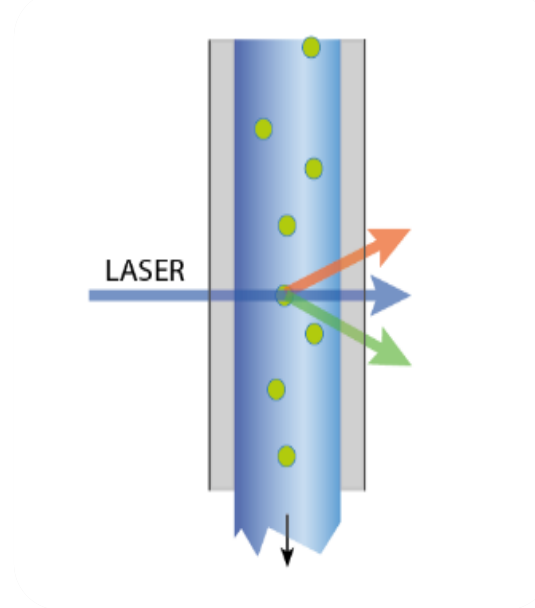


Průtoková cytometrie (FCM)

1

**Metoda pro sledování mikrobiologie vody
v reálném čase („v přímém přenosu“)**



**Zasedání komise laboratoří SOVAK
ÚV Podolí, 2.-3.10.2019**

Expedice do mikrosvětů vody

2

Obsah mikroorganismů ve vodě se vyjadřuje jako jejich počet na 1 mililitr vody.

Otázky:

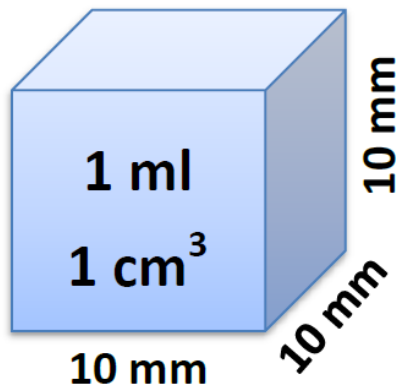
- Jak velký vodní mikrosvět představuje 1 ml vody?
- Kolik buněk se v 1 ml vody vůbec může reálně vyskytovat?
- Kolik mají buňky kolem sebe volného prostoru?
- Jaké maximální množství živin se doporučuje pro biostabilní vodu?

Expedice do mikrosvětů vody

3

Trochu matematiky:

Objem krychle $V = a^3$



Hmotnost 1 ml vody

$$1 \text{ g} = 1\,000\,000 \mu\text{g}$$

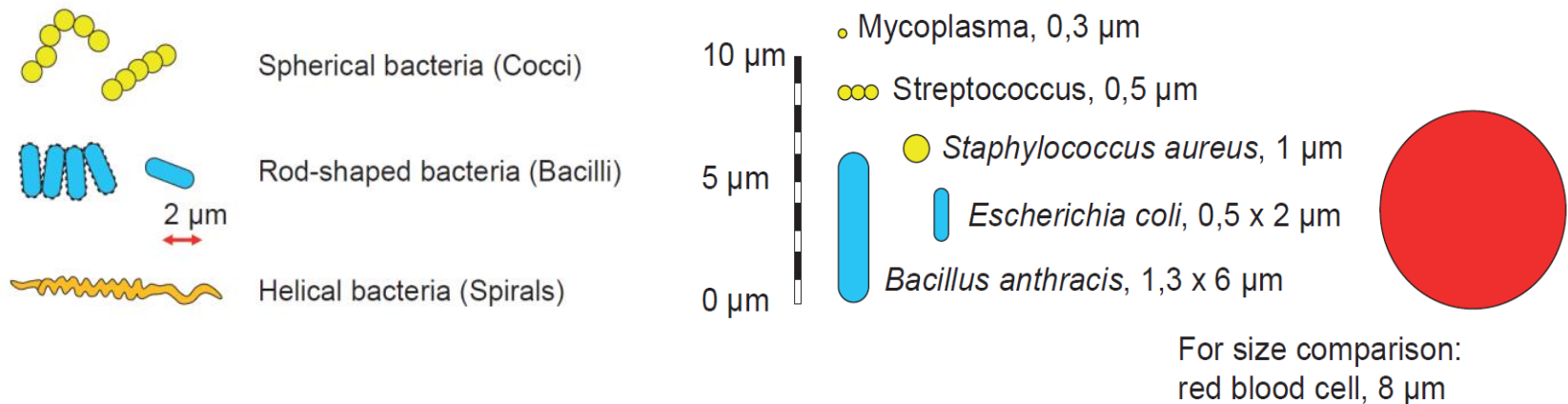
Objemy	Hmotnosti
1 litr = 1 dm^3 (krychle o straně 1 dm)	1 litr vody má hmotnost 1 kg $\approx$ 1000 g
1 ml = 1 cm^3 (krychle o straně 1 cm)	1 ml vody má hmotnost 1 g
1 ml = $1 \text{ cm}^3 = 1\,000\,000\,000\,000 \mu\text{m}^3$ (krychle o straně 10 mm = 10 000 μm)	1 ml neboli 1 000 miliard μm^3 vody má hmotnost 1 g = 1 000 000 μg (viz výše)
1 μm^3 (krychle o straně 1 μm)	1 μm^3 vody má hmotnost 0,000001 μg
1 000 000 $\mu\text{m}^3 = 0,000001 \text{ cm}^3$	1 000 000 μm^3 vody má hmotnost 1 μg

Jak velké jsou vlastně bakterie?

4

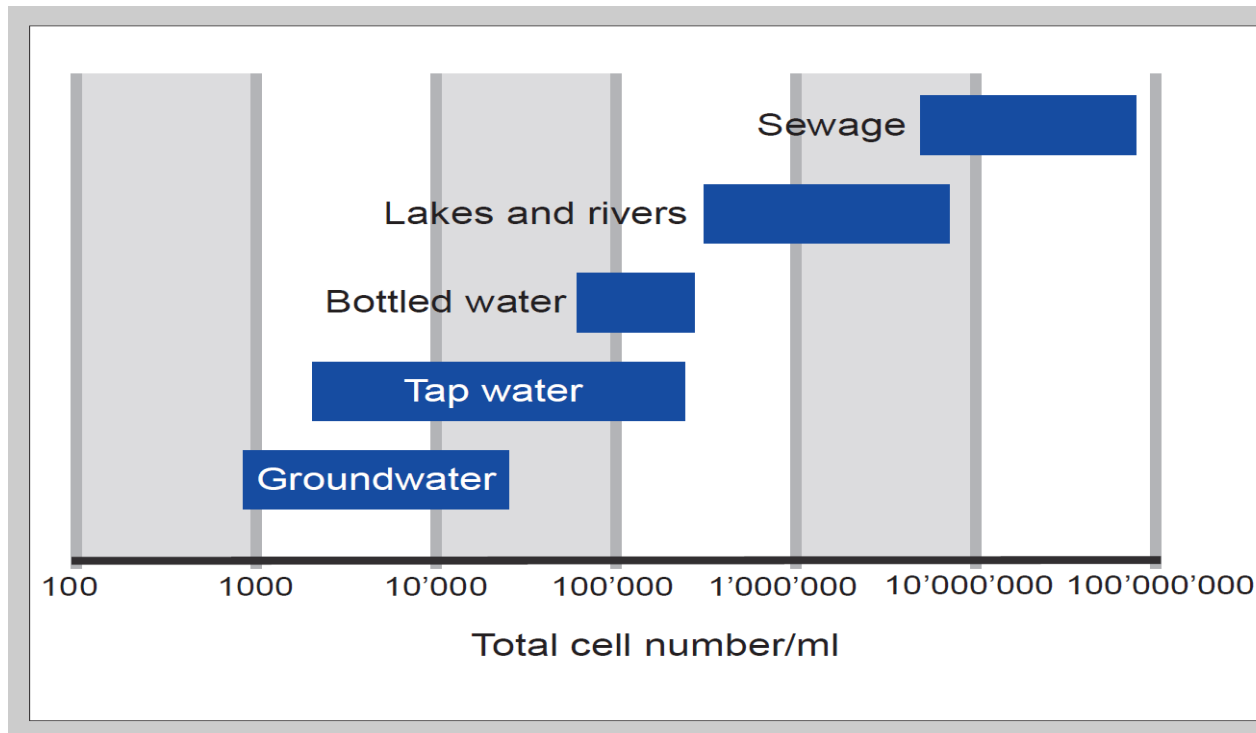
Pro zjednodušení budu v prezentaci používat pro veškeré jednobuněčné mikroorganismy vyskytující se ve vodě název bakterie, případně buňky.

