

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

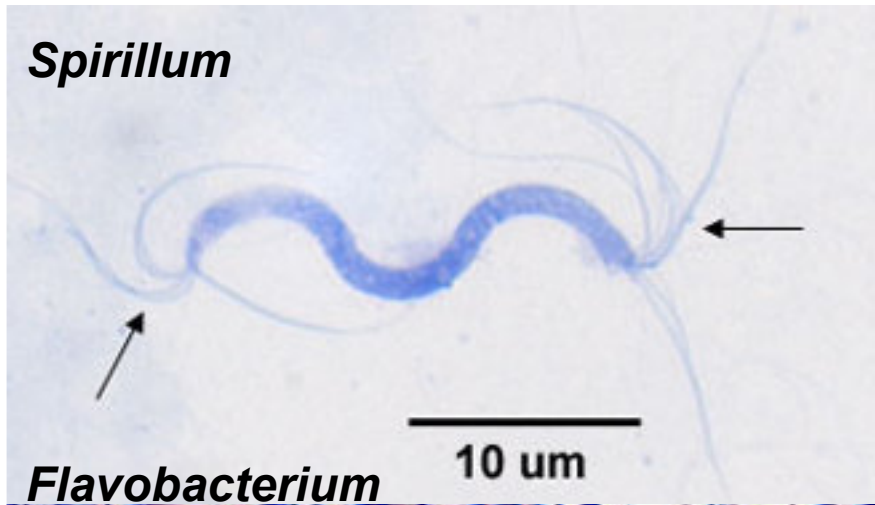
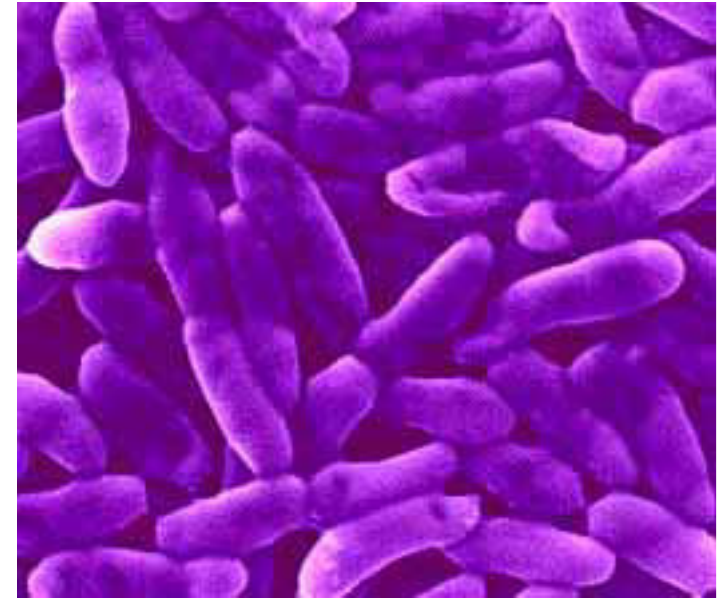
Sladká voda

- přirozené stanoviště bakterií
- zastoupení závisí na zdrojích uhlíku, dusíku a přítomnosti O₂
- 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

