



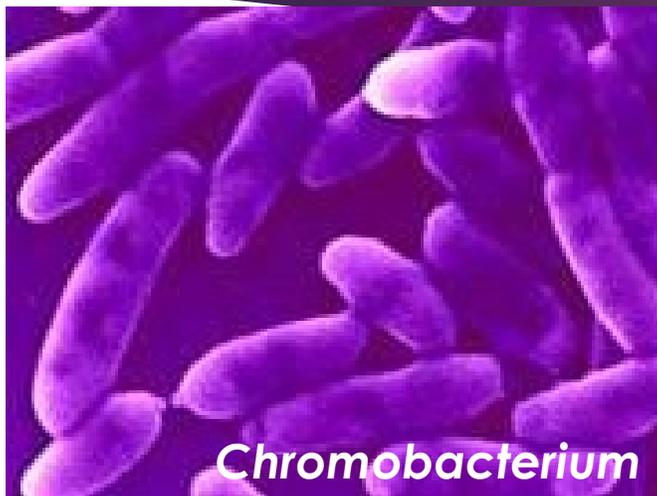
# Základní mikrobiologický rozbor vody

# Voda

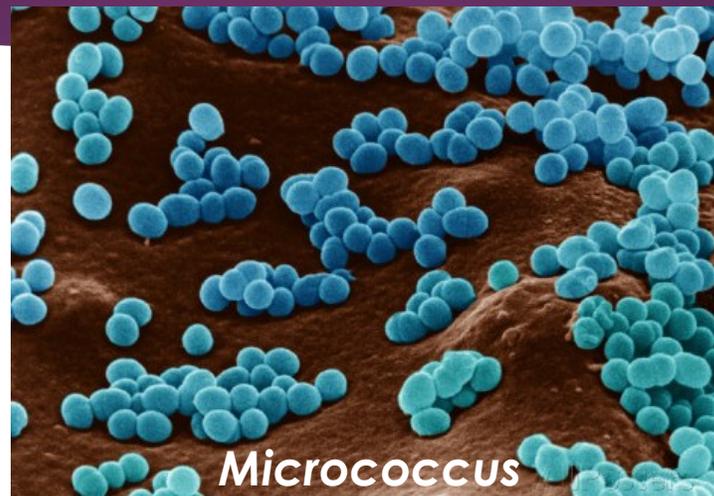
- ▶ **Přirozené stanoviště bakterií**
- ▶ Množství a zastoupení závisí na **přítomnosti kyslíku** a zdrojích **uhlíkaté a dusíkaté výživy**
- ▶ Ve vodě přítomné bakterie můžeme rozdělit do 3 skupin:
  - ▶ **Autochtonní vodní bakterie** – typické vodní bakterie
  - ▶ **Půdní bakterie** – dostávají se do vody splavováním půdy
  - ▶ **Sřevní bakterie** – ze střev člověka a zvířat, jen krátkodobě



