

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Mikroorganismy a jejich riziko v pitné vodě

Bakalářská práce

Autor práce: Simona Prachařová

Obor studia: Kvalita produkce

Vedoucí práce: Ing. Eva Popelářová, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Mikroorganismy a jejich riziko v pitné vodě" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Evě Popelářové, Ph.D. za věnovaný čas, poskytnuté rady a připomínky v průběhu zpracování bakalářské práce.

Mikroorganismy a jejich riziko v pitné vodě

Souhrn

Denní spotřeba pitné vody je značně vysoká, a to nejen v domácnostech, ale také v různých průmyslových odvětvích, proto je velmi důležitá její kvalita. Hlavním cílem bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši na téma výskytu mikroorganismů a jejich rizika v pitné vodě.

Mikrobiální společenství v pitné vodě je druhově i početně velmi rozšířené, proto byla práce zaměřena především na charakteristiku alochtonních mikroorganismů, které mohou ohrozit zdravotní stav člověka a přinášet alimentární onemocnění.

Nejvýznamnější z nich jsou bakterie fekálního původu, k nimž patří především koliformní bakterie, *Escherichia coli*, dále intestinální enterokoky (*Enterococcus*, *Streptococcus*) a *Clostridium perfringens*. Jakmile se dostanou z jejich přirozeného prostředí, jsou považovány za hlavní mikrobiální kontaminanty pitné vody. Lidem mohou způsobovat mírná onemocnění (průjemy, horečky, zvracení a bolesti břicha), až po život ohrožující onemocnění (např. neonatální meningitida, hemolyticko-uremický syndrom, endokarditida).

Dále byly popsány mikroorganismy, které se v pitné vodě nevyskytují tak často, ale pokud jsou zde přítomny, způsobují daleko závažnější onemocnění. Jedná se o skupinu patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů, kam se řadí např. viry (virus hepatitidy, SARS-CoV-2 aj.), prvoci a hlavně bakterie (*Campylobacter* spp., *Legionella* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas aureginosa* a další).

Pro zajištění nezávadné pitné vody je potřeba její pravidelné monitorování. Mikroorganismy přítomné v pitné vodě nelze pozorovat pouhým okem ani nijak sensoricky posoudit, proto je velmi důležité zvolit správnou metodu pro jejich stanovení a rozlišení. Z tohoto důvodu jsou považovány metody izolace a identifikace mikroorganismů z pitné vody za významné kroky vedoucí k eliminaci zdravotních onemocnění. Proto mezi další cíle práce patřilo uvedení příkladů konkrétních metod pro stanovení mikroorganismů z pitné vody a zároveň popis výhod či nedostatků těchto metod.

V rámci bakalářské práce byly také popsány důležité postupy pro stanovení mikroorganismů. Kultivační metody patří mezi základní metody v každé laboratoři, ovšem některé mikroorganismy (převážně patogenní) nelze snadno kultivovat. Proto jsou využívány detekční metody, a to nejen pro určování patogenních mikroorganismů, ale také pro urychlení stanovení a zvýšení přesnosti výsledku u daného vzorku.

Legislativy a vyhlášky jsou v každé zemi odlišné. Většinou se především pátrá po mikroorganismech fekálního původu, jelikož jsou považovány za nejvhodnější indikátory při mikrobiologické analýze pitné vody. Z výzkumů vyplynulo, že ačkoliv jsou stále zvyšovány nároky na kvalitu pitné vody, přesto existuje riziko onemocnění z pitné vody, a to i ve vyspělých zemích.

Klíčová slova: Mikrobiologické ukazatele pitné vody; patogeny; kontaminace; kvalita.

Microorganisms and their risk in drinking water

Summary

Daily consumption of drinking water is quite high, not only in households but also in various industries, so its quality is very important. The main goal of the bachelor's thesis was to conduct a literature search on the occurrence of microorganisms and their risks in drinking water.

The microbial community in drinking water is very widespread in terms of species and numbers, so the work was focused mainly on the characteristics of allochthonous microorganisms, that can endanger human health and bring foodborne illness.

The most important of these are bacteria of fecal origin, which include mainly coliform bacteria, *Escherichia coli*, intestinal enterococci (*Enterococcus*, *Streptococcus*) and *Clostridium perfringens*. Once released from their natural environment, they are considered major microbial contaminants. They can cause people mild illnesses (diarrhoea, fever, vomiting and abdominal pain), up to life-threatening illnesses (e.g. neonatal meningitis, haemolytic uraemic syndrome, endocarditis).

Furthermore, microorganisms have been described which do not occur as frequently in drinking water but, if present, cause far more serious diseases. It is a group of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms, which include, for example, viruses (hepatitis virus, SARS-CoV-2, etc.), protozoa and especially bacteria (*Campylobacter* spp., *Legionella* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas aureginosa* and others).

To ensure safe drinking water, regular monitoring is required. Microorganisms present in drinking water cannot be observed with the naked eye or assessed in any sensory way, so it is very important to choose the right method for their determination and differentiation. For this reason, methods of isolation and identification of microorganisms from drinking water are considered important steps leading to the elimination of health diseases. Therefore, other goals included giving examples of specific methods for the determination of microorganisms from drinking water and also a description of the advantages or disadvantages of these methods.

The bachelor's thesis describes important procedures for the determination of microorganisms. Cultivation methods are among the basic methods in every laboratory, but some microorganisms (mostly pathogenic) are not easy to cultivate. Therefore, detection methods are used, not only to determine pathogenic microorganisms, but also to speed up the determination and increase the accuracy of the result in a given sample.

Legislation and ordinances are different in each country. Microorganisms of fecal origin are mostly sought after, as they are the most suitable indicators for microbiological analysis of drinking water. Research has shown that although the demands on drinking water quality are still increasing, there is still a risk of drinking water disease, even in developed countries.

Keywords: Microbiological indicators of drinking water; pathogens; contamination; quality.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1 Úvod | 7 |
| 2 Cíl práce | 8 |
| 3 Literární rešerše | 9 |
| 3.1 Pitná voda | 9 |
| 3.1.1 Zdroje a úprava pitné vody..... | 9 |
| 3.1.2 Význam pitné vody | 11 |
| 3.1.3 Normy a hygienické požadavky pitné vody v České republice | 12 |
| 3.1.4 Způsoby kontaminace pitné vody..... | 14 |
| 3.2 Mikroorganismy ve vodě | 15 |
| 3.2.1 Diverzita mikroorganismů pitné vody | 15 |
| 3.2.2 Alochtonní mikroorganismy pitné vody | 16 |
| 3.2.2.1 Mikroorganismy ze střevní mikrobioty | 16 |
| 3.2.2.2 Vybrané patogenní bakterie..... | 20 |
| 3.2.2.3 Ostatní mikroorganismy kontaminující pitnou vodu | 22 |
| 3.3 Mikrobiologické ukazatele při kontrole pitné vody | 25 |
| 3.3.1 Indikátory obecného znečištění..... | 26 |
| 3.3.2 Indikátory fekálního znečištění..... | 27 |
| 3.3.3 Patogenní a podmíněné patogenní mikroorganismy | 30 |
| 3.4 Metody izolace a identifikace mikroorganismů v pitné vodě | 31 |
| 3.4.1 Kultivační metody | 31 |
| 3.4.1.1 Stanovení organotrofních bakterií | 31 |
| 3.4.1.2 Stanovení indikátorů fekálního znečištění | 32 |
| 3.4.2 Detekční metody..... | 34 |
| 3.5 Mikrobiologická kvalita pitné vody ve vybraných zemích | 39 |
| 4 Závěr | 42 |
| 5 Seznam literatury | 43 |
| 6 Samostatné přílohy | I |

1 Úvod

Voda je přirozeným prostředím pro výskyt mnoha organismů, proto lze ve vodním prostředí nalézt jejich širokou škálu, a to od mikroorganismů, přes rostliny, až po vyšší živočichy. Z hlediska mikroorganismů jsou nejpočetnější zastoupenou skupinou především bakterie, voda je ideální prostředí pro život i reprodukci.

I když voda může na první pohled vypadat čistě a zdravě, nemusí tomu tak vždycky být. Dopad kontaminované vody na zdraví člověka může být silně negativní a v těch nejhorších případech končí i usmrcením jedince. Přesto i v dnešní době dochází každý rok k obrovskému počtu úmrtí skrz kontaminovanou vodu (nejen v méně rozvinutých, ale i ve vyspělých zemích).

Na kontaminaci vody se nepodílí pouze biologická společenstva, ale může se také jednat o kontaminaci fyzikální nebo chemickou. Avšak biologická kontaminace je označovaná za nejčastějšího původce onemocnění, a to především ta, která je způsobena mikroorganismy ze střevní mikrobioty.

Voda představuje složku téměř každé potraviny, tudíž její kvalita úzce souvisí i s kvalitou potravin. Prevencí před mikrobiálním znečištěním je především vhodná úprava vody a dostatečná údržba jejího zdroje. V praxi bývá nejvíce využívána nízkonákladová a vysoce účinná desinfekce vody pomocí chlóru a jeho sloučenin. Účinným nástrojem v domácnostech, k zajištění prevence proti mikrobiální kontaminaci, slouží pouhé převaření vody.

2 Cíl práce

Ve vodním prostředí se vyskytují autochtonní mikroorganismy, ale také alochtonní, které mohou být pro člověka patogenní a způsobovat alimentární onemocnění, tudíž jsou v pitné vodě nežádoucí. Hlavním cílem bakalářské práce bylo zdůvodnit výskyt mikroorganismů v pitné vodě.

Mikroorganismy přítomné v pitné vodě nelze pozorovat pouhým okem ani nijak sensoricky posoudit, proto je velmi důležité zvolit správnou metodu pro jejich stanovení a rozlišení. Z tohoto důvodu jsou považovány metody izolace a identifikace mikroorganismů z pitné vody za významné kroky vedoucí k eliminaci zdravotních onemocnění. Mezi další cíle práce patřilo uvedení příkladů konkrétních metod pro stanovení mikroorganismů z pitné vody a zároveň popis výhod či nedostatků těchto postupů.

Dalším úkolem bylo zaměřit se na vliv patogenních mikroorganismů na lidské zdraví.

3 Literární rešerše

Snadná dostupnost pitné vody je v dnešní době samozřejmostí snad pro každého člověka. Otočení kohoutku vodovodní baterie patří k běžným a pravidelně se opakujícím každodenním aktivitám společnosti. Lidé si však potřebu vody uvědomují až s její nedostupností. V České republice jsou plány na zabezpečení pitné vody aktuálním tématem. Pro její zachování je v praxi třeba přijmout mnohá opatření (Říhová Ambrožová 2009). Zdravotně nezávadná a bezpečná voda může být zachována pouze za předpokladu, že bude zabráněno její kontaminaci (včetně sekundární) a pokud bude dostatečně upravována (Říhová et al. 2010).

3.1 Pitná voda

Definice pitné vody je zakotvena v zákoně o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů č. 258/2000 Sb. (dále jen zákon o ochraně veřejného zdraví) a udává to, že *„Pitná voda 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 přecházejí do styku s potravinami nebo lidským tělem a k dalším účelům lidské potřeby, a to bez ohledu na její původ, skupenství a způsob jejího dodání“*. Ovšem pitnou vodu nemůžeme brát jako přírodní léčivý zdroj.

Definici pitné vody lze dohledat také ve vyhlášce č. 252/2004 Sb. Ministerstva zdravotnictví České republiky, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů (dále jen vyhláška o pitné vodě), která navazuje na směrnici Rady Evropské unie 98/83/EC, kde se pitná voda definuje jako zdravotně nezávadná pitná voda, která nesmí ohrozit veřejnost a jeho zdraví při její pravidelné požívání, neobsahuje žádné mikroorganismy, parazity a látky v určitém počtu nebo koncentraci, které by ohrožovaly veřejné zdraví.

Voda je lidským právem, každý člověk má právo na vodu, a to bez výjimky. V roce 2010 výslovně uznalo Valné shromáždění OSN lidské právo na vodu a hygienu. Každý tak má právo na dostatečnou, nepřetržitou, bezpečnou, přijatelnou a fyzicky i cenově dostupnou vodu pro osobní i domácí použití (WHO 2019).

3.1.1 Zdroje a úprava pitné vody

Molekula vody je tvořena jedním atomem kyslíku a dvěma atomy vodíku. Při standardní okolní teplotě a tlaku se jedná o kapalinu, může mít však také ve formě ledu nebo plynu. Její existence v kapalně podobě je pro existenci života na zemi velmi důležitá (Stella & Obeagu 2018). Voda pokrývá dvě třetiny země, z tohoto množství je přibližně 99,7 % obsaženo v oceánech a mořích (Caruso 2013). Je odhadováno, že na světě je přibližně 1 386 mil. km² vody, z toho 2,5 % vody sladkovodní, z níž menší polovina není k dispozici, jelikož se nachází v ledovcích hluboko pod zemí.

Použitelná voda pochází ze srážek, jež dopadají na pevninu v rámci koloběhu vody. Pitná voda je nepřetržitě recyklována odpařováním za pomoci sluneční energie. Hydrologický

cyklus denně spotřebuje více vody, než spotřebovalo lidstvo za celou svou existenci. Roční celosvětový úhrn srážek je okolo 119 000 km². Z tohoto množství se přibližně 74 000 km² odpaří zpět do atmosféry a zbylá část přejde do vodních toků a jezer či se infiltruje do země, kde doplní podzemní vody. Z tohoto množství je ekonomicky dostupných pro lidi 9 000 až 14 000 km², což pro srovnání odpovídá jedné čajové lžičce z plné vany (Bhagwat 2019).

Celosvětově se pitná voda k lidem v domácnostech dostává ze dvou hlavních zdrojů. Tím prvním je veřejná vodovodní distribuční síť a tím druhým soukromé studny. Voda z veřejné sítě je pravidelně kontrolována, a tedy zde spíše nehrozí, že by mohlo dojít k ohrožení zdraví spotřebitelů. U studní je však situace jiná. Značný počet studní v České republice obsahuje vodu kontaminovanou patogenními bakteriemi. Je však možné, že lidé užívající tuto vodu dlouhodobě nemají žádné příznaky spojené s její kontaminací. To ale není v žádném případě zárukou její nezávadnosti. Dle Tůma (2015) si tito lidé s největší pravděpodobností vytvořili ke kontaminované vodě toleranci. Avšak onemocnět z ní by mohli jejich návštěvy, děti či při poklesu imunity i oni sami.

Mnohé země v rámci prevence dnes více uplatňují bariérový přístup patogenů do pitné vody. Systémy distribuce tak používají několik bariér k potlačení patogenů, a to v rámci celého procesu hospodaření se zdrojovou vodou, tedy od jejího příjmu až po konečný výstup z vodovodu. Bariérami tak jsou zásahy ze strany provozu vodáren a vodovodů. V systémech přírodních vod působí přirozené bariéry, jako například půda či skalní podloží aj., ty jsou uplatňovány i v případě studní (Santo et al. 2019).

Bezpečná pitná voda je tedy jednou z neúspěšnějších intervencí v oblasti veřejného zdraví, jaké kdy byly vyvinuty. Úpravu vody praktikovaly již starověké civilizace, o čemž svědčí sanskrtské spisy i egyptské nápisy. První dodávka pitné vody do města, která byla ošetřena pomalou pískovou filtrací, byla zaznamenána v roce 1829 ve Skotsku (Guchi 2015). Původní písková filtrace byla později nahrazena desinfekcí vody chlorem (Santo et al. 2019). Guchi (2015) dále dodává, že pomalá písková filtrace byla uznána jako vhodná technologie v méně rozvojových zemích pro odstranění patogenních mikroorganismů ve vodě (a to až o 99,9 %).

Jedním z důležitých kroků, při kterých dochází k úpravě kontaminované vody, je desinfekce, jejímž cílem je zničení všech patogenů, a to dvěma způsoby. Jedním ze způsobů může být konečné ošetření vody, při kterém dochází k usmrcení zbývajících mikroorganismů, nebo slouží jako částečná ochrana před opakující se kontaminací. Chlorace vody je používaná dodnes. Obě metody výrazně snížily výskyt chorob přenášovaných pitnou vodou. Desinfekce nemusí být prováděna pouze chlorem, využívá se dále i ultrafialové záření, horká voda, pára nebo ozonizace (Abu Shmeis 2018).

Mnoho lékařů upozornilo, že pravidelné užívání chlorované vody (zejména pokud je chlór k desinfekci vody využíván ve vyšších koncentracích) může vést k nárůstům nemocí. Jedná se o velmi vážná onemocnění, která představují nádory v trávicím traktu, karcinom močového měchýře a tlustého střeva. Po těchto zprávách, z hlediska onemocnění z chlorované vody, se dodnes spousta firem snaží vytvořit jiné technologie k zajištění bezpečné vody. Odstraněním mikroorganismů z neupravené vody za využití iontů stříbra se zabývali Pavlovič et al. (2014). Ionty stříbra (používané v elektrochemické metodě) vykazují toxicitu vůči mikroorganismům,

a to i těm, které jsou pravidelně monitorovány (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium*, *Enterobacter*).

3.1.2 Význam pitné vody

Na pitnou vodu je třeba nahlížet jako na potravinu. Její význam v souvislosti s člověkem je tudíž zásadní. Největší spotřeby pitné vody je dosahováno v oblasti zemědělství a potravinářství. Její potravinářské využití je velmi široké, i když se jedná o jeho kritický zdroj. Při výrobě potravin ji lze použít na různých úrovních, může mít charakter přísady či například mycího prostředku. Kvalita vody a její dopad na různé stupně potravinářských výrob bývají i přes její důležitost často podceňovány. To vede ke špatnému hospodaření s vodou, problémům s údržbou či provozem, což způsobí značné finanční ztráty a riziko ohrožení bezpečnosti potravin. Bezpečnost potravin má zásadní vliv na kvalitu lidského života, upozorňuje Bhagwat (2019). Jakékoli mikroorganismy, ať už patogenní bakterie, viry či jiné mikroorganismy produkující toxiny, působí ve vodě (používané při výrobě potravin) jako kontaminanty a mohou tak ovlivnit její bezpečnost. V rámci bezpečnosti potravin se ale nejedná pouze o mikrobiální kontaminaci. Pozornost je třeba věnovat také fyzikálním (např. střepy aj.) a chemickým (např. alergeny aj.) aspektům bezpečnosti, kterým je taktéž třeba velmi dobře rozumět.

