

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení vybraných mikroorganismů v odpadních vodách a metody jejich  
detekce

Bc. Nikola Roulová

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Nikola Roulová**  
Osobní číslo: **C16620**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Název tématu: **Stanovení vybraných mikroorganismů v odpadních vodách a metody jejich detekce**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### 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. Zaměřte se především na vody odpadní a na moderní způsoby detekce mikroorganismů.
2. Zpracujte vzorky reálných odpadních vod dle platných norem a identifikujte v nich vybrané bakteriální kmeny mikroorganismů.
3. Metody pro stanovení patogenních, příp. podmíněně patogenních mikroorganismů se pokuste modifikovat s důrazem na "lepší" záchyt patogenních kmenů.
4. Výsledky práce kriticky zhodnoťte a porovnejte s publikovanými pracemi.
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:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucí práce.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Petra Motková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

**Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

**20. února 2018**

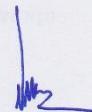
Termín odevzdání diplomové práce:

**11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9. 5. 2018

.....

Nikola Roulová

## Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi byli jakkoli nápomocni při psaní mé diplomové práce. To největší poděkování patří vedoucí mé diplomové práce Ing. Petře Motkové, Ph.D. za všestrannou pomoc, obrovskou ochotu a trpělivost.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá izolací vybraných bakterií z odpadních vod pomocí klasických kultivačních metod. Cílovými bakteriemi byly zvoleny tradiční indikátorové mikroorganismy fekálního znečištění – termotolerantní koliformní bakterie, *Escherichia coli* a intestinální enterokoky, dále patogenní a podmíněně patogenní bakterie rodu *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Aeromonas* a *Pseudomonas*. Ke konečné identifikaci bakteriálních kmenů vyizolovaných ze vzorků odpadních vod byly využity identifikační soupravy z řady MIKROLATEST®.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

odpadní voda, kultivační metody, *Yersinia*, *Salmonella*, *Campylobacter*

## **TITLE**

Isolation and identification of selected microorganisms in wastewater

## **ANNOTATION**

The diploma thesis deals with the isolation of selected bacteria from wastewater using classical cultivation methods. The traditional indicator microorganisms of fecal pollution as thermotolerant coliforms bacteria, *Escherichia coli* and intestinal enterococci were chosen. Also, pathogenic and conditionally pathogenic bacteria of the genus *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Aeromonas* and *Pseudomonas* were evaluated. The identification sets MIKROLATEST® were used for the final identification of bacterial strains isolated from the wastewater samples.

## **KEY WORDS**

wastewater, cultivation methods, *Yersinia*, *Salmonella*, *Campylobacter*

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| ÚVOD .....   | 14 |
| 1 TEORETICKÁ ČÁST .....                                  | 15 |
| 1.1 Odpadní vody.....                                    | 15 |
| 1.2 Význam indikátorových bakterií pro detekci.....      | 16 |
| 1.3 Detekce bakterií kultivačními metodami .....         | 17 |
| 1.4 Detekce bakterií molekulárními metodami.....         | 19 |
| 1.4.1 Polymerázová řetězová reakce .....                 | 21 |
| 1.4.2 Nested PCR .....                                   | 22 |
| 1.4.3 Multiplex PCR.....                                 | 24 |
| 1.4.4 Real-time PCR.....                                 | 26 |
| 1.4.5 Fluorescenční hybridizace <i>in situ</i> .....     | 28 |
| 1.4.6 Genové čipy .....                                  | 30 |
| 1.5 Detekce bakterií imunochemickými metodami .....      | 31 |
| 2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....                             | 35 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....                               | 36 |
| 3.1 Přístroje a laboratorní pomůcky.....                 | 36 |
| 3.2 Materiál.....  | 37 |
| 3.2.1 Kultivační média .....                             | 37 |
| 3.2.2 Reagencie, pracovní roztoky a soupravy (kity)..... | 45 |
| 3.2.3 Vzorke odpadních vod .....                         | 47 |
| 3.3 Pracovní postup.....                                 | 47 |
| 3.3.1 Odběr vzorků odpadních vod .....                   | 47 |
| 3.3.2 Membránová filtrace vzorků odpadních vod.....      | 48 |
| 3.3.3 Další zpracování vzorků odpadních vod .....        | 48 |
| 3.3.4 Průkaz bakterií rodu <i>Salmonella</i> .....       | 49 |
| 3.3.5 Průkaz bakterií rodu <i>Yersinia</i> .....         | 49 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.3.6  | Průkaz bakterií rodu <i>Campylobacter</i> .....  | 50 |
| 3.3.7  | Průkaz bakterií rodu <i>Enterococcus</i> .....   | 51 |
| 3.3.8  | Průkaz termotolerantních koliformních bakterií a <i>Escherichia coli</i> .....           | 52 |
| 3.3.9  | Průkaz bakterií rodu <i>Aeromonas</i> .....  | 52 |
| 3.3.10 | Průkaz bakterií rodu <i>Pseudomonas</i> .....  | 53 |
| 4      | VÝSLEDKY A DISKUZE .....   | 54 |
| 4.1    | Průkaz bakterií rodu <i>Salmonella</i> v odpadních vodách.....                           | 54 |
| 4.2    | Průkaz bakterií rodu <i>Yersinia</i> v odpadních vodách .....                            | 58 |
| 4.3    | Průkaz bakterií rodu <i>Campylobacter</i> v odpadních vodách.....                        | 61 |
| 4.4    | Průkaz bakterií rodu <i>Enterococcus</i> v odpadních vodách.....                         | 65 |
| 4.5    | Průkaz termotolerantních koliformních bakterií a <i>E. coli</i> v odpadních vodách ..... | 67 |
| 4.6    | Průkaz bakterií rodu <i>Aeromonas</i> v odpadních vodách .....                           | 70 |
| 4.7    | Průkaz bakterií rodu <i>Pseudomonas</i> v odpadních vodách .....                         | 72 |
| 5      | ZÁVĚR .....  | 75 |
| 6      | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....  | 77 |



## SEZNAM ILUSTRACÍ

|   |    |
|---|----|
| Obrázek 1A Rambach <sup>®</sup> agar – inokulum vyočkované z RVS média (foto autor).....  | 56 |
| Obrázek 1B Rambach <sup>®</sup> agar – inokulum vyočkované z MKTTn média (foto autor) .....   | 56 |
| Obrázek 2 XLD agar – suspektní kolonie (označeno černými šipkami), vyočkováno z MKTTn média (foto autor) .....                        | 56 |
| Obrázek 3A Rambach <sup>®</sup> agar – suspektní kolonie (označeno černou šipkou) dourčená jako <i>Salmonella</i> (foto autor) .....  | 57 |
| Obrázek 3B Rambach <sup>®</sup> agar – suspektní kolonie (označeno černou šipkou) dourčená jako <i>Citrobacter</i> (foto autor) ..... | 57 |
| Obrázek 4A Inokulum bez alkalizace vyočkované na CIN agaru, nátok do ČOV Kolín (vzorek 7) (foto autor).....                           | 61 |
| Obrázek 4B Inokulum bez alkalizace vyočkované na CIN agaru, odtok z ČOV Kolín (vzorek 8) (foto autor).....                            | 61 |
| Obrázek 5A Inokulum alkalizované po dobu 40 sekund vyočkované na CIN agaru, nátok do ČOV Kolín (vzorek 7) (foto autor).....           | 61 |
| Obrázek 5B Inokulum alkalizované po dobu 60 sekund vyočkované na CIN agaru, nátok do ČOV Kolín (vzorek 7) (foto autor).....           | 61 |
| Obrázek 6 mCCDA agar –suspektní kolonie bakterií rodu <i>Campylobacter</i> (foto autor) .....   | 62 |
| Obrázek 7A Slanetz-Bartley agar – roztěr ředění 10 <sup>-2</sup> , nátok do ČOV Poděbrady (vzorek 9) (foto autor) .....               | 65 |
| Obrázek 7B Slanetz-Bartley agar – membránová filtrace 10 ml, odtok z ČOV Poděbrady (vzorek 10) (foto autor).....                      | 65 |
| Obrázek 8A <i>Enterococcus faecalis</i> na Slanetz-Bartley agaru (foto autor).....  | 67 |
| Obrázek 8B <i>Enterococcus faecalis</i> na žluč-eskulinovém agaru (foto autor).....   | 67 |
| Obrázek 9A <i>Escherichia coli</i> na m-FC agaru, typické kolonie (foto autor).....   | 68 |

|  |    |
|--|----|
| Obrázek 9B <i>Escherichia coli</i> na m-FC agaru, atypické kolonie (foto autor) .....  | 68 |
| Obrázek 10A m-FC agar – membránová filtrace 10 ml, odtok z ČOV Nový Bydžov (vzorek 6) (foto autor).....  | 69 |
| Obrázek 10B Chromocult® Coliform agar – membránová filtrace 10 ml, odtok z ČOV Nový Bydžov (vzorek 6) (foto autor) .....   | 69 |
| Obrázek 11A <i>Aeromonas caviae</i> na m- <i>Aeromonas</i> agaru (foto autor).....   | 71 |
| Obrázek 11B m- <i>Aeromonas</i> agar – membránová filtrace 10 ml, nátok do ČOV Poděbrady (vzorek 9) (foto autor).....  | 71 |
| Obrázek 12 Cetrimidový agar – suspektní kolonie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , roztěr ředění $10^{-1}$ , nátok do ČOV Nový Bydžov (vzorek 5), (označeno červenými šipkami) (foto autor) ... | 73 |

## SEZNAM TABULEK

|  |    |
|--|----|
| Tabulka 1 Výhody a nevýhody vybraných metod používaných k detekci a identifikaci bakterií z vod (1/2)..... | 33 |
| Tabulka 1 Výhody a nevýhody vybraných metod používaných k detekci a identifikaci bakterií z vod (2/2)..... | 34 |
| Tabulka 2 McFarlandova zákalová stupnice .....   | 47 |
| Tabulka 3 Vzorčky odpadních vod.....   | 47 |

## SEZNAM ZKRATEK

|                |   |
|----------------|---|
| A.             | <i>Aeromonas</i>  |
| ABNC           | aktivní, ale nekultivovatelné (active but non-culturable)                               |
| ATP            | adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)  |
| B.             | <i>Bacillus</i>   |
| Ba.            | <i>Bacteroidales</i>  |
| BGA            | agar s brilantní zelení (Brilliant Green Agar)  |
| BGD agar       | agar s brilantní zelení a deoxycholátem sodným (Brilliant Green Deoxycholate agar)      |
| BHI agar       | mozkosrdcový agar (Brain Heart Infusion agar)   |
| bp             | páry bází (base pairs)  |
| C.             | <i>Campylobacter</i>  |
| cDNA           | komplementární deoxyribonukleová kyselina (complementary deoxyribonucleic acid)         |
| CFU            | kolonie tvořící jednotky (colony forming units)   |
| Ci.            | <i>Citrobacter</i>  |
| CIN agar       | agar s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem (Cefsulodin Irgasan Novobiocin Agar)      |
| Cl.            | <i>Clostridium</i>  |
| ČOV            | čistírna odpadních vod  |
| DNA microarray | genové čipy   |
| DNA            | deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)                                      |
| DVC            | přímé stanovení počtu živých buněk (direct viable count)                                |
| E.             | <i>Escherichia</i>  |
| EHEC           | enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>   |
| ELISA          | enzymově značená imunoanalýza s využitím pevné fáze (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) |
| EMA            | ethidium monoazid (ethidium monoazide)  |
| En.            | <i>Enterococcus</i>   |
| FISH           | fluorescenční hybridizace <i>in situ</i> (fluorescent <i>in situ</i> hybridization)     |
| HRM            | vysokorozlišovací analýza křivek tání (high resolution melting)                         |
| IMS            | imunomagnetická separace (immunomagnetic separation)                                    |

|              |   |
|--------------|---|
| ITC bujón    | bujón s irgasanem, tikarcilinem a chlorečnanem draselným (Irgasan Ticarcillin Chlorate Broth)   |
| <i>K.</i>    | <i>Klebsiella</i>   |
| KA           | krevní agar (Blood Agar)  |
| KF agar      | agar dle Kennera pro stanovení fekálních enterokoků (Kenner Fecal Agar)   |
| <i>L.</i>    | <i>Legionella</i>   |
| mCCDA        | modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem (Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar)  |
| mE agar      | agar pro stanovení enterokoků metodou membránové filtrace (membrane- <i>Enterococcus</i> agar)  |
| mEI agar     | agar s Indoxyl- $\beta$ -D-glukosidázou pro stanovení enterokoků metodou membránové filtrace (membrane- <i>Enterococcus</i> Indoxyl- $\beta$ -D-Glucoside agar) |
| m-FC agar    | agar pro stanovení fekálních koliformních mikroorganismů metodou membránové filtrace (membrane Fecal Coliform agar)   |
| MKTTn médium | Mueller-Kauffman tetrathionát novobiocin médium (Mueller Kauffman Tetrathionate Novobiocin Broth Base)  |
| MPA          | masopeptonový agar (Nutrient Agar)  |
| mPCR         | multiplex polymerázová řetězová reakce (multiplex polymerase chain reaction)  |
| MPN          | metoda nejpravděpodobnějšího počtu (most probable number)   |
| mRNA         | messengerová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)   |
| <i>P.</i>    | <i>Pseudomonas</i>  |
| PCR          | polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)  |
| PCR-ELISA    | polymerázová řetězová reakce – enzymově značená imunoanalýza s využitím pevné fáze (polymerase chain reaction – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)              |
| PMA          | propidium monoazid (propidium monoazide)  |
| PPV          | pufrovaná peptonová voda (Buffered Peptone Water)   |
| PSB bujón    | bujón s peptonem, sorbitolem a žlučovými solemi (Peptone Sorbitol Bile Broth)   |
| <i>R.</i>    | <i>Raoultella</i>   |

|               |   |
|---------------|---|
| rDNA          | ribozomální deoxyribonukleová kyselina (ribosomal deoxyribonucleic acid)  |
| real-time PCR | polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real-time polymerase chain reaction)   |
| RNA           | ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)  |
| rRNA          | ribozomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid)  |
| RT-mPCR       | multiplex polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (reverse transcription-multiplex polymerase chain reaction) |
| RT-PCR        | polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (reverse transcription-polymerase chain reaction)                     |
| RVS médium    | Rappaport Vassiliadis sója médium (Rappaport Vassiliadis Soya Broth)  |
| <i>S.</i>     | <i>Salmonella</i>   |
| sp.           | blíže neurčený druh příslušného rodu (specie)   |
| SPC           | cytometrie v pevné fázi (solid-phase cytometry)   |
| spp.          | blíže neurčené druhy příslušného rodu (species)   |
| SS agar       | <i>Salmonella-Shigella</i> agar ( <i>Salmonella-Shigella</i> agar)  |
| subsp.        | poddruh (subspecies)  |
| TSA           | trypton sójový agar (Tryptone Soya Agar)  |
| <i>V.</i>     | <i>Vibrio</i>   |
| VBNC          | životaschopné, ale nekultivovatelné (viable but non-culturable)   |
| XLD agar      | xylóza-lyzin-deoxycholátový agar (Xylose Lysine Deoxycholate agar)  |
| <i>Y.</i>     | <i>Yersinia</i>   |
| ŽE agar       | žluč-eskulinový agar (Bile Esculin Agar)  |

## ÚVOD

Vypouštění přečištěných odpadních vod nedostatečné mikrobiologické kvality do prostředí nebo jejich opětovné používání představuje zdravotní riziko pro obyvatelstvo. Samotný proces čištění odpadních vod nedokáže zcela vyloučit patogenní mikroorganismy. Pro získání zdravotně nezávadné vody je nezbytné použít dezinfekční ošetření. Sledování výskytu bakterií v nátocích a odtocích z čistíren odpadních vod a povrchových vodách do kterých je přečištěná odpadní voda vypouštěna umožňuje nejenom posoudit účinnost čistícího procesu, ale také získat informace o schopnosti přežití a distribuci bakterií v životním prostředí.

Standardně se bakterie ve vodách prokazují kultivačními metodami. Kultivační postupy jsou časově náročné a neumožňují detekovat životaschopné, ale nekultivovatelné formy, ve kterých se bakterie ve vodním prostředí často vyskytují. Výrazné zrychlení detekce bakterií umožnily molekulární metody, které nad klasickými kultivačními metodami vynikají i vysokou citlivostí a specifitou. Přestože molekulární metody dokáží prokázat nekultivovatelné formy bakterií, neposkytují informace o životaschopnosti a infekčnosti. Imunochemické metody pak umožňují detekovat toxiny, jejichž produkce nemusí být kódována v genomu bakterie.

Cílem této diplomové práce bylo pomocí klasických kultivačních metod izolovat z nátoků a odtoků čistíren odpadních vod vybrané bakterie. Mikrobiologický rozbor byl zaměřen jednak na průkaz fekálních indikátorových mikroorganismů – termotolerantní koliformní bakterie, *Escherichia coli* a intestinální enterokoky a dále na průkaz patogenních a podmíněně patogenních bakterií z rodů *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Aeromonas* a *Pseudomonas*. Bakteriální kmeny izolované ze vzorků odpadních vod byly identifikovány pomocí biochemických testů.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Odpadní vody

V několika posledních desetiletí vedl nedostatek vody k rozšíření opětovného použití odpadních vod (Catalan *et al.*, 1997; Levantesi *et al.*, 2010). Množství systémů pro rekultivaci a využití odpadní vody se v tomto století v Evropě i ve světě výrazně zvýšilo (Levantesi *et al.*, 2010). Zúžitkování nacházejí zejména při sprejovém zavlažování zemědělských ploch, zahrad nebo sportovních hřišť. Nicméně toto využití odpadních vod přináší zdravotní riziko spojené s inhalací mikrobiálního nebo chemického obsahu ve tvořeném aerosolu (Catalan *et al.*, 1997). Rekultivovaná odpadní voda nachází využití i v průmyslu a stále častěji slouží k doplňování hladin povrchových a podzemních vod (Costán-Longares *et al.*, 2008).

Jeden z klíčových problémů při opětovném využití odpadní vody představuje její mikrobiologická kvalita a možnost šíření infekčních onemocnění (Levantesi *et al.*, 2010). Primárním úkolem městských čistíren odpadních vod (ČOV), včetně nově vybudovaných, zůstává redukce celkových suspendovaných částic, znečištění uhlíkem, dusíkem a fosforem, na úroveň odpovídající asimilační kapacitě vody, do které ústí odtok z čistíren. Odstranění nebo snížení koncentrace patogenních mikroorganismů je obecně věnováno méně pozornosti a konvenční postupy čištění vod nezaručují jejich úplné vyloučení (Rose *et al.*, 1996; Blumenthal *et al.*, 2000; Espigares *et al.*, 2006; Godfree and Farrell, 2005; Wéry *et al.*, 2010; Lucas *et al.*, 2014; Topic Popovic *et al.*, 2015). Nicméně právě odstranění patogenních mikroorganismů z městských odpadních vod představuje kritický krok, neboť vypouštěná odpadní voda může kontaminovat povrchové vody a zvýšit riziko infekcí v případě využití vody k rekreaci nebo jako zdroje pitné vody (Zanetti *et al.*, 2006). Primárním a sekundárním přečištěním je možné snížit koncentraci bakterií indikujících fekální znečištění vody až o 99 % (Servais *et al.*, 2007; Levantesi *et al.*, 2010; Lucas *et al.*, 2014; Topic Popovic *et al.*, 2015). Ovšem v závislosti na fekálním znečištění původní odpadní vody, nemusí být rozsah eliminace dostačující pro dosažení požadované kvality k jejímu opětovnému použití (Zanetti *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2014).

K minimalizování rizika ohrožení veřejného zdraví a získání bezpečné odpadní vody pro opětovné použití je nezbytné zařadit do konečné fáze čištění dezinfekci nebo jiné pokročilé systémy k redukci patogenních mikroorganismů (Zanetti *et al.*, 2006; Costán-Longares *et al.*, 2008; Levantesi *et al.*, 2010; Lucas *et al.*, 2014). O rozsahu potřebných úprav odpadní vody rozhodují právní požadavky a konečné zúžitkování. Dezinfekční ošetření může významně snížit množství patogenních mikroorganismů, ale vzhledem k relativně vysokým nákladům,

většina čističek odpadních vod v Evropě desinfekčním procesem nedisponuje (Zanetti *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2014). Nejčastěji používané dezinfekční prostředky – chlorované deriváty mají tendenci tvořit potencionálně karcinogenní a mutagenní sloučeniny. Při využití fyzikálního postupu – UV záření nedochází ke vzniku zbytkových látek, ale hrozí riziko regenerace bakterií procesem fotoreaktivace a špatných výsledků při silném zakalení vody (Zanetti *et al.*, 2006).

## 1.2 Význam indikátorových bakterií pro detekci

Vzorky vod a odpadních vod představují komplexní matici, která s vysokou pravděpodobností obsahuje více než jeden patogenní mikroorganismus (Toze, 1999). Detekce, izolace a identifikace všech potencionálních patogenních mikroorganismů kontaminujících vodu by představovala nesmírně obtížný, časově náročný a nákladný proces, zejména při jeho pravidelném opakování (Toze 1999; Alhamlan *et al.*, 2015). Patogenní mikroorganismy se ve vodním prostředí vyskytují nárazově, neboť jsou vylučovány pouze nakaženými jedinci (Badurová, 2011). Z těchto důvodů se k určení relativního rizika přítomnosti patogenních mikroorganismů ve vzorku používají indikátorové mikroorganismy. Do vodního sloupce pronikají stejnou cestou jako patogenní mikroorganismy, avšak snadněji se kultivují a sledují (Toze 1999; Alhamlan *et al.*, 2015).

Mezi nejvýznamnější indikátorové mikroorganismy patří fekální koliformní bakterie. Jejich výskyt je spojován s výkaly zvířat, ptáků a lidí, takže mohou sloužit k označení přítomnosti fekálního znečištění (McLellan and Eren, 2014; Alhamlan *et al.*, 2015). V současné době Světová zdravotnická organizace (WHO) uznává tři skupiny indikátorů – obecné mikrobiální indikátory, zahrnují celkové heterotrofní bakterie nebo koliformní bakterie zbývající po chloraci, dále specifické fekální indikátory, které přímo indikují fekální kontaminaci (např. termotolerantní *Escherichia coli*). Poslední skupinu tvoří indikátory používané jako indexové nebo modelové organismy pro určitý patogenní mikroorganismus (např. *Escherichia coli* jako indexový mikroorganismus pro bakterie rodu *Salmonella*) (Alhamlan *et al.*, 2015).

Přes relativně jednoduchý a levný proces sledování, nepředstavují indikátorové bakterie v mnohých ohledech ideální ukazatele (McLellan and Eren, 2014; Alhamlan *et al.*, 2015). Množství fekálních indikátorů velmi často nekoreluje se skutečným stavem patogenů, což může být způsobeno rozdílným působením faktorů prostředí – teplotou, pH nebo sedimentací (Alhamlan *et al.*, 2015). Navíc samotné bakteriální indikátory nepostačují k zjištění přítomnosti patogenních virů a prvoků (Toze 1999; Alhamlan *et al.*, 2015).



Použití molekulárních metod umožňuje využít jako „alternativní“ fekální indikátory také nekultivovatelné organismy. Jelikož střevnímu traktu lidí a zvířat dominují fekální anaerobní bakterie, představují ideální cíl jako alternativní indikátorové mikroorganismy. Mohou lépe vystihnout přítomnost patogenních mikroorganismů, neboť je nepravděpodobné, že se po uvolnění do životního prostředí budou nadále množit (McLellan and Eren, 2014).

### 1.3 Detekce bakterií kultivačními metodami

Průkaz nebo stanovení bakterií by v ideálním případě mělo být rychlé, citlivé, přesné, levné a snadné (Toze, 1999). Kultivační metody přes svoje stáří nadále zůstávají standardním postupem využívaným k detekci bakterií (Lazcka *et al.*, 2007). Kultivace zahrnuje použití pomnožovacích a selektivních médií za účelem izolace vybrané bakterie od doprovodné mikroflóry. Pomnožení cílových bakterií je často velmi obtížné a celý proces se může značně prodloužit. Avšak ani zařazení pomnožovacího kroku mnohdy nezajistí kultivačně detekovatelnou koncentraci bakterií (Girones *et al.*, 2010). K detekci konkrétních bakterií se následně používají pevné selektivní půdy (Lazcka *et al.*, 2007). Ke konečné identifikaci cílové bakterií slouží biochemická nebo imunochemická konfirmace (Girones *et al.*, 2010).

Přestože tradiční kultivační metody obvykle splňují požadavky na nízké náklady a jednoduchost, výraznou komplikaci představuje časová náročnost (Lazcka *et al.*, 2007; Alhamlan *et al.*, 2015; Helmi *et al.*, 2015; Law *et al.*, 2015). Ta je způsobena závislostí konvenčních metod na schopnosti mikroorganismů růst v různých kultivačních médiích. Obvykle je možné předběžně identifikovat patogenní bakterii do 2 až 3 dní od odběru vzorku, k potvrzení druhové příslušnosti je nutný více než týden (Law *et al.*, 2015). U některých patogenních bakterií je však doba průkazu mnohem delší – např. potvrzení přítomnosti patogenních kmenů rodu *Campylobacter* vyžaduje 14 až 16 dní (Lazcka *et al.*, 2007). Rychlá detekce a identifikace patogenních bakterií z vody přitom představuje klíčový krok, zejména při vypuknutí onemocnění a ohrožení lidských životů (van Blerk *et al.*, 2011).

Kromě dlouhé inkubační doby limituje klasické kultivační metody také vzájemné ovlivňování cílových bakterií a doprovodné mikroflóry, nedostatečné rozlišení mezi patogenními a nepatogenními kmeny a slabá úroveň detekce pomalu rostoucích nebo stresovaných bakterií (Rompré *et al.*, 2002; Alexandrino *et al.*, 2004). V důsledku toho mohou kultivační metody silně podhodnocovat skutečné počty životaschopných buněk přítomných ve vodě (Phe *et al.*, 2005; Helmi *et al.*, 2015). Kultivačními metodami lze detekovat méně než 1 % bakterií přítomných v životním prostředí (Wang *et al.*, 2010; Helmi *et al.*, 2015). Nízký záchyt mohou ovlivnit jednak nepříznivé růstové podmínky během

kultivace, ale též schopnost bakterií přecházet a přetrvávat ve vodním prostředí ve formě životaschopných, ale nekultivovatelných buněk (VBNC) (Rompré *et al.*, 2002). Navzdory neschopnosti růstu na kultivačních médiích, nejsou VBNC buňky považovány za mrtvé. Jelikož nemají narušenou buněčnou membránu, zachovávají si nepoškozený genetický materiál. Nadále pokračuje také proces transkripce a tím produkce mRNA. Jejich metabolická činnost zůstává zachována a v případě příznivých podmínek může u buněk dojít k obnovení schopnosti množení (Li *et al.*, 2014; Helmi *et al.*, 2015). Tvorba VBNC forem byla zjištěna u řady významných patogenních bakterií – *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* nebo *Escherichia coli* (Alexandrino *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2014). Termín VBNC však není přesný, pokud následná resuscitace bakterií vede k obnovení buněčného dělení. Výstižnější výraz je aktivní, ale nekultivovatelné (ABNC), který popisuje bakterie, jež vykazují měřitelné rysy fyziologické aktivity, ale nedokáží růst na detekovatelné úrovni (Hoefel *et al.*, 2003).