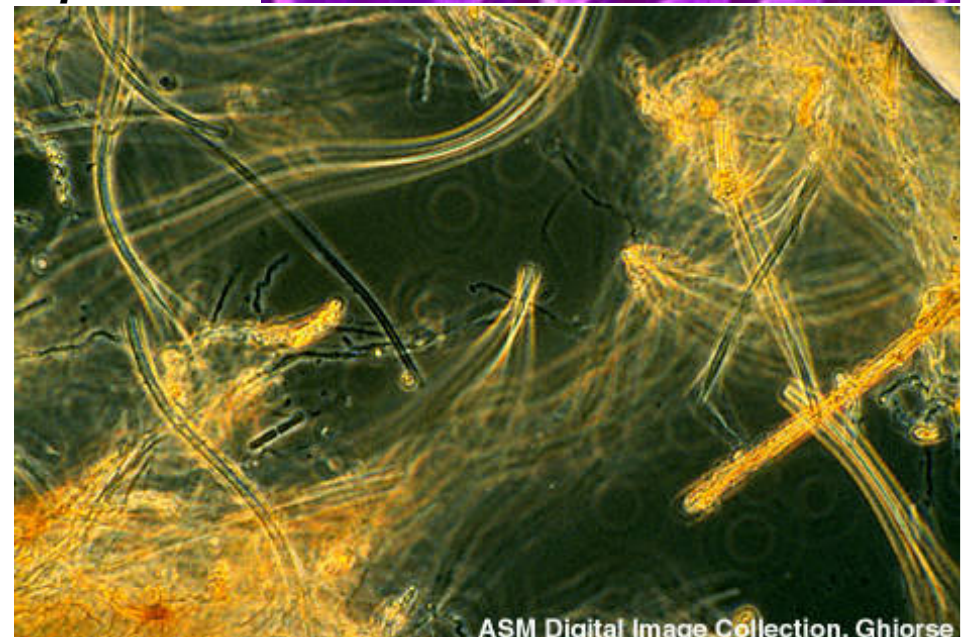
Chromobacterium



Flavobacterium



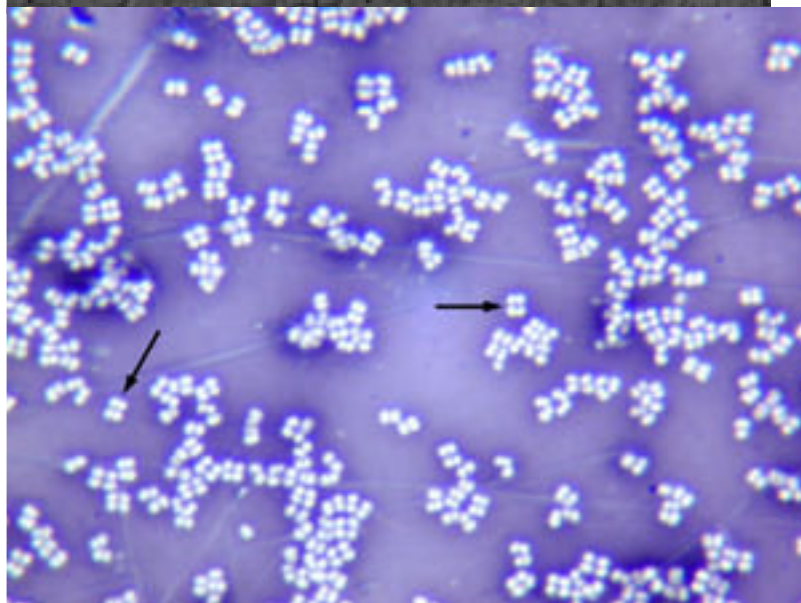
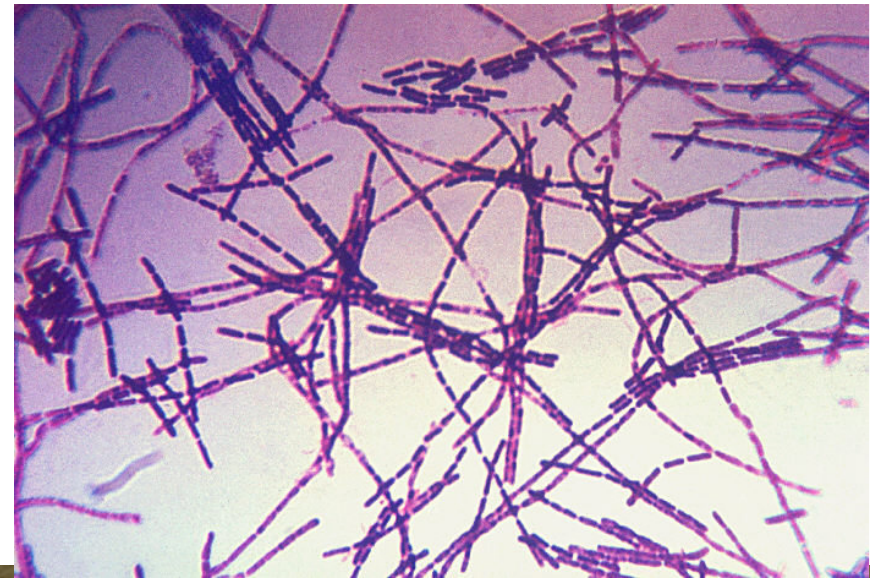
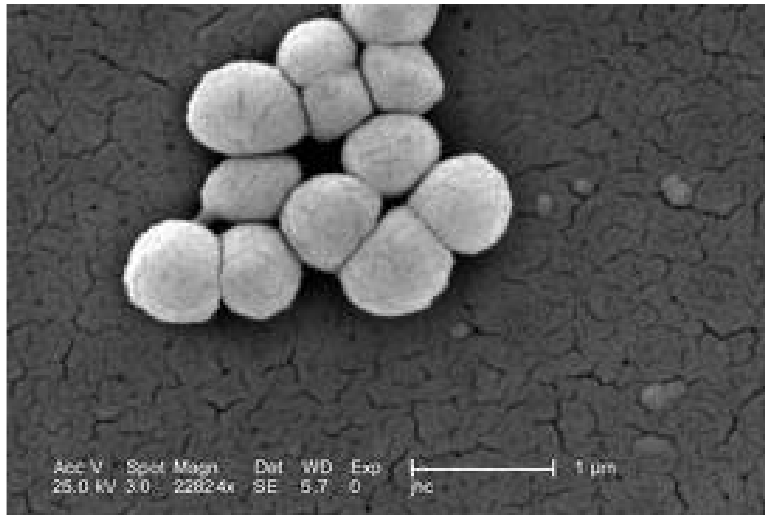
Leptothrix



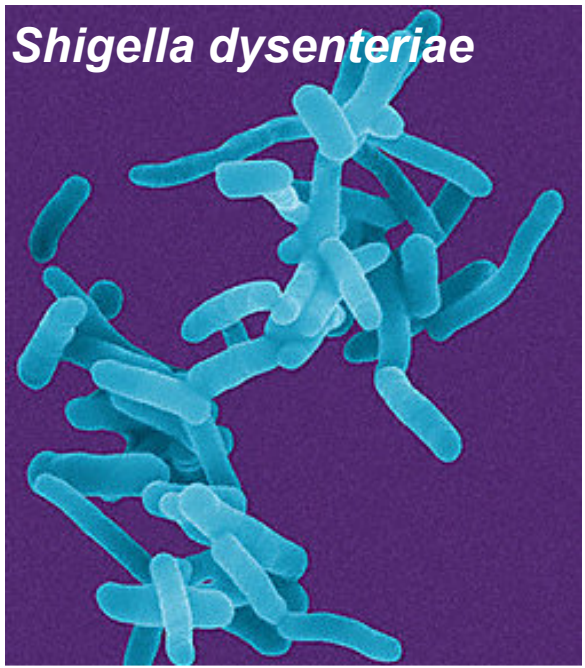
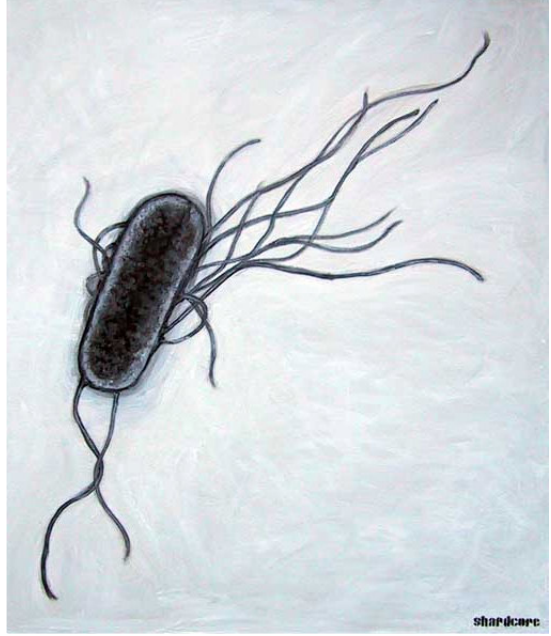
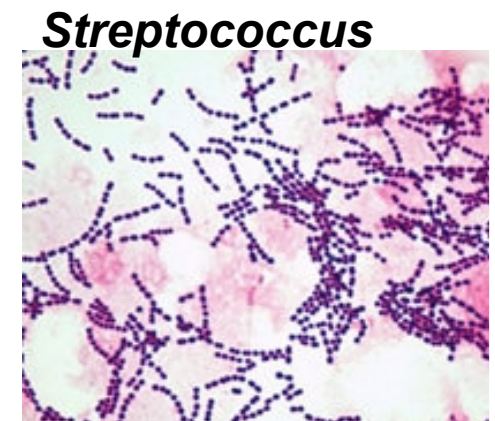
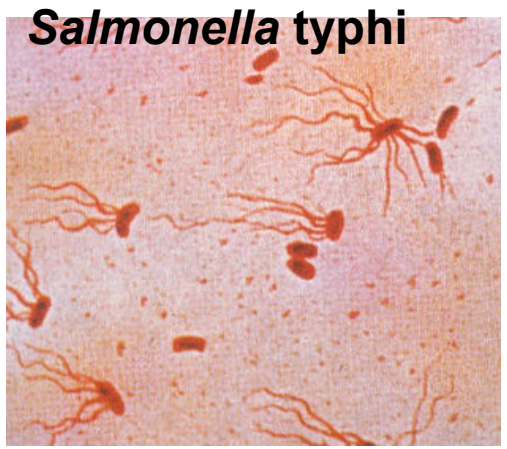
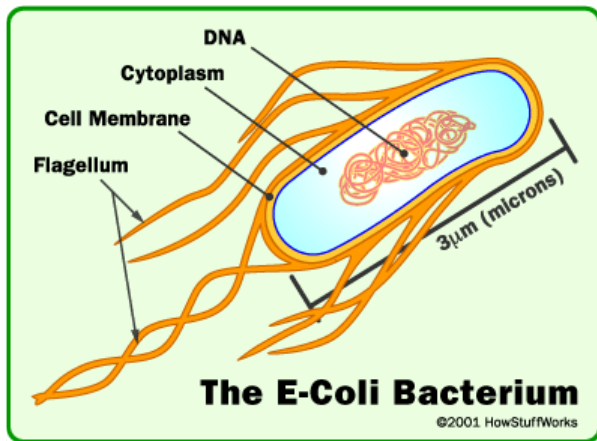
Půdní – splachováním, svrchní vrstvy – limitace koncentrací živin

