Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Vliv časového oddálení zpracování vzorku na výsledky mikrobiologických testů

Bakalářská práce

Autor: Ondřej, Probošt

Studijní program: (B0511A030001) Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Vedoucí práce: RNDr., Jakub, Toman Ph.D.

Odborný konzultant: RNDr. Václav, Koza, Povodí Labe, státní podnik

Hradec Králové 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne Ondřej Probošt

Poděkování

Rád bych poděkoval panu RNDr. Jakubu Tomanovi, Ph.D. za ochotu a pomoc při vytváření bakalářské práce. Dále patří velké díky panu RNDr. Václavu Kozovi a Ivě Havránkové ze státního podniku Povodí Labe za cenné rady a pomoc při pracích v laboratoři. Dále děkuji státnímu podniku Povodí Labe za umožnění využívání jejich laboratoří, materiálu a vybavení.

Anotace

Probošt, O. *Vliv časového oddálení zpracování vzorku na výsledky mikrobiologických testů*. Hradec Králové, 2024. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Jakub Toman. 55 s.

Cílem této bakalářské práce je provedení analýz vybraných povrchových vod odebíraných na řece Labi na území města Hradec králové a zjištění míry vlivu časového oddalování zpracování vzorku na výsledky vybraných mikrobiologických testů. K provádění testů byla používána Endova půda. Dále jsou v práci zpracovány abiotické vlivy prostředí na mikroorganismy, mezi které se řadí vlivy teploty, pH, slunečního záření, množství kyslíku a tlaku, protože všechny tyto vlivy mohou ovlivňovat schopnost přežití mikroorganismů nacházejících se ve vodě. Dále práce obsahuje obecný popis povrchových a pitných vod a rozdělení základních kultivačních a nekultivačních metod sloužících k detekci a stanovení mikroorganismů.

Klíčová slova

Escherichia coli, koliformní bakterie, Endo agar, povrchová voda

Annotation

Probošt, O. *The effect of sample storage time on the result of microbiological tests.* Hradec Králové, 2024. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Suprevisor RNDr. Jakub Toman. 55 p.

The aim of this bachelor thesis is to perform analyses of selected surface waters sampled from the Elbe River in the territory of the city of Hradec Králové and to determine the extent of the influence of the time delay in sample processing on the results of selected microbiological tests. Endo soil was used for the tests. Furthermore, the work discusses the abiotic influences of the environment on microorganisms, including the effects of temperature, pH, sunlight, oxygen levels, and pressure, as all these factors can affect the survival ability of microorganisms found in water. Additionally, the work includes a general description of surface and drinking waters and the classification of basic cultivation and non-cultivation methods used for the detection and determination of microorganisms.

Keywords

Escherichia coli, Coliform bacteria, Endo Agar, surface water

Obsah

Úvod 10

1 Indikátory fekálního znečištění 11

1.1 Charakteristika *E. coli* 11

1.1.1 Onemocnění močových cest způsobené *E.coli* 12

1.1.2 Střevní infekce způsobené *E. coli* 12

1.2 Charakteristika koliformních bakterií 14

1.3 Vliv prostředí na mikroorganismy ve vodě 14

1.3.1 Vliv teploty na mikroorganismy 15

1.3.2 Vliv teploty při skladování a transportu 15

1.3.3 Vliv molekulárního kyslíku 16

1.3.4 Vliv slunečního záření na kolifromní bakterie a *E. coli* 17

1.3.5 Vliv pH na mikroorganismy 18

1.3.6 Vliv osmotického tlaku 19

1.3.7 Vliv tlaku 20

1.4 Dělení vod 20

1.4.1 Povrchové vody 20

1.4.2 Pitná voda 21

1.5 Mikrobiologický rozbor vody 22

1.6 Kultivační metody a jejich význam 23

1.6.1 Selektivní půdy 23

1.6.2 Diagnostické půdy 23

1.6.3 Selektivně diagnostické půdy 23

1.6.4 Transportní půdy 24

1.6.5 Tekuté půdy 24

1.6.6 Pevné půdy 24

1.6.6.1 Přímý výsev do kultivačního média 24

1.6.6.2 Přímý výsev na povrch kultivačního média 25
1.6.6.3 Metoda membránových filtrů 25
1.7 Konkrétní příklady agarů a metoda Colilert Quanti-Tray 25
1.7.1 Endo agar 25
1.7.2 CCA agar 26
1.7.3 m-FC agar 27
1.7.4 Metoda Colilert Quanti-Tray 27
1.8 Nekultivační metody 28
1.8.1 Metoda MALDI – TOF 28
1.8.2 Průtoková cytometrie 29
1.8.3 Polymerásová řetězová reakce 31
1.8.4 Elektroforéza 33
1.8.5 Fluorescenční *in situ* hybridizace 34
2 Metodika 36
2.1 Použité přístrojové a laboratorní vybavení 36
2.2 Použité chemikálie 36
2.3 Použité programy 37
2.4 Princip metody 37
3 Pracovní postup 38
3.1 Odebrání, doprava a skladování vzorků 38
3.2 Zpracování vzorku 38
3.3 Vyhodnocení vzorku 39
3.4 Likvidace vzorku 39
4 Výsledky 41
5. Diskuze 43
Závěr 44

Seznam zkratek

E. coli	*Escherichia coli*
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RT-PCR	Real-time PCR
m-FC agar	membrane fecal coliform agar
MALDI TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
CCA agar	chromogenic coliform agar

Terminologický slovník

Agar	živné médium
Matrice	makromolekula sloužící jako předloha při biosyntéze makromolekuly nové
Patogen	biologický činitel, který může zapříčinit onemocnění hostitele
Mikroorganismus	organismus, který je pozorovatelný pouze mikroskopicky
Aerobní organismus	organismus, který pro svůj metabolismus vyžaduje kyslík jako konečný akceptor elektronů
Anaerobní organismus	organismus, který pro svůj metabolismus nevyžaduje kyslík jako konečný akceptor elektronů
In situ	na svém původním místě

Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá výskytem koliformních bakterií a *Escherichia coli* v povrchových vodách a zdravotními problémy, které mohou způsobovat vlivy okolního prostředí na jejich životnost a možnostmi diagnostiky těchto bakterií.

Bakterie *Escherichia coli* patří v dnešní době mezi nejvíce studované mikroorganismy. Ačkoliv tomu tak v minulých letech nebylo, dnes je tento rod bakterií považován za nejdůležitější indikátory znečištění povrchových vod (Häusler, 1995). Ačkoliv je tato bakterie při výskytu ve střevní mikroflóře člověku většinou neškodná, při výskytu mimo tuto oblast může způsobovat velmi vážná onemocnění. Tato onemocnění jsou následně přenosná z kontaminované vody, z potravin nebo kontaktem s infikovaným člověkem či zvířetem (Hurych et Štícha, 2021).

Z důvodu přesné informace o mikrobiologickém osídlení vody se provádí mikrobiologické rozbory vody. Nejčastěji využívaným rozborem je rozbor pomocí kultivačních metody, kdy pomocí půd s přesným obsahem živin můžeme zkoumat dané mikroorganismy (Häusler, 1994). K detekci *E. coli a* koliformních bakterií se v praxi nejčastěji využívají metody m-FC agaru, Endova agaru a Colilert Quanti-Tray.

Cílem této práce je stanovit, jaký vliv má délka doby a způsob uchovávání odebraných vzorků vody na výsledný počet vykultivovaných kolonií bakterií druhu *E. coli* a dalších koliformních bakterií. Testy byly prováděny metodou přímého výsevu na povrch Endo agaru v laboratořích státního podniku Povodí Labe.

1 Indikátory fekálního znečištění

Organismy, které se používají jako ukazatele fekálního znečištění by měly splňovat několik kritérií. Měly by být ve vysokém počtu přítomny v exkrementech člověka a teplokrevných živočichů. Ve vodě by se neměly množit, měly by být snadno stanovitelné a schopny vydržet ve vodě relativně dlouhou dobu. Mezi indikátory fekálního znečištění řadíme takové bakterie, jejichž přítomnost může indikovat kontaminaci střevními patogeny (například patogenní *Escherichia coli*, salmonely a shigely) (Häusler, 1995; Tortorello, 2003). Vhodnost využití těchto indikátorů je předmětem diskuse. Například dle Noble et al. (2003) použití intestinálních enterokoků by mohlo být důvodem k častějším uzavírkám v přímořských oblastech, protože hodnoty těchto bakterií zde přesahují hygienické normy v častější míře než například koliformní bakterie a *E. coli.* Dle dalších studií fekálního znečištění vod byly jako nejspolehlivějšími ukazateli zvoleny koliformní bakterie, ale vzhledem k tomu, že ne všechny koliformní bakterie jsou původem ze střev teplokrevných živočichů, bylo navrženo přidání dalších indikátorů (*E. coli*, intestinální enterokoky a termotolerantní koliformní bakterie) (Pitter, 1999; Atherholt et al., 2003). Podle českého zákoníku se v dnešní době mezi indikátory fekálního znečištění řadí *Escherichia coli*, koliformní bakterie, termotolerantní koliformní bakterie, intestinální enterokoky a *Clostridium perfingens* (ČSN 75 7221, 2017).

1.1 Charakteristika *E. coli*

E. coli byla poprvé objevena a popsána německým lékařem – pediatrem a bakteriologem Theodorem Escherichem v roce 1885. Izolována byla z dětského výkalu a prvně byla pojmenována *Bacterium coli commune* (Ruiz et Sihavy, 2022). Jedná se o fakultativně anaerobní tyčinku. Tato bakterie se vyskytuje v tlustém střevě člověka a teplokrevných živočichů jako komenzál. V současné době slouží jako indikátor fekálního znečištění vnějšího prostředí. *E. coli* může způsobovat širokou škálu onemocnění. Nejen, že všechny kmeny mohou způsobovat sekundární infekce, které mohou vyvolávat průjmy a infekce močového ústrojí, ale některé kmeny této bakterie jsou i primárními patogeny. Dnes je největší pozornost věnována kmenům, které produkují verocytotoxiny. Celosvětově nejrozšířenějším patogenem z této skupiny je sérotyp *E. coli* O157:H7, který se vyskytuje hlavně v trávicím traktu skotu.

Přenos může být způsoben například nedostatečně tepelně upraveným hovězím masem. V nedávné době se však prokázalo, že pro přenos může být nebezpečná i pitná a užitková voda znečištěná fekáliemi. První prokázanou epidemií byla epidemie v USA v roce 1982, další epidemie propukla v roce 2011 v Německu s 54 úmrtími (Baudišová, 2017; Hurych et Štícha, 2021).

Morfologicky se jedná a tyčinku netvořící spory. Pohyb provádí pomocí peritrichálních bičíků, které jsou rozesety po celém jejím povrchu. U některých druhů je také možné nalézt fimbrie sloužící k lepšímu přichycení na hostitelskou buňku. Rozměry jsou zhruba dva až tři mikrometry na délku a půl mikrometru na šířku. Některé dokážou vytvářet krátké řetězce, ale vyskytují se spíše solitérně (Hurych et Štícha, 2021).

1.1.1 Onemocnění močových cest způsobené *E.coli*

Až 90 % případů infekcí močových cest je vyvolání bakteriemi *E. coli*, těmito infekcemi trpí zejména ženy. Podtyp bakterií, které takto napadají močové cesty se označují jako uropatogenní. Buňky *E. coli* jsou takto úspěšné díky několika specifickým faktorům virulence, adhezinům a invazinům. Adheziny usnadňují přilnavost buněk k epitelům močových cest a také její perzistenci v močových cestách po močení. Invaziny slouží bakteriím k proniknutí do intracelulárního prostoru močových cest, kde jsou chráněny před přítomností antibiotik. Některé uropatogenní bakterie jsou schopny vytvářet takzvaná spící ložiska v bazálních vrstvách epiteliální výstelky. Tato spící ložiska zde přežívají i po léčbě a jsou schopny vyvolávat reinfekci. K léčbě infekce močových cest se využívají antibiotika. Alternativní léčebné kúry využívají D-manózu, bakteriální lyzáty či brusinky (Kladenský 2010; Rutar, 2019).

1.1.2 Střevní infekce způsobené *E. coli*

Onemocnění trávícího traktu jsou způsobovány různými kmeny *E. coli*. Mezi ně patří Enterotoxigenní *E. coli,* Enteroinvazivní *E. coli*, enterohemoragické *E. coli*, Enteropatogenní *E. coli*, Enteroadherující *E. coli*, Shiga-toxin produkující *E. coli*. Onemocnění způsobována těmito kmeny se většinou léči symptomaticky, a to dostatečnou hydratací organismu a doplňováním elektrolytů. Při komplikovanějším průběhu infekce se využívá antibiotik. Výhodné je, že lze využít ampicilin (nicméně v posledních letech se zvyšuje resistence), ale u kmene enterohemorgahické *E. coli*

vede podání antibiotik ke zhoršení stavu. Při onemocněních způsobovaných kmeny *E. coli* je důležitá prevence. Mezi základní pravidla patří konzumace čisté vody, správně tepelně upravené maso a v zahraničních zemích s horší kvalitou vody pak výhradní konzumace vody převařené nebo balené (Ambrožová, 2011; Hurych et Štícha 2021).