V prostředí působí na mikroorganismy řada stresových vlivů – např. nedostatek živin, nevhodná teplota nebo predace prvoků, které mohou vést k poškození nebo inaktivaci buněk (Helmi *et al.*, 2015). V distribučních systémech pitné vody dochází vlivem fyzikálního nebo chemického ošetření k ovlivnění metabolických a fyziologických procesů (Phe *et al.*, 2005; Helmi *et al.*, 2015). Nejběžnější dezinfekční prostředek – chlor poškozuje bakteriální membrány modifikací jejich propustnosti, inhibuje produkci ATP, narušuje nukleové kyseliny, a i v malých dávkách potlačuje růst bakterií na kultivačních půdách (Phe *et al.*, 2005). Problémy klasickým kultivačním metodám způsobuje i růst cílových bakterií v biofilmu, jež pak nemohou být detekovány (Girones *et al.*, 2010). V systémech pitné vody se až 95 % přítomné bakteriální populace vyskytuje na povrchu, zatímco ve vodní fázi je rozptýleno pouze zbývajících 5 % (Wingender and Flemming, 2011).

Vyčíslení patogenních mikroorganismů v nátoku a odtoku z čistíren odpadních vod umožňuje efektivně posoudit účinnost procesu přečištění (Toze *et al.*, 1999). K zachycení indikátorových bakterií z vod obvykle slouží metoda membránová filtrace, kdy je určený objem vody přefiltrován přes sterilní filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$  a následně inkubován na povrchu pevné půdy. K počítání suspektních bakteriálních kolonií dochází, v závislosti na typu bakterie, za 24 až 48 hodin. Výsledky se vyjadřují jako kolonie tvořící jednotky na 100 ml vzorku (CFU/100 ml) (Rompré *et al.*, 2002; Alhamlan *et al.*, 2015). V mnohých zemích představuje metoda membránové filtrace schválený postup pro sledování mikrobiologické kvality pitné vody (Rompré *et al.*, 2002).

V řadě studií je pro vyčíslení patogenních mikroorganismů v nátoky a odtoků z ČOV využívána metoda nejpravděpodobnějšího počtu (MPN), přestože se jedná o metodu, která je vhodná pro vody s nízkým počtem cílových bakterií. Metoda nejpravděpodobnějšího počtu (MPN) představuje tradiční a univerzální techniku, rozsáhle využívanou po několik desetiletí, která umožňuje odhadnout počet mikroorganismů přítomných ve vzorku. Technika využívá Poissonovu distribuci mikroorganismů v daném vzorku (Toranzos *et al.*, 1993). Zkumavky obsahující selektivní kultivační médium se inokulují daným objemem vody a inkubují při dané teplotě a čase, aby bylo umožněno pozorovat negativní nebo pozitivní výsledek. Přítomnost požadované pozitivní reakce umožní odhadnout počet mikroorganismů (Toranzos *et al.*, 1993; Alhamlan *et al.*, 2015). Metoda MPN je využívána v rámci posuzování bakteriologické kvality vody pro stanovení fekálních koliformních bakterií. V tomto případě se za pozitivní výsledek vyhodnocuje jakákoliv zkumavka, kde dochází k tvorbě plynu. Potencionální koliformní bakterie se následně inkubují v selektivních kultivačních médiích, kde se pro potvrzení pozitivního výsledku vyhodnocuje tvorba plynu.

#### **1.4 Detekce bakterií molekulárními metodami**

Molekulární techniky představují rychlé, citlivé a specifické analytické nástroje pro detekci patogenních mikroorganismů (Rompré *et al.*, 2002; Girones *et al.*, 2010). Metody pracují na principu detekce specifické sekvence DNA nebo RNA cílové patogenní bakterie. Průkaz konkrétních úseků nukleových kyselin je umožněn jejich hybridizací se syntetickými oligonukleotidy (sondami nebo primery), komplementárními k zjišťované sekvenci. Pro dosažení detekovatelné úrovně jsou vybrané segmenty podrobeny amplifikaci *in vitro* (Girones *et al.*, 2010; Velusamy *et al.*, 2010; Law *et al.*, 2015).

Použití molekulárních technik vedlo k výraznému zrychlení detekce patogenních bakterií (Alhamlan *et al.*, 2015). Výsledky lze získat v řádu několika hodin, namísto dnů, které vyžadují tradiční kultivační metody (Rompré *et al.*, 2002; Aw and Rose, 2012). Některé techniky umožňují současně detekovat několik patogenních bakterií v jednom jediném kroku (Alhamlan *et al.*, 2015). Pro mnohé patogenní bakterie a nově navržené indikátorové mikroorganismy, které nelze prokázat kultivačně, představují molekulární metody jediný možný způsob detekce a kvantifikace (Girones *et al.*, 2010). Umožnění použití alternativních indikátorových mikroorganismů, které lze snadno spojit s původním hostitelem, vede k efektivnějšímu rozlišení mezi lidskými a zvířecími patogenními bakteriemi (Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). Schopnost molekulárních metod detekovat široké spektrum patogenních mikroorganismů napomáhá odhalit nové původce onemocnění (Aw and Rose, 2012).

Molekulární techniky taktéž poskytují další fylogenetické informace, pro již identifikované kmeny (Girones *et al.*, 2010; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). Lze prokázat i patogenní bakterie s dvojnásobnými fenotypovými vlastnostmi, mezi které patří hippurát negativní kmeny *Campylobacter jejuni* (Law *et al.*, 2015).

Hlavní nevýhodou molekulárních metod je to, že neposkytují informace o životaschopnosti a infekčnosti patogenních mikroorganismů (Girones *et al.*, 2010; Aw and Rose, 2012; Alhamlan *et al.*, 2015; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). Neschopnost rozlišit mrtvé buňky společně s vysokou citlivostí vede k vysokému riziku falešně pozitivních výsledků (Mandal *et al.* 2011; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015).

K rozlišení životaschopných buněk od pouhé přítomnosti DNA ve vzorku byla vypracována celá řada postupů (Girones *et al.*, 2010). Slibné řešení představuje použití DNA interkalačních barviv jako ethidium monoazid (EMA) a propidium monoazid (PMA), které se po silné expozici záření z viditelné oblasti spektra kovalentně váží na molekulu DNA a modifikovaná molekula DNA nemůže být amplifikována pomocí PCR. Barviva do buněk pronikají pouze porušenou buněčnou membránou. Takové buňky pak účinek barviva selektivně vyloučí z analýzy. Naproti tomu ke genomu v neporušených buňkách barviva neproniknou a průběh amplifikace neovlivní (Quijada *et al.*, 2016; Varma *et al.*, 2009; Girones *et al.*, 2010; Aw and Rose, 2012). Integrita membrány jako kritérium životaschopnosti, ale techniku značně omezuje (Girones *et al.*, 2010). Ve spojení s PCR a kvantitativní real-time PCR se pro rozlišení živých a mrtvých buněk častěji používá barvivo PMA, neboť EMA vykazuje vyšší schopnost pronikat neporušenými buněčnými membránami některých organismů (Quijada *et al.*, 2016; Varma *et al.*, 2009; Girones *et al.*, 2010).

Dalším možným řešením je využít jako ukazatel životaschopnosti molekuly mRNA. Ty se vyskytují pouze v replikujících se buňkách, a navíc velmi rychle po smrti buňky degradují. Perzistenci molekul mRNA mohou ale ovlivnit podmínky ve kterých došlo k inaktivaci buněk. Některé molekuly RNA mohou v buňkách přetrvávat i po ztrátě životaschopnosti, což vede k falešně pozitivním výsledkům. Přesto molekuly mRNA mnohem lépe odrážejí přítomnost živých buněk ve vyšetřovaných vzorcích než molekuly DNA (Morin *et al.*, 2004; Cenciarini-Borde *et al.*, 2009; Girones *et al.*, 2010; Botes *et al.*, 2013).

Molekulární techniky často omezuje přítomnost inhibičních látek ve vyšetřovaném vzorku, která může ovlivnit specifitu metody (Alhamlan *et al.*, 2015). Výskyt inhibitorů (např. těžkých kovů) stále představuje problém pro molekulární analýzu vzorků životního prostředí (Girones *et al.*, 2010). U amplifikačních technik může docházet k upřednostňování určitých bakteriálních druhů, v důsledku odlišné dostupnosti cílových sekvencí DNA.

Molekulární metody může limitovat i nedostatečná kvalita genetického materiálu (Alhamlan *et al.*, 2015).

#### 1.4.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) patří mezi nejpoužívanější molekulární metody pro detekci patogenních bakterií ve vodách (Lazska *et al.*, 2007; Law *et al.*, 2015; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). Cyklický proces vedoucí k exponenciálnímu nárůstu cílového úseku DNA zahrnuje tři kroky – denuraci, annealing a elongaci (Toze, 1999; Law *et al.*, 2015; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). Požadovanou sekvenci DNA, ohraničenou krátkými oligonukleotidovými primery, lze za méně než hodinu amplifikovat až milionkrát. PCR se vyznačuje vysokou citlivostí a umožňuje detekovat jedinou molekulu DNA (Velusamy *et al.*, 2010; Law *et al.*, 2015). Neschopnost PCR amplifikovat molekuly RNA přímo lze vyřešit použitím enzymu reverzní transkriptázy, který katalyzuje syntézu komplementární DNA (cDNA) z templátové RNA (Botes *et al.*, 2013).

**Alexandrino *et al.* (2004)** navrhli a optimalizovali metodu pro rychlou detekci patogenních bakterií v odpadních vodách. Metoda zahrnovala pomnožování krok, extrakci DNA a PCR detekci. Jako modelové patogenní bakterie byly vybrány *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* a *Yersinia enterocolitica* sérovar 0:3. Dále byla zhodnocena vhodnost metody pro detekci bakterie *Enterococcus faecalis*, která je používána jako standardní indikátorový mikroorganismus.

V uměle inokulovaných vzorcích přečištěné odpadní vody odebraných z kořenové ČOV bylo možné detekovat 5 buněk *Yersinia enterocolitica*,  $5 \cdot 10^1$  buněk *Campylobacter jejuni/coli* a  $5 \cdot 10^2$  buněk *Enterococcus faecalis* na 100 ml vzorku. Detekční limity pro nátok do ČOV byly vyšší –  $2 \cdot 10^2$  buněk *Yersinia enterocolitica*,  $2 \cdot 10^3$  buněk *Campylobacter jejuni/coli* a  $2 \cdot 10^4$  buněk *Enterococcus faecalis* ve 100 ml vzorku. Nižší citlivost PCR prokázala v městské odpadní vodě –  $2 \cdot 10^2$  buněk *Yersinia enterocolitica* a  $2 \cdot 10^3$  buněk *Campylobacter jejuni/coli* ve 100 ml odtoku z ČOV a  $2,5 \cdot 10^3$  buněk *Yersinia enterocolitica* a  $2,5 \cdot 10^4$  *Campylobacter jejuni/coli* ve 100 ml nátoků do ČOV.

Při reálné aplikaci PCR na vzorky pocházející ze dvou kořenových ČOV nedošlo k zjištění přítomnosti bakterií *Yersinia enterocolitica* sérovar 0:3, *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. PCR také neprokázala přítomnost indikátorové bakterie *Enterococcus faecalis*.

**Bonetta *et al.* (2011)** vypracovali protokol pro detekci bakterií *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 a genů virulence *Escherichia coli* (*stx1*, *stx2*, *eae*) ve vodách. Před

vlastní detekci byl předřazen pomnožovací krok sestávající se z filtrace vzorku vody a kultivace filtru se zachycenými bakteriemi v neselektivním bujónu – peptonové vodě. Navrhnutý protokol byl použit pro zjištění přítomnosti cílových patogenních bakterií ve vzorcích povrchových vod odebraných z povodí italského jezera Brugneto. V uměle inokulovaných vzorcích dosáhla PCR vysoké citlivosti (<3 CFU/l) pro oba mikroorganismy. Získané výsledky také prokázaly, že filtrace nepředstavuje omezující faktor pro citlivost, neboť mez detekce získaná při PCR bez filtračního kroku se nelišila od PCR s filtrací. Ve 14 z celkových 42 odebraných vzorků byla pomocí PCR prokázána přítomnost bakterií rodu *Salmonella*, naproti tomu kultivační metoda ukázala kontaminaci vzorků vody pouze ve 3 případech. Pouze jeden vzorek obsahoval amplikony odpovídající přítomnosti bakterie *E. coli* O157:H7. Gen virulence *E. coli stx1* byl prokázán u 15 vzorků, gen *stx2* nebyl prokázán v žádném ze vzorků. Amplikony odpovídající genům *stx1*, *stx2* a *eae* v nepřítomnosti bakterie *E. coli* O157:H7 ukazovaly na možnou přítomnost jiných patogenních bakterií nesoucí tyto geny např. EHEC nebo bakterie rodu *Shigella*.

**Bonetta et al. (2016)** navázali na svou práci z roku 2011 a využili vyvinutou PCR společně s předřazeným pomnožovacím krokem k zhodnocení výskytu patogenních bakterií *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 a genů virulence bakterie *Escherichia coli* v odpadních vodách. Údaje o přítomnosti těchto bakterií v neupravené odpadní vodě odrážejí klinické i subklinické infekce, které převládají v lidské populaci. Výsledky získané z upravených odpadních vod navíc poskytují užitečné informace o úloze ČOV, jako potenciálního zdroje kontaminace životního prostředí.

Použitá metoda prokázala dostatečnou citlivost pro detekci nízkých hladin (2 CFU/100 ml neupravené odpadní vody) testovaných patogenních bakterií. Ve všech vzorcích byla metodou PCR detekována bakterie rodu *Salmonella*, která byla dokázána i kultivačně. Naopak DNA pocházející z bakterie *E. coli* O157:H7 nebyla nalezena v žádném vzorku. Přesto 33 % vzorků nátoků a odtoků z ČOV obsahovalo amplikony odpovídající genu *stx1*. Naproti tomu 25 % vzorků nátoků do ČOV a 8 % odtoků z ČOV vykazovalo přítomnost genu *stx2*. DNA z bakterií *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* se podařilo prokázat v 50 resp. 25 % vzorků surové odpadní vody a v 8 resp. 25 % vzorků přečištěné odpadní vody.

#### 1.4.2 Nested PCR

Nested PCR představuje variantu PCR, která využívá dva páry primerů ve dvou po sobě následujících amplifikačních krocích (Skotnikova et al., 2000; Rompré et al., 2002). V případě, že amplikony získané v prvním kole nedosahují detekovatelné úrovně, lze pomocí

nested PCR zvýšit účinnost amplifikace a dosáhnout detekovatelné hladiny druhým krokem (Rompré *et al.*, 2002). Druhý cyklus amplifikace lze provést pouze tehdy pokud je v prvním kroku získána správná sekvence DNA, což vede k výraznému zvýšení specifity (Olsen *et al.*, 1995; Rompré *et al.*, 2002).

**Catalan *et al.* (1997)** zjišťovali pomocí nested PCR přítomnost bakterie *Legionella pneumophila* v přečištěných odpadních vodách. Dále zhodnotili účinnost chromatografických metod pro odstranění inhibitorů PCR z odpadních vod. K eliminaci organických látek byla využita gelová permeační chromatografie, k vyloučení kovových iontů filtrace přes iontoměničové pryskyřice.

Analyzované vzorky odtoku pocházely z ČOV v Ibi ve Španělsku. Při aplikaci techniky nested PCR na odebrané vzorky odpadních vod, bez jakékoli předchozí úpravy, nedošlo k tvorbě žádných amplifikačních produktů. Ovšem při použití chromatografických metod k eliminaci inhibitorů PCR došlo k pozitivnímu průkazu bakterie *L. pneumophila* v 9 z celkem 12 testovaných vzorků. Zbývající 3 vzorky s negativním PCR průkazem obsahovaly nejvyšší množství organického uhlíku, železa a zinku a potvrdily nedostatečnost použitého chromatografického kroku pro příliš složité matrice. Výsledky bylo možné získat v rozmezí 5 až 6 hodin.

**Waage *et al.* (1999a)** použili nested PCR při stanovení nízkých počtů patogenní bakterie *Yersinia enterocolitica* v povrchových a odpadních vodách. Celkem bylo odebráno 7 vzorků povrchových vod ze 6 lokalit a 1 vzorek odpadní vody. Shromážděné vzorky byly zaočkovány bakterií *Y. enterocolitica*, přefiltrovány a filtry kultivovány přes noc v neselektivním médiu – trypton sójovém bujónu.

Výsledky studie ukázaly, že použitá nested PCR je schopna detekovat nízké počty bakterií *Y. enterocolitica* nezávisle na množství původní mikroflóry. Sedm vzorků povrchových vod, které obsahovaly heterotrofní mikroorganismy o denzitě  $8,7 \cdot 10^3$  CFU/ml a koliformních bakterie  $1 \cdot 10^4$  CFU/100 ml vzorku, bylo navíc uměle inokulováno bakterií *Y. enterocolitica*. Detekční limit pro bakterii *Y. enterocolitica* byl  $8 - 1 \cdot 10^1$  CFU/100 ml vzorku. Ve vzorku odpadní vody byla prokázána přirozená kontaminace bakteriemi *Y. enterocolitica*. Výsledky bylo možné získat v rozmezí 2 až 3 dnů.

**Waage *et al.* (1999b)** aplikovali nested PCR také k detekci nízkých počtů bakterií rodu *Salmonella* v povrchových a odpadních vodách. Specifita použité techniky byla ověřena na 129 kmenech salmonely, kdy ve 128 případech bylo dosaženo pozitivních výsledků. Pouze u jednoho kmene *Salmonella* Arizonae nedošlo k detekci cílového amplikonu. Nested PCR

byla aplikována také na 31 kmenů, které nenáležely do rodu *Salmonella*, a nedošlo k produkci specifických amplikonů.

K analýze bylo shromážděno celkem 13 vzorků povrchových vod z 8 lokalit a jeden vzorek odpadní vody. Čtyři alikvoty z každého vzorku byly zaočkovány bakterií *Salmonella* Typhimurium, přefiltrovány a filtry kultivovány přes noc v neselektivním médiu – trypton sójovém bujónu. Nested PCR umožnila detekci 10 CFU/100 ml vody nezávisle na množství doprovodné mikroflóry. Pozitivní výsledky byly získány i u vzorku odpadní vody, včetně nezaočkovaného podílu, což ukazovalo na přirozenou kontaminaci cílovými bakteriemi.

**Touren *et al.* (2005)** zavedli multiplex nested PCR pro zjištění přítomnosti bakterií rodu *Salmonella*, včetně jejich nekultivovatelných forem, ve vodách a sedimentech pocházejících z ústí řek. Navrhnutý postup zahrnoval amplifikaci genu *fliC*, přítomného ve všech sérovarech salmonel, bez použití pomnožovacího kroku. Detekční limit použité multiplex nested PCR byl odhadnut na 1 CFU v deionizované vodě a 4 – 5 CFU ve vzorku přírodní vody zaočkovaném cílovou bakterií.

Kontaminace bakteriemi rodu *Salmonella* byla zjišťována ve 132 vzorcích povrchových vod a sedimentů, které pocházely z ústí řeky Seiny. Průkaz byl současně proveden klasickými kultivačními metodami i molekulární detekcí. PCR potvrdila přítomnost *fliC* genu i ve vzorcích, kde kultivační metody neprokázaly přítomnost bakterií rodu *Salmonella*. Ve srovnání s kultivačními metodami poskytla multiplex nested PCR pozitivní výsledky pro dalších 20 % vzorků vod a 11,3 % vzorků sedimentů, navzdory vysokému množství doprovodné mikroflóry a nízkému počtu cílových bakterií.

### 1.4.3 Multiplex PCR

Multiplex PCR (mPCR) využívá v jedné reakci více párů primerů, které umožňují současnou amplifikaci několika cílových sekvencí DNA (Toze, 1999; Alhamlan *et al.*, 2015; Law *et al.*, 2015). V minulosti mPCR umožňovala detekci dvou nebo tří různých patogenních mikroorganismů, v současné době bývá simultánně detekováno pět a více patogenních mikroorganismů (Kong *et al.*, 2002; Law *et al.*, 2015).

**Kong *et al.* (2002)** publikovali studii, ve které poprvé pomocí multiplex PCR detekovali šest různých vodních patogenů – *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* a *Yersinia enterocolitica*. Analýza mPCR byla provedena pro 19 vzorků mořské vody, s různým stupněm znečištění odpadními vodami, které byly odebrány z okolí Honkongu. Metoda byla optimalizována použitím 87 kmenů a mez detekce byla pro cílové patogenní mikroorganismy v rozmezí  $10^2$  – 1 CFU. V 19 testovaných vzorcích



byly v různých kombinacích zjištěny pouze geny pocházející z bakterií *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae* a *Vibrio parahaemolyticus*. Naopak amplikony pocházející z bakterií *Yersinia enterocolitica* a *Shigella* spp. nebyly ve vzorcích prokázány.

Četnost výskytu patogenních mikroorganismů nevykazovala žádnou korelaci s počty *E. coli*. Získané výsledky vykazovaly značnou shodu s již zveřejněnými poznatky jiných autorů, kteří taktéž pozorovali špatnou korelaci počtů *E. coli* a bakterií *V. cholerae*, *Aeromonas* spp., *Y. enterocolitica* a *Campylobacter jejuni*. Toto zjištění ještě zdůrazňuje nedostatečnost využívat jako hygienický standard pro ochranu veřejného zdraví počty bakterií *E. coli*.

**Morin et al. (2004)** představili techniku kombinující reverzní transkripci a multiplex PCR (RT-mPCR) pro rychlou a spolehlivou simultánní detekci živých buněk *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1 a *Salmonella* Typhi. K zajištění detekce životaschopných bakterií byla pro analýzu extrahována RNA cílových bakterií. Po reverzní transkripci byly syntetizované cílové molekuly cDNA simultánně amplifikovány multiplex PCR.

K ověření specifity bylo použito 7 vzorků neznámého složení. Ve všech technika RT-mPCR dokázala identifikovat správnou kombinaci cílových bakterií. Metoda dokázala současně detekovat méně než  $3 \cdot 10^1$  buněk *Salmonella* Typhi a *Escherichia coli* O157:H7.

**Fan et al. (2008)** vyvinuli multiplex PCR, která umožnila simultánní detekci pěti odlišných druhů patogenních bakterií ve vodách – *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, enterohemoragická *Escherichia coli* (EHEC) a *Vibrio parahaemolyticus*. Průkaz cílových patogenních bakterií byl proveden ve 100 vzorcích znečištěné přírodní vody, odebraných z 16 lokalit ve městě Kanton. Výsledky detekce bylo možné získat do 6 až 8 hodin. Pro enterohemoragickou *E. coli* a *Salmonella* sp. byla stanovena mez detekce  $10^1$  CFU, pro ostatní sledované bakterie  $10^2$ . Zvýšení počtu amplifikačních cyklů ani použití vyšší koncentrace *Tag* polymerázy nevedlo ke zlepšení citlivosti multiplex PCR.

**Kheiri et al. (2017)** ve své práci představili dvě multiplex PCR pro současnou detekci šesti patogenních bakterií ve vodách. První triplex protokol byl zaměřen na detekci genů *uidA* (*Escherichia coli*), *int* (*Shigella* spp.) a *gyrB* (*Pseudomonas aeruginosa*), zatímco u druhého protokolu byly amplifikovány geny *invA* (*Salmonella* spp.), *ompW* (*Vibrio cholerae*) a *lacZ* (koliformní bakterie).

K testování specifity metody bylo využito 12 referenčních kmenů. Obě multiplex PCR úspěšně amplifikovaly odpovídající cílové sekvence DNA bez vzniku nespecifických produktů. Pro zhodnocení použitelnost multiplex PCR protokolů k detekci cílových bakterií bylo shromážděno 52 vzorků povrchových vod z řeky Karaj v Íránu. Všechny analyzované vzorky obsahovaly koliformní bakterie, *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp.,

a *P. aeruginosa*. Pouze u dvou vyšetřovaných vzorků byla prokázána přítomnost bakterie *Vibrio cholerae*. Detekční limit pro obě multiplex PCR se nacházel v rozmezí  $3 \cdot 10^2$  až  $3 \cdot 10^3$  CFU. Výsledky detekce bylo možné získat během 16 hodin, přičemž 12 hodin zahrnovalo pomnožení a 4 hodiny vlastní provedení multiplex PCR.

#### 1.4.4 Real-time PCR

Při kvantitativní polymerázové řetězové reakci v reálném čase (real-time PCR) dochází současně k amplifikaci a detekci specifických úseků genomu (Botes *et al.*, 2013). Stanovení množství DNA je umožněno měřením fluorescenčního signálu dvojitě značených sond nebo interkalujících barviv, v průběhu každého cyklu. Intenzita měřené fluorescence přímo odráží množství amplifikované DNA (Law *et al.*, 2015; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015).

**Wéry *et al.* (2008)** využili kvantitativní real-time PCR k monitorování jak střevních bakterií *Salmonella* spp. a *Campylobacter jejuni*, tak indikátorových bakterií *Escherichia coli* a *Clostridium perfringens* během procesů čištění odpadních vod a kompostování čistírenských kalů. V nátocích do ČOV převládala bakterie *E. coli*, jejíž koncentrace dosahovala  $10^7$  kopií cílového genu/ml. Ostatní sledované bakterie byly zjištěny v množství mezi  $10^1$  až  $10^4$  kopií cílového genu/ml. V odtocích z ČOV byly systematicky detekovány pouze bakterie *E. coli* a *Clostridium perfringens*. Koncentrace *Clostridium perfringens* poklesla v průběhu čištění o 1 až 2,5 řádu, výrazně vyšší pokles byl zaznamenán u *E. coli*, kdy rozdíl v množství cílové bakterie mezi nátokem a odtokem ČOV dosahoval 3 až 4 řády.

