

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
katedra biologie

Problematika koliformních bakterií v pitných vodách

Bakalářská práce

Autor: Veronika Frková
Studijní program: Biologie
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce: Ing. Vladimír Dvořák, PhD.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Veronika Frková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala za pomoc při zpracování bakalářské práce Ing. Vladimíru Dvořákovi, PhD. Dále bych chtěla poděkovat týmu laboratoře pitných vod ČOV Hradec Králové za praktické zkušenosti získané při práci s mikrobiologickými metodami a poskytnutá data o výskytu koliformních bakterií.

ANOTACE

Koliformní bakterie se nacházejí v trávicím traktu lidí a živočichů a jsou nejdůležitějším hygienickým indikátorem fekálního znečištění pitných vod. V práci bude zpracována charakteristika bakterie *Escherichia coli* a koliformních bakterií, jejich výskyt, způsoby kontaminace vody a možnosti jejich přežívání ve zdrojích pitných vod. Teoretická část práce se dále bude věnovat patogenitě těchto bakterií. V práci dále budou popsány různé metody stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií v pitných vodách a zkušenosti z praktického provedení vybraných metod.

Klíčová slova:

Koliformní bakterie, *Escherichia coli*, pitná voda, membránová filtrace

ANNOTATION

Coliform bacteria we can find in the digestive tract of humans and animals and they are the most important hygienic indicators of faecal contamination of drinking water. The characteristics of *Escherichia coli* and coliform bacteria, their occurrence, ways of water contamination and the possibility of their survival in drinking water sources will be stated in this thesis. The theoretical part of this work will also discuss the pathogenicity of these bacteria. The thesis will describe different methods of determination of *Escherichia coli* and coliform bacteria in drinking water and experience from the practical implementation of selected methods.

Keywords:

Coliform bacteria, *Escherichia coli*, drinking water, membrane filtration

Obsah

1 Úvod	10
Obecný úvod do problematiky	10
Cíle práce	10
2 Teoretická část práce	11
2.1 Význam sledování koliformních bakterií	11
2.2 Charakteristika koliformních bakterií	11
2.3 Výskyt koliformních bakterií	14
2.3.1 Primární výskyt koliformních bakterií	14
2.3.2 Výskyt koliformních bakterií ve vodách	15
2.3.3 Zdroje bakteriálního znečištění a šíření bakterií ve vodách	15
2.4 Nejvýznamnější rody čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	16
2.4.1 <i>Citrobacter</i>	17
2.4.2 <i>Enterobacter</i>	17
2.4.3 <i>Escherichia coli</i>	17
2.4.4 <i>Klebsiella</i>	18
2.4.5 <i>Proteus</i>	19
2.4.6 <i>Salmonella</i>	19
2.4.7 <i>Serratia</i>	20
2.4.8 <i>Shigella</i>	20
2.4.9 <i>Vibria</i>	20
2.4.10 <i>Yersinia</i>	20
2.5 Patogenita koliformních bakterií	21
2.5.1 Principy patogenity koliformních bakterií	21
2.5.2 Onemocnění způsobená patogenními koliformními bakteriemi	23
2.5.3 Rezistence	24
3 Metodika	28
Metody kultivační - Metody membránové filtrace	28
3.1 Stanovení koliformních bakterií a <i>E. coli</i> v pitných a podzemních vodách	28
3.2 Stanovení termotolerantních koliformních bakterií v pitných, podzemních a povrchových vodách a <i>E. coli</i> v povrchových a nedesinfikovaných vodách	29
3.3 Stanovení koliformních bakterií v nedesinfikovaných vodách	30
4 Výsledky	32
4.1 Koliformní bakterie	32

4.2 <i>Escherichia coli</i>	33
4.3 Porovnání mezi výskytem koliformních bakterií a <i>E. coli</i>	35
5 Diskuze	36
6 Závěr	40
7 Literatura.....	41
8 Přílohy	44

1 Úvod

Obecný úvod do problematiky

Koliformní bakterie jsou považovány za ukazatele fekálního znečištění vod z toho důvodu, že se jejich zástupci vyskytují v trávicím traktu živočichů, a proto jsou tyto bakterie monitorovány v laboratořích sledujících kvalitu a čistotu vod. Praktickým významem této práce je vytvořit přehled poznatků známých o koliformních bakteriích a seznámit se s metodami využívanými ke zjišťování výskytu koliformních bakterií v pitných vodách. Dále se bude práce zabývat výskytem bakterií v závislosti na ročním období a porovnáním dříve využívaných a současných metod k monitorování výskytu koliformních bakterií a *E. coli* v pitných vodách, které jsem si mohla v laboratoři sama vyzkoušet.

Voda je základní složkou životního prostředí, bez které by život nebyl možný. Proto je důležité sledovat kvalitu vody a její nezávadnost, a tím předcházet rizikům spojeným s nedostatečnou kvalitou vody. V České republice je kvalita vody z veřejného rozvodu vysoká, ale u soukromých studen je sledování a kvalita vody na nižší úrovni.

Veřejného zásobování pitnou vodou využívá 85 % obyvatelstva v ČR a zbylých 15 % zastupuje individuální zásobování, které představují především soukromé studny. Veřejné zásobování je zajištěno především z povrchové vody, která prochází úpravou a desinfekcí, dále se využívá podzemní voda či směs podzemní a povrchové vody. Studny využívají jako zdroj vody podzemní. Studny musí splňovat určité stavební normy a procházet laboratorním vyšetřením pro kvalitu vody (Podstatová, 2009). Kožíšek et al. (2006) uvádí, že při ověřování mikrobiologické nezávadnosti vody se nehledají konkrétní bakterie či viry zodpovědné za známá onemocnění přenášená vodou z náročných technických, časových i finančních důvodů. Proto využívá metoda tzv. indikátorů fekálního znečištění, ve které se sledují bakterie žijící ve střevním traktu člověka a teplokrevných živočichů (např. *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*). Při nálezů některé z těchto bakterií ve vodě se stává voda podezřelou tím, že přišla do kontaktu s lidskými nebo zvířecími výkaly či zbytky živočichů a že může obsahovat patogenní bakterie a viry, které nejčastěji pocházejí právě ze střevního traktu. Podle Schindlera (2014) mohou enterobakterie, které se z nějakého důvodu dostanou mimo trávicí trakt, vyvolat závažné zdravotní obtíže jako jsou např. vážné infekce a záněty. Enterobakterie zabraňují svým výskytem na sliznici tlustého střeva tomu, aby se na receptory navázaly jiné nevhodné či patogenní bakterie. Některé druhy jsou ovšem původci různých infekčních onemocnění trávicího traktu. Označujeme je jako podmíněné patogeny, neboť využívají podmínek snížené nespecifické odolnosti a imunity. Hlavním významem ve vyspělých zemích je jejich sledování jako původců nemocničních onemocnění.

Cíle práce

Hlavními cíli předložené práce bylo:

Vypracovat přehled dosavadních znalostí o studované problematice v teoretické části a vytvořit přehlednou práci na toto téma. V praktické části jsou zpracována data za kalendářní rok 2016 s výskytem koliformních bakterií a *Escherichia coli* ve zdrojích pitné vody i soukromých studnách. Z těchto dat jsou zpracovány grafy pro nálezy bakterií vyskytujících se v jednotlivých ročních obdobích a porovnání mezi výskytem bakterií ve studnách a zdrojích pitné vody.

2 Teoretická část práce

2.1 Význam sledování koliformních bakterií

Podle WHO byla celosvětově pitná voda stanovena jako primární přenosová cesta pro patogeny průjmových onemocnění. Obecně není možné testovat vodu na výskyt všech známých vodních patogenů, aby bylo možné posoudit, zda je voda bezpečná pro pití. Proto se využívají indikátorové organismy. Koliformní bakterie jsou považovány za indikátor účinnosti úpravy vody a dezinfekce, sekundární kontaminace či vysokého obsahu živin v upravené vodě (Kožíšek et al., 2006).

Podstatová (2009) definuje pitnou vodu jako zdravotně nezávadnou, která nevyvolává onemocnění ani poruchy zdraví přítomností mikroorganismů nebo jiných látek ani při trvalém používání. Pro zdravotní nezávadnost a čistotu pitné vody jsou stanoveny hygienické limity mikrobiologických, chemických, fyzikálních, biologických a organoleptických ukazatelů, které jsou ošetřeny právními předpisy. V pitné vodě musí být limitováno povolené množství i druh mikroorganismů a množství základních chemických látek, toxické látky nesmí pitná voda obsahovat žádné.

Některé druhy koliformních bakterií jsou schopny dostat se z trávicího traktu do vnějšího prostředí (vzduch, prach, ruce pracovníků, výrobní zařízení), kde se dokáží přizpůsobit změněným podmínkám a pak kratší nebo delší dobu přežívat. Proto jsou v potravinářské mikrobiologii považovány za indikátory fekálního znečištění a s tím související možné přítomnosti patogenních mikroorganismů pocházejících ze zažívacího traktu (Necidová, 2014).

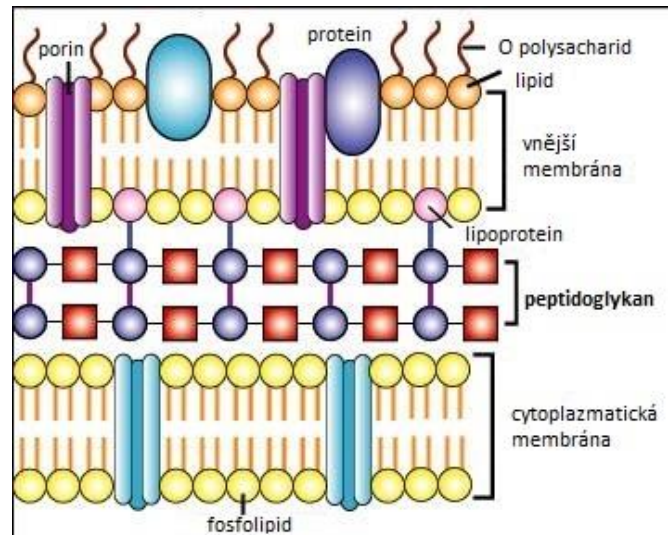
Kontaminace způsobená přítomností celkových koliformních bakterií indikuje nevhodnou technologii úpravy vody, dodatečnou kontaminaci nebo zvýšený obsah organických látek, nedostatečnou dezinfekci pitné vody (Häusler, 1995).

Necidová (2014) označuje koliformní bakterie vzhledem k jejich termolabilnosti jako indikátory účinnosti pasterace a termizace a z důvodu jejich citlivosti k chemickým látkám také jako indikátory účinnosti čištění a sanitace technologických provozů.

2.2 Charakteristika koliformních bakterií

Koliformní bakterie definovala WHO jako nesporulující tyčinkovité bakterie se schopností růstu za přítomnosti žlučových solí a jiných povrchově aktivních látek. Vyznačují se schopností fermentovat laktózu při teplotě 35 °C nebo 37 °C a při tom produkují kyseliny, plyny a aldehydy během 24 až 48 hodin. Jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní. Systematicky řadíme tyto organismy do skupiny *Enterobacteriaceae*. Charakteristickým určovacím znakem je gramnegativita bakterií. Tu způsobují odlišnosti ve stavbě buněčné stěny gramnegativních a grampozitivních bakterií, které reagují odlišně na Gramovo barvení.

Buněčná stěna gramnegativních bakterií (obr. 1) má šířku asi 15 nm. Nad tenkou vrstvou peptidoglykanu je tzv. vnější membrána, která je jako jiné biologické membrány tvořena dvojitou vrstvou fosfolipidů a navázaných bílkovin. Relativní obsah fosfolipidů je však menší než v cytoplasmatické membráně, proto jsou fosfolipidy umístěny především ve vnitřní vrstvě vnější membrány. Ve vnější vrstvě jsou nahrazeny molekulami lipopolysacharidů (Bursová et al., 2014).



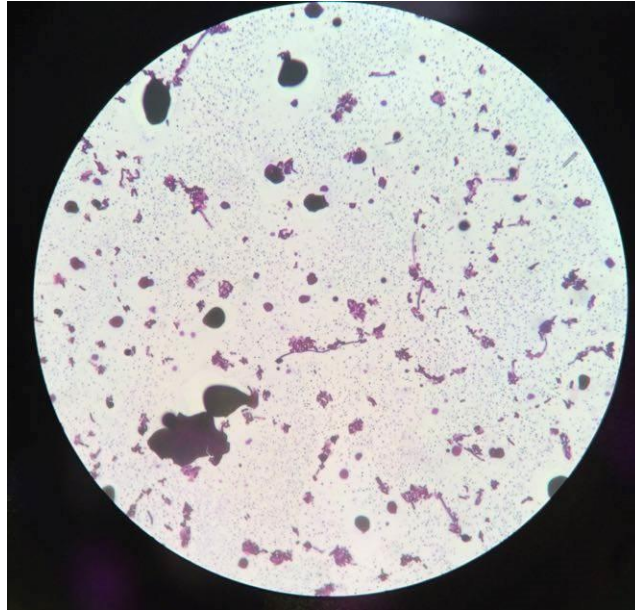
Obrázek 1: Stavba gramnegativní buněčné stěny podle Kaisera - upraveno

Postup barvení je dán čtyřmi činidly, která se na preparát aplikují v určitém časovém intervalu.

Preparát barvíme dle Grama následujícím postupem (Bursová et al., 2014):

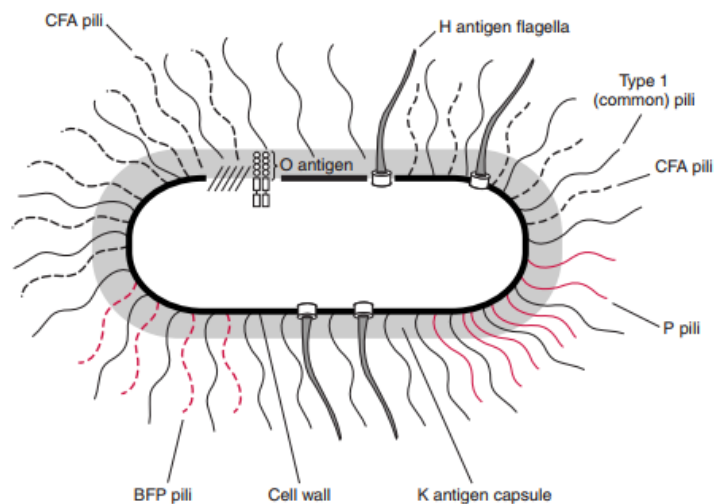
- 1) Preparát přelijeme roztokem krystalové violeti (roztok Gram I), doba působení je 20 – 30 s. Barvivo slijeme, ale neoplachujeme vodou.
- 2) Preparát přelijeme Lugolovým roztokem (roztok Gram II), doba působení je 20 – 30 s, poté slijeme.
- 3) Rychle preparát opláchneme směsí aceton-ethanol (Gram III), dokud odtéká barvivo, tak oplachujeme (max. 30 s) a následně opláchneme vodou.
- 4) Preparát přes hranu sklíčka osušíme filtračním papírem a naneseeme roztok safraninu nebo karbolfuchsinu (roztok Gram IV), doba působení je 1 minuta.
- 5) Preparát opatrně opláchneme vodou a osušíme filtračním papírem přes hranu sklíčka a necháme zaschnout.

