

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Mikrobiologická kvalita balené vody v závislosti na
podmínkách skladování**

Bakalářská práce

**Hana Kurková
Kvalita produkce**

Ing. Šárka Musilová, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Mikrobiologická kvalita balené vody v závislosti na podmínkách skladování" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího 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 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Ing. Šárce Musilové, Ph.D. za vedení práce a konzultace. Dále bych ráda poděkovala paní prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. a Ing. Haně Salmonové za odborné rady.

Mikrobiologická kvalita balené vody v závislosti na podmínkách skladování

Souhrn

Bakalářská práce se zabývá mikrobiologickou kvalitou balené vody v závislosti na podmínkách skladování. Jako dvě hlavní podmínky skladování, které mají vliv na mikrobiologickou kvalitu balené vody, byly stanoveny teplota a světlo.

V práci jsou popsány balené vody a jejich legislativní požadavky. Sledovaly se mikrobiologické ukazatele pro zjištění kvality a nezávadnosti balené vody. Dále jsou v práci uvedeny druhy dezinfekce používané pro usmrcení či odstranění mikroorganismů z balených vod. Pro porozumění výskytu mikroorganismů v určitých skladovacích podmínkách jsou v práci popsány faktory, které mohou mikroorganismy ovlivnit.

Pro zjištění počtu a druhu mikroorganismů v balených vodách byla využita nepřímá metoda stanovení, metoda kultivační. Byly použity tři druhy značek balených vod. Magnesia neperlivá, Bonaqua neperlivá a Dobrá voda neperlivá. Hodnoceny byly mikrobiologické ukazatele podle vyhlášky č. 275/2004 Sb. pro balenou a pitnou vodu. Mezi tyto mikrobiologické ukazatele patří *Escherichia coli*, koliformní bakterie, enterokoky, *Pseudomonas aeruginosa*, mesofilní a psychofilní bakterie. Vzorky vody byly přefiltrovány přes membránové filtry a následně se kultivovaly na selektivních médiích. Kultivace se u zkoumaných mikroorganismů lišila kultivační dobou a teplotou. Po kultivaci byly spočítány narostlé kolonie. První rozbor byl proveden ihned po koupi balených vod a následující rozbor s měsíčním intervalem. V průběhu skladování počty mikroorganismů exponenciálně rostly. Nejvyšší počty byly pozorovány u vzorků uložených ve tmě při teplotě 36 °C. Vzorky skladované na světle při pokojové teplotě obsahovaly nejméně mikroorganismů. V rozbořech byly stanoveny všechny mikrobiologické ukazatele dle požadavků výše zmíněné vyhlášky. Největší zastoupení měl ukazatel koliformní bakterie, mesofilní a psychofilní bakterie. Bonaqua měla po celou dobu rozboru největší množství kolonií. Naopak Magnesie měla nejlepší výsledky ze všech tří balených vod.

Bylo zjištěno, že mikrobiologickou kvalitou balené vody může ovlivnit mnoho faktorů. Pokus ukázal, že balená voda není prostá mikroorganismů a že se jejich počet zvyšuje v průběhu skladování v závislosti na skladovacích podmínkách.

Klíčová slova: Selektivní média, koliformní bakterie, *Escherichia coli*, mesofilní a psychofilní bakterie.

Microbiological quality of bottled water depending on storage temperature

Summary

Bachelor thesis is dealing with microbiological quality of bottled water depending on storage temperature. Temperature and light which have influence on microbiological quality of bottled water are stated as two main storage temperature.

Bottled waters and their legislations are described in the thesis. Microbiological indexes of bottled water quality and safety were monitored. Furthermore, the thesis describes the types of disinfection used to kill or remove microorganisms from bottled water. For understanding the occurrence of microorganisms in certain storage conditions are described factors, which can influence microorganisms.

To find out a quantity and species of microorganisms in bottled water was used the indirect method of determination, cultivation method. It was used three brands of bottled water. Still water Magnesia, still water Bonaqua and still water Dobrá voda. Microbiological indexes were evaluated according to the Decree No. 275/2004 Sb. for bottled and drinking water. To these microbiological indexes belongs *Escherichia coli*, coliform bacteria, intestinal enterococci, *Pseudomonas aeruginosa*, mesophilic and psychrophilic bacteria. Samples of water were filtered through membrane filters and then cultivated on selective media. The cultivation of researched microorganisms was different in cultivation time and cultivation temperature. New colonies were counted after the cultivation. First analysis was done immediately after bottled waters were purchased and following analysis were done with monthly interval. Quantity of colonies was increasing exponentially over storage time. The highest quantity of colonies was monitored stored in the dark and 36 ° C. Samples with the least quantity of colonies were stored in the light and room temperature. All microbiological indexes were stated in analysis according to requirements of the above-mentioned decree. The most often microbiological indexes were coliform bacteria, mesophilic and psychrophilic bacteria. Bonaqua had the most quantity of colonies during the analysis. On the other hand, Magnesia had the best results of all three bottled waters.

It was found that the quality of the bottled water can be influenced by many factors. The experiment showed that the bottled water contains microorganisms and their quantity which is depending on storage temperature has been growing over storage time.

Keywords: Selective mediums, coliform bacteria, *Escherichia coli*, mesophilic and psychrophilic bacteria.

Obsah

1 Úvod.....	10
2 Cíl práce	11
3 Literární rešerše	12
3.1 Balená voda.....	12
3.2 Balená přírodní minerální voda.....	12
3.2.1 Označování přírodních minerálních vod.....	13
3.2.2 Rozdělení dle obsahu oxidu uhličitého	13
3.3 Balená kojenecká voda	13
3.4 Balená pramenitá voda	13
3.5 Balená pitná voda.....	13
3.6 Legislativa	14
3.6.1 Druhy balených vod.....	14
3.6.2 Obecné požadavky na balené vody.....	15
3.6.3 Mikrobiologické požadavky na balené vody	15
3.6.4 Úprava balené vody	16
3.6.5 Kontrola a hodnocení balených vod	16
3.7 Dezinfekce vody	17
3.7.1 Chlorace	17
3.7.2 ClO ₂ (Oxid chlořičitý)	17
3.7.3 Ozonizace.....	17
3.7.4 UV záření.....	17
3.7.5 Alternativa v rozvojových zemích.....	18
3.8 Faktory ovlivňující prostředí mikroorganismů.....	18
3.8.1 Biotické faktory	18
3.8.2 Abiotické faktory	20
3.8.2.1 Teplota.....	20
3.8.2.2 Záření.....	21
3.8.2.3 Ultrazvuk	21
3.8.2.4 Mechanické vlivy	21
3.8.2.5 Voda	21
3.8.2.6 Sucho	22
3.8.2.7 Hydrostatický tlak	22
3.8.2.8 Osmotický tlak.....	22
3.8.2.9 Selektivní permeabilita.....	22
3.8.2.10 pH a oxidoredukční potenciál.....	22

3.8.2.11	Kyslík	23
3.9	Mikroorganismy ve vodě	23
3.9.1	Mikrobiologické ukazatele pro balenou vodu	23
3.9.2	Indikátory obecného znečištění	24
3.9.2.1	Životaschopné mikroorganismy	24
3.9.2.2	Organotrofní bakterie	24
3.9.3	Indikátory fekálního znečištění vody	25
3.9.3.1	Koliformní bakterie	25
3.9.3.2	Presumptivní <i>Escherichia coli</i>	26
3.9.3.3	Intestinální enterokoky	26
3.9.4	Anaerobní sporulující bakterie	26
3.9.5	Hygienicky významné mikroorganismy	27
3.9.5.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
3.9.5.2	Stafylokoky	27
3.9.5.3	Streptokoky	27
3.9.5.4	Anaskogenní kvasinky rodu <i>Candida</i>	28
3.9.5.5	Legionely	28
3.9.5.6	Salmonely	28
3.10	Stanovení mikrobiologických ukazatelů	28
3.10.1	Mikrobiologické ukazatele	28
3.10.2	Stanovení mikroorganismů	29
3.10.2.1	Indikátory obecného znečištění	29
3.10.2.2	Indikátory fekálního znečištění	30
3.10.2.3	Hygienicky významné mikroorganismy	31
4	Metodika	33
4.1	Materiál	33
4.1.1	Magnesia neperlivá	33
4.1.2	Bonaqua neperlivá	33
4.1.3	Dobrá voda neperlivá	33
4.2	Metody	33
4.2.1	Příprava selektivních médií	33
4.2.2	Odběr vzorků	35
4.2.3	Filtrace	35
4.2.4	Způsob očkování	36
4.2.5	Kultivace	36
4.2.6	Vyhodnocení	36
5	Výsledky	37

6	Diskuze	38
7	Závěr.....	40
8	Literatura.....	42
9	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Voda je důležitá a potřebná k životu pro všechny organismy na Zemi. Tělo všech organismů je z velké části tvořeno vodou. Pro člověka je důležitá a nezbytná každý den. Její konzumace se postupem času změnila. S vývojem společnosti, různých technologií a vědy je dnes konzumace vody jednodušší a bezpečnější.

V současnosti se častěji konzumuje voda balená než voda z vodovodního řádu. Pro tuto skutečnost existují dva hlavní důvody. Jedním z nich je jakost a nezávadnost vody z hlediska mikrobiologického. Lidé v ní mají větší důvěru. Je to přirozené, protože je balená voda přísně kontrolována dle legislativy v akreditovaných laboratořích k tomu určených. Je zde jistota, že proběhla přesně stanovená a přísná kontrola a nemohou lidem hrozit žádná onemocnění. Dalším důvodem jsou organoleptické vlastnosti vody, jako je chuť, pach a vzhled. Organoleptické vlastnosti jsou také upravovány dle legislativy, ovšem spotřebitel je může posoudit i sám. Dále je důležitým faktorem složení vody. Některé balené vody obsahují více minerálních látek než voda z vodovodního řádu. Obecně dává spotřebitel přednost vodě, která mu chutná a vyhovuje mu vzhledově, je čirá a čistá.

Kontrola, způsob úpravy a definice druhů balených vod je upravována ve vyhlášce č. 275/2004 Sb., kde jsou vypsány přesně stanovené limity mikrobiologické, fyzikálně-chemické a organoleptické. Při jejich překročení musí být sjednána náprava.

Do jaké míry ovlivňují podmínky skladování mikrobiologickou kvalitu balených vod? Tato práce se zabývá mikroorganismy v balených vodách, jejichž růst a množení je ovlivňován různými podmínkami skladování. Každý mikroorganismus totiž má své optimální podmínky pro růst a je ovlivňován vnějšími fyzikálními a chemickými vlastnostmi prostředí. Je zkoumán rozsah účinku těchto prostředí na jakost a nezávadnost vody a sleduje se počet mikroorganismů a jejich růst. Konkrétně jsou v této práci podmínkami prostředí teplota a světlo. Sleduje se zde rozsah a možná příčina kontaminace balené vody. K posouzení kontaminace nám poslouží někteří zástupci indikátorů obecného znečištění, fekálního znečištění a přítomnost jednoho hygienicky významného mikroorganismu. Výsledky všech rozborů jsou srovnávány mezi sebou a s povolenými limity podle vyhlášky č. 275/2004 Sb.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo zjištění počtu a druhu mikroorganismů, které se vyskytují v balených vodách v závislosti na podmínkách jejich skladování. Cílem bylo také zjistit za jakých podmínek se dané mikroorganismy vyskytují ve větším a za jakých podmínek v menším množství. Obecně se tedy sledovala mikrobiologická kvalita balené vody skladované za určitých podmínek. Jako dva hlavní faktory, které mají vliv na mikrobiologickou kvalitu balené vody, byly stanoveny teplota a světlo. Výsledky byly poté srovnány s vyhláškou č. 275/2004 Sb. upravující požadavky na kvalitu pitné a balené vody.

3 Literární rešerše

3.1 Balená voda

Voda balená se napouští do plastových láhví z polyethylentereftalátu (PET). Pro pitnou vodu to není nejvhodnější obalový materiál. Plastové láhve jsou více propustné pro okolní prostředí. Zároveň se mohou do vody dostat látky z plastu, jako je například formaldehyd nebo acetaldehyd. Lepším balením pro pitnou vodu je sklo, které je oproti plastu mnohem méně propustné (Bach et al. 2012).

Spotřeba balených vod se neustále zvyšuje, lidé ji dávají přednost před vodou z vodovodu (Mary et al. 2000).

3.2 Balená přírodní minerální voda

Přírodní minerální voda je podzemní voda, která si zachovává své původní složení a vlastnosti a má díky přirozenému obsahu minerálních látek fyziologické účinky na výživu. Využívá se jako balená přírodní minerální voda a jako minerální voda pro léčebné účely. K léčebným účelům může například sloužit v podobě koupelí v lázních, dále ve formě různých krystalických solných koncentrátů, pastilek (Vincentka), nebo se zpracovává do základů mastí (Potužák 2011).

Zdroje přírodních minerálních vod jsou přirozeným prostředím pro bakteriální mikrobiotu. Přirozeně se zde vyskytují gramnegativní aerobní bakterie, jako je rod *Pseudomonas*, grampozitivní tyčinky a koky. Podle legislativy se voda neupravuje dezinfekcí, pouze odstraněním některých látek (Mary et al. 2000).

Je distribuována v podobě balených vod například společností Karlovarské minerální vody. Tato společnost patří mezi největší výrobce balených vod ve střední Evropě. Vyrábí mnoho známých značek, jako je Magnesia, Dobrá voda, Poděbradka, Mattoni a další. Čerpá z pramenů u Karlových Varů a Mariánských lázní (Karlovarské minerální vody 2019).

Přírodní minerální voda dodávaná v láhvích je voda ze zdroje, který má osvědčení, případně certifikát podle lázeňského zákona č. 164/2001 Sb. o přírodních léčivých zdrojích, zdrojích přírodních minerálních vod, přírodních léčebných lázních a lázeňských místech a o změně některých souvisejících zákonů. Také může jít o zdroj uznaný v jiném členském státu Evropské unie, Evropského sdružení volného obchodu. Jakost a zdravotní nezávadnost těchto vod je upravená ve vyhlášce č. 275/2004, vydané Ministerstvem zdravotnictví. Vyhláška stanovuje mikrobiologické, fyzikální a chemické ukazatele vztahující se k baleným přírodním minerálním vodám. Dále se v ní upravují obecné ukazatele pro jakost a zdravotní nezávadnost. Mezi ukazatele obecné patří barva a přítomnost sedimentu. Pro tento druh balených vod je, na rozdíl od ostatních balených vod, povolena slabě nažloutlá barva a slabý zákal či sediment. Jako ostatní balené vody nesmí obsahovat původce onemocnění, nesmí mít organoleptické závady a žádné cizí organické látky ve zjiitelném množství. V České republice patří mezi dostupné přírodní minerální vody například Evian, Dobrá voda, Hanácká kyselka, Korunní, Magnesia, Mattoni, Ondrášovka, Poděbradka (Petrová & Stávková 2015).