Dodávka čisté a upravené vody je normou například v Evropě či v Severní Americe, avšak v rozvojových zemích není přístup k čisté vodě a hygienickým zařízením pravidlem (Cabral 2010). Odhaduje se, že až 2 miliardy lidí na světě používají jako zdroj pitné vody vodu kontaminovanou výkaly. Takto znečištěná voda (spolu se špatnou hygienou) může být zdrojem nákazy a přenosu různých nemocí, jako je například cholera, úplavice, tyfus, hepatitida A či obrna aj. V méně rozvinutých zemích, kde jsou vodovodní služby spravované nevhodně, nedostatečně nebo vůbec, je takto kontaminovaná voda mnohdy i původcem průjmových úmrtí. Průjem je nejznámějším onemocněním spojeným s kontaminovanou vodou a potravinami. Bezpečná a snadno dostupná voda je pro veřejné zdraví nesmírně důležitá. Lepší zásobování vodou, dostatečná hygiena a dobrá správa vodních zdrojů, může podpořit hospodářský růst zemí a také výrazně přispět k poklesu chudoby (WHO 2019).

Na nemoci přenášené vodou zemře každý rok 1,5 milionů lidí. Většinu z nich tvoří děti, jež umírají na dehydrataci následkem průjmů. Obecně je u dětí mladších pěti let průjem druhou nejčastější příčinou úmrtí (Yates 2019). Mimo různých onemocnění mohou mikroorganismy způsobovat také změny sensorických vlastností pitné vody, jako její vůni, barvu či chuť (Sharma & Bhattacharya 2017).

WHO (2019) upozornilo, že do roku 2025 polovina světové populace bude žít v oblastech ohrožených nedostatkem vody.

Problematikou dopadu klimatických změn na kvalitu pitné vody se zabývali Leveque et al. (2021). Během klimatických změn po celém světě dochází k úbytku množství zdrojů pitné vody, což může dojít až k úplnému nedostatku těchto zdrojů. Vysoké teploty jsou z jedním důvodem nedostatku vody, jelikož se zvýšeným počtem horkých dní klesají procenta srážek, což vede k nárůstu sucha.

V posledních letech se téma nedostatku vody stalo velmi diskutabilním ve většině zemí. Využívání dešťové vody, jako zdroj pitné vody, se stalo ekologickým trendem mnoha lidí. Tento způsob využití dešťové vody posuzovali Hofman-Caris et al. (2019) v Nizozemsku. Dešťová voda z hlediska mikrobiologické kvality není bezpečná, proto se před použitím pro osobní účely musí upravit např. chlórem. Zdrojem mikrobiologických kontaminantů bývají převážně tvrdé povrchy, na které dešťová voda dopadá. Ve městech tento způsob pokryje 50 % z celkové poptávky na pitnou vodu, ovšem náklady na takto upravenou pitnou vodu jsou velmi vysoké.

3.1.3 Normy a hygienické požadavky pitné vody v České republice

Jakost pitné vody v ČR je regulována legislativou, která na ni klade stále vyšší nároky. Řídí se směrnici Rady 98/83/EHS. Tyto nároky jsou pak výchozím bodem pro vlastníky služeb provozních společností vodárenských organizací, kteří se jim musí povinně přizpůsobovat, stejně jako vodojemy a distribuční sítě. Pokyny týkající se mikrobiální ochrany jsou zakotveny v zákoně č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví lidu a v jeho prováděcí vyhlášce č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Další doporučení, jejichž cílem je dopravit k odběrateli nezávadnou pitnou vodu, vydává Světová zdravotnická organizace (WHO), která se zabývá prevencí přenosu chorob vodou a poskytuje vládám pomoc při vývoji cílů a předpisů směřovaných ke zdraví.

Pitnou vodu lze považovat za zdravotně nezávadnou v případech, kdy splňuje chemické, fyzikální, biologické, mikrobiologické a senzorické požadavky. Mikrobiologické a biologické ukazatele a hygienické limity pitné vody jsou uvedeny v tabulce číslo 1.

Tabulka 1 Mikrobiologické a biologické ukazatele a hygienické limity pitné vody (upraveno dle Vyhlášky 252/2004 Sb.)

| ukazatel | jednotka | limit | typ limitu |
|--------------------------------|------------|-------|------------|
| <i>Clostridium perfringens</i> | KTJ/100 ml | 0 | MH |
| Intestinální enterokoky | KTJ/100 ml | 0 | NMH |
| <i>Escherichia coli</i> | KTJ/100 ml | 0 | NMH |
| Koliformní bakterie | KTJ/100 ml | 0 | MH |
| Počty kolonií při 22 °C | KTJ/ml | 200 | DH |
| Počty kolonií při 36 °C | KTJ/ml | 40 | DH |

Dílčí ukazatel je charakterizován tzv. typem limitu, jenž vyjadřuje jeho úroveň. V případě, kdyby došlo k překročení limitu, který ovšem nesymbolizuje akutní zdravotní riziko, se vyjadřuje jako mezní hodnota (MH). Naopak nejvyšší mezní hodnota (NMH) představuje zdravotní ohrožení, při překročení této hodnoty pitná voda nesmí být dále požitá. Ze zákona

č. 258/2000 Sb. vychází doporučená hodnota (DH), jež je nezávazná hodnota ukazatelů, která stanovuje optimální limit daného ukazatele.

Mikrobiologické a biologické ukazatele a jejich hygienické limity pro balenou vodu se liší od parametrů u pitné vody (tabulka číslo 2). Balenou vodou se rozumí všechny zdroje pitné vody zakoupené v lahvích nebo sloužící jako zdroj pitné vody v kontejnerech.

Rozdílná množství nebo typy limitu jsou téměř u všech mikrobiologických ukazatelů, kromě *Clostridium perfringens*. Navíc u balené vody musí být stanovena *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabulka 2 Mikrobiologické a biologické ukazatele a jejich hygienické limity balené vody (upraveno dle Vyhlášky 252/2004 Sb.)

| ukazatel | jednotka | limit | typ limitu |
|--------------------------------|------------|-------|------------|
| <i>Clostridium perfringens</i> | KTJ/100 ml | 0 | MH |
| Intestinální enterokoky | KTJ/250 ml | 0 | NMH |
| <i>Escherichia coli</i> | KTJ/250 ml | 0 | NMH |
| Koliformní bakterie | KTJ/250 ml | 0 | MH |
| Počty kolonií při 22 °C | KTJ/ml | 100 | NMH |
| Počty kolonií při 36 °C | KTJ/ml | 20 | NMH |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | KTJ/250 ml | 0 | NMH |

Výše zmiňovaná vyhláška č. 252/2004 Sb., o pitné vodě, která zapracovává příslušné předpisy Evropské unie, upravuje hygienické limity fyzikálních, chemických, biologických, mikrobiologických a organoleptických ukazatelů jakosti pitné vody, včetně pitné balené vody a teplé vody. Uvádí také rozsah a četnost kontrol kvality vody i požadavky na jejich metody.

Vyhláška č. 70/2018 mění některé předpisy vyhlášky č. 252/2004 Sb., kdy například vyhláška č. 252/2004 Sb. udávala mezní hodnotu 200 KTJ/ml a nejvyšší mezní hodnotu 500 KTJ/ml pro stanovení počtu kolonií při 22 °C. Dále vyhláška č. 70/2018 upravila minimální roční počet odběrů vzorků pitné vody. Toto upravení se týká pouze zásobovaných oblastí, které mají více než 5 000 obyvatel a jejich denní spotřeba pitné vody činí 200 litrů na jednu osobu. Nově lze také dohledat postup vypracování rizik, hodnocení možnosti výskytu nebezpečí a jejich následky pro kvalitu pitné vody, včetně dodávky.

Stěžejním legislativním dokumentem k pitné vodě je zákon o ochraně veřejného zdraví, který byl v souvislosti s novou Směrnicí Komise Evropské unie 2015/1787 novelizován. Novela se týkala nově obsažených kapitol o posuzování rizik a monitorovacího programu, za účelem ověření účinnosti fungování opatření zavedených pro potřeby kontroly rizik pro lidské zdraví.

V rámci základních norem Evropské unie pro jakost pitné vody je stěžejní již výše uvedená Směrnice 98/83/ES o jakosti pitné vody určené k lidské spotřebě, jež stanovuje

normy pro pitnou vodu, dále například Směrnice Rady 91/676/EHS k ochraně vod před znečištěním dusičnany ze zemědělských zdrojů, podle které země Evropské unie musí testovat koncentraci dusičnanů v podzemních i v povrchových vodách na vybraných vzorkovacích místech (minimálně jednou měsíčně), Směrnice Rady 91/271/EHS o čištění městských odpadních vod, která například udává minimální počet odběrů vzorků za jeden rok (odebraných z odtoku čistíren odpadních vod) a jejich požadavky na vybrané ukazatelé (celkový fosfor, celkový dusík, nerozpuštěné látky atd.)

3.1.4 Způsoby kontaminace pitné vody

Vzhledem k rostoucímu počtu populace dochází ke zvýšenému využívání zdrojů pitné vody, což má za následek i rozšiřování zdrojů kontaminovaných patogeny po celém světě. Kvalita mnoha zdrojových vod je závislá na geologii, typu půdy, podnebí, přirozené vegetaci i charakteristikách odtoku. Dramaticky kvalitu vody ovlivňují silné srážky i různá narušení přírodní geologie. Kvalitu vody ovlivňuje také přítomnost divokých zvířat. Primárně pak může jít i o úniky ze sanitačních systémů v místech, jako jsou septiky, kanalizace či podzemní skladovací nádrže. Kontaminaci může zavinit také hnojení, vypouštění odpadních vod do kanálů či jejich aplikace v zemědělských oblastech (Stella & Obeagu 2018).

Lesní povodí vykazuje velmi kvalitní vodu, které bývá využíváno jako zdroj pitné vody. Nárůstem sucha roste pravděpodobnost požárů v lesích, což může způsobit kontaminaci vody v přírodě. V oblastech zasažených požárem byl zjištěn zvýšený obsah manganu, dusíku, fosforu a také zvýšená koncentrace kovů (Mishra et al. 2020).

Naopak během silných srážek se odpadní voda, která bývá kontaminována patogenními mikroorganismy, dostává do jiných zdrojů vod, a tak naruší původní mikrobiální osídlení (Leveque et al. 2021).

Základním problémem pitných vod je jejich znečištění, které nezřídka souvisí s přítomností mikroorganismů. Pitná voda je jejich kontaminaci vystavována jak ve studnách či vodojemech, tak i v transportním potrubí. Pokud zde není pitná voda zabezpečena proti mikrobiální kontaminaci, pak se může stát zdrojem různých infekčních onemocnění. V případě studen se pak tento problém týká ve většině případů pouze členů rodiny, avšak v rámci veřejné vodovodní sítě však může mít nákaza epidemický charakter (Müllerová & Aujezdská 2014).

Mnohé domácnosti využívají mimo vodovodního řadu (sloužící jako zdroj pitné vody) také studny, jejichž vodu ne vždy nechávají pravidelně testovat. Výkaly jsou hlavním zdrojem patogenních mikroorganismů domácích studní (Yates 2019).

Ke kontaminaci studny, která je zdrojem pitné vody, dochází dvěma běžnými způsoby. Tím prvním je kontaminace ze septického systému, kdy je studna umístěna blízko septickému lůžku nebo v případech prasknutí pláště studny. Plášť studny by měl být vyroben z co nejméně porézního materiálu, jelikož větší pórovitost pláště zapřičiňuje prosáknutí septiku z půdy.

Povrchové vody představují druhou cestu kontaminace studniční vody a to především v případech, kdy je hlava studny pod úrovní země. Povrchová voda (zejména v období silných dešťů) sbírá různé zdroje kontaminace studniční vody (např. živočišný odpad), které pak stékají z povrchu do ústí studen víkem. K obdobnému způsobu kontaminace může dojít i v případech,

kdy je víko umístěno nad povrchem, avšak okolí pláště není vyplněno správným materiálem či je plášť nějakým způsobem narušený (Aquatell 2020).

Yates (2019) uvádí, že celosvětově nejběžnější cestou infekce vodními patogeny je fekálně-orální cesta. K infekcím dochází v důsledku vystavení nesprávně ošetřeným odpadním vodám či vodám přímo kontaminovaným lidskými i zvířecími výkaly, dále nesprávně ošetřeným nebo kontaminovaným potravinám. Brandt et al. (2017) zmiňují, že se lidé v domácnostech vystavují riziku infekce z kontaminované vody během používání při osobní hygieně (koupání, sprchování atd.) nebo také při určitém sportu (plavání, potápění).

3.2 Mikroorganismy ve vodě

Voda je nevyhnutelným předpokladem existence každého organismu a také nezbytnou složkou buněčných hmot. Veškeré reakce probíhající v živé buňce se dějí ve vodném prostředí. Vzhledem ke skutečnosti, že nedisociované molekuly vody mohou cytoplazmatickou membránou mikroorganismů volně difundovat, tak musí být zajištěno i dostatečné množství vody v jejich vnějším prostředí. V opačném případě by mikroorganismy ztratily kvůli dehydrataci schopnost metabolismu. Na základě vztahu mikroorganismů k vodě, lze rozdělit na hydrofilní, jež vyžadují v prostředí volně přístupnou vodu (většina mikroorganismů) a xerofilní, schopné využívat vodu vázanou na povrch půdních částic (některé aktinomycety) (Cepac Morava 2007b).

V přírodě lze vodu nalézt v různých formách a s různým obsahem rozpuštěných látek, například se jedná o vodu sladkou, slanou či vody odpadní (Tůma 2015). Výskyt mikroorganismů v jednotlivých vodách závisí na obsahu živin, na jejich dalším složení i proudění. Obecně lze říct, že ve stojatých vodách je více mikroorganismů než ve vodách proudících, odkud jsou průběžně odplavovány, stejně jako živiny. Na živiny jsou velmi bohaté vody splaškové, a díky tomu v nich lze nalézt bohatá společenstva mikroorganismů.

Osídlení bakterií v pitné vodě ovlivňuje dále i množství a druh organické hmoty ve vodě a také její teplota. Z tohoto důvodu Gerba (2009) zmiňuje, že vysoké množství organické hmoty a vyšší teploty tak mohou vést ke zvýšení počtu bakterií v pitné vodě. V distribučních systémech je obávaný také růst množství koliformních bakterií způsobený zotavením poškozených mikroorganismů, jež způsobuje falešnou pozitivitu stanovení. Bakterie jsou schopné růst volně nebo v biofilmu, který se tvoří na vnitřních stranách distribučních systémů (některé i za přítomnosti určité koncentrace chloru).

3.2.1 Diverzita mikroorganismů pitné vody

Dle Tůmy (2015) lze obecně mikroorganismy sídlící ve vodě rozdělit do dvou skupin. První z nich tvoří autochtonní mikroorganismy, které jsou zde přirozeně se vyskytující. Jde například o *Micrococcus*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Xanthomonas*, sirmé bakterie rodu *Sphaerotilus*, mikromycety *Mucor*, *Saprolegnia* a *Fusarium*. Druhou skupinu tvoří mikroorganismy alochtonní, které se do vody dostávají z jiného (pro ně přirozeného) prostředí.

3.2.2 Alochtonní mikroorganismy pitné vody

Alochtonní mikroorganismy jsou takové, jejichž přítomnost závisí na dodání zvláštních látek, jež se rychle vyčerpávají či na aktuálně zvýšené koncentraci živin. Významná je jejich metabolická aktivita i to, že se podílejí na procesech mineralizace půdy. Tyto mikroorganismy také zajišťují koloběh prvků v živém obalu země (Kopecká & Rotková 2017).

Tato skupina mikroorganismů se do vody dostává ze svého původního základního životního prostředí. Ve vodě pak buďto částečně přežívají, nebo hynou vlivem nedostatku živin. Dostane-li se však mikroorganismus ve vodě do vhodných podmínek, je schopen se zde množit či vodní biotop druhotně osídlit. K tomuto dokonalému přizpůsobení dochází především v odpadních a povrchově znečištěných vodách. Za daných podmínek se tak mohou stát pro konkrétní lokalitu autochtonní. Naopak nepřizpůsobivé typy lze označit za významné indikátory původu znečištění vody, například z výroby léčiv, potravinářství, průmyslových závodů, splachem z polí atp. Z polí a vzduchu se do vod dostávají bakterie rodu *Bacillus* (např. *Bacillus subtilis*), nitrifikační a denitrifikační bakterie, některé nesporulující tyčinky, plísňe i kvasinky (Tůma 2015).

3.2.2.1 Mikroorganismy ze střevní mikrobioty

Ze zástupců pocházejících ze střevní mikrobioty se jedná zejména o enterobakterie, enterokoky a *Clostridium perfringens*. Příležitostně se také jedná o patogenní mikroorganismy, jako je *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* a další (Tůma 2015).

Dle Yatese (2019) jsou bakterie gastrointestinálního traktu přizpůsobeny vyšší koncentraci organického uhlíku, nízkému pH a teplotě 37 °C. Nové prostředí v podobě vody se od toho původního ve své podobě velmi liší. Teplota není optimální pro růst a živiny jsou přítomny v nízkých koncentracích či v obtížně metabolizovaných formách. To způsobuje také jejich horší reprodukci. Jejich životnost je zde většinou tak omezena na několik dnů až týdnů. Mnoho těchto bakteriálních patogenů lze odstranit z vody pomocí procesů čištění odpadních vod.

Vzhledem k identifikaci znečištění pitné vody jsou významné zejména tzv. koliformní (gramnegativní) bakterie zahrnující rody *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Serratia* a *Hafnia*, ke kterým patří střevní komenzálové a symbionti. Jde o skupinu bakterií schopných růst při teplotě 37 °C, v přítomnosti žlučových solí, kterých je užíváno k inhibici neintestinálních bakterií. Za určitých podmínek jsou navíc schopny tvořit z laktosy plyn a kyseliny (Horan 2003).

