

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA ENVIRONMENTÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ A
OCHRANY PROSTŘEDÍ



**MIKROBIOLOGICKÁ KONTAMINACE VENKOVNÍCH
HRACÍCH PLOCH**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: MUDr. Magdalena Zimová, CSc.

Konzultant: Ing. Ladislava Matějů

Diplomantka: Bc. Petra Hofmanová

2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Magdaleny Zimové, CSc., a že jsem použila pouze podklady (literaturu, projekty, software atd.) uvedené v seznamu použité literatury.

V Praze dne 29. 4. 2011

.....

Bc. Petra Hofmanová

Poděkování

Děkuji vedoucí diplomové práce MUDr. Magdaleně Zimové, CSc. za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Ladislavě Matějů, která mi svými připomínkami, náměty a radami pomáhala směřovat práci ke zdárnému cíli. Také děkuji Martině Štěpánkové za trpělivost a užitečné rady při práci v laboratoři Státního zdravotního ústavu v Praze odboru OHME.

V Praze dne 29. 4. 2011

.....

Bc. Petra Hofmanová

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá mikrobiologickou kontaminací na venkovních hracích plochách a jednotlivými zdravotními riziky, které z kontaminace mohou vzniknout. Navazuje na studii z roku 2002, která se prováděla ve Státním zdravotním ústavu v Praze (SZÚ). V rámci hodnocení mikrobiologické kontaminace venkovních hracích ploch, byly provedeny odběry vzorků půdy ve vybraných městech České republiky a následně zpracovány v laboratoři SZÚ. Tyto hodnoty byly porovnány s výsledky z let 2000 - 2002. Výsledky diplomové práce diskutují možné překračování limitů pro termotolerantní koliformní bakterie a enterokoky (indikátorové mikroorganismy) na venkovních hracích plochách v porovnání s limity, které jsou stanoveny pro písek v pískovištích vyhláškou č. 135/2004 Sb., kterou se stanoví požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch.

Klíčová slova: venkovní hrací plochy, dětská hřiště, mikrobiologická kontaminace, termotolerantní koliformní bakterie, enterokoky.

Abstract

The thesis deals with microbiological contamination on outdoors playing areas and individual risks caused by the contamination. It is a follow - up to explorations from 2002 which were carried out in the State Health Institute in Prague (SZÚ). In the framework of assessment of the microbiological contamination outdoor playing areas there were done samplings of the soil in chosen towns in the Czech Republic. Afterwards they were processed in the laboratory of the State Health Institute. These values were compared with the results from the years 2000 - 2002. The results of the thesis point out to exceeding limits of thermotolerant coliform bacteria and enterococci (indicators of microorganisms) on outdoor playing areas in comparison with limits which are given for sand in sandpits by the regulation no. 135/2004 by statute book, which specifies demands for outdoor swimming pools, saunas and hygienic limits of sand in the sandpits of outdoor playing areas.

Key words: outdoor playing areas, playgrounds, microbiological contamination, thermotolerant coliform bacteria, enterococci.

Obsah:

1. Úvod.....	11
2. Cíle diplomové práce.....	12
3. Literární rešerše.....	13
3.1 Půda.....	13
3.1.1 Kontaminace půd v městských aglomeracích.....	14
3.1.2 Zdravotní rizika z kontaminace půd.....	15
3.1.3 Mikroorganismy v půdním prostředí.....	20
3.1.3.1 Indikátorové mikroorganismy.....	22
3.1.3.2 Zdravotní rizika a mikroorganismy.....	23
3.1.3.2.1 Patogenita, virulence a infekčnost mikroorganismů.....	26
3.1.4 Ingesce půdy.....	29
3.2 Legislativa EU.....	30
3.3 Legislativa v ČR.....	32
3.3.1 Venkovní hrací plochy.....	32
3.3.1.1 Hygienické požadavky a limity venkovních hracích ploch.....	33
4. Metodika.....	36
4.1 Výběr lokality.....	37
4.2 Odběr vzorků ve vybraných lokalitách.....	37
4.3 Postup.....	39
4.4 Plány odběrových míst v jednotlivých mateřských školách.....	41
4.4.1 Hradec Králové.....	41
4.4.2 Olomouc.....	44
4.5 Metodika stanovení indikátorových organismů.....	48
4.5.1 Stanovení termotolerantních koliformních bakterií.....	48
4.5.1.1 Kultivační media, ředící roztoky, činidla, přístroje a pomůcky.....	48
4.5.1.2 Pracovní postup v laboratoři.....	49

4.5.2	Stanovení enterokoků	51
4.5.2.1	Kultivační media, ředící roztoky, činidla, přístroje a pomůcky	51
4.5.2.2	Pracovní postup v laboratoři.....	52
4.6	Výpočet	53
4.7	Výsledky	54
5.	Diskuse.....	62
6.	Závěr	65
7.	Seznam použité literatury.....	66
8.	Seznam obrázků.....	72
9.	Seznam tabulek.....	73
10.	Příloha.....	74
10.1	Příloha č. 1: Fotodokumentace mateřských školek v Hradci Králové.....	74
10.2	Příloha č. 2: Fotodokumentace mateřských školek v Olomouci	77

Seznam použitých zkratk

AFNOR	Norma
AHEM	Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica
As	Arzen
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
B	Bodový vzorek
Be	Beryllium
Cr	Chrom
Cu	Měď
ČOV	Čistírna odpadních vod
ČR	Česká republika
DDT	Dichlordifenyltrichlormethylmethan
DIN EN	Norma
E. coli	Escherichia coli
EU	Evropská unie
Hg	Rtuť
KHS v Liberci	Krajská hygienická stanice v Liberci
KTJ	Kolonie tvořící jednotku
LF UK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
MŠ	Mateřská školka
MZ	Ministerstvo zdravotnictví
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
OHME	Odbor hygienické mikrobiologie a ekotoxikologie
Pb	Olovo
PE	Polyethylen
POPs	Perzistentní látky
SM Olomouc	Statutární město Olomouc
SMV	Směsný vzorek
Spp.	Všechny druhy vyššího taxonu
SZÚ	Státní zdravotní ústav v Praze
TI	Thalium
TKB	Termotolerantní koliformní bakterie
US EPA	United States Environmental Protection Agency

USA	United States of America
V	Vanad
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
VTEC	Verocytotoxin
WHO	World Health Organization

1. Úvod

Mikrobiologická kontaminace je způsobena v městských aglomeracích zvláště na venkovních hracích plochách výkaly ptáků a volně pobíhajícími zvířaty. Fekální znečištění představuje řadu zdravotních rizik, která mohou ohrozit nejen dětskou populaci. Mikroorganismy a vyšší paraziti, kteří se do životního prostředí dostávají, mohou přežít v půdě od několika hodin až po několik let. V legislativě České republiky jsou zahrnuty limity, které stanovují hygienické podmínky venkovních hracích ploch (přípustné množství indikátorových mikroorganismů). Mezi indikátorové mikroorganismy patří *Salmonella* spp., termotolerantní koliformní bakterie, enterokoky a geohelmintry.

Tato problematika se v současné době řeší v České republice pouze ojediněle a představuje velmi aktuální problém, který může představovat zdravotní riziko, zvláště pro malé děti. Cílem monitoringu je sledovat výskyt mikrobiologických indikátorů jako jsou *E.coli* a enterokoky na venkovních hracích plochách dětských hřišť.

Diplomová práce bude navazovat na monitoring, který provedl Státní zdravotní ústav v Praze (SZÚ) v letech 2000 - 2002.

2. Cíle diplomové práce

Diplomová práce je zaměřena na monitoring mikrobiologických kontaminantů venkovních hracích ploch pro děti.

Cílem teoretické části je shrnutí poznatků o jednotlivých mikroorganismech vyskytujících se v půdním prostředí a specifikace zdravotních rizik, která vyplývají z možného napadení přítomnými patogeny. Teoretická část je také zaměřena na možnou kontaminaci venkovních hracích ploch a související možná zdravotní rizika. Práce je doplněna porovnáním české a zahraniční legislativy.

Cílem experimentální části je monitoring venkovních hracích ploch v Hradci Králové a Olomouci, který navazuje na monitorování kontaminace půdy prováděným Státním zdravotním ústavem v Praze. Ten proběhl v rámci subsystému VIII: Monitorování zdravotních rizik kontaminace půdy městských aglomerací Systému monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí v letech 2000 - 2002.

Základem vlastní práce byl odběr vzorků z půdy hracích ploch, jejich mikrobiologické rozборы a vyhodnocení výsledků. Aby bylo možné zpracovat a především porovnat dosažené výsledky, musí být metoda odběru vzorků standardní a především kompatibilní s metodou použitou v jiných studiích, s kterými chceme porovnávat výsledky.

Důležitou součástí monitoringu jednotlivých indikátorů je porovnání výsledků s limity, které byly vybrány pro kriteria v rámci monitoringu a odpovídají hygienickým požadavkům na kvalitu venkovních hracích ploch uvedených v prováděcí vyhlášce č. 135/2004 Sb., kterou se stanoví požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch (dále jen vyhláška č. 135/2004 Sb.) ve znění platných předpisů k zákonu č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví.

3. Literární rešerše

3.1 Půda

V různých vědních oborech je pojem půda definován různým způsobem. Z ekonomického hlediska lze půdu chápat jako základní výrobní faktor a dále jako pojem zastoupený pro všechny přírodní zdroje (Zazvonil, 2007).

Z hlediska environmentálního lze půdu definovat několika způsoby, např. jako samostatný přírodní útvar vzniklý z povrchových zvětralin zemské kůry a z organických zbytků za působení půdotvorných faktorů. Půda je životním prostředím půdních organismů, stanovištěm planě rostoucí vegetace, slouží k pěstování kulturních rostlin. Je regulátorem koloběhu látek, může fungovat jako úložiště, ale i jako zdroj potenciálně rizikových látek (MŽP, 2008). Půdu lze také definovat jako svrchní část zemského povrchu, která vzniká rozpadem horninového podloží vlivem působením několika faktorů. Mezi tyto faktory patří kromě chemických faktorů i faktory biologické a fyzikální. Půda obsahuje podíl minerální a organický. Mezi minerální patří fáze pevná, kapalná a plynná, do organického podílu spadají živočišné, rostlinné organismy či jejich části včetně humusu. Půda je živý systém se specifickým zvrstvením, morfologií a určitou produkční schopností (Sklenička, 2003).

Doposud bylo navrženo několik desítek definic, z nichž bohužel ani jedna neuspokojila všechny. Problém je viděn v širokém mezioborovém pojetí půdy. Půda je přírodní útvar, proto musí být definována objektivně a deskriptivně. Několik autorů, v čele s významnými odborníky, podalo návrh na jednu z možných definic:

Půda je nejsvrchnější část zemské kůry, tvořená směsí minerálních součástí, odumřelé organické hmoty a živých organismů. Je vertikálně členěná, propojená se svým podložím a vzniká ze zvětralin nebo nezpevněných minerálních a organických sedimentů (Hauptman a kol., 2009).

3.1.1 Kontaminace půd v městských aglomeracích

Problematika kontaminace půd v městských aglomeracích je v současné době velmi aktuálním tématem. Je to způsobeno především tím, že kontaminace půdy městských aglomerací může být zdrojem rizika pro člověka a zejména pro dětskou populaci. Nejedná se pouze o kontaminaci toxickými kovy, perzistentními organickými látkami, ale i o kontaminaci mikrobiologickou (SM Olomouc, 2002).

Mezi vybrané prvky sledované v městských aglomeracích patří zejména olovo (Pb), chrom (Cr), měď (Cu), arzen (As), beryllium (Be), rtuť (Hg), vanad (V) a thalium (TI). Hlavním zdrojem znečištění těmito prvky jsou především imise z hutí, automobilový provoz. Dalšími zdroji mohou být kaly z čistírny odpadních vod (ČOV), které se mohou dostat do půdy např. zpracováním jako nekvalitní kompost. Významným zdrojem kontaminace je spalování domácích odpadů. V městských aglomeracích je půda kontaminována nejvíce olovem (Pb). Venkovní hrací plochy, které jsou vzdálené jen několik metrů od silnice, bývají právě olovem kontaminovány. Olovo může způsobit poškození centrální nervové soustavy, a tím ohrozit zdraví dětské populace (Zimová, 1998).

Dalším kontaminantem půd v městských aglomeracích jsou perzistentní organické látky, které vznikají převážně z činností člověka. Mezi perzistentní látky (POPs) patří např. různé dioxiny, polychlorované bifenyly a dichlordifenyltrichlormethylmethan (DDT) (Holoubek a kol., 2001).

Kromě znečištění chemickými látkami lze identifikovat také jiné znečištění v městských oblastech, a to fekální znečištění (mikrobiologická kontaminace), které je způsobeno nejen volně žijícími zvířaty a ptáky, ale i „domácími mazlíčky“. V některých městských částech, převážně v okolí městských parků, dětských hřišť a nevyužívaných opuštěných budov, je toto fekální znečištění způsobeno mnohdy i bezdomovci. Fekální znečištění představuje kontaminaci bakteriemi, které se do prostředí dostávají z fekálií lidí a zvířat a mohou v půdě přežívat, dle podmínek a mikroorganismů, od několika hodin až po několik let (Murray, 2002).

3.1.2 Zdravotní rizika z kontaminace půd

Na veřejných hřištích, městských parcích i soukromých zahradách se často vyskytují kontaminované půdy. Kontaminace půd není na první pohled znatelná, z tohoto důvodu je nezbytné monitorovat výše uvedené oblasti a v čas omezit zdravotní rizika představovaná požitím a vdechováním kontaminované půdy a prachu. Lze předpokládat, že velká část půd aglomerací velkých měst může být znečištěna. V některých městech, například v Kodani, se během několika let podařilo identifikovat veškeré kontaminované oblasti, a zmírnit tím zdravotní rizika z kontaminace (WHO, 2000).

Zdravotních rizik, která vznikají z mikrobiologické kontaminace půd, je velké množství. Půda je nedílnou součástí životního prostředí člověka. Po řadu let byla opomíjena ta skutečnost, že právě do půdy se soustřeďuje tok škodlivých látek, které se v ní kumulují, transformují i migrují. Může docházet k vytváření oblastí s větší koncentrací látek, které zvyšují expozici člověka přes všechny cesty vstupu. Vždy to ovšem závisí na typu kontaminantů, fyziologickém stavu populace a typu patogenu. Rizikovým faktorem v půdě jsou i různá infekční agens (činitelé) vyvolávající infekční onemocnění. Může jít o celou škálu mikroorganismů - od virů přes bakterie a plísňe až po parazity (SZÚ, 2000).

Nejčastějším kontaminantem městských aglomerací, zvláště venkovních hracích ploch, jsou ptáci, psi a kočky. Tato domácí i divoká zvířata jsou častými přenašeči parazitů. Kočičí a psí exkrementy mohou obsahovat škrkavku psí a kočičí (*Toxocara canis*, *Toxocara cati*). *Toxocara* se přenáší na člověka spolknutím zralých vajíček obsahujících infekční larvu. Po požití se larva uvolní z vaječného obalu v tenkém střevě a migruje do jaterního krevního oběhu a dále do mozku a oka, do svalstva, mízních uzlin, ledvin a jiných vnitřních orgánů. Klinickými příznaky jsou bolesti hlavy, zvýšená teplota, zvracení, kašel, hubnutí nebo bolesti břicha. Ohroženou skupinou populace jsou zde převážně děti, které vykazují abnormální chování typu geofágie (pojídání půdy) nebo koprofágie (pojídání výkalů) (Judlová, 2001).

Kromě škrkavek hrozí v městských aglomeracích i možnost nakazit se nemocí toxoplasmózou, kterou způsobuje *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma gondii* byla objevena v roce 1908 v Tunisu Charles Nicolle. Projevuje se zánětem tkání, včetně nervové, v mozku (Dubey, 2007).

Významným patogenem je salmonela, která se může do písku dostat kromě výkalů od psů hlavně trusem ptáků. Salmonela je jednou z hlavních příčin vzniku infekčního onemocnění zvláště u dětské populace. Nejčastěji se projevuje zvracením a průjmem. V krajní situaci může dojít až k dehydrataci organismu, poškození mozkové tkáně, selhání životních funkcí či k chronickému poškození vnitřních orgánů (Lahiri a kol., 2010).

V níže uvedené tabulce je uveden přehled onemocnění a jejich původců a přenašečů.

Tabulka č. 1 - Přehled onemocnění způsobených mikrobiologickou kontaminací ploch

Přenašeč	Mikrobiologický činitel	Onemocnění	Zdroj informací
Pes, ptáci	<i>Salmonella enteritidis</i>	Střevní nákaza, zvracení	(SZÚ, 2005)
Kočka, pes	<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	Průjmy, dehydratace organismu, případně i smrt	(Rozsypal, 2002) (Edberg a Allen, 2004)
Kočka	<i>Toxoplasma gondii</i>	Zánět tkání, průjmy	(Matějí a Štěpánková, 2008)
Kočka, pes	<i>Toxocara cati, Toxocara canis</i>	Bolesti břicha, nechutenství, ubývání na váze	(Mizgajska, 1997)
Ptáci	<i>Chlamydia psittaci</i>	Horečka, bolest kloubů a svalů, postižením plic	(Mizgajska, 1997)
Člověk	<i>Entrobium vermicularis</i>	Svědění v perianální a perineální krajině, ekzémy, záněty	(Škardová a Horská, 2000)

Kontaminace půdy městských aglomerací, zvláště písku na venkovních hracích plochách, existuje po celém světě. Tomuto problému je věnována značná pozornost nejen v Evropě, ale i Austrálii, Mexiku, Kanadě a USA. V Severní Americe je tento problém o to větší, že po celém kontinentu rozšířený mýval přenáší škrkavku *Baylisascaris procyonis*, která vyvolává těžkou a smrtelnou encefalitidu u různých ptáků a savců včetně člověka (Murray, 2002). Většina dostupných prací se zabývá monitorováním a způsobem kontaminace povrchu půdy helmity a bakteriemi v různých částech světa, nepatrná část prací studuje vztah této kontaminace k onemocnění dětské populace. Většina prací se shoduje v tom, že tento problém se vyskytuje hlavně ve velkých městech, kde neúměrně roste počet psů a koček. Studie,

kteře se na území dnešní České republiky za posledních dvacet let prováděly, sledovaly pouze lokálně mikrobiální a parazitické kontaminace především v pískách pískovišť dětských hřišť. Ve většině případů výsledky studií ukázaly na značnou kontaminaci různými parazity (Matějů, 2004).

Ve městě Slané byl v říjnu 1997 až březnu 1998 prováděn monitoring dětských hřišť. Bylo zde vyšetřeno celkem 28 vzorků písku a půdy z 6 lokalit dětských hřišť a pískovišť. Celkem 22 vzorků (78,6%) bylo pozitivních na vajíčka *Toxocara* spp. Vajíčka *Toxocara* spp. byla nalezena ve všech vyšetřovaných pískovištích. Testy prokázaly, že 62,5% vyšetřovaných vzorků obsahovalo oplozená a živá vajíčka *Toxocara* spp. (tedy schopná infikovat člověka) (Matějů, 2004).