Bacillus

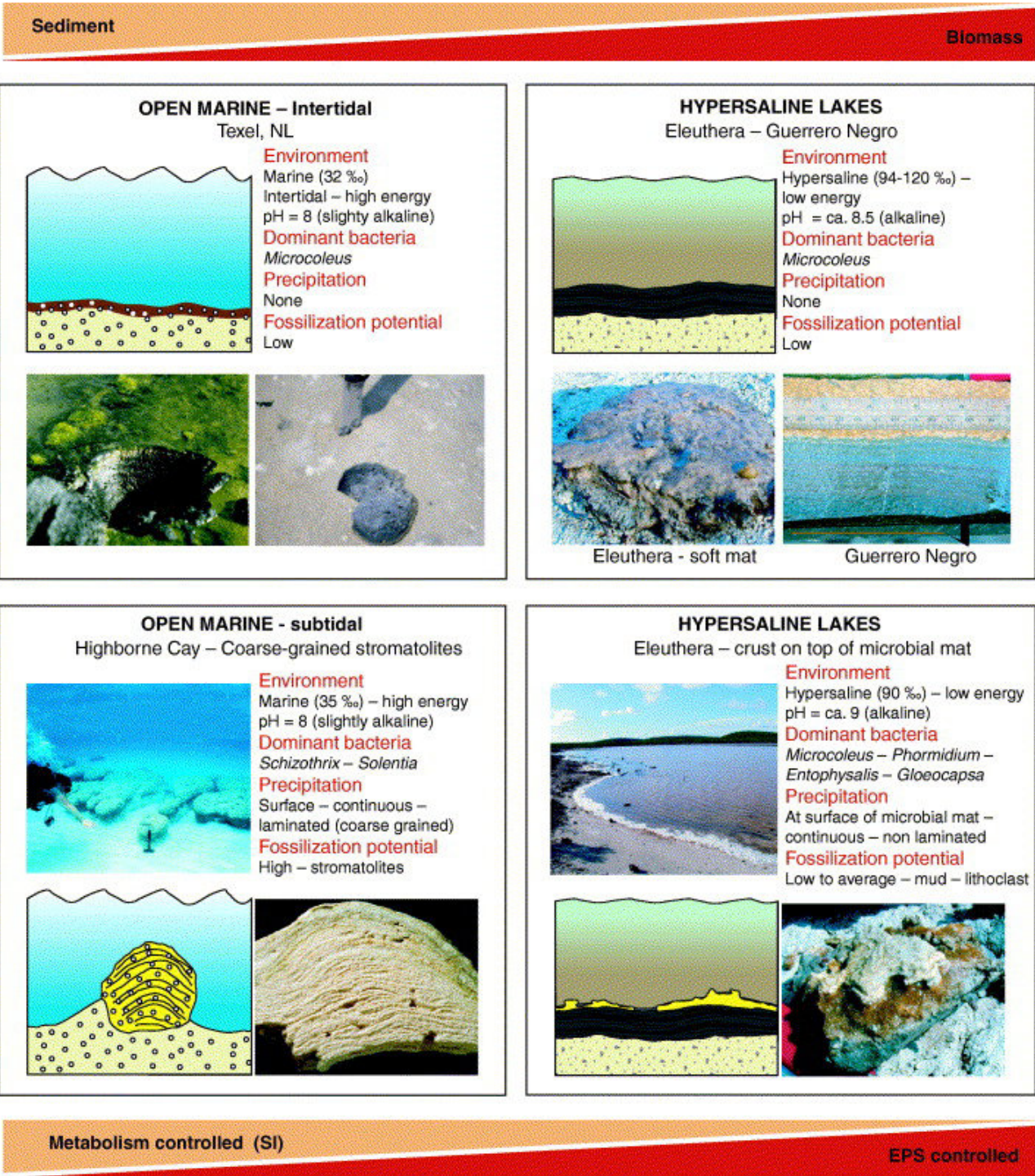
Micrococcus



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

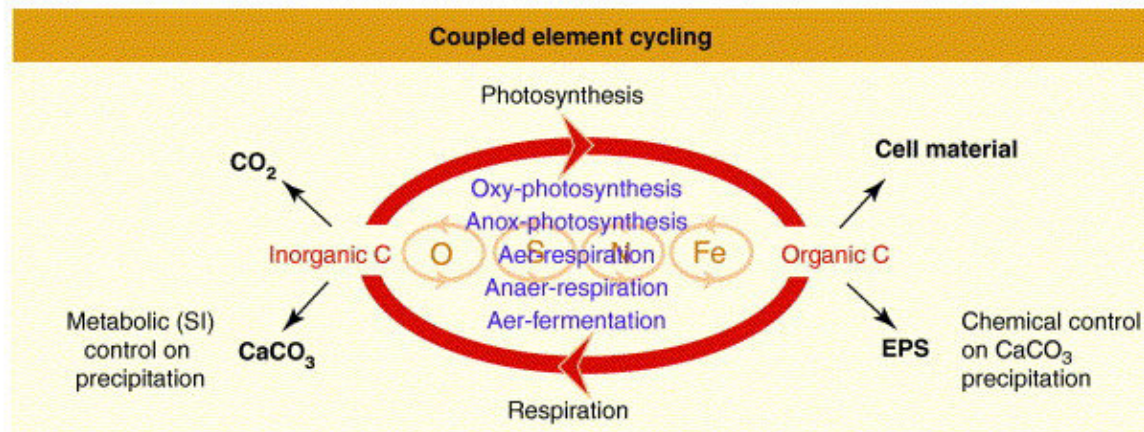
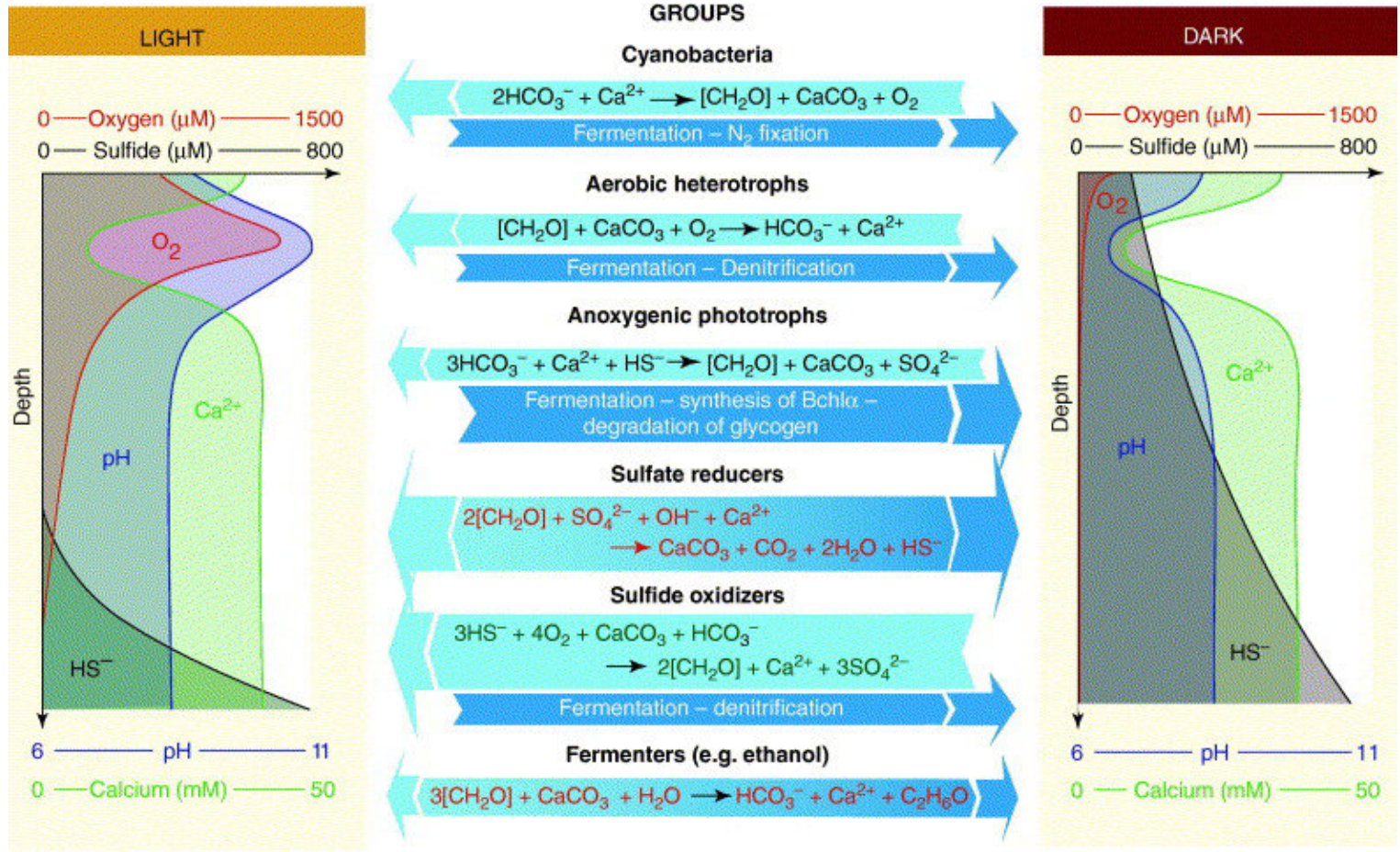


