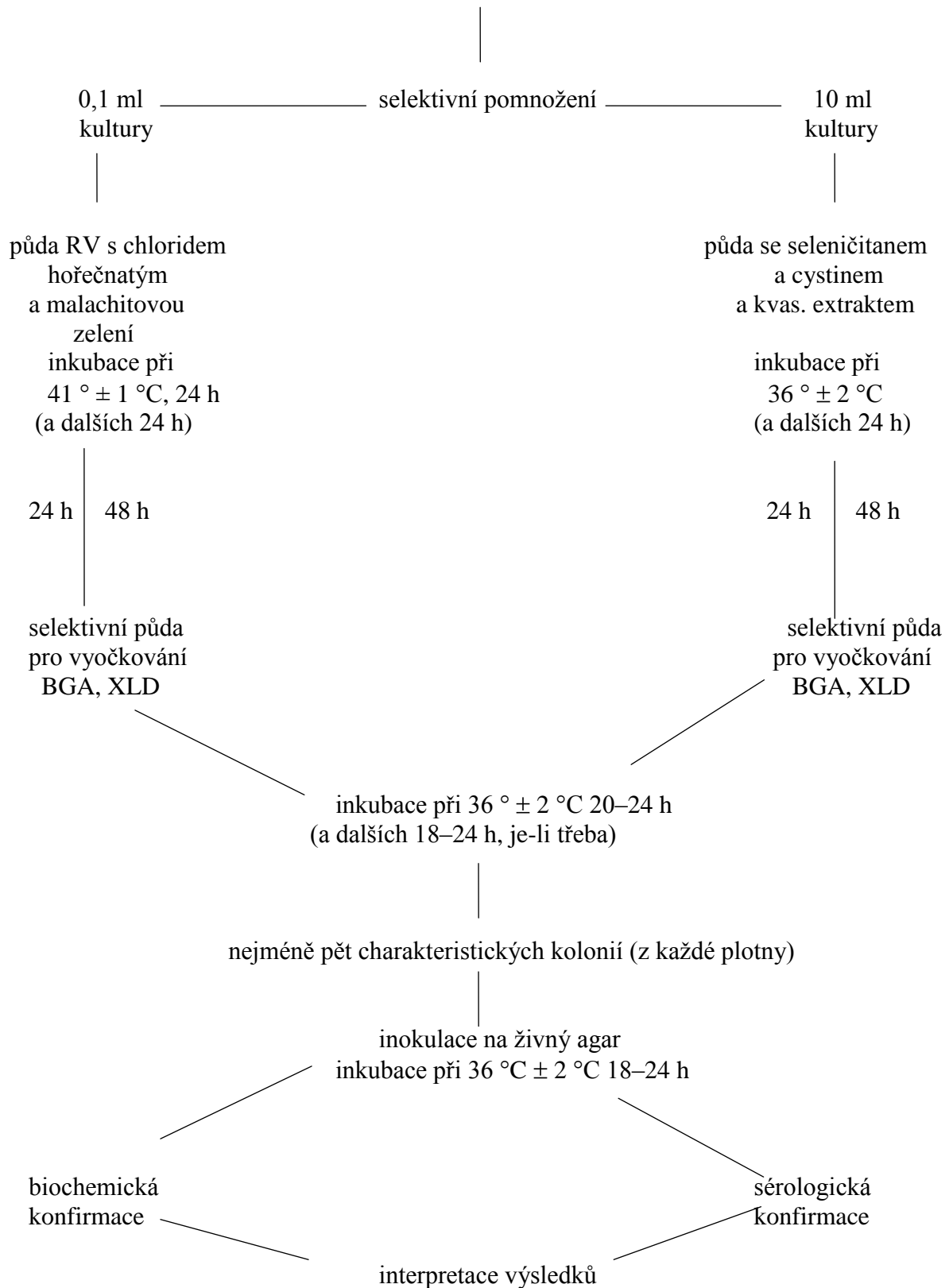
Zásilka musí být doprovázena všemi dostupnými informacemi týkajícími se kmene (kmenů) a musí být dodržena všechna pravidla pro přepravu vzorků obsahujících nebezpečné látky.

2.3.6 Vyjádření výsledků

Výsledek se uvede jako negativní nebo pozitivní detekce salmonel v 50 g matrice.

Schéma postupu zkoušky detekce salmonel v kalech

50 g + 450 ml půdy pro neselektivní předpomnožení
inkubace při 37 °C 16–20 h



3.3.7 Zabezpečování jakosti

Zabezpečování jakosti se provádí naplněním bodů v kapitole 1.10 tohoto metodického postupu.

Pro kontrolu způsobilosti laboratoře prokazovat metodou detekce salmonel s užitím kultivačních půd popsanych v této metodě se jako referenční materiál doporučuje sbírkový kmen:

Salmonella enterica ser. enteritis CCM 4420

Salmonella typhimurium ATCC 13 311

Negativní růst:

Escherichia coli ATCC 25922 žádný/žlutý.

2.3.8 Charakteristiky metody

Při ověřování metody v laboratořích SZÚ a mezilaboratorních ověřovacích zkouškách (MOZ) byly zjištěny následující výsledky při podmínkách daných uvedeným postupem.

- výsledky detekce salmonel získané testovaným postupem jsou ovlivňovány mohutností kontaminace termotolerantních koliformních bakterií a enterokoků
- pro stanovení salmonel v kalech je třeba jako první stupeň metody použít neselektivní pomnožení
- obě používané selektivní pomnožovací půdy nevykazovaly podstatný vliv na pravděpodobnost nálezu salmonel v závislosti na počátečním množství salmonel v kalu (přídavek salmonel), ale lze předpokládat, že seleničitanová půda vykazuje menší citlivost
- stejnou citlivost pro detekci salmonel na pevných selektivních půdách prokázaly půdy BGA a XLD, půda DC vykazovala menší četnosti záchytů
- 50 KTJ salmonel v 50 g kalu detekovalo 100 % zúčastněných laboratoří pro kal s kontaminací termotolerantními koliformními bakteriemi a enterokoky, tuto hodnotu lze považovat za mezní hodnotu stanovitelnosti za podmínek uvedené metodiky
- 40 KTJ salmonel na 50 g kalu detekovalo 66,7 % laboratoří pro kontaminovaný kal termotolerantními koliformními bakteriemi a enterokoky,
- 5 KTJ salmonel v 50 g kalu detekovalo 89,3 % laboratoří pro nekontaminovaný kal termotolerantními koliformními bakteriemi a enterokoky,
- pro kal kontaminovaný víc než 10^3 KTJ enterokoky a termotolerantními koliformními bakteriemi klesá četnost pozitivní detekce salmonel na 40 %.

