

# Druhové složení enterokoků v pitných vodách a možnosti jejich detekce

DANA BAUDIŠOVÁ, KAREL KOLÁŘ

**Klíčová slova:** intestinální enterokoky – pitná voda – druhové složení – citlivost k volnému chloru

## ABSTRAKT

Intestinální enterokoky jsou v „nové“ legislativě pitné vody jedním ze dvou klíčových mikrobiologických indikátorů, které by měly ukazovat na fekální znečištění. Musejí se stanovovat vždy, a to i v kráceném či orientačním rozboru pitné vody. Celkem bylo z provozních vzorků upravených, tj. pitných vod (nikoli však z neupravovaných studen a vrtů, u nichž se předpokládá vyšší riziko fekálního znečištění) vyšetřeno 134 kmenů enterokoků (*Enterococcus* spp.) a 93 kmenů, které byly identifikovány jako doprovodná mikroflóra, resp. potenciálně falešně pozitivní kmeny. Nejčastěji zachyceným druhem enterokoka byl *E. casseliflavus* (31 %), následovaný *E. faecium* (25 %). Absolutně nejčastějším druhem, který nepatří mezi intestinální enterokoky, byl shledán *Aerococcus viridans* (n = 80), a to ještě zdaleka ne všechny získané kmeny přežily první pasáž. Nejmenší citlivost (tj. největší rezistence) k volnému chloru byla zjištěna u druhu *E. hirae* a také u již zmiňovaného *A. viridans*. Všechny kmeny byly dále testovány na konfirmačním žluč-eskulin-azidovém agaru (ŽEA test) po dvou, čtyřech a 24 hodinách inkubace a na aktivitu  $\beta$ -D-glukosidázy (GLD) v selektivním prostředí (médiu Enterolert DW, IDEXX). Falešně negativní ŽEA test po dvou hodinách inkubace byl zaznamenán u 10 % enterokoků, falešně negativní výsledek u testů na GLD vykazovalo pouze 1 % kmenů enterokoků, ale dalších sedm kmenů (5,3 %) vykazovalo reakci slabou. Falešně pozitivní ŽEA test po dvou hodinách inkubace byl zaznamenán u 8 % kmenů doprovodné mikroflóry, falešně pozitivní test na GLD vykazovalo 14 % kmenů. Metoda dle normy ČSN EN ISO 7899-2 plně vyhovuje na stanovení intestinálních enterokoků v pitných vodách. Použití alternativních metod založených na detekci aktivity enzymu  $\beta$ -D-glukosidázy není zcela vhodné, protože se rozšiřuje skupina „intestinálních enterokoků“ na celý rod *Enterococcus* spp., a nález tak nemusí jednoznačně ukazovat na fekální znečištění.

## ÚVOD

Stanovení intestinálních enterokoků se zdá být na první pohled jednoduché, ale i tak má svoje úskalí. Na jedné straně jsou intestinální enterokoky v „nové“ legislativě pitné vody jedním ze dvou klíčových mikrobiologických ukazatelů, které by měly ukazovat na fekální znečištění s nejvyšší mezní hodnotou (NMH), na druhé straně se o svoje „práva“ hlásí alternativní metody založené na detekci enterokoků na základě aktivity  $\beta$ -D-glukosidázy, kdy se cílová skupina rozšiřuje na všechny druhy enterokoků, tj. *Enterococcus* spp. O ekologii enterokoků zejména v pitných vodách se zatím ví velmi málo, což komplikuje interpretaci dosažených výsledků. Proto byla provedena tato studie a výsledky byly prezentovány na konferenci *Vodárenská biologie 2025* [1]. Zde je publikována upravená a doplněná verze.

## PŘEHLED PROBLEMATIKY

Intestinální (střevní) enterokoky jsou grampozitivní kulovité nebo vejčité bakterie uspořádané do párů nebo řetězků a patří do rodu *Enterococcus* (řád Lactobacillales, kmen Firmicutes). Díky molekulárně genetickým metodám v taxonomii se počet popsanych druhů enterokoků neustále zvyšuje, např. v roce 1995 bylo známo jen 19 druhů, v současné době je platně popsáno 60 druhů [2]. Díky již celkem rozšířené metodě MALDI-TOF lze jednotlivé druhy identifikovat a pokusit se podrobněji interpretovat získané výsledky. Např. ze 101 izolátů z různých povrchových, technologických a pitných vod byly identifikovány druhy *E. faecalis* (26,7 %), *E. hirae* 20,8 %, *E. faecium* (18,8 %), *E. casseliflavus* (15,8 %), *E. durans* (11,8 %), *E. mundtii* a *E. moraviensis* (oba 2,3 %) [3].

