

**ACTA      HYGIENICA  
              EPIDEMIOLOGICA  
              ET MICROBIOLOGICA  
              2/2022**



## **Přístupy při monitorování mikrobiálního znečištění koupacích vod**

Šárka Bobková  
Dana Baudišová  
Lenka Mayerová  
Martina Myšáková  
Filip Kothan  
Terezie Pouzarová  
Petr Pumann

Státní zdravotní ústav

ISSN 1804-9613

## **Přístupy při monitorování mikrobiálního znečištění koupacích vod**

*Abstrakt:* Toto monotématické číslo vzniklo jako jeden z výstupů grantového projektu TAČR, TJ04000132 „Využití metod molekulární biologie k identifikaci zdrojů znečištění v koupacích vodách“. Shrnuje výsledky terénních šetření a laboratorních stanovení mikrobiologických, chemických a fyzikálních ukazatelů. Vyhodnocuje využitelnost alternativních metod (kultivačních i molekulárně biologických) pro stanovení mikrobiologických indikátorů fekálního znečištění a ukazuje na možnosti využití stanovení chemických ukazatelů pro pomoc při zjišťování původu znečištění. Na příkladu výsledků z vybraných koupacích lokalit se snaží dát dohromady různé skupiny výsledků (mikrobiologické, chemické, fyzikální) a shrnout, co jednotlivé ukazatele mohou o kvalitě koupací vody říci a jak spolu mohou souviset.

**Klíčová slova:** koupací vody, indikátory fekálního znečištění, qPCR, chemické ukazatele, trasování původu znečištění

## **Approaches in monitoring microbial contamination of bathing waters**

*Abstract:* This monothematic issue was developed as one of the outputs of grant project TJ04000132 „Use of molecular biology methods to identify sources of bathing water contamination“ supported by the Technology agency of the Czech Republic. It summarizes the results of our field investigations and laboratory analyses of microbiological, chemical and physical indicators. It evaluates the use of alternative methods (cultivation methods and molecular biology methods) for the determination of microbial indicators of faecal contamination and the possibilities of the use of chemical indicators for faecal contamination tracking. On the example of several bathing locations it demonstrates different groups of indicators (microbiological, chemical, physical) and summarizes what each indicator can tell us about bathing water quality and how they are related to each other.

**Key words:** bathing water, faecal pollution indicators, qPCR, chemical indicators, faecal pollution tracing

*Doporučená citace:* Bobková Š, Baudišová D, Mayerová M, Myšáková M, Kothan F, Pouzarová T, Pumann P. Přístupy při monitorování mikrobiálního znečištění koupacích vod. Acta Hyg Epidemiol Microbiol. 2022;(2):1-41.

©Státní zdravotní ústav 2022

Žádná část časopisu nesmí být reprodukována tiskem, fotografickou cestou, počítačovými soubory dat nebo jinými způsoby bez předchozího písemného svolení vydavatele.

Redakční rada:

RNDr. František Rettich, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav  
MUDr. Jaroslav Volf, Oddělení pracovního a preventivního lékařství, FN Ostrava  
Mgr. Jana Veselá, Středisko vědeckých informací, Státní zdravotní ústav

Adresa redakce:

Státní zdravotní ústav, redakce časopisu AHM, Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10,  
telefon: 267082288, e-mail: [vaclava.novakova@szu.cz](mailto:vaclava.novakova@szu.cz)

Publikováno 31. 10. 2022

ACTA HYGIENICA  
EPIDEMIOLOGICA  
ET MICROBIOLOGICA

## **Přístupy při monitorování mikrobiálního znečištění koupacích vod**

RNDr. Šárka Bobková, Ph.D, RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.,  
Ing. Lenka Mayerová, Ph.D, Ing. Martina Myšáková, Mgr. Filip Kothan,  
Terezie Pouzarová, Mgr. Petr Pumann

Státní zdravotní ústav, Centrum zdraví a životního prostředí

*Text tohoto čísla časopisu byl připraven v rámci projektu financovaného Technologickou agenturou ČR TJ04000132 „Využití metod molekulární biologie k identifikaci zdrojů znečištění v koupacích vodách“.*

## Obsah

Úvod .....	3
Zdroje znečištění koupacích vod .....	3
Hodnocení kvality koupací vody – ukazatele a metodika .....	4
Mikrobiologické indikátory fekálního znečištění.....	4
<i>Ukazatel Escherichia coli</i> .....	4
Charakteristika a metody stanovení .....	4
Kultivační metody stanovení <i>E. coli</i> .....	6
Molekulárně biologické metody stanovení <i>E. coli</i> .....	9
Ukazatel intestinální enterokoky .....	12
Charakteristika a metody stanovení .....	12
Identifikace enterokoků metodou MALDI-TOF .....	14
Identifikace enterokoků sekvenováním .....	15
Další možné chemické ukazatele.....	20
Optimalizace metodiky stanovení močoviny .....	21
Mikrobiologické a chemické přístupy k odlišení původu znečištění koupacích vod .....	23
Testování metod a různých přístupů k hodnocení kvality koupací vody na vybraných koupacích lokalitách .....	23
Výsledky stanovení na jednotlivých lokalitách .....	25
Celkové shrnutí všech výsledků a jejich korelace.....	34
Závěr .....	37
Literatura .....	38

## Úvod

Během léta se mnoho lidí obrací na různé webové aplikace, kde je možné získat informace o kvalitě koupací vody (např. [www.koupacivody.cz](http://www.koupacivody.cz), [www.mzcr.cz/kvalita-vody-ke-koupani](http://www.mzcr.cz/kvalita-vody-ke-koupani) či stránky příslušných hygienických stanic, např. [www.khsova.cz/obcanum/kvalita-vody](http://www.khsova.cz/obcanum/kvalita-vody), [www.khspce.cz/koupaci-vody](http://www.khspce.cz/koupaci-vody) apod.). Známé obrázkové ikony znázorňující vhodnost či nevhodnost dané lokality ke koupání (vhodná ke koupání (😊), vhodná, ale s mírně zhoršenými vlastnostmi (😬), voda se zhoršenou jakostí (😡), voda nevhodná ke koupání (😞), nebo dokonce voda nebezpečná (😱)) vycházejí ze souborného zhodnocení mikrobiologických, biologických a fyzikálních ukazatelů, jak je popsáno v příloze 6 vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 238/2011 Sb. Z fyzikálních ukazatelů se hodnotí průhlednost a smyslově postižitelné vlastnosti vody, z biologických množství sinic, chlorofylu *a* a riziko vzniku cercariové dermatitidy a z mikrobiologických ukazatelů tzv. indikátory fekálního znečištění (tj. *E. coli* a intestinální enterokoky). Ve výzkumném projektu jsme se zabývali zejména zmíněnými mikrobiologickými ukazateli, které jsou ze zdravotního hlediska nejdůležitější, a proto je toto číslo časopisu věnované hlavně jim.

Při hodnocení kvality koupací vody nejde ale vždy jenom o kvantitativní zhodnocení výskytu či absence jednotlivých indikátorů, ale mělo by jít též o hledání případného zdroje znečištění, aby se mohlo přistoupit k cíleným nápravným opatřením a také pro přesnější odhad možných druhů přítomných patogenů. K tomu by mohl pomoci podrobnější výzkum, včetně např. určení konkrétního druhu bakterií. Zde totiž výsledky, které poskytují klasické kultivační metody (přes veškeré nedostatky stále nejvhodnější pro běžný provozní monitoring), již nestačí a je vhodné výsledky kultivace doplnit dalšími metodami. Těmi jsou např. PCR, qPCR, MALDI-TOF, sekvenace úseků DNA apod. Kromě toho lze pro komplexnější představu uvedené analýzy doplnit chemickými indikátory antropogenního znečištění, jako je například stanovení amonných iontů, močoviny, případně kofeinu. Během našeho výzkumného projektu jsme se těmito různými možnými přístupy zabývali, a proto v další části tohoto čísla prezentujeme naše získané výsledky různých stanovení i zhodnocení, co nám mohou jednotlivé ukazatele o znečištění říci.

## Zdroje znečištění koupacích vod

V následujícím přehledu jsou uvedeny hlavní zdroje mikrobiální kontaminace vod, které je třeba brát v úvahu při hodnocení kvality koupací lokality (profilu ke koupání). Jejich aktuální význam záleží především na velikosti a vzdálenosti zdroje znečištění od koupacího místa a také na velikosti a charakteru vlastního koupacího místa. Zároveň se na míře znečištění koupacích vod podílejí přírodní faktory, zejména počasí – teplota vody a vzduchu, směr větru, sluneční svit, množství srážek a jejich

rozložení. Z nich největší negativní vliv na kvalitu vody mívají právě poslední jmenované srážky. Zdroje znečištění mohou být:

- Bodové (evidované) zdroje: vypouštění komunálních odpadních vod – výpusti z ČOV nebo přepady z kanalizací (evidence podle vyhlášky o bilanci a PRVKÚK), vypouštění z určitých průmyslových zdrojů znečištění, velkochovy hospodářských zvířat (evidované jako bodové zdroje).
- Difuzní zdroje: vypouštění komunálních odpadních vod z obcí mimo evidenci, obce bez kanalizace, chatařské osady a zahrádkářské kolonie, skládky, úložiště hnoje a dalších zemědělských odpadů.
- Plošné zdroje: úroveň, způsob a časování hnojení okolních pozemků, pastviny, volně žijící zvířata.
- Vnitřní zdroje (v nádrži): hospodaření na rybnících (ryby, drůbež), vodní ptactvo (trvalé hnízdění, kolonie), sedimenty v nádrži.
- Rizika plynoucí z vlastní rekreace: znečištění přímo na břehu (kempy, tábořiště, toalety, sprchy), počet návštěvníků/koupajících se, vodní sporty, hausbóty a lodní doprava, rybáři.

## Hodnocení kvality koupací vody – ukazatele a metodika

### Mikrobiologické indikátory fekálního znečištění

Mikrobiologickými indikátory fekálního znečištění jsou mikroorganismy (zde bakterie) vyskytující se přirozeně v gastrointestinálním traktu člověka a teplokrevných živočichů. Jejich přítomnost ve vodním prostředí tedy indikuje možné fekální znečištění konkrétní vodní lokality/vodního zdroje, a tudíž ukazují na možnou přítomnost enterických patogenů (včetně virů). Pro monitoring koupacích vod se používají jako mikrobiologické indikátory *Escherichia coli* (*E. coli*) a intestinální enterokoky (vyhláška č. 238/2011 Sb., ve znění pozdějších předpisů).

### Ukazatel *Escherichia coli*

#### Charakteristika a metody stanovení

*E. coli* je gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Je součástí přirozené střevní mikrobioty teplokrevných živočichů včetně člověka a ve střevech produkuje jednak řadu látek s antibiotickými účinky (koliciny) a též se podílí na tvorbě vitamínu K. Ve vodě se v našich zeměpisných šířkách nerozmnožuje. Kromě komensálních kmenů existují ale i kmeny podmíněně patogenní, které mohou způsobit zejména dva typy infekcí:

extraintestinální (hlavně infekce močových cest) a intestinální (průjemová onemocnění vyvolaná tzv. enteropatogenními kmeny).

*E. coli* patří zároveň mezi tzv. koliformní bakterie, což byla uměle vytvořená skupina gramnegativních nesporulujících tyčinkovitých bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* schopných fermentovat laktózu na kyselinu, případně aldehyd a zároveň nevykazující cytochromoxidázovou aktivitu. Dnes koliformní bakterie zahrnují ještě širší skupinu mikroorganismů, neboť stanovení není založeno na průkazu fermentace laktózy, ale na enzymové aktivitě  $\beta$ -D-galaktosidázy, což je první enzym štěpící laktózu na glukózu a galaktózu. Ty však již nemusí být u všech  $\beta$ -D-galaktosidázy pozitivních kmenů dále fermentovány. Laboratorní stanovení *E. coli* je často spojeno právě se stanovením koliformních bakterií. Stanovení obou „skupin“ (samostatná *E. coli* i veškeré koliformní bakterie) je relativně nenáročné a výsledky jsou známy do 24 hodin. Pro běžný monitoring se nejčastěji používají **kultivační metody**, a to kultivace na pevných nebo v tekutých selektivně-diagnostických kultivačních půdách. Stanovení koliformních bakterií je založeno na detekci aktivity enzymu  $\beta$ -D-galaktosidázy, což je první enzym v metabolismu laktózy (viz výše). *E. coli* je pak od koliformních bakterií odlišena na základě detekce enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy, který má většina kmenů *E. coli* a naopak téměř žádný z jiných druhů koliformních bakterií (1). Výsledkem stanovení na pevných půdách je počet kolonie tvořících jednotek (KTJ)/misce, resp. naočkovaný objem, případně se výsledky standardně přepočítávají na 100 ml. Stanovení v tekutých kultivačních médiích je založeno na stejném principu (též na detekci  $\beta$ -D-glukuronidázy), výsledkem je však tzv. nejpravděpodobnější počet (MPN, most probable number)/ určený objem vzorku vody.

Kromě kultivačních metod se v současné době testuje též využití **molekulárně biologických metod** jako metod doplňkových ke kultivačním metodám. Jedná se zejména o využití kvantitativní polymerázové řetězové reakce (**qPCR**) nebo reverzní transkripční polymerázové řetězové reakce (RT-PCR). Metoda qPCR je založena na detekci a následném mnohonásobném namnožení určitého specifického úseku DNA dané bakterie, metoda **RT-PCR** je založena na detekci určitého specifického úseku RNA dané bakterie, který je následně přepsán do DNA sekvence a v dalším kroku opět mnohonásobně namnožen. Výhodou RT-PCR oproti qPCR je, že molekuly mRNA jsou mnohem méně stabilní než DNA a jsou rychle degradovány. Proto detekce RNA lépe odráží množství životaschopných buněk než detekce DNA, která může být přítomna v prostředí i volná po bakteriální lýze. Na druhou stranu je ale laboratorní práce s RNA v důsledku její rychlé degradace složitější a náchylnější ke kontaminacím. Pro koupací vody se vyvíjejí především metodiky qPCR stanovení. Výsledkem qPCR je počet genomových jednotek (GU) někdy označovaných jako genomové ekvivalenty (GE) na objem zpracovaného vzorku. Protože metodiky tohoto stanovení jsou stále ve fázi testování, existuje i několik možných genů, na kterých by mohla být detekce a kvantifikace založena. Existují komerční

sady (kity), kde detekce vychází z kultivačních stanovení a je tedy založena na detekci a kvantifikaci genů *lacZ* (kódujícího enzym  $\beta$ -D-galaktosidázu) a některého z genů kódujících enzym  $\beta$ -D-glukuronidázu (*uidA*) nebo regulujících produkci tohoto enzymu (*uidR*) (např. AquaScreen *Escherichia coli*, Minerva Biolabs). Metody testované v rámci Evropy jsou založeny na detekci a kvantifikaci specifické části genu pro ribozomální 16S rRNA, v amerických normách je to naopak na základě detekce specifické části genu pro 23S rRNA. Kromě toho je možné v literatuře najít i údaje o dalších možných kandidátech – např. gen *tuf* kódující elongační faktor EF-Tu, gen *cyd* kódující cytochrom bd komplex apod. (2). V současné době neexistuje žádná studie, která by prokázala, zda některý z uvedených genů je pro kvantifikaci lepší či horší, obecně se ale pro standardizované metody uvažuje o třech prvně zmíněných genech, tedy 23S rDNA v Americe a 16S rDNA v Evropě, případně ještě o *uidA*, *uidR* (firemní sady). Metoda, která se vyvíjí a je testovaná Evropskou komisí, je založena na detekci části 16S rRNA specifické pro *E. coli*.