Velikost bakterií se velmi liší, avšak většina bakterií měří 0,6 až 1,0 μm . Protože životní podmínky v pitné vodě jsou obvykle nepříznivé (nízká teplota, nedostatek živin), obsahuje menší bakterie.



Kolik bakterií může žít v 1 ml vody?

5



Počty bakterií se pohybují od hodnot tisíců až desetitisíců bakterií na 1 ml u kvalitní podzemní vody, přes statisíce až miliony bakterií v 1 ml povrchové vody z řek a jezer, až po desítky milionů buněk v 1 ml odpadní vody.

Skutečně se mohou do 1 ml vody vejít

6

i desítky milionů buněk?

Jak jsme si spočítali v úvodu prezentace, objem 1 ml vody si můžeme vyjádřit i jako 1 000 miliard μm^3 .

Pokud budeme pro zjednodušení předpokládat, že 1 buňka má objem 1 μm^3 (koule o průměru 1,24 μm nebo krychle o straně 1 μm), zabírá například 100 000 000 buněk v 1 ml odpadní vody pouhou setinu procenta jejího objemu.

Zbylých 99,99% z tohoto 1 mililitru vody je životním prostředím pro těchto 100 milionů buněk. Pokud budeme předpokládat u buňky stejnou měrnou hmotnost jako u vody, bude těchto 100 milionů buněk mít hmotnost 100 μg .

Mikrobiologie pitné vody

7

Jak si vysvětlíme dále, určení limitu počtu buněk pro pitnou vodu z konkrétního zdroje je do určité míry sofistikovaná záležitost, avšak velmi zhruba lze říci, že **počet buněk v pitné vodě by neměl překračovat 500 000 buněk na ml** (dle dlouholetých zkušeností ze Švýcarska).

Osídlení 1 ml pitné vody mikroorganismy je tudíž velice řídké a pro představu lze konstatovat, že i u vody obsahující 500 000 buněk/ml, připadá na každou z těchto buněk v 1 ml vody životní prostor, který je 2 milion krát větší než její vlastní objem.

Drtivá většina bakterií je pro člověka neškodná. V čisté pitné vodě se vyskytují bakterie přizpůsobené pro život ve studeném prostředí s nízkým obsahem živin (prostředí nepříznivé pro patogenní bakterie).

Asimilovatelný organický uhlík

8

Samozřejmě i bakterie vyžadují pro svůj život a růst živiny - asimilovatelný organický uhlík (AOC). Mikrobiologicky stabilní voda má zpravidla **méně než 50 mikrogramů AOC na litr**. Kvůli nízkému obsahu živin (obsah substrátu) bakterie rostou pomalu nebo vůbec (k dělení buněk nedochází). Za předpokladu neporušené vodovodní sítě (potrubí i vodojemy) lze od přidávání dezinfekčního prostředku (např. chloru) v případě distribuce biostabilní pitné vody zcela upustit.

Koncentrace AOC $50 \mu\text{g/l} = 0,05 \mu\text{g/ml}$ (potrava pro max. 500 000 buněk vážících dohromady cca $0,5 \mu\text{g}$ v 1 ml vody)

Expedice do mikrosvětů vody

9

Rakapitulace odpovědí na otázky v úvodu prezentace:

- Jak velký vodní mikrosvět představuje 1 ml vody?
... z hlediska velikosti mikroorganismů OBROVSKÝ
(1 ml = 1 000 miliard μm^3)
- Kolik buněk se v 1 ml vody může reálně vyskytovat?
... například v odpadní vodě i 100 milionů buněk na 1 ml,
v pitné vodě bývá 5 000 až 500 000 buněk/ml (záleží
na zdroji, způsobu úpravy, obsahu AOC, hygienickém
zabezpečení, atd)

Expedice do mikrosvěta vody

10

Rekapitulace odpovědí na otázky v úvodu prezentace:

- Kolik mají buňky kolem sebe volného prostoru?
 - ... 100 milionů buněk zaujímá v 1 ml vody pouze setinu procenta objemu vody
 - ... při koncentraci buněk v pitné vodě 500 000 na ml připadá na každou buňku životní prostor zhruba 2 miliony krát větší než je její vlastní objem
- Jaké maximální množství živin se doporučuje pro biostabilní vodu?
 - ... 50 µg/l AOC při počtu buněk cca do 500 000 buněk/ml

Průtoková cytometrie (FCM)

11

Metoda průtokové cytometrie byla původně používána pouze v biologii a medicíně.

V posledních desetiletích „Švýcarský federální institut vodních věd a technologie **Eawag**“ společně s několika hlavními producenty pitné vody ve Švýcarsku metodu adaptoval a testoval na vodohospodářských aplikacích.

Metoda umožnila detailněji zmapovat a hlouběji pochopit mikrobiologii vody a mechanismy v ní probíhající při výrobě a distribuci pitné vody.

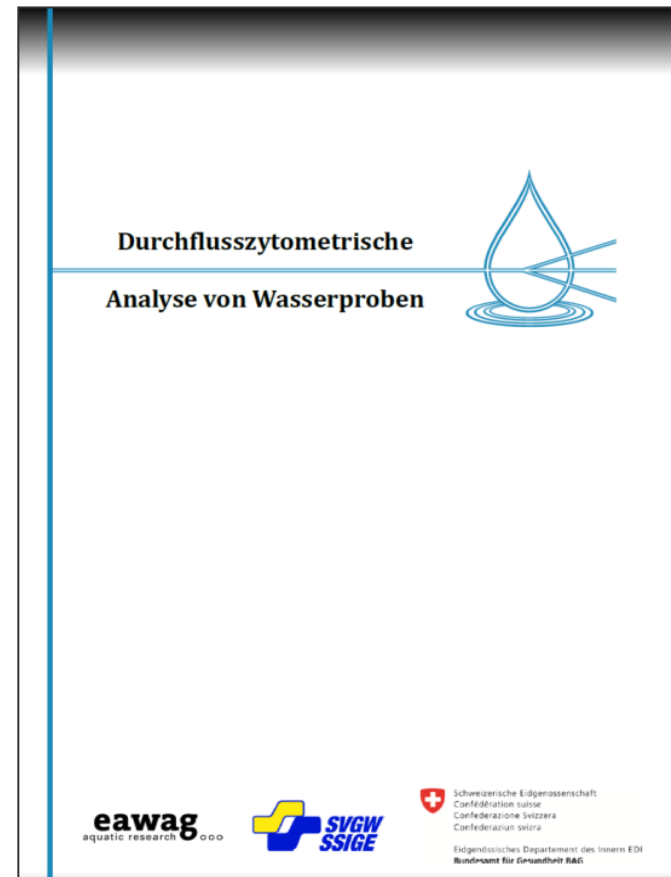
Celkový počet bakterií je určen během 20-ti minut včetně zmapování jejich velikosti a pomocí speciálních barviv lze rozlišit i mezi živými a mrtvými buňkami



19. prosince 2012: Švýcarský federální úřad pro veřejné zdraví (BAG) zahrnul metodu „Analýza vzorků vody průtokovou cytometrií“ do švýcarských předpisů.

 Schweizerische Eidgenossenschaft Confédération suisse Confederazione Svizzera Confederaziun svizra		Federal Department of Home Affairs FDHA Federal Office of Public Health	
333.1		Determining the total cell count and ratios of high and low nucleic acid content cells in freshwater using flow cytometry	

Swiss food book



19. prosince 2012: Švýcarsky federální úřad pro veřejné zdraví (BAG) zahrnul metodu „Analýza vzorků vody průtokovou cytometrií“ do švýcarských předpisů.

Determining the total cell count and ratios of high and low nucleic acid cells in fresh water using flow cytometry

analysis method 333.1
December 2012

II Description of method

1 Aim

Flow cytometry allows precise and rapid detection of the total microbial cell count of a water sample after staining with a fluorescent stain that binds to nucleic acids, as well as the differentiation between small, weak fluorescent (low nucleic acid, LNA) and large, strong fluorescent (high nucleic acid, HNA) bacterial cells that can occur in natural waters as well as drinking water [5; 6; 7; 8; 9; 10; 11].

The main areas of application cover everything from drinking water production, drinking water distribution networks, through to household installations [8; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18].

The method allows determination of microbial bulk parameters and delivers detailed information on the general microbial state and possible existing problems that can be verified with further specific analysis.