3.2.1 Označování přírodních minerálních vod

Etiketa musí obsahovat informace o tom, že se jedná o balenou vodu ze zdroje přírodní minerální vody. Dále musí obsahovat název přírodního minerálního zdroje, nasycenost, způsob úpravy a místo jímání. Důležitá je informace o akreditované laboratoři, která prováděla rozbor minerální vody a způsob skladování (Petrová & Stávková 2015).

3.2.2 Rozdělení dle obsahu oxidu uhličitého

V článku Balené přírodní minerální vody z časopisu Výživa a potraviny jsou popsány druhy balených vod podle jejich obsahu oxidu uhličitého. Dělí se podle jejich nasycenosti na pět druhů. Jsou to vody přirozeně sycené, obohacené, sycené, dekarbonované a nesycené.

Přirozeně sycené jsou vody, které se svým obsahem oxidu uhličitého blíží obsahu u zdroje. Mají minimálně 250 mg/l oxidu uhličitého, ze stejného zdroje.

Obohacené vody mají vyšší obsah oxidu uhličitého, než je tomu tak u zdroje. Jsou dosycovány ze stejného zdroje

Sycené vody obsahují shodné nebo vyšší množství oxidu uhličitého než u zdroje. Dosycení se provádí oxidem uhličitým jiného původu.

Dekarbonované vody mají naopak nižší obsah oxidu uhličitého než u zdroje.

Nesycené vody obsahují maximálně 250 mg/l oxidu uhličitého (Petrová & Stávková 2015).

3.3 Balená kojenecká voda

Jedná se o výrobek z kvalitní vody chráněného podzemního zdroje. Voda je vhodná pro přípravu kojenecké stravy a k trvalému přiměnu požívání všemi skupinami obyvatel. U balené kojenecké vody je zakázána jakákoli úprava, která by měnila její složení. Může obsahovat maximálně 500 mg/l minerálních látek a je u ní zaručeno původní přírodní složení (Kožíšek 2005).

Pod označením balená kojenecká voda se v České republice prodávají Aqua Anna, Bonny, Fromin a také Horský pramen (Kožíšek et al. 2016).

3.4 Balená pramenitá voda

Jde o výrobek z kvalitní vody chráněného podzemního zdroje. Je vhodná pro trvalé užívání dospělými i dětmi. Voda může být na rozdíl od kojenecké vody upravována, ovšem jen některými danými fyzikálními metodami. Stejně jako do kojenecké vody, je zde zakázáno přidávání jiných látek, kromě oxidu uhličitého. Maximální povolené množství minerálních látek je 1000 mg/l (Kožíšek 2005).

Mezi pramenité vody patří Crystalis, Šumavský pramen, Toma Natura a další (Kožíšek et al. 2016).

3.5 Balená pitná voda

Při výrobě balené pitné vody nemusí být použita podzemní voda, ale i jakýkoli vodárenský zdroj. Je možné ji upravovat jako kohoutkovou vodu. Požadavky na jakost a

nezávadnost jsou stejné jako požadavky u vodovodní vody. Balená pitná voda může být podle vyhlášky obohacena jinými minerálními látkami, a to hořčíkem, sodíkem a draslíkem. Tyto změny složení balené pitné vody ale musí být uvedeny na etiketě. Dále je nutné na balení připsat označení balené pitné vody jako „mineralizovaná pitná voda“. I zde se může upravovat obsah oxidu uhličitého (Kožíšek 2005).

3.6 Legislativa

Kvalita pitné vody se začala kontrolovat už v 19. století, kdy se začal řešit problém s fekální kontaminací ve městech. Zároveň vzniklo moderní vodárenství a hygiena. Byly zjištěny nové poznatky o dopadu neošetřené kontaminované vody na obyvatelstvo. Byly shromážděny data z rozborů kontaminovaných vod a ve 20. století byly také sepsány do legislativy. Nyní je kvalita a jakost pitné vody upravována následující legislativou. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, vyhláškou č. 275/2004 Sb., o požadavcích na jakost a zdravotní nezávadnost balených vod a o způsobu jejich úpravy. Dále vyhláškou č. 83/2014 Sb., 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. Zde jsou uvedeny mikrobiologické, fyzikální, chemické a organoleptické ukazatele, jimiž se musí každý dodavatel pitné vody řídit. Voda musí být testována v akreditovaných laboratořích k tomu určených, aby mohla být prodána spotřebitelům. Musí splňovat limity všech ukazatelů, a pokud tomu tak není, musí být ošetřena přesně stanovenými metodami. Mikrobiologickou metodou je membránová filtrace a kultivace na růstovém médiu. U koliformních bakterií a *Escherichia coli* je navíc povolena metoda MPN (most probable number). Metody pro stanovení fyzikálně-chemických ukazatelů jsou analytické, vhodné analytické metody jsou popsány v tabulce. Organoleptické ukazatele se stanovují senzoricou zkouškou, experty na senzoricke analýzy. Postup pro testování vzorků je také legislativně sepsán. Nejdříve se vzorek odebere, poté se převezde do laboratoře, kde probíhá jeho analýza. U některých ukazatelů je nutné tuto analýzu provést ihned po odebrání vzorku, a to je stanovení obsahu chloru a ozonu (Kožíšek 2011).

3.6.1 Druhy balených vod

Podle vyhlášky č. 275/2004 Sb., vyhlášky o požadavcích na jakost a zdravotní nezávadnost balených vod a o způsobu jejich úpravy, jsou balené vody rozlišeny do čtyř druhů. Je to balená přírodní minerální voda, balená pramenitá voda, balená kojenecká voda a balená pitná voda.

Balená přírodní minerální voda je ze zdroje přírodní minerální vody. Zdroj musí mít osvědčení nebo certifikát podle zvláštního právního předpisu. Nebo z přírodního léčivého zdroje, který má taktéž osvědčení.

Balená pramenitá voda, je voda z chráněného podzemního zdroje. Lze ji upravovat podle paragrafu 4. Mohou ji pít dospělí i děti.

Balená kojenecká voda je také z chráněného podzemního zdroje. Nelze ji nijak upravovat. Jediný povolený způsob úpravy je pomocí UV záření, a to podle paragrafu 4 odstavce 4. Je vhodná při přípravě kojenecké stravy, také je vhodná pro všechny skupiny obyvatel.

Balená pitná voda a její kritéria jsou uvedeny ve zvláštním právním předpisu (Ministerstvo zdravotnictví 2004a).

3.6.2 Obecné požadavky na balené vody

Obecné požadavky podle vyhlášky č. 275/2004 Sb. jsou následující. Balené vody musí být čiré a bezbarvé s výjimkou balené přírodní minerální vody, která může být nejvýše slabě nažloutlá nebo se slabým zákalem či sedimentem. Balené vody nesmějí obsahovat původce onemocnění nebo organismy indikující jejich možnou přítomnost a nesmějí vykazovat organoleptické závady.

Balené vody, kromě balené pitné vody, nesmí obsahovat cizorodé látky ve zjiitelném množství.

Balena pramenitá a balená kojenecká voda může být vyrobena pouze chráněného zdroje podzemní vody. Vydatnost, složení, teplota a další základní vlastnosti musí být ustálené v mezích přirozeného kolísání.

Vody určené k výrobě balených vod, kromě balené pitné vody, je možné přepravovat k balení a dalším zpracováním pouze potrubím, které je chrání před poškozením jejich zdravotní nezávadnosti (Ministerstvo zdravotnictví 2004a).

3.6.3 Mikrobiologické požadavky na balené vody

Požadavky na balenou přírodní minerální vodu, balenou pramenitou vodu a balenou kojeneckou vodu jsou stejné. Níže je tabulka ukazatelů jakosti těchto vod a počet kolonií, které jsou podle vyhlášky č. 275/2004 Sb. povolené (viz Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Ukazatelé jakosti vod

Ukazatel	Jednotka	Limit	Typ limitu
<i>Escherichia coli</i>	KTJ/250 ml	0	NMH
koliformní bakterie	KTJ/250 ml	0	NMH
Enterokoky	KTJ/250 ml	0	NMH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KTJ/250 ml	0	NMH
siřičitany redukující střevní sporulující anaerobní bakterie	KTJ/50 ml	0	NMH
počet kolonií při 22 °C	KTJ/ml	100	MH
počet kolonií při 36 °C	KTJ/ml	20	MH
mikroskopický obraz-živé organismy	jedinci/ml	0	NMH

Jednotka KTJ znamená počet kolonií tvořících jednotek na určité množství vody, podle vyhlášky je to 250 ml vzorku vody. Výjimku tvoří ukazatelé počet kolonií při 22 °C a počet kolonií při 36 °C, kde je testován 1 ml vzorku vody (Ministerstvo zdravotnictví 2004a).

Typy limitu jsou zde dva. Mezní hodnota (MH) znamená, že konzumace vody nemusí být vyloučena, je ale nutné provést opatření k nápravě. Nejvyšší mezní hodnota (NMH) znamená, že je vyloučeno použití této vody jako pitné (Ministerstvo zdravotnictví 2004b).

Požadavky pro balenou pitnou vodu jsou stanoveny ve zvláštním předpisu zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění zákona č. 274/2003 Sb. Dále ve vyhlášce č. 37/2001 Sb., o hygienických požadavcích na výrobky přicházejících do přímého styku s vodou a na úpravu vody (Ministerstvo zdravotnictví 2004a).

Dle této vyhlášky nesmí balená voda, kromě balené pitné vody, obsahovat žádné kolonie tvořících jednotek. Výjimku tvoří počet kolonií při 22 °C, kde je mezní hodnota 100 KTJ/ml a počet kolonií při 36 °C s mezní hodnotou 20 KTJ/ml (Ministerstvo zdravotnictví 2004a).

3.6.4 Úprava balené vody

Ošetření balené vody se liší u každého druhu vody. Provádí se vždy podle vyhlášky č. 275/2004 Sb., vyhláška o požadavcích na jakost a zdravotní nezávadnost balených vod a o způsobu jejich úpravy. Zde je přesně stanoveno, kterými metodami se upravují balené přírodní minerální vody, balené pramenité vody, balené kojenecké vody a balené pitné vody. Pro balené vody jsou povoleny jen určité způsoby filtrace. Přírodní minerální vody se nesmí upravovat tak, aby byl změněn obsah základních složek. Přírodní minerální vody a pramenité vody se upravují pouze za účelem odstranění sloučenin železa, síry, arsenu a manganu. Mikroorganismy se neodstraňují, ovšem voda musí splňovat stanovený počet kolonií tvořících jednotek pro balenou vodu, podle vyhlášky č. 275/2004 Sb, a to je žádná kolonie tvořící jednotku. Výjimkou jsou ukazatelé počtu kolonií při 22 °C, kde je limit 20 KTJ/ml a počet kolonií při 36 °C, kde je limit 5 KTJ/ml. Sloučeniny lze odstranit úpravou balené vody pomocí vzduchu obohaceného ozonem. Balená kojenecká voda se může upravovat pouze jednou metodou, a to ozářením UV paprsky. Do kojenecké balené vody se také nemohou přidávat jiné látky, výjimkou je oxid uhličitý. V případě přidání oxidu uhličitého pro nasycení vody, musí být hodnota pH minimálně 5, nikoli nižší. Přidávání oxidu uhličitého do balených vod je řízeno dalším zvláštním právním předpisem. Úprava balené pitné vody je řízena zvláštním právním předpisem. Zde je povoleno přidávat minerální látky, jako jsou vápník, hořčík, draslík a sodík, jen v určitých povolených normách podle právního předpisu (Ministerstvo zdravotnictví 2004a).

3.6.5 Kontrola a hodnocení balených vod

Ve vzorku odebraném z balených vod, kromě balené pitné vody, nesmí být překročeny stanovené limity. Pokud je zjištěno, že v odebraném vzorku jsou nejvýše dvě kolonie tvořící jednotky na 250 ml koliformních bakterií, enterokoků, bakterií druhu *Pseudomonas aeruginosa* nebo nejvýše dvě kolonie tvořící jednotky na 50 ml střevních sporulujících anaerobních bakterií redukujících siřičitany, je znovu provedena zkouška dalších čtyř vzorků ze stejné výrobní šarže. U těchto vzorků musí být splněny požadavky na mikrobiologickou nezávadnost. Kontrola jakosti a zdravotní nezávadnosti balených přírodních minerálních vod je zajišťována výrobcem. U mikrobiologických ukazatelů, fyzikálních a chemických ukazatelů a cizorodých látek se kontrola provádí jednou ročně. Denní kontrola se provádí u ukazatelů organoleptických, jako je pach, chuť a zákal, ukazatelů základních, jako je pH a konduktivita, ukazatelů doplňkových, například dusitany a dusičnany, a ukazatelů mikrobiologických. Kontrola jakosti a zdravotní nezávadnosti balených pramenitých a balených kojeneckých vod je zajišťována výrobcem. Mikrobiologické, fyzikální a chemické požadavky se kontrolují minimálně třikrát do roka.

Kontrola cizorodých látek probíhá minimálně dvakrát do roka. Denní kontrola je zaměřena na organoleptické vlastnosti, základní požadavky, jako je pH a konduktivita, doplňkové požadavky, dusitany a dusičnany, a mikrobiologické požadavky. Kontrola jakosti a zdravotní nezávadnosti balené pitné vody je zajišťována výrobcem a provádí se podle Vyhlášky č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Pokud je při kontrole balených vod zjištěno překročení stanovených limitů, je potřeba vyšetřit příčinu tohoto překročení a konat opatření k nápravě (Ministerstvo zdravotnictví 2004a).

3.7 Dezinfekce vody

Jedná se o působení chemických nebo fyzikálních látek, které usmrcují nebo inhibují patogeny a parazity. Je důležitou částí úpravy vody, předchází pomnožení patogenních mikroorganismů, které způsobují různá onemocnění. Mezi hlavní faktory působící na dezinfekční účinnost patří typ dezinfekčního činidla, typ parazitů, koncentrace dezinfekčního činidla a doba kontaktu, pH, teplota, zákal a jiné (Bitton 2014).

3.7.1 Chlorace

Tento způsob dezinfekce vody je v České republice, ale i ve světě, využíván nejvíce. Ve vodě je ve formě směsi nedisociované kyseliny chlorné a chlornanového aniontu. Chlor není pro člověka v rozumných koncentracích toxický. Chlor ve vodě oxiduje anorganické látky a organické látky. Organické látky navíc podléhají i chloraci (Janda & Švecová 2000).

3.7.2 ClO₂ (Oxid chlořičitý)

Od chlorace se liší tím, že na organické látky působí pouze oxidačně, ne chloračně. Tato chemická látka se připravuje pouze přímo v úpravárnách vody, jelikož je to výbušná látka. Byl zjištěn toxikologický účinek, ale pouze některých forem, jako například nezreagovaný chloritan. Existuje proto daná směrnice hodnota, podle které by měla pitná voda obsahovat 200 µg.l⁻¹ této látky (Janda & Švecová 2000).

3.7.3 Ozonizace

Ozonizace je ze všech způsobů dezinfekce vody považována za nejsilnější. Pro pitnou hodnotu zde platí maximální hodnota 0,05 mg.l⁻¹. Deinfekce ozonem není pro pitnou vodu dostačující, musí se následovně dochlorovat. Tato kombinace ale nese větší riziko vzniku většího podílu nežádoucích vedlejších produktů chlorace. Navíc zde vzniká vedlejší produkt karcinogenní formaldehyd (Janda & Švecová 2000).