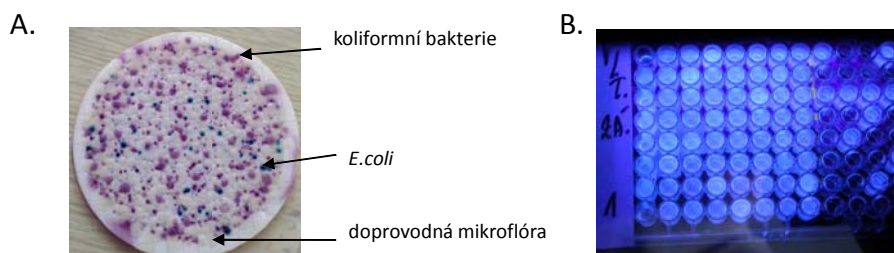
### **Kultivační metody stanovení *E. coli***

Jak již bylo uvedeno výše, kultivační metody stanovení *E. coli* jsou založeny na detekci aktivity enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy. Pro koupací vody jsou metody stanovení předepsané vyhláškou č. 238/2011 Sb. Jedná se o kultivaci na pevném selektivním chromogenním médiu (Chromogenic Coliform Agar (CCA)) s chromogenními substráty, kde *E. coli* (vykazující jak aktivitu  $\beta$ -D-galaktosidázy, tak  $\beta$ -D-glukuronidázy) roste ve formě modrých až fialových kolonií (obrázek 1), koliformní bakterie jako růžové až červené kolonie (pouze aktivita  $\beta$ -D-galaktosidázy) a doprovodná mikroflóra zůstane bezbarvá (podle ČSN EN ISO 9308-1). Výsledky se udávají jako KTJ/100 ml.

Druhá doporučená metoda je miniaturizovaná metoda stanovení v selektivně diagnostickém tekutém médiu s fluorogenním substrátem na detekci  $\beta$ -D-glukuronidázy na mikrotitračních destičkách, kde je výsledkem nejpravděpodobnější počet (most probable number, MPN) (ČSN EN ISO 9308-3) (obrázek 1).

Ani jedna z uvedených metod však není zcela vhodná pro matici koupacích vod, zejména našich střeoevropských; u ČSN EN ISO 9308-1 je to z důvodu velkého množství doprovodné mikroflóry, a tudíž značného zkreslení výsledků. Metoda dle ČSN EN ISO 9308-3 má vysokou mez detekce (15 MPN/100 ml), je pracná, finančně náročná a minimální balení 25 ks je nevhodné pro laboratoře, které testují jen malý počet koupacích vod. Proto je snaha najít vhodnější kultivační média a/nebo kultivační podmínky, které by více eliminovaly doprovodnou mikroflóru a zároveň byly tak citlivé, že by neeliminovaly žádné přítomné bakterie *E. coli* (starší bakteriální buňky, stresované nedostatkem živin, UV zářením apod.).





**Obr. 1 A. Stanovení *E. coli* na chromogenním kultivačním médiu CCA podle ČSN EN ISO 9308-1 a miniaturizovanou metodou v tekutém médiu s fluorogenním substrátem podle ČSN EN ISO 9308-3 (obr. 1 B).**

Na médiu CCA roste *E. coli* ve formě modrých kolonií, koliformní bakterie jsou růžové až červené a doprovodná mikroflóra zůstane bezbarvá. Při miniaturizované metodě stanovení *E. coli* se jako pozitivní odečítají fluoreskující jamky.

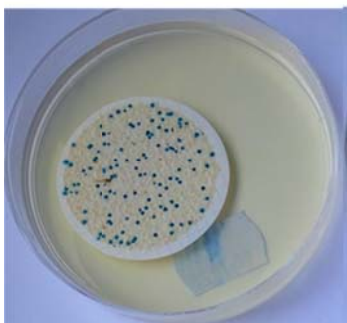
Jednou z takových alternativ je použití metody dle ČSN EN ISO 9308-2, využívající dřívější patent firmy IDEXX z USA, pomocí komerčního kitu (např. Colilert Quanti-Tray). Jde též o stanovení v selektivně diagnostickém tekutém médiu, které je založené opět na detekci enzymu  $\beta$ -D-glukuronidázy (fluorogenní substrát, stejný jako v metodě dle ČSN EN ISO 9308-3), ale systém má větší rozsah detekce. Výsledkem je opět nejpravděpodobnější počet (MPN) (obrázek 2). Tento postup je v České republice ale zatím schválen pouze pro pitné vody, nikoliv pro vody koupací, přestože je pro tuto matrici vhodnější než vyhláškou předepsané chromogenní médium CCA. V našem výzkumu jsme z důvodu přesnějšího vyhodnocení výsledků tuto metodu používali, ale je třeba zmínit, že použití metody dle ČSN EN ISO 9308-2 je finančně mnohem náročnější než metoda dle ČSN EN ISO 9308-1 a po stanovení zůstane velké množství infekčního plastového odpadu.



**Obr. 2. Stanovení *E. coli* dle ČSN EN ISO 9308-2 (Colilert Quanti-Tray).**

Žlutě svítící jamky značí přítomnost koliformních bakterií, jamky obsahující *E. coli* navíc fluoreskují pod UV světlem.

Proto jsme v rámci projektu testovali ještě jiný postup stanovení, a to kultivaci na dalším pevném chromogenním médiu Trypton Bile X-glucuronide agar (TBX), kde je detekce založena též na enzymu  $\beta$ -D-glukuronidáze. *E. coli* roste ve formě tyrkysových kolonií; další koliformní bakterie nejsou odlišeny a s ostatní doprovodnou mikroflórou rostou ve formě bílých kolonií (obrázek 3).



**Obr. 3. Stanovení *E. coli* na Trypton Bile X-glucuronide agar (TBX).**  
*E. coli* zde roste ve formě tyrkysových kolonií.

Optimalizovaná metodika stanovení na TBX médiu byla publikována Jožicem a kol. (3). Tato optimalizace však byla provedena na chorvatských, tj. velmi čistých a málo oživených koupacích vodách (moře a horská jezera). Nebylo ale jisté, že tato metoda bude fungovat i na naše typicky hodně oživené vody s bohatou doprovodnou mikroflórou. Proto jsme metodu na základě uvedené publikace testovali i na našich vzorcích, a to včetně kroku předkultivace za nižší teploty, tj. ve 36 °C po dobu 4 hodin, což by mělo pomoci doprovodnou mikroflóru eliminovat. Výsledky těchto analýz ukazuje tabulka 1. Z tabulky je patrné, že na TBX médiu navíc s krokem předkultivace za nižší teploty bylo možné dosáhnout obdobných výsledků jako s metodou dle ČSN ISO 9308-2 (Colilert/Quantitray). Zároveň bylo ověřeno 17 typických kolonií (tj. presumptivní kolonie *E. coli*, které na tomto médiu rostou ve formě tyrkysových kolonií) pomocí MALDI-TOF. Celkem 15 z těchto 17 kolonií bylo identifikováno jako *E. coli* s vysokým identifikačním skóre. Zbylé 2 kolonie byly identifikovány jako *E. marmotae*, což je nový druh rodu *Escherichia*, izolovaný z trusu himalájských svišťů (tudíž je taktéž fekálního původu) (4).

Metoda stanovení *E. coli* z koupacích vod na TBX médiu má vysoký potenciál stát se optimální metodou pro vyšetřování *E. coli* v koupacích vodách. Je tedy slibná a je i finančně méně náročná než metoda dle ČSN EN ISO 9308-2. V tuto chvíli se uvažuje o jejím navržení v podobě mezinárodní normy ISO 9308-4 (stanovení *E. coli* ve vodách s vysokým obsahem doprovodné mikroflóry). Jediným potenciálním (organizačním) problémem se zdá být uvedená čtyřhodinová předkultivace, to lze však vyřešit termostatem s automatickým přepínáním teploty.

**Tab. 1. Výsledky stanovení *E. coli* z koupacích vod (2 lokality) na TBX médiu s různými metodickými variantami.**

Primární kultivace	Sekundární kultivace	Písník Mělice	Rybník Šeberák
-	TBX 44 °C	38	18
-	TBX 36 °C	43	Přerostlé doprovodnou mikroflórou
neselektivní agar 36 °C 4 h	TBX 44 °C	45	24
TBX 36 °C 4 h	TBX 44 °C	nd	23
-	ČSN EN ISO 9308-2	32	15,8

nd – nedetekováno

### **Molekulárně biologické metody stanovení *E. coli***

Ačkoliv je již jasné, že pro běžný monitoring jsou běžné kultivační metody stále nejvhodnější, neboť jsou relativně levné a technicky nenáročné, v případě havarijních situací či nutnosti znát konkrétní druh bakterie (epidemie, havárie) mohou naopak molekulárně biologické přístupy tyto kultivační vhodně doplnit. V mikrobiologii vody se však, na rozdíl od klinické a potravinářské mikrobiologie, standardizované molekulárně biologické metody teprve tvoří a jsou předmětem testování. V současné době jsou dostupné dvě normy Americké agentury pro ochranu životního prostředí (US EPA), které se však týkají stanovení enterokoků, a to US EPA 161: Enterococci in Water by TaqMan Quantitative Polymerase Chain Reaction a US EPA 1609: Enterococci in Water by TaqMan Quantitative Polymerase Chain Reaction with Internal Amplification Control (IAC) Assay. Obdobu těchto norem pro *E. coli* z koupacích vod US EPA stále ještě testuje a upravuje. V rámci Evropy existuje v této oblasti norma na stanovení legionel ISO/TS 12869 Water quality – Detection and quantification of *Legionella spp.* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genomic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), která se sice týká pitné vody a jiných mikroorganismů, ale lze z ní metodicky vycházet. Metodiky pro detekci *E. coli* z koupacích vod jsou též i v rámci EU předmětem diskuse a testování. My jsme v našich studiích vycházeli z amerických norem US EPA 1611, US EPA 1609 a normy ISO pro legionely ISO/TS 12869, ze znalostí získaných při stáži v Itálii (Joint Research Centre, Ispra) a z pokynů pro mezilaboratorní porovnávání organizované Evropskou komisí (Joint Research Centre, Ispra).

Před vlastním testováním qPCR metody bylo třeba optimalizovat podmínky izolace DNA na matici vnitrozemské (tuzemské) koupací vody. Ve velké části zahraniční literatury i v rámci testování metodiky na mezinárodní úrovni se totiž pod pojmem koupací vody myslí slané mořské vody, nikoliv rybníky a jezera, jako je tomu u nás. Vnitrozemské rybníky jsou oproti mořským vodám silně

mikrobiálně i biologicky (fytoplanktonem) oživené, a proto nelze jednoduše převzít postupy z jiných matric.

Optimalizace izolace DNA i následné porovnání kultivační a molekulárně biologické metody bylo provedeno jednak na uměle připravených (spikovaných) vzorcích, jednak na přírodních vzorcích koupacích vod. Pro spikování byl použit sbírkový kmen *E. coli* CCM 3954. Pro obě metody (jak kultivační, tak qPCR) bylo vždy použito 100 ml vzorku, neboť na tento objem jsou podle vyhlášky č. 238/2011 Sb. vztahovány výsledky mikrobiologických analýz.

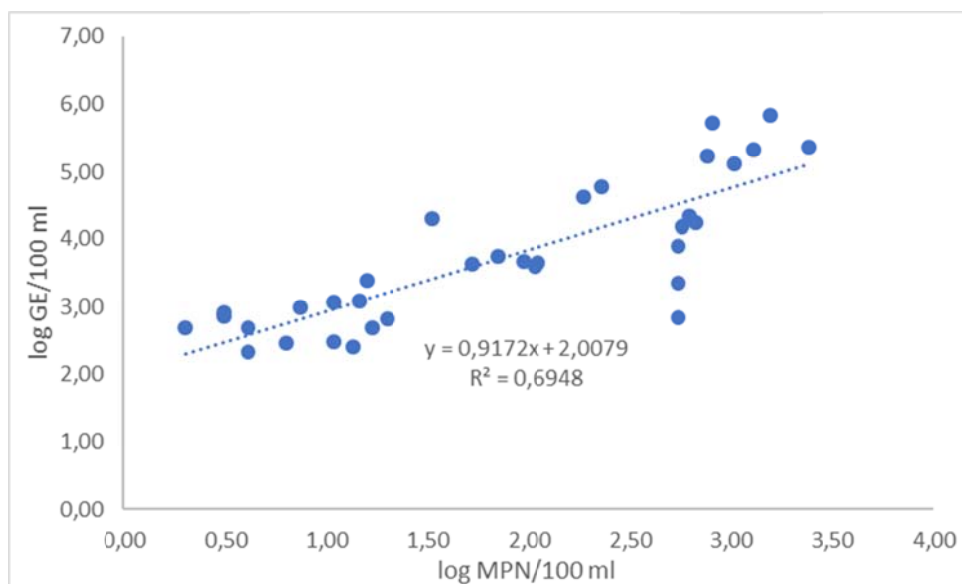
Ve většině odborné literatury i připravovaných metodách se pro zkoncentrování vzorku používá filtrace přes polykarbonátový filtr, z něhož se buňky v následujících krocích lépe odmyjí než z často používaných nitrocelulóзовých filtrů (5). V našich experimentech byly použity polykarbonátové filtry o porozitě 0,4 µm (Isopore). Filtry byly následně rozstříhány na 4 stejné díly a DNA byla izolována jedním z komerčních kolonkových kitů firmy Qiagen (PowerWater a/nebo PowerSoil). Během optimalizace bylo zjištěno, že zatímco při izolaci čistých spikovaných vzorků byla výtěžnost (množství DNA měřené nanodropem) i čistota vyzolované DNA s oběma kity srovnatelná, u přírodních vzorků jsme ve více než polovině vzorků měli výtěžnost větší s PowerSoil kitem než Power Water kitem. Pro další práci jsme proto používali na izolaci DNA PowerSoil kit (Qiagen) původně určený pro izolaci DNA z půdy a kompostů. Výsledná DNA byla vždy eluována do 50 µl pufru C6, který byl součástí kitu. Na qPCR analýzu bylo použito 5 µl vzorku. Vnitřní kontrola izolace a amplifikace byla zvolena podle US EPA 1609, tj. DNA z lososa (10 µg/ml), která byla přidána ke všem vzorkům a kontrolám před vlastní izolací, a to tak, aby konečná koncentrace DNA lososa ve vzorcích byla 0,2 µg/ml.

Pro kvantifikaci *E. coli* pomocí qPCR jsme používali metodu absolutní kvantifikace, při které bylo množství DNA měřeno na základě amplifikace, a kvantifikaci *E. coli* specifické části genu pro 16S rRNA. Pro qPCR byly použity TaqMan sondy nesoucí FAM fluorofor a BHQ zhášec. Sekvence primerů a sond byla převzata z odborných článků týkajících se testování robustnosti a limitů připravované normy na detekci *E. coli* pomocí qPCR v koupacích vodách a z pokynů pro mezinárodní srovnávací studii na stanovení *E. coli* pomocí qPCR v koupacích vodách (tabulka 2) (6).