FCM - průtoková cytometrie

14

Brožura curyšských vodáren
k problematice mikrobů v pitné vodě

- Kontrola kvality vody
ve vodárnách Zurich
- Pochopení průtokové cytometrie
- Biostabilita vody
- Patogeny
- Svět mikrobů



Stadt Zürich
Wasserversorgung

A brief introduction
to germs in drinking
water



Useful information from the laboratory
on bacteria, viruses and water fungi

natürlich **züri**
wasser

Interpretace výsledků FCM

15

- Výsledky FCM potvrzují mimo jiné i to, co se již vědělo. A to, že i vysoce kvalitní pitná voda obsahuje ve skutečnosti 100 až 10 000 krát více bakterií, než kolik jich lze nakultivovat klasickými metodami. **Pouze 0,01 až 1 % všech buněk je kultivovatelných.**
- Porovnání naměřených výsledků FCM mezi jednotlivými producenty pitné vody může být zavádějící.
- **Limity počtů buněk jednotně stanovit nelze.** Závisí na řadě faktorů (zdroj vody, způsob úpravy, obsahu AOC, hygienické zabezpečení, zdržení vody v síti, atd)
- **Každý producent si musí nashromáždit vlastní empirická data** vývoje počtu buněk za delší časové období a v různých místech vodovodní sítě.

Naše legislativa

16

83

VYHLÁŠKA

ze dne 30. dubna 2014,

kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody,
ve znění pozdějších předpisů

A. Mikrobiologické a biologické ukazatele

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

KTJ22 (3 dny), KTJ36 (2 dny)

17

č.	ukazatel	jednotka	limit	typ limitu	Vysvětlivky
8	počty kolonií při 22 °C	KTJ/ml	Bez abnormálních změn	MH	6
		KTJ/ml	200	DH	7
		KTJ/ml	100	NMH	2
9	počty kolonií při 36 °C	KTJ/ml	Bez abnormálních změn	MH	8
		KTJ/ml	40	DH	9
		KTJ/ml	20	NMH	2

6. Pokud u zásobované oblasti nelze pro malý počet vzorků určit, zda se jedná o abnormální změnu, platí jako mezní hodnota 200 KTJ/ml.
7. Pro náhradní zásobování, pro vodu dodávanou ve vzdušných, vodních a pozemních dopravních prostředcích a pro vodu z malých nedezinfikovaných zdrojů, produkujících méně než 5 m³ za den platí doporučená hodnota do 500 KTJ/ml.
8. Pokud u zásobované oblasti nelze pro malý počet vzorků určit, zda se jedná o abnormální změnu, platí jako mezní hodnota 40 KTJ/ml.

Švýcarská revoluce v mikrobiologii

18

HPC (Heterotrophic plate count)

Počet kolonií při 22°C a 36°C
(indikátory celkového bakt. znečištění)



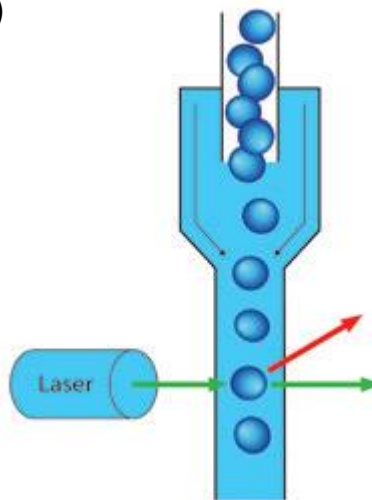
Metoda používaná od roku 1883

manuálně pouze v laboratoři

KTJ22 trvá 3 dny, KTJ36 trvá 2 dny

FCM (Flow cytometry)

Průtoková cytometrie



Od roku 1968

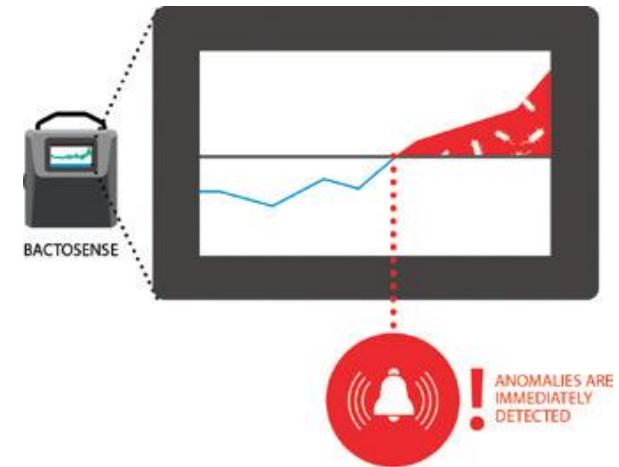
manuálně pouze v laboratoři

trvá cca. 3 hodiny



FCM online

SIGRIST BactoSense



Od roku 2017

automaticky kdekoliv

výsledek za 20 minut



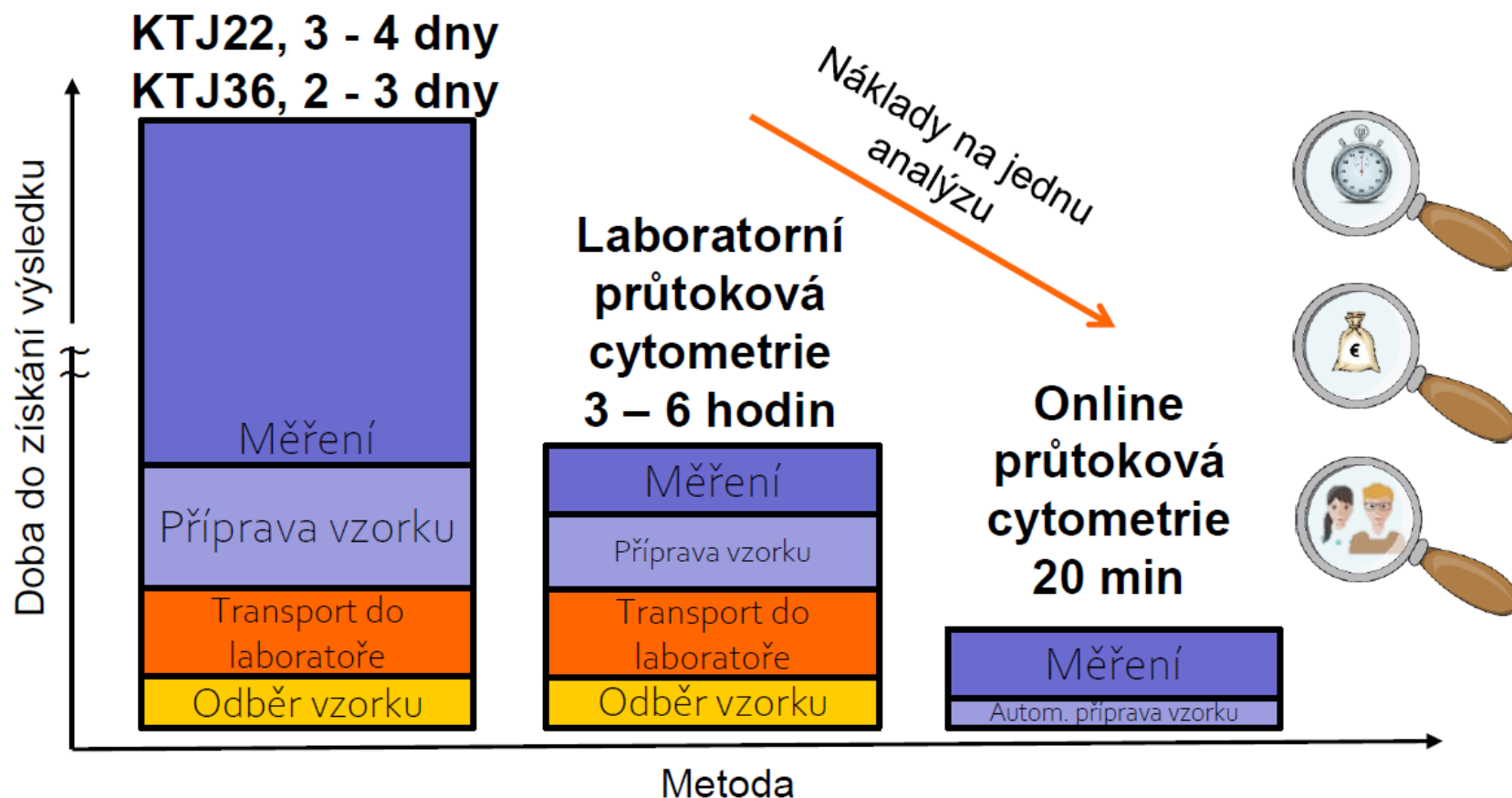
Video BactoSense

Průtoková cytometrie (FCM)