3.7.4 UV záření

Ultrafialové světlo je část elektromagnetického spektra, je součástí slunečního záření. Výhody ošetření tímto způsobem jsou, že se při něm nevyrábějí toxické, mutagenní či karcinogenní vedlejší produkty, nemění se chuť ani pach vody. Pro desinfekci UV zářením se využívají UV lampy uzavřené křemennými trubkami. Faktory ovlivňující působení této dezinfekce vody jsou například obsah organických a anorganických látek ve vodě. Dále bylo

také zjištěno, že koliformní bakterie jsou proti UV záření odolnější než ostatní mikroorganismy. Dalším faktorem je shlukování mikroorganismů do částic. Tento proces dezinfekci zpomaluje. Obecně je UV záření účinné zejména proti virům (Bitton 2014).

3.7.5 Alternativa v rozvojových zemích

V Keni byl proveden pokus s UV zářením. Test proběhl u vzorku vody, obsahující bakterii *Escherichia coli*. Průhledné plastové láhve byly vystaveny slunečnímu záření. Toto záření vodu zcela dezinfikovalo. Tímto bylo prokázáno, že silný sluneční svit je efektivní a levný způsob dezinfekce vody. Tento způsob může být využit například v rozvojových zemích, kde je získání pitné vody velmi obtížné. Ovšem je nutné dosáhnout velmi vysokých teplot. Zde byla voda zahřívána na slunci, kde měla maximální teplotu 55 °C. Po ukončení experimentu, který trval sedm hodin, byla voda zcela dezinfikována (Joyce et al. 1996).

3.8 Faktory ovlivňující prostředí mikroorganismů

Prostředí mikroorganismů je ovlivňováno různými faktory. Jsou to faktory fyzikální, chemické a biologické. Určují všechny jejich životní projevy. Jsou schopné se těmto podmínkám přizpůsobovat, ale mají své optimální hodnoty. Překročení limitních hodnot způsobuje pro daný mikroorganismus nepříznivé podmínky pro růst, rozmnožování a fyziologickou aktivitu (Kunc & Ottová 1997).

Tyto faktory se dělí na biotické a abiotické. Spolu tvoří takzvaný ekosystém. Abiotická složka tvoří neživé prostředí a biotická složka tvoří živé prostředí. Biotickými faktory jsou tedy myšleny samotné mikroorganismy a jejich charakteristika. Abiotické faktory, jsou faktory, které tvoří vnější prostředí a podmínky, ve kterých mikroorganismus žije a roste. Obecně tedy abiotické a biotické faktory spolu úzce souvisí (Ambrožová 2004).

Lidé mohou tyto faktory využít v situacích, kdy je potřeba činnost organismu podpořit či omezit (Kunc & Ottová 1997).

3.8.1 Biotické faktory

Biotické faktory a jejich charakteristika jsou popsány v knize Mikrobiologie v technologii vod od Jany Ambrožové. Biotickými faktory jsou myšleny ty faktory, které ovlivňují mikroorganismus uvnitř. Zde je důležité znát pojmy. Jako jsou například taxon, populace, kultura a další. Níže budou vysvětleny důležité pojmy, které souvisí s ovlivňováním mikroorganismů právě biotickými faktory. Jsou to pojmy ekologické a taxonomické (Ambrožová 2004).

Jedná se o vzájemné vztahy mikroorganismů mezi člověkem a bakteriální mikrobiotou, nebo mezi samotnými mikroorganismy (Turek et al. 2010).

Mezi pojmy taxonomické řadíme taxon, to je základní jednotka taxonomie. Je to například druh, rod, čeleď a další. Taxon je nějaká skupina organismů, které mají společné znaky, charakteristické pro danou skupinu (Ambrožová 2004).

Dalším pojmem je populace, což je skupina organismů určitého druhu. Také ji můžeme nazvat kulturou, například bakteriální. Populace se vyskytují v určitém prostoru a čase. Platí, že v populaci je mnohem pravděpodobnější křížení členů populace než křížení dvou různých

populací. Existují různé druhy populace. Může být populace čistá, to je taková, která obsahuje buňky pouze z jednoho kmene. Dále může být populace smíšená. Tato populace je tvořena dvěma a více kmeny (Ambrožová 2004).

Spojením dvou a více populací, vzniká takzvané společenstvo. Společenstvo se nachází na jednom biotopu. Tyto společenstva se mohou vzájemně ovlivňovat. Vznikají tak mezi nimi určité vztahy. Vztahy mezi společenstvy mohou být buď negativní, negativní anebo se vzájemně nijak neovlivňují. Mezi tyto vzájemné vztahy řadíme adaptaci, neutralismus, komenzalismus, protokooperaci, mutualismus, kompetici, antagonismus, predaci, parazitismus (Ambrožová 2004).

Adaptace je vztah, kdy se populace přizpůsobí podmínkám prostředí. Jiným slovem přizpůsobení. Je pro organismus výhodná, může mu zajistit růst a ochranu před okolím. Dále je tu Neutralismus. To je vztah, při kterém se populace navzájem nijak neovlivňují. Tento vztah se vyskytuje málokdy (Ambrožová 2004).

Dalším vztahem populací je komenzalismus. Tento vztah je založen na úspěchu pouze jedné populace, a to prvního druhu. Ovšem při tomto vztahu není druhá populace nijak ovlivněna. Dvě rívé entity sdílejí jeden prostor, ale vzájemně se nijak negativně neovlivňují (Macela et al. 2006).

Vztah protokooperace je charakteristický svou spoluprací mezi populacemi. Je příznivá pro obě populace, konkrétně jde například o synergismus (Ambrožová 2004).

Mutualismus je vztah symbiózy mezi populacemi. Jde o symbiózu dvou populací. Navzájem se pozitivně ovlivňují a potřebují se. Tato spolupráce je nutná k jejich přežití a to znamená, že je prospěšná pro obě či více populací. Tento typ vztahu můžeme například sledovat u kořenů vickvovitých rostlin a bakterií rodu *Rhizobium* (Ambrožová 2004).

Kompetice je dalším vztahem biotickým. Jedná se o vztah, při němž mezi sebou dané populace soupeří. Soupeří o potravu či o energii. Tyto populace mají stejné nároky na přežití, a tak se sebou soutěží, vyhrát může jen jeden (Ambrožová 2004).

Mezi další biotický vztah populací patří antagonismus, kde je jedna populace či druh vyloučen. Také tento vztah můžeme nazvat alolepatie či antibióza. Tento vztah je mezi populacemi, kde jedna produkuje látky omezující nebo také znemožňující existenci populace jiné. Jejimi přednostmi je například velmi známá produkce antibiotik. Tyto organismy jsou vysoce toxické vůči jiné populaci, druhu organismu. Zde je například známý druh *Penicillium sp.* Jedná se o antibiotika produkovaná houbami. Mezi organismy produkující tyto látky patří zejména aerobní sporulující bacily. Proti *Pseudomonas aeruginosa*, bakterii často se vyskytující v balené vodě, jsou využívány polymyxiny. Polymyxiny jsou produkovány například mikroorganismy jako je *Bacillus circulans*. *Pseudomonas aeruginosa* produkuje antibiotika, jako jsou pyocyanázy, pyocyanin a hemipyocyanin. Mezi další vztah populací patří predace (Ambrožová 2004).

Predace je vztah populací, kdy se jeden druh populace živí jiným druhem. V tomto vztahu jsou populace rozděleny na predátora a kořist. Predátor je druh přizpůsobující se na jinou populaci, druhu. Kořist je ovládána predátorem a slouží jako potrava (Ambrožová 2004).

Jedním z dalších vztahů je parazitismus. Je to vztah, kde je parazit v hostiteli a parazituje na něm. Je pro svého hostitele škodlivý. Existují dva druhy parazitů, ektoparazit a endoparazit. Ektoparazit žije na hostiteli a endoparazit žije v hostiteli. V tomto případě se nejčastěji jedná o viry. Parazitismem jsou typičtí patogenní mikroorganismy. Často způsobují

různá onemocnění, u člověka ale i u jiných organismů a rostlin. Například u ovoce způsobují známé padlím kadeřavost a další onemocnění (Ambrožová 2004).

3.8.2 Abiotické faktory

Mikroorganismy obecně potřebují určité vnější prostředí pro růst a rozmnožování, potřebují získat energii pro život. Toto vnější prostředí se nazývá abiotické, to znamená neživé, a je tvořeno fyzikálními a chemickými podmínkami. Těchto fyzikálních a chemických faktorů je více, ale balené vody, které byly vybrány pro tento výzkum, byly vystaveny jen dvěma z nich, a to teplu a záření (Ambrožová 2004).

3.8.2.1 Teplota

Teplota je velmi významným faktorem pro mikroorganismy. Každý mikroorganismus má tedy své rozmezí teplot, ve kterém dokáže přežít. Při vyšších či nižších teplotách dojde u mikroorganismů ke zrychlení jejich metabolismu, tedy k jeho růstu, množení, či usmrcení a k dalším procesům (Ambrožová 2004).

Teplotní rozmezí se řídí základními teplotními body, a to maximální teplotou, minimální teplotou a optimální teplotou. Teploty, které dosáhnou až za hranice teplotního maxima, jsou pro organismus letální. To znamená, že dojde k usmrcení mikroorganismu. Letální účinek teploty závisí na teplotním optimu mikroorganismu, na jeho termoresistenci a termotorelanci a na dalších faktorech. Mezi další faktory patří například pH, tlak a další. Ovšem některé bakterie jsou schopny tvořit spory, klidové útvary, které jsou mnohem odolnější. K usmrcení odolnějších útvarů bakterií je zapotřebí účinnějších teplot, více drastických. Pro mikroorganismy jsou vyšší teploty méně příznivé než teploty nižší. Dokáží přežít nízké teploty a při jejím zvýšení opět obnovit své funkce, růst, rozmnožování a fyziologickou aktivitu. Při zmrazování potravin je potravina po rozmražení ohrožena působením mikroorganismů, kažením. Vliv na větší počty mikroorganismů má také rychlost zmrazení. Při rychlém zmrazení přežije větší počet mikroorganismů. Tato metoda rychlého zmrazení a sublimace vody je využívána při přípravě tzv. lyofilizovaných kultur mikroorganismů. Tyto mikroorganismy je možné uchovat několik let (Kunc & Ottová 1997).

Podle optimální teploty se mikroorganismy rozlišují do tří skupin. Jedná se o teploty, při kterých rostou, rozmnožují se a jsou fyziologicky aktivní. Jsou to mikroorganismy psychrofilní, mesofilní a termofilní. Psychrofilní neboli chladnomilné, kryofilní, jsou podle názvu aktivnější při nižších teplotách. Teplota intenzivního růstu je 0 °C. Optimální teploty generační doby jsou mezi 20-30 °C. Jsou to velmi odolné organismy, dokáží přežít i velmi nízké teploty i vyšší teploty, okolo 40 °C. Při těchto extrémech jsou jejich biologické a chemické procesy zpomaleny, nikoliv zastaveny. Jsou významné v potravinářském průmyslu. Způsobují kažení potravin v chladárnách. Vyskytují se ale i v půdě, vodě, vzduchu. V půdě jsou významnou součástí cyklu biogenních prvků. Další skupinu tvoří mesofilní mikroorganismy. Ze všech tří skupin je nejrozsáhlejší. Jejich optimální teploty se pohybují v rozmezí 18 až 45 °C. Nejsou tak odolné vůči působení nízkých teplot, jako psychrofilní bakterie. Minimální teplota je 5 °C. Naproti tomu snesou vyšší teploty, okolo 50 °C. Jako poslední jsou Termofilní mikroorganismy, teplomilné. Optimální podmínky pro růst a rozmnožování jsou okolo 40 °C a vyšší. Existují různé druhy, některé mohou mít své teplotní optimum až mezi 60-70 °C. Často

se vyskytují v půdě, termálních vodách. Jsou významné při kompostování, zvyšují teplotu kompostu. Jsou odolné proti pasteraci, zůstávají v mléce po jeho tepelné úpravě pasterací (Kunc & Ottová 1997).

3.8.2.2 Záření

Dalším faktorem ovlivňujícím mikroorganismy je záření. Existuje mnoho druhů záření o různých vlnových délkách. Záření může mít také dezinfekční účinky, jedná se konkrétně o UV záření. Toto záření se používá při dezinfekci vody, díky své schopnosti usmrctvat mikroorganismy. Jedná se o záření vlnové délky 200–300 nm. K usmrcení dochází konkrétně v oblasti 260–265 nm (Ambrožová 2004).

Mikroorganismy tedy reagují na záření různým způsobem, v závislosti na vlnové délce záření. Mezi tyto záření patří infračervené (700 nm – 3 mm), viditelné (380 nm – 760 nm), ultrafialové (50 nm – 380 nm), Roentgenové (0,06 – 50 A) a radioaktivní. Infračervené záření mikroorganismus přímo neohrožuje, jen skrze zvyšování teploty. Viditelné záření má pro mikroorganismy mikrobicidní účinek. Bakterie mají všeobecně více rádi tmu, obzvláště patogenní druhy. Je to z důvodu přítomnosti ultrafialové složky ve viditelném záření. Ultrafialové záření závisí na vzdálenosti, době a absorbovaného množství. Největší baktericidní účinek na bakterie má ultrafialové záření. Roentgenovo záření je také intenzivní a má velmi silný účinek. Radioaktivní záření má kromě silného mikrobicidního účinku ještě účinek mutagení. Mezi druhy radiokativního záření patří nejsilnější gama záření, dále beta a alfa (Kunc & Ottová 1997).

3.8.2.3 Ultrazvuk

Při ultrazvuku, vlnění o vlnové délce vyšší, než je člověk schopen slyšet, dochází k mechanickému poškození buněk organismů, k jejich rozdělení (Ambrožová 2004).

Při překročení frekvence 20 kHz dochází k poškození buněk. Tato frekvence má pro mikroorganismy mikrobicidní účinek. Poškození, rozdělení buněk je způsobeno kmitáním. Blány pulzují a tvoří se v nich plynové bubliny. Při opětovném stlačení je na buňku vyvíjen vysoký tlak a je porušena její struktura. Vlákňité mikroorganismy jsou na ultrazvuk citlivější než tyčinky a tyčinky jsou citlivější než koky. Ultrazvuk se využívá v laboratoři pro přípravu bezbuněčných preparátů (Kunc & Ottová 1997).

3.8.2.4 Mechanické vlivy

Bakterie jsou proti mechanickým vlivům velmi odolné. Je to díky jejich velmi malým rozměrům. Tyto vlivy se běžně využívají. Existují různé způsoby, jak lze mechanicky rozrušit buňky. Například zmrazováním a rozmrazováním (Kunc & Ottová 1997).

