

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická

**Izolace mikroorganismů z vod a testování jejich citlivosti na
vybrané chemické látky**

Bc. Tereza Bekerová

Diplomová práce

2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Bekerová**
Osobní číslo: **C15609**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Izolace mikroorganismů z vod a testování jejich citlivosti na vybrané chemické látky**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na možnosti izolace mikroorganismů z vod. Pro vybrané organismy dále zpracujte rešerši týkající se testování jejich citlivosti na vybrané chemické látky.
2. Zpracujte vzorky reálných vod, izolujte a identifikujte v nich bakteriální kmeny mikroorganismů.
3. Z identifikovaných kmenů vytipujte vhodné kandidáty a následně na nich otestujte jejich citlivost na vybrané chemické látky.
4. Výsledky práce kriticky zhodnoťte.
5. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí Upa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Petra Mořková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

Ing. Iveta Brožková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

28. listopadu 2016

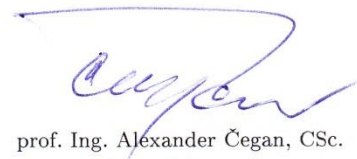
Termín odevzdání diplomové práce:

12. května 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2. 5. 2017

.....

Tereza Bekerová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat Ing. Petře Mořkové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Další poděkování patří doc. MUDr. Renátě Karpíškové, Ph.D. a Mgr. Tereze Gelbíčové, Ph.D. z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně za identifikaci izolovaných bakterií pomocí MALDI–TOF MS. V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli za veškerou podporu při studiu.

ANOTACE

Diplomová práce byla zaměřena na mikrobiologický rozbor různých vzorků vod, u kterých se stanovovaly indikátory fekálního znečištění (termotolerantní koliformní bakterie, *E. coli*, intestinální enterokoky), dále patogenní a podmíněně patogenní bakterie jako jsou salmonely, kampylobakteri, yersinie, aeromonády a pseudomonády. Konečná identifikace bakteriálních kmenů proběhla pomocí identifikačních souprav MIKROLATEST[®], případně s využitím systému BIOLOG a MALDI–TOF MS. U vybraných bakteriálních kmenů byla testována jejich citlivost na antibiotika pomocí diskové difúzní metody.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrobiologický rozbor vod, indikátory fekálního znečištění, patogenní a podmíněně patogenní bakterie, citlivost na antimikrobiální látky

TITLE

Isolation of microorganisms from waters and testing of their sensitivity to selected chemicals

ANNOTATION

The diploma thesis was focused on the microbiological analysis of different samples of water, in which fecal indicator bacteria (thermotolerant coliform bacteria, *E. coli*, intestinal enterococci), also pathogenic and conditionally pathogenic bacteria such as *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Aeromonas* and *Pseudomonas* were determined. The final identification of the bacterial strains was carried out using the MIKROLATEST[®] identification sets or using the system BIOLOG and MALDI–TOF MS. Selected bacterial strains were tested for their antibiotic susceptibility using a disk diffusion method.

KEYWORDS

Microbiological water analysis, fecal indicator bacteria, pathogenic and conditionally pathogenic bacteria, sensitivity to antimicrobial agents

SEZNAM ZKRATEK

A.	<i>Aeromonas</i>
AMC	amoxicilin – klavulát
AMK	amikacin
AMP	ampicilin
ATB	antibiotika
ATM	aztreonam
C.	<i>Campylobacter</i>
CA–SFM	Antimikrobiální výbor francouzské mikrobiologické společnosti (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie)
CAZ	ceftazidim
CFR	cefadroxil
CFU	colony – forming unit
CIP	ciprofloxacin
Cl.	<i>Clostridium</i>
CLSI	Institut pro standardy v klinických laboratořích (Clinical and Laboratory Standards Institute)
CTX	cefotaxim
CXM	cefuroxim
ČOV	čistička odpadních vod
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
DOX	doxycyklin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
En.	<i>Enterococcus</i>
ETEC	enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
EUCAST	Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing)

FEP	cefepim
FOX	cefoxitin
FUR	nitrofurantoin
GEN	gentamicin
HPC	indikátory organického znečištění (Heterotrophic Plate Count)
CHL	chloramfenikol
IMI	imipenem
KA	krevní agar
KTJ	kolonie tvořící jednotky
<i>L.</i>	<i>Legionella</i>
LZD	linezolid
MALDI–TOF MS	metoda hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix – Assisted Laser Desorption/Ionization Time – of – Flight Mass Spectrometry)
MH agar	Mueller – Hinton agar
MH – F	Mueller – Hinton agar s 5 % koňské krve a 20 mg/l β – NAD
MBC	minimální baktericidní koncentrace (Minimum Bactericidal Concentration)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (Minimum Inhibitory Concentration)
MPA	masopeptonový agar
NAD	nikotinamidadenindinukleotid (Nicotinamideadeninedinucleotide)
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PPC	piperacilin
PPCPs	farmaka a produkty osobní péče (Pharmaceuticals and Personal Care Products)
RNA	ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>

<i>Sh.</i>	<i>Shigella</i>
ssp.	poddruh (subspecies)
<i>St.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TET	tetracyklin
TGC	tigecyklin
TSA	trypton – sójový agar
TZP	piperacilin – tazobaktam
<i>V.</i>	<i>Vibrio</i>
XLD	xylóza – lysin – deoxycholátový agar
<i>Y.</i>	<i>Yersinia</i>

OBSAH

ÚVOD	16
1. TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1 Voda	17
1.1.1 Povrchové vody	17
1.1.2 Odpadní vody.....	17
1.1.3 Pitná voda	18
1.2 Mikrobiologie vod	19
1.2.1 Indikátory organického znečištění	19
1.2.2 Indikátory fekálního znečištění.....	20
1.2.2.1 Termotolerantní koliformní bakterie	21
1.2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	21
1.2.2.3 Intestinální enterokoky	21
1.2.2.4 <i>Clostridium perfringens</i>	22
1.2.3 Patogenní a podmíněně patogenní bakterie ve vodách.....	22
1.2.3.1 Rod <i>Salmonella</i>	23
1.2.3.2 Rod <i>Yersinia</i>	24
1.2.3.3 Rod <i>Vibrio</i>	24
1.2.3.4 Rod <i>Shigella</i>	25
1.2.3.5 Rod <i>Campylobacter</i>	25
1.2.3.6 Patogenní <i>Escherichia coli</i>	26
1.2.3.7 Rod <i>Pseudomonas</i>	26
1.2.3.8 Rod <i>Aeromonas</i>	27
1.2.3.9 Rod <i>Legionella</i>	27
1.2.3.10 Rod <i>Staphylococcus</i>	27
1.3 Laboratorní průkaz bakterií ve vodách	28
1.3.1 Mikroskopie	28
1.3.2 Kultivace	28
1.3.3 Metody využívající biochemické vlastnosti bakterií	30
1.3.4 Molekulárně – biologické metody	31
1.4 Chemické látky ve vodách	31

1.4.1	Antibiotika	33
1.4.2	Metody testování citlivosti bakterií vůči antibiotikům	34
2.	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	36
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1	Přístroje a laboratorní pomůcky	37
3.2	Materiál	38
3.2.1	Kultivační půdy	38
3.2.2	Reagencie, pracovní roztoky a soupravy (kity)	43
3.2.3	Vzorky vod	45
3.2.4	Chemické látky	46
3.3	Pracovní postup	47
3.3.1	Ředění vzorků vod	47
3.3.2	Metody stanovení bakterií ve vodách	47
3.3.2.1	Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a <i>E. coli</i>	47
3.3.2.2	Stanovení intestinálních enterokoků	48
3.3.2.3	Stanovení salmonel	49
3.3.2.4	Stanovení yersinií	49
3.3.2.5	Stanovení kampylobakterů	50
3.3.2.6	Stanovení pseudomonád	51
3.3.2.7	Stanovení aeromonád	51
3.3.2.8	Kvantitativní hodnocení nárůstu bakterií	52
3.3.2.9	Identifikace pomocí systému BIOLOG a MALDI-TOF MS	52
3.3.3	Testování citlivosti bakterií vůči antibiotikům	53
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	54
4.1	Izolace bakterií z vod	54
4.1.1	ČOV Pardubice	58
4.1.2	Povrchová voda z Labe	61
4.1.3	ČOV Račín	62
4.1.4	ČOV Hradec Králové	64
4.1.5	Kal – Synthesia a. s.	66

4.2 Celkové zhodnocení testovaných vzorků vod a účinnost ČOV.....	67
4.3 Konfirmace vybraných bakteriálních kmenů	70
4.4 Testování citlivosti bakterií na antibiotika	73
ZÁVĚR	86
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	88

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 – Schéma dělení vod dle původu (Hubačíková a Oppeltová, 2008).....	17
Obrázek 2 – Schéma dělení mikroorganismů vyskytujících se ve vodách (upraveno podle Standing Committee Of Analysts, 2002; Baudišová, 2007; Baudišová a Benáková, 2011)	19
Obrázek 3 – Cesty přenosu bakteriálních patogenů v souvislosti s vodou (upraveno podle WHO, 2008)	23
Obrázek 4 – Suspektní kolonie na Chromocult® Coliform agaru (vlevo) a M–FC agaru (vpravo), (foto autor)	48
Obrázek 5 – Suspektní kolonie na Slanetz–Bartley agaru (červené označení), (foto autor) ...	48
Obrázek 6 – Suspektní kolonie na XLD agaru (červené označení), (foto autor)	49
Obrázek 7 – Suspektní kolonie na CIN agaru (červené označení), (foto autor).....	50
Obrázek 8 – Suspektní kolonie na Karmali agaru (červené označení), (foto autor)	50
Obrázek 9 – Suspektní kolonie na M–Aeromonas selektivním agaru (červené označení), (foto autor), <i>vlevo</i> : přímý výsev na povrch kultivačního média, <i>vpravo</i> : membránová filtrace	51
Obrázek 10 – Vzorek č. 1 na Chromocult® Coliform agaru v ředění 10 ⁻³ (foto autor)	59
Obrázek 11 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ze vzorku č. 1 na neselektivním médiu MPA (černé pozadí), (foto autor)	59
Obrázek 12 – Suspektní kolonie rodu <i>Salmonella</i> ve vzorku č. 1 na XLD agaru v ředění 10 ⁻³ (červené označení), (foto autor)	60
Obrázek 13 – Vzorek č. 2 na Chromocult® Coliform agaru v ředění 10 ⁻³ (foto autor)	60
Obrázek 14 – Izoláty suspektních kolonií z primární kultury ze vzorku č. 3 na XLD agaru (foto autor), <i>vlevo</i> : charakteristické suspektní kolonie, <i>vpravo</i> : vyloučení rodu <i>Salmonella</i> ...	61
Obrázek 15 – <i>Yersinia intermedia</i> ze vzorku č. 3 na neselektivním médiu TSA (černé pozadí), (foto autor)	62
Obrázek 16 – Vzorek č. 4 v ředění 10 ⁻³ (foto autor)	63
Obrázek 17 – Vzorek č. 5 v ředění 10 ⁻¹ (foto autor)	63
Obrázek 18 – Vzorek č. 6 v ředění 10 ⁻³ na Chromocult® Coliform agaru (vlevo) a M – FC agaru (vpravo), (foto autor)	64

Obrázek 19 – Vzorek č. 6 na Slanetz – Bartely agaru v ředění 10^{-2} (foto autor)	64
Obrázek 20 – Izolace suspektní kolonie z primární kultury vzorku č. 6 na XLD agaru (<i>Citrobacter youngae</i>), (foto autor)	65
Obrázek 21 – Vzorek č. 7 na M–Aeromonas selektivním agaru v ředění 10^{-2} (foto autor)	65
Obrázek 22 – Izolace suspektních kolonií z primární kultury vzorku č. 7 na M–Aeromonas selektivní agar (foto autor), vlevo: <i>Aeromonas sobria</i> , vpravo: <i>Aeromonas media</i>	66
Obrázek 23 – <i>Aeromonas sobria</i> ze vzorku č. 7 na KA (foto autor).....	66
Obrázek 24 – <i>Aeromonas caviae</i> ze vzorku č. 8 na KA (foto autor).....	67
Obrázek 25 – Vyhodnocení citlivosti pomocí systému BACMED, (foto autor)	74
Obrázek 26 – Testování citlivosti <i>Escherichia coli</i> (foto autor)	81
Obrázek 27 – Testování citlivosti <i>Yersinia intermedia</i> (foto autor)	81
Obrázek 28 – Testování citlivosti <i>Citrobacter freundii</i> , vyhodnocené pomocí systému BACMED (foto autor)	82
Obrázek 29 – Testování citlivosti <i>Klebsiella pneumoniae</i> (foto autor)	83
Obrázek 30 – Testování citlivosti <i>Aeromonas sobria</i> , vyhodnocené pomocí systému BACMED (foto autor)	83
Obrázek 31 – Testování citlivosti <i>Aeromonas caviae</i> , vyhodnocené pomocí systému BACMED (foto autor)	84
Obrázek 32 – Testování citlivosti <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (foto autor)	85

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – České normy zabývající se stanovením bakterií ve vodách (Český normalizační institut, 2017).....	29
Tabulka 2 – Spotřeba léčivých látek za rok 2015 (SÚKL, 2016b; SÚKL, 2017).....	33
Tabulka 3 – Kultivační média pro stanovení citlivosti vybraných bakterií (EUCAST, 2017d)	35
Tabulka 4 – Příprava McFarlandovy zákalové stupnice	44
Tabulka 5 – Vzorky vod	45

Tabulka 6 – Testovaná antibiotika	46
Tabulka 7 – Kvantitativní hodnocení výskytu bakterií ve vodách	54
Tabulka 8 – Porovnání identifikace bakterií pomocí MIKROLATEST [®] , systému BIOLOG a MALDI-TOF MS	71
Tabulka 9 – Zařazení vybraných antibiotik do příslušných skupin (Votava, 2005; EUCAST, 2017b).....	73
Tabulka 10 – Kontrolní kmeny a jejich meze pro dané antibiotikum dle EUCASTu (EUCAST, 2017b).	75
Tabulka 11 – Breakpointy testovaných antibiotik u daných bakterií dle EUCASTu, případně CLSI (CLSI, 2016; EUCAST, 2017c).....	78
Tabulka 12 – Breakpointy vybraných antibiotik u rodu <i>Aeromonas</i> (Lamy <i>et al.</i> , 2012; EUCAST, 2017c).....	79
Tabulka 13 – Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro bakterie z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	80

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 – Zastoupení bakterií v testovaných vzorcích vod	68
Graf 2 – Srovnání počtu bakterií v odpadních vodách před ČOV a po ČOV	69

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 – Hodnocení kvantitativního nárůstu bakterií v KTJ/ml (ČSN EN ISO 8199).....	52
Rovnice 2 – Odhad nízkých počtů (ČSN EN ISO 8199)	52

ÚVOD

Ve vodách se vyskytuje velké množství mikroorganismů, jako jsou bakterie, kvasinky či plísně. Z mikrobiologického hlediska jsou nejvíce znečištěnými vodami vody odpadní. Odpadní vody jsou po procesu čištění vypouštěny do vod povrchových, proto je nesmírně důležité, aby se během jejich úprav odstranilo co největší množství mikroorganismů. Uvádí se, že by se procesem čištění mělo odstranit více jak 98 % vyskytujících se bakterií. Pro posouzení pravděpodobné přítomnosti patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů ve vodách slouží stanovení indikátorů fekálního znečištění.

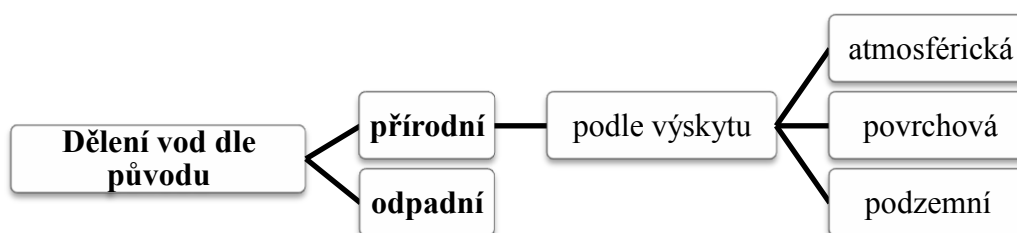
V odpadních vodách se vyskytuje také velké množství chemických látek, jako jsou např. antibiotika, která nejsou při úpravě odpadních vod úplně odstraněna. Tímto způsobem se pak dostávají do povrchových vod, kde následně mohou mít negativní dopad na volně žijící živočichy a rostliny. Zároveň jejich přítomnost ve vodách může vést k rozvoji antibiotické rezistence u vyskytujících se bakterií. Tato rezistence bakterií se čím dál více rozšiřuje a představuje obrovské riziko pro lidstvo, jelikož právě antibiotika jsou lékem volby při bakteriálních infekcích.

Cílem této diplomové práce bylo stanovit bakterie přítomné v různých vzorcích vod se zaměřením na indikátory fekálního znečištění, jako jsou termotolerantní koliformní bakterie, *E. coli* a intestinální enterokoky, dále také na patogenní a podmíněně patogenní bakterie, jako jsou salmonely, kampylobakteři, yersinie, aeromonády a pseudomonády. Po identifikaci izolovaných bakteriálních kmenů byli vytipováni vhodní kandidáti, u nichž bylo provedeno testování citlivosti na vybrané antimikrobiální látky.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Voda

Voda je tou nejdůležitější látkou pro život. Je základní součástí planety Země i člověka. Člověk bez vody nepřežije déle než týden, zatímco bez jídla se obejde i dva měsíce. Ve vodě probíhají všechny důležité chemické reakce. Voda se může vyskytovat v různých skupenstvích, a to v kapalném, pevném či plynném (Bryant *et al.*, 2012; Chattopadhyay, 2009). Z chemického hlediska je voda bezbarvá látka bez chuti a zápachu (Goncharuk, 2010). Dělení vod dle původu je uvedeno na obrázku 1. Podle použití můžeme vodu dělit na vodu povrchovou, odpadní a pitnou (Hubačíková a Oppeltová, 2008).



Obrázek 1 – Schéma dělení vod dle původu (Hubačíková a Oppeltová, 2008)

1.1.1 Povrchové vody

V zákonu o vodách č. 150/2010 Sb. je povrchová voda definována jako voda přirozeně se vyskytující na zemském povrchu, včetně té, která přechodně protéká přirozenými dutinami v podzemním či nadzemním vedením. Obecně můžeme povrchové vody dělit na mořské a kontinentální, do kterých řadíme vodní toky, nádrže, rybníky a jezera (Oppeltová a Novák, 2011).

V závislosti na proměnlivosti životního prostředí se setkáváme s různým množstvím výskytu mikroorganismů v povrchových vodách. Množství mikroorganismů může být ovlivňováno například přívalovými dešti, či povodněmi. Ke kontaminaci může docházet také prostřednictvím výkalů zvířat, dešťovou a odpadní vodou. Přežití mikroorganismů v povrchových vodách je ovlivňováno průtokem, teplotou a ročním obdobím (Tallon *et al.*, 2005). Pro zjištění jakosti povrchových vod se využívá norma ČSN 75 7221, pomocí níž můžeme povrchové vody dělit do 5 skupin dle míry znečištění.

1.1.2 Odpadní vody

Odpadní vody jsou v zákonu o vodách č. 150/2010 Sb. popsány jako vody, které jsou využity v domácnostech, průmyslu, zdravotnictví, zemědělství, ale také vody použité

v dopravních prostředcích. Tyto vody jsou charakterizovány tím, že po daném použití mají změněnou kvalitu, a to ve složení či teplotě, a mohly by vést ke změně kvality podzemních a povrchových vod.

Obecně můžeme odpadní vody dělit na odpadní vody městské a průmyslové. Městské odpadní vody představují hlavně odpadní vody z domácností a dešťové vody, které jsou odváděny veřejnou kanalizací. Průmyslové odpadní vody vznikají při výrobních procesech daného průmyslu, ať už chemického, potravinářského, papírenského, hutního, atd. Nebezpečné jsou odpadní vody obsahující fenoly, které vznikají v plynárnách případně koksárnách. Obzvláště nebezpečné jsou odpadní vody z nemocnic. Tyto průmyslové odpadní vody musí být před vypouštěním do veřejné kanalizace upraveny (Oppeltová a Novák, 2011).

Vypouštění odpadních vod do kanalizací a do vod povrchových je obsahem Nařízení vlády č. 401/2015 Sb. Zároveň se zde mimo jiné řeší i maximální přípustná hodnota znečištění jak odpadních, tak povrchových vod.

1.1.3 Pitná voda

Pitná voda je voda bez barvy a zápachu, jejíž chuť je dána fyziologickou přítomností důležitých solí vápníku, hořčíku, draslíku a sodíku, které jsou pro správné fungování lidského metabolismu nezbytné (Goncharuk, 2010). Základní charakteristikou pitné vody je zdravotní nezávadnost, kdy pitná voda nesmí vyvolávat onemocnění spojené s přítomností mikroorganismů či látek, které způsobují akutní nebo chronické onemocnění (Oppeltová a Novák, 2011). Pitná voda je dle zákona č. 267/2015 Sb., kterým se mění zákon č. 258/2000 Sb., voda, která je určena pro lidské účely, např. pro vaření, přípravu jídel, voda používaná v potravinářském průmyslu, i voda určená pro péči o lidské tělo.

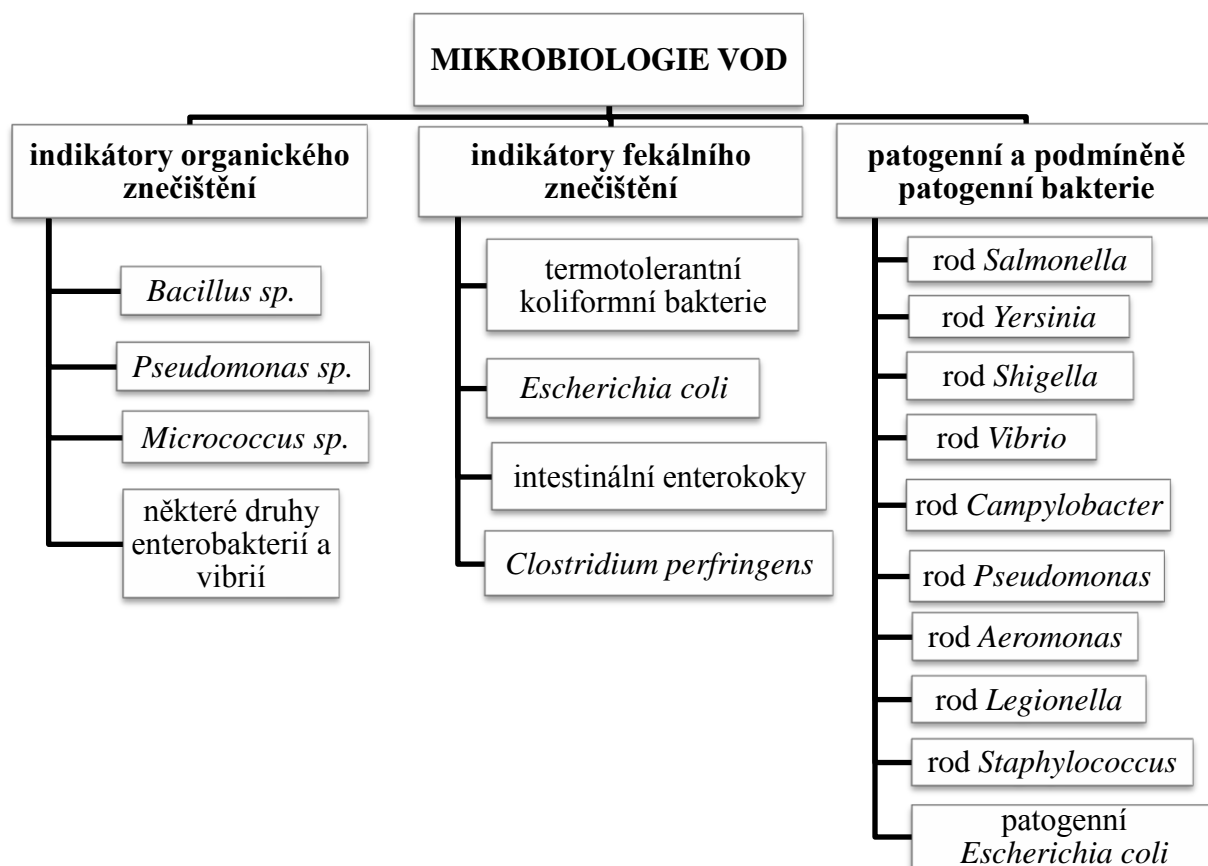
Pro existenci člověka je nejdůležitější přístup k pitné vodě. V dnešní době však stále existují oblasti, ve kterých lidé tento přístup nemají. A to i přes zjištění, že by ekonomicky vyšlo mnohem lépe zásobování těchto oblastí nezávadnou vodou, než léčení nemocných, jejichž onemocnění vzniká v důsledku závadné vody (WHO, 2011).

Dle vyhlášky č. 83/2014 Sb., kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., je stanovována jakost pitné vody, která vychází z hodnocení fyzikálních, mikrobiologických, biologických, chemických a organoleptických hygienických limitů. Jedná se o vyhodnocování 3 organoleptických, 7 mikrobiologických a 52 fyzikálně – chemických parametrů.

1.2 Mikrobiologie vod

Mikrobiologické stanovení vod představuje důležitou informaci pro určení jakosti povrchových, odpadních a pitných vod (Vyhláška č. 83/2014 Sb., Nařízení vlády č. 401/2015 Sb.). Největší význam má kromě pitných vod především mikrobiologie tzv. koupacích vod. Tyto vody obvykle obsahují směs nepatogenních mikroorganismů, které se ve vodě vyskytují přirozeně. Dále mohou obsahovat i patogenní mikroorganismy, např. přirozeně se vyskytující patogeny jako je *Aeromonas sp.*, nebo patogeny, které se do povrchových vod dostávají vlivem nedostatečného čištění odpadních vod (WHO, 2003).

Obecně můžeme významné mikroorganismy vyskytující se ve vodách dělit do tří tříd, a to do třídy indikátorů organického znečištění, třídy indikátorů fekálního znečištění a třídy patogenů a podmíněně patogenů vyskytujících se ve vodách (obr. 2).



Obrázek 2 – Schéma dělení mikroorganismů vyskytujících se ve vodách (upraveno podle Standing Committee Of Analysts, 2002; Baudišová, 2007; Baudišová a Benáková, 2011)

1.2.1 Indikátory organického znečištění

Indikátory organického znečištění (HPC) slouží jako ukazatelé celkové kvality vody v distribučních systémech. Byl to první parametr, který byl využíván k rychlému

monitorování pitné vody (Bartram *et al.*, 2003). Zvýšení jejich počtu ve vodě upozorňuje na významné znečištění vodního zdroje, které se může projevit např. zákalem, pachem, či změněnou chutí (Allen *et al.*, 2004; Sartory, 2004; Baudišová, 2007). Stanovení těchto mikroorganismů ve vodách společně s koliformními bakteriemi se může využívat pro určení účinnosti desinfekce (Ashbolt *et al.*, 2001).

Obecně se jedná o mikroorganismy, které pro svůj růst vyžadují přítomnost uhlíku. Do této skupiny můžeme zařadit nejen bakterie, ale i kvasinky a plísně. Jedná se o velmi rozmanitou skupinu, kdy jednotlivé mikroorganismy vyžadují různou délku inkubace, teplotu, liší se svou náročností na živiny. Kultivačním průkazem však můžeme zachytit pouze nepatrnou část vodní populace (Bartram *et al.*, 2003). Do skupiny indikátorů organického znečištění nejčastěji řadíme bakterie rodu *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, případně také zástupce z enterobakterií a vibrií (Baudišová, 2007).