19

Ekonomika investice do FCM

Úspora času a peněz

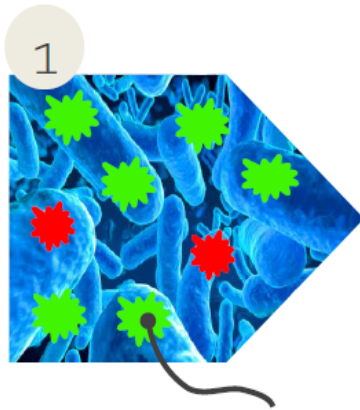


Průtoková cytometrie (FCM)

20

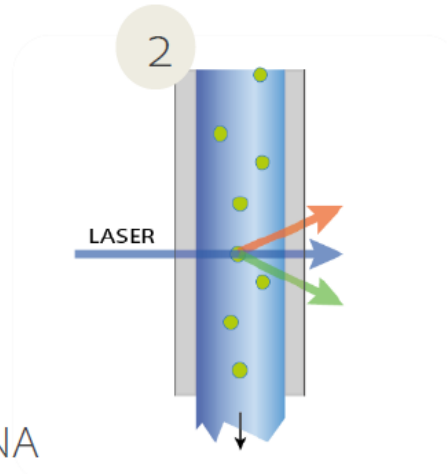
Průtoková cytometrie probíhá ve 3 krocích

Příprava vzorku



Fluorescenční označení DNA

Detekce



Automatické
vyhodnocení
signálů

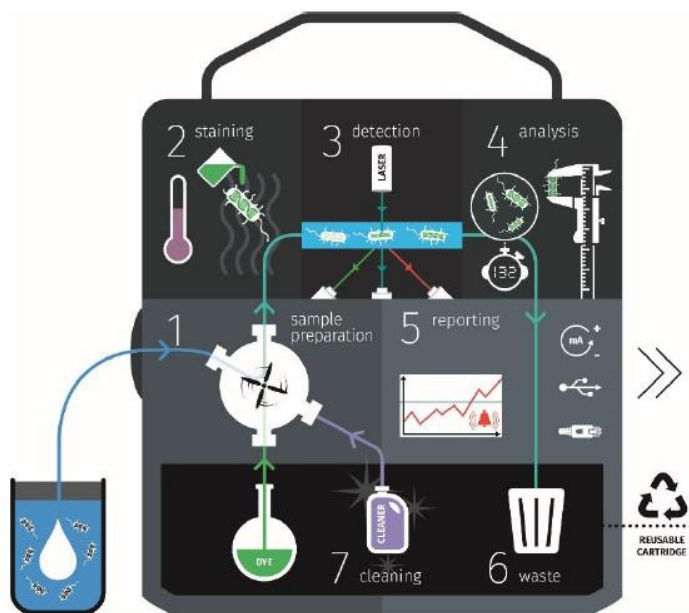


FCM – BactoSense vs. laboratoř

21

Mobilní laboratoř

Snadná obsluha



VS

Odborný laborant



Chemikálie



Pipety



Vortex mixer



Termostat



Příprava
vzorku

Laboratorní průtokový cytometr a PC

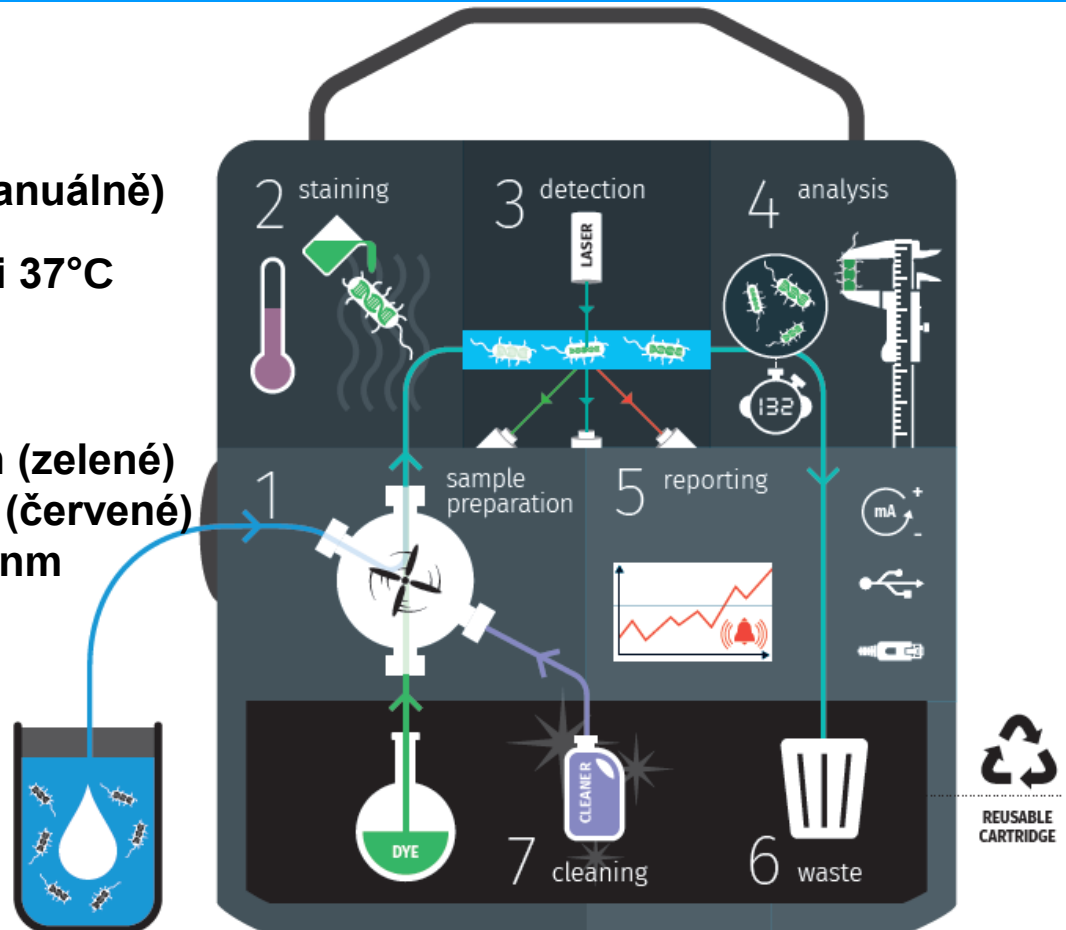


Měření

Postup analýzy

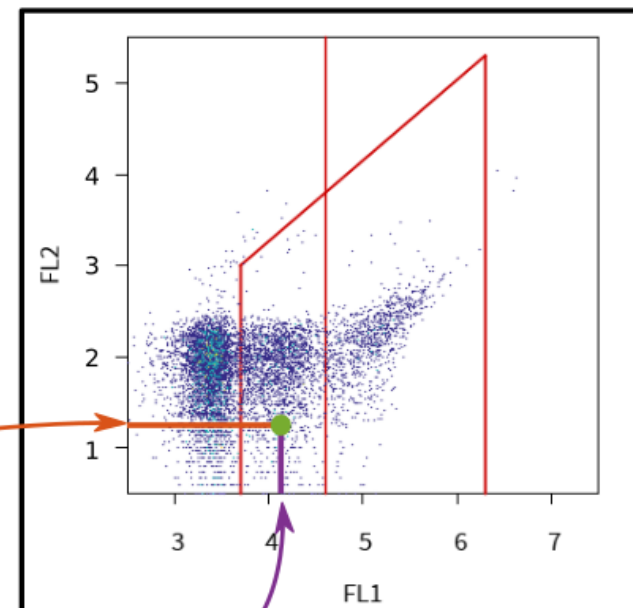
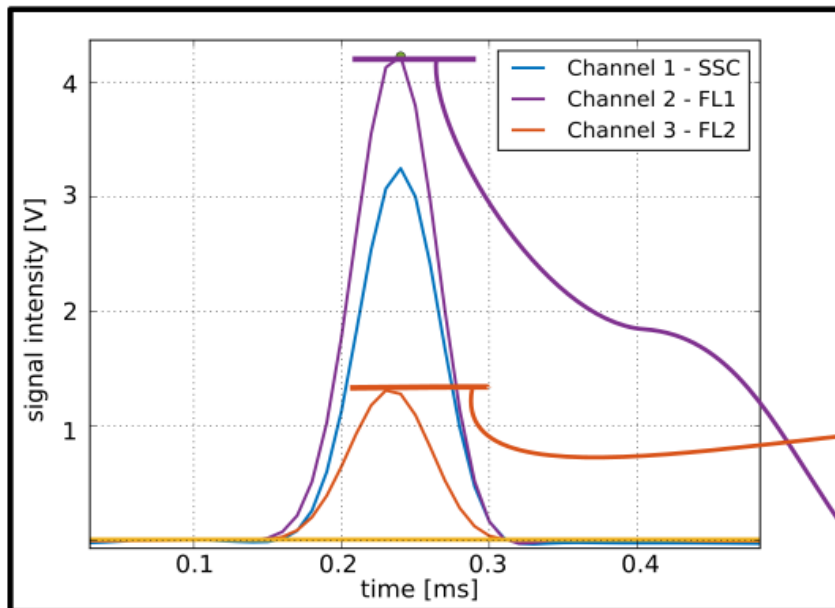
22

