

Vybrané parametry studniční vody z lokality Zlín

Barbora Vandurková

Bakalářská práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Barbora Vandurková**
Osobní číslo: **T190058**
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**
Specializace: **Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Vybrané parametry studniční vody z lokality Zlín**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Voda v prostředí a její využití

Parametry pitných vod

Možnosti dezinfekce pitných vod

Praktická část:

Stanovení přítomnosti mikroorganismů ve vzorcích studniční vody

Sledování vybraných parametrů studniční vody

Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

Cheremisinoff, N. P. Handbook of water and wastewater treatment technologies. Boston: Butterworth-Heinemann, 2002., 636 pages. ISBN 9780750674980.

van Bel, N. et al. Aeromonas Species from Nonchlorinated Distribution Systems and Their Competitive Planktonic Growth in Drinking Water. Applied and Environmental Microbiology, 87(5): Article Number: e02867-20. 2021.

Zemskaya, T. et al. Microorganisms of Lake Baikal-the deepest and most ancient lake on Earth. Applied Microbiology and Biotechnology, 104: 6079-6090. 2020.

Fernandes, H.M.Z. et al. Recovery of Non-tuberculous Mycobacteria from Water is Influenced by Phenotypic Characteristics and Decontamination Methods. Current Microbiology, 77: 621-631. 2020.

Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá sledováním mikrobiologické kvality vybraných studničních vod odebraných převážně ve vybraných lokalitách Zlínského kraje. V teoretické části je pojednáno o základních fyzikálních a chemických vlastnostech vody, o úloze vody v lidském organismu, o druzích vody v prostředí, o vybraných parametrech pitných vod a možnostech jejich stanovení a o možnostech úpravy a dezinfekce pitných vod. V praktické části bylo provedeno mikrobiologické stanovení přítomných mikroorganismů a výsledky analýzy byly porovnány s platnými legislativními předpisy pro pitnou vodu, dále byla provedena charakterizace vybraných izolovaných mikroorganismů barvením dle Grama, vybranými biochemickými testy a metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

Klíčová slova: pitná voda, indikátorové mikroorganizmy v pitných vodách, biochemická identifikace mikroorganismů, MALDI-TOF

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with monitoring the microbiological quality of selected well waters collected mainly in selected localities of the Zlín Region. The theoretical part discusses the basic physical and chemical properties of water, the role of water in the human body, types of water in the environment, selected parameters of drinking water and the possibilities of their determination, and the possibilities of treatment and disinfection of drinking water. In the practical part, the microbiological determination of the microorganisms present was carried out and the analysis results were compared with the valid legislative regulations for drinking water, and the characterization of selected isolated microorganisms was carried out using Gram staining, selected biochemical tests and the mass spectrometry method MALDI-TOF.

Keywords: drinking water, indicator microorganisms in drinking water, biochemical identification of microorganisms, MALDI-TOF

Nejdříve bych chtěla ze srdce poděkovat vedoucí mé bakalářské práce prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady, ochotnou pomoc, vstřícnost a za čas, který mi věnovala. Mé poděkování patří také laborantkám Ing. Olze Vlčkové a Ing. Veronice Kučabové za podnětné rady a pomocnou ruku při měření praktické části. Poděkování patří i všem, kteří mi poskytli vzorky vody ze svých studen. Děkuji také prof. Ing. Miroslavě Kačániové, PhD. za spolupráci při analýze MALDI-TOF. Dále bych chtěla poděkovat svým nejlepším přátelům a kolegům, Bc. Pavlu Jeřábkoví a Anetě Machalové, za jejich podporu, rady a rozveselení i v těch nejtěžších chvílích. V neposlední řadě moc děkuji své rodině a příteli za podporu, trpělivost a nekonečnou lásku, kterou mi poskytli během celé doby mého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 VODA	11
1.1 FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ VLASTNOSTI VODY	11
1.2 ÚLOHA VODY V ORGANISMU	11
1.3 DRUHY VOD	12
1.3.1 Povrchová voda	12
1.3.2 Podzemní voda	12
1.4 PITNÁ VODA	13
1.4.1 Výroba pitné vody	13
1.4.2 Požadavky na jakost pitné vody	14
2 VODA JAKO ZDROJ MIKROORGANISMŮ	15
2.1 MIKROBIOLOGICKÉ VLASTNOSTI STUDNIČNÍ VODY	15
2.2 INDIKÁTORY FEKÁLNÍHO ZNEČIŠTĚNÍ VOD	16
2.2.1 Koliformní bakterie	16
2.2.2 Intestinální enterokoky	18
2.3 INDIKÁTORY OBECNÉHO ZNEČIŠTĚNÍ.....	18
3 SLEDOVANÉ PARAMETRY A MOŽNOSTI JEJICH STANOVENÍ	20
3.1 KOLIFORMNÍ BAKTERIE	20
3.2 INTESTINÁLNÍ ENTEROKOKY	20
3.3 ORGANOTROFNÍ MIKROORGANISMY	21
3.4 IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ	22
3.4.1 Barvení dle Grama	22
3.4.2 Biochemické testy	23
3.4.3 MALDI TOF	24
4 MOŽNOSTI ÚPRAVY VODY	25
II PRAKTICKÁ ČÁST	27
5 CÍLE PRÁCE	28
6.3 ŽIVNÉ PŮDY A CHEMIKÁLIE	33
6.4 PŘÍSTROJE A POMŮCKY	35
6.5 KULTIVAČNÍ STANOVENÍ POČTU VYBRANÝCH INDIKÁTOROVÝCH UKAZATELŮ.....	36
6.6 IDENTIFIKACE IZOLOVANÝCH KULTUR	37
6.6.1 Gramovo barvení.....	38
6.6.2 Biochemické testy	38
6.6.3 MALDI TOF	39

7	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
7.1	STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ.....	41
7.2	IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ IZOLOVANÝCH ZE STUDNIČNÍCH VOD.....	44
	ZÁVĚR	50
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	56
	SEZNAM OBRÁZKŮ	57
	SEZNAM TABULEK	58
	SEZNAM PŘÍLOH	59

ÚVOD

Voda je kolébkou, nositelkou a nevyhnutelnou podmínkou života. Vznikla s největší pravděpodobností před 4,5 mld lety rozkladem hydrátů při ochlazování zemské kůry. Trvalo stovky milionů let, než se ve vodě praoceánů vytvořily z anorganických látek organické a z látek organických nejvyšší forma hmoty – život.

Voda je na Zemi nejrozšířenější látkou, která zaujímá zhruba 3/4 jejího povrchu. Díky tomuto obrovskému množství vody se Zemi přezdívá modrá planeta. Přes 96 % veškeré vody je voda slaná (moře, oceány) a pouze 4 % zaujímá voda sladká. Zdroji sladké vody jsou ledovce, voda podzemní a voda povrchová, kam řadíme jezera, bažiny, močály, řeky, potůčky a také umělá lidská díla jako jsou rybníky, přehrady a nádrže.

Pitnou vodu řadíme k základním životním potřebám každého člověka a její odpovídající příjem je podmínkou pro správné fungování veškerých procesů v lidském těle, a dokonce přispívá i k duševní pohodě. Pakliže kvalita pitné vody neodpovídá hygienickým požadavkům, může způsobovat různé zdravotní problémy. Riziko spojené s neodpovídající kvalitou nelze vyloučit u žádné vody, bez ohledu na to, zda jde o vodu z veřejného vodovodu nebo studny, o vodu upravenou nějakým zařízením nebo vodu balenou.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VODA

1.1 Fyzikální a chemické vlastnosti vody

Molekula vody se skládá z atomu kyslíku, který je polární kovalentní vazbou vázán se dvěma vodíkovými atomy. Úhel, který svírají spojnice atomů, je přibližně 105°. Jednotlivé molekuly vody se spojují vodíkovými můstky (Šrámek, 2000). Jednou z nejdůležitějších chemických vlastností vody je její polární charakter. Vzniklý dipól molekuly vody je zapříčiněn rozdílem elektronegativit atomů vodíku a kyslíku (Pitter, 2015).

Za normálního tlaku a teploty je voda bezbarvá, čirá kapalina bez zápachu a chuti. V přírodě můžeme vodu nalézt ve třech skupenstvích – v pevném (led), v kapalném (voda) a v plynném (vodní pára) (Pitter, 2015).

Voda má vysokou teplotu tání (0 °C) a teplotu varu (100 °C). Maximální hustoty dosahuje voda při 4 °C, což znamená, že hustota ledu je nižší než hustota vody v kapalném stavu. To je způsobeno skutečností, že v ledu jsou molekuly dále od sebe (Navrátil a Rosina, 2019).

1.2 Úloha vody v organismu

Voda tvoří zhruba 60 % hmotnosti lidského těla. Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem se voda uplatňuje zejména (Hrazdira, 1990; Velíšek a Hajšlová, 2009):

- v tepelném hospodaření organismu, kdy se podílí na termoregulaci rozváděním tepla v těle a na výdeji tepla do okolního prostředí,
- jako transportní médium živin, produktů metabolismu a respiračních plynů,
- jako rozpouštědlo nebo disperzní prostředí umožňující molekulové rozptýlení látek v organismu,
- jako látka účastnící se reakcí.

Při normálním fungování lidského organismu dochází k nepřetržitým ztrátám vody, kterou je nutné nahrazovat vodou vznikající oxidací živin, jako jsou bílkoviny, sacharidy a lipidy. Tato voda se dá označit jako voda endogenní. Množství endogenní vody však není dostatečné, proto organismus kompenzuje ztráty vody vodou obsaženou v potravinách, a to zejména v nápojích, tedy vodou exogenní. Potravinové zdroje jsou významným zdrojem vody. Tato skutečnost je námi často přehlížena a uvědomujeme si většinou jen význam pitné vody a vody přítomné v nápojích (Hrazdira, 1990; Velíšek a Hajšlová, 2009).

1.3 Druhy vod

Voda se rozděluje podle několika různých kritérií. Podle výskytu v přírodě dělíme vodu na srážkovou (atmosférickou), povrchovou, podzemní a další druhy vod, kam řadíme například minerální vody nebo důlní vody. Podle účelu vodu dělíme na vodu pitnou, užitkovou, průmyslovou (určená pro dopravu, chlazení, ohřívání, čištění a různé výroby), vodu využívanou v zemědělství na zavlažování a vodu odpadní (Kalavská a Holoubek, 1989).

1.3.1 Povrchová voda

Zákon č. 254/2001 Sb. definuje povrchové vody jako vody přirozeně se vyskytující na zemském povrchu. Tento charakter neztrácejí, protékají-li přechodně zakrytými úseky, přirozenými dutinami pod zemským povrchem nebo v nadzemních vedeních (Česko, 2001).

Povrchová voda je voda odtékající nebo zadržovaná v přírodních a umělých nádržích na zemském povrchu. Vzniká ze srážek, z výtoků podzemní vody a z tajících ledovců (Tölgyessy, 1989).

1.3.2 Podzemní voda

Podzemní vody jsou definovány jako vody přirozeně se vyskytující pod povrchem země v pásmu nasycení v přímém styku s horninami a také vody, které protékají podzemními drenážními systémy a vody ve studních (Česko, 2001).

Podzemní voda se hromadí pod povrchem země v puklinách, pórech a jiných dutinách hornin. Voda je doplňována vsakováním srážkových vod, a proto závisí její kvalita na přítomnosti znečišťujících látek na povrchu terénu (komposty, splašky, hnojiště, ropné látky, skládky odpadů, umělá hnojiva atd.), jež se vsakují společně se srážkovými vodami do podzemní vody. Podzemní voda však bývá kvalitnější než voda povrchová, neboť horninové prostředí má poměrně velkou samočisticí schopnost. Vhodnější je jímat podzemní vodu spíše z větších hloubek, aby povrchové ovlivnění bylo co nejmenší (Zelinka, 2003).

