

# Metody mikrobiologického rozboru vody

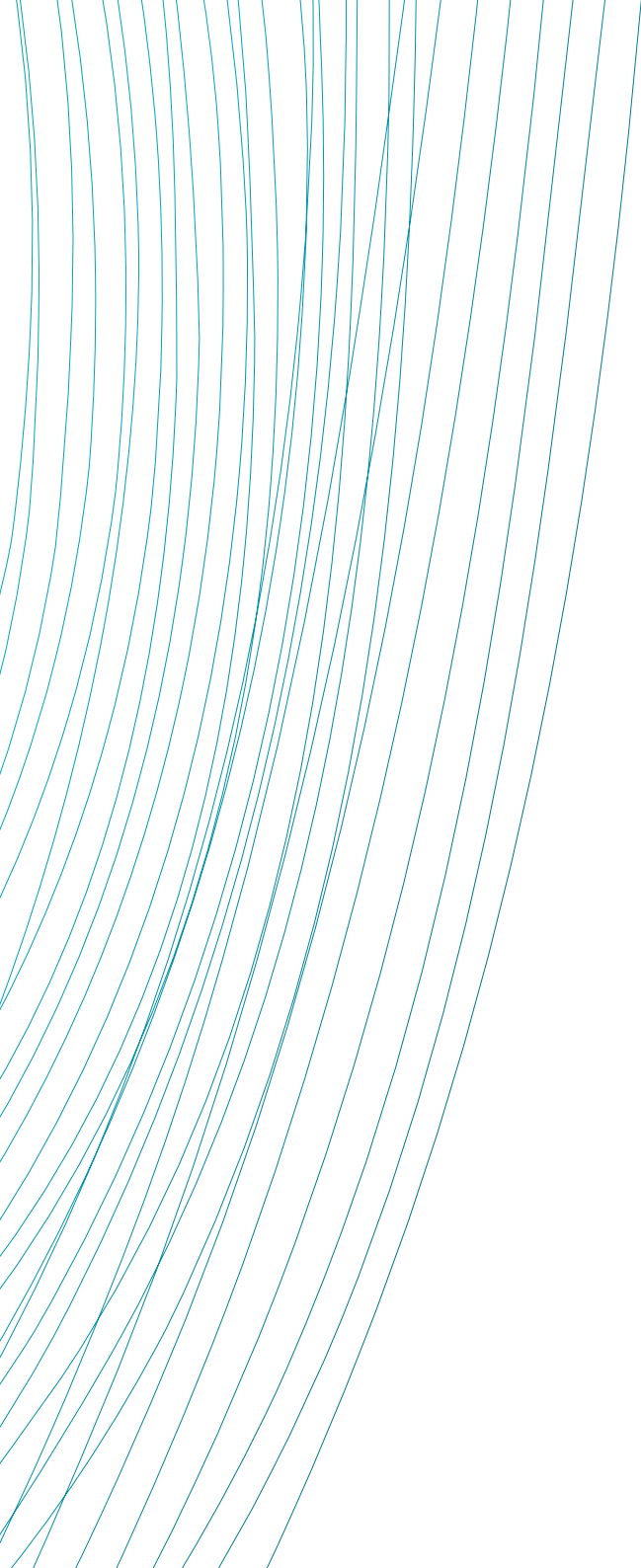
(příručka pro hydroanalytické laboratoře)

RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.





VUV  
TGM



**METODY MIKROBIOLOGICKÉHO  
ROZBORU VODY**  
(PŘÍRUČKA PRO HYDROANALYTICKÉ LABORATOŘE)

**RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.**

VYDAL VÝZKUMNÝ ÚSTAV VODOHOSPODÁŘSKÝ  
T. G. MASARYKA, V. V. I., PRAHA 2017

Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka,  
veřejná výzkumná instituce

## Vědecká redakce:

Ing. Petr Bouška, Ph.D., doc. Ing. Martin Hanel, Ph.D.,  
prof. RNDr. Bohumír Janský, CSc., prof. Ing. Radka Kodešová, CSc., (předsedkyně),  
RNDr. Petr Kubala, Ing. Tomáš Mičaník, Ph.D., Ing. Michael Trnka, CSc.,  
Mgr. Zdeněk Venera, Ph.D., Dr. rer. nat. Slavomír Vosika

## Lektorovali:

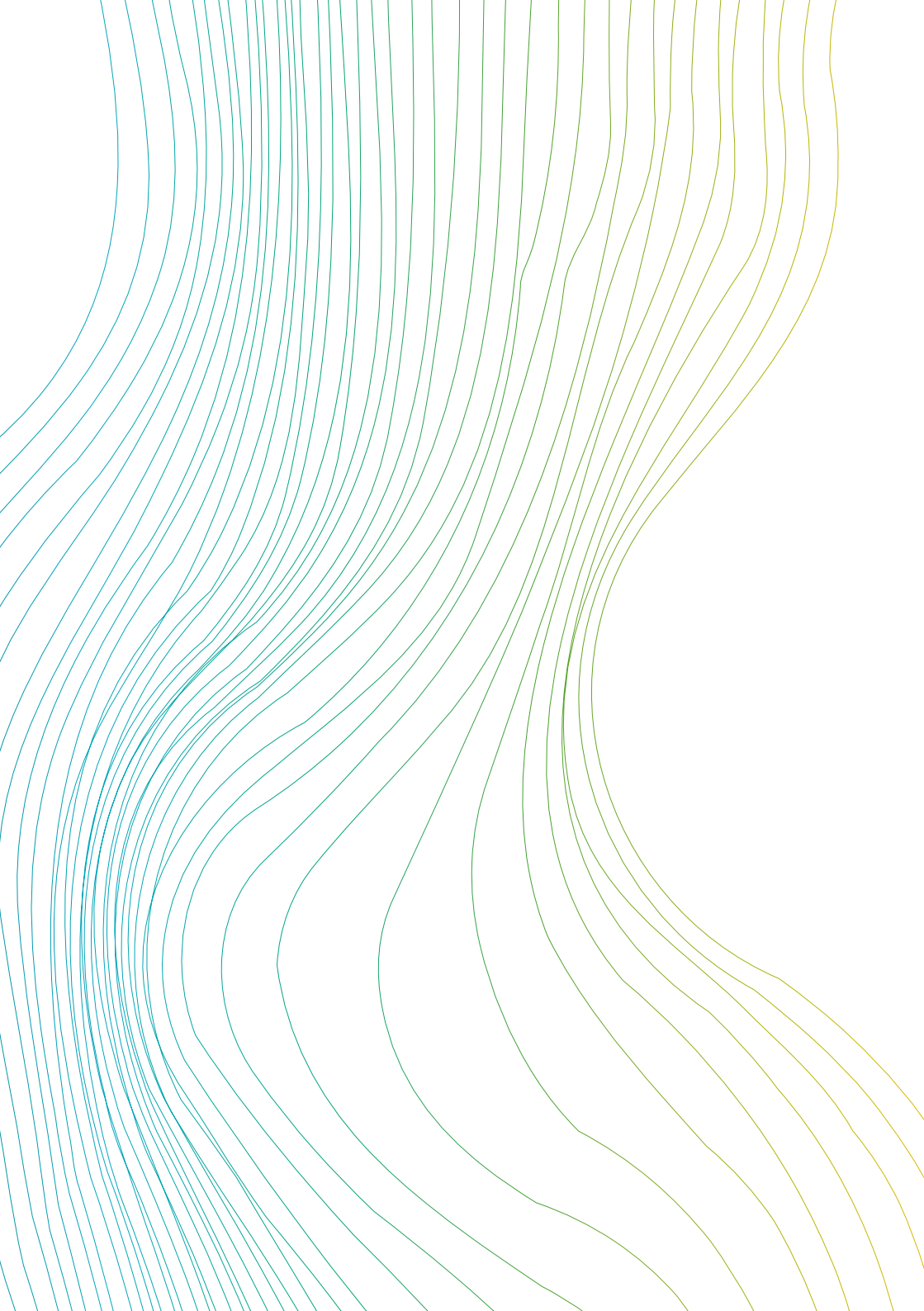
RNDr. Jana Říhová Ambrožová, Ph.D.  
RNDr. Jaroslav Šašek

© **Dana Baudišová, 2017**

ISBN 978-80-87402-61-0

Předmětem této publikace, která má sloužit také jako příručka pro hydroanalytické laboratoře, je shrnutí současných znalostí o mikrobiologických ukazatelích, používaných při kontrole kvality především pitné a surové vody (organotrofní mikroorganismy, koliformní bakterie, *Escherichia coli*, intestinální enterokoky, *Clostridium perfringens*, somatické kolifágy) a vybraných patogenních mikroorganismů, jako jsou salmonely, *Pseudomonas aeruginosa*, legionely, *Campylobacter*, atypická mykobakteria, prvoci, viry a další). Uvedeny jsou charakteristiky jednotlivých ukazatelů, metody jejich stanovení a výskyt ve vodním prostředí. Kapitoly jsou doprovázeny praktickými příklady našich výsledků, získanými při praktickém ověřování nově zaváděných metod. Informace o hygienicky významných mikroorganismech ve vodním prostředí by měly pracovníkům laboratoří napomoci při spolupráci s provozovateli v oblasti plánů zajištění bezpečnosti pitné vody.

Nedílnou součástí publikace je shrnutí známých skutečností týkajících se validace mikrobiologických metod a systému kvality v mikrobiologické laboratoři, včetně nejčastějších a nejzávažnějších chyb vyskytujících se při mikrobiologickém rozboru vody. Jako doplněk je uveden receptář nejběžnějších médií, používaných při standardizovaném stanovení základních mikrobiologických ukazatelů.



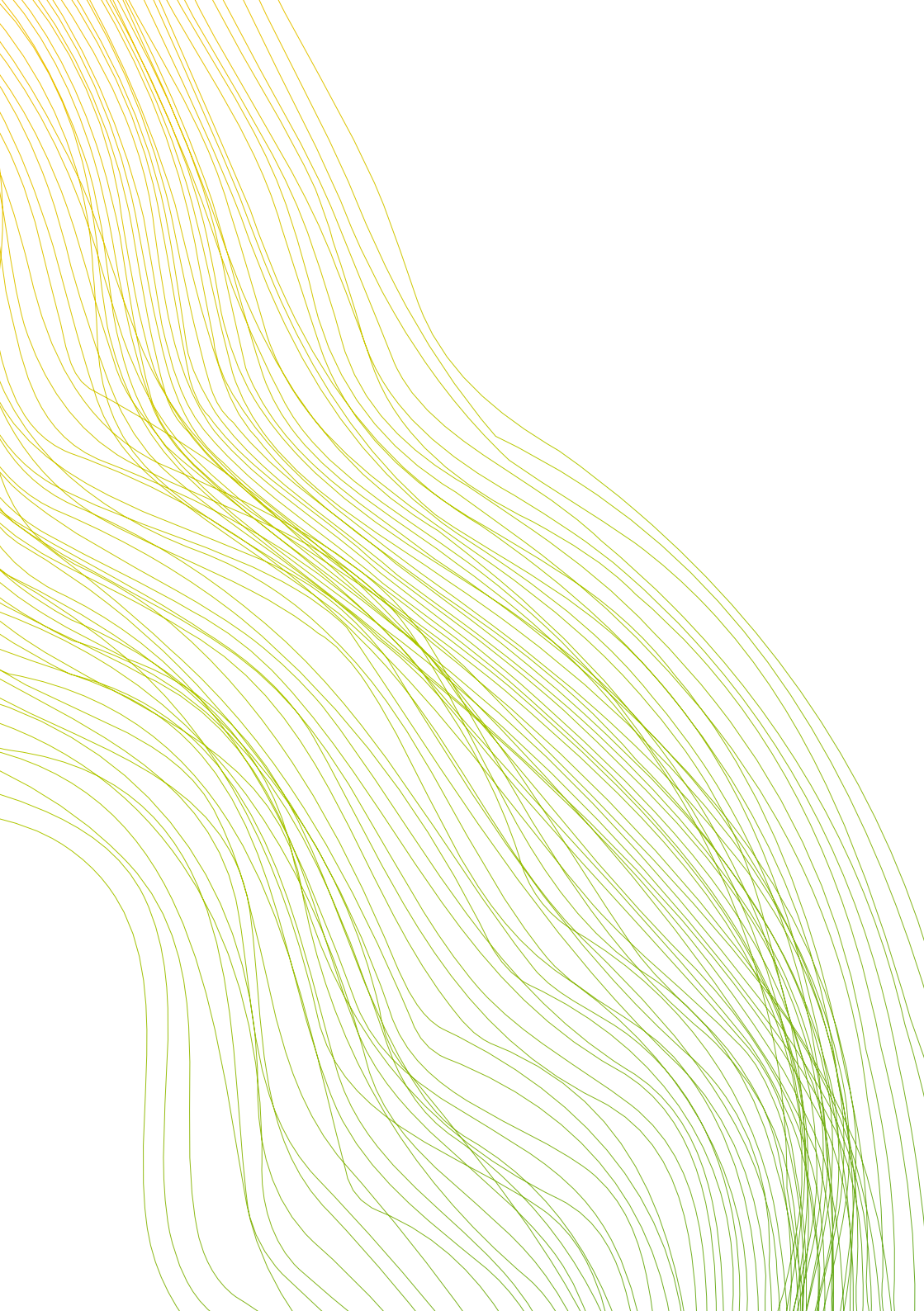


# OBSAH

1. Úvod	11
2. Mikroorganismy ve vodním prostředí	13
3. Metody mikrobiologického rozboru vody	17
3.1. Odběr vzorků	17
3.2. Mikrobiologické metody	19
3.2.1. Kultivační metody	19
3.2.1.1. Orientační metody	21
3.2.2. Nekultivační metody	23
3.2.2.1. Mikroskopické metody	23
3.2.2.2. Molekulárně biologické metody	26
3.2.2.3. Ostatní nekultivační metody	27
4. Mikrobiologická laboratoř	29
4.1. Pracovníci	29
4.2. Zařízení mikrobiologické laboratoře	30
4.2.1. Prostory	30
4.2.2. Zařízení	32
4.2.3. Prostředí mikrobiologické laboratoře	34
4.2.4. Bezpečnost práce v mikrobiologických laboratořích	35
5. Charakteristiky jednotlivých ukazatelů a metody jejich stanovení	37
5.1. Organotrofní mikroorganismy	37
5.1.1. Charakteristika a taxonomie	37
5.1.2. Metody stanovení organotrofních mikroorganismů	38
5.1.3. Organotrofní mikroorganismy ve vodním prostředí	42
5.2. Indikátory fekálního znečištění	44
5.2.1. Koliformní bakterie	44
5.2.1.1. Charakteristika a taxonomie	44
5.2.1.2. Metody stanovení koliformních bakterií	45
5.2.1.3. Koliformní bakterie ve vodním prostředí	50
5.2.2. <i>Escherichia coli</i>	51
5.2.2.1. Charakteristika a taxonomie	51
5.2.2.2. Metody stanovení <i>E. coli</i>	51
5.2.2.3. <i>E. coli</i> ve vodním prostředí	55

5.2.3. Intestinální enterokoky	56
5.2.3.1. Charakteristika a taxonomie	56
5.2.3.2. Metody stanovení intestinálních enterokoků	57
5.2.3.3. Intestinální enterokoky ve vodním prostředí	59
5.2.4. <i>Clostridium perfringens</i>	60
5.2.4.1. Charakteristika a taxonomie	60
5.2.4.2. Metody stanovení <i>Clostridium perfringens</i>	60
5.2.4.3. <i>Clostridium perfringens</i> ve vodním prostředí	62
5.2.5. Bakteriofágy	63
5.3. Patogenní a podmíněně patogenní mikroorganismy	64
5.3.1. Salmonely	70
5.3.1.1. Charakteristika a taxonomie	70
5.3.1.2. Metody stanovení salmonel	70
5.3.1.3. Salmonely ve vodním prostředí	74
5.3.2. Shigely	75
5.3.3. Rod <i>Campylobacter</i>	76
5.3.3.1. Charakteristika a taxonomie	76
5.3.3.2. Metody stanovení bakterií rodu <i>Campylobacter</i>	77
5.3.3.3. <i>Campylobacter</i> ve vodním prostředí	78
5.3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
5.3.4.1. Charakteristika a taxonomie	78
5.3.4.2. Metody stanovení <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79
5.3.4.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve vodním prostředí	80
5.3.5. Legionely	81
5.3.5.1. Charakteristika a taxonomie	81
5.3.5.2. Metody stanovení legionel	81
5.3.5.3. Legionely ve vodním prostředí	82
5.3.6. Atypická (netuberkulózní) mykobakteria	82
5.3.7. Viry	83
5.3.8. Prvoci	85
6. Charakteristiky výkonnosti mikrobiologických metod	87
6.1. Specifika mikrobiologického rozboru	88
6.2. Charakteristiky mikrobiologických metod	90
6.3. Kontrola a řízení kvality práce v mikrobiologii	92
6.3.1. Vnitřní kontrola – referenční kultury	93
6.3.2. Vnější kontrola – mezilaboratorní porovnávání (zkoušky způsobilosti)	94
6.4. Nejistoty v mikrobiologii vody	95
7. Hodnocení výsledků mikrobiologických zkoušek	97

8. Nejčastější zdroje chyb při provádění mikrobiologického rozboru	99
8.1. Nedodržování předepsaných metodik	99
8.2. Produkce nedostatečně přesných výsledků	100
8.3. Nedostatečná kvalifikovaná výstupní kontrola výsledků	101
8.4. Nedostatečná spolupráce se zákazníkem	101
9. Receptář médií a roztoků	103
9.1. Neselektivní média	103
9.1.1. Agar s tryptózou a kvasničným extraktem	103
9.1.2. Masopeptonový agar (Živný agar č. 2)	104
9.1.3. Trypton sójový agar	104
9.2. Selektivní média na stanovení indikátorových mikroorganismů	105
9.2.1. Chromogenic Coliform agar (CCA)	105
9.2.2. Endo agar	106
9.2.2.1. Rostok bazického fuchsínu	106
9.2.3. m-FC agar	107
9.2.3.1. Alkalický roztok kyseliny rosolové	107
9.2.4. Médium na detekci <i>E. coli</i> podle ČSN 757835	108
9.2.5. Selektivní kultivační médium podle Slanetze a Bartleyové	108
9.2.6. Konfirmační médium (žluč-eskulin-azidový agar)	109
9.2.7. m-CP agar	109
9.2.8. Tryptózo siřičitanový agar s cykloserinem	110
9.2.9. Měkký (soft) agar na plakovou titraci	111
9.3. Rostoky a činidla	111
9.3.1. Rostok pro oxidázový test podle ČSN EN ISO 9308-1	111
9.3.2. Rostok pro cytochromoxidázový test podle ČSN 75 7837	112
9.3.3. Tekuté laktóзовé médium	112
9.3.4. Indikátor změny pH	113
9.3.5. Činidlo na průkaz kyselé fosfatázy	113
10. Literatura	115
10.1. Seznam platných norem pro mikrobiologii vody	115
10.2. Doplnující studijní literatura	116
10.3. Citovaná odborná literatura	117
11. Summary	119
12. Přílohy	121

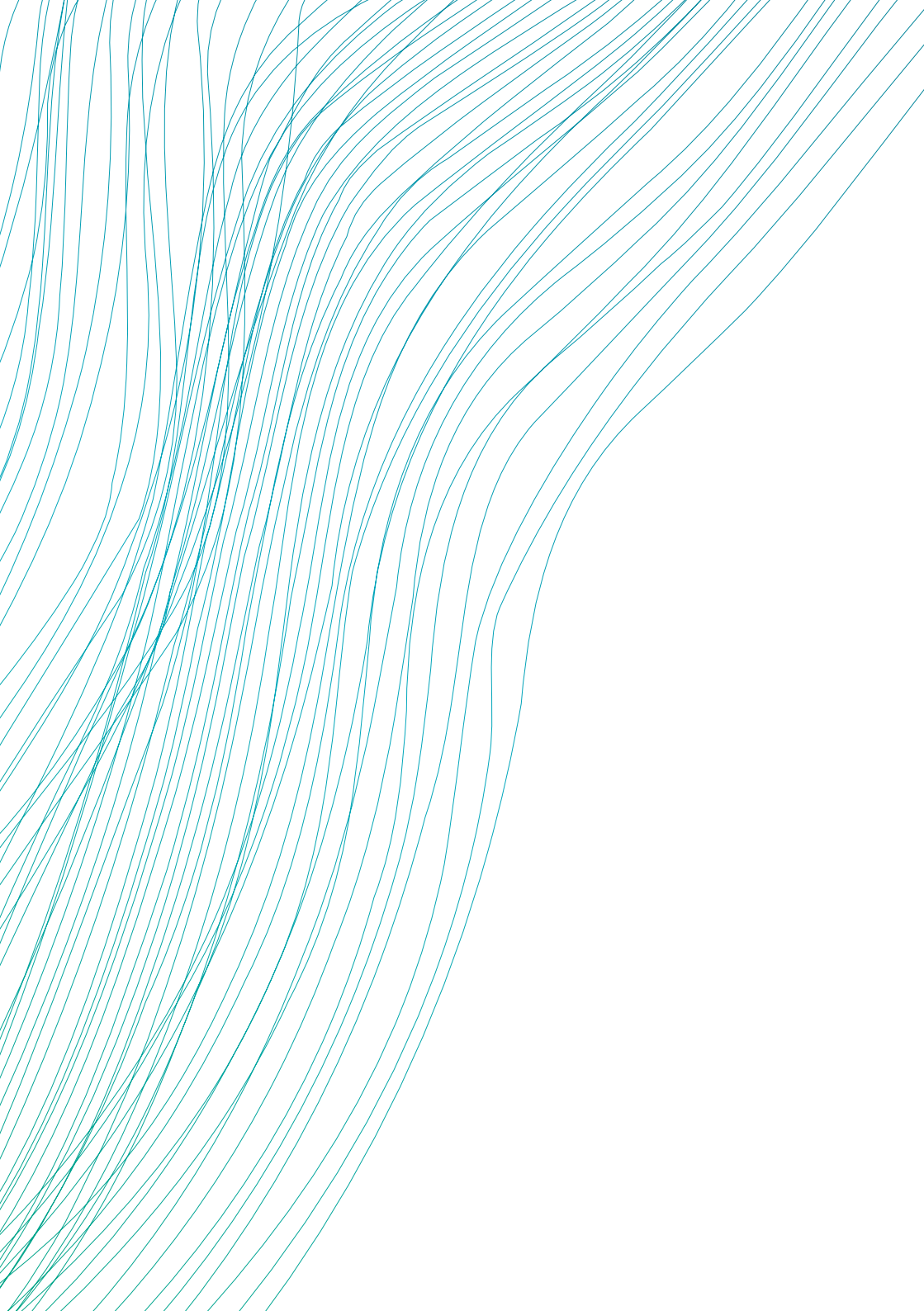


# 1. ÚVOD

Předložená publikace je příručkou pro pracovníky hydroanalytických laboratoří a komplexně se zabývá aktuální problematikou mikrobiologického rozboru vody – od vybavení mikrobiologického pracoviště, přes metody stanovení jednotlivých mikroorganismů až ke kontrole kvality práce a hodnocení výsledků mikrobiologických analýz. Navazuje na deset let starou publikaci Baudišová (2007): *Současné metody mikrobiologického rozboru vody. Příručka pro hydroanalytické laboratoře*, Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v. v. i., Praha. Kromě toho, že je kompletně novelizována ve světle nových znalostí a zkušeností, je více zaměřena na problematiku pitné a surové vody a kromě rozšíření informací o vlastním stanovení jednotlivých ukazatelů má umožnit zájemcům hlubší orientaci v problematice mikrobiologického vyšetřování pitných a surových vod. Získané vědomosti o hygienicky významných mikroorganismech ve vodním prostředí by též měly pracovníkům laboratoří napomoci při spolupráci s provozovateli v oblasti plánů zajištění bezpečnosti pitné vody.

Řada uvedených poznatků vznikla i díky inspirující spolupráci s mnohými pracovníky z hydroanalytických laboratoří, za což mnohokrát děkuji. Zároveň děkuji svým kolegyním Ivaně Benákové a Petře Markové za pomoc a podporu v průběhu celé práce. Neposlední dík patří i recenzentům RNDr. Janě Říhové Ambrožové, Ph.D., a RNDr. Jaroslavovi Šaškovi a dále spoluřešitelům projektu MUDr. Františkovi Kožíškovi, CSc., a MUDr. Haně Jelíkové za řadu podnětných připomínek.

Publikace byla zpracována v rámci projektu Technologické agentury ČR TD03000155 „Podmínky úspěšné transpozice a implementace systému rizikové analýzy při zásobování pitnou vodou v České republice“ v Programu na podporu aplikovaného společenskovedního výzkumu a experimentálního vývoje OMEGA.

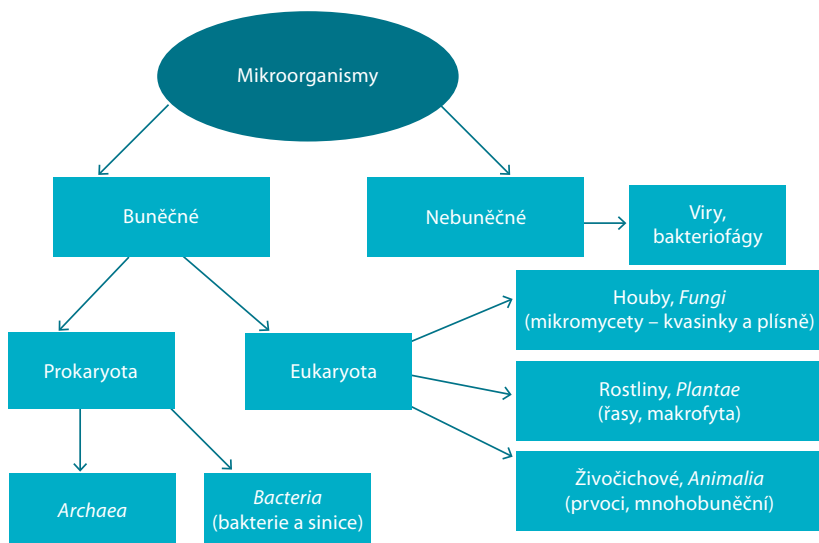


## 2. MIKROORGANISMY

### VE VODNÍM PROSTŘEDÍ

Mikroorganismus je jednobuněčný, jen mikroskopicky (popř. pouze elektronmikroskopicky) pozorovatelný organismus. Mikroorganismy často tvoří různé kolonie, shluky, případně i symbiotická společenstva s jinými organismy. Toto společenstvo ve vodním prostředí je různorodé, druhově i početně velmi bohaté a zahrnuje jak druhy, pro které je vodní prostředí původní, tj. přirozené (autochtonní), tak druhy, které se do vody dostaly z prostředí okolního, např. splachy z půdy, znečištění apod. (alochtonní). Přirozené společenstvo se podílí na všech biologických, chemických a fyzikálně-chemických procesech v ekosystému vodního prostředí (především na koloběhu uhlíku, dusíku, fosforu a dalších živin a mikroelementů) a tvoří převážnou většinu přítomných mikroorganismů. Přesto je z hlediska úpravy vody a její kvality věnována pozornost především mikroorganismům alochtonním, jejichž výskyt nebo jejich významné pomnožení kvalitu vody zhoršuje, a některé z nich (patogenní mikroorganismy) představují pro člověka významné zdravotní riziko. Mezi mikroorganismy zahrnujeme zástupce prokaryot (sem patří domény *Bacteria* a *Archaea*) i eukaryot (drobné mikroskopické houby, tzv. mikromycety, prvoci) a dále organismy tzv. nebuněčné, což jsou viry. Mezi mikroorganismy svým charakterem patří i mikroskopické řasy (eukaryota, rostliny, *Plantae*) a sinice (prokaryota, fotosyntetizující gramnegativní zástupci domény *Bacteria*, známé jako cyanobakterie anebo cyanoprokaryota), které se dnes řeší samostatně v rámci studia fytoplanktonu.

Grafické vyjádření rozčlenění jednotlivých skupin mikroorganismů je uvedeno na obr. 1. Vývoj znalostí o mikrobiálních společenstvech ve vodním ekosystému je úzce spjat s rozvojem metod v posledních desetiletích, především metod molekulárně biologických. Zhruba do 80. let minulého století byly mikrobiální procesy studovány převážně na základě stanovení kultivovatelných mikroorganismů, doplněné o mikroskopické pozorování fytoplanktonu a zooplanktonu a základní chemické analýzy. Dnes nové metody umožňují na základě genetických analýz studovat bakteriální společenstvo v celé šíři a je již možné charakterizovat či částečně identifikovat i mikroorganismy (zejména bakterie) nekultivovatelné.

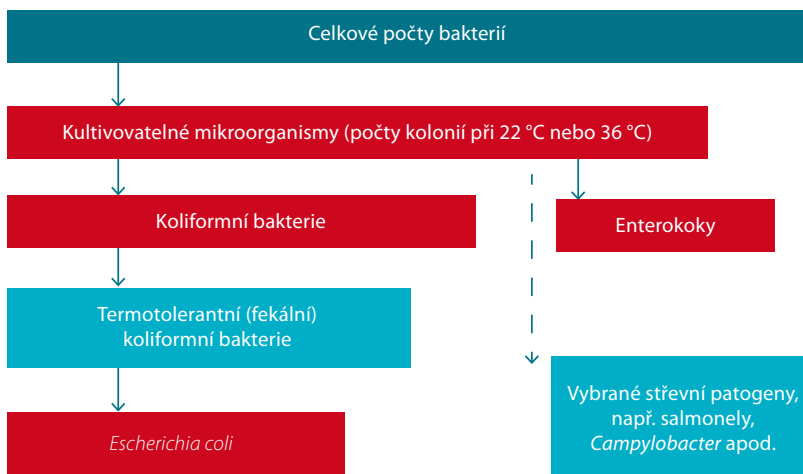


**Obr. 1.** Třídění mikroorganismů do hlavních fylogenetických (taxonomických) skupin

Prokaryota z domény *Archaea* (dříve Archebakterie) byly dříve považovány především za obyvatele extrémních biotopů (vysoká teplota, tlak, kyselé prostředí apod.), dnes je však jisté, že jsou běžnou součástí mikroflóry vodního prostředí (tvoří zhruba 10 % všech prokaryotních buněk a např. v podzemních vodách i mnohem více). Ze známějších prokaryot z této skupiny patří mezi *Archaea* např. zástupci metanogenů z rodu *Methanococcus* (nesprávně v literatuře označovány jako metanogenní bakterie).

Z hlediska hygieny vody jsou nejvýznamnější bakterie kultivovatelné na běžných živných médiích, obsahujících jako komplexní zdroj živin různé druhy natrávených bílkovin (pepton, trypton, kasein). Do této skupiny patří i indikátorové bakterie (nejvýznamnější jsou indikátory fekálního znečištění, které mohou ukazovat na výskyt střevních patogenů). Na obr. 2 jsou schématicky znázorněny jednotlivé podskupiny bakterií (od celkového počtu prokaryotních buněk až po vybrané střevní patogeny), jak je chápeme v kontextu mikrobiologické kontroly kvality vody.





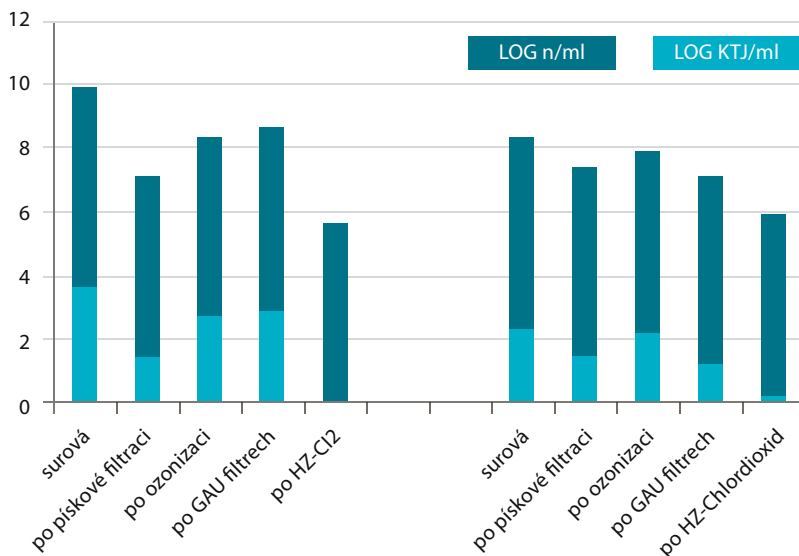
**Obr. 2.** Schématické znázornění skupin bakterií, detekovaných při mikrobiologickém rozboru vody (označeny červeně); graf nevyjadřuje kvantitativní měřítko, tj. velikost dané podskupiny, protože se většinou jedná o velice malý podíl (viz dále)

Obecně charakterizovat mikrobiální společenstva surové vody a upravené vody prakticky nelze, protože se pro úpravu vody používají nejrůznější zdroje vod, a to od vody povrchové (např. potok, údolní nádrž) po vodu podzemní. Každý ekosystém má zcela odlišné složení společenstva, které se mění během procesu úpravy vody a její následné distribuce. Zde je nutné zdůraznit, že v distribučním systému není nejvýznamnější (početně i druhově) mikrobiální společenstvo volné, tj. volně rozptýlené (v planktonu), ale velice významná část společenstva se vyskytuje ve složce přisedlé, tj. v biofilmech v potrubí a na stěnách technologií.

Jak již bylo zmíněno a vyplývá to i z obr. 2, je nutno striktně odlišovat stanovení kultivovatelných bakterií od celkového počtu bakterií, stanoveného mikroskopicky. Zavádějící může být i např. termín „stanovení celkového počtu kolonií (total colony counts)“, který někdy bývá v literatuře užíván místo HPC (heterotrophic plate count). Zastoupení „kultivovatelných“ bakterií mezi jejich „celkovým počtem“ stanoveným mikroskopicky se liší. U čistých, málo organicky znečištěných vod tvoří kultivovatelné bakterie zhruba 0,1 % celkového počtu bakterií, u silně organicky a fekálně znečištěných vod může jít až o 10 %.

Na obr. 3 je uveden příklad zastoupení kultivovatelných bakterií (počty kolonií při 22 °C, světlé sloupce) mezi celkovým počtem bakterií (stanovených mikroskopicky, tmavé sloupce) ve dvou úpravách vody od vody surové přes jednotlivé technologické stupně až po upravenou vodu po hygienickém zabezpečení (dezinfekci).

První úpravna (vlevo) má jako zdroj surové vody potok, druhá úpravna (vpravo) má jako zdroj surové vody údolní nádrž. Pro názornost je uvedeno logaritmické měřítko. Kdyby byly uvedeny absolutní hodnoty, část patřící kultivovatelným mikroorganismům by se vůbec na grafu nezobrazila. Absolutní podíly kultivovatelných bakterií mezi celkovým počtem mikroorganismů jsou zleva 0,27 %, 0,01 %, 0,11 %, 0,17 %, 0,0001 %, 0,01492 %, 0,00450 %, 0,00356 %, 0,00230 %, 0,00001 %.



**Obr. 3.** Podíl kultivovatelných mikroorganismů (počty kolonií při 22 °C, LOG KTJ/ml) mezi celkovým počtem bakterií (LOG n/ml) ve dvou úpravných vody

Převážná většina nekultivovatelných bakterií zahrnuje taxony, které nerostou na běžných živných půdách, protože mají buď velice nízkou afinitu k substrátu (jsou adaptované na velice nízký obsah živin ve vodním prostředí), nebo mají speciální růstové vlastnosti a požadavky. Bylo však zjištěno, že řada kultivovatelných bakterií včetně indikátorů a patogenů není též po delší době přežívání v pro ně nefyziologickém (vodním) prostředí kultivovatelná na běžných živných půdách a přechází do tzv. stavu VNBC (viable but non culturable cells – buňky živé, ale nekultivovatelné). Přestože je toto stadium jednoznačně prokazatelné, není známo, jaký je další osud těchto bakterií – jestli mohou infikovat hostitele, množit se alespoň velmi pomalu a omezeně, nebo zda jde o stadium před vlastním zánikem (biologická smrt buněk).

## 3. METODY MIKROBIOLOGICKÉHO

### ROZBORU VODY

Výběr optimálních testovacích metod je naprosto zásadní krok, nezbytný pro úspěšnou analýzu vzorku vody. Pro standardní sledování kvality vody podle platné legislativy se používají metody uzanční, tj. smluvené, které jsou většinou popsány v příslušných technických normách (z řad ČSN, ČSN ISO, ČSN EN, ČSN EN ISO). Normy jsou platné (pokud není uvedeno jinak, platí nejnovější verze), nikoliv však primárně závazné. Jejich závaznost může být určena jejich uvedením v právních předpisech (např. vyhláška o pitné vodě apod.). Závaznost metody může být též určena smluvními vztahy se zákazníkem. Naprostá většina standardních mikrobiologických metod je založena na kultivaci mikroorganismů, jedná se tedy o metody kultivační.

V současné době je však velmi široký výběr dalších metod, které je možné použít ve speciálních případech (rychlé, jednoduché a orientační stanovení, výzkum obtížně kultivovatelných nebo patogenních mikroorganismů, studium mikrobiální ekologie). Podrobný výčet a charakteristika těchto metod není hlavním předmětem této publikace, nicméně jsou zde zmíněny nejčastěji používané metody v mikrobiologii vody s odkazem na další literaturu.