- 1) Odběr vzorku (on-line nebo manuálně)
- 2) Obarvení buněk a inkubace při 37°C
- 3) Průtoková cytometrie
laserový zdroj světla 488 nm
fluorescenční detektor 525 nm (zelené)
fluorescenční detektor 715nm (červené)
1 detektor rozptylu světla 488 nm
- 4) Analýza - zpracování hodnot
- 5) Zobrazení výsledků
- 6) Odpad (do kartridže)
- 7) Čištění (z kartridže)



Způsob detekce a vyhodnocení

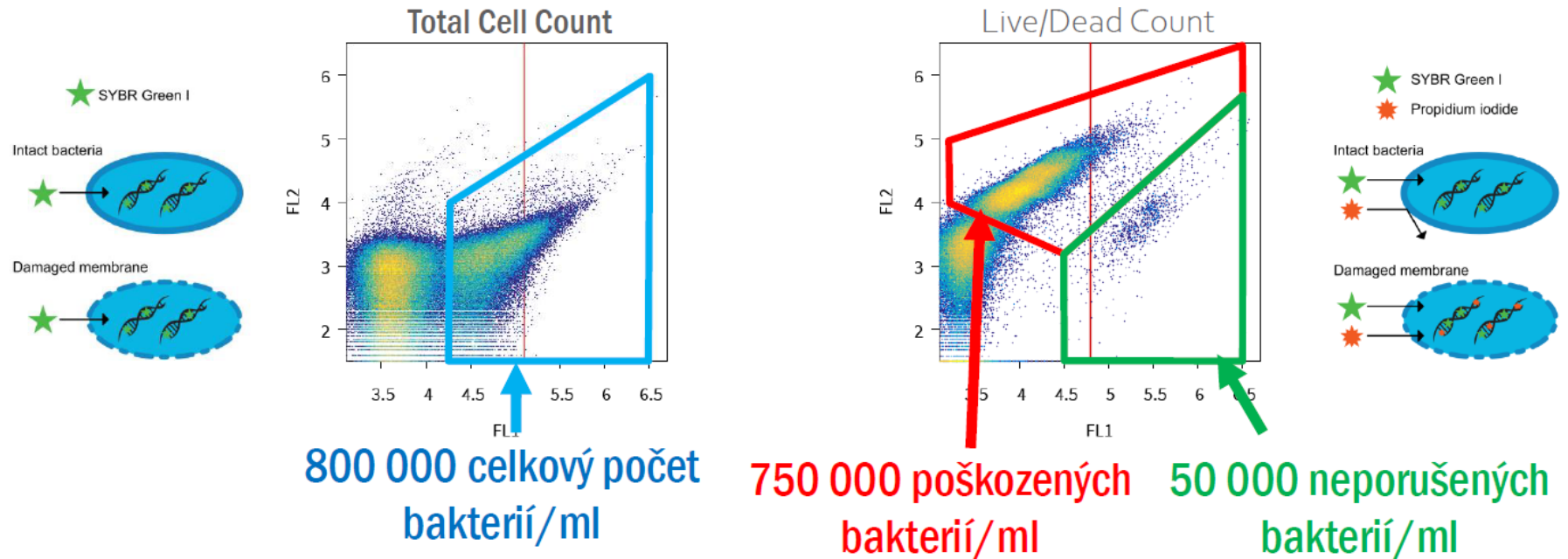
23



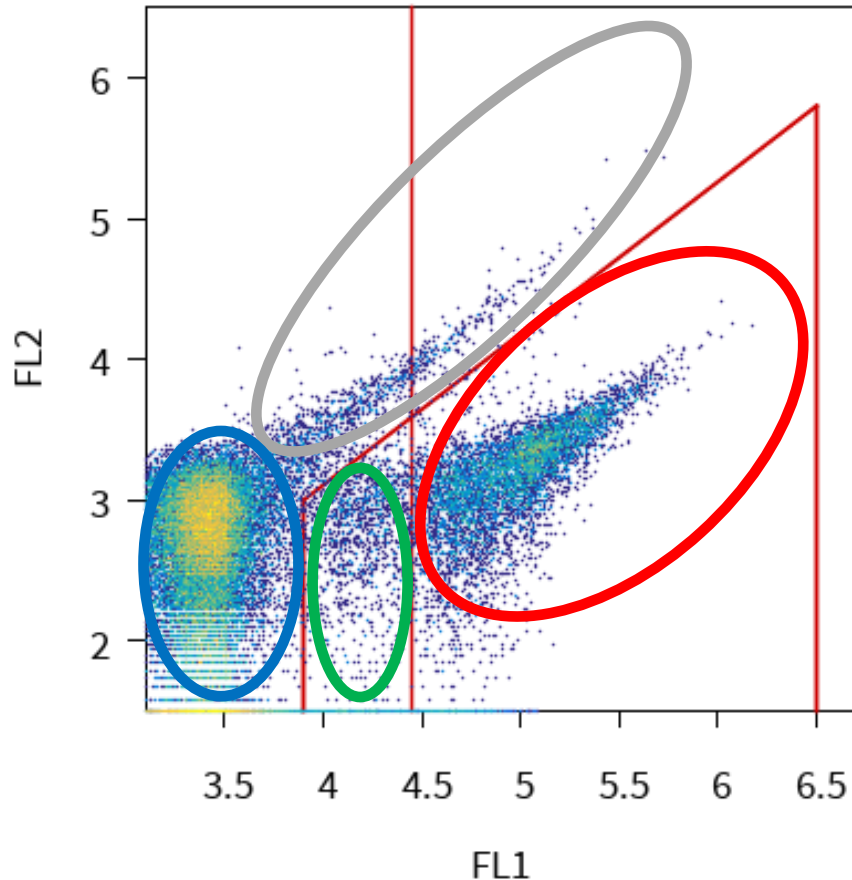
SIGRIST BactoSense

24

**K dispozici výměnné kartridže TCC a LDC
(TCC – Total Cell Count, LDC – Live/Dead Count)**



Oblasti grafu „otisku prstu“ vody – kartridž TCC



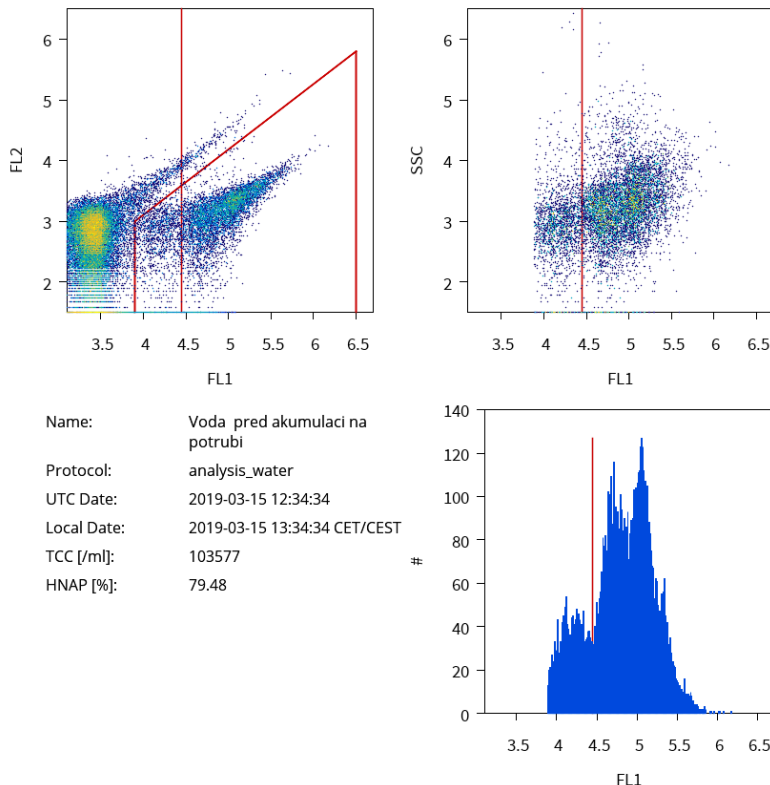
Velké buňky (HNA)