Voda jako stanoviště



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

Voda jako stanoviště



Voda jako stanoviště

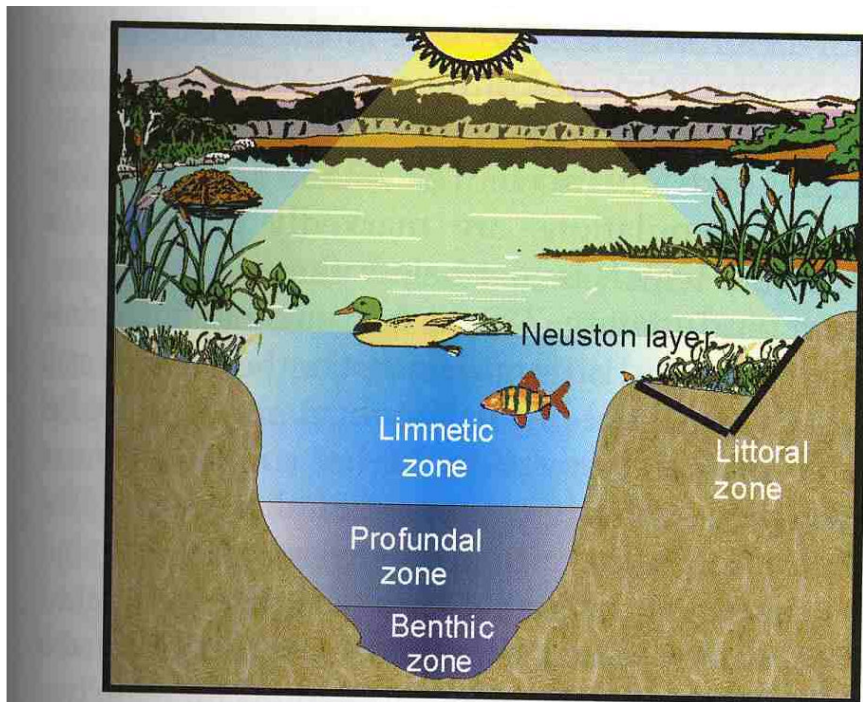


FIGURE 6.10 Schematic representation of a typical lake showing common designations based on sunlight. Other designations for zones are based on features such as temperature, oxygen concentration, and pH. However, the most common are those shown here primarily because of the controlling influence sunlight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

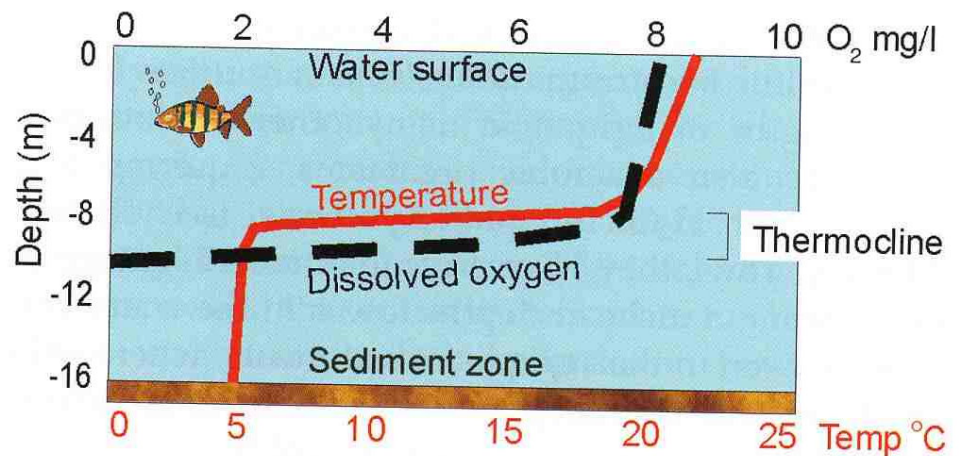
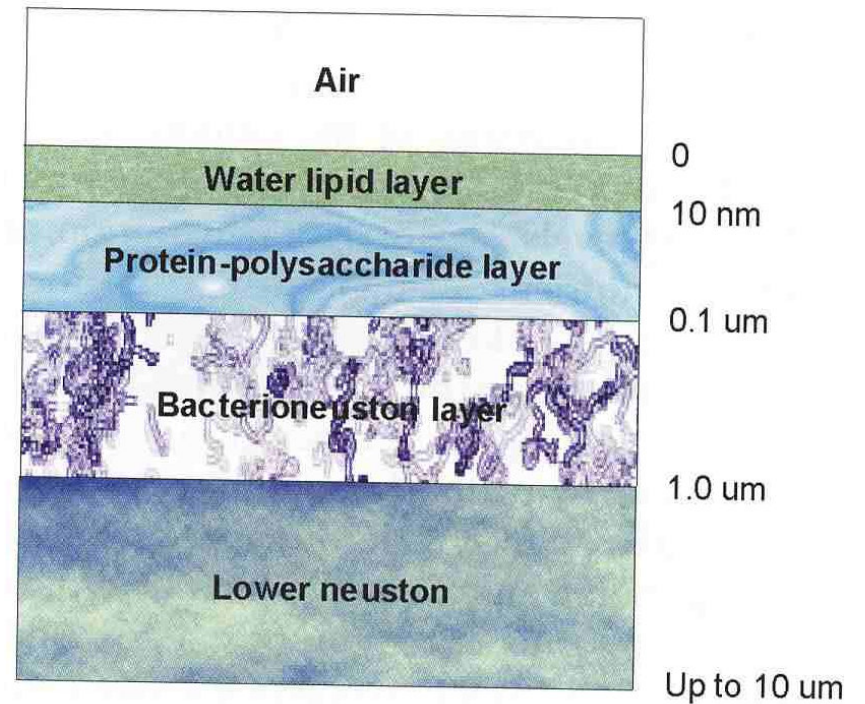