V letech 1998 až 1999 byl proveden rozsáhlý průzkum rozšíření vajíček *Toxocara* spp. v městské a předměstské půdě v Anconě v Itálii. Ve studii bylo zahrnuto i 22 veřejných hřišť. 63,6% vzorků bylo kontaminovaných vajíčky *Toxocara* spp. (Zimová a kol., 2003).

V městské čtvrti Halle byla prováděna otoskopická vyšetření 98 vzorků (psích exkrementů) odebraných z dětských hřišť, parků a koupališť. Z toho 16% vzorků bylo pozitivních na kontaminaci vajíčky *Toxocara canis*. 17% vzorků obsahovalo sporocysty coxidii, 1% vzorků obsahovalo vajíčka *Trichuris vulpis*. 12 z 15 bylo pozitivní na parazity (Zimová a kol., 2003).

V roce 2000 probíhala v mateřských školách v Plzni studie, která zjistila, že 44,2% vzorků písku nevyhovuje limitům příslušné vyhlášky pro některé ze sledovaných organismů, jako jsou termotolerantní koliformní bakterie a enterokoky. Nález pro bakterii rodu *Salmonella* spp. byl pozitivní 5 krát, pro vývojová stádia geohelmintha 3 krát (Matějů, 2004).

Během let 2000 až 2003 probíhalo v rámci Systému monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí sledování kontaminace městské půdy s cílem posoudit stupeň zdravotního rizika, vyplývajícího z expozice toxickými látkami a mikrobiologickým agens z kontaminace půdy a půdního prachu. Vzhledem k tomu, že největší riziko zvýšené expozice škodlivými látkami z kontaminované půdy je u dětské populace, byl projekt zaměřen na hrací plochy mateřských škol (Matějů, 2004).

V roce 2000 byla v Olomouci sledována kontaminace v 10 školcích, v roce 2001 v 37 školcích. Odběry vzorků byly prováděny systémem odběrové sítě (viz také metodika diplomové práce). V roce 2002 byly odběry provedeny ve školcích, kde byla zaznamenána v půdě v předcházejících letech parazitární nebo mikrobiologická kontaminace sledovanými agens v 19 školcích a v dvou v půdách školek, kde v předcházejících letech kontaminace zaznamenána nebyla. Na základně získaných výsledků bylo možné konstatovat, že ve sledovaném období ani v jednom případě nebyla zaznamenána kontaminace salmonelami. Nálezy pro termotolerantní koliformní bakterie (dále jen TKB) nevyhověly hodnotě 10^2 KTJ na g sušiny (limitní hodnota pro termotolerantní koliformní bakterie a enterokoky, stanovená ve vyhlášce č. 135/2004 Sb.) v roce 2000 v 30%, v roce 2001 v 5,4% a v roce 2002 v 36,9% sledovaných školek. Pro enterokoky nevyhověly nálezy v roce 2000 v 30%, v roce 2001 29,7% a v roce 2002 v 47,4% školek (Zimová a kol., 2003).

Sledování mikrobiologické kontaminace v Karviné v roce 2000 bylo prováděno v 10 školcích, v roce 2001 v 15 školcích. V roce 2002 byly odběry provedeny ve 2 školcích, kde byla zaznamenána předcházejících letech parazitární nebo mikrobiologická kontaminace sledovanými agens. Nebyla zde zaznamenána kontaminace salmonelami. Nálezy pro termotolerantní koliformní bakterie nevyhověly hodnotě 10^2 KTJ g sušiny v roce 2000 v 40%, v roce 2001 26,6%. Pro enterokoky nevyhověly nálezy v roce 2000 v 30%, v roce 2001 v 13,3% školek. Pro plísně a kvasinky neexistuje limitní hodnota. V roce 2000 a 2001 se hodnoty nálezů pohybovaly $>10^4$ KTJ na g sušiny. Pozitivní nálezy na vajíčka geohelminů nebyly v roce 2000 zaznamenány, v roce 2001 byl nález pozitivní u 7 školek, což představuje 46,7% (Zimová a kol., 2003).

V roce 2002 byly provedeny rozbory povrchových půd pro ukazatele mikrobiologického znečištění ve 27 školcích v Hradci Králové. Z výsledků vyplývá, že v roce 2002 byla limitní koncentrace indikátorů fekálního mikrobiologického a parazitologického znečištění překročena celkově v 40,7% u všech sledovaných mateřských školek. Z toho limitní hodnota pro termotolerantní koliformní bakterie byla překročena v 14,8%, pro enterokoky v 25,9% a pro helminty v 14,8%. Bakterie rodu *Salmonella* nebyly zjištěny ani v jednom případě (Zimová a kol., 2003).

V tentýž rok byly do monitoringu zařazeny mateřské školy v Klatovech. Rozbory povrchových půd pro ukazatele mikrobiologického znečištění byly

provedeny v 9 školcích. V roce 2002 byla ve sledovaných školcích v Klatovech limitní koncentrace indikátorů fekálního mikrobiologického a parazitologického znečištění překročena celkově v 44,4% u všech sledovaných mateřských škol. Z toho TKB byla překročena v 44,4% a pro enterokoky v 22,2%. Bakterie rodu *Salmonella* nebyly zjištěny ani v jednom případě, stejně jako vajíčka helmintů (Zimová a kol., 2003).

Posledním městem monitorovaným v roce 2002 byla Kroměříž. Zde se prováděl monitoring v 10 mateřských školcích. Z výsledků vyplývá, že limitní koncentrace indikátorů fekální mikrobiologického a parazitologického znečištění byla překročena celkově v 40,7% u všech sledovaných mateřských školek. Z toho limitní hodnota pro TKB byla překročena v 14,8%, pro enterokoky v 25,9% a pro helminty v 14,8%. Bakterie rodu *Salmonella* nebyly zjištěny (Zimová a kol., 2003).

V rámci sledování byly provedeny rozborů povrchových půd na ukazatele mikrobiologického znečištění v 9 školcích v Klatovech, 10 školcích v Kroměříži, v 27 školcích v Hradci Králové, v 25 školcích v Karviné a 47 v Olomouci. Celkem pro tyto účely bylo monitorováno 118 školek. Nejvyšší procento (70%) kontaminovaných školek bylo zaznamenáno v Kroměříži, nejméně kontaminovaných školek bylo v Olomouci (38,3%) (Matějí, 2004) (Zimová a kol., 2003).

Ze získaných výsledků mikrobiologické kontaminace povrchové půdy lze konstatovat, že u téměř poloviny sledovaných školek byla zjištěna vyšší kontaminace, než připouští kritéria ve vyhlášce č. 135/2004 Sb. (Zimová a kol., 2003).

3.1.3 Mikroorganismy v půdním prostředí

Mikroorganismy kromě půdy žijí i ve vodě, na prachových částicích a ve vzduchu, na organismech, v potravinách apod. Mezi půdní bakterie patří bakterie, nižší houby, prvoci, hlístice, červi, členovci a obratlovci (Hauptman a kol., 2009).

Bakterie, které se vyskytují v půdě, vytvářejí typická půdní společenstva způsobující mnoho látkových přeměn a podílejí se zejména na koloběhu dusíku. Rozkládají zbytky rostlinných a živočišných těl a látek, které jsou asimilovány rostlinami. Proces úplného rozkladu těchto organických zbytků je mineralizací půd. Význam mají saprofytické bakterie, podílející se na koloběhu dusíku, které jsou nitrifikační, denitrifikační a dusík vázající. Mnoho bakterií rozkládá bílkoviny rostlinných a živočišných těl na amonné soli, které jsou nitrifikačními bakteriemi oxidovány na dusitan a dusičnany. Denitrifikační bakterie spíše půdu o dusičnany a dusitany ochuzují, mají tedy negativní účinek. Dalším půdním společenstvem jsou bakterie podílející se na koloběhu uhlíku, kde jako heterotrofní mikroorganismy rozkládají odumřelá těla rostlin a živočichů, konečným produktem je mimo jiné oxid uhličitý, který se dostává do atmosféry. Bakterie, které se podílí na koloběhu síry, jsou sirmé a fototrofní bakterie. V půdě žijí i aktinomycety, u nichž je známá produkce antibiotik, kterými brzdí životní pochody jiných organismů či je přímo usmrcují (Říhová Ambrožová, 2008).

Další skupinou půdních bakterií jsou nižší houby. Ty jsou velmi rozsáhlou skupinou organismů, k nimž se řadí i plísně. Jsou také nejznámější, protože nerostou pouze v půdě, ale plísně se mohou rozrůstat na potravinách a jejich kolonie lze pozorovat pouhým okem. V půdě rostou jako velmi malé organismy, takže pouhým okem viditelné nejsou. V některých případech lze pouhým okem pozorovat prorůstající mycelium. Plísně a další nižší houby jsou odolné vůči vnějším podmínkám. Jejich vláknitá struktura a schopnost vytvářet spóry tuto odolnost podporují. V půdě rozkládají velké množství organických látek jak rostlinného, tak živočišného původu, například celulosu, škrob, gumy, lignin, mastné kyseliny, chitin a mnoho dalších. Houby mají několik významů, které je odlišují od ostatních mikroorganismů. Buňky hub jsou větší než buňky bakterií a obsahují membránou oddělené buněčné jádro, které v bakteriálních buňkách chybí. Buňky hub se rozmnožují sexuální i asexuální reprodukcí, bakteriální buňky dělením. Houby jsou heterotrofní mikroorganismy, to znamená, že ke svému životu potřebují organickou

hmotu. Mohou růst pouze v přítomnosti kyslíku, tedy za aerobních podmínek a při pH nižším než 7. Vyskytují se v několika morfologických formách: kvasinky jsou jednobuněčné organismy, plísně jsou vláknité a hyfy (vlákna o síle několika mikrometrů) mohou dosahovat délky až několik metrů. Pro půdu jsou nejvýznamnější vláknité houby vytvářející dlouhá vlákna, jejichž spleť se nazývá mycelium. Toto mycelium připomíná kořeny a je v půdě pozorovatelné pouhým okem (Hauptman a kol., 2009).

Prvoci - jsou jednobuněčné organismy, které se živí především bakteriemi, popřípadě dalšími prvoky, rozpustnými organickými látkami a někdy i houbami. Jsou několikrát větší než bakterie. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 5 až 500 mikrometrů (průměr). Rozdělují se do tří skupin na základě jejich tvaru. První skupina ciliate obsahuje největší prvoky, kteří se pohybují pomocí krátkých brv umístěných po celém povrchu buňky. Živí se dalšími dvěma druhy prvoků, bakteriemi i houbami. Další skupinou jsou měňavky, které se pohybují změnami tvarů buňky. Poslední skupinou jsou bičíkovci. Ti jsou nejmenší a k pohybu používají tzv. bičíky. Jsou důležitým článkem při mineralizaci živin. Přeměňují organické látky na anorganické a vylučují dusík ve formě amoniálních iontů. K tomu dochází nejčastěji v blízkosti kořenů rostlin, takže je dobře rostlinami využitelný (Hauptman a kol., 2009).

Výše uvedené organismy jsou všudypřítomné v životním prostředí. Kromě nepatogenních saprofytických mikroorganismů se však ve složkách životního prostředí (půda, voda, vzduch) vyskytují i patogenní a podmíněně patogenní organismy (Říhová Ambrožová, 2008).

3.1.3.1 Indikátorové mikroorganismy

Indikátorové organismy jsou organismy, které indikují možnou kontaminaci. Jsou využívány pro detekci možné přítomnosti např. fekálních patogenů v pitné vodě ve vodovodech a studních, v rekreačních vodách (sladkých i slaných), bazénech, kompostech, bioodpadech, zbytcích po anaerobních rozkladech organických látek, kalech z čistíren odpadních vod apod. (Matěju a Štěpánková, 2008).

Indikátorové mikroorganismy v podstatě nahrazují rozsáhlá stanovení nejrůznějších potenciálně patogenních, patogenních a jinak závadných organismů. Indikátorové organismy se využívají jako modelové organismy pro zjišťování výskytu, přežívání a inaktivace patogenních organismů. Bohužel, doposud se nepodařilo najít žádný univerzální indikátorový organismus. Obecný přístup vychází z předpokladů, že by měly být stanovovány organismy, které nejdéle přežívají v prostředí. Každý indikátorový mikroorganismus musí splňovat následující požadavky:

- musí se vyskytovat v matici
- musí reprezentovat mikroorganismy, které způsobují choroby u lidí nebo zvířat
- musí být epidemiologicky významný
- izolační a kvantifikační metody musí být jednoduché, definitivní, věrohodné a levné.

(Matěju a Štěpánková, 2008)

Bylo testováno velké množství organismů, především bakterií a parazitických druhů s ohledem na věrohodnost pro posouzení vlivu na obecné zdraví včetně *Escherichia coli*, streptokoky, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, sulfit redukující klostridia a larvy a vajíčka cizopasných červů (Matěju a Štěpánková, 2008). Neopomenutelné jsou i kvasinky a plísně, které se používají převážně v potravinářském průmyslu pro stanovení kvality (Tortorello, 2003). Pro stanovení fekálního znečištění se nejčastěji používají enterokoky, *Escherichia coli*, koliformní bakterie a *Clostridium perfringens*. Mezi nejběžnější indikátorový organismus se považuje fekální *E. coli*, který slouží pro identifikaci rizika pro obecné zdraví. Jelikož se *E. coli* vyskytuje v daleko větším počtu v lidských fekáliích než ve

zvířecích, považuje se její použití pro prokazování fekálního znečištění zvířaty za nevěrohodné (Matějů a Štěpánková, 2008) (Colleran, 2008) (Bloem a Breure, 2007).

Koliformní a termotolerantní bakterie se používají jako indikátorové organismy fekálního znečištění velice často, i když koliformní bakterie nejsou jenom fekálního původu. Mnohem rezistentnější ke stresům prostředí v porovnání s koliformními bakteriemi jsou enterokoky. Stanovení enterokoků má však také nějaká omezení. Především pokud se teplota pohybuje nad 55°C, jejich počty velmi rychle klesají a potom je není možné kvantifikovat (Matějů a Štěpánková, 2008).

3.1.3.2 Zdravotní rizika a mikroorganismy

Zdravotní rizika pro člověka v životním prostředí představuje čeleď bakterií *Enterobacteriaceae*. *Enterobacteriaceae* patří k nejvýznamnějším průvodcům vnitřních infekcí světa (Amlinger a Peyr, 2003). Ze zdravotního hlediska jsou pro oblast sledování kontaminace půdy nejvýznamnější ty mikroorganismy, které jsou zároveň i indikátory fekálního znečištění půdy. Mezi tyto organismy patří např. skupina **koliformních bakterií**. Jsou to gramnegativní tyčinky, které netvoří spory a jsou schopné růst na kultivačním médiu obsahující žlučové soli či jiné povrchově aktivní látky s podobnými vlastnostmi. Jsou aerobní či fakultativně aerobní. Mají schopnost fermentovat laktózu při teplotě 35°C nebo 37°C. Větší hygienický význam je ovšem přisuzován tzv. **termotolerantním koliformním bakteriím**. Ty jsou schopné fermentovat laktózu při teplotě 42°C až 44°C. Dříve se označovaly jako **fekální koliformní bakterie** (Říhová Ambrožová, 2008).

Kmeny *E. coli* se vyskytují jako nepatogenní, patogenní nebo podmíněně patogenní (Šilhánková, 1983). *Escherichia coli* patří mezi koliformní bakterie a je členem čeledi *Enterobacteriaceae*. Je komensálem spodní části střevního traktu člověka a zvířat. Vyskytuje se proto i ve výkalech. Buňky mají tvar tyček vyskytujících se jednotlivě nebo v párech. Jejich velikost kolísá od 1-1,5 µm do 2,0-6,0 µm. Pohybují se peritrichálními bičičky. Jsou však známé i nepohyblivé kmeny. Kmeny izolované z patologického materiálu jsou opouzdřené. Tyto organismy rostou za aerobních podmínek (Rosypal a kol., 1981). Jejich přítomnost ve vodách, půdě nebo potravinách je proto ukazatelem, že zde došlo k znečištění fekáliemi (Šilhánková, 1983).

Nejvíce pozornosti se v posledních letech věnuje *Escherichia coli* VTEC 0157. Je prokázáno, že *Escherichia coli* VTEC 0157 je přítomná v kalech i bioodpadech. Přítomnost tohoto patogenu zapříčiňuje značné riziko přenosu na plochy v městských aglomeracích zvláště na povrch hracích ploch z kompostů. Studie prováděná na 94 kompostárnách zjistila přítomnost *E. coli* VTEC 0157 v 3% kompostáren v USA. Protože infekční dávka tohoto patogenu pro člověka je nízká a přežívání v prostředí je dlouhé, je třeba tomuto patogenu věnovat neustále pozornost.

Stanovení bakterií *E. coli* jako indikátorového organismu ve složkách životního prostředí podporuje materiál Evropské komise s tím, že tato bakterie má mnoho společných charakteristik s dalšími vegetativními bakteriemi jako *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* a *Vibrio*, takže její přežití spolehlivě indikuje nebezpečí i dalších potenciálně patogenních bakterií. Na druhou stranu není vhodné používat *E. coli* a koliformní bakterie jako indikátory patogenů ve vyčištěných odpadních vodách dezinfikovaných chemicky, protože koliformní bakterie jsou velmi citlivé na chemické desinfekční látky, jejich výskyt nekoreluje s výskytem parazitických protozoí jako je *Cryptosporidium* a enterických virů. (Matějů a Štěpánková, 2008).

Bakterie rodu *Salmonella spp.* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou to gram negativní, nesporotvorné tyčinky, které se rozdělují na základě somatických a bičíkových antigenů. Tyčinky jsou 0,5 - 0,8 µm široké a přibližně 1 - 3,5 µm dlouhé. *Salmonella* se vyskytuje převážně v řetězcích, ale není vyloučeno, že se může vyskytovat také jednotlivě nebo v párech. Jsou schopny růst v prostředí s kyslíkem i bez kyslíku při teplotách 6 - 50°C. Dobře přežívá nízké teploty (-18°C), je však rychle usmrcována teplotou nad 66°C (VŠCHT, 2010). Tato bakteriální čeleď obsahuje cca 100 druhů bakterií, z nichž pouhá čtvrtina jsou humánními patogeny nebo se mohou hojněji u člověka vyskytovat. Zástupci této bakteriální čeledi přenášejí nemoci, jako jsou tyfus, úplavice a některé další. V současné době je známo více než 2000 sérovarů *Salmonella spp.*, které se rozdělují do dvou skupin:

Tyfózní salmonely primárně působí v člověku a jeho exkrementech a může již malou infekční dávkou (100 až 1000 buněk) snadno infikovat další lidi. Přenos se může dít jak dotykem, tak nepřímo například s potravinami a zejména vodou. Úmrtnost bez léčení dosahuje 15%, se specifickou terapií 1% až 2%.

