

# 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

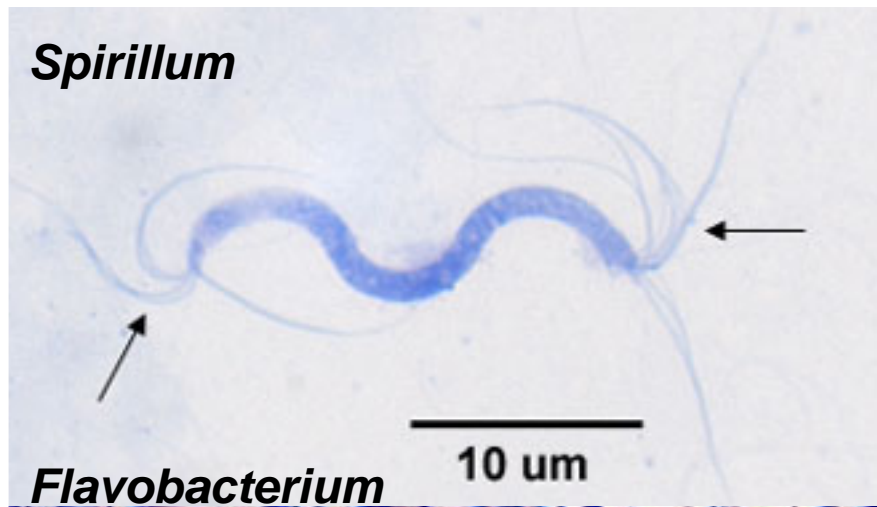
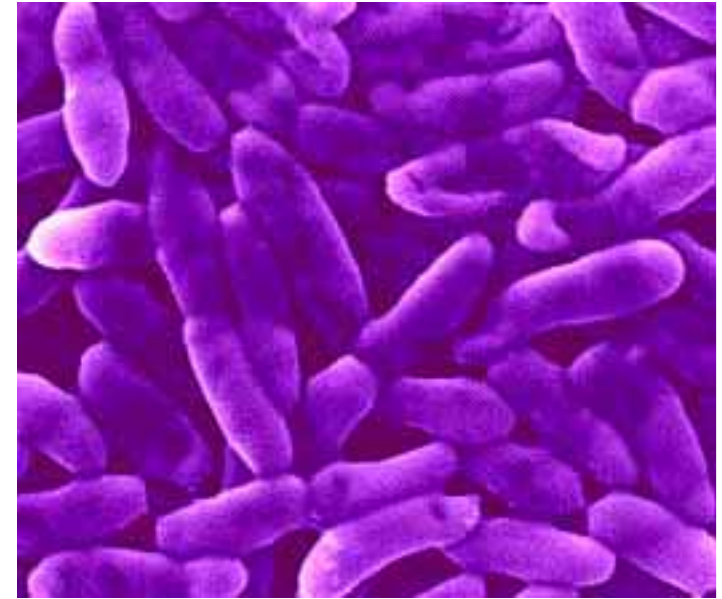
# Sladká voda

