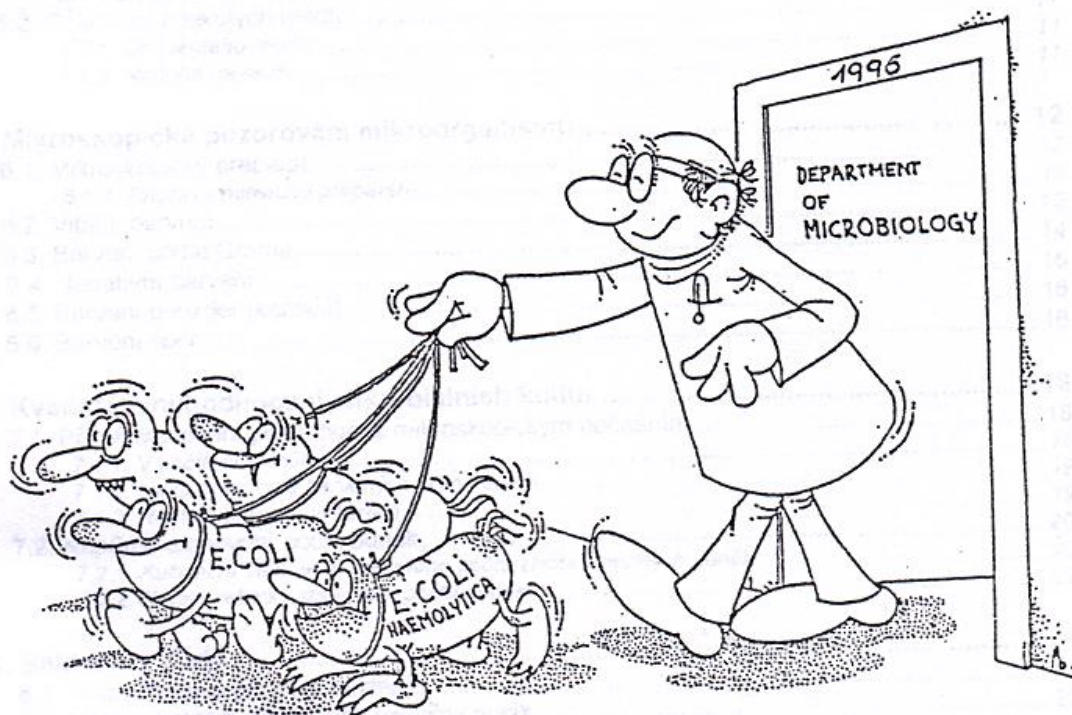


# PRAKTIKUM Z MIKROBIOLOGIE



Božena Jandová

Ludmila Kotoučková

© Božena Jandová, Ludmila Kotoučková, 1996

ISBN 80-210-1374-5

# 1. ZÁSADY PRÁCE V MIKROBIOLOGICKÉ LABORATOŘI

---

1. Vstup do laboratoře je povolen pouze osobám, které tam pracují.
2. V laboratoři mohou být prováděny pouze práce přikázané vedoucím cvičení.
3. Při práci v laboratoři je nutno používat pracovní oděv a obuv.
4. V laboratoři není dovoleno jíst, pít a kouřit.
5. Je nutno zvýšenou měrou dodržovat bezpečnost práce a hygienu, řídit se pokyny vyučujícího.
6. Pracovní plochu je nutno před započítím práce i po jejím ukončení dezinfikovat.
7. Použité sklo a nástroje odkládáme na vyhrazené místo, v žádném případě nevyléváme živé kultury do odpadu! Před umytím je nutno sklo sterilizovat autoklávováním nebo ponořením do dezinfekčního roztoku.
8. Rozbité sklo je nutno odkládat do určených nádob a před likvidací sterilizovat.
9. Dojde - li během práce k potřísnění oděvu či pracovní plochy, je třeba okamžitě vyrozumět vyučujícího a zasažené místo ihned ošetřit dezinfekčním roztokem.
10. Každé poranění je nutno ihned hlásit vyučujícímu. I nejmenší oděrky musí být pečlivě dezinfikovány a ošetřeny, aby nedošlo k infekci rány.
11. Dojde - li k potřísnění pokožky, je nutno zasažené místo okamžitě opláchnout 1% roztokem ajatinu.  
Při vniknutí mikroorganismu do poraněné kůže dezinfikujeme postižené místo jódovou tinkturou.  
Při zasažení oka kulturou mikroorganismů okamžitě oko vypláchneme 3% roztokem kyseliny borité a dezinfikujeme ophthalmoseptonem.  
Pokud dojde k nasátí kultury do úst, materiál je třeba vyplivnout, ústní dutinu vypláchnout ředěným roztokem  $\text{KMnO}_4$ .
12. Před odchodem z laboratoře je nutno uklidit pracovní plochu, kultury uložit do termostatu příp. do chladničky, zkontrolovat, zda jsou uzavřeny plynové kohouty.
13. Po ukončení práce je třeba ruce důkladně umýt teplou vodou a mýdlem, dezinfikovat roztokem ajatinu.

## 2. PRACOVNÍ POMŮCKY

---

V mikrobiologické laboratoři se používá speciální sklo, které se liší od chemického nejen tvarem nádob, ale i jakostí. Základním požadavkem je odolnost vůči vysokým teplotám, kterých se používá při horkovzdušné sterilizaci, dále vysoká odolnost vůči působení nejrůznějších chemických látek, ať už součástí živných medií či produktů kultivovaných organismů. Dále zde nesmí docházet k vyluhování některých složek, které by mohly ovlivnit růst kultivovaných mikroorganismů.

Mikrobiologické sklo bývá silnostěnné, hrdla nádob jsou obvykle rovná a tupá.

### Kultivační nádoby:

1. Biologické zkumavky - bývají silnostěnné s rovnými okraji, užívají se pro kultivace ve všech typech půd, udržování kultur, biochemické testy. Bývají uzavírány kovovými zátkami nebo zátkami z buničité vaty.

2. Baňky - většinou Erlenmeyerovy, příp. varné, zátkují se podobně jako zkumavky. Jsou vhodné jak pro aerobní kultivace, tak pro přípravu živných půd.

3. Durmanova plynovka - je používána ke stanovení tvorby plynu při kultivaci v tekutých půdách.

4. Rouxovy, Frenbachovy a Vinogradského nádoby - slouží k nahromadění většího množství kultury za aerobních podmínek

5. Promývací lahve - modifikované chemické nádoby, používají se pro submerzní kultivace mikroorganismů.

6. Pipety - většinou dělené, na horním konci uzavřené vatovou zátkou. Pro pipetování kultur používáme automatické pipety nebo nástavce na skleněné pipety.

7. Mikroskopická skla - uchováváme v 95% etanolu, odmašťujeme kyselinou chromsírovou. Před použitím sterilizujeme ožihnutím. Čistotu sklíček kontrolujeme kapkou destilované vody, která musí vytvořit na povrchu souvislý film. K přípravě visutých kapek a vlhkých komůrek používáme podložní skla s kruhovou prohlubní uprostřed.

8. Petriho misky - nejčastěji používané mívají průměr 100 mm. Některé typy mají vnitřní prostor členěn přepážkami, což umožňuje použít vedle sebe několik kultivačních medií. Misky jsou vhodné pouze pro krátkodobé kultivace, dochází k poměrně rychlému vysychání kultivačního prostředí.

### Použití nádobí:

Nádoby i s kulturou nejdříve autoklavujeme (30 min. při přetlaku 0,1 MPa), obsah ještě za horka vylijeme a umýváme obvyklým způsobem.

Použití pipety odkládáme do nádoby s 2% roztokem ajatinu, odmašťujeme chromsírovou směsí.

### Preparační a očkovací pomůcky:

Pro očkování a přípravu preparátů používáme bakteriologické kličky nebo jehly z chromniklového nebo platinového drátu, případně jednorázové, ocelové preparační jehly, tyčinky, Pasteurovy pipety, lancety, pinzety a skalpely.

Očkování provádíme v očkovacích boxech nebo flow-boxech.

### Kultivační zařízení:

Pro kultivaci stacionárních kultur jsou využívány termostaty, příp. termostatované boxy, aerobní kultivace v tekutých půdách probíhají na třepacích zařízeních.

K nezbytnému vybavení mikrobiologické laboratoře patří **mikroskop**.

### **Sterilizace skla a pomůcek:**

Ke sterilizaci skla používáme nejčastěji horkovzdušné sterilizátory. Suché teplo má nižší sterilizační účinky než teplo vlhké, proto je třeba použít poměrně vysokých teplot (160-180<sup>o</sup>C) po dobu dvou hodin. Sterilizované nádoby předem zabezpečíme před následnou kontaminací vatovými uzávěry, misky balíme do hliníkových fólií, pipety vkládáme do kovových pouzder. Po ukončení sterilizace necháváme sterilizátor vychladnout a teprve chladné předměty použijeme.

Očkovací pomůcky, pinzety, mikroskopická skla sterilizujeme ožeháváním v plameni kahanu těsně před použitím, zchlazujeme na nezaočkované půdě, ve sterilní vodě nebo okraji kultury. Ihned po zaočkování opět ožehneme, abychom mikroorganismy z kultury nerozptylovali do prostředí.

Vzduch a pracovní plochy očkovacích boxů sterilizujeme germicidními lampami, tj. UV zářením. Během práce sterilizujeme pracovní plochy vhodnými chemickými prostředky (ajatin, persteril, chlornan...).

### 3. ŽIVNÁ MÉDIA

---

Mikroorganismy jsou v laboratořích kultivovány na sterilních živných půdách. Jejich složení musí vyhovovat všem požadavkům daného organismu na výživu, pH, osmotické poměry a další fyzikálně chemické podmínky. Připravovaná živná media musí být izotonická, musí obsahovat zdroj uhlíku a dusíku v koncentraci a formě optimální pro kultivovaný organismus, potřebné růstové faktory a dostatek vody.

Optimální živné prostředí by v průběhu kultivace nemělo měnit svoje fyzikální a chemické vlastnosti. Tento požadavek je však možno splnit pouze při kontinuální kultivaci. Během stacionární kultivace se složení prostředí výrazně mění - vyčerpávání živin, hromaděním metabolitů.

Podle složení lze živná prostředí rozdělit do dvou velkých skupin:

Syntetická prostředí jejichž složení je přesně definováno. Většinou se jedná o ústojné roztoky, zdrojem uhlíku bývá obvykle glukóza, zdrojem dusíku  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nebo  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Dodávají se některé aminokyseliny, vitamíny, růstové faktory.

Přirozená živná prostředí jsou tvořena složkami získávanými po kyselé nebo enzymatické hydrolýze kaseinu, fermentativní hydrolýze masa (masový výtažek), autolýzou nebo hydrolýzou pekařského droždí (extrakt z kvasinek), působením žaludečních šťáv na rostlinné a živočišné bílkoviny (pepton)... Do této skupiny patří i přirozená stanoviště mikroorganismů, používaná v laboratorních podmínkách - brambory, chleba, žluč, atd.

Z hlediska růstu mikroorganismů je možno živná prostředí dělit na

Půdy univerzální - které svým složením vyhovují požadavkům na výživu širokého spektra organismů (masopeptonový bujón, sladivový agar).

Půdy selektivní - jejichž složení zvýhodňuje růst jednoho druhu nebo skupiny organismů.

Růst ostatní mikroflory je brzděn (Ashbyho agar, Staphylococcus medium).

Půdy selektivně diagnostické - na nichž roste jen velmi malá skupina organismů, která se projeví charakteristickou biochemickou reakcí (Endova půda).

#### **Příprava živných půd:**

K přípravě živných půd z přírodního materiálu se většinou používá vodovodní voda (neměla by být příliš tvrdá, nevhodné je i větší množství železa a chloridů). Pro syntetická media používáme vodu destilovanou, ve speciálních případech (stanovení vitamínů, aminokyselin...) vodu redestilovanou nebo deionizovanou.

Jednotlivé složky živných medií rozpustíme ve vodě, upravíme pH, zfiltrujeme, rozplníme do nádob a sterilizujeme.

Do ztužených půd přidáváme agar v koncentraci 1,5 - 3%. Pro kultivaci autotrofních mikroorganismů, které nesnášejí přítomnost organických sloučenin, se jako ztužovacího prostředku používá gel kyseliny křemičité. Důkaz produkce extracelulárních proteolytických enzymů kultivovanými mikroorganismy se provádí na mediích ztužených želatinou (dochází k tzv. ztekucování želatiny).

Většina medií je již dodávána kompletních, v práškové podobě. Potřebné množství pouze rozpustíme ve vodě, upravíme pH a sterilizujeme.

Úpravu pH provádíme 1N NaOH nebo 1N HCl. Pro bakterie na pH 7 - 7,3, kvasinky a houby vyžadují pH v rozmezí 4,5 - 6,0. Sterilizaci půd klesne jejich pH o 0,1 - 0,3.

**Sterilizace medií** se provádí zpravidla autoklávováním při přetlaku 0,1 - 0,15 Mpa, což odpovídá teplotě 121 - 128<sup>0</sup>C. Sterilizační doba je závislá na objemu a viskozitě půdy (20 min pro zkumavky a malé objemy, 30 - 60 min. pro objem 3l). Roztoky cukrů sterilizujeme membránovou filtrací a přidáváme do sterilního media.

Pro půdy, které by byly tlakovou sterilizací poškozeny (mléko, želatinová media), sterilizujeme tzv. frakcionovanou sterilizací. Media zahříváme v proudící páře po dobu 20 - 30 min na teplotu 99 - 100<sup>0</sup>C, postup opakujeme ve třech po sobě následujících dnech.

### **Rozlévání půd a jejich uchování:**

Tekuté a ztekucené půdy plníme do sterilních baněk nebo zkumavek opatřených vatovými či kovovými zátkami. Při rozlévání nesmí půda potřísnit okraje nádob ani vatové zátky, aby nedocházelo ke kontaminaci media mikroorganismy pomnoženými na zátkách.

- \* Půdy sterilizujeme ihned po rozplnění.
- \* Z pevného media ve zkumavkách připravujeme tzv. šikmé agary tak, že vysterilizované půdy necháme utuhnout v šikmé poloze.
- \* Bakteriologické plotny lijeme do sterilních Petriho misek asepticky až po sterilizaci půd. Rozlévání provádíme v předem vydezinfikovaném boxu, misky plníme do výšky 3 - 4 mm, pro kvantitativní analýzy pipetujeme 15 - 20 ml media na misku o průměru 100 mm. Necháme tuhnout ve vodorovné poloze, po utužení obvykle inkubujeme 2 - 3 dny v obrácené poloze při teplotě, jež bude použita pro kultivaci. Tím dojde k vhodnému předsušení půdy, nutnému k povrchovému očkování. Během inkubace se projeví i případná mikrobiální kontaminace plotny.
- \* Takto připravené půdy uchováváme v temném, bezprašném, suchém a pokud možno chladném prostředí. Pro dlouhodobější uchování je vhodné použít chladničku.

## 4. IZOLACE MIKROORGANISMŮ

---

### 4.1. Izolace bakterií

Pro většinu laboratorních experimentů potřebujeme rozdělit jednotlivé mikroorganismy vyskytující se v přirozeném prostředí a sledovat samostatně jednotlivé druhy. Je to nutné pro určení významu daného mikroorganismu v biotopu, pro prokázání, že určitý mikroorganismus je zodpovědný za probíhající biochemickou reakci nebo za probíhající onemocnění člověka nebo živočicha. Mikroorganismy pěstované v laboratorních podmínkách na živných médiích označujeme jako **kultury**. Kultury jednoho druhu označujeme **čisté kultury**. Na přirozených stanovištích se mikroorganismy téměř vždy vyskytují ve společenstvech, tedy jako tzv. **smíšené kultury**. Pokud používáme smíšené kultury pro pokusné nebo provozní účely (např. pro biologické čištění odpadních vod), označujeme je jako **technické kultury**.

K získání čisté kultury (izolaci) se využívá selektivních médií, jejichž složení vychází z požadavků a vlastností izolovaného druhu, a dále u bakterií metoda křížového roztěru. Ten je často zapotřebí několikrát opakovat, než získáme absolutně čistou kulturu. O čistotě izolované kultury je možné se přesvědčit kultivačně nebo mikroskopicky.

#### 4.1.1. Křížový roztěr

Princip metody spočívá v postupném vyředování původního vzorku tak, aby na konci vyrůstaly na tuhém médiu jednotlivé kolonie bakterií. Kolonie je potomstvo jedné původní buňky, klon.

##### Organismy:

např. *Micrococcus varians*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*,  
*Staphylococcus aureus*

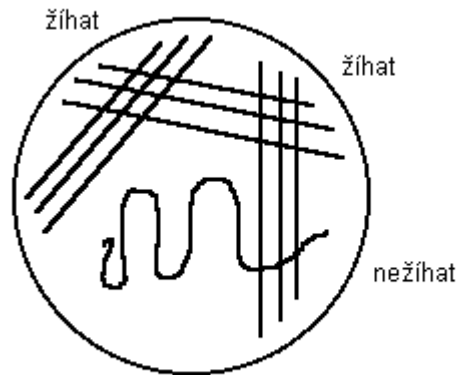
##### Pomůcky:

bakteriologické plotny s MPA (M 2), očkovací klička

##### Postup:

- \* 1. Na povrch tuhého kultivačního média přeneseme vzorek, pečlivě rozetřeme sterilní kličkou nebo tamponem.
- \* 2. Vyžiháme kličku a uděláme 3 - 4 čáry přes hustý nátěr.
- \* 3. Znovu vyžiháme a na agaru "kreslíme" další čáry přes ty původní.
- \* 4. Přes poslední čáry "kreslíme" hádka.
- \* Celý postup je nutno provádět přísně sterilně, misku otevíráme co nejméně a kličku před odložením znovu žiháme v plameni. Klička se žihá v plameni tak dlouho, až se očko i drátek rozžhaví do oranžova, potom je nutné ji před odběrem vzorku vychladit, aby nedošlo k usmrcení bakterií.

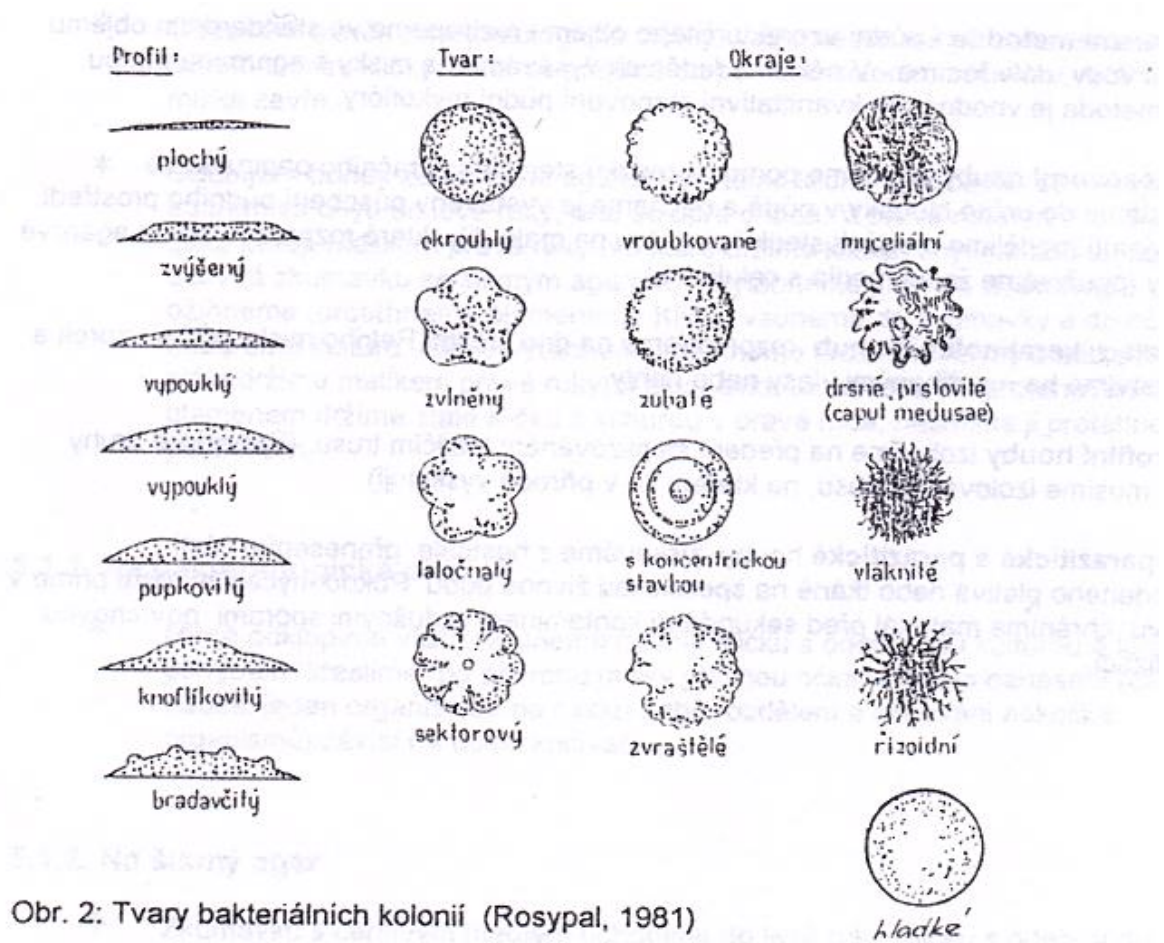




Obr.1 : Křížový roztěr

**Hodnocení:**

Při správně provedeném křížovém roztěru můžeme pozorovat na plotně jednotlivé kolonie, hodnotíme jejich barvu, tvar, profil a okraje. Výsledky hodnocení shrňte do tabulky. Zhodnoťte čistotu kultury.