Podle Bártové (2015) se většinou jedná o podmíněně patogenní kmeny. Jejich patogenita je uplatňována především v rámci výskytu mimo střevní trakt a také při poklesu rezistence. Uváděné mikroorganismy bývají v četných případech původci onemocnění močových a žlučových cest a též pobřišnice. Septické stavy komplikuje produkce endotoxinu, který vyvolá tzv. endotoxinový šok. U některých enteroinvazivních koliformních bakterií, jež jsou primárními patogeny, dochází k vyvolání enterokolitidy s těžkým průběhem. Další enterotoxické koliformní bakterie způsobují průjemová onemocnění. Za nozokomiální infekce

a sepse zodpovídá *Pseudomonas aeruginosa*, jež může být i původcem rozpadových pneumonií obdobně jako *Klebsiella* spp.

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens je anaerobní grampozitivní bakterie z čeledi Bacillaceae, která vytváří spory (Horan 2003). Kalhotka & Tesařová (2014) uvádějí, že určité rody bakterií dokážou za nevhodných podmínek změnit svou fyziologicky činnou buňku v klidové dormantní období, kdy se pozastaví její metabolismus na nulové hodnoty. Toto stádium se označuje jako spora (endospora).

Bakterie *Clostridium perfringens* odolává chladnějším teplotám, zato její spory jsou životaschopné i při vysokých teplotách. Běžně figurují v životním prostředí, ale rovněž i v trávicím traktu lidí a zvířat (Lampel et al. 2017). V trávicím traktu je přítomna v menším množství, než fekální koliformní bakterie (Horan 2003). *Clostridium perfringens* je podmíněně patogenním druhem rodu *Clostridium* (Baudišová 2017). Tato bakterie má za následek nemoc gastroenteritidu, jež se může vyvinout až k poruše tenkého střeva. V některých případech vyvolá mnohem závažnější nekrotickou enteritidu, jež evokuje vodnatý průjem, plynatost a zvracení. Nástup nemoci je téměř okamžitý, jelikož *Clostridium perfringens* se replikuje rychleji než ostatní bakterie, poruchy střevního traktu způsobuje uvolněný enterotoxin (Lampel et al. 2017).

Čeď Enterobacteriaceae

Čeď Enterobacteriaceae zahrnuje gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinky, které se vyskytují v trávicím traktu lidí i zvířat, lze je však izolovat také z vody, půdy či rostlin (Cepac Morava 2007a). Dokážou růst v aerobním, ale i v anaerobním prostředí, avšak v anaerobním prostředí potřebují pro růst dostatek fermentovaných cukrů.

Mezi velmi významné rody této čeledi patří *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter* aj. (Batt & Tortorello 2014). Čeď Enterobacteriaceae obsahuje více jak 50 rodů o velkém počtu druhů (Smith & Fratamico 2016). V rámci stanovení kontaminace vod je velmi významnou bakterií z čeledi Enterobacteriaceae *Escherichia coli*.

- ***Escherichia coli***

Escherichia coli (dále také *E. coli*) je typickou gramnegativní bakterií ve tvaru tyčinky se zaoblenými konci, jež lze pozorovat na obrázku č. 1. Jde o fakultativně anaerobní bakterii tvořící toxiny a nevytvářející spory. *E. coli* je přirozeným obyvatelem lidského trávicího traktu, kde je považována za neškodnou. Získává se při narození orální cestou, stolicí od matky nebo z prostředí (Percival & Williams 2014). Ne všechny kmeny *E. coli* jsou ale neškodné, některé z nich získaly mechanismy virulence, což z nich dělá patogeny (Smith & Fratamico 2016).

Patogenita, kterou získávají bakterie *E. coli* za určitých okolností, může způsobovat lokální či celkové infekce. Bývá i původcem akutních nebo chronických zánětů močových cest

či cholecystitidy, dále také neonatální meningitidy, akutní enteritidy, sepsí a abscesů v některých orgánech. Je také příčinou tzv. cestovního průjmu nebo onemocnění podobnému úplavici, které vyvolává hemoragické kolitidy, charakteristické krvavým průjmem (Percival & Williams 2014).

Výskyt souvisejících onemocnění je dán konkrétním sérovarem, střevní infekce způsobené touto bakterií pak lze rozdělit na základě produkovaného toxinu na enterotoxigenní (ETEC), enteropatogenní (EPEC), enteroinvazní (EIEC), enterohemoragická (EHEC) *E. coli*.

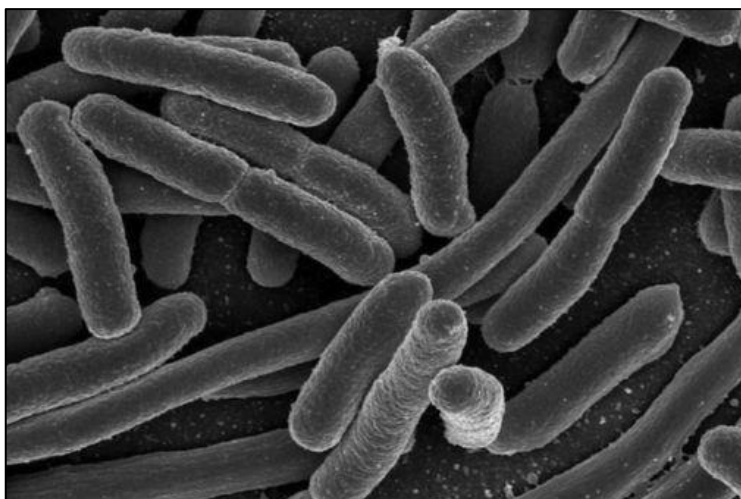
Pro přenos vodou jsou nejpravděpodobnější zástupci ETEC způsobující gastroenteritidu se silným vodnatým průjmem, který je doprovázen křečemi v oblasti břicha. Závažnost onemocnění se liší od mírných až po život ohrožující stavy. Toxiny zde ovlivňují transport elektrolytů, což vede k nadměrné ztrátě tekutin. Infekční dávka je zde vysoká, zapotřebí je zhruba 10^6 mikroorganismů. Onemocnění trvá 3 až 6 týdnů a je hlavní příčinou úmrtnosti dětí v rozvojových zemích do pěti let věku. Dospělí a starší děti se mohou stát asymptotickými nosiči tohoto onemocnění (Percival & Williams 2014; Lampel et al. 2017).

EPEC je dalším zástupcem, pro kterého je typický výskyt ve vodě. I zde je infekční dávka vysoká, jelikož je zapotřebí 10^6 až 10^9 mikroorganismů. Vznikající průjmy jsou hlavní příčinou průjmu dětí do 2 let. I zde je poměrně vysoká úmrtnost (Percival & Williams 2014). Místem působení EPEC je tenké střevo. Vodnaté průjmy doprovází hlen, ale v některých případech se vyskytuje i krev. Dalšími příznaky, které doprovázejí průjmy, je především zvracení, malátnost a dehydratace (Liu 2019).

EIEC nejenom svoji genetickou informací je velmi podobná bakterii rodu *Shigella*, ale i patogenitou. Napadá epitel tlustého střeva, způsobuje vodnaté průjmy (se stopami hlenu i krve), horečky a velmi silné křeče (Liu 2019). Hsu et al. (2010) poukazují na rozdíl mezi EIEC a bakterií rodu *Shigella*, infekční dávka vykazuje značný rozdíl mezi EIEC a rodem *Shigella*, jelikož u rodu *Shigella* je infekční dávka menší (10^1 až 10^4 mikroorganismů) na rozdíl od EIEC, kde se infekční dávka zvyšuje (10^6 až 10^{10} mikroorganismů).

EHEC způsobuje patogenitu u člověka, ale také u zvířat. EHEC proniká do tlustého střeva, dokáže vytvářet toxin, nazývaný se shigalike toxin. EHEC vyvolává těžké vodnaté průjmy, hemoragickou kolitidu, která je příčinou smrtelné nemoci hemolyticko-uremického syndromu (HUS). Ačkoliv se běžně bakteriální nemoci léčí pomocí antibiotik, u tohoto onemocnění tomu tak není. Podáním antibiotik dochází k vyšším zdravotním komplikacím při této nemoci, v této chvíli neexistují žádná léčiva zastavující nemoc HUS (In et al. 2016). Jako hlavním zdrojem nákazy je uváděn tepelně neopracované hovězí maso, kdy ke kontaminaci může dojít během zpracování a balení masa nebo také při nedostatečné tepelné úpravě hovězího masa (Chen et al. 2007).

Bakterie *E. coli* je dále využívána v potravinářství i ve vodárenství jako indikátorový mikroorganismus sanitace, dodržování a zachování hygienických podmínek (Cepac Morava 2007a). Bakterie je považována za ukazatel znečištění stolicí, jedná se o velmi dobré indikátory bakteriálních patogenů (Horan 2003).



Obrázek č. 1 *Escherichia coli* (<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1899-e-coli-the-biotech-bacterium>)

- **Rod *Salmonella***

Pohyblivé a gramnegativní rody *Salmonella* jsou schopny fermentovat sacharidy (kromě laktosy) za vzniku plynu a sirovodíku (Bridle 2014). Dle kliniků je členěn do tří skupin, kterými jsou tyfus, paratyfus a enteritis. Skupiny tyfus a paratyfus obsahují pro člověka obligátně patogenní sérovary salmonel (*Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi*). Ty mohou lidem způsobit vážná tyfová onemocnění (Cepac Morava 2007a).

K jejich přenosu dochází právě kontaminovanou vodou, protože se dokážou rozmnožovat v distribučních systémech pitné vody. Jedním z potenciálních zdrojů nákazy představuje led, který je využíván k přípravě ledových nápojů, jelikož k jeho výrobě může být použita kontaminovaná pitná voda, obsahující rod *Salmonella* (Levantesi et al. 2012).

Mohou se také přenášet potravinami nebo přímým kontaktem s bacilonosičem. Skupina enteritis (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* aj.) obsahuje především původce zviřecích nemocí (Cepac Morava 2007a). Rod *Salmonella* ke svému růstu potřebuje aminokyselinu tryptofan.

- **Intestinální enterokoky**

Intestinální enterokoky zahrnují rody *Enterococcus* a *Streptococcus*, jež jsou přítomny v trávicím traktu lidí a mnoha zvířat. Jde o grampozitivní koky s negativní katalázou. Intestinální enterokoky se nejvíce podobají ideálnímu indikátorovému mikroorganismu, ve vnějším prostředí se nemnoží a jsou přibližně dvakrát odolnější vůči desinfekci než koliformní bakterie (Horan 2003).

Mimo to, že intestinální enterokoky indikují fekální znečištění, i tak někteří zástupci skupiny patří k potenciónním patogenům. Ze střevní mikrobioty lidí byly izolovány pouze dva druhy enterokoků (*Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*). I když některé druhy rodu

Enterococcus v potravinářském průmyslu považujeme za příčinu sekundárních kontaminací, jiné druhy se uplatňují pro senzorycké vlastnosti při zrání sýrů (Cabral 2010).

Enterokoky jsou nejčastěji původci onemocnění močového systému, méně často způsobují bakteriémie nebo endokarditidy. Jsou známé také svojí rezistencí na antibiotika (Baudišová 2017a). Odolnost vůči antibiotikům je zakotvena ve formě genů v jejich genetické informaci. To hraje velmi důležitou roli v potravinářství, ale i v životním prostředí. Rezistenci na antibiotika právě pomocí genů předávají velmi rychle jiným mikroorganismům (Batt & Tortorello 2014).

3.2.2.2 Vybrané patogenní bakterie

Mikrobiální kontaminaci nezapřičinují pouze mikroorganismy ze střevní mikrobioty, ale také další patogenní bakterie. Tyto bakterie žijí v jejich přirozeném prostředí, ale jakmile se dostanou do pitné vody, ohrožují zdravotní stav člověka. Do této skupiny byly zahrnuty rody *Campylobacter*, *Legionella* a *Vibrio*, jejichž stanovení není v ČR legislativně dáno. Výjimku tvoří bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, ke které se vztahuje kontrola v balených vodách.

Pseudomonas aeruginosa

Nesporotvorná, gramnegativní a tyčinkovitá bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je oportunistický patogen. Jedná se o všudypřítomnou bakterii v půdním prostředí, ale vyskytuje se také ve vodě (především kolonizuje biofilmy ve vodních systémech). *Pseudomonas aeruginosa* je ve vodě schopna vytvářet rozpustné pigmenty, které se zbarvují do modrozelené barvy pod ultrafialovým zářením (Batt & Tortorello 2014).

V pitné vodě se dokáže rozmnožovat pod podmínkou, že pitná voda bude bohatá na vhodné živiny (Baudišová 2017b). Toto vyvrací Zamberlan da Silva et al. (2008), kdy podle nich *Pseudomonas aeruginosa* ve vodním prostředí roste i při nízkých koncentracích živin.

Závažné riziko představuje hlavně pro staršího člověka nebo pro člověka, jehož imunitní systém není dobře vyvinutý, případně trpí oslabeným imunitním systémem, neboť pro člověka působí jako oportunní patogen (Brandt et al. 2017). Mezi příznaky přítomnosti *Pseudomonas aeruginosa* patří infekce močových a dýchacích cest nebo způsobuje dermatitidu (Zamberlan da Silva et al. 2008).

Kontrolu této bakterie ve zdrojích pitné vody pravidelně provádí laboratoře. Problém nastává tehdy, kdy *Pseudomonas aeruginosa* osídlí vodovodní kohoutky. Tímto způsobem bývá lidské zdraví vystaveno riziku tohoto patogenu (Batt & Tortorello 2014; Brandt et al. 2017).

Rod *Campylobacter*

Zástupci patogenů, vyskytující se ve vodě, jsou i gramnegativní, mikroaerofilní tyčinky *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* (Cepac Morava 2007a). Lampel et al. (2017) doplňují, že nejlépe rostou při koncentraci kyslíku okolo 3 až 5 %. Nicméně rod *Campylobacter*

zahrnuje 14 druhů, právě *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* znamenají největší ohrožení pro lidské zdraví, jelikož na člověka působí jako patogeny (Brandt et al. 2017).

Jejich optimum se pohybuje okolo 37 °C, vyskytují se ve fekáliích lidí, zejména dětí a také ve fekáliích zvířat. Lze je však izolovat i z některých druhů syrových mas, syrového mléka či vody. Jde o vodou a potravinami přenosný patogenní mikroorganismus (Cepac Morava 2007a). Častý výskyt jmenovaných mikroorganismů je rovněž i v odpadních vodách, kde na povrchu přečkávají několik týdnů, a to i dokonce při nízkých teplotách. Desinfekční látky vylučují přítomnost *Campylobacter* v zásobách pitné vody. Druhy mikroorganismů rodu *Campylobacter* zapříčiňují nemoc zvanou kampylobakteriíza (Brandt et al. 2017). Nemoc kampylobakteriízu doprovází horečky, bolest svalů, břišní křeče a vodnatý průjem obsahující krev (Lampel et al. 2017).

Rod *Legionella*

V pitné vodě se mohou vyskytovat také například zástupci rodu *Legionella*. Legionely jsou původcem zápalů plic (označované i jako pneumonie či Legionářská nemoc). Jejich zdrojem může být biofilm vytvořený uvnitř vodovodního potrubí (Waak et al. 2018). Rod *Legionella* zastupuje 52 druhů tvořících 71 sérovarů, z nichž 21 sérovarů je pro lidstvo patogenních.

Nejvíce zastoupený druh rodu *Legionella* je *Legionella pneumophila* (Steinert et al. 2002). To potvrzuje Beauté (2017), kdy v letech 2011 až 2015 byla sledována legionářská nemoc v Evropě. Z celkového množství rodu *Legionella* bylo vyhodnoceno 96,3 % *Legionella pneumophila*, z čehož 82,9 % způsobil sérovar 1 *Legionella Pneumophila*. To že se *Legionella pneumophila* vyskytuje nejčastěji ve vzorcích, potvrdil i výzkum v Maďarsku. Sérovar 1 *Legionella Pneumophila*, který byl opět nejčastější, vykazoval 37 % z pozitivních vzorků (Barna et al. 2016).

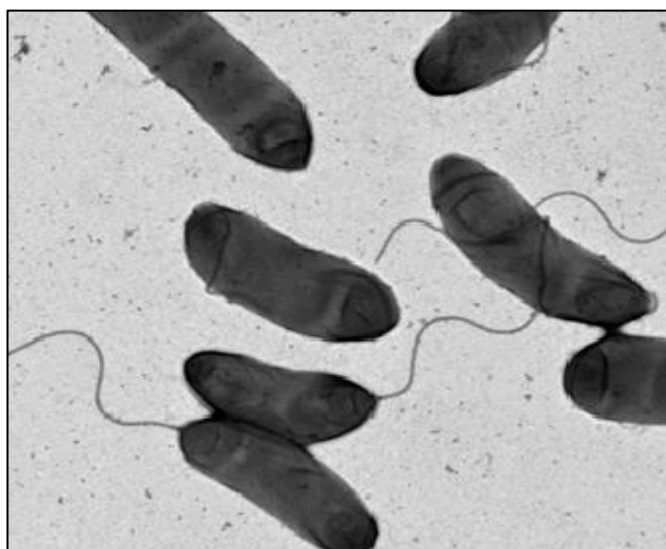
Legionella je gramnegativní, patogenní bakterie, jež má tvar tyčinek. Ke svému růstu potřebuje aminokyseliny, které představují hlavní zdroj uhlíku pro přísun energie (Steinert et al. 2002). Dle Caicedo et al. (2018) je *Legionella pneumophila* auxotrofní organismus, což znamená, že nedokáže sama syntetizovat určité organické sloučeniny (Johnson et al. 2020), především se jedná o aminokyseliny jako cystein, arginin, leucin, izoleucin, methionin, threonin a valin. Proto parazituje uvnitř buněk prvoků (především rod *Acanthamoeba*) sloužících jako zdroj organických sloučenin, ale i jako úkryt, pokud by došlo k nepříznivým podmínkám (Steinert et al. 2002).