**Tab. 2. Sekvence primerů a sond používaných pro detekci a kvantifikaci *E. coli***

Název	Sekvence	Použití	Reference
EC16Sf	CATGCCGCGTGTATGAAGAA	amplifikace a kvantifikace části genu 16S rRNA <i>E. coli</i> , pro qPCR kvantifikaci <i>E. coli</i>	Sivaganesan a kol. (6)
EC16Sr	CGGGTAACGTCAATGAGCAA		
EC16S sonda	[6-FAM]-TATTAACCTTACTCCCTTCTCCCCGCTGAA-BHQ		
Sketta 22f	GGTTCCGCAGGTGGG	amplifikace a kvantifikace intergenové oblasti rRNA operonu lososa, interní kontrola qPCR	US EPA 1611
Sketta 22r	CCGAGCCGTCTGGTC		
Sketta 22sonda	[6-FAM]-AGTCGCAGGCGCCACCGT-BHQ		

Podmínky qPCR reakce byly: 1. 95 °C 30 sec, 2. 95 °C 10 sec, 3. 60 °C 30 sec, krok 2–3 opakován 42krát, přístroj CFX (BioRad). Pro přípravu standardní křivky byl použit komerční standard DNA *E. coli* DSM 30083 (Minerva) a pro amplifikační reakci byl použit Probe Fast Universal (Kapa Biosystems). Výsledky byly vyjadřovány jako GE (genomové ekvivalenty)/100 ml vzorku. Výsledek GE/100 ml byl porovnán s kultivačním stanovením metodou dle ČSN EN ISO 9308-2 (Colilert Quanty-Tray). Na obrázku 4 jsou data vynesena pro lepší zobrazení a přehlednost v semilogaritmickém znázornění. Celkem bylo porovnáno 35 nezávislých vzorků.



**Obr. 4. Semilogaritmické znázornění porovnání výsledků dvou metod (kultivační a qPCR) pro kvantifikaci *E. coli* z koupacích vod.**

Výsledky kultivačního stanovení jsou v MPN/100 ml vzorku a výsledky qPCR stanovení v GE/100 ml vzorku. V grafu je též ukázána rovnice regresní přímky i hodnota spolehlivosti  $R^2$ .

Z rovnice vzniklé regresní přímky byla vypočtena i hodnota  $R^2$  (hodnota spolehlivosti), která říká, s jakou přesností lze z výsledků stanovení jednou metodou (zde kultivační) předpovědět výsledek stanovení druhou metodou (zde qPCR). Do jaké míry jsou tedy výsledky obou metod porovnatelné. Samozřejmě čím je  $R^2$  větší, tím jsou výsledky obou metod porovnatelnější. V našem případě byla hodnota spolehlivosti  $R^2$  0,69, což koresponduje s údaji v publikované literatuře, kde se uvádějí hodnoty spolehlivosti při obdobných porovnáních v rozmezí 0,63–0,80 (7, 8).

Ve vyhlášce č. 238/2011 Sb. je uvedeno, že koupací voda hodnocená jako vhodná ke koupání musí mít množství *E. coli* pod 500 KTJ (nebo MPN)/100 ml. Jedná se o hodnotu 95. percentilu stanovení za poslední 4 roky. Pro zjednodušení našich úvah můžeme říct, že je to limitní hodnota pro jednorázové stanovení *E. coli* z koupací vody. Cílem výše uvedeného porovnání by tedy mělo být určení takové hodnoty GE/100 ml, která odpovídá 500 KTJ (MPN)/100 ml a která by byla tedy limitní hodnotou při

stanovování *E. coli* pomocí qPCR. Zde je ale třeba si uvědomit, že pro takovéto závěry je třeba velkého množství dat z různých laboratoří a také že výsledek qPCR je na rozdíl od kultivačních metod mnohem více ovlivněn dalšími faktory, jako jsou např. možné inhibitory PCR reakce (zejména u velmi zakalených (turbidních) vzorků), způsoby izolace DNA, vlastní provedení (chyby v pipetování, manipulace se vzorkem apod.). Uvedené nedostatky jsou sice při qPCR analýzách ošetřeny různými kontrolami (blank, negativní kontroly, pozitivní kontroly, paralelní stanovování vzorku analyzované koupací vody, do které bylo přidáno známé množství sbírkového kmene *E. coli* (tzv. spikované vzorky), apod.), i tak však uvedené skutečnosti znesnadňují jasné určení limitní hodnoty a v současné době stále probíhají studie na sběr dat a jejich vyhodnocování. Při našich analýzách bylo vzorků nad 500 MPN/100 ml méně než polovina, a proto zde ani orientační limitní hodnotu qPCR neuvádíme. Pro porovnání, v informačním systému PiVo byl v námi sledované koupací sezóně, tedy v roce 2021, ze 183 sledovaných koupacích profilů překročen limit 500 KTJ/100 ml 13krát, tedy cca v 7 %.

Z výše uvedeného je patrné, že pro běžný monitoring koupacích vod jsou kultivační metody stále nejvhodnější. Na druhou stranu z výsledků korelací nejen našich, ale i publikovaných v literatuře také vyplývá, že qPCR lze s dobrou spolehlivostí použít pro rychlé předběžné orientační zjištění množství daných bakterií, kdy je výsledek třeba znát co nejdříve (epidemie), případně u stanovování bakterií, kde jsou kultivační metody zdoluhavé (např. legionela, salmonela), apod. Dalším možným využitím molekulárně biologických metod v praxi je detekce genů virulence, případně antibiotické rezistence.

## Ukazatel intestinální enterokoky

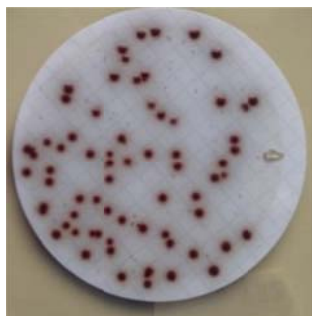
### Charakteristika a metody stanovení

Druhým v koupacích vodách stanovovaným indikátorem fekálního znečištění jsou intestinální enterokoky. Jedná se o skupinu grampozitivních, kataláza negativních koků, nejčastěji se vyskytujících jako diplokoky. Jsou to chemoorganotrofové, jejichž hlavním koncovým produktem při fermentaci cukrů je kyselina mléčná. Ačkoliv fenotypické a biochemické odlišení enterokoků od ostatních bakteriálních druhů je složité, mezi hlavní znaky tohoto rodu patří přítomnost D antigenu, tolerance k vyšším teplotám (až 45 °C) i schopnost růstu v přítomnosti 6,5% NaCl a při pH hodnotě 9,1. Taxonomicky patří mezi kmen Firmicutes, čeleď *Enterococcaceae*. V současné době zahrnuje tento rod 43 druhů (9). Jsou přirozenou součástí mikroflóry trávicího traktu teplokrevných živočichů a člověka, ale na rozdíl od *E. coli* byly izolovány i z trávicího traktu některých bezobratlých (korýši, šneci) (10, 11), z povrchových sladkých i slaných vod, z půdy či z rostlinné vegetace. Některé druhy (např. *E. faecalis*, *E. faecium*) jsou i podmíněně patogenní. Jimi způsobená onemocnění mohou být infekce močových a žlučových cest, méně často pak infekce ran či endokarditidy. Zástupci tohoto druhu jsou

těž známi svou rezistencí na antibiotika, v současné době zejména rezistencí k vankomycinu, který byl dlouhá léta podáván při infekcích multirezistentními kmeny především u hospodářských zvířat.

Z výše uvedeného vyplývá, že přítomnost enterokoků ve vodě může mít různý původ. Buď jsou zdrojem odpadní vody či exkrementy živočichů, a to jak obratlovců, tak bezobratlých. Za typické intestinální druhy jsou považovány *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* (12). Mohou být ale též přirozenou součástí vodního ekosystému a vyskytují se tam volně nebo mohou být asociovány s rostlinnou vegetací (typicky *E. mundtii*, *E. casseliflavus*) (13, 14) nebo se zooplanktonem (15), případně se mohou do vody dostat z půdy (16).

Laboratorně se stanovují opět především kultivačně na selektivně diagnostických pevných půdách, jsou kultivačně nenáročné a výsledek je znám za 48 hod. Stanovení v tekutém médiu se zatím neujalo. Pro matici koupací voda je předepsáno stanovení podle ČSN EN ISO 7899-2, tj. stanovení na pevném médiu podle Slanetze a Bartleyové (SB). Médium SB obsahuje jednak azid sodný pro potlačení růstu doprovodné mikroflóry (hlavně gramnegativních tyčinek) a dále trifenyltetrazolium chlorid, který enterokoky redukuje na červený formazan, a proto rostou na tomto médiu ve formě tmavě červených kolonií (obrázek 5). Následným konfirmačním testem, při kterém je prokázána schopnost hydrolýzy eskulinu v prostředí žlučových solí po dobu 2 hodin, jsou enterokoky odlišeny od doprovodné mikroflóry. Na rozdíl od stanovení *E. coli* jsou kultivační metody stanovení enterokoků i pro matici koupací vody vyhovující, a není tedy snaha je pro běžný provozní monitoring měnit. Pouze v některých lokalitách se mezi koloniemi vyrostlými na SB médiu vyskytují vyšší počty kolonií/druhů *Lactobacillus plantarum* nebo *Pediococcus pentosaceus* (rostou jako nažloutlé, nikoliv červené kolonie, ale žluč-eskulinový test je pozitivní). Problém ale je, že při kultivačním stanovení jsou zachyceny všechny druhy enterokoků a není možné odlišit druhy fekální od těch, které mohou mít jiný než fekální původ. Tato skutečnost může potom zkreslit interpretaci výsledků, neboť zvýšený počet enterokoků nemusí vždy indikovat fekální (humánní) znečištění dané lokality. V problematických lokalitách (lokalitách s dlouhodobě nevyhovující kvalitou) může proto pro lepší interpretaci výsledků pomoci dourčit druhy enterokoků některá z dalších specializovanějších metod jako je **sekvenace DNA** či **MALDI-TOF**).



**Obr. 5. Intestinální enterokoky na médiu podle Slanetze a Bartleyové.**

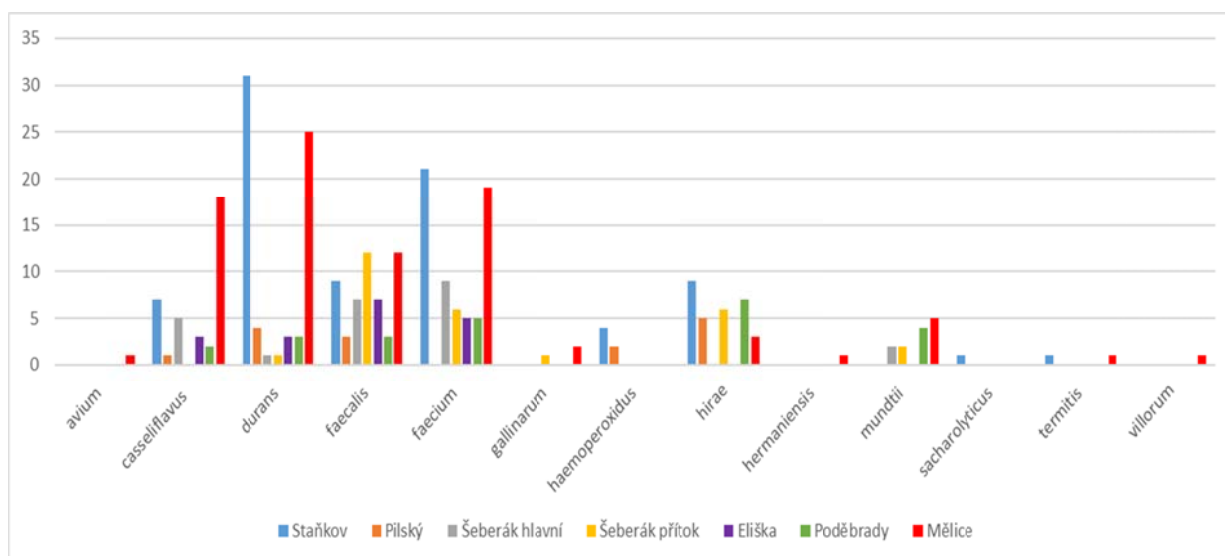
Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (matrix-assisted laser desorption/ionization – MALDI-TOF) je metoda založená na laserové desorpci a ionizaci molekul za účasti matrice. Jedná se o techniku, která využívá tzv. měkké ionizace. Ta způsobuje, že molekuly nejsou štěpeny, ale pomocí matričního roztoku (my používáme deriváty kyseliny skořicové) pouze ionizovány. Nabité částice jsou rozděleny na základě molekulové hmotnosti v elektrickém a magnetickém poli. V mikrobiologii slouží k identifikaci bakterií na základě jedinečného složení proteinů. Proteinové profily jsou srovnávány s databázemi kmenů ze světových sbírek, tudíž lze identifikovat pouze druhy, jejichž zástupci ve sbírkách jsou.

Sekvenování je souhrnný termín pro metody, které umožňují zjistit pořadí nukleotidů v určitém úseku či v celé molekule DNA. Dnes je známo mnoho takových metod, mezi nepoužívanější patří původní tzv. Sangerova metoda, dále pyrosekvenování a dnes zejména metody sekvenování nové generace (tzv. NGS – next-generation sequencing – 454, Solexa, nanopórová technologie apod.). Sangerova metoda a z ní odvozené postupy jsou v současné době celkem levné a jsou vhodné zejména pro analýzu DNA čistých vzorků. Naopak metody sekvenování druhé generace jsou rychlejší, přesnější a umožňují analýzu i komplexních vzorků (vody, půdy apod.), ale jsou proto i dražší a pracnější. Nicméně výsledkem všech sekvenačních metod je pořadí nukleotidů daného sekvenovaného úseku či molekuly DNA. Tato sekvence je pak porovnána s databází známých sekvencí (např. BLAST, EMBL) a na základě podobnosti se známými sekvencemi je s určitou specifickou pravděpodobností identifikována.

### **Identifikace enterokoků metodou MALDI-TOF**

Intestinální enterokoky byly stanoveny membránovou filtrací na médiu SB (kultivace 48 hodin při 36 °C) a konfirmací na žluč-eskulinovém agaru (2 hodin při 44 °C). Poté byly kmeny uchovávány v chladu a v případě potřeby přečištěny na médiu SB. V případě nízkého počtu vyrostlých enterokoků byly identifikovány všechny vyrostlé kolonie, v případě vyššího počtu bylo k identifikaci izolováno podle možností 10–12 kolonií. Všichni typičtí zástupci kolonií byli před vlastní identifikací čerstvě kultivováni na krevním agaru (Columbia) 24 hodin při 36 °C. Identifikace proběhla metodou MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization) na přístroji Bruker Daltonic MALDI Biotyper. V příslušné databázi bylo zařazeno, a tudíž bylo možno identifikovat, 34 druhů enterokoků (MBT 8468). Za dostatečnou identifikaci bylo považováno dosažení identifikačního skóre 2,300 až 3,000 (vysoce pravděpodobná identifikace), 2,000 až 2,299 (pravděpodobná identifikace druhů) a 1,700 až 1,999 (pravděpodobná identifikace rodu). Vždy bylo kontrolováno, že i následné „identifikované druhy“ patřily do stejného rodu i druhu. Pro zvýšení kyselosti prostředí, a tím pro zvýšení spolehlivosti identifikace, byly kultury ošetřeny kyselinou mravenčí. Celkem bylo identifikováno 280 kolonií enterokoků a výsledky jsou znázorněny na obrázku 6.





**Obr. 6. Výsledky identifikace enterokoků ze sledovaných lokalit.**

Na ose y jsou počty určených kmenů.