3.8.2.5 Voda

Voda je pro mikroorganismy a jejich buňky velice důležitá. Buňky jsou tvořeny z 90 % vodou. Vodu využívají ke svým životním procesům, k rozmnožování, k transportu živin a metabolitů, k průběhu biochemických reakcí a dalším. Potřeba vody se u různých mikroorganismů liší. Některé druhy mohou přežít a zachovat životnost i po delší dobu. Jsou to

například mikromycety, které rostou i v menším množství vody. Dalším příkladem jsou spory bakterií. Vydrží sušší období i několik desítek let a při zvýšení obsahu vody, mohou klíčit. Na druhou stranu existují druhy mikroorganismů, které jsou na suché období citlivé. Patří mezi ně například bakterie octového kvašení, nitrifikační bakterie a také některé mikroorganismy patogenní, mezi jejichž zástupce patří Stafylokok, tuberkulózní a tyfové bakterie. S vodou je dále spojen abiotický faktor relativní vzdušná vlhkost. Tento ukazatel je důležitý při skladování kultur a sušených potravin (Kunc & Ottová 1997).

3.8.2.6 Sucho

Suché prostředí není pro mikroorganismy příliš příznivé, zejména pro bakterie, které jsou na sucho nejvíce citlivé. Jejich spory jsou vůči suchu odolné (Ambrožová 2004).

3.8.2.7 Hydrostatický tlak

Tento abiotický faktor má výrazný vliv na růst bakterií. Určuje jejich tvar. Tvoření tyčinek je způsobeno nižším hydrostatickým tlakem. Naopak vysoký hydrostatický tlak způsobí tvorbu vláken (Ambrožová 2004).

3.8.2.8 Osmotický tlak

Mikroorganismy jsou proti změnám osmotického tlaku přizpůsobené. Zvýšením osmotického tlaku v prostředí, se zvýší i tlak vnitřní. Naopak při jeho snížení, se vnitřní tlak také sníží. Jeho zvyšování probíhá anatonosou a snižování probíhá katatonosou. V závislosti na tlaku uvnitř buňky, jsou bakterie odolné vůči určitým koncentracím solí a cukrů (Kunc & Ottová 1997).

Určité druhy organismů snášejí určité koncentrace chloridu sodného v prostředí. Některé bakterie jsou schopné žít v prostředí i s 30 % roztoku chloridu sodného. Naopak plísně a kvasinky mohou žít při koncentracích 70–80 % roztoku cukru (Ambrožová 2004).

3.8.2.9 Selektivní permeabilita

Selektivní permeabilita je propustnost plazmatických membrán. Bakteriální buňka je semipermeabilní, to znamená, že je propustná jen částečně, propouští jen vodu (Ambrožová 2004).

3.8.2.10 pH a oxidoredukční potenciál

Podle Pasteura se bakteriím daří lépe v zásaditějším prostředí, naopak houby rostou lépe v kyselějším prostředí. Bakterie tedy lépe rostou při hodnotách pH 4–10. Dále se mikroorganismy rozdělují do určitých skupin podle kyslíku. Některé jsou aerobní, k růstu a životu potřebují kyslík a některé anaerobní, kyslík nesnášejí (Ambrožová 2004).

Nejdříve se zaměříme na koncentraci vodíkových iontů, tedy pH. Pro buňku je pH důležité z mnoha důvodů. Má vliv na elektrický náboj buněčné povrchu, čímž dochází ke změně permeability buněčné membrány. Dále ovlivňuje odolnost proti jiným vnějším faktorům, aktivitu enzymů a metabolické procesy. Spory jsou vůči změnám pH odolnější než

vegetativní formy. Jak bylo výše uvedeno, bakterie potřebují ke své životní aktivitě zásaditější prostředí a houby kyselejší prostředí. Převážná část kvasinek se rozmnožuje při pH 3-6 a u bakterií optimální pH pro rozmnožování nabývá hodnot od 6,5 do 8. Mezi bakteriemi jsou i druhy odolnější, které svým působením tvoří kyseliny. Patří mezi ně bakterie mléčného kvašení, bakterie octového kvašení a také sírné bakterie (Kunc & Ottová 1997).

Dalším faktorem je redoxní potenciál neboli oxidačně-redukční potenciál. Podle názvu zde dochází k reakcím oxidačním či redukčním, a to za přítomnosti oxidačních a redukčních látek. Ovlivňuje biochemické reakce a růst mikroorganismů (Kunc & Ottová 1997).

3.8.2.11 Kyslík

V Mikrobiologii pro posluchače studijního oboru technologie vody je uvedeno rozdělení mikroorganismů podle jejich potřeby kyslíku k životu. Jeho přítomnost či nepřítomnost je důležitá pro metabolické a energetické procesy mikroorganismů. Podle potřeby kyslíku se rozdělují do čtyř skupin.

a) Aerobní

Kyslík k životu potřebují, je pro ně nezbytný.

b) Anaerobní

Potřebují prostředí bez kyslíku, působí na ně toxicky.

c) Mikroaerofilní

Kyslík nevyžadují, ale jeho malé koncentrace působí pozitivně na množení těchto mikroorganismů.

d) Fakultativně anaerobní

Tyto mikroorganismy jsou schopny množit se v prostředí aerobním i anaerobním. Ovšem za přítomnosti kyslíku je jejich růst větší (Kunc & Ottová 1997).

3.9 Mikroorganismy ve vodě

Voda je důležitou součástí života mikroorganismů. Je potřebná pro aktivitu bakterií. Bez ní mohou bakterie přežít pouze ve formě klidových útvarů, takzvaných spor. Podle druhu a počtu kolonií mikroorganismů v tomto i jiném prostředí, můžeme určit kvalitu daného prostředí neboli biotopu (Kunc & Ottová 1997).

3.9.1 Mikrobiologické ukazatele pro balenou vodu

Ve vodě se vyskytuje mnoho mikroorganismů, v laboratořích jsou ale zkoumány pouze některé druhy, které mohou způsobit závažná onemocnění nebo jiné problémy. Jsou to koliformní bakterie, interstinální enterokoky, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a organotrofní bakterie. Jedná se o mikroorganismy, které jsou předmětem výzkumu této bakalářské práce. Jsou zkoumány z důvodu zjištění jakosti a nezávadnosti balených vod (Ministerstvo zdravotnictví 2004a).

V balené vodě se vždy vyskytuje alespoň malá část mikroorganismů. Voda, která se plní do plastových láhví je náchylnější na množení bakterií než voda ve skleněných láhvích. Je to z důvodu lepší propustnosti plastů pro vnější kyslík a jiné cizí plyny. Po naplnění vody do obalu a uzavření, narůstá v láhvích počet mikroorganismů. Jsou zde přítomny hlavně bakterie rodu

Pseudomonas. Voda je sice podrobena dezinfekci, ale ta po několika týdnech a měsících není tak účinná jako čerstvě dezinfikovaná balená voda. Na počtu a druhu mikroorganismů závisí druh zdroje vody a složení dané vody. Nárůst počtu mikroorganismů je mnohem nižší v chladnějších teplotách, a naopak při vyšších teplotách, to je například při pokojové teplotě, počet mikroorganismů stoupá. Mezi další faktory se řadí uvolňování živin z plastu nebo obsah oxidu uhličitého ve vodě. Vody s vyšším obsahem oxidu uhličitého, to jsou sycené vody, zabraňují růstu bakterií. Je to z důvodu snížení pH po jejich karbonaci. Toto pH je pro bakterie nepříznivé (Rosenberg 2003).

Voda má od počátku svou přirozenou bakteriální mikrobiotu, která je pomocí dezinfekce usmrcena. Různé druhy vod se ve složení bakteriální mikrobioty mohou lišit. Pramenitá voda má svou velkou bakteriální diversitu a může obsahovat například i bakterie rodu *Pseudomonas*. Při úpravě vody a před jejím balením se musí tyto mikroorganismy ve vodě usmrtit. Při nedostatečné dezinfekci vody může ve vodě zůstat určitý počet těchto bakterií, který se po zabalení začne množit. Při nedostatečné dezinfekci, se při následném skladování při teplotě 37 °C, mohou mikroorganismy ve vodě pomnožit až na počet 10^3 - 10^4 KTJ, a to za jeden až tři týdny (Nsanze et al. 1999).

3.9.2 Indikátory obecného znečištění

Určují celkové znečištění vody. Do této skupiny patří dvě podskupiny, Životaschopné mikroorganismy a organotrofní bakterie (Ambrožová 2004).

3.9.2.1 Životaschopné mikroorganismy

Jsou to aerobní bakterie, kvasinky a mikromycety. Rozlišují se ještě do dvou dalších skupin podle teploty růstu. Jeden druh roste při teplotách 22 °C a druhý při teplotách 37 °C. Mikroorganismy s teplotním optimem růstu 22 °C snášejí vysoké teploty a kultivují se při pokojové teplotě. Mikroorganismy rostoucí při teplotách 37 °C se kultivují v termostatu. Ve vodě nepřežijí moc dlouho, protože jsou citlivější (Ambrožová 2004).

3.9.2.2 Organotrofní bakterie

Organotrofní bakterie jsou mikroorganismy, které k životu potřebují organické látky. Jsou to indikátory celkového znečištění vody. Vody jsou jimi kontaminovány přímo z okolí, nebo mají sami o sobě vyšší obsah organických látek. Jejich počet a míra znečištění se zjišťuje pomocí kultivační metody. Řadíme zde bakterie psychrofilní a mesofilní. Jejich kultivace je prováděna v závislosti na požadavcích optimální teploty růstu těchto bakterií (Kunc & Ottová 1997).

Z organických látek získávají energii, uhlík a dusík. Vyskytují se ve vodách, které byly špatně technologicky ošetřeny, nebo špatně skladovány (Ambrožová 2004).

Bakterie mesofilní jsou bakterie s optimální teplotou růstu a množení $37 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$. Jejich kultivace trvá po dobu 48 hodin. Jejich přítomnost ve vodě informuje o zvýšeném obsahu organických látek a o účinnosti dezinfekce. Zvýšený počet mesofilních bakterií signalizuje zvýšené hygienické riziko (Kunc & Ottová 1997).

Bakterie psychrofilní mají optimální teploty růstu a množení 20 °C. Kultivace probíhá po dobu 72 hodin. Počet narostlých kolonií je oproti počtu mesofilních kolonií vyšší. Je to z důvodu působení skladovací teploty. Voda je nejčastěji uchovávána při pokojových a nižších teplotách, které jsou ideální právě pro psychrofilní bakterie (Kunc & Ottová 1997).

3.9.3 Indikátory fekálního znečištění vody

Jedná se o patogenní či podmíněně patogenní mikroorganismy. U vody, využívané jako pitné, je důležité tyto mikroorganismy sledovat. Patogenní mikroorganismy mohou způsobit závažná onemocnění. Pro hodnocení kvality vod se využívá nejčastěji stanovení enterokoků a koliformních bakterií (Kunc & Ottová 1997).

Mezi bakterie způsobující závažná onemocnění patří *Salmonella*, *Shigella*, *Escheria coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* (Ambrožová 2004).

3.9.3.1 Koliformní bakterie

Jsou jedni z nejvýznamnějších ukazatelů fekálního znečištění. Jejich stanovení v laboratoři se řadí mezi jednodušší metody. Patří mezi aerobní nebo fakultativně aerobní bakterie. Jsou to gram-negativní tyčinky, netvořící spory. Název „koliformní“ pochází ze zjištění růstu těchto bakterií na stejném médiu jako *Escherichia coli*. První zjištěnou bakterií byla *Aerobacter aerogenes*. Tyto kmeny, se později začaly označovat jako kmeny patřící do skupiny *coli-aerogenes*. Když se zjistilo, že podobné kolonie vytváří několik dalších organismů, vznikl současný název coliform (koliformní). V překladu coliform znamená „druhy mající podobné růstové vlastnosti jako *E. coli*“. Do této skupiny patří pouze laktóza pozitivní kmeny (Häusler 1995).

Koliformní bakterie se vyskytují u teplokrevných savců včetně člověka. Jsou to mikroorganismy přirozeně se vyskytující ve střevech. Naopak ve vodě se přirozeně nevyskytují, jsou zde zaneseny prostřednictvím fekálií, přes půdu a jiné. Zanesení koliformních bakterií do vody může probíhat kdykoliv během manipulace s vodou, například při jejím odebírání a balení (Rompré et al. 2002).

Voda není ideálním prostředím pro jejich rozmnožování. Svými chemickými a fyzikálními vlastnostmi je pro ně ideálním prostředím trávicí trakt (McFeters 1990).

Podle toho patří do skupiny indikátorů fekálního znečištění. Svou přítomností a rozmnožováním kontaminují vodu, která je pak nepitná. Společně s *Escherichia coli* se využívají jako hlavní indikátory pro kontrolu vody. Jejich přítomnost ve vodě indikuje její málo účinné ošetření či ztrátu dezinfekčního prostředku (Rompré et al. 2002).

Mezi významné rody koliformních bakterií patří *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* (Kunc & Ottová 1997).

Jsou schopné fermentace laktózy při teplotě 35 °C nebo 37 °C, přičemž produkují kyseliny, plyny a aldehydy. Tento proces trvá 24–48 hodin. Stanovení koliformních bakterií je využíváno ke sledování účinnosti úpravy vody anebo k zjištění její dodatečné kontaminace. Řadí se zde i gramnegativní tyčinky termotolerantních koliformních bakterií. Tato skupina spory nevytváří. Termotolerantní koliformní bakterie jsou schopny fermentace laktózy při 44–45 °C. V tomto procesu také tvoří kyseliny, aldehydy a plyny. Dříve byly označovány jako fekální

koliformní bakterie, v současnosti jsou označovány jako termotolerantní. Mají větší hygienický význam (Ambrožová 2004).

3.9.3.2 Presumptivní *Escherichia coli*

Podle WHO je od roku 1993 jediným správným indikátorem fekálního znečištění vody. Řadí se k termotolerantním koliformním bakteriím. Roste při vyšších teplotách, při teplotě $44 \pm 0,5$ °C, za přítomnosti kyslíku (Ambrožová 2004).

Její přítomnost ve vodě naznačuje kontaminaci dané vody bakteriemi, které jsou přítomné ve výkalech teplokrevných savců. Je společně s koliformními bakteriemi hlavním indikátorem nezávadnosti vody (Rompré et al. 2002).

Jako indikátor zdravotní nezávadnosti vody slouží již od 20. století. Později byly, kvůli nedostatkům, přidány celkové testy na koliformní bakterie. Ve vodě může přežít 4–12 týdnů (Edberg et al. 2000).

3.9.3.3 Intestinální enterokoky

Enterokoky, dříve označovány jako fekální streptokoky, jsou gram-pozitivní bakterie ve tvaru koků. Netvoří spory a někdy se vyskytují ve formě diplokoků. Patří mezi indikátory čerstvého fekálního znečištění. Do vody se dostávají prostřednictvím stolice člověka nebo výkalech teplokrevných živočichů, kde se přirozeně vyskytují. Jsou, na rozdíl od koliformních bakterií, odolnější a přežijí i určité koncentrace chloru. Mnoho jiných mikroorganismů, patří mezi ně i koliformní bakterie, zabíjí i malé množství chloru. Také jsou odolné vůči solím a vysokému pH (Kunc & Ottová 1997).