Intestinální enterokoky jsou považovány za indikátory fekálního znečištění a jejich význam se v posledních letech zvýšil – podle nové legislativy [4, 5] jde společně s *Escherichia coli* o klíčový ukazatel a musí se stanovovat v každém typu rozboru (kráceném i úplném). S tím souvisí nejen vyšší počet analyzovaných vzorků, ale i počet pozitivních záchytů, které je třeba dobře interpretovat.

Frekvence záchytu v pitných vodách za posledních pět let v České republice (ČR) dle dat SZÚ (Zpráva o kvalitě pitné vody) [6] jsou uvedeny v *tab. 1*. V současné době se enterokoky stanovují i v rámci kráceného rozboru pitné vody, počet analýz, a tudíž i počet pozitivních záchytů tak stoupá (v *tab. 1* je vidět především výrazný rozdíl mezi lety 2023 a 2024). Vyšší počty zachycených enterokoků souvisejí zejména s vyšším počtem provedených testů. Jelikož se však stále jedná o relativně malá čísla, bude dobré tuto situaci nadále sledovat.

Oborné literatury na téma intestinálních enterokoků je opravdu mnoho, jde však převážně o studie popisující, odkud (z jakého zdroje) byly konkrétní druhy izolovány, nebo o popis a charakteristiku nových druhů. Pokud existují environmentální studie, jsou zaměřeny především na povrchové a koupací vody a dále na kaly či sedimenty. Výzkumy zabývající se hlubším průzkumem enterokoků izolovaných z pitných vod chybějí. Přestože tedy existuje řada studií [7, 8] na téma „kdo, kdy a odkud izoloval jakého enterokoka“, o vlastní ekologii se mnoho neví – a to zejména v souvislosti s pitnou vodou, úpravou pitné vody, přežíváním/množením se v biofilmech apod.

I když se všechny běžně identifikované druhy enterokoků vyskytují ve střevě člověka či teplokrevných živočichů, jsou vyčleněny druhy typicky fekální (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. durans*) a pak druhy, které bývají spojovány s možným pomnožením na rostlinném materiálu (*E. mundtii*, *E. casseliflavus*) [3]. Enterokoky jsou také často používaným ukazatelem při trasování mikrobiálního znečištění (Microbial Source Tracking – MST) a jsou popsány různé způsoby jejich eliminace z vodního prostředí. Také jsou považovány za významné přenašeče antibiotické rezistence (vankomycin, ampicilin). V prostředí se často vyskytují v nevirulentní formě VBNC (Viable But Not Culturable) kmenů.

Tab. 1. Záchyt intestinálních enterokoků v pitných vodách v ČR (kategorie: > 5 000 zásobovaných obyvatel, < 5 000 zásobovaných obyvatel, celkový počet analyzovaných vzorků, počet pozitivních vzorků, aritmetický průměr ze všech výsledků a maximální hodnota) v letech 2020–2024 (KTJ = kolonie tvořící jednotky)

Tab. 1. Detection of intestinal enterococci in drinking water in the Czech Republic (categories: > 5 000 population supplied, < 5 000 population supplied, total number of samples analysed, number of positive samples, arithmetic mean and maximum value) in 2020–2024 (CFU = colony forming units)