- 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

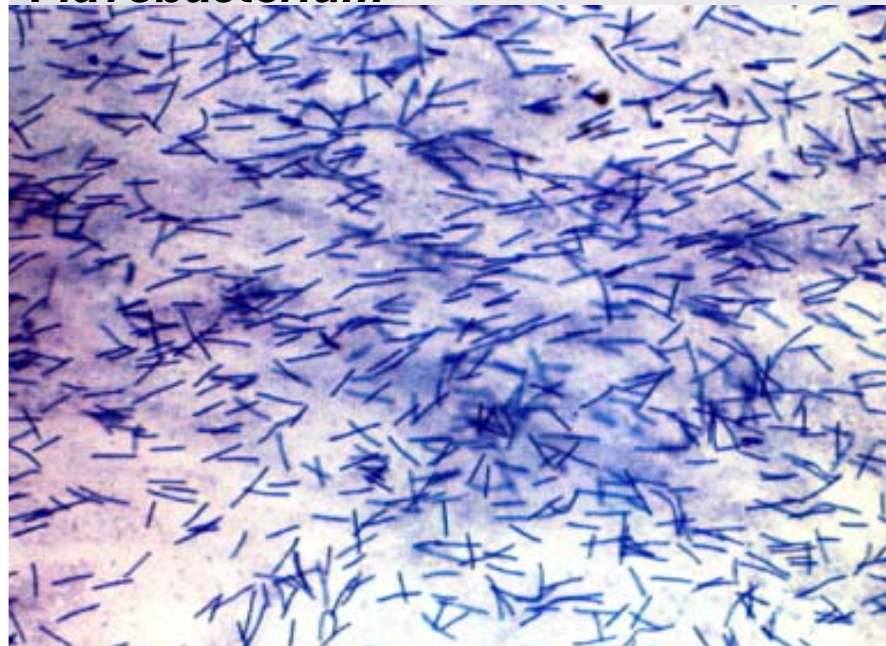
## Autochtonní vodní bakterie

- typické, původní

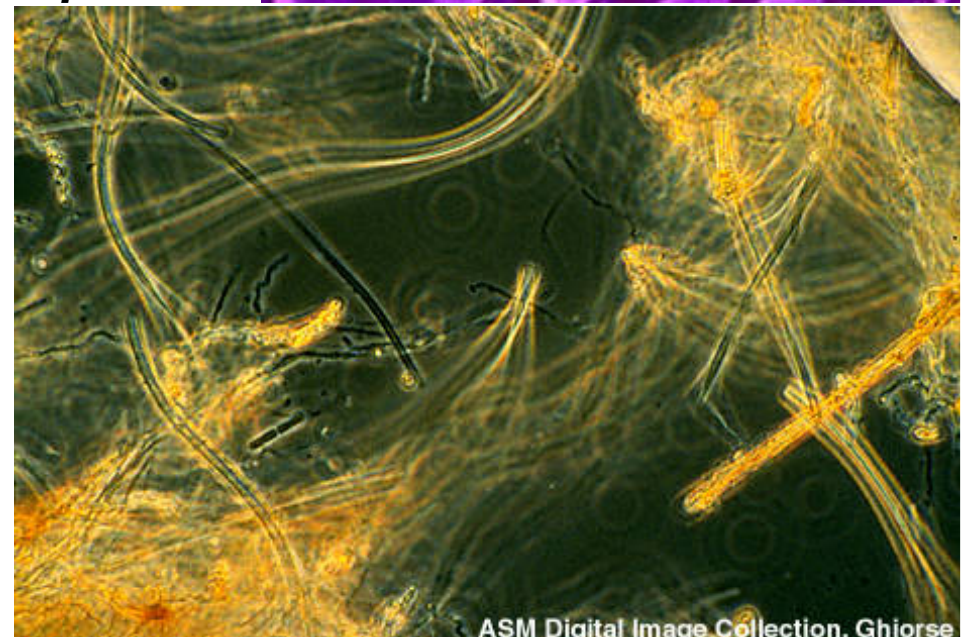
## *Chromobacterium*



## *Flavobacterium*



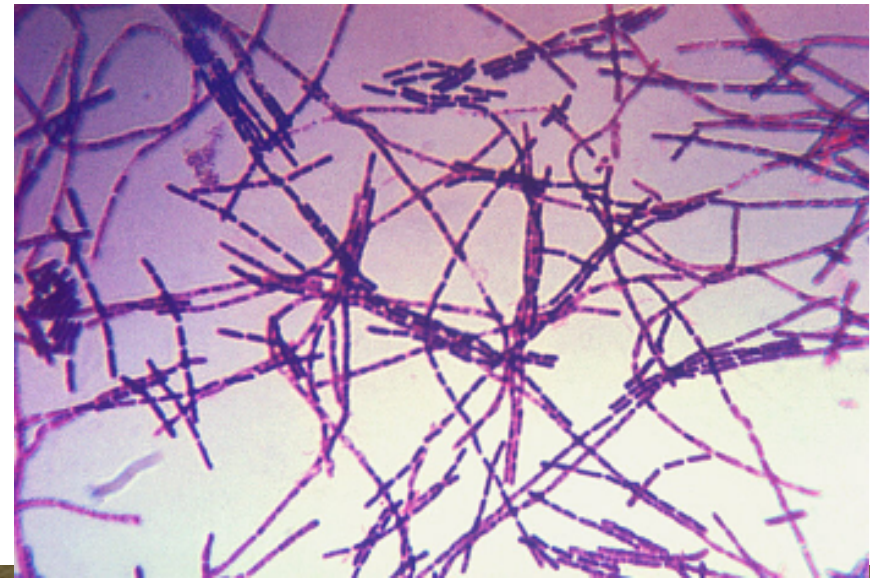
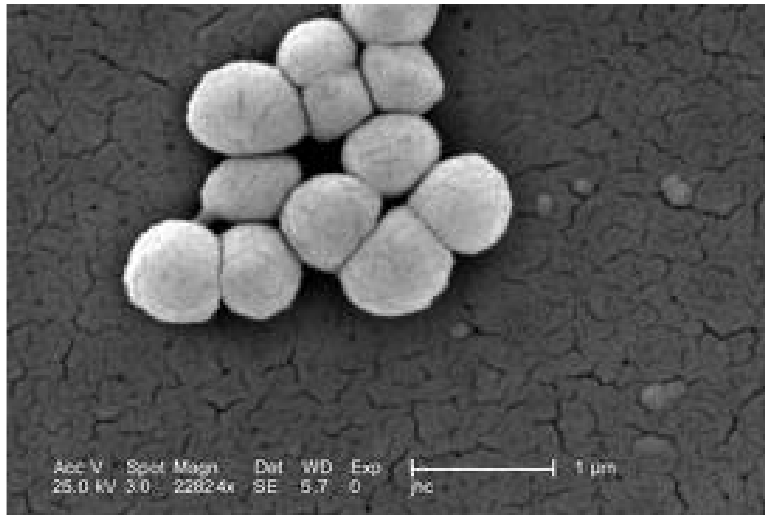
## *Leptothrix*



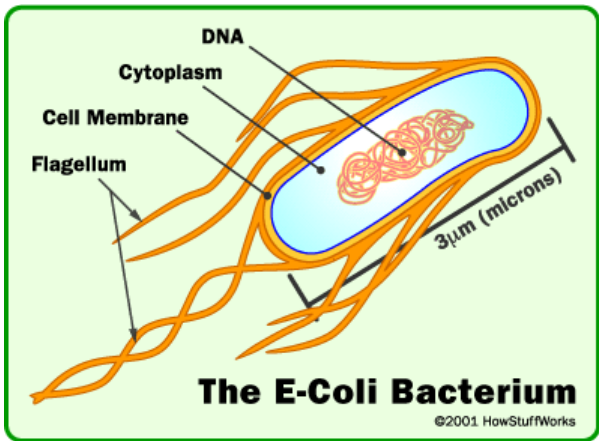
**Půdní – splachováním, svrchní vrstvy – limitace koncentrací živin**

*Bacillus*

*Micrococcus*



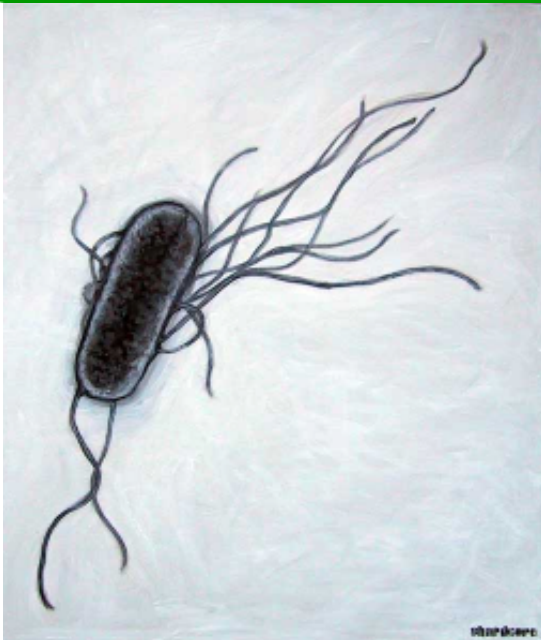
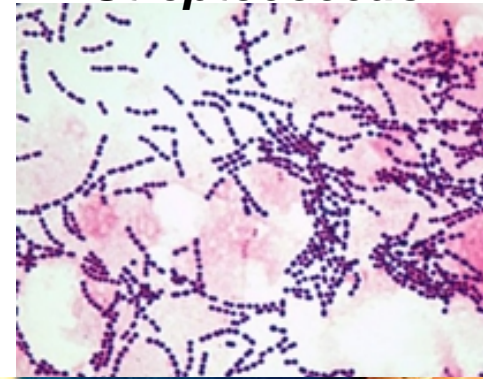
**Střevní** – krátkodobý výskyt (*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*)  
**Patogenní** – krátkodobě (*Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*)



