

Základní mikrobiologický rozbor vody (povrchové nebo pitné)

Jedna skupinka bude pracovat s pitnou (studniční, kohoutek, balená..) vodou, zbylé dvě skupinky s povrchovou (studánky, vodní toky, rybníky, přehrada..). **V protokolu je nutné uvést zdroj Vašeho vzorku**, odvíjí se od něj totiž postup práce, který je u obou odlišný. Práce se vzorky **se liší v ředění**, se kterým se pracuje. V pitné vodě očekáváme nižší počet bakterií, používáme tedy neředěný vzorek a ředění 10^{-1} . Povrchová voda je teoreticky na bakteriální „znečištění“ bohatší, používáme ředění 10^{-1} a 10^{-2} .

Ve cvičeních se setkáme se dvěma základními typy stanovení – a to stanovení a) celkového počtu bakterií (psychofilních a mezofilních) a b) stanovení indikátorových skupin bakterií (selektivní media budou cíleně prokazovat možné fekální znečištění, tedy rody patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*). V bodě a) tedy pracujeme s bohatým **neselektivním médiem TYEA** na kterém počítáme kolonie jako při plotnové metodě, a to kolonie **všech rodů a druhů** schopných růstu při dané teplotě (22°C a 37°C). Psychofilních druhů je teoreticky očekáváno více a jsou víceméně přirozeným zastoupením bakteriálního osazenstva. Mezofilní druhy, pokud se vyskytnou, již mohou naznačovat přítomnost závažného fekálního znečištění – protože rostou při teplotě blízké teplotě lidského těla – 37°C . Tři typy selektivních půd poté pomáhají **spočítat a dourčit buňky** (dle výskytu a zbarvení kolonií), které jsou z indikátorové skupiny přítomny.

Teoretická část:

Sladká voda je jedním z přirozených stanovišť bakterií. Jejich množství a druhové zastoupení závisí na zdrojích uhlíkaté a dusíkaté výživy a na přítomnosti kyslíku. Ve vodě obecně přítomné bakterie (závažné i nezávažné) můžeme rozdělit do tří základních skupin: mezi typické vodní bakterie (tzv. **autochtonní vodní bakterie**) patří kupříkladu *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix* a *Spirillum*. Pokud je ve vodě velké množství organické hmoty, více se vyskytují anaerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie (např. *Clostridium*). Splavováním půdy se do vody navíc dostávají aerobní **půdní bakterie** *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptomyces* a koryneformní bakterie *Corynebacterium*, *Brevibacterium*. Vzhledem k mohutnému enzymatickému systému je jejich výskyt limitován koncentrací živin. Krátkodobě se ve vodě mohou vyskytovat kontaminanty fekálního znečištění - **baktérie ze střev člověka a zvířat**, především zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, dále některé streptokoky (např. *Enterococcus faecalis*) a některé druhy rodu *Clostridium*. Za určitých podmínek můžeme izolovat i patogenní bakterie (*Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* ...). Krátce jsou přítomny z toho důvodu, že voda pro ně není vhodným stanovištěm.

Rutiní mikrobiologický rozbor vody nemůže stanovit všechny přítomné mikroorganismy, ani se pro náročnou metodiku neprovádí stanovení všech patogenních (= onemocnění způsobujících) mikroorganismů. Proto se pro zjištění výskytu z hygienického hlediska závadných bakterií využívá stanovení indikátorových skupin bakterií (=bakterií stejného ekologického charakteru, které lze rychle a poměrně jednoduše stanovit). Indikátorové skupiny bakterií jsou tedy vodítkem, které o vodě prozradí, jaké skupiny mikrobů obsahuje, neboť jsou na ně zacíleny specifické testy. Například stanovení fermentující *Escherichia coli* je možné na Endově agaru, neboť má na něm specifický kovový lesk. Koliformní, tedy fermentující střevní bakterie jsou důkazem fekálního znečištění vody, což může znamenat i přítomnost patogenů! Jsou většinou **oxidáza negativní a laktóza**

pozitivní (= dva základní biochemické testy). Laktóza negativní je *Salmonella* a *Shigella* (odlišná barva kolonií).