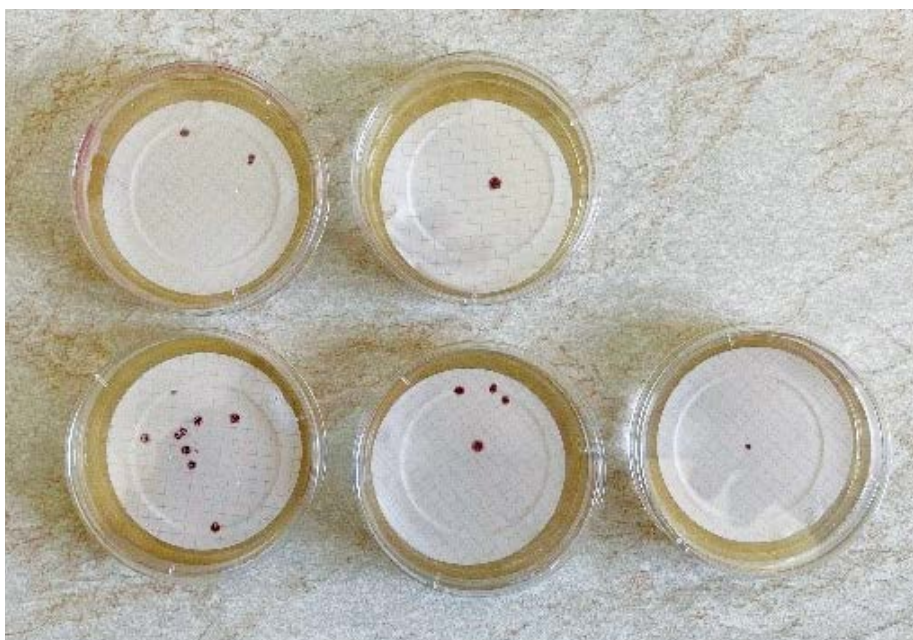
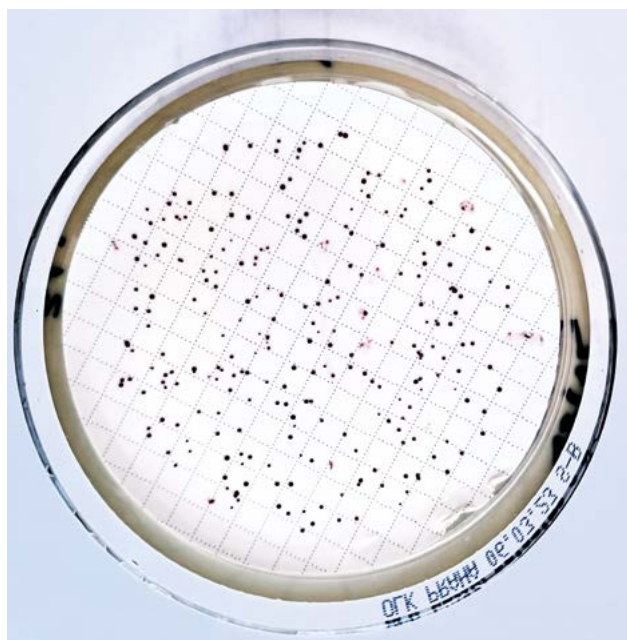
Rok	> 5 000 zásobovaných obyvatel				< 5 000 zásobovaných obyvatel			
	Počet vzorků	Počet pozitivních vzorků	Ar. průměr [KTJ/100 ml]	Max. [KTJ/100 ml]	Počet vzorků	Počet pozitivních vzorků	Ar. průměr [KTJ/100 ml]	Max. [KTJ/100 ml]
2020	4 079	6	0,009	20	9 169	198	0,3	100
2021	4 377	5	0,009	25	9 605	170	0,236	> 150
2022	4 356	15	0,013	12	9 978	222	0,212	> 100
2023	5 778	10	0,024	> 100	10 242	216	0,312	> 100
2024	11 582	57	0,053	> 80	22 340	359	0,211	> 100

Ke stanovení intestinálních enterokoků v pitných vodách se používá již léta osvědčená metoda dle ČSN EN ISO 7899-2 [9], která zahrnuje membránovou filtraci vzorků, kultivaci 48 hodin při 36 °C na agaru dle Slanetze a Bartleyové a potvrzení dvě hodiny při 44 °C na žluč-eskulinovém agaru s azidem sodným (dále ŽEA). Za intestinální enterokoky se považují červeně až vínově zbarvené kolonie (obr. 1), jež po přeočkování na konfirmační médium vykazují zčernání média pod kolonií. Tato metoda by měla zachytit převážně druhy enterokoků fekálního původu (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* a *E. hirae*). S tím také souvisí zkrácení doby konfirmace ze čtyř na dvě hodiny v roce 2001, kdy se předpokládalo, že typické fekální enterokoky mají rychlejší a intenzivnější aktivitu ŽEA testu. Novější metody, které mají ambici stát se alternativními, jsou často založeny na aktivitě enzymu  $\beta$ -D-glukosidázy, což zahrnuje detekci všech druhů

enterokoků (*Enterococcus* spp.) [10]. To se nezdá být vhodné zejména proto, že nejde o indikátorový, nýbrž klíčový ukazatel s limitní hodnotou typu NMH. Naopak cesta pro lepší/podrobnější interpretaci výsledků stanovení enterokoků by měla vést zcela opačným směrem, tedy k identifikaci jednotlivých druhů.

## METODIKA

Do této studie byly zahrnuty kmeny, které byly izolovány z upravených pitných vod (nikoli však studní), získané během dvou let z provozních hydroanalytických laboratoří. Kmeny byly přečištěny, identifikovány metodou MALDI-TOF (s aplikací kyseliny mravenčí) a zopakován byl konfirmační test s tím, že výsledky



Obr. 1 a, b. Vlevo: *Aerococcus viridans*, tvořící velmi drobné (většinou nečernající) kolonie; vpravo: detekce intestinálních enterokoků

Fig. 1 a, b. Left: *Aerococcus viridans*, forming very small (mostly non-blackening) colonies; right: detection of intestinal enterococci

byly odečítány po dvou, čtyřech a 24 hodinách. Navíc byly kmeny testovány na aktivitu  $\beta$ -D-glukosidázy v selektivním prostředí (médiu Enterolert DW firmy IDEXX, nově též dle ISO 7899-3 [11]).