Po obarvení preparátu krystalovou violetí a moření Lugolovým roztokem grampozitivní bakterie zadržují tento barevný komplex v buněčné stěně. Následné použití ethanol-acetonu komplex nerozpouští a bakterie zůstávají modrofialové. U gramnegativních (obr. 2) bakterií je barevný komplex organickými rozpouštědly vymýván a po dobarvení safraninem nebo karbolfuchsinem jsou bakterie červené až narůžovělé (Bursová et al., 2014).



Obrázek 2: Obarvený preparát gramnegativních bakterií

Ryan (2004) popisuje ve své práci komponenty buněčné stěny a povrchu bakterií (obr. 3), které mají antigenní vlastnosti, a lze podle nich rozdělovat bakteriální druhy na sérotypy. Externí membránový lipopolysacharid (LPS) se nazývá O antigen. Jeho antigenní specifita je určena složením cukrů tvořících dlouhé koncové polysacharidové postranní řetězce spojené s polysacharidem jádra a lipid A. Polysacharidy buněčného povrchu mohou tvořit dobře definovanou kapsli nebo amorfni slizové vrstvy a jsou označovány jako antigen K (z dánského slova Kapsel). Motilní kmeny mají proteinové peritrichální flagely, které přesahují rozsah buněčné stěny, a jsou nazývány antigen H.



Obrázek 3: Antigenní struktura *E. coli* podle Ryana

Zástupci přirozené střevní mikroflóry, mezi které se koliformní bakterie řadí, využívají k přežití zejména adhezinů a bičků, díky nimž jsou schopni udržet se i ve vazkém hleny (Holá, 2012).

Gramnegativní bakterie mohou mít na povrchu četná velmi křehká, krátká, rovná, dutá vlákna vybíhající do všech stran. Jedná se o pili nebo-li fimbrie. Na jedné buňce jich můžeme pozorovat až několik set. Fimbrie tvoří proteinové podjednotky (tzv. piliny). Pili mají antigenní vlastnosti. Jejich tvorba může být ovlivněna podmínkami vnějšího prostředí (pH, teplota, obsah kyslíku)

(Bursová, 2014). Pili jsou krátké vláknité proteinové útvary. Funkce fimbrií může být adhezivní, neboť způsobují přilnavost k různým buňkám a povrchům (např. k epiteliím). Dalším významem je tvorba enterotoxinů bakterie *E. coli*, čímž pili podporují tvorbu nástrojů virulence (Julák, 2006). Bursová (2014) doplňuje jako další funkce schopnost, kterou mají fimbrie kódované konjugativním plasmidem (tzv. F pili), které jsou poměrně velké a ohebné. Z donorové bakterie vystupuje jeden sex pilus, který při konjugaci vytváří dutý můstek mezi donorovou a recipientní buňkou. Skrz pilus poté prochází plasmidová DNA z jedné buňky do druhé.

Julák (2006) uvádí, že genetická informace bakterií je zakódována pomocí DNA, která je uložena v chromozomu. Replikace a exprese genů chromosomální genetické informace bakterií má v podstatě stejný průběh jako u vyšších organismů (tzn. replikace, transkripce, translace). Bakterie mohou také obsahovat extrachromosomální DNA v podobě plasmidů či bakteriofágů. Pomocí konjugace probíhá přenos informace ve formě plasmidů mezi dvěma bakteriemi.

Dušková (2014) definuje konjugaci jako proces, při kterém dochází k přenosu genů z donorové (dárcovské) buňky do buňky recipientní (buňka přijímající cizorodé geny) prostřednictvím plasmidů. Julák (2006) dále rozvádí, že konjugace je zvláštní typ předávání genetické informace mezi bakteriemi, ke kterému dochází pomocí pilusů. Pili, určené k přenosu genetického materiálu, jsou nazývány F-pili (též sex-pili). Genetická informace uložená v plasmidu, chromosomu nebo jejich částech jedné bakterie se skrz dutý pilus přenesou do druhé bakterie. Tím mohou vznikat rezistence k antibiotikům. Plasmidy kódující resistenci k antibiotikům se nazývají R-plasmidy (resistence faktor). Pomocí konjugace se mohou populacemi šířit informace pro vznik toxinů. Na plasmidech jsou např. kódovány termostabilní a termolabilní enterotoxiny *E. coli*.

2.3 Výskyt koliformních bakterií

Podle WHO by měly organismy, používané jako fekální indikátory, splňovat následující požadavky: nebýt patogenní, být přítomny ve vysokém počtu v exkrementech teplokrevných živočichů, nemnožit se ve vodě, být snadno stanovitelné, přetrvávat ve vodě minimálně stejně dlouhou dobu jako patogeny a být rezistentní k dezinfekčním činidlům a vlivům okolního prostředí podobně jako střevní patogeny.

Vzhledem k přizpůsobivosti bakterií č. *Enterobacteriaceae* vnějším podmínkám mimo zažívací trakt a jejich schopnosti zde přežít, nemůže být jejich výskyt v potravinách, výrobním zařízení nebo v pitné vodě vždy jednoznačně chápán jako důsledek přímého znečištění fekáliemi (Necidová, 2014). To potvrzují i Baudišová a Mlejnková (2009), které uvádí, že koliformní bakterie indikují více všeobecné (organické), než fekální znečištění. Necidová (2014) dodává, že ke stanovení kmenů, které jsou výhradně střevního původu, se používá teplota 44,5 °C, při které ostatní kmeny koliformních bakterií nerostou. Mluvíme o tzv. termotolerantních koliformních bakteriích.

Gray (2008) uvádí, že roční období má vliv na bakteriální osídlení vody. Při vyšších teplotách a slunečním záření se počty bakterií zvyšují.

2.3.1 Primární výskyt koliformních bakterií

Koliformní bakterie jsou součástí střevní mikroflóry člověka a teplokrevných zvířat. (Klaban, 2005, Julák, 2006, Necidová, 2014) Pro stanovení kmenů výhradně střevního původu, tzv.

termotolerantní koliformní bakterie, se používá teplota 44,5 °C, při které nejsou ostatní kmeny koliformních bakterií schopny růstu (Necidová, 2014).

Holá (2012) řadí *Enterobacteriaceae* k biofilmům lidského těla a střevní mikroflóry. Mezi kladné stránky bakterií patří to, že samotná kolonizace střevní sliznice nepřetržitě stimuluje imunitní systém střeva a dále to, že v trávicím traktu se přítomná přirozená mikroflóra přímo účastní na jeho funkci. Bakterie okyselují střevní obsah, produkují vitamíny (např. B12 a K). Naopak bakterie ve formě biofilmu způsobují řadu chronických a obtížně léčitelných onemocnění. Růst ve formě biofilmu usnadňuje kolonizaci umělých i přirozených povrchů, ale také chrání před imunitním systémem a účinkem antibiotik.

Některé druhy koliformních bakterií se ovšem mohou přirozeně vyskytovat i na rostlinách, na kůře stromů a v půdě (např. rody *Serratia*, *Klebsiella* a *Proteus*).

2.3.2 Výskyt koliformních bakterií ve vodách

Některé druhy koliformních bakterií jsou schopny dostat se z trávicího traktu do vnějšího prostředí (vzduch, prach, ruce pracovníků, výrobní zařízení), kde se dokáží přizpůsobit změněným podmínkám a pak kratší nebo delší dobu přežívat. Proto jsou v potravinářské mikrobiologii považovány za indikátory fekálního znečištění a s tím související možné přítomnosti patogenních mikroorganismů pocházejících ze zažívacího traktu (Necidová, 2014).

Koliformní bakterie jsou považovány za indikátor účinnosti úpravy vody a dezinfekce, sekundární kontaminace či vysokého obsahu živin v upravené vodě (Kožíšek et al., 2006). Vyhláška č. 252/2004 Sb. stanovuje mezní hodnotu koliformních bakterií v pitné vodě 0 KTJ/100 ml, ovšem její překročení obvykle nepředstavuje akutní zdravotní riziko.

V pitné vodě mají bakterie *E. coli* funkci indexových mikroorganismů. Upozorňují na možnou přítomnost střevních patogenů (např. salmonel). Princip indexového významu *E. coli* je dán skutečností, že kmeny *E. coli* pocházející výhradně z lidských fekálií, mají optimální růst při 44,5 – 45,8 °C, na rozdíl od těch, které delší čas přežily ve vnějším prostředí (Necidová, 2014).

Podle Grubera et al. (2014) podporuje jejich studie pokračování v používání *Escherichia coli* jako fekálního indikátoru k posouzení kvality vody v místě použití, ale nepodporují použití termotolerantních koliformních bakterií jako náhrady, protože neprokazuje jednoznačnou souvislost s výskytem průjemových onemocnění.

Výskyt *E. coli* v potravinách, surovinách živočišného původu a v prostředí výrobních podniků je považován za indikátor fekální kontaminace, a s tím spojené nízké úrovně hygieny a sanitačního režimu. V pasterovaných výrobcích indikuje výskyt *E. coli* jejich sekundární kontaminaci (Necidová, 2014). *Escherichia coli* jako indikátor fekálního znečištění přežije v pitné vodě 4 až 12 týdnů v závislosti na okolních podmínkách jako je teplota, mikroflora atd., ale v prostředí se značně nerozmnožuje (Edberg et al., 2000).

2.3.3 Zdroje bakteriálního znečištění a šíření bakterií ve vodách

Kontaminace způsobená přítomností celkových koliformních bakterií indikuje nevhodnou technologii úpravy vody, dodatečnou kontaminaci nebo zvýšený obsah organických látek - živin, nedostatečnou dezinfekci pitné vody (Häusler, 1995).

Řeky a jezera představují hlavní zdroje pitné vody, zároveň jsou však často místem, do kterého ústí kanalizační systémy s odpadní vodou (Devarajan a kol., 2015). Způsoby hospodaření a další

lidské činnosti mají na jakost vody nejvýznamnější vliv. Velkou roli má také horninové podloží, probíhající procesy v půdě, rozmístění a výměra trvalých travních porostů, lesů a orné půdy v povodí a fyzikální, chemické a biologické vlastnosti vody (Tlapák et al., 1992).

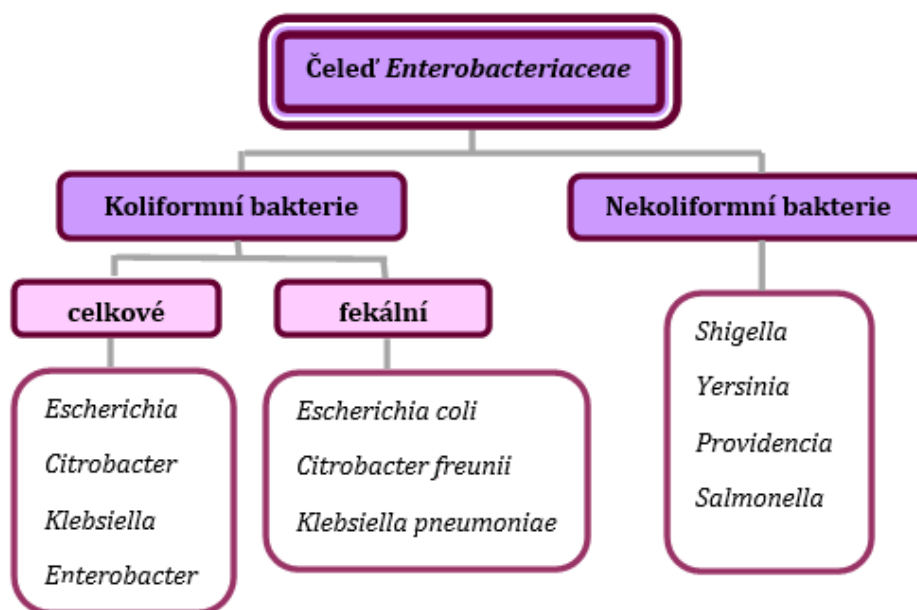
Baudišová (2007) považuje za hlavní zdroje znečištění bakteriemi *E. coli* v povrchových vodách kromě přímého fekálního znečištění i odtoky z čistíren odpadních vod v místech s nedokonalým nebo žádným čištěním. Závislost je vázána na hustotu osídlení s adekvátním čištěním odpadních vod. Devarajan a kol. (2015) poukazují na to, že z kanalizačních systémů a odpadních vod se do přirozených vodních ekosystémů dostávají zbytky léčiv, které se zde mohou hromadit a vytvářet selekční tlak na přítomné bakterie. Odtud se pak rezistentní bakterie mohou šířit dále mezi lidmi, zvířata a do okolního prostředí.

Kožíšek et al. (2006) uvádí, že k zajištění mikrobiologické nezávadnosti vody je nutné používat tzv. multibariérový přístup, což znamená vytvoření systému tolika opatření v průběhu dopravy vody od zdroje ke spotřebiteli, kolik existuje rizikových míst vstupu infekčních zárodků do vody.

2.4 Nejvýznamnější rody čeledi *Enterobacteriaceae*

Bursová (2014) definuje identifikaci jako postup, při kterém zjišťujeme, do kterého taxonu nově izolovaná bakterie (či bakteriální kmen) náleží. Je tedy praktickou aplikací klasifikace a nomenklatury. Podle Juláka (2006) je základem identifikace bakterií a jejich fenotypické klasifikace sledování složení a činnosti enzymů, které jsou charakteristické pro daný typ bakterie a jejichž činnost je základem biochemických identifikačních testů. Tyto testy jsou založeny na změně barvy acidobazických indikátorů, které reagují na změny pH substrátu.

Mezi významné zástupce (obr. 4) této čeledi patří *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. a *Salmonella* spp. Bakterie *E. coli* se podílí zejména na infekcích močového traktu, *K. pneumoniae* spolu s rodem *Enterobacter* způsobují pneumonie a bakterie z rodu *Salmonella* gastroenteritidy, případně závažná invazivní onemocnění (Paterson, 2006).



Obrázek 4: Schéma rozdělení čeledi *Enterobacteriaceae* podle Ambrožové (2008) - upraveno

2.4.1 *Citrobacter*

Rod náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*, tvoří gramnegativní tyčinky a zahrnuje tři druhy – *Citrobacter amalonaticus*, *C. freundii* a *C. koseri*. Všechny druhy jsou schopny využívat citrátů jako jediného zdroje uhlíku (Klaban, 2005). Bakterie mohou rovněž fermentovat mannitol s produkcí plynného H₂S (Knirel et al., 2002). Nachází se ve střevním systému člověka a teplomilných zvířat, ale i v trávicím traktu ptáků, obojživelníků a některého hmyzu (Knirel et al., 2002, Klaban, 2011). Bakterie rodu *Citrobacter* se vyskytují jako oportunní nozokomiální patogeny (Knirel et al., 2002).