1.2.2 Indikátory fekálního znečištění

Do této skupiny řadíme bakterie, jejichž přítomnost ve vodě je spojována s fekálním znečištěním. Význam jejich stanovení ve vodě spočívá ve schopnosti určit potenciální riziko výskytu patogenních mikroorganismů, aniž bychom je museli přímo stanovovat. Indikátory fekálního znečištění se vyznačují v ideálním případě svou nepatogenitou, rychlou kultivací a vlastnostmi, které jsou podobné vlastnostem patogenů. Tou nejdůležitější charakteristikou indikátorů fekálního znečištění je jejich určité spojení s přítomností patogenních mikroorganismů ve vodách. Již po mnoho let se pro určení kvality povrchových a rekreačních vod využívalo stanovení počtu fekálních koliformních bakterií a stanovení celkového počtu bakterií (Sobsey *et al.*, 1990; Desmarais *et al.*, 2002)

Do skupiny indikátorů fekálního znečištění řadíme termotolerantní koliformní bakterie, *Escherichia (E.) coli*, intestinální enterokoky a *Clostridium (Cl.) perfringens* (Standing Committee Of Analysts, 2002). Stanovení všech těchto bakterií je dle vyhlášky č. 83/2014 Sb. vyžadováno v pitných vodách a všechny kromě *Cl. perfringens* i v balených pitných vodách a povrchových vodách (Nařízení vlády č. 401/2015 Sb.). Dále je v umělých koupalištích vyžadováno stanovení *E. coli*, společně se *Staphylococcus (St.) aureus* a legionelami (Vyhláška č. 238/2011 Sb.).

1.2.2.1 Termotolerantní koliformní bakterie

Termotolerantní koliformní bakterie, označované též jako fekální koliformní bakterie, jsou koliformní bakterie, které zkvašují laktózu při 44 – 45 °C v prostředí žlučových solí (WHO, 2008; Cabral, 2010). Koliformní bakterie jsou gram – negativní nesporulující tyčinky patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*, které jsou kataláza pozitivní, oxidáza negativní, a které zkvašují laktózu za vzniku plynu při teplotě 35 – 37 °C za přítomnosti žlučových kyselin (Cabral, 2010). Pro rychlé stanovení celkových koliformních bakterií se využívá enzymatický test pro průkaz enzymu β – D – galaktosidázy (George *et al.*, 2001).

Nejčastějším zástupcem této skupiny je rod *Escherichia*, dále také rod *Citrobacter*, *Klebsiella* a *Enterobacter*. Ve většině případů je populace termotolerantních koliformních bakterií složena hlavně z bakterie *E. coli*. Jejich stanovení se využívá pro hodnocení kvality pitné vody (WHO, 2008).

1.2.2.2 *Escherichia coli*

E. coli je pohyblivá, gram – negativní, nesporulující, tyčinkovitá bakterie, která se řadí do čeledi *Enterobacteriaceae*. Z hlediska biochemických vlastností je tato bakterie kataláza pozitivní, oxidáza negativní, fermentuje laktózu a glukózu, tvoří indol, neprodukuje sulfan, nehydrolyzuje močovinu (Votava, 2003). Pro odlišení této bakterie od ostatních koliformních bakterií může být využíván enzymatický test pro průkaz enzymu β – D – glukuronidázy, který je pro tuto bakterii charakteristický (George *et al.*, 2001).

Tato bakterie je přirozenou a nedílnou součástí přirozené mikroflóry člověka a zvířat. Valná většina kmenů *E. coli* je nepatogenní a vyskytují se ve střevním traktu, přesněji v tlustém střevě (Scheutz a Strockbine, 2005). Pro zjištění kvality vody se využívá stanovení této bakterie již od 19. století (Edberg *et al.*, 2000).

1.2.2.3 Intestinální enterokoky

Intestinální enterokoky neboli střevní enterokoky, jsou gram – pozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní koky. Tyto bakterie jsou schopné růst v přítomnosti 40% žluči, 6,5% chloridu sodného a 0,4% azidu. Enterokoky hydrolyzují eskulin, produkují enzym β – glukosidázu, netvoří enzym katalázu.

Intestinální enterokoky jsou součástí přirozené mikroflóry střev savců, plazů a ptáků. U člověka nejvíce převažuje *Enterococcus (En.) faecalis*. Mezi nejčastěji vyskytující se druhy

enterokoků ve vodách patří *En. durans*, *En. faecalis*, *En. faecium* a *En. hirae*. Méně často se pak vyskytuje *En. avium*, *En. cecorum*, *En. columbae* a *En. gallinarum* (Wilson, 2005; Švec and Devriese, 2009). Stanovení intestinálních enterokoků ve vodách má určité výhody oproti stanovování *E. coli*, případně termotolerantních koliformních bakterií. Je to z toho důvodu, že ve vodním prostředí enterokoky přežijí déle, jsou odolnější vůči vysušení a mnohem odolnější vůči chloraci. Proto se také využívají především pro určení účinnosti desinfekčních prostředků (WHO, 2008).

1.2.2.4 *Clostridium perfringens*

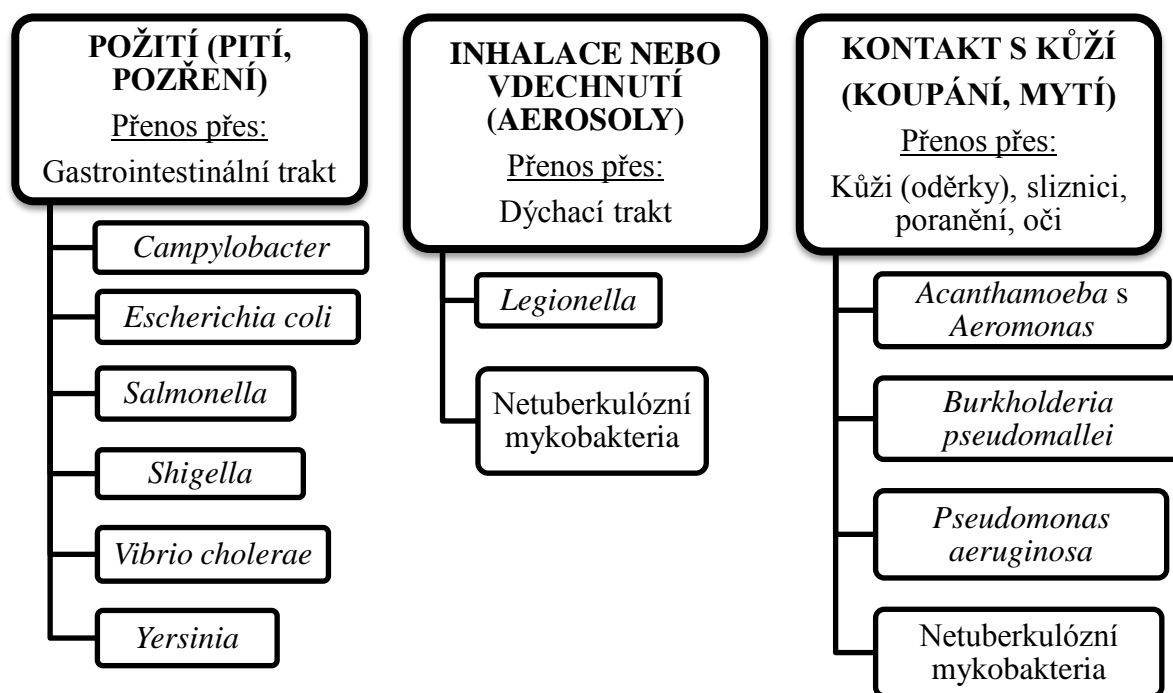
Cl. perfringens je anaerobní, gram – pozitivní, tyčinkovitá bakterie, která tvoří spory a je nepohyblivá. Tato bakterie má schopnost redukovat siřičitany na sulfidy, zkvašuje laktózu, zkapalňuje želatinu a produkuje enzym katalázu. Díky enzymu peroxidáza mohou některé kmeny omezeně růst i za přítomnosti malého množství kyslíku (Standing Committee Of Analysts, 2002; Votava, 2003).

Cl. perfringens se přirozeně vyskytuje ve střevním traktu člověka i zvířat. Avšak množství této bakterie ve stolici je mnohem menší než množství *E. coli* či intestinálních enterokoků. Vznikající spory jsou velmi odolné vůči vnějším podmínkám, takže v nepříznivém prostředí mohou přežívat mnohem déle než ostatní bakterie. Zároveň jsou také odolné vůči běžnému chlorování vody (Standing Committee Of Analysts, 2002). Tato bakterie sice představuje vysoce specifický ukazatel fekálního znečištění, přesto se její stanovení nedoporučuje k běžnému sledování kvůli dlouhodobému přežívání spor ve vodách. A jelikož jsou tyto spory menší než cysty prvoků, mohly by se využívat jako indikátory účinnosti filtračních procesů (WHO, 2008).

1.2.3 Patogenní a podmíněně patogenní bakterie ve vodách

Kontaminace pitných i rekreačních vod patogenními a podmíněně patogenními bakteriemi představuje obrovský problém v mnoha částech světa. Týká se to především rozvojových zemí, kde se ročně z důvodu kontaminované pitné vody nakazí průjmovým onemocněním asi miliarda lidí, a z toho 2,2 miliónů osob zemře (Montgomery and Elimelech, 2007). Právě lidské indikátory fekálního znečištění představují větší ohrožení zdraví člověka než zvířecí, jelikož indikují přítomnost lidských enterických patogenů (Scott *et al.*, 2003; Haller *et al.*, 2009).

Mezi hygienicky nejvýznamnější patogenní a podmíněně patogenní bakterie řadíme kmeny pocházející z rodu *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Legionella*, *Staphylococcus* a v neposlední řadě patogenní kmeny *E. coli* (Standing Committee Of Analysts, 2002; Baudišová a Benáková, 2011). Možnosti způsobu nákazy člověka danými bakteriemi je několik a jsou uvedeny na obrázku 3 (WHO, 2008).



Obrázek 3 – Cesty přenosu bakteriálních patogenů v souvislosti s vodou
(upraveno podle WHO, 2008)

1.2.3.1 Rod *Salmonella*

Rod *Salmonella* (*S.*) patří do čeledi *Enterobacteriaceae* a představuje gram – negativní pohyblivé tyčinky, které využívají citrát jako jediný zdroj energie. Tyto bakterie produkují enzym kataláza, vytváří sirovodík, štěpí glukózu za tvorby plynu a mají negativní cytochromoxidázový test (Votava, 2003). V závislosti na střevním onemocnění můžeme salmonely dělit na dvě skupiny, a to na tyfoidní druhy a netyfoidní druhy. Do tyfoidních druhů řadíme sérovary *S. Typhi* a *S. Paratyphi*, které představují lidské patogeny. Další salmonely, např. *S. Typhimurium* či *S. Enteritidis*, mohou infikovat jak člověka, tak zvířata, např. domácí hospodářská zvířata, ptáky, plazy (WHO, 2008).

Ke kontaminaci vodních zdrojů dochází prostřednictvím výkalů, do kterých jsou salmonely nakažených jedinců uvolňovány, a to hlavně v případě nákazy tyfoidními druhy. Požitím takto kontaminované vody dochází k rozvoji gastroenteritidy, bakteriémie, tyfu,

či po prodělání nemoci k nosičství. Jelikož jsou salmonely docela citlivé vůči desinfekci, je poměrně spolehlivým ukazatelem jejich výskytu v pitných vodách *E. coli*, případně termotolerantní koliformní bakterie (WHO, 2008).

1.2.3.2 Rod *Yersinia*

Rod *Yersinia* (*Y.*) patří do čeledi *Enterobacteriaceae* a je zastupován gram – negativními bakteriemi, které jsou pohyblivé jen při nižších teplotách okolo 25 °C. Tyto bakterie jsou kataláza pozitivní a oxidáza negativní se schopností štěpit močovinu (Votava, 2003). Nejnebezpečnějším zástupcem tohoto rodu je *Y. pestis*, která se ale vodou nepřenáší. Mezi kmeny, které mohou být přenášeny vodou, patří hlavně *Y. enterocolitica*, dále *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii* a *Y. pseudotuberculosis* (Standing Committee Of Analysts, 2002).

V případě nákazy člověka dochází většinou k mírným průjmům, avšak u některých jedinců může nastat až sepse (Standing Committee Of Analysts, 2002). Zdrojem nákazy jsou lidské a zvířecí výkaly. Tyto bakterie mohou ve vodách přežívat dlouhodobě, některé z nich se zde mohou i množit (WHO, 2008).

1.2.3.3 Rod *Vibrio*

Rod *Vibrio* (*V.*) je představován drobnými, zakřivenými, gram – negativními tyčinkami s jedním polárním bičíkem. Jedná se o fakultativně anaerobní bakterie se schopností fermentačního i respiračního metabolismu. Pro svůj růst vyžadují přítomnost sodíku (Farmer and Hickam – Brenner, 2003; Farmer *et al.*, 2005). Nejvýznamnějším zástupcem tohoto rodu je *V. cholerae* sérotypů O1 a O139, které vyvolávají onemocnění označované jako cholera. Některé další sérotypy mohou vyvolávat pouze gastroenteritidy (WHO, 2008).

Vibria jsou především vodní mikroorganismy, jejichž výskyt ve vodách závisí na teplotě vody a koncentraci sodíku. Běžně se vyskytují v mořských vodách a v ústí řek. Ve sladkovodních vodách se mohou vyskytovat *vibria* s nízkým nárokem na sodík (Farmer and Hickam – Brenner, 2003; Farmer *et al.*, 2005). K vypuknutí cholery může docházet v případě požití kontaminované vody či kontaminovaných mořských živočichů. Typickým projevem jsou výrazné průjmy a zvracení se současným vylučováním vibrií. Dehydratace nastupuje velmi rychle, dochází ke ztrátě elektrolytů a rozvíjí se šok. *Vibria* jsou citlivá vůči desinfekci, kyselému pH a teplotě nad 60 °C (Votava, 2003). A jelikož byly *vibria* prokázány

v pitných vodách, ve kterých se nevyskytovala *E. coli*, není tato bakterie vhodným ukazatelem výskytu *V. cholerae* (WHO, 2008)

1.2.3.4 Rod *Shigella*

Do rodu *Shigella* (*Sh.*) řadíme gram – negativní, nepohyblivé, nesporulující, tyčinkovité bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Mohou růst jak v přítomnosti tak nepřítomnosti kyslíku. Tento rod obsahuje 4 druhy, a to *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii* a *Sh. sonnei*. Shigely jsou střevní patogeny, které postihují lidi a primáty (WHO, 2008).

Ke kontaminaci vodních zdrojů dochází prostřednictvím nakažených jedinců, kteří shigely vylučují stolicí (WHO, 2008). Požitím kontaminované vody dochází k rozvoji tzv. bacilární úplavice, neboli shigelózy, která je charakterizována vodnatým průjmem s příměsí hlenu, hnisu a krve. Typickým projevem jsou také tenesmy (Votava, 2003). Jelikož jsou tyto bakterie ve vodách nestabilní, jejich výskyt je ukazatelem nedávného fekálního znečištění. Shigely jsou citlivé vůči desinfekčním prostředkům (WHO, 2008).

1.2.3.5 Rod *Campylobacter*

Rod *Campylobacter* (*C.*) je popisován jako gram – negativní, spirálovitě zakřivené tyčinky, které vyžadují mikroaerofilní a kapnofilní prostředí. Tyto bakterie jsou pohyblivé pomocí jediného polárního bičíku, produkují enzym kataláza a oxidáza (Votava, 2003). Nejčastějším původcem průjmových onemocnění je *C. jejuni*, který je charakterizován mnohem větší infekčností než jiné bakteriální patogeny, dále také v malém množství *C. coli*, *C. lari* a *C. fetus* (WHO, 2008).

Kampylobakteři se vyskytují ve střevním traktu ptáků a savců, a do prostředí jsou vylučovány prostřednictvím výkalů. Tímto způsobem dochází ke kontaminaci vodních zdrojů (Votava, 2003; WHO, 2008). V případě nákazy člověka je typickým projevem průjem s příměsí krve doprovázeným bolestmi břicha a hlavy (Votava, 2003). Jelikož kampylobakteři nejsou nijak zvlášť odolní vůči desinfekci, je spolehlivým ukazatelem jejich výskytu v pitných vodách *E. coli* (WHO, 2008).

1.2.3.6 Patogenní *Escherichia coli*

Patogenní kmeny *E. coli* jsou charakterizovány jako kmeny *E. coli*, které vyvolávají gastroenteritidy vlivem přítomnosti specifických faktorů virulence (Votava, 2003). Existuje šest hlavních podtypů patogenní *E. coli*, avšak vodou přenášené jsou pouze tři, a to enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enterohemoragická *E. coli* (EHEC) a enteroinvazivní *E. coli* (EIEC). V ETEC je nejvýznamnějším sérotypem O148, u EHEC sérotypy O157:H7 a O111 a u EIEC sérotyp O124 (Bettelheim, 2003; Scheutz and Strockbine, 2005; WHO, 2008).

ETEC a EIEC způsobují především onemocnění lidí, zatímco EHEC se vyskytuje zejména u hospodářských zvířat. ETEC je charakterizována tvorbou enterotoxinu vyvolávající vodnaté průjemy a zvracení. Tento typ je nejvýznamnějším původcem průjmů v rozvojových zemích, a to zejména u malých dětí. EHEC způsobuje krvavé průjemy s možností rozvoje hemolyticko – uremického syndromu. EIEC působí podobným mechanismem jako shigely, dochází k rozvoji vodnatých průjmů, občas i s příměsí krve (WHO, 2008). Neexistuje žádný důkaz, že by patogenní *E. coli* byly nějakým způsobem odolnější vůči desinfekci než jiné kmeny *E. coli* (WHO, 2011).

1.2.3.7 Rod *Pseudomonas*

Rod *Pseudomonas* (*P.*) patří do čeledi *Pseudomonadaceae* a je popisován jako gram – negativní, nefermentující tyčinky. Tyto bakterie mají obvykle schopnost tvořit pigmenty a jsou pohyblivé. Tím nejvýznamnějším zástupcem tohoto rodu je *P. aeruginosa* (Votava, 2003).

Pseudomonády se přirozeně vyskytují v půdě, v mořské i sladké vodě, mohou kolonizovat rostliny a živočichy. Mají schopnost se přizpůsobit téměř všem podmínkám, což vede k jejich stálé přítomnosti v našem prostředí. *P. aeruginosa* je oportunní patogen a je častým původcem nozokomiálních nálezů, kdy vyvolává onemocnění u imunokompromitovaných jedinců a pacientů po traumatech, např. po popáleninách a operacích. V případě kontaktu takového jedince s kontaminovanou vodou dochází k rozvoji onemocnění, nejčastěji k infekcím ucha a kůže (Mena and Gerba 2009). Dle vyhlášky č. 83/2014 Sb. je stanovení *P. aeruginosa* požadováno pouze v případě balených pitných vod.

1.2.3.8 Rod *Aeromonas*

Rod *Aeromonas* (A.) patří do čeledi *Aeromonodaceae* a je popisován jako nesporeující, gram – negativní, tyčinkovité bakterie. Tyto bakterie jsou fakultativně anaerobní a produkují enzym kataláza i oxidáza. Jejich pohyblivost je dána přítomností jednoho bičíku (Votava, 2003; Huys, 2014). Nejvýznamnějším zástupcem je *A. hydrophila*, dalšími významnými zástupci jsou *A. caviae*, označovaná i jako *A. punctata*, dále *A. sobria*, přesněji označovaná též jako *A. veronii* biovar *sobria* (Votava, 2003, Figueira *et al.*, 2011).

Aeromonády se vyskytují v půdě, mléce, mase, ale také ve sladkovodních vodách a v distribučních systémech vody. Mohou vyvolávat různé infekce s možností rozvoje sepse zvláště u imunokompromitovaných jedinců. Velmi časté jsou infekce ran v případě kontaktu s kontaminovanou vodou, případně infekty dýchacího ústrojí a průjmy (WHO, 2008). Aeromonády jsou poměrně odolné vůči chloraci (Holmes *et al.*, 1996).

1.2.3.9 Rod *Legionella*

Rod *Legionella* (L.), který patří do čeledi *Legionellaceae*, je zastupován nesporeujícími, gram – negativními, tyčinkovitými bakteriemi. Nejvýznamnějším zástupcem tohoto rodu je lidský patogen *L. pneumophila* (Atlas, 1999).

Legionely se vyskytují ve vodách, např. v odpadních vodách, pitných vodách a chladicích systémech. Při teplotách vyšších jak 25 °C se navíc i množí (Votava, 2003; WHO, 2008). K nákaze člověka dochází vdechnutím aerosolu z kontaminovaných vod. Onemocnění bakterií *L. pneumophila* se může projevovat dvěma způsoby. Buď jako tzv. pontiacká horečka, kdy se jedná o mírnou formu připomínající chřipku, nebo jako tzv. legionářská nemoc, která je charakterizována zápallem plic se současným možným poškozením centrálního nervového systému, ledvin a gastrointestinálního traktu. Legionely jsou odolnější vůči chloraci a vyšším teplotám (Votava, 2003).

1.2.3.10 Rod *Staphylococcus*

Rod *Staphylococcus* zahrnuje nepohyblivé, nesporeující, gram – pozitivní bakterie kokovitého tvaru. Mohou růst jak v aerobním tak anaerobním prostředí a produkují enzym katalázu (WHO, 2008). Patogenní kmeny stafylokoků mají schopnost produkovat enterotoxin. Nejvýznamnějším patogenem tohoto rodu je *St. aureus*, který tvoří i enzym koagulázu, díky čemuž jej řadíme mezi tzv. koaguláza pozitivní stafylokoky (Votava, 2003; Baudišová a Benáková 2011).

Stafylokoky jsou v prostředí poměrně rozšířené, nejčastěji se však vyskytují na kůži a sliznici zvířat i člověka (WHO, 2008). Výskyt koaguláza pozitivních stafylokoků v koupacích vodách představuje obrovský problém z důvodu přímého kontaktu stafylokoků se sliznicemi koupajících se jedinců (Baudišová a Benáková, 2011). Kontaktem se *St. aureus* dochází ke kožním infekcím, vředům či infekcím respiračního traktu (WHO, 2008). Určitou roli mají také koaguláza negativní stafylokoky, např. *St. epidermidis*, *St. hominis*, kteří působí jako podmíněni patogeni u pacientů s oslabenou imunitou (Petráš a kol., 2009). Přítomnost stafylokoků ve vodách nesouvisí s fekálním znečištěním. Stafylokoky jsou odolnější vůči chloraci, avšak jejich přítomnost ve vodách se dá snadno regulovat pomocí konvenčních úprav a desinfekčních procesů (WHO, 2008).

1.3 Laboratorní průkaz bakterií ve vodách

Obecně můžeme metody laboratorního průkazu bakterií dělit na metody fenotypové a genotypové. Pomocí fenotypových laboratorních metod prokazujeme pozorovatelné vlastnosti bakterie, a to například s využitím mikroskopie, kultivačních metod a biochemických testů. Prostřednictvím genotypových metod se stanovuje specifická skupina genů dané bakterie, a to s využitím molekulárně – biologických metod (Votava, 2005; Bursová a kol., 2014).

1.3.1 Mikroskopie

Mikroskopie patří mezi ty nejzákladnější metody průkazu bakterií. V mikroskopii nejčastěji využíváme 2 typy preparátu, a to preparát nativní, díky němuž můžeme pozorovat pohyb bakterií, a preparát barvený (Votava, 2005). Nejvýznamnější a široce používanou barvicí technikou je barvení dle Grama, které umožňuje rozdělit bakterie do dvou skupin, a to na gram - pozitivní a gram - negativní. Toto rozdělení souvisí s rozdílným složením buněčné stěny bakterií. Zároveň díky tomuto barvení můžeme v preparátu rozlišovat tvar a uspořádání bakterií (Leboffe and Pierce, 2011).

1.3.2 Kultivace

Kultivace představuje nedílnou součást laboratorního průkazu bakterií, která spočívá v izolaci a růstu bakterie na různých kultivačních médiích (Votava, 2005). Kultivační média obsahují důležité živiny pro růst bakterií, a dělíme je na tekutá a pevná, u kterých jsou potřebné živiny ztuženy nejčastěji agarem (Leboffe and Pierce, 2011). Výhodou použití

tekutých půd je snadná dostupnost bakterií k živinám, díky čemuž je zajištěn snadnější růst i starších a poškozených bakterií. Velkou nevýhodou je však jejich růst ve formě zákalu, případně blanky či sedimentu a neschopnost určit, zdali se jedná o čistou či směšnou kulturu (Votava, 2005). Velkou výhodou pevných kultivačních médií je růst bakterií ve formě tzv. kolonií, kdy jedna kolonie je tvořena jedním typem buněk. Následnou izolací různých kolonií, můžeme získat čistou kulturu bakterií (Votava, 2005). Celkový počet kolonií se uvádí ve formě tzv. colony – forming unit (CFU), neboli kolonie tvořící jednotky (KTJ), které jsou vztaženy na objem, což využíváme pro kvantitativní zhodnocení nárůstu bakterií na kultivačních médiích (ČSN EN ISO 8199; Leboffe and Pierce, 2011).

Obečně můžeme kultivační média dělit na základní neboli neselektivní, selektivní a selektivně – diagnostická. Neselektivní média jsou tvořena živinami potřebnými pro růst bakterií. Selektivní média navíc obsahují i inhibitory, které blokují růst nežádoucích mikroorganismů. Pomocí selektivně – diagnostických půd můžeme díky přítomnému substrátu a indikátoru rozlišovat některé biochemické vlastnosti bakterií, zatímco nežádoucí mikroorganismy jsou blokovány přítomnými inhibitory (Votava, 2005). Postup kultivačního stanovení bakterií, včetně inkubací a výběru selektivních i neselektivních médií, je přesně popisován Českým normalizačním institutem (ČSN EN ISO 8199). Výčet norem zabývajících se stanovením výše uvedených bakterií ve vodách je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1 – České normy zabývající se stanovením bakterií ve vodách
(Český normalizační institut, 2017)

BAKTERIE	ČESKÝ NORMALIZAČNÍ INSTITUT
Termotolerantní koliformní bakterie a <i>E. coli</i>	ČSN 75 7835 ČSN EN ISO 9308-1 ČSN EN ISO 9308-2 ČSN EN ISO 9308-3 ČSN 75 7837
<i>Clostridium perfringens</i>	ČSN EN 26461-1 ČSN EN 26461-2
Intestinální enterokoky	ČSN EN ISO 7899-1 ČSN EN ISO 7899-2
<i>Salmonella sp.</i>	ČSN ISO 19250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ČSN EN ISO 16266
<i>Legionella sp.</i>	ČSN ISO 11731 ČSN ISO 11731-2
<i>Campylobacter sp.</i>	ČSN ISO 17995

Základní metodou pro zjišťování mikrobiologické kvality pitné vody je membránová filtrace. Tato metoda je používána především pro vzorky, u nichž nečekáme přítomnost velkého množství bakterií a nečistot. Principem membránové filtrace je přefiltrování určitého množství vody s použitím sterilního filtru o velikosti pórů 0,45 µm. Tato velikost pórů je ideální pro zachycení přítomných bakterií filtrem. Poté je filtr sterilně přenesen na selektivní médium a probíhá inkubace. Cílem membránové filtrace je zakoncertování vzorku vody (Rompré *et al.*, 2002; ČSN EN ISO 8199). Pro ostatní typy vod se může využívat metoda přímého výsevu do kultivačního média, či na povrch kultivačního média. V případě přítomnosti velkého množství bakterií se využívá desítkové ředění vzorku vody pomocí vhodného zředovacího roztoku (ČSN EN ISO 8199).

1.3.3 Metody využívající biochemické vlastnosti bakterií

Biochemické testy představují nejvýznamnější metodu identifikace bakterií. Tyto testy slouží pro určení biochemických vlastností izolovaného kmene, díky čemuž následně můžeme neznámý kmen identifikovat. Nejzákladnějším biochemickým testem je průkaz enzymů kataláza a oxidáza, díky kterým, včetně Gramova barvení, můžeme zařadit neznámý kmen do určité skupiny bakterií. Poté následují další specifitější biochemické zkoušky, které jsou založeny buď na průkazu schopnosti bakterie štěpit určité látky, např. cukry, nebo na průkazu schopnosti z těchto látek vytvářet látky jiné, které jsou snadněji prokazatelné, např. indol, sulfan (Votava, 2005).

