

Vybrané metody
a techniky
v potravinářské mikrobiologii

Obsah

1	Teoretická část	3
1.1	Příprava mikroskopického preparátu	3
1.2	Stanovení inhibujících látek mikrobiologickou metodou	6
1.2.1	Jednotlivé metody	7
1.3	Druhy kultivace	8
1.4	Sporotvorné mikroorganismy	10
1.5	Biochemické vlastnosti mikroorganismů	10
1.5.1	Růst mikroba	10
1.5.2	OF – test	11
1.5.3	Zkvašování cukrů	11
1.5.4	Rozklad některých látek	11
1.5.5	Tvorba některých látek	12
1.5.6	Utilizace některých látek	12
1.5.7	Rychlé a kompaktní testy	13
2	Postupy práce	14
2.1	Elementární postupy	14
2.1.1	Vypalování kličky	14
2.1.2	Odebrání bakterií z bujonu / suspenze	14
2.1.3	Odebrání bakterií z pevné půdy	14
2.1.4	Očkování na pevnou půdu	14
2.1.5	Očkování do bujonu	16
2.1.6	Dekadické ředění	18
2.1.7	Aplikace mikroba na povrch půdy	18
2.1.8	Aplikace mikroba do agarů	18
2.1.9	Odečtení velikosti zóny inhibice růstu	19
2.1.10	Odečtení počtu kolonií na misce	19
2.1.11	Šikmení agarů	19
2.1.12	Vylévání agarů na misku	19
2.2	Barvení podle Grama	19
2.3	Acidoresistentní barvení	20
2.4	Barvení na pouzdra	21
2.5	Barvení na spory	22
3	Receptury	23
3.1	Receptury barviv	23
3.2	Receptury půd	24
3.3	Receptury činidel	29
3.4	Biochemické vlastnosti	29

1 Teoretická část

1.1 Příprava mikroskopického preparátu

Zdrojem preparátu mohou být mikrobiologické kultury, klinický materiál (moč, stolice, sputum, výplachy tělních dutin, někdy koncentrované např. odstředěním), stěry z prostředí apod.

Vzorek umísťujeme na podložní sklíčko.

V případě větších objektů (prvoci, kvasinky, houby) kryjeme preparát krycím sklíčkem. Preparát v kapce roztoku (fyziologický roztok, živná půda apod.) kápneme na podložní sklíčko. Na to spustíme sklíčko krycí tak, aby se dotklo jedním okrajem podložního těsně vedle kapky a potom je přes kapku překlopíme. Tím vypudíme většinu bublin na opačnou stranu. Nadbytek kapaliny odsajeme kouskem vaty, buničiny nebo filtračního papíru.

Pozorování větších objektů provádíme ve vhodném roztoku. V případě, že se jedná o živnou půdu nebo fyziologický roztok, pozorujeme *živé objekty*. Je ovšem nutno mít na paměti, že vysoká intenzita světla, jaké je používáno v mikroskopu, je pro naprostou většinu těchto objektů nefyziologická a mohou se proto chovat abnormálně. Pohyblivé objekty (prvoci) mají tendenci utíkat ze světelného paprsku, a tedy i zorného pole. Někdy můžeme jejich struktury zvýraznit *vitálním barvením*, na které většinou užíváme velmi zředěná netoxická barviva.

Další objekty jsou umístěny ve fixačním roztoku, který je usmrcuje a současně zlepšuje optické vlastnosti preparátu (mikroskopické houby budeme takto pozorovat v laktofenolu).

Pozorování menších objektů při největším zvětšení provádíme bez krycího sklíčka. Objekty jsou k podložnímu sklíčku *fixovány* a jsou *vybarveny*, aby vůbec byly pozorovatelné. Pro lepší rozpoznání podrobností na preparátu je používána imerzní kapalina (olej), která vyplní prostor mezi preparátem a objektivem. Ta svou vysokou světlostností zajistí optický kontrast mezi preparátem a jeho okolím. Optika objektivu je stavěna na přechod imerze-sklo, takže některé imerzní objektivy vůbec nelze bez ponoření do imerzního oleje zaostřit, jiné sice vytvoří ostrý, ale zpravidla nedostatečně světelný obraz.

Význam mikroskopického pozorování je různý, podle typů objektů (myšlena je světelná mikroskopie)

virologie – jsou vidět jen největší viry jako nepatrná tělíška, pokud se vybarvují. Nelze je rozeznat od jiného „smetí“, které může v preparátu být. Diagnosticky je toto bezvýznamné. Naopak cenné je pozorování virových inkluzí ve tkáních a buňkách, patrně nejznámější jsou inkluze viru vztekliny v některých partiích mozku, které se dodnes užívají pro diagnostiku tohoto onemocnění.

bakteriologie – rozdělení podle typu barvitelnosti, podle základního tvaru buněk (koky – tyčky), případně uspořádání buněk (diplokoky, tetrády, řetízky, shluky), přítomnost spór, pouzder, případně bičíků. Určí se tím velké skupiny, které se dále dourčováají imunologicky nebo PCR. Můžeme kontrolovat i homogenost kultury¹

prvoci – mikroskopování umožňuje určit zpravidla rod, někdy i druh

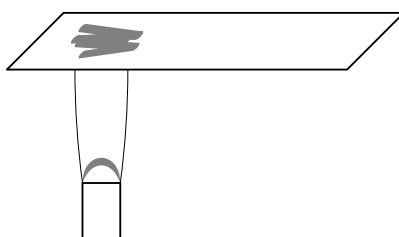
kvasinky – mikroskopování umožňuje stanovit přítomnost některých znaků, bez jejichž znalosti je určení velmi obtížné nebo nemožné

vláknité houby – většinou se určují především podle mikroskopických znaků, v některých skupinách jsou cenné i znaky makroskopické (zbarvení kultury, pŕdy pod ní, struktura a velikost kolonií apod.).

parazitičtí červi – nález vajíček se provádí mikroskopováním vzorků, vajíčka obsahují znaky umožňující často určit přímo druh.

Postup při preparátu bakteriální kultury je velice uniformní:

- Na podložní sklíčko kápneme (nejlépe mírně excentricky) *malou* kapku fyziologického roztoku. (Výjimkou je barvení na pouzdra, kdy takto kápneme tuš)



Obrázek 1: Umístění preparátu pro techniku moření

Pro moření, kdy potřebujeme barvivo na sklíčku zahřívát do výstupu par, používáme asymetrické umístění, abychom se nepopálili.

- Bakterii odebereme vypálenou a ochlazenou kličkou z kolonie.
- Kličkou kvedláme v kapce, a tím suspendujeme bakterie v roztoku.
- Poté kličkou rozetřeme suspenzi na větší plochu a necháme zaschnout.²

¹Toto nepodceňovat, naprostá většina „záhadných“ výsledků z dalších metod, odpovídajících „novému, v literatuře nepopsanému druhu“, byla pořízena tak, že byla kultura jedné bakterie kontaminována jiným druhem.

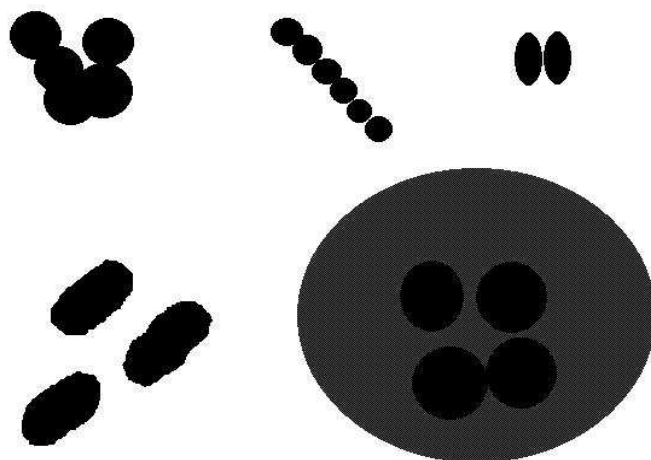
²Jakékoli pokusy urychlit schnutí nahříváním nad plamenem kahanu končí zpravidla „rozvařením“ bakterií na homogenní hmotu.

- Po opravdu důkladném zaschnutí preparát fixujeme protažením plamenem (nanesenými bakteriemi nahoru). Kontrolujeme pokládáním sklíčka spodní stranou na hřbet ruky, má pálit, ale neudělat spáleniny (cca 60°C. Nedostatečné zahřátí vede k tomu, že bakterie při barvení „odplavou“. Pokud preparát zahřejeme příliš, dojde ke změnám tvaru buněk (připomínají kuličky ze zmačkaného papíru) a někdy i barvitelnosti.
- Poté barvíme podle návodu příslušného barvení. Většina barvení je založena na obecném principu, že v první části postupu dojde k vybarvení určitých struktur tak, že se následně neodbarví (barvivo se k těmto strukturám pevněji váže). Ty struktury, které se v další části postupu odbarvily, dobarvujeme na konec kontrastní barvou.
- Po skončení barvení musíme preparát nechat uschnout (zpravidla jej nakonec krátce oplachujeme destilovanou vodou), nejlépe opřený stojící na hraně.
- Po dokonalém uschnutí (není-li dokonale uschlý, vadí kapičky vody a nejde se jich zbavit) mikroskopujeme.