ČÁST 2 - HODNOCENÍ ÚČINNOSTI HYGIENIZACE TECHNOLOGIÍ ZPRACOVÁVAJÍCÍCH BIOODPADY

3 VALIDACE ÚČINNOSTI HYGIENIZACE BIOTECHNOLOGICKÝCH, TEPELNÝCH A CHEMICKÝCH PROCESŮ VEGETATIVNÍMI BUŇKAMI

3.1 Úvod

Schopnost procesu minimalizovat rizika způsobená patogeny v surovinách, nemůže být hodnocena jenom analýzou přítomnosti nebo absence indikátorových organismů (bakterií, virů, plísní a hub nebo parazitů) v konečném produktu. Nepřítomnost jednoho nebo všech zmíněných indikátorů ve finálním produktu může být způsobena několika důvody. Nemusí být přítomny v surovině nebo mohou být přítomny v surovině, ale v nízkém počtu (méně než 5 log). Dalším důvodem je, že neexistují dostatečně obohacující postupy pro metody reizolace cílového indikátorového organismu ve vyšetřované matici (zkoncentrování, např. bakterie) nebo neexistuje technicky možná kvantitativní izolace indikátorového organismu vzhledem k vlivu složité matrice (např. viry).

V případě, že samotný proces zabezpečí inaktivaci patogenů, které reprezentují indikovanou úroveň chemo nebo termorezistence, jsou reprezentativní indikátorové organismy exponovány ve stejné matici jako je zpracovávaná matrice v testované technologii v uzavřeném testovacím systému (TCS) validovaným pokusem. Zároveň se zaznamenávají příslušné parametry procesu během expozice pro definování technických podmínek, které musí být dodrženy pro bezpečnou inaktivaci. Na základě výsledků pokusu přežívání vneseného indikátorového organismu je možné definovat kritické kontrolní body v aplikaci systému HACCP.

UPOZORNĚNÍ – „Odpady a vzorky kalu mohou obsahovat nebezpečné a hořlavé látky. Mohou obsahovat patogeny a podléhat biologické aktivitě. Proto se doporučuje, aby se s těmito vzorky zacházelo se zvláštní péčí. Plyny, které mohou být produkovány mikrobiální činností jsou potenciálně hořlavé a mohou způsobit přetlak v uzavřených lahvích. Explodující lahve by pravděpodobně mohly způsobit uvolnění infekčních částic z explodujícího objektu a/nebo uvolnění patogenních aerosolů. Pokud je to možné, je třeba se vyhnout používání skleněných lahví. Vzhledem k mikrobiologickému riziku spojenému s touto metodou by měly být dodržovány předpisy pro bezpečnou práci v mikrobiologické laboratoři.

3.2 Předmět a vymezení působnosti

Tato část postupu popisuje metodu validace účinnosti hygienizace biotechnologických, termálních a chemických procesů pro zpracování vedlejších živočišných produktů, kalu z čistíren odpadních vod a bioodpadů, u kterých se předpokládá, že zajistí hygienickou nezávadnost výstupů z uvažovaných technologií (hnojiv, kompostů, digestátů nebo srovnatelných produktů) vegetativními formami bakterií.

Popisovaná metoda je vhodná pro stanovení účinnosti hygienizace biotechnologických, termálních a chemických procesů zpracování (CEN/TC 308 – doc. 525 (REVIZE Směrnice 86/278/EEC – 3. návrh (1) a Nařízení (ES) č. 208/2006 (2) pro eliminaci patogenů v neupravených substrátech. Procesy zpracování jsou validovány snížením o právním předpisem definovaný počet řádů počtu testovacích mikroorganismů jako např. *Salmonella Senftenberg 775W*, H₂S negativní a *Enterococcus faecalis* nebo *Escherichia coli*. Pokud není stanoveno právním předpisem jinak, obvykle musí být použita *Salmonella Senftenberg 775W*, H₂S negativní pro validaci aerobních termofilních procesů jako kompostování a chemické

procesy, zatímco převážně termofilní anaerobní procesy a fyzikální procesy musí být validovány s *Enterococcus faecalis*.

Poznámka: Vyhláška č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s bioodpady vyžaduje pro validaci účinnosti hygienizace jako vnesený indikátorový organismus bakterie *Salmonella senftenberg* W 775 (H₂S negativní) a nebo *Escherichia coli*.

3.3 Normativní odkazy

3.3.1 Definice

Pro účely této evropské normy platí následující termíny a definice.

3.3.1.1 Enterokoky

Enterokoky jsou skupinou grampozitivních, kataláza negativních, fakultativně anaerobních bakterií, které rostou v krátkých řetězcích.

3.3.1.2 Metoda pro stanovení enterokoků

Princip metody je popsán v části 1, kapitola 2.2 tohoto návodu.

3.3.1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, je gram negativní, nesporulující, tyčinkovitá bakterie, laktóza pozitivní a je schopná růst při 44 °C. Většina kmenů *E. coli* je schopna produkovat indol z tryptofanu a je β-glukoronidáza pozitivní.

3.3.1.4 Metoda pro stanovení *Escherichia coli*

Princip metody stanovení je popsán v části 1, kapitola 2.1 tohoto návodu.

3.3.1.5 Somatické kolifágy

Somatické kolifágy jsou bakteriofágy, které sestávají z kapsidu obsahujícího DNA jako genom.

3.3.1.6 Metoda pro stanovení bakteriofágů

Princip této metody je popsán v Dokumentu CEN BT/TF 151 (Extraction of bacteriophages from sludge, soils and treated biowaste).

3.3.1.7 Vegetativní bakterie

Bakterie, které jsou schopny normálního růstu v bujonu nebo na agaru bez resuscitace předkultivací.

3.3.1.8 KTJ - kolonie tvořící jednotka

Růst jednotlivých bakteriálních buněk do viditelných kolonií na agarovém médiu, včetně na membránových filtrech na agarovém mediu.

3.3.1.9 PFU, plaky tvořící jednotky

Plaky tvořící jednotka je mírou počtu částic schopných tvořit plaky na jednotku objemu.