Existují různé možnosti stanovení biochemických vlastností bakterie. Příkladem mohou být komerčně dodávané identifikační soupravy v mikrotitračních destičkách, jako jsou soupravy MIKROLATEST[®] od firmy Erba Lachema s. r. o., kde slouží každá mikrotitrační jamka v soupravě (8, 16 nebo 24 jamek), pro průkaz jiné vlastnosti neznámé bakterie. Po inkubaci se vznikající barevné změny v mikrotitračních jamkách odečítají pouhým okem (Erba Lachema s. r. o., 2017). V dnešní době jsou hodně populární automatizované identifikační systémy jako je systém VITEK[®] dodávaný výrobcem BioMérieux a systém BIOLOG od firmy Biolog, Inc. Základem systému VITEK[®] jsou identifikační karty obsahující 30 miniaturních jamek s různými biochemickými substráty. Jedná se o plně automatizovaný systém se schopností určit i minimální inhibiční koncentrace antibiotik. Základem systému BIOLOG je dodávaná mikrotitrační destička s 96 – ti testovacími jamkami obsahující různé sacharidové substráty. Po inkubaci v termostatu je odečítána absorbance (Bursová a kol., 2014).

Tou nejmodernější technikou identifikace neznámého kmene je metoda hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI – TOF MS). V tomto případě se nejedná o identifikaci mikroorganismu pomocí biochemických vlastností, ale o identifikaci pomocí specifických ribozomálních a jiných proteinů s využitím hmotnostní spektrometrie a laserové desorpce a ionizace. Velikou výhodou této techniky je velmi rychlá identifikace v řádech několika minut, reprodukovatelné výsledky a možnost stanovení většího množství vzorků najednou (Bursová a kol., 2014, BioMérieux, 2017).

1.3.4 Molekulárně – biologické metody

Molekulárně – biologické metody jsou založeny na průkazu určitého genu bakterie. Jedná se o metody, které jsou sice velmi nákladné a práce s nimi je většinou složitější, avšak rychlost analýzy a přesnost identifikace bakterií představuje obrovský přínos pro mikrobiologii. Rychlost analýzy je spojována především s možností identifikovat bakterie, aniž bychom je museli vykultivovat (Castro – Escarpulli *et al.*, 2015).

Základní metodou je polymerázová řetězová reakce (PCR), díky které si můžeme namnožit vybraný úsek DNA bakterie do takového množství kopií, které bude možno snadno detekovat konvenčními laboratorními metodami. Velikou nevýhodou molekulárně – biologických metod je neschopnost rozeznat živé a mrtvé bakterie. Tato skutečnost je dána stabilitou DNA, kterou můžeme prokázat i v případě přítomnosti neživotaschopných bakterií, a to po dobu až tří týdnů. Tento problém bychom mohli vyřešit detekcí RNA, ta však rychle degraduje a práce s ní je velmi obtížná (Nocker and Camper, 2006). Vhodnou alternativou je použití fluorescenčního interkalačního barviva jako je ethidium monoazid, který má schopnost vázat se na DNA. Neživotaschopné bakterie mají porušenou integritu buněčné membrány, díky čemuž barvivo prostupuje do bakterií a váže se na jejich DNA. Fotoaktivací dochází ke kovalentní vazbě tohoto barviva s DNA, což vede k blokaci DNA neživotaschopných bakterií, takže se následně nemohou účastnit PCR (Nogva *et al.*, 2003).

1.4 Chemické látky ve vodách

Obecně můžeme chemické látky vyskytující se ve vodách dělit na anorganické a organické. V souvislosti se znečištěním vod anorganickými látkami mluvíme především o znečištění těžkými kovy jako je např. stříbro, kadmium, olovo, zinek, nikl, měď a chrom.

Organické znečištění vod může vznikat z přírodních zdrojů a antropogenních zdrojů. Znečištění organickými látkami antropogenního původu je vždy spojováno s činností člověka, a tyto látky pocházejí např. z odpadů ze zemědělství, z průmyslových a splaškových odpadních vod, ze skládek (Pitter, 2009, Vystavna *et al.*, 2012).

Znečišťující chemické látky ve vodách jsou často označovány jako polutanty, případně mikropolutanty. Charakterizací mikropolutantů je jejich koncentrace ve vodách ve stopovém množství, řádově v ng/l – µg/l. Do této skupiny řadíme hlavně velkou skupinu farmak a produktů osobní péče označované jako PPCPs (pharmaceuticals and personal care products), dále průmyslové chemikálie a pesticidy (Boyd *et al.*, 2003; Bolong *et al.*, 2009). Vlivem nedostatečného čištění odpadních vod se dostávají mikropolutanty do životního prostředí, kde mohou ohrožovat volně žijící živočichy a rostliny. Následně mohou představovat velký problém při úpravách pitných vod, s čímž později souvisí i negativní dopad na člověka (Boyd *et al.*, 2003, Fent *et al.*, 2006).

Významnou skupinou chemických látek jsou léčiva. Léčivo jako takové je zákonem č. 378/2007 Sb. definováno jako látka, případně kombinace látek, která má účinky léčebné a preventivní, s cílem ovlivnit, upravit či obnovit fyziologické funkce u člověka či zvířat. Na základě toho jsou léčiva dělena na humánní a veterinární (Zákon č. 378/2007 Sb.). Po podání léčiv, nejčastěji orální cestou, jsou některé metabolizované, zatímco jiné jsou vylučovány v nezměněné podobě. Ve stále aktivní podobě je směs léčiv a jejich metabolitů vylučována nejčastěji močí a prostřednictvím kanalizace se dostává do odpadních vod (Kümmerer, 2004; Bound and Voulvoulis, 2005). Nejvýznamnějšími zdroji léčiv jsou domácí, nemocniční či průmyslové odpadní vody. Obrovský problém představují nepoužité léky a léky s prošlou expirací, které jsou odstraňovány nevhodným způsobem, např. vysypáním do odpadu či toalety. A jelikož nejsou veškerá léčiva eliminována a transformována procesem čištění odpadních vod, můžeme některá z nich prokazovat v povrchových vodách (Bound and Voulvoulis, 2005; Topp *et al.*, 2008).

Ve vodách nejčastěji nalézáme léky, které jsou běžně užívány, jako jsou antibiotika, léčiva pro diabetiky, antidepresiva, beta – blokátory, hormonální antikoncepce, cytostatika, antipyretika, léky tlumící bolest či zánět, apod. Jejich množství ve vodách je úzce spojeno s jejich spotřebou (Bound and Voulvoulis, 2005). Spotřeba léčiv je sledována Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL). V tabulce 2 je uvedena spotřeba léčivých látek za rok 2015.

Tabulka 2 – Spotřeba léčivých látek za rok 2015 (SÚKL, 2016b; SÚKL, 2017)

Léčivá látka	Využití	Počet balení (mil.)
Metformin	Léčiva k terapii diabetu	3,19
Atorvastatin	Snižování hladiny lipidů v krvi	2,67
Kyselina acetylsalicylová	Antikoagulancia, antitrombotika	2,35
Metoprolol	Beta – blokátory	2,06
Ramipril	Léčiva ovlivňující renin – angiotensinový systém	1,95
Alopurinol	Léčiva k terapii DNY	1,94
Levothyroxin, sodná sůl	Léčiva k terapii onemocnění štítné žlázy: hormony štítné žlázy	1,94
Potraviny pro zvláštní lékařské účely	Celková výživa	1,78
Bisoprolol	Beta – blokátory	1,72
Omeprazol	Léčiva k terapii onemocnění spojených s poruchou acidity	1,65

1.4.1 Antibiotika

Antibiotika (ATB), neboli antimikrobiální látky, jsou využívány pro léčbu a prevenci infekčních onemocnění. Původně se jedná o látky přirozeně se vyskytující, které jsou produkovány plísněmi a bakteriemi. V dnešní době jsou ATB často chemicky modifikované a synteticky vyráběné. Jedná se o látky s antibakteriálním účinkem, pro jejichž využití jako léčiv je důležité jejich selektivní toxické působení pouze na bakterie, nikoli na makroorganismus. Dohromady rozlišujeme pět různých mechanismů působení ATB od inhibice syntézy buněčné stěny, nukleových kyselin a bílkovin, přes inhibici funkce buněčné stěny a působení antimetabolitů na principu kompetitivní inhibice. Účinky ATB mohou být dvojího typu, a to bakteriostatické se schopností inhibovat růst a množení bakterií, a baktericidní se schopností usmrcovat bakterie (Votava, 2005). Mezi baktericidní ATB patří peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a aminoglykosidy. Tetracykliny, amfenikoly, sulfonamidy, nitrofurany a převážně i oxazolidinony patří mezi bakteriostatická ATB. Do skupiny fluorochinolonů řadíme ATB s bakteriostatickými tak baktericidními účinky (Tsuji *et al.*, 2005; Votava, 2005). Nejvíce dodávaným ATB do České republiky byl za rok 2015 oxacilin obsažený v léčivém přípravku PROSTAPHLIN, a to v množství 625 016

balení za rok. Poté následuje léčivý přípravek AUGMENTIN, který obsahuje amoxicilin, jehož dodávka byla 521 101 balení za rok (SÚKL, 2016a).

V současné době stále stoupá rezistence bakterií vůči ATB. Rezistence je charakterizovaná jako snížená, či eliminovaná citlivost bakterií na ATB. Tato skutečnost je dána čím dál častějším užíváním ATB i v případech, kdy jejich použití není nutné (WHO, 2016). V závislosti na přítomnosti ATB ve vodách může docházet k rozvoji antibiotické rezistence u bakterií vyskytujících se ve vodách. Takto vznikající rezistentní bakteriální kmeny následně představují obrovské riziko pro lidskou populaci (Pruden *et al.*, 2006).

1.4.2 Metody testování citlivosti bakterií vůči antibiotikům

Metody testování citlivosti bakterií vůči antibiotikům obecně dělíme na kvalitativní a kvantitativní. Nejvýznamnějším testem kvalitativního stanovení je disková difúzní metoda. Principem tohoto testu je napuštění sterilního filtračního disku určitým ATB a jeho následné nanesení na plotnu s již naočkovaným testovaným kmenem. Léčivo se z disku uvolňuje do agarové půdy a po určité inkubační době se odečítá průměr inhibiční zóny. Velikost inhibiční zóny dané bakterie je porovnávána s velikostí inhibičních zón citlivých kmenů (Urbášková a kol., 1985; Votava, 2005). Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST) stanovil právě tuto metodu za nejvhodnější pro kvalitativní stanovování citlivosti bakterií vůči ATB. Z testovaných bakteriálních kmenů připravíme suspenze odpovídající 0,5 McFarlandově zákalové stupnici. Základní půdou pro stanovení citlivosti je Mueller – Hinton agar (MH) nebo Mueller – Hinton agar s 5% koňské krve a 20 mg/l β – NAD (MH – F). Výběr půdy MH, či MH – F závisí na druhu testované bakterie, příklady jsou uvedeny v tabulce 3. U většiny bakterií je inkubační doba 16 – 20 hodin při 35 ± 1 °C, výjimku představuje např. rod *Campylobacter*, u kterého je inkubace 24 hodin při 41 ± 1 °C v mikroaerofilním prostředí. Ostatní bakterie jsou inkubovány v běžném prostředí na vzduchu, některé mohou vyžadovat zvýšenou tenzi oxidu uhličitého, a to 4 – 6% (EUCAST, 2017d). Po inkubaci se odečítá velikost inhibičních zón (v milimetrech) a hodnocení citlivosti testované bakterie na dané ATB je prováděno pomocí srovnávání s aktuálními klinickými breakpointy. Breakpointy jsou popisovány jako mezní hodnoty, díky kterým můžeme určit, zdali je testovaný bakteriální kmen na dané antibiotikum citlivý, rezistentní či intermediálně rezistentní. Intermediální rezistencí rozumíme nejistotu účinku terapie při podávání daného ATB (Urbášková a kol., 2010; EUCAST, 2017d).

Tabulka 3 – Kultivační média pro stanovení citlivosti vybraných bakterií (EUCAST, 2017d)

BAKTERIE	KULTIVAČNÍ MÉDIUM
<i>Enterobacteriaceae</i>	MH
<i>Pseudomonas</i> spp.	MH
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MH
<i>Acinetobacter</i> spp.	MH
<i>Staphylococcus</i> spp.	MH
<i>Enterococcus</i> spp.	MH
<i>Streptococcus</i> spp.	MH - F
<i>Haemophilus influenzae</i>	MH - F
<i>Moraxella catarrhalis</i>	MH - F
<i>Listeria monocytogenes</i>	MH - F
<i>Campylobacter jejuni</i> a <i>coli</i>	MH - F

Základem kvantitativních metod je stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), která je charakterizována jako nejnižší koncentrace ATB se schopností inhibovat růst testované bakterie. V některých případech se stanovuje minimální baktericidní koncentrace (MBC), která představuje nejnižší koncentraci ATB se schopností usmrtit testovaný bakteriální kmen (Urbášková a kol., 1985). Dle EUCASTu je vhodnou technikou pro stanovení MIC bujónová mikrodiluční metoda. Ta je založena na přípravě stoupající koncentrační řady zvoleného ATB ve vhodném kultivačním médiu, kterými jsou naplněny jamky mikrotitrační destičky. Vhodným kultivačním médiem je Mueller – Hinton bujón, případně Mueller – Hinton bujón s 5% koňské krve a 20 mg/l β – NAD. Následně je do jamek přidávána suspenze testovaného bakteriálního kmene. Po inkubaci se pouhým okem odečítá poslední jamka koncentrační řady daného ATB, ve které byl růst testované bakterie inhibován. Růst bakterie se projeví formou zákalu či sedimentu (Votava, 2005; Melter and Malmgren, 2014; EUCAST, 2017a).

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo provést mikrobiologický rozbor různých vzorků vod (povrchové a odpadní vody, kal) se zaměřením na indikátory fekálního znečištění (termotolerantní koliformní bakterie, *E. coli* a intestinální enterokoky) a dále na patogenní a podmíněně patogenní bakterie jako jsou salmonely, yersinie, kampylobakteri, aeromonády a pseudomonády.

U bakteriálních kmenů, které byly pomocí soupravy MIKROLATEST® nejasně diagnostikovány, bylo cílem porovnat jejich identifikaci s využitím systému BIOLOG a MALDI-TOF MS.

Dalším důležitým krokem bylo po identifikaci všech izolovaných kmenů vytipovat vhodné zástupce, u kterých bylo následně provedeno testování jejich citlivosti k vybraným antimikrobiálním látkám diskovou difúzní metodou s následným kritickým zhodnocení získaných výsledků.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a laboratorní pomůcky

Přístroje:

- Analytické váhy KERN 440 – 43 (KERN, Německo)
- Autokláv PS 20A (BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)
- BACMED (ASPIAG s.r.o., Česká republika)
- BIOLOG (Biolog, Inc., USA)
- Denzitometr Den – 1 (Biosan, Litva)
- Horkovzdušný sterilizátor STERILAB[®] (BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)
- Chladnička (Liebherr, Německo)
- Identifikační programy TNW[®] (Erba Lachema, s. r. o., Česká republika)
- MALDI – TOF MS (Bruker Daltonic, Německo)
- Mikroskop Olympus BX41 (Japonsko)
- Membránová vývěva Diaphragm pump ME 1 (Vacuubrand, Inc., USA)
- pH metr CyberScan pH 510 (Eutech Instruments, USA)
- Sterimat 5104.2 ((BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)
- Termostat Lovibond (TINTOMETER – LOVIBOND, Česká republika)
- UV lampa
- Vodní lázeň CERTOMAT[®] WR (Braun, USA)
- Vortex V1 (Biosan, USA)

Laboratorní pomůcky

Erlenmayerovy baňky, skleněná filtrační souprava, podložní sklíčka, skleněné zkumavky, kovová víčka, Petriho misky, automatické pipety, plastové špičky, L – hokejky (skleněné, plastové), kahan, očkovací kličky, pinzety, nádoba pro mikroaerofilní kultivaci, frita, membránové filtry (pórovitost 0,45 μ m), filtrační papír, nůžky, sterilní vatové tamponky, raznice na antibiotika, černá podložka.

3.2 Materiál

3.2.1 Kultivační půdy

- CIN agar (Yersinia Selective Agar Base), HiMedia

<i>Složení:</i>	pepton, speciál	20 g
	kvasničný extrakt	2 g
	mannitol	20 g
	pyrohroznán sodný	2 g
	chlorid sodný	1 g
	síran hořečnatý	0,01 g
	deoxycholan sodný	0,5 g
	neutrální červeň	0,03 g
	krystalová violet	0,001 g
	agar	12,5 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 29,0 g přípravku do 500 ml destilované vody. Směs byla poté sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci a ochlazení na 45 °C byl přidán rozpuštěný obsah 1 lahvičky Yersinia Selective Supplement (FD 034). Výsledné pH při 25 °C bylo $7,4 \pm 0,2$.

- Cetrimid agar, HiMedia

<i>Složení:</i>	želatinový pepton	20 g
	chlorid hořečnatý	1,4 g
	síran draselný	10 g
	cetrimid	0,3 g
	agar	15 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 46,7 g přípravku do 1000 ml destilované vody obsahující 10 ml glycerolu. Následně byla provedena sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,2 \pm 0,2$.

- **Colubia agar, HiMedia**

<i>Složení:</i>	enzymatický hydrolyzát kaseinu	10 g
	masový pepton	5 g
	enzymatický hydrolyzát srdce	3 g
	kvasničný extrakt	5 g
	kukuřičný škrob	1 g
	chlorid sodný	5 g
	agar	15 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 44,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody. Následně proběhla sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 40 – 50 °C bylo asepticky přidáno 7 % sterilní defibrinované krve. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,3 \pm 0,2$.

- **Chromocult® Coliform agar, Merck KGaA**

<i>Složení:</i>	enzymatický hydrolyzát kaseinu	1 g
	kvasničný extrakt	2 g
	chlorid sodný	5 g
	dihydrogenfosforečnan sodný *2H ₂ O	2,2 g
	hydrogenfosforečnan sodný	2,7 g
	pyrohroznán sodný	1 g
	sorbitol	1 g
	tryptofan	1 g
	tergitol 7	0,15 g
	6-chlor-3-indoxyl-β-D-galaktopyranosid	0,2 g
	kys. 5-brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-glukuronová	0,1 g
	isopropyl- β-D-thiogalaktopyranosid	0,1 g
	agar	10 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 26,5 g do 1000 ml destilované vody. Vzniklé médium se sterilizuje ve vodní lázni při 100 °C po dobu 10 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $6,8 \pm 0,2$.

- **Karmali agar, HiMedia**

<i>Složení:</i>	pepton, speciál	23 g
	škrob	1 g
	chlorid sodný	5 g
	aktivní uhlí	4 g
	agar	12 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 22,5 g přípravku do 490 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Po ochlazení na 50 °C byl asepticky přidán obsah 1 lahvičky Campylobacter Selective Supplement w/Hemin, Modified (FD 167). Výsledné pH při 25 °C bylo $7,4 \pm 0,2$.

- **Krevní agar (KA), HiMedia**

<i>Složení:</i>	proteosový pepton	15 g
	játrový extrakt	2,5 g
	kvasničný extrakt	5 g
	chlorid sodný	5 g
	agar	15 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 21,25 g přípravku do 500 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 40 – 50 °C bylo asepticky přidáno 7 % sterilní defibrinované krve. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,4 \pm 0,2$.

- **M – Aeromonas Selective Agar Base (Havelaar), HiMedia**

<i>Složení:</i>	tryptóza	5 g
	kvasničný extrakt	2 g
	dextrin	11,4 g
	chlorid sodný	3 g
	chlorid draselný	2 g
	síran hořečnatý	0,1 g
	chlorid železitý	0,06 g

deoxycholát sodný	0,1 g
bromthymolová modř	0,08 g
agar	13 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 36,74 g přípravku do 1000 ml destilované vody. Následně proběhla sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 45 – 50 °C byl asepticky přidán ampicilin suplement (FD082). Výsledné pH při 25 °C bylo $7,5 \pm 0,2$.

- **Masopeptonový agar č. 2 (MPA), HiMedia**

<i>Složení:</i>	masový pepton	10 g
	hovězí extrakt	10 g
	chlorid sodný	5 g
	agar	15 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 40,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody. Následně byla směs sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,2 \pm 0,2$.

- **M - FC agar, HiMedia**

<i>Složení:</i>	tryptosa	10 g
	proteosový pepton	5 g
	kvasničný extrakt	3 g
	laktosa	12,5 g
	žlučové soli	1,5 g
	chlorid sodný	5 g
	anilinová modř	0,1 g
	agar	15 g

Příprava: Dle pokynu výrobce bylo naváženo 52,1 g přípravku do 1000 ml destilované vody obsahující 10 ml 1% roztoku kyseliny rosolové (FD 058 Rosolic Acid). Směs byla následně zahřívána ve vodní lázni až do úplného rozpuštění. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,4 \pm 0,2$.

- **Mueller Hinton agar, HiMedia**

<i>Složení:</i>	hovězí masová infuze (sušina)	2 g
	kyselý hydrolyzát kaseinu	17,5 g
	škrob	1,5 g
	agar	17 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 38,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,3 \pm 0,1$.

- **Slanetz – Bartely agar, HiMedia**

<i>Složení:</i>	tryptosa	20 g
	kvasničný extrakt	5 g
	dextrosa	2 g
	hydrogenfosforečnan (di)draselný	4 g
	azid sodný	0,4 g
	trifenyltetrazolium chlorid	0,1 g
	agar	15 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 46,5 g přípravku do 1000ml destilované vody. Vzniklé médium se sterilizuje na vodní lázni při 100 °C po dobu 10 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,2 \pm 0,2$.

- **Trypton sójový agar (TSA), HiMedia**

<i>Složení:</i>	enzymatický hydrolyzát kaseinu	15 g
	sojový pepton	5 g
	chlorid sodný	5 g
	agar	15 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 40,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,3 \pm 0,2$.

- **Xylóza – lyzin – deoxycholátový agar (XLD agar), HiMedia**

<i>Složení:</i>	kvasničný extrakt	3 g
	L-lysin	5 g
	laktosa	7,5 g
	sacharosa	7,5 g
	xylosa	3,5 g
	chlorid sodný	5 g
	citran železito-amonný	0,8 g
	deoxycholan sodný	2,5 g
	thiosíran sodný	6,8 g
	fenolová červeň	0,08 g
	agar	15 g

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 56,68 g přípravku do 1000 ml destilované vody. Vzniklé médium se sterilizuje na vodní lázni při 100 °C po dobu 10 minut. Výsledné pH při 25 °C bylo $7,4 \pm 0,2$.

3.2.2 Reagencie, pracovní roztoky a soupravy (kity)

- **Činidlo na oxidázu:** Biomérieux, Francie

- **Peroxid vodíku:** pro test kataláza

- **Činidlo pro zajištění mikroaerofilního prostředí:** CampyGen, AGS (Oxoid, USA)

- **MIKROLATEST[®]** a potřebná činidla dodávána výrobcem (Erba Lachema, s. r. o., Česká republika)
 - ENTERO – Rapid 24
 - NEFERMtest 24
 - STREPTOtest 24

- **Fyziologický roztok**

<i>Složení:</i>	chlorid sodný	8,5 g
	destilovaná voda	1000 ml

Příprava: Chlorid sodný byl rozpuštěn v 1000 ml destilované vody a poté byl sterilizován při 121 °C po dobu 15 min.

- **McFarlandova zákalová stupnice**

Příprava: Smícháním chloridu barnatého (BaCl_2) a kyseliny sírové (H_2SO_4) vzniká sraženina síranu barnatého. Určitým poměrem mezi chemikáliemi je možné připravit různé stupně McFarlandovy zákalové stupnice (tabulka 4).

Tabulka 4 – Příprava McFarlandovy zákalové stupnice

Číslo stupně zákalu	Chemikálie (ml)		Přibližný počet bakterií ($\times 10^8/\text{ml}$)
	1,175% BaCl_2	1% H_2SO_4	
0,5	0,05	9,95	1,5
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12

- **Erlichovo činidlo**

<i>Složení:</i>	p – dimethylaminobenzaldehyd	5 g
	96% etanol	75 ml
	koncentrovaná HCl	25 ml

Pozn.: Činidlo je nutné uchovávat v chladu.

- **Karbolfuchsin**

<i>Složení:</i>	Roztok A: bazický fuchsin	1 g
	96% etanol	10 ml
	Roztok B: 5% vodný roztok fenolu	100 ml

Příprava: Smísením roztoků A a B vznikla suspenze, která byla po filtraci zředěna destilovanou vodou v poměru 1:10.

3.2.4 Chemické látky

K testování citlivosti bakterií bylo dohromady vybráno 22 antibiotik, které jsou uvedeny v tabulce 6. Všechny antibiotika byly zakoupeny od firmy OXOID CZ, s. r. o.

Tabulka 6 – Testovaná antibiotika

Antibiotikum	Obsah v disku (µg)	Zkratka	Šarže	Expirace
Amikacin	30	AMK 30	1985258	2020/01/05
Amoxicillin – Klavulát	20–10	AMC 20-10	1996605	2020/01/24
Ampicillin	2	AMP 2	1995667	2020/02
Ampicillin	10	AMP 10	1984004	2019/12/28
Aztreonam	30	ATM 30	1969562	2019/12/01
Cefadroxil	30	CFR 30	1984009	2020/01
Cefepim	30	FEP 30	1992829	2020/01/19
Cefotaxim	5	CTX 5	1969538	2018/12
Cefoxitin	30	FOX 30	1984557	2020/01/03
Ceftazidim	10	CAZ 10	2105243	2018/02
Cefuroxim	30	CXM 30	1976855	2019/12/12
Ciprofloxacin	5	CIP 5	1992429	2020/01/16
Doxycyclin	30	DOX 30	1977868	2019/12/15
Gentamicin	10	GEN 10	1985244	2020/01/04
Chloramphenicol	30	CHL 30	1966478	2019/11/25
Imipenem	10	IPM 10	1984001	2017/12/28
Linezolid	10	LZD 10	1972376	2018/12
Nitrofurantoin	100	FUR 100	2108267	2020/02
Piperacillin	30	PPC 30	1958983	2019/12
Piperacilin – Tazobaktam	30–6	TZP 30-6	2107472	2020/02
Tetracyclin	30	TET 30	1985323	2020/01/06
Tigecyclin	15	TGC 15	1969533	2017/11/30

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Ředění vzorků vod

Vzorky vod byly po odběru co nejrychleji zpracovány (obvykle do 4 hodin) a to dle normy ČSN EN ISO 8199. Jelikož byly odebírány vzorky odpadních a povrchových vod, bylo je třeba před nanesením na kultivační půdy zředit desítkovým ředěním, a to 10^{-1} , 10^{-2} a 10^{-3} . U některých vzorků bylo použito i ředění 10^{-4} .

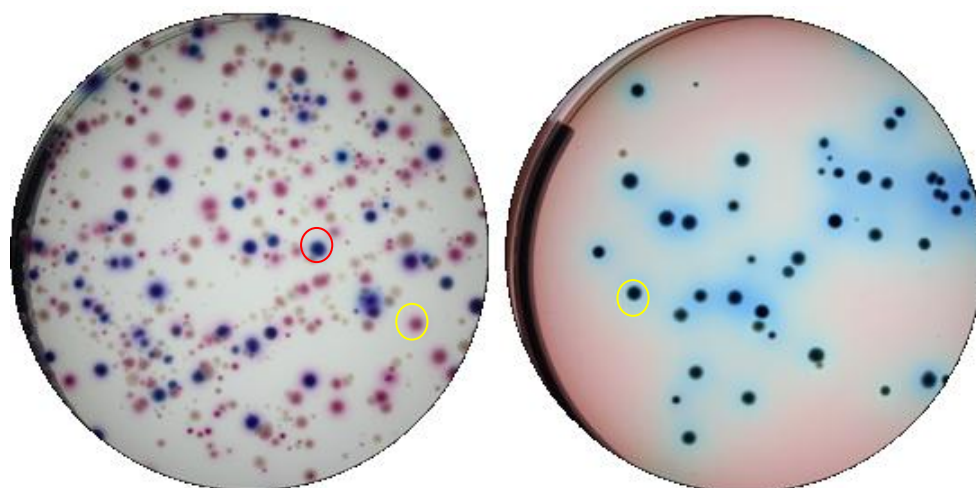
3.3.2 Metody stanovení bakterií ve vodách

V této diplomové práci jsem se zaměřila na stanovení indikátorových mikroorganismů, a to na termotolerantní koliformní bakterie, *E. coli* a enterokoky. Dále jsem stanovovala také salmonely, yersinie, kampylobaktery, aeromonády a pseudomonády.