V neposlední řadě byli zástupci nejčastěji izolovaných druhů testováni na citlivost k volnému chloru metodou, upravenou dle Přílohy 4 vyhlášky 409/2005 Sb. [12]. Do odměřeného objemu (1 000 ml) odstáté vodovodní vody o laboratorní teplotě byl přidán roztok chlornanu sodného tak, aby se obsah volného chloru pohyboval v rozmezí 0,15–0,17 mg/l. Poté se roztok uměle kontaminoval testovanými kmeny rodu *Enterococcus*. Výchozí počet KTJ testovacího kmene dosahoval hodnoty řádově  $10^5$  KTJ/ml. Před vlastní zkouškou byla kontaminovaná voda dokonale promíchána (např. protřepáním), aby se dosáhlo stejnoměrného rozptýlení mikroorganismů. Ve zkušebních intervalech jedna, pět a 30 minut se 0,5 ml takto připraveného vzorku roztoku naočkovalo na povrch pevného kultivačního média a po kultivaci po dobu 48 hodin při teplotě  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  se spočítaly kolonie, jež vyrostly na jeho povrchu. Během zkušební doby se zkušební roztok v baňce neustále promíchával. Zároveň byla naočkována původní suspenze, aby se získal výchozí počet enterokoků. My jsme provedli stanovení ve všech uvedených časových intervalech, ale hodnotili jsme pouze výsledky po jedné minutě (po pěti a 30 minutách byly již výsledky převážně negativní). Vždy byl u každého druhu paralelně testován kmen izolovaný z upravené pitné vody a kmen izolovaný z volného prostředí (koupací voda) a vše bylo očkováno duplicitně. Po inkubaci byl spočítán relativní úbytek testovaného druhu (kmenu) po jedné minutě působení volného chloru oproti kontrolnímu stanovení.

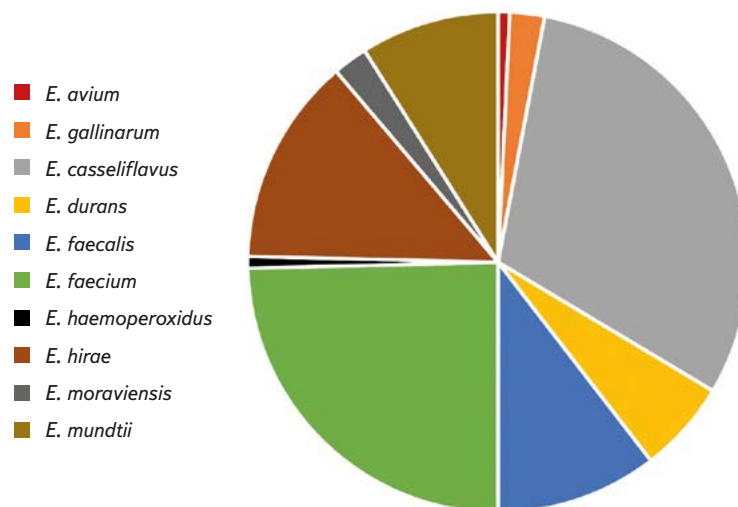
## VÝSLEDKY A DISKUZE

### Identifikace druhů

Celkem bylo zpracováno 227 kmenů izolovaných v pěti vodohospodářských laboratořích z pitných (upravených) vod s tím, že 134 bylo následně identifikováno jako druhy patřící do rodu *Enterococcus* (celkem 10 druhů) a 93 náleželo mezi další rody (s naprostou převahou druhu *Aerococcus viridans*).