Obr. 2: Tvary bakteriálních kolonií (Rosypal, 1981)



## 4.2. Izolace mikroskopických hub

Ke studiu houbové stélky, její variability, růstových podmínek, jednotlivých fází ontogeneze je třeba získat čisté kultury.

Vzorky substrátů, z nichž organismy izolujeme, odebíráme sterilně do sterilních nádob (Petriho misky, dózy, zkumavky), ve kterých je i uchováváme. Doporučuje se vzorek co nejrychleji zpracovat, aby se substrát druhotně neinfikoval a rychle rostoucí mykoflóra nepřerostla druhy s pomalejším růstem.

Ze vzorku substrátu porostlého myceliem nebo pokrytého spórami odebíráme inokulum ožehnutou a zchlazenou kličkou nebo preparační jehlou a přenášíme buď přímo na agarovou plotnu nebo do sterilní vody ve zkumavce - k získání suspenze. Inokulum suspendované ve vodě můžeme dále ředit. 0,1 - 0,5 ml posledního ředění vyséváme na agarovou plotnu. Tento postup je běžný pro saprofytické povrchově rostoucí houby.

Při izolaci půdních hub postupujeme několika způsoby:

**Vyséváme** půdní zrnka do velikosti 1 mm v průměru na agarovou plotnu (doporučuje se syntetická půda s půdním extraktem).

**Suspenzní metodou** - půdní vzorek určitého objemu roztřepeme ve standardním objemu sterilní vody, dále ředíme. V několika ředěních vyséváme na misky s agarovou půdou. Tato metoda je vhodná pro kvantitativní stanovení půdní mykoflóry.

**Celulózožovorní** houby izolujeme pomocí proužků sterilního filtračního papíru, které zakládáme do určité hloubky v půdě a necháme je vystaveny působení půdního prostředí. Po vyjmutí rozdělíme proužek sterilní pinzetou na malé díly, které rozprostřeme na agarové plotny (používáme živná média s celulózou).

Při izolaci **keratinofilních hub** rozprostřeme na dno sterilní Petriho misky půdní vzorek a převrstvíme ho nastříhanými vlasy nebo nehty.

**Koprofilní houby** izolujeme na předem sterilizovaném králíčím trusu. (Specifické druhy však musíme izolovat na trusu, na kterém se v přírodě vyskytují)

**Poloparazitické a parazitické** houby získáváme z hostitele přenesením části napadeného pletiva nebo tkáně na specifickou živnou půdu. Pokud mycelium roste přímo v pletivu, chráníme materiál před sekundární kontaminací vzdušnými spórami povrchovou sterilizací.

## 5. OČKOVÁNÍ MIKROORGANISMŮ

---

Prvním krokem každé kultivace (pomnožování) mikroorganismů je jejich přenesení z uchovávacího média nebo přímo z odebraného vzorku do čerstvého živného prostředí, tomuto přenesení říkáme očkování. Provádí se různými metodami, vždy je nezbytné zachovat všechna pravidla sterilní práce, tak aby se do čerstvého média dostal pouze sledovaný mikroorganismus, nikoliv kontaminace ze vzduchu, rukou, dýchacích cest nebo pracovní plochy. V následujícím textu se budeme zabývat základními postupy užívanými při očkování bakterií (ev. kvasinek), s některými odlišnostmi při práci s mikroskopickými houbami a viry je možno se seznámit v příslušných kapitolách.

### 5.1. Očkování kultur z tuhých médií bakteriologickou kličkou

Sterilizace kličky se provádí žiháním v plameni kahanu. Celý drátek se vloží do plamene a nechá rozžhavit. Potom se ve svislé poloze nechá vychladnout. Po naočkování je nutno vždy před odložením kličku sterilizovat žiháním.

- \* Odebírání buněk z bakteriologické plotny: Víčko se jen mírně nadzvedne a očkem sterilní kličky se lehce přejede po povrchu kolonie. Klička se vytáhne a miska zavře.
- \* Odebírání buněk ze šikmého agaru: Vyžiháme kličku. Zkumavka se šikmým agarem se chytí do levé ruky, dno se opře o dlaň. V pravé ruce držíme kličku (jako pero). Malíkem pravé ruky (ve které držíme kličku) chytíme zátku, která uzavírá zkumavku se šikmým agarem, a vytáhneme ji. Hrdlo zkumavky ožihneme (protáhneme plamenem). Kličku vsuneme do zkumavky a do očka nabereme kulturu. Kličku vytáhneme, ožihneme hrdlo zkumavky a zátku (kterou stále držíme malíkem pravé ruky) a zkumavku uzavřeme. Při protahování zátky plamenem držíme stále kličku s kulturou v pravé ruce, nesmíme ji protáhnout plamenem.

#### 5.1.1. Na bakteriologické plotny

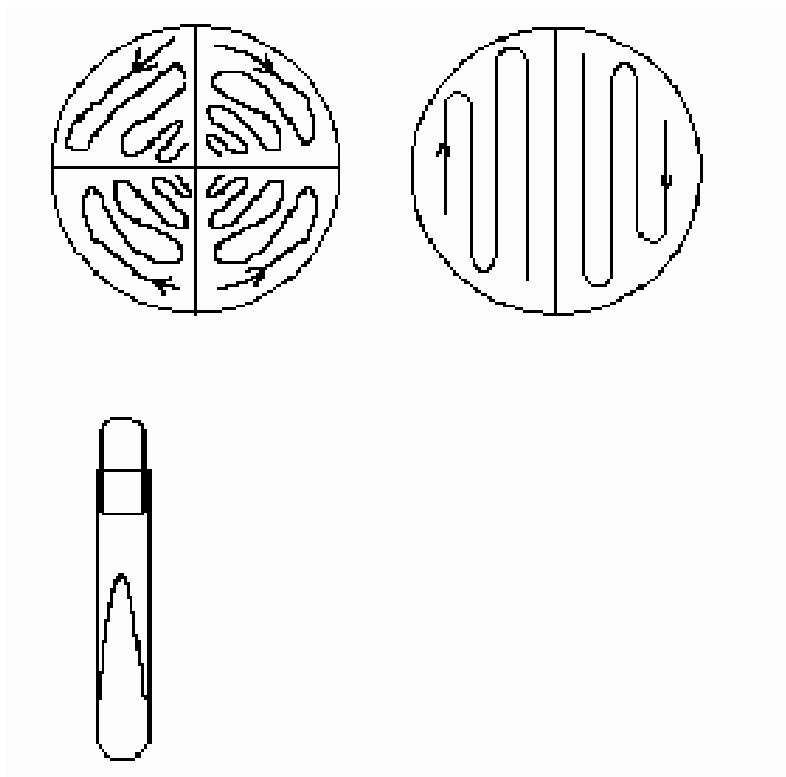
- \* Mírně odklopíme víčko, vsuneme dovnitř kličku s odebranou kulturou a lehkým pohybem "kreslíme" po povrchu misky plochou očka. Způsob nanášení (čáry, hádek, jeden organismus na misku nebo rozdělení a očkování několika organismů) závisí na účelu kultivace.

#### 5.1.2. Na šikmý agar

- \* Zkumavku s čerstvým médiem uchopíme do levé ruky, kličku s odebranou kulturou držíme v pravé ruce.

- \* Malíkem pravé ruky otevřeme zkumavku, ožihneme hrdlo, vsuneme dovnitř kličku a plochou očka "kreslíme" hádka odspodu nahoru na plochu vzniklou ušikmením agaru.
- \* Kličku vytáhneme, ožihneme hrdlo a zátku a zkumavku uzavřeme. Vyžiháme kličku.

Obr. 3: Očkování na bakteriologické plotny a šikmý agar



### 5.1.3. Do tekutého média

Stejně postupujeme při očkování do tekutého média ve zkumavce i v Erlenmeyerově baňce:

- \* Nádoby držíme levou rukou, malíkem pravé ruky ji otevřeme, ožihneme hrdlo a kličkou, kterou od odebrání držíme v pravé ruce, nanese kulturu na stěnu nádoby, kousek nad hladinu, pečlivě rozetřeme a postupně převedeme do média.
- \* Před uzavřením ožihneme hrdlo i zátku, uzavřeme a suspenzi promícháme. Vyžiháme kličku.

## 5.2. Očkování z tekutých médií

Při pouhém přeočkovávání můžeme i v tomto případě použít kličky (tekutinu nabere do jejího očka), většinou však používáme pipet a přenášení přesného známého objemu. Skleněné pipety i špičky automatických pipet používané k očkování musí být sterilní.

- \* Odběr suspenze (inokula): Pipetu držíme v pravé ruce, zkumavku nebo baňku s inokulem v levé ruce. Malíkem pravé ruky otevřeme baňku, ožihneme hrdlo a pipetou odebereme požadované množství inokula. Zátku stále držíme malíkem pravé ruky, nesmíme pokládat.
- \* Po odběru vytáhneme pipetu, ožihneme hrdlo i zátku a baňku uzavřeme. Pipetu stále držíme v pravé ruce. Pak očkujeme:

### 5.2.1. Do tekutého média

- \* Malíkem otevřeme baňku či zkumavku s čerstvým médiem, ožihneme hrdlo a z pipety vypustíme do média požadovaný objem inokula.
- \* Pipetu odložíme do kbelíku se sterilizačním roztokem a nádobu asepticky uzavřeme.
- \* Suspenzi protřepeme.

### 5.2.2. Na tuhé médium

- \* Očkuje se na tuhé médium v Petriho miskách, přímo na povrch média se vypustí z pipety požadovaný objem, nejčastěji 0,1 - 0,5 ml. V tomto případě se inokulum po povrchu roztírá sterilní tyčinkou (hokejkou). Hokejkou se lehce jezdí po povrchu misky, dnem misky se otáčí v opačném směru.
- \* Stejně jako při přenášení inokula na misku se víčko odklápí minimálně, jen pro vsunutí hokejky, levou rukou se stále přidržuje nad miskou.
- \* Při očkování většího objemu inokula (nad 0,5 ml) se inokulum pipetuje na prázdné sterilní misky a zalévá agarem vytemperovaným na 45°C. Přikrytou miskou se opatrně pohybuje, aby došlo k promíchání média s inokulem.

Určitou modifikací je pipetování inokula k vytemperovanému mediu ve zkumavkách, tam se promíchá a potom vylévá na misky.

## 6. MIKROSKOPICKÉ POZOROVÁNÍ MIKROORGANISMŮ

---

### 6.1. Mikroskopický preparát

Některé morfologické znaky mikroorganismů je třeba posuzovat v mikroskopickém preparátu. Pro posouzení skutečného tvaru živé buňky, pohybu bakterií a pod. připravujeme nativní preparát. Vývoj a růst mikroorganismů pozorujeme zpravidla v tzv. vlhké komůrce, kde jsou sledované buňky umístěny ve visuté kapce. Pro diferencované vybarvení některých buněčných struktur nebo k rozlišení živých a mrtvých buněk připravujeme vitálně barvené preparáty. Mezistupeň mezi vitálními a fixovanými preparáty tvoří pozorování nezbarvených buněk na kontrastním pozadí - negativně barvené preparáty. Fixované a barvené preparáty nám umožňují lepší rozlišení jednotlivých typů bezbarvých bakteriálních buněk, jejichž tvar a struktura jsou bez předchozího barvení v optickém mikroskopu málo zřetelné.

#### 6.1.1. Příprava nativního preparátu

**Postup :**

- \* Podložní sklo vyjmeme z alkoholu, přidržíme nad plamenem a položíme na tmavou podložku
- \* Do středu sklíčka nanese kapku sterilní vody a vyžíhanou kličkou do ní přeneseme malé množství kultury kultivované na ztuženém agarovém mediu
- \* Po důkladném rozmíchání překryjeme suspenzi krycím sklem tak, aby se netvořily bublinky (k překrytí použijeme preparační jehlu nebo sklíčko držíme za hrany a opatrně pokládáme). Pokud kapalina přesahuje okraje krycího skla, odsajeme ji filtračním papírem
- \* Pro dlouhodobější pozorování chráníme preparát před vyschnutím tak, že hrany krycího skla potřeme vazelínou, rozehrátým parafinem nebo bezbarvým lakem.

**Poznámka:**

Preparáty připravované z tekutých živných medií obsahují velké množství krystalků a jiných disperzí, které působí rušivě a mohou se podobat bakteriálním buňkám. Proto se doporučuje bakteriální kulturu před přípravou preparátu centrifugovat a živné prostředí nahradit sterilním fyziologickým roztokem.

#### 6.1.2. Příprava fixovaného preparátu

**Postup :**

- \* Podložní sklo vyjmeme z alkoholu, přidržíme nad plamenem a položíme na tmavou podložku blízko plamene
- \* Do středu sklíčka nanese kapku sterilní vody a vyžíhanou kličkou do ní přeneseme malé množství kultury
- \* Po důkladném rozmíchání suspenze zhotovíme pomocí sterilní kličky nebo druhého podložního skla nátěr o ploše cca 2 cm<sup>2</sup>
- \* Preparát necháme volně na vzduchu uschnout a fixujeme

**Fixace:**

Účelem fixace je usmrcení buněk, neboť mrtvé buňky lépe přijímají barvivo, a zároveň přilnutí buněk k podložnímu sklu, aby nebyly během barvicí procedury odplaveny. Bakterie fixujeme zpravidla plamenem, mikroskopické houby a kvasinky většinou chemicky ( etanol, aceton ). Fixace plísňí a kvasinek se provádí pouze při speciálních typech barvení a její postup bývá součástí barvicí metodiky.

Fixace plamenem: Sklíčko se zaschlým nátěrem třikrát protáhneme nesvítivým plamenem kahanu tak, aby bakteriální kultura byla umístěna na horní straně sklíčka. Po vychladnutí barvíme.

**6.1.3. Příprava trvalého preparátu**

Pokud si potřebujeme obarvený preparát bakterií uchovat jako srovnávací a dokladový materiál, zhotovíme si trvalý preparát.

**Postup:**

- \* Po mikroskopické kontrole odstraníme imerzní olej opláchnutím preparátu xylenem a vysušíme na vzduchu
- \* Na nátěr nanese malé množství kanadského balzámu, přikryjeme odmaštěným krycím sklem, jemně zatížíme, aby balzám vyplnil celý prostor mezi podložním a krycím sklem. Stejněměrný tlak by měl trvat alespoň 10 minut.
- \* Preparát necháme vyschnout na temném, bezprašném místě dva až tři týdny. Potom odstraníme přebytek zaschlého balzámu kolem okrajů krycího skla, preparát uchováváme v suchu a temnu.

**6.2. Vitální barvení**

Stanovení procenta živých a mrtvých buněk má v praxi důležitou roli při stanovení jakosti pekařského droždí nebo kontrole pivovarských kvasnic během technologického procesu. Mrtvé buňky se stanovují buď přímo tzv. vitálním testem nebo nepřímo, kultivačně (úloha 7.2.1.).

K přímému barvení se využívají některá netoxická barviva, nejčastěji metylenová modř, která zbarví mrtvé buňky modře, živé buňky zůstávají nezbarveny.

**Organismy:**

24 hodinová kultura kvasinek ze sladiny

**Pomůcky:**

podložní a krycí skla, roztok metylenové modři v pufru o pH 4,6 ( R 6 )

**Postup:**

- \* Do středu podložního skla přeneseme kapku metylenové modři a důkladně v ní rozetřeme kličku kultury kvasinek.
- \* Preparát překryjeme krycím sklem a ihned pozorujeme.
- \* Při zvětšení 10 x 45 počítáme zbarvené a nezbarvené buňky.



**Hodnocení:**

Mrtvé buňky se barví modře. Počítáme živé a mrtvé buňky ve dvaceti zorných polích vitálního preparátu, počet mrtvých buněk vyjádříme v % celkového počtu.

**Pozn:**

Metylenová modř sama působí na kvasinky mírně toxicky, proto je potřeba zbarvený preparát ihned mikroskopovat. Důležité je také dodržet pH barvicího roztoku. Pro kontrolu vybarvení mrtvých buněk připravujeme vedle vitálně barveného preparátu také preparát barvený po fixaci plamenem.

**6.3. Barvení podle Grama**

Barvení, které v roce 1884 použil Ch. Gram, zůstává jedním z nejdůležitějších barvicích postupů aplikovaných při diagnostice bakterií. Mikroorganismy nejen rozdělují na zbarvené - grampozitivní a nezbarvené - gramnegativní, ale současně nám podává informaci o dalších fyziologických a chemických charakteristikách bakteriálních buněk. (citlivost na antibiotika, rozdíly v osmotických hodnotách, citlivost na zásaditá a kyselá barviva ...)

Podstata grampozitivity není dodnes uspokojivě vysvětlena. Pravděpodobně se zde uplatňuje odlišné chemické složení buněčné stěny G+ a G- bakterií a její intaktnost.

Jedná se o barvení fixovaného preparátu a následné moření buněk roztokem jódu. Vzniká komplex barvivo - jód - složky buněčné stěny, který lze z buněk některých rodů nebo druhů mikroorganismů vyplavit etanolem nebo acetonem. Příslušné druhy jsou označovány jako G-, jejich buněčné stěny jsou pro mikroskopická pozorování dobarvovány karbolfuchsinem. Pokud barevný komplex zůstává v buněčných stěnách zachycen, označujeme organismy jako G+.

Gramova reakce je u některých bakterií závislá na fyziologickém stavu buňky a na složení kultivačního prostředí. Tyto organismy jsou označovány jako gramlabilní nebo také gramvariabilní.

Některé vnější chemické a fyzikální vlivy - mechanické poškození, UV záření, některá antibiotika, kyseliny, zásady, organická rozpouštědla, atd. mohou způsobit ztrátu grampozitivity.

**Organismy:**

24 hodinové bakteriální kultury

**Pomůcky:**

Barvicí roztoky - krystalová violet (R2), Lugolův roztok (R3), karbolfuchsin (R4), etanol, očkovací klička, odmaštěná podložní skla

**Postup:**

- \* Připravíme nátěr bakteriální kultury, dokonale vysušíme
- \* Fixujeme plamenem
- \* Převrstvíme krystalovou violetí - 30s
- \* Barvivo slijeme, preparát krátce opláchneme vodou - 2s
- \* Převrstvíme Lugolovým roztokem - 30s
- \* Barvivo slijeme, preparát krátce opláchneme vodou - 2s

- \* Preparát odbarvujeme etanolem nebo acetonem 20 - 30s
- \* Opláchneme vodou - 2s
- \* Dobarvíme zředěným karbolfuchsinem 30 - 60s
- \* Preparát znovu opláchneme tekoucí vodou a osušíme mezi filtračními papíry.
- \* Pozorujeme pod olejovou imerzí.

#### **Hodnocení :**

Pozorujeme mikroskopem při zvětšení 40x a 100x, u zvětšení 100x použijeme olejovou imerzi.

Grampozitivní organismy jsou zbarveny tmavě fialově až modročerně, gramnegativní bakterie jsou červené nebo růžové. Tvar buněk zakreslíme do protokolu, vyhodnotíme jejich grampozitivitu či gramnegativitu.

## **6.4. Negativní barvení**

Negativní barvení tvoří přechod mezi pozorováním nezbarvených živých organismů a fixovaným barveným preparátem. Metoda spočívá v obarvení pozadí, buňky zůstávají nezbarvené, jejich obrysy jsou ohraničeny barvivem. Používá se k mikroskopickému stanovení pouzder a slizů a k měření velikosti bakteriálních buněk, tedy v případech, kdy nemůžeme preparát fixovat, protože by došlo ke změně velikosti buněk a k deformaci pouzder.