### Identifikace enterokoků sekvenováním

Sekvenování je druhou metodou k určení druhů stanovených enterokoků, jak bylo popsáno výše. Protože ale sekvenování celého genomu je velmi náročné a nákladné, pro účely rychlého určení relativně známých organismů v podstatě i zbytečné, používá se v těchto případech sekvenace jen určitých úseků DNA (genů nebo intergenových oblastí), o kterých se ví, že obsahují úseky unikátní pro daný druh. Zároveň to musí být ale úseky, které jsou široce rozšířené v genomech organismů (pro naše zdejší účely v genomech bakterií), musí mít dostatečnou velikost pro možná porovnání, ale zároveň nesmí být příliš dlouhé, aby se daly sekvenovat. Úseky DNA, které splňují výše vyjmenovaná kritéria, jsou v literatuře nazývány molekulární markery a je jich popsáno velké množství. Asi nejnámější molekulární markery, které byly mimo jiné použity i pro tvorbu fylogenetických stromů, jsou geny pro 16S rRNA nebo 23S rRNA (17, 18). Mezi další markery patří některé geny, jejichž produkty se podílejí na expresi genové informace (transkripci a translaci). Jsou to např. geny kódující podjednotku RNA polymerázy (*rpo*) nebo tRNA syntáz (např. *pheS*) (19) nebo elongačního faktoru TU (*tuf*), případně intergenové oblasti mezi nimi (20). Druhou skupinou markerů u bakterií popsaných v literatuře jsou geny kódující proteiny primárního metabolismu, např. geny pro podjednotku ATP syntázy (*atpA*), chaperoniny (*cpn60*) nebo proteiny komponent buněčné stěny, peptidoglykanu (např. *ddl*). Jindy může jít o geny kódující faktory virulence (např. *esp* povrchový protein s funkcí adhezinu) či antibiotické resistance (ABC transportéry, enzymy modifikující antibiotika apod.) (21–23).

V našem projektu jsme na základě literární rešerše vytypovali 22 nejvhodnějších molekulárních markerů, které byly použity pro určení druhů u jiných druhů bakterií nebo při tvorbě fylogenetických stromů enterokoků. Z nich byly pak pro testování vybrány tři, které na základě *in-silico* analýz

dokázaly odlišit skupinu intestinálních druhů enterokoků od těch spíše přírodních a jejichž velikost byla 300–500 bp, aby mohly být později použity i pro metody sekvenování druhé generace. Jednalo se o dvě variabilní oblasti 16S rRNA (V1-V3 oblast 16S rRNA, V6-V9 oblast 16S rRNA) a část genu *pheS* kódujícího phenylalanin tRNA syntázu.

Uvedené markery byly otestovány nejdříve na sbírkových kmenech enterokoků. Z minulých projektů financovaných z institucionální podpory i z analýz provedených v rámci tohoto projektu víme, že v rámci zkoumaných koupacích lokalitách se nejčastěji vyskytuje 6 druhů enterokoků: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* (typicky fekální druhy), dále *E. mundtii* a *E. casseliflavus*. Na těchto šesti druzích byly proto testovány vybrané 3 markery. Pro PCR reakci byla použita vysoce přesná Phusion High Fidelity polymeráza (BioLabs) a podmínky reakce vycházely z odborných článků (19). Ačkoliv část genu *pheS* byla použita jako marker ve studiích (19) a pro amplifikaci jsme použili podmínky reakce jako ve zmíněné publikaci, bylo výsledkem amplifikace vždy více produktů. A to i po snaze optimalizovat podmínky reakce zvýšením hybridizační teploty primerů, zkrácením doby elongace apod. Tento marker jsme tedy nechali pouze jako pomocný, pouze pro porovnání velikosti získaných produktů, které byly pro každý druh jiné. Amplifikované úseky 16S V1-V3 a 16S V6-V9 byly přečištěny komerčním Nucleic Acid Purification kitem (BioLabs) a poslány na sekvenaci do laboratoře SeqMe. Obdržená sekvence byla poté námi porovnána s databází BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Prvních deset bakteriálních druhů, u nichž byla identita dané sekvence 100%, ukazuje tabulka 3. Pokud byly uvedeny různé kmeny daného druhu, je zde uveden vždy jen první z nich. Obecně se zdá, že marker 16S rRNA V6-V9 ukazoval trochu lepší výsledky identifikace než 16S rRNA V1-V3, ale i z literatury víme, že při těchto typech analýz je vždy lepší kombinovat více markerů, než se spoléhat jen na jeden. S oběma markery odpovídaly identifikace kmenů *E. faecium*, *E. faecalis* a *E. mundtii* daným druhům. To může být dáno i tím, že tyto druhy jsou nejvíce prozkoumány a je pro ně tedy v databázi BLAST nejvíce dat. U sbírkového kmene *E. durans* byly amplifikované segmenty identifikovány jako patřící k *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* nebo *E. lactis*. To není moc překvapující, neboť všechny tyto 4 druhy patří do stejné fylogenetické větve tvořící skupinu *E. faecium* (9). Ani vzhledem k trasování původu znečištění tato méně spolehlivá identifikace tolik nevádí, protože všechny uvedené druhy patří mezi typicky fekální. Proto by pro interpretaci výsledků v každém případě poukazovaly na znečištění humánního, případně zvířecího původu. Obdobná situace byla u sbírkového kmene *E. casseliflavus*. Zde se opakovaně mezi identifikacemi se stejným identifikačním skóre objevovaly druhy *E. casseliflavus* a *E. gallinarum*. Tyto dva druhy patří ke stejné fylogenetické větvi a ani jeden z druhů nemusí být fekálního původu. Při použití úseku 16S V1-V3 se objevil též druh *E. canintestini*. Ten patří do skupiny „*E. dispar*“, což je jiná fylogenetická skupina než *E. casseliflavus* a *E. gallinarum*. Jak název „*canintestini*“ napovídá, byl izolován ze střev zdravých psů (9), což by mohlo být pro interpretaci výsledků trochu zavádějící.

Nicméně, vzhledem k tomu, že při použití 16S rRNA V6-V9 se tento druh mezi identifikacemi neobjevil, bylo by v tomto případě výhodou použít kombinaci dvou markerů a podle výsledků a dalších stanovení se přiklonit buď k jedné nebo druhé variantě (tedy fekální či spíše nefekální druhy).

**Tab. 3. Výsledky sekvenování produktů 16S V1-V3 a 16S V6-V9 namnožených ze sbírkových kmenů enterokoků**

Sbírkový kmen	Výsledek sekvenace	
	V1-V3 16S rRNA	V6-V9 16S rRNA
<i>E. faecalis</i>	CP046108.1 <i>Enterococcus faecalis</i> strain 133170041-3	CP076498.1 <i>Enterococcus faecalis</i> strain UAMS_EL53
	MT526413.1 Uncultured bacterium clone OTU_11	
<i>E. faecium</i>	MT597570.1 <i>Enterococcus faecium</i> strain 1698	ON013206.1 <i>Enterococcus faecium</i> strain HBUAS62664
<i>E. durans</i>	MT196421.1 <i>Enterococcus faecium</i> strain FFNL2300	CP037955.1 <i>Enterococcus hirae</i> strain CQP3-9
	MK007316.1 <i>Enterococcus</i> sp. strain 13	LR607372.1 <i>Enterococcus durans</i> strain 4928STDY7387704
	MF077130.1 <i>Enterococcus durans</i> strain 54-LR3	
	KF826018.1 <i>Enterococcus lactis</i> strain CGLBL159	
<i>E. casseliflavus</i>	MT597704.1 <i>Enterococcus gallinarum</i> strain 1880	MT597704.1 <i>Enterococcus gallinarum</i> strain 1880
	MK967090.1 <i>Enterococcus casseliflavus</i> strain 116	MT585575.1 <i>Enterococcus casseliflavus</i> strain 902
	MK967084.1 <i>Enterococcus canintestini</i> strain 110	MT482670.1 <i>Enterococcus</i> sp. strain OL6
<i>E. mundtii</i>	MZ869161.1 <i>Enterococcus mundtii</i> strain Ya17	AP019810.1 <i>Enterococcus mundtii</i> 15-1A
	MK818515.1 Bacterium strain AWKUM2	
	KP843064.1 Uncultured bacterium clone 5L2	

Obdobně jsme testovali uvedené markery (16S V1-V3 a 16S V6-V9) na přírodních izolátech šesti druhů enterokoků. Přírodní izoláty pocházely z různého prostředí (trus, rostliny, koupací voda). Izoláty byly identifikovány pomocí MALDI-TOF a zamražené uchovány v 30% glycerolu v -20 °C. Pro účely testování genových markerů byla z uchovaných kmenů izolována DNA a použita jako templát na PCR reakci s primery pro 16S V1-V3, 16S V6-V9. Výsledky (tabulka 4) byly obdobné jako u sbírkových kmenů: u kmenů *E. faecium*, *E. faecalis* a *E. mundtii* odpovídaly identifikace daným druhům. U kmene *E. durans* byly amplifikované segmenty identifikovány jako patřící k *E. faecium*, *E. durans* nebo *E. hirae*. U druhu *E. casseliflavus* se opět mezi identifikacemi se stejným skóre objevoval druh *E. casseliflavus* a *E. gallinarum* a s 16S V1-V3 i *E. canintestini*. Ten však nebyl identifikován s 16S V6-V9.

**Tab. 4. Sekvence 16S V1-V3 a 16S V6-V9 z přírodních vzorků enterokoků a srovnání výsledků sekvenace s identifikací daného druhu pomocí MALDI-TOF**

Lokalita/označení	Identifikace MALDI	Identifikace sekvenací 16S V1-V3	Identifikace sekvenací 16S V6-V9
Mělice rákosí	POD_013F_ <i>E. casseliflavus</i>	LC484773.1 <i>Enterococcus</i> sp. CSQRZR4.5.2	MT597704.1 <i>Enterococcus gallinarum</i> strain 1880
		MK806672.1 <i>Enterococcus casseliflavus</i> strain D1	MT585575.1 <i>Enterococcus casseliflavus</i> strain 902
		KF254559.1 <i>Enterococcus gallinarum</i> strain 99B	
Staňkov rákosí	POD_012F_ <i>E. casseliflavus</i>	MN901966.1 <i>Enterococcus casseliflavus</i> strain NCIMB 11449	MT597704.1 <i>Enterococcus gallinarum</i> strain 1880
		MZ475082.1 <i>Enterococcus</i> sp. strain LP149	MT585575.1 <i>Enterococcus casseliflavus</i> strain 902
		KM823663.1 <i>Enterococcus gallinarum</i> strain MKU-TS1	
Staňkov koupací voda	P00_006F_ <i>E. durans</i>	MT457707.1 <i>Enterococcus faecium</i> strain MLG20-30	CP037955.1 <i>Enterococcus hirae</i> strain CQP3-9
		MK007316.1 <i>Enterococcus</i> sp. strain 13	MN493617.1 <i>Enterococcus durans</i> strain 11267
		MF077130.1 <i>Enterococcus durans</i> strain 54-LR3	
Staňkov koupací voda	P00_007F_ <i>E. faecalis</i>	MT604856.1 <i>Enterococcus faecalis</i> strain 2429	CP076498.1 <i>E. faecalis</i> strain UAMS_EL53
Staňkov koupací voda	P00_005F_ <i>E. faecium</i>	MT510498.1 <i>Enterococcus faecium</i> strain 5971	MN055949.1 <i>Enterococcus faecium</i> strain ClaCZ117
		MK007316.1 <i>Enterococcus</i> sp. strain 13	OM943006.1 <i>Enterococcus</i> sp. strain Dg13
Pilský ryb. koupací voda	P00_009F_ <i>E. hirae</i>	MF326336.1 <i>Enterococcus hirae</i> strain 1-Y2-11	CP055232.1 <i>Enterococcus hirae</i> strain 708
Staňkov rákosí/R8	P00_014F_ <i>E. mundtii</i> R8	MF136804.1 <i>Enterococcus mundtii</i> strain 15	AP019810.1 <i>Enterococcus mundtii</i> 15-1A

Na závěr jsme uvedené markery testovali na izolátech enterokoků z neznámých vzorků koupacích vod a výsledky stanovení porovnávali s výsledky stanovení MALDI-TOF. První výsledky těchto stanovení a porovnání výsledků MALDI-TOF a sekvenace ukazuje tabulka 5.

**Tab. 5. Výsledky identifikace druhů enterokoků izolovaných ze vzorků koupací vody metodou MALDI-TOF a Sangerovým sekvenováním**

Lokalita/označení	Identifikace MALDI	Identifikace sekvenací 16S V1-V3	Identifikace sekvenací 16S V6-V9
Šeberov/ŠebH1_3	P00_008F_ <i>E. casseliflavus</i> /skóre 2,8	MT597704.1 <i>E. gallinarum</i> strain 1880	KX881405.1 <i>Enterococcus</i> sp. AMR3203
		MK967090.1 <i>E. casseliflavus</i> strain 116	MN880198.1 <i>E. casseliflavus</i> strain EC2-9
		MK967084.1 <i>E. canintestini</i> strain 110	MH259881.1 <i>Enterococcus</i> sp. strain HA3
Poděbrady/Pod1_11	P00_010F_ <i>E. hirae</i> /skóre 2,2	MG786416.1 <i>E. hirae</i> strain ICMP 20897	KX570936.1 <i>E. viikkiensis</i> strain MG6
			KX485320.1 <i>E. thailandicus</i> strain MG6
			KF040096.1 <i>E. hirae</i> strain Sha 22
Poděbrady/Pod1_10	P00_011F_ <i>E. mundtii</i> /skóre 1,72	MK818515.1 Bacterium strain AWKUM2	AP019810.1 <i>E. mundtii</i> 15-1A
		KP843064.1 Uncultured bacterium clone 5L2	MT557791.1 <i>Enterococcus</i> sp. strain AAUGM-16
		MZ869161.1 <i>E. mundtii</i> strain Ya17	
Staňkov/1_H5	P00_006F_ <i>E. durans</i> /skóre 1,8	MT457707.1 <i>E. faecium</i> strain MLG20-30	CP037955.1 <i>E. hirae</i> strain CQP3-9
		MK007316.1 <i>Enterococcus</i> sp. strain 13	MN493617.1 <i>E. durans</i> strain 11267
		MF077130.1 <i>E. durans</i> strain 54-LR3	
Staňkov/1_03	P00_007F_ <i>E. faecalis</i> /skóre 1,79	MT604856.1 <i>E. faecalis</i> strain 2429	CP076498.1 <i>E. faecalis</i> strain UAMS_EL53
Staňkov/1_H1	nespolehlivá identifikace/nejbližší shoda <i>E. faecium</i>	MT510498.1 <i>E. faecium</i> strain 5971	MN055949.1 <i>E. faecium</i> strain ClaC2117
		MK007316.1 <i>Enterococcus</i> strain 13	OM943006.1 <i>Enterococcus</i> sp. strain Dg13
Pilský/Pil1_1	P00_009F_ <i>E. hirae</i> /skóre 2,15	MF326336.1 <i>E. hirae</i> strain 1-Y2-11	CP055232.1 <i>E. hirae</i> strain 708

Výsledky byly obdobné jako u testování sbírkových a přírodních izolátů. Pomocí MALDI-TOF identifikovaný druh jako *E. casseliflavus* vyšel při sekvenaci jako *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* nebo *E. canintestini*. Při porovnání výsledků z obou markerů a s přihlédnutím k výše uvedeným analýzám se sbírkovými kmeny by se dalo předpokládat, že jde spíše o enterokoky jiného než čistě fekálního původu. U druhu *E. hirae* izolovaného z koupací vody v Poděbradech se při sekvenaci objevily též druhy *E. thailandicus* a *E. viikkiensis*. *E. thailandicus* patří spolu s *E. hirae* do širší skupiny „*E. faecium*“, takže jde spíše o fekální druhy (9). *E. viikkiensis* patří do skupiny „*E. avium*“, tedy skupiny vázané na střevní trakt ptáků. Druh *E. viikkiensis* však není v naší používané databázi MALDI (Bruker, ref. 8468) zaveden, a proto se ani nemohl objevit mezi MALDI identifikacemi. Zde by tedy opět pomohlo srovnat výsledky identifikace z obou

markerů. Výsledky identifikace tohoto vzorku z MALDI-TOF jednoznačně ukazovaly na druh *E. hirae*. Jeden izolát ze Staňkovského rybníka nebylo možné spolehlivě určit metodou MALDI (nízké skóre), ale naopak jej bylo možné spolehlivě určit sekvenací.