U všech vzorků s předpokladem nižšího výskytu bakterií byla provedena membránová filtrace s přefiltrováním 100 ml, případně 10 ml vzorku vody přes filtr (velikosti pórů 0,45 μm). Poté byl filtr sterilně přenesen na selektivní médium. Dále byly vzorky vody zpracovány i pomocí metody přímého výsevu na selektivní kultivační médium. V tomto případě byly vzorky zředěny a na selektivní kultivační médium bylo aplikováno po 100 μl a inokulum bylo rozetřeno L – hokejkou. Stanovení bylo vždy prováděno v dubletu.

3.3.2.1 Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli*

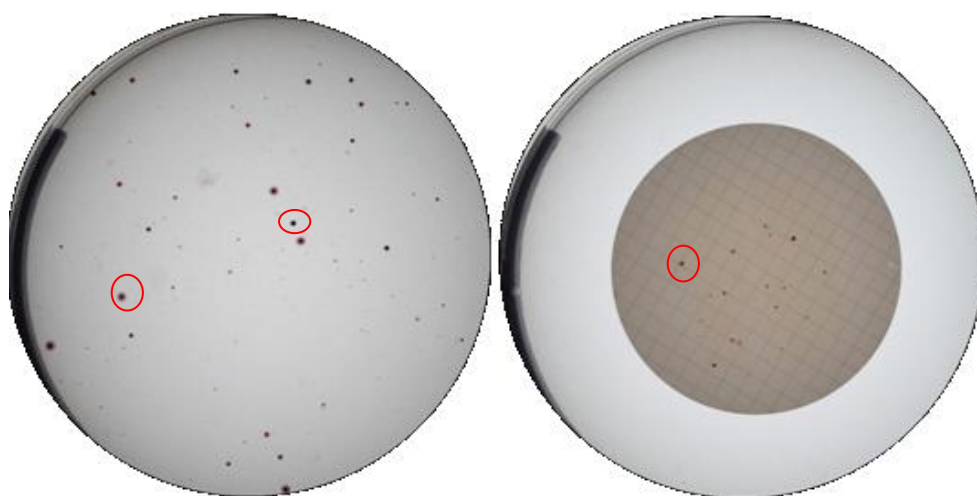
Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli* ve vodách bylo provedeno kombinací dvou norem, a to normy ČSN EN ISO 9308-1 a ČSN 75 7835. Selektivním médiem dle normy ČSN EN ISO 9308-1 je Chromocult[®] Coliform agar, na kterém vyrůstá *E. coli* v tmavě modrých až fialových koloniích a ostatní koliformní bakterie v růžových až červených koloniích. Selektivním médiem dle normy ČSN 75 7835 je M–FC agar, na kterém rostou termotolerantní koliformní bakterie v modře zbarvených koloniích (obr. 4). Inkubace naočkovaných kultivačních médií probíhala v aerobním prostředí 24 hodin při 42 °C. Suspektní kolonie byly izolovány na MPA. Po 24 – hodinové inkubaci při 37 °C bylo provedeno Gramovo barvení a test na přítomnost katalázy a oxidázy. Ke konečné identifikaci bakterií byla použita identifikační souprava MIKROLATEST[®], přesněji ENTERO–Rapid 24 test. V případech nejednoznačného výsledku byl pro identifikaci využit systém BIOLOG a MALDI–TOF MS.



Obrázek 4 – Suspektní kolonie na Chromocult® Coliform agaru (vlevo) a M-FC agaru (vpravo), (foto autor)

suspektní *E. coli* – červené označení,

suspektní termotolerantní koliformní bakterie – žluté označení



Obrázek 5 – Suspektní kolonie na Slanetz–Bartley agaru (červené označení), (foto autor)

vlevo: přímý výsev na povrch kultivačního média, *vpravo*: membránová filtrace

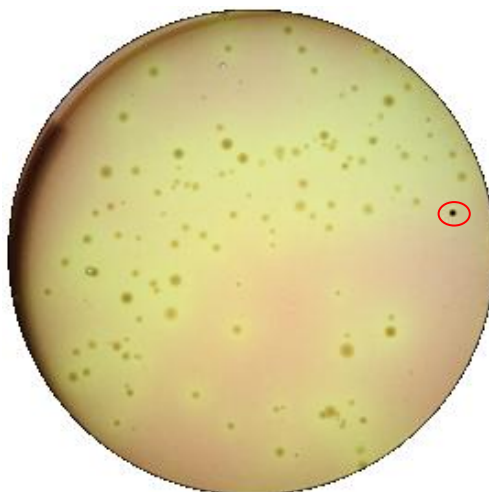
3.3.2.2 Stanovení intestinálních enterokoků

Výchozím materiálem pro stanovení intestinálních enterokoků ve vodách byla norma ČSN EN ISO 7899-2. Selektivním médiem pro enterokoky je Slanetz–Bartley agar. Kultivace probíhala v aerobním prostředí 24 – 48 hodin při 37 °C. Suspektní kolonie (červené až kaštanové kolonie, obr. 5) byly izolovány na MPA. Po 24 – hodinové inkubaci při 37 °C

bylo provedeno Gramovo barvení a test na přítomnost katalázy, oxidázy a test na schopnost hydrolyzovat eskulin. Ke konečné identifikaci bakterií byla použita identifikační souprava MIKROLATEST[®], přesněji STREPTOtest 24.

3.3.2.3 Stanovení salmonel

Při stanovení rodu *Salmonella* se vycházelo z normy ČSN ISO 19250. Selektivním médiem pro rod *Salmonella* je XLD agar. Kultivace probíhala v aerobním prostředí 24 hodin při 37 °C. Suspektní kolonie (průsvitné kolonie s černým středem, obr. 6) byly izolovány na MPA. Po 24 – hodinové inkubaci při 37 °C bylo provedeno Gramovo barvení a test na přítomnost katalázy a oxidázy. Ke konečné identifikaci bakterií byla použita identifikační souprava MIKROLATEST[®], přesněji ENTERO–Rapid 24 test. V případech nejednoznačného výsledku byl pro identifikaci využit systém BIOLOG a MALDI–TOF MS.



Obrázek 6 – Suspektní kolonie na XLD agaru (červené označení), (foto autor)

3.3.2.4 Stanovení yersinií

Při stanovení rodu *Yersinia* ve vodách se vycházelo z normy ČSN EN ISO 10273, přestože je touto normou popisováno stanovení yersinií v potravinách a krmivech. Selektivním médiem pro yersinie je CIN agar (Yersinia Selective Agar Base). Inkubace probíhala v aerobním prostředí 24 – 48 hodin při 30 °C. Suspektní kolonie (průhledné kolonie s výrazným tmavě růžovým středem, obr. 7) byly izolovány na TSA. Po 24 – hodinové inkubaci při 37 °C bylo provedeno Gramovo barvení a test na přítomnost katalázy a oxidázy. Ke konečné identifikaci bakterií byla použita identifikační souprava MIKROLATEST[®],

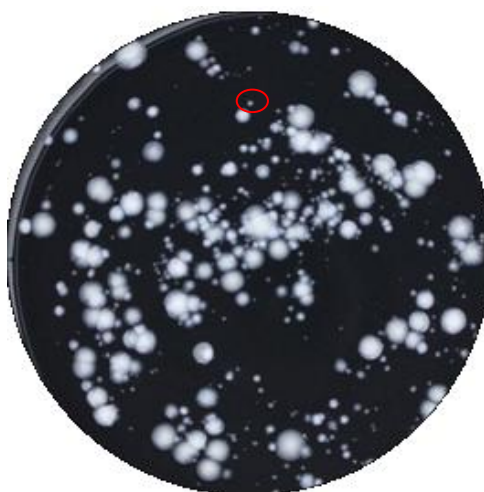
přesněji ENTERO–Rapid 24 test. V případech nejednoznačného výsledku byl pro identifikaci využit systém BIOLOG a MALDI–TOF MS.



Obrázek 7 – Suspektní kolonie na CIN agaru (červené označení), (foto autor)

3.3.2.5 Stanovení kampylobakterů

Výchozím materiálem pro stanovení bakterií z rodu *Campylobacter* byla norma ČSN ISO 17995. Selektivním médiem pro kampylobaktery je Karmali agar. Kultivace probíhala v mikroaerofilním prostředí, a to 48 hodin při 42 °C. Suspektní kolonie (drobné šedé kolonie, obr. 8) byly izolovány na neselektivní médium, kterým je Columbia agar, a to vždy v dubletu, kdy část byla kultivována v aerobním prostředí a další část v mikroaerofilním prostředí. Tímto způsobem byla provedena zkouška neschopnosti růstu kampylobakterů v aerobním prostředí. Poté bylo provedeno Gramovo barvení a test na přítomnost katalázy a oxidázy. Pro průkaz specifického pohybu kampylobakterů byla použita mikroskopie v zástinu.



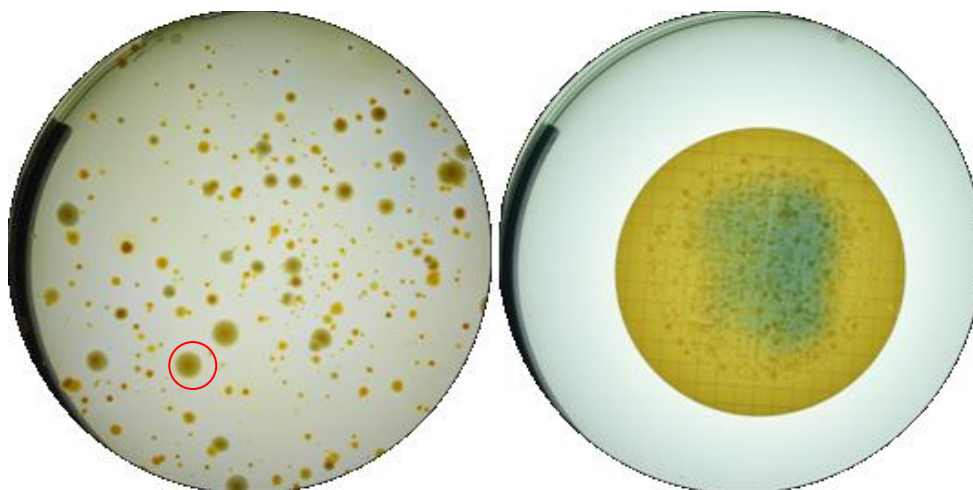
Obrázek 8 – Suspektní kolonie na Karmali agaru (červené označení), (foto autor)

3.3.2.6 Stanovení pseudomonád

Při stanovení bakterií z rodu *Pseudomonas* se vycházelo z normy ČSN EN ISO 16266. Selektivním médiem pro rod *Pseudomonas* je Cetrimidový agar. Kultivace probíhala v aerobním prostředí 24 – 48 hodin při 37 °C. Suspektní kolonie (žluto – zelené, případně žluto – hnědé kolonie) byly izolovány na MPA. Po 24 – hodinové inkubaci při 37 °C bylo provedeno Gramovo barvení a test na přítomnost katalázy a oxidázy. Ke konečné identifikaci bakterií byla použita identifikační souprava MIKROLATEST[®], přesněji NEFERMtest 24. V případech nejednoznačného výsledku byl pro identifikaci využit systém BIOLOG a MALDI–TOF MS.

3.3.2.7 Stanovení aeromonád

Selektivním médiem pro rod *Aeromonas* je M–*Aeromonas* selektivní agar (M–*Aeromonas* Selective Agar Base). Inkubace probíhala v aerobním prostředí 24 – 48 hodin při 30 °C. Suspektní kolonie (velké žluté kolonie, obr. 9) byly izolovány na KA. Po 24 – hodinové inkubaci při 37 °C bylo provedeno Gramovo barvení a test na přítomnost katalázy a oxidázy. Ke konečné identifikaci bakterií byla použita identifikační souprava MIKROLATEST[®], přesněji NEFERMtest 24. V případech nejednoznačného výsledku byl pro identifikaci využit systém BIOLOG a MALDI–TOF MS.



Obrázek 9 – Suspektní kolonie na M–*Aeromonas* selektivním agaru (červené označení), (foto autor), *vlevo*: přímý výsev na povrch kultivačního média, *vpravo*: membránová filtrace

3.3.2.8 Kvantitativní hodnocení nárůstu bakterií

Výsledkem kvantitativního hodnocení nárůstu bakterií je počet KTJ/ml. Toto hodnocení vychází z normy ČSN EN ISO 8199. Základem je počítání narostlých kolonií na kultivačních médiích. V závislosti na jejich počtu byl použit jeden ze dvou uvedených vzorců. Pokud byl počet kolonií na kultivačních médiích od 15 – 300, využíval se k výpočtu vzorec:

$$N = \frac{\Sigma C}{V * (n_1 + 0,1 n_2) * d} \quad [1]$$

ΣCsoučet všech kolonií spočítaných na vybraných miskách

n_1počet misek použitých pro výpočet z prvního použitého ředění

n_2počet misek použitých pro výpočet z druhého použitého ředění

dfaktor pro výpočet prvního použitého ředění

V objem inokula očkovaného na každou z ploten

Pokud byl počet kolonií nižší než 15, využila se metoda tzv. odhadu nízkých počtů, tedy vzorec:

$$N = m * d^{-1} \quad [2]$$

maritmetický průměr narostlých kolonií

dpoužité ředění

3.3.2.9 Identifikace pomocí systému BIOLOG a MALDI–TOF MS

Nedourčené bakteriální kmeny byly identifikovány pomocí dvou systémů, a to systému BIOLOG a systému MALDI TOF MS.

Identifikace systémem BIOLOG byla provedena následujícím způsobem. Pro všechny vzorky byl zvolen protokol A. Pro testování byly použity 24 – hodinové kultury izolované na MPA. Pomocí sterilního vatového tampónu byl z bakteriálního kmene vytvořen zákal v suspenzním médiu A s cílem dosáhnout transmitance 97 – 98 %. Takto připravené médium bylo multikanálovou automatickou pipetou dávkováno po 100 μ l do mikrotitrační destičky s již přítomnými substráty. Poté probíhala inkubace při 35 °C a výsledky byly odečítány po 10, 24 a 48 hodinách. K odečtu absorbancí byl použit poloautomatický systém MicroStation a identifikace kmene proběhla na základě porovnávání odečtených výsledků s GEN III databází.

Identifikace pomocí systému MALDI–TOF MS, od firmy Bruker s. r. o., byla provedena ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně.

3.3.3 Testování citlivosti bakterií vůči antibiotikům

Testování citlivosti bakterií na antibiotika bylo provedeno dle pokynů EUCASTu. Z testovaných bakteriálních kmenů byly připraveny suspenze ve fyziologickém roztoku odpovídající 0,5 stupni McFarlandovy zákalové stupnici. Sterilním bavlněným tamponem, který byl ponořen do bakteriální suspenze a přebytečný roztok odstraněn otíráním o stěnu zkumavky, byl vzorek nanesen ve třech směrech na MH agar. Poté byly prostřednictvím raznice, nanесeny příslušné antibiotické disky s následnou inkubací, která probíhala 18 – 20 hodin při 35 °C. Testování bylo opakováno 3x, a to vždy v dubletu pro každý bakteriální kmen. Inhibiční zóny byly odečítány dle doporučení EUCASTu, a to ze spodní strany Petriho misky proti tmavému pozadí a ve vzdálenosti 30 cm od oka. Případně byly inhibiční zóny odečítány pomocí systému BACMED. Hodnoty inhibičních zón byly porovnávány s klinickými breakpointy.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Izolace bakterií z vod

První část diplomové práce spočívala v izolaci bakterií z vod. K tomuto účelu bylo dohromady odebráno 8 vzorků, ze kterých bylo ke konečné identifikaci vybráno 81 bakteriálních kmenů. U těchto bakteriálních kmenů byly provedeny testy na katalázu, oxidázu, dále byly obarveny dle Grama. Na základě této předběžné identifikace byly použity identifikační soupravy MIKROLATEST®. V případě nejednoznačné identifikace byl ke stanovení využit systém BIOLOG a MALDI-TOF MS.

V začátcích experimentální práce byla snaha stanovit celkové množství vyskytujících se bakterií ve vzorcích vod, a to pomocí přímého výsevu zředěného vzorku vody na MPA. Toto stanovení však nebylo možné z důvodu přítomnosti vysoké koncentrace doprovodné flóry, kdy jednotlivé kolonie byly přerostlé bakteriemi z rodu *Bacillus*, či plísněmi. Proto byly ke stanovení a vyjádření počtů využívány pouze selektivně – diagnostické půdy. V souvislosti s přítomností velkého množství bakterií nebylo možné u většiny vzorků využít ke stanovení metodu membránových filtrů, ale pouze metodu přímého výsevu zředěného vzorku na povrch kultivačního média.

Tabulka 7 – Kvantitativní hodnocení výskytu bakterií ve vodách

Vzorky	Bakterie ve vodách (KTJ/ml)				
	Koliformní bakterie	<i>Escherichia coli</i>	Intestinální enterokoky	Aeromonády	Pseudomonády
1	$5,3 * 10^4$	$3,4 * 10^4$	$1,9 * 10^3$	$2,2 * 10^4$	$1,6 * 10^2$
2	$3,1 * 10^3$	$4,9 * 10^2$	$4,5 * 10^1$	$1,5 * 10^3$	$N < 10^1$
3	$5,5 * 10^1$	$1,0 * 10^1$	$2,5 * 10^1$	$2,5 * 10^1$	$N < 10^1$
4	$1,0 * 10^5$	$4,4 * 10^4$	$4,1 * 10^3$	$2,1 * 10^4$	$9,0 * 10^2$
5	$6,5 * 10^1$	$3,5 * 10^1$	$1,0 * 10^1$	$4,0 * 10^1$	$N < 10^1$
6	$5,1 * 10^4$	$3,8 * 10^4$	$5,9 * 10^3$	$7,5 * 10^3$	$4,5 * 10^2$
7	$2,8 * 10^2$	$1,5 * 10^2$	$3,5 * 10^1$	$1,6 * 10^1$	$N < 10^1$
8	$N < 10^1$	$N < 10^1$	$N < 10^1$	$1,0 * 10^1$	$N < 10^1$

Použité zkratky: 1 – nátok do ČOV Pardubice, 2 – odtok z ČOV Pardubice, 3 – povrchová voda z Labe, 4 – nátok do ČOV Hradec Králové, 5 – odtok z ČOV Hradec Králové, 6 – nátok do ČOV Račín, 7 – odtok z ČOV Račín, 8 – kal ze Synthesia a. s., Pardubice

Při kvantitativním hodnocení nárůstu bakterií se vycházelo z normy ČSN EN ISO 8199. Tímto způsobem byly u všech vzorků vyjádřeny počty v KTJ/ml u termotolerantních koliformních bakterií, *E. coli*, intestinálních enterokoků, aeromonád a pseudomonád. Výsledné počty jsou uvedeny v tabulce 7. Při výpočtu množství termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli* se bral v úvahu pouze nárůst na Chromocult® Coliform agaru, nikoli na M-FC agaru. Baudišová (2014) totiž uvádí, že vlivem vysoké teploty při kultivaci jsou výsledné počty termotolerantních koliformních bakterií často podhodnocené. Tato skutečnost byla potvrzena i při této práci, kdy počty na M-FC agaru byly nižší o 22 – 76 % (průměrně o 46 %) ve srovnání s nárůstem na Chromocult® Coliform agaru.

Pro zajištění záchytu pouze termotolerantních koliformních bakterií byl Chromocult® Coliform agar inkubován při teplotě 42 °C. Pro zajímavost byl vyzkoušen nárůst bakterií na tomto agaru i při 37 °C. Porovnáním výsledných počtů bakterií bylo zjištěno, že kultivací při vyšší teplotě byl počet koliformních bakterií snížen o více než 50 %. Baudišová (2016) uvádí, že Chromocult® Coliform agar není vhodný pro nedesinfikované vzorky vod z důvodu vysokého záchytu doprovodné mikroflóry. V rámci této práce však byly všechny izolované suspektní kolonie, kromě jedné (*A. sobria*), identifikovány jako bakterie patřící do skupiny termotolerantních koliformních bakterií, případně *E. coli*.

Patogenní bakterie, jako jsou salmonely, yersinie a kampylobakteri, byly hodnoceny pouze kvalitativně. Jediným prokázaným patogenem byla *Y. intermedia*, která byla identifikována v povrchové vodě z Labe (vzorek č. 3). V ostatních vzorcích nebyly žádné patogeny přítomny. Tato absence patogenů, která je zarážející obzvláště v odpadních vodách, je pravděpodobně způsobena vlivem aplikace vzorků na selektivní kultivační půdy bez předchozího pomnožení bakterií v selektivních bujóněch. Tento chybějící krok nebude opomenutý v rámci následující diplomové práce na toto téma. Příkladem může být modifikované Rappaport-Vassiliadisovo médium pro salmonely, které použily Baudišová a Benáková (2011) a ve 33 % vzorků odpadních vod prokázaly salmonely, především sérovary *Salmonella enterica*. V odtocích z 5 čistíren v Moravskoslezském kraji stanovovala salmonely také Badurová (2011), která je prokázala pouze u 4 % vzorků, následující rok nebyly salmonely prokázány v žádném odběru (Badurová, 2011). Další výzkum prováděla Masarikova *et al.* (2016), která se zaměřila na stanovení bakterií rodu *Salmonella* v odpadních vodách v Brně v roce 2012. K průkazu salmonel využila pufrovanou peptonovou vodu

pro revitalizaci a pomnožení bakterií s následnou kultivací v modifikovaném polotuhém Rappaport – Vassiliadisovu agaru. Salmonely byly zjištěny ve všech 37 vzorcích. V rámci tohoto výzkumu byl zjištěn vyšší výskyt salmonel rezistentních vůči antibiotikům v odpadních vodách, odkud se šíří do životního prostředí a představují riziko pro volně žijící živočichy a stěhovavé vodní ptáky, např. racky (Masarikova *et al.*, 2016).

Dalším zarážejícím faktem je nepřítomnost kampylobakterů. Baudišová a Benáková (2011) prokázala kampylobaktery ve všech testovaných vzorcích surových odpadních vod, a to ve stovkách KTJ/ml. V odpadních vodách po čištění byly hodnoty kampylobakterů výrazně sníženy, a to o 98,1 – 99,9 % (Baudišová a Benáková, 2011). Hokajärvi *et al.* (2013) uvádí, že během testování finských odpadních vod byl rod *Campylobacter* prokázán u 59 % vzorků a nejčastěji se vyskytujícím druhem byl *C. jejuni*. Alexandrino *et al.* (2004) stanovovali v odpadních vodách patogeny *C. jejuni*, *C. coli* a *Y. enterocolitica* sérovar 0:3 pomocí metod založených na PCR. Pomocí takových metod mohou být patogeny ve vodách identifikovány do 12 hodin. Velkou výhodou je možnost stanovení životaschopných, ale nekultivovatelných bakterií (Alexandrino *et al.*, 2004).

Bakterie z rodu *Aeromonas* byly prokázány ve všech testovaných vzorcích vod, kdy nejčastěji vyskytujícími se druhy byly *A. sobria*, *A. caviae* a *A. media*. Pomocí MALDI–TOF MS byl identifikován jeden kmen jako *A. hydrophila*. Figueira *et al.* (2011) se zaměřil na izolaci oxidáza – pozitivních kmenů z různých vzorků vod v severním Portugalsku. Dohromady ze 741 izolátů bylo pomocí analýzy genové sekvence 16S rRNA identifikováno 121 kmenů. 80 kmenů bylo získáno z různých úpraven pitných vod, kdy 51 kmenů ze surových povrchových vod a 29 kmenů z vod po ozonizaci. Z odpadních vod bylo dohromady izolováno 32 kmenů, z toho 17 ze surových odpadních vod a 15 z již přečištěných odpadních vod. V podzemních vodách ani ve vodách z kohoutku nebyly aeromonády prokázány. V surových povrchových vodách byla nejvíce zastoupena *A. sobria*, ve vodách po ozonizaci *A. hydrophila*, v surových vzorcích odpadních vod *A. media* a *A. caviae* a v odpadních vodách po vyčištění *A. media* (Figueira *et al.*, 2011). Khajanchi *et al.* (2010) stanovil, že nejvíce zastoupenými aeromonádami v různých vzorcích vod z USA je skupina *A. hydrophila*, do které autor řadí *A. hydrophila*, *A. bestiarum* a *A. salmonicida*. Právě tato skupina představovala 87 kmenů (59,5 %) z celkových 146 izolovaných kmenů aeromonád. Největší výskyt bakterií z této skupiny byl v povrchových vodách a poté ve vodách

podzemních. Další nejvíce zastoupenou skupinou ve vodách je skupina *A. veronii* – *A. sobria* (bakterie *A. veronii* biovar *sobria*, *A. jandaei*, *A. schubertii* a *A. trota*). Výskyt této skupiny v testovaných vodách je 15,7 %, z toho nejvíce v povrchových vodách. Skupina *A. caviae* – *A. media* (bakterie *A. caviae*, *A. media* a *A. eucrenophila*) byla zastoupena v 14,3 %, z toho nejvíce v podzemních vodách. Poslední skupinou byly atypické aeromonády, které byly ve vodách zastoupeny v 10,2 % (Khajanchi *et al.*, 2010).

Baudišová a kol. (2011) poukazuje na skutečnost, že *E. coli* čím dál více nahrazuje stanovování termotolerantních fekálních koliformních bakterií. *E. coli* totiž představuje nejvýznamnějšího zástupce této skupiny, jejíž zastoupení je průměrně 60 – 70 %. Autorka také uvádí, že se výskyt fekálních koliformních bakterií v surových odpadních vodách pohybuje řádově v množství 10^5 KTJ/ml, přičemž výskyt *E. coli* je 10^4 – 10^5 KTJ/ml (Baudišová a kol., 2011). V odtocích z ČOV je množství vyskytujících se bakterií nižší, a to 10^2 KTJ/ml pro termotolerantní koliformní bakterie a 10^1 – 10^2 KTJ/ml pro *E. coli* (Baudišová a Benáková, 2011). Údaje uvedené pro surové odpadní vody jsou totožné s výsledky získanými v rámci této práce. Po úpravě odpadních vod byly hodnoty výskytu bakterií ve vzorku č. 2 (ČOV Pardubice) vyšší, a to 10^3 KTJ/ml termotolerantních koliformních bakterií. Ostatní vzorky odpadních vod po úpravě odpovídaly výše uvedeným hodnotám. Baudišová a kol. (2011) testovala v letech 2005 – 2011 odtoky z více než 100 malých i velkých ČOV, u kterých bylo zjištěno, že hodnoty výskytu indikátorů fekálního znečištění byly průměrně desetinásobně vyšší, než udává česká legislativa, a to v té době platné Nařízení vlády č. 23/2011 Sb. Dnes je aktuální Nařízení vlády č. 401/2015 Sb., jejichž maximální přípustné hodnoty znečištění jsou totožné s předchozím nařízením, tedy pro *E. coli* 2500 KTJ/100ml a pro termotolerantní fekální koliformní bakterie 4000 KTJ/100ml (Nařízení vlády č. 401/2015 Sb.). V tomto ohledu žádný testovaný vzorek odtoku z ČOV (vzorek č. 2, 5 a 7) nesplňuje zadané limity.