Malé buňky (LNA)

Pozůstatky buněk/smetí

Elektronický šum/pozadí

Příklad výsledku měření s kartridží TCC



TCC/ml ... celkový počet buněk na ml

HNAC/ml ... velké buňky na ml

LNAC/ml ... malé buňky na ml

HNAP% ... % podíl velkých buněk

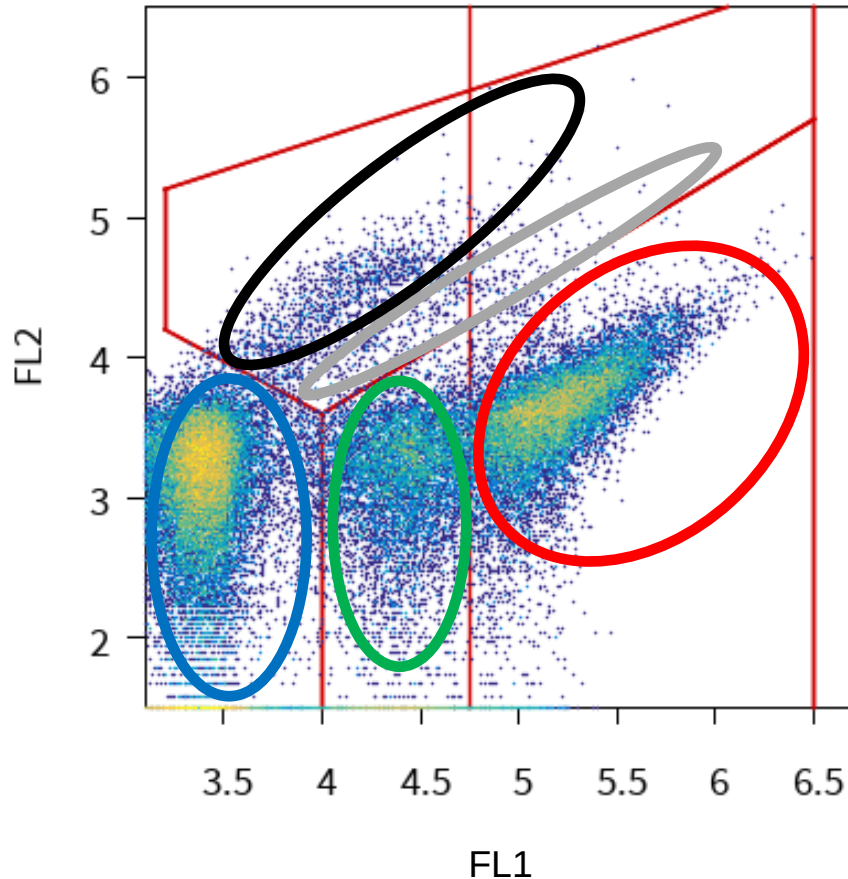
otisk prstu ... bodový graf signálů jednotlivých buněk

Poznámka: není rozlišeno mezi živými a mrtvými buňkami

SIGRIST BactoSense

27

Oblasti grafu „otisku prstu“ vody – kartridž LDC



Živé velké aktivní buňky (HNA)

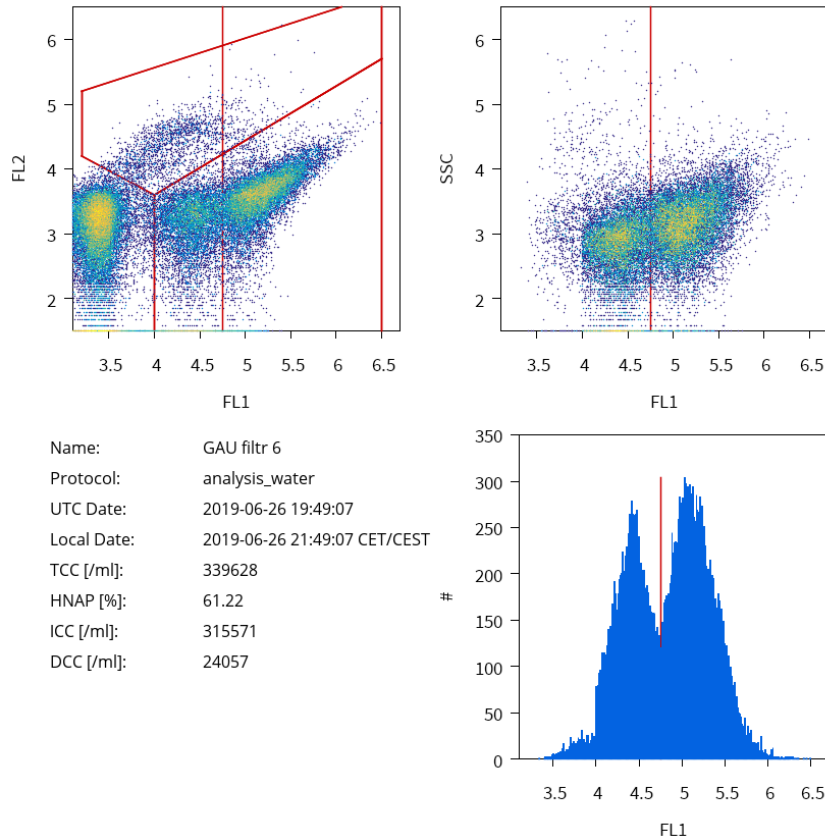
Živé malé slabé buňky (LNA)

Mrtvé buňky

Pozůstatky buněk/smetí

Elektronický šum/pozadí

Příklad výsledku měření s kartridží LDC



TCC/ml ... celkový počet buněk na ml

ICC/ml... živé buňky na ml

HNAC/ml... velké aktivní buňky na ml

LNAC/ml ... malé slabé buňky na ml

DCC/ml ... mrtvé buňky na ml

ICP% ... % podíl živých buněk

HNAP% ... % podíl velkých buněk
v živých buňkách

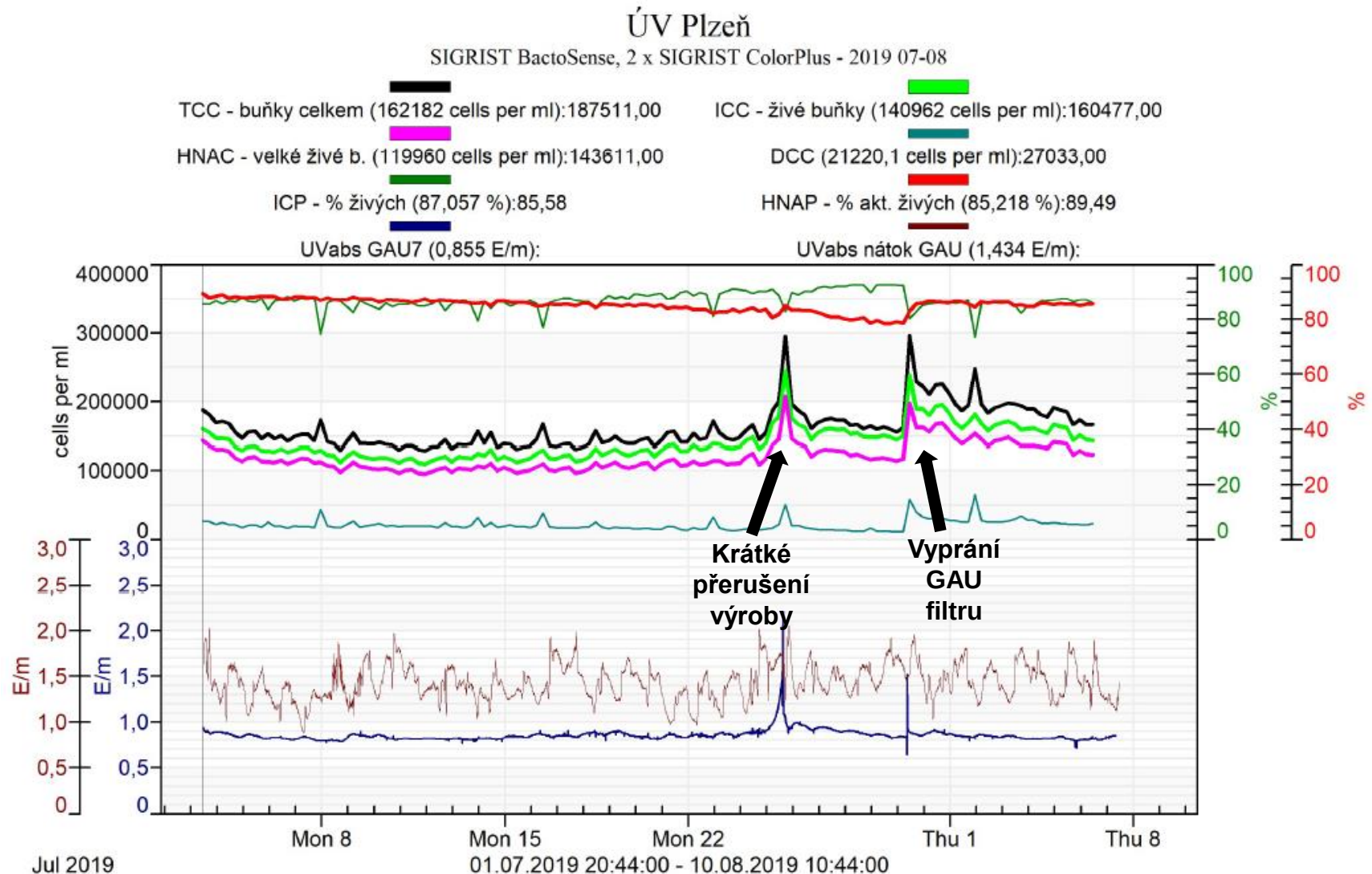
otisk prstu ... bodový graf signálů
jednotlivých buněk