#### **Organismy:**

*Azotobacter sp.*, *Bacillus cereus*

#### **Pomůcky:**

očkovací klička, pipeta, podložní sklíčka, nigrosin (R 13), Kongo-červeně (R 8), 1% HCl, filtr. papír, imerzní směs, mikroskop

#### **Postup:**

- \* 1. Barvení nigrosinem: Klička kultury bakterií se suspenduje v kapce vody na sklíčku a přidá se kapka nigrosinu. Rozmíchá se a pomocí druhého krycího sklíčka rozetře. Necháme uschnout volně na vzduchu. Nefixujeme!
- \* 2. Barvení Kongo-červení: Na sklíčko se kápne kapka Kongo-červeně a přímo v ní se suspendují buňky. Suspenze se rozetře po povrchu sklíčka a nechá zaschnout. Převrstvíme na několik sekund HCl, slijeme, přebytečnou HCl (neoplachujeme) ,osušíme filtračním papírem a dosušíme na vzduchu.

### Hodnocení:

Pozorujeme pod imerzí, 1. světlé buňky na šedém pozadí, 2. světlé buňky na modrém pozadí. Tvar buněk zakreslíme do protokolu.

## 6.5. Barvení pouzder (kapsulí)

Některé druhy bakterií tvoří za vhodných podmínek slizovité obaly kolem svých buněk. Jsou složeny především z polysacharidů, jsou silně hydratované a chrání buňku proti nepříznivým podmínkám. Slizovité obaly se vyskytují ve formě ostře ohraničených pouzder (kapsulí) nebo se difuzně zředňují do prostředí. Na agarových vrstvách rostou tyto bakterie ve formě mukózních kolonií. Tato forma může spontánní mutací přecházet na formu, která sliz netvoří. Polysacharidové obaly znesnadňují izolaci bakterií, neboť se na nich zachycují buňky jiných druhů. Důkaz tvorby pouzder je založen na špatném pronikání některých sloučenin slizovitou vrstvou.

### Organismy:

*Azotobacter* sp.

### Pomůcky:

podložní sklíčka, kličky, pipety, karbolfuchsin (R 4), nigrosin (R 13), Kongo-červeně (R 8), HCl 1%, methylenová modř (R 6)

### Postup:

- \* 1.metoda: Do kapky dest. vody na podložním sklíčku se přenese malé množství kultury *Azotobactera* z nahromadovací půdy. Promíchá se a suspenze se rozetře po povrchu sklíčka. Nechá se uschnout volně na vzduchu. Nefixovat! Barvíme horkým karbolfuchsinem, kterým sklíčko převrstvíme a opatrně zahříváme nad plamenem do výstupu par, 1-2 minuty. Opláchneme vodou a negativně obarvíme nigrosinem, který se kápne do rohu sklíčka a rozetře do tenké vrstvy. Rychle osušíme, např. vysoušečem na vlasy, aby se buňky neodbarvily.
- \* 2.metoda: Připravíme preparát *Azotobactera* negativně obarvený Kongo-červení (viz předchozí úloha) a buňky obarvíme metylenovou modří - preparát se převrství na 3 minuty, potom se slije a usuší volně na vzduchu.

### Hodnocení:

Pozorujeme pod imerzí 1.červené buňky, růžová pouzdra a šedé pozadí, 2.modré buňky, světlá pouzdra a modré pozadí. Zakreslit!

## 6.6. Barvení spór

Některé rody bakterií (např. *Bacillus*, *Clostridium*) mohou vytvářet "klidové" formy zvané spóry (neboli, protože mohou vznikat pouze uvnitř buňky, endospóry). Povrch spór je tvořen silným, špatně prostupným obalem, proto jsou velice odolné vůči působení nepříznivých vnějších vlivů a toxických látek a také obtížně barvitelné. V preparátech barvených běžnými technikami zůstávají neobarvené a vybarví se pouze jejich obal. Proto se barví po předchozím moření nebo za tepla pomocí silných barviv, potom se těžko odbarvují kyseliny (acidorezistence) i jinými sloučeninami.

**Organismy:**

*Bacillus cereus, Bacillus subtilis*

**Pomůcky:**

eozin nebo kongo-červeň nebo neutrální červeň (5% vodné roztoky), malachitová zeleň (R 15), safranin (R 14), 5% kyselina chromová, karbolfuchsin (R 4), metylenová modř (R 5), 5% kyselina sírová

**Postup:**

Běžným způsobem se připraví preparát, po uschnutí se fixuje v plameni a barví:

- \* 1.metoda: Nátěr se převrství malachitovou zelení, nad kahanem zahřeje do výstupu par a potom za stálého přihřívání a doplňování barviva barví 5 minut. Potom se opláchne vodou a dobarvuje kontrastním barvivem - eozinem, kongo-červení nebo neutrální červení. Znovu se opláchne a usuší na vzduchu.
  
- \* 2.Möllerova metoda: Nátěr moříme 10 minut kyselinou chromovou, opláchneme vodou, pokryjeme karbolfuchsinem a zahříváme nad mírným plamenem, do výstupu par a pak 2 minuty, barvivo nesmí vyschnout. Po zchlazení se opláchneme vodou a 10 s odbarvuje 5% kyselinou sírovou, pak znovu opláchneme vodou. Odbarvené vegetativní buňky se dobarví metylenovou modří 4-6 minut, preparát se opláchneme vodou a usuší na vzduchu.

**Hodnocení:**

Mikroskopujeme imerzním objektivem, pozorujeme: 1. Spory jsou zbarveny zeleně, zbylý buněčný obsah červeně. 2. Spory jsou červené a zbytek buňky modrý. Tvar pozorovaných buněk zakreslíme do protokolu.

## 7. KVANTITATIVNÍ HODNOCENÍ MIKROBIÁLNÍCH KULTUR

---

Stanovení počtu mikrobiálních buněk nebo celkové biomasy je nedílnou součástí mnoha experimentů v mikrobiologické laboratoři. Stanovuje se v daném objemu, přepočítává obvykle na 1ml původního vzorku. Těmito hodnotami jsou potom korigovány získané výsledky experimentů. Počítání mikroorganismů je nezbytné při sledování růstu a rozmnožování, při hodnocení podílu jednotlivých skupin mikroorganismů na celkovém zastoupení mikroorganismů. Používané metody se dělí na **přímé - mikroskopické**, využívající počítání buněk v mikroskopickém preparátu a **nepřímé - kultivační**, kterými stanovujeme celkový počet životaschopných buněk pomocí počítání kolonií na agarových plotnách. Mezi nepřímé metody můžeme zařadit i metody nefelometrické. Výběr nejvhodnější metody je závislý na účelu stanovení. Výhodou mikroskopického počítání je rychlost získání výsledků, získané výsledky zahrnují jak živé tak mrtvé buňky. Kultivační metody jsou nákladnější a časově náročnější, poskytují však obraz o skutečném fyziologickém stavu kultury. Nefelometrické metody můžeme použít pouze pro čiré roztoky a určité koncentrace buněk.

### 7.1. Přímé stanovení počtu buněk mikroskopickým počítáním

K počítání pod mikroskopem se používají suspenze o vhodné hustotě, preparáty buď bez úpravy nebo upravované - fixací, barvením. K pozorování nezbarvených buněk se používá upravené mikroskopické techniky, např. fázového kontrastu.

#### 7.1.1. V počítací komůrce

Pro počítání mikroorganismů jsou používány různé typy počítacích komůrek (Thomova, Bürkerova, Vošahlíkova). Všechny se skládají ze silného podložního skla s vyrytou sítí čtverečků a krycího skla, které se pokládá na boční lišty, čímž vzniká mezi sklíčky prostor o přesně definované hloubce. Pokud nemáme k dispozici komůrku, můžeme počítat mikroorganismy v zorném poli a přepočítáme na plochu krycího skla, pracujeme se známým objemem suspenze.

#### Organismy:

kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (pekařské droždí)

#### Pomůcky:

Bürkerova komůrka, sterilní pipety a destilovaná voda, metylenová modř (R6).

#### Postup:

- \* Použijeme Bürkerovu počítací komůrku, která má plošky o obsahu 1/25 a 1/400mm<sup>2</sup> a hloubku prostoru mezi sklíčky 0,1 mm (objemy 1/250 nebo 1/4000mm<sup>3</sup>).
- \* Suspenze, ve které máme stanovovat počet buněk, se vhodně naředí a důkladně zhomogenizuje a pipetou se přenesou do prostoru na podložním sklíčku.
- \* Naplněnou komůrku necháme stát asi 5 min - buňky se usadí na dno.

- \* Počítáme buňky v jednotlivých ploškách (menších čtverečkách) stále stejným postupem - vždy zahrnujeme do obsahu jedné plošky buňky ležící na 2 sbíhajících se stranách (např. na levé a dolní straně, objekty na pravé a horní straně do počtu buněk na plošce nezahrnujeme). Je nutno spočítat buňky ve větším počtu políček (80) z různých částí komůrky (postupujeme po řadách, vždy jedním směrem).
- \* K odlišení živých a mrtvých buněk je možno využít vitální test.

#### **Hodnocení:**

Výpočet: malý čtvereček - plocha  $1/400 \text{ mm}^2$ , objem nad 1 ploškou  $1/4000 \text{ mm}^3$ , počet vyhodnocených plošek - 80, zjištěný celkový počet buněk - 800, ředění suspenze - 10x. Počet buněk v 1ml původní suspenze =  $800/80 \cdot 4000 \cdot 10 = 400000 = 4 \cdot 10^5$  buněk. Pokud se použije vitálního testu, hodnotí se kromě celkového počtu buněk ještě počet mrtvých buněk a stanoví se procento mrtvých buněk v suspenzi.

#### **7.1.2. Na fixovaných a barvených preparátech**

Použití této metody je vhodné, jestliže potřebujeme preparáty uchovat jako dokladový materiál nebo je nutno transportovat již přímo zpracované preparáty.

#### **Postup:**

- \* K přípravě preparátu se používají podložní sklíčka, která mají na spodní straně rydlem nebo fixou označenou přesně definovanou plochu (např. pomocí milimetrového papíru). Na tuto plochu se pak nanáší známý objem suspenze, rozetře se po označené ploše a po usušení a fixaci barví (např. safraninem, erythrosinem, karbolfuchsinem). Buňky se počítají nejméně v 10 zorných polích změřených objektivovým mikrometrem.

#### **Hodnocení:**

Výpočet celkového počtu buněk v 1ml suspenze: průměrný počet buněk v jednom zorném poli násobíme plochou preparátu (políčka) a dělíme plochou zorného pole a použitým objemem.

#### **7.1.3. Na membránových filtrech**

Metoda se využívá tam, kde můžeme dobře oddělit mikroby od ostatní biomasy a kde potřebujeme zkoncentrovat jejich buňky z větších objemů vzorku. V praxi se jedná především o rozbory vody.

#### **Postup:**

- \* Vzorky filtrujeme varem sterilizovanými membránovými filtry (velikost pórů 0,4 až 0,7  $\mu\text{m}$ ), filtrujeme vždy 2 různé objemy od 1 vzorku, tyto objemy volíme podle předpokládaného množství mikroorganismů ve vzorku (např. vodovodní voda 100 a 10 ml, silně znečištěné vody je nutno ředit).
- \* Mikroorganismy zachycené na filtru barvíme karbolerythrosinem (30 - 80 minut v misce s vrstvou filtr. papírů nasycených barvivem nebo 5 - 10 minut na hladině 2% roztoku barviva na hodinovém skle na horké vodní lázni. Filtr se pak přenáší do několika misek s filtračními papíry a destilovanou vodou (vymytí přebytečného barviva). Vysušený filtr přeneseme do kapky imerzního oleje na podložním skle,



další kapku nanese na membránu a preparát uzavřeme krycím sklem.  
Počítáme imerzním objektivem a buď okulárem s vloženou měřicí sítčkou nebo buňky v 1 zorném poli, počítáme dostatečný počet polí.

### Hodnocení:

Vypočítáme množství buněk v 1 ml vody:

$$X = \frac{A1 \cdot n}{A2 \cdot V}$$

kde :

X = počet buněk v 1 ml vody

n = průměrný počet buněk v 1 počítané plošce (čtvereček nebo zorné pole)

A1 = filtrační plocha aparátu v  $\mu\text{m}^2$

A2 = plocha 1 čtverečku nebo 1 zorného pole

V = objem filtrované vody v ml

## 7.2. Nepřímé stanovení počtu buněk

### 7.2.1. Kultivační stanovení celkového počtu životaschopných buněk

Nejčastějším způsobem počítání buněk mikroorganismů pomocí kultivace je počítání kolonií vyrostlých na agarových plotnách. Metoda vychází ze základního empiricky ověřeného předpokladu, že z 1 životaschopné buňky vyrůstá 1 kolonie. Pojmeme "životaschopnost" se v tomto případě rozumí schopnost buňky vytvářet na agarovém živném mediu viditelné makroskopické kolonie. Zaočkování inokula do agarového média je možno provádět dvěma způsoby: 1. očkováním inokula (nejlépe v objemu do 0,5 ml) na předsušené agarové plotny a jeho rozetřením sterilní hokejkou nebo 2. zalitím potřebného objemu inokula (nejčastěji 1 ml) vytemperovaným agarem a důkladným rozmícháním. Druhou metodu je možné použít i pro stanovení anaerobů (kultivace pod parafinem).

Suspenzi je nutné před očkováním ředit, aby na tuhém mediu vyrostly jednotlivé kolonie, které se nepřekrývají svými okraji. Obvykle se používá při ředění koeficient 10, buňky se vyředují postupně, aby se zabránilo rozbití buněk osmotickým šokem. Pro určení optimálního konečného zředění je nutno odhadnout hustotu suspenze ( $0-10^3$  buněk/ml bez opalescence,  $10^5$ /ml lehce opaleskuje,  $10^7-10^9$ /ml tvoří mléčný zákal, závisí na tvaru a velikosti buněk).

### Organismy:

*Micrococcus varians*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*

### Pomůcky:

sterilní bakteriologické plotny s MPA (M 2), sterilní zkumavky, pipety, hokejky, sterilní fosfátový ústoj (R 16) nebo fyziologický roztok (R 1).

## Postup:

### 1.ředění

- \* Připraví se řada sterilních zkumavek s 0,9 ml sterilního ústoje.
- \* Ze vzorku se sterilně odebere 0,1 ml suspenze a přenese se do 1. zkumavky.
- \* Čistou pipetou se nejprve promíchá obsah 1. zkumavky, a potom odebere 0,1 ml, která se přenese do 2. zkumavky.
- \* Další čistou pipetou se opět nejprve obsah 2. zkumavky promíchá a pak odebere 0,1 ml do 3. zkumavky. Stejným způsobem se pokračuje až do konečného zředění.
- \* Všechny kroky ředění je nutno provádět sterilně.

### 2.Očkování

- \* Očkujeme na předem připravené a popisovačem označené plotny s MPA (u stanovení specifických skupin mikroorganismů na příslušné jiné médium, např. Endo-agar).
- \* Očkujeme 0,1 ml suspenze na 1 misku, vždy alespoň 3 misky od každého ředění.
- \* Napipetovaný vzorek se roztírá sterilní hokejkou krouživým pohybem po celém povrchu misky. Dnem misky se otáčí v opačném směru a na hokejku se netlačí.
- \* Při pipetování i "hokejkování" otvíráme misky co nejméně.
- \* Pro kontrolu sterility naočkujeme na 2 misky po 0,1 ml ředícího roztoku.

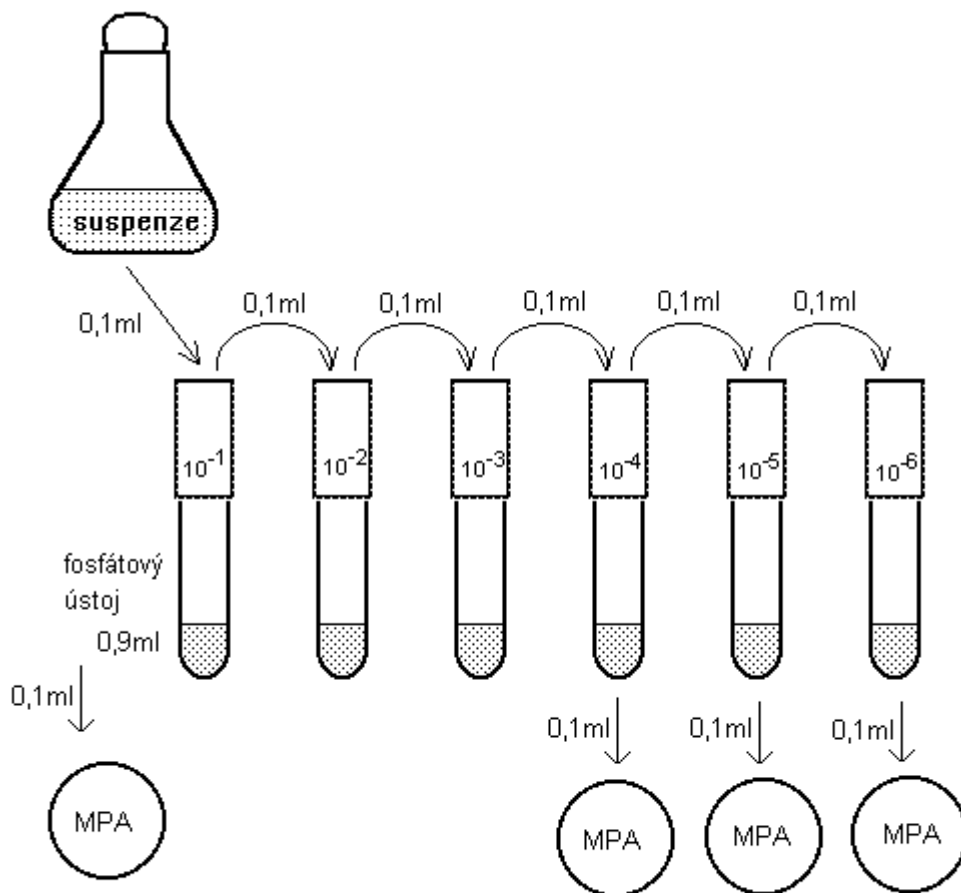
### 3.Kultivace

- \* Kultivujeme v termostatu při 30°C 2-3 dny, misky pokládáme dnem vzhůru

## Hodnocení:

K hodnocení vybereme nejvhodnější ředění (20 - 200 kolonií na misce) a spočítáme počet kolonií na všech miskách tohoto ředění. Počítané kolonie si označíme na spodní stranu misky fixou. Ze získaných hodnot spočítáme průměr, číslo vynásobíme ředěním a 10ti (pipetovali jsme 0,1 ml na misku).

Př.: Průměr ze 3 misek je 75, ředění  $10^{-5}$ , dostaneme potom  $75 \cdot 10^5 \cdot 10 = 7,5 \cdot 10^7$  CFU/ml. Počet buněk se uvádí jako **CFU = colony forming units** v 1 ml, protože ne vždy reprezentuje 1 kolonie 1 buňku, některé buňky jsou dočasně spojeny a vyrůstá z nich pak 1 kolonie.



Obr . 4 Kultivační stanovení počtu buněk

### 7.2.2. Nefelometrické stanovení počtu buněk

Metoda je založena na zjištění aktuální hustoty buněk nefelometrem. Rozptyl světla v zakalené kapalině závisí na jeho vlnové délce, optických vlastnostech kapaliny i vlastnostech rozptýlených částic. Metodu lze použít pouze v kombinaci s mikroskopickou nebo kultivační metodou stanovení počtu buněk a pouze v určitém koncentračním rozmezí suspendovaných částic (při příliš vysokých koncentracích buněk v suspenzi je světlo absorbováno okolní kapalinou, takže hodnoty neodpovídají skutečnosti).

#### Postup:

- \* Nejprve sestojíme kalibrační křivku, vyjadřující závislost optické denzity (OD) na počtu buněk (ev. log) při vhodné vlnové délce (např. 620nm). Použijeme k tomu řadu ředění vzorku v použitém rozpouštědle, živném mediu nebo ústoji. U každého ředění změříme optickou denzitu a stanovíme počet buněk (mikroskopicky nebo kultivačně).
- \* Změříme optickou denzitu vzorku, ve kterém stanovujeme počet buněk.

**Hodnocení:**

Sestrojíme graf. Z něj potom po vynesení změřených hodnot OD odečítáme počet buněk (téhož organismu ve stejném mediu). ! Přesně stanovit počet buněk lze pouze v lineární části křivky !

Pozn: Metoda je vhodná tehdy, zjišťujeme-li počet buněk ve velkém počtu opakování u téhož organismu a za stejných podmínek.