FIGURE 6.12 Idealized profiles of temperature and oxygen in a temperate region, eutrophic lake. Stratification is due to thermal warming of the upper layers in the summer months. Cooling of the upper layer in the fall and early winter breaks the mixing barrier and allows the sediment zone to be reoxygenated.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

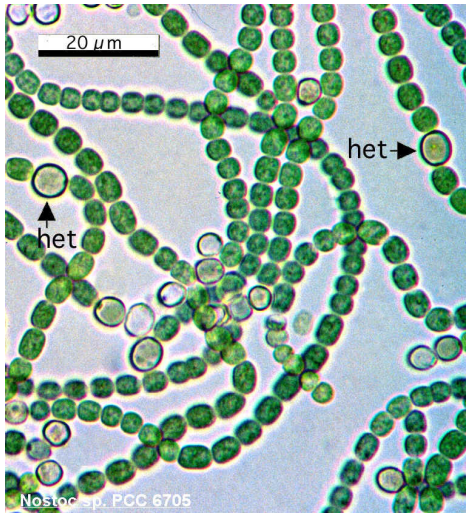
diferencované buňky - heterocysty – fixace N_2
- akinety – klidové stádium
- baeocyty- reprodukční funkce

Sinice a „vodní květ“

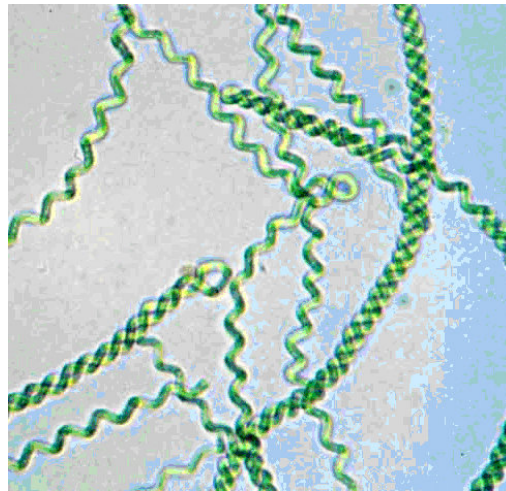
Pro rozvoj – fosfor, vyšší teplota+pH+živiny

Uvolňování cyanotoxinů!!!