Druhy *C. freundii* a *C. koseri* mohou být patogenní a způsobovat průjemovitá onemocnění, většinou méně závažná (Klaban, 2011). Knirel et al. (2002) dodává, že mohou způsobovat kromě gastrointestinálních poruch také infekce močových cest a baktarémie. Mohou být izolovány z ran a poranění. *C. koseri* a *C. freundii* mohou způsobovat novorozeneckou meningitidu, která může vést k mozkovým abscesům (Knirel et al., 2002, Ryan & Ray 2004).

2.4.2 *Enterobacter*

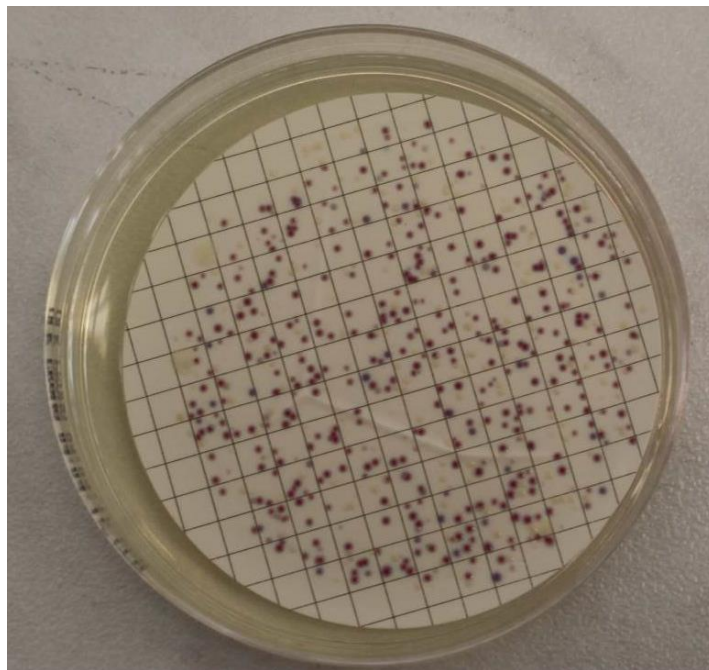
Název *Enterobacter* pochází z řečtiny a znamená v překladu „střevní tyčinka“ (*enteron* a *baktron*) (Klaban, 2005). Mezzatesta et al. (2012) doplňuje, že se jedná o bakterie netvořící spory. Vyskytují se jako komenzálové v trávicí soustavě živočichů, ale i jako patogeny rostlin a hmyzu. Klinický význam mají jako oportunní patogeny, jež mohou být původci nosokomiálních nákaz. Bakterie rodu *Enterobacter* jsou schopné kolonizovat různá prostředí a hostitele, což je jim umožněno jejich schopností rychle a efektivně přizpůsobit svůj metabolismus a fyziologii vnějším podmínkám a environmentálnímu stresu (Davin-Regli & Pagés, 2015).

Podle Ryana & Rye (2004) je diferenciálním znakem od rodu *Klebsiella* pohyblivost díky peritrichálním flagelám. Druhy *Enterobacter*, které se zdají být méně virulentní než *Klebsiella*, se obvykle vyskytují u smíšených infekcí, jejichž význam je třeba rozhodovat z klinických a epidemiologických důvodů. Davin-Regli & Pagés (2015) uvádí, že druhy *Enterobacter aerogenes* a *E. cloacae* byly hlášeny jako významné oportunní a multirezistentní bakteriální patogeny pro člověka během posledních tří desetiletí v nemocničních odděleních. *Enterobacter* je všestranná bakterie schopná rychle reagovat na léčbu antibiotiky u kolonizovaného pacienta. Tyto dva druhy mohou způsobovat infekce močových cest a lehčí průjemová onemocnění. Větší vnímavost k onemocnění mívají děti (Klaban, 2005).

2.4.3 *Escherichia coli*

E. coli (obr. 5) patří mezi nejprozkoumanější druhy z čeledi *Enterobacteriaceae*. Je to gramnegativní tyčkovitá bakterie o velikosti 2-3 um. Vyskytuje se jako běžný obyvatel trávicího traktu člověka a homiotermních živočichů, kde má důležité a pro svého hostitele užitečné funkce. Zabraňuje růstu cizích a patogenních organismů ve střevech tím, že jim konkuruje v boji o živiny a kyslík, čímž se podílí na udržování celkové rovnováhy mikroorganismů žijících ve střevech. Dále pomáhá při trávení a syntetizuje některé důležité vitaminy jako např. vitamin K (Klaban, 2005).

Podle normy ČSN EN ISO 9308-1 jsou bakterie rodu *E. coli* definovány jako koliformní bakterie, které produkují indol z tryptofanu. Norma TNV 75 7835 je popisuje jako termotolerantní koliformní bakterie, které mají schopnost hydrolyzovat specifickým enzymem b-D-glukuronidázou 4-methyl-umbelliferyl-b-D-glukuronid (MUG) za vzniku 4-methyl-umbelliferonu; ten vykazuje modrou fluorescenci v UV světle (WHO, 2011).



Obrázek 5: Narostlé kolonie *E. coli* a doprovodné mikroflory na chromogenním agaru

Julák (2006) píše, že jeden chromosom „průměrné“ *Escherichia coli* má relativní molekulovou hmotnost asi $3 \cdot 10^9$, skládá se z 5000 kpb a tvoří 2-3% sušiny buňky. Genom *E. coli* je schopen kódovat několik tisíc polypeptidů složených průměrně z 360 aminokyselin.

Některé kmeny *E. coli* jsou patogenní a jsou obávanými původci onemocnění z potravin. Jedním z nejznámějších je Shiga-like toxigenní kmen *E. coli* O157:H7 (Necidová, 2014). Podle WHO nejsou infekce způsobené *E. coli* O157:H7 a dalšími enterohemoragickými kmeny *E. coli* příliš časté, ale mohou mít velmi závažné následky, mezi které patří hemolytický uremický syndrom až úmrtí. Což potvrzuje i Kožíšek et al. (2006) a dodává, že při hemolyticko-uremickém syndromu selhává činnost ledvin, a to zejména u dětí. WHO uvádí, že infekční dávka může být velmi nízká (méně než 100 organismů).

E. coli může produkovat každý druh toxinu vyskytující se v čeledi *Enterobacteriaceae*. To zahrnuje póry tvořící cytotoxin, inhibitory syntézy bílkovin a množství toxinů, které mění hostitelské cesty v hostitelských buňkách (Ryan & Ray, 2004).

2.4.4 Klebsiella

Rod *Klebsiella* má tyčinkovitý tvar a je silnější než ostatní enterobakterie (Klaban, 2005). Ryan & Ray (2004) dodávají, že nejvýraznějšími bakteriologickými rysy rodu *Klebsiella* jsou nepřítomnost motility a přítomnost polysacharidové kapsle. To dává kolonii mukoidní charakter a tvoří základ rozdělení sérotypového systému. Jsou to bakterie, žijící ve vodě, půdě, dýchacím i trávicím traktu zvířat a člověka (Podschn et al., 1998, Klaban, 2005). Tyto bakterie byly kultivovány z vodního prostředí, které bylo znečištěno průmyslovými odpadními vodami či pilinami a buničinou z papírenského průmyslu, dále je obsahovaly rostlinné produkty, čerstvá zelenina, potraviny s vysokým obsahem cukrů a kyselin, živé stromy a jejich kůra, rostliny a vedlejší produkty rostlin (Brisse et al., 2006).

Nejčastějším druhem je *K. pneumoniae*, která je schopna způsobit klasickou lobární pneumonii, charakteristickou pro jiné enkapsulované bakterie. Většina pneumonií způsobených Klebsiellami

je nerozlišitelná od těch, které produkují jiné druhy *Enterobacteriaceae*. Ze všech druhů *Enterobacteriaceae* patří nyní druhy *Klebsiella* mezi nejvíce odolné proti antimikrobiálním látkám (Ryan & Ray, 2004). Dalším významným druhem je *Klebsiella planticola*. V průběhu 1 roku byly pro *Klebsiella* spp. sledovány vzorky z orofaryngeálního a rektálního výtěru od 131 novorozenců na novorozeneckém oddělení. Bylo izolováno třináct kmenů *K. planticola* a představovalo 9% všech druhů nálezů *Klebsiella* spp. (Podusch et al., 1998).

Hart (1993) uvádí, že kmeny *Klebsiell* jsou většinou spojeny s infekcí močových a dýchacích cest, stejně jako s infekcemi ran a měkkých tkání a mohou způsobit fatální sepsi. Kmeny *Klebsiella* mají schopnost výrazně se rozšířit u pacientů v nemocnicích, což vede k nozokomiálním ohniskům, zejména u novorozenců. Maroncle et al. (2002) píše, že především čtyři složky bakterie *Klebsiella* se již dlouho podílejí na patogenezi: adhesiny, kapsulární polysacharidy, lipopolysacharid (LPS) a systémy zachytávání železa (siderofory). Většina infekcí způsobených *Klebsiellou* se nyní vyskytuje u hospitalizovaných pacientů a mnoho jich je způsobeno antibioticky rezistentními kmeny, včetně kmenů, které produkují b-laktamasy s rozšířeným spektrem účinku (Brisse et al., 2006).

2.4.5 *Proteus*

Bakterie rodu *Proteus* jsou gramnegativní anaerobní nebo fakultativně anaerobní organismy. Mají tyčinkovitý tvar a povrch těla je pokrytý bičíky. Mezi místa výskytu patří např. půda, povrch rostlin, znečištěná voda a střevní trakt člověka a exkrementy zvířat. Bakterie rodu *Proteus* mají silnou proteolytickou aktivitu a účastní se hnilobných procesů. Jejich činností vzniká ureáza a sirovodík H₂S, což může sloužit k určování rodu při růstu na selektivně diagnostických půdách (Klaban, 2005).

Necidová (2014) označuje *Proteus* jako psychrotrofní bakterii s proteolytickou a lipolytickou aktivitou, která se řadí v potravinách k nežádoucím technologicky škodlivým mikroorganismům.

Rod *Proteus* se řadí mezi potencionální patogeny. Může způsobovat infekce močových cest a sekundární infekce při poraněních a dekubitech (Klaban, 2005).

2.4.6 *Salmonella*

Do rodu *Salmonella* patří gramnegativní, nesporulující, fakultativně anaerobní tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae*. Od ostatních kmenů téže čeledi se odlišují biochemicky a antigenní strukturou (Greenwood, 1999). Klaban (2005) doplňuje, že Salmonely jsou typické tím, že fermentují glukosu s tvorbou plynu. Další vlastností salmonel je produkce sulfanu H₂S. Salmonely jsou téměř všudypřítomné a můžeme je najít v znečištěných a kontaminovaných vodách, v ovzduší a na rostlinách.

Salmonely jsou diferencovány na více než 2200 sérologicky odlišných typů (sérotypů) založených na rozdílech v somatických, flagelárních a kapsulárních antigenech. Infekce způsobené rodem *Salmonella* většinou nemusí vést ke smrtelné formě salmonelózy, ale může se projevit jako septikémie a ovlivňovat některé orgánové systémy (Ekperigin & Nagaraja, 1998).

Klaban (2005) varuje, že nebezpečným zdrojem nákazy pro člověka je především nedostatečně tepelně upravené maso a vejce.

Onemocnění salmonelóza – viz. Kapitola 2.5.2 Onemocnění způsobená patogenními koliformními bakteriemi.

2.4.7 *Serratia*

Rod náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*, tvoří gramnegativní tyčinky. Typickým znakem bakterií je, že jsou proteolyticky aktivní (tj. rozkládají bílkoviny a bílkovinné produkty) (Klaban, 2005). Bakterie rodu *Serratia* jsou rozšířené v prostředí, ale nejsou běžnou součástí lidské fekální flóry. V nemocnici mají druhy *Serratia* u dospělých tendenci spíše kolonizovat dýchací a močové cesty, než gastrointestinální trakt. Výskyt druhů *Serratia* jako příčiny nozokomiálních infekcí se snižuje, ale tyto bakterie jsou stále schopny způsobit ohniska nemocí, zejména na jednotkách intenzivní péče. (Climaco, 2017).

Necidová (2014) dodává, že bakterie rodu *Serratia* jsou psychrotrofní bakterie s proteolytickou a lipolytickou aktivitou, což je řadí v potravinách k nežádoucím technologicky škodlivým mikroorganismům.

2.4.8 *Shigella*

Bakterie rodu *Shigella* jsou nepohyblivé tyčinkovité bakterie. Patří mezi druhy aerobní a zkvašují glukosu bez vzniku plynu. U rodu *Shigella* rozlišujeme sérologické skupiny A-D, které obsahují různé počty sérotypů (Klaban, 2005). Klíčovým virulencním faktorem *Shigella flexneri* je systém výživy typu III (T3SS) kódovaný na velkém plazmidu. T3SS určuje interakce *S. flexneri* s intestinálními buňkami následným translokováním dvou sad efektorových proteinů do cílových buněk. *S. flexneri* tedy kontroluje intra- a intercelulární šíření, smrt makrofágových buněk, stejně jako hostitelské zánětlivé reakce (Schroeder & Hibli, 2008).

WHO uvádí, že *Shigella* způsobuje každý rok více než 2 miliony infekcí s přibližně 60 000 případy úmrtí, a to zejména v rozvojových zemích. Infekční dávka je nízká a může být mezi 10-100 organismy. Schroeder & Hibli (2008) tvrdí, že pochopení molekulárních mechanismů, které je základem patogeneze *Shigella*, podpoří vývoj bezpečné a účinné vakcíny, která by současně se zlepšenou hygienou měla omezit infekce tímto rozšířeným patogenem.

2.4.9 *Vibria*

Zástupci patří do čeledi *Vibrionaceae* a jsou to pohyblivé gramnegativní tyčinky rohlíčkovitého tvaru. Název je odvozen z latinského slova *vibrare*, což znamená kmitat či chvět se. Bakterie se pohybují pomocí jednoho polárního bičíku, což je řadí mezi monotricha. Spory ani pouzdra se u této skupiny netvoří (Klaban, 2005).

Vibrio cholerae je bakterie způsobující cholera, která se projevuje bolestmi v břiše, vodnatými až krvavými průjmy a zvracením. V ČR se každoročně vyskytne několik málo případů importovaných z exotických zemí (Kožíšek et al., 2006). Více - viz. Kapitola 2.5.2 Onemocnění způsobená patogenními koliformními bakteriemi.

Další druh, který ve své práci popisují Strom & Paranjpye (2000), se nazývá *Vibrio vulnificus*. Jeho přítomnost v ústích řek není způsobena znečištěním nebo jinými formami kontaminace. Za určitých podmínek má tato bakterie schopnost způsobit vážné a často fatální infekce. Patří mezi ně invazivní septikémie, kterou může způsobit konzumace syrových nebo nedopečených měkkýšů, stejně jako infekce ran získané při pohybu v šelfových nebo mořských vodách, kde je bakterie přítomna.

2.4.10 *Yersinia*

Zástupci rodu *Yersinia* patří do čeledi *Enterobacteriace*. Typickým znakem této skupiny je pleomorfismus, neboli mnohotvárnost, ovlivněný podmínkami kultivace (délka a teplota kultivace, složení media) (Klaban, 2005).