Enterické salmonely, jejich přirozené prostředí pro život jsou střeva lidí a zvířat. Nejdůležitějším primárním infekčním zdrojem jsou zvířata, která se nakazila krmivem. Infekce zvířat je často bez příznaků, takže je pro člověka neodhalitelná a často dochází k přenosu infekce na potraviny a z nich na člověka. Pro člověka je poměrně vysoká infekční dávka (přibližně kolem 10^6 buněk). Infekce u člověka vede k průjmu se zvracením, avšak i při neléčení brzy odeznívá a jen zřídka vede k smrti (Amlinger a Peyr, 2003).

Primárním způsobem přenosu salmonel je kontakt člověka s člověkem a infikovanou potravinou, především nedobře tepelně upraveným kuřecím masem a vajíčky. Tyto bakterie jsou velmi často detekovány i v kalech z ČOV či na trávnících v městských aglomeracích zvláště na hracích plochách. Bakterie je rozšířena mezi hospodářskými i divokými zvířaty i ptáky. Velmi řídko dochází k infekci tímto mikroorganismem z vodního prostředí (Matějů a Štěpánková, 2008).

Enterokoky (*Enterococcus*) jsou obyvateli střevního systému člověka a zvířat - intestinální enterokoky. V hygienické mikrobiologii a vodohospodářské praxi se intestinální enterokoky běžně používají k detekci možné přítomnosti fekálních patogenů v pitné vodě ve vodovodech a studních, v rekreačních vodách (slaných i sladkých), bazénech, v kompostech, bioodpadech, zbytcích po anaerobním rozkladu organických látek, kalech z čistírny odpadních vod, půdě a podobně. Intestinální enterokoky se pravidelně izolují ze stolice lidí a exkrementů zvířat, kde je možné zjistit přítomnost dvou hlavních skupin enterokoků. V lidských a zvířecích exkrementech se nachází *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae* a *Enterococcus durans*. *Streptococcus bovis*, *Streptococcus aquinus* a *Streptococcus avium* jsou striktní zástupci dobytčích, ptačích či koňských fekálií. Jsou citlivé vůči změnám vnějšího prostředí a jsou používány za indikátory čerstvého fekálního znečištění na rozdíl od koliformních bakterií. Odolávají desinfekčním prostředkům, např. chloru, proto také indikují nedostatečnou dávku desinfekčního prostředku v pitné vodě (Říhová Ambrožová, 2008) (Matějů a Štěpánková, 2008) (Colleran, 2008).

Taxocara je patogenní geohelminth. Název je odvozený od řeckého *toxon* = luk nebo šíp a od řeckého *karé* = hlava. Na plochách dětských hřišť se nejvíce vyskytují dva druhy: *Toxocara canis* (*canis* - pes) a *Toxocara cati* (*cati* - kočka). Larvová toxokaróza je nejčastější tkáňová helmintóza v ČR. Protilátková

promořenost populace se v ČR pohybuje mezi 10 - 20%. Nákaza se přenáší zralými vajíčky. Zdrojem nákazy v našich podmínkách jsou téměř výlučně domestikovaní psi a kočky žijící v domácnostech i zvířata potulná. U psů je udáváno promoření škrkavkami okolo 18%, u koček až 50%. Larvy vylíhlé z vajíček v lidském zaživacím ústrojí se přes stěvní stěnu cestou krevní nebo lymfatickou dostávají do různých orgánů. Dospělý jedinec je v nezralé formě vyloučí denně kolem 20 000 a víc. Při procesu dozrávání vajíček je nutná teplota kolem 10°C, dostatečná vlhkost a přístup kyslíku. Klinické projevy záleží na intenzitě nákazy a lokalizaci larev. Rozeznáváme tak formu skrytou, která je zjištěna většinou náhodně a formu se zjevnými příznaky a charakteristikou danou typem postižených orgánů. (Mikulecký, 1993) (Sovová, 2006).

3.1.3.2.1 Patogenita, virulence a infekčnost mikroorganismů

Infekční agens je označován jako původce daného onemocnění. K nejdůležitějším vlastnostem původce nákazy patří jeho patogenita, virulence, infekčnost, invazivita. (Hubálek a Rudolf, 2007).

Mikroorganismy dělíme dle jejich vztahu k příslušnému makroorganismu na mikroorganismy nepatogenní, patogenní a podmíněně patogenní. Nepatogenní mikroorganismy jsou mikroorganismy, které nejsou schopny vyvolat onemocnění. Protikladem jsou mikroorganismy tzv. patogenní, které vyvolávají pravidelné onemocnění u jedinců. Hovoříme-li o podmíněné patogenitě, jedná se pak o schopnost vyvolat onemocnění mikroorganismy pouze v případě, že jedinec má sníženou obranyschopnost nebo onemocnění je podmíněno způsobem vstupu do organismu (LF UK, 2003).

Pojem patogenita lze tedy charakterizovat, jako schopnost bakteriálního druhu vyvolat chorobu. Existuje ještě pojem vyrovnaná patogenita. Touto vlastností disponuje druh, jehož hostitel je nemocen dostatečně dlouho, případně ani nezahyne, ale nakazí tak co nejvíce dalších hostitelů. Kmeny s nízkou virulencí jsou totiž zničeny imunitním systémem hostitele příliš brzy a nešíří se, kmeny s příliš vysokou virulencí zahubí příliš brzy svého hostitele a zahynou spolu s ním. V případě vyrovnaní patogenity však mluvíme o dlouhodobém oboustranném adaptačním

procesu. Výjimkou jsou zoonózy, tzv. nemoci ze zvířat, kdy je člověk pouhým slepým článkem řetězu šíření původně zvířecí nákazy (LF UK, 2003).

Pojem virulence se vztahuje ne ke druhu mikroorganismu, ale ke kmeni. Na virulenci lze nahlížet jako na schopnost kmene uplatnit patogenitu charakteristickou pro druh. Nejčastěji se říká, že virulence je kvantitativní vyjádření míry patogenity. To platí tam, kde patogenita a virulence mají shodný mechanismus např. *Clostridium perfringens* (alfa toxin). Výraz patogenita bývá neprávňě zaměňována s virulencí. Virulence se vždy týká konkrétního kmene a patogenita druhu (LF UK, 2003).

Invazivita je schopnost agens pronikat do tkání hostitele a pomnožovat se v nich (Hubálek a Rudolf, 2007).

Infekčnost (infekční onemocnění) je onemocnění, které je způsobeno živým organismem a je přenosné ze zdroje nákazy na jiné organismy (jiného člověka). Při vzniku infekčního onemocnění musí existovat vždy 4 základní podmínky, a to zdroj nákazy, mikroorganismus neboli původce infekčního onemocnění, přenos a vnímavá osoba. Samostatný vznik infekčního onemocnění je podmíněn mnoha faktory. K těm nejdůležitějším patří kvalita mikroorganismů, jako je jejich patogenita nebo například virulence. Dále způsob přenosu, vstupní brána infekce, cílová tkáň, obranyschopnost organismu člověka, genetické faktory, věk, infekční dávka a mnoho dalších faktorů. Jedním z nejdůležitějších faktorů je infekční dávka (Wasserbauer, 2009).

Infekční dávka je taková dávka původce infekční choroby (absolutní počet aktivních jednotek), která vyvolá chorobu. Závisí jak na vlastnostech původce infekční choroby, tak i na vlastnostech napadeného organismu. Většinou se počítá s průměrnou hodnotou. Tato hodnota je ovšem rozporuplná, zatímco odolní jedinci se nemusí danou chorobou nakazit, jiní méně odolní jedinci mohou po mnohem menší dávce onemocnět (Anonym, 1999).

Infekční dávka je u každého patogenu rozdílná. Například u *Escherichia coli* je infekční dávka asi jen deset buněk (Schmid-Hempel a Frank, 2007). V následující tabulce jsou uvedené některé patogeny a jejich minimální infekční dávka.

Tabulka č. 2- Infekční dávky patogenů (Vacek, 2002)

Agens	Minimální infekční dávka
<i>Escherichia coli</i> (VTEC)	$< 10^1 - 10^2$
<i>Shigella</i> spp.	$10^1 - 10^2$
<i>Salmonella</i> spp.	$10^4 - 10^5$
<i>Escherichia coli</i> (jiné než VTEC)	10^3
<i>Vibrio cholerae</i>	10^1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	$10^3 - 10^5$

Patogeny se do organismu člověka mohou dostat několika cestami. Mezi tyto cesty patří například kůže, dýchací cesty, gastrointestinální trakt (trávicí soustava), spojivky, sliznice nebo urinogenitální, trakt. Jen několik málo patogenů je schopno proniknout přes neporušenou kůži. Mezi tyto mikroorganismy patří například parazité, jako jsou měchovci nebo larvy např. *Schistosoma*. Některé patogeny se dostanou do těla porušením kožní bariéry. To se může stát v případě kousnutí hmyzem, řezné rány nebo popáleniny. Mnoho patogenů proniká do lidského těla přes sliznici (Mims a kol., 2001).

Dalším nejčastějším místem vstupu jsou dýchací cesty. Jednotlivé mikroby jsou vdechovány ve formě prachových částic nebo kapek vody. Tyto mikroby pak mají za následek nachlazení, zápal plic, tuberkulózu, chřipku nebo spalničky. Mikroorganismy, které se dostanou do těla přes gastrointestinální trakt například prostřednictvím potravy, vody, špinavých rukou nebo vložím předmětu do úst, způsobují onemocnění typu dětská obrna, hepatitida typu A, břišní tyfus, úplavice, cholera nebo např. *Shigelosis*. Většina těchto mikroorganismů je ale při vstupu do těla zničena kyselinou chlorovodíkovou a enzymy v žaludku nebo tenkém střevě. Mikroorganismy, které tělo nezničí svými obrannými protilátkami, jsou vyloučeny ve výkalech a mohou se šířit dál (Mims a kol., 2001).

3.1.4 Ingesce půdy

Nejrizikovější populací pro onemocnění z kontaminace půdy jsou děti. Hlavní příčinou vzniku onemocnění může být opakující se požívání půdy. Požití velkého množství půdy přibližně 1000 - 5000mg za den se nazývá Pica - soil. Pica-soil se převážně vyskytuje u dětí šesti letých a mladších nebo u jednotlivců vývojově zaostalých (Hartwell, 2001).

Dalším termínem souvisejícím s požíváním půdy je ingesce půdy (soil ingestion). Tento termín zahrnuje konzumaci půdy. Zahrnuje různé chování, jako například dotýkání se potravin špinavýma rukama, konzumaci upadnutého jídla na zem nebo přímou konzumaci půdy (Hartwell, 2001).

Záměrné požívání zeminy se nazývá geofágie a je obvykle spojena s kulturními zvyklostmi. K tomu je nezbytné sledovat řadu dalších faktorů, jako je množství požívání půdy, frekvence, ingesce, typ požídaného materiálu, věk jako rizikový faktor (Hartwell, 2001).

Tyto tři uvedené definice vznikly v roce 2000 na konferenci Agentury pro toxické látky a nemoci (ATSDR), která se konala v Atlantě v Georgii. Na této konferenci, zaměřené přímo na problematiku Soil - pica, se sešlo několik specialistů, kteří se danou problematikou zabývali (Hartwell, 2001)

V následující tabulce je uveden odhad dávky pro děti, které během hraní konzumují půdu. Uvedené hodnoty v tabulce byly stanoveny na základě výzkumu americké školy School of Public Health – University of Massachusetts (Stanek a Calabrese, 1995).

Tabulka č. 3 - Odhad dávky, kterou děti požijí (Stanek a Calabrese, 1995)

Odhadovaný počet dní v roce	Denní požití půdy (v mg)				
	>200	>500	>1000	>5000	>10000
1-2	86	72	63	42	33
7-10	72	53	41	20	9
35-40	42	31	16	1,6	1,6

Jednotlivé manuály, které vydala US EPA v souvislosti s riziky plynoucích z kontaminace půdy, uvádějí nejvyšší příjem půdy u malých dětí 200 až 800mg/ den. Nejnovější studie však uvádějí, že přibližně 95% dětí konzumuje spíše 200mg/ den. Pokud by dítě trpělo Pica - soil může konzumační dávka být 25 - 60g půdy. U dospělých jedinců je příjem půdy značně menší, a to kolem 60 mg/den. Většinou se jedná o vdechování prachových částic a zbytky půdy na neumyté zelenině a ovoci (Zimová a kol., 2006).

3.2 Legislativa EU

Legislativa České republiky obsahuje kromě doporučení i hygienické limity mikrobiologického a parazitologického znečištění písku. Tyto limity lze považovat standardem a zároveň hygienickou normou pro bezpečné provozování venkovních hracích ploch. V okolních státech Evropské unie, jako je např. Německo nebo Polsko, tyto limity v jednotlivých legislativách zahrnuté nejsou. V Německu se provozovatelé těchto zařízení řídí zákony o prevenci a potírání infekčních chorob u člověka (zákon č. 57/2000 Sb., Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen) a Infektionsschutzgesetz, který je rozšířen o hygienickou normu -Hygienegrundsätze in Kindertagesstätten. Tato legislativa neřeší limity mikrobiologické kontaminace hracích ploch, v legislativě jsou uvedeny limity pro chemickou kontaminaci některých prvků, která se jako jediná na těchto plochách monitoruje. Zákony obsahují taxativně vyjmenovaná možná onemocnění a kontakty, kam se jednotlivé osoby mají při styku s těmito infekcemi obrátit či jak těmto rizikům předcházet.

Tabulka č. 4 - Přípustné koncentrace pro vybrané chemické prvky v písku - Německo (Selling, 2007)

Prvek	Nejvyšší přípustné hodnoty mg/kg sušiny
Arzen	10,0
Chrom	15,0
Kadmium	0,4
Olovo	0,0

Řešená je ochrana písku před kontaminací a následná výměna, která má být podle německé normy jednou za 3 roky a to pouze v případě, že je okolí zabezpečeno proti vniknutí domácích zvířat a chemická kontaminace splňuje uvedené limity. Pokud nejsou tyto limity splněny, doporučuje se výměna jednou i vícekrát ročně. Sledovaným ukazatelem v těchto normách je vybavenost dětských hřišť. Hřiště postavené po roce 1999 musí být v souladu s DIN EN “1176 zařízení dětských hřišť a vrstvy“, případně musí být v souladu s pokyny výrobce a DIN EN “1177 dopad absorbující povrch hřiště“. Tyto uvedené normy jsou v souladu s legislativou Evropské unie, tedy pro členy EU stejné (Zákon č. 57/2000 Sb.) (Dupal, 2010) (Sellering, 2007).

Podobně jako v Německé republice se i v Polsku těmito problémy zabývá několik zákonů, a to zákon č. 234/2008 Sb. pro prevenci boje proti infekcím a infekčních onemocnění u lidí a zákon č. 236/1996 Sb. o udržování čistoty a pořádku v obcích ve znění pozdějších předpisů. Ani v těchto zákonech není zahrnuta legislativa spojená s hygienickými limity venkovních hracích ploch. Jsou zde uvedena pouze opatření, kterými lze předejít mikrobiologické kontaminaci venkovních hracích ploch, jako je například zabezpečení proti vniknutí toulavých zvířat. A jsou uvedena zdravotní rizika z kontaminace (Woźniczka, 2010).

Jiná legislativa je v Belgii a Francii. V těchto zemích nemají zákon, který stanovuje hygienické limity venkovních hracích ploch. Belgie, jako člen Evropské unie, se řídí převzatými francouzskými normami AFNOR 1176 a AFNOR 1177. Tyto normy jsou stejné jako ve výše uvedené legislativě Německa. Belgie ve své legislativě řeší obecnou bezpečnost dětských hřišť a vybavení. Tuto legislativu má uvedenou v zákoně ze dne 9. února 1994 Sb. o bezpečnosti výrobků a služeb (Loi relative á la sécurité des produits et des services) a Královské vyhlášce ze dne 28. března 2001 o bezpečnosti zařízení dětských hřišť (Arrêté royal du 28 mars 2001 relatif à la sécurité des équipements d'aires de jeux) a Královské vyhlášce ze dne 28. března 2001 o provozování dětských hřišť (Arrêté royal du 28 mars 2001 relatif à l'exploitation des aires de jeux) (Vyhláška, 2001a) (Vyhláška, 2001b).

3.3 Legislativa v ČR

V České republice je v současné době povinnost sledovat mikrobiologickou kontaminaci písku v pískovištích dětských hřišť, která je daná zákonem č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů a jeho prováděcím předpisem. Prováděcím předpisem je vyhláška č.135/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch. Ve vyhlášce jsou uvedeny limitní koncentrace. Limity mikrobiologické kontaminace, které jsou součástí vyhlášky č. 135/2004 Sb. jsou vztaženy pouze na pískoviště venkovní hrací plochy (Vyhláška č.135/2004 Sb.) (Zákon č. 258/2000 Sb.).

Legislativní předpisy mají za úkol, mimo jiné, také zabezpečit nejen minimalizaci zdravotních rizik, ale také kontrolu limitních ukazatelů. Je velmi důležité, aby zároveň s limitními hodnotami ukazatelů (indikátorových organismů, nebezpečných a toxických látek) v legislativních předpisech a normách byly stanoveny i jednotlivé metody stanovení těchto ukazatelů v diskutovaných matricích. Pro účinnou kontrolu musí existovat jednotlivé metody sledování předepsaných ukazatelů a limitů a zároveň i postupy vzorkování. V dnešní době není možné sledovat veškeré patogeny, které se v matricích v životním prostředí nacházejí, ale je třeba hledat organismy se stejnou nebo podobnou rezistencí vůči životnímu prostředí (tzv. indikátorové mikroorganismy) (Matějí a Štěpánková, 2008).

3.3.1 Venkovní hrací plochy

Venkovní hrací plochy jsou veřejné školky a veřejná prostranství, která jsou určena k hraní a pohybu dětí.

Venkovní hrací plocha je definována v zákoně č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. Hygienické požadavky jsou stanoveny v § 13 odst. 2 a vyhlášky č. 135/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích (§ 33 a příloha č. 10). Je důležité si uvědomit, že pro půdu jako takovou nejsou stanovené hygienické limity dle uvedeného zákona a vyhlášky. Tyto limity a hygienické požadavky jsou stanovené pouze pro písky v pískovištích. Zákon č. 258/2000 Sb. a prováděcí předpis vyhláška č. 135/2004 Sb. byly doplněny

metodickým pokynem HH č.j. MZ 35023/2004 HEM, kde jsou specifikovány další definice pojmů, které se týkají venkovních hracích ploch (Houžvičková a kol., 2006).

Definice jednotlivých pojmů dle metodického pokynu MZ 35023/2004 HEM:

Venkovní hrací plocha - je plocha určena pro hry a sport dětí a mladistvých, která k tomuto účelům byla kolaudována.