Jak se test na utilizaci substrátů projevív?

- určitým zbarvením kolonie na určitém mediu

Mikrobiální znečištění vody závažnými druhy mikroorganismů:

- jsou rozeznávány: koliformní bakterie, fekální koliformní bakterie, enterokoky, mezofilní bakterie, psychofilní bakterie, bezbarví bičíkovci a další mrtvé a živé organizmy. První tři druhy bakterií nesmí pitná voda obsahovat.

Jaké testy se při hodnocení kvality vody používají?

I. Postup stanovení počtu indikátorů obecného znečištění (ve cvičeních: kultivace na TYEA) – neselektivní medium, na němž počítáme kolonie

A) Psychofilních bakterií

= bakterie s růstovým optimem kolem 20°C, indikují přítomnost organických látek rychle rozložitelných bakteriemi při nízkých teplotách. Jejich stanovení se provádí u pitných vod, u povrchových vod především v případě využití zdroje k úpravě na vodu pitnou. Pouze jejich velmi vysoký počet znamená přítomnost mnoha organických látek ve vodě.

B) Mezofilních bakterií

Tyto bakterie, rostoucí aerobně při 37°C, indikují znečištění **mikroflorou teplokrevných živočichů a člověka**, včetně možných mikrobů patogenních. Je povolen pouze jejich nízký počet.

II. Postup stanovení indikátorů fekálního znečištění (pro cvičení ENDO, SB a MFC agar)

Jako indikátory fekálního znečištění se stanovují **koliformní bakterie a enterokoky**, tedy bakterie vyskytující se ve střevě. Indikátorová hodnota obou těchto skupin není a nemůže být jednoznačná a je hodně diskutována, zatím však nebyly jako základní organismy hygienického hlediska uspokojivě nahrazeny.

D) Koliformní bakterie

- čeleď *Enterobacteriaceae* (G- tyčky netvořící spory) tlustého střeva člověka a některých zvířat. Nejčastěji je to *Escherichia coli*, ostatní příbuzné druhy mají podobné morfologické a fyziologické vlastnosti (**zkvašování laktózy** do 48h za tvorby kyseliny a plynu, **negativní oxidázový test**). Jejich přítomnost ve vodě je důkazem znečištění fekáliemi a v tomto případě se mohou ve vodě vyskytovat i střevní patogenní bakterie (*Salmonella, Shigella*). V případě, že je podezření na přítomnost některých těchto patogenů, je potřeba rozšířit základní rozbor o jejich stanovení.

➤ Stanovení na Endo-agaru

Endův agar je přesně selektivně diagnostické medium. Je v něm přítomen bazický fuchsin, který eliminuje růst G+ bakterií. Vyrostou tedy pouze G-. Diagnostikuje mikroby, které štěpí laktózu – příznačné pro G- fermentující koliformní - indikátorem je Schiffovo reagens (indikuje acetaldehydy). Počítáme laktózapozitivní koliformní bakterie, které rostou v tmavorudých koloniích, medium rovněž zčervená. *E. coli* vykazuje kovový lesk. Laktózu

neštěpící druhy rostou v růžových až průhledných koloniích a ty jsou diagnosticky významné (obligátní patogeny).



Endův agar - *E. coli*- kovový lesk; koliformní laktózapozitivní druhy – červené, negativní – růžové.