Součástí této kapitoly je též problematika odběru vzorků pro mikrobiologické analýzy, protože má svoje specifika, která je nutné znát a také zohledňovat.

### 3.1. ODBĚR VZORKŮ

Odběr vzorků určených pro mikrobiologické analýzy z různých typů vodního prostředí a jeho složek (povrchové vody, podzemní vody, srážkové vody, vody v technických systémech, např. různé technologické stupně úpravy vody), sedimenty a biofilmy se řídí normami z řady ČSN ISO, resp. ČSN EN ISO 5667.

Vedle technické stránky odběrů, která je popsána ve výše uvedených normách, má nezastupitelnou úlohu i plánování vzorkování, výběr vzorkovacích míst a časový plán odběrů. Chyba, která se stane při odběru vzorků, již většinou nejde dalšími analýzami napravit. Je proto důležité, aby způsob odběru řídil kvalifikovaný a zkušený pracovník, který by měl být zblhlý v mikrobiologii vody a měl by mít znalosti i z přidružených oborů (hydrologie, limnologie, technologie úpravy a distribuce vody apod.) a dále musí být obeznámen se zadaným úkolem (účelem vzorkování) v celé jeho šíři, pokud se provádí vzorkování na více místech.

Odběrové místo musí být vybráno tak, aby byl vzorek reprezentativní, tzn. musí vystihovat všechny existující podmínky ve vodním prostředí ať přírodním, či umělém. Před volbou odběrového místa je třeba posoudit všechny okolnosti, které mohou určené místo ovlivnit (např. vzdálenost od zdroje znečištění) a zároveň určit optimální vzdálenost mezi odběrovými místy.

Mimořádný význam má i četnost odběrů, neboť variabilita počtů mikroorganismů ve vodním prostředí je značná, závislá na řadě meteorologických i ekologických podmínek. Jediným rozbohem tak lze zjistit pouze momentální, náhodný stav v době odběru. K mikrobiologickému hodnocení stavu je nezbytné odebírat vzorky co nejčastěji po delší časové období.

Požadavky na odběr surových vod dále právně specifikuje vyhláška č. 428/2001 Sb. a požadavky na odběry pitných vod vyhláška č. 252/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů.

Přestože se mikrobiologický i chemický odběr řídí většinou shodnými základními principy, existují i významné odlišnosti, dané povahou vzorků pro mikrobiologické analýzy, které je třeba akceptovat. Proto byla vytvořena norma ČSN EN ISO 19458 Jakost vod – Odběr vzorků pro mikrobiologické analýzy, kde jsou požadavky na vzorkování pro mikrobiologii podrobně specifikovány. Mezi nejdůležitější body patří:

- Vzorkovnice: Vzorkovnice musí být čisté a sterilní, čistota a sterilita musí být pravidelně kontrolována.
- Dezinfekce vody: V případě, že se odebírají vody dezinfikované chlorem, je nutná inaktivace dezinfekčního činidla thiosíranem sodným ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). K inaktivaci 1 mg chloru je nutno teoreticky přidat 7,1 mg  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . V praxi se proto přidává ke každým 100 ml objemu vzorkovnice 0,1 ml 1,8% roztoku pentahydrátu thiosíranu sodného ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Toto množství je dostatečné k inaktivaci nejméně 2–5 mg/l volného reziduálního chloru (v závislosti na dynamice inaktivace), což postačuje u většiny vzorků. Thiosíran sodný se nerozkládá při autoklávování, ani při sterilizaci suchým teplem. Hodnota pH roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  musí být přibližně neutrální (nízká hodnota pH může způsobovat jeho rozklad).

- **Konzervace:** Nejsou přípustná žádná konzervační činidla, vzorek je nutné konzervovat pouze chlazením při  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ .
- **Účel odběru:** Při odběru pitné vody je nutné rozlišovat účel odběru. Vzorky určené k posouzení kvality vody v potrubí je nutné odebírat z kohoutků bez jakýchkoliv přídavných zařízení (např. perlátor), dezinfikovaných opálením. V krajním případě, pokud není možno kohoutek opálit, je přípustné použít jiný způsob dezinfekce (např. přípravky na bázi chlornanu, ethanolu a isopropanolu). Zajímá-li nás kvalita vody požívaná spotřebitelem, např. při šetření nějaké epidemie, odebírá se vzorek vody bez dezinfekce kohoutku, bez odpuštění vody a bez demontáže perlátoru. Způsob vzorkování pro různé účely je podrobně rozveden v normě ČSN EN ISO 19458.
- **Transport a časové možnosti:** Vzorek je nutné dopravit do laboratoře tak, aby mohl být zpracován maximálně do 24 hodin po odběru (pro běžné mikrobiologické ukazatele); pro stanovení některých ukazatelů (kultivovatelné mikroorganismy, *Pseudomonas aeruginosa*) je předepsán ještě kratší limit (12 hodin), což již může působit organizační komplikace. Doporučené a přijatelné hodnoty pro maximální dobu uchovávání vzorků pro jednotlivé ukazatele jsou uvedeny v příloze B normy ČSN 19458 a jsou též uváděny v technických (metodických) normách pro stanovení jednotlivých ukazatelů.

## 3.2. MIKROBIOLOGICKÉ METODY

### 3.2.1. Kultivační metody

Kultivační metody, zahrnující pomnožení cílových mikroorganismů v/na živném médiu, a jejich rozřazení na základě fenotypu jsou od 19. století až doposud základním přístupem v aplikované mikrobiologii.

Živná média lze rozdělit na *tekutá*, sloužící především k pomnožení mikroorganismů a *pevná*, sloužící k izolaci jednotlivých kolonií. Pro stanovení počtu mikroorganismů jsou vhodnější pevná kultivační média, kde lze spočítat kolonie, vykazující typické vlastnosti hledaného mikroorganismu. Jako jednotky se uvádějí KTJ (tj. kolonie tvořící jednotky) ve zpracovaném objemu vzorku. Vzorek se na živné médium očkuje buď přímo na povrch (0,1–1 ml ředěného či neředěného vzorku), k rozetření lze použít zakřivené tyčinky (tyčinky podle Drigalskiho) tzv. „hokejky“, nebo se vzorek naočkuje do prázdné Petriho misky a zalije se roztopeným

agarovým médiem, zchladlým na cca 40–45 °C. V tomto druhém případě je však obtížné kolonie následně izolovat a pracovat s nimi. Pokud je třeba zpracovat větší objem vzorku než 1 ml (např. indikátory fekálního znečištění v pitné vodě se stanovují v objemu 100 ml), používá se koncentrace tzv. membránovou filtrací. Jde o filtraci vzorku pod tlakem (pomocí vodní nebo olejové vývěvy) přes nitrocelulózový filtr o porozitě většinou 0,45 µm. V případě, že potřebujeme kvantitativní odhad při použití tekutého kultivačního média, lze použít tzv. metodu „nejpravděpodobnějšího počtu“ – „most probable number“ – MPN. Vzorek vody a jeho ředění jsou rozděleny na několik částí a v jednotlivých porcích se stanoví přítomnost, resp. nepřítomnost hledaného mikroorganismu. Z těchto údajů se odhadne „nejpravděpodobnější počet“ hledaných bakterií (MPN index).

Každé živné médium musí obsahovat všechny potřebné živiny (zdroje uhlíku, dusíku, fosforu a dalších makrobiogenních a mikrobiogenních prvků). Média mohou být buď komplexní (zdrojem živin je nějaká složitější organická látka, jako např. pepton nebo krev), nebo minimální (všechny dodané prvky a jejich sloučeniny jsou chemicky definovány). Pro běžná stanovení v mikrobiologii vody se používají komplexní média, minimální média jsou využívána spíše při stanovení různých fyziologických skupin mikroorganismů (např. denitrifikujících bakterií, bakterií využívajících ropné látky jako zdroj uhlíku apod.).

Další dělení kultivačních médií je na *neselektivní* média, která obsahují všechny potřebné živiny a nic dalšího, a na *selektivní* média, kde je k médiu přidána nějaká chemická látka, která zvýhodňuje pouze určitou skupinu mikroorganismů tím, že ostatní potlačuje (např. azid sodný je toxická látka, která zahubí většinu mikroorganismů, nikoliv však enterokoky, proto se přidává do selektivního média k jejich stanovení). V laboratorní praxi se nejvíce používají tzv. *selektivně diagnostická* média, kde kromě složky selektivní je přítomna složka diagnostická, tj. látka (nebo soubor látek), která využívá specifických vlastností hledaného mikroorganismu, a tak jej lze odlišit od ostatních vyrostlých mikroorganismů. Například typickou vlastností koliformních bakterií je jejich schopnost zkvašovat cukr laktózu, proto se při jejich stanovení jako jeden ze zdrojů uhlíku používá právě laktóza za přítomnosti acidobazického indikátoru, který barevně odliší kyseliny, vzniklé její fermentací. Biochemických vlastností jednotlivých bakterií se využívá nejen při kultivaci, ale i při následném určování druhů (tzv. konfirmaci).

Protože růst mikroorganismů silně závisí na konkrétních podmínkách kultivace, včetně složení médií, pro základní mikrobiologický rozbor se používají tzv. uzanční (tj. smluvené) metody dané příslušnými technickými normami a právními předpisy. Tyto postupy je třeba přesně dodržovat.

### Příklad úloh jednotlivých složek v selektivně diagnostickém médiu m-FC ke stanovení fekálních koliformních bakterií:

— Tryptose nebo biosate	komplexní zdroj živin
— Proteose pepton č. 3 nebo polypepton	komplexní zdroj živin
— Kvasničný extrakt	komplexní zdroj živin
— Chlorid sodný (NaCl)	k selektivitě prostředí
— Laktóza	k diagnostice (je fermentována)
— Žlučové sole č. 3 nebo směs žlučových solí	k selektivitě prostředí
— Anilínová modř	k diagnostice (acidobazický indikátor)
— Kyselina rosolová – alkalický roztok	k selektivitě prostředí
— Agar	ke zpevnění média

Správné zásady přípravy kultivačních médií jsou podrobně rozvedeny v normě ČSN EN ISO 11133 (vážení a rehydratace, rozpouštění a rozptylování, měření a úprava pH, rozplňování, sterilizace, uchovávání, příprava pro použití, inkubace a likvidace).

### **3.2.1.1. ORIENTAČNÍ METODY**

Orientační metody mají za úkol rychle a jednoduše zjistit míru kontaminace vody (především pitné vody). Přestože se tyto metody nepoužívají při standardním testování kvality vody, určitě mají v mikrobiologii vody své místo. Opodstatnění jejich využití je zejména v odůvodněných případech, včetně mimořádných situací, kterými jsou např. povodně, havárie atd., nebo při terénním měření.

Protože lze předpokládat, že nejdůležitější pro rychlou orientaci o kvalitě vody bude zjištění informací o případné fekální kontaminaci, je většina těchto testů zaměřena na metody stanovení indikátorů fekálního znečištění, především na detekci *Escherichia coli*. Jedná se o metody kultivační, jejichž hlavními požadavky jsou:

- **Rychlost** – perspektivní jsou metody, které poskytují výsledky **do 12 hodin** po začátku práce;
- **Jednoduchost** – tu lze posuzovat z několika hledisek:
  1. jednoduché očkování a inkubace vzorků, možnost provedení analýz v terénních podmínkách;
  2. nenáročnost z hlediska kvalifikace personálu – metoda poskytuje jasné a jednoznačné výsledky;
- **Citlivost a specifičnost** – dostatečná citlivost k posouzení zdravotní nezávadnosti zdroje vody, bez falešně pozitivních a zejména falešně negativních nálezů.

Přehled principů jednotlivých rychlých metod použitelných k orientačnímu stanovení indikátorů fekálního znečištění je uveden v *tabulce 1*. Většina těchto metod je založena na kultivaci bakterií v tekutém kultivačním médiu, protože tekuté prostředí je pro jejich růst fyziologicky vhodnější než pevné agarové médium (případně navíc se zachycením mikrobů na membránovém filtru).

**Tabulka 1.** Přehled rychlých metod použitelných k orientačnímu stanovení

Princip metody	Konkretizace	Poznámky
Membránová filtrace	Speciální např. chromogenní média, absorpční podložky, pádlové testery atd.	Málo vhodné pro použití v terénu; pro odečet v laboratoři za kratší dobu inkubace lze použít např. stereomikroskop
Tekuté médium, fermentace	Kvasná zkouška, teplotní test	
Tekuté médium chromogenní nebo fluorogenní substrát, případně jejich kombinace	Testy většinou na základě aktivit enzymů $\beta$ -D-galaktosidázy a $\beta$ -D-glukuronidázy	

Metod, využitelných k orientačnímu stanovení indikátorů fekálního znečištění, je celá řada a většina firem dodávajících materiál pro mikrobiologii vody je má ve své nabídce. Testy mívají ve svých názvech slova jako „rapid“ nebo „fast“ (rychlý), „simple“ či „easy“ (jednoduchý), „cult“, „scan“, „ready-to-use“ apod. Především se jedná o P/A metody, tj. o metody, které určí přítomnost, resp. nepřítomnost cílového mikroorganismu (např. *E. coli*) ve studovaném objemu vzorku vody. Protože se tato nabídka poměrně rychle obměňuje a protože nechceme nějakou firmu preferovat, nejsou zde v přehledu uváděny konkrétní příklady.

Jediný test, který by bylo vhodné zmínit z důvodu jeho maximální optimalizace pro práci v terénu, a prakticky byl ověřen i při řadě misijních aktivit v rozvojových zemích, je „*E. coli* Water Quality Test Kit“ od firmy Aquagenx ([www.aquagenx.com](http://www.aquagenx.com)). Test je založen na průkazu *Escherichia coli* metodou „nejpravděpodobnějšího počtu“ pomocí inkubace ve sterilním plastovém sáčku rozděleném na pět různých velkých oddílů. Kultivační médium obsahuje chromogenní substrát, inkubace probíhá při 25 °C. K testu je přiložena tabulka s určením hodnot MPN a s hodnocením stupně závažnosti kontaminace vody.



Mezi nestandardní mikrobiologické metody lze svým způsobem zařadit i metody resuscitace poškozených či stresovaných mikroorganismů. Mezi faktory negativně působící na fyziologický stav bakterií patří především dezinfekce chlorem, přítomnost iontů těžkých kovů či dalších toxických látek, extrémní hodnoty pH, teplotní šoky, neúměrná sluneční radiace apod. U fyziologicky poškozených mikroorganismů se projevují poruchy struktury buněk nebo metabolismu a ty mohou ztratit schopnost růstu na selektivních diagnostických médiích za běžných kultivačních podmínek. Mezi resuscitační metody patří např. předinkubace vzorků na neselektivním médiu nebo za snížené teploty, eliminace některých selektivních složek z média či použití dvouvrstevného média (podrobněji viz Häusler, 1994, díl II, kap. 6.4.6.).

## 3.2.2. Nekultivační metody

V posledních dvou desetiletích došlo k významnému rozvoji mikrobiologických metod, které nejsou založeny na kultivaci cílových mikroorganismů. Přestože mají svá omezení a pro standardní diagnostiku se v mikrobiologii vody v širší míře neužívají, určitě mají svůj význam. Jsou zásadními metodami v mikrobiální ekologii, kde je třeba studovat společenstvo a jeho funkci jako celek, a tak dochází k významnému rozvoji oboru „molekulární ekologie“. Podrobný popis těchto metod přesahuje rámec této publikace, nicméně jsou zde uvedeny metody, které je možné v mikrobiologii vody (se zaměřením na diagnostiku indikátorových skupin a patogenů) využít, jejich hlavní charakteristiky a současná omezení. Pro podrobnější informace o metodách používaných v mikrobiální ekologii je uveden odkaz na publikaci Rulík a kol. (2015). Další informace o těchto metodách je možné najít např. v publikaci Říhová Ambrožová a kol. (2017).

### 3.2.2.1. MIKROSKOPICKÉ METODY

Mikroskopické metody detekují mikroorganismy po koncentraci a barvení přímo. Vzhledem k velikosti bakterií je třeba použít vysoké zvětšení (až tisícinásobné). Přestože naprostá většina mikrobiologických metod používaných při analýzách vod je kultivační, měli by pracovníci laboratoří určitě ovládat Gramovo barvení, které je jedním ze základních mikrobiologických postupů, umožňující zkontrolovat nejen čistotu kultury, ale i příslušnost kmene do širší taxonomické skupiny. Gramovo barvení (vyvinuté v roce 1884 dánským vědcem H. Ch. Gramem) je jednoduchá metoda barvení o několika krocích, která ve svém výsledku (na základě stavby buněčné stěny) rozliší bakterie na grampozitivní (např. bakterie rodu *Bacillus*, *Clostridium*, enterokoky, stafylokoky) a gramnegativní (např. bakterie z čeledě *Enterobacteriaceae*, aeromonády, pseudomonády).

### Postup Gramova barvení:

- Bakteriální kultura se nanese na odmaštěné podložní sklíčko a vysuší se suchým vzduchem. Poté se podložní sklíčko dvakrát až třikrát protáhne (kvůli fixaci) nad horní částí svítivého plamene.
- Na fixovaný preparát se nalije základní trifenylmetanové barvivo, nejčastěji roztok krystalické violeti (tj. 2 g  $C_{25}H_{30}ClN_3$  s 20 ml 95 % ethylalkoholu) se šťavelanem amonným (0,8 g  $(NH_4)_2C_2O_4$  s 80 ml destilované vody) a nechá se působit 2–3 minuty.
- Základní barvivo se slije a preparát se ponoří do Lugolova činidla (1 g jodu, 2 g KI a 300 ml destilované vody) na 1–2 minuty až do zčernání vzorku.
- Preparát se promývá roztokem 96% ethylalkoholu do případného plného odbarvení (grampozitivní bakterie se neodbarví, gramnegativní bakterie ano).
- Preparát se vymyje destilovanou vodou a provede se dobarvení roztokem safraninu (10 ml 2,5% roztoku  $OC_{20}H_{19}ClN_4$  v 95% ethylalkoholu a 100 ml destilované vody) po dobu 3–5 minut.

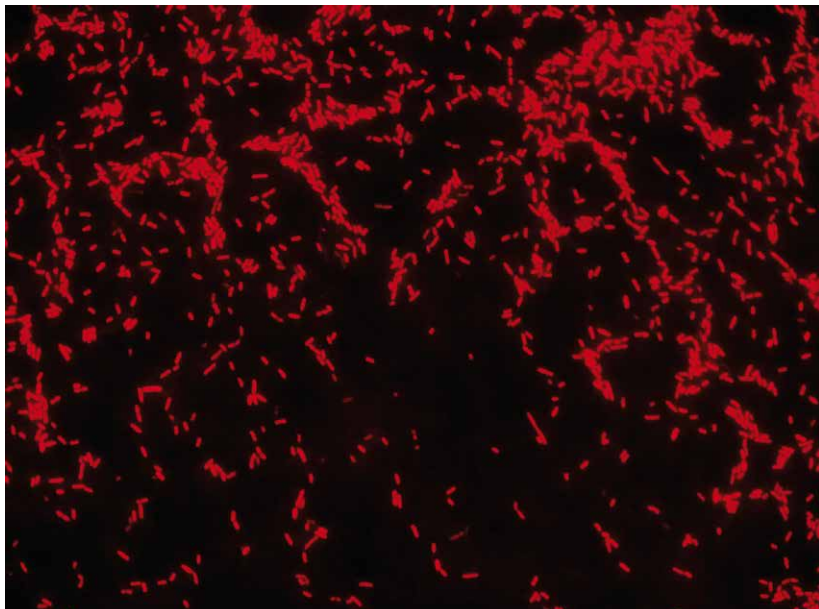
Grampozitivní bakterie jsou tmavofialové (díky krystalické violeti), gramnegativní bakterie jsou růžové díky safraninu (barvitelnost je dána charakterem buněčné stěny, její strukturou a chemickým složením).

### Mikroskopické metody na detekci bakteriálních společenstev

Z mikroskopických metod, analyzujících celý vzorek vody (nebo jeho část), se nejčastěji používá stanovení „celkového počtu bakterií“, kdy je fixovaný vzorek koncentrován membránovou filtrací a obarven roztokem 4–6-diamino-2-phenylindole (DAPI). Když se DAPI naváže na DNA, vznikne díky vysoce energetickému typu interakce silně fluorescenční komplex. DAPI je excitováno v ultrafialové oblasti, v komplexu s DNA má absorpční maximum 358 nm a emisní maximum 461 nm. Bakteriální buňky se počítají při stonásobném zvětšení pod fluorescenčním mikroskopem. Celkový počet bakterií je ukazatel pomocný, protože neposkytuje žádné informace o složení bakteriálního společenstva. Metoda sice umožní všechny buňky ve vzorku spočítat, není však již možné rozlišit je do taxonomických skupin.

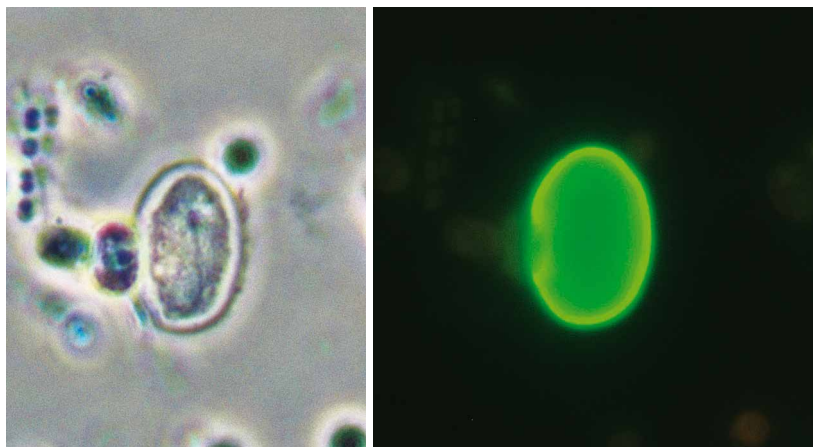
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je metoda, která kombinuje mikroskopickou metodu a molekulárně biologický přístup. Jedná se o přímou metodu detekce bakterií pomocí hybridizace s fluorescenčně značenými genovými sondami. Převážně jsou využívány konzervativní úseky 16S rRNA. Vizualizace se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu (obr. 4). Databáze sekvencí 16S rRNA jsou velmi obsáhlé, v současné době lze kromě širokých taxonomických skupin (např. domény *Bacteria*, *Archaea*, řády – např. *Proteobacteria* apod.) detekovat

i užší skupiny, někdy až jednotlivé rody a druhy, které je obtížné kultivovat. Hlavním omezením v praktickém využití je vysoká mez detekce, neboť dolní pracovní mez je 500 bakteriálních buněk v ml (na membránovém filtru), aby byl zjevný dostatečný signál.



**Obr. 4.** Bakterie z domény *Bacteria* v povrchových vodách (Berounka, Černošice, detekované pomocí FISH), fotografie: Ing. Andrea Benáková, Ph.D.

Mikroskopické metody se standardně používají například při detekci parazitických prvoků (rody *Giardia*, *Cryptosporidium* viz kap. 5.3.8., obr. 5).



*Obr. 5. Cysta prvoka rodu Giardia, ve fázovém kontrastu – vlevo; fluorescenčně barvená FITC – vpravo, fotografie: Mgr. Petr Pummann*

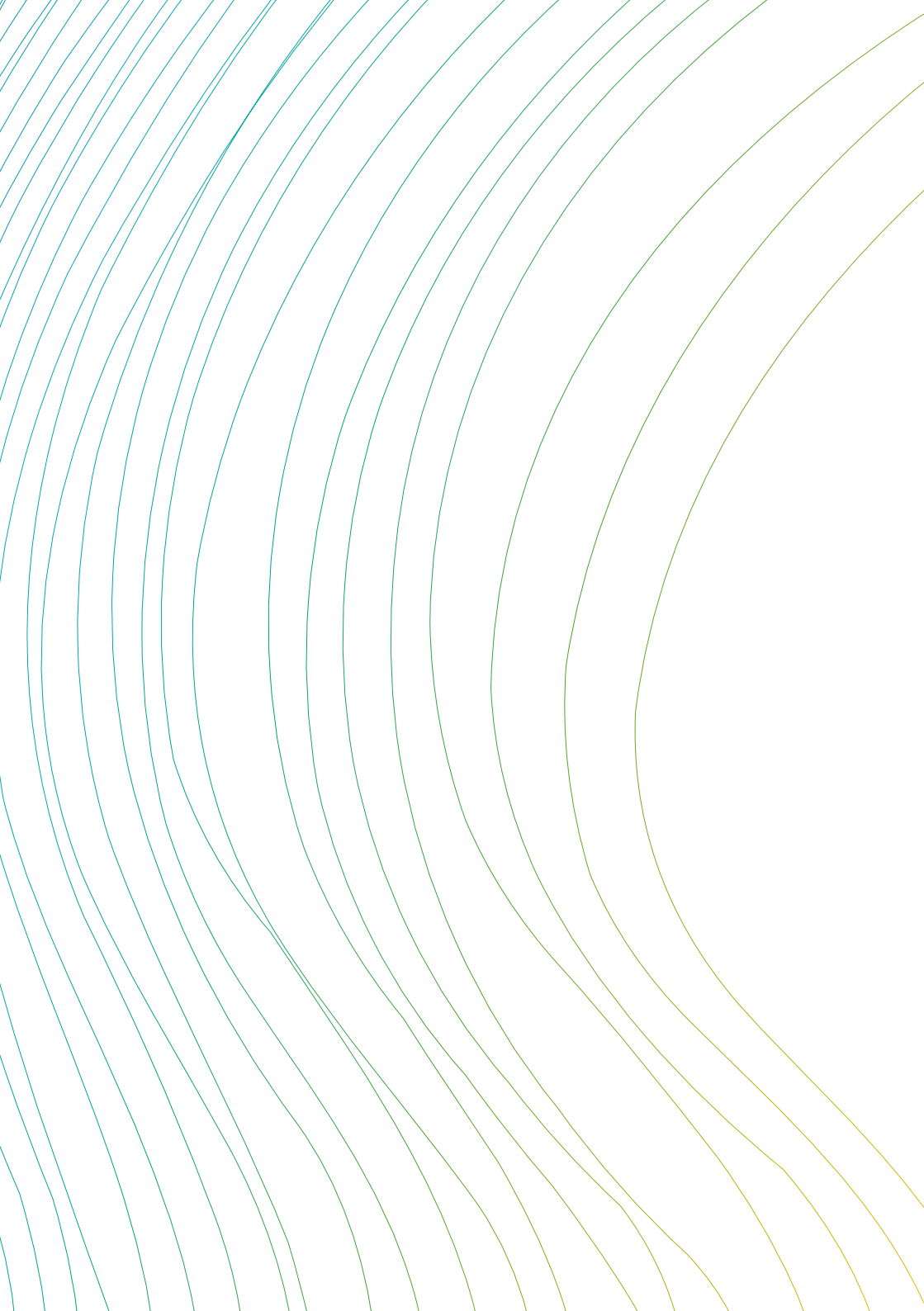
### **3.2.2.2. MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY**

Z molekulárně genetických metod se nejvíce používá polymerázová řetězová reakce (PCR). Principem je mnohonásobná amplifikace (až  $10^6$ ) specifické části izolované molekuly DNA, čímž se určí specifický gen (nebo jeho část) a takto lze identifikovat jednotlivé skupiny či druhy. Této amplifikace je dosaženo opakováním tří základních kroků: denaturace templátu (předloha DNA), hybridizace templátu se syntetickými oligonukleotidy – primery (které svojí polohou na DNA vymezují úsek, který bude amplifikován) a prodlužování primerů DNA termostabilní DNA polymerázou. Amplifikovaná DNA se detekuje elektroforézou v agarózovém gelu s ethidium bromidem a výsledky jsou dále potvrzeny autoradiografií nebo Southernovou hybridizací s následnou detekcí genů chemiluminiscenčně za použití digoxigeninového systému nebo radioaktivně značených genových sond. Pro kvantitativní detekci mikroorganismů se využívá Real Time Quantitative PCR, zkráceně RT-q-PCR. Hlavní úskalí a omezení této metody je izolace DNA ze vzorku vody, což je velmi heterogenní prostředí, a při čištění vzorků se ztrácí i cílová DNA. Přestože teoreticky je PCR schopna zachytit již 3 až 10 kopií DNA, podle praktických výsledků je dolní pracovní mez spíše stovky kopií DNA. Další problém je odlišit DNA z živých (tj. virulentních) kmenů a kmenů již mrtvých, případně částečně rozložených. Na této problematice se nyní intenzivně pracuje.

V současné době existuje mezinárodní norma na stanovení legionel ve vodním prostředí pomocí q-PCR (viz str. 81).

### **3.2.2.3. OSTATNÍ NEKULTIVAČNÍ METODY**

Z ostatních moderních metod je třeba jmenovat metodu MALDI (matrix – assisted laser desorption/ionization), která je založena na identifikaci bakterií na základě jedinečného složení proteinů. Metoda pracuje s čistými, čerstvě narostlými kulturami a je velmi rychlá a provozně levná, výsledky jsou získány do několika minut. Problémem je enormně vysoká cena přístroje, takže je evidentní, že ho mohou vlastnit jenom velká (výzkumná/referenční) centra. Dalším omezením je skutečnost, že proteinové profily jsou srovnávány s databázemi světových sbírek, tudíž lze identifikovat pouze druhy, jejichž zástupci ve sbírkách jsou. Navíc se dá předpokládat zaměření spíše na bakteriální izoláty významné klinicky či průmyslově, než na environmentální kmeny (navíc je z důvodů klinického zaměření požadovaná vysoká přesnost (spolehlivost) identifikace, která je pro environmentální kmeny hodně přísná).



## 4. MIKROBIOLOGICKÁ LABORATOŘ

### 4.1. PRACOVNÍCI

Je jisté, že dobrý pracovník je to nejcennější, co mikrobiologická laboratoř má. Podle dokumentu „Accreditation for microbiological laboratories“ (Eleftheriadou M. a kol., 2013) musí být mikrobiologické zkoušení prováděno osobou, která má ukončené mikrobiologické vzdělání, nebo pod dozorem takové osoby. Alternativně mohou tuto kvalifikaci nahradit rozsáhlé zkušenosti v odpovídajícím oboru.

Mikrobiologie vody je bohužel specializace, pro kterou neexistuje žádné komplexní vzdělání, a to ani na úrovni středních ani vysokých škol. Střední školy, na nichž je možné získat vzdělání „mikrobiologického laboranta“, jsou zdravotní školy (specializace zdravotní laborant), případně různé školy zaměřené na potravinářskou technologii. Odpovídající kvalifikaci však nelze získat na klasických středních průmyslových školách chemických. Pokud jde o vysoké školy, tak tam je situace ještě roztržštěnější, a pokud se mikrobiologie učí, tak pouze jako okrajový předmět, nebo se studuje mikrobiologie jako taková (fyziologie a molekulární biologie) s malou vazbou na ekologii a životní prostředí. V řadě případů se dříve velmi přeceňovaly „zkušenosti“ v oboru, neboť mikrobiologický rozbor se po řadu desetiletí vyvíjel minimálně a „praktické“ zkušenosti se předávaly z generace na generaci. Mnohdy však zároveň docházelo k přenosu řady různých „zlepšováků“ a nepřesností. Dnes se významně zvyšují nároky na flexibilitu pracovníků, protože se mikrobiologické metody rychle vyvíjejí. Zároveň je vyvíjen tlak na hlubší orientaci v oboru, zejména s ohledem na požadavky na validaci mikrobiologických metod a tvorbu systémů kvality práce, díky čemuž je orientace pracovníka v mikrobiologii jako takové nezbytná. V současné době je tak situace mnohdy nevyhovující – zejména v malých vodohospodářských laboratořích. Účast na odborných seminářích může vzdělání pouze doplnit, nikoliv však nahradit. Navíc současná hektická doba, kdy se vše má tendenci dělat co nejrychleji

a nejlevněji (tj. cestou co nejmenšího odporu), výchově úzce zaměřených specialistů značně nesvědčí. V každém případě by měl samostatně pracující v mikrobiologické laboratoři ovládat základy fyziologie mikroorganismů (včetně metabolismu a růstových vlastností) a taxonomie.

## 4.2. ZAŘÍZENÍ MIKROBIOLOGICKÉ LABORATOŘE

Mikrobiologická laboratoř má svoje specifika, daná charakterem mikrobiologické práce, kterými se významně odlišuje od ostatních laboratoří, např. chemických. V první řadě se jedná o nezbytnost aseptické práce, a proto je nutné oddělit mikrobiologii od ostatních prostor. Dále je třeba zajistit takový provoz, aby vzorek bylo možno zpracovat co nejdříve, ve výjimečných případech maximálně do 24 hodin po odběru. Je proto nutné zajistit dokonalou koordinaci odběru vzorku a jeho průchodu „příjmem“ vzorku do mikrobiologické laboratoře, aby se zamezilo jakémukoliv prodlení a zejména jakémukoliv pobytu vzorku mimo chlazený prostor (chladicí brašny, resp. lednice) s monitoringem teploty. Zároveň je nutné mít na paměti, že analýzu vzorku prakticky nelze zopakovat.

### 4.2.1. Prostory

Mikrobiologická laboratoř by měla mít k dispozici minimálně následující oddělené prostory, zahrnující prostory jak zkušební, tak pomocné.

- 
- a. Příjem a úprava vzorků – tyto prostory mohou být společné s dalšími laboratořemi (např. chemickou či biologickou), je však nutné organizačně zajistit bezodkladné uvědomění mikrobiologa o příjmu vzorků na mikrobiologické analýzy.
- 
- b. Přípravná laboratorního skla a kultivačních médií
- 
- c. Vlastní laboratoř pro práci s infekčním materiálem – je nutné veškeré činnosti, jako např. příprava vzorků, analýzy pitných a odpadních vod, očkování vzorků, odečítání vzorků atd., oddělit prostorově, v případě malých laboratoří alespoň časově. Pokud se vlastní laboratoř sestává pouze z jedné místnosti, lze využít pro oddělení činností digestoře, laminární boxy apod.



---

d. Prostor pro dekontaminaci vzorků

---

e. Umývárna – lze využívat společně pro ostatní laboratoře pouze v případě, že k mytí přichází již dezinfikované nádoby a mytí se provádí zásadně odděleně.

---

f. Pomocné prostory – administrativní zóny, sklady, sociální zařízení včetně sprch, šatny atd.

Měl by být k dispozici dostatečný prostor, který umožní udržovat pracovní oblasti v čistotě a v pořádku. Potřebný prostor by měl být v souladu s objemem a strukturou prováděných analýz. Doporučuje se, aby na každého analytika připadalo asi 20 m<sup>2</sup> plochy všech prostor určených ke zkoušení. Je třeba zajistit, aby v průběhu zkoušení byl přístup do prostor určených ke zkoušení omezen pouze na osoby, jejichž přítomnost provedení zkoušek vyžaduje.

Pracovní místnosti by měly být odpovídajícím způsobem větrány a měly by mít vhodnou teplotu. Při použití klimatizace by měly být použity vhodné filtry, které je nutno kontrolovat, udržovat a vyměňovat v závislosti na typu prováděné činnosti.

Pro snížení kontaminace jsou nutné hladké povrchy stěn, stropů, podlah a pracovních ploch (nejsou vhodné dlaždice), stěny by měly být omyvatelné minimálně do 2 metrů výšky. V laboratořích by nemělo být žádné hrubé nebo holé dřevo, žaluzie by měly být instalované zvenku (pokud jsou zevnitř, měl by k nim být snadný přístup z důvodu jejich čištění). Stropy by měly být v ideálním případě hladké s osvětlovacími tělesy v jedné rovině se stropem. Okna a dveře musí být v průběhu zkoušení vzduchotěsně uzavíratelné, aby se omezil průvan na minimum; kromě toho musí být projektovány bez nepřístupných míst, kde by se hromadil prach, a tak se znesnadnilo jejich čištění. Prostředí mikrobiologické laboratoře musí být pravidelně monitorováno (viz kap. 4.2.3.).

Tento seznam není zdaleka vyčerpávající, podrobnější informace lze nalézt v dokumentu „Accreditation for microbiological laboratories“ (Eleftheriadou a kol., 2013), v publikaci Häusler (1994) nebo v normách ČSN EN ISO 8199 (757810) a ČSN ISO 7218 (56 0103) Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné pokyny pro mikrobiologické zkoušení.

## 4.2.2. Zařízení

Požadavky na přístrojové vybavení jsou jednoznačně determinovány typem prováděných zkoušek. V každém předpisu (norma, standardní operační postup atd.) je uveden seznam přístrojů a zařízení, které jsou ke správnému provedení zkoušky nezbytné.

Mezi běžné přístrojové vybavení mikrobiologické laboratoře patří inkubátory, chladničky, případně mraznička, parní a horkovzdušné sterilizátory, UV zářivka, zařízení na membránovou filtraci, zařízení na anaerobní kultivaci, váhy, destilační přístroj, pH metr, laminární boxy, mikroskop a vodní lázeň. Je třeba mít dostatečný počet výše uvedených přístrojů (např. zvláštní ledničku na živná média a zvláštní na infekční materiál, dostatečný počet inkubátorů apod.) a zároveň je třeba mít i určitou provozní rezervu, nebo alespoň připravené (a dokladované) řešení pro případ výpadku. Pro každé zařízení musí být zpracován (a dodržován) plán údržby, kalibrace a verifikace výkonu (v některých případech i za pomoci servisních organizací). Příklady kontrol a údržby vybraných zařízení jsou uvedeny v *tabulce 2*. Všechna použitá měřidla (teploměry, závaží apod.) musí být buď kalibrována, nebo navázána na kalibrovaný etalon.