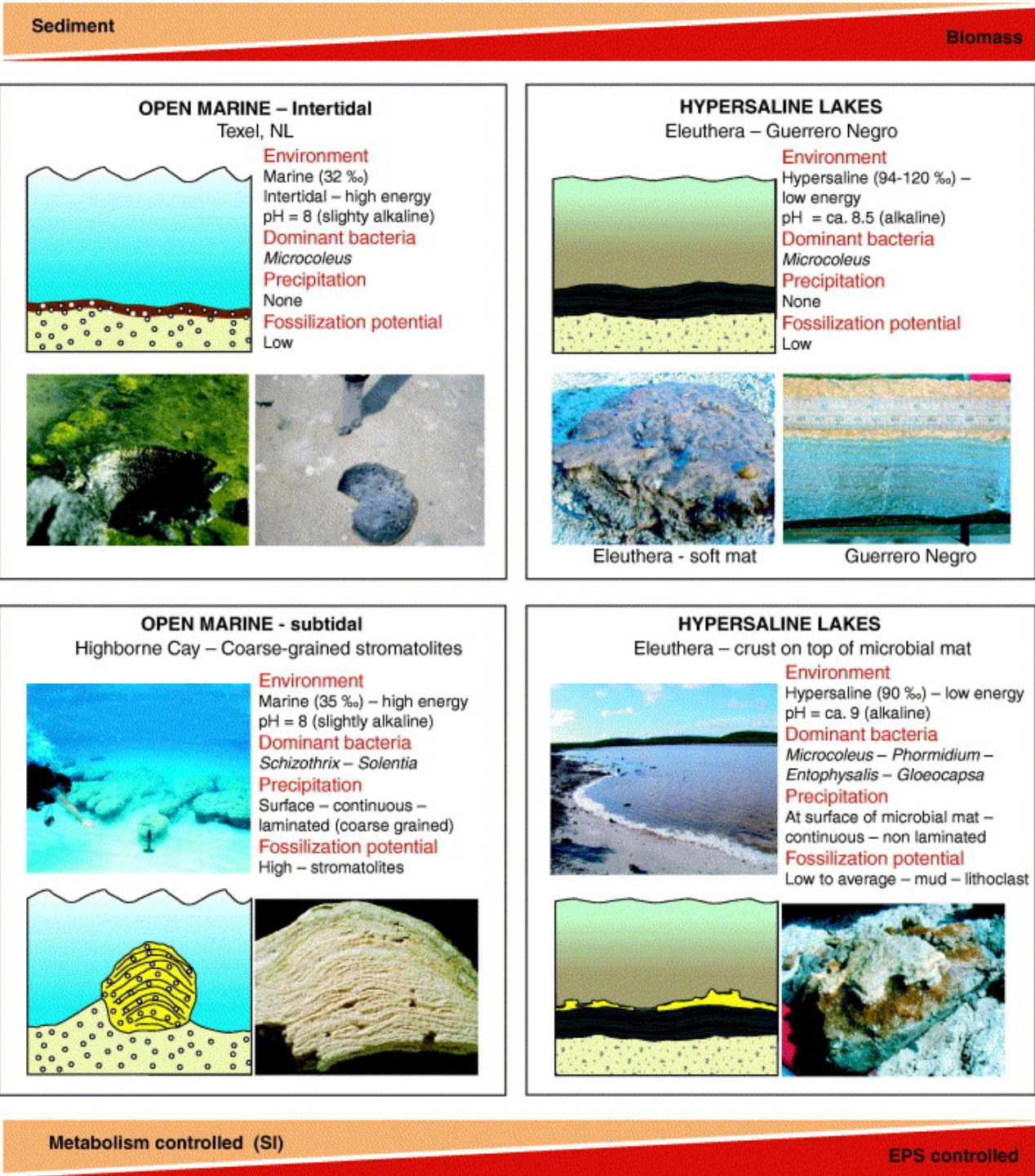
**Salmonella typhi**



**Streptococcus**

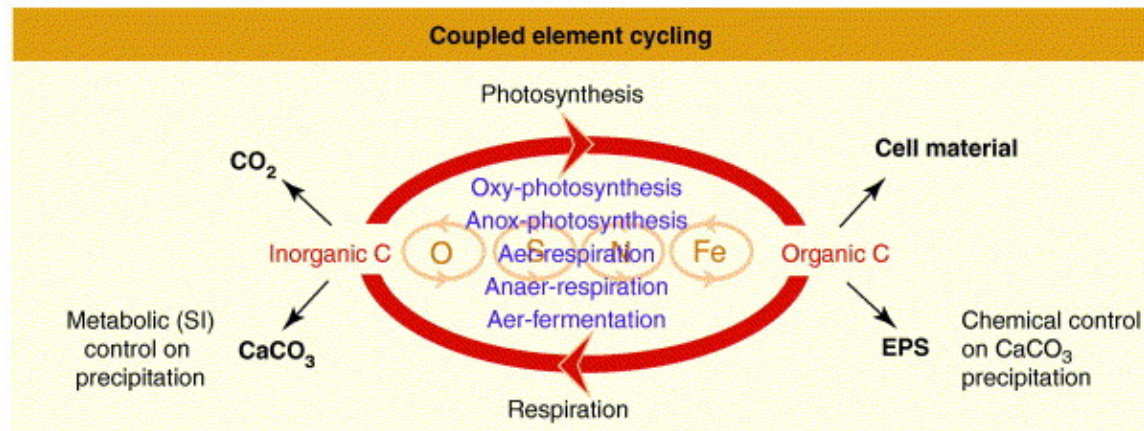
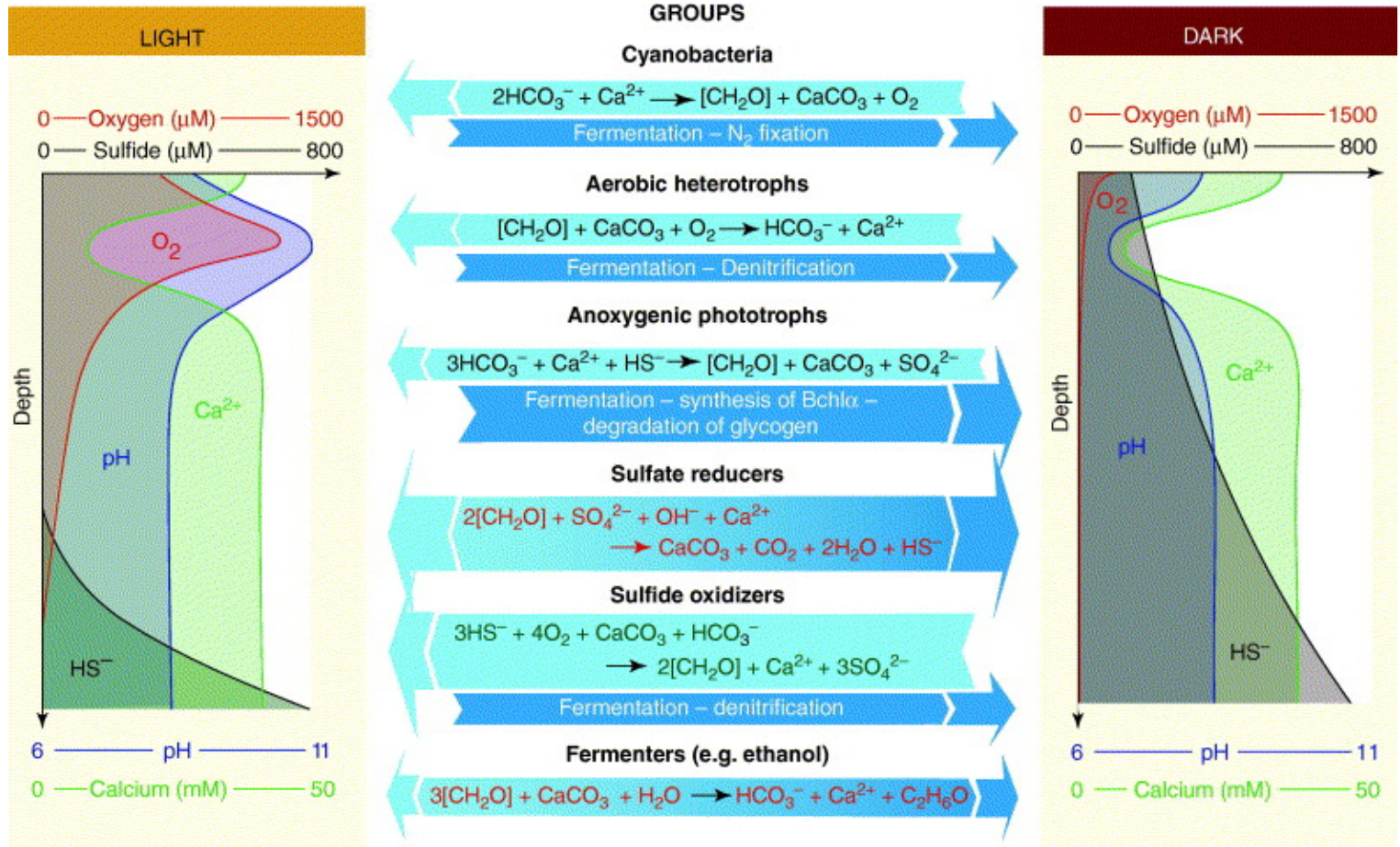


# Voda jako stanoviště

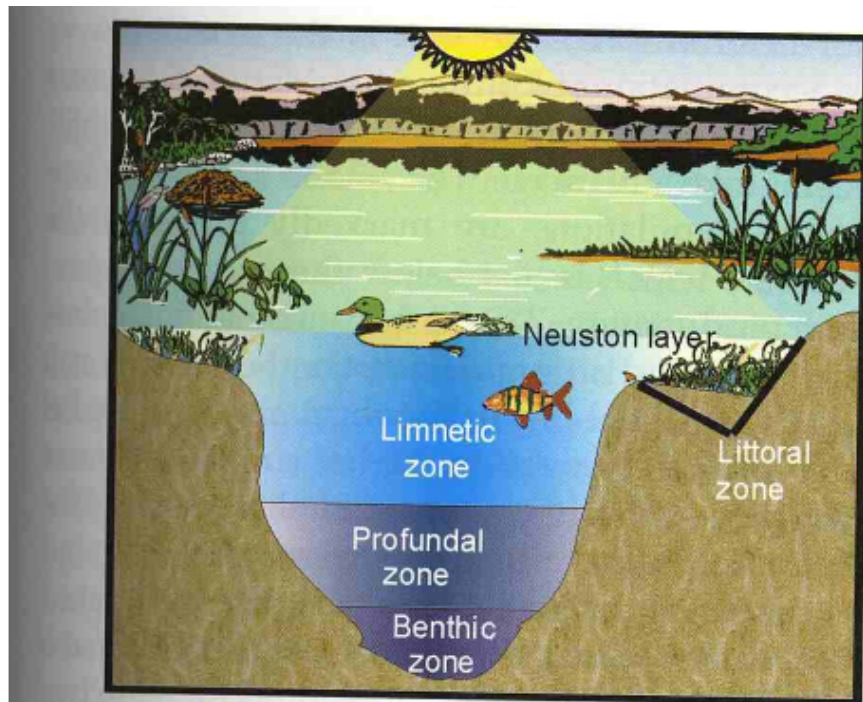


Environmental control on EPS and Saturation Index (UV, Light, Temperature, Nutrients, Ion Concentration)