Studny

Podzemní voda pro pitné i jiné účely je nejčastěji jímána studněmi. Státní zdravotní ústav udává, že v České republice je necelých 10 % obyvatel trvale zásobováno vodou z domovních nebo veřejných studní. Mít vlastní studnu je výhoda: voda je vždy čerstvá a nemusí se za ni platit. Má to však i svá úskalí. Pokud se o studnu nepečuje, nemusí být levným zdrojem dobré vody, ale zdrojem zdravotního rizika. „Zdravotní stav“ studní v ČR

není dobrý: voda ve více než 75 % neodpovídá nejméně jednomu ukazateli hygienických požadavků (Kožíšek, 2003).

V České republice je pro navrhování, výstavbu a provoz nových nebo rekonstruovaných studní a jiných jímacích objektů prosté podzemní vody závazná technická norma ČSN 75 5115 „Jímání podzemní vody“ (Zelinka, 2013).

1.4 Pitná voda

Zákon č. 258/2000 Sb., O ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů charakterizuje pitnou vodu jako veškerou vodu v původním stavu nebo po úpravě, která je určena k pití, vaření, přípravě jídel a nápojů, voda používaná v potravinářství, voda, která je určena k péči o tělo, k čištění předmětů, které svým určením přicházejí do styku s potravinami nebo lidským tělem, a k dalším účelům lidské spotřeby, a to bez ohledu na její původ, skupenství a způsob jejího dodávání (Česko, 2000).

Pitná voda musí takové fyzikálně-chemické vlastnosti, které nepředstavují ohrožení veřejného zdraví. Pitná a teplá voda nesmí obsahovat mikroorganismy, parazity a látky jakéhokoliv druhu v počtu nebo koncentraci, které by mohly ohrozit veřejné zdraví. Ukazatele jakosti pitné vody a jejich hygienické limity jsou uvedeny ve vyhlášce č. 70/2018 Sb. (Česko, 2018).

1.4.1 Výroba pitné vody

Výroba pitné vody se uskutečňuje různými technologickými postupy v závislosti na druhu (voda povrchová, podzemní) a na kvalitě zdroje vody (voda velmi čistá, čistá atd.). Některé vodní zdroje přímo vyhovují požadavkům na pitnou vodu, jiné zdroje vyžadují pouze desinfekci, případně odkyselení, provzdušnění (odstranění oxidu uhličitého a kyslíku). Četné zdroje vyžadují složitější úpravy vody, mezi které patří například čiření, zvýšení koncentrace vápenatých a hydrogenuhličitanových iontů (měkké vody), snížení koncentrace železnatých a manganatých iontů (odželezování a odmanganování), odstranění amonných iontů, odstranění těžkých kovů, radioaktivních látek (radonu a nukleotidů) atd. Některé vodní zdroje jsou téměř nebo zcela nevhodné pro úpravu na pitnou vodu (Velíšek a Hajšlová, 2009).

1.4.2 Požadavky na jakost pitné vody

Pitná voda je nejpřísněji kontrolovanou poživatinou. Požadavky, které jsou pro ni stanoveny zákonem č. 258/2000 Sb., o veřejném zdraví a prováděcí vyhláškou 70/2018 Sb., musí být dodrženy od zdroje až po kohoutek v domácnosti. Tyto požadavky jsou jednotné pro vodu vodovodní i ze studní. Teplá voda, pokud její přívod není oddělen, musí být také zhotovena z pitné vody a musí tedy být zdravotně nezávadná (Česko, 2004).

V pitné vodě se nachází rozdílná množství anorganických solí (příslušných iontů vzniklých procesem disociace různých solí), rozpuštěných plynů (vzduch, resp. kyslík, a další plyny) a indikátorů znečištění, kam mohou patřit některé organické látky (např. rozpustné složky humusu z půdy, tzv. huminy nebo huminové látky), kontaminanty (např. fenoly a ropné látky), možný počet bakterií (Velíšek a Hajšlová, 2009).

2 VODA JAKO ZDROJ MIKROORGANISMŮ

V roce 1854 zjistil anglický lékař Jon Snow spojitost mezi tehdejší epidemií cholery v Londýně a pitnou vodou ze studny kontaminovanou splašky fekálního původu. Do této doby se mikrobiologické rozbory vody v souvislosti se sledováním jakosti pitné vody neprováděly a až na základě zjištěného vztahu mezi nákazou a mikrobiologickým rozbohem vody, byl vznesen požadavek na pravidelné mikrobiologické kontroly vod určených ke konzumaci (Říhová Ambrožová, 2004).

Koncepce indikačních organismů, která se stala základem pro většinu kritérií mikrobiologické kvality vody a je používána dodnes, byla definována v roce 1892. Tato koncepce spočívá v tom, že patogenní organismy mnohdy nelze detekovat jednoduchým způsobem a běžná kultivace není u nich doporučována. Byly tedy vyvinuty metody na zjištění dalších fekálních organismů, které když se ve vzorku nevyskytují, tak se tam s určitou pravděpodobností nevyskytují ani patogenní mikroorganismy (Říhová Ambrožová, 2004).

2.1 Mikrobiologické vlastnosti studniční vody

Bakterie vyskytující se ve vodě mohou způsobit mnoho nemocí, jako je již zmíněná cholera nebo břišní tyfus, úplavice, různá průjmová onemocnění atd. Z tohoto důvodu je pravidelná kontrola a péče o zdroj pitné vody velmi důležitá (Cheremisinoff, c2002).

Kvalita pitné vody z veřejného vodovodu je pravidelně kontrolována, ale o vlastní zdroj musí lidé pečovat sami (Zelinka, 2013).

Podzemní voda je přirozené prostředí pro výskyt velkého počtu mikroorganismů, které mohou ovlivnit její kvalitu, pozitivně i negativně. Druhové zastoupení a množství těchto mikroorganismů je proměnlivé a závislé na mnoha faktorech (Zelinka, 2013).

Mikrobiologický rozbor vod je založen na sledování mikroorganismů, které poukazují na obecné a fekální znečištění. Jako indikátory fekálního znečištění se stanovují koliformní bakterie a enterokoky, což jsou bakterie žijící ve střevním traktu člověka a teplokrevných živočichů. Pokud se ve vodě takové bakterie najdou, je voda podezřelá z kontaktu s výkaly či zbytky živočichů a může obsahovat také patogenní bakterie a viry, které nejčastěji pochází právě ze střevního traktu (Kožíšek, 2003).

Kromě těchto bakterií se provádí stanovení celkového počtu tzv. psychrofilních bakterií a mezofilních bakterií, což jsou indikátory obecného znečištění (Pšross a Pšross, 1971).

Psychrofilní bakterie jsou nesourodá skupina organotrofních saprofytických bakterií, které se kultivují při teplotě 20 °C (ČSN 75 7842, 1999).

Mezofilní bakterie jsou, podobně jako psychrofilní bakterie, nesourodá skupina organotrofních saprofytických bakterií. Tyto bakterie jsou kultivovány při teplotě 37 °C (ČSN 75 7841, 1999).

2.2 Indikátory fekálního znečištění vod

2.2.1 Koliformní bakterie

Koliformní bakterie jsou důležitou skupinou čeledi *Enterobacteriaceae*, kdy tvoří asi 10 % střevní mikrobioty. Nejedná se tedy o taxonomickou jednotku. Tyto bakterie jsou gramnegativní nesporulující tyčinky, oxidáza negativní, fakultativně anaerobní, zpravidla pohyblivé, fermentující laktózu za tvorby plynu, kyselin, popřípadě aldehydu při 35 ± 2 °C během 24 nebo 48 hodin. Koliformní bakterie obecně patří do čtyř rodů *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* a *Klebsiella*. Jsou schopné růst v přítomnosti žlučových solí a jiných povrchově aktivních látek. Jejich reakce na cytochromoxidázu je negativní (Halkman a Halkman, 2014; Říhová Ambrožová, 2004).

Rod *Escherichia*

Bakterie rodu *Escherichia* jsou gramnegativní rovné tyčinky, které se vyskytují jednotlivě a ve dvojicích, některé izoláty z klinického materiálu jsou schopny tvořit pouzdra. Jsou nepohyblivé nebo se pohybují pomocí peritrichálních bičíků. Jedná se o fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní bakterie mající jak respiratorní, tak i fermentatorní typ metabolismu. Jejich optimální teplota růstu je 37 °C. Glukózu i jiné sacharidy zkvašují s tvorbou plynu. Jsou oxidáza negativní, kataláza pozitivní, methyl červeň pozitivní, a většinou citrát negativní. Jedná se o normální mikrobiotu v koncové části střevního traktu teplokrevných živočichů (Sedláček, 2007).

Nejvýznamnějším zástupcem rodu *Escherichia* a zároveň nejznámějším mikroorganismem je *Escherichia coli*. *E. coli* slouží jako důležitý modelový organismus. Jde o podmíněně patogenního mikroba, který je schopen způsobovat i chorobné stavy. Ve střevech je to možné jen tehdy, má-li kmen specifický faktor virulence a mimo střevo je *E. coli* téměř vždy patogenní. Kromě průjmových onemocnění patří *E. coli* mezi nejčastější původce infekce močových cest (Votava, 2003).

Rod *Citrobacter*

Bakterie příslušící do rodu *Citrobacter* jsou gramnegativní, mají tvar tyčinek a jsou obvykle pohyblivé pomocí peritrichálních bičků. Jsou fakultativně anaerobní nebo chemoorganotrofní a mají jak respiratorní, tak i fermentativní typ metabolismu. Jejich optimální růstová teplota je 37 °C. Fermentují glukózu a další sacharidy i s tvorbou plynu. Jsou oxidáza negativní a kataláza pozitivní. Vyskytují se ve stolici člověka a zvířat, pravděpodobně jako běžný obyvatel intestinálního prostředí. Jsou často izolovány z klinického materiálu jako oportunní patogeny a jsou také prokázány v půdě, vodě, potravinách a odpadní vodě. Mezi nejvýznamnější zástupce patří *Citrobacter freundii* (Sedláček, 2007).

Rod *Enterobacter*

Zástupci rodu *Enterobacter* jsou gramnegativní rovné tyčinky, pohybující se většinou pomocí peritrichálních bičků. Jedná se o fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní bakterie, které mají respiratorní i fermentatorní typ metabolismu. Optimální teplota jejich růstu je 30 °C až 37 °C. Okyselují glukózu i jiné sacharidy. Jsou to široce rozšířené bakterie vyskytující se ve sladkých vodách, půdě, odpadní vodě, na rostlinách, zelenině, ve výkalech zvířat i lidské stolici. Ve vodě vyskytující se zástupci tohoto jsou například *Enterobacter cloacae* nebo *Enterobacter aerogenes* (Sedláček, 2007).

Rod *Klebsiella*

Rod *Klebsiella* je blízký rodu *Enterobacter*, se kterým sdílí řadu charakteristik. Je ale lépe přizpůsoben životu mimo střevo. Zástupci tohoto rodu jsou gramnegativní rovné nepohyblivé tyčky, které se vyskytují jednotlivě, po dvou, nebo v krátkých řetízích. Buňky mají pouzdro a jejich kolonie mohou mít mukózní vzhled. Jsou fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní, mají respiratorní i fermentatorní typ metabolismu. Optimální teplota pro jejich růst je 37 °C a nerostou při 10 °C. Jsou oxidáza negativní a kataláza pozitivní, okyselují řadu sacharidů. Nacházejí se ve stolici člověka, klinickém materiálu (sliznice savců), půdě, vodě, na rostlinách. Jedná se o oportunně patogenní bakterie, které mohou vyvolávat bakteriemii, pneumonii, infekce močových cest a jiné infekce člověka, např. jsou původci nozokomiálních infekcí. Nejznámějším zástupcem je *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, který obývá střevní trakt člověka a zvířat a může způsobovat infekce močových a dýchacích cest a mastitidy u zvířat (Sedláček, 2007; Votava, 2003).

2.2.2 Intestinální enterokoky

Za intestinální enterokoky jsou považovány grampozitivní koky, většinou uspořádané do řetízků s antigenovou skupinou D a negativní katalázou. Mají schopnost množit se v rozmezí teplot 10–45 °C, rostou i při poměrně vysokých koncentracích solí (až 6,5 % chloridu sodného) a při hodnotě pH 9,1. Jsou tolerantní až ke 40 % žluči v prostředí (Baudišová, 2017).

