

# Základní mikrobiologický rozbor vody

Cíl: Stanovit celkový počet psychrofilních a mezofilních bakterií

Stanovit indikátorové skupiny bakterií – selektivní média

(Endo agar, SB agar, mFC médium)

Rozbor – složka komplexního posouzení kvality vody

- státní norma (provedení, výsledky)
- indikátory, ne všechny bakterie

Odběr – do sterilních lahví (pitná voda – 250 ml; povrchová - 150 ml)

- dbát na sterilitu práce
- vzorky zpracovat do 6 hod či uchovat v ledničce při 4°C max.  
24 hod

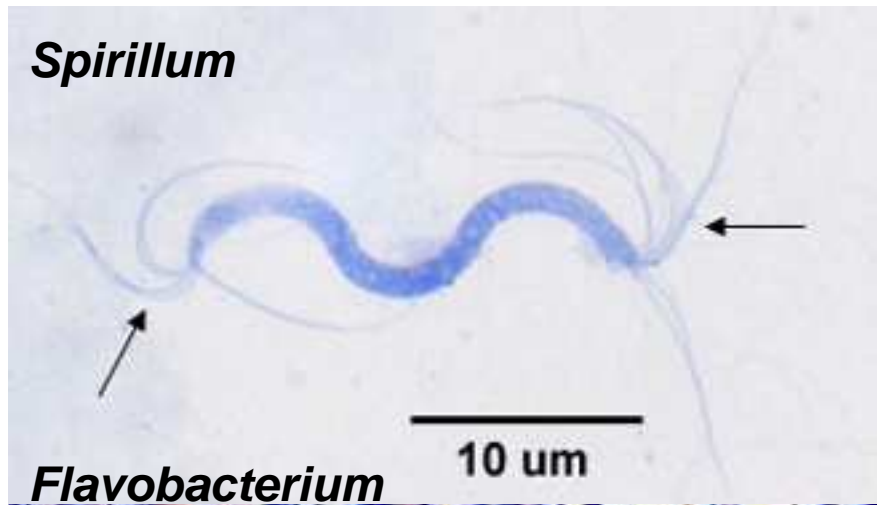
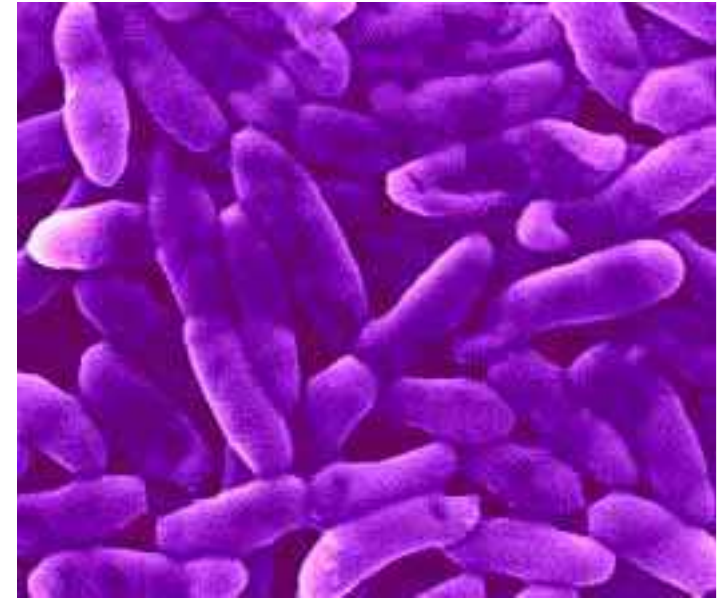
# Sladká voda

- přirozené stanoviště bakterií
- zastoupení závisí na zdrojích uhlíku, dusíku a přítomnosti O<sub>2</sub>
- autochtonní (= typické) – *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Leptothrix*, *Spirillum*, ...
- půdní bakterie → splavováním půdy (*Bacillus*, *Streptomyces*, ..)
  - jsou limitovány koncentrací živin
- střevní bakterie člověka, zvířat – fekální znečištění, výskyt krátkodobě