**Tabulka 2.** Příklady údržby a revizí vybraných přístrojů (nejsou zde uvedeny speciální přístroje používané na metody molekulární biologie)

Zařízení	Kalibrace/ Kontroly	Údržba
<b>Inkubátory (termostaty)</b>	ověření a kontrola rozložení teploty uvnitř přístroje každodenní kontrola teploty	měsíčně čištění a dezinfekce vnitřních povrchů
<b>Parní sterilizátory (autoklávy)</b>	jednou ročně bezpečnostní revize servisním technikem, měsíčně kontrola účinnosti sterilizace pomocí bioindikátorů, kontrola pojistného ventilu. jedenkrát za 3 roky proškolení personálu o obsluhu tlakových nádob.	měsíčně (nebo častěji podle potřeby) výměna vody a vyčištění
<b>Germicidní (UV) zářivka</b>	podle frekvence používání pravidelná kontrola účinnosti pomocí kmenů rodu <i>Serratia rubidae</i>	

Zařízení	Kalibrace/ Kontroly	Údržba
<b>Váhy</b>	váhy musí být umístěny na stabilní horizontální podložce a musí být chráněny před vibracemi jednou ročně kontrola servisním technikem, při každém použití kontrola nuly a odečet proti kontrolnímu závaží	po každém použití vyčištění
<b>Zařízení pro anaerobní kultivaci</b>	při každém použití kontrola anaerobní atmosféry (indikátor)	po každém použití vyčištění a dezinfekce
<b>Chladnička nebo chladič box</b>	monitoring teploty mini/maximálním teploměrem, nebo zařízením na průběžný monitoring teploty	měsíčně čištění a dezinfekce vnitřních povrchů
<b>Lázeň s teplotou řízenou termostatem</b>	kalibrace teploty	při každém použití kontrola úrovně hladiny vody  měsíčně (nebo častěji podle potřeby) výměna vody a vyčištění
<b>Horkovzdušný sterilizátor</b>	kontrola výšky a rovnoměrnosti teploty maximálním teploměrem	pravidelné čištění
<b>Přístroj k měření pH</b>	kalibrace podle pokynů výrobce pomocí dvou tlumivých roztoků při každém použití	pravidelná údržba elektrod
<b>Destilační přístroj</b>	kontrola kvality destilované vody (elektrická konduktivita, pH)	pravidelné čištění a odstraňování vodného kamene
<b>Deionizační přístroj na přípravu demineralizované vody, jednotka reverzní osmózy</b>	kontrola kvality výstupní vody (elektrická konduktivita, pH, případně mikrobiální kontaminace)	
<b>Počítačka kolonií</b>	ověření přesnosti počítání (alespoň interní kontrola)	ročně

Veškeré vybavení (pipety, Petriho misky, zkumavky, očkovací kličky apod.) přicházející do styku se vzorkem určeným na mikrobiologickou analýzu musí být sterilní. Zároveň musí být všechny tyto předměty čisté, beze zbytků detergentů a dezinfekčních prostředků, které by mohly negativně ovlivnit kultivaci mikroorganismů. Čistota a sterilita musí být pravidelně kontrolována. Odměrné předměty je nutno kalibrovat, případně alespoň ověřit jejich přesnost (vážkovou analýzou, minimálně jedenkrát ročně). Podrobné informace jsou uvedeny v publikaci Häusler (1994). Současný trh nabízí řadu plastového již sterilního nádobí s certifikátem kvality, což zejména u větších laboratoří může významně zvýšit produktivitu práce.

### 4.2.3. Prostředí mikrobiologické laboratoře

Prostředí mikrobiologické laboratoře se musí udržovat v naprosté čistotě, aby nemohly být ovlivňovány výsledky zkoušek. Do prostorů mikrobiologických laboratoří musí být zamezen přístup všem nepovolaným osobám, aby se zamezilo zvýšené kontaminaci. Samozřejmostí je každodenní úklid „na mokro“ s pravidelným používáním dezinfekčního prostředku. Plán úklidu musí být zpracován včetně takových detailů, jako je četnost čištění např. osvětlovacích těles, vnitřních rolet apod.

Musí být zajištěna pravidelná údržba a opravy podlah, stěn, povrchů laboratorních stolů a nábytku s cílem odstranit trhliny (praskliny), které mohou zachycovat nečistotu a stát se tak zdrojem kontaminace.

Veškerý infekční materiál musí být okamžitě likvidován (sterilizace, dekontaminace chemickými prostředky nebo použití speciálních boxů na infekční materiál). V laboratoři by měla být udržována a kontrolována (zejména v teplých měsících) relativně stálá teplota, zároveň je však nutné minimalizovat otevírání oken při práci. Prostor a ovzduší v laboratoři je třeba pravidelně (nejlépe v nočních hodinách) dezinfikovat UV zářením (germicidní zářivkou po dobu 30 minut). Germicidní zářivka nesmí být zapnuta v přítomnosti pracovníků, neboť přímé UV záření (zejména krátkovlnné) vyvolává řadu zdravotních potíží.

Čistota prostředí všech prostorů laboratoře musí být pravidelně monitorována. Laboratoř si vypracuje plán kontrol, požadovanou úroveň kontaminace a nápravná opatření v případě nevyhovujících výsledků. Výsledky by měly být vyhodnoceny a dokumentovány.

Běžné plány zahrnují kontroly laboratoře metodou „spadu“ (sedimentační metoda). Provádí se tak, že Petriho misky s nalitým neselektivním kultivačním médiem (např. agar s tryptózou a kvasničným extraktem) se umístí na exponovaná místa v laboratoři, sejmu se z nich víčka a nechají se otevřené po dobu 15 minut. Potom se kultivují 48 hodin při teplotě 36 °C. Tato kontrola by měla být prováděna při běžném provozu laboratoře, nikoliv po generálním úklidu a dezinfekci. Mikrobiální denzita by neměla být při 15minutové expozici větší než jedna kolonie na Petriho misku o průměru 10 cm (tj. 160 KTJ/m<sup>2</sup>). Kratší doba expozice se nedoporučuje. V případě nevyhovujících výsledků je třeba provést mimořádný úklid a dezinfekci, případně najít zdroj kontaminace.

Pravidelné kontroly laboratoře pomocí stěrů (otření vybrané plochy tampónem a jeho následná kultivace ve většinou selektivním kultivačním médiu) nejsou v běžné vodohospodářské laboratoři nutné, je však dobré mít je zahrnuty jako pomocné kontroly v případě hledání zdrojů možné kontaminace (zvýšená kontaminace vzduchu, menší havárie – např. rozlití infekčního materiálu apod.).

#### 4.2.4. Bezpečnost práce v mikrobiologických laboratořích

Bezpečnost práce v mikrobiologických laboratořích se řídí národními právními předpisy, laboratoře je však musejí mít zpracované s ohledem na vlastní podmínky. Pokud laboratoře provádějí stanovení legionel a pracují s jejich čistými kulturami (včetně kontrolních kmenů), je nezbytné splnit ohlašovací povinnost na SÚJB (Státní úřad pro jadernou bezpečnost) pro nakládání s rizikovými biologickými agens a toxiny se všemi náležitostmi.

Mikrobiologická laboratoř je infekční prostředí a to i v případě, že se v ní provádějí pouze analýzy pitných vod. Při jakémkoliv způsobu kultivace totiž dochází k pomnožení mikroorganismů z jedné buňky až na miliardové hodnoty (1 ml běžné bujónové kultury 24 hodin staré obsahuje průměrně 10<sup>9</sup> buněk!!!). Tyto koncentrace mnohonásobně převyšují tzv. minimální infekční dávky, nutné k infikování zdravého člověka. Nejčastější způsob infikace mikrobiologa je proniknutí pomnožené kultury do drobných povrchových zranění kůže (záděry, puchýře apod.). Proto je nutné v mikrobiologické laboratoři klást vysoké požadavky na bezpečnost práce. Zde jsou uvedeny pouze hlavní vybrané zásady:

- Do mikrobiologické laboratoře mají přístup pouze pověřeni pracovníci, ostatní osoby jen v jejich doprovodu po povolení vedoucího oddělení (nebo jeho zástupce).
- Do laboratoře je povolen vstup pouze v pracovním oděvu, který je nutno pravidelně čistit a dezinfikovat, a po přezutí.
- V laboratoři je nutno dodržovat úzkostlivou čistotu a pořádek, pracovní plochy musí být bezprostředně před prací a po skončení práce umyty a dezinfikovány.
- Je nutné zabránit vzniku aerosolů.
- V laboratoři smějí být pouze předměty nutné k mikrobiologické práci, nesmějí zde být osobní předměty pracovníků, záclony, květiny, zvířata apod.
- Bezprostředně před prací a po práci je nezbytné důkladné umytí rukou, případně použití dezinfekčního prostředku (musí být k dispozici u umyvadla).
- Při inokulaci je třeba vyhnout se mluvení, kašlání apod.
- Jakékoliv poranění nebo jinou nehodu hlásit vedoucímu laboratoře, případně jeho zástupci. Při jakémkoliv poranění rukou lze pracovat pouze s ochrannými rukavicemi. Pro pipetování infekčních vzorků je nutné používat pouze jednorázové nebo automatické pipety nebo pipety s nástavcem. V žádném případě nepipetovat ústy.
- V případě potřísnění pracovních stolů nebo podlah bakteriální kulturou je třeba postižené místo dezinfikovat a poté provést mimořádnou kontrolu čistoty či sterility (např. metodou sčtu).
- Lékárna musí kromě běžného vybavení navíc obsahovat dezinfekční prostředky na rány (manganistan draselný, peroxid vodíku apod.), dále živočišné uhlí, kyselinu askorbovou pro dezinfekci úst a roztok na výplach očí.
- V mikrobiologické laboratoři je zakázáno jíst, pít a kouřit. Potraviny určené ke konzumaci pracovníky se nikdy neukládají do laboratorních chladniček.

## 5. CHARAKTERISTIKY JEDNOTLIVÝCH

### UKAZATELŮ A METODY JEJICH STANOVENÍ

Tato kapitola je rozdělena na tři části. První dvě části (5.1. a 5.2.) se zabývají indikátorovými organismy, část 5.3. se zabývá patogenními mikroorganismy.

Indikátorové organismy jsou používány k různým účelům, především k:

- kontrole kvality vody (surové, upravované, upravené),
- kontrole účinnosti procesů úpravy vody (filtrace, dezinfekce apod.),
- kontrole stavu distribuční sítě.

## 5.1. ORGANOTROFNÍ MIKROORGANISMY

### 5.1.1. Charakteristika a taxonomie

Jak již bylo uvedeno v kap. 2., jakékoliv vodní prostředí je běžně oživeno nespécifickou mikroflórou. Protože prokaryotní organismy mají mnohem rozmanitější metabolismus než eukaryota, je v následující *tabulce 3* uveden stručný přehled, z něhož vyplývá, že skupina, která se stanovuje jako ukazatel „počty kolonií“, spadá do skupiny organotrofních (přesněji chemoorganotrofních, resp. chemoorganoheterotrofních) bakterií. Skupiny jsou to umělé a uzanční a zahrnují stanovení bakterií vyskytujících se ve vodním prostředí bez ohledu na to, zda se jedná původem o alochtonní či autochtonní mikroflóru. Jako zdroj energie a uhlíku (a dusíku) využívají zásadně organické látky. Laboratorně se kultivují na komplexním médiu. K nejběžnějším bakteriím organicky znečištěných vod patří např. druhy rodů *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, dále se zde vyskytují zástupci čeledí *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* a další. Mohou se vyskytovat i zástupci rodu *Acinetobacter*. Výsledky stanovení kultivovatelných mikroorganismů nemusí korelovat s výsledky stanovení indikátorů fekálního znečištění.

Na předepsaném komplexním médiu s kvasničným extraktem mohou růst také zástupci mikromycet, patřících do říše houby, *Fungi* (tj. kvasinky a plísňe), což jsou ale již eukaryota (obr. 1).

**Tabulka 3.** Rozdělení prokaryotních mikroorganismů do skupin podle zdrojů uhlíku a energie

Zdroj energie	Substrát donorů elektronů		Zdroj uhlíku	
	anorganický	organický	oxid uhličitý	organické sloučeniny
<b>Světlo</b>	<i>Foto-litotrofové</i> (využívají H <sub>2</sub> S, H <sub>2</sub> O, H <sub>2</sub> , S)	<i>Foto-organotrofové</i> (využívají sukcinát, acetát)	<i>Fotolito-autotrofové</i> (některé purpurové a zelené bakterie)	<i>Fotoorgano-heterotrofové</i> (např. <i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodospirillum</i> apod.)
<b>Chemické látky</b>	<i>Chemo-litotrofové</i> (využívají H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S, NH <sub>3</sub> , Fe <sup>2+</sup> , NO <sub>2</sub> )	<i>Chemo-organotrofové</i> (využívají mnoho organických substrátů)	<i>Chemolito-autotrofové</i> (vodíkové bakterie, bezbarvé sírné bakterie, nitrifikační bakterie, železité bakterie, metylotrofní bakterie; metanogenní <i>Archaea</i> )	<i>Chemoorgano-heterotrofové</i> (většina bakterií)

## 5.1.2. Metody stanovení organotrofních mikroorganismů

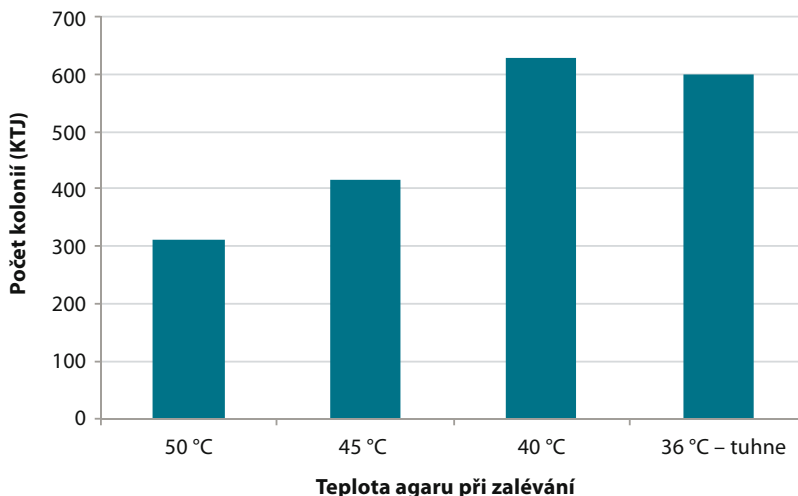
Organotrofní mikroorganismy se stanovují jako kultivovatelné mikroorganismy, tj. stanovení počtu kolonií očkovaním do živného agarového média s tryptonem a kvasničným extraktem (podle ČSN EN ISO 6222), viz obr. 8. Protože tyto mikroorganismy nejsou žádná jednoznačně taxonomicky ohraničená skupina, jejich stanovení je zcela zásadně ovlivněno složením použitého kultivačního média, kultivační teplotou a dobou kultivace. Dříve se organotrofní bakterie stanovovaly jako mezofilní (kultivace při (37 ± 1) °C) a psychrofilní (kultivace při (20 ± 1) °C) na nutričně velice bohatém živném agaru s peptonem, masovým extraktem a chloridem sodným (masopeptonový agar, živný agar č. 2).



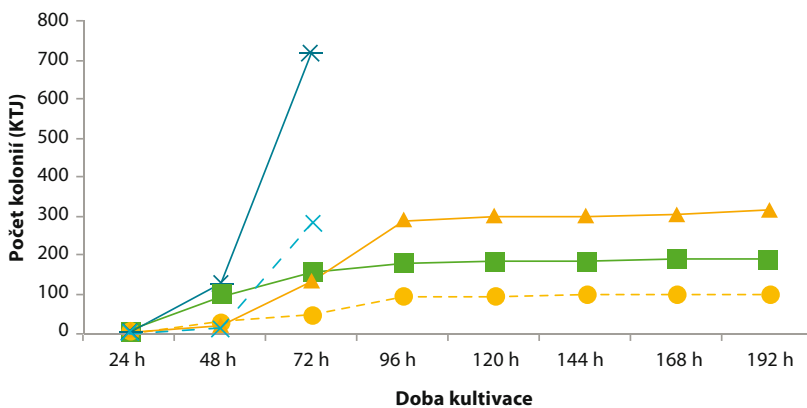
Počty kolonií se stanovují přímým výsevem 1 ml neředěného (nebo ředěného vzorku) do roztopeného kultivačního média (9.1.1.), zchladlého na 45 °C. Kultivace při (36 ± 2) °C probíhá (44 ± 4) hodiny, kultivace při (22 ± 2) °C probíhá (68 ± 4) hodin. Při stanovení organotrofních mikroorganismů je nezbytné přesně dodržovat všechny pracovní postupy a přísně kontrolovat kvalitu práce.

Mezi nejčastější možné zdroje nepřesností patří:

- Nedodržení pokynů ohledně transportu, uchování vzorků před analýzou a příprava vzorků k vlastním analýzám.
- Použití kultivačního média odlišného složení, než je předepsáno normou.
- Vysoká teplota roztopeného kultivačního média při zalévání vzorku. Vliv zalévací teploty na záchyt kultivovatelných mikroorganismů je na obr. 6. Z tohoto obrázku vyplývá, že i teplota 45 °C, která je předepsána v normě, je vyšší než optimální pro růst mikroorganismů.
- Nedostatečné promísení roztopeného kultivačního média se vzorkem při zalévání.
- Při analýzách povrchových vod použití nedostatečně dlouhé ředící řady, popř. vyhodnocení nesprávného stupně ředění.
- Při odečítání výsledků nepoužití 5–6krát zvětšující lupy a bočního osvětlení, což může vést k přehlédnutí drobných kolonií. V některých případech (zejména při intenzivnějším promíchávání kultivačního média před zalitím vzorku) může dojít ke vzniku malých bublinek, které je třeba odlišit od drobných kolonií.
- Při odečítání výsledků (zejména u neředěných vzorků pitné vody) zaměňování výrazů „nepočítatelné“ (tj. stav, kdy na plotně vyrostlo více než 300 na kolonií, a nelze je tedy buď přesně spočítat, nebo je jejich nárůst tak vysoký, že jsou velmi těsně u sebe, a navzájem se tak metabolicky ovlivňují, což je znevýhodňuje) a „přerostlé“ (tj. stav, kdy došlo k nárůstu „plazivých“ kolonií, zejména sporulujících kmenů rodu *Bacillus*, a kdy i jejich malý počet přerostl plotnu tak, že ji nebylo možno vyhodnotit).
- Nedodržení správné doby inkubace. Významné chyby způsobuje především kratší doba inkubace (obr. 7).
- Nedodržení předepsané teploty inkubace.



**Obr. 6.** Vliv teploty agaru při zalévání (50–36 °C) na počet kultivovatelných mikroorganismů (KTJ/ml)



**Obr. 7.** Změny počtů kultivovatelných mikroorganismů (počty kolonií při 22 °C) během kultivace u pěti vzorků (jednotlivé vzorky představují různé šrafované čáry)

Mikroorganismy, tvořící plazivé kolonie (zejména rod *Bacillus*), nejsou typickými „vodními“ mikroorganismy. Jejich zvýšený výskyt se objevuje zejména u mělkých studen a povrchových vod, ovlivněných splachy z půdy. Další skupina bakterií, tvořící rozsáhlé kolonie (připomínající kolonie mikromycet), které mohou přerůst i celou kulturační plotnu, jsou vláknité bakterie – aktinomycety (obr. 9).

I tyto bakterie pocházejí především z půdního prostředí, jsou velice rozšířeny, významně se podílejí na rozkladu organických látek a mohou produkovat řadu látek s antibiotickými účinky. Mohou růst i při nižších teplotách a vyskytují se tak především při stanovení kultivovatelných mikroorganismů při  $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .



**Obr. 8. a 9.** Stanovení počtů kolonií (vlevo) a vzorek s růstem aktinomycety (vpravo) na agaru s tryptonem a kvasničným extraktem

### Stanovení mikromycet

V pitných a surových vodách se stanovení mikromycet (plísni a kvasinek) standardně neprovádí (a není na ně k dispozici žádná platná technická norma). Kromě jejich částečného zachytu při stanovení kultivovatelných mikroorganismů (počtů kolonií při  $22 ^\circ\text{C}$ ) mohou být zaznamenávány jako součást mikroskopického obrazu (hydrobiologický rozbor), který však neprokáže jejich vitalitu. Dále je možné na stanovení mikromycet použít nějakou metodu podle technické normy z příbuzných oborů (mikrobiologie potravin a krmiv, mikrobiologie ovzduší apod.). Plísně a kvasinky se kultivují aerobně na různých médiích (Sabouraudův agar, Czapek Dox agar – viz obr. 10, Czapek Dox agar s bengálskou červení, agar se sladidlovým (malt) extraktem apod.), většinou 5–7 dní při teplotě  $25\text{--}30 ^\circ\text{C}$ . Identifikaci provádí mikroskopicky na barvených preparátech (celkové zvětšení mikroskopu 400–1000krát) specializovaný odborník, neboť je to záležitost relativně složitá. Pro klasifikaci je třeba zachytit rozmnožovací stádium, a to buď pohlavní (gametangia), nebo alespoň nepohlavní (spory, konidie, sporangia). Obě stádia se od sebe významně liší, v řadě případů jsou popsána jako samostatně platný taxon (ale tato skutečnost se nyní reviduje a pokud možno eliminuje).



**Obr. 10.** Stanovení mikromycet – mikroskopický obraz rodu *Cladosporium* (vlevo), růst mikromycet na Czapek – Dox agaru (vpravo)

### 5.1.3. Organotrofní mikroorganismy ve vodním prostředí

Organotrofní mikroorganismy, stanovené jako počty kolonií při 22 °C, resp. 36 °C, tvoří malou část celkového počtu bakterií (viz kap. 2.) a mají jen omezený hygienický význam. Jedná se o všudypřítomné bakterie, kterých člověk denně přijímá do organismu např. s potravou o několik řádů vyšší počty, než může být maximální příjem z pitné vody, a tato expozice nevede k žádným nepříznivým zdravotním účinkům. Nepříjemnosti, plynoucí z pomnožení organotrofních bakterií ve vodě, mohou být především zhoršení organoleptické kvality vody (narůst počtů kolonií může indikovat růst biofilmu a tvorbu produktů ovlivňujících sensoriku vody) a dále vyšší riziko kažení potravin připravovaných z takové vody, případně zkreslování výsledků mikrobiologického rozboru závažnějších ukazatelů (např. stanovení *E. coli* a koliformních bakterií podle ČSN EN ISO 9308-1, viz kap. 5.2.1.2.). Některé aktinomycety (převážně druhy rodů *Nocardia* a *Streptomyces*) jsou významnými producenty látky geosminu, která způsobuje zatuchle zemité zápach vody.

Z potenciálně patogenních mikroorganismů se mohou mezi ukazatelem „organotrofní mikroorganismy“ vyskytovat druhy rodů *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Serratia*, *Pseudomonas* a *Xanthomonas*.

Zvýšený počet organotrofních mikroorganismů většinou signalizuje znečištění vodního zdroje z vnějšího prostředí, a to buď přímo buňkami mikroorganismů, nebo organickými látkami, na nichž se mohou tyto mikroorganismy pomnožit. Pomnožování organotrofních mikroorganismů ve vodě a v distribuční síti ovlivňuje řada faktorů, mezi které patří: původní počet organotrofních bakterií ve zdroji, doba zdržení vody v síti a s ní související faktory, jako jsou teplota vody, rychlost proudění vody, zbytková koncentrace a druh dezinfekčního prostředku, přítomnost biofilmu či korozních produktů na stěnách potrubí a sedimentu na dně potrubí, kvalita materiálu rozvodné sítě a hlavně tzv. stabilita vody (značí přítomnost bakteriemi využitelných živin) měřená např. pomocí ukazatelů asimilovatelný organický uhlík (AOC), případně biodegradabilní organický uhlík (BDOC). Spory mikromycet (plísní) jsou považovány za indikátor vzdušné kontaminace pitné vody ve vodojemech a významně se podílejí na degradaci kvality pitné vody tím, že jsou substrátem pro další troficky závislé mikroorganismy a podílejí se na spotřebě dezinfekčního přípravku.

Z výše uvedených důvodů mají tyto ukazatele především provozní význam při monitorování účinnosti filtrace a dezinfekce vody (včetně validace a verifikace těchto procesů úpravy), při monitorování stavu podmínek a změn distribuční sítě, včetně domovních rozvodů vody apod. Proto došlo ke změně právních předpisů a ve vyhlášce o pitné vodě (č. 252/2004 Sb., ve znění pozdějších předpisů, v návaznosti na změny ve Směrnici EU) jsou uvedeny hodnoty 200 KTJ/ml (pro počty kolonií při 22 °C) a 40 KTJ/ml (pro počty kolonií při 36 °C) pouze jako doporučené a jako mezní hodnota je uvedeno hodnocení „bez abnormálních změn“. Pokud u zásobované oblasti nelze pro malý počet vzorků určit, zda se jedná o abnormální změny (jako minimum pro hodnocení je nutná existence sedmi hodnot v období ne delším než 3 roky), platí doporučené hodnoty 200 KTJ/ml (pro počty kolonií při 22 °C) a 40 KTJ/ml (pro počty kolonií při 36 °C) jako mezní. Pro malé nedezinfikované zdroje produkující méně než 5 m<sup>3</sup>/den, pro náhradní zásobování a pro vodu dodávanou ve vzdušných, vodních a pozemních dopravních prostředcích platí doporučené hodnoty 500 KTJ/ml (pro počty kolonií při 22 °C) a 100 KTJ/ml (pro počty kolonií při 36 °C). Vyhodnocení, co je a co není abnormální změna, jsou záležitostí provozovatelů, kteří nejlépe znají svůj systém zásobování. Státní zdravotní ústav k tomu vypracoval metodické doporučení (Kožíšek a kol., 2014) dostupné na adrese: <http://szu.cz/tema/zivotni-prostredi/pitna-voda>. Důležitá není jen abnormální náhlá změna mimo obvykle se vyskytující rozmezí hodnot počtů kolonií, ale také setrvalý rostoucí trend. I to by mělo být považováno za rizikový faktor a potenciálně nepřijatelný stav, který si vyžaduje vyšetření příčin, případně přijetí nápravného opatření.

## 5.2. INDIKÁTORY FEKÁLNÍHO ZNEČIŠTĚNÍ

### 5.2.1. Koliformní bakterie

#### 5.2.1.1. CHARAKTERISTIKA A TAXONOMIE

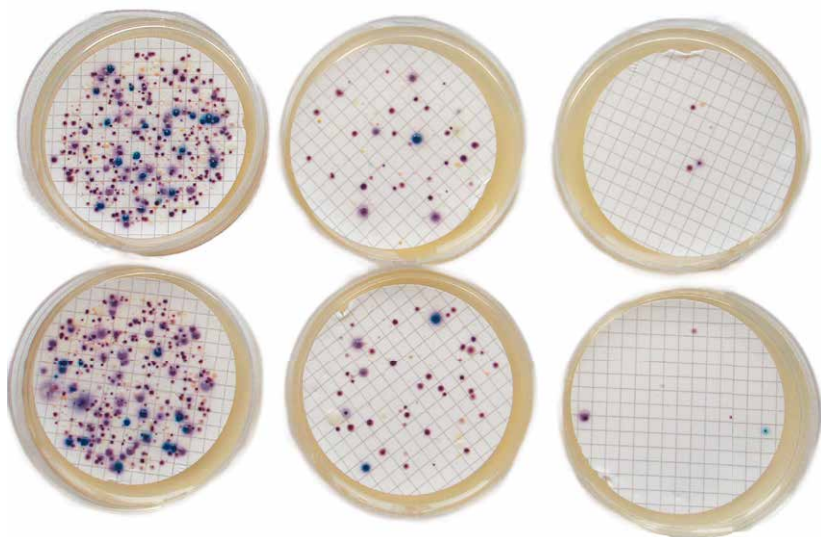
Koliformní bakterie byly tradičně definovány jako gramnegativní nesporulující tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae*, schopné růst a fermentovat laktózu za současné tvorby kyseliny, popř. aldehydu při 36 °C za aerobních či fakultativně anaerobních podmínek v selektivním prostředí žlučových solí (či jiných povrchově aktivních látek s podobnými, růst inhibujícími vlastnostmi) a nevykazující cytochromoxidázovou aktivitu. Nejedná se tedy o taxonomickou skupinu, neboť u řady druhů nefermentuje laktózu 100 % kmenů. Podle 9<sup>th</sup> Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) fermentuje laktózu ve více než 90 % kmenů řada druhů z čeledi *Enterobacteriaceae* (*Butiauxella agrestis*, 5 druhů rodu *Enterobacter*, 6 druhů rodu *Erwinia*, *E. coli*, 3 druhy rodu *Klebsiella*, *Kluyvera ascorbata* a *K. cryocrescens*, *Leclercia adecarboxylata*, *Rahnella aquatilis*, *Moellerella wisconsensis* a 2 druhy rodu *Serratia*). Další 4 druhy fermentují laktózu v 79–89 % a 18 druhů fermentuje laktózu v 25–75 % (včetně řady druhů rodu *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* či *Yersinia*).

Nové metody stanovení koliformních bakterií využívají ke stanovení koliformních bakterií enzymatickou reakci: aktivitu  $\beta$ -D-galaktosidázy, což je první enzym, který se účastní při utilizaci laktózy, štěpí laktózu na galaktózu a glukózu, které dále mohou být fermentovány. Bakteriální kmeny, které fermentují laktózu na kyselinu, resp. aldehyd, musí mít aktivní enzym  $\beta$ -D-galaktosidázu, zatímco všechny kmeny, které jsou  $\beta$ -D-galaktosidáza pozitivní, nemusí fermentovat laktózu až na kyselinu či plyn. Stanovení koliformních bakterií na základě testu  $\beta$ -D-galaktosidázy tak zahrnuje významně širší skupinu mikroorganismů, což dále posunuje skupinu koliformních bakterií od indikace fekálního k obecnému znečištění. Kromě rodů a druhů, uvedených v předchozím odstavci, u nichž pouze některé kmeny laktózu fermentují, ale vždy vykazují aktivitu  $\beta$ -D-galaktosidázy, existuje další skupina (podle 9<sup>th</sup> Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 29 druhů z čeledi *Enterobacteriaceae* (zahrnující rody *Cedecea*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Pantoea*, *Yersinia*), které i když jsou v 90 až 100 % kmenů  $\beta$ -D-galaktosidázapozitivní, laktózu prakticky nikdy nefermentují.

### 5.2.1.2. METODY STANOVENÍ KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ

#### Stanovení koliformních bakterií podle ČSN EN ISO 9308-1

Metoda stanovení koliformních bakterií podle normy ČSN EN ISO 9308-1 je určena pro pitné vody, zejména dezinfikované, s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry, pokud obsah nerozpuštěných látek a doprovodná mikroflóra neruší membránovou filtraci, kultivaci a stanovení počtu kolonií. Metoda má velmi nízkou selektivitu, a proto umožňuje také stanovení fyziologicky poškozených bakterií. Kvůli nízké selektivitě však růst doprovodné mikroflóry, zvláště u nedezinfikovaných vod, toto stanovení hodně komplikuje.



**Obr. 11.** Stanovení *E. coli* a koliformních bakterií na CCA agaru

Koliformní bakterie a *E. coli* se stanovují membránovou filtrací na filtrech o porozitě 0,45  $\mu\text{m}$  (většinou se filtruje objem 100 ml vzorku). Filtr se umístí na chromogenní médium (Chromogenic Coliform Agar, dále CCA) a kultivuje se ( $24 \pm 3$ ) hodiny při ( $36 \pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$ . CCA médium je běžně komerčně dostupné a jeho složení je uvedeno v kap. 9.2.1. Jeho příprava je velmi jednoduchá. Naváží se příslušné množství prášku, resp. granulí, a rozpustí se v destilované vodě. Nepřidávají se žádné další přísady. Nesmí se autoklávat. Po zchlazení na 45–50  $^{\circ}\text{C}$  se agarové médium sterilně rozleje do Petriho misek. Hodnota pH má být  $6,8 \pm 0,2$  při 25  $^{\circ}\text{C}$  (podle zkušeností v laboratoři deklarovaná hodnota pH vždy odpovídala požadavkům, ale i přesto je nutné u každé šarže provést kontrolu). Médium je velmi stálé, uvařené vydrží minimálně měsíc, jen je nutná ochrana před jeho vyschnutím. Kvalita média se testuje podle normy ČSN EN ISO 11133.

Koliformní bakterie rostou jako růžové až červené kolonie, *E. coli* jako tmavě modré až fialové kolonie (viz obr. 11). Doprovodná mikroflóra roste ve formě bezbarvých kolonií. Koliformní bakterie je nutné potvrdit pomocí oxidázového testu (koliformní bakterie jsou oxidázanegativní), který norma připouští provádět přímo na membránovém filtru. Při případném přeočkování kolonií na neselektivní agar (pro další confirmaci) je nutné kolonie pečlivě přečistit, aby se vždy pracovalo s čistou kulturou (obr. 12). Pro případnou další confirmaci, resp. pro potvrzení aktivity enzymů  $\beta$ -D-galaktosidázy a  $\beta$ -D-glukuronidázy, lze využít např. ONPG test a GLR test (Erba, Lachema). Tyto testy lze využít i pro stanovení citlivosti a specifčnosti příslušných reakcí na médium CCA.

Při výpočtu výsledků je nutné mít na paměti důležitý fakt toho, že i *E. coli* patří mezi koliformní bakterie, a musí se tudíž do jejich počtu přičíst:

- počet *E. coli* = počet modrých až modrofialových kolonií,
- počet koliformních bakterií = počet růžových až červených kolonií s negativním oxidázovým testem + počet modrých až modrofialových kolonií.

Další malou, ale opticky výraznou skupinou jsou kolonie, které rostou jako tyrkysové, v některých případech velmi drobné (většinou nevyrostou po přeočkování na neselektivní agar), jindy rostou jako kolonie běžné velikosti (v průměru 1 mm). Podle firemních materiálů, např. dokument Data Sheet Chromocult Coliformen agar – simultaneous detection of coliform bacteria and *E. coli* in waters, MM u firmy Merck zveřejněných na internetu (<https://www.merckmillipore.com>) se jedná o další gramnegativní bakterie (doprovodná mikroflóra),  $\beta$ -D-glukuronidáza pozitivní. Podle praktických zkušeností v laboratoři se jednalo buď o oxidáza pozitivní kmeny, nebo o  $\beta$ -D-galaktosidáza negativní *E. coli*, případně o intermediální bakteriální kmeny ze skupiny rodů *Shigella* a *Yersinia*. V některých případech byly konfirmovány i  $\beta$ -D-galaktosidáza pozitivní kmeny.

*Mezi hlavní výhody tohoto stanovení patří:*

- Výsledky stanovení jak koliformních bakterií, tak *E. coli* jsou k dispozici již 24 hodin po naočkování a není třeba žádné další přeočkování kmenů na neselektivní agar.
- Norma připouští provedení oxidázového testu přímo po přenesení membránového filtru na podložku nasycenou oxidázovým činidlem. Kromě tak pracného přeočkování a přečišťování kolonií odpadne i následný přepoččet na původní počet presumptivních kolonií, čímž se stanovení nejenom zrychlí, ale i zpřesní.



*Nevýhody stanovení jsou:*

- Velký záchyt doprovodné mikroflóry, což znemožňuje využití k jinému než deklarovanému účelu (vody s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry).
- Na CCA agaru se mohou zachytit i bakterie, které mají sice všechny požadované vlastnosti koliformních bakterií, ale nepatří mezi ně; z vodovodního řadu byly zachyceny např. i zástupci rodu *Bacillus*. Jedná se tedy o falešně pozitivní výsledky.
- Ne vždy je vhodné používat CCA u surových vod (v případě vysokého nárůstu doprovodné mikroflóry), nicméně není logické stanovovat koliformní bakterie a *E. coli* u surové a upravené vody na médiích, založených na jiných biochemických principech ( $\beta$ -D-galaktosidáza vs. fermentace laktózy, viz výše).



**Obr. 12.** Přečištění kolonií koliformních bakterií na CCA agaru

Stanovení koliformních bakterií metodou Colilert Quanti-Tray (ČSN EN ISO 9308-2)  
Metoda Colilert Quanti-Tray je patentovaná metoda firmy IDEXX (USA), která se využívá k souběžnému stanovení koliformních bakterií a *E. coli* metodou nejpravděpodobnějšího počtu (MPN).

K průkazu koliformních bakterií, rostoucích v tekutém živném prostředí, je používán chromogenní substrát ONPG (ortho-nitro-phenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid), jež slouží k detekci enzymu  $\beta$ -D-galaktosidázy, produkované koliformními bakteriemi. Při hydrolýze ONPG tímto enzymem dochází ke změně barvy (bezbarvá na žlutou), která indikuje pozitivitu testu.

