

Příloha č. 4/1998

k Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica

Mikrobiologicko - hygienické vyšetřovací metody pro půdy,  
komposty a jiná neminerální hnojiva, čistírenské kaly  
a další tekuté a tuhé odpadní materiály

Mikrobiologicko - hygienické posouzení účinnosti  
procesu kompostování

Praha, duben 1998

Předseda redakční rady: doc.MUDr.L.Komárek, CSc.

Členové: prof.MUDr.V.Bencko, DrSc.,MUDr.D.Bittnerová,CSc.  
Mgr.K.Kánská, Ing.J.Kodl, doc.MUDr.J.Kříž,  
MUDr.J.Mika, RNDr.F.Rettich,CSc., A.Svobodová

Vydává Státní zdravotní ústav v Praze

ISSN 0862-5956

# Obsah

str.č.

## I. Mikrobiologicko-hygienické vyšetřovací metody pro půdy, komposty a jiná neminerální hnojiva, kaly a další tekuté a tuhé odpadní materiály

Odběr a příprava vzorků .....	4
Stanovení momentální vlhkosti, výpočet faktoru .....	6
Kultivační analýza .....	7
Vybrané výsledky mikrobiologických vyšetření .....	16

ACTA HYGIENICA, EPIDEMIOLOGICA ET MICROBIOLOGICA

Příloha č.4/1998

Mikrobiologicko - hygienické vyšetřovací metody pro půdy,  
komposty a jiná neminerální hnojiva, čistírenské kaly a další  
tekuté a tuhé odpadní materiály

Mikrobiologicko - hygienické posouzení účinnosti procesu  
kompostování

Autor: Kateřina Klánová, Centrum zdraví a životních podmínek,  
Státní zdravotní ústav, Praha

Vytiskl: Ústav jaderných informací Praha 5  
Stran: 18, náklad: 380 výtisků, rok vydání 1998  
Vydává Státní zdravotní ústav, Praha 10, Šrobárova 48

## II. Mikrobiologicko-hygienické posouzení účinnosti procesu kompostování .....

17

## Úvod

Půda jako nedílná část ekosystému představuje nejen nezbytný prostředek pro výrobu poživatin, ale je i významnou složkou životního prostředí, ve které persistují toxické látky i patogenní mikroorganismy.

Přítomnost toxických látek i patogenních mikroorganismů v půdě znamená ve svém důsledku totéž - přenosem přes vodu vstup do potravního řetězce s následným ohrožením zdraví člověka.

V rámci trvale udržitelného rozvoje je úkolem současné společnosti likvidace stávajících kontaminantů a zabránění vstupu nových.

Jedny z metod používaných v poslední době stále častěji pro snížení hladin toxických látek kontaminujících půdy jsou metody biologické, které lze souhrně označit jako bioremediace. Jedná se o metody, které využívají přirozené degradační nebo biosorpční schopnosti mikroorganismů rozkládat nebo kumulovat (s následnou možností odstranění) toxické látky.

Půdní mikrobiologie, obor zdánlivě související s lidským zdravím velmi vzdáleně, tak nabývá nových rozměrů: může sledovat přítomnost hygienicky významných mikroorganismů v půdě. Hygienicky významné mikroorganismy lze rozdělit na dvě základní skupiny. Jsou to 1) mikroorganismy patogenní, jejichž přítomnost je v půdách nežádoucí a 2) nepatogenní mikroorganismy, které se do půdy vnášejí záměrně při biodegradacích - dostatečná koncentrace těchto mikroorganismů v půdě je nutná k bezpečnému a co možná nejrychlejšímu průběhu bioremediace.

Patogenní mikroorganismy se mohou do půdy dostat hlavně se špatně vyžralými komposty, průsakem z nezabezpečených skládek a nevhodně vyrobenými biohnojivy. Jednou ze základních složek používaných pro výrobu kompostů a jiných hnojiv neminerálního původu

jsou exkrementy, ve kterých se ve vysokých koncentracích vyskytují fekální bakterie. Tyto bakterie se ve stejně vysokých koncentracích nacházejí i v čistírenských kalesích a různých druzích odpadů organického původu.