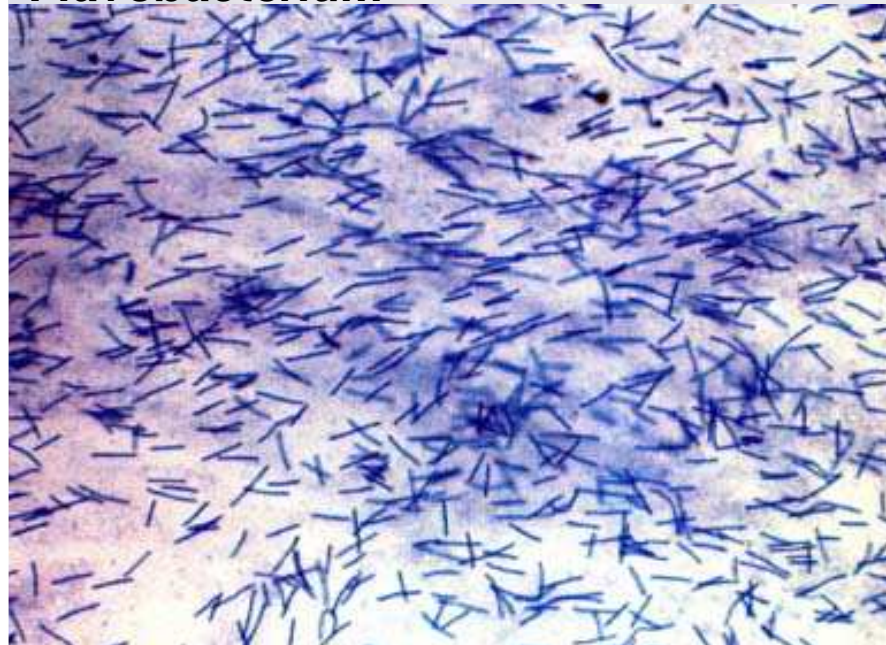
## Autochtonní vodní bakterie

- typické, původní

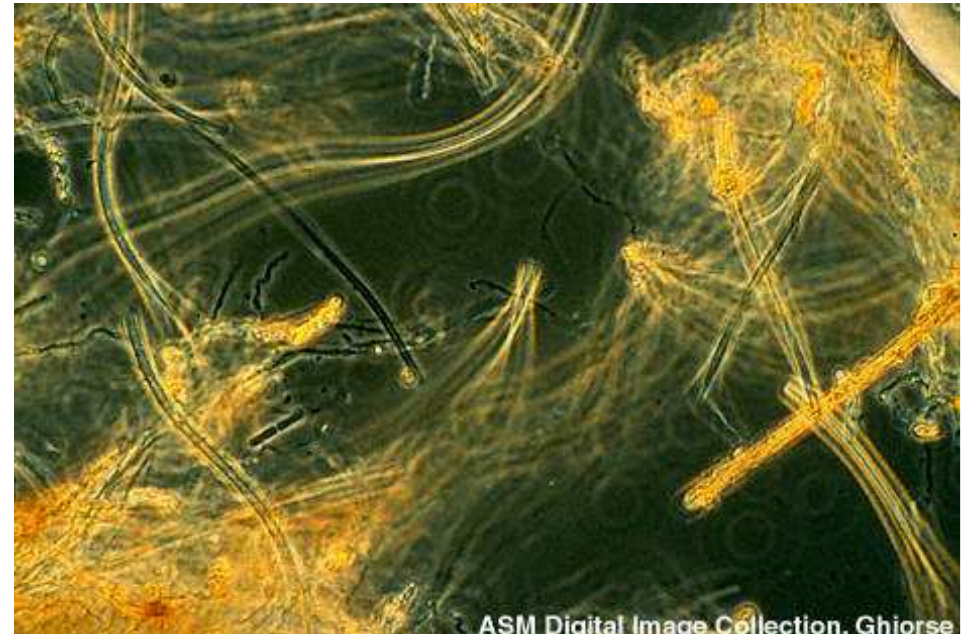
## *Chromobacterium*



## *Flavobacterium*



## *Leptothrix*

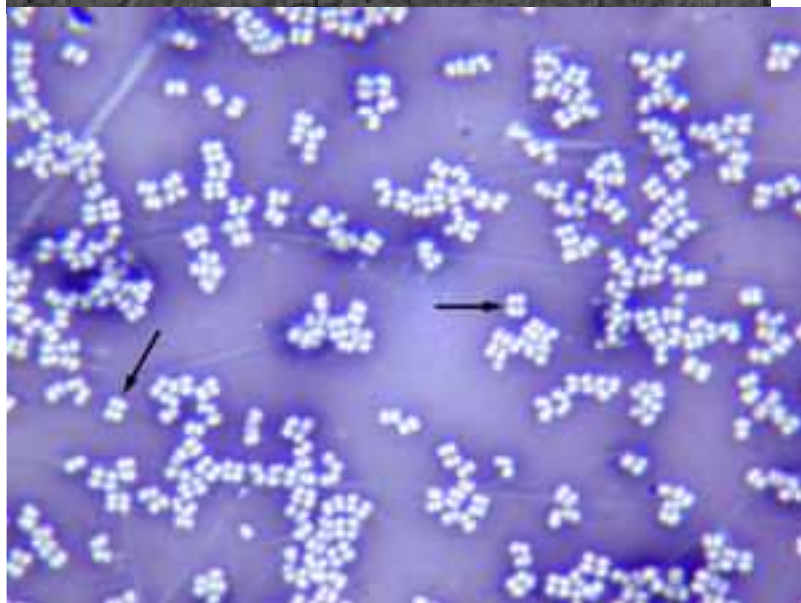
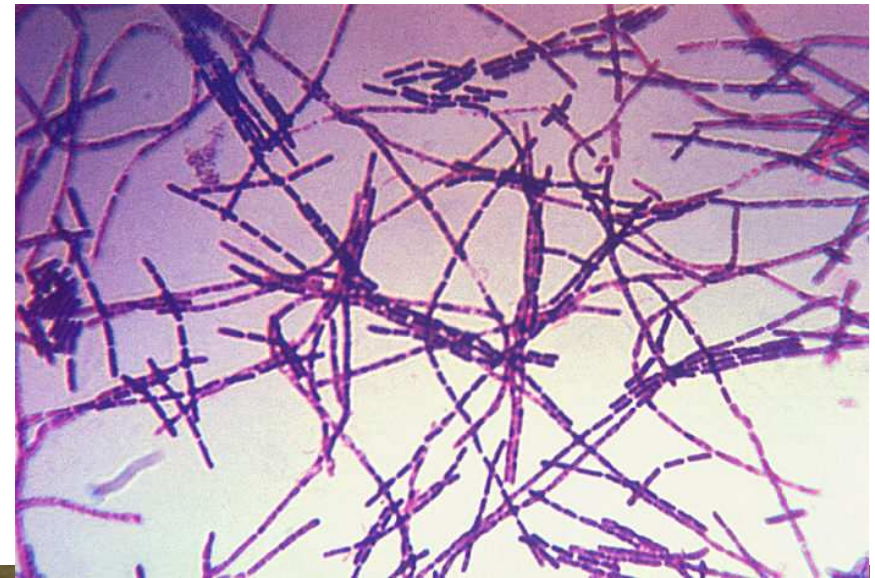
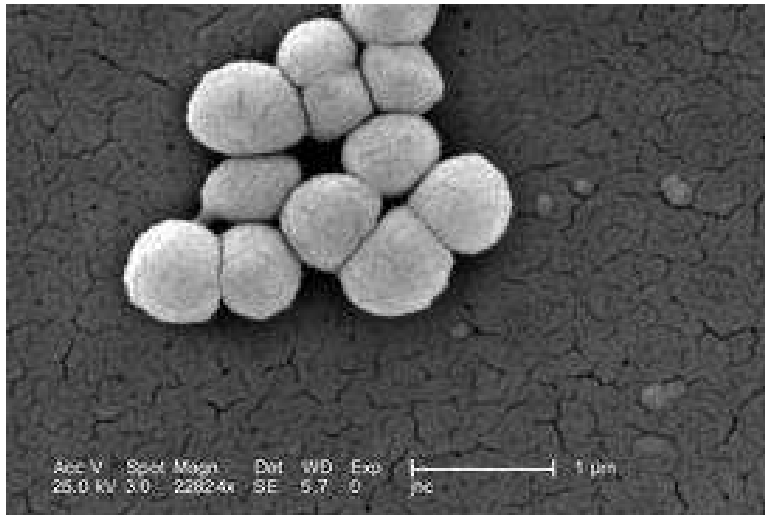