Yersinie jsou patogenní pro zvířata a za příhodných podmínek jsou přenosné i na člověka. Přenos se děje buď přímo, nebo pomocí hmyzího vektoru (Greenwood, 1999, Ryan, 2004). Jako Nejvýznamnější zástupce rodu je *Yersinia pestis*, zvaná také morový bacil. *Y. pestis* je gramnegativní, nesporulující, nepohyblivá krátká kokobacilární tyčinka. *Yersinia* je parazitem především hlodavců, ale je známo zhruba 200 druhů živočichů, které jsou jejími hostiteli. Mor může vypuknout i mezi zvířaty a přes blechy je pak přenesen na člověka (Greenwood, 1999).

Yersinia pestis je antigenně homogenní, ale *Y. pseudotuberculosis* a *Y. enterocolitica* mají na povrchu více různých O a H antigenů (Ryan & Ray, 2004).

2.5 Patogenita koliformních bakterií

Patogenita různých druhů bakterií je způsobena odlišnými faktory a u různých druhů se také liší závažnost patogenních projevů. Následky napadení organismu se liší v závislosti na různém zdravotním stavu postižené osoby. Koliformní patogenní bakterie snadno osidlují sliznice a způsobují s nimi spojené záněty (např. močového měchýře, dýchacích cest, prostaty apod.) Dále mezi časté projevy napadení organismu patogenními druhy koliformních bakterií patří průjmovitá onemocnění.

Klaban (2005) popisuje infekci jako proniknutí choroboplodných mikroorganismů do hostitele a případné další množení se v něm. V závislosti na odpovědi imunitního systému a počtu proniknutých bakterií infekce může, nebo nemusí, vyvolat onemocnění. Julák (2006) definuje patogenitu jako schopnost mikroorganismu vyvolávat onemocnění. Probíhá na úrovni druhu a bakterie s touto schopností označujeme jako patogenní bakterie či patogeny. Schopnost vyvolat onemocnění na úrovni kmene nazýváme virulence, která může být vyjádřena kvantitativně (např. stanovením počtu mikrobů nutných k vyvolání onemocnění).

2.5.1 Principy patogenity koliformních bakterií

Patogeny podle Juláka (2006) rozlišujeme na primární a podmíněné.

- **Primární patogeny** – vyvolávají onemocnění při každé infekci
- **Podmíněné (oportunní, příležitostné) patogeny** – způsobují onemocnění pouze za výjimečných podmínek (např. oslabení organismu, stáří, apod.)

Bakterie produkují exotoxiny, což jsou toxiny bílkovinné povahy uvolňované do prostředí. Exotoxiny můžeme podle jejich biologických účinků dále rozdělit na neurotoxiny, cytotoxiny a enterotoxiny. Shigely, *vibrio cholerae* a některé kmeny *E. coli* produkují právě enterotoxiny, které způsobují vodnaté průjmy, neboť různými mechanismy stimulují hypersekreci vody a elektrolytů z intestinálního epitelu (Julák, 2006).

Dalšími původci zejména průjmových onemocnění přenášených vodou jsou bakterie rodu *Campylobacter* sp. a *Yersinia* sp. (Kožíšek et al., 2006).

Nesporulující patogenní anaerobní bakterie obvykle nemají specifické nástroje virulence a vyvolávají především řadu nespecifických hnisavých onemocnění (často endogenního původu),

při čemž bývají ve směsných kulturách s dalšími fakultativně aerobními a aerobními bakteriemi (Julák, 2006).

V rámci druhu *E. coli* můžeme rozlišit mnoho kmenů, které se zařazují mezi patogenní a mohou způsobit i závažná onemocnění. Jako čtyři hlavní skupiny rozlišujeme bakterie: enteropatogenní, enterotoxigenní, enteoinvazivní a enterohemoragické (Klaban, 2005).

Kmeny EPEC (enteropatogenní, dyspeptická *E. coli*) disponují faktory virulence, které vedou ke vzniku novorozeneckých průjmů. Nejznámější jsou antigenní typy O55, O111, O126 a O86 (Votava, 2011). U EPEC kmenů nebyla prokázána tvorba enterotoxinů. Podstatou infekce je úzká vazba bakterií na enterocyty, čímž se rozpouštějí mikrovilli a důsledkem je alterace epiteliálního povrchu (Bednář, 1996).

Kmeny ETEC (enterotoxigenní *E.coli*) nejsou přímo vázány na určité sérotypy. Produkuje dva typy enterotoxinů – LT (tepelně labilní) a ST (tepelně stabilní). ETEC jsou nejčastější bakteriální příčinou průjmů v rozvojových zemích. Projevují se nejvíce u těch, kteří s nimi nebyli dříve v kontaktu. Jsou příčinou cestovatelských průjmů. Tyto průjmy si prodělává většina cestovatelů z ekonomicky vyspělých zemí, při cestách do zemí rozvojových (Votava, 2011). ETEC kolonizují tenké střevo prostřednictvím kolonizačních faktorů, kterými jsou proteinové fimbrie. Geny pro tvorbu těchto toxinů jsou vázány na plazmidech (Bednář, 1996).

Kmeny EIEC (enteroinvazivní *E.coli*) disponují faktory invazivity, které umožňují invazi do střeva. Infekce těmito kmeny vede ke krvavým průjmům (Votava, 2011). Enteroinvazivní *E. coli* jsou mechanismem patogenity podobné shigelám, tzn. pronikají do buněk a v nich se pomnoží. Onemocnění je tedy velmi podobné shigelóze (Bednář, 1996).

Kmeny STEC (VTEC, EHEC) jsou nejzávažnější. Počátkem infekce bývají těžké průjmy. Zpravidla dojde k systematizaci infekce a vzniku hemolyticko-uremického syndromu (HUS). Tím se tato skupina poněkud vymyká definici „střevního působení“. Nejběžnějším sérotypem je O157:H7. Riziko zvyšuje nízká infekční dávka – udává se, že k vyvolání infekce stačí deset bakterií (Votava, 2011).

Tabulka 1: Patogeny z čeledi *Enterobacteriaceae* šířené vodou a jejich význam (upraveno podle WHO)

Patogen	Zdravotní riziko	Přežívání ve vodě	Resistence vůči chloru	Míra nakažlivosti	Živočišný zdroj	Relevance v ČR
<i>E. coli</i> – patogenní	vysoké	střední	nízká	nízká	ano	vysoká
<i>E. coli</i> – enterohemoragické	vysoké	střední	nízká	vysoká	ano	vysoká
<i>Salmonella typhi</i>	vysoké	střední	nízká	nízká	ne	vysoká
Jiné salmonely	vysoké	Mohou se rozmnožovat	nízká	nízká	ano	vysoká
<i>Shigella</i> spp.	vysoké	krátké	nízká	střední	ne	vysoká
<i>Vibrio cholerae</i>	vysoké	krátké	nízká	nízká	ne	střední
<i>Yersinia enterocolitica</i>	vysoké	dlouhé	nízká	nízká	ano	střední

2.5.2 Onemocnění způsobená patogenními koliformními bakteriemi

Enterobacteriaceae produkují nejširší škálu infekcí ze všech mikrobiálních skupin, včetně dvou nejčastějších infekčních stavů, kterými jsou záněty močových cest a akutní průjemy (Ryan & Ray, 2004).

Velmi častým problémem způsobeným biofilmy jsou infekce močových cest spojené s dlouhodobou katetrizací. Katétrů jsou pro bakterie přímým vstupem až do močového měchýře a výrazně jim usnadňují kolonizaci močových cest. Mezi nejčastější kolonizátory močových katétrů patří *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, druhy rodu *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes* a další. Velmi častý je výskyt smíšených bakteriálních populací (Holá, 2012).

Jako alimentární infekce jsou označovány střevní infekce, u kterých jsou patogenní mikroby vylučovány stolicí nebo močí. Vstupní branou infekce je trávicí ústrojí, jde tedy o přenos fekálně orální (Podstatová, 2009).

Göpfertová et al. (2006) uvádí, že *Salmonella Typhi* je bakterie způsobující břišní tyfus. Břišní tyf probíhá jako horečnaté onemocnění. Na začátku se objevuje zácpa, později průjem s krvavou stolicí. Patogenita salmonel je způsobena produkcí termostabilního endotoxinu identického s tzv. O-antigenem. Podstatová (2009) dodává, že břišní tyfus postihuje lymfatický systém mezenteria a střev. Dále doplňuje, že se objevují výrazné bolesti hlavy a může se zvětšovat slezina. Onemocnění paratyfus A, B a C, které je vyvolané bakteriemi *Salmonella paratyphi A, B* či *C*, popisuje jako podobné onemocnění s lehčím průběhem. Obě onemocnění se u nás však v současnosti vyskytují pouze sporadicky, především importované ze zemí s nízkými hygienickými standardy.

Salmonelózy jsou definovány jako alimentární toxoinfekce, většinou lehce probíhající průjmová onemocnění dětí i dospělých. Běžné jsou inaparentní formy nákazy, vzácná je salmonelová sepe nebo hnisavé afekce různých orgánů. Infekční dávka se u salmonel udává vysoká, kolem 10⁵ těchto mikrobů na 1 g zkonsumované potraviny (Podstatová, 2009). *Salmonella typhimurium* a další druhy vyvolávají salmonelózy, které mají projevy jako zvracení, průjem a malátnost. Inkubační doba je velmi krátká (v průměru přibližně 10 hodin). Typické jsou explozivní epidemie (Kožíšek et al., 2006). Podstatová (2009) doplňuje, že inkubační doba může být až 36 hodin, v závislosti na velikosti infekční dávky. K nákaze dochází perorální cestou, požitím infikované potraviny. Po vniknutí do zažívacího systému se bakterie pomnožují v tenkém střevě. Rozlišujeme tři formy tohoto onemocnění: salmonelózu symptomatickou, gastroenteritickou a tyfoidní. Nejčastější je forma akutní gastroenteritidy (Klaban, 2001). Nejčastějšími původci salmonel u nás jsou druhy *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. agona* a *S. infantum* (Podstatová, 2009).

Cholera je průjmové onemocnění typické mnohočetnými průjmy a zvracením (Kožíšek et al., 2006). Pokud není včas léčena, může dojít až ke smrti z dehydratace. Původcem infekce je bakterie *Vibrio cholerae*, která se vyskytuje v různých sérotypech, z nichž jsou některé schopny produkovat cholerový enterotoxin. Podle velikosti infekční dávky se projevují lehké případy až po smrtelná onemocnění. Cholera je problém především rozvojových zemí. Inkubační doba se pohybuje nejčastěji mezi 2 až 3 dny, ale rozmezí může být od několika hodin až po 5 dní (Podstatová, 2009).

2.5.3 Rezistence

S rozmanitými enterobakteriálními infekcemi se lze setkat v humánní i veterinární medicíně. Vzhledem k jejich častému výskytu a nenáročnosti na podmínky existuje výrazná spojitost mezi antibiotickou léčbou a rozvojem rezistence u enterobakterií (Davies & Davies, 2010). Antibiotika jsou látky s antimikrobiálními účinky. Antibiotika potlačují růst či množení mikrobů, nebo je přímo usmrcují. Mohou být přírodního či syntetického původu a mít různé spektrum účinku (Podstatová, 2009). Existuje mnoho různých způsobů, kterými se rezistentní bakterie šíří (obr. 6) mezi lidmi, zvířaty a prostředím (Harbarth a kol., 2015).



Obrázek 6: Možné způsoby šíření bakterií rezistentních k antibiotikům podle Harbartha

Hlavní roli v šíření většiny klinicky významných rezistencí mají mobilní elementy, kterými jsou plasmidy a transpozony. Plasmidy nesoucí geny rezistence se mohou buď alespoň z části, nebo celé začlenit do bakteriálního chromozomu. Většina bakteriálních kmenů obsahuje konjugativní plasmidy, které zajišťují svůj vlastní přenos mezi buňkami a tím i přenos genů pro rezistenci (Hubáček a kol., 1992). Ryan & Ray (2004) dodávají, že kombinace chromozomální a plazmidem určené rezistence je činí nejvíce proměnlivými ze všech bakterií v citlivosti antimikrobiální látky.

Hrabák et al. (2008) uvádí, že některé druhy z čeledi *Enterobacteriaceae* (např. *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp., *Serratia* spp.) mohou hydrolyzovat peniciliny, cefamyciny, většinu cefalosporinů a monobaktamy, nehydrolyzují karbapenemy a nejsou inhibovány inhibitory b-laktamázy (např. klavulanovou kyselinou).

V následující tabulce 2 jsou uvedeny vybrané antimikrobiální kategorie, proti kterým si dokáží některé druhy z rodu *Enterobacteriaceae* vytvořit rezistenci. Nejsou v ní uvedeny kategorie

karbapenemů, rozšířené spektrum cefalosporinů 3. a 4. generace, fluorochinolony, inhibitory foláhové dráhy, monobaktamy, fenikoly a kyselina fosfonová, proti kterým si žádný druh rezistenci nebyl schopen vytvořit.

Tabulka 2: Bakterie z rodu *Enterobacteriaceae* odolné vůči vybraným antimikrobiálním látkám (zpracováno podle Magiorakose et al., 2012)

Antimikrobiální kategorie	Antimikrobiální látka	Druhy s vnitřní odolností proti antimikrobiálním látkám nebo kategoriím
Aminoglykosidy	Gentamicin	<i>Providencia rettgeri</i> (<i>P. rettgeri</i>), <i>Providencia stuartii</i> (<i>P. stuartii</i>)
	Tobramycin	<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Neomycin	<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Anti-MRSA cefalosporiny	Ceftarolin (Schváleno pouze pro <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>)	
Antipseudomonální peniciliny + β -laktamázové inhibitory	Ticarcilin-Kyselina klavulanová	<i>Escherichia hermannii</i> (<i>E. hermannii</i>)
	Piperacilin-tazobactam	<i>E. hermannii</i>
Nerozšířené spektrum cefalosporinů; 1. a 2. generace cefalosporinů	Cefazolin	<i>Citrobacter freundii</i> (<i>C. freundii</i>), <i>Enterobacter aerogenes</i> (<i>E. aerogenes</i>), <i>Enterobacter cloacae</i> (<i>E. cloacae</i>), <i>Proteus penneri</i> (<i>P. penneri</i>), <i>Proteus vulgaris</i> (<i>P. vulgaris</i>), <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>Serratia marcescens</i> (<i>S. marcescens</i>)
	Cefuroxim	<i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. marcescens</i>
Cephamyciny	Cefoxitin	<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i>
	Cefotetan	<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i>
Glycylcykliny	Tigecyklin	<i>Proteus mirabilis</i> (<i>P. mirabilis</i>), <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>

Antimikrobiální kategorie	Antimikrobiální látka	Druhy s vnitřní odolností proti antimikrobiálním látkám nebo kategoriím
Aminoglykosidy	Gentamicin	<i>Providencia rettgeri</i> (<i>P. rettgeri</i>), <i>Providencia stuartii</i> (<i>P. stuartii</i>)
	Tobramycin	<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Neomycin	<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Peniciliny	Ampicilin	<i>Citrobacter koseri</i> (<i>C. koseri</i>), <i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. hermanii</i> , <i>Klebsiellae</i> spp., <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
Peniciliny+ β -Laktamázové inhibitory	Amoxicilin-Kyselina klavulanová	<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
	Ampicilin-sulbactam	<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>S. marcescens</i>
Polymyxiny	Colistin	<i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
Tetracykliny	Tetracyklin	<i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Doxycyklin	<i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Minocyklin	<i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>

Podle Magiorakose et al. (2012) se v rámci čeledi *Enterobacteriaceae* existují bakteriální druhy, které jsou vnitřně rezistentní vůči jednomu nebo více antimikrobiálním činidlům z různých kategorií nebo všem látkám v rámci určité kategorie. Pro zhodnocení odolnosti bakteriálního druhu a jeho zařazení mezi MDR („odolný více druhům léčiv“), XDR („odolný širokému působení léčiv“) a PDR („odolný všem léčivům“) se používá následujících kritérií:

- MDR: není citlivý na ≥ 1 činidlo ve > 3 kategoriích antimikrobiálních látek.
- XDR: není citlivý na ≥ 1 činidlo ve všech kategoriích kromě ≤ 2 .
- PDR: není citlivý na všechny uvedené antimikrobiální látky.