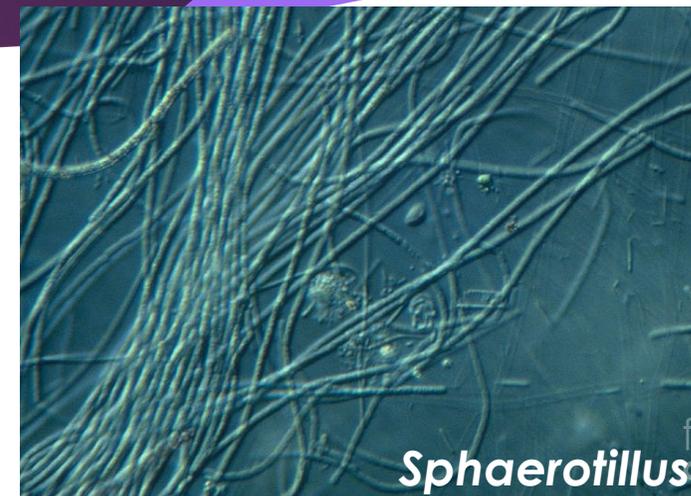
# Autochtónní vodní bakterie



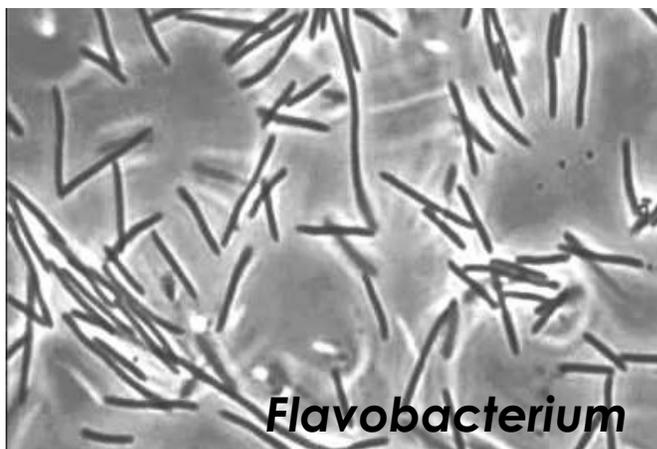
*Chromobacterium*



*Micrococcus*



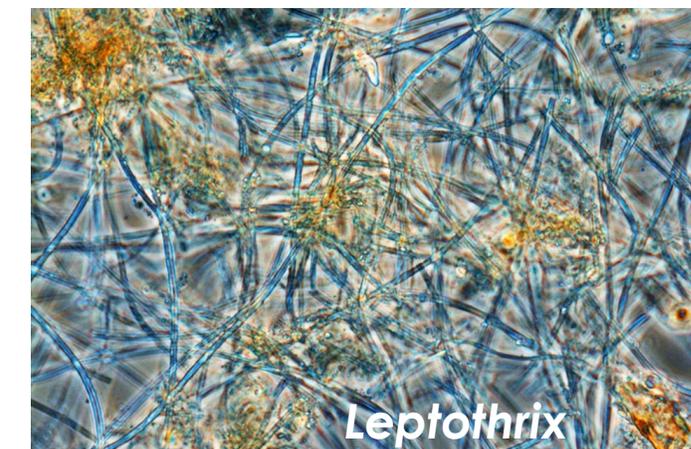
*Sphaerotillus*



*Flavobacterium*

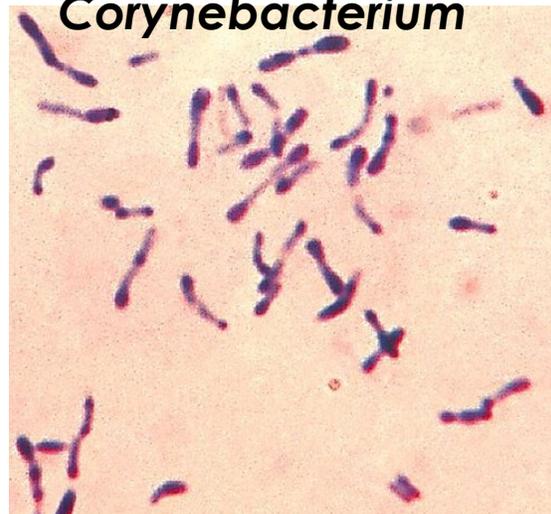
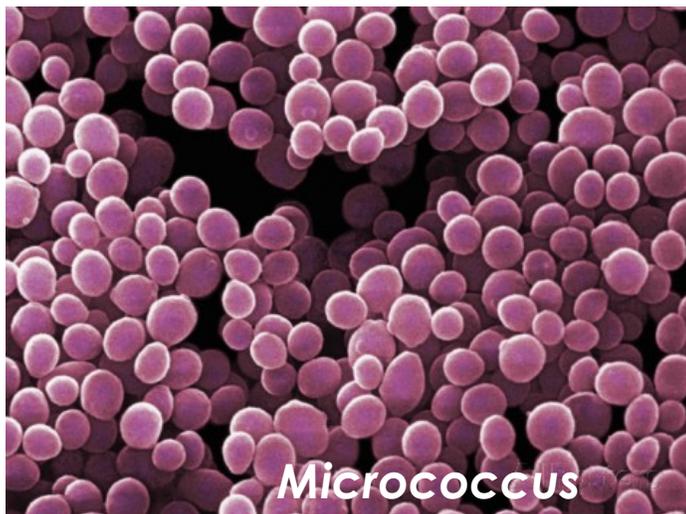
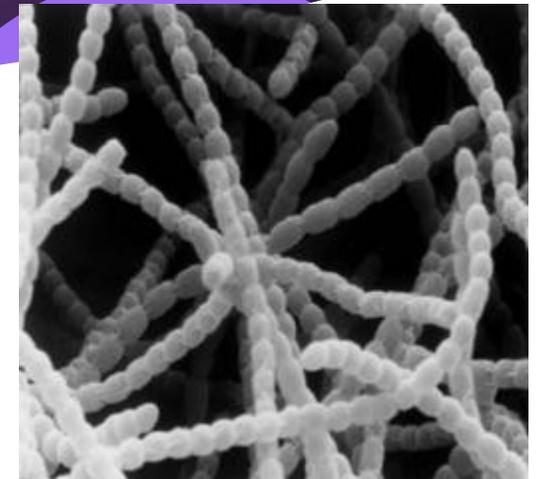