Z výše uvedených výsledků je patrné, že výsledky identifikace enterokoků metodou MALDI-TOF a pomocí sekvenace jsou srovnatelné a pokud máme k dispozici přístrojové vybavení, tak i časově obdobně náročné. Z obou přístupů lze určit, zda identifikované druhy patří spíše k fekální či spíše k jiné než fekální skupině enterokoků, což by bylo důležité především při sledování dlouhodobě mikrobiálně „nevyhovujících“ koupacích lokalit.

### Další možné chemické ukazatele

V letech 2004–2011 v návaznosti na směrnici 76/160/EHS (Council Directive of 8 December 1975 concerning the quality of bathing water 76/160/EEC) o kvalitě vod ke koupání bylo ve vyhlášce č. 135/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch, zakotveno též stanovení dusíkatých látek (amonných iontů, dusičnanů a dusitanů) a dalších chemických (např. celkového fosforu), fyzikálně-chemických a sensorických ukazatelů. Zvýšený obsah dusíkatých látek ve vodě může vypovídat jednak o možnosti kontaminace vody dusíkatými hnojivy používanými v zemědělství, ale také o možnosti fekálního znečištění odpadní vodou, stanovení celkového fosforu zase představuje nejdůležitější limitující prvek pro rozvoj sinic a řas. V roce 2011 bylo však stanovení dusíkatých látek z vyhlášky vypuštěno, díky významné redukci ukazatelů v nové směrnici EU 2006/7/ES. Vzhledem k tomu, že chemické ukazatele v koupacích vodách nemají přímý zdravotní význam, nebyly při transpozici směrnice 2006/7/ES do nově vznikající národní legislativy zařazeny a dnes se tedy na oficiálních koupacích lokalitách nesledují. Nicméně my jsme do našeho projektu zařadili stanovení amonných iontů jako pomocného ukazatele vedle dalších chemických indikátorů, o kterých je v literatuře mnohem méně dat. Jako další možné chemické ukazatele jsou v literatuře diskutovány močovina, kofein a koprostanol. Močovina a kofein jsou sice vylučovány močí, a nejsou tedy ukazateli fekálního znečištění, nicméně logicky i tak možné antropogenní (nepřímo i fekální) znečištění indikují.

Močovina se nachází v moči savců, obojživelníků a některých ryb a v prostředí je rozkládána činností bakteriálních enzymů na amoniak a oxid uhličitý. Do vodního prostředí se může dostat jednak přímo s močí, ale je též v menší míře vylučována pokožkou při pocení. To může být problém především v dezinfikovaných koupacích vodách (bazénech), neboť při reakci močoviny s chlorem vznikají zdraví škodlivé trichloraminy (24). Většina popsaných metod na stanovení močoviny se proto také týká stanovení v dezinfikovaných vodách. V našem projektu jsme se snažili optimalizovat metodiku stanovení i pro přírodní koupací vody a výsledky získané během optimalizace jsou popsány níže.

Koprostanol vzniká ve střevech člověka a vyšších živočichů metabolismem cholesterolu a je ho možné detekovat v odpadních vodách z domácností (25, 26). Jako možný indikátor fekálního znečištění byl použit i v několika studiích (27–29).

Kofein je nejen součástí velmi často užívaných nápojů (káva, coca cola, čaj, energetické nápoje) a čokolády, ale i farmaceutických produktů. Do prostředí se dostává především spolu s antropogenní činností odpadními vodami z lidských sídlišť (je vylučován močí) i z průmyslu. Ačkoliv se nachází i v přírodě jako součást některých rostlin (zejména kávovník, čajovník, kakaovník, v našich podmínkách v různém množství i např. ve fazolích), zejména v našich zeměpisných šířkách je jeho množství v přírodě zanedbatelné (30). Průměrná spotřeba kofeinu na obyvatele a den byla podle dat z potravinové databáze „Food Balance Sheet of the United Nations“ v roce 2013 v Evropě 288,58 mg, s tím, že zde ale byly velké rozdíly v průměrné spotřebě v jednotlivých zemích. Pro srovnání v Jižní Americe to bylo 263,42 mg a v Severní Americe 148,4 mg (31). V odpadních vodách z lidských sídlišť v kanadské Britské Kolumbii byly naměřeny koncentrace kofeinu 20–300 µg/l (26, 32), v řekách v různých částech světa (Španělsko, Velká Británie, USA) byly naměřeny koncentrace 0,007–49,6 µg/l (31, 33–35), v mořských vodách Středozeří a USA to bylo 0,002–0,1 µg/l (36–38), ale u pobřeží byly koncentrace vždy o něco vyšší (0,045–0,33 µg/l) (39, 40). Naše výsledky stanovení kofeinu jsou uvedeny spolu s ostatními souhrnnými výsledky u jednotlivých koupacích lokalit.

Dalším diskutovaným indikátorem je sledování xenobiotik (analgetik apod.). Tato stanovení se hojně užívají v oblasti odpadních vod, např. k monitoringu používaných drog v populaci apod. Myslíme si ale, že v koupacích vodách má tento ukazatel jen omezené použití. Naopak právě kofein může případně vytipovat lokality, kde by mohl být takový problematický výskyt očekáván (spolu s typem lokality – diskotéky apod.).

### **Optimalizace metodiky stanovení močoviny**

V první fázi (květen 2021) byl využit postup podle SOP dr. Krýsla (Labtech v Klatovech), ve kterém je stanovení močoviny prováděno spektrofotometricky za působení 4-dimethylamonobenzaldehydu (DMAB) v kyselém prostředí. Absorbance vzniklého žlutě zbarveného kondenzačního produktu se měří při vlnové délce 420 nm. Mez detekce byla 322 mg/l a mez stanovitelnosti byla 657 mg/l, což jsou hodnoty o 2–3 řády vyšší než očekávané nálezy močoviny v povrchových vodách. Všechny vzorky povrchových vod odebrané v měsíci květnu byly pod mezí detekce. Tato metoda je tedy pro zamýšlený účel nepoužitelná. Navíc je nevhodná pro vzorky, které obsahují řasy či huminové látky, jejichž přítomnost ve Staňkovském a Pilském rybníku byla evidentní. Bylo tedy nutné přejít na citlivější metodu.

V úvahu připadalo několik metod umožňujících stanovovat koncentrace močoviny na úrovni desetin mg/l. Z nich jsme vybrali metodu založenou na enzymatickém rozkladu močoviny ureázou na amonné ionty a jejich následném stanovení spektrofotometricky (41). Oproti citovanému postupu však byla využita jiná metoda na stanovení amonných iontů (podle ČSN ISO 7150-1 (75 7451) – reakce amonných iontů se salicylanem a chlornanovými ionty v přítomnosti nitroprussidu sodného za vzniku světle žluté až modré sloučeniny).

V dostupné literatuře byla tato metoda použita na mořských vodách (41), takže jsme její vhodnost pro použití na vnitrozemských povrchových vodách museli nejdříve ověřit.

Přítomné částice a organismy mohou přímo rušit spektrofotometrické stanovení. Dále mohou přítomné bakterie a fytoplankton močovinu využívat a snižovat její koncentraci. Proto byly všechny vzorky ihned po příjezdu do laboratoře filtrovány přes filtry o velikosti póru 0,45 µm. K úbytku/rozkladu močoviny vlivem přítomných organismů může přes chlazení vzorku docházet i během dopravy do laboratoře. Z těchto důvodů byl k filtrovaným vzorkům z přírodních lokalit paralelně přidáván v místě odběru interní standard močoviny (1 mg/l). Úbytek se ve většině případů pohyboval mezi 10 až 20 %, výjimečně až 24 % (tabulka 6). K omezení rozkladu během dopravy do laboratoře by bylo správnější filtrovat vzorky již v místě odběru. V povrchových vodách se také mohou vyskytovat látky, které inhibují aktivitu ureázy. Kvůli tomu byl k filtrovaným vzorkům z přírodních lokalit paralelně přidáván v laboratoři interní standard močoviny (1 mg/l). Inhibice byla zjištěna ve všech zkoumaných vzorcích a pohybovala se mezi 6 až 18 % (tabulka 6), což považujeme za přijatelné.

**Tab. 6. Snížení koncentrace močoviny (v %) po přidání 1 mg/l v místě odběru a v laboratoři v rámci odběrů v září 2021**

Lokalita	Rozklad během dopravy do laboratoře (%)	Inhibice ureázy po přidání močoviny v laboratoři (%)
Mělice/H	16,7	8,8
Eliška	17,3	8,9
Poděbrady	23,8	15,9
Staňkov/H	6,2	5,5
Pilský	16,6	11,4
Šeberák/přítok	13,1	17,6

Vzhledem k tomu, že vypočítaná mez detekce metody je 0,06 mg/l a mez stanovitelnosti 0,11 mg/l, je metoda dostatečně citlivá i pro účely monitorování koupacích vod. Ve vodách, kde se koupou lidé, lze očekávat koncentrace močoviny na úrovni desetin až jednotek mg/l (42). Vzhledem k přijatelné výtěžnosti a dostatečné citlivosti lze podle našeho názoru metodu používat na různých typech povrchových vod bez obavy, že poskytne zavádějící údaje.



## Mikrobiologické a chemické přístupy k odlišení původu znečištění koupacích vod

Je samozřejmé, že na kvalitu koupacích vod má vliv mnoho faktorů a to nejen samotná přítomnost či nepřítomnost zdroje znečištění a velikost recipientu, ale též např. počasí, množství srážek, směr větru, odběrové místo a další. Kromě toho je třeba se na výsledky laboratorních analýz dívat nikoliv jako na jednotlivá data, ale jako na celkový souhrn výsledků různých analýz, které je třeba spolu porovnat a korelovat. Vztahy některých ukazatelů jsou již v literatuře popsány, jiné jsou stále předmětem zkoumání, k němuž jsme chtěli přispět i v rámci našeho projektu. Příkladem je vyhodnocení mikrobiologických indikátorů, kde nejde pouze o samotné množství *E. coli* (EC) a intestinálních enterokoků (IE), ale též o jejich poměr. V trávicím traktu živočichů totiž převládá množství enterokoků (IE) nad *E. coli* (EC), zatímco u lidí je tomu naopak. V literatuře je proto popsáno, že pokud je  $EC/IE < 0,7$ , je původ znečištění zvířecí a pokud je  $EC/IE > 4$ , je původ znečištění humánní. Poměr mezi 0,7 a 4 je původ smíšený (43). Tento poměr je třeba brát jako orientační, ale spolu s dalšími indikátory může napomoci k objasnění zdroje znečištění v dané lokalitě.

Souvislost mezi mikrobiologickými a chemickými ukazateli (zejména kofeinem) není, zejména v koupacích vodách (moře, jezera) a řekách, úplně zřejmá a spíše se zdá, že každý z těchto ukazatelů indikuje místně či časově odlišný zdroj kontaminace. V publikované literatuře pojednávající o koupacích vodách (moře, jezera) a řekách se většinou píše, že korelace mezi kofeinem a indikátory fekálního znečištění byla nízká (44, 45). Kurrisery ale upozornil na to, že větší korelace je ve vzorcích ze sedimentu než z vody, což by mohlo souviset s rozdílnou rychlostí přežívání mikroorganismů v těchto dvou prostředích (46).

V dalších kapitolách představujeme korelace stanovených mikrobiologických i chemických ukazatelů na jednotlivých lokalitách. Poslední kapitola je pak věnována souhrnnému zhodnocení korelace všech výsledků bez ohledu na určitou lokalitu a zhodnocení, co nám takové korelace mohou říci.

## Testování metod a různých přístupů k hodnocení kvality koupací vody na vybraných koupacích lokalitách

Pro testování výše popsaných mikrobiologických, chemických i fyzikálních ukazatelů kvality koupací vody bylo vybráno 6 lokalit, které patří kromě jedné mezi oficiální koupací profily. Lokality byly vybrány tak, aby byly různorodé, s různou úrovní možného fekálního znečištění (od nevyhovujících po velmi čisté), s různým druhem podloží (písečné lomy, bahnitě dno) i s různými možnými zdroji fekálního znečištění (kempy, město, příroda) a s různým bezprostředním okolím (velké rákosí, nízká tráva, písčité pláž). Jednalo se o Staňkovský rybník, písňík Mělice, koupaliště Šeberák, Pílský rybník u Monínce, jezero Poděbrady a rybník Eliška. Tabulka 7 ukazuje data o vybraných lokalitách za

poslední čtyři roky, jak jsou uvedena v informačním systému PiVo, kde jsou shromažďovány výsledky analýz akreditovaných laboratoří z oficiálních koupacích lokalit.

**Tab. 7. Výsledky hodnocení šesti vybraných koupacích lokalit za posledních 5 let, tak jak jsou uvedeny v informačním systému PiVo.**

Lokalita	Rok	95. p. TKB/EC ( $\sigma$ )	90. p. TKB/EC ( $\sigma$ )	95. p. IE ( $\sigma$ )	90. p. IE ( $\sigma$ )	Celkově ČR
Staňkovský rybník	2017	289	173	658	405	nevyhovující
	2018	272	159	527	340	nevyhovující
	2019	321	185	604	392	nevyhovující
	2020	428	230	678	415	nevyhovující
	2021	479	258	757	450	nevyhovující
Písník Mělice	2017	239	140	478	279	příjatelná
	2018	280	169	905	491	nevyhovující
	2019	220	144	699	422	nevyhovující
	2020	185	130	406	277	příjatelná
	2021	260	161	428	278	příjatelná
Koupaliště Šeberák	2020	94	52	40	29	výborná
Jezero Poděbrady	2017	152	97	113	77	výborná
	2018	172	104	141	87	výborná
	2019	141	91	138	88	výborná
	2020	118	72	156	94	výborná
	2021	120	73	94	60	výborná
Monínec, Pílský rybník	2021	95	59	31	24	výborná

Pro hodnocení výsledků se používá 95. a 90. percentil za poslední 4 roky. Lokalita Šeberák nebyla v roce 2019 v provozu a v předchozích letech nebyla dostatečně testovaná, proto jsou zde uvedena pouze data za rok 2020. Výsledky z Pílského rybníku byly do IS PiVo zařazeny poprvé v roce 2021.

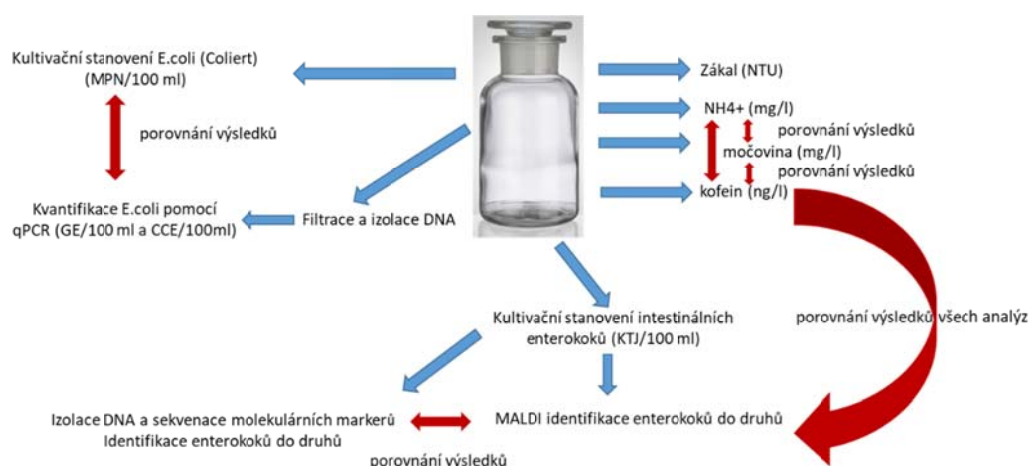
EC – E.coli, IE – intestinální enterokoky

Vybrané lokality byly během koupací sezóny navštíveny čtyřikrát, a to jednou na začátku (květen), dvakrát během sezóny (červen a srpen) a jednou na konci (září). Vzorky byly odebrány z místa, které slouží jako oficiální vzorkovací místo pro danou lokalitu, u rozsáhlejších lokalit byla navíc vzorkována další 1–2 místa.