V průběhu termofilní fáze kompostování čistírenských kalů výrazně poklesla koncentrace bakterií *E. coli* a *Clostridium perfringens*. Bakterie *Salmonella* spp. a *Campylobacter jejuni* nebylo možné po této fázi stanovit. Výsledky potvrdily, že termofilní fázi kompostování lze využít k sanitaci čistírenských kalů. Rozdíly v přežití bakterií v totožných podmínkách ukazují, jak obtížné je vybrat spolehlivé indikátorové mikroorganismy.

**Varma *et al.* (2009)** ve své studii využili kromě real-time PCR, také její modifikaci s interkalačním barvivem propidium monoazidem (PMA) pro stanovení celkových a potenciálně životaschopných buněk fekálních indikátorů rodu *Enterococcus* a *Bacteroidales* v odpadních vodách. U PMA-real-time PCR předcházelo vlastní extrakci DNA ošetření vzorků barvivem PMA, jenž zajistilo odlišení neživotaschopných buněk.

Na životaschopné buňky *En. faecalis* a *Ba. thetaiotaomicron* nemělo barvivo PMA žádný vliv. Naproti tomu analýza teplem usmrcených buněk *En. faecalis* a *Ba. thetaiotaomicron* pomocí PMA-real-time PCR vedla ke snížení detekovaných cílových sekvencí o 3 – 4 log jednotky. Dále bylo zjištěno, že příliš vysoké hladiny suspendovaných pevných částic

a biomasy v odpadních vodách narušují schopnost metody PMA-real-time PCR specificky detekovat živé buňky.

**Cheyne et al. (2010)** ve své práci vyvinuli a zhodnotili použitelnost real-time PCR pro detekci virulentních genů *ail* a *yadA* bakterie *Yersinia enterocolitica* v povrchových vodách. Cílové geny byly zvoleny na základě jejich klíčového významu ve virulenci *Y. enterocolitica*. Ač testování referenčních kmenů dokázalo specifitu genů *ail* a *yadA* pro patogenní sérotypy *Y. enterocolitica*, tak byly oba geny prokázány i v jenom klinickém izolátu *Y. intermedia*.

Vyšetřované vzorky pocházely z pěti lokalit povodí Grand River v jižním Ontariu v Kanadě. Ve všech vzorkovaných oblastech byla prokázána přítomnost alespoň jednoho z cílových genů. Gen *ail* se nacházel ve 121 z celkových 319 vzorků, detekce genu *yadA* byla pozitivní ve 44 z celkových 219 vzorků. Ve 31 vzorcích byly zjištěny obě cílové sekvence. K detekci obou genů docházelo častěji při nižších teplotách odebraných vzorků. Vzorky odebrané při teplotě pod 5 °C byly v 67 % pozitivní na přítomnost genu *ail* a v 35 % na přítomnost genu *yadA*. Naproti tomu při teplotách nad 20 °C byly geny virulence detekovány v méně než 12 % vzorcích. Mezi výskytem detekovaných genů a dalšími parametry kvality vody, např. celkovou koncentrací *E. coli*, zákalem vody, obsahem dusičnanů nebo amoniaku, neexistoval žádný vztah.

**van Blerk et al. (2011)** zveřejnili studii, ve které popsali použití real-time PCR spolu s pomnožovacím krokem pro rychlou a specifickou detekci bakterií rodu *Salmonella* ve vodách. Cílovou sekvencí byl zvolen gen *invA*, který souvisí s virulencí salmonel patogenních pro člověka. K rozlišení a identifikaci ampliconů získaných pomocí real-time PCR byla použita vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM), jako alternativa ke klasické gelové elektroforéze.

Navržená metoda prokázala 100% specifitu pro rod *Salmonella*. V kombinaci s 16 až 18 hodinovým neselektivním pomnožením bylo dosaženo detekčního limitu 1 CFU/ml. Z celkem 122 analyzovaných vzorků bylo 38 pozitivních na přítomnost bakterií rodu *Salmonella*. Výskyt salmonel byl prokázán zejména v upravených odpadních vodách a povrchových vodách, v jednom případě byl pozitivní výsledek zjištěn v pitné vodě. Výsledek bylo možné získat za méně než 24 hod.

**Maheux et al. (2011a)** představili rychlou a robustní metodu využitelnou pro detekci zástupců rodu *Enterococcus* sp. nebo pouze druhů fekálního původu *Enterococcus faecalis/faecium* v pitných vodách. Navržený protokol zahrnoval pomnožení a obnovení životaschopnosti mikroorganismů membránovou filtrací a celogenomovou amplifikací

a detekci pomocí real-time PCR. K porovnání specifity, citlivosti a limitu detekce navrženého postupu byla využita metoda membránové filtrace a kultivace filtrů na mEI agaru.

Z celkem 144 kmenů rodu *Enterococcus* dokázala standardní kultivační technika detekovat 64 % kmenů, zatímco real-time PCR (s primery specifickými pro *Enterococcus* sp.) detekovala 100 % kmenů rodu *Enterococcus*. Naopak žádný ze 150 kmenů, které nenáležely do rodu *Enterococcus*, nebyl detekován ani jednou z metod.

Real-time PCR s primery specifickými pro *En. faecalis* a *En. faecium* úspěšně amplifikovala DNA odpovídající cílovým bakteriím ve 100 % případech. Současná detekce *En. faecalis* a *En. faecium* pomocí real-time PCR navíc poskytla lepší rozlišení enterokoků fekálního původu než klasický kultivační postup. Navržený protokol umožnil detekci 4,5 CFU ve 100 ml pitné vody za méně než 5 hodin, zatímco metoda využívající mIE agaru prokázala 2,3 CFU/100 ml pitné vody za 24 hodin.

**Ugarte-Ruiz et al. (2015)** porovnávali metody použitelné pro izolaci a kvantifikaci bakterií *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* z odpadních vod. Kromě různých kombinací selektivních médií bez nebo se zařazením pomnožovacího kroku byla do studie zahrnuta i real-time PCR.

Celkem 50 vzorků neupravených odpadních vod pocházelo z ČOV v centrálních Španělsku. DNA odpovídající cílovým bakteriím byla detekována ve všech testovaných vzorcích, ale pouze u 32 vzorků (64 %) se přítomnost bakterie *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* prokázala i kultivačně. U 49 vzorků bylo prokázáno přibližně stejné množství DNA *C. jejuni* a *C. coli*. Při použití kultivačních metod se poměrové zastoupení obou druhů lišilo, v závislosti na použitém obohacovacím kroku a selektivním médiu. Navzdory pozitivním výsledkům, které poskytla real-time PCR, nebylo možné u 36 % vzorků bakterie stanovit kultivační technikou.

#### **1.4.5 Fluorescenční hybridizace *in situ***

Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) využívá fluorescenčně značených DNA sond, specificky zacílených na rRNA vybraných buněk. Zvolení rRNA jako cílové sekvence umožňuje detekovat pouze metabolicky aktivní bakterie a poskytuje vysokou specifitu. V přírodních vodách se často vyskytují buňky, které mají velmi nízkou metabolickou aktivitu. Nízký obsah nebo komplikovaná dostupnost některých sekvencí rRNA vede ke slabému fluorescenčnímu signálu po hybridizaci a znemožňuje detekci (Dutil et al., 2006; Baudart and Lebaron, 2010; Baudart et al., 2015). Nízká citlivost a častá potřeba pomnožovacího kroku představují jediné omezení techniky (Dutil et al., 2006; Girones et al., 2010). FISH umožňuje,

v kombinaci s konfokální laserovou nebo epifluorescenční mikroskopií, stanovení počtu konkrétních mikrobiálních buněk. Spojení s průtokovou cytometrií poskytne vedle kvantitativních dat i kvalitativní údaje (Alhamlan *et al.*, 2015; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015).

**Ootsubo *et al.* (2003)** představili metodu k rychlému stanovení bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* přítomných v povrchových vodách. Použitá FISH pracovala s DNA sondou specifickou pro čeleď *Enterobacteriaceae* (sonda D), zacílenou na malou podjednotku 16S rRNA. Pro zlepšení detekčních limitů byl před vlastní FISH předřazen krátký pomnožovací krok. Jednalo se o filtraci 1 ml vyšetřované vody a 6 hodinovou inkubaci filtru na trypton-sójovém agaru. Kolonie vyrostlé na filtru byly následně detekovány a identifikovány pomocí manuální epifluorescenční mikroskopie.

Optimalizací FISH byla zkrácena doba potřebná k detekci bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* na pouhých 7 hodin. Významně k tomu přispělo použití ethanolu namísto paraformaldehydu k fixaci buněk. Tato změna zkrátila čas nutný pro tento krok ze 3 hodin na pouhých 5 minut. Celou FISH pak bylo možné provést během 1 hodiny.

**Garcia-Armisen and Servais (2004)** ve své práci, zaměřené na rychlé stanovení životaschopných buněk *Escherichia coli* v řekách a odpadních vodách, zkombinovali dva různé postupy – přímé stanovení počtu živých buněk (DVC) a metodu FISH.

Metoda DVC spočívá v kultivaci filtru na revitalizačním médiu s obsahem antibiotik, které brání dělení buněk. Jako životaschopné se počítají buňky, které mají protáhlý tvar. V navrhovaném protokolu byly revitalizované buňky hybridizovány sondou značenou barvivem CY3 a specifickou pro 16S rRNA bakterie *Escherichia coli*. Zavedení fáze revitalizace umožnilo získat dostatečné množství rRNA v životaschopných prodloužených buňkách a rozlišovat mezi živými a mrtvými buňkami. Ke stanovení množství navázaných sond byla použita epifluorescenční mikroskopie.

Metoda umožnila stanovit  $3 \cdot 10^3$  životaschopných buněk *E. coli* v přítomnosti nefekálních bakterií. Při aplikaci na vzorky říčních a odpadních vod poskytovala využitá technika systematicky vyšší počty *E. coli* než referenční kultivační metoda (miniaturizovaná MPN).

**Kitaguchi *et al.* (2006)** vyvinuli techniku pro rychlé a simultánní stanovení životaschopných bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas* spp. do tří hodin pomocí multicolor FISH. K hodnocení bakteriální životaschopnosti bylo využito cyaninové dimerové barvivo BOBO-3, jež selektivně zbarvuje pouze bakterie s poškozenou buněčnou stěnou.

Za optimalizovaných podmínek nebyly detekovány nespecifické signály pro fylogeneticky blízké bakterie z rodu *Aeromonas* a *Vibrio*. V připravené směsi, která obsahovala 25% podíl

životaschopných a neživotaschopných bakterií *Escherichia coli* a *Pseudomonas putida*, byly cílové buňky stanoveny ve výchozích poměrech.

Počet životaschopných buněk bakterie *Escherichia coli* nacházejících se ve stacionární fázi růstu stanovených technikou BOBO3-FISH, odpovídal hodnotě získané kultivační metodou. Zatímco počet životaschopných, ale stresovaných buněk *Escherichia coli* detekovaný molekulární technikou byl o  $1 \cdot 10^4$  vyšší v porovnání s počtem buněk stanoveným kultivací.

**Baudart and Lebaron (2010)** představili postup pro rychlou detekci bakterie *Escherichia coli* ve vodách. Metoda spojuje přímé stanovení počtu živých buněk (DVC) s FISH, která využívá kromě značených i neznačené (pomocné) sondy a cytometrii v pevné fázi (SPC) k měření intenzity fluorescence. Použití neznačených sond, kompatibilních k úsekům sousedících s cílovou sekvencí, společně se sondami značenými, umožňuje detekovat i nepřístupné oblasti rRNA pro FISH.

Specifita metody byla zhodnocena pomocí 27 kmenů *Escherichia coli* a 44 kmenů nenáležících do čeledi *Enterobacteriaceae*. Všechny kmeny *Escherichia coli* poskytly fluorescenční signál, naopak u kmenů nepatřících do čeledi *Enterobacteriaceae* nebyl zaznamenán žádný signál.

Metoda DVC-FISH-SPC byla použita ke stanovení buněk *E. coli* v mořské vodě v letním období. Celkem 17 shromážděných vzorků bylo analyzováno jak pomocí DVC-FISH-SPC, tak standardní metodou MPN. Výsledky získané oběma postupy se významně nelišily. U dvou vzorků nedošlo k průkazu *E. coli* ani jednou metodou. U deseti vzorků prokázali pozitivní výsledek obě metody, u pěti vzorků prokázala přítomnost cílové bakterie pouze DVC-FISH-SPC.

#### 1.4.6 Genové čipy

Genové čipy (DNA microarray) patří mezi špičkové metody molekulární biologie (Alhamlan *et al.*, 2015). Technologie zavedená v polovině 90. let minulého století původně sloužila k analýze exprese genů a odhalení specifických mutací DNA (Aw and Rose; 2012; Law *et al.*, 2015; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). Genové čipy pracují na principu hybridizace cílových značených fragmentů nukleových kyselin (DNA, mRNA nebo cDNA) s komplementárním úsekem – sondou. Ta je ve vysoké hustotě imobilizována na malé skleněné podložce nebo čipu. (Aw and Rose; 2012; Alhamlan *et al.*, 2015; Law *et al.*, 2015; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). Zakotvené oligonukleotidové sondy mají velikost 25 až 80 bp (Law *et al.*, 2015). Jako cílové úseky pro používané sondy často slouží taxonomické geny (16S) nebo funkční geny (Alhamlan *et al.*, 2015).

Genové čipy umožňují současné zpracování velkého množství vzorků a sledování až desítek tisíc genů v jediném stanovení (Lee *et al.*, 2006; Alhamlan *et al.*, 2015; Law *et al.*, 2015; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). Celý proces lze snadno automatizovat (Law *et al.*, 2015; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). Technologie může prokázat nejenom přítomnost patogenní bakterie, ale i rezistenci vůči různým antibiotikům. Problémy nastávají při rozlišení živých a mrtvých buněk a nespecifická hybridizace může mít za následek snížení specifity a citlivosti (Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). Vhodným řešením používaným při detekci patogenních mikroorganismů je spojení genových čipů s PCR amplifikací, která zajistí snížení detekčních limitů (Lee *et al.*, 2006; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015).

Lee *et al.* (2008) se ve své studii zaměřili na detekci bakteriálních patogenů v komunálních odpadních vodách za použití genových čipů s imobilizovanými krátkými oligonukleotidovými sondami zacílenými na sekvenci 16S rRNA.

Celkem bylo navrženo 62 sond k zjištění přítomnosti 38 druhů, 4 rodů a 1 čeledi bakterií. Technika úspěšně detekovala řadu patogenních bakterií v odpadních vodách pocházejících z různých fází čistícího procesu (po sekundárním přečištění a konečné desinfekci). Odebrané vzorky pocházely ze dvou čistíren odpadních vod, které využívaly odlišné desinfekční postupy – chloraci a UV záření. Minimální detekční limit byl odhadnut na  $10^4$  kopií 16S rRNA.

Pozitivní hybridizační signály významně vyšší, než detekční limit poskytli *A. hydrophila*, *B. cereus*, *C. jejuni*, *Cl. perfringens*, *En. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp., a *Y. enterocolitica*. Ve všech typech testovaných vod byla prokázána přítomnost bakterií *A. hydrophila*, *Cl. perfringens*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, a *Salmonella* spp., zatímco ostatní patogenní bakterie byly nalezeny pouze v určitých odpadních vodách. Výsledky získané pomocí DNA microarray korelovaly ve všech testovaných vzorcích s výsledky získanými kvantitativní real-time PCR, která sloužila k ověření účinnosti.

## 1.5 Detekce bakterií imunochemickými metodami

Imunochemickými metodami lze detekovat bakteriální buňky, spory, viry a toxiny. Základ imunochemických metod tvoří interakce mezi antigenem a protilátkou, kdy se specifická protilátka váže na specifický antigen (Velusamy *et al.*, 2010; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015). Pevnost vazby mezi konkrétní protilátkou a antigenem určuje citlivost a specifitu metody (Law *et al.*, 2015).

Mezi výhody imunochemických metod patří rychlost, robustnost a schopnost detekovat nejenom patogenní mikroorganismus, ale také produkované toxiny, jenž nemusí být kódovány

v genomu organismu. Specifita a citlivost se příliš neliší od metod molekulární biologie, avšak detekce protilátek neumožňuje získat výsledky v reálném čase (Velusamy *et al.*, 2010).

**Sails *et al.* (2002)** využili k detekci bakterií *Campylobacter coli* a *Campylobacter jejuni* ve vzorcích povrchových vod spojení PCR a ELISA. Ke zvýšení koncentrace cílových bakterií ve vzorcích vod před vlastní analýzou byla využita membránová filtrace a kultivace filtrů v CCD bujónu. Po pomnožení byla extrahována DNA, která sloužila jako templát v PCR-ELISA a současně byla získaná kultura vyočkována na mCCDA agar.

K analýze bylo shromážděno 69 vzorků. V 51 vzorcích byla prokázána přítomnost bakterií rodu *Campylobacter* buď pomocí PCR-ELISA nebo kultivační metodou. Ve 29 vzorcích byl kultivačně prokázán *C. coli*, z 13 vzorků byl izolován *C. jejuni*. U několika vzorků byl kultivační průkaz negativní, ale PCR-ELISA prokázala přítomnost bakterií rodu *Campylobacter*.

**Lee and Deininger (2004)** vyvinuli rychlou metodu pro testování mořské vody za účelem zjištění přítomnosti bakterie *Escherichia coli*. Pro selektivní zachycení cílových bakterií ze vzorku byla využita imunomagnetická separace (IMS), která využívá superparamagnetické polystyrenové kuličky s navázanými protilátkami k vytvoření komplexu s cílovou bakterií. Vzniklý komplex je z heterogenní populace bakterií snadno oddělen působením magnetického pole. Ke kvantifikaci separovaných bakterií byla využita ATP bioluminiscenční metoda.

K odstranění řas, zbytků rostlin a velkých částic byly vzorky mořské vody nejprve přefiltrovány přes filtr s velikostí pórů 20  $\mu\text{m}$ , který nezachytil bakterie přítomné ve vodě. Pro nakoncentrování *Escherichia coli* byla použita filtrace přes filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Kvantitativní výsledky získané metodou IMS-ATP bioluminiscencí korelovaly s výsledky, jež poskytla tradiční membránová filtrace. Průměrná zjištěná koncentrace bakterie *Escherichia coli* se pohybovala v rozmezí 1 – 7·10<sup>2</sup> CFU/100 ml. Detekční limit testu byl stanoven na 2·10<sup>1</sup>CFU/100 ml vody. Celý postup bylo možné dokončit za méně než 1 hodinu. Všechno potřebné vybavení je přenosné a testování může být provedeno přímo v terénu.



Následující Tabulka 1 byla vypracována z publikovaných prací a shrnuje výhody a nevýhody vybraných metod využívaných k detekci a identifikaci bakterií z vod (Dutil *et al.*, 2006; Baudart and Lebaron, 2010; Girones *et al.*, 2010; Aw and Rose, 2012; Mandal *et al.*, 2011; Alhamlan *et al.*, 2015; Baudart *et al.*, 2015; Law *et al.*, 2015; Mendes-Silva and Domingues, 2015; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015; Rohde *et al.*, 2015; Saxena *et al.*, 2015; Topic Popovic *et al.*, 2017).

Tabulka 1 Výhody a nevýhody vybraných metod používaných k detekci a identifikaci bakterií z vod (1/2)

| <b>Metoda</b>            | <b>Výhody</b>   | <b>Nevýhody</b>  |
|--------------------------|---|--|
| <i>kultivační metody</i> | Snadné provedení<br>Není nutné složité školení personálu<br>Umožňuje pozorovat morfologii kolonií   | Časová náročnost<br>Často chybná identifikace<br>Není možné prokázat nekultivovatelné buňky a dále životaschopné, ale nekultivovatelné buňky<br>Neexistuje univerzální kultivační půda   |
| <i>standardní PCR</i>    | Vysoká citlivost a specifita<br>Možnost automatizace<br>Spolehlivé výsledky<br>Detekce životaschopných, ale nekultivovatelných buněk              | Vyžaduje purifikaci DNA<br>Nemožnost kvantitativní analýzy<br>Neschopnost rozlišit mezi živými a mrtvými buňkami<br>Ovlivnění nebo inhibice amplifikace kontaminanty<br>Nutná identifikace produktů po PCR (např. gelová elektroforéza)<br>Nízká koncentrace nukleových kyselin často způsobuje variabilitu výsledků<br>Návrh a koncentrace primerů je klíčový pro správný průběh reakce |
| <i>multiplex PCR</i>     | Vysoká citlivost a specifita<br>Rychlá a simultánní detekce několika mikroorganismů v jedné reakci<br>Možnost automatizace<br>Spolehlivé výsledky | Neschopnost rozlišit mezi živými a mrtvými buňkami<br>Ovlivnění nebo inhibice amplifikace kontaminanty<br>Návrh a koncentrace primerů je klíčový pro správný průběh reakce   |
| <i>RT-PCR</i>            | Rozlišení živých a mrtvých buněk  | Složitý postup<br>Nutná technická odbornost personálu<br>Krátký poločas rozpadu molekul RNA<br>Návrh a koncentrace primerů je klíčový pro správný průběh reakce  |

Tabulka 1 Výhody a nevýhody vybraných metod používaných k detekci a identifikaci bakterií z vod (2/2)

| <i>Metoda</i>                          | <i>Výhody</i>  | <i>Nevýhody</i>  |
|--|--|--|
| <i>kvantitativní<br/>real-time PCR</i> | Vysoká citlivost a specifita<br>Rychlé provedení, reprodukovatelnost<br>Detekce a monitorování produktů amplifikace v reálném čase<br>Kvantitativní analýzy<br>Nevyžaduje zpracování produktů po PCR | Vysoká cena (nákladné reagentie)<br>Ovlivnění nebo inhibice amplifikace kontaminanty<br>Neschopnost rozlišit mezi živými a mrtvými buňkami<br>Vyžaduje speciálně vyškolený a technicky zdatný personál<br>Obtížná simultánní detekce mikroorganismů (multiplex real-time PCR)<br>Možnost křížové kontaminace<br>Návrh a koncentrace primerů je klíčový pro správný průběh reakce |
| <i>PMA-PCR</i>                         | Jednoduché provedení<br>Rozlišení živých a mrtvých buněk   | Toxické reagentie (propidium monoazid)<br>Možná inhibice u vzorků s vysokým obsahem tuhých látek<br>Návrh a koncentrace primerů je klíčový pro správný průběh reakce   |
| <i>FISH</i>                            | Rychlé a snadné provedení<br>Vysoká specifita<br>Kvantitativní analýza<br>Rozlišení živých a mrtvých buněk   | Často nutné zařazení pomnožovacího kroku<br>Problémy s nedostatečnou citlivostí<br>Omezená dostupnost primerů  |
| <i>Genové čipy</i>                     | Možnost automatizace<br>Současná detekce velkého množství genů   | Vysoká cena<br>Nespecifická hybridizace<br>Nízká citlivost   |
| <i>ELISA</i>                           | Vysoká specifita<br>Umožňuje detekovat bakteriální toxiny<br>Možnost automatizace  | Nedostatečná citlivost<br>Falešně negativní výsledky<br>Křížová reaktivita úzce příbuzných antigenů<br>Vyžaduje označení antigenu nebo protilátky<br>Nezbytný pomnožovací krok k produkci antigenů na buněčném povrchu   |

## 2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo izolovat vybrané bakterie z reálných vzorků odpadních vod s využitím klasických kultivačních technik. Cílovými bakteriemi byly zvoleny tradiční indikátorové mikroorganismy fekálního znečištění – termotolerantní koliformní bakterie, *Escherichia coli* a intestinální enterokoky. Mikrobiologický rozbor byl dále zaměřen na průkaz patogenních a podmíněně patogenních bakterií z rodů *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Aeromonas* a *Pseudomonas*. Získané bakterie byly následně identifikovány pomocí biochemických testů.

Důležitým krokem bylo využít získané poznatky v průběhu práce k přizpůsobení a úpravě metod pro kultivační průkaz bakterií v odpadních vodách, za účelem lepšího zachytu cílových bakterií.

## 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)
- Autokláv STERILAB® (BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)
- BACMED (ASPIAG s.r.o., Česká republika)
- Denzitometr Den – 1 (Biosan, Litva)
- Horkovzdušný sterilizátor 5104.2 (BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)
- Chladnička (Electrolux s. r.o., Česká republika)
- 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 Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Germany)
- Identifikační software TNW® (Erba Lachema, s. r. o., Česká republika)

#### Laboratorní pomůcky

- *pomůcky pro odběr a membránovou filtraci odpadní vody* – skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem o objemu 500 ml, skleněné odměrné válce, membránové filtry (pórovitost 0,45 µm), filtrační aparatura, filtrační baňka, kovové pinzety
- *pomůcky pro přípravu kultivačních médií* – Erlenmayerovy baňky, lžičky oboustranné, plastové Petriho misky
- *pomůcky pro inokulaci a inkubaci kultivačních médií a konfirmaci* – plastové bakteriologické kličky, L-hokejky (plastové a skleněné), jednokanálové automatické manuální pipety, pipetovací špičky, pipety dělené (plastové a skleněné), skleněné bakteriologické a krevní zkumavky, kovová víčka na zkumavky, homogenizační sáčky s filtrem, anaerostaty, kahan, plastové pinzety, nůžky, podložní sklička.

## 3.2 Materiál

### 3.2.1 Kultivační média

- **Bile Esculin Azide Agar, HiMedia (žluč-eskulinový agar, ŽE agar)**

|                 |                                |        |
|-----------------|--------------------------------|--------|
| <i>Složení:</i> | enzymatický hydrolyzát kaseinu | 17 g   |
|                 | hovězí extrakt                 | 5 g    |
|                 | proteozový pepton              | 3 g    |
|                 | hovězí žluč                    | 10 g   |
|                 | eskulin                        | 1 g    |
|                 | citrát železito-amonný         | 0,5 g  |
|                 | chlorid sodný                  | 5 g    |
|                 | azid sodný                     | 0,15 g |
|                 | agar                           | 15 g   |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 28,3 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

- **Blood Agar Base No. 2, HiMedia (krevní agar, KA)**

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

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 21,3 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 40 – 50 °C bylo do média asepticky přidáno 7 % sterilní defibrinované beraní krve.