*Spirillum*



*Leptothrix*

# Půdní bakterie

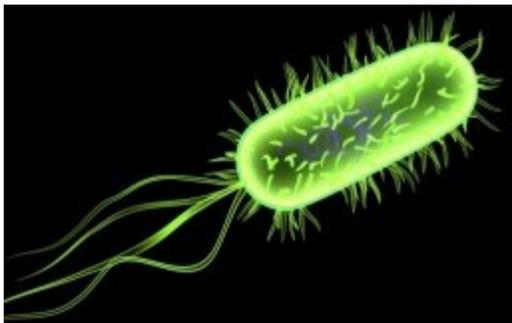


# Střevní bakterie

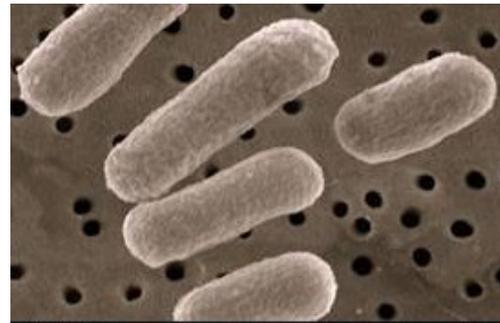
## čeleď *Enterobacteriaceae*



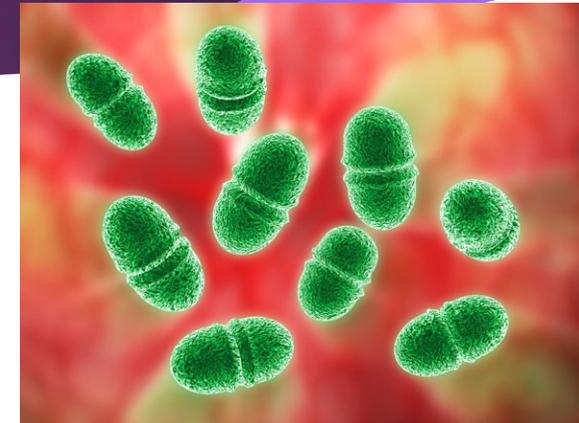
*Salmonella*



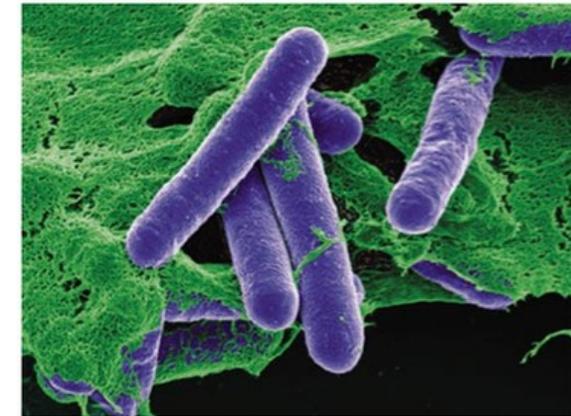
*E. coli*



„*Shigella*“



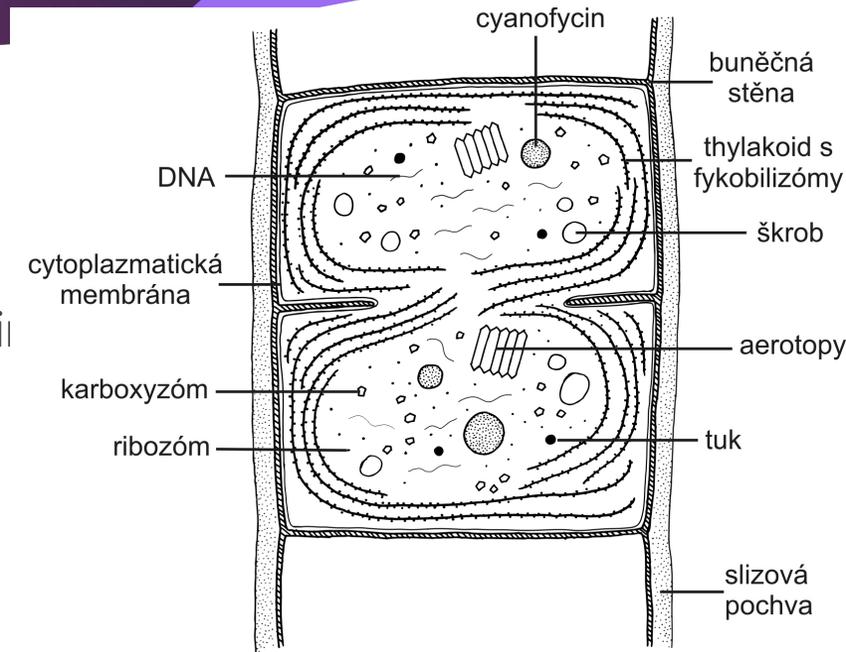
*Enterococcus faecalis*



*Clostridium*

# Sinice = Cyanobacteria

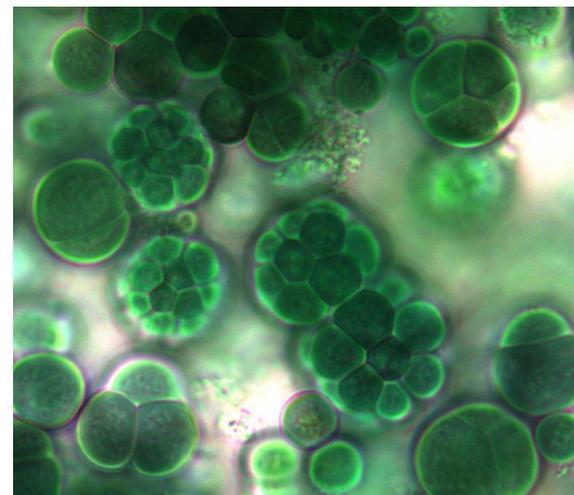