Za indikátory fekálního znečištění jsou považovány ty enterokoky, které jsou nositeli antigenové skupiny D. Způsobují záněty močových a žlučových cest, sepse a meningity. Žijí a množí se nejlépe při teplotách 10–45 °C (Häusler 1995).

Toto teplotní rozmezí je v trávicím traktu člověka a všech teplokrevných savců. Enterokoky jsou konkrétně v tlustém střevě všech savců. Nejčastěji zastoupeni jsou zástupci *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. Ve srovnání s *E. coli* je jeho množství ve fekáliích menší (Edberg et al. 2000).

Název intestinální je odvozen od jejich přirozeného prostředí, tedy intestinálního traktu. Jejich nálezy ve vodě indikuje špatné a nedostatečné ošetření. Ačkoli jsou velmi odolní vůči působení solí a vysokému pH, jsou na druhou stranu velmi citliví na vnější podmínky prostředí a přežívají jen krátký čas. V tomhle ohledu jsou koliformní bakterie mnohem odolnější (Ambrožová 2004).

3.9.4 Anaerobní sporulující bakterie

Clostridia jsou významné svou tvorbou toxinů, například *Clostridium botulinum* nebo *Clostridium tetani*. Ve vodním prostředí mohou jejich spory vydržet velmi dlouho. Kromě stolice, kde se běžně vyskytují, jsou přítomny i v půdě, a proto se nálezy ve vzorku vody nemůže označit jednoznačně za indikátor fekálního znečištění. Slouží jako kontrola správnosti provedené dezinfekce vody, jelikož jsou rezistentní vůči poměrně vysokým koncentracím chlórů. Jedná se hlavně o *Clostridium perfringens*, anaerobní sporulující tyčinku. Je to gram-pozitivní tyčinka,

nepohyblivá. V minulosti, někdy i současně, se používá jako doplňující stanovení při kontrole fekálního znečištění. Běžně se ale kontrola přítomnosti těchto mikroorganismů neprovádí (Kunc & Ottová 1997).

Clostridium perfringens je patogenní mikroorganismus, je významným producentem toxinů. Jak už bylo výše zmíněno, vyskytují se v půdě, v sedimentech a v gastrointestinálním traktu lidského organismu a poté se z těchto prostředí dostává do vody. Může způsobovat různá onemocnění člověka i zvířat. Například otravy jídlem, plynové gangrény, nekrotické enteritidy a infekce (Myers et al. 2006).

3.9.5 Hygienicky významné mikroorganismy

Jejich stanovení se neprovádí rutinně, avšak jejich přítomnost ve vodě je ze zdravotního hlediska závažný ukazatel (Ambrožová 2004).

3.9.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Jsou to tyčinky o velikosti 0,5 μm – 1,0 μm x 1,5 μm – 6,0 μm . Patří mezi bakterie netvořící spory. Jsou schopny pohybu pomocí polárních bičků a jsou chemoorganotrofní. Nepotřebuje speciální podmínky pro růst. Tvoří různé tvary kolonií, například velké a hladké, malé a drsné, nebo mukózní kolonie. Také se vyskytuje ve stolici a výkalech zvířat, ale v menší míře než koliformní bakterie. Patogenní účinky má spíše pro oslabený organismus, jako jsou starší lidé, děti a kojenci. Způsobuje infekce močových cest, střev, středního ucha, kůže a sliznic. Vyskytuje se také po poranění kůže popálením, nebo při bérceových vředech. Je přítomen v hnisu, který je díky této bakterii zbarven do modrozelená. Její přítomností v pitné vodě mohou být potlačeny koliformní bakterie, to způsobí zkreslení výsledků rozboru vody. Hlavně se vyskytuje ve vodním potrubí vyrobeného z plastů, nebo v plaveckých bazénech, které byly kontaminovány poraněnými plavci anebo z výměšků jejich sliznic (Häusler 1995).

Optimální teplota růstu je 37 °C v celkovém teplotním rozpětí 5–42 °C, jen za přítomnosti kyslíku. Vyšší teploty, to je nad 55 °C, jsou pro ně smrtelné a nižší teploty, to je pod 4 °C, způsobí zastavení růstu. Tento mikroorganismus je přítomen v hnisu, kde vytváří typickou modrozelenou barvu. Většinou se také nachází v plaveckých bazénech, nebo na vnitřních stěnách potrubí (Ambrožová 2004).

3.9.5.2 Stafylokoky

Jde o grampozitivní shluky nebo hroznovité útvary netvořící spory. Jejich kolonie jsou velmi pigmentované, mazlavé a laločnaté na okrajích. Produkují enterotoxiny. Kultivace probíhá při teplotách 20–22 °C po dobu 48 hodin. Jejich přítomnost ve vodě je nebezpečná a voda je hygienicky závadná (Ambrožová 2004).

3.9.5.3 Streptokoky

Při stanovení Streptokoků na živné půdě, tvoří jejich kolonie zelené okraje. Známými druhy jsou například *Streptococcus salivarius*, který je přítomen v ústní dutině. Jejich přítomnost ve vodě značí závažné hygienické znečištění. Často se vyskytují v plaveckých bazénech, které obsahují chlor. Jsou vůči němu odolné (Ambrožová 2004).

3.9.5.4 Anaskogenní kvasinky rodu *Candida*

Jedná se o patogenní houby. Způsobují infekce povrchové, ale mohou způsobit i onemocnění uvnitř systému organismů (Douglas 2003).

Tyto kvasinky tvoří blastospory. Většina druhů je pro člověka fakultativně patogenní. Způsobují tzv. kandidózy, to je onemocnění dýchacích cest a sliznic, onemocnění zažívacího nebo urogenitálního systému a kožní onemocnění. Vyskytují se často na koupalištích a v bazénech (Ambrožová 2004).

3.9.5.5 Legionely

Jsou to gram-negativní bakterie. Jsou původcem pneumonií. Hlavní zástupce této skupiny je *Legionella pneumophila*. Často se vyskytují ve vodovodní vodě, povrchové vodě, na filtrech, v chladicích okruzích, v klimatizaci a na dalších místech (Ambrožová 2004).

3.9.5.6 Salmonely

Salmonely jsou fakultativně anaerobní gram-negativní bakterie, které se vyskytují ve tvaru tyčinky. Je to patogenní bakterie, která může způsobit různá onemocnění. Častým problémem Salmonel je jejich výskyt v potravinách, prostřednictvím kterých se člověk nakazí (D'Aoust & Maurer 2007).

Jedním ze zástupců je například *Salmonella typhi*. Stanovení Salmonely je obtížné a je potřeba provést selektivní a neselektivní pomnožení (Ambrožová 2004).

3.10 Stanovení mikrobiologických ukazatelů

Tyto ukazatele jakosti vody se stanovují kultivačními metodami, podle pravidel ČSN. Tato norma je v současné době doplňována mezinárodními a evropskými normami, kterými jsou ISO a EN. Kontrola ukazatelů se provádí rozbořem. Existuje mnoho druhů metod rozboru kvality vody (Häusler 1995).

3.10.1 Mikrobiologické ukazatele

V následující Tabulce č. 2 a Tabulce č. 3 jsou stanovené mezní hodnoty pro mikrobiologické ukazatele podle vyhlášky (Ministerstvo zdravotnictví 2004b).

Tabulka č. 2: Mikrobiologické ukazatele balené vody

	ukazatel	NMH (KTJ/250 ml)
1	intestinální enterokoky	0
2	<i>Escherichia coli</i>	0
3	koliformní bakterie	0
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0

Tabulka č. 3: Mikrobiologické ukazatele balené vody

	ukazatel	NMH (KTJ/ml)	DH (KTJ/ml)
1	počty kolonií při 22 °C	100	200
2	počty kolonií při 36 °C	20	40

NMH – nejvyšší mezní hodnota

DH – doporučená hodnota (§ 3 odst. 1 zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů)

KTJ – kolonie tvořící jednotky

(Ministerstvo zdravotnictví 2004b).

3.10.2 Stanovení mikroorganismů

Stanovení mikroorganismů, jak už bylo zmíněno v kapitole Stanovení mikrobiologických ukazatelů, se provádí různými metodami. Každá z nich se zaměřuje na určitou skupinu mikroorganismů. Jsou to metody, podle kterých se stanovují indikátory obecného znečištění, indikátory fekálního znečištění, hygienicky významné mikroorganismy, patogenní bakterie, indikátory ekologického znečištění a poslední metodou je identifikace biochemickými testy (Häusler 1995).

3.10.2.1 Indikátory obecného znečištění

Zde se jedná o skupinu organotrofních bakterií. Toto stanovení je velmi obtížné a je nutné striktně dodržovat pracovní postup. Pokud se pracovní postup nedodrží, může dojít ke zvýšení počtu kolonií. Jedná se o ekologické stanovení. Zjištění jejich přítomnosti ve vodě ukazuje na celkové mikrobiální znečištění, a to buňkami mikroorganismů anebo organickými látkami (Häusler 1995).

Stanovení těchto ukazatelů se provádí přímým výsevem zředěného, nebo nezředěného 1 ml vzorku do kultivačního média, zchlazeného na 45 °C. Pro stanovení se používá živné kultivační médium s tryptonem a kvasničným extraktem (Baudišová 2017).

3.10.2.1.1 Mikroorganismy s teplotním optimem růstu při teplotě 22 °C

Množství vzorku je od 0,1 ml do 5 ml. Pro každý vzorek je doporučeno udělat dvě paralelní stanovení. Po vychladnutí, tedy ztuhnutí média, se Petriho misky kultivují dnem vzhůru při teplotě 22 °C ± 1 °C, 72 hodin ± 4 hodiny. Po uplynutí této doby se spočítají narostlé kolonie (Ambrožová 2004).

3.10.2.1.2 Mikroorganismy s teplotním optimem růstu při teplotě 37 °C

Jejich stanovení je stejné jako u předchozí metody, stanovení mikroorganismů s optimem růstu při teplotě 22°C. Rozdílná je kultivace, která probíhá při teplotě 37 °C a trvá 24 hodin ± 1 hodina (Ambrožová 2004).

3.10.2.1.3 Stanovení mesofilních bakterií

Na toto stanovení se vztahuje ČSN 83 0521, ČÁST 4. a ČSN 83 0531, ČÁST 4. Narostlé kolonie jsou vidět pouhým okem. Počet kolonií je pouze ukazatelem obecného znečištění, ovšem při vysokých hodnotách se může jednat o indikátor hygienických závad. Pro stanovení mesofilních bakterií se používá Masopeptonový agar (MPA). Na živném mediu by mělo vyrůst mezi 30 až 300 kolonií (Häusler 1995).

Vzorky se očkují sterilní pipetou po 1 ml vzorku vody do Petriho misky. Následně je vzorek zalit zchlazeným na 45 °C, vysterylovaným v kochově parním hrnci. Poté se obsah

Petriho misky opatrně krouživými pohyby promíchá. Po vychladnutí a ztuhnutí agarů se vloží misky do termostatu, kde se kultivují při teplotě $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, 48 hodin ± 2 hodiny. Pro rozbor se provádí 2 paralelní stanovení (Ambrožová 2004).

3.10.2.1.4 Stanovení psychrofilních bakterií

Stanovení probíhá stejně jako u mesofilních bakterií. Rozdílná je teplota kultivace, která činí $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ a délka trvání kultivace, která činí 72 hodin ± 3 hodiny (Ambrožová 2004).

Stanovení probíhá podle ČSN 83 0521, část 5. a ČSN 83 0531, část 5. Tyto podmínky jsou pro bakterie žijící ve vodě příznivější, proto naroste větší počet kolonií. Stejně je i živné médium, kterým zalijeme vzorky. Jedná se o Masopeptonový agar (MPA). Psychrofilní bakterie se mohou dále stanovovat na jiných kultivačních médiích. Například na křemičitém kultivačním mediu, které je určeno pro terénní rozbor a je rychlejší. Dále můžeme stanovení provést na želatinovém kultivačním mediu, pro posouzení jakosti vod z hlediska spíše ekologického (Häusler 1995).

3.10.2.2 Indikátory fekálního znečištění

To jsou takové mikroorganismy, které mohou způsobit závažná onemocnění. Do skupiny patří takzvané patogenní mikroorganismy. Kvůli závažnosti působení těchto mikroorganismů, jsou řazeni mezi hygienické stanovení jakosti vod. Pokud se ve vodě vyskytují některé z těchto mikroorganismů, jako jsou bakterie z rodu *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* a další, považuje se tato voda za nepitnou a nebezpečnou pro člověka (Häusler 1995).

3.10.2.2.1 Stanovení koliformních bakterií

Existují dva způsoby jejich stanovení, a to membránovou filtrací anebo metodou pomnožení v tekutém kultivačním mediu. Způsob stanovení se různí od druhů vod. Pro některé je lepší metoda membránových filtrů a pro některé v tekutém kultivačním mediu. Nevýhodou membránové filtrace je ucpávání pórů u filtrů vlivem nerozpuštěných látek, jako jsou například i jiné živé mikroorganismy, které nejsou předmětem stanovení. Tekutá kultivační média na druhou stranu nejsou vhodné pro vody s vyšším obsahem rozpuštěných látek. Vysoký počet koliformních bakterií indikuje špatnou úpravu vody, či kvalitu vody už ve zdroji vody. Existuje mnoho způsobů jejich stanovení, je důležité uvědomit si jaký je cíl rozboru a také faktory, za kterých je metoda uskutečnitelná. Metody jako je například Kabelíkova metoda, metoda přímého výsevu na povrch kultivačního media. Hodí se pro stanovení znečištění odpadních vod či vod povrchových. Tuto metodu provádíme na Endo-agaru. Další metodou je metoda membránových filtrů podle normy ČSN ISO 9308-1 (75 7841). Používá se k rozboru pitné vody a je také stanovována na Endo-agaru. Metoda membránových filtrů se dá stanovit několika způsoby. Dále kvasná zkouška, Savageova metoda, metoda P-A testu, Muchova metoda a spousta dalších metod (Häusler 1995).

Podrobněji je popsána metoda membránové filtrace podle ČSN EN ISO 9308-1 a ČSN 83 0531 v knize J. Ambrožové, Mikrobiologie v technologii vod I. Kultivace probíhá na endoagaru. Filtrační papír, přes který je přefiltrováno 250 ml vzorku vody, je sterilní pinzetou položen na připravený agar v Petriho misce. Po vychladnutí se Petriho misky obrátí dnem vzhůru a kultivují v termostatu při teplotě $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ po dobu 24 hodin. Při negativním nálezů se prodlužuje kultivace na 48 hodin ± 1 hodina. U termotolerantních koliformních

bakterií je teplota kultivace $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ a doba kultivace činí 18 až 24 hodin (Ambrožová 2004).

3.10.2.2.2 Stanovení presumptivní *Escherichia coli*

Metod stanovení *E. coli* je několik. Například stanovení metodou podle ČSN EN ISO 9308-1 na CCA médiu, stanovení metodou Colilert Quanti-Tray podle ČSN EN ISO 9308-2 a další metody. Jednou z nich je stanovení mezi termotolerantními (fekálními) koliformními bakteriemi na m-FC agaru (Baudišová 2017).