Enterotoxigenní *E. coli*

Bakterie tohoto kmenu způsobují takzvané serózní průjmy cestovatelů (laicky někdy označované jako faraonova pomsta či kletba). Produkují termostabilní enterotoxin a termolabilní enterotoxin, inkubační doba je 1-3 dny a projevuje se většinou jako mírný průjem bez zvracení a horečky. Příznaky obvykle sami odezní po 3 až 5 dnech (Fleckenstein et Kuhlmann, 2019; Hurych et Štícha, 2021)

Enteroinvazivní *E. coli*

Bakterie tohoto typu se vyskytují zejména v tropech. Napadají enterocyty v tlustém střevě, kde se následně množí a napadají sousední epitely. Inkubační doba je 2-3 dny. Projevuje se horečkou s průjmy obsahující krev. Příznaky obvykle odezní do pár dnů samy (Beld et Reubsaet, 2012; Hurych et Štícha, 2021).

Enterohemorhagické *E. coli*

Tyto bakterie produkují toxiny, které jsou podobné toxinům produkovaných Shigelou. Ty se vážou na endotelie a vyvolávají komplikace, které mohou vést až ke smrti pacienta. Mezi komplikace patří kolitida s hemoragií, která může přejít až v hemolyticko-uremický syndrom, ten je spojen s hemolytickou anémií, poškozením mozku a ledvin. Bakterie při stresu, který může být způsoben například antibiotiky, produkuje vyšší množství toxinů, paradoxně tedy antibiotika stav zhoršují. Postižený se nejčastěji nakazí nedostatečně tepelně upraveným hovězím masem nebo nepasterizovaným mlékem (Welinder-Olson et Kaijser, 2005; Hurych et Štícha, 2021).

Enteropatogenní *E. coli*

Tyto bakterie typicky způsobují onemocnění zejména u novorozenců a kojenců. Příznaky jsou časté zvracení a řídký průjem, při nedostatečné rehydrataci může dojít k úmrtí postiženého. Tento kmen neprodukuje toxiny, má ovšem

mechanismy, kterými se váže na enterocyty (Goosney et al., 2000; Hurych et Štícha, 2021).

1.2 Charakteristika koliformních bakterií

Jedná se o gramnegativní tyčinky, které dokážou růst na kultivačním médiu obsahujícím žlučové soli či jiné povrchově aktivní látky s podobnými vlastnostmi. Mají schopnost fermentovat laktózu při 36 °C. Jsou aerobní či fakultativně aerobní. Původně se předpokládalo, že na Endo agaru rostou pouze kolonie *E. coli,* později se ale zjistilo, že na tomto médiu mohou růst i jiné organismy. Prvním takto objeveným organismem byl druh *Enterobacter aerogenes* a ten dal název laktózo-pozitivním kmenům jako „coli-aerogenes", později pouze „coliforms". Do této skupiny koliformních bakterií se dnes řadí rody *Escherichia, Citrobacter, Enterobacter a Klebsiella* (Ambrožová, 2004).

Koliformní bakterie dříve sloužily jako hlavní ukazatel fekálního znečištění životního prostředí, nyní se však tento význam zpochybňuje. Zaprvé se jedná o velkou heterogenní skupinu bakterií, která obsahuje i druhy, které se ve fekáliích nevyskytují (například *Serratia fonticola, Rahnella aquatilis* atd.). Dalším důvodem je, že některé rody jako například *Citrobacter a Enterobacter,* i když jsou původem ze zažívacího traktu teplokrevných živočichů, přežívají ve vodním prostředí relativně dlouhou dobu a při vhodných podmínkách se i množí. Mohou se vyskytovat ve vyšších počtech i v případech, kdy indikátory jako například *E. coli* úplně chybí. Dnes se proto skupina koliformních bakterií používá pouze jako relativní ukazatel pro surovou a pitnou vodu (Baudišová, 2017).

1.3 Vliv prostředí na mikroorganismy ve vodě

Mikroorganismy ve vodě jsou výrazným způsobem ovlivňovány vnějšími fyzikálními a chemickými vlivy okolního prostředí. Těchto vlivů existuje v přírodě mnoho, nicméně jako nejvíce ovlivňující faktory by se daly jmenovat teplota, pH, přístup světla a rozpuštěný kyslík. Dalšími faktory, které přicházejí v potaz jsou například tlak vody nebo salinita (Rulík et al., 2013).

1.3.1 Vliv teploty na mikroorganismy

Faktorem, který nejspíše nejvíce ovlivňuje fungování a růst bakterií je teplota. Pro mikroorganismy můžeme rozlišit tři různé hranice teplot: minimální teplotu, optimální teplotu a maximální teplotu. Minimální teplota je tedy taková teplota, při které má daný organismus nejnižší zjistitelnou rychlost růstu a pokud dojde k jejímu snížení, růst a dělení buněk se úplně zastaví. Optimální teplota je pro daný organismus rozmezí, při které je rychlost růstu nejvyšší. Maximální teplota je potom taková hodnota, po jejímž překročení dojde k zastavení růstu a dělení buněk. Tyto tři teploty se označují jako hlavní (kardinální), nicméně tyto hodnoty nemusí být neměnné, protože mohou být do určité míry substituovány ostatními vlivy vnějšího prostředí (Šilhánková, 2002; Rulík et al., 2013).

Organismy můžeme rozdělit do různých tříd, dle rozložení jejich kardinálních teplot (Rulík et al., 2013).

- Mezofilní organismy se nachází v tělech teplokrevných živočichů a ve vodě mírného a subtropického pásu. Mají optimální teplotu růstu mezi 20 až 40 °C. Typickým příkladem je bakterie *E. coli.*
- Psychrofilní organismy neboli chladnomilné rostou nejlépe při teplotách nižších než 20 °C. V přírodě se s nimi můžeme setkat například v hlubokomořských jezerech nebo studených pramenech. Minimální teploty jsou v rozsahu -5 °C až 0 °C a maximální teploty v rozmezí 25 °C až 30 °C. Mezi zástupce patří některé rody *Mircrococcus, Flavobacterium* atd.
- Termofilní jsou takzvané teplomilné bakterie. Teplota, při které bakterie rostou je vyšší než 45 °C. Optimální teploty se většinou pohybují v rozmezí 50 °C až 60 °C. Mezi zástupce patří některé druhy rodů *Bacillus, Clostridium, Lactobacillus* atd. (Rulík et al., 2013).

1.3.2 Vliv teploty při skladování a transportu

Nejvýhodnější možností zpracování vzorku je přímo v terénu pomocí například pojízdné laboratoře, jelikož za nevhodných podmínek při převozu vzorku může dojít k výrazným kvantitativním a kvalitativním změnám v mikrobiálním společenstvu. Ideální je zpracovat vzorky v době 2 až 6 hodin od odběru, nejpozději

do 24 hodin za předpokladu dodržení skladovacích podmínek při teplotách 4 až 6 °C. Vzorky, které jsou zpracovány za delší období, než 24 hodin jsou pak pro mikrobiologický rozbor zcela bezcenné (Häusler, 1994).

V roce 1981 byly prováděny pokusy se skladováním. Koliformní bakterie byly uchovávány při 22 a 5 °C, následně byly prováděny mikrobiologické zkoušky na m-FC agaru (m-faekal Coliform Agar) 6, 24 a 30 hodin po odběru vzorku. Výsledkem těchto pokusů bylo, že po 24 hodinách byl pokles bakterií oproti vzorku zpracovaném po 6 hodinách skladovaném při 22 °C průměrně 50 %, zatímco u vzorku skladovaném při 5 °C průměrně 17 %. Následně po 30 hodinách byl pokles počtů kolonií u vzorků skladovaných při 5 °C v rozmezí 40 až 50 % a u vzorků skladovaných při 22 °C byly poklesy v rozmezí 70 % až 95 % (McDaniels et Bordner, 1983).

1.3.3 Vliv molekulárního kyslíku

Na mikroorganismy má také vliv, zdali vyžadují k získávání energie přítomnost kyslíku či nikoliv. Dle této potřeby je můžeme rozdělit do více kategorií (Rulík et al., 2013).

- Obligátní aerobové jsou takové bakterie, které ke svému životu a fungování vyžadují kyslík vždy, protože ho využívají jako finální akceptor elektronů při respiraci. Řadí se mezi ně například *Micrococcus luteus.*
- Fakultativně anaerobní bakterie mají schopnost provádět respiraci nebo fermentaci zcela bez přítomnosti kyslíku. Nicméně pokud je v prostředí přítomen, tak ho dokáží využít a mají vyšší energetický výtěžek metabolických procesů než v jeho nepřítomnosti. Mezi takové bakterie se řadí například rody *Escherichia, Bacillus* a *Pseudomonas.*
- Mikroaerofilní bakterie ke svému fungování vyžadují kyslík, avšak v nižších koncentracích, než se nachází v atmosféře. Patří sem například *Spirillum volutans*.

- Obligátní anaerobní mikroorganismy provádí metabolické procesy výhradně bez použití kyslíku a pro některé z nich je kyslík toxický. Řadí se sem například *Streptococcus pyogenes* (Rulík et al., 2013).

Vliv kyslíku na koliformní bakterie

Ve studii Curtis et al. (1992) byl zkoumán vliv kyslíku na koliformní bakterie. Pokus byl rozdělen na dvě větve, a to sice účinek kyslíku za přítomnosti světla a účinek kyslíku bez přítomnosti světla. Bylo zdokumentováno, že účinek kyslíku bez přítomnosti světla neměl na životnost bakterií žádný vliv. Nicméně za přítomnosti světla a zároveň kyslíku se životnost koliformních bakterií značně snížila. Ukázala se lineární návaznost na zvyšující se množství rozpuštěného kyslíku za přítomnosti světla a pokles počtu koliformních bakterií. Dále se ukázalo, že anaerobní podmínky nemají na růst těchto bakterií žádný vliv.

1.3.4 Vliv slunečního záření na kolifromní bakterie a *E. coli*

Ve studiích Yukselen et al. (2003) a Sinton et al. (2002) byly studovány účinky slunečního záření na rychlost odumírání bakterií v pobřežních vodách Černého moře za použití koliformních bakterií jako indikátorového organismu. Experimenty byly prováděny v kádinkách naplněných mořskou vodou při konstantní teplotě a vystaveným účinkům slunečního záření, dále byly prováděny i experimenty ve tmě, aby se izoloval účinek slunečního záření od ostatních činitelů. Bylo zjištěno, že koliformní bakterie byly inaktivovány rychleji na slunci než ve tmě, a to asi 20krát více. UV-B (290–320 nm), UV-A (320–400 nm) a modré až zelené viditelné světlo (400–550 nm) jsou zodpovědné za inaktivaci indikátorových mikroorganismů, ale UV-B část světelného spektra je dominantní baktericidní látka, která způsobuje přímé (fotobiologické) poškození DNA.

Dle další studie, kde byla zkoumána inaktivace fekálních koliformních bakterií, enterokoků a *E. coli* byla zjištěna blízká podobnost mezi údaji o fekálních koliformních bakteriích a *E. coli*. Až 78 % fekálních koliformních bakterií v počátečních vzorcích bylo zaznamenáno jako *E. coli* a tyto podíly se v průběhu času neměnily, protože inaktivace *E. coli* těsně následovala inaktivaci fekálních koliformních bakterií ve všech experimentech. Míra inaktivace byla zhruba 10krát vyšší za přítomnosti přímého slunečního záření než ve tmě. Dále se tato studie

shoduje s Yukselen et al. (2003) v tom, že hlavní vliv na inaktivaci mají především kratší (UV-B) vlnové délky (Sinton et al., 2002).

1.3.5 Vliv pH na mikroorganismy

Dalším významným environmentálním faktorem, který ovlivňuje růst, aktivitu a metabolické vlastnosti je pH. Voda může nabývat hodnot pH v rozmezí 0-14. Roztoky, které dosahují hodnot nižších, než je 7, označujeme jako kyselé. Naopak roztoky, které dosahují hodnot vyšších, označujeme jako zásadité. V přírodních vodách se nejčastěji setkáváme s hodnotou pH v rozmezí mezi 5 až 9. Naprostá většina organismů je přizpůsobena právě takovýmto hodnotám a při extrémnějších podmínkách nerostou. Nicméně existují i takové mikroorganismy, které rostou i při hodnotách pH nižších než 5, takové poté označujeme jako acidofilní anebo rostou i při hodnotách přesahující hodnotu 9 pH, takové poté označujeme jako alkalifilní (Rulík et al., 2013; Razmi et al., 2023).