Venkovní hrací plocha předškolních zařízení - je plocha určena k hraní a pohybu dětí. Plocha je nedílnou součástí předškolního zařízení.

Venkovní hrací plocha školských zařízení - je plocha určena ke sportu a venkovnímu pohybu dětí. Plocha je nedílnou součástí školského zařízení.

Pískoviště - je ohraničená plocha s možností výměny písku, určena pro hraní dětí.

Písek - kopaný písek, který vyhovuje hygienickým požadavkům uvedené ve vyhlášce Ministerstva zdravotnictví (MZ) č. 135/2004 Sb., kterou se stanovují hygienické požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích (MZ, 2004).

Venkovní pískové hrací plochy (písková hřiště na volejbal, pískové plochy dětských hřišť a dopadové plochy pod herními prvky) - musí být chráněny před volně pobíhajícími zvířaty. Vzhledem k nákladnému zajištění výměny písku a k hygienickým přednostem se preferují dopadové plochy u herních prvků ze zdravotně nezávadných povrchů např. z elastických desek z pryžových granulátů certifikovaných na výšku volného pádu. (ČSN EN 1177).

3.3.1.1 Hygienické požadavky a limity venkovních hracích ploch

Venkovní hrací plocha musí splňovat základní hygienické požadavky pro provoz venkovních hracích ploch ve smyslu zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a prováděcí vyhláškou 135/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch (SZÚ, 2007).

Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví vymezuje práva a povinnost subjektů (výkon státní správy) v ochraně veřejného zdraví. Hygienickými požadavky na venkovní hrací plochy se zabývá § 13 odstavec 2, kde je závažně stanovena povinnost provozovatele venkovních hracích ploch. Provozovatel venkovních hracích ploch určené pro hry dětí je povinen zajistit, aby písek určen ke

hrám dětí v pískovištích nebyl mikrobiálně, chemicky a parazitárně znečištěn nad hygienické limity upravené prováděcím právním předpisem. Prováděcím předpisem se rozumí vyhláška č. 135/2004 Sb., kterou se stanovují požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch, která v příloze č. 10 specifikuje požadavky na chemické složení písku a jeho mikrobiální kvalitu (KHS v Liberci, 2009).

Jednotlivé hygienické limity upravené prováděcím předpisem pro pískoviště venkovních hracích ploch jsou uvedené v následujících tabulkách.

Tabulka č. 5 - Hygienické limity mikrobiologického a parazitologického znečištění písku v pískovištích na venkovních hracích plochách (Vyhláška č.135/2004 Sb.)

Indikátor	Nejvyšší přípustné množství KTJ v 1g sušiny		Vysvětlivky
	vzorku		
Termotolerantní koliformní bakterie	750		1
	150		2
Fekální streptokoky	750		1
	150		2
<i>Salmonella</i> spp.	negativní nález		3
Geohelminți (vajíčka, larvy)	negativní nález		4

Vysvětlivky:

- 1) Platí pro technické očkovaní roztěrem na povrch při očkovaném množství 0,2 ml prvního desítkového ředění.
- 2) Platí pro techniky očkovaní zaléváním vzorku do kultivační půdy při očkovaném množství 0,1 ml prvního desítkového ředění.
- 3) Písek dětských pískovišť nesmí obsahovat žádné bakterie rodu *Salmonella* spp. v 50g matrice.
- 4) Vajíčka geohelminťů patogenních pro lidi v 15g matrice. Parazitické rozbory jsou prováděny podle metodiky uveřejněné v příloze v Acta hygienica et epidemiologica č. 1/86 (Vyhláška č. 135/2004).

Hygienické limity vybraných ukazatelů chemického znečištění písku v pískovištích na venkovních hracích plochách jsou uvedeny v tabulce č. 6 a 7.

Tabulka č. 6 - Hygienické limity vybraných chemických prvků (Vyhláška č.135/2004 Sb.)

Prvek	Nejvyšší přípustné hodnoty uvedené v mg.kg-1 sušiny	
	Obsah ve výluhu 2M HNO ₃	Obsah po úplném rozkladu
As	2,0	10,0
Be	0,5	1,5
Cd	0,3	0,3
Co	7,0	16,0
Cr	20,0	85,0
Cu	21,0	45,0
Hg	-	0,3
Mo	0,7	0,8
Ni	10,0	40,0
Pb	30,0	50,0
V	10,0	80,0
Zn	40,0	90,0

Pozn.: vzorek půdy se extrahuje roztokem 2 mol/l kyseliny dusičné v poměru fází 1:10 (půda: kyselina) za laboratorní teploty po dobu 6 hodin na horizontální třepačce

Tabulka č. 7 - Hygienické limity vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) a benzenu (Vyhláška č.135/2004 Sb.)

Název PAU	Nejvyšší přípustné hodnoty uvedené v mg.kg-1 písku
Antracen	0,01
benz (a) antracen	1,0
benzo (a) pyren	0,1
Fenanthren	0,1
Fluoranthren	0,1
Chrysen	0,01
Naftalen	0,1
PAU suma	1,0
Benzen	0,05

Pozn.: Stanovení PAU a benzenu se provede ve výluhu do směsi aceton + dichlormethan 1 : 1 po případném předchozím chemickém vysušení.

4. Metodika

V letech 2000 až 2002 bylo v rámci monitorování půdy provedeno sledování mikrobiální kontaminace na povrchových vrstvách půdy na sledovaných plochách. Státní zdravotní ústav se sídlem v Praze od roku 2000 v rámci Systému monitorování prováděl monitorování městské půdy s cílem posoudit stupeň zdravotního rizika, vyplývajícího z expozice toxickými látkami a mikrobiologickým agens z kontaminace půdy a půdního prachu. Vzhledem k tomu, že největší riziko zvýšené expozice škodlivými látkami z kontaminace půdy je u dětské populace, projet byl zaměřen na hrací plochy mateřských škol (Zimová a kol., 2003).

Cílem této práce je navázat i na metodiku vlastního měření a na studie, které byly provedeny v letech 2000 - 2002 Státním zdravotním ústavem a následně výsledky vyhodnotit a porovnat. Od roku 2002 se monitorování mikrobiologické kontaminace na těchto plochách (hrací plochy mateřských škol) neprovádělo, proto je možné navázat pouze na výsledky z roku 2000 - 2002.

Základem vlastní práce byl odběr vzorků půdy a jejich mikrobiologický rozbor. Aby bylo možné zpracovat a především porovnávat dosažené výsledky, musí být metoda odběru vzorků standardní a především kompatibilní s metodou použitou v letech 2002. Proto bylo nezbytné, před započítím vlastní práce metodiku odběru vzorků konzultovat s odborníky, kteří se danou tematikou zabývají. Velmi důležitá byla volba lokality, ze které byly vzorky odebírány. Zvolená lokalita musela odpovídat svým charakterem a vstupními podmínkami plochám, které byly již vyhodnoceny a byly známy výsledky, na které bylo možno navázat.

Získané vzorky byly zpracovány metodami, které jsou shodné s postupy ve studii Státního zdravotního ústavu v Praze. Výsledky byly využity pro porovnání a získání informací o chování mikrobiologické kontaminace na sledovaných plochách.

Získané výsledky byly porovnávány s limity pro dětská pískoviště uvedenými ve vyhlášce 135/2004 Sb., kterou se stanoví požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch (tabulka č. 5), protože pro půdy venkovních hracích neexistují žádná omezení pro kontaminaci mikrobiologickým činitelem. Stejný způsob hodnocení byl zvolen i ve studii Státního zdravotního ústavu vzhledem k tomu, že lze předpokládat stejné chování dětí na písku a půdě hracích ploch. Na základě diskuze byly vysloveny závěry práce.

4.1 Výběr lokality

V diplomové práci byly pro monitorování vybrány dvě z již dříve zkoumaných lokalit. Tyto lokality byly v letech 2000 - 2002 pozitivní na mikrobiální kontaminaci. V těchto lokalitách byly odebrány vzorky půd na venkovních hracích plochách a následně byly porovnány s výsledky předchozího monitorování. Pro monitorování byly vybrány 2 lokality, a to Hradec Králové a Olomouc.

V Hradci Králové byly odebrány vzorky z 6 mateřských školek. Z toho 4 mateřské školky již byly monitorovány v minulých letech s pozitivními nálezy. 2 nové byly vybrány s předpokladem, že nález kontaminace bude negativní. V Olomouci se monitorovalo 7 mateřských školek (5 již monitorovaných, 2 nové opět s předpokládaným negativním nálezem). Vzorky odebrané v mateřských školkách se dále analyzovaly v laboratořích SZÚ odbor OHME (odbor hygienické mikrobiologie a ekotoxikologie), v laboratoři hygieny půdy a odpadů.

4.2 Odběr vzorků ve vybraných lokalitách

Na jednotlivých lokalitách byly odebírané vzorky směsné, dílčí (bodové). Dílčí vzorek je vzorek, který byl odebrán z jednoho odběrového místa. Z těchto vzorků se skládal vzorek směsný, který vznikl následnou homogenizací a kvartací. Směsný vzorek byl brán jako tzv. reprezentativní vzorek, v kterém byly zprůměrované vzorky dílčí. Rozbory v dvou typech vzorků (směsném a bodovém) se prováděly pro porovnání, protože rozdělení mikrobiální kontaminace je velmi heterogenní a je pravděpodobné, že ve směsném vzorku nemusí být kontaminace zachycena. Pokud byl směsný vzorek při laboratorním stanovení pozitivní, neznamená to, že kontaminace se nachází na celé ploše, kde se vzorky odebíraly. Pro určení, zda byla lokalita kontaminována celá, nebo jen některé úseky, je možné použít bodových vzorků. Tyto vzorky byly odebrány náhodně v monitorované lokalitě. Bodový vzorek byl odebrán z jednoho odběrového místa a slouží pro upřesnění mikrobiologické kontaminace na jednotlivých plochách.

Postup práce při odběru vzorku a definice

Vzorkovacím zařízením se na daném místě odebere vhodné množství povrchové půdy a po homogenizaci a kvantifikaci se vzniklý materiál rozdělí na dva ekvivalentní podíly, které se pak transportují do laboratoře.

Odběrovým místem - je plocha o rozměrech 18 × 18 m na zvolené ploše 0,5 ha.

Odběrovým bodem - je konkrétní místo odběru vzorku půdy.

Při odběru vzorků byly použity tyto spotřební materiály:

Polyethylenové (PE) sáčky vhodné velikosti (schopné pojmout vzorek zeminy hmotnosti 1,5 až 2kg), polyethylenová (PE) folie rozměru 1×1 m.

Dále byla použita tato pomocná zařízení a přístroje:

Vzorkovací zařízení (nerezový zahradnický rýč), termotaška, plastové nádoby vhodné velikosti pro homogenizaci odebraných vzorků, dřevěné (plastové) kolíky pro vytyčování odběrových míst a odběrových bodů, plastová lopatka (úměrná velikosti nádoby pro homogenizaci vzorku).

Při vzorkování zeminy je nutné dodržet základní pravidla bezpečnosti a ochrany veřejného zdraví (Lepší, 2000).



Obrázek č. 1 - Spotřební materiál a pomocná zařízení při vzorkování

4.3 Postup

Odběr vzorků zeminy na odběrových místech

Na každém odběrovém místě se vzorkovacím zařízením odebere vzorek zeminy v celkové hloubce 10cm (pokud možno po celém profilu). Z povrchové



Obrázek č. 2 - Měření odběrového místa

vrstvy drnu o velikosti 2 až 5 cm se mechanickým vytřepáním oddělí půda (zbylý drn se odstraní) a přidá se k ostatním vzorkům. Z celkového množství se pak odstraní cizorodý materiál (kmeny, úlomky skla, zbylé kořeny atd.) a všechny bodové

vzorky, které tvoří směsný vzorek se zhomogenizují v plastové nádobě odpovídající velikosti manuálním promícháním plastovou lopatkou. Obsah nádoby se pak převede na PE folii, vytvoří se z něho kruh tzv. koláč o síle 1 až 2cm, a ten se pak rozdělí na čtyři kvadranty (viz obrázek č. 4). Dva protilehlé kvadranty se oddělí a zbylé dva kvadranty spojí v jeden. To se opakuje, až docílíme přibližně 1 kg půdy. Tímto způsobem se odeberou vzorky na všech odběrových místech dané lokality. Množství vzorků z jedné lokality je přímo úměrné velikosti dané plochy. Pro analýzy se z takto připraveného vzorku připraví laboratorní vzorek. (Lepší, 2000).



Obrázek č. 3 - Odběr vzorku z povrchové vrstvy

Odběr se provádí sterilním náradím, které se mezi odběry na různých lokalitách dekontaminuje oplachem vodou a následně postřikem nebo oplachem desinfekčním agens. Odběrové zařízení po dekontaminaci při použití pro další odběr nesmí být mokré ani zavlhlé (Lepší, 2000).



Obrázek č. 4 - Rozdělení na 4 kvadranty

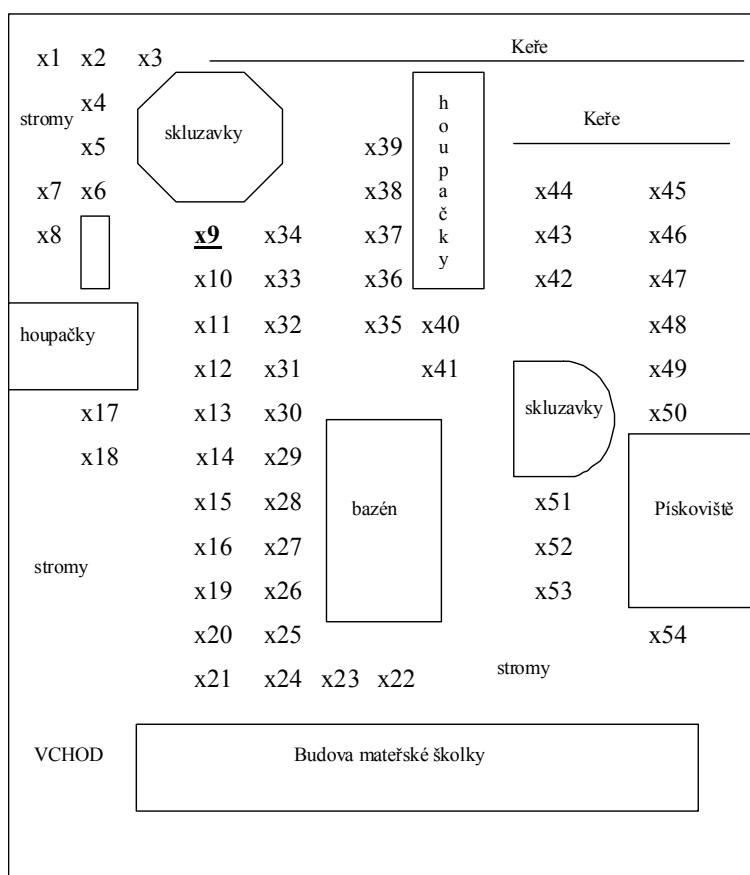
4.4 Plány odběrových míst v jednotlivých mateřských školách

Vzorky byly odebrány dle následujících schémat ve školách v Hradci Králové a v Olomouci. Schémata jsou uvedena v následující kapitole, jako obrázek č. 5 - 17. Fotodokumentace jednotlivých mateřských školek viz příloha č. 1 a 2.

4.4.1 Hradec Králové

Na následujících schématech jsou uvedeny záznamy odběrových míst, kde, byly na jednotlivých plochách odebrány bodové (B) a směsné vzorky (SMV). U vzorků směsného je uvedeno z kolika bodových (dílkých) vzorků se skládá, např. (SMV 1 - 8) znamená, že se tento vzorek skládá z bodových vzorků 1 až 8 (odběrového místa 1 - 8). Z těchto 8 bodových vzorků se postupnou homogenizací a kvartací připravil směsný vzorek, zmenšený na odpovídající hmotnost. Pokud je pod schématem uvedeno např. $4 \times \text{SMV}$ a $2 \times \text{B}$, znamená to, že bylo analyzováno celkem 6 vzorků půdy z jedné mateřské školky, a to 4 směsné a 2 bodové.

Mateřská školka - Průmyslová

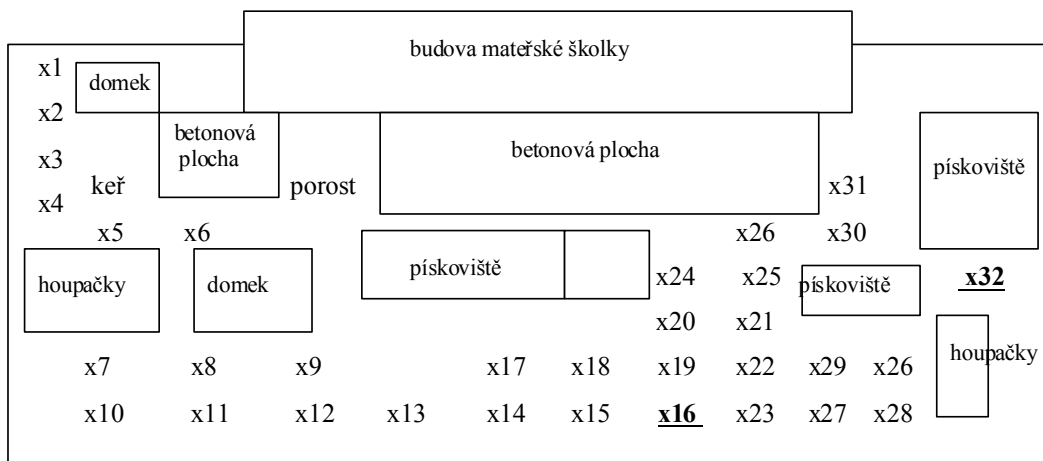


Obrázek č. 5 - Plán odběru vzorků v MŠ Průmyslová

SMV 1-8, SMV 9-18, SMV 19-30, SMV 31- 42, SMV 43- 54, B x9

V mateřské školce Průmyslová bylo celkem odebráno 5 směsných vzorků, které byly získány z 54 odběrových míst a z jednoho vzorku bodového.