3.3.1.10 Spikování

Umělá kontaminace matrice, která má být exponována v procesu, definovaným množstvím bakteriální suspenze testovacího kmene.

3.3.1.11 Matrice

Matrice je reprezentativní vzorek materiálu, považovaného za zpracovaný, který je spikován testovacím kmenem, pro vyhodnocení vlivu chemických, fyzikálních a biologických vlastností matrice na inaktivaci exponovaných bakterií.

3.3.1.12 Biotechnologický proces

Proces charakterizovaný především aktivitou organismů (např. mikroorganismů) za definovaných podmínek, pro zamýšlený účel (např. kompostování).

3.3.1.13 Tepelný proces

Proces charakterizovaný především přidáním energie ve formě tepla za definovaných podmínek, pro zamýšlený účel (např. pasterizace).

3.3.1.14 Chemické procesy

Proces charakterizovaný především přidáním určitého množství chemikálií (např. vápna) k matrici, za definovaných podmínek, pro zamýšlený účel (např. dezinfekci).

3.3.1.15 Inaktivace mikroorganismů

Redukce mikroorganismů během biochemických, tepelných a chemických procesů.

3.3.2 Citované a související normativní předpisy

Jsou uvedeny v části 1, kapitole 1.3.

3.4 Symboly a zkratky

SNA: standardní živný agar I

SNB: standardní živná půda I

TCS 1: testovací uzavřený systém typ 1

TCS 2: testovací uzavřený systém typ 2

NK: neupravená kontrola

3.5 Princip validačního procesu

Proces pro validaci různých procesů s využitím vhodného testovacího uzavřeného systému (TCS) vyžaduje následující kroky:

1. Příprava definované suspenze bakteriálního testovacího kmene v laboratoři
2. Stanovení počátečního počtu bakterií v připravené suspenzi
3. Příprava substrátu, který má být použit jako matrice
4. Příprava testovacího uzavřeného systému
5. Vložení definovaného objemu matrice do TCS-a spikování určitého množství testovacích bakterií (TCS 1) nebo spikování definovaného objemu matrice určitým množstvím testovacích bakterií a naplnění TCS kontaminovaným materiálem (TCS 2)
6. Expozice TCS procesu na definovaných místech vhodným způsobem pro zamýšlenou dobu expozice
7. Odebrání TCS a stanovení reziduálního počtu bakterií v exponované matrici
8. Stanovení stupně inaktivace.

3.6 Činidla, zřed'ovací roztoky a kultivační média

K zajištění reprodukovatelných výsledků se pro přípravu kultivačních médií a zřed'ovacích roztoků používají buď složky definované kvality a chemikálie zaručené analytické kvality nebo dehydratované zřed'ovací roztoky nebo kompletní média připravená podle pokynů

výrobce. Přípravují se podle účelu z demineralizované nebo destilované vody, které neobsahují látky, které mohou za testovacích podmínek inhibovat růst [ISO 8199].

3.6.1 Standardní živný agar I (SNA) (pH 7 ± 0,2)

Složení

Pepton	15,0 g
Kvasničný extrakt	3,0 g
Chlorid sodný	6,0 g
Glukóza	1,0 g
Agar	12,0 g
Demineralizovaná voda	1 000 ml

Příprava

Jednotlivé složky se rozpustí za promíchávání. Pokud je třeba, upraví se hodnota pH roztoku na 7±0,2 kyselinou chlorovodíkovou (1 mol/l) nebo roztokem hydroxidu sodného (1 mol/l). Médium se sterilizuje v autoklávu (4.7.3) při teplotě 121 ± (-1 až +3)°C po dobu 15 min a plní do kultivačních misek (4.7.5).

3.6.2 Standardní živná půda I (SNB) (pH 7 ± 0,2)

Složení

Pepton	15,0 g
Kvasničný extrakt	3,0 g
Chlorid sodný	6,0 g
Glukóza	1,0 g
Demineralizovaná voda	1 000 ml
Demineralizovaná voda	1 000 ml

Příprava

Jednotlivé složky se rozpustí za promíchávání. Pokud je třeba, upraví se hodnota pH roztoku na 7±0,2 kyselinou chlorovodíkovou (1 mol/l) nebo roztokem hydroxidu sodného (1 mol/l). Médium se sterilizuje v autoklávu (4.7.3) při teplotě 121 ± (-1 až +3)°C po dobu 15 min a plní se po 9 ml do zkumavek (4.7.9).

3.6.4 Roztok NaCl (0,9 % w/v)

Složení

Chlorid sodný (NaCl)	9 g
Demineralizovaná voda	1 000 ml

Příprava

Chlorid sodný se rozpustí v baňce o objemu 2 000 ml s plochým dnem. Hodnota pH se upraví na 7±0,2 při teplotě 25°C. Plní se po 9 ml do kultivačních zkumavek (4.7.9). Sterilizuje se v autoklávu (4.7.3) při 121 ± (-1 až + 3)°C po dobu 15 min.

3.7 Přístroje

S výjimkou komerčně dodávaného sterilního skla, musí být skleněné nádoby a pomůcky sterilizovány podle pokynů daných v ISO 8199.

Obvyklé vybavení mikrobiologické laboratoře a zejména:

3.7.1 Širokohrdlé skleněné lahve nebo kádinky např. 125 ml, 200 ml, 500 ml a 2 000 ml.

3.7.2 Termostat vytemperovaný na teplotu 36 ± 2 °C (s integrovanou třepačkou, s krouživým pohybem a statický) a na teplotu 70 ± 1 °C (statický).

3.7.3 Autokláv (parní sterilizátor).

3.7.4 Lednice.

3.7.5 Sterilní plastové kultivační misky, s víčkem asi 90 mm v průměru.

3.7.6 Sterilní dělené pipety, s nominálním objemem 1 a 10 ml.

3.7.7 Očkovací klička (např. platino-iridiový drát), o průměru asi 3 mm.

3.7.8 Zařízení pro třepání kultivačních zkumavek nebo baněk.

3.7.9 Kultivační zkumavky, o objemu 25 ml nebo ekvivalentní nádoby.

3.7.10 Vortex mixer vhodný pro kultivační zkumavky o objemu 25 ml nebo ekvivalentní nádoby.

3.7.11 Laboratorní lžička.

3.7.12 pH metr, s tepelnou kompenzací a měřicí elektrodou.