Vzhledem k tomu, že přítomnost fekálních bakterií v uvedených materiálech představuje největší riziko právě s ohledem na vstup těchto bakterií do povrchových a podzemních vod, jsou zde uvedené metody mikrobiologického rozboru téměř totožné s metodami používanými pro stanovení mikrobiálního znečištění vod. Odlišnost a specifika metod používaných při mikrobiologických rozborech půd a dalších zde uvedených materiálů spočívají především v prvních fázích rozboru, kde na rozdíl od vod nelze použít metody s membránovými filtry vzhledem k vysokému obsahu pevných částic.

Jako jediný správný indikátor fekálního znečištění označují směrnice WHO (1993) tzv. "presumptivní *Escherichia coli*". Toto stanovení je také součástí ČSN ISO 9308-1 (757841) a ČSN ISO 9308-2 (757842). Dalším indikátorem fekálního znečištění jsou fekální streptokoky, bakterie jinak reagující na zevní vlivy.

Zatímco přítomnost presumptivní *Escherichia coli* může indikovat výskyt bakterií rodu *Salmonellae*, jsou některými autory považovány fekální streptokoky za indikátor případného nebezpečí virových částic.

Při nálezů indikátorů fekálního znečištění by mělo být vyšetření vždy doplněno o stanovení salmonel. Ty jsou také považovány za vhodný ukazatel dobře provedeného procesu kompostování.

V závislosti na kapacitě laboratoře a zaměření prováděného rozboru je vhodné doplnit stanovení indikátorů fekálního znečištění o stanovení celkového počtu mikroorganismů a stanovení počtu plísňů a kvasinek.

Stanovení celkového počtu mikroorganismů lze použít jako vhodný doplněk i při hodnocení biodegradací, kdy je možné při vyšetřování použít zde uvedené metody odběru vzorků a jejich přípravu před kultivační analýzou. Pro kultivační analýzu je dále nutné postupovat v souladu s metodami dostupnými pro stanovení dané skupiny biodegradujících mikroorganismů.

Zde uvedená vyšetření jsou doplněna o mikrobiologicko-hygienické posouzení účinnosti procesu kompostování. Všechny popsané metody byly vypracovány a ověřeny v laboratořích Státního zdravotního ústavu v Praze.

Nezbytným předpokladem pro mikrobiologická vyšetření je kvalifikovaný personál a odpovídajícím způsobem vybavená laboratoř.

Hodnocení výsledků mikrobiologických vyšetření by mělo vždy vycházet z konkrétní situace v místně příslušné oblasti.

## I. Mikrobiologické vyšetřovací metody pro půdy, komposty a jiná neminerální hnojiva, kaly a další tekuté a tuhé odpadní materiály

1. Odběr a příprava vzorků
2. Stanovení momentální vlhkosti, výpočet faktoru
3. Kultivační analýza
  - 3.1. Zředovací roztok a kultivační media
  - 3.2. Příprava vzorku k rozboru, ředění, očkování, inkubace, vyhodnocení, výpočet výsledků
  - 3.3. Stanovení indikátorů fekálního znečištění
    - 3.3.1. Stanovení presumptivní *Escherichia coli*
    - 3.3.2. Stanovení fekálních streptokoků
  - 3.4. Stanovení salmonel
  - 3.5. Stanovení celkového počtu mikroorganismů
  - 3.6. Stanovení plísní a kvasinek
4. Vybrané výsledky mikrobiologických vyšetření

### 1. Odběr a příprava vzorků

Místo odběru vzorků se vybírá s ohledem na účel práce. Z hygienického hlediska má největší význam odběr vzorků půd v ochranných pásmech vodního zdroje nebo z břehů vod využívaných pro rekreační účely. Stejně metody jako pro sledování půd se mohou použít i pro hodnocení písku v dětských pískovištích.

Tekuté a tuhé odpadní materiály, kejdy a kaly (nebo jejich směsi) se sledují v závislosti na jejich dalším osudu v ekosystému,

zejména tam, kde je možný jejich vstup do vod a následně potravního řetězce. U skládek, nebo při sušení a jiných úpravách kalů z ČOV lze předpokládat i přenos mikroorganismů k člověku větrem s pevnými částicemi.