Před vlastním vzorkováním byla stažena data ohledně počasí a srážek v dané lokalitě. Data pocházela z volně přístupných údajů Českého hydrometeorologického ústavu a byla vždy stahována tak, aby pokryla den vzorkování a 72 hodin před vlastním odběrem vzorku. V místě odběru bylo sledováno počasí: zaznamenány byly srážky, teplota vzduchu, teplota vody, průhlednost a počet lidí, ptactva a zvěře. Každý vzorek byl odebrán v biologickém duplikátu.

Po přivezení do laboratoře byly vzorky hned zpracovány, jak je uvedeno na obrázku 7. Část vzorku (100 ml) byla použita na stanovení *E. coli* pomocí qPCR, jak bylo popsáno v kapitole „Molekulárně

biologické metody stanovení *E. coli*“, a část (100 ml) na kulturační stanovení *E. coli* podle ČSN EN ISO 9308-2:2014. Další část vzorku (100 ml) byla použita na kulturační stanovení intestinálních enterokoků podle ČSN EN ISO 7899-2. Z narostlých misek byly pak bakterie v jednotlivých koloniích identifikovány do druhů pomocí metody MALDI-TOF a zároveň byla ze stejných kolonií izolována DNA, která sloužila jako templát pro PCR reakci a následné sekvenování molekulárních markerů, jak je popsáno v kapitole „Ukazatel intestinální enterokoky“. Další část vzorku byla použita pro chemické analýzy, při kterých byly stanoveny ukazatele související s metabolismem dusíku – tedy amonné ionty, močovina a další ukazatel přímo související s antropogenním znečištěním – kofein. Všechny chemické ukazatele kromě kofeinu byly stanoveny v laboratoři SZÚ, kofein byl stanoven v laboratoři Povodí Labe v Hradci Králové. Stanovení chemických ukazatelů měla sloužit k doplnění mikrobiologických a molekulárně biologických analýz jako další podpůrné ukazatele případného antropogenního znečištění.



**Obr. 7. Schématické zobrazení analýz provedených na odebraných vzorcích koupacích vod.**

## Výsledky stanovení na jednotlivých lokalitách

### Lokalita Staňkovský rybník

Tato jihočeská lokalita je na základě mikrobiologických stanovení dlouhodobě hodnocena jako nevyhovující (tabulka 7), a to především z důvodů vysokého počtu enterokoků. Zdroj znečištění ale není jasný. V úvahu připadají především blízké kempy a chaty a v těsné blízkosti mola, kde byly odebírány vzorky, jsou též maringotky k pronajmutí. Standardní odběrové místo, využívané pro výsledky zasílané do informačního systému PiVo do konce koupací sezóny 2021 (odpovídá našemu místu H, viz níže), bylo situováno na výše zmíněném mole, kde ale v době nízkého stavu vody hloubka vodního sloupce nepřesahuje 1 m.

Z našich dřívějších analýz ale také víme, že mezi druhy enterokoků vyskytujících se na této lokalitě je často identifikován i druh *E. casseliflavus* asociovaný s možností pomnožení na rákosí (47). Protože se jedná o rozsáhlejší lokalitu, vzorky byly odebírány na třech různých místech: místo H (odběrové místo pro ZÚ do roku 2021; uprostřed kempů, rákosí, rybáři), místo 01 (chatová oblast, dle informací místních obyvatel ústí septiků, rákosí) a místo 03 (u hráze, větší hloubka u břehu, půjčovna loděk). V odběrových místech H a 01 jsou významné rákosové porosty (obrázek 8).



**Obr. 8. Rákosové porosty na březích Staňkovského rybníka.**

Z poměru hodnocení 95., resp. 90. percentilu hodnot (EC) ku hodnotám (IE) na této lokalitě (tabulka 8) se zdá, že znečištění je spíše zvířecího původu než lidského.

**Tab. 8. Poměr 95. resp. 90. percentilu hodnot *E. coli* (EC) ku hodnotám intestinálních enterokoků (IE) v lokalitě Staňkovský rybník za uplynulých 5 let.**

	EC 95. p./IE 95. p.	EC 90. p./IE 90. p.
2017	0,4	0,4
2018	0,5	0,5
2019	0,5	0,5
2020	0,6	0,5
2021	0,6	0,5

Data ohledně *E. coli* a enterokoků byla převzata z informačního systému PiVo.

Obdobně jsme též porovnali výsledky absolutních hodnot (EC) a (IE) našich kultivačních analýz a zjistili, že poměry značí spíše původ zvířecí nebo smíšený než humánní (tabulka 9, poslední tři sloupce).

Z MALDI-TOF identifikovaných a/nebo sekvenací identifikovaných druhů převládají spíše fekální druhy (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae*), které ale mohou pocházet též z traktu zvířat. Pouze ojediněle se mezi nimi vyskytl též potenciálně „nefekální“ *E. casseliflavus*. Jenom v zářijovém vzorku z místa 03 byl *E. casseliflavus* převažující druh. Dlouhodobě významné rozdíly ve druhovém složení enterokoků mezi jednotlivými profily však nebyly zaznamenány.

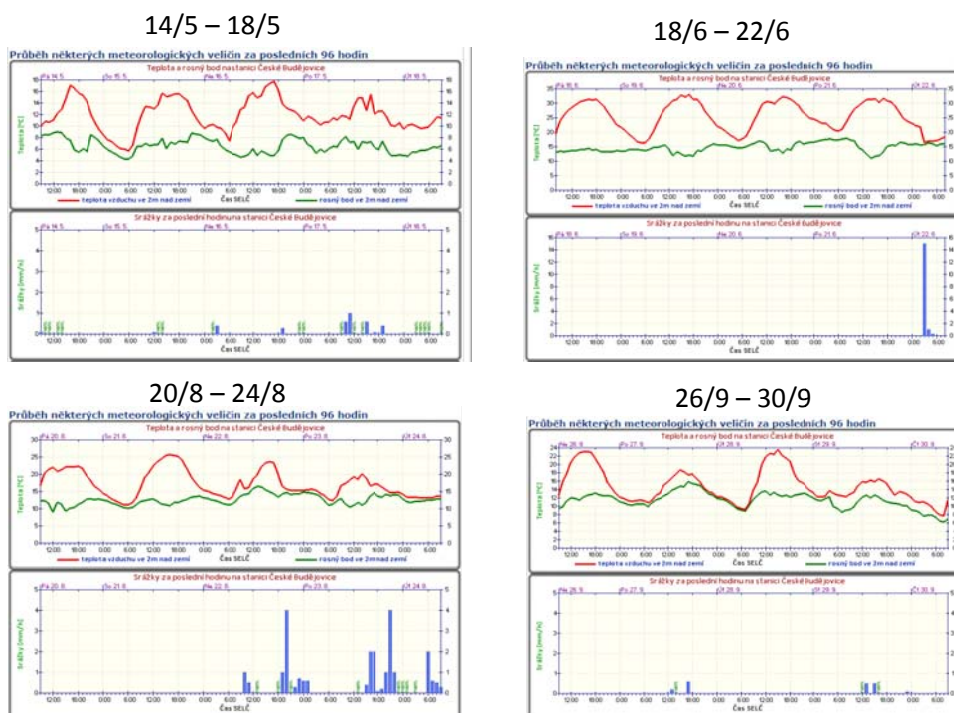
Výsledky doprovodných chemických analýz ukazuje tabulka 9. Koncentrace močoviny byla ve většině vzorků pod mezí detekce. Koncentrace kofeinu byla nejvyšší v místě 01 (chatová oblast) v červnu a srpnu a pak v místě 03 (půjčovna loděk) v květnu a červnu. Zejména u místa 03, které je v neobydlené části u hráze, byly hodnoty kofeinu nejvyšší a ani v jednom případě (místo 01 ani místo 03) nekorelovaly se zvýšeným množstvím mikrobiologických indikátorů fekálního znečištění. Korelace mezi kofeinem a amonnými ionty nebyla taktéž nijak významná. Obdobný výsledek jsme ale pozorovali i na dvou jiných lokalitách, v Mělicích a dlouhodobě i na rybníku Eliška. Domníváme se tedy, že parametr kofein může ukazovat na znečištění časově a/nebo místně odlišné od toho nedávného, indikovaného přítomností *E. coli*, případně fekálních enterokoků, ačkoliv k tomuto závěru bude třeba ještě dalších dat.

Z údajů o počasí a srážkách je zřejmé, že pouze před srpnovým odběrem pršelo, jinak odběrům předcházely dny bez deště (obrázek 9).

**Tab. 9. Výsledky chemických a mikrobiologických analýz vzorků ze třech odběrových míst na lokalitě Staňkovský rybník.**

Místo H	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µg/l)	Močovina (mg/l)	Kofein (ng/l)	EC (MPN/100 ml)	IE (KTJ/100 ml)	EC/IE
květen	174	< MD	87	4	6	0,7
červen	50	0,229	59	117	37	3,2
srpen	12	< MD	53	32	24	1,3
září	37	< MD	< 50	4	20	0,2
<b>Místo 01</b>						
květen	61	< MD	87	5	56	0,1
červen	23	< MD	<b>116</b>	10	138	0,1
srpen	22	< MD	<b>119</b>	7	4	1,8
září	16	< MD	< 50	10	22	0,5
<b>Místo 03</b>						
květen	124	< MD	<b>184</b>	4	9	0,4
červen	50	< MD	<b>292</b>	19	10	1,9
srpen	21	< MD	< 50	31	45	0,7
září	19	< MD	< 50	4	8	0,5

< MD = pod mezí detekce



**Obr. 9. Data znázorňující vývoj teplot (horní grafy) a množství srážek (spodní grafy) 72 h před a v den odběru vzorků.**

Data byla stažena z volně dostupných údajů ČHMÚ.

### Lokalita písňík Mělice



**Obr. 10. Pohled na odběrové místo na lokalitě písňík Mělice.**

Lokalita písňík Mělice je oblíbenou koupací lokalitou situovanou v Pardubickém kraji. Na jeho břehu se nachází několik autokempů. V rámci hodnocení kvality vody patří též mezi ty znečištěnější (tabulka 7). Je to jedna z lokalit, kterou jsme sledovali již v minulosti. I zde byl také identifikován kromě fekálních druhů druh, který nemusí být vždy fekální, tj. *E. casseliflavus*.

Tato lokalita je též rozsáhlá, a proto bylo vzorkováno na 3 různých místech s tím, že místo H bylo opět shodné s odběrovým místem provozovatele/krajské hygienické stanice, které není v místě největšího

počtu koupajících se, ale na straně protilehlé, nicméně návětrné. Další náš profil 01 byl na pláži uprostřed největšího autokempu, profil 03 na pláži, kde nebyl autokemp, ale kiosek s občerstvením, tudíž byla pláž hojně využívána. Ani zde nebyly shledány velké rozdíly v druhovém složení enterokoků mezi jednotlivými profily.

Z porovnání percentilů množství *E. coli* a intestinálních enterokoků se zdá, že původ případného znečištění může být spíše zvířecí než antropogenní (tabulka 11).

**Tab. 10. Poměr 95., resp. 90. percentilu hodnot (EC) ku hodnotám (IE) v lokalitě Mělice za uplynulých 5 let.**

	EC 95. p./IE 95. p.	EC 90. p./IE 90. p.
2017	0,5	0,5
2018	0,3	0,3
2019	0,3	0,3
2020	0,5	0,5
2021	0,6	0,6

Data ohledně *E. coli* a enterokoků byla převzata z informačního systému PiVo.

Poměry absolutních hodnot *E. coli* a intestinálních enterokoků ukazuje tabulka 10, ze které je patrné, že poměr EC/IE je obdobný jako při porovnávání hodnot percentilů.

Z identifikovaných enterokoků převažují fekální *E. faecalis*, *E. faecium* a *E. durans*. Pouze v srpnovém odběru z lokality 01 a částečně též 03 převažují nefekální druhy *E. casseliflavus* a *E. gallinarum*.

V žádném z analyzovaných vzorků nebyla detekována močovina a kofein byl ve větší míře pouze ve dvou vzorcích, přičemž ani v jednom z nich nebyl zároveň významný počet *E. coli*. Je to obdobný výsledek jako u Staňkovského rybníka, kde se domníváme, že kofein může indikovat znečištění pocházející ze vzdálenější lokality. I zde je to však pouze domněnka, kterou bude třeba dále prozkoumat.

**Tab. 11. Výsledky stanovení chemických a mikrobiologických ukazatelů ve vzorcích z koupací lokality Mělice.**

	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μg/l)	Močovina (mg/l)	Kofein (ng/l)	EC	IE	EC/IE
<b>Místo H</b>						
květen	20	< MD	86	2	12	0,2
červen	15	< MD	90	70	160	0,4
srpen	11	< MD	< 50	100	101	1,0
září	21	< MD	57	17	34	0,5
<b>Místo 01</b>						
květen	23	< MD	69	6	21	0,3
červen	27	< MS	73	110	72	1,5
srpen	17	< MD	104	13	106	0,1
září	14	< MD	57	5	9	0,6
<b>Místo 03</b>						
květen	8	< MD	170	4	7	0,5
červen	17	< MD	89	17	33	0,5
srpen	9	< MD	69	11	36	0,3
září	19	< MD	< MS	4	17	0,2

< MD pod mezí detekce, < MS pod mezí stanovitelnosti.

#### Lokalita rybník Šeberák



**Obr. 11. Rybník Šeberák – pohled z odběrového místa na molu na venkovní restauraci nacházející se na břehu rybníka.**

Lokalita rybník Šeberák je jedna z nejnavštěvovanějších pražských koupacích lokalit, jejíž kvalita však bývá již brzy v létě zhoršená. Na břehu se nachází venkovní restaurace. Na této lokalitě byly vzorky odebrány ze dvou míst: a) z přírodního koupaliště Šeberov, b) z jihozápadu přítékajícího potoka. Přitékající potok je považován za jeden z hlavních zdrojů antropogenního znečištění této lokality (bodové a difuzní zdroje znečištění). Proto jsme předpokládali, že zde budou vyšší koncentrace indikátorů fekálního znečištění.

Na lokalitě Šeberák převládalo podle poměru EC/IE na začátku sezóny znečištění spíše humánního původu a později pak původu smíšeného (tabulka 12). Tomu též odpovídá, že převažující druhy



identifikované z květnových a červnových odběrů byly *E. faecium* a *E. faecalis*. V srpnu se pak objevuje i *E. hirae* a *E. mundtii*, v září pak i *E. casseliflavus*.

V tomto případě byl kofein změřen ve zvýšené koncentraci ve všech vzorcích kromě dvou zářijových, což by odpovídalo největší návštěvnosti jak blízké restaurace, tak vlastního rybníka v letních dnech. S tím koreluje i zvýšené množství *E. coli* (kromě jednoho z odběrů) a převaha fekálních druhů enterokoků.