- **Blood Free *Campylobacter* Selectivity Agar Base, HiMedia (modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem, mCCDA agar)**

|                 |                                |        |
|-----------------|--------------------------------|--------|
| <i>Složení:</i> | masový pepton                  | 10 g   |
|                 | hovězí extrakt                 | 10 g   |
|                 | enzymatický hydrolyzát kaseinu | 3 g    |
|                 | chlorid sodný                  | 5 g    |
|                 | deoxycholát sodný              | 1 g    |
|                 | síran železnatý                | 0,25 g |
|                 | pyruvát sodný                  | 0,25 g |
|                 | dřevěné uhlí, bakteriologické  | 4 g    |
|                 | agar                           | 12 g   |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 22,8 g do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 45 – 50 °C byl do média asepticky přidán rozpuštěný obsah 1 lahvičky *Campylobacter* Supplement V (FD067).

- **Bolton Broth Base, HiMedia (bujón dle Boltona)**

|                 |                                  |        |
|-----------------|----------------------------------|--------|
| <i>Složení:</i> | pepton                           | 10 g   |
|                 | hydrolyzát laktalbuminu          | 5 g    |
|                 | kvasničný extrakt                | 5 g    |
|                 | chlorid sodný                    | 5 g    |
|                 | metabisulfit sodný               | 0,5 g  |
|                 | uhličitan sodný                  | 0,6 g  |
|                 | hemin                            | 0,01 g |
|                 | $\alpha$ -ketoglutarová kyselina | 1 g    |
|                 | pyruvát sodný                    | 0,5 g  |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 13,8 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 50 °C byl do bujónu asepticky přidán rozpuštěný obsah 1 lahvičky Bolton Selective Supplement (FD231) a 25 ml lyzované defibrinované koňské krve (Oxoid).

- **Buffered Peptone Water, HiMedia (pufrovaná peptonová voda, PPV médium)**

|                 |                                |       |
|-----------------|--------------------------------|-------|
| <i>Složení:</i> | proteozový pepton              | 10 g  |
|                 | chlorid sodný                  | 5 g   |
|                 | hydrogenfosforečnan (di)sodný  | 3,5 g |
|                 | dihydrogenfosforečnan draselný | 1,5 g |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 10 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

- **Bujón s peptonem, sorbitolem a žlučovými solemi (PSB bujón)**

|                 |  |        |
|-----------------|--|--------|
| <i>Složení:</i> | pepton                                 | 5 g    |
|                 | sorbitol                               | 5 g    |
|                 | chlorid sodný                          | 5 g    |
|                 | hydrogenfosforečnan disodný            | 8,23 g |
|                 | dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát | 1,2 g  |
|                 | žlučové soli                           | 0,01 g |

*Příprava:* Dle předloženého postupu byly všechny složky naváženy do 500 ml destilované vody. pH bujónu bylo před sterilizací upravováno na hodnotu 7,8. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

- **Cetrimide agar Base, HiMedia (cetrimidový agar)**

|                 |                   |       |
|-----------------|-------------------|-------|
| <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 postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 23,4 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody obsahující 5 ml glycerolu. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

- **Columbia Agar, HiMedia (krevní agar Columbia)**

|                 |                                |      |
|-----------------|--------------------------------|------|
| <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 postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 22 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 40 – 50 °C bylo do média asepticky přidáno asepticky přidáno 7 % sterilní defibrinované beraní krve.

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

|                 |   |        |
|-----------------|---|--------|
| <i>Složení:</i> | enzymatický hydrolyzát kaseinu                    | 1 g    |
|                 | kvasničný extrakt                                 | 2 g    |
|                 | chlorid sodný                                     | 5 g    |
|                 | dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát              | 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  |
|                 | 5-brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-glukuronová kyselina | 0,1 g  |
|                 | isopropyl- β-D-thiogalaktopyranosid               | 0,1 g  |
|                 | agar  | 10 g   |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 13,3 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována ve vodní lázni při 100 °C po dobu 20 minut.



- **ITC Broth Base, Himedia (bujón s irgasanem, tikarcilinem a chlorečnanem draselným, ITC bujón)**

|                 |                              |         |
|-----------------|------------------------------|---------|
| <i>Složení:</i> | trypton                      | 10 g    |
|                 | kvasničný extrakt            | 1 g     |
|                 | chlorid hořečnatý hexahydrát | 60 g    |
|                 | chlorid sodný                | 5 g     |
|                 | malachitová zeleň            | 0,01 g  |
|                 | Triclosan (Irgasan)          | 0,001 g |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 44,1 g dehydratovaného média do 988 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 40 – 50 °C byl do bujónu asepticky přidán rozpuštěný obsah 1 lahvičky Ticarcillin Supplement (FD102) a 1 lahvičky Potassium Chlorate Supplement (FD103).

- **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 postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 36,7 g dehydratovaného média do 1000 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 45 – 50 °C byl do média asepticky přidán rozpuštěný obsah 1 lahvičky Ampicillin Supplement (FD082).

- **m-FC Agar Base, HiMedia (m-FC agar)**

|                 |                   |        |
|-----------------|-------------------|--------|
| <i>Složení:</i> | tryptóza          | 10 g   |
|                 | proteozový pepton | 5 g    |
|                 | kvasničný extrakt | 3 g    |
|                 | laktóza           | 12,5 g |
|                 | žlučové soli      | 1,5 g  |
|                 | chlorid sodný     | 5 g    |
|                 | anilinová modř    | 0,1 g  |
|                 | agar              | 15 g   |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 52,1 g dehydratovaného média do 1000 ml destilované vody obsahující 10 ml 1% roztoku kyseliny rosolové (FD058 Rosolic Acid). Připravená směs byla sterilizována ve vodní lázni při 100 °C po dobu 20 minut.

- **Modified Rappaport Vassiliadis Medium, HiMedia, (Rappaport Vassiliadis sója médium, RVS médium)**

|                 |                              |        |
|-----------------|------------------------------|--------|
| <i>Složení:</i> | sójový pepton                | 5 g    |
|                 | chlorid sodný                | 8 g    |
|                 | fosforečnan draselný         | 1,6 g  |
|                 | chlorid hořečnatý hexahydrát | 40 g   |
|                 | malachitová zeleň            | 0,04 g |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 15 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

- **Mueller Kauffman Tetrathionate Novobiocin Broth Base, HiMedia (Mueller-Kauffman tetrathionát novobiocin médium, MKTTn médium)**

|                 |                                |          |
|-----------------|--------------------------------|----------|
| <i>Složení:</i> | masový pepton                  | 4,3 g    |
|                 | enzymatický hydrolyzát kaseinu | 8,6 g    |
|                 | býčí žluč, sušená              | 4,75 g   |
|                 | chlorid sodný                  | 2,6 g    |
|                 | uhličitan vápenatý             | 38,7 g   |
|                 | thiosíran sodný pentahydrát    | 47,8 g   |
|                 | brilantní zeleň                | 0,0095 g |

Příprava: Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 89,4 g dehydratovaného média do 1000 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována ve vodní lázni při 100 °C po dobu 20 minut. Po ochlazení na 45 – 50 °C byl do bujónu asepticky přidáno 20 ml jodového roztoku (20 g jodu a 25 g jodidu draselného ve 100 ml sterilní destilované vody) spolu s rozpuštěným obsahem 1 lahvičky MKTT Novobiocin Supplement (FD203).

- **Nutrient Agar No. 2, HiMedia (masopeptonový agar, MPA)**

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

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 20 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

- **Rambach® agar, Merck KGaA**

|                 |                   |        |
|-----------------|-------------------|--------|
| <i>Složení:</i> | pepton            | 8 g    |
|                 | chlorid sodný     | 5 g    |
|                 | deoxycholát sodný | 1 g    |
|                 | chromogenní směs  | 1,5 g  |
|                 | propylenglykol    | 10,5 g |
|                 | agar              | 15 g   |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem byl obsah 1 lahvičky tekuté směsi přidán do 250 ml destilované vody. Následně byla přidána 1 lahvička dehydratovaného média a celá směs byla důkladně promíchána a sterilizována ve vodní lázni při 100 °C po dobu 20 minut.

- **Slanetz and Bartley Medium, HiMedia (Slanetz-Bartley agar, SB agar)**

|                 |                                   |       |
|-----------------|-----------------------------------|-------|
| <i>Složení:</i> | tryptóza                          | 20 g  |
|                 | kvasničný extrakt                 | 5 g   |
|                 | glukóza                           | 2 g   |
|                 | hydrogenfosforečnan (di)draselný  | 4 g   |
|                 | azid sodný                        | 0,4 g |
|                 | 2,3,5 trifenyltetrazolium chlorid | 0,1 g |
|                 | agar                              | 15 g  |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 23,3 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována ve vodní lázni při 100 °C po dobu 20 minut.

- **Soyabean Casein Digest Agar, HiMedia (trypton sójový agar, TSA)**

|                 |               |      |
|-----------------|---------------|------|
| <i>Složení:</i> | trypton       | 15 g |
|                 | sójový pepton | 5 g  |
|                 | chlorid sodný | 5 g  |
|                 | agar          | 15 g |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 20 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

- **Xylose-Lysine Deoxycholate Agar, HiMedia (xylóza-lyzin-deoxycholátový agar, XLD agar)**

|                 |                        |        |
|-----------------|------------------------|--------|
| <i>Složení:</i> | kvasničný extrakt      | 3 g    |
|                 | L-lyzin                | 5 g    |
|                 | laktóza                | 7,5 g  |
|                 | sacharóza              | 7,5 g  |
|                 | xylóza                 | 3,5 g  |
|                 | chlorid sodný          | 5 g    |
|                 | deoxycholát sodný      | 2,5 g  |
|                 | thiosíran sodný        | 6,8 g  |
|                 | citran železito-amonný | 0,8 g  |
|                 | fenolová červeň        | 0,08 g |
|                 | agar                   | 15 g   |

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 28,3 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována ve vodní lázni při 100 °C po dobu 20 minut.

- ***Yersinia Selective Agar Base, Himedia (agar s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem, CIN agar)***

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

*Příprava:* Dle postupu stanoveným výrobcem bylo naváženo 29 g dehydratovaného média do 500 ml destilované vody. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po ochlazení na 45 °C byl do média asepticky přidán rozpuštěný obsah 1 lahvičky *Yersinia Selective Supplement* (FD034).

### 3.2.2 Reagencie, pracovní roztoky a soupravy (kity)

- **Činidlo pro test oxidáza:** Biomérieux, Francie
- **Činidlo pro test kataláza:** 3% peroxid vodíku
- **Činidlo pro zajištění mikroaerofilního prostředí:** CampyGen, AGS (Oxoid, USA)
- **Soupravy MIKROLATEST<sup>®</sup>** a potřebná činidla dodávána výrobcem (Erba Lachema, s. r. o., Česká republika)

- ENTERO – Rapid 24
- ENTEROtest 24
- NEFERMtest 24
- STREPTOtest 24

- **Fyziologický roztok**

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

*Příprava:* Navážka chloridu sodného byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

- **Karbofuchsin**

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

*Příprava:* Suspenze, která vznikla smísením roztoků A a B, byla filtrována a následně zředěna destilovanou vodou v poměru 1:10.

- **Krystalová violet'**

|                 |           |                    |        |
|-----------------|-----------|--------------------|--------|
| <i>Složení:</i> | Roztok A: | krystalová violet' | 5 g    |
|                 |           | 96% etanol         | 200 ml |
|                 | Roztok B: | 1% oxalát amonný   |        |

*Příprava:* Suspenze vzniklá smísením 20 ml roztoku A a 80 ml roztoku B byla následně filtrována.

- **Lugolův roztok**

|                 |                  |        |
|-----------------|------------------|--------|
| <i>Složení:</i> | jód              | 1 g    |
|                 | jodid draselný   | 2 g    |
|                 | destilovaná voda | 300 ml |

*Příprava:* V určeném objemu destilované vody byla rozpuštěna navážka jódu a jodidu draselného.

- **McFarlandova zákalová stupnice**

*Příprava:* Smícháním roztoků chloridu barnatého ( $\text{BaCl}_2$ ) a kyseliny sírové ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) se vytvoří ve vodě nerozpustná sraženina síranu barnatého ( $\text{BaSO}_4$ ). Určitým poměrem mezi roztoky lze dosáhnout různých stupňů McFarlandovy zákalové stupnice. (Tabulka 2).

Tabulka 2 McFarlandova zákalová stupnice

|   | <i>Stupeň zákalu</i> |          |          |          |          |          |
|---|----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|   | <i>0,5</i>           | <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> |
| <i>1,175% roztok BaCl<sub>2</sub> [ml]</i>            | 0,05                 | 0,1      | 0,2      | 0,3      | 0,4      | 0,5      |
| <i>1% roztok H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [ml]</i>     | 9,95                 | 9,9      | 9,8      | 9,7      | 9,6      | 9,5      |
| <i>přibližný počet bakterií (x 10<sup>8</sup>/ml)</i> | 1,5                  | 3        | 6        | 9        | 12       | 15       |

### 3.2.3 Vzorky odpadních vod

Pro průkaz vybraných bakteriálních kmenů bylo shromážděno 10 bodových vzorků odpadních vod z 5 čistíren odpadních vod (ČOV) různých velikostí, lokalizovaných v Královéhradeckém, Pardubickém, Středočeském kraji a Vysočině. Vzorkována byla vždy surová odpadní voda před vstupem do ČOV (nátok do ČOV) a následně voda po procesu přečištění (odtok z ČOV). Vzorky byly odebrány v období od října 2017 do dubna 2018. U dvou vzorků byl proveden opakovaný odběr z důvodu nedostatečného záchytu cílových bakterií. Seznam odebraných vzorků uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3 Vzorky odpadních vod

| <i>Číslo vzorku</i> | <i>Typ vzorku</i> | <i>ČOV</i>  | <i>Datum odběru</i> | <i>Opakovaný odběr</i> |
|---------------------|-------------------|-------------|---------------------|------------------------|
| <i>1</i>            | nátok do ČOV      | Račín       | 23. 10. 2017        | 3. 4. 2018             |
| <i>2</i>            | odtok z ČOV       | Račín       | 23. 10. 2017        | 3. 4. 2018             |
| <i>3</i>            | nátok do ČOV      | Pardubice   | 13. 11. 2017        | 12. 3. 2018            |
| <i>4</i>            | odtok z ČOV       | Pardubice   | 13. 11. 2017        | 12. 3. 2018            |
| <i>5</i>            | nátok do ČOV      | Nový Bydžov | 27. 11. 2017        | -----                  |
| <i>6</i>            | odtok z ČOV       | Nový Bydžov | 27. 11. 2017        | -----                  |
| <i>7</i>            | nátok do ČOV      | Kolín       | 12. 2. 2018         | -----                  |
| <i>8</i>            | odtok z ČOV       | Kolín       | 12. 2. 2018         | -----                  |
| <i>9</i>            | nátok do ČOV      | Poděbrady   | 26. 2. 2018         | -----                  |
| <i>10</i>           | odtok z ČOV       | Poděbrady   | 26. 2. 2018         | -----                  |

## 3.3 Pracovní postup

### 3.3.1 Odběr vzorků odpadních vod

Odpadní vody byly odebrány v souladu s normami ČSN EN ISO 19458 – Jakost vod – odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu, ČSN EN ISO 5667-1 – Jakost vod – odběr vzorků, ČSN ISO 5667-10 – Jakost vod – Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod. Odběr odpadních vod byl prováděn do skleněných lahví s plastovými šroubovacími uzávěry. Uzavřené otvory vzorkovnic byly dále chráněny před kontaminací hliníkovou fólií. Odebrané

vzorky odpadních vod nebyly konzervovány a do laboratoře byly přepravovány v uzavřených polystyrenových termoboxech, pro zajištění konstantní teploty. Odpadní vody byly po odběru zpracovány co nejrychleji – obvykle za méně než 4 hodiny.

### 3.3.2 Membránová filtrace vzorků odpadních vod

Membránová filtrace odpadních vod byla provedena dle pokynů uvedených v normě ČSN EN ISO 8199 – Jakost vod – Obecný návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami.

V případě nátoků do ČOV byla provedena filtrace 10 ml odpadní vody, vzhledem k vysokému množství pevných částic, jež vedly k ucpání pórů membránových filtrů. V případě, že charakter vzorku umožňoval filtraci většího objemu, bylo filtrováno 25 ml odpadní vody, doplněné na objem 100 ml fyziologickým roztokem. U odtoků z ČOV byla provedena filtrace 10 ml i 100 ml odpadní vody bez ředění fyziologickým roztokem.

Určený objem vzorku nebo jeho zředění bylo přefiltrováno přes membránový filtr s velikostí pórů dostatečnou pro zachycení bakterií (0,45  $\mu\text{m}$ ). Membránový filtr byl asepticky přenesen na povrch pevné selektivně-diagnostické půdy. Petriho miska byla inkubována za podmínek předepsaných pro konkrétní mikroorganismus. Membránová filtrace byla vždy u každého objemu prováděna v dubletu.

### 3.3.3 Další zpracování vzorků odpadních vod

Pro průkaz bakterií rodu *Aeromonas*, *Pseudomonas* a *Enterococcus*, bakterie *Escherichia coli* a termotolerantních koliformních bakterií bylo kromě membránové filtrace využito i očkování roztěrem L-hokejkou na povrch příslušného média. Pro tento postup bylo nutné u vzorků odpadních vod provést desítkové ředění.

Do sterilních bakteriologických zkumavek bylo napipetováno 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Poté byl do první zkumavky přidán 1 ml odpadní vody a obsah zkumavky byl promíchán. Tím bylo připraveno ředění  $10^{-1}$ . První ředění bylo připraveno i roztěrem 0,1 ml neředěné odpadní vody na příslušná média.

U nátoků do ČOV bylo zvoleno ředění na miskách  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  a u jednoho vzorku bylo použito i ředění  $10^{-5}$ . U odtoků z ČOV bylo zvoleno ředění na miskách  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ . U všech ředění byl roztěr prováděn vždy v dubletu.



### 3.3.4 Průkaz bakterií rodu *Salmonella*

Pro průkaz bakterií rodu *Salmonella* v odpadních vodách byla využita norma ČSN EN ISO 6579-1, jež specifikuje horizontální metodu pro určení přítomnosti nebo nepřítomnosti salmonel v potravinách.

Vyšetřovaný vzorek odpadní vody o objemu 25 ml byl pipetován do 225 ml pufované peptonové vody (PPV médium). Současně bylo 25 ml odpadní vody přefiltrováno přes membránový filtr a ten byl sterilně přenesen do 225 ml pufované peptonové vody. Inkubace v obou případech probíhala aerobně při 37 °C po dobu 18 ± 2 hodin. Získané kultury byly přeočkovány do dvou selektivních tekutých půd – Rappaport Vassiliadis sója médium (RVS médium) a Mueller-Kauffman tetrathionát novobiocin médium (MKTTn médium). Do zkumavky obsahující 10 ml RVS média bylo pipetováno 0,1 ml získané kultury a půda byla inkubována aerobně při 41,5 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Do zkumavky obsahující 10 ml MKTTn média byl pipetován 1 ml získané kultury a půda byla inkubována aerobně při 37 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Kultury ze selektivních tekutých půd RVS a MKTTn byly vyočkovány na dvě selektivně-diagnostické pevné půdy – xylóza-lyzin-deoxycholátový agar (XLD agar) a chromogenní médium Rambach® agar. Naočkované misky byly inkubovány aerobně při 37 °C po dobu 24 ± 3 hodin a následně byla zjišťována přítomnost suspektních kolonií rodu *Salmonella*. Typické kolonie salmonel na XLD agaru mají narůžovělou barvu s černým středem. Na Rambach® agaru bakterie rodu *Salmonella* vyrůstají v jasně červených koloniích. Ke confirmaci byla z každé plotny každé selektivně-diagnostické půdy vybrána nejméně jedna kolonie, jež byla považována za typickou nebo suspektní. Vybrané kolonie byly subkultivovány na neselektivní tuhé půdě – MPA při 37 °C aerobně po dobu 24 ± 3 hodin. Následně bylo provedeno barvení dle Grama a testy na tvorbu katalázy a oxidázy. Konečná identifikace bakterií byla provedena pomocí identifikačních souprav ENTEROtest 24 případně ENTERO-Rapid 24 z řady MIKROLATEST®.

### 3.3.5 Průkaz bakterií rodu *Yersinia*

Průkaz přítomnosti bakterií rodu *Yersinia* v odpadních vodách byl proveden dle normy ČSN EN ISO 10273 z března 2004, jež specifikuje horizontální metodu průkazu suspektních patogenních kmenů *Yersinia enterocolitica* v potravinách.

Vyšetřovaný vzorek odpadní vody o objemu 25 ml byl pipetován do 225 ml bujónu s irgasanem, tikarcilinem a chlorečnanem draselným (ITC Broth Base, ITC bujón) nebo do bujónu s peptonem, sorbitolem a žlučovými solemi (PSB bujón). Zaočkovaný ITC bujón byl inkubován aerobně při 25 °C po dobu 48 ± 3 hodin. Zaočkovaný PSB bujón byl

inkubován aerobně při 25 °C po dobu 48 až 72 hodin s třepáním. Kultury získané z ITC nebo PSB bujónu byly vyočkovány na povrch agaru s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem (*Yersinia* Selective Agar Base, CIN agar). Současně bylo přeneseno 0,5 ml kultury z ITC nebo PSB bujónu do 4,5 ml roztoku hydroxidu draselného. Po 20 ± 5 sekundách alkalizace byla kultura vyočkována na povrch CIN agaru a naočkované misky byly v obou případech inkubovány aerobně při 30 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Po ukončení kultivace byla na CIN agaru zjišťována přítomnost charakteristických kolonií *Yersinia enterocolitica*. Typické kolonie yersinií jsou na CIN agaru drobné s červeným středem a průsvitným okrajem. Ke confirmaci byla z každé misky se selektivně-diagnostickou půdou vybrána nejméně jedna kolonie, která byla považována za typickou nebo suspektní. Vybrané kolonie byly subkultivovány na neselektivní tuhé půdě – trypton sójovém agaru (Soyabean Casein Digest Agar, TSA agar) při 30 °C aerobně po dobu 24 ± 3 hodin. Následně bylo provedeno barvení dle Grama a testy na tvorbu katalázy a oxidázy. Konečná identifikace bakterií byla provedena pomocí identifikačních souprav ENTEROtest 24 případně ENTERO-Rapid 24 z řady MIKROLATEST®.

V listopadu 2017 byla norma ČSN EN ISO 10273 z března 2004 nahrazena novou normou, jež výrazně pozměnila postup při průkazu suspektních patogenních kmenů *Yersinia enterocolitica* v potravinách.

Vyšetřovaný vzorek odpadní vody o objemu 25 ml byl pipetován do 225 ml PSB bujónu. Na povrch 4 CIN agarů bylo očkováno 1 ml PSB bujónu s odpadní vodou (0,2 ml na misku) a inokulum bylo rozetřeno L-hokejkou. Naočkované misky byly inkubovány aerobně při 30 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Dále bylo 10 ml PSB bujónu s odpadní vodou pipetováno do 90 ml ITC bujónu. Zaočkované ITC a PSB bujóny byly inkubovány aerobně při 25 °C po dobu 48 ± 3 hodin bez třepání. Po ukončení inkubace bylo 0,5 ml kultury z ITC a PSB bujónu pipetováno do 4,5 ml roztoku hydroxidu draselného. Po 20 ± 5 sekundách alkalizace byla kultura vyočkována na povrch CIN agaru a misky byly v obou případech inkubovány aerobně při 30 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Následný postup subkultivace a confirmace nebyl pozměněn a byl prováděn stejným způsobem.

### 3.3.6 Průkaz bakterií rodu *Campylobacter*

Pro průkaz bakterií rodu *Campylobacter* v odpadních vodách byla využita norma ČSN EN ISO 10272-1 z července 2006, jež specifikuje horizontální metodu průkazu *Campylobacter* spp.

Vyšetřovaný vzorek odpadní vody o objemu 25 ml byl pipetován do 225 ml bujónu dle Boltona (Bolton Broth Base) a poté inkubován v mikroaerofilním prostředí při 41,5 °C po dobu 48 hodin. Kultura získaná z bujónu dle Boltona byla vyočkována na povrch selektivní kultivační půdy – modifikovaného deoxycholátového agarů s aktivním uhlím a cefoperazonem (Blood Free *Campylobacter* Selectivity Agar Base, mCCDA agar). Naočkované misky byly inkubovány v mikroaerofilním prostředí při 41,5 °C po dobu 48 ± 3 hodin a následně byla zjišťována přítomnost suspektních kolonií rodu *Campylobacter*. Typické kolonie kampylobakterů jsou na mCCDA agarů šedé nebo světle hnědé a vodnaté. Ke konfirmaci byla z každé misky se selektivní půdou vybrána nejméně jedna kolonie, jež byla považována za typickou nebo suspektní. Vybrané kolonie byly subkultivovány na krevním agarů Columbia (Columbia Agar) v mikroaerofilním prostředí při 41,5 °C po dobu 48 ± 3 hodin. Následně bylo provedeno barvení dle Grama, testy na tvorbu katalázy a oxidázy a byl sledován pohyb v zástině. Ke konečné identifikaci byl dále zkoušen růst suspektních kolonií na krevním agarů Columbia při 41,5 °C aerobně a při 25 °C v mikroaerofilním prostředí po dobu 24 až 48 hodin.

### 3.3.7 Průkaz bakterií rodu *Enterococcus*

Průkaz bakterií rodu *Enterococcus* byl zčásti proveden dle normy ČSN EN ISO 7899-2, jež určuje metodu stanovení intestinálních enterokoků ve vodě metodou membránových filtrů. Dle výše zmíněné normy byl selektivně-diagnostickou tuhou půdou zvolen Slanetz-Bartley agar (Slanetz and Bartley Medium), kde jsou typické kolonie enterokoků zbarvené celé nebo ve středu červeně, kaštanově či růžově.

Zkoušený objem odpadní vody nebo jeho ředění bylo zfiltrováno přes membránový filtr, jež byl asepticky přenesen na povrch pevného selektivně-diagnostického média. Současně bylo pipetováno 0,1 ml příslušného ředění odpadní vody na povrch selektivně-diagnostické půdy a inokulum bylo rozetřeno L-hokejkou. Inkubace byla v obou případech prováděna aerobně při 37 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Suspektní kolonie cílových bakterií byly subkultivovány na neselektivní tuhé půdě – KA aerobně při 30 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Následně bylo provedeno barvení dle Grama a testy na tvorbu katalázy a oxidázy. Kolonie izolované na KA byly vyočkovány na žluč-eskulinový agar (Bile Esculin Azide Agar, ŽE agar) k potvrzení přítomnosti enzymu eskulin-β-D-glukosidázy. Konečná identifikace bakterií byla provedena pomocí identifikačních soupravy STREPTOtest 24 z řady MIKROLATEST®.