## 8. BAKTERIE V PŮDĚ

---

### 8.1. Přímé barvení půdních bakterií

Půda je jedním z přirozených stanovišť mikroorganismů. Mikroorganismy jsou rozhodujícím činitelem při vzniku půdy, ovlivňují půdní strukturu, účastní se rozkladu organické hmoty - ať už v procesu humifikace nebo mineralizace - mají nezastupitelnou roli při přeměně a koloběhu biologicky důležitých prvků v přírodě.

Produkují řadu látek, jimiž ovlivňují růst rostlin - vitamíny, růstové látky .... Zanedbatelná není ani jejich schopnost fixovat vzdušný dusík.

Zastoupení jednotlivých skupin bakterií v půdě můžeme zjišťovat metodou přímého barvení v půdním vzorku. Pro přesnou identifikaci je nutno mikroorganismy izolovat a dále kultivovat v čistých kulturách.

#### Organismy:

vzorky zeminy odebrané z různých lokalit

#### Pomůcky:

Podložní skla, karbolerytrosin, 0,1% agar, 96% etanol, 0,015 % roztok želatiny, 40% kyselina octová, 1% roztok bengálské červeně, 1% roztok erytrosinu Y

#### Postup: 1.

- \* Připravíme suspenzi zeminy ve sterilní vodě 1 : 10
- \* Kapku suspenze necháme zaschnout na sklíčku, převrstvíme 0,1% roztokem agaru ve vodě a usušíme při 40 - 50 ° C.
- \* Na suchý preparát kápneme několik kapek 96% etanolu , usušíme na vzduchu
- \* Fixovaný preparát barvíme karbolerytrosinem 5 - 15 minut , dobu barvení můžeme prodloužit, případně preparát slabě zahřát
- \* Opláchneme vodou, usušíme

#### Postup: 2.

- \* Připravíme suspenzi zeminy 1 : 10 v 0,015% vodném roztoku želatiny
- \* Natřeme tenký film na podložní sklo, usušíme
- \* Ponoříme do 40% kyseliny octové na 1 - 3 minuty, opláchneme vodou a usušíme na vodní lázni
- \* Barvíme 1 minutu 1% vodným roztokem erytrosinu Y nebo 1% vodným roztokem bengálské červeně. Po dobu barvení necháme sklíčko stále na vodní lázni
- \* Opláchneme vodou, usušíme

#### Hodnocení:

Mikroskopicky vyhodnotíme zastoupení mikroorganismů v jednotlivých vzorcích půd

## 8.2. Izolace bakterií poutajících vzdušný dusík

Atmosféra nám poskytuje obrovskou zásobu plynného dusíku (asi 78%), ale jen malý počet organismů je vybaven enzymatickým aparátem, který jim umožňuje vzdušný dusík vázat a využívat. Mezi volně žijící bakterie disponující touto schopností patří rody *Azotobacter* a *Clostridium*.

*Azotobacter chroococcum* je druh náročný na podmínky prostředí, jeho podíl na celkovém množství půdní mikroflory je relativně malý - uvádí se  $10^2 - 10^4$  buněk /1g půdy. Vyskytuje se jen v dobře provzdušňovaných a hnojených půdách s neutrální až alkalickou reakcí. Nejčastěji jej lze nalézt v těsné blízkosti kořenového systému rostlin, kde je půda obohacena o organické látky - kořenové výměšky. Vyžaduje přítomnost cukrů, jednoduchých alkoholů nebo solí organických kyselin, jejichž oxidací získává azotobakter energii potřebnou k fixaci molekulárního dusíku. Poměrně velké jsou i jeho nároky na přítomnost fosforu a vápníku, z mikroelementů molybdenu, bóru, vanadu, železa a manganu. V kyselých půdách nefixuje dusík. Jeho teplotní optimum se pohybuje mezi 25 -30° C .

*Clostridium pasteurianum* patří do skupiny přísně anaerobních bakterií máselného kvašení. Je tolerantní ke kyselé i zásadité reakci půdy, dobře snáší vysoké nasycení půdy vodou a nižší teploty. Malé nároky na prostředí a schopnost tvořit spóry umožňují jeho rozšíření téměř ve všech typech půd. Zastoupení v půdní mikroflóře je udáváno v rozmezí  $10^3 - 10^5$  buněk/1g půdy.

### 8.2.1. Izolace azotobacteria

Izolaci provádíme na selektivním bezdusíkatém mediu, které eliminuje druhy vyžadující přítomnost dusíku. Médium nezaručuje eliminaci mikroskopických hub.

#### Organismy:

Vzorky zeminy z úrodné, dobře provzdušňované půdy

#### Média:

Petriho misky s Ashbyho agarem (M 5)

#### Pomůcky:

očkovací kličky

#### Postup:

- \* a) Petriho misky s Ashbyho agarem zaočkujeme 0,5 ml půdního extraktu (viz izolace clostridia)
- \* b) Petriho misky s Ashbyho agarem zaočkujeme přímo zrníčky zeminy
- \* Kultivujeme 72 hodin při 30° C.
- \* Čistotu izolované kultury hodnotíme křížovým roztěrem

#### Hodnocení:

Přítomnost azotobacteria se projeví průhlednými, později hnědnoucími slizovitými koloniemi.

Provedeme mikroskopickou kontrolu



## 8.2.2. Izolace clostridií

Izolaci provádíme ze zeminy s kyselou půdní reakcí, v anaerobních podmínkách. Přítomnost nesporelujících anaerobních bakterií vyloučíme pasteurizací.

### Organismy:

vzorky lesní zeminy

### Média:

MPB č.2 (M 1) s 5% glukózy (po 5 ml ve zkumavkách)

### Pomůcky:

Vodní lázeň, zkumavky, zařízení pro filtraci, pipety, sterilní parafinový olej

### Postup:

- \* Připravíme půdní extrakt:
  - zeminu smícháme s destilovanou vodou v poměru 1 : 10
  - třepeme alespoň 10 minut
  - zfiltrujeme dvakrát přes buničitou vatu (filtrát není zcela čistý)
- \* Pasteurizujeme 10 - 20 minut při 75° - 80° C na vodní lázni
- \* Do horkého, čerstvě přesterilizovaného média pipetujeme pasteurizovaný půdní extrakt (1 ml) a ihned převrstvíme 1 ml sterilního parafinového oleje
- \* Kultivujeme 72 hod. při 30° C

### Hodnocení:

Během kultivace pozorujeme tvorbu plynu, kultura má charakteristický zápach po kyselině máselné, na dně zkumavky se tvoří světlá usazenina. Provedeme mikroskopickou kontrolu.

### 8.3. Izolace celulolytických bakterií

Podstatnou součástí buněčných stěn rostlinných buněk je celulóza. V rostlinném materiálu je zpravidla doprovázena dalšími těžko odbouratelnými průvodními látkami - hemicelulózami, ligninem, pektinovými a tukovými látkami.

Na jejich rozkladu se podílí celá řada mikroorganismů schopných hydrolyticky štěpit celulózu na celobiózu a dále na glukózové jednotky. Největší podíl na těchto procesech mají aerobní celulolytické bakterie. Jejich zastoupení v půdě je jedním z ukazatelů úrodnosti. V intenzivně obdělávaných půdách se vyskytují zástupci rodů *Cytophaga*, *Cellvibrio*, *Cellfalcicula*, *Sporocytophaga*, atd. Ve slabě obdělávaných a zvláště kyselých půdách převládají mikroskopické houby.

#### Mikroorganismy:

Vzorky zeminy z různých stanovišť

#### Média:

Půda pro izolaci celulolytických bakterií (M 13)

#### Pomůcky:

Zkumavky, chromatografický papír

#### Postup:

- \* Zkumavky naplníme do 1/3 živným roztokem
- \* Do roztoku zasuneme proužek chromatografického papíru tak, aby alespoň 3cm vyčníval nad hladinu
- \* Sterilizujeme 20 minut při 120° C
- \* Po ochlazení na pokojovou teplotu očkujeme 2 ml půdního extraktu (viz úloha č. 8.2.2.)
- \* Kultivujeme při 25° C 10 dní
- \* Z izolovaných kultur připravíme preparáty a provedeme mikroskopickou kontrolu

#### Hodnocení:

Rozklad celulózy se projeví zbarvením filtračního papíru a jeho postupným rozkladem na napadených místech.

Popsanou izolační technikou většinou získáme zástupce rodů *Cellvibrio* a *Cellfalcicula*, v našich experimentech se projeví tvorbou žlutého a hnědého pigmentu, *Sporocytophaga* s okrovým pigmentem a *Cytophaga* s pigmentem oranžovým, červeným nebo zeleným.

Pozn: Čisté kultury izolujeme křížovým roztěrem na syntetickém mediu s celulózou.

## 8.4. Izolace lipolytických bakterií

Tuky jsou v půdě odbourávány na volné mastné kyseliny a glycerol. Tento proces zahrnuje celý komplex enzymatických reakcí, na kterých se podílejí především mikroorganismy náležející k rodům *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Serratia* a *Corynebacterium*.

Orientační stanovení druhového zastoupení a rychlosti rozkladu tuků lze provést následující metodou:

### Organismy:

Vzorky zeminy odebrané z různých stanovišť

### Média:

MPA č.1 (M 2), tuky ( lůj, sádlo, tributyrin, tween )

### Pomůcky:

Zkumavky, pipety, Petriho misky, 20% CuSO<sub>4</sub>

### Postup:

- \* Rozvažené živné médium rozpipetujeme po 15 ml do zkumavek
- \* Přidáme 0,15g tekutého tuku
- \* Sterilizujeme 20 minut při 120° C
- \* Celý obsah zkumavky vlijeme do Petriho misky a kývavým pohybem promícháme. Tím zajistíme rovnoměrné rozptýlení tuku v misce.
- \* Na utužené médium očkujeme částice zeminy nebo půdní extrakt ( viz úloha č.8.2.2. )
- \* Kultivujeme ve dvou variantách - při 37° C a 25° C - po dobu 24 - 72 hodin.
- \* Do každé misky pipetujeme 5 ml roztoku CuSO<sub>4</sub>, necháme 15 minut působit, přebytečný roztok slijeme.

### Hodnocení:

V místech, kde byl tuk mikroorganismy rozštěpen, se výrazně vyjasní živné médium, okraje zóny jsou obvykle křídově bíle zbarveny. V přítomnosti CuSO<sub>4</sub> se kolem kolonií objeví zelené zbarvení.

Na misce je možno nalézt různé druhy mikroskopických hub - *Penicillium*, *Geotrichum*, *Aspergillus*...., kvasinek, z bakterií *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* apod.

Pozn.: Přesnější identifikaci lze provést až po další izolaci a biochemickém testování.

## 9. BAKTERIE VE VODĚ

---

Sladká voda je jedním z přirozených stanovišť bakterií. Jejich množství a druhové zastoupení závisí na zdrojích uhlíkaté a dusíkaté výživy a na přítomnosti kyslíku. Ve vodě přítomné bakterie můžeme rozdělit do tří základních skupin:

- a) **Autochtonní vodní bakterie**, typické vodní bakterie, jsou zastoupeny především rody *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Sphaerotilus*, *Leptothrix* a *Spirillum*. Pokud je ve vodě velké množství organické hmoty, ve větším množství se vyskytují anaerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie (např. *Clostridium*).
- b) **Půdní bakterie** (rody *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptomyces* a koryneformní bakterie - *Corynebacterium*, *Brevibacterium*) se do vody dostávají splavováním půdy. Jedná se převážně o aerobní bakterie a nachází se hlavně ve svrchních vrstvách. Vzhledem k jejich mohutnému enzymatickému systému je jejich výskyt limitován koncentrací živin.
- c) **Baktérie ze střev člověka a zvířat**, především zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, dále některé streptokoky (např. *Streptococcus faecalis*) a některé druhy rodu *Clostridium*. Za určitých podmínek můžeme izolovat i patogenní bakterie (*Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* ...), jejich výskyt ve vodě je však krátkodobý, protože voda pro ně není vhodným stanovištěm.

### 9.1. Základní mikrobiologický rozbor vody

Mikrobiologický rozbor vody je vedle hodnocení chemického a ev. biologického základní složkou komplexního posouzení kvality u všech typů vod. Některá stanovení jsou zařazena do státních norem a způsob jejich provedení je tedy závazný pro všechny provádějící organizace (ČSN 830521 "Mikrobiologický rozbor pitné vody"), jiná jsou doplňující, zvláště ve sporných případech v některých povrchových vodách, při znečištění zdrojů pitné vody nebo při sledování kvality vyčištěné vody odpadní.

Při rutinním mikrobiologickém rozboru vody není možno stanovovat všechny přítomné mikroorganismy, ani se pro náročnou metodiku neprovádí stanovení všech patogenních (= onemocnění způsobujících) mikroorganismů. Proto se pro zjištění, zda se ve sledované vodě vyskytují z hygienického hlediska závadné bakterie, využívá stanovení indikátorových skupin bakterií (bakterií stejného ekologického charakteru, které lze rychle a poměrně jednoduše stanovit).

#### 9.1.1. Stanovení indikátorů obecného znečištění

##### a) Psychofilních bakterií

Jedná se o bakterie s růstovým optimem 20°C, indikují přítomnost organických látek rychle rozložitelných bakteriemi při nízkých teplotách. Jejich stanovení se provádí u pitných vod, u povrchových vod především v případě využití zdroje k úpravě na vodu pitnou a v ostatních případech v závislosti na účelu mikrobiologického rozboru.

##### Postup:

Po 0,1 ml příslušně naředěného vzorku pipetujeme na 3 sterilní plotny s MPA, důkladně rozetřeme sterilní hokejkou a kultivujeme dnem vzhůru 72h při 20°C.

##### Hodnocení:

Spočítáme vyrostlé kolonie na miskách s nejvhodnějším ředěním (30-300 kolonií) a průměr přepočítáme na 1 ml původního neředěného vzorku.

## b) Mezofilních bakterií

Tyto bakterie, rostoucí aerobně při 37°C, indikují znečištění mikroflorou teplokrevných živočichů a člověka, včetně mikrobů patogenních.

### Postup a hodnocení:

Shodné jako u bakterií psychrofilních, kultivujeme při teplotě 37°C po dobu 48h.

## 9.1.2. Stanovení indikátorů fekálního znečištění

Jako indikátory fekálního znečištění se stanovují koliformní bakterie a enterokoky, tedy bakterie vyskytující se ve střevě. Indikátorová hodnota obou těchto skupin není a nemůže být jednoznačná a je hodně diskutována, zatím však nebyly jako základní organismy hygienického hlediska uspokojivě nahrazeny.

### a) Koliformních bakterií

Tato skupina zahrnuje bakterie náležející do čeledi *Enterobacteriaceae* (G- tyčky netvořící spory), běžné obyvatelé tlustého střeva člověka a některých zvířat. Nejčastějším zástupcem je *Escherichia coli*, i ostatní příbuzné druhy mají podobné morfologické a fyziologické vlastnosti (zkvašování laktózy do 48h za tvorby kyseliny a plynu, negativní cytochromoxidázový test). Jejich přítomnost ve vodě je důkazem znečištění fekáliemi a v tomto případě se mohou ve vodě vyskytovat i střevní patogenní bakterie (*Salmonella*, *Schigella*). V případě, že je podezření na přítomnost některých těchto patogenů, je potřeba rozšířit základní rozbor o jejich stanovení.

### Postup:

#### 1. Stanovení na Endo-agaru

Přes sterilní membránový filtr o velikosti pór cca 0,3 μm (např. SYN-POR 7) zfiltrujeme 10 ml pitné vody ze zdroje pro individuální zásobování nebo 100 ml vody ze zdroje pro hromadné zásobování (membránu klademe do sterilního filtračního přístroje ožihnutou pinzetou, lesklou stranou nahoru). U povrchových vod s větším znečištěním filtrujeme menší objem vzorku nebo pipetujeme vzorek přímo na misku (stejně jako u psychrofilních a mezofilních bakterií).

Po filtraci sterilně přeneseme membránu na plotnu s Endo-agarem tak, aby spodní strana dobře přilnula na povrch plotny. Kultivujeme v termostatu dnem vzhůru při 37°C 48h.

#### 2. Stanovení kvasnou zkouškou

Metodu používáme souběžně s Endo-agarem u pitných vod, v některých případech u vod povrchových a odpadních. Test provádíme v tekutém mediu s laktózou, dojde k pomnožení koliformních bakterií za tvorby kyselin a plynu, nebo jen kyselin.

Do zkumavky s 9 ml média a s plynovkou přidáme 1 ml vzorku, opatrně promícháme a inkubujeme při 37°C 24h, při negativním výsledku dalších 24h.

#### 3. Stanovení fekálních koliformních bakterií

Provedením tzv. teplotního testu stanovíme podíl koliformních bakterií pocházejících přímo ze zažívacího traktu teplokrevných živočichů a člověka, tedy čerstvé fekální znečištění. Odlišíme je od bakterií pocházejících ze staršího znečištění, které jsou již součástí heterotrofního společenstva dané lokality.

Test provádíme při teplotě 43°C na Endo-agaru a v mediu s laktózou stejně jako při 37°C.

**Hodnocení:**

1. a 3.: Počítáme kolonie na membráně (eventuelně přímo na agarové plotně). Kolonie charakteristické pro koliformní bakterie mají červené zbarvení (laktózopozitivní) a negativní cytochromoxidázový test.

2. a 3.: Tvorba kyselin se projeví zežloutnutím média, tvorba plynu bublinou v plynovce. Za pozitivní výsledek zkoušky se považuje současná tvorba kyselin a plynu nebo jen tvorba kyselin.

**b) Enterokoků**

Enterokoky jsou skupina G+ streptokoků, která se vyskytuje v trávicím traktu člověka a živočichů. Oproti koliformním bakteriím se vyznačují relativně vyšší termorezistencí a odolností vůči dalším fyzikálním a chemickým vlivům okolního prostředí. Jsou považovány za významný indikátor fekálního znečištění, především ve vodách pitných, upravovaných dezinfekcí.

**Postup:**

Vodu filtrujeme stejně jako pro stanovení koliformních bakterií a membránu kultivujeme na půdě s azidem sodným a TTC. Misky inkubujeme dnem vzhůru 48h při 37°C. Více znečištěné vzorky můžeme přímo vyočkovávat na misku.

**Hodnocení:**

Počítáme úplně nebo částečně červené kolonie, bílé a bezbarvé kolonie nepočítáme.

**9.1.3. Odběr vzorků pro mikrobiologická stanovení**

Odběr vody se provádí do sterilních zábrusových lahví, u zdrojů pro lokální zásobování odebíráme 250 ml, u vodovodů více. U znečištěných povrchových a odpadních vod stačí 100-150 ml (pro základní rozbor, pro speciální stanovení je třeba odebírat až 1l). Při odběru je nutno zajistit, aby nedošlo ke kontaminaci z okolního prostředí. Při odběru z vodovodního kohoutku nebo pumpy necháme vodu nejprve 5 min rovnoměrně odtékat. Potom naplníme odběrovou láhev tak, že mezi hladinou a zátkou zůstane asi 2 cm vysoký prázdný prostor. Po uzavření láhve zátku překryjeme hliníkovou folií. Vzorky je nutno zpracovat co nejdříve po odběru, nejlépe do 2h, maximálně do 6h, v případě transportu a uchovávání v chladničce (4-6°C) maximálně do 24h.



## 9.2. Provedení základního rozboru pitné vody (cvičení)

### Pomůcky:

bakteriologické plotny s MPA (M 2) a s Endovým agarem (M 6), sterilní pipety, hokejky, zkumavky a fosfátový ústoj (pH 7,2), vzorek pitné vody.

### Postup:

- \* 1. Odebereme vzorek pitné vody.
- \* 2. Vodu ředíme ve sterilním fosfátovém ústoji (0,2 ml vzorku do 1,8 ml fosf. ústoje, promíchat čistou pipetou a odebrat 0,2 ml do další předem připravené zkumavky s 1,8 ml fosfátového ústoje) do ředění  $10^{-2}$ . Dbáme na dodržení všech podmínek sterilní práce.
- \* 3. Očkujeme 0,1 ml vody neředěné i všech ředění na misky s MPA pro stanovení psychrofilních a mezofilních bakterií.
- \* 4. Stanovíme koliformní bakterie filtrací nebo vyočkováním 0,1 ml neředěné vody na misku s Endo-agarem.
- \* 5. Kultivujeme, jak je uvedeno výše.