Růst a množení je ideální při teplotách okolo 44 °C , v aerobním prostředí. Její stanovení lze uskutečnit také několika metodami. Už zmíněná, metoda membránových filtrů je jednou z nich. Slouží k posouzení hygienické stránky pitné vody na m-FC agaru. Další metody stanovení probíhají také membránovou filtrací (Häusler 1995).

Po kultivaci koliformních bakterií se filtrační papírek s narostlými koloniemi přesune na navlhčený prostředek m-Coli-test v prázdné Petriho misce. Kultivují se 2 až 4 hodiny, při teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Poté se sleduje modrá fluorescence viditelná pod UV lampou (Ambrožová 2004).

3.10.2.2.3 Stanovení enterokoků

Stanovení probíhá na kultivačních médiích obsahujících azid sodný, který zamezuje nárůstu jiných mikroorganismů. Zde jsou metody přímého výsevu na tekuté kultivační medium, metodou membránové filtrace, metodou pomnožení v kultivačním mediu (Häusler 1995).

Kultivují se na m-enterokovém agaru, to je Slanetz-Bartley agar. Po membránové filtraci se kultivují v termostatu při teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, po dobu 44 hodin ± 4 hodiny. Po kultivaci se spočítají červenohnědé kolonie (Ambrožová 2004).

3.10.2.2.4 Stanovení klostridií

Stanovují se spory sulfit redukujících klostridií na kultivačním médiu železnato-sulfitém agaru. Po filtraci filtr vloží na povrch kultivačního média a zalije další vrstvou média. Agar je ochlazen na teplotu 50 °C . Kultivace probíhá za nepřítomnosti kyslíku při teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ 20 hodin ± 4 hodiny. Stanovení *Clostridium perfringens* probíhá jinak. Po filtraci se vzorek kultivuje v anaerobním prostředí na m-CP agaru, při teplotě $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, 21 hodin ± 3 hodiny. Sleduje se zbarvení narostlých kolonií po přidání parám amoniaku na 20 až 30 sekund (Ambrožová 2004).

3.10.2.3 Hygienicky významné mikroorganismy

Už podle názvu je zřejmé, že se jedná o hygienické stanovení jakosti vod. Jejich stanovení není tak časté jako u ostatních mikroorganismů, avšak tyto bakterie jsou velmi nebezpečné, až epidemiologického charakteru. Zde stanovujeme *Pseudomonas aeruginosa* (Häusler 1995).

3.10.2.3.1 Stanovení *Pseudomonas aeruginosa*

Tato bakterie se stanovuje dvěma metodami. Metodou membránových filtrů na Drakeově kultivačním médiu 19 a metodou pomnožení v tekutém kultivačním médiu na Drakeově kultivačním médiu 10, s ethanolem. První metodu, metodu membránových filtrů, lze použít na jakékoli druhy vod, které neobsahují velké množství nerozpuštěných látek. Tato metoda se

provádí při určení jakosti pitné vody. Metoda pomnožení taktéž určena pro všechny druhy vod, se provádí ke zjištění počtu této bakterie (Häusler 1995).

Metoda pomocí membránových filtrů je podrobněji popsána v knize J. Ambrožové, Mikrobiologie v technologii vod I. Přefiltrovaný filtr se vloží na podložku nasycenou Drakeovým médiem a kultivuje při teplotě $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, 48 hodin. Po uplynutí této doby se počítají kolonie s modrozelenou barvou nebo zelenohnědou barvou. Kolonie rodu *Pseudomonas aeruginosa* fluoreskují pod UV světlem, je tedy možné je spočítat tímto způsobem (Ambrožová 2004).

3.10.2.3.2 Stanovení stafylokoků

Pro stanovení stafylokoků se filtruje se 100 ml vzorku a následně se filtr pokládá na povrch předsušeného Baird-Parkerova agaru. Kultivace trvá 48 hodin při teplotě $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. Sledují se kolonie šedé až černé, hladké a břídlícovité. Po spočítání kolonií je potřeba ještě provést ověřovací katalázový test a koagulázový test. K provedení katalázového testu je potřeba kolonii vložit do jednoho mililitru 10% roztoku peroxidu vodíku. Zkumavka se protřepe, a pokud se v ní tvoří bublinky, test je pozitivní. K provedení koagulázového testu se kolonie přesunou do zkumavky s bujónem, kde jsou inkubovány v 37 °C po dobu 20 až 24 hodin. Nakonec se odebere z tohoto vzorku 0,1 ml a vloží se do zkumavky s 0,3 ml králičí plazmy. Zkumavky se nadále inkubují 4 až 6 hodin při teplotě 37 °C . Když se vytvoří sraženina, takzvaný koagulát, znamená to, že test je pozitivní (Ambrožová 2004).

3.10.2.3.3 Stanovení streptokoků

Pro kultivaci se použije kultivační médium Haasovo. Filtruje se 100 ml vody. Filtr je poté položen na povrch agaru. Asi po 10 až 15 minutách se filtr z agaru odejme a zničí. Tyto misky se pak kultivují ve $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ 24 hodin ± 1 hodina. Po potvrzení se provede katalázový test, který by měl být negativní (Ambrožová 2004).

3.10.2.3.4 Stanovení anaskogenních kvasinek rodu *Candida*

Filtruje se 100 ml, případně 10 ml vody. Filtr se položí na povrch agaru dle Sabourauda. Kultivace probíhá po dobu 5 až 7 dní, teplota je 22 °C až 25 °C . Poté se počítají kolonie, které jsou vypouklé, lesklé nebo matné, mají porcelánově bílou barvu nebo jsou nažloutlé či krémové. Kolonie se pak zkoumají pomocí mikroskopu. Přičemž se před pozorováním obarví Lofflerovou modří. Mají oválný nebo vejčitý tvar. Pro potvrzení se může provést kvasná zkouška (Ambrožová 2004).

3.10.2.3.5 Stanovení legionel

Filtruje se 200 ml vody. Filtr se pokládá na povrch GVPC agaru s antibiotiky. Inkubuje se po dobu 10 dnů při teplotě $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (Ambrožová 2004).

3.10.2.3.6 Stanovení salmonel

Jejich stanovení je složité, je upravováno normou TNV 75 7855. Voda se přefiltruje přes filtr. Provede se neselektivní množení mikrobioty v pufrované peptonové vodě po dobu 24 hodin při 37 °C (Ambrožová 2004).

4 Metodika

4.1 Materiál

Vybrala jsem si tři druhy balených neperlivých vod, které jsou v této práci porovnávány z hlediska kvality, počtů a druhů mikroorganismů. A to jsou Magnesia, Bonaqua a Dobrá voda.

4.1.1 Magnesia neperlivá

Je přírodní minerální voda s vysokým obsahem přírodního horčíku a nízkým obsahem sodíku. Zvláštní složení Magnesie je způsobeno díky pozůstatkům po sopečné činnosti. Jsou zde totiž pozůstatky magnetického oxidu uhličitého, který napomáhá lepšímu rozpouštění minerálů ve vodě. Vyrábí ji společnost Karlovarské minerální vody. Balená voda je z pramene 100 metrů pod zemí, který se nachází u Mariánských lázní, ve Slavkovském lese (Karlovarské minerální vody 2019).

4.1.2 Bonaqua neperlivá

Je přírodní minerální voda, má charakteristickou čistou jemnou chuť. Má také nízký obsah sodíku a velké množství minerálů. Bonaqua spadá pod The Coca-Cola company. Jejich voda pochází z chráněných zdrojů nacházejících se v Rakousku a Maďarsku. Bonaqua je konkrétně ze zdroje v Maďarsku. Má čistou a jemnou chuť a nízký obsah sodíku (The Coca-Cola Company 2019).

4.1.3 Dobrá voda neperlivá

Je přírodní minerální voda. Patří do společnosti Poděbradka, a.s. a pod Karlovarské minerální vody. Pochází z hlubinného jezera 260 metrů pod zemí, v Novohradských horách. Neobsahuje příliš těžké minerály, a proto je vhodná i pro přípravu kojenecké stravy (Poděbradka 2019).

4.2 Metody

Vody jsem skladovala ve čtyřech různých prostředích. Vlastnosti prostředí ovlivňují rychlost růstu mikroorganismů. Balené vody byly uloženy do tmy při teplotách 22 °C, 36 °C a při pokojové teplotě. Zbývající část balených vod byla uložena na světlo při pokojové teplotě.

4.2.1 Příprava selektivních médií

Selektivní médium je uměle či přirozeně vytvořené prostředí pro mikroorganismy, pro jejich kultivaci. Selektivní médium je také označováno jako růstové médium, kultivační médium nebo živné médium.

Nejdříve bylo dle pokynů výrobce připraveno živné médium. Na tento rozbor bylo použito pět selektivních médií od výrobce Oxoid pro šest skupin bakterií. Nutrient agar byl použit pro stanovení psychofilních a mesofilních bakterií. Pro stanovení *Pseudomonas aeruginosa* byl připraven *Pseudomonas* agar. Pro stanovení intestinálních enterokoků byl

použit agar Slanetz Bartley. Ke stanovení *Escherichia coli* byl použit TBX agar. MacConkey agar byl použit pro stanovení koliformních bakterií.

Selektivní média byla sterilována v autoklávu, sterilace probíhala po natlakování 20 minut. Jediný Slanetz Bartley agar byl pouze rozvářen v hrnci po dobu 20 minut. Připravená živná média byla vložena do vodní lázně o teplotě 49 °C a s dostatkem destilované vody uvnitř. Vodní lázně byly potřebná pro udržení selektivních médií v tekutém stavu.

Příprava Nutrient agaru

Složení: 200 ml destilované vody
5 g bujónu Nutrient broth
3 g technického agaru

Nutrient agaru bylo připraveno větší množství, jelikož byl v rozboru využit ve dvou kopiích. Do erlenmeyerovy baňky s 200 ml destilované vody byly vloženy všechny ingredience a směs byla promíchána. Technický agar má zde funkci tuhnoucí složky.

Příprava Pseudomonas agaru

Složení: 100 ml destilované vody
4,84 g Pseudomonas agaru
1 ml glycerolu
0,4 ml C-F-C suplementu

Příprava C-F-C suplementu: 1 ml destilované vody
1 ml 100 % ethanolu
1 ml antibiotik (Pseudomonas C-F-C Supplement)

Do erlenmeyerovy baňky se 100 ml destilované vody byly vloženy všechny ingredience a směs byla promíchána. Poté se živné médium steriluje. Po sterilaci a vytemperování Pseudomonas agaru na 49 °C byl přidán C-F-C suplement, který byl zvlášť připraven. Při přípravě C-F-C suplementu bylo důležité udržení sterilního prostředí a lahvičky. Byla ožehnutá lahvička a použita sterilní injekční jehla.

Příprava Slanetz Bartley agaru

Složení: 100 ml destilované vody
4,2 g Slanetz Bartley

Do erlenmeyerovy baňky se 100 ml destilované vody byly vloženy všechny ingredience a směs byla promíchána. Poté se živné médium steriluje.

Příprava TBX agaru

Složení: 100 ml destilované vody
3,66 g TBX agaru

Do erlenmeyerovy baňky se 100 ml destilované vody byly vloženy všechny ingredience a směs byla promíchána. Poté se živné médium steriluje.

Příprava MacConkey agaru

Složení: 100 ml destilované vody
5,2 g MacConkey agaru

Do erlenmeyerovy baňky se 100 ml destilované vody byly vloženy všechny ingredience a směs byla promíchána. Poté se živné médium steriluje.

4.2.2 Odběr vzorků

Před otevřením testované láhve musela být láhev protřepána, aby bylo prostředí v ní homogenizováno. Po jejím otevření bylo nutné pracovat rychle. Vzorek byl odebrán pomocí sterilní injekční stříkačky a aplikován podle potřeby na filtrační aparaturu. V tomto rozboru bylo potřeba filtrovat 250 ml u každého vzorku dle požadavků vyhlášky. Na každý vzorek byla použita nová injekční stříkačka, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků.

4.2.3 Filtrace

V době přípravy selektivních médií byly vyvářeny membránové filtry (velikost pórů – 0,3 μm) určené pro membránovou filtraci. Membránová filtrace je běžně využívána pro vyšetření velkého objemu vzorku s nízkým počtem mikroorganismů. Stanovení psychrofilních a mesofilních bakterií bylo provedeno bez použití filtrů, protože se stanovují v 1 ml vzorku. Očekáváme tedy vyšší počty v malém objemu. Pro ostatní mikrobiologické ukazatele bylo vyvářeno 12 filtrů na jedno prostředí (dle počtu analyzovaných vzorků). Stejný postup byl opakován i u ostatních, zbylých tří prostředí. Odměrná baňka byla naplněna destilovanou vodou, tak aby byly filtry celé ponořené. Nad kahanem na stojanu byly pak vařeny dvakrát po dobu pěti minut, přičemž po prvních pěti minutách byla voda vyměněna.

Před zahájením membránové filtrace bylo nutné, aby bylo prostředí určené pro filtrační aparaturu sterilováno. Pro celý rozbor bylo nutné udržet prostředí čisté a sterilní. I zde byly pracovní deska a rukavice olihovány pomocí ethanolu. Tento proces byl opakován stejně i u ostatních prostředí. Následně bylo připraveno 24 Petriho misek na jedno ze čtyř prostředí. To znamená, že na všechny prostředí, tedy jeden celý rozbor balené vody, bylo potřeba 96 Petriho misek. Misky byly označeny lihovým fixem tak, aby bylo vidět, která zkoumaná bakterie v daných miskách byla kultivována. Nakonec byla připravena filtrační aparatura. Zároveň byla na každou vodu použita sterilní injekční stříkačka. 48 misek (4 skupiny mikroorganismů pro 12 vzorků balených vod) byly zality selektivními médii: TBX agar, Pseudomonas agar, Slanetz Bartley medium, MacConkey agar. Na zatuhlé agarové plotny (4 druhy médií po cca 10 ml na jednu velkou Petriho misku) byly, po přefiltrování 250 ml vzorku balené vody membránovou filtrací, pokládány membránové filtry. Bylo filtrováno 250ml vzorku balené vody přes jeden filtr (dle vyhlášky byly výše uvedené skupiny bakterií stanoveny ve 250 ml vzorku vody). Počty mesofilních a psychrofilních bakterie byly stanoveny na selektivním Nutrient agaru přelivem. Na Petriho misku byl naočkován 1 ml vzorku vody a přelit Nutrient agarem. Selektivním faktorem byla po zatuhnutí agaru teplota (psychrofilní 22 °C, mesofilní 36 °C).

4.2.4 Způsob očkování

Na polotekutá živná média byly pokládány filtrační papíry, přes které byl přefiltrován vzorek vody o objemu 250 ml. Pro vzorky testované na psychrofilní a mesofilní bakterie byl odebrán 1 ml vzorku balené vody a následně očkován přímo do petriho misky. Na tento 1 ml vzorku bylo nalito seletivní médium.