### 3.3.8 Průkaz termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*

K průkazu termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli* byly zčásti využity dvě normy. První používanou normou byla ČSN 75 7835, která určuje metodu pro stanovení termotolerantních koliformních bakterií a *Escherichia coli*. Dle normy ČSN 75 7835 byl první selektivně-diagnostickou tuhou půdou zvolen m-FC agar, kde koliformní bakterie a *E. coli* (laktóza pozitivní kolonie) vyrůstají v modře zbarvených koloniích. Druhou používanou normou byla ČSN EN ISO 9308-1, jenž popisuje referenční metodu pro stanovení *Escherichia coli* a koliformních bakterií membránovou filtrací ve vodách určených pro lidskou spotřebu. Dle normy ČSN EN ISO 9308-1 bylo druhou selektivně-diagnostickou tuhou půdou zvoleno chromogenní médium Chromocult® Coliform agar, kde koliformní bakterie ( $\beta$ -D-galaktozidáza pozitivní kolonie) vyrůstají v růžových až červených koloniích a *E. coli* ( $\beta$ -D-galaktozidáza a  $\beta$ -D-glukuronidáza pozitivní kolonie) v tmavě modrých až fialových koloniích.

Zkoušený objem odpadní vody nebo jeho ředění bylo zfiltrováno přes membránový filtr, jenž byl asepticky přenesen na povrch obou pevných selektivně-diagnostických půd. Současně bylo pipetováno 0,1 ml příslušného ředění odpadní vody na povrch obou selektivně-diagnostických půd a inokulum bylo rozetřeno L-hokejkou. Inkubace byla v obou případech pro obě média prováděna aerobně při 41,5 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Ke confirmaci byla z každé plotny každé selektivně-diagnostické půdy vybrána nejméně jedna kolonie, jež byla považována za typickou nebo suspektní. Vybrané kolonie byly subkultivovány na neselektivní tuhé půdě – MPA při 37 °C aerobně po dobu 24 ± 3 hodin. Následně bylo provedeno barvení dle Grama a testy na tvorbu katalázy a oxidázy. Konečná identifikace bakterií byla provedena pomocí identifikačních souprav ENTEROtest 24 případně ENTERO-Rapid 24 z řady MIKROLATEST®.

### 3.3.9 Průkaz bakterií rodu *Aeromonas*

Selektivně-diagnostickou tuhou půdou pro průkaz bakterií rodu *Aeromonas* z odpadních vody byl zvolen m-*Aeromonas* agar (m-*Aeromonas* Selective Agar Base), jenž je doporučen pro detekci aeromonád z vod technikou membránové filtrace.

Zkoušený objem odpadní vody nebo jeho ředění bylo zfiltrováno přes membránový filtr, jenž byl asepticky přenesen na povrch pevného selektivně-diagnostického média. Současně bylo pipetováno 0,1 ml příslušného ředění odpadní vody na povrch selektivně-diagnostické půdy a inokulum bylo rozetřeno L-hokejkou. Inkubace byla v obou případech prováděna aerobně při 30 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Zástupci rodu *Aeromonas* tvoří na m-*Aeromonas*

agaru velké žluté vypouklé kolonie. Suspektní kolonie cílových bakterií byly subkultivovány na neselektivní tuhé půdě – MPA aerobně při 30 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Následně bylo provedeno barvení dle Grama a testy na tvorbu katalázy a oxidázy. Konečná identifikace bakterií byla provedena pomocí identifikačních soupravy NEFERMtest 24 z řady MIKROLATEST®.

### **3.3.10 Průkaz bakterií rodu *Pseudomonas***

Pro průkaz bakterií rodu *Pseudomonas* v odpadních vodách byla zčásti využita norma ČSN EN ISO 16266, jež určuje metodu pro izolaci a stanovení počtu *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorcích balených vod pomocí membránových filtrů. Selektivně-diagnostickou půdou byl zvolen cetrimidový agar (Cetrimid Agar Base), na kterém *P. aeruginosa* vyrůstá v koloniích charakteristicky obklopených modrozeleným zbarvením.

Zkoušený objem odpadní vody nebo jeho ředění bylo zfiltrováno přes membránový filtr, jenž byl asepticky přenesen na povrch pevného selektivně-diagnostického média. Současně bylo pipetováno 0,1 ml příslušného ředění odpadní vody na povrch selektivně-diagnostické půdy a inokulum bylo rozetřeno L-hokejkou. Inkubace byla v obou případech prováděna aerobně při 37 °C po dobu 48 ± 3 hodin. Suspektní kolonie cílových bakterií byly subkultivovány na neselektivní tuhé půdě – MPA aerobně při 30 °C po dobu 24 ± 3 hodin. Následně bylo provedeno barvení dle Grama a testy na tvorbu katalázy a oxidázy. Konečná identifikace bakterií byla provedena pomocí identifikačních soupravy NEFERMtest 24 z řady MIKROLATEST®.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Průkaz bakterií rodu *Salmonella* v odpadních vodách

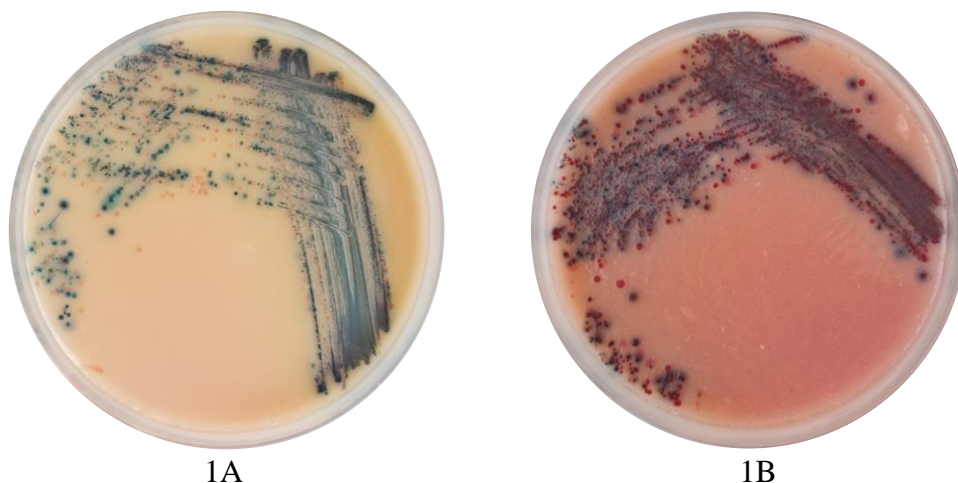
Bakterie rodu *Salmonella* byly horizontální metodou dle normy ČSN EN ISO 6579-1 prokázány v nátoku a odtoku z ČOV Pardubice (vzorky 3 a 4) a ČOV Poděbrady (vzorky 9 a 10). Všechny 11 získaných izolátů patřících do rodu *Salmonella* bylo identifikováno jako *Salmonella enterica* sérovar Enteriditis. Také ve studii Polo *et al.* (1999), která se zabývala izolací bakterií rodu *Salmonella* v povrchových vodách membránovou filtrací, byl nejčastěji identifikován sérovar Enteriditis. Z celkových 823 získaných izolátů, bylo 111 identifikováno jako sérovar Enteriditis (13,5 %), 8,6 % izolátů bylo identifikováno jako *S. Virchow* a 7,3 % jako *S. Hadar*. Celkem bylo identifikováno 55 různých sérotypů. Naproti tomu Koivunen *et al.* (2003) ze 197 izolátů získaných z nátoků a odtoků čtyř velkých ČOV ve Finsku identifikovali jako sérovar Enteritis pouze 4 izoláty. Nejvíce izolátů (41) bylo identifikováno jako sérovar Bradenburg. Catalao Dionisio *et al.* (2000) zjistili, že v mořské vodě převládá *S. Virchow*. V 93 vzorcích bylo identifikováno 17 různých sérotypů. Sérotyp *Virchow* byl detekován v 21,6 %. Velmi časté byly i *S. Senftenberg* (8,1 %) a *S. Derby* (8,1 %).

Průkaz bakterií rodu *Salmonella* v odpadních vodách byl proveden dle normy ČSN EN ISO 6579-1 a zahrnoval neselektivní pomnožení, selektivní pomnožení, vyočkování a konfirmaci. K neselektivnímu pomnožení bylo použito PPV médium, do kterého bylo pipetováno 25 ml odpadní vody. K selektivnímu pomnožení byly využity dvě tekuté půdy – RVS médium a MKTTn médium. Kultury po selektivním pomnožení byly vyočkovány na XLD agar a chromogenní médium Rambach® agar. Současně byly bakterie rodu *Salmonella* v odpadních vodách prokazovány upraveným postupem dle normy ČSN EN ISO 6579-1, který zahrnoval zařazení filtračního kroku. V PPV médiu byl inkubován membránový filtr po filtraci 25 ml odpadní vody. Další postup nebyl pozmeněn.

Metodu pro potvrzení přítomnosti bakterií rodu *Salmonella* ve vzorcích vod specifikuje norma ČSN ISO 19250. Vzorky o objemu pod 10 ml lze naočkovat přímo do PPV média, pro vzorky o objemu nad 10 ml je používána pouze membránová filtrace a inkubace filtru v PPV médiu. V obou případech je objem PPV média 50 ml, použití MKTTn média je dobrovolné. V dalším postupu ani podmínkách kultivace se normy neliší. Zařazení membránové filtrace jsme použily i v naší práci, abychom mohly posoudit její vliv na záchyt bakterií rodu *Salmonella*.

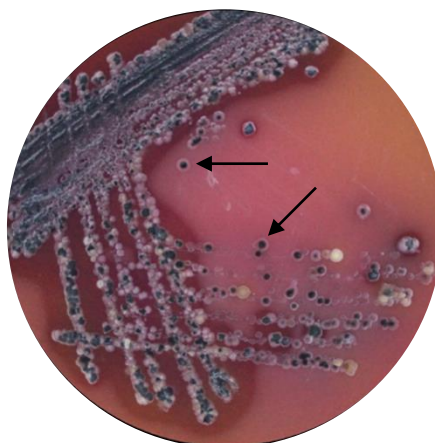
Ve všech pozitivních vzorcích byly bakterie rodu *Salmonella* izolovány postupem, který zahrnoval přímou kultivaci 25 ml odpadní vody v PPV médiu. Pouze u nátoky do ČOV Pardubice (vzorek 3) byly bakterie rodu *Salmonella* současně izolovány i postupem se zařazeným filtračním krokem. Membránová filtrace 25 ml vody a inkubace filtru v PPV médiu tedy nevedla k lepšímu zachytu bakterií rodu *Salmonella* z odpadních vod. K nízkému zachytu bakterií rodu *Salmonella* ve vodách používaných k zavlažování vedlo použití membránové filtrace i v práci Pianetti *et al.* (2004). Membránové filtry se zachycenými bakteriemi byly kultivovány přímo v selektivním médiu – selenid-cysteinovém bujónu při 37 °C po dobu 18 hodin. Získaná kultura byla vyočkována na Hektoen Enteric Agar a SS agar. Z celkem 52 odebraných vzorků byly bakterie rodu *Salmonella* prokázány pouze ve dvou případech. Pomnožení membránových filtrů v nelesektivní půdě nepoužili ani Dekker *et al.* (2015), kteří sledovali kontaminaci studniční vody bakteriemi rodu *Salmonella* v Ghaně. Po přefiltrování 100 ml vody byly filtry přeneseny do selenidového F bujónu. Po 18 až 24 hodinách kultivace byla kultura vyočkována na chromogenní agar pro salmonely. Přítomnost bakterií rodu *Salmonella* byla prokázána ve 26 z celkem 398 vyšetřovaných vzorků. Předpomnožení membránových filtrů v PPV médiu naopak při izolaci bakterií rodu *Salmonella* v povrchových vodách použili Economou *et al.* (2013). Pro selektivní pomnožení byly použity dvě média – selenid-cysteinový bujón a RVS médium a získané kultury byly vyočkovány na XLD a SS agar. Z 240 vyšetřovaných vzorků bylo izolováno 28 sérovarů *Salmonella* spp., které byly identifikovány jako *Salmonella* Enteritidis (23), *Salmonella* Thompson (3) a *Salmonella* Virchow (2).

Bakterie rodu *Salmonella* byly izolovány pouze po selektivním pomnožení v MKTTn médiu. Z kultur pocházejících z RVS média nebyly na XLD ani Rambach® agaru u žádného vzorku získány suspektní kolonie, a to i ve vzorcích, kde byla přítomnost bakterií rodu *Salmonella* prokázána (obr. 1A a 1B). Vyšší selekční tlak RVS média spolu s teplotou kultivace (41,5 °C) zřejmě vedl k úplnému potlačení bakterií rodu *Salmonella*. Modifikované RVS médium k selektivnímu pomnožení použily při průkazu bakterií rodu *Salmonella* v odpadních vodách Baudišová a Benáková (2011). Po kultivaci na BGA a XLD agaru se salmonely podařilo prokázat v 33 % vyšetřovaných odtoků z ČOV. Dvě selektivní média využili pro průkaz bakterií rodu *Salmonella* v povrchových vodách Arvanitidou *et al.* (1997). Po předpomnožení v PPV médiu byla získaná kultura inokulována do RVS média a selenid-cysteinového bujónu. Jako selektivní tuhé půdy byly zvoleny SS agar a BGD agar. Z celkových 128 vyšetřovaných vzorků se bakterie rodu *Salmonella* podařilo izolovat v 8 případech.



Obrázek 1A Rambach® agar – inokulum vyočkované z RVS média (foto autor)  
 Obrázek 1B Rambach® agar – inokulum vyočkované z MKTTn média (foto autor)

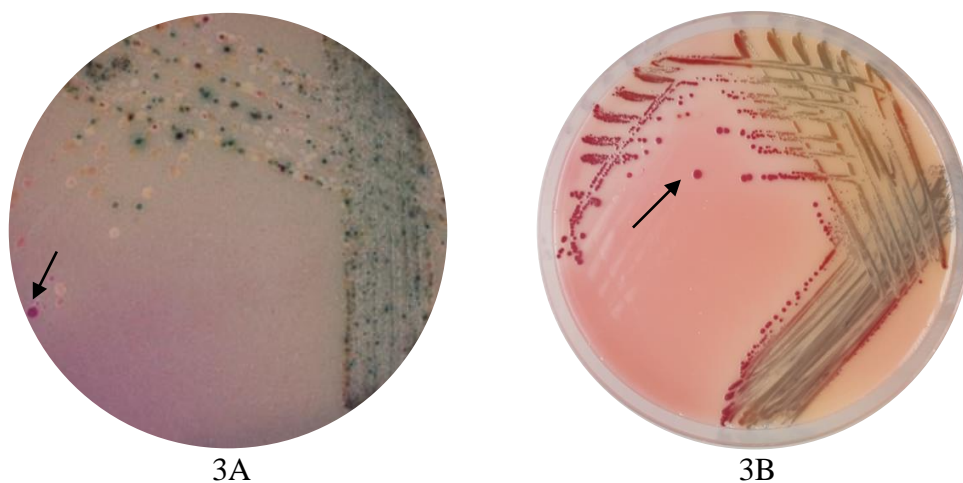
XLD agar se pro izolaci bakterií rodu *Salmonella* z odpadních vod ukázal jako málo účinný. Jak ale uvádějí El-Sherif and Elmoosalami (1998), kolonie bakterií rodu *Salmonella* mohou být na XLD agaru zcela potlačeny v případě, že se ve vyšetřovaném vzorku nachází vysoké množství konkurenčních Gram-negativních bakterií. Přes přítomnost suspektních kolonií na XLD agaru se bakterie rodu *Salmonella* nepodařilo potvrdit (obr. 2). Průsvitné kolonie s černým středem byly na základě charakteristického růstu po subkultivaci na MPA identifikovány jako bakterie rodu *Proteus*. U silně kontaminovaných nátoků do ČOV byl typický plazivý růst bakterií rodu *Proteus* pozorován přímo na XLD agaru za méně než 18 hodin kultivace. El-Sherif and Elmoosalami (1998) taktéž uvádí, že bakterie rodu *Proteus*, podobně jako *Pseudomonas* a *Providencia*, jsou schopné selekční tlak XLD média překonat.



Obrázek 2 XLD agar – suspektní kolonie (označeno černými šipkami), vyočkováno z MKTTn média (foto autor)



Druhou selektivní tuhou půdou byl vedle XLD agaru, který přímo určuje ČSN EN ISO 6579-1 zvolen Rambach® agar. Až jeho použití umožnilo izolovat bakterie rodu *Salmonella* ze vzorků odpadních vod. Rambach® agar odstranil problém s přerůstáním kolonií bakteriemi rodu *Proteus* a umožnil snadné vizuální rozlišení obou rodů. Zatímco bakterie rodu *Salmonella* rostly v tmavě fialovo-červených koloniích (obr. 3A), bakterie rodu *Proteus* ve světle růžových. Nicméně v tmavě fialovo-červených koloniích na Rambach® agaru rostly i bakterie rodu *Citrobacter* (obr. 3B). Téměř všechny izoláty z Rambach® agaru, které nebyly identifikovány jako *Salmonella enterica* sérovar Enteriditis náleželi do rodu *Citrobacter*. Převažujícím druhem byl *Ci. amalonaticus*, v nátoku do ČOV Račín (vzorek 1) byl prokázán *Ci. braaki* a *Ci. youngae* a v odtoku z ČOV Račín (vzorek 2) byl identifikován *Ci. freundii*. Kolonie bakterií rodu *Salmonella* a *Citrobacter* nebylo možné na agaru těsně po ukončení kultivace vizuálně rozlišit. V průběhu práce bylo zjištěno, že kolonie bakterií rodu *Citrobacter* po 24 hodinách při 4 °C mění barvu na zelenou. Ovšem byly pozorovány i takové kolonie bakterií rodu *Citrobacter*, které si i po 48 hodinách při 4 °C zachovávaly tmavě fialově-červenou barvu.



Obrázek 3A Rambach® agar – suspektní kolonie (označeno černou šipkou) dourčena jako *Salmonella* (foto autor)

Obrázek 3B Rambach® agar – suspektní kolonie (označeno černou šipkou) dourčena jako *Citrobacter* (foto autor)

Za suspektní kolonie bakterií rodu *Salmonella* na Rambach® agaru byly považovány i kolonie, které byly zbarveny cihlově červeně a neměnily zbarvení ani po 48 hodinách při 4°C. Takové kolonie byly ve všech případech identifikovány jako *Ci. amalonaticus*, přesto pro tento druh nebyly specifické a *Ci. amalonaticus* rostl i v tmavě fialovo-červených koloniích.

V odtoku z ČOV Poděbrady (vzorek 10) byly jako bakterie rodu *Salmonella* identifikovány i atypické kolonie. Salmonely rostly na Rambach® agaru jako 2 mm velké, hladké, lesklé kruhové kolonie s tmavě fialovým středem, který byl ohraničen světle růžovým lemem. Rovný okraj byl průsvitný.

## 4.2 Průkaz bakterií rodu *Yersinia* v odpadních vodách

Bakterie rodu *Yersinia* byly horizontální metodou dle ČSN EN ISO 10273 prokázány v nátoku a odtoku z ČOV Račín (vzorek 1 a 2), ČOV Pardubice (vzorek 3 a 4) a v nátoku do ČOV Kolín (vzorek 7). Přestože norma ČSN EN ISO 10273 stanovuje metodu pro průkaz *Y. enterocolitica* v potravinách a krmivech, byla v této práci využita i pro odpadní vody, neboť norma pro stanovení *Y. enterocolitica* neexistuje.

Všech 7 izolátů, které byly získány z CIN agaru a náležely do rodu *Yersinia* bylo identifikováno jako *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica*. V nátoku do ČOV Račín (vzorek 1) byla z m-*Aeromonas* agaru izolována *Yersinia intermedia*. V odtoku z ČOV Pardubice (vzorek 4) byla na Chromocult® Coliform agaru zachycena *Yersinia rohdei* a v nátoku do ČOV Kolín (vzorek 7) byla ve dvou případech z Rambach® agaru izolována *Yersinia frederiksenii*. Cheyne *et al.* (2010) uvádí, že ve většině případů jsou z vodního prostředí izolovány nepatogenní kmeny *Yersinia*. Falcão *et al.* (2004) identifikovali 114 izolátů *Yersinia* spp. pocházejících z různých typů vod, včetně odpadních v Brazílii. Nejvíce zastoupenými druhy byla *Y. enterocolitica* (67 izolátů) a *Y. intermedia* (64 izolátů). V devíti případech byla prokázána *Y. frederiksenii* a tři izoláty byly identifikovány jako *Y. kristensenii*.

Vzorky 1 až 8 byly zpracovány dle normy ČSN EN ISO 10273 z března 2004. U nátoku a odtoku z ČOV Račín (vzorky 1 a 2) byl k selektivní pomnožení použit PSB bujón, u ostatních vzorků ITC bujón. V nátoku a odtoku z ČOV Pardubice (vzorky 3 a 4) byly bakterie rodu *Yersinia* prokázány až při opakovaném odběru vzorku. V tomto případě bylo z důvodu nedostatku vzorku použito pouze 15 ml vzorku namísto 25 ml. Tento objem byl přidán k devítinásobnému objemu ITC bujónu, tedy k 135 ml. Cheyne *et al.* (2009) uvádí, že často používanou pomnožovací metodou pro izolaci *Yersinia enterocolitica* je kultivace v PBS bujónu při 4°C. Nízká teplota pomnožení psychrotrofní yersinie zvýhodňuje, nicméně bujón je nutné kultivovat 14 až 21 dní. Naproti tomu se ITC bujón inkubuje pouze po dobu 48 hodin při 25 °C, avšak nemusí zajistit dobrou obnovu všech subtypů *Y. enterocolitica*. Obě pomnožovací metody využili Terech-Majewska *et al.* (2016) při izolaci bakterií *Yersinia enterocolitica* ve vodách z polské řeky Drwęca. 1 ml každého

vzorku byl současně kultivován v PSB bujónu (4 °C; 21 dní) a ITC bujónu (25 °C; 24 hodin). Získané kultury byly po alkalizaci vyočkovány na CIN agar. Z 39 vzorků byly vyizolovány 4 kmeny *Yersinia enterocolitica*. Ve třech případech byla *Yersinia enterocolitica* získána po pomnožení v PSB bujónu. Cheyne *et al.* (2009) využili při detekci bakterií rodu *Yersinia* ve vzorcích odebraných v povodí Grand River v Kanadě pomnožení v modifikovaném trypton-sójovém bujónu při 12 °C po dobu 3 dnů. Po 24 hodinové inkubaci byl do bujónu přidán Irgasan, aby konečná koncentrace byla 4 µg/ml. Po ukončení kultivace byla získaná kultura vyočkována na CIN agar. Bakterie rodu *Yersinia* byly prokázány v 52 ze 200 vyšetřovaných vzorků. Všechny izoláty z pozitivních vzorků byly identifikovány jako nepatogenní druhy – *Y. enterocolitica* biotyp 1A, *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* a *Y. mollaretii*.

Nátok a odtok z ČOV Poděbrady (vzorky 9 a 10) byly zpracovány dle ČSN EN ISO 10273 z listopadu 2017, která původní normu z března 2004 nahradila a výrazně upravila metodu horizontálního průkazu *Yersinia enterocolitica*. Bylo zavedeno přímé očkování 1 ml výchozí suspenze vzorku v PBS bujónu roztěrem na povrch 2 až 4 CIN agarů. I přes využití 4 CIN agarů byly suspektní kolonie v důsledku vysokého nárůstu doprovodné mikroflóry v odpadní vodě zcela potlačeny. Přímé vyočkování vzorku na CIN agary je pro odpadní vody zcela nevhodné. Norma také pozměnila čas a způsob kultivace pomnožovacích pūd. PSB a ITC bujón jsou kultivovány při 25 °C bez třepání po dobu 48 hodin. Změnil se také způsob inokulace ITC bujónu. Využívá se pouze 90 ml bujónu, který je zaočkován 10 ml výchozí suspenze vzorku PSB. Vyočkování kultury získané ze selektivního pomnožení bez alkalizace na CIN agary není povinné, je pouze doporučováno. Dále byla upřesněna příprava roztoku KOH pro alkalizaci. Dle normy je nezbytné roztok připravit den před použitím. Nové vydání normy ČSN EN ISO 10273 zvýšilo pracnost a materiálovou náročnost metody pro průkaz *Y. enterocolitica*. Pozměněný postup v případě odpadní vody nevedl k pozitivnímu průkazu bakterií rodu *Y. enterocolitica* v nátoku a odtoku z ČOV Poděbrady (vzorky 9 a 10). Je ale nutné znovu zdůraznit, že norma ČSN EN ISO 10273 není určena pro vzorky vod.

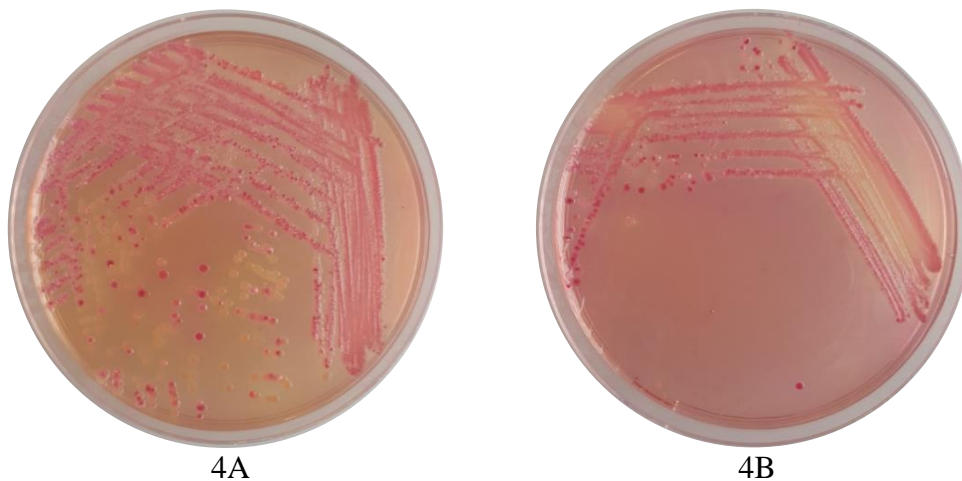
Dalším přístupem využívaným k izolaci bakterií rodu *Yersinia* ve vodách je membránová filtrace. Tuto metodu použili Arvanitidou *et al.* (1995a) k detekci bakterií rodu *Yersinia* ve vodách z řek a jezer v severním Řecku. Vzorky vody o objemu 100 ml byly přefiltrovány a filtry inkubovány v pufované peptonové vodě při 4 °C. V den inokulace, po 7 a 21 dnech kultivace byla kultura vyočkována na CIN agar a kultivována při 32 °C po dobu 24 hodin. Z 86 vyšetřovaných vzorků byla v 9 případech izolována *Y. intermedia*. Arvanitidou *et al.* (1995b) použili metodu z předcházející studie také ke sledování výskytu bakterií rodu

*Yersinia* v mořských a říčních vodách. Z 241 vyšetřovaných vzorků bylo získáno 12 izolátů *Y. intermedia*, 7 izolátů pocházelo z říční vody, zbylých 5 z vody mořské. Membránovou filtraci využili Bozcal *et al.* (2015) pro zjištění přítomnosti bakterie *Y. enterocolitica* v surových odpadních vodách. Po filtraci 500 ml vody byly membránové filtry přeneseny do 10 ml modifikovaného trypton-sójového bujónu a kultivovány při 12 °C po dobu 24 hodin. Získané kultury byly vyočkovány na CIN agar. Celkem bylo vyšetřováno 6 nátoků do ČOV. Na CIN agaru bylo zjištěno 43 suspektních kolonií, z nichž 4 byly potvrzeny jako *Y. enterocolitica*.