Z tabulky 2 je patrné, že mají druhy z čeledi *Enterobacteriaceae* vnitřní odolnost proti více druhům léčivých látek (především z kategorie spektra cefalosporinů a penicilinů).

Aminoglykosidy jsou antibiotika syntetického nebo polosyntetického původu. (Podstatová, 2012) V tabulce vidíme, že vůči nim mohou vytvářet rezistenci někteří zástupci rodu *Proteus* – konkrétně druhy *P. rettgeri* a *P. stuartii*. Mezzatesta et al. (2012) udává, že hlavní mechanismus rezistence *Enterobacteriaceae* je způsoben aminoglykosidem modifikujícími enzymy, které jsou často kódovány plazmidy, ale mohou být také spojeny s transpozovatelnými prvky. Plazmidové výměny usnadňují rychlé získávání rezistence.

Podstatová (2012) popisuje peniciliny jako antibiotika přírodního původu (vylučován plísní *Penicillium notatum*), která nejsou toxická, ale trpí rychlým rozkladem, což vyžaduje jejich častější dávkování. U čeledi *Enterobacteriaceae* je nutné vyšší dávkování, jinak mohou vznikat rezistence, tzv. penicilinový typ rezistence, který je zvrtný. V tabulce 2 jsou uvedeny druhy rezistentní proti penicilinům, patří mezi ně některé druhy z rodu např. *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*. Dalšími odolnými druhy jsou *Escherichia hermani*, *Serratia marcesnes* a zástupci rodu *Klebsiella*.

Cefalosporiny jsou přírodní a polosyntetická antibiotika příbuzná penicilinu. Využívají se u osob s alergií na penicilin. Nevýhodou je, že mohou být toxičtější, ale mají vyšší spektrum účinku (Podstatová, 2012). Z tabulky 2 vidíme, že na testované druhy (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*) nemají antibiotika vliv.

Polymyxiny patří mezi polypeptidová antibiotika, která se využívají především v lokální aplikaci (např. masti) (Podstatová, 2012). U této antimikrobiální látky najdeme v tabulce rezistentní druhy *Proteus* a *Serratia marcesnes*.

Podstatová (2012) uvádí, že tetracykliny jsou antibiotika, která mají široké spektrum účinku. Nesmí se podávat dětem a těhotným i kojícím ženám, protože mohou způsobit narušení střevní mikroflóry a tetracyklinové zuby. Způsobují rezistenci intermediálního typu, neboť rezistence vzniká pomaleji než na penicilin, ale rychleji než na streptomycin. Pouze druhy rodu *Proteus* si k němu umí vytvořit rezistenci – viz. Tabulka 2.

Podle WHO štěpí běžné β -laktamázy většinou pouze peniciliny a cefalosporiny nižších generací, ty jsou nazývány penicilinázy nebo cefalosporinázy. Postupně se však u bakterií vyvinuly širokospektré β -laktamázy, AmpC β -laktamázy a karbapenemázy, které značně komplikují antimikrobiální léčbu. Podle WHO jsou producenti rozšířeného spektra beta-laktamáz a karbapenemáz řazeni do skupiny kritických patogenů, jež nejvíce ohrožují lidské zdraví a kvůli kterým je nutné vyvíjet nová antibiotika. Konkrétně se jedná o bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* a bakterie *A. baumannii*, *P. aeruginosa*.

3 Metodika

K identifikaci mikroorganismů je třeba získat čisté kultury, k čemuž nám slouží izolace kolonií. Izolace mikroorganismů je postup, při kterém pomocí vyžíhané mikrobiologické kličky či jehly přeneseme ze smíšené kultury určenou kolonii na novou čistou živnou půdu, kde se následně kolonie rozočkuje. Při přenosu nesmí dojít k mikrobiální kontaminaci (Klaban, 2005).

Metody kultivační - Metody membránové filtrace

Pro kontrolu a zamezení chyb se s každou sérií testovaných vzorků provede tzv. zkouška půdy. To znamená, že se kultivuje čistý sterilní membránový filtr, který zajišťuje správnost měření.

Příloha této práce obsahuje fotodokumentaci vlastního provedení použité metody.

Metodika byla zpracována podle pracovních postupů laboratoře pitných vod ČOV v Hradci Králové a upravena podle vlastních zkušeností.

3.1 Stanovení koliformních bakterií a *E. coli* v pitných a podzemních vodách

Princip

Vzorek vody se přefiltruje přes membránový filtr, přenesse se na povrch kultivačního selektivního agarového média a inkubuje se při $36 (\pm 2)^\circ\text{C}$ po dobu $21 (\pm 3)$ hodin. Narostlé růžové až červené kolonie se podrobí testu na produkci oxidázy. Modré až tmavě fialové kolonie se počítají jako *Escherichia coli*.

Přístroje a pomůcky

Autokláv, bakteriologický termostat, filtrační aparát na membránovou filtraci, vodní lázeň, Erlenmeyerova baňka o objemu 500 ml, sterilní Petriho misky o průměru 6 cm, sterilní pinzetu s plochými hroty, sterilní membránové filtry o průměru 47 nebo 50 mm s póry o průměru 0,45 μm , pipety třídy K, A: nedělené 1 ml, 2 ml (dělené po 0,1 ml), plynový kahan, horkovzdušná pistole, sterilní skleněné vzorkovnice o objemu 100 ml, 250 ml a 500 ml, pH metr.

Kultivační média a chemikálie

CCA agar, tetramethyl-p-fenyldiamindihydrochlorid, hydroxid sodný, chlorid sodný, destilovaná voda, denaturovaný líh, hotové misky s CCA agarem (dodávané s certifikátem jakosti).

Použité roztoky

činidlo pro oxidázový test, sterilní (zřed'ovací) fyziologický roztok, 1M roztok hydroxidu sodného

Postup

Příprava vzorku

Vzorkovnice se vzorkem se nechá temperovat při laboratorní teplotě minimálně jednu hodinu. Při předpokládaném znečištění nebo u neznámého vzorku vody, je nutné vzorek ředit. Ředění se provede tak, že z dobře protřepaného vzorku se pipetou odebere jeden objemový díl vzorku a přenesse se do devíti objemových dílů sterilního fyziologického roztoku, čímž vznikne ředění 1:10. Z takto připraveného ředění se sterilní pipetou opět přenesse jeden objemový díl vzorku do devíti objemových dílů fyziologického roztoku, čímž vznikne druhý stupeň ředění. Takto pokračujeme až do požadovaného stupně ředění.

Filtrace

Misky s předem nalitým médiem se vyndají z lednice a označí se příslušným číslem vzorku. Před vlastním stanovením se vzorkovnice se vzorkem intenzivně potřepe. Následně se provede dezinfekce porézního disku spodní části filtračního aparátu vatou namočenou do lihu a poté opálení plamenem. Sterilní membránový filtr se uchopí za okraj ožehnutou pinzetou a položí se mřížkovanou stranou vzhůru na porézní disk. Na spodní část aparátu se upevní sterilní nálevka. Zavře se kohoutek na aparátu, ožehne se okraj hrdla vzorkovnice a do nálevky se nalije vzorek o objemu 100 ml. Kohoutek se otevře a vzorek se nechá pomalu protéct a přefiltrovat přes membránový filtr. Po tomto se kohoutek ihned uzavře. Filtr se přenese na povrch kultivačního média pomocí pinzety tak, aby mezi filtrem a médiem nevznikly vzduchové bubliny. Naočkované misky se obrátí dnem vzhůru a vloží se do termostatu. V termostatu se miska inkubuje při $36 (\pm 2)^\circ\text{C}$ po dobu $21 (\pm 3)$ hodin.

Potvrzující testy

Ihned po provedení inkubace se provede odečet narostlých kolonií koliformních bakterií. Pro stanovení jsou počítány růžově až červeně zbarvené kmeny. K provedení oxidázového testu se na víčko Petriho misky umístí filtrační papír, na který se kápnou 2-3 kapky oxidačního činidla. Filtr s narostlými koloniemi se přenese na tento filtrační papír s činidlem. Sleduje se laktosa pozitivní reakce, tj. modré zbarvení kolonií. Jako koliformní bakterie se počítají všechny kolonie, které mají negativní oxidázový test, nezabarví se tedy do modra do 2 minut.

Jako *Escherichia coli* jsou počítány všechny modře až tmavě fialově zbarvené narostlé kolonie. Výsledky se udávají jako KTJ (kolonie tvořící jednotka) na 100 ml vzorku.

3.2 Stanovení termotolerantních koliformních bakterií v pitných, podzemních a povrchových vodách a *E. coli* v povrchových a nedesinfikovaných vodách

Princip

Vzorek vody se přefiltruje přes membránový filtr, přenese se na povrch kultivačního selektivního agarového média s laktózou a inkubuje se při $44 (\pm 0,5)^\circ\text{C}$ po dobu $21 (\pm 3)$ hodin.

Přístroje a pomůcky

Autokláv, bakteriologický termostat, filtrační aparát na membránovou filtraci, vodní lázeň, Erlenmeyerova baňka o objemu 500 ml, sterilní Petriho misky o průměru 6 cm, sterilní pinzeta s plochými hroty, sterilní membránové filtry o průměru 47 nebo 50 mm s póry o průměru $0,45\ \mu\text{m}$, pipety třídy K, A: nedělené 1 ml, 10 ml (dělené po 1 ml), plynový kahan (horkovzdušnou pistolí), sterilní skleněné vzorkovnice o objemu 100 ml, 250 ml a 500 ml, pH metr.

Kultivační média a chemikálie

m-FC agar, hydroxid sodný, kyselina rosolová, chlorid sodný, destilovaná voda, denaturovaný líh.

Použité roztoky

sterilní (zřed'ovací) fyziologický roztok, 0,2M roztok hydroxidu sodného, alkalický roztok kyseliny rosolové, 1M roztok hydroxidu sodného

Postup

Příprava vzorku

Vzorkovnice se vzorkem se vyndá z lednice a nechá se temperovat při laboratorní teplotě minimálně jednu hodinu. Při předpokládaném znečištění nebo u neznámého vzorku vody, je nutné vzorek ředit. Ředění se provede tak, že z dobře protřepaného vzorku se pipetou odebere jeden objemový díl vzorku a přenesení se do devíti objemových dílů sterilního zředovacího roztoku, čímž vznikne ředění 1:10. Z takto připraveného ředění se sterilní pipetou opět přenesení jeden objemový díl vzorku do devíti objemových dílů fyziologického roztoku, čímž vznikne druhý stupeň ředění. Takto pokračujeme až do požadovaného stupně ředění.

Filtrace

Misky s předem nalitým médiem se vyndají z lednice a poznačí se příslušným číslem vzorku. Před vlastním stanovením se vzorkovnice se vzorkem intenzivně protřepe. Následně se provede dezinfekce porézního disku spodní části filtračního aparátu vatou namočenou do lihu a poté ožehnutí plamenem. Sterilní membránový filtr se uchopí za okraj ožehnutou pinzetou a položí se mřížkovanou stranou vzhůru na porézní disk. Na spodní část aparátu se upevní sterilní nálevka. Zavře se kohoutek na aparátu, ožehne se okraj hrdla vzorkovnice a do nálevky se nalije vzorek o objemu 100 ml. Kohoutek se otevře a vzorek se nechá pomalu přefiltrovat přes membránový filtr. Poté se kohoutek ihned uzavře. Filtr se přenesení na povrch kultivačního média pomocí pinzety tak, aby mezi filtrem a médiem nevznikly vzduchové bubliny. Naočkované misky se obrátí dnem vzhůru a vloží se do termostatu. V termostatu se miska inkubuje při 44 (\pm 0,5) °C po dobu 21 (\pm 3) hodin.

Ihned po provedení inkubace se provede odečet narostlých kolonií termotolerantních koliformních bakterií. Pro stanovení jsou počítány laktosa pozitivní, tj. modře zbarvené kmeny. Výsledky se udávají jako KTJ (kolonie tvořící jednotka) na 100 ml vzorku.

3.3 Stanovení koliformních bakterií v nedesinfikovaných vodách

Metodika byla zpracována podle pracovních postupů laboratoře pitných vod ČOV v Hradci Králové a upravena podle vlastních zkušeností.

Princip

Vzorek vody se přefiltruje přes membránový filtr, přenesení se na povrch selektivního kultivačního agarového média s laktózou a inkubuje se při 44 (\pm 0,5) °C po dobu 21 (\pm 3) hodin. Případné narostlé kolonie se otestují na *E. coli*.

Přístroje a pomůcky

Autokláv, bakteriologický termostat, filtrační aparát na membránovou filtraci, vodní lázeň, Erlenmeyerova baňka o objemu 500 ml, sterilní Petriho misky o průměru 6 cm, sterilní pinzeta s plochými hroty, sterilní membránové filtry o průměru 47 nebo 50 mm s póry o průměru 0,45 μ m, pipety třídy K, A: nedělené 1 ml, 10 ml (dělené po 1 ml), plynový kahan (horkovzdušnou pistolí), sterilní skleněné vzorkovnice o objemu 100 ml, 250 ml a 500 ml, pH metr.

Kultivační média a chemikálie

Endo agar, hydroxid sodný, kyselina rosolová, chlorid sodný, destilovaná voda, roztok bazického fuchsinu, denaturovaný líh.

Použité roztoky

(zředovací) fyziologický roztok, 0,2M roztok hydroxidu sodného, alkalický roztok kyseliny rosolové, sterilní hydroxid sodný roztok 1 mol

Postup

Příprava vzorku

Vzorkovnice se vzorkem se vyndá z lednice a nechá se temperovat při laboratorní teplotě minimálně jednu hodinu. Při předpokládaném znečištění nebo u neznámého vzorku vody, je nutné vzorek ředit. Ředění se provede tak, že z dobře protřepaného vzorku se pipetou odebere jeden objemový díl vzorku a přenesse se do devíti objemových dílů sterilního zředovacího roztoku, čímž vznikne ředění 1:10. Z takto připraveného ředění se sterilní pipetou opět přenesse jeden objemový díl vzorku do devíti objemových dílů fyziologického roztoku, čímž vznikne druhý stupeň ředění. Takto pokračujeme až do požadovaného stupně ředění.