Tyto enterokoky zahrnují druhy dvou rodů: *Enterococcus* a *Streptococcus*, které se vyskytují ve střevech, a tedy i výkalech lidí a mnoha zvířat. Nejčastěji ve vodě se vyskytující druhy rodu *Enterococcus*, které ukazují na fekální kontaminaci, jsou *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* a *E. hirae*. Z rodu *Streptococcus* jsou to druhy *Streptococcus bovis* a *S. equinus* (Horan, Mara, 2003).

Intestinální enterokoky jsou významným indikátorem tzv. nedávného fekálního znečištění, protože se jedná o skupinu mikroorganismů, která je ve srovnání s koliformními bakteriemi citlivější vůči vlivům vnějšího prostředí a ve vodě se pomnožují jen zřídka. Na druhou stranu jsou ale více rezistentní vůči chloru a dalším desinfekčním prostředkům (Baudišová, 2017).

Mimo to, že střevní enterokoky indikují fekální znečištění, tak některé druhy patří mezi tzv. potenciální patogeny, tedy mezi mikroorganismy, které mohou vyvolávat onemocnění lidí a zvířat. Proti takovým onemocněním existuje určitá ochrana a jsou léčitelná. Enterokoky jsou značně rezistentní vůči antibiotikům. Onemocnění, která vyvolávají, postihují nejčastěji močový systém, méně často způsobují bakteriémie a byly popsány i případy endokarditidy (Baudišová, 2017).

2.3 Indikátory obecného znečištění

Za indikátory obecného znečištění vod lze považovat uměle vytvořenou skupinu organotrofních bakterií. Jedná se o bakterie, které se vyskytují ve vodním prostředí bez ohledu na to, zda jsou původem alochtonní (nepůvodní) nebo autochtonní (původní) mikroflóra. Jako zdroj energie, uhlíku a dusíku využívají zásadně organické látky. K nejčastěji se vyskytujícím bakteriím organicky znečištěných vod patří např. druhy rodů *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, dále se zde vyskytují zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* a další. Mohou se vyskytovat i zástupci rodu *Acinetobacter*. Nežádoucí účinky pomnožení organotrofních bakterií ve vodě jsou hlavně zhoršené organoleptické vlastnosti vody (nárůst jejich počtu může detekovat růst biofilmu

a vytváření produktů, které zhoršují organoleptické vlastnosti vody) a poté také zvýšené riziko kažení potravin vyrobených z takové vody. Vyšší nárůst organotrofních bakterií může také zkreslovat výsledky mikrobiologického rozboru závažnějších ukazatelů (koliformní bakterie). Zvýšený počet organotrofních mikroorganismů signalizuje většinou znečištění vodního zdroje z vnějšího prostředí, a to buď přímo buňkami mikroorganismů, nebo organickými látkami, na nichž se mohou tyto mikroorganismy pomnožit. Organotrofní bakterie se stanovují jako počty kolonií mezofilních a psychrofilních bakterií a jejich stanovení slouží k ekologickému posouzení jakosti vod (Baudišová, 2017; Říhová Ambrožová, 2004).

3 SLEDOVANÉ PARAMETRY A MOŽNOSTI JEJICH STANOVENÍ

3.1 Koliformní bakterie

Koliformní bakterie je možné stanovit podle normy ČSN EN ISO 9308-1. Tato norma je určena pro stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií metodou membránových filtrů pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikrobioty. Metoda je založena na membránové filtraci a následné kultivaci filtrů na chromogenním médiu. Tato metoda není vhodná pro povrchové vody a vody z mělkých studní, kvůli nízké selektivitě diferenciálního média a s tím spojeným možným větším výskytem doprovodné mikrobioty, která by mohla narušit spolehlivé stanovení *E. coli* a koliformních bakterií. Principem metody je filtrace 100 ml vzorku vody přes membránový filtr o porozitě 0,45 μm . Po filtraci se filtr přenesse na dané médium. Filtr se na daném médiu inkubuje po dobu 24 hodin při teplotě 36 °C (ČSN EN ISO 9308-1, 2015).

Pro izolaci a stanovení počtu koliformních bakterií ve vodě metodou membránové filtrace bylo vybráno kultivační médium Tergitol 7 Agar Base, Modified. Složení přípravku odpovídá požadavkům ČSN EN ISO 9308-1. V příbalové informaci přípravku od společnosti HiMedia bylo uvedeno, že přídavek roztoku trifenylnitrazoliumchloridu (TTC) činí médium selektivním. Tergitol-7 (heptadecylsulfát sodný) inhibuje grampozitivní organismy a zpomaluje růst rodu *Proteus*, což umožňuje lepší růst koliformním bakteriím. Fermentace laktózy se projevuje změnou barvy indikátoru pH bromthymolové modři. TTC je rychle redukován většinou koliformních bakterií, kromě *Escherichia coli* a *Klebsiella aerogenes*, za vzniku formazanu, červeně zbarveného nerozpustného komplexu, čímž vznikají červeně zbarvené kolonie, což umožňuje jejich snadnou diferenciaci. Žluté kolonie jsou identifikovány jako fekální koliformní bakterie (anonym, 2015).

3.2 Intestinální enterokoky

Střevní enterokoky se stanovují výlučně pomocí membránové filtrace na kultivačním médiu podle Slanetze a Bartleyové (SB). Stanovení probíhá podle ČSN EN ISO 7899-2. Metoda je založena na membránové filtraci na filtrech o porozitě 0,45 μm a následné kultivaci na SB médiu po dobu 48 hodin při teplotě 36 °C (ČSN EN ISO 7899-2, 2001). SB je vysoce selektivní médium s azidem sodným a TTC. Azid sodný inhibuje gramnegativní organismy. Trifenylnitrazoliumchlorid (TTC) se redukuje na nerozpustný formazan uvnitř bakteriální buňky a vytváří se tak tmavě červené kolonie (Baudišová, 2017; Rice, c2012).

3.3 Organotrofní mikroorganismy

Organotrofní mikroorganismy se stanovují jako počty kolonií narostlých při 22 °C, resp. 36 °C. Stanovení je prováděno dle normy ČSN EN ISO 6222 Jakost vod – Stanovení kultivovatelných mikroorganismů – Stanovení počtu kolonií očkovaním do živného agarového kultivačního média. Podstata zkoušky spočívá v tom, že je odměřený objem vzorku (obvykle 1 ml) dokonale promíchán s roztopeným živným kultivačním médiem v Petriho misce. Jedna sada misek se následně kultivuje při 22 °C a druhá při 36 °C. Jako kultivační médium je v tomto případě použit agar s kvasničným extraktem (ČSN EN ISO 6222, 1999).

Dalším způsobem, jakým lze stanovit organotrofní mikroorganismy, je stanovení psychrofilních a mezofilních bakterií. Toto stanovení probíhá podle norem ČSN 75 7841 (mezofilní bakterie) a ČSN 75 7842 (psychrofilní bakterie). Do sterilních Petriho misek je napipetován vzorek vody (u pitných vod se očkuje 1 ml) a následně zalit roztopeným kultivačním médiem. Směs se důkladně promíchá krouživým pohybem a nechá se kultivovat při 20 °C (psychrofilní), resp. 37 °C (mezofilní). Jako kultivační médium je použit masopeptonový agar (MPA) č.2 (Baudišová, 2017).

Tabulka 1 Mikrobiologické ukazatele pitné vody a jejich hygienické limity (Česko, 2018)

Ukazatel	Jednotka	Limit	Typ limitu
Koliformní bakterie	KTJ/100 ml	0	MH
Intestinální enterokoky	KTJ/100 ml	0	NMH
Počet kolonií při 22 °C	KTJ/1 ml	500*	DH
Počet kolonií při 36 °C	KTJ/1 ml	100*	DH

MH – mezní hodnota, NMH – nejvyšší mezní hodnota, DH – doporučená hodnota podle § 3 odst. 1 zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví

*limit platí pro vodu z malých nedezinfikovaných zdrojů, produkujících méně než 5 m³ za den

3.4 Identifikace mikroorganismů

Cílem mikrobiologického vyšetřování vod je zjištění přítomnosti mikroorganismů a jejich zařazení do taxonomických skupin. K identifikaci se používá celá řada různých metod (Ambrožová, 2004).

3.4.1 Barvení dle Grama

Gramovo barvení je jedna z nejdůležitějších technik používaných v mikrobiologii. Tuto metodu vyvinul v roce 1884 dánský vědec Hans Christian Gram. Toto barvení umožňuje rozlišit bakterie na grampozitivní (G+) a gramnegativní (G-) na základě rozdílného uspořádání buněčné stěny, a tudíž i rozdílné reakce na barvení komplexem krystalové violeti, jódem a safraninovým kontrastním barvivem (Coico, 2006).

Buněčná stěna grampozitivních bakterií je poměrně silná (asi 20 nm) a obsahuje dvě hlavní složky – tlustou vrstvu peptidoglykanu a řetězce teikových kyselin. Teikové kyseliny se nachází pouze u grampozitivních buněk a tvoří hlavní antigen na buněčném povrchu. Kromě těchto dvou hlavních složek obsahuje grampozitivní stěna pouze málo jiných molekul. Některé z nich jsou polysacharidy, jako například specifické antigeny streptokoků; jiné jsou proteiny. S výjimkou některých bakterií, jako jsou například mykobakterie, neobsahuje buněčná stěna grampozitivních bakterií lipidy (Ryan a Ray, 2004).

Druhý typ buněčné stěny nacházející se u bakterií je gramnegativní stěna. S výjimkou přítomnosti peptidoglykanu, existuje jen malá chemická podobnost se stěnou grampozitivní a stavba je zásadně odlišná. Vrstva peptidoglykanu je mnohem tenčí a nad ní se nachází vnější membrána tvořená dvojvrstvou fosfolipidů. Na povrchu vnější membrány se nachází lipopolysacharidy, které tvoří hlavní povrchový antigen gramnegativních buněk. Mezi vrstvou peptidoglykanu a vnější membránou se nachází periplasmatický prostor a tyto dvě vrstvy jsou spojeny lipoproteiny. Významné jsou proteiny, které se nazývají poriny, ty pronikají přes vnější membránu až k peptidoglykanu a vytvářejí póry, které umožňují průnik malým hydrofilním molekulám přes vnější membránu až k cytoplasmatické membráně (Ryan a Ray, 2004).

Grampozitivní mikroorganismy mají relativně silnou buněčnou stěnu a při barvení krystalovou violetí se barvivo dostává do buněk a tvoří s Lugolovým roztokem komplex, který je v buňce zadržen, nevymývá se použitím alkoholu a po použití druhého barviva zůstávají bakterie zbarveny fialově. U gramnegativních bakterií postupy barvení poškozují

buněčný povrch, což vede ke ztrátě komplexů barviv při vymývání alkoholem a po následném dobarvení se bakterie zbarví do růžova (Popescu a Doyle, 2009; Buňková a Doležalová, 2007).

3.4.2 Biochemické testy

Metody biochemických testů využívají fyziologických vlastností mikroorganismů, jako jsou například schopnost zkvašovat různé sacharidy, schopnost využívání různých substrátů jako zdrojů uhlíku, hydrolýza některých substrátů, aktivita enzymů, citlivost ke žluči a deoxycholátu, produkce specifických metabolitů apod (Kopecká a Rotková, 2016).

KOH test

Tento test se používá k rychlému rozlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií. Je založen, stejně jako barvení dle Grama, na rozdílném složení buněčné stěny. V reakci s 2% hydroxidem draselným dojde u G- bakterií k narušení tenké peptidoglykanové vrstvy a vytvoření táhnoucí se viskózní hmoty. U G+ bakterií se hmota netvoří kvůli silné vrstvě peptidoglykanu, která je odolná vůči hydroxidu (Kopecká a Rotková, 2016).