Většinu acidofilních mikroorganismů můžeme nalézt v prostředí bohatém na síru a sloučeniny síry. Takováto prostředí mají nejčastěji důlní nebo geotermální původ. Mezi zástupce nacházíme rody ze skupiny Archea (například řády Sulfolobales a Thermoplasmatales), dále můžeme nalézt i zástupce bakterií jako například *Acidobacterium ferroxidans, Thiobacillus presperus.* Acidofilní prokaryota lze ještě rozdělit do tří podskupin: mesofilní, středně termofilní acidofilové a termofilní acidofilové (Rulík et al., 2013).

Alkalifilní organismy jsou takové, které mají optimální podmínky pro růst a metabolismus při hodnotách 9 pH a výše. Dále můžeme rozlišit alkalitolerantní mikroorganismy, které jsou schopné přežívat hodnoty pH vyšší než 9, nicméně jejich optimální hodnoty pro růst dosahují hodnot kolem 7 pH (Horikoshi et Grant, 1998).

Vliv pH na *E. coli*

Kmeny *E. coli* musí být schopny odolat širokému rozmezí hodnot pH (4,5–9), aby přežily a kolonizovaly lidský gastrointestinální trakt, zahrnující výrazně širší rozsah hodnot pH ve srovnání s jejich optimálními růstovými hodnotami pH (6,5 – 7,5). Mechanismy přežití za nepříznivých podmínek vnější hodnoty pH jsou spojeny se schopností udržet vnitřní cytoplazmatickou homeostázu pH v rozmezí 7,2–7,8 což se děje v časovém úseku od několika minut do několika hodin a zajišťuje zachování

enzym metabolické aktivity zachováním stability proteinu a DNA. Několik dosud popsaných mechanismů vysvětluje adaptaci *E. coli* na nepříznivé hodnoty pH prostředí, jako je produkce organických kyselin ke zlepšení kondice při vysokých hodnotách pH úpravou vnější hodnoty pH, nebo zvýšená produkce nenasycených mastných kyselin za účelem změny membránových lipidů, složení a snížení fluidity membrány v případě acidorezistentní odpovědi. Dále je třeba vzít v úvahu, že vnější podněty založené na hodnotě pH mohou vyvolat produkci enterotoxinů, například enterotoxigenní *E. coli*, způsobující sekreční průjem a šířící se fekálně-orální cestou vylučuje tepelně labilní enterotoxin stimulovaný alkalickými hodnotami pH. (Razmi et al., 2023).

1.3.6 Vliv osmotického tlaku

V prostředí není hlavní pouze dostupnost a množství vody, ale i množství roztoků (nejčastěji soli, cukry a další rozpuštěné látky) rozpuštěných ve vodě. Hlavním důvodem je vysoká afinita těchto látek k vodě, která činí vodu nedostupnou pro mikroorganismy. Ve většinové míře má vnitřní prostředí buněk vyšší koncentraci než okolní prostředí, a proto se voda díky osmóze pohybuje směrem z prostředí do buňky. Nicméně pokud se buňka dostane do opačného stavu, kdy má prostředí nižší koncentraci, musí mít vyvinuté obranné mechanismy, jinak jí hrozí smrt. Mezi takové mechanismy patří akumulace anorganický kationtů (jako například $K^{+,}$ Na^{+}) v buňce. Tento mechanismus je složitější, protože všechny organely přítomné v buňce musí být adaptované na vysoké hladiny soli a je charakteristická pro středně a extrémně halofilní organismy. Dalším mechanismem je akumulace organických roztoků nazývaných kompatibilní nebo slučitelné (např. glycerol, glycin betain, ektoin) za současného vylučovaní solí a udržování si malé koncentrace solí v cytoplazmě. Tato strategie je méně náročná, protože organely nemusí být přizpůsobeny vysokým obsahům solí (Oren, 2008; Rulík et al., 2013).

Dle schopnosti snášet vysoké koncentrace solí můžeme organismy rozdělit na halotolerantní a halofilní. Halotoleratní jsou takové organismy, které jsou schopné snášet zvýšené koncentrace solí, ale lépe rostou ve vodním prostředí s nižší koncentrací než jejich buňka. Halofilní bakterie jsou takové, které snášejí vysoké koncentrace solí (2 mol/dm^3, tedy dvoumolární). Bakterie této skupiny se vyznačují obsahem purpurového pigmentového proteinu bakteriorhodopsinu a lze je dále

rozdělit na lehce, středně a extrémně halofilní. Extrémně halofilní skupiny dokonce ke svému životu vysokou koncentraci solí vyžadují a při koncentracích nižších, než je 15-20 % umírají. V přírodě bychom je mohli hledat ve vnitřních mořích a slaných jezerech, například v Mrtvém moři. Patří mezi ně například *Halomonas elongata* (Rulík et al., 2013).

1.3.7 Vliv tlaku

V hlubomořském prostředí lze nalézt specializované mikroorganismy. Toto prostředí je charakteristické vysokým tlakem a nízkými teplotami (nicméně v blízkosti hlubokomořských výronů panují extrémně vysoké teploty). Dle současného výzkumu se ukázalo, že růst a schopnost přežití mikroorganismů je ovlivněna vztahem mezi teplotou a tlakem (Yayanos, 1998).

Dle vztahu k velikosti tlaku můžeme mikroorganismy rozdělit na barofilní, takové dosahují optimálního růstu při tlaku vyšším než 40 MPa (pro srovnání, tlak klasické atmosféry dosahuje hodnoty 0,1 MPa), dále obligátní barofily, tyto organismy vyžadují hodnotu tlaku kolem 100 MPa při současné teplotě 3 °C a tmu, protože nemají mechanismy na opravu poškozené DNA a jsou velmi citlivé na UV záření, mezi ně patří například *Halomonas salaria.* Posledním typem jsou barotolerantní mikroorganismy. Tyto organismy dokážou růst i při normálním atmosférickém tlaku (tedy 0,1 MPa) a jejich únosným maximem je hranice 40 MPa (Rulík et al., 2013).

1.4 Dělení vod

1.4.1 Povrchové vody

Povrchové vody jsou vody přirozeně se vyskytující na zemském povrchu a tento charakter neztrácejí, protékají-li přechodně zakrytými úseky, přirozenými dutinami pod zemským povrchem nebo v nadzemních vedeních. Dělí se na stojaté (lentické) a tekoucí (lotické). Povrchové vody jsou charakteristické velkou dynamikou prostředí a změnami v čase. U lotického typu vod se toto projevuje prohlubováním koryta toku, rozšiřováním příčného průřezu, erozí, meandry a vyrovnáním dna. U lentických vod dochází k zarůstání, sedimentaci a hromadění živin. Přirozeným biologickým procesem je stárnutí jezer, kterým se jezera zarůstáním a zabahňováním mění v mělčiny a bažiny (Křížová, 2013).

Jsou charakteristické vysokou teplotní proměnlivostí, nízkou mineralizací, obsah kyslíku je v tomto typu vod vysoký (pokud se nejedná o znečištěné vody), dále mají nízký obsah oxidu uhličitého a vysoký obsah organických látek, mívají také vysoký obsah mikroorganismů různých druhů. Tyto vody bývají znečištěny původci infekčních onemocnění, mezi které patří zejména fekální bakterie (Häusler, 1994; Žáček, 1998).

Povrchové vody lze rozdělit do 5 různých tříd.

1. Velmi čistá voda
2. Čistá voda
3. Znečištěná voda
4. Silně znečištěná vod
5. Velmi silně znečištěná voda

Velmi čistá voda je příhodná pro všechny účely, nicméně hlavní využití má jako voda pitná a v potravinářském průmyslu. Čistá voda je vhodná například pro vodárenské účely. Znečištěná voda se využívá v některých průmyslových provozech (Velíšek, 2002; Langhammer, 2009).

Jednotlivé třídy jsou odvozeny z takzvaných ukazatelů jakosti vody, mezi které patří ukazatele kyslíkového režimu, množství rozpuštěného kyslíku, základní fyzikální a chemické ukazatele (vodivost, amonný dusík, dusičnany, fosfor, pH, rozpuštěné a nerozpuštěné látky), doplňující ukazatele (množství hořčíku, chloridů, síranů, vápníku), ukazatele množství těžkých kovů jako například arsenu, olova rtuti a kadmia a biologických a mikrobiologických ukazatelů, kterými jsou především koliformní bakterie (Velíšek, 2002).

1.4.2 Pitná voda

Dle zákona je pitná voda popsána takto: „*Pitnou vodou je veškerá voda v původním stavu nebo po úpravě, která je určena k pití, vaření, přípravě jídel a nápojů, voda používaná v potravinářství, voda, která je určena k péči o tělo, k čištění předmětů, které svým určením přicházejí do styku s potravinami nebo lidským tělem, a k dalším účelům lidské spotřeby, a to bez ohledu na její původ, skupenství a způsob jejího dodávání. Hygienické požadavky na zdravotní nezávadnost a čistotu pitné vody (dále jen "jakost pitné vody") se stanoví hygienickými limity mikrobiologických,*

biologických, fyzikálních, chemických a organoleptických ukazatelů, které jsou upraveny prováděcím právním předpisem, nebo jsou povoleny nebo určeny podle tohoto zákona příslušným orgánem ochrany veřejného zdraví. Hygienické limity se stanoví jako nejvyšší mezní hodnoty, mezní hodnoty, směrné hodnoty, referenční hodnoty a doporučené hodnoty. Za pitnou vodu se nepovažuje přírodní léčivý zdroj a přírodní minerální voda, o níž bylo vydáno osvědčení podle zvláštního právního předpisu." (Zákon č. 258/2000 Sb.).

Zdravá společnost vyžaduje spolehlivé zabezpečení bezpečné pitné vody. Stát má za úkol vytvořit právní rámec a instituce, které se zabývají jak kvantitativním, tak kvalitativním aspektem dodávky pitné vody. V České republice jsou kompetentními subjekty Ministerstvo životního prostředí, Ministerstvo zemědělství a Ministerstvo zdravotnictví. Očekává se, že vodárenské společnosti samy projeví iniciativu a aktivitu při plnění cílů stanovených Mezinárodní asociací pro vodu v Bonnské chartě pro bezpečnou pitnou vodu. Kvalita pitné vody není pouze otázkou dostatečného množství, ale také jejích specifických vlastností, jako je bezpečnost, chuť a další smyslové charakteristiky. Zásadní je rovněž vnímání kvality vody spotřebiteli (Kožíšek et al., 2007).

1.5 Mikrobiologický rozbor vody

Hlavním důvodem provádění mikrobiologických rozborů vody je zjištění, jaké druhy nebo skupiny mikroorganismů se v dané vodě nachází a jaký je jejich počet. Dají se rozlišit dvě hlediska, podle kterých se posuzuje přítomnost mikroorganismů ve vodě. Tím primárním hlediskem je hygienické, kterého se týká kontaminace pitných vod, vypátrání zdroje daného znečištění a možnost nápravy stavu. Tím druhým hlediskem je hledisko ekologické, díky kterému můžeme posoudit řadu přirozených a umělých biologických procesů, které ovlivňují jakost vody. Pomocí mikrobiologického vyšetření vody získáme poměrně přesný obraz hygienického stavu dané vody, ale nelze s jistotou stanovit, zdali je voda vhodná pro běžné zásobení, anebo ne, a to z toho důvodu, že mikrobiologicky lze posoudit s přesností pouze zkoumaný vzorek, ne však celý zdroj (Häusler, 1994).

1.6 Kultivační metody a jejich význam

Kultivační metody patří mezi nejhojněji rozšířené metody v mikrobiologii a uplatňují se ve všech dílčích odvětvích tohoto oboru. Hlavním principem kultivačních metod je, že mikroorganismy na uměle vytvořených růstových mediích mají vhodné podmínky, které jim umožňují rozmnožovat se (Häusler 1994). Každé připravené růstové médium musí pro správný růst mikroorganismů obsahovat všechny potřebné zdroje živin (uhlík, dusík, fosfor a další biogenní prvky). Dále je nutné pro organismy zajistit vhodnou vlhkost, optimální teplotu a vyhovující přítomnost kyslíku. Naprostá většina mikroorganismů se inkubuje při teplotách 20-37 °C, ale v případě termotolerantních koliformních bakterií kultivace probíhá při 44 °C (Häusler, 1994; Baudišová, 2017).

Růstová média lze rozlišit dle různých kritérií do skupin. Dle konzistence můžeme rozlišovat média tekutá nebo pevná. Dle účelu můžeme rozlišit půdy selektivní, diagnostické, selektivně diagnostické půdy a transportní půdy.