Filtrace

Misky s předem nalitým médiem se vyndají z lednice a poznačí se příslušným číslem vzorku. Před vlastním stanovením se vzorkovnice se vzorkem intenzivně protřepe. Následně se provede dezinfekce porézního disku spodní části filtračního aparátu vatou namočenou do lihu a poté opálení plamenem. Sterilní membránový filtr se uchopí za okraj ožehnutou pinzetou a položí se mřížkovanou stranou vzhůru na porézní disk. Na spodní část aparátu se upevní sterilní nálevka. Zavře se kohoutek na aparátu, ožehne se okraj hrdla vzorkovnice a do nálevky se nalije vzorek o objemu 100 ml. Kohoutek se otevře a vzorek se nechá pomalu protéct a přefiltrovat přes membránový filtr. Po tomto se kohoutek ihned uzavře. Filtr se přenesse na povrch kultivačního média pomocí pinzety tak, aby mezi filtrem a médiem nevznikly vzduchové bubliny. Naočkované misky se obrátí dnem vzhůru a vloží se do termostatu. V termostatu se miska inkubuje při 36 (\pm 0,5) °C po dobu 21 (\pm 3) hodin.

Ihned po provedení inkubace se provede odečet narostlých kolonií termotolerantních koliformních bakterií. Pro stanovení jsou počítány laktosa pozitivní, tj. modře zbarvené kmeny. Výsledky se udávají jako KTJ (kolonie tvořící jednotka) na 100 ml vzorku.

4 Výsledky

4.1 Koliformní bakterie

Tabulky byly zpracovány z údajů poskytnutých laboratoří pitných vod ČOV Hradec Králové. V následující tabulce 3 je uveden výskyt koliformních bakterií nalezených ve vzorcích pitné vody v Královéhradeckém kraji pomocí metody ČSN EN ISO 9308-1. Data byla sbírána od ledna do prosince roku 2016. Jeden vzorek vzniká přefiltrováním 100 ml pitné vody. Z celkových výsledků za rok 2016 můžeme pozorovat velmi vysoký rozdíl záchytu koliformních bakterií a *E. coli* mezi zdroji pitných vod a soukromými studnami. Výskyt bakterií v soukromých studnách mnohonásobně převyšuje výskyt ve zdrojích pitné vody.

Tabulka 3: Výskyt koliformních bakterií ve vzorcích pitné vody za rok 2016

Původ vzorku	Počet vzorků	Celkový počet KTJ	Průměrný výskyt KTJ/1 vzorek
Veřejné zdroje pitné vody	171	58	0,339
Soukromé studny	88	6 710	73,796

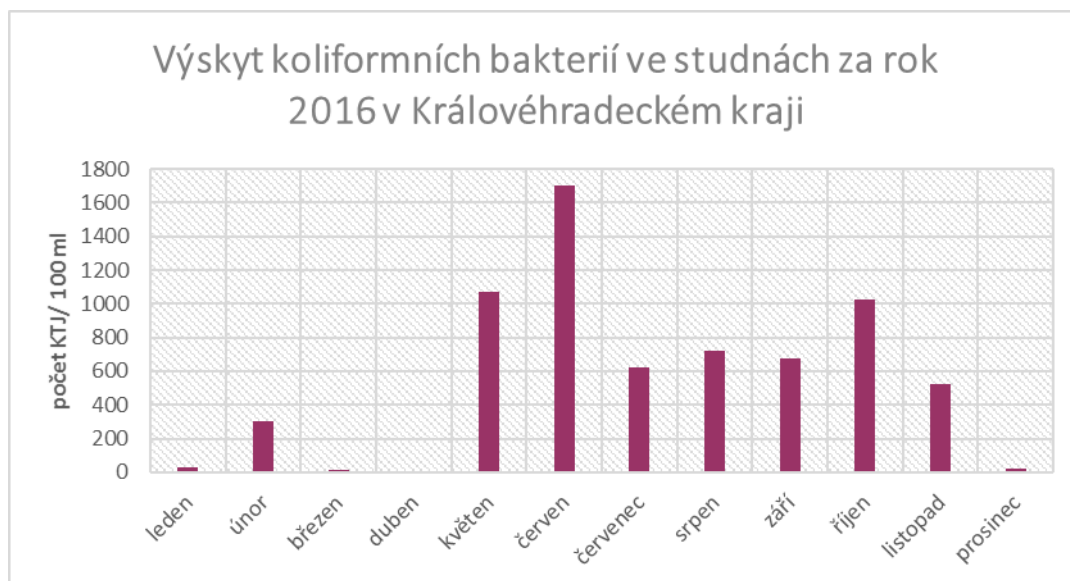
Výskyt koliformních bakterií ve vzorcích pitné vody ze studen v jednotlivých měsících za rok 2016 v Královéhradeckém kraji pomocí metody ČSN EN ISO 9308-1 je zpracován v tabulce 4. Metoda využívá jako média laktózoový TTC agar s tergitolem. Množství vzorků pitné vody ze studen se v jednotlivých měsících liší, neboť o vyšetření žádají soukromí vlastníci podle jejich potřeby. Nejvyšší počet vzorků byl testován v červnu. V zimních a jarních měsících je počet vzorků nižší.

Tabulka 4: Výskyt koliformních bakterií v pitné vodě ze studen za rok 2016

Měsíc	Počet vzorků - studny	Celkový počet KTJ	Průměrný výskyt KTJ na 1 vzorek
Leden	6	26	4,33
Únor	2	306	153
Březen	7	16	2,28
Duben	3	5	1,66
Květen	9	1069	118,77
Červen	20	1700	85
Červenec	8	624	78
Srpen	5	721	144,2
Září	9	675	75
Říjen	12	1024	85,33
Listopad	4	520	130

Prosinec	3	24	8
celkem:	88	6710	73,796

Z tabulky 4 je vytvořen graf 1, kde je výskyt bakterií přehledně znázorněn. Můžeme vidět nárůst výskytu bakterií s koncem jarního a začátkem letního období, pak dochází ke stagnaci až mírnému poklesu s výjimkou října, kdy je nárůst srovnatelný s květnem. Vysoké naměřené hodnoty způsobují především vzorky, kde je zachyceno více než 300 KTJ.



Graf 1: Výskyt koliformních bakterií ve studnách za rok 2016

V tabulce 5 je zobrazen výskyt koliformních bakterií stanovených ve vzorcích pitné vody ze studen v jednotlivých měsících za rok 2017 v Královéhradeckém kraji pomocí metody ČSN EN 75 7835. Metoda se provádí na endo agaru, který je určen pro nedesinfikované vody.

Tabulka 5: Výskyt koliformních bakterií ve vzorcích pitné vody ze studen za rok 2017

Měsíc	Počet vzorků - studny	Celkový počet KTJ	Průměrný výskyt KTJ na 1 vzorek
Leden	4	20	5
Únor	4	430	107,5
Březen	8	18	2,25
Duben	2	0	0

4.2 *Escherichia coli*

Výskyt *E. coli* ve vzorcích pitné vody za rok 2016 v Královéhradeckém kraji pomocí metody ČSN EN ISO 9308-1 je zpracován v tabulce 6. Záchyt *E. coli* ve vzorcích pocházejících ze zdrojů pitných vod je téměř nulový, ovšem ve vzorcích pocházejících ze studen je výskyt vyšší.

Tabulka 6: Výskyt *E. coli* ve vzorcích pitné vody za rok 2016

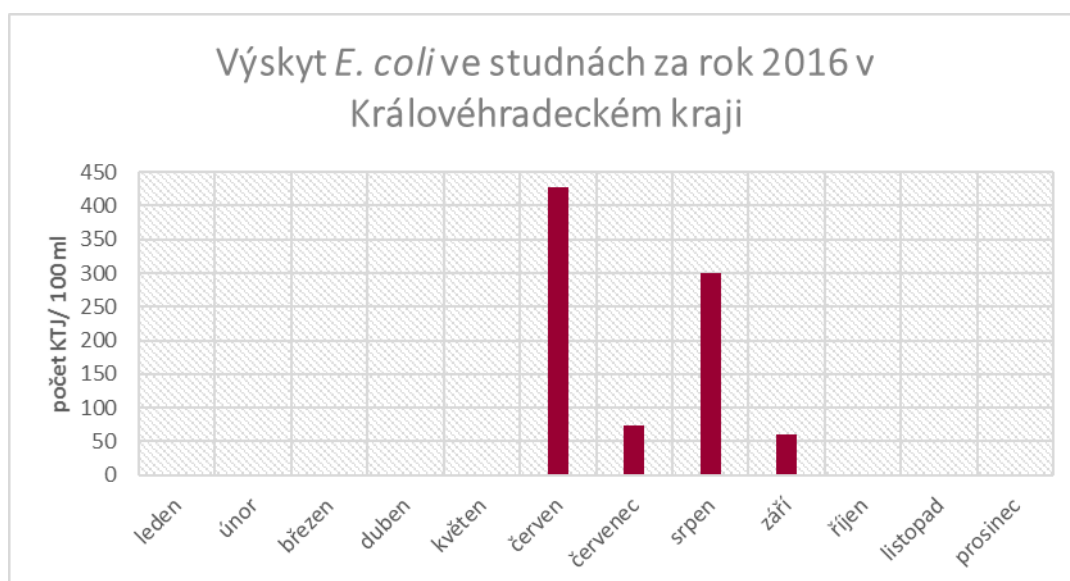
Původ vzorku	Počet vzorků	Celkový počet KTJ	Průměrný výskyt KTJ na 1 vzorek
Veřejné zdroje pitné vody	171	7	0,041
Soukromé studny	27	864	32,00

V tabulce 7 je zpracován výskyt *E. coli* ve vzorcích pitné vody ze studen v jednotlivých měsících za rok 2016 v Královéhradeckém kraji pomocí metody ČSN EN ISO 9308-1. Jako médium se využíval m-FC agar. V časovém období od února do května se u vzorků prováděly pouze testy na přítomnost koliformních bakterií, proto nejsou k danému období žádná data.

Tabulka 7: Výskyt *E. coli* ve vzorcích pitné vody ze studen za rok 2016

Měsíc	Počet vzorků - studny	Celkový počet KTJ	Průměrný výskyt KTJ/1 vzorek
Leden	1	0	0
Únor	-	-	-
Březen	-	-	-
Duben	-	-	-
Květen	-	-	-
Červen	10	428	42,8
Červenec	1	74	74
Srpen	2	300	150
Září	4	60	15
Říjen	5	0	0
Listopad	2	0	0
Prosinec	2	2	1
celkem:	27	864	32

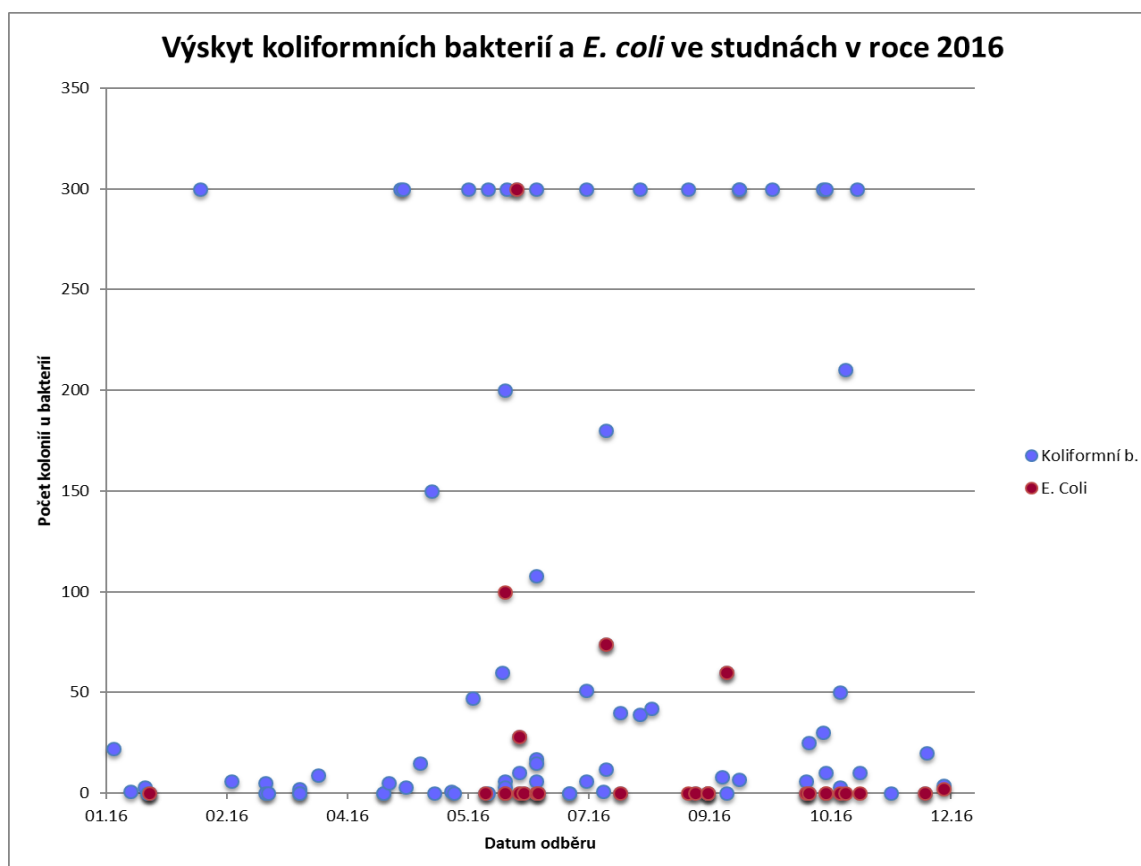
Z tabulky 7 je dále zpracován graf 2, kde je vidět výskyt *E. coli* v letních měsících a září. Stejně jako u koliformních bakterií je pozorován nárůst v červnu následovaný kolísavým výskytem a poklesem se začínajícím ochlazováním v podzimním období.



Graf 2: Výskyt *E. coli* ve studnách za rok 2016

4.3 Porovnání mezi výskytem koliformních bakterií a *E. coli*

Za jednotlivé měsíce v roce 2016 v Královéhradeckém kraji byla naměřena data, která jsou zobrazena v grafu 3. Výskyt koliformních bakterií několikanásobně převyšuje výskyt *E. coli*. V grafu 3 můžeme vidět, že výskyt *E. coli* byl nejvyšší v časovém intervalu od června do září, Koliformní bakterie, které jsou méně náročné než *E. coli*, se vyskytují až do listopadu a v menším množství se mohou objevovat i v jarním období.