### Hodnocení:

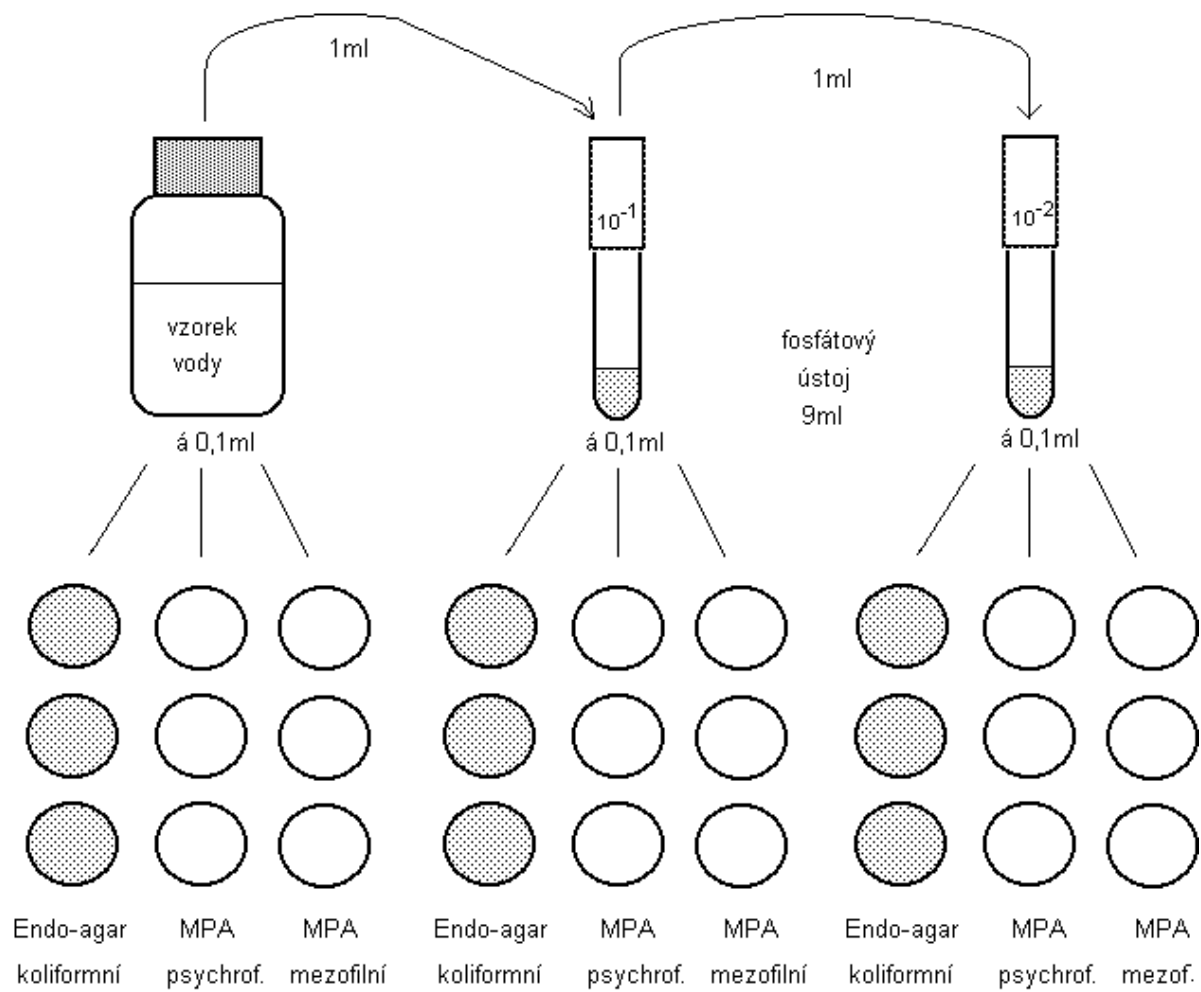
Počty mezofilních a psychrofilních bakterií přepočteme na 1 ml, koliformní bakterie nebo enterokoky vyjadřujeme jako počet ve sledovaném objemu. Stanovené počty srovnáme s normou a zhodnotíme, zda voda vyhovuje požadavkům kladeným na vodu pitnou.

**ČSN 830521:** Voda pro **hromadné zásobování** (více než 100 osob) nesmí obsahovat více než:

200 psychrofilních  
20 mezofilních bakterií v 1 ml  
a 0 koliformních bakterií nebo enterokoků ve 100 ml.

Voda pro **individuální zásobování** (méně než 100 osob) nesmí obsahovat více než:

500 psychrofilních  
100 mezofilních bakterií v 1 ml  
a 0 koliformních bakterií nebo enterokoků v 10 ml.



Obr . 5 Mikrobiologický rozbor vody

## 10. ZÁKLADY IDENTIFIKACE BAKTERIÍ

---

Úkolem identifikace bakteriální kultury je stanovení příslušnosti studovaného kmene k určité taxonomické skupině. Základní taxonomickou jednotkou je druh, přehled popsáných druhů a jejich vlastností, klíče a tabulky k určování jednotlivých rodů udává Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, mezinárodní publikace vycházející ve stále doplňovaných a rozšiřovaných vydáních. Identifikace je možná jen tehdy, pokud pracujeme s čistou kulturou (ověření Gramovým barvením nebo křížovým roztěrem). Při identifikaci sledujeme několik skupin vlastností:

**1.Morfologické vlastnosti**, makroskopické i mikroskopické, tvar a zbarvení kolonií, charakter růstu, různá identifikační barvení (např. Gramovo nebo acidorezistentní barvení), tvorbu spor, přítomnost pouzdra, bičíků atd.

**2.Fyziologické vlastnosti** - vztah ke kyslíku, teplotní rozmezí pro růst, rezistence k teplotě, tolerance k NaCl, citlivost ke žlučovým solím, na antibiotika, typ metabolismu (fermentativní, aerobně nebo anaerobně respirační).

**3.Biochemické vlastnosti** - využívání zdrojů uhlíku, redukce nitrátů, tvorba indolu, acetoinu atd.

**4.Doplňující testy** - elektronová mikroskopie, stanovení obsahu G+C v DNA, sérotypizace, fagotypizace, chemická analýza buněčné stěny, PCR, ribotypizace, důkaz produkce toxinu, důkaz patogenity.

Výběr vhodných testů závisí na charakteristických znacích sledované skupiny. Zařazení sledovaného kmene do určité skupiny, na základě morfologických a fyziologických vlastností, je vždy prvním krokem. Na jeho základě potom navrhujeme další testy - série biochemických testů a testy doplňující (sérotypizace, důkaz produkce toxinu nebo patogenity u materiálu izolovaného z infekčních procesů, molekulárně-biologické metody při popisu nového druhu, chemická analýza buněčné stěny u koryneformních bakterií apod.). Získané údaje jsou zpracovávány podle klíčů a tabulek, často za pomoci počítače. Protože identifikace je značně náročná, podaří se jen málo typických vzorků zařadit až do druhu přímo v provozních laboratořích.

### 10.1. Biochemické identifikační testy bakterií

Jako identifikační biochemické znaky slouží ty vlastnosti, které jsou snadno zjištělné a poměrně stálé, tzn. že výskyt mutantů, které ztratily tuto vlastnost, je poměrně vzácný. Přesto se však tyto mutanty vyskytují a jejich procento stoupá v souvislosti se vzrůstajícím znečištěním životního prostředí. Proto se dnes přechází od identifikačních klíčů, které uváděly pouze pozitivní či negativní reakce, k tabulkám, v nichž je uvedeno procento kmenů daného druhu, u nichž je test pozitivní, eventuálně zda výsledek kolísá i u buněk určitého kmene. Příklady rychlých biochemických testů (vyhodnotitelných v průběhu cvičení):

## 1. Důkaz produkce katalázy

Při některých biochemických procesech vzniká toxický peroxid vodíku. Některé bakterie mají schopnost produkovat enzym katalázu, který rozkládá  $H_2O_2$  na vodu a molekulární vodík.

**Činidlo:** 3% peroxid vodíku

**Postup:**

- \* Na podložní skříčko kápneme 3% peroxid vodíku a do kapky kličkou rozetřeme testovanou 24 hodinovou kulturu z agarové plotny. Je možno také peroxidem převrstvit nárůst přímo na misce nebo roztok přidat ke kultuře narostlé v tekutém mediu.

**Hodnocení:**

Pozitivní reakce se projeví uvolňováním bublinek  $O_2$  bezprostředně po přidání kultury (ev. peroxidu).

- + : *Pseudomonas sp.*, *E.coli*, *Micrococcus sp.*
- : *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus sp.*

## 2. Důkaz produkce oxidázy

Test se používá k diferenciaci druhů rodu *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*.

**Činidla:** I. 1% vodný roztok dimetyl-p-fenylendiaminoxalátu + 1% kyseliny askorbové

II. 1% alkoholický roztok  $\alpha$ -naftolu

Před použitím smícháme 2 díly I a 3 díly II. Roztoky uchováváme v tmavých lahvích při 4°C nejdéle 14 dnů.

**Postup:**

- \* Do směsi roztoků namočíme filtrační papír, usušíme, rozstříháme a uchováváme při 4°C ve tmě a suchu.
- \* Na tyto papírky pak kličkou nanášíme 24 hodinovou kulturu.
- \* Médium, z něhož kulturu odebíráme, nesmí obsahovat glukózu nebo nitráty.

**Hodnocení:**

Reakce:	Zbarvení:
pozitivní	do 30s intenzivně modré
opožděně pozitivní	do 2 min intenzivně modré
negativní	beze změny nebo reakce po 2 min

+ : *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescens*

- : *E.coli*, *Agrobacterium spp.*

### 3. Důkaz produkce fosfatázy

Slouží k diferenciaci např. stafylokoků, pseudomonád. Fenolftaleindifosfát je štěpen za vzniku volného fenolftaleinu, který se v alkalickém prostředí barví růžově.

**Médium:** Fenolftaleindifosfát.....0,01g  
Tris ústoj.....100ml  
uchováváme v tmavé lahvi při 4°C nejdéle 3 týdny.

**Činidlo:** 1M roztok NaOH

#### Postup:

- \* Médium, které nemusí být sterilní, pipetujeme po 0,3ml do zkumavek a těsně před inokulací předehejeme 15min při 37°C.
- \* Očkujeme masivně kličkou 24 hodinové kultury a inkubujeme 4 hodiny při 37°C.

#### Hodnocení:

Do každé zkumavky kápneme 1 kapku 1M NaOH a ihned odečítáme výsledky.

Reakce:	Zbarvení:
pozitivní	tmavě růžové až červené
negativní	bezbarvé až lehce narůžovělé

+ : *Pseudomonas cepacia*, *Flavobacterium spp.*

- : *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes faecalis*

### 4. Důkaz deaminace fenylalaninu

Provádí se jako mikrotest, médium není třeba sterilizovat.

**Médium:** 0,1% roztok L-fenylalaninu nebo 0,2% roztok DL-fenylalaninu

**Činidlo:** FeCl<sub>3</sub>.....10,0g  
destilovaná voda.....100ml

#### Postup:

- \* Médium se napipetuje po 0,5ml do zkumavek a očkuje masivně kličkou 24 hodinové kultury.
- \* Inkubuje se při pokojové teplotě 4 hodiny v téměř vodorovné poloze, aby byl umožněn přístup kyslíku.

#### Hodnocení:

Přidají se 2-3 kapky činidla a ihned se hodnotí.

Reakce	Zbarvení
pozitivní	olivově zelené (mizí během několika minut)
negativní	špinavě žluté

+ : *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*

- : *Pseudomonas putida*, *Ps. fluorescens*, *E.coli*

## 5. Důkaz produkce ureázy

Ureáza je enzym rozkládající močovinu za vzniku čpavku a oxidu uhličitého. Reakce je detekována změnou barvy indikátoru. Reakci je možno provádět jako mikrotest bez sterilizace média.

**Médium:** Fosfátový ústoj (0,1 mol/l, pH=6,0).....100ml  
Močovina.....2,0g  
Fenolová červeň (0,2% vodný roztok).....2,0ml

### Postup:

- \* Médium pipetujeme po 0,3 ml do zkumavek a očkujeme masivně kličkou 18-24 hodinové kultury.
  
- \* Inkubujeme 2 hodiny při 37°C.

### Hodnocení:

Hodnotíme změnu barvy média:

Reakce:	Zbarvení
pozitivní	červená
negativní	beze změny (žlutá až oranžová)

+ : *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Agrobacterium* spp.

- : *E.coli*, *Alcaligenes faecalis*

## Některé další biochemické testy:

### 1. Tvorba sirovodíku

Některé enterobakterie tvoří sirovodík redukcí kyslíkatých siriých sloučenin. Pozitivní reakce se projeví zčernáním média (vzniká sulfid olovnatý).

### 2. Hydrolýza eskulinu

Test sleduje štěpení eskulinu na eskuletin a glukózu. Hydrolýza se projeví hnědým až černým zbarvením média v důsledku reakce eskuletinu s ionty železa.

### 3. Dekarboxylace lyzinu

Při reakci dochází k odštěpení CO<sub>2</sub> z karboxylové skupiny aminokyseliny za vzniku aminu. Reakce je provázena alkalizací média a z ní plynoucím fialovým zbarvením média (indikátor bromkrezolpurpur).

### 4. Tvorba indolu

Indol vzniká při metabolické činnosti některých bakterií dekarboxylací peptidů. K jeho detekci se používá p-dimethylaminobenzaldehyd, s nímž dává indol červené zbarvení.

### 5. Dekarboxylace ornitinu

Viz test č.3, dekarboxylace lyzinu.

### 6. Důkaz využívání citrátů - Simmons citrátový test

Sledujeme využívání citrátu jako jediného zdroje uhlíku. Pozitivní reakce se projeví změnou zeleného zbarvení na modré (indikátor bromtymolová modř).

## 7. Rozklad močoviny

Provádíme důkaz produkce ureázy - viz výše.

## 8. ONP test - důkaz produkce $\beta$ -galaktozidázy

K provedení testu je používán bezbarvý o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranozid, který je v pozitivním případě (kmen má enzymy schopné štěpit laktózu) hydrolyzován na žlutý o-nitrofenol.

## 9. Voges-Proskauerův test

Sledujeme tvorbu acetoinu jako meziprojektu rozkladu glukózy . Průkaz se provádí pomocí  $\alpha$  -naftolu a KOH. Pozitivní reakce se projeví jako zčervenání asi po 30 minutách.

## 10. Rozklad inositu

Je sledován rozklad provázený tvorbou kyselin, reakce je detekována zežloutnutím indikátoru v kyselém prostředí.

## 11. Produkce fenylalanindeaminázy

Viz výše - důkaz deaminace fenylalaninu.

## 12 .Vznik kyseliny z manitolu, adonitu, celobiózy, rhamnózy, sacharózy, sorbitolu, trehalózy, dulcitolu

Sledujeme rozklad cukrů za tvorby kyselin, pozitivní reakce se projeví žlutým zbarvením acidobazického indikátoru (bromtymolová modř).

## 10.2. Využití standardizovaných testovacích systémů

Aby se urychlilo zpracovávání velkého množství identifikovaného materiálu a zároveň odstranily nesrovnalosti v určování, způsobené individuálními rozdíly v přípravě médií, provedení i hodnocení testů, jsou vyráběny standardizované diagnostické soupravy. Jedná se o reprezentativní soubory biochemických testů, které mají tyto společné vlastnosti:

- 1.Používají mikrometody, tím šetří materiál i energii.
- 2.V jedné diagnostické soupravě je 10 až 20 testů.
- 3.Testy jsou jednoduché a snadno se provádějí.
- 4.K urychlení interpretace výsledků slouží diagnostické tabulky.
- 5.Dodávající firmy zaručují možnost telefonické konzultace ve sporných případech.
- 6.Mají dostatečně dlouhou skladovací dobu.

V současné době je již zavedena řada těchto testovacích systémů, ve světě je jedním z nejrozšířenějších API systém, u nás jsou nejčastěji používány mikrotesty, které vyrábí Lachema Brno v těsné spolupráci s Českou sbírkou mikroorganismů (CCM). Soupravy biochemických testů Lachema Mikro-LA-Test obsahují vysušená média v plastických destičkách s jamkami, do kterých se kape suspenze testovaných bakterií. Nejrozšířenější jsou soupravy pro identifikaci gramnegativních fermentujících tyček - zástupců čeledi Enterobacteriaceae - ENTEROtest a ENTERO Rapid, další dodávané soupravy jsou: ANAEROtest pro identifikaci anaerobů, STAPHYtest pro stafylokoky a mikrokoky, STREPTOtest pro rozlišení streptokoků a enterokoků, NEFERMtest pro identifikaci gramnegativních nefermentujících tyček. K vyhodnocování výsledků testů je možno kromě diferenčních tabulek a Indexu použít také program TNW - mikrobiologický identifikační systém (Pavel Benda, CCM).

### 10.2.1. Identifikace gramnegativních fermentujících tyček pomocí ENTEROtestu

ENTEROtestu se využívá k identifikaci kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* izolovaných na Endově či Levinově agaru, ať už z klinického materiálu nebo z vody, potravin atd. Potvrzení příslušnosti ke střevním bakteriím se provádí testem na fermentaci glukózy, pro odlišení kmenů čeledi *Vibrionaceae* (rody *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*) se provádí oxidázový test.

Destička ENTEROtest umožňuje provedení 16 testů, které jsou řazeny po 8 vždy ve dvou po sobě následujících řádcích (na výšku): produkce sirovodíku (H<sub>2</sub>S), dekarboxylace lysinu (LYS), produkce indolu (IND), dekarboxylace ornithinu (ORN), rozklad močoviny (URE), deaminace fenylalaninu (PHE), hydrolýza eskulinu (ESC), utilizace citrátu (SCI), utilizace malonátu (MAL), produkce kyseliny z inositolu (INO), adonitu (ADO), celobiózy (CEL), sacharózy (SUC), sorbitolu (SOR), trehalózy (TRE), mannitolu (MAN). Na jedné destičce je možno zpracovávat 6 kmenů.

#### Organismy:

G- fermentující tyčky s negativním oxidázovým testem (z rozboru vody, ev. jiné čisté kultury získané křížovým roztěrem) na agarové plotně.

#### Pomůcky:

ENTEROtest , souprava činidel pro ENTEROtest, oxidázové papírky, sterilní zkumavky a špičky, ster. fyziologický roztok, bakteriol. klička, mikropipeta 100μl.

#### Postup:

##### 1.Příprava inokula:

- \* Z 24 hodinové kultury na běžné tuhé půdě odpícháme kličkou dobře izolovanou kolonii a suspendujeme ve 2,2 ml sterilního fyziologického roztoku. Suspenze musí být homogenní a odpovídat 1.stupni McFarlandovy zákalové stupnice .
- \* Pro kontrolu čistoty kultury provedeme stejnou kličkou křížový roztěr na agarové půdě.

##### 2.Příprava destičky:

- \* Destičku orientujeme na výšku a odřízneme ze 3 stran krycí fólii. Sejmeme krycí fólii i ochrannou fólii překrývající jamky. Destička se označí čísly identifikovaných kmenů, pokud se identifikuje méně než 6 kmenů, nepoužité proužky se od zbývajících částí destičky oddělí a uchovají k dalšímu použití.

##### 3.Inokulace:

- \* Do každé jamky pipetujeme 0,1 ml důkladně protřepané suspenze. Suspenze se nesmí dostat mimo jamku ani do jamky v jiném řádku.
- \* Po zaočkování převrstvíme dvěma kapkami sterilního parafinového oleje tyto testy: sirovodík (H), lysin (G), indol (F), ornitin (E), ureáza (D). Tím zajistíme pro tyto reakce anaerobní podmínky.



#### 4. Inkubace:

- \* Destičku překryjeme krycí fólií a vsuneme do PE sáčku, okraj sáčku zahneme pod destičku, abychom zabránili vysychání.
- \* Inkubujeme 18 - 24 hodin při 35 - 37°C.

#### **Hodnocení:**

- \* Zakapeme jamky: F (činidlo pro indol), a 12 (činidlo pro fenylalanin).
- \* Odečteme všechny reakce ENTEROtestu, fenylalanin do 3 minut, protože po této době pozitivní reakce mizí. Orientujeme se podle interpretační tabulky přiložené k soupravě (eventuelně podle Barevné srovnávací stupnice).
- \* Jako kontrola kvality použitých chemikálií a kontrola interpretace barevných reakcí se používají tzv. kontrolní kmeny bakterií, které dávají standardní výsledky. Tyto kontrolní kmeny dodává CCM v lyofilizovaném stavu nebo na želatinových discích.  
Výsledky zapište do protokolu.

#### Identifikace:

1. pomocí **diferenciační tabulky**

2. pomocí **programu TNW** - vytvoříme si vlastní soubor prováděných testů, nastavíme programové parametry a zadáváme výsledky jedním ze 3 možných způsobů:   přímým vkládáním (+, -, , )  
                  jednoduchým kódem (1,2,0)  
                  oktalovým kódem (sestavíme dle "Příručky TNW")

Výsledky identifikace podrobíme kritice, v případě, že dostaneme nízké identifikační skóre (<90%), využijeme utility rozlišující testy, v případě nízkého T-indexu (<0,75) utility nestandardní výsledky. Konečné rozhodnutí o identifikaci nám mohou usnadnit i doplňující informace o taxonech.