Většina izolátů získaných z CIN agaru, které nebyly potvrzeny jako *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica*, byly identifikovány jako bakterie rodu *Citrobacter*. Nejčastěji byl prokázán *Ci. freundii*, v odtoku z ČOV Pardubice (vzorek 4) byl identifikován *Ci. braaki* a v odtoku z ČOV Poděbrady (vzorek 10) *Ci. farmeri*. Bakterie rodu *Yersinia* a *Citrobacter* nebylo možné na CIN ani TSA agaru vizuálně rozlišit. V obou případech vyrůstali v kruhových hladkých a lesklých koloniích. Na CIN agaru byl střed kolonií zbarven tmavě růžově, rovný okraj byl průhledný. Velikost kolonií se pohybovala v rozmezí 1 až 3 mm. Drobné kolonie (1 mm) byly na CIN agaru přítomny pouze po vyočkování alkalizované kultury. Naopak kolonie o velikosti 3 mm byly nejvíce zastoupeny po přímém vyočkování kultury z pomnožovací půdy. Nebylo pozorováno, že určitá velikost kolonií je specifická pro bakterie rodu *Yersinia* nebo *Citrobacter*. ČSN EN ISO 10273 popisuje typické kolonie *Y. enterocolitica* jako velmi drobné (<1 mm). Avšak ani takové kolonie nebyly identifikovány jako bakterie rodu *Yersinia*.

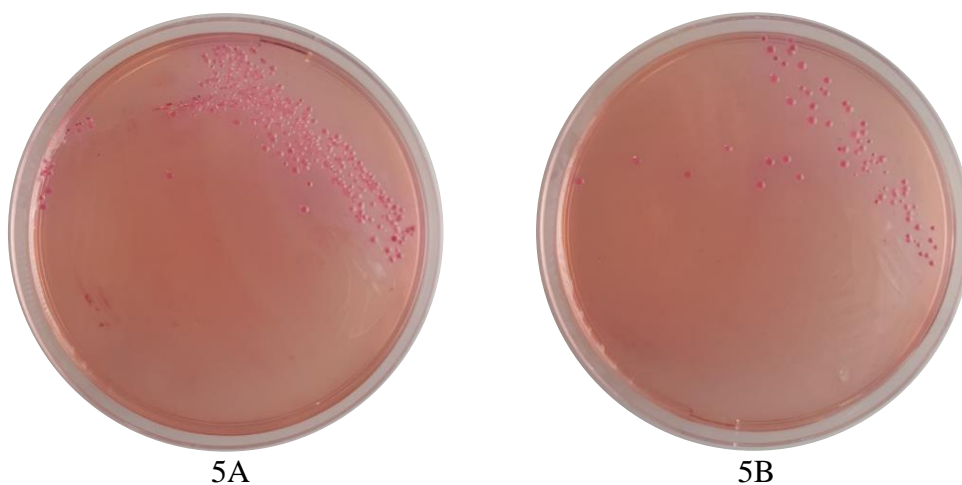
Nepoužití alkalizace vedlo k výraznému nárůstu doprovodné mikroflóry na CIN agaru, především u nátoků do ČOV (obr. 4A a 4B). V některých případech ani nebyly přítomné suspektní kolonie. Stanovená doba alkalizace je dle ČSN EN ISO 10273 20±5 sekund. Ale ani tato doba mnohdy nestačila k úplnému potlačení růstu doprovodné mikroflóry na CIN agaru, zejména pak u silně kontaminovaných nátoků do ČOV. Proto byly kultury v KOH ponechány i 40 a 60 sekund. Prodloužení doby alkalizace vedlo k potlačení doprovodné mikroflóry a růstu pouze suspektních kolonií (obr. 5A a 5B). *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* byla v nátoku a odtoku ČOV Račín (vzorky 1 a 2) a v nátoku do ČOV Kolín (vzorek 7) prokázána z kultury alkalizované 40 sekund. Naopak z nátoků a odtoků ČOV Pardubice (vzorky 3 a 4) byla izolována po 20 sekundách alkalizace. Ani prodloužení doby alkalizace nevedlo k jednoznačnému zvýhodnění bakterií rodu *Yersinia*.

Na bakterie rodu *Citrobacter* neměla doba alkalizace vliv a byly izolovány i z kultur, které byly účinku KOH vystaveny po dobu 60 sekund. U vzorku 3 byl z kultury alkalizované 40 sekund vyizolován *Enterobacter aerogenes*.



Obrázek 4A Inokulum bez alkalizace vyočkované na CIN agaru, nátok do ČOV Kolín (vzorek 7) (foto autor)

Obrázek 4B Inokulum bez alkalizace vyočkované na CIN agaru, odtok z ČOV Kolín (vzorek 8) (foto autor)



Obrázek 5A Inokulum alkalizované po dobu 40 sekund vyočkované na CIN agaru, nátok do ČOV Kolín (vzorek 7) (foto autor)

Obrázek 5B Inokulum alkalizované po dobu 60 sekund vyočkované na CIN agaru, nátok do ČOV Kolín (vzorek 7) (foto autor)

### 4.3 Průkaz bakterií rodu *Campylobacter* v odpadních vodách

Bakterie rodu *Campylobacter* byly prokazovány dle ČSN EN ISO 10272-1 z července 2006. U všech vyšetřovaných vzorků byly na mCCDA přítomné charakteristické drobné, šedobílé, vodnaté kolonie s nepravidelným okrajem (obr. 6). Konfirmační testy a mikroskopie v zástinu potvrdila u každého vzorku alespoň jeden izolát s pozitivní tvorbou katalázy a oxidázy a typickým vlnitým pohybem připomínající komáří hejno. U všech těchto kmenů

byl ale prokázán růst při 42 °C aerobně i při 25 °C mikroaerofilně za méně než 24 hodin. Pozitivní růst kolonií ve zmíněných podmínkách vyloučil přítomnost bakterií rodu *Campylobacter* ve všech vzorcích.



Obrázek 6 mCCDA agar –suspektní kolonie bakterií rodu *Campylobacter* (foto autor)

Jacob *et al.* (1996) uvádí, že atypické izoláty z vodního prostředí považované za bakterie rodu *Campylobacter*, jsou často identifikovány jako bakterie z rodu *Arcobacter*. Podle Collado *et al.* (2008) jsou zástupci rodu *Arcobacter* lépe přizpůsobeni pro přežití ve vodním prostředí. Na rozdíl od bakterií rodu *Campylobacter* vykazují vyšší odolnost vůči vysokým koncentracím chloridu sodného, jsou schopni růstu při nízkých teplotách a v přítomnosti kyslíku. Ve studii Diergaardt *et al.* (2004) bylo izolováno z různých typů vod 100 kmenů, které byly považovány za zástupce rodu *Campylobacter*. Pouze 22 izolátů nerostlo za aerobních podmínek a pomocí biochemických testů byly identifikovány jako *Campylobacter* spp. Sekvenování 16S rRNA ale ukázalo, že pouze 3 kmény jsou *Campylobacter jejuni*. Zbylých 19 kmenů bylo identifikováno jako *Arcobacter butzleri*.

Pitkänen (2013) uvádí, že v povrchových vodách je kultivačními metodami nejčastěji prokázán *Campylobacter jejuni*, který se vyskytuje zejména v místech vypouštění odpadních vod do prostředí. Mezi běžně detekované druhy dále patří *Campylobacter coli* a *Campylobacter lari*. Schopnost přežití bakterií rodu *Campylobacter* ve vodách zvyšuje nízká teplota, nepřítomnost slunečního záření a nízká koncentrace doprovodné mikroflóry.

Podle Diergaardt *et al.* (2004) lze záchyt bakterií rodu *Campylobacter* ze vzorků vod zvýšit použitím membránové filtrace. Arvanitidou *et al.* (1995a) pro průkaz bakterií rodu *Campylobacter* v říčních a jezerních vodách filtrovali vzorky o objemu 100 ml a filtry inkubovali na agaru dle Skirrowa. Po 24 hodinové kultivaci v mikroaerofilních podmínkách při 42 °C byly filtry odstraněny a misky při stejných podmínkách inkubovány dalších

48 hodin. Z 86 vyšetřovaných vzorků byl ve 14 případech izolován *C. jejuni*. Stejný postup využili Arvanitidou *et al.* (1995b) i pro průkaz bakterií rodu *Campylobacter* v říčních a mořských vodách. Z 200 vzorků mořských vod byl *C. jejuni* izolován ve čtyřech případech. V 41 vzorcích říčních vod bylo získáno 7 izolátů *C. jejuni*. Naopak v práci autorů Economou *et al.* (2013) nevedlo použití membránové filtrace, zahrnující inkubaci filtrů v bujónu dle Prestona a vyočkování inokula na Karmali agar, k průkazu bakterií rodu *Campylobacter* ani v jednom z 240 vyšetřovaných vzorků povrchových vod.

Různé kultivační postupy k průkazu bakterií rodu *Campylobacter* v odpadních vodách porovnávali Ugarte-Ruiz *et al.* (2015). Ve studii nebylo potvrzeno, že použití filtrace, pomnožovacího kroku nebo jejich kombinace vede k výraznému zlepšení detekce bakterií rodu *Campylobacter* v odpadních vodách. Naopak typ použité selektivní tuhé půdy záchyt bakterií výrazně ovlivnil. Výrazně lepších výsledků bylo dosaženo s chromogenním médiem CASA, než s mCCDA. Kim *et al.* (2016) zjistili, že přídavek polymyxinu B nebo rifampicinu, případně jejich kombinace do bujónu dle Boltona spolu s teplotou kultivace (42 °C) vede ke zlepšení selektivity izolace *Campylobacter jejuni* z odpadních vod. Sekvenování rDNA dále ukázalo, že hlavními konkurenčními bakterie při izolaci *C. jejuni* z odpadní vody jsou *Enterococcus* sp. a *Pseudomonas aeruginosa*. Khan *et al.* (2009) srovnávali dvě metody pro detekci bakterií rodu *Campylobacter* v povrchových vodách. První postup zahrnoval membránovou filtraci 500 ml vody, selektivní pomnožení filtru v bujónu dle Boltona a vyočkování na mCCDA. Druhá metoda byla založena na centrifugaci 1000 ml vody s následným selektivním pomnožením v Boltonově bujónu a vyočkováním na modifikovaný Karmali agar. V obou případech byla ke konečné identifikaci využita PCR. Oběma metodami bylo zpracováno 699 vzorků povrchových vod a nejčastěji byla prokázána přítomnost *Campylobacter jejuni*. Metodou používající centrifugaci vzorku bylo ale detekováno vyšší množství *Campylobacter coli* (17 %) a ostatních druhů rodu *Campylobacter* (13 %), než metodou s membránovou filtrací (11 % *C. coli*, 3 % ostatních druhů). Výsledky studie naznačují, že konkrétní kultivační postup může ovlivnit poměr identifikovaných druhů. Stejně závěry byly zjištěny i ve studii Ugarte-Ruiz *et al.* (2015). V této práci byl *C. coli* nejčastěji izolován po pomnožení v bujónu dle Prestona a vyočkování na chromogenní médium CASA. Zatímco přímým výsevem na povrch půdy CASA byl získán převážně *C. jejuni*. Abulreesh *et al.* (2005) zjišťovali přítomnost bakterií rodu *Campylobacter* v povrchových vodách a sedimentech. Tři objemy povrchové vody (10, 100 a 1000 ml) byly zfiltrány, membránové filtry selektivně pomnoženy v bujónu dle Prestona a získaná kultura byla vyočkována na mCCDA. Vzorky sedimentu o objemu 0,1, 1 a 5 ml byly přidány přímo

do bujónu dle Prestona. Bakterie rodu *Campylobacter* byly potvrzeny v 10 a 100 ml vzorku odpadní vody a 0,1 a 1 ml vzorku sedimentu. Při zpracování vyšších objemů (1000 ml a 5 ml) nebylo možné cílové bakterie prokázat vzhledem k vysoké koncentraci doprovodné mikroflóry. Získané izoláty byly pomocí PCR identifikovány jako *C. jejuni* nebo *C. coli*.

Metoda membránové filtrace je podstatou zkoušky dle normy ČSN ISO 17995 – Jakost vod – Stanovení termotolerantních bakterií rodu *Campylobacter*. Tři objemy zkoušené vody (10, 100 a 1000 ml) jsou zfiltrovány a membránové filtry inkubovány ve 100 ml bujónu dle Boltona a bujónu dle Prestona v mikroaerofilním prostředí při 37 °C po dobu 44 ± 4 hodin. Získané kultury jsou vyočkovány na mCCDA agar a inkubovány v mikroaerofilním prostředí při 41,5 °C po dobu 44 ± 4 hodin. Přestože je norma ČSN ISO 17995 určena přímo pro detekci bakterií rodu *Campylobacter* ve vodách, nebyla v naší práci použita, neboť je vhodná pouze pro filtrovatelné vody. Filtrace odpadních vod je vzhledem k vysokému znečištění velmi obtížná. Jak bylo v průběhu naší práce zjištěno, u nátoků do ČOV bylo možné filtrovat nanejvýš vzorky o objemu 10 ml, u méně znečištěných odtoků z ČOV pak vzorky o objemu 100 ml. Filtrace vzorků o objemu 1000 ml není u odpadních vod možná. Nicméně záchyt bakterií rodu *Campylobacter* v odpadních vodách by mohlo zvýšit použití vysoce selektivního bujónu dle Prestona, který se v normě ČSN ISO 17995 povinně používá. Tyto získané poznatky budou využity pro další zpracovávání vzorků odpadních vod.

Podobně Pitkänen (2013) uvádí, že pro vzorky odpadních vod je použití bujónu dle Prestona nezbytné, neboť bujón dle Boltona je méně selektivní. Ovšem i přes zvýšenou selektivitu pomnožovacího kroku stále může dojít k nadměrnému růstu doprovodné mikroflóry na mCCDA agaru. Tento problém je možné překonat zkrácením kultivační doby z 48 na 24 hodin a zvýšením teploty inkubace při selektivním pomnožení z 37 °C na 41,5 °C.

Norma ČSN EN ISO 10272-1 z července 2006, podle které byl průkaz bakterií rodu *Campylobacter* v naší práci proveden, byla v březnu 2018 nahrazena novou normou, která výrazně pozměnila metodu pro horizontální průkaz bakterií rodu *Campylobacter*. V závislosti na typu vyšetřovaného vzorku a účelu zkoušky je možné využít tři různé detekční postupy. Pro odpadní vodu se jeví jako nejvhodnější postup B, který je doporučován pro vzorky s nízkým počtem bakterií rodu *Campylobacter* a vysokou koncentrací doprovodné mikroflóry. Průkaz je založen na pomnožení 10 ml vzorku v 90 ml bujónu dle Prestona v mikroaerofilním prostředí při 41,5 °C po dobu 24 hodin a vyočkování získané kultury na mCCDA agar. Inkubace probíhá v mikroaerofilním prostředí při 41,5 °C po dobu 44 hodin.

I přesto, že postup dle normy ČSN EN ISO 10272-1 z března 2018 není přímo určen pro odpadní vody, jeví se při tomto typ vzorku jako nejvhodnější. Postup zajišťuje vysokou



selektivitu pomnožovací kroku použitím bujónu dle Prestona, zkrácením inkubační doby na 24 hodin a zvýšením teploty inkubace na 41,5 °C.

#### 4.4 Průkaz bakterií rodu *Enterococcus* v odpadních vodách

Bakterie rodu *Enterococcus* byly prokázány v nátoku do ČOV Račín (vzorek 1) v nátoku a odtoku z ČOV Pardubice (vzorek 3 a 4), ČOV Nový Bydžov (vzorek 5 a 6) a ČOV Poděbrady (vzorek 9 a 10). Ze Slanetz-Bartley agaru bylo celkem získáno 24 izolátů z nichž 18 náleželo do rodu *Enterococcus* a 6 do rodu *Streptococcus*. 15 izolátů bylo identifikováno jako *Enterococcus faecalis* a 3 jako *Enterococcus casseliflavus*. Zástupci rodu *Streptococcus* byly shodně identifikováni jako *Streptococcus uberis*. Maheux *et al.* (2011a) uvádí, v odpadních vodách a výkalech teplokrevných zvířat jsou převládajícími druhy *En. faecalis* a *En. faecium*. Ke stejným závěrům došli i Pinto *et al.* (1999), kteří detekovali bakterie rodu *Enterococcus* v různých typech vod. Z přečištěné odpadní vody bylo získáno 21 izolátů, i nichž 9 bylo identifikováno jako *En. faecalis* a 8 jako *En. faecium*, 3 jako *En. casseliflavus/gallinarum* a 1 jako *En. durans/hirae*.



Obrázek 7A Slanetz-Bartley agar – roztěr ředění  $10^{-2}$ , nátok do ČOV Poděbrady (vzorek 9) (foto autor)  
Obrázek 7B Slanetz-Bartley agar – membránová filtrace 10 ml, odtok z ČOV Poděbrady (vzorek 10) (foto autor)

Bakterie rodu *Enterococcus* byly ve všech případech prokázány metodou roztěru neředěného vzorku odpadní vody, příp. příslušného ředění. Po očkování roztěrem na povrch Slanetz-Bartley agaru došlo vždy k nárůstu izolovaných kolonií, a to i v případě roztěru neředěných nátoků a odtoků z ČOV (obr. 7A). Naopak při využití membránové filtrace u nátoků do ČOV nebyly na filtrech přítomny izolované kolonie, a to bez ohledu na filtrovaný objem. Spojitý nárůst kolonií byl na filtrech přítomen i při filtraci 100 ml odtoků z ČOV. Ovšem pokud bylo filtrováno pouze 10 ml odtoku z ČOV byly na filtrech přítomny zcela

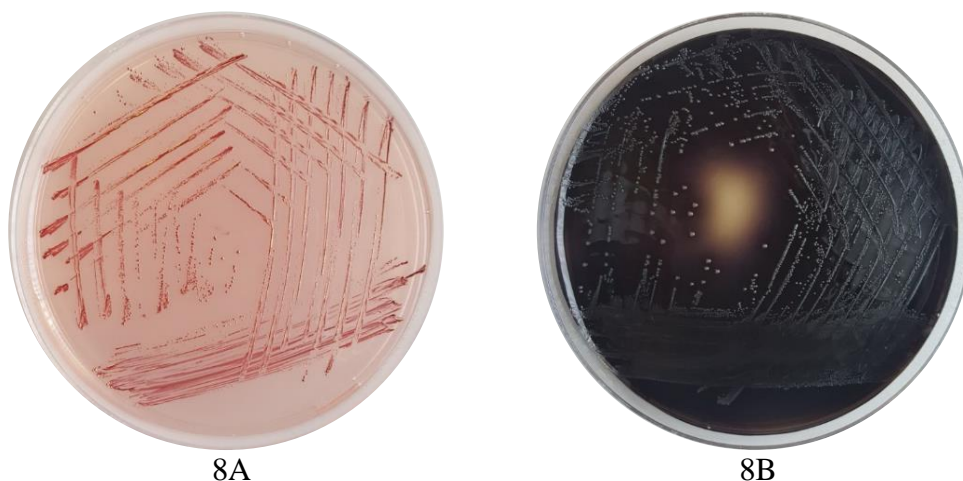
izolované kolonie (obr 7B). Nicméně po přeočkování těchto kolonií z membránových filtrů na Slanetz-Bartley agar v žádném případě nedošlo k nárůstu nové kultury, a to ani po 48 hodinové kultivaci.

Membránovou filtraci k izolaci bakterií rodu *Enterococcus* z odpadních vod využili i Manero *et al.* (2002). Filtry byly nejprve přeneseny na BHI agar a při 37 °C kultivovány 2 hodiny. Po této době byly filtry umístěny na mE agar a kultivovány 48 hodin za stejné teploty. K zjištění přítomnosti enzymu eskulin- $\beta$ -D-glukosidázy byly filtry nakonec přeneseny na ŽE agar. V souladu s předcházejícími studii byly převládajícími druhy ve vyšetřovaných odpadních vodách *En. faecalis* a *En. faecium*. Dále byly identifikovány *En. hirae* a *En. gallinarum*. Kultivaci membránových filtrů na BHI agaru pro obnovení stresovaných buněk využili také Blanch *et al.* (2003). Ve své práci detekovali bakterie rodu *Enterococcus* v městských a nemocničních odpadních vodách a v povrchových vodách, kam ústí výtoky z ČOV. Ve všech typech vyšetřovaných vod opět převládali *En. faecalis* a *En. faecium*. Dalšími často identifikovanými druhy byly *En. hirae* a *En. durans*. Massa *et al.* (2001) využili ke stanovení bakterií rodu *Enterococcus* v řece, do níž ústí výtok z ČOV, kromě membránové filtrace i metodu zalití a MPN. Membránové filtry byly inkubovány na agaru s azidem sodným a maltózou při 37 °C po dobu 48 hodin. Při metodě zalití byl 1 ml příslušného ředění vody zaléván KF agarem a po utužení byly misky inkubovány při 35 °C po dobu 48 hodin. Pro MPN metodu byl zvolen bujón s azidem sodným a dextrózou. Bylo zjištěno, že všechny tři metody poskytly srovnatelné výsledky.

Na Slanetz-Bartley agaru inkubovaném při 37 °C po dobu 24 až 48 hodin rostly bakterie rodu *Enterococcus* v kruhových hladkých a kovově lesklých koloniích. Střed kolonií byl zbarven tmavě karmínově, rovný okraj byl světle růžový. Velikost kolonií se pohybovala v rozmezí 1 až 2 mm (obr. 8A). Jak ale uvádí Domig *et al.* (2003) selektivitu média lze zvýšit inkubací při 44,5 °C. Vyšší kultivační teplota (41,5 °C) byla použita i při prvním odběru u vzorků 3 a 4. V tomto případě získané izoláty při 41,5 °C nerostly a byly identifikovány jako zástupci rodu *Streptococcus*. Zvýšenou teplotu kultivace zvolili při detekci bakterií rodu *Enterococcus* v různých typech vod, včetně odtoků a nátoků do ČOV Harwood *et al.* (2004). Membránové filtry byly kultivovány na mEI agaru při 41 °C po dobu 24 hodin. Suspektní kolonie, u nichž byla potvrzena hydrolýza eskulinu byly subkultivovány na TSA agar (35 °C; 24 hodin). Ze 128 získaných izolátů bylo 42,2 % identifikováno jako *En. faecalis*. Tento druh byl detekován ve všech typech vyšetřovaných vod.

K subkultivaci suspektních kolonií ze Slanetz-Bartley agaru musel být používán KA, neboť na MPA bakterie rodu *Enterococcus* nerostly. Aby byla potvrzena přítomnost enzymu

eskulin- $\beta$ -D-glukosidázy byly suspektní kolonie kultivovány před závěrečnou konfirmací také na ŽE agaru. Tento krok ale neumožnil rozlišit rod *Enterococcus* od rodu *Streptococcus*, jehož zástupci mají taktéž enzym eskulin- $\beta$ -D-glukosidázu. Přítomnost enzymu se projevila černo-hnědým zbarvením okolo kolonií na ŽE agaru, neboť došlo k hydrolyze eskulinu a k detekci vzniklého produktu železitými solemi přítomnými v agaru (obr. 8B).



Obrázek 8A *Enterococcus faecalis* na Slanetz-Bartley agaru (foto autor)

Obrázek 8B *Enterococcus faecalis* na žluč-eskulinovém agaru (foto autor)

#### 4.5 Průkaz termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli* v odpadních vodách

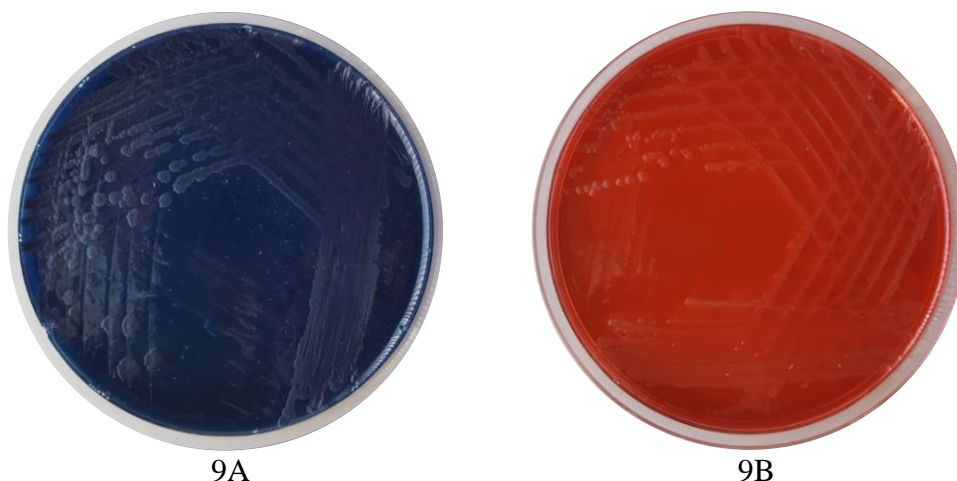
Bakterie *Escherichia coli* byla prokázána ve všech vyšetřovaných vzorcích, kromě odtoku z ČOV Račín (vzorek 2). Termotolerantní koliformní bakterie byly prokázány v nátoce a odtoku z ČOV Pardubice (vzorek 3 a 4), ČOV Nový Bydžov (vzorek 5 a 6), ČOV Kolín (vzorek 7 a 8) a v nátoce do ČOV Račín (vzorek 1) a ČOV Poděbrady (vzorek 9).