Mikroskopování preparátu bakteriální kultury je opět velmi uniformní:

- Preparát zakápneme imerzním olejem³
- Sklíčko položíme na stolec mikroskopu a připevníme.
- Vybereme nejsilněji vybarvené místo na preparátu a do něj spustíme imerzní objektiv. Ten poznáme zpravidla podle jednoho nebo dvou prstenčitých proužků.
- Za kontroly zrakem mikrošroubem zvedáme. Můžeme mírně pohybovat preparátem (šrouby na stolku), abychom viděli změny síly světla v zorném poli. Při zvedání sledujeme okamžik, kdy vidíme ostrý obraz. Pokud „přeběhneme“, spouštíme objektiv na sklíčko opět při pozorování z boku. Vzhledem k pomalému pohybu se objektiv pohybuje značnou silou (fyzika!) a vůbec nemusíme při pohledu do okuláru a spouštění na slepo pozorovat dosednutí na sklíčko a poznáme až jeho prasknutí. Takto se zničí preparát, ale může dojít i k poškození objektivu!
- Když se nám podaří zaostřit, posuneme preparát na nějaké řidší místo, protože tam jsou buňky typicky vybarveny (na přehuštěném místě mohou být špatně vybarveny).
- Po skončení mikroskopování (závěr praktika) utřeme objektiv buničinou (existují na to i speciální tkaniny).

³Pozor na to, z které strany sklíčka preparát je, mnoho preparátů, které „nejdou zaostřit“ vzniká právě mikroskopováním z rubové strany.



Obrázek 2: Typy mikroskopovaných objektů

Vlevo nahoře vidíme shluk kulovitých bakterií, *stafylokoků*, napravo od nich je řetízek kulovitých bakterií, *streptokoků*, v pravém horním rohu jsou *diplokoky* („kávové zrno“ připomínají původci kapavky nebo meningitidy, pneumokoky připomínají více tupouhlé trojúhelníky přisedlé k sobě základnami), vlevo dole jsou tyčinkovité bakterie, vpravo dole kvasinka s askosporami uvnitř.

1.2 Stanovení inhibujících látek mikrobiologickou metodou

Inhibice mikroba účinnou látkou v kultuře se projeví zástavou jeho množení, případně jeho úhynem. Z tohoto hlediska rozlišujeme látky inhibující a látky mikrobicidní. Některé látky mohou mít v nižší koncentraci inhibující a ve vyšší mikrobicidní účinky.

Interakce probíhá tak, že máme známou látku a testujeme jí mikroba neznámých vlastností, nebo máme mikroba známých vlastností (např. sbírkový kmen) a testujeme jím přítomnost látek, které by ho mohly inhibovat.

V klinické mikrobiologii se provádí především testování izolovaných bakterií a dalších původců infekcí známými antibiotiky a chemoterapeutiky za účelem stanovení jejich citlivosti a nasazení správné (případně korekce stávající) terapie. Postupy, při nichž se pomocí velmi citlivých bakterií sledovalo např. pronikání antibiotik do hnisu, likvoru apod. byly zcitlivěním a poklesem ceny fyzikálně chemických analytických metod vytlačeny dříve, než se dostaly do běžné praxe.

V potravinářské mikrobiologii se jako obecně inhibující účinky materiálu (extraktů z něj) sleduje výskyt antibiotik a chemoterapeutik např. v mléce nebo mase. Nejde jen o ochranu zdraví konzumenta, ale i o to, že uvušlechtilá mikroflóra, používaná k výrobě některých masných i mléčných fermentovaných potravin je zpravidla velice citlivá na antibiotika a chemoterapeutika. Ty mohou narušit technologii i v koncentracích, které by obecně pro konzumenta nebyly rizikové.

Historicky byly užívány uvedené metody též ke stanovování některých mykotoxinů, protože řada z nich má antibiotické účinky.

Uvedené metody lze s úspěchem využít i v potravinářských provozech, jednak na kontrolu účinnosti používaných desinfekčních prostředků vůči standardní mikroflóře (normy definují konkrétní druhy a někdy i sbírkové kmeny, které mají být k testování účinnosti desinfekčních prostředků použity). Takovýto postup zachytí např. hrubé chyby při přípravě desinfekčních roztoků (někdo se splete v desetinném čísle), záměnu surovin na jejich přípravu apod. Lze testovat i přímo mikroorganismy, které byly v prostředí výroby zachyceny (tento postup je náročnější, ale zachytí např. vznikající nebo už vzniklou rezistenci na používané desinfekční prostředky).

1.2.1 Jednotlivé metody

Obecně se dělí tyto mikrobiologické metody na dvě skupiny. První jsou metody *diluční*, při nichž je mikrob aplikován do řady roztoků, získaných ředěním původního materiálu, a sleduje se, zda roste nebo ne. Druhou jsou metody *difúzní*, které jsou založeny na difúzi látky od místa aplikace půdou, na níž roste mikrob. Se vzdáleností od místa aplikace klesá koncentrace látky a výsledkem je zpravidla (na Petriho miskách) vytváření zóny inhibice růstu mikroba. Její velikost je úměrná⁴ množství aplikované látky, resp. její koncentraci v roztoku. Velikost zón silně závisí i na tloušťce půdy v misce.

Diluční metody nejčastěji vychází z dekadicky ředěné základní koncentrace. Ředění provádíme v bujonu vhodném pro růst užitého mikrobiálního kmene. Do jednotlivých roztoků přidáme identické množství kultury mikroba a sledujeme růst (nejčastěji vznik zákalu, usazeniny nebo blanky). V některých případech je možné odečtení usnadnit zavedením vhodného biochemického testovacího systému (viz dále), který indikuje růst kmene např. změnou barvy půdy.

V případě sledování pouze letálního účinku mikroby z roztoků po stanovené době expozice (zpravidla minuty až hodiny) vyočkujeme na růstové médium a sledujeme, ze kterých koncentrací se ještě podařilo vyočkovat životaschopné buňky.

Výsledkem uvedených testů je *minimální inhibiční koncentrace*, zkratka MIC.

Komínková metoda je historicky nejstarší metodou. Na povrch půdy v Petriho misce se postaví duté válečky, „komínky“. Buď se spolehneme na jejich přilnutí k podložce, nebo agar s nimi přelijeme další vrstvou agarové půdy „top agar“. Do nitra válečků aplikujeme vzorky. Agar je buď předem potřen kulturou mikroba, nebo je mikrob suspendován v top agaru. Sledujeme zóny inhibice růstu.

Jamková metoda spočívá ve vykrojení jamek do agaru (zpravidla do nich musíme následně kápnout kapičku rozehřáté půdy, aby roztok z jamky nevytékal škvírou mezi půdou a dnem misky). Po aplikaci mikroba na povrch půdy do jamek aplikujeme vzorek. Protože

⁴Průměr zóny zhruba lineárně koreluje s logaritmem množství nanesené inhibující látky.

difúzní metody jsou obecně citlivější tím víc, čím je půda tenší, hodí se tyto metody na takové vzorky, kterých je zapotřebí aplikovat velice málo (setiny ml).

Disková metoda spočívá v aplikaci testovaného vzorku na povrch půdy nasáklého do disku z filtračního papíru vhodného průměru a síly⁵ Mikrob je buď předem rozetřen po povrchu půdy, nebo je zakomponován do top agaru.

Disková metoda se standardně používá ke stanovení citlivosti kmenů, zachycených z klinického materiálu. Mnoho výrobců dodává standardní antibiotické disky, které se buď kladou na povrch půdy ručně, nebo se používají vhodné aplikátory (někdy i takové, které vloží na povrch současně více různých disků). Někdy se setkáme i s proužky, na nichž koncentrace antibiotika plynule narůstá od jednoho konce ke druhému. Vzniká zóna inhibice růstu zhruba trojúhelníkového nebo lichoběžníkového tvaru a podle místa, kde překročí zadanou šířku, se stanovuje citlivost mikroba.

Řada výrobců též doporučuje konkrétní kmeny ze světových sbírek na testování svých disků (kmen má kolem disku s konkrétním antibiotikem za stanovených podmínek vytvořit zónu inhibice růstu v zadaném rozmezí průměrů).

Metoda je v některých skupinách bakterií používána i jako diagnostický test, protože např. původci kapavky a původci meningitidy se od podobných G- diplokoků (nepatogenních, ale také se vyskytujících v klinickém materiálu) liší citlivostí na některá antibiotika. Více než sto let je známa vysoká citlivost *Streptococcus pneumoniae* na chemoterapeutikum optochin a disky s touto látkou se užívaly k jeho diagnóze. Pokud se očekávala přítomnost tohoto patogenu, vkládaly se už do křížového roztěru při primárním záchytu.

1.3 Druhy kultivace

Z hlediska vztahu ke kyslíku se bakterie dělí na:

aerobní využívají kyslík ke svému metabolismu a bez jeho přísunu zastavují růst a množení

fakultativně anaerobní mají schopnost jak aerobního tak i anaerobního metabolismu

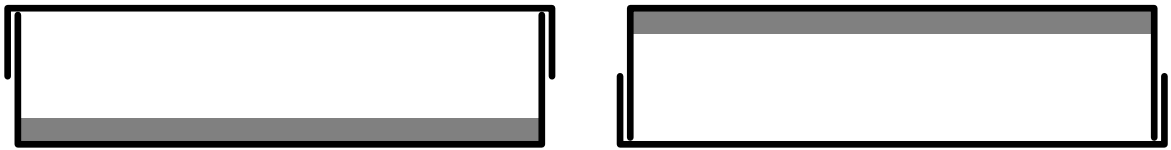
aerotolerantní přítomnost kyslíku jim nevádí, ale nevyužívají ho ve svém metabolismu

anaerobní kyslík je pro ně jedovatý

Z praktického hlediska ještě rozeznáváme skupinu **mikroaerofilní**, které rostou při snížené tenzi kyslíku. Patří sem jak některé fakultativně anaerobní, tak i některé aerotolerantní nebo nikoli striktně anaerobní bakterie.