Katalázový test

Některé bakterie mají schopnost redukovat kyslík na peroxid vodíku, který je pro buňky toxický. Ochranným mechanismem, který snižuje možné poškození, je rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Tento mechanismus je katalyzován enzymem katalázou. Přítomnost tohoto enzymu je možné stanovit jednoduchým katalázovým testem, kdy se k bakteriální suspenzi přidá peroxid vodíku a pozoruje se tvorba bublinek kyslíku. Pozitivní jsou například bakterie rodů *Staphylococcus* nebo *Corynebacterium*, negativní jsou bakterie rodů *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* nebo *Clostridium*, případně nových rodů odvozených od výše uvedených (Harrigan, 1998).

Oxidázový test (OXI test)

Jedná se o test pro zjištění přítomnosti enzymu cytochromoxidázy. Tento enzym je detekován barevnou reakcí N,N-dimethyl-1,4-fenylendiaminu s α -naftolem za vzniku indolfenolové modři. Test je užitečný pro odlišení rodu *Pseudomonas* od jiných gramnegativních tyčinek (Harrigan, 1998).

3.4.3 MALDI TOF

K identifikaci mikroorganismů je možné použít metodu hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry – MALDI-TOF MS).

4 MOŽNOSTI ÚPRAVY VODY

Nezávadná pitná voda je základem zdravého života, a proto bychom měli věnovat potřebnou pozornost ochraně naší studny. Vrtané i kopané studny pro pitné účely je třeba ochraňovat před znečištěním z povrchu. Kvalita podzemní vody může být zhoršena únikem nejrůznějších škodlivých látek v širokém okolí studny, klidně i ze vzdálenosti desítek či stovek metrů. Možné riziko představují v okolí studny nejrůznější průmyslové provozy, kde pracují se závadnými látkami (ropné produkty, rozpouštědla atd.), nebo pole a zemědělská půda, kde se používají hnojiva. Podobný vliv mohou však mít i malá domácí hospodářství, hnojiště, septiky, úniky odpadních vod z kanalizací nebo skládky odpadů v blízkosti (Zelinka, 2013; Herzán, 2008).

Studna individuálního zásobování vodou (studna určená pro zásobování například jednotlivých domácností) musí být situována tam, kde není zdroj možného znečištění nebo ohrožení kvality vody ve studni. Nejmenší vzdálenosti studen od zdrojů možného znečištění jsou stanoveny podle druhu možného znečištění pro různě propustná prostředí a tyto hodnoty jsou uvedeny ve vyhlášce č. 501/2006 Sb., o obecných požadavcích na využívání území (Česko, 2006.).

Jak už bylo zmíněno, tak o vlastní zdroj (studnu) se musí starat každý majitel sám, na rozdíl od veřejných vodovodů, u kterých je kvalita vody pravidelně kontrolována. Voda ve studni může obsahovat celou řadu zdraví ohrožujících látek nebo látek zhoršujících její organoleptické vlastnosti nebo způsobujících usazeniny a zbarvení. Z tohoto důvodu je doporučováno minimálně jednou ročně provádět kontrolu jakosti vody. K běžné kontrole se doporučuje informativní chemicko-bakteriologický rozbor pro individuální zásobování minimálně v rozsahu zjištění pH, obsahu dusičnanů, dusitanů, amonných iontů, chloridů, síranů, enterokoků, koliformních bakterií a počtů kolonií při 22 °C a při 36 °C. Při překročení bakteriologických limitů může pomoci desinfekce vodního zdroje (Zelinka, 2013).

První úpravy vody lze datovat do dob, kdy lidé začali používat nádoby na vodu vyrobené ze stříbra či mědi. Zjistili totiž, že voda v těchto nádobách se nekazí tak rychle. Tyto materiály mají schopnost zabránit nadměrnému množení mikroorganismů, čemuž se odborně říká oligodynamie. Této vlastnosti stříbra využíváme dodnes. Prostředek Sagen obsahuje asi 0,8 % stříbra a používá se jako dlouhodobá desinfekce studniční vody při použití jednou až dvakrát za rok v množství 10 g přípravku na 1 m³ vody. Doba expozice je minimálně 2 až 3 dny (Zelinka a Formánek, 2005; Michek a Daříčková, 2007).

V dnešní době jsou pro desinfekci vody častěji používané chlorové sloučeniny. Nejvíce používaný je kapalný přípravek SAVO, který je běžně dostupný. Jeho účinnou složkou je chlornan sodný v koncentraci 40 až 45 g Cl₂ na litr výrobku. Na obalu výrobku je uvedeno od výrobce, že při desinfekci pitné vody ve studnách je dávkování 90 ml Sava Original na každý 1 m³ pitné vody a po třiceti minutách je voda vydesinfikována a zároveň dochází k rozložení účinné látky (Michek a Daříčková, 2007).

Po provedeném ošetření (přípravkem Sagen, SAVO atd.) je doporučováno alespoň 24 hodin zdroj nečerpat a po 1 týdnu až 1 měsíci zopakovat bakteriologický rozbor. Pokud i po tomto rozboru budou hodnoty nadlimitní, je nutno identifikovat zdroj znečištění a odstranit jej. Pokud se ani toto nepovede, je třeba provádět opakovanou desinfekci v závislosti na rozsahu infekčního přítoku (Zelinka 2013).

Dalším možným řešením je kontinuální (trvalá) desinfekce, jejíž instalaci je nutné svěřit odborné firmě. Trvalou desinfekci je možné zajistit buď chemicky nebo fyzikálně. Pro fyzikální desinfekci se používá UV záření nebo mechanická (keramická či membránová) separace realizovaná mikrofiltrací přes přepážky s póry 0,2 – 0,5 μm. Pro chemickou kontinuální desinfekci lze využít například chlornan sodný. (Kožíšek, 2003; Michek a Daříčková, 2007).

Bakteriologické znečištění je možné odstranit i pomocí varu, a to nejméně po dobu pěti minut (Zelinka 2013).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

- Provedení mikrobiologického stanovení vybraných indikátorových skupin mikroorganismů (koliformní bakterie, intestinální enterokoky, mezofilní a psychrofilní bakterie) u 14 vzorků studniční vody ze 13 různých studen,
- porovnání výsledků analýzy s limity pro pitnou vodu uvedenými v platné legislativě,
- identifikace vybraných izolovaných mikroorganismů.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Vzorky vody a jejich odběrová místa

Praktická část byla zaměřena na mikrobiologický rozbor 14 vzorků vody (Tabulka 2, Obrázek 1). Z větší části se jednalo o vzorky pocházející ze studní ve Zlíně a jeho okolí. Jeden vzorek (vzorek číslo 10) byl odebrán ze studny ve Velkém Meziříčí.

Tabulka 2 Testované vzorky a místa jejich odběru

Vzorek č.	Lokalita	Datum odběru
1	Zbožensko	1.7.2021
2	Zbožensko	20.2.2022
3	Hvozdná	20.2.2022
4	Hvozdná	20.2.2022
5	Nedachlebice	20.2.2022
6	Zbožensko	14.3.2022
7	Žeranovice	14.3.2022
8	Slušovice	14.3.2022
9	Vlčková	3.4.2022
10	Velké Meziříčí	6.4.2022
11	Prlov	21.2.2023
12	Prlov	21.2.2023
13	Leskovec	21.2.2023
14	Malenovice	21.2.2023

Vzorek 5

Vzorek číslo 5 byl odebrán ze studny v obci Nedachlebice v okrese Uherské Hradiště ve Zlínském kraji. Studna byla vykopána na počátku 20. století a je vyztužena skružemi. Hluboká je zhruba 20 m. Původně byla studna v okolí pole, kde se dnes nachází zastavěná oblast.

Vzorek 6

Studna je situována podobně jako studna použitá pro odběr vzorku 1 a 2 na Zbožensku. Jedná se o studnu využívanou k pitným účelům a voda je vedena pomocí čerpadla a rozvodem vody ukončeným kohoutkem. Byla vyvrtána v roce 1998 je hluboká 22 m a široká 14 cm. Jak již bylo zmíněno, tak se v okolí místní části Zbožensko nachází skládka odpadů Suchý důl, zemědělská půda a statek s koňmi.

Vzorek 7

Studna se nachází v obci Žeranovice v okrese Kroměříž ve Zlínském kraji. Je stará 48 let a jedná se o studnu kopanou a vyztuženou pomocí skruží. Je hluboká 12 m a je situována na kopci.

Vzorek 8

Studna pro odběr vzorku číslo 8 se nachází ve městě Slušovice v okrese Zlín ve Zlínském kraji. Je umístěna na zahradě rodinného domu a byla vyvrtána mezi lety 1960 až 1970 do hloubky 12 m. Studna je vyztužena pomocí dvou skruží. V okolí studny se nachází zastavěná oblast. Voda z této studny je využívána k závlaze zahrady.

Vzorek 9

Odběrové místo se nachází v obci Vlčková v okrese Zlín ve Zlínském kraji na zahradě rodinného domu. Studna byla vykopána mezi roky 1973-1975 do hloubky zhruba 9 m a vyztužena skružemi. V 80. letech (cca po 10-12 letech) byla vlivem nedostatku vody prohloubena o asi 3 metry (už bez betonové výztuže). Jedná se o studnu s čerpadlem a rozvodem vody ukončeným kohoutkem a slouží jako zdroj pitné vody. V blízkém okolí se nachází mírně zastavěná oblast (několik málo rodinných domů) a zemědělská a/nebo lesnická půda.

Vzorek 10

Studna pro odběr vzorku číslo 10 se nachází ve Velkém Meziříčí v okrese Žďár nad Sázavou v Kraji Vysočina. Studna byla vykopána v polovině 20. století a je vyztužena skružemi. Hluboká je zhruba 20 m. Původně byla v okolí studny zemědělská oblast, dnes se zde nachází převážně zastavěná oblast.

Vzorek 11

Odběrové místo je situováno v obci Prlov v okrese Vsetín ve Zlínském kraji. Jedná se o vrtanou studnu lokalizovanou na dvorku rodinného domu. Studna byla vyvrtána v roce 2000 do hloubky 6,5 m. V blízkém okolí se nachází tři podzemní septiky, silniční komunikace a nedaleko protéká potok. Studna je využívána denně jako zdroj pitné vody. Zhruba půl roku před odběrem bylo provedeno čištění pomocí Sava.

Vzorek 12

V obci Prlov je situována i studna pro odběr vzorku číslo 12. Jedná se o kopanou studnu ve vlhkém sklepě pod chatou umístěnou pod svahem osázeném ovocnými stromy. Studna byla vykopána v roce 2017 do hloubky 4 m, je vyztužena pomocí skruží a její dno je vysypáno jemnou kamennou drtí. V blízkosti se nachází rodinný dům, který má zabudovanou jímku. Dále je v blízkosti pole, které dříve sloužilo jako zemědělská půda. Vedle chaty se zdrojem vody je umístěna hromada kompostu a v okolí také protéká potok. Zdroj je využíván k pitným účelům pouze sezóně.

Vzorek 13

Studna pro odběr vzorku číslo 13 se nachází v obci Leskovec v okrese Vsetín ve Zlínském kraji. Jedná se o studnu ve sklepě rodinného domu vykopanou v roce 1984 do hloubky asi 6 m, která je vyztužena pomocí skruží. V blízkém okolí se nachází pole, které dříve bylo využíváno jako pastvina pro dobytek, ale dnes se již jedná o zastavěnou oblast novostavbami. V okolí je silnice, nepoužívaný septik. Dříve se v blízkosti nacházela černá skládka. Studna je jako zdroj pitné vody využívána denně.

Vzorek 14

Studna se nachází na zahradě rodinného domu v Malenovicích, což je městská část Zlína. Studna je kopaná a vyztužena pomocí 9 skruží. Vykopána byla v roce 1936, je široká 1,2 m a hluboká 7 m. V bezprostřední blízkosti studny je zástavba rodinných domů a louka.

6.2 Příprava a odběr vzorků

Při odběru vzorků bylo postupováno v souladu s platnými předpisy ČSN EN ISO 19458 Jakost vod – Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu. Odběr vzorků z různých vodních útvarů je popsán v příslušných částech ČSN ISO 5667-1 až 5667-18.