**Půdní – splachováním, svrchní vrstvy – limitace koncentrací živin**

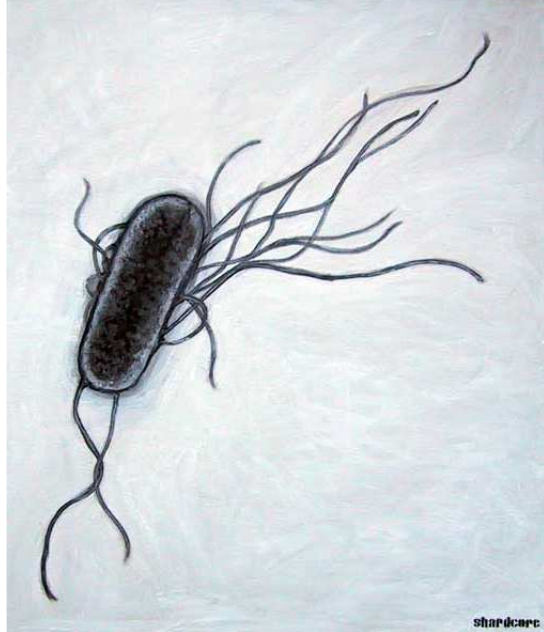
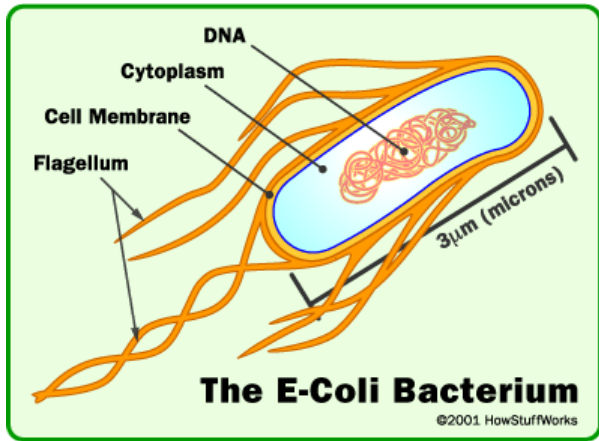
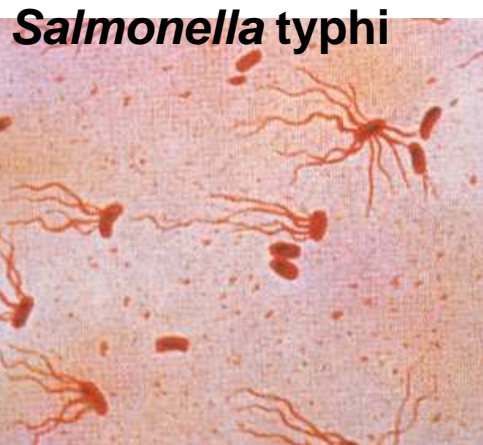
*Bacillus*

*Micrococcus*





**Střevní** – krátkodobý výskyt (*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*)  
**Patogenní** – krátkodobě (*Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*)





# Voda jako stanoviště

Sediment

Biomass

Non-lithifying mat

### OPEN MARINE – Intertidal

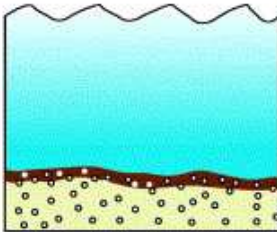


Texel, NL

**Environment**  
 Marine (32 ‰)  
 Intertidal – high energy  
 pH = 8 (slightly alkaline)

**Dominant bacteria**  
*Microcoleus*

**Precipitation**  
 None

**Fossilization potential**  
 Low

### HYPERSALINE LAKES

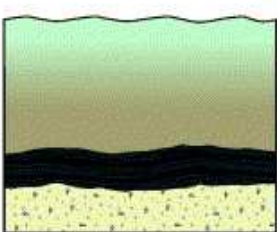


Eleuthera – Guerrero Negro

**Environment**  
 Hypersaline (94-120 ‰) – low energy  
 pH = ca. 8.5 (alkaline)

**Dominant bacteria**  
*Microcoleus*

**Precipitation**  
 None

**Fossilization potential**  
 Low

Eleuthera - soft mat      Guerrero Negro

Lithifying mat

### OPEN MARINE - subtidal

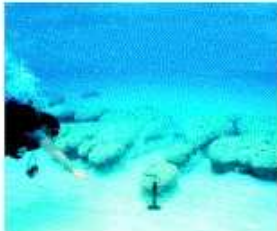
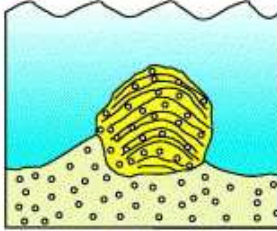