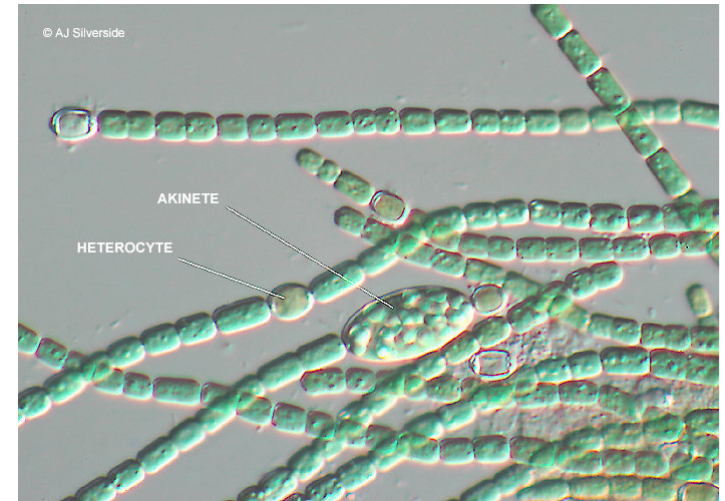




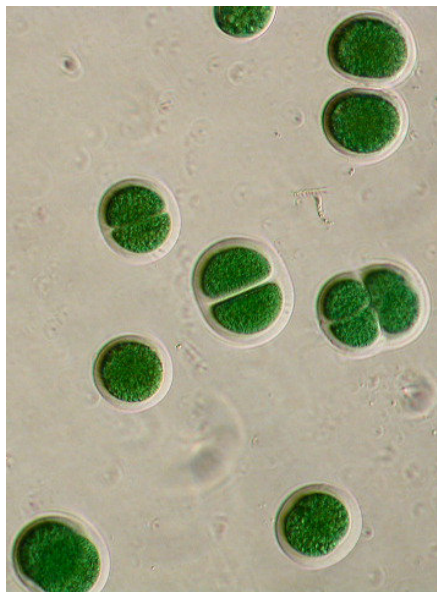
Nostoc



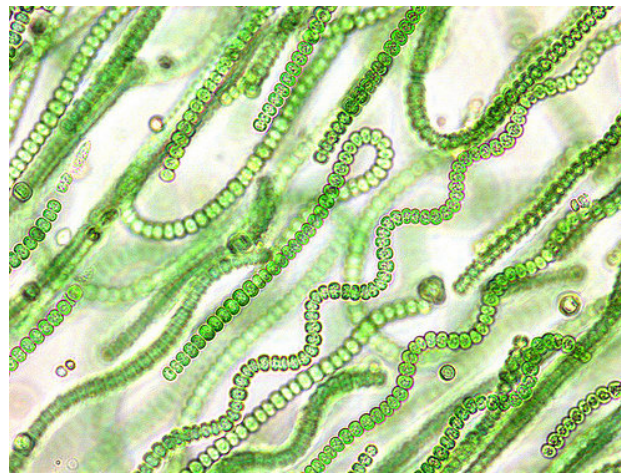
Spirulina = Arthrospira



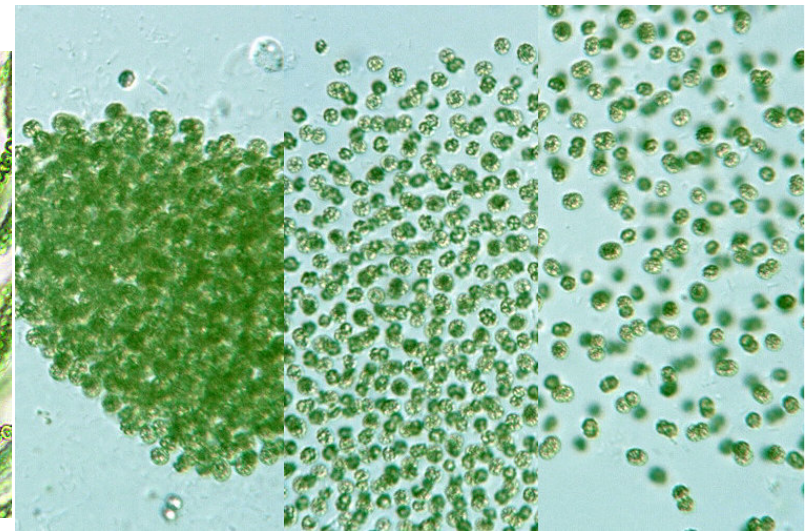
Anabaena



Chroococcus



Cyanobacterium



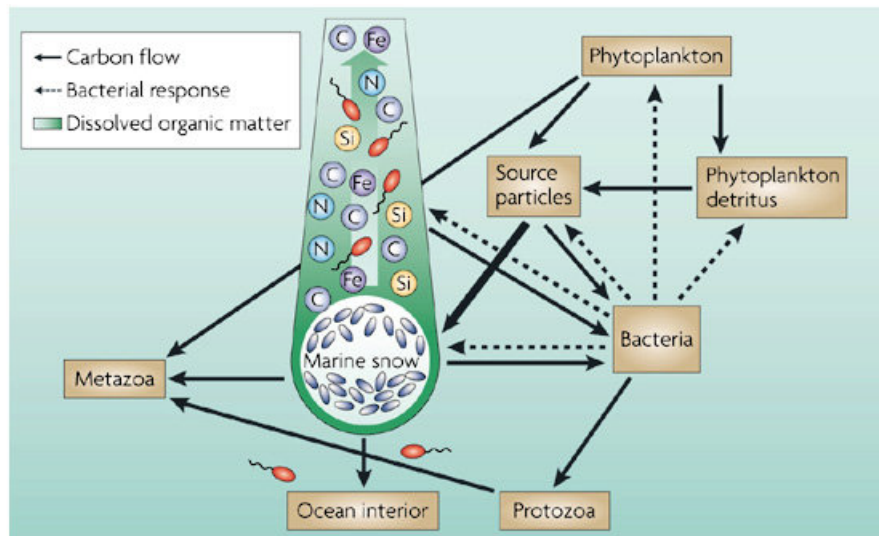
Microcystis

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

Moře a oceány

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

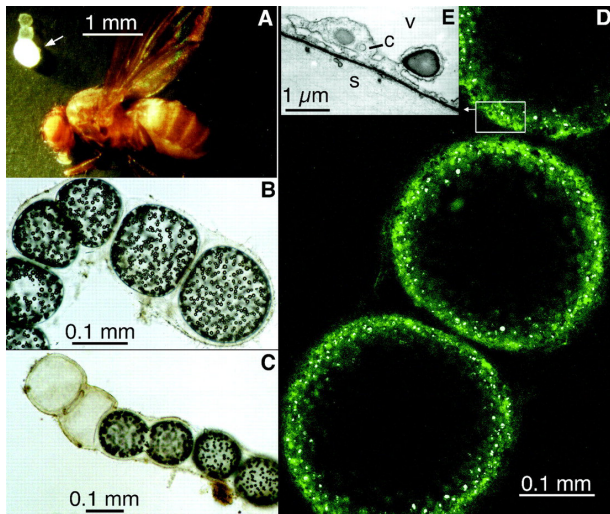




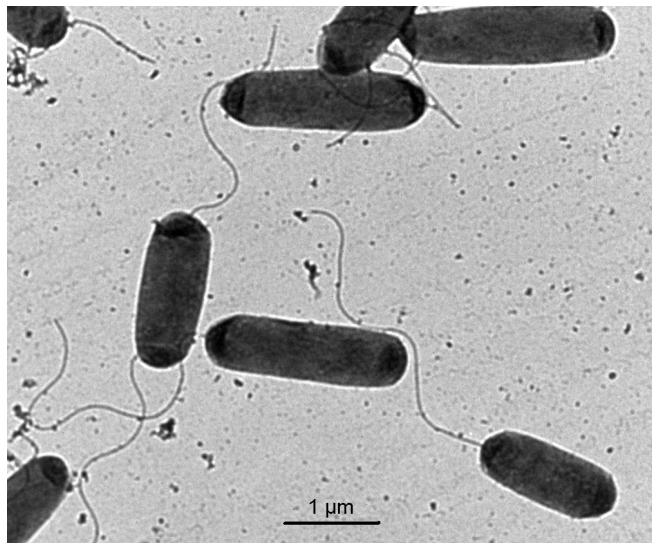
Shewanella



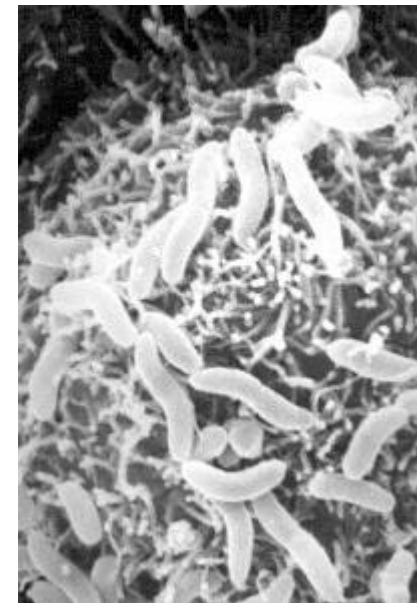
Vibrio



Thiomargarita namibiensis



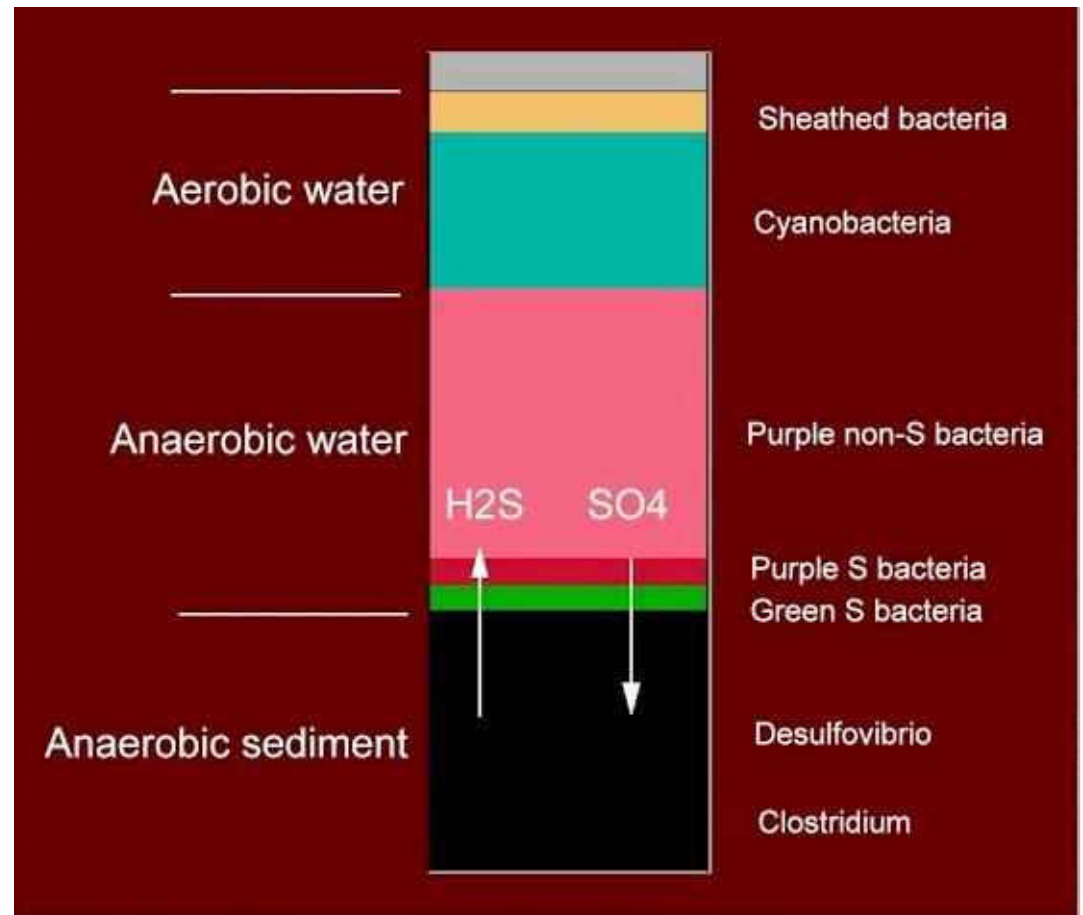
Marinobacter

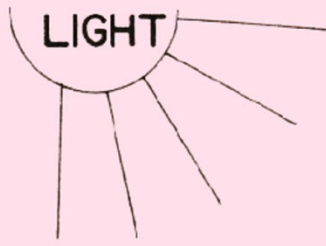