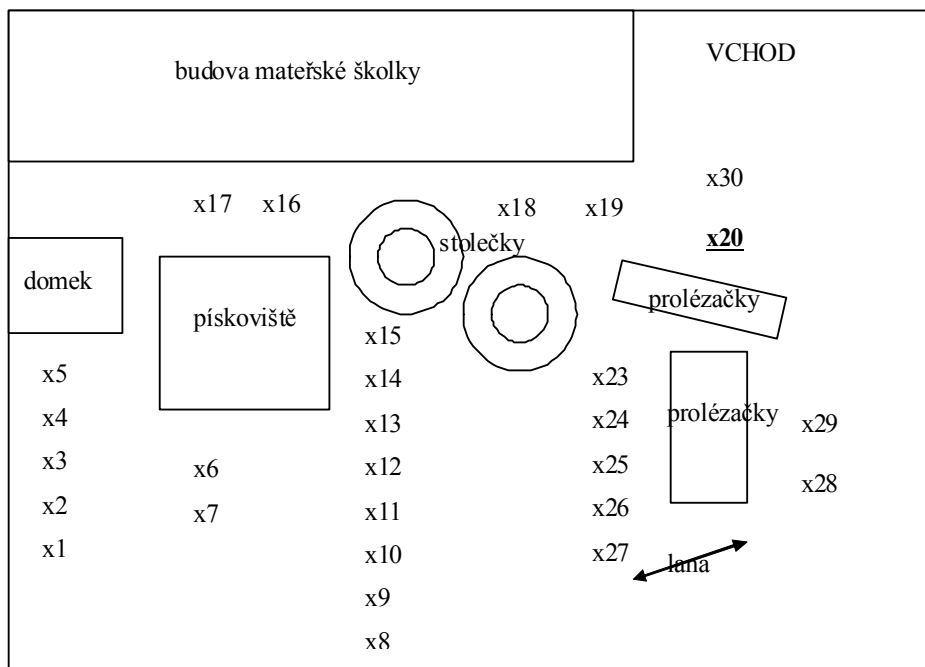
Mateřská školka - Čajkovského



Obrázek č. 6 - Plán odběru vzorků v MŠ Čajkovského

SMV 1-11, SMV 12-22, SMV 23-32, B x16, B x32

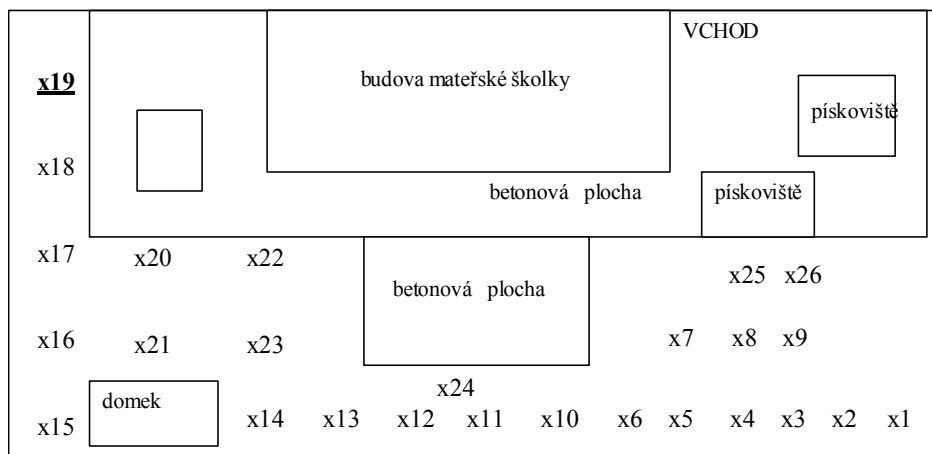
Mateřská školka - Štefcova 1125



Obrázek č. 7 - Plán odběru vzorků v MŠ Štefcova 1125

SMV 1-11, SMV 12-21, SMV 22-30, B x20

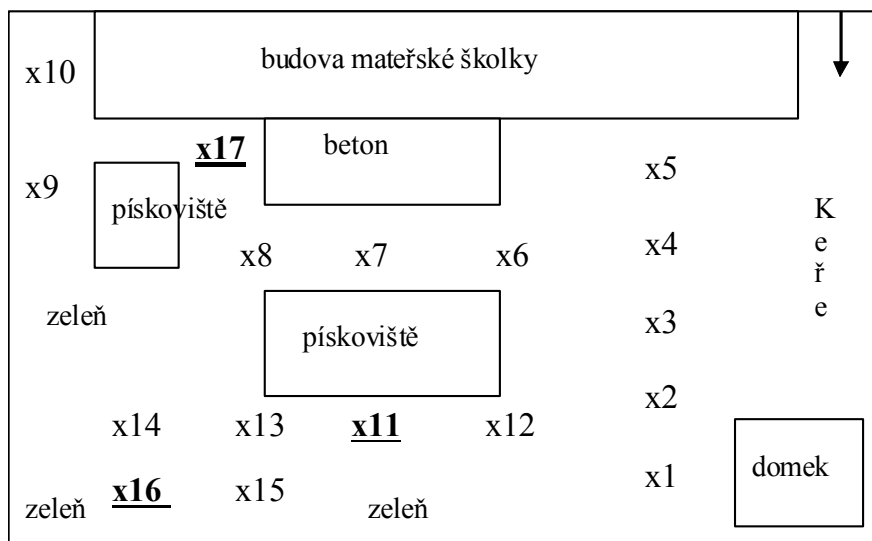
Mateřská školka - Kyjovská 550/38



Obrázek č. 8 - Plán odběru vzorků v MŠ Kyjovská 550/38

SMV 1-14, SMV 15-26, B x19

Mateřská školka - Albertova

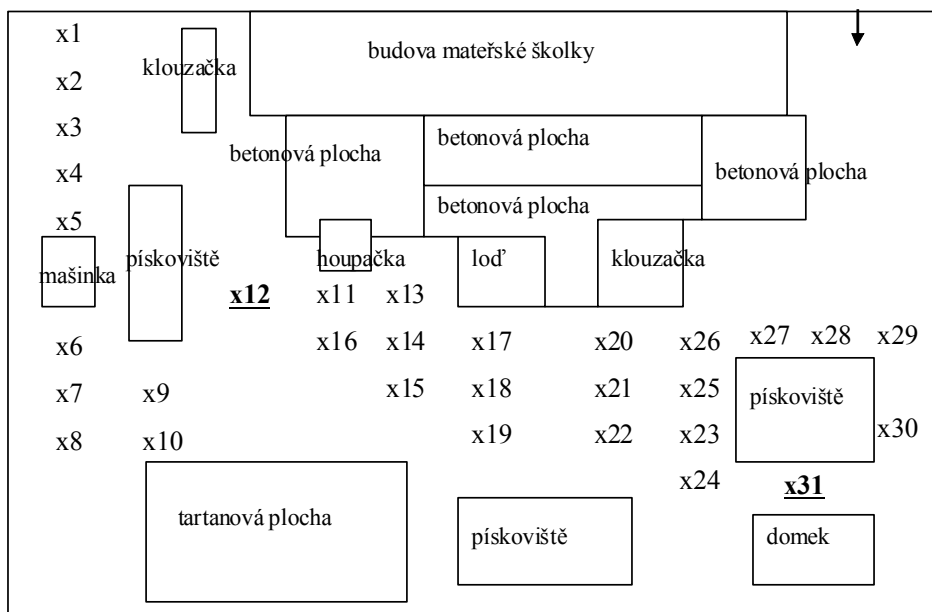


Obrázek č. 9 - Plán odběru vzorků v MŠ Albertova

SMV 1-10, SMV 11- 15, B x11, B x16, B x17

V této školce byl v době odběrů vzorků vyměněný povrch půdy.