3.7.13 Nastavitelná mikropipeta až na objem 200 µl.

3.7.14 Vodní lázeň.

3.7.16 Analytické váhy.

3.7.17 Sterilní plastová láhev např. 125 ml, 200 ml a 500 ml.

3.7.18 Kontejner autoklávovatelný.

3.7.19 Centrifuga.

3.8 Pracovní postup.

3.8.1 Příprava definované suspenze bakteriálního testovacího kmene v laboratoři

Pro přípravu definované suspenze bakteriálního testovacího kmene se použijí následující lyofilizované referenční materiály:

Salmonella Senftenberg H₂S negativní

nebo/a

Escherichia coli

nebo/a

Enterococcus faecalis

POZNÁMKA: Vyhláška č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s bioodpady vyžaduje pro validaci účinnosti hygienizace jako vnesený indikátorový organismus bakterie *Salmonella senftenberg* W 775 (H₂S negativní) a nebo *Escherichia coli*.

POZNÁMKA: Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002 ze 3. října 2002, kterým se stanoví hygienická pravidla týkající se vedlejších živočišných produktů, které nejsou určeny k lidské spotřebě (ve znění Nařízení Komise (ES) č. 208/2006, Annex VI a VIII) vyžaduje pro validaci účinnosti hygienizace jako vnesený indikátorový organismus *Salmonella senftenberg* W 775 (H₂S negativní) a/nebo *Enterococcus faecalis* (podle způsobu hygienizace).

Příprava definované bakteriální suspenze vyžaduje následující tři kroky:

1. Příprava rekonstitučního roztoku:

Referenční materiál se suspenduje v 9 ml standardní živné půdy I Inkubuje se při 36±2 °C po dobu 22±2 hod. v temnu, s nebo bez třepání.

2. Příprava čisté kultury (zásobní kultury) inokulací pevného média:

Nabere se plná klička (10 µl) kultury (dle bodu 1) a zaočkuje se standardní živný agar I (4.6.1). Inkubuje se v temnu při 36 °C±2 °C po dobu 22±2 hod. Po inkubaci může být kultura na agaru uchovávána při 4 °C po dobu až 7 dnů.

3. Příprava finální bakteriální suspenze (spikovací suspenze):

Kličkou se asepticky přenese pět kolonií ze standardního živného agaru I (4.6.1) přímo do 500 ml standardní živné půdy I (4.6.2). inkubuje se při 36 °C±2 °C po dobu 22±2 hod. v temnu, s nebo bez třepání.

Tato bakteriální suspenze (**spikovací suspenze**) se použije pro umělou kontaminaci matrice v testovacím uzavřeném systému typu 1 a typu 2.

3.8.2 Stanovení počátečního počtu bakterií v připravené suspenzi

Princip:

1. Vezme se alikvotní část (1 ml) čerstvě připravené finální spikovací suspenze. Připraví se sada ředění 1:10 – 1 ml spikovací suspenze + 9 ml sterilního roztoku NaCl (3.6.3) – až do ředění 10⁻⁷.
2. Po promíchání, se přenese 0.1 ml z posledních třech ředění (10⁻⁵, 10⁻⁶ a 10⁻⁷) vždy na dvě plotny se standardním živným agarem I (3.6.1).
3. Na všech plotnách se po povrchu agaru rozetře inokulum s použitím sterilní laboratorní lžičky otáčením plotny rukou nebo na otočné desce.
4. Inkubuje se při 36°C ± 2°C po dobu 20±2 hod.
5. Spočítá se počet vyrostlých kolonií na každé agarové plotně. Ideální počet vyrostlých kolonií se pohybuje mezi 30 až 300 koloniemi na jedné plotně. Pokud počet kolonií přesáhne horní mez, připraví se další ředění 10⁻⁸ a 10⁻⁹ a přenese 0.1 ml z obou ředění na dvě plotny se standardním živným agarem I (3.6.1).
6. Spikovací suspenze a všechna ředění se uchovávají při 4 °C ± 2 °C až do doby, kdy se stanoví konečný počet kolonií na příslušných agarových plotnách.

Koncentrace bakterií (KTJ/ml) se vypočítá v neředěné spikovací suspenzi podle následující rovnice:

$$KTJ/ml = \frac{C}{N \times d \times V} \quad (3)$$

kde:

KTJ: kolonie tvořící jednotky

N: počet ploten vzatých v úvahu pro ředění

C: součet KTJ spočítaných na plotnách vzatých v úvahu

d: zředovací faktor

V: objem vzorku (0,1 ml)

Příklad:

Vzorek	KTJ na standardním živném agaru I (duplicitní analýzy)		
	10 ⁻⁶ plotny	10 ⁻⁷ plotny	10 ⁻⁸ plotny
	102, 104	73, 53	21, 30
Celkový počet	224	126	51

$$\text{KTJ/ml} = \frac{120+104}{2 \times 10^{-6} \times 0,1} = \frac{224}{2} \times 10^7 = 112 \times 10^7$$

Počet KTJ v 1ml suspenze = 1,12 x 10⁹

3.8.3 Příprava substrátu, který má být použit jako matrice

3.8.3.1 Všeobecně

Vzorky mají tendenci fermentovat, zejména pokud nejsou upraveny a mohou obsahovat patogenní mikroorganismy. Je nezbytné udržovat vzorky i části vzorků odděleně od potravin a nápojů. Při přepravě a nakládání se vzorky je nezbytné, aby byla dodržována národní a mezinárodní nařízení vztahující se ke vzorkům, které obsahují infekční agens.

Dodržování čistoty při práci je nezbytné. Při zacházení se vzorky je nutné mít rukavice, chránit oči a obličej. Zároveň je nutné chránit ochranným oděvem celé tělo a hlavu bezpečnostním štítem. Je třeba zamezit poranění, ke kterému by mohlo dojít explozí vzorkovnic. Plyn, který může vznikat dodatečnou fermentací matric vzorků, je obvykle hořlavý, takže veškeré zařízení v okolí musí být nehořlavé, aby nebyly zdrojem požáru.

Viz také UPOZORNĚNÍ v úvodu.

3.8.3.2 Substrát pro bioplynové stanice a pasterizační jednotky

Princip:

1. Odebere se asi 1 l určené matrice (vstupní suroviny nebo jejich směsi) do plastové lahve
2. Sterilizuje se v autoklávu při 121 °C ± 3 °C po dobu 15 ± 2 min. k získání určené matrice bez bakterií, které se přidávají jako suspenze.
3. Po autoklávování se upraví hodnota pH na 6,5–7,0.