Colwellia

Winogradského sloupec

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



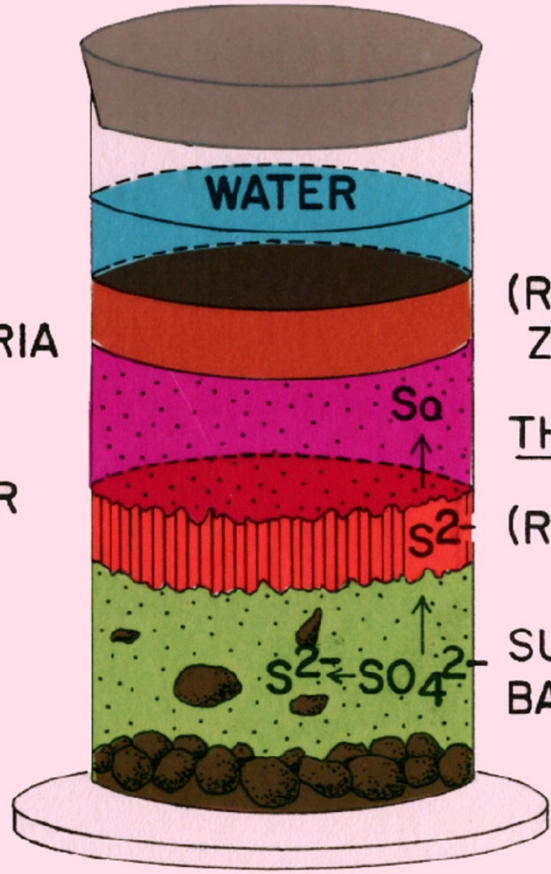


WINOGRADSKY COLUMN (SULFUR-METABOLIZING BACTERIA)

NONSULFUR
PURPLE BACTERIA

PURPLE SULFUR
BACTERIA

GREEN SULFUR
BACTERIA



(RUST-COLORED
ZONE)

THIOBACILLUS

(RED ZONE)

SULFATE-REDUCING
BACTERIA

GYPSUM ($CaSO$) + PLANT PARTS + MUD

Obecné znečištění:

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

Mezofilní – znečištění mikroflórou teplotokrevných 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)

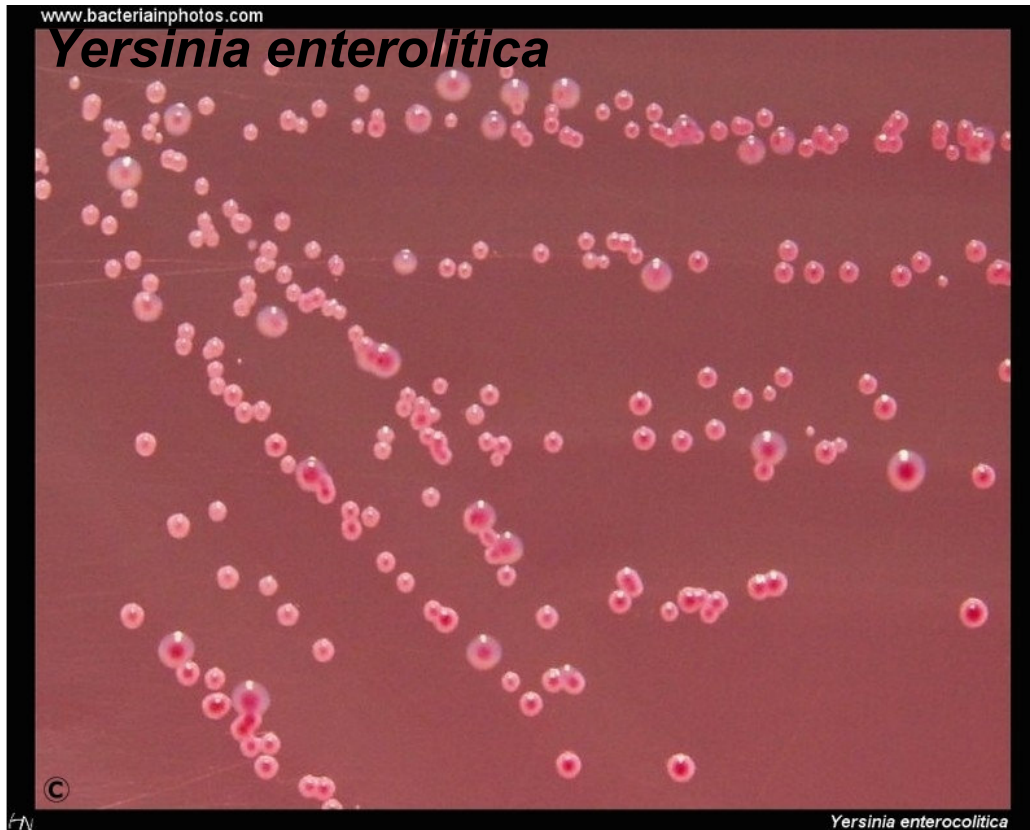
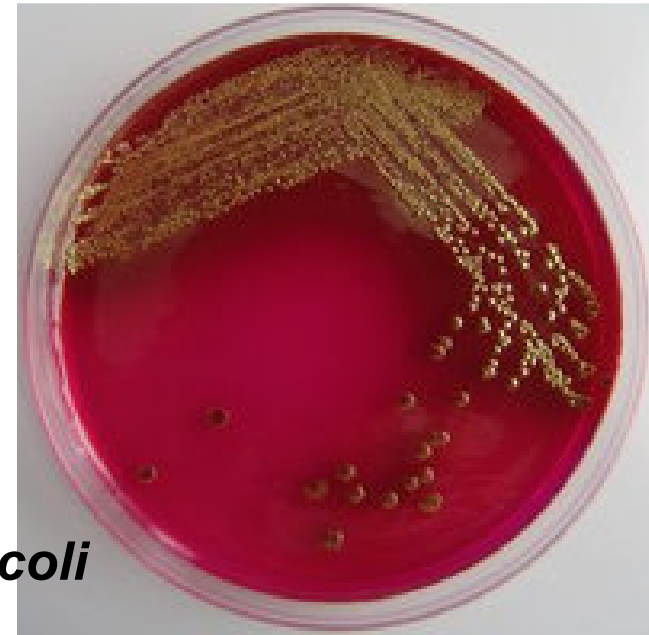
-azid sodný = selektivní činidlo pro enterokoky