Mateřská školka - Kampánova

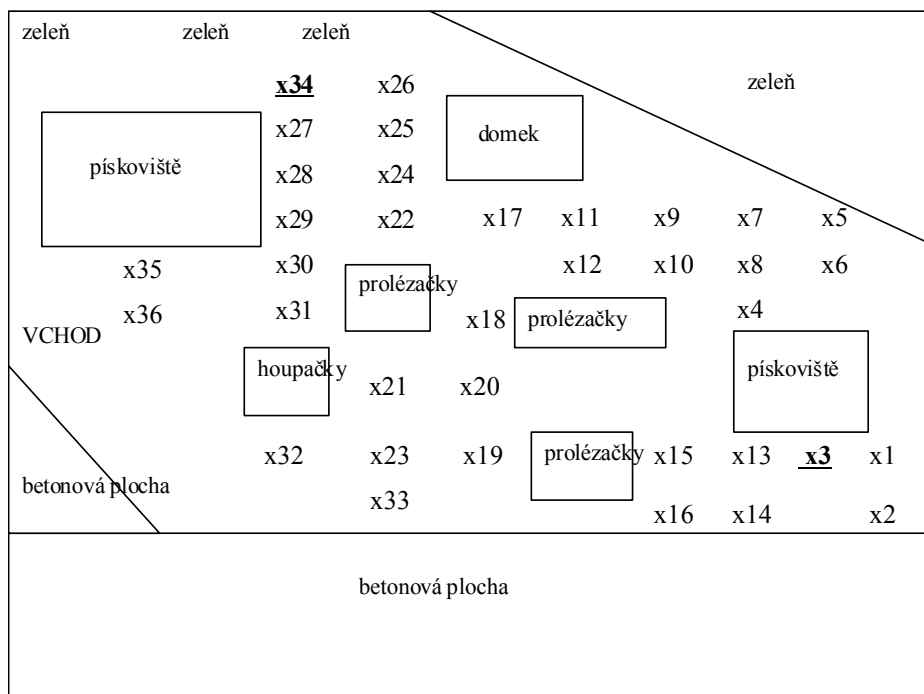


Obrázek č. 10 - Plán odběru vzorků v MŠ Kampánova

SMV 1-11, SMV 12-20, SMV 21-31, B x12, B x31

4.4.2 Olomouc

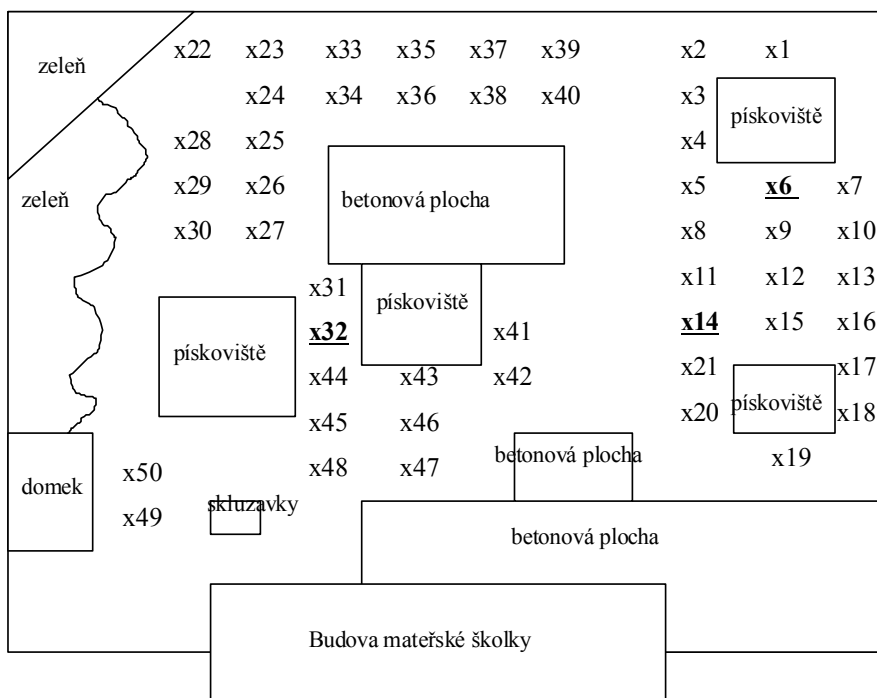
Mateřská školka - Na trati



Obrázek č. 11 - Plán odběru vzorků v MŠ Na trati

SMV 1-10, SMV 11-21, SMV 22-36, B x3, B x34

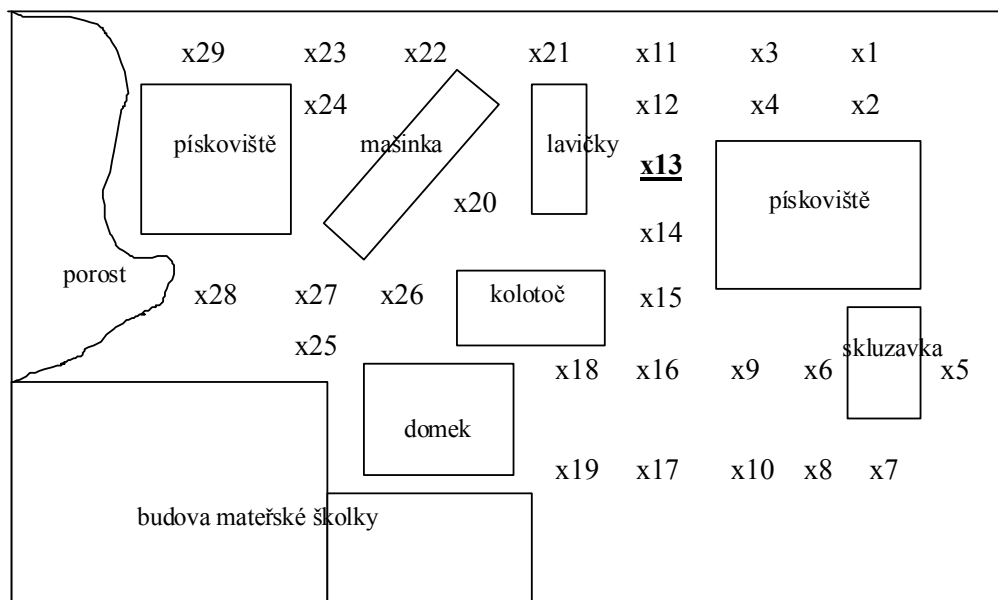
Mateřská školka - Dělnická



Obrázek č. 12 - Plán odběru vzorků v MŠ Dělnická

SMV 1-15, SMV 16-25, SMV 26-36, SMV 37-50, B x6, B x14, B x32

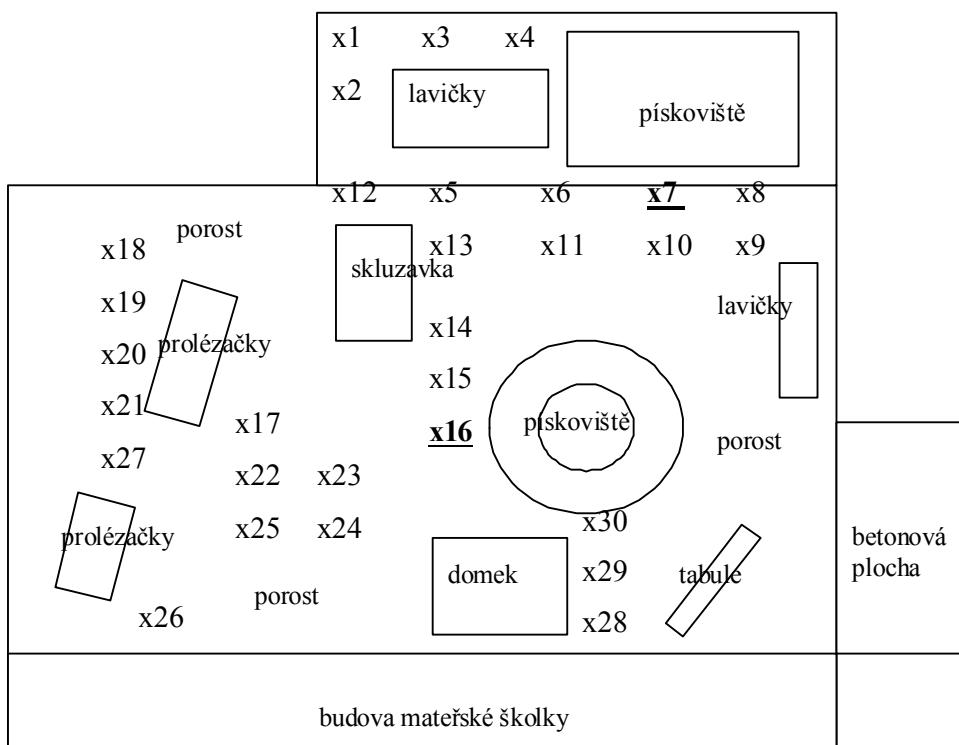
Mateřská školka - Střední Novosadská



Obrázek č. 13 - Plán odběru vzorků v MŠ Střední Novosadská

SMV 1-18, SMV 19-29, B x13

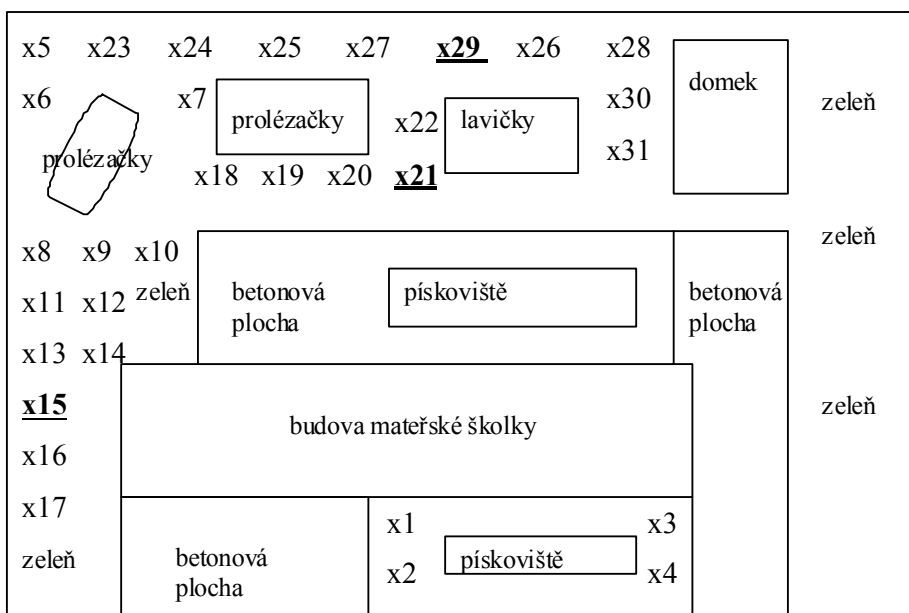
Mateřská školka - Kpt. Nálepky



Obrázek č. 14 - Plán odběru vzorků v MŠ Kpt. Nálepky

SMV 1-15, SMV 16-30, B x7, B x16

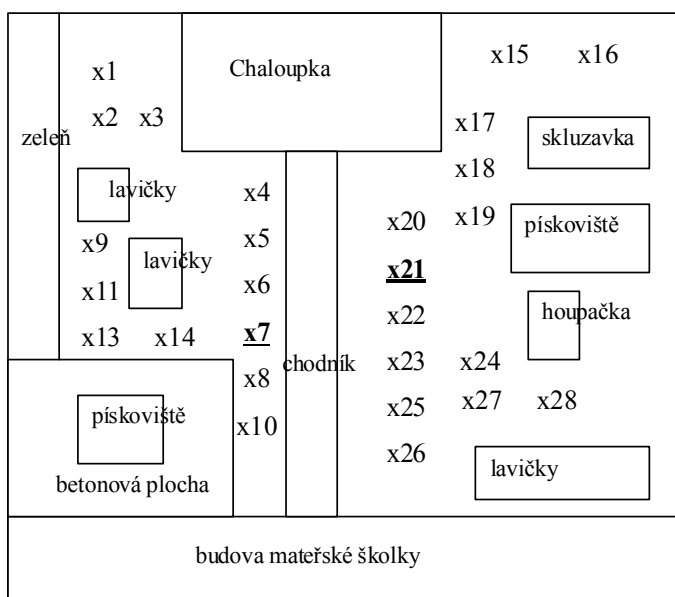
Mateřská školka - Zeyerova



Obrázek č. 15 - Plán odběru vzorků v MŠ Zeyerova

SMV 1-17, SMV 18-31, B x15, B x21, B x29

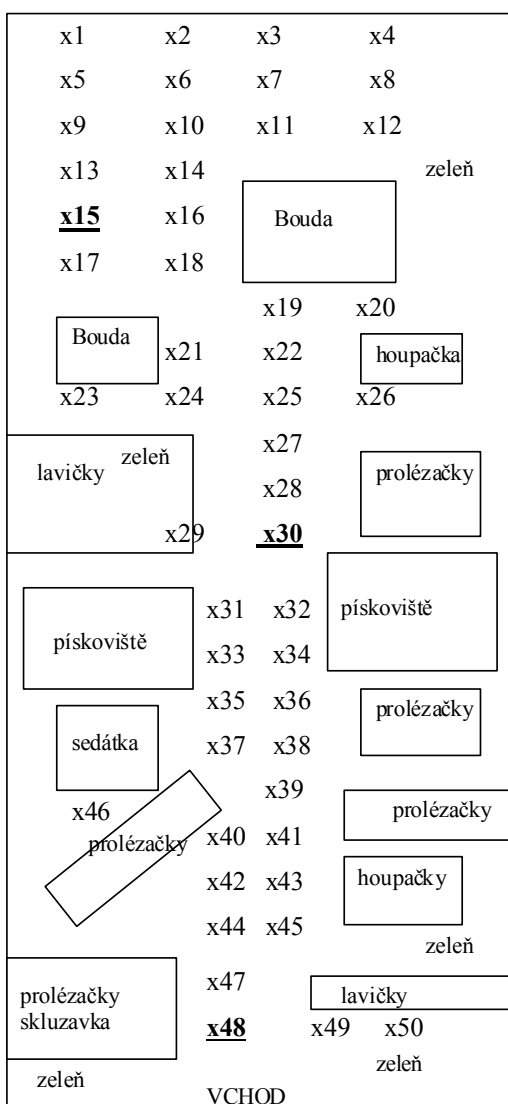
Mateřská školka - Purkyňova 3



SMV 1-14, SMV 15-28, B x7, B x21

Obrázek č. 16 - Plán odběru vzorků v MŠ Purkyňova 3

Mateřská školka - Chválkovická



SMV 1-17, SMV 18-31, SMV 32-41, SMV 42-52, B x15, B x30, B x48

Obrázek č. 17 - Plán odběru vzorků v MŠ Chválkovická

4.5 Metodika stanovení indikátorových organismů

4.5.1 Stanovení termotolerantních koliformních bakterií

Termotolerantní koliformní bakterie jsou gramnegativní tyčinky netvořící spóry z čeledi *Enterobacteriaceae*, které tvoří po 24 hod. kultivace za aerobních podmínek při 44°C charakteristické kolonie na selektivním médiu s laktózou. Mají vždy negativní cytochromoxidázový test.

E. coli patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, gram negativní nespíralující tyčinkovitá bakterie, pozitivní na laktózu a schopna růstu při 44°C. Většina druhů *E. coli* je schopna produkovat indol z tryptofanu a je pozitivní na β - glukuronidázu (AHM, 2008).

Princip:

Stanovení je založeno na zachycení uvedeného mikroorganismu ze zkušného podílu vzorku na povrchu m - FC agaru, kultivací při 44°C 18 - 24 hodin. Jako termotolerantní koliformní bakterie se hodnotí tmavě modré kolonie, jejich počet se vyjádří v KTJ/1g vzorku nebo sušiny vzorku. Jako *E. coli* se hodnotí modré kolonie, které jsou dourčeny konfirmačními testy pro *E. coli*, počet se vyjádří v KTJ/1g vzorku nebo sušiny vzorku (AHM, 2008).

4.5.1.1 Kultivační media, ředící roztoky, činidla, přístroje a pomůcky

Při stanovení termotolerantních koliformních bakterií byly použity následující pomůcky a media:

mFC Agar

Tabulka č. 8 - Složení mFC agaru (SZÚ, 2001)

Složení	
Tryptose nebo bionte	10 g
Proteose pepton č. 3 nebo polypepton	5 g
Kvasničný extrakt	3 g
Chlorid sodný (NaCl)	5 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	12g - 15 g*
Voda	Do 1000 ml

*podle ztužovací schopnosti agaru

Zřed'ovací roztok – fosfátový

Tabulka č. 9 - Složení zřed'ovacího roztoku (SZÚ, 2001)

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

Další použité pomůcky, media atd. – cytochromoxidázový test, komerčně vyráběný



Obrázek č. 18 - Inkubátor schopný udržet teplotu 44°C

test, inkubátor schopný udržet teplotu 44°C, inkubátor schopný udržet teplotu 36°C, pH metr s přesností měření ± 0,1 jednotky pH při 25°C, homogenizátor, síto s velikostí otvorů 2 - 5 mm (AHM, 2008).

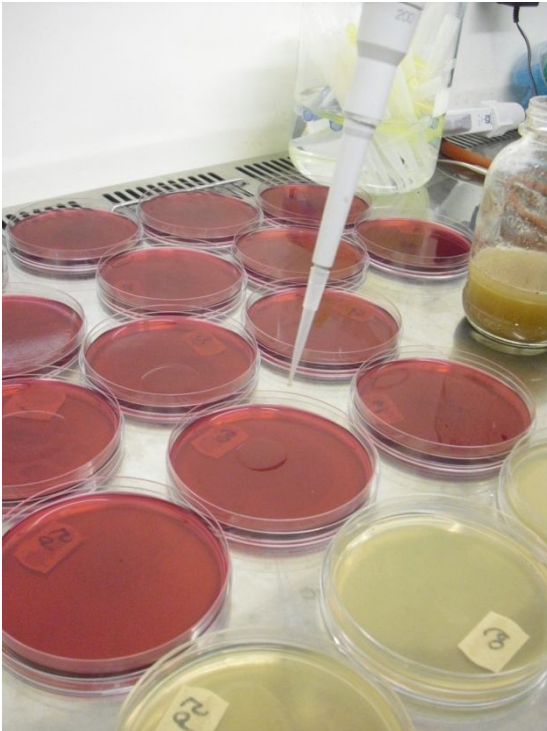
4.5.1.2 Pracovní postup v laboratoři

Vzorky se transportují v chladicí tašce nebo v jiném přepravním boxu, kde je zaručena požadovaná teplota. Vzorky se uchovávají při teplotě $6 \pm 2^\circ\text{C}$ ve skleněných nebo umělohmotných vzorkovnicích, volně zavřených, tak aby byla zajištěna cirkulace vzduchu. Doba skladování vzorku (tj. doba od odběru vzorku po jeho analýze) je 3 měsíce (AHM, 2008).



Obrázek č. 19 - Vzorky půdy před zpracováním

Vzorky mají být zpracovány v závislosti na stabilitě vzorku nejlépe do 48



Obrázek č. 20 - Očkování

homogenizujeme (ve stomacheru po dobu 1 minuty - nutno použít víc homogenizačních vaků vzhledem k možnosti jejich poškození během homogenizace). Necháme 5 minut ustát a pak pipetujeme na Petriho misky s mFC agarem $2 \times 0,2$ ml prvního dekadického ředění. Rozetřeme sterilní tyčinkou a po zaschnutí umístíme dnem vzhůru v termostatu s teplotou $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ na 18 - 24 hodin. Počet ředění se provádí podle matrice, pro stanovení termotolerantních koliformních bakterií bylo použito 10 ředění.

Po skončení inkubace spočítáme laktózu - pozitivní tj. sytě modré kolonie o průměru 0,5 mm nebo větší (AHM, 2008).

hodin po odběru. K dosažení homogenity vzorku je třeba (podle typu matice) jej prosít přes kovové síto o velikosti otvorů 2 - 5 mm podle konzistence matice. Prosévání je nutno provádět ručně ve sterilních rukavicích ve vymezeném prostoru. Síto se po každém vzorku důkladně omyje, usuší a vydesinfikuje lihem. Po oschnutí je možno síto znovu použít (AHM, 2008).

K 10 g upraveného vzorku přidáme 90 ml sterilního zředovacího roztoku (fosfátový roztok) a



Obrázek č. 21 - Fosfátový roztok

4.5.2 Stanovení enterokoků

Fekální streptokoky jsou bakterie, které rostou na kultivačním médiu s azidem sodným. Vykazují pozitivní nárůst typických kolonií na žluč - eskulinovém agaru a negativní reakci katalázového testu.

Enterokoky jsou gram pozitivní koky, nesporující kokovité nebo oválné buňky v párech nebo v krátkých řetězcích.

Stanovení je založeno kultivací fekálních streptokoků na povrchu pevné selektivní půdy obsahující azid sodný (k potlačení rodu G - bakterií) a 2,3,4 - trifényltetrazolium chlorid, který je redukován na červený formazan, způsobující charakteristické zbarvení kolonií fekálních streptokoků. Vyrostlé kolonie jsou dále podrobeny konfirmačním testům.

Jako enterokoky se hodnotí hnědočervené kolonie, které jsou dourčeny konfirmačními testy, počet se vyjádří v KTJ/1 g vzorku nebo sušiny vzorku (AHM, 2008).

4.5.2.1 Kultivační media, ředící roztoky, činidla, přístroje a pomůcky

Při stanovení enterokoků byly použity následující pomůcky, roztoky a média:

Enterokokový agar (SLANETZ – BARTLEY)

Tabulka č. 10 - Složení enterokokového agaru (SZÚ, 2001)

Složení	
Tryptose	20 g
Kvasniční extrakt	5 g
Glukóza	2 g
Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)	4 g
Azid sodný (NaN_3)	0,4 g
Agar	8 g až 18 g*
Voda	do 1000 ml

* závisí na viskozitě agaru

Dále byly použity stejné pomůcky jako u metody stanovení termotolerantních koliformních bakterií.



Obrázek č. 22 - Enterokokový agar (žlutý), TKB (červený)

4.5.2.2 Pracovní postup v laboratoři

Vzorky písku v pískovištích hracích ploch, mají být zpracovány do 48 hodin po odběru. K dosažení homogenity vzorku je třeba (podle typu matice) jej prosít přes kovové síto o velikosti 2 - 5 mm podle konzistence matice (viz pracovní postup termotolerantních koliformních bakterií).

Postup práce je stejný jako při stanovování termotolerantních koliformních bakterií pouze s výjimkou doby inkubace v termostatu. Pro enterokoky se nastavuje teplota v termostatu stejná a to $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ na dobu 44 ± 4 hodiny.

Po inkubaci se spočítají všechny kolonie červené, kaštanové nebo i s růžovým zbarveným středem (AHM, 2008).

4.6 Výpočet

Pro výpočet se použijí misky obsahující 15 až 150 charakteristických kolonií ve dvou po sobě jdoucích koloniích. Je třeba, aby jedna z těchto misek obsahovala alespoň 15 charakteristických kolonií. Výsledek se uvádí přepočtený na KTJ v 1 g sušiny (AHEM, 2008).

$$N = \frac{\sum a}{V \times [n1 + (0,1 \times n2)] \times d}$$

Kde:

$\sum a$ = součet kolonií spočítaných po identifikaci na všech vybraných plotnách

$n1$ = je počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění

$n2$ = je počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění

d = je první pro výpočet použité ředění

N = výsledný počet kolonií v KTJ

V = objem inokula v ml očkovaného na každou plotnu

Jestliže dvě misky očkované výchozí suspenzí obsahují méně než 15 charakteristických kolonií, vyjádří se výsledky takto: < 750. Pokud dvě misky očkované výchozí suspenzí neobsahují žádné charakteristické kolonie, vyjádří se výsledky takto: < 50 (AHEM, 2008).

Výsledky se zaokrouhlí tak, aby obsahoval pouze dvě číslice různé od nuly. A vyjádří se jako číslo 1,0 - 9,9 násobené 10^n , kde n je příslušná mocnina 10 (AHEM, 2008).

4.7 Výsledky

Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a enterokoků bylo provedeno na celkovém počtu 38 směsných vzorků a 28 vzorků bodových. V laboratoři hygieny půdy a odpadů bylo zpracováno celkově 64 vzorků, které byly odebrány z hracích ploch mateřských školek.

Přehled výsledků mikrobiologických rozborů z jednotlivého monitorování mateřských školek je uveden v následujících tabulkách.

Tabulka č. 11 - Přehled odběru vzorků

Město	Místo odběru	Četnost odběru	
		Vzorek směsný	Vzorek dílčí
Hradec Králové	Průmyslová	5	54
Hradec Králové	Čajkovského 1093	3	32
Hradec Králové	Štefcova 1125	3	30
Hradec Králové	Kyjovská 550/38	2	26
Hradec Králové	Albertova	2	15
Hradec Králové	Kampánova	3	31
Olomouc	Na trati	3	36
Olomouc	Dělnická	4	50
Olomouc	Střední Novosadská	2	29
Olomouc	Kpt. Nálepky	2	30
Olomouc	Zeyerova	2	31
Olomouc	Purkyňova 3	2	28
Olomouc	Chválkovická	4	52

Tabulka č. 12 - Výsledky mikrobiologických rozborů v Hradci Králové

Město	Místo odběru	č. vzorku	TKB*	Enterokoky
			(KTJ**/g)	(KTJ**/g)
Hradec Králové	Průmyslová	49	< 50	< 50
		50	< 50	< 50
		51	< 50	< 50
		52	< 50	< 50
		53	< 50	< 50
Hradec Králové	Čajkovského 1093	44	< 50	< 50
		45	< 50	< 50
		46	< 50	< 750
		47	< 50	< 50
		48	< 50	< 50
Hradec Králové	Štefcova 1125	54	< 50	< 50
		55	< 50	< 50
		56	< 50	< 750
		57	< 50	< 50
		58	< 50	< 50
Hradec Králové	Kyjovská 550/38	41	< 50	< 50
		42	< 50	< 50
		43	< 50	< 50
Hradec Králové	Albertova	36	< 50	< 750
		37	< 50	< 750
		38	< 50	< 750
		39	< 50	1,4. 10 ³
		40	< 50	1,2. 10 ³
Hradec Králové	Kampánova	59	< 50	< 50
		60	< 50	< 50
		61	< 50	< 50
		62	< 50	< 50
		63	< 50	< 50
		64	< 50	< 50

* TKB - Termotolerantní koliformní bakterie

** KTJ - Kolonie tvořící jednotku

Tabulka č. 13 - Výsledků mikrobiologických rozborů v Olomouci

Město	Místo odběru	č. vzorku	TKB*	Enterokoky
			(KTJ**/g)	(KTJ**/g)
Olomouc	Na trati	31	< 50	< 50
		32	< 50	< 750
		33	< 50	< 50
		34	< 50	< 50
		35	< 50	< 50
Olomouc	Dělnická	14	< 50	< 50
		15	< 50	< 50
		16	< 50	< 750
		17	< 50	< 50
		18	< 50	< 50
		19	< 50	< 50
Olomouc	Střední Novosadská	28	< 50	< 50
		29	< 50	< 50
		30	< 50	< 50
Olomouc	Kpt. Nálepky	10	< 50	< 50
		11	< 50	< 750
		12	< 50	< 50
Olomouc	Zeyerova	13	< 50	< 50
		1	< 50	< 50
		2	< 50	< 50
		3	< 50	< 50
		4	< 50	< 50
Olomouc	Purkyňova 3	5	< 50	< 50
		6	< 50	< 50
		7	< 50	< 50
		8	< 50	< 50
Olomouc	Chválkovická	9	< 50	< 750
		21	< 50	< 50
		22	< 50	< 50
		23	< 50	< 50
		24	< 50	< 750
		25	< 50	< 50
		26	< 50	< 50
27	< 50	< 50		

* TKB - Termotolerantní koliformní bakterie

** KTJ - Kolonie tvořící jednotku

V následující tabulce č. 14 jsou uvedeny hrací plochy mateřských školek, které byly na základě mikrobiologických rozborů zjištěny jako mikrobiologicky kontaminované (nesplňující hygienické limity stanovené vyhláškou č. 135/2004 Sb.). Tabulka č. 14 kromě výše zmíněných mikrobiologicky kontaminovaných hracích ploch obsahuje i plochy, které splňují hygienické limity venkovních hracích ploch, ale byly při laboratorní expertíze stanoveny jako hraniční (kritické).