V protokolu budou uvedeny výsledky identifikace a její zhodnocení (kmen typický - netypický - které reakce, výborně odlišen - neodlišen...).

Nejčastější příčiny neúspěšné identifikace:

- kontaminace
- jiná hustota nebo objem suspenze
- kápnutí inokula do sousední řady nebo činidla do jiného sloupce
- jedná se o druh nebo atypický kmen, jehož údaje nejsou uvedeny v tabulce.

## 11. ZÁKLADY IDENTIFIKACE KVASINEK

---

Při identifikaci neznámých kultur je třeba využít celou škálu testů, která postihuje

**1. charakteristiku morfoloigickou** - tvar buněk, způsob vegetativního rozmnožování, schopnost tvořit pseudomycelium nebo pravé mycelium a výskyt specializovaných buněk, jako jsou balistospor, arthrospora, chlamydo-spory, atd.

**2. charakteristiku kultivační** - vzhled kultury v tekuté půdě ( sediment, zákal, prsteneček, kříž ), vzhled kultury na pevné půdě, tvorba pigmentů, tvorba pouzdrového polysacharidu

**3. charakteristiku sexuální** - schopnost sporulace, tvar vrčec a askospor, tvar promycelia, teliospor a sporidií, typ spájení

**4. charakteristiku fyziologickou** - schopnost fermentace cukrů, asimilace nitrátů a inositolu

Při určování druhu je třeba rozšířit fyziologickou charakteristiku o sledování schopnosti využít a fermentovat celou řadu uhlíkatých látek, schopnost růstu v mediu bez vitamínů, tvorby kyselin, růst při různých teplotách, rezistenci k cykloheximidu a případné další vlastnosti.

Získané charakteristiky porovnáváme s klíčem pro určování kvasinek.

### 11.1. Tvorba a charakter pseudomycelia

#### Organismy:

třídenní kultury kvasinek ve sladidlovém agaru

#### Pomůcky:

fyziologický roztok (R1), cibulový agar (M18), vlhká komůrka, očkovací klička, podložní skla, Petriho misky, pipety, centrifugační zkumavky

#### Postup:

- \* Na podložní sklo umístěné v Petriho misce nanese vrstvu cibulového agaru a necháme ztuhnout
- \* Kultury zcentrifugujeme, sediment resuspendujeme ve fyziologickém roztoku a naředíme ( 2x opakovaně přeneseme kapku kultury do 5 ml fyziologického roztoku)
- \* Kličkou nanášíme kapky ředěné suspenze na povrch agaru. Podložní skla umístíme ve vlhké komůrce v termostatu, kultivujeme při 28°C.

#### Hodnocení:

Tvorbu a charakter pseudomycelia pozorujeme pod mikroskopem na okraji kolonií vyrostlých na agaru. Pseudomycelium zakreslíme a určíme jeho typ ( rudimentální, větvené, diferencované)

## 11.2. Kultivační charakteristika na pevné a tekuté půdě

### Organismy:

Kultury neznámých kvasinek na šikmém agaru

### Pomůcky:

Zkumavky s 5 ml YEPG media (M19), fyziologický roztok (R1), sladinový agar (M3), agar pro důkaz tvorby pouzdrového polysacharidu (M20), očkovací klička, pipety

### Postup:

- \* Tekuté YEPG medium slabě zaočkujeme kulturami neznámých kvasinek
- \* Kapku ředěné kultury očkujeme do středu agarové plotny se sladinovým agarem
- \* Ze šikmého agaru zaočkujeme agarové plotny pro důkaz tvorby pouzdrového polysacharidu
- \* Kultivujeme v termostatu při 28<sup>0</sup>C

### Hodnocení:

1. Hodnotíme růst kultury v tekutém mediu
2. Sledujeme tvorbu pigmentu, vzhled povrchu kolonií (hladký, drsný, sliznatý), povrch kolonie (hladký, drsný, radiálně nebo zonálně rýhovaný), průřez kolonie (plochá, vyvýšená, kulovitá, uprostřed vyvýšená nebo prohloubená), tvar okraje (ucelený, vlnitý, kořínkovitý, cípatý, pilovitý)
3. Povrch nátěru na misce s půdou pro důkaz pouzdrového polysacharidu přelijeme Lugolovým roztokem. Přítomnost polysacharidu se projeví zmodráním nátěru.

## 11.3. Sporulace

### Organismy:

Třídenní kultura neznámé kvasinky

### Pomůcky:

Askosporové medium, Ringerův roztok(R18), centrifugační zkumavky, pipety

### Postup:

- \* Kultury centrifugujeme, sediment resuspendujeme v Ringerově roztoku, znovu centrifugujeme.
- \* Sediment znovu resuspendujeme a asi 1 ml suspenze nanese na povrch askosporového media. Kultivujeme při laboratorní teplotě 2 - 10 dnů.

### Hodnocení:

Připravíme nativní preparát z kultury rostoucí na askosporovém mediu, mikroskopicky hodnotíme tvar věceček a spór. Zakreslíme do protokolu.

## 11.4. Asimilace různých zdrojů uhlíku

Asimilace cukrů, tj. schopnost využívat za aerobních podmínek cukry jako zdroj energie a materiál pro syntézu buněčné hmoty se prokazuje auxanografickou metodou

nebo v tekuté půdě. Asimilační testy v tekuté půdě dávají přesnější výsledky než testy na agarové plotně, neboť zachycují i velmi pomalé využívání substrátu.

Testy se provádějí s glukózou, sacharózou, galaktózou, maltózou a laktózou.

Mimo to je pro diagnostické účely sledována schopnost asimilace etanolu, organických kyselin, jednotlivých pentóz apod.

**Organismy:**

Šikmé agary s kulturou neznámé kvasinky

**Pomůcky:**

Půda pro testování asimilace uhlíku (M21) ve zkumavkách po 5 ml, 20% sterilní roztoky testovaných cukrů, pipety

**Postup:**

- \* Do syntetického media sterilně přidáme testované látky tak, aby výsledná koncentrace byla 1 - 2%
- \* Jako kontrolu použijeme medium bez zdroje uhlíku
- \* Kličkou slabě zaočkujeme všechny typy medií
- \* Zkumavky kultivujeme při 28<sup>0</sup>C po dobu jednoho týdne

**Hodnocení:**

Zjistíme, ve kterých typech medií se kultury pomnožují, srovnáme s kontrolou

### 11.5. Asimilace nitrátů

Schopnost využívat nitrátový dusík je dalším důležitým znakem při identifikaci kvasinek. Postupujeme obdobně jako v předcházejícím testu.

Zdrojem C je roztok glukózy, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> je nahrazen 1% roztokem KNO<sub>3</sub>, jako pozitivní kontrola slouží (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 11.6. Růst na půdě bez vitamínů

Většina kvasinek vyžaduje pro svůj růst vitamíny. Nejčastěji se jedná o vitamíny skupiny B. Abychom vyloučili zkreslení výsledků, které může způsobit poměrně velká zásoba vitamínů uvnitř živých buněk, provádíme test v několika pasážích po sobě v tekutém mediu bez vitamínů.

**Organismy:**

48 hodinová kultura testovaného kmene na šikmém agaru (M22)

**Pomůcky:**

Minerální půda bez vitamínů (M22) po 7 ml ve zkumavkách

**Postup:**

- \* Zkumavky zaočkujeme kulturou, inkubujeme 2 - 7 dnů při 28<sup>0</sup>C
- \* Z takto získané kultury zaočkujeme další zkumavku a kultivujeme stejným způsobem. Při pozitivní reakci postup opakujeme ještě jednou.

**Hodnocení:**

Pozorujeme -li dobrý růst, nevyžaduje kmen přítomnost vitamínů

## 11.7. Kvašení cukrů a cukerných alkoholů

Kvasinky zkvašují některé jednoduché cukry za vzniku etanolu a oxidu uhličitého, vedle toho vzniká malé množství glycerolu a sukcinátu. Ke zkvasitelným cukrům patří především cukry se základní hexózovou jednotkou, přímo zkvasitelné jsou pouze monosacharidy. Disacharidy a trisacharidy zkvašují pouze kvasinky vybavené příslušnými hydrolytickými enzymy.

### Organismy:

Šikmé agary s kulturou neznámé kvasinky

### Pomůcky:

Zkumavky s 9 ml media (M23) s Durmanovou plynovkou, sterilní 10% roztoky testovaných cukrů - glukóza, maltóza, fruktóza, laktóza, sacharóza

### Postup:

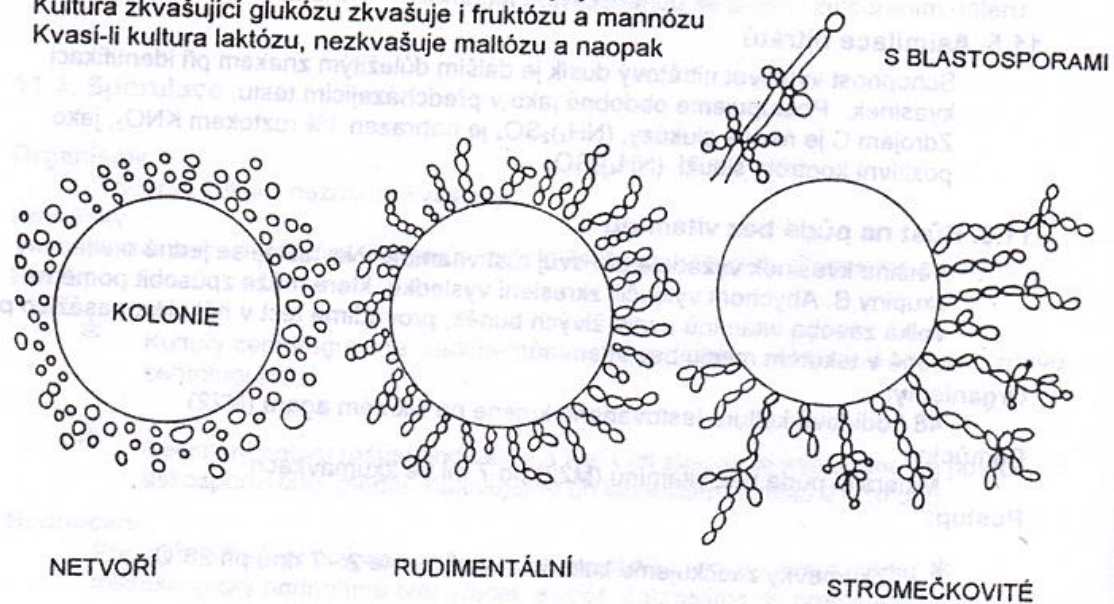
- \* K testovacímu mediu přidáme roztok cukrů tak, aby výsledná koncentrace byla 1%
- \* Roztoky inokulujeme masivní kličkou testované kultury
- \* Inkubujeme při 25°C 5 dnů

### Hodnocení:

Hodnotíme vývoj plynu - objeví se v plynovce, a tvorbu kyselin - projeví se žlutým zbarvením.

### Poznámka:

Pro zkvašování cukrů platí Kluverova pravidla:  
Pokud kultura nekvasí glukózu, nekvasí ani jiný cukr.  
Kultura zkvašující glukózu zkvašuje i fruktózu a mannózu  
Kvasí-li kultura laktózu, nezkašuje maltózu a naopak



Tvorba mycelia a pseudomycelia koloniemi kvasinek

## 12. ZÁKLADY IDENTIFIKACE MIKROSKOPICKÝCH HUB

Pod pojmem mikroskopické houby nebo plísně rozumíme organismy, které vytvářejí jemné vláknité povlaky na nejrůznějších substrátech. Botanicky zahrnují tři velké skupiny organismů - mukorovité houby, houby vláknité a sterilní mycelia. V přírodě i ve všech oblastech životního prostředí člověka se vyskytují společně a tvoří běžné biocenózy. Díky značné adaptabilitě, pokud jde o živiny, klimatické podmínky, ale i schopnost rozšiřování, osidlují stále nové substráty a pronikají tak do všech oblastí lidského prostředí.

V půdě se mikroskopické houby účastní tvorby humusu, mineralizačních pochodů, mnohé z nich žijí v užší nebo volnější spojitosti s kořeny vyšších rostlin. V půdě se však uchovávají i parazitické nebo patogenní organismy, přežívající ve formě trvalých spór nebo saprofytické fázi svého životního cyklu. Řada druhů saprofytických nebo poloparazitických hub může způsobovat nejen mykózy a intoxikace, ale velmi často i alergická onemocnění.

Mikroskopické houby jsou však také člověkem využívány při výrobě chleba, mléčných výrobků, alkoholických nápojů, k syntéze organických kyselin, vitamínů, růstových látek, antibiotik, jako významný činitel v čistírnách odpadních vod atd.

Rozkladná činnost mikroskopických hub i stále nově objevené metabolické produkty zasahují do nejrůznějších výzkumných i výrobních odvětví. Proto je druhové určení a poznání životního cyklu počátkem pro další výzkum a využití těchto organismů.

Pro diagnostiku mikroskopických hub jsou stále velmi významné morfologické znaky, biochemické a fyziologické charakteristiky zde nacházejí pouze malé uplatnění.

## 12.1. Makroskopické morfologické znaky

Pro posouzení celkového vzhledu kultury a určení růstových vlastností kultivujeme izoláty na Petriho miskách s Czapek-Doxovým agarem (M22) nebo sladinovým agarem (M3).

Zachováváme standardní kultivační podmínky, které pro jednotlivé taxony předepisují identifikační klíče. Při očkování se řídíme obdobnými zásadami jako při očkování bakterií:

- \* Nádobky otevíráme na co nejkratší dobu, před přenesením inokula i po něm ožiháváme hrdla nádob i zátky.
- \* Při otevírání Petriho misek nadzdvihneme víčko jen nepatrně, abychom zabránili infikování kultury a aby se současně nerozšiřovaly spóry z misek do okolí.
- \* K přeočkování mycelia z misky do misky používáme nejčastěji preparační jehlu, při přeočkování do zkumavek koleho držák s háčkovitě zahnutým tuhým drátem. Suspenzi očkujeme pipetou nebo bakteriologickou kličkou.
- \* Pro přeočkování silně sporulujících a invazivních kultur připravujeme suspenzi do fyziologického roztoku se smáčedlem nebo do 0,3 % agaru.
- \* Pro posouzení charakteru kolonií a mycelia očkujeme zpravidla kapku suspenze do tří bodů agarové plotny, kultivujeme v miskách obrácených dnem vzhůru.
- \* Čerstvě naočkované kultury kultivujeme v termostatu při 25<sup>0</sup>C, po několika dnech je vhodné umístit kultury na světlo, při pokojové teplotě. U některých druhů podporuje světlo sporulaci a tvorbu pigmentu.

- \* Staré kultury sterilizujeme autoklávováním, potom teprve likvidujeme.

#### **Hodnocení:**

Izoláty vytvářejí na živné půdě vícesporické kolonie, které splývají v porost. Kolonie je tvořena myceliem povrchovým a substrátovým, zastoupení obou forem se může na různých substrátech měnit.

Z vizuálních znaků hodnotíme především:

- \* výšku a hustotu vzdušného mycelia
- \* texturu kolonií
- \* pigmentaci vrchní a spodní strany kolonie, vylučování pigmentu do prostředí
- \* výšku a zbarvení sporangioforů a konidioforů
- \* rychlost růstu kolonie (vyjadřuje se jako průměr kolonie v mm za časovou jednotku)
- \* přítomnost exudátu a jeho zbarvení

## **12.2. Mikroskopické morfologické znaky**

Pro mikroskopické studium připravujeme nativní nebo polotrvalé preparáty, pro pozorování morfologických struktur u organismů s křehkými a lehce se rozpadajícími fruktifikačními orgány připravujeme sklíčkové kultury. Pro krátkodobá pozorování použijeme jako uzavírací médium vodu. Pro dlouhodobější sledování používáme pomalu vysychající kapaliny, např. 10 - 20 % glycerol, kyselinu mléčnou nebo laktofenol. Laktofenol zabrání změnám velikosti buněk, jeho nevýhodou je však index lomu velmi blízký indexu lomu cytoplazmy. Vnitřní struktura hyf je bez dobarvení velmi těžko rozlišitelná. Proto je lépe použít laktofenol s přídavkem bavlníkové modři nebo fuchsinu.

### 12.2.1. Sklíčková kultura

#### Organismy:

čisté kultury mikroskopických hub např. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phoma*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Ulocladium*, *Cladosporium*, *Paecilomyces* ...

#### Pomůcky:

Sterilní podložní skla v Petriho miskách, sladinový agar (M3), pinzeta, preparační jehla, pipety, sterilní voda se smáčečem, zkumavky

#### Postup:

- \* Na sterilní podložní sklo kápneme agarovou půdu, sklo přidržíme v pinzetě nad kahanem a kapku rovnoměrně rozlijeme po povrchu
- \* Připravíme suspenzi spor z čisté kultury
- \* Na ztuhlou agarovou vrstvu naočkujeme kapku suspenze spor
- \* Sklíčko umístíme do misky na zahnutou skleněnou trubičku, na dno misky nalijeme sterilní vodu. Misky umístíme do termostatu
- \* Růst kultury průběžně kontrolujeme
- \* Po několika dnech překryjeme mikrokulturu krycím sklem a pozorujeme

#### Poznámka:

Podobně lze vypěstovat mikrokulturu na krycím skle, které po vytvoření mycelia a rozmnožovacích orgánů houby klademe na podložní sklo s kapkou laktofenolu.

### 12.2.2. Příprava preparátu

#### Organismy:

čisté kultury mikroskopických hub např. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phoma*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Ulocladium*, *Cladosporium*, *Paecilomyces* ...

#### Pomůcky:

Odmaštěná podložní a krycí skla, preparační jehly, roztok laktofenolu a glycerolu

#### Postup:

- \* Sterilní preparační jehlou asepticky odebereme část mycelia a přeneseme do kapky uzavíracího média na podložním skle. Nejde-li odebrat pouze mycelium, odebíráme kulturu i s částí agaru, který potom na sklíčku odpreparujeme. U silně sporulujících kultur odebíráme mycelium na rozhraní mezi zbarvenou částí kolonie a bílým okrajem, abychom se vyhnuli velkému množství spor v preparátu.
- \* Pomocí jehly rozprostřeme preparát na co největší plochu a překryjeme krycím sklem. Přebytečnou kapalinu odsajeme. Mycelium neroztíráme ani neroztlačujeme, dojde k porušení fruktifikačních orgánů.



- \* Pozorujeme nejdříve při malém zvětšení, jednotlivé struktury proměříme při zvětšení 45x, nebo za použití imerze. Zakreslíme a podrobně popíšeme všechny pozorované útvary.