K provedení testu je potřeba:

- činidlo „Colilert“,
- validovaná odměrná nádobka na 100 ml,
- speciální multikomorový tácek (plato) Colilert Quanti-Tray (viz obr. 13),
- forma pro zakládání multikomorových táček (plat) Quanti-Tray,
- zatavovací přístroj,
- UV stínící skříňka nebo UV lampa o vlnové délce 360 až 365 nm,
- tabulka s hodnotami nejpravděpodobnějšího počtu (MPN),
- komparátor,
- termostat udržující teplotu ( $36 \pm 2$ ) °C.

Vzorek analyzované vody (nebo jeho ředění) se nalije do 100 ml odměrné nádobky, přidá se činidlo Colilert a vzorek se důkladně promíchá. Po rozpuštění činidla (asi 3 minuty) se nalije do sáčku s multikomorovým táckem (plato obsahující 51 komůrek, nebo 49 + 48 komůrek), uloží se do příslušné formy a zataví se v zatavovací přístroji. Poté se inkubuje 18 hodin ( $\pm 4$  hodiny) při 36 °C. Poté se spočítají žlutě zbarvené komůrky a pomocí tabulky s hodnotami MPN se stanoví nejpravděpodobnější počet koliformních bakterií.

*Mezi hlavní výhody této metody patří:*

- Jednoduchá manipulace a snadná práce s testy, což vede zároveň k možnosti zpracovat několikanásobně vyšší počet vzorků oproti „klasickým“ metodám.
- Kultivace mikroorganismů ve fyziologicky pro ně vhodnějším tekutém prostředí.
- Větší pracovní rozsah (nejednou lze postihnout početní rozmezí až tří řádů).

*Naopak nevýhodné jsou skutečnosti:*

- Vyšší primární investice do zařízení (zatavovačka) a významně vyšší materiálové náklady na stanovení (plata, činidla).
- Neprovádí se žádné konfirmační testy (ani cytochromoxidázový test), tudíž jsou výsledky koliformních bakterií významně nadhodnocené, zejména v letním období, kdy dochází k významnému pomnožení bakterií z rodu *Aeromonas* (při testování v laboratoři byly dosaženy takto falešně pozitivní výsledky ve 26 %, další podrobnosti z ověření této metody viz Baudišová, 2007). Z tohoto důvodu nelze metodu stanovení koliformních bakterií Colilert Quanti-Tray doporučit především pro analýzy nedezinfikovaných vod.



**Obr. 13.** Stanovení koliformních bakterií metodou Colilert Quanti-Tray

### Stanovení koliformních bakterií v nedezinfikovaných vodách

Metoda je určena zejména pro stanovení koliformních bakterií v povrchových (případně odpadních a podzemních) vodách, ale lze ji použít i pro ty pitné vody (zejména nedezinfikované), kde nadměrný růst doprovodné mikroflóry zneumožňuje použití metody podle ČSN EN ISO 9308-1. Jedná se o klasickou, během mnoha desetiletí používanou metodu, která je popsána v národní normě ČSN 75 7837. Metoda je založena na fermentaci laktózy cílovými kmeny, přičemž výsledně kyselé prostředí způsobí vysrážení bazického fuchsínu se siričitanem sodným.

Princip metody je založen na membránové filtraci vzorků na membránových filtrech o porozitě 0,45  $\mu\text{m}$  a následné kultivaci na Endo agaru s bazickým fuchsínem (9.2.2.) po dobu 24 hodin při  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Po kultivaci se provede cytochromoxidázový test. Membránový filtr s narostlými koloniemi se přenese na filtrační papír nasycený činidlem pro cytochromoxidázu (9.3.2.). Cytochromoxidáza pozitivní kolonie do 2 minut zmodrají. Činidlo nesmí přijít do styku se železem.

Jako koliformní bakterie se počítají tmavočervené kolonie (s tmavou spodinou) a s negativním cytochromoxidázovým testem.

*K metodě jsou uvedeny následující poznámky:*

- Složení Endo agaru má zcela zásadní vliv na získané výsledky stanovení koliformních bakterií. Je tedy v zájmu každé laboratoře, aby si ověřila, jaký Endo agar používá, a zkontrolovala jeho složení se složením předepsaným v normě. Důležitý je zejména obsah chloridu sodného a masového extraktu, který v dalších variantách tohoto média (používaného dříve v EU, u nás zejména v klinické mikrobiologii) zcela chybí. Nevhodné varianty Endo agaru vykazují nižší záchyt koliformních bakterií a je hůře odečitatelná laktóza pozitivní reakce.

- Použití membránové filtrace pro povrchovou vodu je nezbytné zejména z toho důvodu, že je třeba v řadě případů (např. zdroje surové vody, prameniště, vodní nádrže apod.) filtrovat i větší objemy než 1 ml, aby mohly být koliformní bakterie stanoveny s dostatečnou přesností (viz meze stanovitelnosti, kap. 6.2.).

### 5.2.1.3. KOLIFORMNÍ BAKTERIE VE VODNÍM PROSTŘEDÍ

Koliformní bakterie byly dříve považovány za hlavní indikátor fekálního znečištění. V současné době je však tento význam z několika důvodů zpochybňován. Jedná se totiž o heterogenní skupinu bakterií zahrnující i druhy, které se ve fekáliích zásadně nevyskytují, jako např. *Serratia fonticola*, *Rahnella aquatilis*, *Buttiauxella agrestis* atd. Některé druhy, zejména rodů *Citrobacter* a *Enterobacter*, i když jsou původem ze zažívacího traktu člověka a teplotokrevných živočichů, přežívají ve vodním prostředí relativně dlouhou dobu a při dostatečné koncentraci organických látek se mohou dokonce i pomnožovat. Mohou se vyskytovat i ve vyšších počtech v případech, kdy další indikátory fekálního znečištění jako *E. coli* a intestinální enterokoky chybí.

Dnes jsou koliformní bakterie využívány jako relevantní indikátor pouze pro pitnou a surovou vodu, v pitné vodě může jejich výskyt poukazovat na různé technologické závady (zvýšená tvorba biofilmů, sekundární kontaminace atd.).

Problematická je detekce koliformních bakterií v soukromých studnách, které nejsou ošetřeny v právních předpisech. Legislativně předepsané metody stanovení podle norem ČSN EN ISO 9308-1 nebo ČSN EN ISO 9308-2 navíc s požadavkem negativního nálezu ve 100 ml jsou velice přísné a soukromé studny mohou jen těžko vyhovět. Byly porovnávány dva odlišné soubory výsledků koliformních bakterií v soukromých studnách ( $n = 2 \cdot 40$ ). V letech 2013 až 2014 byly koliformní bakterie testovány metodou podle ČSN 75 7837 (Endo agar) a 53,2 % výsledků vyhovovalo a 46,8 % nikoliv. U 4 % výsledků byly zjištěny hodnoty do 10 KTJ/100 ml. V letech 2015 až 2016 byly koliformní bakterie testovány metodou podle ČSN EN ISO 9308-1 (CCA) a vyhovovalo pouze 29,8 % výsledků a 70,2 % nevyhovovalo (12,8 % celkových výsledků byly hodnoty 1 až 10 KTJ/100 ml). Přestože se jednalo o jiné soubory (jiné studny), nárůst pozitivních výsledků u stanovení počtu koliformních bakterií je vysoký.

## 5.2.2. *Escherichia coli*

### 5.2.2.1. CHARAKTERISTIKA A TAXONOMIE

Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinka *Escherichia coli* (typový druh rodu *Escherichia* z čeledi *Enterobacteriaceae*) je nejprozkoumanější organismus na Zemi, jako první u něj byl znám kompletní genom. Tato bakterie žije jako komenzál v tlustém střevě člověka a teplokrevných živočichů a slouží jako indikátor fekálního znečištění prostředí. Může však být příčinou řady onemocnění. Nejen že všechny kmeny *E. coli* mohou způsobovat sekundární infekce vyvolávající průjemy, infekce močového ústrojí a nozokomiální nákazy včetně septicémie a meningitidy, ale některé kmeny jsou i primárními patogeny. V současné době je velká pozornost věnována enterohemorhagickým kmenům *E. coli*, které produkují verocytotoxiny – VTEC (označované také jako Shiga-like toxiny) a další faktory virulence včetně faktorů invazivních a kolonizačních. VTEC kmeny produkují dva typy verocytotoxinu VT1 a VT2, infekční agens je vylučováno stolicí. Ke vzniku vážného, průjemovitého onemocnění, které v některých případech může gradovat až v hemolyticko-uremický syndrom s letálním koncem, stačí podobně jako u shigelóz malá infekční dávka (cca  $10^2$ – $10^3$ ). Je známa řada sérotypů kmenů *E. coli* produkujících verocytotoxiny. Nejrozšířenějším celosvětovým patogenem z této skupiny je sérotyp *E. coli* O157:H7, jehož rezervoárem je především střevní trakt dobytka. Nákaza se přenáší nejčastěji potravinami (např. nedostatečně tepelně upraveným hovězím masem). V posledních letech se však ukázalo, že pro přenos VTEC infekce může být nebezpečná i pitná a užitková fekálně znečištěná voda, včetně lesních pramenů a studánek. Největší ohrožení tímto patogenem je v zemích s vysokou živočišnou výrobou a difúzním znečištěním (Velká Británie, USA apod.). První prokázaná epidemie byla v roce 1982 ve Spojených státech amerických, v posledních letech byla zaznamenána epidemie např. v roce 2011 v Německu s 54 úmrtími. Tuto epidemii způsobil sérotyp O104:H4 a zdroj infekce nebyl spolehlivě prokázán.

*E. coli* vytváří společně s druhy rodu *Shigella* přirozenou taxonomickou skupinu (podle vysoké shody primární struktury DNA se jedná o jeden rod). Shigely jsou metabolicky inaktivní, nepohyblivé mikroorganismy a je obtížné je odlišit především od metabolicky inaktivních kmenů *E. coli*.

### 5.2.2.2. METODY STANOVENÍ *E. COLI*

Dříve se *E. coli* stanovovala mezi koliformními, resp. termotolerantními koliformními bakteriemi výjimečně, většinou pomocí souboru biochemických reakcí v tzv. cukerných řadách, případně pomocí mikrotěstů (využit lze např. systémy

API od firmy Biomérieux nebo MIKRO-LA-TEST® od firmy Lachema). Tento způsob testování je, přestože poskytuje nejpřesnější výsledky, velice pracný, a proto nebylo možné zavést takto stanovovaný ukazatel do praxe. Bylo tedy nutné najít takovou charakteristiku (nejlépe biochemickou), která by *E. coli* spolehlivě odlišila od ostatních koliiformních bakterií, a bylo by možné převést toto stanovení do jednoduchého, praktického testu. Tyto požadavky splnila aktivita enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy.

Biochemická charakteristika kmenů *E. coli* je uvedena v příloze I. Je uveden soubor biochemických reakcí, které byly testovány, a výsledky analýz (pomocí Enterotestu I a II, Erba Lachema) 164 kmenů *E. coli*, izolovaných z vodního prostředí. Výsledky jsou uvedeny jako procento kmenů, které vykazovaly pozitivní výsledek. Kromě výsledků našich analýz jsou v téže tabulce uvedeny hodnoty z nejdůležitější frekvenční matice, jak ji prezentovali Farmer a Kelly (1991), která byla vytvořena na základě studia o několik řádů vyššího počtu klinických izolátů (byly provedeny tzv. testy „ve zkumavce“). Byla zaznamenána překvapivě vysoká shoda s laboratorními výsledky, drobné neshody mohou být způsobeny odlišností použitých metodik testování.

*Vylučuje se tedy dříve běžné tvrzení, že kmeny izolované z vodního prostředí se odlišují od běžných klinických izolátů.*

Dnes jsou všechny normované metody založené na průkazu enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy (E.C. 3.2.1.31). Je to první enzym hexuronid-hexuronátové dráhy, katalyzující hydrolyzu  $\beta$ -D-glukuronidu a zároveň  $\beta$ -D-galakturonidu na glukuronát (resp. galakturonát). Od 80. let byla provedena řada prací (uvedených v souborné publikaci Frampton a Restaino, 1993), které prokázaly, že mezi bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae* je tento enzym specifický právě pro *E. coli* (přes 90% kmenů je fenotypově pozitivních), v menší míře pro rod *Shigella* (40–67%) a *Salmonella* (17–29%).  $\beta$ -D-glukuronidáza je produkt strukturního genu *uid A* a regulačního genu *uid R*. Expres *uid A* genu (tj. tvorba  $\beta$ -D-glukuronidázy) je vícenásobně regulována. Bylo zjištěno, že i kmeny, které jsou, pokud jde o produkci  $\beta$ -D-glukuronidázy, fenotypově negativní, *uid* geny obsahují až v 99%.

Současné standardně užívané metody k detekci *E. coli* pomocí  $\beta$ -D-glukuronidázy jsou založeny především na jejím fenotypovém projevu za využití fluorogenních či chromogenních substrátů. Metoda použitá ke stanovení aktivity  $\beta$ -D-glukuronidázy může zásadně ovlivnit získané výsledky.

Pro stanovení *E. coli* O157:H7, popř. ostatních VTEC (verocytotoxin – produkující *E. coli*) ve vodě není k dispozici standardizovaná metoda. Vhodný je postup

s membránovou filtrací dostatečného objemu vody (100 až 1 000 ml) a následným selektivním pomnožením v mTSM médiu s novobiocinem. Důležitým krokem v případě čistých vod je pak IMS (imunomagnetická separace) s anti-*E. coli* O157 částicemi, popř. částicemi s dalšími významnými sérotypy (zejména O26 apod.). Následuje kultivace na selektivně-diagnostickém médiu Sorbitol Mac Conkey (SMAC) agaru s CT suplementem a SMAC + MUG (médiu je doplněno o MUG, tj. 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronid). Suspektní kolonie vykazují negativní reakci na sorbitol a  $\beta$ -D-glukuronidázu. Konfirmace se provádí biochemicky, sérologicky, případně i PCR metodou, popř. i s detekcí verocytotoxinů VT1 a VT2 (postup podle Schets a kol., 2005). Vzhledem k tomu, že enteropatogenní *E. coli* jsou převážně  $\beta$ -D-glukuronidáza negativní, nebývají metodami, které jsou na tomto principu založené, detekovány.

#### Stanovení *E. coli* metodou podle ČSN EN ISO 9308-1 (CCA médium)

Toto stanovení je podrobně popsáno v předchozí kapitole (stanovení koliformních bakterií metodou podle ČSN EN ISO 9308-1 (str. 45). Podstatou metody je, že se oba ukazatele stanovují paralelně na jednom médiu (CCA), tudíž je popis metody stanovení obou ukazatelů neoddělitelný.

U stanovení *E. coli* je nutno konstatovat, že došlo k významnému posunu k lepšímu, protože  $\beta$ -D-glukuronidáza je vysoce specifický marker (oproti dříve používanému indol testu, který pozitivně jako *E. coli* konfirmoval i řadu dalších koliformních bakterií, např. druhy rodů *Kluyvera*, *Klebsiella* apod., a podíl falešně pozitivních výsledků byl někdy až 50 %). Dále je výhodné, že počítání *E. coli* je možné ihned po inkubaci (24  $\pm$  3) hodin a není nutné provádět další testy s dobou inkubace navíc (oxidázový test lze provést ihned). Tím se významně zkrátí doba k dodání přesných výsledků (o minimálně 24 hodin).

#### Stanovení *E. coli* metodou Colilert Quanti-Tray (ČSN EN ISO 9308-2)

Princip metody je popsán u paralelní kapitoly stanovení koliformních bakterií (str. 47), neboť se jedná o souběžné stanovení.

*Escherichia coli* je stanovena mezi koliformními bakteriemi na základě aktivity enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy pomocí fluorogenního substrátu. Pozitivní jamky se odečítají pod dlouhovlnným UV zářením (360–365 nm). Výsledky se uvádí jako počet MPN/100 ml vzorku.

Je nutné konstatovat, že na rozdíl od koliformních bakterií, je stanovení *E. coli* touto metodou vysoce specifické a dostatečně citlivé a jedná se jednoznačně o nejlepší metodu stanovení *E. coli* v povrchových vodách (Baudišová a kol., 2013).

### Stanovení *E. coli* metodou podle ČSN 75 7835

Metoda předepisuje stanovení druhu *E. coli* mezi **termotolerantními (fekálními) koliformními bakteriemi**, vykultivatelnými na m-FC médiu při  $(44 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ . Termín „termotolerantní“ vyjadřuje schopnost bakterií růst v relativně vysoké teplotě  $44 ^\circ\text{C}$ , termín „fekální“ značí jejich očekávaný fekální původ. Ve světové literatuře jednoznačně převažuje používání termínu fekální, tj. faecal coliform (běžná mezinárodní zkratka je FC). Termotolerantní koliformní bakterie jsou méně vhodný indikátor fekálního znečištění než *E. coli*, ale v určitých případech směrnice WHO používání tohoto indikátoru místo *E. coli* připouštějí.

Tato metoda vychází z Amerických standardních metod (US EPA, 2012) a do roku 2000 byla i součástí normy ISO 9308-1. Dnes je standardizována pouze v české technické normě ČSN 75 7835 a její použití není zakotveno v žádných právních předpisech. Doposud se však využívá při stanovení termotolerantních (fekálních) koliformních bakterií v povrchových vodách, včetně vod surových. Jedná se o vysoce specifickou a selektivní metodu, která má bohužel nižší citlivost, vzhledem ke složení média (viz 3.2.1.) a relativně vysoké teplotě při primární kultivaci.

Princip metody je založen na membránové filtraci vzorků na membránových filtrech o porozitě  $0,45 \mu\text{m}$  a následné kultivaci na m-FC agaru (9.2.3.) po dobu 24 hodin při teplotě  $(44 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ . Termotolerantní (fekální) koliformní bakterie rostou jako modré kolonie (kyselé prostředí změni barvu anilínové modře z bezbarvé na modrou). Membránový filtr s narostlými termotolerantními koliformními bakteriemi se přenesne na médium s 4-methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronidem (viz 9.2.4.) a kultivuje se 4 hodiny při  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Jako *E. coli* se počítají kolonie se světle modrou fluorescencí pod dlouhovlnným UV zářením 360–365 nm (např. ruční bankovní svítidla). Kromě výše uvedeného konfirmačního média jsou k dispozici i komerční přípravky např. m-Colitest od firmy Erba Lachema.

### Stanovení *E. coli* miniaturizovanou metodou podle ČSN EN ISO 9308-3

Principem metod je očkování subkultur do 96 jamek mikrotitrační destičky, která již obsahuje kompletní dehydratované médium s fluorogenními substráty. Na stanovení *E. coli* se jedná o 4-methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronid. Vzorek příslušného ředění (podle předpokládaného znečištění) se rozočkuje a po předepsané kultivaci (36 hodin při  $44 \pm 0,5 ^\circ\text{C}$ ) se spočítají jamky s pozitivní fluorescencí v dlouhovlnném UV záření (360–365 nm). Doba inkubace se může prodloužit až na 72 hodin, neboť po vytvoření pozitivní reakce se již stav nemění.



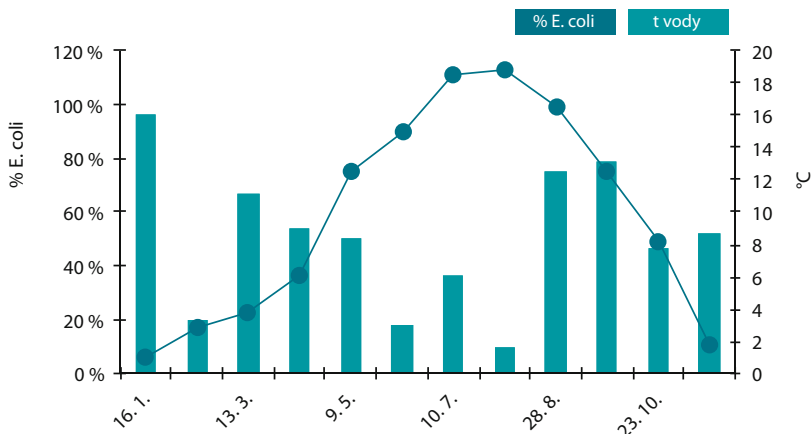
Výsledky lze vyhodnotit pomocí statistických tabulek dodaných k mikrotitračním destičkám nebo pomocí počítačového programu v jazyce Basic, který je popsán v příslušné normě. Spolu s výsledkem nejpravděpodobnějšího počtu jsou v tabulkách uvedeny i konfidenční meze P 95.

Tento typ testů je určen pouze pro odpadní a silně znečištěné povrchové vody, jelikož je zde relativně vysoká mez detekce (15 MPN/100 ml).

### 5.2.2.3. *E. COLI* VE VODNÍM PROSTŘEDÍ

Stanovení *Escherichia coli* jak v evropské, tak české legislativě prakticky nahradilo stanovení termotolerantních (fekálních) koliformních bakterií. Přímé stanovení *E. coli* je oproti stanovení termotolerantních koliformních bakterií výhodnější z několika důvodů. Jak již bylo uvedeno, *E. coli* vždy pochází ze střevního traktu člověka či teplokrevných živočichů (na rozdíl od některých zástupců termotolerantních koliformních bakterií, především druhů z rodu *Citrobacter* a *Enterobacter*) a ve vodním prostředí se v našich zeměpisných šířkách (klimatických podmínkách) nerozmnožuje. Podle našich zkušeností je ve vodách zastoupení *E. coli* mezi termotolerantními (fekálními) koliformními bakteriemi v rozmezí 20–90 %, průměrně v 60 %. V přisedlé složce (např. biofilm) je zastoupení *E. coli* ve skupině termotolerantních koliformních bakterií významně nižší (průměrně 30 %). Ve více organicky a fekálně znečištěných vodách byla zaznamenána vysoká korelace počtů termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli*. V čistých vodách je tato korelace výrazně nižší a více závislá na přírodních podmínkách (srážky, teplota vody apod.). Na obr. 14 jsou uvedeny změny poměrů termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli* v průběhu sezony v málo znečištěném toku. Je zřejmé, že se vzrůstající teplotou vody klesá relativní podíl *E. coli* (vyjádřeno v %) mezi termotolerantními koliformními bakteriemi.

Zdrojem *E. coli* ve vodách jsou především bodové a difúzní zdroje znečištění. Jejich zvýšené počty se v civilizovaných zemích vyskytují především v souvislosti s odtoky z čistíren odpadních vod a dále je zvýšení významné v místech s nedokonalým nebo žádným čištěním odpadních vod. Z toho vyplývá, že zvýšená fekální kontaminace je v první řadě závislá na hustotě osídlení oblasti a adekvátním čištění odpadních vod. V pitných vodách *E. coli* indikuje jednoznačné a závažné fekální znečištění, které by mělo vést k okamžitému vyhledání zdrojů kontaminace (neadekvátní čištění, porušení integrity distribučního systému atd.).



**Obr. 14.** Relativní zastoupení *E. coli* (v %) mezi termotolerantními koliformními bakteriemi v průběhu roku (vodárenský tok Želivka, profil Lísky, 1995)

## 5.2.3. Intestinální enterokoky

### 5.2.3.1. CHARAKTERISTIKA A TAXONOMIE

Za intestinální enterokoky (starší, již neužívaný název je fekální streptokoky) jsou považovány grampozitivní koky, většinou uspořádané do řetízků s antigenovou skupinou D a negativní katalázou. Mají schopnost množit se v rozmezí teploty 10–45 °C, rostou i při poměrně vysokých koncentracích solí (až 6,5 % chloridu sodného) a při hodnotě pH 9,1. Tolerují až 40 % žluči v prostředí. Podle současného taxonomického systému patří do rodu *Enterococcus* (rod v současnosti zahrnuje celkem 43 druhů, které lze na základě fylogenetické analýzy genu pro 16S rRNA rozdělit do několika vnitrodruhových fylogenetických skupin; podle Švec a Devriese, 2009) a *Streptococcus* (především druhy *S. equinus* a *S. bovis*). Kromě toho, že intestinální enterokoky indikují fekální znečištění, některé druhy patří mezi tzv. potenciální patogeny (podle tabulky WHO do skupiny č. 2, tj. mezi mikroorganismy, které mohou vyvolat onemocnění lidí a zvířat). Existuje proti nim účinná profylaxe a způsobená onemocnění jsou léčitelná. Enterokoky jsou známy svojí rezistencí na antibiotika. Nejčastěji jsou původci onemocnění močového systému, méně často bakterémie, byly popsány i případy endokarditidy.

Voda představuje bohatý zdroj environmentálních kmenů enterokoků, kteří jsou považováni, především v případě jejich zvýšené koncentrace, za fekální kontaminanty živočišného či humánního původu. Zejména druhy *E. faecalis* a *E. faecium*, kteří představují spolu s *E. durans* a *E. hirae* nejčastější druhy vyskytující se ve vodě, jsou typické druhy související s fekální kontaminací. Z vodního prostředí jsou však často izolováni zástupci druhu *E. casseliflavus*, kteří reprezentují nefekální druhy z rostlinného materiálu.

### 5.2.3.2. METODY STANOVENÍ INTESTINÁLNÍCH ENTEROKOKŮ

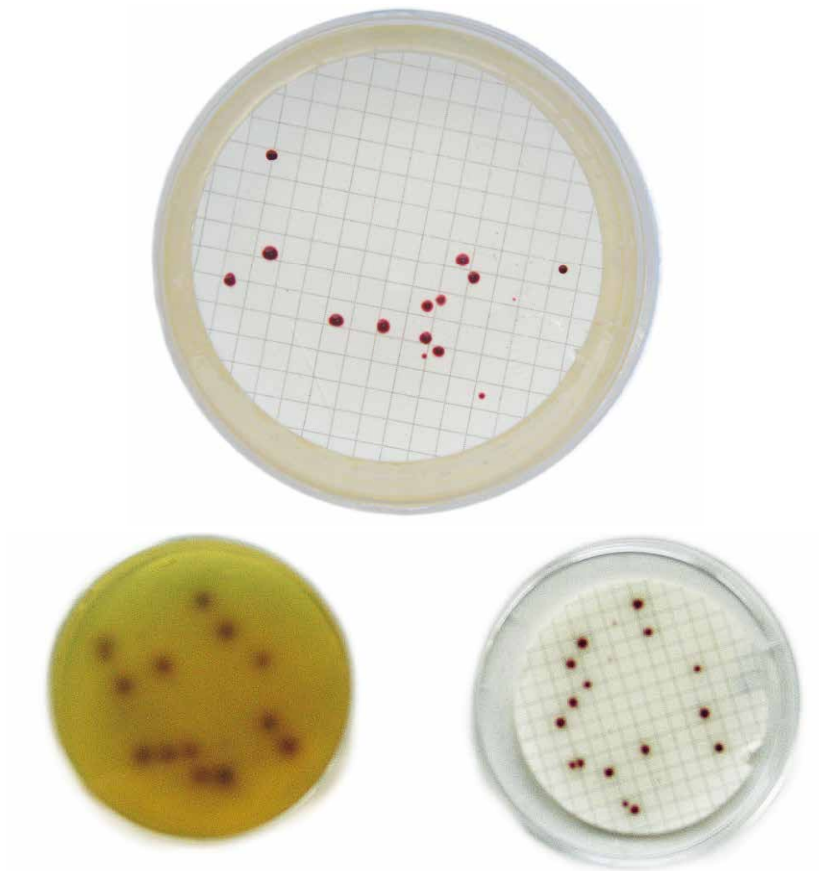
Intestinální enterokoky se u nás téměř výhradně stanovují membránovou filtrací na médiu podle Slanetze a Bartleyové (dále SB). Další možnost jejich detekce pomnožením v tekutém kultivačním médiu (buď jako přítomnost, resp. nepřítomnost v předem daném objemu inokula, či metodou nejvíce pravděpodobného počtu) s využitím enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy se prakticky nevyužívá.

#### Stanovení intestinálních enterokoků podle ČSN EN ISO 7899-2

Princip metody je založen na membránové filtraci vzorků na membránových filtrech o porozitě 0,45  $\mu$ m a následné kultivaci na SB médiu (9.2.5.) po dobu 48 hodin při  $(36 \pm 2)$  °C. Intestinální enterokoky rostou jako tmavočervené až vínové kolonie (enterokoky redukují TTC na červený formazan), viz *obr. 15*. SB je poměrně selektivní médium s azidem sodným (jedná se o látku s vysoce selektivním účinkem, která je přidávána za účelem eliminace růstu doprovodné mikroflóry, zejména gramnegativních tyčinek) a trifenyltetrazolium chloridem (TTC). Bylo však prokázáno, že na tomto médiu mohou kromě intestinálních enterokoků růst i další (v zásadě nefekální) druhy rodu *Streptococcus*, *Aerococcus*, popř. *Micrococcus*, a proto je nutné vždy provádět konfirmační testy.

Membránový filtr s narostlými koloniemi se přenese na žluč eskulinové médium s azidem sodným (viz 9.2.6.) a kultivuje se 2 hodiny při  $(44 \pm 0,5)$  °C, pozitivní reakce se projeví výrazným zčernáním média v okolí kolonie, viz *obr. 16*. Hydrolyza eskulinu v prostředí žlučových solí je považována za hlavní konfirmační test odlišující intestinální enterokoky od doprovodné mikroflóry vyrostlé na kultivačním médiu. Všechny intestinální enterokoky jsou schopné eskulin v prostředí žlučových solí hydrolyzovat, z „ostatních“ streptokoků má tuto schopnost jen 25–75 % kmenů *S. mutans* (orální streptokok). V případě, že je podezření na nižší selektivitu SB média (méně než 70 % vyrostlých kolonií je pozitivně konfirmováno na žluč eskulinovém agaru), je vhodné provést doplňující konfirmační test (který byl i v původní verzi normy ČSN EN ISO 7899-2, ale posléze byl vyřazen), a to katalázový test.

Provedení katalázového testu: Kolonie přeočkované na neselektivní agar (např. na agar s tryptózou a kvasničným extraktem, viz 9.1.1.) a vykultivované 24 hodin při 36 °C (v případě, že je podezření, že se nejedná o čistou kulturu, je třeba přečištění) se zakapou čerstvě připraveným 10% peroxidem vodíku. Katalázová reakce se projeví šuměním, tj. tvorbou bublinek. Kolonie, které nešumí, jsou intestinální enterokoky.



**Obr. 15. a 16.** Stanovení a potvrzení intestinálních enterokoků

### Stanovení intestinálních enterokoků na základě aktivity $\beta$ -D-glukosidázy

Intestinální enterokoky lze též specificky detekovat pomocí enzymu  $\beta$ -D-glukosidázy za využití fluorogenního (4-methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glukosid) nebo chromogenního substrátu. Tento enzym se podílí i na hydrolyze eskulinu. Protože je aktivita enzymu  $\beta$ -D-glukosidázy poměrně běžně rozšířena mezi druhy mikroorganismů, selektivitu pro intestinální enterokoky zajišťuje prostředí nalidixové kyseliny a salicinu.

Na tomto principu je založena miniaturizovaná metoda na mikrotitračních destičkách (ČSN EN ISO 7899-1), která je analogická jako u stanovení *E. coli* podle ČSN EN ISO 9308-3 (str. 54). Dále jsou k dispozici systémy Enterolert Quanti-Tray (IDEXX), které jsou analogické testům Colilert Quanti-Tray na stanovení koliformních bakterií a *E. coli* (str. 47 a 53). Existuje několik různých typů Enterolertů s využitím fluorogenních či chromogenních substrátů, ale na rozdíl od Colilertu je jejich spolehlivost a srovnatelnost s konvenčními metodami výrazně nižší a nejsou ani standardizovány (normovány).

### **5.2.3.3. INTESTINÁLNÍ ENTEROKOKY VE VODNÍM PROSTŘEDÍ**

Intestinální enterokoky jsou významným indikátorem fekálního znečištění a jejich limity jsou uvedeny téměř ve všech normách a právních předpisech, týkajících se mikrobiologické kvality vody. Jsou citlivější vůči vnějším vlivům než skupina koliformních bakterií a ve vodě se zřídka pomnožují. Mohou tedy být považovány za ukazatele čerstvého fekálního znečištění. Na druhé straně jsou rezistentnější k chloru či jiným dezinfekčním prostředkům a mohou přežít takové dávky chloru, které koliformní bakterie bezpečně usmrtí. Mohou tak indikovat nedostatečně provedenou dezinfekci pitné vody chlorem (i za nepřítomnosti koliformních bakterií). Bývá též uváděno, že poměr počtů termotolerantních (fekálních) koliformních bakterií a enterokoků může ukazovat na původ fekálního znečištění (z humánních a nehumánních, resp. ostatních zdrojů). Bylo totiž prokázáno, že termotolerantních (fekálních) koliformních bakterií je relativně více ve fekáliích humánního původu, naopak u teplokrevných živočichů převládají ve stolici enterokoky. Tento poměr je však nutné brát jen orientačně a s rezervou, neboť s výskytem enterokoků a fekálních koliformních bakterií souvisí další faktory (schopnost přežívání jednotlivých druhů a kmenů, různá citlivost na dezinfekční činidla apod.).

## 5.2.4. *Clostridium perfringens*

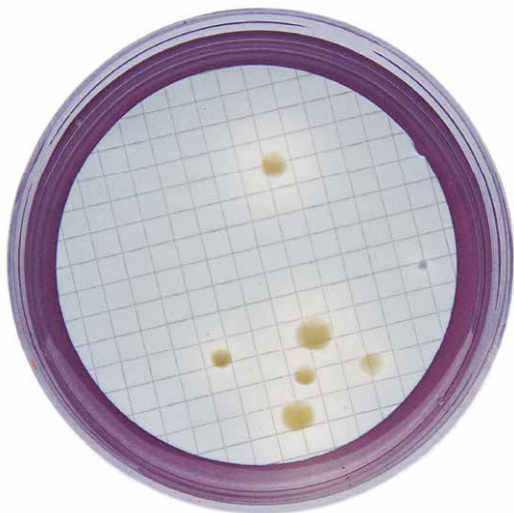
### 5.2.4.1. CHARAKTERISTIKA A TAXONOMIE

*Clostridium perfringens* patří spolu s dalšími druhy rodu *Clostridium* mezi gram-pozitivní, sporulující a anaerobní bakterie z čeledi *Bacillaceae*. Jsou to typicky dlouhé, rovné nebo lehce zahnuté tyčky se zaoblenými konci. Často jsou bohatě pleomorfní; objevují se vláknité nebo jen prodloužené vřetenovité (closter = vřeteno) a kyjovité buňky. Tito mikrobi jsou nároční na vysoký obsah živin, jsou značně biochemicky aktivní a mají různé sacharolytické a proteolytické vlastnosti. Redukují siřičitany.

Některé druhy rodu *Clostridium*, např. *C. perfringens* a *C. sporogenes*, jsou komenzální ve střevě zvířat a člověka. Po smrti rychle pronikají do krve a do tkání a zahajují hnilobný rozklad mrtvého těla. Některé druhy jsou podmíněně patogeny, např. *C. perfringens*, *C. septicum* a *C. novyi* způsobují klostridiovou myonekrozu, *C. difficile* je původcem pseudomembranózní kolitidy. Do rodu *Clostridium* patří i velmi známé patogeny *C. tetani* (původce tetanu) a *C. botulinum* (původce botulismu, spojeného především s otravami z potravin).

### 5.2.4.2. METODY STANOVENÍ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Ke stanovení *Clostridium perfringens* se od roku 2001 používá velmi selektivní metoda, skládající se ze tří kroků: membránová filtrace vzorků přes membránový filtr o porozitě 0,2  $\mu\text{m}$ , kultivace ( $21 \pm 3$ ) hodin při ( $44 \pm 0,5$ )  $^{\circ}\text{C}$  v anaerobním prostředí na m-CP médiu (9.2.7.) a konfirmace narostlých kolonií v parách amoniaku. Kmeny *C. perfringens* rostou jako žluté kolonie (viz obr. 17), které v parách amoniaku zrůžoví (jsou vyjádřeny typické znaky: pozitivní fermentace sacharózy, negativní fermentace celobiózy a pozitivní fermentace kyselých fosfatázy). Přestože se toto médium osvědčilo, bylo shledáno jako nedostatečně citlivé (produktivita média je výrazně menší než požadovaných 70 %, experimentálně byla zjištěna „až“ 35 %).

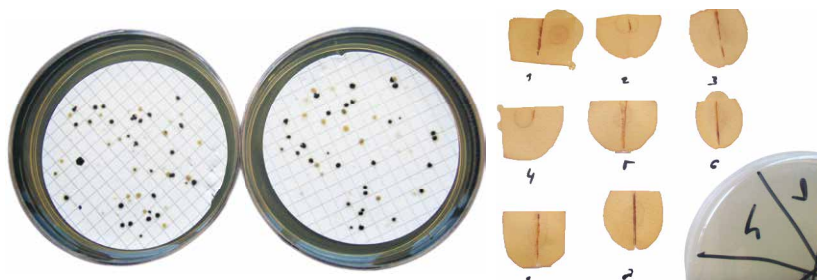


**Obr. 17.** Stanovení *Clostridium perfringens* na m-CP agaru (před confirmací v parách amoniaku)

Na stanovení *C. perfringens* tak byla vytvořena nová norma ČSN EN ISO 14189 (2017), která je předepsána i legislativně (novela směrnice EU o kvalitě vody k lidské spotřebě 2015/1787 z 6. října 2015 a relevantní právní předpisy členských států). Přesto je metoda stanovení *C. perfringens* na m-CP médiu vhodná především při testování povrchových a odpadních vod, kalů a sedimentů a v roce 2017 novelizované vyhlášce č. 252/2004 Sb. je uvedena jako metoda alternativní.