Vzorky vod se odebíraly do sterilních skleněných vzorkovnic o objemu 500 ml. Před samotným odběrem vzorku vody byl kohoutek očištěn (např. dezinfekčním prostředkem). Poté byla studená voda ponechána odtékat ustáleným proudem asi 5 minut. Sterilní vzorkovnice byla otevřena těsně před samotným odběrem. Vzorkovnice byla naplněna vodou a uzavřena. Vzorek byl uložen do chladničky a co nejdříve testován.

6.3 Živné půdy a chemikálie

Sterilní H₂O

Absolutní etanol

Krystalová violet

Lugolův roztok

Denaturovaný etanol nebo aceton

Karbolfuchsin nebo safranin

Benzín

Imerzní olej

H₂O₂

KOH

Plate Count Agar (PCA) – složení (g/l)

Ezymatický hydrolyzát kaseinu	5,00
Kvasničný extrakt	2,50
Glukosa	1,00
Agar	15,00

Konečné pH (při 25°C) $7,2 \pm 0,2$

Příprava:

Do 1000 ml destilované vody v reagenční lahvi bylo naváženo 23,5 g přípravku. Obsah lahve byl důkladně protřepán a následně autoklávován při 121 °C po dobu 15 minut. Láhev byla ochlazená na 45-50 °C obsah lahve byl nalit do Petriho misek.

Modified Tergitol 7 Agar Base – složení (g/l)

Masový pepton	10,00
Kvasničný extrakt	6,00
Masový extrakt	5,00
Laktosa	20,00
Tergitol 7	0,10
Bromthymolová modř	0,05
Agar	16,00

Konečné pH (při 25°C) $7,2 \pm 0,2$

Příprava:

Do čisté reagenční lahve bylo naváženo 57,15 g přípravku do 1000 ml destilované vody. Obsah lahve byl protřepán a zahříván do úplného rozpuštění. Po rozpuštění proběhla sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Láhev byla ochlazená na 45-50 °C a k obsahu bylo přidáno 2,5 ml 1% roztoku 2,3,5-trifenylnitrazolium chloridu (FD 057 TTC Solution 1%). Obsah lahve byl důkladně promíchán a nalit do Petriho misek.

Slanetz and Bartley Medium (SB) – složení (g/l)

Tryptosa	20,00
Kvasničný extrakt	5,00
Dextrosa	2,00
Hydrogenfosforečnan (di)sodný	4,00
Azid sodný	0,40
Trifenyltetrazolium chlorid	0,10
Agar	15,00

Konečné pH (při 25°C) $7,2 \pm 0,2$

Příprava:

Bylo naváženo 46,5 g přípravku do reagenční lahve a přidáno 1000 ml destilované vody. Při četném promíchávání byl obsah lahve opatrně zahříván do úplného rozpuštění – neautoklárováno. Po rozpuštění byla láhev ihned ochlazena ve vodní lázni na 45-50 °C. Obsah lahve byl nalit do Petriho misek.

6.4 Přístroje a pomůcky

Sterilní zásobní lahve

Váhy

Autokláv

Bio II Advance Biohazard Box

Sterilní očkovací kličky

Sterilní očkovací hokejky

Termostat nastavený na teplotu 37°C a 20 °C

Petriho misky

Membránové filtry – velikost pórů 0,45 µm, průměr 47 mm

Mikroskop s imerzí

Podložní sklíčka

Kapátko

Mikrozkumavky Eppendorf

OXItest

6.5 Kultivační stanovení počtu vybraných indikátorových ukazatelů

U všech vzorků byly stanovovány následující indikátorové skupiny mikroorganismů:

- koliformní bakterie
- enterokoky
- mezofilní bakterie
- psychofilní bakterie

Očkování a kultivace

Vzorky ze sterilních vzorkovnic byly naočkovány za pomoci automatických mikropipet. Na Petriho misky s příslušnou půdou byl nanesen 1 ml vzorku vody a asepticky rozetřen pomocí očkovací hokejky. V případě koliformních bakterií (stanovení na půdě Tergitol) a enterokoků (stanovení na půdě Slanetz-Bartley) byla dle vyhlášky č. 70/2018 Sb. provedena technika membránové filtrace 100 ml vzorku vody (Obrázek 2). Filtry byly následně kultivovány na příslušných živných půdách. Po zaočkování byly Petriho misky kultivovány za daných podmínek, které jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 3), kde jsou uvedeny i použité živné půdy pro jednotlivé mikroorganismy.

Tabulka 3 Kultivační podmínky sledovaných indikátorových skupin mikroorganismů

Mikroorganismy	Použitá živná půda	Teplota kultivace [°C]	Doba kultivace [hodiny]	Použitá metoda
Mezofilní bakterie	PCA	37	24	přímo 1 ml
Psychofilní bakterie	PCA	20	48	přímo 1 ml
Koliformní bakterie	Tergitol	37	24	filtr 100 ml
Enterokoky	SB	37	48	filtr 100 ml



Obrázek 2 Aparatura pro membránovou filtraci (archiv autorky)

Stanovení počtu mikroorganismů

Po skončení inkubace za stanovených podmínek byly spočítány kolonie narostené na Petriho miskách, a to všechny kolonie nebo pouze kolonie s charakteristickou morfologií, které ukazují charakteristické reakce se složkami půdy (presumptivní kolonie). Z počtu kolonií mikroorganismů narostlých na miskách byl vypočítán počet mikroorganismů přítomných ve vzorku jako CFU nebo KTJ (kolonie tvořící jednotka) v 1 ml vzorku vody nebo CFU (KTJ) ve 100 ml vzorku při použití membránové filtrace.

6.6 Identifikace izolovaných kultur

Po stanovené době kultivace byly na živných půdách u vyrostených bakteriálních kolonií charakterizovány makroskopické morfologické znaky, které jsou pozorovatelné pouhým okem. Mezi tyto znaky patří například barva, velikost, tvar, profil a okraj kolonií.

Při stanovení počtu mikroorganismů byly pro výpočet zohledněny pouze kolonie s charakteristickou morfologií pro sledovaný parametr. Pro identifikaci byly izolovány všechny typy kolonií narostlých na daných půdách (tj. i ty, které nemají typickou morfologii).

Jednotlivé bakteriální kolonie byly pomocí křížového roztěru přeneseny na univerzální živnou půdu (PCA) a kultivovány za stejných podmínek jako původní vzorky.

U izolovaných kultur bakterií byla provedena identifikace následujícími metodami:

- Gramovo barvení
- Základní biochemické testy (KOH test, oxidázový test a test pro důkaz produkce katalázy)
- MALDI TOF

6.6.1 Gramovo barvení

Prvním krokem barvení dle Grama je fixace preparátu. Fixací buňky přilnou ke sklíčku a nespláchnou se působením barviva nebo alkoholu a lépe barvivo přijmou. Na čisté a odmaštěné (otřené etanolem) podložní sklíčko byla nanесena kapka destilované vody, do které byla pomocí sterilní očkovací kličky přeneseno malé množství sledované kultury. Suspenze byla rozetřena po sklíčku. Samotná fixace proběhla až byl nátěr suchý, aby nedošlo k uvaření buněk. Podložní sklíčko s nátěrem bylo třikrát protaženo nesvítivou částí plamene. Po fixaci preparátu proběhlo samotné Gramovo barvení podle postupu:

- 1) Na preparát byl nanесen roztok krystalové violeti a byl ponechán 60 sekund působit. Barva byla slita a preparát byl opláchnut vodou.
- 2) Preparát byl převrstven Lugolovým roztokem. Po 30 sekundách působení byl roztok slit a preparát byl opláchnut vodou.
- 3) Následovalo odbarvování pomocí etanolu či acetonu. Rozpouštědlo se nechalo působit, dokud z preparátu odtékala barva. Preparát byl následně opět opláchnut vodou.
- 4) Po odbarvení byl preparát dobarven pomocí safraninu nebo karbofuchsinu. Po 60 sekundách bylo barvivo slito a preparát byl opláchnut vodou.
- 5) Preparát byl osušen mezi filtračními papíry a pozorován pod mikroskopem s imerzí.

6.6.2 Biochemické testy

KOH test

Na čisté podložní sklíčko byla nanесena kapka 2% hydroxidu draselného (KOH). Do kapky byla pomocí sterilní očkovací kličky přenesena testovaná kultura. Za G+ bakterie jsou považovány ty, jejichž buněčný lyzát vytvoří viskózní suspenzi, která se táhne za kličkou.

Oxidázový test

Pro tento test byly využity standardní indikátorové papírky. Na indikátorový papírek byla nanášena testovaná bakteriální kultura pomocí sterilní kličky a byla pozorována barevná reakce. Pokud se indikátorový papírek zbarví modře, jedná se o pozitivní reakci.

Katalázový test

Na čisté podložní sklíčko byla nanášena kapka peroxidu vodíku (H_2O_2), do které byla očkovací kličkou nanášena bakteriální kultura. Pozitivní reakce se projeví uvolňováním bublinek kyslíku (O_2).

6.6.3 MALDI TOF

Vybrané mikroorganismy byly identifikovány metodou MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry) – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem. Čisté kultury vyrostlé na PCA byly sterilní očkovací kličkou odebrány a resuspendovány v mikrozkušavce Eppendorf ve 300 μl sterilní H_2O . Do zkumavky bylo přidáno 900 μl absolutního etanolu a obsah zkumavky byl promíchán. Takto připravené vzorky byly zamrazeny a připraveny k identifikaci. Mikrozkušavky určené pro identifikaci pomocí MALDI-TOF byly následně odeslány na Slovenskou poľnohospodárskou univerzitu v Nitře, kde samotná identifikace proběhla ve Výskumném centru AgroBioTech ve spolupráci s prof. Ing. Kačániovou, PhD.



Obrázek 3 Bruker MALDI Biotyper (archiv autorky)

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Stanovení počtu mikroorganismů

Pomocí kultivačního stanovení byl pozorován nárůst mikroorganismů, které se vyskytovaly v analyzovaných vzorcích vody. Výsledky mikrobiologické analýzy byly porovnány s limity mikrobiologických ukazatelů dle vyhlášky č. 70/2018 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody (Tabulka 1).

Tabulka 4 Počty mikroorganismů v jednotlivých vzorcích vody

Vzorek č.	Sledovaný parametr			
	Intestinální enterokoky [KTJ/100 ml]	Koliformní bakterie [KTJ/100 ml]	Psychrofilní mikroorganismy [KTJ/ml]	Mezofilní mikroorganismy [KTJ/ml]
1	<1	5	2	<1
2	<1	2	67	19
3	11	245	58	52
4	11	1	39	9
5	<1	<1	30	4
6	1	2	427	107
7	<1	20	16	5
8	<1	1	71	<1
9	<1	<1	140	24
10	<1	<1	228	<1
11	<1	<1	<1	<1
12	<1	<1	10	<1
13	1	6	6	<1
14	<1	<1	20	<1

Vzorek 1 a 2

Vzorky 1 a 2 byly odebrány z vrtané studny na Zbožensku. V blízkém okolí odběrového místa se nachází skládka odpadů, zemědělská půda a statek. Tyto okolnosti mohou zásadně ovlivnit kvalitu vody z tohoto zdroje. Na tomto odběrovém místě byly provedeny odběry ve dvou časových horizontech, a to na začátku července (vzorek 1) a v únoru následujícího roku (vzorek 2). V letním období byl pozorován nepatrný nárůst počtu koliformních bakterií, což mohlo být způsobeno pravidelně hnojenou zemědělskou půdou, která leží v blízkosti odběrového místa. Markantní je rozdíl počtu mezofilních a psychofilních mikroorganismů, kdy v únoru (vzorek 2) byl jejich počet několikanásobně vyšší. Nárůst počtu mikroorganismů mohl být způsoben oblevou a větším množstvím živin (organických látek) pro mikroorganismy. Počet mezofilních i psychofilních mikroorganismů však stále nepřekračuje limity dané vyhláškou č. 70/2018 Sb. Limitem, který byl dle zmíněné vyhlášky překročen při obou odběrech, byl počet koliformních bakterií (0 KTJ/100 ml). Voda z této studny by tedy neměla být využívána k pitným účelům.