Při stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli* byly použity selektivně diagnostické půdy, které obsahují substráty pro enzym β – D – galaktosidázu (koliformní bakterie) a pro enzym β – D – glukuronidázu (*E. coli*). Poté probíhala 24 hodinová inkubace. Vhodnou a rychlejší alternativu tohoto stanovení popisuje Fiksdal *et al.* (1994) a George *et al.* (2001) s využitím enzymatických testů, které jsou založeny na průkazu výše uvedených enzymů. Principem testu je filtrace malého množství vzorku vody (1 – 20 ml) přes filtr

o velikosti pórů 0,2 μm . Dalším krokem je přenesení filtru do baňky s fosfátovým pufrem (a dalšími roztoky) a příslušným specifickým substrátem pro daný stanovovaný enzym. Po inkubaci v třepací vodní lázni při 37 °C se měří fluorescence pomocí spektrofluorometru. Díky tomu mohou být koliformní bakterie a *E. coli* stanoveny již během 20 – ti minut. Uplatnění této metody se nabízí např. pro rychlé stanovení účinnosti čištění odpadních vod (Fiksdal *et al.*, 1994; George *et al.*, 2001).

V odpadních a povrchových vodách je výskyt enterokoků očekávaný. Da Silva *et al.* (2006) vyzoloval ze surových a vyčištěných odpadních vod ze severního Portugalska během roku dohromady 148 kmenů enterokoků. Nejvíce zastoupeným druhem v surových odpadních vodách byl *En. hirae*, poté následuje *En. faecium* a *En. faecalis*. Ve vyčištěných odpadních vodách převažoval *En. faecium*, což prokazuje vyšší odolnost oproti *En. hirae*. Kühn *et al.* (2003) uvádí, že výskyt druhů enterokoků v povrchových vodách je srovnatelný s výskytem ve vyčištěných odpadních vodách. Odpadní vody po ČOV ve Španělsku a Velké Británii obsahovaly enterokoky v množství $10^2 - 10^3$ KTJ/ml a nejvíce zastoupeným druhem byl *En. faecium*. Ve Švédsku byl výskyt enterokoků nižší, a to 10^1 KTJ/ml, kdy *En. faecalis* byl nejvíce zastoupeným druhem (Kühn *et al.* 2003). Podobné výsledky uvádí i Blanch *et al.* (2003). Uvedené počty enterokoků ve vyčištěných odpadních vodách jsou srovnatelné s výsledky získanými v rámci této práce, kdy nejvíce zastoupeným druhem byl *En. hirae* a *En. faecalis*. Dále byl ve vodách prokázán i *En. gallinarum* a *En. mundtii*.

4.1.1 ČOV Pardubice

První odběr byl z ČOV Pardubice, kde vzorek č. 1 představoval nátok do ČOV a vzorek č. 2 odtok z ČOV. Vzorek č. 1 obsahoval z testovaných bakterií 69 % termotolerantních koliformních bakterií, z toho 45 % *E. coli* (obr. 10). Dále byly ve 3 % přítomny intestinální enterokoky, 28 % aeromonád a 0,2 % pseudomonád. Z rodu *Pseudomonas* byl přítomen ten nejvýznamnější zástupce, a to *P. aeruginosa* (obr. 11). Schwartz *et al.* (2006) provedl výzkum výskytu *P. aeruginosa* v různých vzorcích německých odpadních vod a zároveň testoval jejich citlivost vůči ciprofloxacinu. Dohromady stanovil 127 kmenů *P. aeruginosa*, přičemž u 119 kmenů byla prokázána rezistence vůči ciprofloxacinu, tedy u 93,7 % kmenů. Více než dvě třetiny ciprofloxacin – rezistentních kmenů *P. aeruginosa* byly izolovány z odpadních vod z nemocnic (Schwartz *et al.*, 2006). Černohorská a Sláviková (2009) vyzolovaly 118 kmenů *P. aeruginosa* od pacientů s infekcí močových cest a prokázaly, že 86 kmenů, tedy

72,9 %, je rezistentní vůči ciprofloxacinu. *P. aeruginosa* izolovaná v rámci této práce byla na ciprofloxacin citlivá. Dále byly v testovaném vzorku přítomny na XLD agaru suspektní kolonie rodu *Salmonella* (obr. 12), avšak biochemickými testy byla jejich přítomnost vyvrácena. Stejně tak nebyly ve vzorku prokázány ani yersinie a kampylobakteři.



Obrázek 10 – Vzorek č. 1 na Chromocult® Coliform agaru v ředění 10^{-3} (foto autor)

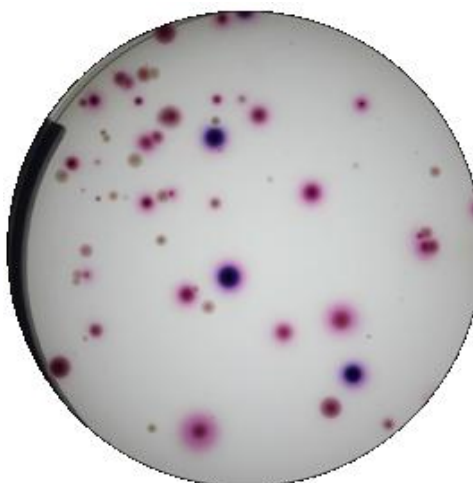


Obrázek 11 – *Pseudomonas aeruginosa* ze vzorku č. 1 na neselektivním médiu MPA (černé pozadí), (foto autor)



Obrázek 12 – Suspektní kolonie rodu *Salmonella* ve vzorku č. 1 na XLD agaru v ředění 10^{-3} (červené označení), (foto autor)

Zastoupení bakterií ve vzorku č. 2 bylo obdobné jako ve vzorku č. 1, a to 67 % termotolerantních koliformních bakterií, z toho 11 % *E. coli* (obr. 13). Porovnáním obrázku 13 a obrázku 10 získáme docela jasnou představu o množství vyskytujících se bakterií, které je výrazně nižší oproti vzorku č. 1. Zastoupení enterokoků bylo v tomto vzorku vody velice nízké, a to pouhé 1 %, zatímco aeromonády byly zastoupeny z 32 %. Pseudomonády nebyly ve vzorku prokázány, stejně tak ani salmonely, yersinie a kampylobakteři.



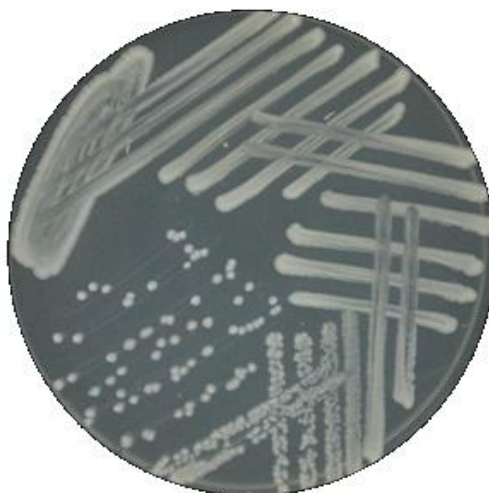
Obrázek 13 – Vzorek č. 2 na Chromocult® Coliform agaru v ředění 10^{-3} (foto autor)

4.1.2 Povrchová voda z Labe

Další odběr představoval povrchovou vodu z Labe (vzorek č. 3), kde bylo z testovaných bakterií prokázáno 52 % termotolerantních koliformních bakterií, z toho 10 % *E. coli*, dále 24 % intestinálních enterokoků a 24 % aeromonád. Bakterie z rodu *Pseudomonas*, *Campylobacter* ani z rodu *Salmonella* nebyly ve vzorku prokázány. Na obrázku 14 jsou zobrazeny dvě izolace suspektních kolonií rodu *Salmonella* z primární kultury. Po izolaci se však ukázalo, že pouze jedna z izolací roste v typických průsvitných koloniích s černým středem. Neznámý kmen ale nebyl identifikován jako zástupce rodu *Salmonella*, nýbrž *Citrobacter*. Zároveň je z obrázku zřejmé, že vlevo se jedná o směšnou kulturu. Jedinou patogenní bakterií, která byla prokázána ve vodě z Labe, je *Yersinia intermedia*, která je zobrazena na obrázku 15. Sinha *et al.* (2000) izoloval tuto bakterii z odpadních vod v Dillí v Indii, kdy z 50 vzorků byla *Y. intermedia* prokázána v 11 vzorcích odpadních vod. Stock and Wiedemann (2003) ve své studii využili k testování citlivosti na antibiotika bakteriální kmeny *Y. intermedia*, které byly izolovány z vod ve Švédsku a Německu.



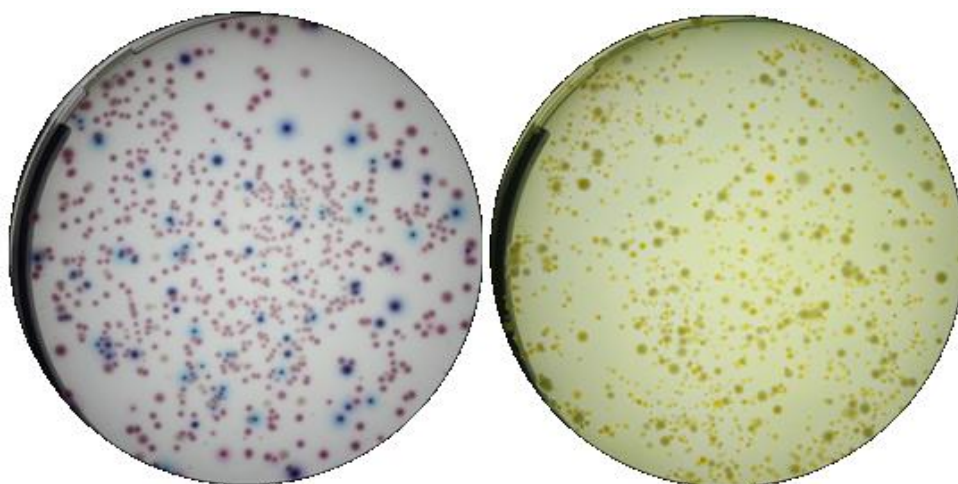
Obrázek 14 – Izoláty suspektních kolonií z primární kultury ze vzorku č. 3 na XLD agaru (foto autor), *vlevo*: charakteristické suspektní kolonie, *vpravo*: vyloučení rodu *Salmonella*



Obrázek 15 – *Yersinia intermedia* ze vzorku č. 3 na neselektivním médiu TSA (černé pozadí), (foto autor)

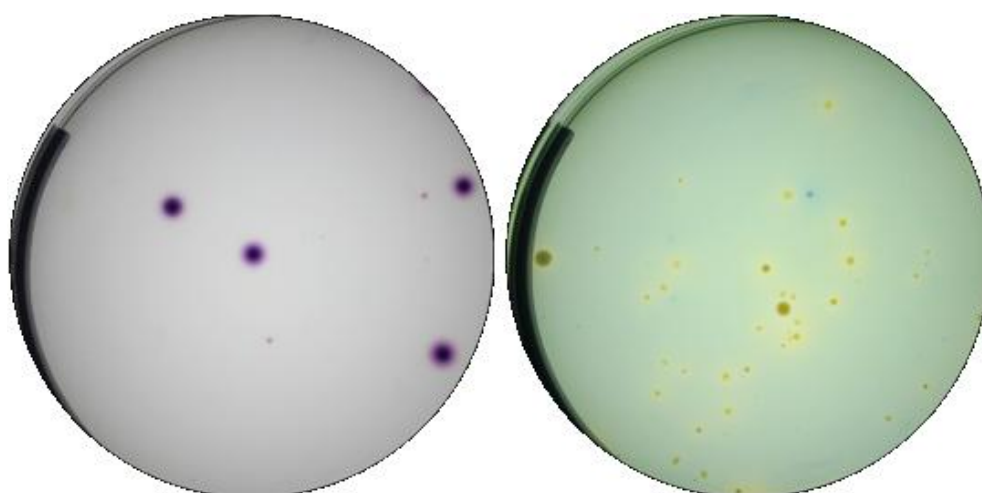
4.1.3 ČOV Račín

ČOV Račín (okr. Žďár nad Sázavou) poskytla k testování dva vzorky vod, a to nátok do ČOV (vzorek č. 4) a odtok z ČOV (vzorek č. 5). Vzorek č. 4 obsahoval největší množství bakterií ve srovnání s ostatními vzorky, což je také viditelné na obrázku 16. Písařová a kol. (2003) uvádí, že míra znečištění odpadních vod často nezávisí jen na velikosti města či obce. Charakter odpadních vod významně ovlivňují zemědělské a průmyslové odpadní vody (Písařová a kol., 2003). Na základě této skutečnosti si můžeme vysvětlit zarážející skutečnost vyššího výskytu bakterií v nátoce ČOV z obce než v nátoce ČOV z měst. Z testovaných bakterií bylo prokázáno 79 % termotolerantních koliformních bakterií, z toho 34 % *E. coli*, dále 3 % intestinálních enterokoků, 19 % aeromonád a 1 % pseudomonád. Patogenní bakterie jako jsou salmonely, yersinie a kampylobakteři nebyly ve vzorku vody prokázány.



Obrázek 16 – Vzorek č. 4 v ředění 10^{-3} (foto autor),
vlevo Chromocult® Coliform agar, vpravo M–Aeromonas selektivní agar

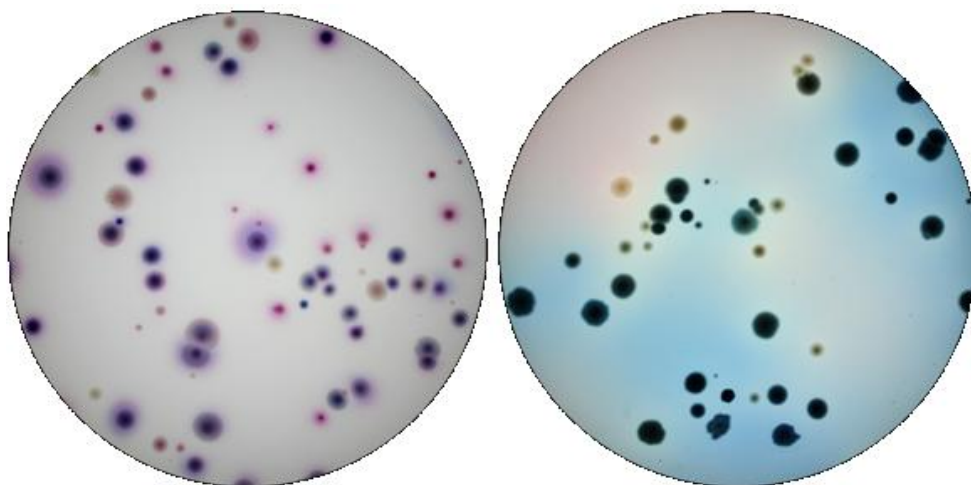
Vzorek odtoku odpadní vody z ČOV (vzorek č. 5) obsahoval nejmenší množství bakterií ve srovnání s ostatními vzorky, s výjimkou vzorku č. 8 (kal z firmy Synthesia a. s.), což je patrné z obrázku 17. Z celkového množství bakterií bylo ve vzorku přítomno 57 % termotolerantních koliformních bakterií, z toho 30 % *E. coli*, dále 9 % intestinálních enterokoků, 35 % aeromonád. Pseudomonády nebyly ve vzorku prokázány, stejně tak kampylobakteri, salmonely a yersinie.



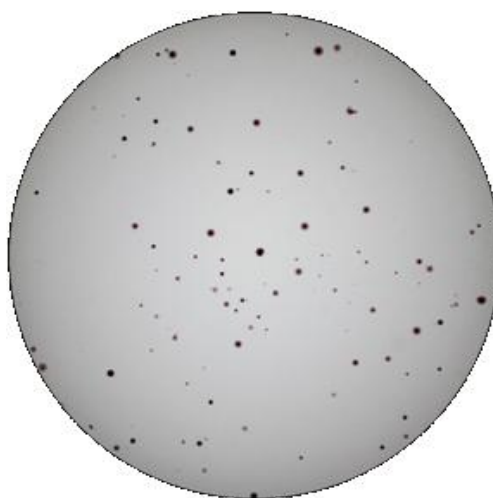
Obrázek 17 – Vzorek č. 5 v ředění 10^{-1} (foto autor),
vlevo M – FC agar, vpravo M – Aeromonas selektivní agar

4.1.4 ČOV Hradec Králové

Další ČOV, ze které byly odebrané dva vzorky, byla ČOV Hradec Králové. První představoval nátok do ČOV (vzorek č. 6), druhý zase odtok z ČOV (vzorek č. 7). Vzorek č. 6 obsahoval z testovaných bakterií 79 % termotolerantních koliformních bakterií, z toho 59 % *E. coli* (obr. 18). Vzorek dále obsahoval 9 % intestinálních enterokoků (obr. 19), 11 % aeromonád a 1% pseudomonád. Suspektní kolonie rodu *Salmonella* byly izolovány na XLD agar (obr. 20), avšak testem ENTERO – Rapid 24 byl kmen identifikován jako *Citrobacter youngae*. Yersinie ani kampylobakteri nebyly ve vzorku vody prokázány.



Obrázek 18 – Vzorek č. 6 v ředění 10^{-3} na Chromocult[®] Coliform agaru (vlevo) a M – FC agaru (vpravo), (foto autor)

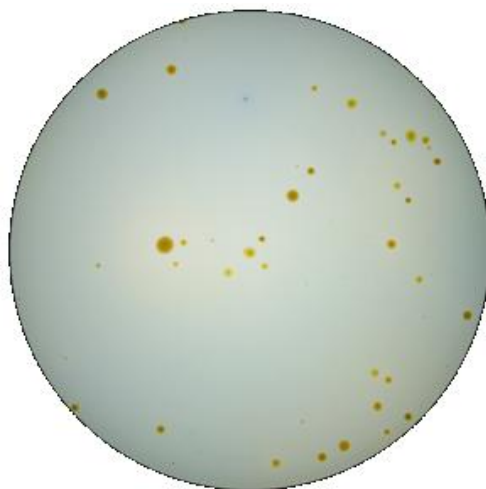


Obrázek 19 – Vzorek č. 6 na Slanetz – Bartely agaru v ředění 10^{-2} (foto autor)

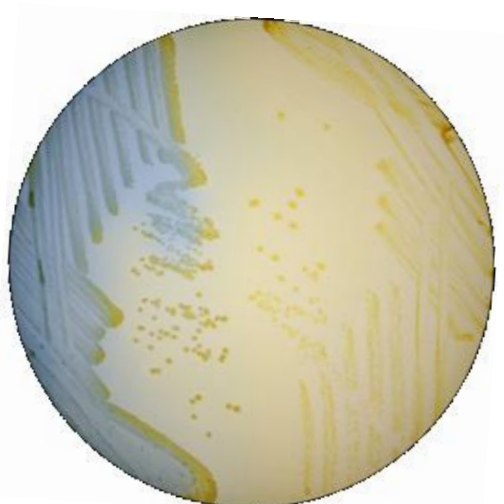


Obrázek 20 – Izolace suspektní kolonie z primární kultury vzorku č. 6 na XLD agaru (*Citrobacter youngae*), (foto autor)

Zastoupení bakterií ve vzorku č. 7 bylo 59 % termotolerantních koliformních bakterií, z toho 32 % *E. coli*, dále 7 % intestinálních enterokoků a 34% aeromonád (obr. 21). Suspektní kolonie rodu *Aeromonas* byly izolovány na M–*Aeromonas* selektivní agar (obr. 22), a poté i na KA, odkud byly kmeny identifikovány jako *Aeromonas sobria* (obr. 23) a *Aeromonas media*. *A. sobria* byla dle Figueira *et al.* (2011) nejvíce prokázána v surových povrchových vodách (49 %), dále ve vodách po ozonizaci (24,1 %) a v surových odpadních vodách (4,5 %), zatímco v odpadních vodách po ČOV prokázána nebyla. Výskyt *A. media* byl nejvyšší v odpadních vodách po ČOV (36,8 %), dále v surových odpadních vodách (36,4 %) a v surových povrchových vodách (19,6 %). Ve vodách po ozonizaci se *A. media* nevyskytovala (Figueira *et al.*, 2011). Pseudomonády, salmonely, yersinie ani kampylobakteři nebyli ve vzorku vody prokázáni.



Obrázek 21 – Vzorek č. 7 na M–*Aeromonas* selektivním agaru v ředění 10^{-2} (foto autor)



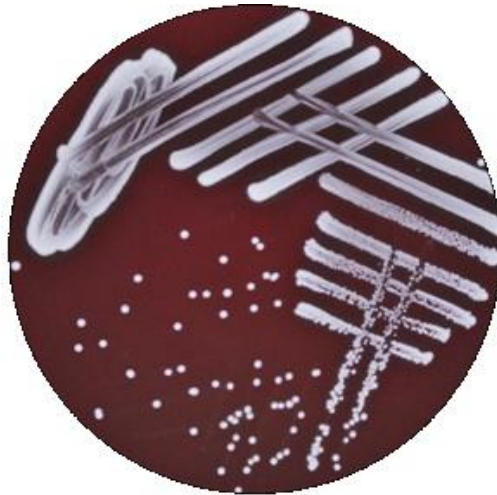
Obrázek 22 – Izolace suspektních kolonií z primární kultury vzorku č. 7 na M–*Aeromonas* selektivní agar (foto autor), vlevo: *Aeromonas sobria*, vpravo: *Aeromonas media*



Obrázek 23 – *Aeromonas sobria* ze vzorku č. 7 na KA (foto autor)

4.1.5 Kal – Synthesia a. s.

Posledním odebraným vzorkem byl kal z pardubické firmy Synthesia a. s. (vzorek č. 8). Jelikož se jednalo o kal z chemické čističky, bylo pro jistotu změřené i pH, které bylo 8. V tomto vzorku byly přítomny pouze aeromonády, přesněji *A. caviae* (obr. 24), a to v množství $1,0 \cdot 10^1$ KTJ/ml. Dle Figueira *et al.* (2011) byla *A. caviae* nejvíce zastoupena v surových odpadních vodách (36,4 %), dále v odpadních vodách po ČOV (31,6 %) a v surových povrchových vodách (7,8%).

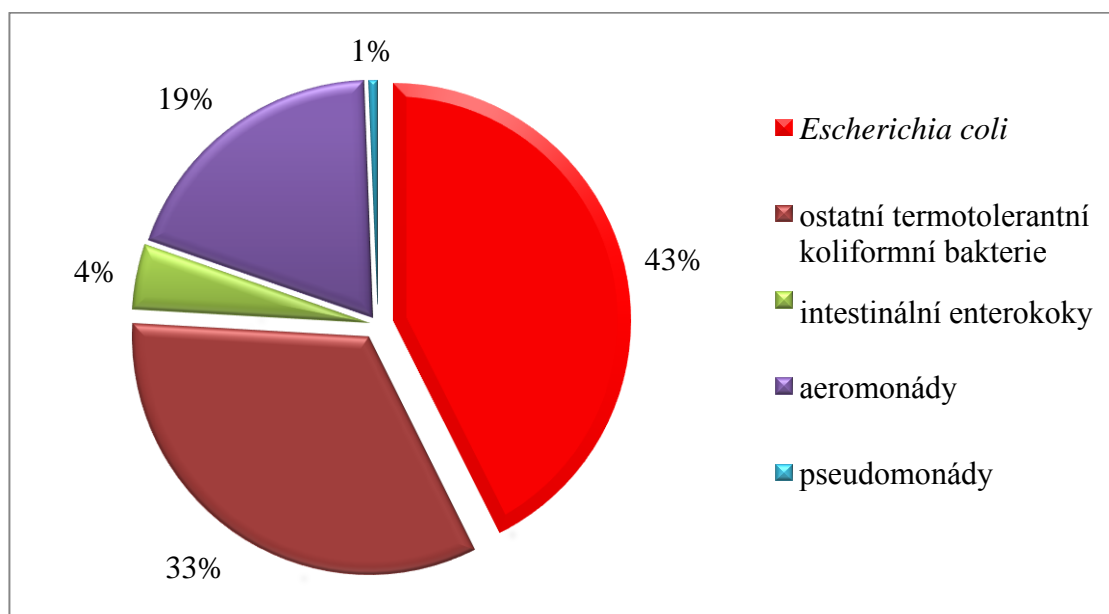


Obrázek 24 – *Aeromonas caviae* ze vzorku č. 8 na KA (foto autor)

4.2 Celkové zhodnocení testovaných vzorků vod a účinnost ČOV

Celkové zhodnocení výskytu bakterií v testovaných vzorcích vod je uvedeno na grafu 1, ze kterého je zřejmé, že nejvíce zastoupenými bakteriemi ve vodách jsou termotolerantní koliformní bakterie, z nichž více než polovinu představuje *E. coli*. Další skupinou nejvíce zastoupených bakterií jsou aeromonády. Pianetti *et al.* (2004) uvádí, že výskyt aeromonád ve vodách nijak nesouvisí s fekálním znečištěním. Zároveň byly provedeny testy na molekulární úrovni, díky kterým bylo zjištěno, že aeromonády vyvolávající gastroenteritidy nejsou totožné s těmi, které bývají prokázány v pitných vodách (WHO, 2011). Intestinální enterokoky jsou zastoupeny v poměrně malém množství. Z toho můžeme usuzovat, že zdrojem znečištění vod je člověk. Sinton *et al.* (1998) totiž uvádí, že prostřednictvím výpočtu poměru termotolerantních koliformních bakterií a intestinálních enterokoků, dříve tzv. fekálních streptokoků, můžeme určit zdroj kontaminace. Tato skutečnost je dána mnohem nižším výskytem intestinálních enterokoků u člověka ve srovnání s termotolerantními koliformními bakteriemi, zatímco u zvířat zase převládají intestinální enterokoky. Pokud je tento poměr větší než 4, jedná se o znečištění lidského původu. Tato metoda je ale pro charakterizaci původu znečištění nespolehlivá, a to z důvodu variabilního přežívání různých druhů intestinálních enterokoků, různé odolnosti vůči vodnímu prostředí, změnám v detekčních metodách apod. (Clesceri *et al.*, 1998; Sinton *et al.*, 1998). V nejmenším množství jsou pak ve vodách zastoupeny pseudomonády. Relai and Rosati (1994) uvádí, že kmeny *P. aeruginosa* izolované z environmentálního prostředí mohou být méně rezistentní vůči antibiotikům než ty, které jsou izolovány z klinických vzorků.