1.6.1 Selektivní půdy

Tyto půdy slouží k usnadnění růstu cíleně zkoumaných mikroorganismů, a naopak potlačení životaschopnosti nechtěných organismů. Toho můžeme docílit přidáním látek, které mají baktericidní účinky na některé druhy bakterií anebo naopak přidáním látek, které hledané druhy zvýhodňují. Mezi tyto půdy se řadí například Löwensteinova-Jensenova půda (Häusler, 1994; Baudišová, 2017).

1.6.2 Diagnostické půdy

Tyto půdy se využívají k rozlišení více druhů mikroorganismů nacházejících se na jednom růstovém médiu. Tohoto je většinou docíleno pomocí rozdílného zbarvení jednotlivých kolonií, což je způsobeno rozdílným metabolismem druhů určité látky. Příkladem je ENTEROtest (Häusler, 1994; Baudišová, 2017).

1.6.3 Selektivně diagnostické půdy

Tyto půdy jsou kombinací předešlých dvou typů půd. Obsahují specifičtější indikátory a inhibitory než předchozí dva typy. Příkladem je Endo agar, DC agar či žluč-eskulinový agar atd. (Häusler, 1994; Baudišová, 2017).

1.6.4 Transportní půdy

Tyto půdy jsou určené k přepravení vzorku do laboratoře. Aby nedošlo ke zkreslení kvantitativních znaků ve vzorku, tak tyto půdy obsahují minimum živin. Příkladem je Amiesovo, Stuartovo nebo Cary-Blairovo médium (Julák, 2009).

1.6.5 Tekuté půdy

Kultivace pomocí tekutých půd byla zavedena Louisem Pasteurem a jedná se o jednu z nejstarších kultivačních metod využívaných v mikrobiologii. Tato metoda se používá zejména k množení organismů. Výhodou této metody je, že kultivovaným mikroorganismům dává prakticky ideální podmínky pro růst a množení. Je využívána při rozboru vod, kde se předpokládá výskyt fyziologicky stresovaných nebo poškozených mikroorganismů. Nevýhodou této metody je, že při této metodice nelze dosáhnout přesného kvantitativního výsledku, výjimkou je použití metody nejvíce pravděpodobného počtu. Principem této metody je naočkování několika stejných objemů vzorků do zkumavek v ředících řadách (Häusler, 1994).

1.6.6 Pevné půdy

Tato metoda byla do praxe přivedena Robertem Kochem a bývá využívána zejména pro kvantitativní stanovení daných mikroorganismů. Při této metodě je předpokladem, že každá vyrostlá kolonie na médiu je populace, která pochází z jedné buňky nebo z jedné kolonie tvořící jednotku, které se nacházely ve vzorku vody v momentě, kdy byl naočkován. Následně je počet narostlých kolonií přepočítáván na množství objemu vzorku, který byl na pevné médium nasazen. Objemy jsou nejčastěji 1, 10 a 100 ml. Očkování na pevnou půdu může být provedeno různými způsoby. Těmi jsou přímý výsev do kultivačního média, přímý výsev na povrch kultivačního média anebo metodou membránových filtrů (Häusler, 1994; Lawless et al., 2010).

1.6.6.1 Přímý výsev do kultivačního média

Tato metoda očkování je využívána při stanovování psychrofilních a mezofilních bakterií. Není vhodná při kultivaci mikroorganismů, které jsou striktně anaerobní. Dále není vhodná u mikroorganismů pocházejících z jezer nebo chladných vod, protože při zalévání 45 °C agarem by docházelo k velkému teplotnímu šoku. Metoda probíhá tak, že se předem zvolený objem vzorku vody

(nejčastěji 1 ml) napipetuje do Petriho misky a do té je následně nalito kultivační médium o teplotě 45 °C (Häusler, 1994; Baudišová, 2017).

1.6.6.2 Přímý výsev na povrch kultivačního média

Tato metoda očkování je na rozdíl od předchozí metody vhodná i ke kultivaci striktně aerobních mikroorganismů anebo mikroorganismů nacházejících se v chladných vodách. Nevyužívá při kultivaci mikroorganismů, které jsou citlivé na vyšší obsah kyslíku. Využívá se při kultivaci koliformních bakterií, fekálně koliformních bakterií a enterokoků pocházejících z povrchových vod.

Metoda probíhá tak, že se do Petriho misky s připraveným zatuhlým kultivačním médiem naočkuje 1 ml vzorku, který je následně krouživými pohyby rozprostřen po celé ploše agaru. Takto připravené misky se následně odkryté vloží do sušárny vytemperované na 44 °C, kde se vysouší zhruba po dobu 15-30 minut. Po vyschnutí se misky dají kultivovat obráceny dnem vzhůru (Häusler, 1994).

1.6.6.3 Metoda membránových filtrů

Tato metoda je používána především pro kvantitativní stanovení mikroorganismů ve větších objemech vody. Je především využívána pro kultivaci koliformních bakterií a enterokoků. Principem této metody je, že pomocí filtračního aparátu za podtlaku jsou přes vhodný membránový filtr zachyceny buňky mikroorganismů (Häusler, 1994).

1.7 Konkrétní příklady agarů a metoda Colilert Quanti-Tray

1.7.1 Endo agar

Historie tohoto média sahá až do roku 1904, kdy bylo představeno jako metoda, které rozliší bakterie fermentující a nefermentující laktózu. Patří mezi půdy selektivně diagnostické. Médium díky obsahu siřičitanu sodného a bazického fuchsinu inhibuje růst grampozitivních bakterií (Zavadilová, 2008).

Médium funguje na principu štěpení laktózy. Při štěpení laktózy dochází ke vzniku acetaldehydu a ten následně reaguje s fuchsinem za vzniku červeného zbarvení. Hledané bakterie *E. coli* se tedy na živné půdě projevují jako tmavě červené

kolonie s kovovým leskem, doprovodná mikroflóra se projevuje ve formě velmi světle zbarvených kolonií. Při potřebě otestování výsledku je možné použít cytochrom oxidázový test. Při práci s tímto médiem je nutné dodržovat opatrnost, protože fuchsin je karcinogenní látka (Genung et Thompson, 1927; Zavadilová, 2008).

Očkování vzorku je možné provádět přímým výsevem na povrch agaru nebo pomocí membránového filtru. Kultivace probíhá po dobu 24 hodin při 36 °C (Zavadilová, 2008).

Tato živná půda se využívá při testování povrchových a odpadních vod a mléčných výrobků (Zavadilová, 2008).

1.7.2 CCA agar

Tato živná půda se řadí mezi diagnostické půdy a používá se pro kultivaci koliformních bakterií a *E. coli.* Většinou se při této metodě využívá membránová filtrace a nasazené živné médium se následně kultivuje při 36 °C po 24 hodin (Baudišová, 2016).

Médium funguje na principu toho, že koliformní bakterie vykazují aktivitu β-D-galaktosidázy a bakterie *E. coli* zároveň vykazuje aktivitu β-D-glukuronidázy (některé kmeny *E. coli,* jako například O157, jsou β-D-glukuronidáza negativní a budou se projevovat jako koliformní bakterie). Tyto procesy se následně barevně projeví na kultivovaném médiu. Koliformní bakterie se zbarvují do růžova až červena. Bakterie *E. coli* se zbarvují tmavě modře až do odstínů fialové. Doprovodná mikroflóra se projevuje ve formě bezbarvých kolonií. Pro případné podrobnější otestování je možnost použití oxidázového testu, který lze provést přímo na membránovém filtru (Alonso et al., 1998; Baudišová, 2016).

Toto médium je velmi citlivé a je vhodné pouze pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry. Z tohoto důvodu se využívá především při testování dezinfikovaných pitných vod, popřípadě vod z bazénů. Pro vyšetření povrchových a odpadních vod není vhodné (Baudišová, 2016).

1.7.3 m-FC agar

Toto médium se řadí mezi selektivní kultivační půdy. Funguje na principu toho, že termotolerantní bakterie hydrolyzují v médiu přítomný 4-metyl–umbelliferyl-β-D-glukuronid na 4-metyl-umbelliferon a v přítomnosti dlouhovlnného UV záření (365 nanometrů) vykazují světle modrou fluorescenci. Dále médium obsahuje žlučové kyseliny, které jsou přítomné z důvodu omezení růstu grampozitivních mikroorganismů (Bencko et al., 2008).

Stanovení se provádí pomocí membránových filtrů. Po přenesení na agar se vzorek kultivuje při 43 ± 1 °C po dobu 24 hodin. Koliformní termotolerantní bakterie vytváří kolonie tmavě modré barvy, přídatná mikroflóra se projevuje vznikem šedých kolonií. Toto stanovení se používá pro rozbor nedezinfikovaných odpadních a povrchových vod (Bencko et al., 2008; Aulenbach, 2010).

1.7.4 Metoda Colilert Quanti-Tray

Tato metoda slouží k zjištění přítomnosti různých bakterií ve vodě, dle toho, jaký rod bakterie je testován se rozděluje na více druhů.

- Metoda Colilert testuje přítomnost koliformních bakterií a bakterií *Escherichia coli* v pitné vodě. Kultivace u této metody trvá 24 hodin při teplotě 35-37 °C. Metoda je založena na tom, zda dojde ke štěpení metyl-umbelliferyl-beta-D-glukuronidu. Při vyhodnocení se komůrky, ve kterých jsou koliformní bakterie přítomny, zbarví žlutě, navíc komůrky obsahující *E. coli* pod UV lampou fluoreskují modře.
- Metoda Colilert-18 se používá k ověření přítomnosti koliformních bakterií a bakterií *E. coli* v nedezinfikovaných povrchových a odpadních vodách. Kultivace u této metody trvá 18 hodin při teplotě 35-37 °C. Vyhodnocení probíhá stejně jako u metody Colilert.
- Metoda Enterolert-E se používá pro ověření přítomnosti enterokoků (rody *Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis)* ve vodě. Kultivace u této metody trvá 24 hodin při teplotě 41 °C. Metoda je založena na tom, zda vzorek obsahuje enzym beta-glukosdiáza. Vyhodnocení probíhá stejně jako u metody Colilert.

- Metoda Pseudalert se používá pro ověření přítomnosti bakterií druhu *Pseudomonas aeruginosa* ve vodě. Kultivace u této metody trvá 24 hodin při teplotě 38 °C. Vyhodnocení probíhá stejně jako u metody Colilert.

Zkouška probíhá tak, že se ke 100 ml vzorku vody přidá činidlo k detekci cílového organismu. Poté, co se činidlo plně rozpustí a promíchá, se celý objem přeleje do plata sloužícího k odečtu. Plato se následně vsune do gumové podložky a zataví se pomocí zatavovačky. Po zatavení se plato vloží do kultivačního boxu (Fricker et al., 1997; Ambrožová, 2008).

1.8 Nekultivační metody

V posledních letech se díky pokroku v molekulární biologii vyvinuly analytické metody, které ke svému provedení nevyžadují kultivaci mikroorganismů. Klasické techniky jsou relativně pomalé ve srovnání s jinými analytickými technikami, například z důvodu nutnosti kultivovat organismy. Kromě toho jsou klasické metody obtížně proveditelné při práci s nekultivovatelnými mikroorganismy. Další výhodou nekultivačních metod je urychlení získání výsledků a informací o analyzovaném mikroorganismu. Patří mezi ně například metoda MALDI – TOF, průtoková cytometrie, elektroforéza a další (Koo et al., 2008; Baudišová, 2017).

1.8.1 Metoda MALDI – TOF

Jedná se o hmotnostní spektrometrii s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátorem (anglicky matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight). Vývoj této metody započal v 80. letech minulého století. Prvotně se touto metodou analyzovaly molekuly s nízkou molekulovou hmotností, jako například lipidy. Později v roce 1996 byla metoda rozvinuta a bylo možné analyzovat celé buňky bakterií na úrovni rodů a druhů. Dále je tato metoda používána i k charakterizaci hub a virů (Přibil et Fenselauová, 2005).

Vzorek je odebrán z bakteriální kultury z pevného anebo z tekutého kultivačního média. Vzorek kultury je následně smísen s vodou a vhodným

rozpouštědlem (například aceton nebo acetonitril), které zapříčiní narušení buněk a následné uvolnění proteinů. Takto vzniklá směs je následně smíchána s vhodnou matricí, která má silnou optickou absorpci v rozsahu použité vlnové délky laseru. Používají se různé typy matric dle toho, jaká biomolekula je analyzována a jaký laser je použit. Mezi nejčastěji používané matrice patří například kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB), kyselina α-kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), kyselina sinapinová (SA) a kyselina ferulová (FA). Matrice FA, SA a CHCA jsou vhodné při provádění analýz proteinů, naopak matrice DHB je vhodná pří provádění analýz glykopeptidů a glykoproteinů (Croxatto et al., 2012).