Druhové složení enterokoků a jejich poměrné rozdělení je uvedeno na obr. 2. Nejčastěji identifikovaným druhem byl *E. casseliflavus* (31 %), následoval *E. faecium* (25 %), *E. hirae* (13 %), *E. faecalis* (10 %) a *E. mundtii* (9 %). Druhy enterokoků, které jsou dle ČSN EN ISO 7899-2 [9] považovány za fekální (*faecalis*, *faecium*, *hirae*, *durans*), celkem tvořily pouze 54 %. Pro srovnání – naše dřívější nepublikované výsledky identifikace 612 enterokoků z koupacích vod ukázaly, že nejčastějším identifikovaným druhem byl *E. faecium* (25,2 %), následoval *E. faecalis* (21,1 %), *E. durans* (17,3 %) a *E. casseliflavus* (14,4 %). Takové soubory lze samozřejmě srovnávat jen omezeně, nicméně jak je z toho patrné, jiná matrice dává jiné výsledky (bohužel literatura citovaná v úvodu [3] analyzovala enterokoky ze „směsí matric“). Že jde v případě koupací vody o zcela jinou matrici, je zjevné i z typu doprovodné mikroflóry. Nejčastějším druhem, který rušil stanovení intestinálních enterokoků v koupacích vodách, byl podle našich dřívějších výsledků a též v citované literatuře [3] druh *Lactobacillus plantarum*, zatímco v pitných vodách byl nejrozšířenějším druhem doprovodné mikroflóry *Aerococcus viridans*.

Nejvyšší výskyt druhu *E. casseliflavus* v pitné vodě zatím neumíme dobře interpretovat, je však nutno zmínit, že nebylo izolováno „hodně kmenů z jednoho vzorku“, jak tomu bývá často u vod koupacích, ale většinou šlo o průběžný výskyt. I v dříve uvedených publikacích se tento druh mnohdy spojuje s možným pomnožením na rostlinném materiálu. V pitné vodě jde především o to, jak se „chová“ např. v biofilmech či na pískových filtrech (což nevíme). Avšak na rozdíl od vzorků koupacích vod, kdy může dojít k pomnožení tohoto druhu třeba na rákosí a membránový filtr je pak plný těchto (spíše drobnějších) kolonií, zde se většinou o přerostlé filtry nejednalo. Pokud byl membránový filtr plný drobných kolonií, šlo výhradně o *A. viridans*.



Obr. 2. Zastoupení jednotlivých druhů intestinálních enterokoků izolovaných z pitných vod

Fig. 2. Occurrence of individual species of intestinal enterococci isolated from drinking water

### Konfirmační a doplňující testy

V tab. 2 jsou uvedeny výsledky stanovení konfirmačních a doplňkových testů u jednotlivých druhů. Kromě absolutního počtu pozitivních reakcí u kmenů jednotlivých druhů je uveden relativní podíl falešně pozitivních (u doprovodné mikroflóry) a falešně negativních testů (u enterokoků).

Doba provádění ŽEA testu je podle stávající verze normy ČSN EN ISO 7899-2 [9] dvě hodiny, což bylo také bráno jako referenční čas. Další časy (původně používané čtyři hodiny a 24 hodin) byly testovány pro případnou diskuzi výsledků. Rozdíl mezi dvěma a čtyřmi hodinami byl však minimální. Falešně negativní ŽEA test (tedy po dvou hodinách inkubace) byl zaznamenán u 10 % enterokoků, nejvíce u druhů *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* a *E. durans*. Falešně negativní výsledek u testů na  $\beta$ -D-glukosidázu vykazovalo pouze 1 % kmenů enterokoků, ale dalších sedm kmenů (5,3 %) vykazovalo reakci slabou. Není bohužel přesně známo, jak má pozitivní test na GLD vypadat, protože u Enterolert DW testu není dostupný žádný komparátor. Falešně pozitivní ŽEA test (po dvou hodinách inkubace) byl zaznamenán u 8 % kmenů doprovodné mikroflóry, u některých kmenů *A. viridans* pozitivní reakce během následných 20 hodin „vyledla“. Falešně pozitivní test na  $\beta$ -D-glukosidázu vykazovalo 14 % kmenů.