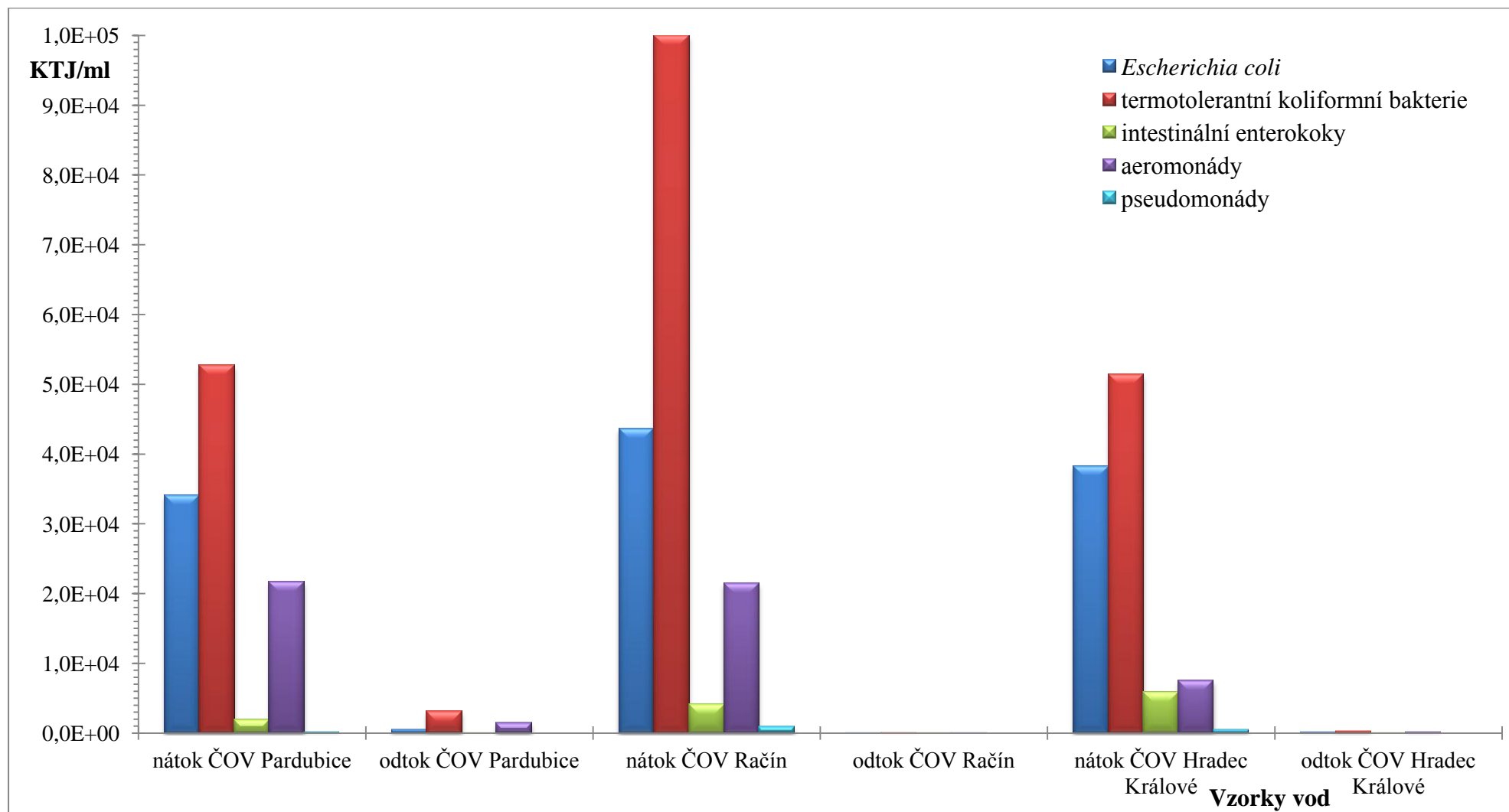
Graf 1 – Zastoupení bakterií v testovaných vzorcích vod



Výskyt bakterií ve vodách významně koreluje se schopností bakterií přežít v tomto prostředí. Schopnost přežívání bakterií je ovlivňována teplotou, koncentrací rozpuštěného organického uhlíku, intenzitou slunečního záření. Důležitý je i jejich přechod do životaschopného, ale nekultivovatelného stavu (Medema *et al.*, 2003). Baudišová (1997) testovala schopnost přežití celkových koliformních bakterií, termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli* ve sterilních a nesterilních vodách. Ve sterilních vodách všechny bakterie přežily po dobu několika měsíců, avšak ve vodách nesterilních, které více odpovídaly skutečnému prostředí, se jejich schopnost přežití výrazně snížila. V takovémto prostředí nejdéle přežily celkové koliformní bakterie, zatímco *E. coli* vymizela nejrychleji (Baudišová, 1997).

Díky odběru vzorků před ČOV a po ČOV bylo možné zhodnotit účinnost čištění odpadní vody v jednotlivých čističkách, a to v Pardubicích (vzorky č. 1 a 2), obci Račín (vzorky č. 4 a 5) a Hradci Králové (vzorky č. 6 a 7). Výsledky nárůstu bakterií uvádí graf 2, ze kterého je zřejmé snížené množství vyskytujících se bakterií v odpadních vodách po ČOV (vzorek č. 2, 5 a 7). V Pardubicích byl výskyt bakterií po ČOV snížen o 93,9 %, v obci Račín o 99,9 % a v Hradci Králové o 99,3 %. Baudišová (2011) uvádí, že by se procesem čištění odpadních vod mělo snížit množství fekálních bakterií o 2 – 3 řády, tedy o více než 98 %. Z této skutečnosti lze vyvodit, že nejhůře si stojí ČOV Pardubice (94,2 %), zatímco ČOV Račín (99,9 %) a ČOV Hradec Králové (99,5%) těmto podmínkám vyhovují.

Graf 2 – Srovnání počtu bakterií v odpadních vodách před ČOV a po ČOV.



4.3 Konfirmace vybraných bakteriálních kmenů

Z již zmíněných 81 bakteriálních kmenů bylo pomocí identifikační soupravy MIKROLATEST[®] dobře identifikováno 63 kmenů, avšak 18 kmenů bylo identifikováno nejasně. Proto byla konečná identifikace u těchto kmenů zprostředkována pomocí systému BIOLOG a MALDI–TOF MS. Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulce 8 společně s posouzením kvality identifikace. Kvalita identifikace soupravou MIKROLATEST[®] je uváděná v tzv. identifikačních % (0 – 100 %) a v T – indexu (0 – 1). Identifikační % vyjadřují míru pravděpodobnosti a T – indexy zase míru typičnosti testovaného kmene. T – index $\geq 0,75$ vypovídá o typickém kmenu, $\geq 0,50$ o málo typickém kmenu a hodnoty T – indexu $< 0,50$ představují kmen atypický (Erba Lachema s. r. o., 2016). U systému BIOLOG je kvalita identifikace uváděna jako hodnota tzv. similarity neboli podobnosti, a to v rozmezí od 0 – 1. Pokud je hodnota podobnosti vyšší jak 0,75, můžeme výsledek identifikace považovat za vysoce pravděpodobný. Pokud je od 0,75 – 0,50, je výsledek identifikace přijatelný a bakterie s hodnotou similarity pod 0,50 nejsou identifikovány (Miller and Rhoden, 1991). V případě MALDI–TOF MS je míra spolehlivosti identifikace uváděna ve formě tzv. skóre od 1 – 3. Skóre od 2,3 – 3,0 vypovídá o identifikaci s vysokou pravděpodobností na úrovni druhu, 2,0 – 2,3 o identifikaci s vysokou pravděpodobností na úrovni rodu a s pravděpodobností na úrovni druhu a skóre od 1,7 – 2,0 vypovídá o pravděpodobné identifikaci na úrovni rodu. V případě, že je výsledné skóre nižší jak 1,7, bakterie není identifikována (Bursová a kol., 2014).

Shoda v identifikaci rodu i druhu systémem BIOLOG a MALDI–TOF MS byla v šesti případech. Ostatní výsledky byly již mírně odlišné, avšak identifikace bakterie na úrovni rodu byla většinou totožná v obou případech. Jak je z tabulky patrné, velké rozdíly jsou v případě bakterií z rodu *Klebsiella* a *Raoultella*. Obecně se jedná o bakterie, které jsou si velice blízké. Rod *Raoultella* byl od rodu *Klebsiella* oddělen teprve v roce 2001. *Raoultella ornithinolytica* byla do nedávna nazývána jako ornitin – pozitivní *Klebsiella oxytoca* (Drancourt *et al.*, 2001; Walckenaer *et al.*, 2004). Na tuto podobnost rodů upozorňuje i systém MALDI–TOF MS při vyhodnocování identifikace. Významné neshody v identifikaci jsou i v případě druhů rodu *Aeromonas*. Systémem BIOLOG nebyly identifikovány 2 kmene aromonád, což by se dalo vyřešit použitím protokolu B, místo protokolu A. Protokol B se využívá pro identifikaci rychle redukujících a opouzdřených druhů bakterií (BIOLOG, 2017). Dalším případem je *Yokenella regensburgei* a *Hafnia alvei*. Rozdílná identifikace je pravděpodobně způsobená

tím, že bakterie *Yokenella regensburgei* je jak biochemicky, tak geneticky velmi podobná bakterii *Hafnia alvei* (Niedziela *et al.*, 2010).

Tabulka 8 – Porovnání identifikace bakterií pomocí MIKROLATEST[®], systému BIOLOG a MALDI-TOF MS

MIKROLATEST [®]	BIOLOG	MALDI TOF MS
<i>Burkholderia cepacia</i> komplex (0,658)	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 0,66	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2,19
<i>Burkholderia cepacia</i> komplex (0,630)	<i>Klebsiella oxytoca</i> 0,58	<i>Klebsiella oxytoca</i> 2,40
<i>Hafnia alvei</i> (1,000)	<i>Yokenella regensburgei</i> 0,65	<i>Hafnia alvei</i> 2,21
<i>Burkholderia cepacia</i> komplex (0,508)	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 0,73	<i>Klebsiella variicola</i> 2,15
<i>Serratia ficaria</i> (0,156) <i>Yersinia enterocolitica</i> (0,048)	<i>Yersinia intermetida</i> 0,73	<i>Yersinia intermedia</i> 2,28
<i>Klebsiella oxytoca</i> (0,638) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (0,653)	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 0,66	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 2,34
<i>Citrobacter youngae</i> (0,758) <i>Yersinia kristensenii</i> (0,747)	<i>Citrobacter youngae</i> 0,70	<i>Citrobacter youngae</i> 2,29
<i>Pseudomonas monteilli</i> (0,476) netypický kmen	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> 0,72	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> 2,31
<i>Klebsiella oxytoca</i> (0,638) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (0,653)	<i>Klebsiella oxytoca</i> 0,65	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 2,47
<i>Aeromonas caviae</i> (0,416) <i>Aeromonas hydrophila</i> (0,517)	Neidentifikováno	<i>Aeromonas media</i> 2,21
<i>Klebsiella oxytoca</i> (0,668) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (0,653)	<i>Klebsiella mobilis</i> 0,52	<i>Raoultella ornithinolytica</i> 2,36
<i>Aeromonas caviae</i> (0,621) <i>Aeromonas hydrophila</i> (0,597)	<i>Aeromonas hydrophila</i> 0,58	<i>Aeromonas bestiarum</i> 2,18
<i>Aeromonas caviae</i> (0,247) <i>Burkholderia cepacia</i> komplex (0,471)	<i>Aeromonas eucrenophila</i> 0,58	<i>Aeromonas caviae</i> 2,26
<i>Aeromonas caviae</i> (0,476) <i>Aeromonas sobria</i> (0,594)	<i>Aeromonas bestiarum</i> 0,56	<i>Aeromonas media</i> 2,14
<i>Vibrio hollisae</i> (0,806) <i>Chryseobacterium indologenes</i> (0,721)	<i>Aeromonas eucrenophila</i> 0,55	<i>Aeromonas bestiatum</i> 2,16
<i>Citrobacter freundii</i> (0,491) <i>Yersinia rhodei</i> (0,442)	<i>Citrobacter braakii</i> 0,62	<i>Citrobacter freundii</i> 2,39
<i>Chryseobacterium indologenes</i> (0,369) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (0,223)	<i>Aeromonas media</i> 0,54	<i>Aeromonas media</i> 2,35
<i>Aeromonas caviae</i> (0,399) <i>Burkholderia cepacia</i> komplex (0,533)	Neidentifikováno	<i>Aeromonas hydrophila</i> 2,21

Z tabulky 8 je patrné, že identifikace pomocí soupravy MIKROLATEST[®] byla v rámci rodu ve většině případech totožná jako identifikace pomocí moderních systémů. Významnou výjimku představují bakterie z komplexu *Burkholderia cepacia*, které byly systémem BIOLOG a MALDI–TOF MS identifikovány jako bakterie rodu *Klebsiella*, případně *Raoultella*.

Bessede *et al.* (2011) uvádí, že identifikace prostřednictvím MALDI–TOF MS je mnohem spolehlivější než využití různých fenotypových metod. Markerem kvality identifikace je skóre, kdy MALDI–TOF MS falešně identifikovalo v rámci rodu pouze 4 kmeny (s hodnotou skóre $\geq 2,00$) z dohromady 1013 izolací z klinických vzorků. Sedm kmenů nebylo identifikováno vůbec. Správnost identifikace pomocí MALDI–TOF MS byla posuzována pomocí sekvenace 16S rRNA genů (Bessede *et al.*, 2011).

Wragg *et al.* (2014) porovnával kvalitu identifikace pomocí systému BIOLOG, MALDI–TOF MS a sekvenace 16S rRNA genů. Nejlepší identifikaci v rámci druhu poskytovala metoda sekvenace 16S rRNA genů. Avšak tato metoda je velmi náročná a nákladná. Přesnost identifikace v rámci rodu byla systémem BIOLOG a MALDI–TOF srovnatelná. Systémem BIOLOG bylo správně identifikováno v rámci druhu 56 % a v rámci rodu 29 % testovaných kmenů. Zbývající kmeny (15 %) nebyly identifikovány vůbec. MALDI–TOF MS identifikoval v rámci druhu 53 %, a v rámci rodu 35 % testovaných kmenů a 12 % kmenů nebylo identifikováno vůbec. Bakteriální kmeny testované v této studii byly izolovány z veterinárních vzorků (Wragg *et al.*, 2014).

Velkou výhodou systému BIOLOG oproti MALDI–TOF MS je schopnost rozeznat rod *Shigella* od *E. coli*. Oba tyto rody jsou si velmi podobné (Bizzini *et al.*, 2010; BIOLOG, 2014). Další výhodou je lepší identifikace rodu *Bacillus* a čeledi *Pasteurellaceae* (BIOLOG, 2014).

Systém MALDI–TOF MS je tou nejlepší možnou volbou pro identifikaci mikroorganismů v lidských vzorcích (Urwyler and Glaubitz, 2016). Použití systému BIOLOG však není povoleno v diagnostických laboratořích, ale je hojně využíván ve veterinárních a farmaceutických laboratořích (BIOLOG, 2014).

4.4 Testování citlivosti bakterií na antibiotika

Druhá část diplomové práce spočívala v testování citlivosti vybraných bakterií na antimikrobiální látky. K testování bylo vybráno dohromady 11 bakteriálních kmenů, a to 7 kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Y. intermedia*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella ornithinolytica*, *Citrobacter freundii* a *Klebsiella pneumoniae*), dále dva kmeny z rodu *Aeromonas* (*A. sobria* a *A. caviae*) a bakterie *P. aeruginosa* a *En. faecalis*.

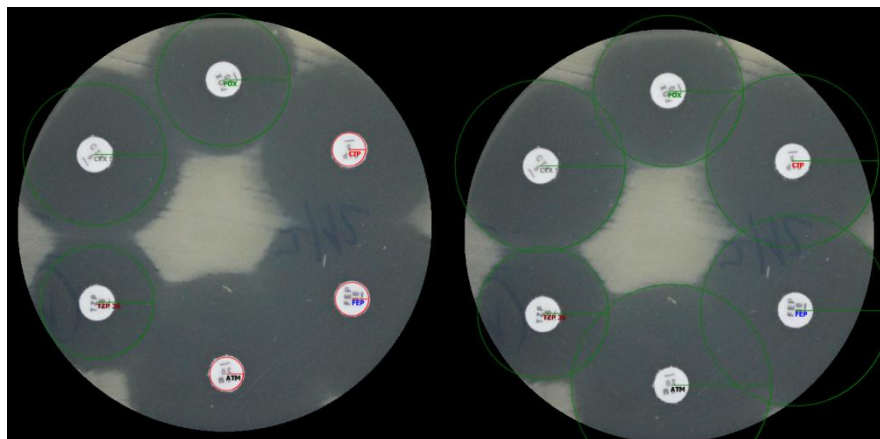
Tabulka 9 – Zařazení vybraných antibiotik do příslušných skupin
(Votava, 2005; EUCAST, 2017b).

SKUPINA ANTIBIOTIK	JEDNOTLIVÁ ANTIBIOTIKA
Peniciliny	Amoxicilin – Klavulát
	Ampicilin
	Piperacilin
	Piperacilin – Tazobaktam
Cefalosporiny	Cefadroxil
	Cefepim
	Cefotaxim
	Cefoxitin
	Ceftazidim
	Cefuroxim
Karbapenemy	Imipenem
Monobaktamy	Aztreonam
Fluorochinolony	Ciprofloxacin
Aminoglykosidy	Amikacin
	Gentamicin
Tetracykliny	Doxycyklin
	Tetracyklin
	Tigecyklin
Oxazolidinony	Linezolid
Amfenikoly	Chloramfenikol
Nitrofurany	Nitrofurantoin

K testování bylo vybráno dohromady 22 antimikrobiálních látek ze skupiny penicilinů, cefalosporinů, karbapemenů, monobaktamů, fluorochinolonů, aminoglykosidů, tetracyklinů,

oxazolidinonů, amfenikolů a nitrofuranů. Zařazení vybraných ATB do určitých skupin je uvedeno v tabulce 9.

Odečet velikosti inhibičních zón byl proveden dvěma způsoby, a to ručně pomocí pravítka a dále pomocí přístroje Bacmed. Každá z těchto metod měla své výhody a nevýhody. Velkou výhodou ručního odečtu je dle mého názoru rychlost, avšak k vyhodnocení výsledku je nezbytné si dohledat breakpointy každého antibiotika pro daný kmen. Ruční měření je také zatíženo určitou chybou odečítajícího. Výhodou přístroje Bacmed je současné vyhodnocení výsledku díky breakpointům, které jsou již zadané v paměti přístroje. K odečtu zón je však nutné do systému předem připravit danou testovanou antibiotickou řadu. Nevýhodou využití tohoto systému je dle mého názoru časová náročnost oproti ručnímu měření. To navíc prodlužuje i skutečnost nezměření inhibičních zón, které se vzájemně překrývají. V takovýchto případech je pak nutné vlastní nastavení velikosti zón. Příkladem je obrázek 25, na kterém je zobrazeno testování citlivosti u bakterie *Klebsiella pneumoniae*. Z obrázku vlevo je patrné, že u třech ATB nejsou změřeny skutečné inhibiční zóny z důvodu jejich překrytí. Obrázek vpravo představuje již ruční upravení.



Obrázek 25 – Vyhodnocení citlivosti pomocí systému BACMED, (foto autor)

vlevo: před úpravou; *vpravo:* po úpravě

Tabulka 10 – Kontrolní kmeny a jejich meze pro dané antibiotikum dle EUCASTu
(EUCAST, 2017b).

Kontrolní bakteriální kmeny	Testovaná antibiotika	Rozmezí dle EUCASTu
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 (CCM 4224)	Ampicilin 2	15 – 21
	Ciprofloxacín	19 – 25
	Imipenem 10	24 – 30
	Linezolid 10	19 – 25
	Nutrofurantoin 100	18 – 24
	Tigecyklin 15	20 – 26
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (CCM 3954)	Amikacin 30	19 – 26
	Amoxicilin – Klavulát 20–10	18 – 24
	Ampicilin 10	15 – 22
	Aztreonam 30	28 – 36
	Cefadroxil 30	14 – 20
	Cefepim 30	31 – 37
	Cefotaxim 5	25 – 31
	Cefoxitin 30	23 – 29
	Ceftazidim 10	23 – 29
	Cefuroxom 30	20 – 26
	Ciprofloxacín 5	29 – 37
	Gentamicin 10	19 – 26
	Chloramfenikol 30	21 – 27
	Imipenem 10	26 – 32
	Piperacilin – Tazobactam 30–6	21 – 27
	Piperacilin 30	21 – 27
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (CCM 4985)	Aztreonam 30	9 – 17
	Cefotaxim 5	12 – 18
	Ceftazidim 10	6 – 12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (CCM 3955)	Amikacin 30	18 – 26
	Aztreonam 30	23 – 29
	Cefepim 30	25 – 31
	Ceftazidim 10	21 – 27
	Ciprofloxacín 5	25 – 33
	Gentamicin 10	17 – 23
	Imipenem 10	20 – 28
Piperacilin – Tazobactam 30–6	23 – 29	

Pro kontrolu kvality byly použity 4 bakteriální kontrolní kmeny dané EUCASTem. Tyto kontrolní kmeny byly testovány na taková antibiotika, u nichž bylo EUCASTem dané rozmezí velikosti inhibičních zón. Principem testování je to, aby se velikosti inhibičních zón vyskytovaly v daném rozmezí. Testování bylo provedeno 3x a to vždy v dubletu pro každý kontrolní kmen. Testované kontrolní kmeny společně s rozmezím pro daná ATB jsou uvedena v tabulce 10. Testováním bylo zjištěno, že se všechny změřené inhibiční zóny vyskytovaly v daných mezích. Z toho lze usuzovat, že zjištěné antimikrobiální citlivosti testovaných bakteriálních kmenů izolovaných z vod můžeme považovat za spolehlivé.

Testování bylo rozděleno na dvě části. V první části byly antibiotické řady pro jednotlivé skupiny bakterií zvoleny dle dostupných breakpointů vydaných EUCASTem. Rod *Enterococcus* byl testován na ampicilin (2 µg), ciprofloxacin (5 µg), imipenem (10 µg), linezolid (10 µg), nitrofurantoin (100 µg) a tigecyklin (15 µg). Pro čeleď *Enterobacteriaceae* byly k testování vybrány antibiotika amoxicilin – klavulát (20–10 µg), amikacin (30 µg), ampicilin (10 µg), aztreonam (30 µg), cefepim (30 µg), cefotaxim (5 µg), ceftazidim (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), chloramfenikol (30 µg), imipenem (10 µg) a piperacilin (30 µg). Rod *Pseudomonas* byl testován na amikacin (30 µg), aztreonam (30 µg), ceftazidim (10 µg), gentamicin (10 µg), imipenem (10 µg) a piperacilin (30 µg). Jelikož nejsou pro rod *Aeromonas* dostupné breakpointy, byla k testování vybrána taková ATB, u kterých jsou dostupné breakpointy jak pro čeleď *Enterobacteriaceae*, tak pro rod *Pseudomonas*. EUCAST (2016) uvádí, že aeromonády jsou vlastnostmi někde mezi čeledí *Enterobacteriaceae* a rodem *Pseudomonas*. V ideálním případě by se měla stanovit MIC testovaných ATB, která by se následně porovnávala s breakpointy MIC nevztahovaných k druhu (EUCAST, 2017c). EUCAST (2016) také uvádí, že v případě neuvedené MIC pro dané ATB se má získaná MIC aeromonád porovnávat s MIC pro enterobakterie. Avšak v rámci této práce byla citlivost na ATB stanovována pouze pomocí diskové difúzní metody. Z tohoto důvodu byly velikosti inhibičních zón u aeromonád porovnávány s breakpointy pro enterobakterie.

V druhé části testování se při výběru ATB pro enterobakterie, pseudomonády a enterokoky vycházelo z antibiotických řad používaných v mikrobiologické laboratoři v Litomyšli. Jedinou výjimkou bylo nepoužití trimetoprim – sulfometoxazolu a záměna tikarcilin – klavulátu (75–10 µg) za piperacilin – tazobaktam (30–6 µg). Firma

OXOID CZ s. r. o. totiž tikarcilin – klavulát (75–10 µg) již nedodává z důvodu jeho nestability. Enterobakterie a pseudomonády byly testovány na amoxicilin – klavulát (20–10 µg), ampicilin (10 µg), aztreonam (30 µg), cefadroxil (30 µg), cefepim (30 µg), cefotaxim (5 µg), ceftaxim (30 µg), cefuroxim (30 µg), ciprofloxacín (5 µg), doxycyklin (30 µg) a piperacilin – tazobaktam (30–6 µg). Enterokoky byly testovány na amoxicilin – klavulát (20–10 µg), ampicilin (2 µg), ciprofloxacín (5 µg), doxycyklin (30 µg) a tetracyklin (30 µg). Výběr ATB pro rod *Aeromonas* vycházel z článku od Lamy *et al.* (2012), který k testování použil ampicilin – klavulát (20–10 µg), amikacin (30 µg), cefepim (30 µg), cefotaxim (30 µg), ceftaxim (30 µg), ciprofloxacín (5 µg), gentamicin (15 µg), imipenem (10 µg), piperacilin (75 µg), piperacilin – tazobaktam (30–6 µg) a tigecyklin (15 µg). Breakpointy použité ve studii od Lamy *et al.* (2012) byly odvozeny od čeledi *Enterobacteriaceae*, které byly dány antimikrobiálním výborem francouzské mikrobiologické společnosti (CA–SFM). Avšak u třech ATB byly dostupné jiné koncentrace, než byly uvedené v článku, a to cefotaxim (5 µg), gentamicin (10 µg) a piperacilin (30 µg). Jelikož je třeba při vyhodnocování citlivostí brát zřetel na odlišné obsahy ATB v disku, vycházelo se v těchto případech z breakpointů pro čeleď *Enterobacteriaceae*, které byly dány EUCASTem (Urbášková a kol., 2010).

Breakpointy ATB použité k vyhodnocení citlivostí testovaných bakteriálních kmenů byly u většiny dány EUCASTem. Avšak u některých ATB (doxycyklin a tetracyklin) nebyly breakpointy dostupné, z toho důvodu se vycházelo z breakpointů, které byly vydány Institutem pro standardy v klinických laboratořích v USA (CLSI). Všechny použité breakpointy jsou uvedeny v tabulce 11 a 12.

Tabulka 11 – Breakpointy testovaných antibiotik u daných bakterií dle EUCASTu, případně CLSI (CLSI, 2016; EUCAST, 2017c)

Antibiotika (μg)	Breakpointy průměru inhibičních zón (mm)					
	<i>Enterobacteriaceae</i>		<i>Pseudomonas</i>		<i>Enterococcus</i>	
	C ≥	R <	C ≥	R <	C ≥	R <
Amikacin 30	18	15	18	15	–	–
Amoxicilin – Klavulát 20–10	19	19	–	–	*	*
Ampicilin 10	14	14	–	–	–	–
Ampicilin 2	–	–	–	–	10	8
Aztreonam 30	26	21	50	16	–	–
Cefadroxil 30	12	12	–	–	–	–
Cefepim 30	27	21	19	19	–	–
Cefotaxim 5	20	17	–	–	–	–
Cefoxitin 30	19	19	/	/	–	–
Ceftazidim 10	22	19	17	17	–	–
Cefuroxim 30	19	19	–	–	–	–
Ciprofloxacin 5	26	24	26	26	15	15
Doxycyklin 30	14	10	–	–	16	12
Gentamicin 10	17	14	15	15	–	–
Chloramfenikol 30	17	17			–	–
Imipenem 10	22	16	20	17	21	18
Linezolid 10	–	–	–	–	19	19
Nitrofurantoin 100	–	–	–	–	15	15
Piperacilin 30	20	17	18	18	–	–
Piperacilin – Tazobaktam 30–6	18	23	19	18	–	–
Tetracyklin 30	–	–	–	–	19	14
Tigecyklin 15	–	–	–	–	18	15

Použité zkratky a znaky:

- C citlivý
- R rezistentní
- nebylo testováno
- / není použitelné
- * citlivost se určuje podle citlivosti ampicilinu (2 μg)

Tabulka 12 – Breakpointy vybraných antibiotik u rodu *Aeromonas* (Lamy *et al.*, 2012; EUCAST, 2017c)

ANTIBIOTIKA	Breakpointy průměru inhibičních zón (mm)	
	C ≥	R <
Amikacin 30	17	15
Amoxicilin – klavulát 20–10	21	16
Cefepim 30	26	19
Cefotaxim 5	20	17
Cefoxitin 30	22	15
Ciprofloxacin 5	25	22
Gentamicin 10	17	14
Imipenem 10	24	17
Piperacilin 30	20	17
Piperacilin - Tazobaktam 30-6	20	17
Tigecyklin 15	21	19

Z tabulky 13, ve které jsou shrnuty výsledky testování citlivosti pro čeleď *Enterobacteriaceae*, je patrné, že *E. coli* je citlivá na všechna testovaná ATB s výjimkou ampicilinu a piperacilinu (obr. 26). Rezistenci vůči ampicilinu potvrzuje i Chmelařová a kol. (2001), která ji prokázala téměř u 50 % izolovaných *E. coli* z moči pacientů se zánětem močových cest. Reinthaler *et al.* (2003) testoval rezistenci *E. coli* izolovanou z odpadních vod v Rakousku a zjistil, že rezistence vůči ampicilinu byla až u 18 % a vůči piperacilinu až u 12 % izolátů. Izoláty z odpadních nemocničních vod byly odolnější než ostatní. Rezistenci k piperacilinu potvrzuje i Lockhart *et al.* (2007), který ji stanovil u 36 % kmenů *E. coli*, které byly izolovány od pacientů z nemocnic.

Izolovaný kmen *Y. intermedia* je rezistentní pouze k ampicilinu, k ostatním testovaným ATB je citlivý (obr. 27). Tzelepi *et al.* (1999) izoloval z různých vzorků vod 30 kmenů *Y. intermedia*, z nichž bylo vůči ampicilinu 60 % kmenů intermediálně rezistentních a 37 % rezistentních. Další rezistence byla vůči karbenicilinu (83 %), cefalotinu (67 %) a tikarcilinu (37 %) (Tzelepi *et al.*, 1999).