Značný vliv na růst druhu *Legionella pneumophila* má také teplota. Caicedo et al. (2018) vyhodnocovali tři teploty a teplotní vliv na růst. Při teplotě 35 ± 1 °C docházelo k nejvyššímu růstu *Legionella pneumophila*, naproti tomu nižší teploty (15 ± 1 °C a 24 ± 2 °C) neprospívají růstu bakterie. Teplota nad 50 °C a teplota pod 10 °C snižují riziko výskytu *Legionella pneumophila*, jelikož tyto teploty zpomalují její růst. To potvrzuje, že optimální teplota pro růst *Legionella pneumophila* je okolo 30–35 °C (Barna et al. 2016). K přenosu může také docházet pomocí vdechování aerosolů (např. z klimatizace) nebo také například z veřejných sprch nebo vířivek (Magama-Arachchi & Wanigatunge 2020).

Rod *Vibrio*

Charakteristickou bakterií vodního prostředí je rovněž i rod *Vibrio*. Jedná se o malé (1,5 – 3,0 µm x 0,5 µm), gramnegativní, fakultativně anaerobní, tyčinkovité bakterie nevytvářející spory. K pohybu bakterie slouží jeden polární bičík (Cabral 2010; Bridle 2014; Magama-Arachchi & Wanigatunge 2020).

Počet bakterií ve vodě ovlivňují dva faktory – koncentrace sodíku a teplota vody. Sodík asimiluje jejich růst a *Vibrio cholerae* roste při relativně vysokých teplotách (40 °C) vody se zásaditým (9 až 10) pH (Cabral 2010). Ačkoliv mnoho druhů rodu *Vibrio* (např. *Vibrio fluvialis*, *Vibrio hollisae* a *Vibrio mimicus*) přináší infekční onemocnění člověka, častým patogenním druhem, izolovaným ze sladké vody, je *Vibrio cholerae* (Bridle 2014). *Vibrio cholerae* je vyobrazena na obrázku č. 2.



Obrázek č. 2 *Vibrio cholerae*

(<https://www.eurekalert.org/multimedia/pub/159616.php>)

Struktury fimbrií tvoří protein TcpA, kde dochází k expresi exotoxinu cholery. Za nemocí cholerou, při které člověk trpí průjmy a ztrácí přibližně 10 až 15 litrů vody, stojí sérotypy O1 a O139 (existuje až 200 sérotypů *Vibrio cholerae*). Přibližně 50 % osob onemocněním cholerou umírá, proto se jedná o velmi vážnou nemoc. Lidé, jenž se nakazí ostatními druhy rodu *Vibrio* i sérotypy *Vibrio cholerae*, trpí průjmy a infekcemi gastrointestinálního traktu (Cabral 2010). Magama-Arachchi & Wanigatunge (2020) označují *Vibrio cholerae* za velmi senzitivní vůči chlorové desinfekci.

3.2.2.3 Ostatní mikroorganismy kontaminující pitnou vodu

Mikrobiologické kontroly pitné vody po celém světě jsou především založeny na kultivaci pouze bakterií, přesto některé závažné onemocnění nezpůsobují jen bakterie. Mezi další mikroorganismy v pitné vodě, které představují zdravotní riziko pro člověka, patří houby,

prvoci a také viry. Za zdroj kontaminace pitné vody bývají považovány především exkrementy a také biofilmy tvořící se ve vodovodních systémech.

Houby

Běžnou součástí vody jsou také plísně (mikromycety), jedná se o eukaryotní organismus patřící do skupiny hub. Schopnost některých plísni produkovat mykotoxiny, představují jednu z možností pro vyvolání onemocnění u člověka. S tímto souvisí např. *Aspergillus* spp. (uvolňující karcinogenní aflatoxin) a *Fusarium* spp., ovšem plísně nepůsobí jen jako toxické pro člověka. Z dalších možných plísni, které ohrožují zdraví člověka, jsou například *Aspergillus fumigatus* a *Fusarium solani* (zapříčiňují patogenní onemocnění), třetí způsob je takový, že některé plísně mohou vyvolat u člověka alergenní reakci. Plísňové alergeny opouští buňky přímo z plísni nebo jsou vylučovány jako sekundární metabolity (Afonso et al. 2021).

V Portugalsku byly odebrány vzorky kohoutkové vody a následně Gonçalves et al. (2006) vyhodnoceny. Nejčastější výskyt byl rod *Penicillium* (40,6 %) a druhým čtým rodem vykazoval rod *Acremonium* (38,8 %). Tento rod je schopen produkovat sekundární alkohol, označovaný jako oktenol, který senzorycky ovlivňuje pitnou vodu. *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus* patří mezi další rody plísni detekovatelné v pitné vodě.

Jako všechny mikroorganismy, i plísně lze nalézt v biofilmech, nacházejících se nejenom v rozvodech pitné vody. Afonso et al. (2021) popsali zajímavou symbiózu v biofilmech mezi vláknitými houbami a bakteriemi. Tyto mikroorganismy mezi sebou spolupracují a komunikují. Například bakterie rodu *Pseudomonas* pozitivně interaguje s rodem *Basidiobolus*. Rod *Basidiobolus* uvolňuje extracelulární enzymy, které mimo buňku štěpí složité molekuly látek, které přijímá bakterie *Pseudomonas* jako živiny, dále bakterie využívá i sekundární metabolity, uvolněné právě rodem *Basidiobolus*. Vlákňité houby také poskytují ochranu bakterií a pomocí hyf zajišťují lepší udržení bakterií na biofilmech.

Prvoci

Také parazitičtí prvoci jsou podle Dawsona (2005) v posledních desetiletích považovány za původce vážných onemocnění lidí způsobovaných přenosem skrze vodu nebo potraviny. Největšímu zájmu se v této oblasti těší rody *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Giardia* a *Toxoplasma*, jenž jsou považovány celosvětově za největší riziko. Yates (2019) uvádí, že jde o silně různorodou skupinu mikroorganismů žijící na hostitelském organismu nebo v něm. Paraziti, jejichž klidovým stádiem je to infekční, jsou více riziková než ti, jejichž infekční formou je stádium vegetativní. Mnoho střevních prvoků je přenášeno fekálně znečištěnou vodou.

Přítomnost prvoka *Giardia* v pitné vodě může být hrozbou, ale přítomnost *Giardia* je také známá v mořské vodě. Averaldo et al. (2018) poukazují na další riziko přenosu tohoto prvoka mezi lidmi, a to především konzumací syrových mořských plodů. Ústřice a měkkýši, pěstované pro produkci na trh v mořské vodě, jsou častým rezervoárem prvoka *Giardia*, ale uvnitř tkání těchto mořských plodů byly identifikovány i viry (např. virus hepatitidy A).

Viry

Mezi nejmenší patogeny, jenž se nacházejí v pitné vodě, patří viry. Jejich velikost se pohybuje okolo 20 až 300 nm. Viry jsou výjimečné v tom, že svoji genetickou informaci mají uloženou ve formě nukleových kyselin, a to nejen v DNA, ale i v RNA. K jejich rozmnožování dochází pouze uvnitř buněk hostitele, tudíž se ve vodě nedokážou rozmnožovat, ale jsou schopny kontaminovat i hluboké zvodnělé vrstvy (Bridle 2014). Na druhou stranu nejsou dle Yates (2019) tak citlivé na nedostatek živin, a proto přežívají ve vodě déle než bakterie. Problémem je zde možnost jejich transportu do podzemních vod přes půdu, jelikož jsou rozměrově velmi malé (25 až 80 nm).

Viry, stejně jako bakterie, jsou součástí mikrobioty člověka. Přítomnost virů ve fekáliích může být ale pouze v případě, kdy je jedinec virem infikován. Viry projevují pro hostitele větší druhovou specifičnost než bakterie, například nějaké druhy virů vědí, na jaké buňky orgánů či tkání budou působit. Gastroenteritické viry se replikují ve střevech, enteroviry (způsobující hepatitidu) jsou infekční pro játra (Bridle 2014). Navíc jejich specifičnost usnadňuje identifikaci kontaminace. Virus specifický pro člověka tak poukazuje na kontaminaci způsobenou člověkem (Yates 2019).

Zdrojem nákazy virusu hepatitidy E (HEV) je nejen kontaminovaná voda, ale i čerstvá zelenina, maso a mléčné výrobky. Virus se také může přenášet nepřímo. K nepřímému přenosu dochází tehdy, pokud je kontaminovaná voda použita v dalších průmyslových odvětvích (např. v zemědělství pro závlahu zeleniny), kde virus působí jako infekční částice. V Portugalsku Salvador et al. (2020) posuzovali 18 vzorků pitné vody, z nichž 27,7 % vykazovalo pozitivní výsledek na infekční HEV. Infekční HEV v pitné vodě také identifikovali ve Švédsku a Indii. Nakažený člověk trpí žloutenkou, zvracením či horečkou.

Do skupiny virů rovněž patří virus SARS-CoV-2 ze skupiny koronavirů (Brendish et al. 2020). Wurtzer (2020) dodává k virusu SARS-CoV-2, že jde o jednořetězcový RNA virus. Na obrázku č. 3 je znázorněn mikroskopický snímek virusu SARS-CoV-2.

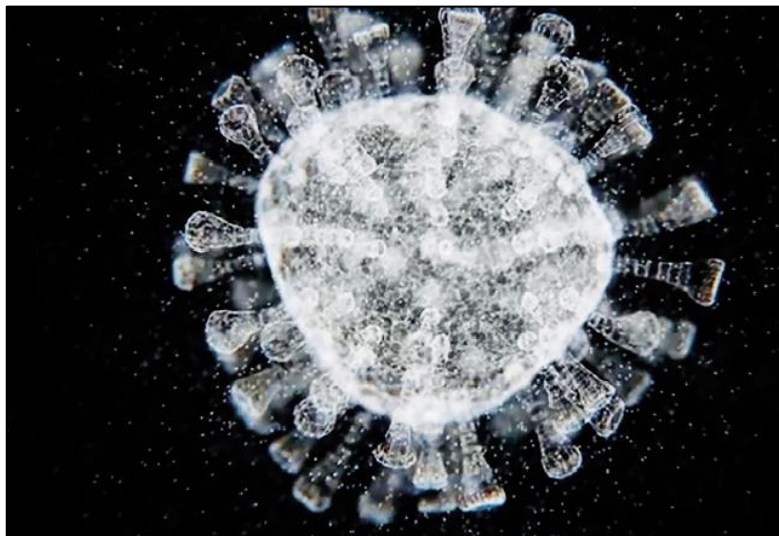
Nemoc u lidí, kterou vyvolává SARS-CoV-2, se nazývá jako covid-19, typickými příznaky této nemoci mohou být únava, horečka, bolest v krku, snížená chuť k jídlu, špatné dýchání, kašel, průjem nebo ztráta čichu, označována také jako anosmie (Brendish et al. 2020). Prvního nakaženého člověka nahlásila Čína (konkrétně ve městě Wu-čan) v prosinci 2019. WHO (2020) k datu 11. 3. 2020 označilo nemoc covid-19 za pandemickou.

Detekci SARS-CoV-2 v odpadní vodě potvrdilo několik výzkumů. Virus SARS-CoV-2 detekovali v odpadních vodách ve Francii (Wurtzer et al. 2020), v Itálii (La Rosa et al. 2020), v Austrálii (Ahmed et al. 2020) a v Japonsku (Hata et al. 2021).

Virus se do odpadní vody může dostat stolicí infikovaných lidí. Výskyt virusu ve stolici ukazuje na možné riziko přenosu virusu fekálně-orální cestou, především v zemích, kde se nepoužívají uzavřené kanalizace nebo také např. v uprchlických táborech (Quilliam et al. 2020). Pro jeho přežití v odpadní vodě je důležitá teplota, při teplotě 4 °C přežívá až 14 dní, naproti tomu při teplotě 20 °C dokáže přežít pouze 3 dny (García-Ávila et al. 2020). Pitná voda není rizikem přenosu virusu SARS-CoV-2, jelikož virus vykazuje citlivost na přítomnost chlóru

nebo jejich sloučenin sloužících pro desinfekci vody vhodné k pití (García-Ávila et al. 2020; La Rosa et al. 2020).

Virus byl detekován v nedostatečně ošetřených vodách, proto je velmi důležité dbát na správnou koncentraci chlóru pro správnou desinfekci odpadní vody. Aktivní chlór je účinnější na deaktivaci viru při čištění odpadní vody než oxid chloričitý. Monitorování přítomnosti viru SARS-CoV-2 v odpadních vodách je jedním z hlavních zdrojů, jak se dá epidemie kontrolovat, např. zda se virus v dané oblasti stále vyskytuje (García-Ávila et al. 2020).



Obrázek č. 3 Mikroskopický snímek viru SARS-CoV-2
(<https://www.vtei.cz/2020/06/koronavirus-sars-cov-2-v-povrchovych-a-odpadnich-vodach/>)

3.3 Mikrobiologické ukazatele při kontrole pitné vody

Vyšetřování vzorků vody na přítomnost patogenů je mnohdy zdlouhavým, obtížným a časově náročným úkolem. Je tedy výhodné při rozbořech nezakládat stanovení přímo na původcích onemocnění, nýbrž na snáze stanovitelných bakteriích (Gerba 2009).

Při rozbořech vody se tak nepátrá po patogenních bakteriích, ale po bakteriích, které se běžně vyskytují v lidském trávicím traktu a v trávicím traktu teplokrevných zvířat, kde tvoří jejich přirozenou mikrobiotu. Přímé hledání patogenních mikroorganismů by bylo technicky i finančně velmi náročné. Tato praktika vychází z poznatků, že člověk nakažený nějakou chorobou může být současně nositelem skrytých patogenních organismů. Z tohoto důvodu je nežádoucí, aby byly ve vodě obsaženy i bakterie běžně se vyskytující v trávicím traktu (APALAB 2020).

Koncept indikátoru byl vyvinut na přelomu 20. století pro hodnocení kontaminace stolic Gerba (2009). Tento koncept závisí na skutečnosti, že se ve výkalech člověka a všech teplokrevných živočichů vyskytují určité nepatogenní mikroorganismy. Ty je možné snadno izolovat a kvantifikovat prostřednictvím jednoduchých bakteriologických metod.

Indikátorové organismy jsou používány ke kontrole kvality vody, ke kontrole účinnosti procesů úpravy vody, ke kontrole stavu distribučních sítí (Baudišová 2017), k monitorování integrity podzemní potrubní vodovodní sítě i jako screeningová skupina čerstvé fekální kontaminace (Santo et al. 2019).

Gerba (2009) dále uvádí, že již od počátku 20. století se jako standard pro hodnocení znečištění pitných vod používá koliformní skupina mikroorganismů. Výzkumy bylo prokázáno, že nepřítomnost těchto mikroorganismů, ve sto mililitrech pitné vody, zajišťuje prevenci před vypuknutím nemocí přenášených bakteriemi z vody.

Problémem stanovení indikátorových mikroorganismů může být odlišná patogenita různých druhů v kmeni, již nejsou detekční metody schopny od sebe rozlišit. I přes to, že jsou k dispozici kultivační techniky pro mnohé patogeny, tak některé z nich jsou neselektivní, což umožňuje necíleným mikroorganismům proliferovat v množství, které patogen přerůstá. Například některé virové patogeny mají tak náročné požadavky na růst, že je lze kultivovat pouze na speciálních tkáňových kulturách, které se hůře udržují, a navíc jsou finančně velmi nákladné. Dle Santo et al. (2019) některé z nich tak není možné vůbec v laboratorních podmínkách kultivovat. Obdobná je situace u patogenních prvoků, zde jsou metody neúčinné skrze jejich špatný výtěžek, kdy je například potřeba pro detekci filtrovat velké množství vody (problémem je zde analýza velkoobjemových vzorků s nízkým výtěžkem).

Mikroorganismy lze vzhledem k jejich výskytu v pitné vodě rozdělit na organotrofní, indikátory fekálního znečištění, patogenní a podmíněně patogenní mikroorganismy. Jejich podrobnější výčet uvádí tabulka číslo 3.

Tabulka 3 Skupiny indikátorových mikroorganismů (vlastní zpracování dle Baudišová 2017a)

| Skupina MO | Příklad |
|---------------------------------|--|
| Indikátory obecného znečištění | druhy rodů <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Vibrionaceae</i> aj. |
| Indikátory fekálního znečištění | koliformní bakterie, <i>Escherichia coli</i> , intestinální enterokoky, <i>Clostridium perfringens</i> , bakteriofágy. |
| Patogenní a podmíněně patogenní | salmonely, shigely, legionely, rod <i>Campylobacter</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , atypická (netuberkulózní) mykobakteria, viry, prvoci. |

3.3.1 Indikátory obecného znečištění

Indikátory obecného (nefekálního) znečištění jsou organotrofní mikroorganismy. Jakmile dojde k jejich vyššímu namnožení ve vodě, může se očekávat zhoršení organoleptických vlastností vody. Stanovení indikátorů obecného znečištění v pitné vodě je využíváno z důvodu, že poukazují na tvorbu biofilmů a přítomnost organicky odbouratelného substrátu. Jejich optimum růstu se pohybuje mezi 22 a 36 °C (Negm et al. 2019).

Organotrofní mikroorganismy lze zařadit do autochtonní mikrobioty, jedná se nejen o bakterie, ale také i o houby a kvasinky. Zdroj energie i živin, jenž potřebují pro svůj růst a

rozmnožování, získávají rozkladem organických substrátů. Přirozeným prostředím jejich výskytu je půda, vzduch, voda a také potraviny (Bartram & Cotruvo 2004). Člověk je denně přijímá ve vysokých počtech konzumací potravin a pitné vody. Příjem těchto mikroorganismů ovšem nemá žádné nepříznivé účinky na zdraví. Rizikem pro člověka může být skutečnost, že jejich přítomnost ve vodě (např. k výrobě potravin) zvyšuje riziko jejich kažení (Baudišová 2017b). Z hygienického hlediska je obecné znečištění méně významné, avšak podává informaci o vztahu zdroje pitné vody (studny) a jeho okolí (Zelinka 2013).