3.8.3.3 Substrát pro kompostování

Princip:

1. Odebere se tolik určené matrice, kolik je potřeba pro naplnění zamýšleného počtu TCS 2 (počítá se asi 300 g matrice na TCS 2) v kontejnerech nebo sterilních plastových sáčcích.
2. Po odběru určené matrice, se matrice vloží do kovového kontejneru.
3. Sterilizuje se v autoklávu při 121 °C ± 3 °C po dobu 15 ± 2 min. k získání určené matrice bez bakterií, které se přidávají jako suspenze.

3.8.4 Příprava testovacího uzavřeného systému

3.8.4.1 Testovací uzavřený systém typu 1 (TCS 1)

Tento typ uzavřeného systému se používá pro více nebo méně tekuté substráty, u kterých se předpokládá, že budou zpracovány v bioplynové stanici nebo pasterizační jednotce (např. hnůj, odpad ze stravování, kal z čistíren odpadních vod). Několik testovacích uzavřených

systémů tohoto typu se může exponovat procesu, v závislosti na mechanických silách, které se očekávají na místě expozice buď, upevněné na tyči bez mechanické ochrany nebo ve vhodném ochranném zařízení, příklady jsou uvedeny v příloze A.

Popis:

TCS 1 (viz obr. 1 v příloze A) sestává z dutého syntetického válce (polykarbonát) krytého na obou stranách semi-permeabilními polykarbonátovými membránami (velikost pórů 20 µm), které jsou upevněny dvěma těsníci šroubovacími kroužky. Polykarbonátový membránový filtr umožňuje přístup rozpustných a plyných sloučenin ze substrátu k testovacím organismům bez kontaminace okolního prostředí. Je možné použít i jiný testovací uzavřený systém, ve kterém je zaručen přístup rozpustných a plyných sloučenin, ale je zamezen únik bakteriální suspenze do okolního prostředí.

3.8.4.2 Testovací uzavřený systém typu 2 (TCS 2)

Tento typ uzavřeného systému se používá pro pevné matrice (u kterých se předpokládá, např., že budou kompostovány), obr.2a, b.

Popis:

TCS 2 sestává z 225 g určené matrice (např. kompost) spikované 25 ml suspenze bakteriálních testovacích kmenů. Důkladně promíchaný vzorek se vloží do 30 x 30 cm sáčku vyrobeného z materiálu na Raschel sáčky nebo podobné sterilní tkaniny (viz odstavec 3.8.5.2).

Lze použít i jiné množství matrice a tomu odpovídající množství suspenze a zároveň je třeba uzpůsobit velikost sáčku (obr. 2a, b).

3.8.5 Plnění a inokulace uzavřeného systému

S TCS 1 a TCS 2 se zachází při plnění a reizolaci testovacích bakterií různým způsobem.

3.8.5.1 Uzavřený systém typu 1 (TCS 1)

Princip:

1. Jedna strana testovacího kontejneru se uzavře podložkou membrány, membránovým filtrem a uzavíracím kroužkem (viz Příloha A, obr. 1). Prázdná Petriho miska se položí na váhu a na ni se položí TCS 1 s otevřenou stranou. Přímou do TCS 1 se naváží 9 g určené matrice.
2. Přidá se 1 ml spikovací suspenze (4.8.1) – pomocí sterilních dělených pipet.
3. Důkladně se promíchá sterilní skleněnou tyčinkou.
4. TCS 1 se uzavře podložkou membrány, membránovým filtrem a uzavíracím kroužkem (viz Příloha A, obr. 1).
5. Konečný počet bakterií v TCS 1 by měl být mezi 10^7 a 10^8 KTJ/g.
6. Připraví se nejméně jeden TCS 1 navíc než je požadováno pro expozici v procesu, který má být validován jako neupravená kontrola (NK).
7. Inokulované TCS 1 se mohou uložit na maximálně 15 h při teplotách mezi +4 °C a +8 °C dokud nejsou exponovány v bioplynové stanici nebo pasterizační jednotce.

Příklad inokulace suspenze:

KTJ/ml ve spikovací suspenzi	Objem spikovací suspenze použitý pro umělou kontaminaci	Substrát v TCS 1 (v g)	Konečná koncentrace bakterií ve spikovaném substrátu v TCS 1 (v KTJ/ml)
10^9	1 ml	9 g	10^8
10^8	1 ml	9 g	10^7
10^7	1 ml	9 g	10^6

POZNÁMKA 3: Počet bakterií v TCS 1 závisí na koncentraci bakterií ve spikovací suspenzi a typu spikované matrice a měl by být ověřen metodou stanovení sledovaného vneseného indikátorového organismu vždy před expozicí testovacího uzavřeného systému procesu (neupravená kontrola).

3.8.5.2 Uzavřený systém typu 2 (TCS 2)

Princip:

1. Naváží se 225 g substrátu do 1 l sterilní plastové lahve (nebo jiného zvoleného množství (3.8.4.2)).
2. Tento substrát se inokuluje spikovací suspenzí (3.8.1) pomocí sterilní dělené pipety přidáním alikvotů ml v 5 krocích.
3. Po každém kroku se láhev uzavře a důkladně ručně protřepe, před přidáním dalšího podílu. Nakonec se důkladně, dokonale promíchá.
4. Toto je inokulovaný TCS 2 s konečnou koncentrací použitých bakterií mezi 10^7 a 10^8 KTJ/g.

POZNÁMKA: Počet bakterií v TCS 2 závisí na koncentraci bakterií ve spikovací suspenzi a typu spikovaného substrátu a měl by být okamžitě ověřen pomocí metod stanovení jednotlivých indikátorových organismů před expozicí testovacího uzavřeného systému procesu (neexponovaná kontrola).

POZNÁMKA: Koncentrace bakterií v TCS 1 závisí na koncentraci bakterií ve spikovací suspenzi.

KTJ/ml ve spikovací suspenzi	Objem spikovací suspenze použitý pro umělou kontaminaci	Substrát v plastové kádince (v g)	Konečná koncentrace bakterií ve spikovaném substrátu v TCS 1 (v KTJ/ml)
10^9	25 ml	225 g	10^8
10^8	25 ml	225 g	10^7
10^7	25 ml	225 g	10^6

- Jestliže byl vzorek spikován, musí uplynout nejméně 1 h mezi spikováním a přenosem do TCS 2
- Po 1 h se přenesou spikovaný substrát do TCS 2 a skladuje v lednici při 5 ± 3 °C dokud nejsou uloženy do zařízení (např. kompostárny).