Aerobní kultivaci provádíme běžně v termostatu.

⁵Pro semikvantitativní stanovení někdy stačí, když známe nasáklivost roztoku vzorku do materiálu z něhož je disk tvořen (vztaženou zpravidla na cm^2), a známe plochu disku. Poté stačí disky namáčet ve vzorku a po okápnutí pokládat na povrch půdy.



Obrázek 3: Poloha Petriho misek při kultivaci

Při kultivaci bakterií a kvasinek nejčastěji kultivujeme misky víčkem dolů, při kultivaci mikroskopických hub spíše víčkem nahoru.

Mikroaerofilní kultivace se provádí v běžných anaerostatech (a existují dokonce i vaky s vyvíječem plynu na jednoduchou „anaerobní“ kultivaci. U klasických termostátů se používala k odstranění části kyslíku svíčka (hořlaviny jako etanol by byly nevhodné, protože v závěru hoření by v prostoru vznikal aldehyd a kyselina s baktericidními účinky). Obdobného efektu (lze to kombinovat) se dosáhne směsí pyrogallol - hydroxid sodný (v silně alkalickém prostředí pyrogallol oxiduje a odebírá na tento proces kyslík z prostředí).

Existují i speciální bujony s látkami pohlcujícími kyslík, které nality do vyšší vrstvy ve vysoké zkumavce (sloupec půdy vyšší než 10 cm) zajišťují při hladině anaerobní a při dně mikroaerofilní prostředí. Promíchávání půdy zajišťuje malý přírůstek agarů (menší než u půd na pohyblivost). Aerobní × anaerobní prostředí je indikováno vhodnými látkami, které v přítomnosti kyslíku mění barvu.

Fortnerovy plotny představují utěsněné Petriho misky, z jejichž vnitřního prostředí je kyslík vypotřebován bakterií *Serratia marcescens*. V klasickém provedení se misky položily na skleněné destičky a utěsnily směsí vazelíny a parafinu, přičemž na část plochy půdy v misce se vysadila *Serratia* a na zbytek vzorek nebo kultura. Lze též spojit dvě dna misek, nebo půdu pro *Serratii* vylít na víčko. Těsnění se dá provést ponořením do parafinu (opakovaným), který je pevnější než směs s vazelínou.

Hluboko anaerobní podmínky jsou dosahovány ve speciálních anaerostatech, které jsou dlouhodobě proplachovány směsí plynů (CO_2 a některé další). Materiál je do nich a z nich přenášen skrze turnikety a očkuje se přímo v nich klíčkami vypálenými elektrickým proudem.

V malém lze podobného efektu dosáhnout kultivací v lahvičkách od injekcí (s gumovým uzávěrem), půda v nichž je probublávána z bomby (lze použít i Kippův přístroj)⁶ Na závěr (probublávání trvá až desítky minut) se hrdlo lahvičky i se zátkou opakovaně ponoří do roztaveného parafinu.

Pro uvedené silně anaerobní podmínky se používají speciální půdy, u nichž je počítáno s vysokou koncentrací oxidu uhličitého (normální půdy by se neúnosně okyselily). Tyto půdy jsou růstově velice bohaté, obsahují řadu vitamínů a dalších růstových faktorů; velice častou složkou půd pro kultivaci extrémních anaerobů z trávicího ústrojí je bacherová tekutina z krávy.

⁶Uzávěr tedy musíme probodnout dvěma jehlami, jednou, která jde co nejhlouběji do kapaliny v lahvičce, aby došlo k porobublávání a strhávání kyslíku z půdy, druhou jen skrze zátku, aby plyn z lahvičky odcházel.

1.4 Sporotvorné mikroorganismy

Přestože existuje dále popsané barvení na spory, pro detekci výskytu spor v potravinářských vzorcích se nepoužívá. Spory jsou detekovány na základě obecného postupu, kterým zlikvidujeme vegetativní formy mikrobů a to, co přežije a vyroste, jsou organismy vyklíčené ze spor.

Obecně se používá teplota 70 °C, a expoziční doba (pro vzorek ve zkumavce) 30 minut, v odůvodněných případech lze použít i vyšší teplotu a delší expozici.

Detekce životaschopných spor má v potravinářských výrobcích význam tam, kde potravina nebo potravinová surovina je uchovávána při teplotách umožňujících růst mikroorganismů a současně neobsahuje látky inhibující vyklíčení spor (např. kyselina octová nebo kyselina mléčná).

1.5 Biochemické vlastnosti mikroorganismů

Biochemické vlastnosti mikroorganismů jsou zajišťovány enzymy, které jsou genovými produkty. Z toho plyne, že mají vztah ke genetickému materiálu mikroorganismu. Některé biochemické vlastnosti jsou posléze natolik specifické, že se vyskytují pouze (nebo především) u některých skupin mikroorganismů a mohou být z tohoto důvodu využity k jejich diagnóze.

Testy jsou jednak klasické (které byly rozvíjeny ve druhé polovině 19. a ve 20. století), jednak různé rychlotesty, vyvíjené od poloviny 20. století dosud.

Klasický test představuje kultivaci mikroba na půdě vhodné pro jeho růst, přičemž tato půda obsahuje substrát vhodný pro sledovanou biochemickou reakci (v několika málo případech jsou jím standardní komponenty půdy) a v řadě případů i činidlo, které změnou barvy signalizuje proběhnutí (neproběhnutí) reakce.

1.5.1 Růst mikroba

Již samotný růst mikroba může být diagnosticky užitečný. Rozeznává se zpravidla růst při chladničkové (4 °C) – pokojové (20 °C) a tělesné (37 °C) teplotě. Růst zpravidla detekujeme pohledem jako vznik viditelných kolonií do určité doby. Růstem při chladničkové teplotě se vyznačují např. listerie. Naopak meningokoky a gonokoky mají úzké pásmo teploty růstu kolem 37 °C, takže vznik nárůstu zachycených mikrobů při teplotě 20 – 25 °C vede k závěru, že izolát nepatří k uvedeným patogenům.

Pohyblivost může být chápána jako vlastnost související s růstem. Detekuje se na půdách rosolovité konzistence (0,1 – 0,2% agaru), v nichž nepohyblivé mikroby vytvoří masivní nárůst v místě očkování (půdy bývají ve zkumavkách a očkují se hlubokým vpichem) a zbytek půdy je sklovitě čirý, zatímco pohyblivé se aktivně rozlézají půdou a vyvolají její opalescenci až zákal. I pohyblivost může být limitována teplotou (nejčastěji se testuje při 37 °C, ale někdy má diagnostický význam různá pohyblivost při pokojové a tělesné teplotě).

Růst v přítomnosti inhibujících látek často používaným testem u G- tyček je růst v půdě s obsahem KCN. Některé koky a G+ bakterie se diagnostikují na základě rezistence nebo naopak vnímavosti vůči některým antibiotikům nebo chemoterapeutikům.

Různé růstové nároky skupin mikrobů způsobují, že pro jednotlivé skupiny musí být základ diagnostických půd různý, pro růstově náročnější skupiny bohatší, protože jinak dojde k falešně negativním výsledkům (mikrob na půdě nenaroste a jeho vlastnosti se neprojeví). V případě pochybností je nutné vyzkoušet na základu půdy, bez substrátu a indikátoru, zda mikrob na takovéto půdě vůbec roste.

1.5.2 OF – test

Do bujony s glukosou (tu jsou schopny zpracovat prakticky všechny organismy, které nějak zpracují sacharidy) dáme indikátor změny pH a polovinu bujonů převrstvíme parafinovým olejem. Testované kmeny vyočkováváme do jedné zkumavky bez oleje a jedné s olejem. Pokud naočkovaný mikrob změní pH v obou zkumavkách, tak fermentuje i na vzduchu, i bez, pokud jen ve zkumavce bez parafinu, potřebuje k metabolismu vzduch, pokud jen pod olejem, pak je anaerobní a fermentuje. Pokud nezmění pH nikde a přitom roste (dělá se zákal), patří mezi nefermentující organismy, které se určují podle speciálních testů. Pokud není nárůst, může se jednat o organismus s vyššími nároky než splňuje náš bujon, nebo natolik striktního anaeroba, že mu pouhé překrytí bujony parafinovým olejem nestačí⁷.

1.5.3 Zkvašování cukrů

Zkvašování cukrů je obligátně detekováno na základě *změny pH*, indikátorem pH komponovaným přímo do půdy. Protože existují biochemické alternativní cesty zkvašování, přičemž při jedné vzniká paralelně s kyselými odpadními produkty plyn a ve druhé ne, bývá u některých cukrů paralelně detekována *tvorba plynu*.

Nejčastěji se zkvašování provádí v živném bujonu, do něhož bylo přidáno 1% testovaného sacharidu a indikátor pH (nejčastěji bromthymolová modř).

1.5.4 Rozklad některých látek

Rozštěpení močoviny Rozštěpením močoviny vzniká oxid uhličitý a amoniak. Výsledkem je alkalizace půdy, detekovaná opět indikátorem pH.