Konečný produkt kompostování se vyšetřuje před balením pro spotřebitele; stejným způsobem lze vyšetřovat i hnojiva vyrobená ze surovin, při jejichž výrobě byly výchozí složkou různě upravené exkrementy. Ostatní stanovení jsou závislá na úkolech a možnostech příslušné mikrobiologické laboratoře.

Na dané lokalitě se odebírá vždy z několika (nejméně pěti) míst asi po 200 g vzorku. Vzorky tuhé konzistence - půda, kompost, tuhý odpad - se odebírají lopatkou do velkého igelitového sáčku. Při odběrech půdních vzorků se odebírá nejvhodněji z rohů a středu čtverce, jehož strana je 5 m. Odstraní se povrchová část humusu, drny s kořenovou částí, větší hroudy a kameny. Odebírá se do hloubky 25 cm.

Tekuté vzorky - kejdy, kaly - odebírá se menší umělohmotnou nádobou do kbelíku.

V sáčku nebo kbelíku se lopatkou nebo protřepáním promíchá, ze směsi se odebere asi 250 g směsného vzorku do skleněné sterilní uzavíratelné nádoby. Do laboratoře se přepravují řádně označené vzorky v chladících přenosných kabelách. Vzorky se zpracují ihned nebo uschovají v lednici při + 4 °C nejdéle 24 hodin. Po uplynutí této doby dochází k výrazným změnám v počtu jednotlivých skupin mikroorganismů a vzorky již nejsou vhodné pro mikrobiologický rozbor.

Odběr se provádí v gumových rukavicích při dodržování zásad práce s infekčním materiálem. Dobře umyté odběrové pomůcky není nutné sterilizovat, před odběrem se vždy pomůcky (lopatka, umělohmotná nádoba) "opláchnou" v půdě, kalu atd.

Princip přípravy reprezentativního vzorku se dodržuje i při vyšetřování kompostů, hnojiv atd.

Vzdušná kontaminace nemá velký význam vzhledem k masivnímu zastoupení mikroorganismů ve sledovaných materiálech.

## 2. Stanovení momentální vlhkosti, výpočet faktoru

Momentální vlhkost je množství vody, které je obsaženo ve vzorku v době zpracování.

Na předem zvážený kus alobalu se naváží 20 - 100 g tuhého materiálu, nebo do předem zvážené Petriho misky se přenesou 20 - 100 g tekutého vzorku. Suší se otevřené v alobalu nebo Petriho misce při 105 °C do konstantní hmotnosti.

$$mv = \text{momentální vlhkost (\%)} = 100 \cdot (a - b) \cdot 1/a$$

$$s = \text{sušina (\%)} = 100 \cdot b \cdot 1/a$$

a = hmotnost navážky čerstvého vzorku

b = hmotnost zůstatku suchého vzorku

Stanovení momentální vlhkosti nebo sušiny vzorku se provádí minimálně 2x u téhož vzorku, jako výsledek se použije průměr obou stanovení.

Hodnoty a, b se použijí pro přepočet počtu bakterií v 1 g čerstvého vzorku na počet bakterií v 1 g suchého vzorku. Tento přepočet se používá výjimečně, nejčastěji při dlouhodobém sledování jedné lokality (půda, skládka, pískoviště), na které mohou být aktuální výsledky udávány v čerstvém vzorku zkrácené v důsledku klimatických vlivů (silný déšť apod.).

Počet bakterií v 1 g suchého vzorku = počet bakterií v 1 g čerstvého vzorku násobený faktorem f.

$$\text{Výpočet faktoru: } f = a/b$$

## 3. Kultivační analýza

Kultivační analýza patří ke kvantitativním metodám stanovení počtu mikroorganismů. Je používána pro svou jednoduchost a přístrojovou nenáročnost, i když má mnohé nevýhody (obvykle nevyrostou bakterie autotrofní, bakterie poutající vzdušný dusík, bakterie anaerobní, nevyvinou se všechny mikroorganismy vlivem pomalého růstu, antagonismu apod.).