**Tab. 12. Výsledky stanovení chemických a mikrobiologických parametrů na lokalitě Šeberák.**

Odběr H	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μg/l)	Močovina (mg/l)	Kofein (ng/l)	EC	IE	EC/IE
květen	267	< MD	204	33,9	3,5	9,7
červen	126	< MD	185	107	59	1,8
srpen	173	< MD	120	34	144	0,2
září	126	< MS	< MD	52	32	1,6
<b>Odběr přítok</b>						
květen	168	< MS	144	241,35	24,5	9,9
červen	461	< MD	167	797	368	2,2
srpen	374	< MS	113	228	56	4,1
září	261	0,127	50	262	50	5,2

< MD pod mezí detekce, < MS pod mezí stanovitelnosti.

#### Pilský rybník, Monínec



**Obr. 12. Pohled na molo na středočeském Pilském rybníku u obce Jetřichovice.**

Tato lokalita leží ve Středočeském kraji u obce Jetřichovice a známého lyžařského střediska Monínec. Lokalita patří mezi ty čistší a je oficiálně sledována až od roku 2019. V roce 2021 byla lokalita orientačně hodnocena jako výborná. Jde o menší rybník, a proto bylo odebíráno z jednoho hlavního místa.

Podle poměru EC/IE jde spíše o lokalitu se smíšeným znečištěním (tabulka 13). Mezi identifikovanými druhy enterokoků převládaly *E. hirae*, *E. faecalis* a *E. durans*, ojediněle se vyskytl též *E. casseliflavus*.

Z chemických ukazatelů nebyla detekována ani v jednom ze vzorků močovina a kofein se pohyboval pod 100 ng/l.

**Tab. 13. Stanovení chemických a mikrobiologických ukazatelů ve vzorcích z lokality Pilský rybník, Monínec.**

	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μg/l)	Močovina (mg/l)	Kofein (ng/l)	EC	IE	EC/IE
květen	1	< MD	NA	72,3	11	6,6
červen	47	< MS	93	192,05	80	2,4
srpen	38	< MD	84	7,5	3	2,5
září	17	< MD	NA	14,8	4	3,7

< MD pod mezí detekce, < MS pod mezí stanovitelnosti, NA neanalyzováno.

#### Lokalita koupaliště Poděbrady



**Obr. 13. Odběr na přírodním koupališti Poděbrady.**

Přírodní koupaliště Poděbrady je jezero s písčitou pláží. Na jeho břehu se nachází restaurace i autokemp, vodní plocha je však rozsáhlá. Kvalita vody bývá v této lokalitě výborná (tabulka 7). Pro naše analýzy byly vzorky odebrány z jednoho místa a výsledky jsou shrnuty v tabulce 14. V tomto případě zvýšené koncentrace kofeinu ze srpnového vzorku koreluje s výrazně zvýšeným počtem *E. coli* i intestinálních enterokoků. Poměr EC/IE se rovnal 4, což by ukazovalo spíše na humánní původ znečištění. Z intestinálních enterokoků byly izolovány typicky fekální druhy *E. faecium*, *E. faecalis* a *E. hirae*.

**Tab. 14. Výsledky chemických a mikrobiologických analýz vzorků z přírodního koupaliště v Poděbradech.**

	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μg/l)	Močovina (mg/l)	Kofein (ng/l)	EC	IE	EC/IE
květen	19	< MD	NA	6,4	36,5	0,2
červen	16	< MD	< 50	66,3	48	1,4
srpen	9	< MD	121	488,4	122	4,0
září	8	< MD	NA	22,3	30	0,7

< MD pod mezí detekce, < MS pod mezí stanovitelnosti, NA neanalyzováno.

## Lokalita Eliška



**Obr. 14. Rybník Eliška nacházející se na území Prahy 9.**

Rybník Eliška nepatří mezi oficiálně sledované koupací lokality, ale zařadili jsme ji do našeho výběru na základě pilotních měření v prvním roce řešení projektu. Ačkoliv se jedná o lokalitu poměrně mikrobiálně čistou, k našemu překvapení zde bylo stanovitelné množství kofeinu, a proto jsme se rozhodli sledovat tuto lokalitu i v další koupací sezóně.

Eliška se nachází na území Prahy 9 – Horních Počernic a je součástí soustavy dalších rybníků (rybník Barbora) spojených Svěpravickým potokem. Rybník je relativně malý a bylo zde pouze jedno vzorkovací místo.

V tabulce 15 jsou výsledky mikrobiologických stanovení na této lokalitě. Zajímavější byly ale hodnoty stanovení kofeinu, které byly po celý rok nad 100 ng/l, stejně jako při pilotních analýzách v roce předešlém. Z našich mikrobiologických analýz je patrné, že jde o lokalitu celkem čistou i v době koupací sezóny.

**Tab. 15. Stanovení chemických a mikrobiologických ukazatelů ve vzorcích z rybníka Eliška.**

	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μg/l)	Močovina (mg/l)	Kofein (ng/l)	EC	IE	EC/IE
květen	86	< MS	296	5,2	8,5	0,6
červen	83	0,121	133	14,8	8	1,9
srpen	108	< MD	118	5,2	82	0,1
září	61	< MD	< MD	4,1	30	0,1

< MD pod mezí detekce, < MS pod mezí stanovitelnosti.

Vzhledem k tomu, že výsledek s větším množstvím kofeinu v relativně čistém prostředí byl zajímavý, odebrali jsme též jeden vzorek v sousedním rybníku Barbora, který je s Eliškou spojen Svěpravickým potokem. I zde byl detekován kofein v koncentraci 171 ng/l. Na rozdíl od Staňkovského rybníka a Mělic, kde byl též detekován kofein, ale pouze jednou či dvakrát, v Elišce byl stanoven opakovaně, a proto by bylo zajímavé tuto lokalitu dále zkoumat a zjistit, co může být zdrojem uvedeného kofeinu

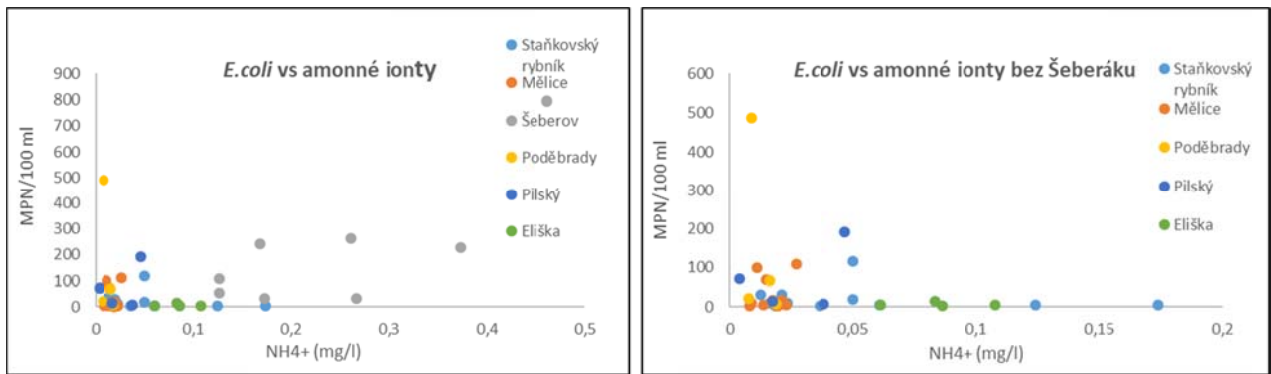
ve vodě (možná antropogenní znečištění z oblasti Xaverova nad touto soustavou). To však by již bylo nad rámec tohoto projektu.

## Celkové shrnutí všech výsledků a jejich korelace

V předchozí kapitole byly prezentovány výsledky stanovení mikrobiologických a chemických ukazatelů v jednotlivých sledovaných lokalitách. V této kapitole jsme se snažili porovnat výsledky stanovení souhrnně, najít mezi nimi případné souvislosti a porovnat je s údaji publikovanými v literatuře i s údaji z našich předchozích analýz.

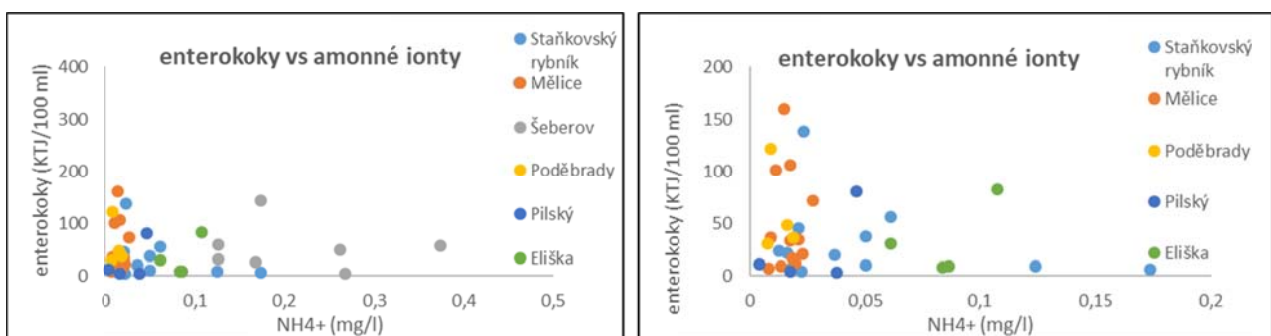
Z laboratorních stanovení je základním ukazatelem pro hodnocení kvality koupací vody stanovení mikrobiologických indikátorů fekálního znečištění (*E. coli* a intestinálních enterokoků). Kultivační stanovení, jak je předepsáno vyhláškou, nám sice napoví o kvalitě vody, ale nelze z něj vždy jasně prokázat původ znečištění. Zejména v případě zvýšeného množství enterokoků může jít jak o znečištění fekálního původu, tak částečně může být i výsledkem namnožení původně fekálních druhů v prostředí. Určitým orientačním vodítkem pro posouzení původu může být zmíněný poměr množství *E. coli* a intestinálních enterokoků. Dalším vodítkem může být určení druhu enterokoků (spíše fekálních druhů či spíše přírodních druhů) pomocí metod MALDI-TOF či sekvenováním. V našich vzorcích jsme během celé koupací sezóny nacházeli fekální druhy *E. faecium*, *E. faecalis* a *E. durans* a/nebo *E. hirae* (obrázek 6). V září se na většině lokalit (Šeberov, Staňkov, Mělice, ojediněle v Monínci a na Elišce) objevil i potenciálně nefekální druh *E. casseliflavus*. Obdobné složení druhů jsme pozorovali již dříve, zejména na lokalitě Staňkov a Mělice. Tam se též vedle fekálních druhů objevoval i potenciálně nefekální *E. casseliflavus* a výsledky druhového složení byly též ovlivněny odběrovým místem. I když je třeba v této oblasti dalšího zkoumání, mohlo by toto pozorování znamenat, že ne vždy zvýšené množství enterokoků musí indikovat fekální znečištění.

Dalším možným vodítkem pro zjištění zdroje znečištění a případně i k jeho vytrasování je stanovení chemických ukazatelů. Jak již bylo zmíněno výše, v letech 2004–2011 bylo ve vyhlášce č. 238/2011 Sb. předepsáno vedle stanovení mikrobiologických ukazatelů též stanovení amonných iontů, dusičnanů a dusitanů a výsledky těchto stanovení jsou proto uvedeny i v systému PiVo. Na začátku řešení projektu jsme se proto nejdříve snažili porovnat stanovovaná množství sloučenin dusíku a přítomných indikátorů fekálního znečištění. Celkem jsme našli v systému PiVo kolem padesáti záznamů, ze kterých bylo možné porovnat mikrobiologické ukazatele versus některý z chemických ukazatelů. Nicméně během tohoto porovnávání jsme nenašli žádnou významnou korelaci, tj. např. vzorky s vyšší hladinou intestinálních enterokoků byly jednou spojeny s množstvím amonných iontů v řádu desetin, jindy tisícín mg/l apod. V našich analýzách jsme došli k podobným závěrům, jak ukazují obrázky 15 a 16.



**Obr. 15. Porovnání výsledků stanovení amonných iontů (osa x) a *E. coli* (osa y).**

Na obrázku vlevo jsou data bez výsledků lokality Šeberák, aby bylo možné lépe porovnat výsledky nižších hodnot obou ukazatelů.



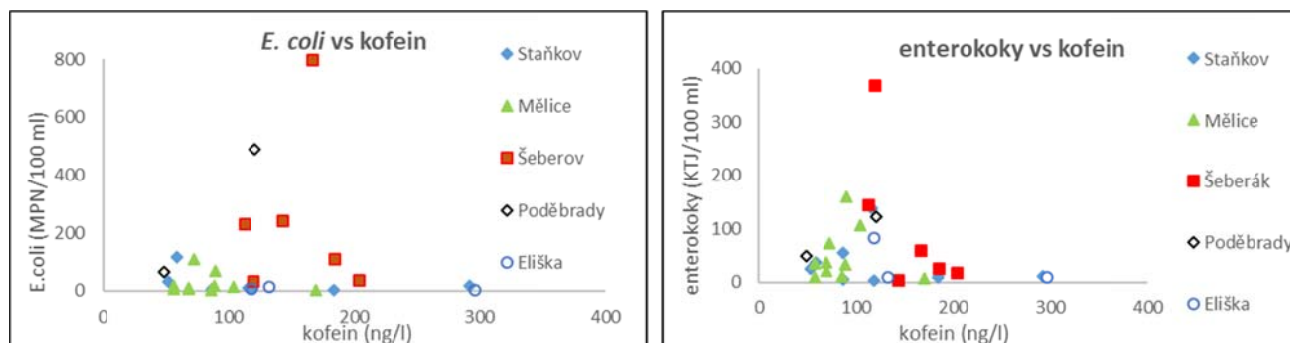
**Obr. 16. Porovnání výsledků stanovení amonných iontů (osa x) a intestinálních enterokoků (osa y).**

Na obrázku vlevo jsou data bez výsledků lokality Šeberov, aby bylo možné lépe porovnat výsledky nižších hodnot obou ukazatelů.

To není zase až tak překvapivé, neboť na rozdíl od pitných vod nemá u povrchových (koupacích vod) tento ukazatel takový význam, protože amonné ionty mohou vznikat i přirozenými procesy, např. při rozkladu těl mrtvých organismů apod., a nemusí tedy souviset vyloženě s fekálním znečištěním. Z tohoto důvodu bylo také toto ustanovení z vyhlášky vypuštěno. Pro nás ale sloužil jako pomocný chemický ukazatel, protože o jiných testovaných chemických ukazatelích se toho ví málo.