Vzorek smíchaný s matricí se následně nanese na vodivou kovovou destičku a ta je následně vložena do hmotnostního spektrometru. V něm je vzorek ostřelován krátkými laserovými pulzy. Tento proces vede k odpařování ionizovaných analytů. Plynné molekuly jsou následně kovovou trubicí, která obsahuje vakuum, transportovány k detektoru, kde dochází k vyhodnocení vzorku (Croxatto et al., 2012).

Mezi analyzované bakterie patří například *Bacillus, Clostridium, Campylobacter a E. coli.* Výhodou této metody je velmi rychlá (do několika minut) a levná analýza s vysokou přesností a specifičností. Nevýhodou je vysoká pořizovací cena vyhodnocovacího přístroje (Baudišová, 2017).

1.8.2 Průtoková cytometrie

Typický průtokový cytometr se skládá z 5 částí: hydraulického, osvětlovacího, optického a elektronického systému a systému k analýze dat (Alvarez-Barrientos et al., 2000).

Hydraulický systém vytváří úzký proud kapaliny vytvořený z buněčné suspenze. Takto vzniklý proud je následně transportován ke světelnému zdroji. Rychlost proudu dosahuje hodnot 1-10 m/s (Alvarez-Barrientos et al., 2000).

Světelný systém může být tvořen dvěma různými zdroji světla. Obloukovou lampou anebo laserem. Obloukové lampy jsou výhodné zejména kvůli jejich nízké pořizovací ceně. Nevýhodami pak je krátká životnost a nízká citlivost. Výhodou laseru je vysoká citlivost, nevýhodou vysoká pořizovací cena (Alvarez-Barrientos et al., 2000). V praxi se využívají různé druhy laserů. Nejběžnějším je argonový laser

s excitační vlnovou délkou 488 nm, používá se při excitaci syntetických barviv (např. fluorescein isothiokyanát) a přírodních fluorochomových barviv. Druhým příkladem jsou ultrafialové lasery, které excitují fluorochromy citlivé na UV (300-400 nm). Dalším příkladem je laser s červenou diodou, který excituje fluorochromy citlivé na rozsah kolem 630 nm (Wilkerson, 2012; Adan et al., 2015).

V optickém systému, který je tvořen systémem filtrů, zrcadel a čoček jsou jednotlivé fotony rozdělovány podle vlnové délky do jednotlivých kanálů. Optické filtry lze rozdělit do tří skupin podle toho, jaké fotony propouští. Short pass filtry propouští pouze fotony s nižší vlnovou délkou, než je určená hranice, naopak long pass filtry propouští fotony s vyšší vlnovou délkou, než je konkrétní určená hranice. Posledním typem jsou pásmové filtry, které propouští částice v určitém rozmezí vlnových délek (Alvarez-Barrientos et al., 2000).

Na elektronickém systému obsahujícím detektory je světelný signál změřen a následně převeden do elektrického impulsu. Elektrické impulsy jsou následně analyzovány. Software vyhodnocuje data a následně je reprezentuje pomocí histogramů. Histogramy mohou být monoparametrické a diparametrické (Alvarez-Barrientos et al., 2000).

Způsoby detekce bakterií

V dnešní době je nejsnadnější a nejrychlejší způsob detekce (až 100 buněk na mililitr za 30 minut) proveden za pomoci specifických protilátek značených fluorochromem. Nevýhodou této metody je, že je omezené množství dostupných protilátek proti konkrétním bakteriím (Groschel, 1983). Detekce pomocí protilátek byla prováděna například u rodů *Legionella, Salmonella, Brucella, Mycobacterium*.

Například za využití látky ethidium bromidu jako fluorochromu, kterou byly zkoumány vzorky krve, bylo detekováno 10 buněk *E. coli* na mililitr (Mansour et al., 1985).

Dále bylo využito 4,6-diamino-2-fenylindolu (DAPI) pro obarvení nukleových kyselin. Touto metodou bylo možné analyzovat rod *Acinetobacter*. Nicméně kvůli složité metodice tento postup není klinicky využíván (Wallner et al., 1997).

1.8.3 Polymerásová řetězová reakce

Polymerásová řetězová reakce (anglicky polymerase chain reaction, PCR). Je metoda, která byla prvně použita v roce 1983. Vymyšlena byla vědcem jménem Kary Mullis v USA a za tento objev mu byla udělena Nobelova cena. PCR dnes patří mezi nejvíce využívané metody v prakticky všech vědeckých odvětvích. Využívá se například při analýzách patogenních hub, bakterií a virů, při identifikaci onkogenů, při prenatální diagnostice dědičných chorob atd. (McPherson et Møller, 2000; Šmarda et al., 2005).

Principem je opakující se syntéza nových řetězců DNA enzymy, která nastává po spojení dvou primerů, jež se vážou na protilehlé řetězce DNA, přičemž jejich 3´OH-konce směřují proti sobě. Oligonukleotidy o délce přibližně 20 bazických párů jsou běžně používány jako primery a ty jsou komplementární ke koncům amplifikovaného úseku. Pro provádění amplifikace pomocí PCR musí směs obsahovat nejen templátovou DNA a primery, ale také deoxyribonukleotidtrifosfáty a termostabilní DNA polymerázu, která katalyzuje syntézu nových řetězců (McPherson et Møller, 2000).

Tato metoda probíhá ve třech krocích, které tvoří jeden cyklus a ten se následně opakuje.

Denaturace je prvním krokem cyklu. Probíhá během ní tepelný rozklad DNA na 2 jednoduché řetězce, toho je dosaženo za použití vysoké teploty kolem 95 °C.

V další fázi cyklu je vzorek ochlazen na nižší teplotu, nejčastěji v rozmezí 50-65 °C. Díky tomuto ochlazení dojde k připojení primerů na komplementární 3´ konce DNA. Primery jsou tvořené předem synteticky připravenými oligonukleotidy, které se skládají zhruba z 17-28 nukleotidů. V poslední fázi dochází k opětovnému zahřátí vzorku na teplotu kolem 75 °C. DNA polymeráza za využití primerů, které na vlákna přisedly v předchozím kroku, syntetizuje nová vlákna DNA. Aby syntéza mohla proběhnout, nachází se ve vzorku nadbytečné množství deoxynukleotid trifosfátů. Po skončení syntézy vláken je vzorek opět zahříván na teplotu 95 °C a nastává opakování cyklu. Takto proběhne až 30 opakujících se cyklů (McPherson et Møller, 2000).

1.8.3.1 Typy PCR

Nested PCR – tato metoda je využívána v situacích, kdy je nutné zvýšit specifitu a senzitivitu PCR. Zlepšená specificita reakce je odvozena od vazby dvou samostatných sad primerů na stejný cílový templát. Nested PCR je účinná metoda pro amplifikaci segmentů dlouhých templátů, ale vyžaduje znalost sekvence cíle (Green et Sambrook., 2019).

Multiplexní PCR – tato metoda se používá k současné amplifikaci několika různých sekvencí DNA. V multiplexní PCR může být amplifikována více než jedna cílová sekvence zahrnutím více než jednoho páru primerů do reakce. Multiplexní PCR má potenciál produkovat značné úspory času a úsilí v laboratoři, aniž by byla ohrožena užitečnost testu. V oblasti infekčních onemocnění se tato technika ukázala jako cenná metoda pro identifikaci virů, bakterií a hub (Elnifro et al., 2000; Markoulatos et al., 2002).

Náhodně amplifikovaná polymorfní DNA – Markery RAPD jsou amplifikační produkty anonymních sekvencí DNA pomocí jednoduchých, krátkých a libovolných oligonukleotidových primerů, a proto nevyžadují předchozí znalost sekvence DNA. Nízké náklady, účinnost při vývoji velkého počtu DNA markerů v krátkém čase a požadavek na méně sofistikované vybavení, učinily techniku RAPD cennou, ačkoli reprodukovatelnost profilu RAPD je stále středem debat (Tingey et Tufo, 1993; Bardakci, 2001).

Jako další příklad lze uvést metodu nazývanou TaqMan PCR. Kromě primerů je do reakce přidán další oligonukleotid, který hybridizuje s amplifikovaným úsekem. Tento oligonukleotid má na jednom konci fluorescenční značku a na druhém konci obsahuje tzv. zhášeč. Když je fluorescenční značka v blízkosti zhášeče, je její fluorescence potlačena. PCR probíhá normálně až do chvíle, kdy DNA polymerasa při syntéze nového řetězce narazí na značený nukleotid. V tomto okamžiku ho začne vytlačovat z templátového vlákna a následně ho rozkládá (Taq polymerasa sice nemá 3‘-exonukleázovou aktivitu, ale má 5‘-exonukleázovou aktivitu, která umožňuje degradaci "brzdícího" řetězce). Tím se uvolní fluorescenční sonda do roztoku a během speciálního cyklu PCR je možné měřit fluorescenci přímo

ve zkumavce během amplifikace. Intenzita fluorescence odpovídá množství syntetizovaného PCR produktu (Kalinina et al., 1997; Šmarda et al., 2005).

RT-PCR je metoda využívána pro amplifikaci mRNA místo DNA. Nejprve se izoluje celková RNA nebo mRNA z tkáňového vzorku. Poté se mRNA převede na cDNA pomocí reverzní transkripce, a následně se provádí běžná PCR. Přepis RNA na cDNA není obtížný, avšak tato metoda je technicky náročnější než amplifikace DNA, protože RNA se rychle degraduje kvůli ribonukleasám, které jsou běžnými kontaminanty vzorků, pomůcek i chemikálií. RNasy jsou navíc termostabilní a odolávají sterilizaci autoklávováním a aktivitu si zachovávají i po čištění materiálu denaturačními činidly. Aby se zabránilo degradaci RNA, pomůcky a roztoky se ošetřují inhibitory RNas, jako je například diethylpyrokarbonát (Šmarda et al., 2005; Valasek et Repa, 2005).

1.8.4 Elektroforéza

Jedná se o metodu, která využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se ve stejnosměrném elektrickém poli. Rychlost pohybu částic je ovlivněna velikostí celkového povrchového náboje, tvaru a velikosti molekuly a na tom, jaká je koncentrace v roztoku. Švédský vědec jménem Arne W. Tiselius získal za sestavení aparatury pro elektroforézu v roce 1948 Nobelovu cenu. Elektroforéza je dnes často využívána v lékařství a ve výzkumu, při studiu a analýze povrchů bakterií, virů atd, (Gaš, 2001).

Jedním z typů je gelová elektroforéza. Při této metodě se využívá gelu jako nosného média a také slouží jako jakési síto, které umožňuje rozdělení molekul podle velikosti. Gely můžou být tvořené agarózou, uvnitř takového gel vytváří nekovalentní vodíkové můstky a hydrofobní vazby mezi dlouhými cukernými řetězci. Koncentrace agarózy ovlivňuje, jak velká molekula může být separována. Například u DNA, při koncentraci 0,2 % projde póry DNA o velikosti 5000-40000 bp, ale už při koncentraci 3 % projde DNA o velikosti pouze 100-1000 bp. Dalším typem gelu je gel tvořený polyakrylamidy, kdy díky této látce tvoří gely kovalentní příčné vazby mezi dlouhými řetězci. Vztah mezi koncentrací polyakrylamidů a velikostí molekuly, která je schopna projít, funguje obdobně jako u agarózového gelu (Lee et al., 2012; Magdeldin, 2012).

Dalším typem je kapilární zónová elektroforéza. Při této metodě se provádí separace molekul v kapiláře naplněné základním elektrolytem a umístěné v elektrickém poli. Používá se jeden jediný základní elektrolyt (nazývaný background electrolyte). Na základě jejich rozdílné elektroforetické mobility se molekuly v látce oddělují. Menší částice s vyšším nábojem migrují v kapiláře rychleji než větší částice s nižším nábojem. K separaci kladně a záporně nabitých molekul (iontů) i neutrálních částic přispívá elektroosmotický tok. Do vytvořeného stejnosměrného elektrického pole se vloží kapilára, ve které je vzorek o objemu 10-100 nl. Detektorem, který se nachází na druhé straně kapiláry, je následně pokus vyhodnocen. Výhodou této metody je nízká spotřeba rozpouštědel, potřeba malého množství vzorku a vysoká citlivost (Roblová, 2011).