Kvantitativní stanovení mikroorganismů je založeno na schopnosti organismů růst na specifických kultivačních mediích.

Dlouhodobé mikrobiologické vyšetřování zde uváděných materiálů prokázalo výhodnost metod přímého výsevu na kultivační media. Většinou se jedná o vzorky s vysokým počtem různých skupin mikroorganismů, kde je nutné suspektní kolonie dále izolovat a vyšetřovat, zároveň je možné s výhodou používat předem a v zásobě uchované misky s agarovými půdami.

Princip metody: známý objem suspenze materiálu určitého zředění vyočkujeme na Petriho misky s agarovou půdou.

### 3.1. Zředovací roztok, kultivační media

Jako zředovací roztok se používá fyziologický roztok. Pro přípravu medií se s výhodou používají dehydratovaná kompletní kultivační media, přičemž se přísně dodržují instrukce výrobců. Pokud se připravená kultivační media skladují, je nutné prověřit před použitím, zda nejsou kontaminována. Dle potřeby se před použitím předsouší.

### 3.2. Příprava vzorku k rozboru, ředění, očkování, inkubace, vyhodnocení, výpočet výsledků

Před vlastním rozbořem se vzorek musí dokonale promíchat, a to buď silným protřepáváním, nebo homogenizací sterilními nástroji.

Pro desetinásobné zředění se odměří 90 ml nebo 9 ml zředovacího roztoku do zředovacích lahvíček či zkumavek. Přenosem 10 g nebo 10 ml vzorku do 90 ml zředovacího roztoku, nebo 1 g nebo 1 ml do 9 ml zředovacího roztoku se připraví desetinásobné zředění. Sterilní pipetou nebo mechanickým způsobem se roztok promíchá a potom se přenese jeden objemový díl tohoto roztoku do devíti dílů zředovacího roztoku. Tento postup se opakuje do žádoucího stupně zředění.

Nejčastěji vysévaná zředění pro jednotlivá stanovení a výchozí vzorky jsou uvedeny v následující tabulce.

Pro jednu Petriho misku o průměru 90 nebo 100 mm se očkuje objem vzorku nebo zředěného vzorku 0,1 ml až 0,5 ml. Zředění vzorku se volí tak, aby se výsledný počet narostlých kolonií na misce pohyboval mezi 25 až 300.

Teplota a doba inkubace se volí v závislosti na požadovaném stanovení. Vyhodnocení se provádí ihned po inkubaci, není-li to možné, mohou být misky uchovávány krátkou dobu při teplotě + 4 °C. Kolonie, které se mají počítat jsou uvedeny pro jednotlivá stanovení v dalším textu.

Tabulka nejčastěji vysévaných zředění pro uvedená stanovení

Vzorek	Vyšetření	Zředění							
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
Půda, komposty, hnojiva	Presump- tivní		+	+					
		<i>E. coli</i>				+	+	+	
Půda, komposty, hnojiva	Fekální strepto- koky		+	+					
							+	+	+
Půda, komposty, hnojiva	Celkový počet mikro- organismů						+	+	+
							+	+	+
Půda, komposty, hnojiva	Počet plísni a kvasinek			+	+	+			
							+	+	+

Výpočet výsledků vychází z předpokladu, že každá kolonie vznikla z jednoho mikroorganismu. Výsledky se vyjadřují jako počet kolonie tvořících jednotek ve specifickém objemu vzorku podle následující rovnice:

$$C = N : [(n_1 V_1 F_1) + (n_2 V_2 F_2) + \dots + (n_i V_i F_i)],$$

kde  $C$  je počet kolonie tvořících jednotek ve zvolené hmotnosti nebo objemu vzorku (1 g nebo 1 ml);

$N$  součet všech vyrostlých kolonií spočítaných na miskách ze zředění  $F_1, F_2 \dots F_i$ ;

$n_i$  počet spočítaných misek z příslušných zředění;

$V_i$  očkovaný objem vzorku;

$F_i$  zředění, užitá pro zkoušený objem vzorku  $V_1, V_2$ .

$\dots V_i$  ( $F = 1$  pro nezředěný vzorek,  $F = 0,1$  pro desetkrát zředěný vzorek atd.)