Highborne Cay – Coarse-grained stromatolites

**Environment**  
 Marine (35 ‰) – high energy  
 pH = 8 (slightly alkaline)

**Dominant bacteria**  
*Schizothrix – Solentia*

**Precipitation**  
 Surface – continuous – laminated (coarse grained)

**Fossilization potential**  
 High – stromatolites

### HYPERSALINE LAKES


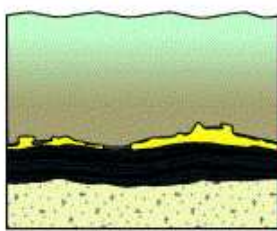

Eleuthera – crust on top of microbial mat

**Environment**  
 Hypersaline (90 ‰) – low energy  
 pH = ca. 9 (alkaline)

**Dominant bacteria**  
*Microcoleus – Phormidium – Entophysalis – Gloeocapsa*

**Precipitation**  
 At surface of microbial mat – continuous – non laminated

**Fossilization potential**  
 Low to average – mud – lithoclast

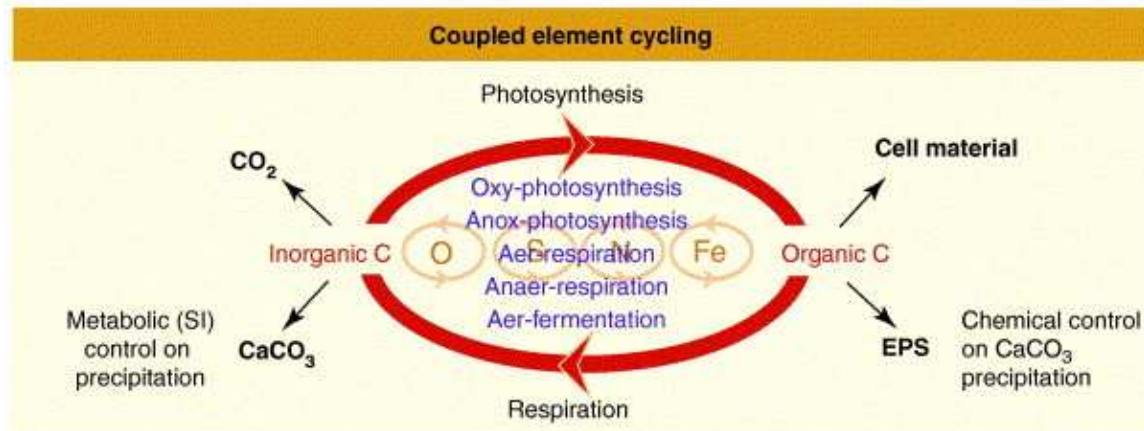
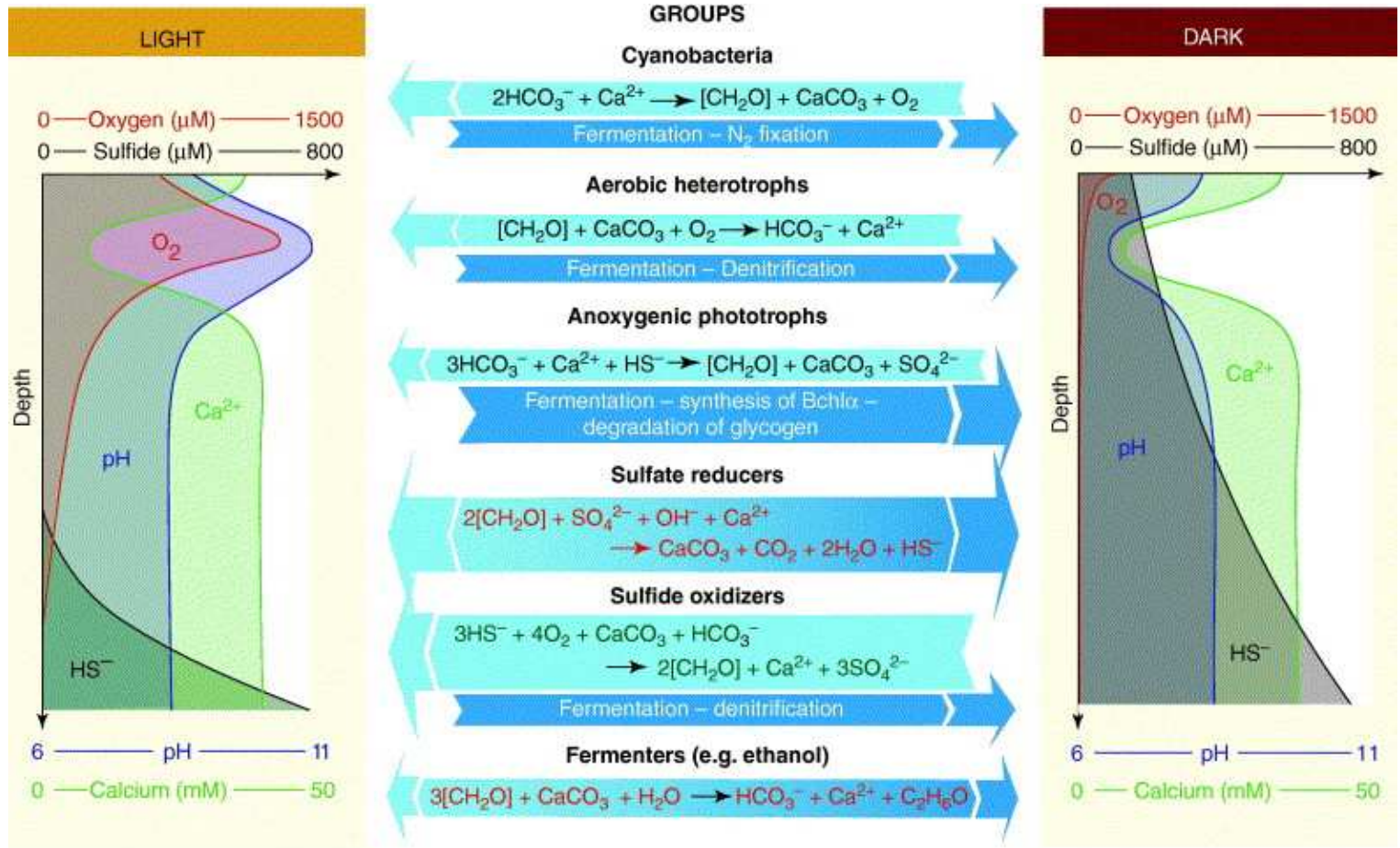