Graf 3: Porovnání výskytu koliformních bakterií a *E. coli* ve studnách za rok 2016

5 Diskuze

Častou příčinou pozitivních nálezů bakterií ve zdrojích pitné vody mohou být vnější vlivy či materiálové selhání (např. vysoká míra srážek, opotřebení materiálu apod.). Pouze jeden zdroj je možné považovat za problémový a to z důvodu opakovaných nálezů koliformních bakterií (52 z 58 výskytů koliformních bakterií je právě z tohoto zdroje a veškeré záchyty *Escherichia coli* z pitných zdrojů též). Distribuovaná voda z pitných zdrojů je při rozvodu do potrubních sítí v té nejvyšší kvalitě čistoty a nezávadnosti. Dalším možným zdrojem mikrobiálního znečištění mohou být některé vodovodní trubky a kohoutkové baterie, které jsou velmi vhodným místem pro některé druhy bakterií. Proto se během roku provádí i kontroly pitné vody v domácnostech a dalších objektech (pošty, úřady, školy...), aby byla monitorována funkčnost potrubních rozvodů vody a byla jistota, že ke spotřebiteli se dostane kvalitní a čistá pitná voda. Kontroly probíhají podle určených rozvrhů a pokrývají různé lokace, aby bylo monitorováno rozdělení konečných míst distribuce rozvodů a potrubních sítí.

U studen je větší míra nálezů bakterií, protože soukromé osoby obvykle nemají studny vysoce hygienicky ošetřené. Problémy mohou být spojeny s nevhodným umístěním studen (v blízkosti splachů z pole, apod.), dále může být problém ve stavbě studny, kdy je zvolen nevhodný materiál a může docházet k vysoké propustnosti látek skrz stěny studny. Staré studny též mohou být opotřebené a popraskané, což může způsobit průsak látek z okolí do vody ve studni. Vysoký rozdíl ve výskytu mikrobiálních organismů bývá též v závislosti na hloubce studny. Zpravidla platí, že čím hlubší studna, tím méně kyslíku a též mikrobiálního znečištění. Proto mají hluboké studny výhodu kvalitnější a čistější vody. Výsledné hodnoty mohou být také zkresleny nesprávným odebráním vzorku vody. Většina vlastníků studen však nekontroluje kvalitu vody více, než je pro ně nutné. Začínají projevovat vlastní iniciativu až poté, co se objeví s vodou ze studně pozorovatelné problémy (např. zákal, zápach, špatná chuť).

Pravidelné kontroly vodních zdrojů a vody z veřejných vodovodů usnadňují získání většího přehledu o čistotě vody a tím snazší je, v případě potřeby, zasáhnout a vodu upravit a potřebně ošetřit. Je ovšem nutné znát podrobnosti o zdrojích vody a podmínkách, při kterých byl odběr uskutečněn. V případě, že byl odběr uskutečněn po přívalovém dešti a je zároveň známo, že zdroj je náchylný ke zhoršení v těchto podmínkách, není nutné reakce přehánět a vyvolávat krizové stavy. Abychom situaci správně vyhodnotili, musíme mít celkový přehled o problematice tohoto tématu.

Při využívání povrchové vody je nutná větší úprava vody, než když je využívána voda podzemní. Podzemních zdrojů je ovšem mnohem méně než zdrojů povrchových, což vyžaduje vyšší nároky na technologii úpravy vody. U povrchových zdrojů je větší možnost kontaminace vody látkami z okolí a musí se dbát na jejich odstranění. Z mikrobiologického hlediska je podle WHO chlór účinným prostředkem proti koliformním bakteriím. Je to jednoduchý a účinný způsob čištění vod, ovšem mohou se vyskytovat i škodlivé dopady dlouhodobého používání chlorované vody. Existují studie o problematice chlorované vody spojené např. s výskytem rakoviny. V porovnání s tím, kolik infekčních nemocí by se šířilo bez použití chloru, jsou ovšem tato rizika zanedbatelná.

Na grafu 1 *Výskyt koliformních bakterií ve studnách za rok 2016 v Královéhradeckém kraji* pomocí metody ČSN EN ISO 9308-1 využívající laktózový agar s tergitolem je vidět, že v květnu začíná záchyt koliformních bakterií ve vzorcích výrazně narůstat. Vysoké hodnoty zůstávají naměřeny po celé léto a také podzim. V únoru je větší výskyt způsoben jedním vzorkem s více

než 300 KTJ koliformních bakterií, který velmi ovlivnil celkový výskyt za daný měsíc. Vzorky s více než 300 KTJ koliformních bakterií se objevují i v měsících letních a podzimních. Tyto záchyty jsou v letních měsících častější a mají výrazný vliv na celkovou hodnotu výskytu KTJ koliformních bakterií v pitných vodách. Výskyt celkových koliformních bakterií ve vodách je mnohem vyšší, než výskyty bakterií *E. coli*, neboť jsou některé další druhy z čeledi *Enterobacteriaceae* méně náročné na teplotu. Některé druhy koliformních bakterií se vyskytují běžně v prostředí a nejsou pouze součástí střevního traktu, což je vhodné k určování obecného mikrobiálního znečištění. Např. některé druhy rodu *Klebsiella* se běžně vyskytují na rostlinách a kůře stromů. *E. coli* a termotolerantní bakterie jsou proto vhodnější jako ukazatele fekálního znečištění.

Nepřesnosti v měření mohou být způsobeny chybou v odečítání KTJ ze vzorku, nedostatečným protřepáním vzorkovnice, nebo nevhodným odebráním vzorku. K zabránění nepřesností způsobených kontaminovanými médii by díky zkouškám půd nemělo docházet.

Na výskyty bakterií ve vodách mají vliv vnější podmínky jako teplota, srážky, pH vody apod. Proto se mohou během roku objevovat výskyty v závislosti na těchto okolnostech. Menší výskyty se dají očekávat v chladných a suchých obdobích. Naopak se mohou během chladnějších období objevovat vzorky s vyššími hodnotami výskytu KTJ způsobené vysokým podílem srážek, nebo rychlým táním sněhu. To by mohlo vysvětlovat vzorek s vysokým výskytem koliformních bakterií z února 2016, pokud by nebyla na vině nezabezpečení studny nebo jiný faktor.

U vzorků odebraných v letošním roce byla použita metoda s endo agarem, protože nová metoda ČSN EN ISO 9308-1 (2015) s chromogenním agarem zachycovala větší množství KTJ koliformních bakterií a mohlo dojít k přerůstání celého vzorku. Metoda využívající endo agar se běžně používá pro nedesinfikované vody, kde jsou vyšší záchyty bakterií očekávané. Metoda s endo agarem není náročnější, než metoda využívající jako média laktózosový TTC agar s tergitolem a z časového hlediska ani z hlediska postupu se žádné změny při zpracování vzorku nedějí.

Postup přípravy vzorku je u obou metod téměř stejný, liší se pouze z hlediska použitého kultivačního média (ČSN EN ISO 9308-1 (2015) využívá CCA agar/ dříve ČSN EN ISO 9308-1 využívala laktózosový TTC agar s tergitolem). Na misky s kultivačním médiem se píše pouze číslo vzorku, žádné jiné označení, které by rozlišovalo metody, se nepoužívá. Důležité je řádné protřepání vzorkovnice, aby se potřebných 100 ml pitné vody skládalo z neusazené vody. S membránovým filtrem je nutné pracovat rychle, aby se pod ním nevytvořily bubliny, ale zároveň opatrně, aby nedošlo k roztržení filtru při sundávání z filtračního aparátu. Naočkované misky se u obou metod obrátí dnem vzhůru a v termostatu se miska inkubuje při 36 (± 2)°C po dobu 21 (± 3) hodin. Teplota i čas se nemění. K rozlišení toho, která metoda byla použita, se může uvádět poznámka do Labsystému, kam se zapisují výsledky odečítání vzorků.

Baudišová (2014) udává, že záchyty pomocí metody ČSN EN ISO 9308-1 (2015) s chromogenním agarem jsou vyšší a není vhodné metody z tohoto hlediska porovnávat. V laboratoři pitných vod ČOV Hradec Králové provedli některá měření záchyťů a výsledky jim též ukázaly větší záchyty u nové metody. Výsledky z těchto měření ovšem nebyly k dispozici.

U zdrojů pitných vod, kdy jsou hodnoty nulové téměř pro všechny vzorky, není v použití různých metod velký rozdíl. Pokud se ovšem najde vzorek s výskytem bakterií, má metoda s chromogenním agarem některé výhody.

Výhodou metody s chromogenním agarem je vyšší citlivost, i když u vzorků ze studen to znamená nutnost využívání endo agaru. Oproti metodě laktózového TTC média s tergitolem je další výhodou možnost provádění oxidázového testu přímo na filtru, což znamená, že je tento způsob rychlejší a také přesnější. Není nutné přeočkování na neselektivní agar. Tím se snižuje i riziko nepřesností spojené s počítáním kolonie tvořících jednotek.

Jako nevýhodu nové metody ČSN EN ISO 9308-1 (2015) s chromogenním agarem můžeme uvést to, že je její cena vyšší. Existuje řada výrobců připravených agarů, což může způsobit velkou variabilitu produktů. K objektivnímu porovnání zkoumaných vzorků by se ovšem vždy měly používat výrobky od stejné firmy.

Výskyty *Escherichia coli* a termotolerantních koliformních bakterií, které jsou přesnějším indikátorem fekálního znečištění, jsou proti výskytu celkových koliformních bakterií mnohem menší. Jelikož je *E. coli* zástupcem koliformních bakterií, její výskyt být větší nikdy nemůže. Což ukazuje menší riziko fekálního znečištění, než je riziko obecného mikrobiálního znečištění. Pro měření výskytu *E. coli* a termotolerantních koliformních bakterií se využívá jako média m-FC agaru.

Ve studnách bylo za rok 2016 zachyceno 864 KTJ *Escherichia coli* oproti celkovému počtu koliformních bakterií 6710 KTJ. Průměrný výskyt na vzorek ze studny tedy vychází 32 KTJ *Escherichia coli* a 76,25 KTJ celkových koliformních bakterií. To znamená, že téměř necelá polovina z celkových koliformních bakterií byla identifikována jako *E. coli*.

Ve zdrojích pitné vody ve stejném roce bylo zachyceno 7 KTJ *Escherichia coli* a 58 KTJ celkových koliformních bakterií. To je v přepočtu 0,041 KTJ *Escherichia coli* a 0,339 KTJ koliformních bakterií na jeden vzorek, což představuje asi jednu osminu celkových koliformních bakterií. Z těchto naměřených dat nelze vytvořit graf o výskytu *E. coli* v průběhu roku, neboť různé zdroje jsou měřeny v různých měsících. Výskyt *E. coli* se objevuje především u jednoho problémového zdroje a naměřené nenulové hodnoty jsou tedy z měsíců, kdy byl monitorován právě tento zdroj. Z toho lze soudit, že zdroje pitných vod jsou velmi dobře zabezpečené proti nebezpečí fekálního znečištění. Nebezpečí vzniká při náhlých zhoršených podmínkách a stavebních či jiných nehodách. Při těchto nebezpečích se dá ovšem zasáhnout až po nehodě a předchozí pravidelné monitorování nemůže takovéto situace ovlivnit.

Escherichia coli se na rozdíl od některých jiných rodů a druhů z čeledi *Enterobacteriaceae* nedokáže ve vodě rozmnožovat. Je obligátním obyvatelům střevního traktu a její výskyt je tedy přímým důkazem fekálního znečištění. To je také důvodem, proč jsou její hodnoty nižší než celkové počty koliformních bakterií v pitných vodách. Optimální podmínky pro růst *E. coli* vyžadují vyšší teploty, které se ve vodě běžně nedosahují. Ovšem v letních měsících, kdy se teploty zvyšují, a také na podzim, kdy ještě oteplení přetrvává, se může objevovat více záchtů *E. coli* ve vzorcích. To tvrdí o výskytu bakterií ve vodách i Gray (2008). Ovšem ani při potvrzeném výskytu *E. coli* ve vzorku to neznámá, že se jistě jedná o patogenní druh. Stejně je ale nutné při nálezů bakterií učinit opatření k nápravě čistoty vody.

V mnoha publikacích se zabývají otázkou, zda je vhodné používat celkové koliformní bakterie jako vhodný indikátor fekálního znečištění. Většina prací se shoduje, že koliformní bakterie jsou spíše znakem obecného znečištění, protože někteří zástupci se vyskytují běžně v prostředí (např. některé druhy bakterií rodu *Klebsiella*, *Serratia* či *Proteus*) a nejsou obyvateli střevního traktu. Proto je přesnější pro mapování výskytu fekálního znečištění zaměřením na výskyt *E. coli*, která je primárním obyvatelům střevního traktu a je tedy jasným ukazatelem fekálního znečištění.

S vysokou rezistencí bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* k antimikrobiálním látkám je nutné vymýšlet nové druhy antibiotik, které jsou schopny nastolit úspěšnou léčbu a zastavit negativní účinky patogenních bakterií. Na rezistenci mnoha různých zástupců bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* se neustále provádí nové studie a sleduje se účinnost jednotlivých antimikrobiálních látek na jejich životnost. Některé antimikrobiální látky jsou schopné bakterie usmrtit a jiné zastavit jejich rozmnožování. Účinek antimikrobiálních látek je ovšem někdy vysoce specifický a má vliv pouze na určitý druh bakterie, nikoliv na celý rod.

Otázka bakteriálního znečištění vody se týká především méně rozvinutých zemí, ovšem je nutné mít kvalitu ošetření vod pod kontrolou i v zemích vyspělejších. Čištěním vody, které představuje prevenci, se dá zabránit rozšíření mnoha infekčních onemocnění. Touto prevencí se dá předejít tomu, aby se rozšířily epidemie, které by jinak vyžadovaly složitou následnou léčbu.

Významným nebezpečím způsobovaným bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae* ve vyspělých zemích je riziko nozokomiálních nákaz – tzn. nákazy vznikající v nemocničním prostředí. Vyšší podíl nákaz se vyskytuje především v nemocničních odděleních, jako jsou např. oddělení intenzivní péče. Další nezanedbatelnou složkou, kde může dojít ke vzniku nozokomiálních nákaz, jsou pečovatelská zařízení. Nebezpečí nakažení bakteriálními infekcemi může mít i další jiné způsoby přenosu – jako např. infikované potraviny, nebo dotyk nakažené osoby. Tyto způsoby přenosu se ve vyspělých zemích vyskytují častěji, než je nakažení způsobené kontaminovanou vodou.

Včasným a správným ošetřením vody by mělo riziko nákaz způsobených požitím vody téměř vymizet. U našich zdrojů pitných vod je toto nebezpečí téměř nulové, potenciální hrozbou mohou být spíše nesprávně ošetřované studny a nečekané havárie.

6 Závěr

Teoretická část práce vytváří přehled o základní problematice spojené s koliformními bakteriemi, jejich významem z hlediska patogenity a s tím spojeným monitorováním těchto bakterií ve vodách. Důležitou stránkou, kvůli které je nutné se těmito bakteriemi zabývat, je vysoká odolnost některých druhů vůči antibiotikům.

Z poskytnutých výsledků s výskytem koliformních bakterií v roce 2016 pomocí metody ČSN EN ISO 9308-1 je možné říci, že naměřené hodnoty u zdrojů pitných vod a veřejných vodovodů jsou téměř nulové (0,339 KTJ na 1 vzorek) a pozitivní nálezy jsou často spojeny s náhlými vnějšími vlivy (např. vysoká míra srážek, havárie apod.). Téměř všechny nálezy jsou z jednoho zdroje. Výskyt koliformních bakterií v soukromých studnách je naopak velmi vysoký (73,796 KTJ na 1 vzorek). Často jsou testovány vzorky studen s výskytem vyšším než 300 KTJ na 100 ml.