Dalším typem je 2D elektroforéza, která umožňuje rozlišení až 10 000 proteinů. Nejprve se proteiny oddělí podle svých izoelektrických bodů v gradientu pH. Poté, co jsou separovány v prvním rozměru, se provádí SDS-elektroforéza ve druhém směru, čímž se bílkoviny rozdělí podle svých velikostí. Na rozdíl od předchozích metod, které často vedly k frakcím obsahujícím směsi několika bílkovin, 2D elektroforéza umožňuje izolovat jednotlivé proteiny i z biologických vzorků. Výsledné mapy proteinů lze porovnávat s kontrolními vzorky, například s pacienty trpícími konkrétním onemocněním a zdravými jedinci. 2D elektroforéza se také používá jako preparativní metoda: konkrétní skvrna se vystřihne z gelu, bílkovina se z ní izoluje a následně se využije k další analýze nebo jiným postupům (Celis et Gromov, 1999; Bouchal et Kučera, 2003).

1.8.5 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Poprvé byla tato metoda vyvinuta v roce 1969 dvěma na sobě nezávislými vědeckými týmy. V této době byla využívána pro studium chromozomální evoluce a chromozomovou analýzu nádorů. Až o necelých 20 let později v roce 1988 byla zavedena do bakteriologie a použita pro mikroskopickou detekci bakterií (Moter et Göbel, 2000; Levsky et Singer, 2003).

Nejprve je nutné denaturovat vyšetřovanou nukleovou kyselinu. Tím dochází k rozrušení vodíkových můstků mezi bázemi a oddělení řetězců. Tímto procesem se z původní dvoušroubovice DNA získají dva jednoduché polynukleotidové řetězce. Po nastolení reasociačních podmínek je na tyto řetězce navázán krátký a značený úsek

nukleové kyseliny, nazývaný sonda, podle pravidel komplementarity bází. Navázání sondy na vyšetřovanou DNA se projevuje jako hybridizační signál, který lze pozorovat ve fluorescenčním mikroskopu (Moter et Göbel, 2000).

Sondy jsou typicky tvořeny oligonukleotidovým řetězcem o délce zhruba 15-30 bp. Existují různé typy značení sond. Nejčastějším typem je přímé fluorescenční označování. Výhodou této metody je, že lze signál pozorovat ihned po skončení hybridizace. Mezi používaná fluorescenční barviva patří fluorescein–isothiokyanát, 5-(-6-)karboxyfluorescein– N -hydroxysukcimidester a deriváty rhodaminu - Tetramethyl–Rhodamin–Isothiokyanát. Lze použít i metodu nepřímou. Pomocí této metody je k sondě připojena látka jako například digoxygenin a ten je následně detekován pomocí fluorescenční protilátky. Díky tomuto postupu získáme zesíleny hybridizační signál (Wessendorf et Brelje, 1992; Moter et Göbel, 2000).

Metoda je využívána v molekulární biologii a v lékařství. Slouží k diagnóze virových a bakteriálních onemocnění, pro mapování chromozomálních abnormalit a genetických onemocnění (Moter et Göbel, 2000).

2 Metodika

2.1 Použité přístrojové a laboratorní vybavení

- Protocol 2, přístroj sloužící k pořizování fotografií kolonií na Petriho miskách a počítání kolonií, výrobce Synbiosis
- CoolnyStar 8500, přístroj se spodním LED podsvícením a lupou sloužící k počítání kolonií, výrobce Funke gerber
- Model FED 400, multifunkční sušící pec, výrobce Binder
- CFKS 470, lednice, výrobce Vestfrost
- Testo 147T, datalogger k zaznamenání teploty, výrobce výrobce Testo SE & Co. KGaA
- DX 23, autokláv, výrobce Systec
- DX 45, autokláv, výrobce Systec
- BTE-23D, autokláv, výrobce Boeco
- EW1500-2M, digitální váhy, výrobce Kern
- GIM 530 MS, bezkontaktní infračervený teploměr laserovým zaměřovačem, výrobce Greisinger
- Model 620-2017, voděodolný teploměr určený k měření teploty vody, výrobce Traceable
- Jednorázové očkovací kličky, výrobce VWR
- Plastová vzorkovnice s objemem 500 ml, výrobce Golias
- Pipetovací špička s objemem 5 ml, výrobce Brand
- Automatická pipeta s objemem 0,5 ml až 5 ml, výrobce Brand
- Petriho misky o průměru 90 mm, výrobce Gama Group a.s.
- Jednorázové vinylové rukavice
- Laboratorní sklo

2.2 Použité chemikálie

- Disky pro detekci oxidázy produkované mikroorganismy, výrobce HiMedia
- Endoagar M029 (pepton 10 g/l, laktosa 10 g/l, siřičitan sodný 2,5 g/l, hydrogenfosforečnan draselná 3,5 g/l, basický fuchsin 0,5 g/l, agar 15 g/l, celkově 41,5 g na 1000 ml vody), výrobce HiMedia

- Desam® spray 500 ml, tekutý alkoholový přípravek sloužící k dezinfekci povrchů, výrobce Schuelke
- Činidlo pro cytochrom oxidázový test, připravováno dle ČSN 83 0521, Tetrametylparafenylendiamiddihydrochlorid 1 g, pentahydrát thiosíranu sodného 0,2, g, Chelaton 3 0,1 g, rozpustit v destilované vodě a doplnit na 100 ml
- Fosforečnanový tlumivý roztok, připravovaný dle ČSN EN ISO 8199, roztok chloridu hořečnatého 5 ml, fosforečnanový roztok 1,25 ml, 1 l vody

2.3 Použité programy

- Microsoft® Excel®, verze 2016, součást sady Microsoft 365®, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
- Microsoft® Word®, verze 2016, součást sady Microsoft 365®, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

2.4 Princip metody

Zpracováno dle ČSN 83 0531-3,6 (metoda přímého výsevu), ČSN 75 7835, ČSN 75 7837 a dle ČSN EN ISO 8199 (757810).

Zachycení mikroorganismů kultivací na povrchu Endo agaru přímým výsevem a potvrzení příslušnosti do skupiny koliformních bakterií cytochromoxidázovým testem. Koliformní bakterie zkvašují laktózu při 37 °C do 24 hodin za současné tvorby kyselin a eventuálně plynů. Po dokončení kultivace se počítají laktóza-pozitivní kolonie s negativním cytochromoxidázovým testem (purpurově červené, případně s kovovým leskem). Rozsah použití je na všechny typy povrchových vod, případně pro vody technologické, znečištěné a odpadní.

3 Pracovní postup

3.1 Odebrání, doprava a skladování vzorků

Odběr vody byl prováděn na vytipované lokalitě v Hradci Králové na pravém břehu řeky Labe. Před započetím samotného odběru byla změřena teplota vody. Následně byl proveden odběr vody do plastové vzorkovnice, která byla před započetím odběru vysterilizovaná a zatavená v plastovém obalu. Těsně před provedením odběru byla vzorkovnice vyňata z obalu, dále se odšroubovalo víčko a vzorkovnice byla hrdlem umístěna proti proudu řeky zhruba 20-30 centimetrů pod hladinu a ve vzdálenosti zhruba 1 metr od břehu. Celý tento proces byl prováděn ve sterilních jednorázových gumových rukavicích. Vzorek vody byl následně uzavřen do termoboxu s chladícími vložkami, teplota termoboxu se pohybovala v rozmezí 7-11 °C. Termobox se vzorkem byl v co nejrychlejším čase dopraven do laboratoře Povodí Labe, zde byl vzorek skladován v lednici při 7 °C a zároveň z něj bylo ihned po příjezdu odlito zhruba 100 ml ke zpracování testu v čase 0. Podmínky jednotlivých odběrů viz Příloha (Tabulka 1).

3.2 Zpracování vzorku

Do Erlenmeyerovy baňky bylo pro přípravu jednoho litru Endo Agaru naváženo 41,5 g přípravku. Toto množství živné půdy bylo rozmícháno v 500 ml destilované vody a až poté bylo přidáno zbylých 500 ml destilované vody. Hrdlo baňky bylo přikryto alobalem a takto připravená půda byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení baňky na teplotu cca 45 °C byla půda rozlita do sterilních Petriho misek.

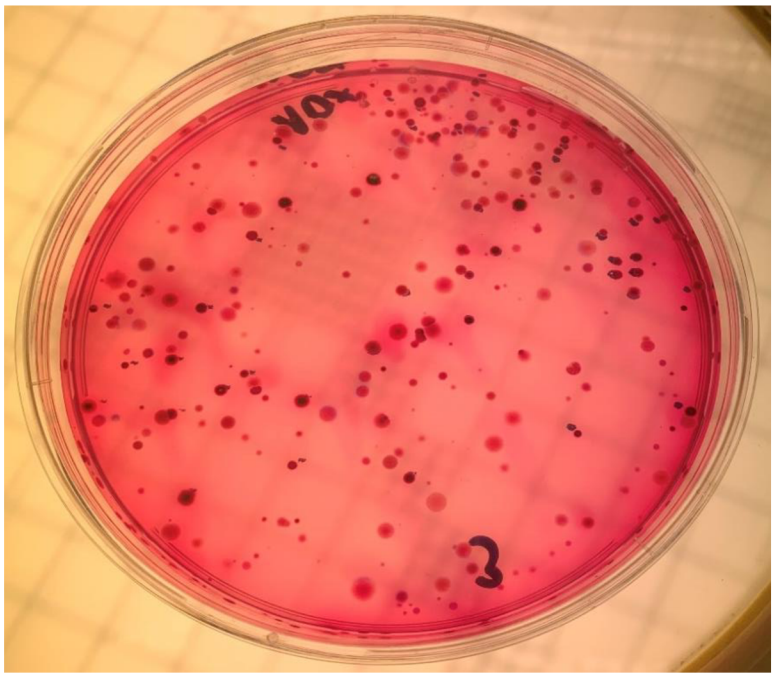
Vzorky byly zpracovávány ve třech časech. První čas je označován časem 0, tento vzorek byl zpracován ihned po příjezdu do laboratoře, což bylo časové rozmezí 1-2 hodin. Druhý čas 24 byl zpracován 24 hodin od nasazení vzorku v čase 0. Poslední čas 48 byl zpracován 48 hodin od nasazení vzorku v čase 0.

Vzorky byly zpracovány pomocí metody přímého výsevu na Endo agar. Tři Petriho misky s již zatuhlým agarem byly vyndány z lednice a vloženy do sušárny o teplotě 44 °C. V mezičase bylo ze vzorkovnice odlito 100 ml vzorku do sterilní skleněné lahvičky, aby byl vzorek vytemperován na laboratorní teplotu, která dosahovala 25 °C. Teplota odlitého vzorku byla monitorována pomocí

bezdotykového infračerveného teploměru. Po vytemperování byl vzorek homogenizován otočením lahvičky dnem vzhůru a zpět, tento pohyb byl opakován patnáctkrát. Následně byl 1 ml vzorku dávkován pomocí automatické pipety doprostřed Petriho misky a krouživými pohyby byl rovnoměrně rozdistribuován po celé ploše. Otevřené misky byly opět vloženy do sušárny zhruba na dobu 15 minut (do úplného zaschnutí vzorku). Následně byly misky uzavřeny a vloženy do kultivačního boxu s teplotou 36 °C dnem vzhůru po dobu 24 hodin.

3.3 Vyhodnocení vzorku

Po 24 hodinách byly misky z boxu vyňaty. Nejprve byly vyfotografovány pomocí přístroje Protocol 2. Následně byly odečítány na zařízení se spodním osvícením a lupou. Hledané kolonie bakterií byly zbarveny tmavě červeně s kovovým leskem. Při nejasném zbarvení byl použit cytochromoxidázový test. Hledané kolonie měly negativní výsledek cytochromoxidázového testu, což se projevovalo nezmodráním okraje kolonie. Naopak ostatní kolonie s pozitivním výsledkem zmodraly. Výsledky byly zaznamenávány do sešitu a následně přepisovány do tabulek v programu Excel.



Obrázek 1: Odečet bakteriálních kolonií po 24hodinové kultivaci na Endo agaru (Ondřej Probošt, 2024).