Environmental control on EPS and Saturation Index (UV, Light, Temperature, Nutrients, Ion Concentration)

Metabolism controlled (SI)

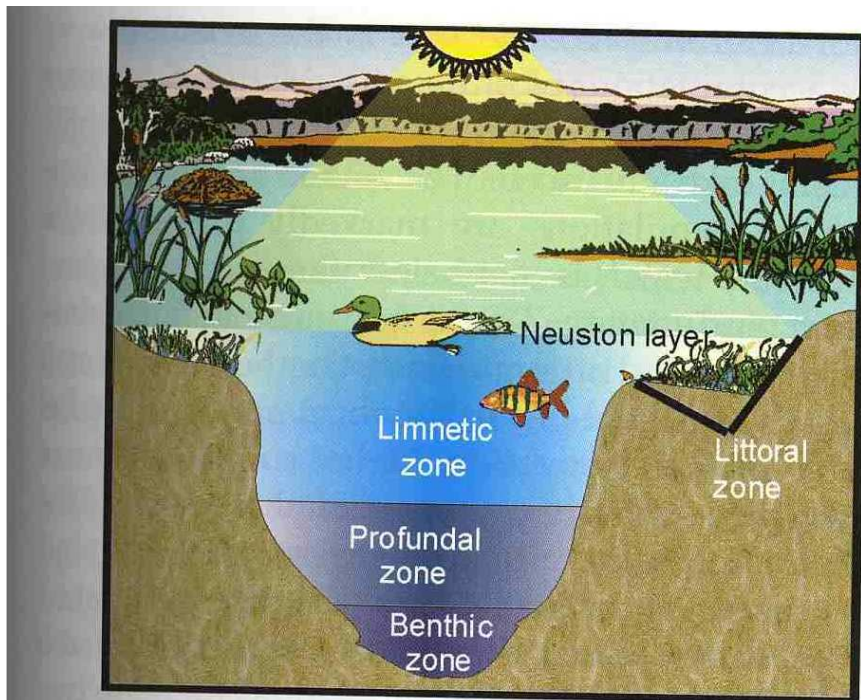
EPS controlled

# Voda jako stanoviště

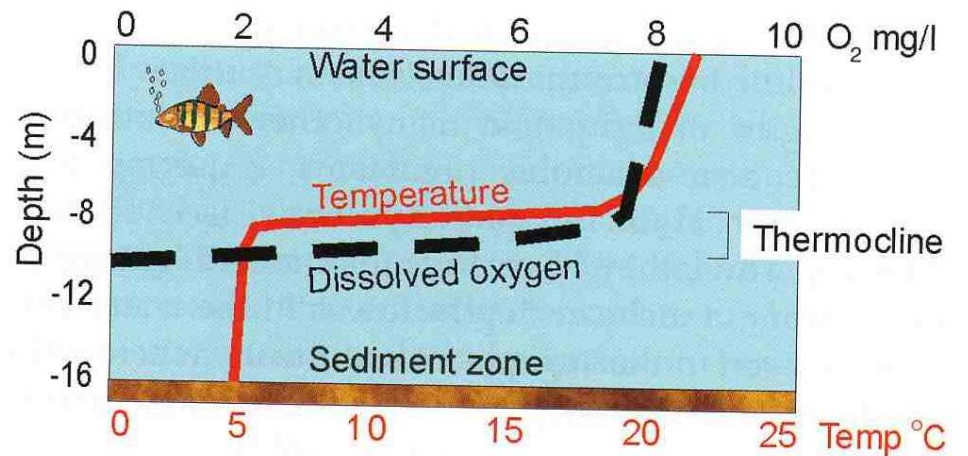
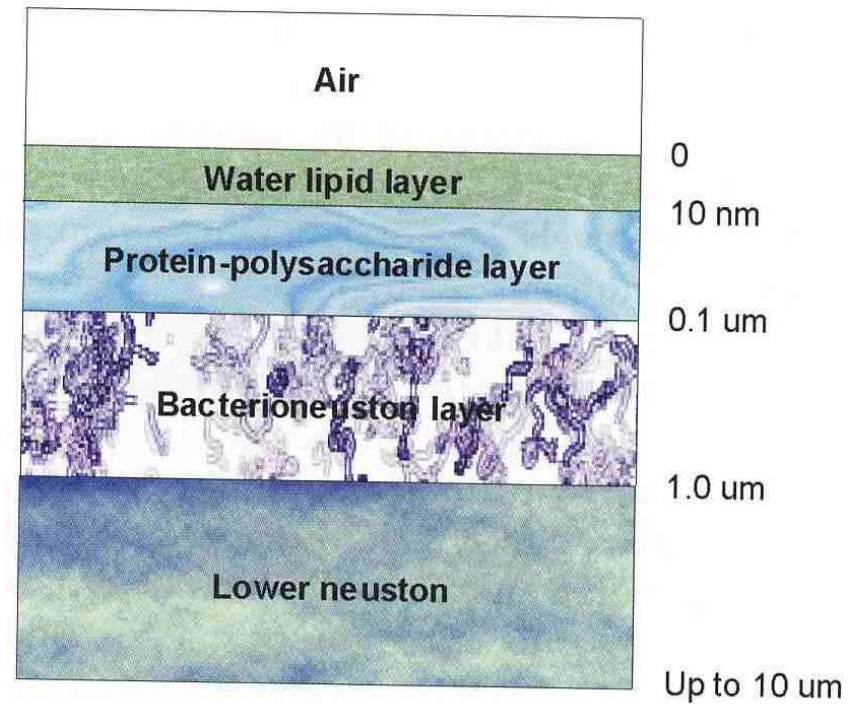




# Voda jako stanoviště



**FIGURE 6.10** Schematic representation of a typical lake showing common designations based on sunlight. Other designations for zones are based on features such as temperature, oxygen concentration, and pH. However, the most common are those shown here primarily because of the controlling influence sunlight has on these environments.