Dekarboxylace aminokyselin Některé aminokyseliny jsou charakteristicky dekarboxylovány jen určitými skupinami mikrobů, opět za vzniku alkaličtějšího pH. K diagnostickým účelům jsou užívány především aminokyseliny *arginin*, *lysin* a *ornitin*.

⁷To bychom ovšem měli být schopni určit podle způsobu jeho zachycení.

Rozklad želatiny Klasické testy připravovaly směs živné půdy se želatínou na Petriho misce. Po několika dnech kultivace (charakteristicky 5) se půda polila roztokem sublimátu (HgCl_2) ve vodě a narušená želatina se odlišila od nenarušené (mimo kolonie). Později byly vyráběny želatínové disky s aktivním uhlím. Kultivovaly se v peptonovém bujonu cca dva dny a v případě pozitivity (rozklad želatiny) se zatřepáním uhlí uvolnilo a vytvořilo černý zákal. Protože tento test trvá velice dlouho, používá se jen výjimečně.

1.5.5 Tvorba některých látek

Tvorba sirovodíku je podmíněna přítomností vhodného substrátu (nejčastěji thiosíran sodný). Detekce je možná solemi železa nebo olova. V obou případech vzniká šedé až černé zabarvení, dané vznikem příslušného siřníku. Výrazný rozdíl je v citlivosti. Soli železa zachytí výraznou produkci sirovodíku, zatímco octan olovnatý šedne i při malých kvantech. Proto pro oba detekční systémy existují oddělené tabulky.

Tvorba indolu nepotřebuje nějaký speciální substrát, postačuje i peptonový bujon. Pro indol bohužel neexistuje činidlo, které by se přidalo přímo do půdy, ale po ukončení růstu do půdy (používají se bujony nebo rosolovité půdy) přidáme Ehrlichovo nebo Kováčovo činidlo⁸

Neutralizace vznikajících kyselin tvorbu alkalických produktů je schopna zachytit reakce s metylenovou červení po ukončení růstu.

Tvorba acetoinu signalizuje kvašení bez výrazné změny pH. Detekuje se Voges - Proskaurerovou reakcí po ukončení kultivace.

1.5.6 Utilizace některých látek

Utilizace některých organických látek je detekována jejich nabídkou jako jediného zdroje uhlíku. Je užívána jednak utilizace organických kyselin, jednak některých cukrů.

Utilizace citrátu je detekována na půdě podle Simmonse, která má vybalancované pH. Spotřebením citrátové složky z citrátu sodného se médium alkalizuje.

Utilizace cukrů je nečastěji detekována pomocí auxanogramů. Větší uplatnění než u bakterií nachází u kvasinek. Agar na cukrové auxanogramy neobsahuje žádný zdroj uhlíku. Je vylit na Petriho misce. Na jeho povrch je masívně rozetřena kultura, po vaschnutí inokula dáváme na povrch malé hromádky jednotlivých cukrů (na misku se jich vejde 6 -

⁸Složení je podobné, liší se především rozpouštědlem p-dimethylaminobenzaldehydu, v Ehrlichově činidle je etanol (proto se mísí s vodou), v Kováčově amyalkohol (nemísí se s vodou). Dle mých zkušeností je odečítání zbarvení Kováčova činidla snadnější.

7)⁹ Umístění cukrů si označíme na spodní straně misky. Po cca 5 – 7 dnech je vidět kolem utilizovaných cukrů nárůst jako zakalení povrchu půdy.

U kvasinek lze podobným způsobem vytvářet auxanogramy na zdroje dusíku nebo i některé vitamíny.

1.5.7 Rychlé a kompaktní testy

Pro některé vlastnosti byly vyvíjeny „rychltesty“ už hluboko ve 20. století. Poslední čtvrtina minulého století přinesla soustředění testů na kompaktní destičky, umožňující současně určení celé baterie testů a u více kmenů současně. Uvedené sady jsou vyráběny řadou výrobců¹⁰ v různých úpravách. Testy jsou zpravidla vyráběny pro konkrétní skupinu (enterobakterie a příbuzné, g+ koky, g+ tyčky apod.). Bakterie se vyočkovávají masívně (v některých případech je zapotřebí jejich předpěstování v čisté kultuře) ze suspenze ve fyziologickém roztoku. Některé testy se zakapávají parafinovým olejem pro zajištění mikroaerofilních podmínek. Na konci inkubace při 37 °C se do některých testů přikapávají činidla, která jsou součástí sady.

Vyhodnocením testů obdržíme pro „ruční práci“ číselný kód, který porovnáváme s kódy v dodávaném manuálu. Další možností je nasazení výpočetní techniky, která nachází nejlepší shodu výsledků s databází. V takovém případě je výsledkem často „nabídka“ více mikrobů s pravděpodobností vyjádřenou v procentech. V některých případech lze dohledat i neprovedené testy, které by mezi nabízenými mikroby rozhodly.

Důležité je, že tabulky pro výše uvedené klasické testy a pro mikrotesty nejsou zcela zaměnitelné, především klesá pravděpodobnost pozitivivity některých testů pro pomaleji metabolizující druhy, které pak na destičkách vycházejí negativní a v klasických testech mohou být pozitivní. Nejsou ani zcela převoditelné sady a vyhodnocovací prostředky (tabulky, počítačové programy) mezi různými výrobci.

⁹Hromádky skutečně musejí být malé, tak 1 - 2 mm³, jinak dojde k vytažení vody z agarů a rozlití sirupovité kapaliny po jeho povrchu a slítí jednotlivých nárůstů.

¹⁰Na trhu se udržela i Lachema Brno, spolupracující s Českou sbírkou mikroorganismů, spadající pod naši univerzitu.

2 Postupy práce

2.1 Elementární postupy

(Postupy jsou popsány pro praváka, levák je dělá zrcadlově.)

2.1.1 Vypalování kličky

Kličku vypalujeme vždy v poloze šikmo dolů, aby se částečně ožehla i kovová část rukojeti. Zrakem kontrolujeme její rozžhavení do rudého žáru. Nedržíme ji vodorovně, v tom případě je její část v plameni kahanu příliš krátká. Dbáme také na to, aby její konec nebyl v konusu spodní části plamene, kde je nízká teplota.

2.1.2 Odebrání bakterií z bujonu / suspenze

Kličku namočíme do bujonu, aby byl ponořený celý zatočený konec. Při velkém objemu bujonu (mimilitry) ji můžeme ponořit ihned po vypálení. Při malém objemu (kapka) musíme nechat kličku několik sekund vychladnout, protože jinak bychom zahřáli kapalinu až na teplotu neslučitelnou s přežitím vegetativních buněk.

Zkumavku s bujonem uchopíme do pravé ruky. Mezi malíček a dlaň sevřeme zátku a vytáhneme. Odzátkovanou zkumavku uchopíme mezi palec a ukazováček a pravou rukou s kličkou z ní můžeme nabírat.

Zazátkování provedeme buď v opačném gardu (zkumavku uchopíme tou rukou, v níž držíme kličku), nebo zkumavku postavíme do stojánku a zazátkujeme.

Je vhodné se před tímto manévrem, ještě než vypálíme kličku, přesvědčit o tom, že zátka není připečená a pokud je, tak ji uvolnit oběma rukama.

2.1.3 Odebrání bakterií z pevné půdy

Vypálenou kličku nejprve ochladíme v holém (bez nárůstu) kousku půdy. Potom nabereme kousek kolonie.

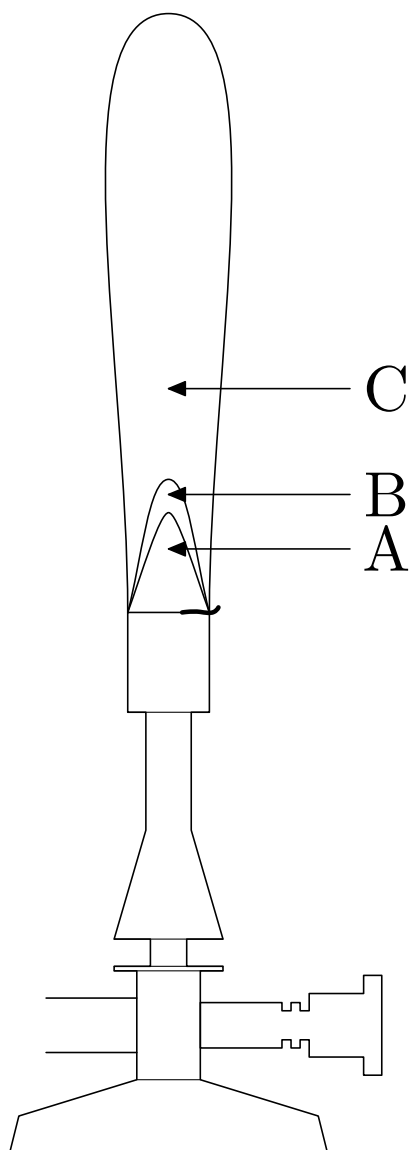
Pokud odebíráme z pevné půdy ve zkumavce (šikmý agar) postupujeme při jejím otevírání a zavírání jako výše¹¹

Petriho misku nejlépe položíme dnem vzhůru. Do levé ruky uchopíme dno misky, zvedneme, otočíme, nabereme bakterie, hned misku položíme zpět na víčko. Tím se redukuje riziko kontaminace kultury spadem ze vzduchu.