Poznámka - Takto získaný konečný počet je vážený průměr z počtu stanoveném na každé misce.

Při paralelní kultivaci dvou misek z každého zředění a očkovaném objemu 0,2 ml můžeme výraz zjednodušit na

$$C = (2,5 \cdot N) : (F_1 + F_2 + \dots + F_i)$$

Příklad výpočtu pro metodu přímého výsevu na kultivační medium:

Je-li použitý objem zkoušeného vzorku 0,2 ml, pak následující počty získané z individuálních zředění jsou:

Zředění	Počty
$10^{-4}$	74 a 101 kolonií
$10^{-5}$	9 a 15 kolonií

$$C = (74 + 101 + 9 + 15) : [(2 \cdot 0,2 \cdot 0,0001) + (2 \cdot 0,2 \cdot 0,00001)] = 199 : (0,00004 + 0,000004) = 199 : 0,000044 = 4,52 \cdot 10^6 / \text{g nebo ml},$$

nebo

$$C = (2,5 \cdot 199) : (0,0001 + 0,00001) = 497,5 : 0,00011 = 4,52 \cdot 10^6 / \text{g nebo ml}.$$

### 3.3. Stanovení indikátorů fekálního znečištění

V současné době jsou za indikátory fekálního znečištění považovány presumptivní *Escherichia coli* a fekální streptokoky. Obě tyto skupiny bakterií se vyznačují růstem při teplotě 44 °C.

Pro většinu vzorků, které přicházejí v úvahu u zde uváděných vyšetření, je charakteristický masivní výskyt doprovodné mikroflóry z půdy, rostlinného materiálu a dalších látek převážně organického původu. Stanovení koliformních bakterií a enterokoků při 37 °C může dávat falešně pozitivní výsledky (stanovení různých saprofytických druhů bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* s jinými morfologickými a biochemickými vlastnostmi než presumptivní *Escherichia coli* nebo stanovení enterokoků nefekálního původu) či získání výsledků falešně negativních (doprovodná mikroflóra rostoucí na půdách pro stanovení koliformních bakterií a enterokoků při 37 °C je ve vyšších koncentracích než bakterie fekálního původu, které pak nemohou být zachyceny).

Z výše uvedených důvodů je vhodné provádět vyšetření při teplotě kultivace 44 °C.

#### 3.3.1. Stanovení presumptivní *Escherichia coli*

Presumptivní *Escherichia coli* jsou termotolerantní koliformní organismy, které produkují plyn z laktózy (a mانيتolu) a indol z tryptofanu během 24 hodin při teplotě 44 °C.



Zvolený objem vzorku nebo zředěného vzorku se vysévá na povrch mFC media, na kterém se hodnotí jako termotolerantní koliformní organismy kolonie, jejichž zbarvení je modré.

Suspektní kolonie se přeočkují na neselektivní kultivační media, ze kterých se očkuje 1) do zkumavek s laktózo-peptonovou vodou, 2) do zkumavek s tryptonovou vodou - zkumavky inkubujeme při 44 °C 24 hodin a 3) provedeme oxidázový test.

Jako presumptivní *Escherichia coli* hodnotíme ty kolonie, které produkují plyn ve zkumavkách s laktózo-peptonovou vodou, po přidání Kováčova činidla na povrch tryptonové vody po inkubaci vytvářejí červené zbarvení a mají negativní oxidázový test.

### 3.3.2. Stanovení fekálních streptokoků

Fekální streptokoky jsou bakterie vykazující pozitivní reakci na žluč-aeskulin-azidovém agaru a negativní reakci při katalázovém testu.

Zvolený objem vzorku nebo ředěného vzorku se vysévá na povrch žluč-aeskulin-azidového agaru. Naočkované misky se inkubují při teplotě 44 °C po dobu 48 hodin.

Vyhodnocují se všechny misky vykazující tříslově hnědé až černé zbarvení kolonií a / nebo dvůrků na kultivačním mediu kolem kolonií.