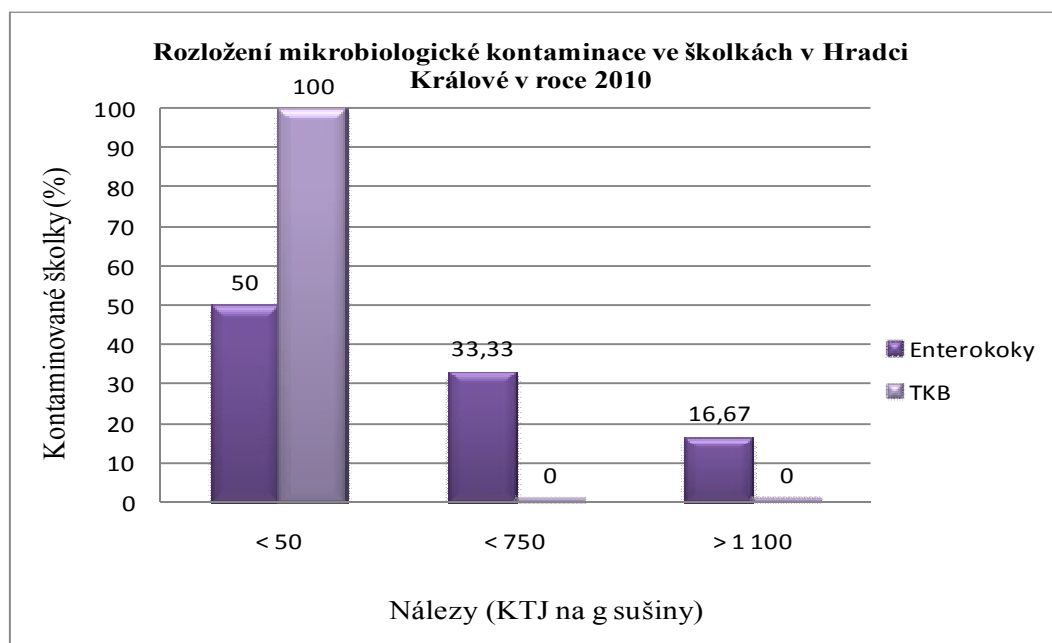
Tabulka č. 14 - Přehled mikrobiologické kontaminace na hracích plochách mateřských škol - bodové a směsné vzorky

Město	Místo odběru	č. vzorku	Směsný	Bodový	TKB*	Enterokoky
					(KTJ**/g)	(KTJ**/g)
Hradec Králové	Čajkovského 1093	46	1 - 11	-	< 50	< 750
Hradec Králové	Štefcova 1125	56	1 - 11	-	< 50	< 750
		36	-	11	< 50	< 750
		37	-	16	< 50	< 750
Hradec Králové	Albertova	38	-	17	< 50	< 750
		39	1 - 10	-	< 50	1,4. 10 ³
		40	11 - 15	-	< 50	1,2. 10 ³
Olomouc	Na trati	32	-	2	< 50	< 750
Olomouc	Dělnická	16	-	32	< 50	< 750
Olomouc	Kpt. Nálepky	11	-	16	< 50	< 750
Olomouc	Purkyňova 3	9	16 - 30	-	< 50	< 750
Olomouc	Chválkovická	24 cm	1 - 17	-	< 50	< 750

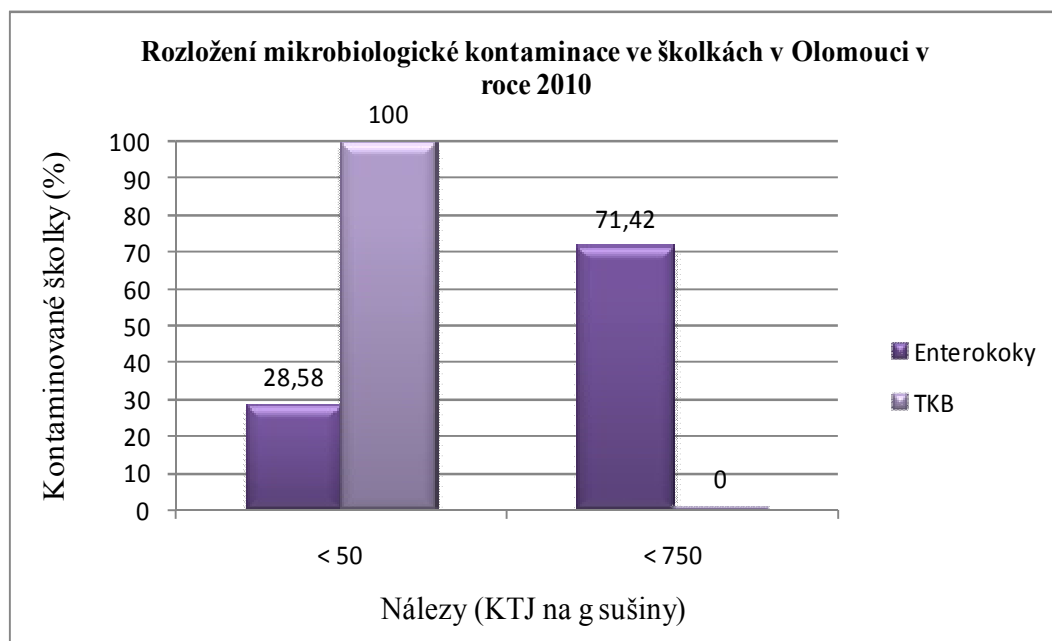
* TKB - Termotolerantní koliformní bakterie

** KTJ - Kolonie tvořící jednotku

Obrázek č. 23 - Graf četnosti rozložení mikrobiologické kontaminace v mateřských školách v Hradci Králové



Obrázek č. 24 - Graf četnosti rozložení mikrobiologické kontaminace v mateřských školách v Olomouci



Státní zdravotní ústav v letech 2000 - 2002 prováděl monitorování vybraných mateřských škol v různých městech České republiky. Pro srovnání s dosavadními výsledky jsou použity údaje z města Olomouc a Hradce Králové. Následující tabulka uvádí monitorování mikrobiologické kontaminace půdy, který SZÚ v tomto období prováděl.

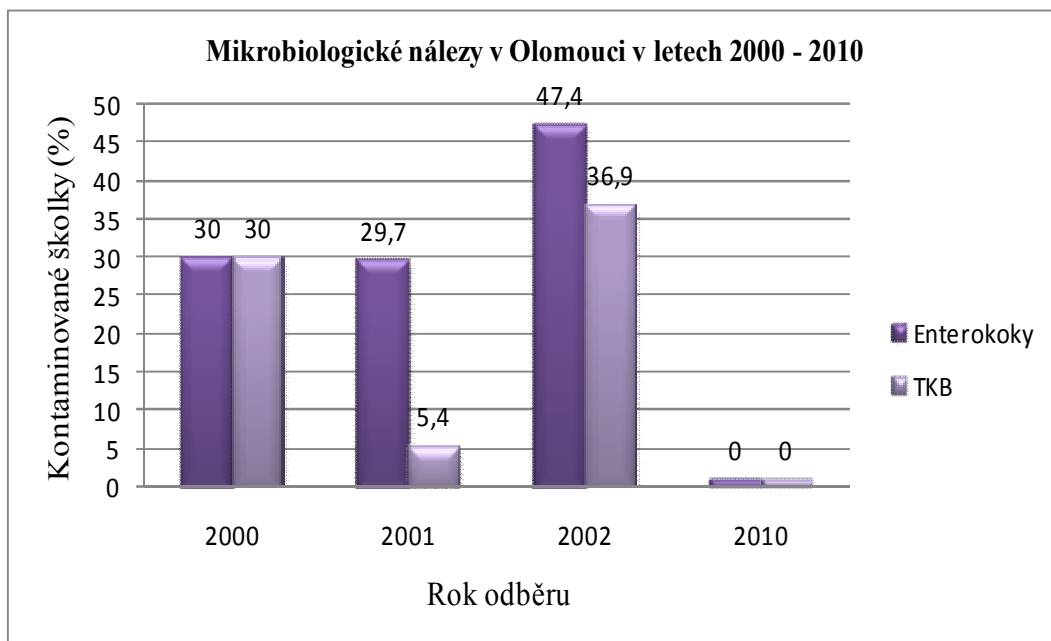
Tabulka č. 15 - Mikrobiologický rozbor v půdách mateřských školek v Olomouci a Hradci Králové v letech 2000 - 2002 (Zimová a kol., 2003).

Rok odběru	Vzorek	Město	Místo odběru	TKB*	Enterokoky
				(KTJ**/g)	(KTJ**/g)
2000	-	Olomouc	Na trati	< 50	< 50
2000	-	Olomouc	Zeyerova	1,3. 10 ²	< 50
2002	01 - směsný	Olomouc	Zeyerova	1,1. 10 ²	1,6. 10 ³
2002	02 - dílčí	Olomouc	Zeyerova	< 50	1,1. 10 ³
2002	03 - dílčí	Olomouc	Zeyerova	< 50	1,6. 10 ³
2002	04 - dílčí	Olomouc	Zeyerova	< 50	1,4. 10 ³
2002	05 - dílčí	Olomouc	Zeyerova	< 50	6,0. 10 ²
2002	-	Olomouc	Zeyerova	1,1. 10 ²	1,6. 10 ³
2001	-	Olomouc	Střední Novosadská	1,2. 10 ²	7,7. 10 ¹
2002	-	Olomouc	Střední Novosadská	< 50	1,7. 10 ⁴
2002	59 - směsný	Olomouc	Střední Novosadská	< 50	1,7. 10 ³
2001	-	Olomouc	Kpt. Nálepky	< 50	< 50
2000	-	Olomouc	Chválkovická	< 50	9,7. 10 ²
2002	-	Olomouc	Chválkovická	< 50	7,1. 10 ²
2002	6 - směsný	Olomouc	Chválkovická	< 50	7,1. 10 ²
2002	7 - dílčí	Olomouc	Chválkovická	< 50	1,7. 10 ²
2002	8 - dílčí	Olomouc	Chválkovická	< 50	2,5. 10 ²
2002	9 - dílčí	Olomouc	Chválkovická	< 50	1,1. 10 ²
2002	10 - dílčí	Olomouc	Chválkovická	< 50	7,0. 10 ²
2000	-	Olomouc	Purkyňova 3	1,2. 10 ²	< 50
2001	-	Olomouc	Purkyňova 3	8,2. 10 ¹	< 50
2002	-	Olomouc	Purkyňova 3	< 50	2,9. 10 ³
2002	-	Olomouc	Purkyňova 3	< 50	2,9. 10 ³
2002	-	Olomouc	Dělnická	< 50	1,3. 10 ²
2002	-	Olomouc	Dělnická	< 50	1,3. 10 ²
2002	-	Hradec Králové	Průmyslová	< 50	1,2. 10 ⁴
2002	-	Hradec Králové	Kyjovská	3,4. 10 ²	2,2. 10 ²
2002	-	Hradec Králové	Kampánova	< 50	< 50
2002	-	Hradec Králové	Albertova	6,5. 10 ³	< 50
2002	-	Hradec Králové	Štefcova	< 50	< 50
2002	-	Hradec Králové	Štefcova	< 50	< 50
2002	-	Hradec Králové	Štefcova	< 50	< 50
2002	-	Hradec Králové	Čajkovského	3,8. 10 ²	8,5. 10 ²

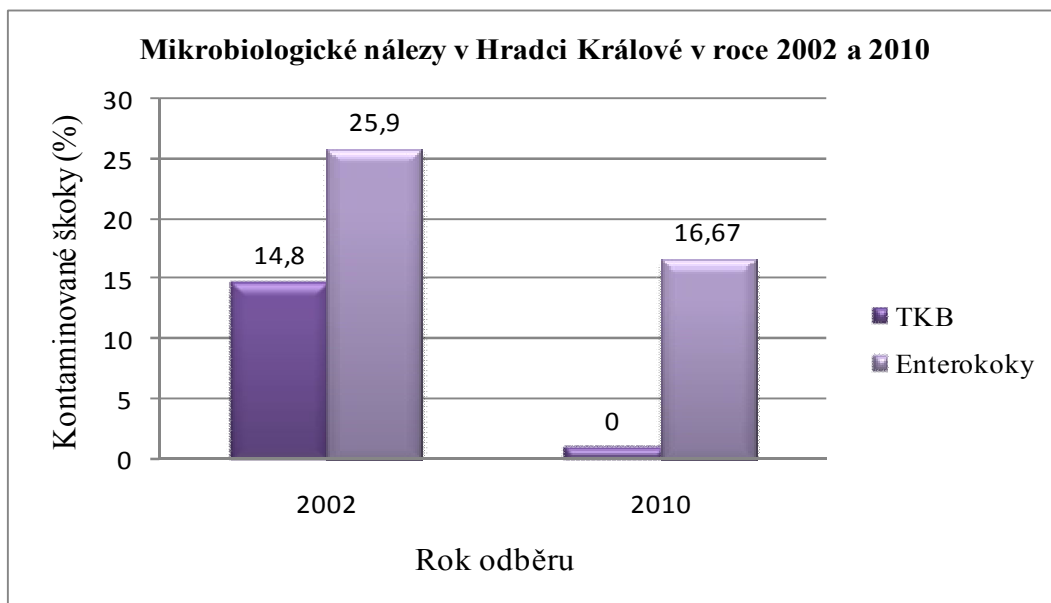
* TKB - Termotolerantní koliformní bakterie

** KTJ - Kolonie tvořící jednotku

Obrázek č. 25 - Graf srovnání výsledků mikrobiologického stanovení za rok 2000 - 2010 v Olomouci (Zimová a kol., 2003)



Obrázek č. 26 - Graf srovnání výsledků mikrobiologického stanovení za rok 2002 a 2010 v Hradci Králové (Zimová a kol., 2003)



Z výsledků monitorování venkovních hracích ploch ve školách v Hradci Králové a Olomouci z roku 2010 lze konstatovat, že mikrobiologická kontaminace koliformními termotolerantními bakteriemi nebyla prokázána na žádné hrací ploše sledovaných školek.

Získané hodnoty výsledků pro hrací plochy školek v obou městech splňují hygienické limity stanovené vyhláškou č. 135/2004 Sb. (viz tabulka č. 5). Enterokoky byly zjištěny na plochách v mateřské školce v Hradci Králové - Albertova a jejich hodnoty nesplňují hygienické limity stanovené vyhláškou. Předpokládaná příčina mikrobiologické kontaminace mateřské školky v Hradci Králové - Albertova, je oprava povrchu na zkoumané ploše (navážka nového substrátu). Obnova povrchu byla provedena zřejmě bez ohledu na kvalitu navezené matice. Jako podklad pro nově navezený substrát byl použit starý, zřejmě kontaminovaný písek, který tvořil do té doby povrch hracích ploch. Na hracích plochách ve školce Albertova byl zjištěn značný výskyt enterokoků ($> 1,2 \cdot 10^3$ KTJ na g sušiny). Nálezy pro enterokoky v Olomouci byly negativní.

5. Diskuse

Monitorování mikrobiologických kontaminantů venkovních hracích ploch je velmi složité. V poslední době se stupňuje neochota zpřístupnit jednotlivé venkovní hrací plochy ve školkách a s tím související neochota spolupráce s jednotlivými pracovníky, kteří se na jednotlivých odběrech podílejí.

Přestože má mnoho států zaveden systém kontrol dětských hřišť, málo států má zavedeny ve svých právních předpisech limitní koncentrace indikátorových organismů, a proto je velmi složité porovnávat výsledky této práce s výsledky publikované v zahraničí. S tím souvisí i nedostatek literatury, ve které by byla tato problematika spolu s riziky mikrobiologické kontaminace a mikrobiologickými indikátory řešena.

V České republice se nejvíce touto problematikou zabýval Státní zdravotní ústav, a proto výsledky této práce byly porovnávány s výsledky Státního zdravotního ústavu z let 2000 - 2002. Od tohoto roku se monitorování v rámci Systému monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí neprovádělo.

Z dříve uvedených důvodů (kapitola č. 4), byly výsledky, které prezentuje tato diplomová práce, porovnávány stejně jako ve studii Státního zdravotního ústavu v Praze s limity ve vyhlášce 135/2004 Sb., kterou se stanoví požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch.

Získané hodnoty pro mikrobiální kontaminace, které byly získány v roce 2010, se značně liší od výsledků, které byly zpracované Státním zdravotním ústavem v Praze v roce 2000 - 2002. V Hradci Králové v roce 2010 nebyla zaznamenána kontaminace termotolerantními koliformními bakteriemi. Nálezy na jednotlivých venkovních hracích plochách mateřských školek vyhověly hodnotě 750 KTJ na g sušiny a vyhověly požadavkům vyhlášky č. 135/2004 Sb.). U 50 % nálezů kontaminace venkovních hracích ploch školek (dále také pouze školek) byly zjištěny negativní nálezy na enterokoky a u 33 % školek nálezy vyhovovaly stanoveným hygienickým normám dané vyhláškou (750 KTJ na g sušiny). 17 % školek bylo pozitivních na enterokoky (viz obrázek č. 23).

Ve sledovaných školkách v Hradci Králové bylo v roce 2002 zjištěno, že limitní hodnota nálezů byla překročena u termotolerantních koliformních bakterií v 15 %

školek a enterokoků v téměř 26 % (viz obrázek č. 26). Z výsledků grafu (viz obrázek č. 26) lze konstatovat, že se mikrobiologická kontaminace snížila u pozitivních nálezů enterokoků z 26 % školek na 17 % v roce 2010 a u termotolerantních koliformních bakterií nebyl v roce 2010 zjištěn žádný pozitivní nález, takže došlo k poklesu četnosti pozitivních nálezů u 15 % školek.

V Olomouci nebyla v roce 2010 zaznamenána kontaminace termotolerantními koliformními bakteriemi u žádné ze sledovaných ploch. U 29 % školek byla kontaminace enterokoky negativní. U 71 % školek nálezy nepřesahovaly stanovené hygienické limity dané vyhláškou č. 135/2004 Sb. (viz obrázek č. 24).

Srovnáme-li výsledky z Olomouce z roku 2000 - 2002 s výsledky z roku 2010, lze konstatovat, že kontaminace enterokoky byla snížena z 47 % školek s pozitivními nálezy až na žádný pozitivní nález. U termotolerantních koliformních bakterií došlo ke snížení pozitivních nálezů u 37 % školek (viz obrázek č. 25).

Zlepšení výsledků pro mikrobiologickou kontaminaci hracích ploch v roce 2010 je zřejmě způsobeno zvýšenou kontrolou personálu školek a dostatečným zabezpečením venkovních hracích ploch před vstupem domácích, ale i divokých zvířat, která tuto mikrobiologickou kontaminaci způsobují svými výkaly. Jedním z dalších důvodů, proč se stav ploch s pozitivní mikrobiologickou kontaminací snížil, je také jejich častá údržba. Velkou roli pro výskyt mikrobiální kontaminace hraje roční období a klimatické podmínky. Nelze proto opomenout také skutečnost, že vzorky z roku 2000 - 2002 byly odebrány v měsíci srpnu a září a odběry prováděné v roce 2010 byly odebrány až v měsíci listopadu, kdy je podstatně nižší venkovní teplota a nedochází k tak velkému pomnožení sledovaných bakterií.

V práci, kromě sledování výskytu aktuální mikrobiální kontaminace, byla také řešena otázka reprezentativnosti odběru vzorku. Byla sledována kontaminace jednak dílčího vzorku, jednak směsného. Mikrobiální kontaminace není v povrchových vrstvách hracích ploch homogenně rozložena jako třeba chemické látky (např. těžké kovy), a proto směsný vzorek nemusí být reprezentativní pro mikrobiologickou kontaminaci. Tímto problémem se zabýval už v roce 1998 ve své studii Carabin (Carabin a kol., 1998). V této studii, která byla zaměřena na srovnání a posouzení různých strategií při vzorkování písku a půdy z dětských hřišť pro stanovení vajíček *Toxocara* spp. a počtů fekálních koliformů bylo zjištěno, že nejreprezentativnější

výsledky byly získány analýzou směsných vzorků odebraných po celém povrchu zařízení. Výsledky z analýz bodových vzorků nebo vzorků odebraných na základě rozhodovací analýzy byly méně reprezentativní. Z výsledků v tabulce č. 14 lze konstatovat, že i v našem případě byly zjištěny pozitivní nálezy u vzorků směsných a výsledky jsou v souladu s výsledku studie Státního zdravotního ústavu (viz tabulka č. 15) i studie provedené Carabinem a kol.

6. Závěr

V roce 2010 byly provedeny rozbory mikrobiologické kontaminace půd městských aglomerací (venkovních hracích ploch) v 6 mateřských školách v Hradci Králové a 7 mateřských školách v Olomouci. Celkem bylo monitorováno 13 mateřských školek s cílem stanovit výsledky a porovnat je s mikrobiologickou kontaminací získanou v roce 2002 prováděným Státním zdravotním ústavem v Praze.