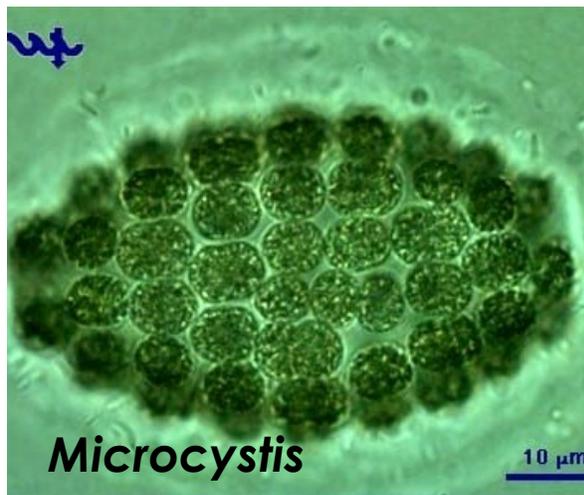
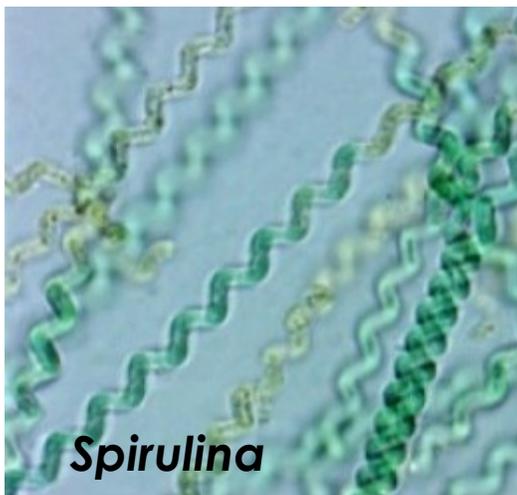
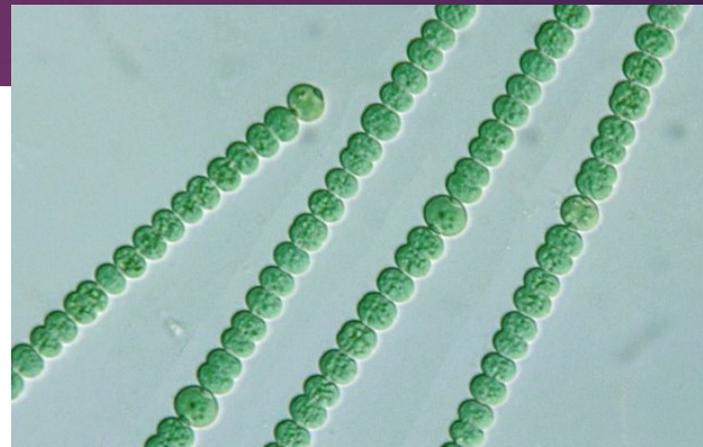
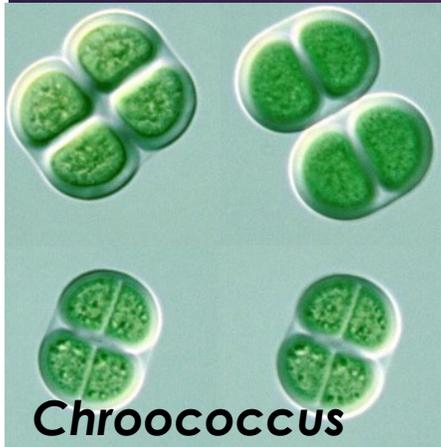
- ▶ Prokaryota, gramnegativní typ buněčné stěny
- ▶ Nejstarší **fotosyntetizující** organizmy (3,5 miliardy let), mají tylakoidy, na kterých jsou pigmenty, chlorofyl a fykobilini
- ▶ Schopnost přežít nepříznivé podmínky
- ▶ Vodní květ , toxiny