Norma ČSN EN ISO 14189 předepisuje stanovení *C. perfringens* membránovou filtrací vzorků přes membránové filtry o porozitě 0,45  $\mu\text{m}$  (od dříve používané porozity 0,2  $\mu\text{m}$  se upustilo, protože při větší porozitě je lepší kontakt rostoucích bakterií s kulturačním médiem), kultivací na TSC médiu (trypton siričitanový agar s cykloserinem viz 9.2.8.) (21  $\pm$  3) hodin při (44  $\pm$  0,5)  $^{\circ}\text{C}$  v anaerobním prostředí a confirmací kolonií kyselou fosfatázou. Presumptivní kmeny *C. perfringens* rostou na TSC médiu jako černé, šedé až šedožluté kolonie (viz obr. 18). Tyto kolonie je třeba přeočkovat na neselektivní agar (např. 9.1.3.), kultivovat (21  $\pm$  3) hodiny při (36  $\pm$  2)  $^{\circ}\text{C}$  v anaerobních podmínkách (pokud není jistota, že se jedná o čistý kmen, pak je nutné kulturu přechistit), přenést na filtrační papír a zakápnout činidlem na kyselou fosfatázu (9.3.5.). Přeočkovat se musí všechny podezřelé kolonie, nebo alespoň jejich poměrná část (minimálně 10 a výsledek se přepočítá na celkový počet presumptivních kolonií). Pozitivní reakce se projeví zčervenáním až zfialověním bakteriální

biomasy (viz obr. 19). Negativní reakce je rezavá. Pozor, činidlo na detekci kyselé fosfatázy je kancerogenní! Výhodné je udělat (i když to norma nepředepisuje) dvojí přeočkování a paralelní kultivaci přeočkovaných kolonií v aerobních podmínkách, čímž se vyloučí část šířičitany redukující doprovodné mikroflóry. Na TSC médiu částečně roste ve formě žlutohnědých kolonií, např. i *E. coli*.



Obr. 18. a 19. Stanovení *Clostridium perfringens* na TSC agaru (vlevo) a konfirmace kyselou fosfatázou (vpravo)

#### 5.2.4.3. CLOSTRIDIUM PERFRINGENS VE VODNÍM PROSTŘEDÍ

Spory šířičitany redukujících anaerobů (klostridií) jsou široce rozšířeny v prostředí. Jsou přítomné v lidských i živočišných exkrementech, v odpadních vodách i v půdě. Nejsou však tak hojné jako koliformní bakterie. Na rozdíl od *E. coli* a ostatních koliformních bakterií spory ve vodě přežívají dlouhou dobu a jsou podstatně více rezistentní k účinkům chemických a fyzikálních faktorů než vegetativní buňky. Mohou indikovat starší a periodické znečištění. Ukázalo se však, že za určitých okolností se mohou ve vodě i rozmnožovat. Vegetativní buňky (nikoliv spory) *C. perfringens* však přežívají ve vzorku povrchové vody jen velmi krátce. Během prvních 24 hodin skladování vzorku za předepsaných podmínek (chlazení při 8 °C) se sníží počty *C. perfringens* zhruba na polovinu původního počtu. Během dalších 48 hodin se již počty nemění (Baudišová, 2007). Proto, pokud se stanovují nejen spory, ale i vegetativní buňky, by měl být vzorek na stanovení *C. perfringens* zpracován co nejdříve, pokud možno do 6 hodin po odběru. Hlavní negativní vliv na přežívání *C. perfringens* má zřejmě přítomný kyslík.

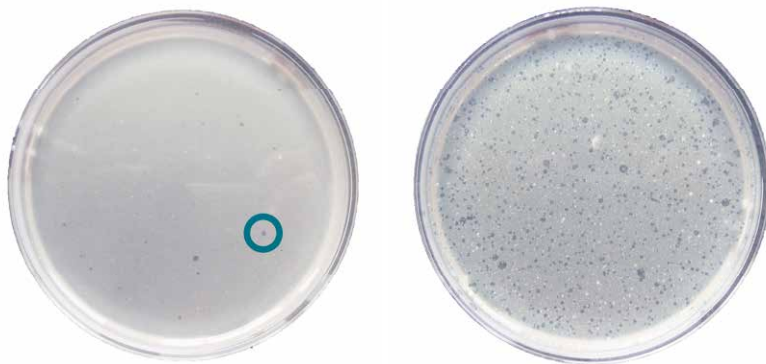
*Clostridium perfringens* se nyní stanovuje v pitné vodě, upravované přímo z povrchových vod nebo u podzemních vod ovlivněných povrchovými vodami. Tam, kde hodnota tohoto ukazatele není dodržena (negativní záchyt ve 100 ml), by se měl z důvodu potenciálního ohrožení lidského zdraví přítomností patogenních mikroorganismů, např. parazitických prvoků z rodu *Giardia* a *Cryptosporidium*, prozkoumat daný vodní zdroj a technologie úpravy (především filtrační procesy).



## 5.2.5. Bakteriofágy

Bakteriofágy jsou nepatogenní viry, infikující bakteriální buňky, které se mohou využívat i jako indikátory. Dnes se stanovují skupiny F-specifické RNA bakteriofágy, somatické kolifágy nebo bakteriofágy infikující střevní bakterii *Bacteroides fragilis*. Jsou schopné infikovat vybrané hostitelské kmeny bakterií a pomnožovat se uvnitř jejich buněk, čímž se bakteriální buňka zahubí. Kolifágy jsou podskupinou bakteriofágů se specifickým názvem, neboť napadají stěny bakteriální buňky druhu *E. coli*. Bakteriofágy produkují v ploše nárůstu hostitelského kmene okem viditelné plaky (prosvětlené zóny – viz obr. 20), což je principem metody plakové titrace.

Somatické kolifágy se relativně jednoduše stanovují plakovou titrací za použití hostitelského kmene *Escherichia coli* kmen C (ATCC 13706), který je dostupný ve sbírce mikroorganismů ve Státním zdravotním ústavu v Praze pod číslem EC 427/82. Je možné využít normu ČSN EN ISO 10705-2 (75 7871) Průkaz přítomnosti a kvantitativní stanovení bakteriofágů – Část 2: Kvantitativní stanovení somatických kolifágů. Recept na měkký (soft) agar, do kterého se přidává suspenze hostitelského kmene a zalévá se s ním vyšetřovaný vzorek vody, je uveden v kap. 9.2.9.



**Obr. 20.** Stanovení somatických kolifágů plakovou titrací

Bakteriofágy jsou nepatogenní a běžně se vyskytují ve střevním traktu člověka a teplotokrevných zvířat, ale v nižším počtu než např. *E. coli* nebo intestinální enterokoky. Dříve byly považovány za „virový“ indikátor fekálního znečištění (bakteriofágy jsou bakteriální viry s podobnou strukturou a způsobem replikace), tato indikace je však v současné době zpochybňována, a to ze dvou důvodů. Jednak již bylo prokázáno, že se mohou ve vodě pomnožovat, a dále proto, že se jejich specifickánost nemusí omezovat jen na jeden hostitelský druh/kmen a že mohou

být napadány i další koliformní bakterie nefekálního původu. Přestože se jedná o viry (přesněji bakteriální viry), nemusí jejich přítomnost ve vodě ukazovat na přítomnost enterovirů, neboť ty se ve vodách vyskytují pouze nárazově v souvislosti s jejich vylučováním infikovanými jedinci. Na druhou stranu se bakteriofágy zdají být velmi dobrým ukazatelem účinnosti procesů úpravy a čištění vod (úpravny vod, čistírny odpadních vod), protože díky své struktuře mohou být eliminovány výrazně jinak než bakteriální buňky.

## 5.3. PATOGENNÍ A PODMÍNĚNĚ PATOGENNÍ MIKROORGANISMY

Je jisté, že z hlediska využitelnosti vody a vlivu na zdraví člověka je nejdůležitější výskyt, resp. absence patogenních mikroorganismů. Patogenita je schopnost mikrobiálního druhu (v některých případech kmenu) vyvolat onemocnění konkrétního druhu hostitele a patogeny jsou organismy (v tomto případě mikroorganismy), které jsou schopny využívat prostředí poskytované hostitelem, ale svým metabolismem, jeho produkty a vyvolanou reakcí mohou hostitele poškozovat a způsobit onemocnění. Infektivita (jedná se o epidemiologický termín) je schopnost patogenů působit i hostiteli infekci. Termín infektivita je úzce spjat s termínem virulence.

Patogenní mikroorganismy se při rutinní kontrole vody většinou běžně nestanovují. Děje se tak v případech, kdy to epidemiologická situace vyžaduje. Patogenní mikroorganismy (bakterie, viry, prvoci) jsou vylučováni do prostředí pouze infikovanými jedinci, a to buď přenašeči (např. zvířecího původu, nebo tzv. bacilonosiči, což jsou infikovaní jedinci, kteří nevykazují známky onemocnění), nebo přímo nemocnými. Infekční dávka (tj. množství mikroorganismů, nutné k vyvolání onemocnění) se liší u jednotlivých mikroorganismů, a to od několika stovek jedinců (počítáno celkem jako suma, nikoliv počet v konkrétním objemu), jako je tomu u bakterií rodu *Shigella*, přes statisíce až po milióny (*Salmonella* spp.). Zároveň je nutné poznamenat, že orální cesta (požití vody, resp. její vypití) není jedinou vstupní bránou infekce do lidského těla. Mikroorganismy mohou do těla člověka proniknout také kůží, zejména poraněnou (rány, puchýře, oděrky) či sliznicemi (oční, nosní, ušní, močová trubice, vagina). Infekce, které se dostanou do těla takto přímo (kůže, sliznice), mohou být nebezpečnější, protože neprocházejí selektivním prostředím trávicího ústrojí (uniknou např. vlivu kyseliny chlorovodíkové v žaludku apod.).

Stanovení (detekce) patogenních mikroorganismů je výrazně komplikovanější než stanovení indikátorových mikroorganismů. Je nutné použít složitá a drahá selektivní média, metody se většinou sestávají z několika kroků (pomnožení, kultivace, konfirmační testy, v řadě případů i sérotypizace apod.), musí se stanovovat každý potenciálně přítomný patogen zvláště apod. Situaci částečně vyřešilo zavedení metod molekulární biologie, ale vzhledem k vysoce heterogennímu prostředí vod a značnému množství doprovodné mikroflóry je doposud jejich využití v mikrobiologii vody omezené, a tyto metody se tak využívají především ke konfirmaci kmenů izolovaných konvenčním způsobem, tj. kultivačně. Technickým problémem metod molekulární biologie (např. polymerázové řetězové reakce, PCR) je především izolace dostatečného množství dostatečně čisté DNA z vodního prostředí.

V současné době nejsou ve vyspělém světě běžné epidemie z vodního prostředí, které byly zaznamenávány v dobách minulých. Z krásné nebo historické literatury známe popisy epidemií břišního tyfu (*Salmonella Typhi*) či úplavice – dyzentérie (*Shigella* spp.). Tyto nákazy jsou dnes vázány spíše na rozvojové země, kde je kromě nižšího hygienického standardu a vyšší hustoty obyvatelstva i teplejší klima, které podporuje přežívání patogenních mikroorganismů (většinou s optimem růstu okolo 37 °C) v prostředí. K nám se dnes tyto infekce mohou dostat především díky větší migraci obyvatel, včetně zvýšeného cestovního ruchu do exotických destinací.

Ani civilizované země však nemají vyhráno, pokud jde o zdravotní nezávadnost pitné vody. Vzhledem ke zvýšené spotřebě antibiotik v lékařské a veterinární praxi se objevují bakterie rezistentní na široké spektrum antibiotik, jsou zaznamenávána onemocnění způsobená nově objevenými, resp. popsány, patogeny (např. *Campylobacter* spp., enteropatogenní *E. coli*), anebo dochází k závažným onemocněním, spojeným s pomnožováním nebezpečných bakterií v moderních technických systémech (např. *Legionella* spp. ve vodovodních rozvodech teplé vody či v klimatizačních jednotkách). Dále je potřeba zmírnit nárůst onemocnění způsobených tzv. podmíněnými patogeny v důsledku snížení imunity v populaci. Mezi podmíněné patogeny se řadí ty mikrobiální druhy, které jsou schopny být původci onemocnění jen v případě, že jsou poškozeny přirozené obranné mechanismy (sem patří např. také nozokomiální infekce, tj. infekce získané v nemocničním prostředí, když se pacient léčil s jiným onemocněním). Typickými podmíněnými patogeny jsou např. *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Aeromonas* atd.

V následující tabulce (viz *tabulka 4*) jsou uvedeny patogeny, nejčastěji přenášené pitnou vodou (podle WHO, 2011, upraveno). **Zdravotní význam** ukazuje četnost a závažnost případů, včetně spojení s epidemiemi. **Přežívání ve zdrojích vody** značí dobu, ve které mohou být detekována infekční stádia patogenů (při 20 °C): krátké – do 1 týdne, střední – 1 týden až 1 měsíc, dlouhé – více než 1 měsíc. **Rezistence k chloru** se určuje tak, že se na suspenzi kmene aplikuje běžná dávka chloru (při hodnotě pH 7–8, 20 °C). Nízká = 99 % inaktivace patogenu za méně než 1 minutu, střední = inaktivace za 1–30 minut a vysoká = inaktivace za více než 30 minut. Neplatí pro organismy v biofilmech. **Relativní infektivita** byla stanovena na základě experimentů na dobrovolnících, experimentálních zvířatech nebo z epidemiologických studií. Vysoká = 1–10<sup>2</sup> částic, střední = 10<sup>2</sup>–10<sup>4</sup> částic, nízká = více než 10<sup>4</sup> částic.

Další patogenní mikroorganismy, které se vyskytují ve zdrojích pitné vody (někdy se mohou i pomnožit), ale u kterých není přímý důkaz o přenosu nákazy pitnou vodou (WHO, 2011), jsou z bakterií např. *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Enterobacter sakazakii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Tsukamurella* (patřící mezi atypická mykobakteria), *Yersinia enterocolitica*, z virů koronaviry a chřipkové viry a z prvoků např. *Balantidium coli*, *Blastocystis hominis*, *Isoospora belli*, *Microsporidia* (mikrosporidie), *Toxoplasma gondii*, *Fasciola* spp. a další volně žijící hlístice (*Nematoda*), jiné než *Dracunculus medinensis*.

Následuje výčet patogenních mikroorganismů nejčastěji detekovaných v pitných a surových vodách. U skupin mikroorganismů, které se stanovují i v některých rutinních hydroanalytických laboratořích, jsou uvedeny metody stanovení, u dalších jsou alespoň základní informace. Mikroorganismy, které ve výčtu chybí, se ve vodách téměř nestanovují, jejich výzkumem se zabývají výhradně úzce specializovaná pracoviště (např. referenční laboratoře SZÚ). Některé patogenní bakterie mají i indikátorovou hodnotu a jsou proto uvedeny v kapitole 5.2. (jako např. *Clostridium perfringens*). *Pseudomonas aeruginosa* se stanovuje pouze v balených vodách (dále v bazénových vodách). V seznamu dále chybí *Staphylococcus aureus*, který způsobuje především kožní infekce a je spojován především s bazénovými (případně koupacími) vodami. Tento ukazatel je podrobně specifikován v publikaci Baudišová a kol. (2013).

Média, uvedená v metodách stanovení patogenních mikroorganismů, nejsou zahrnuta v receptáři. Lze je však vyhledat v příslušných normách.



Tabulka 4. Patogenní mikroorganismy přenesené pitnou vodou

Patogen	Zdravotní význam	Přežívání ve zdrojích vody	Rezistence k chloru	Relativní infektivita	Význam zvířecích zdrojů	Poznámka
<b>Bakterie</b>						
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Vysoký	Může se množit	Nízká	Nízká	Ne	
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Vysoký	Střední	Nízká	Střední	Ano	
Patogenní <i>E. coli</i> a <i>Shigella</i>	Vysoký	Střední	Nízká	Nízká	Ano	
<i>Francisella tularensis</i>	Vysoký	Dlouhé	Střední	Vysoká	Ano	Způsobuje tularémii, hlavním zdrojem infekce jsou zajáci a jiní hlodavci.
<i>Legionella</i> spp.	Vysoký	Může se množit	Nízká	Střední	Ne	
<i>Leptospira</i>	Vysoký	Dlouhé	Nízká	Vysoká	Ano	
Mykobakteria (netuberkulózní)	Nízký	Mohou se množit	Vysoká	Nízká	Ne	
<i>Salmonella</i> Typhi	Vysoký	Střední	Nízká	Nízká	Ne	Způsobuje břišní tyfus. V ČR jen importované případy.
Další salmonely	Vysoký	Mohou se množit	Nízká	Nízká	Ano	
<i>Vibrio cholerae</i>	Vysoký	Různá (může přežívat v dalších vodních organismech)	Nízká	Nízká	Ne	V ČR jen importované případy.

<b>Viry</b>								
Adenoviry	Střední	Dlouhé	Střední	Vysoká	Ne			
Astroviry	Střední	Dlouhé	Střední	Vysoká	Ne			
Enteroviry	Vysoký	Dlouhé	Střední	Vysoká	Ne			
Viry hepatitidy A	Vysoký	Dlouhé	Střední	Vysoká	Ne			
Viry hepatitidy E	Vysoký	Dlouhé	Střední	Vysoká	Možný (potenciální)			
Noroviry	Vysoký	Dlouhé	Střední	Vysoká	Možný (potenciální)			
Rotaviry	Vysoký	Dlouhé	Střední	Vysoká	Ne			
Sapoviry	Vysoký	Dlouhé	Střední	Vysoká	Možný (potenciální)			
<b>Prvoci</b>								
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Vysoký	Může se množit	Vysoká	Vysoká	Ne			
<i>Cryptosporidium hominis/parvum</i>	Vysoký	Dlouhé	Vysoká	Vysoká	Ano			
<i>Cyclospora cayentanensis</i>	Vysoký	Dlouhé	Vysoká	Vysoká	Ano			
<i>Entamoeba histolytica</i>	Vysoký	Střední	Vysoká	Vysoká	Ne			
<i>Giardia intestinalis</i>	Vysoký	Střední	Vysoká	Vysoká	Ano			
<i>Naegleria fowleri</i>	Vysoký	V teple vodě se může množit	Nizká	Střední	Ne			
<b>Červi</b>								
<i>Dracunculus medinensis</i>	Vysoký	Střední	Střední	Vysoká	Ne			Udává se pouze v tropech.
<i>Schistosoma</i> spp.	Vysoká	Krátké	Střední	Vysoká	Ano			U nás spojeno především s koupáním.

## 5.3.1. Salmonely

### 5.3.1.1. CHARAKTERISTIKA A TAXONOMIE

Druhy rodu *Salmonella* jsou gramnegativní, nesporulující tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae*. Současná klasifikace salmonel klade důraz jak na fenotypické studie, tak na stanovení příbuznosti DNA metodou sekvenování rRNA. Bylo prokázáno, že se rod *Salmonella* skládá ze dvou druhů (*S. bongori* a *S. enterica*), přičemž *S. enterica* má šest poddruhů (*S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houstenae*, *S. enterica* subsp. *indica*). Jednotlivé druhy či poddruhy mají samozřejmě řadu sérotypů (podle jejich somatického (O) a bičíkového (H) antigenu), kterých je u salmonel známo více než 2 500. Protože je pro praktické použití v laboratorní diagnostice výše uvedená oficiální taxonomie příliš složitá (např. běžně používaný název „*Salmonella typhimurium*“, popř. *Salmonella* Typhimurium by se měl správně uvádět jako *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium), jsou pro rutinní potřeby akceptovány názvy sérotypů salmonel jako ekvivalent druhového jména.

Salmonely jsou střevní patogeny člověka, i když jejich virulence a patogenita může kolísat ve velmi širokém rozmezí. Jejich přirozeným habitatem je lidská populace, zemědělská či domácí zvířata, divoká zvěř a ptactvo. Lidé a zvířata mohou vylučovat salmonely nejen v případech jejich onemocnění, ale i asymptomaticky jako bacilonosiči. U lidské populace jsou většinou původci břišního tyfu, paratyfu, gastroenteritid (nejčastější gastroenteritidy jsou tzv. salmonelózy, což jsou toxikoinfekce, kdy kromě bakterie současně působí na hostitele i toxiny, které mikroorganismus produkuje) a septikémie. Šíření infekce probíhá prostřednictvím kontaminovaných potravin a vody. Přestože salmonely z vodního prostředí nejsou významným vehikulem při vzniku salmonelóz, vyskytují se běžně v odpadních i povrchových vodách a mohou pronikat i do vod podzemních a pitných.

### 5.3.1.2. METODY STANOVENÍ SALMONEL

Pro stanovení salmonel ve vodním prostředí platí standardizovaná metoda podle normy ČSN ISO 19250. Jedná se o kvalitativní stanovení v předem daném objemu vzorku, které se sestává z pěti kroků: primárního (neselektivního) pomnožení v tekutém médiu, dále z pomnožení v selektivním tekutém médiu, z následného vyočkování a kultivace na různých selektivně diagnostických půdách a potvrzení kolonií. Pro semikvantitativní stanovení mohou být provedeny zkoušky nejpravděpodobnějšího počtu (MPN) s vhodnými objemy vzorku.



Neselektivní primární pomnožení zahrnuje membránovou filtraci vzorků vody (přes membránový filtr o porozitě 0,45 µm) předem daného objemu a kultivaci, tj. neselektivní pomnožení mikroflóry zachycené na membránových filtrech po dobu 24 hodin při  $(36 \pm 2)$  °C v tlumivé peptonové vodě. Objem vyšetřovaného vzorku vody se stanovuje podle případné potřeby (např. pro surovou vodu 1 000 ml nebo 5 000 ml). Tento bod se zdá být nejslabším článkem celé metody stanovení salmonel. Za prvé je problematická samotná membránová filtrace (vzhledem k velkým objemům se musí použít velké množství membránových filtrů) a druhý problém spočívá v tom, že salmonely jsou ve srovnání s jinými bakteriálními druhy přítomné ve výrazné menšině. Zejména při vysokém mikrobiálním znečištění může být jejich pomnožení potlačeno růstem a metabolismem doprovodné mikroflóry. Při analýzách vod s vyšším mikrobiálním oživením (např. odpadních vod) se doporučuje neselektivní pomnožení vynechat a provést rovnou pomnožení selektivní.

Selektivní pomnožení v tekutých selektivních médiích zahrnuje 24hodinovou kultivaci při 41,5 °C v médiu Rappaport-Vassiliadis se sójou a 24hodinovou kultivaci v médiu podle Mullera a Kauffmanna s tetrathionátem a novobiocinem (MKTtn) při 36 °C. V případě, že je z epidemiologického hlediska žádoucí stanovit i *Salmonella* Typhi a *Salmonella* Paratyphi A, je nutné použít i médium se seleničitanem sodným a cystinem (kultivace 24 hodin při 36 °C). Očkuje se 1 ml pomnožené kultury (z povrchové blanky) do 9 ml selektivního média.

Vyočkování se provádí jednoduchým nebo křížovým roztěrem selektivně pomnožené kultury (opět nabrané z povrchové blanky) bakteriologickou kličkou tak, aby na konci roztěru rostly izolované kolonie. Při stanovení salmonel je vhodné použít paralelně minimálně dvě selektivně-diagnostická média, pokud možno na odlišném diferenciacním principu. V ČSN ISO 19250 je jako médium předepsáno xylóza-lysin-dekarboxylázové médium (dále XLD). Jako druhé médium lze použít např. agar s brilantovou zelení, fenolovou červení a laktózou podle Edel a Kampelmachera (dále BGA). XLD médium odlišuje salmonely od ostatních druhů na základě štěpení xylózy, laktózy, sacharózy, dekarboxylace lysinu a tvorby H<sub>2</sub>S. Nevýhodou je riziko falešné negativity u *Salmonella* Typhimurium. BGA médium odlišuje salmonely na základě štěpení laktózy. Výsledky příkladu růstu referenčních kmenů na různých médiích je uvedeno v tabulce 5. Dnes se média testují podle tabulky F1 v normě ČSN EN ISO 11133.

**Tabulka 5.** Výsledky růstu referenčních kmenů z České sbírky mikroorganismů na selektivních diagnostických médiích používaných pro detekci salmonel

Referenční kmen	Médium BGA		Médium XLD		Chromogenní médium Salmonella differential agar (firma HiMedia)	
	Růst	Barva kolonie	Růst	Barva kolonie	Růst	Barva kolonie
<i>Citrobacter koseri</i> CCM 2535	+	Světle zelená	++	Žlutá	+++	Modrá
<i>Proteus vulgaris</i> CCM 1799	+++	Žlutá až bezbarvá	+/-	Světlá	++	Bezbarvá
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	-	Žlutá až bezbarvá	+/-	-	+	Modrá
<i>Salmonella enterica</i> CCM 7189	+++	Růžová	+++	Světlá s černým středem	+++	Červená

Při studiu reálných vzorků vody bylo laboratorně zjištěno, že i kmeny zejména rodu *Proteus* mohou na selektivních diagnostických půdách tvořit kolonie podobné jako rod *Salmonella* (viz obr. 21). Na XLD médiu se jedná o světlé kolonie s černým středem, v případě rodu *Proteus* je kolonie matná a střed spíše tmavěšedý. Na médiu BGA může i *Proteus* tvořit růžové kolonie, někdy s mírně nepravidelným okrajem nebo s šedavým nádechem.

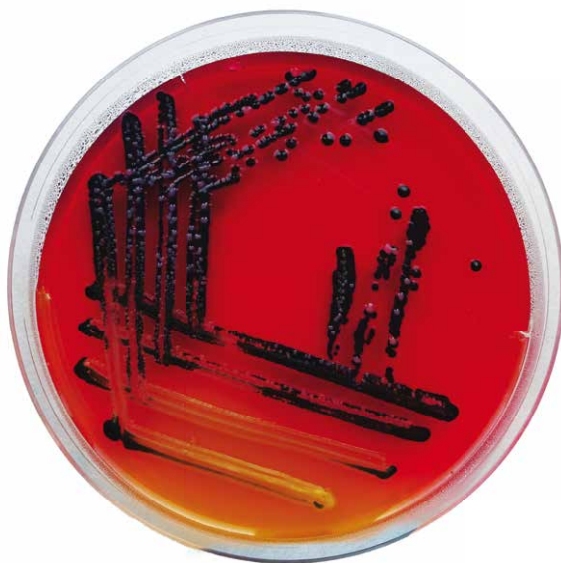
Všechny typické kolonie ze selektivně-diagnostických médií (nebo nejméně 3, pokud jich je velký počet) je třeba přeočkovat na neselektivní živný agar a po kultivaci 24 hodin při 36 °C podrobit biochemické konfirmaci. V normě jsou uvedena jednotlivá konfirmační média, je však možné použít i komerční testy. V tabulce 6 jsou uvedeny biochemické reakce typické pro rod *Salmonella*, které jsou vhodné k jeho odlišení od dalších bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* s podobnými růstovými a biochemickými vlastnostmi.

**Tabulka 6.** Vybrané biochemické reakce k odlišení kmenů rodu *Salmonella*; v tabulce je uvedeno procento kmenů daného taxonu, vykazující pozitivní reakci

Druh	GLU	LAK	H <sub>2</sub> S	URE	PHE	LYS
<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	100	1	95	1	0	98
<i>Citrobacter freundii</i>	100	50	80	70	0	0
<i>Morganella morganii</i>	90	1	0	98	95	0
<i>Proteus vulgaris</i>	85	2	95	95	99	0

Vysvětlivky: GLU = fermentace glukózy s tvorbou plynu, LAK = fermentace laktózy, H<sub>2</sub>S = tvorba sulfanu (sirovodíku), URE = aktivita ureázy, PHE = aktivita fenylalanindekarboxylázy, LYS = aktivita lysindekarboxylázy.

K uvedeným konfirmačním testům je doporučeno přiřadit CTO test (měl by být negativní), protože laboratorně byl zaznamenán na selektivních médiích (zejména BGA) růst i nefermentujících bakteriích (např. *Pseudomonas aeruginosa*).



**Obr. 21.** Vyočkování salmonel RV média na XLD médium; kolonie typické pro salmonely (světlé s tmavým středem) však byly následně určeny jako *Proteus mirabilis*

Izoláty, které jsou typické podle biochemických reakcí, jsou presumptivní bakterie rodu *Salmonella*, které mají být v případech nutnosti vyšetřeny v referenční laboratoři (sérologické potvrzení, sérotypizace).

### 5.3.1.3. SALMONELY VE VODNÍM PROSTŘEDÍ

Většina salmonel je široce rozšířena v různých prostředích i zeměpisných oblastech. Výskyt salmonel v pitné vodě znamená ve všech případech závažné bezprostřední ohrožení lidského zdraví (infekce probíhá výhradně fekálně orální cestou). V povrchových vodách poukazují na značné fekální znečištění. Znečištěná voda je navíc bohatou zásobárnou kmenů salmonel se širokým spektrem rezistencí na antibiotika, případně další antimikrobiální látky.

Podle zpráv Státního zdravotního ústavu bývá v humánním klinickém materiálu jednoznačně nejčastěji zachycena *Salmonella Enteritidis* (ve více než 95 %). Podle našich zkušeností s izolací salmonel z povrchových vod (Labe, Vltava) bylo spektrum sérotypů ve vodách výrazně bohatší. I zde byla nejčastěji zachycena *Salmonella Enteritidis* (ale pouze v 39,3 %), následovaná *S. infantis* (21 %), *S. agona* a *S. panama*. Druhý nejčastější sérotyp, vyskytující se v klinickém materiálu – *Salmonella Typhimurium*, nebyl ve vodách téměř detekován. Bylo to však zřejmě proto, že většina kmenů byla izolována z XLD média, které růst tohoto sérotypu potlačuje. Tyto výsledky však byly získány v letech 1996–1997, od té doby se záchyt salmonel v povrchové vodě několikanásobně snížil.

Dříve bylo stanovení salmonel legislativně vyžadováno v surové vodě (negativní nález v 1 000 ml, resp. 500 ml vzorku), případně ve vodě na koupání (negativní nález v 1 000 ml vzorku). V současné době však již aktuální předpisy tyto požadavky neobsahují a podle WHO (2011) jsou *E. coli*, resp. termotolerantní koliformní bakterie, dostatečným indikátorem jejich nepřítomnosti. Salmonely jsou pouze jedním z ukazatelů jakosti vody pro závlahu (podle normy ČSN 75 7143), kde je vyžadován negativní nález v 500 ml, resp. 100 ml. Zároveň jsou jedním z ukazatelů určujících hygienickou nezávadnost čistírenských kalů.

## 5.3.2. Shigely

Bakterie rodu *Shigella* jsou fakultativně anaerobní, gramnegativní, nesporulující, nepohyblivé tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae*. Glukózu a další sacharidy (nikoliv laktózu) fermentují, ojediněle s tvorbou plynu, jsou oxidáza negativní, kataláza pozitivní. Nevyužívají citrát ani malonát jako zdroj uhlíku. Jsou vysoce příbuzné s rodem *Escherichia*, některými taxonomy jsou dokonce považovány za jeden rod, a některými metodami (např. biochemické, nebo metoda MALDI) je ani nelze od inaktivních kmenů *E. coli* spolehlivě odlišit. Pro potvrzení druhové identifikace shigel je nezbytná typizace somatických (O) antigenů. Rod se skládá ze čtyř druhů, které jsou často zařazovány jako podskupiny: *S. dysenteriae* (podskupina A, vysoce infekční kmeny sérotypu O1 produkující Shiga toxin, Stx), *S. flexneri* (podskupina B), *S. boydii* (podskupina C) a *S. sonnei* (podskupina C).

Shigely způsobují vážná střevní onemocnění, včetně bacilární dyzentérie. Infekční dávka je velmi nízká, již požití 10–100 zárodků může vést k infekci. Velkou roli hraje produkce shigatoxinu (Stx), která se může mezi jednotlivými kmeny lišit. Primární hostitel je člověk a další vyšší primáti. Epidemie shigelózy bývají spojeny s místy s nízkou hygienou (denní centra, věznice a psychiatrické léčebny apod.). Infekce se přenáší fekálně orální cestou, kontaktem s nakaženým člověkem, kontaminovanou vodou či potravinami.

Stanovení bakterií rodu *Shigella* není běžnou součástí mikrobiologického rozboru vody a neexistuje na ně ani standardizovaná (normovaná) metoda. Shigely lze stanovit pomnožením v modifikovaném selenitovém (selenitové médium F) nebo GN médiu či membránovou filtrací a kultivací na XLD médiu nebo MacConkey médiu (bezbarvé kolonie). Inkubace probíhá 24 hodin při 35 °C. Další identifikace musí být sérologická, případně lze využít metod molekulární biologie (např. PCR).

Vodní prostředí je významným přenašečem shigelóz a je zaznamenáno i mnoho epidemií z pitné vody. Detekce shigel se provádí pouze v případě epidemiologické potřeby, podle závažnosti vyskytujících se onemocnění. Všechny detekční techniky však mají nízkou citlivost a spolehlivost, takže výsledky bývají podhodnocené (WHO, 2011). Plány pro zajištění bezpečnosti vody by měly zajistit pitnou vodu prostou shigel. *E. coli* (případně termotolerantní koliformní bakterie) je však vhodným indikátorem jejich výskytu. Shigely jsou citlivé k dezinfekci.

### 5.3.3. Rod *Campylobacter*

#### 5.3.3.1. CHARAKTERISTIKA A TAXONOMIE

Rod *Campylobacter* (původně spadající do rodu *Vibrio*) patří do čeledi *Campylobacteraceae*, která kromě tohoto rodu zahrnuje i rody *Arcobacter* a *Sulfospirillum*. V současné době je známo 28 druhů kampylobakterů (NCBI Taxonomy Browser). Co se týče zdravotního rizika pro člověka, jsou nejvýznamnějšími druhy *C. jejuni* a *C. coli*, v menší míře pak *C. lari* a *C. upsaliensis*. Tyto čtyři druhy patří do skupiny termotolerantních kampylobakterů (růst při 42 °C).

Jedná se o malé (cca 0,2–0,8 × 0,5–5 μm), štíhlé, zakřivené, případně až spirálovité gramnegativní tyčky s jedním bičíkem na jednom nebo obou pólech buňky. Kampylobaktery vykazují charakteristický vývrtkovitý pohyb. Jsou velmi citlivé ke kyslíku a superoxidům, nicméně v menších koncentracích kyslík ke svému růstu potřebují. Při kultivaci je tedy nutno zajistit mikroaerofilní atmosféru, tzn. 3–15 % kyslíku (optimální složení atmosféry pro jejich růst je pak 5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>). Nejlépe rostou při 41,5–43 °C, avšak při teplotě nižší než 30 °C nikoliv. Patří k nesporelujícím bakteriím, které za nepříznivých podmínek (např. chlad, nedostatek živin či poškození buňky) mají kokoidní tvar a mohou přecházet do stavu životaschopných, ale nekultivovatelných bakterií (VBNC). Jsou silně kataláza a oxidáza pozitivní, v biochemických testech jinak většinou nevykazují aktivitu a jsou asacharolytické. Charakteristickou vlastností *C. jejuni* je schopnost hydrolyzovat hippurát. Bakterie rodu *Campylobacter* jsou citlivé k většině dezinfekčních látek včetně chloru.

Termofilní druhy *Campylobacter* spp. jsou jednou z nejčastějších příčin akutního průjmového onemocnění u člověka tzv. kampylobakteriízy. Přírodním rezervoárem je zažívací trakt teplokrevných zvířat, přičemž znečištěná voda je jedním z dominantních vektorů přenosu těchto mikroorganismů. K rozvoji nákazy stačí nízká infekční dávka (cca 500 až 800 bakteriálních buněk, podle Black a kol., 1988). Na velikost infekční dávky se uvádí rozdílné názory. Například Bednář (1996) uvádí infekční dávku jako požití více než 10<sup>4</sup> mikrobů, Allosa a Blaser (1995) uvádějí rozpětí 800 až 10<sup>6</sup> mikroorganismů, které způsobuje symptomy u 10–50 % osob, Thomas a kol. (1999) zase udávají vznik klinických symptomů u 10 % osob při požití méně než 800 buněk. Infekční doba je nejčastěji udávána v rozpětí 2 až 5 dní. Kampylobakteriíza vyvolaná *C. jejuni* nebo *C. coli* je onemocnění, které se projevuje bolestmi břicha následovanými průjmy. Postižení mohou vykazovat další nespecifické příznaky, jakými jsou např. horečka, bolest hlavy, závrať, svalová bolest, popř. zvracení. Po jednom až dvou dnech se u cca 15 % pacientů objevuje krev ve stolici. Popsané epidemie kampylobakteriízy způsobené infekcí

z kontaminované pitné nebo povrchové vody byly dříve popsány např. v USA (1978 a 1983), Kanadě (1991), na Novém Zélandu (1987), ve Finsku (1986 a 1989) a Norsku (1991) a zahrnovaly celkem přes 5 000 nakažených osob (Koenraad a kol., 1997). Termotolerantní bakterie rodu *Campylobacter* se často vyskytují ve střevním traktu domácích i volně žijících teplokrevných zvířat, aniž by vykazovala příznaky onemocnění.