Na pomnožování těchto indikátorů obecného znečištění v pitné vodě má značný vliv několik faktorů. Mezi tyto faktory patří například druh a zbytková koncentrace použité desinfekce, kvalita zdrojové vody, technologie použitá na úpravu zdrojové vody, skladování pitné vody, teplota, ale také obsah rozpuštěných organických látek (Bartram & Cotruvo 2004).

Ačkoliv organotrofní mikroorganismy nemají vliv na zdraví člověka, jsou především využívány jako ukazatelé kvality pitné vody, účinnost desinfekce vody a její filtrace, tvorby biofilmů v distribučních systémech. Tyto výhody stanovení indikátorů obecného znečištění potvrzují Baudišová (2017b) i Bartram & Cotruvo (2004).

O celkovém znečištění podává informaci počet kolonií, který narůstá při 22 °C. Stanovení počtu kolonií při 36 °C přispívá pouze k objasnění celkového charakteru vodního zdroje a stejně jako počet kolonií při 22 °C doplňuje nález indikátorů fekálního znečištění (Zelinka 2013). Obdobná kritéria udávají i Brandt et al. (2017).

V laboratořích v České republice ke stanovení počtu kolonií při teplotách 22 a 36 °C používá předepsaná metoda ČSN EN ISO 6222 (Baudišová 2017b). Zároveň probíhá monitorování abnormálních změn hodnot počtu kolonií u zásobovaných oblastí, na jehož zpracování se podílí i Státní zdravotní ústav. Dále je sledován i jejich rostoucí trend, který je považován za rizikový faktor, vyžadující prověření příčin a případné přijetí nápravných opatření.

3.3.2 Indikátory fekálního znečištění

Indikátory fekálního znečištění mají pro hygienické účely prvořadý význam, jelikož jejich průkaz indikuje kontaminaci vody střevní mikrobiotou (Zelinka 2013).

To, že jsou gastrointestinální onemocnění přenášena fekálně kontaminovanou vodou, prokázal jako první již v roce 1855 Snow (Horan 2003). A to i bez jakékoli znalosti příčiněného mikroorganismu. O čtyřicet let později ukázal Smith, že přítomnost bakterie *Bacillus coli communis*, by mohla být považována za cenný indikátor znečištění vody. Stal se tak prvním bakteriologem, který propagoval skupinu koliformních bakterií za indikátory fekálního znečištění. V této době se začala výrazněji rozvíjet vodní bakteriologie. V roce 1905 se objevily první standardizované metody obsahující doporučení pro bakteriologické vyšetřování vod. První vydání standardů pro bakteriologické vyšetření pitné vody bylo však vydáno až v roce 1934. Zde byl důraz kladen na detekci koliformních bakterií za pomoci média žlučových solí a laktosy, jež vyvinul MacConkey. Zahrnuty byly také testy na *Clostridium perfringens* a fekální enterokoky. Fekální indikátorové organismy dodnes zůstávají v popředí mikrobiologie pitné vody, kde představují základ nejčastějších technik detekce i kvantifikace jejího znečištění.

Ideální fekální indikátorová bakterie neexistuje. Pokud by však existovala, potom by byla vhodná pro všechny druhy vod, přítomna ve znečištěných a odpadních vodách vždy, když zde budou přítomny patogeny, byla by přítomna ve větším množství než patogeny, měla podobné vlastnosti přežití ve vodách i při jejich čištění jako patogeny, byla by sama nepatogenní a bez schopnosti se v těchto vodách množit a bylo by možné ji spolehlivě, rychle, snadno a za nízkou cenu detekovat již v malém počtu. I když některé z koliformních bakterií se tomuto popisu přibližují, tak indikace nebakteriálních patogenů, jako jsou například hlístice, viry či prvoci, je stále problematická (Horan 2003; Gerba 2009).

Základní zástupce mikrobiologických ukazatelů této skupiny tvoří koliformní bakterie. Koliformní bakterie patří do čeledi Enterobacteriaceae. Obecně lze říct, že zahrnuje všechny aerobní a fakultativně anaerobní, gramnegativní, nesporotvorné bakterie tyčinkovitého tvaru, kteří fermentují laktosu při teplotě 37 °C po dobu dvou dní. Další podmínkou pro zařazení mikroorganismu do skupiny koliformních je, že bakterie musí mít ve své genetické informaci uložený gen pro tvorbu enzymu β -galaktosidázy (Paruch & Mæhlum 2012). Do skupiny koliformních bakterií se zahrnují i *E. coli* a *Enterobacter*, ale i oportunní patogeny jako rody *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Kluyvera* a někteří zástupci z rodu *Serratia* (Batt & Tortello 2014).

Koliformní bakterie jsou tedy dnes využívány předně pro operační monitoring, který ukazuje čistotu vodovodního distribučního systému. Jejich výskyt zde může poukazovat na sekundární kontaminaci, ale také na riziko zvýšené tvorby biofilmů (Baudišová 2017b).

Koliformní bakterie ovšem nejsou považovány za hlavní indikátory fekálního znečištění, poněvadž skupina zahrnuje i druhy bakterií, jež se v exkrementech nevyskytují, k nim patří například *Pantoea* spp., *Kluyvera* spp. nebo také *Cedecea* spp. Bakterie nefekálního původu nejsou odolné vůči zvýšené teplotě, naproti tomu bakterie, které pochází ze střevní mikrobioty, dokážou fermentovat laktosu i při teplotě 44 °C. Tímto způsobem dochází k potlačení bakterií nefekálního původu, proto lze zajistit detekci pouze fekálních koliformních bakterií (Paruch & Mæhlum 2012).

Z této čeledi se některé bakterie přirozeně vyskytují ve střevní mikrobiotě, kde z celkového množství tvoří zhruba 10 % (Batt & Tortello 2014). Paruch & Mæhlum (2012) zmiňují, že *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. a *Citrobacter* spp. jsou původem ze zažívacího traktu teplokrevných živočichů nebo člověka, ale vyskytují se i v jiných přírodních zdrojích. Rody *Enterobacter* a *Citrobacter* ve vodním prostředí relativně dlouho přežívají a při dostačujících koncentracích živin se i množí (Baudišová 2017b).

Vlivem velkého množství heterotrofních bakterií ve vodě může dojít k maskování růstu koliformních bakterií na selektivním médium, použitém k jejich izolaci, čímž by byl jejich skutečný počet podceňován, proto dle Gerba (2009) jejich stanovení nemusí být velmi přesné. Koliformní bakterie nelze použít ani jako indikátory patogenních virů a prvoků, jelikož ti mají větší odolnost vůči desinfekčním prostředkům a také delší životní cyklus.

Stanovení termotolerantních fekálních koliformních bakterií (druhy z rodu *Enterobacter* a *Citrobacter*) nahradila právě bakterie *E. coli*, jelikož *E. coli* je vždy přítomná v trávicím traktu teplokrevných živočichů i člověka, kde se velmi rozmnožuje. Naopak v jiném prostředí nedochází k jejímu intenzivnímu rozmnožování (Edberg 2000).

Dle Paruch & Mæhlum (2012) existují jak patogenní druhy *E. coli*, ale také rody, jenž neohrožují zdraví. V pitných vodách tato bakterie indikuje jednoznačné fekální znečištění, proto její detekce je nesmírně důležitá pro minimalizování zdravotního rizika.

Přítomnost *E. coli* v biofilmech vykazuje problémy především v potravinářských provozech. Odolnost růstu na biofilmech *E. coli* také značně podporují jiné přítomné mikroorganismy. Nedávné výzkumy potvrdily, že některé druhy *E. coli* začínají být více tolerantní vůči antimikrobiálním látkám (Percival & Williams 2014). Gerba (2009) dodává, že *E. coli* je 2400x odolnější vůči volnému chlóru, pokud se vyskytuje na povrchu potrubí (např. v rámci biofilmu), než jako samostatná buňka ve vodě. Podle Edberga et al. (2000) přežívá *E. coli* ve vodě 4 až 12 týdnů v závislosti na podmínkách konkrétního prostředí, k nimž patří teplota, ostatní mikrobiota a další faktory.

Bakterie *E. coli* se nejbližší blíží k terminologii ideální fekální bakterie. Do odpadní vody se ve vysokých koncentracích dostává z exkrementů teplokrevných zvířat i lidí, kde pouze přežívá, ale nedochází k jejímu rozmnožování. Lze ji velmi snadno a rychle detekovat ve všech zdrojích pitné vody (Edberg et al. 2000; Paruch & Mæhlum 2012). *E. coli* je vhodným ukazatelem pro okamžité vyhledání zdroje kontaminace. Dále dobře koreluje s výskytem střevních patogenů, jako jsou rody *Salmonella*, *Campylobacter* a *Shigella* (Baudišová 2017b).

Mezi další skupinu, která slouží pro identifikaci fekálního znečištění, zahrnují Saxena et al. (2015) intestinální enterokoky. K vyloučení velkého množství enterokoků dochází pomocí exkrementů, jelikož střevní mikrobiota je pro ně přirozeným prostředím. Ačkoliv se mohou dostat do vodního prostředí, nejsou schopny se zde dále rozmnožovat. Na rozdíl od koliformních bakterií přežívají ve vodě delší dobu.

Batt & Tortorello (2014) popisují výhody těchto indikátorů, jsou odolné vůči vysokým koncentracím solí, pasteraci i teplotě pod bodem mrazu. Z toho plyne, že intestinální enterokoky dokážou přetrvat horší podmínky než koliformní bakterie a *E. coli*, proto jejich stanovení je mnohem výhodnější k identifikaci fekálního znečištění. Zjištění intestinálních enterokoků v potravinářských provozech značí nedostatečnou sanitaci a hygienu.

Mezi prvními indikátory fekálního znečištění byla využívána právě bakterie *Clostridium perfringens*. Je přítomná v exkrementech člověka a domácích i divokých zvířat. V životním prostředí přežívá ve formě endospor (Mueller-Spitz et al. 2010). Mikroorganismy, které nevytváří spory, mohou být detekovány ve vodě pouze krátkou dobu. Spory ve vodě přežívají delší dobu, proto stanovení *Clostridium perfringens* bývá využíváno pro identifikaci dlouhodobé fekální kontaminace (Ryzinska-Paier et al. 2011).

Junqueira et al. (2012) doplňují, že spory *Clostridium perfringens* dokážou přežít nepříznivé podmínky oproti koliformním bakteriím a *Escherichia coli*, proto jsou také vhodnější metodou pro stanovení fekální kontaminace. Endospory *Clostridium perfringens* jsou méně náchylné na koncentrace chlóru, tudíž slouží jako indikátor čistících procesů, pro kontrolu řádné inaktivace virů a také cyst *Giardia* spp. (Manafi et al. 2013).

Může se dále jednat například o znečištění průmyslových odpadních vod stolicí, kde obsažené toxické látky potlačily růst fekálních enterokoků a koliformních bakterií, ale již nepotlačily spory *Clostridium perfringens*. Obecně je tak této bakterie využíváno pouze

v případě existence podezření na přítomnost průmyslových toxických látek či v případech, kdy nelze detekovat koliformní bakterie i fekální enterokoky (Horan 2003).

Pokud by u vzorků pitné vody nebyla dodržena jeho hodnota, mělo by správně dojít k průzkumu vodního zdroje a technologickým úpravám s cílem zjistit, zda není zdraví člověka ohroženo patogenními mikroorganismy (Baudišová 2017b).

Saxena et al. (2015) upozorňují, že časté stanovení *Clostridium perfringens* není vhodné pro identifikaci fekálního znečištění. Důvodem je zmíněná dlouhodobá výdrž endospor, které se dokážou pohybovat ve zdrojích pitné vody. Odhalení zdroje kontaminace komplikuje právě schopnost pohybu endospor *Clostridium perfringens*.

Gerba (2009) uvádí průměrné hodnoty hustoty mikrobioty v 1 gramu živočišných výkalů dle jednotlivých druhů živočichů. Jejich vybrané zástupce ukazuje tabulka číslo 4. Z tabulky je zřejmé, že nejvyšší hodnoty fekálních koliformních bakterií lze pozorovat u kachen, ovcí a lidí, nejvyšší hodnoty *Clostridium perfringens* u koček. Naopak nejnižší hodnoty fekálních koliformních bakterií u koní, skotu a myši.

Tabulka 4 Druhy živočichů a jejich průměrné hodnoty hustoty mikrobioty v 1 gramu živočišných výkalů (upraveno dle Gerba 2009)

| Živočich | Fekální koliformní bakterie | <i>Clostridium perfringens</i> |
|----------|-----------------------------|--------------------------------|
| Skot | 230 000 | 200 |
| Prase | 3 300 000 | 3 980 |
| Ovce | 16 000 000 | 199 000 |
| Kůň | 12 600 | <1 |
| Kachna | 33 000 000 | - |
| Kuře | 1 300 000 | 250 |
| Kočka | 7 900 000 | 25 100 000 |
| Myš | 330 000 | <1 |
| Člověk | 13 000 000 | 1 580 |

Obecně používané indikátory jsou užívány po celém světě. Upřednostňovaná kultivační média používaná k detekci se v jednotlivých zemích liší. V závislosti na druzích kultivačních médií se liší i druhy bakterií jednotlivých rodů *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Serratia* a dalších (Santo et al. 2019).

3.3.3 Patogenní a podmíněně patogenní mikroorganismy

Patogenní (choroboplodné, vyvolávající chorobu) a podmíněně patogenní bakterie (mohou, ale nemusí u člověka vyvolat onemocnění) jsou do prostředí vnášeny především exkrementy zvířat a lidí. Pitná voda nesmí v žádném případě obsahovat patogenní bakterie,

jelikož jejich přítomnost ve vodě vždy pro člověka znamená závažné ohrožení jeho zdraví. Důležité je tedy dbát na to, aby pitná voda měla vždy nulový obsah KTJ/100 ml patogenních bakterií (Zelinka 2013).

Baudišová (2017a) do skupin patogenních a podmíněně patogenních bakterií, jež se vyskytují ve zdrojích pitné vody, zařazuje rody *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella*, *Campylobacter*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Aeromonas*, dále rody *Enterobacter sakazakii*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* aj. Do skupiny patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů se řadí také viry a prvoci.

3.4 Metody izolace a identifikace mikroorganismů v pitné vodě

Pro praxi v rámci metod a identifikací mikroorganismů v pitné vodě je důležité, jak pochopení vlastností konkrétních bakterií, tak i to, jak spolu bakterie interagují a jak interagují s okolním prostředím. Ideální diagnostická metoda by si měla umět poradit se vzorky obsahujícími velké množství bakteriálních druhů v nízkých koncentracích, přičemž by neměla upřednostňovat některé bakteriální skupiny před jinými (Falteisek 2014).

3.4.1 Kultivační metody

Kultivační metody představují nejstarší a nejvíce používaný způsob kultivace mikroorganismů v *in vitro* podmínkách. Nejsou finančně nákladné, příprava kultivačního média je rychlá a jednoduchá. Kultivační médium (pro izolaci určitých mikroorganismů) musí obsahovat všechny potřebné živiny pro jejich rozmnožování i růst, proto jsou stále zdokonalována složení kultivačních médií. Zároveň je potřeba zajistit i vhodné podmínky pro jejich kultivaci (např. pH, aerobní/anaerobní prostředí, teplota apod.).

3.4.1.1 Stanovení organotrofních bakterií

Organotrofní bakterie nepatří mezi stěžejní skupinu mikroorganismů, neboť většinou nezpůsobují lidem v pitné vodě vážnější zdravotní problémy.

Organotrofní bakterie se stanovují kultivací, tedy stanovením počtu kolonii tvořících jednotek (KTJ) po naočkování do živného média s kvasničným extraktem a tryptonem podle ČSN EN ISO 6222. Složení živné půdy, teplota a délka kultivace je dána konkrétním druhem bakterie. Očkování živné půdy probíhá přímým výsevem 1 ml vzorku do roztopeného kultivačního média, které je zchlazené na 45 °C. Následná kultivace probíhá jak při 36 °C po dobu 48 hod (dříve mezofilní bakterie při 37 °C), tak při 22 °C po dobu 72 hod (dříve psychofilní bakterie při 20 °C). Nezbytné je přísné dodržování pracovního postupu (Baudišová 2017a).

3.4.1.2 Stanovení indikátorů fekálního znečištění

K nejvýznamnějším a nejčastějším metodám stanovení nežádoucích bakterií v pitné vodě patří stanovení indikátorů fekálního znečištění. Metody stanovení indikátorů fekálního znečištění jsou rozděleny do čtyř samostatných skupin, které tvoří metody stanovení koliformních bakterií, metody stanovení *E. coli*, metody stanovení intestinálních enterokoků a metody stanovení *Clostridium perfringens*.

Stanovení koliformních bakterií a *Escherichia coli*

Stanovení koliformních bakterií pro pitné vody je realizováno na základě EN ISO 9308-1. Stanovení je zaměřené hlavně pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikrobioty, pro tyto vody se udává hodnota menší než sto z celkového počtu kolonií na Petriho misce (Jozić et al. 2018). Ke stanovení je ve většině případů užíváno chromogenní médium (CCA – Chromogenic Coliform Agar), jehož složení a přípravu lze nalézt v příloze číslo 1 (Baudišová 2017a).

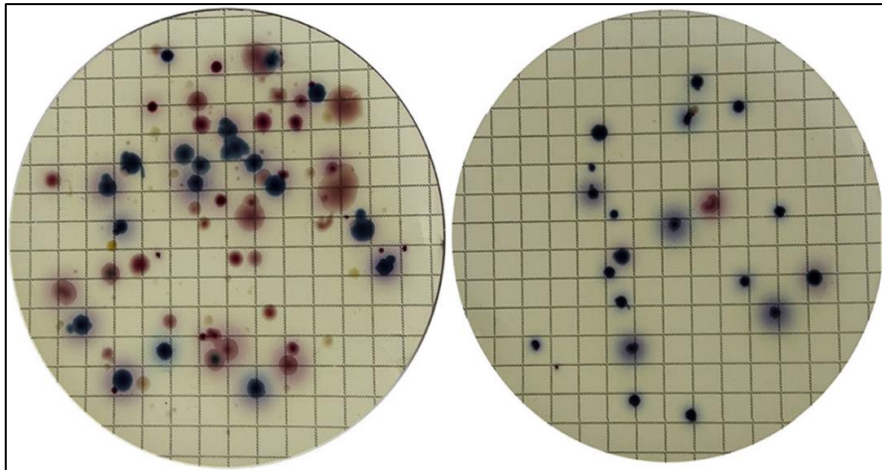
Účinnost CCA média dle ENV ISO 13843 pro stanovení počtu koliformních bakterií a *Escherichia coli* ověřili Lange et al. (2013). Citlivost metody vykazovala 91 až 94 %, specifčnost metody 94 až 97 % a metoda byla velice účinná (92 až 96 %). Tímto byla metoda za použití CCA média označena jako spolehlivá pro stanovení počtu koliformních bakterií a *Escherichia coli*. Nevýhodou metody je poměrně nízká selektivita, která vykazovala hodnoty od -0,79 až -0,32. Při nízké selektivitě dochází k růstu doprovodné mikrobioty, naopak výhodou nízké selektivity CCA agaru umožňuje stanovit fyziologicky poškozené bakterie (Baudišová 2017a).