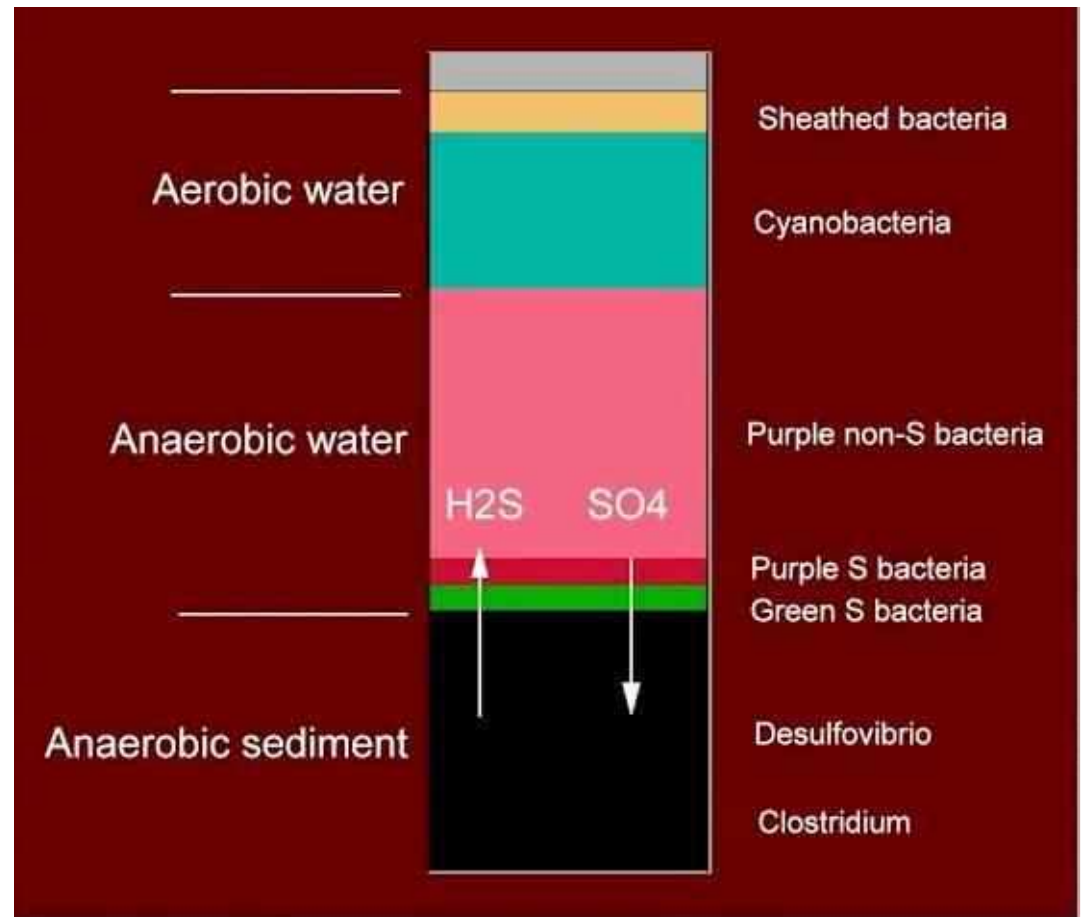


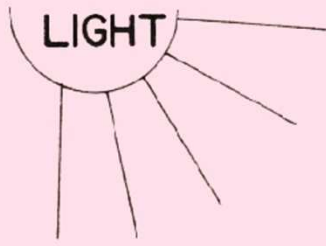
**FIGURE 6.12** Idealized profiles of temperature and oxygen in a temperate region, eutrophic lake. Stratification is due to thermal warming of the upper layers in the summer months. Cooling of the upper layer in the fall and early winter breaks the mixing barrier and allows the sediment zone to be reoxygenated. (Adapted from Wetzel, 1983.)



# Winogradského sloupec

- demonstruje různé úlohy mikroorganismů v přírodě: aktivita jednoho MO umožňuje růst jiného a naopak
- sloupec je kompletní, soběstačný a recyklační systém, který je doplňován pouze světelnou energií



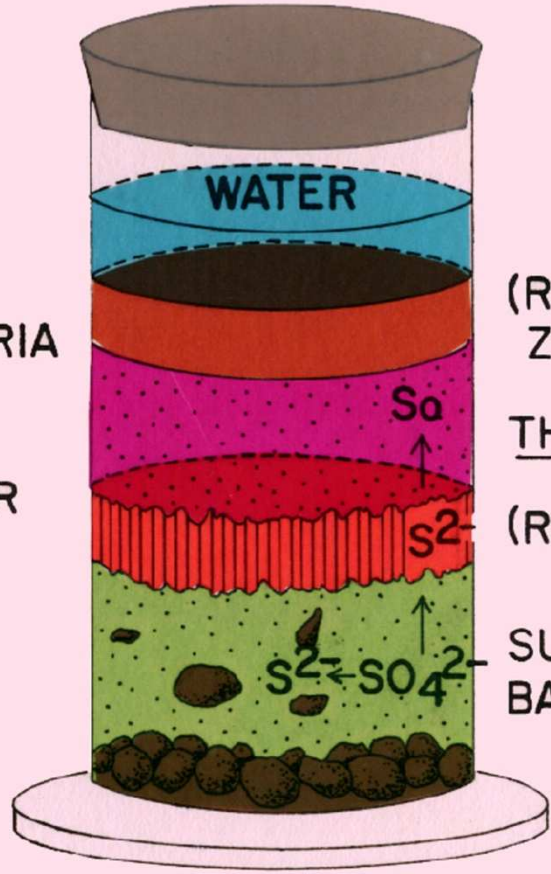


# WINOGRADSKY COLUMN (SULFUR-METABOLIZING BACTERIA)

NONSULFUR  
PURPLE BACTERIA

PURPLE SULFUR  
BACTERIA

GREEN SULFUR  
BACTERIA



(RUST-COLORED  
ZONE)

THIOBACILLUS

(RED ZONE)