### **5.3.3.2. METODY STANOVENÍ BAKTERIÍ RODU *CAMPYLOBACTER***

Pro stanovení termotolerantních bakterií rodu *Campylobacter* platí norma ČSN ISO 17995, která popisuje stanovení těchto bakterií buď pomnožením v předem daném objemu vzorku vody (je možné použít jako kvalitativní stanovení, nebo pro semikvantitativní stanovení metodou nejpravděpodobnějšího počtu, tzv. MPN s vhodnými objemy vzorku), anebo membránovou filtrací pro kvantitativní stanovení u více kontaminovaných vzorků.

Pro kvalitativní (nebo semikvantitativní) zkoušku se požadovaný objem vzorku, zfiltrovaný přes membránový filtr o porozitě 0,45 µm, pomnoží ve 100 ml vysoce selektivním Prestonově médiu (předem vytemperovaném na teplotu 20–30 °C) a paralelně v méně selektivním Boltonově médiu. Prestonovo médium může být příliš selektivní na to, aby umožnilo dostatečnou výtěžnost některých kmenů *C. coli*. Boltonovo médium naopak nemusí být dostatečně selektivní, aby zabránilo v některých vzorcích růstu jiných bakterií, než jsou kampylobaktery. Pro čisté vody nebo vody, v nichž se předpokládá nízký počet doprovodné mikroflóry, je pravděpodobně vhodnější Boltonovo médium. Naočkovaná média se inkubují při (36 ± 2) °C po dobu (44 ± 4) hodin v mikroaerofilních podmínkách (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> a 85 % N<sub>2</sub>). Během kultivace se uzávěry inkubačních lahví sejmou, aby se ke vzorku dostala mikroaerofilní atmosféra. Po inkubaci se 10 µl pomnožené kultury rozetře na povrch mCCDA média a naočkované plotny se inkubují při (41,5 ± 1) °C po dobu (44 ± 4) hodin v mikroaerofilních podmínkách. Typické kolonie kampylobakterů jsou malé, ploché, nebo vypouklé, s lesklým povrchem. Při pokračující inkubaci se kolonie snižují a získávají vypouklý tvar s matným povrchem. Barva kolonií se mění od průhledné, do šedavé nebo bělavé. Konfirmace typických kolonií se provádí pomocí biochemických testů na katalázu a oxidázu, které jsou v tomto případě pozitivní, a také se provádí mikroskopické vyšetření v kapce na živiny bohatého média, ideálně za použití fázového kontrastu. Kampylobaktery jsou velmi pohyblivé, tenké tyčinky se spirálovitým tvarem. Pohyblivost je charakterizována prudkými nebo spirálovitými pohyby (označovanými jako „pohyb korkové zátky“). Dále se testuje neschopnost aerobního růstu.

K případné konečné konfirmaci lze nad rámec požadavků normy použít metodu fluorescenční *in situ* hybridizace pomocí sondy 5' GCC CTA AGC GTC CTT CCA 3', která by měla být specifická pro čtyři druhy *C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. upsaliensis* (Poppert a kol., 2008). Kmeny lze popř. také ověřit pomocí polymerázové řetězové reakce nebo pomocí MALDI.

V případě očekávaného vyššího výskytu kampylobakterů ve vodě je možné selektivní pomnožení vynechat a vzorky zpracovat membránovou filtrací a kultivovat přímo na mCCDA agaru.

### 5.3.3.3. **CAMPYLOBACTER VE VODNÍM PROSTŘEDÍ**

Bylo zjištěno, že se tyto patogeny ve vodním prostředí běžně vyskytují. Za hlavní zdroje kampylobakterů je považováno znečištění pocházející především ze střevního traktu teplokrevných živočichů. Hlavním rezervoárem mohou být sedimenty (vzhledem k mikroaerofilním nárokům kampylobakterů pro jejich přežívání je to vhodnější prostředí), kde výskyt kampylobakterů sezonní změny nevykazovaly. Ze sedimentů se zpětně *Campylobacter* spp. dostává do vodního sloupce zejména při velkých deštích. Pokud jde o druhové zastoupení izolovaných kampylobakterů z vodního prostředí, nejčastěji jsou zachycovány různé sérotypy druhů *Campylobacter jejuni*, *C. coli* a *C. lari* v různých poměrech. Kontaminovaná pitná voda byla opakovaně prokázána jako zdroj nákazy. Plány rizikové analýzy by měly zajistit nepřítomnost kampylobakterů v systému, nicméně bylo prokázáno, že *E. coli* jejich přítomnost, resp. nepřítomnost, dobře indikuje.

## 5.3.4. *Pseudomonas aeruginosa*

### 5.3.4.1. CHARAKTERISTIKA A TAXONOMIE

*Pseudomonas aeruginosa* je typový druh rodu *Pseudomonas* z čeledi *Pseudomonadaceae*. Je to striktně aerobní, gramnegativní, mírně zahnutá, štíhlá, pohyblivá tyčinka. Je chemoorganotrofní a je schopna využít širokou škálu organických látek. Roste na selektivním médiu s cetrimidem, je oxidáza i kataláza pozitivní, vykazuje světle zelenou fluorescenci pod UV světlem (360 ± 20 nm) a je schopna produkovat amoniak z acetamidu. Typická je též produkce barevných pigmentů (např. pyoverdin, pyocyanin nebo fluorescein) a vydávání specifické vůně, resp. zápachu (sladký, jahodový až jasmínový). *Pseudomonas aeruginosa* je podmíněně patogenní mikroorganismus, ohrožující zejména starší osoby a malé děti; odhaduje se, že vyvolává 10 % nozokomiálních infekcí.



Může vyvolávat infekce ran, sliznic, např. ušních, močové infekce, pneumonie, endokarditidy a sepse, zvláště u imunitně oslabených pacientů.

### 5.3.4.2. METODY STANOVENÍ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

*Pseudomonas aeruginosa* se standardně stanovuje podle ČSN EN ISO 16266 membránovou filtrací vhodného objemu vody, po kultivaci na selektivním médiu s cetrimidem. Konfirmované v prvním kroku jsou ty kolonie, jež produkují modrozelené barvivo pyocyanin. Potvrzení dalších kolonií viz ČSN EN ISO 16266, tabulka 1.

Metoda zahrnuje koncentraci vzorku membránovou filtrací (používají se membránové filtry o porozitě 0,45 µm), kultivace na C-N agaru s cetrimidem (44 ± 4) hodiny při (36 ± 2) °C. Suspektní kolonie se přeočkují na neselektivní živný agar a provádějí se konfirmační testy: produkce amoniaku z acetamidu, aktivita oxidázy (viz koliformní bakterie) a fluorescence na Kingově médiu B. Postup potvrzení kolonií *Pseudomonas aeruginosa* je uveden v tabulce 7. Subkultivují se všechny kolonie z membránového filtru, které vyžadují potvrzení. Pokud to není proveditelné, subkultivuje se co největší počet těchto kolonií a výsledky se přepočítají na celkový počet. Subkultivace se provádí (22 ± 2) hodin při (36 ± 2) °C. Zkontroluje se čistota subkultur a ty, které byly zpočátku červenohnědé, se testují oxidázovým činidlem (9.3.1.).

Pro odlišení *Pseudomonas aeruginosa* od *P. fluorescens* je ještě vhodné (i když to norma nepředepisuje) zařadit jako konfirmační test schopnost růstu izolátu při 44 °C.

**Tabulka 7.** Postup potvrzování suspektních kolonií *Pseudomonas aeruginosa*

Popis kolonií na CN agaru	Produkce amoniaku z acetamidu	CTO test	Fluorescence na Kingově médiu B	Potvrzeno jako <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Modrozelené	Neprovádí se	Neprovádí se	Neprovádí se	ANO
Vykazující světle zelenou fluorescenci (ne modrozelené)	+	Neprovádí se	Neprovádí se	ANO
Červenohnědé	+	+	+	ANO
Jiné	Neprovádí se	Neprovádí se	Neprovádí se	NE

V současné době je v návrhu norma ISO/CD 16266-2, která předepisuje stanovení *Pseudomonas aeruginosa* metodou nejpravděpodobnějšího počtu (MPN) pomocí systému Pseudalert (od firmy IDEXX). Tento systém je analogický systémům Colilert (na stanovení koliformních bakterií a *E. coli*), nebo Enterolert (stanovení enterokoků), které jsou uvedeny v kap. 5.2. Princip je založen na růstu kmenů *P. aeruginosa* v selektivním médiu a schopnosti kmenů hydrolyzovat specifické, fluorescenčně značené proteinové látky. Metoda je určena pro pitné a bazénové vody, včetně vod s vysokou doprovodnou mikroflórou. Není vhodná pro balené karbonizované vody. Laboratorním testováním byla zjištěna nevhodnost metody Pseudalert i v případě hodnocení kvality přírodních koupacích vod (Baudišová a kol., 2013). Dalším problémem je skutečnost, že tato metoda vyšetřuje maximálně 100 ml vzorku a v některých případech (např. balené vody) je požadovaný objem vzorku 250 ml (negativní záchyt v 250 ml).

#### **5.3.4.3. PSEUDOMONAS AERUGINOSA VE VODNÍM PROSTŘEDÍ**

Bakterie druhu *Pseudomonas aeruginosa* je široce rozšířena v různých typech životního prostředí. Vyskytuje se i ve fekáliích člověka, ale v menší míře než koliformní bakterie. Navíc se ve vodě velmi snadno pomnožuje, proto nemůže být považována za indikátor fekálního znečištění a *E. coli* její výskyt nemusí indikovat. Protože má schopnost utilizovat i těžko rozložitelné organické látky, může se v případě nevhodných konstrukčních prvků ve vodovodních řadech vyskytovat v pitné vodě. Je považována za indikátor přítomnosti nevhodných organických látek a její výskyt indikuje hrubé hygienické závady. Často také kolonizuje biologické nárosty na vnitřních stranách vodovodního potrubí, čímž se po odumření může stát substrátem pro nutričně náročnější mikroorganismy.

Stanovení *Pseudomonas aeruginosa* se při běžném rozboru pitné vody neprovádí (jako ukazatel je předepsána pouze pro balenou vodu), ale bývá detekována ve skupině „kultivovatelné mikroorganismy“, tedy počty kolonií. Je citlivá na dezinfekci, ale omezení jejího výskytu lze docílit optimalizací odstranění organického uhlíku v systému a tím i „zhoršením podmínek“ pro rozvoj biofilmů.

## 5.3.5. Legionely

### 5.3.5.1. CHARAKTERISTIKA A TAXONOMIE

*Legionella* je rod gramnegativních, aerobních, nesporulujících, acidorezistentních tyčinek z čeledi *Legionellaceae*. Rod je tvořen několika desítkami druhů a sérotypů, z nichž naprosto nejvýznamnější je *Legionella pneumophila*, sérotyp 1, případně 5. Legionely jsou kultivačně velmi náročné, obvykle schopné růstu po nejméně dvou dnech kultivace na agaru s aktivním uhlím a kvasničným extraktem obsahujícím L-cystein a železité ionty a tvoří často kolonie bílé, purpurové až modré nebo zeleně zbarvené jako limety. Legionely jsou původci závažných pneumonií, někdy končících i fatálně (zejména u imunosupresivních pacientů).

### 5.3.5.2. METODY STANOVENÍ LEGIONEL

Pro stanovení legionel platily normy ČSN ISO 11731 Jakost vod – Stanovení bakterií rodu *Legionella* a ČSN ISO 11731-2 Jakost vod – Stanovení bakterií rodu *Legionella*; Metoda přímé membránové filtrace pro vody s malým počtem bakterií. V současné době se tyto normy spojují v jednu – ČSN EN ISO 111731. Jsou určeny pouze na rodové stanovení – *Legionella* spp., které je vyžadováno českou legislativou pro provozní kontrolu teplé a bazénové vody. Zjištění počty legionel však nemusejí vždy vypovídat o závažnosti zdravotního rizika, protože toto je spojeno výhradně s určitými sérotypy, např. *L. pneumophila* sérotyp 1, resp. 5. Pro bližší identifikaci (např. při vyhledávání zdroje nákazy nebo při posuzování závažnosti zdravotního rizika) je nezbytná aglutinace se specifickými séry (specifikováno v příloze G normy). Například vhodné a pro většinu laboratoří mikrobiologie vody dostupné je použít skupinové sérologické dourčení legionel pomocí rychlého latex-aglutinačního testu pro identifikaci legionel od některého dodavatele diagnostik (např. Oxoid, Bio-Rad aj.). Jedná se o identifikaci skupiny *L. pneumophila* sg. 1, *L. pneumophila* sg. 2–15 a *Legionella* species, třetí skupina zahrnuje detekci deseti nejběžnějších druhů legionel, většinou patogenních. V odůvodněných případech je žádoucí detailnější určení druhů a séroskupin ve specializovaných laboratořích.

Kromě výše uvedených norem existuje i mezinárodní norma (např. na Slovensku přijatá jako STN P ISO/TS 12869) na stanovení legionel metodou kvantitativní PCR (qPCR). V České republice tato norma nebyla přijata a metoda qPCR se k detekci legionel nepoužívá (zachycuje i mrtvé buňky apod., viz kap. 3.2.2.2.).

### 5.3.5.3. LEGIONELY VE VODNÍM PROSTŘEDÍ

Legionely se ve vodním prostředí vyskytují běžně. Velké problémy však mohou způsobovat v umělých systémech (vodovodní potrubí nebo klimatizační jednotky, zejména ve velkých komplexech budov), které poskytují vhodné podmínky (např. teplotu 25–50 °C) pro pomnožení. Legionely jsou citlivé k dezinfekčním prostředkům, mohou však též přežívat a pomnožovat se v biofilmech, zvláště jsou-li jejich hostitelem prvoci (améby), které prakticky nelze eliminovat. Riziko legionel tak lze pouze minimalizovat.

Kontrolní stanovení legionel musí probíhat zvlášť, legionely nejsou stanoveny ve skupině „kultivovatelné mikroorganismy“, ani *E. coli* jejich výskyt neindikuje. Plány zajištění bezpečnosti vody prováděné provozovatelem neodhalí u vnitřních vodovodů jednotlivých zásobovacích objektů riziko osídlení legionelou. Je odpovědností správců budov, zejména těch rizikových, nebo v nichž přebývají ohrožené skupiny obyvatel, aby si pro své budovy takové plány sami zpracovali, případně nechali zpracovat.

### 5.3.6. Atypická (netuberkulózní) mykobakteria

Mykobakteria jsou aerobní, nesporulující tyčky, v přírodě značně rozšířené. Většina z nich nepůsobí žádná onemocnění, ale patří k nim i původce tuberkulózy (*Mycobacterium tuberculosis*) a lepry – malomocenství (*M. leprae*). Zjišťuje se však i účast některých dalších „atypických“ mykobakterií na různých onemocněních, známých jako mykobakteriízy. Termín „atypická mykobakteria“, který je uveden ve vyhlášce pro pitnou vodu 252/2004 Sb., je starší. Adekvátní jsou i termíny oportunní mykobakteria, PPM (podmíněně patogenní mykobakteria), NTM (netuberkulózní mykobakteria) či EM (environmentální mykobakteria). Termínů je více především proto, že žádný z nich plně nevystihuje podstatu skupiny. V poslední době se v odborné literatuře nejčastěji vyskytují termíny NTM a EM.

V České republice se v rámci vyšetřování atypických mykobakterií izoluje s nejvyšší frekvencí *Mycobacterium kansasii*, *M. avium* komplex (což je suma *M. avium*, *M. intercellulare* a *M. scrofulaceum*) a *M. gordonae* (považován většinou za nepatogenní), s poněkud nižší frekvencí *M. xenopi* a *M. fortuitum*, což jsou všechno příležitostné patogeny. Údaje americké CDC (the Centre for Control and Prevention of Diseases, Atlanta) naopak s největší frekvencí uvádějí vždy *M. avium* komplex. Druh *M. avium* zahrnuje poddruhy: *M. avium* subsp. *avium* (MAA), *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) a *M. avium* subsp. *silvaticum*.

Ve vyhlášce, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, je v teplé vodě vyrobené z jiné vody než pitné (příloha 2) a v teplé vodě z individuálního zdroje vyráběné pro účely osobní hygieny zaměstnanců (příloha 3) stanovení atypických mykobakterií předepsáno. Ukazatel se stanovuje pouze v případě výroby teplé vody ze zdroje povrchové vody nebo důlní vody a s centrálním ohřevem a rozvodem. Centrálním ohřevem se rozumí ohřev vody na jednom místě pro celou budovu nebo více budov. Pro tento ukazatel je stanovena limitní hodnota 100 KTJ/1000 ml (příloha 2), která se vztahuje na součet počtů následujících druhů atypických mykobakterií: *Mycobacterium chelonae*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*. V příloze 3 je uveden limit 100 KTJ/100 ml.

Ve vyhlášce jsou předepsány dvě alternativní kultivační metody pro záchyt atypických mykobakterií, a to metoda s laurylsulfátem sodným a metoda s cetylpyridinium chloridem (CPC). Metody jsou založeny na opakované centrifugaci a membránové filtraci vzorků a z toho vyplývá jejich značná nepřesnost. Metody molekulární biologie na stanovení atypických bakterií (např. PCR) se zatím používají pouze ve výzkumných projektech, nejsou dosud standardizované a ani výše zmíněná vyhláška jejich používání nepřipouští.

Atypická mykobakteria jsou přítomna a množí se zejména v koncových částech potrubí uvnitř objektů, zvláště v rozvodech teplé vody, a jejich přítomnost zdaleka není jen problémem „teplé vody vyráběné z individuálního zdroje povrchové nebo důlní vody“, ale týká se vodovodní sítě obecně. Riziko onemocnění mykobakteriíozou je sice poměrně nízké, avšak existuje, a to zejména u osob s oslabenou imunitou. Vzhledem k rezistenci atypických mykobakterií na provozně únosné koncentrace dezinfekčních prostředků (chlorace, ozonizace) je prevencí jejich výskytu dobrý stav vodovodní sítě bez slepých a neprůtočných částí a s minimálním množstvím biofilmů.

### 5.3.7. Viry

Viry se od ostatních mikroorganismů liší nejen menšími rozměry, ale zcela zásadně svojí povahou. Nerostou, nedělí se, nemetabolizují. S ostatními živými mikroorganismy je spojuje jediná vlastnost – mají genetický kód pro vlastní replikaci. Jsou to vnitrobuněční parazité, kteří všechny ostatní nezbytnosti včetně replikačního aparátu využívají od hostitelské buňky. Nemnoží se, a tudíž je nelze ani kultivovat bez přítomnosti hostitelských buněk.

Viry přenosné vodou zahrnují různé skupiny s odlišnou morfologií a genetickou informací. Nejčastěji se jedná o zástupce rodu *Norovirus* (odvozeno od názvu Norwalk virus, genom je tvořen jedním řetězcem RNA s pozitivní polaritou), kteří jsou zodpovědní téměř za většinu nebakteriálních gastroenteritid. Méně časté jsou adenoviry (genom je tvořen dvěma řetězci DNA), rotaviry (genom je tvořen dvěma řetězci RNA) či virus hepatitidy A (genom je tvořen jedním řetězcem RNA s pozitivní polaritou). Další skupinou virů jsou enteroviry, kam patří například skupiny polioviry (genom je tvořen jedním řetězcem RNA s pozitivní polaritou), coxsackieviry, ECHOviry a dále jednotlivé enteroviry (celkem přes 70 sérotypů).

Společnými znaky virových agens přenosných vodou jsou:

- výrazná odolnost vůči vlivům vnějšího prostředí (hodnota pH, teplotní stres, běžné koncentrace dezinfekčních prostředků);
- schopnost setrvat v infekčním stavu po velmi dlouhou dobu (v podzemní vodě i roky);
- nízká infekční dávka (v případě norovirů se jedná o 10 až 100 virových částic);
- schopnost šíření vysokého množství virových částic (až  $10^{11}$  virových částic v 1 g stolice);
- potřeba specifických živých buněk k vlastní replikaci.

Hlavním způsobem přenosu této skupiny virů (tzv. enterické viry) je fekálně-orální přenos. V některých případech tyto viry způsobují krátkodobá onemocnění nebo symptomatické infekce, v jiných případech mohou i u zdravých osob způsobit závažná onemocnění a v případě zanedbání léčby i smrt. Ještě závažnější situace nastává u rizikových skupin (děti, starší osoby či osoby s poruchou imunity).

Detekce virů je záležitostí vysoce specializovaných pracovišť. Monitoring enterovirů v České republice je v současné době zabezpečován Národní referenční laboratoří pro enteroviry (ve Státním zdravotním ústavu), která je akreditována Světovou zdravotnickou organizací (WHO), a výsledky jsou přímo do WHO předávány. Tato laboratoř provádí pravidelný monitoring skupiny enterovirů – poliovirů v odpadních vodách (přítoky) v krajských ČOV a utečeneckých táborech jedenkrát měsíčně. Stanovení poliovirů je kvalitativní, k izolaci se používají metody tkáňových kultur. Stanovení norovirů, adenovirů, rotavirů či virů hepatitidy A či E se provádí ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně, od roku 2005 v akreditovaném režimu.

Vzhledem k tomu, že většina vodou přenosných virů je problematicky kultivovatelná na buněčných kulturách, metody jejich průkazu jsou dnes většinou založeny na molekulárně genetických metodách (koncentrace vzorku, izolace

virových částic, následná izolace nukleové kyseliny, vlastní detekce pomocí PCR (viry, jejichž genom je tvořen DNA) či reverzně transkripční PCR (RT-PCR u virů, jejichž genom je tvořen RNA)). Koncentrace virů ve vzorcích vody je většinou velmi nízká (pod limitem detekce), proto je nutné odebírat větší množství vzorku (běžně 10 až 20 litrů, v některých případech až stovky litrů) a následně je koncentrovat. Tento krok je kritickým bodem stanovení. Při volbě dané metody je tak nutné zvážit charakteristiku jak analyzovaného vzorku, tak virových agens a následně provést optimalizaci postupu (podrobněji viz Vašíčková a kol., 2017).

Při hodnocení výsledků získaných za použití molekulárně genetických metod je nutné postupovat velmi obezřetně v širších souvislostech, neboť většinou nelze posoudit infekčnost detekovaných částic. Nicméně v případě virů, jejichž genom je tvořen RNA je možné zohlednit fakt, že molekula RNA není v prostředí stabilní, a tak lze z jejího průkazu odvodit pravděpodobnost v podstatě čerstvého výskytu infekčních částic.

### 5.3.8. Prvoci

Z parazitických prvoků jsou nejnámější a nejčastěji detekovaní zástupci rodu *Cryptosporidium* a *Giardia*.

Rod *Cryptosporidium* je obligátní intracelulární parazit s komplexním životním cyklem, zahrnující jak pohlavní, tak nepohlavní replikaci. Tlustostěnné oocysty o průměru 4–6 μm jsou vylučovány stolicí. Rod *Cryptosporidium* zahrnuje 13 druhů, přičemž nejdůležitější lidské infekce jsou způsobovány druhy *C. hominis* a *C. parvum*. Tento patogen způsobuje průjemová onemocnění zahrnující i nauzeu, zvracení a horečku. Závažnost infekce závisí na věku a stavu imunity. Zdrojem infekce jsou lidé a hospodářská zvířata, zejména mladí jedinci (infikované tele může vyloučit až  $10^{10}$  oocyst za den, viz WHO, 2011). Oocysty mohou přežívat ve vodním prostředí (sladká voda) až několik měsíců. Infekce se přenáší fekálně-orální cestou a bylo zjištěno, že již méně než 10 oocyst může vyvolat infekci. Úloha kontaminované pitné vody jako přenašeče je potvrzena. Oocysty jsou rezistentní na oxidační činidla (jako např. chlor), ale jsou citlivé na UV záření. Plány zajištění bezpečnosti vody by měly zahrnovat prevenci kontaminace surové vody oocystami rodu *Cryptosporidium*. Hlavní opatření by však měly spočívat ve vhodné úpravě pitné vody. *E. coli* a termotolerantní koliformní bakterie nejsou vzhledem k jejich odlišné citlivosti na chlor dostatečným indikátorem výskytu kryptosporidií.

*Giardia* spp. je bičíkatý prvok, který parazituje v gastrointestinálním traktu člověka a některých zvířat. Rod *Giardia* zahrnuje mnoho druhů, ale s lidským onemocněním (nazývaným giardiáza) je spojen pouze druh *G. intestinalis* (synonymum *G. lamblia* nebo *G. duodenalis*). *Giardia* má relativně jednoduchý životní cyklus, skládající se z bičíkatého trophozoida, který se pomnožuje v gastrointestinálním traktu, a infekční tlustostěnné, oválné cysty o velikosti 8–12 µm v průměru. Cysty mohou přežívat ve vodním prostředí několik týdnů až měsíců a méně než 10 cyst představuje riziko infekce. Symptomy onemocnění jsou především průjem a křeče, u řady pacientů může nemoc přejít do chronické formy. Onemocnění se převážně přenáší z člověka na člověka, ale kontaminovaná voda, včetně vody pitné, byla také prokázána jako zdroj onemocnění, resp. epidemií. Cysty rodu *Giardia* jsou více rezistentní na oxidativní dezinfekční prostředky než střevní bakterie, ale méně než oocysty rodu *Cryptosporidium*. *E. coli* (nebo alternativně termotolerantní koliformní bakterie) nemohou být spolehlivým indikátorem nepřítomnosti giardií. Plány zajištění bezpečnosti vody by měly eliminovat potenciální riziko výskytu giardií v surové vodě (především prevencí kontaminace surové vody vodami odpadními) a dále adekvátní úpravou, dezinfekcí a ochranou vody během distribuce.

Pro stanovení oocyst *Cryptosporidium* spp. a cyst *Giardia* spp. existují standardizované metody podle ISO 15553 a US EPA 1623 (US EPA, 2005). Je nezbytné zfiltrovat velké objemy vody u povrchových vod obvykle desítky litrů (u pitných vod ještě více) přes speciální filtry (alternativně lze použít např. flokulaci). Zahuštěný vzorek je vyčištěn pomocí imunomagnetické separace. Detekce se provádí ve fluorescenčním mikroskopu po označení specifickými protilátkami s navázaným FITC a DAPI barvením. K potvrzení se ještě prohlíží vnitřní struktura suspektních organismů pomocí diferenciálního interferenčního kontrastu. U vod s velkým rozvojem fytoplanktonu, popř. u vod se silným anorganickým zákallem lze filtrovat jen menší objemy vody, řádově litry, čímž se zvyšuje mez detekce. V povrchových vodách se navíc vyskytují organismy, které je obtížné v mikroskopu odlišit od cyst a oocyst; jedná se například o některé zelené řasy nebo akinety nostokálních sinic. Vzhledem k tomu, že ke stanovení je zapotřebí speciální vybavení a drahý spotřební materiál, bude pravděpodobně i v budoucnu prováděno jen ve specializovaných laboratořích. Výstupem je pouze rodová příslušnost obou prvků, protože jejich cysty a oocysty jsou až na výjimky v mikroskopu vzájemně neodlišitelné. Přitom jen některé druhy *Cryptosporidium* spp. a cyst *Giardia* spp. mohou u lidí vyvolat onemocnění. Odlišit jednotlivé druhy či nižší jednotky ve vzorcích vody je možné pomocí molekulárně genetických metod (molekulárně biologických metod).



## 6. CHARAKTERISTIKY VÝKONNOSTI

### MIKROBIOLOGICKÝCH METOD

Pro rutinní mikrobiologickou analýzu vody se používají převážně metody, které jsou standardizované, tj. zavedené v příslušných technických normách. Tyto metody jsou většinou již validované. V novějších normách jsou uváděny i příslušné validační parametry, přesto, že není nutné metody validovat v plném rozsahu, může řada charakteristik výkonnosti významně pomoci k pochopení principů a úskalí používaných či nově zaváděných metod a také umožní relevantní odhad nejistot měření.

**Validace** je proces poskytnutí důkazu, že metoda je schopná sloužit určenému účelu, tj. prokázat přítomnost či kvantitativně stanovit specifické mikroby nebo skupinu mikrobů s adekvátní shodností a přesností. Validace metod pro kvantitativní mikrobiologické analýzy zahrnují stanovení citlivosti a specifčnosti, pozitivní a negativní odchylky (podíl falešně pozitivních a negativních výsledků), opakovatelnost, reprodukovatelnost a meze detekce. Validace by měly být prováděny (pokud je to možné) na přirozeně kontaminovaných vzorcích.

Při vlastním zavedení metod do praxe je v každém případě nezbytná **verifikace** metod, což potvrdí, že je laboratoř umí správně používat. Minimální požadavky na verifikaci jsou stanovení opakovatelnosti, mezí detekce a nejistot měření.

Vlastní výpočty přesahují rámec této publikace, konkrétní schémata výpočtů a příslušné vzorce lze nalézt v citovaných normách.

## 6.1. SPECIFIKA MIKROBIOLOGICKÉHO ROZBORU

Je všeobecně známé, že výsledky mikrobiologických stanovení jsou charakterizovány velkým rozptylem a že tato skutečnost může zbytečně degradovat hodnocení mikrobiologických ukazatelů. Metody mikrobiologického rozboru vody mají svoje zvláštnosti, které jsou dané nejen omezením stále vylepšovaných metod stanovení, ale i charakterem vzorku jako takového.

Mezi nejvýznamnější zvláštnosti patří:

- Vzorek pro mikrobiologickou analýzu se skládá z jednotlivých živých partikulí (např. kolonie tvořící jednotka „KTJ“). Počet pozorovaných kolonií je aproximací počtu živých částic. Použitelnost dostupných „testů výkonnosti“ je limitována tím, že nelze poznat skutečné množství hledaných mikroorganismů ve vzorku.
- Stanovené mikroorganismy jsou *diskrétní jednotky* a rozptýlení partikulí je nerovnoměrné jak ve vzorcích, připravených v laboratoři, tak ve vzorcích pocházejících z prostředí. Nelze použít takové způsoby míchání vzorku, které sice zajistí dokonalé promíchání obsahu vzorkovnice, ale nezabrání ztrátě živých buněk (např. ultrazvuk). Rozptýl uvnitř vzorků je často významný a působí problémy při validaci. Charakteristickým rysem mikrobiologických metod jsou náhodné rozdíly mezi paralelními vzorky, způsobené nestejným rozdělením partikulí dokonce i v dokonale promíchané suspenzi. Základní náhodné kolísání je nevyhnutelné a nesouvisí s technickým zařízením či dovedností. Vyplývá to z Poissonova rozdělení. Pokud jsou vzorky paralelních stanovení rozptýlené více, než udává Poissonovo rozdělení (což mohou způsobovat technické nedokonalosti či další příčiny), tak tento jev se nazývá nadměrná disperze (extravariabilita).
- Bakterie a ostatní mikroorganismy jsou *živé*. Vodní prostředí je pro hygienicky významné mikroorganismy zcela nefyziologické, proto mohou být stresované či fyziologicky poškozené a nemusejí vždy vykazovat vlastnosti typické pro hledanou skupinu. Navíc mohou být negativně ovlivněny přítomností dalších např. toxických látek ve vzorku. Zároveň může docházet k řadě interakcí jak abiotických (neživých), tak biotických (živých) faktorů. Pokud se např. projevuje nadměrný růst doprovodné mikroflóry, může dojít k maskování či dokonce potlačení růstu hledaných kolonií.
- Mikrobiologické metody nejsou robustní. Jakákoliv odchylka od standardního postupu může vést k naprosto odlišným výsledkům.
- Dalším typickým rysem mikrobiologických metod založených na počítání kolonií je jejich náchylnost k neočekávaným problémům, často i na jediné plotně. Tyto problémy mohou být vyvolány přítomností jediné rušící kolonie (např. růst aktinomycet na agaru s tryptózou a kvasničným extraktem), nerozpuštěnými

látkami či jiným znečištěním ve zkoušeném vzorku, kontaminací apod. Takovéto „nehody“ se neodrážejí ve výkonnosti metody obecně, nejsou kvantifikovatelné při validaci, ani je nelze předpovídat matematickým modelováním.

- Vzorek pro mikrobiologické stanovení je velmi nestabilní, je nutné jej zpracovat maximálně do 24 hodin po odběru a stanovení nelze v žádném případě opakovat. To může být problém především u neznámých vzorků povrchové vody, kdy je nutné zvolit správný stupeň ředění.

V tabulce 8 jsou uvedeny hlavní požadavky na různé součásti mikrobiologického, základního chemického a biologického rozboru. V tabulce nejsou uvedeny požadavky na speciální organickou analýzu (která je např. součástí úplného rozboru pitné vody), neboť tam se požadavky od základního chemického rozboru liší (vysokoškolský vzdělaný analytik, speciální přístroje – chromatografy apod.).

**Tabulka 8.** Charakteristiky a odlišnosti mikrobiologického, biologického a základního chemického rozboru vody

	Mikrobiologie	Biologie	Chemie
<b>Personál (analytik)</b>	pracovník se základními mikrobiologickými znalostmi a zkušenostmi s rozboru	vysoce kvalifikovaný pracovník s mnohaletou zkušeností	pracovník se základními chemickými znalostmi a zkušenostmi s rozboru
<b>Požadavky na vzorky</b>	chlazení během transportu vzorku, doručit do laboratoře tak, aby bylo možné zpracovat maximálně do 24 hodin po odběru	chlazení během transportu vzorku, doručit do laboratoře tak, aby ho bylo možné zpracovat do 24 hodin po odběru	vzorky na některá stanovení lze konzervovat bezprostředně po odběru, pokud nelze zpracovat hned, je možné chlazení během transportu vzorku; pro řadu ukazatelů není nutná ani konzervace, ani chlazení
<b>Zařízení</b>	běžné zařízení mikrobiologické laboratoře, důraz na sterilitu prostředí a aseptickou práci	nezbytné jsou kvalitní fluorescenční mikroskop a odstředivka s výkyvným nebrzděným rotorem	běžné zařízení chemické laboratoře

<b>Metody</b>	uzanční metody, je nutné použít předepsané metody normami ČSN, ČSN EN, ČSN EN ISO	metoda je jednoznačně definována normami	je možné použít větší množství metod, laboratoř si může vybrat; je nutné dodržovat předepsané meze stanovitelnosti a nejistoty měření, pravdivost a přesnost metod
<b>Mez detekce / stanovitelnosti</b>	mez detekce je 1 KTJ ve filtrovatelném objemu, mez stanovitelnosti je 10 až 15 KTJ na membránovém filtru či Petriho misce, v řadě případů se pracuje pod mezí stanovitelnosti	mez stanovitelnosti je při standardním provedení – 2 jedinci v 1 ml, lze metodu upravit až na mez stanovitelnosti 1 jed./ml	u různých metod různá, meze stanovitelnosti nesmí být vyšší než limity dané legislativně
<b>Nejistoty měření</b>	pouze u detekce nad mezí stanovitelnosti (viz kap. 6.4.), obvykle okolo 40 %	vzhledem k charakteru používaných metod se neudává, zatím není k dispozici postup věrohodného stanovení	u různých metod jsou nejistoty různé, obvykle 5–15 %

## 6.2. CHARAKTERISTIKY MIKROBIOLOGICKÝCH METOD

Stanovení jednotlivých charakteristik vede k určení, resp. ověření, výkonnosti metod. Pokud je to možné, je vhodné pracovat s přirozeně kontaminovaným vzorkem, který obsahuje různou škálu cílových mikroorganismů i doprovodné mikroflóry. Je nezbytné provést dostatečný počet opakování (u některých charakteristik je to vyložene předepsáno, ale obecně se považuje za minimální počet 20) a pracovat s oživenými vzorky, které jsou podobné vzorkům, které se v laboratoři provozně zpracovávají. Základní (užitečné) používané charakteristiky mikrobiologických metod jsou:

- **Meze detekce:** Počet partikulí, kdy pravděpodobnost negativního výsledku se rovná 5 %. U Poissonova rozdělení se jedná o 1 KTJ v objemu vzorku (konfidenční meze 95 % jsou v tomto případě 0,0253–5,57), který lze zpracovat (obvykle max. 100 ml). Pro analýzy pitných vod je daný limit a objem zpracovaného vzorku, který musí být podle platné legislativy dodržen.
- **Mez stanovitelnosti:** Nejnižší průměrná koncentrace partikulí ve zkoušeném objemu vzorku, kdy se očekává relativní standardní nejistota rovná určené hodnotě. Platí pouze pro povrchové a podzemní vody, kdy lze stanovit počet KTJ s dostatečnou přesností (25 %). Při velmi nízké koncentraci partikulí se všechny mikrobiologické metody včetně MPN a počítání kolonií ve své podstatě stávají kvalitativními (presence/absence; P/A) metodami. U pitných vod nelze přesný výsledek zaručit, neboť je daný limit a objem zpracovaného vzorku, který musí být podle platné legislativy dodržen.
- **Citlivost (senzitivita):** Část z celkového počtu pozitivních kolonií správně označených při předběžném hodnocení. Citlivost metody by obecně měla být větší než 90 %.
- **Specifita:** Část z celkového počtu pozitivních kolonií správně označených při předběžném hodnocení. Specifita metody by obecně měla být větší než 80 %.
- **Podíl falešně pozitivních výsledků:** Část typických kolonií, které se následně ukázaly (potvrdily) jako necílové (nesledované). Ke stanovení podílu falešně pozitivních a falešně negativních výsledků je vhodné využít nezávislé konfirmační testy.
- **Podíl falešně negativních výsledků:** Část netypických kolonií, které se následně ukázaly (potvrdily) jako cílové.
- **Selektivita:** Poměr počtu cílových kolonií a celkového počtu kolonií vyrostlých na Petriho misce či membránovém filtru. Selektivita by neměla být menší než 10 %.
- **Účinnost:** Část (frakce) celkového počtu kolonií, správně označená jako presumptivní počty.
- **Opakovatelnost:** Těsnost shody mezi výsledky za sebou následujících měření téže měřené veličiny provedených za stejných podmínek. Rozptyl výsledků by měl odpovídat Poissonově rozdělení ( $P = 0,95$ ). Pokud nějaký pracovník tohoto výsledku nedosahuje, měl by se buď zlepšit, nebo se musí příslušně zvýšit nejistota stanovení. V mikrobiologii se význam této charakteristiky dosti přeceňuje. Opakovatelnost ukazuje prakticky pouze na homogenizaci a na rozdělení částic ve vzorku.
- **Reprodukovatelnost:** Těsnost shody mezi výsledky za sebou následujících měření téže měřené veličiny provedených za odlišných podmínek. Reprodukovatelnost se počítá jako  $R = 2,8 S_R$ ; kde  $S_R$  je směrodatná odchylka reprodukovatelnosti obvykle vypočtená z mezilaboratorní směrodatné odchylky  $S_L$  a směrodatné odchylky opakovatelnosti  $S_r$ :  $S_R = \sqrt{(S_L^2 + S_r^2)}$ . Pro výpočty lze s výhodou použít výsledky mezilaboratorních porovnávání (interlaboratorní reprodukovatelnost). Stanovit vnitrolaboratorní reprodukovatelnost je většinou komplikované a výsledky mohou

být podhodnocené. Jeden vzorek by totiž měl být analyzován v odlišných podmínkách. Různý pracovník, to není problém, ale použití různé šarže média, různých inkubátorů a dalších zařízení už problematické je.