Na narostlé kolonie se kápne po 1 kapce roztoku peroxidu vodíku (30 g/l). Tvorba bublin kyslíku indikuje kataláza- pozitivní mikroorganismy, které se nepovažují za fekální streptokoky.

Při časových a pracovních možnostech laboratoře je výhodné provádět katalázový test na přeočkované kultuře na neselektivním kultivačním mediu, protože na žluč-aeskulin-azidovém agaru může dojít k tvorbě falešně pozitivní reakce.

### 3.4. Stanovení salmonel

Salmonely se ve složkách životního prostředí vyskytují ojediněle. Vzhledem k časové náročnosti stanovení se tedy zjišťují jen ve vzorcích, kde je jejich výskyt vzhledem k původu očekáván (např. kaly ČOV, zakládky kompostů obsahující exkrementy atd.), nebo indikován (vzorky pozitivní v nálezů bakterií indikujících fekální znečištění). I v těchto případech však z celkového počtu přítomných bakterií představují jen malou část, proto není vhodné používat neselektivní předpomnožení pro jejich záchyt.

Pomnožení se provádí ve dvou selektivních tekutých půdách, z nichž se vyočkovává na dvě selektivní pevné půdy. Suspektní kolonie se konfirmují pomocí vhodných biochemických testů.

25 g nebo 25 ml vzorku se přenesse do dvou baněk s

- a) 225 ml půdy s chloridem hořečnatým a malachitovou zelení a inkubuje se 24 hodin při 42 °C a
- b) 225 ml půdy se seleničitanem a cystinem a inkubuje se po dobu 24 hodin při 37 °C.

Po přenesení vzorku do tekutého media se vzorek před inkubací důkladně homogenizuje sterilní pipetou nebo mechanickým způsobem.

Z baňky s chloridem hořečnatým a malachitovou zelení po inkubaci se přenesse 1 ml kultury do zkumavky s 10 ml půdy se seleničitanem a cystinem a zkumavka se inkubuje po dobu 24 hodin při 37 °C.

Ze stejné kultury z baňky s chloridem hořečnatým a malachitovou zelení po inkubaci se inokuluje kličkou na povrch první selektivní půdy pro vyočkování (agar s fenolovou červení a brilantovou zelení) vylité do Petriho misek. Stejnou kličkou bez opalování se očkuje i na další misku se stejnou půdou. Očkuje se na

celý povrch misek tak, aby čáry vedené kličkou byly od sebe vzdálené 0,5 cm. Stejným způsobem se očkují i další dvě misky s deoxycholát-citrátovým agarem. Misky se inkubují 20 - 24 hodin v termostatu při 37 °C.

Z baňky se seleničitanem a cystinem po inkubaci se přenesou 1 ml kultury do zkumavky s 10 ml půdy s chloridem hořečnatým a malachitovou zelení a zkumavka se inkubuje 24 hodin při 42 °C.

Ze stejné kultury po inkubaci se z baňky se seleničitanem a cystinem inokuluje kličkou na povrch dvou misek s agarem s fenolovou červení a brilantovou zelení a dvou misek s deoxycholát-citrátovým agarem způsobem popsaným výše.

Ze zkumavek po inkubaci se očkuje na pevná agarová média stejným způsobem jakým jsme očkovali z baněk.

Po inkubaci na plotnách se zjišťuje přítomnost typických kolonií bakterií rodu *Salmonellae*. U každé typické nebo suspektní kolonie (nebo alespoň pěti takovýchto kolonií z každé misky, je-li jejich počet vyšší) se provádí identifikace. Pro identifikaci se nám osvědčily Enterotesty I a II (Lachema, Brno), lze užít i jiné komerčně dostupné identifikační řady. K sérologické konfirmaci se zasílají kmeny do specializovaných laboratoří.

### 3.5. Stanovení celkového počtu mikroorganismů a stanovení počtu plísňů a kvasinek

Tato vyšetření jsou pouze orientační vzhledem k bohatosti oživení zkoušených vzorků.

### Celkový počet mikroorganismů

Po vyočkování určeného objemu zkoušeného vzorku se počítají kolonie všech bakterií, plísňů i kvasinek vyrostlých za 72 hodin při teplotě inkubace 30 °C na povrchu kultivační půdy s tryptonem, kvasničním extraktem a glukózou.