4.2.5 Kultivace

Po zatuhnutí selektivního média byly misky kultivovány dnem vzhůru v termostatu při teplotě 37 °C. Vyjímkou bylo stanovení psychrofilních bakterií, které byly kultivovány při pokojové teplotě. Psychrofilní a mesofilní bakterie byly kultivovány ve dvou kopiích, ostatní mikrobiologické ukazatele jen v jedné kopii. Kultivace probíhala dle rychlosti růstu jednotlivých skupin mikroorganismů (*E. coli* a *Enterococcus* 37 °C/24 h; *Pseudomonas aeruginosa* a koliformní bakterie 37 °C/48 h; MB 37 °C/48 h, PB 22 °C/72 h.)

4.2.6 Vyhodnocení

Po kultivaci, která měla různou délku trvání a podmínky pro každý mikroorganismus, byl vyhodnocen počet kolonií. Narostlé kolonie byly spočítány a výsledky zapsány v log KTJ/ml.

5 Výsledky

Pro rozbor byly použity tři druhy balených vod. Všechny druhy byly nesycené a ze stejné šarže. Hodnoceny byly mikrobiologické ukazatele podle vyhlášky č. 275/2004 Sb: indikátory fekálního znečištění, indikátory obecného znečištění a *Pseudomonas aeruginosa*. Do skupiny indikátorů fekálního znečištění jsou řazeny: koliformní bakterie, *Escherichia coli* a enterokoky. Indikátory obecného znečištění jsou psychofilní a mesofilní bakterie. Hodnocení těchto ukazatelů bylo provedeno po době působení podmínek skladování: světlo a pokojová teplota, tma a pokojová teplota, tma a 22 °C a tma a 36 °C.

První rozbor byl proveden ihned po koupi balených vod. Výsledky tohoto rozboru byly následující. U Magnesie a Bonaquy byl zjištěn nález mikroorganismů. Na kultivačním médiu u Magnesie narostly 3 KTJ ve 250 ml *Pseudomonas aeruginosa*. Vzorek Bonaquy obsahoval malé množství kolonií bakterií mesofilních a psychofilních. Oba tyto nálezy se týkaly první kopie vzorku. Hodnota psychofilních bakterií, která činila 36 KTJ/1 ml, je podle této vyhlášky v normě. Hodnota pro mesofilní bakterie, se stejným počtem kolonií, však překračuje danou mezní hodnotu. Jen Dobrá voda neobsahovala žádné narostlé kolonie.

Další rozbor byly provedeny s měsíčním odstupem, tedy každý měsíc jeden rozbor, aby se zjistil vliv působení skladovacích podmínek. Počet mikroorganismů v balených vodách každým měsícem exponenciálně rostl.

Jedním z hlavních indikátorů fekálního znečištění byla *Escherichia coli*. Nález tohoto indikátoru byl pouze u balené vody Bonaquy, která byla skladována ve tmě, při 36 °C.

Koliformní bakterie byly dalšími hlavními indikátory fekálního znečištění. Jejich velký výskyt byl zaznamenán u vod skladovaných v prostředí ve tmě, při 22 °C a 36 °C. Vyskytly se u všech tří balených vod, ale nejvíce u Bonaquy.

Dalším fekálním indikátorem byly intestinální enterokoky. Jejich množství bylo mnohem menší než množství koliformních bakterií. Nárůst enterokoků byl sledován pouze u jednoho vzorku, u balené vody Bonaquy. Nález byl u vody skladované ve tmě při 22 °C.

Pseudomonas aeruginosa je hygienicky významný mikroorganismus. Objevil se u všech tří balených vod, nejvíce u vod skladovaných ve tmě, při teplotě 22 °C a 36 °C.

Organotrofní bakterie narostly u všech tří vod, a to ve velmi velkém počtu. Velké množství se objevilo u vody Bonaquy. Počet kolonií při 22 °C, psychofilních bakterií, se vyskytl převážně u vod skladovaných v prostředí tma a 22 °C. Počet kolonií při 36 °C, mesofilních bakterií, se vyskytl hlavně u vod skladovaných v prostředí tma a 36 °C.

Po shrnutí všech výsledků výjdou tyto závěry. Balená voda Bonaqua obsahovala větší množství mikroorganismů než ostatní vody. V jednom vzorku Bonaquy se vyskytla i *Escherichia coli*. Přítomností tohoto fekálního indikátoru se voda stává nepitnou. Největších počtů kolonií dosahovaly organotrofní bakterie, které byly nalezeny u všech balených vod. Výsledky vod skladovaných ve tmě a na světle se také výrazně lišily. Balené vody, které byly ve tmě, měly postatně vyšší počty mikroorganismů než balené vody uchovávané na světle. Teplota měla také značný vliv na počet mikroorganismů i na druh mikroorganismu. Nejvíce mikroorganismů narostlo u vod, které byly skladovány při teplotě 36 °C a ve tmě. Menší počty byly u vod, které byly skladovány při pokojových teplotách a na světle.

6 Diskuze

V nultém rozboru, který byl proveden ihned po koupí balených vod, byly nálezy mikroorganismů minimální. Dobrá voda byla čistá a neobsahovala žádnou kolonii, byla zdravotně nezávadná. Hůře dopadly vody Magnesia a Bonaqua, které neměly příznivé výsledky už na začátku výzkumu. Nález jedné kolonie koliformní bakterie u Magnesia a větší počet kolonií organotrofních bakterií u Bonaquy, než je povolen pro nejvyšší mezní hodnotu, nám signalizuje, že zkoumané vzorky by neprošly testem o zdravotní nezávadnosti a jakosti vody podle vyhlášky č. 275/2004. V dalších rozborech, které probíhaly s určitým časovým intervalem a byly podrobeny určeným prostředím, byly výsledky mnohem horší. S postupem času se počet kolonií indikátorů fekálního, obecného znečištění a hygienicky významných mikroorganismů exponenciálně zvyšoval.

Tento výzkum je zaměřen na čtyři prostředí. Největší počet kolonií a velký počet mikrobiologických ukazatelů se vyskytl u prostředí ve tmě při teplotě 36 °C. Tento výsledek není překvapením, vzhledem k tomu, že většina z daných mikrobiologických ukazatelů má své teplotní růstové optimum nejbližší právě 36 °C. Bakterie řazené k fekálním indikátorům se běžně vyskytují v trávicím traktu teplokrevných živočichů-savců a lidí, kde jsou přirozené teploty okolo 35 °C a více. Mesofilní bakterie a *Pseudomonas aeruginosa* rostou také při teplotě okolo 36 °C. Výjimkou jsou psychrofilní bakterie, pro které je optimální růstová teplota 20 °C. Optimální teploty růstu a množení daných mikroorganismů způsobují jejich vyšší výskyt v určitých prostředích. Například psychrofilním bakteriím se daří lépe v podmínkách, kde je okolo 20 °C. Mají tedy větší zastoupení v prostředí, kde byla tma a 22 °C (Ambrožová 2004).

Ve vodách se objevily všechny mikrobiologické ukazatele, které jsem testovala. Z indikátorů fekálního znečištění mají největší zastoupení koliformní bakterie, v menším množství enterokoky a výjimečně *Escherichia coli*.

Escherichia coli se vyskytla pouze u vzorku balené vody Bonaquy, ve tmě při 36 °C. *E. coli* se přirozeně vyskytuje ve výkalech savců a ve stolici člověka, kde se teploty pohybují právě okolo 36°C. (Edberg et al. 2000).

Pitná voda by neměla obsahovat žádnou kolonii *E. coli* (Ministerstvo zdravotnictví 2004a).

Do vody se tedy mohla dostat už před její úpravou a dezinfekce byla pravděpodobně neúčinná.

Enterokoky se vyskytly také jen u vzorku vody Bonaquy, v prostředí ve tmě při 22 °C. Opět šlo o indikátor fekálních znečištění, pro jeho růst je optimální teplota okolo 36 °C. Vyskytují se v trávicím traktu teplokrevných živočichů a člověka, kde jsou teploty okolo 35°C. Ve vodě se nevyskytují přirozeně. Voda byla kontaminována z prostředí (Edberg et al. 2000).

Koliformních bakterií bylo početně mnohem více. Ze všech rozborů byly přítomny u všech tří balených vod. Nejvíce u Bonaquy. Největší počet kolonií koliformních bakterií jsem zaznamenala u vod z prostředí ve tmě při 22 °C. Přítomnost koliformních bakterií může být ovlivněna působením několika faktorů. Mezi faktory ovlivňující jejich přítomnost ve vodě patří dezinfekce, teplota a filtrace vody.

Výzkumem koliformních bakterií a faktory jejich výskytu se zabýval Mark W. LeChevallier. Uvádí, že vliv na přítomnost těchto mikroorganismů má například typ a stupeň

provedené dezinfekce. Také uvádí, že se bakterie vyskytly ve vodách, které měly teplotu nad 15 °C (LeChevallier et al. 1996).

Pseudomonas aeruginosa, bakterie patřící k hygienicky významným indikátorům vod, měla velké počty kolonií u vod z prostředí ve tmě při 22 °C a 36 °C. Vyskytla se u všech tří balených vod ze všech čtyř prostředí. Roste při teplotách od 5 do 42 °C, optimum je 37 °C. Přítomností mikroorganismu *Pseudomonas aeruginosa* mohou být výsledky rozboru zkreslené, jelikož potlačuje koliformní bakterie. Je to velmi odolná bakterie, dokáže růst na mnoha místech (Mena & Gerba 2009).

Pseudomonas aeruginosa se vyskytuje v potravinách a v nižších počtech ve vodě. Je to bakterie způsobující infekce, její přítomnost ve vodě je pro člověka nebezpečná. Má velkou schopnost přizpůsobit se vnějším podmínkám prostředí, je velmi odolná. Způsobuje závažné infekce, a proto by měla být z vody odstraněna. Její přítomnost v balených vodách je regulována legislativou. Tato regulace se ale nevztahuje na pitnou vodu a vodu z vodovodu (Hardalo & Edberg 1997).

Posledními ukazateli jsou bakterie mesofilní a psychofilní. Kolonie mesofilních bakterií byly nejvíce zastoupeny u vod, které se uchovávaly ve tmě při 36 °C. Psychofilních bakterií bylo naopak více u prostředí ve tmě při 22 °C a při pokojové teplotě.

Psychofilní a mesofilní bakterie se vyskytují ve vodě přirozeně. Psychofilní se vyskytují ve větším počtu, protože mesofilní bakterie mají optimální teploty růstu 36 °C. Voda má většinou teplotou blízkou pokojové teplotě. To je ideální pro psychofilní bakterie (Allen et al. 2004).

K získávání energie a živin potřebují organické látky. Vyskytují se tedy ve větším množství ve vodách obsahujících více organických látek. Může se jednat o kontaminaci z prostředí, jako jsou cizí plyny a jiné organické látky (Bach et al. 2012).

Když si shrneme všechna prostředí a to, čím jsou charakteristické, tak zjistíme, že nejlépe dopadlo prostředí na světle a při pokojové teplotě a nejhůře prostředí ve tmě při 36 °C.

Balené vody uložené na světle a při pokojových teplotách měly ze všech čtyř prostředí relativně nejlepší výsledky. Mikrobiologická analýza ukázala, že v tomto prostředí narostlo nejmenší množství kolonií z celkového rozboru.

Podle článku časopisu Water research je UV záření pro všechny vodní patogeny smrtící. Toto záření je součástí záření Slunce a využívá se pro dezinfekci pitné vody (Hijnen et al. 2006).

Je možné, že byly vody vystaveny tomuto záření a ve vodě se mikroorganismy nepomnožili v tak velkém měřítku, jako tomu bylo u ostatních prostředí. Anebo byl růst bakteriální mikrobioty těchto vzorků zastaven. Zároveň zde působila pokojová teplota, která není optimální pro růst většiny těchto mikrobiologických ukazatelů. Naopak v podmínkách prostředí, kde byla tma, se mikroorganismům dařilo lépe. Nejvíce kolonií narostlo v teplotách 36 °C, což je optimální teplota růstu většiny mikrobiologických ukazatelů podle vyhlášky č. 275/2004 Sb.

7 Závěr

- Analýzou tří druhů balených vod byla zjištěna míra působení určitých prostředí na mikroorganismy. Čtyři určená prostředí působila na jakost a kvalitu vody jinak. Důležitým faktorem byla teplota a světlo. Podle vyhlášky č. 275/2004 nemůžeme říci, že zkoumané balené vody byly zdravotně nezávadné. U všech vzorků byly překročeny limitní hodnoty.
- Co se týče tří zkoumaných balených vod, nejvíce mikroorganismů a také s největším počtem kolonií měla balená voda Bonaqua. Naopak Magnesie na tom byla od počátku, z hlediska mikrobiologické kvality, nejlépe. Dobrá voda a Magnesia jsou od stejné společnosti, a tou je společnost Karlovarské minerální vody. Zároveň je Bonaqua jediná, která nemá svůj zdroj na českém území. Je ze zdroje nacházejícího se v Maďarsku. Důvodem většího počtu mikroorganismů mohou být právě tyto rozdíly. Dalším důležitým faktorem je vyšší obsah minerálních látek v Magnesii, který takto mohl ovlivnit menší nárůst mikroorganismů oproti ostatním baleným vodám.
- Dezinfekce používaná pro usmrcení mikroorganismů v balených vodách je jen dočasná. Řeší současný problém kontaminace vody, ale postupem času se voda může opětovně kontaminovat až při jejím skladování. Další možností je neúčinnost dezinfekce. Ve vodě se pomnoží kolonie mikroorganismů, které v ní zůstaly i po její úpravě. To jsou zejména indikátory fekálního znečištění a hygienicky významné mikroorganismy. Organotrofní bakterie se do vody mohou dostat po zvýšení organických látek v ní. Plastový obal, ve kterém je voda uchovávána, není tak odolný jako sklo. Může propouštět cizí plyny, organické látky z okolí. Pokud je v balené vodě organický materiál, je to pro organotrofní bakterie ideální prostředí.
- Balené vody byly vystaveny různým teplotním podmínkám a zároveň byly uloženy buď ve tmě, nebo na světle. Co se týče teploty, každý mikroorganismus má své optimální teplotní podmínky pro růst a rozmnožování. Některé mikroorganismy jsou odolnější na výkyvy teplot a některé zase snesou pouze malé rozmezí a větší výkyv je zabijí. Mikrobiologické ukazatele, které byly předmětem zkoumání v balených vodách, mají ideální podmínky pro růst a množení okolo teplot 37 °C. Tato teplota byla jejich kultivační teplota. Pouze psychrofilní bakterie se kultivovaly při pokojové teplotě. Převaha mikrobiologických ukazatelů s optimálními podmínkami pro růst při teplotě 36 °C vysvětloval celkové větší zastoupení mikroorganismů právě v prostředí při 36 °C. Dalším důležitým faktorem prostředí bylo světlo. Působením světla byl snížen nárůst a množení mikroorganismů. V prostředí, kde byla tma a teplota 36 °C, se vyskytl výrazněji větší počet než v prostředí při pokojové teplotě a na světle.
- Balená voda je do určité doby zdravotně nezávadná a prostá mikroorganismů. Je ale potřeba ji spotřebovat co nejdříve. Způsob skladování je u balených vod důležitý. Při delším skladování počet mikroorganismů roste. Také záleží, v jakém prostředí se voda skladuje. Aby se předcházelo kontaminaci, nebo se zpomalil proces růstu mikroorganismů, měla by být voda skladována v chladnějších podmínkách nebo na světle. Z výsledků vyplývá to, že se kvalita a jakost balených vod se v průběhu skladování zhoršovala a docházelo k exponenciálnímu nárůstu mikroorganismů.