Stock et al. (2005) uvádí, že bakterie *Hafnia alvei* je přirozeně rezistentní, případně intermediálně rezistentní, na amoxicilin – klavulát a ceftazidim. Výsledky testování byly v souladu s tímto tvrzením. Navíc byla tato bakterie rezistentní i vůči cefadroxiilu.

Tabulka 13 – Výsledky testování citlivosti na antibiotika pro bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*

ANTIBIOTIKA	1	2	3	4	5	6	7
Amoxicilin – Klavulát 20–10	C	C	R	C	C	R	C
Ampicilin 10	R	R	C	R	R	C	R
Piperacilin 30	R	C	C	I	C	C	C I
Piperacilin – Tazobaktam 30-6	C	C	C	C	C	C	C
Cefadroxiil 30	C	C	R	C	C	C	C
Cefepim 30	C	C	C	C	C	C	C
Cefotaxim 5	C	C	C	C	C	C	C
Cefoxitin 30	C	C	C	C	C	R	C
Ceftazidim 10	C	C	I	C	C	C	C
Cefuroxim 30	C	C	C	C	C	C	C
Imipenem 10	C	C	C	C	C	C	C
Aztreonam 30	C	C	C	C	C	C	C
Ciprofloxacín 5	C	C	C	C	R	I R	C
Amikacin 30	C	C	C	C	C	C	C
Gentamicin 10	C	C	C	C	C	C	C
Doxycyklin 30	C	C	C	C	C	C	C
Chloramfenikol 30	C	C	C	C	C	C	C

Použité zkratky: *Escherichia coli* (1), *Yersinia intermedia* (2), *Hafnia alvei* (3), *Enterobacter aerogenes* (4), *Raoultella ornithinolytica* (5), *Citrobacter freundii* (6), *Klebsiella pneumoniae* (7)

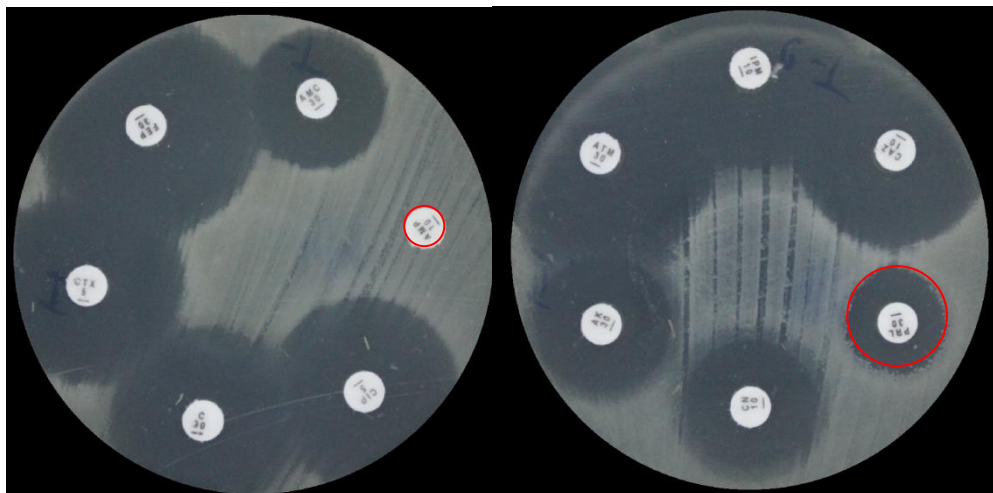
C Citlivý

R Rezistentní (červené označení)

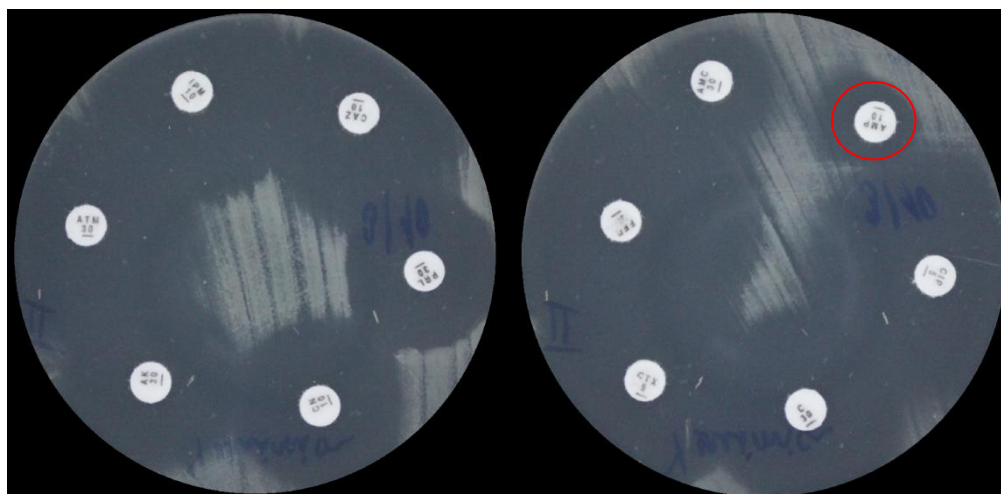
I Intermediálně rezistentní (žluté označení)

C | I Hraniční hodnota mezi citlivým a intermediálně rezistentním (zelené a žluté označení)

I | R Hraniční hodnota mezi intermediálně rezistentním a rezistentním (žluté a červené označení)



Obrázek 26 – Testování citlivosti *Escherichia coli* (foto autor), rezistentní (červené označení)

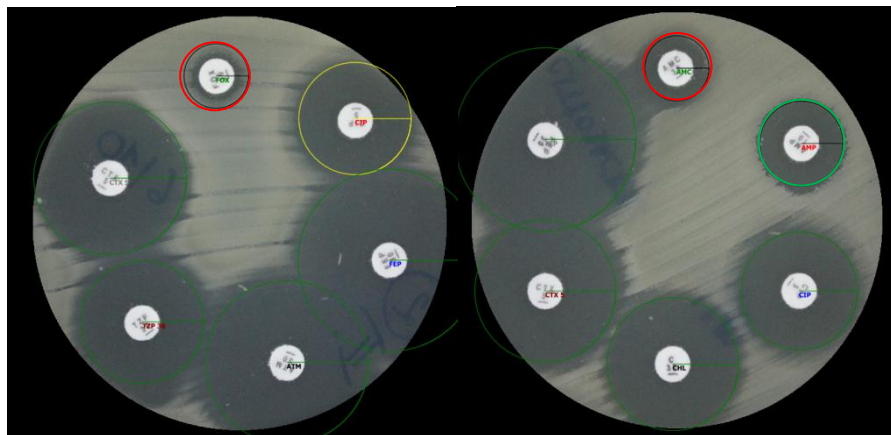


Obrázek 27 – Testování citlivosti *Yersinia intermedia* (foto autor)
rezistentní (červené označení)

Jedinou prokázanou rezistencí z testovaných ATB u kmene *Enterobacter aerogenes* je rezistence k ampicilinu a intermediální rezistence k piperacilinu. Karlowsky *et al.* (2003) izoloval tuto bakterii od pacientů z nemocnic, přičemž nejvyšší rezistence byla právě u ampicilin – sulbaktamu. Lockhart *et al.* (2007) také uvádí rezistenci k ampicilin – sulbaktamu (39 %), přičemž 11,3 % kmenů bylo intermediálně rezistentní. Dále byla prokázána rezistence na piperacilin u 10,8 % kmenů.

Chun *et al.* (2015) ve své studii uvádí, že 94 % kmenů *Raoultella ornithinolytica* izolovaných z krve pacientů bylo rezistentní na ampicilin a 11 % na ciprofloxacín. Další

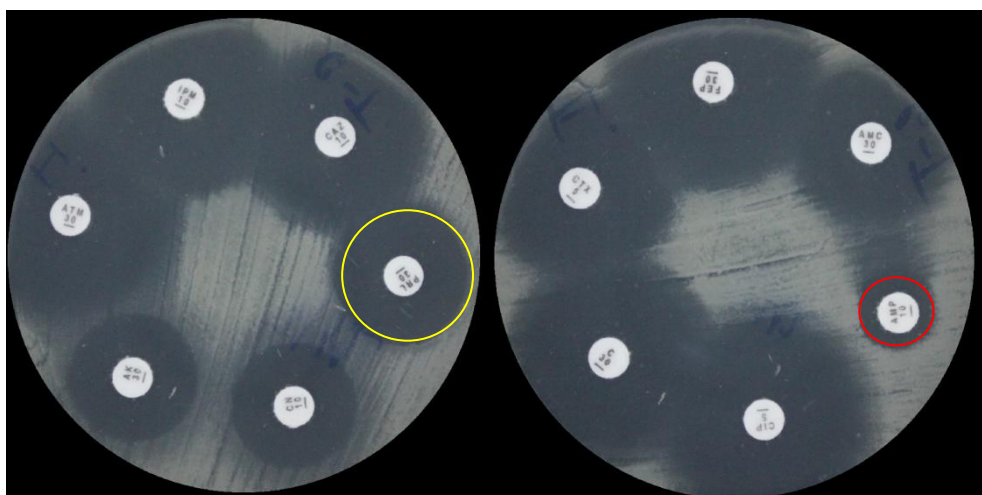
významnou rezistencí je rezistence na cefoxitin (23 %). Rezistence na ampicilin a ciprofloxacín byla u bakterie *Raoultella ornithinolytica* izolované z vody prokázána, avšak k cefoxitinu byla bakterie citlivá.



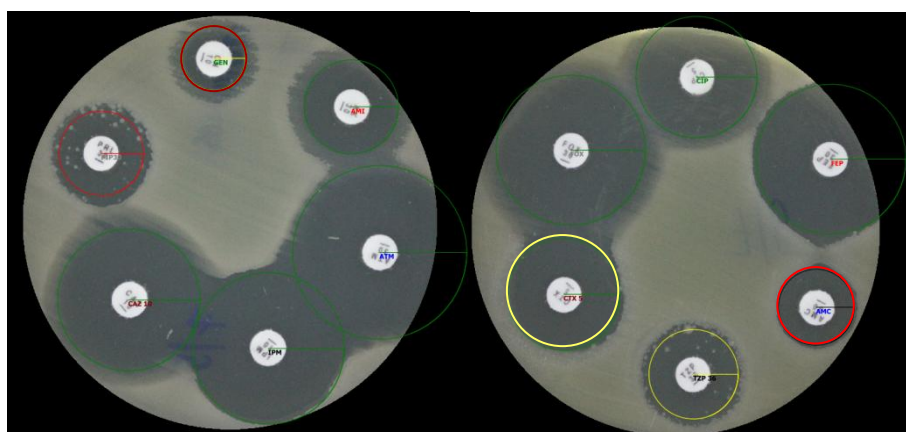
Obrázek 28 – Testování citlivosti *Citrobacter freundii*, vyhodnocené pomocí systému BACMED (foto autor); citlivé (zelené označení) hraniční intermediálně rezistentní/rezistentní (žluté označení); rezistentní (červené označení),

U bakterie *Citrobacter freundii* byla zjištěna rezistence na amoxicilin – klavulát a cefoxitin (obr. 28). Citlivost této bakterie na ciprofloxacín je hraniční, a to mezi intermediálně rezistentním a rezistentním. Při opakovaném testování citlivosti se velikosti inhibičních zón lišily byť jen o milimetr, avšak i tento malý rozdíl má velký význam. Karlowsky *et al.* (2003) uvádí, že 14 % kmenů *Citrobacter freundii* bylo rezistentních vůči ciprofloxacínu. Lockhart *et al.* (2007) prokázal na toto ATB u 5 % kmenů intermediální rezistenci a u 21 % kmenů rezistenci.

Zhanel *et al.* (2000) uvádí, že 66 % kmenů *Klebsiella pneumoniae*, které byly izolovány od pacientů s infekcí močových cest, byly rezistentní na ampicilin. Tato rezistence byla v rámci našeho testování potvrzena. Výsledky citlivosti této bakterie na piperacilin byly hraniční, a to mezi citlivým a intermediálně rezistentním (obr. 29). Lockhart *et al.* (2007) stanovil, že 17 % kmenů *Klebsiella pneumoniae* byly k piperacilinu intermediálně rezistentní a 29 % kmenů bylo rezistentní.



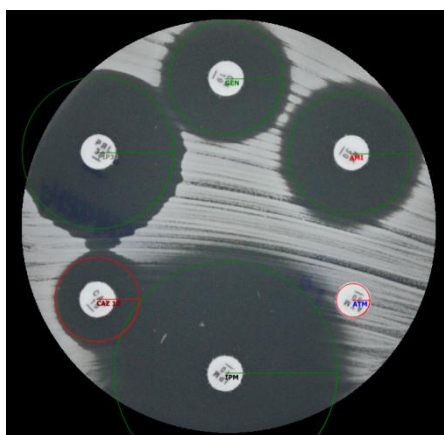
Obrázek 29 – Testování citlivosti *Klebsiella pneumoniae* (foto autor); hraniční citlivé/intermediálně rezistentní (žluté označení); rezistentní (červené označení),



Obrázek 30 – Testování citlivosti *Aeromonas sobria*, vyhodnocené pomocí systému BACMED (foto autor); citlivé (zelené označení), intermediálně rezistentní (žluté označení), rezistentní (červené označení)

Testováním citlivosti rodu *Aeromonas* bylo zjištěno, že kmen *A. sobria* je odolnější než *A. caviae*. *A. sobria* je rezistentní na amoxicilin – klavulát, gentamicin, piperacilin (obr. 30), dále byla prokázána intermediální rezistence na amikacin, cefotaxim, ciprofloxacin a piperacilin – tazobaktam. Rezistenci této bakterie na amoxicilin – klavulát (84 %) stanovil i Turnidge *et al.* (2003). Dále stanovil i rezistenci na piperacilin – tazobaktam (38 %), gentamicin (5 %) a rezistence *A. sobria* vůči ciprofloxacinu nebyla prokázána. U kmene *A. caviae* byla stanovena rezistence na aztreonam a ceftazidim (obr. 31) a intermediální

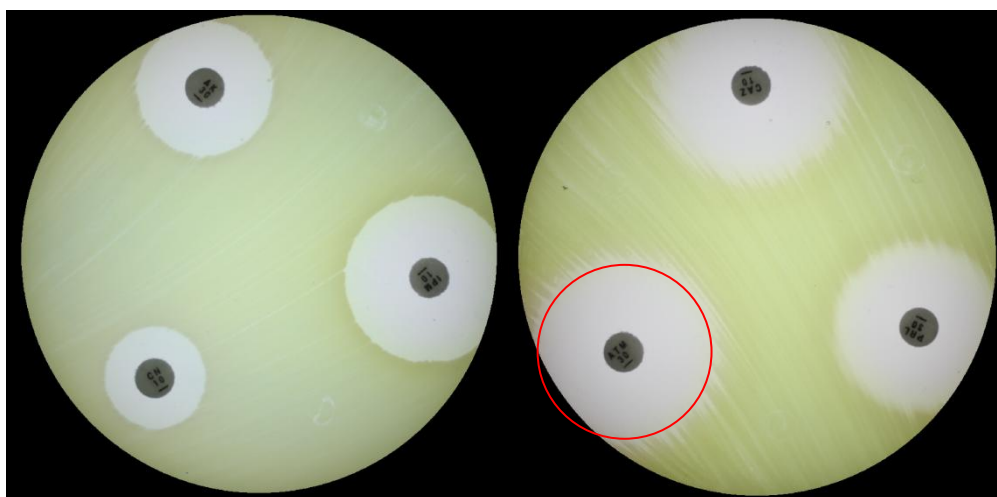
rezistence na cefotaxim a ciprofloxacin. Turnidge *et al.* (2003) prokázal u 10 % izolovaných kmenů *A. caviae* rezistenci na ceftazidim a u 5 % na aztreonam a ciprofloxacin. Lamy *et al.* (2012) prokázal u rodu *Aeromonas* nejvýznamnější rezistenci na amoxicilin (98 %) a amoxicilin – klavulát (96 %). Ghenghesh *et al.* (2001) uvádí 0% rezistenci vůči gentamicinu a ciprofloxacinu a 100% rezistenci na ampicilin. Pokhrel and Thapa (2004) se zaměřili na stanovení aeromonád v klinických vzorcích a ve vzorcích vody z nemocnic. Ve své studii prokázali větší odolnost aeromonád izolovaných z klinických vzorků. U aeromonád z vodního prostředí nebyla prokázána žádná rezistence na gentamicin a ciprofloxacin (Pokhrel and Thapa, 2004).



Obrázek 31 – Testování citlivosti *Aeromonas caviae*, vyhodnocené pomocí systému BACMED (foto autor); citlivé (zelené označení), rezistentní (červené označení)

Další testovanou bakterií byla *Pseudomonas aeruginosa*. Přestože pro polovinu antibiotik v antibiotických řadách z mikrobiologické laboratoře v Litomyšli nebyly dostupné breakpointy, dají se získané citlivosti s jistotou vyhodnotit z důvodu velmi úzkých inhibičních zón, většinou 6 mm, případně až 10 mm. Tyto velikosti zón vypovídají o rezistenci *Pseudomonas aeruginosa* na dané ATB. Jedná se o amoxicilin – klavulát, ampicilin, cefotaxim, cefuroxim, cefadroxil a doxycyklin. Dalším rezistentním antibiotikem je cefoxitin, avšak u tohoto ATB přímo EUCAST zmiňuje jeho nemožnost použití (EUCAST, 2017c). Poslední rezistencí *Pseudomonas aeruginosa* je rezistence na aztreonam, kterou zaznamenal i Lockhart *et al.* (2007) u 18 % izolovaných kmenů. Rezistence této bakterie na aztreonam je znázorněna na obrázku 32 (červené označení), a přestože je patrná šikorá inhibiční zóna, k tomu, aby byl kmen citlivý, je třeba velikosti inhibiční zóny ≥ 50 mm (EUCAST, 2017c). Jak již bylo zmíněno dříve (v části izolace bakterií z vod), je častá rezistence této bakterie vůči ciprofloxacinu. Lockhart *et al.* (2007) uvádí rezistenci na toto ATB u 29 % testovaných

kmenů, avšak *Pseudomonas aeruginosa* izolována v rámci této práce byla vůči ciprofloxacinu citlivá. Černohorská a Sláviková (2009) dále také uvádí rezistenci *Pseudomonas aeruginosa* na gentamicin (59 %), ceftazidin (35 %), imipenem (34 %), piperacilin – tazobaktam (30 %) a amikacin (12 %). *Pseudomonas aruginosa* izolována v rámci této práce byla na všechna tato ATB citlivá.



Obrázek 32 – Testování citlivosti *Pseudomonas aeruginosa* (foto autor)
rezistentní (červené označení)

Poslední testovanou bakterií byl *En. faecalis*. Tato bakterie byla citlivá na všechna testovaná ATB, tedy na amoxicilin – klavulát, ampicilin, ciprofloxacin, doxycyklin, imipenem, linezolid, nitrofurantoin, tetracyklin a tigecyklin. Zhanel *et al.* (2000) uvádí, že 20 % testovaných kmenů *Enterococcus* spp. bylo rezistentní na ciprofloxacin a 5 % na ampicilin. Na tetracyklin nebyla zaznamenána rezistence. Łuczkiwicz *et al.* (2010) stanovil u izolovaných kmenů *En. faecalis* rezistenci na tetracyklin (30 %), nitrofurantoin (30 %) ciprofloxacin (23 %) a linezolid (5 %).

Porovnáním citlivosti všech testovaných kmenů je zřejmé, že největší rezistence byla zaznamenána k ampicilinu, na který bylo rezistentní 6 kmenů (67 %) z devíti testovaných. Další významná rezistence je vůči amoxicilin – klavulátu (36 %), cefoxitinu (20 %), aztreonamu (20 %). Za zmínku stojí i výsledky testování vůči ciprofloxacinu, na který byly zaznamenány sklony k rezistenci u 36 % kmenů.

ZÁVĚR

K mikrobiologickému rozboru bylo vybráno 8 vzorků vod, z toho 6 vzorků odpadních vod, a po jednom vzorku povrchové vody a kalu. U těchto vzorků se stanovovaly indikátory fekálního znečištění (termotolerantní koliformní bakterie, *E. coli* a intestinální enterokoky), dále patogenní a podmíněně patogenní bakterie jako jsou salmonely, yersinie, kampylobakteri, aeromonády a pseudomonády. Ke stanovení se využívaly selektivní půdy dle platných norem. Z již zmíněných 8 vzorků bylo ke konečné identifikaci vybráno 81 bakteriálních kmenů. U těchto bakteriálních kmenů byly provedeny testy na katalázu, oxidázu, dále byly obarveny dle Grama. Na základě této předběžné identifikace byly použity identifikační soupravy MIKROLATEST[®]. Z 81 bakteriálních kmenů bylo pomocí této soupravy dobře identifikováno 63 kmenů, avšak 18 kmenů bylo identifikováno nejasně. Největší část představovaly kmeny vyhodnocené jako málo typické (52 %) a kmeny atypické (39 %). Proto byla konečná identifikace v těchto případech zprostředkována pomocí systému BIOLOG a MALDI–TOF MS.

Nejvíce zastoupenými bakteriemi v testovaných vzorcích vod, s výjimkou kalu, byly termotolerantní koliformní bakterie, z nichž více než polovinu představovala *E. coli*. Další skupinou nejvíce zastoupených bakterií byly aeromonády. Nejvýznamnějším prokázáným zástupcem je *A. hydrophila* izolována v odtoku ČOV Hradec Králové, která byla identifikována pomocí MALDI–TOF MS. Nejvíce zastoupenými druhy ve vodách byla *A. sobria*, *A. caviae* a *A. media*. Intestinální enterokoky byly ve vodách přítomny poměrně v malém množství, přičemž nejčastěji se vyskytujícími druhy byly *En. hirae* a *En. faecalis*. V nátoce odpadní vody do ČOV Pardubice byl prokázán nejvýznamnější zástupce rodu *Pseudomonas*, a to *P. aeruginosa*. Dalšími identifikovanými pseudomonádami v testovaných vzorcích vod byla *P. putida* a *P. nitroreducens*. Patogeny z rodu *Salmonella* a *Campylobacter* nebyly prokázány v žádném vzorku vody. Z rodu *Yersinia* byla prokázána *Y. intermedia*, a to v povrchové vodě z Labe.

V rámci této diplomové práce byla porovnávána kvalita identifikace neznámých bakteriálních kmenů pomocí systému BIOLOG a MALDI–TOF MS. Kvalita identifikace je u systému BIOLOG uváděna jako hodnota tzv. similarity, kdy 100 % kmenů mělo similaritu v rozmezí 0,50 – 0,75, která vypovídá o přijatelné identifikaci. V případě MALDI–TOF MS

je míra spolehlivosti identifikace uváděna ve formě tzv. skóre, kdy 39 % kmenů mělo skóre v rozmezí 2,3 – 3,0 (identifikace s vysokou pravděpodobností na úrovni druhu) a 61 % kmenů mělo skóre v rozmezí 2,0 – 2,3 (identifikace s vysokou pravděpodobností na úrovni rodu a s pravděpodobností na úrovni druhu). Z těchto výsledků lze usuzovat, že identifikace pomocí MALDI–TOF MS poskytuje lepší výsledky.

Po identifikaci izolovaných bakterií z vod bylo vybráno k testování citlivosti na antimikrobiální látky diskovou difúzní metodou 11 bakteriálních kmenů, a to 7 kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Y. intermedia*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella ornithinolytica*, *Citrobacter freundii* a *Klebsiella pneumoniae*), dále dva kmeny z rodu *Aeromonas* (*A. sobria* a *A. caviae*) a bakterie *P. aeruginosa* a *En. faecalis*.

Testováním byla zjištěna nejvyšší míra rezistence k ampicilinu, na který bylo rezistentních 6 kmenů (67 %) z devíti testovaných, a to *E. coli*, *Y. intermedia*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella pneumoniae* a *P. aeruginosa*. Další významná rezistence byla vůči amoxicilin – klavulátu (36 %) u *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *A. sobria* a *P. aeruginosa*. Kmeny *A. caviae* a *P. aeruginosa* byly rezistentní na aztreonam. Dále byly obě testované aeromonády rezistentní vůči cefoxitinu. Za zmínku stojí i výsledky testování vůči ciprofloxacinu, na který byly zaznamenány sklony k rezistenci u 36 % kmenů, kdy kmen *Raoultella ornithinolytica* byl vůči němu rezistentní a u *A. sobria* a *A. caviae* byla prokázána intermediální rezistence. U kmene *Citrobacter freundii* byla citlivost na ciprofloxacin hraniční, a to mezi intermediálně citlivým a rezistentním.

Se zvýšenou rezistencí bakterií vůči antimikrobiálním látkám se setkáváme čím dál častěji. Na této zvyšující se rezistenci se také podílí fakt, že procesem čištění odpadních vod nejsou antibiotika plně odstraněna a dostávají se tak do povrchových vod, kde ovlivňují celou řadu makro i mikroorganismů a rostlin. Nejideálnějším řešením tohoto problému by bylo najít účinnější metody úpravy odpadních vod, které by odstraňovaly veškeré mikroorganismy a chemické látky přítomné v surových odpadních vodách.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALEXANDRINO, M.; GROHMANN, E.; SZEWZYK, U. Optimization of PCR-based methods for rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Yersinia enterocolitica* serovar 0:3 in wastewater samples. *Water Research*. 2004, roč. 38, č. 5, s. 1340 – 1346.
2. ALLEN, M. J.; EDBERG, C. S.; REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology*. 2004, roč. 92, s. 265 – 274.
3. ASHBOLT, N. J.; GRABOW, W. O. K.; SNOZZI, M. *Indicators of microbial water quality*. In: *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*. IWA Publishing, London, 2001. ISBN 1 900222 28 0.
4. ATLAS, R. M. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology*. 1999, roč. 1, č. 4, s. 283 – 293.
5. BADUROVÁ, J. Mikrobiální znečištění vypouštěných odpadních vod městských čistíren. *Vodohospodářské technicko – ekonomické informace*. 2011, roč. 53, č. 3, s. 17 – 19, příloha Vodního hospodářství č. 6/2011.
6. BARTRAM, J.; COTRUVO, J.; EXNER, M.; FRICKER, C.; GLASMACHER, A. (eds.) *Heterotrophic plate counts and drinking-water safety*. IWA publishing, 2003, 272 s. ISBN 1 84339 025 6.
7. BAUDIŠOVÁ, D. Evaluation of *Escherichia coli* as the main indicator of faecal pollution. *Water Science and Technology*. 1997, roč. 35, s. 333 – 336.
8. BAUDIŠOVÁ, D. *Současné metody mikrobiologického rozboru vody: příručka pro hydroanalytické laboratoře*. Vyd. 1. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka, 2007, 100 s. ISBN 978-80-85900-72-9.
9. BAUDIŠOVÁ, D. *Novinky v mikrobiologii vody 2014*. [online]. [cit. 2017-04-15]. Dostupné z:
http://www.heisvuv.cz/data/spusteni/projekty/mikrobiologie/dokumenty/novinky_v_mikrobiologii_vody_2014.pdf
10. BAUDIŠOVÁ, D. Stanovení koliformních bakterií a *Escherichia coli* na chromogenním médiu. *Výzkumný Ústav Vodohospodářský T. G. Masaryka*. 2016, roč. 1, s. 16 – 19.