Porovnání výsledků stanovení druhého ukazatele – kofeinu versus mikrobiologické ukazatele – je znázorněno na obrázku 17. Kofein koreloval se zvýšeným množstvím mikrobiologických indikátorů fekálního znečištění na znečištěné lokalitě Šeberák a v Poděbradech. V ostatních případech, kdy byl detekován, se jednalo o lokality (Eliška) s nízkým počtem mikrobiálních indikátorů fekálního znečištění (obrázek 17 a tabulka 15). Obdobné pozorování můžeme najít i v několika zahraničních studiích (44, 45). Tak například ve studii Lindena byly naměřeny koncentrace kofeinu na různých místech řeky Sinos v Brazílii od 0,2 do 16 mg/l, přičemž ale hodnota korelačního koeficientu mezi fekálními koliformními bakteriemi a koncentrací kofeinu byla nízká ( $r^2 = 0,4$ ) (45). Ve studii Paiga a kol., ve které analyzovali vzorky vody z mořského pobřeží, naměřili maximální hodnotu kofeinu

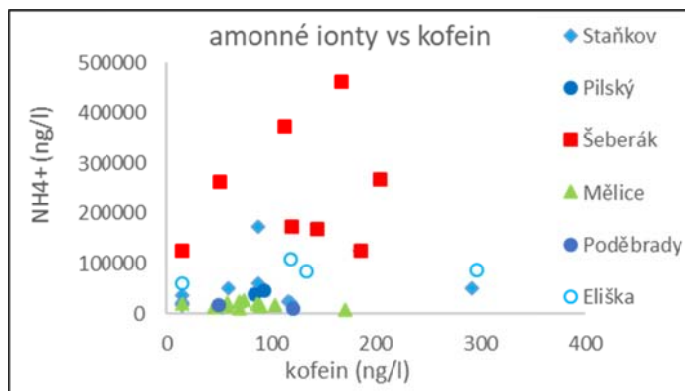
0,525 mg/l. Tato hodnota i ostatní koncentrace v řádech stovek ng/l byly ve vzorcích hodnocených podle množství indikátorů fekálního znečištění jako vyhovující (všechny byly do 15 MPN/100 ml) (44).



**Obr. 17. Porovnání výsledků stanovení kofeinu a *E. coli* a kofeinu a intestinálních enterokoků na námi sledovaných lokalitách.**

V literatuře se setkáváme jak se studii, kde koncentrace kofeinu korelovala s indikátory fekálního znečištění, tak s těmi, u nichž byla korelace velmi nízká. Zhruba jde ale říci, že tam, kde byla popsána zvýšená koncentrace kofeinu a zároveň vyšší koncentrace fekálních indikátorů, se jednalo o studie na odpadních vodách (48). Naopak u povrchových vod (řeky, moře, jezera) byla korelace mezi kofeinem a fekálními bakteriemi, stanovenými jako skupina fekálních koliformních bakterií nebo jako *E. coli* a intestinální enterokoky, velmi nízká (30, 44, 45). Kurisseri ve své práci studoval stabilitu kofeinu v povrchových vodách a v sedimentu během celého roku a porovnával ji s délkou přežití koliformních bakterií a *E. coli*. Kofein byl degradován mnohem pomaleji než sledované mikroorganismy a degradace byla pomalejší v zimě než v létě. To si vysvětloval jednak sníženou biologickou aktivitou všech organismů v zimním období a taky menším množstvím UV záření, které mimo jiné ovlivňuje rychlost rozkladu kofeinu (46, 49). Kromě toho v sedimentu je rychlost rozkladu kofeinu ještě pomalejší než v povrchové vodě a v těchto podmínkách množství kofeinu též více korelovalo s množstvím sledovaných fekálních indikátorů (46).

Když jsme se pokusili porovnat množství kofeinu a amonných iontů, zjistili jsme, že zvýšená koncentrace obou těchto ukazatelů byla ve fekálně znečištěné lokalitě Šeberák a v jednom ze vzorků z lokality Staňkov. Naopak na Elišce, kde byl kofein detekován opakovaně v různých koncentracích, se množství amonných iontů drželo na podobné koncentraci. To může být důsledkem zcela jiné stability obou indikátorů v různých přírodních podmínkách (obrázek 18).



**Obr. 18. Porovnání stanovení amonných iontů a kofeinu v námi sledovaných lokalitách.**

Z výše uvedeného vyplývá, že mikrobiální indikátory fekálního znečištění signalizují relativně čerstvé znečištění dané lokality. Na dlouhodobě znečištěných lokalitách nám samy o sobě neřeknou nic o jeho původu. V tom případě je dobré zvážit i další okolnosti odběru (možná přítomnost rákosových porostů, charakter dna apod.) a případně přistoupit k dalším doplňkovým analýzám (identifikace druhů enterokoků, stanovení chemických ukazatelů), které by mohly usnadnit odlišení fekálního (a případně antropogenního) znečištění od zvýšení množství mikrobiologických indikátorů fekálního znečištění na základě přírodních procesů.

Na druhou stranu chemický ukazatel kofein je známkou čistě antropogenního znečištění, ale vzhledem k jeho stabilitě může signalizovat znečištění pocházející ze vzdálenější lokality nebo znečištění, které je staršího data. Každé z těchto stanovení (mikrobiologické ukazatele vs. chemické) má tedy svůj význam a každé signalizuje něco jiného, a mohou se tedy při hodnocení kvality koupací vody vhodně doplňovat.

## Závěr

Toto monotematické číslo shrnuje poznatky týkající se použití různých laboratorních metod při monitorování znečištění koupacích vod a vyhodnocování jejich výsledků. Snaží se přiblížit využití molekulárně biologických metod (zejména qPCR, sekvenování, MALDI), které se i v mikrobiologii vody začínají rozvíjet, a zhodnotit jejich přínos pro hodnocení kvality koupacích vod. Práce se také zabývá dalšími chemickými ukazateli (močovina, kofein), které mohou být též využity při hledání zdrojů znečištění koupacích vod jako indikátory antropogenního znečištění. Závěrem je pak shrnutí, co nám které ukazatele mohou o kvalitě vody říci.

Předkládané číslo AHEM je určené širší odborné veřejnosti i přímo pracovníkům zabývajícím se hodnocením kvality koupacích vod jednak jako přehled o nových metodách a možných přístupech jednak jako „odrazový můstek“ pro analýzy v oblasti hledání zdrojů znečištění koupacích vod.

## Poděkování

Děkujeme Technologické agentuře České republiky za financování grantového projektu TJ04000132 „Využití metod molekulární biologie k identifikaci zdrojů znečištění v koupacích vodách“, jehož jedním z výstupů je toto monotematické číslo.

Děkujeme Ing. M. Ferenčíkovi ze státního podniku Povodí Labe za analýzy spojené se stanovením kofeinu i za vysvětlení týkající se těchto analýz.

## Literatura

1. Chang GW, Brill J, Lum R. Proportion of Beta-D-Glucuronidase-Negative Escherichia-Coli in Human Fecal Samples. *Appl Environ Microb.* 1989;55(2):335-9.
2. Horakova K, Mlejnkova H, Mlejnek P. Direct detection of bacterial faecal indicators in water samples using PCR. *Water Sci Technol.* 2006;54(3):135-40.
3. Jozic S, Vukic Lusic D, Aljinovic A, Vlakancic W, Cenov A, Vrdoljak Tomas A, et al. Is TBX agar a suitable medium for monitoring Escherichia coli in bathing water using the membrane filtration method? *Environ Monit Assess.* 2019;191(9):558.
4. Liu S, Jin D, Lan R, Wang Y, Meng Q, Dai H, et al. Escherichia marmotae sp. nov., isolated from faeces of Marmota himalayana. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(7):2130-4.
5. Djurhuus A, Port J, Closek CJ, Yamahara KM, Romero-Maraccini O, Walz KR, et al. Evaluation of Filtration and DNA Extraction Methods for Environmental DNA Biodiversity Assessments across Multiple Trophic Levels. *Front Mar Sci.* 2017;4.
6. Sivaganesan M, Aw TG, Briggs S, Dreelin E, Asian A, Dorevitch S, et al. Standardized data quality acceptance criteria for a rapid Escherichia coli qPCR method (Draft Method C) for water quality monitoring at recreational beaches. *Water Research.* 2019;156:456-64.
7. Walker DI, McQuillan J, Taiwo M, Parks R, Stenton CA, Morgan H, Mowlem MC, Lees DN. A highly specific Escherichia coli qPCR and its comparison with existing methods for environmental waters. *Water Res.* 2017;126:101-10.
8. Best S, Rediske R, Lane M. A comparison study of Colilert and qPCR methods at pere Marquette Beach, Muskegon County, MI. *Student Summer Scholars.* 203; 2018.
9. Svec PF, C.M.A.P. Part III. The family Enterococcaceae. *Lactic acid bacteria, Wiley Blackwell: Holzapfel WH, Wood BJB.* 2014. p. 171-211.
10. Svec P, Devriese LA, Sedlacek I, Baele M, Vancanneyt M, Haesebrouck F, et al. Characterization of yellow-pigmented and motile enterococci isolated from intestines of the garden snail Helix aspersa. *Journal of Applied Microbiology.* 2002;92(5):951-7.



11. Signoretto C, Burlacchini G, Pruzzo C, Canepari P. Persistence of *Enterococcus faecalis* in aquatic environments via surface interactions with copepods. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(5):2756-61.
12. Whitehead M, Godfree V. Imperial Cancer Research Fund and the Lancet. *Lancet.* 1997;350(9091):1627.
13. Svec P, Vandamme P, Bryndova H, Holochova P, Kosina M, Maslanova I, et al. *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62(Pt 7):1499-505.
14. Ott EM, Muller T, Muller M, Franz CM, Ulrich A, Gabel M, et al. Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. *J Appl Microbiol.* 2001;91(1):54-66.
15. Signoretto C, Burlacchini G, Lleo MM, Pruzzo C, Zampini M, Pane L, et al. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the nonculturable state to plankton is the main mechanism responsible for persistence of this bacterium in both lake and seawater. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(11):6892-6.
16. Byappanahalli M, Fujioka R. Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. *Water Sci Technol.* 2004;50(1):27-32.
17. Deasy BM, Rea MC, Fitzgerald GF, Cogan TM, Beresford TP. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Syst Appl Microbiol.* 2000;23(4):510-22.
18. Tsiodras S, Gold HS, Coakley EP, Wennersten C, Moellering RC, Jr., Eliopoulos GM. Diversity of domain V of 23S rRNA gene sequence in different *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol.* 2000;38(11):3991-3.
19. Naser SM, Thompson FL, Hoste B, Gevers D, Dawyndt P, Vancanneyt M, et al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology (Reading).* 2005;151(Pt 7):2141-50.
20. Baele M, Baele P, Vanechoutte M, Storms V, Butaye P, Devriese LA, et al. Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol.* 2000;38(11):4201-7.
21. Scott TM, Jenkins TM, Lukasik J, Rose JB. Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution. *Environ Sci Technol.* 2005;39(1):283-7.
22. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33(5):1434.

23. Bobková Š, Baudišová D. Hledání vhodných molekulárních markerů pro rozlišení různých druhů enterokoků. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace*. 2021;63:19-23.
24. Schmalz C, Frimmel FH, Zwiener C. Trichloramine in swimming pools--formation and mass transfer. *Water Res*. 2011;45(8):2681-90.
25. Macdonald IA, Bokkenheuser VD, Winter J, McLernon AM, Mosbach EH. Degradation of Steroids in the Human Gut. *J Lipid Res*. 1983;24(6):675-700.
26. Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, Farrah SR, Lukasik J. Microbial source tracking: Current methodology and future directions. *Appl Environ Microb*. 2002;68(12):5796-803.
27. Laureillard J, Saliot A. Biomarkers in Organic-Matter Produced in Estuaries - a Case-Study of the Krka Estuary (Adriatic Sea) Using the Sterol Marker Series. *Mar Chem*. 1993;43(1-4):247-61.
28. Leeming R, Ball A, Ashbolt N, Nichols P. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Research*. 1996;30(12):2893-900.
29. Venkatesan MI, Kaplan IR. Sedimentary Coprostanol as an Index of Sewage Addition in Santa-Monica Basin, Southern-California. *Environmental Science & Technology*. 1990;24(2):208-14.
30. Peeler KA, Opsahl SP, Chanton JP. Tracking anthropogenic inputs using caffeine, indicator bacteria, and nutrients in rural freshwater and urban marine systems. *Environ Sci Technol*. 2006;40(24):7616-22.
31. Korekar G, Kumar A, Ugale C. Occurrence, fate, persistence and remediation of caffeine: a review. *Environ Sci Pollut R*. 2020;27(28):34715-33.
32. Rogers IHB, Birtwell IK, Kruzynski, GM. Organic extractables in municipal wastewater Vancouver, British Columbia. *Water Poll Res J Canada*. 1986;21(2):197-204.
33. Garrido E, Camacho-Munoz D, Martin J, Santos A, Santos JL, Aparicio I, et al. Monitoring of emerging pollutants in Guadiamar River basin (South of Spain): analytical method, spatial distribution and environmental risk assessment. *Environ Sci Pollut R*. 2016;23(24):25127-44.
34. Nakada N, Hanamoto S, Jurgens MD, Johnson AC, Bowes MJ, Tanaka H. Assessing the population equivalent and performance of wastewater treatment through the ratios of pharmaceuticals and personal care products present in a river basin: Application to the River Thames basin, UK. *Sci Total Environ*. 2017;575:1100-8.
35. Weissinger RH, Blackwell BR, Keteles K, Battaglin WA, Bradley PM. Bioactive contaminants of emerging concern in National Park waters of the northern Colorado Plateau, USA. *Sci Total Environ*. 2018;636:910-8.
36. Brumovsky M, Becanova J, Kohoutek J, Borghini M, Nizzetto L. Contaminants of emerging concern in the open sea waters of the Western Mediterranean. *Environ Pollut*. 2017;229:976-83.

37. Gardinali PR, Zhao X. Trace determination of caffeine in surface water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS). *Environ Int.* 2002;28(6):521-8.
38. Siegener R, Chen RF. Caffeine in Boston Harbor seawater. *Mar Pollut Bull.* 2002;44(5):383-7.
39. Rodriguez del Rey Z, Granek EF, Sylvester S. Occurrence and concentration of caffeine in Oregon coastal waters. *Mar Pollut Bull.* 2012;64(7):1417-24.
40. Biel-Maeso M, Baena-Nogueras RM, Corada-Fernandez C, Lara-Martin PA. Occurrence, distribution and environmental risk of pharmaceutically active compounds (PhACs) in coastal and ocean waters from the Gulf of Cadiz (SW Spain). *Sci Total Environ.* 2018;612:649-59.
41. Revilla M, Alexander J, Glibert PM. Urea analysis in coastal waters: comparison of enzymatic and direct methods. *Limnol Oceanogr Methods.* 2005;3.
42. De Laat J, Feng WT, Freyfer DA, Dossier-Berne F. Concentration levels of urea in swimming pool water and reactivity of chlorine with urea. *Water Research.* 2011;45(3):1139-46.
43. Fewtrell L, Bartram J. *Water quality - Guidelines, Standards and Health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease.* IWA Publishing. 2001:p.1 - 431.
44. Paiga P, Delerue-Matos C. Anthropogenic contamination of Portuguese coastal waters during the bathing season: Assessment using caffeine as a chemical marker. *Mar Pollut Bull.* 2017;120(1-2):355-63.
45. Linden R, Antunes MV, Heinzelmann LS, Fleck JD, Staggemeier R, Fabres RB, et al. Caffeine as an indicator of human fecal contamination in the Sinos River: a preliminary study. *Braz J Biol.* 2015;75(2):81-4.
46. Kurissery S, Kanavillil N, Verenitch S, Mazumder A. Caffeine as an anthropogenic marker of domestic waste: A study from Lake Simcoe watershed. *Ecol Indic.* 2012;23:501-8.
47. Ferguson DM, Weisberg SB, Hagedorn C, De Leon K, Mofidi V, Wolfe J, et al. Enterococcus growth on eelgrass (*Zostera marina*); implications for water quality. *FEMS Microbiol Ecol.* 2016;92(4):fiw047.
48. Potera C. Caffeine in wastewater is a tracer for human fecal contamination. *Environ Health Perspect.* 2012;120(3):A108-9.
49. Verenitch SS, Mazumder A. Development of a methodology utilizing gas chromatography ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of low levels of caffeine in surface marine and freshwater samples. *Anal Bioanal Chem.* 2008;391(7):2635-46.