- **Nejistota v počítání:** *Relativní standardní odchylka opakovaně získaných počtů cílových kolonií v různých podmínkách (počítání stejnou osobou, různými osobami apod.).* Individuální počítání (1 osoba) by nemělo přesáhnout  $u_{\text{rel}} = \pm 0,03$  (tj. 3 %). Počítání různými pracovníky by nemělo přesáhnout  $u_{\text{rel}} = \pm 0,05$  (tj. 5 %). Pokud je nejistota v počítání větší než  $u_{\text{rel}} = \pm 0,1$  (tj. 10 %), jedná se o problémové stanovení.
- **Robustnost:** *Necitlivost analytické metody k malým změnám v postupu zkoušky.* Mikrobiologické metody jsou obecně velmi málo robustní a jakákoliv odchylka většinou vede k odlišným výsledkům.

## 6.3. KONTROLA A ŘÍZENÍ KVALITY PRÁCE V MIKROBIOLOGII

Ideální referenční materiály pro mikrobiologii vody (které by zahrnovaly škálu druhů a kmenů, vyskytující se ve vodním prostředí ve vhodné matrici) dosud neexistují. Současně dostupné kvalitativní (referenční kultury) i kvantitativní (referenční materiály) produkty jsou založeny na čistých kulturách, které mají s mikroflórou, vyskytující se ve vodním prostředí, společného jen málo. Referenční kmeny však mají své místo pro kontrolu výkonnosti kultivačních médií, jak je předepsáno v normě ČSN EN ISO 11133, kdy se také laboratorní pracovníci mohou seznámit s tím, jak typický kmen daného druhu na daném médiu vypadá. Je však nutné mít na paměti, že ve vodním prostředí se vyskytuje rozmanitější škála kmenů s širším rozsahem typického vzhledu (pro toto rozlišení je právě určeno testování podílu falešně pozitivních a negativních výsledků z přirozeně kontaminovaných vzorků).

Vnitřní provozní kontrola kvality práce laboratoří je založena na analýze duplicitních, přirozeně kontaminovaných vzorků, přičemž hodnocení si laboratoř zvolí sama. Buď je možné využít komerčně dostupné speciální statistické programy, nebo vlastní výpočty (konfidenčních) mezi například podle návodu, uvedeného v normě ČSN EN ISO 8199. Při celkovém hodnocení je třeba posoudit, jsou-li výsledky v souladu s deklarovanými nejistotami měření.

Vnější kontrola kvality práce v laboratoři se pak provádí v rámci mezilaboratorního porovnávání – tzv. zkoušek způsobilosti.

### 6.3.1. Vnitřní kontrola – referenční kultury

V České republice se používají referenční kultury z České sbírky mikroorganismů v Brně (CCM). Pro rutinní práci je nevhodnější forma želatinových disků – většina předepsaných kontrolních kmenů je ve formě želatinových disků k dispozici. Výhodou je jejich cena, doba expirace (více než 1 rok) a možnost jednoduché manipulace. Kromě běžných disků dodává Česká sbírka mikroorganismů tzv. „kmeny s definovaným obsahem“, které sice nespĺňují veškerá kritéria referenčních (případně certifikovaných referenčních materiálů), lze je však velmi výhodně používat pro vnitřní kontrolu práce, porovnání prací jednotlivých laborantů, porovnání jednotlivých médií (případně jejich šarží) apod. Jedná se o definované množství (řádově  $10^2$ – $10^3$  KTJ) testovacího kmene v rozpustné matrici. Cena je dostupná, manipulace jednoduchá, trvanlivost činí 6–12 měsíců. Tyto kmeny je třeba uchovávat při teplotě  $-20$  °C (!), což je rozdíl oproti běžným želatinovým diskům. Zatím jsou v této formě pro mikrobiologii vody k dispozici pouze *Escherichia coli* (CCM 3954), *Enterococcus faecalis* (CCM 4224), *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 1961) a *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (CCM 3953). Veškeré informace o dostupných referenčních kmenech jsou uvedeny na internetové adrese <http://www.sci.muni.cz/ccm/>.

Kultivační média je třeba pravidelně kontrolovat podle normy ČSN EN ISO 11133, která byla sice původně určena pouze pro mikrobiologii potravin, revize z roku 2014 ji však rozšířila i pro využití v mikrobiologii vody. Na tuto normu už jsou i přímé odkazy v novějších technických normách např. ČSN EN ISO 9308-1 (2015) nebo ČSN EN ISO 14189 (2017), tudíž je její používání povinné. Požadavky na kontrolu konkrétních médií a činidel (kontrolní kmeny, referenční půda, metoda kontroly, kritéria a charakteristické reakce) jsou specifikovány v tabulce F1 normy ČSN EN ISO 11133. Ke kontrole kultivačních médií jsou předepsány harmonizované referenční kmeny, z nichž řadu dodává i Česká sbírka mikroorganismů (odkaz na stránku s příslušným seznamem viz výše). Při nákupu hotových médií (tj. již nalitých na Petriho miskách) je třeba dbát na to, aby byla várka opatřena příslušným certifikátem. Pokud tomu tak není, je třeba ověřit každou várku. Média a činidla, která jsou připravována z komerčně dostupných dehydratovaných složek, je třeba kontrolovat minimálně při otevření každé šarže (s vyloučením všech vlivů na kvalitu média, jako je např. teplota při rozehrívání, vliv sterilizace, světla apod.).

Pro přípravu kultivačních půd se používá pouze purifikovaná voda, tj. destilovaná, demineralizovaná, deionizovaná nebo připravená reverzní osmózou nebo voda prostá látek, které by mohly za podmínek zkoušení inhibovat nebo ovlivnit růst mikroorganismů, např. stopy chloru, amoniaku či iontů kovů. Mikrobiální kontaminace nemá přesáhnout  $10^3$  KTJ/ml (počty kolonií při 22 °C, podle ČSN EN ISO 6222). Konduktivita vody nesmí být při 25 °C vyšší než  $25 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , přednostně však nižší než  $5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### Metoda kvantitativní (např. stanovení produktivity média)

Pro techniku stanovení počtu mikroorganismů je v zájmu k dosažení dostatečné shodnosti mít k dispozici testovací inokulum v počtu asi  $10^2$  KTJ. Je třeba používat prakticky použitelný rozsah 80 až 120 KTJ na plotnu (o průměru 90 mm) a minimem počtu 50 KTJ. Pro kvantitativní zkoušení ředicích roztoků a tekutých transportních půd je zapotřebí testovací inokulum obsahující od  $10^3$  do  $10^4$  KTJ, aby v objemu inokulovaném na povrch ploten bylo obsaženo asi 100 KTJ.

### Příklad stanovení produktivity média

- **Datum:** 1. 3. 2017
- **Testované médium:** HiCrome Chromogenic Coliform agar (HiMedia M 1991I, šarže 0000224229)
- **Referenční médium:** Trypton Yeast extract agar (HiMedia M1272 – 500 g, šarže 0000280660)
- **Testovaný kmen:** *E. coli* CCM 3953
- **Podmínky testování:** přímý výsev, inkubace 24 hodin při  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$
- **Výsledek testované médium:** ředění -5, průměr 286 KTJ/0,5 ml (= 57 200 000 KTJ/disk)
- **Výsledek referenčního médium:** ředění -5, počet 282 KTJ/0,5 ml (= 56 400 000 KTJ/disk)
- **Spočítaná produktivita:** 101 %
- **Konečný výsledek:** Vyhovuje/nevyhovuje srovnání s F1

### Metoda kvalitativní

Pro zkoušení selektivity se na plotnu nebo do zkumavky kultivačního média inokuluje suspenze jiného než cílového mikroorganismu obsahující  $10^4$  až  $10^6$  KTJ. Pro zkoušení specifity tuhých plotnových půd je potřebné inokulum obsahující  $10^3$  až  $10^4$  KTJ.

## 6.3.2. Vnější kontrola – mezilaboratorní porovnávání (zkoušky způsobilosti)

Zkoušky způsobilosti (ZZ), organizované různými subjekty (v České republice např. ASLAB, Státní zdravotní ústav či CSLab, o. p. s.) jsou většinou založeny na stanovení indikátorových skupin mikroorganismů ve vzorcích vody s přirozenou mikroflórou. Přestože mají tyto vzorky mnohé nevýhody (především nejsou stabilní, analýzy nelze v delším časovém horizontu opakovat), považujeme tento způsob kontroly za nejvhodnější, protože laboratoře pracují se škálou kmenů, vyskytující se při jejich normální rutinní práci. Další nevýhodou však je, že tyto vzorky neobsahují v dostatečném počtu (statisticky významně detekovatelném)



mikroorganismy, zejména patogenní, jejichž stanovení je nyní legislativou vyžadováno (např. *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* apod.), a tudíž jsou ZZ v této oblasti organizovány. Obohacení vzorků při jejich přípravě je tak nezbytné. Při přípravě vzorků je nutné zohlednit, že vodní prostředí je pro tyto mikroorganismy tak nefyziologické, že z něj velice rychle mizí (zejména pokud jde o izolát čisté, stresované kultury, proto je optimální použít více různých kmenů), a jednotlivé buňky mohou tvořit shluky (je tedy nutná předinkubace v tekutém médiu a velice pečlivé promíchání vzorku).

Vnější kontroly by se laboratoř měla optimálně účastnit několikrát do roka, což sice současné nabídky umožňují, nicméně se toho u nás příliš nevyužívá. Některé zahraniční systémy (např. ve Velké Británii) doporučují vnější kontrolu až desetkrát do roka, neboť pouze tato frekvence spravedlivě prokáže kvalitu práce v laboratoři bez negativních či pozitivních odchylek. V České republice je však každý „další“ okružní rozbor většinou považován pouze za opravu neúspěchu v prvním kole.

Výsledky mezilaboratorního porovnání je třeba kriticky zhodnotit (nepřeceňovat, ale ani nepodceňovat) a využít jako zpětnou vazbu. V případě neúspěšného výsledku (zejména v případě, kdy se do intervalu správných hodnot nevejde ani s intervalem z nejistot měření) je nutné vyloučit všechny náhodné (nesystémové) chyby, identifikovat případné rušivé vlivy (vertikální kontrolou) a především zjistit, nejedná-li se o trvalý trend (opakované hodnoty konkrétního ukazatele nad nebo pod vztažnou hodnotou), který by mohl ukazovat na chybu systémovou. Při hodnocení výsledků zkoušek způsobilosti je možné přezkoumat i vlastní nejistoty stanovení.

## 6.4. NEJISTOTY V MIKROBIOLOGII VODY

Nejistota měření je definována jako „parametr spojený s výsledkem měření, jenž charakterizuje rozptýlení hodnot, které může být racionálně přisouzeno měřené veličině“. Je to míra nepřesnosti. Parametr se vyjadřuje jako standardní nejistota nebo relativní standardní nejistota (v procentech).

Jeden z hlavních a zásadních problémů mikrobiologického rozboru vody je skutečnost, že většina mikrobiologických analýz (především u pitné vody) nesplňuje statistické požadavky na „kvantitativní“ analýzy. Vzhledem k určitým požadavkům

právních předpisů (hodnota „0“ ve 100 ml) nelze splnit minimální počet KTJ, aby byla splněna mez stanovitelnosti (tj. *nejnižší průměrná koncentrace partikul ve zkoušeném objemu vzorku, kdy se očekává relativní standardní nejistota rovná určené hodnotě*). Konfidenční meze hodnot 0–10 na hladině pravděpodobnosti  $P = 0,95$  jsou uvedeny v příloze II a pro hodnoty 1–5 je uvedena i relativní směrodatná odchylka těchto mezí. Pokud tedy laboratoř neuvádí relativní nejistoty větší než 100–140 % (což se předpokládá), nelze je použít pro nižší hodnoty než je 10 KTJ ve studovaném objemu. Lze tedy konstatovat, že hodnoty menší než 10 KTJ jsou pod mezí stanovitelnosti a lze je považovat maximálně za semikvantitativní výsledek (přestože se v protokolu v souladu s legislativou uvádí číslo). Správně nastavená nejistota se pozná podle toho, že se do rozmezí vejde minimálně 95 % duplicitních stanovení (včetně tajných vzorků).

Odhad nejistot měření je jedním ze základních požadavků na akreditaci metod. Jak již bylo naznačeno v kapitole 6.1., povahy mikrobiologických testů většinou znemožňují tvrdé statistické a metrologické hodnocení, nicméně i v této oblasti bylo dosaženo významného pokroku, který mikrobiologům umožňuje se této povinnosti vhodně zhostit. Současné právní předpisy (udávající požadavky např. na kvalitu pitné nebo surové vody však s nejistotami jako takovými nepočítají).

Pro odhad nejistot měření se předpokládá, že pracovníci laboratoří důkladně pochopili principy a úskalí jednotlivých mikrobiologických metod a mají potřebné zkušenosti s mikrobiologickými analýzami. V současné době je pro stanovení nejistot měření možné využít normu ČSN ISO 29201. Norma nedává jednotný striktní postup odhadů nejistot, ale je možné vybrat si ze dvou přístupů:

Globální (celkový) přístup: Základní myšlenkou je duplikovat celý analytický postup od přípravy počáteční suspenze po konečný výpočet. Kdekoli je to možné, musí být analyzovány reálné vzorky. Preciznost stanoveného průměru závisí na počtu vyšetřovaných vzorků (doporučuje se nejméně 30 vzorků). Globální stanovení nejistoty má být vyhodnoceno samostatně pro každý postup, typ matrice a každý stanovovaný mikroorganismus, aby realisticky reprezentovalo vnitrolaboratorní reprodukovatelnost. Během experimentu se mají měnit faktory, o nichž se předpokládá, že jsou důležité. Tento přístup se obecně mnoho nehodí k použití pro nízké počty, čímž se jeho využití omezuje.

Přístup „per partes“, tj. po částech: Při vyhodnocení složky po složce se zkombinují jednotlivé příspěvky k nejistotě měření, odděleně vyhodnocené (odběr podvzorků, zředění, inokulace, inkubace a počítání). Podle našich zkušeností jsou největším příspěvkem k nejistotám homogenizace vzorku (zahrnující i vlastní rozptyl částic) a počítání kolonií (vliv osobního barvocitu apod.).

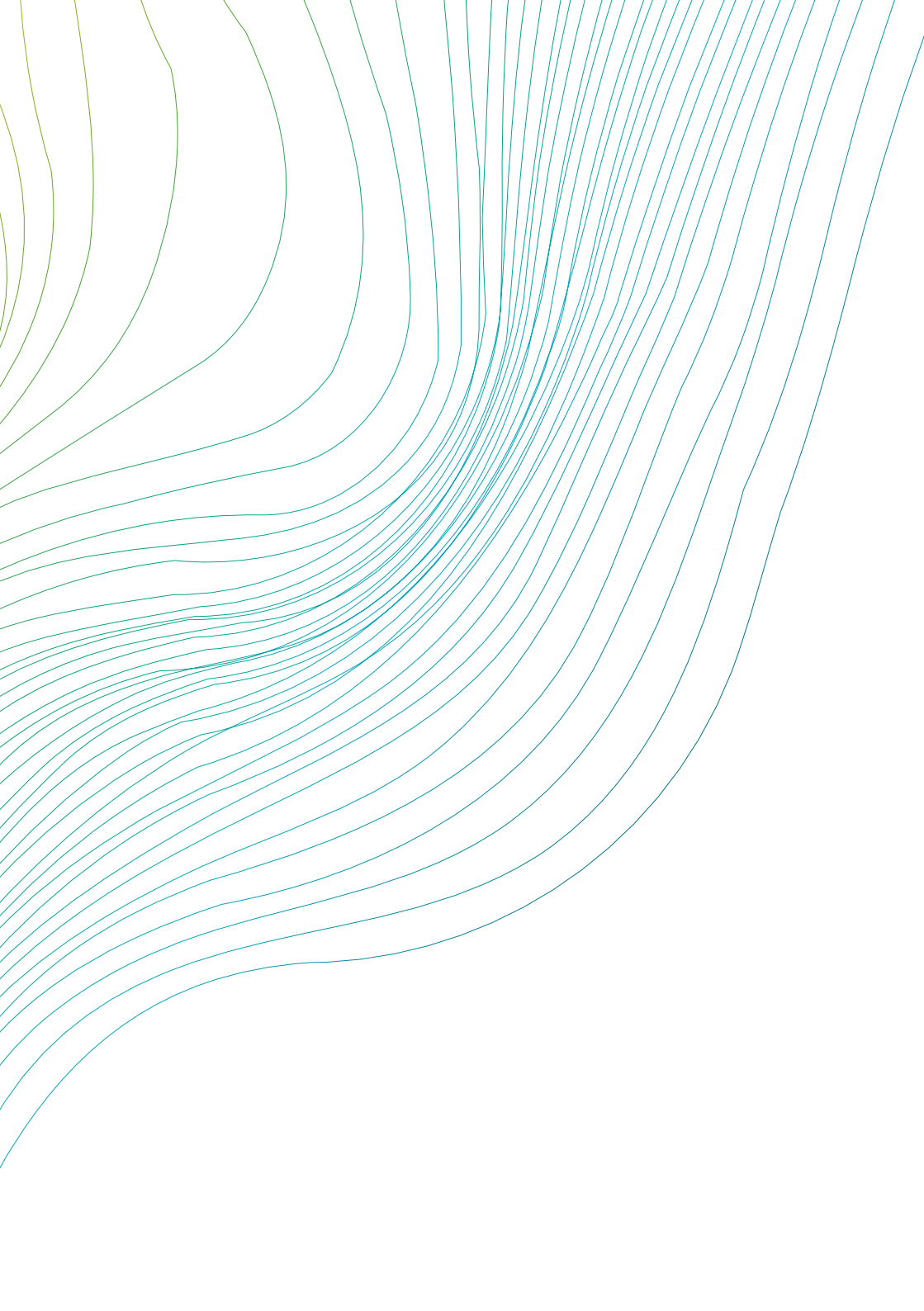
## 7. HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

### MIKROBIOLOGICKÝCH ZKOUŠEK

Povinné – analytik musí vždy neprodleně zkontrolovat, jestli jsou výsledky jednotlivých ukazatelů v souladu mezi sebou a odpovídají výsledkům dalších chemických či biologických ukazatelů. V případě významných výkyvů je nezbytné neprodleně zjistit, jestli někde není možná chyba. Vzorek jako takový není možné skladovat a znovu analyzovat, nicméně lze provést vertikální kontrolu pracovního postupu, případně znovu zkontrolovat nárůsty mikroorganismů na Petriho miskách či membránových filtrech, než dojde k jejich definitivní likvidaci.

Základní – srovnání výsledků s limity uvedenými v právních předpisech již dnes většinou automaticky provádí laboratorní počítačové programy. Mikrobiolog analytik by však měl být schopen vysvětlit (nebo alespoň navrhnout možnosti) zdroje nálezu a odborně zhodnotit jeho závažnost (s využitím nejistot měření, se kterými legislativa bohužel nepočítá).

Nadstavbová část – erudovaný mikrobiolog vody se zkušenostmi ve vodním hospodářství, technologii a hygieně vody by měl být schopen provádět na základě požadavků a spolupráce se zákazníky hodnocení výsledků, posouzení trendů a výkyvů. Velmi vhodná je i spolupráce s technologií úpraven vod (pokud to rozdělení kompetencí umožňuje), zejména při hodnocení výsledků mikrobiologických analýz (kolísání hodnot jednotlivých ukazatelů během roku, výběr vhodných metod stanovení, upozornění na nejistoty výsledků apod.). Tato spolupráce by se měla projevit i ve spolupráci při tvorbě rizikové analýzy a monitorovacího programu (četnost odběrů, výběr vhodných ukazatelů a metodik stanovení, kritické hodnocení kolísání výsledků apod.).



## 8. NEJČASTĚJŠÍ ZDROJE CHYB PŘI PROVÁDĚNÍ

### MIKROBIOLOGICKÉHO ROZBORU

V této kapitole jsou rozebírány nejčastější zdroje nepřesností mikrobiologických analýz, které mohou v důsledku vést až k nemožnosti realistického hodnocení výsledků. Tato kapitola byla zpracována z poznatků získaných jednak při posuzování mikrobiologických laboratoří a z těžkostí, které vyplývaly z práce s datovými soubory, dodanými různými laboratořemi.

#### 8.1. NEDODRŽOVÁNÍ PŘEDEPSANÝCH METODIK

Mikrobiologické metody jsou uzanční, tzn. smluvené. Nestanovuje se tedy taxonomicky definovaný mikroorganismus (nebo skupina), ale mikroorganismus detekovaný „podle metody“. Vzhledem k tomu, že mikrobiologické metody jsou velmi málo robustní, odchylky v použití odlišných metodik mohou vést ke zcela odlišným výsledkům.

Při mikrobiologických analýzách povrchových vod jsou nejčastější tyto problémy:

- Používání médií o jiném složení než je předepsáno (podobný komerční název, ale jiné než předepsané složení).
- Neprovádění nebo nedostatečné provádění předepsaných konfirmačních testů (např. hydrolyza eskulinu u stanovení intestinálních enterokoků, kyselá fosfatáza u *Clostridium perfringens*, všechny konfirmační testy u presumptivních kolonií salmonel, oxidázový test u koliformních bakterií apod.).
- Nezvládnutí předepsané metodiky stanovení z důvodů nedostatečné kvalifikace nebo nedostatečných mikrobiologických zkušeností pracovníků. Toto připadá v úvahu nejen u složitějších stanovení, jako je např. stanovení patogenních mikroorganismů (včetně salmonel), ale i v případech, kdy je obtížnější rozlišení cílových kolonií a laboratoře si neprovedly testy citlivosti, resp. specifčnosti.

## 8.2. PRODUKCE NEDOSTATEČNĚ PŘESNÝCH VÝSLEDKŮ

Při mikrobiologickém rozboru pitné vody je legislativními předpisy stanoven vyšetřovaný objem vzorku vody – u indikátorových bakterií se zpravidla používá objem 100 ml – a negativní záchyt (např. výsledek 0 KTJ/100 ml). V tomto případě lze získané výsledky statisticky považovat za víceméně kvalitativní, maximálně semikvantitativní.

Pokud laboratoře při analýzách povrchové vody (včetně vody surové) neprovádějí dostatečný počet ředění (včetně zpracovávaných objemů), nemusí být vždy splněny podmínky kvantitativních analýz (tj. pracovat s minimálním počtem kolonií na misce či membránovém filtru 10–15, aby byla dosažena dostatečná přesnost analýzy). Navíc nejsou vždy dostatečně zaznamenávána primární data tak, aby z nich šel následně rekonstruovat průběh analýz. Toto vede k tomu, že jsou občas poskytována čísla nepřesná, tj. „malá“ s velmi širokými konfidenčními mezemi. Kromě toho jsou do informačních systémů mnohdy dodávány výsledky ve formě „<nebo>“, které jsou pro následné statistické zpracování a další hodnocení bezcenné.

Toto se děje zejména z finančních důvodů. Ceny analýz jsou trhem neúměrně tlačeny dolů, čímž nezbyvá prostor na materiál, nezbytný pro zpracování více objemů anebo ředění vzorků. Jak již bylo uvedeno, vzorek se musí zpracovat ihned a na rozdíl od vzorků určených k chemickým analýzám se nemůže skladovat.

Velké množství vzorků ke zpracování může vést i k nepřesné práci. Největším zdrojem nepřesností je nedostatečné promíchání (homogenizace) vzorků. Jak již bylo uvedeno u definice opakovatelnosti (viz kap. 6.2.), tyto chyby se podílejí minimálně v 10 % na celkové variabilitě, v případě nekvalitní práce (dané např. spěchem) se může opakovatelnost vyšplhat až na 30 %. Naopak odměřování objemu (např. pipetováním) se na nepřesnostech podílí relativně málo, téměř vždy méně než 5 % (lze to ověřit vázkovou analýzou).

Dále se mnohdy vyskytují chyby při „přepočtu“ výsledků. Byla-li stanovena např. „0“ KTJ ve 100 ml, což bylo následně interpretováno jako „0“ KTJ v 1 ml, a ztratila se tím informace o vysoké čistotě vzorku. Nebo naopak při nevěnování pozornosti dostatečné koncentraci vzorků je stanoveno „0“ KTJ v 1 ml (surová voda), a poté uvedeno jako kvantitativní výsledek < 100 KTJ ve 100 ml. To je sice též matematicky správně, údaj má však mizivou informační hodnotu.

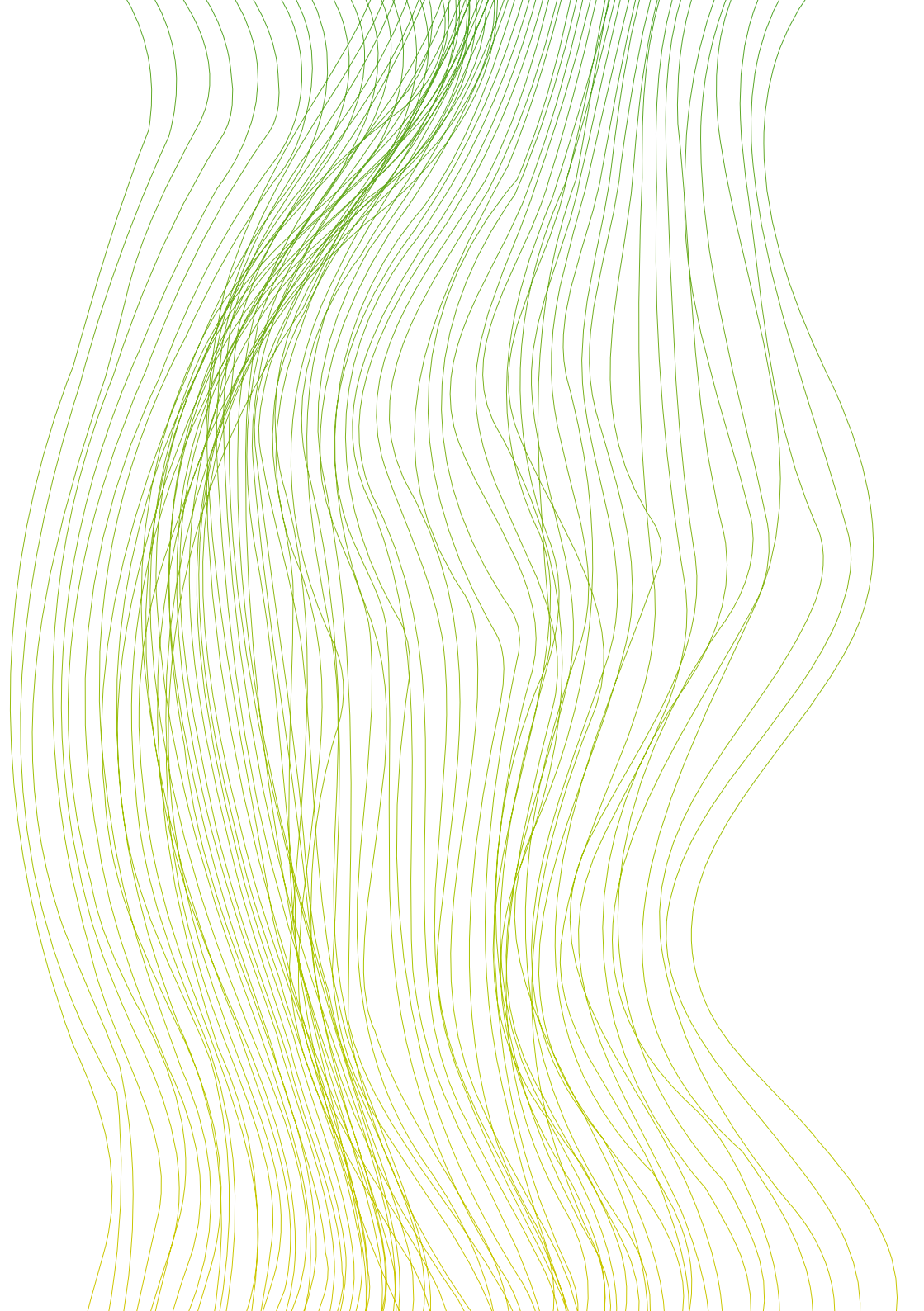
## 8.3 NEDOSTATEČNÁ KVALIFIKOVANÁ VÝSTUPNÍ KONTROLA VÝSLEDKŮ

Ne vždy je provedena konečná výstupní kontrola výsledků mikrobiologických analýz pracovníkem s dostatečnými znalostmi v mikrobiologii vody (včetně zhodnocení reálnosti získaných výsledků, vzájemnému poměru jednotlivých indikátorů, kontroly přepočtů, zaokrouhlování apod.). Tato kontrola je nezbytná. Je nutné mít na paměti, že většinou je to poslední fáze, kdy výsledky mikrobiologického rozboru vidí člověk s dostatečnou odbornou kvalifikací (v tomto případě myšleno mikrobiologickou), neboť další zpracování a hodnocení většinou provádějí pracovníci jiných profesí (technologové, úředníci apod.).

## 8.4. NEDOSTATEČNÁ SPOLUPRÁCE SE ZÁKAZNÍKEM

Aby výsledky mikrobiologických analýz splnily svoji úlohu a přispěly k zlepšení daného stavu, je velmi důležité věnovat pozornost spolupráci se zákazníkem.

V naprosté většině případů není zákazník v mikrobiologii zběhlý, je proto vhodné (pokud o to jeví zájem) informovat jej o možnostech stanovení, stabilitě vzorku, nejistotách měření apod. Dále je dobré získat doplňující informace o místě odběru včetně netypických okolností. U soukromníků objedávajících si rozbor studny je důležité zeptat se na typ studny/vrtu, její/jeho hloubce, případně stávající dezinfekci.





## 9. RECEPTÁŘ MÉDIÍ

V přehledu této kapitoly jsou uvedena pouze média určená na základní mikrobiologický rozbor a některá média doplňková, která jsou využitelná při běžné práci v mikrobiologické laboratoři zabývající se analýzou vod.

### 9.1. NESELEKTIVNÍ MÉDIA

#### 9.1.1. Agar s tryptózou a kvasničným extraktem

Složení:

- Trypton 6,0 g
- Dehydratovaný kvasničný extrakt 3,0 g
- Agar 12,0 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

*Příprava:* Předepsané ingredience se rozpustí ve vodě, upraví se hodnota pH tak, aby po sterilizaci byla  $7,2 \pm 0,2$  při teplotě 25 °C. Potom se plní do patřičných nádob a sterilizuje se v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Před použitím se kultivační médium roztopí při max. 100 °C, nechá se zchladnout na teplotu cca 45 °C.

## 9.1.2. Masopeptonový agar (Živný agar č. 2)

*(dříve používaný ke stanovení tzv. mezofilních a psychrofilních bakterií)*

### Složení:

- Masový extrakt 10,0 g
- Pepton (z masa vyrobený) 10,0 g
- Chlorid sodný (NaCl) 5,0 g
- Agar 15 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

*Příprava: Předepsané ingredience se zahříváním na vodní lázni či v proudící páře rozpustí ve vodě, upraví se hodnota pH tak, aby po sterilizaci byla  $7,2 \pm 0,2$  při teplotě 25 °C. Potom se plní do patřičných nádob a sterilizuje se v autoklávu při teplotě  $(121 \pm 3)$  °C po dobu  $(15 \pm 1)$  minut. Pokud není kultivační médium ihned po přípravě bezprostředně použito, musí být ve sterilním stavu uskladněno ve tmě a při teplotě 4 °C, a to ne déle než jeden měsíc. Před použitím se kultivační médium roztopí při max. 100 °C, nechá se zchladnout na teplotu  $(45 \pm 1)$  °C.*

## 9.1.3. Trypton sójový agar

*(nejběžnější agar, používaný k subkultivaci kmenů bakterií; bez přidaného agaru se používá jako trypton sójový bujón, který je vhodný ke kultivaci kmenů v tekutém prostředí)*

### Složení:

- Tryptický hydrolyzát kaseinu 15,0 g
- Pepton (ze sóji vyrobený) 5,0 g
- Chlorid sodný (NaCl) 5,0 g
- Agar 15 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

*Příprava: Předepsané ingredience se zahříváním na vodní lázni či v proudící páře rozpustí ve vodě, upraví se hodnota pH tak, aby po sterilizaci byla  $7,2 \pm 0,2$  při teplotě 25 °C. Potom se plní do patřičných nádob a sterilizuje se v autoklávu při teplotě  $(121 \pm 3)$  °C po dobu  $(15 \pm 1)$  minut. Po zchlazení na 45–50 °C se rozlévá do Petriho misek. Plotny je možné uchovávat nejméně jeden měsíc v temnu při teplotě  $(5 \pm 3)$  °C, chráněně proti odpařování.*

## 9.2. SELEKTIVNÍ MÉDIA NA STANOVENÍ INDIKÁTOROVÝCH MIKROORGANISMŮ

### 9.2.1. Chromogenic Coliform agar (CCA)

#### Složení:

- Enzymatický hydrolyzát kaseinu 1,0 g
- Kvasničný extrakt 2,0 g
- Chlorid sodný 5,0 g
- Dihydrogenfosforečnan sodný • 2H<sub>2</sub>O 2,2 g
- Hydrogenfosforečnan sodný 2,7 g
- Pyrohroznan sodný 1,0 g
- Sorbitol 1,0 g
- Tryptofan 1,0 g
- Tergitol 7 0,15 g
- 6-Chlor-3-indoxyl-β-D-galaktopyranosid 0,2 g
- Kyselina 5-brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-glukuronová 0,1 g
- Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) 0,1 g
- Agar 9–18 g
- Destilovanou vodou doplnit do 1 000 ml

*Příprava:* Jednotlivé ingredience se rozpustí ve vodě pomocí zahřívání při maximální teplotě 100 °C. Je-li to nutné, upraví se hodnota pH tak, aby po sterilizaci odpovídala jeho hodnota 6,8 ± 0,2. Po zchlazení na 45–50 °C se rozlévá do Petriho misek. Plotny je možné uchovávat nejméně jeden měsíc v temnu při teplotě (5 ± 3) °C, chráněné proti odpařování.

## 9.2.2. Endo agar

### Složení:

- Pepton (z masa vyrobený) 10 g
- Masový výtažek (sušina) 8,6 g
- Laktóza 10 g
- Siřičitan sodný (bezvodý) 1,2 g
- Chlorid sodný 5 g
- Agar 12 g
- 5% roztok bazického fuchsínu v ethylalkoholu 3,4 ml
- Destilovaná voda do 1000 ml

*Příprava:* Jednotlivé ingredience se postupně rozpustí v 1000 ml destilované vody. Nakonec se přidá roztok bazického fuchsínu (viz 9.2.2.1.) a sterilizuje se 30 minut při 100 °C. Výsledná hodnota pH má být  $7,5 \pm 0,2$ . Připravené médium se skladuje maximálně dva týdny při teplotě 4 až 8 °C. Médium by mělo být slabě růžové; pokud médium zčervená, již se nehodí k použití.

### 9.2.2.1. ROZTOK BAZICKÉHO FUCHSÍNU

#### Složení:

- Bazický fuchsín 1 g
- 95% ethylalkohol 20 ml

*Příprava:* Po dokonalém rozpuštění se roztok v případě potřeby přefiltruje. Skladuje se v chladničce při 2–8 °C nebo podle pokynů výrobce.