3.8.6 Expozice TCS procesu na definovaných místech vhodným způsobem po určenou dobu expozice

Expozice TCS je závislá na situaci v procesu zpracování (technologii). Doba expozice TCS musí odpovídat nejkratší době, po kterou se očekává, že matrice zpracovávána v procesu zpracování (např. pasterizace při 70 °C po dobu 60 minut).

TCS se musí umístit na různá místa v procesu, která jsou reprezentativní pro proces a která mohou být považována za kritické kontrolní body. V procesech, kde se nemůže očekávat homogenní distribuce teploty nebo koncentrace chemikálií, místa expozice musí reprezentovat nejnižší teplotu nebo koncentraci, nejvyšší teplotu nebo koncentraci a střední teplotu nebo koncentraci. Všeobecně se musí vložit minimálně 10 TCS na tato reprezentativní místa v procesu. V procesu, ve kterém se očekává homogenní distribuce teploty nebo chemikálií (vzhledem dříve provedeným měřením, např. pasterizační jednotka), se musí exponovat nejméně 4 TCS. V místech, kde jsou exponovány TCS, musí být paralelně měřeny a zaznamenávány příslušné parametry procesu (tj. teplota nebo hodnota pH). Tyto údaje jsou

považovány za kritické body procesu a musí být kontinuálně kontrolovány v dalším běžném provozu.

3.8.7 Vyjmutí TCS a stanovení zbytkového počtu bakterií z exponovaných matic

TCS se po expozici vyjmou a přepravují uložené v chladícím boxu do laboratoře a zpracují se co nejdříve jak je to možné, ale ne za delší dobu než 12 h. Pokud se validuje chemický proces (např. vápnění) je nutná okamžitá neutralizace kontaminované matrice z TCS. Indikátorové organismy vnesené v kontejnerech jako spikovací suspenze se stanovují metodami uvedenými v Části 1, kapitolách 2.1, 2.2 a 2.3.

3.8.8 Stanovení stupně inaktivace

Validace účinnosti biotechnologických, termálních a chemických procesů musí prokázat, že proces dosáhl požadované celkové redukce podle stávajícího právního předpisu.

Jestliže redukce vneseného indikátorového organismu po expozici nevyhovuje požadavkům uvedeným v právním předpise, účinnost hygienizace procesu se považuje za nedostatečnou.

POZNÁMKA: Pro validaci podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002 z 3. října 2002, kterým se stanoví hygienická pravidla týkající se vedlejších živočišných produktů, které nejsou určeny k lidské spotřebě (ve znění Nařízení Komise (ES) č. 208/2006, Annex VI a VIII) vyžaduje pro validaci účinnosti hygienizace jako vnesený indikátorový organismus *Salmonella senftenberg* W 775 (H₂S negativní) a/nebo *Enterococcus faecalis* (podle způsobu hygienizace) je třeba:

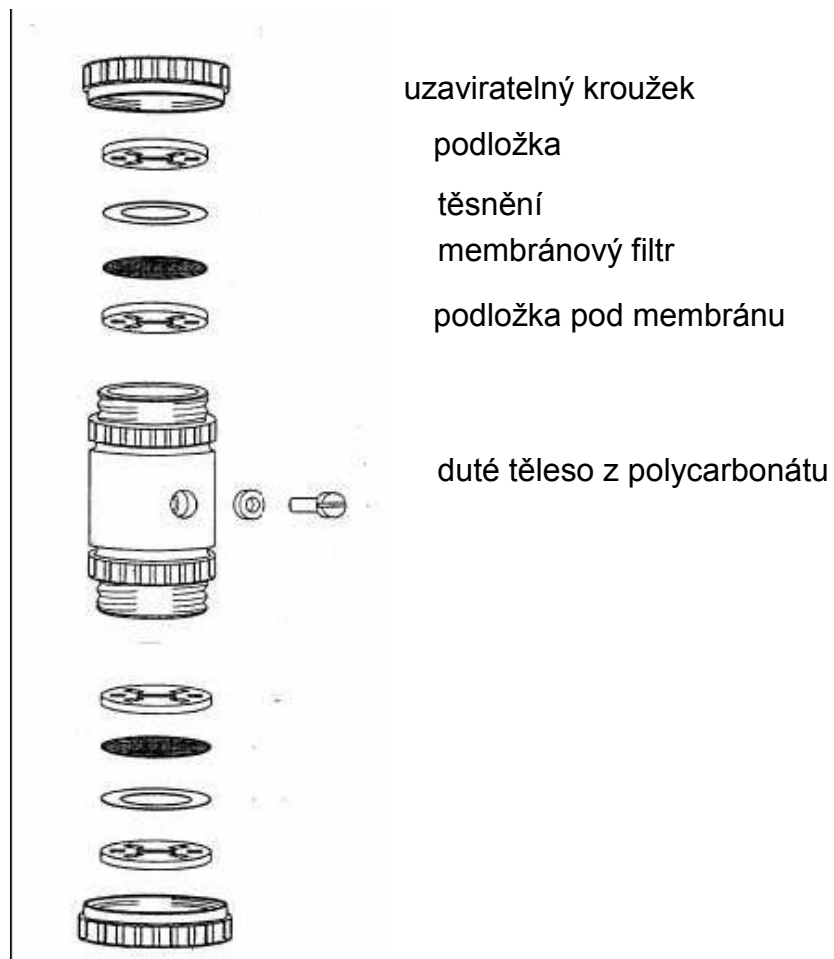
- snížení o pět řádů *Enterococcus faecalis* nebo *Salmonella Senftenberg* (775W, H₂S negativní)

POZNÁMKA: Pro validaci podle vyhlášky č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s bioodpady je třeba:

- snížení o šest řádů *Salmonella senftenberg* W 775 (H₂S negativní) nebo *Escherichia coli*.