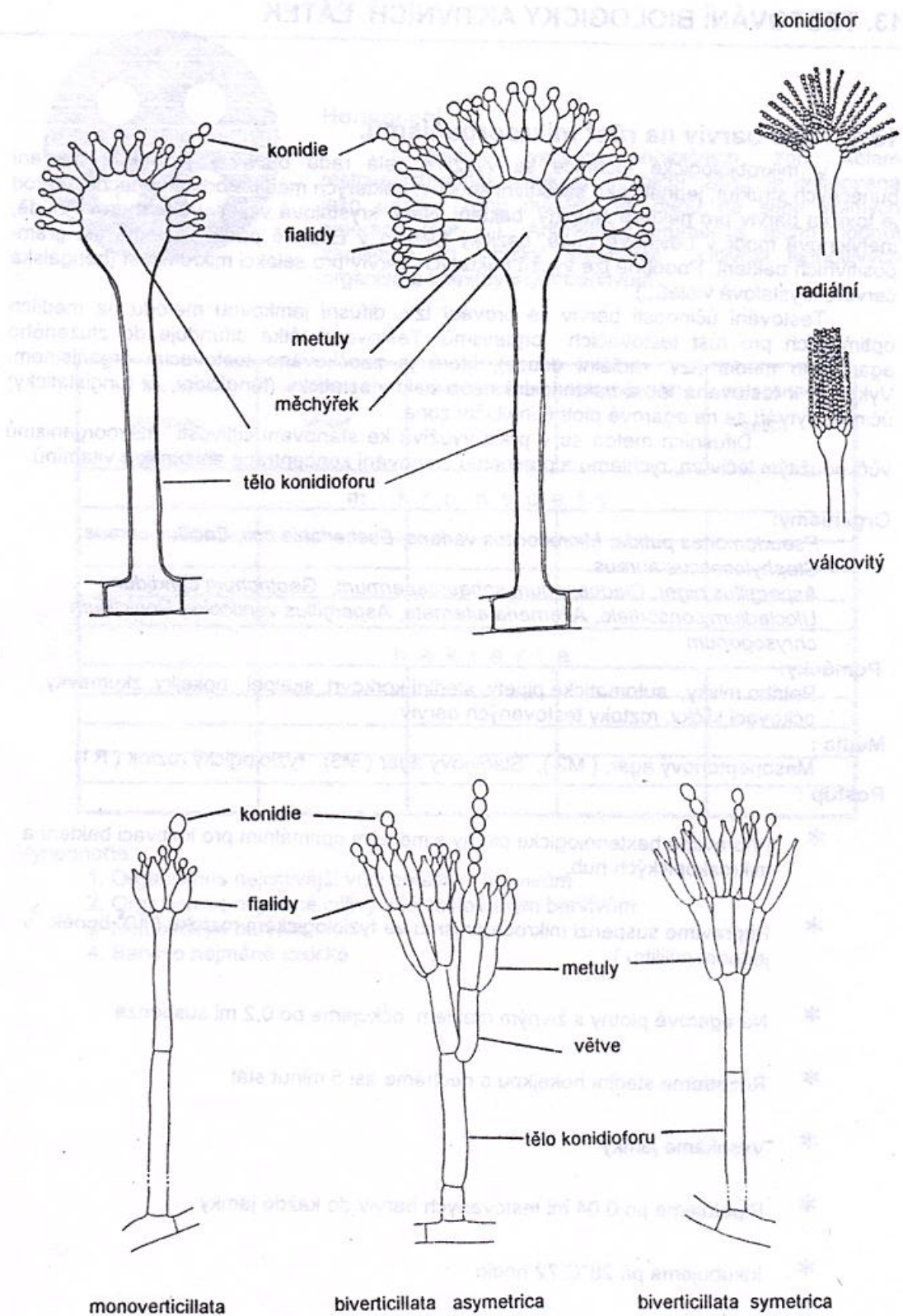
**Poznámka:**

1. Některé kultury jsou velmi těžko smáčitelné a je obtížné připravit z nich preparát bez vzduchových bublin. V takovém případě je vhodné připravit preparát do 70% etanolu a po zakrytí krycím sklem alkohol nahradit jiným médiem.
2. Ve starších kulturách dochází k tvorbě exudátu, tvořeného látkami tukové povahy, které se v preparátu jeví jako kuličky, silně lámající světlo a mohou být mylně pokládány za konidie.

**Hodnocení:**

V preparátech a sklíčkových kulturách hodnotíme:

1. Typ mycelia ( přehrádkované, nepřehrádkované, způsob větvení, tloušťka a barva hyf, přítomnost a umístění chlamydospor)
2. Charakter fruktifikačních orgánů ( konidiofor, sporangiofor, jeho délka, tloušťka, větvení, zakončení)
3. Přítomnost vegetativních fruktifikačních struktur ( sporangium, kolumela, sporangiospory, sterigmata - primární, sekundární, konidie)
4. Přítomnost a charakter pohlavních fruktifikačních struktur ( askus, askospory, zygospory)
5. Přítomnost zvláštních útvarů (chlamydospor, sklerocií, koremií, sporodochií, pyknid, stolonů, rhizoidů)
6. Determinaci rodu provedeme srovnáním námi pozorovaných znaků s určovacím klíčem.



obr. 6 : Morfologické struktury v kultuře rodů *Aspergillus* a *Penicillium*

## 13. TESTOVÁNÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

---

### 13.1. Vliv barviv na růst mikroorganismů.

V mikrobiologické technice se využívá celá řada barviv - jednak k barvení buněčných struktur, jednak jako selektivní součást některých médií. Podstatou těchto metod je toxicita barviv pro některé skupiny bakterií. Např. krystalová violet v Gassnerově půdě, metylenová modř v Levinově půdě, bazický fuchsin v Endově půdě eliminují růst gram-positivních bakterií. Podobně lze využít některých barviv pro selekci mikromycet (bengálská červeň, krystalová violet...)

Testování účinnosti barviv se provádí tzv. difusní jamkovou metodu na médiích optimálních pro růst testovacích organismů. Testovaná látka difunduje do ztuženého agarového média (tzv. radiální difuze), které je zaočkováno testovacím organismem. Vykazuje-li testovaná látka baktericidní nebo bakteriostatický (fungicidní, či fungistatický) účinek, vytváří se na agarové plotně inhibiční zóna.

Difusních metod se v praxi využívá ke stanovení citlivosti mikroorganismů vůči použitým léčivům, rychlému a přesnému stanovení koncentrace antibiotik a vitamínů.

#### Organismy:

*Pseudomonas putida, Micrococcus varians, Escherichia coli, Bacillus cereus*  
*Staphylococcus aureus*  
*Aspergillus niger, Cladosporium sphaerospermum, Geotrichum candidum,*  
*Ulocladium consortiale, Alternaria alternata, Aspergillus versicolor, Penicillium*  
*chrysogenum*

#### Pomůcky:

Petriho misky, automatické pipety, sterilní korkovrt, skalpel, hokejky, zkumavky, očkovačské kličky, roztoky testovaných barviv

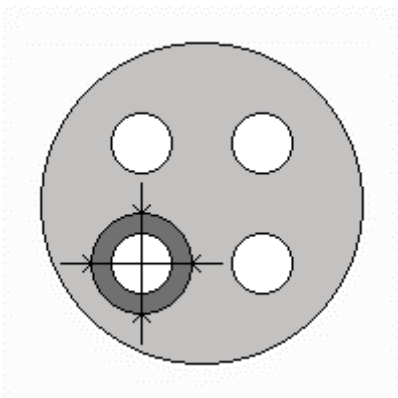
#### Média :

Masopectonový agar ( M2 ), Sladinový agar ( M3), fyziologický roztok ( R1)

#### Postup :

- \* Připravíme bakteriologické plotny s médiem optimálním pro kultivaci bakterií a mikroskopických hub.
- \* Připravíme suspenzi mikroorganismů ve fyziologickém roztoku (  $10^6$  buněk v jednom mililitru )
- \* Na agarové plotny s živným médiem očkujeme po 0,2 ml suspenze
- \* Rozetřeme sterilní hokejkou a necháme asi 5 minut stát
- \* Vysekáme jamky
- \* Pipetujeme po 0,04 ml testovaných barviv do každé jamky
- \* Inkubujeme při 28°C 72 hodin.

Obr. 7



**Hodnocení:**

Sledujeme velikost inhibičních zón kolem testovacích jamek. Velikost inhibiční zóny je definována jako průměr zóny měřený ve dvou na sebe kolmých směrech (obr. 7). Aritmetický průměr z těchto hodnot zapíšeme do tabulky, srovnáme citlivost jednotlivých organismů k testovaným barvivům.

barvivo testovací organismus	krystalová violet	karbofuchsin	kongočerveň	malachitová zeleň
m i k r o m v c e t v				
b a k t e r i e				

Vyhodnoťte:

1. Organismus nejcitlivější vůči použitým barvivům
2. Organismus nejméně citlivý vůči testovaným barvivům
3. Nejtoxičtější barvivo
4. Barvivo nejméně toxické

## 13.2. Antibiotické účinky hub

V přirozeném prostředí patří mezi největší producenty antibiotik houby. Extracelulární produkci sekundárních metabolitů ovlivňují ostatní mikroorganismy ve svém bezprostředním okolí. Mezi nejproduktivnější rody patří *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Cephalosporium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*...

Pouze malá část produkčních kmenů se však využívá při průmyslové výrobě antibiotik, některá antibiotika produkovaná houbami se vyrábějí synteticky (peniciliny, cefalosporiny).

Prvním organismem popsaným v souvislosti s tvorbou látky, která vykazovala antibiotické účinky, je *Penicillium chrysogenum*, podle kterého Fleming v roce 1928 pojmenoval penicilin.

### 1. Příprava filtrátu s antibiotickými účinky

#### Organismy:

Produkční kmen *Penicillium chrysogenum* na šikmém agaru

#### Média:

Sabouraudovo glukóзовé médium (M 17), sladinový agar (M 3)

#### Postup:

- \* Vysporulovanou kulturu produkčního kmene na šikmém agaru přelijeme 5 ml živného média, mírně protřepeme a spláchneme do 20 ml kultivačního média v Erlenmeyerově baňce.
- \* Kultivujeme při 25°C deset dnů,
- \* Kultivační roztok sterilně centrifugujeme a zfiltrujeme, abychom odstranili spóry.

### 2. Posouzení antibiotického účinku získaného filtrátu

#### Organismy:

*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus varians*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Proteus vulgaris*

#### Média:

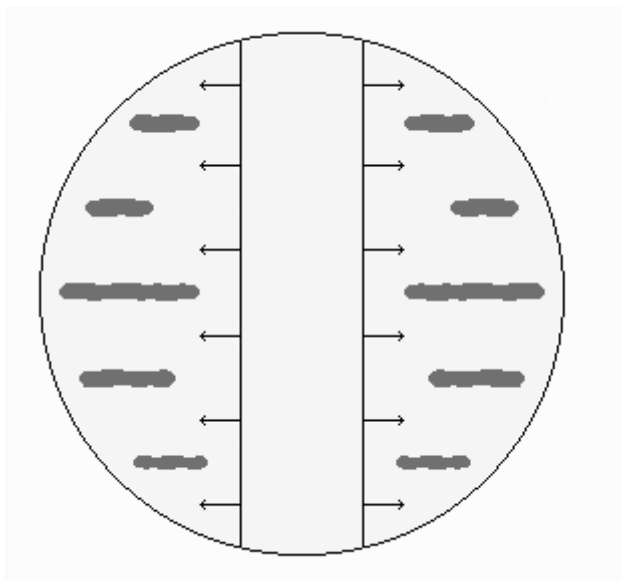
MPB (M 2), fyziologický roztok (R 1)

#### Pomůcky:

Petriho misky, skalpel, očkovací klička, zkumavky

### Postup:

- \* Připravíme agarové plotny, agar necháme utuhnout
- \* Sterilním skalpelem vybereme středem agaru v misce pruh asi 1 cm široký
- \* 2 ml MPB s 3% agaru temperujeme na 45°C, přidáme 2 ml filtrátu, promícháme
- \* Směsí zaplníme volný pruh v misce a necháme utuhnout
- \* Bakteriální kultury suspendujeme ve fyziologickém roztoku, očkujeme kolmo na vložený agarový pruh (obr. 8)
- \* Kultivujeme 48 hodin při 30°C



Obr. č. 8 Hodnocení antibiotických účinků nižších hub

### Hodnocení:

Pozorujeme růst bakteriálních kultur na misce a jeho inhibici. Účinnost filtrátu hodnotíme podle vzdálenosti nátěru od středního pruhu.

### 13.3. Citlivost mikroorganismů k antibiotikům

Celá řada mikroorganismů produkuje látky zařazované mezi antibiotika. Antibiotika se vzájemně liší svým původem, chemickou strukturou, spektrem účinnosti i mechanismem účinku. Pouze malá část ze známých antibiotik se komerčně vyrábí a využívá k terapeutickým účelům.

Z hlediska aplikace v humánní či veterinární medicíně je důležité stanovit citlivost či rezistenci patogenního nebo potenciálně patogenního organismu k aplikovanému antibiotiku.

Stanovení citlivosti se nejčastěji provádí kvalitativním difusním testem v agarovém mediu.

#### Organismy:

Kultury testovaných mikroorganismů v tekutém mediu nebo na šikmém agaru

#### Média:

Mueller - Hintonův agar (M 12)

#### Pomůcky:

Petriho misky, standardní disky s antibiotiky

#### Postup:

- \* Na povrch agarové plotny předem předsušené ( 60°C, 10 - 20 minut ) pipetujeme po 0,2 ml bujonové kultury, rozetřeme sterilní hokejkou a necháme asi 5 minut stát. V případě, že použijeme kulturu na pevném mediu, očkujeme kličkou hustý nátěr po celé ploše misky.
- \* Na zaočkovanou plotnu sterilně rozložíme testovací disky s antibiotiky
- \* Inkubujeme 24 -36 hodin při 37°C.
- \* Sledujeme velikost zón vytvořených kolem disků

#### Hodnocení:

Velikost inhibičních zón měříme ve dvou na sebe kolmých směrech, vypočteme aritmetický průměr a stanovíme citlivost.

zóna není patrná = organismus není citlivý na zkoušenou látku

zóna 5 - 10 mm = citlivý mikroorganismus

zóna nad 12 mm = velmi citlivý organismus

Pozn. Metodu lze použít pouze pro antibiotika, která dobře difundují agarem. U látek špatně difundujících použijeme zkumavkovou zředovací metodu.

Výsledky testů jsou závislé na síle agarové vrstvy, je třeba pečlivě dbát na rovnoměrné nalití ploten.

## 13. 4. Stanovení koncentrace vitamínů a antibiotik mikrobiologickými metodami

Chemické látky, které vykazují inhibiční účinek na určité mikroorganismy (např. antibiotika) nebo stimulují růst jako růstové faktory, je možno stanovovat mikrobiologickými metodami. Výhodou mikrobiologických metod oproti analýze chemické je jejich vysoká citlivost (pg na ml) a selektivita - vybereme-li vhodný mikroorganismus citlivý pouze na jednu účinnou látku v nízké koncentraci. Selektivita umožňuje stanovit účinnou látku přímo v surovém materiálu, na rozdíl od metod chemických, kdy je nutná předběžná purifikace.

Látky, které jsou nejčastěji stanovovány mikrobiologickými metodami, jsou antibiotika a vitamíny. Mikrobiologické metody užívané k jejich stanovení se podle charakteru dělí na:

**1. zřed'ovací** - v řadě ředění zkoumané látky stanovujeme minimální koncentraci účinnou pro daný organismus, v případě antibiotika minimální inhibiční konc. (MIC), v případě vitamínu minimální stimulační konc. Výsledek se udává jako titer účinné látky (rozmezí koncentrací), nikoliv přesná hodnota koncentrace.

**2. nefelometrické** - hodnotíme odpověď testovacího organismu na řadu koncentrací účinné látky měřením intenzity růstu (zákalu) v tekutém mediu. Pomocí standartní křivky je možno stanovovat koncentrace v neznámých vzorcích.

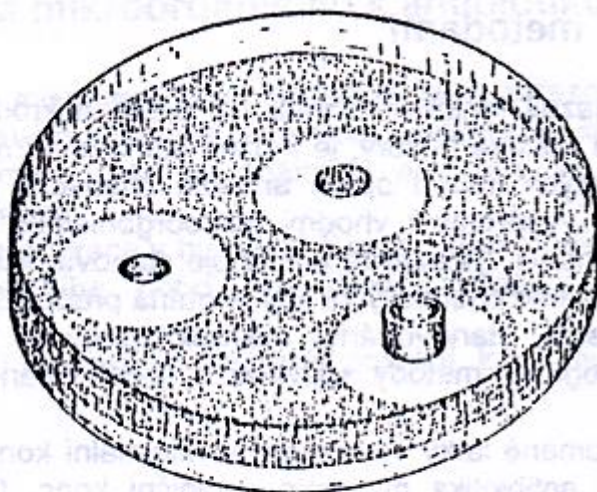
**3. titrimetrické** - jsou předešlým velmi podobné, v tomto případě hodnotíme intenzitu růstu pomocí fyzikálně-chemických změn prostředí, např. produkce kyseliny - množství zjišťujeme titrací.

**4. difúzní** - využívají tuhých médií, ve kterých je naočkovaný citlivý mikroorganismus, testovaná látka difunduje mediem a způsobuje vznik inhibičních (antibiotika) nebo stimulačních (vitamíny) zón. Velikost zóny je závislá na koncentraci testované látky. V případě horizontální difúze je mikroorganismus zaočkován do média na bakteriologických plotnách a látka difunduje horizontálně do média, odpověď mikroorganismu se projeví vznikem kruhové zóny, jejíž průměr měříme ve dvou na sebe kolmých směrech. Podle způsobu nanášení testované látky rozlišujeme metodu: **a/ kapkovou**, kdy se látka kape na povrch tuhého média (je nepřesná, využívá se spíše pro kvalitativní stanovení), **b/ diskovou**, testovanou látkou jsou v tomto případě nasyceny disky filtračního papíru, které se kladou na agarové plotny (rozsáhlé využití při rutinním testování citlivosti patogenních mikroorganismů na antibiotika, komerčně vyráběné disky), **c/ komínkovou** - do agarové vrstvy se vtlačují komínky ze skla, porcelánu nebo nerezavějící oceli (ne až na dno a všechny stejně hluboko) a do nich se pipetují roztoky testovaných látek a konečně **d/ jamkovou**, u které se testované látky pipetují do jamek vyhloubených korkovrtem přímo do agarové vrstvy.

Protože citlivost difúzních metod je závislá především na difúzi testované látky v agarové vrstvě, je nutno při její přípravě dodržet některé podmínky: konstantní hustotu a vlhkost agaru, stejnou tloušťku agaru (všeobecně se doporučuje 5 mm, ale výhodné je stanovení na tenkých vrstvách - 3 mm) a přípravu na absolutně rovném povrchu. Při přípravě vzorků je rovněž nutno přesně dodržovat stanovené podmínky týkající se hlavně extrakce a pH roztoku.

U všech mikrobiologických metod je nutno zachovávat stejnou dobu a teplotu kultivace pro danou testovanou látku a určitý testovací mikroorganismus.





Obr. 9. Radiální difusní test

#### 13.4.1. Stanovení koncentrace kyseliny nikotinové a oxacylinu difúzní jamkovou metodou

Výhodou difúzní jamkové metody je, že nemusí být dodržovány sterilní podmínky při práci s testovanou látkou, difúze účinné látky není podstatně ovlivňována ostatními látkami a metoda je dostatečně rychlá a citlivá. Nevýhodou je pracná příprava jamek a nebezpečí vylití testované látky při manipulaci s miskami.