3.4 Likvidace vzorku

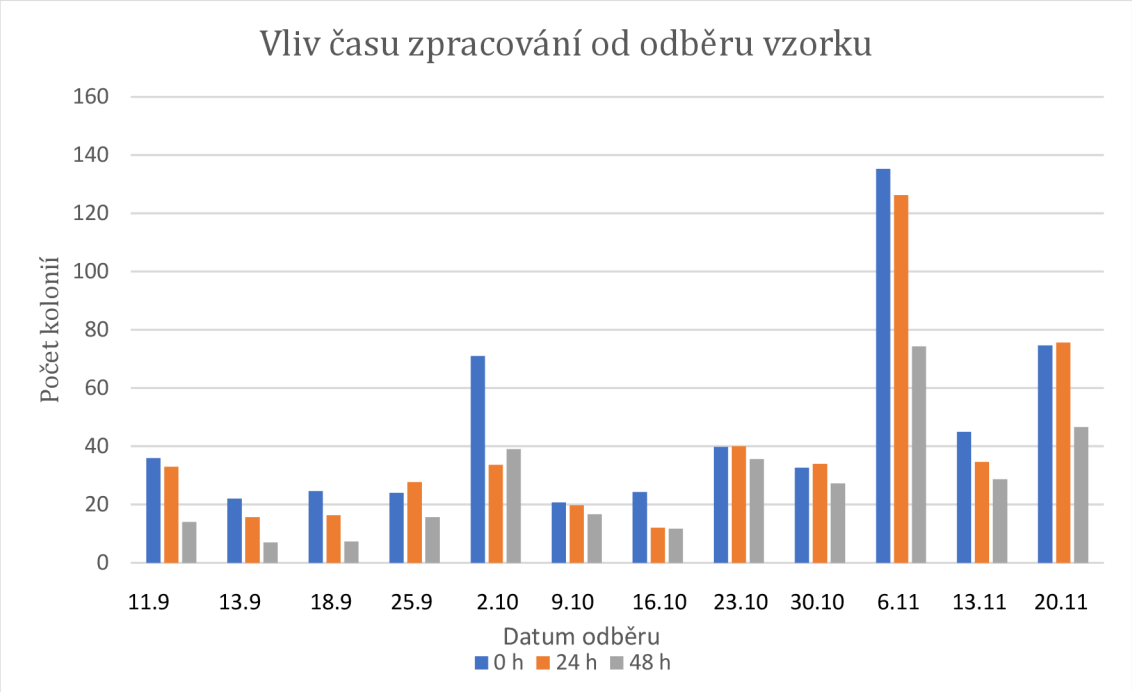
„Veškeré zbytky vzorků vody, které nebyly použity pro rozbor, jsou vylity do výlevky. Použitá tuhá média se odstraní z kultivačních nádob a soustředí se v polyetylénových sáčcích vhodné velikosti. Společně s dalšími komerčními jednorázovými kultivačními prostředky (např. Colilert apod.) se umístí do bezpečnostních nádob (s označením Biohazard) o objemu cca 60 l. Tyto nádoby se skladují se ve velkoobjemovém mrazicím boxu a v pravidelném cyklu je smluvní organizace odváží k likvidaci ve spalovně. Použité plastové kultivační nádobí se sterilizuje v tlakové nádobě (autoklávu) a likviduje se jako tuhý domovní odpad“ (Dolének, 2023).

4 Výsledky

Celkově bylo takto v 12 po sobě jdoucích týdnech v období od září do listopadu vytvořeno 108 Petriho misek se vzorky, ke každému času byly vždy vytvořeny 3 misky. Počet kolonií byl následně z těchto tří misek k danému dnu zprůměrován do jednoho čísla.

Na následujícím grafu (Graf 1) jsou znázorněny průměrné počty celkových narostlých kolonií koliformních bakterií.

Graf 1: Vliv času zpracování od odběru vzorku



Po zpracování výsledků je evidentní, že vzorky, které byly v lednici uchovávány po dobu 48 hodin, jsou k provádění mikrobiologických testů nevhodné. Průměrný pokles vyrostlých kolonií v porovnání s výsledky ze vzorků zpracovaných do 2 hodin od odběru je zhruba 41,5 %, nejnižší zaznamenaná hodnota je dokonce pokles o 71 %. V případě výsledků vzorků zpracovaných po 24 hodinách je průměrný pokles zhruba o 15,5 %. Nicméně takto vysoká odchylka je způsobena dvěma odběry, a to konkrétně výsledky z dat 2. října a 16. října. To mohlo být způsobeno chybným zpracováním vzorku anebo následným chybným odečtením kultivovaného vzorku. Bez započítání těchto dvou výrazně se odchylujících hodnot je pokles kultivovaných kolonií zhruba o 8,5 % a proto je vzorek uchovávaný po dobu

24 hodin vhodný k dalšímu zpracování. Celkový přehled získaných dat viz Příloha (Tabulka 2).

5. Diskuze

V roce 1983 byla provedena studie zabývající se vlivem doby a teploty skladování na následný výsledek počtu narostlých kultur koliformních bakterií. Vzorky byly skladovány po dobu 6 hodin, 24 hodin a 30 hodin, při teplotách 5 °C a 22 °C. Testy byly prováděny pomocí média m-FC. Z provedených studií vyplývá, že vzorky je potřeba uchovávat při nízkých teplotách, protože vzorky uchovávané při 22 °C po 24 hodinách vykazovaly pokles o 50 % oproti vzorku zpracovaném po 6 hodinách. Zatímco vzorek skladovaný při 5 °C po 24 hodinách dosahoval průměrně 83 % množství narostlých kolonií v porovnání s šestihodinovým vzorkem. Při stejné teplotě 5 °C po 30 hodinách dosahovaly narostlé kolonie zhruba polovině hodnoty vzorku zpracovaného po 6 hodinách, z čehož vyplývá, že k zásadnímu bodu zlomu v životnosti koliformních bakterií skladovaných při 5 °C dochází mezi 24. a 30. hodinou (McDaniels et Bordner, 1983).

Další studie byla prováděna v roce 1997. Vzorky byly obdobně skladovány při 5 °C a 22 °C, po dobu 6, 24 a 30 hodin. Při 5 °C se počty kolonií po 24 hodinách snížily o 23 % oproti době 6 hodin a po 30 hodinách skladování se snížily o 33 %. Při 22 °C skladování se po dobu 24 hodin počty kultivovaných kolonií snížily o 47 % oproti vzorku zpracovaném po 6 hodinách a po 30 hodinách se počty snížily dokonce o 62 % (Toranzos et McFeters, 1997).

Z následujících studií a z mé práce evidentně vyplývá, že hraniční doba pro zpracování vzorku je 24 hodin od odběru. Testy provedené po této době vykazují významnou odchylku od vzorků zpracovaných ihned po odběru. Dále je patrné, že je lepší pro uchovávání vzorku teplota 7 °C, protože oproti studiím prováděných při 5 °C je pokles po době 24 hodin o 1,5 – 7,5 % nižší. Při skladování po dobu 48 hodin při 7 °C je pokles o 8,5 % nižší než při skladování po dobu 30 hodin při 5 °C.

Závěr

Po provedení prací je jisté, že při provádění mikrobiologických odběrů vody je nutné dodržet základní hygienická pravidla, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku. Při převozu je klíčová doba a teplota při uchování, ta by se měla držet okolo 7 °C. Avšak je také nutné změřit teplotu odebírané vody, aby mikroorganismy v odebraném vzorku nebyly vystaveny vysoké rozdílné teplotě a tím způsobenému teplotnímu šoku. Dále by měly být vzorky uchovávány v laboratoři ve tmě a při nízké teplotě (5–7 °C) a zpracovány by měly být nejdéle do 24 hodin od odběru. Vzorky zpracované po uplynutí této doby nevykazují významné úbytky, snížení o zhruba 15,5 % oproti vzorkům zpracovaným v době 2 hodin od odběru. Zatímco výsledky zpracované po 48 hodinách dosahují počtů nižších o 41,5 % a jsou tak pro mikrobiologický rozbor nepoužitelné.

Mezi další důležité vlivy působící na koliformní bakterie a *E. coli* při skladování je světlo. Při vystavení spektru světla mezi 290-550 nm se inaktivace bakterií oproti podmínkám bez světla zrychlí až dvacetkrát. Největší baktericidní účinky má potom UV-B (290-320 nm) část spektra (Yukselen et al., 2003).

Naopak mezi vlivy, které životnost *E. coli* a koliformních bakterií prakticky neovlivňují, patří nízká hladina kyslíku a hladina pH. Přirozeně totiž osidlují prostředí gastrointestinálního traktu teplokrevných živočichů, kde je velmi malá koncentrace kyslíku a vysoké rozpětí pH (4,5 – 9) (Curtis et al., 1992; Razmi et al., 2023.)

V budoucí práci by bylo možné se v laboratorních podmínkách zaměřit na sledování více faktorů nežli jen teplotě. Například míře intenzity světla, množství přístupného kyslíku a také vlivu doprovodné mikroflóry.

Seznam použité literatury

Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y., Nalbant A. *Flow cytometry: basic principles and applications.* Critical Reviews in Biotechnology, 2015, číslo 2: 163-176. ISSN 1549-7801 Dostupné z https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2015.1128876

Alonso J., Soriano A., Amoros I., Ferrus M. *Quantitative determination of E. coli and fecal coliforms in water using chromogenic medium.* Journal of Environmental Science and Health, 1998 číslo 6: 1299-1248 ISSN 15324117 Dostupné z https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10934529809376785

Alvarez-Barrientos A., Arroyo J., Cantón R., Nombela C, Sánchez-Pérez M. *Applications of flow cytometry to clinical microbiology*. Clin Microbiol Rev, 2000, číslo 13, 167-95. ISSN 1098-6618 Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC100149/#B122

Ambrožová H., *Průjmová onemocnění a jejich léčba.* Praktické lékarenství, 2011, číslo 3: 116-120. ISSN 2788-1717. Dostupné z https://farmaciepropraxi.cz/pdfs/lek/2011/03/06.pdf .

Ambrožová J. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, 2004. ISBN 80-7080-534-X

Ambrožová J., *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha, Skriptum VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-676-0

Atherholt T., Feerst E., Hovendon B., Kwak J., Rosen J. *Evaluation of indicators of fecal contamination in Groundwater* Journal AWWA, 2003. číslo 95: 119-131. ISSN:1551-8833 Dostupné z: https://awwa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1551-8833.2003.tb10479.x

Aulenbach B., *Bacteria holding times for fecal coliform by mFC agar method and total coliform and Escherichia coli by Colilert®-18 Quanti-Tray® method.* Environmental Monitoring and Assessment, 2010, číslo 161: 147-159. ISSN 0167-

6369. Dostupné z https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-008-0734-3#citeas

Bardakci F. *Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers*. Turkish journal of Biology, 2001, číslo 2. Dostupné z: https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol25/iss2/10/.

Baudišová D. *Metody mikrobiologického rozboru vody*. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, 2017. ISBN 978-80-87402-61-0

Baudišová D., *Stanovení koliformních bakterií a Escherichia coli na chromogenním médiu.* Vodohospodářské technicko-ekonomické informace, 2016, číslo 1: 16-19. ISSN 1805-6555. Dostupné z https://www.vtei.cz/wp-content/uploads/2016/01/vtei-1_2016_Stanoveni_koliformnich.pdf.

Beld M., Reubsaet F., *Differentiation between Shigella, enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and noninvasive Escherichia coli.* European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2012, číslo 31: 899-904. ISSN 1435-4373 Dostupné z: https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-011-1395-7.

Bencko V., Mika J., Rettich F., Veselá J., Volf J. *Metodický návod pro stanovení indikátorových organismů v bioodpadech, upravených bioodpadech, kalech z čistíren odpadních vod, digestátech, substrátech, kompostech, pomocných růstových prostředcích a podobných matricích*. Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica, 2008, číslo 1: 1-53. ISSN: 1804-9613. Dostupné z: https://szu.cz/wp-content/uploads/2023/01/full_2008_01.pdf.

Bouchal P., Kučera I. *Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: Principy a aplikace.* Chemické listy. Praha: Česká společnost chemická, 2003, číslo 1: 29-35. ISSN 0009-2770.

Celis J., Gromov P. *2D protein electrophoresis: ca nit be perfected?* Current Opinion in Biotechnology, 1999, číslo 1: 16-21. ISSN 0958-1669. Dostupné z https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166999800044

Croxatto A., Prod´hom G., Greub G., *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic mikrobiology.* FEMS Mircogiology Reviews, 2012,

číslo 36, 380-407. ISSN 1574-6976 Dostupné z: https://academic.oup.com/femsre/article/36/2/380/565595

Curtis T., Mara D., Silva S. *Ifluence of pH, oxygen and humic substances on Ability of sulight to demage fecal coliforms in waste stabilization pond water.* Applied and enviromental mikrobiology 1992, číslo 58: 1335-1343. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC195595/

Česko. *Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů.* Zákony pro lidi.cz [cit. 22. 4. 2024]. Dostupné z: https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2000-258

ČSN 75 7221. *Kvalita vod – Klasifikace kvality povrchových vod.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2017, 20 s. Třídící znak 757221.

ČSN 75 7835. *Jakost vod – Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a Escherichia coli.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2009, 12 s. Třídící znak 757835.

ČSN 75 7837. *Jakost vod – Stanovení koliformních bakterií v nedesinfikovaných vodách*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010, 8 s. Třídící znak 757837.

ČSN EN ISO 8199 (757810). *Kvalita vod – Obecné požadavky a návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2019, 56 s. Třídící znak 757810.