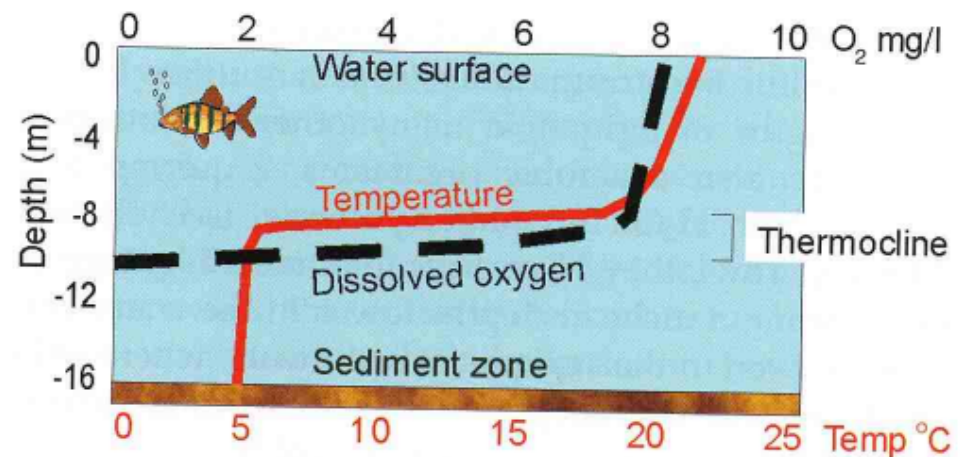
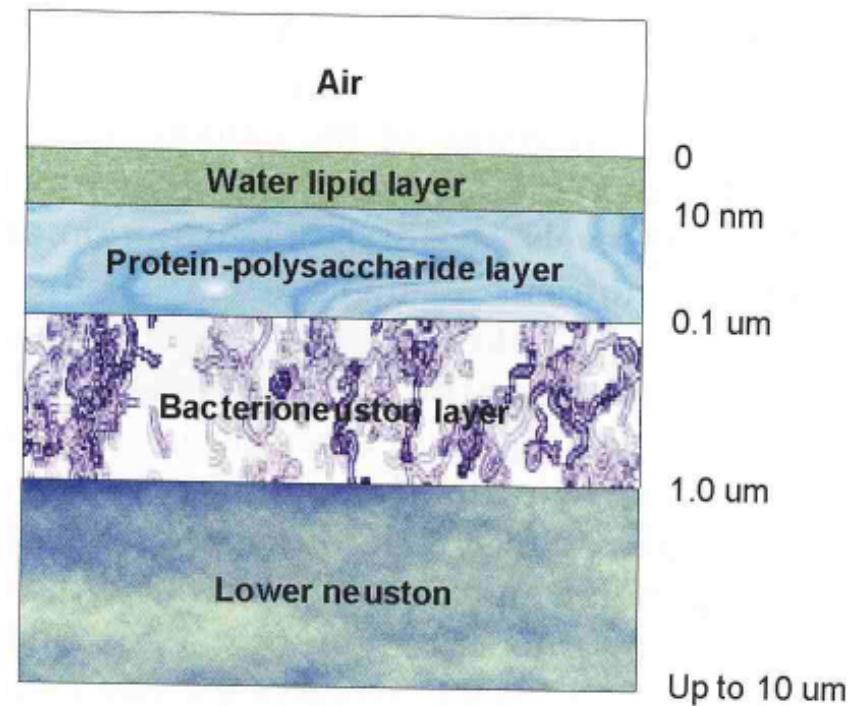
# Voda jako stanoviště



## 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.)



# Sinice - *Cyanobacteria*

- schopnost fotosyntézy (fotoautotrofové)  
tylakoidy (chlorofyl), fykobilizomy
- Gram-negativní typ buněčné stěny
- glykokalyx = vnější obal, kapsula z polysacharidů či polypeptidů
- tvorba vláken či koloniálních forem
- plynné měchýřky – vznášení se ve vodě
- karboxyzómy – enzym RUBISCO
- voda, půda, ale i extrémní podmínky (pouště, polární oblasti)

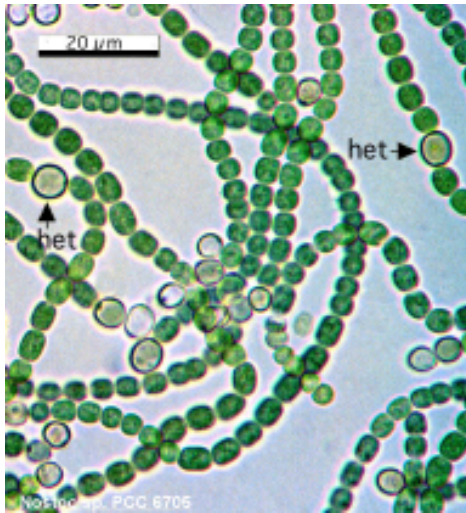
diferencované buňky - heterocysty – fixace  $N_2$   
- akinety – klidové stádium  
- baeocyty- reprodukční funkce

# Sinice a „vodní květ“

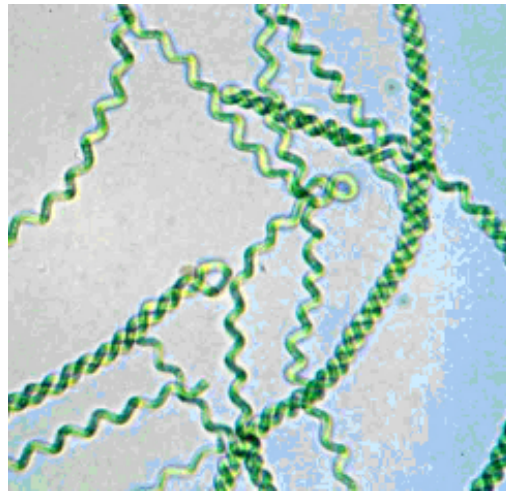
Pro rozvoj – fosfor, vyšší teplota + pH + živiny

Uvolňování cyanotoxinů!!!