Na médium jsou umísťovány filtry s porozitou 0,45 µm, přes které bylo přefiltrováno 100 ml vzorku vody. Bakterie se během filtrace zachycují na povrchu filtrů. Filtry se uloží na danou živnou půdu v Petriho miskách. Účinnost metody je závislá na použití účinného diferenciatního nebo selektivního média, jež usnadňuje identifikaci kolonií narostlých na povrchu membránového filtru (Gerba 2009).

Připravené Petriho misky se kultivují při teplotě 36 ± 2 °C. Výhodami stanovení je rychlost získání jeho výsledku (přibližně jeden den), kmeny odečítáme přímo z Petriho misky. Koliformní bakterie zde rostou v růžové až červené barvě, na CCA agaru se mohou zachytit i nekoliformní bakterie (např. *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*), jejich nárůst je bezbarvý nebo oranžový. Bakterie koliformní povahy se potvrzují oxidázovým testem, na který vykazují negativní reakci. K výsledku je nutné přičíst i *E. coli*, která tvoří odlišné zbarvení (modré až modrofialové) kolonie (Lange et al. 2013).

Dle Jozić et al. (2018) se selektivita pro stanovení *E. coli* pomocí CCA média zvýšila tehdy, kdy došlo ke zvýšení kultivační teploty. Tímto způsobem došlo k potlačení růstu mezofilních mikroorganismů. Petriho misky byly kultivovány při teplotě 36 ± 2 °C, po 4 až 5 hodinách byla teplota zvýšena na $44 \pm 0,5$ °C a kultivace skončila po 17 až 19 hodinách.

Výsledek kultivace na Petriho misce při teplotě 36 °C lze vidět v levé části obrázku č. 4. V pravé části stejného obrázku můžeme pozorovat navýšení selektivity pouze pro stanovení bakterie *E. coli* při zvýšené teplotě. Selektivita metody vzrostla přibližně o 66 %.



Obrázek č. 4 Selektivita metody (pomocí CCA média) pro stanovení *E. coli*
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X18304739>

Stauber et al. (2014) se zabývali rychlým a přesným stanovením přítomnosti *E. coli*. Metodou stanovení je tzv. test v přihrádkovém plastovém sáčku. Vzorek vody se promíchá s chromogenním kultivačním médiem ve sterilní nádobě, takto připravený vzorek se přelije do přihrádkového plastového sáčku, pomocí plastových svorek se sáček uzavře. Po inkubaci sáčku při teplotě 35 °C po dobu 18–24 hodin dochází k vyhodnocení přítomnosti bakterie, pozitivní výsledek se určí dle změny barvy agarů ze žlutohnědé na modrozelenou. Výhodou této metody, že přítomnost *E. coli* se dá zjistit přímo na místě odběru vzorku, metoda vyšla jako velmi citlivá (94,9 %) na vyhodnocení této bakterie.

Stanovení intestinálních enterokoků

Stanovení intestinálních enterokoků se věnuje ČSN EN ISO 7899-2 na základě membránové filtrace. Norma je určena zejména pro rozbor pitných vod, plaveckých bazénů a jiných vod ošetřovaných desinfekcí. Metoda není vhodná pro vody s vyšším obsahem doprovodné mikrobioty a vody s vysokým množstvím nerozpuštěných látek.

Kultivace probíhá na selektivním kultivačním médiu podle Slanetz – Bartley (SB médium, viz příloha číslo 2). Stejně jako v předešlých případech se princip zakládá na membránové filtraci, po následné kultivaci na SB médiu (při teplotě 36 °C po dobu dvou dnů) intestinální enterokoky tvoří tmavočervené až vínové kolonie. Na půdě mohou růst i některé další koliformní mikroorganismy, proto je nutné provést konfirmační test. Filtr se přenesne na žlučovo – eskulinové médium s azidem sodným, kde se dále kultivují při 44 ± 0,5 °C zhruba dvě hodiny. Pozitivní reakce se projeví zčervenáním média v okolí kolonie. Alternativním testem je používán test katalázy.

Stanovení *Clostridium perfringens*

Ke stanovení *Clostridium perfringens* byla vytvořena norma EN ISO 14189, jejíž užití pro vodu k lidské spotřebě je dáno i legislativně. Metoda se zakládá na membránové filtraci vzorku

na filtrech o porozitě 0,45 μm , kultivací na tryptózo – siřičitanovým agaru s cykloserinem (TSC, příloha číslo 3). Kultivace probíhá při $44 \pm 0,5$ °C po dobu dvaceti jedna hodin v anaerobním prostředí, kolonie jsou konfirmovány kyselinou fosfatázovou. Kolonie zde narůstají v barvě černožluté, černé nebo šedé. Je třeba je přeočkovat na neselektivní agar (například trypton sójový agar) s následnou kultivací při 36 ± 2 hodinách a při teplotě 36 ± 2 °C za anaerobních podmínek. V případě nečistých kmenů je třeba kulturu ještě přechistit, pozitivní reakce je dána zčervenáním nebo zfialováním biomasy bakterií.

Mezi další metody ke stanovení *Clostridium perfringens* Mueller-Spitz et al. (2010) zahrnují metodu s využitím par amoniaku. Nejdříve je vzorek přefiltrován přes filtr, poté je v anaerobním prostředí kultivován při teplotě $44,5 \pm 1$ °C po dobu 24 hodin za použití membránového *Clostridium perfringens* média (m-CP médium). Přípravu a složení m-CP média uvádí příloha číslo 4. Narostlé kolonie *Clostridium perfringens* na m-CP médiu vykazují slámově žlutou barvu. Poté se médium vystaví párám hydroxidu amonného po dobu 20 až 30 sekund. Slámově žluté zbarvení kolonií v přítomnosti amoniaku zčervená.

Také Araujo et al. (2004) porovnávali média pro stanovení *Clostridium perfringens*. Médium m-CP může poskytovat falešné výsledky tehdy, pokud by vzorky pitné vody obsahovaly spory *Clostridium perfringens*, na tomto médiu se nacházel menší počet kolonií oproti TSC médiu. K nejspolehlivějšímu médiu ovšem patří TSCF médium, jehož složení je stejné jako TSC médium, jen obohacené fluorem.

Podle Manafi et al. (2013) kolonie *Clostridium perfringens* na TSCF médiu mají černou barvu. Vyvrací informaci, že TSCF médium je nejlepším médiem pro stanovení *Clostridium perfringens*. Pokud je vzorek pitné vody příliš kontaminován, může TSCF poskytovat negativní výsledek na přítomnost *Clostridium perfringens*, a to díky nárůstu bezbarvých kolonií.

Junqueira et al. (2012) uvádí, že pokud potřebujeme rychlou metodu do 48 hodin pro stanovení *Clostridium perfringens*, lze použít bujón DRCM (diferenciální zesílený klostridiový bujón). Do zkumavky, obsahující 10 ml zmíněného bujónu, se naočkuje 1 ml vzorku vody. Pokud bujón ztmavne, při kultivační teplotě 35 °C, lze posoudit, že vzorek je pozitivní na přítomnost *Clostridium perfringens*.

K identifikaci lze použít také médium „lakmusové mléko“. Pokud s ním *Clostridium perfringens* reaguje, dochází ke srážení bílkovin a současně k tvorbě plynu. Přítomnost *Clostridium perfringens* potvrzuje také změna barvy média z modré na růžovou, jež způsobí změna pH.

3.4.2 Detekční metody

Riziko onemocnění mikroorganismy z pitné vody se celosvětově stále zvyšuje. Z tohoto důvodu jsou vyhledávány co nejpřesnější metody pro kontrolu pitné vody, ale přesto neexistuje jednotná metoda pro stanovení všech mikroorganismů (Law et al. 2014; Ramírez-Castillo et al. 2015).

Kultivační metody, které jsou nejčastěji využívány ke kontrole nejenom pitné vody, mohou vykazovat falešné výsledky. Nejen to, že kultivační metody jsou málo citlivé na určitý

indikátor v pitné vodě, hlavním problémem je ale to, že některé mikroorganismy (např. *Vibrio cholerae*) nelze běžně kultivovat (Ramírez-Castillo et al. 2015).

Z těchto důvodů jsou vyvíjeny jiné alternativy pro stanovení mikroorganismů v pitné vodě i v dalších průmyslových odvětvích. Příkladem jsou detekční metody, které jsou podle Law et al. (2014) časově úspornější, spolehlivější, u nichž klesá i riziko lidských chyb. Obecně lze detekční metody rozdělit na stanovení koncentrace nukleových kyselin, dále za využití biosenzorů a imunologických metod.

Obtížná kultivace patogenních a podmíněně patogenních bakterií napomohla k rozvoji metod molekulární biologie, avšak to je v mikrobiologii vod díky přítomnosti bohaté mikrobioty hodně omezené, a to i kvůli náročnosti izolace dostatečného množství DNA v potřebné čistotě. Tyto metody jsou tak využívány především ke confirmaci kmenů izolovaných kultivací (Baudišová 2017a).

V tabulce č. 5 jsou uvedeny detekční metody pro pitnou vodu, včetně konkrétního patogenního mikroorganismu, který jde danou metodou určit, jelikož jednou detekční metodou nelze detekovat všechny vodní patogenní mikroorganismy.

Tabulka 5 Metody detekce a příklady vodních patogenních mikroorganismů pro danou metodu (Ramírez-Castillo et al. 2015)

| Metody detekce | Příklady vodních patogenních mikroorganismů |
|---|---|
| PCR | <i>E. coli</i> , ETEC, <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> |
| Multiplexní PCR (mPCR) | EHEC, <i>Shigella</i> sp., <i>Pseudomonas aureginosa</i> , <i>Salmonella</i> sp. |
| Kvantitativní PCR (qPCR, PCR v reálném čase) | <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , patogenní <i>E. coli</i> , viry hepatitidy A i E |
| Mikročipy | <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Cryptosporidium</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Giardia</i> |
| Biosenzory | <i>E. coli</i> a <i>Vibrio cholerae</i> |
| Fluorescenční hybridizace <i>in situ</i> (FISH) | <i>E. coli</i> |
| Imunologické metody | <i>E. coli</i> a <i>Salmonella enterica typhimurium</i> |

Polymerázová řetězová reakce

Nepostradatelnou a běžnou technikou představuje polymerázová řetězová reakce (PCR). Jelikož je tato metoda velice rychlá, jednoduchá a citlivá, běžně bývá využívána v lékařství a v molekulární biologii. Základem PCR metody je proces opakovaného množení (amplifikace) určitých DNA fragmentů v *in vitro* podmínkách, kde lze získat nekonečno kopií pouze z jedné kopie molekuly DNA. Aby došlo k úspěšnému dokončení amplifikace určitých DNA fragmentů, jsou zapotřebí polymerázy, DNA templát (matrice) a krátké DNA fragmenty (primery). Po skončení několika po sobě jdoucích amplifikací molekuly DNA je nutno PCR vyhodnotit prostřednictvím gelu elektroforézy (Joshi & Deshpande 2011).

Metoda PCR není citlivá na 100 %, jelikož nedokáže od sebe rozlišovat životaschopné a neživotaschopné buňky mikroorganismů. Účinnost PCR také klesá v případě, kdy se ve vzorku nachází nízká koncentrace patogenních mikroorganismů (Ramírez-Castillo et al. 2015).

Jedna amplifikace molekuly DNA v PCR probíhá ve třech krocích, které byly popsány Joshi & Deshpande (2011):

- 1) Denaturace - probíhá při vysokých teplotách (90 až 97 °C), templátová DNA (matrice) je denaturována, což vede k oddělení jednotlivých vláken a vzniká jednovláknová molekula DNA.
- 2) Annealing – hybridizace primerů k jednovláknové molekule DNA, v tomto kroku dochází ke snížení teploty (50 až 60 °C).
- 3) Elongace – na primery nasedá DNA polymeráza, která syntetizuje komplementární řetězce DNA. Teplota musí být okolo 72 °C, jelikož tato teplota působí kladně pro Taq DNA polymerázu. Po skončení elongace se vytvoří dvojnásobné množství DNA.

Multiplexní PCR

Multiplexní PCR (mPCR) představuje rychlejší detekce v porovnání s klasickou PCR. Výhodou multiplexní PCR oproti PCR je, že dokáže stanovit až pět (ale i více) patogenních mikroorganismů v rámci jednoho stanovení, poněvadž multiplexní PCR obsahuje několik sad specifických primerů, zatímco v PCR působí pouze jedna sada specifických primerů. Proto jsou zdokonalovány vhodné primery pro detekci patogenních mikroorganismů. Kromě toho se také musí hlídat koncentrace specifických primerů, jelikož zvýšená koncentrace primerů by mohla vést k jejich interakci (Law et al. 2014).

PCR v reálném čase

Délka trvání metody PCR se prodlužuje kvůli vyhodnocení vzorku elektroforézou. Proto byla vyvinuta metoda PCR v reálném čase ke zkrácení celkového vyhodnocení. Princip metody je stejný jako u klasické PCR, s tím rozdílem, že PCR v reálném čase nevyžaduje dokončení výsledku za použití elektroforézy. Před proběhnutím všech tří kroků PCR jsou přidány fluorescenční signálová barviva (např. SYBR green) k ostatním komponentům, během procesů PCR se tato barviva vážou na molekuly DNA. Následovně je zmonitorována intenzita fluorescenčního barviva a výsledky jsou interpretovány do počítače (Hue-Roye & Vege 2008).

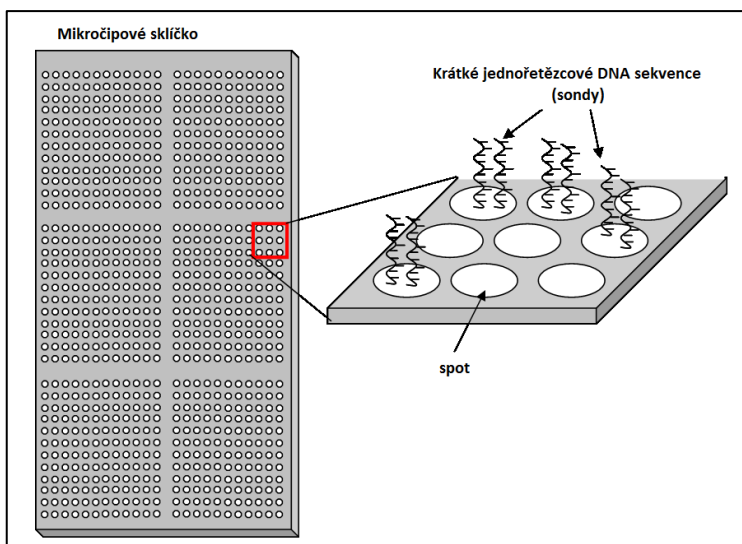
Mikročipy

Jednou z dalších molekulárních metod jsou tzv. mikročipy (označované také jako DNA čipy, RNA čipy). Technologie je využívána pro monitorování genové exprese za různých podmínek buněčného růstu a identifikaci mikroorganismů z různého prostředí. Nejenom že tato metoda je velice rychlá, ale v jediném vzorku je možná detekce všech genů z různých mikroorganismů. Dále se pomocí mikročipů dají stanovit mikroorganismů, kteří vykazují rezistenci vůči antibiotikům (Ramírez-Castillo et al. 2015).

DNA mikročipy se skládají ze skleněného sklíčka, kde na povrchu ve spotech probíhá imobilizace známé jednovláknové molekuly DNA (označovaná jako sonda) biochemickou analýzou (viz obrázek č. 5).

Khelurkar et al. (2017) zmiňují dva způsoby imobilizace této sondy. Pokud jednovláknová molekula DNA pochází z molekuly cDNA (complementary DNA) daného organismu, metoda se označuje jako cDNA mikročip. Druhý způsob představuje syntézu krátkých oligonukleotidů, tato syntéza bývá označována jako fotolitografie. Princip metody tvoří hybridizace mezi sondou a vzorkem (neznámou sekvencí DNA), kdy se komplementárně spárují sekvence nukleových kyselin pomocí vodíkových můstků. Po následném promytí zůstávají pouze komplementárně navázané molekuly, které jsou fluorescenčně značené. Pro vyhodnocení jsou využívány různé druhy záření (např. laserové nebo pro detekci fluorescence).

Ačkoliv je tato metoda citlivá, i tak se může zajistit zvýšení citlivosti této metody. Pokud se před stanovením pomocí DNA mikročipů použije metoda PCR, dochází ke zvýšení citlivosti DNA mikročipů. Na tom to se shodují Ramírez-Castillo et al. (2015) a Joshi & Deshpande (2011).



Obrázek č. 5 Mikročipové sklíčko s popsáním úsekem spotů

(<https://telemedicina.med.muni.cz/genomic-proteomic-analysis/index.php?pg=e-learning--2-analyza-dat--2-2-analyza-vysokopokryvných-genomických-dat--2-2-1-dna-mikrociipy--2-2-1-1-zakladni-princip-dna-mikrociipy>)

Biosenzory

Biosenzory patří mezi analytické přístroje určené pro detekci mikroorganismů, tento přístroj se skládá z převodníku a bioreceptoru. Rozpoznání cílového analytu poskytuje bioreceptor, cílovým analytem mohou být například enzymy, protilátky nebo nukleové kyseliny. Avšak bioreceptor není schopen poskytnout výsledné informace o daném vzorku. Kvantitativní vyhodnocení probíhá v převodníku, který převádí biologické interakce na

změřitelný elektrický signál. Třebaže biosenzory zaručují krátký čas detekce, zájem o ně vzrostl kvůli jejich přenositelnosti.