Dolének P. *Příručka kvality zkušební laboratoře, příloha: Standartní pracovní postupy Bio*. Hradec Králové: Povodí Labe, 2023.

Elnifro E., Ashshi A., Cooper R., Klapper P. *Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology.* Clninical Microbiology Reviews, 2000, číslo 13: 559-570. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88949/.

Fleckenstein J., Kuhlmann F. *Enterotoxigenic Escherichia coli Infections*. Current Infectious Disease Reports, 2019, číslo 21. ISSN 2036-7449. Dostupné z: https://link.springer.com/article/10.1007/s11908-019-0665-x.

Fricker E., Illingworth K., Fricker C. *Use of two formulations of Colilert and QuantiTray™ for assessment of the bacteriological quality of water.* Water Research, 1997, číslo 10: 2495-2499. ISSN 0043-1354 Dostupné z https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135496003429

Gaš B. *Kapilární elektroforéza.* Vesmír, 2001, číslo 7: 370-373. ISSN 0042-4544. Dostupné z https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2001/cislo-7/kapilarni-elektroforeza.html.

Genung E., Thompson L. *Color diffusion in endo agar.* Journal of Baceriology, 1927, číslo 2: 139-156. ISSN 1098-5530. Dostupné z https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374949/?page=1.

Goosney D., Greuenheid S., Finlay B. *Gut Feelings: Enteropathogenic E. coli (EPEC) Interactions with the Host.* Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2000, číslo 16: 173-189. ISSN 1530-8995. Dostupné z https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.cellbio.16.1.173.

Green M., Sambrook J. *Nested Polymerase Chain Reaction (PCR).* Cold Spring Harbor Labaratory Press, 2019, číslo 2. Dostupné z https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30710024/.

Groschel D H. *Methods, reagents and media: new technology in clinical microbiology.* Infect Control, 1983 číslo 4, 232–233. ISSN 1996-9783.

Häusler J. *Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vod.* Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky, 1994. ISBN 80-7084-107-9

Häusler J. *Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vod: receptář.* Praha: Agrospoj, 1995. ISBN 80-7084-126-5

Horikoshi K., Grant W.D., *Mikrobial life in extreme environments*. New York: Wiley-Liss, 1998. ISBN 0-471-02618-2

Hurych J., Štícha R. *Lékařská mikrobiologie – repetitorium*. Praha: Stanislav Juhaňák – TRITON, 2021. ISBN 978-80-7553-900-7

Julák J. *Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie. 2. vydání*. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1141-9.

Kalinina O., Lebedeva I., Brown J., Silver J. *Nanoliter scale PCR with TagMan detection.* Nucleic Acids Research, 1997, číslo 10: 1994-2004. ISSN 1362-4962. Dostupné z https://academic.oup.com/nar/article/25/10/1999/2359882.

Kladenský J. *Infekce dolních močových cest u žen – možnosti diferencovaného přístupu léčby a prevence*. Urologie pro praxi, 2010, číslo 11: 234-240. ISSN 1803-5299. Dostupné z https://www.solen.cz/pdfs/uro/2010/05/03.pdf

Koo H., Won H., Chung H., Yoo Y., Kang J., Kim B. Lee S., Ahn S. *Diversity of Marine Microbes Using Non-Cultivating Method.* Proceedings of the Korean Society of Life Science Conference, 2008.

Kožíšek F., Kos J., Pumann P. *Hygienické minimum pro pracovníky ve vodárenství*. Praha: Státní zdravotní ústav, 2007. Dostupné z: https://szu.cz/wp-content/uploads/2023/04/hygmin2.pdf

Křížová I., *Analýza vybraných ukazatelů kvality vody.* Diplomová práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2013. Dostupné z https://theses.cz/id/hkrrzn/Diplomov_prce_-_Bc__Iveta_Kov.pdf.

Langhammer J. *Kvalita povrchových vod a jejich ochrana.* Praha: Přirodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, 2009.

Lawless C., Wilkinson D., Young A., Addinall S., Lydall D. *Colonyzer: automated quantification of micro-organism growth characteristics on solid agar.* BMC Bioinformatics, 2010, číslo 11. ISSN 1471-2105. Dostupné z https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2105-11-287.

Lee P., Costumbrado J., Hsu Ch., Kim Y. *Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Frameents*. Journal of Visualized Experiments, 2012, číslo 62. ISSN 1940-087X. Dostupné z https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4846332/#

Levsky J., Singer R. *Fluorescence in situ hybridization: past, present and future.* Journal of Cell Science, 2003, číslo 14: 2833-2838 ISSN 1477-9137.

Magdeldin S. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics.* IntechOpen, 2012. ISBN 978-953-51-0458-2.

Mansour J., Robson J., Arndt C., Schulte T. *Detection of Escherichia coli in blood using flow cytometry.* Cytometry Part A, 1985, číslo 6: 186-190. ISSN 1552-4930. Dostupné z https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3888555/.

Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M. *Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach.* Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2002, čísli 1: 47-51. ISSN 1098-2825. Dostupné z https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.2058

McDaniels A., Bordner R. *Effects of holding time and temperature on coliform numbers in drinking wate*. Journal - American Water Works Association 1983, číslo 75: 458-463. dostupné z https://www.jstor.org/stable/41273033

McPherson M. J., Møller S. G., *PCR*. Oxoford, BIOS Scentific Publishers, 2000. ISBN 1-85996-017-0.

Moter A., Göbel U. *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms.* Journal of Microbiological Methods, 2000, číslo 2: 85-112. ISSN 0167-7012 Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701200001524?via%3Dihub.

Noble R., Moore D., Leecaster M., McGee C., Weisberg S. *Comparison of total coliform, fecal coliform and enterococcus bacterial indicator respons for ocean recreational water quality testing.* Water Research, 2003, číslo 7: 1637-1643. ISSN 0043-1354

Oren, A., *Microbial life at high salt concentrations: Phylogenetic and metabolic diversity.* Saline Systems, 2008, číslo 4. Dostupné z: https://aquaticbiosystems.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-1448-4-2 .

Pitter P., *Hydrochemie.* Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1999. ISBN 80-7080-340-1.

Přibil P., Fenselauová K., *Charakterizace enterobakterií pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.* Anal Chem., 2005, číslo 18. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16159146/

Razmi N., Lazouskaya M., Pajcin I., Petrovic B., Grahovac J., Simic M., Willander., Nur O., Stojanovic G. *Monitoring the effect of pH on the growth of pathogenic bacteria using electrical impedance spectroscopy.* Results in Engineering 2023, číslo 20. ISSN 2590-1230 Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590123023005522?fbclid=IwAR05RLswkmfUIrfLMSGoDEjZO5I9iU6s39OykQU6dtKWzJABubua52BJs5M

Roblová V. *Analýza biologicky akvitvních látek ve vinohradnickém materiálnu metodou kapilární elektroforézy.* Diplomová práce. Brno, Masarykova univerzita, 2011. Dostupné z https://is.muni.cz/th/vbazn/DIPLOMOVA_PRACE.pdf.

Ruiz N, Silhavy TJ. *How Escherichia coli Became the Flagship Bacterium of Molecular Biology.* Journal of Bacteriology 2022 září, číslo 20;204 - 212(9) doi: 10.1128/jb.00230-22 Dostupné z : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9487582/

Rulík M., Baudišová D., Růžička J., Šimek K., *Mikrobiální ekologie vod*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. ISBN 978-80-244-3477-3.

Rutar P., *Recidivující infekce močových cest.* Medicína pro praxi, 2019, číslo 3: 196-198. Dostupné z https://www.solen.cz/pdfs/med/2019/03/14.pdf

Sinton L., Hall C., Lynch P., Davies-Coley R. *Sunlight Inactivation of Fecal Indicator Bacteria and Bacteriophages from Waste Stabilization Pond Effluent in Fresh and Saline Waters.* Applied and enviromental mikrobiology 2002, číslo 68: 1122-1131. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC123754/

Šilhánková L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology.3.* Praha: ACADEMIA, 2002. ISBN 80-200-1024-6.

Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. *Metody molekulární biologie.* Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1

Tingey S., Tufo J. *Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers.* Plant Physiology, 1993, číslo 2: 349:352. ISSN 153-2548. Dostupné z https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC160578/.

Toranzos G., McFeters G. *Detection of indicator microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters.* Manual of environmental mikrobiology, 1997, číslo 75: 184-194. ISBN 9781555810870 Dostupné z: https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19982005803

Tortorello M., *Inficator organisms for safet and quality-uses and methods for detection: minireview.* Journal of AOAC International, 2003, číslo 6. ISSN 1944-7922. Dostupné z https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14979704/.

Valasek M., Repa J. *The power of real-time PCR.* Advances in Physiology Education, 2005, čísli 3: 151-159. Dostupné z https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/advan.00019.2005.

Velíšek J., *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-01-1.

Wallner G., Fuchs B., Spring S., Beisker W., Amann R. *Flow sorting of microorganisms for molecular analysis*. Appl Environ Microbiol, 1997 číslo 63, 4223–4231. ISSN 1098-5336

Welinder-Olsson C., Kaijser B., *Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC).* Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2005, číslo 37: 405-416. Dostupné z https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365540510038523

Wessendorf M., Brelje T. *Which fluorophore is brightest? A comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, texas red, and cyanine 3.18.* Histochemistry and Cell Biology, 1992, číslo 98: 81-85. ISSN 1432-119X. Dostupné z https://link.springer.com/article/10.1007/BF00716998#citeas

Wilkerson M. *Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine.* Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 2012, číslo 1: 53-71. ISSN 0195-5616

Yayanos A., *Empirical and theoretical aspects of life at high pressure in the deep sea.* New York, Wiley-Liss, 1998. ISBN 978-0471-026-181

Yukselen M., Calli B., Gokyay O., Saatci A. *Inactivation of coliform bacteria in Black Sea waters due to solar radiation.* Environment International, 2003, číslo 29: 45-50. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412002001447#BIB4

Zavadilová Š. *Dekontaminace povrchu drůbeže organickými kyselinami v kombinaci s lysozymem.* Diplomová práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/6007/zavadilov%C3%A1_2008_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Žáček L., *Technologie úpravy vody*. Brno: Vutium, 1998. ISBN 80 214-1257-7.

Přílohy

Tabulka 1. Kompletní shrnutí doby provádění odběrů, průtoku a teploty odebírané vody na lokalitě Hradec Králové – Náplavka.

datum	teplota vody v °C	čas odběru	průtok v m^3/s
11.03.2023	19,5	7:10	10
13.09.2023	19,8	7:00	8,3
18.09.2023	19,2	6:40	8,4
25.09.2023	18	7:00	7,5
02.10.2023	18,5	7:05	8,4
09.10.2023	15,7	7:05	6,3
16.10.2023	14,5	7:00	5,4
23.10.2023	12,3	7:05	7,4
30.10.2023	12,5	7:10	10,2
06.11.2023	10,7	7:15	25,4
13.11.2023	7,2	7:10	17,9
20.11.2023	6,7	7:20	38

Tabulka 2. Kompletní výsledky mikrobiologických testů ze vzorků odebraných na lokalitě Hradec Králové – Náplavka.

datum	čas naočkování[1]	*E. coli*[2]	koli CTO[3]	koli celkem[4]
11.09.2023	0	30,33	5,67	36
	24	18,33	14,67	33
	48	11,67	2,33	14
13.09.2023	0	13,67	8,33	22
	24	9	6,67	15,67
	48	1,67	5,33	7
18.09.2023	0	10	14.67	24.67
	24	9,33	7	16,33
	48	4,33	3	7,33
25.09.2023	0	19,67	4,33	24
	24	23	4,67	27,67
	48	10	5,67	15,67
02.10.2023	0	66	5	71
	24	29,67	4	33,67
	48	33,33	5,67	39
09.10.2023	0	17	3,67	20,67
	24	12,33	7,33	19,67
	48	11	5,67	16,67
16.10.2023	0	20	4,33	24,33
	24	8,33	3,67	12
	48	8,67	3	11,67
23.10.2023	0	39	0	39
	24	26,33	13,67	40
	48	24,33	11,33	35,67
30.10.2023	0	25,33	7,33	32,67
	24	23,67	10,33	34
	48	20,67	6,67	27,33
06.11.2023	0	117,67	17,67	135,33
	24	108,33	18	126,33
	48	60,33	14	74,33
13.11.2023	0	37	8	45
	24	22,33	12,33	34,67
	48	18,67	10	28,67
20.11.2023	0	61,67	13	74,67
	24	62,67	13	75,67
	48	37	9,67	46,67

[1] doba od odběru do naočkování; [2] průměrný počet kolonií *E. coli*; [3] průměrný počet kolonií s negativním CTO testem; [4]celkový průměrný počet kolonií *E. coli* + koliformních bakterií s negativním CTO testem