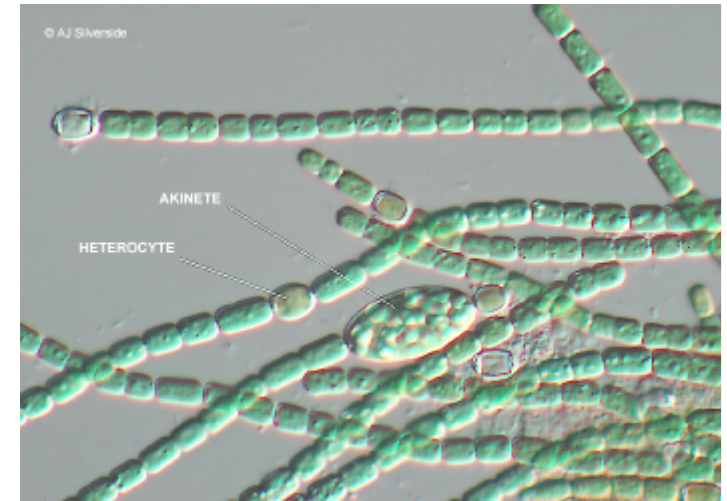




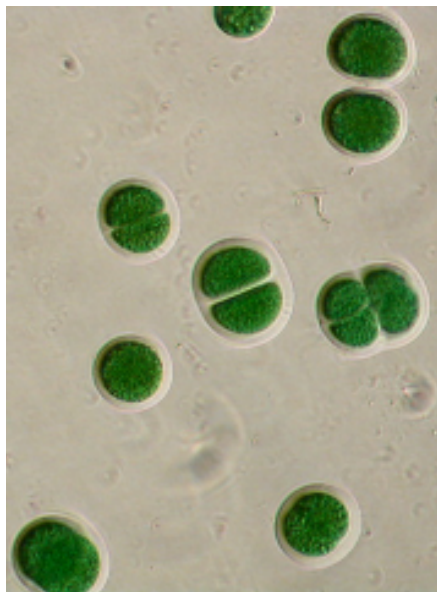
*Nostoc*



*Spirulina = Arthrospira*



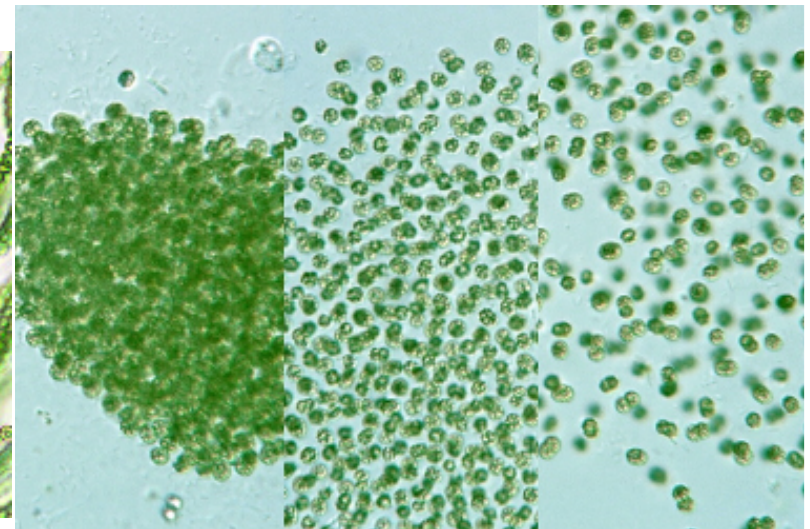
*Anabaena*



*Chroococcus*



*Cyanobacterium*



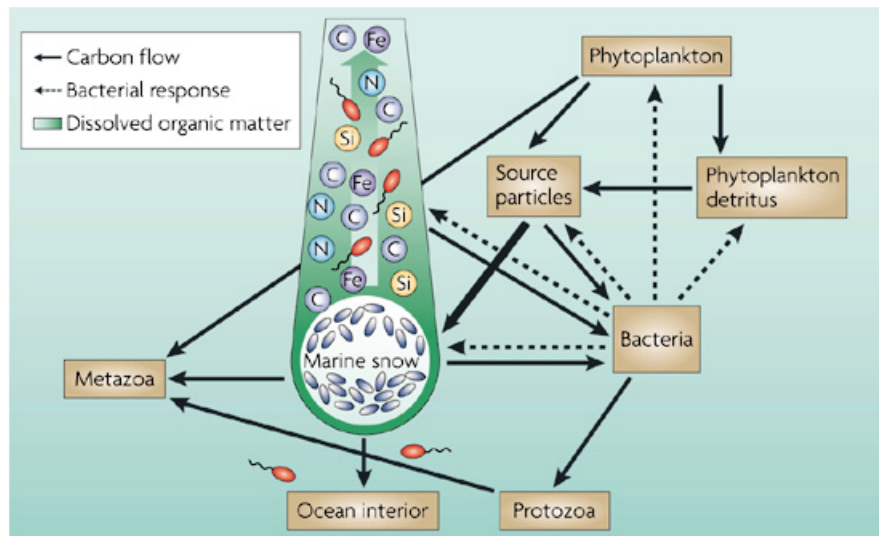
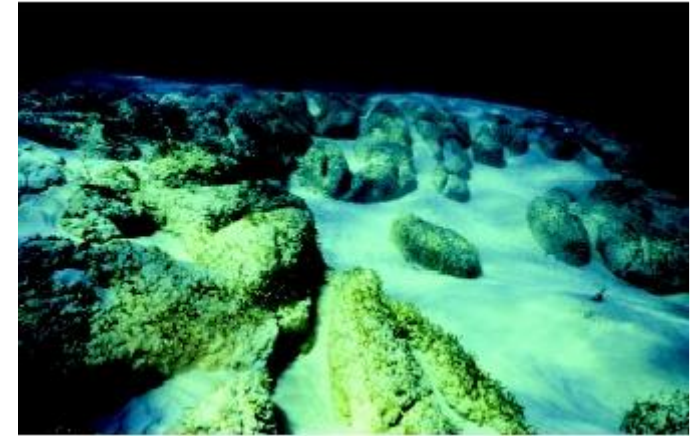
*Microcystis*

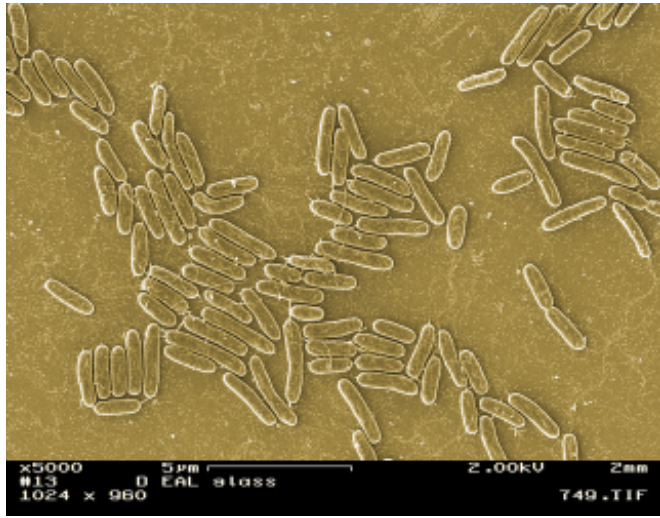
# Sinice

- „vodní květ“ a cyanotoxiny
- *Spirulina* – vitamínové tablety
- pokrmy – velké množství bílkovin
- pigmenty – barviva (pozorování biologických dějů v buňkách)
- Více info <http://www.sinicearasy.cz/pro-vsechny>  
[www.sinice.cz](http://www.sinice.cz)

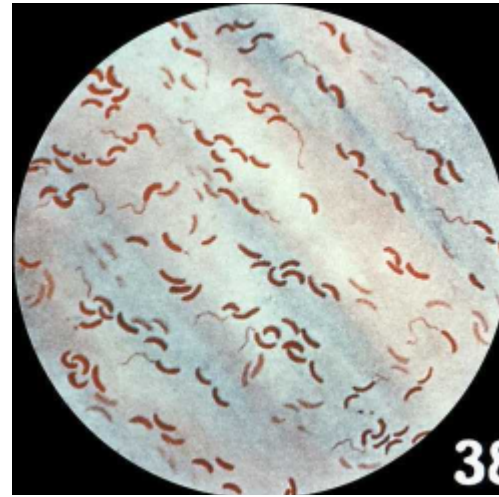
# Moře a oceány

- tolerance k soli, teplotě, tlaku
- součást planktonu, koloběh prvků
- extremofilové – hlubokomořské příkopy