2.1.4 Očkování na pevnou půdu

Na pevné půdě provádíme nejčastěji křížový roztěr (viz obrázek). Kousek kolonie rozetřeme do 1 – 2 cm čárky při okraji misky. Poté kličku vypálíme. Ochladíme ji na místě bez

¹¹Není-li šikmý agar úplně zaschlý, je na dolním konci půdy kondenzovaná pára, která může vytéci ze zkumavky stejně jako bujonová kultura.



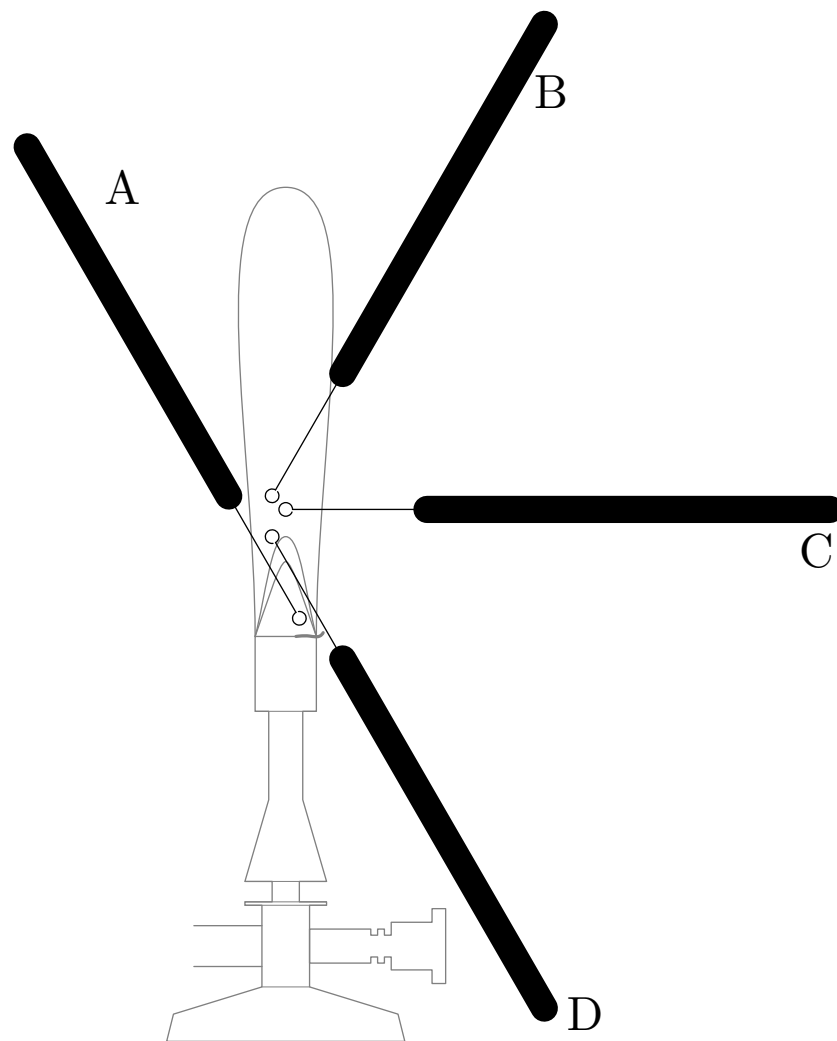
Obrázek 4: Schéma plamene plynového kahanu

Oblast **A** obsahuje ještě nehořící plyn, je to nejchladnější část plamene, oblast **B** představuje místo nejintenzivnějšího hoření, zde je teplota plamene nejvyšší, v oblasti **C** se teplota plamene směrem zdola nahoru postupně snižuje.

roztěru a křížem přes prvotní roztěr provedeme druhotný. Opět kličku vypálíme, ochladíme a provedeme roztěr třetího řádu, případně stejně i čtvrtého.

Na šikmý agar ve zkumavce očkujeme „hadovitým“ roztěrem, který ukončíme vpichem do dolní části půdy (není-li to nějaká speciální půda, vyžadující zvláštní techniku očkování).

Petriho misky i zkumavky otevíráme stejně jako misky a zkumavky s kulturou a jen na



Obrázek 5: Poloha kličky při vypalování

Správná je poloha kličky **B**. Klička **A** je moc nízko a je v chladné části plamene. Klička **C** je vypalována pouze v malé části. Klička **D** je vypalována o něco méně účinně než B, ale existují mechanická zařízení, která vypalují kličky právě v této poloze.

nejkratší nutný okamžik, aby do nich nenapadaly vzdušné mikroby.

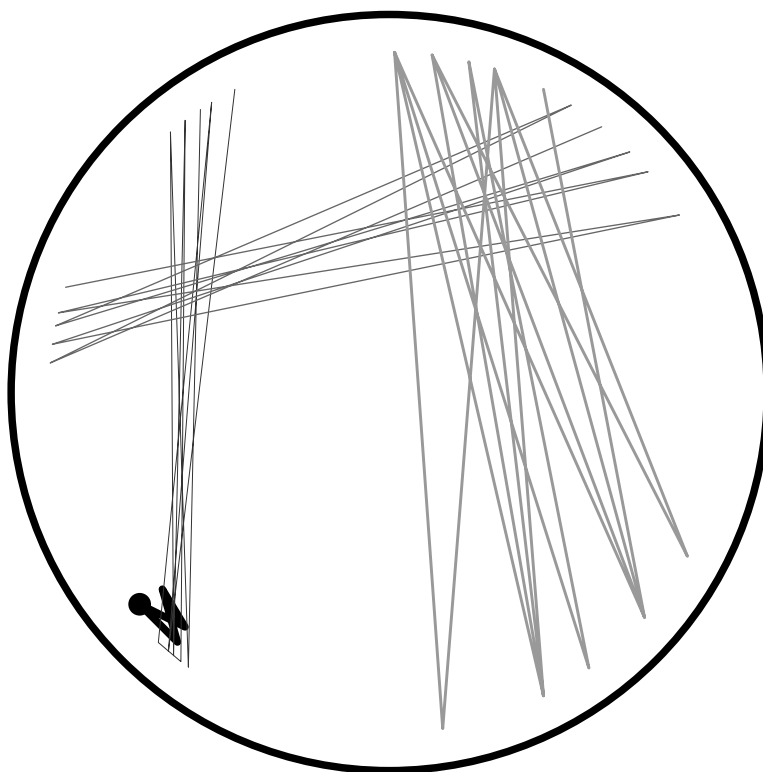
2.1.5 Očkování do bujonu

Zkumavky otevíráme jako zkumavky s kulturou a stačí ponoření kličky do bujonu.



Obrázek 6: Držení zkumavky a zátky

Takto správně držíme zátku při odběru bakterií ze zkumavky nebo naopak očkování na půdu ve zkumavce, zátku nikam nepokládáme, odkládáme až kličku, kterou držíme v druhé ruce.



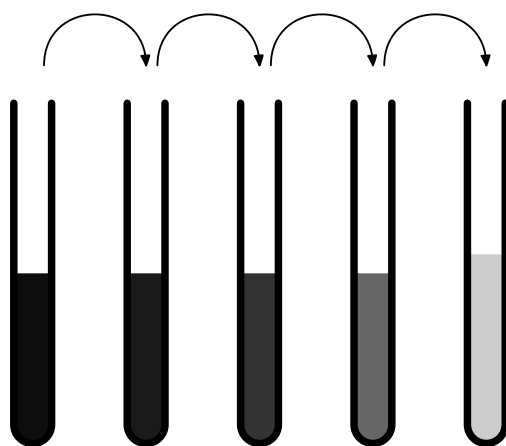
Obrázek 7: Křížový roztěr

Takto provádíme postupný křížový roztěr po povrchu misky, abychom dostali jednotlivé kolonie.

2.1.6 Dekadické ředění

Nachystáme příslušný počet zkumavek. Obsahují 0.9 potřebného objemu. (Pokud se jedná o neběžnější bakteriologické zkumavky, rozpiprtujeme do nich 4,5 ml roztoku, který používáme k ředění (bujon, fyziologický roztok). Do první zkumavky přidáme 0.1 potřebného objemu vzorku / kultury (nebo něčeho jiného, co ředíme). (V případě zkumavek po 4,5 ml to bude 0,5 ml.) Obsah zkumavky dobře promícháme (několikerým nasátím do pipety a vypuštěním), potom stejný objem přepipetujeme do následující zkumavky, promícháme, přepipetujeme do další atd.

Analogicky můžeme dělat i třeba binární ředění nebo ředění v jiném poměru, nicméně dekadické se užívá zdaleka nejčastěji.



Obrázek 8: Dekadické ředění

Schéma dekadického ředění, při níž vždy 1/10 porce půdy (vztaheno k objemu po doplnění předchozí zkumavky) po promíchání přesouváme do zkumavky další. V poslední zkumavce zůstane větší objem.

2.1.7 Aplikace mikroba na povrch půdy

Potřebné množství suspenze mikroba napipetujeme sterilně na povrch půdy (nejlépe zhruba uprostřed) a sterilní hokejkou důkladně a opakovaně rozetřeme po celém povrchu. Při aplikaci větších objemů necháváme někdy povrch půdy vyschout s pootevřeným víčkem v neprašném prostředí (nejčastěji v termostatu).

2.1.8 Aplikace mikroba do agarů

Na střed prázdné misky napipetujeme potřebné množství suspenze (kultury apod.). Zalijeme agarovou půdou ochlazenou na 45°C (teplejší by mohla usmrtit vegetativní buňky). Krouživým pohybem opatrně rozmícháme (kritické je jednak dostatečné rozmíchání, jinak vznikne „ostrov“ slitého nárůstu, jednak vylití kapalné půdy přes okraj misky).