Vzorek 3

Studna, která sloužila jako odběrové místo pro vzorek 3, se nachází v obci Hvozdná. Jedná se studnu vrtanou. V okolí studny se nachází zástavba, les a louka. U této studny byly v důsledku špatné údržby zaznamenány nejhorší výsledky, a to u koliformních bakterií a intestinálních enterokoků, kdy byl limit překročen ve velké míře. Díky alarmujícím hodnotám (zejména počtu koliformních bakterií a enterokoků) by tato studna v žádném případě neměla být využívána k pitným účelům.

Vzorek 4

Rozbor vody z kované studny nacházející se nedaleko obce Hvozdná prokázal nadlimitní výskyt intestinálních enterokoků a koliformních bakterií. Voda z této studny je využívána jako užitková a vzhledem k nadlimitním hodnotám by ani neměla být využívána k pitným účelům.

Vzorek 5

Vzorek vody z této kované studny, která se nachází v obci Nedachlebice, splňuje, dle vyhlášky č. 70/2018 Sb., limity u všech sledovaných ukazatelů. Voda je z mikrobiologického hlediska vhodná pro pitné účely.

Vzorek 6

Vzorek 6 byl odebrán na Zbožensku, nedaleko odběrového místa vzorků 1 a 2. U vzorku vody z této studny byl překročen limit pro koliformní bakterie, intestinální enterokoky a mezofilní mikroorganismy. Nadlimitní hodnoty mohou být způsobeny lokací studny, kdy v blízkém okolí se nachází skládka odpadů, zemědělská půda i statek. Studna by neměla být využívána jako zdroj pitné vody.

Vzorek 7

Odběrové místo se nachází v obci Žeranovice. Rozbor vody z této kopané studny prokázal nadlimitní hodnoty u koliformních bakterií. Ostatní sledované parametry odpovídaly limitům uvedeným v platné legislativě. Voda není vhodná pro pitné účely.

Vzorek 8

Vzorek vody z vrtané studny ve městě Slušovice, která je využívána k závlaze zahrady, obsahoval koliformní bakterie, proto voda z tohoto zdroje není vhodná pro pitné účely.

Vzorky 9, 10, 11 a 12

Vzorky vod z těchto studen, které se nacházejí v obci Vlčková (vzorek 9), ve Velkém Meziříčí (vzorek 10) a v obci Prlov (vzorek 11 a 12), splňují limity sledovaných parametrů uvedených ve vyhlášce č. 70/2018 Sb. Z mikrobiologického hlediska je voda z těchto zdrojů nezávadná a vhodná pro pitné účely.

Vzorek 13

V případě vzorku 13, který byl odebrán z kopané studny nacházející se ve sklepě rodinného domu v obci Leskovec, byl překročen limit pro intestinální enterokoky a koliformní bakterie. Voda z tohoto zdroje neodpovídá limitům stanoveným pro pitnou vodu ve vyhlášce č. 70/2018 Sb.

Vzorek 14

Vzorek z kopané studny, která je situována na zahradě rodinného domu v Malenovicích splňuje stanovené limity pro pitnou vodu. Z mikrobiologického hlediska je voda vhodná pro pitné účely.

7.2 Identifikace mikroorganismů izolovaných ze studničních vod

Následujícím krokem byla identifikace vybraných izolovaných mikroorganismů. Po kultivačním stanovení počtu mikroorganismů byly z příslušných půd izolovány jednotlivé kolonie odlišných morfologických znaků, které byly pomocí křížového roztěru přeneseny na univerzální živnou půdu (PCA). Celkový počet izolovaných kolonií byl 91. Tyto izoláty byly charakterizovány barvením dle Grama, vybranými biochemickými testy (KOH test, oxidázový a katalázový test) a metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF ve spolupráci s paní prof. Ing. Miroslavou Kačániovou, PhD. ve Výzkumném centru AgroBioTech Slovenské poľnohospodárske univerzity v Nitře. Analyzované proteiny přítomné v bakteriální buňce byly porovnány s referenční knihovnou a podle toho byly dané mikroorganismy identifikovány.

Tabulka 5 Identifikované mikroorganismy pomocí MALDI-TOF MS

Vzorek č.	Izolát	Indikátor	Identifikovaný MO
1	1A	Kol	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
	1C	Kol	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
2	2A	Kol	<i>Pseudomonas mosselii</i>
	2C	Kol	<i>Bacillus licheniformis</i>
	2D	Psm	<i>Bacillus licheniformis</i>
	2E	Psm	<i>Bacillus licheniformis</i>
3	3A	Kol	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	3C	Kol	<i>Escherichia coli</i>
	3E	Kol	<i>Acinetobacter junii</i>
	3J	Psm	<i>Serratia fonticola</i>
4	4B	Kol	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	4E	Psm	<i>Bacillus pumilus</i>
	4F	Psm	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>
5	5B	Psm	<i>Pseudomonas veronii</i>
	5C	Psm	<i>Bacillus licheniformis</i>
	5D	Psm	<i>Janthinobacterium lividum</i>
6	6A	Eko	<i>Enterococcus faecalis</i>
	6B	Kol	<i>Escherichia coli</i>
	6C	Kol	<i>Escherichia hermannii</i>
	6E	Mem	<i>Bacillus cereus</i>
	6F	Mem	<i>Bacillus cereus</i>
	6G	Mem	<i>Bacillus cereus</i>
	6H	Psm	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
	6I	Psm	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
6M	Psm	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	

Tabulka 5 Identifikované mikroorganismy pomocí MALDI-TOF MS – pokračování

Vzorek č.	Izolát	Indikátor	Identifikovaný MO
7	7A	Kol	<i>Citrobacter freundii</i>
	7E	Psm	<i>Bacillus licheniformis</i>
	7F	Psm	<i>Buttiauxella agrestis</i>
8	8A	Kol	<i>Citrobacter freundii</i>
	8B	Kol	<i>Citrobacter gillenii</i>
	8C	Psm	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
9	9A	Kol	<i>Buttiauxella izardii</i>
	9B	Kol	<i>Serratia grimesii</i>
	9E	Psm	<i>Serratia liquefaciens</i>
	9F	Psm	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
	9G	Psm	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>
10	9H	Psm	<i>Brevundimonas intermedia</i>
	10A	Kol	<i>Serratia liquefaciens</i>
12	10D	Psm	<i>Pseudomonas grimontii</i>
	12A	Psm	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>
	12B	Psm	<i>Flavobacterium gossypii</i>
	12C	Psm	<i>Flavobacterium piscis</i>
13	12D	Psm	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	13A	Psm	<i>Aeromonas bestiarum</i>
	13B	Psm	<i>Pedobacter cryoconitis</i>
	13C	Psm	<i>Flavobacterium hibernum</i>
	13D	Psm	<i>Aeromonas bestiarum</i>
	13E	Kol	<i>Hafnia alvei</i>
14	13F	Kol	<i>Hafnia alvei</i>
	14A	Psm	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
	14B	Psm	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>
	14C	Psm	<i>Variovorax paradoxus</i>

Kol – kolidformní bakterie, Psm – psychrofilní mikroorganismy, Eko – enterokoky, Mem – mezofilní mikroorganismy

Úspěšně se podařilo metodou MALDI-TOF MS identifikovat celkem 52 izolátů z celkového počtu 91. Úspěšně identifikované mikroorganismy jsou uvedeny v tabulce 5. Příčinou neúspěšné identifikace mohla být kontaminace vzorku, nízká koncentrace mikroorganismu zaslaná k identifikaci nebo nepřítomnost daného spektra v referenčních knihovnách, které jsou tvořeny především pro izoláty z klinického materiálu. Mikroorganismy z environmentálního prostředí tak nemusí být dle dostupných knihoven spolehlivě nebo vůbec identifikovány. Další vlastnosti izolovaných mikroorganismů (barvení dle Grama a výsledky biochemických testů jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1, 2 a 3).

Charakteristika identifikovaných mikroorganismů a jejich možný výskyt ve vodách

Acinetobacter je rod gramnegativních bakterií, jsou všudypřítomné a často se vyskytují na kůži zdravých osob. Jsou aerobní. U oslabených osob, např. při popáleninách, po transplantaci, u osob na jednotkách intenzivní péče, mohou vyvolávat pneumonie a sepse. Jsou to bakterie přirozeně rezistentní na mnoho antibiotik. *Acinetobacter radioresistens* je bakterie schopná přežít extrémní podmínky (oxidační stres, vysychání a ozáření) a primárně byla izolována ze zdrojů přírodního prostředí (tj. bavlna, voda a půda) (Opazo-Capurro et al., 2019; Verma a Baroco, 2017).

Bakterie rodu *Bacillus*, zejména *Bacillus cereus*, jsou příležitostnými patogeny lidí a hospodářských zvířat, ale velká většina druhů jsou neškodní saprofyty (Baron, 1996).

Bakterie rodu *Pseudomonas* se ve vodách běžně neprojevují, ale při jejich extrémním přemnožení mohou způsobovat zákal vody, zápach a pachůť (zhoršovat organoleptické vlastnosti vod). Při konzumaci vody, která obsahuje vyšší počet těchto bakterií se mohou objevit nevolnosti, průjemy a zvracení (Mena a Gerba, 2009).

Bakterie rodu *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* a *Klebsiella* z čeledi *Enterobacteriaceae* patří mezi koliformní bakterie, které jsou podrobněji rozebrány v kapitole 2.2.1. Koliformní bakterie ve vodním prostředí považujeme za indikátory fekálního znečištění. Voda obsahující koliformní bakterie je podezřelá z kontaktu s výkaly či zbytky živočichů, proto je limit pro výskyt koliformních bakterií ve vodách nulový (Kožíšek, 2003).

Do čeledi *Enterobacteriaceae* se řadí i rody *Buttiauxella* nebo *Serratia*. U člověka mohou bakterie z rodu *Serratia* způsobovat infekce zejména u oslabených jedinců. Obecně jsou ale tyto bakterie považovány za nepatogenní a jsou součástí běžné střevní mikroflóry (Gupta et al., 2021).

Dalším zástupcem čeledi *Enterobacteriaceae* je *Hafnia alvei*. Bakterie se příležitostně podílí na střevních i extraintestinálních infekcích u lidí (septikémie nebo zápal plic) (Janda a Abbott, 2006).

Yersinia enterocolitica je zařazen do čeledi *Yersiniaceae* (Adeolu et al., 2016). Způsobuje yerseniózu. Tato zoonóza, která se přenáší alimentárně přes nakažené syrové vepřové maso, se projevuje akutním průjmem a léčí se antibiotiky. *Yersinia enterocolitica* se může kromě kontaminovaných potravin přenášet i neupravenou vodou (Sabina et al., 2011).

Aeromonády (rod *Aeromonas* a příbuzné bakterie) se běžně vyskytují ve vodách (sladké i odpadní) a v půdách. Některé druhy jsou patogenní pro ryby nebo žáby, ale mohou se nacházet také v lidském klinickém materiálu. U člověka mohou některé druhy způsobovat průjmová onemocnění. *Aeromonas bestiarum* způsobuje onemocnění ryb a nebyl nalezen žádný případ, kdy by tento druh byl izolován z humánního klinického materiálu (Pessoa et al., 2022; van Bel et al., 2021).

Jak naznačuje jejich název, jsou bakterie rodu *Pedobacter* primárně izolovány z půd, ale mohou se nacházet i ve vodách (včetně vody pitné) (Viana et al., 2018).

Enterococcus faecalis je bakterie, kterou řadíme mezi intestinální enterokoky, kteří jsou ukazatelem fekálního znečištění. Tato skupina je více popsána v kapitole 2.2.2.