SULFATE-REDUCING  
BACTERIA

GYPSUM ( $\text{CaSO}_4$ ) + PLANT PARTS + MUD



## Obecné znečištění:

**Psychofilní** – do 20°C; indikují přítomnost organických látek rozložitelných bakteriemi při nízkých teplotách; běžný výskyt

**Mezofilní** – znečištění mikroflórou teplokrevných živočichů a člověka, včetně patogenů

## Fekální znečištění:

**Koliformní bakterie** – obyvatelé tlustého střeva, čeled'

*Enterobacteriaceae* (G- tyčky), nejčastěji *E. coli*

- značí znečištění fekáliemi, možný výskyt střevních patogenů → rozšířit rozbor o jejich stanovení

- většinou oxidáza negativní, laktóza pozitivní (lac negativní je *Salmonella* a *Shigella* – odlišná barva kolonií)

*Enterococcus* sp. (G+ koky) – trávící trakt člověka i živočichů, vyšší termorezistence, odolnost k fyzikálním a chemickým vlivům

- důležitý ukazatel fekálního znečištění

- ale výskyt i běžně v prostředí

**TYEA** (trypton, kvasničný extrakt, agar)

-univerzální půda (pro celkový počet)

-kultivace při 22 a 37°C

**ENDO agar** – fuchsin zabije G+ a kolonie koliformních bakterií zbarví červeně s kovovým leskem

-laktózu využijí koliformní bakterie (lac+) – Schiffovo činidlo (acetaldehydy)

-kultivace při 37°C

**mFC** – laktóza

-anilínová modř a žlučové soli inhibují G+ a termotolerantní bakterie zbarví modře

-kultivace při 44°C

**SB agar** (Slanetz-Bartley)

-azid sodný = selektivní činidlo pro enterokoky

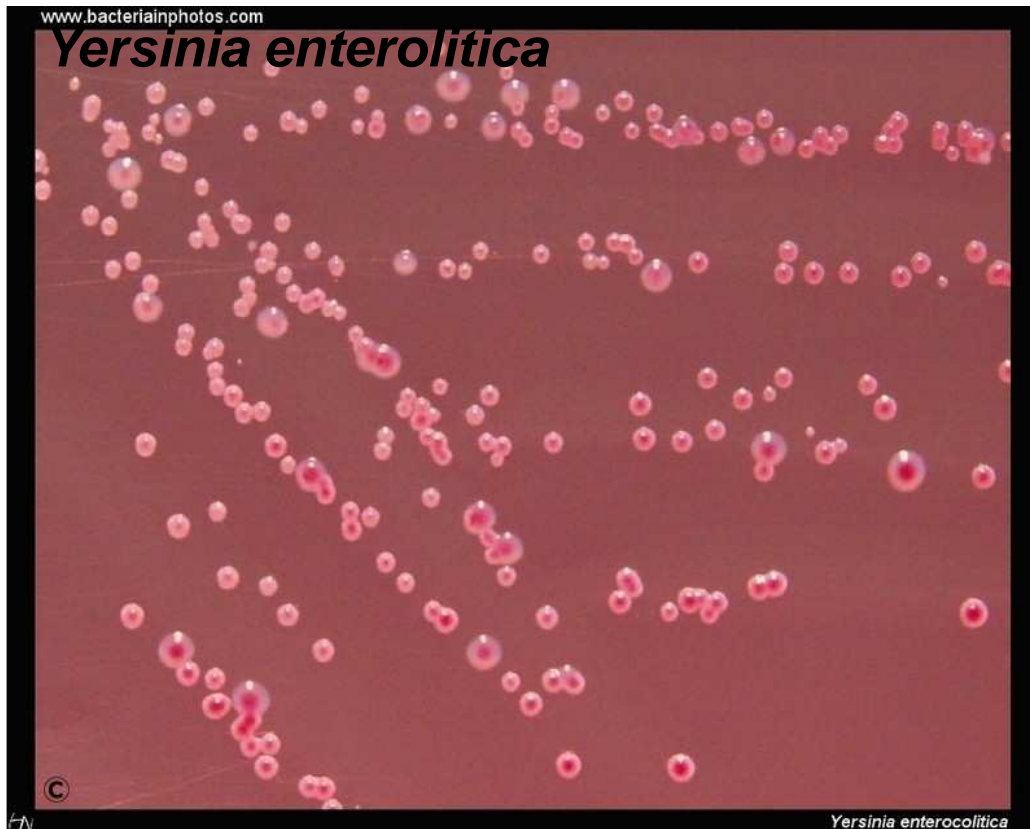
-indikátor TTC (tetrazolium chlorid) – červený či vínově červený střed kolonií s růžovým okrajem

-kultivace při 37°C



## ENDO agar – bazický fuchsin eliminuje G+

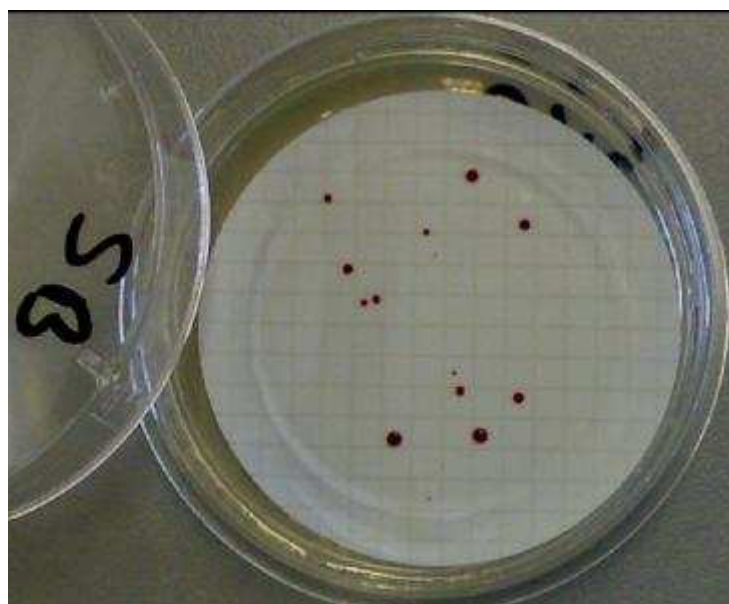
- kolonie koliformních bakterií zbarví červeně s kovovým leskem
- laktózu využijí koliformní bakterie (lac+) – Schiffovo činidlo (acetaldehydy)
- Laktózu něštěpící → růžové kolonie (obligátní patogeny)