V závěru můžeme tedy říct, že balená voda by měla být spotřebována co nejdříve po její koupi. Postupem času se v ní pomnoží mikroorganismy a ztrácí svou jakost a kvalitu. Oddálení kontaminace a pomnožení mikroorganismů je možné, pokud se neotevřená voda uloží do chladnějších podmínek anebo je vystavena slunečnímu záření, které obsahuje UV záření. Doba uložení v chladnějších podmínkách je ale také omezená.

8 Literatura

- Allen MJ, Edberg SC, Reasoner DJ. 2004. Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology* **92**:265–274. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160503004537> (accessed March 30, 2019).
- Ambrožová J. 2004. *Mikrobiologie v technologii vod*. Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha. (accessed March 29, 2019).
- Bach C, Dauchy X, Chagnon M-C, Etienne S. 2012. Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. *Water Research* **46**:571–583. Pergamon. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135411007548> (accessed March 29, 2019).
- Baudišová D. 2017. *Metody mikrobiologického rozboru vody (příručka pro hydroanalytické laboratoře)*. Výzkumný ústav hospodářský T. G. Masaryka, Praha. Available from file:///C:/Users/jakub/Downloads/baudisova_metody_mikrobiol_rozboru_vody.pdf (accessed March 31, 2019).
- Bitton G. 2014. *Microbiology of drinking water production and distribution*. Wiley Blackwell, New Jersey. Available from <https://www.wiley.com/en-us/Microbiology+of+Drinking+Water%3A+Production+and+Distribution-p-9781118743928> (accessed March 29, 2019).
- D'Aoust J-Y, Maurer J. 2007. *Salmonella Species*. Pages 187–236 *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Third Edition. American Society of Microbiology, Washington, DC. Available from <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555815912.ch10> (accessed March 29, 2019).
- Douglas LJ. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* **11**:30–36. Elsevier Current Trends. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X02000021> (accessed March 30, 2019).
- Edberg SC, Rice EW, Karlin RJ, Allen MJ. 2000. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology* **88**:106S–116S. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111). Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x> (accessed March 29, 2019).
- Hardalo C, Edberg SC. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of Risk from Drinking Water. *Critical Reviews in Microbiology* **23**:47–75. Taylor & Francis. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408419709115130> (accessed March 30, 2019).
- Häusler J. 1995. *Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vod III.: Stanovení mikrobiologických ukazatelů*. MZe ČR, Praha.
- Janda V, Švecová M. 2000. Vedlejší produkty dezinfekce pitné vody. *Chemické listy* **94**:905–908. Available from <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/2477/2477> (accessed March 29, 2019).
- Joyce TM, Mcguigan KG, Elmore-Meegan M, Conroy ARM. 1996. Inactivation of Fecal Bacteria in Drinking Water by Solar Heating. *Applied and environmental microbiology* **62**:399–402. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167810/pdf/620399.pdf> (accessed March 29, 2019).
- Karlovarské minerální vody a. s. 2019. [www.magnesia.cz](http://kmv.cz/cs/). Available from <http://kmv.cz/cs/> (accessed March 29, 2019).

- Kožíšek F. 2005. Rady spotřebitelům balených vod. Available from file:///C:/Users/jakub/Downloads/tema_zivotni-prostredi_rady-spotrebitelum-balenych-vod.pdf (2).pdf (accessed March 29, 2019).
- Kožíšek F. 2011. Kam směřuje kontrola a analytika pitné vody. Praha. Available from http://www.w.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_04_237-244.pdf (accessed March 29, 2019).
- Kožíšek F, Myšáková M, Dvořáková A. 2016. Složení balených vod. Available from http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/bv_sloz.pdf (accessed March 29, 2019).
- Kunc F, Ottová V. 1997. Mikrobiologie pro posluchače studijního oboru technologie vody. VŠCHT Praha, Praha.
- LeChevallier M, Welch N, Smith D. 1996. Full-scale studies of factors related to coliform regrowth in drinking water. *Applied and environmental microbiology* **62**:2201–2211. American Society for Microbiology (ASM). Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8779557> (accessed March 30, 2019).
- Macela A, Stulík J, Trebichavský I, Kroča M, Janovská S. 2006. Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií. Grada publishing, a.s., Praha. Available from https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=zNuUESdwjA4C&oi=fnd&pg=PA97&dq=Infekční+choroby+a+intracelulární+parazitismus+bakterií+&ots=e30GLgGac2&sig=ZmU7ZKlbYsmiRNlytzgfZnLz7Yg&redir_esc=y#v=onepage&q=Infekční+choroby (accessed March 30, 2019).
- Mary P, Defives C, Hornez JP. 2000. Occurrence and Multiple Antibiotic Resistance Profiles of Non-fermentative Gram-Negative Microflora in Five Brands of Non-carbonated French Bottled Spring Water. *Microbial ecology* **39**:322–329. Available from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs002480000019.pdf> (accessed March 29, 2019).
- McFeters GA. 1990. *Drinking Water Microbiology: Progress and Recent Developments*. Springer-Verlag, New York. Available from https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=fo7bBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=McFeters+G.A.+1990.+Drinking+Water+Microbiology.+Springer&ots=MTJrdvW4F&sig=gL_c-OTW8dKlQ3mVB-cZvfQKwYI&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (accessed March 30, 2019).
- Mena KD, Gerba CP. 2009. Risk Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in Water. Pages 71–115 *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, Boston, MA. Available from http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0032-6_3 (accessed March 30, 2019).
- Ministerstvo zdravotnictví. 2004a. Vyhláška č. 275/2004 Sb. ze dne 28.4.2004 o požadavcích na jakost a zdravotní nezávadnost balených vod a o způsobu jejich úpravy. Pages 5791–5807. *Sbírka zákonů České republiky, Česká republika*. Available from [file:///C:/Users/jakub/Downloads/sb088-04 \(2\).pdf](file:///C:/Users/jakub/Downloads/sb088-04%20(2).pdf) (accessed March 30, 2019).
- Ministerstvo zdravotnictví. 2004b. Vyhláška č. 252/2004 Sb. ze dne 22. dubna 2004, kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou vodu a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Pages 5402–5422. *Sbírka zákonů České republiky, Česká republika*. Available from [file:///C:/Users/jakub/Downloads/sb082-04 \(2\).pdf](file:///C:/Users/jakub/Downloads/sb082-04%20(2).pdf) (accessed March 30, 2019).
- Myers G et al. 2006. Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Research* **16**:1031–1040. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16825665> (accessed March 30, 2019).
- Nsanze H, Babarinde Z, Kohaly HA. 1999. Microbiological quality of bottled drinking water in the UAE and the effect of storage at different temperatures. *Environment International*

- 25:53–57. Available from [https://pdf.sciencedirectassets.com/271763/1-s2.0-S0160412000X00256/1-s2.0-S016041209800097X/main.pdf?x-amz-security-token=AgoJb3JpZ2luX2VjEKH%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaCXVzLWVhc3QtMSJIMEYCIQDbXpVb%2FaODyn84k7qSpX2oLoapTN6yXHrUHSufsOvXQIhANThktl9dI](https://pdf.sciencedirectassets.com/271763/1-s2.0-S0160412000X00256/1-s2.0-S016041209800097X/main.pdf?x-amz-security-token=AgoJb3JpZ2luX2VjEKH%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2F%2FwEaCXVzLWVhc3QtMSJIMEYCIQDbXpVb%2FaODyn84k7qSpX2oLoapTN6yXHrUHSufsOvXQIhANThktl9dI) (accessed March 30, 2019).
- Petrová J, Stávková J. 2015. Balené přírodní minerální vody. *Výživa a potraviny* **5**:123–125. Available from <http://bilinskakyselka.cz/bilinska-kyselka/> (accessed March 30, 2019).
- Poděbradka a. s. 2019. www.dobra-voda.cz. Available from <https://www.dobra-voda.cz/> (accessed March 30, 2019).
- Potužák M. 2011. Minerální vody ve výživě a terapii. *Praktické lékařství* **7**:242–244. *Praktické lékařství*. Available from https://www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-201105-0010_Mineralni_vody_ve_vyzive_a_terapii.php (accessed March 30, 2019).
- Rompré A, Servais P, Baudart J, de-Roubin MR, Laurent P. 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of microbiological methods* **49**:31–54. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777581> (accessed March 30, 2019).
- Rosenberg FA. 2003. The microbiology of bottled water. *Clinical Microbiology Newsletter* **25**:41–44. Elsevier. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196439903800193> (accessed March 30, 2019).
- The Coca-Cola Company. 2019. www.coca-cola.cz/bonaqua. Available from <https://www.coca-cola.cz/bonaqua/cs/home/> (accessed March 30, 2019).
- Turek B, Šíma P, Ševčík J. 2010. Střevní mikrobiota včera a dnes. Available from <https://hygiena.szu.cz/pdfs/hyg/2010/02/08.pdf> (accessed March 30, 2019).

9 Samostatné přílohy

Příloha 1: Tabulky vyhodnocení rozborů

Příloha 2: Fotografie balených vod

Příloha 1:

Tabulka č. 4: Vyhodnocení – nultý rozbor

1. Magnesia	
Ukazatel	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0
koliformní bakterie	0
enterokoky	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	0
2. počet kolonií při 22 °C	0
1. počet kolonií při 36 °C	0
2. počet kolonií při 36 °C	0
2. Bonaqua	
Ukazatel	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0
koliformní bakterie	0
enterokoky	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	36
2. počet kolonií při 22 °C	0
1. počet kolonií při 36 °C	36
2. počet kolonií při 36 °C	0
3. Dobrá voda	
Ukazatel	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0
koliformní bakterie	0
enterokoky	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	0
2. počet kolonií při 22 °C	0
1. počet kolonií při 36 °C	0
2. počet kolonií při 36 °C	0

Tabulka č. 5: Vyhodnocení – první rozbor

1. Magnesia	Pokožová teplota (světlo)	Pokožová teplota (tma)	22 °C (tma)	36 °C (tma)
Ukazatel	Nález (KTJ/250 mlm)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
koliformní bakterie	1	6	30	14
enterokoky	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	23	21
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	0	0	1	6
2. počet kolonií při 22 °C	0	0	2	2
1. počet kolonií při 36 °C	1	0	2	7
2. počet kolonií při 36 °C	0	0	3	9

Tabulka č. 6: Vyhodnocení – první rozbor

2. Bonaqua	Pokožová teplota (světlo)	Pokožová teplota (tma)	22 °C (tma)	36 °C (tma)
Ukazatel	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
koliformní bakterie	1	0	41	38
enterokoky	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38	0	45	26
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	278	1	85	10
2. počet kolonií při 22 °C	376	426	35	29
1. počet kolonií při 36 °C	373	48	123	358
2. počet kolonií při 36 °C	199	347	150	226

Tabulka č. 7: Vyhodnocení – první rozbor

3. Dobrá voda	Pokožová teplota (světlo)	Pokožová teplota (tma)	22 °C (tma)	36 °C (tma)
Ukazatel	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
koliformní bakterie	24	7	9	32
enterokoky	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1	23	19
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	7	18	12	48
2. počet kolonií při 22 °C	0	1	9	32
1. počet kolonií při 36 °C	6	0	6	87
2. počet kolonií při 36 °C	0	0	10	64

Tabulka č. 8: Vyhodnocení – druhý rozbor

1. Magnesia	Pokožová teplota (světlo)	Pokožová teplota (tma)	22 °C (tma)	36 °C (tma)
Ukazatel	Nález (KTJ/250 mlm)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
koliformní bakterie	4	0	8	19
enterokoky	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	9	35
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	2	20	3	7
2. počet kolonií při 22 °C	0	13	8	2
1. počet kolonií při 36 °C	0	16	7	13
2. počet kolonií při 36 °C	0	16	4	26

Tabulka č. 9: Vyhodnocení – druhý rozbor

2. Bonaqua	Pokožová teplota (světlo)	Pokožová teplota (tma)	22 °C (tma)	36 °C (tma)
Ukazatel	Nález (KTJ/250 mlm)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
koliformní bakterie	0	6	103	27
enterokoky	0	0	13	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	89	123
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	0	55	138	38
2. počet kolonií při 22 °C	1	265	179	89
1. počet kolonií při 36 °C	0	221	158	328
2. počet kolonií při 36 °C	0	11	203	369

Tabulka č. 10: Vyhodnocení – druhý rozbor

3. Dobrá voda	Pokožová teplota (světlo)	Pokožová teplota (tma)	22 °C (tma)	36 °C (tma)
Ukazatel	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
koliformní bakterie	0	6	19	0
enterokoky	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	4	0	1
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	0	106	122	31
2. počet kolonií při 22 °C	0	68	161	22
1. počet kolonií při 36 °C	0	40	4	34
2. počet kolonií při 36 °C	0	93	4	52

Tabulka č. 11: Vyhodnocení – třetí rozbor

1. Magnesia	Pokoj teplota (světlo)	Pokojová teplota (tma)	22 °C (tma)	36 °C (tma)
Ukazatel	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
koliformní bakterie	9	2	13	16
enterokoky	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	7	23
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	5	31	24	14
2. počet kolonií při 22 °C	3	18	32	3
1. počet kolonií při 36 °C	0	21	18	28
2. počet kolonií při 36 °C	0	16	15	56

Tabulka č. 12: Vyhodnocení – třetí rozbor

2. Bonaqua	Pokojová teplota (světlo)	Pokojová teplota (tma)	22 °C (tma)	36 °C (tma)
Ukazatel	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	6
koliformní bakterie	0	14	40	38
enterokoky	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	1	38	68
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	2	113	252	43
2. počet kolonií při 22 °C	10	235	136	29
1. počet kolonií při 36 °C	0	48	108	130
2. počet kolonií při 36 °C	2	27	72	291

Tabulka č. 13: Vyhodnocení – třetí rozbor

3. Dobrá voda	Pokožová teplota (světlo)	Pokožová teplota (tma)	22 °C (tma)	36 °C (tma)
Ukazatel	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)	Nález (KTJ/250 ml)
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
koliformní bakterie	0	9	2	0
enterokoky	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aerugina</i>	5	3	11	15
Ukazatel	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)	Nález (KTJ/ml)
1. počet kolonií při 22 °C	0	86	103	48
2. počet kolonií při 22 °C	1	75	268	72
1. počet kolonií při 36 °C	0	35	35	114
2. počet kolonií při 36 °C	0	62	11	65

Příloha 2:

Obr. 1: Magnesia



www.magnesia.cz

Obr. 2: Bonaqua



www.coca-cola.cz/bonaqua/cs/produkty/

Obr. 3: Dobrá voda



www.dobra-voda.cz/produkty