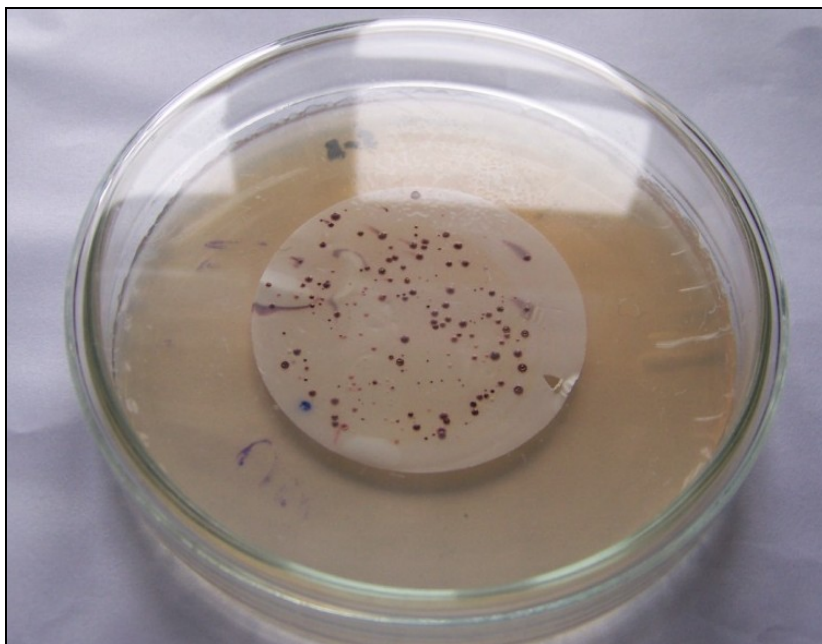
➤ Stanovení termotolerantních fekálních koliformních bakterií

Provedením tzv. teplotního testu stanovíme podíl koliformních bakterií pocházejících přímo ze zažívacího traktu teplotokrevných živočichů a člověka, tedy **čerstvé fekální znečištění**. Odlišíme je od bakterií pocházejících ze staršího znečištění, které jsou již součástí heterotrofního společenstva dané lokality. Test provádíme při teplotě 44°C na mFC mediu s laktózou. Laktóza je zkvašována, selektivním činidlem jsou anilinová modř a žlučové soli, které inhibují G+ floru. Počítáme fialové až tmavomodré laktózapozitivní kolonie, nepočítáme světle růžové a šedé.

II) Enterokoky

Enterokoky jsou skupina fakultativně anaerobních G+ streptokoků, která se vyskytuje v trávicím traktu člověka a živočichů. Oproti koliformním bakteriím se vyznačují relativně vyšší termorezistencí a odolností vůči dalším fyzikálním a chemickým vlivům okolního prostředí. Jsou považovány za významný indikátor **čerstvého fekálního znečištění**, především ve vodách pitných, upravovaných dezinfekcí.

- Vodu (100ml) filtrujeme přes membránu, kterou kultivujeme na Slanetz-Bartley agaru = půdě s azidem sodným a TTC (tetrazolium chlorid), který je redukován na červený formazan. Počítáme úplně červené kolonie nebo kolonie s červeným středem a růžovými okraji, bílé a bezbarvé kolonie nepočítáme.
- Toto medium je selektivní pro celou čeleď streptokoků, která je na něm schopna růstu. Jak však dokázat pouze podskupinu enterokoků? Misky inkubujeme dnem vzhůru 48h při 44°C, neboť enterokoky oproti ostatním rodům čeledi *Streptococaceae* vykazují termorezistenci, čehož se dá využít v jejich selektivním průkazu. Dále musíme použít konfirmační testy pro odlišení od ostatních streptokoků (využití antibiotik atd.).



Enterococcus na SB

Poznámka:

Postup ve cvičeních vychází z normy ČSN 830521; v dnešní době je však platný jiný (modifikace použitých medií k zachytu daných bakt.druhů – používají se tedy jiná media nastavená na jiné indikátorové skupiny bakterií po filtraci vody) a to Vyhláška 252/2004 Sb.