BactoSense – typické aplikace

29

- Monitoring oživení pískových filtrů a GAU filtrů
(prodloužení filtračních cyklů, úspora vody a energie na praní, využití biomasy agregované na zrnkách náplně filtru k biologickému čištění vody, snížení AOC)
- On-line dohled nad kvalitou vody na klíčových nebo problematických místech vodovodní sítě (rychlá detekce mikrobiální kontaminace, možnost integrace do systému včasného varování, eliminace rizik)
- Monitoring nárůstu oživení pitné vody s délkou doby zdržení ve vodovodní síti
- Kontrola a optimalizace úrovně desinfekce pitné vody
- Kontrola proplachovacích procedur, údržby rozvodů, atd.
- Výzkum za účelem optimalizace výroby pitné vody

30



Příklad 1: Monitoring oživení GAU filtru

31



**Výstup GAU filtru - sestava analyzátorů SIGRIST
(ColorPlus, BactoSense, AquaScat)**

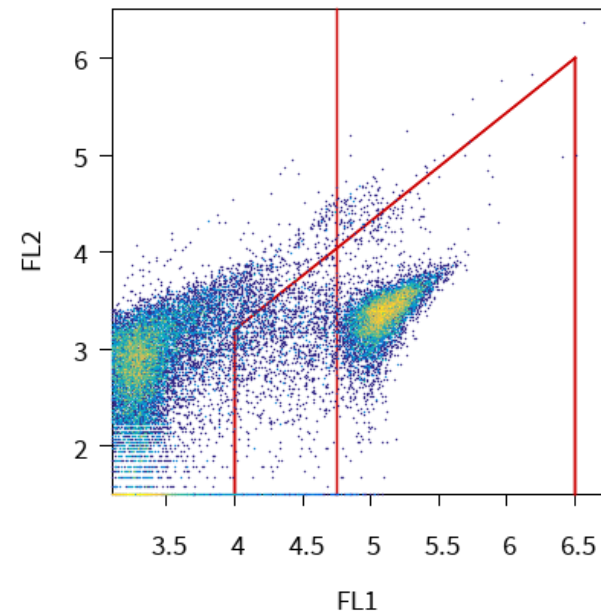
Příklad 2: Změna koncentrace chloru

32

Výstupní pitná voda z jedné velké vodárny.

- Celkový počet buněk byl poměrně vysoký: 153'600 c/ml
- Koncentrace chloru byla velmi nízká: 0,09 mg/l
- Dávka zvýšena na 0,12 mg/l
- O 2 hodiny později celkový počet buněk poklesl o 25%

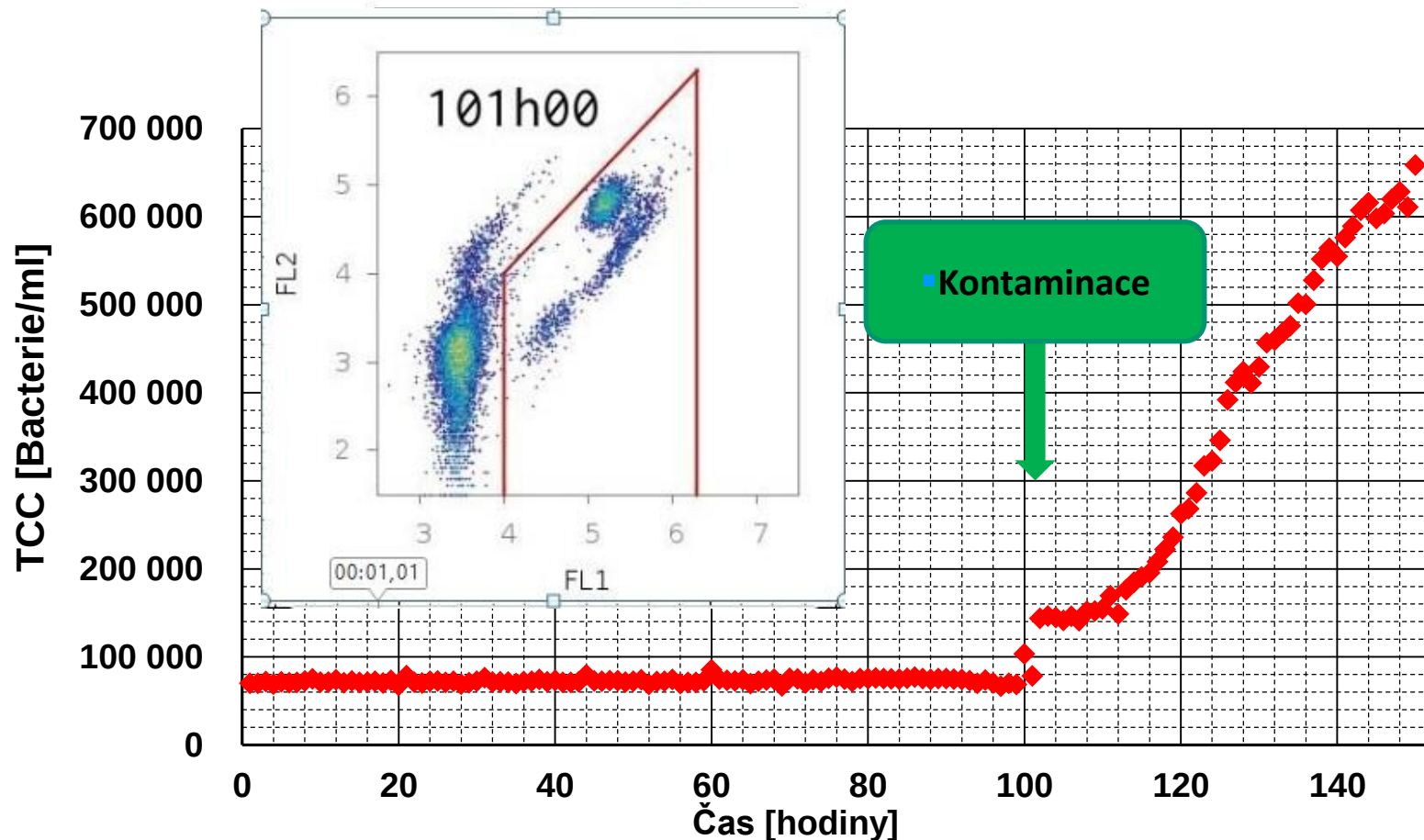
BactoSense je dostatečně citlivý, aby zaznamenal i vliv změny koncentrace chloru o 0,03 mg/l na mikrobiální oživení velkého průtoku vyrobené pitné vody



Příklad 3: Simulace kontaminace

33

On-line monitoring pitné vody s využitím TCC.