Existuje poměrně mnoho druhů biosenzorů, avšak na trhu převládají především optické biosenzory, které fungují na principu změny optických vlastností (Law et al. 2014; Ramírez-Castillo et al. 2015).

Fluorescenční *in situ* hybridizace

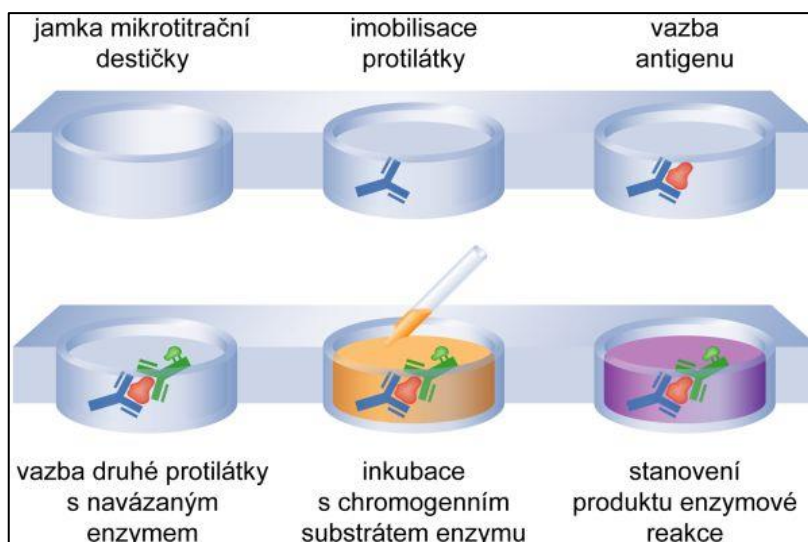
Identifikaci jednotlivých mikrobiálních buněk zajišťuje metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Na základě metody FISH se nejenom detekují mikroorganismy v určitém vzorku, navíc zmíněná metoda je dle Botarri et al. (2006) důležitá pro pochopení mezidruhových interakcí v mikrobiálních společenstvech. Metoda představuje analýzu nukleových kyselin aplikací oligonukleotidových sond. Metoda FISH je založena na čtyřech krocích:

- 1) Fixace mikroorganismů – prostřednictvím fixačního činidla, přenesením na skleněné sklíčko, zaschnutí a následná dehydratace etanolem. Tento krok je důležitý pro navázání fluorescenčních sond.
- 2) Hybridizace – aplikace předehřátého hybridizačního pufru přímo na fixovaný vzorek. Nezbytnou součástí hybridizačního pufru je fluorescenčně značená sonda, zajisté musí být komplementární k cílové RNA/DNA. Délka trvání hybridizace představuje zhruba 30 minut až několik hodin, odehrává se v tmavé komoře při teplotě mezi 37 – 50 °C.
- 3) Promytí vzorku – destilovanou vodou se odplaví nenavázané sondy na sklíčku, poté se vzorek nechá zaschnout.
- 4) Vyhodnocení vzorku – počet fluorescenčně značených buněk se vyhodnotí mikroskopem nebo průtokovou cytometrií.

Imunologické testy

Podstata imunologických testů je založena na vazbě mezi určitou protilátkou a specifickým antigenem v mikroorganismu. Zhao et al. (2014) tvrdí, že nejvíce využívanou imunologickou metodou představuje metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Základem metody ELISA je imunoenzymatická reakce. Průběh reakce probíhá v mikrotitrační destičce, jež je tvořena z jamek. Každá jamka obsahuje vzorek v podobě imobilizovaného antigenu, přidaná primární protilátka zajistí jejich vazbu. Přítomnosti a množství antigenu mikroorganismu detekují sekundární protilátky (protilátky s enzymem). Enzym poté reaguje s chromogenním médiem, během této reakce dochází ke změně zbarvení média. Intenzita zbarvení je přímo úměrná k množství mikroorganismů (Gan & Patel 2013). Postup metody ELISA je schematicky zobrazen na obrázku č. 6.



Obrázek č. 6 Schéma postupu metody ELISA (https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/elisa.html)

Z kontextu vyplývá, že falešný výsledek při stanovení mikroorganismů mohou poskytovat jak kultivační metody, ale také i detekční metody, proto některé laboratoře pro stanovení mikroorganismů využívají kombinaci obou metod. Kultivační metody slouží pro růst mikroorganismů, detekční metody napomáhají jejich správnému potvrzení. Výzkum Posnicek et al. (2016) kombinoval kultivační a detekční metodu pro stanovení *E. coli*, kdy byl vzorek pitné vody nejdříve přefiltrován přes membránový filtr, inkubace trvala šestnáct hodin (37 °C). Poté byl filtr převeden do bioreaktoru, kde fluorescenční sonda (po uplynutí zhruba 90 minut) označila všechny přítomné bakterie *E. coli*. Po promytí vodou byl filtr přenesen na skleněné víčko, umístěn pod mikroskop, který pomocí kamery naskenoval a označil kolonie *E. coli*. Tato metoda neposkytla žádné falešné výsledky.

3.5 Mikrobiologická kvalita pitné vody ve vybraných zemích

Pro srovnání kvality pitné vody byly vybrány tři země, které se nacházejí na odlišných kontinentech (Evropa, Amerika a Afrika). Ačkoliv jsou stále zvyšovány nároky na kvalitu pitné vody, zároveň i na četnost kontrol pitné vody, přesto existuje vysoké riziko onemocnění z pitné vody, a to i ve vyspělých zemích.

Itálie

Itálie patří do Evropské unie, tudíž se řídí Evropskými předpisy na pitnou vodu (konkrétně Směrnicí Rady 98/83/ES).

Analýzu kohoutkové pitné vody ze školních jídelen po celé Itálii uskutečnili Marzano & Balzaretii (2013). Bylo odebráno celkově 26 vzorků kohoutkové pitné vody, vzorky byly odebrány z kohoutku ze dvou míst. Jeden kohoutek byl na místě určeném pro mytí zeleniny a zpracování masa, druhý kohoutek byl vyžíván jako zdroj přímé spotřeby kohoutkové pitné

vody. Před odběrem vody byl vydesinfikován vodovodní koutek 1,5% roztokem benzalokoniumchloridem a po dobu tří minut došlo k odtočení vody.

Odebraný objem vody na analýzu činil 1000 ml, který se plnil do sterilních lahví obsahujících 10 mg thiosíranu sodného potřebného k neutralizaci chlóru v pitné vodě. Mikrobiologické analýzy sledovaly přítomnost počtu heterotrofních mikroorganismů, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus* spp. 47,8 % vzorků pitné vody používaných k oplachu zeleniny nebo zpracování masa a 10 % vzorků pitné vody k přímé spotřebě nevyhovovalo předpisům Směrnice Rady Evropské unie. *Pseudomonas aeruginosa* byla zjištěna u 8,7 % vzorků pitné vody, což může být zdravotním rizikem pro lidi s vyvíjející nebo s oslabenou imunitou, konkrétně pro děti, nejvíce se stravujících ve školních jídelnách.

Sacchetti et al. (2014) a Liguori et al. (2010) vyhodnocovali mikrobiologickou kvalitu pitné vody v automatických dávkovačích na pitnou vodu a kohoutkové pitné vody. Dle Liguori et al. (2020) *Escherichia coli* a *Enterococcus* spp. nebyly analyzovány ani v jednom vzorku, *Pseudomonas aeruginosa* byla nalezena pouze u jednoho vzorku kohoutkové vody, ale 28,9 % vzorků detekovaly přítomnost *Pseudomonas aeruginosa* v nasycené pitné vodě z dávkovače. U nesycené pitné vody z automatického dávkovače přítomnost této bakterie byla o něco nižší (o 5,2 %). Vyšší mikrobiologickou kvalitu můžeme proto potvrdit u kohoutkové vody než u vody z automatického dávkovače. K obdobným výsledkům došli i Sachetti et al. (2014).

Brazílie (Jižní Amerika)

Legislativní nařízení pro mikrobiologické parametry vzorků potravin v Brazílii řídí Národní agentura pro sanitární dohled (ANVISA). Jedinou mikrobiologickou kontaminací, řízenou legislativou, a to jak u pitné vody z vodovodního kohoutku nebo u balené vody, představují koliformní bakterie. Měsíčně musí být stanoveno nejméně čtyřicet vzorků pitné vody z vodovodního kohoutku. Mikrobiologická kontaminace nesmí být potvrzena u 95 % vzorků po dobu jednoho roku (Zamberlan da Silva et al. 2008).

Během roku 2010 v Brazílii zemřelo 4000 osob z celkových 43 miliónů osob nakažených akutním průjmem, nemoc způsobili právě patogenní mikroorganismy, zdrojem nákazy byla uvezená pitná voda a potrava. O mikrobiologické kontrole, která proběhla v letech 2000 až 2010 celkově u 4567 vzorků potravin a vody, z čehož 13,8 % vzorků neodpovídalo hygienickým požadavkům, informovali Nunes et al. (2013). Mezi zkoumanými vzorky pitné vody byla zahrnuta minerální voda, kostky ledu, čištěná a balená voda, z nichž 17,4 % vzorků neodpovídalo legislativním normám. 32 vzorků bylo podrobena analýze na přítomnost rodu *Salmonella*, pozitivní výsledek byl nalezen u 3,1 % vzorků. Pozitivní test na přítomnost *Pseudomonas aeruginosa* detekovaly u 10,5 % z celkových 362 vzorků.

Zamberlan da Silva et al. (2008) porovnávali mikrobiologickou kvalitu kohoutkové a balené pitné vody. 96 vzorků pitné vody bylo odebráno z vodovodního kohoutku a 99 vzorků pitné vody z 20 litrových barelů, určených do automatických dávkovačů. Tabulka č. 6 udává procento negativních vzorků pro jednotlivé zjišťované mikrobiologické ukazatele. Z této

tabulky dále vyplývá, že kohoutková voda vykazuje mnohem lepší mikrobiologickou kvalitu oproti pitné vodě z barelu.

Tabulka 6 Porovnání mikrobiologické kvality kohoutkové a barelové pitné vody v procentech negativních vzorků (upraveno dle Zamberlan da Silva et al. 2008)

| Mikrobiologický ukazatel | Druh vzorku pitné vody | |
|-------------------------------|------------------------|---------------------|
| | Kohoutková voda | Pitná voda z barelu |
| Celkové koliformní bakterie | 65,6 | 39,1 |
| Fekální koliformní bakterie | 65,5 | 26,1 |
| <i>Escherichia coli</i> | 63,5 | 25,0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 89,7 | 56,2 |

Etiopie

Mezi nejčastější zdroje pitné vody na území východní Afriky bývají používané prameny, vykopané studny a vodovodní potrubí. Monitorování pitné vody v Etiopii není dobře rozvinuté, pouze několik málo laboratoří posuzuje mikrobiologickou kvalitu pitné vody. Legislativní normy jsou uvedeny v Etiopských standardech.

Abera et al. (2017) sledovali mikrobiologický stav pitné vody v oblasti Amhara po dobu deseti let (2004 – 2014). Množství 1030 vzorků pitné vody bylo stanoveno metodou ve zkumavkách za použití bujónu MacConkey, naočkované zkumavky byly inkubovány při teplotě 37 °C, po uplynutí dvou dní došlo k vyhodnocení zkumavek. Pozitivní vzorek na přítomnost koliformních bakterií vyprodukoval kyselinu nebo plyn za aerobních podmínek. Míra detekce koliformních bakterií byla prokázána u polovinu vzorků (44,7 %), tato polovina vzorků byla dále testována na přítomnost *E. coli*. Tato bakterie byla přítomna ve 28,9 % z pozitivních vzorků na koliformní bakterie. Voda z vodovodního potrubí dopadla jako nejlepší zdroj pitné vody, přesto se velké procento vzorků (72,1 %) pitné vody odchýlilo od legislativy.

V další oblasti Jimma o rok později provedli průzkum pitné vody Yasin et al. (2015). Z celkového počtu 90 vzorků byla prokázána přítomnost koliformních bakterií v 80 % vzorků. Nejvíce dominovala čeleď Enterobacteriaceae (32 %), dalšími nejčastějšími rody představovaly *Bacillus* (28,4 %) a *Pseudomonas* (17 %). Výskyt *Salmonella* spp. se projevil pouze u 3 vzorků (3,3 %). Výzkumy Abera et al. (2017) a Yasin et al. (2015) prokázaly, že nejlepší zdroj pitné vody je z vodovodního potrubí.

4 Závěr

Hlavním cílem bakalářské práce bylo zdůvodnit výskyt mikroorganismů v pitné vodě. V rámci práce bylo prokázáno, že mikrobiální společenství v pitné vodě je velmi rozšířené, nejčastěji se jedná o bakterie fekálního původu, k nimž patří koliformní bakterie, včetně *Escherichia coli*. Ty jsou přirozenou součástí trávicího traktu lidí a teplokrevných živočichů, avšak lze mezi nimi narazit i na patogenní kmeny tvořící toxiny a jiné škodlivé metabolity.

S narůstajícím počtem osob na zemi dochází k vyšší spotřebě zemědělských a živočišných produktů, které představují zvýšení rizika přenosu koliformních bakterií, hlavně především splachem z polí či z živočišné části zemědělství. Dalším zdrojem koliformních bakterií mohou být septiky a kanalizace, proto je třeba dbát na jejich dostatečná zabezpečení proti úniku výkalů do povrchových a podzemních vod.

K často se vyskytujícím bakteriím fekálního původu patří také intestinální enterokoky a *Clostridium perfringens*. V pitné vodě se lze setkat i se skupinou organotrofních bakterií, která ale většinou nezpůsobuje lidem vážnější zdravotní problémy.

V pitné vodě se mohou vyskytovat i silně patogenní rody např. *Salmonella*, *Legionella*, *Campylobacter* a další, ale přestože mohou být v rámci pitné vody nositeli vážných infekčních onemocnění, stanovení v pitné vodě se provádí pouze nárazově v případě opodstatněného podezření či epidemiologické situace.

Cíle bakalářské práce, zaměřené na zdravotní riziko způsobené patogenními mikroorganismy, byly splněny. Současně byly popsány i významné kultivační a detekční metody izolace a identifikace bakterií v pitné vodě.

Účelem monitorování pitné vody je zajištění toho, aby splňovala hygienické požadavky na pitnou vodu stanovené příslušnou legislativou. Z výzkumů vyplynulo, že ačkoliv jsou stále zvyšovány nároky na kvalitu, přesto existuje riziko onemocnění z pitné vody, a to i ve vyspělých zemích. Legislativní základ týkající se pitné vody je v České republice na vysoké úrovni.

5 Seznam literatury

Abera B, Bezabih B, Hailu D. 2017. Microbial quality of community drinking water supplies: A ten year (2004-2014) analyses in west Amhara, Ethiopia. *Sustainability of Water Quality and Ecology* **9-10**: 22-26.

Abu Shmeis RM. 2018. Water Chemistry and Microbiology. *Comprehensive Analytical Chemistry* **81**: 1-56.

Afonso TB, Simões LC, Lima N. 2021. Occurrence of filamentous fungi in drinking water: their role on fungal-bacterial biofilm formation. *Research in Microbiology* **172**: 103791

Ahmed W et al. 2020. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Science of the Total Environment* **728**: 138764.

APALAB. 2020. Jsou bakterie ve vodě škodlivé? Laboratoř Příbor. Available from <http://laborator-pribor.cz/jsou-bakterie-ve-vode-skodlive>.

Aquatell. 2020. *E. coli* in Drinking Water. Aquatell Inc, London Ontario. Available from <https://www.aquatell.com/pages/e-coli-in-drinking-water>.

Araujo M, Sueiro RA, Gómez MJ, Garrido MJ. 2004. Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in groundwater samples: Comparison of six culture media. *Journal of Microbiological Methods* **57**: 175-180.

Averaldo D et al. 2018. Genotypic characterisation and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil. *Water Research* **137**: 273-280.

Barna Z, Kádár M, Kálmán E, Scheirich Szax A, Vargha M. 2016. Prevalence of *Legionella* in premise plumbing in Hungary. *Water Research* **90**: 71-78.

Bártová J. 2015. Přehled patologie. Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum, Praha.

Bartram J, Cotruvo J. 2004. HPC Bacteria in drinking water: Public Health Implications. *International Journal of Food Microbiology* **92**: 239-414.

Baudišová D. 2017a. Metody mikrobiologického rozboru vody: příručka pro hydroanalytické laboratoře. Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, Praha.

Baudišová, D. 2017b. Mikrobiologický rozbor podle novely vyhlášky o pitné vodě. Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, Praha.

Batt CA, Tortorello ML. 2014. Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd Edition. Academic Press, London.

Beauté J. 2017. Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. Eurosurveillance **22**: 1–8.

Bhagwat VR. 2019. Safety of water used in food production. Pages 219-247 in Singh RL, Mondal S, editors. Food Safety and Human Health. Elsevier, USA.

Bottari B, Ercolini D, Gatti M, Neviani E. 2006. Application of FISH technology for microbiological analysis: Current state and prospects. Applied Microbiology and Biotechnology **73**: 485–494.

Brandt MJ, Johnson KM, Elphinston AJ, Ratnayaka DD. 2017. Twort's Water Supply, 7th Edition. Elsevier, UK.

Brendish NJ et al. 2020. Clinical characteristics, symptoms and outcomes of 1054 adults presenting to hospital with suspected COVID-19: A comparison of patients with and without SARS-CoV-2 infection. Journal of Infection **81**: 937-943.

Bridle H. 2014. Waterborne pathogens. Elsevier, Great Britain.

Caicedo C, Rosenwinkel KH, Nogueira R. 2018. Temperature-driven growth of *Legionella* in lab-scale activated sludge systems and interaction with protozoa. International Journal of Hygiene and Environmental Health **221**: 315-322.