Podle grafů lze soudit, že roční období má na výskyt bakterií značný vliv a s oteplováním na jaře a v letním období vzrůstá i počet bakterií, který je pozorován u celkových koliformních bakterií až do podzimu. Výskyt *E. coli* je zaznamenán pouze v letních měsících.

Nová metoda ČSN EN ISO 9308-1 (2015), která je platná od letošního roku, je citlivější a vykazuje větší množství záchytu koliformních bakterií, což ve své práci potvrzuje i Baudišová (2016). U zdrojů pitné vody a veřejných vodovodů, ve kterých hodnoty bakterií převážně splňují limit 0 KTJ na 100 ml, není změna citlivosti. Naopak u studen není vždy vhodné využívat tuto metodu, a proto v laboratoři pro testování studen využívají metodu s endo agarem podle doporučení ČSN EN 75 7837. Z hlediska provedení a kultivace není mezi metodou využívající laktózového média s tergitolem a metody s chromogenním agarem významný rozdíl. Výhodou chromogenního agaru je možnost provádění oxidázového testu přímo na filtru.

Pravidelné kontroly vodních zdrojů a vody z veřejných vodovodů usnadňují, v případě potřeby, zasáhnout a vodu upravit a potřebně ošetřit. Je nutné znát podrobnosti o zdrojích vody a podmínkách, při kterých byl odběr uskutečněn. V případě, že byl odběr uskutečněn po přivalovém dešti a je zároveň známo, že zdroj je náchylný ke zhoršení v těchto podmínkách, není nutné reakce přehánět a vyvolávat krizové stavy. Abychom situaci správně vyhodnotili, musíme mít celkový přehled o problematice tohoto tématu.

Vodu lze ošetřit pomocí chlóru a tím zamezit rozšíření bakterií a možných následných bakteriálních nákaz. Tímto jednoduchým antimikrobiálním zabezpečením čistoty vody se lze vyhnout hromadným epidemiím, které mohou být způsobeny právě z řad zástupců koliformních bakterií.

Otázkou zůstává důležitost měření koliformních bakterií, které jsou vhodné spíše jako ukazatele obecného mikrobiálního znečištění. Ke zjištění fekálního znečištění je přesnější metodou testování výskytu *E. coli* a termotolerantních koliformních bakterií. A to z toho důvodu, že je *E. coli* obligátním obyvatelům střevního traktu, běžně se v jiném prostředí nenachází a ve vodě se nedokáže rozmnožovat.

I přes nízký výskyt koliformních bakterií ve zdrojích pitných vod a veřejných rozvodech vod, by neměla být opomíjena hrozba nákazy infekčních onemocnění z dalších zdrojů, které představují např. nemocniční oddělení a pečovatelské služby.

7 Literatura

- Ambrožová Říhová, J. (2008): Mikrobiologie v technologii vod. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 252 str.
- Ambrožová, J. (2004): Mikrobiologie v technologii vod. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 244 str.
- Baudišová, D. (2013): Metody stanovení *Escherichia coli* a intestinálních enterokoků v koupacích vodách. VTEI, roč. 55, č. 1, str. 5-7, příloha Vodního hospodářství č. 2/2013
- Baudišová, D. (2007): Současné metody mikrobiologického rozboru vody. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, 104 str.
- Baudišová, D. (2016): Stanovení koliformních bakterií a *Escherichia coli* na chromogenním médiu. Praha: VÚV T.G. Masaryka, VTEI, roč. 58, č. 1, str. 16-19
- Baudišová, D. & Mlejnková, H. (2009): Mikrobiální znečištění povrchových vod – mikrobiologické ukazatele. Vodní hospodářství, č. 3, str. 101
- Bednář, M. (1996): Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil, 558 str.
- Brisse, S., Grimont, F. & Grimont, P. A. D. (2006): *The Genus Klebsiella*. Prokaryotes 6: str. 159–196
- Bursová, Š., Dušková, M. & Necidová L. (2014): Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Obecná mikrobiologie. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 80 str.
- Bursová, Š., Karpíšková, R., Dušková, M. & Necidová L. (2014): Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I. Obecná mikrobiologie. Revidované vydání, Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 72 str.
- Climaco, A. (2017): *Serratia*. [online]. [cit. 08. 06. 2017]. (dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/228495-overview#a5>)
- ČSN EN ISO 9308-1. Kvalita vod - Stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií - Část 1: Metoda membránových filtrů pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry, 2015.
- ČSN EN ISO 11133. Mikrobiologie potravin, krmiv a vody - Příprava, uchovávání a zkoušení výkonnosti kultivačních půd, 2015.
- ČSN EN 75 7835. Jakost vod - Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*, 2009.
- ČSN EN 75 7837. Jakost vod - Stanovení koliformních bakterií v nedesinfikovaných vodách, 2010.
- Davies J. & Davies D. (2010): *Origins and evolution of antibiotic resistance*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74: str. 417-433.
- Davin-Regli, A. & Pagés, J-M. (2015): *Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment*. Front Microbiol. 6: str. 392.

- Devarajan, N., Laffite, A., Graham, N. D., Meijer, M., Prabakar, K., Mubedi, J. I., Elongo, V., Mpiana P. T., Ibelings, B. W., Wildi, W. & Poté, J. (2015): *Accumulation of clinically relevant antibiotic-resistance genes, bacterial load, and metals in freshwater lake sediments in Central Europe*. Environ. Sci. Technol. 49: 6528–37.
- Edberg, S. C., Rice, E. W., Karlin, R. J. & Allen, M. J. (2000): *Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection*. Journal of Applied Microbiology, volume 88, issue 1, str. 106-116.
- Ekperigin, H. E. & Nagaraja, K. V. (1998): *Salmonella*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 14(1) str. 17-29
- Göpfertová, D., Pazidora, P. & Dáňová, J. (2006): *Epidemiologie infekčních nemocí*. Praha: Karolinum, 299 str.
- Gray, N. F. (2008): *Drinking water quality, problems and solutions*. second edition, England: Cambridge University Press, 538 str.
- Greenwood, D. & kol. (1999): *Lékařská mikrobiologie. Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vydání, Praha: Grada, 690 str.
- Gruber, J. S., Ercumen, A. & Colford, J. M., Jr.(2014): *Coliform Bacteria as Indicators of Diarrheal Risk in Household Drinking Water: Systematic Review and Meta-Analysis*. Plos one. 9(9): e107429. (dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4175079/>)
- Guidelines for Drinking-water Quality (Doporučení pro kvalitu pitné vody)*, 4. vydání, Díl 1 – Recommendation. Vydala WHO, Ženeva 2011.
- Harbarth, S., Balkhy, H. H., Goossens, H., Jarlier, V., Kluytmans, J., Laxminarayan, R., Saam, M., Belkum, A. V. & Pittet, D. (2015): *Antimicrobial resistance: one world, one fight!* Antimicrob. Resist. Infect. Control 4: str. 49-64.
- Hart, C. A. (1993): *Klebsiellae and neonates*. J. Hosp. Infect. 23(2): str. 83–86
- Häsler, J. (1995): *Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vod. Díl III. Stanovení mikrobiologických ukazatelů*. Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky, 408 str.
- Hrabák, J., Vaniš, V., Bergerová, T., & Urbášková, P. (2008): *Průkaz beta-laktamáz širokého spektra (ESBL) a typu AmpC u enterobakterií. SZÚ*. (dostupné z: <http://www.szu.cz/prukaz-beta-laktamaz-sirokeho-spektra-esbl-a-typu-ampc-u>)
- Hubáček, J., Bezděk, M. & Janeček, J. (1992): *Vybrané kapitoly z molekulární genetiky mikroorganismů*. 1. vydání. Praha: Academia, 253 str.
- Julák, J. (2006): *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vydání, Praha: Karolinum, 404 str.
- Klaban, V. (2001): *Svět mikrobů*. 2. vydání, Hradec Králové: Gaudeamus, 416 str.
- Klaban, V. (2005): *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén, 654 str.
- Klaban, V. (2011): *Ekologie mikroorganismů - ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů*. 1. vydání, Praha: Galén, 549 str.
- Knirel, Y. A., Kocharova, N. A., Bystrova, O. V., Katzenellenbogen, E., & Gamian, A. (2002): *Structures and serology of the O-specific polysaccharides of bacteria of the genus Citrobacter*.

- Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis, 50, str. 379-391. (dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/8e2a/227dec324cd20e0e96cc5e82f47683633e23.pdf>)
- Kožíšek, F., Kos, J. & Pumann, P. (2006): Hygienické minimum pro pracovníky ve vodárenství. Praha: Sovak, 80 str.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T. & Monnet, D. L. (2012): *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. Clinical Microbiology and Infection, volume 18, issue 3, str. 268-281.
- Maroncle, N., D. Balestrino, C. Rich, & Forestier, C. (2002): *Identification of Klebsiella pneumoniae genes involved in intestinal colonization and adhesion using signature-tagged mutagenesis*. Infect. Immun. 70(8): str. 4729–4734.
- Mezzatesta, M. L., Gona, F. & Stefani, S. (2012): *Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance*. Future Microbiol. 7: str. 887–902
- Paterson, D. L. (2006): *Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae*. Am. J. Med. 119: str. 20-28. (dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735147>)
- Podstatová, H. (2009): Základy epidemiologie a hygieny. 1. vydání, Praha: Galén, Karolinum, 158 str.
- Podschn, R., Acktun, H., Okpara, J., Linderkamp, O., Ullmann, U. & Borneff-Lipp, M. (1998): *Isolation of Klebsiella planticola from Newborns in a Neonatal Ward*. J Clin Microbiol. 36(8): str. 2331–2332. (dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC105041/>)
- Ryan, K. J. & Ray, C. G. (2004): *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious diseases*. 4th ed. USA: McGraw-Hill, 979 str.
- Schindler, J. (2014): Mikrobiologie pro studenty zdravotnických studií. 2. vydání, Praha: Grada, 248 str.
- Schroeder, G. N. & Hibli, H. (2008): *Molecular Pathogenesis of Shigella spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion*. Clin. Microbiol. Rev. 21(1): str. 134-156
- Strom, M. S. & Paranjpye R. N. (2000): *Epidemiology and pathogenesis of Vibrio vulnificus*. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Microbes and Infection, 2: str. 177–188
- Tlapák, V., Šálek, V. & Legát, V. (1992): Voda v zemědělské krajině. Praha: Nakladatelství Brázda, 318 str.
- Votava, M. (2003): Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vydání, Brno: Neptun, 495 str.
- Votava, M. (2005): Lékařská mikrobiologie obecná. 2. vydání, Brno: Neptun, 351 str.

8 Přílohy

Příloha 8. 1 : Fotografický postup metody membránové filtrace



Obrázek 7: Aparatura pro membránovou filtraci



Obrázek 8: Sterilizace porézního disku spodní části filtračního aparátu pomocí horkovzdušné pistole.



Obrázek 9: Sterilní membránový filtr se za okraj přenesse ožehnutou pinzetou na porézni disk mřížkovanou stranou vzhůru.



Obrázek 10: Dezinfekce části filtračního aparátu vatou namočenou do lihu a poté pomocí horkovzdušné pistole.



Obrázek 11: Na spodní část aparátu se připraví sterilní nálevka a zavře se kohoutek na aparátu.



Obrázek 12: Okraj hrdla vzorkovnice se ožehne nad horkovzdušnou pistolí. (Vzorkovnice musí být předem vytemperovaná a protřepaná.)



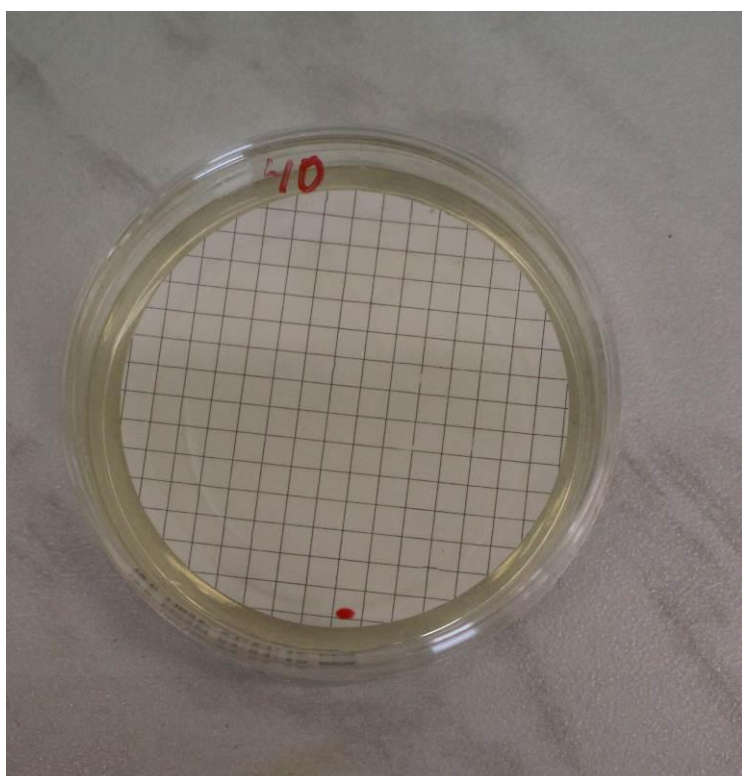
Obrázek 13: Do nálevky se nalije vzorek o objemu 100 ml (po rysku nálevky).



Obrázek 14: Kohoutek u nálevky se otevře a vzorek se nechá pomalu protéct a přefiltrovat přes membránový filtr. Poté se kohoutek ihned uzavře.



Obrázek 15: Pomocí pinzety se filtr přenese na povrch kultivačního média tak, aby mezi filtrem a médiem nevznikly vzduchové bubliny.



Obrázek 16: Naočkované misky se obrátí dnem vzhůru a vloží se do termostatu. V termostatu se miska inkubuje při dané teplotě po dobu 21 (\pm 3) hodin.

Příloha 8. 2: Seznam použitých obrázků

Obrázek 1: Stavba gramnegativní buněčné stěny podle Kaisera - upraveno
(zdroj: <http://www.sci.muni.cz/ptacek/CYTOLOGIE6.htm>)

Obrázek 2: Obarvený preparát gramnegativních bakterií
(foto: autor)

Obrázek 3: Antigenní struktura *E. coli* podle Ryana
(zdroj: http://lalashan.mcmaster.ca/theobio/projects/images/c/c0/An_Introduction_to_Infectious_Diseases.pdf)

Obrázek 4: Schéma rozdělení čeledi *Enterobacteriaceae* podle Ambrožové (2008) - upraveno

Obrázek 5: Narostlé kolonie *E. coli* a doprovodné mikroflory na chromogenním agaru
(foto: autor)

Obrázek 6: Možné způsoby šíření bakterií rezistentních k antibiotikům
(Harbarth et al., 2015) - upraveno