### Citlivost enterokoků k volnému chloru

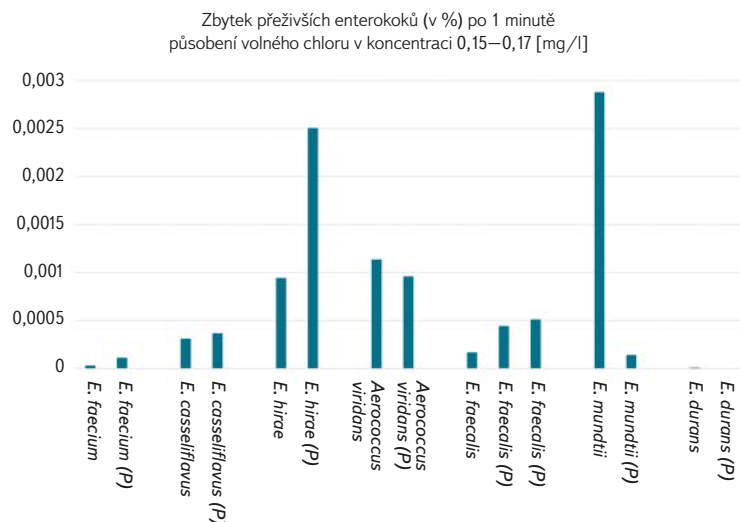
Nejčastěji izolované druhy enterokoků a nejčastější doprovodný druh *A. viridans* byly vybrány k testování na citlivost k volnému chloru. Traduje se, že enterokoky jsou méně citlivé k působení volného chloru než třeba koliformní bakterie, a i výsledky našeho provozního testování dezinfekčních činidel to potvrzují (komerční, nepublikované výsledky). Vždy byly testovány dva kmeny od jednoho druhu (u *E. faecalis* tři kmeny) s tím, že jeden kmen byl pokaždé izolován z upravené pitné vody (a dá se předpokládat, že se mohl s volným chlorem setkat) a druhý z typicky přírodního prostředí (koupací vody). Legislativně [12] jsou dány požadavky, aby počty enterokoků byly sníženy minimálně o tři řády, a to v koncentraci volného chloru 0,3 mg/l [12]. Naše studované kmeny toto víceméně splnily i při poloviční koncentraci volného chloru (0,15 mg/l). Výsledky jsou demonstrovány na obr. 3. Nejméně citlivé druhy byly *E. hirae*, *A. viridans* a kmen *E. mundtii*, který byl izolován z pitné (nikoli z koupací) vody. Naopak

Tab. 2. Výsledky doplňkových testů u kmenů jednotlivých druhů; je uveden počet vyšetřených kmenů (n), pozitivní výsledky ŽEA testu po dvou, čtyřech a 24 hodinách, pozitivní výsledky u testu na β-D-glukosidázu (GLD). Zvlášť jsou uvedeny falešné výsledky (falešně pozitivní u doprovodné mikroflóry či falešně negativní u enterokoků) u testů ŽEA po dvou hodinách a GLD v %  
 Tab. 2. Results of additional tests for strains of individual species; the number of strains examined (n), positive results of the BEA test after 2, 4 and 24 hours, positive results of the β-D-glucosidase (GLD) test. False results (false positives for background microflora or false negatives for enterococci) for BEA tests after 2 hours and GLD are given separately [%]

		n	ŽEA 2 h	Falešné výsledky ŽEA 2 h [%]	ŽEA 4 h	ŽEA 24 h	GLD	Falešné výsledky GLD [%]
<i>Aerococcus</i>	<i>viridans</i>	80	7	9 %	8	5	12	15 %
<i>Carnobacterium</i>	<i>maltarum</i>	2	0	0 %	0	0	0	0 %
<i>Enterococcus</i>	<i>avium</i>	1	1	0 %	1	1	1	0 %
<i>Enterococcus</i>	<i>gallinarum</i>	3	1	67 %	1	1	2	33 %
<i>Enterococcus</i>	<i>casseliflavus</i>	41	34	17 %	34	41	41	0 %
<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	8	6	25 %	8	8	8	0 %
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	14	14	0 %	14	14	14	0 %
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	33	30	9 %	33	33	33	0 %
<i>Enterococcus</i>	<i>haemoperoxidus</i>	1	1	0 %	1	1	1	0 %
<i>Enterococcus</i>	<i>hirae</i>	18	18	0 %	18	18	18	0 %
<i>Enterococcus</i>	<i>moraviensis</i>	3	3	0 %	3	3	3	0 %
<i>Enterococcus</i>	<i>mundtii</i>	12	12	0 %	12	12	12	0 %
<i>Lactobacillus</i>	<i>lactis</i>	1	0	0 %	0	0	1	100 %
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	1	0	0 %	0	0	0	0 %
<i>Staphylococcus</i>	<i>pasteuri</i>	1	0	0 %	0	0	0	0 %
<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus</i>	5	0	0 %	0	0	0	0 %
<i>Staphylococcus</i>	<i>warneri</i>	2	0	0 %	0	0	0	0 %
<i>Streptococcus</i>	<i>infantarius</i>	1	0	0 %	0	0	0	0 %

nejcitlivější druh byl *E. durans*. U 25 % kmenů druhu *E. durans* byla zaznamenána zpožděná reakce ŽEA testu (tab. 2), což by mohlo být způsobeno stresem kmenů z upravené vody. Určitá rezistence k volnému chloru u druhu *E. hirae* mohla způsobit, že se tento druh vyhoupl na třetí místo mezi identifikovanými kmeny, a taktéž určitá rezistence druhu *A. viridans* může vysvětlit jeho častý výskyt ve formě doprovodné mikroflóry. Nejvíce rezistentní kmen *E. hirae* je rovněž předepsán pro testování baktericidních vlastností dezinfekčních prostředků [13].