Přednosti FCM oproti HPC (KTJ22/36)

34

- Výsledek FCM mnohem lépe reprezentuje celkové oživení vody (FCM přesně spočítá 99,9% všech buněk, kdežto výsledek HPC určují pouze kultivovatelné buňky, kterých je pouze 0,01 – 1% z celkového počtu)
- Výsledek FCM je k dispozici mnohem rychleji, díky čemuž lze v případě potřeby ještě stihnout odpovídající opatření (odpadá několikadenní čekání na výsledek kultivací)
- FCM má mnohem vyšší opakovatelnost i přesnost
- FCM poskytuje informaci nejen o celkovém mikrobiálním oživení, ale i rozčlenění buňky do skupin (živé malé, živé velké, mrtvé) a výsledkem je i charakteristický „otisk prstu“ vody, pomocí něž lze změny nejen číselně, ale i vizuálně snadno vyhodnocovat

Přednosti SIGRIST BactoSense

35

- BactoSense provádí FCM analýzu zcela automaticky (obsahu zvládne prakticky každý) s výsledkem za 20 minut
- Obsluha nepřichází do styku s žádnými chemikáliemi ani odpadními vzorky (systém výměnných kartridží na 1000 analýz)
- BactoSense může analyzovat nejen manuálně odebrané vzorky, ale může měřit i on-line se zcela automatickým vzorkováním v intervalech dle potřeby (30 minut až 6 hodin)
- Kompaktní provedení, stacionární nebo mobilní využití
- BactoSense má robustní provedení (IP65), umožňuje instalaci přímo v provozu, k dispozici jsou výstupy do ŘS

SIGRIST BactoSense

36

Jeden přístroj – mnoho možností využití



Jedinečný pomocník vodohospodáře



» Online monitoring onsite



Dohled nad kvalitou vody 24/7/365

» Rychlá a přesná analýzy



Včasná detekce problémů

» Plně automatizovaný provoz

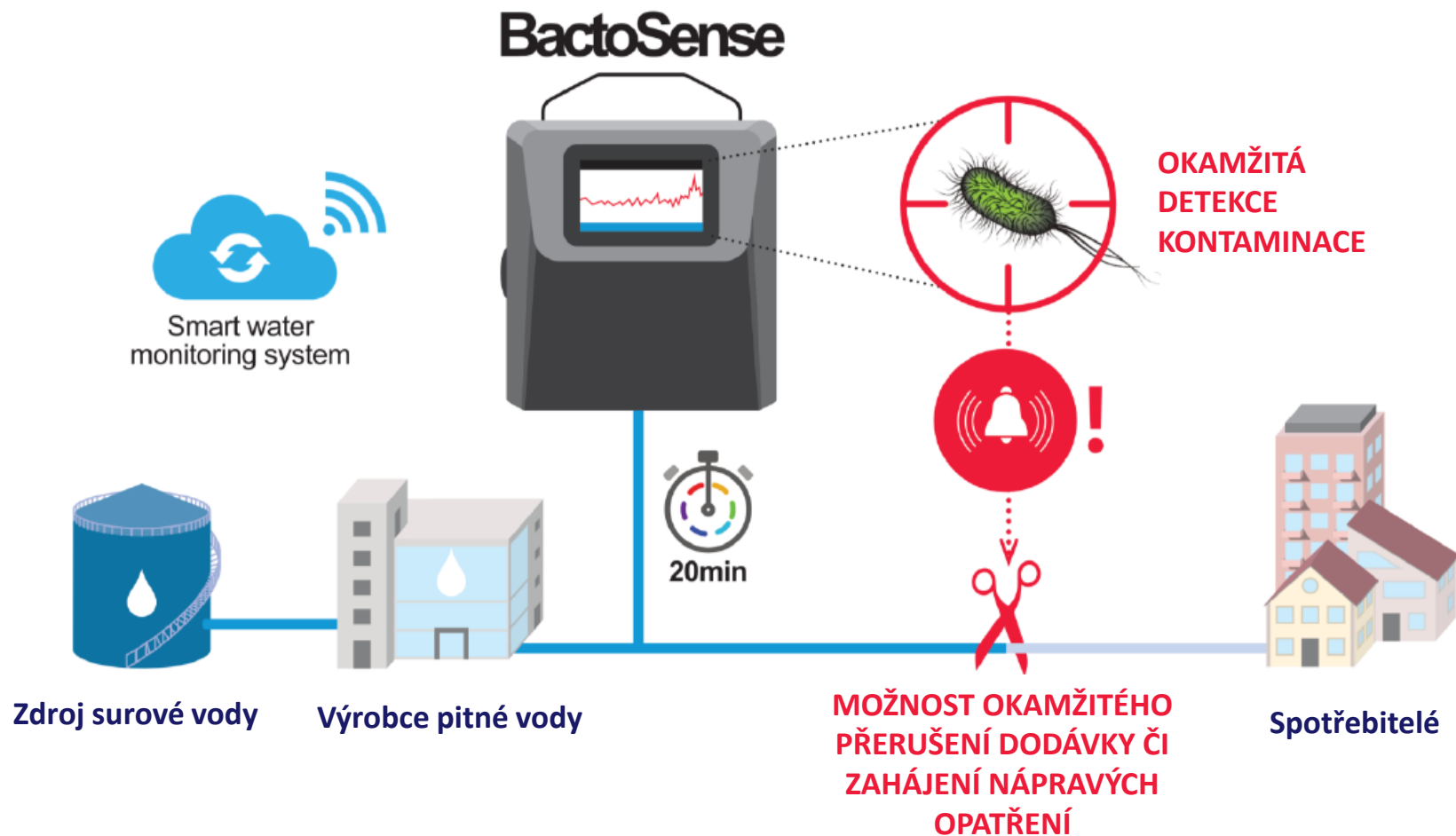


Obsluhu zvládne kdokoliv

SIGRIST BactoSense - WSP

38

Možnost integrace do systému včasného varování



SIGRIST BactoSense - ocenění

39

Uznání a ocenění

Metoda, otevírající cestu k nesčetným inovacím ve vodárenství



Industry award 2017
in Germany



Innovation price 2017
in Spain at SMAGUA



Innovation price 2018 in
Italy at H₂O Exhibition



Innovation Price 2018 in
Switzerland at Aqua Pro
& Gas



Innovation price 2019 Water
Innovation Europe



Drinking Water
Innovation project of
the year UK 2019



GOLDEN VOD-KA
Innovation price 2019
Czech Republic

Ocěnění Zlatá VOD-KA 2019

40



SIGRIST BactoSense

41

**Unikátní přenosný průtokový cytometr
pro monitoring mikrobiologické kvality vody**



SIGRIST BactoSense - parametry

42

Měřicí princip: průtoková cytometrie

Měřené parametry: dle typu kardridže

Měřicí rozsah: 1 000 až 2 000 000 buněk/ml

Detekční limit: 100 až 5 000 000 buněk/ml

Nejmenší detekovatelné částice: 100 nm (0,1 μm)

Doba analýzy: méně než 30 minut

Kapacita kartridže: 1000 analýz

Hmotnost přístroje: 14 kg

Rozměry: 350x373x240 (šxvxh)

Výstupy: 2 x 4-20 mA, digitální výstupy, Ethernet, USB



Dotykový grafický displej

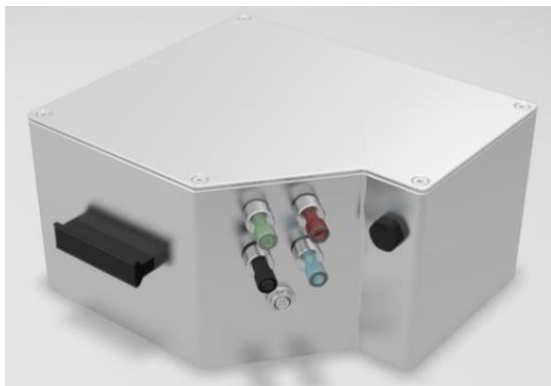
43



SIGRIST BactoSense - kartridže

44

- Kartridž na 1 000 analýz
- Typ: TCC nebo LDC
- Obsahuje: barvivo, proplachovací roztok, čisticí roztok, zásobník na odpadní vzorek
- Recyklace – opětovné naplnění výrobcem



BactoSense - zápůjčky

45

Přístroj SIGRIST BactoSense je k dispozici pro zápůjčky.

Materiály k prezentaci:

- **BactoSense – investice pro rok 2020 - Top 10 aplikací**
- **Ceník zápůjček**
- **Katalogový list**

Děkuji za pozornost.

Ing. Josef Pišan, TECHNOPROCUR CZ, spol. s r.o.

Email: josef.pisan@technoprocur.cz, mobil 602 239 910