Příloha A ke kapitole 4 - Validace účinnosti hygienizace vegetativními buňkami

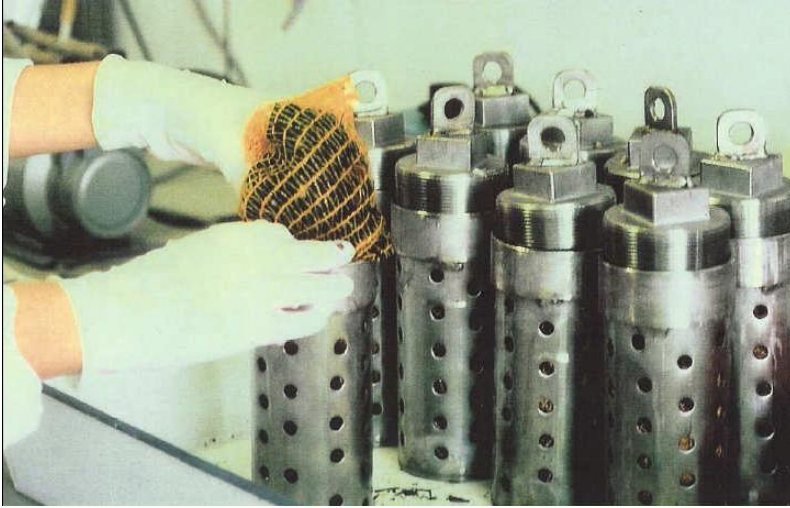
Obr. 1: TCS 1 pro zařízení zpracovávající tekuté matrice



Obr. 2: TCS-2 pro zařízení zpracovávající pevné matrice
a)



b)



4 VALIDACE ÚČINNOSTI HYGIENIZACE BIOTECHNOLOGICKÝCH, TEPELNÝCH A CHEMICKÝCH PROCESŮ STANOVENÍM POČTŮ VYBRANÝCH ENDOGENNÍCH ORGANISMŮ V SUBSTRÁTU PŘED A PO ZPRACOVÁNÍ A VÝPOČET STUPNĚ REDUKCE (ANALÝZA VSTUPU-VÝSTUPU)

4.1 Úvod

Jak bylo zmíněno již v kapitole 3.1 schopnost procesu minimalizovat rizika způsobená patogeny v surovinách, nemůže být hodnocena jenom analýzou přítomnosti nebo absence indikátorových organismů (bakterií, virů, plísní a hub nebo parazitů) v konečném produktu. Nepřítomnost jednoho nebo všech zmíněných indikátorů ve finálním produktu může být způsobena několika důvody. Nemusí být přítomny v surovině nebo mohou být přítomny v surovině, ale v nízkém počtu (méně než 5 log). Dalším důvodem je, že neexistují dostatečně obohacující postupy pro metody reizolace cílového indikátorového organismu ve vyšetřované matici (zkoncentrování, např. bakterie) nebo neexistuje technicky možná kvantitativní izolace indikátorového organismu vzhledem k vlivu složité matrice (např. viry).

Proto je třeba hodnocení účinnosti založit na jiné strategii. Jedním ze způsobů je hodnocení účinnosti hygienizace analýzou vstup – výstup. Možnost validace procesu analýzou vstupu-výstupu určitého indikátoru za reálných podmínek závisí na mikrobiologických vlastnostech zpracovávaného vstupního materiálu. V případě, že je proveditelnost metody vstup- výstup limitována reálnými podmínkami, je třeba použít proces validace s jedním nebo více reprezentativními testovacími indikátorovými organismy.

UPOZORNĚNÍ – „Odpady a vzorky kalu mohou obsahovat nebezpečné a hořlavé látky. Mohou obsahovat patogeny a podléhat biologické aktivitě. Proto se doporučuje, aby se s těmito vzorky zacházelo se zvláštní péčí. Plyny, které mohou být produkovány mikrobiální činností jsou potenciálně hořlavé a mohou způsobit přetlak v uzavřených lahvích. Explodující lahve by pravděpodobně mohly způsobit uvolnění infekčních částic z explodujícího objektu a/nebo uvolnění patogenních aerosolů. Pokud je to možné, je třeba se vyhnout používání skleněných lahví. Vzhledem k mikrobiologickému riziku spojenému s touto metodou by měly být dodržovány předpisy pro bezpečnou práci v mikrobiologické laboratoři.

POZNÁMKA: Pokud je bakteriální počet v neupravené určené matrice (vstupní materiál) pod 10^6 KTJ/ml nebo g nebo počet fágů pod 10^5 PFU/ml nebo g, nemůže být použita tato metoda.

4.2 Předmět a vymezení působnosti

Tato část návodu popisuje postup s endogenními vegetativními bakteriemi (*Escherichia coli*, *Salmonella sentenberg*, *Enterococcus faecalis*) pro validaci biotechnologických, tepelných a chemických procesů pro zpracování vedlejších živočišných produktů, kalu z čistíren odpadních vod a bioodpadů, který má zabezpečit hygienickou bezpečnost výstupů z technologií zpracovávajících určené matrice (např. hnojiv, digestátů, kompostů nebo srovnatelných produktů).

Metoda je vhodná pro stanovení účinnosti biotechnologických, tepelných a chemických procesů zpracování (CEN/TC 308 – doc. 525 (REVIZE Směrnice 86/278/EEC – 3rd Draft a Nařízení (ES) No 208/2006) pro eliminaci patogenů v nezpracovaném substrátu. Procesy zpracování jsou validovány na redukci log₁₀ na vybraných organismech přítomných v nezpracovaném substrátu jako např. *Enterokoky*, *Escherichia coli* a somatické kolifágy. *Enterokoky* a *E. coli* mohou být považovány v rámci určitých omezení, za zástupce nesporulujících bakteriálních patogenů a patogenních virů s průměrnou chemo- a termorezistencí, zatímco somatické kolifágy mohou být použity jako náhrada termorezistentních patogenních virů. Pokud není jinak určeno právním předpisem, obvykle se

užívá pro validaci aerobních termofilních procesů, jako je kompostování a chemické procesy, *E. coli* a *Enterococcus faecalis*, zatímco pro termofilní anaerobní procesy a tepelné procesy jsou převážně validovány pouze enterokoky. Pokud je vyžadována redukce termorezistentních virů provádí se stanovením somatických kolifágů.

4.3 Normativní odkazy

4.3.1 Definice

Pro účely této evropské normy platí termíny a definice, které jsou uvedeny v kapitole 3.3.1.

4.3.2 Citované a související normativní předpisy

Jsou uvedeny v části 1, kapitole 1.3.