Až do posledního provedeného experimentu se zdálo, že přírodní kmeny mají vyšší citlivost k působení volného chloru (nejsou stresované?) než kmeny izolované z pitné vody, což se však absolutně nepotvrdilo u druhu *E. mundtii*, kde to bylo přesně naopak.



Obr. 3. Citlivost různých druhů enterokoků k volnému chloru; kmen označený (P) pochází z přírodního prostředí

Fig. 3. Sensitivity of different enterococci species to free chlorine; the strain marked (P) originates from the natural environment

## ZÁVĚR

Ačkoli „sběr enterokoků“ trval minimálně dva roky, počet získaných kmenů není nikterak vysoký (enterokoky = 134 + doprovodná mikroflóra = 93). I tak byly ale získány cenné údaje. Nejčastěji izolovaným druhem z pitných vod byl *E. casseliflavus*, jenž bývá v přírodních vodách zastoupen méně a spíše nárazově. Tento výskyt zatím neumíme zcela interpretovat, nabízí se možnost jeho schopnosti přežívání v biofilmu (?). Tento druh bývá také spojován s možností pomnožení na rostlinném materiálu. Z doprovodné mikroflóry byl nejčastěji identifikován druh *A. viridans*, který má spolu s *E. hirae* zároveň nejmenší citlivost k volnému chloru. Metoda dle normy ČSN EN ISO 7899-2 plně vyhovuje na stanovení intestinálních enterokoků v pitných vodách. Používání alternativních metod založených na stanovení aktivity enzymu GLD není zcela vhodné, jelikož rozšiřuje skupinu „intestinálních enterokoků“ na stanovení *Enterococcus* spp., čímž rozšiřuje detekovanou skupinu i o druhy s ne zcela jasným fekálním původem. Navíc k hodnocení výsledků enterokoků se více hodí zcela opačný trend – identifikace kmenů a interpretace jejich výskytu v prostředí. Kromě toho nejčastěji detekovaný druh *A. viridans*, jenž patří mezi doprovodnou mikroflóru, vykazuje falešně pozitivní výsledky GLD v 15 %. Vzhledem k tomu, že jde o klíčový ukazatel s nejvyšší mezní hodnotou (NMH), by takové rozšíření „skupiny“ mohlo způsobit komplikace.

## Poděkování

Vznik této publikace byl podpořen v rámci MZ ČR – RVO (Státní zdravotní ústav – SZÚ, IČ 75010330). Zvláštní poděkování patří pracovníkům laboratoří provozovatelů vodovodů, kteří nám zaslali kmeny ke studiu.

## Literatura

- [1] BAUDIŠOVÁ, D. Enterokoky v pitných vodách. In: ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J., PETRÁKOVÁ KÁNSKÁ, K. (eds). *Sborník z konference Vodárenská biologie*. 2025, 29–30. 1. 2025. Praha: Vodní zdroje EKOMONITOR, Chrudim, 2025, s. 131–136. ISBN 978-80-88238-40-9.
- [2] SCHWARTZMAN, J. A., LEBRETON, F., SALAMZADE, R., SHEA, T., MARTIN, M. J., SCHAUFLE, K., URHAN, A., ABEEL, T., CAMARGO, I. L. B. C., SCARDIOLI, B. F., PRICHULA, J., GUEDES FRAZZON, A. P., GIRIGET, G., VAN TYNE, D., TREINISH, G., INNIS, Ch. J., WAGENAAR, J. A., WHIPPLE, R. M., MANSON, A. L., EARL, A. M. Global Diversity of Enterococci and Description of 18 Previously Unknown Species. *PNAS*. 2024, 121(10), e2310852121, s. [1–12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.2310852121>
- [3] TAUČER-KAPTEJN, M. *Occurrence of Enterococci in the Environment and Their Value As an Indicator of Water Quality*. Doctoral Thesis. Delft: TU Delft, 2017. Dostupné z: <https://doi.org/10.4233/uuid:e897f4b7-505e-4648-a2b9-acff485d8cea>
- [4] *Směrnice Evropského parlamentu a RADY (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepřevaně znění)*.
- [5] *Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody*.
- [6] GARI, D. W., KOŽÍŠEK, F., JELIGOVÁ, H. *Zpráva o kvalitě pitné vody za rok 2020–2024*, Státní zdravotní ústav.
- [7] BYAPPANAHALLI, M. N., NEVERS, M. B., KORAJKIC, A., STALEY, Z. R., HARWOOD, V. J. Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2012, 76(4), s. 685–706. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>
- [8] ŠVEC, P. *Systematika rodu Enterococcus*. Habilitační práce. Brno: Masarykova univerzita Brno, 2019, s. 1–68.
- [9] ČSN EN ISO 7899-2 (757831). *Jakost vod. Stanovení intestinálních enterokoků. Metoda membránových filtrů*.
- [10] NIEGOWSKA, M., PITKÄNEN, T., SOMMER, R., BRANDAO, J., BONADONNA, L., BAUDIŠOVÁ, D., BURLION, N., GASSILLOU, B., PISSARIDES, N., PROKŠOVÁ, M., RUPEL, T., SCHAEFER, B., SCHETS, C., SLAPOKAS, T., VARGHA, M., LETTIERI, T. Recast Drinking Water Directive – State of Play: Guidance Note for the Analysis of Microbiological Parameters. *Publications Office of the European Union*, 2022. ISBN 978-92-79-53688-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.2760/14494>
- [11] ISO 7899-3:2025. *Water Quality – Enumeration of Intestinal Enterococci Part 3: Most Probable Number Method*.
- [12] *Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 409/2005 Sb., o hygienických požadavcích na výrobky přicházející do přímého styku s vodou a na úpravu vody*.
- [13] EN 1276:2009/AC: *Chemical Disinfectants and Antiseptics – Quantitative Suspension Test for the Evaluation of Bactericidal Activity of Chemical Disinfectants and Antiseptics Used in Food, Industrial, Domestic and Institutional Areas – Test Method and Requirements (Phase 2, Step 1)*.