Cyanobacteria - stavba buňky. © Markéta Krautová

# Cyanobacteria

Anabaena

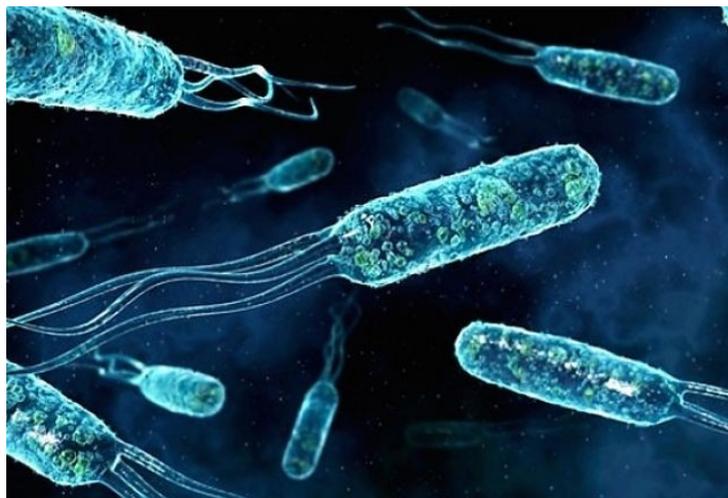


# Moře a oceány

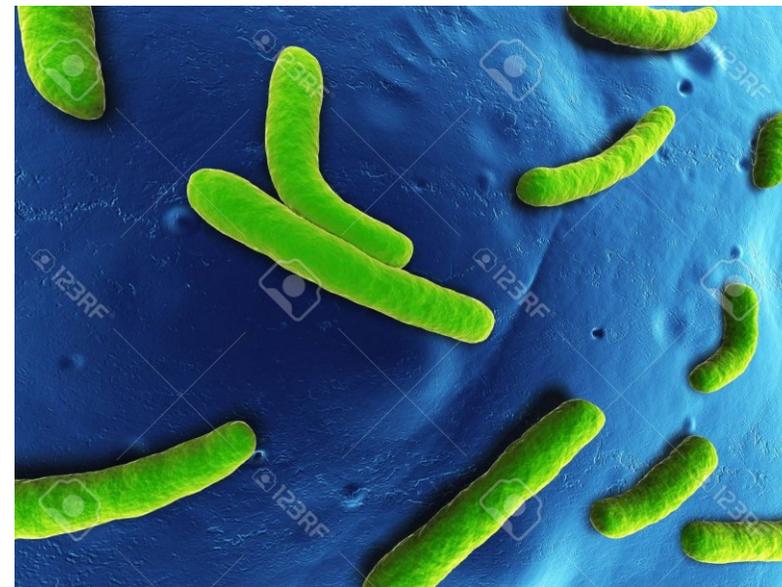
- ▶ Extrémofilové, tolerance k tlaku, soli, teplotě, součást planktonu



**Vibrio**



**Marinobacter**



**Aeromonas**

# Mikrobiologický rozbor vody

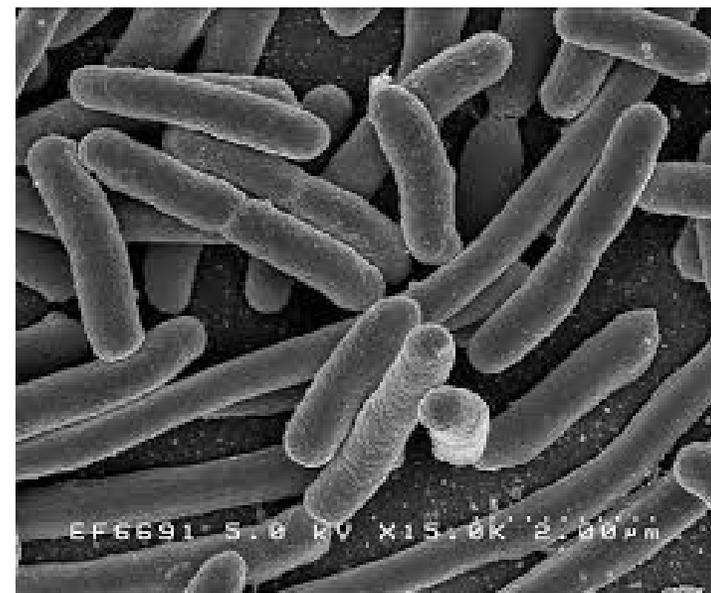
- ▶ Rutinní mikrobiologický rozbor vody **nemůže stanovit všechny přítomné mikroorganismy**, ani se neprovádí stanovení všech patogenních mikroorganismů
- ▶ Pro zjištění výskytu závadných bakterií se využívá stanovení **tzv. indikátorových skupin bakterií** – stanoví se bakterie stejného ekologického charakteru, které lze rychle a jednoduše stanovit
- ▶ Na indikátorové skupiny jsou zacílené **specifické testy**
- ▶ Rozeznáváme: **Koliformní bakterie, fekální koliformní bakterie, enterokoky, mezofilní bakterie, psychofilní bakterie**, bezbarví bičíkovci a další mrtvé a živé organizmy
- ▶ Pitná voda nesmí obsahovat první tři druhy bakterií

# Stanovení počtu indikátorů obecného znečištění

- ▶ **1. Psychofilní bakterie** – kultivace při 22 °C
- ▶ Růstové optimum bakterií – kolem 20 °C
- ▶ **Indikují přítomnost organických látek** rychle rozložitelných bakteriemi při nízkých teplotách
- ▶ Stanovují se u pitných vod, u povrchových v případě úpravy vody na pitnou
- ▶ Pouze velmi vysoký počet znamená přítomnost mnoha organických látek ve vodě
  
- ▶ **2. Mezofilních bakterií** – kultivace při 37 °C
- ▶ Jsou to aerobní bakterie rostoucí při 37 °C
- ▶ **Indikují znečištění mikroflórou** teplokrevných živočichů a člověka
- ▶ Je povolen pouze jejich nízký počet