K průkazu termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli* byly využity dvě selektivně-diagnostická média. Prvním z nich bylo chromogenní médium Chromocult<sup>®</sup> Coliform agar, který obsahuje specifické substráty pro průkaz enzymů  $\beta$ -D-galaktozidázy a  $\beta$ -D-glukuronidázy a umožňuje simultánní detekci koliformních bakterií a *E. coli*. Jak uvádí Rompré *et al.* (2002), právě enzymy  $\beta$ -D-galaktozidáza a  $\beta$ -D-glukuronidáza jsou široce využívány pro detekci koliformních bakterií a *E. coli*. Geny kódující tvorbu obou enzymů lze využít také jako cílové sekvence při detekci pomocí PCR.

Druhým používaným médiem byl m-FC agar, který je přímo určen k detekci a stanovení termotolerantních koliformních bakterií metodou membránové filtrace. V normě ČSN 75 7835 je uvedeno, že membránová filtrace a kultivace filtru na m-FC agaru je určena

zejména pro stanovení *E. coli* v povrchové vodě s vysokým obsahem doprovodné mikroflóry. Jak ale uvádí Maheux *et al.* (2011b) m-FC agar je založen na schopnosti bakterií využívat laktózu a růst při teplotě 44,5 °C. Nicméně tyto vlastnosti nejsou, na rozdíl od produkce enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy, specifické pouze pro *E. coli*. Z tohoto důvodu jsou média, která obsahují substráty pro zjištění  $\beta$ -D-glukuronidázové aktivity pro detekci *E. coli* specifitější než m-FC agar. Autor dále uvádí, že na m-FC agaru může falešně pozitivní výsledky způsobit růst bakterií rodu *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Proteus*, a *Yersinia*. Tato skutečnost byla pozorována i v naší práci. Je ale nutné zmínit, že obě selektivně-diagnostické půdy byly kultivovány při 41,5 °C a nikoli 44,5 °C. Snížená teplota kultivace mohla ovlivnit zastoupení vyizolovaných bakterií z obou půd.

Z m-FC agaru bylo celkem získáno 25 izolátů, které vyrůstaly v charakteristických tmavě modrých koloniích. Z těchto izolátů bylo 19 identifikováno jako *E. coli*. V tmavě modrých koloniích dále na m-FC agaru rostly *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia odorifera*, *Raoultella ornithinolytica* a *Kluyvera ascorbata*. Na m-FC agaru byly pozorovány tři typy tmavě modrých kolonií, přičemž *E. coli* nejčastěji vyrůstala v nepravidelných, zvrásněných a matných koloniích s vroubkovaným okrajem o velikosti 3 mm (obr. 9A). Dále byly pozorovány drobné kruhové, hladké a lesklé kolonie s rovným okrajem o velikosti 1 mm a třetím typem byly kruhové, zvrásněné a matné kolonie s hladkým okrajem o velikosti 2 mm.



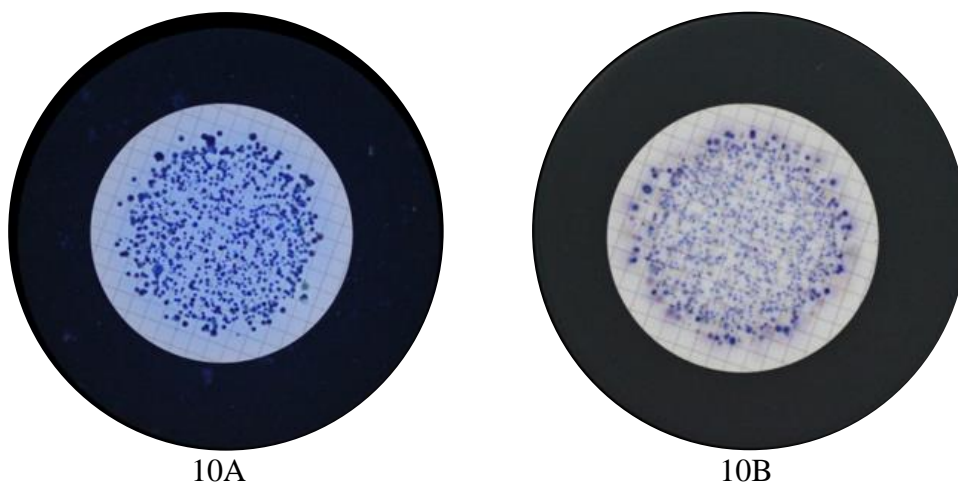
Obrázek 9A *Escherichia coli* na m-FC agaru, typické kolonie (foto autor)

Obrázek 9B *Escherichia coli* na m-FC agaru, atypické kolonie (foto autor)

Ovšem na m-FC agaru se vyskytovaly i atypické červeně zbarvené kolonie. Takové kolonie byly velké 4 mm, nepravidelného tvaru, na povrchu zvrásněné a matné, s vyvýšeným středem a vroubkovaným okrajem. Půda v okolí kolonií byla zbarvena intenzivně červeně

(obr. 9B). Z celkem 8 izolátů, které na m-FC agaru vyrůstaly v atypických koloniích byly 4 identifikovány jako *E. coli*. Zbývající 4 izoláty byly identifikovány jako *Raoutella ornithinolytica*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* a *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*.

Z Chromocult® Coliform agaru bylo získáno 16 izolátů, které vyrůstaly v tmavě modrých nebo fialových koloniích. Z těchto izolátů bylo 15 identifikováno jako *E. coli*. Pouze jeden izolát byl identifikován jako *Yersinia rohdei*. Z termotolerantních koliformních bakterií, které vyrůstaly v růžových koloniích, byl nejčastěji izolován *Ci. freundii*. Dále byly zjištěny *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* a *Enterobacter aerogenes*.



Obrázek 10A m-FC agar – membránová filtrace 10 ml, odtok z ČOV Nový Bydžov (vzorek 6) (foto autor)

Obrázek 10B Chromocult® Coliform agar – membránová filtrace 10 ml, odtok z ČOV Nový Bydžov (vzorek 6) (foto autor)

Ve všech případech byly termotolerantní koliformní bakterie a *E. coli* prokázány metodou roztěru neředěného vzorku odpadní vody, příp. příslušného ředění. U nátoků do ČOV byl na membránových filtrech po 24 hodinové inkubaci při 41,5 °C na obou selektivně diagnostických-půdách pozorován spojitý nárůst kolonií, bez ohledu na filtrovaný objem. Spojitý nárůst na obou selektivně diagnostických-půdách byl pozorován i po filtraci 100 ml odtoků z ČOV. Izolované kolonie byly na membránových filtrech přítomny pouze po filtraci 10 ml odtoků z ČOV (obr. 10A a 10B). Po přeočkování kolonií z membránových filtrů nedošlo ani na jednom médiu k nárůstu nových kolonií, a to ani v případě, že byla doba kultivace prodloužena na 48 hodin. Membránovou filtraci použil k detekci termotolerantních koliformních bakterií a *E. coli* v odpadních a povrchových vodách Wohlsen (2011). Po filtraci 100 ml vody byly filtry umístěny na m-FC agar a chromogenní médium Brilliance *E. coli*/Coliform Selective agar. Obě půdy byly inkubovány 4 hodiny při 30 °C a 16 hodin při

44,5 °C. Z m-FC agaru bylo izolováno 1242 suspektních kolonií, z nichž 1128 (90,8 %) bylo potvrzeno jako termotolerantní koliformní bakterie. Z těchto izolátů bylo 963 identifikováno jako *E. coli*. Z Brilliance *E. coli*/Coliform Selective agaru bylo izolováno 1171 typických kolonií pro *E. coli*, z nichž 1157 (98,8 %) bylo pozitivně potvrzeno.

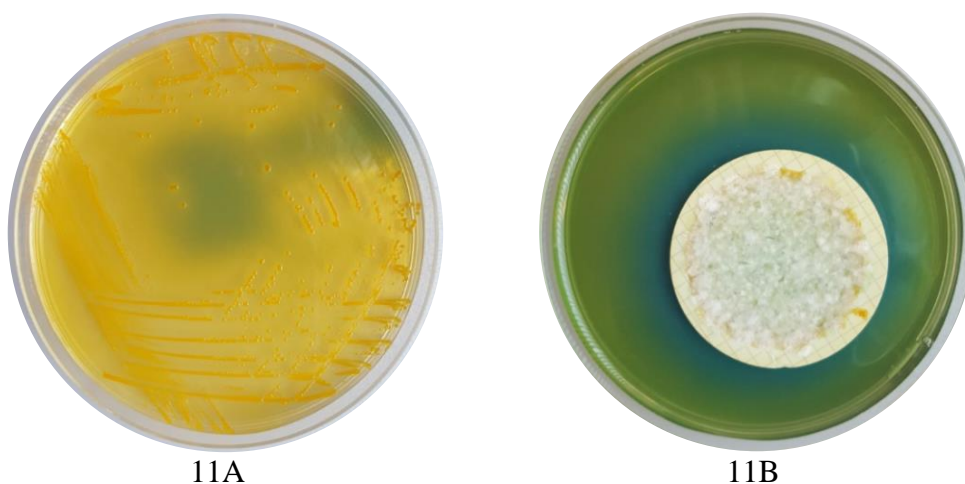
#### 4.6 Průkaz bakterií rodu *Aeromonas* v odpadních vodách

Bakterie rodu *Aeromonas* byly prokázány ve všech testovaných vzorcích odpadních vod. Nejčastěji izolovaným druhem byla *Aeromonas caviae*, která byla kromě m-*Aeromonas* agaru zachycena i na jiných selektivních půdách. V nátoku do ČOV Poděbrady (vzorek 9) byla *A. caviae* izolována z cetrimidového agaru a v odtoku z ČOV Poděbrady (vzorek 10) byla ve dvou případech zachycena na CIN agaru. Mezi další identifikované druhy patřila *Aeromonas sobria*, která byla izolována z nátoky a odtoku z ČOV Račín (vzorky 1 a 2) a v nátoky do ČOV Kolín (vzorek 7). V nátoky do ČOV Račín (vzorek 1) byla identifikována také *Aeromonas hydrophila*. V odtoku z ČOV Nový Bydžov (vzorek 6) byla potvrzena přítomnost *Aeromonas jandaei* a v odtoku z ČOV Kolín (vzorek 8) byla zachycena *Aeromonas ichthiosmia*. V nátoky a odtoku z ČOV Račín (vzorky 1 a 2) byly bakterie rodu *Aeromonas* prokázány až při opakovaném odběru. *A. caviae* byla převládajícím druhem i ve studii Varela *et al.* (2016). Ze 122 izolátů bakterií rodu *Aeromonas* získaných z nátoků a odtoků ČOV a nemocničních odpadních vod bylo jako *A. caviae* identifikováno 50 % izolátů. 41 % izolátů bylo identifikováno jako *A. hydrophila*. Oba druhy byly navíc prokázány ve všech typech odebíraných vzorků. Ostatní druhy tvořily méně než 10 % izolátů a byly zjištěny jen v některých typech vod.

Araujo *et al.* (1991) zjistili, že druhové zastoupení bakterií rodu *Aeromonas* ve vodách souvisí s úrovní fekálního znečištění. *Aeromonas caviae* byla ve studii převládajícím druhem v odpadních vodách a vodách s vysokou fekální kontaminací. V méně znečištěných vodách byly téměř rovnoměrně zastoupeny *A. caviae* a *A. hydrophila*. Ve vodách s nízkou fekální kontaminací nad ostatními druhy převažovala *A. sobria*. Pianetti *et al.* (2004) se ve své práci analyzovali povrchové vody používaná k zavlažování. Bakterie rodu *Aeromonas* byly prokázány v 11 z celkem 13 odběrových míst. Ze 111 izolovaných kmenů bylo 48,64 % identifikováno jako *A. caviae*, 35,13 % jako *A. sobria* a 16,22 % jako *A. hydrophila*. Sharma *et al.* (2005) izolovali bakterie rodu *Aeromonas* z indické řeky Narmady. Ze 168 odebraných vzorků bylo získáno 30 izolátů. Nejvíce zastoupenými druhy byly *A. hydrophila*, *A. veronni* biovar *veronni* a *A. veronni* biovar *sobria*. Figueira *et al.* (2011) při analýze různých druhů

vod zjistili, že v odpadních vodách převládaly *A. media* a *A. punctata*. V povrchové vodě byla nejvíce zastoupeným druhem *A. veronii* a v ionizované vodě převládala *A. hydrophila*.

K selektivní izolaci bakterií rodu *Aeromonas* byl využit m-*Aeromonas* agar, na kterém aeromonády vyrůstají v kulatých vypouklých žlutých koloniích o velikosti 1-3 mm. Takové kolonie byly popsány u všech vyšetřovaných vzorků, ale v žádném případě nebyly identifikovány jako bakterie rodu *Aeromonas*. U izolátů nebyla potvrzena tvorba oxidázy a byly identifikovány jako bakterie rodu *Klebsiella* nebo *Raoutella*. Nejčastěji byla izolována *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae* a *K. oxytoca*. V nátoku do ČOV Pardubice (vzorek 3) byla identifikována *R. oxytoca* a v nátoku do ČOV Nový Bydžov (vzorek 5) *R. ornithinolytica*.



Obrázek 11A *Aeromonas caviae* na m-*Aeromonas* agaru (foto autor)

Obrázek 11B m-*Aeromonas* agar – membránová filtrace 10 ml, nátok do ČOV Poděbrady (vzorek 9) (foto autor)

Bakterie rodu *Aeromonas* na m-*Aeromonas* agaru rostly ve třech typech kolonií. Morfologie kolonií nebyla specifická pro konkrétní druh aeromonád. Prvním typem byly nepravidelné, na povrchu matné a zvrásněné suché kolonie o velikost 2 až 3 mm. Kolonie byly ve středu zbarveny tmavě oranžově, vroubkovaný okraj byl světle žlutý až béžový. Kolonie v základním nátěru byly po 24 hodinové kultivaci při 30 °C většinou zbarveny modře, nebo ke vzniku modrého zbarvení došlo po 24 hodinách v lednici při 4°C. Po 48 hodinách došlo vždy k zmodrání celé půdy. Druhým typem byly drobné, kulaté, hladké a lesklé kolonie o velikosti 1 mm. Střed kolonií byl zbarven tmavě oranžově, rovný okraj byl zbarven světle žlutě. Půda v okolí kolonií byla zbarvena žlutě nebo zeleně, ke změně barvy nedocházelo ani po 48 hodinách při 4 °C (obr. 11A) Třetím typem byly zvlněné, suché, matné a zvrásněné kolonie o velikosti 1 až 2 mm. Celé kolonie byly zbarveny tmavě oranžově, okraj byl vroubkovaný, střed nevystupoval. Půda v okolí kolonií byla zbarvena žlutě nebo zeleně,

barva se neměnila ani po 48 hodinách při 4 °C. Všechny typy kolonií bylo možné z m-*Aeromonas* agaru přeočkovat nejdéle do 48 hodin po zaočkování. Po uplynutí této doby již nedošlo na nových půdách k nárůstu vyočkovaných kolonií.

Z membránových filtrů nebyly izolovány žádné kolonie, neboť filtry po 24 hodinové inkubaci při 30 °C byly přerostlé plísněmi, a to nezávisle na typu vzorku a přefiltrovaném objemu odpadní vody (obr. 11B). Membránovou filtraci a kultivaci filtrů na m-*Aeromonas* agaru využil ke stanovení bakterií rodu *Aeromonas* v povrchových vodách také Pettibone (1998). Kultivace membránových filtrů ale probíhala v anaerobním prostředí při 30 °C po dobu 18 až 22 hodin. Po anaerobní kultivaci byly misky s filtry inkubovány aerobně při 30 °C po dobu 4 hodin. Množství bakterií rodu *Aeromonas* se v letních měsících ve vyšetřovaných vodách pohybovalo mezi 18 až  $4 \cdot 10^3$  CFU/ml. Pro sledování koncentrace bakterií rodu *Aeromonas* během procesu čištění odpadních vod použili Stecchini a Domenis (1994) metodu rozřezu na dvě selektivní média. Selektivními půdami byly zvoleny m-*Aeromonas* agar a škrobový agar s ampicilinem. Během procesu čištění pokleslo množství bakterií rodu *Aeromonas* o 96,5 %. Ve vzorcích převládala *A. caviae*, v menší míře byla identifikována *A. veronii* biotyp *veronii*. Škrobový agar s ampicilinem ve studii poskytl vyšší selektivitu, neboť 32,3 % typických kolonií bylo potvrzeno jako *Aeromonas* spp. Z m-*Aeromonas* agaru bylo pozitivně potvrzeno 25,9 % suspektních kolonií. Zařazení pomnožovací kroku při detekci bakterií rodu *Aeromonas* v různých místech procesu čištění odpadních vod využili Martone-Rocha *et al.* (2010). Příslušné ředění vzorků ( $10^0$ - $10^8$ ) bylo pomnoženo v alkalické peptonové vodě a kultura vyočkována na krevní agar s ampicilinem. Bakterie rodu *Aeromonas* byly prokázány v 72,40 % vzorků surové odpadní vody, v 55,2 % vzorcích odtoku z anaerobní nádrže a v 48,3 % vzorcích odtoku z aerobní nádrže. Celkem bylo izolováno 13 druhů aeromonád. Převládajícím druhem v surové odpadní vodě byla *A. caviae* (33 % izolátů), následovaná *A. allosaccharophila* (17,5 % izolátů). Naopak v upravené vodě došlo k nárůstu *A. allosaccharophila* (46,6 % izolátů) a poklesu *A. caviae* (8 % izolátů).

#### **4.7 Průkaz bakterií rodu *Pseudomonas* v odpadních vodách**

Bakterie rodu *Pseudomonas* byly prokázány v nátoku do ČOV Račín (vzorek 1), ČOV Pardubice (vzorek 3), ČOV Nový Bydžov (vzorek 5), ČOV Kolín (vzorek 7) a ČOV Poděbrady (vzorek 9). V odtoku žádné ČOV nebyly bakterie rodu *Pseudomonas* detekovány. Z cetrimidového agaru bylo získáno celkem 21 izolátů, z nichž 15 bylo identifikováno jako bakterie rodu *Pseudomonas*. Převládajícím druhem byla *Pseudomonas aeruginosa*



(14 izolátů), v jednom případě byla v nátoku do ČOV Poděbrady (vzorek 9) identifikována *Pseudomonas putida*.

Ve všech případech byly bakterie rodu *Pseudomonas* prokázány metodou roztěru neředěného vzorku odpadní vody, příp. příslušného ředění. Cetrimidový agar bylo nutné kultivovat 48 hodin, po 24 hodinách většinou na miskách nebyly přítomny žádné kolonie. U všech nátoků do ČOV nedošlo k nárůstu kolonií na miskách s ředěním  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  a suspektní kolonie byly pozorovány pouze na miskách s ředěním  $10^{-1}$  a  $10^{-2}$ . Přechištění odpadních vod zřejmě vedlo k úplnému vyloučení bakterií rodu *Pseudomonas* z odpadních vod, neboť u všech vyšetřovaných odtoků z ČOV nedošlo na cetrimidovém agaru k nárůstu žádných kolonií, nezávisle na použitém ředění.



Obrázek 12 Cetrimidový agar – suspektní kolonie *Pseudomonas aeruginosa*, roztěr ředění  $10^{-1}$ , nátok do ČOV Nový Bydžov (vzorek 5), (označeno červenými šipkami) (foto autor)

Na membránových filtrech kultivovaných na cetrimidovém agaru došlo vždy k nárůstu kolonií už po 24 hodinách kultivace, a to i v případě odtoků z ČOV. Nicméně, bez ohledu na typ vzorku (nátok/odtok) a filtrovaný objem vody nebyly možné na membránových filtrech rozlišit suspektní kolonie. Kolonie nerostly izolovaně a na filtru tvořily mukózní spojitý povlak, který často přesahoval okraj filtru. Při pokusech přeočkovat kulturu nedošlo na nových půdách k nárůstu kolonií ani po 48 hodinách kultivace. Naproti tomu, Luczkiewicz *et al.* (2015) ve své studii pomocí membránové filtrace prokázali přítomnost bakterií rodu *Pseudomonas* v nátoku i odtoku z ČOV, a také v mořské vodě, do které ústí výtok z ČOV. Membránové filtry byly inkubovány na agaru pro pseudomonády při 37 °C. Z celkem 12 identifikovaných druhů převládala ve všech třech typech vzorků *P. putida*. Dokonce bylo pozorováno, že koncentrace *P. aeruginosa* byla v odtoku vyšší než v surové odpadní vodě.

Kolonie bakterií rodu *Pseudomonas* se na cetrimidovém agaru vyznačovaly intenzivní pigmentací a charakteristickou jasmínovou vůní (obr. 12). V průběhu práce byly pozorovány různé barvy pigmentace od intenzivně žluté, přes žlutozelenou, zelenou až zeleno-růžovou.

## 5 ZÁVĚR

Pro mikrobiologický rozbor bylo shromážděno 10 vzorků odpadních vod z 5 čistíren odpadních (ČOV) vod různých velikostí. Vždy byl současně odebírán nátok do ČOV (5 vzorků) a odtok z ČOV (5 vzorků). Z odebraných vzorků byly izolovány jednak tradiční indikátorové mikroorganismy fekálního znečištění (termotolerantní koliformní bakterie, *Escherichia coli* a intestinální enterokoky), jednak patogenních a podmíněně patogenních bakterií z rodů *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Aeromonas* a *Pseudomonas*. Z 10 vyšetřovaných vzorků bylo celkem izolováno 205 kmenů, u kterých byl proveden test na tvorbu katalázy a oxidázy a barvení dle Grama. Ke konečné identifikaci byly využity identifikační soupravy z řady MIKROLATEST®.

Bakterie rodu *Salmonella* byly horizontální metodou dle ČSN EN ISO 6579-1 prokázány ve 40 % vzorků, a to vždy současně v nátoku a odtoku z ČOV. Nejúčinnějším postupem pro izolaci bakterií rodu *Salmonella* z odpadních vod byl ten, který zahrnoval předpomnožení v PPV médiu, selektivní pomnožení v MKTTn médiu a vyočkování na Rambach® agar. Selektivní pomnožení v RVS médiu potlačilo i samotné bakterie rodu *Salmonella*. Na XLD agaru docházelo k značnému nárůstu doprovodné mikroflóry, zejména pak bakterií rodu *Proteus*, což znemožňovalo izolovat suspektní kolonie.

Pro průkaz bakterií rodu *Yersinia* v odpadních vodách byly v průběhu práce použity dvě normy. Ve vzorcích 1 až 8 byl používán postup dle normy ČSN EN ISO 10273 z března 2004 a bakterie rodu *Yersinia* byly prokázány v 5 vzorcích (62,5 %). Postup dle normy ČSN EN ISO 10273 z listopadu 2017 byl používán ve vzorcích 9 a 10 a bakterie rodu *Yersinia* nebyly prokázány. Ve všech případech byly bakterie rodu *Yersinia* izolovány z kultur po alkalizaci. Prodloužení doby alkalizace z 20 sekund, které určuje norma, na 40 až 60 sekund vedlo k úplnému potlačení růstu doprovodné mikroflóry na CIN agaru i u silně kontaminovaných nátoků do ČOV, ale nikoli k jednoznačnému zvýhodnění bakterií rodu *Yersinia*.

Bakterie rodu *Campylobacter* nebyly postupem dle ČSN EN ISO 10272-1 z července 2006 prokázány ani v jednom ze vzorků.

Termotolerantní koliformní bakterie, *Escherichia coli* a bakterie z rodu *Enterococcus*, *Aeromonas* a *Pseudomonas* byly prokazovány pomocí metody membránové filtrace a metody roztěru L-hokejkou. Všechny izoláty byly získány pouze metodou roztěru. Při očkování

roztěrem bylo po desítkovém ředění vzorků odpadních vod možné získat velmi dobře izolované kolonie.

Metoda membránové filtrace se pro silně kontaminované odpadní vody ukázala jako zcela nevhodná. Zejména u nátoků do ČOV docházelo k ucpávání pórů membránových filtrů nečistotami. Na membránových filtrech docházelo ke spojitému růstu kolonií a nebylo možné rozeznat suspektní kolonie. K nárůstu izolovaných kolonií na membránových filtrech docházelo v některých případech po přefiltrování 10 ml odtoku z ČOV. Nicméně u kolonií přeočkovanych z membránových filtrů nedošlo v žádném případě na nových selektivně-diagnostických půdách k opětovnému nárůstu.

Bakterie rodu *Aeromonas* a bakterie *Escherichia coli* byly prokázány ve všech vyšetřovaných vzorcích. Termotolerantní koliformní bakterie byly prokázány v 80 % vzorků a bakterie rodu *Enterococcus* v 70 % vzorků. Bakterie rodu *Pseudomonas* byly prokázány v 50 % vzorků, a to vždy v nátoků do ČOV.

Bakterie izolované z odpadní vody velmi často na příslušných selektivně-diagnostických médiích vyrůstaly v atypických koloniích, a naopak v typických koloniích vyrůstaly bakteriální druhy, pro které nebyla selektivně-diagnostická půda primárně určena. Tento jev se vyskytoval zejména u m-*Aeromonas* agarů, kde v typických koloniích pro bakterie rodu *Aeromonas* rostly bakterie rodu *Klebsiella* nebo *Raoutella*. Na Rambach® agarů a CIN agarů vyrůstali v charakteristických koloniích pro rod *Salmonella* resp. *Yersinia* zástupci rodu *Citrobacter*.