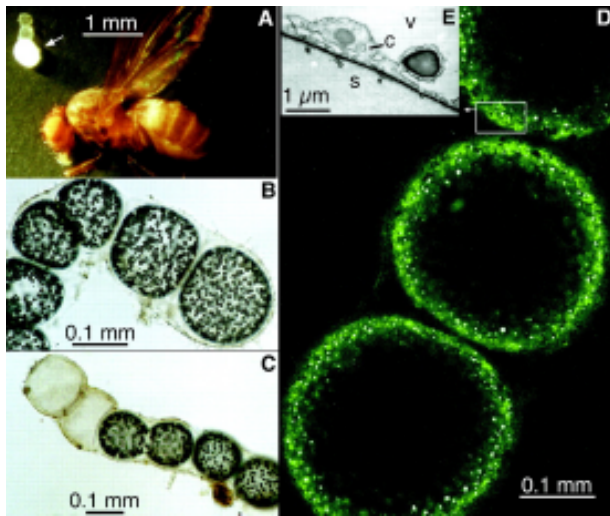




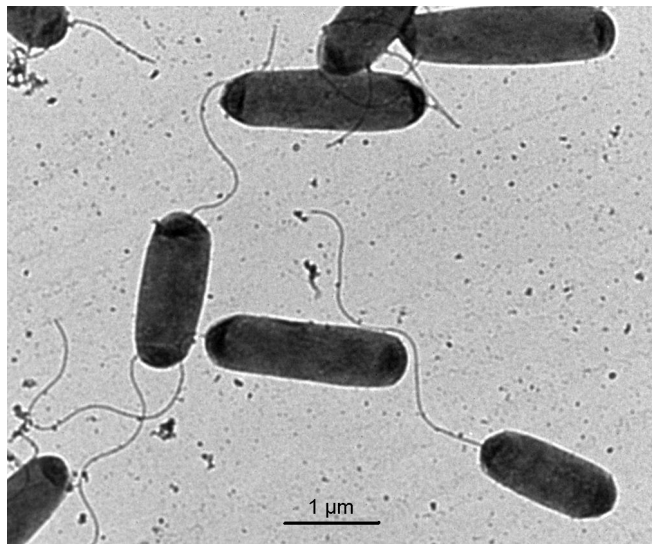
*Shewanella*



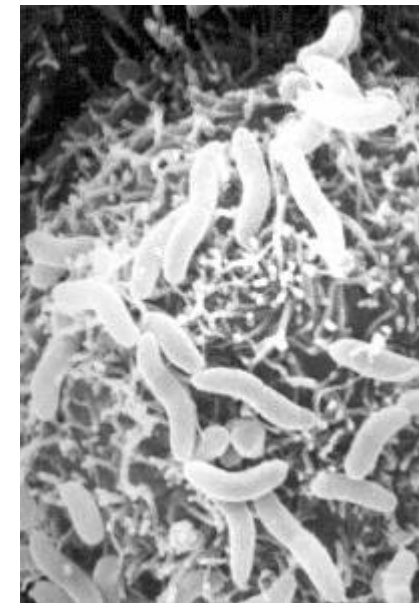
*Vibrio*



*Thiomargarita namibiensis*



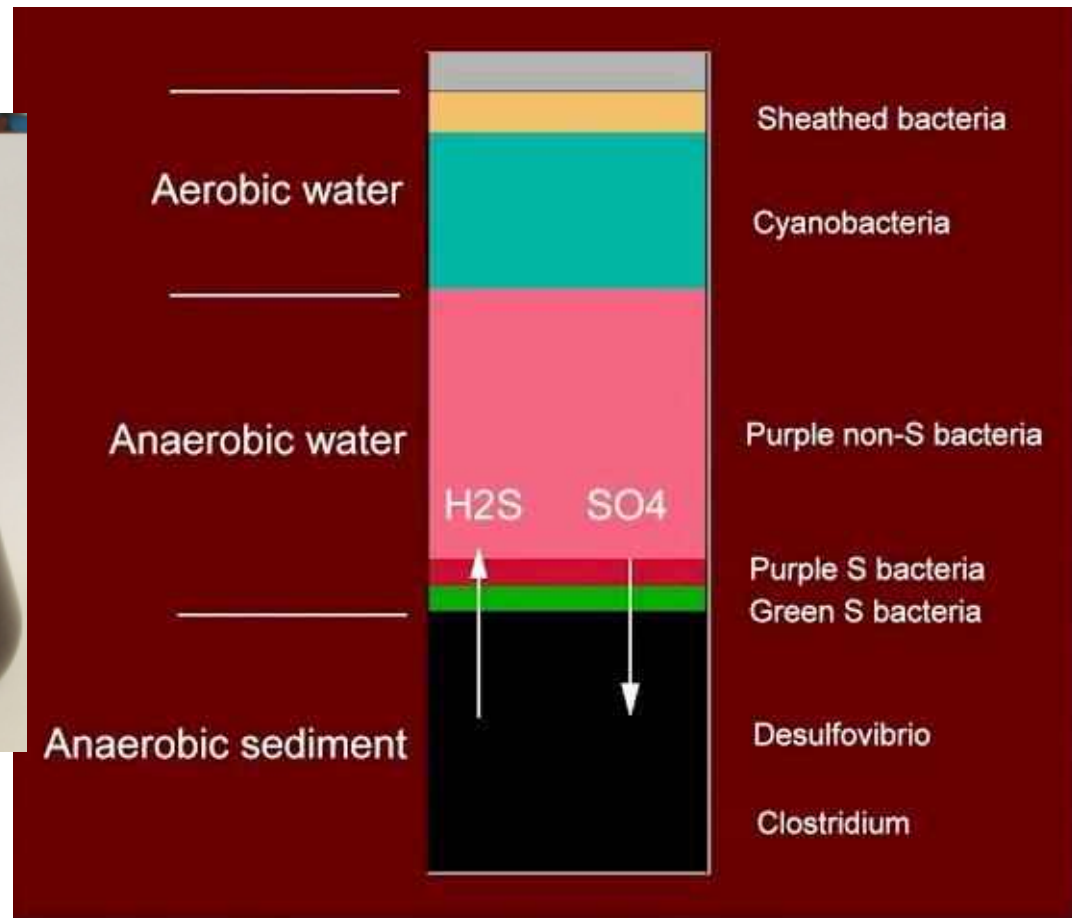
*Marinobacter*




*Colwellia*

# Winogradského sloupec

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







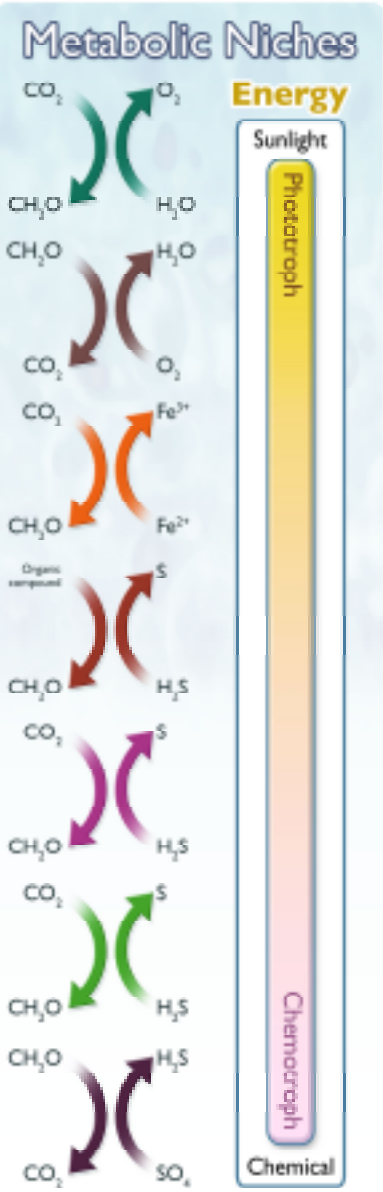
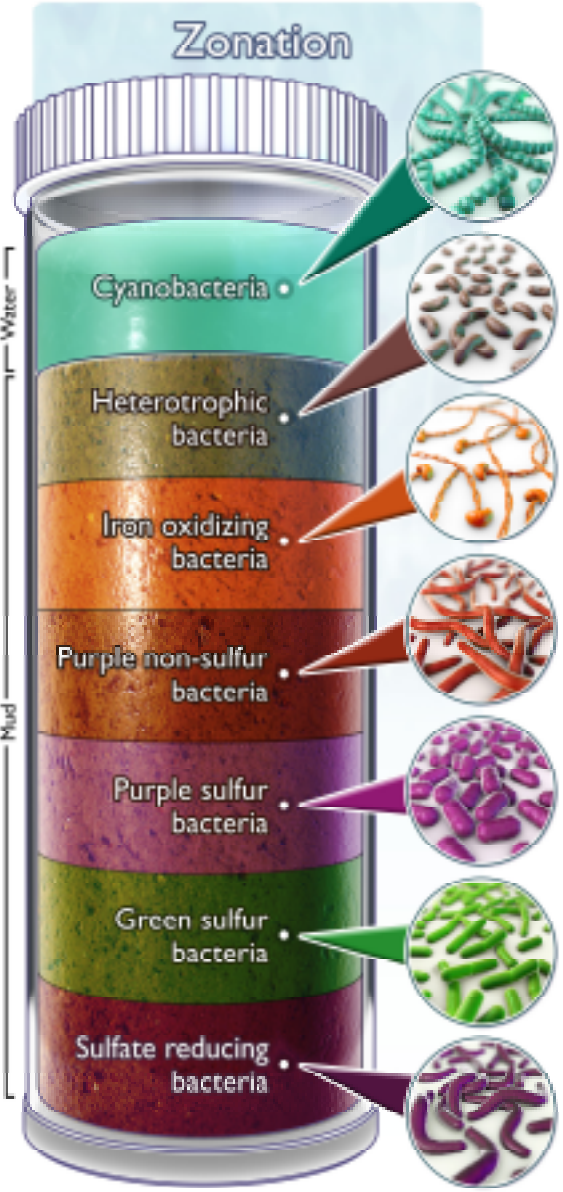
Sergei N. Winogradsky was one of the first microbiologists to study the organisms found in complex biofilm communities. One of the strategies he used to isolate organisms from nature was a miniature model of a pond cross section that is now called a Winogradsky column. It is a simple device for constructing a stratified ecosystem and provides a visual example of various modes of metabolism and zonation in the microbial world. It is a classic demonstration of the metabolic diversity of prokaryotes.

Sergei N. Winogradsky  
1856 - 1953

Life ↔ Environment

A soil or sediment sample is collected from nearly any source and amended with a variety of compounds such as carbon, sulfur, iron, and/or calcium. The mixture is added to a clear container and topped with water; the container is lightly capped to prevent evaporation. The column is incubated for weeks or months in weak to moderate, steady, nonflashing gradients of oxygen, nutrients, and light. Numerous microbial forms can be observed, as illustrated above, showing overlapping gradients, occurring in a stratified ecosystem defined by microbial processes.



All life on Earth can be categorized according to an organism's carbon and energy source. Energy can be obtained from light reactions (phototrophy) or chemical oxidations (chemotrophy), and carbon for cellular synthesis can be obtained from carbon dioxide (autotrophy) or from preformed organic compounds (heterotrophy). These categories combined form the four basic life strategies and can be found among the bacteria within a single Winogradsky column: phototrophic autotrophs, phototrophic heterotrophs, chemotrophic autotrophs, and chemotrophic heterotrophs. The resulting mix of autotrophs, heterotrophs, and chemotrophs can be observed in a Winogradsky column, as shown above.