2.1.9 Odečtení velikosti zóny inhibice růstu

Přes střed místa, kde byla aplikována testovací látka (střed disku, komínku, jamky) měříme tři průměry od nejbližších vyrostlých kolonií na jedné straně k nejbližším vyrostlým na straně protější, průměry svírají úhel cca 60°, z naměřených hodnot vypočteme průměr.

2.1.10 Odečtení počtu kolonií na misce

Na spodní straně dna Petriho misky si fixem na sklo děláme pod koloniemi značky, vždy devětkrát tečku a jednou kolečko. Nakonec spočteme kolečka (desítky) a připočteme, co nám zbylo do již nenamalovaného kolečka (jednotky). U velmi hustých nárůstů počítáme jen na čtvrtině dna (rozdělíme kolmicemi před střed). Pokud se zjevně nevejdeme do rozmezí 50 - 500 u bakterií a 50 - 150 u plísní, nemá většinou cenu počítat. U menších počtů je větší zátěž chybami v ředění apod., u velkých zase dochází k inhibici mikrobů a tomu, že některé kolonie nenarostou do viditelné velikosti.

2.1.11 Šikmení agarů

Agar zpravidla již před sterilizací rozplníme do zkumavek. Po sterilizaci ještě tekutý ukládáme do téměř vodorovné polohy (aby vznikla silně našikmená hladina), opřením o vhodný předmět (ideální je tyčka cca 2 cm vysoká se zářezy na jednotlivé zkumavky). Po ztuhnutí ukládáme do lednice nebo očkujeme.

2.1.12 Vylévání agaru na misku

Baňku s půdou uchopíme do ručníku nebo utěrky, držíme za smotanou látku. Misky si připravíme do řady podle kraje stolu. Při vylévání vždy jen nadzdvihneme víčko a vylejeme půdu (zpravidla odhadem). Pro nalévání přesného množství použijeme sterilní odměrný válec. Vyléváme-li do skleněných misek, můžeme následně odstranit bubliny na povrchu půdy jeho přejetím plamenem kahanu, na plastových to nejde.

Misky i agary vždy popisujeme – na jednotlivé kusy druh půdy a alespoň na balení (sáček se zkumavkami nebo miskami) i datum.

2.2 Barvení podle Grama

Gramovo barvení představuje základní barvení v bakteriologii. Veškeré bakterie se dělí na tři skupiny:

1. **Gram pozitivní (G+)** Mezi něž patří bakterie s poněkud jednodušší stavbou buněčné stěny. Tato stěna obsahuje polysacharidy, které vytvářejí s gencianovou violetí a jodem komplexy nerozpustné v etanolu (acetonu).
2. **Gram negativní (G-)** Tyto bakterie mají složitější stavbu buněčné stěny a obsahují v ní více lipidů. Gencianová violet se na ně nenaváže a vymyje se.

3. **Gram nebarvitelné** Několik málo skupin bakterií se nevybarví žádným z barviv zahrnutých do tohoto barvení¹² a musí být zobrazovány pomocí velice speciálních zobrazovacích postupů.

Gramovo barvení je důležité i pro diagnostiku, včetně rozhodování o tom, jaké další kultivační a diagnostické postupy budou použity. Jeho bezpečné zvládnutí patří k základům laboratorní práce v mikrobiologii.

Používá se k diagnostice čistých kultur, jednotlivých kolonií, i surového materiálu, jako jsou výtěry z tělesných otvorů, vzorky patologických tekutin apod.

Urtčitá zkušenost je nutná nejen při barvení, ale i při vyhodnocování preparátů. Velmi mladé a velmi staré kultury se mohou vybarvovat „Gram labilně“ (G±), tj. v preparátu vidíme buňky G+ i G-, případně buňky strakaté.

Postup práce:

1. Preparát převrstvíme Gram I na dobu 20 sekund
2. Gram I slijeme, preparát splachujeme Gram II pokud se dělá zlatavá vrstvička, pak necháme stát na preparátu do úhrnné doby 20 sekund
3. Kapeme na šikmo držené – položené sklíčko etylalkohol nebo aceton do té doby, než přestane odtékat barva, resp do 20 – 30 sekund
4. Opláchneme vodou
5. Přelijeme na 30 – 60 sekund Gram IV
6. Osušíme a prohlížíme

2.3 Acidoresistentní barvení

Barvení je založeno na principu tepelné fixace barviva do bakteriální stěny, která je tak pevná, že vzdoruje i následnému vymývání kyselým etanolem (proto acidoresistentní)

Acidoresistentní barvení má především klinický význam. Historicky se používalo ke hledání mykobakterií v klinickém materiálu (především *Mycobacterium tuberculosis*). To má svůj význam i teď, protože kultivační a další techniky průkazu těchto bakterií mají sice vyšší záchytnost, ale trvají déle (i několik týdnů), zatímco příprava a prohlédnutí preparátu jsou otázkou desítek minut a v případě positivity je možné ihned zahájit cílenou léčbu.

Vedle mykobakterií se acidoresistentně vybarvují i některé zralé askospory. Vhodným modelovým objektem (i např. pro výuku na středních školách) jsou kultury *Saccharomyces cerevisiae* (tedy kvasinek pekařského droždí), protože jde o nepatogenní organismus. Kultury je nutno pěstovat cca týden na speciálním agaru, aby dobře vysporulovaly.

¹²A žádným z dalších běžných barviv.

Postup práce: Preparát se doporučuje umístit na sklíčko k jednomu konci

1. preparát po tepelné fixaci převrstvíme karbolfuchsinem s fenolem, třikrát po sobě zahříváme tak dlouho, až z něj začne jít pára, celkem 3 – 5 minut¹³
2. preparát se opláchne kyselým alkoholem (postup oplachování se stejný jako u Gramova barvení)
3. preparát se opláchne vodou
4. preparát se převrství na 10 – 30 sekund roztokem malachitové zeleně
5. znovu se opláchne vodou
6. osuší se stáním na hraně na teple

2.4 Barvení na pouzdra

Pouzdra (jejich přítomnost nebo nepřítomnost) mají diagnostický význam uvnitř některých skupin bakterií (např. rod *Klebsiella*). Pouzdra se skládají ze slizovitých látek, které se uplatňují v potravinářství. Zajišťují zahuštění výrobku a „mastnou“ chuť i u nízkotučných výrobků.

„Školskou“ bakterií s pouzdry je *Azotobacter sp.*, který patří k běžné půdní mikroflóře. Jeho záchyt se provádí na speciálním agaru bez zdrojů dusíku (protože bakterie je schopna využít dusík ze vzduchu, takže roste i zde, na rozdíl od konkurence). Tyto bakterie jsou symbionty některých bobovitých rostlin a zajišťují jejich reaktivní nezávislost na přítomnosti sloučenin dusíku v půdě.

V zimním období, na něž toto praktikum připadá, bývají s izolací azotobakterů problémy a izolace z květináčů od pokojových rostlin nebývá jistá.

Pro potřeby praktik jsme vyzkoušeli jako velmi dobrý model bakterie z povrchového mazu sýrů (typu Zlato nebo Romadur) nebo syrečků.

Postup práce (původní, z literatury):

1. suspendovat kulturu v kapce destilované vody na sklíčku
2. přidat nigrozin (tuš)
3. tence rozetřít druhým sklíčkem
4. nechat zaschnout, protáhnout plamenem
5. barvit metylénovou modří s KOH 3 – 5 min

¹³Tomuto postupu se říká „moření“.

6. slít barvu a kapátkem ve vodorovné poloze dest. vodou opláchnout sklíčko, nechat ve svislé poloze uschnout

V praxi se nám při práci s kulturami osvědčilo body 1 – 3 spojit a suspendovat kousek kolonie v kapce tuše a kapku nakonec přímo kličkou rozetřít na větší plochu. Oplachování (bod 6) je kritické v tom, že pokud je příliš razantní, vrstvička zaschlé tuše odplave i s bakteriemi. Pouzdra jsou nejlépe viditelná na středně hustých místech preparátu jako světlé (někdy narůžovělé) dvorce kolem modrofialově vybarvených buněk.

2.5 Barvení na spory

Sporotvorné bakterie mají značný význam v potravinářství, spočívající v tom, že spory přežijí běžné konzervační postupy a mohou následně znehodnotit hotový výrobek nebo polotovár. Tvorba spor za definovaných podmínek je rovněž cenným dignostickým znakem.

Barvení na spory se užívá na detekci spor v bakteriální kultuře. **Není možné ho použít** na detekci spor v běžných potravinách, leda by na nich byl natolik mohutný nárůst, že by měl vlastnosti prakticky stejné jako čistá kultura.¹⁴ Na detekci jednotkových počtů spor v obsahu konzervy mikroskopování užít nelze.

Spory jsou někdy vidět i v Gramově barvení jako odlišně vybarvené části buněk (spora je G+, odumírající zbytek vegetativní buňky je G±). Případně vidíme větší zbytky vegetativních buněk a mezi nimi menší spory.

Při barvení na spory se mohou spory vybarvovat s různou intenzitou v závislosti na stádiu jejich vývoje. V preparátech, kde se spory teprve tvoří, vidíme zbarvenou část buňky, ve velmi starých preparátech zase vidíme již jen spory, protože vegetativní buňky se rozpadly.