##### Organismy:

*Staphylococcus aureus* NCTC 8511 (stanovení oxacylinu), *Proteus vulgaris* OX-19 (stanovení kys. nikotinové)

##### Pomůcky:

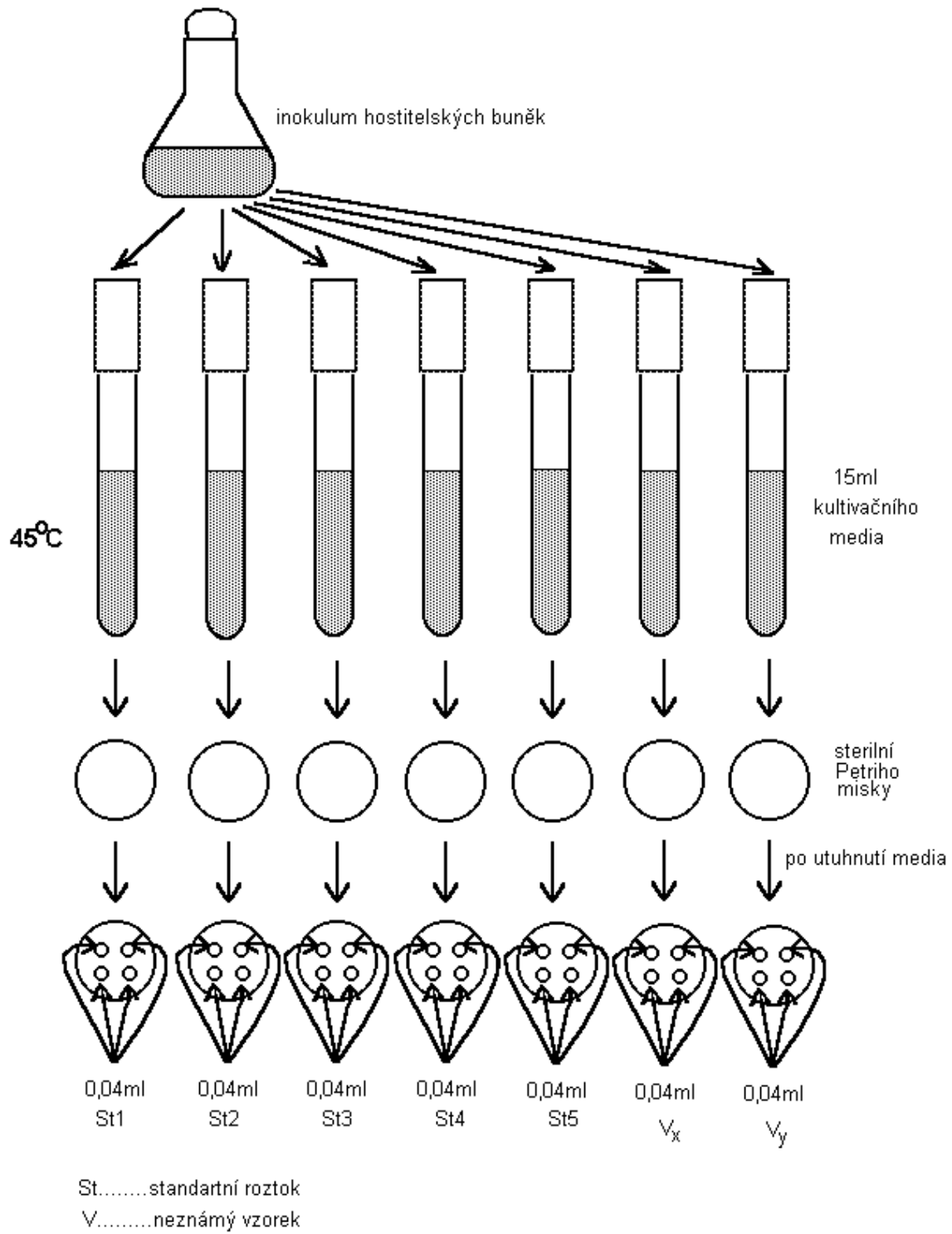
sterilní Petriho misky, pipety, zkumavky, MPA (M 2), KN-médium (M 24), roztok glukózy a citranu železitého (0,1 g citranu a 200 g glukózy na 1000 ml dest. vody), standardy a vzorky oxacylinu a kyseliny nikotinové, korkovrty a skalpely, etanol, vodní lázeň

## Postup:

- \* 1. Rozvaří se média a vytemperují na 45°C.
- \* 2. Ke KN-médiu se přidá roztok glukózy a citranu (5ml na 100ml média).
- \* 3. Média se rozpipetují po 15ml do sterilních zkumavek a dále temperují na vodní lázni.
- \* 4. Do zkumavek se naočkují testovací mikroorganismy - po 0,8ml inokula *P. vulgaris* OX-19 do KN-média a po 0,5ml inokula *S. aureus* NCTC 8511 do MPA.
- \* 5. Obsah zkumavek se opatrně promíchá a vylije na sterilní misky, krouživým pohybem se rozlije po povrchu misky a nechá utuhnout na rovné podložce. Před naléváním je třeba osušit zkumavky, aby na misku nestékala voda z vodní lázně.
- \* 6. Připravíme standardní řadu ředění oxacylinu i kyseliny nikotinové, ředíme v destilované vodě na koncentrace:  
kyselina nikotinová: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$   
oxacylin: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .
- \* 7. Po utužení agarů vyhloubíme korkovrtem a skalpelem na miskách jamky - 4 na každé misce. Korkovrt a skalpel sterilizujeme ožhnutím po namočení v etanolu. Vyhloubené kousky agarů odkládáme do Petriho misky - je s nimi nutno pracovat jako s infekčním materiálem. Korkovrt a skalpel se musí po skončení práce sterilizovat.
- \* 8. Misky se pečlivě popíšu - vždy na 1 misce 1 standardní koncentrace nebo 1 vzorek. Do každé jamky se kape 0,04ml roztoku, vždy roztok jedné koncentrace na 1 misku, kyselina nikotinová na misky s KN-médiem naočkovaným *P. vulgaris* a oxacylin na misky s MPA (*S. aureus*). Je třeba pipetovat i přemisťovat misky opatrně, aby roztoky nepřetékały přes okraje jamek.
- \* 9. Inkubace trvá 24 hodin, *S. aureus* (OXA) při 37°C a *P. vulgaris* (KN) při 30°C.

## Hodnocení:

Po 24 hodinách inkubace (nutno dodržet - dostavit se druhý den k odečtení) odečítáme výsledky - změříme průměry zón (stimulačních u kyseliny nikotinové a inhibičních u oxacylinu) ve dvou na sebe kolmých směrech. Pro každou zónu vypočítáme průměrnou hodnotu a ze čtyř zón na misce pak průměrnou hodnotu pro danou koncentraci. Z hodnot standardních roztoků se sestrojí kalibrační přímka (závislost průměru zóny v mm na logaritmu koncentrace), jak pro kyselinu nikotinovou, tak pro oxacylin. Z kalibrační přímky se stanoví koncentrace neznámých vzorků (v  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). V protokolu bude přesně uvedeno označení vzorku a jeho koncentrace.



Obr. č.10: Stanovení koncentrace kyseliny nikotinové a oxacylinu difusí jamkovou metodou

## 14. PRÁCE S BAKTERIOFÁGEM

---

Bakteriofágy (nebo jen fágy) jsou viry napadající bakteriální buňky, přičemž každý bakteriofág má širší nebo užší rozmezí hostitele, některé jsou natolik specifické, že se množí jen v některých kmenech určitého druhu bakterií. Podle průběhu životního cyklu se fágy dělí na dvě skupiny, virulentní fágy s lytickým životním cyklem a temperované fágy s lyzogenním cyklem.

Dále popsané metody se týkají virulentního fága s lytickým průběhem infekce. Jeho životní cyklus má tyto fáze: 1. adsorpce virionu na povrch citlivé buňky, 2. penetrace nukleové kyseliny fága do cytoplazmy buňky, 3. replikace fágové DNA, syntéza bílkovin fága a kompletace nových virových částic (virionů) a 4. uvolnění virionů do vnějšího prostředí umožněné lýzí buňky. Uvolněné viriony pak mohou infikovat další citlivé buňky. Pokud lytická infekce probíhá v tekutém mediu, dojde po určité době k vyčeření média s narostlými buňkami hostitelského kmene a dostaneme tzv. fágový lyzát (kultivační prostředí obsahující aktivní virové částice, zbytky membrán a vylitý buněčný obsah).

### 14.1. Stanovení titru fágového lyzátu metodou dvouvrstevného agaru

Ke stanovení fágových částic se používá nepřímé metody, založené na tvorbě plak. Plaky jsou projasněné zóny na tuhém mediu souvisle porostlém hostitelským bakteriálním kmenem. Vznikají v místě, kde se v okamžiku očkování nacházela aktivní fágová částice, která dala po infekci vznik dalším virionům, ty napadly okolní citlivé buňky a tak v několika po sobě následujících lytických cyklech dochází k lýzi velkého počtu sousedních hostitelských buněk a vzniká plaka. Plaka představuje potomstvo vzniklé z 1 fágové částice. Základním předpokladem metody je, že počet hostitelských buněk musí být mnohonásobně vyšší než počet fágových částic.

#### Organismy:

*Staphylococcus aureus* SA 812, stafylofág 812

#### Pomůcky:

masopeptonový bujón (MPB-M1), masopeptonový agar (MPA-M2) - 2% a 0,7%, sterilní tris HCl ústoj (pH 7,2), sterilní 0,22% CaCl<sub>2</sub>, st. Petriho misky, pipety, zkumavky, vodní lázeň, termostat.

#### Postup:

##### 1. Příprava fágového lyzátu:

- \* 2 ml narostlého 24h inokula *S.aureus* SA 812 naočkujeme do 100 ml čerstvého MPB v provzdušňovací lahvi a za intenzivního provzdušňování pokračujeme v kultivaci další 4h při stejné teplotě (30°C). Po 4h asepticky přidáme 10 ml sterilního 0,22% CaCl<sub>2</sub> a 5 ml zásobního lyzátu fága 812 a pokračujeme v kultivaci. Po 60 minutách přemístíme provzdušňovací láhev do temna a pokojové teploty. Za 12 - 24h se médium vyčeří. Přesto zůstává určitý počet necitlivých buněk ve fágovém lyzátu. Proto lyzát sterilizujeme přídatkem chloroformu (5 - 10 kapek na 10 ml lyzátu) - nechá se působit 1 - 2 hodiny. Pak se lyzát stáhne sterilní pipetou a přenesení do sterilní baňky. V takto připraveném lyzátu se při teplotě 4°C významně nemění počet aktivních fágových částic po dobu 1 - 2 měsíců.

## 2. Příprava hostitelských buněk:

- \* Ze zásobní kultury *S.aureus* SA 812 naočkujeme 20 ml sterilního MPB (ve 100ml baňce) a kultivujeme 24 hodin při teplotě 30°C.

## 3. Stanovení počtu virionů:

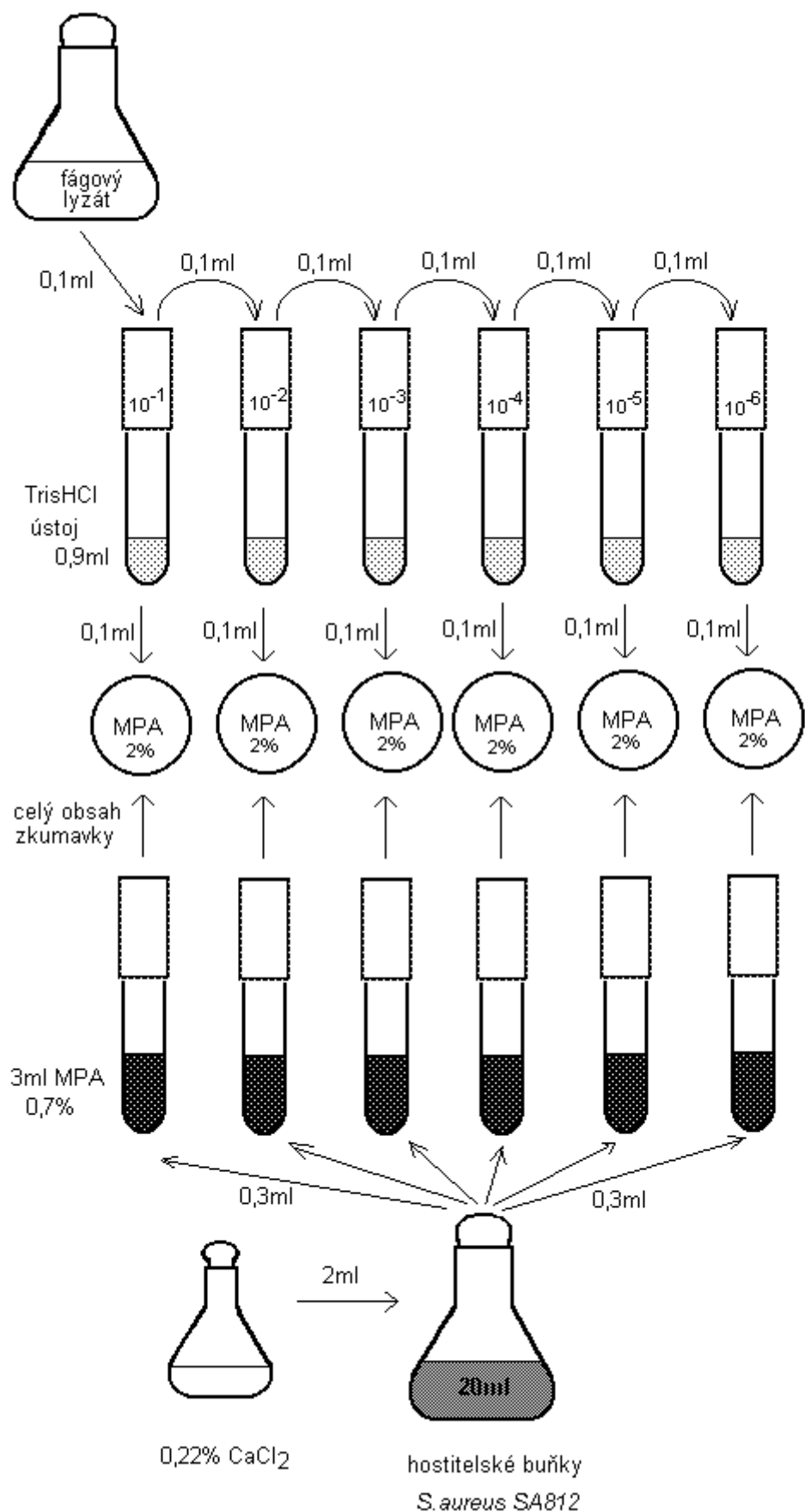
- \* a/ Lyzát fága 812 zředíme ve sterilním tris HCl ústoji postupem stejným jako u počítání buněk bakterií (vždy sterilně přenášíme 0,1ml lyzátu nebo předchozího ředění do 0,9 ml ústoje, na každé ředění používáme čistou pipetu).
- \* b/ Připravíme si sterilní zkumavky, které budou obsahovat 3 ml 0,7% MPA, rozvařeného a vytemperovaného na 45°C. K hostitelským buňkám se sterilně přidají 2 ml 0,22% CaCl<sub>2</sub> (do 20 ml). Pak se pipetuje 0,3 ml inokula do každé zkumavky.
- \* c/ Na bakteriologické plotny s 2%MPA se pipetuje 0,1ml příslušných ředění fága. Ihned po napipetování se miska zaleje obsahem jedné zkumavky, kruživým pohybem se agar promíchá s napipetovanou kapkou a ve vodorovné poloze nechá utuhnout.
- \* d/ Misky umístíme dnem vzhůru do termostatu a kultivujeme při 30°C 12 - 24 hodin.

### **Hodnocení:**

Počítáme počet plak na miskách s nevhodnějším ředěním, tj. takovým, kde vyrůstá na 1 misce okolo 100 plak. K miskám, na kterých je méně než 10 plak při hodnocení nepřihlížíme. Výsledek dostaneme v PFU .ml<sup>-1</sup>.

Příklad výpočtu: Na 3 Petriho miskách naočkovaných 0,1ml vzorku ředěného 10<sup>-5</sup> se vytvořil následující počet plak: 122, 132, 139. Aritmetický průměr z těchto hodnot je 131.

Titř lyzátu je:  $131 \cdot 10^5 = 1,31 \cdot 10^7$  v 0,1ml, tedy  $1,31 \cdot 10^8$  v 1ml neředěného vzorku. Toto číslo ve skutečnosti vyjadřuje počet fágových částic schopných vytvářet plaky, nikoliv absolutní počet virionů, výsledek se proto uvádí v tzv. PFU = plaques forming units. Titř našeho fágového lyzátu je tedy  $1,31 \cdot 10^8$  PFU.ml<sup>-1</sup>.



## 14.2. Jednostupňová růstová křivka fága

---

Průběh růstového cyklu fága je charakterizován jednostupňovou růstovou křivkou. Kromě průběhu jednotlivých fází životního cyklu můžeme z růstové křivky stanovit fágový výnos, tj. poměr mezi konečným a počátečním počtem fágových částic. Ke stanovení růstové křivky virulentního fága je možno použít výše popsanou metodu dvouvrstevného agaru.

### Organismy:

*Staphylococcus aureus* SA 812, virulentní stafylofág 812

### Pomůcky:

masopeptonový bujon (MPB, M 1), 0,067M fosfátový ústoj (R 16), 0,22% CaCl<sub>2</sub>, Petriho misky s 2% MPA (M 2), 0,7% MPA, sterilní pipety, zkumavky, provzdušňovací lahve, provzdušňovací motorek, vodní lázeň, spektrofotometr.

### Postup:

- \* 20 ml MPB naočkujeme kličkou buněk a necháme 24h kultivovat při 30°C.
- \* 3 ml inokula přeočkujeme do 200 ml čerstvého MPB a pokračujeme v kultivaci 4h při 30°C za intenzivního provzdušňování.
- \* Narostlou kulturu sterilně zcentrifugujeme a resuspendujeme v MPB tak, aby suspenze obsahovala přibližně 10<sup>9</sup> buněk v 1 ml (orientačně nastavíme nefelometricky na absorpci 78%). Kulturu pak 100x zředíme ve sterilním MPB a plotnovou metodou stanovíme počet buněk.
- \* Do sterilní baňky napipetujeme 18 ml zředěné suspenze buněk, 2 ml 0,22% CaCl<sub>2</sub> a vytemperujeme směs na teplotu 30°C.
- \* Po 15 minutách přidáme 0,2 ml lyzátu fága 812 (titr přibližně 10<sup>8</sup> aktivních fágových částic v 1 ml).
- \* V časových intervalech 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 minut od přidání fága odebíráme vzorky a stanovíme v nich počet virionů metodou dvouvrstevného agaru.

### Hodnocení:

Průměrné počty vytvořených plak sestavíme do tabulky a znázorníme graficky průběh jednostupňové růstové křivky virulentního fága 812 (osa x - čas v minutách; osa y - log počtu fágových částic přepočtený na 1 ml). Na základě jednostupňové růstové křivky stanovíme hodnotu průměrného fágového výnosu (BS). Dále vypočteme vkladový poměr (input ratio), označený jako IR a definovaný poměrem celkového počtu virionů ve směsi (PFU) k celkovému počtu do pokusu vzatých bakteriálních buněk. Jde tedy o teoretický počet fágů připadajících na jednu bakteriální buňku.



## OBSAH:

1. Zásady práce v mikrobiologické laboratoři .....	1
2. Pracovní pomůcky .....	2
3. Živná média .....	4
4. Izolace mikroorganismů.....	6
4.1. Izolace bakterií.....	6
4.1.1. Křížový roztěr.....	6
4.2. Izolace mikroskopických hub.....	8
5. Očkování mikroorganismů.....	9
5.1. Očkování kultur z tuhých médií bakteriologickou kličkou .....	9
5.1.1. Na bakteriologické plotny.....	9
5.1.2. Na šikmý agar.....	9
5.1.3. Do tekutého média.....	10
5.2. Očkování z tekutých médií .....	11
5.2.1. Do tekutého média.....	11
5.2.2. Na tuhé médium.....	11
6. Mikroskopické pozorování mikroorganismů.....	12
6.1. Mikroskopický preparát.....	12
6.1.1. Příprava nativního preparátu.....	12
6.2. Vitální barvení .....	13
6.3. Barvení podle Grama .....	14
6.4. Negativní barvení .....	15
6.5. Barvení pouzder (kapsulí).....	16
6.6. Barvení spór.....	16
7. Kvantitativní hodnocení mikrobiálních kultur .....	18
7.1. Přímé stanovení počtu buněk mikroskopickým počítáním.....	18
7.1.1. V počítací komůrce .....	18
7.1.2. Na fixovaných a barvených preparátech.....	19
7.1.3. Na membránových filtrech.....	19
7.2. Nepřímé stanovení počtu buněk .....	20
7.2.1. Kultivační stanovení celkového počtu životaschopných buněk .....	20
7.2.2. Nefelometrické stanovení počtu buněk .....	22
8. Bakterie v půdě .....	24
8.1. Přímé barvení půdních bakterií.....	24
8.2. Izolace bakterií poutajících vzdušný dusík .....	25
8.2.1. Izolace azotobacteria .....	25
8.2.2. Izolace clostridií.....	26
8.3. Izolace celulolytických bakterií .....	27
8.4. Izolace lipolytických bakterií .....	28
9. Bakterie ve vodě .....	29
9.1. Základní mikrobiologický rozbor vody .....	29
9.1.1. Stanovení indikátorů obecného znečištění .....	29
9.1.2. Stanovení indikátorů fekálního znečištění .....	30
9.1.3. Odběr vzorků pro mikrobiologická stanovení .....	31
9.1. Provedení základního rozboru pitné vody (cvičení).....	32



<b>10. Základy identifikace bakterií .....</b>	<b>34</b>
10.1. Biochemické identifikační testy bakterií .....	34
10.2. Využití standardizovaných identifikačních systémů.....	38
10.2.1. Identifikace gramnegativních fermentujících tyčků pomocí ENTEROtestu .....	39
<b>11. Základy identifikace kvasinek.....</b>	<b>41</b>
11.1. Tvorba a charakter pseudomycelia.....	41
11.2. Kultivační charakteristika na pevné a v tekuté půdě .....	42
11.3. Sporulace.....	42
11.4. Asimilace různých zdrojů uhlíku .....	43
11.5. Asimilace nitrátů.....	43
11.6. Růst na půdě bez vitaminů.....	43
11.7. Kvašení cukrů a cukerných alkoholů.....	45
<b>12. Základy identifikace mikroskopických hub .....</b>	<b>45</b>
12.1. Makroskopické morfologické znaky .....	46
12.2. Mikroskopické morfologické znaky.....	47
<b>13. Testování biologicky aktivních látek.....</b>	<b>50</b>
13.1. Vliv barviv na růst mikroorganismů.....	52
13.2. Antibiotické účinky hub.....	54
13.3. Citlivost mikroorganismů k antibiotikům.....	56
13.4.1. Stanovení koncentrace kyseliny nikotinové a oxalocyanu difúzní jamkovou metodou.....	58
<b>14. Práce s bakteriofágem .....</b>	<b>59</b>
14.1. Stanovení titru fágového lyzátu metodou dvouvrstevného agaru.....	59
14.2. Jednostupňová růstová křivka fága .....	62