Tabulka: Hlavní problémy stanovení koliformních a termotolerantních koliformních bakterií; minimální nepřesnosti jsou zde charakterizovány experimentálně stanovenými variačními koeficienty (tj. podílem rozptylů na průměrech)

| Problémový okruh | Charakteristika | Minimální stanovená nepřesnost | Využití dostupných RM v problémovém okruhu |
|-----------------------|--|--------------------------------|---|
| 0. Charakter vzorku | odběr, rozdíly mezi paralelními vzorky (není součástí mikrobiologického rozboru) | | nelze využít, jde o mimolaboratorní činnost |
| 1. Očkování vzorku | homogenizace vzorku, očkování, ředění, vliv typu pipet apod. | 10 % | v základě lze využít, matrice však zcela neodpovídá (např. z hlediska absorpce) |
| 2. Živné médium | příprava, šarže, stáří přípravného média za dodržení skladovacích podmínek apod. | 4 % | záchytnost média lze dobře ověřit, diferenciální schopnosti média omezeně |
| 3. Inkubace | vliv teploty za dodržení předepsaného rozmezí | 2 % | v zásadě lze využít |
| 4. Odečítání výsledků | netypické reakce některých kmenů, diferenciální schopnosti média | 4–10 % | nelze využít, ve vodním prostředí je směs různých kmenů, na rozdíl od sbírkového kmenu v RM |
| 5. Výpočty | volba správného způsobu výpočtu a výběr správného ředění | lze zvýšit až na 100 % | lze využít |

Pomůcky:

- bakteriologické plotny s TYEA (trypton yeast extrakt agar)
- Endův agar (M 6), mFC a Slanetz-Bartley medium (SB)
- sterilní pipety, hokejky
- zkumavky
- sterilní fosfátový pufr (pH 7,2)
- vzorky pitné a povrchové vody ve sterilních zábrusových lahvích

Postup – v protokolu prosím uveďte pouze Váš postup dle zdroje vody:

Postup je odlišný u vzorků s vodou pitnou a u vzorků s vodou povrchovou. U pitné vody předpokládáme mnohem nižší zastoupení indikátorových skupin bakterií (díky její desinfekce, chlorace..), proto s ní pracujeme jako s neředěným vzorkem a v ředění 10^{-1} . Povrchová voda je na mikroby samozřejmě bohatší, proto s neředěným vzorkem nepracujeme, ale na misky pipetujeme vzorek ředěný 10^{-1} a 10^{-2} .

Studenti pracující s pitnou vodou:

- Odebereme vzorek pitné vody zpracovávaný jako neředěný
- Očkujeme **1 ml** neředěné vody do sterilní Petriho misky a zaléváme temperovaným agarem TYEA (cca 15 ml) pro stanovení psychofilních (první miska kultivována při 22°C) a mezofilních (kultivace při 37°C) bakterií; je nutno pracovat v opakováních, abychom získali průměrný výsledek, naléváme tedy od každého vzorku po dvou miskách (celkem 4 misky) – **ve výpočtu nenásobíme koeficientem 10, pouze dilučním faktorem v případě ředění 10^{-1} !!** (pipetován celý 1ml)
- Vodu ředíme ve sterilním fosfátovém pufru (0,5 ml vzorku do 4,5 ml pufru) = **10^{-1}**
- Promícháme čistou pipetou, se kterou již pipetujeme na misku a očkujeme 1 ml této ředěné vody do sterilní Petriho misku a zaléváme temperovaným agarem TYEA pro stanovení psychofilních (kultivace při 22 °C) a mezofilních (kultivace při 37 °C) bakterií, opět po dvou miskách pro každou teplotu
- Stanovíme koliformní bakterie vyočkováním **0,1 ml** neředěné vody a **0,1 ml** ředění 10^{-1} na misky s Endo-agarem (oba vzorky po dvou miskách)
- To samé na misku s SB a MFC agarem
- Kultivujeme při 22°C pro stanovení psychofilů (pouze první dvě misky s TYEA)
- Ostatní misky kultivujeme při 37°C (u koliformů předpokládáme dobrý růst při teplotě lidského těla)

Studenti pracující s povrchovou vodou:

- Vodu ředíme ve sterilním fosfátovém pufru (0,5 ml vzorku do 4,5 ml pufru) = ředění **10^{-1}**
- Promícháme čistou pipetou, kterou odebereme 0,5 ml do další předem připravené zkumavky s 4,5 ml fosfátového pufru) = ředění **10^{-2}** ; sterilní práce.
- Očkujeme **1 ml** obou ředění do sterilní Petriho misky a zaléváme temperovaným agarem TYEA (cca 25 ml) pro stanovení psychofilních (kultivace při 22°C) a mezofilních (kultivace při 37°C) bakterií (opět celkem 4 misky) – **ve výpočtu nenásobíme koeficientem 10, pouze dilučním faktorem!!** (pipetován 1ml)
- Stanovíme koliformní bakterie vyočkováním **0,1 ml** neředěné vody a **0,1 ml** ředění 10^{-1} na misku s Endo-agarem, po dvou miskách od každého vzorku
- To samé na misku s SB a MFC agarem
- Kultivujeme při 22°C pro stanovení psychofilů (pouze první dvě misky s TYEA)

- Ostatní misky kultivujeme při 37°C (u koliformů předpokládáme dobrý růst při teplotě lidského těla)

Hodnocení:

Dříve se kvalita stanovovala podle normy **ČSN 830521**, která hodnotila výskyt psychofilních a mesofilních bakterií, což je náplní jedné úlohy ve cvičeních – očkování na agar TYEA .

I. stanovení indikátorů obecného znečištění – kultivace při 22 a 37°C

Stanovení CFU (=KTJ) se opět počítá v 1 ml vzorku (jako plotnová metoda).

- Zde je potřeba uvažovat – práce s agary TYEA: agar se naléval přímo na celý mililitr vzorku (pro stanovení CFU nenásobíme faktorem 10).
- Misky se selektivními medii: pipetováno pouze 0,1 ml, ve vzorci pro CFU tedy násobíme 10ti
- Koliformní bakterie nebo enterokoky se v hodnocení kvality vody stanovují jako počet buněk ve sledovaném objemu, protože hodnotit jejich počet v 1 ml nelze (příliš malý objem – buňky se v 1ml vyskytovat nemusí, ale ve 100ml je již zachytíme...celkově jich je méně); tolerován je určitý počet např. pro 100ml vody.
- Stanovené počty srovnáme s normou a zhodnotíme, zda voda vyhovuje požadavkům kladeným na vodu pitnou.

Voda pro hromadné zásobování (více než 100 osob) nesmí obsahovat více než: 200 psychofilních a 20 mezofilních bakterií/1 ml a 0 koliformních či enterokoků/ 100 ml

Voda pro individuální zásobování (studny; méně než 100 osob) nesmí obsahovat více než 500 psychofilních a 100 mezofilních bakterií v 1 ml a 0 koliformních či enterokoků v 10 ml

| | pitná voda | balená voda | upravovaná z povrchového zdroje | náhradní zásobování, studny |
|--------------------------------|--------------|--------------|---------------------------------|-----------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 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 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | | | 0 KTJ/100 ml | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | 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 |

II. stanovení indikátorů fekálního znečištění – stanovení po – stanovení počtu kolonií na vybraných mediích

- 1) Endův agar – odečítáme kovově lesklý růst *E. coli*, červené kolonie ostatních koliformních bakterií. Růžové či průhledné kolonie značí laktóza negativní rody.
- 2) SB agar – počítáme temně červené kolonie či kolonie s červeným středem
- 3) mFC medium - počítáme fialové až tmavomodré laktózapozitivní kolonie, nepočítáme světle růžové a šedé.

Zdroje:

<http://www.env.cz/ris/ais-ris-info-copy.nsf/da28f37425da72f7c12569e600723950/3e5d5bba30e14c0a8025680e003396c6?OpenDocument>
<http://sweb.cz/Hlavaty.Vaclav/kvalita.htm>
<http://www.sci.muni.cz/mikrob/skripta/mikrobiologiecv.pdf>
<http://www.rozборы.cz>