Postup práce

1. Připravit preparát z kultury, raději k jenomu konci sklíčka a fixovat
2. Přelít 5% roztokem malachitové zeleně a třikrát zahřívát do výstupu par, podobně jako u acidoresistentního barvení
3. opláchnout vodou
4. přelít 5% roztokem eosinu
5. opláchnout vodou, osušit

¹⁴Měl jsem možnost asi dvakrát v životě vidět konzervu – rybí maso v oleji, kde v oleji plavaly cca 2 – 3 mm velké kuličky, kolonie bakterií, které obsah konzervy znehodnotily.

3 Receptury

Přestože většinu barviv a pŮd lze v dnešní době nakoupit jako komerční produkty, uvádím složení alespoň některých. Úplně všechny z uvedených materiálů se běžně nedají nakoupit a navíc je vhodné v případě nějakých „záhadných“ problémů porovnat se zakoupeným výrobkem výrobek vlastní, vyrobený ze základních surovin.

3.1 Receptury barviv

Metylénová modř s KOH. Smísíme

1. Nasycený roztok metylénové modři v etanolu¹⁵ 30 ml
2. Destilovaná voda 99 ml
3. Vodný roztok KOH 1%

Metylénová modř pro vitální barvení. Odvážit přesně 10 – 20 mg (na desetiny mg) metylénové modři, rozpustit ve vodě (cca 5 × ml, kolik bylo mg metylénové modři), po rozpuštění a filtraci přidat vodu tak, aby výsledný objem roztoku byl desetkrát tolik mililitrů, kolik bylo metylénové modři miligramů.

Barvení podle Grama

1. Gram 1
 - Krystalová nebo genciánová violeť 5 g + 96% etanol 200 ml
Nechat stát přes noc v termostatu v dobře uzavřené láhvi, druhý den zfiltrovat a přidat:
 - 1% roztok šťavelanu amonného v dest. vodě 800 ml
2. Gram 2 (SOLUTIO LUGOL)
 - Jód 1 g + 1% roztok KJ v dest. vodě 200 ml
Lugolův roztok je nestabilní na světle, nelze ho delší dobu (týdny) uchovávat v plastových lahvičkách.
3. Gram 3
SPIRITUS CUM BENZINO nebo aceton¹⁶
4. Gram 4
2,5% roztok safraninu v 96% etanolu 10 ml + dest. voda 100 ml

¹⁵Stačí SPIRITUS CUM BENZINO, nasycený roztok vznikne tak, že ve směsi rozpouštědla a rozpouštěné substance zůstává část substance trvale nerozpouštěna.

¹⁶Vzhledem k razantnímu zdanění (a tím i zdražení) i denaturovaného lihu vychází aceton nyní levněji.

Barvení podle Ziehl – Neelsena

1. Karboľfuchsinový roztok:

- Komponenta a: 10g fuchsinu rozpustit v 100 g (!) 96% etanolu
- Komponenta b: 50g krystalického fenolu rozpustit ve 200 ml dest. vody a po rozpuštění doplnit na 1000 ml
Po filtraci obou komponent smísit 1 díl **a** a 9 dílů **b**
- Kyselý alkohol¹⁷
- HCl 25% 3 ml
- etanol 96% 97 ml

2. Roztok malachitové zeleně

1,2% roztok malachitové zeleně ve vodě

Barvení na pouzdra

- Roztok nigrozinu: nigrozin 10 g + voda dest. 100 ml
Místo originální receptury se nám více osvědčuje rýsovací tuš
- Metylénová modř s KOH (viz výše)

Barvení na spory

- 5% roztok malachitové zeleně ve vodě
- 5% roztok eosinu ve vodě

3.2 Receptury půd

Půda pro *Paramecium caudatum*

Pšeničné zrno v bakt. zkumavce přelijeme 10 ml vodovodní vody, necháme nabobtnat a autokládujeme 20 min. při 1 atmosféře. Očkujeme semisterilně – v kultuře jsou zároveň bakterie, kterými se *Paramecia* živí. Kultivujeme při teplotě 24 – 30 °C.

Půda pro *Eugleny* a *Tetrahymeny*

2% roztok peptonu ve vodovodní vodě, rozplnit do zkumavek po 10 – 15 ml a autokládovat 30 minut při 1 atm., pokud potřebujeme urychlit růst, přidáme 0,05-0,1% kvasničného autolyzátu (nebo sušeného droždí).

¹⁷Existují různé varianty, původní receptura obsahovala kyselinu sírovou a etanol 1:1, některé příručky uvádějí ještě přídavek NaCl (5%).

Ashbyho agar pro *Azotobacter*

Manitol	10g
NaCl	0,1g
CaSO ₄	0,1g
K ₂ HPO ₄	0,2g
MgSO ₄ bezv.	0,2g

rozpustíme v litru dest. vody, v roztoku necháme nabobtnat 20g agaru před autoklávováním přidáme 5g CaCO₃, autoklávujeme 15 min. při 1 atmosféře, před vyléváním důkladně mícháme, aby se CaCO₃ suspenzoval rovnoměrně do všech misek.

Půda je selektivní pro bakterie přijímající vzdušný dusík, po vyočkování hlíny (v zimním období raději z květináčů) vyrostou především azotobactery. Kultivace při 30 °C, trvá týden.

Acetát askosporový agar

Octan draselný	10,0g
Glukóza	1,0g
Kvasničný autolysát	2,5g
agar	30,0g
Voda	1000,0 ml

Octan draselný, kvasničný autolysát a glukózu rozpustíme ve vodě. Přidáme agar, necháme nabobtnat (cca půl hodiny) a autoklávujeme 15 min. při 1 atmosféře.

Kvasinky pekařského droždí vytváří spóry po cca týdenní kultivaci při teplotě 30 °C.

Urea - H₂S - Pb acetát

Pepton	0,5 g
Enzymatický kaseinový hydrolyzát	0,5 g
NaCl	0,5 g
Bromthymolový indikátor	1,5 ml
Agar	1,5 g
Voda	do 95 ml

Autoklávovat, současně autoklávovat 2 g ury v lahvičce a 5 ml vody v jiné lahvičce a 0,1 g glukózy v další lahvičce. Sterilní vodou po autoklávování obojí rozpustit a sterilně přidat do roztoku, dále přidat 0,8 ml Na₂S₂O₃ 25% roztok a plumbum aceticum 0,8 ml 10 % roztok. pH upravit sterilním roztokem NaOH na „semaforovou zelen“.

Pufrovaný fyziologický roztok pro pomnožení *Yersinia enterocolitica* dle dr. Aldové

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	18,1 g
KH ₂ PO ₄	1,83 g
NaCl	8,5 g
Voda	do 1000 ml

Rozplnit po 5 ml do bakteriologických zkumavek - pH zkontrolovat a upravit na 7,2. Autoklávovat při 120 °C 30 min.

Kultivovat v lednici, vyočkovávat z pufry 1., 2. a 3. týden (je možné zachytit pozitivní růst i po dvou předchozích neúspěšných vyočkováních) na DC agar, ten kultivovat 48 hod. při pokojové teplotě. V pufry ale mohou růst i jiné G- tyčky!

Stanovení štěpení lysinu nebo argininu nebo ornithinu

Pepton	0,5 g
Beef extract	0,5 g
Roztok bromkresolové červeně 1:500 v etanolu	0,5 ml
Roztok kresolové červeně 1:500 v etanolu	0,5 ml
Pyridoxin (=vitamin B ₆)	0,5 mg
Glukóza	0,05 g
Voda	do 100 ml

Smístit, vařit a filtrovat přes filtrační papír.

Následně přidat 1% (W/V) l-lysinu (dihydrochlorid) nebo l-argininu (monohydrochlorid) nebo l-ornithinu (dihydrochlorid). pH upravit na 6 a rozplnit po 0,5 ml do sterilních mikrozkušavek (sérovky, velké plynovky), převrstvit 0,25 ml parafinového oleje a sterilizovat 15 minut v autoklávu.

Masívně inokulovat. Pozitivní je přechod ze žluté do rudofialové.

MIU - pohyblivost, indol, močovina

Trypton (nebo enzymatický kaseinový hydrolyzát)	30 g
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Agar	3 g
Voda	do 1000 ml

Rozvařit, pH upravit na 6,9 a přidat 2 ml 0,2% roztoku fenolčerveně. Ze zásobního roztoku odlít 50 ml a po schladnutí na 50 °C přidat 50 ml 20% roztoku urey (močoviny) ve vodě sterilního, rozplnit do do sterilních zkumavek.

Očkuje se hlubokým vpichem. Pohyblivost se posuzuje: Růst jen okolo vpichu, nebo difúzní zákal, zčervenání znamená štěpení urey, produkce indolu se testuje na závěr (kultura se tím usmrtí) přilitím Ehrlichovým nebo Kovacovým činidlem. Tato činidla nabudou s indolem do několika minut červenou až červenofialovou barvu.

Peptonová voda

Pepton	10 g
NaCl	5 g
Voda	1000 ml

Rozvařit, rozplnit do zkumavek a autoklávovat.

Lze použít pro stanovení produkce indolu, na umístění želatinových disků (rozklad želatiny), přidáním 1 % sacharidu a bromthymolového indikátoru získáme bujon pro stanovení zkvašování cukrů vhodný pro růstově méně náročné členy skupiny *Enterobacteriaceae*

Bujon pro fermentaci sacharidů

Živný bujon	100 ml
Bromthymolový indikátor	1,5 ml
Sacharid	1 g

Jako „živný bujon“ lze vzít peptonovou vodu, peptonovou vodu obohacenou 0,5 – 1 % masového extraktu, komerční živný bujon apod.