# Stanovení indikátorů fekálního znečištění

- ▶ **Indikátory fekálního znečištění** – koliformní bakterie a enterokoky, bakterie vyskytující se ve střevě
- ▶ **Koliformní bakterie**
- ▶ Gramnegativní bakterie z čeledi ***Enterobacteriaceae***
- ▶ Jejich přítomnost je **důkazem znečištění fekáliemi**
- ▶ Při kultivaci na selektivně-diagnostických půdách **rozkládají laktózu**
- ▶ Většinou živné média s laktózou
- ▶ Zástupce: *Escherichia coli* (trávicí trakt teplokrevných živočichů), *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, „*Shigella*“
- ▶ V případě detekce, je třeba rozšířit rozbor o jejich stanovení



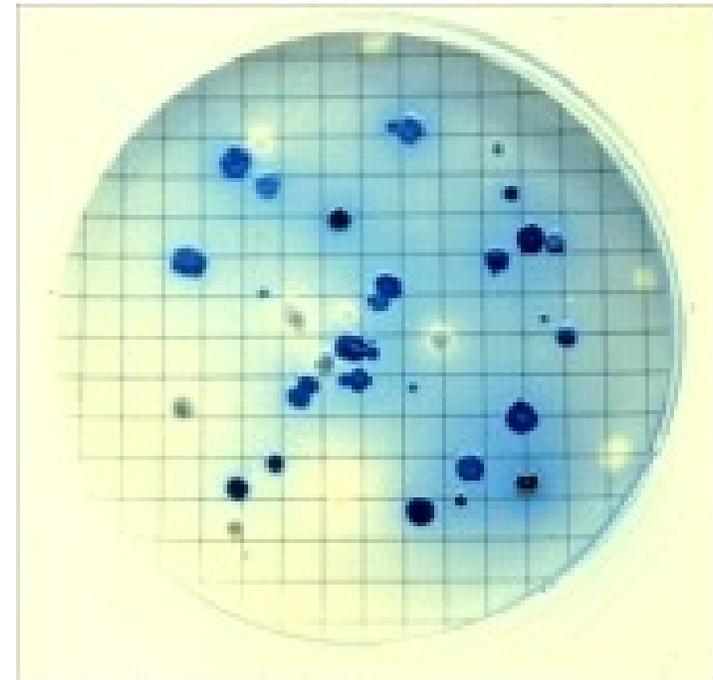
# Koliformní bakterie - stanovení

- ▶ **Endo agar**
- ▶ Selektivně diagnostické médium
- ▶ Rostou tu **jen G- bakterie**
- ▶ Bazický fuchsin eliminuje růst G+
- ▶ Shiffovo reagens indikuje **štěpení laktózy**
- ▶ Laktózapozitivní koliformní bakterie rostou **tmavorudě**, médium také zčervená
- ▶ Laktóza negativní jsou růžové až průhledné, nezahrnují se do výpočtu
- ▶ 37 °C