**VÝSTRAHA!** Bazický fuchsín je kancerogenní a při manipulaci s ním musí být dodržována veškerá bezpečnostní opatření.

### 9.2.3. m-FC agar

#### Složení:

- Tryptose nebo biosate 10,0 g
- Proteose pepton č. 3 nebo polypepton 5,0 g
- Kvasničný extrakt 3,0 g
- Chlorid sodný (NaCl) 5,0 g
- Laktóza 12,5 g
- Žlučové sole č. 3 nebo směs žlučových solí 1,5 g
- Anilínová modř 0,1 g
- Kyselina rosolová – alkalický roztok (viz 9.2.3.1.) 10,0 ml
- Agar 15 g

*Příprava:* Jednotlivé ingredience se postupně rozpouští v 1 000 ml destilované vody, která již obsahuje 10 ml základního alkalického roztoku kyseliny rosolové (viz 9.2.3.1.). Potom se médium zahřeje těsně pod bod varu a ihned (!) se ochladí na teplotu 45 °C až 50 °C. Nesterilizuje se! Výsledná hodnota pH musí být  $7,4 \pm 0,2$ . Připravené médium se skladuje maximálně dva týdny při teplotě 4 až 8 °C.

#### 9.2.3.1. ALKALICKÝ ROZTOK KYSELINY ROSOLOVÉ

##### Složení:

- Roztok hydroxidu sodného (NaOH) o koncentraci  $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  100,0 ml
- Kyselina rosolová 1,0 g

*Příprava:* Po dokonalém rozpuštění se roztok přefiltruje. Základní roztok se skladuje ve tmě při teplotě 2 až 10 °C maximálně dva týdny. Potom se likviduje. Stejně tak je nutno ho vyřadit, změní-li se barva z tmavě červené na hnědou. Roztok se nesmí (!) sterilizovat, neboť se sloučenina rozkládá.

## 9.2.4. Médium na detekci *E. coli* podle ČSN 757835

### Složení:

- Pepton 5 g
- Masový extrakt 3 g
- MUG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glukuronid) 100 mg
- Agar 15 g
- Demineralizovaná nebo destilovaná voda 1 000 ml

*Příprava:* Jednotlivé složky se rozpustí v destilované vodě zahříváním. Sterilizuje se v autoklávu po dobu 15 minut při 121 °C. Hodnota pH po sterilizaci musí být  $6,9 \pm 0,1$ . Médium vydrží v temnu při teplotě 2 až 10 °C minimálně dva týdny.

## 9.2.5. Selektivní kultivační médium podle Slanetze a Bartleyové

### Složení:

- Tryptóza 20 g
- Kvasničný extrakt 5 g
- Glukóza 2 g
- Hydrogen fosforečnan sodný 4 g
- Azid sodný 0,4 g
- Trifenyltetrazolium chlorid 0,1 g
- Agar 15 g
- Destilovanou vodu doplnit do 1 000 ml

*Příprava:* Jednotlivé složky se naváží a nechají 30 minut „nabobtnat“ v destilované vodě. Poté se rozvaří agar na vodní lázni, max. 30 minut. Celou dobu musí být médium chráněno před světlem. Potom se ochladí na 50 až 60 °C a plní se do Petriho misek. Skladuje se ve tmě v chladničce, nejdéle dva týdny.

## 9.2.6. Konfirmační médium (žluč-eskulin-azidový agar)

### Složení:

- Trypton 17,0 g
- Pepton 3,0 g
- Kvasničný extrakt 5,0 g
- Volská žluč dehydratovaná 10,0 g
- Chlorid sodný (NaCl) 5,0 g
- Eskulin 1,0 g
- Citran železitý 0,5 g
- Azid sodný 0,15 g
- Agar 15 g
- Destilovaná voda do 1 000 ml

*Příprava: Jednotlivé složky se rozpustí ve vodě v proudící páře. Upraví se hodnota pH tak, aby po sterilizaci byla  $7,1 \pm 0,1$  při 25 °C. Médium se sterilizuje 15 minut při 121 °C. Potom se ochladí na 50 až 60 °C a plní se do Petriho misek. Skladuje se ve tmě v chladničce, nejdéle dva týdny.*

VÝSTRAHA! Azid sodný je toxický a při manipulaci s ním musí být dodržována veškerá bezpečnostní opatření.

## 9.2.7. m-CP agar

### Základní médium:

- Tryptóza 30 g
- Kvasničný extrakt 20 g
- Sacharóza 5 g
- L-cystein hydrochlorid 1 g
- Síran hořečnatý, heptahydrát 0,1 g
- Chlorid železitý, hexahydrát 0,09 g
- Bromkresolová červeň 40 mg
- Indoxyl- $\beta$ -D-glukosid 0,06 g
- Agar 1 g
- Destilovaná voda do 970 ml

*Příprava: Jednotlivé složky se rozpustí ve vodě zahříváním. Je-li to nutné, upraví se pH tak, aby po sterilizaci odpovídala jeho hodnota  $7,6 \pm 0,1$ . Médium se sterilizuje v autoklávu při  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 minut. Po zchlazení na  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  se postupně přidají následující složky:*

- D-cykloserin 400 mg
- Polymyxin B sulfát 25 mg
- 0,5% Fenoltalein difosfát sterilizovaný filtrací 20 ml

*Po důkladném promíchání se asepticky rozlévá do Petriho misek. Médium je při skladování ve tmě v chladničce stabilní jeden měsíc.*

## 9.2.8. Tryptózo siřičitanový agar s cykloserinem

### Složení:

- Kasein 15 g
- Enzymatický sójový hydrolyzát 5 g
- Kvasničný extrakt 5 g
- Disiřičitan sodný 1 g
- Citran železitoamonný 1 g
- Agar 9–18 g
- Destilovanou vodou (6.1.) doplnit do 1 000 ml

*Příprava: Jednotlivé ingredience se rozpustí ve vodě pomocí zahřívání při maximální teplotě  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Je-li to nutné, upraví se pH tak, aby po sterilizaci odpovídala jeho hodnota  $7,6 \pm 0,1$ . Sterilizace 15 minut při teplotě  $(121 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po zchlazení na  $45\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$  se sterilně přidá 10 ml roztoku D-cykloserinu (4 g/100 ml) připraveného podle pokynů výrobce, vše se zamíchá a rozlévá se do Petriho misek. Plotny je možné uchovávat maximálně pět dní v temnu při teplotě  $(5 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ , chráněné proti odpařování.*



## 9.2.9. Měkký (soft) agar na plakovou titraci (stanovení somatických kolifágů)

### Složení:

- Pepton 10 g
- Agar 1,6 g
- Destilovaná voda 1 000 ml

*Příprava:* Jednotlivé složky se rozpustí ve vodě, aby se jednotlivé složky dobře rozpustily, je nutné suspenzi zahřát. Je-li to nutné, upraví se pH tak, aby po sterilizaci odpovídala jeho hodnota  $7,1 \pm 0,2$ . Médium se po rozpuštění sterilizuje v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Poté se ochladí na cca 45 °C a použije se k přímému zalévání vzorku vody. Před zalitím se asepticky přidá 5 ml/l média suspenze hostitelských kmenů ve fyziologickém roztoku a důkladně se promíchá.

## 9.3. ROZTOKY A ČINIDLA

### 9.3.1. Roztok pro oxidázový test podle ČSN EN ISO 9308-1

### Složení:

- Tetramethylparafenylendiamindihydrochlorid 1 g
- Thiosíran sodný ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0,2 g
- Chelaton 3 0,1 g
- Destilovaná voda do 100 ml

*Příprava:* Chemikálie se postupně rozpustí ve vodě a doplní se do 100 ml. Roztok nesmí přijít do styku se železem a musí se chránit před světlem. Uchovává se v tmavých zbrusových lahvičkách v chladničce. Roztok nesmí zmodrat; jeho životnost je maximálně týden.

### 9.3.2. Roztok pro cytochromoxidázový test podle ČSN 75 7837

Složení:

- Tetramethylparafenyldiamindihydrochlorid 1 g
- Thiosíran sodný ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 0,2 g
- Chelaton 3 0,1 g
- Destilovaná voda do 100 ml

*Příprava:* Chemikálie se postupně rozpustí ve vodě a doplní se do 100 ml. Roztok nesmí přijít do styku se železem a musí se chránit před světlem. Uchovává se v tmavých zbrusových lahvičkách v chladničce. Roztok nesmí zmodrat; jeho životnost je maximálně týden.

### 9.3.3. Tekuté laktóзовé médium

*(využívá se při confirmaci např. schopnosti kmenů fermentovat laktózu)*

Složení:

- Pepton 10,0 g
- Chlorid sodný (NaCl) 5,0 g
- Hydrogenfosforečnan draselný ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 1,0 g
- Laktóza 10 g
- Destilovaná voda do 1 000 ml

*Příprava:* Jednotlivé složky se rozpustí za tepla a hodnota pH se upraví na 7,2–7,4. Půda se rozplní do zkumavek s plynovkami (10 ml) nebo do Durhamových zkumavek (5 ml) a sterilizuje se frakcionovaně 3 dny po 30 minutách v proudící páře (při 100 °C).

Poznámka: Laktózu lze nahradit jiným cukrem, jehož fermentaci je potřeba testovat.

### 9.3.4. Indikátor změny pH

*(využívá se při confirmaci např. schopnosti kmenů fermentovat různé cukry, příklad změny pH tekutého laktóзовého média – viz 9.3.3.)*

Složení:

- 0,1 N hydroxid sodný (NaOH) 25 ml
- Bromthymolová modř 1,0 g
- Destilovaná voda 475 ml

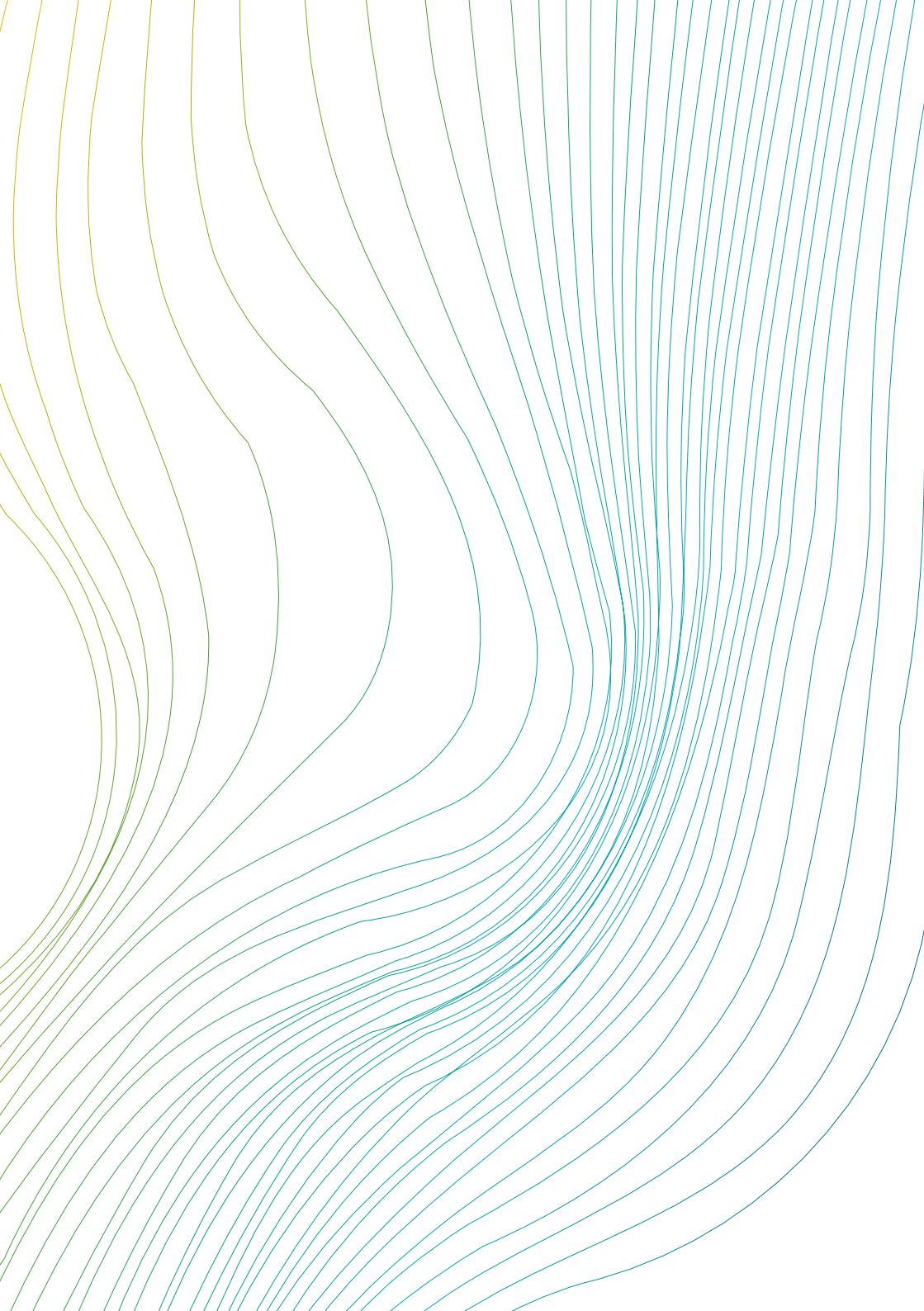
*Příprava: Jednotlivé složky se rozpustí při teplotě max. 36 °C, v průběhu této doby se roztok několikrát protřepe. Zfiltruje se a nesterilizuje se!*

### 9.3.5 Činidlo na průkaz kyselé fosfatázy

Složení:

- 1-naftylfosfát disodná sůl 0,4 g
- Fast Blue B Salt 0,8 g
- Octanový tlumivý roztok (pH 4,6 ± 0,2) 20 ml

*Příprava: Octanový tlumivý roztok se připraví rozpuštěním 0,3 ml ledové kyseliny octové a 0,4 g octanu sodného v destilované vodě a doplněním do 1 000 ml. Výše uvedené složky se rozpustí v octanovém tlumivém roztoku a nechají se stát po dobu (60 ± 5) minut při teplotě (5 ± 3) °C, aby mohla vzniknout sraženina. Potom se roztok zfiltruje skládaným filtrem, aby se sraženina odstranila. Připravený roztok se uchovává při teplotě (5 ± 3) °C po dobu nejdéle dvou týdnů. Pokud se opět objeví sraženina, roztok se před použitím znovu zfiltruje.*



## 10. LITERATURA

### 10.1. SEZNAM PLATNÝCH NOREM PRO MIKROBIOLOGII VODY

(Pozn. Normy jsou udávány bez datace, protože jsou pravidelně každých 5 let revidovány a může dojít k jejich výrazným změnám.)

**ČSN 75 0176:** Kvalita vod – Názvosloví mikrobiologie vody.

**ČSN EN ISO 6222 (75 7821):** Jakost vod – Stanovení kultivovatelných mikroorganismů – Stanovení počtu kolonií očkovaním do živného agarového kultivačního média.

**ČSN EN ISO 9308-1 (75 7836):** Kvalita vod – Stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií – Část 1: metoda membránových filtrů pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry.

**ČSN EN ISO 9308-2 (75 7836):** Kvalita vod – Stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií – Část 2: Metoda nejpravděpodobnějšího počtu.

**ČSN EN ISO 9308-3 (75 7836):** Jakost vod – Stanovení *Escherichia coli* v povrchových a odpadních vodách – Část 3: Miniaturizovaná metoda stanovení v tekutém médiu (stanovení MPN).

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

**ČSN 75 7837:** Jakost vod – Stanovení koliformních bakterií v nedesinfikovaných vodách.

**ČSN EN ISO 7899-1 (75 7831):** Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků v povrchových a odpadních vodách – Část 1: Miniaturizovaná metoda stanovení v tekutém médiu (stanovení MPN).

**ČSN EN ISO 7899-2 (75 7831):** Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků – Část 2: Metoda membránových filtrů.

**ČSN EN 26461-1 (75 7861):** Jakost vod – Stanovení spor šířičitany redukcujících anaerobů (klostridií) – Část 1: Metoda pomnožení v tekutém médiu.

**ČSN EN 26461-2 (75 7861):** Jakost vod – Stanovení spor šířičitany redukcujících anaerobů (klostridií) – Část 2: Metoda membránových filtrů.

**ČSN EN ISO 11731 (75 7881):** Kvalita vod – Stanovení bakterií rodu *Legionella*.

**ČSN EN 16266 (75 7850):** Jakost vod – Stanovení *Pseudomonas aeruginosa* metodou membránových filtrů.

**ČSN ISO 19250 (75 7855):** Jakost vod – Průkaz přítomnosti bakterií rodu *Salmonella*.

**ČSN ISO 17995 (75 7875):** Jakost vod – Stanovení termotolerantních bakterií rodu *Campylobacter*.

**ČSN EN ISO 10705-2 (75 7871):** Průkaz přítomnosti a kvantitativní stanovení bakteriofágů – Část 2: Kvantitativní stanovení somatických kolifágů.

**ČSN ISO 8199 (75 7810):** Jakost vod – Obecné pokyny pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami.

**ČSN P ENV ISO 13843 (75 7015):** Jakost vod – Pokyny pro validaci mikrobiologických metod (*tento dokument prochází v současné době velkou revizí a bude nahrazen*).

**ČSN EN ISO 19458 (75 7801):** Jakost vod – Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu.

**ČSN ISO 29201 (75 7014):** Kvalita vod – Variabilita výsledků zkoušek a nejistota měření u mikrobiologických metod.

**ČSN EN ISO 17994 (75 7016):** Jakost vod – Kritéria pro zjištění ekvivalence dvou mikrobiologických metod.

**ČSN EN ISO 11133 (56 0099):** Mikrobiologie potravin, krmiv a vody – příprava, uchovávání a zkoušení výkonnosti kultivačních pūd.

**ČSN EN ISO 14189 (757865):** Kvalita vod – Stanovení *Clostridium perfringens* – Metoda membránových filtrů.

**ISO 15553:** Water quality – Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water.

## 10.2. DOPLŇUJÍCÍ STUDIJNÍ LITERATURA

**BAUDIŠOVÁ, D., ŠAŠEK, J. a PUMANN, P.** Mikrobiologické rozborů povrchových vod ke koupání. Technické doporučení, I-F-24, SwecoHydroprojekt, 2013, 27 str.

**BAUDIŠOVÁ, D.** Současné metody mikrobiologického rozborů vody. Příručka pro hydroanalytické laboratoře. Výzkum pro praxi, sešit 54. Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v. v. i., 2007, s. 1–99.

**ELEFTHERIADOU, M. and TSIMILLIS, K.C.** (eds.) Accreditation for microbiological laboratories. Second edition, Eurachem. 2013.

**HÄUSLER, J.** Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vody. Díl I. Mikrobiologické pracoviště. Ministerstvo zemědělství ČR, 1994, s. 1–125.

**HÄUSLER, J.** Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vody. Díl II. Mikrobiologický rozbor vod. Ministerstvo zemědělství ČR, 1994, s. 1–164.

**HÄUSLER, J.** Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vody. Díl III. Stanovení mikrobiologických ukazatelů. Ministerstvo zemědělství ČR, 1995, s. 1–408.

**HÄUSLER, J.** Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vody. Díl IV. Receptář. Ministerstvo zemědělství ČR, 1996.

**KOŽÍŠEK, F., PUMANN, P. a ŠAŠEK, J.** Hodnocení výsledků ukazatelů počty kolonií při 22 °C a 36 °C v pitné vodě. Metodické doporučení SZÚ. Státní zdravotní ústav, 2014. Dostupné z: <http://szu.cz/tema/zivotni-prostredi/pitna-voda>

**RULÍK, M., BURIÁNKOVÁ, I. a BRABLCOVÁ, L.** Vybrané kapitoly z molekulární ekologie mikroorganismů. Skripta. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2015, s. 1–146. ISBN 978-80-244-4642-4.

**RULÍK, M., BAUDIŠOVÁ, D., RŮŽIČKA, J. a ŠIMEK, K.** Mikrobiální ekologie vod. Skripta. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013, s. 1–292. ISBN 978-80-3477-3.

**ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J., VEJMEKOVÁ, D. a ČIHÁKOVÁ, P.** Technická mikrobiologie a hydrobiologie. Skripta. Praha: VŠCHT, 2017, s. 1–161. ISBN 978-80-7080-986-0.

**US EPA** (United States Environmental Protection Agency). Standard methods for the examination of water and wastewater 21<sup>st</sup> edition. Edited by EATON, A.D., CLESCERI, L.S., RICE, E.W., GREENBERG, A.E., 2005.

**US EPA** (United States Environmental Protection Agency). Standard methods for the examination of water and wastewater 22<sup>nd</sup> edition. Edited by RICE, E.W., BAIRD, R.B., EATON, A.D., CLESCERI, L.S., 2012.

**WHO**. Guidelines for Drinking – Water Quality, 4<sup>th</sup> Edition, 2011.

Pozn. Všechny citované publikace Dr. Häuslera jsou k dispozici ve VÚV TGM, v. v. i., nebo u autorky.

## 10.3. CITOVANÁ ODBORNÁ LITERATURA

**ALLOS, B.M. and BLASER, M.J.** Campylobacter jejuni and the expanding spectrum of related infections. *Clin. Infect. Dis.*, 1995, 20: 1092–1099.

**BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A. a VÁVRA, J.** Lékařská mikrobiologie. Praha: Marvil, 1996, 558 s.

**BLACK, R.E., LEVINE, M.M., CLEMENTS, M.L., HUGHES, T.P., and BLASER, M.J.** Experimental Campylobacter jejuni infection in humans. *J. Infect. Dis.*, 1988, 157: 472–479.

**NCBI**. Taxonomy Browser. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=194> (cit. 5. 4. 2012).

**FARMER III., J.J. and KELLY, M.T.** Enterobacteriaceae. Chapter 36. In: BALOWS, A., et al. *Manual of Clinical Microbiology*, ASM, 1991.

**FRAMPTON, E.W. and RESTAINO, L.** Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. *J. Appl. Bacteriol.*, 1993, 74(3): 223–233.

**KOENRAAD, P.M.F.J., ROMBOUTS, F.M., and NOTERMANS, S.H.W.** Epidemiological aspects of thermophilic Campylobacter in water-related environments. *Water Environ. Res.*, 1997, 69(1): 52–63.

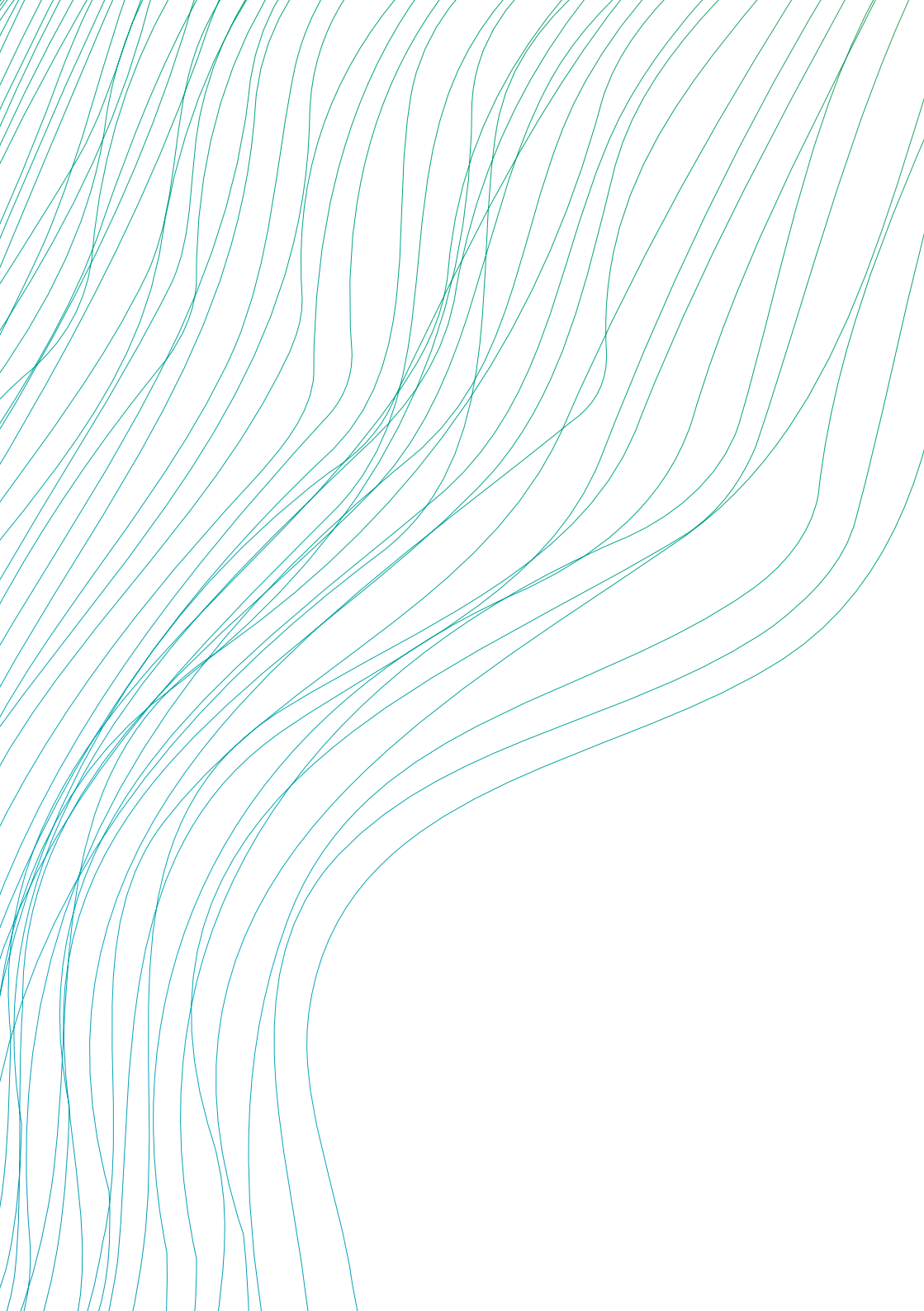
**POPPERT, S., HAAS, M., YILDIZ, T., ALTER, T., BARTEL, E., FRICKE, U., and ESSIG, A.** Identification of Thermotolerant Campylobacter Species by Fluorescence In Situ Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(6): 2133–2136.

**SCHETS, F.M., DURING, M., ITALIAANDER, R., HEIJNEN, L., RUTJES, S.A., VAN DER ZWALUW, W.K., and DE RODA HUSMAN, A.M.** Escherichia coli O157:H7 in drinking water from private water supplies in the Netherlands. *Water Research*, 2005, 39(18): 4485–4493.

**ŠVEC, P. and DEVRIESE, L.A.** Genus I. *Enterococcus* (ex Thiercelin and Jouhaud) Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984 32<sup>o</sup>. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Firmicutes, vol. 3, p. 594–607. Edited by DE VOS, P., GARRITY, G.M., JONES, D., KRIEG, N.R., LUDWIG, W., RAINEY, F.A., SCHLEIFER, K.H., and WHITMAN, W.B. New York, Springer, 2009.

**THOMAS, C., GIBSON, H., HILL, D.J., and MABEY, M.** Campylobacter epidemiology: an aquatic perspective. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.*, 1999, 85:168–177.

**VAŠÍČKOVÁ, P., HRDÝ, J., KUBÁNKOVÁ, M. a MIKEL, P.** Stanovení virových agens ve vodě – od odběru vzorku až k interpretaci výsledků. In: ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J., PECINOVÁ, A. (eds.) Vodárenská biologie 2017, Vodní zdroje Ekomonitor, 2017, s. 40–45.

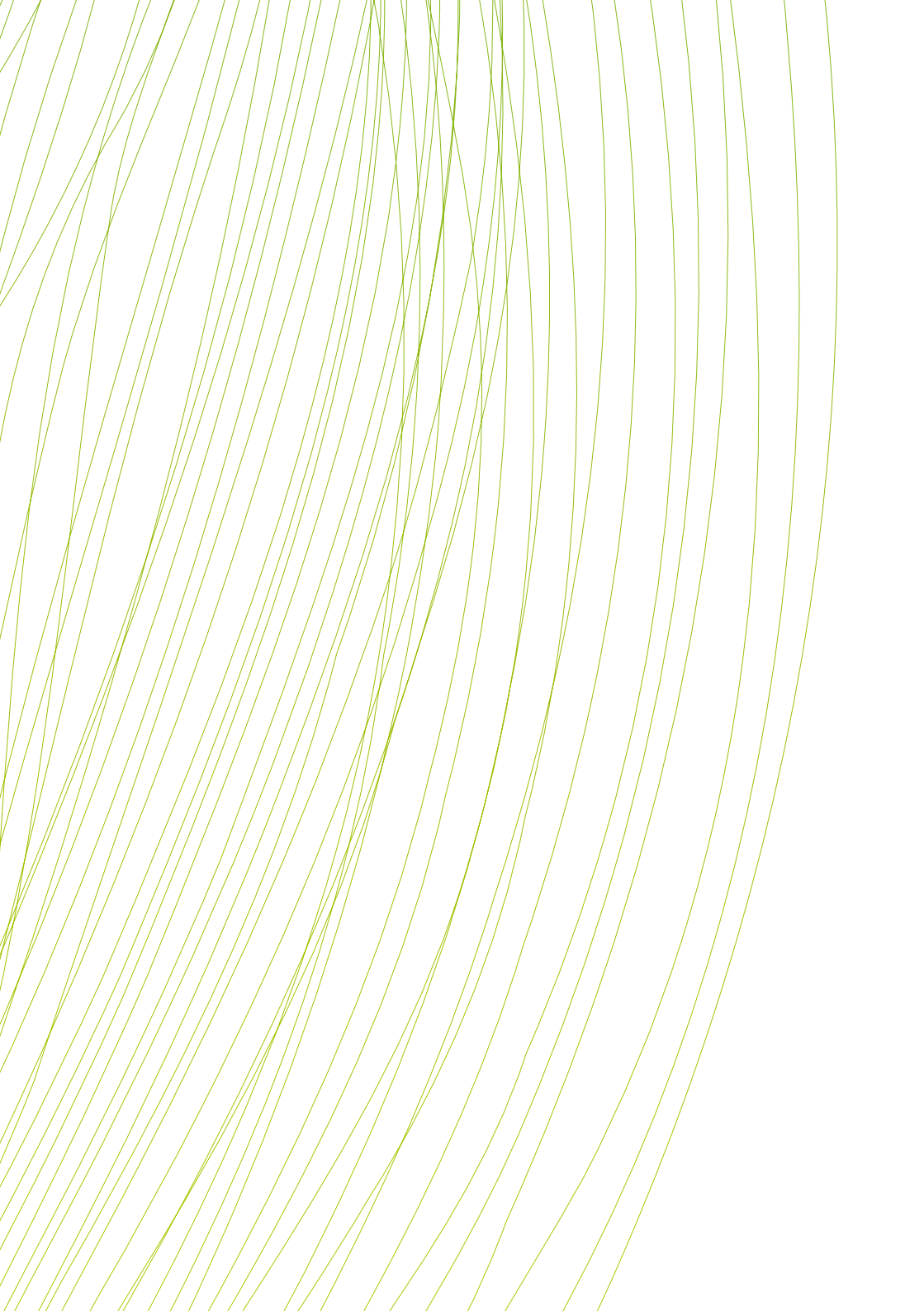




## 11. SUMMARY

The aim of this study, that have to serve as a handbook for hydroanalytical laboratories, is the summary of update knowledge about microbiological indicators, usable during microbiological control of drinking and source water quality (organotrophic microorganisms, total coliforms, *Escherichia coli*, intestinal enterococci, *Clostridium perfringens*, bacteriophages) and pathogenic microorganisms such as salmonellae, *Pseudomonas aeruginosa*, legionellae, *Campylobacter*, atypical mycobacteria, viruses, protozoan, etc.). The characteristics of above-mentioned microorganisms are presented, together with methods of their detection and their occurrence in water environment. All chapters are completed by practical examples of our results, obtained during checking and verification of new and/or international methods. Information dealing with hygienically important microorganisms in water environment could help in cooperation of laboratories with operators of water pipeline on the topic of water safety plans.

The entire part of this study is the summary of practical knowledge dealing with the validation of microbiological methods and the quality assurance system in microbiological laboratories, together with the most frequent mistakes during the performance of microbiological examination of water. As appendix, the formulae of the mostly used media are added.



## 12. PŘÍLOHY

Příloha I: Biochemická charakteristika kmenů *E. coli*

### KÓDY BIOCHEMICKÝCH REAKCÍ A TESTŮ (ABECEDNĚ ŘAZENO)

Kód	reakce/test
<b>ADO</b>	fermentace adonitolu
<b>ARG</b>	hydrolyza argininu
<b>CEL</b>	fermentace celobiózy
<b>DUL</b>	fermentace dulcitolu
<b>ESL</b>	hydrolyza eskulinu
<b>GLR</b>	aktivita b-D- glukuronidázy
<b>GLU</b>	fermentace glukózy (tvorba kyseliny)
<b>H<sub>2</sub>S</b>	tvorba sirovodíku
<b>IND</b>	tvorba indolu (odštěpení z tryptofanu)
<b>INO</b>	fermentace inositolu
<b>LIP</b>	aktivita lipázy
<b>LYS</b>	dekarboxylace lysinu
<b>MAL</b>	utilizace malonátu
<b>MAN</b>	fermentace manitolu
<b>ONP</b>	aktivita b-D- galaktosidázy
<b>ORN</b>	dekarboxylace ornitinu
<b>OXI</b>	aktivita cytochromoxidázy
<b>PHE</b>	aktivita phenylalanindeaminázy
<b>RHA</b>	fermentace rhamnózy
<b>SCI</b>	utilizace citrátu
<b>SOR</b>	fermentace sorbitolu
<b>SUC</b>	fermentace sacharózy
<b>TRE</b>	fermentace trehalózy
<b>URE</b>	aktivita ureázy (hydrolyza močoviny)
<b>VPT</b>	tvorba acetoinu (Voges-Proskauer)

Porovnání procentuální positivity jednotlivých reakcí u 164 kmenů *E. coli* izolovaných z vodního prostředí (VUV) s výsledky uvedenými ve frekvenční matici (Farmer a Kelly, 1991) (FK). V řádce „n+“ je uveden celkový počet kmenů s pozitivní reakcí.

	H2S	MAN	LYS	IND	ORN	SCI	URE	ONP	VPT	INO	LIP	FEN
<b>n+</b>	0	164	127	159	68	3	0	158	11	4	0	2
<b>VUV</b>	0 %	100 %	77 %	97 %	41 %	2%	0 %	96 %	7 %	2 %	0 %	1 %
<b>FK</b>	1 %	98 %	90 %	98 %	65 %	1 %	1 %	95 %	0 %	1 %	0 %	0 %

	MAL	ADO	CEL	RHA	ARG	SUC	SOR	ESL	TRE	DUL	GLU	OXI
<b>n+</b>	0	16	6	146	2	75	151	9	159	108	164	0
<b>VUV</b>	0 %	10 %	4 %	89 %	1 %	46 %	92 %	5 %	97 %	66 %	100 %	0 %
<b>FK</b>	0 %	5 %	2 %	80 %	17 %	50 %	94 %	35 %	98 %	60 %	100 %	0 %

Příloha II: Konfidenční meze Poissonova rozdělení (hladina pravděpodobnosti  $P = 0,95$ ) a relativní směrodatná odchylka u hodnot 1–5 (viz dolní tabulka)

## POISSONOVO ROZDĚLENÍ

N	meze
<b>0</b>	0,000–3,69
<b>1</b>	0,0253–5,57
<b>2</b>	0,242–7,22
<b>3</b>	0,619–8,77
<b>4</b>	1,09–10,24
<b>5</b>	1,62–11,67
<b>6</b>	2,2–13,06
<b>7</b>	2,81–14,42
<b>8</b>	3,45–15,76
<b>9</b>	4,12–17,08
<b>10</b>	4,8–18,39

$P = 0,95$	1	2	3	4	5
<b>Poissonovo rozdělení</b>	0,0–5,6	0,2–7,2	0,6–8,8	1,1–10,2	1,6–11,7
<b>Relativní směrodatná odchylka</b>	140 %	132 %	128 %	108 %	107 %

**EDICE VÝZKUM PRO PRAXI**  
ISSN 1211-3751

## **METODY MIKROBIOLOGICKÉHO ROZBORU VODY (PŘÍRUČKA PRO HYDROANALYTICKÉ LABORATOŘE)**

Vydal Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, veřejná výzkumná instituce  
v Praze 2017, vydání první

### **POVĚŘENÝ ŘÍZENÍM:**

Ing. Petr Bouška, Ph.D.

### **REDAKČNÍ RADA:**

Ing. Libor Ansorge, Ph.D., RNDr. Dana Baudišová, Ph.D., (předsedkyně),  
Ing. Adam Beran, Ing. Petr Bouška, Ph.D., Ing. Jiří Kučera,  
RNDr. Diana Marešová, Ph.D., Ing. Miloš Rozkošný, Ph.D.,  
RNDr. Přemysl Soldán, Ph.D., Ing. Michal Vaculík, Mgr. Aleš Zbořil

Počet stran: 124, náklad: 200 výtisků  
Odpovědný redaktor: Lenka Jeřábková  
Grafická úprava, sazba: ABALON s. r. o.  
Tisk: VAMB, s. r. o.  
ISBN 978-80-87402-61-0