## 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

***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

- 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

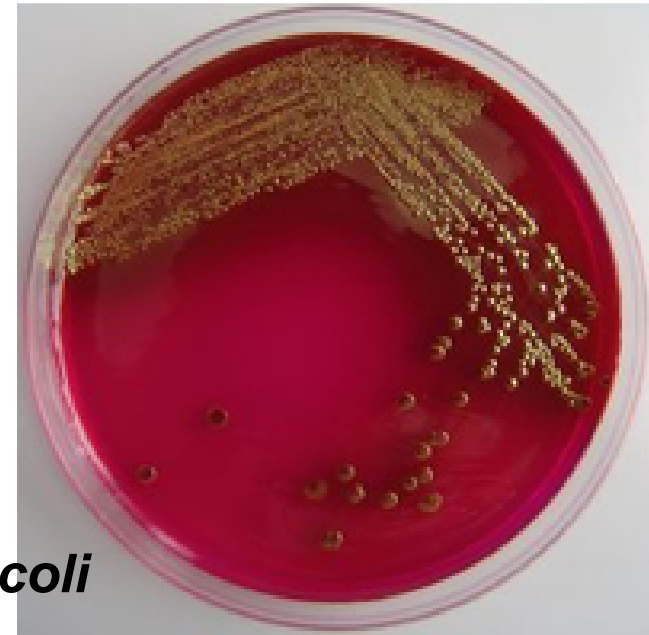
- kultivace při 44°C

**SB agar** (Slanetz-Bartley); azid sodný = selektivní činidlo pro enterokoky

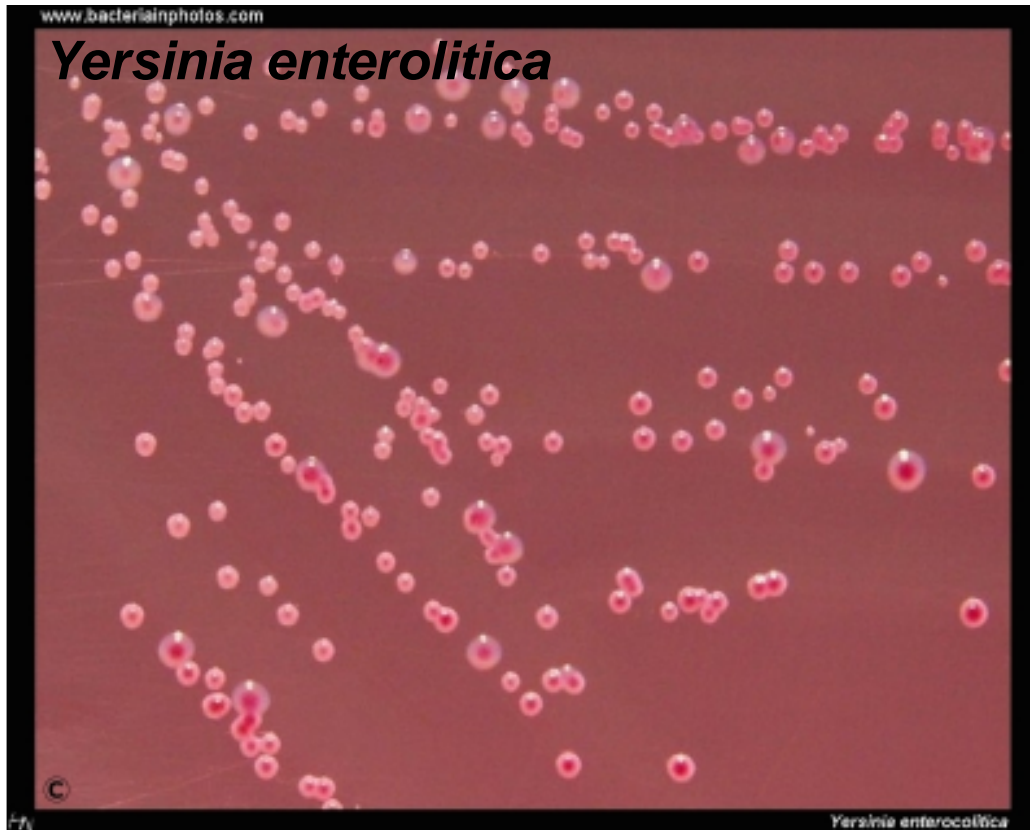
- indikátor TTC (tetrazolium chlorid) – červený či vínově červený střed kolonií s růžovým okrajem
- kultivace při 37°C, kultivace při 44°C inhibuje streptokoky

## ENDO agar – bazický fuchsin eliminuje G+

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



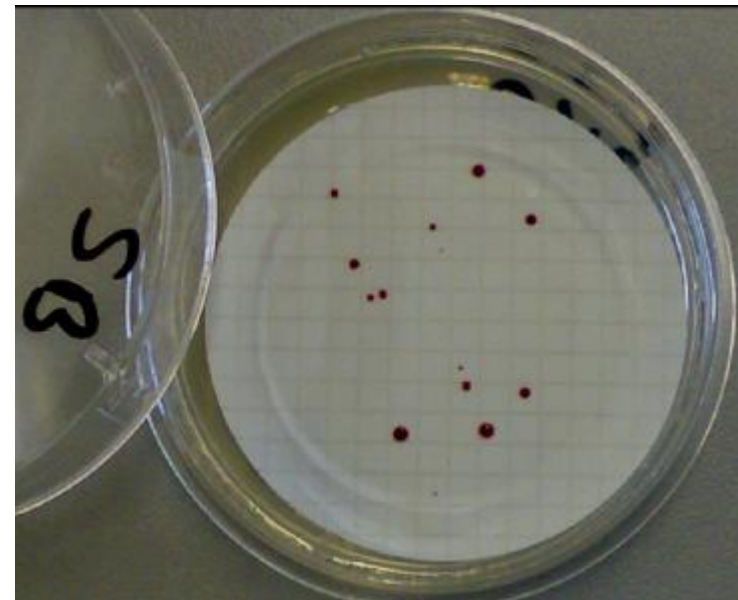
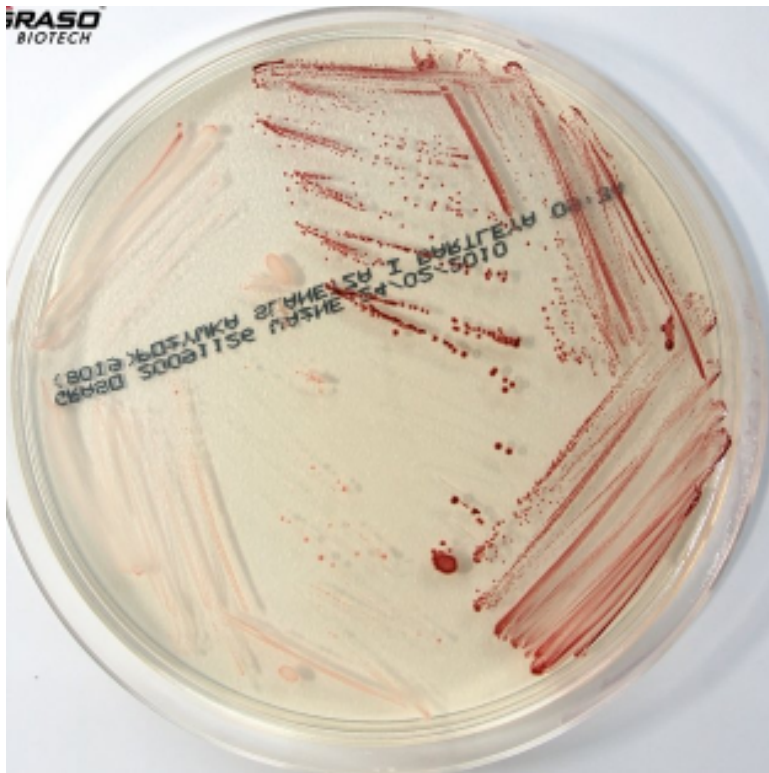
*E. coli*



## Slanetz Bartley agar

- azid sodný = selektivní činidlo pro enterokoky
- indikátor TTC (tetrazolium chlorid) – červený či vínově červený střed kolonií s růžovým okrajem
- kultivace při 37 či 44°C (enterokoky jsou termorezistentní; streptokoky nejsou)