Bujony se sacharidy nelze autoklávovat, musejí se sterilizovat frakcionovaně v proudící páře. Druhou možností je přidavek sterilního roztoku sacharidu o vyšší koncentraci (10 – 20 %), který lze autoklávovat (nebo sterilizovat filtrací). Přidavek sterilního roztoku sacharidu do sterilního bujonu je nutno technicky dobře zvládnout!

Agar s octanem olovnatým

Živný bujon	1000 ml
Agar	15 g
Plumbum aceticum $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$	1 g
Voda destilovaná sterilní	6 ml

Druhou složku přidáme do první, sterilizujeme, vlejeme třetí rozpuštěnou ve čtvrté, rozplníme do zkumavek po 3 ml a necháme ztuhnout. Očkujeme vpichem, zešednutí až zčernání znamená produkci sirovodíku.

Přidáním sterilního roztoku 20 g urey a 1 g glukózy a 1,5 ml bromthymolového indikátoru získáme půdu, v níž vedle produkce sirovodíku detekujeme štěpení urey (zmodrání půdy).

Sterilní roztoky octanu olovnatého a urey s glukózou můžeme připravit frakcionovanou sterilizací, bromthymolový indikátor můžeme přidat k bujonu.

Agar podle Hajny

Tento agar existuje v různých úpravách, jeho podstata je však vždy stejná: Laktóza a sacharóza v množství detekujícím jejich zkvašování, malý přidavek glukózy (pro lepší růst bakterií), thiosíran sodný jako substrát pro tvorbu sirovodíku a sůl dvojmocného železa jako indikátorový systém pro sirovodík.

Agar	15 g
Pepton	20 g
NaCl	5 g
Voda	1000 ml
Laktóza	10 g
Sacharóza	10 g
Glukóza	1 g
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	0,2 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	0,2 g
1% roztok fenolčerveně	2,5 ml

Klasická receptura sterilizuje směs prvních čtyř látek a následně frakcionovaně sterilizuje hotový výrobek; komerční půdy (např. TSI agar) lze zpravidla autoklávovat. Vylévá se do zkumavek do vyšší vrstvy a šikmí, očkuje se jako šikmý agar a následně vpichem až ke dnu zkumavky. Zežloutnutí značí zkvašování laktózy nebo sacharózy, trhání půdy kolem vpichu zkvašování s tvorbou plynu, černání tvorbu sirovodíku.

Půda se používala jako rychlý orientační test na salmonely, které nezkvašují uvedené sacharidy a tvoří sirovodík. Se zvyšováním podílu atypických salmonel, které mohou laktózu nebo sacharózu zkvašovat, a poklesem potřeby detekovat *Salmonella typhi*, která na této půdě roste typicky (červená se zčernáním) význam této půdy poklesl a používá se spíše jen na detekci tvorby sirovodíku.

Agar pro stanovení utilizace citrátu

NaCl	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 g
Agar	20 g
Voda dest.	1000 ml

Po rozpuštění uvedených solí ve vodě přidáme 40 ml 0,2% roztoku bromthymolové modře, 5 g citronanu sodného, promícháme, rozplníme do zkumavek, frakcionovaně sterilizujeme a šikmíme. Test vyřaduje velmi masívní vyočkování.

3.3 Receptury činidel

Bromthymolový indikátor

1g bromthymolové modře do 16 ml 0.1N NaOH, rozpustit, přidat vodu do objemu 500 ml dát na 24 hodin do termostatu (případně poté zfiltrvat)

Běžně dávat 1,5ml do 100 ml půdy.

Ehrlichovo činidlo

p-dimethylaminobenzaldehydum	5 g
HCl koncentrovaná	25 ml
Etanol (stačí lihobenzin)	75 ml

Smísit, uchovávat potmě.

Kovaczovo činidlo

p-dimethylaminobenzaldehydum	2,5 g
HCl koncentrovaná	15 ml
Amylalkohol	75 ml

Smísit, uchovávat potmě.

3.4 Biochemické vlastnosti

Tabulka biochemických vlastností nejdůležitějších G- tyček.

Název bakterie	Mot	Ind	SC	Ure	H2S Pb	H2S TSI	Man kva	Man ply	Glu kva	Glu ply	Sac	Sor	Oxi	Lak	Mal	Lys	Název bakterie	bakterie	
Arizona	Hinshawii	99	5	50	1	99	99	99	99	99	1	.	.	50	.	0	Arizona	Hinshawii	
Citrobacter	diversus	90	90	95	50	50	1	99	99	99	.	90	99	50	99	1	Citrobacter	diversus	
	Freundii	99	1	99	50	99	90	95	95	99	95	50	95	99	99	95	1	Freundii	
Edwardsiella	tarda	99	95	1	1	99	95	1	1	95	95	5	5	1	1	95	99	Edwardsiella	tarda
Enterobacter	aerogenes	99	1	99	10	5	1	99	99	99	99	99	1	99	99	95	Enterobacter	aerogenes	
	agglomeratus	50	50	50	50	.	.	99	99	99	50	50	50	1	.	50	1	agglomeratus	
	cloacae	99	1	99	50	10	1	99	99	99	95	95	95	1	95	99	1	cloacae	
Erwinia	liquefaciens	50	1	99	50	1	1	99	99	99	99	99	1	50	95	99	1	liquefaciens	
	amylovora	99	1	1	50	.	1	99	.	99	1	1	99	1	.	1	1	Erwinia	amylovora
cartovora	cartovora	95	50	50	1	.	1	99	.	99	50	50	50	1	.	50	1	cartovora	
	herboidea	50	1	50	1	1	1	99	.	99	5	90	10	1	50	90	1	herboidea	
Escherichia	adekarboxylata	99	95	1	1	1	1	99	1	99	99	99	1	1	99	99	1	adekarboxylata	
	alcaligenes dispar	1	95	1	1	1	1	99	1	99	99	50	99	1	10	99	1	alcaligenes	dispar
	aureescens	90	95	5	1	50	5	95	95	99	95	10	90	1	95	90	50	aureescens	
	coli v. coli	90	95	5	1	50	5	95	95	99	95	10	95	1	95	95	50	coli	var. coli
Hafnia	coli v. Neapolitana	90	95	5	5	50	5	95	1	99	95	99	50	1	95	95	50	coli	var. Neapolitana
	alwei	50	1	50	5	99	90	99	99	99	95	10	5	1	10	99	95	Hafnia	alwei
Klebsiella	aerogenes	1	50	99	99	5	1	99	50	90	90	99	95	1	90	99	90	Klebsiella	aerogenes
	edwardsii v. edw.	.	1	50	99	.	1	99	.	1	99	.	1	50	.	1	edwardsii	v. edw.	
	v. atlantae	.	1	99	99	.	1	99	.	99	99	.	1	50	.	1	v.	atlantae	
	ozanae	1	1	50	50	1	1	99	50	99	50	50	90	1	90	90	50	ozanae	
	pneumotoxica	1	10	95	99	1	1	99	50	99	95	95	95	1	90	99	10	pneumotoxica	
rhinoscleromatis	1	1	1	1	1	1	99	50	99	99	99	99	1	1	99	10	rhinoscleromatis		
Protens	mirabilis	95	5	10	90	99	95	5	1	99	95	90	1	1	1	5	1	Protens	mirabilis
	Morgani	99	95	1	95	95	1	1	1	99	90	10	5	1	1	1	1	Morgani	
	Rettgeri	95	95	95	99	50	10	99	50	99	10	50	5	1	5	5	1	Rettgeri	
	vulgaris	95	90	10	99	99	90	5	1	99	90	50	1	1	1	95	1	vulgaris	
Providentia	alkalifaciens	50	95	90	1	50	5	10	1	99	90	50	1	1	1	5	1	alkalifaciens	
	Stuartii	50	95	95	1	50	1	50	1	99	1	90	5	1	1	10	1	Stuartii	
Pseudomonas	aeruginosa	99	1	1	99	1	1	90	1	1	1	1	99	.	1	1	1	Pseudomonas	aeruginosa
Salmonella	choleraesuis	99	1	90	1	50	50	99	99	99	95	1	90	1	1	90	99	choleraesuis	
	enteritidis	95	5	90	1	99	95	99	99	99	95	1	95	1	1	95	99	enteritidis	
	paratyphi A	99	1	50	1	90	90	99	99	99	99	1	99	1	1	99	1	paratyphi	
Serratia	typhi	99	1	1	1	95	95	99	99	99	1	1	95	1	1	99	99	typhi	
	liquefaciens	90	5	90	10	50	1	99	.	99	50	95	95	1	5	99	99	Serratia	liquefaciens
	marcescens	90	1	95	10	50	1	99	.	99	50	95	95	1	10	99	95	marcescens	
Shigella	rubidae	50	5	90	50	1	1	99	.	99	50	95	95	1	99	95	50	rubidae	
	Boydii	1	50	1	1	.	1	95	.	99	5	1	50	1	1	50	1	Shigella	Boydii
Flexneri	dysenteriae	1	50	1	1	.	1	5	.	50	1	1	50	1	1	50	1	dysenteriae	
	Flexneri	1	50	1	1	.	1	95	.	50	5	5	50	1	1	50	1	Flexneri	
	Sonnei	1	1	1	1	1	1	95	.	90	1	50	5	1	10	90	1	Sonnei	