### Počet plísňů a kvasinek

Po vyočkování určeného objemu zkoušeného vzorku se počítají kolonie všech plísňů a kvasinek vyrostlých za 3, 4 nebo 5 dnů při teplotě inkubace 25 °C na povrchu kultivační půdy s kvasničním extraktem, glukózou a chloramfenikolem. Po pěti dnech inkubace se vyberou plotny, kde vyrostlo méně než 150 kolonií. Pokud lze kolonie obtížně spočítat, vychází se z jejich počtu zjištěných po 4 nebo 3 dnech. V případě potřeby se provede mikroskopické vyšetření a podle morfologie se odliší kvasinky a plísňe od bakterií.

#### 4. Vybrané výsledky mikrobiologických vyšetření

Stanovení	Presumptivní <i>E. coli</i>	Fekální streptokoky
	počet KTJ / g vzorku	
Půda zemědělská		
po minerálním hnojení	nd	nd
hnojená kalem nebo kejdou	$< 10^3$	$< 10^3$
Kompost		
zakládka	$< 10^7$	$< 10^7$
před vyskladněním	$< 10^2$	$< 10^3$
Živočišné exkrementy	$< 10^7$	$< 10^8$
Čistírenské kaly	$< 10^7$	$< 10^7$
Biohnojivo, startér pro kompost	nd	nd
Tuhý komunální odpad	$< 10^7$	$< 10^7$

KTJ - kolonie tvořící jednotky

nd - nedetekováno

#### II. Mikrobiologicko - hygienické posouzení účinnosti procesu kompostování

V současné době se provádí kompostování různými novými způsoby (vermikompostování, několik způsobů aerobního i anaerobního zpracování). Jedno z důležitých kritérií pro posouzení účinnosti procesu zpracování odpadů těmito způsoby je mikrobiologické hledisko. Zpravidla se pro provedení experimentu používají bakterie rodu *Salmonellae*, jejichž přítomnost v konečném produktu je nežádoucí. Alternativně se uvedený způsob může použít i pro hodnocení vymírání rostlinných patogenů např. *Plasmodiophora brassicae*.

Před založením kompostu se z připravené zakládky odebere materiál do dvou velkých jutových pytlů tak, aby nebyly zcela plné. Z každého pytle se odebere 1 kg materiálu, který se v laboratoři infikuje směsnou kulturou bakterií tak, aby se výsledná koncentrace salmonel pohybovala v rozmezí  $10^2$  -  $10^3$  salmonel v 1 g. Důkladně se homogenizuje, nejlépe promícháním menší lopatkou.

Infikovaný materiál se rozdělí na čtyři části.

Do dvou předem připravených sáčků ze silonového pletiva velikosti 40 x 20 cm se přenesou po 0,5 kg směsi a sáčky uzavřeme. Tyto sáčky se vloží do středů jutových pytlů, které se zaváží provazem a vloží zpět do zakládky zpracování na dvě různá místa.

Třetí část infikovaného materiálu se uloží při laboratorní teplotě na chráněné místo, kde zůstane po celou dobu až do konce zpracování.

Čtvrtá část je ihned použita pro vyšetření na stanovení salmonel (viz 3.4.). V závislosti na mikrobiologické kvalitě

zakládky (jejíž rozbor před experimentem se provede), je možné stanovit salmonely nejen kvalitativně, ale i kvantitativně přímým výsevem na selektivní půdy s fenolovou červení a brilantovou zelení nebo na deoxycholát-citrátový agar.

Po ukončení procesu se vyjmou jutové pytle a materiál ze silonového pletiva se podrobí stejným vyšetřením. Mikrobiologický rozbor se provede i v materiálu uchovávaném v laboratorní teplotě.

Po řádně provedeném kompostování nejsou bakterie rodu *Salmonellae* ve vzorcích detekovány. Pokud nejsou detekovány salmonely ani ve vzorku z laboratorní teploty, je možno použitý kmen označit za nevhodný a je nutno celý proces zopakovat.

Související normy a předpisy včetně použité literatury jsou k dispozici u autorky.