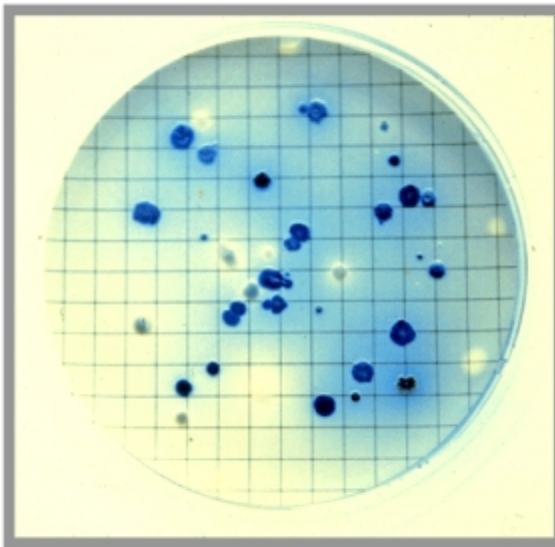
*E. faecalis*



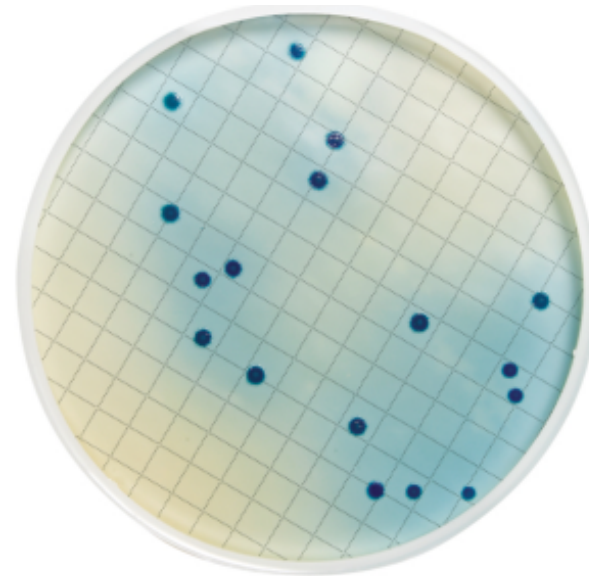
## mFC medium

- 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, přelít cca 15 ml temperovaného média (1 vzorek = 2 misky)

**ENDO, mFC agar:** 0,1 ml vzorku na agar

**SB agar: povrchová** 0,1 ml vzorku na agar; **pitná** - filtrace

Kultivace:

TYEA – 22°C

TYEA, ENDO, SB – 37°C

mFC, SB – 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

## Požadavky na mikrobiologické a biologické analýzy

Objednatel: \_\_\_\_\_

Typ vzorků: \_\_\_\_\_

Zakázka: \_\_\_\_\_

č. \_\_\_\_\_

### Rozsah analýz kráceného rozboru pitné vody podle 252/2004

	pitná voda	balená voda	upravovaná z povrchového zdroje	náhradní zásobování, studny
Escherichia coli	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/250 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
koliformní bakterie	0 KTJ/100 ml		0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
Clostridium perfringens			0 KTJ/100 ml	
Pseudomonas aeruginosa		0 KTJ/250 ml		
počty kolonií při 22 °C	200 KTJ/1 ml	500 KTJ/1 ml	200 KTJ/1 ml	500 KTJ/1 ml
počty kolonií při 36 °C	100 KTJ/1 ml	20 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml

### Rozsah analýz základního rozboru pitné vody podle 252/2004

	pitná voda	balená voda	upravovaná z povrchového zdroje	náhradní zásobování, studny
Escherichia coli	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/250 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
koliformní bakterie	0 KTJ/100 ml		0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
Clostridium perfringens			0 KTJ/100 ml	
Pseudomonas aeruginosa		0 KTJ/250 ml		
počty kolonií při 22 °C	200 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml	200 KTJ/1 ml	500 KTJ/1 ml
počty kolonií při 36 °C	20 KTJ/1 ml	20 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml	100 KTJ/1 ml
enterokoky	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/250 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml

### Rozsah analýz rozboru teplé vody podle 252/2004

	teplá voda	nemocnice
legionely	100 KTJ/100 ml	0 KTJ/50 ml
počty kolonií při 36 °C	200 KTJ/1 ml	

### Rozsah analýz rozboru teplé vody z individuálního zdroje pro hygienu zaměstnanců podle 252/2004

atypická mykobakteria	0 KTJ/100 ml
Escherichia coli	0 KTJ/100 ml
legionely	100 KTJ/100 ml
počty kolonií při 36 °C	200 KTJ/1 ml
Pseudomonas aeruginosa	0 KTJ/100 ml
Staphylococcus aureus	0 KTJ/100 ml



### Rozsah analýz balené vody podle 275/2004

Escherichia coli	0 KTJ/250 ml
koliformní bakterie	0 KTJ/250 ml
enterokoky	0 KTJ/250 ml
Pseudomonas aeruginosa	0 KTJ/250 ml
siřičitany redukující střešní sporující anaerobní bakterie	0 KTJ/50 ml
počty kolonií při 22 °C	100 KTJ/1 ml
počty kolonií při 36 °C	20 KTJ/1 ml

### Rozsah analýz rozboru povrchové vody podle 61/2003

	pro rozlišení způsobu úpravy na pitnou vodu			povrchová voda	povrchová voda na koupání	
	A1	A2	A3		cilová hodnota	připustná hodnota
koliformní bakterie	50 KTJ/100 ml	5000 KTJ/100 ml	50000 KTJ/100 ml	200 KTJ/1 ml	500 KTJ/100 ml	10000 KTJ/100 ml
enterokoky	20 KTJ/100 ml	1000 KTJ/100 ml	10000 KTJ/100 ml	40 KTJ/1 ml	100 KTJ/100 ml	400 KTJ/100 ml
termotolerantní koliformní bakterie	20 KTJ/100 ml	2000 KTJ/100 ml	20000 KTJ/100 ml	20 KTJ/1 ml	100 KTJ/100 ml	2000 KTJ/100 ml
salmonely	0 jedinců/5000 ml	0 jedinců/5000 ml			/1000 ml	0 KTJ/1000 ml
mikroskopický obraz: živé org.	50 jedinců/1 ml	3000 jedinců/1 ml	10000 jedinců/1 ml			

### Rozsah analýz rozboru povrchové vody podle ČSN 75 7221/98

	třída I	třída II	třída III	třída IV	třída V
enterokoky	< 6 KTJ/1 ml	< 13 KTJ/1 ml	< 25 KTJ/1 ml	< 46 KTJ/1 ml	>46 KTJ/1 ml
termotolerantní koliformní bakterie	< 40 KTJ/1 ml	< 100 KTJ/1 ml	< 500 KTJ/1 ml	< 1000 KTJ/1 ml	>1000 KTJ/1 ml

### Rozsah analýz rozboru povrchové vody pro koupaliště podle 135/2004

	koupání ve volné přírodě		povrchový zdroj pro umělá koupaliště	umělá koupaliště	teplá voda vyrobená z vody jiné kvality než vody pitné
	cilová hodnota	limitní hodnota			
koliformní bakterie	500 KTJ/100 ml	10000 KTJ/100 ml			
termotolerantní koliformní bakterie	100 KTJ/100 ml	2000 KTJ/100 ml			
enterokoky	100 KTJ/100 ml	400 KTJ/100 ml	1 KTJ/1 ml		
salmonely	0 KTJ/1000 ml	0 KTJ/1000 ml			
Escherichia coli			2 KTJ/1 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
Pseudomonas aeruginosa			3 KTJ/1 ml	0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
počty kolonií při 22 °C			500 KTJ/1 ml		
počty kolonií při 36 °C				100 KTJ/1 ml	200 KTJ/1 ml
Staphylococcus aureus				0 KTJ/100 ml	0 KTJ/100 ml
legionely				0 KTJ/1 ml	100 KTJ/100 ml

### Ostatní parametry

	jednotka
železitá bakterie	titr
nitrifikační bakterie	titr
denitrifikační bakterie	titr
trofický potenciál	mg/l
test akutní toxicity na bezobratlých	TU
test akutní toxicity na řasách	TU
PCR identifikace E. coli	(+/-)

Poznámky:

Vypracovala: H. Mlejnková 21.1.2003  
Opraveno: H. Mlejnková 15.6.2004

## V současnosti platné rozборы vody

Indikátorová skupina	označení	kultivace				konfirmasi				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	tříšlově 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