## Autoři

**RNDr. Dana Baudišová, Ph.D.<sup>1</sup>**

✉ [dana.baudisova@szu.gov.cz](mailto:dana.baudisova@szu.gov.cz)  
ORCID:0000-0003-1879-0306

**Mgr. Karel Kolář, Ph.D.<sup>2</sup>**

✉ [karel.kolar@pvk.cz](mailto:karel.kolar@pvk.cz)  
ORCID:0009-0008-9873-2117

<sup>1</sup>Státní zdravotní ústav, Praha (Česká republika)

<sup>2</sup>Pražské vodovody a kanalizace, Praha (Česká republika)

Príspevek prošel recenzním řízením.

DOI: 10.46555/VTEI.2026.03.001

ISSN 0322-8916/© 2026 Autoři. Tuto práci je kdokoli oprávněn šířit a využívat za podmínek licence CC BY-NC 4.0

## SPECIES COMPOSITION OF ENTEROCOCCI IN DRINKING WATER AND DETECTION METHODS

BAUDIŠOVÁ, D.<sup>1</sup>; KOLÁŘ, K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Health, Prague (Czech Republic)

<sup>2</sup>Pražské vodovody a kanalizace, Prague (Czech Republic)

**Keywords:** intestinal enterococci — drinking water — species composition — sensitivity to free chlorine

Intestinal enterococci are one of the two “core” microbiological parameters in the “new” drinking water legislation that should indicate faecal contamination. They must be detected in all analyses of drinking water. A total of 134 strains of enterococci (*Enterococcus* spp.) and 93 strains that were identified as background microflora, or potentially false-positive strains, were examined from operational samples of treated, i.e. drinking water (but not from untreated wells and boreholes, which are expected to have a higher risk

of faecal contamination). The most frequently detected *Enterococcus* species was *E. casseliflavus* (31 %), followed by *E. faecium* (25 %). The absolutely most frequent species that does not belong to intestinal enterococci was found to be *Aerococcus viridans* (n = 80), but not all obtained strains survived the first passage. The least sensitivity to free chlorine was found in the species *E. hirae* and also in the already mentioned *A. viridans*. All strains were further tested at bile esculin azide confirmation medium (BEA test) after 2, 4 and 24 hours of incubation and for  $\beta$ -D-glucosidase (GLD) activity in a selective medium (Enterolert DW medium, IDEXX). A false-negative BEA test after 2 hours of incubation was recorded in 10 % of enterococci, most often in the species *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* and *E. durans*. Only 1 % of *Enterococcus* strains showed a false negative results in GLD, but another 7 strains (5.3 %) showed a weak reaction. A false positive BEA test after 2 hours of incubation was recorded in 8 % of the background microflora strains, a false positive test for GLD was shown by 14 % of the strains. The method according to the EN ISO 7899-2 standard is fully suitable for the detection of intestinal enterococci in drinking water. The suitability of using alternative methods based on the determination of the activity of the enzyme  $\beta$ -D-glucosidase is not entirely appropriate, because it expands the group of “intestinal enterococci” to determine the entire *Enterococcus* genus and the detection may not clearly indicate fecal contamination.