11. BAUDIŠOVÁ, D.; BENÁKOVÁ, A. Detekce patogenních bakterií v odpadních vodách. *Vodohospodářské technicko – ekonomické informace*. 2011, roč. 53, s. 1 – 20.
12. BAUDIŠOVÁ, D.; BENÁKOVÁ, A.; MLEJNKOVÁ, H.; SOVOVÁ – HORÁKOVÁ, K.; SLEZÁKOVÁ, K.; BENÁKOVÁ, I.; MARKOVÁ, P.; KUPCOVÁ R. *Výzkum v oblasti mikrobiálního znečištění povrchových a odpadních vod (2005 – 2011)*. In *Výzkum a ochrana hydrosféry – výzkum vztahů a procesů ve vodní složce životního prostředí, orientovaný na vliv antropogenních tlaků, její trvalé užívání a ochranu, včetně legislativních nástrojů*. Ministerstvo životního prostředí, MZP0002071101, Praha, 2011.
13. BESSEDE, E.; ANGLA-GRE, M.; DELAGARDE, Y.; SEP HIENG, S.; MÉNARD, A.; MÉGRAUD, F. Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a University hospital. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011, roč. 17, č. 4, s. 533 – 538.
14. BETTELHEIM, K.A. The genus *Escherichia*. In *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, electronic release 3.14, 3. vydání; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Eds.; Springer-Verlag: New York, NY, USA, 2003.
15. BIOLOG. *Biolog GEN III technology proves its accuracy in the first direct comparison against molecular methods*. 2014 [online]. [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: <http://www.biolog.com/pr070414.shtml>
16. BIOLOG. *GEN III MicroPlate™: instructions for use*. [online]. [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: https://www.google.com/url?q=http://www.biolog.com/pdf/milit/00P%2520185rA%2520GEN%2520III%2520MicroPlate%2520IFU%2520Mar2008.pdf&sa=U&ved=0ahUKEwjsoOj5g6TTAhuRJsAKHU_GAvYQFggEMAA&client=internal-uds-cse&usg=AFQjCNGoqNBGXvorstwCVCXc8wFWUuFQGw
17. BioMérieux [online]. [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: <http://www.biomerieux.com/en/maldi-tof-mass-spectrometry>
18. BIZZINI, A.; DURUSSEL, C.; BILLE, J.; GREUB, G.; PROD'HOM, G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010, roč. 48, č. 5, s. 1549 – 1554.

19. BLANCH, A. R.; CAPLIN, J. L.; IVERSEN, A.; KÜHN, I.; MANERO, A.; TAYLOR, H. D.; VILANOVA, X. Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *Journal of Applied Microbiology*. 2003, roč. 94, č. 6, s. 994 – 1002.
20. BOLONG, N.; ISMAIL, A. F.; SALIM, M. R.; MATSUURA, T. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*. 2009, roč. 239, č. 1-3, s. 229 – 246.
21. BOUND, J. P.; VOULVOULIS, N. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environmental Health Perspectives*. 2005, roč. 113, s. 1705 – 1711.
22. BOYD, G. R.; REEMTSMA, H.; GRIMM, D. A.; MITRA, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Science of the Total Environment*. 2003, roč. 311, č. 1 – 3, s. 135 – 149.
23. BRYANT, R. G.; JOHNSON, M. A.; ROSSKY, P. J. Water. *Accounts of Chemical Research*. 2012, roč. 45, č. 1, s. 1 – 2.
24. BURSOVÁ, Š.; DUŠKOVÁ, M.; NECIDOVÁ, L.; KARPÍŠKOVÁ, R.; MYŠKOVÁ, P. *Mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 2014, 80 s., ISBN 978-80-7305-676-6.
25. CABRAL, J. P. S. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2010, roč. 7, č. 10, s. 3657 – 3703.
26. CASTRO-ESCARPULLI, G.; ALONSO-AGUILAR, N. M.; RIVERA, G.; BOCANEGRA-GARCIA, V.; GUO, X.; JUÁREZ-ENRÍQUEZ, S. R.; LUNA-HERRERA, J.; MARTÍNEZ, C. M.; GUADALUPE, A. A. M. Identification and typing methods for the study of bacterial infections: a brief review and mycobacterial as case of study. *Archives of Clinical Microbiology*. 2015, roč. 7, č. 1:3, s. 1 – 10.
27. CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; A. D. EATON A. D. (ed.). Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. *American Public Health Association*. Washington, D.C., 1998.
28. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th ed. CLSI supplement M100S*. CLSI, Wayne. 2016, 256 s., ISBN 1-56238-924-6.

29. ČERNOHORSKÁ, L.; P. SLÁVIKOVÁ. *Pseudomonas aeruginosa*, její rezistence k vybraným antibiotikům a tvorba biofilmu u kmenů izolovaných od pacientů s infekcí močových cest. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 2009, roč. 58, č. 4, s. 154 – 157.
30. Český normalizační institut. *Třída 7578: Jakost vod: Mikrobiologický rozbor vod* [online]. [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: <https://shop.normy.biz/trida/7578>
31. ČSN 75 7221: Jakost vod – Klasifikace jakosti povrchových vod. Český normalizační institut, vydáno 1998.
32. ČSN 75 7835: Jakost vod – Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*. Český normalizační institut, vydáno 2009.
33. ČSN 75 7837: Jakost vod - Stanovení koliformních bakterií v nedesinfikovaných vodách. Český normalizační institut, vydáno 2010.
34. ČSN EN 26461-1: Jakost vod. Stanovení spor siřičitany redukujících anaerobů (klostridií). Část 1: Metoda pomnožení v tekutém médiu (ISO 6461-1:1986). Český normalizační institut, vydáno 1995.
35. ČSN EN 26461-2: Jakost vod. Stanovení spor siřičitany redukujících anaerobů (klostridií). Část 2: Metoda membránových filtrů (ISO 6461-2:1986). Český normalizační institut, vydáno 1995.
36. ČSN EN ISO 7899-1: Jakost vod - Stanovení intestinálních enterokoků v povrchových a odpadních vodách - Část 1: Miniaturizovaná metoda stanovení v tekutém médiu (stanovení MPN). Český normalizační institut, vydáno 2000.
37. ČSN EN ISO 7899-2: Jakost vod - Stanovení intestinálních enterokoků - Část 2: Metoda membránových filtrů. Český normalizační institut, vydáno 2001.
38. ČSN EN ISO 8199: Jakost vod - Obecný návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami. Český normalizační institut, vydáno 2008.
39. 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. Český normalizační institut, vydáno 2015.
40. ČSN EN ISO 9308-2: Kvalita vod - Stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií - Část 2: Metoda nejpravděpodobnějšího počtu. Český normalizační institut, vydáno 2014.
41. ČSN EN ISO 9308-3: Jakost vod - Stanovení *Escherichia coli* v povrchových a odpadních vodách - Část 3: Miniaturizovaná metoda stanovení v tekutém médiu (stanovení MPN). Český normalizační institut, vydáno 2000.

42. ČSN EN ISO 10273: Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu suspektních patogenních *Yersinia enterocolitica*. Český normalizační institut, vydáno 2004.
43. ČSN EN ISO 16266: Jakost vod - Stanovení *Pseudomonas aeruginosa* - Metoda membránových filtrů. Český normalizační institut, vydáno 2008.
44. ČSN ISO 11731: Jakost vod - Stanovení bakterií rodu *Legionella*. Český normalizační institut, vydáno 2010.
45. ČSN ISO 11731-2: Jakost vod - Stanovení bakterií rodu *Legionella* - Část 2: Metoda přímé membránové filtrace pro vody s malým počtem bakterií. Český normalizační institut, vydáno 2005.
46. ČSN ISO 17995: Jakost vod - Stanovení termotolerantních bakterií rodu *Campylobacter*. Český normalizační institut, vydáno 2010.
47. ČSN ISO 19250: Jakost vod - Průkaz přítomnosti bakterií rodu *Salmonella*. Český normalizační institut, vydáno 2011.
48. DA SILVA, M. F.; TIAGO, I.; VERÍSSIMO, A.; BOAVENTURA, R. A.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiology Ecology*. 2006, roč. 55, č. 2, s. 322 – 329.
49. DESMARAIS, T. R.; SOLO-GABRIELE, H. M.; PALMER C. J. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, roč. 68, s. 1165 – 1172.
50. DRANCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA, A.; ROUSSELIER, P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella species* delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001, roč. 51, s. 925 – 932.
51. EDBERG, S. C.; RICE, E. W.; KARLIN, R. J.; ALLEN, M. J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, roč. 88, s. 106 – 116.
52. Erba Lachema s. r. o. *Diagnostický seznam / Code Book*. 2016 [online]. [cit. 2017-04-30]. Dostupné z:
https://www.erbalachema.com/attachments/Code%20book%20NEFERMtest%2024_CZ_EN_RU_H.pdf

53. Erba Lachema s. r. o. [online]. [cit. 2017-02-23]. Dostupné z:
<https://www.erbalachema.com/en/products-and-solutions/microbiology/mikrolatest-id/id-kits/>
54. EUCAST. *Často kladené otázky k dokumentům EUCAST*. 2016 [online]. [cit. 2017-04-23]. Dostupné z:
http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Casto_kladene_otazky_eucast_2016.pdf
55. EUCAST. *Příprava půd pro diskovou difúzní metodu EUCAST a pro vyšetření hodnot MIC bujonovou mikrodiluční metodou*. Verze 5.0, 2017a [online]. [cit. 2017-03-01]. Dostupné z:
http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/priprava_pud/Priprava_pud_v_5.0_2017.pdf
56. EUCAST. *Rutinní a rozšířená kontrola kvality doporučená EUCAST*. Verze 7, 2017b [online]. [cit. 2017-03-24]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tabulky-pro-rutinni-kontrolu-kvality-eucast>
57. EUCAST. *Tabulky breakpointů EUCAST pro interpretaci MIC a průměrů inhibičních zón*. Verze 7.0, 2017c [online]. [cit. 2017-03-21]. Dostupné z:
<http://www.szu.cz/tabulky-breakpointu-eucast>
58. EUCAST. *Vyšetření citlivosti k antibiotikům: EUCAST disková difúzní metoda*. Verze 6.0, 2017d [online]. [cit. 2017-03-01]. Dostupné z:
http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/NRLs/atb/EUCAST/Diskova_metoda/EUCAST_Diskova_difuze_Manual_v_6.0.pdf
59. FARMER, J. J.; HICKAM-BRENNER, F. W. The Genus *Vibrio* and *Photobacterium*. In *The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community*, electronic release 3.14, 3. vydání; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Eds.; Springer-Verlag: New-York, NY, USA, 2003.
60. FARMER, J. J.; JANDA, J. M.; BRENNER, F. W.; CAMERON, D. N.; BIRKHEAD, K. M. Genus *Vibrio*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2. vydání; Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2005, roč. 2, část B, s. 494 – 546.
61. FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 2006, roč. 76, č. 2, s. 122 – 159.

62. FIGUEIRA, V.; VAZ-MOREIRA, I.; SILVA, M.; MANAIA, C. M. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas spp.* in drinking and waste water treatment plants. *Water Research*. 2011, roč. 45, č. 17, s. 5599 – 5611.
63. FIKSDAL, L.; POMMEPUY, M.; CAPRAIS, M. P.; MIDTTUN, I. Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994, roč. 60, č. 5, s. 1581 – 1584.
64. GEORGE, I.; PETIT, M.; SERVAIS, P. Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, roč. 88, č. 3, s. 404 – 413.
65. GHENGHESH, K. S.; EL-GHODBAN, A.; DKAKNI, R.; ABEID, S.; ALTOMI, A.; ABDUSSALAM, T.; MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001, roč. 96, č. 2, s. 169 – 173.
66. GONCHARUK, V. V. SOS: drinking water. *Journal of Water Chemistry and Technology*. 2010, roč. 32, č. 5, s. 255 – 283.
67. HALLER, L.; POTÉ, J.; LOIZEAU, J. L.; WILDI, W. Distribution and survival of faecal indicator bacteria in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. *Ecological Indicators*. 2009, roč. 9, s. 540 – 547.
68. HOKAJÄRVI, A. M.; PITKÄNEN, T.; SILJANEN, H. M.; NAKARI, U. M.; TORVINEN, E.; SIITONEN, A.; MIETTINEN, I. T. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter spp.* and adenoviruses in Finnish bathing waters and purified sewage effluents. *Journal of Water and Health*. 2013, roč. 11, č. 1, s. 120 – 134.
69. HOLMES, P.; NICCOLLS, N. H.; SARTORY D. P. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. *The Genus Aeromonas*. 1996, s. 127 – 150.
70. HUBAČÍKOVÁ, V.; OPPELTOVÁ, P. *Úpravy vodních toků a ochrana vodních zdrojů*. 1. vydání. Brno. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. 2008, 131 s., ISBN 978-80-7375-243-9.
71. HUYS, G. The family *Aeromonadaceae*. In *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, 2014, s. 27 – 57.
72. CHATTOPADHYAY, M. K. Life without water. *Resonance*. 2009, roč. 14, č. 1, s. 60 – 65.
73. CHMELAŘOVÁ, E.; TORŠOVÁ, V.; REMEŠOVÁ, J. Význam sledování citlivosti kmenů *Escherichia coli* pro empirickou léčbu akutních infekcí močových cest. *Urologie pro praxi*. 2001, roč. 4, s. 171 – 172.

74. CHUN, S.; YUN, J. W.; HUH, H. J.; LEE, N. Y. Clinical characteristics of *Raoultella ornithinolytica* bacteremia. *Infection*. 2015, roč. 43, č. 1, s. 59 – 64.
75. KARLOWSKY, J. A.; JONES, M. E.; THORNSBERRY, C.; FRIEDLAND, I. R.; SAHM, D. F. Trends in antimicrobial susceptibilities among *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in the United States from 1998 to 2001. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003, roč. 47, č. 5, s. 1672 – 1680.
76. KHAJANCHI, B. K.; FADL, A. A.; BORCHARDT, M. A.; BERG, R. L.; HORNEMAN, A. J.; STEMPER, M. E.; JOSEPH, S. W.; MOYER, N. P.; SHA, J.; CHOPRA, A. K. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas species* isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, roč. 76, č. 7, s. 2313 – 2325.
77. KÜHN, I.; IVERSEN, A.; BURMAN, L. G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; FRANKLIN, A.; FINN, M; AARESTRUPD, F.; SEYFARTH, A. M.; BLANCHE, A. R.; VILANOVAE, X.; TAYLORF, H.; CAPLINF, J.; MORENOG, M. A.; DOMINGUEZG, L.; HERREROG, I. A.; MOLLBY, R. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment – a European study. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 88, č. 2, s. 103 – 145.
78. KÜMMERER, K. *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. 2. vydání. Springer, New York, 2004, s. 3–23.
79. LAMY, B.; LAURENT, F.; KODJO, A.; ROGER, F.; JUMAS-BILAK, E.; MARCHANDIN, H., colBVH STUDY GROUP. Which antibiotics and breakpoints should be used for *Aeromonas* susceptibility testing? Considerations from a comparison of agar dilution and disk diffusion methods using *Enterobacteriaceae* breakpoints. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2012, roč. 31, č. 9, s. 2369 – 2377.
80. LEBOFFE, M. J.; PIERCE, B. E. *A photographic atlas for the microbiology laboratory*. 4th ed. Englewood: Morton Publishing Company. 2011, 264 s., ISBN 978-089-5828-729.
81. LOCKHART, S. R.; ABRAMSON, M. A.; BEEKMANN, S. E.; GALLAGHER, G.; RIEDEL, S.; DIEKEMA, D. J.; QUINN, J. P.; DOERN, G. V. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, roč. 45, č. 10, s. 3352 – 3359.

82. ŁUCZKIEWICZ, A.; JANKOWSKA, K.; FUDALA-KSIAŻEK, S.; OLAŃCZUK-NEYMAN, K. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Research*. 2010, roč. 44, č. 17, s. 5089 – 5097.
83. MASARIKOVA, M.; MANGA, I.; CIZEK, A.; DOLEJSKA, M.; ORAVCOVA, V.; MYSKOVA, P.; KARPISKOVA R.; LITERAK, I. *Salmonella enterica* resistant to antimicrobials in wastewater effluents and black-headed gulls in the Czech Republic, 2012. *Science of the Total Environment*. 2016, roč. 542, s. 102 – 107.
84. MEDEMA, G. J; SHAW, S.; WAITE, M.; SNOZZI, M.; MORREAU, A.; GRABOW, W. Catchment characteristics and source water quality. In *Assessing Microbial Safety of Drinking Water. Improving Approaches and Method*; WHO & OECD, IWA Publishing: London. 2003, s. 111 – 158.
85. MELTER, O.; MALMGREN, A. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Karolinum Press. 2014, 139 s., ISBN: 978-80-246-2414-3.
86. MENA, K. D.; GERBA, C. P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2009, roč. 201., s. 71 – 115.
87. MILLER, J. M.; RHODEN, D. L. Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991, roč. 29, č. 6, s. 1143 – 1147.
88. MONTGOMERY, M. A.; ELIMELECH, M. Water and sanitation in developing countries: including health in the equation. *Environmental Science and Technology*. 2007, roč. 41, s. 17 – 24.
89. Nařízení vlády č. 23/2011 Sb.: Nařízení vlády, kterým se mění nařízení vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, ve znění nařízení vlády č. 229/2007 Sb. Sbíрка zákonů ČR, vydáno 2011.
90. Nařízení vlády č. 401/2015 Sb.: Nařízení vlády o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech. Sbíрка zákonů ČR, vydáno 2015.

91. NIEDZIELA, T.; JACHYMEK, W.; LUKASIEWICZ, J.; MACIEJEWSKA, A.; ANDERSSON, R.; KENNE, L.; LUGOWSKI, C. Structures of two novel, serologically nonrelated core oligosaccharides of *Yokenella regensburgei* lipopolysaccharides differing only by a single hexose substitution. *Glycobiology*. 2010, roč. 20, č. 2, s. 207 – 214.
92. NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, roč. 72, č. 3, s. 1997 – 2004.
93. NOGVA, H. K.; DROMTORP, S. M.; NISSEN, H.; RUDI, K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques*. 2003, roč. 34, č. 4, s. 804 – 813.
94. OPPELTOVÁ, P.; NOVÁK, J. *Vzdělávací modul: Ochrana životního prostředí – voda*. Název projektu: Udržitelnost hospodaření v krajině CZ.1.07/3.2.09/01.0024. Brno. 2011, 166 s.
95. PETRÁŠ, P.; NOVÁKOVÁ, D.; MACHOVÁ, I.; SEDLÁČEK, I.; PANTŮČEK, R. První záchyt kmene *Staphylococcus pettenkoferi* v České republice. *Zprávy Epidemiologie a Mikrobiologie*. SZÚ, PRAHA, 2009, roč. 18, č. 2, s. 61 – 63.
96. PIANETTI, A.; SABATINI, L.; BRUSCOLINI, F.; CHIAVERINI, F.; CECCHETTI, G. (2004). Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for the irrigation of agricultural products. *Epidemiology and Infection*. 2004, roč. 132, č. 2, s. 231 – 238.
97. PITTEK, P.. *Hydrochemie*. 4. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009, 568 s., ISBN 978-80-7080-701-9.
98. PÍSAŘOVÁ, M.; MRÁZKOVÁ, M.; FUCHS, P. *Postup při volbě a schvalování způsobů zneškodňování odpadních vod v obcích do 2000 ekvivalentních obyvatel*. Praha, 2003.
99. POKHREL, B. M.; THAPA, N. Prevalence of *Aeromonas* in different clinical and water samples with special reference to gastroenteritis. *Nepal Medical College Journal: NMCJ*. 2004, roč. 6, č. 2, s. 139 – 143.
100. PRUDEN, A.; PEI, R.; STORTEBOOM, H.; CARLSON, K. H. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environmental Science & Technology*. 2006, roč. 40, č. 23, s. 7445 – 7450.

101. REINTHALER, F. F.; POSCH, J.; FEIERL, G.; WÜST, G.; HAAS, D.; RUCKENBAUER, G.; MASCHER, F.; MARTH, E. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Research*. 2003, roč. 37, č. 8, s. 1685 – 1690.
102. RELAI, D.; ROSATI, S. Antibiotic susceptibility and serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from surface waters, thermomineral waters and clinical specimens. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*. 1994, roč. 196, s. 75 – 80.
103. ROMPRÉ, A.; SERVAIS, P.; BAUDART, J.; DE-ROUBIN, M. – R.; LAURENT, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. 2002, roč. 49, s. 31 – 54.
104. SARTORY, D. P. Heterotrophic plate count monitoring of treated drinking water in the UK: a useful operational tool. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, roč. 92, s. 297 – 306.
105. SCOTT, T. M.; PARVEEN, S.; PORTIER, K. M.; ROSE, J. B.; TAMPLIN, M. L.; FARRAH, S. R.; KOO, A.; LUKASIK, J. Geographical variation in ribotype profiles of *Escherichia coli* isolates from humans, swine, poultry, beef, and dairy cattle in Florida. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, roč. 69, s. 1089 – 1092.
106. SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus *Escherichia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2. vydání; Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Eds.; Springer: New York. 2005; roč. 2, část B, s. 607 – 623.
107. SCHWARTZ, T.; VOLKMANN, H.; KIRCHEN, S.; KOHNEN, W.; SCHÖN-HÖLZ, K.; JANSEN, B.; OBST, U. Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiology Ecology*. 2006, roč. 57, č. 1, s. 158 – 167.
108. SINHA, I.; CHOUDHARY, I.; VIRDI, J. S. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia intermedia* from wastewaters and their biochemical and serological characteristics. *Current Science*. 2000, roč. 79, č. 4, s. 510 – 513.
109. SINTON, L. W.; FINLAY, R. K.; HANNAH, D. J. Distinguishing human from faecal contamination in water: a review. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 1998, roč. 32, s. 323 – 348.
110. SOBSEY, M. D.; SCHWAB, K. J.; HANDZEL, T. R. A simple membrane filter method to concentrate and enumerate male specific RNA coliphages. *Journal American Water Works Association*. 1990, roč. 82, č. 9, s. 52 – 59.

111. STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS, *The microbiology of drinking water: part 1 - methods for the examination of waters and associated materials*, in this series, Environment Agency. 2002 [online].[cit. 2017-02-09]. Dostupné z: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/316838/mdwpart1.pdf
112. STOCK, I.; WIEDEMANN, B. Natural antimicrobial susceptibilities and biochemical profiles of *Yersinia enterocolitica*-like strains: *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* and *Y. rohdei*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2003, roč. 38, č. 2, s. 139 – 152.
113. STOCK, I.; RAHMAN, M.; SHERWOOD, K. J.; WIEDEMANN, B. Natural antimicrobial susceptibility patterns and biochemical identification of *Escherichia albertii* and *Hafnia alvei* strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2005, roč. 51, č. 3, s. 151 – 163.
114. SÚKL: *Dodávky léčivých přípravků do ČR v roce 2015*. 2016a, 5 s. [online]. [cit. 2017-03-21]. Dostupné z: http://www.sukl.cz/file/82416_1_1
115. SÚKL: *Vydané léčivé přípravky v ČR v roce 2015*. 2016b, 6 s. [online]. [cit. 2017-03-08]. Dostupné z: www.sukl.cz/file/82413_1_1
116. SÚKL: *ATC skupiny*. [online].[cit. 2017-03-08]. Dostupné z: http://www.sukl.cz/modules/medication/atc_tree.php?current=#
117. ŠVEC, P.; DEVRIESE, L. A. Genus *Enterococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed.; DE Vos, P.; Garrity, G. M.; Jones, D.; Krieg, N. R.; Ludwig, W.; Rainey, F. A.; Schleifer, K.- H.; Whitman, W. B. Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009, roč. 3, s. 594 – 607.
118. TALLON, P.; MAGAJNA, B.; LOFRANCO, C.; LEUNG, K. T. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2005, roč. 166, s. 139 – 166.
119. TOPP, E.; MONTEIRO, S. C.; BECK, A.; COELHO, B. B.; BOXALL, A. B.; DUENK, P. W.; LI, H.; PAYNE, M.; SABOURIN, L.; METCALFE, C. D. Runoff of pharmaceuticals and personal care products following application of biosolids to an agricultural field. *Science of the Total Environment*. 2008, roč. 396, č. 1, s. 52 – 59.
120. TSUJI, B. T.; KAATZ, G. W.; RYBAK, M. J. Linezolid and other oxazolidinones. *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. Esun Technologies, LLC, Pittsburgh, PA. 2005, s. 223 – 241.

121. TURNIDGE, J. D.; BELL, J. M.; JONES, R. N.; SADER, H. *Resistances in Aeromonas species from the SENTRY Global Surveillance*. 2003. [online]. [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <https://www.jmilabs.com/data/posters/C2-2176.PDF>
122. TZELEPI, E.; ARVANITIDOU, M.; MAVROIDI, A.; TSAKRIS, A. Antibiotic susceptibilities of *Yersinia enterocolitica* and *Y. intermedia* isolates from aquatic environments. *Journal of Medical Microbiology*. 1999, roč. 48, č. 2, s. 157 – 160.
123. URBÁŠKOVÁ, P.; SCHINDLER, J.; TICHÁČEK, B.; POTUŽÍK, V. Vyšetření pro antimikrobiální terapii, *Avicenum*. 1985, s. 19 – 31.
124. URBÁŠKOVÁ, P.; ŽEMLIČKOVÁ, H.; HRABÁK, J. Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům? *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. SZÚ: Praha. 2010, roč. 19, č. 9, s. 266 – 267.
125. URWYLER, S. K.; GLAUBITZ, J. Advantage of MALDI-TOF-MS over biochemical-based phenotyping for microbial identification illustrated on industrial applications. *Letters in Applied Microbiology*. 2016, roč. 62, č. 2, s. 130 – 137.
126. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s., ISBN 80-902-8966-5.
127. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005, 351 s., ISBN 80-868-5000-5.
128. Vyhláška č. 83/2014 Sb., kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů. Sbíрка zákonů ČR, vydáno 30. 4. 2014.
129. Vyhláška č. 238/2011 Sb.: Vyhláška o stanovení hygienických požadavků na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch. Sbíрка zákonů ČR, vydáno 10. 8. 2011.
130. Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody. Sbíрка zákonů ČR, vydáno 22. 4. 2004.
131. VYSTAVNA, Y.; LE COUSTOMER, P.; HUNEAU, F. Monitoring of trace metals and pharmaceuticals as anthropogenic and socio-economic indicators of urban and industrial impact on surface waters. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2013, roč. 185, č. 4, s. 3581 – 3601.

132. WALCKENAER, E.; POIREL, L.; LEFLON-GUIBOUT, V.; NORDMANN, P.; NICOLAS-CHANOINE, M. H. Genetic and biochemical characterization of the chromosomal class A β -lactamases of *Raoultella* (formerly *Klebsiella*) *planticola* and *Raoultella ornithinolytica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004, roč. 48, č. 1, s. 305 – 312.
133. WILSON, M. *Microbial inhabitants of humans. their ecology and role in health and disease*. Cambridge University Press: Cambridge, UK. 2005, ISBN 978-0-521-84158-0.
134. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for safe recreational water environments, volume 1: coastal and fresh waters*. Geneva: WHO, 2003, 253 s., ISBN 92 4 154580 1.
135. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for drinking-water quality, third edition incorporating the first and second addenda*. 3. vydání. Geneva: WHO, 2008, roč. 1, 668 s., ISBN 978 92 4 154761 1.
136. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for drinking – water quality*. 4. vydání. Geneva: WHO, 2011, 564 s. ISBN 978 92 4 154815 1.
137. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Antimicrobial resistance: fact sheet*. 2016 [online]. [cit. 2017-02-28]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>
138. WRAGG, P.; RANDALL, L.; WHATMORE, A. M. Comparison of Biolog GEN III MicroStation semi-automated bacterial identification system with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and 16S ribosomal RNA gene sequencing for the identification of bacteria of veterinary interest. *Journal of Microbiological Methods*. 2014, roč. 105, s. 16 – 21.
139. Zákon č. 150/2010 Sb., kterým se mění zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon), ve znění pozdějších předpisů, a zákon č. 200/1990 Sb., o přestupcích, ve znění pozdějších předpisů. Sbírka zákonů ČR, vydáno 2010.
140. Zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů. Sbírka zákonů ČR, vydáno 2000.
141. Zákon č. 267/2015 Sb., kterým se mění zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a další související zákony. Sbírka zákonů ČR, vydáno 2015.

142. Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech). Sbírka zákonů ČR, vydáno 2007.
143. ZHANEL, G. G.; KARLOWSKY, J. A.; HARDING, G. K.; CARRIE, A.; MAZZULLI, T.; LOW, D. E.; HOBAN, D. J. A Canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: comparison of the activities of trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, mecillinam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000, roč. 44, č. 4, s. 1089 – 1092.