## SB agar

- azid sodný = selektivní činidlo pro enterokoky
- indikátor TTC (tetrazolium chlorid) – červený či vínově červený střed kolonií s růžovým okrajem
- kultivace při 44°C – enterokoky jsou termorezistentní

## *E. faecalis*

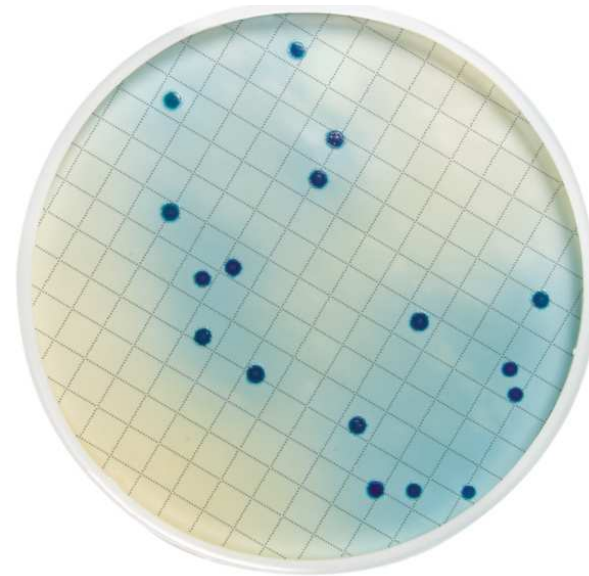
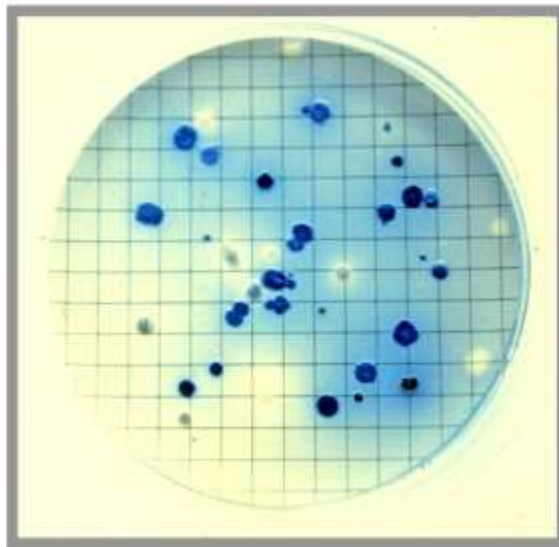




## mFC medium

- laktóza je zkvašována
- selektivní činidlo: anilínová modř a žlučové soli inhibují G+ a termotolerantní bakterie zbarví modře
- kultivace při 44°C – teplotní test na čerstvé znečištění

mFC agar



Colonies that are light to dark blue, in whole or part, are counted as fecal coliforms

## Postup:

- **PITNÁ VODA – neředěný vzorek a  $10^{-1}$**  (neočekáváme kontaminaci)
- **POVRCHOVÁ VODA – ředění  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$**  (očekáváme výskyt bakterií)

TYEA – 1 ml vody do misky, přelit cca 15 ml temperovaného média  
(1 vzorek = 2 misky)

ENDO, SB, mFC – 0,1 ml vzorku na agar

Kultivace:

TYEA – 22°C

TYEA, ENDO, SB – 37°C

mFC – 44°C

Hodnocení:

Počítání kolonií na 1 ml – pozor na přepoččet!!! (0,1 x 1 ml na misku!!!)

Enterokoky počítat na 100 ml

**Voda pro hromadné zásobování (více než 100 osob) nesmí obsahovat více než:**

200 psychrofilních a 20 mezofilních bakterií na 1 ml

0 koliformních či enterokoků na 100 ml

**Voda pro individuální zásobování (studny; méně než 100 osob) nesmí obsahovat více než:**

500 psychrofilních a 100 mezofilních bakterií na 1 ml

0 koliformních či enterokoků v 10 ml



Indikátorová skupina	označení	kultivace				konfirmace				typ vody
		půda	teplota	doba	barva kolonií	půda/test	teplota	doba	barva kolonií	
koliformní bakterie	TC	modif. ENDO agar	36±2°C	21±3 hod., když nevyrostou tak 44±4 hod	sytě červené kolonie s tmavě červenou spodní částí a červené kolonie s kovovým leskem	cytochrom-oxidázový	/	2 min	ne modré zbarvení (koliformní bakterie)	povrchové, odpadní
enterokoky	ENT	Slanetz-Bartley agar	36±2°C	44±4 hod.	červené, kaštanové nebo růžové kolonie, celé zbarvené či s barevným středem	žluč-eskulin-azidový agar	44±0,5°C	2 hod	tříslově hnědé až černé zbarvení okolí (enterokoky)	povrchové, odpadní, pitné
koliformní – <i>E.coli</i>	TC	Laktoza-TTC agar	36±2°C	21±3 hod.	žluté kolonie	cytochrom-oxidázový	/	3 min	ne modré zbarvení (koliformní bakterie)	pitné
termotolerantní a <i>E. coli</i>	FC	M-FC agar	44±0,5°C	21±3 hod., když nevyrostou, ta 44±4 hod.	modré kolonie (fekální koliformní bakterie)	MUG	36±2°C	3 hod.	modře fluoreskující ( <i>E. coli</i> )	povrchové a odpadní
Kultivovatelné MO	HPC	tryptone yeast extract agar	22±2°C	68±4 hod.	všechny kolonie					povrchové, odpadní, pitné
			36±2°C	44±4 hod.	všechny kolonie					pitné