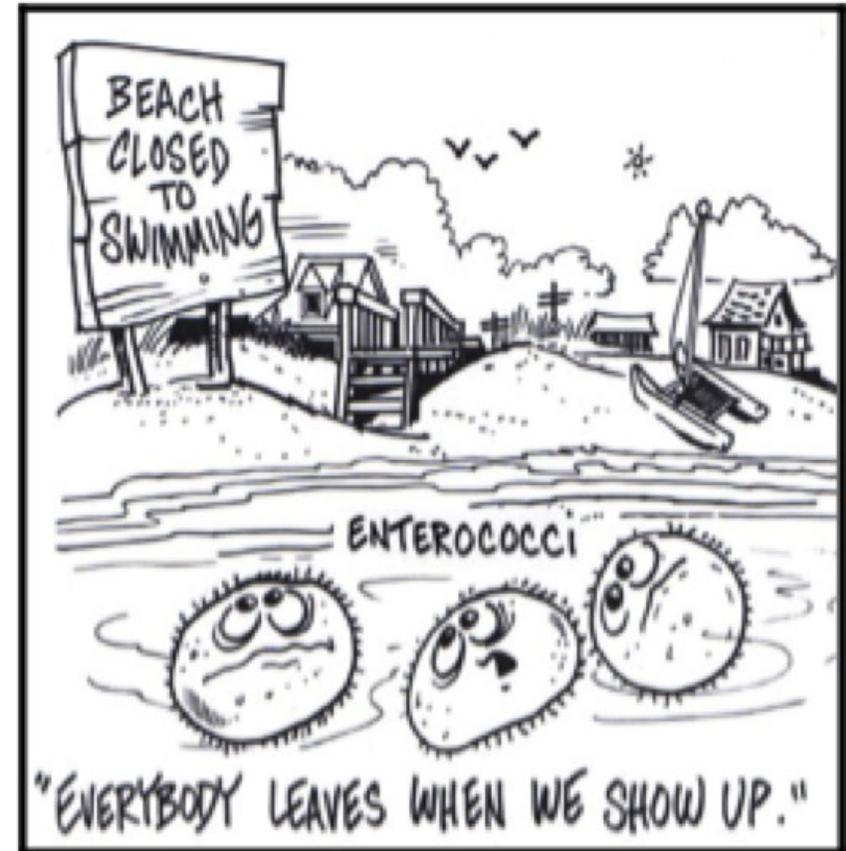
# Koliformní bakterie - stanovení

- ▶ **Teplotní test**
- ▶ Potvrdí **čerstvé fekální znečištění**
- ▶ Test při **44 °C** na **mFC** médiu **s laktózou**
- ▶ Laktóza pozitivní kolonie budou **fialové až tmavomodré**, negativní světlorůžové a šedé.



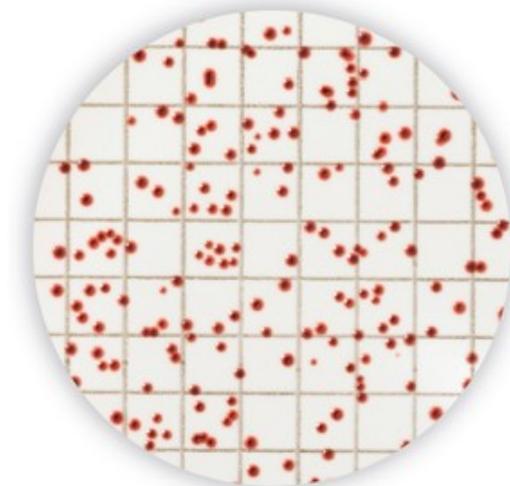
# Enterokoky

- ▶ Fakultativně anaerobní grampozitivní koky, vyskytující **se v trávicím traktu člověka a živočichů**
- ▶ Oproti koliformním jsou **více termorezistentní** a odolní vůči vplyvům prostředí
- ▶ Jsou **významný indikátor čerstvého fekálního znečištění**, především v pitných vodách
- ▶ *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*



# Enterokoky - stanovení

- ▶ Selektivní médium pro enterokoky: **Slanetz-Bartley agar** (azid sodný a tetrazolium chlorid).
- ▶ Počítáme **červené kolonie** nebo kolonie s červeným středem, nepočítáme bílé, bezbarevné a kolonie menší než 2 mm.
- ▶ Inkubujeme **48 h při 44 °C**, tím odlišíme enterokoky od streptokoků – enterokoky jsou termorezistentní

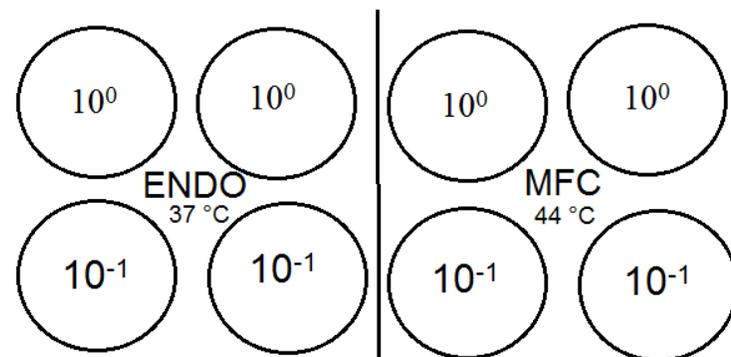
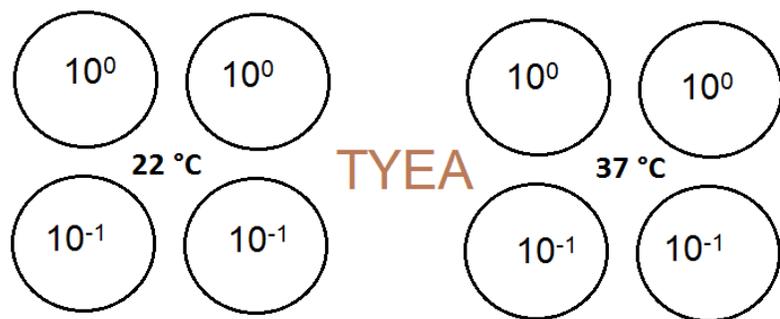


# Postup ve cvičení

- ▶ Stanovení celkového počtu bakterií (psychrofilních a mezofilních) = **obecné znečistění**
- ▶ Univerzální médium **TYEA** (trypton yeast extract agar)
- ▶ Stanovení indikátorových skupin bakterií = **fekální znečistění**
- ▶ Selektivní média **Endův agar, mFC agar, Slanetz-Bartley médium**

# Postup

- ▶ **Pitná voda** - předpokládáme mnohem nižší zastoupení indikátorových skupin bakterií, proto pracujeme s **neředěným** vzorkem a s **ředěním  $10^{-1}$**  (500  $\mu$ l a 4500  $\mu$ l)
- ▶ 8 misek TYEA agar, 4 misky Endo, 4 misky mFC
- ▶ **Povrchová voda** - očekáváme tu více bakterií – pracujeme s ředěním  **$10^{-1}$  a  $10^{-2}$**
- ▶ 8 misek TYEA agar , 4 misky Endo, 4 misky mFC, 1 miska SB