Brevundimonas je rod bakterií, které jsou nefermentující, gramnegativní. Tento typ bakterií je považován za oportunní patogeny, které mohou způsobovat problémy zejména v klinickém prostředí, kdy napadají pacienty oslabené jinými nemocemi (Ryan a Pembroke, 2018).

Přirozeným prostředím pro bakterie rodu *Flavobacterium* je půda a voda. Některé druhy jsou běžně spojovány s infekcemi u ryb. U člověka mohou způsobovat infekce jen velmi vzácně (Verma a Rathore, 2015).

Variovorax paradoxus je aerobní půdní bakterie často spojována s důležitými biodegradními procesy v přírodě (Jamieson et al., 2009).

Bakterie rodu *Janthinobacterium* jsou obecně považovány za nepatogenní. *Janthinobacterium lividum* je fialově pigmentovaná tyčinkovitá gramnegativní bakterie. Pro svou charakteristickou fialovou barvu byl rod pojmenován na základě latinského slova „jantinus“, což znamená fialka. Pigmentace je výsledkem sloučeniny violaceinu, která vzniká biochemickou aktivitou při metabolismu (Oh et al., 2019). Tato bakterie byla izolována ze vzorku vody č. 5 (izolát 5D; obr. 4)



Obrázek 4 *Janthinobacterium lividum* na půdě PCA (archiv autorky)

Výsledky této bakalářské práce byly porovnány se závěry diplomové práce Ing. Lenky Šidlíkové, Dis. (Šidlíková, 2012), která se zabývala kvalitou zdrojů vody. V práci byly zpracovány výsledky mikrobiologického rozboru 287 vzorků ze studní na Kroměřížsku v letech 2006 až 2011. Byla použita zpracovaná data z laboratoře Vodovodů a kanalizací v Kroměříži. Mikrobiologický rozbor sledoval výskyt psychrofilních, mezofilních a koliformních bakterií. Výsledky práce poukazují na převažující počet vzorků, které byly nevyhovující kvůli výskytu koliformních bakterií, které indikují fekální znečištění. Výsledky výše zmíněné práce korespondují s výsledky této práce, kdy i v mém případě byla většina vzorků kontaminována koliformními bakteriemi.

Výsledky identifikace mikroorganismů izolovaných ze studničních vod byly porovnány také se studií (Baia et al., 2022) zabývající se mikrobiologickou kontaminací a identifikací mikroorganismů přítomných v podzemních vodách v západoamazonském městě Porto Velho. Kontaminace koliformními bakteriemi byla detekována v 96 % kopaných a 74 % případů vrtaných studní (celkový počet odebraných vzorků z obou typů studen byl 74). V mém případě bylo 38 % kopaných a 67 % vrtaných studen kontaminováno koliformními bakteriemi (celkový počet odebraných vzorků z kopaných studen bylo 8 a z vrtaných studen 6). Po biochemické identifikaci byly v této publikaci identifikovány rody bakterií *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, a další. Mnou identifikované izoláty gramnegativních bakterií, včetně

koliformních, se s touto studií shodují. Díky menšímu počtu vzorků testovaných v rámci této bakalářské práce ale nelze vyvodit jasný závěr, zda kontaminace studen koliformními bakteriemi souvisí s metodou budování studny (kopaná či vrtaná studna) nebo s jejich hloubkou.

O mikrobiologickém rozboru studniční vody je pouze malé množství publikovaných studií, proto výsledky této bakalářské práce byly porovnány i se studii zabývajícími se pitnou vodou obecně. Jednou z těchto prací je i studie zabývající se mikrobiologickými riziky spojenými s konzumací oligocenní vody pocházející z polského města Varšava (Karwowska et al., 2023). Kvantitativní testování vzorků vody prokázalo, že všechny vzorky byly prosté mikroorganismů svědčících o fekální kontaminaci, nebyly prokázány žádné fekální enterokoky ani koliformní bakterie. To svědčí o tom, že testovaná oligocenní voda splnila základní hygienické požadavky pro pitné vody. Při kvantitativní analýze psychrofilních a mezofilních mikroorganismů bylo nalezeno jen několik bakterií. Při srovnání s výsledky této bakalářské práce lze vyvodit, že voda ze studny je daleko náchylnější ke kontaminaci než voda testovaná ve výše zmíněné studii.

Další vybranou studií pro srovnání výsledků byla práce zabývající se výskytem koliformních bakterií a enterokoků ve vzorcích vody, používané k pitným účelům, získaných z vybraných farem pro chov mléčného skotu v Portugalsku (Soares et al., 2023). V této práci bylo testováno 32 vzorků, přičemž 19 z nich neodpovídalo limitům. Bakterie izolované z kontaminovaných vod byly identifikovány jako *Escherichia coli* (u 20 % kontaminovaných vod), *Enterococcus faecalis* (u 25 % kontaminovaných vod), celkové koliformní bakterie (u 65,6 % kontaminovaných vod) a fekální enterokoky (u 43,8 % kontaminovaných vod). Výsledkem studie je, že kvalita vody u farem s větším množstvím zvířat byla horší než u farem, kde je počet zvířat nižší. Při porovnání s výsledky této bakalářské práce lze dojít k závěru, že přítomnost farem nebo statků se zvířaty může zásadně ovlivnit kvalitu pitné vody.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na mikrobiologickou analýzu 14 vzorků studniční vody získané ze 13 různých studen. Bylo provedeno mikrobiologické stanovení vybraných parametrů (přítomnost koliformních bakterií, intestinálních enterokoků, mezofilních a psychofilních bakterií) a výsledky analýzy byly porovnány s limity pro pitnou vodu uvedenými ve vyhlášce č. 70/2018 Sb.

Parametrům uvedeným v platné vyhlášce vyhovovalo 6 vzorků vod, a to vzorky označené jako 5, 9, 10, 11, 12 a 14. Limity dané vyhlášky byly překročeny u zbývajících 8 vod. Ve všech 8 případech byl překročen limit pro koliformní bakterie a ve většině případů i limit pro intestinální enterokoky. Koliformní bakterie a intestinální enterokoky jsou považovány za indikátory fekálního znečištění vod a jejich přítomnost v pitných vodách je nežádoucí (0 KTJ/100 ml). Jedná se o bakterie, které žijí ve střevním traktu teplokrevných živočichů (včetně člověka) a jejich přítomnost ve vodách poukazuje na znečištění výkaly nebo zbytky živočichů. Tyto bakterie mohou způsobovat onemocnění a jejich přítomnost v pitné vodě je tedy nežádoucí. Limitům pro počty mikroorganismů kultivovaných při 36 °C a 22 °C (v našem případě se jednalo o počty mezofilních, respektive psychofilních bakterií) vyhovovaly všechny testované vzorky, s výjimkou vzorku 6, kde byl překročen limit pro mezofilní bakterie.

Následná identifikace izolovaných mikroorganismů prokázala přítomnost různého spektra bakterií, od nepatogenních, až po ty, které mohou způsobit při svém přemnožení závažná onemocnění. Přítomnost a identifikaci striktně patogenních bakterií by bylo třeba potvrdit dalšími metodami, např. sekvenací genomu, což nebylo předmětem této práce.

Na mnoha místech České republiky není zaveden komunální rozvod pitné vody, a proto lidé používají k pitným účelům vlastní zdroje, včetně studny. Voda ze studny se může jevit jako chutná, zcela nezávadná, přesto může potenciálně ohrožovat zdraví konzumentů. Z tohoto důvodu by měli konzumenti vody z vlastních studní její kvalitu pravidelně testovat.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADEOLU, Mobolaji et al., 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. **66**(12), 5575-5599 [cit. 2023-05-17]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.001485
- BAIA, Célia Ceolin et al., 2022. Microbiological Contamination of Urban Groundwater in the Brazilian Western Amazon. *Water* [online]. **14**(24) [cit. 2023-05-17]. ISSN 2073-4441. Dostupné z: doi:10.3390/w14244023
- Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. PMID: 21413252.
- BAUDIŠOVÁ, Dana, 2017. *Metody mikrobiologického rozboru vody: (příručka pro hydroanalytické laboratoře)*. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka. ISBN 978-80-87402-61-0.
- BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ, 2007. *Obecná mikrobiologie*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7318-516-9.
- COICO, Richard, 2006. Gram Staining. *Current Protocols in Microbiology* [online]. **00**(1) [cit. 2023-04-08]. ISSN 1934-8525. Dostupné z: doi:10.1002/9780471729259.mca03cs00
- ČESKO, 2000. Zákon č. 258/2000 Sb. Zákon o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. In: *Sbírka zákonů České republiky*. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2000-258/souvislosti>
- ČESKO, 2001. Zákon č. 254/2001 Sb. Zákon o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon). In: *Sbírka zákonů České republiky*. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-254>
- ČESKO, 2006. Vyhláška č. 501/2006 Sb. Vyhláška o obecných požadavcích na využívání území. In: *Sbírka zákonů České republiky*. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2006-501>
- ČESKO, 2018. Vyhláška č. 70/2018 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly

pitné vody. In: *Sbírka zákonů České republiky*. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-70>.

ČSN 75 7841, 1999. *Jakost vod – Stanovení mezofilních bakterií*. Praha: Úřad pro technologickou normalizaci, meteorologii a státní zkušebnictví.

ČSN 75 7842, 1999. *Jakost vod – Stanovení psychrofilních bakterií*. Praha: Úřad pro technologickou normalizaci, meteorologii a státní zkušebnictví.

ČSN EN ISO 6222, 1999. *Jakost vod – Stanovení kultivovatelných mikroorganismů – Stanovení počtu kolonií očkováním do živného agarového kultivačního média*. Praha: Úřad pro technologickou normalizaci, meteorologii a státní zkušebnictví.

ČSN EN ISO 9308-1, 2015. *Kvalita vod – Stanovení Escherichia coli a koliformních bakterií – Část 1: Metoda membránových filtrů pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry*. Praha: Úřad pro technologickou normalizaci, meteorologii a státní zkušebnictví.

ČSN ISO 5667-1 až 5667-18. *Jakost vod – Odběr vzorků – Část 1 až 18*. Praha: Úřad pro technologickou normalizaci, meteorologii a státní zkušebnictví.

GUPTA, Varsha et al., 2021. Serratia, No Longer an Uncommon Opportunistic Pathogen – Case Series & Review of Literature. *Infectious Disorders - Drug Targets* [online]. **21**(7) [cit. 2023-04-21]. ISSN 18715265. Dostupné z: doi:10.2174/1871526521666210222125215

HALKMAN, H.B.D. a A.K. HALKMAN, 2014. Indicator Organisms. *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, s. 358-363 [cit. 2022-04-29]. ISBN 9780123847331. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00396-7

HARRIGAN, Wilkie F., 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3rd Ed. San Diego: Academic Press. ISBN 0123260434.

HERZÁN, Miroslav, 2008. *Studny: zásady pro vyhledávání zdrojů podzemní vody*. Praha: BEN – technická literatura. ISBN 978-80-7300-188-9.

HORAN, Nigel, MARA, Duncan, ed., 2003. *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Amsterdam: Academic Press. ISBN 0-12-470100-0.

CHEREMISINOFF, Nicholas P., c2002. *Handbook of water and wastewater treatment technologies*. Boston: Butterworth-Heinemann. ISBN 9780750674980.

JAMIESON, W David et al., 2009. Coordinated surface activities in *Variovorax paradoxus* EPS. *BMC Microbiology* [online]. **9**(1) [cit. 2023-04-22]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2180-9-124

JANDA, J. Michael a Sharon L. ABBOTT, 2006. The Genus *Hafnia*: from Soup to Nuts. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **19**(1), 12-28 [cit. 2023-04-22]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.19.1.12-28.2006

KALAVSKÁ, Dagmar a Ivan HOLOUBEK, 1989. *Analýza vód*. Bratislava: Alfa. ISBN 80-05-00065-0.

KARWOWSKA, Ewa et al., 2023. Microbiological Hazards Associated with the Use of Oligocene Waters: A Study of Water Intakes in Warsaw, Poland. *Microorganisms* [online]. **11**(4) [cit. 2023-05-17]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms11040826

KOPECKÁ, Jana a Gabriela ROTKOVÁ, 2016. *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií*. Brno: Tribun EU. ISBN 978-80-263-1123-2.