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

-kultivace při 37°C

ENDO agar – bazický fuchsin eliminuje G+

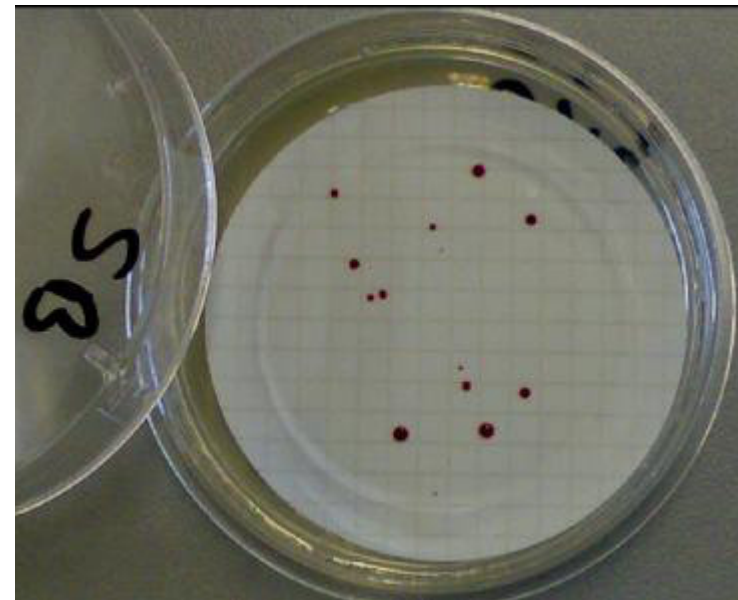
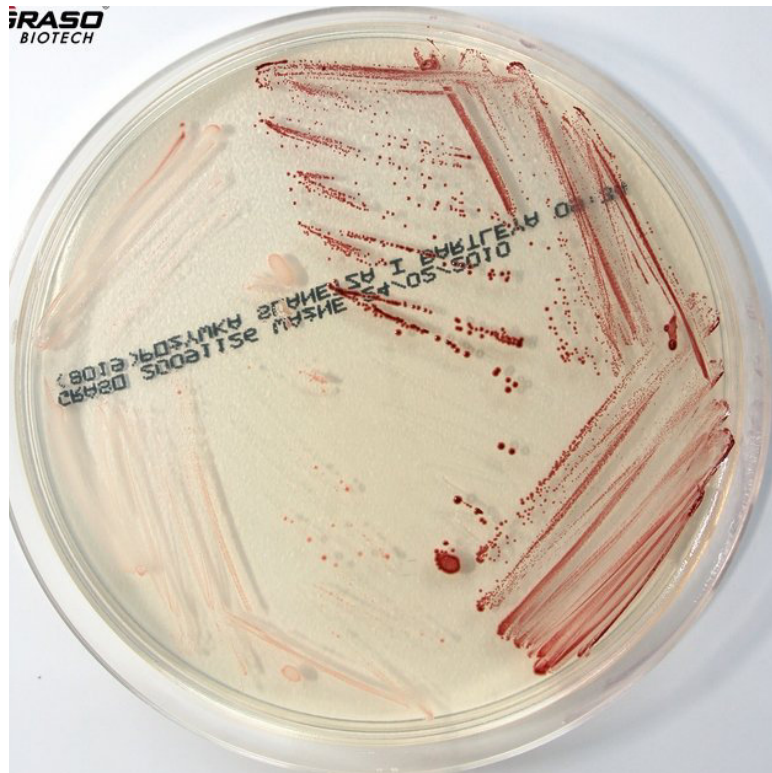
- kolonie koliformních bakterií zbarví červeně s kovovým leskem
- laktózu využijí koliformní bakterie (lac+) – Schiffovo činidlo (acetaldehydy)
- Laktózu neštěpící → růžové kolonie (obligátní patogeny)



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

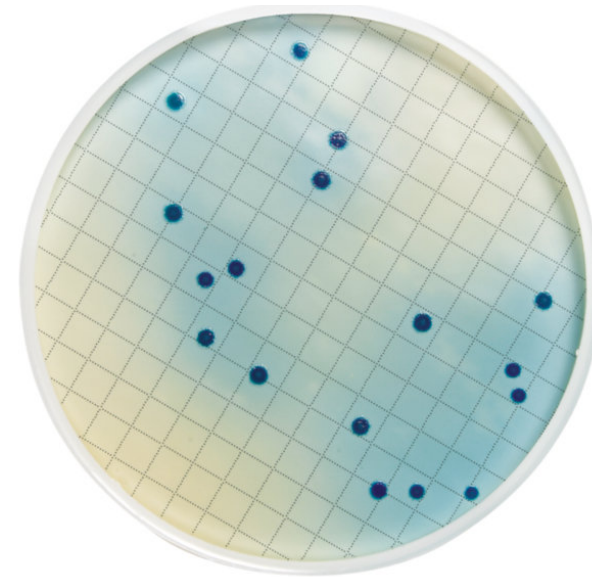
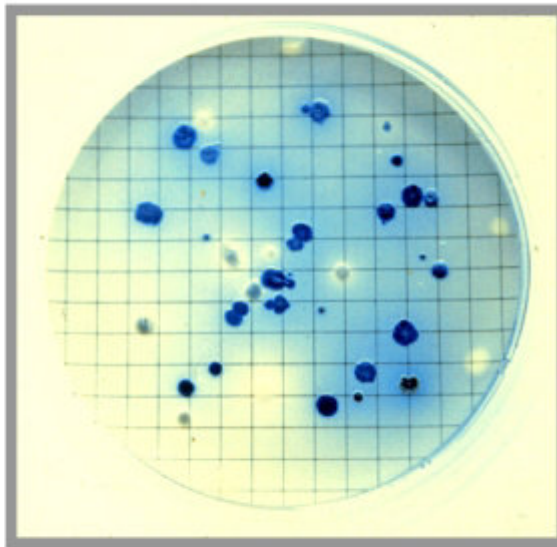
E. faecalis



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