▶ **Pitná voda: (neředěná + ředění  $10^{-1}$  )**

- ▶ Do 4 misek (2 misky 22 °C, 2 misky 37 °C) pipetovat 1 ml **neředěné** vody a zalét **TYEA agarem**
- ▶ Do 4 misek (2 misky 22 °C, 2 misky 37 °C) pipetovat 1 ml **ředěné** vody a zalét **TYEA agarem**
- ▶ **Endo agar:** 100  $\mu$ l **neředěné** (2 misky) a 100  $\mu$ l **ředěné** (2 misky) vody na agar, rozhokejkovat
- ▶ **mFC agar:** 100  $\mu$ l **neředěné** (2 misky) a 100  $\mu$ l **ředěné** (2 misky) vody na agar, rozhokejkovat

▶ **Povrchová voda ( $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  )**

- ▶ Do 4 misek (2 misky 22 °C, 2 misky 37 °C) napipetovat 1 ml  **$10^{-1}$**  vody a zalét **TYEA agarem**
- ▶ Do 4 misek (2 misky 22 °C, 2 misky 37 °C) napipetovat 1 ml  **$10^{-2}$**  vody a zalét **TYEA agarem**
- ▶ **Endo agar:** 100  $\mu$ l  **$10^{-1}$**  (2 misky) a 100  $\mu$ l  **$10^{-2}$**  (2 misky) vody na agar, rozhokejkovat
- ▶ **mFC agar:** 100  $\mu$ l  **$10^{-1}$**  (2 misky) a 100  $\mu$ l  **$10^{-2}$**  (2 misky) vody na agar, rozhokejkovat
- ▶ **SB agar:** profiltrovat vodu, položit filtr na SB médium

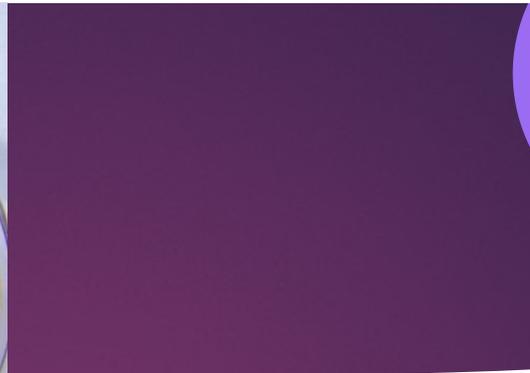
- ▶ Kultivace: TYEA na 22 °C a 37 °C, Endo 37 °C, mFC 44 °C, SB 44 °C

# Hodnocení

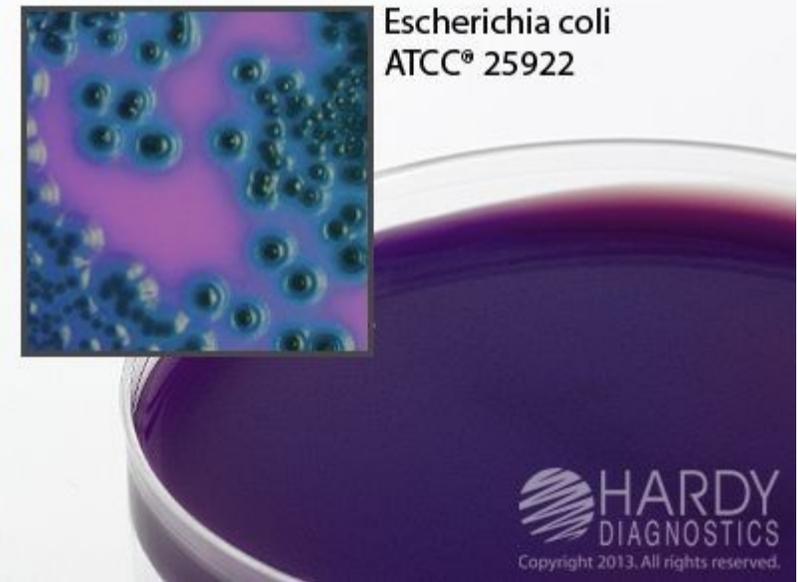
- ▶ Počítání kolonií na 1 ml – pozor na přepoččet!!! (0,1 x 1 ml na misku!!!)
- ▶ Enterokoky v pitné vodě přepočítat na 100 ml
  
- ▶ **Voda pro hromadné zásobování (více než 100 osob) nesmí obsahovat více než:**
- ▶ 200 psychrofilních a 20 mezofilních bakterií na 1 ml
- ▶ 0 koliformních či enterokoků 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



Endo – počítat tie tmavo červené/tmavo ružové alebo s kovovým leskom, nie svetlo ružové



mFC – počítat modré kolónie



TYEA – spočítat všetky kolónie

SB – červené kolónie = enterokoky