KOŽÍŠEK, František, 2003. *Studna jako zdroj pitné vody: příručka pro uživatele domovních a veřejných studní*. 2. vyd. Praha: Státní zdravotní ústav. ISBN 80-7071-224-4.

MENA, Kristina D. a Charles P. GERBA, 2009. Risk Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in Water. In: WHITACRE, David M., ed. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 201* [online]. Boston, MA: Springer US, s. 71-115 [cit. 2023-04-21]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. ISBN 978-1-4419-0031-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-0032-6_3

MICHEK, Václav a Anita DAŘÍČKOVÁ, 2007. *Upravujeme vodu doma a na chatě: [zdroj pitné vody, vyšetření kvality, úprava a dezinfekce]*. Praha: Grada. Profi & hobby. ISBN 978-80-247-1546-9.

Modified Tergitol-7 Agar Base (Tergitol-7 Agar Base, Modified) M616I [příbalový leták]. Mumbai, India: HiMedia Laboratories.

NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA, 2019. *Medicínská biofyzika*. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 9788027102099.

OH, Woo Taek et al., 2019. *Janthinobacterium lividum* as An Emerging Pathogenic Bacterium Affecting Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fisheries in Korea. *Pathogens* [online]. **8**(3) [cit. 2023-04-21]. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens8030146

OPAZO-CAPURRO, Andrés et al., 2019. Genetic Features of Antarctic *Acinetobacter radioresistens* Strain A154 Harboring Multiple Antibiotic-Resistance Genes. *Frontiers in*

Cellular and Infection Microbiology [online]. **9** [cit. 2023-04-21]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2019.00328

PESSOA, Rafael Bastos Gonçalves et al., 2022. Aeromonas and Human Health Disorders: Clinical Approaches. *Frontiers in Microbiology* [online]. **13** [cit. 2023-04-22]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.868890

PITTER, Pavel, 2015. *Hydrochemie*. 5. aktualizované a doplněné vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 9788070809280.

POPESCU, Andreia a R. J. DOYLE, 2009. The Gram Stain after More than a Century. *Biotechnic & Histochemistry* [online]. **71**(3), 145-151 [cit. 2023-04-08]. ISSN 1052-0295. Dostupné z: doi:10.3109/10520299609117151

PŠTROSS, Miloš a Čeněk PŠTROSS, 1971. *Domovní a vodárenské studny: určeno [také] pro žáky odb. škol*. Praha: SNTL. Řada stavební literatury.

RICE, Eugene W., ed., c2012. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. Washington, DC: American Public Health Association. ISBN 978-0-87553-013-0.

RYAN, Kenneth J. a C. George RAY, 2004. *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases* [online]. Fourth Edition. New York: The McGraw-Hill. ISBN 0-07-150238-6.

RYAN, Michael P. a J. Tony PEMBROKE, 2018. Brevundimonas spp: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence* [online]. **9**(1), 480-493 [cit. 2023-04-22]. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.1080/21505594.2017.1419116

ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. *Barvení dle GRAMA*. From [Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník](#) [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2023-04-08]. Available from www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=B012>

ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana, 2004. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-7080-534-X.

SABINA, Yeasmin et al., 2011. Yersinia enterocolitica: Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, and Pathogenesis of Infection. *Journal of Pathogens* [online]. **2011**, 1-10 [cit. 2023-04-21]. ISSN 2090-3065. Dostupné z: doi:10.4061/2011/429069

SEDLÁČEK, Ivo, 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 9788021042070.

SOARES, Ana Sofia et al., 2023. Occurrence of Coliforms and Enterococcus Species in Drinking Water Samples Obtained from Selected Dairy Cattle Farms in Portugal. *Agriculture* [online]. **13**(4) [cit. 2023-05-17]. ISSN 2077-0472. Dostupné z: doi:10.3390/agriculture13040885

ŠIDLÍKOVÁ, Lenka, 2012. *Kvalita místních zdrojů vody*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

TÖLGYESSY, Juraj, 1989. *Chémia, biológia a toxikológia vody a ovzdušia*. 2. vyd. Bratislava: Veda. ISBN 8022400343.

VAN BEL, Nikki et al., 2021. Aeromonas Species from Nonchlorinated Distribution Systems and Their Competitive Planktonic Growth in Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **87**(5), e02867-20 [cit. 2023-04-22]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02867-20

VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-16-9.

VERMA, Dev Kumar a Gaurav RATHORE, 2015. New host record of five Flavobacterium species associated with tropical fresh water farmed fishes from North India. *Brazilian Journal of Microbiology* [online]. **46**(4), 969-976 [cit. 2023-04-22]. ISSN 1678-4405. Dostupné z: doi:10.1590/S1517-838246420131081

VERMA, Rajanshu a Allison L. BAROCO, 2017. Acinetobacter radioresistens Septicemia Associated With Pneumonia in a Patient With Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Hepatitis C. *Infectious Diseases in Clinical Practice* [online]. **25**(4), e12-e13 [cit. 2023-04-21]. ISSN 1536-9943. Dostupné z: doi:10.1097/IPC.0000000000000521

VIANA, Ana Teresa et al., 2018. Environmental superbugs: The case study of Pedobacter spp. *Environmental Pollution* [online]. **241**, 1048-1055 [cit. 2023-04-22]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2018.06.047

VOTAVA, Miroslav, 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 8090289665.

ZELINKA, Zdeněk a Zdeněk FORMÁNEK, 2005. *Úpravy vody*. Brno: ERA group. Stavíme. ISBN 80-7366-036-9.

ZELINKA, Zdeněk, 2013. *Studny*. Praha: Grada. Profí & hobby. ISBN 978-80-247-4482-7.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight
MO	mikroorganismus
PCA	Plate Count Agar
SB	Slanetz-Bartley agar
TTC	trifenyltetrazoliumchlorid
MH	mezní hodnota
NMH	nejvyšší mezní hodnota
DH	doporučená hodnota
KTJ	kolonie tvořící jednotky
CFU	Colony Forming Unit
G+	grampozitivní
G-	gramnegativní

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Geografické zobrazení odběrových míst (vytvoreno pomocí Google My Maps)	30
Obrázek 2 Aparatura pro membránovou filtraci (archiv autorky).....	37
Obrázek 3 Bruker MALDI Biotyper (archiv autorky).....	40
Obrázek 4 <i>Janthinobacterium lividum</i> na půdě PCA (archiv autorky)	48

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Mikrobiologické ukazatele pitné vody a jejich hygienické limity (Česko, 2018)	21
Tabulka 2 Testované vzorky a místa jejich odběru	29
Tabulka 3 Kultivační podmínky sledovaných indikátorových skupin mikroorganismů	36
Tabulka 4 Počty mikroorganismů v jednotlivých vzorcích vody	41
Tabulka 5 Identifikované mikroorganismy pomocí MALDI-TOF MS	44

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Testované vlastnosti izolovaných mikroorganismů – část 1	60
Příloha 2 Testované vlastnosti izolovaných mikroorganismů – část 2	61
Příloha 3 Testované vlastnosti izolovaných mikroorganismů – část 3	62

Příloha 1 Testované vlastnosti izolovaných mikroorganismů – část 1

Vzorek č.	Izolát	Gamovo barvení	KOH test	Oxidázový test	Katalázový test	
1	1A	G-	koky	N	N	P
	1B	G-	tyčinky	N	P	P
	1C	G-	tyčinky	N	P	P
	1D	G-	tyčinky	N	N	P
2	2A	G-	tyčinky	N	P	P
	2B	G+	koky	P	N	P
	2C	G+	tyčinky	P	N	P
	2D	G+	tyčinky	P	N	P
	2E	G+	tyčinky	P	N	P
	2F	G-	tyčinky	N	P	P
	2G	G-	tyčinky	N	N	N
	2H	G-	tyčinky	N	N	N
3	3A	G-	tyčinky	N	N	P
	3B	G-	tyčinky	N	N	N
	3C	G-	tyčinky	N	N	P
	3D	G-	koky	N	N	P
	3E	G-	koky	N	N	P
	3F	G+	koky	P	N	N
	3G	G-	tyčinky	N	N	N
	3H	G-	tyčinky	N	N	P
	3I	G-	tyčinky	N	P	N
	3J	G-	tyčinky	N	N	P
	3K	G-	tyčinky	N	N	N
	3L	G-	tyčinky	N	N	P
	3M	G-	tyčinky	N	P	N
4	4A	G+	koky	N	N	N
	4B	G-	tyčinky	N	N	P
	4C	G+	tyčinky	P	N	N
	4D	G+	tyčinky	P	P	P
	4E	G-	tyčinky	N	P	P
	4F	G-	tyčinky	N	N	P
	4G	G+	tyčinky	P	P	N
5	5A	G-	tyčinky	N	N	N
	5B	G-	tyčinky	N	P	P
	5C	G+	tyčinky	P	N	P
	5D	G-	tyčinky	N	P	P
	5E	G+	tyčinky	P	N	P

Příloha 2 Testované vlastnosti izolovaných mikroorganismů – část 2

Vzorek č.	Izolát	Gamovo barvení	KOH test	Oxidázový test	Katalázový test	
6	6A	G+	koky	P	N	N
	6B	G-	tyčinky	N	N	P
	6C	G-	tyčinky	N	N	P
	6D	G-	tyčinky	N	P	N
	6E	G+	tyčinky	P	N	P
	6F	G+	tyčinky	P	N	P
	6G	G+	tyčinky	P	N	P
	6H	G-	koky	N	N	P
	6I	G-	koky	N	N	P
	6J	G-	tyčinky	N	P	N
	6K	G-	tyčinky	N	P	N
	6L	G-	tyčinky	N	P	N
	6M	G-	koky	N	N	P
	6N	G-	tyčinky	N	P	N
	6O	G-	tyčinky	N	P	N
	6P	G-	tyčinky	N	P	N
6Q	G+	tyčinky	P	N	N	
7	7A	G-	tyčinky	N	N	P
	7B	G+	koky	P	P	N
	7C	G-	tyčinky	N	N	N
	7D	G-	tyčinky	N	N	N
	7E	G+	tyčinky	P	N	P
	7F	G-	tyčinky	N	N	P
	7G	G+	tyčinky	P	P	N
8	8A	G-	tyčinky	N	N	P
	8B	G-	tyčinky	N	N	P
	8C	G+	tyčinky	P	N	P
	8D	G-	tyčinky	N	N	P
9	9A	G-	tyčinky	N	N	P
	9B	G-	tyčinky	N	N	P
	9C	G-	tyčinky	N	P	N
	9D	G-	tyčinky	N	P	N
	9E	G-	tyčinky	N	N	P
	9F	G-	tyčinky	N	P	P
	9G	G-	tyčinky	N	P	P
	9H	G-	tyčinky	N	P	P

Příloha 3 Testované vlastnosti izolovaných mikroorganismů – část 3

Vzorek č.	Izolát	Gamovo barvení	KOH test	Oxidázový test	Katalázový test	
10	10A	G-	tyčinky	N	N	P
	10B	G-	tyčinky	N	N	P
	10C	G-	tyčinky	N	N	P
	10D	G-	tyčinky	N	P	P
12	12A	G-	tyčinky	N	P	P
	12B	G-	tyčinky	N	P	N
	12C	G-	tyčinky	N	P	N
	12D	G-	tyčinky	N	P	P
13	13A	G-	tyčinky	N	P	P
	13B	G-	tyčinky	N	P	P
	13C	G-	tyčinky	N	P	N
	13D	G-	tyčinky	N	P	P
	13E	G-	tyčinky	N	N	P
	13F	G-	tyčinky	N	N	P
14	14A	G-	tyčinky	N	P	P
	14B	G-	tyčinky	N	P	P
	14C	G-	tyčinky	N	P	N
	14D	G-	tyčinky	N	P	P

P – pozitivní reakce, N – negativní reakce

„G+“ grampozitivní

„G-“ gramnegativní