4.4 Symboly a zkratky

IR: stupeň inaktivace

4.5 Princip validačního procesu analýzou vstupu-výstupu

Postup pro validaci různých procesů pomocí analýzy vstupu-výstupu vyžaduje následující stupně:

1. Stanovení minimální doby zdržení procesu
2. Stanovení počátečního počtu vybraných endogenních organismů v nezpracované matici (vstupní surovina nebo směs surovin)
3. Stanovení počátečního počtu vybraných endogenních organismů ve zpracované matici
4. Výpočet stupně inaktivace

POZNÁMKA: Pro stanovení minimální doby zdržení může být použita jakákoli metoda, pokud je validována na příslušné matici.

Validace analýzou vstupu - výstupu má být provedena dvakrát v oddělených časových úsecích. Pokud je proces, který má být validován, ovlivněn klimatickými faktory, nejméně jedna validace musí být provedena v teplém a jedna v chladném ročním období.

4.6 Činidla, zřed'ovací roztoky a kultivační média

K zajištění reprodukovatelných výsledků, se připravují kultivační média a zřed'ovací roztoky s použitím složek standardní kvality a chemikálie zaručené analytické kvality nebo dehydratovaná média nebo kompletní média, připravená podle pokynů výrobce. Připravují se z destilované nebo demineralizované vody, která neobsahuje látky schopné inhibovat růst za podmínek zkoušky [ISO 8199].

Potřebná činidla zřed'ovací roztoky a kultivační média jsou uvedeny v jednotlivých kapitolách pro stanovení sledovaných indikátorových organismů 2.1.5, 2.2.5, 2.3.5.

4.7 Přístroje

S výjimkou komerčně dodávaného sterilního skla, musí být skleněné nádoby a pomůcky sterilizovány podle pokynů daných v ISO 8199.

Obvyklé vybavení mikrobiologické laboratoře a zejména přístroje uvedené v kapitole 3.7, 2.1.6, 2.2.6 a 2.3.6.

4.8 Stanovení počátečního počtu mikroorganismů v nezpracované matrici (vstup)

Pokud není právním předpisem stanoveno jinak, musí se odebrat 10 vzorků ze vstupního materiálu (nezpracovaného substrátu) a musí se stanovit počet vybraných sledovaných organismů, které se musí stanovit příslušnou metodou (2.1, 2.2, 2.3).

POZNÁMKA 9: Před jakoukoli další přípravou materiálů a stanovení minimální doby zdržení musí být stanoven počáteční počet cílových mikrobiálních parametrů. Pokud je počet bakterií nižší než 10^6 KTJ/ml nebo g nebo počet fágů je nižší než 10^5 PFU/ml nebo g nelze tuto metodu validace použít. V takovém případě musí být provedeny metody pro validaci účinnosti hygienizace biotechnologických, tepelných a chemických procesů metodou vnesených organismů (kapitola 4).

4.9 Stanovení počátečního počtu mikroorganismů ve zpracované matrici (výstup)

Vzorky musí být odebírány jak ve vstupu, tak ve výstupu s ohledem na stanovenou hydraulickou dobu zdržení. Doba mezi odebráním vzorků vstupu a odebráním vzorků výstupu by měla stejná jako je zjištěná hydraulická doba zdržení. Pokud není právním předpisem stanoveno jinak, musí se odebrat 10 vzorků ze vstupního a 10 z výstupního materiálu (zpracované matrice). Výsledné počty stanovovaných indikátorových organismů se stanoví metodami uvedenými v části 1.

4.10 Stanovení stupně inaktivace (IR)

Vypočítá se hodnota mediánu z výsledků stanovených ve vzorcích vstupu (med I) a z výsledků vzorků výstupu (med 0). Stupeň inaktivace v procesu se vypočítá podle následující rovnice:

$$\log IR = \log \text{med I} - \log \text{med 0} \quad (4)$$

Pokud není legislativou stanoveno jinak, **log IR by měl být 5 pro bakteriální parametry a 4 pro bakteriofágy**. Pokud redukce po expozici nevyhovuje uvedeným požadavkům bude proces považován za nedostatečný pro hygienizaci substrátu.

Literatura

1. CEN/TC 308 – doc525:2001, Revision of Directive 86/278/EEC (3rd Draft). *Characterization of sludges*. Brussels : European Committee for Standardization (CEN), 2001.
2. Snyder, ML., Lichtstein, HC. Sodium azide as an inhibiting substance for gramnegative bacteria. *Journal of infectious diseases*, 1940, vol. 67, no. 1, p. 113-115.
3. Litsky, W., Mallmann, WL., Fifield, CW. A new medium for the detection of enterococci in water. *American journal of public health and the nation's health*, 1953, vol. 43, no. 7, p. 873-879.
4. Mossel, DAA., Bijker, PGH., Eelderling, J. Streptokokken der Lancefield-Gruppe D in Lebensmittel und Trinkwasser – Ihre Bedeutung, Erfassung und Bekämpfung. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 1978, vol. 29, p. 121-127.
5. De Man, JC. MPN-tables, corrected. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 1983, vol. 17, no. 5, p. 301-305.
6. COMMISSION REGULATION (EC) No 208/2006 of 7 February 2006 amending Annexes VI and VIII to Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the Council as regards processing standards for biogas and composting plants and requirements for manure. *Official journal of the European Union*, 2006, vol. 49, no. L36, p. 25-31.
7. Rambach, A. New plate medium for facilitated differentiation of Salmonella spp. from Proteus spp. and other enteric bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 1990, vol. 56, no. 1, p. 301-303.
8. EN 1040:1997. *Chemical disinfectants and antiseptics - basic bactericidal activity. Test method and requirements (phase 1)*. Brussels : European Committee for Standardization (CEN), 1997.
9. pr CEN BT/TF 151 - WP 3-Part I. *Methods for the validation of biotechnological, thermal and chemical processes for the treatment of animal by-products, sewage sludge and biowastes in order to determine the hygienic safety of the resulting fertilizers or comparable products by exposition of test organisms or test viruses – Part 1 : Validation with vegetative bacteria*. Brussels : European Committee for Standardization (CEN), 2007.
10. pr CEN BT/TF 151 - WP 3-Part II. *Methods for the validation of biotechnological, thermal and chemical processes for the treatment of animal by-products, sewage sludge and biowastes in order to determine the hygienic safety of the resulting fertilizers or comparable products by determination of the count of selected endogenous organisms in the substrate before and after processing and calculation of the reduction rate (Input-Output- Analysis)*. Brussels : European Committee for Standardization (CEN), 2007.