Cabral JPS. 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. International Journal of Environmental Research and Public Health **7**: 3657-3703.

Caruso G. 2013. Microbes and their use as Indicators of Pollution. Journal of Pollution Effects & Control **1**: 1-4.

Cepac Morava. 2007a. Potravinářská mikrobiologie I – Mikroorganismy v potravinářství [Distanční text]. Projekt OP RLZ Opatření 3.3-0212.

Cepac Morava. 2007b. Potravinářská mikrobiologie II – Vnější faktory a jejich vliv na jakost potravin [Distanční text]. Projekt OP RLZ Opatření 3.3-0212.

ČSN EN ISO 7899-2. 2001. Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků – Část 2: Metoda membránových filtrů. Český normalizační institut, Praha.

- Dawson D. 2005. Foodborne protozoan parasites. *International Journal of Food Microbiology* **103**: 207–227.
- Edberg SC, Rice EW, Karlin RJ and Allen MJ. 2000. *Escherichia coli*: the best biological dribling water for public health protection. *Journal of Applied Mikrobiology* **88**: 106-116.
- EN ISO 14189. 2016. Water quality – Enumeration of *Clostridium perfringens* – Method using membrane filtration. European Committee for Standardization, Brusel.
- Falteisek, L. 2014. Diverzita mikroorganizmů jako indikátor procesů v podzemních vodách. *Vodní hospodářství* **8**: 22-24.
- Gan SD, Patel KR. 2013. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology* **133**: 1–3.
- García-Ávila F, Valdiviezo-Gonzales L, Cadme-Galabay M, Gutiérrezz-Ortega H, Altamirano-Cárdenas L, Arévalo CZ, Flores del Pino L. 2020. Considerations on water quality and the use of chlorine in times of SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic in the community. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* **2**: 100049.
- Gerba CP. 2009. Indicator Microorganisms. Pages 485-499 in Maier RM, Pepper IL, Gerba CP, editors. *Environmental Microbiology*, 2nd Edition. Elsevier, USA.
- Gonçalves AB, Paterson RRM, Lima N. 2006. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **209**: 257-264.
- Guchi E. 2015. Review on Slow Sand Filtration in Removing Microbial Contamination and Particles from Drinking Water. *American Journal of Food and Nutrition* **3**: 47-55.
- Hata A, Hara-Yamamura H, Meuchi Y, Imai S, Honda R. 2021. Detection of SARS-CoV-2 in wastewater in Japan during a COVID-19 outbreak. *Science of the Total Environment* **758**: 143578.
- Hofman-Caris R, Bertelkamp C, de Waal L, van den Brand T, Hofman J, van der Aa R, van der Hoek JP. 2019. Rainwater Harvesting for Drinking Water Production: A Sustainable and Cost-Effective Solution in The Netherlands? *Water* **11**: 511.
- Horan NJ. 2003. Faecal indicator organisms. Pages 105-112 in Mara D, Horan NJ, editors. *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Elsevier, UK.

Hsu BM, Wu SF, Huang SW, Tseng YJ, Ji D Der, Chen JS, Shih FC. 2010. Differentiation and identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* in environmental water by a molecular method and biochemical test. *Water Research* **44**: 949-955.

Hue-Roye K, Vege S. 2008. Principles of PCR-based assays. *Immunohematology* **24**: 170-175.

Chen J, Rossman ML, Pawar DM. 2007. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. *LWT – Food Science and Technology* **40**: 249-254.

In J et al. 2016. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Reduces Mucus and Intermicrovillar Bridges in Human Stem Cell-Derived Colonoids. *Cmgh* **2**: 48-62.

Johnson WM, Alexander H, Bier RL, Miller DR, Muscarella ME, Pitz KJ, Smith H. 2020. Auxotrophic interactions: A stabilizing attribute of aquatic microbial communities? *FEMS Microbiology Ecology* **96**: 1-14.

Joshi M, Deshpande JD. 2011. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research* **2**: 81-97.

Jozić et al. 2018. Performance characteristics of the temperature-modified ISO 9308-1 method for the enumeration of *Escherichia coli* on marine and inland bathing water. *Marine Pollution Bulletin* **135**: 150-158.

Junqueira VCA, Neto RC, Da Silva N, Terra JH. 2012. Comparison of methods for the enumeration of *Clostridium perfringens* spores in water. *Water Science and Technology* **65**: 227-232.

Kalhotka L, Tesařová M. 2014. *Potravinářská mikrobiologie pro Zahradnickou fakultu. Mendelova univerzita v Brně. Brno.*

Khelurkar VC, Ingle KP, Padole DA. 2017. DNA Microarray : Basic Principle and It's Applications DNA. *Trends in Biosciences* **10**: 488–490.

Kopecká J, Rotková G. 2017. Průkaz a izolace některých půdních mikroorganismů. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno. Available from https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/pudni_mikroorganizmy.html.

La Rosa G, Laconelli M, Mancini P, Bonanno Ferraro G, Veneri C, Bonadonna L, Lucentini L, Suffredini E. 2020. First detections of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. *Science of the Total Environment* **736**: 139652.

Lampel AK, Khaldi - Al S, Cahill MS. 2017. Handbook of Foodborne pathogenic. Microorganisms and Natural Toxins, 2nd Edition. Center for Food Safety and Applied Nutrition, USA. Available online <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/bad-bug-book-second-edition> (access October 2017).

Lange B, Strathmann M, Oßmer R. 2013. Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria: Letters in Applied Microbiology **57**: 547-553.

Law JWF, Mutalib NSA, Chan KG, Lee LH. 2014. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. Frontiers in Microbiology **5**: 1–20.

Levantesi C, Bonadonna L, Briancesco R, Grohmann E, Toze S, Tandoi V. 2012. *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. Food Research International **45**: 587-602.

Leveque B, Burner JB, Dorner S, Bichai F. 2021. Impact of climate change on the vulnerability of drinking water intakes in a northern region. Sustainable Cities and Society **66**: 102656.

Ligouri G, Cavallotti I, Arnese A, Amiranda C, Anastasi D, Amgelillo IF. 2010. Microbiological quality of drinking water from dispensers in Italy. BMC Microbiology **10**: 19.

Liu D. 2019. *Escherichia coli*. Pages 171-188 in Schmidt MT, editor. Encyclopedia of Microbiology, 4th Edition. Elsevier, UK.

Manafi M, Waldherr K, Kundi M. 2013. Evaluation of CP Chromo Select Agar for the enumeration of *Clostridium perfringens* from water. International Journal of Food Microbiology **167**: 92-95.

Magama-Arachchi DN, Wanigatunge RP. 2020. Ubiquitous waterborne pathogens. Pages 15 – 42 in Prasad VNM, Grobelak A, editors. Waterborne Pathogens. Butterworth-Heinemann, UK.

Marzano MA, Balzaretta CM. 2013. Protecting child health by preventing school-related foodborne illnesses: Microbiological risk assessment of hygiene practices, drinking water and ready-to-eat foods in Italian kindergartens and schools. Food Control **34**: 560-567.

Ministerstvo zdravotnictví. 2018. Vyhláška č. 70 ze dne 20. dubna 2018, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů. Pages 945-976 in Sběrka zákonů České republiky 2018, částka 35. Česká republika.

Ministerstvo zdravotnictví. 2004. Vyhláška č. 252 ze dne 22. dubna 2004, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Pages 5401-5424 in Sběrka zákonů České republiky 2004, částka 82. Česká republika.

Mishra A, Alnahit A, Campbel B. 2020. Impact of land uses, drought, flood, wildfire, and cascading events on water quality and microbial communities: A review and analysis Journal of Hydrology: 125707.

Müllerová D, Aujezdská A. 2014. Hygiena, preventivní lékařství a veřejné zdravotnictví. Karolinum, Praha.

Mueller-Spitz SR, Stewart LB, McLellan SL. 2010. Reliability of mCP method for identification of *Clostridium perfringens* from faecal polluted aquatic environments. Journal of Applied Microbiology **108**: 1994-2002.

Negm AM, Zelenakova M, Hlavínek P. 2019. Management of Water Quality and Quantity. Springer, Cham-Schwitzerland.

Nunes MM, Mota ALA de A, Caldes ED. 2013. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. Food Control **34**: 235-240.

Paruch AM, Mæhlum T. 2012. Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. Ecological Indicators **23**: 140–142.

Pavlović MG, Pavlović MM, Pavlović MM, Nikolić ND. 2014. Electrochemical removal of microorganisms in drinking water. International Journal of Electrochemical Science **9**: 8249–8262.

Percival SL, Williams DW. 2014. *Escherichia coli*. Pages 89 -117 in Percival SL, Williams DW, Gray FN, Yates MV, Chalmers MR, editors. Microbiology of Waterborne Diseases, 2nd Edition. Elsevier, UK.

Posnicek T, Ettenauer J, Zuser K, Kellner K, Brandl M. 2016. A Fluorescence Based Sensos System for Automated Detection of *E. coli* in Water. Procedia Engineering **168**: 574-577.

Quilliam RS, Weidmann M, Moresco V, Purshouse H, O'Hara Z, Oliver DM. 2020. COVID-19: The environmental implications of shedding SARS-CoV-2 in human faeces. Environment international **140**: 105790.

Ramírez-Castillo FY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J, Guerrero-Barrera AL. 2015. Waterborne pathogens: Detection methods and challenges. *Pathogens* **4**: 307–334.

Ryzinska-Paier G, Sommer R, Haider JM, Knetsch S, Frick C, Kirschner AKT, Farnleitner AH. 2011. Acid phosphatase test proves superior to standard phenotypic identification procedure for *Clostridium perfringens* strains isolated from water. *Journal of Microbiological Methods* **87**: 189-194.

Říhová Ambrožová J. 2009. Zajištění zdravotně nezávadné a bezpečné pitné vody v distribuční síti. *Chemické listy* **103**: 1041-1046.

Říhová Ambrožová J, Hubáčková J, Čiháková I, Říha J. 2010. Minimalizace rizik při provozu akumulací s pitnou vodou. Pages 253-258 in Dolejš P, editor. *Sborník konference Pitná voda*. W&ET Team, České Budějovice.

Sacchetti R, De Luca G, Dormi A, Guberti E, Zanetti F. 2014. Microbial quality of drinking water from microfiltered water dispensers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **217**: 255-259.

Salvador D, Neto C, Benoliel MJ, Filomena Caeiro M. 2020. Assessment of the presence of hepatitis e virus in surface water and drinking water in Portugal. *Microorganisms* **8**: 1-16.

Santo Domingo JW, Ashbolt NJ, Rice EW. 2019. Drinking Water. Pages 63-82 in Schmidt MT, editor. *Encyclopedia of Microbiology*, 4th edition. Elsevier, Amsterdam.

Saxena G, Bharagava RN, Kaithwas G, Raj A. 2015. Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. *Journal of Water and Health* **13**: 319–339.

Sharma S, Bhattacharya A. 2017. Drinking water contamination and treatment techniques. *Applied Water Science* **7**: 1043-1067.

Smith JL, Fratamico PM. 2016. *Escherichia coli* and Other Enterobacteriaceae: Food Poisoning and Health Effects. Pages 539-544 in Caballero B, Fingals MP, Toldrá F, editors. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, UK.

Směrnice Rady 91/271/EHS o čištění městských odpadních vod ze dne 21. května 1991. Rada Evropské unie.

Směrnice Rady 98/83/ES o jakosti vody určené k lidské spotřebě ze dne 3. listopadu 1998. Rada Evropské unie.

Směrnice Rady 91/676/EHS o ochraně vod před znečištěním dusičnany ze zemědělských zdrojů ze dne 12. prosince 1991. Rada Evropské unie.

Stauber C, Miler C, Cantrell B, Kroell K. 2014. Evaluation of the compartment bag test for the detection of *Escherichia coli* in water. *Journal of Microbiological Methods* **99**: 66-70.

Steinert M, Hentschel U, Hacker J. 2002. *Legionella pneumophila*: An aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 149-162.

Stella EI, Obeagu EI. 2018. A Review on salmonella species and indicator organisms in drinking water. *International Journal of Comprehensive Research in Biological Science* **5**: 5-23.

Tůma I. 2015. Mikrobiologie (pro zahradnické obory). Mendelova univerzita v Brně. Brno.

Waak MB, LaPara TM, Hallé C, Hozalski RM. 2018. Occurrence of *Legionella spp.* in Water-Main Biofilms from Two Drinking Water Distribution Systems. *National Library of Medicine* **52**: 7630-7639.

Wurtzer S, Marechal V, Mouchel JM, Maday Y, Teyssou R, Richard E, Almayrac JL, Moulin L. 2020. Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. medRxiv. Available from <https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679> (accest in May 2020).

Yasin M, Ketema T, Bacha K. 2015. Physico-chemical and bacteriological quality of drinking water of different sources, Jimma zone, Southwest Ethiopia. *BMC Research Notes* **8**: 1-13.

Yates MV. 2019. Drinking Water Microbiology. Pages 83–89 in Schmidt MT, editor. *Encyclopedia of Microbiology*, 4th edition. Elsevier, Amsterdam.

WHO. 2019. Drinking-water. World Health Organization. Geneva. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water> (accest June 2019).

WHO. 2020. Timeline: WHO's COVID-19 response. World Health Organization. Available from <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline> (accest December 2019).

Zákon č. 258 o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů ze dne 14. července 2000. Pages 3622-3662 in *Sbírka zákonů České republiky 2000, částka 74*. Česká republika.

Zamberlan da Silva ME, Santana RG, Guihermetti M, Filho IC, Endo EH, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. 2008. Comparison of the bacteriological quality of tap water and

bottled mineral water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **211**: 504 – 509.

Zelinka Z. 2013. *Studny*. Grada, Praha.

Zhao X, Lin CW, Wang J, Oh DH. 2014. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**: 297–312.

6 Samostatné přílohy

Vybraná nejběžněji používaná média pro stanovení bakterií ve vodě. Zmíněná média jsou především vhodná pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikrobioty (např. pro pitné vody, dezinfikované vody používané do plaveckých bazénů atd.).

Příloha 1 Chromogenic Coliform Agar

Složení:

- Enzymatický hydrolyzát kaseinu 1,0 g/l
- Kvasničný extrakt 2,0 g/l
- Chlorid sodný 5,0 g/l
- Dihydrogenfosforečnan sodný x 2 H₂O 2,2 g/l
- Hydrogenfosforečnan sodný 2,7 g/l
- Pyrohroznan sodný 1,0 g/l
- Sorbitol 1,0 g/l
- Tryptofan 1,0 g/l
- Tergitol 7 0,15 g/l
- 6-Chlor-3-indoxyl- β-D-galaktopyranosid 0,2 g/l
- Kyselina 5-brom-4-chlor-3-indoxyl- β-D-glukuronová 0,1 g/l
- Isopropyl- β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) 0,1 g/l
- Agar 9,0-18,0 g/l
- Destilovaná voda (pro rozpuštění složek CCA agaru) 1 l

Postup: Jednotlivé ingredience se rozpustí v destilované vodě, pomocí vysoké teploty 100 °C. Pokud je to nutné, upraví se hodnota pH, aby po sterilizaci hodnota pH odpovídala $6,8 \pm 0,2$. Poté se směs ochladí na teplotu 45 - 50 °C a rozlévá se do Petriho misek. Takto připravený CCA agar v Petriho miskách je možné uchovávat nejméně jeden měsíc v temnu při teplotě 5 ± 3 °C, musí být chráněné proti odpařování.

Příloha 2 Selektivní kultivační médium podle Slanetz – Bartley

Složení:

- Tryptóza 20,0 g/l
- Kvasničný extrakt 5,0 g/l
- Glukóza 2,0 g/l
- Hydrogen fosforečnan sodný 4,0 g/l
- Azid sodný 0,4 g/l
- Trifenyltetrazolium chlorid 0,1 g/l
- Agar 10,0 g/l

Postup: Jednotlivé složky se rozmíchají v destilované vodě a nechají se sterilovat po dobu 30 minut, nepoužívá se autokláv. U média podle Slanetz – Bartley by mělo být konečné pH $7,2 \pm 0,2$ při teplotě 25 °C.

Příloha 3 Tryptóza – siřičitanový agar s cykloserinem

Složení:

- Tryptóza 15,0 g
- Enzymatický sójový hydrolyzát 5,0 g
- Kvasničný extrakt 5,0 g
- Disiřičitan sodný 1,0 g
- Citran železitoamonný 1,0 g
- 1% D-cykloserin 4 ml
- Agar 15,0 g
- Destilovaná voda 1000 ml

Postup: Všechny složky kromě D-cykloserinu se rozmíchají v 960 ml destilované vody, směs se přivede k varu, do sterilovaných nádob se odměří 96 ml roztoku a nechá se sterilizovat za použití autoklávu při 121 °C po dobu 10 minut. Poté se ochladí na teplotu 50-52 °C, po ochlazení se přidají 4 ml 1% roztoku D-cykloserinu. Takto připravené médium by mělo mít hodnotu pH 7,6 ± 0,2.

Příloha 4 Membránové *Clostridium perfringens* médium

Složení pro základní médium:

- Tryptóza 3,0 g/100 ml
- Kvasničný extrakt 2,0 g/100 ml
- Sacharóza 0,5 g/100 ml
- L-cystein 0,1 g/100 ml
- Síran hořečnatý heptahydrát 0,01 g/100 ml
- Bromkreslový purpur 0,0004 g/100 ml
- Agar 1,5 g/100 ml

Postup I.: Všechny složky se smíchají s destilovanou vodou, za použití autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut dojde k jejich sterilizaci. Hodnota pH by měla odpovídat 7,2. Takto připravené základní médium se ochladí na teplotu 50 °C a do média se přidají další chemikálie.

Složení přídatné:

- D-cykloserin 40 mg/100 ml
- Polymyxin- β-sulfát 2,5 mg/100 ml
- Indoxyl- β-D-glukosid 60 mg/100 ml
- 0,5% Fenolftalein difosfát sterilovaný filtrací 2,0 ml/100 ml
- 4,5% Chlorid železitý hexahydrát sterilovaný filtrací 0,2 ml/100 ml

Postup II.: Po důkladném promíchání všech složek se takto připravené m-CP médium rozlévá do Petriho misek.