Průkaz bakterií v odpadních vodách pouze pomocí klasických kultivačních metod je nedostačující. Selektivní tlak používaných médií často nedokáže potlačit vysoké množství doprovodné mikroflóry. Nepříznivé podmínky v odpadních vodách mohou u bakterií způsobit tvorbu VBNC forem nebo ovlivnit růst a vzhled bakteriálních kolonií na selektivně-diagnostických půdách. Vhodným řešením je používat současně s kultivačním průkazem i jiný způsob detekce bakterií – např. metody molekulární biologie.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abulreesh, H.H., Paget, T.A., Goulder, R., 2005. Recovery of thermophilic campylobacters from pond water and sediment and the problem of interference by background bacteria in enrichment culture. *Water Research*. Vol. 39, no. 13, s. 2877-2882. ISSN 1879-2448.
- Alexandrino, M., Grohmann, E., Szewzyk, U., 2004. Optimization of PCR-based methods for rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Yersinia enterocolitica* serovar 0:3 in wastewater samples. *Water Research*. Vol. 38, no. 5, s. 1340-1346. ISSN 1879-2448.
- Alhamlan, F.S., Al-Qahtani, A.A., Al-Ahdal, M.N., 2015. Recommended advanced techniques for waterborne pathogen detection in developing countries. *Journal of Infection in Developing Countries*. Vol. 9, no. 2, s. 128-135. ISSN 2036-6590.
- Araujo, R.M., Arribas, R.M., Pares, R., 1991. Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. *Journal of Applied Bacteriology*. Vol. 71, no. 2, s. 182-186. ISSN 2056-5232.
- Arvanitidou, M., Stathopoulos, G.A., Constantinidis, T.C., Katsouyannopoulos, V., 1995a. The occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. in river and lake waters. *Microbiological Research*. Vol. 150, n. 2, s. 153-158. ISSN 1618-0623.
- Arvanitidou, G.A., Constantinidis, T.C., Katsouyannopoulos, V., 1995b. Survey on *Campylobacter* and *Yersinia* spp. occurrence in sea and river waters in Northern Greece. *The Science of the Total Environment*. Vol. 171, no. 1-3, s. 101-106. ISSN 1879-1026.
- Arvanitidou, M., Papa, A., Constantinidis, T.C., Danielides, V., Katsouyannopoulos, V., 1997. The occurrence of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. in surface waters. *Microbiological Research*. Vol. 152, no. 4, s. 395-397. ISSN 1618-0623.
- Aw, T.G., Rose, J.B., 2012. Detection of pathogens in water: from phylochips to qPCR to pyrosequencing. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 23, no. 3, s. 422-430. ISSN 1879-0429.
- Badurová, J., 2011. Mikrobiální znečištění vypouštěných odpadních vod městských čistíren. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace*. Vol. 53, no. 3, s. 17-19. ISSN 1805-6555.

- Baudart, J., Lebaron, P., 2010. Rapid detection of *Escherichia coli* in waters using fluorescent in situ hybridization, direct viable counting and solid phase cytometry. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 109, no. 4, s. 1253-1264. ISSN 1365-2672.
- Baudart, J., Guillaume, C., Mercier, A., Lebaron, P., Binet M., 2015. Rapid quantification of viable *Legionella* in nuclear cooling tower waters using filter cultivation, fluorescent in situ hybridization and solid-phase cytometry. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 118, no. 5, s. 1238-1249. ISSN 1365-2672.
- Baudišová, D., Benáková, A., 2011. Detekce patogenních bakterií v odpadních vodách. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace*. Vol. 53, no. 5, s. 1-20. ISSN 1805-6555.
- Blanch, A.R., Caplin, J.L., Iversen, A., Kühn, I., Manero, A., Taylor, H.D., Vilanova, X., 2003. Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 94, no. 6, s. 994-1002. ISSN 1365-2672.
- Blumenthal, U.J., Mara, D.D., Peasey, A., Ruiz-Palacios, G., Stott, R., 2000. Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used. *Bulletin of the World Health Organization*. Vol. 78, no. 9, s. 1104-1116. ISSN 1564-0604.
- Bonetta, S., Borelli, E., Bonetta, S., Conio, O., Palumbo, F., Carraro, E., 2011. Development of a PCR protocol for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in surface water. *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 177, no. 1-4, s. 493-503. ISSN 1573-2959.
- Bonetta, S., Pigmata, C., Lorenzi, E., De Ceglia, M., Meucci, L., Bonetta S., Gilli, G., Carraro E., 2016. Detection of pathogenic *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in wastewater by PCR assay. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol. 23, no. 15, s. 15302-15309. ISSN 1614-7499.
- Botes, M., De Kwaadsteniet, M., Cloete, T.E., 2013. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 405, no. 1, s. 91-108. ISSN 1618-2650.
- Bozcal, E., Uzel, A., Aydemir, S., Skurnik, M., 2015. Isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains from different sources in Izmir region, Turkey. *Folia Microbiologica*. Vol. 60, no. 6, s. 523-529. ISSN 1874-9356.
- Catalan, V., Garcia, F., Moreno, C., Vila, M.J., Apraiz, D., 1997. Detection of *Legionella pneumophila* in wastewater. *Research in Microbiology*. Vol. 148, no. 1, s. 71-78. ISSN 1769-7123.

- Catalao Dionisio, L.P., Joao, M., Soares Ferreira, V., Leonor Fidalgo, M., Esther, M., García Rosado, M.E., Borrego, J.J., 2000. Occurrence of *Salmonella* spp in estuarine and coastal waters of Portugal. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 78, no. 1, s. 99-106. ISSN 1572-9699.
- Cenciarini-Borde C., Courtois, S., La Scola B., 2009. Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools. *Future Microbiology*. Vol. 4, no. 1, s. 45-64. ISSN 1746-0921.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., Figueras, M.J., 2008. Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environmental Microbiology*. Vol. 10, no. 6, s. 1635-1640. ISSN 1462-2920.
- Costán-Longares, A., Montemayor, M., Payán, A., Méndes, J., Jofre, J., Mujeriego, R., Lucena F., 2008. Microbial indicators and pathogens: Removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. *Water Research*. Vol. 42, no. 17, s. 4439-4448. ISSN 1879-2448
- ČSN 75 7835, 2009. *Jakost vod – Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a Escherichia coli*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
- ČSN EN ISO 5667-1, 2007. *Jakost vod – Odběr vzorků – Část 1: Návod pro návrh programu odběru vzorků a pro způsoby odběru vzorků*. Praha: Český normalizační institut.
- ČSN EN ISO 6579-1, 2017. *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu, stanovení počtu a sérotypizace bakterií rodu Salmonella – Část 1: Průkaz bakterií rodu Salmonella*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
- ČSN EN ISO 7899-2, 2001. *Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků – Část 2: Metoda membránových filtrů*. Praha: Český normalizační institut.
- ČSN EN ISO 8199, 2008. *Jakost vod – Obecný návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami*. Praha: Český normalizační institut.
- ČSN EN ISO 9308-1, 2015. *Kvalita vod – Stanovení Escherichia coli a koliformních bakterií – Část 1: Metoda membránových filtrů pro vody s nízkým obsahem doprovodné mikroflóry*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
- ČSN EN ISO 10272-1, 2006. *Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Campylobacter spp. – Část 1: Metoda průkazu*. Praha: Český normalizační institut.

- ČSN EN ISO 10272-1, 2018. *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu bakterií rodu Campylobacter – Část 1: Metoda průkazu*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví
- ČSN EN ISO 10273, 2004. *Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu suspektních patogenních Yersinia enterocolitica*. Praha: Český normalizační institut.
- ČSN EN ISO 10273, 2017. *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu patogenních Yersinia enterocolitica*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
- ČSN EN ISO 16266, 2008. *Jakost vod – Stanovení Pseudomonas aeruginosa – Metoda membránových filtrů*. Praha: Český normalizační institut.
- ČSN EN ISO 19458, 2007. *Jakost vod – Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu*. Praha: Český normalizační institut.
- ČSN ISO 5667-10, 1996. *Jakost vod. Odběr vzorků. Část 10: Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod*. Praha: Český normalizační institut.
- ČSN ISO 17995, 2010. *Jakost vod – Stanovení termotolerantních bakterií rodu Campylobacter*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
- ČSN ISO 19250, 2011. *Jakost vod – Průkaz přítomnosti bakterií rodu Salmonella*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví.
- Dekker, D.M., Krumkamp, R., Sarpong, N., Frickmann, H., Boahen, K.G., Frimpong, M., Asare, R., Larbi, R., Hagen, R.M., Poppert, S., Rabsch, W., Marks, F., Sarkodie, Y.A., May, J., 2015. Drinking water from dug wells in rural Ghana — *Salmonella* contamination, environmental factors, and genotypes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol. 12, no. 4, s. 3535-3546. ISSN 1660-4601.
- Diergaardt, S.M., Venter, S.N., Spreeth, A., Theron, J., Brözel, V.S., 2004. The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. *Water Research*. Vol. 38, no. 10, s. 2589-2595. ISSN 1879-2448.
- Domig, K.J., Mayer, H.K., Kneifel, W., 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 88, no. 2-3, s. 147-164. ISSN 1879-3460.



- Dutil, S., Tessier, S., Veillette, M., Laflamme, C., Mériaux, A., Leduc, A., Barbeau, J., Duchaine, C., 2006. Detection of *Legionella* spp. by fluorescent *in situ* hybridization in dental unit waterlines. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 100, no. 5, s. 955-963. ISSN 1365-2672.
- Economou, V., Gousia, P., Kansouzidou, A., Sakkas, H., Karanis, P., Papadopoulou, C., 2013. Prevalence, antimicrobial resistance and relation to indicator and pathogenic microorganisms of *Salmonella enterica* isolated from surface waters within an agricultural landscape. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. Vol. 216, no. 4, s. 435-444. ISSN 1618-131X.
- El-Sherif, A.M., Elmoosalami, M.K., 1998. Rambach agar as a new plate differential medium for the identification of some enteric pathogens in meat products. *European Food Research and Technology*. Vol. 207, no. 2, s. 160-163. ISSN 1438-2385.
- Espigares, E., Bueno, A., Espigares, M., Gálvez, R., 2006. Isolation of *Salmonella* serotypes in wastewater and effluent: Effect of treatment and potential risk. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. Vol. 209, no. 1, s. 103-107. ISSN 1618-131X.
- Falcão, J.P., Brocchi, M., Proença-Módena, J.L., Acrani, G.O., Corrêa, E.F., Falcão, D.P., 2004. Virulence characteristics and epidemiology of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* other than *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis* isolated from water and sewage. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 96, no. 6, s. 1230-1236. ISSN 1365-2672.
- Fan, H., Wu, Q., Kou, X., 2008. Co-detection of five species of water-borne bacteria by multiplex PCR. *Life Science Journal*. Vol. 5, no. 4, s. 47-54. ISSN 2372-613X.
- Figueira, V., Vaz-Moreira, I., Silva, M., Manaia, C.M., 2011. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Research*. Vol. 45, no. 17, s. 5599-5911. ISSN 1879-2448.
- Garcia-Armisen, T., Servais, P., 2004. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent *in situ* hybridization. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 58, no. 2, s. 269-279. ISSN 1872-8359.
- Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corrêa, A., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas, S., 2010. Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*. Vol. 44, no. 15, s. 4325-4339. ISSN 1879-2448
- Godfree, A., Farrell, J., 2005. Processes for managing pathogens. *Journal of Environmental Quality*. Vol. 34, no. 1, s. 105-113. ISSN 1537-2537.

- Harwood, V.J., Delahoya, N.C., Ulrich, R.M., Kramer, M.F., Whitlock, J.E., Garey, J.R., Lim, D.V., 2004. Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 38, no. 6, s. 476-482. ISSN 1472-765X.
- Helmi, K., Barthod, F., Méheut, G., Henry, A., Poty, F., Laurent, F., Charni-Ben-Tabassi, N., 2015. Methods for microbiological quality assessment in drinking water: A comparative study. *Journal of Water and Health*. Vol. 13, no. 1, s. 34-41. ISSN 1996-7829.
- Hoefel, D., Grooby, W.L., Monis, P.T., Andrews, S., Saint, C.P., 2003. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 55, no. 3, s. 585-597. ISSN 1872-8359.
- Cheyne, B.M., Van Dyke, M.I., Anderson, W.B., Huck, P.M., 2009. An evaluation of methods for the isolation of *Yersinia enterocolitica* from surface waters in the Grand River watershed. *Journal of Water and Health*. Vol. 7, no. 3, s. 392-403. ISSN 1996-7829.
- Cheyne, B.M., Van Dyke, M.I., Anderson, W.B., Huck, P.M., 2010. The detection of *Yersinia enterocolitica* in surface water by quantitative PCR amplification of the *ail* and *yadA* genes. *Journal of Water and Health*. Vol. 8, no. 3, s. 487-499. ISSN 1996-7829.
- Jacob, J., Feuerpfeil, I., Schulze, E., 1996. PCR-mediated DNA fingerprinting of atypical *Campylobacter* strains isolated from surface and drinking water. *Zentralblatt für Bakteriologie*. Vol. 285, no. 1, s. 106-112. ISSN 0934-8840.
- Khan, I.U.H., Gannon, V., Loughborough, A., Jokinen, C., Kent, R., Koning, W., Lapen, D.R., Medeiros, D., Miller, J., Neumann, N., Phillips, R., Robertson, W., Schreier, H., Topp, E., van Bochove, E., Edge, T.A., 2009. A methods comparison for the isolation and detection of thermophilic *Campylobacter* in agricultural watersheds. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 79, no. 3, s. 307-313. ISSN 1872-8359.
- Kheiri, R., Ranjbar, R., Memariani, M., Akhtari, L., 2017. Multiplex PCR for detection of water-borne bacteria. *Water Science & Technology: Water Supply*. Vol. 17, no. 1, s. 169-175. ISSN 1607-0798.
- Kim, J., Oh, E., Banting, G.S., Braithwaite, S., Chui, L., Ashbolt, N.J., Neumann, N.F., Jeon, B., 2016. An improved culture method for selective isolation of *Campylobacter jejuni* from wastewater. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 7. ISSN 1664-302X.

- Kitaguchi, A., Yamaguchi, N., Nasu, M., 2006. Simultaneous enumeration of viable Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. within three hours by multicolor fluorescence in situ hybridization with vital staining. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 65, no. 3, s. 623-627. ISSN 1872-8359.
- Koivunen, J., Siitonen, A., Heinonen-Tanski, H., 2003. Elimination of enteric bacteria in biological–chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. *Water Research*. Vol. 37, no. 3, s. 690-698. ISSN 1879-2448.
- Kong, R.Y.C., Lee, S.K.Y., Law, T.W.F., Law, S.H.W., Wu, R.S.S., 2002. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Research*. Vol. 36, no. 11, s. 2802-2812. ISSN 1879-2448.
- Law, J.W.F., Ab Mutalib, N.S., Chan, K.G., Lee, L.H., 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 5. ISSN 1664-302X.
- Lazcka, O., Campo, F.J.D., Muñoz, F.X., 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. Vol. 22, no. 7, s. 1205-1217. ISSN 1873-4235.
- Lee, J., Deininger, R.A., 2004. Detection of *E. coli* in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence. *Luminescence*. Vol. 19, no. 1, s. 31-36. ISSN 1522-7243.
- Lee, D.Y., Shannon, K., Beaudette, L.A., 2006. Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 65, no. 3, s. 453-467. ISSN 1872-8359.
- Lee, D.Y., Lauder, H., Cruwys, H., Falletta, P., Beaudette, P.F., 2008. Development and application of an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR for detection of wastewater bacterial pathogens. *Science of the Total Environment*. Vol. 398, no. 1-3, s. 203-211. ISSN 1879-1026.
- Levantesi, C., La Mantia, R., Masciopinto, C., Böckelmann, U., Ayuso-Gabella, M.N., Salgot, M., Tandoi, V., Van Houtte, E., Wintgens, T., Grohmann, E., 2010. Quantification of pathogenic microorganisms and microbial indicators in three wastewater reclamation and managed aquifer recharge facilities in Europe. *Science of the Total Environment*. Vol. 408, no. 21, s. 4923-4930. ISSN 1879-1026.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., Faucher, S.P., 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 5. ISSN 1664-302X.

- Lucas F.S., Therial, C., Gonçalves, A., Servais, P., Rocher, V., Mouchel, J.M., 2014. Variation of raw wastewater microbiological quality in dry and wet weather conditions. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol. 21, no. 8, s. 5318-5328. ISSN 1614-7499.
- Luczkiewicz, A., Kotlarska, E., Artichowicz, W., Tarasewicz, K., Fudala-Ksiazek, S., 2015. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol. 22, no. 24, s. 19823-19834. ISSN 1614-7499.
- Maheux, A.F., Bissonnette, L., Boissinot, M., Bernier, J.L.T., Huppé, V., Bérubé, È., Boudreau, D.K., Picard, F.J., Huletsky, A., Bergeron, M.G., 2011a. Method for rapid and sensitive detection of *Enterococcus* sp. and *Enterococcus faecalis/faecium* cells in potable water samples. *Water Research*. Vol. 45, no. 6, s. 2342-2354. ISSN 1879-2448.
- Maheux, A., Bérubé, E., Boudreau, D.K., Cantin, P., Boissinot, M., Bissonnette, L., Rodrigue, L., Bergeron, M.G., 2011b. Ability of three DNA-based assays to identify presumptive *Escherichia coli* colonies isolated from water by the culture based mFC agar method. *Water Research*. Vol. 45, no. 8, s. 2638-2646. ISSN 1879-2448.
- Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., Pal, U.K., 2011. Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An overview. *American Journal of Food Technology*. Vol. 6, no. 2, s. 87-102. ISSN 1557-458X.
- Manero, A., Vilanova, X., Cerdà-Cuéllar, M., Blanch, A.R., 2002. Characterization of sewage waters by biochemical fingerprinting of *Enterococci*. *Water Research*. Vol. 36, no. 11, s. 2831-2835. ISSN 1879-2448.
- Martone-Rocha, S., Piveli, R.P., Matté, G.R., Dória, M.C., Dropa, M., Morita, M., Peternella, F.A., Matté, M.H., 2010. Dynamics of *Aeromonas* species isolated from wastewater treatment system. *Journal of Water and Health*. Vol. 8, no. 4, s. 703-711. ISSN 1996-7829.
- Massa, S., Brocchi, G.F., Peri, G., Altieri, C., Mammina, C., 2001. Evaluation of recovery methods to detect faecal streptococci in polluted waters. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 32, no. 5, s. 298-302. ISSN 1472-765X.
- McLellan, S.L., Eren, A.M., 2014. Discovering new indicators of fecal pollution. *Trends in Microbiology*. Vol. 22, no. 12, s. 697-706. ISSN 1878-4380.
- Mendes Silva, D., Domingues, L., 2015. On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 113, s. 400-411. ISSN 1090-2414.

- Morin, N.J., Gong, Z., Li, X.F., 2004. Reverse transcription-multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1 and *Salmonella* Typhi. *Clinical Chemistry*. Vol. 50, no. 11, s. 2037-2044. ISSN 1530-8561.
- Olsen, J.E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P.E., Popovic, T., Rasmussen, H.N., Olsvik, Ø., 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 28, no. 1, s. 1-78. ISSN 1879-3460.
- Ootsubo, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K., Ezura, Y., 2003. Seven-hour fluorescence in situ hybridization technique for enumeration of *Enterobacteriaceae* in food and environmental water sample. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 95, no. 6, s. 1182-1190. ISSN 1365-2672
- Pettibone, G.W., 1998. Population dynamics of *Aeromonas* spp. in an urban river watershed. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 85, no. 4, s. 723-730. ISSN 1365-2672.
- Phe, M.H., Dossot, M., Guilloteau, H., Block, J.C., 2005. Nucleic acid fluorochromes and flow cytometry prove useful in assessing the effect of chlorination on drinking water bacteria. *Water Research*. Vol. 39, no. 15, s. 3618-3628. ISSN 1879-2448.
- Pianetti, A., Sabatini, L., Bruscolini, F., Chiaverini, F., Ceccehetti, G., 2004. Faecal contamination indicators, salmonella, vibrio and aeromonas in water used for the irrigation of agricultural products. *Epidemiology & Infection*. Vol. 132, no. 2, s. 231-238. ISSN 1469-4409.
- Pinto, B., Pierotti, R., Canale, G., Reali, G., 1999. Characterization of 'faecal streptococci' as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 29, no. 4, s. 258-263. ISSN 1472-765X.
- Pitkänen, T., 2013. Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 95, no. 1, s. 39-47. ISSN 1872-8359.
- Polo, F., Figueras, M.J., Inza, I., Sala, J., Fleisher, J.M., Guarro, J., 1999. Prevalence of *Salmonella* serotypes in environmental waters and their relationships with indicator organisms. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 75, no. 4, s. 285-292. ISSN 1572-9699.
- Quijada, N.M., Fongaro, G., Barandi, C.R.M., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., 2016. Propidium monoazide integrated with qPCR enables the detection and enumeration of infectious enteric RNA and DNA viruses in clam and fermented sausages. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 7. ISSN 1664-302X.

- Ramírez-Castillo, F.Y., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F.J., Harel, J., Guerrero-Barrera, A.L., 2015. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*. Vol. 4, no. 2, s. 307-334. ISSN 2076-0817.
- Rohde, A., Hammerl, J.A., Appel, B., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., 2015. FISHing for bacteria in food – A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria? *Food Microbiology*. Vol. 46, s. 395-407. ISSN 1095-9998.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., De-Roubin, M.R., Laurent, P., 2002. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 49, no. 1, s. 31-54. ISSN 1872-8359.
- Rose, J.B., Dickson, L.J., Farrah, S.R., Carnahan, R.P., 1996. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. *Water Research*. Vol. 30, no. 11, s. 2785-2797. ISSN 1879-2448.
- Sails, A.D., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wareing, D.R.A., Greenway, D.L.A., 2002. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental waters by PCR enzyme-linked immunosorbent assay. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, no. 3, s. 1319-1324. ISSN 1098-5336.
- Saxena G., Bharagava, R.N., Kaithwas, G., Raj, A., 2015. Microbial indicators, pathogens and methods for their monitoring in water environment. *Journal of Water and Health*. Vol. 13, no. 2, s. 319-339. ISSN 1996-7829.
- Servais, P., Garcia-Armisen, T., George, I., Billen, G., 2007. Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): Sources, fate and modelling. *Science of the Total Environment*. Vol. 375, no. 1-3, s. 152-167. ISSN 1879-1026.
- Sharma, A., Dubey, N., Sharan, B., 2005. Characterization of aeromonads isolated from the river Narmada, India. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. Vol. 208, no. 5, s. 425-433. ISSN 1618-131X.
- Skotnikova O.I., Sobolev, A.Yu., Demkin, V.V., Nikolaeva, N.P., Nosova, E.Yu., Isaeva, E.L., Moroz, A.M., Litvinov, V.I., 2000. Application of nested-PCR technique for the diagnosis of tuberculosis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. Vol. 129, no. 6, s. 612-614. ISSN 1573-8221.
- Stecchini, M.L., Domenis, C., 1994. Incidence of *Aeromonas* species in influent and effluent of urban wastewater purification plants. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 19, no. 4, s. 237-239. ISSN 1472-765X.

- Terech-Majewska, E., Pajdak, J., Platt-Samoraj, A., Szczerba-Turek, A., Bancercz-Kisiel, A., Grabowska, K., 2016. Characterization of *Yersinia enterocolitica* strains potentially virulent for humans and animals in river water. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 121, no. 2, s. 554-560. ISSN 1365-2672.
- Topic Popovic, N., Kazazic, S.P., Strunjak-Perovic, I., Barisic, J., Sauerborn Klobucar, R., Kepec, S., Coz-Rakovac, R., 2015. Detection and diversity of aeromonads from treated wastewater and fish inhabiting effluent and downstream waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 120, s. 235-242. ISSN 1090-2414.
- Topic Popovic, N., Kazazic, S.P., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., 2017. Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS. *Environmental Research*. Vol. 152, s. 7-16. ISSN 1096-0953.
- Toranzos, G.A., Alvarez, A.J., Dvorsky, E.A., 1993. Application of the polymerase chain reaction technique to the detection of pathogens in water. *Water Science & Technology*. Vol. 27, no. 3-4, s. 207-210. ISSN 1996-9732.
- Touron, A., Berthe, T., Pawlak, B., Petit, F., 2005. Detection of *Salmonella* in environmental water and sediment by a nested-multiplex polymerase chain reaction assay. *Research in Microbiology*. Vol. 156, no. 4, s. 541-553. ISSN 1769-7123.
- Toze, S., 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research*. Vol. 33, no. 17, s. 3545-3556. ISSN 1879-2448.
- Ugarte-Ruiz, M., Florez-Cuadrado, D., Wassenaar, T.M., Porrero, M.C., Domínguez, L., 2015. Method comparison for enhanced recovery, isolation and qualitative detection of *C. jejuni* and *C. coli* from wastewater effluent samples. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol. 12, no. 3, s. 2749-2764. ISSN 1660-4601.
- van Blerk, G.N., Leibach, L., Mabunda, A., Chapman, A., Louw, D., 2011. Rapid and specific detection of *Salmonella* in water samples using real-time PCR and high resolution melt (HRM) curve analysis. *Water Science & Technology*. Vol. 64, no. 12, s. 2453-2459. ISSN 1996-9732.
- Varela, A.R., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2016. Quinolone resistant *Aeromonas* spp. as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater. *Science of the Total Environment*. Vol. 542, s. 665-671. ISSN 1879-1026.

- Varma, M., Field, R., Stinson, M., Rukovets, B., Wymer, L., Haugland, R. 2009. Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater. *Water Research*. Vol. 43, no. 19, s. 4790-4801. ISSN 1879-2448.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C., 2010. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*. Vol. 28, no. 2, s. 232-254. ISSN 1873-1899.
- Waage, A.S., Vardund, T., Lund, V., Kapperud, G., 1999a. Detection of low numbers of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental water and sewage samples by nested polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 87, no. 6, s. 814-821. ISSN 1365-2672.
- Waage, A.S., Vardund, T., Lund, V., Kapperud, G., 1999b. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 87, no. 3, s. 418-428. ISSN 1365-2672.
- Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W., Boon, N., 2010. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in Biotechnology*. Vol. 28, no. 8, s. 416-424. ISSN 1879-3096.
- Wéry, N., Lhoutellier, C., Ducray, F., Delgenès, J.P., Godon, J.J., 2008. Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Research*. Vol. 42, no. 1-2, s. 53-62. ISSN 1879-2448.
- Wéry, N., Monteil, C., Pourcher, A.M., Godon, J.J., 2010. Human-specific fecal bacteria in wastewater treatment plant effluents. *Water Research*. Vol. 44, no. 6, s. 1873-1883. ISSN 1879-2448.
- Wingender, J., Flemming, H.C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. Vol. 214, no. 6, s. 417-423. ISSN 1618-131X.
- Wohlsen, T.D., 2011. Comparative evaluation of chromogenic agar CM1046 and mFC agar for detection of *E. coli* and thermotolerant coliform bacteria from water samples. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 53, no. 2, s. 155-160. ISSN 1472-765X.
- Zanetti, F., De Luca, G., Sacchetti, R., 2006. Microbe removal in secondary effluent by filtration. *Annals of Microbiology*. Vol. 56, no. 4., s. 313-317. ISSN 1869-2044.