Sledována byla přítomnost termotolerantních koliformních bakterií a enterokoků. Sledování bakterií rodu *Salmonella* spp., které předepisuje vyhláška č. 135/2004 Sb., kterou se stanoví požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch bylo vypuštěno, protože již při monitorování v roce 2002 nebyl zjištěn žádný pozitivní nález.

Ze zjištěných výsledků lze konstatovat, že mikrobiologická kontaminace se snížila na přípustnou limitní hodnotu stanovenou vyhláškou č. 135/2004 Sb. Přetrvávající mikrobiologická kontaminace byla potvrzena pouze u jedné hrací plochy pouze v jedné mateřské školce v Hradci Králové - Albertova. V roce 2002 byla na této hrací ploše zjištěna mikrobiologická kontaminace termotolerantními koliformními bakteriemi (TKB) - $6,5 \cdot 10^3$ KTJ na g sušiny. Během 8 let se mikrobiologická kontaminace TKB snížila na stanovené hygienické limity dané vyhláškou. Monitorování v roce 2010 ale prokázalo, že mikrobiologická kontaminace stále přetrvává, a to pro nálezy enterokoků v rozsahu $> 1,2 \cdot 10^3$ KTJ na g sušiny.

Z výsledků zjištěných v této práci lze konstatovat, že se kontaminace mění a přestože výsledky vykazují značný posun k negativním nálezům, je třeba tento trend potvrdit dalším monitorováním. Monitorování by mělo být provedeno v několika termínech v různých ročních obdobích a za různého počasí. Další výzkum by také měl být zaměřen na vliv kontaminace hracích ploch na zdraví dětské populace.

7. Seznam použité literatury

AHEM, 2008: Metodický návod pro stanovení indikátorových organismů v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalech z čistíren odpadních vod, digestátech, substrátech, kompostech, pomocných růstových prostředcích a podobných maticích 1/2008. Státní zdravotní ústav v Praze, Praha, 53 s.

AMLINGER F. a PEYR S., 2003: Umweltrelevanz der dezentralen Kompostierung, klimarelevante Gasemissionen, flüssige Emissionen, Massenbilanz, Hygienisierungsleistung. Endbericht, Institut für Land - Umwelt und Energietechnik (ILUET), Universität für Bodenkultur, Wien, 150 s.

BLOEM J. a BREURE M. A., 2007: Chapter 8 Microbial Indicators. In: Markert B. A., Breure A. M. a Zechmeister H. G. [eds]: Trace metals and other contaminants in the environment. Bioindicators and Biomonitoring - Principles, Elsevier, 259 - 282. ISBN 9780080441771.

CARABIN, H., GYORKOS, T.W., KOKOSKIN, E., PAYMENT, P., JOSEPH, L., SOTO, J., 1998: Comparison of methods of sampling for *Toxocara* species and fecal coliforms in an outdoor day care environment. *Can.J.Infect.Diseases* 9: 149 - 156.

COLLERAN E., 2008: Hygienic and sanitation requirements in biogas plants treating animal manures or mixtures of manures and other organic wastes. National University of Ireland, Galway, 11 s.

DUBEY L. P., 2007: The history and life cycle of *Toxoplasma gondii*. In: Weiss L. M. a Kim K. [eds]: *Toxoplasma Gondii*. Academic Press, London, 1 - 17. ISBN 978-0-12-369542-0.

DUPAL L., 2010: Analysis on operation rules on child playgrounds in Norway discussion paper for the meeting in Prague. Standards Norway, 4 s.

EDBERG C. S. a ALLEN J. M., 2004: Virulence and risk from drinking water of heterotrophic plate count bacteria in human population groups. *International Journal of food microbiology*: 255 - 263.

HAUPTMAN I., KUBAL Z., POŠMOURNÝ K. [eds], 2009: Půda v České republice, Consult, Praha, 255 s. ISBN 80-903482-4-6.

HOLOUBEK I., HOLOUBKOVÁ I., KOHOUTEK J., 2001: Národní implementační plán Stockholmské úmluvy v České Republice. Příloha č. 11 - Persistentní organické pulutanty POPs., Ministerstvo životního prostředí, Brno, 11 s.

HOUŽVIČKOVÁ Z., ZÍKOVÁ R., BENEŠOVÁ V., VÍT M., 2006: Provozování bezpečných hřišť. Pracovní materiál. Ministerstvo životního prostředí a Státní zdravotní ústav, Sportservis Zanap, Praha, 50 s.

HUBÁLEK Z. a RUDOLF I., 2007: Mikrobiální zoonózy a sapronózy. Přírodovědecká fakulta Masarykovi univerzity, Brno, 153 s.

JUDLOVÁ O., 2001: Výskyt vajíček psí a kočičí škrkavky na území našeho města. Měsíčník Slánská radnice, Slaný, 13 s.

LAHIRI A., LAHIRI A., IYER N., CHAKRAVARTTY D., 2010: Visiting the cell biology of Salmonella infection. *Microbes and Infection* 11: 809 - 818.

LEPŠÍ P., 2000: Metodický postup pro odběr vzorků povrchové půdy pro studium aerobních mikrobiologických procesů a pro fyzikálně chemické rozborů. Státní zdravotní ústav v Praze, Praha, 5 s.

MATĚJŮ L. a ŠTĚPÁNKOVÁ M., 2008: Rešerše současného stavu poznání a strategií pro určování indikátorových organismů v oblasti sledování účinnosti hygienizace technologií zpracovávajících BRO s předpokládanou přítomností infekčních biologických činitelů. Příloha č. 1 projektu SP2f1/32/07 - Výběr a metody stanovení indikátorových organismů pro hodnocení vlivů na zdraví a životní prostředí při nakládání s biologicky rozložitelnými odpady. Státní zdravotní ústav, Praha, 49 s.

MATĚJŮ L., 2004: Mikrobiologické parametry čistírenských kalů a písku z pískovišť dětských hracích ploch. Pracovní materiál. Státní zdravotní ústav, Praha, 7 s.

MIKULECKÝ M., 1993: Toxokaróza. Utajená hrozba? Asklepios, Bratislava, 90 s. ISBN 80-7161-007-3.

MIMS C. A., NASH A., STEPHEN J., 2001: Attachment to and Entry of Microorganisms into the Body. *Mims' Pathogenesis of Infectious Disease (Fifth Edition)*. Academic Press, London, 10 - 66 s. ISBN 978-0-12-498264-2.

MIZGAJSKA H., 1997: The role of some environmental factors in the contamination of soil with *Toxocara* spp. and other geohelminth eggs. *Parasitology International* 1: 67 - 72.

MURRAY W. J., 2002: Human infections caused by the Raccoon roundworm, *Baylisascaris procyonis*. *Clinical Microbiology Newsletter* 1: 1 - 7.

ROSYPAL S., 1981: *Obecná bakteriologie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 852 s. ISBN 14-549-81.

ROZSYPAL H., 2002: *Infekční nemoci pro diplomované sestry pro intenzivní péči*. Střední zdravotnická a vyšší zdravotnická škola v Praze 4, Praha, 17 s.

ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ J., 2008: *Mikrobiologie v technologii vod*. 2. vydání. Vydavatelství VŠCHT Praha, 252 s. ISBN 978-80-7080-676-0.

SELLERING E., 2007: *Hygienegrundsätze in Kindertageseinrichtungen*. Ministerium für Soziales und Gesundheit, Schwerin, 128 s.

SKLENIČKA P., 2003: *Základy krajinného plánování*. 2. vydání. Nakladatelství Naděžda Skleničková Praha, Praha, 321 s. ISBN 80-903206-1-9.

STANEK E. a CALABRESE E., 1995: Daily estimates of soil ingestion in children. *School of Public Health - University of Massachusetts, Environmental health perspectives*: 276 - 285.

SZÚ, 2001: *Acta hygienica, epidemiologica at microbiologica*. Státní zdravotní ústav v Praze, Praha, 57 s.

SZÚ, 2005: *Alimentární onemocnění - infekce a otravy z potravin*. Státní zdravotní ústav v Brně, Brno, 38 s.

SZÚ, 2000: *Manuál prevence v lékařské praxi, VIII. Základy hodnocení zdravotních rizik*, Státní zdravotní ústav v Praze, 160 s.

SZÚ, 2007: *Metodické doporučení k zajištění ochrany zdraví a zvýšení bezpečnosti dětí a mládeže na dětských a poštovních hřištích i v tělocvičnách*. Státní zdravotní ústav v Praze, 9 s.

ŠILHÁNKOVÁ L., 1983: *Mikrobiologie*. 2. vydání. Nakladatelství technické literatury n. p., Praha, 162 s.

ŠKARDOVÁ J. a HORSKÁ H., 2000: Hodnocení kvality písku na pískovištích mateřských škol v Plzni z hlediska mikrobiálního a parazitárního znečištění. Městská hygienická stanice v Plzni, 6 s.

TORTORELLO L. M., 2003: Microbiological methods-indicator organisms for safety and quality-uses and methods for detection: minireview. Journal of AOAC international 6: 1208 - 1217 s.

VACEK V., 2002: Alimentární infekce. 1. vydání. Galén, Praha, 163 s. ISBN 80-7262-166-1.

WASSERBAUER S., 2009: Prevence infekčních nemocí. Zdravotní ústav se sídlem v Jihlavě, 25 s.

WHO, 2000: Contaminated soil in cities. Children playing outside. World Health Organization, 16 s.

ZAZVONIL Z., 2007: Odhad hodnoty pozemků. 1. vydání. Nakladatelství Oeconomica, Praha, 201 s. ISBN 978-80-245-1211-2.

ZIMOVÁ M., LEPŠÍ P., MATĚJŮ L., PUKLOVÁ V., MELICHERČÍK J., KULHÁNEK A., JEŽOVÁ M., 2002: Systém monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí. Zdravotní rizika kontaminace půdy městských aglomerací. Odborná zpráva za rok 2002. Státní zdravotní ústav v Praze, 19 s.

ZIMOVÁ M., MELICHERČÍK J., BÍBROVÁ Z., PODOLSKÁ Z., VEDRALOVÁ E., JEŽOVÁ M., 2006: Systém monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí. Zdravotní rizika kontaminace půdy městských aglomerací. Odborná zpráva za rok 2005. Státní zdravotní ústav v Praze, 13 s.

POUŽITÁ LEGISLATIVA:

ČSN EN 1177, povrch hřiště tlumící náraz - bezpečnostní požadavky a zkušební metody. Česká technická norma.

VYHLÁŠKA, 2001a: Arrêté royal du 28 mars 2001 relatif à l'exploitation des aires de jeux.

VYHLÁŠKA, 2001b: Arrêté royal du 28 mars 2001 relatif à l'exploitation des aires de jeux.

VYHLÁŠKA č. 135/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch.

ZÁKON č. 57/2000 Sb., zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen.

ZÁKON č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

ANONYM, 1999: Salmonelózy. Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně, Brno, online: <http://www.med.muni.cz/salmonel/salmvysv.htm>, cit. 20. 2. 2011.

HARTWELL A., 2001: Summary Report for the ATSDR Soil-Pica Workshop. Agency for toxic substances and disease registry, Georgia, online: <http://www.atsdr.cdc.gov/NEWS/soilpica.html>, cit. 9. 1. 2011.

KHS V LIBERCI, 2009: Odbor hygieny dětí a mladistvých – venkovní hrací plochy. Krajská hygienická stanice Libereckého kraje, online: <http://khslibc.cz/odbory/hdd/VHP09.pdf>, cit. 16. 1. 2011.

LF UK, 2003: Patogenita. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, online: <http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/mikrobiologie/teozak/pato/patogenita.htm>, cit. 15. 1. 2011.

MZ, 2004: Pokyn hlavního hygienika České republiky k zajištění jednotného postupu při kontrolách pískovišť venkovních hracích ploch, včetně příslušných příloh a metodik, online: <http://www.sotkvo.cz/news/metodicky-pokyn-mz-35023-2004-hem-ke-kontrola-piskovist-priloha/>, cit. 10. 4. 2011.

MŽP, 2008: Definice půdy. Ministerstvo životního prostředí, online: http://www.mzp.cz/cz/definice_pudy, cit. 2. 1. 2011.

SCHMID-HEMPEL P. a FRANK S., 2007: Pathogenesis, virulence and infective dose. PloS Pathogens, Germany, online: <http://stevefrank.org/reprints-pdf/07PLoSPath.pdf>, cit. 14. 2. 2011.

SM OLOMOUC, 2002: Hodnocení kontaminace půdy ve vybraných městských školkách. Statutární město Olomouc, online: <http://www.olomouc.eu>, cit. 3. 1. 2011.

SOVOVÁ E., 2006: Venkovní hrací plochy. Krajská hygienická stanice kraje Vysočina, online: <http://www.khsjih.cz/index.php?id=115>, cit. 17. 3. 2011.

VŠCHT, 2010: Mikrobiologické zkoumání potravin. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, online: <http://biomikro.vscht.cz>, cit. 5. 1. 2011.

WOŹNICZKA A., 2010: Bezpieczne piaskownice dla dzieci. Higiena Dzieci i Młodzieży. Wojewódzka stacja sanitarno epidemiologiczna, online: <http://www.wsse.gorzow.pl/?mod=news&act=detail&cID=310&nID=2362>, cit. 21. 2. 2011.

ZIMOVÁ M., 1998: Děti jsou ohroženy nejen mikroby, ale i těžkými kovy. iDnes, online: http://ekonomika.idnes.cz/deti-jsou-ohrozeny-nejen-mikroby-ale-i-tezkymi-kovy-fyc-/test.aspx?c=981013_212408_test_rom, cit. 19. 12. 2010.

8. Seznam obrázků

Obrázek č. 1 - Spotřební materiál a pomocná zařízení při vzorkování	38
Obrázek č. 2 - Měření odběrového místa.....	39
Obrázek č. 3 - Odběr vzorku z povrchové vrstvy.....	39
Obrázek č. 4 - Rozdělení na 4 kvadranty.....	40
Obrázek č. 5 - Plán odběru vzorků v MŠ Průmyslová	41
Obrázek č. 6 - Plán odběru vzorků v MŠ Čajkovského.....	42
Obrázek č. 7 - Plán odběru vzorků v MŠ Štefcova 1125.....	42
Obrázek č. 8 - Plán odběru vzorků v MŠ Kyjovská 550/38	43
Obrázek č. 9 - Plán odběru vzorků v MŠ Albertova	43
Obrázek č. 10 - Plán odběru vzorků v MŠ Kampánova	44
Obrázek č. 11 - Plán odběru vzorků v MŠ Na trati	44
Obrázek č. 12 - Plán odběru vzorků v MŠ Dělnická.....	45
Obrázek č. 13 - Plán odběru vzorků v MŠ Střední Novosadská.....	45
Obrázek č. 14 - Plán odběru vzorků v MŠ Kpt. Nálepky	46
Obrázek č. 15 - Plán odběru vzorků v MŠ Zeyerova	46
Obrázek č. 16 - Plán odběru vzorků v MŠ Purkyňova 3	47
Obrázek č. 17 - Plán odběru vzorků v MŠ Chválkovická	47
Obrázek č. 18 - Inkubátor schopný udržet teplotu 44°C	49
Obrázek č. 19 - Vzorky půdy před zpracováním	49
Obrázek č. 20 - Očkování	50
Obrázek č. 21 - Fosfátový roztok.....	50
Obrázek č. 22 - Enterokokový agar (žlutý), TKB (červený)	52
Obrázek č. 23 - Graf četnost rozložení mikrobiologické kontaminace v mateřských školách v Hradci Králové.....	58
Obrázek č. 24 - Graf četnosti rozložení mikrobiologické kontaminace v mateřských školách v Olomouci	58
Obrázek č. 25 - Graf srovnání výsledků mikrobiologického stanovení za rok 2000 - 2010 v Olomouci (Zimová a kol., 2003).....	60
Obrázek č. 26 - Graf srovnání výsledků mikrobiologického stanovení za rok 2002 a 2010 v Hradci Králové.....	60

9. Seznam tabulek

Tabulka č. 1 - Přehled onemocnění způsobených mikrobiologickou kontaminací ploch.....	16
Tabulka č. 2 - Infekční dávky patogenů (Vacek, 2002)	28
Tabulka č. 3 - Odhad dávky, kterou děti požijí (Stanek a Calabrese, 1995)	29
Tabulka č. 4 - Příпустné koncentrace pro vybrané chemické prvky v písku - Německo (Sellering, 2007)	30
Tabulka č. 5 - Hygienické limity mikrobiologického a parazitologického znečištění písku v pískovištích na venkovních hracích plochách (Vyhláška č.135/2004 Sb.)...34	
Tabulka č. 6 - Hygienické limity vybraných chemických prvků (Vyhláška č.135/2004 Sb.).....	35
Tabulka č. 7 - Hygienické limity vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) a benzenu (Vyhláška č.135/2004 Sb.).....	35
Tabulka č. 8 - Složení mFC agarů (SZÚ, 2001).....	48
Tabulka č. 9 - Složení zředovacího roztoku (SZÚ, 2001).....	49
Tabulka č. 10 - Složení enterokokového agarů (SZÚ, 2001).....	51
Tabulka č. 11 - Přehled odběru vzorků.....	54
Tabulka č. 12 - Výsledky mikrobiologických rozborů v Hradci Králové	55
Tabulka č. 13 - Výsledků mikrobiologických rozborů v Olomouci.....	56
Tabulka č. 14 - Přehled mikrobiologické kontaminace na hracích plochách mateřských škol - bodové a směsné vzorky	57
Tabulka č. 15 - Mikrobiologický rozbor v půdách mateřských školek v Olomouci a Hradci Králové v letech 2000 - 2002 (Zimová a kol., 2003).	59

10. Příloha

10.1 Příloha č. 1: Fotodokumentace mateřských školek v Hradci Králové

Mateřská školka Albertova



Mateřská školka Čajkovského 1093





Mateřská školka Kampánova



Mateřská školka Kyjovská 550/38



Mateřská školka Průmyslová



Mateřská školka Štefcova 1125



10.2 Příloha č. 2: Fotodokumentace mateřských školek v Olomouci

Mateřská školka Chválkovická





Mateřská školka Kpt. Nálepky



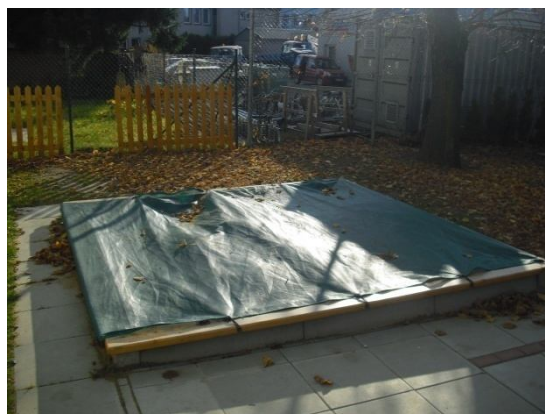
Mateřská školka Na trati



Mateřská školka Střední Novosadská



Mateřská školka Purkyňova 3





Mateřská školka Zeyerova

